(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-178938
(P2016-178938A)
(43)公開日　平成28年10月13日(2016.10.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12P 21/02	***(2006.01)***	C12P	21/02	B	4B064
C12N 15/09	*(2006.01)*	C12P	21/02	ZNAC	4C076
A61K 38/00	*(2006.01)*	C12N	15/00	A	4C084
A61K 47/48	*(2006.01)*	A61K	37/02		
A61K 47/34	*(2006.01)*	A61K	47/48		

審査請求 有　請求項の数 1　OL　外国語出願　（全 485 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-118316 (P2016-118316)
(22)出願日　平成28年6月14日 (2016.6.14)
(62)分割の表示　特願2014-13799 (P2014-13799)の分割
原出願日　平成14年10月9日 (2002.10.9)
(31)優先権主張番号　60/328,523
(32)優先日　平成13年10月10日 (2001.10.10)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/344,692
(32)優先日　平成13年10月19日 (2001.10.19)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/334,233
(32)優先日　平成13年11月28日 (2001.11.28)
(33)優先権主張国　米国 (US)

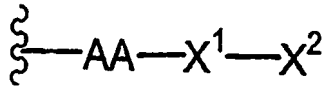
(71)出願人　502238523
ノボ　ノルデイスク　エイ　エス
デンマーク国　２８８０　バーグスバード　ノボ　アレ
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉　良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫　敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口　昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤　和彦

最終頁に続く

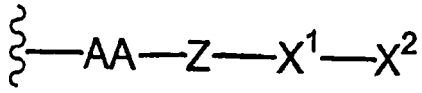
(54)【発明の名称】ペプチドの改造および複合糖質化

(57)【要約】
【課題】より効果的なＧ－ＣＳＦ因子の提供。
【解決手段】Ｇ－ＣＳＦ因子にグリコシル基を有する修飾基を共有結合させる方法および該方法により得られる結合体。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式：
【化１】

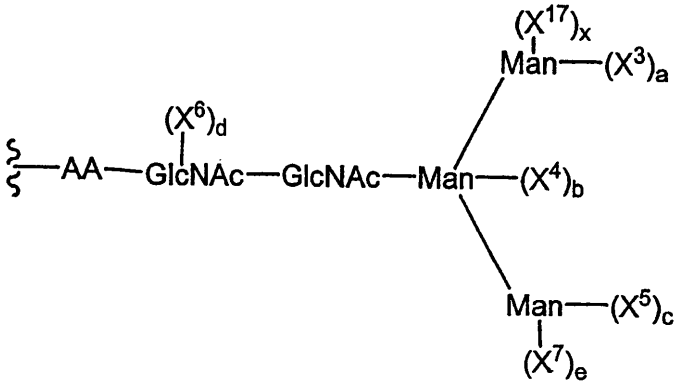


式中、
ＡＡはペプチドの末端または内部アミノ酸残基であり；
X^1-X^2は該ＡＡに共有結合したサッカリドであり、ここで
X^1は第１グリコシル残基であり；そして
X^2はX^1に共有結合した第２グリコシル残基であり、ここでX^1およびX^2は単糖およびオリゴ糖残基から選択される、
を有するペプチドの無細胞のインビトロ改造方法であって；
（ａ）X^2またはその糖サブユニットを該ペプチドから除去し、これにより短縮化グリカンを形成し；そして
（ｂ）該短縮化グリカンを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、該少なくとも１つのグリコシル供与体を該短縮化グリカンへ転移させるために適する条件下で接触させ、これにより該ペプチドを改造する、
ことを含んでなる上記方法。
【請求項２】
さらに：
（ｃ）X^1を除去し、これにより該ＡＡを露出し；そして
（ｄ）該ＡＡを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、該少なくとも１つのグリコシル供与体を該ＡＡへ転移させるために適する条件下で接触させ、これにより該ペプチドを改造する、
ことを含んでなる請求項１に記載の方法。
【請求項３】
さらに：
（ｅ）工程（ｂ）の前に、翻訳後修飾中に該サッカリドに付加された基を除去する、
ことを含んでなる請求項１に記載の方法。
【請求項４】
上記基がホスフェート、スルフェート、カルボキシレートおよびそれらのエステルから選択される員である、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
ペプチドが式：
【化２】



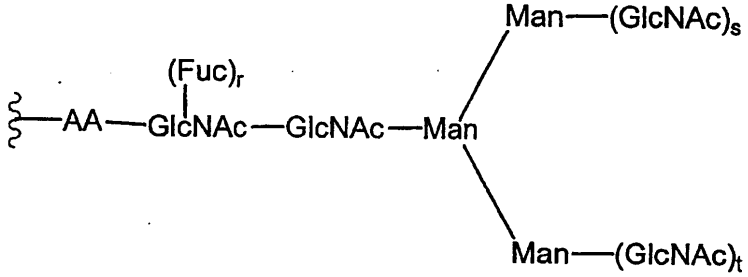
式中、
ＺはＯ、Ｓ、ＮＨおよびクロスリンカーから選択される員である、
を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
少なくとも１つの該グリコシル供与体が修飾基を含んでなる、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
上記の修飾基が水溶性ポリマー、治療部分、検出可能な標識、反応性リンカー基および標的部分からなる群から選択される員である、請求項１に記載の方法。

【請求項８】
上記の修飾基が水溶性ポリマーである請求項７に記載の方法。
【請求項９】
上記の水溶性ポリマーがポリ（エチレングリコール）を含んでなる請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
上記ポリ（エチレングリコール）が本質的に均一分散である分子量分布を有する、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
上記ペプチドが顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－ベータ、第ＶＩＩａ因子、第ＩＸ因子、濾胞刺激ホルモン、エリトロポエチン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン－ガンマ、アルファ－１－プロテアーゼインヒビター、ベーターグルコシダーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーター、タンパク質、インターロイキン－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラ腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体、キメラ抗－呼吸合胞体ウイルス抗体、キメラ抗－ＣＤ２０抗体、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－腫瘍壊死因子抗体、ヒトインスリン、Ｂ型肝炎ｓＡｇおよびヒト成長ホルモンからなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
式：
【化３】



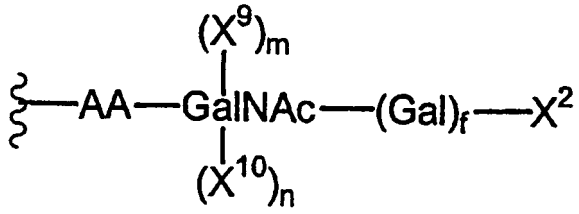
式中、
Ｘ３、Ｘ４、Ｘ５、Ｘ６、Ｘ７およびＸ１７は、単糖またはオリゴ糖残基から独立して選択され；そして
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅおよびｘは、整数０、１および２から独立して選択されるが、ただしａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅおよびｘから選択される少なくとも１つの員は１または２である、を有するペプチドの無細胞のインビトロ改造方法であって；
（ａ）少なくとも１つのＸ３、Ｘ４、Ｘ５、Ｘ６、Ｘ７またはＸ１７、またはその糖サブユニットを該ペプチドから除去し、これにより短縮化グリカンを形成し；そして
（ｂ）該短縮化グリカンを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、該少なくとも１つのグリコシル供与体を該短縮化グリカンへ転移させるために適する条件下で接触させ、これにより該ペプチドを改造する、
ことを含んでなる上記方法。
【請求項１３】
工程（ａ）の上記除去が、ａ、ｂ、ｃ、ｅおよびｘがそれぞれ０である短縮化グリカンを生成する請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
Ｘ３、Ｘ５およびＸ７が（マンノース）$_z$および（マンノース）$_z$－（Ｘ８）$_y$から成る群から選択され、かつ、

上式中、
X^8は単－およびオリゴ－糖から選択されるグリコシル部分であり；
ｙは０および１から選択される整数であり；そして
ｚは１から２０の間の整数であり、ここで
Ｚは３以上である時、（マンノース）$_z$は直鎖および分岐構造から選択される、
請求項１２に記載の方法。
【請求項１５】
X^4がＧｌｃＮＡｃおよびキシロースからなる群から選択される請求項１２に記載の方法。
【請求項１６】
X^3、X^5およびX^7が（マンノース）$_u$であり、ここでｕが１から２０の間の整数から選択され、そしてｕが３以上である時、（マンノース）$_u$は直鎖および分岐構造から選択される請求項１２に記載の方法。
【請求項１７】
少なくとも１つの該グリコシル供与体が修飾基を含んでなる請求項１２に記載の方法。
【請求項１８】
上記の修飾基が水溶性ポリマー、治療部分、検出可能な標識、反応性リンカー基および標的部分からなる群から選択される員である、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
上記の修飾基が水溶性ポリマーである請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
上記の水溶性ポリマーがポリ（エチレングリコール）を含んでなる請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
上記ポリ（エチレングリコール）が本質的に単分散である分子量分布を有する、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
上記ペプチドが顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－ベータ、第ＶＩＩａ因子、第ＩＸ因子、濾胞刺激ホルモン、エリトロポエチン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン－ガンマ、アルファ－１－プロテアーゼインヒビター、ベーターグルコシダーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベータータンパク質、インターロイキン－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラ腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体、キメラ抗－呼吸合胞体ウイルス抗体、キメラ抗－ＣＤ２０抗体、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－腫瘍壊死因子抗体、ヒトインスリン、Ｂ型肝炎ｓＡｇおよびヒト成長ホルモンからなる群から選択される、請求項１２に記載の方法。
【請求項２３】
式：
【化４】



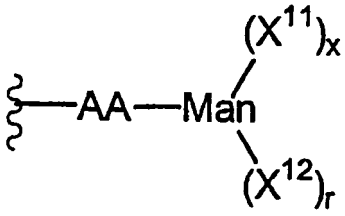
式中、
ｒ、ｓおよびｔは、０および１から独立して選択される整数である、
を有するグリカンを含んでなるペプチドの無細胞のインビトロ改造方法であって；

（ａ）該ペプチドを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、該少なくとも１つのグリコシル供与体を該グリカンへ転移させるために適する条件下で接触させ、これにより該ペプチドを改造する、
ことを含んでなる上記方法。
【請求項２４】
少なくとも１つの該グリコシル供与体が修飾基を含んでなる請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
上記の修飾基が水溶性ポリマー、治療部分、検出可能な標識、反応性リンカー基および標的部分からなる群から選択される員である、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
上記の修飾基が水溶性ポリマーである請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
上記の水溶性ポリマーがポリ（エチレングリコール）を含んでなる請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
上記ポリ（エチレングリコール）が本質的に均一分散である分子量分布を有する、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
上記ペプチドが顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－ベータ、第ＶＩＩａ因子、第ＩＸ因子、濾胞刺激ホルモン、エリトロポエチン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン－ガンマ、アルファ－１－プロテアーゼインヒビター、ベーターグルコシダーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベータータンパク質、インターロイキン－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラ腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体、キメラ抗－呼吸合胞体ウイルス抗体、キメラ抗－ＣＤ２０抗体、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－腫瘍壊死因子抗体、ヒトインスリン、Ｂ型肝炎ｓＡｇおよびヒト成長ホルモンからなる群から選択される、請求項２３に記載の方法。
【請求項３０】
上記ペプチドが式：
【化５】

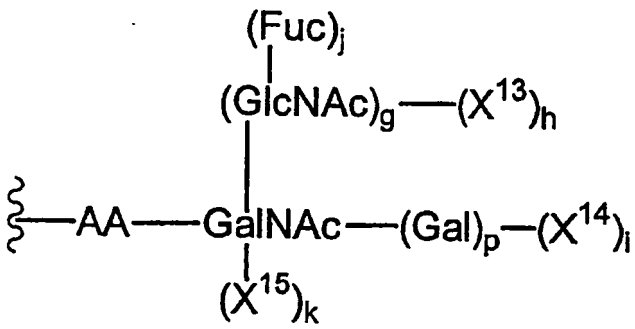


式中、
X^9およびX^{10}は、単糖またはオリゴ糖残基から独立して選択され；そして
ｍ、ｎおよびｆは０および１から選択される整数である、
を有する請求項１に記載の方法。
【請求項３１】
上記ペプチドが式：

【化６】

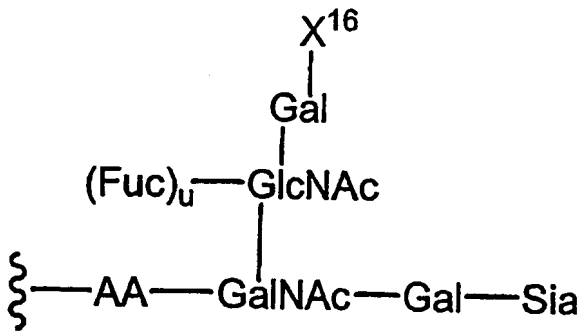


式中、
Ｘ１１およびＸ１２は、独立して選択されるグリコシル部分であり；そして
ｒおよびｘは０および１から独立して選択される整数である、
を有する請求項１に記載の方法。
【請求項３２】
Ｘ１１およびＸ１２が（マンノース）$_q$であり、ここでｑは１から２０の間の整数から選択され、そしてｑが３以上である時、（マンノース）$_q$は直鎖および分岐構造から選択される、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
上記ペプチドが式：
【化７】

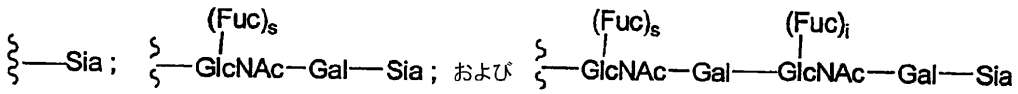


式中、
Ｘ１３、Ｘ１４およびＸ１５は、独立して選択されるグリコシル残基であり；そして
ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋおよびｐは整数０および１から独立して選択されるが、ただし少なくとも１つのｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋおよびｐは１である、
を有する請求項３０に記載の方法。
【請求項３４】
Ｘ１４およびＸ１５がＧｌｃＮＡｃおよびＳｉａから独立して選択される員であり；そしてｉおよびｋが整数０および１から独立して選択されるが、ただし少なくとも１つのｉおよびｋは１であり、そしてｋが１ならばｇ、ｈおよびｊは０である、
請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
上記ペプチドが式：

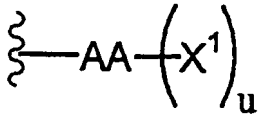
【化８】



式中、
Ｘ１６は
【化９】



ここでｓ、ｕおよびｉは整数０および１から独立して選択される、
から選択される員である、
を有する請求項１に記載の方法。
【請求項３６】
上記の除去がグリコシダーゼを利用する請求項１に記載の方法。
【請求項３７】
式：
【化１０】



式中、
ＡＡはペプチドの末端または内部アミノ酸残基であり；
Ｘ１は、単糖およびオリゴ糖残基から選択される該ＡＡに共有結合したグリコシル残基であり；そして
ｕは０および１から選択される整数である、
を有するペプチドの無細胞のインビトロ改造方法であって；
該ペプチドを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、該少なくとも１つのグリコシル供与体を該短縮化グリカンへ転移させるために適する条件下で接触させ、ここで該グリコシル供与体は修飾基を含んでなり、これにより該ペプチドを改造する、
ことを含んでなる上記方法。
【請求項３８】
上記の修飾基が水溶性ポリマー、治療部分、検出可能な標識、反応性リンカー基および標的部分からなる群から選択される員である、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
上記の修飾基が水溶性ポリマーである請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
上記の水溶性ポリマーがポリ（エチレングリコール）を含んでなる請求項３９に記載の方法。

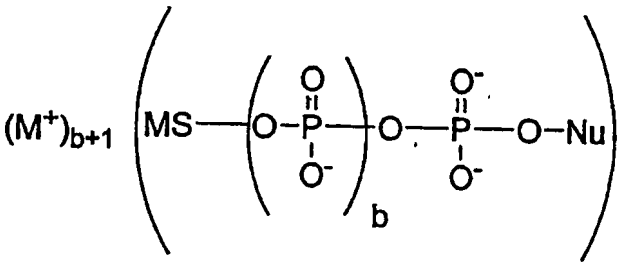
【請求項４１】
上記ポリ（エチレングリコール）が本質的に単分散である分子量分布を有する、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
上記ペプチドが顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－ベータ、第ＶＩＩａ因子、第ＩＸ因子、濾胞刺激ホルモン、エリトロポエチン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン－ガンマ、アルファ－１－プロテアーゼインヒビター、ベーターグルコシダーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーター、タンパク質、インターロイキン－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラ腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体、キメラ抗－呼吸合胞体ウイルス抗体、キメラ抗－ＣＤ２０抗体、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－腫瘍壊死因子抗体、ヒトインスリン、Ｂ型肝炎ｓＡｇおよびヒト成長ホルモンからなる群から選択される、請求項３７に記載の方法。
【請求項４３】
ペプチドと該ペプチドの特性を改変する修飾基との間の共有結合物であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該ペプチドの予め定めたグリコシルまたはアミノ酸残基で該ペプチドに共有結合している上記の共有結合物。
【請求項４４】
上記の修飾基が水溶性ポリマー、治療部分、検出可能な標識、反応性リンカー基および標的部分からなる群から選択される員である、請求項４３に記載の共有結合物。
【請求項４５】
上記の修飾基および完全なグリコシル連結基前駆体が、共有結合した単位として酵素の作用を介して該ペプチドに結合し、該酵素は該前駆体を該完全なグリコシル連結基に転換し、これにより該結合物を形成する、請求項４３に記載の共有結合物。
【請求項４６】
第１の完全なグリコシル連結基を介して上記ペプチドの第１残基に共有結合した第１修飾基、および
第２の完全なグリコシル連結基を介して上記ペプチドの第２残基に結合した第２グリコシル連結基：
を含んでなる、請求項４３に記載の共有結合物。
【請求項４７】
上記第１残基および上記第２残基が構造的に同一である、請求項４６に記載の共有結合物。
【請求項４８】
上記第１残基および上記第２残基が異なる構造を有する、請求項４６に記載の共有結合物。
【請求項４９】
上記第１残基および上記第２残基がグリコシル残基である、請求項４６に記載の共有結合物。
【請求項５０】
上記第１残基および上記第２残基がアミノ酸残基である、請求項４６に記載の共有結合物。
【請求項５１】
上記ペプチドが上記結合物を形成する前に改造される、請求項４３に記載の共有結合物。
【請求項５２】
改造されたペプチドが上記の完全なグリコシル連結基の受容部分を導入するために改造される、請求項５１に記載の共有結合物。
【請求項５３】
上記修飾基が水溶性ポリマーである請求項４３に記載の共有結合物。

【請求項５４】
上記水溶性ポリマーがポリ（エチレングリコール）を含んでなる請求項５３に記載の共有結合物。
【請求項５５】
上記ペプチドが顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－ベータ、第ＶＩＩａ因子、第ＩＸ因子、濾胞刺激ホルモン、エリトロポエチン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン－ガンマ、アルファ－１－プロテアーゼインヒビター、ベーターグルコシダーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベータータンパク質、インターロイキン－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラ腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体、キメラ抗－呼吸合胞体ウイルス抗体、キメラ抗－ＣＤ２０抗体、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－腫瘍壊死因子抗体、ヒトインスリン、Ｂ型肝炎ｓＡｇおよびヒト成長ホルモンからなる群から選択される、請求項４３に記載の共有結合物。
【請求項５６】
上記の完全なグリコシル連結単位が、シアル酸残基、Ｇａｌ残基、ＧｌｃＮＡｃ残基およびＧａｌＮＡｃ残基からなる群から選択される員である、請求項４３に記載の共有結合物。
【請求項５７】
上記ポリ（エチレングリコール）が本質的に単分散である分子量分布を有する、請求項５４に記載の共有結合物。
【請求項５８】
ポリマーとグリコシル化または非－グリコシル化ペプチドとの間に共有結合物を形成する方法であって、該ポリマーは、間に挿入され、そして該ペプチドと該ポリマーの両方を共有的に連結する完全なグリコシル連結基を介して該ペプチドに結合しており、該方法が：
該ペプチドを、該ポリマーに共有結合しているヌクレオチド糖および該ヌクレオチド糖が基質であるグリコシルトランスフェラーゼを含んでなる混合物と、該結合物を形成するために十分な条件下で接触させる、
ことを含んでなる上記方法。
【請求項５９】
上記ポリマーが水溶性ポリマーである請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
上記グリコシル連結基が、上記ペプチドに共有結合したグリコシル残基に共有結合する、請求項５８に記載の方法。
【請求項６１】
上記グリコシル連結基が該ペプチドのアミノ酸残基に共有結合する、請求項５８に共有の方法。
【請求項６２】
上記ポリマーがポリアルキレンオキシドおよびポリペプチドからなる群から選択される員を含んでなる、請求項５８に記載の方法。
【請求項６３】
上記ポリアルキレンオキシドがポリ（エチレングリコール）である、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
上記ポリ（エチレングリコール）が約１～約２０，０００の重合度を有する、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
上記ポリエチレングリコールが約１～約５，０００の重合度を有する、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】

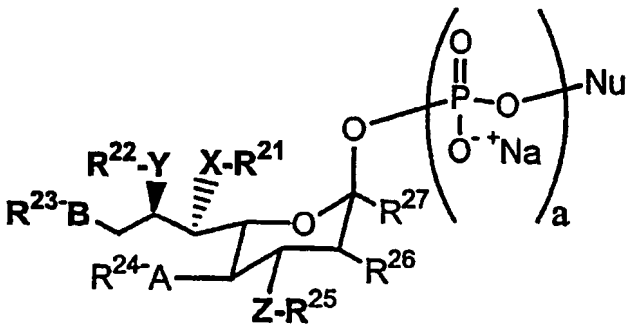
上記ポリエチレングリコールが約１～約１，０００の重合度を有する、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
上記グリコシルトランスフェラーゼが、シアリルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、ＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼ、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼおよびマンノシルトランスフェラーゼからなる群から選択される、請求項５８に記載の方法。
【請求項６８】
上記グルコシルトランスフェラーゼが組換え的に生産される請求項５８に記載の方法。
【請求項６９】
上記グルコシルトランスフェラーゼが組換え原核酵素である請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
上記グルコシルトランスフェラーゼが組換え真核酵素である請求項６８に記載の方法。
【請求項７１】
上記ヌクレオチド糖がＵＤＰ－グリコシド、ＣＭＰ－グリコシドおよびＧＤＰ－グリコシドからなる群から選択される、請求項５８に記載の方法。
【請求項７２】
上記ヌクレオチド糖が、ＵＤＰ－ガラクトース、ＵＤＰ－ガラクトサミン、ＵＤＰ－グルコース、ＵＤＰ－グルコサミン、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルガラクトサミン、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミン、ＧＤＰ－マンノース、ＧＤＰ－フコース、ＣＭＰ－シアル酸、ＣＭＰ－ＮｅｕＡｃからなる群から選択される、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
上記ペプチドが治療薬である請求項５８に記載の方法。
【請求項７４】
上記グリコシル化ペプチドが該接触前に部分的に脱グリコシル化されている、請求項５８に記載の方法。
【請求項７５】
上記の完全なグリコシル連結基がシアル酸残基である請求項５８に記載の方法。
【請求項７６】
上記方法が無細胞環境下で行われる請求項５８に記載の方法。
【請求項７７】
上記の共有結合物が単離されている請求項５８に記載の方法。
【請求項７８】
上記の共有結合物が膜濾過により単離されている請求項７７に記載の方法。
【請求項７９】
リンカー部分により連結された第１のグリコシル化または非－グリコシル化ペプチドと第２のグリコシル化または非－グリコシル化ペプチド、
ここで
該リンカー部分は、該第１ペプチドおよび該リンカー部分の間に挿入され、そして両方に共有結合した第１の完全なグリコシル連結基を介して該第１ペプチドに結合し、そして
該リンカー部分は、該第２ペプチドおよび該リンカー部分の間に挿入され、そして両方に共有結合した第２の完全なグリコシル連結基を介して該第２ペプチドに結合している、との間に共有結合物を形成する方法であって：
（ａ）該第１ペプチドを、該第１の完全なグリコシル連結基の該前駆体および該第２の完全なグリコシル連結基の前駆体を含んでなる該リンカー部分前駆体の誘導体と接触させ；
（ｂ）（ａ）からの混合物を、該第１グリコシル連結基の該前駆体が基質であるグリコシルトランスフェラーゼと、該第１の完全なグリコシル連結基の該前駆体を該第１の完全なグリコシル連結基に転換するために十分な条件下で接触させ、これにより該リンカー部分前駆体と該第１ペプチドとの間に第１結合物を形成し；
（ｃ）該第１結合物を、該第２ペプチドおよび該第２の完全なグリコシル基の該前駆体が

基質であるグリコシルトランスフェラーゼと、該第２の完全なグリコシル連結基の該前駆体を該第２のグリコシル連結基に転換するために十分な条件下で接触させ、これにより該リンカー部分と該第１グリコシル化または非グリコシル化ペプチドとの間、および該第２グリコシル化または非－グリコシル化ペプチドとの間に該結合物を形成する、
ことを含んでなる上記方法。
【請求項８０】
上記リンカー部分が水溶性ポリマーを含んでなる請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
上記水溶性ポリマーがポリ（エチレングリコール）を含んでなる請求項８０に記載の方法。
【請求項８２】
リンカー部分により連結された第１のグリコシル化または非－グリコシル化ペプチドと第２のグリコシル化または非－グリコシル化ペプチド、
ここで
該リンカー部分は該第１ペプチドに共有結合し、そして
該リンカー部分は、該第２ペプチドと該リンカー部分の間に挿入され、そして両方に共有結合した完全なグリコシル連結基を介して該第２ペプチドに結合している、
との間に共有結合物を形成する方法であって：
（ａ）該第１ペプチドを、
該第１ペプチド上の残基に相補的な反応性の反応性官能基、および該完全なグリコシル連結基の前駆体、
を含んでなる該リンカー部分の活性化誘導体と、該反応性官能基と該残基との間に共有結合を形成するために十分な条件下で接触させ、これにより第１結合物を形成し；そして
（ｂ）該第１結合物を、該第２ペプチドおよび該完全なグリコシル連結基の該前駆体が基質であるグリコシルトランスフェラーゼと、該完全なグリコシル連結基の該前駆体を該完全なグリコシル連結基に転換するために十分な条件下で接触させ、これにより該第１グリコシル化または非グリコシル化ペプチドと、該第２グリコシル化または非－グリコシル化ペプチドとの間に該リンカー部分により連結された該結合物を形成する、
ことを含んでなる上記方法。
【請求項８３】
上記リンカー部分が水溶性ポリマーを含んでなる請求項８２に記載の方法。
【請求項８４】
上記水溶性ポリマーがポリ（エチレングリコール）を含んでなる請求項８３に記載の方法。
【請求項８５】
製薬学的に許容され得る希釈剤およびポリマーとグリコシル化または非グリコシル化ペプチドとの間の共有結合物を含んでなる製薬学的組成物であって、該ポリマーが、該ペプチドと該ポリマーとの間に挿入され、そして両該ペプチドと該ポリマーとに共有結合した完全なグリコシル連結基を介して該ペプチドに結合している上記の製薬学的組成物。
【請求項８６】
ペプチドと修飾された糖との間に結合物を形成するための組成物であって：修飾された糖、グリコシルトランスフェラーゼおよびペプチド受容体基質の混合物を含んでなり、該修飾された糖はポリマー、治療部分および生体分子から選択されるそれに共有結合した員を有する上記組成物。
【請求項８７】
請求項１に記載の方法により改造されたペプチド。
【請求項８８】
請求項８７に記載のペプチドを含んでなる製薬学的組成物。
【請求項８９】
請求項１２に記載の方法により改造されたペプチド。

【請求項９０】
請求項８９に記載のペプチドを含んでなる製薬学的組成物。
【請求項９１】
請求項２３に記載の方法により改造されたペプチド。
【請求項９２】
請求項９１に記載のペプチドを含んでなる製薬学的組成物。
【請求項９３】
請求項３０に記載の方法により改造されたペプチド。
【請求項９４】
請求項９３に記載のペプチドを含んでなる製薬学的組成物。
【請求項９５】
請求項３７に記載の方法により改造されたペプチド。
【請求項９６】
請求項９５に記載のペプチドを含んでなる製薬学的組成物。
【請求項９７】
式：
【化１１】

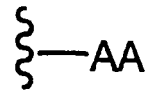


式中、
ＭＳは修飾基に共有結合した糖を含んでなる修飾された糖であり；
Ｎｕはヌクレオシドであり；そして
ｂは０から２の整数である、
を有する化合物。
【請求項９８】
式：
【化１２】

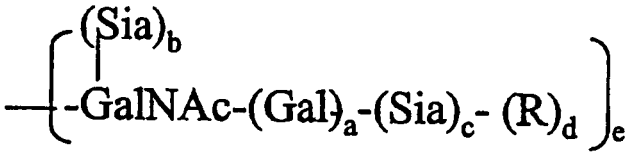


式中、
Ｘ、Ｙ、Ｚ、ＡおよびＢは、Ｓ、ＯおよびＮＨから独立して選択される員であり；
R^{21}、R^{22}、R^{23}、R^{24}およびR^{25}は、Ｈおよびポリマーから独立して選択される員であり；
R^{26}は、Ｈ、ＯＨおよびポリマーから選択される員であり；
R^{27}はCOO^-およびNa^+から選択される員であり；
Ｎｕはヌクレオシドであり；そして

ａは１から３の整数である、
を有する請求項９７に記載の化合物。
【請求項９９】
式：
【化１３】



式中、
ＡＡはペプチドの末端または内部アミノ酸残基である、
を有するペプチドの無細胞のインビトロ改造方法であって；
該ペプチドを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、該少なくとも１つのグリコシル供与体を該アミノ酸残基へ転移させるために適する条件下で接触させ、ここで該グリコシル供与体は修飾基を含んでなり、これにより該ペプチドを改造する、
ことを含んでなる上記方法。
【請求項１００】
顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該Ｇ－ＣＳＦペプチドに共有結合し、該Ｇ－ＣＳＦペプチドが式：
【化１４】



式中、
ａ、ｂ、ｃおよびｅは、０および１から独立して選択される員であり；
ｄは０であり；そして
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースである、
を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該Ｇ－ＣＳＦペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基の形成に適する条件下で接触させる
ことを含んでなる上記方法。
【請求項１０１】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記Ｇ－ＣＳＦペプチドをシアリダーゼと、該Ｇ－ＣＳＦペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０２】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）の前に、上記Ｇ－ＣＳＦペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該Ｇ－ＣＳＦペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０３】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）の生成物を上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完

全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項１００に記載の方法。

【請求項１０４】

さらに：

（ｅ）工程（ａ）の前に、上記Ｇ－ＣＳＦペプチドをＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼおよびＧａｌＮＡｃ供与体と、ＧａｌＮＡｃを該Ｇ－ＣＳＦペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１００に記載の方法。

【請求項１０５】

さらに：

（ｆ）工程（ａ）の前に、上記Ｇ－ＣＳＦペプチドを、合成的に作用するエンド－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼおよびＧａｌＮＡｃ供与体と、ＧａｌＮＡｃを該Ｇ－ＣＳＦペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１００に記載の方法。

【請求項１０６】

上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項１００に記載の方法。

【請求項１０７】

ａ、ｂ、ｃおよびｅが０である請求項１００に記載の方法。

【請求項１０８】

ａおよびｅが０および１から独立して選択される員であり；そして

ｂ、ｃおよびｄが０である、請求項１００に記載の方法。

【請求項１０９】

ａ、ｂ、ｃ、ｄおよびｅが０および１から独立して選択される員である請求項１００に記載の方法。

【請求項１１０】

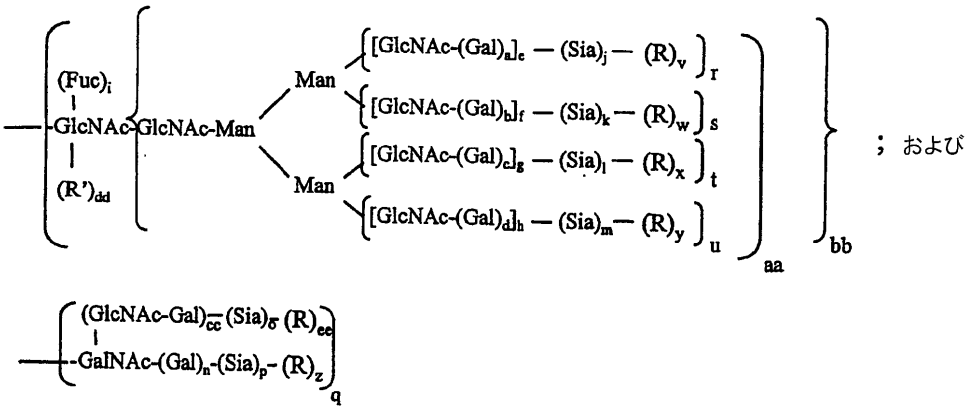
請求項１００に記載の方法により形成されたＧ－ＣＳＦペプチド結合物。

【請求項１１１】

インターフェロンアルファペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、

該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して糖ペプチドに共有結合し、該糖ペプチドが：

【化１５】



ここで

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｅｅは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の整数から独立して選択される員であり；

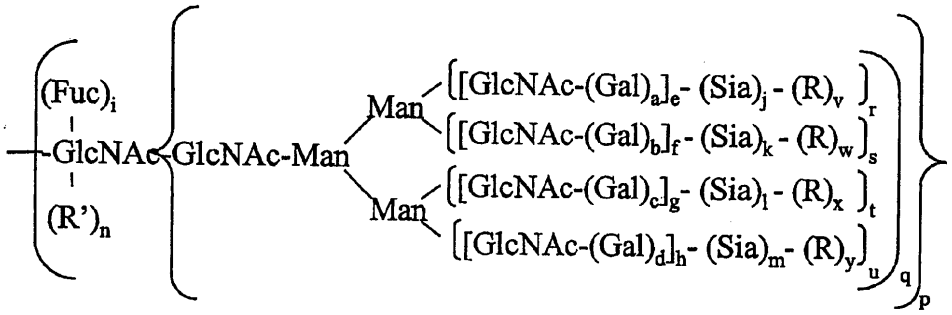
ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚは０であり；そして

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり、
Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基または複合糖質である、
から選択される式を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該グリコペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼ、合成的に作用するエンド－アセチルガラクトサミニダーゼおよびトランス－シアリダーゼから選択される員、および該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項１１２】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをシアリダーゼと、該糖ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）からの生成物を上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１４】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記グリコペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせ物と接触させることを含んでなる、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１５】
さらに：
（ｅ）工程（ａ）の前に、上記グリコペプチドをエンドグリカナーゼと、該グリコペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１６】
さらに：
（ｆ）工程（ａ）の前に、上記グリコペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該グリコペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１７】
さらに：
（ｇ）工程（ａ）の前に、上記グリコペプチドを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを上記生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１８】
さらに：
（ｈ）工程（ｂ）の前に、上記グリコペプチドをエンドグリカナーゼと、該グリコペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１９】
さらに：
（ｉ）工程（ａ）の前に、上記グリコペプチドをマンノシダーゼと、該グリコペプチドからマンノースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１２０】
さらに：
（ｊ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シア

ル酸を上記生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１２１】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１２２】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ａａおよびｂｂが１であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが、１から４の整数から独立して選択される員であり；
ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびｃｃが０および１から独立して選択される員であり；
ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚ、ｄｄおよびｅｅが０である、
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１２３】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚ、ｃｃ、ｄｄおよびｅｅが０であり；
ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そして
ａａおよびｂｂが１である、
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１２４】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；
ｈが１から３の整数から独立して選択される員であり；
ｄｄ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして、
ａａおよびｂｂが１である、
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１２５】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄが０であり；
ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そして
ａａおよびｂｂが１である、
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１２６】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｄｄが０であり；
ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；そして
ａａおよびｂｂが１である、
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１２７】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄが０であり；そして
ａａおよびｂｂが１である、
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１２８】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；
ｈが１から３の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄが０であり；そして
ａａおよびｂｂが１である、
請求項１１１に記載の方法。

【請求項１２９】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄが０であり；
ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そして
ａａおよびｂｂが１である、
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１３０】
ｎ、ｏおよびｐが０および１から独立して選択される員であり；
ｑが１であり；そして
ｚ、ｃｃおよびｅｅが０である、
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１３１】
ｎおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｏ、ｐ、ｚ、ｃｃおよびｅｅが０である、
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１３２】
ｎが０または１であり；
ｑが１であり；そして
ｏ、ｐ、ｚ、ｃｃおよびｅｅが０である、
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１３３】
ｎ、ｏ、ｐおよびｆが０および１から独立して選択される員であり；
ｑが１であり；そして
ｚおよびｅｅが０である
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１３４】
ｎ、ｏ、ｐおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｚ、ｃｃおよびｅｅが０である
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１３５】
ｎおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｏ、ｐ、ｚ、ｃｃおよびｅｅが０である
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１３６】
ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｚ、ｃｃおよびｅｅが０である、
請求項１１１に記載の方法。
【請求項１３７】
請求項１１１に記載の方法により形成されたインターフェロンアルファペプチド結合物。
【請求項１３８】
インターフェロンベータペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該インターフェロンベータペプチドに共有結合し、該インターフェロンベータペプチドが式：

【化１６】



ここで

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨ、またはグリコシル、修飾基または複合糖質基である、

を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、

（ａ）該インターフェロンベータペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよびトランスシアリダーゼから選択される員および該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項１３９】

さらに：

（ｂ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンベータペプチドをシアリダーゼと、該インターフェロンベータペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１３８に記載の方法。

【請求項１４０】

さらに：

（ｃ）工程（ａ）からの生成物を、上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項１３８に記載の方法。

【請求項１４１】

さらに：

（ｄ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンベータペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる、請求項１３８に記載の方法。

【請求項１４２】

さらに：

（ｅ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンベータペプチドをエンドグリカナーゼと、該インターフェロンベータペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１３８に記載の方法。

【請求項１４３】

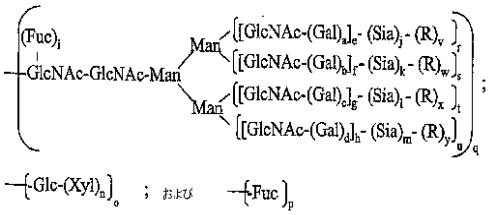
さらに：

（ｆ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンベータペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該インターフェロンベータペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１３８に記載の方法。

【請求項１４４】

さらに：
（ｇ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンベータペプチドを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを上記生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４５】
さらに：
（ｈ）工程（ｂ）の前に、上記インターフェロンベータペプチドをエンドグリカナーゼと、該インターフェロンベータペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４６】
さらに：
（ｉ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンベータペプチドをマンノシダーゼと、該インターフェロンベータペプチドからマンノースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４７】
さらに：
（ｊ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を上記生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４８】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４９】
ｈが１から３の間の整数から独立して選択される員であり；
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｑ、ｐが１である、
請求項１３８に記載の方法。
【請求項１５０】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｑ、ｐが１である、
請求項１３８に記載の方法。
【請求項１５１】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｑ、ｐが１であり；そして
ｉが０および１から独立して選択される、
請求項１３８に記載の方法。
【請求項１５２】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、Ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｐ、ｑが１である、
請求項１３８に記載の方法。
【請求項１５３】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｎが０であり；
ｑ、ｐが１であり；そして
ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員である、

請求項１３８に記載の方法。
【請求項１５４】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｑ、ｐが１である、
請求項１３８に記載の方法。
【請求項１５５】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇが０から３の間の整数から選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｑ、ｐが１である、
請求項１３８に記載の方法。
【請求項１５６】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｐおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そして
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項１３８に記載の方法。
【請求項１５７】
請求項１３８に記載の方法により形成されたインターフェロンベータペプチド結合物。
【請求項１５８】
第ＶＩＩａ因子ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該第ＶＩＩａ因子ペプチドに共有結合し、該第ＶＩＩａ因子ペプチドが：
【化１７】



；

；および

ここで
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｎは０から６の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；そして
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノース、シアリルルイス^{x}またはシアリルルイス^{a}である、
から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該第ＶＩＩａ因子ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項１５９】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記第ＶＩＩａ因子ペプチドをシアリダーゼと、該第ＶＩＩａ

因子ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１５８に記載の方法。

【請求項１６０】

さらに：

（ｃ）工程（ａ）の前に、上記第ＶＩＩａ因子ペプチドをガラクトシダーゼと、該第ＶＩＩａ因子ペプチドからガラクトースを除去するためにに適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１５８に記載の方法。

【請求項１６１】

さらに：

（ｄ）工程（ａ）の前に、上記第ＶＩＩａ因子ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該第ＶＩＩａ因子ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１５８に記載の方法。

【請求項１６２】

（ｅ）工程（ａ）の生成物を、シアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１５８に記載の方法。

【請求項１６３】

上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項１５８に記載の方法。

【請求項１６４】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｇ、ｉ、ｊ、ｌ、ｏ、ｐおよびｑが、０および１から独立して選択される員であり；

ｒおよびｔが１であり；ｆ、ｈ、ｋ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして

ｎが０から４の整数から選択される、

請求項１５８に記載の方法。

【請求項１６５】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして

ｎが０から４の整数から選択される員である、

請求項１５８に記載の方法。

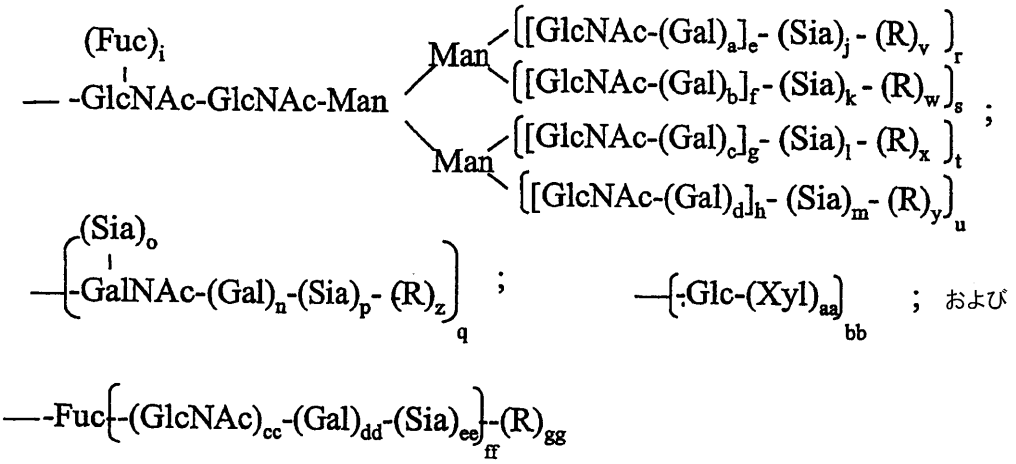
【請求項１６６】

請求項１５８に記載の方法により形成された第ＶＩＩａ因子ペプチド結合物。

【請求項１６７】

第ＩＸ因子ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該第ＩＸ因子ペプチドに共有結合し、該第ＩＸ因子ペプチドが：

【化１８】



ここで

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄ、ｅｅ、ｆｆおよびｇｇは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびａａは０から６の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースである、

から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、

（ａ）該第ＩＸ因子ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項１６８】

さらに：

（ｂ）工程（ａ）の前に、上記第ＩＸ因子ペプチドをシアリダーゼと、該第ＩＸ因子ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１６７に記載の方法。

【請求項１６９】

さらに：

（ｃ）工程（ａ）で形成された生成物を、シアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１６７に記載の方法。

【請求項１７０】

さらに：

（ｄ）工程（ｂ）からの生成物を、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１６８に記載の方法。

【請求項１７１】

さらに：

（ｅ）工程（ｄ）からの生成物を、ＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１７０に記載の方法。

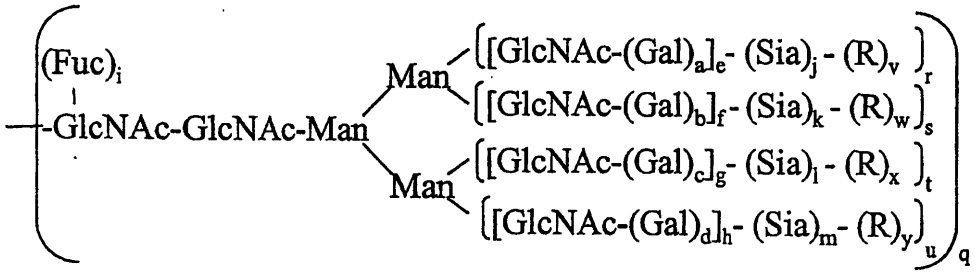
【請求項１７２】

さらに：

（ｄ）工程（ａ）からの生成物を上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項

１６７に記載の方法。
【請求項１７３】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項１６７に記載の方法。
【請求項１７４】
ａ、ｂ、ｃおよびｄが１であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から４の整数から独立して選択される員であり；
ａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄ、ｅｅ、ｆｆ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；そして
ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｇｇが０である、
請求項１６７に記載の方法。
【請求項１７５】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｎ、ｑが０および１から独立して選択され；
ａａ、ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から４の整数から独立して選択される員であり；
ｂｂ、ｃｃ、ｄｄ、ｅｅ、ｆｆ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｉ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｇｇが０である、
請求項１６７に記載の方法。
【請求項１７６】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｎ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｆｆが１であり；
ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびａａが１から４の整数から独立して選択される員であり；
ｑ、ｅｅ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｇｇが０である、
請求項１６７に記載の方法。
【請求項１７７】
ａ、ｂ、ｃ、ｄおよびｑが１であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から４の整数から独立して選択される員であり；
ａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄ、ｅｅ、ｆｆ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｇｇが０である、
請求項１６７に記載の方法。
【請求項１７８】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｑ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｆｆが１であり；
ａａ、ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から４の整数から独立して選択される員であり；
ｅｅ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｇｇが０である、
請求項１６７に記載の方法。
【請求項１７９】
請求項１６７に記載の方法により形成された第ＩＸ因子ペプチド結合物。
【請求項１８０】
濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該ＦＳＨペプチドに共有結合し、該ＦＳＨペプチドが式：

【化１９】



式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；そして

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースである、

を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、

（ａ）該ＦＳＨペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項１８１】

さらに：

（ｂ）工程（ａ）の前に、上記ＦＳＨペプチドをシアリダーゼと、該ＦＳＨペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１８０に記載の方法。

【請求項１８２】

さらに：

（ｃ）工程（ａ）の生成物を、シアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１８０に記載の方法。

【請求項１８３】

さらに：

（ｄ）工程（ａ）の前に、該ＦＳＨペプチドをガラクトシダーゼと、該ＦＳＨペプチドからガラクトースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１８０に記載の方法。

【請求項１８４】

（ｅ）工程（ａ）の前に、上記ＦＳＨペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる、請求項１８０に記載の方法。

【請求項１８５】

さらに：

（ｆ）工程（ａ）の前に、上記ＦＳＨペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該ＦＳＨペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１８０に記載の方法。

【請求項１８６】

さらに

（ｄ）工程（ａ）からの生成物を、上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより該完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成する、請求項１８０に記載の方法。

【請求項１８７】

（ｅ）工程（ｂ）の前に、上記ＦＳＨペプチドをエンドグリカナーゼと、該ＦＳＨペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１８０に記載の方法。

【請求項１８８】

さらに

（ｆ）工程（ａ）の前に、上記ＦＳＨペプチドをＮ－アセチルアセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃをＦＳＨペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１８０に記載の方法。

【請求項１８９】

上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項１８０に記載の方法。

【請求項１９０】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そして

ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、

請求項１８０に記載の方法。

【請求項１９１】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、

請求項１８０に記載の方法。

【請求項１９２】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして

ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員である、

請求項１８０に記載の方法。

【請求項１９３】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌおよびｍが０であり；

ｉ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択され；

ｐが１であり；

Ｒ（分岐または直鎖）はマンノースおよびオリゴマンノースから選択される員である、

請求項１８０に記載の方法。

【請求項１９４】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗおよびｙが０であり；

ｉが０または１であり；そして

ｑが１である、

請求項１８０に記載の方法。

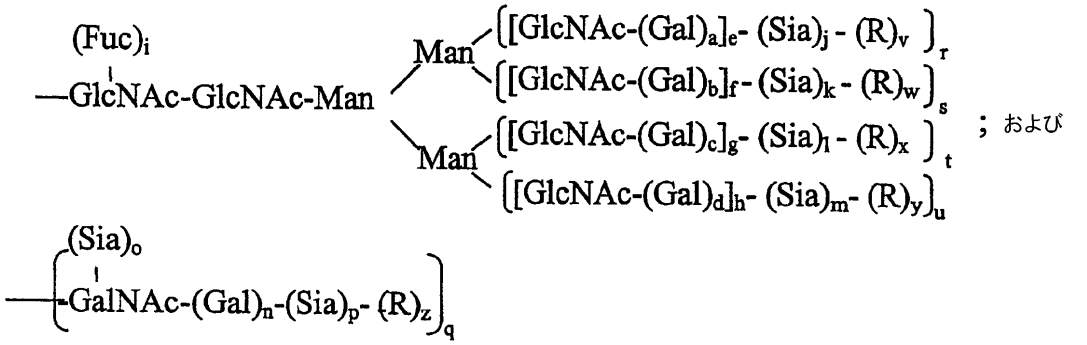
【請求項１９５】

請求項１８０に記載の方法により形成されたＦＳＨペプチド結合物。

【請求項１９６】

エリトロポエチン（ＥＰＯ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該ＥＰＯペプチドに共有結合し、該ＥＰＯペプチドが：

【化２０】



；および

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の間の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の間の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚは０であり；そして

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースである、

から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、

（ａ）該ＥＰＯペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項１９７】

さらに：

（ｂ）工程（ａ）の前に、上記ＥＰＯペプチドをシアリダーゼと、該ＥＰＯペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１９６に記載の方法。

【請求項１９８】

さらに：

（ｃ）工程（ａ）の生成物を、シアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１９６に記載の方法。

【請求項１９９】

さらに：

（ｄ）工程（ａ）の前に、該ＥＰＯペプチドを合成的に作用するガラクトシダーゼと、該ＥＰＯペプチドにガラクトースを付加するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１９６に記載の方法。

【請求項２００】

（ｅ）工程（ａ）の前に、上記ＥＰＯペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該ＥＰＯペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１９６に記載の方法。

【請求項２０１】

（ｆ）工程（ｅ）からの生成物をＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２００に記載の方法。

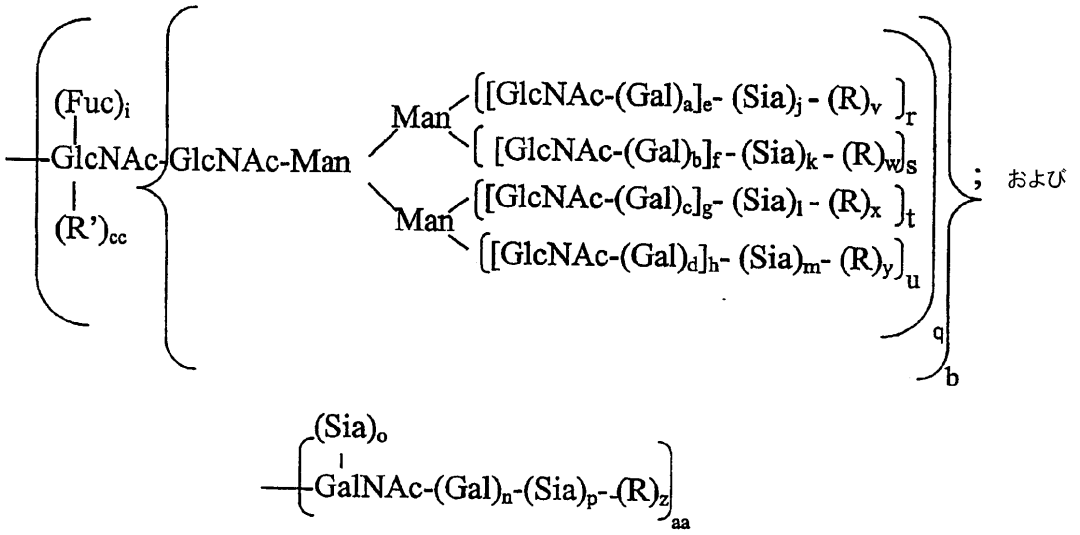
【請求項２０２】

さらに：

（ｇ）工程（ａ）からの生成物を上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項

１９６に記載の方法。
【請求項２０３】
さらに
（ｈ）工程（ａ）の前に、上記ＥＰＯペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃをＥＰＯペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１９６に記載の方法。
【請求項２０４】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項１９６に記載の方法。
【請求項２０５】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｎおよびｑが１であり；
ｈが１から３の間の整数から選択される員であり；
ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である、
請求項１９６に記載の方法。
【請求項２０６】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そして
ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員である、
請求項１９６に記載の方法。
【請求項２０７】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員あり；そして
ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である、
請求項１９６に記載の方法。
【請求項２０８】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｎおよびｑが１であり；
ｈが１から３の間の整数から選択される員であり；
ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；そして
ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である、
請求項１９６に記載の方法。
【請求項２０９】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そして
ｅ、ｇ、ｉ、ｎ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される、
請求項１９６に記載の方法。
【請求項２１０】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そして
ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員である、
請求項１９６に記載の方法。
【請求項２１１】
ｑが１であり；
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｖ、ｗ、ｘおよびｚが０である、
請求項１９６に記載の方法。
【請求項２１２】

請求項１９６に記載の方法により形成されたＥＰＯペプチド結合物。
【請求項２１３】
顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該ＧＭ－ＣＳＦペプチドに共有結合し、該ＧＭ－ＣＳＦペプチドが：
【化２１】



ここで、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ａａ、ｂｂおよびｃｃは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨまたはグリコシル残基または修飾基または複合糖質である、
から選択される式を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該ＧＭ－ＣＳＦペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項２１４】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記ＧＭ－ＣＳＦペプチドをシアリダーゼと、該ＧＭ－ＣＳＦペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２１３に記載の方法。
【請求項２１５】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）からの生成物を上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項２１３に記載の方法。
【請求項２１６】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記ＧＭ－ＣＳＦペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる、請求項２１３に記載の方法。
【請求項２１７】
さらに：

（ｅ）工程（ａ）の前に、上記ＧＭ－ＣＳＦペプチドをエンドグリカナーゼと、、該ＧＭ－ＣＳＦペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２１３に記載の方法。

【請求項２１８】

さらに：

（ｆ）工程（ａ）の前に、上記ＧＭ－ＣＳＦペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該ＧＭ－ＣＳＦペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２１３に記載の方法。

【請求項２１９】

さらに：

（ｇ）工程（ａ）の前に、上記ＧＭ－ＣＳＦペプチドをマンノシダーゼと、該ＧＭ－ＣＳＦペプチドからマンノース残基を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２１３に記載の方法。

【請求項２２０】

さらに：

（ｈ）工程（ａ）の前に、上記ＧＭ－ＣＳＦペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を上記生成物に転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２１３に記載の方法。

【請求項２２１】

上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項２１３に記載の方法。

【請求項２２２】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびａａが０および１から独立して選択される員であり；

ｂｂ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｎが１であり；そして

ｃｃ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である、

請求項２１３に記載の方法。

【請求項２２３】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびａａが０および１から独立して選択される員であり；

ｂｂ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｎが０および１から独立して選択される員であり；そして

ｃｃ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である、

請求項２１３に記載の方法。

【請求項２２４】

ｃｃ、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そして

ｅ、ｇ、ｉ、ｎ、ｑ、ｒ、ｔおよびａａが０および１から独立して選択される員であり；そして

ｂｂが１である、

請求項２１３に記載の方法。

【請求項２２５】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｚおよびｃｃが０であり；

ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびａａが、０および１から独立して選択される員であり；

ｂｂが１であり；そして

Ｒがマンノースまたはオリゴマンノースである、

請求項２１３に記載の方法。

【請求項２２６】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ａａおよびｂｂが０および１から　独立して選択される員であり；

ｎ、ｐ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｃｃが０である、

請求項２１３に記載の方法。

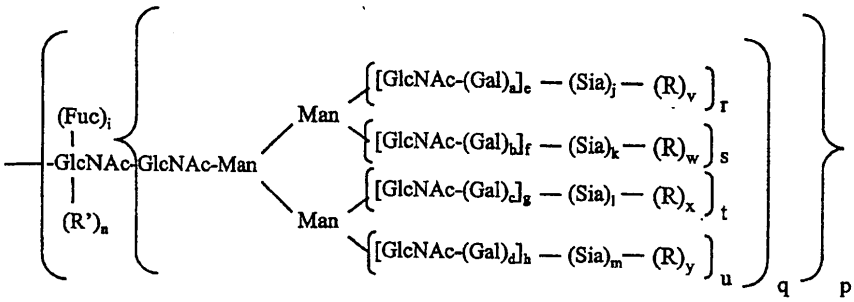
【請求項２２７】

請求項２１３に記載の方法により形成されたＧＭ－ＣＳＦペプチド結合物。

【請求項２２８】

インターフェロンガンマペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該インターフェロンガンマペプチドに共有結合し、該インターフェロンガンマペプチドが式：

【化２２】



式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨ、またはグリコシル残基、複合糖質または修飾基である、

を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、

（ａ）該インターフェロンガンマペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび合成的に作用するガラクトシダーゼから選択される員および該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項２２９】

さらに：

（ｂ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンガンマペプチドをシアリダーゼと、該インターフェロンガンマペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２２８に記載の方法。

【請求項２３０】

さらに：

（ｃ）工程（ａ）からの生成物を、上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項２２８に記載の方法。

【請求項２３１】

さらに：

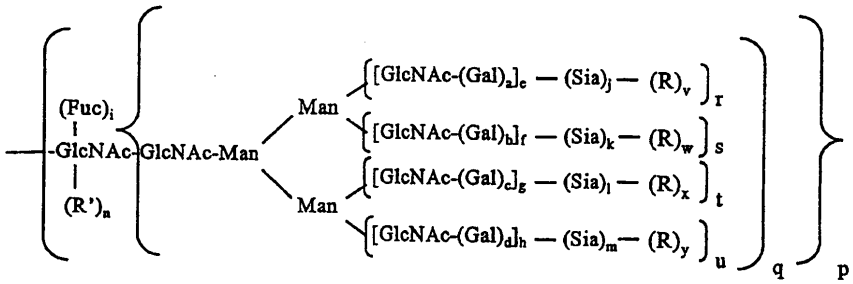
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンガンマペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる、請求項２２８に記載の方法。

【請求項２３２】

さらに：

（ｅ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンガンマペプチドをエンドグリカナーゼと、該インターフェロンガンマペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２２８に記載の方法。
【請求項２３３】
さらに：
（ｆ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンガンマペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該インターフェロンガンマペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２２８に記載の方法。
【請求項２３４】
さらに：
（ｇ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンガンマペプチドを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを上記生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２２８に記載の方法。
【請求項２３５】
さらに：
（ｈ）工程（ａ）の生成物を、シアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を上記生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２２８に記載の方法。
【請求項２３６】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項２２８に記載の方法。
【請求項２３７】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そして
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項２２８に記載の方法。
【請求項２３８】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；
ｐ、ｑ、ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そして
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項２２８に記載の方法。
【請求項２３９】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｐが１である、
請求項２２８に記載の方法。
【請求項２４０】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｎが０であり；
ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｐが１であり；そして
Ｒがマンノースまたはオリゴマンノースである、
請求項２２８に記載の方法。
【請求項２４１】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；

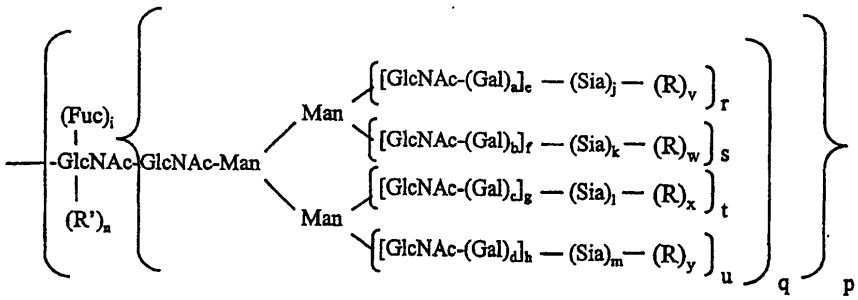
ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｐが１であり；そして
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項２２８に記載の方法。
【請求項２４２】
請求項２２８に記載の方法により形成されるインターフェロンガンマペプチド結合物。
【請求項２４３】
アルファ１プロテアーゼインヒビター（Ａ－１－ＰＩ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該Ａ－１－ＰＩペプチドに共有結合し、該Ａ－１－ＰＩペプチドが式：
【化２３】



式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨ、またはグリコシル残基、複合糖質または修飾基である、
を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該Ａ－１－ＰＩペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項２４４】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記Ａ－１－ＰＩペプチドをシアリダーゼと、該Ａ－１－ＰＩペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２４３に記載の方法。
【請求項２４５】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）からの生成物を、上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項２４３に記載の方法。
【請求項２４６】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記Ａ－１－ＰＩペチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる、請求項２４３に記載の方法。
【請求項２４７】
さらに：
（ｅ）工程（ａ）の前に、上記Ａ－１－ＰＩペプチドをエンドグリカナーゼと、該Ａ－１－ＰＩペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含

んでなる、請求項２４３に記載の方法。
【請求項２４８】
さらに：
（ｆ）工程（ａ）の前に、上記Ａ－１－ＰＩペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該Ａ－１－ＰＩペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２４３に記載の方法。
【請求項２４９】
さらに：
（ｇ）工程（ａ）の前に、上記Ａ－１－ＰＩペプチドをマンノシダーゼと、該Ａ－１－ＰＩペプチドからマンノースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２４４に記載の方法。
【請求項２５０】
さらに：
（ｈ）工程（ａ）の前に、上記Ａ－１－ＰＩペプチドをマンノシダーゼ、キシロシダーゼ、ヘキソサミニダーゼおよびその組み合わせから選択される員と、該Ａ－１－ＰＩペプチドからグリコシル残基を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２４３に記載の方法。
【請求項２５１】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項２４３に記載の方法。
【請求項２５２】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項２４３に記載の方法。
【請求項２５３】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項２４３に記載の方法。
【請求項２５４】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員である、
請求項２４３に記載の方法。
【請求項２５５】
ｎ、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌおよびｍが０であり；そして
ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｐが１である、
請求項２４３に記載の方法。
【請求項２５６】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｐおよびｑが０であり；
ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員である、
請求項２４３に記載の方法。
【請求項２５７】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；
ｐ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして

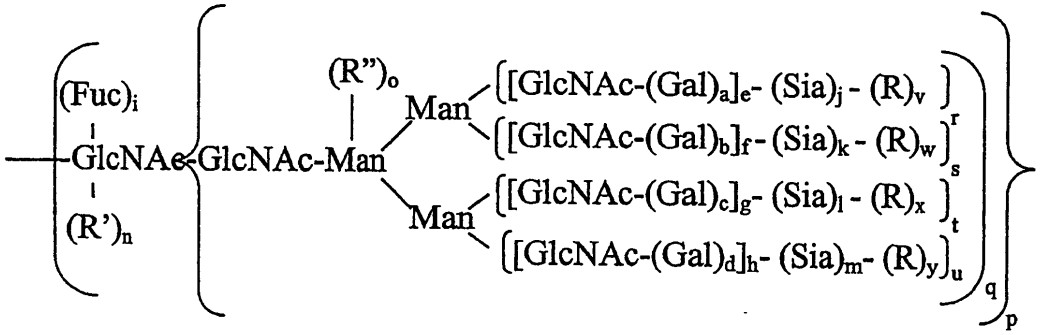
ｎおよびｑが１である、
請求項２４３に記載の方法。
【請求項２５８】
請求項２４３に記載の方法により形成されるアルファ１プロテアーゼインヒビターペプチド結合物。
【請求項２５９】
ベータグルコシダーゼペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該ベータグルコシダーゼペプチドに共有結合し、該ベータグルコシダーゼペプチドが式：
【化２４】



式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨ、またはグリコシル残基、複合糖質または修飾基である、
を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該ベータグルコシダーゼペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項２６０】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記ベータグルコシダーゼペプチドをシアリダーゼと、該ベータグルコシダーゼペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２５９に記載の方法。
【請求項２６１】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）からの生成物を、上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項２５９に記載の方法。
【請求項２６２】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記ベータグルコシダーゼペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる、請求項２５９に記載の方法。
【請求項２６３】
さらに：
（ｅ）工程（ａ）の前に、上記ベータグルコシダーゼペプチドをエンドグリカナーゼと、

該ベータグルコシダーゼペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２５９に記載の方法。
【請求項２６４】
さらに：
（ｆ）工程（ａ）の前に、上記ベータグルコシダーゼペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該ベータグルコシダーゼペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２５９に記載の方法。
【請求項２６５】
さらに：
（ｇ）工程（ａ）の前に、上記ベータグルコシダーゼペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２５９に記載の方法。
【請求項２６６】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項２５９に記載の方法。
【請求項２６７】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｐ、ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そして
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項２５９に記載の方法。
【請求項２６８】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項２５９に記載の方法。
【請求項２６９】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｐが１である、
請求項２５９に記載の方法。
【請求項２７０】
ｎ、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌおよびｍが０であり；
ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；
ｐが１であり；そして
Ｒがマンノースまたはオリゴマンノースである、
請求項２５９に記載の方法。
【請求項２７１】
請求項２５９に記載の方法により形成されたベータグルコシダーゼペプチド結合物。
【請求項２７２】
組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該ＴＰＡペプチドに共有結合し、該ＴＰＡペプチドが式：

【化２５】



式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の整数から独立して選択される員であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；
Ｒ’はＨ、またはグリコシル残基、複合糖質または修飾基であり；そして
Ｒ”はグリコシル基、複合糖質または修飾基である、
を含んでなるグリコシルサブユニットを有し、かつ、
（ａ）該ＴＰＡペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび合成的に作用するグリコシダーゼから選択される員、および該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項２７３】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記ＴＰＡペプチドをシアリダーゼと、該ＴＰＡペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２７２に記載の方法。

【請求項２７４】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２７２に記載の方法。

【請求項２７５】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記ＴＰＡペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該ＴＰＡペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２７２に記載の方法。

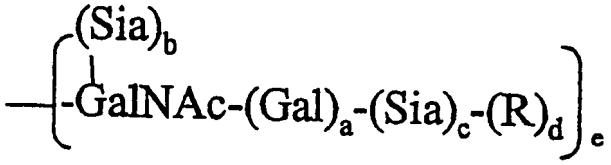
【請求項２７６】
さらに：
（ｅ）工程（ａ）の前に、上記ＴＰＡペプチドをグリルコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる、請求項２７２に記載の方法。

【請求項２７７】
さらに：
（ｆ）工程（ａ）からの生成物を該修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項２７２に記載の方法。

【請求項２７８】

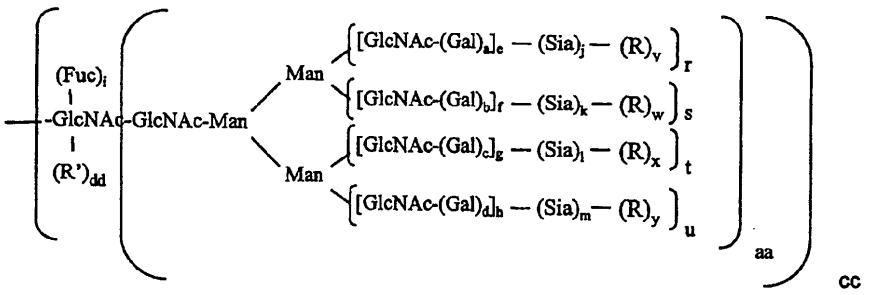
さらに：
（ｇ）工程（ａ）の前に、上記ＴＰＡペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該ＴＰＡプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２７２に記載の方法。
【請求項２７９】
さらに：
（ｈ）工程（ａ）の前に、上記ＴＰＡペプチドをエンドグリカナーゼと、該ＴＰＡペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２７２に記載の方法。
【請求項２８０】
（ｉ）工程（ａ）の前に、上記ＴＰＡペプチドをマンノシダーゼ、キシロシダーゼ、ヘキソサミニダーゼおよびそれらの組み合わせから選択される員と、該ＴＰＡペプチドからグリコシル残基を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２７２に記載の方法。
【請求項２８１】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項２７２に記載の方法。
【請求項２８２】
ａ、ｂ、ｃ、ｄが１であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から３の間の整数から選択される員であり；
ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｎ、ｏ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項２７２に記載の方法。
【請求項２８３】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｑおよびｐが１である、
請求項２７２に記載の方法。
【請求項２８４】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｎ、ｏ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項２７２に記載の方法。
【請求項２８５】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇおよびｐが１であり；
ｈが１から３の間の整数から選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｉ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｎ、ｏ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項２７２に記載の方法。
【請求項２８６】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；
ｏが１であり；そして
Ｒ”がキシロースである、
請求項２７２に記載の方法。
【請求項２８７】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そして
ｎ、ｏ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項２７２に記載の方法。
【請求項２８８】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｉおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｐが１である、
請求項２７２に記載の方法。
【請求項２８９】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｉおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；
ｐが０であり；そして
ｎが１である、
請求項２７２に記載の方法。
【請求項２９０】
請求項２７２に記載の方法により形成されたＴＰＡペプチド結合物。
【請求項２９１】
インターロイキン２（ＩＬ－２）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該ＩＬ－２プチドに共有結合し、該ＩＬ－２ペプチドが式：
【化２６】

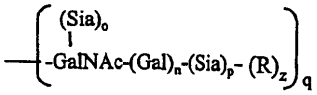


式中、
ａ、ｂ、ｃおよびｅは０および１から独立して選択される員であり；
ｄは０であり；そして
Ｒは修飾基である、
を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該ＩＬ－２ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項２９２】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記ＩＬ－２ペプチドをシアリダーゼと、該ＩＬ－２ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２９１に記載の方法。
【請求項２９３】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）の前に、上記ＩＬ－２ペプチドを合成的に作用するエンド－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼと、ＧａｌＮＡｃを該ＩＬ－２ペプチドに付加するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２９１に記載の方法。

【請求項２９４】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）からの生成物を該修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項２９１に記載の方法。
【請求項２９５】
さらに：
（ｅ）工程（ａ）の前に、上記ＩＬ－２ペプチドをＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼおよびＧａｌＮＡｃ供与体と、ＧａｌＮＡｃを該ＩＬ－２ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２９１に記載の方法。
【請求項２９６】
さらに：
（ｆ）工程（ａ）の前に、上記ＩＬ－２ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを該ＩＬ－２ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項２９１に記載の方法。
【請求項２９７】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項２９１に記載の方法。
【請求項２９８】
ａおよびｅが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｂ、ｃおよびｄが０である、
請求項２９１に記載の方法。
【請求項２９９】
ａ、ｂ、ｃ、ｄおよびｅが０である、
請求項２９１に記載の方法。
【請求項３００】
請求項２９１に記載の方法により形成されたＩＬ－２ペプチド結合物。
【請求項３０１】
第ＶＩＩＩ因子ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該糖ペプチドに共有結合し、該糖ペプチドが：
【化２７】



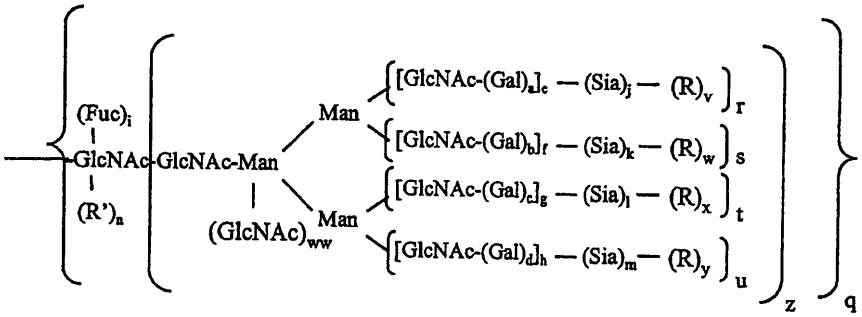
および



式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ａａ、ｃｃおよびｄｄは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の間の整数から独立して選択される員であり；

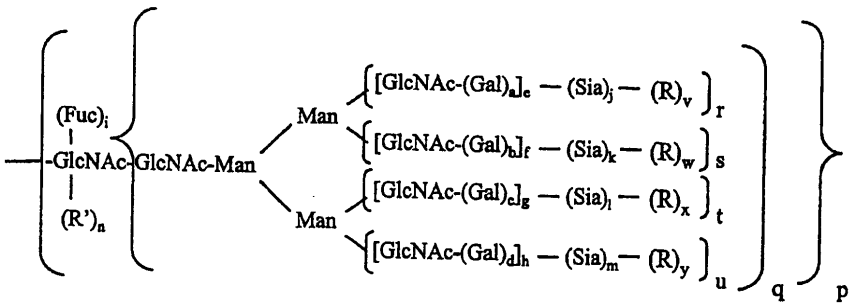
ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚは０であり；そして
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；
Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基および複合糖質から選択される員である、
から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該糖ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項３０２】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをシアリダーゼと、該糖ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３０１に記載の方法。
【請求項３０３】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３０１に記載の方法。
【請求項３０４】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３０１に記載の方法。
【請求項３０５】
さらに：
（ｅ）工程（ａ）からの生成物を上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項３０１に記載の方法。
【請求項３０６】
さらに：
（ｆ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３０１に記載の方法。
【請求項３０７】
さらに：
（ｇ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをエンドグリカナーゼと、該糖ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３０１に記載の方法。
【請求項３０８】
さらに：
（ｈ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を上記生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３０１に記載の方法。
【請求項３０９】
さらに：
（ｉ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをマンノシダーゼと、該糖ペプチドからマンノースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３０１に記載の方法。
【請求項３１０】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択さ

れる員である、請求項３０１に記載の方法。
【請求項３１１】
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から４の間の整数から独立して選択される員であり；
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ａａおよびｃｃが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびがｄｄが０である、
請求項３０１に記載の方法。
【請求項３１２】
請求項３０１に記載の方法により形成された第ＶＩＩＩペプチド結合物。
【請求項３１３】
腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）アルファ受容体／ＩｇＧ融合ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該糖ペプチドに共有結合し、該糖ペプチドが式：
【化２８】



式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｗ、ｗｗおよびｚは０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の間の整数から独立して選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｘおよびｙは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基および複合糖質から選択される員である、
を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該糖ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項３１４】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３１３に記載の方法。
【請求項３１５】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをエンドグリカナーゼと、該糖ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３１３に記載の方法。
【請求項３１６】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項３１３に記載の方法。
【請求項３１７】

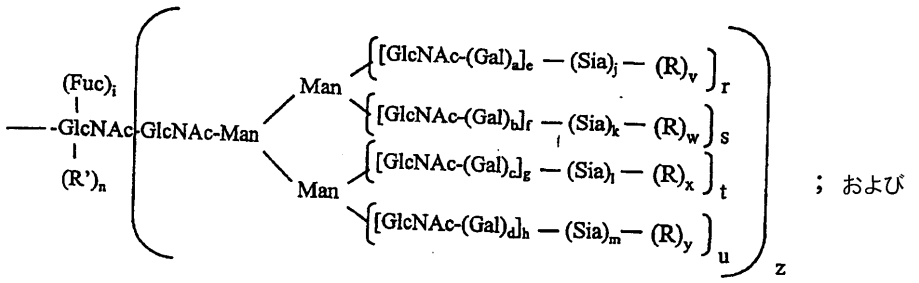
ａ、ｃ、ｉ、ｊおよびｌが０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｇ、ｑ、ｒ、ｔおよびｚが１であり；そして
ｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項３１３に記載の方法。
【請求項３１８】
ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｑおよびｚが１である、
請求項３１３に記載の方法。
【請求項３１９】
請求項３１３に記載の方法により形成されたＴＮＦアルファ受容体／ＩｇＧ融合結合物。
【請求項３２０】
ウロキナーゼペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該ウロキナーゼペプチドに共有結合し、該ウロキナーゼペプチドが式：
【化２９】



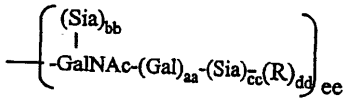
式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨ、グリコシル残基、複合糖質または修飾基である、
を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該ウロキナーゼペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項３２１】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記ウロキナーゼペプチドをシアリダーゼと、該ウロキナーゼペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３２０に記載の方法。
【請求項３２２】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項

３２０に記載の方法。
【請求項３２３】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記ウロキナーゼペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該ウロキナーゼペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３２０に記載の方法。
【請求項３２４】
さらに：
（ｅ）工程（ａ）の前に、上記ウロキナーゼペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる、請求項３２０に記載の方法。
【請求項３２５】
さらに：
（ｆ）工程（ａ）からの生成物を上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項３２０に記載の方法。
【請求項３２６】
さらに：
（ｇ）工程（ａ）の前に、上記ウロキナーゼペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該ウロキナーゼペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３２０に記載の方法。
【請求項３２７】
さらに：
（ｈ）工程（ａ）の前に、上記ウロキナーゼペプチドをエンドグリカナーゼと、該ウロキナーゼペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３２０に記載の方法。
【請求項３２８】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項３２０に記載の方法。
【請求項３２９】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；
ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｐが１である、
請求項３２０に記載の方法。
【請求項３３０】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｐが１である、
請求項３２０に記載の方法。
【請求項３３１】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが、０および１から独立して選択される員であり；そして
ｐが１である、
請求項３２０に記載の方法。
【請求項３３２】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ

およびｙが０であり；
ｉが０または１であり；そして
ｑおよびｐが１である、
請求項３２０に記載の方法。
【請求項３３３】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが０、１、２、３および４からから独立して選択され；そして
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項３２０に記載の方法。
【請求項３３４】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｑが１であり；そして
ｎが０または１である、
請求項３２０に記載の方法。
【請求項３３５】
請求項３２０に記載の方法により形成されたウロキナーゼペプチド結合物。
【請求項３３６】
抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａモノクローナル抗体ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該糖ペプチドに共有結合し、該糖ペプチドが：
【化３０】



；および



式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｚ、ａａ、ｂｂ、ｃｃおよびｅｅは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の整数から独立して選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基および複合糖質から選択される員である、
から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該糖ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項３３７】
さらに：

（ｂ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをシアリダーゼと、該糖ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３３６に記載の方法。

【請求項３３８】

さらに：

（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３３６に記載の方法。

【請求項３３９】

さらに：

（ｄ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドを合成的に作用するガラクトシダーゼと、ガラクトシダーゼを該糖ペプチドに付加するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３３６に記載の方法。

【請求項３４０】

さらに：

（ｅ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３３６に記載の方法。

【請求項３４１】

さらに：

（ｆ）工程（ａ）からの生成物を、ＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３４０に記載の方法。

【請求項３４２】

さらに：

（ｇ）工程（ａ）からの生成物を上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項３３６に記載の方法。

【請求項３４３】

さらに：

（ｈ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３３６に記載の方法。

【請求項３４４】

さらに：

（ｉ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをエンドグリカナーゼと、該糖ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３３６に記載の方法。

【請求項３４５】

上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項３３６に記載の方法。

【請求項３４６】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；

ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして

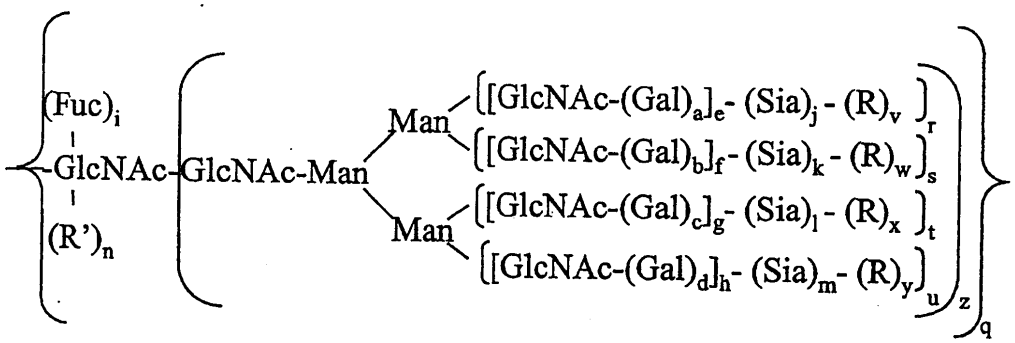
ｚが１である、

請求項３３６に記載の方法。

【請求項３４７】

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；

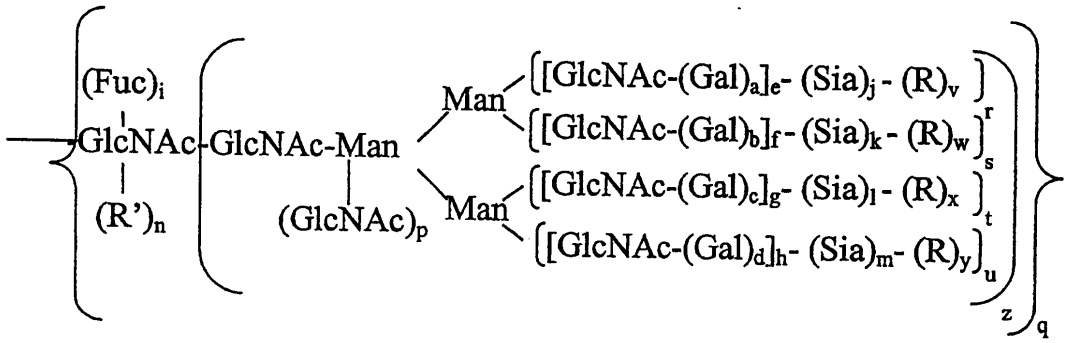
ｉおよびｒが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｚが１である、
請求項３３６に記載の方法。
【請求項３４８】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｎが０であり；
ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｚが１である、
請求項３３６に記載の方法。
【請求項３４９】
ａａ、ｂｂ、ｃｃおよびｅｅが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｄｄが０である、
請求項３３６に記載の方法。
【請求項３５０】
ａａおよびｅｅが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｂｂ、ｃｃおよびｄｄが０である、
請求項３３６に記載の方法。
【請求項３５１】
ａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｅｅが０である、
請求項３３６に記載の方法。
【請求項３５２】
請求項３３６に記載の方法により形成された抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａモノクローナル抗体ペプチド結合物。
【請求項３５３】
キメラ抗ＨＥＲ２抗体ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該キメラ抗ＨＥＲ２抗体ペプチドに共有結合し、該キメラ抗ＨＥＲ２抗体ペプチドが式：
【化３１】



式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびｚは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の間の整数から独立して選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
ｍは０～２０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’は水素およびグリコシル残基および修飾基から選択される員である、
を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該キメラ抗ＨＥＲ２抗体ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する

条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項３５４】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記キメラ抗ＨＥＲ２抗体ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該キメラ抗ＨＥＲ２抗体ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３５３に記載の方法。
【請求項３５５】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）の前に、上記キメラ抗ＨＥＲ２抗体ペプチドをエンドグリカナーゼと、該キメラ抗ＨＥＲ２抗体ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３５３に記載の方法。
【請求項３５６】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項３５３に記載の方法。
【請求項３５７】
ａ、ｃおよびｉが、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｇ、ｒおよびｔが１であり；
ｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｑおよびｚが１である、
請求項３５３に記載の方法。
【請求項３５８】
ｉが０または１であり；
ｑおよびｚが１であり；そして
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項３５３に記載の方法。
【請求項３５９】
ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｑおよびｚが１である、
請求項３５３に記載の方法。
【請求項３６０】
請求項３５３に記載の方法により形成された抗ＨＥＲ２抗体ペプチド結合物。
【請求項３６１】
抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドに共有結合し、該抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドが式：

【化３２】



式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびｚは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の整数から独立して選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨおよびグリコシル残基、複合糖質および修飾基から選択される員である、
を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項３６２】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３６１に記載の方法。

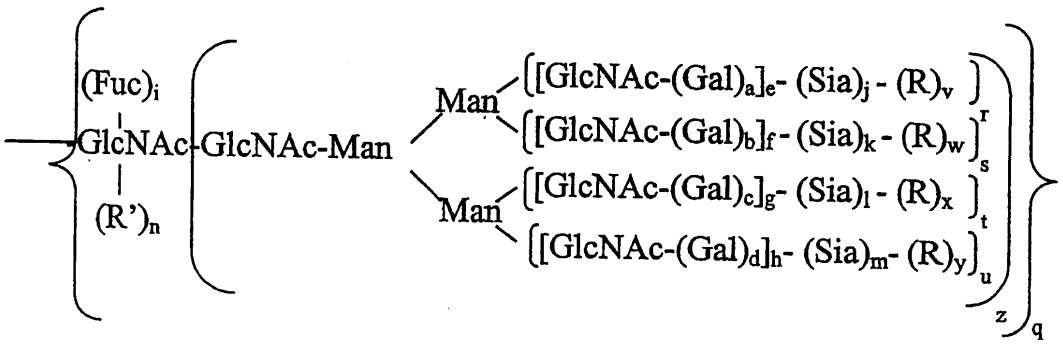
【請求項３６３】
さらに：
（ｃ）工程（ｂ）の前に、上記抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドをエンドグリカナーゼと、該抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３６２に記載の方法。

【請求項３６４】
ａ、ｃ、ｅ、ｇおよびｉが、０および１から独立して選択される員であり；
ｒおよびｔが１であり；
ｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｚが１である、
請求項３６１に記載の方法。

【請求項３６５】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙが０であり；
ｉおよびｐが０および１から独立して選択され；
ｑおよびｚが１であり；そして
ｎが０である、
請求項３６１に記載の方法。

【請求項３６６】
ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であ

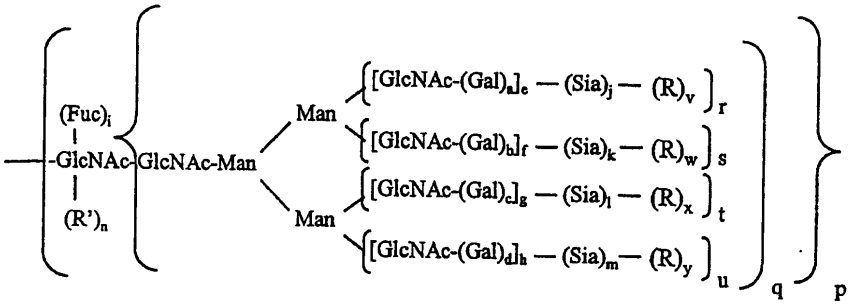
り；そして
ｑおよびｚが１である、
請求項３６１に記載の方法。
【請求項３６７】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項３６１に記載の方法。
【請求項３６８】
請求項３６１に記載の方法により形成された抗ＲＳＶ　Ｆペプチド結合物。
【請求項３６９】
抗－ＣＤ２０抗体ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該抗－ＣＤ２０抗体ペプチドに共有結合し、該抗－ＣＤ２０抗体ペプチドが式：
【化３３】



式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびｚは、０および１から独立して選択される整数であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の整数から独立して選択され；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨ、グリコシル残基、複合糖質または修飾基から選択される員である、
を含んでなるグリコシルサブユニットを有し、かつ、
（ａ）該抗－ＣＤ２０抗体ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項３７０】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記抗－ＣＤ２０抗体ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトシル供与体と、該ガラクトシル供与体を該抗－ＣＤ２０抗体ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３６９に記載の方法。
【請求項３７１】
さらに：
（ｃ）工程（ｂ）の前に、上記抗－ＣＤ２０抗体ペプチドをエンドグリカナーゼと、該抗－ＣＤ２０抗体ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３７０に記載の方法。
【請求項３７２】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記抗－ＣＤ２０抗体ペプチドをマンノシダーゼと、該抗－Ｃ

Ｄ２０抗体ペプチドからマンノースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３７１に記載の方法。
【請求項３７３】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項３６９に記載の方法。
【請求項３７４】
上記グリコシルトランスフェラーゼがガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして上記の修飾されたグリコシル供与体が修飾されたガラクトシル供与体である、請求項３６９に記載の方法。
【請求項３７５】
ａ、ｃ、ｅ、ｇおよびｉが、０および１から独立して選択される員であり；
ｒ、ｔ、ｑおよびｚが１であり；そして
ｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項３６９に記載の方法。
【請求項３７６】
ａ、ｃ、ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが、０および１から独立して選択される員であり；
ｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙが０であり；そして
ｚが１である、
請求項３６９に記載の方法。
【請求項３７７】
ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｚが１である、
請求項３６９に記載の方法。
【請求項３７８】
ｉが０または１であり；
ｑおよびｚが１であり；そして
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項３６９に記載の方法。
【請求項３７９】
ｅ、ｇ、ｉ、ｒ、ｔ、ｖ、ｘおよびｚが０および１から独立して選択される員であり；
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｗおよびｙが０であり；そして
ｚが１である、
請求項３６９に記載の方法。
【請求項３８０】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｎおよびｑが１であり；そして
ｉが０または１である、
請求項３６９に記載の方法。
【請求項３８１】
請求項３６９に記載の方法により形成された抗－ＣＤ２０抗体ペプチド結合物。
【請求項３８２】
組換えＤＮａｓｅペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該組換えＤＮａｓｅペプチドに共有結合し、該組換えＤＮａｓｅペプチドが式：

【化３４】



式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択され；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；そして

Ｒはポリマー、複合糖質、マンノース、オリゴマンノースおよび修飾基から選択される員である、

を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、

（ａ）該組換えＤＮａｓｅペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項３８３】

さらに：

（ｂ）工程（ａ）の前に、上記組換えＤＮａｓｅペプチドをシアリダーゼと、該組換えＤＮａｓｅペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３８２に記載の方法。

【請求項３８４】

さらに：

（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３８２に記載の方法。

【請求項３８５】

さらに：

（ｄ）工程（ａ）の前に、上記組換えＤＮａｓｅペプチドを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該組換えＤＮａｓｅペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３８２に記載の方法。

【請求項３８６】

さらに：

（ｅ）工程（ａ）の前に、上記組換えＤＮａｓｅペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる、請求項３８２に記載の方法。

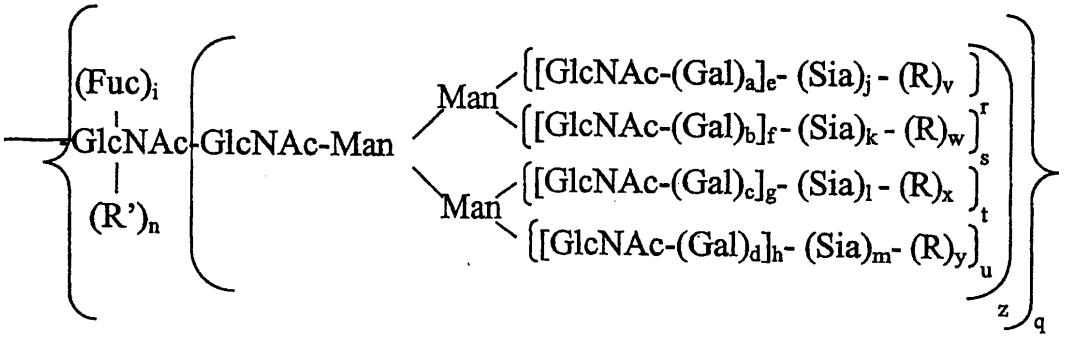
【請求項３８７】

（ｆ）工程（ａ）からの生成物を上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項３８２に記載の方法。

【請求項３８８】

さらに：
（ｇ）工程（ａ）の前に、上記組換えＤＮａｓｅペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該組換えＤＮａｓｅペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３８２に記載の方法。
【請求項３８９】
さらに：
（ｈ）工程（ａ）の前に、上記組換えＤＮａｓｅペプチドをエンドグリカナーゼと、該組換えＤＮａｓｅペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３８２に記載の方法。
【請求項３９０】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｐが１であり；そして
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項３８２に記載の方法。
【請求項３９１】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；
ｐが１であり；そして
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である、
請求項３８２に記載の方法。
【請求項３９２】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｐが１である、
請求項３８２に記載の方法。
【請求項３９３】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｉが０または１であり；そして
ｐが１である、
請求項３８２に記載の方法。
【請求項３９４】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌおよびｍが０であり；
ｉ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；
ｐが１であり：そして
Ｒがマンノースまたはオリゴマンノースである、
請求項３８２に記載の方法。
【請求項３９５】
請求項３８２に記載の方法により形成された組換えＤＮａｓｅペプチド結合物。
【請求項３９６】
抗－腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）アルファペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該抗ＴＮＦアルファペプチドに共有結合し、該抗－ＴＮＦアルファペプチドが式：

【化３５】



式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびｚは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の間の整数から独立して選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；そして
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；
Ｒ’は複合糖質または修飾基である、
を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該抗－ＴＮＦアルファペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項３９７】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記抗－ＴＮＦアルファペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該抗－ＴＮＦアルファペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３９６に記載の方法。

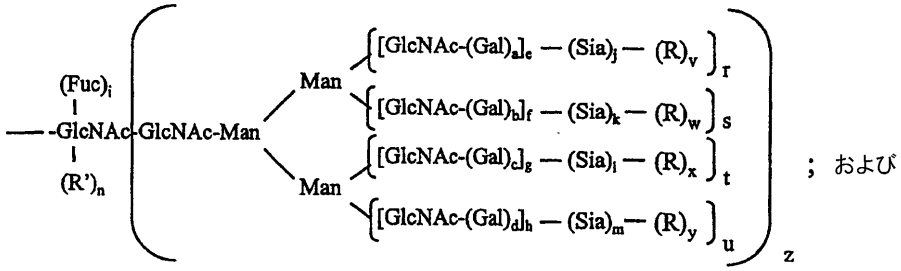
【請求項３９８】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）の前に、上記抗－ＴＮＦアルファペプチドをエンドグリカナーゼと、該抗－ＴＮＦアルファペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項３９６に記載の方法。

【請求項３９９】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項３９６に記載の方法。

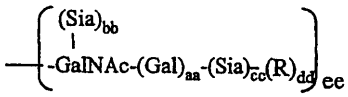
【請求項４００】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；
ｎが１であり；そして
ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である、
請求項３９６に記載の方法。

【請求項４０１】
ａ、ｃ、ｅ、ｇおよびｉが、０および１から独立して選択される員であり；
ｒおよびｔが１であり；
ｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙ；そして
ｑおよびｚが１である、

請求項３９６に記載の方法。
【請求項４０２】
請求項３９６に記載の方法により形成された抗－ＴＮＦアルファペプチド結合物。
【請求項４０３】
インスリンペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該糖ペプチドに共有結合し、該糖ペプチドが：
【化３６】



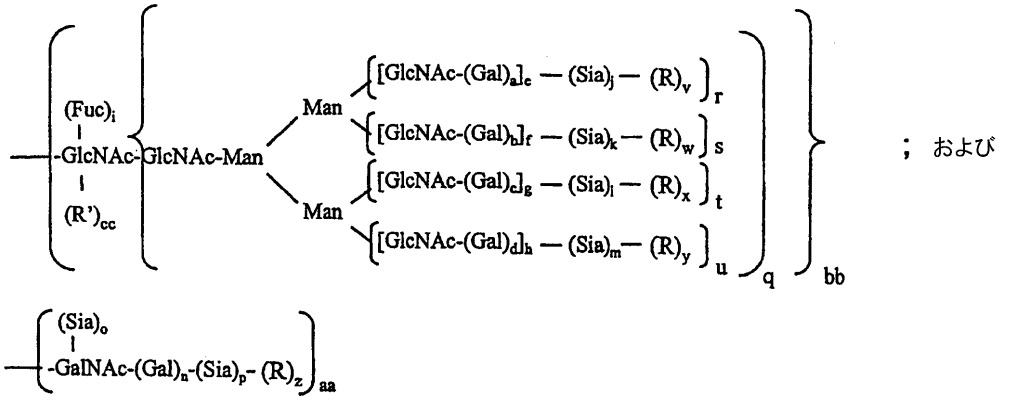
；および



式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｚ、ａａ、ｂｂ、ｃｃおよびｅｅは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の間の整数から独立して選択される員であり；
ｄｄ、ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基および複合糖質から選択される員である、
から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該糖ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項４０４】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをシアリダーゼと、該糖ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４０３に記載の方法。
【請求項４０５】
（ｃ）工程（ａ）の生成物を、シアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４０３に記載の方法。
【請求項４０６】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記糖プチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４０３に記載の方法。
【請求項４０７】
さらに：
（ｅ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをエンド－Ｈと、該糖ペプチドからグリコシル

部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４０３に記載の方法。
【請求項４０８】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である、請求項４０３に記載の方法。
【請求項４０９】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｚが１である、
請求項４０３に記載の方法。
【請求項４１０】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｉおよびｒが、０および１から独立して選択される員であり；そして
ｚが１である、
請求項４０３に記載の方法。
【請求項４１１】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｎが０であり；
ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；
ｚが１である、
請求項４０３に記載の方法。
【請求項４１２】
ａａ、ｂｂ、ｃｃおよびｅｅが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｄｄが０である、
請求項４０３に記載の方法。
【請求項４１３】
ａａおよびｅｅが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｂｂ、ｃｃおよびｄｄが０である、
請求項４０３に記載の方法。
【請求項４１４】
ａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｅｅが０である、
請求項４０３に記載の方法。
【請求項４１５】
請求項４０３に記載の方法により形成されたインスリンペプチド結合物。
【請求項４１６】
Ｂ型肝炎表面抗原（ＨｂｓＡｇ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該ＨＢｓＡｇペプチドに共有結合し、該ＨＢｓＡｇペプチドが：

【化３７】



ここで、

ａａ、ｂｂ、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；

ｏ、ｐ、ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；

ｃｃ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨ、またはグリコシル残基、複合糖質、または修飾基である、

から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、

（ａ）該ＨＢｓＡｇペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項４１７】

さらに：

（ｂ）工程（ａ）の前に、上記ＨＢｓＡｇペプチドをシアリダーゼと、該ＨＢｓＡｇペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４１６に記載の方法。

【請求項４１８】

さらに：

（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４１６に記載の方法。

【請求項４１９】

さらに：

（ｄ）工程（ａ）の前に、上記ＨＢｓＡｇペプチドをガラクトシダーゼと、該ＨＢｓＡｇペプチドからグリコシル残基を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４１６に記載の方法。

【請求項４２０】

（ｅ）工程（ａ）の前に、上記ＨＢｓＡｇペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該ＨＢｓＡｇペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４１６に記載の方法。

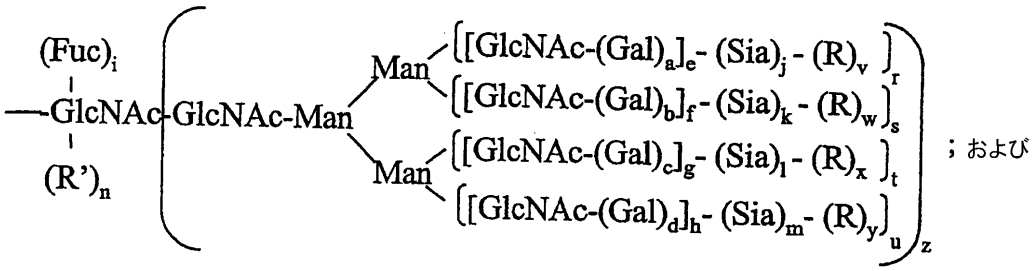
【請求項４２１】

さらに：

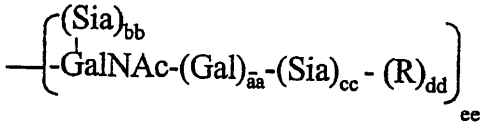
（ｆ）工程（ｄ）の生成物を、ＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を該生

成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項８８に記載の方法。
【請求項４２２】
（ｇ）工程（ａ）からの生成物を上記修飾基に反応する部分と接触させ、これにより上記の完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる、請求項４１６に記載の方法。
【請求項４２３】
さらに：
（ｈ）工程（ａ）の前に、上記ＨＢｓＡｇペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該ＨＢｓＡｇペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４１６に記載の方法。
【請求項４２４】
さらに：
（ｉ）工程（ａ）の前に、上記ＨＢｓＡｇペプチドをマンノシダーゼと、該ＨＢｓＡｇペプチドからマンノースを開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４１６に記載の方法。
【請求項４２５】
さらに：
（ｊ）工程（ａ）の前に、上記ＨＢｓＡｇペプチドをエンドグリカナーゼと、該ＨＢｓＡｇペプチドからグリコシル基を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項１に記載の方法。
【請求項４２６】
上記修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分、アジュバントおよび複合糖質から選択される員である、請求項４１６に記載の方法。
【請求項４２７】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびａａが、０および１から独立して選択される員であり；
ｂｂ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｎが１であり；そして
ｃｃ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である、
請求項４１６に記載の方法。
【請求項４２８】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびａａが、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈが０、１、２、３または４から独立して選択され；
ｃｃ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そして
ｂｂが１である、
請求項４１６に記載の方法。
【請求項４２９】
ｃｃ、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そして
ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびａａが、０および１から独立して選択される員であり；そして
ｂｂが１である、
請求項４１６に記載の方法。
【請求項４３０】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびａａが、０および１から独立して選択される員であり；
ｂｂ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｎが１であり；そして
ｎ、ｐ、ｃｃ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である、
請求項４１６に記載の方法。

【請求項４３１】
ｂｂ、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０および１から独立して選択される員であり；
ｃｃが１であり；そして
ｎが０または１である、
請求項４１６に記載の方法。
【請求項４３２】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｃｃが０であり；
ｂｂが１であり；
ｅ、ｇ、ｉ、ｎ、ｑ、ｒ、ｔおよびａａが０および１から独立して選択される員である、
請求項４１６に記載の方法。
【請求項４３３】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｚおよびｃｃが０であり；
ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびａａが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｂｂが１である、
請求項４１６に記載の方法。
【請求項４３４】
請求項４１６に記載の方法により形成されたＨＢｓＡｇペプチド結合物。
【請求項４３５】
ヒト成長ホルモン（ＨＧＨ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、該修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該糖ペプチドに共有結合し、該糖ペプチドが：
【化３８】



；および



ここで、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｚ、ａａ、ｂｂ、ｃｃおよびｅｅは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の間の整数から独立して選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基および複合糖質から選択される員である、
から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなり、かつ、
（ａ）該糖ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該

グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる、上記方法。
【請求項４３６】
さらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをシアリダーゼと、該糖ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４３５に記載の方法。
【請求項４３７】
さらに：
（ｃ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをエンドグリカナーゼと、該糖ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４３５に記載の方法。
【請求項４３８】
（ｃ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、該ガラクトースを該糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４３５に記載の方法。
【請求項４３９】
（ｄ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を該生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４３５に記載の方法。
【請求項４４０】
さらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記糖ペプチドをガラクトシダーゼと、該糖ペプチドからグリコシル残基を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる、請求項４３５に記載の方法。
【請求項４４１】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そして
ｚが１である、
請求項４３５に記載の方法。
【請求項４４２】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；
ｉおよびｒが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｚが１である、
請求項４３５に記載の方法。
【請求項４４３】
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｎが０であり；
ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｚが１である、
請求項４３５に記載の方法。
【請求項４４４】
ａａおよびｅｅが０および１から独立して選択される員であり；そして
ｂｂ、ｃｃおよびｄｄが０である、
請求項４３５に記載の方法。
【請求項４４５】
ａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｅｅが０である、

請求項４３５に記載の方法。
【請求項４４６】
ａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄ、ｅｅおよびｎが０である、
請求項４３５に記載の方法。
【請求項４４７】
請求項４３５に記載の方法により形成されたＨＧＨペプチド結合物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ペプチドの改造および複合糖質化に関する。
【背景技術】
【０００２】
天然に存在するほとんどのペプチドは、主ペプチド鎖長に沿って選択された数のアミノ酸へ特異的な連結を介してペプチドに結合している炭水化物部分を含む。このように多くの天然に存在するペプチドは「糖ペプチド（ｇｌｙｃｏｐｅｐｔｉｄｅ）」と呼ばれている。任意の上記ペプチドに関するグリコシル化パターンの可変性は、そのペプチドの機能について膨大な意味を有する。例えばペプチド上のＮ－結合グリカン構造は、細胞または生物中のペプチドのプロテアーゼ感受性、細胞内トラフィッキング、分泌、組織ターゲッティング、生物学的半減期および抗原性を含むペプチドの様々な特性に影響を及ぼすことができる。これら１以上の特性の改変は、ペプチドの天然な状況でその効力に大きく影響し、そしてまたペプチドが治療薬の目的に生成された状況では、治療薬としてのペプチドの効力にも影響する。
【０００３】
ペプチド鎖に結合した炭水化物の構造は、「グリカン（ｇｌｙｃａｎ）」分子として知られている。ペプチド上の特別なグリカン構造はペプチドの可溶性および凝集特性、１次ペプチド鎖のホールディング、したがってその機能的または酵素的活性、タンパク質分解的攻撃に対するペプチドの耐性およびペプチドの不活性形から活性形への転換を導くタンパク質分解の制御に影響を及ぼす。重要なことはグリカン分子上に存在する末端シアル酸残基が哺乳動物の循環系でペプチドの半減期の長さに影響することである。グリカンが末端シアル酸残基を含まないペプチドは肝臓により循環から急速に除去され、この出来事がペプチドの潜在的な治療的利益を無効にする。
【０００４】
天然に存在する糖ペプチドに見いだされるグリカン構造は典型的には２種類、Ｎ－結合およびＯ－結合グリカンに分けられる。
【０００５】
真核細胞で発現されるペプチドは、典型的には配列アスパラギン－Ｘ－セリン／トレオニン（ここでＸはプロリンおよびアスパラギン酸以外の任意のアミノ酸であることができる）を含むペプチドの１次構造中の部位のアスパラギン残基上でＮ－グリコシル化されている。そのようなペプチドの炭水化物部分はＮ－結合グリカンとして知られている。Ｎ－グリコシル化の初期の反応（ｅｖｅｎｔ）は小胞体（ＥＲ）中で起こり、そして哺乳類、植物、昆虫および他の高等真核生物で同一である。最初に１４個の糖残基を含んでなるオリゴ糖が脂質担体分子上に構築される。新生ペプチドはＥＲへ翻訳およびトランスロケーションされるので、全オリゴ糖鎖は膜結合グリコシルトランスフェラーゼ酵素により触媒される反応でアスパラギン残基のアミド基に転移する。Ｎ－結合グリカンはさらにＥＲおよびゴルジ装置内の両方でプロセッシングされる。さらなるプロセッシングは一般に除去および付加される糖残基について特異的なグリコシラーゼおよびグリコシルトランスフェラーゼにより触媒される反応で、幾つかの糖残基の除去および他の糖残基の付加を伴う。
【０００６】
典型的にはＮ－結合グリカンの最終的構造はペプチドが生産される生物に依存する。例えば一般に、細菌中で生産されるペプチドは完全に非グリコシル化である。昆虫細胞中で

発現されるペプチドは中でも高マンノース、ポンチ（ｐａｕｎｃｉ）－マンノースＮ－結合オリゴ糖鎖を含む。哺乳動物の細胞培養で生産されるペプチドは通常、例えば種および細胞培養条件に依存して様々にグリコシル化される。同じ種および同じ条件下でも、時々、グリコシル鎖における特定量の異質性に遭遇する。さらに植物細胞中で生産されるペプチドは、動物細胞中で生産されるものとは有意に異なるグリカン構造を含んでなる。組換えペプチドの生産分野、特にペプチドが治療薬として使用される時のジレンマは、正しくグリコシル化されたペプチドを生成できることであり、すなわち天然に存在するペプチドの形態上に存在するものに似ているか、または同一のグリカン構造を有するペプチドを生成できることである。組換え手段により生産されるほとんどのペプチドが、天然に存在するグリカンとは異なるグリカン構造を含んでなる。

【０００７】

当該技術分野において様々な方法がペプチドのグリコシル化パターンをカスタマイズするために提案され、それらにはとりわけ特許文献１、特許文献２、特許文献３および特許文献４を含む。本質的にはペプチドのインビトログリコシル化に必要な多くの酵素がクローン化され、そして配列決定された。中にはこれらの酵素がインビトロで使用され、そして特異的な糖がペプチド上の不完全なグリカン分子に加えられた場合もある。他の例では、発現したペプチド上へ所望の糖部分の付加が細胞内で起こるように、細胞を遺伝的に操作して酵素および所望のペプチドの組み合わせを発現させた。

【０００８】

ペプチドはＯ－結合グリカンの付加によっても修飾することができ、これはそれらのムチン様糖ペプチド上での広がり（ｐｒｅｖａｌｅｎｃｅ）によりムチン－型グリカンとも呼ばれている。アスパラギン残基に結合し、そして脂質－結合中間体からのオリゴ糖のｅｎ　ｂｌｏｃ転移により形成されるＮ－グリカンとは異なり、Ｏ－グリカンは主にセリンおよびトレオニン残基に結合し、そしてヌクレオチド糖から糖の段階的付加により形成される（非特許文献１；および非特許文献２）。ペプチドの機能はそれに存在するＯ－結合グリカン構造により影響され得る。例えばＰ－セレクチンリガンドの活性は、それに存在するＯ－結合グリカン構造により影響を受ける。Ｏ－結合グリカン構造の総説については、非特許文献３を参照にされたい。他のグリコシル化パターンはグリコシルホスファチジルイノシトールをタンパク質のカルボキシル－末端カルボキシル基に連結することにより形成される（非特許文献４；および非特許文献５）。

【０００９】

現在、ペプチドのＮ－結合グリカンを修飾するために様々な技術が存在するが、当該技術分野には所望する、すなわちカスタマイズされたグリコシル化パターンを有するペプチドの一般的に応用できる生産法の必要性が存在する。当該技術分野では生成するペプチドを工業的規模で生産することができる、ペプチドのカスタマイズされたインビトログリコシル化について特別な必要性が存在する。この、および他の必要性が本発明により満たされる。

【００１０】

特定の生理学的応答を生じるためにグリコシル化および非－グリコシル化ペプチドを投与することは医学分野では周知である。中でもこの目的に使用されている最も知られているペプチドは、糖尿病を処置するために使用されているインスリンである。酵素もそれらの治療的利益のために使用されてきた。治療用ペプチドの使用を制限する主な要因は、ほとんどのペプチドの免疫原性である。患者では投与されたペプチドに対する免疫原性応答がペプチドを中和し、かつ／または患者にアレルギー応答の発生を導き得る。治療用ペプチドの他の欠点には最適状態には及ばない効力および急速な排除速度（ｃｌｅａｒａｎｃｅ　ｒａｔｅ）を含む。ペプチド治療薬に固有の問題が当該技術分野では認識されており、そしてこの問題の様々な排除法が調査された。可溶性ペプチド治療薬を提供するために、合成ポリマーがペプチド骨格に付けられた。

【００１１】

ポリ（エチレングリコール）（“ＰＥＧ”）はペプチドに結合されたポリマーの１例で

ある。ペプチド治療薬を誘導化するためのＰＥＧの使用はペプチドの免疫原性を下げ、そして循環からの排除時間を長くすることが示された。例えば特許文献５（Ｄａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．）は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはポリプロピレングリコールにカップリングした酵素およびペプチドホルモンのような非－免疫原性ペプチドに関する。１モルのペプチドあたり１０から１００モルの間のポリマーが使用され、そして少なくとも１５％の生理学的活性が維持される。

【００１２】

特許文献６（Ｖｅｒｏｎｅｓｅ　ｅｔ　ａｌ．）は、ポリエチレングリコール－修飾化タンパク質分解酵素の活性を、タンパク質分解酵素を高分子化インヒビターに連結することにより維持する方法に関する。結合物は医学的応用を意図している。

【００１３】

ペプチドへのＰＥＧ結合の主な様式およびその誘導体は、ペプチドのアミノ酸残基を介する非特異的結合である。例えば特許文献７は、ＰＥＧに共有結合した酵素の酵素的に活性なポリマー－酵素結合物を開示する。同様に特許文献８は、α－１プロテアーゼインヒビターと、ＰＥＧまたはメトキシポリ（エチレングリコール）（“ｍＰＥＧ”）のようなポリマーの共有結合複合体を開示する。Ａｂｕｃｈｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，（非特許文献６）は、ｍＰＥＧのウシ血清アルブミンのアミン基への共有結合を開示する。特許文献９はインターフェロンをポリ（エチレン無水琥珀酸）のようなジカルボン酸の無水物に結合することにより、インターフェロンをより低い疎水性にする方法を開示する。特許文献１０はＰＥＧおよびポリ（オキシエチル化）ポリオールの、インターフェロン－β、インターロイキン－２およびイムノトキシンのようなタンパク質への結合を開示する。特許文献１１は、リンホカインの少なくとも１つの１級アミノ基に直接結合したＰＥＧを含有するＩＬ－２のような化学的に修飾したリンホカインを開示し、そして特許請求する。特許文献１２は、多糖のようなポリマー性基質に共有結合したタンパク質分解酵素の水溶性複合体の製薬学的組成物を開示する。

【００１４】

ＰＥＧをペプチドに結合する別の様式は、ペプチド上のグリコシル残基の非－特異的な酸化を介する。酸化された糖はＰＥＧ部分をペプチドに結合させるための部位として利用する。例えばＭ’Ｔｉｍｋｕｌｕ（特許文献１３）は、ＰＥＧを糖タンパク質へ付加するためにヒドラジン－またはアミノ－ＰＥＧの使用を開示する。グリコシル部分は対応するアルデヒドに無作為に酸化され、これは続いてアミノ－ＰＥＧにカップリングされる。

【００１５】

上記に開示した各方法では、ポリ（エチレングリコール）が無作為な非特異的様式でペプチド骨格の反応性残基に付加される。治療用ペプチドを生産するために、特異的に標識され、容易に特性決定可能な、本質的に均一な生成物をもたらす誘導化法を利用することが望ましいのは明らかである。

【００１６】

主要な２種類の酵素、グリコシルトランスフェラーゼ（例えばシアリルトランスフェラーゼ、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ）およびグリコシダーゼが炭水化物の合成に使用されている。グリコシダーゼはさらにエキソグリコシダーゼ（例えばβ－マンノシダーゼ、β－グルコシダーゼ）およびエンドグリコシダーゼ（例えばエンド－Ａ、エンド－Ｍ）に分類される。これらの種類の各酵素は、炭水化物を調製するために成功裏に合成的に使用されてきた。一般的な総説については、非特許文献７を参照にされたい。

【００１７】

グリコシルトランスフェラーゼはペプチド上のオリゴ糖構造を修飾する。グリコシルトランスフェラーゼは良好な立体化学的および位置化学的制御で特異的生成物を生産するために効果的である。グリコシルトランスフェラーゼはオリゴ糖を調製し、そして末端Ｎ－およびＯ－結合炭水化物構造、特に哺乳動物細胞で生産されたペプチドを修飾するために使用されてきた。例えば糖ペプチドの末端オリゴ糖は完全にシアル化および／またはフコ

シル化されてより一貫した糖構造を提供し、これは糖ペプチドの薬物動態学および種々の他の生物学的特性を改善する。例えばβ－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼを使用してラクトサミンを合成し、これは炭水化物の合成におけるグリコシルトランスフェラーゼの用途の具体例である（例えば非特許文献８を参照にされたい）。さらに多くの合成手順がシチジン－５’－モノホスホ－Ｎ－アセチルノイラミン酸からシアル酸をガラクトースの３－ＯＨまたは６－ＯＨへ転移するために、α－シアリルトランスフェラーゼを使用した（非特許文献９を参照にされたい）。フコシルトランスフェラーゼはグアノシン－５’－ジホスホフコースからフコース単位をサッカリド受容体の特異的なヒドロキシルへ転移させるための合計経路で使用される。例えばＩｃｈｉｋａｗａは、クローン化されたフコシルトランスフェラーゼを用いてシアリル化ラクトサミンのフコシル化が関与する方法により、シアリルルイス－Ｘを調製した（非特許文献１０）。治療的使用について複合糖質合成における最近の進歩についての考察は、非特許文献１１を参照にされたい。また特許文献１４；１５；１６；１７；および１８も参照にされたい。

【００１８】

グリコシダーゼはまた、サッカリドを調製するためにも使用することができる。グリコシダーゼは通常はグリコシド結合の加水分解を触媒する。しかし適切な条件下でそれらはこの結合を形成するために使用することができる。炭水化物合成に使用するほとんどのグリコシダーゼはエキソグリコシダーゼであり；グリコシル転移は基質の非－還元末端で起こる。グリコシダーゼはグリコシル－酵素中間体中のグリコシル供与体に結合し、これは水に遮断されて加水分解産物を生じるか、または受容体により遮断されて新たなグリコシドまたはオリゴ糖を生じるいずれかである。エキソグリコシダーゼを使用した経路の例は、β－マンノシダーゼの作用により形成されるβ－マンノシド結合を含むすべてのＮ－結合糖ペプチドのコア（ｃｏｒｅ）となる三糖の合成である（非特許文献１２）。

【００１９】

グリコシド結合を形成するためのグリコシダーゼの使用の別の応用例では、突然変異グリコシダーゼが調製され、ここで活性部位内の標準的な求核性アミノ酸が非求核性アミノ酸に変えられる。突然変異酵素はグリコシド結合を加水分解しないが、それらを形成することはできる。そのような突然変異グリコシダーゼは、α－グリコシルフルオリド供与体およびグリコシド受容体分子を使用してオリゴ糖を調製するために使用される（Ｗｉｔｈｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，特許文献１９）。

【００２０】

エンドグリコシダーゼの使用はエキソグリコシダーゼよりも一般的ではないが、エンドグリコシダーゼも炭水化物を調製するために使用されている。エンドグリコシダーゼの使用に基づく方法は、単糖よりもオリゴ糖を転移する利点を有する。オリゴ糖フラグメントは、エンド－Ｆ、エンド－Ｍのようなエンド－β－Ｎ－アセチルグルコサミンを使用して基質に加えられた（非特許文献１３；および非特許文献１４）。

【００２１】

上記酵素の炭水化物の調製における使用に加えて、それらは糖ペプチドの合成にも応用される。リボヌクレアーゼＢの均一なグリコフォーム（ｇｌｙｃｏｆｏｒｍ）の合成が報告された（非特許文献１５）。リボヌクレアーゼＢの高いマンノースコア（ｃｏｒｅ）は、糖ペプチドをエンドグリコシダーゼＨで処理することにより開裂された。この開裂は２つのコアＧｌｃＮＡｃ残基間で特異的に起こる。次に四糖のシアリルルイスＸが、β－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ、α－２，３－シアリルトランスフェラーゼおよびα－１，３－フコシルトランスフェラーゼＶの順次使用により、今、均一なタンパク質に残るＧｌｃＮＡｃアンカー部位で酵素的に再構築された。しかし各々の酵素的に触媒される工程は優れた収量で進行するものの、そのような手順は工業的規模での糖ペプチドの生成に適合しなかった。

【００２２】

化学的および酵素的合成要素を組み合わせる方法が当該技術分野では知られている。例えばＹａｍａｍｏｔｏおよび共同研究者（非特許文献１６）は、エンドグリコシダーゼを

使用した糖ペプチド、グリコシル化ペプチドＴの化学酵素的合成を報告した。Ｎ－アセチルグルコサミニルペプチドは純粋に化学的な手段で合成された。このペプチドは続いてヒトトランスフェリンペプチドのオリゴ糖を用いて酵素的に仕上げられた（ｅｌａｂｏｒａｔｅｄ）。サッカリド部分はエンド－β－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼで処理することによりペプチドに付加された。生成したグリコシル化ペプチドは、ペプチドＴおよびＮ－アセチルグルコサミニルペプチドＴと比べた時、高度に安定であり、しかもタンパク質分解に耐性であった。

【００２３】

レポーター基を用いてペプチド構造を修飾するために、グリコシルトランスフェラーゼの使用が調査された。例えばＢｒｏｓｓｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（特許文献２０）は、シアル酸の蛍光－標識シチジンモノリン酸（“ＣＭＰ”）誘導体の形成、およびシアリルトランスフェラーゼ活性のアッセイ、および細胞表面、糖タンパク質およびペプチドの蛍光－標識のアッセイに蛍光グリコシドの使用を開示する。Ｇｒｏｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，（非特許文献１７）は、同様のアッセイを記載する。Ｂｅａｎ　ｅｔ　ａｌ．，（特許文献２１）は、不十分に（ｄｅｆｉｃｉｅｎｔｌｙ）グリコシル化されたタンパク質の再グリコシル化を利用した、グリコシル化欠損疾患のためのアッセイを開示する。欠損タンパク質は蛍光－標識ＣＭＰグリコシドにより再グリコシル化される。各蛍光シアル酸誘導体は、９－位またはシアル酸内で通常はアセチル化されているアミンのいずれかで蛍光部分に置き換えられる。蛍光シアル酸誘導体を使用するこの方法は、グリコシルトランスフェラーゼの存在または非－グリコシル化またはグリコシル化されていないまたは不適切にグリコシル化された糖タンパク質に関するアッセイである。このアッセイは生物起源のサンプル中の少量の酵素または糖タンパク質について行われる。修飾したシアル酸を使用して調製用または工業的規模でグリコシル化または非－グリコシル化ペプチドを酵素的に誘導化することは、従来技術では開示も示唆もされなかった。

【００２４】

細胞表面を、それらの表面に提示されるグリコシル残基を改変させることにより修飾することに対してかなりの努力が向けられた。例えばＦｕｋｕｄａおよび共同研究者は、定めた構造のグリコシドを細胞表面に結合する方法を開発した。この方法は、多様なグリコシル基質を有する、フコースおよびフコース類似体を転移することができるフコシルトランスフェラーゼの弛緩した基質特異性を活用する（非特許文献１８）。

【００２５】

酵素的方法は続いて化学的合成（ｃｈｅｍｉｃａｌ　ｅｌａｂｏｒａｔｉｏｎ）に向けて、糖ペプチド上のグリコシル残基を活性化するためにも使用されてきた。グリコシル残基は典型的には、末端のガラクトース残基を対応するアルデヒドに転換するガラクトースオキシダーゼを使用して活性化される。アルデヒドは続いてアミンを含む修飾基にカップリングされる。例えばＣａｓａｒｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，（非特許文献１９）は、ドキソルビシンを組換えＭＨＣＩＩ－ペプチドキメラの酸化されたガラクトース残基に結合させた。

【００２６】

グリコシル残基はケトン基を含むようにも修飾された。例えばＭａｈａｌおよび共同研究者（非特許文献２０）は、天然な基質ではアセチル基により通常は占められている位置にケトン官能基を有するＮ－レブリノイルマンノサミン（“ＭａｎＬｅｖ”）を調製した。細胞はＭａｎＬｅｖで処理され、これによりケトン基を細胞表面に包含した。また非特許文献２１；非特許文献２２；非特許文献２３；および非特許文献２４も参照にされたい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００２７】

【特許文献１】国際公開第９９／２２７６４号パンフレット
【特許文献２】国際公開第９８／５８９６４号パンフレット

【特許文献３】国際公開第９９／５４３４２号パンフレット
【特許文献４】米国特許第５，０４７，３３５号明細書
【特許文献５】米国特許第４，１７９，３３７号明細書
【特許文献６】国際公開第９３／１５１８９号パンフレット
【特許文献７】米国特許第４，０８８，５３８号明細書
【特許文献８】米国特許第４，４９６，６８９号明細書
【特許文献９】米国特許第４，４１４，１４７号明細書
【特許文献１０】国際公開第８７／０００５６号パンフレット
【特許文献１１】欧州特許第１５４，３１６号明細書
【特許文献１２】米国特許第４，０５５，６３５号明細書
【特許文献１３】国際公開第９４／０５３３２号パンフレット
【特許文献１４】米国特許第５，８７６，９８０号明細書
【特許文献１５】米国特許第６，０３０，８１５号明細書
【特許文献１６】米国特許第５，７２８，５５４号明細書
【特許文献１７】米国特許第５，９２２，５７７号明細書
【特許文献１８】国際公開第９８／３１８２６号パンフレット
【特許文献１９】米国特許第５，７１６，８１２号明細書
【特許文献２０】米国特許第５，４０５，７５３号明細書
【特許文献２１】米国特許第５，４３２，０５９号明細書
【非特許文献】
【００２８】
【非特許文献１】Ｔａｎｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．９０６：８１－９１（１９８７）
【非特許文献２】Ｈｏｕｎｓｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊ．Ｊ．１３：１９－２６（１９９６）
【非特許文献３】Ｓｃｈａｃｈｔｅｒ　ａｎｄ　Ｂｒｏｃｋｈａｕｓｅｎ、分岐Ｏ－結合グリカンの生合成（Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｏｆ　Ｂｒａｎｃｈｅｄ　Ｏ－Ｌｉｎｋｅｄ　Ｇｌｙｃａｎｓ）、１９８９、実験生物学学会（Ｓｏｃｉｅｔｙ　ｆｏｒ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ）、第１～２６頁（英国）
【非特許文献４】Ｔａｋｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．２０：３６７－３７１（１９９５）
【非特許文献５】Ｕｄｅｎｆｒｉｅｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６４：５９３－５９１（１９９５）
【非特許文献６】Ａｂｕｃｈｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５２：３５７８（１９７７）
【非特許文献７】Ｃｒｏｕｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２：９８－１１１（１９９８）
【非特許文献８】Ｗｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．４７：５４１６－５４１８（１９８２）
【非特許文献９】Ｋｅｖｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｅｕｒ．Ｊ．２：１３５９－１３６２（１９９６）
【非特許文献１０】Ｉｃｈｉｋａｗａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１４：９２８３－９２９８（１９９２）
【非特許文献１１】Ｋｏｅｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１８：８３５－８４１（２０００）
【非特許文献１２】Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．９９３－９９４（１９９６）
【非特許文献１３】Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．３７：１９７５－１９７８
【非特許文献１４】Ｈａｎｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ．Ｒｅｓ．２９２

：６１－７０（１９９６）
【非特許文献１５】Ｗｉｔｔｅ Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１９：２１１４－２１１８（１９９７）
【非特許文献１６】Ｙａｍａｍｏｔｏ ａｎｄ ｃｏｗｏｒｋｅｒ，Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ．Ｒｅｓ．３０５：４１５－４２２（１９９８）
【非特許文献１７】Ｇｒｏｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌｙｔ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１８６：１２７（１９９０）
【非特許文献１８】Ｔｓｕｂｏｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：２７２１３（１９９６）
【非特許文献１９】Ｃａｓａｒｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１９：１４２（２００１）
【非特許文献２０】Ｍａｈａｌ ａｎｄ ｃｏ－ｗｏｒｋｅｒｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ２７６：１１２５（１９９７）
【非特許文献２１】Ｓａｘｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ２８７：２００７（２０００）
【非特許文献２２】Ｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２３：１２４２（２００１）
【非特許文献２３】Ｙａｒｅｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３：３１１６８（１９９８）
【非特許文献２４】Ｃｈａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １０：１０４９（２０００）

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００２９】
細胞表面の修飾法は、グリコシル化または非グリコシル化ペプチドを修飾するために細胞の不存在下では適用されなかった。さらに細胞表面の修飾法は、修飾されたグリコシル供与体部分をペプチドへ移す酵素的包含には利用されていない。さらにいずれの細胞表面修飾法も、工業的規模でグリコシル－修飾ペプチドを生産するために現実的ではない。
【課題を解決するための手段】
【００３０】
サッカリド構造の酵素的合成（ｅｎｚｙｍａｔｉｃ ｅｌａｂｏｒａｔｉｏｎ）に向けられた努力にもかかわらず、水溶性ポリマー、治療部分、生体分子等のような修飾基を用いて、グリコシル化および非グリコシル化ペプチドを修飾するための工業的に現実的な方法の必要性がいまだに存在する。特に興味深いのは、修飾ペプチドが治療薬または診断薬としての使用を強化する改善された特性を有する方法である。本発明はこれらの、および他の必要性を満たす。
【００３１】
発明の要約
本発明はペプチドに結合した特別なグルカン構造を有するペプチドの多数の改造方法を含む。特別なグリカン構造を本明細書に記載するが、本発明は任意の１つの特定のグリカン構造に限定されると解釈されるべきではない。加えて本明細書には特別なペプチドを記載するが、本発明は記載するペプチドの性質に限定されるべきではなく、むしろ任意のすべての適当なペプチドおよびその変形物を包含するべきである。
【００３２】
本発明を具体的に説明する目的で、本発明の特定な態様を描く図面がある。しかし本発明は図面に表す態様のまさにその組み合わせ方および手段に限定されない。
【図面の簡単な説明】
【００３３】
【図１Ａ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。

【図１Ｂ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｃ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｄ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｅ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｆ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｇ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｈ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｉ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｊ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｋ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｌ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｍ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｎ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｏ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｐ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｑ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｒ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｓ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｔ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｕ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｖ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｗ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｘ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｙ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１Ｚ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。

【図１ＡＡ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１ＢＢ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図１ＣＣ】図１Ａから図１Ｚおよび図１ＡＡから図１ＣＣから成る図１は、本発明の方法に有用なペプチドの一覧である。
【図２】図２は、トリマンノシルコア（ｃｏｒｅ）グリカン（左側）およびバイセクティングＧｌｃＮＡｃを有するグリカンの酵素的生成法を表すスキームである。
【図３】図３は、基本的なトリマンノシルコア構造および種々の完成度の複雑な鎖を表すスキームである。バイセクティングＧｌｃＮＡｃ残基を含まない複雑な炭水化物グリカン構造から基本的なトリマンノシルコア構造のインビトロの酵素的生成は、バイセクティングＧｌｃＮＡｃを含むものからのグリカン構造の生成のように示す。記号：四角：ＧｌｃＮＡｃ；明るい丸：Ｍｎ；暗い丸：Ｇａｌ；三角：ＮｅｕＡｃ。
【図４】図４は、トリマンノシルコアおよびバイセクティングＧｌｃＮＡｃを有するグリカン（左側）から始まるシアリル化グリカン構造（右側）の酵素的生成のスキームである。
【図５】図５は、典型的な高マンノース含有グリカン（左側）および基本的なトリマンノシルコア構造に対するこの構造の酵素的減少法のスキームである。
【図６】図６は、典型的には植物細胞で生産されるＮ－結合グリカン構造を含むフコースおよびキシロースの図解である。
【図７】図７は、典型的には昆虫細胞で生産されるＮ－結合グリカン構造を含むフコースの図解である。
【図８】図８は、高マンノース構造を改作し、そしてそれから複雑な糖鎖を合成するための種々の経路を表すスキームである。記号：四角：ＧｌｃＮＡｃ；丸：Ｍａｎ；菱形：フコース；五角形：キシロース。
【図９】図９は、基本的なトリマンノシルコア構造から複雑な構造を合成するためのインビトロ法を表すスキームである。記号：暗い四角：ＧｌｃＮＡｃ；明るい丸：Ｍａｎ；暗い丸：Ｇａｌ；暗い三角：ＮｅｕＡｃ；ＧｎＴ：Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ；ＧａｌＴ：ガラクトシルトランスフェラーゼ；ＳＴ：シアリルトランスフェラーゼ。
【図１０】図１０は、基本的なトリマンノシルコア構造から合成することができる種々の複雑な構造を表すスキームである。記号：暗い四角：ＧｌｃＮＡｃ；明るい丸：Ｍａｎ；暗い丸：Ｇａｌ；暗い三角：ＮｅｕＡｃ；暗い菱形：フコース；ＦＴおよびＦｕｃＴ：フコシルトランスフェラーゼ；ＧａｌＴ：ガラクトシルトランスフェラーゼ；ＳＴ：シアリルトランスフェラーゼ；Ｌｅ：ルイス抗原；ＳＬｅ：シアリル化ルイス抗原。
【図１１】図１１は、セリンまたはトレオニンから始まるＯ－結合糖ペプチドの調製スキームの例である。
【図１２】図１２は、コア１から４と名付けられた４つの型のＯ－グリカン構造を表す一連の図解である。コア構造は点線で輪郭を描く。
【図１３Ａ】図１３Ａおよび図１３Ｂからなる図１３は、炭水化物残基が第１世代の２アンテナ（ｂｉａｎｔｅｎｎａｒｙ）構造に戻るように改作された複雑な炭水化物構造および／または高マンノース高マンノース構造を含んでなる、本発明の例示態様を示す一連スキームである。水溶性ポリマー（ＷＳＰ）を持つ修飾糖を、次に戻し改作法（ｔｒｉｍｍｉｎｇ　ｂａｃｋ　ｐｒｏｃｅｓｓ）により暴露した１以上の糖残基に結合させる。
【図１３Ｂ】図１３Ａおよび図１３Ｂからなる図１３は、炭水化物残基が第１世代の２アンテナ（ｂｉａｎｔｅｎｎａｒｙ）構造に戻るように改作された複雑な炭水化物構造および／または高マンノース高マンノース構造を含んでなる、本発明の例示態様を示す一連スキームである。水溶性ポリマー（ＷＳＰ）を持つ修飾糖を、次に戻し改作法（ｔｒｉｍｍｉｎｇ　ｂａｃｋ　ｐｒｏｃｅｓｓ）により暴露した１以上の糖残基に結合させる。
【図１４】図１４は図２に示すスキームと同様であり、ここで高マンノース構造がマンノ

ースに「戻し改作」され、次にこれから２アンテナ構造枝および水溶性ポリマーを持つ修飾糖を次に戻し改作法に暴露された１以上の糖残基に結合させる。
【図１５】図１５は図２に示すスキームと同様であり、ここで高マンノースがＧｌｃＮＡｃに戻し改作され、これに第１マンノースが結合し、そして次に水溶性ポリマーを持つ修飾糖を、戻し改作法により暴露した１以上の糖残基に結合する。
【図１６】図１６は図２に示すスキームと同様であり、ここで高マンノースがペプチドのＡｓｎに結合した第１ＧｌｃＮＡｃに戻し改作され、この後に続いて付加された１以上の糖残基に水溶性ポリマーを結合する。
【図１７Ａ】図１７Ａおよび１７Ｂからなる図１７は、Ｎ－結合炭水化物が戻し改作され、そして続いて水溶性ポリマーを持つ修飾糖部分（ＧｌｃＮＡｃ）で誘導化されるスキームである。
【図１７Ｂ】図１７Ａおよび１７Ｂからなる図１７は、Ｎ－結合炭水化物が戻し改作され、そして続いて水溶性ポリマーを持つ修飾糖部分（ＧｌｃＮＡｃ）で誘導化されるスキームである。
【図１８Ａ】図１８Ａおよび１８Ｂからなる図１８は、Ｎ－結合炭水化物が戻し改作され、そして続いて水溶性ポリマーを持つシアル酸部分で誘導化されるスキームである。
【図１８Ｂ】図１８Ａおよび１８Ｂからなる図１８は、Ｎ－結合炭水化物が戻し改作され、そして続いて水溶性ポリマーを持つシアル酸部分で誘導化されるスキームである。
【図１９】図１９は、Ｎ－結合炭水化物が戻し改作され、そして続いて１以上のシアル酸部分で誘導化され、そして水溶性ポリマーで誘導化されたシアル酸で終結するスキームである。
【図２０】図２０は、Ｏ－結合サッカリドが「戻し改作」され、そして続いて水溶性ポリマーを持つ修飾糖に結合させる。例示のスキームでは、炭水化物部分が２アンテナ構造の第１世代に「戻し改作」される。
【図２１】図２１は、Ｏ－結合糖ペプチドの炭水化物部分を戻し改作して、炭水化物部分に結合した水溶性ポリマーを有する修飾糖との結合物に利用することができるマンノースを生産するための例示スキームである。
【図２２Ａ】図２２Ａから図２２Ｃからなる図２２は、一連の例示スキームである。図２２ＡはＰＥＧ化糖の付加、続いて非－修飾糖の付加を説明するスキームである。図２２Ｂは１種類より多くの修飾糖を１つのグリカンへ付加することを説明するスキームである。図２２Ｃは異なる修飾糖のＯ－結合グリカンおよびＮ－結合グリカンへの付加を具体的に説明するスキームである。
【図２２Ｂ】図２２Ａから図２２Ｃからなる図２２は、一連の例示スキームである。図２２ＡはＰＥＧ化糖の付加、続いて非－修飾糖の付加を説明するスキームである。図２２Ｂは１種類より多くの修飾糖を１つのグリカンへ付加することを説明するスキームである。図２２Ｃは異なる修飾糖のＯ－結合グリカンおよびＮ－結合グリカンへの付加を具体的に説明するスキームである。
【図２２Ｃ】図２２Ａから図２２Ｃからなる図２２は、一連の例示スキームである。図２２ＡはＰＥＧ化糖の付加、続いて非－修飾糖の付加を説明するスキームである。図２２Ｂは１種類より多くの修飾糖を１つのグリカンへ付加することを説明するスキームである。図２２Ｃは異なる修飾糖のＯ－結合グリカンおよびＮ－結合グリカンへの付加を具体的に説明するスキームである。
【図２３】図２３は結合を含むグリカン改造によるペプチドの治療的機能の種々の改善法の図解である。
【図２４】図２４はゴーシェ病を処置するための治療用ペプチドのグリカン改造に関する１組のスキームである。
【図２５】図２５は末端－マンノース－６－ホスフェート部分を有するグリカンを生成するためのグリカン改造に関するスキームである。
【図２６】図２６はシアリル化後のＣＨＯ－生産グルコセレブロシダーゼ（Ｃｅｒｅｚｙｍｅ（商標））に見いだされるグリカン構造の配列を具体的に説明する図解である。

【図２７Ａ】図２７Ａから２７Ｇからなる図２７は、顆粒球コロニージ刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）に関するグリカン構造を改造するための例示スキームを提供する。図２７Ａは、グリカンが結合するアミノ酸残基を示すＧ－ＣＳＦペプチド、およびそれに結合した例示グリカンの式を表す図解である。図２７Ｂから２７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２７Ｂ】図２７Ａから２７Ｇからなる図２７は、顆粒球コロニージ刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）に関するグリカン構造を改造するための例示スキームを提供する。図２７Ａは、グリカンが結合するアミノ酸残基を示すＧ－ＣＳＦペプチド、およびそれに結合した例示グリカンの式を表す図解である。図２７Ｂから２７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２７Ｃ】図２７Ａから２７Ｇからなる図２７は、顆粒球コロニージ刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）に関するグリカン構造を改造するための例示スキームを提供する。図２７Ａは、グリカンが結合するアミノ酸残基を示すＧ－ＣＳＦペプチド、およびそれに結合した例示グリカンの式を表す図解である。図２７Ｂから２７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２７Ｄ】図２７Ａから２７Ｇからなる図２７は、顆粒球コロニージ刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）に関するグリカン構造を改造するための例示スキームを提供する。図２７Ａは、グリカンが結合するアミノ酸残基を示すＧ－ＣＳＦペプチド、およびそれに結合した例示グリカンの式を表す図解である。図２７Ｂから２７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２７Ｅ】図２７Ａから２７Ｇからなる図２７は、顆粒球コロニージ刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）に関するグリカン構造を改造するための例示スキームを提供する。図２７Ａは、グリカンが結合するアミノ酸残基を示すＧ－ＣＳＦペプチド、およびそれに結合した例示グリカンの式を表す図解である。図２７Ｂから２７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２７Ｆ】図２７Ａから２７Ｇからなる図２７は、顆粒球コロニージ刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）に関するグリカン構造を改造するための例示スキームを提供する。図２７Ａは、グリカンが結合するアミノ酸残基を示すＧ－ＣＳＦペプチド、およびそれに結合した例示グリカンの式を表す図解である。図２７Ｂから２７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２７Ｇ】図２７Ａから２７Ｇからなる図２７は、顆粒球コロニージ刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）に関するグリカン構造を改造するための例示スキームを提供する。図２７Ａは、グリカンが結合するアミノ酸残基を示すＧ－ＣＳＦペプチド、およびそれに結合した例示グリカンの式を表す図解である。図２７Ｂから２７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ａ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現され

る細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｂ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｃ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基

（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｄ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｅ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２

８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２８Ｆ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２８Ｇ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２８Ｈ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが

発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｉ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｊ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示す

インターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｋ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｌ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発

現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｍ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｎ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｏ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｐ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｑ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残

基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｒ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｓ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現され

る細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｔ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｕ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合

する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｖ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｗ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｘ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合する

アミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｙ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８Ｚ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現され

る細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８ＡＡ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８ＢＢ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残

基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８ＣＣ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２８ＤＤ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図

２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２８ＥＥ】図２８Ａから２８ＡＡからなる図２８は、インターフェロン－アルファのグリカン構造を改造するための例示的スキームを説明する。図２８Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｂから２８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｅはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム１４ｃペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｆから２８Ｎは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｏはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－アルファ　アイソフォーム２ａまたは２ｂペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｐから２８Ｗは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｏ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８Ｘは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチド、およびそれに結する例示グリカンの式を表す図解である。図２８Ｙから２８ＡＡは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８Ｘ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２８ＢＢは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインターフェロン－アルファ　ムチン融合ペプチドおよびインターフェロン－アルファペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図２８ＣＣから２８ＥＥは、ペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２８ＢＢ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２９Ａ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２９Ｂ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２９Ｃ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカ

ンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２９Ｄ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２９Ｅ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２９Ｆ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２９Ｇ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２９Ｈ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図２９Ｉ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企

図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２９Ｊ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２９Ｋ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２９Ｌ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２９Ｍ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２９Ｎ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２９Ｏ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２９Ｐ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２９Ｑ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２９Ｒ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図２９Ｓ】図２９Ａから２９Ｓからなる図２９は、インターフェロン－ベータのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図２９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｂから２９Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図２９Ｐはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターフェロン－ベータペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図２９Ｑから２９Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図２９Ｐ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３０Ａ】図３０Ａから３０Ｄからなる図３０は、第ＶＩＩ因子および第ＶＩＩａ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す第ＶＩＩ因子および第ＶＩＩａ因子ペプチドＡ（実線）およびＢ（点線）、およびグリカンの式を表す図解である。図３０Ｂから３０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３０Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、お

よび望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３０Ｂ】図３０Ａから３０Ｄからなる図３０は、第ＶＩＩ因子および第ＶＩＩａ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す第ＶＩＩ因子および第ＶＩＩａ因子ペプチドＡ（実線）およびＢ（点線）、およびグリカンの式を表す図解である。図３０Ｂから３０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３０Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３０Ｃ】図３０Ａから３０Ｄからなる図３０は、第ＶＩＩ因子および第ＶＩＩａ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す第ＶＩＩ因子および第ＶＩＩａ因子ペプチドＡ（実線）およびＢ（点線）、およびグリカンの式を表す図解である。図３０Ｂから３０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３０Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３０Ｄ】図３０Ａから３０Ｄからなる図３０は、第ＶＩＩ因子および第ＶＩＩａ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す第ＶＩＩ因子および第ＶＩＩａ因子ペプチドＡ（実線）およびＢ（点線）、およびグリカンの式を表す図解である。図３０Ｂから３０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３０Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３１Ａ】図３１Ａから３１Ｇからなる図３１は、第ＩＸ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す第ＩＸ因子ペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３１Ｂから３１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３１Ｂ】図３１Ａから３１Ｇからなる図３１は、第ＩＸ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す第ＩＸ因子ペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３１Ｂから３１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３１Ｃ】図３１Ａから３１Ｇからなる図３１は、第ＩＸ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す第ＩＸ因子ペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３１Ｂから３１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３１Ｄ】図３１Ａから３１Ｇからなる図３１は、第ＩＸ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す第ＩＸ因子ペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３１Ｂから３１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３１Ｅ】図３１Ａから３１Ｇからなる図３１は、第ＩＸ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す第ＩＸ因子ペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３１Ｂから３１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３１Ｆ】図３１Ａから３１Ｇからなる図３１は、第ＩＸ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す第ＩＸ因子ペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３１Ｂから３１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３１Ｇ】図３１Ａから３１Ｇからなる図３１は、第ＩＸ因子のグリカン構造を改造す

るための例示スキームを説明する。図３１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す第ＩＸ因子ペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３１Ｂから３１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３２Ａ】図３２Ａから３２Ｊからなる図３２は、αおよびβサブユニットを含んでなる濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す濾胞刺激ホルモンペプチドＦＳＨαおよびＦＳＨβ、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３２Ｂから３２Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３２Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３２Ｂ】図３２Ａから３２Ｊからなる図３２は、αおよびβサブユニットを含んでなる濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す濾胞刺激ホルモンペプチドＦＳＨαおよびＦＳＨβ、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３２Ｂから３２Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３２Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３２Ｃ】図３２Ａから３２Ｊからなる図３２は、αおよびβサブユニットを含んでなる濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す濾胞刺激ホルモンペプチドＦＳＨαおよびＦＳＨβ、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３２Ｂから３２Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３２Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３２Ｄ】図３２Ａから３２Ｊからなる図３２は、αおよびβサブユニットを含んでなる濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す濾胞刺激ホルモンペプチドＦＳＨαおよびＦＳＨβ、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３２Ｂから３２Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３２Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３２Ｅ】図３２Ａから３２Ｊからなる図３２は、αおよびβサブユニットを含んでなる濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す濾胞刺激ホルモンペプチドＦＳＨαおよびＦＳＨβ、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３２Ｂから３２Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３２Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３２Ｆ】図３２Ａから３２Ｊからなる図３２は、αおよびβサブユニットを含んでなる濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す濾胞刺激ホルモンペプチドＦＳＨαおよびＦＳＨβ、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３２Ｂから３２Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３２Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３２Ｇ】図３２Ａから３２Ｊからなる図３２は、αおよびβサブユニットを含んでなる濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す濾胞刺激ホルモンペプチドＦＳＨαおよびＦＳＨβ、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３２Ｂから３２Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３２Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３２Ｈ】図３２Ａから３２Ｊからなる図３２は、αおよびβサブユニットを含んでなる濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す濾胞刺激ホルモンペプチドＦＳＨαおよびＦＳＨβ、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３

２Ｂから３２Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３２Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３２Ｉ】図３２Ａから３２Ｊからなる図３２は、αおよびβサブユニットを含んでなる濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す濾胞刺激ホルモンペプチドＦＳＨαおよびＦＳＨβ、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３２Ｂから３２Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３２Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３２Ｊ】図３２Ａから３２Ｊからなる図３２は、αおよびβサブユニットを含んでなる濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す濾胞刺激ホルモンペプチドＦＳＨαおよびＦＳＨβ、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３２Ｂから３２Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３２Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３３Ａ】図３３Ａから３３Ｊからなる図３３は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３３Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＥＰＯペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３３Ｂから３３Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３３Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３３Ｂ】図３３Ａから３３Ｊからなる図３３は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３３Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＥＰＯペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３３Ｂから３３Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３３Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３３Ｃ】図３３Ａから３３Ｊからなる図３３は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３３Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＥＰＯペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３３Ｂから３３Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３３Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３３Ｄ】図３３Ａから３３Ｊからなる図３３は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３３Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＥＰＯペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３３Ｂから３３Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３３Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３３Ｅ】図３３Ａから３３Ｊからなる図３３は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３３Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＥＰＯペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３３Ｂから３３Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３３Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３３Ｆ】図３３Ａから３３Ｊからなる図３３は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３３Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＥＰＯペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３３Ｂから３３Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３３Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３３Ｇ】図３３Ａから３３Ｊからなる図３３は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３３Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＥＰＯペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３３Ｂから３３Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３３Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３３Ｈ】図３３Ａから３３Ｊからなる図３３は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）のグリ

カン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３３Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＥＰＯペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３３Ｂから３３Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３３Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３３Ｉ】図３３Ａから３３Ｊからなる図３３は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３３Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＥＰＯペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３３Ｂから３３Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３３Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３３Ｊ】図３３Ａから３３Ｊからなる図３３は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３３Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＥＰＯペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３３Ｂから３３Ｊはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３３Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３４Ａ】図３４Ａから３４Ｋからなる図３４は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｂから３４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｉから３４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３４Ｂ】図３４Ａから３４Ｋからなる図３４は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｂから３４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｉから３４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３４Ｃ】図３４Ａから３４Ｋからなる図３４は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｂから３４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｉから３４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３４Ｄ】図３４Ａから３４Ｋからなる図３４は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｂから３４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｉから３４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３４Ｅ】図３４Ａから３４Ｋからなる図３４は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｂから３４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｉから３４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３４Ｆ】図３４Ａから３４Ｋからなる図３４は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｂから３４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｉから３４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３４Ｇ】図３４Ａから３４Ｋからなる図３４は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｂから３４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｉから３４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３４Ｈ】図３４Ａから３４Ｋからなる図３４は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｂから３４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｉから３４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３４Ｉ】図３４Ａから３４Ｋからなる図３４は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｂから３４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｉから３４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３４Ｊ】図３４Ａから３４Ｋからなる図３４は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｂから３４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン

構造の図解である。図３４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｉから３４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３４Ｋ】図３４Ａから３４Ｋからなる図３４は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｂから３４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＧＭ－ＣＳＦペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３４Ｉから３４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３４Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ａ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｂ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｃ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｄ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｅ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカ

ン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｆ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｇ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｈ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｉ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｊ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガ

ンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｋ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｌ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｍ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３５Ｎ】図３５Ａから３５Ｎからなる図３５は、インターフェロン－ガンマのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｂから３５Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３５Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すインターフェロン－ガンマペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３５Ｉから３５Ｎはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３５Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ａ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α_1－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に

基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｂ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α$_1$－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｃ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α$_1$－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｄ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α$_1$－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｅ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α$_1$－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改

造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｆ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α_1－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｇ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α_1－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｈ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α_1－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｉ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α_1－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解で

ある。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｊ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α_1－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｋ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α_1－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｌ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α_1－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｍ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α_1－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、

および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｎ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α_1－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３６Ｏ】図３６Ａから３６Ｏからなる図３６は、α_1－アンチトリプシン（ＡＴＴ、またはα－１プロテアーゼインヒビター）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示ＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｂから３６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｉから３６Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３６Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＡＴＴペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３６Ｍから３６Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３６Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３７Ａ】図３７Ａから３７Ｋからなる図３７は、グルコセレブロシダーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３７Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｂから３７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３７Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｉから３７Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３７Ｂ】図３７Ａから３７Ｋからなる図３７は、グルコセレブロシダーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３７Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｂから３７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３７Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｉ

から３７Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３７Ｃ】図３７Ａから３７Ｋからなる図３７は、グルコセレブロシダーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３７Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｂから３７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３７Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｉから３７Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３７Ｄ】図３７Ａから３７Ｋからなる図３７は、グルコセレブロシダーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３７Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｂから３７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３７Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｉから３７Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３７Ｅ】図３７Ａから３７Ｋからなる図３７は、グルコセレブロシダーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３７Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｂから３７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３７Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｉから３７Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３７Ｆ】図３７Ａから３７Ｋからなる図３７は、グルコセレブロシダーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３７Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｂから３７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３７Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｉから３７Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３７Ｇ】図３７Ａから３７Ｋからなる図３７は、グルコセレブロシダーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３７Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｂから３７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３７Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｉから３７Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３７Ｈ】図３７Ａから３７Ｋからなる図３７は、グルコセレブロシダーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３７Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカン

の式を表す図解である。図３７Ｂから３７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３７Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｉから３７Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３７Ｉ】図３７Ａから３７Ｋからなる図３７は、グルコセレブロシダーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３７Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｂから３７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３７Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｉから３７Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３７Ｊ】図３７Ａから３７Ｋからなる図３７は、グルコセレブロシダーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３７Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｂから３７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３７Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｉから３７Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３７Ｋ】図３７Ａから３７Ｋからなる図３７は、グルコセレブロシダーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３７Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｂから３７Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３７Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すグルコセレブロシダーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３７Ｉから３７Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３７Ｈ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ａ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、およ

び望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３８Ｂ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３８Ｃ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図３８Ｄ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現さ

れる細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｅ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｆ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｇ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、および

グリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｈ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｉ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｊ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈ

は改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｋ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｌ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｍ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベータ

ー（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｎ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｏ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突

然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｐ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｑ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｒ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の

図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｓ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｔ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｕ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図す

る図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｖ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３８Ｗ】図３８Ａから３８Ｗからなる図３８は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｂから３８Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｉから３８Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｌは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｍから３８Ｏはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｌ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｐは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｑから３８Ｓはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｐ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図３８Ｔは改造を企図するグリカンに結合する残基を示す突然変異ＴＰＡペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図３８Ｕから３８Ｗはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３８Ｔ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３９Ａ】図３９Ａから３９Ｇからなる図３９は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターロイキン－２ペプチド、およびそれに結合する例示グリカ

ンの式を表す図解である。図３９Ｂから３９Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３９Ｂ】図３９Ａから３９Ｇからなる図３９は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターロイキン－２ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３９Ｂから３９Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３９Ｃ】図３９Ａから３９Ｇからなる図３９は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターロイキン－２ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３９Ｂから３９Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３９Ｄ】図３９Ａから３９Ｇからなる図３９は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターロイキン－２ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３９Ｂから３９Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３９Ｅ】図３９Ａから３９Ｇからなる図３９は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターロイキン－２ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３９Ｂから３９Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３９Ｆ】図３９Ａから３９Ｇからなる図３９は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターロイキン－２ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３９Ｂから３９Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図３９Ｇ】図３９Ａから３９Ｇからなる図３９は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図３９Ａはグリカンが結合するアミノ酸残基を示すインターロイキン－２ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図３９Ｂから３９Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図３９Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ａ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドの Ｎ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドの Ｎ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｂ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドの Ｎ－結合グリコ

シル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｃ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｄ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｅ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｆ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｇ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細

胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｈ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｉ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｊ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｋ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｌ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４０Ｍ】図４０Ａから４０Ｎからなる図４０は、第ＶＩＩＩ因子のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４０Ａは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式で

ある。図４０Ｂから４０Ｆはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４０Ｇは第ＶＩＩＩペプチドのＮ－結合グリコシル化部位（ＡおよびＡ’）およびＯ－結合部位（Ｂ）に結合するグリカンに関する式である。図４０Ｈから４０Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４０Ｇ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４１Ａ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４１Ｂ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４１Ｃ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４１Ｄ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４１Ｅ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造

の図解である。
【図４１Ｆ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図４１Ｇ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図４１Ｈ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図４１Ｉ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図４１Ｊ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図４１Ｋ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中の

ペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４１Ｌ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４１Ｍ】図４１Ａから４１Ｍからなる図４１は、ウロキナーゼのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｂから４１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４１Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すウロキナーゼペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４１Ｉから４１Ｍはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４１Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４２Ａ】図４２Ａから４２Ｋからなる図４２は、ヒトＤＮａｓｅ（ｈＤＮａｓｅ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｂから４２Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４２Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｉから４２Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４２Ｂ】図４２Ａから４２Ｋからなる図４２は、ヒトＤＮａｓｅ（ｈＤＮａｓｅ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｂから４２Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４２Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｉから４２Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４２Ｃ】図４２Ａから４２Ｋからなる図４２は、ヒトＤＮａｓｅ（ｈＤＮａｓｅ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｂから４２Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４２Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｉから４２Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４２Ｄ】図４２Ａから４２Ｋからなる図４２は、ヒトＤＮａｓｅ（ｈＤＮａｓｅ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｂから４２Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４２Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｉから４２Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４２Ｅ】図４２Ａから４２Ｋからなる図４２は、ヒトＤＮａｓｅ（ｈＤＮａｓｅ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｂから４２Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４２Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｉから４２Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４２Ｆ】図４２Ａから４２Ｋからなる図４２は、ヒトＤＮａｓｅ（ｈＤＮａｓｅ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｂから４２Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４２Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｉから４２Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４２Ｇ】図４２Ａから４２Ｋからなる図４２は、ヒトＤＮａｓｅ（ｈＤＮａｓｅ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｂから４２Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４２Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｉから４２Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４２Ｈ】図４２Ａから４２Ｋからなる図４２は、ヒトＤＮａｓｅ（ｈＤＮａｓｅ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｂから４２Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４２Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｉから４２Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４２Ｉ】図４２Ａから４２Ｋからなる図４２は、ヒトＤＮａｓｅ（ｈＤＮａｓｅ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｂから４２Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解であ

る。図４２Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｉから４２Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４２Ｊ】図４２Ａから４２Ｋからなる図４２は、ヒトＤＮａｓｅ（ｈＤＮａｓｅ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｂから４２Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４２Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｉから４２Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４２Ｋ】図４２Ａから４２Ｋからなる図４２は、ヒトＤＮａｓｅ（ｈＤＮａｓｅ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４２Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｂから４２Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４２Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒトＤＮａｓｅペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４２Ｉから４２Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４２Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ａ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ｂ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ｃ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異

させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ｄ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ｅ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ｆ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ｇ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ｈ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ｉ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ｊ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される

細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ｋ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４３Ｌ】図４３Ａから４３Ｌからなる図４３は、インスリンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４３ＡはＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｂから４３Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｅは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチド、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４３Ｆから４３Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｅ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４３Ｉは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すインスリン－ムチン融合ペプチドおよびインスリンペプチド、およびグリカンの式を表す図解である。図４３Ｊから４３Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４３Ｉ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４４Ａ】図４４Ａから４４Ｋからなる図４４は、Ｂ型肝炎表面タンパク質のＭ抗原（ｐｒｅＳおよびＳ）（ＨｂｓＡｇ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｂから４４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｉから４４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４４Ｂ】図４４Ａから４４Ｋからなる図４４は、Ｂ型肝炎表面タンパク質のＭ抗原（ｐｒｅＳおよびＳ）（ＨｂｓＡｇ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｂから４４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｉから４４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４４Ｃ】図４４Ａから４４Ｋからなる図４４は、Ｂ型肝炎表面タンパク質のＭ抗原（ｐｒｅＳおよびＳ）（ＨｂｓＡｇ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｂから４４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に

基づき、企図する図４４Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｉから４４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４４Ｄ】図４４Ａから４４Ｋからなる図４４は、Ｂ型肝炎表面タンパク質のＭ抗原（ｐｒｅＳおよびＳ）（ＨｂｓＡｇ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｂから４４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｉから４４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４４Ｅ】図４４Ａから４４Ｋからなる図４４は、Ｂ型肝炎表面タンパク質のＭ抗原（ｐｒｅＳおよびＳ）（ＨｂｓＡｇ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｂから４４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｉから４４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４４Ｆ】図４４Ａから４４Ｋからなる図４４は、Ｂ型肝炎表面タンパク質のＭ抗原（ｐｒｅＳおよびＳ）（ＨｂｓＡｇ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｂから４４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｉから４４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４４Ｇ】図４４Ａから４４Ｋからなる図４４は、Ｂ型肝炎表面タンパク質のＭ抗原（ｐｒｅＳおよびＳ）（ＨｂｓＡｇ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｂから４４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｉから４４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４４Ｈ】図４４Ａから４４Ｋからなる図４４は、Ｂ型肝炎表面タンパク質のＭ抗原（ｐｒｅＳおよびＳ）（ＨｂｓＡｇ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｂから４４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｉから４４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４４Ｉ】図４４Ａから４４Ｋからなる図４４は、Ｂ型肝炎表面タンパク質のＭ抗原（ｐｒｅＳおよびＳ）（ＨｂｓＡｇ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｂから４４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｉから４４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４４Ｊ】図４４Ａから４４Ｋからなる図４４は、Ｂ型肝炎表面タンパク質のＭ抗原（ｐｒｅＳおよびＳ）（ＨｂｓＡｇ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｂから４４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｉから４４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４４Ｋ】図４４Ａから４４Ｋからなる図４４は、Ｂ型肝炎表面タンパク質のＭ抗原（ｐｒｅＳおよびＳ）（ＨｂｓＡｇ）のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４４Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｂから４４Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４４Ｈは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＭ－抗原ペプチドおよびグリカンの式を表す図解である。図４４Ｉから４４Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４４Ｈ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４５Ａ】図４５Ａから４５Ｋからなる図４５は、Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体を含むヒト成長ホルモンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒト成長ホルモンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４５Ｂから４５Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４５Ｅはヒト成長ホルモンペプチドおよびムチンペプチドの一部および全部を含んでなる３つの融合ペプチドを表し、そして改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示し、およびそれに結合する例示グリカンの式（１つまたは複数）を表す図解である。図４５Ｆから４５Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４５Ｂ】図４５Ａから４５Ｋからなる図４５は、Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体を含むヒト成長ホルモンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒト成長ホルモンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４５Ｂから４５Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４５Ｅはヒト成長ホルモンペプチドおよびムチンペプチドの一部および全部を含んでなる３つの融合ペプチドを表し、そして改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示し、およびそれに結合する例示グリカンの式（１つまたは複数）を表す図解である。図４５Ｆから４５Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４５Ｃ】図４５Ａから４５Ｋからなる図４５は、Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体を含む

ヒト成長ホルモンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒト成長ホルモンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４５Ｂから４５Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４５Ｅはヒト成長ホルモンペプチドおよびムチンペプチドの一部および全部を含んでなる３つの融合ペプチドを表し、そして改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示し、およびそれに結合する例示グリカンの式（１つまたは複数）を表す図解である。図４５Ｆから４５Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４５Ｄ】図４５Ａから４５Ｋからなる図４５は、Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体を含むヒト成長ホルモンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒト成長ホルモンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４５Ｂから４５Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４５Ｅはヒト成長ホルモンペプチドおよびムチンペプチドの一部および全部を含んでなる３つの融合ペプチドを表し、そして改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示し、およびそれに結合する例示グリカンの式（１つまたは複数）を表す図解である。図４５Ｆから４５Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４５Ｅ】図４５Ａから４５Ｋからなる図４５は、Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体を含むヒト成長ホルモンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒト成長ホルモンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４５Ｂから４５Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４５Ｅはヒト成長ホルモンペプチドおよびムチンペプチドの一部および全部を含んでなる３つの融合ペプチドを表し、そして改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示し、およびそれに結合する例示グリカンの式（１つまたは複数）を表す図解である。図４５Ｆから４５Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４５Ｆ】図４５Ａから４５Ｋからなる図４５は、Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体を含むヒト成長ホルモンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒト成長ホルモンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４５Ｂから４５Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４５Ｅはヒト成長ホルモンペプチドおよびムチンペプチドの一部および全部を含んでなる３つの融合ペプチドを表し、そして改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示し、およびそれに結合する例示グリカンの式（１つまたは複数）を表す図解である。図４５Ｆから４５Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４５Ｇ】図４５Ａから４５Ｋからなる図４５は、Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体を含むヒト成長ホルモンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒト成長ホルモンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４５Ｂから４５Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４５Ｅはヒト成長ホルモンペプチドおよびムチンペプチドの一部および全部を含んでなる３つの融合ペプチドを表し、そして改造を企図する

グリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示し、およびそれに結合する例示グリカンの式（１つまたは複数）を表す図解である。図４５Ｆから４５Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４５Ｈ】図４５Ａから４５Ｋからなる図４５は、Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体を含むヒト成長ホルモンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒト成長ホルモンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４５Ｂから４５Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４５Ｅはヒト成長ホルモンペプチドおよびムチンペプチドの一部および全部を含んでなる３つの融合ペプチドを表し、そして改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示し、およびそれに結合する例示グリカンの式（１つまたは複数）を表す図解である。図４５Ｆから４５Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４５Ｉ】図４５Ａから４５Ｋからなる図４５は、Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体を含むヒト成長ホルモンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒト成長ホルモンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４５Ｂから４５Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４５Ｅはヒト成長ホルモンペプチドおよびムチンペプチドの一部および全部を含んでなる３つの融合ペプチドを表し、そして改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示し、およびそれに結合する例示グリカンの式（１つまたは複数）を表す図解である。図４５Ｆから４５Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４５Ｊ】図４５Ａから４５Ｋからなる図４５は、Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体を含むヒト成長ホルモンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒト成長ホルモンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４５Ｂから４５Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４５Ｅはヒト成長ホルモンペプチドおよびムチンペプチドの一部および全部を含んでなる３つの融合ペプチドを表し、そして改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示し、およびそれに結合する例示グリカンの式（１つまたは複数）を表す図解である。図４５Ｆから４５Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４５Ｋ】図４５Ａから４５Ｋからなる図４５は、Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体を含むヒト成長ホルモンのグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４５Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すヒト成長ホルモンペプチドおよびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４５Ｂから４５Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図４５Ｅはヒト成長ホルモンペプチドおよびムチンペプチドの一部および全部を含んでなる３つの融合ペプチドを表し、そして改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示し、およびそれに結合する例示グリカンの式（１つまたは複数）を表す図解である。図４５Ｆから４５Ｋはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４５Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４６Ａ】図４６Ａから４６Ｇからなる図４６は、ＴＮＦ－受容体－ＩｇＧ領域融合タンパク質（Ｅｎｂｒｅｌ（商標））のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明

する。図４６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すさらなるＮ－グリコシル化部位を含むように突然変異させることができるＴＮＦ－受容体－ＩｇＧＦｃ領域融合ペプチドを表す図解である。ＴＮＦ受容体ペプチドは太線で示し、そしてＩｇＧＦｃ領域は実線で示す。図４６Ｂから４６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４６Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４６Ｂ】図４６Ａから４６Ｇからなる図４６は、ＴＮＦ－受容体－ＩｇＧ領域融合タンパク質（Ｅｎｂｒｅｌ（商標））のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すさらなるＮ－グリコシル化部位を含むように突然変異させることができるＴＮＦ－受容体－ＩｇＧＦｃ領域融合ペプチドを表す図解である。ＴＮＦ受容体ペプチドは太線で示し、そしてＩｇＧＦｃ領域は実線で示す。図４６Ｂから４６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４６Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４６Ｃ】図４６Ａから４６Ｇからなる図４６は、ＴＮＦ－受容体－ＩｇＧ領域融合タンパク質（Ｅｎｂｒｅｌ（商標））のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すさらなるＮ－グリコシル化部位を含むように突然変異させることができるＴＮＦ－受容体－ＩｇＧＦｃ領域融合ペプチドを表す図解である。ＴＮＦ受容体ペプチドは太線で示し、そしてＩｇＧＦｃ領域は実線で示す。図４６Ｂから４６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４６Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４６Ｄ】図４６Ａから４６Ｇからなる図４６は、ＴＮＦ－受容体－ＩｇＧ領域融合タンパク質（Ｅｎｂｒｅｌ（商標））のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すさらなるＮ－グリコシル化部位を含むように突然変異させることができるＴＮＦ－受容体－ＩｇＧＦｃ領域融合ペプチドを表す図解である。ＴＮＦ受容体ペプチドは太線で示し、そしてＩｇＧＦｃ領域は実線で示す。図４６Ｂから４６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４６Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４６Ｅ】図４６Ａから４６Ｇからなる図４６は、ＴＮＦ－受容体－ＩｇＧ領域融合タンパク質（Ｅｎｂｒｅｌ（商標））のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すさらなるＮ－グリコシル化部位を含むように突然変異させることができるＴＮＦ－受容体－ＩｇＧＦｃ領域融合ペプチドを表す図解である。ＴＮＦ受容体ペプチドは太線で示し、そしてＩｇＧＦｃ領域は実線で示す。図４６Ｂから４６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４６Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４６Ｆ】図４６Ａから４６Ｇからなる図４６は、ＴＮＦ－受容体－ＩｇＧ領域融合タンパク質（Ｅｎｂｒｅｌ（商標））のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すさらなるＮ－グリコシル化部位を含むように突然変異させることができるＴＮＦ－受容体－ＩｇＧＦｃ領域融合ペプチドを表す図解である。ＴＮＦ受容体ペプチドは太線で示し、そしてＩｇＧＦｃ領域は実線で示す。図４６Ｂから４６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４６Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４６Ｇ】図４６Ａから４６Ｇからなる図４６は、ＴＮＦ－受容体－ＩｇＧ領域融合タンパク質（Ｅｎｂｒｅｌ（商標））のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４６Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すさらなるＮ－グリコシル化部位を含むように突然変異させることができるＴＮＦ－受容体－ＩｇＧＦｃ領域融合ペプチドを表す図解である。ＴＮＦ受容体ペプチドは太線で示し、そしてＩｇＧＦｃ領域は実線で示す。図４６Ｂから４６Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４６Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４７Ａ】図４７は、抗－ＨＥＲ２モノクローナル抗体（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標））のグリカン構造を改造するための例示スキームを提供する。図４７Ａは改造を企図するグリカンに結合する抗体重鎖上の残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（

１つまたは複数）を含むように突然変異させた抗－ＨＥＲ２モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンを表す図解である。図４７Ｂから４７Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４７Ｂ】図４７は、抗－ＨＥＲ２モノクローナル抗体（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標））のグリカン構造を改造するための例示スキームを提供する。図４７Ａは改造を企図するグリカンに結合する抗体重鎖上の残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた抗－ＨＥＲ２モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンを表す図解である。図４７Ｂから４７Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４７Ｃ】図４７は、抗－ＨＥＲ２モノクローナル抗体（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標））のグリカン構造を改造するための例示スキームを提供する。図４７Ａは改造を企図するグリカンに結合する抗体重鎖上の残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた抗－ＨＥＲ２モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンを表す図解である。図４７Ｂから４７Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４７Ｄ】図４７は、抗－ＨＥＲ２モノクローナル抗体（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標））のグリカン構造を改造するための例示スキームを提供する。図４７Ａは改造を企図するグリカンに結合する抗体重鎖上の残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた抗－ＨＥＲ２モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンを表す図解である。図４７Ｂから４７Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４７Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４８Ａ】図４８Ａから４８Ｄからなる図４８は、呼吸合胞体ウイルスのプロテインＦに対するモノクローナル抗体（Ｓｙｎａｇｉｓ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させるプロテインＦペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４８Ｂから４８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４８Ｂ】図４８Ａから４８Ｄからなる図４８は、呼吸合胞体ウイルスのプロテインＦに対するモノクローナル抗体（Ｓｙｎａｇｉｓ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させるプロテインＦペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４８Ｂから４８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４８Ｃ】図４８Ａから４８Ｄからなる図４８は、呼吸合胞体ウイルスのプロテインＦに対するモノクローナル抗体（Ｓｙｎａｇｉｓ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させるプロテインＦペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４８Ｂから４８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４８Ｄ】図４８Ａから４８Ｄからなる図４８は、呼吸合胞体ウイルスのプロテインＦ

に対するモノクローナル抗体（Ｓｙｎａｇｉｓ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４８Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させるプロテインＦペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４８Ｂから４８Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４８Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４９Ａ】図４９Ａから４９Ｄからなる図４９は、ＴＮＦ－αに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｍｉｃａｄｅ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４９Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＴＮＦ－αに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４９Ｂから４９Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４９Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４９Ｂ】図４９Ａから４９Ｄからなる図４９は、ＴＮＦ－αに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｍｉｃａｄｅ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４９Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＴＮＦ－αに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４９Ｂから４９Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４９Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４９Ｃ】図４９Ａから４９Ｄからなる図４９は、ＴＮＦ－αに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｍｉｃａｄｅ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４９Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＴＮＦ－αに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４９Ｂから４９Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４９Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図４９Ｄ】図４９Ａから４９Ｄからなる図４９は、ＴＮＦ－αに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｍｉｃａｄｅ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図４９Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＴＮＦ－αに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図４９Ｂから４９Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき、企図する図４９Ａ中のペプチドの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図５０Ａ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造

グリカン構造の図解である。
【図５０Ｂ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図５０Ｃ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図５０Ｄ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図５０Ｅ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対

するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図５０Ｆ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図５０Ｇ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図５０Ｈ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは

複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図５０Ｉ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図５０Ｊ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図５０Ｋ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する

例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図５０Ｌ】図５０Ａから５０Ｄからなる図５０は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するモノクローナル抗体（Ｒｅｏｐｒｏ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５０Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させた糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対する突然変異モノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｂから５０Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基を示す糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｆから５０Ｈはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５０Ｉは、改造を意図するグリカンに結合する残基を含む糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ－ムチン融合ペプチドに対するモノクローナル抗体および糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａペプチドに対するモノクローナル抗体、およびそれらに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５０Ｊから５０Ｌはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図５１Ａ】図５１Ａから５１Ｄからなる図５１は、ＣＤ２０に対するモノクローナル抗体（Ｒｉｔｕｘａｎ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｂから５１Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５１Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｆから５１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図５１Ｂ】図５１Ａから５１Ｄからなる図５１は、ＣＤ２０に対するモノクローナル抗体（Ｒｉｔｕｘａｎ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｂから５１Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５１Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｆから５１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構

造の図解である。
【図５１Ｃ】図５１Ａから５１Ｄからなる図５１は、ＣＤ２０に対するモノクローナル抗体（Ｒｉｔｕｘａｎ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｂから５１Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５１Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｆから５１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図５１Ｄ】図５１Ａから５１Ｄからなる図５１は、ＣＤ２０に対するモノクローナル抗体（Ｒｉｔｕｘａｎ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｂから５１Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５１Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｆから５１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図５１Ｅ】図５１Ａから５１Ｄからなる図５１は、ＣＤ２０に対するモノクローナル抗体（Ｒｉｔｕｘａｎ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｂから５１Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５１Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｆから５１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図５１Ｆ】図５１Ａから５１Ｄからなる図５１は、ＣＤ２０に対するモノクローナル抗体（Ｒｉｔｕｘａｎ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｂから５１Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５１Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｆから５１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。
【図５１Ｇ】図５１Ａから５１Ｄからなる図５１は、ＣＤ２０に対するモノクローナル抗

体（Ｒｉｔｕｘａｎ（商標））上のグリカン構造を改造するための例示スキームを説明する。図５１Ａは改造を企図するグリカンに結合する残基を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｂから５１Ｄはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ａ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。図５１Ｅは、改造を企図するグリカンに結合する残基（１つまたは複数）を示すＮ－グリコシル化部位（１つまたは複数）を含むように突然変異させたＣＤ２０に対するモノクローナル抗体、およびそれに結合する例示グリカンの式を表す図解である。図５１Ｆから５１Ｇはペプチドが発現される細胞の型に基づき企図する図５１Ｅ中のペプチドのグリカンの改造工程、および望ましい改造グリカン構造の図解である。

【図５２Ａ】図５２Ａおよび５２Ｂからなる図５２は、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１および２）。

【図５２Ｂ】図５２Ａおよび５２Ｂからなる図５２は、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１および２）。

【図５３Ａ】図５３Ａおよび５３Ｂからなる図５３は、インターフェロンアルファ（ＩＦＮ－アルファ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号３および４）。

【図５３Ｂ】図５３Ａおよび５３Ｂからなる図５３は、インターフェロンアルファ（ＩＦＮ－アルファ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号３および４）。

【図５４Ａ】図５４Ａおよび５４Ｂからなる図５４は、インターフェロンベータ（ＩＦＮ－ベータ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号５および６）。

【図５４Ｂ】図５４Ａおよび５４Ｂからなる図５４は、インターフェロンベータ（ＩＦＮ－ベータ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号５および６）。

【図５５Ａ】図５５Ａおよび５５Ｂからなる図５５は、第ＶＩＩａ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号７および８）。

【図５５Ｂ】図５５Ａおよび５５Ｂからなる図５５は、第ＶＩＩａ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号７および８）。

【図５６Ａ】図５６Ａおよび５６Ｂからなる図５６は、第ＩＸ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号９および１０）。

【図５６Ｂ】図５６Ａおよび５６Ｂからなる図５６は、第ＩＸ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号９および１０）。

【図５７Ａ】図５７Ａから５７Ｄからなる図５７は、濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のアルファおよびベーター鎖の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１１から１４）。

【図５７Ｂ】図５７Ａから５７Ｄからなる図５７は、濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のアルファおよびベーター鎖の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１１から１４）。

【図５７Ｃ】図５７Ａから５７Ｄからなる図５７は、濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のアルファおよびベーター鎖の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１１から１４）。

【図５７Ｄ】図５７Ａから５７Ｄからなる図５７は、濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のアルファおよびベーター鎖の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１１から１４）。

【図５８Ａ】図５８Ａおよび５８Ｂからなる図５８は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）の例

示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１５および１６）。
【図５８Ｂ】図５８Ａおよび５８Ｂからなる図５８は、エリトロポエチン（ＥＰＯ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１５および１６）。
【図５９Ａ】図５９Ａおよび５９Ｂからなる図５９は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１７および１８）。
【図５９Ｂ】図５９Ａおよび５９Ｂからなる図５９は、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１７および１８）。
【図６０Ａ】図６０Ａおよび６０Ｂからなる図６０は、インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－ガンマ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１９および２０）。
【図６０Ｂ】図６０Ａおよび６０Ｂからなる図６０は、インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－ガンマ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号１９および２０）。
【図６１Ａ】図６１Ａおよび６１Ｂからなる図６１は、α－１－プロテアーゼインヒビター（Ａ－１－ＰＩ、またはα－アンチトリプシン）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２１および２２）。
【図６１Ｂ】図６１Ａおよび６１Ｂからなる図６１は、α－１－プロテアーゼインヒビター（Ａ－１－ＰＩ、またはα－アンチトリプシン）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２１および２２）。
【図６２Ａ－１】図６２Ａ－１から６２Ａ－２および６２Ｂおよびからなる図６２は、グルコセレブロシダーゼの例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２３および２４）。
【図６２Ａ－２】図６２Ａ－１から６２Ａ－２および６２Ｂおよびからなる図６２は、グルコセレブロシダーゼの例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２３および２４）。
【図６２Ｂ】図６２Ａ－１から６２Ａ－２および６２Ｂおよびからなる図６２は、グルコセレブロシダーゼの例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２３および２４）。
【図６３Ａ】図６３Ａおよび６３Ｂからなる図６３は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２５および２６）。
【図６３Ｂ】図６３Ａおよび６３Ｂからなる図６３は、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２５および２６）。
【図６４Ａ】図６４Ａおよび６４Ｂからなる図６４は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２７および２８）。
【図６４Ｂ】図６４Ａおよび６４Ｂからなる図６４は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２７および２８）。
【図６５Ａ－１】図６５Ａ－１から６５Ａ－４および６５Ｂ－１から６５Ｂ－４からなる図６５は、第ＶＩＩＩ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２９および３０）。
【図６５Ａ－２】図６５Ａ－１から６５Ａ－４および６５Ｂ－１から６５Ｂ－４からなる図６５は、第ＶＩＩＩ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２９および３０）。

【図６５Ａ－３】図６５Ａ－１から６５Ａ－４および６５Ｂ－１から６５Ｂ－４からなる図６５は、第ＶＩＩＩ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２９および３０）。
【図６５Ａ－４】図６５Ａ－１から６５Ａ－４および６５Ｂ－１から６５Ｂ－４からなる図６５は、第ＶＩＩＩ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２９および３０）。
【図６５Ｂ－１】図６５Ａ－１から６５Ａ－４および６５Ｂ－１から６５Ｂ－４からなる図６５は、第ＶＩＩＩ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２９および３０）。
【図６５Ｂ－２】図６５Ａ－１から６５Ａ－４および６５Ｂ－１から６５Ｂ－４からなる図６５は、第ＶＩＩＩ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２９および３０）。
【図６５Ｂ－３】図６５Ａ－１から６５Ａ－４および６５Ｂ－１から６５Ｂ－４からなる図６５は、第ＶＩＩＩ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２９および３０）。
【図６５Ｂ－４】図６５Ａ－１から６５Ａ－４および６５Ｂ－１から６５Ｂ－４からなる図６５は、第ＶＩＩＩ因子の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号２９および３０）。
【図６６Ａ】図６６Ａおよび６６Ｂからなる図６６は、ウロキナーゼの例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号３３および３４）。
【図６６Ｂ】図６６Ａおよび６６Ｂからなる図６６は、ウロキナーゼの例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号３３および３４）。
【図６７Ａ】図６７Ａおよび６７Ｂからなる図６７は、ヒト組換えＤＮａｓｅ（ｈｒＤＮａｓｅ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号３９および４０）。
【図６７Ｂ】図６７Ａおよび６７Ｂからなる図６７は、ヒト組換えＤＮａｓｅ（ｈｒＤＮａｓｅ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号３９および４０）。
【図６８Ａ】図６８Ａおよび６８Ｂからなる図６８は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するヒト化モノクローナル抗体の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号４３および４４）。
【図６８Ｂ】図６８Ａおよび６８Ｂからなる図６８は、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａに対するヒト化モノクローナル抗体の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号４３および４４）。
【図６９Ａ】図６９Ａおよび６９Ｂからなる図６９は、Ｂ型肝炎ウイルスに由来するＳ－タンパク質（ＨｂｓＡｇ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号４５および４６）。
【図６９Ｂ】図６９Ａおよび６９Ｂからなる図６９は、Ｂ型肝炎ウイルスに由来するＳ－タンパク質（ＨｂｓＡｇ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号４５および４６）。
【図７０Ａ】図７０Ａおよび７０Ｂからなる図７０は、ヒト成長ホルモン（ＨＧＨ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号４７および４８）。
【図７０Ｂ】図７０Ａおよび７０Ｂからなる図７０は、ヒト成長ホルモン（ＨＧＨ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号４７および４８）。
【図７１Ａ】図７１Ａおよび７１Ｂからなる図７１は、Ｅｎｂｒｅｌ（商標）（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦ－Ｒ）／ＩｇＧ融合）の一部を含んでなる７５ｋＤａの腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦ－Ｒ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号３１および３２）。

【図７１Ｂ】図７１Ａおよび７１Ｂからなる図７１は、Ｅｎｂｒｅｌ（商標）（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦ－Ｒ）／ＩｇＧ融合）の一部を含んでなる７５ｋＤａの腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦ－Ｒ）の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号３１および３２）。
【図７２Ａ】図７２Ａおよび７２Ｂからなる図７２は、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）（Ｈｅｒ－２、ヒト上皮増殖因子受容体に対するモノクローナル抗体（ＭＡｂ））のそれぞれ軽および重鎖の例示アミノ酸配列である（それぞれ配列番号３５および３６）。
【図７２Ｂ】図７２Ａおよび７２Ｂからなる図７２は、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）（Ｈｅｒ－２、ヒト上皮増殖因子受容体に対するモノクローナル抗体（ＭＡｂ））のそれぞれ軽および重鎖の例示アミノ酸配列である（それぞれ配列番号３５および３６）。
【図７３Ａ】図７３Ａおよび７３Ｂからなる図７３は、Ｓｙｎａｇｉｓ（商標）（呼吸合胞対ウイルスのＦペプチドに対するＭＡｂ）のそれぞれ重および軽鎖の例示アミノ酸配列である（それぞれ配列番号３７および３８）。
【図７３Ｂ】図７３Ａおよび７３Ｂからなる図７３は、Ｓｙｎａｇｉｓ（商標）（呼吸合胞対ウイルスのＦペプチドに対するＭＡｂ）のそれぞれ重および軽鎖の例示アミノ酸配列である（それぞれ配列番号３７および３８）。
【図７４Ａ】図７４Ａおよび７４Ｂからなる図７４は、Ｒｅｍｉｃａｄｅ（商標）（ＴＮＦαに対するＭＡｂ）の非－ヒト可変領域の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号４１および４２）。
【図７４Ｂ】図７４Ａおよび７４Ｂからなる図７４は、Ｒｅｍｉｃａｄｅ（商標）（ＴＮＦαに対するＭＡｂ）の非－ヒト可変領域の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号４１および４２）。
【図７５Ａ】図７５Ａおよび７５Ｂからなる図７５は、ヒトＩｇＧのＦｃ部分の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号４９および５０）。
【図７５Ｂ】図７５Ａおよび７５Ｂからなる図７５は、ヒトＩｇＧのＦｃ部分の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号４９および５０）。
【図７６】図７６は、抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａマウス抗体の成熟可変領域軽鎖の例示アミノ酸配列である（配列番号５２）。
【図７７】図７７は、抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａマウス抗体の成熟可変領域重鎖の例示アミノ酸配列である（配列番号５４）。
【図７８】図７８は、ヒトＩｇＧの可変領域軽鎖の例示アミノ酸配列である（配列番号５１）。
【図７９】図７９は、ヒトＩｇＧの可変領域重鎖の例示アミノ酸配列である（配列番号５３）。
【図８０】図８０は、ヒトＩｇＧの軽鎖の例示アミノ酸配列である（配列番号５５）。
【図８１】図８１は、ヒトＩｇＧの重鎖の例示アミノ酸配列である（配列番号５６）。
【図８２Ａ】図８２Ａおよび図８２Ｂからなる図８２は、抗－ＣＤ２０マウス抗体の軽鎖の成熟可変領域軽鎖の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号５９および６０）。
【図８２Ｂ】図８２Ａおよび図８２Ｂからなる図８２は、抗－ＣＤ２０マウス抗体の軽鎖の成熟可変領域軽鎖の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号５９および６０）。
【図８３Ａ】図８３Ａおよび図８３Ｂからなる図８３は、抗－ＣＤ２０マウス抗体の重鎖の成熟可変領域の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号６１および６２）。
【図８３Ｂ】図８３Ａおよび図８３Ｂからなる図８３は、抗－ＣＤ２０マウス抗体の重鎖の成熟可変領域の例示ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列である（それぞれ配列番号６１および６２）。
【図８４Ａ】図８４Ａから図８４Ｅからなる図８４は、タンデムキメラ抗体発現ベクターＴＣＡＥ８のヌクレオチド配列である（配列番号５７）。

【図８４Ｂ】図８４Ａから図８４Ｅからなる図８４は、タンデムキメラ抗体発現ベクターＴＣＡＥ８のヌクレオチド配列である（配列番号５７）。
【図８４Ｃ】図８４Ａから図８４Ｅからなる図８４は、タンデムキメラ抗体発現ベクターＴＣＡＥ８のヌクレオチド配列である（配列番号５７）。
【図８４Ｄ】図８４Ａから図８４Ｅからなる図８４は、タンデムキメラ抗体発現ベクターＴＣＡＥ８のヌクレオチド配列である（配列番号５７）。
【図８４Ｅ】図８４Ａから図８４Ｅからなる図８４は、タンデムキメラ抗体発現ベクターＴＣＡＥ８のヌクレオチド配列である（配列番号５７）。
【図８５Ａ】図８５Ａから図８５Ｅからなる図８５は、抗－ＣＤ２０マウス抗体の軽および重可変ドメインを含むタンデムキメラ抗体発現ベクターＴＣＡＥ８のヌクレオチド配列である（配列番号５８）。
【図８５Ｂ】図８５Ａから図８５Ｅからなる図８５は、抗－ＣＤ２０マウス抗体の軽および重可変ドメインを含むタンデムキメラ抗体発現ベクターＴＣＡＥ８のヌクレオチド配列である（配列番号５８）。
【図８５Ｃ】図８５Ａから図８５Ｅからなる図８５は、抗－ＣＤ２０マウス抗体の軽および重可変ドメインを含むタンデムキメラ抗体発現ベクターＴＣＡＥ８のヌクレオチド配列である（配列番号５８）。
【図８５Ｄ】図８５Ａから図８５Ｅからなる図８５は、抗－ＣＤ２０マウス抗体の軽および重可変ドメインを含むタンデムキメラ抗体発現ベクターＴＣＡＥ８のヌクレオチド配列である（配列番号５８）。
【図８５Ｅ】図８５Ａから図８５Ｅからなる図８５は、抗－ＣＤ２０マウス抗体の軽および重可変ドメインを含むタンデムキメラ抗体発現ベクターＴＣＡＥ８のヌクレオチド配列である（配列番号５８）。
【図８６】図８６はＴＰ１０のシアリル化前後のＦＡＣＥ分析の結果の表すアクリルアミドゲルの像である。ＢｉＮＡ$_0$種はシアル酸残基が無い。ＢｉＮＡ$_1$種は１つのシアル酸残基を有する。ＢｉＮＡ$_2$種は２つのシアル酸残基を有する。Ｂｉ＝２アンテナ；ＮＡ＝ノイラミン酸。
【図８７】図８７はラットに注射したシアル化前後のＴＰ１０の経時的な血漿濃度をμｇ／ｍｌで表すグラフである。
【図８８】図８８はシアル化前後のＴＰ１０について、血漿濃度－時間曲線（ＡＵＣ）下の面積をμｇ／時間／ｍｌで表すグラフである。
【図８９】図８９はＴＰ１０のフコシル化前後のＦＡＣＥ分析の結果の表すアクリルアミドゲルの像である。ＢｉＮＡ$_2$Ｆ$_2$種は２つのノイラミン（ＮＡ）酸残基および２つのフコース残基（Ｆ）を有する。
【図９０】図９０はインビトロ（菱形）およびＬｅｃ１１　ＣＨＯ細胞（四角）内のインビボでグリコシル化されたＴＰ２０（ｓＣＲ１ｓＬｅ^x）のインビトロ結合を表すグラフである。
【図９１】図９１はＥＰＯのＧｌｃＮＡｃ－化に由来するグリコフォームの２－ＡＡ　ＨＰＬＣによる分析を表すグラフである。
【図９２Ａ】図９２Ａおよび９２Ｂからなる図９２は、ＲＮａｓｅＢのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトル（図９２Ａ）およびＮ－グリカナーゼによりＲＮａｓｅＢから開裂されたオリゴ糖のＨＰＬＣプロフィール（図９２Ｂ）を表す２つのグラフである。ペプチドのＮ－グリコシル化部位の大部分が、５～９個のマンノース残基からなるマンノースオリゴ糖で修飾される。
【図９２Ｂ】図９２Ａおよび９２Ｂからなる図９２は、ＲＮａｓｅＢのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトル（図９２Ａ）およびＮ－グリカナーゼによりＲＮａｓｅＢから開裂されたオリゴ糖のＨＰＬＣプロフィール（図９２Ｂ）を表す２つのグラフである。ペプチドのＮ－グリコシル化部位の大部分が、５～９個のマンノース残基からなるマンノースオリゴ糖で修飾される。
【図９３】図９３は高マンノースＮ－グリカンのハイブリッドＮ－グリカンへの転換を表

すスキームである。酵素１は、トリコダーマ　レーゼイ（Ｔｒｉｃｏｄｏｍａ　ｒｅｅｓｅｉ）またはスルペルギルス　サイトイ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｓａｉｔｏｉ）に由来するα１，２－マンノシダーゼである。酵素２は、ＧｎＴ－Ｉ（β－１，２－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩ）である。酵素３はＧａｌＴ－Ｉ（β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩ）である。酵素４はα２，３－シアリルトランスフェラーゼまたはα２，６－シアリルトランスフェラーゼである。

【図９４Ａ】図９４Ａおよび９４Ｂからなる図９４は、組換えＴ．（レーゼイ）ｒｅｅｓｅｉのα１，２－マンノシダーゼで処理したＲＮａｓｅＢのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトル（図９４Ａ）および修飾ＲＮａｓｅＢからＮ－グリカナーゼにより開裂されたオリゴ糖のＨＰＬＣプロフィール（図９４Ｂ）を表す２つのグラフである。

【図９４Ｂ】図９４Ａおよび９４Ｂからなる図９４は、組換えＴ．（レーゼイ）ｒｅｅｓｅｉのα１，２－マンノシダーゼで処理したＲＮａｓｅＢのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトル（図９４Ａ）および修飾ＲＮａｓｅＢからＮ－グリカナーゼにより開裂されたオリゴ糖のＨＰＬＣプロフィール（図９４Ｂ）を表す２つのグラフである。

【図９５】図９５はＡ．サイトイ（ｓａｉｔｏｉ）から精製された市販されているα１，２－マンノシダーゼ（グリコ＆カルビオケム：Ｇｌｙｋｏ　＆　ＣａｌｂｉｏＣｈｅｍ）で処理したＲＮａｓｅＢのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトルを表すグラフである。

【図９６】図９６は組換えＧｎＴ－Ｉ（ＧｌｃＮＡｃ－トランスフェラーゼＩ）で図９４に示した生成物を処理することにより修飾したＲＮａｓｅＢのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトルを表すグラフである。

【図９７】図９７は組換えＧｎＴ１（ガラクトシルトランスフェラーゼ１）で図９６に示した生成物を処理することにより修飾したＲＮａｓｅＢのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトルを表すグラフである。

【図９８】図９８はトランスフェラーゼの供与体としてＣＭＰ－ＳＡを使用して、組換えＳＴ３ＧａｌＩＩＩ（α２，３－シアリルトランスフェラーゼＩＩＩ）で図９７に示した生成物を処理することにより修飾したＲＮａｓｅＢのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトルを表すグラフである。

【図９９Ａ】図９９はトランスフェラーゼの供与体としてＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）を使用して、組換えＳＴ３ＧａｌＩＩＩ（α２，３－シアリルトランスフェラーゼＩＩＩ）で図９７に示した生成物を処理することにより修飾したＲＮａｓｅＢのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトルを表すグラフである。

【図９９Ｂ】図９９はトランスフェラーゼの供与体としてＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）を使用して、組換えＳＴ３ＧａｌＩＩＩ（α２，３－シアリルトランスフェラーゼＩＩＩ）で図９７に示した生成物を処理することにより修飾したＲＮａｓｅＢのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトルを表すグラフである。

【図１００】図１００は高マンノースＮ－グリカンの複雑なＮ－グリカンへの転換を表すスキームである。酵素１は、トリコダーマ　レーゼイ（Ｔｒｉｃｏｄｏｍａ　ｒｅｅｓｅｉ）またはスルペルギルス　サイトイ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｓａｉｔｏｉ）に由来するα１，２－マンノシダーゼである。酵素２は、ＧｎＴ－Ｉである。酵素３はＧａｌＴ１である。酵素４はα２，３－シアリルトランスフェラーゼまたはα２，６－シアリルトランスフェラーゼである。酵素５はα－マンノシダーゼＩＩである。酵素６はα－マンノシダーゼである。酵素７はＧｎ－ＩＩである。酵素８はα１，６－マンノシダーゼである。酵素９はα１，３－マンノシダーゼである。

【図１０１】図１０１は、Ｎ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼＩにより触媒されるＶＩ（ＧｎＴ　Ｉ－ＶＩ）への連結の図解である。Ｒ＝ＧｌｃＮＡｃβ１，４ＧｌｃＮＡｃ－Ａｓｎ－Ｘ。

【図１０２Ａ】図１０２Ａおよび１０２Ｂからなる図１０２は、Ｎ－アセチルグルコサミンが付加されたＥＰＯの２つのロットに関する２－ＡＡ　ＨＰＬＣ分析を表すグラフである。図１０２Ａはロットの分析を表し、そして図１０２Ｂはロットの分析を表す。

【図１０２Ｂ】図１０２Ａおよび１０２Ｂからなる図１０２は、Ｎ－アセチルグルコサミ

ンが付加されたＥＰＯの２つのロットに関する２－ＡＡ　ＨＰＬＣ分析を表すグラフである。図１０２Ａはロットの分析を表し、そして図１０２Ｂはロットの分析を表す。
【図１０３】図１０３はＧｎＴ－ＶでＥＰＯに第３グリカン枝を導入する反応の生成物の２－ＡＡ　ＨＰＬＣ分析を表すグラフである。
【図１０４】図１０４は適当な供与基を用いて、ＧｎＴ－Ｉ、ＧｎＴ－ＩＩ、ＧｎＴ－ＩＩＩ、ＧｎＴ－ＩＶおよびＧａｌＴ１で処理した後のＥＰＯ調製物のグリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトルを表すグラフである。
【図１０５】図１０５はヒト下垂体ＦＳＨの脱シアリル化反応の生成物を表す等電点電気泳動（ＩＥＦ）ゲルの像である。レーン１および４は等電点電気泳動（ＩＥＦ）の標準である。レーン２は天然の（ｎａｔｉｖｅ）ＦＳＨである。レーン３は脱シアリル化ＦＳＨである。
【図１０６】図１０６はｒＦＳＨのＰＥＧ－シアリル化を作成するための反応の生成物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの像である。レーン１および８は、ＳｅｅＢｌｕｅ＋２分子量標準である。レーン２は１５μｇの天然のＦＳＨである。レーン３は１５μｇのアシアロ－ＦＳＨ（ＡＳ－ＦＳＨ）である。レーン４はＡＳ－ＦＳＨとＣＭＰ－ＳＡの１５μｇの反応生成物である。レーン５はＡＳ－ＦＳＨとＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａ）の１５μｇの反応生成物である。レーン６はＡＳ－ＦＳＨとＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（５ｋＤａ）の１５μｇの反応生成物である。レーン７はＡＳ－ＦＳＨとＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）の１５μｇの反応生成物である。
【図１０７】図１０７はＦＳＨのＰＥＧ－シアリル化を作成するための反応の生成物の等電点電気泳動ゲルの像である。レーン１および８はＩＥＦ標準である。レーン２は１５μｇの非変性ＦＳＨである。レーン３は１５μｇのアシアロ－ＦＳＨ（ＡＳ－ＦＳＨ）である。レーン４はＡＳ－ＦＳＨとＣＭＰ－ＳＡの１５μｇの反応生成物である。レーン５はＡＳ－ＦＳＨとＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａ）の１５μｇの反応生成物である。レーン６はＡＳ－ＦＳＨとＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（５ｋＤａ）の１５μｇの反応生成物である。レーン７はＡＳ－ＦＳＨとＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）の１５μｇの反応生成物である。
【図１０８】図１０８はヒト下垂体細胞で生産される非変性非－組換えＦＳＨのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの像である。レーン１、２および５はＳｅｅＢｌｕｅ（商標）＋２分子量標準である。レーン３および４はそれぞれ５μｇおよび２５μｇの天然のＦＳＨである。
【図１０９】図１０９はｒＦＳＨのアシアリル化反応の生成物を表す等電点電気泳動ゲル（ｐＨ３－７）の像である。レーン１および４はＩＥＦ標準である。レーン２は天然のｒＦＳＨである。レーン３はアシアロ－ｒＦＳＨである。
【図１１０】図１１０はアシアロ－ｒＦＳＨのＰＥＧ－シアリル化の結果を表すＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの像である。レーン１は非変性ｒＦＳＨである。レーン２はアシアロ－ＦＳＨである。レーン３はアシアロ－ＦＳＨと０．５ｍＭのＣＭＰ－ＳＡの反応生成物である。レーン４～７はアシアロ－ＦＳＨとＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）との間のそれぞれ２時間、５時間、２４時間および４８時間の反応生成物である。レーン８は、アシアロ－ＦＳＨと１．０ｍＭのＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）との間の４８時間の反応生成物である。レーン９はアシアロ－ＦＳＨと１．０ｍＭのＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａ）との間の４８時間の反応生成物である。
【図１１１】図１１１はアシアロ－ｒＦＳＨとＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａ）のＰＥＧ－シアリル化の生成物を示す等電点電気泳動ゲルの像である。レーン１は非変性ｒＦＳＨである。レーン２はアシアロ－ｒＦＳＨである。レーン３はアシアロ－ＦＳＨとＣＭＰ－ＳＡとの２４時間の反応生成物である。レーン４～７はアシアロ－ｒＦＳＨと０．５ｍＭ　ＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａ）のそれぞれ２時間、５時間、２４時間および４８時間の反応生成物である。レーン８はブランクである。レーン９および１０は、アシアロ－ｒＦＳＨとそれぞれ０．５ｍＭおよび１．０ｍＭのＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）の４８時間の反応生成物である。
【図１１２】図１１２はｒＦＳＨおよびｒＦＳＨ－ＡＳ－ＰＥＧ（１ＫＤａおよび１０Ｋ

Ｄａ）の薬物動態学のグラフである。このグラフはグリコＰＥＧ化ｒＦＳＨについて、非－ＰＥＧ化ｒＦＳＨに比べて、ラットの血流中にあるｒＦＳＨ化合物の時間と血流中のｒＦＳＨ化合物の平均濃度との間の関係を具体的に説明する。

【図１１３】Ｓｅｒｔｏｌｉ細胞を使用したＦＳＨバイオアッセイの結果のグラフである。このグラフはインキューベーション培地中のＳｅｒｔｏｌｉ細胞中のＦＳＨ濃度とＳｅｒｔｏｌｉ細胞から放出された１７－βエストラジオールの量との間の関係を具体的に説明する。

【図１１４】図１１４はＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの像である：標準（レーン１）；天然のトランスフェリン（レーン２）；アシアロトランスフェリン（レーン３）；アシアロトランスフェリンおよびＣＭＰ－ＳＡ（レーン４）；レーン５および６、アシアロトランスフェリンおよびそれぞれ０．５ｍＭおよび５ｍＭのＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ＫＤａ）；レーン７および８、アシアロトランスフェリンおよびそれぞれ０．５ｍＭおよび５ｍＭのＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（５ＫＤａ）；レーン９および１０、アシアロトランスフェリンおよびそれぞれ０．５ｍＭおよび５ｍＭのＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）。

【図１１５】図１１５はＩＥＦゲルの像である：天然のトランスフェリン（レーン１）；アシアロトランスフェリン（レーン２）；アシアロトランスフェリンおよびＣＭＰ－ＳＡ、２４時間（レーン３）；アシアロトランスフェリンおよびＣＭＰ－ＳＡ、９６時間（レーン４）レーン５および６、それぞれ２４時間および９６時間のアシアロトランスフェリンおよびＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａ）；レーン７および８、それぞれ２４時間および９６時間のアシアロトランスフェリンおよびＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（５ＫＤａ）；レーン９および１０、それぞれ２４時間および９６時間のアシアロトランスフェリンおよびＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）。

【図１１６】図１１６はアシアロ－第ＶＩＩａ因子の等電点電気泳動ゲル（ｐＨ３－７）の像である。レーン１は第ｒＶＩＩａ因子；レーン２～５はアシアロ－第ＶＩＩａ因子である。

【図１１７】図１１７は第ＶＩＩａ因子のＭＡＬＤＩスペクトルのグラフである。

【図１１８】図１１８は第ＶＩＩａ因子－ＰＥＧ（１ｋＤａ）のＭＡＬＤＩスペクトルのグラフである。

【図１１９】図１１９は第ＶＩＩａ因子－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）のＭＡＬＤＩスペクトルのグラフである。

【図１２０】図１２０はＰＥＧ化第ＶＩＩａ因子のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの像である：レーン１はアシアロ－第ＶＩＩａ因子である。レーン２はＳＴ３Ｇａｌ３を用いた４８時間後のアシアロ－第ＶＩＩａ因子とＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａ）との反応の生成物である。レーン３はＳＴ３Ｇａｌ３を用いた４８時間後のアシアロ－第ＶＩＩａ因子とＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａ）との反応の生成物である。レーン４はＳＴ３Ｇａｌ３を用いた９６時間のアシアロ－第ＶＩＩａ因子とＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）との反応の生成物である。

【図１２１】図１２１は脱シアリル化手順の生成物のｐＩを表すＩＥＦゲルの像である。レーン１および５はＩＥＦ標準である。レーン２は第ＩＸ因子タンパク質である。レーン３はｒ第ＩＸタンパク質である。レーン４はｒ第ＩＸタンパク質の２０時間の脱シアリル化反応である。

【図１２２】図１２２は、ＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧとの反応後、ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａ）またはＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）のいずれかと結合した第ＩＸ因子の分子量を表すＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの像である。レーン１および６は、ＳｅｅＢｌｕｅ＋２分子量標準である。レーン２はｒＦ－ＩＸである。レーン３は脱シアリル化ｒＦ－ＩＸである。レーン４はＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａ）に結合したｒ第ＩＸ因子である。レーン５はＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）に結合したｒ第ＩＸ因子である。

【図１２３】図１２３は、第ＩＸ因子の直接－シアリル化および第ＩＸ因子－ＳＡ－ＰＥＧのシアル酸キャッピングの反応生成物を表すＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの像である。レーン１はタンパク質標準であり、レーン２はブランクであり；レーン３はｒ第ＩＸ因子であり

；レーン４はＳＡキャップ化ｒ第ＩＸ因子－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）であり；レーン５はｒ第ＩＸ因子－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）であり；レーン６はＳＴ３Ｇａｌ１であり；レーン７はＳＴ３Ｇａｌ３であり；レーン８、９、１０は事前のシアリダーゼ処理無しのｒ第ＩＸ因子－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）である。

【図１２４】図１２４は非変性ＥＰＯのグリカンのＭＡＬＤＩスペクトルを表すグラフである。

【図１２５】図１２５はＣＭＰ－ＮＡＮ－ＰＥＧ（１ＫＤａ）およびＣＭＰ－ＮＡＮ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）を使用したＰＥＧ化の生成物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの像である。

【図１２６】図１２６はＰＥＧ化ＥＰＯのインビトロバイオアッセイの結果を表すグラフである。菱形はＰＥＧ分子を持たないシアリル化ＥＰＯからのデータを表す。四角はＰＥＧ（１ＫＤａ）を持つＥＰＯを使用して得たデータを表す。三角はＰＥＧ（１０ＫＤａ）を持つＥＰＯを使用して得たデータを表す。

【発明を実施するための形態】

【００３４】

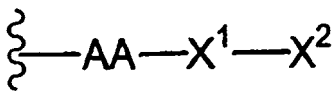
以下に記載する説明は本発明の好適な態様を開示し、そして本発明に添付する請求の範囲の文章による説明を提供する。本発明は明らかな、または本明細書を読んだ後に明らかになるこのような態様の任意の、そしてすべての変形態様を包含する。

【００３５】

本発明は、　式：

【００３６】

【化１】



【００３７】

式中、

ＡＡはペプチドの末端または内部アミノ酸残基であり；

X^1－X^2は該ＡＡに共有結合したサッカリドであり、ここで

X^1は第１グリコシル残基であり；そして

X^2はX^1に共有結合した第２グリコシル残基であり、ここでX^1およびX^2は単糖およびオリゴ糖残基から選択される、

を有するペプチドの無細胞のインビトロ改造方法を提供する。この方法は：

（ａ）X^2またはその糖サブユニットを該ペプチドから除去し、これにより短縮化グリカンを形成し；そして

（ｂ）短縮化グリカンを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、少なくとも１つのグリコシル供与体を短縮化グリカンへ転移させるために適する条件下で接触させ、これにより該ペプチドを改造する、

ことを含んでなる。

【００３８】

１つの観点では、この方法はさらに

（ｃ）X^1を除去し、これによりＡＡを露出し；そして

（ｄ）ＡＡを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、少なくとも１つのグリコシル供与体をＡＡへ転移させるために適する条件下で接触させ、これにより該ペプチドを改造する、

ことを含んでなる。

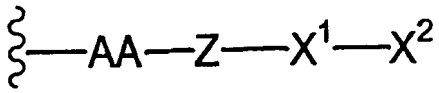
【００３９】

別の観点では、本発明はさらに：

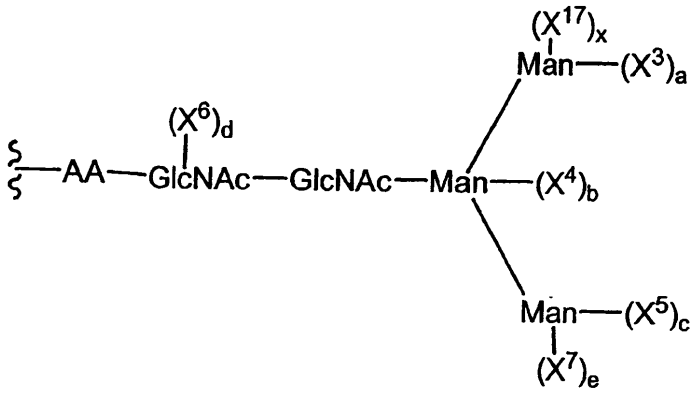
（ｅ）工程（ｂ）の前に、翻訳後修飾中にサッカリドに付加した基を除去する、

ことを含んでなる。

【００４０】
１つの態様では、基がホスフェート、スルフェート、カルボキシレートおよびそれらのエステルから選択される員である。
【００４１】
別の態様では、ペプチドは式：
【００４２】
【化２】



【００４３】
式中、
ＺはＯ、Ｓ、ＮＨおよびクロスリンカーから選択される員である、
を有する。
【００４４】
少なくとも１つのグリコシル供与体は修飾基を含んでなり、そして修飾基は水溶性ポリマー、治療部分、検出可能な標識、反応性リンカー基および標的部分からなる群から選択される員であり得る。好ましくは修飾基は水溶性ポリマーであり、そしてより好ましくは水溶性ポリマーはポリ（エチレングリコール）を含んでなる。さらにより好ましくはポリ（エチレングリコール）は本質的に均一分散である分子量分布を有する。
【００４５】
この、および幾つかの他の態様では、ペプチドは顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－ベータ、第ＶＩＩａ因子、第ＩＸ因子、濾胞刺激ホルモン、エリトロポエチン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン－ガンマ、アルファ－１－プロテアーゼインヒビター、ベーターグルコシダーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベータータンパク質、インターロイキン－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラ腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体、キメラ抗－呼吸合胞体ウイルス抗体、キメラ抗－ＣＤ２０抗体、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－腫瘍壊死因子抗体、ヒトインスリン、Ｂ型肝炎ｓＡｇおよびヒト成長ホルモンからなる群から選択され得る。
【００４６】
また本発明に含まれるのは、式：
【００４７】
【化３】



【００４８】
式中、
Ｘ３、Ｘ４、Ｘ５、Ｘ６、Ｘ７およびＸ１７は、単糖またはオリゴ糖残基から独立して選択され；そして

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅおよびｘは、整数０、１および２から独立して選択されるが、ただしａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅおよびｘから選択される少なくとも１つの員は１または２である、を有するペプチドの無細胞のインビトロ改造方法である。この方法は；
（ａ）少なくとも１つのX^3、X^4、X^5、X^6、X^7またはX^{17}、またはその糖サブユニットをペプチドから除去し、これにより短縮化グリカンを形成し；そして
（ｂ）短縮化グリカンを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、少なくとも１つのグリコシル供与体を該短縮化グリカンへ転移させるために適する条件下で接触させ、これにより該ペプチドを改造する、
ことを含んでなる。

【００４９】

１つの観点では工程（ａ）の除去は、ａ、ｂ、ｃ、ｅおよびｘがそれぞれ０である短縮化グリカンを生成する。

【００５０】

別の観点では、X^3、X^5およびX^7は（マンノース）$_z$および（マンノース）$_z$－（X^8）$_y$、
式中、
X^8は単－およびオリゴ－糖から選択されるグリコシル部分であり；
ｙは０および１から選択される整数であり；そして
ｚは１から２０の間の整数であり、ここで
Ｚは３以上である時、（マンノース）$_z$は直鎖および分岐構造から選択される、
から成る群から選択される。

【００５１】

別の観点では、X^4はＧｌｃＮＡｃおよびキシロースからなる群から選択される。別の観点ではX^3、X^5およびX^7が（マンノース）$_u$であり、ここでｕは１から２０の間の整数から選択され、そしてｕが３以上である時、（マンノース）$_u$は直鎖および分岐構造から選択される。

【００５２】

少なくとも１つの該グリコシル供与体は修飾基を含んでなり、そして修飾基は水溶性ポリマー、治療部分、検出可能な標識、反応性リンカー基および標的部分からなる群から選択される員であり得る。好ましくは修飾基は水溶性ポリマーであり、そしてより好ましくは水溶性ポリマーはポリ（エチレングリコール）を含んでなる。より一層好ましくはポリ（エチレングリコール）は本質的に均一分散である分子量分布を有する。

【００５３】

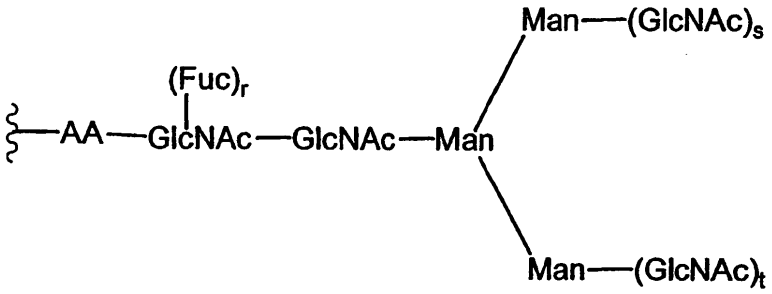
さらにペプチドは顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－ベータ、第ＶＩＩａ因子、第ＩＸ因子、濾胞刺激ホルモン、エリトロポエチン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン－ガンマ、アルファ－１－プロテアーゼインヒビター、ベーターグルコシダーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーターパク質、インターロイキン－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラ腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体、キメラ抗－呼吸合胞体ウイルス抗体、キメラ抗－ＣＤ２０抗体、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－腫瘍壊死因子抗体、ヒトインスリン、Ｂ型肝炎ｓＡｇおよびヒト成長ホルモンからなる群から選択され得る。

【００５４】

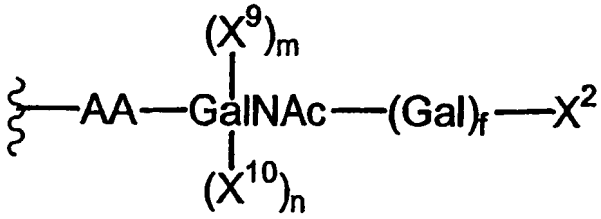
また含まれるのは式：

【００５５】

【化４】

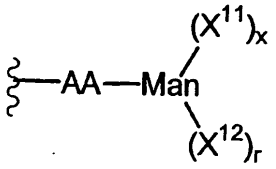


【００５６】
式中、
ｒ、ｓおよびｔは、０および１から独立して選択される整数である、
を有するグリカンを含んでなるペプチドの無細胞のインビトロ改造方法である。この方法は：
（ａ）ペプチドを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、少なくとも１つのグリコシル供与体をグリカンへ転移させるために適する条件下で接触させ、これにより該ペプチドを改造する、
ことを含んでなる。
【００５７】
好適な態様では、少なくとも１つのグリコシル供与体は修飾基を含んでなり、そして修飾基は水溶性ポリマー、治療部分、検出可能な標識、反応性リンカー基および標的部分からなる群から選択される員であり得る。好ましくは修飾基が水溶性ポリマーであり、そしてより好ましくは水溶性ポリマーはポリ（エチレングリコール）を含んでなる。より一層好ましくはポリ（エチレングリコール）は本質的に均一分散である分子量分布を有する。
【００５８】
さらにペプチドは顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－ベータ、第ＶＩＩａ因子、第ＩＸ因子、濾胞刺激ホルモン、エリトロポエチン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン－ガンマ、アルファ－１－プロテアーゼインヒビター、ベーターグルコシダーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーターンパク質、インターロイキン－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラ腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体、キメラ抗－呼吸合胞体ウイルス抗体、キメラ抗－ＣＤ２０抗体、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－腫瘍壊死因子抗体、ヒトインスリン、Ｂ型肝炎ｓＡｇおよびヒト成長ホルモンからなる群から選択され得る。
【００５９】
さらに別の観点では、ペプチドは式：
【００６０】
【化５】

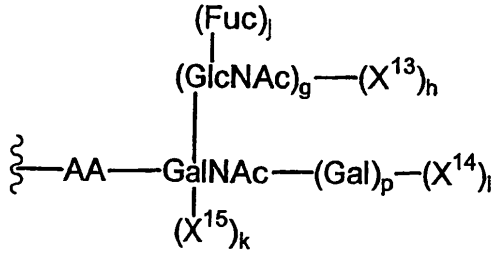


【００６１】
式中、
Ｘ^{9}およびＸ^{10}は、単糖またはオリゴ糖残基から独立して選択され；そして

ｍ、ｎおよびｆは０および１から選択される整数である、
を有する。
【００６２】
別の観点では、ペプチドは式：
【００６３】
【化６】

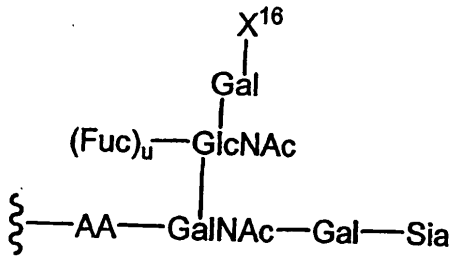


【００６４】
式中、
Ｘ１１およびＸ１２は、独立して選択されるグリコシル部分であり；そして
ｒおよびｘは０および１から独立して選択される整数である、
を有する。
【００６５】
好適な態様では、Ｘ１１およびＸ１２が（マンノース）$_q$であり、ここでｑは１から２０の間の整数から選択され、そしてｑが３以上である時、（マンノース）$_q$は直鎖および分岐構造から選択される。
【００６６】
別の観点では、ペプチドは式：
【００６７】
【化７】



【００６８】
式中、
Ｘ１３、Ｘ１４およびＸ１５は、独立して選択されるグリコシル残基であり；そして
ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋおよびｐは整数０および１から独立して選択されるが、ただし少なくとも１つのｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋおよびｐは１である、
を有する。
【００６９】
本発明の観点の１つの態様では、Ｘ１４およびＸ１５がＧｌｃＮＡｃおよびＳｉａから独立して選択される員であり；そしてｉおよびｋが整数０および１から独立して選択されるが、ただし少なくとも１つのｉおよびｋは１であり、そしてｋが１ならばｇ、ｈおよびｊは０である。
【００７０】
本発明の別の観点では、ペプチドは式：
【００７１】

【化８】



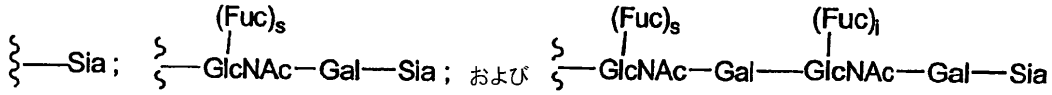
【００７２】

式中、

Ｘ１６は

【００７３】

【化９】



【００７４】

ここでｓ、ｕおよびｉは整数０および１から独立して選択される、

から選択される員である、

を有する請求項１に記載の方法。

【００７５】

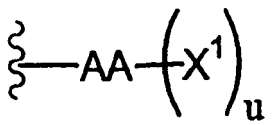
本発明の１つの態様では除去がグリコシダーゼを利用する。

【００７６】

また本発明に含まれるのは式：

【００７７】

【化１０】



【００７８】

式中、

ＡＡはペプチドの末端または内部アミノ酸残基であり；

Ｘ１は、単糖およびオリゴ糖残基から選択される、ＡＡに共有結合したグリコシル残基であり；そして

ｕは０および１から選択される整数である、

を有するペプチドの無細胞のインビトロ改造方法である。この方法は：ペプチドを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、少なくとも１つのグリコシル供与体を該短縮化グリカンへ転移させるために適する条件下で接触させ、ここで該グリコシル供与体は修飾基を含んでなり、これにより該ペプチドを改造することを含んでなる。

【００７９】

好適な態様では、少なくとも１つのグリコシル供与体が修飾基が修飾基を含んでなり、そして修飾基が水溶性ポリマー、治療部分、検出可能な標識、反応性リンカー基および標的部分からなる群から選択される員であり得る。好ましくは修飾基は水溶性ポリマーであり、そしてより好ましくは水溶性ポリマーはポリ（エチレングリコール）を含んでなる。

さらにより一層好ましくは、ポリ（エチレングリコール）は本質的に均一分散である分子量分布を有する。

【００８０】

加えてペプチドは顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－ベータ、第ＶＩＩａ因子、第ＩＸ因子、濾胞刺激ホルモン、エリトロポエチン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン－ガンマ、アルファ－１－プロテアーゼインヒビター、ベーターグルコシダーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーターンパク質、インターロイキン－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラ腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体、キメラ抗－呼吸合胞体ウイルス抗体、キメラ抗－ＣＤ２０抗体、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－腫瘍壊死因子抗体、ヒトインスリン、Ｂ型肝炎ｓＡｇおよびヒト成長ホルモンからなる群から選択され得る。

【００８１】

本発明はさらに、ペプチドとペプチドの特性を改変する修飾基との間の共有結合物（ｃｏｖａｌｅｎｔ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）を含み、ここで修飾基は完全なグリコシル連結基を介してペプチドの予め定めたグリコシルまたはアミノ酸残基で該ペプチドに共有結合している。

【００８２】

１つの観点では、修飾基は水溶性ポリマー、治療部分、検出可能な標識、反応性リンカー基および標的部分からなる群から選択される員である。

【００８３】

別の観点では、修飾基および完全なグリコシル連結基前駆体が、酵素の作用を介して共有結合した単位としてペプチドに結合し、酵素が該前駆体を完全なグリコシル連結基に転換し、これにより該結合物を形成する。

【００８４】

本発明の共有結合物は：

第１の完全なグリコシル連結基を介してペプチドの第１残基に共有結合した第１修飾基、および

第２の完全なグリコシル連結基を介してペプチドの第２残基に結合した第２グリコシル連結基、

を含んでなる。

【００８５】

１つの態様では、第１残基および第２残基が構造的に同一である。別の態様では、第１残基および第２残基が異なる構造を有する。さらなる態様では、第１残基および第２残基がグリコシル残基である。別の態様では、第１残基および第２残基はアミノ酸残基である。

【００８６】

さらに別の態様では、ペプチドが結合物（ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）を形成する前に改造される。好ましくはペプチドは完全なグリコシル連結基の受容部分を導入するために改造される。

【００８７】

別の態様では、修飾基はポリ（エチレングリコール）を含んでなる水溶性ポリマーであり、別の態様では、これは本質的に均一分散である分子量分布を有することができる。

【００８８】

さらなる態様では、ペプチドは顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－ベータ、第ＶＩＩａ因子、第ＩＸ因子、濾胞刺激ホルモン、エリトロポエチン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン－ガンマ、アルファ－１－プロテアーゼインヒビター、ベーターグルコシダーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーターンパク質、インターロイキン－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラ腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体、キメラ抗－H

ＥＲ２抗体、キメラ抗－呼吸合胞体ウイルス抗体、キメラ抗－ＣＤ２０抗体、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－腫瘍壊死因子抗体、ヒトインスリン、Ｂ型肝炎ｓＡｇおよびヒト成長ホルモンからなる群から選択される。

【００８９】

別の態様では、完全なグリコシル連結単位が、シアル酸残基、Ｇａｌ残基、ＧｌｃＮＡｃ残基およびＧａｌＮＡｃ残基からなる群から選択される員である。

【００９０】

また本発明で提供されるのは、ポリマーとグリコシル化または非－グリコシル化ペプチドとの間に共有結合物を形成する方法であって、ここでポリマーは、間に挿入され、そしてペプチドとポリマーの両方に共有結合した完全なグリコシル連結基を介してペプチドに結合している。この方法はペプチドを、ポリマーに共有的に連結したヌクレオチド糖および該ヌクレオチド糖が基質であるグリコシルトランスフェラーゼを含んでなる混合物と、結合物を形成するために十分な条件下で接触させることを含んでなる。

【００９１】

好適な態様では、ポリマーは水溶性ポリマーである。別の好適な態様では、グリコシル連結基が、ペプチドに共有結合したグリコシル残基に共有結合し、そして別の態様ではグリコシル連結基がペプチドのアミノ酸残基に共有結合する。

【００９２】

さらなる態様では、ポリマーはポリアルキレンオキシドおよびポリペプチドからなる群から選択される員を含んでなる。本発明の１態様ではポリアルキレンオキシドはポリ（エチレングリコール）でよい。別の態様では、ポリ（エチレングリコール）は約１～約２０，０００の、約１～約５，０００の重合度、また好ましくは約１～約１，０００の重合度を有する。

【００９３】

別の態様では、グリコシルトランスフェラーゼがシアリルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、ＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼ、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼおよびマンノシルトランスフェラーゼからなる群から選択される。１つの態様ではグルコシルトランスフェラーゼは組換え的に生産され、そして別の態様ではグルコシルトランスフェラーゼは組換え原核酵素、または組換え真核酵素である。

【００９４】

さらなる態様では、ヌクレオチド糖がＵＤＰ－グリコシド、ＣＭＰ－グリコシドおよびＧＤＰ－グリコシドからなる群から選択され、そして好ましくはＵＤＰ－ガラクトース、ＵＤＰ－ガラクトサミン、ＵＤＰ－グルコース、ＵＤＰ－グルコサミン、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルガラクトサミン、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミン、ＧＤＰ－マンノース、ＧＤＰ－フコース、ＣＭＰ－シアル酸、ＣＭＰ－ＮｅｕＡｃからなる群から選択される。

【００９５】

別の態様ではペプチドは治療薬である。

【００９６】

さらに別の態様では、グリコシル化ペプチドが接触前に部分的に脱グリコシル化されている。

【００９７】

さらなる態様では、完全なグリコシル連結基がシアル酸残基である。

【００９８】

さらにこの方法は無細胞環境で行われる。

【００９９】

そして別の態様では、共有結合物は単離されることができ、そして好ましくは共有結合物が膜濾過により単離される。

【０１００】

また、リンカー部分により連結された第１のグリコシル化または非－グリコシル化ペプ

チドと第２のグリコシル化または非－グリコシル化ペプチド、
ここで
リンカー部分は、第１ペプチドおよびリンカー部分の間に挿入され、そして両方を共有結合した第１の完全なグリコシル連結基を介して第１ペプチドに結合し、そして
リンカー部分は、第２ペプチドおよ該リンカー部分の間に挿入され、そして両方に共有結合した第２の完全なグリコシル連結基を介して該第２ペプチドに結合している、
との間に共有結合物を形成する方法を提供する。この方法は：
（ａ）第１ペプチドを、第１の完全なグリコシル連結基の前駆体および第２の完全なグリコシル連結基の前駆体を含んでなるリンカー部分前駆体の誘導体と接触させ；
（ｂ）（ａ）からの混合物を、第１グリコシル連結基の前駆体が基質であるグリコシルトランスフェラーゼと、第１の完全なグリコシル連結基の前駆体を第１の完全なグリコシル連結基に転換するために十分な条件下で接触させ、これによりリンカー部分前駆体と第１ペプチドとの間に第１結合物を形成し；
（ｃ）第１結合物を、第２ペプチドおよび第２の完全なグリコシル基の前駆体が基質であるグリコシルトランスフェラーゼと、第２の完全なグリコシル連結基の前駆体を第２のグリコシル連結基に転換するために十分な条件下で接触させ、これによりリンカー部分と第１グリコシル化または非グリコシル化ペプチドとの間、および第２グリコシル化または非－グリコシル化ペプチドとの間に該結合物を形成する、
ことを含んでなる。

【０１０１】
１つの観点では、リンカー部分が水溶性ポリマーを含んでなり、そして１つの態様では、水溶性ポリマーがポリ（エチレングリコール）を含んでなる。

【０１０２】
また、リンカー部分により連結された第１のグリコシル化または非－グリコシル化ペプチドと第２のグリコシル化または非－グリコシル化ペプチド、
ここで
リンカー部分は第１ペプチドに共有結合し、そして
リンカー部分は、第２ペプチドとリンカー部分の間に挿入され、そして両方に共有結合した完全なグリコシル連結基を介して第２ペプチドに結合している、
との間に共有結合物を形成する方法を提供する。この方法は：
（ａ）第１ペプチドを、
第１ペプチド上の残基に相補的な反応性の反応性官能基、および完全なグリコシル連結基の前駆体、
を含んでなるリンカー部分の活性化誘導体と、反応性官能基と残基との間に共有結合を形成するために十分な条件下で接触させ、これにより第１結合物を形成し；そして
（ｂ）第１結合物を、第２ペプチドおよび完全なグリコシル連結基の前駆体が基質であるグリコシルトランスフェラーゼと、完全なグリコシル連結基の前駆体を完全なグリコシル連結基に転換するために十分な条件下で接触させ、これにより第１グリコシル化または非グリコシル化ペプチドと、第２グリコシル化または非－グリコシル化ペプチドとの間にリンカー部分により連結された結合物を形成する、
ことを含んでなる。

【０１０３】
１つの態様では、リンカー部分はポリ（エチレングリコール）であることのできる水溶性ポリマーを含んでなる。

【０１０４】
また提供されるのは、製薬学的に許容され得る希釈剤およびポリマーとグリコシル化または非グリコシル化ペプチドとの間の共有結合物を含んでなる製薬学的組成物であり、ここでポリマーは、ペプチドとポリマーとの間に挿入され、そして両ペプチドとポリマーとに共有結合した完全なグリコシル連結基を介してペプチドに結合している。

【０１０５】

本発明はさらに、ペプチドと修飾された糖との間に結合物を形成するための組成物を含み、この組成物は：修飾された糖、グリコシルトランスフェラーゼおよびペプチド受容体基質混合物を含んでなり、ここで修飾された糖は、ポリマー、治療部分および生体分子から選択されるそれに共有結合した員を有する。

【０１０６】

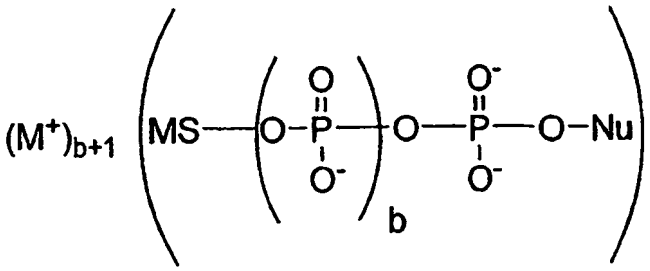
また本発明は　本発明の方法を使用して改造されたペプチドおよび改造されたペプチドを含んでなる製薬学的組成物を含む。

【０１０７】

また本発明で提供するのは、式：

【０１０８】

【化１１】



【０１０９】

式中、

ＭＳは修飾基に共有結合した糖を含んでなる修飾された糖であり；

Ｎｕはヌクレオシドであり；そして

ｂは０から２の整数である、

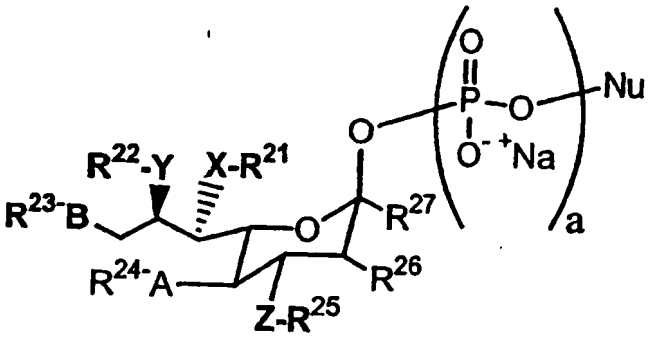
を有する化合物である。

【０１１０】

１つの観点では、式：

【０１１１】

【化１２】



【０１１２】

式中、

Ｘ、Ｙ、Ｚ、ＡおよびＢは、Ｓ、ＯおよびＮＨから独立して選択される員であり；

R^{21}、R^{22}、R^{23}、R^{24}およびR^{25}は、Ｈおよびポリマーから独立して選択される員であり；

R^{26}は、Ｈ、ＯＨおよびポリマーから選択される員であり；

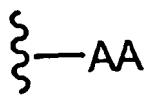
R^{27}はCOO^-およびNa^+から選択される員であり；

Ｎｕはヌクレオシドであり；そして

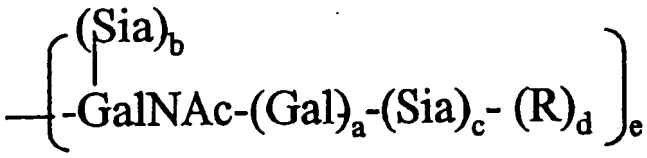
ａは１から３の整数である、

を有する化合物を含む。

【０１１３】
本発明はさらに、式：
【０１１４】
【化１３】

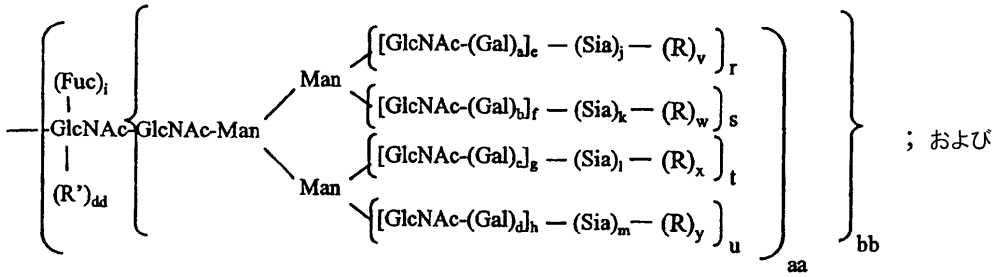


【０１１５】
式中、
ＡＡはペプチドの末端または内部アミノ酸残基である、
を有するペプチドの無細胞のインビトロ改造方法を提供する。この方法は；
該ペプチドを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、少なくとも１つのグリコシル供与体を該アミノ酸残基へ転移させるために適する条件下で接触させ、ここでグリコシル供与体は修飾基を含んでなり、これにより該ペプチドを改造する、
ことを含んでなる。
【０１１６】
以下に検討する各態様では、具体的な改造スキームおよびペプチドが単に本発明の好適態様を強調するために確認される。
【０１１７】
したがって本発明は、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を含み、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介してＧ－ＣＳＦペプチドに共有結合し、Ｇ－ＣＳＦペプチドが式：
【０１１８】
【化１４】

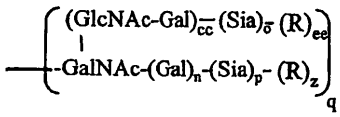


【０１１９】
式中、
ａ、ｂ、ｃおよびｅは、０および１から独立して選択される員であり；
ｄは０であり；そして
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースである、
を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は
（ａ）Ｇ－ＣＳＦペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび該修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基の形成に適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１２０】
１つの態様ではこの方法はさらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、Ｇ－ＣＳＦペプチドをシアリダーゼと、Ｇ－ＣＳＦペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１２１】
別の態様では、この方法はさらに：
（ｃ）工程（ａ）の前に、Ｇ－ＣＳＦペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースをＧ－ＣＳＦペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０１２２】
さらに別の態様では、この方法はさらに：
（ｄ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０１２３】
別の態様では、この方法はさらに：
（ｅ）工程（ａ）の前に、Ｇ－ＣＳＦペプチドをＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼおよびＧａｌＮＡｃ供与体と、ＧａｌＮＡｃをＧ－ＣＳＦペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１２４】
さらなる態様では、この方法はさらに：
（ｆ）工程（ａ）の前に、Ｇ－ＣＳＦペプチドを、合成的に作用するエンド－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼおよびＧａｌＮＡｃ供与体と、ＧａｌＮＡｃ該Ｇ－ＣＳＦペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１２５】
さらなる態様では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。
【０１２６】
上記に程度するＧ－ＣＳＦペプチドの式に関する具体的な態様では、ａ、ｂ、ｃおよびｅが０である。あるいはａおよびｅが０および１から独立して選択される員であり；そしてｂ、ｃおよびｄが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄおよびｅが０および１から独立して選択される員である。
【０１２７】
本発明はさらに上記方法により形成されたＧ－ＣＳＦペプチド結合物を含む。
【０１２８】
また、インターフェロンアルファペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法も含み、ここで修飾基は完全なグリコシル連結基を介して糖ペプチドに共有結合し、糖ペプチドが：
【０１２９】
【化１５】



；および

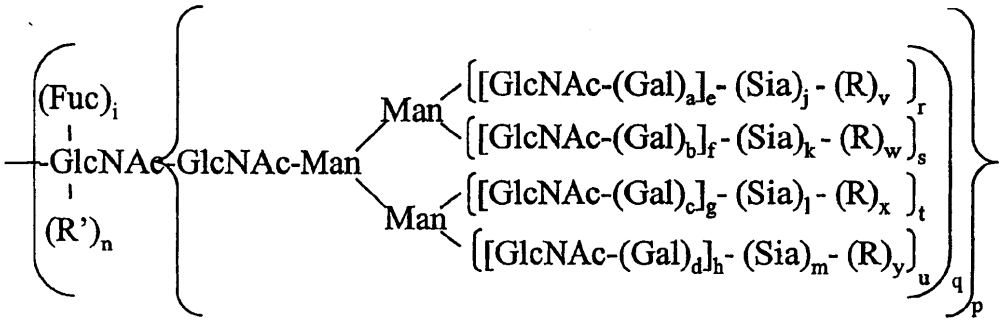


【０１３０】
ここで
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｅｅは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚは０であり；そして

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり、
Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基または複合糖質である、
から選択される式を有するグリコシル残基を含んでなる。
【０１３１】
この方法は：
（ａ）糖ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼ、合成的に作用するエンド－アセチルガラクトサミニダーゼおよびトランス－シアリダーゼから選択される員、および修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１３２】
１つの態様では、この方法はさらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをシアリダーゼと、糖ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１３３】
別の態様では、この方法はさらに：
（ｃ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０１３４】
さらなる態様では、この方法はさらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる。
【０１３５】
さらなる態様では、この方法はさらに：
（ｅ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをエンドグリカナーゼと、糖ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１３６】
さらなる態様では、この方法はさらに：
（ｆ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１３７】
さらにこの方法はまた：
（ｇ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１３８】
またこの方法はさらに：
（ｈ）工程（ｂ）の前に、糖ペプチドをエンドグリカナーゼと、糖ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１３９】
本発明はさらに：
（ｉ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをマンノシダーゼと、糖ペプチドからマンノースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１４０】
加えて本発明はさらに：
（ｊ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１４１】
１つの観点では、修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖

質から選択される員である。
【０１４２】
本発明に従い、そして上記に開示したインターフェロンアルファペプチドに関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ａａおよびｂｂが１であり；ｅ、ｆ、ｇおよびｈが、１から４の整数から独立して選択される員であり；ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびｃｃが０および１から独立して選択される員であり；そしてｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚ、ｄｄおよびｅｅが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚ、ｃｃ、ｄｄおよびｅｅが０であり；ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そしてａａおよびｂｂが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；ｈが１から３の整数から独立して選択される員であり；ｄｄ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてａａおよびｂｂが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄが０であり；ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そしてａａおよびｂｂが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｄｄが０であり；ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；そしてａａおよびｂｂが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄが０であり；そしてａａおよびｂｂが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｈが１から３の整数から独立して選択される員であり；ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄが０であり；そしてａａおよびｂｂが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄが０であり；ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そしてａａおよびｂｂが１である。あるいはｎ、ｏおよびｐが０および１から独立して選択される員であり；ｑが１であり；そしてｚ、ｃｃおよびｅｅが０である。あるいはｎおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；そしてｏ、ｐ、ｚ、ｃｃおよびｅｅが０である。あるいはｎが０であり；ｑが１であり；そしてｏ、ｐ、ｚ，ｃｃおよびｅｅが０である。あるいはｎ、ｏ、ｐおよびｆが０および１から独立して選択される員であり；ｑが１であり；そしてｚおよびｅｅが０である。あるいはｎ、ｏ、ｐおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；そしてｚ、ｃｃおよびｅｅが０である。あるいはｎおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；そしてｏ、ｐ、ｚ、ｃｃおよびｅｅが０である。あるいはｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｚ、ｃｃおよびｅｅが０である。
【０１４３】
また開示された方法により形成されたインターフェロンアルファペプチド結合物を提供する。
【０１４４】
本発明は、インターフェロンベータペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、修飾基が完全なグリコシル連結基を介してインターフェロンベータペプチドに共有結合し、インターフェロンベータペプチドが式：
【０１４５】

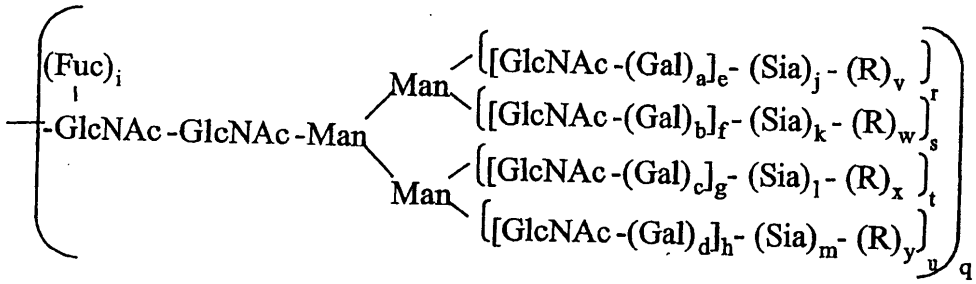
【化１６】



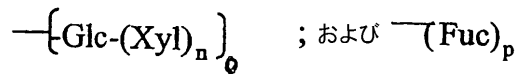
【０１４６】
ここで
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨ、またはグリコシル、修飾基または複合糖質基である、
を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は
（ａ）インターフェロンベータペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよびトランスーシアリダーゼから選択される員および修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１４７】
１つの態様では、この方法はさらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、インターフェロンベータペプチドをシアリダーゼと、インターフェロンベータペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１４８】
別の態様では、この方法はさらに：
（ｃ）工程（ａ）からの生成物を、修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０１４９】
さらに別の態様では、この方法もさらに：
（ｄ）工程（ａ）の前に、上記インターフェロンベータペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる。
【０１５０】
さらに別の態様では、この方法はさらに：
（ｅ）工程（ａ）の前に、インターフェロンベータペプチドをエンドグリカナーゼと、インターフェロンベータペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１５１】
またこの方法はさらに：
（ｆ）工程（ａ）の前に、インターフェロンベータペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃをインターフェロンベータペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１５２】

加えてこの方法はさらに：
（ｇ）工程（ａ）の前に、インターフェロンベータペプチドを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１５３】
さらに別の態様では、この方法はさらに：
（ｈ）工程（ｂ）の前に、インターフェロンベータペプチドをエンドグリカナーゼと、インターフェロンベータペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１５４】
さらなる態様では、この方法はさらに：
（ｉ）工程（ａ）の前に、インターフェロンベータペプチドをマンノシダーゼと、インターフェロンベータペプチドからマンノースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１５５】
加えて、この方法はさらに：
（ｊ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１５６】
１つの観点では、修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。
【０１５７】
好適な態様において、および上記に開示したベータインターフェロンペプチドの式に関してｈが１から３の間の整数から独立して選択される員であり；ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｑ、ｐが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そしてｑ、ｐが１である、。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｐ、ｑが１であり；そしてｉが０および１から独立して選択される。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、Ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｐ、ｑが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｎが０であり；ｐ、ｑが１であり；そしてｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｑ、ｐが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｅ、ｆ、ｇが０から３の間の整数から選択される員であり；ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｑ、ｐが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｐおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。
【０１５８】
さらに含まれるのは、上記方法により形成されたインターフェロンベータペプチド結合物である。
【０１５９】
本発明はまた、第ＶＩＩａ因子ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を提供し、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介して第ＶＩＩａ因子ペプチドに共有結合し、第ＶＩＩａ因子ペプチドが：
【０１６０】

【化１７】



;



；および

【０１６１】

ここで

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｎは０から６の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；そして

Ｒは修飾基、マンノース、オリゴマンノース、シアリルルイス^{x}（ＳｉａｌｙｌＬｅｗｉｓ^{x}）またはシアリルルイス^{a}（ＳｉａｌｙｌＬｅｗｉｓ^{a}）である、

から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなる。

【０１６２】

この方法は：

（ａ）第ＶＩＩａ因子ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０１６３】

好適な態様では、この方法はさらに：

（ｂ）工程（ａ）の前に、第ＶＩＩａ因子ペプチドをシアリダーゼと、第ＶＩＩａ因子ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０１６４】

さらに別の態様では、この方法はさらに：

（ｃ）工程（ａ）の前に、第ＶＩＩａ因子ペプチドをガラクトシダーゼと、第ＶＩＩａ因子ペプチドからガラクトースを除去するためにに適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０１６５】

別の態様では、この方法は：

（ｄ）工程（ａ）の前に、第ＶＩＩａ因子ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを第ＶＩＩａ因子ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０１６６】

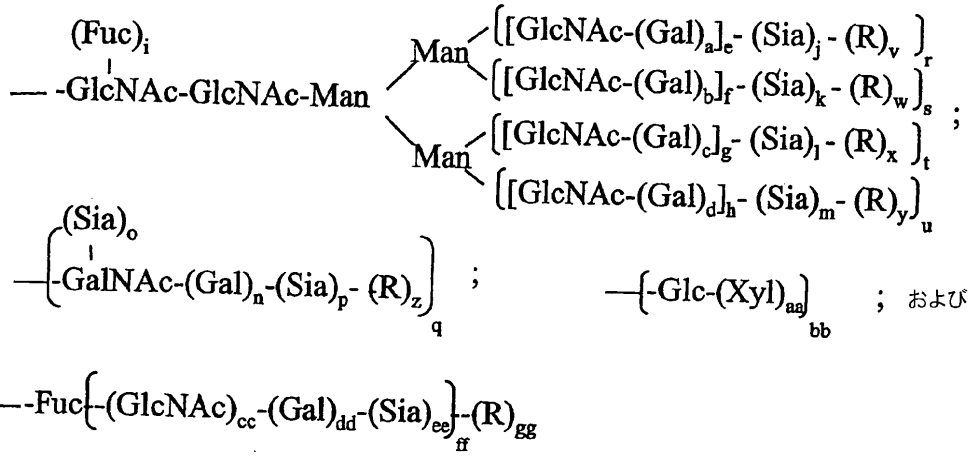
さらなる態様では、この方法は：

（ｅ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０１６７】

１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。

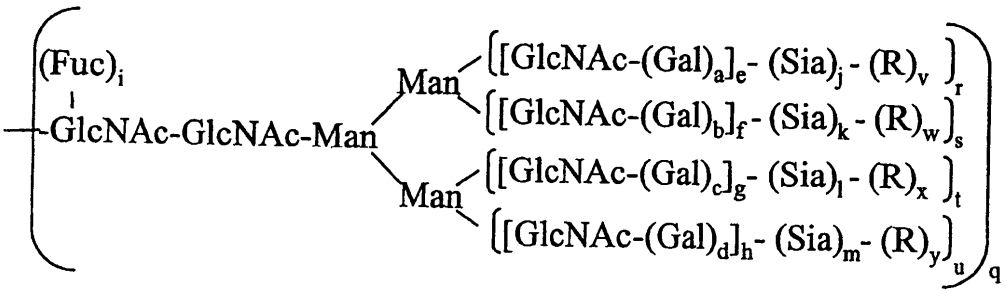
【０１６８】
好適な態様において、および上記に開示した第ＶＩＩａ因子の式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｇ、ｉ、ｊ、ｌ、ｏ、ｐおよびｑが、０および１から独立して選択される員であり；ｒおよびｔが１であり；ｆ、ｈ、ｋ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｎが０から４の整数から選択される。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｎが０から４の整数から選択される員である。
【０１６９】
加えて、本明細書に開示する方法により形成された第ＶＩＩａ因子ペプチド結合物を含む。
【０１７０】
本発明はさらに第ＩＸ因子ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を提供し、ここで、修飾基が完全なグリコシル連結基を介して第ＩＸ因子ペプチドに共有結合し、第ＩＸ因子ペプチドが：
【０１７１】
【化１８】



【０１７２】
ここで
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄ、ｅｅ、ｆｆおよびｇｇは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびａａは０から６の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースである、
から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は
（ａ）第ＩＸ因子ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１７３】
１つの態様では、この方法はさらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、第ＩＸ因子ペプチドをシアリダーゼと、第ＩＸ因子ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１７４】
別の態様では、この方法はさらに：（ｃ）工程（ａ）で形成された生成物を、シアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適す

る条件下で接触させることを含んでなる。
【０１７５】
加えてこの方法は：
（ｄ）工程（ｂ）からの生成物を、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１７６】
さらにこの方法は：
（ｅ）工程（ｄ）からの生成物を、ＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１７７】
さらに別の態様では、この方法はさらに：
（ｄ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０１７８】
また、修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員であるという事実も含む。
【０１７９】
さらなる態様において、および上記に開示した第ＩＸペプチド因子の式に関して、ａ、ｂ、ｃおよびｄが１であり；ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から４の整数から独立して選択される員であり；ａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄ、ｅｅ、ｆｆ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；そしてｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｇｇが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｎ、ｑが０および１から独立して選択され；ａａ、ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から４の整数から独立して選択される員であり；ｂｂ、ｃｃ、ｄｄ、ｅｅ、ｆｆ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｉ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｇｇが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｎ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｆｆが１であり；ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびａａが１から４の整数から独立して選択される員であり；ｑ、ｅｅ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｇｇが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄおよびｑが１であり；ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から４の整数から独立して選択される員であり；ａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄ、ｅｅ、ｆｆ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｇｇが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｑ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｆｆが１であり；ａａ、ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から４の整数から独立して選択される員であり；ｅｅ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｇｇが０である。
【０１８０】
また上記に開示した方法により形成された第ＩＸ因子ペプチド結合物も含む。
【０１８１】
本発明は濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法も含み、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介してＦＳＨペプチドに共有結合し、ＦＳＨペプチドが式：
【０１８２】

【化１９】



【０１８３】
式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；そして
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースである、
を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：
（ａ）ＦＳＨペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１８４】
１つの態様では、この方法は：
（ｂ）工程（ａ）の前に、ＦＳＨペプチドをシアリダーゼと、ＦＳＨペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１８５】
別の態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）の生成物を、シアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１８６】
さらに別の態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）の前に、該ＦＳＨペプチドをガラクトシダーゼと、ＦＳＨペプチドからガラクトースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１８７】
さらなる態様では、この方法は：
（ｅ）工程（ａ）の前に、ＦＳＨペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる。
【０１８８】
さらに別の態様では、この方法は：
（ｆ）工程（ａ）の前に、ＦＳＨペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースをＦＳＨペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１８９】
別の態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）からの生成物を、修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成する。
【０１９０】
さらなる態様では、この方法は：

（ｅ）工程（ｂ）の前に、ＦＳＨペプチドをエンドグリカナーゼと、ＦＳＨペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０１９１】

別の態様では、この方法は：

（ｆ）工程（ａ）の前に、ＦＳＨペプチドをＮ－アセチルアセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃをＦＳＨペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０１９２】

さらに別の態様では、修飾基がポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。

【０１９３】

さらに好適な態様において、および上記に開示したＦＳＨペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そしてｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌおよびｍが０であり；ｉ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択され；ｐが１であり；Ｒ（分岐または直鎖）はマンノースおよびオリゴマンノースから選択される員である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗおよびｙが０であり；ｉが０または１であり；そしてｑが１である。

【０１９４】

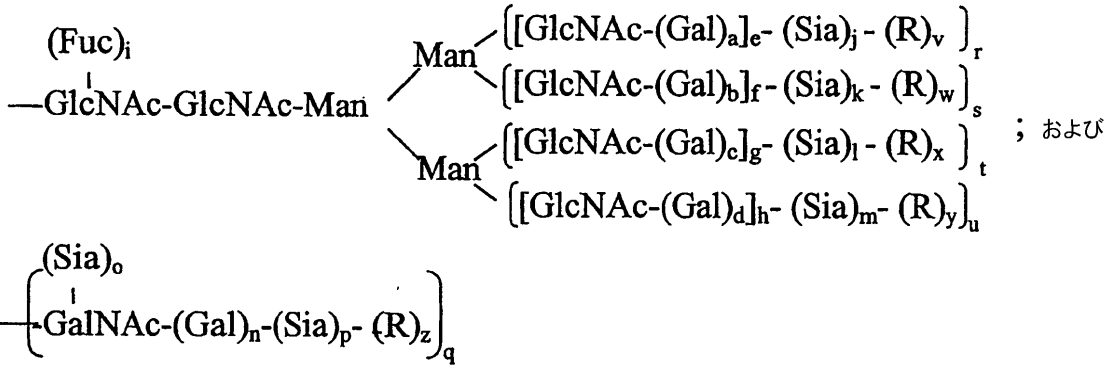
また上記の方法により形成されたＦＳＨペプチド結合物も含む。

【０１９５】

本発明はさらに、エリトロポエチン（ＥＰＯ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を提供し、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介してＥＰＯペプチドに共有結合し、ＥＰＯペプチドが：

【０１９６】

【化２０】



【０１９７】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の間の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の間の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚは０であり；そして

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースである、から選択される員である式を

有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：
（ａ）ＥＰＯペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、該完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１９８】
１つの態様では、この方法は：
（ｂ）工程（ａ）の前に、ＥＰＯペプチドをシアリダーゼと、ＥＰＯペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０１９９】
別の態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）の生成物を、シアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２００】
さらに別の態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）の前に、ＥＰＯペプチドを合成的に作用するガラクトシダーゼと、ＥＰＯペプチドにガラクトースを付加するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２０１】
さらなる態様では、この方法は：
（ｅ）工程（ａ）の前に、ＥＰＯペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースをＥＰＯペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２０２】
さらなる態様では、この方法は：
（ｆ）工程（ｅ）からの生成物をＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２０３】
さらにこの方法は：
（ｇ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０２０４】
またこの方法は：
（ｈ）工程（ａ）の前に、ＥＰＯペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃをＥＰＯペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２０５】
別の観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。
【０２０６】
好適な態様において、および上記のＥＰＯペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｎおよびｑが１であり；ｈが１から３の間の整数から選択される員であり；ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そしてｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員あり；そしてｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｎおよびｑが１であり；ｈが１から３の間の整数から選択される員であり；ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独

立して選択される員であり；そしてｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そしてｅ、ｇ、ｉ、ｎ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そしてｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員である。あるいはｑが１であり；ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｖ、ｗ、ｘおよびｚが０である。

【０２０７】

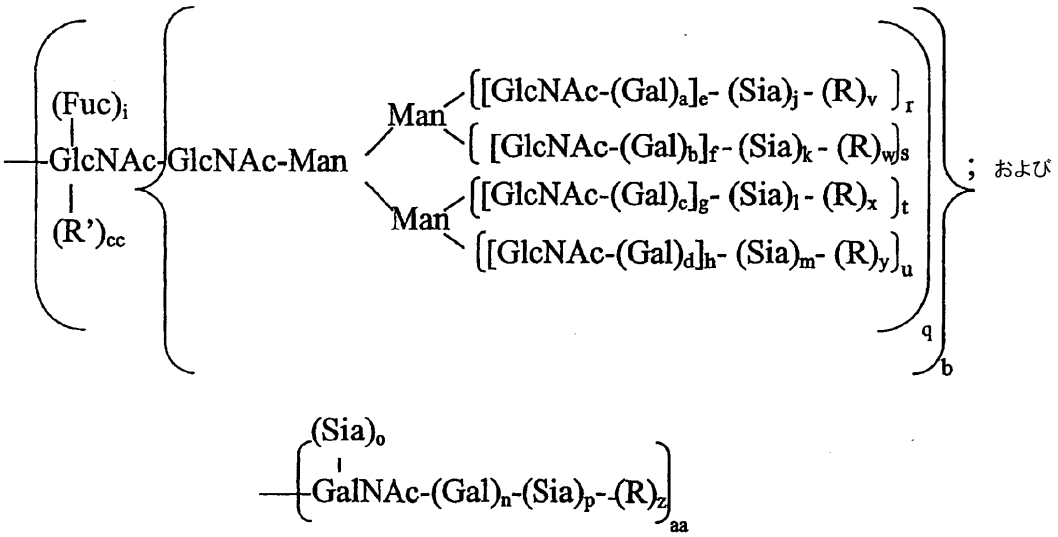
また、上記の方法により形成されたＥＰＯペプチド結合物も含む。

【０２０８】

本発明はさらに、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を提供し、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介してＧＭ－ＣＳＦペプチドに共有結合し、ＧＭ－ＣＳＦペプチドが：

【０２０９】

【化２１】



【０２１０】

ここで、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ａａ、ｂｂおよびｃｃは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨまたはグリコシル残基または修飾基または複合糖質である、

から選択される式を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：

（ａ）ＧＭ－ＣＳＦペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２１１】

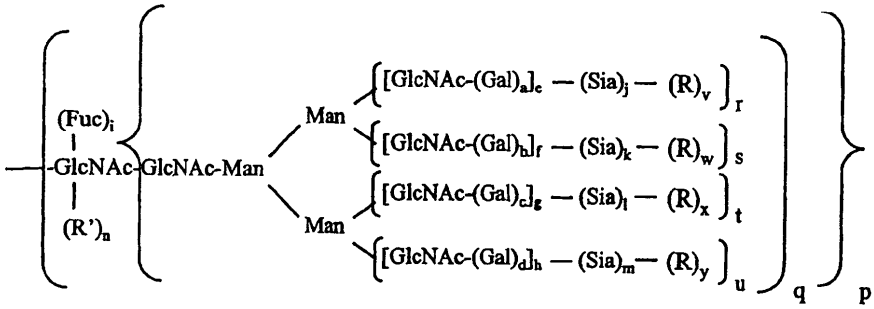
１つの態様では、この方法は：

（ｂ）工程（ａ）の前に、ＧＭ－ＣＳＦペプチドをシアリダーゼと、ＧＭ－ＣＳＦペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２１２】

別の態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０２１３】
さらに別の態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）の前に、ＧＭ－ＣＳＦペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる。
【０２１４】
さらなる態様では、この方法は：
（ｅ）工程（ａ）の前に、ＧＭ－ＣＳＦペプチドをエンドグリカナーゼと、、ＧＭ－ＣＳＦペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２１５】
またこの方法は：
（ｆ）工程（ａ）の前に、ＧＭ－ＣＳＦペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃをＧＭ－ＣＳＦペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２１６】
さらにこの方法は：
（ｇ）工程（ａ）の前に、ＧＭ－ＣＳＦペプチドをマンノシダーゼと、ＧＭ－ＣＳＦペプチドからマンノース残基を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２１７】
さらにこの方法は：
（ｈ）工程（ａ）の前に、ＧＭ－ＣＳＦペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物に転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２１８】
１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。
【０２１９】
さらに好適な態様において、および上記のＧＭ－ＣＳＦペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびａａが０および１から独立して選択される員であり；ｂｂ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｎが１であり；そしてｃｃ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびａａが０および１から独立して選択される員であり；ｂｂ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｎが０および１から独立して選択される員であり；そしてｃｃ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である。あるいはｃｃ、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そしてｅ、ｇ、ｉ、ｎ、ｑ、ｒ、ｔおよびａａが０および１から独立して選択される員であり；そしてｂｂが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｚおよびｃｃが０であり；ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびａａが、０および１から独立して選択される員であり；ｂｂが１であり；そしてＲがマンノースまたはオリゴマンノースである。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ａａおよびｂｂが０および１から　独立して選択される員であり；ｎ、ｐ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｃｃが０である。
【０２２０】
さらに上記方法により形成されたＧＭ－ＣＳＦペプチド結合物を含む。
【０２２１】
本発明は、インターフェロンガンマペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法も含み、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介してインターフェロンガンマペプチドに共有結合し、インターフェロンガンマペプチドが式：

【０２２２】
【化２２】



【０２２３】
式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨ、またはグリコシル残基、複合糖質または修飾基である、
を有するグリコシル残基を含んでなる。
【０２２４】
該方法は：
（ａ）インターフェロンガンマペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび合成的に作用するガラクトシダーゼから選択される員および修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２２５】
１つの態様では、この方法は：
（ｂ）工程（ａ）の前に、インターフェロンガンマペプチドをシアリダーゼと、インターフェロンガンマペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２２６】
別の態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０２２７】
さらなる態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）の前に、インターフェロンガンマペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる。
【０２２８】
この方法はまた：
（ｅ）工程（ａ）の前に、インターフェロンガンマペプチドをエンドグリカナーゼと、インターフェロンガンマペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２２９】
加えて本発明は：

（ｆ）工程（ａ）の前に、インターフェロンガンマペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃをインターフェロンガンマペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２３０】

また本発明は：

（ｇ）工程（ａ）の前に、インターフェロンガンマペプチドを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２３１】

さらなる態様では、本発明は：

（ｈ）工程（ａ）の生成物を、シアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２３２】

別の観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。

【０２３３】

上記のインターフェロンガンマペプチドに関して、さらに好適な態様にはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｐ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であるものを含む。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｐ、ｑ、ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そしてｐが１である。ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｎが０であり；ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；そしてｐが１であり；そしてＲがマンノースまたはオリゴマンノースである。ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｐが１であり；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。

【０２３４】

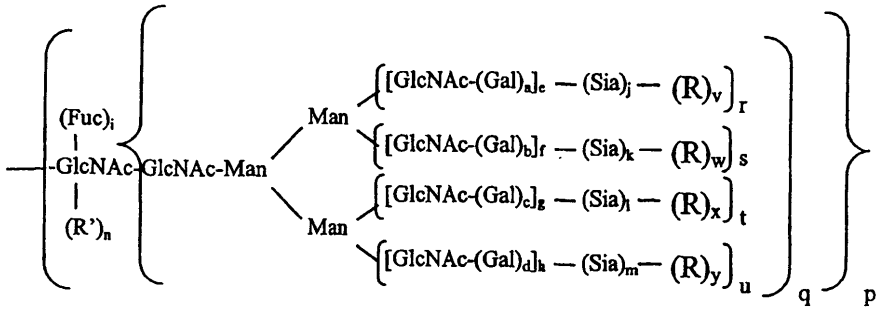
さらに上記方法により形成されるインターフェロンガンマペプチド結合物を含む。

【０２３５】

本発明はさらに、アルファ１プロテアーゼインヒビター（Ａ－１－ＰＩ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を含み、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介してＡ－１－ＰＩペプチドに共有結合し、Ａ－１－ＰＩペプチドが式：

【０２３６】

【化２３】



【０２３７】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選

択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；
ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；
ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’はＨ、またはグリコシル残基、複合糖質または修飾基である、
を有するグリコシル残基を含んでなる。
【０２３８】
この方法は：
（ａ）Ａ－１－ＰＩペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２３９】
１つの態様では、この方法は：
（ｂ）工程（ａ）の前に、Ａ－１－ＰＩペプチドをシアリダーゼと、Ａ－１－ＰＩペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２４０】
別の態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、こうして完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０２４１】
この方法はまた：
（ｄ）工程（ａ）の前に、Ａ－１－ＰＩペチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせ物と接触させることを含んでなる。
【０２４２】
さらにこの方法は：
（ｅ）工程（ａ）の前に、Ａ－１－ＰＩペプチドをエンドグリカナーゼと、Ａ－１－ＰＩペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２４３】
別の態様では、この方法は：
（ｆ）工程（ａ）の前に、Ａ－１－ＰＩペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃをＡ－１－ＰＩペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２４４】
加えて本発明は：
（ｇ）工程（ａ）の前に、Ａ－１－ＰＩペプチドをマンノシダーゼと、Ａ－１－ＰＩペプチドからマンノースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２４５】
さらに本発明は：
（ｈ）工程（ａ）の前に、Ａ－１－ＰＩペプチドをマンノシダーゼ、キシロシダーゼ、ヘキソサミニダーゼおよびその組み合わせから選択される員と、Ａ－１－ＰＩペプチドからグリコシル残基を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２４６】
１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。
【０２４７】
他の好適な態様では、および上記Ａ－１ＰＩペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員で

あり；そしてｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員である。あるいはｎ、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌおよびｍが０であり；そしてｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；そしてｐが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｐおよびｑが０であり；ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｐ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｎおよびｑが１である。

【０２４８】

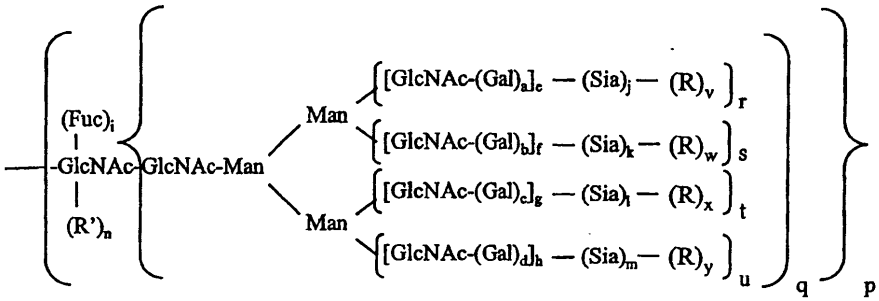
また上記記載の方法により形成されるアルファ１プロテアーゼインヒビターペプチド結合物も提供する。

【０２４９】

また本発明にはベータグルコシダーゼペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を含み、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介してベータグルコシダーゼペプチドに共有結合し、ベータグルコシダーゼペプチドが式：

【０２５０】

【化２４】



【０２５１】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨ、またはグリコシル残基、複合糖質または修飾基である、

を有するグリコシル残基を含んでなる。

【０２５２】

この該方法は：

（ａ）ベータグルコシダーゼペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

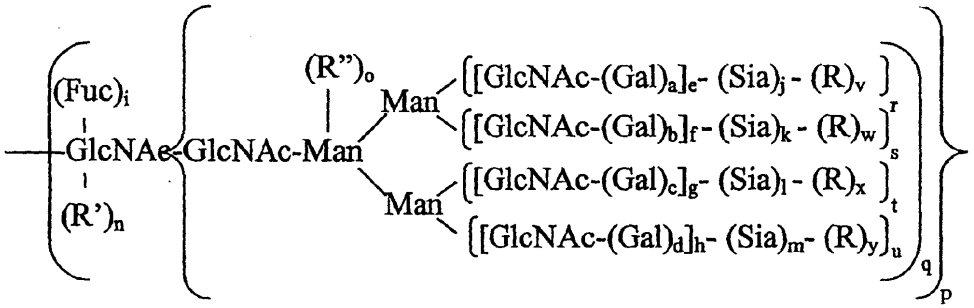
【０２５３】

１つの態様では、この方法は：

（ｂ）工程（ａ）の前に、ベータグルコシダーゼペプチドをシアリダーゼと、ベータグルコシダーゼペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含ん

でなる。
【０２５４】
別の態様では、この方法はさらに：
（ｃ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０２５５】
別の態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）の前に、ベータグルコシダーゼペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせ物と接触させることを含んでなる。
【０２５６】
さらなる態様では、この方法は：
（ｅ）工程（ａ）の前に、ベータグルコシダーゼペプチドをエンドグリカナーゼと、ベータグルコシダーゼペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２５７】
加えて、この方法は：
（ｆ）工程（ａ）の前に、ベータグルコシダーゼペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該ベータグルコシダーゼペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２５８】
さらにこの方法は：
（ｇ）工程（ａ）の前に、ベータグルコシダーゼペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２５９】
別の観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。
【０２６０】
好適な態様において、および上記のベータグルコシダーゼペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｐ、ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そしてｐが１である。あるいはｎ、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌおよびｍが０であり；ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；ｐが１であり；そしてＲがマンノースまたはオリゴマンノースである。
【０２６１】
本発明はまた、上記記載の方法により形成されたベータグルコシダーゼペプチド結合物も含む。
【０２６２】
本発明はさらに組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を提供し、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介してＴＰＡペプチドに共有結合し、ＴＰＡペプチドが式：
【０２６３】

【化２５】



【０２６４】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の整数から独立して選択される員であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；

Ｒ’はＨ、またはグリコシル残基、複合糖質または修飾基であり；そして

Ｒ”はグリコシル基、複合糖質または修飾基である、

を含んでなるグリコシルサブユニットを有する。この方法は：

（ａ）ＴＰＡペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび合成的に作用するグリコシダーゼから選択される員および修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２６５】

１つの態様では、この方法はさらに：

（ｂ）工程（ａ）の前に、ＴＰＡペプチドをシアリダーゼと、ＴＰＡペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２６６】

別の態様では、この方法は：

（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２６７】

さらに別の態様では、この方法は：

（ｄ）工程（ａ）の前に、ＴＰＡペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースをＴＰＡペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２６８】

さらに別の態様では、この方法は：

（ｅ）工程（ａ）の前に、上記ＴＰＡペプチドをグリルコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる。

【０２６９】

さらに別の態様では、この方法は：

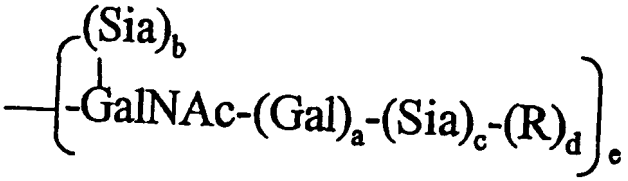
（ｆ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成することを含んでなる。

【０２７０】

別の態様では、この方法は：

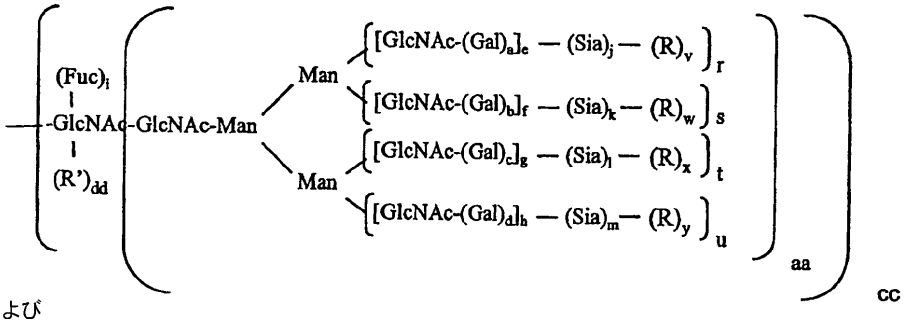
（ｇ）工程（ａ）の前に、上ＰＡペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃをＴＰＡプチドへ転移させるために適する

条件下で接触させることを含んでなる。
【０２７１】
加えてこの方法は：
（ｈ）工程（ａ）の前に、ＴＰＡペプチドをエンドグリカナーゼと、ＴＰＡペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２７２】
さらに別の態様では、この方法は：
（ｉ）工程（ａ）の前に、ＴＰＡペプチドをマンノシダーゼ、キシロシダーゼ、ヘキソサミニダーゼおよびそれらの組み合わせから選択される員と、ＴＰＡペプチドからグリコシル残基を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２７３】
１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。
【０２７４】
好適な態様では、および上記のＴＰＡペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄが１であり；ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から３の間の整数から選択される員であり；ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｎ、ｏ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そしてｑおよびｐが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｎ、ｏ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇおよびｐが１であり；ｈが１から３の間の整数から選択される員であり；ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｉ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｎ、ｏ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；ｏが１であり；そしてＲ”がキシロースである。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；そしてｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；そしてｎ、ｏ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｉおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；そしてｐが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｉおよびｑが０および１から独立して選択される員であり；ｐが０であり；そしてｎが１である。
【０２７５】
また上記方法により形成されたＴＰＡペプチド結合物も含む。
【０２７６】
本発明は、インターロイキン２（ＩＬ－２）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法も提供し、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介してＩＬ－２プチドに共有結合し、ＩＬ－２ペプチドが式：
【０２７７】
【化２６】

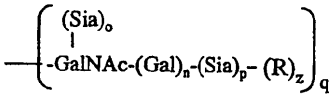


【０２７８】
式中、
ａ、ｂ、ｃおよびｅは０および１から独立して選択される員であり；
ｄは０であり；そして
Ｒは修飾基である、
を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：
（ａ）ＩＬ－２ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２７９】
１つの態様では、この方法はさらに：
（ｂ）工程（ａ）の前に、ＩＬ－２ペプチドをシアリダーゼと、ＩＬ－２ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２８０】
別の態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）の前に、ＩＬ－２ペプチドを合成的に作用するエンド－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼと、ＧａｌＮＡｃをＩＬ－２ペプチドに付加するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２８１】
さらなる態様では、本発明は：
（ｄ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０２８２】
さらに、本発明は：
（ｅ）工程（ａ）の前に、ＩＬ－２ペプチドをＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼおよびＧａｌＮＡｃ供与体と、ＧａｌＮＡｃをＩＬ－２ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２８３】
加えて本発明は：
（ｆ）工程（ａ）の前に、ＩＬ－２ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースをＩＬ－２ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０２８４】
１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。
【０２８５】
好適な態様では、および上記のＩＬ－２ペプチドの式に関して、ａおよびｅが０および１から独立して選択される員であり；そしてｂ、ｃおよびｄが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄおよびｅが０である。
【０２８６】
本発明は加えて、上記の方法により形成されたＩＬ－２ペプチド結合物を含む。
【０２８７】
また本発明に含まれるのは、第ＶＩＩＩ因子ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であり、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該糖ペプチドに共有結合し、該糖ペプチドが：
【０２８８】

【化２７】



および



【０２８９】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ａａ、ｃｃおよびｄｄは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の間の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚは０であり；そして

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；

Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基および複合糖質から選択される員である、

から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：

（ａ）該糖ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２９０】

１つの態様では、この方法は：

（ｂ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをシアリダーゼと、糖ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２９１】

別の態様では、この方法は：

（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２９２】

さらなる態様では、この方法は：

（ｄ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２９３】

またこの方法は：

（ｅ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる。

【０２９４】

さらにこの方法は：

（ｆ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼお

よびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２９５】

加えてこの方法は：

（ｇ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをエンドグリカナーゼと、糖ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２９６】

この方法はまた：

（ｈ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２９７】

さらにこの方法は：

（ｉ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをマンノシダーゼと、糖ペプチドからマンノースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０２９８】

１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。

【０２９９】

好適な態様において、および上記の第ＶＩＩＩ因子ペプチドの式に関して、ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１から４の間の整数から独立して選択される員であり；ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ａａおよびｃｃが０および１から独立して選択される員であり；そしてｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびがｄｄが０である。

【０３００】

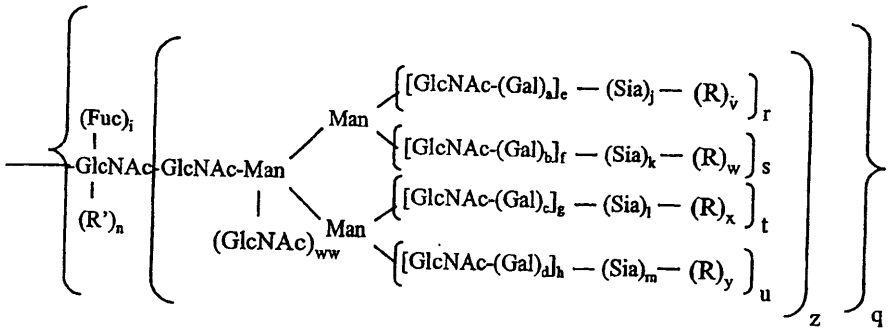
また上記の方法により形成された第ＶＩＩＩペプチド結合物も提供する。

【０３０１】

さらに本発明では、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）アルファ受容体／ＩｇＧ融合ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を提供し、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介して糖ペプチドに共有結合し、糖ペプチドが式：

【０３０２】

【化２８】



【０３０３】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｗ、ｗｗおよびｚは０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の間の整数から独立して選択される員であり；

ｎ、ｖ、ｘおよびｙは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基および複合糖質から選択される員である、

を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：

（ａ）該糖ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合した該グ

リコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３０４】

１つの態様では、この方法は：

（ｂ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３０５】

別の態様では、この方法は：

（ｃ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをエンドグリカナーゼと、糖ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３０６】

１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。

【０３０７】

好適な態様において、および上記ＴＮＦアルファ受容体／ＩｇＧ融合ペプチドの式に関して、ａ、ｃ、ｉ、ｊおよびｌが０および１から独立して選択される員であり；ｅ、ｇ、ｑ、ｒ、ｔおよびｚが１であり；そしてｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｑおよびｚが１である。

【０３０８】

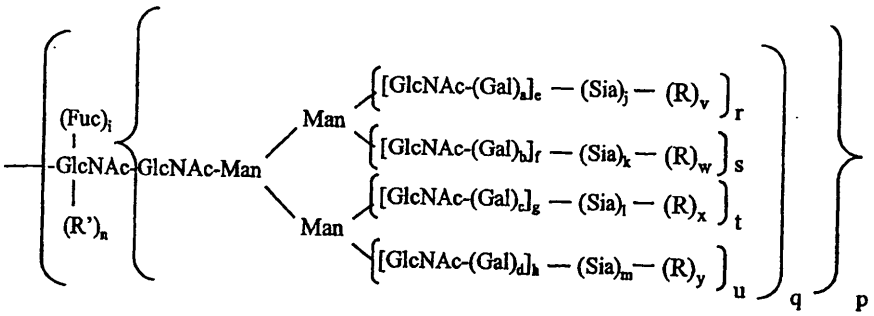
また上記の方法により形成されたＴＮＦアルファ受容体／ＩｇＧ融合結合物も提供する。

【０３０９】

本発明はウロキナーゼペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法も含み、修飾基が完全なグリコシル連結基を介してウロキナーゼペプチドに共有結合し、ウロキナーゼペプチドが式：

【０３１０】

【化２９】



【０３１１】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨ、グリコシル残基、複合糖質または修飾基である、

を有するグリコシル残基を含んでなる。
【０３１２】
この方法は：
（ａ）該ウロキナーゼペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３１３】
１つの態様では、この方法は：
（ｂ）工程（ａ）の前に、ウロキナーゼペプチドをシアリダーゼと、ウロキナーゼペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３１４】
別の態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３１５】
さらに別の態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）の前に、ウロキナーゼペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースをウロキナーゼペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３１６】
さらなる態様では、この方法は：
（ｅ）工程（ａ）の前に、記ウロキナーゼペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる。
【０３１７】
別の態様では、この方法は：
（ｆ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これによりの完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０３１８】
加えて、この方法は：
（ｇ）工程（ａ）の前に、ウロキナーゼペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃをウロキナーゼペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３１９】
さらにこの方法は：
（ｈ）工程（ａ）の前に、ウロキナーゼペプチドをエンドグリカナーゼと、ウロキナーゼペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３２０】
１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。
【０３２１】
好適な態様において、および上記のウロキナーゼペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；ｅ、ｆ、ｇおよびｈが１であり；ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｐが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｐが１である。あるるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが、０および１から独立して選択される員であり；そしてｐが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、

ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｉが０または１であり；そしてｑおよびｐが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｅ、ｆ、ｇおよびｈが０、１、２、３および４からから独立して選択され；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｑが１であり；そしてｎが０または１である。

【０３２２】

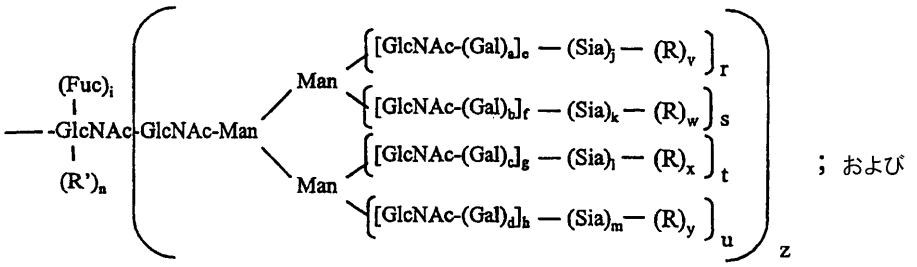
また提供するのは、上記記載の方法により形成されたウロキナーゼペプチド結合物である。

【０３２３】

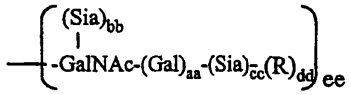
本発明は抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａモノクローナル抗体ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法も含み、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介して該糖ペプチドに共有結合し、糖ペプチドが：

【０３２４】

【化３０】



；および



【０３２５】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｚ、ａａ、ｂｂ、ｃｃおよびｅｅは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の整数から独立して選択される員であり；

ｎ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基および複合糖質から選択される員である、

から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：

（ａ）糖ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３２６】

１つの態様では、この方法は：

（ｂ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをシアリダーゼと、糖ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

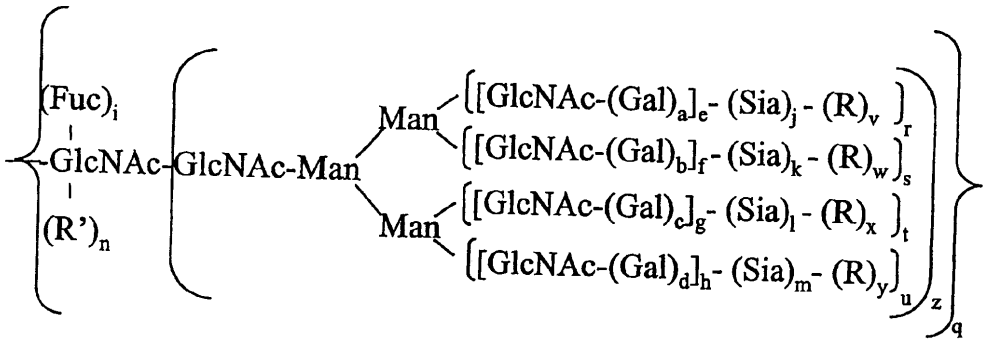
【０３２７】

別の態様では、この方法は：

（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シア

ル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３２８】
さらに別の態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドを合成的に作用するガラクトシダーゼと、ガラクトシダーゼを糖ペプチドに付加するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３２９】
さらなる態様では、この方法は：
（ｅ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３３０】
加えてこの方法は：
（ｆ）工程（ａ）からの生成物を、ＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３３１】
さらにこの方法は：
（ｇ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と該部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０３３２】
またこの方法は：
（ｈ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３３３】
さらにこの方法は：
（ｉ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをエンドグリカナーゼと、糖ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３３４】
１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。
【０３３５】
好適な態様において、および上記の抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａモノクローナル抗体ペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｚが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｉおよびｒが０および１から独立して選択される員であり；そしてｚが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｎが０であり；ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；そしてｚが１である。あるいはａａ、ｂｂ、ｃｃおよびｅｅが０および１から独立して選択される員であり；そしてｄｄが０である。あるいはａａおよびｅｅが０および１から独立して選択される員であり；そしてｂｂ、ｃｃおよびｄｄが０である。あるいはａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｅｅが０である。
【０３３６】
また提供するのは、上記記載の方法により形成された抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａモノクローナル抗体ペプチド結合物である。
【０３３７】
さらに本発明では、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であって、修飾基が完全なグリコシル連結基を介してキメラ抗－ＨＥＲ２抗体ペプチドに共有結合し、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体ペプチドが式：

【０３３８】
【化３１】



【０３３９】
式中、
ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびｚは、０および１から独立して選択される員であり；
ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の間の整数から独立して選択される員であり；
ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；
ｍは０～２０であり；
Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして
Ｒ’は水素およびグリコシル残基および修飾基から選択される員である、
を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：
（ａ）キメラ抗－ＨＥＲ２抗体ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３４０】
１つの態様では、この方法は：
（ｂ）工程（ａ）の前に、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースをキメラ抗－ＨＥＲ２抗体ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３４１】
別の態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）の前に、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体ペプチドをエンドグリカナーゼと、キメラ抗－ＨＥＲ２抗体ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３４２】
１つの観点では修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。
【０３４３】
好適な態様において、および上記の抗－ＨＥＲ２抗体ペプチドの式に関して、ａ、ｃおよびｉが、０および１から独立して選択される員であり；ｅ、ｇ、ｒおよびｔが１であり；ｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｑおよびｚが１である。あるいはｉが０または１であり；ｑおよびｚが１であり；そしてａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｑおよびｚが１である。
【０３４４】
また提供するのは、上記記載の方法により形成された抗ＨＥＲ２抗体ペプチド結合物で

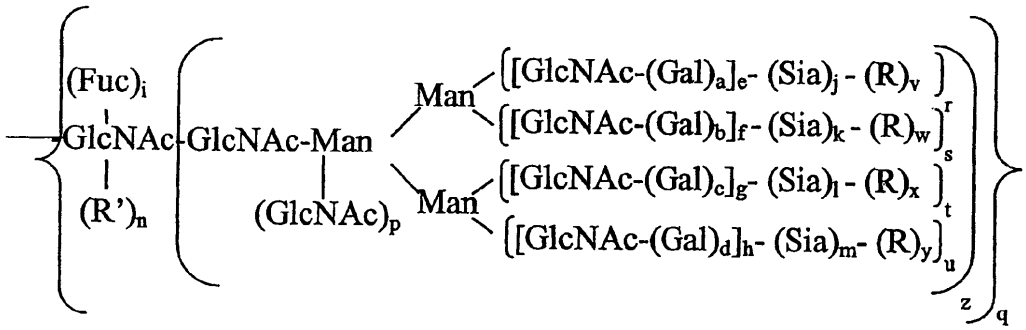
ある。

【０３４５】

本発明はさらに、抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を提供し、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介して抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドに共有結合し、抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドが式：

【０３４６】

【化３２】



【０３４７】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびｚは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の整数から独立して選択される員であり；

ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨおよびグリコシル残基、複合糖質および修飾基から選択される員である、

を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：

（ａ）抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３４８】

１つの態様では、この方法は：

（ｂ）工程（ａ）の前に、抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３４９】

別の態様では、この方法は：

（ｃ）工程（ｂ）の前に、抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドをエンドグリカナーゼと、抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３５０】

好適な態様において、および上に提示した抗－ＲＳＶ　Ｆペプチドの式に関して、ａ、ｃ、ｅ、ｇおよびｉが、０および１から独立して選択される員であり；ｒおよびｔが１であり；ｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｚが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙが０であり；ｉおよびｐが０または１から独立して選択され；ｑおよびｚが１であり；そしてｎが０である。あるいはｅ、ｇ、ｉ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｑおよびｚが１である。

【０３５１】

１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。

【０３５２】

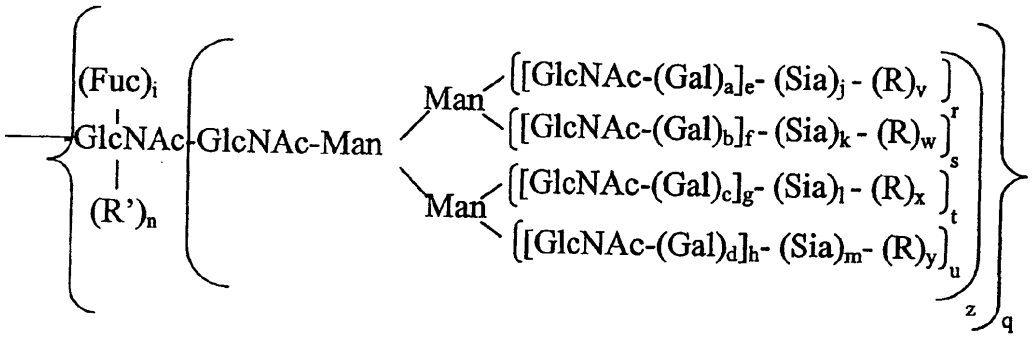
また提供するのは、上記の方法により形成された抗ＲＳＶ　Ｆペプチド結合物である。

【０３５３】

また提供するのは、抗－ＣＤ２０抗体ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法であり、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介して抗－ＣＤ２０抗体ペプチドに共有結合し、抗－ＣＤ２０抗体ペプチドが式：

【０３５４】

【化３３】



【０３５５】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびｚは、０および１から独立して選択される整数であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の整数から独立して選択され；

ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨ、グリコシル残基、複合糖質または修飾基から選択される員である、

を含んでなるグリコシルサブユニットを有する。この方法は：

（ａ）抗－ＣＤ２０抗体ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３５６】

１つの態様では、この方法は：

（ｂ）工程（ａ）の前に、抗－ＣＤ２０抗体ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトシル供与体と、ガラクトシル供与体を抗－ＣＤ２０抗体ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３５７】

別の態様では、この方法は：

（ｃ）工程（ｂ）の前に、抗－ＣＤ２０抗体ペプチドをエンドグリカナーゼと、抗－ＣＤ２０抗体ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３５８】

別の態様では、この方法は：

（ｄ）工程（ａ）の前に、抗－ＣＤ２０抗体ペプチドをマンノシダーゼと、抗－ＣＤ２０抗体ペプチドからマンノースを除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３５９】

１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖

質から選択される員である。

【０３６０】

別の観点では、グリコシルトランスフェラーゼがガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして修飾されたグリコシル供与体が修飾されたガラクトシル供与体である。

【０３６１】

好適な態様において、そして上記に提示した抗－ＣＤ２０抗体ペプチドの式に関して、ａ、ｃ、ｅ、ｇおよびｉが０および１から独立して選択される員であり；ｒ、ｔ、ｑおよびｚが１であり；そしてｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｃ、ｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが、０および１から独立して選択される員であり；ｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙが０であり；そしてｚが１である。あるいはｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｚが１である。あるいはｉが０または１であり；ｑおよびｚが１であり；そしてａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはｅ、ｇ、ｉ、ｒ、ｔ、ｖ、ｘおよびｚが０および１から独立して選択される員であり；ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｗおよびｙが０であり；そしてｚが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｎおよびｑが１であり；そしてｉが０または１である。

【０３６２】

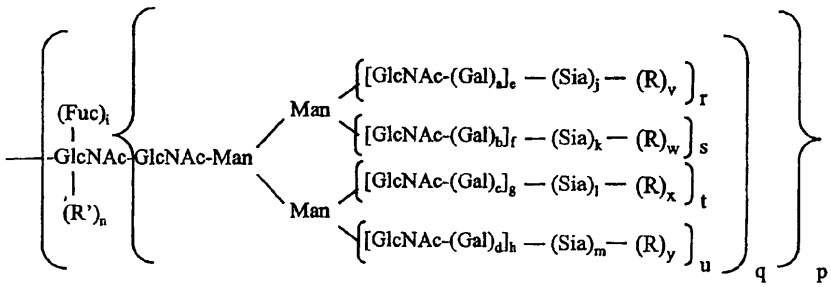
また上記の方法により形成された抗－ＣＤ２０抗体ペプチド結合物を含む。

【０３６３】

加えて本発明は、組換えＤＮａｓｅペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を提供し、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介して組換えＤＮａｓｅペプチドに共有結合し、組換えＤＮａｓｅペプチドが式：

【０３６４】

【化３４】



【０３６５】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；

ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；そして

Ｒはポリマー、複合糖質、マンノース、オリゴマンノースおよび修飾基から選択される員である、

を有するグリコシル残基を含んでなり、該方法が

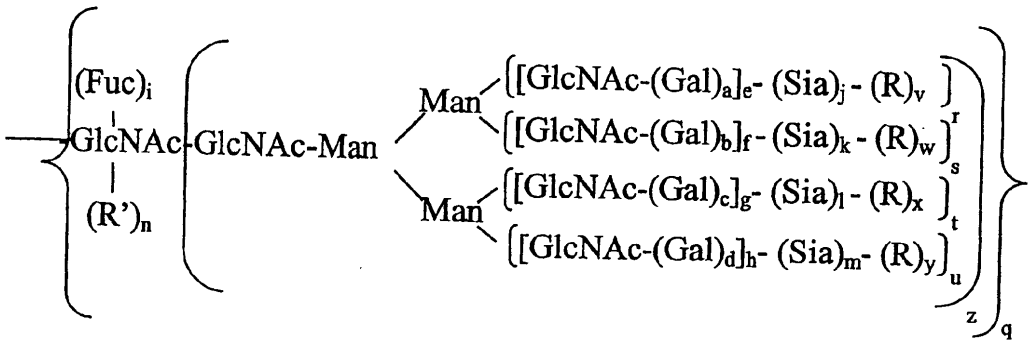
（ａ）組換えＤＮａｓｅペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３６６】
１つの態様では、この方法は：
（ｂ）工程（ａ）の前に、組換えＤＮａｓｅペプチドをシアリダーゼと、組換えＤＮａｓｅペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３６７】
別の態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３６８】
さらなる態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）の前に、組換えＤＮａｓｅペプチドを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを組換えＤＮａｓｅペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３６９】
さらなる態様では、この方法は：
（ｅ）工程（ａ）の前に、組換えＤＮａｓｅペプチドをグリコシダーゼおよびシアリダーゼの組み合わせと接触させることを含んでなる。
【０３７０】
別の態様では、この方法は：
（ｆ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０３７１】
この方法はまた：
（ｇ）工程（ａ）の前に、組換えＤＮａｓｅペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを該組換えＤＮａｓｅペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３７２】
加えて、この方法は：
（ｈ）工程（ａ）の前に、組換えＤＮａｓｅペプチドをエンドグリカナーゼと、組換えＤＮａｓｅペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３７３】
好適な態様において、および上記に提示したＤＮａｓｅペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｐが１であり；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；ｐが１であり；そしてｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｅ、ｇ、ｉ、ｑ、ｒおよびｔが０および１から独立して選択される員であり；そしてｐが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｉが０または１であり；そしてｐが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌおよびｍが０であり；ｉ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；ｐが１であり：そしてＲがマンノースまたはオリゴマンノースである。
【０３７４】
また上記の方法により形成された組換えＤＮａｓｅペプチド結合物も提供する。
【０３７５】
本発明はさらに、抗－腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）アルファペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を含み、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介して抗ＴＮＦアル

ファペプチドに共有結合し、抗－ＴＮＦアルファペプチドが式：

【０３７６】

【化３５】



【０３７７】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびｚは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；

ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から２０の間の整数から独立して選択される員であり；

ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；そして

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；

Ｒ’は複合糖質または修飾基である、

を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：

（ａ）抗－ＴＮＦアルファペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３７８】

１つの態様では、この方法は：

（ｂ）工程（ａ）の前に、抗－ＴＮＦアルファペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを抗－ＴＮＦアルファペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３７９】

別の態様では、この方法は：

（ｃ）工程（ａ）の前に、抗－ＴＮＦアルファペプチドをエンドグリカナーゼと、抗－ＴＮＦアルファペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３８０】

１つの態様では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。

【０３８１】

好適な態様において、および上記に提示した抗－ＴＮＦアルファペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが、０および１から独立して選択される員であり；ｎが１であり；そしてｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である。あるいはａ、ｃ、ｅ、ｇおよびｉが０および１から独立して選択される員であり；ｒおよびｔが１であり；ｂ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙ；そしてｑおよびｚが１である。

【０３８２】

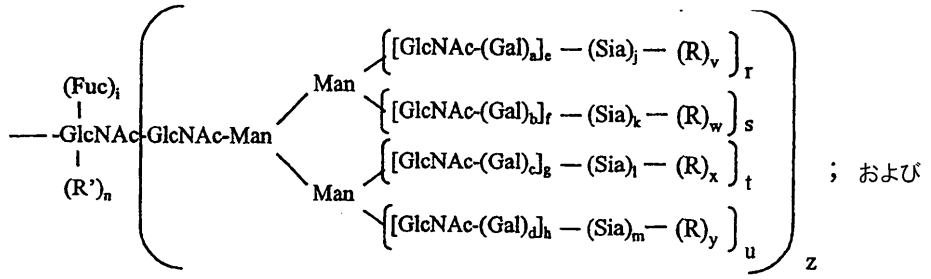
また上記の方法により形成された抗－ＴＮＦアルファペプチド結合物を含む。

【０３８３】

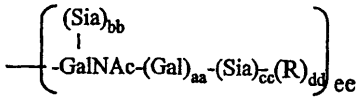
また本発明は、インスリンペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法も提供し、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介して糖ペプチドに共有結合し、該糖ペプチドが：

【０３８４】

【化３６】



；および



【０３８５】

式中、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｚ、ａａ、ｂｂ、ｃｃおよびｅｅは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の間の整数から独立して選択される員であり；

ｄｄ、ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基および複合糖質から選択される員である、

から選択される員である、式を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：

（ａ）糖ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合した該グリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３８６】

１つの態様では、この方法は：

（ｂ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをシアリダーゼと、糖ペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３８７】

別の態様では、この方法は：

（ｃ）工程（ａ）の生成物を、シアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３８８】

さらなる態様では、この方法は：

（ｄ）工程（ａ）の前に、糖プチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃを糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３８９】

さらなる態様では、この方法は：

（ｅ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをエンドグリカナーゼと、糖ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０３９０】

１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分および複合糖質から選択される員である。

【０３９１】

好適な態様において、および上記に提示したインスリンペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｚが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｉおよびｒが０および１から独立して選択される員であり；そしてｚが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｎが０であり；ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；ｚが１である。あるいはａａ、ｂｂ、ｃｃおよびｅｅが０および１から独立して選択される員であり；そしてｄｄが０である。あるいはａａおよびｅｅが０および１から独立して選択される員であり；そしてｂｂ、ｃｃおよびｄｄが０である。ａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｅｅが０である。

【０３９２】

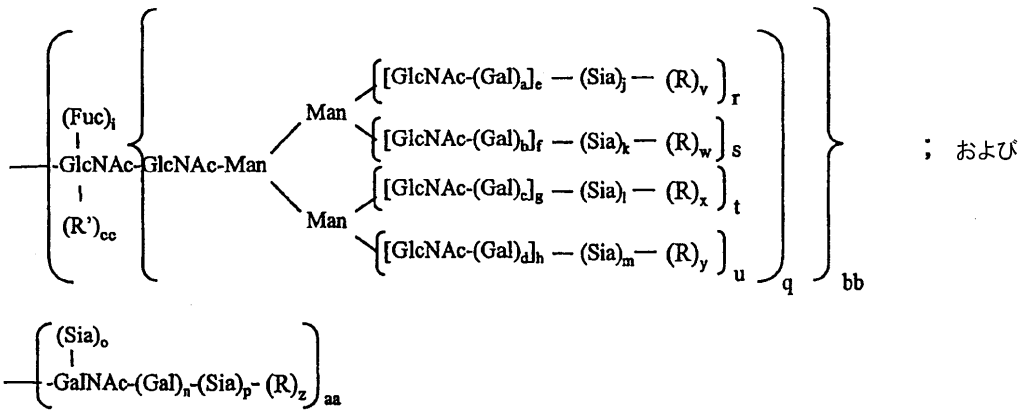
本発明はさらに、上記の方法により形成されたインスリンペプチド結合物を含む。

【０３９３】

加えて本発明では、Ｂ型肝炎表面抗原（ＨＢｓＡｇ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法が提供され、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介してＨＢｓＡｇペプチドに共有結合し、ＨＢｓＡｇペプチドが：

【０３９４】

【化３７】



【０３９５】

ここで、

ａａ、ｂｂ、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｎ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から６の間の整数から独立して選択される員であり；

ｏ、ｐ、ｊ、ｋ、ｌおよびｍは０から１００の間の整数から独立して選択される員であり；

ｃｃ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨ、またはグリコシル残基、複合糖質、または修飾基である、

から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなる。

【０３９６】

この方法は：

（ａ）ＨＢｓＡｇペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させる

ことを含んでなる。
【０３９７】
１つの態様では、この方法は：
（ｂ）工程（ａ）の前に、ＨＢｓＡｇペプチドをシアリダーゼと、ＨＢｓＡｇペプチドからシアル酸を除去するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３９８】
別の態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０３９９】
さらに別の態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）の前に、ＨＢｓＡｇペプチドをガラクトシダーゼと、ＨＢｓＡｇペプチドからグリコシル残基を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０４００】
この方法は：
（ｅ）工程（ａ）の前に、ＨＢｓＡｇペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースをＨＢｓＡｇペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０４０１】
加えて、この方法は：
（ｆ）工程（ｄ）の生成物を、ＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０４０２】
またこの方法は：
（ｇ）工程（ａ）からの生成物を修飾基に反応する部分と接触させ、これにより完全なグリコシル連結基と部分との間に結合物を形成することを含んでなる。
【０４０３】
またこの方法は：
（ｈ）工程（ａ）の前に、ＨＢｓＡｇペプチドをＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよびＧｌｃＮＡｃ供与体と、ＧｌｃＮＡｃをＨＢｓＡｇペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０４０４】
加えて、この方法は：
（ｉ）工程（ａ）の前に、ＨＢｓＡｇペプチドをマンノシダーゼと、ＨＢｓＡｇペプチドからマンノースを開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０４０５】
またこの方法は：
（ｊ）工程（ａ）の前に、ＨＢｓＡｇペプチドをエンドグリカナーゼと、ＨＢｓＡｇペプチドからグリコシル基を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０４０６】
１つの観点では、修飾基はポリマー、トキシン、放射性同位体、治療部分、アジュバントおよび複合糖質から選択される員である。
【０４０７】
好適な態様において、および上記に提示したＨＢｓＡｇペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびａａが、０および１から独立して選択される員であり；ｂｂ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｎが１であり；そしてｃｃ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびａａが、０および１から独立して選択される員であり；ｅ、ｆ、ｇおよびｈが０、１、２、３または４から独立して選択され；ｃｃ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そしてｂｂが１である。あるいはｃｃ、ａ、ｂ、ｃ、

ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０であり；そしてｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびａａが０および１から独立して選択される員であり；そしてｂｂが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕおよびａａが０および１から独立して選択される員であり；ｂｂ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈおよびｎが１であり；そしてｎ、ｐ、ｃｃ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０である。あるいはｂｂ、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｚが０および１から独立して選択される員であり；ｃｃが１であり；そしてｎが０または１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｆ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｏ、ｐ、ｓ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙ、ｚおよびｃｃが０であり；ｂｂが１であり；ｅ、ｇ、ｉ、ｎ、ｑ、ｒ、ｔおよびａａが０および１から独立して選択される員である。ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｚおよびｃｃが０であり；ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびａａが０および１から独立して選択される員であり；そしてｂｂが１である。

【０４０８】

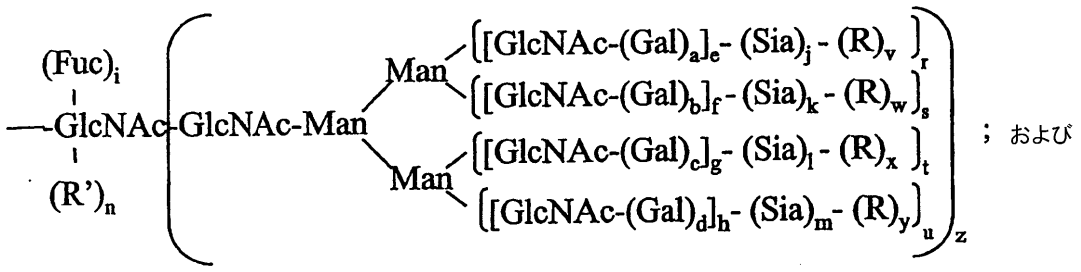
また、上記の方法により形成されたＨＢｓＡｇペプチド結合物も含む。

【０４０９】

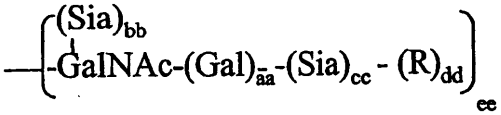
本発明はさらに、ヒト成長ホルモン（ＨＧＨ）ペプチドと修飾基との間に結合物を形成する方法を提供し、ここで修飾基が完全なグリコシル連結基を介して糖ペプチドに共有結合し、糖ペプチドが：

【０４１０】

【化３８】



；および



【０４１１】

ここで、

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｚ、ａａ、ｂｂ、ｃｃおよびｅｅは、０および１から独立して選択される員であり；

ｅ、ｆ、ｇおよびｈは０から４の間の整数から独立して選択される員であり；

ｎ、ｖ、ｗ、ｘ、ｙおよびｄｄは０であり；

Ｒは修飾基、マンノースまたはオリゴマンノースであり；そして

Ｒ’はＨ、グリコシル残基、修飾基および複合糖質から選択される員である、

から選択される員である式を有するグリコシル残基を含んでなる。この方法は：

（ａ）糖ペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾基に共有結合したグリコシルトランスフェラーゼの基質であるグリコシル部分を含んでなる修飾されたグリコシル供与体と、完全なグリコシル連結基が形成するために適する条件下で接触させることを含んでなる。

【０４１２】

別の態様では、この方法は：

（ｂ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをシアリダーゼと、糖ペプチドからシアル酸を除去

するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０４１３】
１つの態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをエンドグリカナーゼと、糖ペプチドからグリコシル部分を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０４１４】
別の態様では、この方法は：
（ｃ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体と、ガラクトースを糖ペプチドへ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０４１５】
さらに別の態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）の生成物をシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体と、シアル酸を生成物へ転移させるために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０４１６】
さらなる態様では、この方法は：
（ｄ）工程（ａ）の前に、糖ペプチドをガラクトシダーゼと、糖ペプチドからグリコシル残基を開裂するために適する条件下で接触させることを含んでなる。
【０４１７】
好適な態様において、および上記に提示するＨＧＨペプチドの式に関して、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｒ、ｓ、ｔおよびｕが０および１から独立して選択される員であり；ｎ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；そしてｚが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０であり；ｉおよびｒが０および１から独立して選択される員であり；そしてｚが１である。あるいはａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｋ、ｌ、ｍおよびｎが０であり；ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ、ｗ、ｘおよびｙが０および１から独立して選択される員であり；そしてｚが１である。あるいはａａおよびｅｅが０および１から独立して選択される員であり；そしてｂｂ、ｃｃおよびｄｄが０である。あるいはａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄおよびｅｅが０である。あるいはａａ、ｂｂ、ｃｃ、ｄｄ、ｅｅおよびｎが０である。
【０４１８】
また上記の方法により形成されたＨＧＨペプチド結合物も含む。
【０４１９】
発明の詳細な記述
本発明は、特別にカスタマイズされた、または所望のグリコシル化パターンを有する糖ペプチド分子を提供する様式で、ペプチド分子に、またはペプチド分子から糖を無細胞でインビトロ付加および／または削除するための方法および組成物を含み、ここで糖ペプチドは工業的規模で生産される。本発明の好適な態様では、そのように生産された糖ペプチドは酵素反応を介してペプチドに付加された修飾糖が糖ペプチドに結合している。本発明の重要な特徴は、任意の細胞型により生産されるペプチドを取り、そしてペプチド上にコアグリカン構造を生成し、その後にグリカン構造をインビトロで改造して、哺乳動物の治療的使用に適するグリコシル化パターンを有する糖ペプチドを生成するように改造することである。より具体的には、結合分子がペプチドに有利な特性を付与するように、本発明に従い修飾された糖分子またはそれに結合した他の化合物を有する糖ペプチド分子を調製することが可能である。本発明により、結合分子のペプチドへの酵素に基づく付加は位置選択性および立体選択性の利点を有するので、結合分子はペプチドに酵素的に付加される。したがって本明細書に提供する方法および組成物を使用することにより、ペプチドを改造して好ましくはペプチドに結合した修飾された糖を有する望ましいグリカン構造をペプチドに付与することが可能である。また本発明の方法および組成物を使用することにより、工業的規模で所望する、かつまたは修飾されたグリカン構造を有するペプチド分子を生

成することも可能であり、これにより初めて当該技術分野に改善された治療用ペプチドを効率的に生産するための現実的解決を提供する。

【０４２０】

定義

他に定義しない限り、本明細書で使用するすべての技術でおよび科学的用語は、一般に本発明が属する分野で当業者が普通に理解している意味と同じ意味を有する。一般に細胞培養、分子遺伝学、有機化学、および核酸化学およびハイブリダイゼーションで本明細書で使用する命名法および研究手順は、当該技術分野において周知なものであり、そして普通に使用されている。核酸およびペプチド合成については標準的な技術を使用する。これらの技法および手順は当該技術分野の常法および様々な一般的参考書（例えばＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９，モレキュラークローニング：ア　ラボラトリーマニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ）、第２版、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州）に従い一般に行われ、これらはこの文献全体にわたって提供されている。本明細書で使用する命名法および以下に記載する分析化学および有機合成で使用する研究手順は周知で、しかも当該技術分野では普通に使用されているものである。標準技法およびそれらの変法を、化学合成および化学分析に使用する。

【０４２１】

本明細書で使用する冠詞“ａ”および“ａｎ”は１以上（すなわち少なくとも１）の物体の文法的対象を指す。例として“要素（ａｎ　ｅｌｅｍｅｎｔ）”は１または１より多くの要素を指す。

【０４２２】

本明細書で使用する用語「抗体」は、抗原上の特異的エピトープに特異的に結合することができる免疫グロブリン分子を称する。抗体は天然な供給源または組換え源に由来する完全な免疫グロブリンであることができ、そして完全な免疫グロブリンの免疫反応性部分であることができる。抗体は典型的には四量体の免疫グロブリン分子である。本発明における抗体は、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Ｆｖ、ＦａｂおよびＦ（ａｂ）$_2$、ならびに一本鎖抗体およびヒト化抗体を含む種々の形態で存在することができる（Ｈａｒｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．、１９９９、抗体を使用して：ア　ラボラトリーマニュアル（Ｕｓｉｎｇ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ）、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、ニューヨーク州；Ｈａｒｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．、１９８９、抗体：ア　ラボラトリーマニュアル（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ）、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク；Ｈｏｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５：５８７９－５８８３；Ｂｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ２４２：４２３－４２６）。

【０４２３】

本明細書で使用する用語「合成抗体」は、例えば本明細書に記載するバクテリオファージにより発現される抗体のような組換えＤＮＡ技術を使用して生成される抗体を意味する。この用語は抗体をコードするＤＮＡ分子の合成により生成された抗体を意味するとも解釈すべきであり、そしてこのＤＮＡ分子は抗体タンパク質または抗体を特定するアミノ酸配列を発現し、ここでＤＮＡまたはアミノ酸配列は当該技術分野で利用可能であり、しかも周知な合成ＤＮＡまたはアミノ酸配列技法を使用して既に得られている。

【０４２４】

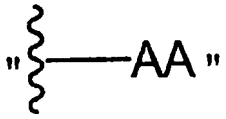
本明細書で使用する「機能的な」生物学的分子は、特徴とする特性を現す形態の生物学的分子である。例えば機能的酵素は、その酵素の特徴とする特徴的な触媒活性を示すものである。

【０４２５】

本明細書で使用する構造

【０４２６】

【化３９】



【０４２７】
は、ペプチド中のアミノ酸とグリカン構造との間の連結点である。
【０４２８】
「Ｎ－結合」オリゴ糖は、アスパラギン－Ｎ－アセチルグルコサミン結合によりアスパラギンを介してペプチド骨格に連結しているオリゴ糖である。Ｎ－結合オリゴ糖は「Ｎ－グリカン」とも呼ぶ。すべてのＮ－結合オリゴ糖は共通する$Man_3GlcNAc_2$の五糖コアを有する。それらはＮ－アセチルグルコサミン、ガラクトース、Ｎ－アセチルガラクトサミン、フコースおよびシアル酸のような周辺糖の存在および分岐（アンテナとも呼ぶ）の数が異なる。場合によりこの構造はコアのフコース分子および／またはキシロース分子を含んでもよい。
【０４２９】
「基本的なトリマンノシルコア構造」とは、さらなる糖は結合していないトリマンノシルコア構造のみから構成されるグリカン部分を称する。用語「基本的な」が「トリマンノシルコア構造」の記載に含まれない時、グリカンはグリカンはそれに結合したさらなる糖を持つトリマンノシルコア構造を構成する。場合によりこの構造はコアフコース分子および／またはキシロース分子を含んでもよい。
【０４３０】
用語「基本的なトリマンノシルコア糖ペプチド」は、本明細書では主に基本的なトリマンノシルコア構造から構成されるグリカン構造を有する糖ペプチドを指すために使用する。場合によりこの構造はコアフコース分子および／またはキシロース分子を含んでもよい。
【０４３１】
「Ｏ－結合」オリゴ糖は、トレオニンまたはセリンの介してペプチド骨格に結合したオリゴ糖である。
【０４３２】
本明細書に記載するすべてのオリゴ糖は、非還元サッカリド（すなわちＧａｌ）に関する名前および記号で記載し、次にグリコシド結合の立体配置（αまたはβ）、環結合（１または２）、結合に関与する還元サッカリドの環の位置（２、３、４、６または８）、そして次に還元サッカリドの名前または記号（すなわちＧｌｃＮＡｃ）を記載する。各サッカリドは好ましくはピラノースである。標準的な糖生物学命名法に関する総説は、例えば糖生物学の本質（Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ｏｆ　Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ）、Ｖａｒｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，編集、１９９９、ＣＳＨＬ出版を参照にされたい。
【０４３３】
用語「シアル酸」は、９－炭素カルボキシル化糖のファミリーの任意の員を指す。シアル酸ファミリーの最も普通の員は、Ｎ－アセチル－ノイラミン酸（２－ケト－５－アセトアミド－３，５－ジデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクトノヌロピラノソ－１－ン酸（しばしばＮｅｕ５Ａｃ、ＮｅｕＡｃまたはＮＡＮＡと略記される）。このファミリーの第２の員は、Ｎ－グリコリル－ノイラミン酸（Ｎｕｅ５ＧｃまたはＮｅｕＧｃ）であり、ここでＮｅｕＡｃのＮ－アセチル基はヒドロキシル化されている。第３のシアル酸ファミリーの員は、２－ケト－３－デオキシ－ノヌロン酸（ＫＤＮ）である（Ｎａｄａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８６）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６１：１１５５０－１１５５７；Ｋａｎａｍｏｒｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５：２１８１１－２１８１９（１９９０））。また含まれるのは９－Ｏ－C_1－C_6アシル－Ｎｅｕ５Ａｃ様の９－Ｏ－ラクチル－Ｎｅｕ５Ａｃまたは９－Ｏ－アセチル－Ｎｅｕ５Ａｃ、９－デオキシ－９－フルオロ－Ｎｅｕ５Ａｃおよび９－アジド－９－デオキシ－Ｎｅｕ５Ａｃのような９

－置換シアル酸である。シアル酸ファミリーの総説については、例えばＶａｒｋｉ，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ，２：２５－４０（１９９２）；シアル酸：化学、代謝および機能（Ｓｉａｌｉｃ Ａｃｉｄ：Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ ａｎｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ）、Ｒ．Ｓｃｈａｕｅｒ、編集（スプリンガーファーラーグ、ニューヨーク（１９９２））を参照にされたい。シアリル化手順におけるシアル酸化合物の合成および使用は、１９９２年、１０月１日に公開された国際公開第９２／１６６４０号パンフレットに開示されている。

【０４３４】

本明細書で使用する「所望のグリコシル化」を有するペプチドは、ペプチドの効率的な生物学的活性に必要な１以上のオリゴ糖分子を含んでなるペプチドである。

【０４３５】

「疾患」は、動物が恒常性を維持することができず、そして疾患が改善されなければ、動物の健康状態は悪化し続ける動物の健康状態である。

【０４３６】

患者にペプチド薬剤を投与する内容において、本明細書で使用する「曲線下の面積」または「ＡＵＣ」は、ゼロから無限大の時間の関数として患者の全身循環における薬剤濃度を記載する曲線下の総面積と定義する。

【０４３７】

患者にペプチド薬剤を投与する内容において、本明細書で使用する「半減期」または「$t_{1/2}$」は、患者の血漿薬剤濃度が半分に減少するために必要な時間と定める。多くの排除（ｃｌｅａｒｅｎｃｅ）メカニズム、再分布および当該技術分野で周知な他のメカニズムに依存して、ペプチド薬剤に関連する１より多くの半減期が存在するかもしれない。通常、アルファ期が再分布に関連し、そしてベータ期が排除に関連するような、アルファおよびベータ半減期が定義されている。しかしタンパク質薬剤については、ほとんどの部分が血流に限定され、少なくとも２つの排除半減期が存在し得る。幾つかのグリコシル化ペプチドに関しては、急速なベータ期排除はマクロファージ上のレセプター、あるいは末端ガラクトース、Ｎ－アセチルガラクトサミン、Ｎ－アセチルグルコサミン、マンノースまたはフコースを認識する内皮細胞を介して媒介される。より遅いベータ期排除は有効半径（ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ ｒａｄｉｕｓ）＜２ｎｍ（約６８ｋＤ）の分子については腎臓の糸球体濾過を介して、および／または組織中の特異的もしくは非特異的取り込みおよび代謝を介して起こり得る。糖ＰＥＧ化（ＧｌｙｃｏＰＥＧｙｌａｔｉｏｎ）は末端糖（例えばガラクトースまたはＮ－アセチルガラクトサミン）をキャップすることができ、そしてこれによりこれらの糖を認識するレセプターを介する急速なアルファ期排除を遮断する。より大きな有効半径を与え、そしてこれにより分布の容量および組織の取り込みを下げ、これにより後期ベータ期を延長することもできる。このようにアルファ期およびベータ期半減期に及ぼす糖ＰＥＧ化の明確な影響は、サイズ、グリコシル化の状態および当該技術分野で周知な他のパラメーターに依存して変動するだろう。「半減期」のさらなる説明は、製薬学的バイオテクノロジー（Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、（１９９７，ＤＦＡ Ｃｒｏｍｍｅｌｉｎ ａｎｄ ＲＤ Ｓｉｎｄｅｌａｒ、編集、ハウウッド出版、アムステルダム、第１０１－１２０頁）に見いだすことができる。

【０４３８】

患者にペプチド薬剤を投与する内容において、本明細書で使用する用語「滞留時間」とは、薬剤が投薬後に患者の身体に留まる平均時間と定義する。

【０４３９】

「単離された核酸」とは天然に存在する状態でそれを挟む配列、例えばフラグメントに通常隣接する配列から取り出されたＤＮＡフラグメント、例えば天然に存在するゲノム中のフラグメントに隣接する配列から分離された核酸セグメントまたはフラグメントを称する。この用語は、核酸に天然に付随する他の成分、例えば通常は細胞中で付随するＲＮＡまたはＤＮＡまたはタンパク質から実質的に精製された核酸にも適用する。したがってこ

の用語には、例えばベクターに、自律複製プラスミドまたはウイルスに、または原核または真核生物のゲノムＤＮＡに包含されるか、または他の配列から独立して別個の分子として存在する（ｃＤＮＡまたはゲノムもしくはＰＣＲまたは制限酵素消化により生成されるｃＤＮＡフラグメントのような）組換えＤＮＡを含む。またさらなるペプチド配列をコードするハイブリッド核酸の一部である組換えＤＮＡも含む。

【０４４０】

「ポリヌクレオチド」は、核酸の一本鎖またはパラレルおよび抗－パラレル鎖を意味する。すなわちポリヌクレオチドは一本鎖または二本鎖核酸のいずれかでよい。

【０４４１】

用語「核酸」は典型的には大きなポリヌクレオチドを称する。用語「オリゴヌクレオチド」は典型的には短いポリヌクレオチド、一般には約５０ヌクレオチド未満を指す。

【０４４２】

本明細書では従来の表記法を使用してポリヌクレオチド配列を記載する：一本鎖ポリヌクレオチド配列の左手末端は５’－末端である；２本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向は、５’－方向を指す。新生ＲＮＡ転写物に対してヌクレオチドの５’から３’付加の方向は転写方向と称する。ｍＲＮＡと同じ配列を有するＤＮＡ鎖を「コード鎖」と称し；ＤＮＡ上の参照点に対して５’に位置するＤＮＡ鎖上の配列は「上流配列」と称し；ＤＮＡ上の参照点に対して３’に位置するＤＮＡ鎖上の配列は「下流配列」と称する。

【０４４３】

「コードする」とは、ヌクレオチド（すなわち、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡおよびｍＲＮＡ）の定めた配列、またはアミノ酸の定めた配列およびそれらから生じる生物学的特性のいずれかを有する、生物学的プロセスにおける他のポリマーおよび高分子を合成するための鋳型として役立つ遺伝子、ｃＤＮＡまたはｍＲＮＡのようなポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特別な配列に固有の特性を称する。すなわち核酸配列は、その核酸に対応するｍＲＮＡの転写および翻訳が、細胞または他の生物系であるタンパク質を生産する場合、そのタンパク質をコードする。両コード鎖は、そのヌクレオチド配列がｍＲＮＡ配列と同一であり、そして通常は配列表に提供され、そして遺伝子またはｃＤＮＡの転写に鋳型として使用される非コード鎖は、その核酸またはｃＤＮＡのタンパク質または他の産物をコードすると言うことができる。

【０４４４】

他に特定しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は互いの縮重形物であり、そして同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質およびＲＮＡをコードするヌクレオチド配列はイントロンを含んでもよい。

【０４４５】

本明細書で使用する「相同的」とは２つの重合性分子の間、例えば２つの核酸分子の間、例えば２つのＤＮＡ分子または２つのＲＮＡ分子の間、または２つのペプチド分子の間のサブユニット配列類似性を称する。２つの両分子中のサブユニット位置が同じモノマー性サブユニットに占有されている時、例えば２つの各ＤＮＡ分子の１つの位置がアデニンで占められているならば、それらはその位置で相同的である。２つの配列間の相同性は対合するか、または相同的な位置の数の直接的関数であり、例えば２つの化合物の配列で位置の半分（例えば１０個のサブユニット長のポリマー中の５箇所）が相同的ならば、２つの配列は５０％相同的であり、９０％の位置、例えば１０のうちの９が対合または相同的ならば、２つの配列は９０％の相同性を共有する。例として、ＤＮＡ配列３’ＡＴＴＧＣＣ５’および３’ＴＡＴＧＧＣは５０％の相同性を共有する。

【０４４６】

本明細書で使用するように、「相同性」は「同一性」と同義的に使用する。

【０４４７】

２つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性の割合の決定は、数学的アルゴリズムを使用して行うことができる。例えば２つの配列を比較するために有用な数学的アルゴリズムは、Ｋａｒｌｉｎ ａｎｄ Ａｌｔｓｃｈｕｌ（１９９３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．

Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：５８７３－５８７７）におけるように改良されたＫａｒｌｉｎ　ａｎｄ　Ａｌｔｓｃｈｕｌ（１９９０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：２２６４－２２６８）のアルゴリズムである。このアルゴリズムはＡｌｔｓｃｈｕｌ，ｅｔ　ａｌ．（１９９０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０）のＮＢＬＡＳＴおよびＸＢＬＡＳＴプログラムに包含され、そして例えばホームページのＵＲＬ“ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ／”を有するナショナル　センター　フォー　バイオテクノロジー　インフォメーション（ＮＣＢＩ）の世界的なウェッブサイトからアクセスすることができる。ＢＬＡＳＴのヌクレオチド調査は、以下のパラメーターを使用してＮＢＬＡＳＴプログラムを用いて行うことができる（ＮＣＢＩウェッブサイトで“ｂｌａｓｔｎ”と命名）：本明細書に記載する核酸に対して相同的なヌクレオチド配列を得るために、ギャップペナルティー＝５；ギャップエクステンションペナルティー＝２；ミスマッチペナルティー＝３；マッチリワード＝１；期待値＝１０．０；およびワードサイズ＝１１。ＢＬＡＳＴのタンパク質調査は、以下のパラメーターを使用してＸＢＬＡＳＴプログラム（ＮＣＢＩウェッブサイトで“ｂｌａｓｔｎ”と命名）またはＮＣＢＩ“ｂｌａｓｔｐ”プログラムを用いて行うことができる：本明細書に記載するタンパク質分子に対して相同的なアミノ酸配列を得るために、期待値＝１０．０、ＢＬＯＳＵＭ６２スコアリングマトリックス。比較目的のギャップ化アライメントを得るために、Ｇａｐｐｅｄ　ＢＬＡＳＴをＡｌｔｓｃｈｕｌ，ｅｔ　ａｌ．（１９９７，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２）に記載されているように利用することができる。あるいはＰＳＩ－ＢｌａｓｔまたはＰＨＩ－Ｂｌａｓｔを使用して、分子間の距離関係（Ｉｄ．）および共通パターンを共有する分子間の関係を検出する反復調査を行うことができる。ＢＬＡＳＴ、Ｇａｐｐｅｄ化ＢＬＡＳＴ、ＰＳＩ－ＢｌａｓｔおよびＰＨＩ－Ｂｌａｓｔプログラムを使用する時、各プログラムのデフォルトパラメーター（例えばＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）を使用することができる。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ．を参照にされたい。

【０４４８】

２つの配列間の同一性の割合は、ギャップを割り当てるか、または割り当てずに上記の技術に類似する技術を使用して決定することができる。同一性の割合の計算では、多くの場合、正確な対合をカウントする。

【０４４９】

ペプチドをコードする「ヘテロロガスな核酸発現単位」は、プロモーターおよび／またはリプレッサー配列（ここで少なくとも１つの配列はヘテロロガス、すなわち宿主細胞中に通常は見いだされない）のような１以上の発現制御配列に操作可能に連結された、問題のペプチドのコード配列を有する核酸と定義する。

【０４５０】

２つのポリヌクレオチドが「操作可能に連結された」と記載することは、一本鎖または二本鎖核酸部分が、２つのポリヌクレオチドの少なくとも１つがその特徴とする生理学的効果をもう一方に及ぼすことができる様式で、核酸部分内に配列されている２つのポリヌクレオチドを含んでなることを意味する。例として核酸のコード領域と操作可能に連結されたプロモーターは、コード領域の転写を促進することができる。

【０４５１】

本明細書で使用する用語「プロモーター／調節配列」は、プロモーター／調節配列に操作可能に連結された遺伝子産物の発現に必要な核酸配列を意味する。ある場合ではこの配列はコアプロモーター配列でよく、そして他の場合ではこの配列は遺伝子産物の発現に必要なエンハンサー配列および他の調節要素を含んでもよい。プロモーター／調節配列は、例えば組織特異的様式で遺伝子産物を発現するものであり得る。

【０４５２】

「構成的プロモーターは、それが操作可能に連結された遺伝子の発現を細胞中で一定の様式で駆動するプロモーターである。例として、細胞のハウスキーピング遺伝子の発現を

駆動するプロモーターは構成的プロモーターである。

【０４５３】

「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードするか、または特定するポリヌクレオチドに操作可能に連結された時、プロモーターに対応するインデューサーが細胞に存在する時にのみ生きている細胞中で遺伝子産物の生産を実質的に引き起こすヌクレオチド配列である。

【０４５４】

「組織－特異的」プロモーターは、遺伝子産物をコードするか、または特定するポリヌクレオチドに操作可能に連結された時、細胞がプロモーターに対応する組織型の細胞である時にのみ生きている細胞中で遺伝子産物の生産を実質的に引き起こすヌクレオチド配列である。

【０４５５】

「ベクター」は、単離された核酸を含んでなり、そして単離された核酸を細胞の内部へ送達するために使用することができる物質の組成物である。当該技術分野では数々のベクターが知られており、それらには限定するわけではないが線状ポリヌクレオチド、イオン性または両イオン性化合物を付随するポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを含む。このように用語「ベクター」には自律複製プラスミドまたはウイルスを含む。この用語は、例えばポリリシン化合物、リポソーム等のような核酸の細胞への転移を促進する非－プラスミドおよび非－ウイルス化合物を含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例には、限定するわけではないがアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター等を含む。

【０４５６】

「発現ベクター」は発現されるべきヌクレオチド配列に操作可能に連結された発現制御配列を含んでなる組換えポリヌクレオチドを含んでなるベクターを称する。発現ベクターは発現に十分なシス－作用要素を含んでなり；発現のための他の要素は宿主細胞またはインビトロ発現系により供給され得る。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを包含するコスミド、プラスミド（例えば裸の、またはリポソームに含まれた）およびウイルスのような、当該技術分野で既知のこれらすべてを含む。

【０４５７】

「遺伝的に操作された」または「組換え」細胞は、細胞の遺伝的物質に対して１以上の修飾を有する細胞である。そのような修飾には限定するわけではないが、遺伝的物質の挿入、遺伝的物質の削除、およびそのような物質が安定に維持さるか、またはされなくても染色体外の遺伝的物質の挿入に見られる。

【０４５８】

「ペプチド」はオリゴペプチド、ポリペプチド、ペプチド、タンパク質または糖タンパク質である。本明細書における用語「ペプチド」の使用は、糖部分がペプチドに結合している時、ペプチドに結合した糖部分を有するペプチドを含む。

【０４５９】

本明細書で使用する「天然の形態」は、天然に見いだされる、細胞および／または生物により生産される時のペプチドの形態を意味する。ペプチドが複数の細胞および／または生物により生産される時、ペプチドは種々の天然な形態を有することができる。

【０４６０】

「ペプチド」は、モノマーがアミノ酸であり、そしてアミド結合を介して一緒に連結されているポリマーを称するか、あるいはペプチドと呼ぶ。さらに天然には存在しないアミノ酸、例えばβ－アラニン、フェニルグリシンおよびホモアルギニンも含む。核酸がコードしないアミノ酸も本発明で使用することができる。さらに反応性基、グリコシル化部位、ポリマー、治療部分、生体分子等を含むように修飾されたアミノ酸も本発明に有用となり得る。本発明で使用するすべてのアミノ酸は、そのＤ－またはＬ－同位体のいずれかであり得る。Ｌ－同位体が一般に好ましい。さらに他のペプチド模造物も本発明に有用である。本明細書で使用するように、「ペプチド」はグリコシル化および非グリコシル化ペプ

チドの両方を指す。またペプチドを発現する系により不完全にグリコシル化されたペプチドも含む。一般的な総説については、Ｓｐａｔｏｌａ，Ａ．Ｆ．、アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質の化学および生化学（ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ　ＡＮＤ　ＢＩＯＣＨＥＭＩＳＴＲＹ　ＯＦ　ＡＭＩＮＯ　ＡＣＩＤＳ，ＰＥＰＴＩＤＥＳ　ＡＮＤ　ＰＲＯＴＥＩＮＳ）、Ｂ．Ｗｅｉｎｓｔｅｉｎ編集、マルセルデッカー（Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ）、ニューヨーク、第２６７（１９８３）頁を参照にされたい。

【０４６１】

「ペプチド結合物（ｐｅｐｔｉｄｅ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）」は、ペプチドが本明細書で説明する修飾された糖を用いて結合されている本発明の種を称する。

【０４６２】

用語「アミノ酸」は、天然に存在する、および合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様な様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模造物を称する。天然に存在するアミノ酸は遺伝子コードによりコードされるもの、ならびに後に修飾されるアミノ酸、例えばヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタメートおよびＯ－ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学的構造、すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基およびＲ基に結合したα炭素を有する化合物、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを称する。そのような類似体は修飾されたＲ基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。アミノ酸模造物は、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様の様式で機能する化学化合物を指す。　本明細書で使用するアミノ酸は、以下の表１に示すように、その完全名により、それらに対応する３文字コードにより、またはそれらに対応する１文字コードにより表す：

【０４６３】

【表１】

表1：アミノ酸および3文字および1文字コード

1文字コード	3文字コード	1文字コード
アスパラギン酸	Asp	D
グルタミン酸	Glu	E
リシン	Lys	K
アルギニン	Arg	R
ヒスチジン	His	H
チロシン	Tyr	Y
システイン	Cys	C
アスパラギン	Asn	N
グルタミン	Gln	Q
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
グリシン	Gly	G
アラニン	Ala	A
バリン	Val	V
ロイシン	Leu	L
イソロイシン	Ile	I
メチオニン	Met	M
プロリン	Pro	P
フェニルアラニン	Phe	F
トリプトファン	Trp	W

【０４６４】

本発明はまた、上で確認されたようなタンパク質を含んでなるタンパク質またはペプチドの類似体も提供する。類似体は保存的アミノ酸配列の差異により、または配列に影響しない修飾により、あるいはその両方により天然に存在するタンパク質またはペプチドとは異なることができる。例えばタンパク質またはペプチドの１次配列は変えるが、通常はその機能を変えない保存的アミノ酸の変化を作成することができる。保存的アミノ酸置換には典型的には以下の群内の置換を含む：

グリシン、アラニン；

バリン、イソロイシン、ロイシン；

アスパラギン酸、グルタミン酸；

アスパラギン、グルタミン；

セリン、トレオニン；

リシン、アルギニン；

フェニルアラニン、チロシン。

【０４６５】

修飾（通常は１次配列を変えない）には、 インビボまたはインビトロの、ペプチドの化学的誘導化、例えばアセチル化またはカルボキシル化を含む。またグリコシル化の修飾、例えばペプチドの合成およびプロセッシング中、またはさなるプロセッシング段階でのペプチドのグリコシル化パターンを修飾することにより；例えばペプチドをグリコシル化に影響を及ぼす酵素、例えば哺乳動物のグリコシル化または脱グリコシル化酵素に暴露することにより作られるものを含む。またリン酸化アミノ酸残基を有する配列、例えばホスホチロシン、ホスホセリンまたはホスホトレオニンも含む。

【０４６６】

もちろんペプチドは活性に影響を及ぼさずに修飾されるアミノ酸残基を含むことができると考える。例えば末端を誘導化してブロッキング基、すなわち「望ましくない分解」（この用語は化合物の機能に影響を及ぼすと思われる化合物の末端で任意の種類の酵素的、化学的または生化学的分解、すなわちその末端での化合物の順次分解を意味する）からＮ－末端およびＣ－末端を保護し、かつ／または安定化するために適する化学置換基を含むことができる。

【０４６７】

ブロッキング基にはペプチドのインビボ活性に悪い影響を及ぼさないペプチド化学の分野で従来から使用されている保護基を含む。例えば適当なＮ－末端ブロッキング基は、Ｎ－末端のアルキル化またはアシル化により導入することができる。適当なＮ－末端ブロッキング基の例には、$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{5}$分岐もしくは非分岐アルキル基、ホルミルおよびアセチル基のようなアシル基、ならびにアセトアミドメチル（Ａｃｍ）、ＦｍｏｃまたはＢｏｃ基のようなそれらの置換形を含む。アミノ酸のデスアミノ類似体も有用なＮ－末端ブロッキング基であり、そしてペプチドのＮ－末端にカップリングされるか、またはＮ－末端残基の代わりに使用されるかのいずれかであり得る。適当なＣ－末端ブロッキング基（ここでＣ－末端のカルボキシル基が含まれるか、または含まれない）には、エステル、ケトンまたはアミドを含む。エステルまたはケトン－形成アルキル基、特にメチル、エチルおよびプロピルのような低級アルキル基、および１級アミン（$－ＮＨ_{2}$）のようなアミド形成アミノ基、およびメチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、メチルエチルアミノ等のようなモノ－およびジ－アルキルアミノ基は、Ｃ－末端ブロッキング基の例である。アグマチンのようなデスカルボキシル化アミノ酸類似体も有用なＣ－末端ブロッキング基であり、そしてペプチドのＣ－末端残基にカップリングされるか、またはそれに変えて使用することができる。さらに末端の遊離アミノおよびカルボキシル基はペプチドから一緒に取り出して、ペプチドの活性に影響を及ぼすことなくそれらのデスアミノおよびデスカルボキシル化形を生じることができると考えられる。

【０４６８】

他の修飾も活性に悪影響を及ぼさずに包含することができ、そしてこのような修飾には限定するわけではないが天然のＬ－異性体における１以上のアミノ酸をＤ－異性体中のアミノ酸に置換することを含む。このようにペプチドは１以上のＤ－アミノ酸残基を含んでもよく、あるいはすべてがＤ－形のアミノ酸から構成されてもよい。本発明に従いペプチドのレトロ－インベルソ（ｒｅｔｒｏ－ｉｎｖｅｒｓｏ）形、例えばすべてのアミノ酸がＤ－アミノ酸形に置換されている転化（ｉｎｖｅｒｔｅｄ）ペプチドも企図する。

【０４６９】

本発明の酸付加塩も機能的均等物として企図する。すなわちペプチドの水溶性塩を提供するために、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸で、あるいは酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、蓚酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、シンナミン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、サリチル酸等のような有機酸で処理した本発明のペプチドは、本発明での使用に適している。

【０４７０】

タンパク質分解的分解に対するペプチドの耐性を改善し、または溶解特性の至適化し、またはペプチドを治療薬としてより適するようにするために、通常の分子生物学的技術を使用して修飾されたペプチドも含む。そのようなペプチドの類似体には、天然に存在するＬ－アミノ酸以外の残基、例えばＤ－アミノ酸または天然には存在しない合成アミノ酸を含有するものを含む。本発明のペプチドは本明細書に掲載する具体的な例示法の生成物に限定されない。

【０４７１】

本明細書で使用する用語「ＭＡＬＤＩ」はマトリックス支援レーザー脱離イオン化の略である。イオン化中、ＳＡ－ＰＥＧ（シアル酸－ポリ（エチレングリコール））は糖タンパク質のＮ－グリカン構造から部分的に排除され得る。

【０４７２】
本明細書で使用する用語「グリコシルトランスフェラーゼ（ｇｌｙｃｏｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ）」とは、供与体の糖を受容部分（ａｃｃｅｐｔｏｒ　ｍｏｉｅｔｙ）に転移する能力を有する任意の酵素／タンパク質を称する。
【０４７３】
本明細書で使用する用語「修飾された糖（ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ｓｕｇｅｒ）」は、本発明の方法でペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基に酵素的に付加された天然に存在する、または天然には存在しない炭水化物を称する。修飾された糖は限定するわけではないが糖ヌクレオチド（モノ－、ジ－およびトリ－ホスフェート）、活性化糖（例えばグリコシルハライド、グリコシルメシラート）および活性化もされず、ヌクレオチドでもない糖を含む多数の酵素基質から選択される。
【０４７４】
「修飾された糖」は「修飾基（ｍｏｄｉｆｙｉｎｇ　ｇｒｏｕｐ）」を用いて共有的に官能化される。有用な修飾基には限定するわけではないが、水溶性ポリマー、治療部分、診断部分、生体分子等を含む。修飾基での官能化の位置は、「修飾された糖」がペプチドに酵素的に加えられることを妨げないように選択される。
【０４７５】
用語「水溶性（ｗａｔｅｒ－ｓｏｌｕｂｌｅ）」とは水中で幾らかの検出可能な溶解度を有する部分を称する。水溶性を検出し、かつ／または定量するための方法は当該技術分野では周知である。例として水溶性ポリマーには、ペプチド、サッカリド、ポリ（エーテル）、ポリ（アミン）、ポリ（カルボン酸）等を含む。ペプチドは混合配列を有するか、または単一アミノ酸からなる（例えばポリ（リシン））ことができる。同様にサッカリドは混合配列であるか、または単一サッカリドサブユニット（例えばデキストラン、アミロース、キトサンおよびポリ（シアル酸））からなることができる。ポリ（エーテル）の例はポリ（エチレングリコール）である。ポリ（エチレンイミン）はポリアミンの例であり、そしてポリ（アスパラギン）酸は代表的なポリ（カルボン酸）である。
【０４７６】
本明細書で使用する用語「グリコシル連結基（ｇｌｙｃｏｓｙｌ　ｌｉｎｋｉｎｇ　ｇｒｏｕｐ）」とは、作用物質（例えば水溶性ポリマー、治療部分、生体分子）が共有結合するグリコシル残基を指す。本発明の方法において「グリコシル連結基」は、グリコシル化または非グリコシル化ペプチドに共有結合するようになり、これにより作用物質をペプチド上のアミノ酸および／またはグリコシル残基に連結する。「グリコシル連結基」は、一般に「修飾された糖」をペプチド上のアミノ酸および／またはグリコシル残基に酵素的に結合することにより、「修飾された糖」に由来する。「完全なグリコシル連結基（ｉｎｔａｃｔ　ｇｌｙｃｏｓｙｌ　ｌｉｎｋｉｎｇ　ｇｒｏｕｐ）」はグリコシル部分に由来する連結基を称し、ここで結合物を連結する個々のサッカリドモノマーは分解、例えばメタ過ヨウ素酸ナトリウムにより酸化されない。本発明の「完全なグリコシル連結基」はグリコシル単位（１つまたは複数）の付加により、または元のサッカリド構造から１以上のグリコシル単位の除去により天然に存在するオリゴ糖に由来することができる。
【０４７７】
本明細書で使用する用語「標的部分（ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　ｍｏｉｅｔｙ）」および「標的剤（ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）」は、身体の特定の組織または領域に選択的に局在化する種を称する。局在化は分子決定基の特異的認識、標的剤または結合物の分子サイズ、イオン的相互作用、疎水的相互作用等により媒介される。作用物質を特定の組織または領域に標的化する他のメカニズムは、当業者により知られている。
【０４７８】
本明細書で使用する「治療部分（ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｍｏｉｅｔｙ）」は、治療に有用な任意の作用物質を意味し、それらには限定するわけではないが抗生物質、抗－炎症剤、抗－腫瘍剤、サイトトキシンおよび放射性剤を含む。「治療部分」には生物活性剤（１より多くの治療部分が担体に結合している構築物、例えば多機能剤（ｍｕｌｔｉｖａ

ｌｅｎｔ　ａｇｅｎｔ））のプロドラッグを含む。治療部分はペプチドおよびペプチドを含む構築物も含む。例示ペプチドには図１および本明細書中の表５および表６に開示されているものを含む。

【０４７９】

本明細書で使用する「抗－腫瘍剤」とはガンを克服するために有用な任意の作用物質を意味し、限定するわけではないがサイトトキシンおよび代謝拮抗物質、アルキル化剤、アンスラサイクリン、抗生物質、抗有糸分裂剤、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、コルチコステロイド、インターフェロンおよび放射性剤のような作用物質を含む。また用語「抗腫瘍剤」の範囲内に包含されるのは、ペプチドと－腫瘍活性、例えばＴＮＦ－αとの結合物である。結合物は限定するわけではないが、治療用タンパク質と本発明の糖タンパク質との間で形成されるものを含む。代表的な結合物は、ＰＳＧＬ－１とＴＮＦ－αとの間で形成される結合物である。

【０４８０】

本明細書で使用する「サイトトキシンまたは細胞傷害剤（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　ａｇｅｎｔ）」は、細胞に有害な任意の作用物質を意味する。例にはタキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、エチジウムブロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノルオールおよびピューロマイシンおよびそれらの類似体または相同体を含む。他のトキシンには例えばリシン、ＣＣ－１０６５および類似体、ヅオカルマイシンを含む。さらに別のトキシンにはジフテリアトキシンおよび蛇毒（例えばコブラ毒）を含む。

【０４８１】

本明細書で使用するように、「放射性剤」には腫瘍を診断し、または破壊するために効果的な任意の放射性同位体を含む。例には限定するわけではないが、インジウム－１１１、コバルト－６０およびテクネチウムを含む。さらにウラン、ラジウムおよびトリウムのような天然に存在する放射性同位体元素（これらは典型的には放射性同位体の混合物を表す）は、放射性剤の適切な例である。金属イオンは典型的には有機錯化部分で錯化される。

【０４８２】

多くの有用な錯化基、クラウンエーテル、クリプタンド等が当該技術分野では知られており、そして本発明の化合物に包含することができる（例えばＥＤＴＡ、ＤＴＰＡ、ＤＯＴＡ、ＮＴＡ、ＨＤＴＡ等、およびＤＴＰＰ、ＥＤＴＰ、ＨＤＴＰ、ＮＴＰ等のようなそれらのホスホネート類似体）。例えばＰｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ．、「鉄過剰負荷の処置のための錯化剤の設計（Ｔｈｅ　Ｄｅｓｉｇｎ　ｏｆ　Ｃｈｅｌａｔｉｎｇ　Ａｇｅｎｔｓ　ｆｏｒ　Ｔｈｅ　Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｉｒｏｎ　Ｏｖｅｒｌｏａｄ）」、生物学および医学における無機化学（ＩＮＯＲＧＡＮＩＣ　ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ　ＩＮ　ＢＩＯＬＯＧＹ　ＡＮＤ　ＭＥＤＩＣＩＮＥ）で；Ｍａｒｔｅｌｌ編集；アメリカ化学学会、ワシントン、Ｄ．Ｃ．、１９８０、第２７９～３１２頁；Ｌｉｎｄｏｙ、大環リガンド錯体の化学（ＴＨＥ　ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ　ＯＦ　ＭＡＣＲＯＣＹＣＬＩＣ　ＬＩＧＡＮＤ　ＣＯＭＰＬＥＸＥＳ）；ケンブリッジ大学出版、ケンブリッジ、１９８９；Ｄｕｇａｓ、生物有機化学（ＢＩＯＯＲＧＡＮＩＣ　ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ）；スプリンガー－ファーラーク、ニューヨーク、１９８９、およびそれらの中に含まれている参考文献を参照にされたい。

【０４８３】

さらに錯化剤、クラウンエーテルおよびシクロデキストリンを他の分子に付ける多数の経路を当業者は利用することができる。例えばＭｅａｒｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，「インビボのキレート－標識タンパク質およびポリペプチドの性質（Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ　ｏｆ　Ｉｎ　Ｖｉｖｏ　Ｃｈｅｌａｔｅ－Ｔａｇｇｅｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ａｎｄ　Ｐｏｌｙ

ｐｅｐｔｉｄｅｓ）」、タンパク質の修飾：食品、栄養および薬理学的観点（ＭＯＤＩＦＩＣＡＴＩＯＮ　ＯＦ　ＰＲＯＴＥＩＮＳ：ＦＯＯＤ，ＮＵＴＲＩＴＩＯＮＡＬ，ＡＮＤ　ＰＨＡＲＭＡＣＯＬＯＧＩＣＡＬ　ＡＳＰＥＣＴＳ）」で、Ｆｅｅｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．、アメリカ化学学会、ワシントン、Ｄ．Ｃ．、１９８２、第３７０～３８７頁；Ｋａｓｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．，９：１０８－１１７（１９８８）；Ｓｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．，８：２４９－２５５（１９９７）を参照にされたい。

【０４８４】

本明細書で使用するところの「製薬学的に許容され得る担体」には、結合物と合わせた時に結合物活性の活性を保持し、そして個体の免疫系とは非反応性の任意の物質を含む。例には限定するわけではないが、リン酸緩衝化生理食塩水、水、油／水型乳液のような乳液、および様々な種類の湿潤剤のような標準的な製薬学的担体を含む。他の担体には、滅菌溶液、コート錠剤を含む錠剤およびカプセルを含んでもよい。典型的にはそのような担体は澱粉、ミルク、糖、ある種のクレー、ゼラチン、ステアリン酸またはその塩、ステアリン酸マグネシウムまたはカルシウム、タルク、植物油脂または油、ガム、グリコールのような賦形剤、または他の既知の賦形剤を含む。そのような担体はまた、香料および着色用添加剤または他の材料を含んでもよい。そのような担体を含んでなる組成物は、周知な常法により配合される。

【０４８５】

本明細書で使用するように、「投与する」とは個体への経口投与、座薬としての投与、局所的接触、静脈内、腹腔内、筋肉内、病巣内（ｉｎｔｒａｌｅｓｉｏｎａｌ）、鼻内または皮下投与、鞘内投与、または緩効性デバイス（例えばミニー浸透圧ポンプ）の移植を意味する。

【０４８６】

用語「単離された」とは、物質を生産するために使用する成分を実質的または本質的に含まない物質を称する。本発明のペプチド結合物について、用語「単離された」とはペプチド結合物を調製するために使用する混合物中の物質を通常付随する成分を実質的または本質的に含まない物質を称する。「単離された」および「純粋な」とは互換的に使用する。典型的には本発明の単離されたペプチド結合物は好ましくは範囲として表される純度のレベルを有する。ペプチド結合物に関する純度範囲の下限は約６０％、約７０％または約８０％であり、そして純度範囲の上限は約７０％、約８０％、約９０％または約９０％より高い。

【０４８７】

ペプチド結合物が約９０％より高い純度である時、それらの純度も好ましくは範囲で表される。純度範囲の下限は約９０％、約９２％、約９４％、約９６％または約９８％である。純度範囲の上限は約９２％、約９４％、約９６％、約９８％または約１００％である。

【０４８８】

純度は技術的に認識されている分析法（例えば銀染色ゲル上のバンドの強度、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ＨＰＬＣまたは類似の手段）により決定される。

【０４８９】

本明細書で使用する「群の本質的な各員」とは、ペプチドに付加される選択された割合の修飾された糖が、ペプチド上の多数の同一な受容体部位（ａｃｃｅｐｔｏｒ　ｓｉｔｅ）に付加されている、本発明のペプチド結合物群の特徴を説明する。「群の本質的な各員」は、修飾された糖に対するペプチド結合物上の部位の「均一性」にも言及しており、そして少なくとも約８０％、好ましくは少なくとも約９０％、そしてより好ましくは少なくとも約９５％均一である本発明の結合物を称する。

【０４９０】

「均一性」とは、修飾された糖が結合する受容体部分の群全域の構造的一貫性を称する。すなわち各修飾された糖が、それぞれ他の修飾された糖が結合する受容体部位と同じ構

造を有する受容体部位に結合している本発明のペプチド結合物では、ペプチド結合物は約１００％均一であると言える。均一性は典型的には範囲で表される。ペプチド結合物について均一性の範囲の下限は約６０％、約７０％または約８０％であり、そして純度範囲の上限は約７０％、約８０％、約９０％または約９０％より高い。

【０４９１】

ペプチド結合物が約９０％以上均一である時、それらの均一性も好ましくは範囲で表される。均一性の範囲の下限は約９０％、約９２％、約９４、約９６％または約９８％である。純度範囲の上限は約９２％、約９４％、約９６％、約９８％または約１００％の均一性である。ペプチド結合物の純度は典型的には当業者に既知の１以上の方法、例えば液体クロマトグラフィー－質量分析（ＬＣ－ＭＳ）、飛行スペクトロメトリーのマトリックス支援レーザー脱離質量時間（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）、キャピラリー電気泳動等により決定される。

【０４９２】

糖ペプチド種に関して言う時、「実質的に単一なグリコフォーム（ｓｕｂｓｔａｎｔｉａｌｌｙ　ｕｎｉｆｏｒｍ　ｇｌｙｃｏｆｏｒｍ）」または「実質的に単一なグリコシル化パターン（ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ　ｐａｔｔｅｒｎ）」とは、問題のグリコシルトランスフェラーゼ（例えばフコシルトランスフェラーゼ）によりグリコシル化される受容体部分の割合を指す。例えばα１，２－フコシルトランスフェラーゼの場合では、実質的にすべての（以下に定義するように）Ｇａｌβ１，４－ＧｌｃＮＡｃ－Ｒおよびそのシアリル化類似体が本発明のペプチド結合物中でフコシル化される場合、実質的に単一なフコシル化パターンが存在する。当業者は出発原料がグリコシル化受容体部分（例えばフコシル化Ｇａｌβ１，４－ＧｌｃＮＡｃ－Ｒ部分）を含んでもよいと理解するだろう。すなわち計算されるグリコシル化の割合は、本発明の方法によりグリコシル化される受容体部分、ならびに出発原料中ですでにフコシル化された受容体部分を含む。

【０４９３】

「実質的に単一」の上記定義において用語「実質的に」とは、一般に特定のグリコシルトランスフェラーゼについて少なくとも約４０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、より好ましくは少なくとも約９０％、そしてさらに好ましくは少なくとも約９５％の受容体部分がグリコシル化されることを意味する。

【０４９４】

発明の説明

Ｉ．グリカン鎖の改造するための方法

本発明は、好ましくは修飾された糖をペプチドに付加することを含む特別にカスタマイズされた、または所望のグリコシル化パターンを有するペプチド分子を提供するような様式で、糖ペプチド分子へ、またはそれから糖をインビトロで付加および／または削除するための方法および組成物を含む。したがって本発明の重要な特徴は、任意の細胞型により生産されるペプチドを取り、そしてペプチド上にコアグリカン構造を生成し、その後にグリカン構造をインビトロで改造して哺乳動物における治療的使用に適するグリコシル化パターンを有するペプチドを生成することである。

【０４９５】

ペプチドのグリコシル化パターンの重要性は、正しくグリコシル化されたペプチドを生産するための現在のインビボ法の、特にこれらのペプチドが組換えＤＮＡの方法論を使用して生産される時の限界から当該技術分野では周知である。さらに本発明まで、ペプチドは工業的規模で生産できるが、ペプチド上に所望のグリカン構造を有する糖ペプチドを生成することは可能でなかった。

【０４９６】

本発明では、本明細書のいたるところで記載するような「所望のグリコシル化」を有する糖ペプチドを提供する様式で、ペプチド上に存在すべきではない糖部分が除去され、そしてペプチドに付加されるべき、場合により修飾された糖を含む糖部分が付加されるように、細胞により生産されるペプチドが適当な酵素およびその基質の体系的付加によりイン

ビトロで酵素的に処理される。

【０４９７】

Ａ．Ｎ－結合グリカンを改造する方法

１つの観点では、本発明は商業的または製薬学的に興味深いほとんどのペプチドが本明細書でトリマンノシルコア（ｔｒｉｍａｎｎｏｓｙｌ　ｃｏｒｅ）と呼ぶ共通する５個の糖構造を含んでなり、これはペプチド鎖上の配列Ａｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ／ＴｈｒでアスパラギンにＮ－結合しているという事実を利用する。基本的なトリマンノシルコアは本質的にペプチドに結合した２個のＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）残基および３個のマンノース（Ｍａｎ）残基からなり、すなわちこれは場合によりフコース残基を含むことができる場合を除き、このような５個の糖残基を含んでなり、そしてさらなる糖は含まない。第１ＧｌｃＮＡｃはアスパラギンのアミド基に結合し、そして第２のＧｌｃＮＡｃはβ１，４－結合を介して第１に結合している。マンノース残基はβ１，４－結合を介して第２のＧｌｃＮＡｃに結合し、そして２個のマンノース残基がそれぞれα１，３およびα１，６結合を介してこのマンノースに結合している。トリマンノシルコア構造の図解的説明は図２、左側に示す。ほとんどのペプチド上のグリカン構造はトリマンノシルコアに加えて他の糖を含んでなるのが通例であるが、トリマンノシルコア構造は哺乳動物のペプチド上のＮ－結合グリカンの本質的特徴を表す。

【０４９８】

本発明は、ペプチド上にグリカン分子の構造の基本的要素としてトリマンノシルコア構造を有するペプチドの生成を含む。系がそれ自体天然に存在するものであるか、あるいはそれらは組換えＤＮＡ法を含むかどうかにかかわらず、ペプチドを生産するために使用する種々の細胞系を考慮して、本発明は任意の細胞型で生産されるペプチド上のグリカン分子が基本的なトリマンノシルコア構造に減少できる方法を提供する。いったん基本的なトリマンノシルコア構造を生成したら、次いで本明細書に記載する方法を使用して、ペプチドにペプチドの治療的効果を強化する１以上の特性を付与するペプチド上の所望するグリカン構造をインビトロでペプチドに生成することが可能である。

【０４９９】

本明細書に記載する考察から、用語「トリマンノシルコア」は図２、左側に示すグリカン構造を記載するために使用することは明らかなはずである。トリマンノシルコア構造を有する糖ペプチドは、それらに加えられたさらなる糖を有してもよく、そしてほとんどの部分について、糖が所望するグリカン構造を有するペプチドを生じるかどうかには無関係に、それに加えられたさらなる構造を有する。用語「基本的なトリマンノシルコア構造」は、本明細書中のいたるところで定義している。用語「要素」が「トリマンノシルコア構造」の記載には含まれない時、グリカンはさらにそれに付いた糖を含むトリマンノシルコア構造を含んでなる。

【０５００】

用語「基本的なトリマンノシルコア糖ペプチド」は、本明細書では主に基本的なトリマンノシルコア構造を含んでなるグリカン構造を有する糖ペプチドを指すために使用する。しかし場合によりそれに結合したフコース残基を含んでもよい。本明細書に記載するように、基本的なトリマンノシルコア糖ペプチドは１つの最適例であり、したがって本発明のグリカン改造方法の好適な出発原料である。

【０５０１】

本発明のグリカン改造方法の別の最適な出発原料は、１または２個のさらなるＧｌｃＮＡｃ残基が各α１，３およびα１，６－マンノース残基に加えられたトリマンノシルコアを有するグリカン構造である（例えば図３の第２行の、図の左から２番目の構造を参照にされたい）。この構造は本明細書では「Ｍａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４」と呼ぶ。場合により、この構造はコアフコース分子を含んでもよい。いったんＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造が生成したら、本明細書に記載する方法を使用してペプチドの治療的効果を強化する１以上の特性を糖ペプチド上に付与する所望のグリカン構造を糖ペプチド上にインビトロで生成することが可能である。

【０５０２】
それらの天然の形態では、本発明のＮ－結合糖ペプチド、そして特に本発明に有用な哺乳動物およびヒトの糖ペプチドは、トリマンノシルコア構造およびそれに結合した１以上の糖を用いてＮ－結合グリコシル化される。
【０５０３】
用語「糖ペプチド」および「糖ポリペプチド」は本明細書では同義的に使用し、そしてペプチドに結合した糖部分を有するペプチド鎖を指す。本明細書では小さい糖ポリペプチドまたは糖ペプチドを、大きな糖ポリペプチドまたは糖ペプチドから区別する識別は行わない。すなわち大変わずかなアミノ酸をそれらのペプチド鎖中に有するホルモン分子（例えばしばしばわずか３アミノ酸）および他の大変大きなペプチドも、それらが結合した糖部分を有するならば総称用語「糖ポリペプチド」および「糖ペプチド」に含める。しかし用語「ペプチド」の使用はペプチドが糖ペプチドであることを除外しない。
【０５０４】
所望のグリコシル化を有するＮ－結合糖ペプチドの例は、それに結合した少なくとも１つのＧｌｃＮＡｃ残基を含むトリマンノシルコアを有するＮ－結合グリカンを有するペプチドである。この残基はＮ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩ（ＧｎＴ－Ｉ）を使用してトリマンノシルコアに加えられる。第２のＧｌｃＮＡｃ残基を加える場合、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩ（ＧｎＴ－ＩＩ）を使用する。場合によりさらなるＧｌｃＮＡｃ残基をＧｎＴ－ＩＶおよび／またはＧｎＴ－Ｖを用いて加えてもよく、そして第３のバイセクティング（ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ）ＧｌｃＮＡｃ残基をＮ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴ－ＩＩＩ）を使用してトリマンノシルコアのβ１，４マンノースに結合することができる。場合により、この構造は、ガラクトース残基を各非－バイセクティングＧｌｃＮＡｃに加えるためにβ１，４ガラクトシルトランスフェラーゼを用いて処理することにより延長してもよく、そしてさらに場合により、α２，３またはα２，６－シアリルトランスフェラーゼ酵素を使用して、シアル酸残基を各ガラクトース残基に加えてもよい。バイセクティングＧｌｃＮＡｃをグリカンに付加することは、引き続きガラクトースおよびシアル酸残基の付加に必要ではない；しかしラットおよびヒトＧｎＴ－ＩＩＩ酵素の基質親和性に関して、グリカン上の１以上のガラクトース残基の存在は、ガラクトースを含むグリカンがこれらＧｎＴ－ＩＩＩ形の基質ではないのでバイセクティングＧｌｃＮＡｃの付加を防止する。このようにバイセクティングＧｌｃＮＡｃの存在が望まれ、そしてこのような形のＧｎＴ－ＩＩＩを使用する場合、グリカンはバイセクティングＧｌｃＮＡｃの付加前に除去されるさらなるガラクトースおよび／またはシアル酸残基を含べきであることが重要である。他のＧｎＴ－ＩＩＩ形はそれらの活性にこの特異的な基質の順序を必要としない。
【０５０５】
「所望のグリコシル化」を有するペプチドの種々の観点を表すグリカン構造の例は、本明細書に提供する図面に示す。「所望のグリコシル化」を有するペプチドのインビトロ生成に関する正確な手順は、本明細書のいたるところに記載する。しかし本発明は本明細書に開示する任意の１つのグリカン構造のみに限定されると解釈されるべきではない。むしろ本発明は本明細書に提供する方法論を使用して作成され得るありとあらゆるグリカン構造を含むと解釈すべきである。
【０５０６】
場合により、基本的なトリマンノシルコア構造のみがペプチドの所望するグリコシル化を構成するかもしれない。例えば唯一のトリマンノシルコアを有するペプチドは、ゴーシェ病に関与することが示された（Ｍｉｓｔｒｙ ｅｔ ａｌ．，１９６６，Ｌａｎｃｅｔ ３４８：１５５５－１５５９；Ｂｉｊｓｔｅｒｂｏｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２３７：３４４－３４９）。
【０５０７】
本発明に従い、所望のグリコシル化を有するペプチドを生成するために以下の手順が明らかとなる。

【０５０８】
ａ）共通する特徴としてトリマンノシルコア構造およびそれに結合した１以上の糖の少なくとも１以上の異種または均一な混合物を有する１以上のグリカン分子を有する糖ペプチドから始めて、唯一のグリカン構造として基本的なトリマンノシルコア構造を有するか、または唯一のグリカン構造としてＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４を有する糖ペプチドの比率を上げることが可能である。これはグリカン構造の糖の異種または均一混合物が基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造に減少するまで、それを開裂する適当数の酵素を適当な順序で糖ペプチドに体系的に加えることによりインビトロで達成される。どのようにこれがなされるかの具体例は、ペプチドが生産される細胞型、それゆえに細胞により最初に生産されたペプチド上に存在するグリカン構造（１つまたは複数）の複雑さの程度を含む種々の因子に大部分が依存する。どのように複雑なグリカン構造が基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造に減少できるかを図３に提示し、そして本明細書のいたるところで詳細に記載する。
【０５０９】
ｂ）細胞のグリコシル化機構が唯一のグリカン構造としてペプチド上に基本的なトリマンノシルコア構造を有するペプチドを生産する、天然に存在する細胞を単離することにより、そのようなペプチドを生成することが可能である。次に選択したペプチドが唯一のグリカン構造としてペプチド上に基本的なトリマンノシルコア構造を有するように、選択するペプチドをコードするＤＮＡを、ＤＮＡが転写、翻訳、そしてグリコシル化される細胞にトランスフェクトする。例えば機能的ＧｎＴ－Ｉ酵素を欠く細胞は数種の糖ペプチドを生産するだろう。場合によってはこれらはトリマンノシルコアに結合したさらなる糖を伴わない糖ペプチドとなることもある。しかし別の場合では、生産されるペプチドはトリマンノシルコアに結合した２つのさらなるマンノース残基を有することができ、Ｍａｎ５グリカンを生じる。これも本発明の改造方法に望ましい出発原料である。そのようなグリカン構造の生成の具体例を本明細書に記載する。
【０５１０】
ｃ）あるいはペプチド上に唯一のグリカン構造として基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造を有するペプチドが生産されるように、特異的なグリコシル化機構を付与するために細胞を遺伝的に工作することが可能である。選択したペプチドが基本的なトリマンノシルコア構造のみを含んでなる増加した数のグリカンを有するように、選択したペプチドをコードするＤＮＡを、ＤＮＡが転写、翻訳、そしてグリコシル化される細胞にトランスフェクトする。例えばＧｎＴ－Ｉを欠くように遺伝的に工作されたある種の細胞は、基本的なトリマンノシルコア構造を有するグリカンを生産するか、あるいは細胞に依存して、結合した２つのさらなるマンノース残基が加えられたトリマンノシルコアを有するグリカン（Ｍａｎ５）を生産することができる。細胞がＭａｎ５グリカン構造を生産する時、細胞は２つのさらなるマンノース残基を開裂してトリマンノシルコアを生成するマンノシダーゼ３を発現するようにさらに遺伝的に工作されることができる。あるいはこのＭａｎ５グリカンはインビトロでマンノシダーゼ３とインキューベーションして同じ効果を有することが可能である。
【０５１１】
ｄ）ｂ）およびｃ）での考察から、細胞は基本的なトリマンノシルコアまたはそれに結合したＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造を有するペプチドのみを生産する必要はないことが容易に明らかである。むしろｂ）およびｃ）で記載した細胞が１００％の基本的なトリマンノシルコア構造（すなわち、それに結合したさらなる糖を持たない）、あるいは１００％のＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造を有するペプチドを生産しなければ、細胞は実際には唯一のグリカン構造として基本的なトリマンノシルコア構造、またはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造を、それに結合したさらなる糖を有するこれらの構造に加えて組み合わせて有するペプチドの異種の混合物を生産する。結合したさらなる糖を有するトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造を有するペプチドの比率は、１つの構造を有するペプチドの比率とは反対に、それらを生産する細胞に依存して変動するだろう。グリカンの複雑さ（

すなわちトリマンノシルコアにどの糖がどれくらい結合しているか）も、それらを生産する細胞に依存して変動するだろう。

【０５１２】

ｅ）いったん基本的なトリマンノシルコアまたは１または２個のＧｌｃＮＡｃ残基がそれに結合したトリマンノシルコアを有する糖ペプチドが上記のａ）、ｂ）またはｃ）に従い生産されれば、本発明に従い、さらなる糖分子をインビトロでトリマンノシルコア構造に加えて、所望のグリコシル化を有するペプチド（すなわち、インビトロでカスタマイズされたグリカン構造を有するペプチド）を生成する。

【０５１３】

ｆ）しかしすべてではないが幾らかの所望する糖を結合して含む基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造を有するペプチドが生産される場合の時は、グリカン構造を基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造に減少することなく、残りの所望の糖を付加することのみが必要である。したがって場合により、さらなる糖を結合したトリマンノシルコア構造を有するグリカン構造を有するペプチドは、改造の適当な出発原料である。

【０５１４】

基本的なトリマンノシルコア糖ペプチドの単離

本発明の基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４糖ペプチドは、必要ならばペプチド精製の分野で周知な技術を使用して単離し、そして精製することができる。適当な技術にはクロマトグラフィー技法、等電点電気泳動技法、超遠心技法等を含む。そのような任意の技法を使用して、本発明の組成物を調製することができ、ここで本発明の糖ペプチドは通常、細胞培養基内に見いだされる他のペプチドおよび他の成分から単離されている。精製の程度は例えば他のペプチドに関して９０％または９５％、あるいは一層高い、例えば９８％となり得る。例えばＤｅｕｔｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．（編集、１９９０、ペプチド精製に対する手引き（Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ）、Ｈａｒｃｏｕｒｔ Ｂｒａｃｅ Ｊｏｖａｎｏｖｉｃｈ、サンディエゴ）を参照にされたい。

【０５１５】

従来技術の方法により生産された糖ペプチド中に存在するＮ－結合グリカンの異質性は通常、所望の糖ペプチドを生産するために修飾することができる少ない割合の標的糖ペプチドを単離することを可能にするだけである。本発明では、大量の基本的なトリマンノシルコア糖ペプチドおよびＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４グリカンを含む他の所望する糖ペプチドを生産することができ、次いでこれらはさらに修飾されて所望するグリコシル化を有する大量のペプチドを生成することができる。

【０５１６】

ペプチドに結合した特定の型のグリカンの特異的濃縮は、所望のグリカンに親和性を有するレクチンを使用して達成することができる。そのような技術は糖生物学の分野では周知である。

【０５１７】

以下により詳細に記載する本発明の重要な特徴は、いったんペプチド上にコアグリカン構造が生成されれば、次いでこのグリカン構造は哺乳動物において改善された治療的使用を有する望ましいグリコシル化を有するペプチドを生成するためにインビトロで改造されることである。哺乳動物は任意の適当な種でよく、そして好ましくはヒトである。

【０５１８】

所望のグリコシル化を持つペプチドを調製するのための種々のシナリオおよび正確な方法および組成物が、以下の開示から明らかになるだろう。

【０５１９】

哺乳動物で治療に使用するためのペプチド生産の最終的な目的は、ペプチドがペプチドの治療的利益を無効にするというよりは促進するグリカン構造を含んでなるべきであるということである。本明細書を通して開示するように、細胞中で生産されるペプチドは、所

望のグリコシル化を有し、こうして哺乳動物での治療的使用に適するペプチドが生成するように、グリカン上に存在すべきではない糖の開裂およびグリカン上に存在すべき糖の付加を触媒する種々の酵素を用いて、インビトロで処理されることができる。細胞中でペプチドの種々のグリコ形の生成は、上に記載する。所望するグリコシル化を有するペプチド生成の様々なメカニズムをこれから記載し、ここで出発原料、すなわち細胞により生産されるペプチドは細胞型毎に異なってもよい。本開示から明らかになるように、出発原料はそのグリカン組成に関して単一である必要はない。しかし出発原料は、大量の最終産物、すなわち正しくグリコシル化されたペプチドが生産されるために、ある一定のグリコ形について豊富にすることが好ましい。

【０５２０】

本発明に従い好適な態様では、所望のグリコシル化を有するペプチドをもたらす分解および合成反応（ｅｖｅｎｔ）には、ある点で基本的なトリマンノシルコア構造またはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造をペプチド上に生成することを含む。

【０５２１】

本発明はペプチドに１以上の選択したグリコシル残基を加える手段も提供し、その後に修飾した糖をペプチドの少なくとも１つの選択したグリコシル残基に結合させる。本態様は例えば、修飾された糖を、ペプチド上には存在しないか、または望ましい量で存在しないいずれかの選択したグリコシル残基に結合させることが望ましい時に有用である。このように修飾された糖をペプチドにカップリングさせる前に、選択したグリコシル残基を酵素または化学的カップリングによりペプチドに結合させる。別の態様ではペプチドのグリコシル化パターンは、ペプチドから炭水化物残基を除去することにより修飾された糖の結合前に改変させる。例えば国際公開第９８／３１８２６号パンフレットを参照にされたい。

【０５２２】

ペプチド上に存在する任意の炭水化物部分の付加または除去は、化学的にまたは酵素的に行う。化学的な脱グリコシル化は好ましくはペプチド変異体を化合物であるトリフルオロメタンスルホン酸または均等な化合物に暴露することにより行われる。この処理は連結糖（Ｎ－アセチルグルコサミンまたはＮ－アセチルガラクトサミン）を除くほとんどすべての糖の開裂をもたらすと同時に、ペプチドは完全なままである。化学的な脱グリコシル化は、Ｈａｋｉｍｕｄｄｉｎ ｅｔ ａｌ／．１９８７，Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２５９：５２およびＥｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１１８：１３１に記載されている。ペプチド変異体上の炭水化物部分の酵素的開裂は、種々のエンド－およびエキソ－グリコシダーゼの使用により、Ｔｈｏｔａｋｕｒａ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１３８：３５０に記載されているように行うことができる。

【０５２３】

グリコシル部分の化学的付加は、任意の技術的に認識されている方法により行う。糖部分の酵素的付加は好ましくは本明細書に説明する方法の変法を使用して行い、天然のグリコシル単位を本発明で使用する修飾された糖に置換する。糖部分を付加する他の方法は、米国特許第５，８７６，９８０号、同第６，０３０，８１５号、同第５．７２８，５５４号および同第５，９２２，５７７号明細書に開示されている。

【０５２４】

選択されたグリコシル残基の結合点の例には、限定するわけではないが：（ａ）Ｎ－およびＯ－結合グリコシル化の部位；（ｂ）グリコシルスランスフェラーゼの受容体である末端グリコシル部分；（ｃ）アルギニン、アスパラギンおよびヒスチジン；（ｄ）遊離カルボキシル基；（ｅ）システインのもののような遊離スルフヒドリル基；（ｆ）セリン、トレオニンまたはヒドロキシプロリンのもののような遊離ヒドロキシル基；（ｇ）フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンのもののような芳香族残基；あるいは（ｈ）グルタミンのアミド基を含む。本発明での使用法の例は、１９８７年９月１１日に公開された国際公開第８７／０５３３０号パンフレットおよびＡｐｌｉｎ ａｎｄ Ｗｒｉｓｔ

ｏｎ ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，ｐｐ．２５９－３０６（１９８１）に記載されている。

【０５２５】

本明細書で提供する幾つかの図面に示す例を特に扱って、ペプチド上に所望のグリカンを生産するためのインビトロ酵素反応の順序に関する説明をこれから与える。以下に開示する各酵素転換の正確な反応条件は糖生物学の当業者には周知であり、故にここでは繰り返さない。このような種類の反応に関する反応条件の総説は、Ｓａｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８２，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ８３：４５８－５１４およびそれに引用されている文献を参照にされたい。

【０５２６】

図２では、左側に基本的なトリマンノシルコアグリカンの構造を示す。この構造は、基本的なトリマンノシルコア構造をＧｎＴ－Ｉ、続いてＧｎＴ－ＩＩ、そしてさらにＧｎＴ－ＩＩＩ、およびＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃを含んでなる糖供与体の存在下でインキューベーションすることにより、バイセクティングＧｌｃＮＡｃを有する完全なグリカン構造に転換することが可能であり、ここでＧｌｃＮＡｃは順次、基本的なトリマンノシルコア構造に付加されてバイセクティングＧｌｃＮＡｃを有するトリマンノシルコアを生成する。

【０５２７】

図４では、バイセクティングＧｌｃＮＡｃを含むトリマンノシルコアグリカンの、ガラクトースおよびＮ－アセチルノイラミン酸を含んでなる複雑なグリカン構造への転換を示す。バイセクティングＧｌｃＮＡｃを含むトリマンノシルコアグリカンを最初にガラクトシルトランスフェラーゼおよび供与体分子としてＵＤＰ－Ｇａｌとインキューベーションし、ここで２個のガラクトース残基が分子上の周辺ＧｌｃＮＡｃ残基に加えられる。次いで酵素ＮｅｕＡｃ－トランスフェラーゼを使用して２個のＮｅｕＡｃ残基を１から各ガラクトース残基に加える。

【０５２８】

図５では、高マンノースグリカン構造の基本的なトリマンノシルコアグリカンへの転換を示す。高マンノースグリカン（Ｍａｎ９）はマンノシダーゼ１の存在下で順次インキューベーションされて、Ｍａｎ５構造を生成し、そして次にマンノシダーゼ３の存在下でインキューベーションされて、すべて、しかし３個のマンノース残基を残してグリカンから除去される。あるいはＭａｎ９構造のインキューベーションは、単にマンノシダーゼ３の存在下でのインキューベーションによりトリマンノシルコア構造のみに戻し改作されてもよい。上記図２および４に提示するスキームに従い、次にこの基本的なトリマンノシルコアグリカンの複雑なグリカン分子への転換が可能である。

【０５２９】

図６では、植物細胞により生産される典型的な複雑なＮ－結合グリカン構造を示す。植物細胞がＧｎＴ－Ｉ酵素活性を欠く時、キシロースおよびフコースはグリカンに付加されることはできないことに注目することが重要である。すなわちＧｎＴ－Ｉノックアウト細胞の使用は、これらの細胞がどのような「戻し改作」反応を行うことなくさらなる糖を付加することができる基本的なトリマンノシルコアを有するペプチドを生産する点で本発明に特定の利点を提供する。同様に、植物細胞中で生産される構造がグリカンのＭａｎ５変形物であり、ＧｎＴ－Ｉがこれらの細胞に存在しなければ、キシロースおよびフコースはこの構造に付加されることができない。この場合、マンノシダーゼ３を使用してＭａｎ５構造を基本的なトリマンノシルコア（Ｍａｎ３）に戻し改作することができる。本明細書に提供する方法に従い、今、所望する糖部分をトリマンノシルコアに付加して所望するグリカン構造を生成することが可能である。

【０５３０】

図７では、昆虫細胞で生産される典型的な複雑なＮ－結合グリカン構造を示す。明らかに、例えばフコースのようなさらなる糖も存在する。さらにここでは示さないが、昆虫細胞は９個ものマンノース残基を有する高マンノースグリカンを生産することができ、そしてそれに結合したさらなる糖を含むかもしれない。昆虫細胞ではＧｎＴ－Ｉノックアウト

細胞がフコース残基をグリカンに付加することを妨げる場合もある。このように昆虫細胞中でのペプチドの生産は、好ましくはＧｎＴ－Ｉノックアウト細胞で達成される。このようにして生産されたグリカンは、次いで必要ならば本明細書に記載する任意の方法およびスキームを使用してインビトロで戻し改作されることができ、そしてさらなる糖を本明細書に提供する方法およびスキームを使用してインビトロでそれらに加えてもよい。

【０５３１】

図３では、様々な完成段階のグリカン構造を示す。特にバイセクティングＧｌｃＮＡｃ残基を含まない複雑な炭水化物グリカン構造から基本的なトリマンノシルコア構造のインビトロの酵素的生成を示す。またそれらからのバイセクティングＧｌｃＮＡｃを含むグリカン構造の生成を示す。生産することができる幾つかの中間体グリカン構造を示す。これらの構造は細胞により生産されることができ、あるいは本明細書に記載するインビトロ戻し改作反応で生産されることができる。糖部分はインビトロで基本的なトリマンノシルコア構造に、または所望するグリカンを生産するために任意の適当な中間体構造に付加することができる。

【０５３２】

図８では、高マンノース構造から始まるグリカンを戻し改作またはそれに付加するために行うことができる一連の可能なインビトロ反応を示す。例えばＭａｎ９グリカンはマンノシダーゼ１を使用して改作してＭａｎ５グリカンを生成するか、あるいはこれはマンノシダーゼ３または１以上の微生物マンノシダーゼを使用してトリマンノシルコアに改作してもよい。次いでＧｎＴ－ＩおよびまたはＧｎＴ－ＩＩを使用してさらなるＧｌｃＮＡｃ残基をグリカンに転移することができる。さらにグリカン分子がＧｎＴ－Ｉを持たない細胞中で生産される時には起こらない状況を示す（影を付けた箱を参照にされたい）。例えばフコースおよびキシロースは、ＧｎＴ－Ｉが活性であり、そしてＧｌｃＮＡｃの分子への転移を促進する時にのみグリカンに付加され得る。

【０５３３】

図９はトリマンノシルコア構造から始まり、２アンテナ、３アンテナそしてさらには４アンテナグリカン構造を合成するための周知法を表す。本発明の方法に従い、これらの各構造は糖生物学の分野で周知の適切な酵素および反応条件を使用して、インビトロで合成することが可能である。

【０５３４】

図１０では、トリマンノシルコア構造から始まり、さらにより一層複雑な炭水化物構造を合成するためのスキームを示す。例えばシアリル化されていてもいなくてもよいルイスｘおよびルイスａ抗原構造をインビトロで生産するためのスキームを示す。そのような構造はペプチド上に存在する時、免疫応答をアップレギュレート（ｕｐｒｅｇｕｌａｔｉｎｇ）またはダウンレギュレート（ｄｏｗｎｒｅｇｕｌａｔｉｎｇ）するために免疫学的な利点をペプチドに付与することができる。さらにそのような構造は、これらの構造の型が細胞接着ペプチド等への結合に関与するので、ペプチドを特異的な細胞に標的化するためにも有用である。

【０５３５】

図１１はセリンまたはトレオニンから始まる多くのＯ－結合ペプチドを調製するための例示スキームである。

【０５３６】

図１２はコア１から４と名付けられた４種類のＯ－結合グリカン構造を表す一連の図解である。コア構造は点線で囲む。この構造に含むことができる糖には、ガラクトース残基に加えられたシアル酸残基およびＧｌｃＮＡｃ残基に加えられたフコース残基を含む。

【０５３７】

このように好適な態様では、本発明は基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造が結合する単離および精製された糖ペプチドを提供し、この糖ペプチドをグリコシルトランスフェラーゼ酵素およびグリコシル部分を有する供与体分子と、グリコシル部分を糖ペプチドに転移させるために適する条件下で接触させることにより、Ｎ－結

合グリコシル化糖ペプチドを作成する方法を提供する。次に所望のグリコシル化パターンを有するペプチドを生産するためのトリマンノシルコア糖ペプチドまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４糖ペプチドのカスタマイズ化が、当該技術分野で周知の技術を使用して所望の糖部分の順次付加により達成される。

【０５３８】

グリカン１次構造の決定

Ｎ－結合糖ペプチドが細胞により生産される時、本明細書のいたるところで記載するように、これは他の糖部分をそれに付加する前に共通の、一般的には基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造に減少されなければならないグリカン構造の異種の混合物を含んでなるかもしれない。どの糖を特定のグリカン構造から除去するべきであるかを正確に決定するために、１次グリカン構造を同定することが必要となる場合がある。グリカンの１次構造を決定するための技術は当該技術分野では周知であり、そして例えばＭｏｎｔｒｅｕｉｌ、「糖ペプチドの構造および生合成（Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ Ｇｌｙｃｏｐｅｐｔｉｄｅｓ）」、医学的応用における多糖（Ｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅｓ ｉｎ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ）、第２７３～３２７頁、１９９６、Ｓｅｖｅｒｉａｎ Ｄａｍｉｔｒｉｕ編集、マルセルデッカー、ニューヨーク州、に詳細に記載されている。したがって糖生物学の分野の当業者には、細胞により生産されたペプチド群を単離し、そしてそれに結合しているグリカンの構造（１つまたは複数）を決定することは単純な事柄である。例えば（ｉ）加水分解、アセトリシス、ヒドラジン分解のような化学的開裂により、または亜硝酸のデアミネーションによりいずれかでグリコシド結合を分解し（ｓｐｌｉｔｔｉｎｇ）；（ｉｉ）メチル化を完成し、続いて加水分解またはメタノリシスを行い、そして部分的にメチル化された単糖のガス－液体クロマトグラフィーおよび質量分析を行い；そして（ｉｉｉ）エキソグリコシダーゼを使用して単糖間のアノマー結合を決定し、これはまた順次分解により１次グリカン構造の洞察も提供するための効率的な方法を利用することができる。特に質量分析および核磁気共鳴（ＮＭＲ）分光法の技術、特に高磁場ＮＭＲはグリカン１次構造を決定するために成功裏に使用されてきた。

【０５３９】

炭水化物分析用のキットおよび装置も市販されている。フルオロフォア支援炭水化物電気泳動（Ｆｌｕｏｒｏｐｈｏｒｅ Ａｓｓｉｓｔｅｄ Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ：ＦＡＣＥ（商標））は、グリコ（Ｇｌｙｋｏ）社（ノバト、カリフォルニア州）から販売されている。ＦＡＣＥ分析では、Ｎ－結合グリカンに関してはエンドＨまたはＮ－グリカナーゼ（ＰＮＧａｓｅＦ）のいずれかを用いて、あるいはＳｅｒ／Ｔｈｒ結合グリカンに関してはヒドラジンを用いて、ペプチドから複合糖質が放出される。次いでグリカンは還元末端でフルオロフォアにより非－構造識別様式で標識される。フルオロフォアで標識したグリカンは次いでポリアクリルアミドゲルでサッカリドの荷電／質量比ならびに流体力学的容量に基づき分離される。像をＵＶ光の下で取り、そしてグリカンの組成は標準と比較した移動距離により決定される。オリゴ糖はエキソグリコシダーゼ消化によりサッカリドの順次除去による移動シフトを分析することにより、この様式で配列決定することができる。

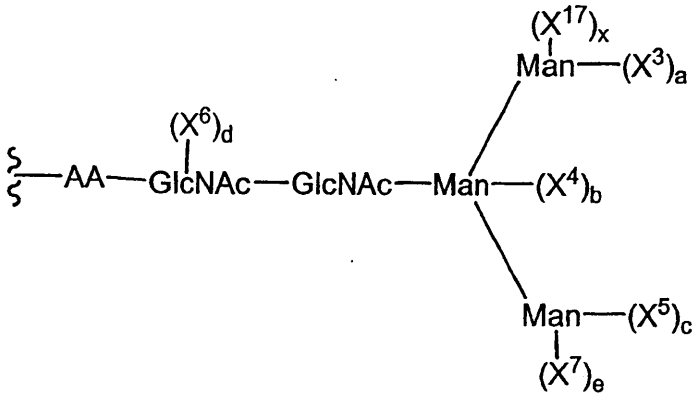
【０５４０】

例示態様

Ｎ－結合グリコシル化の改造は、式１：

【０５４１】

【化４０】



【０５４２】

式中、Ｘ３、Ｘ４、Ｘ５、Ｘ６、Ｘ７およびＸ１７は、（独立して選択された）単糖またはオリゴ糖残基であり；そして

ａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅおよびｘは（独立して選択された）０、１または２であるが、ただしａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅおよびｘから選択される少なくとも１つの員は１または２である、を参照にして最もよく説明される。

【０５４３】

式１はトリマンノシルコアを含んでなる、好ましくはペプチド骨格のアスパラギン残基に共有結合しているグリカン構造を記載する。好適な発現系は、トリ－マンノシルコアを含んでなるＮ－結合グリカンを含む外因性のペプチドを発現し、そして分泌する。本発明の改造方法を使用して、これらペプチド上のグリカン構造は所望する任意のグリカン構造に都合よく改造することができる。例示的な反応条件は、実施例および参考文献全体に見いだされる。

【０５４４】

好適な態様では、式１に記載するグリカンは構造が特異的な決定基を有するように改造される。グリカンの構造は中でもペプチドの生物学的活性を強化し、ペプチドに新しい生物活性を与え、ペプチドの生物学的活性を除去し、またはとりわけ天然のペプチドのグリコシル化パターンにより良く近づけるために選択することができる。

【０５４５】

第１の好適な態様では、ペプチドＮ－結合グリカンを改造して天然のヒトのタンパク質のグリコシル化パターンにより良く近づける。この態様では、式１に記載するグリカン構造は以下の部分：

Ｘ３およびＸ５＝｜－ＧｌｃＮＡｃ－Ｇａｌ－ＳＡ；

ａおよびｃ＝１；

ｄ＝０または１；

ｂ、ｅおよびｘ＝０

を有するように改造される。

【０５４６】

この態様は異質な細胞発現系で発現するヒトペプチドに特に有利である。Ｎ－結合グリカン構造をこの立体配置に改造することにより、ペプチドはとりわけヒト患者中での免疫原性が低くなり、かつ／またはより安定となる。

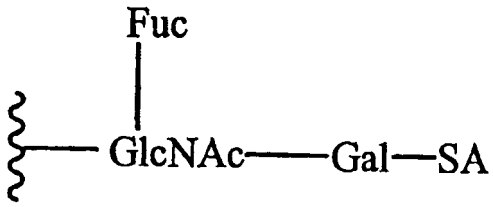
【０５４７】

第２の好適な態様では、ペプチドＮ－結合グリカンがトリ－マンノシルコア上にバイセクティングＧｌｃＮＡｃ残基を有するように改造される。この態様では、式１に記載するグリカン構造は以下の部分：

Ｘ３およびＸ５は｜－ＧｌｃＮＡｃ－Ｇａｌ－ＳＡ；

ａおよびｃ＝１；

X^4がＧｌｃＮＡｃであり；
ｂ＝１；
ｄ＝０または１；
ｅおよびｘ＝０
を有するように改造される。
【０５４８】
この態様は異質な細胞系で発現する組換え抗体分子に特に有利である。抗体分子がＦｃ－媒介型細胞傷害性を含む時、Ｆｃドメインに結合したバイセクティングオリゴ糖の存在が抗体－依存性の細胞傷害性を著しく増すことが知られている。
【０５４９】
第３の好適態様では、ペプチドＮ－結合グリカンがシアリル化ルイスＸ部分を有するように改造される。この態様では、式１に記載するグリカン構造は以下の部分：
X^3およびX^5は
【０５５０】
【化４１】



【０５５１】
であり；
ａ、ｃ、ｄ＝１；
ｂ、ｅおよびｘ＝０；
X^6＝フコース
を有するように改造される。
【０５５２】
この態様は改造されるペプチドがセレクチン分子およびそれを発現する細胞を標的にすることを意図する時に特に有利である。
【０５５３】
第４の好適な態様では、ペプチドＮ－結合グリカンが結合部分を有するように改造する。この結合部分は、とりわけＰＥＧ分子、他のペプチド、薬剤のような低分子でよい。この態様では、式１に記載するグリカン構造は以下の部分：
X^3およびX^5は｜－ＧｌｃＮＡｃ－Ｇａｌ－ＳＡ－Ｒ；
ａおよびｃ＝１または２；
ｄ＝０または１；
ｂ、ｄ、ｅおよびｘ＝０；
ここでＲ＝結合基
を有するように改造される。
【０５５４】
結合部分は、とりわけＰＥＧ分子、他のペプチド、薬剤のような低分子でよい。したがってこの態様はペプチドを、患者の血流からペプチドの排除を遅らせるＰＥＧ分子に、両ペプチドを特異的組織または細胞を標的とさせるペプチドに、あるいは相補的な治療的使用の別のペプチドに結合させるために有用である。
【０５５５】
当業者には本発明が上記の好適なグリカン分子に限定されないことは明らかであろう。好適態様は本発明の改造方法により作成することができる多くの有用なグリカン分子のわずか２～３である。当業者は他の有用なグリカンをどのように設計するかを知っているだ

ろう。
【０５５６】
第１の例示態様では、ペプチドを当該技術分野で周知の方法に従いＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵母細胞系）で発現させる。Ｎ－結合グリカンの共通（ｃｏｎｓｅｎｓｕｓ）部位を持つペプチドがＣＨＯ細胞から発現され、そして分泌される時、Ｎ－結合グリカンは図３の上段に表す構造を有する。これらすべての構造が存在することができるが、断然最も多くの構造は右側の２つである。式１の用語において、
X^3およびX^5は｜－ＧｌｃＮＡｃ－Ｇａｌ－（ＳＡ）であり；
ａおよびｃ＝１；
ｂ、ｄ、ｅおよびｘ＝０
である。
【０５５７】
したがって１つの例示態様では、ＣＨＯ細胞で発現するペプチドのＮ－結合グリカンは、ペプチドをガラクトース受容体分子およびシアル酸供与体分子に特異的であるグリコシルトランスフェラーゼと接触させることにより、好適なヒト化グリカンに改造する。この工程を図３および実施例２で具体的に説明する。別の例示態様では、ＣＨＯ細胞から発現され、そして分泌されるペプチドのＮ－結合グリカンを、好適なＰＥＧ化構造に改造する。ペプチドを最初にシアル酸に特異的なグリコシダーゼと接触させて末端ＳＡ部分を除去し、そして次いでガラクトース受容体部分およびシアル酸受容体部分に特異的であるグリコシルトランスフェラーゼとＰＥＧ－シアル酸－ヌクレオチド供与体分子の存在下で接触させる。場合によりペプチドは次いでガラクトース受容体部分およびシアル酸受容体部分に特異的であるグリコシルトランスフェラーゼと、シアル酸－ヌクレオチド供与体分子の存在下で接触させて、すべてのグリカン分子の完全なＳＡキャッピングを確実とする。
【０５５８】
他の例示態様では、ペプチドを当該技術分野で周知の方法に従いＳＦ－９細胞系のような昆虫細胞中で発現させる。Ｎ－結合グリカンと共通部位を持つペプチドがＳＦ－９細胞から発現され、そして分泌される時、Ｎ－結合グリカンは図７の上段に表す構造を有する。式１の用語において：
X^3およびX^5は｜－ＧｌｃＮＡｃであり；
ａおよびｃ＝０または１；
ｂ＝０；
X^6はフコースであり；
ｄ＝０、１または２；そして
ｅおよびｘ＝０
である。
【０５５９】
トリマンノースコアは昆虫細胞により作られるＮ－結合グリカンのほとんどすべてに存在し、そして時折、アンテナＧｌｃＮＡｃおよび／またはフコース残基（１つまたは複数）も存在する。１つの例示態様では、昆虫細胞から発現され、そして分泌されるペプチドのＮ－結合グリカンは、最初にグリカンをフコース分子に特異的なグリコシダーゼと接触させ、次いでグリカンをトリマンノースコアの各アンテナ上のマンノース受容体分子、ＧｌｃＮＡｃ供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－ＧｌｃＮＡｃ分子の存在下で接触させ；次いでグリカンをＧｌｃＮＡｃ受容体分子、Ｇａｌ供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－Ｇａｌ分子の存在下で接触させ；そして次にグリカンをガラクトース受容体分子、シアル酸供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－ＳＡ分子の存在下で接触させることにより好適なヒト化グリカンに改造される。当業者は存在するならばフコース分子はこの方法の任意の時点で除去できると考えるだろう。別の例示態様では、前例のヒト化グリカンはグリカンをＧｌｃＮＡｃ受容体分子、フコース供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼとヌクレオチド－フコース分子の存在下で接触させることにより、シ

アリル化ルイスＸグリカンにさらに改造する。この工程は図１０および実施例３で具体的に説明する。

【０５６０】

さらに他の例示態様では、ペプチドは当該技術分野で周知の方法に従いサッカロミセスセルビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のような酵母で発現させる。Ｎ－結合グリカンの共通部位を持つペプチドがＳ．セルビシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）細胞から発現され、そして分泌される時、Ｎ－結合グリカンは図５の左に表す構造を有するだろう。Ｎ－結合グリカンは常にトリマンノシルコアを有し、これはしばしばマンノースまたは関連する多糖を用いて１０００残基まで合成される。式１の用語において、

X^3およびX^5＝｜－Ｍａｎ－Ｍａｎ－（Ｍａｎ）$_{0-1000}$；

ａおよびｃ＝１または２；

ｂ、ｄ、ｅおよびｘ＝０

である。

【０５６１】

１つの例示態様では、酵母細胞から発現され、そして分泌されるペプチドのＮ－結合グリカンは、最初にグリカンをα２マンノース分子に特異的なグリコシダーゼと接触させ、次にグリカンをα６マンノース分子に特異的なグリコシダーゼと接触させることにより、基本的なトリマンノースコアに改造される。この工程を図５および実施例６で具体的に説明する。別の例示態様では、Ｎ－結合グリカンは、基本的なトリマンノースコアグリカンをトリマンノースコアの各アンテナ上のマンノース受容体分子、ＧｌｃＮＡｃ供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－ＧｌｃＮＡｃ分子の存在下で接触させ；次いでグリカンをトリマンノースコアの真ん中のマンノース受容体分子、ＧｌｃＮＡｃ供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－ＧｌｃＮＡｃ分子の存在下で接触させ；次いでグリカンをＧｌｃＮＡｃ受容体分子、Ｇａｌ供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－Ｇａｌ分子の存在下で接触させ；そして次にグリカンをガラクトース受容体分子、シアル酸供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－ＳＡ分子の存在下で接触させることにより、Ｆｃ媒介型の細胞毒性機能を持つ組換え抗体に適するグリカンを作成するためにさらに改造される。

この工程は図２、３および４で具体的に説明する。

【０５６２】

別の例示態様では、ペプチドは当該技術分野で周知の方法に従い細菌細胞、特に大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞で発現させる。Ｎ－結合グリカンの共通部位を持つペプチドが（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞で発現する時、Ｎ－結合共通部位はグリコシル化されない。例示態様では、ヒト化グリカン分子はペプチドをＮ－結合共通部位およびＧｌｃＮＡｃ供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチドＧｌｃＮＡｃの存在下で接触させ；そしてさらに成長しているグリカンを受容体および供与体部分に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、必要な供与体部分の存在下で所望のグリカン構造が完成するまで順次接触させることにより、ペプチド骨格から構築される。Ｎ－結合グリカンを持つペプチドが真核細胞で発現するが、新生ペプチドをゴルジ装置に向ける正しいリーダー配列が無い時、成熟ペプチドはグリコシル化されないらしい。この場合もペプチドは前述のペプチドＮ－結合共通部位から構築することにより、Ｎ－結合グリコシル化を与えることができる。タンパク質が糖部分を用いて化学的に修飾される時、タンパク質を前述のように構築することができる。

【０５６３】

これらの例は本発明を具体的に説明するものであり、そして本発明を限定するものではないことを意味している。当業者は各例で取られる工程が状況によっては異なる順序で行われ、同じ結果を得ることができると考えるだろう。また当業者は、異なる工程の組が同じ生成グリカンを生産することもできると理解するだろう。好適な改造されたグリカンは

ペプチドが発現される発現系に対して全く特異的では無いと理解するだろう。改造されたグリカンは単に具体的説明であり、そして当業者は本明細書に具体的には記載していないグリカンを作成するために、これらの例からどのように原理を取り出し、そしてそれらを種々の発現系で生産されるペプチドに応用するかを知っている。

【０５６４】

Ｂ．Ｏ－結合グリカンの改造方法

Ｏ－グリコシル化は種々の単糖がＯ－グリコシド結合でヒドロキシアミノ酸へ結合していることが特徴である。Ｏ－グリコシル化は動物および植物界で広く行き渡った翻訳後修飾である。タンパク質にＯ－結合したグリカンの構造的複雑さは、Ｎ－結合グリカンのそれをはるかに越える。新たに翻訳されたペプチドのセリンまたはトレオニン残基は、ペプチドのＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼによりゴルジのシスからトランス区画で修飾されるようになる。Ｏ－グリコシル化の部位はグリコシルトランスフェラーゼの配列特異性により決定されだけでなく、異なる基質部位間の競合およびグリカンを形成する原因となる他のグリコシルトランスフェラーゼとの競合により媒介される後成的調節によっても決定される。

【０５６５】

Ｏ－結合グリカンは任意に３つの領域：コア、骨格領域および周辺領域を有すると任意に定義された。Ｏ－結合グリカンの「コア」領域はペプチドに近いグリカン鎖の最も内側の２または３つの糖である。骨格領域は単一な延長により形成されたグリカン鎖の長さに主に貢献している。周辺領域は高度な構造の複雑性を現す。Ｏ－結合グリカンの構造的複雑さはコア構造から始まる。多くの場合で、Ｏ－結合グリカン共通部位に加えた第１の糖残基はＧａｌＮＡｃであり；しかし糖は中でもＧｌｃＮＡｃ、グルコース、マンノース、ガラクトースまたはフコースでもよい。図１１は既知のＯ－結合グリカンコア構造およびそれらのインビボ合成の原因となる酵素の図解である。

【０５６６】

哺乳動物細胞では、少なくとも８つの異なるＯ－結合コア構造が見いだされ、すべてコア－α－ＧａｌＮＡｃ残基に基づく。図１２に表す４つのコア構造が最も一般的である。コア１およびコア２は哺乳動物細胞で最も豊富な構造であり、そしてコア３およびコア４はより限定された、器管－特徴的発現系で見いだされる。Ｏ－結合グリカンはＭｏｎｔｒｅｕｉｌ、糖ペプチドの構造および合成（Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ Ｇｌｙｃｏｐｅｐｔｉｄｅｓ）、医学的応用における多糖（Ｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅｓ ｉｎ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ）で、第２７３－３２７頁、１９９６、Ｓｅｖｅｒｉａｎ Ｄａｍｉｔｒｉｕ編集、マルセルデッカー、ニューヨーク州、およびＳｃｈａｃｈｔｅｒ ａｎｄ Ｂｒｏｃｋｈａｕｓｅｎ、分岐Ｏ－結合グリカンの生合成（Ｔｈｅ Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ Ｂｒａｎｃｈｅｄ Ｏ－Ｌｉｎｋｅｄ Ｇｌｙｃａｎｓ）、１９８９、実験生物学会、第１～２６頁（英国）で総説されている。

【０５６７】

本開示からＯ－グリコシル化ペプチドのグリカン構造は、Ｎ－結合グリカンについて記載したものに類似の技術を使用して改造できることは明らかであろう。Ｏ－グリカンはアスパラギン残基ではなくセリンまたはトレオニン残基に結合している点でＮ－グリカンとは異なる。Ｎ－グリカンの改造に関して本明細書に記載するように、加水分解酵素を使用してＯ－結合グリカン中の望ましくない糖部分を開裂し、そして次にさらに望ましい糖をそれらに付加して、カスタマイズされたＯ－グリカン構造をペプチド上に構築することができる（図１１および１２を参照にされたい）。

【０５６８】

哺乳動物細胞におけるＯ－グリコシル化の最初の段階は、各々が限定された受容体ペプチド特異性を有する少なくとも１１種の既知のα－Ｎ－アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼの任意のファミリーを使用したＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）の結合である。一般に各酵素により認識される受容体ペプチドは少なくとも１０個のア

ミノ酸の配列を構成する。１つの特定のＧａｌＮＡｃ－トランスフェラーゼにより認識されるアミノ酸配列を含むペプチドは、それらがこの酵素を発現している細胞中で発現し、そしてそれらがＵＤＰ－ＧａｌＮＡｃも存在するゴルジ装置に適切に局在するならば、この受容体部位でＯ－グリコシル化されるようになる。

【０５６９】

しかし組換えタンパク質の場合、最初のＧａｌｃＮＡｃの結合は起こらないかもしれない。発現している細胞に天然なα－Ｎ－アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ酵素は、組換えペプチドが発現している細胞とは異なる共通配列特異性を有するかもしれない。

【０５７０】

所望の組換えペプチドは、グリカン鎖を合成しない大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のような細菌細胞できる発現させることができる。これらの場合、最初のＧａｌＮＡｃ部分をインビトロで付加することが有利である。ＧａｌＮＡｃ部分は、いったん組換えペプチドが可溶性の状態で回収されれば、ペプチドを適切なＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼとＵＤＰ－ＧａｌＮＡｃの存在下で接触させることによりインビトロでペプチドに導入することができる。

【０５７１】

１つの態様では、Ｏ－結合糖を転移されるために効果的な受容体を構成するアミノ酸のさらなる配列が存在し得る。そのようなアミノ酸配列はペプチドのコード配列に対する枠内で融合したＤＮＡ配列によりコードされるか、または化学的手段により導入してもよい。あるいはペプチドはグリカン鎖を欠いているかもしれない。場合によりペプチドはＮ－および／またはＯ－結合グリカン鎖を有することができるが、例えばさらなるグリカン置換を望む時、さらなるグリコシル化部位が必要である。

【０５７２】

例示態様では、アミノ酸配列ＰＴＴＴＫ－ＣＯＯＨ（これはヒトのムチンＭＵＣ－１中の天然なＧａｌＮＡｃ受容体配列である）を融合タグとして加える。次いで融合タンパク質は大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中で発現し、そして精製される。次いでペプチドを組換えヒトＧａｌＮＡｃ－トランスフェラーゼＴ３またはＴ６と、ＵＤＰ－ＧａｌＮＡｃの存在下で接触させてＧａｌＮＡｃ残基をペプチドにインビトロで転移させる。

【０５７３】

このペプチド上のグリカン鎖は、次いでＮ－結合またはＯ－結合グリカンに関して本明細書に記載した方法を使用してさらに延長することができる。あるいはＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼ反応は、Ｏ－３、４または６位あるいはＮ－２位でＰＥＧに共有的に置換されるＵＤＰ－ＧａｌＮＡｃの存在下で行うことができる。複合糖質化（Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）は本明細書のいたるところで詳細に記載する。新たなペプチド配列によりペプチドに導入される抗原性は、結合するグリカンのＰＥＧ化により都合よく遮蔽することができる。受容体部位融合技術はＰＥＧ部分を導入するだけでなく、限定するわけではないがトキシン、抗－感染剤、細胞傷害剤、放射性核種のキレーターおよび組織ターゲッティングのような他の官能性を有するグリカンを含む他のグリカンおよび非－グリカン部分を導入するためにも使用することができる。

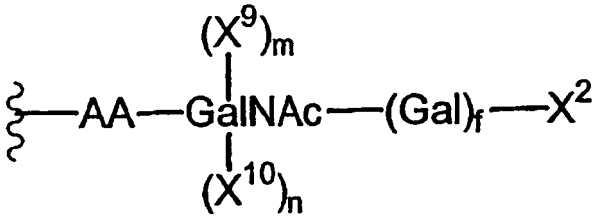
【０５７４】

例示態様

Ｏ－結合グリコシル化の改造は、式２を参照にして最もよく具体的に説明される：

【０５７５】

【化４２】



【０５７６】

式２は、好ましくはペプチド骨格上のセリンまたはトレオニン残基に共有結合しているＧａｌＮＡｃを含んでなるグリカン構造を記載する。この構造はＯ－結合グリカンの最も普通の形態を具体的に説明するために使用するが、本発明はこれらＯ－結合グリカンに単に限定されると解釈されるべきではない。Ｏ－結合グリカンの他の形態は図１１に具体的に説明する。本発明に有用な好適な発現系は、ＧａｌＮＡｃ残基を含んでなるＯ－結合グリカンを有する外因性ペプチドを発現し、そして分泌する。本発明の改造方法を使用して、これらペプチド上のグリカン構造は所望する任意のグリカン構造を生成するために都合よく改造することができる。当業者はいったん本開示から着手すれば、当該技術分野で利用可能なものと同じ原理、酵素および反応条件を使用してＯ－結合グリカンを改造できると考えるだろう。例示的な反応条件は、実施例中に見いだされる。

【０５７７】

好適な態様では、グリカン構造は式２に記載する構造が特異的な部分を有するように改造される。グリカンの構造は中でもペプチドの生物学的活性を強化し、ペプチドに新しい生物活性を与え、ペプチドの生物学的活性を除去または改変させ、または天然のペプチドのグリコシル化パターンにより良く近づけるために選択することができる。

【０５７８】

第１の好適な態様では、ペプチドＯ－結合グリカンを改造して天然のヒトのタンパク質のグリコシル化パターンにより良く近づける。この態様では、式２に記載するグリカン構造が以下の部分：

X^2は｜－ＳＡ；または｜－ＳＡ－ＳＡであり；

ｆおよびｎ＝０または１；

X^{10}はＳＡであり；

ｍ＝０

を有するように改造される。

【０５７９】

この態様は異質な細胞発現系で発現するヒトペプチドに特に有利である。Ｏ－結合グリカン構造をこの立体配置を有するように改造することにより、ペプチドはヒト患者中での免疫原性が低くなり、かつ／またはより安定となる。

【０５８０】

別の好適な態様では、ペプチドＯ－結合グリカンはシアリル化ルイスＸ抗原を表すように改造される。この態様では、式２に記載するグリカン構造が以下の部分：

X^2は｜－ＳＡであり；　X^{10}はＦｕｃまたは｜－ＧａｌＮＡｃ（Ｆｕｃ）－Ｇａｌ－ＳＡであり；

ｆおよびｎ＝１；

ｍ＝０

を有するように改造される。

【０５８１】

この態様は改造されるペプチドがセレクチン分子を標的とし、そして細胞がそれを発現している時に最も効果的である時、特に有利である。

【０５８２】

さらに別の好適な態様では、ペプチドＯ－結合グリカンは結合部分を含むように改造さ

れる。この結合部分は、とりわけＰＥＧ分子、他のペプチド、薬剤のような低分子でよい。この態様では、式２に記載するグリカン構造が下の部分：

X^2は｜－ＳＡ－Ｒであり；

ｆ＝１；

ｎおよびｍ＝０

ここでＲは結合基である

を有するように改造される。

【０５８３】

この態様はペプチドを、患者の血流からペプチドの排除を遅らせるＰＥＧ分子に、両ペプチドを特異的組織または細胞を標的とさせるペプチドに、あるいは相補的な治療的使用の別のペプチドに結合させるために有用である。

【０５８４】

当業者には本発明が上記の好適なグリカン分子に限定されないことは明らかであろう。好適態様は本発明の改造方法を使用して作成することができる多くの有用なグリカン分子のわずか２～３である。当業者はいったん本発明から着手すれば他の有用なグリカンをどのように設計するかを知るだろう。

【０５８５】

第１の例示態様では、ペプチドは当該技術分野で周知の方法に従いＣＨＯ（チャイニーズハムスター細胞系）で発現させる。Ｏ－結合グリカンの共通部位を持つペプチドがＣＨＯ細胞から発現され、そして分泌される時、Ｏ－結合グリカンの大部分が式２の用語において、

X^2＝｜－ＳＡ；

ｆ＝１；

ｍおよびｎ＝０

である構造を有することが多い。

【０５８６】

したがってＣＨＯ細胞中のほとんどのグリカンは、ヒト患者での使用に許容され得るために改造を必要としない。別の例示態様では、ＣＨＯ細胞から発現され、そして分泌されるペプチドのＯ－結合グリカンは、グリカンをＧａｌＮＡｃ受容体部分およびフコース供与体部分に特異的であるグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－フコースの存在下で接触させることにより、シアリル化ルイスＸ構造を含むように改造される。この工程は図１０および実施例３でＮ－結合グリカンに関して具体的に説明している。

【０５８７】

他の例示態様では、ペプチドを当該技術分野で周知の方法に従いｓｆ９のような昆虫細胞中で発現させる。Ｏ－結合グリカンの共通部位を持つペプチドがほとんどのｓｆ９細胞から発現され、そして分泌される時、Ｏ－結合グリカンの大部分は式２の用語において、

X^2＝Ｈ；

ｆ＝０または１；

ｎおよびｍ＝０

である構造を有する。

【０５８８】

例えばＭａｒｃｈａｌ　ｅｔ　ａｌ．，（２００１，Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．３８２：１５１－１５９）を参照にされたい。１つの例示態様では、昆虫細胞で発現されるペプチド上のＯ－結合グリカンは、グリカンをＧａｌＮＡｃ受容体分子およびガラクトース供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－Ｇａｌの存在下で接触させ；そして次にグリカンをＧａｌ受容体分子およびＳＡ供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼとヌクレオチド－ＳＡの存在下で接触させることにより、ヒト化グリカンに改造される。別の例示態様では、Ｏ－結合グリカンをさらにヒト化形態から、グリカンをさらにＧａｌＮＡｃ受容体分子およびフコース供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－フコースの存在下で接触させることにより、シア

リル化ルイスＸ形態に改造する。

【０５８９】

さらに他の例示態様では、ペプチドは当該技術分野で周知の方法に従い真菌細胞、特にＳ．セルビシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）細胞で発現させる。Ｏ－結合グリカンの共通部位を持つペプチドがＳ．セルビシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）細胞から発現され、そして分泌される時、ほとんどのＯ－結合グリカンは構造：

｜－ＡＡ－Ｍａｎ－Man_{1-2}

を有する。Ｇｅｍｍｉｌｌ ａｎｄ Ｔｒｉｍｂｌｅ（１９９９，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ １４２６：２２７－２３７）を参照にされたい。このようなＯ－結合グリカンをヒトでの使用に改造するために、グリカンをアミノ酸レベルで開裂し、そしてここから再構築することが好ましい。

【０５９０】

１つの例示態様では、グリカンは真菌細胞で発現されるペプチド上のＯ－結合グリカンであり、そしてグリカンをアミノ酸－ＧａｌＮＡｃ結合に特異的なエンドグリコシダーゼと接触させ；そして次いでグリカンをＯ－結合共通部位およびＧａｌＮＡｃ供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－ＧａｌＮＡｃの存在下で接触させ；グリカンをＧａｌＮＡｃ受容体分子およびガラクトース供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－Ｇａｌの存在下で接触させ；そして次にグリカンをＧａｌ受容体分子およびＳＡ供与体分子に特異的なグリコシルトランスフェラーゼと、ヌクレオチド－ＳＡの存在下で接触させることにより、ヒト化グリカンに改造する。

【０５９１】

あるいは別の例では、グリカンは真菌細胞で発現されるペプチド上のＯ－結合グリカンであり、そしてグリカンをタンパク質Ｏ－マンノースβ－１，２－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（ＰＯＭＧｎＴＩ）と、ＧｌｃＮＡｃ－ヌクレオチドの存在下で接触させ；次いでグリカンをヌクレオチド－Ｇａｌの存在下でガラクトシルトランスフェラーゼと接触させ；そして次にグリカンをヌクレオチド－ＳＡの存在下でシアリルトランスフェラーゼと接触させることによりヒト化グリカンに改造する。

【０５９２】

別の例示態様では、ペプチドは当該技術分野で周知の方法に従い細菌細胞、特に大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞で発現させる。Ｏ－結合グリカンの共通部位を持つペプチドが（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞で発現する時、Ｏ－結合共通部位はグリコシル化されない。この場合、所望するグリカン分子は上記のＳ．セルビシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）について記載した様式に準じて、ペプチド骨格から構築しなければならない。さらにＯ－結合グリカンを有するペプチドが新生ペプチドをゴルジ装置に向けるための正しいリーダー配列無しで真核細胞で発現する時、成熟ペプチドはグリコシル化されないらしい。この場合もＯ－結合グリコシル構造は、グリカンをペプチドＯ－結合共通部位から直接構築することによりペプチドに加えることができる。さらにタンパク質が糖部分を用いて化学的に修飾される時、タンパク質は前述のように改造される。

【０５９３】

これらの例は本発明を具体的に説明するものであり、そして本発明を限定するものではないことを意味している。当業者は同じ結果を得るために各例で取られる工程を状況によっては異なる順序で行うことができると考えるだろう。また当業者は異なる工程の組が同じ生成グリカンを生産することもできると理解するだろう。さらに好適な改造されたグリカンはペプチドが発現する発現系に対して全く特異的では無いと理解するだろう。改造されたグリカンは単に具体的説明であり、そして当業者は本明細書に具体的には記載していないグリカンを作成するために、これらの例からどのように原理を取り出し、そしてそれらを異なる発現系で生産されるペプチドに応用するかを知っている。

【０５９４】

Ｃ．複合糖質化（Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）、総論

本発明はグリコシル化または非グリコシル化ペプチドの結合物の調製法を提供する。本発明の結合物はペプチドと水溶性ポリマー、治療部分、診断部分、標的部分等のような多様な種との間で形成される。また提供されるのはリンカーアーム（ｌｉｎｋｅｒ　ａｒｍ）を介して一緒に連結された２以上のペプチドを含む結合物、すなわち多機能性結合物（ｍｕｌｔｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）である。本発明の多機能性結合物は、同じペプチドの２以上のコピー、または異なる構造および／または特性を持つ多様なペプチドの集合を含むことができる。

【０５９５】

本発明の結合物は、修飾された糖のグリコシル化または非グリコシル化ペプチドへの酵素的結合により形成される。修飾された糖はペプチドと糖上の修飾基との間に挿入された時、本明細書でのいわゆる「完全なグリコシル連結基」となる。グリコシルトランスフェラーゼのような酵素の優れた選択性を使用して、本方法は１以上の特異的な位置に所望する基を持つペプチドを提供する。すなわち本発明に従い、修飾された糖はペプチド鎖上の選択された位置に直接結合させられるか（ａｔｔａｃｈｅｄ）、あるいは修飾された糖はペプチドの炭水化物部分につけられる（ａｐｐｅｎｄｅｄ）。修飾された糖がペプチド炭水化物に、およびペプチド骨格のアミノ酸残基に直接、両方で結合したペプチドも本発明の範囲内である。

【０５９６】

既知の化学的および酵素的なペプチドの合成（ｅｌａｂｏｒａｔｉｏｎ）法とは対照的に、本発明の方法はペプチドおよび実質的に均一な誘導化パターンを有する糖ペプチドを集成させることが可能であり；本発明で使用する酵素は、一般にペプチドの特定のアミノ酸残基またはアミノ酸残基の組み合わせに選択的である。この方法はまた修飾されたペプチドおよび糖ペプチドの大規模生産にも現実的である。このように本発明の方法は前以て選択された実質的に単一な誘導化パターンを有するペプチドの大規模調製のための現実的手段を提供する。この方法は限定するわけではないが、細胞培養細胞（例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、菌類細胞、酵母細胞または原核細胞）またはトランスジェニック植物または動物中での生産中に不完全にグリコシル化されたペプチドを含め、治療用ペプチドの修飾にも特によく適している。

【０５９７】

本発明の方法は、例えば排除速度の低下または免疫もしくは細網内皮系（ＲＥＳ）による取り込み率の低下により、上昇した治療的半減期を有するグリコシル化および非グリコシル化ペプチドの結合物も提供する。さらに本発明の方法はペプチド上の抗原決定基を遮蔽するための手段を提供し、これがペプチドに対する宿主免疫応答を下げるか、または排除する。標的剤の選択的結合を使用して、ペプチドを特定の標的剤に特異的な特定の組織または細胞表面レセプターを標的とするためにも使用できる。さらに治療部分を用いて特異的に修飾された種類のペプチドを提供する。

【０５９８】

１．結合物（ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）

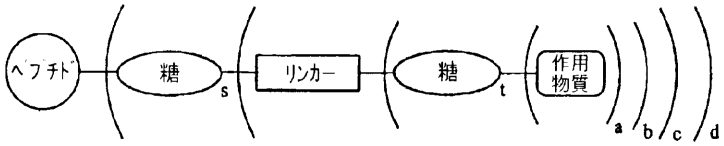
第１の観点では、本発明はペプチドと選択部分との間に結合物を提供する。ペプチドと選択部分との間の連結には、ペプチドと選択部分の間に挿入された完全なグリコシル連結基を含む。本明細書で検討するように、選択部分は、サッカリド単位に結合することができる本質的には任意の種であり、ペプチドに修飾された糖を付ける適切なトランスフェラーゼ酵素により認識される「修飾された糖」を生じる。修飾された糖のサッカリド成分は、ペプチドと選択部分との間に挿入された時、「完全なグリコシル連結基」となる。このグリコシル連結基は、選択部分を用いた修飾後に適切なトランスフェラーゼの基質となる単－またはオリゴ糖から形成される。

【０５９９】

本発明の結合物は典型的には一般構造：

【０６００】

【化４３】



【０６０１】

ここで、記号ａ、ｂ、ｃ、ｄおよびｓは正のゼロではない整数を表し；そしてｔは０または正の整数である、

に相当する。「作用物質（ａｇｅｎｔ）」は治療薬、生物活性剤、検出可能な標識、水溶性部分等である。この「作用物質」はペプチド、例えば酵素、抗体、抗原等であることができる。リンカーは任意の広い配列の上記連結基であることができる。あるいはリンカーは単結合または「ゼロ次リンカー（ｚｅｒｏ　ｏｒｄｅｒ　ｌｉｎｋｅｒ）」でもよい。ペプチドの同一性には限界がない。ペプチドの例を図１に提供する。

【０６０２】

例示態様では、選択部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーは完全なグリコシル連結基を介してペプチドに共有結合する。グリコシル連結基はペプチド上のアミノ酸残基またはグリコシル残基のどちらかに共有結合する。あるいはグリコシル連結基は糖ペプチドの１以上のグリコシル単位に結合する。本発明はグリコシル連結基がアミノ酸残基およびグリコシル残基の両方に結合した結合物も提供する。

【０６０３】

酵素的に付加される完全なグリコシル連結基を介して形成される結合物を提供することに加えて、本発明はそれらの置換パターンが高度に均一な結合物を提供する。本発明の方法を使用して、本発明の結合物群の全域で本質的にすべての修飾された糖部分が、構造的に同一のアミノ酸またはグリコシル残基の複数のコピーに結合しているペプチド結合物を形成することが可能である。すなわち第２の観点では、本発明は完全なグリコシル連結基を介してペプチドに共有結合する水溶性ポリマー部分の群を有するペプチド結合物を提供する。本発明の好適な結合物では、本質的に群の各員がグリコシル連結基を介してペプチドのグリコシル残基に結合し、そしてグリコシル連結基が結合するペプチドの各グリコシル残基は同じ構造を有する。

【０６０４】

また完全なグリコシル連結基を介してペプチド結合物に共有結合した水溶性ポリマー部分の群を有するペプチド結合物も提供する。好適な態様では、本質的に水溶性ポリマー部分群の各員が完全なグリコシル連結基を介してペプチドのアミノ酸残基に結合し、そして完全なグリコシル連結基を結合して有する各アミノ酸残基は同じ構造を有する。

【０６０５】

また本発明は、ペプチドが完全なグリコシル連結基を介して治療部分、診断部分、標的部分、トキシン部分等に結合した上記のものに類似する結合物を提供する。上に引用した各部分は、低分子、天然ポリマー（例えばペプチド）または合成ポリマーであることができる。

【０６０６】

例示態様ではインターロイキン－２（ＩＬ－２）が、ＰＥＧ部分の各末端で完全なグリコシル連結基を含む二官能性リンカーを介してトランスフェリンに結合させられる（スキーム１）。例えばＰＥＧリンカーの１末端をトランスフェリンに結合する完全なシアル酸リンカーで官能化し、そしてもう１端をＩＬ－２に結合する完全なＧａｌＮＡｃリンカーで官能化する。

【０６０７】

別の例示態様ではＥＰＯをトランスフェリンに結合する。別の例示態様ではＥＰＯをグリア由来神経栄養増殖因子（ＧＤＮＦ）に結合する。これらの態様では、各結合は上記の

ようにＰＥＧ部分の各末端に完全なグリコシル連結基を含む二官能性リンカーを介してなされる。トランスフェリンはタンパク質を血液脳関門をわたって移動させる。

【０６０８】

本明細書に添付する図面で説明するように、本発明の結合物は単－または多－価である（例えばアンテナ構造）完全なグリコシル連結基を含むことができ、図１３～２１を参照にされたい。本発明の結合物はセリンまたはトレオニンから始まるＯ－結合グリカンであるグリコシル連結基も含む（図１０）。このように本発明の結合物は、選択部分が単価のグリコシル連結基を介してペプチドに結合している両方の種を含む。また本発明の範囲内に含まれるのは、１より多くの選択部分が多価連結基を介してペプチドに結合している結合物も含む。１以上のタンパク質を一緒に結合して、それらの生物物理的および生物学的特性を利用することができる。

【０６０９】

さらなる態様では、本発明は結合物の成分として標的剤の存在により、特定の組織中に選択的に局在する結合物を提供する。例示態様では、標的剤はタンパク質である。タンパク質の例にはトランスフェリン（脳、血液プール）、ヒト血清（ＨＳ）－糖タンパク質（骨、脳、血液プール）、抗体（脳、抗体－特異的抗原を含む組織、血液プール）、凝固第Ｖ－ＸＩＩ因子（損傷組織、凝血、ガン、血液プール）、血清タンパク質、例えばα－酸性糖タンパク質、フェチュイン、α－胎児タンパク質（脳、血液プール）、β２－糖タンパク質（肝臓、アテローム硬化症斑、脳、血液プール）、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦおよびＥＰＯ（免疫刺激、ガン、血液プール、赤血球過剰生産、神経保護）、およびアルブミン（半減期の上昇）。

【０６１０】

上記で検討した結合物に加えて、本発明はこれらのおよび他の結合物を調製する方法を提供する。すなわちさらなる観点では、本発明は選択部分とペプチドとの間の共有結合物を形成する方法を提供する。したがって本発明は本発明の結合物を身体の特定の組織または領域を標的とさせるための方法を提供する。

【０６１１】

例示態様では、結合物は水溶性ポリマー、治療部分、標的化部分または生体分子と、グリコシル化または非グリコシル化ペプチドとの間に形成される。ポリマー、治療部分または生体分子は、間に挿入され、そしてペプチドおよび修飾基（例えば水溶性ポリマー）の両方を共有結合する完全なグリコシル連結基を介してペプチドに結合させる。この方法はペプチドを、修飾された糖および修飾された糖が基質であるグリコシルトランスフェラーゼを含む混合物と接触させることを含む。反応は修飾された糖とペプチドとの間に共有結合を形成するために十分な条件下で行う。修飾された糖の糖部分は、好ましくはヌクレオチド糖、活性化糖およびヌクレオチドでもなく活性化されてもいない糖から選択される。

【０６１２】

１つの態様では、本発明は２以上のペプチドを連結基を介して連結するための方法を提供する。連結基は任意の有用な構造であり、そして直－鎖および分岐鎖構造から選択することができる。好ましくはペプチドに結合するリンカーの各末端には、修飾された糖（すなわち新生の完全なグリコシル連結基）を含む。

【０６１３】

本発明の方法の例では、２つのペプチドがＰＥＧリンカーを含むリンカー部分を介して一緒に連結される。この構築物は上記の絵で説明する一般構造と同じである。本明細書で記載するように、本発明の構築物は２つの完全なグリコシル連結基（すなわちｓ＋ｔ＝１）を含む。２つのグリコシル基を含むＰＥＧリンカーに焦点をあてているのは明瞭さを目的とするものであり、そして本発明のこの態様でのリンカーアームの使用の同一性に限定すると解釈されるべきではない。

【０６１４】

このようにＰＥＧ部分を第１末端で第１のグリコシル単位を用いて、そして第２末端で第２のグリコシル単位を用いて官能化する。第１および第２のグリコシル単位は好ましく

は異なるトランスフェラーゼの基質であり、第１および第２ペプチドのそれぞれ第１および第２グリコシル単位への直交（ｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ）結合を可能とする。実際には（グリコシル）^{1}－ＰＥＧ－（グリコシル）^{2}リンカーを、第１ペプチドおよび第１グリコシル単位が基質である第１トランスフェラーゼと接触させ、これにより（ペプチド）^{1}－（グリコシル）^{1}－ＰＥＧ－（グリコシル）^{2}を形成する。次いで第１トランスフェラーゼおよび／または未反応ペプチドを場合により反応混合物から除去する。第２ペプチドおよび第２グリコシル単位が基質である第２トランスフェラーゼを、（ペプチド）^{1}－（グリコシル）^{1}－ＰＥＧ－（グリコシル）^{2}結合物に加え、（ペプチド）^{1}－（グリコシル）^{1}－ＰＥＧ－（グリコシル）^{2}－（ペプチド）^{2}を形成する。当業者は上記に概説した方法が２より多くのペプチド間の結合物を、例えば分岐ＰＥＧ、樹状物、ポリ（アミノ酸）、多糖等の使用により形成するためにも応用できると考えるだろう。

【０６１５】

すでに記載したように例示態様では、インターロイキン－２（ＩＬ－２）は、ＰＥＧ部分の各末端で完全なグリコシル連結基を含む二官能性リンカーを介してトランスフェリンに結合される（スキーム１）。ＩＬ－２結合物は結合物のより大きな分子量サイズにより、ＩＬ－２単独よりも上昇したインビボ半減期を有する。さらにＩＬ－２のトランスフェリンへの結合は、結合物が脳を選択的に標的とするために役立つ。例えば、ＰＥＧリンカーの１つの末端をＣＭＰ－シアル酸を用いて官能化し、そしてもう１端をＵＤＰ－ＧａｌＮＡｃを用いて官能化する。リンカーはＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼの存在下でＩＬ－２と合わせられ、リンカーアームのＧａｌＮＡｃの、ＩＬ－２上のセリンおよび／またはトレオニン残基への結合を生じる。

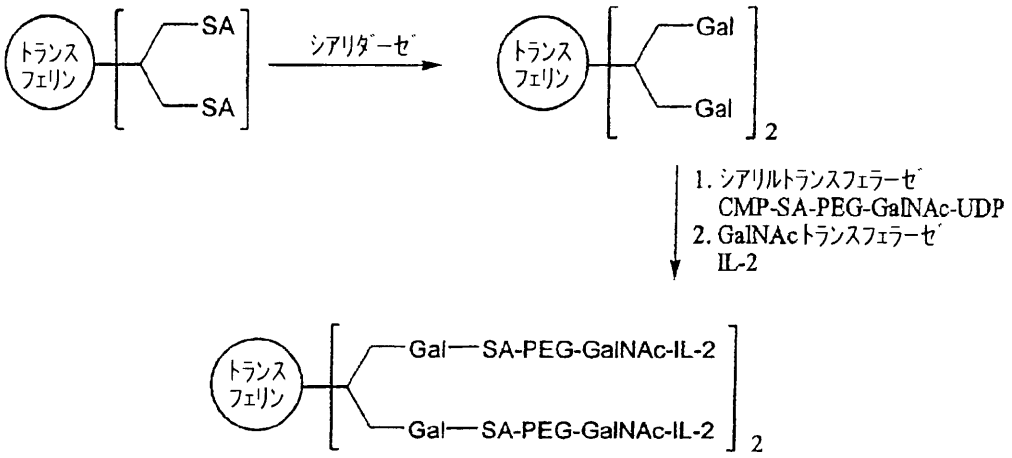
【０６１６】

別の例示態様では、トランスフェリンを遺伝子治療に使用するために核酸に結合する。

【０６１７】

【化４４】

スキーム1

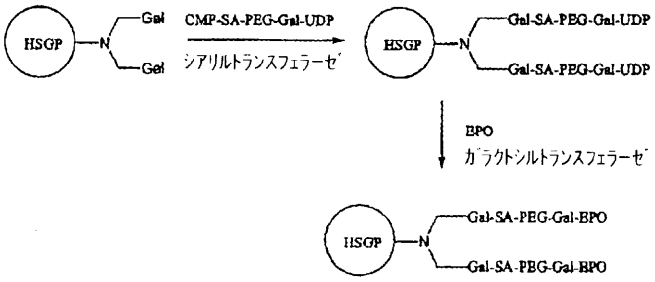


【０６１８】

上記の工程は望みの数のサイクルを通して行うことができ、そして２つのペプチドと１つのリンカーとの間に結合物を形成することに限定されない。さらに当業者はペプチドを含むＰＥＧ（または他の）リンカーの末端で完全なグリコシル連結基を官能化する反応が、同じ反応槽中で同時に起こることができるか、あるいはそれらの反応は段階的様式で行うことができると考えるだろう。反応を段階的様式で行う時、各段階で生成される結合物は任意に１以上の反応成分（例えば酵素、ペプチド）から精製される。

【０６１９】
さらなる例示態様をスキーム２に説明する。スキーム２は選択したタンパク質、例えばＥＰＯが骨を標的とし、そして選択したタンパク質の循環半減期を上昇させる結合物の調製法を示す。
【０６２０】
【化４５】

スキーム2



【０６２１】
１以上のペプチド部分をリンカーに結合するために、ＰＥＧ（または他のリンカー）の反応性誘導体の使用は、本発明の範囲内である。本発明は反応性ＰＥＧ類似体の同一性に限定されない。ポリ（エチレングリコール）の多くの活性化誘導体が市販されており、そして文献で利用可能である。本発明に有用な基質を調製するために用いる適当な活性化ＰＥＧ誘導体を選択し、そして必要ならば合成することは、十分に当業者の能力の範囲内である。Ａｂｕｃｈｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｃｈｅｍ. Ｂｉｏｐｈｙｓ.，７：１７５－１８６（１９８４）；Ａｂｕｃｈｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ. Ｃｈｅｍ.，２５２：３５８２－３５８６（１９７７）；Ｊａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ. Ｂｉｏｃｈｅｍ.，１６５：１１４－１２７（１９８７）；Ｋｏｉｄｅ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ. Ｂｉｏｐｈｙｓ. Ｒｅｓ. Ｃｏｍｍｕｎ. １１１：６５９－６６７（１９８３））、トレシレート（Ｎｉｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ.，１０４：５６－６９（１９８４）；Ｄｅｌｇａｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ. Ａｐｐｌ. Ｂｉｏｃｈｅｍ.，１２：１１９－１２８（１９９０））；Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド誘導化活性エステル（Ｂｕｃｋｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍａｋｒｏｍｏｌ. Ｃｈｅｍ.，１８２：１３７９－１３８４（１９８１）；Ｊｏｐｐｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍａｋｒｏｍｏｌ. Ｃｈｅｍ.，１８０：１３８１－１３８４（１９７９）；Ａｂｕｃｈｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｃｈｅｍ. Ｂｉｏｐｈｙｓ.，７：１７５－１８６（１９８４）；Ｋａｔｒｅｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. Ｕ. Ｓ. Ａ.，８４：１４８７－１４９１（１９８７）；Ｋｉｔａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ.，５１：４３１０－４３１５（１９９１）；Ｂｏｃｃｕ ｅｔ ａｌ．，Ｚ. Ｎａｔｕｒｆｏｒｓｃｈ.，３８Ｃ：９４－９９（１９８３）；カーボネート（Ｚａｌｉｐｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，ポリ（エチレングリコール）化学：生物工学的および生物医学的応用（ＰＯＬＹ（ＥＴＨＹＬＥＮＥ ＧＬＹＣＯＬ）ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ：ＢＩＯＴＥＣＨＮＩＣＡＬ ＡＮＤ ＢＩＯＭＥＤＩＣＡＬ ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ）、Ｈａｒｒｉｓ編集、プレナム出版、ニューヨーク、１９９２、第３４７－３７０頁；Ｚａｌｉｐｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ. Ａｐｐｌ. Ｂｉｏｃｈｅｍ.，１５：１００－１１４（１９９２）；Ｖｅｒｏｎｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ. Ｂｉｏｃｈｅｍ. Ｂｉｏｔｅｃｈ.，１１：１４１－１５２（１９８５））；イミダゾリルホルメート（Ｂｅａｕｃｈａｍｐ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ. Ｂｉｏｃｈｅｍ.，１３１：２５－３３（１９８３）；Ｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，７１：１６４１－１６４７（１９８８））

；４－ジチオピリジン（Ｗｏｇｈｉｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．，４：３１４－３１８（１９９３））；イソシアネート（Ｂｙｕｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＡＳＡＩＯ　Ｊｏｕｒｎａｌ，Ｍ６４９－Ｍ－６５３（１９９２））およびエポキシド（Ｎｏｉｓｈｉｋｉ　ｅｔ　ａｌ．へ発効された米国特許第４，８０６，５９５号明細書（１９８９）を参照にされたい。他の連結基にはアミノ基と活性化ＰＥＧとの間のウレタン結合を含む。Ｖｅｒｏｎｅｓｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１１：１４１－１５２（１９８５）を参照にされたい。

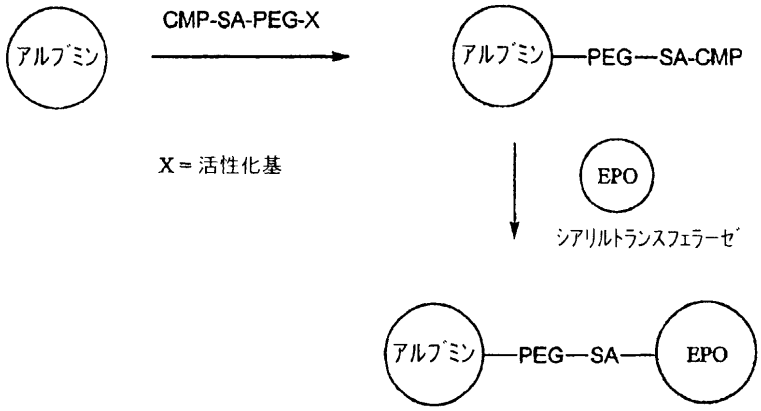
【０６２２】

反応性ＰＥＧ誘導体を利用する別の例示態様では、本発明はペプチドを糸球体によるタンパク質の濾過を遅らせるためにペプチドを、十分なサイズの合成もしくは天然のポリマーに結合させることにより、本質的に血液プールにペプチドを標的させて、選択したペプチドの血液循環半減期を伸ばす方法を提供する（例えばアルブミン）。本発明のこの態様はスキーム３で具体的に説明するが、ここでエリトロポエチン（ＥＰＯ）を化学的および酵素的修飾の組み合わせを使用してＰＥＧリンカーを介してアルブミンに結合する。

【０６２３】

【化４６】

スキーム3



【０６２４】

このようにスキーム３で示すように、アルブミンのアミノ酸残基はＸ－ＰＥＧ－（ＣＭＰ－シアル酸）（ここでＸは反応性基：例えば活性エステル、イソチオシアネート等）であるような反応性ＰＥＧ誘導体を用いて修飾される。ＰＥＧ誘導体およびＥＰＯは合わせられ、そしてＣＭＰ－シアル酸が基質であるトランスフェラーゼと接触させる。別の具体的説明の態様では、リシンのε－アミンをＰＥＧ－リンカーのＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルと反応させてアルブミン結合物を形成する。リンカーのＣＭＰ－シアル酸はＥＰＯ上の適切な残基、例えばＧａｌに酵素的に結合し、これにより結合物が形成する。当業者は上記の方法が説明した反応パートナーに限定されないと考えるだろう。さらにこの方法は、例えば２以上の末端を有する分岐リンカーを利用することにより２より多くのタンパク質部分を含む結合物を形成するために実施できる。

【０６２５】

２．修飾された糖

修飾されたグリコシル供与体種（「修飾された糖」）は好ましくは、修飾された糖ヌクレオチド、活性化された修飾された糖およびヌクレオチドでもなく活性化されてもいない単なるサッカリドである修飾された糖から選択される。任意の所望する炭水化物構造が本発明の方法を使用してペプチドに加えられる。典型的には構造は単糖であるが、本発明は修飾された単糖の糖の使用に限定されず；オリゴ糖および多糖も有用である。

【０６２６】

修飾された基は酵素的手段、化学的手段またはそれらの組み合わせにより糖部分に結合させ、これにより修飾された糖を生成する。糖は修飾部分の結合を可能とする任意の位置で置換されるが、それでもこれは糖を、修飾された糖がペプチドに連結するために使用する酵素の基質として機能することを可能とする。好適な態様ではシアル酸が糖である時、シアル酸はピルビル側の鎖上の９－位または通常はシアル酸中でアセチル化されるアミン部分上の５－位のいずれかで修飾基に置換される。

【０６２７】

本発明の特定の態様では、修飾された糖ヌクレオチドが修飾された糖をペプチドに加えるために利用される。本発明の方法において修飾された状態で使用される糖ヌクレオチドの例には、ヌクレオチドモノ－、ジ－またはトリ－ホスフェートまたはそれらの類似体を含む。好適な態様では修飾された糖ヌクレオチドは、ＵＤＰ－グリコシド、ＣＭＰ－グリコシドまたはＧＤＰ－グリコシドから選択される。さらにより一層好ましくは、修飾された糖ヌクレオチドは、ＵＤＰ－ガラクトース、ＵＤＰ－ガラクトサミン、ＵＤＰ－グルコース、ＵＤＰ－グルコサミン、ＧＤＰ－マンノース、ＧＤＰ－フコース、ＣＭＰ－シアル酸またはＣＭＰ－ＮｅｕＡｃから選択される。糖ヌクレオチドのＮ－アセチルアミン誘導体も本発明の方法で使用される。

【０６２８】

本発明は、修飾された糖、例えば修飾された－ガラクトース、－フコースおよび－シアル酸を使用して修飾された糖ペプチドの合成法も提供する。修飾されたシアル酸を使用する時、シアリルトランスフェラーゼまたはトランス－シアリダーゼ（α２，３－結合シアル酸のみ）をこれらの方法に使用することができる。

【０６２９】

別の態様では、修飾された糖は活性化された糖である。本発明に有用な活性化された修飾された糖は、典型的には活性化された脱離基を含むように合成的に改変させたグリコシドである。本明細書で使用する用語「活性化された脱離基」は、酵素が調節する求核性置換反応で容易に置き換わる部分を称する。多くの活性化された糖が当該技術分野では知られている。例えばＶｏｃａｄｌｏ ｅｔ ａｌ．，炭水化物の化学および生物学（ＣＡＲＢＯＨＹＤＲＡＴＥ ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ ＡＮＤ ＢＩＯＬＯＧＹ）、第２巻、Ｅｒｎｓｔ編集、ウィリー－ＶＣＨファーラーグ；ヴァインハイム、ドイツ；Ｋｏｄａｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．３４：６４１９（１９９３）；Ｌｏｕｇｈｅｅｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７４：３７７１７（１９９９））を参照にされたい。

【０６３０】

活性基（脱離基）の例にはフルオロ、クロロ、ブロモ、トシラートエステル、メシラートエステル、トリフラートエステル等を含む。本発明での使用に好適な活性化された脱離基は、グリコシドの受容体への酵素的転移を有意に立体的に妨害しないものである。したがって活性化されたグリコシド誘導体の好適態様には、グリコシルフルオリドおよびグリコシルメシラートを含み、グリコシルフルオリドが特に好適である。グリコシルフルオリドの中でもα－ガラクトシルフルオリド、α－マンノシルフルオリド、α－グリコシルフルオリド、α－フコシルフルオリド、α－キシロシルフルオリド、α－シアルフルオリド、α－Ｎ－アセチルグリコサミニルフルオリド、α－Ｎ－アセチルガラクトサミニルフルオリド、β－ガラクトシルフルオリド、β－マンノシルフルオリド、β－グリコシルフルオリド、β－フコシルフルオリド、β－キシロシルフルオリド、β－シアリルフルオリド、β－Ｎ－アセチルグルコサミニルフルオリドおよびβ－Ｎ－アセチルガラクトサミニルフルオリドが最も好適である。

【０６３１】

具体的説明として、グリコシルフルオリドは最初に糖をアセチル化し、そして次にそれをＨＦ／ピリジンで処理することにより遊離糖から調製することができる。これは保護された（アセチル化）グリコシルフルオリドの熱力学的に最も安定なアノマーを生じる（すなわちα－グリコシルフルオリド）。より安定性が低いアノマー（すなわちβ－グリコシ

ルフルオリド）を所望するならば、これはアノマー性ブロミドまたはクロライドを生成するために前アセチル化糖をＨＢｒ／ＨＯＡｃまたはＨＣｌを用いて転換することにより調製することができる。この中間体を臭化銀のような臭化物塩と反応させて、グリコシルフルオリドを生成する。アセチル化グリコシルフルオリドは、メタノール中の穏やか（触媒的）な塩基（例えばＮａＯＭｅ／ＭｅＯＨ）との反応により脱保護される。さらに、多くのグリコシルフルオリドが市販されている。

【０６３２】

他の活性化されたグリコシル誘導体は、当該技術分野で既知の常法を使用して調製することができる。例えば、グリコシルメシラートは完全にベンジル化されたヘミアセタール状態の糖をメシルクロライドで処理し、続いてベンジル基を除去するための触媒的水素添加により調製することができる。

【０６３３】

さらなる例示態様では、修飾された糖はアンテナ構造を有するオリゴ糖である。好適な態様では１以上のアンテナの末端が修飾部分を持つ。１つの修飾部分がアンテナ構造を有するオリゴ糖に結合する時、オリゴ糖は修飾基を「増幅」するために有用であり；ペプチドに結合した各オリゴ糖単位は、修飾基の多数のコピーをペプチドに結合する。上記の図に説明する本発明の典型的なはさみ状（ｃｈｅｌａｔｅ）の一般構造は、アンテナ構造を利用して本発明の結合物を調製することから生じる多価種を包含する。多くのアンテナ状サッカリド構造が当該技術分野では知られており、そして本発明は限定することなくそれらを用いて実施することができる。

【０６３４】

修飾基の例を以下で検討する。修飾基は１以上の望ましい特性のために選択することができる。特性の例には限定するわけではないが、強化された薬物動態学、強化された薬力学、改善された生体分布、多価種を提供すること、改善された水溶性、強化または縮小した親油性および組織ターゲッティングを含む。

【０６３５】

Ｄ．ペプチド結合物

ａ）水溶性ポリマー

選択したペプチドの親水性は、アミン－、エステル－、ヒドロキシル－およびポリヒドロキシル－含有分子のような極性分子との結合により強化される。代表例には限定するわけではないがポリリシン、ポリエチレンイミン、ポリ（エチレングリコール）およびポリ（プロピレングリコール）を含む。好適な水溶性ポリマーは本質的に非－蛍光性であるか、あるいはアッセイで蛍光マーカーとして使用するためには不適当であるような最少量の蛍光を発する。天然に存在しない糖であるポリマーを使用してもよい。さらに他の物質（例えばポリ（エチレングリコール）、ポリ（プロピレン　グリコール）、ポリ（アスパルテート）、生体分子、治療部分、診断部分等）の共有結合により修飾されている外は天然に存在する糖の使用も意図している。別の例示態様では、治療用の糖部分をリンカーアームに結合し、そして糖－リンカーアームを続いて本発明の方法を介してペプチドに結合する。

【０６３６】

水溶性ポリマーおよび糖を活性化するための方法および化学、ならびにサッカリドおよびポリマーを種々の種に結合する方法は、技術文献に記載されている。ポリマーを活性化するために共通して使用する方法には、官能基の臭化シアン、過ヨウ素酸塩、グルタルアルデヒド、ビエポキシド、エピクロロヒドリン、ジビニルスルホン、カルボジイミド、スルホニルハライド、トリクロロトリアジン等での活性化を含む（Ｒ．Ｆ．Ｔａｙｌｏｒ，（１９９１）、タンパク質の固定化．基礎および応用（ＰＲＯＴＥＩＮ　ＩＭＭＯＢＩＬＩＳＡＴＩＯＮ．ＦＵＮＤＡＭＥＮＴＡＬＳ　ＡＮＤ　ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ）、マルセルデッカー、ニューヨーク；Ｓ．Ｓ．Ｗｏｎｇ，（１９９２）、タンパク質結合および架橋化の化学（ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ　ＯＦ　ＰＲＯＴＥＩＮ　ＣＯＮＪＵＧＡＴＩＯＮ　ＡＮＤ　ＣＲＯＳＳＬＩＮＫＩＮＧ）、ＣＲＣ出版、ボカラトン；Ｇ．Ｔ．Ｈｅｒｍａ

ｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９３）、固定化アフィニティーリガンド技術（ＩＭＭＯＢＩＬＩＺＥＤ　ＡＦＦＩＮＩＴＹ　ＬＩＧＡＮＤ　ＴＥＣＨＮＩＱＵＥＳ）、アカデミック出版、ニューヨーク；Ｄｕｎｎ，Ｒ．Ｌ．，ｅｔ　ａｌ．，編集、ポリマー性薬剤および薬剤送達系（ＰＯＬＹＭＥＲＩＣ　ＤＲＵＧＳ　ＡＮＤ　ＤＥＬＩＶＥＲＹ　ＳＹＳＴＥＭＳ）、ＡＣＳシンポジウムシリーズ、第４６９巻、アメリカ化学学会、ワシントン、Ｄ．Ｃ．１９９１）を参照にされたい。

【０６３７】

反応性ＰＥＧ分子を調製し、そして反応性分子を使用して結合物を形成する経路は、当該技術分野では既知である。例えば米国特許第５，６７２，６６２号明細書は、直鎖もしくは分岐ポリ（アルキレンオキシド）、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィン性アルコール）およびポリ（アクリロモルホリン）から選択されるポリマー性酸の活性エステルの水溶性および単離可能な結合物を開示し、ここでポリマーは約４４個以上の反復単位を有する。

【０６３８】

米国特許第６，３７６，６０４号明細書は、ポリマーの末端ヒドロキシルをジ（１－ベンゾトリアゾイル）カーボネートと有機溶媒中で反応させることにより、水溶性および非ペプチド性ポリマーの水溶性の１－ベンゾトリアゾリルカルボン酸エステルの調製法を説明する。活性エステルを使用してタンパク質またはペプチドのような生物学的な活性剤との結合物を形成する。

【０６３９】

国際公開第９９／４５９６４号パンフレットは、生物学的な活性剤および活性化された水溶性ポリマー（安定な連結を介してポリマー骨格に連結された少なくとも１つの末端を有するポリマー骨格を含んでなり、ここで少なくとも１つの末端は、分岐部分に連結された近接反応基を有する分岐部分を含んでなり、ここで生物学的な活性剤が少なくとも１つの近接反応基に連結している）を含んでなる結合物を記載する。他の分岐ポリ（エチレングリコール）は、国際公開第９６／２１４６９号パンフレットに記載され、そして米国特許第５，９３２，４６２号明細書は、反応性官能基を含む分岐末端を含む分岐ＰＥＧ分子を用いて形成された結合物を記載する。遊離反応基はタンパク質またはペプチドのような生物学的な活性剤と反応することが可能であり、ポリ（エチレン　グリコール）と生物学的な活性種との間に結合物を形成する。米国特許第５，４４６，０９０号明細書は二官能性ＰＥＧリンカーおよび各ＰＥＧリンカー末端にペプチドを有する結合物の形成におけるその使用を記載する。

【０６４０】

分解性ＰＥＧ結合を含む結合物は国際公開第９９／３４８３３号：および同第９９／１４２５９号パンフレットならびに米国特許第６，３４８，５５８号明細書に記載されている。そのような分解性結合は本発明に応用することができる。

【０６４１】

反応性ＰＥＧ誘導体およびこの誘導体を使用して形成した結合物の両方が当該技術分野で知られているが、本発明まで結合物がＰＥＧ（または他のポリマー）とペプチドまたは糖ペプチドのような別の種との間に完全なグリコシル連結基を介して形成される得ることは認識されなかった。

【０６４２】

多くの水溶性ポリマーが当業者により知られ、そして本発明を実施するするために有用である。水溶性ポリマーという用語は、サッカリド（例えばデキストラン、アミロース、ヒアルロン酸、ポリ（シアル酸）、ヘパラン、ヘパリン等）；ポリ（アミノ酸）；核酸；合成ポリマー（例えばポリ（アクリル酸）、ポリ（エーテル）、例えばポリ（エチレングリコール）；ペプチド、タンパク質等のような種を包含する。本発明は任意の水溶性ポリマーを用いて実施することができ、唯一の限定はポリマーが結合物の残部（ｒｅｍａｉｎｄｅｒ）を結合することができる点を含まなければならないということだけである。

【０６４３】

ポリマーの活性化法は国際公開第９４／１７０３９号パンフレット、米国特許第５，３２４，８４４号明細書、国際公開第９４／１８２４７号、同第９４／０４１９３号パンフレット、米国特許第５，２１９，５６４号、同第５，１２２，６１４号明細書、国際公開第９０／１３５４０号パンフレット、米国特許第５，２８１，６９８号明細書、そしてさらに国際公開第９３／１５１８９号パンフレットにも見いだすことができ、そして活性化ポリマーとペプチドとの間の結合物に関しては例えば、凝固第ＶＩＩＩ因子（国際公開第９４／１５６２５号パンフレット）、ヘモグロビン（国際公開第９４／０９０２７号パンフレット）、酸素運搬分子（米国特許第４，４１２，９８９号明細書）、リボヌクレアーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ（Ｖｅｒｏｎｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１１：１４１－４５（１９８５））に見いだすことができる。

【０６４４】

好適な水溶性ポリマーは、ポリマーのサンプル中の実質的な割合のポリマー分子がおよそ同じ分子量であるものであり；そのようなポリマーは「単分散（ｈｏｍｏｄｉｓｐｅｒｓｅ）」である。

【０６４５】

本発明は、ポリ（エチレングリコール）結合物を参照にすることによりさらに具体的に説明される。ＰＥＧの官能化および結合について、幾つかの総説および小論が入手可能である。例えばＨａｒｒｉｓ，Ｍａｃｒｏｎｏｌ．Ｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓ．Ｃ２５：３２５－３７３（１９８５）；Ｓｃｏｕｔｅｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １３５：３０－６５（１９８７）；Ｗｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｅｎｚｙｍｅ Ｍｉｃｒｏｂ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．１４：８６６－８７４（１９９２）；Ｄｅｌｇａｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ ９：２４９－３０４（１９９２）；Ｚａｌｉｐｓｋｙ，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．６：１５０－１６５（１９９５）；およびＢｈａｄｒａ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｚｉｅ，５７：５－２９（２００２）を参照にされたい。

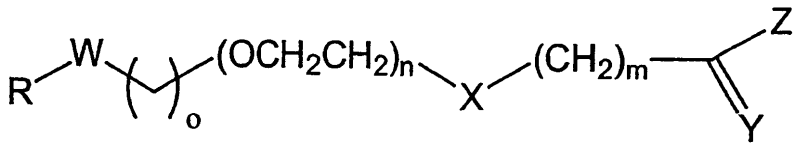
【０６４６】

本発明の使用に適するポリ（エチレン グリコール）分子には限定するわけではないが、以下の式３により記載されるものを含む：

【０６４７】

【化４７】

式3.

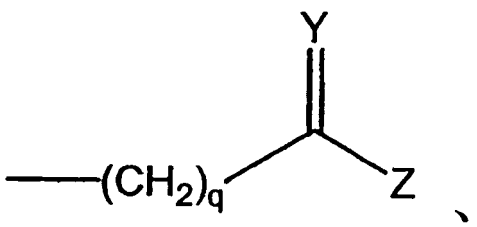


【０６４８】

Ｒ＝Ｈ、アルキル、ベンジル、アリール、アセタール、ＯＨＣ－、$H_2N-CH_2CH_2-$、$HS-CH_2-CH_2-$、

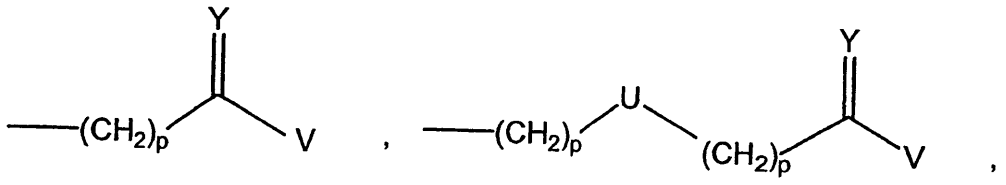
【０６４９】

【化４８】

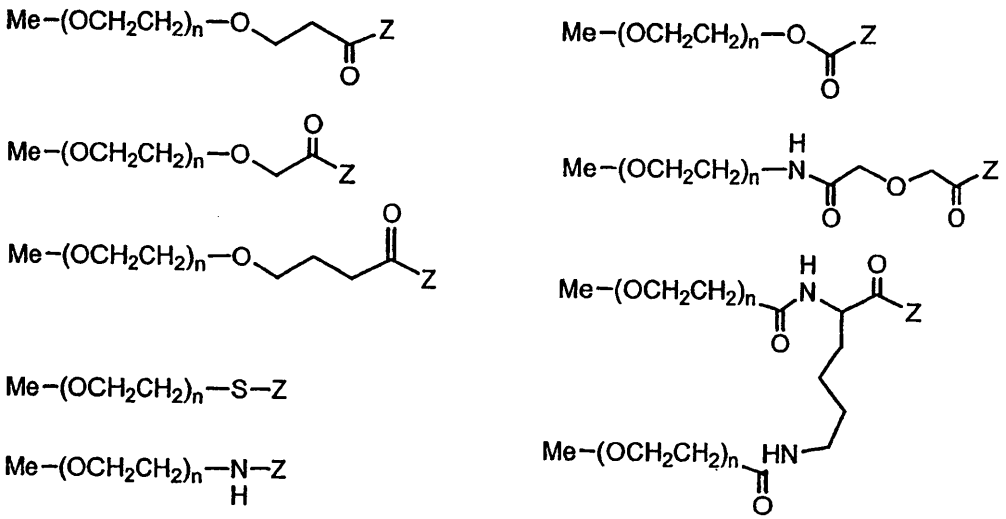


、

【０６５０】
－糖－ヌクレオチド、タンパク質、メチル、エチル：
Ｘ、Ｙ、Ｗ、Ｕ（独立して選択される）＝Ｏ、Ｓ、ＮＨ、Ｎ－Ｒ’；
Ｒ’、Ｒ”’（独立して選択される）＝アルキル、ベンジル、アリール、アルキルアリール、ピリジル、置換アリール、アリールアルキル、アシルアリール；
ｎ＝１～２０００；
ｍ、ｑ、ｐ（独立して選択される）＝０～２０
ｏ＝０～２０
Ｚ＝ＨＯ、NH_2、ハロゲン、Ｓ－Ｒ”’、活性化エステル、
【０６５１】
【化４９】



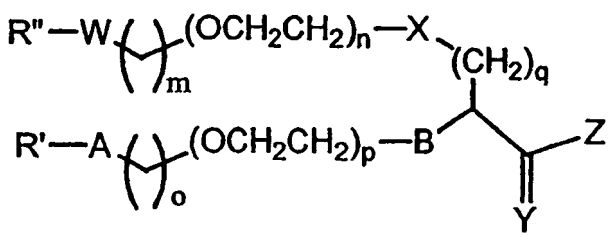
【０６５２】
－糖－ヌクレオチド、タンパク質、イミダゾール、ＨＯＢＴ、テトラゾール、ハライド；そして
Ｖ＝ＨＯ、NH_2、ハロゲン、Ｓ－Ｒ”’、活性化エステル、活性化アミド、－糖－ヌクレオチド、タンパク質。
【０６５３】
好適な態様では、ポリ（エチレングリコール）分子は以下から選択される：
【０６５４】
【化５０】



【０６５５】
本発明の結合物を形成するために有用なポリ（エチレングリコール）は、直鎖もしくは分岐している。本発明の使用に適する分岐ポリ（エチレングリコール）分子には、限定するわけではないが以下の式により記載されるものを含む：
【０６５６】

【化５１】

式4:



【０６５７】

Ｒ’、Ｒ”、Ｒ”’（独立して選択される）＝Ｈ、アルキル、ベンジル、アリール、アセタール、ＯＨＣ－、$H_2N-CH_2CH_2-$、$HS-CH_2-CH_2-$、$-(CH_2)_qCY-Z$、－糖－ヌクレオチド、タンパク質、メチル、エチル、ヘテロアリール、アシルアルキル、アシルアリール、アシルアルキルアリール：

Ｘ、Ｙ、Ｗ、Ａ、Ｂ（独立して選択される）＝Ｏ、Ｓ、ＮＨ、$N-R'(CH_2)_1$；

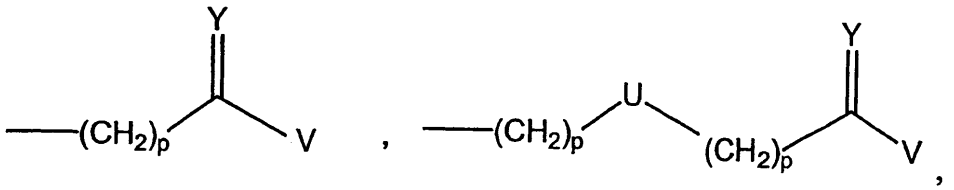
ｎ、ｐ（独立して選択される）＝１～２０００；

ｍ、ｑ、ｏ（独立して選択される）＝０～２０

Ｚ＝ＨＯ、NH_2、ハロゲン、Ｓ－Ｒ”’、活性化エステル、

【０６５８】

【化５２】



【０６５９】

－糖－ヌクレオチド、タンパク質；

Ｖ＝ＨＯ、NH_2、ハロゲン、Ｓ－Ｒ”’、活性化エステル、活性化アミド、－糖－ヌクレオチド、タンパク質。

【０６６０】

治療用ペプチドのインビボ半減期、曲線下面積および／または滞留時間も、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）およびポリプロピレングリコール（ＰＰＧ）のような水溶性ポリマーを用いて強化することができる。例えばＰＰＧを用いたタンパク質の化学的修飾（ＰＥＧ化：ＰＥＧｙｌａｔｉｏｎ）はそれらの分子量サイズを上げ、そしてそれらの表面－および官能基－接近性（ａｃｃｅｓｓｉｂｉｌｉｔｙ）を下げるが、それぞれがタンパク質に結合したＰＰＧのサイズに依存する。これは血漿半減期およびタンパク質溶解的－安定性に改善をもたらし、そして免疫原性および肝臓の取り込みを下げる（Ｃｈａｆｆｅｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８９：１６４３－１６５１（１９９２）；Ｐｙａｔａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．Ｃｈｅｍ．Ｐａｔｈｏｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２９：１１３－１２７（１９８０））。インターロイキン－２のＰＥＧ化は、インビボで抗腫瘍効力を上昇させることが報告され（Ｋａｔｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８４：１４８７－１４９１（１９８７））、そしてモノクローナル抗体Ａ７に由来するＦ（ａｂ’）２のＰＥＧ化は、その腫瘍への局在化を向上させた（Ｋｉｔａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２８：１３８７－１３９４（１９９０））。

【０６６１】

１つの好適な態様では、本発明の方法により水溶性ポリマーを用いて誘導化されたペプチドのインビボ半減期は、非－誘導化ペプチドのインビボ半減期に比べて上昇する。別の好適な態様では、本発明の方法を使用して水溶性ポリマーを用いて誘導化されたペプチド

の曲線下の面積は、非－誘導化ペプチドの曲線下面積に比べて上昇する。別の好適な態様では、本発明の方法を使用して水溶性ポリマーを用いて誘導化されたペプチドの滞留時間は、非－誘導化ペプチドの滞留時間に比べて上昇する。インビボ半減期、曲線下面積および滞留時間を決定する技法は、当該技術分野では周知である。そのような技法の説明は、Ｊ．Ｇ．Ｗａｇｎｅｒ、１９９３、製薬科学者のための薬物動態学（Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｓｔ）、テクノミック出版社（Ｔｅｃｈｎｏｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ Ｉｎｃ．）、ランカスター、ペンシルベニア州）に見出すことができる。

【０６６２】

ペプチドのインビボ半減期の上昇は、この量における上昇の割合の範囲で最も良く表される。上昇の割合の範囲の下限は約４０％、約６０％、約８０、約１００％、約１５０％または約２００％である。この範囲の上限は約６０％、約８０％、約１００％、約１５０％または約２５０％以上である。

【０６６３】

例示態様では、本発明はＰＥＧ化された濾胞刺激ホルモンを提供する（実施例９および１０）。さらなる例示態様では、本発明はＰＥＧ化トランスフェリンを提供する（実施例１３）。

【０６６４】

本発明で使用する他の水溶性ポリマーの例には、限定するわけではないが直鎖もしくは分枝ポリ（アルキレンオキシド）、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィン性アルコール）およびポリ（アクリロモルホリン）、デキストラン、澱粉、ポリ（アミノ酸）等を含む。

【０６６５】

ｂ）水－不溶性ポリマー

本発明の結合物は１以上の水－不溶性ポリマーを含んでもよい。本発明のこの態様は、治療用ペプチドを制御された様式で送達する賦形剤としての結合物の使用により具体的に説明される。ポリマー性の薬剤送達系は当該技術分野では既知である。例えばＤｕｎｎ ｅｔ ａｌ．、ポリマー性薬剤および薬剤送達系（ＰＯＬＹＭＥＲＩＣ ＤＲＵＧ ＡＮＤ ＤＲＵＧ ＤＥＬＩＶＥＲＹ ＳＹＳＴＥＭＳ）、ＡＣＳシンポジウムシリーズ、第４６９巻、アメリカ化学学会、ワシントン、Ｄ．Ｃ．１９９１を参照にされたい。当業者は実質的に任意の既知の薬剤送達系を本発明の結合物に応用できると考えるだろう。

【０６６６】

代表的な水－不溶性ポリマーには限定するわけではないが、ポリホスファジン、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアクリルアミド、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハライド、ポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシル　アクリレート）ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、ポリ（エチレンテレフタレート）、ポリ（ビニルアセテート）、ポリビニルクロライド、ポリスチレン、ポリビニルピロリドン、プルロニックおよびポリビニルフェノールおよびそれらのコポリマーを含む。

【０６６７】

本発明の結合物で使用する合成的に修飾された天然ポリマーには、限定するわけではないがアルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステルおよびニトロセルロースを含む。広い種類の合成的に修飾された天然ポリマーの特に好適な員には、限定するわけではないがメチルセルロース、エチルセルロース、

ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシメチルセルロース、セルローストリアセテート、セルロース硫酸ナトリウム塩およびアクリル酸およびメタクリル酸エステルおよびアルギン酸のポリマーを含む。

【０６６８】

本明細書で検討するこれらのおよび他のポリマーは、シグマケミカル社（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．）（セントルイス、モンタナ州）、ポリサインエンス（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ）、ウァレントン、ペンシルベニア州）、アルドリッチ（Ａｌｄｒｉｃｈ）（ミルウォーキー、ウィスコンシン州）、フルカ（ロンコンコーマ、ニューヨーク州）およびバイオラッド（ＢｉｏＲａｄ）（リッチモンド、カリフォルニア州）のような市販の供給源から容易に得ることができ、あるいはこれらの供給元から得たモノマーから標準技術を使用して合成することができる。

【０６６９】

本発明の結合物に使用する代表的な生分解性ポリマーには、限定するわけではないがポリラクチド、ポリグリコリドおよびそれらのコポリマー、ポリ（エチレンテレフタレート）、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド－コ－カプロラクトン）、ポリ（ラクチド－コ－グリコリド）、ポリ無水物、ポリオルトエステル、それらのブレンドおよびコポリマーを含む。特別な使用は、コラーゲン、プルロニック等を含むもののようなゲルを形成する組成物である。

【０６７０】

本発明におけるポリマーの使用には、それらの構造の少なくとも一部の中に生物再吸収性（ｂｉｏｒｅｓｏｒｂａｂｌｅ）分子を有する水不溶性材料を含む「ハイブリッド」ポリマーを含む。そのようなポリマーの例は、ポリマー鎖あたり生物再吸収性領域、親水性領域および複数の架橋結合可能な官能基を有する水－不溶性コポリマーを含むものである。

【０６７１】

本発明の目的のために、「水－不溶性材料」には水または水を含有する環境中で実質的に不溶性である材料を含む。すなわちコポリマーの特定領域またはセグメントは親水性または水溶性でもよく、全体としてポリマー分子は任意の実質的な限界まで水に溶解しない。

【０６７２】

本発明の目的のために、用語「生物再吸収性分子」には代謝または分解され、そして再吸収および／または身体による正常な排出経路を介して排除され得る領域を含む。そのような代謝産物または分解産物は、好ましくは身体に対して実質的に非毒性である。

【０６７３】

生物再吸収性領域は、コポリマー組成物を全体として水溶性にしない限り、疎水性または親水性のいずれかでよい。すなわち生物再吸収性領域はポリマーが全体として水－不溶性を保持することの優先性に基づき選択される。したがって関連する特性、すなわち含まれる官能基の種類、および生物再吸収性領域の相対的割合、および親水性領域は、有用な生物再吸収性組成物が水－不溶性を保持することを確実にするように選択される。

【０６７４】

再吸収性ポリマーの例には、例えばポリ（α－ヒドロキシ－カルボン酸）／ポリ（オキシアルキレン）の合成的に生成される再吸収性ブロックコポリマーを含む（Ｃｏｈｎ ｅｔ ａｌ．、米国特許第４，８２６，９４５号明細書を参照にされたい）。これらのコポリマーは架橋結合されず、そして水溶性であるので身体は分解したブロックコポリマー組成物を排出することができる。Ｙｏｕｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．２１：１３０１－１３１６（１９８７）；およびＣｏｈｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．２２：９９３－１００９（１９８８）を参照にされたい。

【０６７５】
現在好適な生物再吸収性ポリマーには、ポリ（エステル）、ポリ（ヒドロキシ酸）、ポリ（ラクトン）、ポリ（アミド）、ポリ（エステル－アミド）、ポリ（アミノ酸）、ポリ（無水物）、ポリ（オルトエステル）、ポリ（カーボネート）、ポリ（ホスファジン）、ポリ（ホスホエステル）、ポリ（チオエステル）、多糖およびそれらの混合物から選択される１以上の成分を含む。より好ましくはさらに生物再吸収性ポリマーにはポリ（ヒドロキシ）酸成分を含む。ポリ（ヒドロキシ）酸の中で、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカルプロン酸、ポリ酪酸、ポリ吉草酸およびそれらのコポリマーおよび混合物が好ましい。

【０６７６】
インビボで吸収される（「生物に吸収される」）フラグメントを形成することに加えて、本発明の方法での使用に好適なポリマー性コーティングも、排出可能かつ／または代謝可能なフラグメントを生成することができる。

【０６７７】
高次コポリマーも本発明に使用することができる。例えば１９８４年、３月２０日に発効されたＣａｓｅｙ　ｅｔ　ａｌ．、米国特許第４，４３８，２５３号明細書は、ポリ（グリコール酸）およびヒドロキシル－末端化ポリ（アルキレングリコール）のエステル交換反応から生産されるトリ－ブロックコポリマーを開示する。そのような組成物は再吸収性モノフィラメント縫合糸として使用するために開示されている。そのような組成物の柔軟性は、テトラ－ｐ－トリルオルトカーボネートのような芳香族オルトカーボネートをコポリマー構造に包含させることにより制御される。

【０６７８】
乳酸および／またはグリコール酸に基づく他のコーティングも利用することができる。例えば１９９３年４月１３日に発効されたＳｐｉｎｕ、米国特許第５，２０２，４１３号明細書は、ラクチドおよび／またはグリコリドのオリゴジオールまたはジアミン残基への開環重合、続いてジイソシアネート、ジアシルクロライドまたはジクロロシランのような二官能性化合物を用いた鎖延長により生産されたポリラクチドおよび／またはポリグリコリドを順次に配置した（ｏｒｄｅｒｅｄ）ブロックを有する生分解性マルチ－ブロックコポリマーを開示する。

【０６７９】
本発明に有用なコーティングの生物再吸収性領域は、加水分解的かつ／または酵素的に開裂できるように設計することができる。本発明の目的のために、「加水分解的に開裂可能な」とは、水中または水を含む環境下で加水分解に対するコポリマー、特に生物再吸収性領域の感受性を指す。同様に本明細書で使用する「酵素的に開裂可能な」とは、内因性または外因性酵素による開裂に対するコポリマー、特に生物再吸収性領域の感受性を指す。

【０６８０】
身体内に置かれた時、親水性領域は排出可能かつ／または代謝可能なフラグメントに処理され得る。すなわち親水性領域には例えばポリエーテル、ポリアルキレンオキシド、ポリオール、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（アルキル　オキサゾリン）、多糖、炭水化物、ペプチド、タンパク質およびそれらのコポリマーおよび混合物を含むことができる。さらに親水性領域は例えばポリ（アルキレン）オキシドであることもできる。そのようなポリ（アルキレン）オキシドには、例えばポリ（エチレン）オキシド、ポリ（プロピレン）オキシドおよびそれらの混合物およびコポリマーを含むことができる。

【０６８１】
ヒドロゲルの成分であるポリマーも本発明に有用である。ヒドロゲルは比較的大量の水を吸収することができるポリマー性材料である。ヒドロゲル形成化合物の例には限定するわけではないが、ポリアクリル酸、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、カラゲーナンおよび他の多糖、ヒドロキ

シエチレンメタクリル酸（ＨＥＭＡ）ならびにそれらの誘導体等を含む。安定で、生分解性の、そして生物再吸収性であるヒドロゲルを生成することができる。さらにヒドロゲル組成物は１以上のこれらの特性を現すサブユニットを含むことができる。

【０６８２】

完全性が架橋結合を介して制御され得る生物適合性（ｂｉｏ－ｃｏｍｐａｔｉｂｌｅ）ヒドロゲル組成物が知られており、そして現在、本発明の方法で使用するために好適である。例えば１９９５年４月２５日に発効されたＨｕｂｂｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．、米国特許第５，４１０，０１６号明細書および１９９６年６月２５日に発効された米国特許第５，５２９，９１４号明細書は、２つの加水分解的に不安定な延長物の間に挟まれた水溶性の中央ブロックセグメントを有する架橋結合したブロックコポリマーである水溶性の系を開示する。そのようなコポリマーは光重合性アクリレート官能基を用いてさらにエンド－キャップ化されている。架橋結合する時、これらの系はヒドロゲルになる。そのようなコポリマーの水溶性の中央ブロックには、ポリ（エチレングリコール）を含むことができ；一方加水分解的に不安定な延長物はポリグリコール酸またはポリ乳酸のようなポリ（α－ヒドロキシ酸）であることができる。Ｓａｗｈｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ　２６：５８１－５８７（１９９３）を参照にされたい。

【０６８３】

別の好適な態様では、ゲルは熱可逆性ゲルである。プルロニック、コラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸、多糖、ポリウレタンヒドロゲル、ポリウレタン－尿素ヒドロゲルおよびそれらの組み合わせのような成分を含む熱可逆性ゲルが現在好適である。

【０６８４】

さらに別の例示態様では、本発明の結合物はリポソームの成分を含む。リポソームは例えば１９８５年、６月１１日に発効されたＥｐｐｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．、米国特許第４，５２２，８１１号明細書に記載されているように、当該技術分野で既知の方法に従い調製することができる。例えばリポソーム配合物は適当な脂質（１つまたは複数）（ステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ステアロイル　ホスファチジルコリン、アラカドイルホスファチジルコリンおよびコレステロールのような）を無機溶媒に溶解し、これを次いで蒸発させ、容器の表面上の乾燥脂質の薄いフィルムを残しておくことにより調製することができる。次いで活性化合物またはその製薬学的に許容され得る塩の水溶液を容器に注ぐ。次いで容器を手で旋回して、容器の側面から脂質材料を解放し（ｆｒｅｅ）、そして脂質凝集物を分配し、これによりリポソーム懸濁液を形成する。

【０６８５】

上記に引用した微粒子および微粒子の調製法は例として提供され、そしてそれらは本発明で使用する微粒子の範囲を定めることを意図しない。当業者は異なる方法により作成される多くの微粒子を本発明に使用できると考えるだろう。

ｃ）生体分子

別の好適な態様では、修飾された糖は生体分子を持つ。さらに好適な態様では、生体分子は機能的タンパク質、酵素、抗原、抗体、核酸（例えばシングルヌクレオチドまたはヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドおよび１－およびより多い鎖の核酸）、レクチン、レセプターまたはそれらの組み合わせである。

【０６８６】

幾つかの好適な生体分子は本質的に非－蛍光性であり、またはアッセイで蛍光マーカーとして使用するには不適切な最少量の蛍光を発する。他の生体分子は蛍光でもよい。別の物体（例えばＰＥＧ、生体分子、治療部分、診断部分等）の共有結合により修飾されている外は天然に存在する糖の使用が適当である。例示態様では、生体分子である糖部分をリンカーアームに結合し、そして糖－リンカーアームカセットを続いて本発明の方法を介してペプチドに結合する。

【０６８７】

本発明の実施に有用な生体分子は、任意の供給源に由来することができる。生体分子は天然な供給源から単離することができ、またはそれらは合成法により生成することができ

る。ペプチドは天然なペプチドまたは突然変異したペプチドであることができる。突然変異は化学的な突然変異誘発法、部位－特異的突然変異誘発法または当業者に既知の突然変異を導入する他の手段により行うことができる。本発明の実施で有用なペプチドには例えば、酵素、抗原、抗体およびレセプターを含む。抗体はポリクローナルまたはモノクローナルでよく；完全またはフラグメントのいずれかであることができる。ペプチドは任意に方向付けされた進化（ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ）のプログラムの産物である。

【０６８８】

天然に由来する、および合成ペプチドの両方および核酸も本発明と共に使用される；これらの分子は糖残基成分または架橋結合剤に利用可能な反応基により結合することができる。例えばペプチドは反応性アミン、カルボキシル、スルフヒドリルまたはヒドロキシル基を介して結合することができる。反応基はペプチド末端またはペプチド鎖に対して内部に存在することができる。核酸は塩基（例えばエキソ環式アミン）上の反応基または糖部分の利用可能なヒドロキシル基（例えば３’－または５’－ヒドロキシル）を介して結合することができる。ペプチドおよび核酸鎖はさらに１以上の部位で誘導化されて、適切な反応基を鎖に付けることが可能となる。例えばＣｈｒｉｓｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２４：３０３１－３０３９（１９９６）を参照にされたい。

【０６８９】

さらに好適な態様では、生体分子を選択して本発明の方法により修飾したペプチドを特異的組織に向け、これによりその組織に送達される非誘導化ペプチドの量に比べてペプチドのその組織への送達を強化する。さらなに好適な態様では、選択した時間内に特異的な組織へ送達される誘導化ペプチドの量は、誘導化により少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約４０％、そしてより好ましくは少なくともさらに約１００％まで強化する。現在、標的化に応用するために好適な生体分子には抗体、ホルモンおよび細胞表面レセプターのリガンドを含む。

【０６９０】

現在好適な態様では、修飾基はタンパク質である。例示態様では、タンパク質はインターフェロンである。ヒトではインターフェロンは、ウイルスまたは二本鎖ＲＮＡで誘導した後にヒトの１次繊維芽細胞により分泌される抗ウイルス糖タンパク質である。インターフェロンは治療薬として、例えば抗ウイルス剤および多発性硬化症の処置に興味深い。インターフェロン－βを考察した参考文献については、例えばＹｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌ．，６４（１）：９１－１００（１９９６）；Ｓｃｈｍｉｄｔ，Ｊ．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｒｅｓ．，６５（１）：５９－６７（２００１）；Ｗｅｎｄｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｆｏｌｉａ　Ｎｅｕｒｏｐａｔｈｏｌ．，３９（２）：９１－９３（２００１）；Ｍａｒｔｉｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｓｅｍｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ．，１８（１）：１－２４（１９９６）；Ｔａｋａｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．，２９４（２）：７４６－７５２（２００）；Ｓｂｕｒｌａｔｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．，１４：１８９－１９２（１９９８）；Ｄｏｄｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ　ｅｔ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ　Ａｃｔａ，７８７：１８３－１８７（１９８４）；Ｅｄｅｌｂａｕｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ　Ｒｅｓ．，１２：４４９－４５３（１９９２）；Ｃｏｎｒａｄｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６２（３０）：１４６００－１４６０５（１９８７）；Ｃｉｖａｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１７３：３１１－３１６（１９８８）；Ｄｅｍｏｌｄｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，３２：１７９－１８９（１９９４）；Ｓｅｄｍａｋ，ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ　Ｒｅｓ．，９（Ｓｕｐｐｌ　１）：Ｓ６１－Ｓ６５（１９８９）；Ｋａｇａｗａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６３（３３）：１７５０８－１７５１５（１９８８）；Ｈｅｒｓｈｅｎｓｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．４，８９４，３３０；Ｊａｙａｒａｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．

Interferon Res.，3（2）：177－180（1983）；Menge，et al.，Develop. Biol. Standard.，66：391－401（1987）；Vonk，et al.，J. Interferon Res.，3（2）：169－175（1983）；and Adolf，et al.，J. Interferon Res.，10：255－267（1990）. For references relevant to interferon－，see，Asano，et al.，Eur. J. Cancer，27（Suppl 4）：S21－S25（1991）；Nagy，et al.，Anticancer Research，8（3）：467－470（1988）；Dron，et al.，J. Biol. Regul. Homeost. Agents，3（1）：13－19（1989）；Habib，et al.，Am. Surg.，67（3）：257－260（3／2001）；およびSugyiama，et al.，Eur. J. Biochem.，217：921－927（1993）を参照にされたい。

【0691】

インターフェロン結合物の例では、インターフェロンβはリンカーアームを介して第2ペプチドに結合する。リンカーアームには完全なグリコシル連結基を含み、これを通して本発明の方法を介して第2ペプチドに連結する。リンカーアームも場合により第2の完全なグリコシル連結基も含み、これを通してインターフェロンに結合する。

【0692】

別の例示態様では、本発明は濾胞刺激ホルモン（FSH）の結合物を提供する。FSHは糖タンパク質ホルモンである。例えばSaneyoshi，et al.，Biol. Reprod.，65：1686－1690（2001）；Hakola，et al.，J. Endocrinol.，158：441－448（1998）；Stanton，et al.，Mol. Cell. Endocrinol.，125：133－141（1996）；Walton，et al.，J. Clin. Endocrinol. Metab.，86（8）：3675－3685（08／2001）；Ulloa－Aguirre，et al.，Endocrine，11（3）：205－215（12／1999）；Castro－Fernadez，et al. I，J. Clin. Endocrinol. Matab.，85（12）：4603－4610（2000）；Prevost，Rebecca R.，Pharmacotherapy，18（5）：1001－1010（1998）；Linskens，et al.，The FASEB Journal，13：639－645（04／1999）；Butnev，et al.，Biol. Reprod.，58：458－469（1998）；Muyan，et al.，Mol. Endo.，12（5）：766－772（1998）；Min，et al.，Endo. J.，43（5）：585－593（1996）；Boime，et al.，Recent Progress in Hormone Research，34：271－289（1999）；およびRafferty，et al.，J. Endo.，145：527－533（1995）を参照にされたい。FSH結合物はインターフェロンについて上に記載した様式に準じて形成することができる。

【0693】

さらに別の例示態様では、結合物はエリトロポエチン（EPO）を含む。EPOは低酸素に対する反応を媒介し、そして赤血球の生産を刺激することが知られている。関連する参考文献については、Cerami et al.，Seminars in Oncology，28（2）（Suppl8）：66－70（04／2001）を参照にされたい。例示のEPO結合物は、インターフェロンの結合物に準じて形成される。

【0694】

さらなる例示態様では、本発明はヒト顆粒球コロニー刺激因子（G－CSF）の結合物を提供する。G－CSFはニュートロポイエティック（neutropoietic）前駆細胞の機能的に成熟した好中球への増殖、分化および活性化を刺激する糖タンパク質である。注入されたG－CSFは身体から急速に排除されることが知られている。例えばN

ohynek, et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 39：259－266（1997）；Lord et al., Clinical Cancer Research, 7（7）：2085－2090（07／2001）；Rotondaro, et al., Molecular Biotechnology, 11（2）：117－128（1999）；およびBoenig, et al., Bone Marrow Transplantation, 28：259－264（2001）を参照にされたい。G－CSFの例示結合物は、インターフェロンの結合物について上に記載したように調製される。当業者は多くの他のタンパク質が、限定するわけではないが表6（本明細書のいたるところに記載する）および図1、および個々の修飾スキームが提示されている図27～51に掲げるペプチドを含む本発明の方法および組成物を使用して、インターフェロンに結合することができると考えるだろう。

【0695】

さらなる例示態様では、ビオチンとの結合物が提供される。すなわち例えば選択的にビオチン化されたペプチドは、1以上の修飾基を持つアビジンまたはストレプトアビジン部分の結合により仕上げられる。

【0696】

さらに好適な態様では、生体分子は本発明の方法により修飾したペプチドを特異的な細胞内コンパートメントへ向けるために選択され、これにより組織に送達される非誘導化ペプチドの量に比べて細胞内コンパートメントへのペプチドの送達を強化する。さらに好適な態様では、選択した時間内に特異的な細胞区画へ送達される誘導化ペプチドの量を誘導化により、少なくとも約20％、より好ましくは少なくとも約40％、そしてさらにより好ましくは少なくとも約100％まで強化する。別の特に好適な態様では生体分子は、いったん内面化されると加水分解することができる開裂可能なリンカーによりペプチドに連結される。細胞内ターゲッティングの応用に現在好適な生体分子には、トランスフェリン、ラクトトランスフェリン（ラクトフェリン）、メラノトランスフェリン（p97）、セルロプラスミンおよび二価のカチオン輸送体を含む。意図する連結には限定するわけではないが、タンパク質－糖－リンカー－糖－タンパク質、タンパク質－糖－リンカー－タンパク質およびそれらの多価形態、および薬剤がとりわけ低分子、ペプチド、脂質を含むタンパク質－糖－リンカー－薬剤を含む。

【0697】

治療薬の部位特異的および標的－指向的送達は、種々の悪性疾患および特定の神経障害のようなヒトの広い種々の疾患を処置する目的に望ましい。そのような手順は薬剤のより少ない副作用およびより高い効率で達成される。これらの送達系の設計は様々な原理に頼るものであった。総説については、Garnett, Advanced Drug Delivery Reviews 53：171－216（2001）を参照にされたい。

【0698】

組織を特異的に標的するために、薬剤送達系の設計における1つの重要な考察。腫瘍表面抗原の発見により、定めることができる表面抗原を提示している腫瘍細胞を特異的に標的とし、そして殺す治療的取り組みを開発することが可能となった。悪性疾患の処置においてヒトの臨床試験で効果が証明された3つの主要のクラスの治療用モノクローナル抗体（MAb）がある：（1）非結合MAb、これは成長阻害および／またはアポトーシスを直接誘導するか、あるいは抗腫瘍細胞傷害性を媒介するために宿主の防御メカニズムを間接的に活性化する；（2）薬剤を結合したMAb、これは有力な細胞傷害性トキシンを腫瘍細胞に優先的に送達し、したがって従来の化学療法に普通は付随する全身性の細胞傷害性を最少とする；および（3）放射性同位体を結合したMAb、これは腫瘍に殺菌用量の放射線を送達する。Reff et al., Cancer Control 9：152－166（2002）による総説を参照にされたい。

【0699】

悪性細胞を殺す力を持つMAbを準備するために、MAbを植物、細菌または菌類の供給源から得たトキシンに結合して、イムノトキシンと呼ばれるキメラタンパク質を形成す

ることができる。頻繁に使用される植物トキシンは２種類に分類される：（１）リシン、アブリン、アメリカヤドリギ レクチン、およびモデクシン（ｍｏｄｅｃｃｉｎ）のようなホロトキシン（またはクラスＩＩリボソーム不活性化タンパク質）、および（２）アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質（ＰＡＰ）、サポリン、Ｂｒｙｏｄｉｎ１、ボウガニン（ｂｏｕｇａｎｉｎ）およびゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）のようなヘミトキシン（クラスＩリボソーム不活性化タンパク質）。よく使用される細菌トキシンには、ジフテリアトキシン（ＤＴ）およびシュードモナスのエキソトキシン（ＰＥ）を含む。Ｋｒｅｉｔｍａｎ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２：３１３－３２５（２００１）。

【０７００】

通例のイムノトキシンは、正常細胞への結合を最少にするために突然変異または化学的に修飾したトキシンに化学的に結合したＭＡｂを含む。例にはＣＤ５を標的とする抗－Ｂ４－ブロック化リシン；およびＣＤ２２を標的とするＲＦＢ４－脱グリコシル化リシンＡ鎖を含む。より最近開発された組換えイムノトキシンは、組換えＤＮＡ技術を使用してタンパク質トキシンに融合させた腫瘍抗原に対して向けられた抗体の可変領域からなるキメラタンパク質である。トキシンはまた、正常組織結合部位は除去するが、その細胞傷害性を保持するために、頻繁に遺伝的に修飾される。造血性ガン、グリオーマおよび胸部、結腸、卵巣、膀胱および胃腸管のガンを含む種々の悪性疾患を処置するために、イムノトキシンの標的として多数の分化抗原、過剰発現したレセプターまたはガン－特異的抗原、例えばＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２０、ＩＬ－２レセプター（ＣＤ２５）、ＣＤ３３、ＩＬ－４レセプター、ＥＧＦレセプターおよびその突然変異体、ＥｒＢ２、ルイス炭水化物、メソセリン（ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ）、トランスフェリンレセプター、ＧＭ－ＣＳＦレセプター、Ｒａｓ、Ｂｃｒ－Ａｂ１およびｃ－Ｋｉｔが同定された。例えばＢｒｉｎｋｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．１：６９３－７０２（２００１）；Ｐｅｒｅｎｔｅｓｉｓ ａｎｄ Ｓｉｅｖｅｒｓ，Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ／Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｃｌｉｎｉｃｓ ｏｆ Ｎｏｒｔｈ Ａｍｅｒｅｉｃａ １５：６７７－７０１（２００１）を参照にされたい。

【０７０１】

放射性同位体に結合したＭＡｂは、ヒトの悪性疾患、特に造血性の悪性疾患を高レベルの特異性および効力で処置する別の手段として使用される。最もよく使用される治療用の同位体は、^{131}Ｉおよび^{90}Ｙのような高エネルギー－エミッターである。最近、^{213}Ｂｉ－標識抗－ＣＤ３３ヒト化ＭＡｂも、フェイズＩのヒト臨床試験で試験された。Ｒｅｆｆ ｅｔ ａｌ．，同上。

【０７０２】

多数のＭＡｂが治療目的に使用されてきた。例えば特定の造血性悪性疾患を処置するために、リツキシマブ（ｒｉｔｕｘｉｍａｂ：Ｒｉｔｕｘａｎ（商標））、組換えキメラ抗－ＣＤ２０ＭＡｂの使用が１９９７年にＦＤＡにより認可された。それからヒトのガンの処置に治療的使用が認められた他のＭＡｂには：アレムツズマブ（ａｌｅｍｔｕｚｕｍａｂ：Ｃａｍｐａｔｈ－１Ｈ（商標））、ＣＤ５２に対するヒト化ラット抗体；およびジェンツズマブ オゾガマイシン（ｇｅｍｔｕｚｕｍａｂ ｏｚｏｇａｍｉｃｉｎ：Ｍｙｌｏｔａｒｇ（商標））、カリーチマイシン（ｃａｌｉｃｈｅｍｉｃｉｎ）－結合ヒト化マウス抗ＣＤ３３ＭＡｂを含む。現在、ＦＤＡはまた細胞傷害剤または照射、例えば放射標識Ｚｅｖａｌｉｎ（商標）およびＢｅｘｘａｒ（商標）の部位特異的送達を目的にするための数種の他のＭＡｂの安全性および効力も調査している。Ｒｅｆｆ ｅｔ ａｌ．，同上。

【０７０３】

薬剤送達系の設計において２番目に重要な考察は、標的とする組織の治療薬への接近性である。これは血液脳関門が高分子の拡散を妨害する中枢神経系（ＣＮＳ）の疾患を処置する場合に特に関心のある事柄である。治療薬のＣＮＳへの効率的送達のために、血液脳関門をバイパスするための幾つかの取り組みが開発された。

【０７０４】
血漿から脳への鉄輸送メカニズムを解明することは、血液脳関門（ＢＢＢ）のバイパスに有用な道具を提供した。トランスフェリンにより血漿中で輸送される鉄は、ほとんどすべての種類の細胞に必須な成分である。脳は代謝プロセスに鉄を必要とし、そして脳の毛細管内皮細胞に位置するトランスフェリンレセプターを通して、レセプターが媒介するトランスサイトーシスおよびエンドサイトーシスを介して鉄を受容する。Ｍｏｏｒ ａｎｄ Ｍｏｒｇａｎ，Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ２０：７７－９５（２０００）。トランスフェリン－トランスフェリンレセプター相互作用に基づく送達系が、ペプチド、タンパク質およびリポソームを脳に効率的に送達するために確立された。例えばペプチドは脳によるより多い取り込みを達成するために、トランスフェリンレセプターに対して向けられたＭａｂにカップリングすることができる、Ｍｏｏｓ ａｎｄ Ｍｏｒｇａｎ、同上。同様に、トランスフェリンレセプターに向けられたＭＡｂにカップリングした時、血液脳関門全域の塩基性繊維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）の輸送が強化される。Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ３０１：６０５－６１０（２００２）；Ｗｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ １０：２３９－２４５（２００２）。さらに化学療法剤、ドキソルビシンのＣ６グリオーマへの効果的輸送のためのリポソーム送達系が報告され、ここでトランスフェリンはリポソームＰＥＧ鎖の遠位末端に結合された。Ｅａｖａｒｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．５１：１０－１４（２０００）。多数の米国特許もトランスフェリン－トランスフェリンレセプター相互作用に基づき血液－脳関門をバイパスする送達法に関する。例えば米国特許第５，１５４，９２４号；同第５，１８２，１０７号；同第５，５２７，５２７号；同第５，８３３，９８８号；同第６，０１５，５５５号明細書を参照にされたい。

【０７０５】
血液脳関門をバイパスするための製剤用に適する他の結合パートナーがある。例えば米国特許第５，６７２，６８３号、同第５，９７７，３０７号明細書および国際公開第９５／０２４２１号パンフレットは、血液脳関門をわたる神経製剤を送達する方法に関し、ここで薬剤は脳の毛細管内皮細胞レセプターと反応性のリガンドとの融合タンパク質の状態で投与される；国際公開第９９／００１５０号パンフレットは、血液脳関門をわたる薬剤の輸送が、ヒトのインスリンレセプターに対して向けられたＭＡｂとの結合により促進される薬剤送達系を記載する；国際公開第８９／１０１３４号パンフレットは、脳へ親水性の神経ペプチドを導入する手段として、比較的高速で血液脳関門をわたることができるペプチドおよびトランスサイトーシスできない親水性の神経ペプチドを含むキメラペプチドを開示する；国際公開第０１／６０４１１　Ａ１号パンフレットは、製薬学的な有効成分を脳に容易に輸送することができる製薬学的組成物を提供する。有効成分は結合物として使用されるヒバーネーション（ｈｉｂｅｒｎａｔｉｏｎ）－特異的タンパク質に結合させ、そして甲状腺ホルモンまたは甲状腺ホルモンの生産を促進する物質と共に投与される。さらに血液脳関門をバイパスするために、別の薬剤送達経路が調査された。例えば結合を必要としない治療薬の鼻内送達は別の送達法の可能性を示した（Ｆｒｅｙ，２００２，Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２（５）：４６－４９）。

【０７０６】
血液脳関門をわたる薬剤の輸送を促進することに加えて、トランスフェリン－トランスフェリンレセプター相互作用は、多くの腫瘍細胞がそれらの表面上にトランスフェリンレセプターを過剰発現するので、特定の腫瘍細胞の特異的標的化にも有用である。この方法はトランスフェリン結合物を介してＫ５６２細胞に生物活性高分子を送達するために（Ｗｅｌｌｈｏｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２６６：４３０９－４３１４（１９９１））、そしてトランスフェリン結合物を介して腸細胞－様Ｃａｃｏ－２細胞にインスリンを送達するために（Ｓｈａｈ ａｎｄ Ｓｈｅｎ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓ

ｃｉｅｎｃｅｓ ８５：１３０６－１３１１（１９９６））使用されてきた。

【０７０７】

さらにラクトトランスフェリンレセプター、メラノトランスフェリン、セルロプラスミンのような種々の鉄輸送タンパク質の機能、および二価のカチオン輸送体およびそれらの発現パターンについてより知られるようになったので、鉄輸送メカニズムに関与する幾つかのタンパク質（例えばメラノトランスフェリン）またはそれらのフラグメントは、血液脳関門をわたる治療薬の輸送、または特異的組織のターゲッティングを支援するために同様に効果的であることが分かった（国際公開第０２／１３８４３Ａ２号、同第０２／１３８７３Ａ２号パンフレット）。薬剤送達において、結合物としての鉄の取り込みが関与するトランスフェリンおよび関連タンパク質の使用に関する総説は、Ｌｉ ａｎｄ Ｑｉａｎ，Ｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｒｅｖｉｅｗｓ ２２：２２５－２５０（２００２）を参照にされたい。

【０７０８】

治療薬の組織－特異的送達の概念は、トランスフェリンとトランスフェリンレセプターまたはそれらの関連タンパク質との間の相互作用を越える。例えば石化（ｍｉｎｅｒａｌｉｚｅｄ）した組織へのタンパク質の送達を改善するために、タンパク質が骨を探す（ｂｏｎｅ－ｓｅｅｋｉｎｇ）アミノビホスフェートと結合した骨－特異的送達系が記載された。Ｕｌｕｄａｇ ａｎｄ Ｙａｎｇ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．１８：６０４－６１１（２００２）。この話題に関する総説は、Ｖｙａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍ １８：１－７６（２００１）を参照にされたい。

【０７０９】

種々のリンカーを、治療薬の特異的送達の目的で生物結合物の生成法に使用することができる。適当なリンカーには、例えば酸－触媒型の解離により開裂され得る、あるいは非－開裂性のホモ－およびヘテロ二官能性架橋結合試薬を含む（例えば、Ｓｒｉｎｉｖａｓａｃｈａｒ ａｎｄ Ｎｅｖｉｌｌｅ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２８：２５０１－２５０９（１９８９）；Ｗｅｌｌｈｏｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２６６：４３０９－４３１４（１９９１）を参照にされたい）。ビオチンおよびアビジン／ストレプトアビシンのような多くの既知の結合パートナー間の相互作用も、治療薬と治療薬の特異的かつ効果的送達を確実とする結合パートナーとを連結する手段として使用することができる。本発明の方法を使用して、タンパク質は分子を結合物として細胞内コンパートメントへ送達するために使用することができる。リガンド結合後に内面化される、特異的な細胞表面レセプターに結合するタンパク質、ペプチド、ホルモン、サイトカイン、低分子等は、結合した治療用化合物の細胞内ターゲッティングに使用することができる。典型的にはレセプター－リガンド複合体は、特異的な細胞コンパートメントへ送達される細胞内小胞中に内面化され、これらのコンパートメントには限定するわけではないがレセプターにより標的化される細胞内の位置に依存して核、ミトコンドリア、ゴルジ、ＥＲ、リソソームおよびエンドソームを含む。レセプターリガンドを所望する分子に結合することにより、薬剤はレセプター－リガンド複合体で運ばれ、そしてレセプターにより通常は標的とされる細胞内の位置へ送達される。したがって薬剤は疾患の処置が必要とされている細胞の特異的な細胞内の位置へと送達され得る。

【０７１０】

多くのタンパク質が治療薬を特異的な組織および器官を標的とするために使用することができる。標的化タンパク質には限定するわけではないが増殖因子（とりわけＥＰＯ、ＨＧＨ、ＥＧＦ、神経成長因子、ＦＧＦ）、サイトカイン（とりわけＧＭ－ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、インターフェロンファミリー、インターロイキン）、ホルモン（とりわけＦＳＨ、ＬＨ、ステロイドファミリー、エストロゲン、コルチコステロイド、インスリン）、血清タンパク質（とりわけアルブミン、リポタンパク質、フェトプロテイン、ヒト血清タンパク質、抗体および抗体のフラグメント）、およびビタミン（とりわけ葉酸、ビタミンＣ、

ビタミンＡ）を含む。ほとんどの細胞型上のレセプターに特異的な標的化剤も利用可能である。

【０７１１】

企図する連結の立体配置には、限定するわけではないがタンパク質－糖－リンカー－糖－タンパク質およびそれらの多価の形態、タンパク質－糖－リンカー－タンパク質およびそれらの多価の形態、タンパク質－糖－リンカー－治療薬（ここで治療薬には限定するわけではないが低分子、ペプチドおよび脂質を含む）を含む。幾つかの態様では、いったん内面化されれば加水分解され得る加水分解可能なリンカーを使用する。酸性ｐＨを有するエンドソームまたはリソソーム中にタンパク質結合物が内面化される場合、酸に不安定なリンカーを使用することは有利となり得る。いったんエンドソームまたはリソソーム中に内面化されれば、リンカーは加水分解され、そして治療薬が標的剤から放出される。

【０７１２】

例示態様では、トランスフェリンは、患者中でトランスフェリンレセプターを提示する細胞を標的することが望まれる酵素にリンカーを介して連結される。患者は例えばその特定の酵素について酵素代替療法を必要とすることができる。特に好適な態様では、酵素はリソソーム蓄積疾患の患者に欠けているものである（表４を参照にされたい）。いったん循環に入れば、トランスフェリン－酵素結合物はトランスフェリンレセプターに結合し、そして早期にエンドソームにより内面化される（Ｘｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．３３６：６６７；Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｃｉ．２３：２０６；Ｓｕｈａｉｌａ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３：１４３５５）。トランスフェリンに関する他の企図する標的剤には、限定するわけではないがラクトトランスフェリン（ラクトフェリン）、メラノトランスフェリン（ｐ９７）、セルロプラスミンおよび二価カチオン輸送体を含む。

【０７１３】

別の例示態様では、トランスフェリン－ジストロフィン結合物がトランスフェリン経路によりエンドソームに入る。いったん入れば、ジストロフィンが加水分解可能なリンカーにより放出され、これは次いで必要とされる細胞内コンパートメントに取り込まれることができる。この態様は、トランスフェリンに結合された機能的ジストロフィンペプチドを用いて、遺伝的に欠損性のジストロフィン遺伝子および／またはタンパク質を補充することにより筋ジストロフィーの患者を処置するために使用することができる。

【０７１４】

Ｅ．治療部分

別の好適な態様では、修飾された糖は治療部分を含む。当業者は治療部分と生体分子の範疇の間で重複する部分があると考えるだろう；多くの生体分子が治療特性または潜在性を有する。

【０７１５】

治療部分は臨床的使用がすでに許容された作用物質であることができ、あるいはそれらはその使用が実験的であるか、またはその活性もしくは作用メカニズムが調査中の薬剤であることができる。治療部分は所定の疾患状態で証明された作用を有することができ、あるいは所定の疾患状態で望まれる作用を示すと仮定されるだけであることができる。好適な態様では、治療部分は選択した組織と相互作用するそれらの能力についてスクリーニングされている化合物である。本発明の方法を実施するために有用な治療部分は、種々の薬理学的活性を有する薬剤の広範な種類からの薬剤を含む。幾つかの態様では、糖ではない治療部分を使用することが好ましい。この好適例の例外は、ＰＥＧ、生体分子、治療部分、診断分子等のような別の物体と共有結合することにより修飾された糖である。別の例示態様では、治療用の糖部分をリンカーアームと結合させ、そして続いて糖－リンカーアームカセットを本発明の方法を介してペプチドに結合させる。

【０７１６】

治療および診断薬を様々な他の種に結合する方法は、当業者には周知である。例えばＨ

ｅｒｍａｎｓｏｎ，バイオコンジュゲート技術（ＢＩＯＣＯＮＪＵＧＡＴＥ ＴＥＣＨＮＩＱＵＥＳ）、アカデミック出版、サンディエゴ、１９９６；およびＤｕｎｎ ｅｔ ａｌ．，編集、ポリマー性薬剤および薬剤送達系（ＰＯＬＹＭＥＲＩＣ ＤＲＵＧＳ ＡＮＤ ＤＲＵＧ ＤＥＬＩＶＥＲＹ ＳＹＳＴＥＭＳ）、ＡＣＳシンポジウムシリーズ、第４６９巻、アメリカ化学学会、ワシントン、Ｄ．Ｃ．１９９１を参照にされたい。

【０７１７】

例示態様では、治療部分は選択した条件下で開裂する連結を介して修飾された糖に結合させる。条件の例には、限定するわけではないが、選択されたｐＨ（例えば胃、腸、エンドサイトーシスの液胞）、活性な酵素の存在（例えばエステラーゼ、プロテアーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ）、光、熱等を含む。多くの開裂可能な基が当該技術分野では知られている。例えばＪｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，７６１：１５２－１６２（１９８３）；Ｊｏｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６５：１４５１８－１４５２５（１９９０）；Ｚａｒｌｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２４：９１３－９２０（１９８０）；Ｂｏｕｉｚａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１５５：１４１－１４７（１９８６）；Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６１：２０５－２１０（１９８６）；Ｂｒｏｗｎｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４３：１８５９－１８６７（１９８９）を参照にされたい。

【０７１８】

有用な治療部分の種類には、限定するわけではないが非－ステロイド性抗－炎症剤（ＮＳＡＩＤＳ）を含む。ＮＳＡＩＤＳは例えば以下の範疇から選択することができる：（例えばプロピオン酸誘導体、酢酸誘導体、フェナム酸誘導体、ビフェニルカルボン酸誘導体およびオキシカム（ｏｘｉｃａｍｓ））；ヒドロコルチゾン等を含むステロイド性抗－炎症剤；アジュバント：抗－ヒスタミン剤（例えばクロロフェニラミン（ｃｈｌｏｒｐｈｅｎｉｒａｍｉｎｅ）、トリプロリジン（ｔｒｉｐｒｏｌｉｄｉｎｅ））；鎮咳剤（例えばデキストロメトルファン（ｄｅｘｔｒｏｍｅｔｈｏｒｐｈａｎ）、コデイン（ｃｏｄｅｉｎ）、カラミフェン（ｃａｒａｍｉｐｈｅｎ）、およびカルベタペンタン（ｃａｒｂｅｔａｐｅｎｔａｎｅ）；止痒剤（例えばメトジラジン（ｍｅｔｈｄｉｌａｚｉｎｅ）およびトリメプラジン（ｔｒｉｍｅｐｒａｚｉｎｅ）；抗コリン作用剤（例えばスコポラミン（ｓｃｏｐｏｌａｍｉｎｅ）、アトロピン（ａｔｒｏｐｉｎｅ）、ホマトロピン（ｈｏｍａｔｒｏｐｉｎｅ）、レボドパ（ｌｅｖｏｄｏｐａ）；嘔吐抑制剤および抗めまい剤（例えばシクリジン（ｃｙｃｌｉｚｉｎｅ）、メクリジン（ｍｅｃｌｉｚｉｎｅ）、クロルプロマジン（ｃｈｌｏｒｐｒｏｍａｚｉｎｅ）、ブクリジン（ｂｕｃｌｉｚｉｎｅ）；食欲減退剤（例えばベンズフェタミン（ｂｅｎｚｐｈｅｔａｍｉｎｅ）、フェンテルミン（ｐｈｅｎｔｅｒｍｉｎｅ）、クロルフェンテルミン（ｃｈｌｏｒｐｈｅｎｔｅｒｍｉｎｅ）およびフェンフルラミン（ｆｅｎｆｌｕｒａｍｉｎｅ）；中枢刺激剤（例えばアンフェタミン（ａｍｐｈｅｔａｍｉｎｅ）、メタンフェタミン（ｍｅｔｈａｍｐｈｅｔａｍｉｎｅ）、デクストロアンフェタミン（ｄｅｘｔｒｏａｍｐｈｅｔａｍｉｎｅ）およびメチルフェニデート（ｍｅｔｈｙｌｐｈｅｎｉｄａｔｅ））；抗不整脈剤（例えばプロパノルオール（ｐｒｏｐａｎｏｌｏｌ）、プロカインアミド（ｐｒｏｃａｉｎａｍｉｄｅ）、ジソピラミド（ｄｉｓｏｐｙｒａｍｉｄｅ）、キニジン（ｑｕｉｎｉｄｉｎｅ）、エンカイニド（ｅｎｃａｉｎｉｄｅ）；β－アドレナリン遮断薬（例えばメトプロロール（ｍｅｔｏｐｒｏｌｏｌ）、アセブトロール（ａｃｅｂｕｔｏｌｏｌ）、ベタキソロール（ｂｅｔａｘｏｌｏｌ）、ラベタロール（ｌａｂｅｔａｌｏｌ）およびチモロール（ｔｉｍｏｌｏｌ）；強心剤（例えばミルリノン（ｍｉｌｒｉｎｏｎｅ）、アムリノン（ａｍｒｉｎｏｎｅ）およびドブタミン（ｄｏｂｕｔａｍｉｎｅ）；降圧剤（例えばエナラプリル（ｅｎａｌａｐｒｉｌ）、クロニジン（ｃｌｏｎｉｄｉｎｅ）、ヒドララジン（ｈｙｄｒａｌａｚｉｎｅ）、ミノキシジル（ｍｉｎｏｘｉｄｉｌ）、グアナドレル（ｇｕａｎａｄｒｅｌ）、グアネチジン（ｇｕａｎｅｔｈｉｄｉｎｅ）；利尿剤（例えばアミロライド（ａｍｉｌｏｒｉｄｅ）およびヒドロクロロチアジド（ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｏｔｈｉａｚｉｄｅ）；冠血

管拡張薬（例えばジルチアゼム（ｄｉｌｔｉａｚｅｍ）、アミオダロン（ａｍｉｏｄａｒｏｎｅ）、イソクスプリン（ｉｓｏｘｓｐｕｒｉｎｅ）、ナイリドリン（ｎｙｌｉｄｒｉｎ）、トラゾリン（ｔｏｌａｚｏｌｉｎｅ）およびベラパミル（ｖｅｒａｐａｍｉｌ）；血管収縮薬（例えばジヒドロエルゴタミン（ｄｉｈｙｄｒｏｅｒｇｏｔａｍｉｎｅ）、エルゴタミン（ｅｒｇｏｔａｍｉｎｅ）およびメチルセルギド（ｍｅｔｈｙｌｓｅｒｇｉｄｅ）；抗潰瘍剤（例えばラニチジン（ｒａｎｉｔｉｄｉｎｅ）およびシメチジン（ｃｉｍｅｔｉｄｉｎｅ）；麻酔薬（例えばリドカイン（ｌｉｄｏｃａｉｎｅ），ブピバカイン（ｂｕｐｉｖａｃａｉｎｅ）、クロロプロカイン（ｃｈｌｏｒｏｐｒｏｃａｉｎｅ）、ジブカイン（ｄｉｂｕｃａｉｎｅ）；抗鬱剤（例えばイミプラミン（ｉｍｉｐｒａｍｉｎｅ）、デシプラミン（ｄｅｓｉｐｒａｍｉｎｅ）、アミトリプチリン（ａｍｉｔｒｙｐｔｉｌｉｎｅ）、ノルトリプチリン（ｎｏｒｔｒｙｐｔｉｌｉｎｅ）；精神安定剤および鎮静剤（例えばクロルジアゼポキシド（ｃｈｌｏｒｄｉａｚｅｐｏｘｉｄｅ）、ベナシチジン（ｂｅｎａｃｙｔｙｚｉｎｅ）、ベンズキナミド（ｂｅｎｚｑｕｉｎａｍｉｄｅ）、フルラゼパム（ｆｌｕｒａｚｅｐａｍ）、ヒドロキシジン（ｈｙｄｒｏｘｙｚｉｎｅ）、ロキサピン（ｌｏｘａｐｉｎｅ）およびプロマジン（ｐｒｏｍａｚｉｎｅ））；抗精神病薬（例えばクロルプロチキセン（ｃｈｌｏｒｐｒｏｔｈｉｘｅｎｅ）、フルフェナジン（ｆｌｕｐｈｅｎａｚｉｎｅ）、ハロペリドール（ｈａｌｏｐｅｒｉｄｏｌ）、モリンドン（ｍｏｌｉｎｄｏｎｅ）、チオリダジン（ｔｈｉｏｒｉｄａｚｉｎｅ）およびトリフルオペラジン（ｔｒｉｆｌｕｏｐｅｒａｚｉｎｅ）；抗微生物剤（抗バクテリア、抗菌・カビ、抗原生生物および抗ウイルス剤）。

【０７１９】

有用な治療部分の種類にはアジュバントを含む。アジュバントは例えば、とりわけ当該技術分野で周知のキーホールリンペットヘモシアニン結合物、モノホスホリル脂質Ａ、マイコプラズマ－由来リポペプチドＭＡＬＰ－２、コレラトキシンＢサブユニット、大腸菌（Ｅｓｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）熱不安定性トキシン、破傷風トキソイドに由来するユニバーサルＴヘルパーエピトープ、インターロイキン－１２、ＣｐＧオリゴデオキシヌクレオチド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、シクロデキストリン、スクワレン、アルミニウム塩、髄膜炎菌の外膜小胞（ＯＭＶ）、モンタニド（ｍｏｎｔａｎｉｄｅ）ＩＳＡ、ＴｉｔｅｒＭａｘ（商標）（モンタナ州、セントルイスのシグマから入手可能）、ニトロセルロース吸着、ＱｕｉｌＡのような免疫－刺激複合体、Ｇｅｒｂｕ（商標）アジュバント（ゲルブ　バイオテクニーク（Ｇｅｒｂｕ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｋ）、キルヒバルド、ドイツ）、トレオニルムラミルジペプチド、チモシン　アルファ、ブピバカイン、ＧＭ－ＣＳＦ、不完全フロインドアジュバント、ＭＴＰ－ＰＥ／ＭＦ５９（チバ／ガイギー（Ｃｉｂａ／Ｇｅｉｇｙ）、バーゼル、スイス）、ポリホスファゼン、セッケンボクの木（Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａ）に由来するサポニンおよびＳｙｎｔｅｘアジュバント製剤（バイオカイン（Ｂｉｏｃｉｎｅ）、エミリーヴァレ、カリフォルニア州）から選択することができる。

【０７２０】

本発明の組成物に包含するために好適な抗微生物剤には、例えばβ－ラクタム剤、キノロン剤、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、テトラサイクリン、エリスロマイシン、アミカシン、トリクロサン、ドキシサイクリン、カプレオマイシン、クロルヘキシジン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クリンダマイシン、エタムブトール、ヘキサミジンイソチオネート、メトロニダゾール、ペンタミジン、ゲンタマイシン、カナマイシン、リネオマイシン、メタサイクリン、メタンアミド、ミノサイクリン、ネオマイシン、ネチルマイシン、パロモマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、ミコナゾールおよびアマンタジンの製薬学的に許容され得る塩を含む。

【０７２１】

本発明の実施に使用する他の薬剤部分には、抗癌剤（例えばアンチアンドロゲン（例えばロイプロリド（ｌｅｕｐｒｏｌｉｄｅ）またはフルタミド（ｆｌｕｔａｍｉｄｅ））、殺細胞剤（例えばアドリアマイシン、ドキソルビシン、タキソール、シクロホスファミド

、ブスルファン、シスプラチン、β－２－インターフェロン）抗－エストロゲン剤（例えばタモキシフェン）、代謝拮抗物（例えばフルオロウラシル、メトトレキセート、メルカプトプリン、チオグアニン）を含む。またこの分類に含まれるのは、診断および治療の両方のための放射性同位体に基づく作用物質およびリシンのような結合トキシン、ゲルダナマイシン、ミタンシン（ｍｙｔａｎｓｉｎ）、ＣＣ－１０６５、Ｃ－１０２７、デュオカルマイシン、カリーチマイシンおよび関連する構造およびそれらの類似体である。

【０７２２】

治療部分はホルモン（例えばメドロキシプロゲステロン、エストラジオール、ロイプロリド、メゲステロール、オクトレチドまたはソマトスタチン）；筋弛緩剤（例えばシンナメドリン（ｃｉｎｎａｍｅｄｒｉｎｅ）、シクロベンザプリン（ｃｙｃｌｏｂｅｎｚａｐｒｉｎｅ）、フラボキセート（ｆｌａｖｏｘａｔｅ）、オルフェナドリン（ｏｒｐｈｅｎａｄｒｉｎｅ）、パパヴェリン（ｐａｐａｖｅｒｉｎｅ）、メベヴェリン（ｍｅｂｅｖｅｒｉｎｅ）、イダヴェリン（ｉｄａｖｅｒｉｎｅ）、リトドリン（ｒｉｔｏｄｒｉｎｅ）、ジフェノキシレート（ｄｉｐｈｅｎｏｘｙｌａｔｅ）、ダントロレン（ｄａｎｔｒｏｌｅｎｅ）およびアズモレン（ａｚｕｍｏｌｅｎ））；抗痙剤；骨－活性剤（例えばジホスホネートおよびホスホノアルキルホスフィネート剤化合物）；内分泌調節（ｍｏｄｕｌａｔｉｎｇ）物質（例えば、避妊薬（例えばエチノジオール（ｅｔｈｉｎｏｄｉｏｌ）、エチニルエストラジオール、ノレチンドロン（ｎｏｒｅｔｈｉｎｄｒｏｎｅ）、メストラノール（ｍｅｓｔｒａｎｏｌ）、デソゲステレル（ｄｅｓｏｇｅｓｔｒｅｌ）、メドロキシプロゲステロン（ｍｅｄｒｏｘｙｐｒｏｇｅｓｔｅｒｏｎｅ））、糖尿病の調節物質（例えばグリブリド（ｇｌｙｂｕｒｉｄｅ）またはクロルプロパミド（ｃｈｌｏｒｐｒｏｐａｍｉｄｅ）、テストラクトンまたはスタノゾロールのような同化産物、アンドロゲン類（例えばメチルテストステロン、テストステロンまたはフルオキシメステロン）、抗利尿物（例えばデスモプレッシン（ｄｅｓｍｏｐｒｅｓｓｉｎ）およびカルシトニン（ｃａｌｃｉｔｏｎｉｎ））であることができる。

【０７２３】

また本発明に使用するのはエストロゲン（例えばジエチルシチルベステロール）、グルココルチコイド（例えばトリアムシノロン、ベタメサゾン等）、およびノレチンドロン、エチノジオール、ノレエチンドロン、レボノルゲストレルのようなプロゲステロン；甲状腺剤（例えばリオチロニン（ｌｉｏｔｈｙｒｏｎｉｎｅ）またはレボチロキシン（ｌｅｖｏｔｈｙｒｏｘｉｎｅ）または抗－甲状腺剤（例えばメチマゾール（ｍｅｔｈｉｍａｚｏｌｅ））；抗過プロラクチン血症剤（例えばカベルゴリン（ｃａｂｅｒｇｏｌｉｎｅ）；ホルモンサプレッサー（例えばダナゾール（ｄａｎａｚｏｌ）またはゴセレリン（ｇｏｓｅｒｅｌｉｎ））、子宮収縮剤（例えばメチルエルゴノビン（ｍｅｔｈｙｌｅｒｇｏｎｏｖｉｎｅ）またはオキシトシン（ｏｘｙｔｏｃｉｎ）およびミオプロストール（ｍｉｏｐｒｏｓｔｏｌ）、アルプロスタジル（ａｌｐｒｏｓｔａｄｉｌ）またはジノプロストーン（ｄｉｎｏｐｒｏｓｔｏｎｅ）のようなプロスタグランジンである。

【０７２４】

他の有用な修飾基には免疫調節剤（例えば抗ヒスタミン剤、ロドキサミド（ｌｏｄｏｘａｍｉｄｅ）および／またはクロモリン（ｃｒｏｍｏｌｙｎ）のようなマスト細胞安定化剤、ステロイド（例えばトリアムシノロン（ｔｒｉａｍｃｉｎｏｌｏｎｅ）、ベクロメタゾン（ｂｅｃｌｏｍｅｔｈａｚｏｎｅ）、コルチゾン（ｃｏｒｔｉｓｏｎｅ）、デキサメタゾン（ｄｅｘａｍｅｔｈａｓｏｎｅ）、プレドニゾロン（ｐｒｅｄｎｉｓｏｌｏｎｅ）、メチルプレドニゾロン（ｍｅｔｈｙｌｐｒｅｄｎｉｓｏｌｏｎｅ）、ベクロメタゾン（ｂｅｃｌｏｍｅｔｈａｓｏｎｅ）またはクロベタゾル（ｃｌｏｂｅｔａｓｏｌ））、ヒスタミンＨ２アンタゴニスト（例えばファモチジン（ｆａｍｏｔｉｄｉｎｅ）、シメチジン（ｃｉｍｅｔｉｄｉｎｅ）、ラニチジン（ｒａｎｉｔｉｄｉｎｅ））、免疫抑制剤（例えばアザチオプリン（ａｚａｔｈｉｏｐｒｉｎｅ）、シクロスポリン（ｃｙｃｌｏｓｐｏｒｉｎ））等を含む。

【０７２５】

スリンダク（ｓｕｌｉｎｄａｃ）、エトドラク（ｅｔｏｄｏｌａｃ）、ケトプロフェン（ｋｅｔｏｐｒｏｆｅｎ）およびケトロラク（ｋｅｔｏｒｏｌａｃ）のような抗炎症活性を有する群も使用する。本発明と一緒に使用する他の薬剤は、当業者には明らかである。

【０７２６】

Ｆ．修飾された糖の調製法

本発明の結合物を形成するために有用な修飾された糖を本明細書で検討する。この検討は説明の簡明さのために水溶性ポリマーで修飾された糖の調製に焦点をあてる。特にこの検討はポリ（エチレングリコール）部分を含む修飾された糖の調製に焦点をあてる。当業者は本明細書に記載する方法が修飾された糖の調製に広く応用可能であり、したがってこの検討は本発明の範囲を限定すると解釈すべきでないと考えるだろう。

【０７２７】

一般に糖部分および修飾基は、典型的には連結法により新規な有機官能基または非反応性種に転移される反応基の使用を介して一緒に連結される。糖の反応性官能基（１つまたは複数）は、糖部分の任意の位置に位置する。本発明の実質に有用な反性基および反応の種類は、一般にバイオコンジュゲート（ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ）化学の分野で周知なものである。反応性糖部分を用いて利用可能な現在好適な種類の反応は、比較的穏和な条件下で進行するものである。これらには限定するわけではないが、求核性置換（例えばアミンおよびアルコールとアシルハライド、活性エステルとの反応）、求電子置換（例えばエナミン反応）、および炭素－炭素および炭素－ヘテロ原子多重結合への付加（例えばマイケル反応、ディールス－アルダー付加）を含む。これらのおよび他の有用な反応は、例えばＳｍｉｔｈ ａｎｄ Ｍａｒｃｈ、進歩した有機化学（ＡＤＶＡＮＣＥＤ ＯＲＧＡＮＩＣ ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ）、第５版、ジョン ウィリー＆サンズ、ニューヨーク、２００１；Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ、バイオコンジュゲート技術（ＢＩＯＣＯＮＪＵＧＡＴＥ ＴＥＣＨＮＩＱＵＥＳ）、アカデミック出版、サンディエゴ、１９９６；およびＦｅｅｎｅｙ ｅｔ ａｌ．，タンパク質の修飾：化学シリーズの進歩（ＭＯＤＩＦＩＣＡＴＩＯＮ ＯＦ ＰＲＯＴＥＩＮＳ：Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｓｅｒｉｅｓ）、第１９８巻、アメリカ化学学会、ワシントン、Ｄ．Ｃ．、１９８２で検討されている。

【０７２８】

糖核または修飾基から下がる（ｐｅｎｄａｎｔ）有用な反応性官能基には、限定するわけではないが以下を含む：

（ａ）カルボキシル基およびそれらの種々の誘導体、限定するわけではないが、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、Ｎ－ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル、酸ハライド、アシルイミダゾール、チオエステル、ｐ－ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニルおよび芳香族エステルを含む；

（ｂ）例えばエステル、エーテル、アルデヒド等に転換できるヒドロキシル基；

（ｃ）ハロアルキル基、ここでハライドは例えばアミン、カルボキシレートアニオン、チオールアニオン、カルバニオン、またはアルコキシドイオンのような求核性基に後で置き換わることができ、これによりハロゲン原子の官能基で新たな基の共有結合をもたらす；

（ｄ）ディールス－アルダー反応に参加することができるジエノフィル基、例えばマレイミド基；

（ｅ）後の誘導化が例えばイミン、ヒドラゾン、セミカルバゾンまたはオキシムのようなカルボニル誘導体の形成を介して、あるいはグリニャール付加またはアルキルリチウム付加のようなメカニズムを介して可能となるようなアルデヒドまたはケトン基；

（ｆ）例えばスルホンアミドを形成するために、アミンとの後の反応のためのスルホニルハライド基；（ｇ）例えばジスルフィドに転換されるか、またはアルキルおよびアシルハライドと反応することができるチオール基；

（ｈ）例えばアシル化、アルキル化または酸化され得るアミンまたはスルフヒドリル基；

（ｉ）例えば付加環化、アシル化、マイケル付加等を受けることができるアルケン；および

（ｊ）例えばアミンおよびヒドロキシル化合物と反応することができるエポキシド。

【０７２９】

反応性官能基は、それらが反応性糖の核（ｒｅａｃｔｉｖｅ ｓｕｇｅｒ ｎｕｃｌｅｕｓ）または修飾基の集成に必要な反応に参加せず、または妨害しないように選択することができる。あるいは反応性官能基は保護基の存在により反応へ参加することから保護することができる。当業者は選択した組の反応条件を妨害しないように、どのように特定の官能基を保護するかを理解している。例えば有用な保護基は、Ｇｒｅｅｎｅ ｅｔ ａｌ．、有機合成における保護基（ＰＲＯＴＥＣＴＩＶＥ ＧＲＯＵＰＳ ＩＮ ＯＲＧＡＮＩＣ ＳＹＮＴＨＥＳＩＳ）、ジョン ウィリー＆サンズ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ）、ニューヨーク、１９９１を参照にされたい。

【０７３０】

以下に続く検討では、本発明の実施に有用な多数の修飾された糖の具体例を説明する。例示態様ではシアル酸誘導体を糖の核として利用して、これに修飾基を結合する。シアル酸誘導体についての検討に焦点をあてるのは、具体的説明の明瞭性のみのためであり、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。当業者は例としてシアル酸を使用して説明した様式に準じて、種々の他の糖部分を活性化し、そして誘導化することができると考えるだろう。例えばガラクトース、グルコース、Ｎ－アセチルガラクトサミンおよびフコースを修飾して、当該技術分野で認識されている方法により容易に修飾される幾つかの糖基質を挙げるために多数の方法を利用することができる。例えばＥｌｈａｌａｂｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．６：９３（１９９９）：およびＳｃｈａｆｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６５：２４（２０００）を参照にされたい。

【０７３１】

例示態様では、本発明の方法により修飾するペプチドは哺乳動物細胞（例えばＣＨＯ細胞）またはトランスジェニック動物で生産されるペプチドであり、すなわちＮ－および／またはＯ－結合オリゴ糖鎖を含み、これらは不完全にシアル化されている。シアル酸を欠き、そして末端ガラクトース残基を含む糖ペプチドのオリゴ糖鎖は、ＰＥＧ化、ＰＰＧ化またはそうではなく修飾されたシアル酸を用いて修飾することができる。

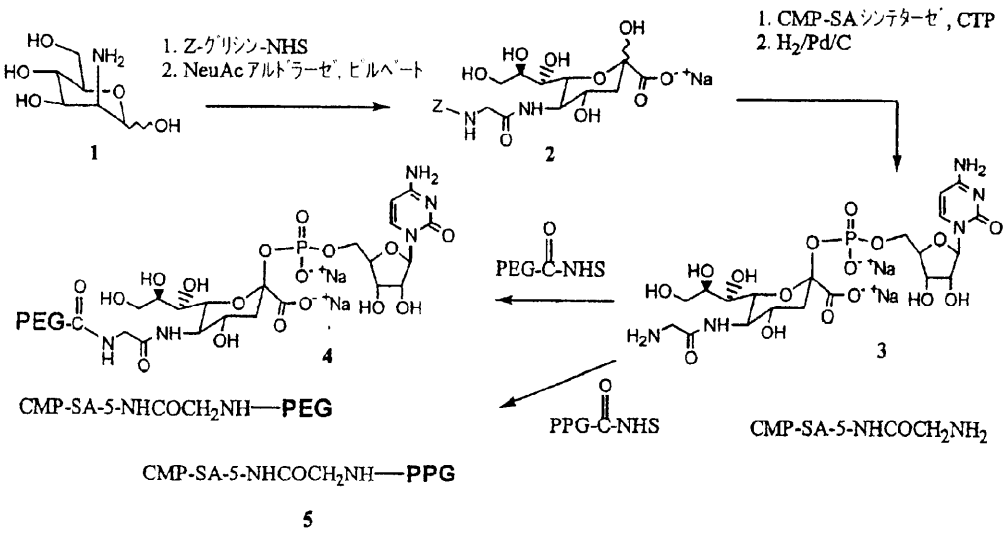
【０７３２】

スキーム４では、マンノサミングリコシド１を保護されたアミノ酸（例えばグリシン）誘導体の活性化エステルを用いて処理し、糖のアミン残基を対応する保護されたアミノ酸アミド付加物に転換する。付加物をアルドラーゼを用いて処理してシアル酸２を形成する。化合物２をＣＭＰ－ＳＡシンテターゼの作用により対応するＣＭＰ誘導体へ転換し、続いてＣＭＰ誘導体の触媒的水素付加により化合物３を生成する。グリシン付加物の形成を介して導入されたアミンは、化合物３を活性化ＰＥＧまたはＰＰＧ誘導体と反応させることによりＰＥＧまたはＰＰＧ結合の位置として利用して（例えばＰＥＧ－Ｃ（Ｏ）ＮＨＳ、ＰＰＧ－Ｃ（Ｏ）ＮＨＳ）、それぞれ４または５を生成する。

【０７３３】

【化５３】

スキーム4



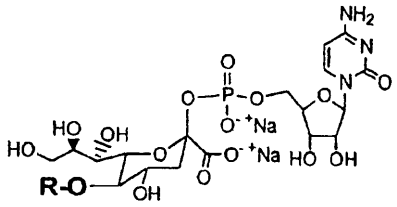
【０７３４】

表２はＰＥＧまたはＰＰＧ部分により誘導化される糖モノホスフェートの代表例を説明する。表２の相当の化合物がスキーム１の方法により調製される。他の誘導体は技術的に認識されている方法により調製される。例えばＫｅｐｐｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　１１：１１Ｒ（２００１）；およびＣｈａｒｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　１０：１０４９（２０００）を参照にされたい。他のアミン反応性ＰＥＧおよびＰＰＧ類似体は市販されているか、または当業者が容易に入手できる方法により調製することができる。

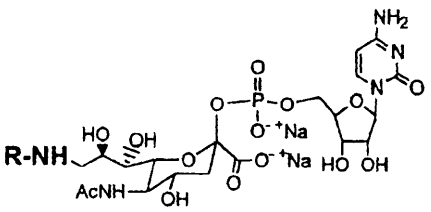
【０７３５】

【表２】

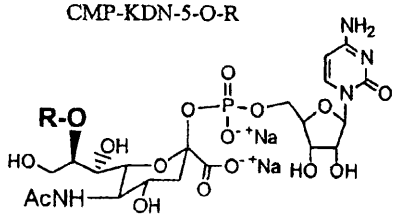
表2. PEGまたはPPG部分により誘導化される糖モノホスフェートの例



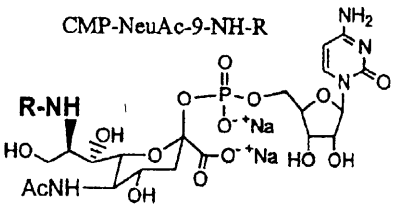
CMP-KDN-5-O-R



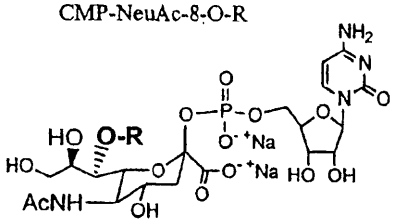
CMP-NeuAc-9-NH-R



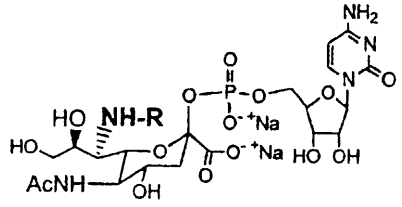
CMP-NeuAc-8-O-R



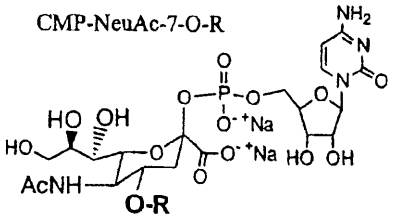
CMP-NeuAc-8-NH-R



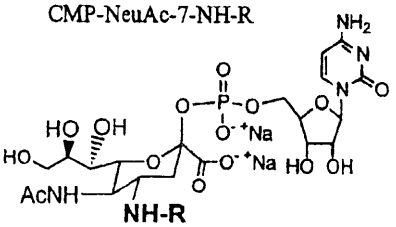
CMP-NeuAc-7-O-R



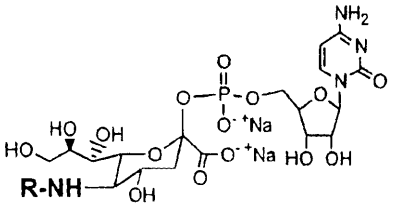
CMP-NeuAc-7-NH-R



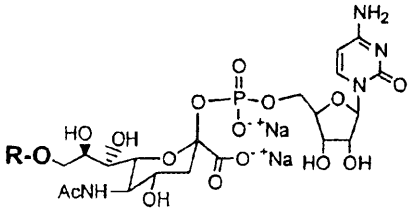
CMP-NeuAc-4-O-R



CMP-NeuAc-4-NH-R



CMP-SA-5-NH-R



CMP-NeuAc-9-O-R

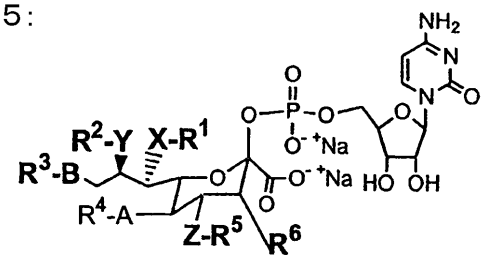
【０７３６】

本発明の実施に使用する修飾された糖ホスフェートは、上記に説明したものと同じく他の位置でも置換され得る。現在好適なシアル酸の置換を式５に説明する。

【０７３７】

【化５４】

式5:



(I)

【０７３８】

式中、Ｘは好ましくは－Ｏ－、－Ｎ（Ｈ）－、－Ｓ、ＣＨ$_2$－およびＮ（Ｒ）$_2$から選択される連結基であり、ここで各ＲはＲ^1～Ｒ^{5}から独立して選択される員である。記号Ｙ、Ｚ、ＡおよびＢは、各々がＸの同一性について上に説明した基から選択される基を表す。Ｘ、Ｙ、Ｚ、ＡおよびＢはそれぞれ独立して選択され、したがってそれらは同じかまたは異なることができる。記号Ｒ^1、Ｒ^2、Ｒ^3、Ｒ^{4}およびＲ^{5}はＨ、ポリマー、水溶性ポリマー、治療部分、生体分子または他の部分を表す。記号Ｒ６はＨ、ＯＨまたはポリマーを表す。あるいはこれらの記号はポリマー、水溶性ポリマー、治療部分、生体分子または他の部分に結合したリンカーを表す。

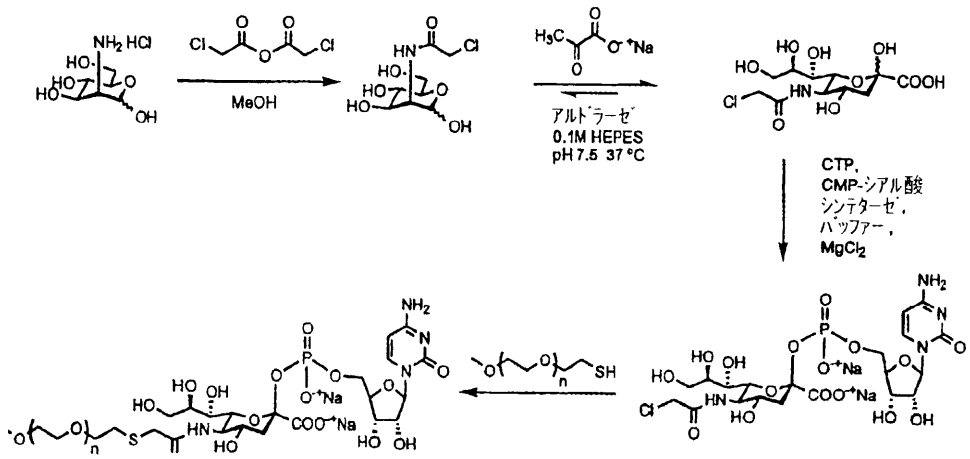
【０７３９】

別の例示態様では、スキーム５に説明するように無水クロロ酢酸の使用による求核置換のためにマンノサミンが同時にアシル化そして活性化される。

【０７４０】

【化５５】

スキーム5



【０７４１】

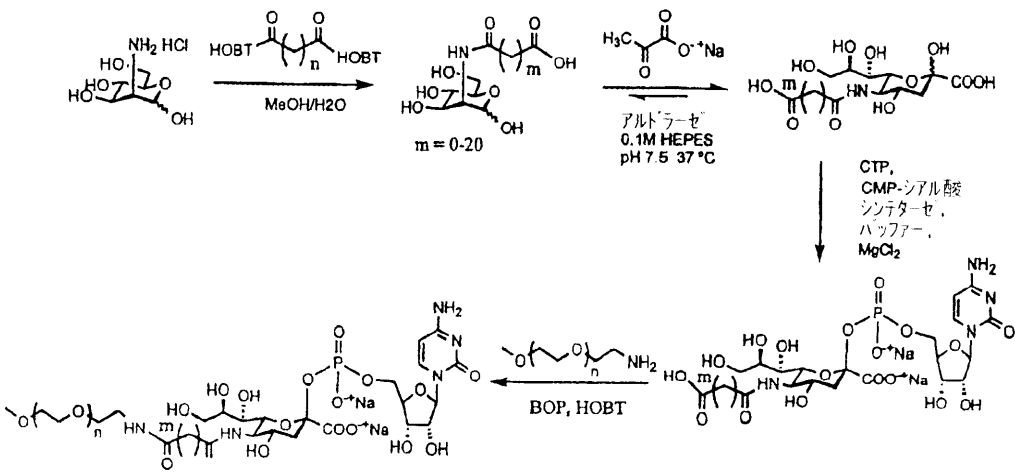
生成したクロロ－誘導化グリカンをピルベートとアルドラーゼの存在下で接触させ、クロロ－誘導化シアル酸を形成する。対応するヌクレオチド糖はシアル酸誘導体を適当なヌクレオチドトリホスフェートおよびシンテターゼと接触させることにより調製する。シアル酸部分のクロロ基をチオ－ＰＥＧのような求核性ＰＥＧ誘導体に置き換える。

【０７４２】

さらなる例示態様では、スキーム６に示すように、マンノサミンをビス－ＨＯＰＴジカルボキシレートを用いてアシル化し、対応するアミド－アルキル－カルボン酸を生成し、これを続いてシアル酸誘導体に転換する。このシアル酸誘導体をヌクレオチド糖に転換し、そしてカルボン酸を活性化し、そしてアミノ－ＰＥＧのような求核性ＰＥＧ誘導体と反応させる。

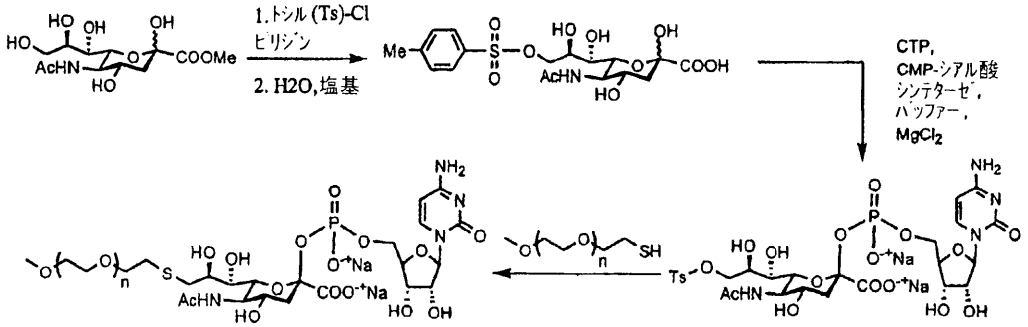
【０７４３】
【化５６】

スキーム6



【０７４４】
スキーム７に説明する別の例示態様では、アミン－およびカルボキシル－保護ノイラミン酸を、１級ヒドロキシル基を対応するｐ－トルエンスルホン酸エステルに転換することにより活性化し、そしてメチルエステルを開裂する。活性化されたノイラミン酸は対応するヌクレオチド糖に転換され、そして活性基はチオ－ＰＥＧのような求核性ＰＥＧ種に置き換える。
【０７４５】
【化５７】

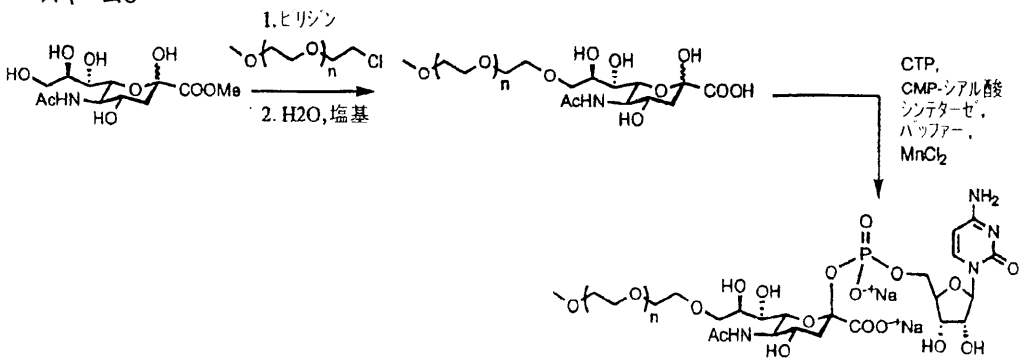
スキーム7



【０７４６】
スキーム８に説明するようなさらなる例示態様では、アミン－およびカルボキシル－保護ノイラミン酸誘導体の１級ヒドロキシル部分を、クロロ－ＰＥＧのような求電子性ＰＥＧを使用してアルキル化する。続いてメチルエステルを開裂し、そしてＰＥＧ－糖をヌクレオチド糖に転換する。
【０７４７】

【化５８】

スキーム8



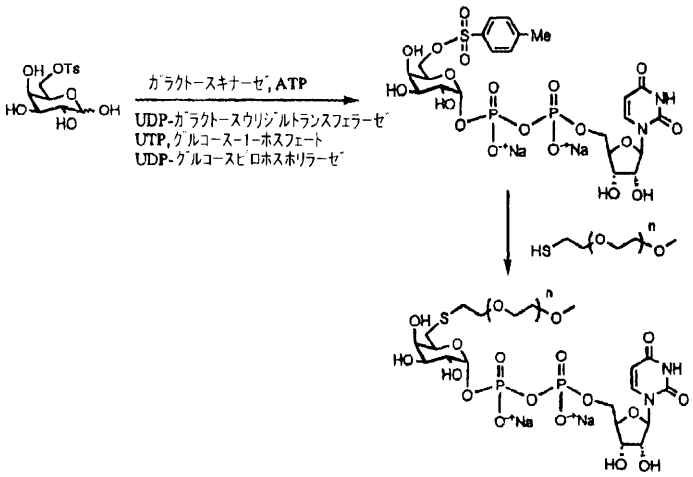
【０７４８】

シアル酸以外のグリカンは、本明細書に説明する方法を使用してＰＥＧで誘導化することができる。誘導化されたグリカンそれ自体が本発明の範囲内である。すなわちスキーム９はＰＥＧ化ガラクトースヌクレオチド糖への例示合成経路を提供する。ガラクトースの１級ヒドロキシル基は対応するトルエンスルホン酸エステルのように活性化され、これは続いてヌクレオチド糖に転換される。

【０７４９】

【化５９】

スキーム9



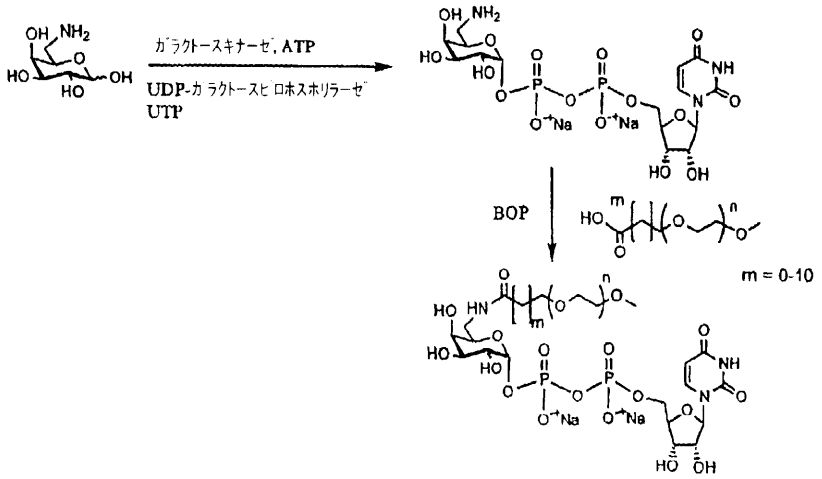
【０７５０】

スキーム１０は、ガラクトース－６－アミン部分に基づくガラクトース－ＰＥＧ誘導体を調製する例示経路を説明する。すなわちガラクトサミンをヌクレオチド糖に転換し、そしてガラクトサミンのアミン部分を活性なＰＥＧ誘導体で官能化する。

【０７５１】

【化６０】

スキーム10



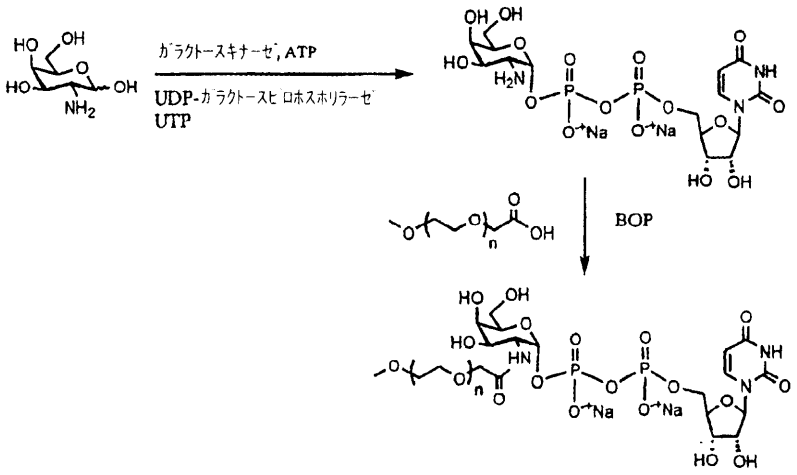
【０７５２】

スキーム１１はガラクトース誘導体の別の例示経路を提供する。スキーム１１の出発点はガラクトース－２－アミンであり、これをヌクレオチド糖に転換する。ヌクレオチド糖のアミン部分は、メトキシ－ＰＥＧ（ｍＰＥＧ）カルボン酸のようなＰＥＧ誘導体を結合するための位置である。

【０７５３】

【化６１】

スキーム11



【０７５４】

本明細書で開示する結合物に結合する部分の例には、限定する訳ではないがＰＥＧ誘導体（例えばアシル－ＰＥＧ、アシル－アルキル－ＰＥＧ、アルキル－アシル－ＰＥＧカルバモイル－ＰＥＧ、アリール－ＰＥＧ、アルキル－ＰＥＧ）、ＰＰＧ誘導体（例えばアシル－ＰＰＧ、アシル－アルキル－ＰＰＧ、アルキル－アシル－ＰＰＧカルバモイル－ＰＰＧ、アリール－ＰＰＧ）、ポリアスパラギン酸、ポリグルタメート、ポリリシン、治療部分、診断部分、マンノース－６－ホスフェート、ヘパリン、ヘパラン、ＳＬｅ^{x}、マンノース、マンノース－６－ホスフェート、シアリルルイスＸ、ＦＧＦ、ＶＦＧＦ、タンパク質（例えばトランスフェリン）、コンドロイチン、ケラタン、デルマタン、デキストラン、修飾されたデキストラン、アミロース、ビスホスフェート、ポリ－ＳＡ、ヒアルロン酸

、ケリタン、アルブミン、インテグリン、アンテナ状オリゴ糖、ペプチド等を含む。種々の修飾基をサッカリド部分に結合する方法は、当業者が容易に入手できるものである（ポリ（エチレングリコールの化学：生物工学的および生物医学的応用（ＰＯＬＹ（ＥＴＨＹＬＥＮＥ　ＧＬＹＣＯＬ　ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ：ＢＩＯＴＥＣＨＮＩＣＡＬ　ＡＮＤ　ＢＩＯＭＥＤＩＣＡＬ　ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ）、Ｊ．Ｍｉｌｔｏｎ　Ｈａｒｒｉｓ編集、プレナム出版社、１９９２；ポリ（エチレングリコール）の化学および生物学的応用（ＰＯＬＹ（ＥＴＨＹＬＥＮＥ　ＧＬＹＣＯＬ）ＣＨＥＭＩＣＡＬ　ＡＮＤ　ＢＩＯＬＯＧＩＣＡＬ　ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ）、Ｊ．Ｍｉｌｔｏｎ　Ｈａｒｒｉｓ編集、ＡＣＳシンポジウムシリーズ、Ｎｏ．６８０、アメリカ化学学会、１９９７；Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ、バイオコンジュゲート技術（ＢＩＯＣＯＮＪＵＧＡＴＥ　ＴＥＣＨＮＩＱＥＳ）、アカデミック出版、サンディエゴ、１９９６；およびＤｕｎｎ　ｅｔ　ａｌ．編集、ポリマー性薬剤および薬剤送達系（ＰＯＬＹＭＥＲＩＣ　ＤＲＵＧＳ　ＡＮＤ　ＤＲＵＧ　ＤＥＬＩＶＥＲＹ　ＳＹＳＴＥＭＳ）、ＡＣＳシンポジウムシリーズ、Ｎｏ．４６９、アメリカ化学学会、ワシントン、Ｄ．Ｃ．１９９１）。

【０７５５】

糖、ヌクレオチド糖および誘導体の精製

上記の方法により生成されたヌクレオチド糖および誘導体は、精製せずに使用することができる。しかし通常、生成物を回収することが好ましい。薄または厚層（ｔｈｉｃｋ　ｌａｙｅｒ）クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、または膜濾過のような標準的な周知技法を使用することができる。膜濾過を使用すること、より好ましくは逆浸透膜を使用することが好ましく、または回収のためにはこれから、そして本明細書に引用する技術文献で検討するように１以上のカラムクロマトグラフィー技術を使用することが好適である。例えば膜濾過（ここで膜は約３０００～約１０，０００の分子量カットオフを有する）を使用して、１０，０００Ｄａ未満の分子量を有する試薬についてタンパク質を取り出すために使用することができる。次に膜濾過または逆浸透を使用して塩を除去し、かつ／または生成物サッカリドを精製するために使用することができる（例えば国際公開第９８／１５５８１号パンフレットを参照にされたい）。ナノフィルター（ｎａｎｏｆｉｌｔｅｒ）膜は１種の逆浸透膜であり、これは使用する膜に依存して１価の塩を通すが、多価の塩および約１００から約２，０００ダルトンより大きい非電荷溶質は保持する。このように典型的な応用では、本発明の方法により調製されるサッカリドは膜内に保持され、そして混入する塩は通過する。

【０７５６】

Ｇ．架橋性基

本発明の方法で使用するための修飾された糖の調製には、修飾基の糖残基への結合、そしてグリコシルトランスフェラーゼの基質となる安定な付加物の形成を含む。このように修飾基を糖へ結合するために架橋剤を使用することが好ましいことが多い。修飾基を炭水化物部分に結合するために使用することができる二官能性化合物の例には、限定するわけではないが二官能性ポリ（エチレングリコール）、ポリアミド、ポリエーテル、ポリエステル等を含む。炭水化物を他の分子に連結するための一般的取り組みは、技術文献にて知られている。例えば、Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２８：１８５６（１９８９）；Ｂｈａｔｉａ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１７８：４０８（１９８９）；Ｊａｎｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１２：８８８６（１９９０）およびＢｅｄｎａｒｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．、国際公開第９２／１８１３５号パンフレットを参照にされたい。以下の考察は反応基が新生の修飾された糖の糖部分上で良性（ｂｅｎｉｇｎ）として処置される。この考察に焦点をあてるのは具体的説明の明瞭性のためである。当業者はこの考察が修飾基上の反応基にも関連すると考えるだろう。

【０７５７】

例示の方法には、ヘテロ二官能性クロスリンカーＳＰＤＰ（ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート）を使用して、保護されたスルフヒドリルの糖

への包含、そして次に修飾基上の別のスルフヒドリルとジスルフィド結合を形成するためにスルフヒドリルの脱保護が関与する。

【０７５８】

ＳＰＤＰがグリコシルトランスフェラーゼの基質として作用する修飾された糖の能力に悪影響を及ぼす場合、２－イミノチオランまたはＮ－スクシンイミジルＳ－アセチルチオアセテート（ＳＡＴＡ）のような多数のクロスリンカーの１つを使用して、ジスルフィド結合を形成する。２－イミノチオランは１級アミンと反応し、即座に非保護スルフヒドリルをアミノ－含有分子に包含する。ＳＡＴＡも１級アミンと反応するが保護されたスルフヒドリルを包含し、これは後にヒドロキシルアミンを使用して脱アセチル化されて遊離のスルフヒドリルを生成する。各々の場合で、包含されたスルフヒドリルは他のスルフヒドリルまたは保護されたスルフヒドリルとＳＰＤＰのように自由に反応し、必要なジスルフィド結合を形成する。

【０７５９】

上記の方法は例であり、そして本発明で使用するリンカーを限定するものではない。修飾基をペプチドに架橋するための様々な方法に使用できる他のクロスリンカーを入手することができる。例えばＴＰＣＨ（Ｓ－（２－チオピリジル）－Ｌ－システインヒドラジドおよびＴＰＭＰＨ（Ｓ－（２－チオピリジル）メルカプト－プロピオノヒドラジド）は、穏和な過ヨウ素酸塩処理により前以て酸化された炭水化物部分と反応し、このようにクロスリンカーのヒドラジド部分と過ヨウ素酸塩が生成したアルデヒドとの間にヒドラゾン結合を形成する。ＴＰＣＨおよびＴＰＭＰＨは２－ピリジルチオン保護スルフヒドリル基を糖に導入し、これはＤＴＴで脱保護することができ、そして次いで成分間にジスルフィド結合を形成するように結合物に使用される。

【０７６０】

ジスルフィド結合が安定な修飾された糖を生成するには適さないことが分かった場合、成分間により安定な結合を包含する他のクロスリンカーを使用することができる。ヘテロ二官能性クロスリンカーＧＭＢＳ（Ｎ－ガンマ－マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミド）およびＳＭＣＣ（スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミド－メチル）シクロヘキサン）は１級アミンと反応し、これがマレイミド基を成分上に導入する。続いてマレイミド基は前に挙げたクロスリンカーにより導入することができる他の成分上のスルフヒドリルと反応し、このようにして成分間に安定なチオエーテル結合を形成する。成分間の立体障害がいずれかの成分の活性または修飾された糖がグリコシルトランスフェラーゼの基質として作用する能力を妨害する場合、成分間に長いスペーサーアームを導入し、そして前に挙げた幾つかのクロスリンカー（例えばＳＰＤＰ）の誘導体を含むクロスリンカーを使用することができる。このように有用な適当なクロスリンカーが豊富に存在し：その各々が最適なペプチド結合物および修飾された糖の生成に及ぼす効果に依存して選択される。

【０７６１】

さまざまな試薬が、分子内の化学的架橋で修飾糖の成分を修飾するために使用される（架橋試薬および架橋結合手順の総説に関しては：Ｗｏｌｄ，Ｆ．Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２５：６２３－６５１，１９７２；Ｗｅｅｔａｌｌ，Ｈ．Ｈ．，ａｎｄ Ｃｏｏｎｅｙ，Ｄ．Ａ．：薬剤としての酵素（ＥＮＺＹＭＥ ＡＳ ＤＲＵＧＳ）で、（Ｈｏｌｃｅｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｒｏｂｅｒｔｓ編集）、第３９５～４４２頁、ウィリー、ニューヨーク、１９８１；Ｊｉ，Ｔ．Ｈ，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．９１：５８０－６０９，１９８３：Ｍａｔｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐ．１７：１６７－１８３，１９９３を参照にされたい（これらすべては引用により本明細書に編入する））。好適な架橋剤は種々のゼロ－長（ｚｅｒｏ－ｌｅｎｇｔｈ）、ホモ－二官能性およびヘテロ－二官能性架橋試薬に由来する。ゼロ－長架橋試薬には、外因性の物質の導入が無い、２つの必須の化学基の直接的結合を含む。ジスルフィド結合の形成を触媒する試薬は、この範疇に属する。別の例はカルボキシルと１級アミノ基の縮合を導入してアミド結合を形成する、カルボジイミド、エチルクロロホルメート、ウッドワード（Ｗｏｏｄｗａｒｄ’ｓ）試薬Ｋ－（２－エチル－５－フェニルイソオキサゾリウム－３’－スルホネート）お

よびカルボニルイミダゾールのような試薬である。これらの化学試薬に加えて、酵素トランスグルタミナーゼ（グルタミル－ペプチドγ－グルタミルトランスフェラーゼ；ＥＣ２．３．２．１３）をゼロ－長の架橋試薬として使用することができる。この酵素は通常、基質として１級アミノ基を用いて、タンパク質－結合グルタミン残基のカルボキサミド基でアシル転移反応を触媒する。好適なホモ－およびヘテロ－二官能性試薬はそれぞれ２つの同一または２つの似ていない部位を含み、これらはアミノ、スルフヒドリル、グアニジノ、インドールまたは非特異的基と反応性となり得る。

【０７６２】

２．架橋試薬中の好適な特異的部位

ａ．アミノ－反応基

１つの好適な態様では、クロス－リンカー上のこの部位はアミノ－反応基である。アミノ－反応基の有用な非限定的例には、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル、イミドエステル、イソシアネート、アシルハライド、アリールアジド、ｐ－ニトロフェニルエステル、アルデヒドおよびスルホニルクロライドを含む。

【０７６３】

ＮＨＳエステルは修飾された糖成分の１級（芳香族を含む）アミノ基と優先的に反応する。ヒスチジンのイミダゾール基は１級アミンと反応を競合するが、反応生成物は不安定であり、そして容易に加水分解される。この反応にはＮＨＳエステルの酸カルボキシル上でアミンの求核的攻撃が関与し、アミドを形成してＮ－ヒドロキシスクシンイミドを放出する。このようにして元のアミノ基の正電荷が失われる。

【０７６４】

イミドエステルは修飾された糖成分のアミン基との反応のための最も特異的なアシル化試薬である。７から１０の間のｐＨで、イミドエステルは１級アミンとのみ反応する。１級アミンは求核的にイミデートを攻撃し、高ｐＨでアミジンに、または低ｐＨで新しいイミデートに分解する中間体を生成する。この新たな中間体は別の１級アミンと反応させることができ、これにより単官能性イミデートが二官能的に反応すると仮定する場合、２つのアミノ基を架橋する。１級アミノとの反応の主な生成物は、元のアミンよりも強力な塩基であるアミジンである。したがって元のアミノ基の正電荷が保持される。

【０７６５】

イソシアネート（およびイソチオシアネート）は修飾された糖成分の１級アミンと反応して、安定な結合を形成する。スルフヒドリル、イミダゾールおよびチロシル基とそれらの反応は、比較的不安定な生成物を生じる。

【０７６６】

アシルアジドもアミノ－特異的試薬として使用され、ここで親和性成分の求核性アミンがわずかにアルカリ性の条件下、例えばｐＨ８．５で酸性カルボキシル基を攻撃する。

【０７６７】

１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンのようなアリールハライドは、修飾された糖成分のアミノ基およびチロシンのフェノール性基と優先的に反応するが、スルフヒドリルおよびイミダゾール基とも反応する。

【０７６８】

モノ－およびジカルボン酸のｐ－ニトロフェニルエステルも有用なアミノ－反応基である。試薬の特異性はそれほど高くないが、α－およびε－アミノ基は最も急速に反応するようである。

【０７６９】

グルタルアルデヒドのようなアルデヒドは、修飾された糖の１級アミンと反応する。不安定なシッフ塩基がアミノ基とアルデヒドのアルデヒドとの反応で形成されるが、グルタルアルデヒドは安定な架橋により修飾糖を修飾することができる。ｐＨ６～８で（このｐＨは典型的な架橋条件である）、環式ポリマーは脱水を受けてα－β不飽和アルデヒドポリマーを形成する。しかしシッフ塩基は別の二重結合と結合した時に安定である。両二重結合の共鳴的相互作用は、シッフ結合の加水分解を防止する。さらに高い局所的濃度でア

ミンはエチレン二重結合を攻撃して安定なマイケル付加生成物を形成することができる。
【０７７０】
芳香族スルホニルクロライドは、修飾された糖成分の種々の部位と反応するが、安定なスルホンアミド結合を生じるアミノ基との反応が最も重要である。
【０７７１】
ｂ．スルフヒドリル－反応基
別の好適な態様では、部位はスルフヒドリル－反応性基である。スルフヒドリル－反応基の有用な非限定的例には、マレイミド、アルキルハライド、ピリジルジスルフィドおよびチオフタルイミドを含む。
【０７７２】
マレイミドは修飾された糖成分のスルフヒドリル基と優先的に反応して安定なチオエーテル結合を形成する。それらはまた、より一層遅い反応速度でヒスチジンの１級アミノ基およびイミダゾール基とも反応する。しかしｐＨ７では、このｐＨで単純なチオールの反応速度は対応するアミンの反応速度よりも１０００倍大きいので、マレイミド基はスルフヒドリルに特異的な基と考えられる。
【０７７３】
アルキルハライドはスルフヒドリル基、スルフィド、イミダゾールおよびアミノ基と反応する。しかし中性からわずかにアルカリ性のｐＨで、アルキルハライドは主にスルフヒドリル基と反応して安定なチオエーテル結合を形成する。より高ｐＨではアミノ基との反応が有利である。
【０７７４】
ピリジルジスルフィドはジスルフィド交換を介して遊離のスルフヒドリルと反応して、混合ジスルフィドを与える。結果としてピリジルジスルフィドは最も特異的なスルフヒドリル－反応基である。
【０７７５】
チオフタルイミドは遊離のスルフヒドリル基と反応してジスルフィドを形成する。
【０７７６】
ｃ．カルボキシル－反応性残基
別の態様では、水および有機溶媒に可溶性のカルボジイミドをカルボキシル－反応試薬として使用する。これらの化合物は遊離のカルボキシル基と反応してプソイドウレアを形成し、次にこれは利用可能なアミンにカップリングしてアミド結合を形成することができる。カルボジイミドを用いてカルボキシル基を修飾する手順は、当該技術分野では周知である（Ｙａｍａｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２０：４８３６－４８４２，１９８１を参照にされたい）。
【０７７７】
３．架橋試薬中の好適な非特異的部位
部位－特異的な反応性部分に加えて、本発明は糖を修飾基に連結するための非特異的な反応性基も企図する。
【０７７８】
非特異的なクロス－リンカーの例には、暗中では完全に不活性な光活性化可能な（ｐｈｏｔｏａｃｔｉｖａｔａｂｌｅ）基を含み、これは適切なエネルギーの光子を吸収すると反応性種に変換される。好適な態様では、光活性化可能な基は、アジドの加熱または光分解で生成するニトレンの前駆体から選択される。電子－欠損ニトレンは極めて反応性であり、そしてＮ－Ｈ、Ｏ－Ｈ、Ｃ－ＨおよびＣ＝Ｃを含む種々の化学結合と反応することができる。３種類のアジド（アリール、アルキルおよびアシル誘導体）を使用することができるが、アリールアジドが現在好適である。光分解でのアリールアジドの反応性は、Ｃ－Ｈ結合よりもＮ－ＨおよびＯＨでより良い。電子－欠損アリールニトレンは急速に環が拡大してデヒドロアゼピンを形成し、これはＣ－Ｈ挿入生成物を形成するよりは求核性物質と反応する傾向がある。アリールアジドの反応性は環中のニトロまたはヒドロキシル基のような電子－吸引置換基の存在により上げることができる。そのような置換はより長い波

長にアリールアジドの最大吸収を支援する（ｐｕｓｈ）。非置換アリールアジドは２６０～２８０ｎｍに範囲の最大吸収を有し、一方、ヒドロキシおよびニトロアリールアジドは３０５ｎｍを越えて有意な光を吸収する。したがってヒドロキシおよびニトロアリールアジドは、非置換アリールアジドよりも親和性成分に関してより害が少ない光分解条件を使用するので最も好ましい。

【０７７９】

別の好適な態様では、光活性化可能な基はフッ素添加されたアリールアジドから選択される。フッ素添加されたアリールアジドの光分解産物はアリールニトレンであり、そのすべてが高い効率でのＣ－Ｈ結合の挿入を含むこの基に特徴的な反応を受ける（Ｋｅａｎａｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．５５：３６４０－３６４７，１９９０）。

【０７８０】

別の態様では、光活性化可能な基はベンゾフェノン残基から選択される。ベンゾフェノン試薬は一般にアリールアジド試薬よりも高い架橋結合収量を与える。

【０７８１】

別の態様では、光活性化可能な基はジアゾ化合物から選択され、これが光分解で電子－欠損カルベンを形成する。これらのカルベンはＣ－Ｈ結合への挿入、二重結合への付加（芳香族系を含む）、水素誘引および求核中心への配位を含む種々の反応を受け、炭素イオンを与える。

【０７８２】

さらに別の態様では、光活性化可能な基はジアゾピルベートから選択される。例えばｐ－ニトロフェニルジアゾピルベートのｐ－ニトロフォニルエステルは脂肪族アミンと反応してジアゾピルビン酸アミドを与え、これは紫外線の光分解を受けてアルデヒドを形成する。光分解したジアゾピルベートで修飾された親和性成分はホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒドのように反応して架橋を形成する。

【０７８３】

４．ホモ二官能性試薬

ａ．第一アミンと反応性のホモ二官能性クロスリンカー

アミン－反応性クロス－リンカーの合成、特性および応用は、技術文献で工業的使用のために記載されている（架橋の手順および試薬の総説については上記を参照にされたい）。多くの試薬が利用可能である（例えば、ピアスケミカル（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ）社、ロックフォード、イリノイ州；シグマケミカル社、セントルイス、モンタナ州；モレキュラープローブス社、ユージーン、オレゴン州）。

【０７８４】

ホモ二官能性ＮＨＳエステルの好適な非限定的例には、ジスクシンイミジルグルタレート（ＤＳＧ）、ジスクシンイミジルスベレート（ＤＳＳ）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（ＢＳ）、ジスクシンイミジルタルトレート（ＤＳＴ）、ジスルホスクシンイミジルタルトレート（スルホ－ＤＳＴ）、ビス－２－（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチルスルホン（ＢＳＯＣＯＥＳ）、ビス－２－（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチルスルホン（スルホ－ＢＳＯＣＯＥＳ）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（ＥＧＳ）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ－ＥＧＳ）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（ＤＳＰ）およびジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（スルホ－ＤＳＰ）を含む。ホモ二官能性イミドエステルの好適な非－限定的例には、ジメチルマロンイミデート（ＤＭＭ）、ジメチルスクシンイミデート（ＤＭＳＣ）、ジメチルアジピミデート（ＤＭＡ）、ジメチルピメリミデート（ＤＭＰ）、ジメチルスベリミデート（ＤＭＳ）、ジメチル－３，３’－オキシジプロピオンイミデート（ＤＯＤＰ）、ジメチル－３，３’－（メチレンジオキシ）ジプロピオンイミデート（ＤＭＤＰ）、ジメチル－３’－（ジメチレンジオキシ）ジプロピオンイミデート（ＤＤＤＰ）、ジメチル－３，３’－（テトラメチレンジオキシ）－ジプロピオンイミデート（ＤＴＤＰ）およびジメチル－３，３’－ジチオビスプロピオンイミデート（ＤＴＢＰ）を含む。

【０７８５】
ホモ二官能性イソチオシアネートの好適な非限定的例には：ｐ－フェニレンジイソチオシアネート（ＤＩＴＣ）、および４，４’－ジイソチオシアノ－２，２’－ジスルホン酸スチルベン（ＤＩＤＳ）を含む。
【０７８６】
ホモ二官能性イソシアネートの好適な非限定的例には、キシレン－ジイソシアネート、トルエン－２，４－ジイソシアネート、トルエン－２－イソシアネート－４－イソチオシアネート、３－メトキシジフェニルメタン－４，４’－ジイソシアネート、２，２’－ジカルボキシ－４，４’－アゾフェニルジイソシアネートおよびヘキサメチレンジイソシアネートを含む。
【０７８７】
ホモ二官能性アリールハライドの好適な非限定的例には、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン（ＤＦＤＮＢ）、および４，４’－ジフルオロ－３，３’－ジニトロフェニル－スルホンを含む。
【０７８８】
ホモ二官能性脂肪族アルデヒド試薬の好適な非限定的例には、グリオキサール、マロンジアルデヒドおよびグルタルアルデヒドを含む。
【０７８９】
ホモ二官能性アシル化試薬の好適な非限定的例には、ジカルボン酸のニトロフェニルエステルを含む。
【０７９０】
ホモ二官能性芳香族スルホニルクロライドの好適な非限定的例には、フェノール－２，４－ジスルホニルクロライドおよびα－ナフトール－２，４－ジスルホニルクロライドを含む。
【０７９１】
さらなるアミノ－反応性ホモ二官能性試薬の好適な非限定的例には、アミンと反応してビスカルバメートを与えるエリトリトールビスカルボネートを含む。
【０７９２】
ｂ．遊離スルフヒドリル基と反応性のホモ二官能性クロスリンカー
そのような試薬の合成、特性および応用は、技術文献に記載されている（架橋の手順および試薬の総説については上記を参照にされたい）。多くの試薬が市販されている（例えば、ピアスケミカル社、ロックフォード、イリノイ州；シグマケミカル社、セントルイス、モンタナ州；モレキュラープローブス社、ユージーン、オレゴン州）。
【０７９３】
ホモ二官能性マレイミドの好適な非限定的例には、ビスマレイミドヘキサン（ＢＭＨ）、Ｎ，Ｎ’－（１，３－フェニレン）ビスマレイミド、Ｎ，Ｎ’－（１，２－フェニレン）ビスマレイミド、アゾフェニルジマレイミドおよびビス（Ｎ－マレイミドメチル）エーテルを含む。
【０７９４】
ホモ二官能性ピリジルジスルフィドの好適な非限定的例には、１，４－ジ－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミドブタン（ＤＰＤＰＢ）を含む。
【０７９５】
ホモ二官能性アルキルハライドの好適な非限定的例には、２，２’－ジカルボキシ－４，４’－ジヨードアセトアミドアゾベンゼン、α，α’－ジヨード－ｐ－キシレンスルホン酸、α，α’－ジブロモ－ｐ－キシレンスルホン酸、Ｎ，Ｎ’－ビス（ｂ－ブロモメチル）ベンジルアミン、Ｎ，Ｎ’－ジ（ブロモアセチル）フェニルヒドラジンおよび１，２－ジ（ブロモアセチル）アミノ－３－フェニルプロパンを含む。
【０７９６】
ｃ．ホモ二官能性の光活性化可能なクロスリンカー
そのような試薬の合成、特性および応用は、技術文献に記載されている（架橋の手順お

よび試薬の総説については上記を参照にされたい）。数種の試薬が市販されている（例えば、ピアスケミカル社、ロックフォード、イリノイ州；シグマケミカル社、セントルイス、モンタナ州；モレキュラープローブス社、ユージーン、オレゴン州）。

【０７９７】

ホモ二官能性の光活性化可能なクロスリンカーの好適な非限定的例には、ビス－β－（４－アジドサリチルアミド）エチルジスルフィド（ＢＡＳＥＤ）、ジ－Ｎ－（２－ニトロ－４－アジドフェニル）－シスタミン－Ｓ，Ｓ－ジオキシド（ＤＮＣＯ）および４，４’－ジチオビスフェニルアジドを含む。

【０７９８】

５．ヘテロ二官能性試薬

ａ．ピリジルジスルフィド部分を持つアミノ－反応性ヘテロ二官能性試薬

そのような試薬の合成、特性および応用は、技術文献に記載されている（架橋結合の手順および試薬の総説については上記を参照にされたい）。多くの試薬が市販されている（例えば、ピアスケミカル社、ロックフォード、イリノイ州；シグマケミカル社、セントルイス、モンタナ州；モレキュラープローブス社、ユージーン、オレゴン州）。

【０７９９】

ピリジルジスルフィド部分およびアミノ－反応性ＮＨＳエステルを持つヘテロ二官能性試薬の好適な非限定的例には、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、スクシンイミジル６－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオンアミドヘキサノエート（ＬＣ－ＳＰＤＰ）、スルホスクシンイミジル６－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオンアミドヘキサノエート（スルホ－ＬＣＳＰＤＰ）、４－スクシンイミジルオキシカルボニル－α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルエン（ＳＭＰＴ）およびスルホスクシンイミジル６－α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルアミドヘキサノエート（スルホ－ＬＣ－ＳＭＰＴ）を含む。

【０８００】

ｂ．マレイミド部分を持つアミノ－反応性ヘテロ二官能性試薬

そのような試薬の合成、特性および応用は、技術文献に記載されている。マレイミド部分およびアミノ－反応性ＮＨＳエステルを持つヘテロ二官能性試薬の好適な非限定的例には、スクシンイミジルマレイミジルアセテート（ＡＭＡＳ）、スクシンイミジル３－マレイミジルプロピオネート（ＢＭＰＳ）、Ｎ－γ－マレイミドブチリルオキシスクシンイミドエステル（ＧＭＢＳ）Ｎ－γ－マレイミドブチリルオキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＧＭＢＳ）スクシンイミジル６－マレイミジルヘキサノエート（ＥＭＣＳ）、スクシンイミジル３－マレイミジルベンゾエート（ＳＭＢ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＭＢＳ）、スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、スルホスクシンイミジル　４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ＳＭＣＣ）、スクシンイミジル　４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（ＳＭＰＢ）およびスルホスクシンイミジル　４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（スルホ－ＳＭＰＢ）を含む。

【０８０１】

ｃ．アルキルハライド部分を持つアミノ－反応性ヘテロ二官能性試薬

そのような試薬の合成、特性および応用は、技術文献に記載されている。アルキルハライド部分およびアミノ－反応性ＮＨＳエステルを持つヘテロ二官能性試薬の好適な非限定的例には、Ｎ－スクシンイミジル－（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（ＳＩＡＢ）、スルホスクシンイミジル－（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（スルホ－ＳＩＡＢ）、スクシンイミジル－６－（ヨードアセチル）アミノヘキサノエート（ＳＩＡＸ）、スクシンイミジル－６－（６－（（ヨードアセチル）－アミノ）ヘキサノイルアミノ）ヘキサノエート（ＳＩＡＸＸ）、スクシンイミジル－６－（（（４－ヨードアセチル）－アミノ）－メチル）－シクロヘキサン－１－カルボニル）アミノヘキサノエート（Ｓ

ＩＡＣＸ）およびスクシンイミジル－４（（ヨードアセチル）－アミノ）－メチルシクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＩＡＣ）を含む。

【０８０２】

アミノ－反応性ＮＨＳエステルおよびアルキルジハライド部分を持つヘテロ二官能性試薬の好適な例には、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル　２，３－ジブロモプロピオネート（ＳＤＢＰ）を含む。ＳＤＢＰは、クロスリンカーをアミノ基に結合することにより親和性成分に分子内クロスリンカーを導入する。１級アミン基に対するジブロモプロピオニル部分の反応性は、反応温度により制御される（ＭｃＫｅｎｚｉｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｈｅｍ．７：５８１－５９２（１９８８））。

【０８０３】

アルキルハライド部分およびアミノ－反応性ｐ－ニトロフェニルエステル部分を持つヘテロ二官能性試薬の好適な非限定的例には、ｐ－ニトロフェニルヨードアセテート（ＮＰＩＡ）を含む。

【０８０４】

他の架橋結合剤も当業者に知られている。例えばＰｏｍａｔｏ　ｅｔ　ａｌ．、米国特許第５，９６５，１０６号明細書を参照にされたい。特定の応用のための適切な架橋剤を選択する能力は、当業者の能力の範囲内である。

【０８０５】

ｄ．開裂性リンカー基

さらなる態様では、リンカー基には開裂して糖残基から修飾基を放出することができる基が提供される。多くの開裂性基が当該技術分野では知られている。例えばＪｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ　７６１：１５２－１６２（１９８３）；Ｊｏｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５：１４５１８－１４５２５（１９９０）；Ｚａｒｌｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２４：９１３－９２０（１９８０）；Ｂｏｕｉｚａｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１５５：１４１－１４７（１９８６）；Ｐａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６１：２０５－２１０（１９８６）；Ｂｒｏｗｎｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４３：１８５９－１８６７（１９８９）を参照にされたい。さらに広範な開裂性の二官能性（ホモ－およびヘテロ－二官能性の両方）リンカー基がピアスのような供給元から市販されている。

【０８０６】

例示する開裂性部分は、光、熱またはチオール、ヒドロキシルアミン、塩基、過ヨウ素酸塩等のような試薬を使用して開裂することができる。さらに特定の好適な基はエンドサイトーシスされる反応でインビボで開裂される（例えばシス－アコニチル；Ｓｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．１０２：１０４８（１９９１）を参照にされたい）。好適な開裂性基は、ジスルフィド、エステル、イミド、カーボネート、ニトロベンジル、フェナシルおよびベンゾイン基からなる群から選択される員である開裂性部分を含んでなる。

【０８０７】

ｅ．修飾された糖のペプチドへの結合

修飾された糖は、結合を媒介する適切な酵素を使用してグリコシル化または非グリコシル化ペプチドに結合される。好ましくは修飾された供与体の糖（１つまたは複数）、酵素（１つまたは複数）および受容体ペプチド（１つまたは複数）の濃度は、受容体が消費されるまでグリコシル化が進行するように選択される。以下に検討する考察は、シアリルトランスルフェラーゼの内容について説明すると同時に、一般に他のグリコシルトランスフェラーゼ反応に応用することできる。

【０８０８】

グリコシルトランスフェラーゼを使用して所望のオリゴ糖構造を合成する多数の方法が知られており、そして一般に本発明に応用することができる。例示方法は例えば、国際公開第９６／３２４９１号パンフレット、Ｉｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｕｒｅ　Ａｐｐｌ．Ｃ

ｈｅｍ．６５：７５３（１９９３）、および米国特許第５，３５２，６７０号、同第５，３７４，５４１号および同第５，５４５，５５３明細書に記載されている。

【０８０９】

本発明は単一のグリコシルトランスフェラーゼまたはグリコシルトランスフェラーゼの組み合わせを使用して実施される。例えばシアリルトランスフェラーゼおよびガラクトシルトランスフェラーゼの組み合わせを使用することができる。１以上の酵素を使用するそれらの態様では、酵素および基質は好ましくは最初の反応混合物で合わせられるか、または第２の酵素反応用の酵素および試薬はいったん第１酵素反応が完了したら、またはほぼ完了したら反応媒質に加えられる。２つの酵素反応を１つの反応槽で順次行うことにより、中間体種が単離される手順よりも全体的な収量が改善する。さらに過剰な溶媒および副産物の洗浄および廃棄が減少する。

【０８１０】

好適な態様では、各第１および第２酵素がグリコシルトランスフェラーゼである。別の好適な態様では、１つの酵素がエンドグリコシダーゼである。別の好適な態様では、１つの酵素がエキソグリコシダーゼである。さらに好適な態様では、２より多くの酵素を使用して本発明の修飾された糖タンパク質を集成する。酵素は、修飾された糖をペプチドに加える前または後の任意の時点で、ペプチド上のサッカリド構造を改変させるために使用する。

【０８１１】

別の好適な態様では、少なくとも２つの酵素がグリコシルトランスフェラーゼであり、そしてペプチドのサッカリド構造に加えられる最後の糖は修飾されていない糖である。代わりに修飾された糖がグリカン構造の内部にあり、したがってグリカン上に最終的な糖は必要ない。例示態様では、ガラクトシルトランスフェラーゼはＧａｌ－ＰＥＧのＵＤＰ－Ｇａｌ－ＰＥＧからグリカンへの転移を触媒することができ、続いてＳＴ３Ｇａｌ３およびＣＭＰ－ＳＡ（これは「キャッピング」する非修飾シアル酸をグリカンに加えるために役立つ）の存在下でインキューベーションする（図２２Ａ）。

【０８１２】

別の態様では、使用する少なくとも２つの酵素がグリコシルトランスフェラーゼであり、そして少なくとも２つの修飾された糖がペプチド上のグリカン構造に加えられる。この様式で、２以上の異なる複合糖質をペプチド上の１以上のグリカンに加えることができる。この方法は、２以上の機能的に異なる修飾された糖を有するグリカン構造を生成する。例示態様では、ペプチドとＧｎＴ－Ｉ、ＩＩとＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃ－ＰＥＧとのインキューベーションは、ＧｌｃＮＡｃ－ＰＥＧ分子をグリカンに付加するために役立ち；次いでガラクトシルトランスフェラーゼとＵＤＰ－Ｇａｌのインキューベーションは、Ｇａｌ残基をそれに付加するために役立ち；そしてＳＴ３Ｇａｌ３とＣＭＰ－ＳＡ－Ｍａｎ－６－ホスフェートのインキューベーションは、ＳＡ－マンノース－６－ホスフェート分子のグリカンへの付加に役立つ。この反応順序で、ＰＥＧ化グリカンの機能的特徴ならびにマンノース－６－ホスフェート標的化活性を有するグリカン鎖をもたらす（図２２Ｂ）。

【０８１３】

別の態様では、反応に使用する少なくとも２つの酵素がグリコシルトランスフェラーゼであり、そしてここでも異なる修飾された糖がペプチド上のＮ－結合およびＯ－結合グリカンに加えられる。この態様は２つの異なる修飾された糖がペプチドのグリカンに加えられるようになる時、しかしペプチド上の修飾された糖を互いに空間的に離すことが重要である時に特に有用である。例えば修飾された糖が、限定するわけではないがＰＥＧおよびリンカー分子のような他の分子を含む嵩高の分子を含んでなる時、この方法が好ましいかもしれない。修飾された糖はペプチド上のグリカン構造に同時に加えるか、またはそれらを順次加えてもよい。例示態様では、ＳＴ３Ｇａｌ３およびＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧとのインキューベーションは、シアル酸－ＰＥＧをＮ－結合グリカンに加えるために役立つが、ＳＴ３Ｇａｌ１およびＣＭＰ－ＳＡ－ビスホスホネートとのインキューベーションはシアル酸－ビスホスホネートをＯ－結合グリカンへ加えるために役立つ（図２２Ｃ）。

【０８１４】
別の態様では、この方法は１以上のエキソ－またはエンド－グリコシダーゼを使用する。グリコシダーゼは典型的には突然変異体であり、これはグリコシル結合を破壊というようは形成するように工作されている。突然変異体のグリカナーゼは時折、グリコシンターゼと呼ばれるが、典型的には活性部位の酸性アミノ酸残基にアミノ酸残基の置換を含む。例えばエンドグリカナーゼがエンド－Ｈである時、置換される活性部位の残基は典型的には１３０位のＡｓｐ、１３２位のＧｌｕ、またはそれらの組み合わせである。アミノ酸は一般にセリン、アラニン、アスパラギンまたはグルタミンに置換される。トランスシアリリダーゼのようなエキソグリコシダーゼも有用である。
【０８１５】
突然変異酵素は通常、エンドグリカナーゼの加水分解工程の逆反応に準じる合成工程により反応を触媒する。これらの態様では、グリコシル供与体分子（例えば所望するオリゴ－またはモノ－サッカリド構造）が脱離基を有し、そして反応は供与体分子をタンパク質上のＧｌｃＮＡｃ残基へ加えることにより進行する。例えば脱離基はフルオリドのようなハロゲンであることができる。別の態様では脱離基はＡｓｎまたはＡｓｎ－ペプチド部分である。さらなる態様では、グリコシル供与体分子上のＧｌｃＮＡｃ残基が修飾される。例えばＧｌｃＮＡｃ残基は１，２オキサゾリン部分を含んでなることができる。
【０８１６】
好適な態様では、本発明の結合物を生成するために使用する各酵素は触媒量で存在する。特定酵素の触媒量は、その酵素基質の濃度ならびに温度、時間、ｐＨ値のような反応条件に従い変動する。予め選択した基質濃度および反応条件下での所定の酵素の触媒量を決定する手段を、当業者は周知である。
【０８１７】
上記方法が行なわれる温度は、ちょうど凍結より上から最も感受性の酵素が変性する温度までの範囲で変動することができる。好適な温度範囲は約０℃から約５５℃、そしてより好ましくは約３０℃から約３７℃である。別の例示態様では、本方法の１以上の成分が好熱性酵素を使用して高温で行われる。
【０８１８】
反応混合物は受容体がグリコシル化されるために十分な時間、維持され、これにより所望の結合物を形成する。結合物の中にはしばしば数時間後に検出できるものもあり、回収可能な量は通常、２４時間以内に得られる。当業者は反応速度は多数の可変性因子（例えば、酵素濃度、供与体濃度、受容体濃度、温度、溶媒容量）に依存し、これは選択する系に至適化されると理解している。
【０８１９】
本発明は修飾されたペプチドの工業的規模の生産も提供する。本明細書で使用するように、工業的規模では一般に少なくとも１グラムの完成され、精製された結合物が生産される。
【０８２０】
以下の検討では、本発明は修飾されたシアル酸分子のグリコシル化ペプチドへの結合により例示される。例示する修飾されたシアル酸はＰＥＧで標識される。以下の検討をＰＥＧ－修飾シアル酸およびグリコシル化ペプチドの使用に焦点をあてるのは具体的説明の明瞭さのためであり、本発明がこれら２つのパートナーの結合に限定されることを意味するものではない。当業者はこの検討が一般にシアル酸以外の修飾されたグリコシル部分の付加に応用できることを理解している。さらにこの検討は他の水溶性ポリマー、治療部分および生体分子を含むＰＥＧ以外の作用物質を含むグリコシル単位の修飾にも等しく応用できる。
【０８２１】
酵素的取り組みは、ＰＥＧ化またはＰＰＧ化炭水化物のペプチドまたは糖ペプチドへの選択的導入に使用することができる。この方法はＰＥＧ、ＰＰＧ、または遮蔽された反応性官能基を含む修飾された糖を利用し、そして適切なグリコシルトランスフェラーゼまた

はグリコシンターゼと組み合わせる。所望する炭水化物結合を作るグリコシルトランスフェラーゼを選択し、そして供与体基質として修飾された糖を利用することにより、ＰＥＧまたはＰＰＧをペプチド骨格に、糖ペプチドに既存の糖残基に、またはペプチドに加えられた糖残基に直接導入することができる。

【０８２２】

シアリルトランスフェラーゼの受容体は本発明の方法により修飾されるペプチド上に、天然に存在する構造として、または組換え的に、酵素的にまたは化学的にそこに配置されたものとして存在する。適当な受容体には例えばＧａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ１，４ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ１，３ＧａｌＮＡｃ、ラクト－Ｎ－テトラオース、Ｇａｌβ１，３ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ１，３Ａｒａ、Ｇａｌβ１，６ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ１，４Ｇｌｃ（ラクトース）のようなガラクトシル受容体、および当業者に知られている他の受容体を含む（例えば、Ｐａｕｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５３：５６１７－５６２４（１９７８）を参照にされたい）。

【０８２３】

１つの態様では、シアリルトランスフェラーゼの受容体は修飾されるペプチド上にペプチドのインビボ合成で存在する。そのようなペプチドは、ペプチドのグリコシル化パターンの前修飾無しで特許請求する方法を使用してシアリル化することができる。あるいは本発明の方法を使用して、適切な受容体を含まないペプチドをシアリル化することができ；最初にペプチドを当該技術分野で既知の方法により受容体を含むように修飾する。例示態様では、ＧａｌＮＡｃ残基をＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼの作用により加える。

【０８２４】

例示態様では、ガラクトシル受容体はガラクトース残基をペプチドに連結された適切な受容体（例えばＧｌｃＮＡｃ）に結合することにより集成する。この方法には修飾されるペプチドを適当量のガラクトシルトランスフェラーゼ（例えばｇａｌβ１，３またはｇａｌβ１，４）および適当なガラクトシル供与体（例えばＵＤＰ－ガラクトース）を含む反応混合物とインキューベーションすることを含む。反応は実質的に完了するまで進行するように行うか、あるいは反応は前以て選択した量のガラクトース残基が加えられた時に終了する。選択したサッカリド受容体を集成する他の方法は、当業者には明らかである。

【０８２５】

さらに別の態様では、ペプチド－結合オリゴ糖は最初に全体的または部分的「改作（ｔｒｉｍｍｅｄ」されて、シアリルトランスフェラーゼの受容体または適当な受容体を得るために１以上の適切な残基を加えることができる部分のいずれかを露出する。グリコシルトランスフェラーゼおよびエンドグリコシダーゼのような酵素（例えば米国特許第５，７１６，８１２号明細書を参照にされたい）は、付加および改作反応に有用である。「改作」およびＮ－結合およびＯ－結合グリカンの改造に関する詳細な検討は、本文献のいたるところに提供されている。

【０８２６】

以下の検討では、本発明の方法が水溶性ポリマーを結合した修飾された糖の使用により例示される。これに焦点をあてるのは具体的説明の明瞭さのためである。当業者はこの検討は修飾される糖が治療部分、生体分子等を持つ態様にも等しく関連すると考えるだろう。

【０８２７】

修飾される糖を加える前に炭水化物残基が「改作」される本発明の例示態様を図１３に説明し、これは高マンノースが第１世代の２アンテナ構造に戻し改作されるスキームを説明する。水溶性ポリマーを持つ修飾された糖は、「戻し改作（ｔｒｉｍｍｉｎｇ ｂａｃｋ」により露出した１以上の糖残基に結合される。１つの態様では水溶性ポリマーは水溶性ポリマーに結合したＧｌｃＮＡｃ部分を介して加えられる。修飾されるＧｌｃＮＡｃは２アンテナ構造の１または両末端マンノース残基に付けられる。あるいは非修飾ＧｌｃＮＡｃを分岐種の１または両末端に加えることができる。

【０８２８】

別の例示態様では、水溶性ポリマーが、末端マンノース残基上に加えられるＧｌｃＮＡｃ残基に結合するガラクトース残基を有する修飾された糖を介して、２アンテナ構造の１または両方の末端マンノース残基に加えられる。あるいは非修飾Ｇａｌを１または両方の末端ＧｌｃＮＡｃ残基に加えることができる。

【０８２９】

さらなる態様では、水溶性ポリマーが修飾されたシアル酸を使用してＧａｌ残基に加えられる。

【０８３０】

別の例示態様を図１４で説明し、これは図１３に示すスキームと同様であり、ここで高マンノース構造がマンノースに「戻し改作」され、それから２アンテナ構造が分岐する。１例では、水溶性ポリマーがポリマーで修飾されたＧｌｃＮＡｃを介して加えられる。あるいは非修飾ＧｌｃＮＡｃをマンノースに加え、続いて結合した水溶性ポリマーを持つＧａｌを加える。さらに別の態様では、非修飾ＧｌｃＮＡｃおよびＧａｌ残基を順次マンノースに加え、続いて水溶性ポリマーで修飾したシアル酸部分を加える。

【０８３１】

図１５は図１３に類似したスキームを使用してさらなる例示態様を説明し、ここで高マンノースをＧｌｃＮＡｃに「戻し改作」し、これに第１マンノースを結合させる。ＧｌｃＮＡｃは水溶性ポリマーを持つＧａｌ残基に結合する。あるいは非修飾ＧａｌをＧｌｃＮＡｃに加え、続いて水溶性糖で修飾したシアル酸を加える。さらなる例では、末端ＧｌｃＮＡｃをＧａｌに結合し、そして続いてＧｌｃＮＡｃを水溶性ポリマーを持つ修飾されたフコースでフコシル化する。

【０８３２】

図１６は図１３に示したものに類似するスキームであり、ここで高マンノースはペプチドのＡｓｎに結合した第１ＧｌｃＮＡｃに戻し改作される。１例では、ＧｌｃＮＡｃ－（Ｆｕｃ）$_{a}$残基のＧｌｃＮＡｃを、水溶性ポリマー持つＧｌｃＮＡｃに結合させる。別の例では、ＧｌｃＮＡｃ－（Ｆｕｃ）$_{a}$残基のＧｌｃＮＡｃを、水溶性ポリマーを持つＧａｌで修飾する。さらに別の態様では、ＧｌｃＮＡｃをＧａｌで修飾し、続いて水溶性ポリマーで修飾したシアル酸をＧａｌに結合する。

【０８３３】

別の例示態様を図１７～２１に説明する。本発明を実施することができる反応型の順序の説明は、前述の各図面に提供されている。

【０８３４】

上で説明した例は、本明細書で説明する方法の威力の具体的説明を提供する。本発明の方法を使用して「戻し工作」し、そして実質的に任意の所望する構造の炭水化物残基に構築することが可能である。修飾された糖は上記に説明したように炭水化物部分の末端に加えることができ、あるいはこれはペプチドコアと炭水化物の末端との間の中間体となることができる。

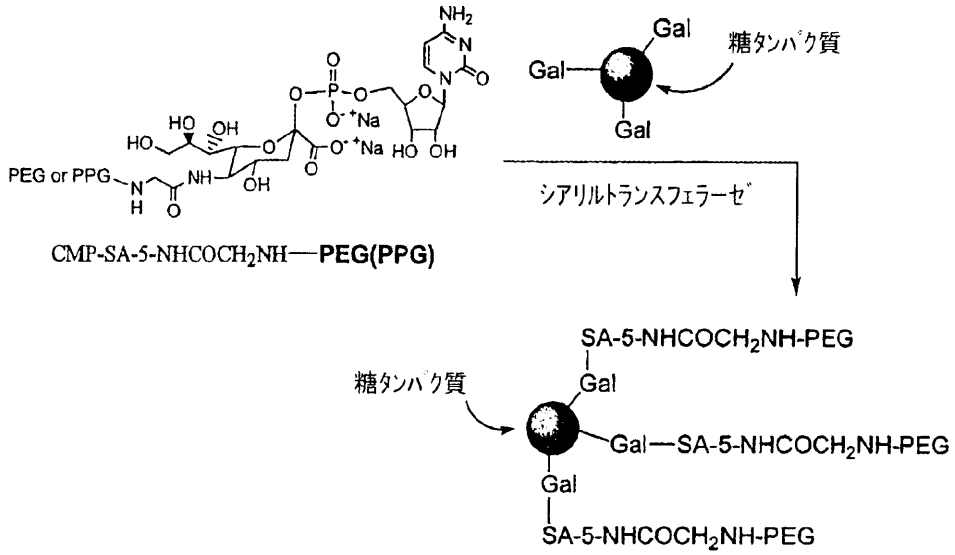
【０８３５】

例示態様では、既存のシアル酸はシアリダーゼを使用して糖ペプチドから除去し、これにより元となるガラクトシル残基のすべてまたはほとんどを露出する（ｕｎｍａｓｋｉｎｇ）。あるいはペプチドもしくは糖ペプチドをガラクトース残基、あるいはガラクトース単位で終了したオリゴ糖残基で標識する。ガラクトース残基を露出または付加した後、適切なシアリルトランスフェラーゼを使用して修飾されたシアル酸を加える。この取り組みをスキーム１２にまとめる。

【０８３６】

【化６２】

スキーム12



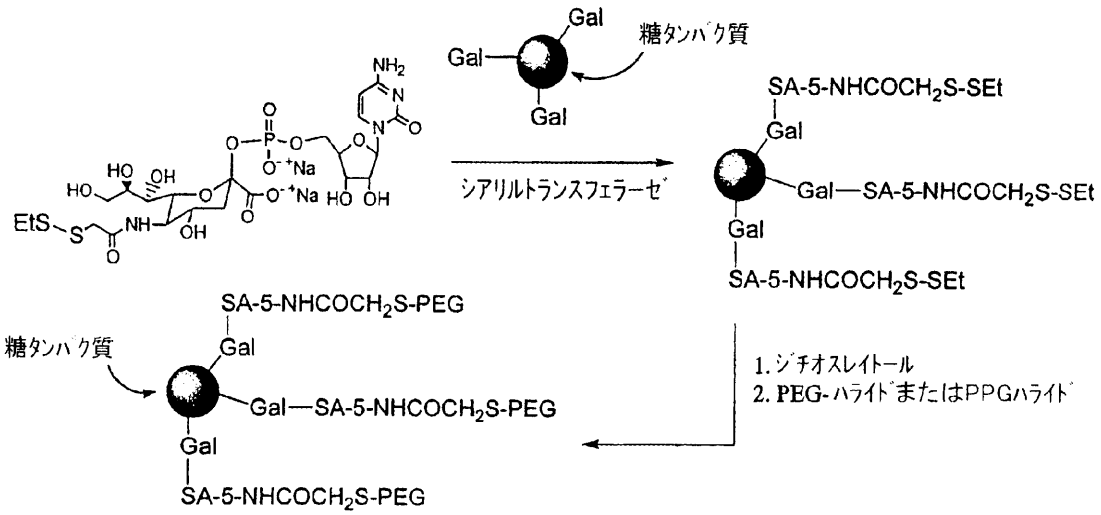
【０８３７】

スキーム１３にまとめるさらなる取り組みでは、遮蔽した反応性官能基がシアル酸上に存在する。遮蔽した反応基は好ましくは、修飾されたシアル酸をペプチドに結合するために使用する条件に影響を受けない。修飾されたシアル酸のペプチドへの共有結合後、遮蔽を除き、そしてペプチドをＰＥＧ、ＰＰＧ、治療部分、生体分子または他の作用物質と結合させる。作用物質は、修飾された糖残基上の露出した反応基との反応により特異的様式でペプチドに結合する。

【０８３８】

【化６３】

スキーム13



【０８３９】

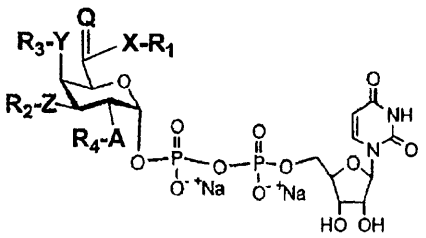
任意の修飾された糖は、糖ペプチドのオリゴ糖側鎖の末端糖に依存して、それに適切な

グリコシルトランスフェラーゼと使用することができる（表３）。上で検討したように、ＰＥＧ化またはＰＰＧ化構造の導入に必要な糖ペプチドの末端糖は、発現中に天然に導入できるか、あるいは適切なグリコシダーゼ（１つまたは複数）、グリコシルトランスフェラーゼ（１つまたは複数）またはグリコシダーゼ（１つまたは複数）およびグリコシルトランスフェラーゼ（１つまたは複数）の混合を使用して発現後に生成することができる。

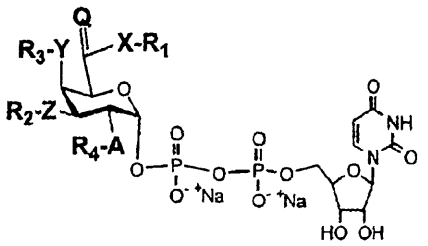
【０８４０】

【表３】

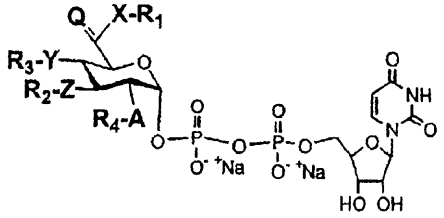
表3



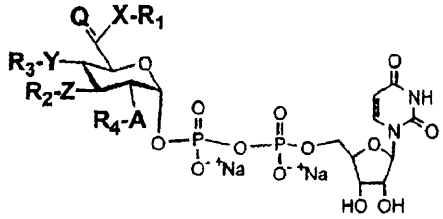
UDP-ｶﾞﾗｸﾄｰｽｰ誘導体



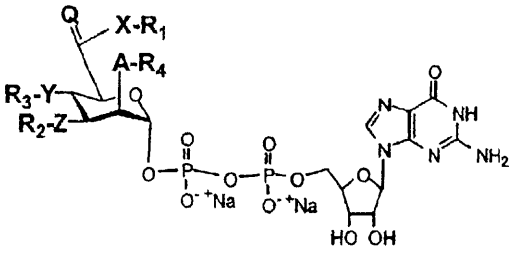
UDP-ｶﾞﾗｸﾄｻﾐﾝｰ誘導体
(A＝NHである時，R_4はｱｾﾁﾙであることができる)



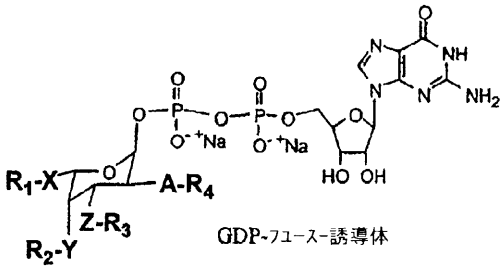
UDP-ｸﾞﾙｺｰｽｰ誘導体



UDP-ｸﾞﾙｺｻﾐﾝｰ誘導体
(A＝NHである時，R_4はｱｾﾁﾙであることができる)



GDP-ﾏﾝﾉｰｽｰ誘導体



GDP-ﾌｭｰｽｰ誘導体

X＝O, NH, S, CH_2, N-$(R_1\text{-}5)_2$. Y＝X; Z＝X; A＝X; B＝X. Q＝H_2, O, S, NH, N-R. R, $R_{1\text{-}4}$＝H, ﾘﾝｶｰ -M, M. M＝問題のﾘｶﾞﾝﾄﾞ	問題のﾘｶﾞﾝﾄﾞ＝ｱｼﾙ-PEG, ｱｼﾙ-PPG, ｱﾙｷﾙ-PEG, ｱｼﾙ-ｱﾙｷﾙ-PEG, ｱｼﾙ-ｱﾙｷﾙ-PEG, ｶﾙﾊﾞﾓｲﾙ-PEG, ｶﾙﾊﾞﾓｲﾙ-PPG, PEG, PPG, ｱｼﾙ-ｱﾘｰﾙ-PEG, ｱｼﾙ-ｱﾘｰﾙ-PPG, ｱﾘｰﾙ-PEG, ｱﾘｰﾙ-PPG, ﾏﾝﾉｰｽ-6-ﾎｽﾌｪｰﾄ, ﾍﾊﾟﾘﾝ, ﾍﾊﾟﾗﾝ, Slex, ﾏﾝﾉｰｽ, FGF, VFGF, ﾀﾝﾊﾟｸ質, ｺﾝﾄﾞﾛｲﾁﾝ, ｹﾗﾀﾝ, ﾃﾞﾙﾏﾀﾝ, ｱﾙﾌﾞﾐﾝ, ｲﾝﾃｸﾞﾘﾝ, ﾍﾌﾟﾁﾄﾞ等。

【０８４１】

さらなる例示態様では、ＵＤＰ－ガラクトース－ＰＥＧを牛乳のβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼと反応させ、これにより修飾されたガラクトースを適切な末端Ｎ－アセチルグルコサミン構造に転移させる。糖ペプチドの末端Ｇｌｃ ＮＡｃ残基は、哺乳動物、昆虫、植物または真菌のような発現系で起こるように発現中に生成され得るが、糖ペプチドを必要に応じてシアリダーゼおよび／またはグリコシダーゼおよび／またはグリコ

シルトランスフェラーゼで処理することにより生成することもできる。

【０８４２】

別の例示態様では、ＧｎＴＩ－ＶのようなＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼをＰＥＧ化－ＧｌｃＮＡｃを糖ペプチドのマンノース残基に転移するために利用する。さらなる例示態様では、Ｎ－および／またはＯ－結合グリカン構造を糖ペプチドから酵素的に除去してアミノ酸または末端グリコシル残基を露出し、次いでこれを修飾された糖に結合する。例えばエンドグリカナーゼを使用して糖ペプチドのＮ－結合構造を除去して、末端ＧｌｃＮＡｃを糖ペプチド上のＧｌｃＮＡｃ－結合－Ａｓｎとして露出する。ＵＤＰ－Ｇａｌ－ＰＥＧおよび適切なガラクトシルトランスフェラーゼを使用してＰＥＧ－またはＰＰＧ－ガラクトース官能基を露出したＧｌｃＮＡｃ上に導入する。

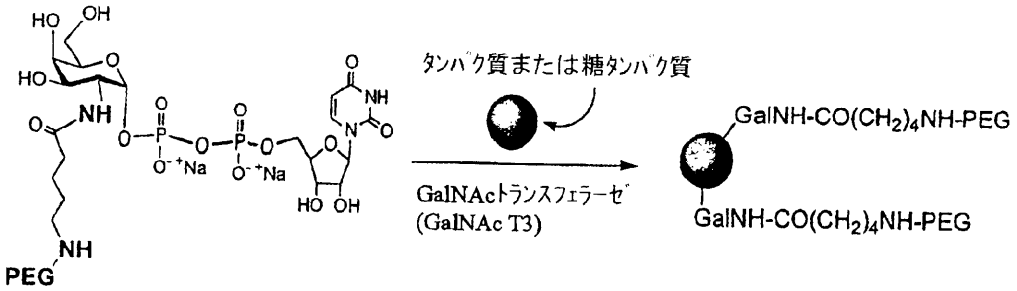
【０８４３】

別の態様では、修飾された糖は糖残基をペプチド骨格に転移することが知られているグリコシルトランスフェラーゼを使用してペプチド骨格に直接加える。この例示態様はスキーム１４で説明する。本発明を実施するために有用なグリコシルトランスフェラーゼの例には、限定するわけではないがＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼ（ＧａｌＮＡｃＴ１－１４）、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、キシロシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ等を含む。この取り組みの使用は、炭水化物を欠くペプチド上へ、あるいは既存の糖ペプチド上への修飾された糖の直接的付加を可能とする。両方の場合で、修飾された糖の付加はグルコシルトランスフェラーゼの基質特異性により定められるペプチド骨格上の特異的な位置で起こり、そして化学的な方法を使用したタンパク質のペプチド骨格の修飾中に起こる様式のような無作為の様式では起こらない。適当なアミノ酸配列をペプチド鎖に工作することにより、多くの作用物質がグルコシルトランスフェラーゼの基質ペプチド配列を欠くタンパク質または糖ペプチドに導入され得る。

【０８４４】

【化６４】

スキーム14



【０８４５】

上に説明した各例示態様では、１以上のさらなる化学的または酵素的修飾工程を、修飾された糖がペプチドに結合した後に利用することができる。例示態様では、酵素（例えばフコシルトランスフェラーゼ）を使用してグルコシル単位（例えばフコース）をペプチドに結合した末端修飾糖に付加（ａｐｐｅｎｄ）する。別の例では酵素反応を利用して修飾された糖が結合できなかった部位を「キャップ」する。あるいは化学反応を利用して結合した修飾糖の構造を改変させる。例えば結合した修飾糖を、修飾糖が結合しているペプチド成分との結合を安定化または不安定化する作用物質と反応させる。別の例では、修飾された糖の成分をそのペプチドへの結合後に脱保護する。当業者は修飾された糖がペプチドに結合した後の段階で本発明の方法に有用な多数の酵素的または化学的手順があると考えるだろう。修飾された糖－ペプチド結合物のさらなる仕上げ（ｅｌａｂｏｒａｔｉｏｎ）は、本発明の範囲内である。

【０８４６】

マンノース－６－ホスフェートでのペプチドの標的化

例示態様では、ペプチドを少なくとも１つのマンノース－６－ホスフェート部分で誘導化する。マンノース－６－ホスフェート部分はペプチドを細胞のリソソームに標的し、そして例えばリソソーム蓄積疾患（ｌｙｓｏｓｏｍａｌ　ｓｔｏｒａｇｅ　ｄｉｓｅａｓｅ）の治療に治療用タンパク質をリソソームに標的するために有用である。

【０８４７】

リソソーム蓄積疾患は、細胞のリソソーム内の糖脂質または多糖廃棄産物を分解する酵素をコードする遺伝子の欠損の結果である４０を越える疾患群である。次いで酵素産物、例えば糖および脂質は新たな生成物に再使用される。これら各疾患はリソソーム中の酵素レベルに影響を及ぼす遺伝する常染色体またはＸ－結合劣性形質から生じる。一般に影響を受けている個体の細胞および組織中には、影響を受けた酵素の生物学的または機能的活性が無い。表４は代表的蓄積疾患および疾患に関連する酵素的欠失の一覧を提供する。そのような疾患では、酵素機能の欠乏が身体の細胞中のリソソームに脂質または炭水化物基質の進行的な全身性の沈積を生じ、最終的には器官の機能損失および死を引き起こす。遺伝的病因論、臨床的発現、分子生物学およびリソソーム蓄積疾患の可能性は、Ｓｃｒｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．編集、遺伝疾患の代謝および分子的基礎（ＴＨＥ　ＭＥＴＡＢＯＬＩＣ　ＡＮＤ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＡＳＩＳ　ＯＦ　ＩＮＨＥＲＩＴＥＤ　ＤＩＳＥＡＳＥ）、７．ｓｕｐ．ｔｈ．Ｅｄ、Ｖｏｌ．ＩＩ、マグローヒル（１９９５）に詳細に記載されている。

【０８４８】

【表４】

表4：リソソーム蓄積疾患および関連する酵素欠陥

疾患	酵素的欠損
ポーンプ病	酸性α-グリコシダーゼ（酸性マルターゼ）
MPSI* (Hurler病)	α-L-イズロニダーゼ
MPSII (Hunter病)	イズロン酸スルファターゼ
MPSIII (Sanfilippo)	ヘパランN-スルファターゼ
MPS IV (Morquio A)	ガラクトース-6-スルファターゼ
MPS IV (Morquio B)	酸性β-ガラクトシダーゼ
MPS VII (Sly病)	β-グルクロニダーゼ
I-細胞疾患	N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ
Schindler病	α-N-アセチルガラクトサミニダーゼ（α-ガラクトシダーゼB）
Wolman病	酸性リパーゼ
コレステロールエステル蓄積疾患	酸性リパーゼ
Farber病	リソソーム酸性セラミダーゼ
Niemann-Pick病	酸性スフィンゴミエリナーゼ
Gaucher病	グルコセレブロシダーゼ
Krabbe病	ガラクトセラミダーゼ
Fabry病	α-ガラクトシダーゼA
GM1ガングリオシドーシス	酸性β-ガラクトシダーゼ
ガラクトシアリドーシス	β-ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ
Tay-Sach's病	ヘキソサミニダーゼA
Sandhoff病	ヘキソサミニダーゼAおよびB

*MPS＝ムコポリサッカライドーシス

【０８４９】

Ｄｅ　Ｄｕｖｅは損失しているリソソーム酵素を外因性の生物学的に活性な酵素で代用することがリソソーム蓄積疾患を処置する貴重な取り組みであると最初に提案した（Ｄｅ　Ｄｕｖｅ，Ｆｅｄ．Ｐｒｏｃ．２３：１０４５（１９６４））。その時から、酵素代替治療が様々なリソソーム蓄積疾患を処置するために有益になり得るという種々の研究が提

案された。最高の成功は、胎盤から（Ｃｅｒｅｄａｓｅ（商標））またはより最近では組換え的（Ｃｅｒｅｚｙｍｅ（商標））に調製した外因性酵素（β－グルコセレブロシダーゼ）で処置したＩ型ゴーシェ病を持つ個体で示された。酵素代替はファブリー病ならびに他のリソソーム蓄積疾患を処置するためにも有益であることが示唆された。例えばＤａｗｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｅｄ．Ｒｅｓ．７（８）：６８４－６９０（１９７３）（インビトロ）およびＭａｐｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ １６９：９８７（１９７０）（インビボ）を参照にされたい。酵素代替治療の臨床試験は、正常血漿（Ｍａｐｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ １６９：９８７－９８９（１９７０））、胎盤から精製したα－ガラクトシダーゼＡ（Ｂｒａｄｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇ．Ｊ．Ｍｅｄ．２７９：１１６３（１９７３））；または脾臓または血漿から精製したα－ガラクトシダーゼＡ（Ｄｅｓｎｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７６：５３２６－５３３０（１９７９））の潅流を使用したファブリー患者について報告され、そしてファブリー病の直接的酵素代替の生物化学的効力が証明された。これらの研究は反復した酵素代替により病理学的な糖脂質蓄積を排除し、または有意に減少するための可能性を示す。例えば１つの実験では（Ｄｅｓｎｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，同上）、精製された酵素の静脈内注入で、蓄積される脂質物質、グロボトリアシルセラミドの血漿レベルに一過性の減少がもたらされた。

【０８５０】

したがって当該技術分野には、ヒトα－ガラクトシダーゼＡのような十分な量の生物学的に活性なリソソーム酵素を、欠乏細胞に提供するための方法の必要性が存在する。最近、組換え的な方法でこれらの必要性に取り組んだ、例えば米国特許第５，６５８，５６７号、同第５，５８０，７５７明細書；Ｂｉｓｈｏｐ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８３：４８５９－４８６３（１９８６）；Ｍｅｄｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９３：７９１７－７９２２（１９９６）；Ｎｏｖｏ，Ｆ．Ｊ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ．４：４８８－４９２（１９９７）；Ｏｈｓｈｉｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９４：２５４０－２５４４（１９９７）；およびＳｕｇｉｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６：９０５－９１６（１９９５）を参照にされたい。マンノース－６－ホスフェートは治療用ペプチドがリソソームを標的とすることを媒介し、本発明は十分量の生物学的に活性なリソソームペプチドを欠損細胞に送達するための組成物および方法を提供する。

【０８５１】

このように例示態様では、本発明はマンノース－６－ホスフェートで誘導化した表６によるペプチドを提供する（図２３および図２４）。ペプチドは組換え的または化学的に調製することができる。さらにペプチドは完全に天然な配列であるか、または例えば短縮化、延長により修飾することができ、あるいは置換または欠失を含んでもよい。本発明の方法を使用して改造されるタンパク質の例は、グルコセレブロシダーゼ、β－グルコシダーゼ、α－ガラクトシダーゼＡ、酸性－α－グルコシダーゼ（酸性マルターゼ）を含む。臨床的に使用する代表的な修飾されたペプチドには、限定するわけではないがＣｅｒｅｄａｓｅ（商標）、Ｃｅｒｅｚｙｍｅ（商標）およびＦａｂｒｙｚｙｍｅ（商標）を含む。修飾され、そして臨床的に関連するペプチド上のグリコシル基も、本発明の方法を利用して改変させることができる。マンノース－６－ホスフェートはグリコシル連結基を介してペプチドに結合させる。例示態様では、グリコシル連結基はシアル酸に由来する。シアル酸－由来グリコシル連結基の例は表２に説明し、ここで１以上の“Ｒ”部分がマンノース－６－ホスフェートまたは結合した１以上のマンノース－６－ホスフェート部分を有するスペーサー基である。修飾されたシアル酸部分は好ましくはペプチドの表面に結合したオリゴ糖の末端残基である（図２５）。

【０８５２】

マンノース－６－ホスフェートに加えて、本発明のペプチドは水溶性ポリマー、治療部分、またはさらなる標的部分のような部分を用いて誘導化することができる。これらのお

よび他の基を結合する方法は本明細書で説明する。例示態様では、マンノース－６－ホスフェート以外の基を、表２に従い誘導化されたシアル酸誘導体を介してペプチドに結合させ、ここで１以上の“Ｒ”部分がマンノース－６－ホスフェート以外の基である。

【０８５３】

例示態様では、Ｃｂｚ－保護グリシンに基づくリンカーアームで修飾されたシアル酸部分を調製する。対応するヌクレオチド糖を調製し、そしてＣｂｚ基は触媒的水素添加により除去する。生成するヌクレオチド糖は、利用可能な反応性アミンを有し、これを活性化マンノース－６－ホスフェート誘導体と接触させて、本発明の方法の実施に有用であるマンノース－６－ホスフェート誘導化ヌクレオチド糖を提供する。

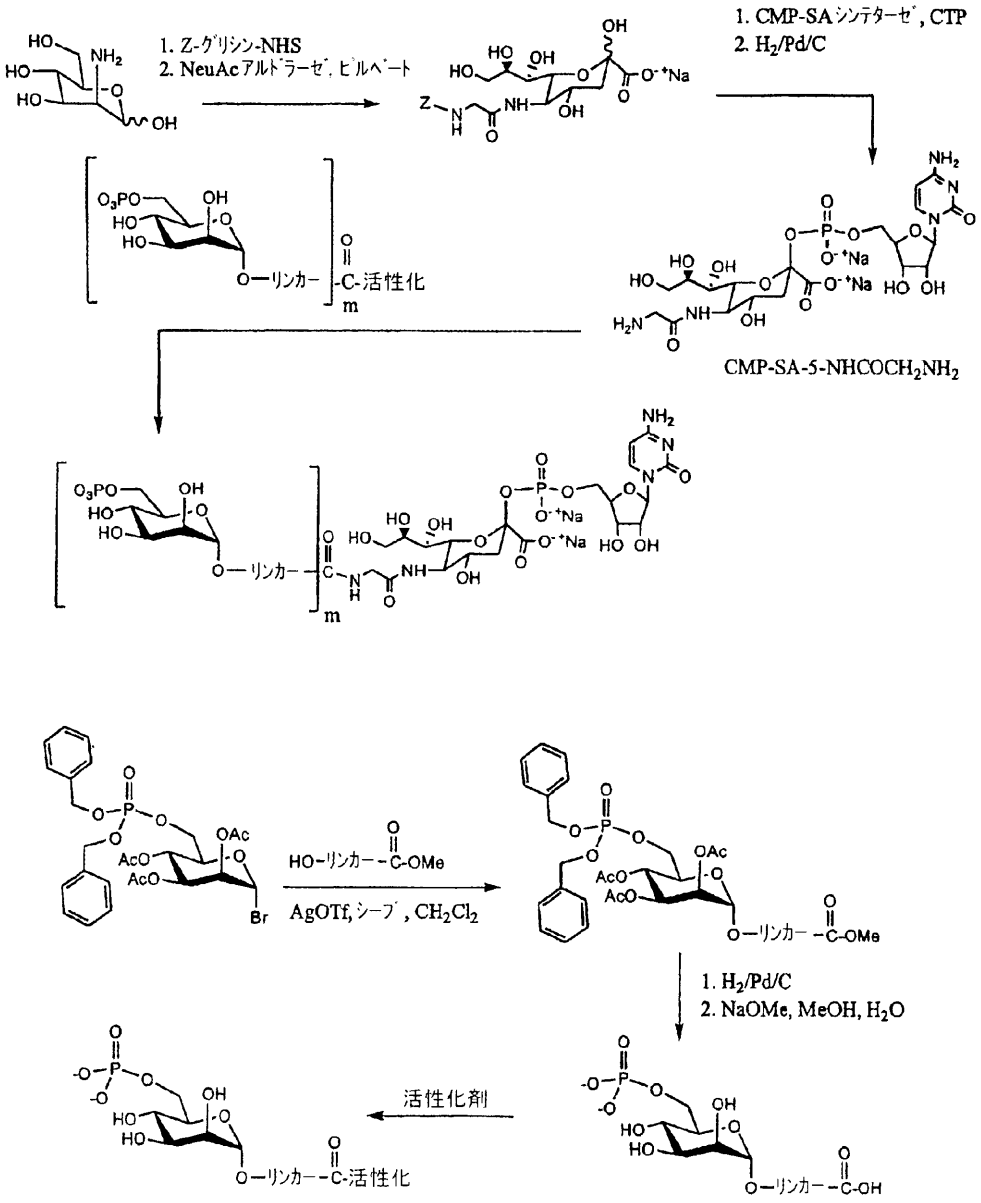
【０８５４】

以下のスキーム（スキーム１５）に示すように、活性化マンノース－６－ホスフェート誘導体の例は、２－ブロモ－ベンジル－保護ホスホトリエステルを対応するトリフラートにその場で転換し、そしてトリフラートと反応性酸素を含有する部分を有するリンカーとを反応させ、糖とリンカーとの間にエーテル結合を形成することにより形成される。ベンジル保護基は触媒的水素添加により除去され、そしてリンカーのメチルエステルは加水分解され、対応するカルボン酸を提供する。カルボン酸は当該技術分野で既知の方法により活性化される。活性化手順の例は、カルボン酸のＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルへの転換に依る。

【０８５５】

【化６５】

スキーム15



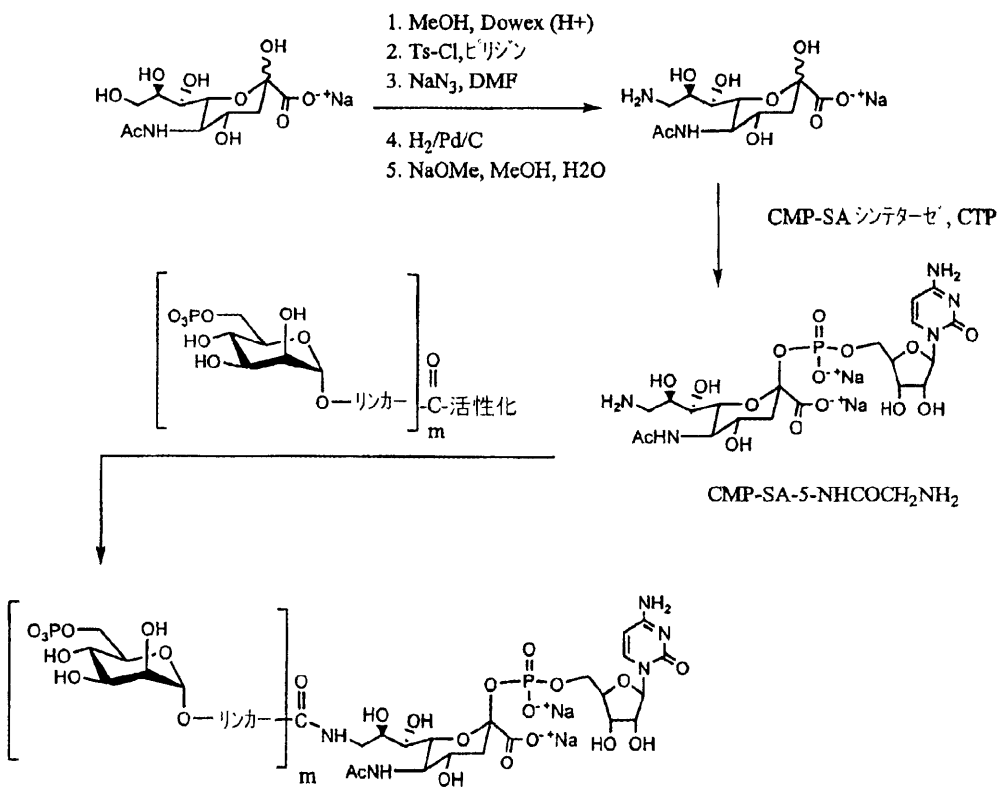
【０８５６】

別の例示態様では、以下のスキーム（スキーム１６）に示すように、Ｎ－アセチル化シアル酸をピルビル部分の操作によりアミンに転換する。このように１級ヒドロキシルをスルホン酸エステルに転換し、そしてアジ化ナトリウムと反応させる。アジドを対応するアミンに触媒的に還元する。続いて糖はヌクレオチド類似体に転換し、そしてアミン基を介して上記のように調製したリンカーアーム－誘導化マンノース－６－ホスフェートにカップリングする。

【０８５７】

【化６６】

スキーム16



【０８５８】

リソソーム蓄積疾患を処置するために有用なペプチドは、限定するわけではないがトランスフェリン、（血液脳関門をわたり、そしてエンドソームにペプチドを送達するために）、カルニチン（ペプチドを筋肉細胞に送達するために）、およびホスホネート、例えばビスホスホネート（ペプチドを骨および他の炭酸カルシウムを含む組織を標的とさせるために）を含む他の標的部分で誘導化することができる。標的部分および治療用ペプチドは本明細書に記載する任意の方法または当該技術分野で既知の方法により結合される。

【０８５９】

例示態様では、標的剤および治療用ペプチドはリンカー部分を介してカップリングされる。この態様では、少なくとも１つの治療用ペプチドまたは標的剤が本発明の方法に従い、リンカー部分に完全なグリコシル連結基を介してカップリングされる。例示態様では、リンカー部分にはポリ（エチレングリコール）のようなポリ（エーテル）を含む。別の例示態様ではリンカー部分は、結合物を身体中の標的とする組織または領域に送達した後、インビボで分解されて標的剤から治療用ペプチドを放出する少なくとも１つの結合を含む。

【０８６０】

さらに別の例示態様では、治療用ペプチドを標的部分に結合することなく治療部分のグリコホームの改変を介して治療部分のインビボ分布が改変される。例えば治療用ペプチドはシアル酸（またはその誘導体）でグリコシル基の末端ガラクトース部分をキャッピングすることにより、網内系による取り込みからそらすことができる（図２３および２６）。末端Ｇａｌを覆うシアリル化は、肝臓のアシアロ糖タンパク質（ＡＳＧＰ）レセプターによるペプチドの取り込みを回避し、そしてシアリル化が無い複雑なグリカン鎖のみを有するペプチドに比べてペプチドの半減期を伸ばすことができる。

【０８６１】

ＩＩ．本発明のペプチド／糖ペプチド

１つの態様では、本発明は基本的なトリマンノシルコアを主要なグリカン構造としてペプチドに結合して有する１つのペプチドの多数のコピーを含んでなる組成物を提供する。好適な態様では、ペプチドは治療用分子である。ペプチドの天然な形態は複雑なＮ－結合グリカンを含んでなることができ、あるいは高マンノースグリカンでよい。ペプチドは哺乳動物のペプチドでよく、そして好ましくはヒトのペプチドである。幾つかの態様では、ペプチドは免疫グロブリン、エリスロポエチン、組織型アクチベーターペプチドおよびその他からなる群から選択される（図１を参照にされたい）。

【０８６２】

グリカンが本発明の方法を使用して改造できるペプチドの例を図１に説明する。

【０８６３】

【表５】

表5. グリカン改造に好適なペプチド

ホルモンおよび増殖因子	レセプターおよびキメラレセプター
G-CSF	CD4
GM-CSF	腫瘍壊死因子(TNF-R)
TPO	TNF-R:IgG Fc融合
EPO	アルファ-CD20
EPO変異体	PSGL-1
FSH	補体
HGH	GlyCAMまたはそのキメラ
インスリン	N-CAMまたはそのキメラ
アルファ-TNF	モノクローナル抗体(免疫グロブリン)
レプチン	MAb-抗-RSV
酵素およびインヒビター	MAb-抗-IL-2レセプター
TPA	MAb-抗-CEA
TPA変異体	MAb-抗-糖タンパク質IIb/IIIa
ウロキナーゼ	MAb-抗-EGF
第VII, VIII, IX, X因子	MAb-抗-Her2
DNase	MAb-CD20
グルコセレブロシダーゼ	MAb-アルファ-CD3
ヒルジン	MAb-TNFα
α1アンチトリプシン(α1プロテアーゼインヒビター)	MAb-CD4
	MAb-PSGL-1
アンチトロンビンIII	Mab-呼吸合胞体ウイルスのMab-抗Fタンパク質
酸性α-グルコシダーゼ(酸性マルターゼ)	
αガラクトシダーゼA	細胞
α-L-イズロニダーゼ	赤血球
ウロキナーゼ	白血球(例えばT細胞, B細胞, 樹状細胞, マクロファージ, NK細胞, 好中球, 単球等)
サイトカインおよびキメラサイトカイン	
インターロイキン-1 (IL-1), 1B, 2, 3, 4	
インターフェロン-アルファ(IFN-アルファ)	幹細胞
IFN-アルファ-2b	その他
IFN-ベータ	B型肝炎表面抗原(HbsAg)
IFN-ガンマ	
キメラジフテリアトキシン-IL-2	

【０８６４】

【表６】

表6. グリカン改造に最も好適なペプチド

顆粒球コロニー刺激(G-CSF)因子	インターロイキン-2 (IL-2)
	第VIII因子
インターフェロンα	hrDNase
インターフェロンβ	インスリン
第VII凝固因子	B型肝炎表面抗原(HbsAg)
第IX凝固因子	ヒト成長ホルモン(HGH)
濾胞刺激ホルモン(FSH)	ウロキナーゼ
エリトロポエチン(EPO)	TNFレセプター-IgG Fc融合(Enbrel™)
顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)	MAb-Her-2 (Herceptin™)
	呼吸合胞体ウイルスの
インターフェロンγ	MAb-Fタンパク質(Synagis™)
α_1プロテアーゼインヒビター (α_1アンチトリプシン)	MAb-CD20 (Rituxan™)
組織プラスミノーゲンアクチベーター(TPA)	MAb-TNFα (Remicade™)
グルコセレブロシダーゼ(Cerezyme™)	MAb-糖タンパク質IIb/IIIa (Reopro™)

【０８６５】

本発明に有用なペプチドのより詳細な一覧およびそれらの供給源を図１に提供する。

【０８６６】

本発明の方法により修飾されるペプチドの他の例には、免疫グロブリンファミリーの員（例えば抗体、ＭＨＣ分子、Ｔ細胞レセプター等）、細胞間レセプター（例えばインテグリン、ホルモンまたは増殖因子のレセプター等）レクチン、およびサイトカイン（例えばインターロイキン）を含む。さらなる例にはとりわけ、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）、レニン、第ＶＩＩＩ因子およびＩＸ因子のような凝固因子、ボンベシン、トロンビン、造血増殖因子、コロニー刺激因子、ウイルス抗原、補体ペプチド、α１－アンチトリプシン、エリトロポエチン、Ｐ－セレクチン糖ペプチドリガンド－１（ＰＳＧＬ－１）、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子、抗－トロンビンＩＩＩ、インターロイキン、インターフェロン、ペプチドＡおよびＣ、フィブリノーゲン、ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）、レプチン、グリコシダーゼを含む。ペプチドの一覧は例であり、排他的であると考えるべきではない。むしろ本明細書に提供する開示から明らかなように、本発明の方法は所望するグリカン構造を形成することができる任意のペプチドに応用可能である。

【０８６７】

本発明の方法は、限定するわけではないがＩｇＧのような免疫グロブリンに由来する部分を含むキメラペプチドを含むキメラペプチドの修飾にも有用である。

【０８６８】

本発明の方法により修飾されるペプチドは合成または野生型ペプチドであることができ、あるいはそれらは部位指向的突然変異誘発法のような当該技術分野で既知の方法により生成される突然変異したペプチドであることができる。ペプチドのグリコシル化は典型的にはＮ－結合またはＯ－結合である。Ｎ－結合の例は、修飾された糖のアスパラギン残基の側鎖への結合である。トリペプチド配列アスパラギン－Ｘ－セリンおよびアスパラギン－Ｘ－トレオニン（ここでＸはプロリンを除く任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。このようにペプチド中のこれらトリペプチド配列のいずれかの存在が潜在的なグリコシル化部位を作成する。本明細書のいたるところで開示するように、Ｏ－結合グリコシル化は、１つの糖（例えばＮ－アセチルガラクトサミン、ガラクトース、マンノース、ＧｌｃＮＡｃ、グルコース、フコー

スまたはキシロース）の、ヒドロキシアミノ酸、好ましくはセリンまたはトレオニンのヒドロキシ側鎖への結合を指すが、５－ヒドロキシプロリンまたは５－ヒドロキシリシンも使用することができる。

【０８６９】

本発明の数種の例示態様を、以下で検討する。これらの態様の幾つかは商用名で記載される名前を有するペプチド、および例示ペプチドとして他の具体的なペプチドを使用するが、これらの例は具体的ペプチドに限定するものではない。以下の例示態様はすべてのペプチド均等物および任意のペプチドの変異体を含むことを意図している。そのような変異体には限定するわけではないが、Ｎ－結合およびＯ－結合グリコシル化部位の付加または削除、および加えたグリコシル化部位との融合タンパク質を含む。当業者は以下の態様およびそこに開示されている基本的方法が多くのペプチドに応用でき、等しく成功すると考えるだろう。

【０８７０】

１つの例示態様では、本発明は顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）を修飾するための方法を提供する。図２７Ａ～２７Ｇは、本明細書に開示する方法論を使用してこれがどのようになされるかの幾つかの例を説明する。図２７Ｂでは、哺乳動物細胞系で発現したＧ－ＣＳＦペプチドをシアリダーゼを使用して戻し改作する。このように露出した残基は、それに適切な供与体およびＳＴ３Ｇａｌ１を使用してシアル酸－ポリ（エチレングリコール）部分（ＰＥＧ部分）の付加により修飾される。図２７Ｃは昆虫細胞で発現したＧ－ＣＳＦペプチドを修飾するための例示スキームを説明する。このペプチドは、それに適切な供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトース部分を加えることにより修飾する。ガラクトース残基は、シアル酸－ＰＥＧ誘導体を介してＳＴ３Ｇａｌ１の作用を通してＰＥＧで官能化される。図２７Ｄでは、細菌が発現したＧ－ＣＳＦをＮ－アセチルガラクトサミン供与体およびＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼと接触させる。このペプチドはＰＥＧ化シアル酸供与体およびシアリルトランスフェラーゼを使用してＰＥＧで官能化する。図２７Ｅでは、哺乳動物細胞が発現したＧ－ＣＳＦをレブリン酸で修飾したシアル酸供与体と接触させ、反応性ケトンをシアル酸供与体に加える。ペプチド上のグリカン上のグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図２７Ｆでは細菌が発現したＧ－ＣＳＦを、ペプチドをエンド－ＧａｌＮＡｃ酵素と、これが加水分解的様式ではなく合成的に機能する条件下で接触させ、これによりＰＥＧ－Ｇａｌ－ＧａｌＮＡｃ分子をそれらの活性化誘導体から加える。図２７Ｇは細菌が発現したＧ－ＣＳＦの別の改造経路を提供する。ポリペプチドはＰＥＧ化Ｎ－アセチルガラクトサミン残基を用いて、ポリペプチドをＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼおよび適切なＰＥＧ化Ｎ－アセチルガラクトサミンの供与体と接触させることにより誘導化する。

【０８７１】

別の例示態様では、本発明は図２８Ａ～２８Ｎに示すようにインターフェロンα－１４Ｃ（ＩＦＮα１４Ｃ）を修飾する方法を提供する。様々なＩＦＮα形態を本明細書のいたるところに開示する。図２８Ｂでは哺乳動物細胞で発現したＩＦＮα１４Ｃを最初にシアリダーゼで処理してそれらの上のシアル酸単位を戻し改作し、そして次いでこの分子をＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸供与体を使用してＰＥＧ化する。図２８Ｃでは最初にＮ－アセチルグルコサミンを昆虫もしくは真菌細胞で発現したＩＦＮα１４Ｃに加え、ここで反応はＧｎＴ－Ｉおよび／またはＩＩの作用を介してＮ－アセチルグルコサミン供与体を使用して行う。次いでポリペプチドはガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ化－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化される。図２８Ｄでは酵母で発現したＩＦＮα１４Ｃを最初にエンド－Ｈで処理してその上のグリコシル単位を戻し改作する。この分子はガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体を使用してガラクトシル化し、そして次にこれをＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図２８Ｆでは哺乳動物細胞により生産されたＩＦＮα１４Ｃが、ＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化－シアル酸の供与体を使用して修飾されてＰＥＧ部分が少しづつ動

かれされる（ｉｎｃｈｅｄ）。図２８Ｇでは昆虫または真菌細胞で発現したＩＦＮα１４Ｃは、最初に１以上のＧｎＴ　Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶ、およびＮ－アセチルグルコサミン供与体を使用してＮ－アセチルグルコサミンが加えられる。このタンパク質は次いで適切な供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化される。次いでＩＦＮα１４ＣはＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化される。図２８Ｈでは酵母が生産したＩＦＮα１４Ｃを最初にマンノシダーゼで処理してマンノシル基を戻し改作する。次いでＮ－アセチルグルコサミンが、Ｎ－アセチルグルコサミンの供与体および１以上のＧｎＴ　Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶを使用して加えられる。さらにＩＦＮα１４Ｃは適切な供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化される。次いでポリペプチドはＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化される。図２８ＩではＮＳＯ細胞が発現したＩＦＮα１４Ｃを、適切な末端残基をレブリン酸で修飾したシアル酸供与体でキャッピングすることにより修飾し、これにより反応性ケトンをシアル酸供与体に付加する。ペプチドのグリコシル残基へ加えた後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図２８Ｊでは哺乳動物細胞により発現されたＩＦＮα１４Ｃが、ＰＥＧ－シアル酸の供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してＰＥＧ化される。図２８Ｋでは哺乳動物細胞により生産されたＩＦＮα１４Ｃが最初にシアリダーゼを用いて末端シアル酸残基を戻し改作され、そして次に分子はトランス－シアリダーゼおよびＰＥＧ化シアル酸－ラクトース複合体を使用してＰＥＧ化される。図２８Ｌでは哺乳動物系で発現したＩＦＮα１４Ｃがシアル酸の供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してシアル化される。図２８Ｍでは昆虫または真菌細胞で発現したＩＦＮα１４Ｃに、最初に適切な供与体およびＧｎＴＩおよび／またはＩＩを使用してＮ－アセチルグルコサミンが加えられる。次いで分子をガラクトシルトランスフェラーゼおよびリンカーを介して反応性シアル酸で誘導化したガラクトース供与体と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよびガラクトース残基を介して反応性シアル酸に結合させる。ついでポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３およびトランスフェリンと接触させ、そしてこのようにしてシアル酸残基を介してトランスフェリンが連結するようになる。図２８Ｎでは昆虫または酵母細胞のいずれかで発現したＩＦＮα１４Ｃを、最初にエンドグリカナーゼで処理してグリコシル基を戻し改作し、そして次いでガラクトシルトランスフェラーゼおよびリンカーを介して反応性シアル酸で誘導化されたガラクトース供与体と接触させて、ポリペプチドにリンカーおよびガラクトース残基を介して反応性シアル酸を結合させる。ついで分子をＳＴ３Ｇａｌ３およびトランスフェリンと接触させ、そしてこのようにしてシアル酸残基を介してトランスフェリンが連結するようになる。

【０８７２】

別の例示態様では、本発明は図２８Ｏ～２８ＥＥに示すようにインターフェロンα－２ａまたは２ｂ（ＩＦＮα）を修飾する方法を提供する。図２８Ｐでは哺乳動物細胞で生産されたＩＦＮαを最初にシアリダーゼで処理してグリコシル単位を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸供与体を使用してＰＥＧ化する。図２８Ｑでは昆虫細胞で発現したＩＦＮαを最初に適切な供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ１およびＰＥＧ化シアル酸供与体を使用してＰＥＧ化する。図２８Ｒは細菌中で発現したＩＦＮαの別の改造方法を提供する：ＰＥＧ化Ｎ－アセチルガラクトサミンは、適切な供与体およびＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼを使用してタンパク質に加える。図２８Ｓでは哺乳動物細胞で発現したＩＦＮαを、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体を用いて適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に加えることにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基に加えた後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図２８Ｔでは細菌で発現したＩＦＮαを、加水分解的様式の代わりに合成的に機能する修飾された酵素であるエンド－Ｎ－アセチルガラクトサミダーゼを使用して、およびＰＥＧ部分で誘導化したＮ－アセチルガラクトサミン供与体を使用してＰＥＧ化する。図２８ＵではＮ－アセチルガラクトサミンを最初に、適当な供与体およびＮ－

アセチルガラクトサミントランスフェラーゼを使用してＩＦＮαに加え、そして次いでシアリルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ化シアル酸供与体を使用してＰＥＧ化する。図２８Ｖでは哺乳動物系で発現したＩＦＮαを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そして次に適当な供与体およびＳＴ３Ｇａｌ１および／またはＳＴ３Ｇａｌ３を使用してＰＥＧ化する。図２８Ｗでは哺乳動物細胞で発現したＩＦＮαを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作する。次いでこのポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ１およびリンカーで連結された２つの反応性シアル酸残基と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよび２番目のシアル酸残基を介して１つの反応性シアル酸に結合させる。続いてポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３およびトランスフェリンと接触させ、そしてこのようにしてトランスフェリンがシアル酸残基を介して結合するようになる。図２８Ｙでは哺乳動物細胞で発現したＩＦＮαを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そして次にＳＴ３Ｇａｌ１およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図２８Ｚでは昆虫細胞により生産されたＩＦＮαを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ化ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化する。図２８ＡＡでは細菌が発現したＩＦＮαに、最初に適切な供与体およびＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼを使用してアセチルガラクトサミンを加える。このタンパク質は次いで、シアリルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化される。図２８ＣＣでは細菌で発現したＩＦＮαが別の手順で修飾される；ＰＥＧ化Ｎ－アセチルガラクトサミンを、Ｎ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼによりＰＥＧ化Ｎ－アセチルガラクトサミンの供与体を使用してタンパク質に加える。図２８ＤＤでは細菌で発現したＩＦＮαを別のスキームで改造する。ポリペプチドを最初にＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼおよびリンカーを介して反応性シアル酸を用いて誘導化されたＮ－アセチルガラクトサミンの供与体と接触させて、ＩＦＮαをリンカーおよびＮ－アセチルガラクトサミンを介して反応性のシアル酸に結合させる。次いでＩＦＮαをＳＴ３Ｇａｌ３およびアシアロトランスフェリンと反応させて、これがシアル酸残基を介してトランスフェリンに連結するようになる。次いでＩＦＮαはＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアル酸残基でキャッピングされる。細菌が発現したＩＦＮαを修飾するさらなる方法を図２８ＥＥに開示し、ここでＩＦＮαは最初にＮＨＳ－ＣＯ－リンカー－ＳＡ－ＣＭＰに暴露され、そして次いでリンカーを介して反応性シアル酸に連結される。これは続いてＳＴ３Ｇａｌ３およびトランスフェリンを使用してトランスフェリンに結合する。

【０８７３】

別の例示態様では、本発明は図２９Ａ～２９Ｓで示すようにインターフェロンβ（ＩＦＮ－β）の修飾法を提供する。図２９Ｂでは哺乳動物系で発現したＩＦＮ－βを最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作する。次いでタンパク質はＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化される。図２９Ｃは昆虫細胞により生産されたＩＦＮ－βを修飾するためのスキームである。最初にＮ－アセチルグルコサミンを、適切な供与体およびＧｎＴ－ｉおよび／または－ＩＩを使用してＩＦＮ－βに加える。次いでタンパク質はガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化される。最後にＩＦＮ－βはＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧされる。図２９Ｄでは酵母で発現したＩＦＮ－βを最初にエンド－Ｈで処理してそのグリコシル鎖を戻し改作し、そして次いでガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図２９Ｅでは哺乳動物細胞で生産されたＩＦＮ－βを、ＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ部分ですでに誘導化したシアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化することにより修飾する。図２９Ｆでは昆虫細胞で発現したＩＦＮ－βは最初に、Ｎ－アセチルグルコサミン供与体を使用して１以上のＧｎＴ　Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶによりＮ－アセチルグルコサミンが加えられ、そして次にガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化され、そして次にＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化される。図２９Ｇでは酵母で発現したＩＦＮ－βを最初にマンノシダーゼで処理してマンノ

シル単位を戻し改作し、次いでＮ－アセチルグルコサミン供与体および１以上のＧｎＴ Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶを使用してＮ－アセチルグルコサミンが加えられる。このタンパク質はさらにガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化され、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸供与体を使用してＰＥＧ化される。図２９Ｈでは哺乳動物細胞が発現したＩＦＮ－βを、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基でキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に加えることにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図２９Ｉでは哺乳動物系で発現したＩＦＮ－βを、ＰＥＧ－シアル酸の供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してＰＥＧ化する。図２９Ｊでは哺乳動物細胞により発現されたＩＦＮ－βを最初にシアリダーゼで処理してその末端シアル酸残基を戻し改作し、次いでトランスシアリダーゼおよびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図２９Ｋでは哺乳動物細胞で発現したＩＦＮ－βを最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。図２９Ｌでは哺乳動物細胞で発現したＩＦＮ－βを最初にシアリダーゼおよびガラクトシダーゼで処理してグリコシル鎖を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびα－ガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３またはシアリルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図２９Ｍでは哺乳動物細胞で発現したＩＦＮ－βを最初にシアリダーゼで処理してグリコシル単位を戻し改作する。これを次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。図２９Ｎでは哺乳動物細胞で発現したＩＦＮ－βを、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に加えることにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図２９Ｏでは哺乳動物細胞で発現したＩＦＮ－βを、シアル酸供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してシアリル化する。図２９Ｑでは昆虫細胞により発現されたＩＦＮ－βに、最初にＮ－アセチルグルコサミンの供与体および１以上のＧｎＴ Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶを使用してＮ－アセチルグルコサミンを加え、そしてさらにＰＥＧ－ガラクトースの供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してさらにＰＥＧ化する。図２９Ｒでは酵母で発現したＩＦＮ－βを最初にエンドグリカナーゼで処理してグリコシル基を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図２９Ｓでは哺乳動物系で発現したＩＦＮ－βを最初にＳＴ３Ｇａｌ３およびリンカーを介して連結された２つの反応性シアル酸残基と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよび第２のシアル酸残基を介して１つの反応性シアル酸と連結する。次いでポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３および脱シアリル化トランスフェリンと接触させ、そしてこのようにしてシアル酸残基を介してトランスフェリンが結合するようになる。次いでＩＦＮ－βはシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してさらにシアリル化される。

【０８７４】

別の例示態様では、本発明は図３０Ａ～３０Ｄに示す第ＶＩＩ因子または第ＶＩＩａ因子を修飾するための方法を提供する。図３０Ｂでは哺乳動物系により生産された第ＶＩＩまたはＶＩＩａ因子を最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図３０Ｃでは哺乳動物細胞により発現された第ＶＩＩまたはＶＩＩａ因子を最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。さらにポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体でシアリル化する。図３０Ｄは哺乳動物細胞により生産される第ＶＩＩまたはＶＩＩａ因子の別の修飾スキームを提供する：ポリペプチドを最初にシアリダー

ゼおよびガラクトシダーゼで処理してそのシアル酸およびガラクトース残基を戻し改作し、次いでガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体を使用してガラクトシル化し、そして次にＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。

【０８７５】

別の例示態様では、本発明は第ＩＸ因子の修飾法を提供し、その幾つかの例が図３１Ａ～３１Ｇに含まれる。図３１Ｂでは哺乳動物細胞により生産された第ＩＸ因子を最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作し、そして次いでＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＳＴ３Ｇａｌ３でＰＥＧ化する。図３１Ｃでは哺乳動物細胞により発現された第ＩＸ因子を最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作し、これを次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化－シアル酸供与体を使用してＰＥＧ化し、そしてさらにＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。哺乳動物細胞が生産した第ＩＸ因子の改造の別のスキームは、図３１Ｄに見いだすことができる。ポリペプチドを最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、さらにシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してシアリル化し、そして次いでＰＥＧ化シアル酸の供与体およびＳＴ３Ｇａｌ１を使用してＰＥＧ化する。図３１Ｅでは哺乳動物系で発現した第ＩＸ因子が、ＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＳＴ３Ｇａｌ３により触媒されるシアリル化の方法を通してＰＥＧ化される。図３１Ｆでは哺乳動物細胞で発現した第ＩＸ因子を、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に加えることにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンはヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化される。図３１Ｇは第ＩＸ因子のさらなる修飾法を提供する。哺乳動物細胞で生産されたポリペプチドは、ＰＥＧ－シアル酸の供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してＰＥＧ化される。

【０８７６】

別の例示態様では、本発明は濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）の修飾法を提供する。図３２Ａ～３２Ｊは幾つかの例を提示する。図３２Ｂでは、ＦＳＨが哺乳動物系で発現し、そしてシアリダーゼで処理されて末端シアル酸残基が戻し改作され、続いてＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化されることにより修飾される。図３２Ｃでは哺乳動物細胞で発現したＦＳＨを最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。図３２Ｄは哺乳動物系で発現したＦＳＨを修飾するスキームを提供する。ポリペプチドをシアリダーゼおよびガラクトシダーゼで処理してそのシアル酸およびガラクトース残基を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図３２Ｅでは哺乳動物系で発現したＦＳＨを以下の手順で修飾する：ＦＳＨを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次にＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。図３２Ｆは哺乳動物細胞により生産されたＦＳＨの別の修飾例を提供する：ポリペプチドを、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に加えることにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図３２Ｇでは哺乳動物系で発現したＦＳＨを別の手順で修飾する：ポリペプチドは、シアル酸供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用したシアル酸の付加を用いて改造される。図３２ＨではＦＳＨを昆虫細胞で発現させ、そして以下の手順で修飾する：Ｎ－アセチルグルコサミンを適切なＮ－アセチルグルコサミン供与体および１以上のＧｎＴ　Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶを使用して最初にＦＳＨに加え；次いでＦＳＨはＰＥＧ－ガラクトースの供与体およびガラクトシルトラン

スフェラーゼを使用してＰＥＧ化される。図３２Ｉは酵母により生産されたＦＳＨの修飾スキームを表す。このスキームに従い、ＦＳＨを最初にエンドグリカナーゼで処理してグリコシル基を戻し改作し、ガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体でＰＥＧ化する。図３２Ｊでは哺乳動物細胞により発現されたＦＳＨを最初に、ＳＴ３Ｇａｌ３およびリンカーを介した２つの反応性シアル酸残基と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよび２番目のシアル酸残基を介して１つの反応性シアル酸に結合させる。次いでポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ１およびＣＨＯで生産された脱シアリル化絨毛性ゴナドトロピン（ＣＧ）と接触させ、そしてこのようにしてＣＧが第２シアル酸残基を介して連結するようになる。ついでＦＳＨはシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３および／またはＳＴ３Ｇａｌ１を使用してシアリル化される。

【０８７７】

別の例示態様では、本発明はエリトロポエチン（ＥＰＯ）の修飾法を提供し、図３３Ａ～３３Ｊは、野生型および突然変異ＥＰＯペプチドの両方の改造に関する幾つかの例を説明する。図３３Ｂでは、種々の哺乳動物系で発現したＥＰＯが、発現したタンパク質をシアリダーゼと接触させて末端シアル酸残基を除去することにより改造される。生成したペプチドを、シアリルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ部分で誘導化したＣＭＰ－シアル酸と接触させる。図３３Ｃでは昆虫細胞で発現したＥＰＯが、ＧｎＴ　Ｉおよび／またはＧｎＴ、ＩＩを使用してＮ－アセチルグルコサミンを用いて改造される。次いでガラクトースがガラクトシルトランスフェラーゼを使用してペプチドに加えられる。ＰＥＧ基は、改造されたペプチドをシアリルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ部分で誘導化されたＣＭＰ－シアル酸と接触させることにより改造されたペプチドに加えられる。図３３Ｄでは哺乳動物細胞系で発現したＥＰＯが、シアリダーゼの作用を介して末端シアル酸を除去することにより改造される。ガラクトースはガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体を使用して新たに露出した末端に加えられる。Ｎ－結合グリコシル単位の末端ガラクトース残基は、ＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアル酸で「キャップ化」される。末端ガラクトース残基は、適切なシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ１を使用してＰＥＧ部分を持つシアル酸で官能化される。図３３Ｅでは哺乳動物細胞系で発現したＥＰＯを、ＰＥＧ－誘導化シアル酸部分でＮ－結合グリコシル残基を官能化することにより改造する。ペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３および適切な修飾されたシアル酸供与体と接触させる。図３３Ｆでは昆虫細胞系で発現したＥＰＯが、ペプチドをＮ－アセチルグルコサミン供与体および１以上のＧｎＴＩ、ＧｎＴＩＩおよびＧｎＴＶと接触させることにより、１以上の末端Ｎ－アセチルグルコサミン残基を付加することにより改造される。次いでペプチドはＰＥＧ化ガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼと接触させることによりＰＥＧ化される。図３３Ｇでは昆虫細胞系で発現したＥＰＯを、適切なＮ－アセチルグルコサミン供与体および１以上のＧｎＴＩ、ＧｎＴＩＩおよびＧｎＴＶを使用して、末端Ｎ－アセチルグルコサミン残基を付加することにより改造する。加水分解的様式ではなく合成的に作用するように作られたガラクトシダーゼを利用して、活性化ＰＥＧ化ガラクトース供与体をＮ－アセチルグルコサミン残基に加える。図３３Ｈでは哺乳動物細胞で発現した突然変異ＥＰＯを、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより改造する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図３３Ｉは哺乳動物細胞系で発現した突然変異ＥＰＯの例示改造経路を説明する。ＰＥＧは、ＰＥＧ－修飾シアル酸およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してグリコシル残基へ加える。図３３Ｊは哺乳動物細胞系で発現した突然変異ＥＰＯに関する別の例示改造経路を説明する。シアル酸はシアル酸供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼでグリコシル残基に加えられる。

【０８７８】

別の例示態様では、本発明は図３４Ａ～３４Ｋに示すように顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）の修飾法を提供する。図３４Ｂでは哺乳動物細胞で発現

したＧＭ－ＣＳＦを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図３４Ｃでは哺乳動物細胞で発現したＧＭ－ＣＳＦを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次いでシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ１および／またはＳＴ３Ｇａｌ３を使用してさらにシアリル化する。図３４ＤではＮＳＯ細胞で発現したＧＭ－ＣＳＦを最初にシアリダーゼおよびα－ガラクトシダーゼで処理してグリコシル基を戻し改作し、次いでシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してシアリル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ１およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図３４Ｅでは、哺乳動物細胞で発現したＧＭ－ＣＳＦを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してさらにシアリル化する。図３４Ｆは哺乳動物細胞で発現したＧＭ－ＣＳＦを、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図３４Ｇでは哺乳動物細胞で発現しＧＭ－ＣＳＦを、シアル酸供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してシアリル化する。図３４Ｉでは昆虫細胞で発現したＧＭ－ＣＳＦが、適当な供与体および１以上のＧｎＴＩ、ＩＩ、ＩＶおよびＶを使用したＮ－アセチルグルコサミンの付加、続いて適当な供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用したＰＥＧ化ガラクトースの付加により修飾される。図３４Ｊでは酵母が発現したＧＭ－ＣＳＦを最初にエンドグリカナーゼおよび／またはマンノシダーゼで処理してグリコシル単位を戻し改作し、そして続いてガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化する。図３４Ｋでは哺乳動物細胞で発現したＧＭ－ＣＳＦを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そして続いてＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。次いでポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ１およびリンカーを介して連結された２つの反応性シアル酸残基と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよび第２のシアル酸残基を介して１つの反応性シアル酸に結合させる。ポリペプチドはさらにＳＴ３Ｇａｌ３およびトランスフェリンと接触させ、そしてこのようにしてトランスフェリンと連結するようになる。

【０８７９】

別の例示態様では、本発明はインターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）の修飾法を提供する。図３５Ａ～３５Ｎは幾つかの例を含む。図３５Ｂでは、種々の哺乳動物細胞で発現したＩＦＮγを最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作し、そして続いてＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図３５Ｃでは哺乳動物系で発現したＩＦＮγを最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作する。次いでポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化し、そしてさらにＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸の供与体を使用してシアリル化する。図３５Ｄでは哺乳動物細胞が発現したＩＦＮγを最初にシアリダーゼおよびα－ガラクトシダーゼで処理してシアル酸およびガラクトース残基を戻し改作する。次いでポリペプチドはガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化される。次いでＩＦＮγはＰＥＧ－シアル酸の供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してＰＥＧ化される。図３５Ｅでは哺乳動物系で発現したＩＦＮγを最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作する。次いでポリペプチドはＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化され、そしてさらにＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化される。図３５Ｆは哺乳動物系で発現したＩＦＮγを修飾するための別の方法を記載する。タンパク質はレブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図３５Ｇは哺乳動物細胞で発現したＩＦ

Ｎγは、シアル酸供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用したシアル酸の付加により改造される。図３５Ｉでは昆虫または真菌細胞で発現したＩＦＮγが、適切な供与体および１以上のＧｎＴ　Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶを使用してＮ－アセチルグルコサミンを付加することにより修飾される。このタンパク質はさらに、ＰＥＧ化ガラクトースの供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用したＰＥＧ部分の付加により修飾される。図３５Ｊは酵母で発現したＩＦＮγを修飾するための方法を提供する。ポリペプチドを最初にエンドグリカナーゼで処理してサッカリド鎖を戻し改作し、そして次にガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化する。次にＩＦＮγはＰＥＧ化シアル酸の供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してＰＥＧ化される。図３５Ｋでは哺乳動物細胞により生産されたＩＦＮγが以下のように修飾される：ポリペプチドを最初にＳＴ３Ｇａｌ３およびリンカーを介して反応性ガラクトースで誘導化されたシアル酸の供与体と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよびシアル酸残基を介して反応性ガラクトースに結合させる。ついでポリペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびエンドグリカナーゼで前処理したトランスフェリンと接触させ、そしてこれによりトランスフェリンがガラクトース残基を介して連結するようになる。図３５Ｌに具体的に説明するスキームでは、哺乳動物系で発現したＩＦＮγがＳＴ３Ｇａｌ３の作用を介して修飾され：ＰＥＧ化シアル酸が適当な供与体からＩＦＮγに転移する。図３５Ｍは昆虫または真菌細胞で発現したＩＦＮγを修飾する例であり、ここでポリペプチドのＰＥＧ化はＧｎＴ　Ｉおよび／またはＩＩを使用してＰＥＧ化Ｎ－アセチルグルコサミンを供与体からＩＦＮγに転移することにより達成される。図３５Ｎでは哺乳動物系で発現したＩＦＮγが、適当な供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用したＰＥＧ化シアル酸の付加により改造される。

【０８８０】

別の例示態様では、本発明はα_1アンチ－トリプシン（α１－プロテアーゼインヒビター）の修飾法を提供する。そのような例の幾つかは図３６Ａ～３６Ｏに見いだすことができる。図３６Ｂでは、種々の哺乳動物細胞で発現したα_1アンチ－トリプシンを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作する。次いでＰＥＧ化シアル酸残基がＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧのような適当な供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３のようなシアリルトランスフェラーゼを使用して加えられる。図３６Ｃではα_1アンチ－トリプシン修飾の別のスキームを示す。哺乳動物系で発現したα_1アンチ－トリプシンを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作する。次いでＰＥＧで誘導化されたシアル酸残基が、適当な供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３のようなシアリルトランスフェラーゼを使用して加えられる。続いて分子はシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用したシアル酸残基の付加によりさらに修飾される。図３６Ｄでは、哺乳動物細胞が発現したα_1アンチ－トリプシンを最初にシアリダーゼおよびα－ガラクトシダーゼで処理して末端シアル酸およびα－結合ガラクトース残基を戻し改作する。次いでポリペプチドはガラクトシルトランスフェラーゼおよび適当なガラクトース供与体を使用してガラクトシル化される。さらにＰＥＧで誘導化したシアル酸が、ＰＥＧ化シアル酸供与体を使用してＳＴ３Ｇａｌ３の作用により加えられる。図３６Ｅでは哺乳動物系で発現したα_1アンチ－トリプシンは最初に、シアリダーゼを使用して末端シアル酸残基が戻し改作される。次いでＰＥＧが、ＰＥＧ化シアル酸をＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧのような供与体からα_1アンチ－トリプシンへ転移することを媒介するＳＴ３Ｇａｌ３の作用を介してＮ－結合グリコシル残基に加えられる。引き続きより多くのシアル酸残基を、シアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用して結合させる。図３６Ｆはα_1アンチ－トリプシンを改造する別の方法を具体的に説明する。哺乳動物細胞で発現したα_1アンチ－トリプシンを、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図３６Ｇはα_1アンチ－トリプシン修飾の別の方法を開示する。哺乳動物発現系から得たα_1アンチ－トリプシンは、シアル酸供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してシアル酸の付加により改造する。図３６Ｉで

はα$_1$アンチ－トリプシンが昆虫または酵母細胞で発現し、そしてポリペプチドをＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミンおよび１以上のＧｎＴ　Ｉ、ＩＩ、ＩＶまたはＶと接触させることにより、末端Ｎ－アセチルグルコサミン残基を付加することにより改造される。ついでこのポリペプチドは、ＰＥＧ化ガラクトースの供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してＰＥＧ部分を用いて修飾される。図３６Ｊは酵母細胞で発現したα$_1$アンチ－トリプシンを最初にエンドグリカナーゼで処理してグリコシル鎖を戻し改作する。これを次にガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体を使用してガラクトシル化する。次にポリペプチドはＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化される。図３６Ｋではα$_1$アンチ－トリプシンが哺乳動物系で発現する。ポリペプチドを最初にＳＴ３Ｇａｌ３およびリンカーを介して反応性ガラクトースで誘導化されたシアル酸の供与体と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよびシアル酸残基を介して反応性ガラクトースに結合させる。ついでポリペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびエンドグリカナーゼで前処理したトランスフェリンと接触させ、そしてこれによりトランスフェリンがガラクトース残基を介して連結するようになる。図３６Ｍでは酵母で発現したα$_1$アンチ－トリプシンを最初にエンドグリカナーゼで処理してそのグリコシル基を戻し改作する。次いでタンパク質はガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ部分を持つガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化する。図３６Ｎでは植物細胞で発現したα$_1$アンチ－トリプシンをヘキソサミニダーゼ、マンノシダーゼおよびキシロシダーゼで処理してグリコシル鎖を戻し改作し、そして続いてＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよび適当な供与体を使用して、ＰＥＧ部分で誘導化されたＮ－アセチルグルコサミンで修飾する。図３６Ｏでは哺乳動物細胞で発現したα$_1$アンチ－トリプシンを、ＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧで誘導化したシアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化シアル酸残基を加えることにより修飾する。

【０８８１】

別の例示態様では、本発明は図３７Ａ～３７Ｋに示すグルコセレブロシダーゼ（β－グルコシダーゼＣｅｒｅｚｙｍｅ（商標）またはＣｅｒｅｄａｓｅ（商標））の修飾法を提供する。図３７Ｂでは、哺乳動物系で発現したＣｅｒｅｚｙｍｅ（商標）を最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図３７Ｃでは哺乳動物細胞で発現したＣｅｒｅｚｙｍｅ（商標）を最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびマンノース－６－ホスフェートで誘導化した反応性シアル酸を使用してマンノース－６－ホスフェート基を結合させ、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。図３７ＤではＮＳＯ細胞が発現したＣｅｒｅｚｙｍｅ（商標）を最初にシアリダーゼおよびガラクトシダーゼで処理してグリコシル基を戻し改作し、そして次いでガラクトース供与体およびα－ガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化する。次いでマンノース－６－ホスフェート部分がＳＴ３Ｇａｌ３およびマンノース－６－ホスフェートで誘導化した反応性シアル酸を使用して分子に加えられる。図３７Ｅでは、哺乳動物細胞で発現したＣｅｒｅｚｙｍｅ（商標）を最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、これを次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。図３７Ｆでは、哺乳動物細胞で発現したＣｅｒｅｚｙｍｅ（商標）を、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンを１以上のマンノース－６－ホスフェート基のような部分で誘導化する。図３７Ｇは哺乳動物細胞で発現したＣｅｒｅｚｙｍｅ（商標）を、シアル酸供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してシアリル化する。図３７Ｉでは昆虫細胞で発現したＣｅｒｅｚｙｍｅ（商標）は、最初に適当な供与体および１以上のＧｎＴ　Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶを使用してＮ－アセチルグルコサミンが加えられ、そして次にガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化される。図３７Ｊでは酵母で発現したＣｅｒｅｚｙｍｅ（商標）を最

初にエンドグリカナーゼで処理してグリコシル基を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次にＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図３７Ｋでは哺乳動物細胞で発現したＣｅｒｅｚｙｍｅ（商標）を、最初にＳＴ３Ｇａｌ３およびリンカーを介して連結した２つの反応性シアル酸残基と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよび第２のシアル酸残基を介して１つの反応性シアル酸に結合させる。ついでポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３および脱シアリル化トランスフェリンと接触させ、そしてこれによりトランスフェリンが連結するようになる。次いでこのポリペプチドはシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してシアリル化される。

【０８８２】

別の例示態様では、本発明は組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）およびその突然変異体の修飾法を提供する。幾つかの具体的修飾スキームを図３８Ａ～３８Ｗに提示する。図３８Ｂは１つの修飾手順を具体的に説明する：ＴＰＡが哺乳動物細胞により発現された後、これを１以上のマンノシダーゼ（１つまたは複数）およびシアリダーゼで処理してマンノシルおよび／またはシアル酸残基を戻し改作する。次いで末端Ｎ－アセチルグルコサミンを、ポリペプチドと適切なＮ－アセチルグルコサミンおよび１以上のＧｎＴ　Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶとを接触させることにより加える。ＴＰＡはさらにガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化される。次いでＰＥＧは、ＳＴ３Ｇａｌ３により触媒されるシアル化により、そしてＰＥＧ部分で誘導化されたシアル酸の供与体を使用して分子に結合させる。図３８Ｃでは、ＴＰＡが昆虫または真菌細胞で発現する。修飾には、適切なＮ－アセチルグルコサミンの供与体およびＧｎＴ　Ｉおよび／またはＩＩを使用したＮ－アセチルグルコサミンの付加：ガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用したガラクトシル化：およびＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧで誘導化されたシアル酸の供与体を使用したシアリル化によるＰＥＧの結合工程を含む。図３８Ｄでは、ＴＰＡが酵母で発現し、そして続いてエンドグリカナーゼで処理されてサッカリド鎖を戻し改作する。ポリペプチドは、供与体からＴＰＡへのＰＥＧ－ガラクトースの転移を触媒するガラクトシルトランスフェラーゼの作用を介してさらにＰＥＧ化される。図３８Ｅでは、ＴＰＡが昆虫または酵母細胞で発現する。ついでポリペプチドをα－およびβ－マンノシダーゼで処理して末端マンノシル残基を戻し改作する。さらにＰＥＧ部分は、ガラクトシルトランスフェラーゼにより媒介される適当な供与体からＴＰＡへのＰＥＧ－ガラクトースの転移を介して分子へ結合させる。図３８Ｆは昆虫または酵母系から得たＴＰＡの異なる修飾法を提供する：ポリペプチドは、Ｎ－アセチルグルコサミンの供与体およびＧｎＴ　Ｉおよび／またはＩＩを使用したＮ－アセチルグルコサミンの付加、続いてガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ化ガラクトースの供与体を使用したガラクトシル化により改造される。図３８Ｇは昆虫または酵母細胞で発現したＴＰＡの別の改造スキームを提供する。末端Ｎ－アセチルグルコサミンは、Ｎ－アセチルグルコサミンの供与体およびＧｎＴ　Ｉおよび／またはＩＩを使用して加える。加水分解的様式というよりむしろ合成的に作用するように修飾されたガラクトシダーゼを利用して、適切な供与体からＮ－アセチルグルコサミン残基へＰＥＧ化ガラクトースを加える。図３８Ｉでは、哺乳動物系で発現したＴＰＡを最初にシアリダーゼおよびガラクトシダーゼで処理してシアル酸およびガラクトース残基を戻し改作する。ポリペプチドはさらに、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図３８Ｊでは、哺乳動物系で発現したＴＰＡをこのスキームに従い改造する：最初にポリペプチドをα－およびβ－マンノシダーゼで処理して末端マンノシル残基を戻し改作する：次いでシアル酸残基をシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用して末端ガラクトシル残基に結合させる：さらにＴＰＡは、ガラクトシルトランスフェラーゼにより触媒される供与体からＮ－アセチルグルコサミニル残基へのＰＥＧ化ガラクトースの転移を介してＰＥＧ化される。図３８ＫではＴＰＡが植物細胞で発現する。この例の修飾手順は以下の通

りである：ＴＰＡを最初にヘキソサミニダーゼ、マンノシダーゼおよびキシロシダーゼで処理してそのグリコシル基を戻し改作する；次いでＰＥＧ化Ｎ－アセチルグルコサミンを、適当な供与体およびＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼを使用してＴＰＡに加える。図３８Ｍでは、哺乳動物細胞で発現したＴＰＡ突然変異体（ＴＮＫ　ＴＰＡ）を改造する。末端シアル酸残基を最初にシアリダーゼを使用して戻し改作する；次いでポリペプチドがＰＥＧ化されるようにＳＴ３Ｇａｌ３を使用してＰＥＧ化シアル酸を供与体からＴＮＫ　ＴＰＡへ転移する。図３８Ｎでは、哺乳動物系で発現したＴＮＫ　ＴＰＡを最初にシアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作する。次いでタンパク質を、供与体としてＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧおよびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してＰＥＧ化し、そしてさらにシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してシアリル化する。図３８Ｏでは、ＮＳＯ細胞が発現したＴＮＫ　ＴＰＡを最初にシアリダーゼおよびα－ガラクトシダーゼで処理して末端シアル酸およびガラクトース残基を戻し改作する。ついでＴＮＫ　ＴＰＡは、ガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化される。この改造スキームの最終工程は、ＰＥＧ部分で誘導化されたシアル酸を、シアリルトランスフェラーゼまたはＳＴ３Ｇａｌ３を使用して供与体からＴＮＫ　ＴＰＡへ転移することである。図３８ＱではＴＮＫ　ＴＰＡが哺乳動物系で発現し、そして最初にシアリダーゼで処理されて末端シアル酸残基が戻し改作される。次いでタンパク質はＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してシアリル化される。次いでタンパク質はシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してシアリル化される。図３８Ｒでは哺乳動物系で発現したＴＮＫ　ＴＰＡを、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図３８Ｓでは哺乳動物細胞で発現したＴＮＫ　ＴＰＡを異なる方法を介して修飾する：ポリペプチドは、シアル酸供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用したシアル酸の付加により改造する。図３８Ｕでは、昆虫細胞で発現したＴＮＫ　ＴＰＡを、適当な供与体および１以上のＧｎＴ　Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶを使用してＮ－アセチルグルコサミンの付加により改造する。このタンパク質はさらに、ＰＥＧ化ガラクトースの供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用したＰＥＧ部分の付加により修飾される。図３８Ｖでは、ＴＮＫ　ＴＰＡは酵母で発現する。ポリペプチドを最初にエンドグリカナーゼで処理してそのグリコシル鎖を戻し改作し、そして次いでＰＥＧで誘導化したガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してＰＥＧ化する。図３８ＷではＴＮＫ　ＴＰＡが哺乳動物系で生産される。ポリペプチドを最初に、ＳＴ３Ｇａｌ３およびリンカーを介して反応性ガラクトースで誘導化したシアル酸の供与体と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよびシアル酸残基を介して反応性ガラクトースに結合させる。次いでポリペプチドをガラクトシルトランスフェラーゼおよびＣＨＯで生産された抗－ＴＮＦ　ＩＧキメラと接触させて、これによりキメラはガラクトース残基を介して連結するようになる。

【０８８３】

別の例示態様では、本発明はインターロイキン－２（ＩＬ－２）を修飾する方法を提供する。図３９Ａ～３９Ｇは幾つかの例を提供する。図３９Ｂは２段階の修飾スキームを提供する：哺乳動物細胞により生産されたＩＬ－２を最初にシアリダーゼで処理してその末端シアル酸残基を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図３９Ｃでは、昆虫細胞が発現したＩＬ－２を最初にガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化する。続いてＩＬ－２を、ＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図３９Ｄでは細菌で発現したＩＬ－２を、適切な供与体およびＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼを使用してＮ－アセチルガラクトサミンで、続いてＰＥＧ－シアル酸供与体およびシアリルトランスフェラーゼを用いたＰＥＧ化工程で修飾する。図３９Ｅでは、哺乳動物系により生産されたＩＬ－２を修飾する別のスキームを提供する。ポリペプチドを、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピング

し、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図３９Ｆは大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）で発現したＩＬ－２の改造例を具体的に説明する。ポリペプチドは、ＰＥＧ基で誘導化した反応性Ｎ－アセチルガラクトサミン複合体および加水分解的酵素というよりはむしろ合成的酵素として機能するように修飾された酵素を使用してＰＥＧ化する。図３９Ｇでは、細菌が発現したＩＬ－２を適切な供与体およびＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼを使用してＰＥＧ化Ｎ－アセチルガラクトサミンの付加により修飾する。

【０８８４】

別の例示態様では、本発明は図４０Ａ～４０Ｎに示すように第ＶＩＩＩ因子の修飾法を提供する。図４０Ｂでは哺乳動物細胞で発現した第ＶＩＩＩ因子を最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４０Ｃでは、哺乳動物細胞で発現した第ＶＩＩＩ因子を最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３および適切な供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次にＳＴ３Ｇａｌ１およびシアル酸供与体を使用してさらにシアリル化する。

【０８８５】

図４０Ｅでは、哺乳動物細胞が生産した第ＶＩＩＩ因子を、ＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化の１工程により修飾する。図４０Ｆは哺乳動物細胞により発現された第ＶＩＩＩ因子の別の修飾例を提供する。タンパク質は、ＳＴ３Ｇａｌ１およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化される。図４０Ｇでは哺乳動物細胞が発現した第ＶＩＩＩ因子を別のスキームに従い改造する：これはα２，８－シアリルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化される。図４０Ｉでは哺乳動物細胞により生産された第ＶＩＩＩ因子を、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図４０Ｊでは哺乳動物細胞で発現した第ＶＩＩＩ因子を、最初にエンド－Ｈで処理してグリコシル基を戻し改作する。ついでこれをガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化する。図４０Ｋでは哺乳動物系で発現した第ＶＩＩＩ因子を、最初にＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化し、ついでエンド－Ｈで処理してグリコシル基を戻し改作し、そして次いでガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体でＰＥＧ化する。図４０Ｌでは哺乳動物系で発現した第ＶＩＩＩ因子を、最初にマンノダーゼで処理して末端マンノシル残基を戻し改作し、次いで適当な供与体およびＧｎＴ　Ｉおよび／またはＩＩを使用してＮ－アセチルグルコサミン基を加え、そして次にガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化する。図４０Ｍでは哺乳動物細胞で発現した第ＶＩＩＩ因子を最初にマンノダーゼで処理してマンノシル単位を戻し改作し、次いでＮ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよび適当な供与体を使用してＮ－アセチルグルコサミン基を加える。これはさらにガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体を使用してガラクトシル化され、そして次にＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化される。図４０Ｎでは第ＶＩＩＩ因子が哺乳動物細胞で生産され、そして以下のように修飾される：これは最初にマンノダーゼで処理して末端マンノシル基を戻し改作する。次いでＰＥＧ化Ｎ－アセチルグルコサミン基が、ＧｎＴＩおよびＰＥＧ化Ｎ－アセチルグルコサミンの適当な供与体を使用して加えられる。

【０８８６】

別の例示態様では、本発明は図４１Ａ～４１Ｍに示すようにウロキナーゼを修飾する方法を提供する。図４１Ｂでは哺乳動物細胞で発現したウロキナーゼを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４１Ｃでは、哺乳動物細胞で発現したウロキナ

ーゼを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次にＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。図４１Ｄでは哺乳動物系で発現したウロキナーゼを最初にシアリダーゼおよびガラクトシダーゼで処理してグリコシル鎖を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびα－ガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３またはシアリルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４１Ｅでは哺乳動物細胞で発現したウロキナーゼを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次にＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してさらにシアリル化する。図４１Ｆでは哺乳動物細胞で発現したウロキナーゼを、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図４１Ｇでは哺乳動物細胞で発現したウロキナーゼを、シアル酸供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してシアリル化する。図４１Ｉでは昆虫細胞で発現したウロキナーゼを以下の工程で修飾する：最初にＮ－アセチルグルコサミンを、Ｎ－アセチルグルコサミンの適当な供与体および１以上のＧｎＴ　Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶを使用してポリペプチドに加え：次いでガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化ガラクトースを加える。図４１Ｊでは酵母で発現したウロキナーゼを最初にエンドグリカナーゼで処理してグリコシル基を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４１Ｋでは哺乳動物細胞で発現したウロキナーゼを、最初にＳＴ３Ｇａｌ３およびリンカーを介して連結された２つの反応性シアル酸残基と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよび第２シアル酸残基を介して１つの反応性シアル酸に結合させる。次いでポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ１および哺乳動物細胞で生産された脱シアリル化ウロキナーゼと接触させ、そしてこれによりウロキナーゼの第２分子と連結するようになる。次いで全分子はさらにシアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ１および／またはＳＴ３Ｇａｌ３を使用してシアリル化される。図４１Ｌは単離したウロキナーゼを最初にスルホヒドロラーゼで処理してスルフェート基を除去し、そして次にシアリルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４１Ｍでは単離したウロキナーゼを最初にスルホヒドロラーゼおよびヘキソサミニダーゼで処理してスルフェート基およびヘキソサミン基を除去し、そして次にガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化する。

【０８８７】

別の例示態様では、本発明は図４２Ａ～４２Ｋに示すようにＤＮａｓｅＩを修飾する方法を提供する。図４２Ｂでは哺乳動物系で発現したＤＮａｓｅＩを以下の工程で修飾する：最初にタンパク質をシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作する；次いでタンパク質をＳＴ３Ｇａｌ３でＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４２Ｃでは、哺乳動物細胞で発現したＤＮａｓｅＩを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３でＰＥＧ－シアル酸供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次にＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。図４２Ｄでは哺乳動物系で発現したＤＮａｓｅＩを最初にシアリダーゼおよびガラクトシダーゼに暴露してグリコシル基を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびα－ガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３またはシアリルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４２Ｅでは哺乳動物細胞で発現したＤＮａｓｅＩを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸供与体を使用してＰＥＧ化し、そして次にＳＴ３Ｇａｌ３でシアル酸供与体を使用してシアリル化する。図４２Ｆでは哺乳動物細胞で発現したＤＮａｓｅＩを、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体

で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図４２Ｇでは哺乳動物細胞で発現したＤＮａｓｅＩを、シアル酸供与体およびα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してシアリル化する。図４２Ｉでは昆虫細胞で発現したＤＮａｓｅＩには、最初に適当な供与体および１以上のＧｎＴ　Ｉ、ＩＩ、ＩＶおよびＶを使用してＮ－アセチルグルコサミンが加えられる。次いでタンパク質は、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化される。図４２Ｊでは酵母で発現したＤＮａｓｅＩを最初にエンドグリカナーゼで処理してグリコシル単位を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４２Ｋでは哺乳動物細胞で発現したＤＮａｓｅＩを、最初にＳＴ３Ｇａｌ３およびリンカーを介して連結された２つの反応性シアル酸残基と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよび第２シアル酸残基を介して１つの反応性シアル酸に結合させる。次いでポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ１および脱シアリル化α１－プロテアーゼインヒビターと接触させ、そしてこれによりシアル酸残基を介してインヒビターと連結するようになる。次いでポリペプチドはさらに適当な供与体およびＳＴ３Ｇａｌ１および／またはＳＴ３Ｇａｌ３を使用してシアリル化される。

【０８８８】

別の例示態様では、本発明は図４３Ａ～４３Ｌに示すようにＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたインスリンを修飾する方法を提供する。図４３Ｂでは哺乳動物系で発現したインスリンを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸供与体を使用してＰＥＧ化する。図４３Ｃでは昆虫細胞で発現したインスリンを、適当な供与体およびＧｎＴ　Ｉおよび／またはＩＩを使用してＰＥＧ化Ｎ－アセチルグルコサミンの付加により修飾する。図４３Ｄでは酵母で発現したインスリンを最初にエンド－Ｈで処理してグリコシル基を戻し改作し、次いでガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化する。図４３Ｆでは哺乳動物細胞で発現したインスリンを、最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ１およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４３Ｇでは昆虫細胞で発現したインスリンを、適当な供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してＰＥＧ化ガラクトースの付加により修飾する。図４３Ｈでは細菌で発現したインスリンに最初に、適当な供与体およびＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼを使用してＮ－アセチルガラクトサミンを加える。次いでポリペプチドはシアリルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４３Ｊでは細菌で発現したインスリンが異なる方法を通して修飾される：ＰＥＧ化Ｎ－アセチルガラクトサミンを、適当な供与体およびＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼを使用してタンパク質に加える。図４３Ｋでは細菌で発現したインスリンを以下の別のスキームに従い修飾する：ポリペプチドを最初にＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼおよびリンカーを介した反応性シアル酸で誘導化した反応性Ｎ－アセチルガラクトサミンと接触させて、ポリペプチドをリンカーおよびＮ－アセチルガラクトサミンを介して反応性シアル酸に結合させる。次いでポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３およびアシアロ－トランスフェリンと接触させ、それゆえにトランスフェリンに連結するようになる。次いでポリペプチドはＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化される。図４３Ｌでは細菌で発現したインスリンをさらに別の方法を使用して修飾する：ポリペプチドは最初にＮＨＳ－ＣＯ－リンカー－ＳＡ－ＣＭＰに暴露されて、リンカーを介して反応性シアル酸残基に連結するようになる。次いでポリペプチドはＳＴ３Ｇａｌ３およびアシアロトランスフェリンを使用してトランスフェリンに連結される。次いでポリペプチドはＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してさらにシアリル化される。

【０８８９】

別の例示態様では、本発明は図４４Ａ～４４Ｋに示すようにＢ型肝炎抗原（Ｍ抗原－ｐｒｅＳ２およびＳ）を修飾する方法を提供する。図４４ＢではＭ－抗原が哺乳動物系で発現され、そして最初にシアリダーゼで処理されてシアル酸残基を戻し改作し、そして続いてＳＴ３Ｇａｌ３およびリンカーを介して脂質Ａに連結した反応性シアル酸を使用して脂質Ａに結合することにより修飾される。図４４Ｃでは哺乳動物細胞で発現したＭ－抗原を、シアリダーゼで処理して末端シアル酸残基を戻し改作し、次いでＳＴ３Ｇａｌ１およびリンカーを介しトキシンに連結した反応性シアル酸を使用してリンカーを介して破傷風トキシンに結合し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。図４４Ｄでは哺乳動物系で発現したＭ－抗原を最初にガラクトシダーゼで処理してガラクトシル残基を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化する。次いでポリペプチドは、ＳＴ３Ｇａｌ１および適当な供与体を使用して加えたＫＬＨでシアル酸を誘導化する。図４４Ｅでは酵母で発現したＭ－抗原を最初にマンノダーゼで処理してマンノシル残基を戻し改作し、そして次いでＧｎＴ　Ｉおよびジフテリアトキシンに連結したＮ－アセチルグルコサミンの供与体を使用してジフテリアトキシンに結合させる。図４４Ｆでは哺乳動物細胞が発現したＭ－抗原を、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。ペプチドのグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図４４Ｇでは哺乳動物系から得たＭ－抗原が、シアル酸供与体およびポリα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用したシアリル化により改造される。図４４Ｉでは昆虫細胞で発現したＭ－抗原を、ＧｎＴ　ＩＩおよびナイセリア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）タンパク質に連結したＮ－アセチルグルコサミンの適当な供与体を使用することによりナイセリア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）タンパク質に結合させる。図４４Ｊでは酵母が発現したＭ－抗原を、最初にエンドグリカナーゼで処理してグリコシル鎖を戻し改作し、そして次いでガラクトシルトランスフェラーゼおよびナイセリア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）タンパク質に連結されたガラクトースの適切な供与体を使用してナイセリア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）タンパク質に結合する。図４４Ｋは酵母で発現したＭ－抗原の修飾の別の例である。ポリペプチドを最初にマンノダーゼで処理して末端マンノシル残基を戻し改作し、そして次いでＧｎＴ　Ｉおよび／またはＩＩを使用してＮ－アセチルグルコサミンを加える。続いてポリペプチドを、ガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸供与体を使用してシアル酸残基でキャッピングする。

【０８９０】

別の例示態様では、本発明は図４５Ａ～４５Ｋに示すようにヒト成長ホルモン（Ｎ、Ｖおよびそれらの変異体）を修飾する方法を提供する。図４５ＢではＮ－結合部位を含むように突然変異させたか、または哺乳動物により生産されたＮ－結合部位を有する天然に存在するアイソフォーム（すなわち胎盤の酵素）のいずれかのヒト成長ホルモンを、最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そして続いてＳＴ３Ｇａｌ３を用いて、そしてＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４５Ｃでは昆虫細胞で発現したヒト成長ホルモンが、ＧｎＴ　Ｉおよび／またはＩＩおよびＰＥＧ化Ｎ－アセチルグルコサミンの適切な供与体を使用してＰＥＧ化Ｎ－アセチルグルコサミンの付加により修飾される。図４５Ｄでは、ヒト成長ホルモンを酵母で発現させ、エンド－Ｈで処理してグリコシル基を戻し改作し、そしてさらにＰＥＧ化ガラクトースの供与体を使用してガラクトシルトランスフェラーゼを用いてＰＥＧ化する。図４５Ｆでは哺乳動物系で発現したヒト成長ホルモン－ムチン融合タンパク質を、最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そして続いてＰＥＧ－シアル酸の供与体およびＳＴ３Ｇａｌ１を使用したＰＥＧ化により修飾する。図４５Ｇでは昆虫細胞で発現したヒト成長ホルモン－ムチン融合タンパク質を、ガラクトシルトランスフェラーゼでＰＥＧ化ガラクトースの供与体を使用したＰＥＧ化により改造する。図４５Ｈではヒト成長ホルモン－ムチン融合タンパク質が細菌で生産される。Ｎ－アセチルガラクトサミンが最初にＮ－アセチルガラクトサ

ミントランスフェラーゼの作用によりＮ－アセチルガラクトサミンの供与体を使用して融合タンパク質に加えられ、続いてＰＥＧ－シアル酸の供与体およびシアリルトランスフェラーゼを使用して融合タンパク質をＰＥＧ化する。図４５Ｉでは細菌が発現したヒト成長ホルモン－ムチン融合タンパク質の別の修飾スキームを記載する：融合タンパク質は、ＰＥＧ化Ｎ－アセチルガラクトサミンの供与体を使用してＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼの作用を介してＰＥＧ化される。図４５Ｊはヒト成長ホルモン－ムチン融合タンパク質のさらなる改造スキームを提供する。融合タンパク質を最初にＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼおよびリンカーを介して反応性シアル酸で誘導化したＮ－アセチルガラクトサミンの供与体と接触させて、融合タンパク質をリンカーおよびＮ－アセチルガラクトサミンを介して反応性シアル酸に結合させる。次いで融合タンパク質をシアリルトランスフェラーゼおよびアシアロ－トランスフェリンと接触させ、このようにしてシアル酸残基を介してトランスフェリンが連結するようになる。次いで融合タンパク質は、ＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアル酸残基でキャッピングする。図４５Ｋでは、細菌で生産されたヒト成長ホルモン（Ｎ）の修飾についてさらに別のスキームを与える。ポリペプチドを最初にＮＨＳ－ＣＯ－リンカー－ＳＡ－ＣＭＰと接触させ、そしてリンカーを介して反応性シアル酸とカップリングされるようになる。次いでポリペプチドをＳＴ３Ｇａｌ３およびアシアロ－トランスフェリンと接触させ、そしてシアル酸残基を介してトランスフェリンと連結するようになる。次いでポリペプチドはＳＴ３Ｇａｌ３およびシアル酸供与体を使用してシアリル化される。

【０８９１】

別の例示態様では、本発明は図４６Ａ～Ｇに示すようにＴＮＦレセプターＩｇＧ融合タンパク質（ＴＮＦＲ－ＩｇＧ、またはＥｎｂｒｅｌ（商標））を改造する方法を提供する。図４６Ｂは哺乳動物系で発現したＴＮＦＲ－ＩｇＧが最初にシアル酸供与体およびシアリルトランスフェラーゼ、ＳＴ３Ｇａｌ１でシアリル化され；次いで融合タンパク質がガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼでガラクトシル化され；次いで融合タンパク質がＳＴ３Ｇａｌ３の作用およびＰＥＧで誘導化されたシアル酸の供与体を介してＰＥＧ化される修飾手順を具体的に説明する。図４６Ｃでは哺乳動物細胞で発現したＴＮＦＲ－ＩｇＧを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作する。続いてＰＥＧ部分は、ＳＴ３Ｇａｌ１により触媒される反応で供与体から融合タンパク質へＰＥＧ化シアル酸を転移することによりＴＮＦＲ－ＩｇＧに結合させる。図４６ＤではＴＮＦＲ－ＩｇＧが哺乳動物系で発現され、そしてＰＥＧ－ガラクトース供与体を使用したガラクトシルトランスフェラーゼにより媒介されるガラクトシル化法を介したＰＥＧの付加により修飾される。図４６ＥではＴＮＦＲ－ＩｇＧが哺乳動物系で発現される。融合タンパク質の改造における第１工程は、シアル酸供与体およびシアリルトランスフェラーゼ、ＳＴ３Ｇａｌ１を使用したＯ－結合シアル酸残基の付加である。続いてＰＥＧ化ガラクトースを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ部分を有するガラクトースの適当な供与体を使用して融合タンパク質に加える。図４６Ｆでは哺乳動物細胞で発現したＴＮＦＲ－ＩｇＧを最初に、レブリン酸で修飾したシアル酸供与体で適切な末端残基をキャッピングし、反応性ケトンをシアル酸供与体に付加することにより修飾する。融合タンパク質のグリコシル残基への付加後、ケトンをヒドラジン－またはアミン－ＰＥＧのような部分で誘導化する。図４６Ｇでは哺乳動物細胞で発現したＴＮＦＲ－ＩｇＧは、ＰＥＧ化シアル酸をＰＥＧ部分を持つシアル酸の供与体から融合タンパク質へ転移する反応を触媒する２，８－シアリルトランスフェラーゼにより改造する。

【０８９２】

別の例示態様では、本発明は図４７Ａ～４７Ｄに示すようにＨｅｒｅｃｅｐｔｉｎ（商標）結合物の生成法を提供する。図４７ＢではＨｅｒｅｃｅｐｔｉｎ（商標）を哺乳動物系で発現させ、そして最初にガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化する。次いでＨｅｒｅｃｅｐｔｉｎ（商標）は、反応性シアル酸－トキシン複合体を使用してＳＴ３Ｇａｌ３の作用を通してシアル酸を介してトキシンに結合させる。図４７Ｃでは哺乳動物細胞または真菌のいずれかで生産されたＨｅｒｅｃ

ｅｐｔｉｎ（商標）は、ガラクトシルトランスフェラーゼおよび反応性ガラクトース－トキシン複合体を使用してガラクトシル化の工程を通してトキシンに結合させる。図４７ＤはＨｅｒｅｃｅｐｔｉｎ（商標）結合物の別の作成スキームを含む：真菌で生産されたＨｅｒｅｃｅｐｔｉｎ（商標）を最初にエンド－Ｈで処理してグリコシル基を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３および反応性シアル酸－放射性同位体複合体を使用することによるシアリル化により放射性同位体と結合させる。

【０８９３】

別の例示態様では、本発明は図４８Ａ～４８Ｄに示すようにＳｙｎａｇｉｓ（商標）結合物の生成法を提供する。図４８Ｂでは哺乳動物細胞で発現したＳｙｎａｇｉｓ（商標）を最初にガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化される。図４８Ｃでは哺乳動物または真菌細胞で発現したＳｙｎａｇｉｓ（商標）は、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化する。図４８Ｄは発現したＳｙｎａｇｉｓ（商標）を最初にエンド－Ｈで処理してグリコシル基を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。

【０８９４】

別の例示態様では、本発明は図４９Ａ～４９Ｄに示すようにＲｅｍｉｃａｄｅ（商標）結合物の生成法を提供する。図４９Ｂでは哺乳動物系で発現したＲｅｍｉｃａｄｅ（商標）を最初にガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図４９Ｃでは哺乳動物系で発現したＲｅｍｉｃａｄｅ（商標）は、適当な供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してＰＥＧ化ガラクトースの付加により修飾する。図４９Ｄは真菌で発現したＲｅｍｉｃａｄｅ（商標）を最初にエンド－Ｈで処理してグリコシル鎖を戻し改作し、次いでガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ３および放射性同位体で誘導化した反応性シアル酸を使用して放射性同位体に結合する。

【０８９５】

別の例示態様では、本発明はＮグリコシル化部位を含むように突然変異させたＲｅｏｐｒｏを修飾する方法を提供する。図５０Ａ～５０Ｌはそのような例を含む。図５０Ｂでは哺乳動物系で発現したＲｅｏｐｒｏを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そしてＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図５０Ｃでは昆虫細胞で発現したＲｅｏｐｒｏを、適当な供与体およびＧｎＴ　Ｉおよび／またはＩＩを使用したＰＥＧ化Ｎ－アセチルグルコサミンの付加により修飾する。図５０Ｄでは酵母で発現したＲｅｏｐｒｏを最初にエンド－Ｈで処理してグリコシル基を戻し改作する。続いてタンパク質はガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧする。図５０Ｆでは哺乳動物細胞で発現したＲｅｏｐｒｏを最初にシアリダーゼで処理してシアル酸残基を戻し改作し、そして次いでＳＴ３Ｇａｌ１で、ＰＥＧ化シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図５０Ｇでは昆虫細胞で発現したＲｅｏｐｒｏを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－ガラクトースの供与体を使用してＰＥＧ化により修飾する。図５０Ｈでは細菌で発現したＲｅｏｐｒｏは最初に、Ｎ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼおよび適当な供与体を使用してＮ－アセチルグルコサミンが加えられる。次いでタンパク質はシアリルトランスフェラーゼおよびＰＥＧ－シアル酸の供与体を使用してＰＥＧ化する。図５０Ｊでは細菌で発現したＲｅｏｐｒｏが異なるスキームで修飾される：これはＰＥＧ化Ｎ－アセチルガラクトサミンの供与体を使用して、Ｎ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼの作用を介したＰＥＧ化である。図５０Ｋでは細菌で発現したＲｅｏｐｒｏを別の方法で修飾する：最初にポリペプチドをＮ－アセチルガラクトサミントランスフェラーゼおよびリンカーを介

して反応性シアル酸で誘導化したＮ－アセチルガラクトサミンの供与体と接触させて、ポリペプチドをリンカーおよびＮ－アセチルガラクトサミンを介して反応性シアル酸に結合させる。次いでポリペプチドはＳＴ３Ｇａｌ３およびアシアロ－トランスフェリンと接触させ、これによりシアル酸残基を介してトランスフェリンに連結するようになる。次いでポリペプチドは適当な供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してシアル酸残基でキャッピングする。図５０Ｌでは細菌で発現したＲｅｏｐｒｏのさらなる修飾スキームを提供する。ポリペプチドを最初にＮＨＳ－ＣＯ－リンカー－ＳＡ－ＣＭＰに暴露して、リンカーを介して反応性シアル酸に連結するようにする。次いでポリペプチドはＳＴ３Ｇａｌ３およびアシアロ－トランスフェリンと接触させ、そしてこのようにしてシアル酸残基を介してトランスフェリンと連結するようにする。次いでポリペプチドは適切な供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してシアル酸残基でキャッピングする。

【０８９６】

別の例示態様では、本発明はＲｉｔｕｘａｎ（商標）結合物を生産する方法を提供する。図５１Ａ～５１Ｇはその幾つかの例を提示する。図５１Ｂでは種々の哺乳動物系で発現したＲｉｔｕｘａｎ（商標）は、最初に適切なガラクトース供与体およびガラクトシルトランスフェラーゼを使用してガラクトシル化される。次いでペプチドは、シアル酸供与体およびＳＴ３Ｇａｌ３を使用してトキシン部分で誘導化したシアル酸で官能化される。図５１Ｃでは哺乳動物細胞または真菌細胞で発現したＲｉｔｕｘａｎ（商標）を、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体を使用してガラクトシル化し、これは薬剤部分を含有するペプチドガラクトースを提供する。図５１Ｄでは真菌系で発現したＲｉｔｕｘａｎ（商標）を改造する別の例を提供する。ポリペプチドのグリコシル基を最初にエンド－Ｈを使用して戻し改作する。次いでガラクトシルトランスフェラーゼおよびガラクトース供与体を使用してガラクトースを加える。続いて放射性同位体を、放射同位体－複合化シアル酸供与体およびシアリルトランスフェラーゼ、ＳＴ３Ｇａｌ３を介して分子に結合させる。図５１ＦではＲｉｔｕｘａｎ（商標）を哺乳動物系で発現させ、そして最初にガラクトシルトランスフェラーゼおよび適切なガラクトース供与体を使用してガラクトシル化し；ＰＥＧ部分を持つシアル酸を、次いでＳＴ３Ｇａｌ３およびＰＥＧ化シアル酸供与体を使用して分子に結合させる。図５１Ｇに示すように、真菌、酵母または哺乳動物細胞で発現したＲｉｔｕｘａｎ（商標）は以下の方法で修飾することもできる：最初にポリペプチドをα－およびβ－マンノシダーゼで処理して末端マンノシル残基を除去する；次いでＧｌｃＮＡｃを、ＧｎＴ－Ｉ、ＩＩおよびＧｌｃＮＡｃ供与体を使用して分子に結合させ、次いでガラクトシルトランスフェラーゼおよび放射性同位体を結合することができる錯化部分にカップリングしたガラクトースの供与体を使用したガラクトシル化により放射性同位体を結合する。

【０８９７】

Ａ．Ｎ－結合グルコシル化部位の作成または排除

本発明は、ペプチド上のグリカン鎖（１つまたは複数）の部位が天然なペプチドグリカン鎖から改変されたペプチドの使用を意図する。典型的にはＮ－結合グリカン鎖はアスパラギン残基で１次ペプチド構造に連結され、ここでアスパラギン残基は小胞体（ＥＲ）内の膜－結合グリコシルトランスフェラーゼにより認識されるアミノ酸配列内にある。典型的には１次ペプチド構造上の認識部位は配列アスパラギン－Ｘ－セリン／トレオニンであり、ここでＸはプロリンおよびアスパラギン酸を除く任意のアミノ酸であることができる。この認識部位は典型的なものであるが、本発明はさらに、Ｎ－結合鎖が天然なまたは組換えグリコシルトランスフェラーゼを使用して加えられた他の認識部位にＮ－結合グリカン鎖を有するペプチドを包含する。

【０８９８】

ペプチドのＮ－結合グリコシル化の認識部位は知られているので、天然なＮ－結合グリコシル化認識部位が除去されるか、あるいはさらに１以上のさらなるＮ－グリコシル化認識部位が作成される突然変異した１次ペプチド配列を作成することは十分に当業者の技術範囲内である。最も単純な場合では、アスパラギン残基をペプチドの１次配列から除去し

、これによりグリカンの結合部位を除去し、このようにして成熟ペプチドから１つのグリカンを除去することができる。例えばアスパラギン－セリン－セリンの配列をもつ天然な認識部位は、配列ロイシン－セリン－セリンを有するように遺伝的に操作して、この位置でのＮ－結合グリコシル化部位を排除することができる。

【０８９９】

さらにＮ－結合グリコシル化部位は、たとえアスパラギン残基が存在しても１以上のさらなる認識残基が存在しないように、認識部位中の残基を改変することにより除去することができる。例えばアスパラギン－セリン－セリンの天然な配列をアスパラギン－セリン－リシンに突然変異させて、これによりその位置でのＮ－グリコシル化部位を排除することができる。上記の典型的な認識部位以外の残基を含んでなるＮ－結合グリコシル化部位の場合では、当業者は適切なグリコシルトランスフェラーゼにより認識されるために必要な配列および残基を決定し、そして次に適切なグリコシルトランスフェラーゼがもはやその部位を認識しないように少なくとも１つの残基を突然変異させることができる。換言すると、グリコシル化部位の作成または除去、あるいは両方を行い、これにより改変されたグリコシルパターンを有するペプチドを生成するために、ペプチドの１次配列を操作することは十分に当業者の技術範囲内である。したがって本発明はグリカン改造の唯一の配列として本明細書に提供する１次ペプチド配列に限定されると解釈するべきではなく、むしろグリカン改造に適する任意かつすべてのペプチド配列を含むと解釈するべきである。

【０９００】

突然変異ペプチドを作成するために、天然なアミノ酸残基をコードする天然なコドンを突然変異させて別のアミノ酸残基をコードするコドンを生成するように、ペプチドの１次配列をコードする核酸配列を改変させる。核酸配列を改変させる技術は当該技術分野で一般的であり、そして例えば任意の周知な分子生物学マニュアルに記載されている。

【０９０１】

さらに１次ペプチド構造をコードする核酸は、標準的な技術を使用してインビトロで合成することができる。例えば核酸分子はホスホロアミダイト法のようなプロトコールを使用する「遺伝子機械」で合成することができる。化学的に合成した二本鎖ＤＮＡが核酸またはそのフラグメントの合成のような応用に必要な場合、各相補鎖を別個に合成する。短い核酸（６０～８０塩基対）の生成は技術的には単純であり、そして相補鎖を合成し、そして続いてそれらをアニーリングすることにより行うことができる。長い核酸（＞３００塩基対）の生成については、化学的なＤＮＡ合成中の各サイクルのカップリング効率がめったに１００％とはならないので特別な方法が必要かもしれない。この問題を克服するために、合成遺伝子（二本鎖）を、２０～１００ヌクレオチド長の一本鎖であるフラグメントからの組み立て形態で集成する。ポリヌクレオチド合成に関する総説は、例えばＧｌｉｃｋ ａｎｄ Ｐａｓｔｅｒｎａｋ（モレキュラーバイオテクノロジー、組換えＤＮＡの原理および応用：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ）、１９９４、ＡＳＭ出版）、Ｉｔａｋｕｒａ ｅｔ ａｌ．，（１９８４，Ａｎｎｕ，Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５３：３２３）、およびＣｌｉｍｉｅ ｅｔ ａｌ．，（１９９０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：６３３）を参照にされたい。

【０９０２】

さらにペプチドをコードする核酸配列中の変化は部位指向的突然変異誘発法により作成することができる。明らかであるように、この技術は典型的には一本鎖および二本鎖状態の両方で存在するファージベクターを使用する。部位指向的突然変異誘発法に有用な典型的なベクターには、Ｍ１３ファージのようなベクターを含む。これらのファージは容易に入手可能であり、そしてそれらの使用は当業者にとって周知である。二本鎖プラスミドも部位指向的突然変異誘発法に日常的に使用され、これは問題の核酸をプラスミドからファージへ移す工程を排除する。

【０９０３】

一般に部位指向的突然変異誘発法は最初に、その配列内に所望のペプチドをコードするＤＮＡ配列を含む一本鎖ベクターを得るか、または二本鎖ベクターの二本鎖を融解することにより行なわれる。所望の突然変異した配列を持つオリゴヌクレオチドプライマーを一般には合成的に調製する。このプライマーを次いで一本鎖ベクターとアニーリングし、そして突然変異を持つ鎖の合成を完成するために大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ポリメラーゼＩクレノーフラグメントのようなＤＮＡ重合酵素に供する。これによりヘテロ二本鎖が形成され、ここで１つの鎖がもとの非突然変異配列をコードし、そして２番目の鎖が所望の突然変異を持つ。このヘテロ二本鎖ベクターを次いで大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞のような適切な細胞を形質転換またはトランスフェクトするために使用し、そして突然変異した配列の配列を持つ組換えベクターを含むクローンを選択する。突然変異したオリゴヌクレオチドを包含するクローンを濃縮するための遺伝子選択スキームは、Ｋｕｎｋｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９８７，Ｋｕｎｋｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５４：３６７－３８２）により考案された。あるいはＰＣＲ（商標）と市販されているＴａｑポリメラーゼのような熱安定性酵素との使用を、増幅したＤＮＡフラグメントに突然変異誘発性のオリゴヌクレオチドプライマーを包含させるために使用し、これは次いで適切なクローニングまたは発現ベクターにクローン化することができる。Ｔｏｍｉｃ ｅｔ ａｌ．（１９９０，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１２：１６５６）およびＵｐｅｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９５，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，１８：２９－３１）のＰＣＲ（商標）媒介突然変異誘発法の手順は、そのようなプロトコールの２例を提供する。熱安定性ポリメラーゼに加えて熱安定性リガーゼを使用するＰＣＲ（商標）を使用して、リン酸化された突然変異誘発性オリゴヌクレオチドを増幅したＤＮＡフラグメントに包含させることもでき、これは次いで適当なクローニングまたは発現ベクターにクローン化することができる。Ｍｉｃｈａｅｌ（１９９４，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，１６：４１０－４１２）により記載された突然変異誘発法の手順は、そのようなプロトコールの１例を提供する。

【０９０４】

すべてのＡｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ配列がＮ－グリコシル化されていないことは、提示されているモチーフの内容が重要であることを示唆している。別の取り組みでは、インビボでグリコシル化され、そして活性、安定性またはペプチドの他の特性に対して有利である新規なＮ－結合部位を同定するために、新規Ｎ－結合共通部位を有する突然変異ペプチドのライブラリーを作成する。

【０９０５】

前に記載したように、糖タンパク質中にＮ－結合グリカン鎖を付加するための共通配列はＡｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ（ここでＸは任意のアミノ酸であることができる）である。Ａｓｎのカルボキシル末端側から２つの目のアミノ酸位をコードするヌクレオチド配列は、当業者に知られている標準的な手順を使用してＳｅｒおよび／またはＴｈｒ残基をコードするように突然変異させることができる。上記のように、すべてのＡｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ部位がグリカンの付加により修飾されるわけではない。したがって各組換え突然変異糖タンパク質は真菌、酵母または動物または哺乳動物発現系で発現され、そしてＮ－結合グリカン鎖の付加に関して分析されなければならない。グリコシル化部位を特性決定するための技術は当業者には周知である。さらに突然変異した組換え糖タンパク質の生物学的機能は、調査する特定のタンパク質に関して標準的なアッセイを使用して決定することができる。このようにペプチドの１次配列を操作し、そしてそれに含まれる新規なグリコシル化部位を同定し、そしてさらにペプチドの生物学的活性に及ぼす新規部位の効果を決定することは簡単な問題となる。

【０９０６】

別の態様では、Ｓｅｒ／Ｔｈｒ残基のアミノ末端側から２つ目のアミノ酸位をコードするヌクレオチド配列は、当業者に知られている標準的な手順を使用してＡｓｎをコードするように突然変異させることができる。新規なグリコシル化部位が作成されたかどうか、およびこの部位がペプチドの生物学的活性に及ぼす効果を決定する手順は上に記載してい

る。

【０９０７】

Ｂ．Ｏ－結合グリコシル化部位の作成または排除

ペプチドにＯ－結合グリコシル化部位を付加することは、ペプチドの始めの１次アミノ酸配列に比べてペプチドの１次アミノ酸配列が１以上のさらなるＯ－結合グリコシル化部位を含むように、ペプチドの１次アミノ酸配列を改変させることにより都合よく行う。ペプチドにＯ－結合グリコシル化部位を加えることは、ＯＨ基が接近可能となり、そしてＯ－結合グリコシル化に利用できるようになるように、ペプチドの配列内に－ＯＨ基、好ましくはセリンまたはトレオニン残基を含んでなる１以上のアミノ酸種をペプチドに包含させることにより行うこともできる。ペプチド内のＮ－結合グリコシル化部位の改変の検討と同様に、ペプチドの１次アミノ酸配列は好ましくはヌクレオチドレベルで改変する。ペプチドをコードするＤＮＡ配列中の特別なヌクレオチドは、所望のアミノ酸が配列にコードされるように改変することができる。ＤＮＡ中の突然変異（１つまたは複数）は好ましくは、上記のホスホロアミダイト法のＤＮＡ合成および部位指向的突然変異誘発法の技術のような当該技術分野で既知の方法を使用して作成される。

【０９０８】

あるいはＯ－結合グリカンを付加する推定部位をコードするヌクレオチド配列はＤＮＡ分子に、１または幾つかのコピーで分子の５’または３’末端に加えることができる。次いで改変されたＤＮＡ配列を真菌、酵母または動物もしくは哺乳動物発現系の任意の１つで発現させ、そしてペプチドへの配列の付加およびこの配列が機能的なＯ－結合グリコシル化部位であるか否かが分析される。簡単に説明すると合成ペプチドの受容体配列をヌクレオチド分子の５’または３’末端に導入する。原理的には、この型の配列の付加は適当な発現系で発現した時に生じる糖タンパク質に対して破壊性が低い。次いで改変したＤＮＡはＣＨＯ細胞または他の適切な発現系で発現させ、そしてこれにより発現したタンパク質をＯ－結合グリコシル化部位の存在について調査する。さらにグリカン鎖の存在または不存在を決定することができる。

【０９０９】

別の取り組みでは、新規なＯ－結合部位に有利な部位を、様々な新規Ｏ－結合部位を含むペプチドのライブラリーを作成することによりペプチド中に見いだすことができる。例えばＮ－アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼによるＮ－アセチルガラクトサミン付加のための共通アミノ酸配列は、使用する特異的なトランスフェラーゼに依存する。ペプチドのアミノ酸配列を走査して、Ｏ－結合グリカン鎖の付加の可能性部位を生じるように突然変異させることができるアミノ酸の連続する基を同定することができる。これらの突然変異はすでに記載したような当業者には知られている標準的手順を使用して生成することができる。見いだされたグリコシル化部位が実際にグリコシル化されるかどうかを決定するために、次に各組換え突然変異ペプチドを適当な発現系で発現させ、そして続いてＯ－結合グリカン鎖の部位および／または存在の付加について分析する。

【０９１０】

Ｃ．ペプチドの化学合成

本発明に有用なペプチドの１次構造は細胞に基づく発現系で最も効率的に生成され得るが、ペプチドが合成的に生成できることも本発明の範囲内である。ペプチドの化学合成は当該技術分野では周知であり、そして限定するわけではないが段階的な固相合成、および溶液中または固相上でのフラグメント縮合を含む。古典的な段階的固相合成には、所望のペプチド鎖のカルボキシ－末端アミノ酸に対応するアミノ酸を固体支持体に共有結合し、そしてペプチド鎖を、活性化カルボキシル基を有する活性化アミノ酸誘導体の段階的カップリングにより、アミノ末端に向けて延長することを含む。完全に保護された固相結合ペプチド鎖の集成体が完成した後、ペプチド－固相の共有結合を適当な化学により開裂し、そして保護基を除去して生成物であるペプチドを得る。Ｒ．Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ、固相ペプチド合成：テトラペプチドの合成（Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：Ｔｈｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ Ｔｅｔｒａｐｅｐｔｉｄｅ）、Ｊ

．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，８５：２１４９－２１５４（１９６３）を参照にされたい。より長いペプチド鎖ほど、高純度の十分に規定された生成物を得ることが難しくなる。複雑な混合物の生産のために、段階的な固相合成法にはサイズに限界がある。一般に１００の連続するアミノ酸残基またはそれ以上の十分に規定されたペプチドが、段階的な固相合成を介して日常的に調製されることはない。

【０９１１】

セグメント縮合法は、固相の段階的方法による数種のペプチドセグメントの調製、続いて固相からの開裂、そしてこれら最大に保護されたセグメントの精製を含む。保護されたセグメントは固相に結合した最初のセグメントまで１つずつ縮合される。

【０９１２】

本発明に有用なペプチドは、排他的固相合成、部分的固相法、フラグメント縮合または古典的な溶液合成により合成することができる。これらの合成法は当業者には周知である（例えばＭｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９（１９６３）、Ｓｔｅｗａｒｔ ｅｔ ａｌ．、「固相ペプチド合成（Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ）」（第２版）、（ピアスケミカル社、１９８４）、Ｂａｙｅｒ ａｎｄ Ｒａｐｐ，Ｃｈｅｍ．Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｔ．３：３（１９８６）、Ａｔｈｅｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，固相ペプチド合成：実践的とりくみ（Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（ＩＲＬ出版、１９８９）、Ｆｉｅｌｄｓ ａｎｄ Ｃｏｌｏｗｉｃｋ、「固相ペプチド合成（Ｓｏｌｉｄ－Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ）」、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ 第２８９巻（アカデミック出版１９９７）、およびＬｌｏｙｄ－Ｗｉｌｌｉａｍｓ ｅｔ ａｌ．、ペプチド合成の化学的取り組みおよびペプチド（Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ ｔｏ ｔｈｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ）（ＣＲＣ出版社、１９９７）を参照にされたい）。「天然な化学的連結」および「発現したペプチドの連結」のような全化学合成法における変更も標準的である（例えばＤａｗｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６６：７７６（１９９４），Ｈａｃｋｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９４：７８４５（１９９７），Ｄａｗｓｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２８７：３４（１９９７），Ｍｕｉｒ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９５：６７０５（１９９８），ａｎｄ Ｓｅｖｅｒｉｎｏｖ ａｎｄ Ｍｕｉｒ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３：１６２０５（１９９８））を参照にされたい）。また有用であるのは、カリフォルニア州、サウスサンフシンシスコのグリフォン サイエンス（Ｇｒｙｐｈｏｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ）により開発された固相ペプチド合成法である。米国特許第６，３２６，４６８号、同第６，２１７，８７３号、同第６，１７４，５３０号および同第６，００１，３６４号明細書を参照にされたい（これらすべては全部、引用により本明細書に編入する）。

【０９１３】

Ｄ．翻訳後修飾

当業者はペプチドがＮ－結合および／またはＯ－結合グリカンを付加される上に、翻訳後修飾も受け得ると考えるだろう。グリコシル化以外の翻訳後修飾を有するペプチドは、ペプチドの所望する生物学的活性または機能を保持または改善するかぎり、本発明でペプチドとして使用できることを意図している。そのような翻訳後修飾は通常、インビボで起こる天然な修飾、またはペプチドにインビトロで行われる操作された修飾であることができる。意図する既知の修飾には限定するわけではないがアセチル化、アシル化、ＡＤＰ－リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有架橋結合の形成、システィンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、ＧＰＩアンカーの形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ

化、セレノイル化、硫黄化、アルギニレーションのようなトランスファー－ＲＮＡが媒介するアミノ酸のペプチドへの付加、およびユビキチン化を含む。多くのこれらの修飾を行うために使用され得る酵素は当該技術分野では周知であり、そして中でもベーリンガーマンハイム（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）（インディアナポリス、イリノイ州）およびシグマケミカル社（セントルイス、モンタナ州）のような会社から市販されている。

【０９１４】

そのような修飾は当業者には周知であり、そして科学技術文献で大変詳細に記載されてきた。幾つかの特に一般的な修飾、例えばグリコシル化、脂質結合、硫黄化、グルタミン酸残基のガンマ－カルボキシル化、ヒドロキシル化およびＡＤＰ－リボシル化は、ペプチド－構造および分子的特性（Ｐｅｐｔｉｄｅｓ－Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ）、第２版、Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ、ニューヨーク（１９９３）のようなほとんどの基本的な教科書に記載されている。この主題については、Ｗｏｌｄ，Ｆ．、ペプチドの翻訳後の共有的修飾（Ｐｏｓｔ－ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　Ｃｏｖａｌｅｎｔ　Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｐｅｐｔｉｄｅｓ）、Ｂ．Ｃ．Ｊｏｈｎｓｏｎ編集、アカデミック出版、ニューヨーク、１－１２（１９８３）；Ｓｅｉｆｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８２：６２６－６４６（１９９０））およびＲａｔｔａｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６３：４８－６２（１９９２））によるような多くの詳細な総説が入手可能である。

【０９１５】

ペプチドの共有的修飾も、選択した側鎖または末端アミノ酸残基と反応することができる有機誘導化剤を用いてペプチドの標的とするアミノ酸残基と反応させることにより、インビトロで分子に導入することもできる。最も一般的に誘導化される残基はシステイン、ヒスチジン、リシン、アルギニン、チロシン、グルタミン、アスパラギンおよびアミノ末端残基である。プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリンおよびトレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、ヒスチジンのアルファ－アミノ基およびヒスチジン側鎖のメチル化、Ｎ－末端アミンのアセチル化およびＣ－末端カルボキシル基のアミド化。そのような誘導化された部分は溶解性、吸収、生物学的半減期等を改善する。この部分はまた、ペプチド等の望ましくない副作用も排除または弱めることができる。

【０９１６】

さらに二官能性試薬での誘導化もペプチドを水不溶性支持体マトリックスまたは他の高分子担体に架橋するために有用である。一般的に使用される架橋剤にはグルタルアルデヒド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、ホモ二官能性イミドエステル、１，１－ビス（－ジアゾロアセチル）－２－フェニルエタンおよび二官能性マレイミドを含む。メチル－３－［９ｐ－アジドフェニル）］ジチオプロピオイミデートのような誘導化剤は、光の存在下で架橋を形成することができる光活性化可能な中間体を生じる。あるいは臭化シアンで活性化した炭水化物および米国特許第３，９６９，２８７号および同第３，６９１，０１６号明細書に記載されている反応性物質のような反応性の水不溶性マトリックスをペプチドの固定化に使用してもよい。

【０９１７】

Ｅ．融合ペプチド／ペプチド

本発明に有用なペプチドは融合ペプチドを含んでなることができる。融合ペプチドは２つのペプチドの生物学的および／または機能的特性が１つのペプチド分子内に組み合わされることが望まれる場合、特に有利である。そのような融合ペプチドは、治療用および工業的応用の新規かつ有用な分子を作成するために、天然には見いだされない生物学的活性および機能の組み合わせを提示することができる。問題の生物学的活性には限定するわけではないが酵素活性、レセプターおよび／またはリガンド活性、免疫原性モチーフおよび構造的ドメインを含む。

【０９１８】

そのような融合ペプチドは当該技術分野では周知であり、そして作成法は当業者には周知である。例えばヒトα－インターフェロン－ヒト融合ペプチドがすでに作成され、ここで生成したペプチドはアルブミンの長期循環寿命と組合わされたα－インターフェロンの治療的利益を有し、これにより減少した投与頻度、および患者に副作用の可能性が低下した治療用組成物が作られる。ヒトゲノムサイエンス（Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）社からのＡｌｂｕｆｅｒｏｎ（商標）および米国特許第５，７６６，８８３号明細書を参照にされたい。他の融合ペプチドには、本明細書のいたるところに記載する抗体分子を含む。

【０９１９】

Ｆ．より小さな「生物学的に活性な」分子の生成

本発明で使用するペプチドは天然なペプチドの変異体でよく、ここで天然なペプチドのフラグメントが完全長の天然なペプチドの代わりに使用される。さらにプレ－プロ－およびプレ－ペプチドを企図する。変異体ペプチドは天然なペプチドよりもサイズが小さくてもよく、そしてより大きなペプチドの１以上のドメインを含んでなってもよい。特別なペプチドドメインの選択は、ペプチド中の特定のドメインの生物学的活性が望まれるが、ペプチドの他のドメインの生物学的活性は望まない時に有利となり得る。またペプチドの所望する治療的効果を強化することができるペプチドの短縮化および内部削除も含む。そのような任意な形のペプチドは、ペプチドの所望する活性が保存される限り、本発明に有用となることを意図している。

【０９２０】

ペプチドのより短い変形物は天然なペプチドには見いだされない独自の利点を有することができる。ヒトのアルブミンの場合、天然なアルブミンペプチドのわずか６３％を含んでなる短縮化形態が、血漿容量増量剤として有利であることが分かった。短縮化アルブミンペプチドは、天然なヒト血清アルブミンあるいは組換えヒト血清アルブミンの２分の１から３分の２の個々のペプチド用量が均等なコロイド浸透効果（ｃｏｌｌｏｉｄ　ｏｓｍｏｔｉｃ　ｅｆｆｅｃｔ）に必要とされるだけなので、治療目的のために天然なペプチドよりも良いと考えられている。米国特許第５，３８０，７１２号明細書（この内容は全部、引用により本明細書に編入する）を参照にされたい。

【０９２１】

より小さい「生物学的に活性な」ペプチドも、天然なペプチドに比べて強化された治療的活性を有することが見いだされた。ＩＬ－２の治療的効力は、血管漏出症候群により支配される種々の副作用により制限される。全α－ヘリックスに対応する残基１～３０から成るより短く化学的に合成したペプチドの変形物は正しく折り畳まれ、そして天然なＩＬ－２の生物学的的活性を副作用を伴うこと無しに含むことが分かった。

【０９２２】

Ｇ．新規ペプチドの生成

本発明のペプチドは天然なペプチドの１次配列に由来するものでよく、または当業者に知られている多くの手段を使用して工作することができる。そのように工作したペプチドは、天然なペプチドに比べて強化された、または新規な特性から設計され、かつ／または選択されることができる。例えばペプチドは、上昇した酵素反応速度、上昇したまたは低下した基質もしくはリガンドへの結合親和性、上昇または低下したレセプターへの結合親和性、基質、リガンド、レセプターまたは他の結合パートナーに対する改変された特異性、上昇または低下したインビトロおよび／またはインビボの安定性、あるいは動物において上昇または低下した免疫原性を有するように工作することができる。

【０９２３】

Ｈ．突然変異

１．合理的な設計の突然変異

本発明の方法に有用なペプチドは、所望する生物学的活性または機能を強化し、ペプチドの望ましくない特性を縮小し、かつ／またはペプチドに新規活性または機能を加えるために突然変異させることができる。「合理的なペプチド設計」はそのような改変されたペ

プチドを生成するために使用することができる。いったんペプチドのアミノ酸配列および構造を知り、そして所望する突然変異を計画すれば、突然変異は突然変異させることを望むアミノ酸残基をコードする対応する核酸コドンに対して最も都合良く作成することができる。当業者は一般的（ｕｎｉｖｅｒｓａｌ）な遺伝子コード、および選択した発現系でのコドン優先性の知識に基づき、どのように核酸配列を改変すべきかを容易に決定することができる。コドン中の突然変異は翻訳中にペプチドに重合化されるアミノ酸残基を変化させるために作ることができる。あるいはコドンは対応するコードされるアミノ酸残基は同じであるが、コドンの選択が所望のペプチド発現系により適するように突然変異させることができる。例えばシス－残基を別のアミノ酸に置き換えて成熟ペプチドからジスルフィド結合を除去してもよく、触媒ドメインを突然変異させて生物学的活性を改変してもよく、そして一般にペプチドのアイソフォームを工作することができる。そのような突然変異はとりわけ点突然変異、削除、挿入および短縮であることができる。

【０９２４】

ペプチド中の特別なアミノ酸を突然変異させる技術は当該技術分野において周知である。上で検討した部位指向的突然変異誘発法はコドンの指向的突然変異によく適している。オリゴヌクレオチド－媒介突然変異誘発法もＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，（２００１、モレキュラークローニング：ア ラボラトリーマニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）、コールドスプリングハーバーラボラトリー、ニューヨーク、１５．５１頁から始まる）により詳細に検討されている。体系的な削除、挿入および短縮化は、当該技術分野で周知な他の方法の中でもリンカー挿入突然変異誘発法、ヌクレアーゼＢａｌ３１での消化、およびリンカー走査（ｌｉｎｋｅｒ－ｓｃａｎｎｉｎｇ）突然変異誘発法を使用して作成することができる（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．、２００１、モレキュラークローニング：ア ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー、ニューヨーク）。

【０９２５】

合理的なペプチドの設計は、熱不活性化および酸化に対する酵素の安定性を上げるために成功裏に使用されてきた。例えば酵素の安定性はα－アミラーゼ中のアスパラギン残基の除去（Ｄｅｃｌｅｒｃｋ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０１：１０４１－１０５７）、プロリンのようなより硬い構造的要素のα－アミラーゼ（Ｉｇａｒａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６３：１５３５－１５４０）およびＤ－キシロースイソメラーゼ（Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｅｎｇ．１２：６３５－６３８）への導入により向上した。さらに疎水的接触の導入が３－イソプロピルマレートデヒドロゲナーゼ（Ａｋａｎｕｍａ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２６０：４９９－５０４）およびシュードモナス種（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種から得たギ酸デヒドロゲナーゼ（Ｒｏｊｋｏｖａ ｅｔ ａｌ．，１９９９，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４４５：１８３－１８８）を安定化した。これら突然変異の安定化効果の背後にあるメカニズムは、一般に多くのペプチドに応用することができる。これらのおよび同様の突然変異は、本発明の方法で改造されるペプチドに関して有用になると予想する。

【０９２６】

２．ランダム変異導入（Ｒａｎｄｏｍ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）技術

本発明の方法に有用な新規ペプチドは、核酸のコード配列にランダムな突然変異を導入する技術を使用して生成することができる。次いで核酸は望ましい発現系で発現され、そして生成したペプチドを問題の特性について評価する。ランダムな突然変異をＤＮＡ配列に導入するための技術は当該技術分野では周知であり、そしてＰＣＲ突然変異誘発法、飽和（ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ）突然変異誘発法および縮重オリゴヌクレオチド法を含む。Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ（２００１、モレキュラークローニング、アラボラトリーアプローチ、コールドスプリングハーバー出版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州）およびＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（２００２、分子生物学の現在の手法（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌ

ｏｇｙ）、ジョン　ウィリー＆サンズ、ニューヨーク州）を参照にされたい。

【０９２７】

ＰＣＲ突然変異誘発法では、低下したＴａｑポリメラーゼの忠実度を使用してランダムな突然変異をＤＮＡのクローン化したフラグメントに導入する（Ｌｅｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９，Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ　１：１１－１５）。これはランダムの突然変異をＤＮＡ配列に導入する大変有力で、しかも比較的迅速な方法である。突然変異させるＤＮＡ領域は、例えば改変したｄＧＴＰ／ｄＡＴＰ比を使用することにより、およびMn^{2+}をＰＣＲ反応に加えることにより、ＴａｑＤＮＡポリメラーゼによるＤＮＡ合成の忠実度が下がる条件下でポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して増幅させる。増幅したＤＮＡフラグメントのプールは適切なクローニングベクターに挿入してランダムな突然変異ライブラリーを提供する。

【０９２８】

飽和突然変異誘発法は、多数の１塩基置換をクローン化したＤＮＡフラグメントに迅速に導入することを可能とする（Ｍａｙｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９８５，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：２４２）。この技術には例えばインビトロでの化学的処理または一本鎖ＤＮＡの照射による突然変異の作成、そして相補的ＤＮＡ鎖の合成を含む。突然変異の頻度は処理の厳しさを調節（ｍｏｄｕｌａｔｉｎｇ）することにより調節することができ、そして本質的にすべての可能な塩基置換を得ることができる。この手順には突然変異フラグメントに関する遺伝子選択が関与しないので、中性の置換ならびに機能を改変する置換の両方が得られる。点突然変異の分布は保存された配列要素に片寄らない。

【０９２９】

核酸相同体のライブラリーは、１組の縮重オリゴヌクレオチド配列から生成することもできる。縮重オリゴヌクレオチド配列の化学的合成は、自動化ＤＮＡ合成器で行うことができ、そして合成遺伝子は次に適切な発現ベクターに連結することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成は当該技術分野では知られている（例えばＮａｒａｎｇ，ＳＡ（１９８３）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ３９：３；Ｉｔａｋｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（１９８１）組換えＤＮＡ（Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　ＤＮＡ）、Ｐｒｏｃ　３ｒｄ、クリーブランドシンポ。高分子（Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ）編集、ＡＧ　ヴァルトン、アムステルダム：エルセビア（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ）２７３－２８９頁；Ｉｔａｋｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（１９８４）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５３：３２３；Ｉｔａｋｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（１９８４）Ｓｃｉｅｎｃｅ１９８：１０５６；Ｉｋｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９８３）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１１：４７７を参照にされたい。そのような技術は他のペプチドの方向性のある進化（ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ）にも使用された（例えばＳｃｏｔｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ２４９：３８６－３９０；Ｒｏｂｅｒｔｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）ＰＮＡＳ８９：２４２９－２４３３；Ｄｅｖｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ２４９：４０４－４０６；Ｃｗｉｒｌａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）ＰＮＡＳ８７：６３７８－６３８２；ならびに米国特許第５，２２３，４０９号、同第５，１９８，３４６号および同第５，０９６，８１５号明細書を参照にされたい）。

【０９３０】

ａ．方向付けされる進化（Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ）

本発明の方法で有用なペプチドは、「方向付けされる進化」の技術を使用して生成することもできる。ペプチドの構造の知識を必要とする部位指向的突然変異誘発技術とは対照的に、今ではペプチドの構造的特徴の知識無しで改善された特性を持つペプチドが得られる突然変異のライブラリーを作成する方法が存在する。これらの方法は一般に「方向付けされる進化」の技術として知られ、そして問題のペプチドをコードする核酸配列を循環的（ｒｅｃｕｒｓｉｖｅ　ｒｏｕｎｄ）な突然変異、スクリーニングそして増幅に供する点でこれまでのランダムな変異誘導手順とは異なる。

【０９３１】

幾つかの「方向付けされる進化」技術では、得られた核酸の多様性は核酸配列に点突然

変異をランダムに作成する突然変異法により生成される。点突然変異技術には限定するわけではないが、「誤－傾向（ｅｒｒｏｒ－ｐｒｏｎｅ）ＰＣＲ（商標）」（Ｃａｌｄｗｅｌｌ ａｎｄ Ｊｏｙｃｅ，１９９４：ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌ．２：２８－３３；およびＫｅ ａｎｄ Ｍａｄｉｓｏｎ，１９９７，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２：３３７１－３３７２）、反復オリゴヌクレオチド－指向的突然変異誘発法（ｒｅｐｅａｔｅｄ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）（Ｒｅｉｄｈａａｒ－Ｏｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ，２０８：５６４－５８６）、および前記の任意なランダム変異導入法を含む。

【０９３２】

方向付けされる進化が作用し得る多様性を作成する別の方法は、突然変異誘発遺伝子の使用である。問題の核酸を、ゲノムが典型的には欠損性ＤＮＡ修復遺伝子をコードする突然変異誘発細胞株の中で培養する（米国特許第６，３６５，４１０号明細書、Ｓｅｌｉｆｏｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６７：３６４５－３６４９；Ｌｏｎｇ－ＭｃＧｉｅ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｅｎｇ．６８：１２１－１２５；ジェネンコール インターナショナル社（Ｇｅｎｅｎｃｏｒ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｃ．）、パロアルト、カリフォルニア州を参照にされたい）。

【０９３３】

方向付けされる進化の技術を使用して多様性を達成することは、縮重プライマーと一緒に飽和突然変異誘発法を使用しても行うことができる（Ｇｅｎｅ Ｓｉｔｅ Ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ（商標）、ディバーサ社（Ｄｉｖｅｒｓａ Ｃｏｒｐ）、サンディエゴ、カリフォルニア州）。この種の飽和突然変異誘発法では、多様化されるべき核酸配列長を覆うように設計された縮重プライマーを使用して、ＰＣＲ反応でポリメラーゼをプライムする。この様式では、アミノ酸のコード配列の各コドンを突然変異させて、残りは一般的な各１９個のアミノ酸をコードするようにする。この技術は核酸コード配列の特別な領域に突然変異、削除および挿入を導入するためにも使用できると同時に、残りの核酸分子を手付かずにしておく。遺伝子飽和技術に関する手順は当該技術分野では周知であり、そして米国特許第６，１７１，８２０号明細書に見いだすことができる。

【０９３４】

ｂ．ＤＮＡシャフリング（ｓｈｕｆｆｌｉｎｇ）

本発明の方法に有用な新規ペプチドは、遺伝子－シャフリング、モチーフ－シャフリング、エキソン－シャフリングおよび／またはコドン－シャフリング（集合的に「ＤＮＡシャフリング」と呼ぶ）を使用して生成することもできる。ＤＮＡシャフリング技術は本発明に有用なペプチドの活性をモジュレートするために使用することができ、そして改変した活性を有するペプチドを生成するために使用することができる。一般に米国特許第５，６０５，７９３号；同第５，８１１，２３８号；同第５，８３０，７２１号；同第５，８３４，２５２号；および同第５，８３７，４５８号明細書、およびＳｔｅｍｍｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４，Ｎａｔｕｒｅ ３７０（６４８８）：３８９－３９１）；Ｃｒａｍｅｒｉ ｅｔ ａｌ．（１９９８，Ｎａｔｕｒｅ ３９１（６６６４）：２８８－２９１）；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９７，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９４（９）：４５０４－４５０９）；Ｓｔｅｍｍｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ９１（２２）：１０７４７－１０７５１），Ｐａｔｔｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９７，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８：７２４－３３）；Ｈａｒａｙａｍａ，（１９９８，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６（２）：７６－８２）；Ｈａｎｓｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，（１９９９，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８７：２６５－７６）；ａｎｄ Ｌｏｒｅｎｚｏ ａｎｄ Ｂｌａｓｃｏ（１９９８，Ｂｉｏｔｅｃ ｈｎｉｑｕｅｓ ２４（２）：３０８－１３）

を参照にされたい（これら各々は、引用により本明細書に編入する）。

【０９３５】

ＤＮＡシャフリングにはポリヌクレオチド配列に変化を生じるために、２以上のＤＮＡセグメントの相同的または部位特異的組換えを集合することが関与する。ＤＮＡシャフリングはヒト免疫不全ウイルス１型タンパク質（Ｐｅｋｒｕｎ ｅｔ ａｌ．２００２，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７６（６）：２９２４－３５）、トリアジンヒドロラーゼ（Ｒａｉｌｌａｒｄ ｅｔ ａｌ．２００１，Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ８（９）：８９１－８９８）、マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）タンパク質（Ｐｏｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．２０００，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １８（１２）：１２７９－１２８２）、およびインドールグリセロールホスフェートシンターゼ（Ｍｅｒｚ ｅｔ ａｌ．２０００，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３９（５）：８８０－８８９）の新規変化を生成するために使用されて来た。

【０９３６】

ＤＮＡシャフリングの技術は、ＤＮＡのインビトロ相同的組換えを可能にすることにより天然な組換えを模することによる生体分子の多様性を作成するために開発された（Ｓｔｅｍｍｌｅｒ，１９９４，Ｎａｔｕｒｅ ３７０：３８９－３９１；およびＳｔｅｍｍｌｅｒ，１９９４，ＰＮＡＳ ９１：１０７４７－１０７５１）。一般にこの方法では関連する遺伝子群を断片化し、そして変性の循環サイクル、再ハイブリダイゼーション、そして続いてＴａｑポリメラーゼによる５’突出部の延長に供する。各サイクルでフラグメントの長さが増し、そしてＤＮＡ組換えは異なる遺伝子に由来するフラグメントが互いにハイブリダイズする時に起こる。ＤＮＡの最初の断片化は通常、ヌクレアーゼ消化、典型的にはＤＮａｓｅを使用して達成されるが（Ｓｔｅｍｍｌｅｒの参考文献、同上を参照にされたい）、切断（ｉｎｔｅｒｒｕｐｔｅｄ）ＰＣＲ合成により行うこともできる（米国特許第５．９６５，４０８号明細書、引用により全部、本明細書に編入する；ディバース社、サンディエゴ、カリフォルニア州を参照にされたい）。ＤＮＡシャフリング法は各回のシャフリングにより、生成される有利な突然変異の指向的な組換えが達成され、したがってペプチドの改善された表現型について自己選択がある点で、ランダムな点突然変異法よりも有利である。

【０９３７】

ＤＮＡシャフリングの技術は当該技術分野では周知である。そのような技術の詳細な説明は、Ｓｔｅｍｍｌｅｒ，１９９４，Ｎａｔｕｒｅ ３７０：３８９－３９１およびＳｔｅｍｍｌｅｒ，１９９４，ＰＮＡＳ ９１：１０７４７－１０７５１に見いだされる。ＤＮＡシャフリング技術は米国特許第６，１８０，４０６号、同第６，１６５，７９３号、同第６，１３２，９７０号、同第６，１１７，６７９号、同第６，０９６，５４８号、同第５，８３７，４５８号、同第５，８３４，２５２号、同第５，８３０，７２１号、同第５，８１１，２３８号および同第５，６０５，７９３号明細書にも記載されている（これらはすべて引用により全部、本明細書に編入する）。

【０９３８】

この技術はまた、さらに最近ではＤＮＡシャフリングの基本的技術の変法も提供する。１例では、エキソンシャフリングでペプチドの特別なドメインをコードするエキソンまたはエキソンの組み合わせがキメラオリゴヌクレオチドを使用して増幅される。増幅された分子は次いで自己－プライミングアッセンブリー（ｓｅｌｆ－ｐｒｉｍｉｎｇ ＰＣＲ ａｓｓｅｍｂｌｙ）により組換えられる（Ｋｏｌｋｍａｎ ａｎｄ Ｓｔｅｍｍｌｅｒ，２００１，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１９：４２３－４２８）。別の例では一過性の鋳型ライブラリー構築に関するランダムなキメラ誘発法（ｒａｎｄｏｍ ｃｈｉｍｅｒａｇｅｎｅｓｉｓ：ＲＡＣＨＩＴＴ）の技術を使用して、１本鎖の元のＤＮＡフラグメントを完全長の１本鎖の鋳型にアニーリングする（Ｃｏｃｏ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：３５４－３５９）。さらに別の例では、付着伸長法（ｓｔａｇｇｅｒｅｄ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ｐｒｏｃｅｓｓ：ＳｔＥＰ）、大変省略されたアニーリング／延長サイクルでの熱サイクリングを使用して、フランキングプライマーからＤＮＡ重合を反復して切断する（Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔ

ｅｃｈｎｏｌ．１６：２５８－２６１）。ＣＬＥＲＹとして知られている技術では、酵母を対象としてインビトロのファミリーシャフリングをインビボの相同的組換えと組み合わせる（Ａｂｅｃａｓｓｉｓ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８：Ｅ８８；）。遺伝子間組換えを最大にするために、各核酸の相補鎖からの１本鎖ＤＮＡをＤＮａｓｅで消化し、そしてアニーリングする（Ｋｉｋｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｇｅｎｅ ２４３：１３３－１３７）。次いで開裂可能な配列により連結されている可変長の２つの短縮化核酸の平滑末端を連結して、相同的組換え無しに遺伝子融合を生成する（Ｓｉｅｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：４５６－４６０；Ｌｕｔｚ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２９：Ｅ１６；Ｏｓｔｅｒｍｅｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１７：１２０５－１２０９；Ｌｕｔｚ ａｎｄ Ｂｅｎｋｏｖｉｃ，２０００，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１１：３１９－３２４）。小さい配列相同性を持つ核酸間の組換えは一般に、ＤＮＡフラグメントのエキソヌクレアーゼが媒介する平滑末端化、そしてフラグメントを一緒に連結してそれらを組換えることによっても強化された（米国特許第６，３６１，９７４号明細書、引用により全部、本明細書に編入する）。本発明は本発明の方法に有用なペプチドおよび／または酵素の生物学的特性を強化する手段として、上記の各々、およびすべての変異の使用を意図する。

【０９３９】

方向性のある進化および遺伝子シャフリング技術を詳細に記載する公開されたプロトコールに加えて、今では選択したペプチドの遺伝子シャフリングおよび選択手順を請け負う商業的サービスも利用することができる。マキシジェン（Ｍａｘｙｇｅｎ：レッドウッドシティ、カリフォルニア州）は、カスタムＤＮＡシャフリングライブラリーを作成するための商業的サービスを提供する。さらにこの会社は、遺伝子シャフリングおよび選択するペプチドファミリーの選択を含むカスタマイズされた方向付けされる進化の手順も行う。

【０９４０】

オプティジェニックス社（Ｏｐｔｉｇｅｎｉｘ Ｉｎｃ．、ニューアーク、デラウエア州）、プラスミドシャフリングに関連したサービスを提供する。オプティジェニックスは新たな特性を有する突然変異をその中に得るために、遺伝子ファミリーを使用する。問題の核酸をアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）発現系中のプラスミドにクローン化する。次いで関連するファミリーのＤＮＡを発現系に導入し、そしてファミリーの保存された領域中の組換えが宿主中で起こる。次いで生成した突然変異ＤＮＡが発現し、そしてそれらから生産されたペプチドを、所望の特性の存在および望ましくない特性の不存在についてスクリーニングする。

【０９４１】

ｃ．スクリーニング手順

「進化」の各循環後、突然変異した遺伝子により発現された所望のペプチドを問題の特性についてスクリーニングする。次いで「候補」遺伝子を増幅し、そして次回のＤＮＡシャフリング用にプールする。使用するスクリーニング手順は、「進化」したペプチドおよび問題の特性に高度に依存する。中でもとりわけペプチド安定性、生物学的活性、抗原性のような特性は、当該技術分野で周知な手順を使用して選択することができる。本発明の方法に有用な好適ペプチドの生物学的活性に関する個々のアッセイは、本明細書のいたるところに記載する。

【０９４２】

ｄ．技術の組み合わせ

当業者には突然変異および選択の上記技術は、本発明の方法に有用な最高に可能なペプチド分子を生成するために、互いに、そしてさらなる手順と組み合わせることができると考えるだろう。すなわち本発明はペプチドの生成に関して任意の１つの方法に限定されることはなく、そして本明細書に記載するありとあらゆる方法論を包含すると解釈すべきである。例えば点突然変異を核酸配列に導入する手順を最初に行い、続いて循環的ＤＮＡシ

ャフリング、選択および増幅を行うことができる。初期の点突然変異の導入を使用して、それを欠く遺伝子群に多様性を導入し、次回のＤＮＡのシャフリングおよびスクリーニングにより有利な点突然変異を選択し、そして組み合わせることができる。

【０９４３】

ＩＩＩ．グリコシダーゼおよびグリコトランスフェラーゼ

Ａ．グリコシダーゼ

グリコシダーゼは受容体分子として水を使用し、そしてそのままで典型的なグリコシド－加水分解酵素であるグリコシルトランスフェラーゼである。グリコシダーゼは、反応混合物の熱力学または動力学を制御することによりインビトロでグリコシド結合を形成するために使用することができる。変更された反応条件でも、グリコシダーゼ反応はうまく作用することが難しく、そしてグリコシダーゼは可逆的なトランスグリコシラーゼ反応および競合する加水分解反応の結果、低い合成収量を与える傾向がある。

【０９４４】

グリコシダーゼは加水分解中に破壊される結合で立体化学を維持することにより、あるいは加水分解中に破壊される結合で立体化学を逆転することにより機能することができ、それぞれ「維持（ｒｅｔａｉｎｉｎｇ）」グリコシダーゼまたは「逆転（ｉｎｖｅｒｔｉｎｇ）」グリコシダーゼのいずれかに分類される。維持グリコシダーゼは活性部位に存在する２つの重要なカルボン酸部分を有し、１つのカルボキシレートは酸／塩基触媒として作用し、そしてもう１つは求核性として作用するが、逆転グリコシダーゼは１つのカルボン酸が酸として、そしてもう１つが塩基として作用する。

【０９４５】

任意のグリコシダーゼの活性および結合特性を決定する方法は当該技術分野では周知であり、それらには簡略化ＨＰＬＣプロトコール（Ｊａｃｏｂ ａｎｄ Ｓｃｕｄｄｅｒ，１９９４，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２３０：２８０－３００）を含む。グリコシダーゼおよびグリコシダーゼ処理の一般的考察は、糖生物学、実践的取り組み（Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ）、（１９９３，Ｆｕｋｕｄａ ａｎｄ Ｋｏｂａｔａ編集、オックスフォード大学出版社、ニューヨーク）に見いだせる。

【０９４６】

本発明に有用なグリコシダーゼには限定するわけではないが、シアリダーゼ、ガラクトシダーゼ、エンドグリカナーゼ、マンノシダーゼ（すなわちαおよびβ、ＭａｎＩ、ＭａｎＩＩおよびＭａｎＩＩＩ）、キシロシダーゼ、フコシダーゼ、アグロバクテリウム種（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ．）のβ－グリコシダーゼ、セルロモナス フィミ（Ｃｅｌｌｕｌｏｍｏｎａｓ ｆｉｍｉ）のマンノシダーゼ２Ａ、フミコーラ インソレンス（Ｈｕｍｉｃｏｌａ ｉｎｓｏｌｅｎｓ）のグリコシダーゼ、スルホロブス ソルファタリカス（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ ｓｏｌｆａｔａｒｉｃｕｓ）のグリコシダーゼおよびバチルス リケニホルミス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）のグリコシダーゼを含む。

【０９４７】

本発明で使用するフコシダーゼの選択はフコースの他の分子に対する結合に依存する。本発明の方法に有用な多くのα－フコシダーゼの特異性は当該技術分野では周知であり、そしてまた多種のフコシダーゼが市販されている（とりわけグリコ（Ｇｌｙｋｏ）、ノバト、カリフォルニア州；プロザイム（ＰＲＯｚｙｍｅ）、サンレアンドロ、カリフォルニア州；カルビオケム－ノババイオケム（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ－Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ）社、サンディエゴ、カリフォルニア州）。興味深いα－フコシダーゼには限定するわけではないが、タルボ コルナタス（Ｔｕｒｂｏ ｃｏｒｎｕｔｕｓ）、カロニア ランパス（Ｃｈａｒｏｎｉａ ｌａｍｐａｓ）、バチルス フルミナンス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｆｕｌｍｉｎａｎｓ）、アスペルギルス ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）、クロストリジウム パーフリンゲンス（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、ウシ腎臓（グリコ）、ニワトリ肝臓（Ｔｙａｇａｒａｊａｎ ｅｔ ａｌ．，

１９９６，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　６：８３－９３）に由来するα－フコシダーゼ、およびザントモナス　マニホティス（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ　ｍａｎｉｈｏｔｉｓ）（グリコ、プロザイム）由来のα－フコシダーゼＩＩを含む。ニワトリ肝臓のフコシダーゼはＮ－結合グリカンからコアフコースの除去に特に有用である。

【０９４８】

Ｂ．グリコシルトランスフェラーゼ

グリコシルトランスフェラーゼは活性化糖（供与体ＮＤＰ－糖）のタンパク質、糖ペプチド、脂質または糖脂質への、あるいは成長しているオリゴ糖の非還元末端への付加を段階的様式で触媒する。Ｎ－結合糖ペプチドは、トランスフェラーゼおよび脂質－結合オリゴ糖供与体Ｄｏｌ－ＰＰ－ＮＡＧ$_2$Ｇｌｃ$_3$Ｍａｎ$_9$をｅｎブロック転移で、続いてコアの改作を介して合成される。この場合、「コア」サッカリドの性質は後の結合とは幾分異なる。大変多数のグリコシルトランスフェラーゼが当該技術分野で知られている。

【０９４９】

本発明で使用するグリコシルトランスフェラーゼは、それが糖供与体として修飾された糖を利用できる限り任意のものでよい。そのような酵素の例はガラクトシルトランスフェラーゼ、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、Ｎ－アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、キシロシルトランスフェラーゼ、グルクロノニルトランスフェラーゼ等のようなルロアール経路のグリコシルトランスフェラーゼを含む。

【０９５０】

グリコシルトランスフェラーゼ反応に関与する酵素的サッカリド合成については、グリコシルトランスフェラーゼをクローン化することができ、あるいは任意の供給源から単離することができる。多くのクローン化グリコシルトランスフェラーゼ、およびそれらのポリヌクレオチド配列も知られている。例えばＴａｎｉｇｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００２，グリコシルトランスフェラーゼおよび関連遺伝子のハンドブック（Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　ｇｌｙｃｏｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅｓ　ａｎｄ　ｒｅｌａｔｅｄ　ｇｅｎｅｓ）、スプリンガー、東京、を参照にされたい。

【０９５１】

グリコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列、およびアミノ酸配列を推定することができるグリコシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列も、ＧｅｎＢａｎｋ、Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ、ＥＭＢＬおよびその他を含む様々な公開されているデーターベースに見いだすことができる。

【０９５２】

本発明の方法で採用できるグリコシルトランスフェラーゼには、限定するわけではないがガラクトシルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、Ｎ－アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、グルクロニルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、グルクロン酸トランスフェラーゼ、ガラクツロン酸トランスフェラーゼおよびオリゴ糖トランスフェラーゼを含む。適当なグリコシルトランスフェラーゼには真核生物ならびに原核生物から得られるものを含む。

【０９５３】

グリコシルトランスフェラーゼをコードするＤＮＡは化学合成により、適切な細胞または細胞系カルチャーに由来するｍＲＮＡの逆転写物をスクリーニングすることにより、適切な細胞に由来するゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、あるいはこれらの手法の組み合わせにより得ることができる。ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡのスクリーニングは、グリコシルトランスフェラーゼの核酸配列から生成したオリゴヌクレオチドプローブを使用して行うことができる。プローブは限定するわけではないが蛍光基、放射性原子または化学発光基のような検出可能な標識で既知の手順に従い標識し、そして通例のハイブリダイゼーションアッセイで使用することができる。あるいはグリコシルトランスフェラーゼの核酸配列から生成されるＰＣＲオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、グ

リコシルトランスフェラーゼの核酸配列をポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）手法を使用して得ることができる。Ｍｕｌｌｉｓ　ｅｔ　ａｌ．に対する米国特許第４，６８３，１９５号明細書およびＭｕｌｌｉｓに対する米国特許第４，６８３，２０２号明細書を参照にされたい。

【０９５４】

グリコシルトランスフェラーゼ酵素は、グリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードするＤＮＡを含むベクターで形質転換した宿主細胞で合成することができる。ベクターは複製可能なＤＮＡ構築物である。ベクターはグリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードするＤＮＡを増幅し、かつ／またはグリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードするＤＮＡを発現させるいずれかのために使用する。発現ベクターは複製可能なＤＮＡ構築物であり、ここでグリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードするＤＮＡ配列が、適切な宿主中でグリコシルトランスフェラーゼ酵素の発現を行うことができる適切な制御配列に操作可能に連結されている。そのような制御配列の必要性は選択した宿主および選択した形質転換法に依存して変動する。一般に制御配列には転写プロモーター、転写を制御する任意のオペレーター配列、適当なｍＲＮＡリボゾーム結合部位をコードする配列、および転写および翻訳の終結を制御する配列を含む。増幅ベクターは発現制御ドメインを必要としない。必要なすべてのものは、通常は複製起点により付与される宿主中で複製する能力、および形質転換体の認識を容易にするための遺伝子の選択である。

【０９５５】

１．フコシルトランスフェラーゼ

幾つかの態様では、本発明の方法で使用するグリコシルトランスフェラーゼは、フコシルトランスフェラーゼである。フコシルトランスフェラーゼは当業者に知られている。フコシルトランスフェラーゼの例には、Ｌ－フコースをＧＤＰ－フコースから受容体の糖のヒドロキシ部位へ転移する酵素を含む。非－ヌクレオチド糖から受容体へ転移するフコシルトランスフェラーゼも本発明で使用される。

【０９５６】

幾つかの態様では、受容体の糖が例えばオリゴ糖のグリコシド中のＧａｌβ（１→３，４）ＧｌｃＮＡｃβ－基のＧｌｃＮＡｃである。この反応に適当なフコシルトランスフェラーゼには、最初にヒトの乳から特性決定されたＧａｌβ（１→３，４）ＧｌｃＮＡｃβ１－α（１→３，４）フコシルトランスフェラーゼ（ＦＴＩＩＩ　Ｅ．Ｃ．Ｎｏ．２．４．１．６５）、（Ｐａｌｃｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ　Ｒｅｓ．１９０：１－１１（１９８９）；Ｐｒｉｅｅｌｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５６：１０４５６－１０４６３（１９８１）；およびＮｕｎｅｚ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎ．Ｊ．Ｃｈｅｍ．５９：２０８６－２０９５（１９８１）を参照にされたい）、およびヒトの血清で見いだされたＧａｌβ（１→４）ＧｌｃＮＡｃβ－αフコシルトランスフェラーゼ（ＦＴＩＶ、ＦＴＶ、ＦＴＶＩ）を含む。ＦＴＶＩＩ（Ｅ．Ｃ．Ｎｏ．２．４．１．６５）、シアリルα（２→３）Ｇａｌβ（１→３）ＧｌｃＮＡｃβフコシルトランスフェラーゼも特性決定された。Ｇａｌβ（１→３，４）ＧｌｃＮＡｃβ－α（１→３，４）フコシルトランスフェラーゼの組換え形も特性決定された（Ｄｕｍａｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｌｅｔｔｅｒｓ　１：４２５－４２８（１９９１）およびＫｕｋｏｗｓｋａ－Ｌａｔａｌｌｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　４：１２８８－１３０３（１９９０）を参照にされたい）。他のフコシルトランスフェラーゼの例には例えば、α１，２フコシルトランスフェラーゼ（Ｅ．Ｃ．Ｎｏ．２．４．１．６９）を含む。酵素的フコシル化はＭｏｌｌｉｃｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９１：１６９－１７６（１９９０）または米国特許第５，３７４，６５５号明細書に記載されている方法により行うことができる。

【０９５７】

２．ガラクトシルトランスフェラーゼ

別の態様群では、グリコシルトランスフェラーゼはガラクトシルトランスフェラーゼである。ガラクトシルトランスフェラーゼの例にはα（１，３）ガラクトシルトランスフェ

ラーゼ（E．C．No．2．4．1．151、Dabkowski et al.，Transplant Proc．25：2921（1993）およびYamamoto et al.，Nature345：229－233（1990）を参照にされたい）、ウシ（GenBank j04989、Joziasse et al.，J．Biol．Chem．264：14290－14297（1989））、マウス（GenBank m26925；Larsen et al.，Proc．Nat'l．Acad．Sci．USA 86：8227－8231（1989）、ブタ（GenBank L36152；Strahan et al.，Immunogenetics 41：101－105（1995）を含む。別の適当なα1，3ガラクトシルトランスフェラーゼは、血液のB抗原群の合成に関与するものである（E．C．2．4．1．37、Yamamoto et al.，J．Biol．Chem．265：1146－1151（1990）（ヒト））。

【0958】

また本発明の方法での使用に適するのはβ（1，4）ガラクトシルトランスフェラーゼであり、これには例えばEC2．4．1．90（LacNAcシンテターゼ）およびEC2．4．1．22（ラクトースシンテターゼ）、ウシ（D'Agostaro et al.，Eur，J．Biochem．183：211－217（1989））、ヒト（Masri et al.，Biochem．Biophys．Res．Commun．157：657－663（1988））、マウス（Nakazawa et al.，J．Biochem．104：165－168（1988））、ならびにEC．2．4．1．38およびセラミド ガラクトシルトランスフェラーゼ（EC2．4．1．45、Stahl et al.，J．Neurosci．Res．38：234－242（1994））を含む。他の適当なガラクトシルトランスフェラーゼには例えば、α1，2ガラクトシルトランスフェラーゼ（例えばシゾサッカロミセス ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）に由来、Chapell et al.，Mol．Biol．Cell 5：519－528（1994）を参照にされたい）を含む。さらに適当なグリコシルトランスフェラーゼについては、Taniguchi et al.（2002、グリコシルトランスフェラーゼおよび関連遺伝子のハンドブック、プリンガー、東京）、Guo et al.（2001，Glycobiology，11（10）：813－820）およびBreton et al.（1998，J．Biochem．123：1000－1009）を参照にされたい。

【0959】

遺伝子操作によりクローン化した遺伝子に由来する酵素GalNAc T_{I-XIV}のようなタンパク質の生産も周知である。例えば米国特許第4，761，371号明細書を参照にされたい。1つの方法は十分なサンプルの収集、次いで酵素のアミノ酸配列をN－末端シークエンシングにより決定することを含む。次いでこの情報を使用して完全長の（膜に結合した）トランスフェラーゼをコードするcDNAクローンを単離し、これは昆虫細胞系Sf9中で発現して完全に活性な酵素の合成をもたらす。次いで酵素の受容体特異性を、16種のタンパク質における既知のグリコシル化部位の周辺のアミノ酸の半定量的分析、続いて合成ペプチドのインビトロのグリコシル化の実験により決定する。この作業では特定のアミノ酸残基がグリコシル化ペプチドセグメント中で過剰に提示され（overrpresented）、そしてグリコシル化されたセリンおよびトレオニン残基周辺の特異的位置の残基が、受容体効率に他のアミノ酸部分よりも顕著な効果を有し得ることが示された。

【0960】

3．シアリルトランスフェラーゼ

シアリルトランスフェラーゼは、組換え細胞および本発明の反応混合物に有用な別の種類のグリコシルトランスフェラーゼである。本発明の使用に適するシアリルトランスフェラーゼの例には、ST3GalIII（例えばラットまたはヒトST3GalIII）、ST3GalIV、ST3GalI、ST6GalI、ST3GalV、ST6GalI

Ｉ、ＳＴ６ＧａｌＮＡｃＩ、ＳＴ６ＧａｌＮＡｃＩＩおよびＳＴ６ＧａｌＮＡｃＩＩＩを含む（本明細書で使用するシアリルトランスフェラーゼの命名法は、Ｔｓｕｊｉ ｅｔ ａｌ．，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ，６：ｖ－ｘｉｖ（１９９６）に記載されている）。α（２，３）シアリルトランスフェラーゼ（ＥＣ２．４．９９．６）と呼ぶα（２，３）シアリルトランスフェラーゼの例は、シアル酸をＧａｌβ１→３Ｇｌｃ二糖またはグリコシドの非還元末端のＧａｌへ転移する。Ｖａｎ ｄｅｎ Ｅｉｊｎｄｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５６：３１５９（１９８１）、Ｗｅｉｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５７：１３８４５（１９８２）およびＷｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：２１０１１（１９９２）を参照にされたい。別の例のα２，３シアリルトランスフェラーゼ（ＥＣ２．４．９９．４）は、シアル酸を二糖またはグリコシドの非還元末端のＧａｌへ転移する。Ｒｅａｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５４：４４４４（１９７９）およびＧｉｌｌｅｓｐｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：２１００４（１９９２）を参照にされたい。さらなる酵素の例にはＧａｌ－β－１，４－ＧｌｃＮＡｃα－２，６－シアリルトランスフェラーゼを含む（Ｋｕｒｏｓａｗａ ｅｔ ａｌ．Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２１９：３７５－３８１（１９９４）を参照にされたい）。

【０９６１】

好ましくは糖ペプチドの炭水化物のグリコシル化について、シアリルトランスフェラーゼは完全にシアリル化された炭水化物構造上の末端シアル酸の下にある最も多くの終わりから２番目の配列である配列Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃ－、Ｇａｌβ１，３ＧｌｃＮＡｃ－またはＧａｌβ１，３ＧａｌＮＡｃ－にシアル酸を転移させることができる（表７を参照にされたい）。２，８－シアリルトランスフェラーゼは、シアル酸を本発明の方法に有用なα２，３Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃに転移させることができる。

【０９６２】

【表７】

表7. 受容体基質としてGalβ1,4GlcNAc配列を使用するシアリルトランスフェラーゼ

シアリルトランスフェラーゼ	起源	形成される配列 (1つまたは複数)	Ref.
ST6Gal I	哺乳動物	NeuAcα2,6Galβ1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	哺乳動物	NeuAcα2,3Galβ1,4GlcNAc- NeuAcα2,3Galβ1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	哺乳動物	NeuAcα2,3Galβ1,4GlcNAc- NeuAcα2,3Galβ1,3GlcNAc-	1
ST6Gal II	哺乳動物	NeuAcα2,6Galβ1,4GlcNAc-	
ST6Gal II	フォトバクテリウム (*Photobacterium*)	NeuAcα2,6Galβ1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	髄膜炎菌 (*N. meningitides*) 淋菌 (*N. gonorrhoeae*)	NeuAcα2,3Galβ1,4GlcNAc-	3

1) Goochee et al., Bio/Technology 9: 1347-1355 (1991)
2) Yamamoto et al., J. Biochem. 120: 104-110 (1996)
3) Gilbert et al., J. Biol. Chem. 271: 28271-28276 (1996)

【０９６３】
特許請求する方法に有用なシアリルトランスフェラーゼの例は、ＳＴ３ＧａｌＩＩＩであり、これはα（２，３）シアリルトランスフェラーゼ（ＥＣ２．４．９９．６）とも呼ばれる。この酵素はシアル酸をＧａｌβ１，３ＧｌｃＮＡｃまたはＧａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃグリコシドのＧａｌへ転移させることを触媒し（例えばＷｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：２１０１１（１９９２）；Ｖａｎ ｄｅｎ Ｅｉｊｎｄｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５６：３１５９（１９９１）を参照にされたい）、そして糖ペプチド中のアスパラギン－結合オリゴ糖のシアリル化の原因である。シアル酸はＧａｌと結合して２つのサッカリド間にα－結合を形成する。サッカリド間の結合（連結）は、ＮｅｕＡｃの２－位とＧａｌの３－位との間である。この特別な酵素はラットの肝臓（Ｗｅｉｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５７：１３８４５（１９８２））；ヒトｃＤＮＡ（Ｓａｓａｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：２２７８２－２２７８７；Ｋｉｔａｇａｗａ ＆ Ｐａｕｌｓｏｎ（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：１３９４－１４０１）、およびゲノム（Ｋｉｔａｇａｗａ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：９３１－９３８）から単離することができる。ＤＮＡ配列も既知であり、組換え発現によるこの酵素の生産を促進する。好適な態様では、特許請求するシアリル化法はラットのＳＴ３ＧａｌＩＩＩを使用する。

【０９６４】
本発明に使用する他のシアリルトランスフェラーゼの例には、α（２，３）を含むカンピロバクター ジェジュニ（Ｃａｍｐｈｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ）から単離されるものを含む。例えば国際公開第９９／４９０５１号パンフレットを参照にされたい。

【０９６５】
表７に掲げるものも含む他のシアリルトランスフェラーゼも、工業的に重要な糖ペプチドの経済的かつ効率的な大規模シアリル化法に有用である。このような他の酵素の有用性を見いだすための単純な試験として、様々な量の酵素（１～１００ｍＵ／ｍｇタンパク質）をアシアロ－α$_1$ＡＧＰ（１～１０ｍｇ／ｍｌで）と反応させて、糖ペプチドをシアリル化する問題のシアリルトランスフェラーゼの能力を、ウシのＳＴ６Ｇａｌ、ＳＴ３ＧａｌＩＩＩまたは両シアリルトランスフェラーゼのいずれかと比較する。あるいは他の糖ペプチドまたは糖ペプチド、またはペプチド骨格から酵素的に放出されるＮ－結合オリゴ糖を、この評価のためにアシアロ－α$_1$ＡＧＰの代わりに使用することができる。ＳＴ６ＧａｌＩよりも効率的に糖ペプチドのＮ－結合オリゴ糖をシアリル化する能力を持つシアリルトランスフェラーゼは、ペプチドをシアリル化するための現実的な大規模法に有用である（本開示においてＳＴ３ＧａｌＩＩＩについて具体的に説明するように）。

【０９６６】
４．他のグリコシルトランスフェラーゼ
当業者は他のグリコシルトランスフェラーゼを、シアリルトランスフェラーゼについて詳細に記載したように同様なトランスフェラーゼサイクルで置き換え得ることができると理解するだろう。特にグリコシルトランスフェラーゼは例えばグルコシルトランスフェラーゼ、例えばＡｌｇ８（Ｓｔａｇｌｊｏｖ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：５９７７（１９９４））またはＡｌｇ５（Ｈｅｅｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２２４：７１（１９９４））であることもできる。

【０９６７】
Ｎ－アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼも本発明の実施に使用する。適当なＮ－アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼには限定するわけではないが、α（１，３）Ｎ－アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、β（１，４）Ｎ－アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ（Ｎａｇａｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：１２０８２－１２０８９（１９９２）およびＳｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：１５１６２（１９９４））およびペプチドＮ－アセチ

ルガラクトサミニルトランスフェラーゼ（Ｈｏｍａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１２６０９（１９９３））を含む。適当なＮ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼにはＧｎＴＩ（２．４．１．１０１、Ｈｕｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，ＢＢＲＣ１７６：６０８（１９９１））、ＧｎＴＩＩ、ＧｎＴＩＩＩ（Ｉｈａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．ＢｉｏＣｈｅｍ．１１３：６９２（１９９３））、ＧｎＴＩＶ、ＧｎＴＶ（Ｓｈｏｒｅｉｂａｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１５３８１（１９９３））およびＧｎＴＶＩ、Ｏ－結合Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（Ｂｉｅｒｈｕｉｚｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：９３２６（１９９２））、Ｎ－アセチルグルコサミン－１－ホスフェートトランスフェラーゼ（Ｒａｊｐｕｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｊ．２８５：９８５（１９９２））およびヒアルロナン　シンターゼを含む。

【０９６８】

マンノシルトランスフェラーゼは、修飾されたマンノース部分を転移するために使用する。適当なマンノシルトランスフェラーゼにはα（１，２）マンノシルトランスフェラーゼ、α（１，３）マンノシルトランスフェラーゼ、α（１，６）マンノシルトランスフェラーゼ、β（１，４）マンノシルトランスフェラーゼ、Ｄｏｌ－Ｐ－Ｍａｎシンターゼ、ＯＣｈ１およびＰｍｔ１を含む（Ｋｏｒｎｆｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５４：６３１－６６４（１９８５）を参照にされたい）。

【０９６９】

キシロシルトランスフェラーゼも本発明に有用である。例えばＲｏｄｇｅｒｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｊ．２８８：８１７－８２２（１９９２）；およびＥｌｂａｉｎ，ｅｔ　ａｌ．、米国特許第６，１６８，９３７号明細書を参照にされたい。

【０９７０】

他の適当なグリコシルトランスフェラーゼサイクルは、Ｉｃｈｉｋａｗａ　ｅｔ　ａｌ．，ＪＡＣＳ１１４：９２８３（１９９２）、Ｗｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．５７：４３４３（１９９２）およびＩｃｈｉｋａｗａ　ｅｔ　ａｌ．、炭水化物および炭水化物ポリマー（ＣＡＲＢＯＨＹＤＲＡＴＥＳ　ＡＮＤ　ＣＡＲＢＯＨＹＤＲＡＴＥ　ＰＯＬＹＭＥＲＳ）、Ｙａｌｔａｍｉ編集（ＡＴＬ出版、１９９３）に記載されている。

【０９７１】

原核生物のグリコシルトランスフェラーゼも本発明の実施に有用である。そのようなグリコシルトランスフェラーゼには多くのグラム陰性細菌により生産されるリポオリゴ糖（ＬＯＳ）の合成に関与する酵素を含む。ＬＯＳは典型的には、ヒト上皮細胞の表面または宿主の分泌に見いだされる複合糖質を模する末端グリカン配列を有する（Ｐｒｅｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　ｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　２３（３）：１３９－１８０（１９９６））。そのような酵素には限定するわけではないが、β１，６ガラクトシルトランスフェラーゼおよびβ１，３ガラクトシルトランスフェラーゼを含む大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）およびネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）のような種のｒｆａオペロンのタンパク質（例えばＥＭＢＬ寄託番号Ｍ８０５９９およびＭ８６９３５（大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））；ＥＭＢＬ寄託番号Ｓ５６３６１（ネズミチフス菌（Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）を参照にされたい）、グルコシルトランスフェラーゼ（スイスープロット寄託番号Ｐ２５７４０（大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））、β１，２－グルコシルトランスフェラーゼ（ｒｆａＪ）（スイスープロット寄託番号Ｐ２７１２９（大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））およびスイスープロット寄託番号Ｐ１９８１７（ネズミチフス菌（Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ））、およびβ１，２－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（ｒｆａＫ）（ＥＭＢＬ寄託番号Ｕ０００３９（大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））を含む。アミノ酸配列が既知の他のグリコシルトランスフェラーゼには、肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、ネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、サルモネラ　エンテリカ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ）、腸炎エルシニア（Ｙｅ

ｒｓｉｎｉａ ｅｎｔｅｒｏｃｏｌｉｔｉｃａ）、マイコバクテリウム レプロサム（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒｏｓｕｍ）のような微生物で特徴付けられたｒｆａＢのようなオペロン、および緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のｒｈｌオペロンにコードされるものを含む。

【０９７２】

また本発明での使用に適するのは、ラクト－Ｎ－ネオテトラオース、Ｄ－ガラクトシル－β－１，４－Ｎ－アセチル－Ｄ－グルコサミニル－β－１，３－Ｄ－ガラクトシル－β－１，４－Ｄ－グルコース、およびＰ^{k}血液型の三糖配列、Ｄ－ガラクトシル－α－１，４－Ｄ－ガラクトシル－β－１，４－Ｄ－グルコースを含む構造の生産に関与するグリコシルトランスフェラーゼであり、これらは粘膜病原菌である淋菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）および髄膜炎菌（Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）のＬＯＳで同定された（Ｓｃｈｏｌｔｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４１：２３６－２４３（１９９４））。グリコシルトランスフェラーゼをコードする髄膜炎菌（Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）および淋菌（Ｎ．ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）由来の遺伝子は、髄膜炎菌（Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）のイムノタイプＬ３およびＬ１（Ｊｅｎｎｉｎｇｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１８：７２９－７４０（１９９５））、および淋菌（Ｎ．ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）突然変異体のＦ６２（Ｇｏｔｓｈｌｉｃｈ，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８０：２１８１－２１９０（１９９４））から同定されたこれらの構造の生合成に関与した。髄膜炎菌（Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）では、３つの遺伝子、ｌｇｔＡ、ｌｇｔＢおよびｌｇＥからなる位置がラクト－Ｎ－ネオテトラオース鎖に最後の３つの糖を付加するために必要であるグリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードする（Ｗａｋａｒｃｈｕｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：１９１６６－７３（１９９６））。最近、ｌｇｔＢおよびｌｇｔＡ遺伝子産物の酵素活性が証明され、それらの提案されたグリコシルトランスフェラーゼ機能について直接的な証拠が提供された（Ｗａｋａｒｃｈｕｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１（４５）：２８２７１－２７６（１９９６））。淋菌（Ｎ．ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）では２つのさらなる遺伝子、β－Ｄ－ＧａｌＮＡｃをラクト－Ｎ－ネオテトラオース構造の末端ガラクトースの３位に加えるｌｇｔＤ、および短縮化ＬＯＳのラクトース要素に末端α－Ｇａｌを加えるｌｇｔＣがあり、これによりＰ^{k}血液型抗原構造を作成する（Ｇｏｔｓｈｌｉｃｈ（１９９４）、同上）。髄膜炎菌（Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）では、別のイムノタイプＬ１もＰ^{k}血液型抗原を発現し、そしてｌｇｔＣ遺伝子を持つことが示された（Ｊｅｎｎｉｎｇｓ ｅｔ ａｌ．，（１９９５）、同上）。ナイセリア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）のグリコシルトランスフェラーゼおよび関連遺伝子も、米国特許第５，５４５，５５３号明細書（Ｇｏｔｓｃｈｌｉｃｈ）に記載されている。ヘリコバクター ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ）に由来するα１，２－フコシルトランスフェラーゼおよびα１，３－フコシルトランスフェラーゼに関する遺伝子も特性決定された（Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：２１３４９－２１３５６（１９９７））。また本発明で使用するのはカンピロバクター ジェジュニ（Ｃａｍｐｈｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ）のグリコシルトランスフェラーゼである（Ｔａｎｉｇｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，２００２、グリコシルトランスフェラーゼおよび関連遺伝子のハンドブック、スプリンガー、東京を参照にされたい）。

【０９７３】

Ｂ．スルホトランスフェラーゼ

本発明は、例えばヘパリン、硫酸ヘパラン、カラゲニン（ｃａｒｒａｇｅｎｅｎ）のような硫黄化多糖および関連化合物を含む硫黄化した分子を含むペプチドの生産法を提供する。適当なスルホトランスフェラーゼには例えば、コンドロイチン－６－スルホトランスフェラーゼ（Ｆｕｋｕｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：１８５７５－１８５８０（１９９５）により記載されたニワトリｃＤＮＡ；ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号Ｄ４９９１５）、グルコサミノグリカンＮ－アセチルグルコサミンＮ－デアセチラーゼ／Ｎ－スルホトランスフェラーゼ１（Ｄｉｘｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ２

６：２３９－２４１（１９９５）；ＵＬ１８９１８）、およびグルコサミノグリカンＮ－アセチルグルコサミンＮ－デアセチラーゼ／Ｎ－スルホトランスフェラーゼ２（Ｏｒｅｌｌａｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：２２７０－２２７６（１９９４）およびＥｒｉｋｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：１０４３８－１０４４３（１９９４）に記載されたマウスｃＤＮＡ；ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号Ｕ２３０４に記載されたヒトｃＤＮＡ）を含む。

【０９７４】

Ｃ．細胞－結合グリコシルトランスフェラーゼ

別の態様では、本発明の方法で採用する酵素は細胞－結合グリコシルトランスフェラーゼである。多くの可溶性グリコシルトランスフェラーゼが知られているが（例えば米国特許第５，０３２，５１９号明細書を参照にされたい）、グリコシルトランスフェラーゼは細胞に付随する時は一般に膜に結合している状態である。これまでに研究された多くの膜に結合酵素は内在性のタンパク質であると考えられ；すなわちそれらは超音波により膜から放出されず、そして可溶化に界面活性剤を要する。表面のグリコシルトランスフェラーゼは脊椎動物および無脊椎動物の細胞上の表面で同定され、そしてこれら表面のトランスフェラーゼが生理学的条件下で触媒活性を維持していることも認識された。しかし細胞表面のグリコシルトランスフェラーゼのより認識されている機能は細胞間の認識である（Ｒｏｔｈ，１９９０，超細胞現象に対する分子的取り組み（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ ｔｏ Ｓｕｐｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｐｈｅｎｏｍｅｎａ）。

【０９７５】

細胞により発現されるグリコシルトランスフェラーゼを改変させるための方法が開発された。例えばＬａｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６：８２２７－８２３１（１９８９）は、細胞表面のオリゴ糖構造およびそれらのコグネイトグルコシルトランスフェラーゼの発現を決定するクローン化ｃＤＮＡ配列を単離する遺伝的取り組みを報告する。ＵＤＰ－ガラクトース；β－Ｄ－ガラクトシル－１，４－Ｎ－アセチル－Ｄ－グルコサミニドα－１，３－ガラクトシルトランスフェラーゼをを発現することが知られているマウスの細胞系から単離したｍＲＮＡから作成したｃＤＮＡライブラリーをＣＯＳ－１細胞にトランスフェクトした。次いでトランスフェクトした細胞を培養し、そしてα１，３－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性についてアッセイした。

【０９７６】

Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：２７１３－２７１７（１９９２）は、β－ラクタマーゼを大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）の外面に足掛けする（ａｎｃｈｏｒｉｎｇ）方法を開示する。（ｉ）外膜タンパク質のシグナル配列、（ｉｉ）外膜タンパク質の膜－拡張区分（ｓｐａｎｎｉｎｇ ｓｅｃｔｉｏｎ）、および（ｉｉｉ）完全な成熟β－ラクタマーゼ配列からなる三者（ｔｒｉｐａｒｔｉｔｅ）融合が生産され、活性な表面結合β－ラクタマーゼ分子を生じる。しかしＦｒａｎｃｉｓｃｏの方法は原核細胞系にのみ限定され、著者により認識されているように、正しく機能するには完全な三者融合を必要とする。

【０９７７】

Ｄ．融合酵素

別の例示態様では、本発明の方法は所望の糖ペプチド結合物の合成に関与する１より多くの酵素活性を有する融合ペプチドを利用する。融合ペプチドは例えば、アクセサリー酵素の触媒的に活性なドメインに連結されたグリコシルトランスフェラーゼの触媒的に活性なドメインからなることができる。アクセサリー酵素の触媒ドメインは、例えばグリコシルトランスフェラーゼの供与体であるヌクレオチド糖の形成における工程を触媒するか、あるいはグリコシルトランスフェラーゼサイクルに関与する反応を触媒することができる。例えばグリコシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドはフレイム内で、ヌクレオチド糖合成に関与する酵素をコードするポリヌクレオチドに結合され得る。生成した融合ペプチドは次いでヌクレオチド糖合成を触媒するだけでなく、アクセプター分子

への糖部分の転移も触媒する。融合ペプチドは１つの発現可能なヌクレオチド配列に連結された２以上のサイクル酵素であることができる。別の態様では融合ペプチドは２以上のグリコシルトランスフェラーゼの触媒的に活性なドメインを含む。例えば米国特許５，６４１，６６８第号明細書を参照にされたい。本発明の修飾された糖ペプチドは、様々な適切な融合ペプチドを利用して容易に設計し、そして製造することができる（例えば国際公開第９９／３１２２４号パンフレットとして１９９９年６月２４日に公開されたＰＣＴ特許出願ＰＣＴ／ＣＡ９８／０１１８０を参照にされたい）。

【０９７８】

Ｅ．固定化酵素

細胞に結合した酵素に加えて、本発明は固体および／または可溶性支持体上に固定化された酵素の使用も提供する。例示態様では、本発明の方法に従い完全なグリコシルリンカーを介してＰＥＧに結合されたグリコシルトランスフェラーゼを提供する。ＰＥＧ－リンカー－酵素結合物は、場合により固体支持体に結合される。本発明の方法において固体に支持された酵素の使用は、反応混合物の処理および反応生成物の精製を簡単にし、そしてまた酵素の容易な回収を可能とする。このグリコシルトランスフェラーゼ結合物は本発明の方法に利用する。他の酵素および支持体の組み合わせも当業者には明らかであろう。

【０９７９】

Ｆ．グリコシルトランスフェラーゼの突然変異誘発法

本発明の方法で使用するグリコシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、スルホトランスフェラーゼおよび任意の他の酵素の新規形態は、これまでに記載した任意の方法ならびに当該技術分野で周知の他の方法を使用して作成することができる。特に興味深いのは、改変された受容体特異性および／または供与体特異性を持つトランスフェラーゼである。また興味深いのは、中でもより高い転換速度およびより高い安定性を持つ酵素である。

【０９８０】

合理的な設計の突然変異誘発技術は、ペプチドの配列が知られている時に使用することができる。本発明で使用するトランスフェラーゼおよびグルコシダーゼ配列ならびに３次構造の多くは知られているので、これらの酵素は突然変異の合理的な設計に理想的である。例えば酵素の触媒部位を突然変異させて酵素の供与体および／または受容体特異性を改変することができる。

【０９８１】

グリコシルトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼヒドロラーゼに関する膨大な３次構造に関するデータにより、これらの酵素はドメイン交換が関与する突然変異にも理想的なものとなる。グリコシルトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼヒドロラーゼはモジュラー酵素（ｍｏｄｕｌａｒ　ｅｎｚｙｍｅ）である（Ｂｏｕｒｎｅ　ａｎｄ　Ｈｅｎｒｉｓｓａｔ，２００１，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１１：５９３－６００）。グリコシルトランスフェラーゼはそれらの構造に基づき２つのファミリーに分類される：ＧＴ－ＡおよびＧＴ－Ｂ。ＧＴ－Ａファミリーのグリコシルトランスフェラーゼは２つの似ていないドメインを含んでなり、１つはヌクレオチド結合に関与し、そしてもう１つは受容体結合に関与する。このように１つの遺伝子に由来するドメインをコードするＤＮＡ配列を、第２の遺伝子に由来するドメインとフレイム内で都合よく融合して、新たな受容体／供与体特異性を持つタンパク質をコードする新たな遺伝子を作成することができる。そのようなドメインの交換にはさらに炭水化物モジュールおよび他のアクセサリードメインを含むことができる。

【０９８２】

上記のようなランダム変異導入および／または方向性のある進化の技術は、本発明で使用するグリコシルトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼの新規な形態を作成するためにも使用することができる。

【０９８３】

ＩＶ．インビトロおよびインビボの発現系

Ａ．糖ペプチドを生産するための細胞

グリコシルトランスフェラーゼの作用はペプチドのグリコシル化に重要であり、すなわち所定の細胞型での１組のグリコシルトランスフェラーゼの発現における差異は、その細胞で生産される所定のペプチドのグリコシル化パターンに影響を及ぼす。宿主細胞に依存的なペプチドのグリコシル化の総説に関しては、Ｋａｂａｔａ ａｎｄ Ｔａｋａｓａｋｉ、「細胞表面の炭水化物の構造および生合成（Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｓｕｒｆａｃｅ Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅｓ）」、細胞表面の炭水化物および細胞生育（Ｃｅｌｌ Ｓｕｒｆａｃｅ Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅｓ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ）で、１９９１、第１～２４頁、編集．Ｍｉｎｏｒｕ Ｆｕｋｕｄａ、ＣＲＣ出版、ボカ ラトン、フロリダ州を参照にされたい。

【０９８４】

本開示に従いペプチドが生産される細胞の型は、所望のグリコシル化を有するペプチドを生成するために必要な改造の程度に対してのみ関係がある。例えば所望のグリコシル化を有するペプチドを生成するために、インビトロで必要な酵素的消化反応の回数および順序および酵素的合成反応の回数および順序は、特定の細胞型により生産されるペプチド上のグリカンの構造に依存して変動する。本発明は本明細書に開示する任意の細胞型を含む任意の１つの特定の細胞型に由来するペプチドの生産に限定されるとは全く解釈されるべきではなく、本発明の威力およびペプチドが生成される細胞系の独立性を確立する幾つかの細胞系の検討をこれから提示する。

【０９８５】

一般に、そしてペプチドをコードする核酸からペプチドを発現させるために、核酸はプロモーター要素、ターミネーター要素およびこの２つの間に操作可能に連結されたペプチドのコード配列を含んでなる発現カセットに包含されなければならない。次いで発現カセットをベクターに操作可能に連結する。この末端に向けてアダプターまたはリンカーを使用してヌクレオチドフラグメントを連結することができ、あるいは便利な制限部位、余分なヌクレオチドの除去、制限部位の除去等を提供するために他の操作が関与してもよい。このために、インビトロの突然変異誘発法、プライマー修復、制限、アニーリング、再置換、例えばトランジッションおよびトランスバージョンを含むことができる。シャトルベクターは細胞中で複製に必要な遺伝子要素を有する。ベクターの中には原核細胞中でのみ複製できるもの、あるいは原核および真核細胞の両方で複製できるものがある。そのようなプラスミド発現ベクターは１以上の複製系、好ましくは発現の目的で酵母宿主細胞内で、そしてクローニングの目的で原核宿主内で安定に維持されることができる２つの複製系で維持される。今では多様な特性を持つ多くのベクターが市販されている。ベクターは通常、プラスミドまたはファージであるが、コスミドまたはミニ－染色体でもよい。都合が良いことに、多くの市販されているベクターはすでに存在する発現カセットにプロモーターおよびターミネーター、および問題のペプチド用のコード配列を挿入できるマルチ－リンカー部位を有する。次いで発現カセットを含むシャトルベクターは大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中で形質転換され、ここでベクターは細胞分裂中に複製して選択した発現系の宿主細胞を形質転換するのに十分なベクターの調製物を生成する。上記の方法は当業者には周知であり、そして行なわれるプロトコールはＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（２００１，モレキュラークローニング：ア ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー、ニューヨーク）に見いだすことができる。

【０９８６】

ベクターはいったん増幅された細胞から精製されれば、次に発現系の細胞に形質転換される。形質転換のプルトコールは細胞の種類およびベクターの性質に依存する。形質転換体を適当な栄養培地中で成長させ、そして適当な場合には内因性ＤＮＡの維持を選択圧下で維持する。発現が誘導性である場合、成長により酵母宿主が高密度の細胞を生じることができるようになり、次いで発現が誘導される。分泌した成熟したヘテロロガスなペプチドは通常の手段により回収することができ、そしてクロマトグラフィー、電気泳動、透析

、溶媒－溶媒抽出等により精製され得る。

【０９８７】

分子クローニングの技術は当該技術分野では周知である。さらに分子クローニングの手順に関する技術は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（２００１、モレキュラークローニング：ア ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州）；Ｇｌｏｖｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９８５、ＤＮＡクローニング：実践的取り組み（ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ）、第ＩおよびＩＩ巻）；Ｇａｉｔ ｅｔ ａｌ．，（１９８５、オリゴヌクレオチド合成（Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ））；Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｈｉｇｇｉｎｓ（１９８５、核酸ハイブリダイゼーション（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ））；Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｈｉｇｇｉｎｓ（１９８４、転写および翻訳（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ））；Ｆｒｅｓｈｎｅｙ ｅｔ ａｌ．，（１９８６、動物細胞培養（Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ））；Ｐｅｒｂｅｌ、（１９８６、固定化細胞および酵素（Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌｓ Ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅｓ）、ＩＲＬ出版）；Ｐｅｒｂｅｌ、（１９８４、分子クローニングに関する実践的指針（Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ））；Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（２００２、分子生物学の現在のプロトコール（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）、ジョン ウィリー＆サンズ社）に見いだすことができる。

【０９８８】

Ｂ．真菌および酵母

酵母で生産されたペプチドはグリコシル化されており、そしてそこに存在するグリカン構造は主に高マンノース構造である。Ｎ－グリカンの場合では、酵母で生産されたグリカン構造は、９以上ものマンノース残基を含むことができ、この残基はそれに結合したさらなる糖を含んでも、含まなくてもよい。酵母細胞により生産されるペプチド上のこの型のグリカンの例を、図５の左側に示す。マンノース残基の番号およびそれに結合したさらなる糖の型および複雑さに関係なく、酵母細胞で生産されたペプチドの成分としてＮ－グリカンは、図５に示すトリマンノシルコア構造を含んでなる。酵母細胞で生産されたペプチド上のグリカン構造が高マンノース構造である時、当業者が利用可能なマンノシダーゼ酵素を使用してグリカンのトリマンノシルコアを含んでなる残基を除き、分子からすべてのマンノース残基をインビトロで除去することは単純なことであり、これにより結合した基本的なトリマンノシルコア構造を有するペプチドを生成する。ここで今、当該技術分野で利用可能な技術を使用し、そして本開示から着手すれば、インビトロで酵素的にさらなる糖部分を基本的なトリマンノシルコア構造に加え、所望のグリカン構造をトリマンノシルコアに結合して有するペプチドを生成することは簡単である。同様に酵母細胞により生産されたペプチドが、結合した他の複雑な糖に加えて高マンノース構造を含んでなる時、余分なマンノース残基を含めさらなる糖のすべてを酵素的に開裂して基本的なトリマンノシルコア構造に到達することは簡単な事柄である。いったん基本的なトリマンノシルコアが生成されれば、所望のグリコシル化を有するペプチドの生成は本明細書に提供する指針に従い可能となる。

【０９８９】

「酵母」は無胞子酵母（Ｅｎｄｏｍｙｃｅｔａｌｅｓ）、担子胞子酵母（ｂａｓｉｄｉｏｓｐｏｒｏｇｅｎｏｕｓ）、および不完全菌類（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｔｅｓ）に属する酵母を意図している。無胞子酵母は２つのファミリー、スペルモフィトラ科（Ｓｐｅｒｍｏｐｈｔｈｏｒａｃｅａｅ）およびサッカロミセス科（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｔａｃｅａｅ）に分類される。後者は４つのサブファミリー、シゾサッカロミセス科（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｏｉｄｅａｅ）（例えばシゾサッカロミセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属）、ナドゾニア科（Ｎａｄｓｏｎｉｏｉｄｅａｅ）、リポミセス科（Ｌｉｐｏｍｙｃｏｉｄｅａｅ）およびサッカロミセス科（Ｓａｃｃｈａｒ

omycoideae）（例えばピヒア（Pichia）、クルイベロミセス（Kluyveromyces）、およびサッカロミセス（Saccharomyces）属）からなる。担子胞子酵母にはロイコスポリジウム（Leucosporidium）、ロドスポリジウム（Rhodosporidium）、スポリディオボルス（Sporidiobolus）、フィロバシジウム（Filobasidium）およびフィロバシジーラ（Filobasidiella）属を含む。不完全菌類に属する酵母は2つのファミリー、スポロボロミセス科（Sporobolomycetaceae）（例えば、スポロボロミセス（Sporobolomyces）、ブレラ（Bullera）属）およびクリプトコッカス科（Cryptococcaceae）（例えばカンジダ（Candida）属）に分類される。本発明で特に興味深いのは、サッカロミセス（Saccharomyces）、ピヒア（Pichia）、アスペルギルス（Aspergillus）、トリコデルマ（Trichoderma）、クルイベロミセス（Kluyveromyces）属、特にK. ラクティス（lactis）およびK. ドロソフィラム（drosophilum）、カンジダ（Candida）、ハンセニューラ（Hansenula）、シゾサッカロミセス（Schizosaccharomyces）、ヤロウィア（Yarrowia）およびクリソポリウム（Chrysoporium）属内の種である。酵母の分類は将来、変わるかもしれないので、本発明の目的のための酵母は、Skinner et al. 編集、1980）、酵母の生物学および活性（Bilogy and Activities of Yeast）（Soc. App. Bacteriol. Symp. Series No. 9）に記載されてように定義されるものである。

【0990】

先の記述に加えて、当業者は恐らく酵母の生物学および酵母遺伝子の操作に関して精通している。例えばBacila et al. 編集（1978、酵母の生化学および遺伝学（Biochemistry and Genetics of Yeast）、アカデミック出版、ニューヨーク）；およびRose and Harrison.（1987、酵母（The Yeasts）（第2版）、アカデミック出版、ロンドン）を参照にされたい。外因性のDNAを酵母宿主に導入する方法は、当該技術分野で周知である。酵母の形質転換のためには広範な種々の方法がある。スフェロプラスト形質転換はHinnen et al（1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA75：1919－1933）；Beggs,（1978, Nature275（5676）：104－109）；およびStinchcomb et al.,（欧州特許出願公開第45,573号明細書；引用により本明細書に編入する）により教示され、電気穿孔はBecker and Gaurante,（1991, Methods Enzymol. 194：182－187）により教示され、酢酸リチウムはGietz et al.（2002, Methods Enzymol. 350：87－96）およびMount et al.（1996, Methods Mol Biol. 53：139－145）により教示されている。非サッカロミセス（Saccharomyces）酵母の形質転換系の総説に関しては、Wang et al.（Crit Rev Biotechnol. 2001；21（3）：177－218）を参照にされたい。酵母の遺伝子操作に関する一般的手順については、Barr et al.,（1989、酵母の遺伝子操作（Yeast genetic enginerring）、バターワース、ボストン）を参照にされたい。

【0991】

野生型酵母および真菌細胞に加えて、外因性遺伝子の発現レベル、純度、生成したペプチドの翻訳後修飾プロセッシングおよび成熟ペプチドの回収および純度を強化するように突然変異および／または選択された酵母および真菌の株が存在する。外因性ペプチドの発現は、インスリンの発現により具体的に説明されるように細胞の分泌経路に向けることもできる（Kjeldsen, 2000, Appl. Microbiol. Biotechnol. 54：277－286、およびその中の参考文献を参照にされたい）。一般に酵母細胞から外因性ペプチドの分泌を引き起こすためには、キラートキシン（Stark

ａｎｄ Ｂｏｙｄ，１９８６、ＥＭＢＯ Ｊ．１９９５－２００２）、またはアルファフェロモン（Ｋｕｒｊａｎ ａｎｄ Ｈｅｒｓｋｏｗｉｔｚ，１９８２，Ｃｅｌｌ ３０：９３３；Ｂｒａｋｅ ｅｔ ａｌ．，１９８８，Ｙｅａｓｔ ４：Ｓ４３６）の遺伝子のもののような酵母遺伝子に由来する分泌シグナルを使用することができる。

【０９９２】

一般に糸状菌に関して、遺伝子操作法はＫｉｎｇｈｏｒｎ ａｎｄ Ｔｕｒｎｅｒ（１９９２，糸状菌の応用分子遺伝学（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ Ｆｕｎｇｉ）、ブラッキー アカデミック アンド プロフェッショナル（Ｂｌａｃｋｉｅ Ａｃａｄｅｍｉｃ ａｎｄ Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ）、ニューヨーク）に見いだすことができる。適切なベクターに関するガイダンスは、Ｍａｒｔｉｎｅｌｌｉ ａｎｄ Ｋｉｎｇｈｏｒｎ（１９９４，アルペルギルス：５０年（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ：５０ ｙｅａｒｓ）、エルセビア、アムステルダム）に見いだすことができる。

【０９９３】

１．サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）

サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）では、ペプチドを生産するために使用する適当な酵母ベクターにはＹＲｐ７（Ｓｔｒｕｈｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７６：１０３５－１０３９，１９７８）、ＹＥｐ１３（Ｂｒｏａｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ８：１２１－１３３，１９７９）、ＰＯＴベクター（Ｋａｗａｓａｋｉ ｅｔ ａｌ．，米国特許第４，９３１，３７３号明細書、これは引用により本明細書に編入する）、ｐＪＤＢ２４９およびｐＪＤＢ２１９（Ｂｅｇｇｓ，Ｎａｔｕｒｅ ２７５：１０４－１０８，１９７８）およびそれらの誘導体を含む。酵母での使用に好適なプロモーターは、酵母の解糖遺伝子の発現に関するプロモーター（Ｈｉｔｚｅｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５５：１２０７３－１２０８０，１９８０；Ａｌｂｅｒ ａｎｄ Ｋａｗａｓａｋｉ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．１：４１９－４３４，１９８２；Ｋａｗａｓａｋｉ，米国特許第４，５９９，３１１号明細書）、またはアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（Ｙｏｕｎｇ ｅｔ ａｌ．、化学品のための微生物の遺伝子工学（Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ ｆｏｒ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）、Ｈｏｌｌａｅｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，（編集）、第３５５頁、プレナム出版、ニューヨーク、１９８２；Ａｍｍｅｒｅｒ，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１０１：１９２－２０１，１９８３）、およびＡＤＨ２－４^{c}プロモーター（Ｒｕｓｓｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３０４：６５２－６５４，１９８３；Ｉｒａｎｉ ａｎｄ Ｋｉｌｇｏｒｅ，米国特許出願第０７／７８４，６５３号明細書、カナダ国特許第１，３０４，０２０号明細書および欧州特許第２８４ ０４４号明細書、これらは引用により本明細書に編入する）を含む。発現単位は転写ターミネーターも含むことができる。好適な転写ターミネーターはＴＰＩ１ターミネーター（Ａｌｂｅｒ ａｎｄ Ｋａｗａｓａｋｉ，同上）である。

【０９９４】

そのような酵母－細菌シャトルベクターの例には、Ｙｅｐ２４（Ｂｏｔｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９７９）Ｇｅｎｅ ８：１７－２４；ｐＣ１（Ｂｒａｋｅ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８１：４６４２－４６４６）、およびＹｒｐ１７（Ｓｔｎｉｃｈｏｍｂ ｅｔ ａｌ．（１９８２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５８：１５７）を含む。さらにプラスミド発現ベクターは高または低コピー数プラスミドでよく、コピー数は一般に約１～約２００の範囲である。高コピー数酵母ベクターの場合、一般に１つの宿主中に少なくとも１０、好ましくは少なくとも２０、そして通常は約１５０コピーを越えない。選択したヘテロロガスなペプチドに依存して、高または低コピー数ベクターのいずれかが、ベクターおよび組換えペプチドが宿主に及ぼす効果に依存して望ましい。例えばＢｒａｋｅ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：４６４２－４６４６を参照にされたい。本発明のＤＮＡ構築物はベクターに組み込むことにより酵母ゲノムに組み込んでもよい。そのような

ベクターの例は当該技術分野で知られている。例えばＢｏｔｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９７９）Ｇｅｎｅ ８：１７－２４を参照にされたい。

【０９９５】

本発明を実施するために適当な酵母および他の微生物宿主に関する選択は、当該技術分野の技術内である。特に興味深いのは、サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）のＳ．セルビシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、Ｓ．カールスベルゲンシス（ｃａｒｌｓｂｅｒｇｅｎｓｉｓ）、Ｓ．ジアスタティカス（ｄｉａｓｔａｔｉｃｕｓ）、Ｓ．ドウグラシー（ｄｏｕｇｌａｓｉｉ）、Ｓ．クルイベリ（ｋｌｕｙｖｅｒｉ）、Ｓ．ノルベンシス（ｎｏｒｂｅｎｓｉｓ）およびＳ．オビホルミス（ｏｖｉｆｏｒｍｉｓ）種である。所望のペプチドを発現させるために酵母宿主細胞を選択する時、適当な宿主細胞は、中でも良好な分泌能力、低いタンパク質分解活性、および全体的な成長力（ｖｉｇｏｒ）を有することが示されたものを含むことができる。酵母および他の微生物は一般に様々な供給源から入手可能であり、それらにはカリフォルニア州、バークレーのカリフォルニア大学、生物物理学および医学物理学部（Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃｓ ａｎｄ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｐｈｙｓｉｃｓ）、酵母遺伝子ストックセンター（Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｓｔｏｃｋ Ｃｅｎｔｅｒ）；およびバージニア州、マナッサスのアメリカンタイプカルチャーコレクションを含む。総説に関しては、Ｓｔｒａｔｈｅｒｎ ｅｔ ａｌ．編集．（１９８１、酵母、サッカロミセスの分子生物学（Ｔｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｙｅａｓｔ Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州）をに参照にされたい。

【０９９６】

外因性ＤＮＡを酵母宿主に導入する方法は、当該技術分野では周知である。

【０９９７】

２．ピヒア

組換えペプチドの生産のための宿主としてピヒア メタノリカ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）の使用は、ＰＣＴ出願、国際公開第９７／１７４５０号、同第９７／１７４５１号、同第９８／０２５３６号および同第９８／０２５６５号パンフレットに開示されている。Ｐ．メタノリカ（ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）の形質転換に使用するＤＮＡ分子は一般に、形質転換前に好ましくは直線化される二本鎖の環状プラスミドとして調製される。Ｐ．メタノリカ（ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）でのペプチド生産には、プラスミド中のプロモーターおよびターミネーターは、Ｐ．メタノリカ（ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）のアルコール利用遺伝子（ＡＵＧ１またはＡＵＧ２）のようなＰ．メタノリカ（ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）遺伝子のものであることが好ましい。他の有用なプロモーターにはジヒドロキシアセトンシンターゼ（ＤＨＡＳ）、ギ酸デヒドロゲナーゼ（ＦＭＤ）およびカタラーゼ（ＣＡＴ）遺伝子のもの、ならびに米国特許第５，２５２，７２６号明細書に開示されているものを含む。ＤＮＡの宿主染色体への組み込みを容易にするために、宿主ＤＮＡ配列により両末端を挟まれたプラスミドの全発現セグメントを有することが好ましい。ピヒア メタノリカ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）での使用に好適な選択マーカーは、ホスホリボシル－５－アミノイミダゾールカルボキシラーゼ（ＡＩＲＣ；ＥＣ４．１．１．２１）をコードするＰ．メタノリカ（ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）ＡＤＥ２遺伝子であり、これはａｄｅ２宿主細胞がアデニンの不存在下で成長することを可能とする。メタノールの使用を最少にすることが望まれる大規模な工業的方法には、両方のメタノール利用遺伝子（ＡＵＧ１およびＡＵＧ２）が削除されている宿主細胞が好ましい。分泌するペプチドの生産には、液胞プロテアーゼ遺伝子（ＰＥＰ４およびＰＲＢ１）を欠く宿主細胞が好適である。目的のペプチドをコードするＤＮＡを含むプラスミドを、Ｐ．メタノリカ（ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）細胞に導入することを容易にするために、電気穿孔を使用する。指数的に減少する、２．５～４．５ｋＶ／ｃｍ、好ましくは約３．７５ｋＶ／ｃｍの場の強さを有するパルス電場、および１～４０ミリ秒、最も好ましくは約２０ミリ秒の時間定数（ｔ）を使用して、電気穿孔によりＰ．メタノリカ（ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃ

ａ）細胞を形質転換することが好ましい。抗体フラグメントの大規模生産のためのピヒアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）の使用に関する総説は、Ｆｉｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９９，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｐｐｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ．３０（Ｐｔ２）：１１７－１２０）を参照にされたい。

【０９９８】

３．アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）

アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）種でペプチドを発現させる方法は当該技術分野では周知であり、それらには限定するわけではないが引用により全部、本明細書に編入するＣａｒｒｅｚ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｇｅｎｅ ９４：１４７－１５４；Ｃｏｎｔｒｅｒａｓ，１９９１，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：３７８－３８１；Ｙｅｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：１４７０－１４７４；Ｔｉｌｂｕｒｎ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｇｅｎｅ ２６：２０５－２２１；Ｋｅｌｌｙ ａｎｄ Ｈｙｎｅｓ，１９８５，ＥＭＢＯ Ｊ．４：４７５－４７９；Ｂａｌｌａｎｃｅ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１１２：２８４－２８９；Ｂｕｘｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｇｅｎｅ ３７：２０７－２１４，ａｎｄ Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．４，９３５，３４９に記載されているものを含む。アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）で有用なプロモーターの例は、米国特許第５，２５２，７２６号明細書に見いだされる。ペプチドの発現に有用なアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）の株は、米国特許第４，９３５，３４９号明細書に見いだされる。外因性ペプチドの工業的生産は、アスペルギルス ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）およびアスペルギルス オリーゼ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅ）についてノボエンザイム（Ｎｏｖｏｅｎｚｙｍｅｓ）から入手可能である。

【０９９９】

４．トリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）

トリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）は所望のペプチドを発現させるために、他の種の組換え宿主細胞に優るある一定の利点を有する。この微生物は大量に成長させることが容易であり、そしてグリコシル化する能力を有し、そして組換え哺乳動物ペプチドを培地に高い収量で効率よく分泌し、ペプチドの単離を比較的容易とする。さらに発現したペプチド上のグリコシル化パターンは、他の系で発現されるものよりもヒトペプチドに類似している。しかしこれらの細胞から発現したペプチド上のグリカン構造にも差異が存在する。例えば末端シアル酸残基は、グリカン構造の末端のこれらの部分の存在が哺乳動物の血流からペプチドの排除を遅らせるので、哺乳動物系におけるペプチドの治療的機能に対して重要である。シアリル化分子が生物学的半減期を上昇させる背後にあるメカニズムは、レクチンによるそれらの認識の低下にあると考えられる（Ｄｒｉｃｋａｍｅｒ，１９８８，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６３：９５５７－９５６０）。しかし一般に真菌細胞は末端シアル酸残基をペプチド上のグリカンに加えず、故に真菌細胞で合成されたペプチドはシアル酸が除かれている。本発明に従い、この欠如は本明細書のいたるところに詳細に記載する本発明のインビトログリカン改造方法を使用して補修する（ｒｅｍｅｄｉｅｄ）ことができる。

【１０００】

改造するペプチドの生産のために宿主として有用なトリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）種には、ＱＭ６ａ、ＡＬＫＯ２４４２またはＣＢＳ３８３．７８（セントラールビュロー、フォーア シンメルカルチャー（Ｃｅｎｔｒａａｌｂｕｒｅａｕ ｖｏｏｒ Ｓｃｈｉｍｍｅｌｃｕｌｔｕｒｅｓ）、オースターストラート １、私書箱２７３、３７４０ バールン社（ＡＧ Ｂａａｒｎ）、オランダ）、またはＡＴＣＣ１３６３１（アメリカンタイプカルチャーコレクション、マナッサス、バージニア州、１０８５２、米国、型）のようなＴ．レーゼイ（ｒｅｅｓｅｉ）；Ｔ．ビリデ（ｖｉｒｉｄｅ）（ＣＢＳ１８９．７９のような（ｄｅｔ．Ｗ．Ｇａｍｓ）；ＣＢＳ８１６．６８のようなＴ．ロンギブラキアタム（ｌｏｎｇｉｂｒａｃｈｉａｔｕｍ）（型）；Ｔ．シュードコニンギー（ｐｓｅ

ｕｄｏｋｏｎｉｎｇｉｉ）（ＭＵＣＬ１９３５８のような；Ｍｙｃｏｔｈｅｑｕｅ ｄｅ ｌ’Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｅ Ｃａｔｈｏｌｉｑｕｅ ｄｅ Ｌｏｕｖａｉｎ）；Ｔ．サチュルニスポラム（ｓａｔｕｒｎｉｓｐｏｒｕｍ）ＣＢＳ３３０．７０（型）；Ｔ．ハルジアナム（ｈａｒｚｉａｎｕｍ） ＣＢＳ３１６．３１（ｄｅｔ．Ｗ．Ｇａｍｓ）；Ｔ．ビルガタム（ｖｉｒｇａｔｕｍ）（Ｔ．シュードコニンギー（ｐｓｅｕｄｏｋｏｎｉｎｇｇｉｉ））ＡＴＣＣ２４９６１を含む。最も好ましくは宿主はＴ．レーゼイ（ｒｅｅｓｅｉ）であり、そしてより好ましくはこれはＴ．レーゼイ（ｒｅｅｓｅｉ）のＱＭ９４１４（ＡＴＣＣ２６９２１）、ＲＵＴ－Ｃ－３０（ＡＴＣＣ５６７６５）およびＱＭ９４１４に由来するＶＴＴ－Ｄ－７９１２５株のような高度に生産的な突然変異体（Ｎｅｖａｌａｉｎｅｎ、テクニカル リサーチ センター オブ フィンランド（Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｒｅ ｏｆ Ｆｉｎｌａｎｄ）公報２６、（１９８５）、エスポー、フィンランド）である。

【１００１】

ＤＮＡでのトリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）の形質転換は、欧州特許第０２４４２３４号明細書、Ｈａｒｋｋｉ（１９８９，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７：５９６－６０１）およびＵｕｓｉｔａｌｏ（１９９１，Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１７：３５－５０）に教示されている技術を含め当該技術分野で既知の技術を使用して行う。トリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）の培養は、工業的規模の発酵技術でのこれまでの豊富な経験により支持されている；例えばＦｉｎｋｅｌｓｔｅｉｎ，１９９２，糸状菌のバイオテクノロジー：技術および産物（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ Ｆｕｎｇｉ：Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）、バターワース－ヘイネマン出版、ストーンハム、マサチューセッツ州を参照にされたい。

【１００２】

５．クルイベロミセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）

クルイベロミセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）属に属する酵母は、組換えペプチドの生産に宿主微生物として使用されてきた。この属の酵母により生産されるペプチドは特にキモシン（欧州特許第９６４３０号明細書）、タウマチン（欧州特許第９６９１０号明細書）、アルブミン、インターロイキン－１β、ＴＰＡ、ＴＰＡ、ＴＩＭＰ（欧州特許第３６１９９１号明細書）および治療的機能を有するアルブミン誘導体（欧州特許第４１３６２２号明細書）である。クルイベロミセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）属の中で特に興味深い種にはＫ．ラクティス（ｌａｃｔｉｓ）を含む。

【１００３】

クルイベロミセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）種での組換えペプチドの発現法は、当該技術分野で周知である。クルイベロミセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）でのヒト組換えペプチドの発現および分泌のためのベクターは、組換えペプチドの形質転換および発現のための生産体として当該技術分野（Ｙｅｈ，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｕｐｐｌ．１４Ｃ：６８，Ａｂｓｔ．Ｈ４０２；Ｆｌｅｅｒ，１９９０，Ｙｅａｓｔ６（特集）：Ｓ４４９）で既知である（Ｉｔｏ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１５３：１６３－１６８；ｖａｎ ｄｅｎ Ｂｅｒｇ，１９９０，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ８：１３５－１３９；米国特許第５，６３３，１４６号明細書、国際公開第８３０４０５０Ａ１号パンフレット、欧州特許第００９６９１０号、同第０２４１４３５号、同第０３０１６７０号、同第０３６１９９１号明細書、すべて引用により全部、本明細書に編入する）。遺伝子ターゲッティングおよびプラスミドシャフルによるクルイベロミセス ラクティス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ）の線状ＤＮＡプラスミドの遺伝子操作の総説に関しては、Ｓｃｈａｆｆｒａｔｈ ｅｔ ａｌ．（１９９９，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ．１７８（２）：２０１－２１０）を参照にされたい。

【１００４】

６．クリソポリウム（Ｃｈｒｙｓｏｐｏｒｉｕｍ）

真菌の属であるクリソポリウム（Ｃｈｒｙｓｏｐｏｒｉｕｍ）は最近、外来組換えペプ

チドの発現に使用された。外来ペプチドを発現するために当業者がクリソポリウム（Ｃｈｒｙｓｏｐｏｒｉｕｍ）を使用することができる手順の記載は、国際公開第００／２０５５５号明細書に見いだされる（これは引用により全部、本明細書に編入する）。発現系に特に適する種は限定するわけではないが、Ｃ．ボトリオイデス（ｂｏｔｒｙｏｉｄｅｓ）、Ｃ．カルミカエリー（ｃａｒｍｉｃｈａｅｌｉｉ）、Ｃ．クラッシツニカタム（ｃｒａｓｓｉｔｕｎｉｃａｔｕｍ）、Ｃ．ヨーローパ（ｅｕｒｏｐａｅ）、Ｃ．エボルセアンヌイ（ｅｖｏｌｃｅａｎｎｕｉ）、Ｆ．ファスチジウム（ｆａｓｔｉｄｉｕｍ）、Ｃ．フィリホルメ（ｆｉｌｉｆｏｒｍｅ）、Ｃ．ゲロギエ（ｇｅｒｏｇｉａｅ）、Ｃ．グロビフェラム（ｇｌｏｂｉｆｅｒｕｍ）、Ｃ．グロビフェラム　変種　アーチクラタム（ｇｌｏｂｉｆｅｒｕｍ　ｖａｒ．ａｒｔｉｃｕｌａｔｕｍ）、Ｃ．グロビフェラム　変種　ニベウム（ｇｌｏｂｉｆｅｒｕｍ　ｖａｒ．ｎｉｖｅｕｍ）、Ｃ．ヒルンド（ｈｉｒｕｎｄｏ）、Ｃ．ヒスパニカム（ｈｉｓｐａｎｉｃｕｍ）、Ｃ．ホルミー（ｈｏｌｍｉｉ）、Ｃ．インジカム（ｉｎｄｉｃｕｍ）、Ｃ．イノプス（ｉｎｏｐｓ）、Ｃ．ケラチノフィラム（ｋｅｒａｔｉｎｏｐｈｉｌｕｍ）、Ｃ．クレイセリー（ｋｒｅｉｓｅｌｉｉ）、Ｃ．クズロビアナム（ｋｕｚｕｒｏｖｉａｎｕｍ）、Ｃ．リグノラム（ｌｉｇｎｏｒｕｍ）、Ｃ．ロバタム（ｌｏｂａｔｕｍ）、Ｃ．ラックノヴェンセ（ｌｕｃｋｎｏｗｅｎｓｅ）、Ｃ．ラックノヴェンセ（ｌｕｃｋｎｏｗｅｎｓｅ）Ｇａｒｇ２７Ｋ、Ｃ．メディウム（ｍｅｄｉｕｍ）、Ｃ．メディウム　変種　スピッセスセンス（ｍｅｄｉｕｍ　ｖａｒ．ｓｐｉｓｓｅｓｃｅｎｓ）、Ｃ．メフィチカム（ｍｅｐｈｉｔｉｃｕｍ）、Ｃ．メルダリウム（ｍｅｒｄａｒｉｕｍ）、Ｃ．メルダリウム　変種　ロゼウム（ｍｅｒｄａｒｉｕｍ　ｖａｒ．ｒｏｓｅｕｍ）、Ｃ．マイナー（ｍｉｎｏｒ）、Ｃ．パンニコーラ（ｐａｎｎｉｃｏｌａ）、Ｃ．パルバム（ｐａｒｖｕｍ）、Ｃ．パルバム　変種　クレセンス（ｐａｒｖｕｍ　ｖａｒ．ｃｒｅｓｃｅｎｓ）、Ｃ．ピロサム（ｐｉｌｏｓｕｍ）、Ｃ．ペオドメルデリウム（ｐｅｏｄｏｍｅｒｄｅｒｉｕｍ）、Ｃ．ピリホルミス（ｐｙｒｉｆｏｒｍｉｓ）、Ｃ．クィーンズランディカム（ｑｕｅｅｎｓｌａｎｄｉｃｕｍ）、Ｃ．シグレリ（ｓｉｇｌｅｒｉ）、Ｃ．スルフレウム（ｓｕｌｆｕｒｅｕｍ）、Ｃ．シンクロナム（ｓｙｎｃｈｒｏｎｕｍ）、Ｃ．トロピカム（ｔｒｏｐｉｃｕｍ）、Ｃ．ウンダラタム（ｕｎｄｕｌａｔｕｍ）、Ｃ．バレレナレンス（ｖａｌｌｅｎａｒｅｎｓｅ）、Ｃ．ベスペルチリウム（ｖｅｓｐｅｒｔｉｌｉｕｍ）およびＣ．ゾナタム（ｚｏｎａｔｕｍ）を含む。

【１００５】

７．その他

シュワニオマイセス（Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ）を形質転換する方法は欧州特許第３９４５３８号明細書に開示されている。アクレモニウム　クリソゲナム（Ａｃｒｅｍｏｎｉｕｍ　ｃｈｒｙｓｏｇｅｎｕｍ）を形質転換する方法は、米国特許第５，１６２，２２８号明細書に開示されている。ニューロスポーラ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）を形質転換する方法は、米国特許第４，４８６，５３３号明細書に開示されている。またシゾサッカロミセス　ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）に特異的な発現系も知られている（欧州特許第３８５３９１号明細書）。分裂酵母シゾサッカロミセス　ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）でペプチドを発現させるための一般的方法は、Ｇｉｇａ－Ｈａｍａ　ａｎｄ　Ｋｕｍａｇａｉ（１９９７、分裂酵母：シゾサッカロミセス　ポンベでの外来遺伝子発現（Ｆｏｒｅｉｇｎ　ｇｅｎｅ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｉｎ　ｆｉｓｓｉｏｎ　ｙｅａｓｔ：Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）、スプリンガー、ベルリン）に見いだすことができる。

【１００６】

Ｃ．哺乳動物系

上記のように、哺乳動物細胞は典型的にはトリマンノシルコアに結合したさらなる糖の数および配列について変動するＮ－グリカン構造のヘテロロガスな混合物を生産する。典型的には哺乳動物細胞は図４右側に示すような複雑なグリカン構造を有するペプチドを生産する。本発明の方法を使用して、最初に１次グリカン構造を同定し、次にグリカン構造

を改造するためにはどの糖が除去されるなけれければならないかを決定することにより、哺乳動物細胞で生産されたペプチドをインビトロで改造して、所望のグリコシル化を有するペプチドを生成することができる。本明細書で検討するように、除去される糖によりどの開裂酵素が使用されるかが決定され、すなわち改造方法の正確な工程は最初の基質として使用される１次グリカン構造に依存して変動するだろう。哺乳動物細胞で一般に生産されるグリカン構造を改造するための実例スキームは図３に示す。哺乳動物細胞でのＮ－グリカン生合成経路は十分に特徴付けられた（Ｍｏｒｅｍｅｎ，１９９４，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ４：１１３－１２５を参照にされたい）。グリカン合成に必要な酵素の多くが同定され、そしてチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞系Ｌｅｃ２３（アルファ－グルコシダーゼＩ欠損）およびＬｅｃ１８（新規ＧｌｃＮＡｃ－ＴＶＩＩＩ）を含め、この酵素的経路を欠く突然変異体細胞系が単離された。これらの突然変異体細胞により生産されるペプチドのグリコシル化パターンは、正常ＣＨＯ細胞に対して改変されている。本明細書で検討するように、これらおよび他の突然変異体細胞におけるグリコシル化の欠損は、複雑なグリカン構造を欠くペプチドを生産する目的に活かすことができる。例えばＬｅｃ２３細胞により生産されたペプチドはシアル酸残基を欠き、すなわち基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮａｃ４にグリカン構造を減少させるために必要な酵素的操作が少ない。このようにこれらの細胞で生産されるペプチドはグリカン改造用の好適な基質として役立つ。当業者は既知の方法、例えばＳｔａｎｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．，１６：２１１－２２３に記載されている方法に基づき、他のグリコシル化－欠損細胞系を単離し、そして同定することができる。同定された、または未だ同定されていないグリコシル化－欠損細胞系の使用は、本明細書に記載する改造方法のための好適なペプチド基質を生成する目的で本発明に含まれる。

【１００７】

哺乳動物細胞中で外因性ペプチドを発現させるための発現ベクターは膨大にあり、そして当該技術分野では周知である。現在、多くの哺乳動物発現ベクターがとりわけノバジェン（Ｎｏｖａｇｅｎ）社（マジソン、ウィスコンシン州）、ジーンセラピーシステム（Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｓｙｓｔｅｍ）（サンディエゴ、カリフォルニア州）、プロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）（マジソン、ウィスコンシン州）、クローンテック（ＣｌｏｎＴｅｃｈ）社（パロ アルト、カリフォルニア州）およびストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）（ラ ジョラ、カリフォルニア）を含む会社から市販されている。

【１００８】

外因性ペプチドの発現に特に適合した数種の哺乳動物細胞系がある。典型的には哺乳動物細胞系は不死化した哺乳動物から抽出した腫瘍細胞（すなわちそれらは培養中、本質的に無限に複製できる）に由来する。これらの細胞系には限定するわけではないがＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵巣、例えばＣＨＯ－Ｋ１；ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＣＬ６１）およびそれらの変異体、ＮＳ０（マウス 骨髄腫）、ＢＮＫ、ＢＮＫ５７０（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ１０３１４）、ＢＨＫ（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ１６３２）、Ｐｅｒ．Ｃ６（商標）（不死化ヒト細胞、Ｃｒｕｃｅｌｌ Ｎ．Ｖ．，ライデン、オランダ）、ＣＯＳ－１（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ１６５０）、ＣＯＳ－７（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ１６５１）、ＨＥＫ２９３、マウスＬ細胞、Ｔリンパ球細胞系、ＢＷ５１４７細胞およびＭＤＣＫ（Ｍａｄｉｎ－Ｄａｒｂｙ イヌ腎臓）、ＨｅＬａ（ヒト）、Ａ５４９（ヒト肺癌腫）、２９３（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ１５７３；Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．，１９７７，Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．３６：５９－７２）、ＢＧＭＫ（バッファローグリーンモンキーの腎臓）、Ｈｅｐ－２（ヒト類表皮咽頭癌腫）、ＬＬＣ－ＭＫ$_2$（アフリカグリーンモンキーの腎臓）、ＭｃＣｏｙ、ＮＣＩ－Ｈ２９２（ヒト肺粘膜類表皮癌腫管）、ＲＤ（横紋筋肉腫）、Ｖｅｒｏ（アフリカグリーンモンキーの腎臓）、ＨＥＬ（ヒト胚性肺）、ヒト胎児Ｌｕｎｇ－Ｃｈａｎｇ、ＭＲＣ５（ヒト胚性肺）、ＭＲＨＦ（ヒト包皮）、およびＷＩ－３８（ヒト胚性肺）を含む。幾つかの場合では、治療用ペプチドが発現される細胞は処置する患者のものでよく、あるいはそれらは別の関連または非関連哺乳動物に由来するもので

もよい。例えば繊維芽細胞は哺乳動物の皮膚組織から単離し、そして培養し、そしてインビトロで形質転換させることができる。この技術はトランスカリオティック セラピー（Ｔｒａｎｓｋａｒｙｏｔｉｃ Ｔｈｅｒａｐｉｅｓ）社（ケンブリッジ、マサチューセッツ州）から市販されている。ほとんどすべての現在使用されている細胞系はアメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ、マナッサス、バージニア州）およびバイオウィッタカー（ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ）（ウォーカーズヴィル、メリーランド州）から入手可能である。

【１００９】

哺乳動物細胞は、当該技術分野で周知な幾つかの技術の１つを使用してＤＮＡを用いて形質転換させることができる。そのような技術には限定するわけではないが、とりわけリン酸カルシウム形質転換（Ｃｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｍａ，１９８８；Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，１９７３；Ｃｏｒｓａｒｏ ａｎｄ Ｐｅａｒｓｏｎ，１９８１，Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ７：６０３），ジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）－デキストラン トランスフェクション（Ｆｕｊｉｔａ ｅｔ ａｌ．，１９８６；Ｌｏｐａｔａ ｅｔ ａｌ．，１９８４；Ｓｅｌｄｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９８６，），電気穿孔（Ｎｅｕｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，１９８２，；Ｐｏｔｔｅｒ，１９８８，；Ｐｏｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８４，；Ｗｏｎｇ ａｎｄ Ｎｅｕｍａｎ，１９８２），カチオン性脂質試薬のトランスフェクション（Ｅｌｒｏｙ－Ｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｍｏｓｓ，１９９０；Ｆｅｉｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７；Ｒｏｓｅ ｅｔ ａｌ．，１９９１；Ｗｈｉｔｔ ｅｔ ａｌ．，１９９０；Ｈａｗｌｅｙ－Ｎｅｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｆｏｃｕｓ １５：７３；Ｃｉｃｃａｒｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｆｏｃｕｓ １５：８０），レトロウイルス（Ｃｅｐｋｏ ｅｔ ａｌ．，１９８４；Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８６；Ｐｅａｒ ｅｔ ａｌ．，１９９３；Ａｕｓｔｉｎ ａｎｄ Ｃｅｐｋｏ，１９９０；Ｂｏｄｉｎｅ ｅｔ ａｌ．，１９９１；Ｆｅｋｅｔｅ ａｎｄ Ｃｅｐｋｏ，１９９３；Ｌｅｍｉｓｃｈｋａ ｅｔ ａｌ．，１９８６；Ｔｕｒｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９０；Ｗｉｌｌｉａｍｓ ｅｔ ａｌ．，１９８４；Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｒｏｓｍａｎ，１９８９，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ７：９８０－９０；Ｗａｎｇ ａｎｄ Ｆｉｎｅｒ，１９９６，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ．２：７１４－６），ポリブレン（Ｃｈａｎｅｙ ｅｔ ａｌ，１９８６；Ｋａｗａｉ ａｎｄ Ｎｉｓｈｉｚａｗａ，１９８４），マイクロインジェクション（Ｃａｐｅｃｃｈｉ，１９８０），およびプロトプラスト融合（Ｒａｓｓｏｕｌｚａｄｅｇａｎ ｅｔ ａｌ．，１９８２；Ｓａｎｄｒｉ－Ｇｏｌｄｉｎ ｅｔ ａｌ．，１９８１；Ｓｃｈａｆｆｅｒ，１９８０）を含む。一般に形質転換技術に関しては、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（２００１、モレキュラークローニング：ア ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー、ニューヨーク）およびＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（２００２、分子生物学の現在のプロトコール、ジョン ウィリー＆サンズ、ニューヨーク）を参照にされたい。

【１０１０】

最近、昆虫細胞の形質転換で広く知られているバキュロウイルス系が哺乳動物細胞の安定な形質転換に適合させられた（総説に関しては、Ｋｏａｔ ａｎｄ Ｃｏｎｄｒｅａｙ，２００２，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：１７３－１８０、およびそこに引用されている参考文献を参照にされたい）。培養した哺乳動物細胞中の組換えペプチドの生産が、例えば米国特許第４，７１３，３３９号、同；第４，７８４，９５０号；同第４，５７９，８２１号；および同第４，６５６，１３４号明細書に開示されている。セルトレンド（Ｃｅｌｌ Ｔｒｅｎｄｓ）（ミドルタウン、メリーランド州）を含む数社が、哺乳動物細胞の形質転換および培養のサービスを提供している。哺乳動物細胞を培養する技術は当該技術分野で周知であり、そしてさらにＨａｕｓｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９７，哺乳動物細胞のバイオテクノロジー（Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、ウォルター デ グルイャー（Ｗａｌｔｅｒ ｄｅ Ｇｒｕｙｅｒ）社、ホーソーン、ニューヨーク州）、およびＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（２００１

、モレキュラークローニング：ア　ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーおよびそこに引用されている参考文献）に見いだされる。

【１０１１】

Ｄ．昆虫

昆虫細胞、そして特に培養した昆虫細胞は、シアリル化されることが稀で、そして通常は結合したさらなるフコース残基を持つかまたは持たないかもしれないマンノース残基を含んでなるＮ－結合グリカン構造を有するペプチドを発現する。培養した昆虫細胞で生産されるペプチド上に存在するグリカン構造の型の例は、図７およびそれらのマンノースグリカンに示す。

【１０１２】

昆虫細胞中でバキュロウイルスが媒介する発現は、組換えペプチドの生産について特によく樹立されるようになった（Ａｌｔｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９，Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｊ．１６：１０９－１２３）。ペプチドのホールディングおよび翻訳後プロセッシングに関して、昆虫細胞は唯一、哺乳動物細胞に次ぐ。しかし上記のように昆虫細胞中でのペプチドのＮ－グリコシル化は、多くの観点で哺乳動物細胞でのＮ－グリコシル化とは異なり、特に昆虫細胞は３個だけ、または時にわずか２個のマンノース残基を含むオリゴ糖を含んでなる短縮化されたグリカン構造を頻繁に生成する点で異なる。これらの構造はさらにフコース残基で置換されているかもしれない。

【１０１３】

本発明に従い昆虫細胞で生産されるペプチドは最初に、場合により任意の置換フコース残基を適切なフコシダーゼ酵素を使用して除去することにより、インビトロで改造されて所望のグリコシル化を持つペプチドを生成することができる。ペプチドがフコース残基の除去後に基本的なトリマンノシルコア構造を含んでなる場合、所望のグリコシル化を有するペプチドを生成するために必要なすべてのことは、適切な糖をトリマンノシルコア構造にインビトロで付加することである。ペプチドがフコース残基の除去後のグリカン構造に２個のマンノース残基のみを含む場合、第３のマンノース残基をマンノシルトランスフェラーゼ酵素およびＧＤＰ－マンノースのような適切な供与体分子を使用して加え、そしてその後に適切な残基を加えて所望するグリコシル化を有するペプチドを生成する。

【１０１４】

昆虫細胞を形質転換するためのバキュロウイルスの使用に関するプロトコールは当業者には周知である。昆虫細胞中でペプチドを発現させるためのバキュロウイルス系の使用に対する手順を提供する数冊の本が出版された。これらの本には限定するわけではないが、Ｒｉｃｈａｒｄｓｏｎ（バキュロウイルス発現プロトコール（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ）、１９９８，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、３９巻、ヒュマナ出版）、Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９４、バキュロウイルス発現ベクター：ア　ラボラトリーマニュアル（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ）、オックスフォード大学出版）、およびＫｉｎｇ　ａｎｄ　Ｐｏｓｓｅｅ（１９９２、バキュロウイルス発現系：ア　ラボラトリーガイド（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｇｕｉｄｅ）、チャップマン＆ホール（Ｃｈａｐｍａｎ＆Ｈａｌｌ））を含む。さらにＬｕｃｋｌｏｗ（１９９３，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．４：５６４－５７２）およびＭｉｌｌｅｒ（１９９３，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖ．３：９７－１０１）のような報告もある。

【１０１５】

外来タンパク質のバキュロウイルス発現用の系に関する多くの特許も発効された。これらの特許には限定するわけではないが、米国特許第６，２１０，９６６号明細書（グルタミンを欠き、そしてアンモニウム塩を含む昆虫細胞に関する培養基）、米国特許第６，０９０，５８４号明細書（組換えペプチドを生産するためのＢＶＡＣｓ（バキュロウイルス人工染色体）の使用）、米国特許第５，８７１，９８６号明細書（哺乳動物細胞中で組換

え核酸を発現させるためのバキュロウイルスの使用）、米国特許第５，７５９，８０９号明細書（昆虫細胞中でのペプチドの発現法および昆虫を殺す方法）、米国特許第５，７５３，２２０号明細書（システインプロテアーゼ遺伝子欠損バキュロウイルス、その生産法、およびそれを使用することによる経済的なペプチドの生産法）、米国特許第５，７５０，３８３号明細書（バキュロウイルスクローニングシステム）、米国特許第５，７３１，１８２号明細書（哺乳動物細胞中で組換え核酸を発現させるための非－哺乳動物ＤＮＡウイルス）、米国特許第５，７２８，５８０号明細書（昆虫細胞系で単一細胞懸濁液を誘導する方法および培養基）、米国特許第５，５８３，０２３号明細書（修飾されたバキュロウイルス、その調製法および遺伝子発現ベクターとしてのその応用）、米国特許第５，５７１，７０９号明細書（修飾されたバキュロウイルスおよびバキュロウイルス発現ベクター）、米国特許第５，５２１，２９９号明細書（バキュロウイルス感染を検出するためのオリゴヌクレオチド）、米国特許第５，５１６，６５７号明細書（分泌および膜－結合ペプチドを発現させるためのバキュロウイルスベクター）、米国特許第５，４７５，０９０号明細書（宿主昆虫のウイルス感染を強化するペプチドをコードする遺伝子）、米国特許第５，４７２，８５８号明細書（昆虫の幼虫での組換えペプチドの生産）、米国特許第５，３４８，８８６号明細書（細菌での組換え真核ウイルスの生産法）、米国特許第５，３２２，７７４号明細書（組換えバキュロウイルス発現系での原核リーダー配列）、米国特許第５，２７８，０５０号明細書（昆虫系での組換え遺伝子のプロセッシングおよび分泌の効率を改善するための方法）、米国特許第５，２４４，８０５号明細書（バキュロウイルス発現ベクター）、米国特許第５，２２９，２９３号明細書（組換えバキュロウイルス）、米国特許第５，１９４，３７６号明細書（組換えペプチドを高レベルで生産することができるバキュロウイルス発現系）、米国特許第５，１７９，００７号明細書（組換えペプチド精製のための方法およびベクター）、米国特許第５，１６９，７８４号明細書（バキュロウイルス二重プロモーター発現ベクター）、米国特許第５，１６２，２２２号明細書（安定に形質転換された昆虫細胞または組換えバキュロウイルスでの組換え核酸の発現のためのバキュロウイルス初期プロモーターの使用）、米国特許第５，１５５，０３７号明細書（昆虫系での組換え核酸のプロセッシングおよび分泌の効率を改善するために有用な昆虫シグナル配列）、米国特許第５，１４７，７８８号明細書（バキュロウイルスベクターおよび使用法）、米国特許第５，１１０，７２９号明細書（培養した細胞中でバキュロウイルスベクターを使用してペプチドを生産する方法）、米国特許第５，０７７，２１４号明細書（安定に形質転換された昆虫細胞で組換え遺伝子を発現するためのバキュロウイルス初期プロモーターの使用）、米国特許第５，０２３，３２８号明細書（鱗翅目ＡＫＨシグナル配列）および米国特許第４，８７９，２３６号および同第４，７４５，０５１明細書（組換えバキュロウイルス発現ベクターを生産する方法）を含む。前述のすべての特許は引用により全部、本明細書に編入する。

【１０１６】

現在、幾つかの異なる種起源の昆虫細胞系がペプチド発現に使用され、そしてこれらの系は当業者には周知である。問題の昆虫細胞系は限定するわけではないが、中でも一般に双翅目および鱗翅目の昆虫細胞、Ｓｆ９およびそれらの変異体（ヤガ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）、アメリカヒトリガ（Ｅｓｔｉｇｍｅｎｅ　ａｃｒｅａ）、イラクサギンウワバ（Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ）、カイコガ（Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ）、マラコソマ　ジシットリ（Ｍａｌａｃｏｓｏｍａ　ｄｉｓｓｔｒｉ）、キイロショウジョウバエ属のＫｃ１およびＳＬ２系および蚊を含む。

【１０１７】

Ｅ．植物

ペプチド生産体としての植物細胞は、別口の話題を提示する。植物により生産されるＮ－結合グリカンはトリマンノシルコア構造を含んでなり、この五糖骨格は図６に示すように数個の異なるさらなる糖を含んでなることができる。例えば例として、トリマンノシルコア構造はβ１，２結合キシロース残基およびα１，３結合フコース残基に置き換えられる。さらに植物細胞はＭａｎ５ＧｌｃＮＡｃ２構造も生産することができる。植物細胞中

で生産されたペプチドはしばしば、グリカン構造上のコアα１，３フコースおよびキシロースの存在の結果として高度に抗原性であり、そして末端シアル酸残基の不存在から哺乳動物に導入された時、血流から迅速に排除される。したがってこれらのペプチドは本明細書で提供する方法を使用して改造されない限り、それらは一般には哺乳動物の治療薬としては適さないと考えられる。植物細胞中で発現した幾つかのモノクローナル抗体がマウスで非－免疫原性であることが判明したが、これはグリカン鎖がこれらの抗体中のＦｃ領域に埋め込まれたので免疫原性ではなかったらしい（Ｃｈａｒｇｅｌｅｇｕｅ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒｅｓ．９（３）：１８７－１９４）。

【１０１８】

本明細書で提供する指示に従い、今、植物細胞で生産されたペプチドを生成することが可能であり、ここでペプチド上に存在する増加した数のグリカン構造が基本的なトリマンノシルコア構造またはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造を含んでなる。これはフコシダーゼを含む適切なグリコシダーゼの組み合わせを使用して、基本的なトリマンノシルコア構造またはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造に到達するまでインビトロでさらなる糖を開裂することにより達成される。これらの開裂反応には、哺乳動物に導入した時に最終的なペプチドの抗原性を縮小させるために、構造からフコースまたはキシロース残基の除去も含むべきである。フコースおよびキシロース残基をトリマンノシルコア構造に付加することを阻害する突然変異を有する植物細胞は、当該技術分野では知られている（ｖｏｎ Ｓｃｈａｅｗｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ １０２：１１０９－１１１８）。フコースおよびキシロースを欠いたグリカンを有するペプチドを生産するためのこれらの細胞の使用は本発明の意図するところである。基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造の生産で、さらなる糖がそれらに結合されて、哺乳動物での治療薬的使用に適する所望のグリコシル化を有するペプチドに達することができる。

【１０１９】

多くの人がトランスジェニック植物は製薬学的ペプチドの発現系として選択されると考えている。潜在的に植物は組換えペプチドのより廉価な供給源を提供することができる。植物での組換えペプチドの生産コストは、同じペプチドを大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）で生産するコストよりも１０から５０倍低くできると予想された。動物と較べて植物でのコドン利用頻度にわずかな差異があるものの、これらは組換えＤＮＡ配列を調整することにより相補できる（Ｋｕｓｎａｄｉ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．５６：４７３－４８４；Ｋｈｏｕｄｉ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．１３５－１４３；Ｈｏｏｄ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．４６４：１２７－１４７を参照されたい）。さらにペプチド合成、分泌および翻訳後修飾は植物のグリコシル化にわずかな差異があるだけで、植物と動物で大変似ている（Ｆｉｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｇｕｌ．Ｈｏｍｅｓｔ．Ａｇｅｎｔｓ １４：８３－９２を参照にされたい）。次いでトランスジェニック植物からの産物は動物病原体、微生物トキシンおよび発癌性配列の混入も少ないと思われる。

【１０２０】

植物細胞中での組換えペプチドの発現は当該技術分野では周知である。トランスジェニック植物に加えて、ペプチドはトランスジェニック植物細胞培養（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．７：７８３－７８７）、および組換え植物ウイルスを接種した非－トランスジェニック植物でも生産され得る。植物細胞の遺伝子形質転換に関するプロトコールを記載する数冊の本が出版された：Ｐｏｔｒｙｋｕｓ（１９９５、植物への遺伝子転移（Ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｔｏ ｐｌａｎｔｓ）、スプリンガー、ニューヨーク）、Ｎｉｃｋｏｌｏｆｆ（１９９５、植物細胞の電気穿孔および電気融合プロトコール（Ｐｌａｎｔ ｃｅｌｌ ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｅｌｅｃｔｒｏｆｕｓｉｏｎ ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ）、ヒューマナ出版、トトワ、ニューヨーク）およびＤｒａｐｅｒ（１９８８、植物遺伝子形質転換（Ｐｌａｎｔ ｇｅｎｅｔｉｃ ｔ

ｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ）、オックスフォード出版、ボストン）。

【１０２１】

現在、組換え遺伝子材料を用いて植物細胞を安定に形質転換させるために、幾つかの方法が使用されている。これらの方法は限定するわけではないがアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）形質転換（Ｂｅｃｈｔｏｌｄ ａｎｄ Ｐｅｌｌｅｔｉｅｒ，１９９８；Ｅｓｃｕｄｅｒｏ ａｎｄ Ｈｏｈｎ，１９９７；Ｈａｎｓｅｎ ａｎｄ Ｃｈｉｌｔｏｎ，１９９９；Ｔｏｕｒａｅｖ ｅｔ ａｌ．，１９９７），バイオリスティックス（ミクロプロジェクティル（ｍｉｃｒｏｐｒｏｊｅｃｔｉｌｅｓ））（Ｆｉｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９９；Ｈａｎｓｅｎ ａｎｄ Ｃｈｉｌｔｏｎ，１９９９；Ｓｈｉｌｉｔｏ，１９９９），プロトプラストの電気穿孔（Ｆｒｏｍｍ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｏｕ－Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，１９８６；Ｒｈｏｄｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９８８；Ｓａｕｎｄｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，１９８９；Ｔｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，１９９７），ポリエチレン グリコール処理（Ｓｈｉｌｔｉｏ，１９９９；Ｔｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，１９９７），植物内 マイクロインジェクション（Ｌｅｄｕｃ ｅｔ ａｌ．，１９９６；Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，１９８３），種子 インビビッション（Ｔｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，１９９７），レーザー ビーム（１９９６），およびシリコン カーバイド ウイスカ（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９５；米国特許出願第２００２０１００７７号明細書、引用
により全部、本明細書に編入する）を含む。

【１０２２】

多くの種類の植物は、形質転換され、そして外因性ペプチドを発現し易い。本発明の改造方法で使用されるペプチドを発現するために特に興味深い植物には、限定するわけではないが、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｌｉａｎａ，ナタネ（Ｂｒａｓｓｉｃａ ｓｐｐ．；Ｒｕｉｚ ａｎｄ Ｂｌｕｍｗａｌｄ，２００２，Ｐｌａｎｔａ ２１４：９６５－９６９）），ダイズ（Ｇｌｙｃｉｎｅ ｍａｘ），ヒマワリ（Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ ｕｎｎｕｕｓ），ギニア アブラヤシ（Ｅｌａｅｉｓ ｇｕｉｎｅｅｉｓ），アメリカホドイモ（ラッカセイ，Ａｒａｃｈｉｓ ｈｙｐｏｇａｅａ；Ｄｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｃｅｌｌ．Ｒｅｓ．１１：１５６－１６０），ココヤシ（Ｃｏｃｕｓ ｎｕｃｉｆｅｒａ），キャスター（Ｒｉｃｉｎｕｓ ｃｏｍｍｕｎｉｓ），ベニバナ（Ｃａｒｔｈａｍｕｓ ｔｉｎｃｔｏｒｉｕｓ），カラシナ（Ｂｒａｓｓｉｃａ ｓｐｐ．ａｎｄ Ｓｉｎａｐｉｓ ａｌｂａ），コリアンダー，（Ｃｏｒｉａｎｄｒｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ），カボチャ（Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ ｍａｘｉｍａ；Ｓｐｅｎｃｅｒ ａｎｄ Ｓｎｏｗ，２００１，Ｈｅｒｅｄｉｔｙ ８６（Ｐｔ ６）：６９４－７０２），亜麻子／亜麻（Ｌｉｎｕｍ ｕｓｉｔａｔｉｓｓｉｍｕｍ；Ｌａｍｂｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｐｌａｎｔ １１２：２２３－２３２），ブラジル ナッツ（Ｂｅｒｔｈｏｌｌｅｔｉａ ｅｘｃｅｌｓａ），ホホバ（Ｓｉｍｍｏｎｄｓｉａ ｃｈｉｎｅｎｓｉｓ），トウモロコシ（Ｚｅａ ｍａｙｓ；Ｈｏｏｄ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．４６４：１２７－１４７；Ｈｏｏｄ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｍｏｌ．Ｂｒｅｅｄ．３：２９１－３０６；Ｐｅｔｏｌｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ９：１－９），アルファルファ（Ｋｈｏｕｄｉ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．６４：１３５－１４３），タバコ（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ ｔａｂａｃｕｍ；Ｗｒｉｇｈｔ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒｅｓ．１０：１７７－１８１；Ｆｒｉｇｅｒｉｏ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１２３：１４８３－１４９３；Ｃｒａｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ａｎｎ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７９２：６２－８－７１；Ｃａｂａｎｅｓ－Ｍａｃｈｅｔｅａｕ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ ９：３６５－３７２；Ｒｕｇｇｉｅｒｏ ｅｔ ａｌ．，２０００，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４６９：１３２－１ ３６），キャノーラ（Ｂａｉ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．１７：１６８－ １７４；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｊ．Ａｎｉｍ．Ｓｃｉ．７８：２８６８－２８７

8)), ジャガイモ(Tacket et al., 1998, J. Infect. Dis. 182:302-305; Richter et al., 2000, Nat. Biotechnol. 18:1167-1171; Chong et al., 2000, Transgenic Res. 9:71-78), アルファルファ(Wingdorovitz et al., 1999, Virology 255:347-353), エンドウ(Pisum sativum; Perrin et al., 2000, Mol. Breed. 6:345-352), コメ(Oryza sativa; Stoger et al., 2000, Plant Mol. Biol. 42:583-590), ワタ(Gossypium hirsutum; Kornyeyev et al., 2001, Physiol Plant 113:323-331), オオムギ(Hordeum vulgare; Petersen et al., 2002, Plant Mol Biol 49:45-58); コムギ(Triticum spp.; Pellegrineschi et al., 2002, Genome 45:421-430)およびインゲン(Vicia spp.; Saalbach et al., 1994, Mol Gen Genet 242:226-236)を含む。

【1023】

組換え核酸の発現が培養した細胞中ではなく植物全体であることを望む場合、植物細胞は最初にペプチドをコードするDNAで形質転換され、その後、植物を再生させる。これには典型的には各植物種に至適化された組織培養手順が関与する。植物を再生するプロトコールはすでに多くの種について当該技術分野で周知である。さら他の種に関するプロトコールは、日常的な実験を使用して当業者により開発され得る。植物の再生に関する手順を記載する多数の研究用マニュアルが利用可能であり、それらには限定するわけではないがSmith(2000、植物組織培養:技法および実験(Plant tissue culture:techniques and experiments)、アカデミック出版、サンディエゴ)、Bhojwani and Razdan(1996、植物組織培養:理論および実践(Plant tissue culture:theory and practice)、エルセビア サイエンス出版、アムステルダム)、Islam(1996、植物組織培養(Plant tissue culture)、オックスフォード&IBH出版社、ニューデリー、インド)、Dodds and Roberts(1995、植物組織培養における実験(Experiments in plant tissue culture)、ニューヨーク;ケンブリッジ大学出版、ケンブリッジ、イギリス)、Bhojwani(植物組織培養:応用および限界(Plant tissue culture:applications and limitations)、エルセビア、アムステルダム、1990)、Trigiano and Gray(2000、植物組織培養の概念および実験実習(Plant tissue culture concepts and laboratory exercises)、CRC出版、ボカ ラトン、フロリダ州)およびLindsey(1991、植物組織培養マニュアル:基礎および応用(Plant tissue culture manual:fundamentals and applications)、クルヴァー アカデミック(Kluwer Academic)、ボストン)を含む。

【1024】

植物から組換えペプチドを精製することは潜在的に経費がかさみ、これらの経費を最少にするために幾つかの系が開発された。1つの方法は合成されるペプチドを種子の内胚乳に向け、ここからペプチドを容易に抽出することができる(Wright et al., 2001, Transgenic Res. 10:177-181, Guda et al., 2000, Plant Cell Res. 19:257-262; および米国特許第5.767,379号明細書、これらは引用により全部、本明細書に編入する)。別の取り組みは組換えペプチドと澱粉、粉または油のような従来の植物産物とを同時抽出することである。油-種子のナタネでは、植物中で発現させた時にオレオシン-ヒュルディン(hurudin)の融合ペプチドは種子の油体に結合し、そして油と一緒に植物の

種子から抽出することができる（Ｐａｒｍｅｎｔｅｒ，１９９５，Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９：１１６７－１１８０；米国特許第５，６５０，５５４号、同第５，７９２，９２２号、同第５，９４８，６８２号および同第６，２８８，３０４号明細書、ならびに米国特許出願第２００２／００３７３０３号明細書、これらすべてが引用により全部、本明細書に編入される）。この取り組みに関する変更では、オレオシンを外因性の問題の同時発現ペプチドに親和性を有するペプチドに融合させる（米国特許第５，８５６，４５２号明細書、引用により全部、本明細書に編入する）。

【１０２５】

クロロプラストのような植物プラスチド中での組換えペプチドの発現は、原核細胞での状況と同様、それに結合したグリカン構造を持たないペプチドを生じる。しかしそのようなペプチドの収量はこれらの植物細胞オルガネラで発現させた時に格段に大きく、すなわちこの種の発現系は他の系に優る利点を有することができる。外因性ペプチドの高等植物中のプラスチド発現に関する技術の一般的総説については、Ｈａｇｅｒ ａｎｄ Ｂｅｃｋ（２０００，Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．５４：３０２－３１０およびそれに引用されている文献）を参照にされたい。プラスチド発現はタバコ（例えばＳｔａｕｂ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１８：３３３－３３８を参照にされたい）で特に成功した。

【１０２６】

Ｆ．トランスジェニック動物

動物（例えば哺乳動物）の受精卵への組換えＤＮＡの導入は、トランスジェニック動物技術で標準的な多数の技術を使用して行うことができる。例えばＨｏｇａｎ ｅｔ ａｌ．，マウス胚の操作；ア ラボラトリーマニュアル（Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｍｏｕｓｅ Ｅｍｂｒｙｏ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州、１９８６；および米国特許第５，８１１，６３４号明細書（これは引用により全部、本明細書に編入する）を参照にされたい。最も普通には組換えＤＮＡは前核マイクロインジェクションにより胚に導入されるＧｏｒｄｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８０，ＰＮＡＳ ７７：７３８０－７３８４；Ｇｏｒｄｏｎ ａｎｄ Ｒｕｄｄｌｅ，１９８１，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２１４：１２４４－１２４６；Ｂｒｉｎｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｃｅｌｌ ２７：２２３－２３１；Ｃｏｓｔａｎｔｉｎｉ ａｎｄ Ｌａｃｙ，１９８１，Ｎａｔｕｒｅ ２９４：９２－９４）。マイクロインジェクションは広範な様々な種に応用可能な利点を有する。着床前の胚もレトロウイルスで形質転換することができる（Ｊａｅｎｉｓｃｈ ａｎｄ Ｍｉｎｔｚ，１９７４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７１：１２５０－１２５４；Ｊａｅｎｉｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９７６，Ｈａｍａｔｏｌ Ｂｌｕｔｔｒａｎｓｆｕｓ．１９：３４１－３５６；Ｓｔｕｈｌｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８１：７１５１－７１５５）。レトロウイルスが媒介する形質転換は１コピーの組換え核酸を細胞へ加える利点があるが、高度なモザイク現象を生じる。最も最近では、胚性幹細胞が媒介する技法が使用され（Ｇｏｓｓｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，８３：９０６５－９０６９）、全染色体セグメントの転移（Ｌａｖｉｔｒａｎｏ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｃｅｌｌ ５７：７１７－７２３）およびインビトロ受精と組み合わせた配偶子トランスフェクション（Ｌａｖｉｔｒａｎｏ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｃｅｌｌ ５７：７１７－７２３）も使用された。これらの技法を開示した研究手順に関する数冊の本が出版された：Ｃｉｄ－Ａｒｒｅｇｕｉ ａｎｄ Ｇａｒｃｉａ－Ｃａａｒａｎｃａ（１９９８，マイクロインジェクションおよびトランスジェネシス：方法およびプロトコール（Ｍｉｃｒｏｉｎｊｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｇｅｎｅｓｉｓ：Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ）、スプリンガー、ベルリン）、Ｃｌａｒｋｅ（２００２、トランスジェネシス技法：原理およびプロトコール（Ｔｒａｎｓｇｅｎｅｓｉｓ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ）、ヒューマナ出版、トトワ、ニュージャージー州）お

よびＰｉｎｋｅｒｔ（１９９４、トランスジェニック動物技法：ア ラボラトリーハンドブック（Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ａｎｉｍａｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ）、アカデミック出版、サンディエゴ）。

【１０２７】

いったん組換えＤＮＡが卵に導入されれば、卵を短時間インキューベーションし、そして次いで卵を得た同じ種の偽妊娠動物に移す（Ｈｏｇａｎ ｅｔ ａｌ．，同上）。哺乳動物の場合、１回の実験あたり典型的には１２５個の卵を注入し、そのおよそ３分の２がこの手順で生き残る。２０個の生きている卵を偽妊娠哺乳動物に移し、その４～１０個が生きている子孫に生育する。典型的には１０～３０％の子孫（マウスの場合）が組換えＤＮＡを持つ。

【１０２８】

全動物体を本発明のペプチドの発現系として使用することができるが、好適な態様では外因性ペプチドは動物の産物中に蓄積し、そこから動物を傷つけずに回収できる。好適な態様では、外因性ペプチドは乳、卵、毛髪、血液および尿に蓄積する。

【１０２９】

組換えペプチドが動物の乳に蓄積する場合、適当な哺乳動物は反芻動物、有蹄動物、家畜および酪農動物である。特に好適な動物はヤギ、ヒツジ、ラクダ、雌ウシ、ブタ、ウマ、牡ウシおよびラマである。乳の中に組換えペプチドを蓄積するトランスジェニック雌ウシを作出する方法は周知である：Ｎｅｗｔｏｎ（１９９９，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ２３１：１５９－１６７）、Ｅｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９９１，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：８３５－８３８）および米国特許第６，２１０，７３６号、同第５，８４９，９９２号、同第５，８４３，７０５号、同第５，８２７，６９０号、同第６，２２２，０９４号明細書（これらすべては引用により全部、本明細書に編入する）を参照にされたい。所望する組換えペプチドを生産するトランスジェニック哺乳動物の子孫（ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ）は、マサチューセッツ州、フラミンガムのＧＴＣバイオセラピューティックス（Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）から販売されている。

【１０３０】

組換えペプチドが卵に蓄積される場合、適当な鳥には限定するわけではないがニワトリ、アヒルおよび七面鳥を含む。他の興味深い動物には限定するわけではないが、鳥類の他の種、魚、爬虫類および両生類を含む。レトロウイルス形質転換による組換えＤＮＡのニワトリへの導入は、当該技術分野では周知である：Ｔｈｏｒａｖａｌ ｅｔ ａｌ．（１９９５，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４：３６９－３７６），Ｂｏｓｓｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（１９８９，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４３：５３３－５３５），Ｐｅｔｒｏｐｏｕｌｏｓ ｅｔ ａｌ．（１９９２，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：３３９１－３３９７）、米国特許第５，１６２，２１５号明細書（引用により全部、本明細書に編入する）。組換えＤＮＡを用いたニワトリの成功裏の形質転換も達成され、ここでＤＮＡは胚盤葉細胞に導入され、そしてそのようにしてトランスフェクトされた胚盤葉細胞が胚に導入された：Ｂｒａｚｏｌｏｔ ｅｔ ａｌ．（１９９１，Ｍｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｄｅｖ．３０：３０４－３１２），Ｆｒａｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．（１９９３，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．３７：３８１－３８５），ａｎｄ Ｐｅｔｉｔｔｅ ｅｔ ａｌ．（１９９０，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １０８：１８５－１８９）。トランスジェニックニワトリが所望のペプチドを発現するかどうかを評価するために、高処理技法が開発された（Ｈａｒｖｅｙ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｐｏｕｌｔ．Ｓｃｉ．８１：２０２－２１２、米国特許第６，４２３，４８８号明細書、引用により全部、本明細書に編入する）。組換えＤＮＡを用いたニワトリのレトロウイルス形質転換を使用して、外因性ベーターラクタマーゼがニワトリの卵白中に蓄積した（Ｈａｒｖｅｙ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｏｌ．２０（４）：３９６－３９９）。ニワトリが生産する卵中の外因性ペプチドの生産物は、ジョージア州、アテネのアビジェニックス（ＡｖｉＧｅｎｉｃｓ）から販売されている。

【１０３１】

Ｇ．細菌

細菌で組換え的に発現したペプチドは一般にグリコシル化されていない。しかしペプチドをグリコシル化することができる細菌系は明らかになりつつあり、したがって将来はグリコシル化された組換えペプチドを細菌で生産することができるかもしれない。

【１０３２】

多数の細菌発現系が当該技術分野では知られている。好適な細菌種には限定するわけではないが大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）およびバチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）種を含む。

【１０３３】

大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）での組換えペプチドの発現は当該技術分野では周知である。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）に基づく発現系に関するプロトコールは、とりわけ米国特許出願第２００２００６４８３５号明細書、米国特許第６，２４５，５３９号、同第５，６０６，０３１号、同第５，４２０，０２７号、同第５，１５１，５１１号明細書およびＲＥ３３，６５３号明細書に見いだされる。細菌を形質転換するための方法には限定するわけではないが、塩化カルシウム（Ｃｏｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９７２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，６９：２１１０－２１１４；Ｈａｎａｈａｎ，１９８３，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１６６：５５７－５８０；Ｍａｎｄｅｌ ａｎｄ Ｈｉｇａ，１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．５３：１５９－１６２）および電気穿孔（Ｓｈｉｇｅｋａｗａ ａｎｄ Ｄｏｗｅｒ，１９８８，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：７４２－７５１）、およびＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，２００１（同上）に記載されているものを含む。微生物の形質転換および発現系に関する実験室用のプロトコールの総説は、Ｓａｕｎｄｅｒｓ ａｎｄ Ｓａｕｎｄｅｒｓ（１９８７、バイオテクノロジーに応用される微生物遺伝学：遺伝子転移および操作の原理および技法（Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ａｐｐｌｉｅｄ ｔｏ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐａｌｅｓ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ）、クルーム ヘルム、ロンドン）、Ｐｕａｈｌｅｒ（１９９３、微生物の遺伝子工学（Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍ）、ヴァインヘイム、ニューヨーク）、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，（１９９９、代謝工学（Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ）、マルセルデッカー、ニューヨーク）、Ａｄｏｌｐｈ（１９９６、微生物のゲノム法（Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｇｅｎｏｍｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ）、ＣＲＣ出版、ボカ ラトン）、およびＢｉｒｒｅｎ ａｎｄ Ｌａｉ（１９９６、非哺乳動物ゲノム分析：実践的指針（Ｎｏｎｍａｍｍａｌｉａｎ Ｇｅｎｏｍｉｃ Ａｎａｌｙｓｉｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ）、アカデミック出版、サンディエゴ）を参照にされたい。

【１０３４】

大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）でのペプチドの発現に関する技術文献の一般的総説については、Ｂａｌｂａｓ（２００１，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：２５１－２６７）を参照にされたい。今では数社が大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のＲｏｓｅｔｔａ（商標）株のような哺乳動物ペプチドの発現系のために選択された細菌株を提供している（ノバジェン社、マジソン、ウィスコンシン州；細菌細胞で通常使用されていない真核コドンの強化された発現、および強化されたジスルフィド結合の形成を含む）。

【１０３５】

Ｈ．細胞工学

本開示から、細胞により生産される出発原料が均一なほど、より効率的に所望のグリコシル化を有する大量のペプチドがインビトロで生成されることは明白である。すなわち本明細書で開示するインビトロの酵素的反応の出発原料として、均一にグリコシル化されたペプチドを生産するための宿主細胞の遺伝子工学は、ヘテロロガスな組のグリカン構造を結合して有するペプチド出発原料を使用することよりも有意な利点を提供する。本発明で使用するために好適な１つのペプチド出発原料は、基本的なトリマンノシルコア構造のみからなる１次グリカン分子を有するペプチドである。別の好適な出発原料はＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４である。改造方法の後、好適なペプチドは所望のグリコシル化、すなわち改善

された臨床的効力を有する最大量のペプチドを生じるようになる。しかし他のグリカン出発原料も、例えば高マンノースグリカンは一連のマンノシダーゼを使用してインビトロで基本的なトリマンノシルコア構造に容易に減少されるので、本明細書に記載する方法での使用に適する。本明細書のいたるところに記載するように、基本的なトリマンノシルコア構造またはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４が生成されるようにすべての過剰な糖部分が開裂可能であるならば、他のグリカン出発原料も使用することができる。このように本発明のペプチドを生産するために、遺伝的に工作した細胞を使用する目的は、出来る限り均一なグリカン構造を結合して有するペプチドを生成することであり、ここでグリカン構造はインビトロで改造されて所望のグリコシル化を有するペプチドを生成することができる。これによりこのようなペプチドの生産コストに劇的な減少をもたらす。この方法を使用して生産された糖ペプチドは、大部分が同じＮ－結合グリカン構造を有するので、生産後修飾プロトコールはバッチ毎の一貫性がより高い最終産物を生成するために標準化し、そして至適化することができる。結果として、最終的に完成された－鎖（ｃｈａｉｎ）生成物は、現在入手可能なものよりも異質性が低くなり得る。この生成物は従来技術の生成物よりも改善された生物学的半減期および生物学活性を有する。あるいは所望により本発明は、例えば異なる糖部分の付加をもたらす反応条件を選択することにより、限定され、そして特異的な異質性を導入するために使用することができる。

【１０３６】

好ましくは厳しい要件ではないが、遺伝的に工作した細胞は主に基本的なトリマンノシルコア構造またはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４からなるグリカン構造を有するペプチドを生産する細胞である。最少限、遺伝的に工作された細胞により生産されるこれらの好適な構造の比率は、改造プロトコールの後に望ましいグリコシル化を有するペプチドを生じるために十分でなければならない。

【１０３７】

一般に任意の真核細胞型を修飾して本発明の宿主細胞とすることができる。基本的なトリマンノシルコア糖ペプチドまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４糖ペプチドの生産をもたらす酵素活性の適切な付加／削除を同定するために、最初に微生物により生産される内因性および組換え糖ペプチドの両方のグリコシル化パターンを決定する。これは典型的にはグリコシルトランスフェラーゼ反応の基質としてトリマンノシル糖ペプチドを使用する酵素活性の削除、およびより短い鎖を生成するためにより複雑なＮ－結合グリカンを分解する酵素活性の挿入を伴う。さらに遺伝的に工作された細胞は高マンノースグリカンを生成することができ、これはマンノシダーゼにより開裂されて所望の出発グリカン構造を生成することができる。マンノシダーゼは細胞中、インビボで活性であることができ（すなわち、細胞はそれらを生産するように遺伝的に工作することができる）、あるいはそれらは生産後の反応にインビトロで使用することができる。

【１０３８】

発現したペプチドのグリコシル化プロフィールを改変するために、遺伝的に修飾した宿主細胞に関する技法は周知である。例えばＡｌｔｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９，Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｊ．１６：１０９－１２３），Ａｉｌｏｒ ｅｔ ａｌ．（２０００，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １０（８）：８３７－８４７），Ｊａｒｖｉｓ ｅｔ ａｌ．，（Ｉｎ ｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ，Ｍａｒｃｈ，１９９９，ａｂｓｔｒａｃｔ），Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ ａｎｄ Ｊａｒｖｉｓ，（２００１，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １１（１）：１－９），ａｎｄ Ｐａｌａｃｐａｃ ｅｔ ａｌ．，（１９９９，ＰＮＡＳ ＵＳＡ ９６：４６９７），Ｊａｒｖｉｓ ｅｔ ａｌ．，（１９９８．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９：５２８－５３３），Ｇｅｒｎｇｒｏｓｓ（米国特許出願２００２０１３７１３４第号明細書）を参照にされたい、これらすべてが昆虫または植物細胞をグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子でトランスフェクションすることにより、昆虫または植物発現系を「哺乳動物化する（ｍａｍｍａｌｉａｎｉｚｅ）」ための技術を開示する。

【１０３９】

大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）で発現したペプチドのグリコシル化プロフィールを遺伝的に改変する技法も存在する。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）は、インビボでオリゴ糖を生産するように、細菌である髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）およびアゾリゾビウム（Ａｚｏｒｈｉｚｏｂｉｕｍ）に由来する種々のグリコシルトランスフェラーゼで工作された（Ｂｅｔｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊ．Ｊ．１６：２０５－２１２）。髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）のβ１，３ＮアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼｌｇｔＡ遺伝子を過剰に発現するように遺伝的に工作された大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）は、外因性ラクトースを効率的にグリコシル化する（Ｐｒｉｅｍ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １２：２３５－２４０）。

【１０４０】

真菌細胞も遺伝的に修飾されて外因性のグリコシルトランスフェラーゼを生産した（Ｙｏｓｈｉｄａ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ，９（１）；５３－５８；Ｋａｌｓｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊ．Ｊ．１２：３６０－３７０；Ｓｃｈｗｉｅｎｔｅｋ ａｎｄ Ｅｒｎｓｔ，１９９４，Ｇｅｎｅ １４５（２）：２９９－３０３；Ｃｈｉｂａ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ，３０８：４０５－４０９）。

【１０４１】

このように１つの観点では、本発明は細胞により生産される糖ペプチドの比率が基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造を有するように、糖ペプチド群をグリコシル化する細胞を提供する。好ましくは細胞は基本的なトリマンノシルコアのみからなるグリカン構造を有するペプチドを生産する。最少限、基本的なトリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造を有するペプチドの比率は、改造方法後に所望のグリコシル化を有するペプチドを生じるために十分である。細胞は１以上のヘテロロガスな核酸発現単位を導入され、その各々は１以上の問題のペプチドをコードする１以上の核酸配列を含んでなることができる。問題の糖ペプチドの天然な形態は、１以上の複雑なＮ－結合グリカンを含んでなることができ、あるいは単に高マンノースグリカンであり得る。

【１０４２】

細胞は任意の型の細胞でよく、そして好ましくは真核細胞である。この細胞はヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスターのような哺乳動物細胞または他の型の哺乳動物細胞でよい。細胞が哺乳動物細胞である時、哺乳動物細胞は非－ヒトトランスジェニック哺乳動物に由来するか、またはその中に含まれ、ここで哺乳動物中の細胞は、所望の糖ペプチド分子の生産に必要な所望の糖ペプチドおよび種々のグリコシル化およびグリコシダーゼ酵素をコードする。加えて細胞は真菌細胞、好ましくは酵母細胞でよく、あるいは細胞は昆虫または植物細胞でよい。同様に細胞が植物細胞である時、植物細胞はトランスジェニック植物に由来するか、またはその中に含まれ、ここで植物は所望の糖ペプチド分子の生産に必要な所望の糖ペプチドおよび種々のグリコシル化およびグリコシダーゼ酵素をコードする。

【１０４３】

いくつかの態様では、宿主細胞は１以上のヘテロロガスなグリコシルトランスフェラーゼ酵素および／または１以上のヘテロロガスなグリコシダーゼ酵素を発現する真核細胞でよく、ここで宿主細胞中での組換え糖ペプチドの発現は、１次グリカン構造としてペプチドに結合した基本的なトリマンノシルコアを有する組換え糖ペプチドの生産をもたらす。

【１０４４】

いくつかの態様では、細胞中で有用なヘテロロガスなグリコシルトランスフェラーゼ酵素は、例えばＴａｎｉｇｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．（２００２，グリコシルトランスフェラーゼおよび関連遺伝子のハンドブック、スプリンガー、ニューヨーク）で利用可能なグリコシルトランスフェラーゼのリストに含まれる既知のグリコシルトランスフェラーゼ酵素からなる群から選択することができる。

【１０４５】

別の態様では、ヘテロロガスなグリコシラーゼ酵素はマンノシダーゼ１、マンノシダーゼ２、マンノシダーゼ３および限定するわけではないが微生物のマンノシダーゼを含む他のマンノシダーゼからなる群から選択することができる。本発明の方法に有用な酵素に関するさらなる開示は、本明細書のいたるところに提供している。

【１０４６】

さらに別の態様では、宿主細胞は真核細胞でよく、ここで１以上の内因性グリコシルトランスフェラーゼ酵素および／または１以上の内因性グリコシダーゼ酵素は、宿主細胞での組換え糖ペプチドの発現が１次グリカン構造として結合した基本的なトリマンノシルコアを有する組換え糖ペプチドの生産をもたらすように不活性化されている。

【１０４７】

さらなる態様では、宿主細胞はヘテロロガスなグリコシルトランスフェラーゼ酵素および／またはグリコシダーゼ酵素を発現することができると同時に、１以上の内因性グリコシルトランスフェラーゼ酵素および／またはグリコシダーゼ酵素が不活性化されている。内因性グリコシルトランスフェラーゼ酵素および／またはグリコシダーゼ酵素は、限定するわけではないがアンチセンス技法および核酸を宿主細胞のゲノムに挿入することが関与する技法を含む当業者に既知の技法を使用して不活性化することができる。幾つかの態様では、内因性酵素はＧｎＴ－Ｉからなる群から選択することができ、マンノシダーゼ、キシロシルトランスフェラーゼ、コアα１，３フコシルトランスフェラーゼ、セリン／トレオニンＯ－マンノシルトランスフェラーゼ等の選択であることができる。

【１０４８】

あるいは、Ｎ－結合グリカンが主にトリマンノシルコア型またはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４型となるように、天然にペプチドをグリコシル化する発現系を利用することができる。トリマンノシルコアを生産する細胞型の例は、Ｓｆ９細胞である。他のそのような発現系は、天然にまたは組換え的に細胞で発現した糖ペプチドを分析し、所望のグリコシル化特性を現す糖ペプチドを選択することにより同定することができる。本発明は、本発明のペプチドを生産するためにありとあらゆるそのような細胞を含むと解釈すべきである。

【１０４９】

Ｖ．改造されたグリカンおよび／または複合糖質化ペプチドの精製

修飾された糖タンパク質が細胞内で生産され、または分泌される場合、第１工程として特定の屑、宿主細胞、分解したフラグメントを、例えば遠心または超遠心により除去し；場合によりタンパク質は市販されているタンパク質濃縮フィルターを用いて濃縮することができ、続いてペプチド変異体はイムノアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換カラム分画（例えばジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）またはカルボキシメチルもしくはスルホプロピル基を含むマトリックス）、Ｂｌｕｅ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、ＣＭ Ｂｌｕｅ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、ＭＯＮＯ－Ｑ、ＭＯＮＯ－Ｓ、レンチルレクチン－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、ＷＧＡ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、ＣｏｎＡ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、Ｅｔｈｅｒ Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ、Ｂｕｔｙｌ Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ、Ｐｈｅｎｙｌ ＴｏｙｏｐｅａｒｌまたはプロテインＡ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅでのカラムクロマトグラフィー、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ－クロマトグラフィー、シリカクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）、ゲル濾過（例えばＳｅｐｈａｄｅｘ分子篩またはサイズ－排除クロマトグラフィー）、ペプチドを選択的に結合するカラムでのクロマトグラフィー、およびエタノール、ｐＨまたは硫酸アンモニウム沈殿、膜濾過および種々の技法から選択される１以上の工程により他の不純物から分離することができる。

【１０５０】

培養で生産された修飾ペプチドは通常、細胞、酵素等からの初期の抽出、続いて１以上の濃縮、塩析、水性イオン－交換またはサイズ－排除クロマトグラフィー工程により単離される。さらに修飾糖タンパク質はアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。次いで最終精製工程にＨＰＬＣを使用することができる。

【１０５１】

タンパク質分解を阻害するためにプロテアーゼインヒビター、例えばフェニルメチルス

ルホニルフルオリド（ＰＭＳＦ）を前述の任意工程に含めることができ、そして偶発的な混入物の成長を防止するために抗生物質を含めることができる。

【１０５２】

別の態様では、本発明の修飾ペプチドを生産する系からの上清を、最初に市販されているタンパク質濃縮フィルター、例えばアミコン（Ａｍｉｃｏｎ）またはミリポアペリコン（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｐｅｌｌｉｃｏｎ）超遠心ユニットを使用して濃縮する。濃縮工程後、濃縮物を適当な精製マトリックスに乗せる。例えば適当なアフィニティーマトリックスは適当な支持体に結合したペプチド用のリガンド、レクチンまたは抗体分子を含んでなることができる。あるいはアニオン－交換樹脂、例えばペンダントＤＥＡＥ基を有するマトリックスまたは支持体を使用することができる。適当なマトリックスにはアクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたはタンパク質精製に一般的に使用されている他の種類のものを含む。あるいはカチオン－交換工程を使用してもよい。適当なカチオン交換体には、スルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含んでなる種々の不溶性マトリックスを含む。スルホプロピル基が特に好適である。

【１０５３】

次いで疎水性のＲＰ－ＨＰＬＣ媒体、例えばペンダントメチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルを使用した１以上のＲＰ－ＨＰＬＣ工程を使用してさらにペプチド変異体組成物を精製することができる。前述の精製工程の幾つかまたは全ては、種々に組み合わせて使用して均一な修飾糖タンパク質を提供することもできる。

【１０５４】

大規模な発酵から得られた本発明の修飾ペプチドは、Ｕｒｄａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇ．２９６：１７１（１９８４）により開示された方法に類似する方法により精製することができる。この参考文献は調製用ＨＰＬＣカラムで組換えヒトＩＬ－２を精製するために、２つの順次のＲＰ－ＨＰＬＣ工程を記載する。あるいはアフィニティークロマトグラフィーのような技法を使用して修飾糖タンパク質を精製することができる。

【１０５５】

ＶＩ．好適なペプチドおよび好適なペプチドをコードする核酸

本発明は種々のペプチドおよびタンパク質、および同様な分子またはそれらのフラグメントをコードする単離された核酸を含む。そのようなペプチドには限定するわけではないが、ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、ヒトインターフェロンアルファ（ＩＦＮ－アルファ）、ヒトインターフェロンベータ（ＩＦＮ－ベータ）、ヒト第ＶＩＩ因子（第ＶＩＩ因子）、ヒト第ＩＸ因子（第ＩＸ因子）、ヒト濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、ヒトエリトロポエチン（ＥＰＯ）、ヒト顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ヒトインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－ガンマ）、ヒト－アルファ－１プロテアーゼインヒビター（アルファ－１アンチトリプシンまたはアルファ－１－トリプシンインヒビター、Ａ－１－Ｐ１としても知られている）、グルコセレブロシダーゼ、ヒト組織型アクチベーター（ＴＰＡ）、ヒトインターロイキン－２（ＩＬ－２）、ヒト第ＶＩＩＩ因子（第ＶＩＩＩ因子）、ヒトＩｇＧ免疫グロブリンＦｃ部分に融合した７５ｋＤａ腫瘍壊死因子レセプター（ＥＮＢＲＥＬ（商標）またはＥＴＡＮＥＲＣＥＰＴ（商標）（キメラＴＮＦＲ）として商業的に知られている）、ヒトウロキナーゼ（ウロキナーゼ）、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａおよびビトロネクチンアルファ$_{v}$ベータ$_{3}$レセプターに特異的に結合するヒト／マウスキメラモノクローナル抗体のＦａｂフラグメント（ＲＥＯＰＲＯ（商標）またはＡＢＣＩＸＩＭＡＢ（キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ）として商業的に知られている）、ヒトＨＥＲ２に特異的に結合するマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（商標）（キメラ抗－ＨＥＲ２）として商業的に知られている）、呼吸合胞体ウイルスのＡ抗原部位またはＦタンパク質に特異的に結合するヒト／マウスキメラ抗体（ＳＹＮＡＧＩＳ（商標）またはＰＡＬＩＶＩＺＵＭＡＢ（キメラ抗－ＲＳＶ）として商業的に知られている）、ヒトＢ－細胞上のＣＤ２０に特異的に結合するキメラヒト／マウスモノクローナル抗体（ＲＩＴＵＸＡＮ（商標）またはＲＩＴＵＸＡ

ＭＡＢ（商標）（キメラ抗－ＣＤ２０）として商業的に知られている）、ヒト組換えＤＮａｓｅ（ＤＮａｓｅ）、ヒト腫瘍壊死因子に特異的に結合するキメラヒト／マウスモノクローナル抗体（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（商標）またはＩＮＦＬＩＸＩＭＡＢ（キメラ抗－ＴＮＦ）として商業的に知られている）、ヒトインスリン、Ｂ型肝炎ウイルスの表面抗原（ａｄｗサブタイプ；ＨＢｓＡｇ）、およびヒト成長ホルモン（ＨＧＨ）等を含む。

【１０５６】

本発明の単離された核酸は、本発明で上に確認した任意のペプチド、およびそれらの任意の修飾された形態（ヌクレオチド配列が無細胞である時、または細胞に付随する時、ヌクレオチド配列をより安定にするＤＮＡまたはＲＮＡの化学的修飾を含む）をコードするＲＮＡまたはＤＮＡ配列を含むと解釈するべきである。非限定的な例として、少なくとも１つのホスホロチオエート修飾を含むオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼに対して強化された耐性を付与することが知られている。修飾オリゴヌクレオチドの具体例には、ホスホロチオエート、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、短鎖アルキルもしくはシクロアルキル糖間結合、または短鎖ヘテロ原子もしくはヘテロ環式糖間（「骨格」）結合を含むものを含む。さらにモルホリノ骨格構造（米国特許第５，０３４，５０６号明細書）またはポリアミド骨格構造（Ｎｉｅｌｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｓｃｉｅｎｃｅ２５４：１４９７）を有するオリゴヌクレオチドも使用することができる。

【１０５７】

ヌクレオチドの化学修飾を使用して、細胞によるヌクレオチド配列の取り込み効率、または細胞でヌクレオチド配列が発現される効率を強化することもできる。ヌクレオチド配列の修飾のありとあらゆる組み合わせが本発明では企図されている。

【１０５８】

本発明は本明細書に開示する核酸およびアミノ酸配列のみに限定されると解釈されるべきではない。本明細書のいたるところにより詳細に記載するように、いったん本発明を着手すれば、当業者には本発明のペプチドをコードする他の核酸が本明細書に記載する手順（例えば部位指向的突然変異誘発法、フレイムシフト突然変異等）、および当該技術分野で周知の手順に従うことにより得られるのは明らかである

【１０５９】

またペプチドのフラグメントをコードする単離された核酸も含み、ここでペプチドのフラグメントはペプチドの所望する生物学的活性を保持している。さらに好適なペプチドをコードする核酸の例を具体的な配列番号と関連して本明細書に開示するが、本発明は本明細書に開示する具体的な核酸には限定されることは全くないと解釈すべきである。むしろ本発明は核酸が本明細書に開示する所望の生物学的活性を有するペプチドをコードするように、本明細書に開示する配列と十分な同一性の割合を有するありとあらゆる核酸分子を含むと解釈するべきである。また完全長よりも短い単離された核酸も意図し、ここでそれによりコードされるペプチドの生物学的活性は保持されている。１つの核酸ともう１つの核酸との間の同一性の割合を決定する方法は、任意の特に好適なペプチドの生物学的活性を決定するためのアッセイとして本明細書のいたるところに開示する。

【１０６０】

また本明細書のいたるところに開示するように、例えばＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．、（１９８９、モレキュラークローニング：ア ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、ニューヨーク）およびＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７、分子生物学の現在のプロトコール、グリーン＆ウィリー、ニューヨーク）のような当該技術分野で周知な組換えＤＮＡ法を使用して、本発明のペプチドの誘導体、突然変異体または変異体を生成するための多数の他の手順を使用することができる。ペプチドをコードするＤＮＡ配列を改変することによりペプチドまたはポリペプチド中にアミノ酸の変化を導入するための手順は当該技術分野では周知であり、そしてＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９８９、同上）；Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７、同上）にも記載されている。

【１０６１】
本発明は、Ｇ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－アルファ、ＩＦＮ－ベータ、第ＶＩＩ因子、第ＩＸ因子、ＦＳＨ、ＥＰＯ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－ガンマ、Ａ－１－Ｐ１、グルコセレブロシダーゼ、ＴＰＡ、ＩＬ－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラＴＮＦＲ、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩａ、キメラ－抗－ＨＥＲ２、キメラ抗－ＲＳＶ、キメラ抗－ＣＤ２０、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－ＴＮＦ、ヒトインスリン、ＨＢｓＡｇおよびＨＧＨをコードする核酸を含み、ここで標識ペプチドをコードする核酸はそれに共有結合している。すなわち本発明は、標識ペプチドをコードする核酸配列が本発明のペプチドをコードする核酸に共有結合しているキメラ核酸を包含する。そのような標識ペプチドは当該技術分野では周知であり、そして例えばグリーン蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ｍｙｃ、ｍｙｃ－ピルベートキナーゼ（ｍｙｃ－ＰＫ）、His_6、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、インフルエンザウイルス赤血球凝集素標識ポリペプチド、フラッグ標識ポリペプチド（ＦＬＡＧ）、およびグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）標識ポリペプチドを含む。しかし本発明は上記に掲載した標識ペプチドをコードする核酸に限定すべきものとは全く解釈されない。むしろこれらの標識ペプチドに実質的に類似する様式で機能することができるペプチドをコードする任意の核酸配列を、本発明に含むと解釈すべきである。

【１０６２】
標識ペプチドをコードする核酸を含んでなる核酸は、本発明のペプチドを細胞、組織内に、および／または生物全体（例えば哺乳動物の胚）に局在させ、細胞から分泌された本発明のペプチドを検出し、そして細胞中でのペプチドの役割（１つまたは複数）を研究するために使用することができる。さらに標識ペプチドの付加により「標識」されたペプチドの単離および精製が容易になるので、本発明のペプチドが生産され、そして容易に精製され得る。

【１０６３】
本発明は以下の好適な単離ペプチドを含む：Ｇ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－アルファ、ＩＦＮ－ベータ、第ＶＩＩ因子、第ＩＸ因子、ＦＳＨ、ＥＰＯ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－ガンマ、Ａ－１－Ｐ１、グルコセレブロシダーゼ、ＴＰＡ、ＩＬ－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラＴＮＦＲ、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ、キメラ－抗－ＨＥＲ２、キメラ抗－ＲＳＶ、キメラ抗－ＣＤ２０、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－ＴＮＦ、ヒトインスリン、ＨＢｓＡｇおよびＨＧＨ。

【１０６４】
本発明は本発明のペプチド（またはそれをコードするＤＮＡ）の「誘導体」、「突然変異体」および「変異体」を包含すると解釈され、この誘導体、突然変異体および変異体は１以上のアミノ酸が改変されている（またはそれをコードするヌクレオチド配列を指す時は、１以上の塩基対が改変されている）ので、生成するペプチド（またはＤＮＡ）は本明細書に引用する配列とは同一ではないが、そのペプチドがＧ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－アルファ、ＩＦＮ－ベータ、第ＶＩＩ因子、第ＩＸ因子、ＦＳＨ、ＥＰＯ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－ガンマ、Ａ－１－Ｐ１、グルコセレブロシダーゼ、ＴＰＡ、ＩＬ－２、第ＶＩＩＩ因子、キメラＴＮＦＲ、ウロキナーゼ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ、キメラ－抗－ＨＥＲ２、キメラ抗－ＲＳＶ、キメラ抗－ＣＤ２０、ＤＮａｓｅ、キメラ抗－ＴＮＦ、ヒトインスリン、ＨＢｓＡｇおよびＨＧＨの生物学的／生化学的特性を有するという点で本明細書に開示するペプチドと同じ生物学的特性を有する。

【１０６５】
さらにペプチドの長さに関係なく、望ましいペプチドの生物学的活性を保持するペプチドのフラグメントを含む。本発明に有用な任意のペプチドの完全長形態よりも小さいものを単離し、そして本明細書に提供するアッセイを使用して単離したどのフラグメントが所望の生物学的活性を保持するか、したがって本発明に有用なペプチドであるかを決定することは当業者の技術範囲内である。

【１０６６】

本発明のタンパク質の生物学的特性は、炎症の減少、免疫応答の顕在化、血液凝固、造血産出力の上昇、プロテアーゼ阻害、免疫系の調節、抗原の結合、成長、疾患の処置の軽減、ＤＮＡ開裂等のような、限定するわけではなく含む本明細書に記載する生物学的アッセイおよび環境においてペプチドが機能する能力を含むと解釈されるべきである。

【１０６７】

Ａ．Ｇ－ＣＳＦ

本発明はＧ－ＣＳＦ上のグリカン構造を修飾する方法を包含する。Ｇ－ＣＳＦは活性化Ｔ－細胞、マクロファージ、内皮細胞およびストロマの繊維芽細胞により生産されるサイトカインとして当該技術分野では周知である。Ｇ－ＣＳＦは主に骨髄に作用して炎症性白血球の生産を増加し、そしてさらに内分泌ホルモンとして機能して炎症機能中に消費される好中球の補充を開始する。またＧ－ＣＳＦは化学療法後の骨髄代用に臨床的応用を有する。

【１０６８】

Ｇ－ＣＳＦは哺乳動物、特にヒトにおける治療的応用に重要でしかも有用な化合物であると示されてきたが、組換え細胞からＧ－ＣＳＦを生産するための現在の方法は、比較的短い生物学的寿命、免疫原性を導く可能性がある不適切なグリコシル化パターン、機能の損失を有する生成物、および同じ効果を達成するためにより大量およびより頻繁な投与の両方の必要性の増加をもたらす。

【１０６９】

Ｇ－ＣＳＦは単離そしてクローン化され、その核酸およびアミノ酸配列はそれぞれ配列番号１および配列番号２（それぞれ図５２Ａおよび５２Ｂ）に示す。本発明はＧ－ＣＳＦを、特に有力かつ機能的な生物学的分子として機能するＧ－ＣＳＦの能力に関係するように飾する方法を包含する。当業者は本開示および本明細書の教示をもってすれば、本発明がＧ－ＣＳＦを修飾するための組成物および方法を提供することを容易に理解するだろう。

【１０７０】

本発明はさらに当該技術分野で周知なＧ－ＣＳＦ変異体を包含する。例として、しかし本発明を限定することは全く意味せずに、Ｇ－ＣＳＦ変異体はすでに米国特許第６，１６６，１８３号明細書に記載され、ここでＧ－ＣＳＦはリシン残基の天然な補体を含んでなり、そしてさらに１または２個のポリエチレングリコール分子に結合したものが記載されている。さらに米国特許第６，００４，５４８号、同第５，５８０，７５５号、同第５，５８２，８２３号および同第５，６７６，９４１号明細書は、１以上のシステイン残基が１７、３６、４２、６４および７４位でアラニンあるいはセリンに置き換えられたＧ－ＣＳＦ変異体を記載する。米国特許第５，４１６，１９５号明細書は、１７位のシステイン、２７位のアスパラギン酸、および６５および６６位のセリンがそれぞれセリン、セリン、プロリンおよびプロリンに置き換えられたＧ－ＣＳＦ分子を記載する。別の変異体は当該技術分野で周知であり、そして例えば米国特許第５，３９９，３４５号明細書に記載されている。

【１０７１】

本発明の修飾されたＧ－ＣＳＦ分子の発現および活性は、当該技術分野で周知な、そして例えば米国特許第４，８１０，６４３号明細書に記載されているような方法を使用してアッセイすることができる。例として活性は放射能－標識チミジンの取り込みアッセイを使用して測定することができる。簡単に説明すると、健康なドナーに由来するヒトの骨髄をＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅでの密度カットに供し（１．０７７ｇ／ｍｌ、ファルマシア（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）、そして低密度細胞を、１０％ウシ胎児血清、グルタミンおよび抗生物質を含むＩｓｃｏｖｅの培地（ギブコ（ＧＩＢＣＯ）、ラジョラ、カリフォルニア州）に懸濁する。約2×10^{4}個のヒト骨髄細胞を対照培地またはＧ－ＣＳＦまたは本発明のいずれかと、９６－ウェル平底プレート中で約３７℃で空気中５％CO_2で約２日間、インキューベーションする。次いでカルチャーは約４時間、０．５μＣｉ／ウェルの^{3}Ｈ－チミジン（ニューイングランドヌクレ

アー（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｎｕｃｌｅａｒ）、ボストン、マサチューセッツ州）でパルスをかけ、そして取り込みを例えばＶｅｎｔｕａ，ｅｔ　ａｌ．（１９８３，Ｂｌｏｏｄ　６１：７８１）に記載されているように測定する。対照化合物で処理した骨髄細胞と比べて、^{3}Ｈ－チミジンのヒト骨髄細胞への包含の上昇は、活性なそして能力のあるＧ－ＣＳＦ化合物の指標である。

【１０７２】

Ｂ．ＩＦＮアルファおよびＩＦＮベータ

本発明はさらに、ＩＦＮアルファおよびＩＦＮベータの改造および修飾法を包含する。ＩＦＮアルファは重量が約１８ｋＤａの約２０個のペプチドのファミリーの一部である。ＩＦＮアルファおよびＩＦＮベータは集合的にＩ型インターフェロンとして知られるが、同じ細胞レセプターに結合し、そして類似の応答を誘導する。Ｉ型ＩＦＮは中でも、ウイルス複製を阻害し、ＮＫ細胞の溶解能力を上げ、ＭＨＣ分子の発現を調節し、そして細胞増殖を阻害する。Ｉ型ＩＦＮはウイルス感染、特に肝炎ウイルスの治療として、および多発性硬化症の治療として使用されてきた。

【１０７３】

Ｉ型ＩＦＮの現在の組成物は上記のように、異型の免疫学的応答の調節、および種々の疾患の治療の両方に有用な化合物である。しかしそれらは天然なグリコシル化の補体を含んでなる天然なサイトカインと比べて、体内での能力および機能の低下、および限定された半減期により阻まれている。

【１０７４】

ＩＦＮアルファの原型ヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、本明細書ではそれぞれ配列番号３および配列番号４（それぞれ図５３Ａおよび５３Ｂ）として説明する。ＩＦＮベータは約２０ｋＤａの単一の遺伝子産物を含んでなり、その核酸およびアミノ酸配列は、本明細書では配列番号５および配列番号６（それぞれ図５４Ａおよび５４３Ｂ）として表す。本発明は本明細書のヌクレオチドおよびアミノ酸配列に限定されない。当業者はＩＦＮアルファの多くの変異体が天然な、および工作された誘導体として両方が存在すると容易に考えるだろう。同様に、ＩＦＮベータはより有利な治療的プロフィールを達成することを試みるために修飾された。修飾されたＩ型ＩＦＮの例は当該技術分野では周知であり（表８を参照にされたい）、そして例えば米国特許第６，３２３，００６号明細書（ここでシステイン－６０がチロンシに置換されている）、米国特許第４，７３７，４６２号、同第４、５８８，５８５号、同第５，５４５，７２３号および同第６，１２７，３３２号明細書（ここで種々のアミノ酸の置換を持つＩＦＮベータが記載されている）に記載されている。さらに米国特許第４，９６６，８４３号、同第５，３７６，５６７号、同第５，７９５，７７９号明細書は、ＩＦＮアルファ－６１およびＩＦＮ－アルファ－７６を記載する。米国特許第４，７４８，２３３号および同第４，６９５，５４３号明細書は、ＩＦＮアルファｇｘ－１を記載し、一方米国特許第４，９７５，２７６号明細書はＩＦＮアルファ５４を記載する。米国特許第４，６９５，６２３号、同第４，８９７，４７１号、同第５，６６１，００９号および同第５，５４１，２９３号明細書はすべて共通ＩＦＮアルファ配列を記載し、提出日までに知られているすべての変異体を表す。このＩ型ＩＦＮおよびその変異体のリストは網羅的であること全く意味せず、当業者は本発明が既知の、または将来見いだされるＩＦＮベータおよびＩＦＮアルファ分子、誘導体および変異体を包含すると容易に理解するだろう。

【１０７５】

【表８】

表8. インターフェロン-α アイソフォーム

α型	特徴的なAA
1a	A^{114}
1b	V^{114}
2a	K^{23}-H^{34}
2b	R^{23}-H^{34}
2c	R^{23}-R^{34}
4a	A^{51}-E^{114}
4b	T^{51}-V^{114}
7a	M^{132}-K^{159}-G^{161}
7b	M^{132}-Q^{159}-R^{161}
7c	T^{132}-K^{159}-G^{161}
8a	V^{98}-L^{99}-C^{100}-D^{101}-R^{161}
8b	S^{98}-C^{99}-V^{100}-M^{101}-R^{161}
8c	S^{98}-C^{99}-V^{100}-M^{101}-$D^{161}\Delta(162\text{-}166)$
10a	S^{8}-L^{89}
10b	T^{8}-I^{89}
14a	F^{152}-Q^{159}-R^{161}
14b	F^{152}-K^{159}-G^{161}
14c	L^{152}-Q^{159}-R^{161}
17a	P^{34}-S^{55}-I^{161}
17b	H^{34}-S^{55}-I^{161}
17c	H^{34}-S^{55}-R^{161}
17d	H^{34}-P^{55}-R^{161}
21a	M^{96}
21b	L^{96}

【１０７６】

組換え細胞中のＩＦＮの発現法は周知であり、そして例えば米国特許第４，９６６，８４３号明細書およびＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（２００１、モレキュラークローニング：ア　ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、ニューヨーク）およびＡｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７、分子生物学の現在のプロトコール、グリーン＆ウィリー、ニューヨーク）に記載されている技法を使用して容易に行われる。

【１０７７】

本発明の方法により修飾されたＩ型ＩＦＮの生物学的活性を測定するアッセイは、当業者には周知である。例えばＲｕｂｉｎｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８１，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　３７：７５５－７５８）に記載されているアッセイは、細胞群に及ぼすウイルス感染の細胞病理学効果を測定することにより、Ｉ型ＩＦＮの効果を決定するために一般的に使用されている。この方法はＩＦＮ型の生物学的機能をアッセイするために当該技術分野で知られている多くの１つにすぎない。

【１０７８】

Ｃ．第ＶＩＩａ因子

さらに本発明は第ＶＩＩ因子の改造および修飾法を包含する。血液凝固経路は、多くの出来事（ｅｖｅｎｔ）を含んでなる複雑な反応である。この経路の中間の出来事が第ＶＩＩ因子であり、これは組織因子およびカルシウムイオンの存在下で第Ｘ因子をＸａ因子に転換することにより（第ＶＩＩａ因子への活性化で）、血液凝固の外因系経路に参加するプロ酵素である。次に第Ｘａ因子は、第Ｖａ因子、カルシウムイオンおよびリン脂質の存

在下でプロトロンビンをトロンビンに転換する。第Ｘ因子から第Ｘａ因子への活性化は、内因系および外因系の血液凝固経路の両方により分けられる（ｓｈａｒｅｄ）出来事であり、したがって第ＶＩＩａ因子は第ＶＩＩＩ因子の欠損またはインヒビターを有する患者の処置に使用することができる。また第ＶＩＩａ因子が内因系の経路にも参加できることを示唆する証拠もあるので、血液凝固における第ＶＩＩ因子の役割の突出および重要性が増している。

【１０７９】

第ＶＩＩ因子は約５０ｋＤａの分子量を持つ一本鎖の糖タンパク質である。この状態で、この因子は血液中を不活性なプロ酵素として循環する。第ＶＩＩ因子のＶＩＩａへの活性化は、第ＸＩＩａ因子のような数種の血漿プロテアーゼにより触媒され得る。第ＶＩＩ因子の活性化は、少なくとも１つのジスルフィド結合により一緒に保たれる重鎖および軽鎖の形成をもたらす。さらに第ＶＩＩａ因子に転換されることができない修飾された第ＶＩＩ因子分子が記載され、そしてこれらは血液凝固、血栓症等のような場合に抗－凝固薬として有用である。血液凝固経路における第ＶＩＩ因子の重要性、および上昇または減少した凝固レベルの両方の処置としての使用を仮定すると、より長い生物学的半減期、上昇した能力および一般に野生型の第ＶＩＩ因子により似ている治療プロフィールを有する分子が、健康なヒトで合成され、そして分泌されれば、血液凝固障害の処置に有益でしかも有用となるだろう。

【１０８０】

第ＶＩＩ因子はクローン化そして配列決定され、そして核酸およびアミノ酸配列が本明細書に配列番号７および配列番号８（それぞ図５５Ａおよび５５Ｂ）として提示されている。本発明は本明細書で説明する第ＶＩＩ因子の核酸およびアミノ酸配列に全く限定されないと解釈されるべきである。第ＶＩＩ因子の変異体も例えば米国特許第４，７８４，９５０号および同第５，５８０，５６０号明細書に記載され、ここでリシン－３８、リシン－３２、アルギニン－２９０、アルギニン－３４１、イソロイシン－４２、チロシン－２７８およびチロシン３３２が種々のアミノ酸に置き換えられている。さらに米国特許第５，８６１，３７４号、同第６，０３９，９４４号、同第５、８３３，９８２号、同第５，７８８，９６５号、同第６，１８３，７４３号、同第５，９９７，８６４号および同第５，８１７，７８８号明細書は、第ＶＩＩａ因子の形態に開裂されない第ＶＩＩ因子変異体を記載する。当業者は、血液凝固経路およびその中での第ＶＩＩ因子の役割については周知であり、したがって天然に存在するか、または上記のように工作された多くの変異体が本発明に含まれることを認識するだろう。

【１０８１】

第ＶＩＩ因子の発現および活性の測定法は当該技術分野では周知であり、そして例えば米国特許第４，７８４，９５０号明細書に記載されている。簡単に説明すると、第ＶＩＩ因子、またはその変異体の発現は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、ＣＨＯ細胞、ＢＨＫ細胞、昆虫細胞を含む様々な原核および真核系で、バキュロウイルス発現系を使用して行うことができ、そのすべてが当該技術分野では周知である。

【１０８２】

本発明の方法に従い調製された修飾第ＶＩＩ因子の活性のアッセイは、当該技術分野で周知な方法を使用して行うことができる。非限定的な例として、Ｑｕｉｃｋ ｅｔ ａｌ．（出血性疾患および血栓症（Ｈｅｍｏｒｒａｇｉｃ Ｄｉｓｅａｓｅ ａｎｄ Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ）、第２版、リート フェビガー（Ｌｅａｔ Ｆｅｂｉｇｅｒ）、フィラデルフィア、１９６６）は、本発明の方法に従い調製した第ＶＩＩ因子分子の生物学的活性を測定するために有用な１段階凝固アッセイを記載している。

【１０８３】

Ｄ．第ＩＸ因子

本発明はさらに第ＩＸ因子を改造および／または修飾するための方法を包含する。上記のように第ＩＸ因子は血液凝固カスケードで活性で（ｖｉｔａｌ）ある。体内での第ＩＸ因子の欠損は、血友病（Ｂ型）の型の特徴である。この疾患の処置は通常、ヒト血漿タン

パク質の第ＩＸ因子濃縮物の静脈内輸血に限られている。しかし時間および経費の現実的な欠点に加えて、血液濃縮物の輸血にはウイルス性肝炎、後天的免疫不全症候群の伝播、または受容者に対する血栓塞栓性疾患の危険性を含む。

【１０８４】

第ＩＸ因子はそれ自体が治療的応用に重要かつ有用な化合物であることが示されたが、組換え細胞から第ＩＸ因子を生産する現在の方法（米国特許第４，７７０，９９９号明細書）は、生成物にやや短い生物学的半減期、免疫原性を導く可能性がある不適切なグリコシル化パターン、機能損失、同じ効果等を達成するためにより大量かつ頻繁な投与の必要性の増加をもたらす。

【１０８５】

第ＩＸ因子の核酸アミノ酸配列は、本明細書では配列番号９および配列番号１０（それぞれ図５６Ａおよび５６Ｂ）に説明する。本発明は本明細書に説明する配列に全く限定されない。第ＩＸ因子の変異体は例えば米国特許第４，７７０，９９９号、同第５，５２１，０７０号明細書（ここでチロシンが第一位でアラニンに置換されている）、米国特許第６，０３７，４５２号（ここで第ＸＩ因子はアルキレンオキシド基に結合している）、および米国特許第６，０４６，３８０号明細書（ここで第ＩＸ因子をコードするＤＮＡが少なくとも１つのスプライス部位で修飾されている）に記載されているように、当該技術分野で周知である。本明細書で示すように第ＩＸ因子の変異体も当該技術分野では周知であり、そして本開示はこれらの既知のまたは将来開発もしくは見いだされる変異体を包含する。

【１０８６】

本発明の方法に従い調製された修飾第ＩＸ因子を活性を測定する方法は、上記の方法を使用して、またはさらに例えばＢｉｇｇｓ（１９７２，ヒト血液凝固止血および血栓症（第１版）（Ｈｕｍａｎ Ｂｌｏｏｄ Ｃｏａｇｕｌａｔｉｏｎ Ｈａｅｍｏｓｔａｓｉｓ ａｎｄ Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ）、オックスフォード、ブラックウェル、サイエンティフィック、第６１４頁）に記載されているような１段階の活性化部分トロンボプラスチン時間アッセイのような周知方法を使用して行うことができる。簡単に説明すると、本発明の方法により開発された第ＩＸ分子の生物学的活性をアッセイするために、このアッセイは等容量の活性化部分トロンボプラスチン試薬、Ｂ型血友病患者から単離した第ＩＸ因子欠損血漿を用いて、当該技術分野で周知の滅菌瀉血技法、および標準として正常プール血清またはサンプルを使用して行うことができる。このアッセイでは１単位の活性を、１ミリリットルの正常プール血清に存在する量と定める。さらに正常に対して第ＩＸ因子欠損患者に由来する血漿の凝固時間を下げる第ＩＸ因子の能力に基づく生物学的活性に関するアッセイが、例えばＰｒｏｃｔｏｒ ａｎｄ Ｒａｐａｐｏｒｔ（１９６１，Ａｍｅｒ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐａｔｈ．３６：２１２）に記載されているように行うことができる。

【１０８７】

Ｅ．ＦＳＨ

本発明はさらＦＳＨを改造および／または修飾する方法を含む。ヒトの生殖機能は部分的には、共通する９２アミノ酸糖タンパク質アルファサブユニットを有するが、ホルモン－特異的ベータサブユニットが異なるヘテロ二量体のヒト糖タンパク質ホルモンのファミリーにより制御されている。このファミリーには濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、黄体形成ホルモン（ＬＨ）、チロトロピンまたは甲状腺－刺激ホルモン（ＴＳＨ）およびヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（ｈＣＧ）を含む。ヒトＦＳＨおよびＬＨは治療的に使用されて、ヒト女性において生殖に関する様々な代謝的な観点を調節する。例えば尿から部分精製されたＦＳＨは、無排卵症候群または黄体期欠損の無排卵女性の小胞成熟を刺激するために臨床的に使用されている。黄体形成ホルモン（ＬＨ）およびＦＳＨは、インビトロの受精のために卵胞の生育の刺激に組み合わせて使用されている。生殖サイクルにおけるＦＳＨの役割は十分によく知られているので治療的使用が可能であるが、部分的には天然な供給源からの調製物の異質性および不純さから困難に遭遇した。

【１０８８】

ＦＳＨはインビトロの受精およびインビボでの受精の刺激の両方に価値ある道具であるが、上述のようにその臨床的効力はタンパク質のグリコシル化の一貫性の無さから妨げられている。したがってＦＳＨを改造する方法が生殖科学に大変有益となるのは明らかと思われる。

【１０８９】

ＦＳＨはクローン化そして配列決定され、そのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は本明細書でそれぞれ配列番号１１および配列番号１２（アルファサブユニット）およびそれぞれ配列番号１３および配列番号１４（ベータサブユニット）として表す（それぞれ図５７Ａおよび５７Ｂ）。当業者には本発明が、当該技術分野で周知であるＦＳＨの変異体のように本明細書に表す配列に限定されないと容易に考えるだろう。非限定的例として、米国特許第５，６３９，６４０号明細書は２つの異なるアミノ酸配列を含んでなるベータサブユニットを記載し、そして米国特許第５，３３８，８３５号明細書はヒト絨毛性性腺刺激ホルモンのベータサブユニットに由来する約２７個のアミノ酸のさらなるアミノ酸配列を含んでなるベータサブユニットを記載する。したがって本発明は天然のまたは人の手により工作されたＦＳＨ変異体（すべて当該技術分野では周知である）を含んでなる。

【１０９０】

原核および真核の両方の細胞中でＦＳＨを発現するための方法は当該技術分野では周知であり、そして技術文献に豊富に記載されている（米国特許第４，８４０，８９６号、同第４，９２３，８０５号、同第５，１５６，９５７号明細書）。さらに本発明の改造されたＦＳＨ分子の生物学的活性を評価する方法は当該技術分野では周知であり、そして例えば米国特許第４，５８９，４０２号明細書（ここでＦＳＨが受精、卵の生産および妊娠率に及ぼす効果を測定する方法が、非ヒト霊長類およびヒト個体の両方について記載されている）に記載されている。

【１０９１】

Ｆ．ＥＰＯ

本発明はさらＥＰＯを改造および／または修飾する方法を含んでなる。ＥＰＯは約３４ｋＤａの酸性糖タンパク質であり、そして３つの天然な形態で存在することができる：アルファ、ベータおよびアシアロ。アルファおよびベータ形は炭水化物成分がわずかに異なるが、同じ能力、生物学的活性および分子量を有する。アシアロ形はアルファまたはベータ形であり、末端シアル酸が除去されている。ＥＰＯは身体が健康な状態である時は血漿中に大変低濃度で存在し、ここで組織は既存の数の赤血球から十分な酸素を受容する。この正常濃度は通常は加齢を通して失われる赤血球細胞の代替を刺激するために十分である。循環中のエリトロポエチンの量は、循環中の血液細胞による酸素輸送が低下する時の低酸素の条件下で増加する。低酸素は出血による大量の血液損失、照射に過剰暴露された赤血球細胞の破壊、高山病または長期の意識不明による酸素取り込みの低下、または様々な状態の貧血によるより引き起こされ得る。したがってＥＰＯは、照射療法後の赤血球細胞の補充、貧血および他の生命を脅かす状態に有用な化合物である。

【１０９２】

種々の疾患および障害から回復することを目的とするＥＰＯの重要性に鑑みて、本発明は天然な、したがってより効果的なサッカリド成分を持つＥＰＯの生産に有用である。現在合成されているようにＥＰＯは完全なグリコシル化補体を欠くので、したがって体内でのその短い半減期により、より頻繁に、そしてより高用量で投与されなければならない。

【１０９３】

ＥＰＯはクローン化そして配列決定され、そしてヌクレオチドおよびアミノ酸配列は本明細書でそれぞれ配列番号１５および配列番号１６に表す（それぞれ図５８Ａおよび５８Ｂ）。当業者には本明細書で説明する配列がＥＰＯをコードし、そして含んでなる配列の単なる一例であると容易に理解するだろう。例として、米国特許第６，１８７，５６４号明細書は２以上のＥＰＯペプチドのアミノ酸配列を含んでなる融合タンパク質を記載し、米国特許第６，０４８，９７１号および同第５，６１４，１８４号明細書は、１０１、１０３、１０４および１０８位でアミノ酸置換を有する突然変異体ＥＰＯ分子を記載する。

米国特許第５，１０６，９５４号明細書は短縮化されたＥＰＯ分子を記載し、そして米国特許第５，８８８，７７２号明細書は３３、１３９および１６６位に置換を持つＥＰＯ類似体を記載する。したがって当業者は本発明が技術文献および当該技術分野で十分に記載されたＥＰＯおよびＥＰＯ誘導体および変異体を全部、包含すると認識するだろう。

【１０９４】

さらに細胞中でＥＰＯを発現する方法は当該技術分野で周知である。とりわけ米国特許第４，７０３，００８号、同第５，６８８，６７９号および同第６，３７６，２１８号明細書に例示されるように、ＥＰＯは原核および真核発現系で発現することができる。ＥＰＯの生物学的活性を測定する方法も、等しく当該技術分野では周知である。例としてＫｒｙｓｔａｌアッセイ（Ｋｒｙｓｔａｌ，１９８３，Ｅｘｐ．Ｈｅｍａｔｏｌ．１１：６４９－６６０）を使用して、本発明の方法に従い調製したＥＰＯの活性を測定することができる。簡単に説明すると、アッセイはエリトロポエチンが完全なマウス脾臓細胞に及ぼす効果を測定する。マウスはエリトロポエチン－反応性赤血球細胞の子孫細胞の生産を刺激するために、フェニルヒドラジンで処置される。処置後、脾臓を摘出し、完全な脾臓細胞を単離し、そして様々な量の野生型エリトロポエチンまたは本明細書に記載するエリトロポエチンタンパク質とインキューベーションする。一晩インキューベーションした後、^{3}Ｈ－チミジンを加え、そして細胞内ＤＮＡの取り込みを測定する。^{3}Ｈ－チミジンの取り込み量は、エリトロポエチンと細胞レセプターとの間の相互作用を介してエリトロポエチンが刺激する血液細胞生産の指標である。本発明のエリトロポエチンのタンパク質濃度ならびに野生型エリトロポエチンの濃度は、当該技術分野で周知の競合的ラジオイムノアッセイ法により定量される。比活性は、ラジオイムノアッセイにより免疫沈降可能なタンパク質として測定された時、ミリグラムで除算されたＫｒｙｓｔａｌアッセイで測定した国際単位として算出する。

【１０９５】

Ｇ．ＧＭ－ＣＳＦ

本発明はＧＭ－ＣＳＦを修飾する方法を包含する。ＧＭ－ＣＳＦは活性化Ｔ－細胞、マクロファージ、内皮細胞およびストロマの繊維芽細胞により生産されるサイトカインとして当該技術分野では周知である。ＧＭ－ＣＳＦは主に骨髄に作用して炎症性白血球の生産を増加し、そしてさらに内分泌ホルモンとして機能して炎症機能中に消費される好中球の補充を開始する。さらにＧＭ－ＣＳＦはマクロファージ活性化因子であり、そしてランゲルハンス細胞の樹状細胞への分化を促進する。Ｇ－ＣＳＦと同様に、ＧＭ－ＣＳＦは化学療法後の骨髄代用にも臨床的応用を有する。

【１０９６】

Ｇ－ＣＳＦはそれ自体が治療的応用に重要でしかも有用な化合物であると示されてきたが、組換え細胞からのＧ－ＣＳＦを生産するための現在の方法は比較的短い生物学的寿命、免疫原性を導く可能性がある不適切なグリコシル化パターン、機能の損失を有する生成物、および同じ効果等を達成するためにより大量およびより頻繁な投与の両方の必要性の増加をもたらす。

【１０９７】

ＧＭ－ＣＳＦは単離そしてクローン化され、その核酸およびアミノ酸配列はそれぞれ配列番号１７および配列番号１８（それぞれ図５９Ａおよび５９Ｂ）に示す。本発明はＧＭ－ＣＳＦ、特に有力かつ機能的な生物学的分子として機能するＧＭ－ＣＳＦの能力に関係するように修飾する方法を包含する。当業者は本開示および本明細書の技術をもってすれば、本発明がＧＭ－ＣＳＦを修飾するための組成物および方法を提供することを容易に理解するだろう。

【１０９８】

本発明はさらに当該技術分野で周知なＧＭ－ＣＳＦ変異体を包含する。例として、しかし本発明を限定することは全く意味せずにＧＭ－ＣＳＦ変異体はすでに国際公開第８６／０６３５８号パンフレットに記載され、ここでタンパク質は選択的な（ａｌｔｅｒｎａｔｉｖｅ）４次構造に修飾されている。さらに米国特許第６，２８７，５５７号明細書は、

遺伝子治療の応用のためにヘルペスウイルスのゲノムに連結されたＧＭ－ＣＳＦの核酸配列を記載する。さらに欧州特許出願公開第０２８８８０９号明細書（国際公開第８７／０２０６０号パンフレットに対応する）は、ＩＬ－２およびＧＭ－ＣＳＦを含んでなる融合タンパク質を報告する。ＩＬ－２配列は、融合タンパク質の酸開裂後に、Ｎ－またはＣ－末端配列修飾のいずれかを有するＧＭ－ＣＳＦが生成できるように、ＧＭ－ＣＳＦのＮ－またはＣ－末端配列であることができる。したがってＧＭ－ＣＳＦ誘導体、突然変異体および変異体は当該技術分野では周知であり、そして本発明の方法の中に包含される。

【１０９９】

本発明の修飾されたＧＭ－ＣＳＦ分子の発現および活性は、当該技術分野で周知な、そして例えば米国特許第４，８１０，６４３号明細書に記載されているような方法を使用してアッセイすることができる。例として活性は放射能－標識チミジン取り込みアッセイを使用して測定することができる。簡単に説明すると、健康なドナーに由来するヒトの骨髄をＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅでの密度カットに供し（１．０７７ｇ／ｍｌ、ファルマシア、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）、そして低密度細胞を、１０％ウシ胎児血清、グルタミンおよび抗生物質を含むＩｓｃｏｖｅの培地（ギブコ、ラジョラ、カリフォルニア州）に懸濁する。約２Ｘ１０^{4}個のヒト骨髄細胞を対照培地またはＧＭ－ＣＳＦまたは本発明のいずれかと、９６－ウェル平底プレート中で約３７℃で空気中５％CO_2で約２日間、インキューベーションする。次いでカルチャーは約４時間、０．５μＣｉ／ウェルの^{3}Ｈ－チミジン（ニューイングランドヌクレアー、ボストン、マサチューセッツ州）でパルスをかけ、そして取り込みを例えばＶｅｎｔｕａ，ｅｔ　ａｌ．（１９８３，Ｂｌｏｏｄ　６１：７８１）に記載されているように測定する。対照化合物で処理した骨髄細胞と比べて、^{3}Ｈ－チミジンのヒト骨髄細胞への包含の上昇は、活性な、そして活力のあるＧＭ－ＣＳＦ化合物の指標である。

【１１００】

Ｈ．ＩＦＮ－ガンマ

ＩＦＮ－ガンマを修飾および／または改造する方法を包含することは、本発明の目的である。ＩＦＮ－ガンマはＩＩ型インターフェロンとしても知られているが、ＩＦＮアルファおよびＩＦＮベータとは対照的に、約２１～２４ｋＤａの２つのサブユニットを含んでなるホモ二量体糖タンパク質である。サイズの変動は、当該技術分野で知られている種々の発現系で組換え的に再生した時、通常は複製しない可変性のグリコシル化パターンによるものである。ＩＦＮ－ガンマはマクロファージの有力なアクチベーターであり、ＭＨＣクラスＩ分子の発現、そして程度は低いがＭＨＣクラスＩＩ分子刺激物を上昇させる。さらにＩＦＮ－ガンマはＴ－細胞の分化およびＢ－細胞中でのアイソタイプスイッチを促進する。ＩＦＮ－ガンマはまた好中球、ＮＫ細胞、および食細胞が媒介する排除を導く抗体応答の刺激物としてもよく知られている。ＩＦＮ－ガンマは、結核症およびリーシュマニアのような細胞内病原体による感染と関連して使用される処置として、および種々の癌および他の新形成のような、顕著な特徴として異常な細胞増殖を伴う状態に有用な抗－増殖性治療剤としても提案された。

【１１０１】

ＩＦＮ－ガンマは有力な免疫学的活性が証明されたが、ＩＦＮ－ガンマを発現するために現在使用されている系に由来するグリコシル化の変動により、治療薬の能力、効力、生物学的半減期、および他の重要な因子は最善の状態では可変的である。本発明はこの重要な欠点を正す方法を包含する。

【１１０２】

ＩＦＮ－ガンマのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、本明細書ではそれぞれ配列番号１９および配列番号２０に示す（それぞれ図６０Ａおよび６０Ｂ）。本明細書で説明する配列は、本発明を限定するものでは全くないことは容易に理解される。対照的にＩＦＮ－ガンマの変異体、誘導体および突然変異体は当業者には周知である。例として米国特許第６，０８３，７２４号明細書は、組換えトリＩＦＮ－ガンマを記載し、そして米国特許第５，７７０，１９１号明細書は、ヒトＩＦＮ－ガンマのＣ－末端変異体を記載する。さら

に米国特許第４，７５８，６５６号明細書は新規ＩＦＮ－ガンマ誘導体および種々の発現系でそれらを合成する方法を記載する。したがって本発明は本明細書のいたるところに開示するＩＦＮ－ガンマの配列に限定されず、当該技術分野で周知なすべての誘導体、変異体、突然変異体等を包含する。

【１１０３】

ＩＦＮ－ガンマの発現系も等しく当該技術分野では周知であり、そして原核および真核系、ならびに植物および昆虫細胞調製物を含み、その方法は当業者に知られている。例として米国特許第４，７５８，６５６号明細書は大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）でＩＦＮ－ガンマ誘導体を発現させる系を記載し、一方米国特許第４，８８９，８０３号明細書はチャイニーズハムスター卵巣細胞およびＳＶ４０プロモーターを使用する発現系を記載する。

【１１０４】

本明細書に開示された方法に従い調製されたＩＦＮ－ガンマの生物学的活性のアッセイは、当業者には周知である。ＩＦＮ－ガンマ発現の生物学的アッセイは、例えば米国特許第５，８０７，７７４号明細書に見いだすことができる。簡単に説明すると、ＩＦＮ－ガンマを、ＩＬ－３，ｃ－ｋｉｔリガンドおよびＩＬ－１、ＩＬ－６またはＧ－ＣＳＦのいずれかのようなサイトカインの組み合わせにより刺激したＣＤ３４$^{++}$ＣＤ３８$^{-}$細胞（ウェルあたり１００個の細胞）のカルチャーに加えて、ＣＤ３４$^{++}$ＣＤ３８$^{-}$細胞の増殖を誘導する。細胞増殖および２次コロニー形成細胞の生成は用量依存的様式で大いに阻害され、５０００Ｕ／ミリリットルのＩＦＮ－ガンマでほぼ完全な阻害が起こる。ＩＦＮ－ガンマの阻害効果に対する確認試験として、対照としてＩＦＮ－ガンマ抗体の添加を行うことができる。

【１１０５】

Ｉ．アルファ－プロテアーゼインヒビター（α－アンチトリプシン）

本発明はさらに、アルファ－アンチトリプシンとしても知られているアルファ－プロテアーゼインヒビター（Ａ－Ｉ－ＰＩ、α－１－アンチトリプシンまたはα－１－トリプシンインヒビター）の改造方法を含む。Ａ－Ｉ－ＰＩは５３ｋＤａの分子量を有する糖タンパク質である。Ａ－Ｉ－ＰＩは内因性のセリンプロテアーゼによる組織破壊の制御に役割を有し、そして血漿中で最も有名なセリンプロテアーゼインヒビターである。特にＡ－Ｉ－ＰＩは好中球エラスターゼを含む種々のエラスターゼを阻害する。エラスターゼは組織を破壊するプロテアーゼであり、そしてその活性が肺組織で調節されない時、特に問題を生じる。このプロテアーゼは外来タンパク質を分解することにより機能する。しかしＡＰＩがエラスターゼ活性を調節するために十分な量で存在しない時、エラスターゼは肺組織を分解する。早晩、この平衡失調が慢性の肺組織傷害および気腫をもたらす。実際に、Ａ－１－ＰＩの遺伝的欠損は、肺気腫の未成熟な発生を伴うことが示された。Ａ－１－ＰＩの補充はこの状態の気腫の治療に成功裏に使用された。さらにＡ－１－ＰＩの欠損は嚢胞性繊維症および関節炎のような他の疾患の悪化にも関与し、この場合、白血球は感染と戦うために肺または関節に移動する。

【１１０６】

したがってＡ－１－ＰＩは恐らく、インヒビターとプロテアーゼ（１つまたは複数）、特に好中球エラスターゼとの間の平衡失調が疾患状態の進行を引き起こす疾患を処置するために使用できるだろう。抗ウイルス活性もＡ－１－ＰＩに起因した。この観点で本発明は論理上、肺の空気の永久的な交換に、安全で、効果的で、しかも有力であるＡ－１－ＰＩの生産に有用となる。

【１１０７】

Ａ－１－ＰＩはクローン化そして配列決定され、そして配列番号２１および配列番号２２に説明する（それぞれ図６１Ａおよび６１Ｂ）。当業者に理解されるように、Ａ－１－ＰＩの天然な、および工作された変異体が存在し、そして本発明に包含される。例として米国特許第５，７２３，３１６号明細書は、３５６～３６１位にアミノ酸置換を有し、そしてさらに約３個のアミノ酸のＮ－末端延長を含んでなるＡ－１－ＰＩ誘導体を記載する。米国特許第５，６７４，７０８号明細書は、１次アミノ酸配列の３５８位にアミノ酸置

換を持つＡ－１－ＰＩ類似体を記載する。当業者は本発明が既知の、または今後見いだされるＡ－１－ＰＩ変異体、誘導体および突然変異体を包含すると容易に認識するだろう。

【１１０８】

本発明の方法に従い生産された改造Ａ－１－ＰＩ活性の発現および測定法は当該技術分野では周知であり、そして例えば米国特許第５，６７４，７０８号および同第５，７２３，３１６号明細書に記載されている。簡単に説明すると生物学的活性は、例えばＤｅｌＭａｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９７９，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．９９：３１６）に記載されているように、基質Ｎ－ｓｕｃ－Ａｌａ－－Ａｌａ－－Ｐｒｏ－－Ｐｈｅ－ｐ－ニトロアニリド（９０％ＤＭＳＯ中、０．１ｍｌの１０ｍＭ溶液）のキモトリプシンが触媒する加水分解の阻害を測定することにより、アンチキモトリプシン活性に関するアッセイを使用して測定することができる。典型的なキモトリプシンアッセイは、１．０ミリリットル中に：１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌバッファー、ｐＨ８．３、０．００５（容量／容量）％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、ウシ膵臓キモトリプシン（１８キロモル）および本発明のＡ－１－ＰＩを含む。アッセイ混合物を室温で５分間、プレ－インキューベーションし、基質（９０％ＤＭＳＯ中、０．０１ｍｌの１０ｍＭ溶液）を加え、そして残りのキモトリプシン活性を、ｐ－ニトロアニリンの放出により生じる４１０ｎｍでの吸収の変化の割合により決定する。光学的吸収の測定は、温度制御サンプル区画を備えた分光光度計を使用して２５℃で行う。

【１１０９】

Ｊ．グルコセレブロシダーゼ

本明細書に記載する本発明はさらに、グルコセレブロシダーゼを修飾する方法を含む。グルコセレブロシダーゼは糖脂質であるグルコセレブロシドをグルコースおよびセラミドへ加水分解することを触媒するリソソームの糖タンパク質酵素である。グルコセレブロシダーゼの変異体は、Ｃｅｒｅｚｙｍｅ（商標）およびＣｅｒｅｄａｓｅ（商標）として市販されており、ゴーシェ病の処置に治療薬として認可されている。Ｃｅｒｅｄａｓｅ（商標）は完全なＮ－結合構造を有するグルコセレブロシダーゼの胎盤に由来する形態である。Ｃｅｒｅｚｙｍｅ（商標）は４９７アミノ酸長で、ＣＨＯ細胞で発現されたグルコセレブロシダーゼの組換え変異体である。Ｃｅｒｅｚｙｍｅの４Ｎ－結合グリカンはトリマンノースコアで終結するように修飾された。

【１１１０】

グルコセレブロシダーゼは現在、組換え哺乳動物細胞培養で生産され、したがってこれらの細胞、通常、チャイニーズハムスター卵巣細胞またはベビーハムスター腎臓細胞のような齧歯類の細胞のグリコシル化パターンを反映し、これはヒトのグリコシル化パターンとは劇的に異なり、中でも免疫原性および能力の欠如を導く。

【１１１１】

グルコセレブロシダーゼの核酸およびアミノ酸配列は本明細書で配列番号２３および２４に説明する（それぞれ図６２Ａおよび６２Ｂ）。しかし当業者には明らかであるように、本明細書で提示する配列は原型配列であり、そして本発明を限定するものではない。実際にグルコセレブロシダーゼの変異体は周知であり、そして例えば米国特許第６，０１５，７０３号明細書に記され、これはグルコセレブロシダーゼ同族体およびその変異体の強化された生産を記載する。さらに米国特許第６，０８７，１３１号明細書は、別のグルコセレブロシダーゼ変異体のクローニングおよびシークエンシングを記載する。既知の、または将来見いだされるこれらおよび他の誘導体、変異体および突然変異体を包含することは本発明の意図するところである。

【１１１２】

標準的な技法を使用したグルコセレブロシダーゼの発現法は周知であり、そして例えば米国特許第６，０１５，７０３号明細書に詳細に記載されている。本発明の方法に従い調製されたグルコセレブロシダーゼ分子の生物学的効力のアッセイも同様に当該技術分野では周知であり、そして評価のためのマウスのゴーシェ病モデルおよびグルコセレブロシダーゼ治療薬の使用は、例えばＭａｒｓｈａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，（２００２，Ｍｏｌ．Ｔ

ｈｅｒ．６：１７９）に記載されている。
【１１１３】
Ｋ．ＴＰＡ
本発明はさらに組織－型アクチベーター（ＴＰＡ）の改造方法も包含する。ＴＰＡはプラスミノーゲンを活性化して、フィブリン（血栓のタンパク質物質の主成分）を溶解するプラスミンを形成する。ＴＰＡ調製物は、心筋梗塞および脳梗塞を引き起こす血栓症の血栓溶解処置において血栓に対して大変高い選択性を有する血栓溶解剤として開発された。
【１１１４】
さらにフィブリンに対する高い親和性および天然なＴＰＡよりも長い血液中の半減期を得る目的で、様々な修飾されたＴＰＡが遺伝子工学により生産されてきた。原核生物から生産された修飾ＴＰＡの形態は天然のＴＰＡとは異なりグリコシル化されていない。ＴＰＡは、一般に水に溶解することが極端に難しいタンパク質である。特に修飾されたＴＰＡは天然なＴＰＡよりも水に溶解することが難しく、修飾されたＴＰＡの調製を大変難しくしている。このように修飾されたＴＰＡは患者に投与する時に水に溶解することが難しい。しかし修飾されたＴＰＡはフィブリンに対して上昇した親和性および血液中でのより長い半減期のような種々の利点を有する。本発明の目的は修飾されたＴＰＡの可溶性を上昇させることである。
【１１１５】
ＴＰＡの核酸およびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号２５および配列番号２６として本明細書に説明する（それぞれ図６３Ａおよび６３Ｂ）。上記のようにＴＰＡの変異体は治療的応用に構築され、そして使用されてきた。例えば米国特許第５，７７０，４２５号明細書はフィブリンドメインの幾つか、またはすべてが削除されたＴＰＡ変異体を記載する。さらに米国特許第５，７３６，１３４号明細書は、２７６位のアミノ酸に対する修飾が開示されているＴＰＡを記載する。当業者は本開示および本明細書の教示をもってすれば、本発明が本明細書に説明するＴＰＡ配列ならびに技術文献に精通した人に周知なそれら変異体を含んでなることを容易に認識するだろう。
【１１１６】
ＴＰＡをコードする核酸配列からのＴＰＡの発現は当該技術分野では周知であり、そして例えば米国特許第５，７５３，４８６号明細書に詳細に記載されている。本発明の方法に従い調製したＴＰＡ分子の生物学的特性を測定するアッセイも、当該技術分野では同様に周知である。簡単に説明すると、本明細書のいたるところに開示するように合成したＴＰＡ分子は、Ｃａｒｌｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１６８：４２８）の方法に従い、飽和濃度のプラスミノーゲンの存在下でフィブリンを溶解するそれらの能力についてアッセイすることができる。インビトロの血塊溶解アッセイは、微遠心（ｍｉｃｒｏｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ）分析機を使用した比濁法により組織－型アクチベーターの活性を測定する。トロンビンおよびＴＰＡの混合物をフィブリノーゲンおよびプラスミノーゲンの混合物中で遠心して血塊形成を開始し、そして引き続き血塊を溶解する。生成した吸収　対　時間のプロフィールを分析してアッセイの終点を決定する。ＴＰＡ変異体の活性はＴＰＡの標準曲線と比較する。アッセイを通じて使用するバッファーは、０．０１（容量／容量）％ＴＷＥＥＮ８０および０．０１（重量／容量）％のアジ化ナトリウムを含有する０．０６Ｍリン酸ナトリウム、ｐＨ７．４である。ヒト　トロンビンは約３３単位／ｍｌの濃度である。フィブリノーゲン（２．０ｍｇ／ｍｌの血塊性タンパク質）を湿った氷上で冷却してフィブロネクチンを沈殿させ、そして次いで重力により濾過する。Ｇｌｕ－プラスミノーゲンは１ｍｇ／ｍｌの濃度である。分析機のチャンバーの温度は３７℃に設定する。ローダーは、標準曲線用のサンプルとして２０マイクロリットルのＴＰＡ（約５００ナノグラム／ミリリットル～約１．５マイクログラム／ミリリットル）を、または標準曲線の範囲内で溶解を引き起こす濃度で２０マイクロリットルの変異体ＴＰＡを分配するように設定する。第２試薬として２０マイクロリットルのトロンビン、および１次試薬として２００マイクロリットルの５０：１（容量／容量）のフィブリノーゲン：プラスミノーゲン混合物。吸収／時間プログラムは５分間のインキュベー

ション時間、３４０－ナノメーターのフィルターおよび９０秒間隔の読み取りで使用する。

【１１１７】

Ｌ．ＩＬ－２

本発明はさらにＩＬ－２を改造および修飾する方法を包含する。ＩＬ－２はＴリンパ球の主要な増殖因子であり、そして細胞傷害性ＣＤ８Ｔ細胞およびＮＫ細胞を刺激することにより液性および細胞性免疫応答を上昇させる。したがってＩＬ－２は腫瘍およびウイルス感染に対する防御メカニズムにおいて重要である。ＩＬ－２は転移性メラノーマおよび腎腺癌に対する治療にも使用され、そして臨床試験で多くの形態の癌に使用されてきた。さらにＩＬ－２は、ＣＤ４カウントの有意な上昇を導くＨＩＶに感染した患者にも使用されてきた。

【１１１８】

ＩＬ－２が様々な癌およびＡＩＤＳのような生命を脅かす疾患の管理および処置において証明した成功を考慮すれば、本発明の方法はより長い生物学的半減期、上昇した能力、そして一般に健康なヒトで合成分泌されるような野生型のＩＬ－２に似た治療プロフィールを有するＩＬ－２分子を開発するために有用ということになるだろう。

【１１１９】

ＩＬ－２はクローン化そして配列決定され、そして核酸およびアミノ酸配列を本明細書で配列番号２７および配列番号２８に示す（それぞれ図６４Ａおよび６４Ｂ）。本発明は本明細書に説明するＩＬ－２の核酸およびアミノ酸配列に限定されると全く解釈されるべきではない。ＩＬ－２の変異体は例えば米国特許第６，３４８，１９３号明細書に記載され、ここで８８位のアスパラギンがアルギニンに置換され、そして米国特許第５，２０６，３４４号明細書では、種々のアミノ酸置換を持つＩＬ－２変異体を含んでなるポリマーが記載されている。本発明はこれらのＩＬ－２変異体および当該技術分野で周知なその他を包含する。

【１１２０】

ＩＬ－２の発現および活性の測定法は当該技術分野で周知であり、そして例えば米国特許第５，４１７，９７０号明細書に記載されている。簡単に説明すると、ＩＬ－２またはその変異体の発現は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、ＣＨＯ細胞、ＢＨＫ細胞、昆虫細胞を含む種々の原核および真核系の両方で、バキュロウイルス発現系を使用して行うことができ、それらすべてが当該技術分野では周知である。

【１１２１】

本発明の方法に従い調製された修飾ＩＬ－２の活性についてのアッセイは以下のように進めることができる。末梢血リンパ球は、例えばＡ．Ｂｏｙｕｍ ｅｔ ａｌ．（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１９８４，Ｖｏｌ．１０８，ｐａｇｅ８８、アカデミック出版社）に記載された方法により、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（ファルマシア、ピスカタウェイ、ニュージージー州）勾配での遠心により、赤血球および顆粒球から分離することができる。続いてリンパ球は、ＲＲＭＩ１６４０（ギブコ－ＢＲＬ、ラジョラ、カリフォルニア州）に熱（５６℃で１時間）不活性化した１０％ＡＢヒト血清（ＣＴＳパーパン（Ｐｕｒｐａｎ）、トゥールーズ、フランス）、２ｍＭ ピルビン酸ナトリウム、５ｍＭ ＨＥＰＥＳ、４ｍＭ Ｌ－グルタミン、１００Ｕ／ｍｌ ペニシリン、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシンおよび０．２５μｇ／ｍｌのアンホテリシンを加えてなる培養基（完全培地）で約３回洗浄する。

【１１２２】

接着細胞（単核およびマクロファージ）はプラスティックに接着させることにより排除し、そして残りの細胞を完全培地にミリリットル当たり約５～１０Ｘ１０^{5}細胞の濃度で懸濁し、そして平方センチメートルあたり約１～２Ｘ１０^{5}細胞の密度で培養フラスコに播種した。次いでフラスコを３７℃で５％CO_2の雰囲気中で約１時間インキューベーションし、その後、非－接着リンパ球は培養フラスコをゆるやかに撹拌した後、吸引により回収する。

【１１２３】
非－接着リンパ球を１回洗浄し、そしてミリリットルあたり約10^5細胞の濃度で本発明のＩＬ－２の存在下、完全培地中で約４８時間、上記のインキューベーター中で培養する。次いで細胞を１回洗浄する。
【１１２４】
細胞の細胞傷害活性は、Ｓａｌａｈｕｄｄｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９８３，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １２９：５１－６４；１９８４，Ｓｃｉｅｎｃｅ：２２３，７０３－７０７）により記載されているように、ＮＫ細胞の細胞傷害性に対して耐性のヒトＴリンパ系Ｃ８１６６－４５／Ｃ６３（ＨＴ１細胞）の標的細胞と約４時間接触させた後に評価する。６Ｘ10^5ＨＴ１細胞を約２００μＣｉの^{51}Ｃｒ（クロム酸ナトリウム、アマーシャム、アーリントンハイツ、イリノイ州）で、３７℃で約１時間、血清を含まない完全培地中で放射－標識し、次いで数回洗浄する。標的細胞およびエフェクティブ細胞は丸底マイクロタイタープレートに、エフェクティブ細胞　対　標的細胞の比率を変動させながら分配する（５０：１、１０：１、１：１）。マイクロタイタープレートを遠心し、そして上記のようにインキューベーションした後、各ウェルからの上清を回収し、そして放射性をガンマカウンターを使用して測定する。細胞傷害性は死んだ標的細胞により放出された^{51}Ｃｒの量から決定する。非－特異的細胞傷害性は、エフェクティブ細胞の不存在下で、標的細胞から天然に放出された放射性の量から決定する。
【１１２５】
本方法はエフェクター細胞の細胞傷害性を測定するために当該技術分野で周知な多くの方法のうちの１つであり、そして本発明を限定するとは解釈すべきではない。
【１１２６】
Ｍ．第ＶＩＩＩ因子
本発明はさらに第ＶＩＩＩ因子の改造および修飾法を包含する。第ＶＩＩおよび第ＩＸ因子について前に記載したように、第ＶＩＩＩ因子は血液凝固経路の重要な成分である。ヒト第ＶＩＩＩ因子（抗血友病因子；ＦＶＩＩＩ：Ｃ）は２つのペプチド（８０ｋＤａの軽鎖分子量、およびグリコシル化状態に依存して９０から２２０ｋＤａまで可変の重鎖分子量）からなるヒト血漿タンパク質である。これは凝固経路の必須なコファクターであり、そして第Ｘ因子がその活性状態（第Ｘａ）因子に転換するために必要である。第ＶＩＩＩ因子は、２０５０ａａペプチドの二量体であるフォン　ビルブラント（ｖｏｎ　Ｗｉｌｌｉｂｒａｎｄ）因子（ａｋａ　ＦＶＩＩＩ：ＲＰ）との非共有複合体として血漿中を循環する（米国特許第６，３０７，０３２号明細書を参照にされたい）。正常の２０％未満の第ＶＩＩＩ因子の血液濃度は、血友病Ａと呼ばれる出血性障害を引き起こす。１％未満の第ＶＩＩＩ因子の血液レベルは、重篤な出血障害を生じ、最も共通する症状である天然な関節出血を伴う。
【１１２７】
他の血液凝固因子と同様に、第ＶＩＩＩ因子は血友病Ａおよび血友病Ｂのような様々な出血性障害の処置に相当有力な治療薬である。重鎖のグリコシル化により、組換え細胞から第ＶＩＩＩ因子を調製する現在の方法は、天然な第ＶＩＩＩ因子ほど効果的な生成物をもたらさない。ヒト血漿からの精製法は効果が低く、そして組換え第ＶＩＩＩ因子を調製するよりも難しい粗組成物をもたらす。本発明はこの状況の改善を求める。
【１１２８】
第ＶＩＩＩ因子の核酸およびアミノ酸配列は、本明細書で配列番号２９および配列番号３０にそれぞれ表す（それぞれ図６５Ａおよび６５Ｂ）。当該技術分野では例えば米国特許第５，６６８，１０８号明細書に記載されているように（ここで１２４１位のアスパラギン酸がグルタミン酸に置き換えられ、関連する核酸も変わる）、第ＶＩＩＩ因子のおびただしい数の変異体が存在する。米国特許第５，１４９，６３７号明細書はグリコシル化されているか、または非グリコシル化のＣ－末端画分を含んでなる第ＶＩＩＩ因子変異体を記載し、そして米国特許第５，６６１，００８号明細書はアミノ酸１６４９～２３３２に少なくとも３個のアミノ酸残基で連結したアミノ酸１～７４０を含んでなる第ＶＩＩＩ

因子変異体を記載する。したがって第ＶＩＩＩ因子の変異体、誘導体、修飾および複合体は当該技術分野では周知であり、そして本発明に包含される。

【１１２９】

第ＶＩＩＩ因子を生産するための発現系は当該技術分野では周知であり、そして米国特許第５，６３３，１５０号、同第５，８０４，４２０号および同第５，４２２，２５０号明細書に例示されるように原核および真核細胞を含む。

【１１３０】

本発明の方法に従い合成された第ＶＩＩＩ因子分子の生物学的活性を測定するために、当業者は第ＶＩＩ因子および第ＩＸ因子を評価するために本明細書に記載したアッセイが第ＶＩＩＩ因子にも応用可能であることを認識するだろう。

【１１３１】

Ｎ．ウロキナーゼ

本発明はウロキナーゼを改造および／または修飾する方法も含む。ウロキナーゼはプラスミノーゲンをプラスミンに活性化するセリンプロテアーゼである。このタンパク質は内皮および腎臓を含む種々の組織中で合成され、そして尿中に微量分泌される。精製されたウロキナーゼは２つの活性形態、高分子量形（ＨＵＫ：約５０ｋＤａ）および低分子量形（ＬＵＫ：約３０ｋＤａ）で存在する。ＬＵＫはＨＵＫから最初の１３５アミノ酸を放出するリシン３５以降のタンパク質分解により、ＨＵＫから誘導されることが示された。ＨＵＫまたはＬＵＫは、プロウロキナーゼと呼ばれる１本鎖前駆体の、リシン１５８とイソロイシン１５９との間のタンパク質分解的加水分解によりタンパク質分解的に活性な形に転換されて、二本鎖の活性化形（これはＨＵＫまたはＬＵＫをいずれかに対応し続ける）を生じるはずであるという従来の見識が維持された。この加水分解的切断から生じるタンパク質分解的に活性なウロキナーゼ種は、１つのジスルフィド結合により一緒に保持される２つのアミノ酸鎖を含む。活性化切断により形成された２つの鎖をＡまたはＡ$_1$鎖（それぞれＨＵＫまたはＬＵＫ）と呼び、そしてＢ鎖は分子のプロテアーゼドメインを含んでなる。　ウロキナーゼは効果的な血栓溶解剤であることが示されてきた。しかしこれは天然には微量でしか生産されないので、効果的な投薬用量のための酵素のコストは高い。ウロキナーゼは組換え細胞培養で生産され、そしてウロキナーゼをコードするＤＮＡは適当なベクターおよび宿主微生物と一緒に知られている。ウロキナーゼを含んでなる現在の組成物およびウロキナーゼを組換え的に生産する方法はグリコシル化パターンが欠如した産物により阻まれ、そしてウロキナーゼの活性化を取り巻く複雑なタンパク質分解的開裂を考慮すると、この異型のグリコシル化は効果が低く、そして能力が低い生成物を導く。

【１１３２】

ウロキナーゼの１次アミノ酸鎖をコードするヌクレオチドの配列を、配列番号３３および配列番号３４に表す（それぞれ図６６Ａおよび６６Ｂ）。ウロキナーゼの変異体は当該技術分野では周知であり、したがって本発明は本明細書に説明する配列に限定されない。実際に当業者は例えば米国特許第５，２１９，５６９号、同第５，６４８，２５３号および同第４，８９２，８２６号明細書に記載されているウロキナーゼ変異体が機能的部分として存在し、したがって本明細書に包含されることを容易に認識するだろう。

【１１３３】

本発明の方法に従い調製されたウロキナーゼ分子の発現および評価は、同様に当該技術分野では周知である。非限定的な例として、様々な系でのウロキナーゼの発現が米国特許第５，２１９，５６９号明細書に詳細に記載されている。本発明の方法に従い調製されたウロキナーゼの活性および機能性を測定するためアッセイは本明細書で説明され、そして技術文献を通して記載され、そしていたるところにあまねく記載されている他のプラスミノーゲンのアッセイおよびフィブリン関連アッセイに類似している。本明細書に記載するように合成したウロキナーゼ分子の活性を測定するためのアッセイの１例は、例えば１．２５％アガロース、４．１ｍｇ／ｍｌヒトフィブリノーゲン、０．３単位／ｍｌのトロンビンおよび０．５μｇ／ｍｌのダイズトリプシンインヒビターを含んでなるフィブリンプレートを使用するＰｌｏｕｇ，ｅｔ　ａｌ．（１９５７，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙ

ｓ．Ａｃｔａ２４：２７８－２８２）に記載されているアッセイであることができる。
【１１３４】
Ｏ．ヒトＤＮａｓｅ
本発明はさらに組換えヒトＤＮａｓｅを改造および／または修飾する方法を包含する。ヒトＤＮａｓｅＩは治療薬として試験され、そしてインビトロで嚢胞性線維症の粘液の粘度を低下させることが示された。化膿した粘液は約１０～１３ｍｇ／ｍｌのＤＮＡを含むと測定され、イオン性ポリマーが気道流体の流動学的特性に影響を及ぼすと予想された。したがってウシ膵臓ＤＮａｓｅＩ（ＤＮＡを分解する酵素）が粘液溶解剤として何年も前に試験されたが、抗原性および／または混入プロテアーゼにより誘導される副作用から臨床的実施には入らなかった。組換えヒトＤＮａｓｅは現在、嚢胞性線維症のような疾患の症状を緩和するために治療薬として使用されている。
【１１３５】
ウシ起源のＤＮａｓｅと同様に、組換えヒトＤＮａｓｅには幾つかの困った問題をかかえ、ほとんどが現在使用されている哺乳動物発現系により伝えられた不適切なグリコシル化により低下した効力による。本発明はＤＮａｓｅを改造する方法を記載し、上昇した効力およびより良い治療的結果を導く。
【１１３６】
ヒトＤＮａｓｅのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、本明細書では配列番号３９および配列番号４０に提示する（それぞれ図６７Ａおよび図６７Ｂ）。ＤＮａｓｅを含んでなるペプチドの変異体は当該技術分野では周知である。例として米国特許第６，３４８，３４３号明細書は１次構造全体にわたり多数のアミノ酸置換を持つヒトＤＮａｓｅを記載する。さらに米国特許第６，３９１，６０７号明細書は９、１４、７４、７５および２０５位に多数のアミノ酸置換を持つＤＮａｓｅの超活性変異体を記載する。この例および当該技術分野で他の周知の変異体、または将来見いだされる変異体は本発明に包含する。
【１１３７】
ＤＮａｓｅペプチドを生産するための発現系は当業者には周知であり、そして原核および真核系で記載された。例えばＰＣＴ特許出願、国際公開第９０／０７５７２号パンフレットはかなり詳細にこれらの方法を記載する。
【１１３８】
本発明の方法に従い開発したＤＮａｓｅ分子の生物学的活性を測定するアッセイは、当該技術分野で周知である。例として、しかし本発明を限定するとは全く意味せずに、ヒトＤＮａｓｅＩのＤＮＡ－加水分解活性を測定するアッセイを本明細書に提示する。簡単に説明すると、２種類のプラスミド消化アッセイを使用する。第１アッセイ（「スーパーコイル化ＤＮＡ消化アッセイ」）は、スーパーコイル化二本鎖プラスミドＤＮＡの、弛緩した（ニック入り）、線状および分解形への転換を測定する。第２アッセイ（「線状ＤＮＡ消化アッセイ」）は、線状の二本鎖プラスミドＤＮＡの分解形への転換を測定した。具体的には、本発明の方法に従い調製したＤＮａｓｅを、２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．１、１００μｇ／ｍｌウシ血清アルブミン、１ｍＭ　$MgCl_2$、２．５ｍＭ　$CaCl_2$、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ中に、２５マイクログラム／ミリリットルのスーパーコイル化プラスミドＤＮＡまたはＥｃｏＲ　－消化線状化プラスミドＤＮＡのいずれかを含んでなる１６０マイクロリットルの溶液に加え、そしてサンプルを室温でインキューベーションする。様々な時間で、反応混合物のアリコートを取り出し、そして２５ｍＭ　ＥＤＴＡをキシレンシアノール、ブロモフェノールブルーおよびグリセロールと一緒に加えることにより止める。止めたサンプル中のプラスミドＤＮＡの完全性はアガロースゲルでのサンプルの電気泳動により分析する。電気泳動後、ゲルはエチジウムブロミドの溶液で染色し、そしてゲル中のＤＮＡを紫外線光により視覚化する。スーパーコイル形、弛緩形および線形のプラスミドＤＮＡの相対的量は、ゲルを蛍光造影機で走査し（モレキュラーダイナミックス（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ）モデル５７５ＦｌｕｏｒＩｍａｇｅｒ）、そしてゲルのバンド中の異なる状態に対応するＤＮＡ量を定量することにより決定する。

【１１３９】
Ｐ．インスリン
本発明はさらにインスリンの改造方法を含む。インスリンは、血中グルコースレベルを調節するために膵臓のベータ小島細胞がインスリンを生産しないＩ型糖尿病に最も効果的な処置であることは周知である。糖尿病の系統および非制御血中グルコースには、循環器系および足の問題、および失明、挙げることはしないが糖尿病の悪化からもたらされるか、または悪化のいずれかである他の様々な合併症を含む。
【１１４０】
ヒトインスリンのクローニングおよびシークエンシング以前は、ブタのインスリンが糖尿病の処置に使用された。インスリンは今では組換え的に生産されているが、成熟分子の短い、５１アミノ酸配列は多数のスルフィド結合を含んでなる複雑な構造である。インスリンを組換え的に生産する現在の方法は、健康な非－糖尿病個体で生産されるような天然なタンパク質との類似性を欠く生成物を生じる。本発明はこの弱点を修復することを試みる。
【１１４１】
ヒトインスリンのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号４３および配列番号４４に描かれている（それぞれ図６８Ａおよび６８Ｂ）。インスリンの変異体は当該技術分野を通して豊富に存在する。米国特許第６，３３７，１９４号明細書はインスリン融合タンパク質同族体を記載し、米国特許第６，３２３，３１１号明細書はジカルボン酸の環式無水物を含んでなるインスリン誘導体を記載し、そして米国特許第６，２５１，８５６号明細書は多数のアミノ酸置換および親油性基を含んでなるインスリン誘導体を記載する。当業者はインスリン誘導体の以下の例が網羅的では全くなく、単に当該技術分野で周知な誘導体の小さい実例を表すだけであると認識するだろう。したがって本発明は既知のおよびこれから見いだされるインスリン誘導体を含んでなる。
【１１４２】
インスリンを生産するための発現系は当該技術分野では周知であり、そして例えばＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９、モレキュラークローニング：ア　ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、ニューヨーク）に記載されているような分子生物学的技法を使用して行うことができる。
【１１４３】
本発明の方法に従い調製されたインスリン分子の機能性を測定するアッセイも、当該技術分野では周知である。例えばグルコース抑制のインビボモデルは、本発明の方法を使用して合成されたインスリンの生物学的活性を評価するために使用することができる。この目的に有用であるのはラットモデルである。動物は実験前に一晩絶食させ（１６時間）、次いでペントバルビタールナトリウムまたはケタミンのような他の適当な麻酔剤を腹腔内投与することにより麻酔をかける。各動物は特定のインスリン誘導体（２０μｇ／ｍｌ／ｋｇ）のｉ．ｖ．注射（尾の静脈）を受ける。血液サンプルは頸静脈から注射の１５および５分前、および注射から１５、３０、６０、９０、１２０、１８０および２４０分後に採血する。血中グルコースレベルは、種々の商業的提供源から入手可能な血液グルコースモニターで測定する。
【１１４４】
Ｑ．Ｂ型肝炎ワクチン（ＨＢｓＡｇ）
本発明はさらにＢ型肝炎ワクチン（ＨｂｓＡｇまたはＢ型肝炎ｓＡｇ）で使用する抗原を改造する方法を含んでなる。ＨＢｓＡｇはＢ型肝炎Ｓ－タンパク質の組換え的に生産される表面抗原であり、そしてＢ型肝炎ウイルス（とりわけ肝硬変および癌腫を含む肝臓疾患を引き起こす危険なウイルスを増やし、そして世界中で年間に百万人以上の死をもたらす）に対する免疫応答を誘導するために使用される。現在ＨＢｓＡｇワクチンは防御および中和免疫応答を誘導するために、６カ月間の間隔で３回投与される。
【１１４５】
現在、ＨＢｓＡｇは酵母株で生産され、したがって真菌に天然なグリコシル化パターン

を反映する。本発明はＨＢｓＡｇを改造するための方法を提供し、とりわけ改善された免疫原性、ウイルスに対して改善された親和性を有する抗体等をもたらす。

【１１４６】

Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢｓＡｇ）に由来するＳ－タンパク質の核酸および１次アミノ酸鎖配列は、本明細書中に配列番号４５および配列番号４６として説明する（それぞれ図６９Ａおよび６９Ｂ）。ヌクレオチドは１２０３塩基長である。アミノ酸は４００残基長である。最後の２２６アミノ酸残基は小さいＳ－抗原であり、これはグラクソスミスクライン（ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ）のワクチンおよびメルク（Ｍｅｒｃｋ）のワクチンに使用されている。小さいＳ－抗原から上流の５５個のアミノ酸はプレ－Ｓ出発コドンである。プレＳ＋Ｓ領域は中央Ｓ抗原であり、これはアベンティス　パスツール（Ａｖｅｎｔｉｓ　Ｐａｓｔｅｕｒ）のワクチンに使用されている。第１出発コドンからプレ－Ｓ出発コドンまでは残りのＳ－タンパク質を含んでなり、そして大きいＳ－タンパク質と呼ばれている。これはワクチンに使用されているＨＢｓＡｇの１例であるが、ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃ　Ｎｏ．に例示されているように他のサブタイプも周知である：ＡＦ４１５２２２、ＡＦ４１５２２１、ＡＦ４１５２２０およびＡＦ４１５２１９。本明細書に提示された配列は単に当該技術分野で知られているＨＢｓＡｇの例である。同様な抗原がＢ型肝炎ウイルスの他の株から単離され、そしてワクチン候補として抗原性および能力を評価されたかもしれないし、またはされなかったかもしれない。したがって本発明は既知の、または今後見いだされるＢ型肝炎ワクチンＳ－タンパク質表面抗原を包含する。

【１１４７】

発現系でのＨＢｓＡｇの発現は当業者には日常的な手順であり、そして例えば米国特許第５，８５１，８２３号明細書に記載されている。ワクチンの免疫原性に関するアッセイは当該技術分野では周知であり、そして中和抗体を生産するための種々の試験を含んでなり、そしてＥＬＩＳＡ、中和アッセイ、ウエスタンブロット、免疫沈降等のような技法を使用する。簡単に説明すると、効果的な抗－ＨＢｓＡｇ抗体を検出するためのサンドイッチＥＬＩＳＡが記載されている。Ｅｎｚｙｇｎｏｓｔ　ＨＢｓＡｇアッセイ（アベンティス　ベーリング（Ｂｅｈｒｉｎｇ）、キングオブプルシア、ペンシルバニア州）をそのような方法に使用する。ウェルは抗－ＨＢｓでコートされる。血清血漿または精製したタンパク質および適切な対照をウェルに加え、そしてインキューベーションする。洗浄後、ＨＢｓＡｇに対するペルオキシダーゼ－標識抗体を残りの抗原決定基と反応させる。非結合酵素－結合抗体を洗浄により除き、そして固体相上の酵素活性を当該技術分野で周知な方法により測定する。過酸化水素および発色源の酵素的に触媒される反応は、希釈した硫酸を加えることにより止める。色の強度はサンプルのＨＢｓＡｇ濃度に比例し、そして未知のサンプルの色の強度は、付随する負および正の対照血清の色の強度と分光的に比較することにより得られる。

【１１４８】

Ｒ．ヒト成長ホルモン

本発明はさらにヒト成長ホルモン（ＨＧＨ）の改造方法を包含する。ヒト下垂体で分泌されるＨＧＨのアイソフォームは、１９１個のアミノ酸からなり、そして約２１，５００の分子量を有する。胎盤で作られるＨＧＨのアイソフォームはグリコシル化形である。ＨＧＨは、とりわけ一次成長（ｌｉｎｅａｒ　ｇｒｏｗｔｈ）（体細胞発生）、哺乳期、マクロファージの活性化およびインスリン－様および糖尿病原性効果を含む正常なヒトの成長および発生の調節に大いに関与している。

【１１４９】

ＨＧＨは複雑なホルモンであり、そしてその効果は種々の細胞レセプターとの相互作用の結果として変動する。ＨＧＨを含んでなる組成物は臨床的な状況、特に萎縮発育症で使用されてきたが、効力は組換え的に生産されるＨＧＨのグリコシル化構造により制限されている。

【１１５０】

ＨＧＨの核酸およびアミノ酸配列は、本明細書で配列番号４７および配列番号４８とし

ていたるところに説明する（それぞれ図７０Ａおよび７０Ｂ）。当業者はＨＧＨの変異体、誘導体および突然変異体が周知であることを認識している。例は１０、１４、１８、２１、１６７、１７１、１７４、１７６および１７９位のアミノ酸残基が置換されている米国特許第６，１４３，５２３号明細書に見いだすことができ、そして米国特許第５，９６２，４１１号明細書はＨＧＨのスプライス変異体を記載する。本発明は、当該技術分野で知られている、またはこれから見いだされるこのようなＨＧＨ変異体を包含する。

【１１５１】

組換え細胞中でのＨＧＨの発現法は、例えば米国特許第５，７９５，７４５号明細書に記載されている。とりわけ原核、真核、昆虫細胞系、植物、およびインビトロ翻訳系でのＨＧＨの発現法は、当該技術分野では周知である。

【１１５２】

本発明の方法を使用して生産したＨＧＨ分子は、活性について当業者に知られてる様々な方法を使用してアッセイすることができる。例えば米国特許第５，７３４　０２４号明細書は、発現したＨＧＨの生物学的機能を測定する方法を記載する。

【１１５３】

Ｓ．抗体

本発明はさらに、キメラＴＮＦＲ、キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ、キメラ抗－ＨＥＲ２、キメラ抗－ＲＳＶ、キメラ抗－ＣＤ２０およびキメラ抗－ＴＮＦを含む種々のキメラ抗体調製物を改造する方法を含んでなる。キメラ抗体調製物は、ＩｇＧ抗体に由来するヒトのＦｃ部分および抗原に特異的なモノクローナル抗体に由来する可変領域を含んでなる。他の調製物はレセプター、例えばヒトＩｇＧＦｃ部分に融合した７５ｋＤａのＴＮＦレセプターを含んでなる。これらの分子はさらに、ヒトおよびマウスに由来する軽および重鎖を含んでなるＦａｂフラグメントを含む。キメラＴＮＦＲは、慢性関節リウマチのような炎症性疾患の処置に有用である。キメラ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａは、心臓異常、血液凝固および血小板機能障害の処置に有用である。キメラ抗－ＨＥＲ２は胸部癌の処理として有用であり、キメラ抗－ＲＳＶは呼吸合胞体ウイルスの処理に有用であり、キメラ抗－ＣＤ２０は非－ホジキンリンパ腫の処置に有用であり、そしてキメラ抗－ＴＮＦはクローン病の処置に有用である。

【１１５４】

これらのキメラ抗体は変動する疾患の管理に有用であることが示されたが、齧歯類細胞で生産された組換えタンパク質の比較的短い半減期により、投与はかなり頻繁で、しかもかなり高用量でなければならない。キメラ抗体のほとんどがヒトであり、したがって免疫系により「自己」とみなされると同時に、それらは天然ではないグリコシル化パターン故に分解、そして破壊される。本発明はこの問題を修復し、これら新規薬剤の効力を大いに上昇させることを提案する。

【１１５５】

抗体およびそれらの作成法

本明細書で使用する用語「抗体」は、抗原上の特異的なエピトープに特異的な結合することができる免疫グロブリン分子を称する。抗体は天然な供給源に由来するか、または組換え源に由来する完全な免疫グロブリンであることができ、そして完全な免疫グロブリンの免疫反応性部分であることができる。抗体は典型的には免疫グロブリン分子の四量体である。本発明の抗体は、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Ｆｖ、ＦａｂおよびＦ（ａｂ）$_2$を含む種々の形態、ならびに一本鎖抗体およびヒト化抗体で存在することができる（Ｈａｒｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９，抗体を使用して（Ｕｓｉｎｇ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）：ア　ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、ニューヨーク州；Ｈａｒｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９，抗体：アラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク；Ｈｏｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５：５８７９－５８８３；Ｂｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ２４２：４２３－４２６）。

【１１５６】
本明細書で使用する用語「合成抗体」とは、例えば本明細書に記載するバクテリオファージにより発現された抗体のような組換えＤＮＡ技法を使用して作成された抗体を意味する。この用語は抗体をコードするＤＮＡ分子の合成により作成された抗体を意味すると解釈され、そしてこのＤＮＡ分子が抗体ペプチドまたは抗体を特定するアミノ酸配列を発現し、ここでＤＮＡまたはアミノ酸配列は当該技術分野で利用可能で、しかも周知な合成ＤＮＡまたはアミノ酸配列技法を使用して得られた。
【１１５７】
ペプチドの完全長またはペプチドフラグメントまたはペプチドに対するモノクローナル抗体は、例えばＨａｒｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８，抗体：ア　ラボラトリーマニュアルで、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州）、およびＴｕｓｚｙｎｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８，Ｂｌｏｏｄ，７２：１０９－１１５）に記載されているような周知のモノクローナル抗体調製手順を使用して調製することができる。望ましいペプチドの量は、化学的合成技法を使用しても合成することができる。あるいは所望するペプチドをコードするＤＮＡをクローン化し、そして大量のペプチドを作成するために適する細胞中で適当なプロモーター配列から発現させることができる。ペプチドに対するモノクローナル抗体は、本明細書で参照にしたような標準的な手順を使用して、ペプチドで免疫感作したマウスから作成する。
【１１５８】
本明細書に記載した手順を使用して得たモノクローナル抗体コードする核酸は、当該技術分野で利用可能であり、そして例えばＷｒｉｇｈｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２，Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｒｅｖ．ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２（３，４）：１２５－１６８およびそこに引用されている参考文献に記載されている技術を使用してクローン化し、そして配列決定することができる。さらに本発明の抗体はＷｒｉｇｈｔ　ｅｔ　ａｌ．，（同上）およびそこに引用されている参考文献、およびＧｕ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７，Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ　ａｎｄ　Ｈｅｍａｔｏｃｙｓｔ　７７（４）：７５５－７５９）に記載されている技術を使用して「ヒト化」することができる。
【１１５９】
ファージ抗体ライブラリーを作成するために、ｃＤＮＡライブラリーを最初に細胞、例えば発現すべき所望のペプチドを、例えば所望の抗体をファージ表面に発現するハイブリドーマから単離したｍＲＮＡから得る。ｍＲＮＡのｃＤＮＡコピーを逆転写酵素により生産する。免疫グロブリンフラグメントを特定するｃＤＮＡはＰＣＲにより得、そして生成したＤＮＡを適当なバクテリオファージベクターにクローン化して、免疫グロブリン遺伝子を特定するＤＮＡを含んでなるバクテリオファージのＤＮＡライブラリーを作成する。ヘテロロガスなＤＮＡを含んでなるバクテリオファージのライブラリーを作成する手順は当該技術分野では周知であり、そして例えばＳａｍｂｒｏｏｋ　ａｎｄ　Ｒｕｓｓｅｌｌ（２００１、モレキュラークローニング：ア　ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州）に記載されている。
【１１６０】
所望する抗体をコードするバクテリオファージは、その対応する結合ペプチド、例えば抗体が向けられる抗原に結合できる様式で、ペプチドがその表面上で表示されるように工作することができる。このように特異的な抗体を発現するバクテリオファージが対応する抗原を発現する細胞の存在下でインキューベーションされる時、バクテリオファージは細胞に結合するだろう。抗体を発現しないバクテリオファージは細胞に結合しない。そのような難しい（ｐａｎｎｉｎｇ）技術は当該技術分野では周知であり、そして例えばＷｒｉｇｈｔ　ｅｔ　ａｌ．，（同上）に記載されている。
【１１６１】
上記のような方法はＭ１３バクテリオファージ表示を使用してヒト抗体を生産するために開発された（Ｂｕｒｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４，Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５７：１９１－２８０）。本質的に、ｃＤＮＡライブラリーは抗体－生産細胞の１群から得た

ｍＲＮＡから作成する。ｍＲＮＡは再配列した免疫グロブリン遺伝子をコードし、そしてすなわちｃＤＮＡはそれをコードする。増幅したｃＤＮＡをＭ１３発現ベクターにクローン化して、表面上にヒト抗体フラグメントを発現するファージのライブラリーを作成する。問題の抗体を表示するファージは抗原の結合により選択し、そして細菌中で増殖させて可溶性のヒト免疫グロブリンを生産させる。このように従来のモノクローナル抗体合成とは対照的に、この手順はヒト免疫グロブリンを発現する細胞ではなくヒト免疫グロブリンをコードするＤＮＡを不滅化する。

【１１６２】

抗体分子のグリカンの改造

ペプチドの１クラス、すなわち免疫グロブリンの特異的なグリコシル化は、これらペプチドの生物学的活性に特に重要な効果を有する。本発明はＩｇＧクラスの免疫グロブリンのみに限定されると解釈すべきではなく、抗体のＩｇＡ、ＩｇＥおよびＩｇＭクラスの免疫グロブリンも含むと解釈すべきである。

【１１６３】

さらに本発明は任意の型の伝統的な抗体構造のみに限定されると解釈すべきではない。むしろ本発明は例えば抗体のフラグメント、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体等を含むすべての型の抗体分子を含むと解釈すべきである。

【１１６４】

典型的な免疫グロブリン分子は、エフェクタータンパク質および抗原結合部分を含んでなる。免疫グロブリンの総説に関しては、；Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，１９８８，抗体：ア ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、およびＨａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，１９９９，抗体を使用して：ア ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、ニューヨーク州を参照にされたい。免疫グロブリン分子のエフェクター部分は分子のＦｃ部分に存在し、そして免疫グロブリンのそのコグネイト細胞レセプターへの効率的結合に一部、寄与している。免疫グロブリン分子、特に分子のＦｃ部分のＣＨ２ドメイン中の不適切なグリコシル化は、免疫グロブリンの生物学的活性に影響を及ぼす。

【１１６５】

免疫グロブリンＩｇＧに関してさらに具体的には、ＩｇＧエフェクター機能は大部分、ＩｇＧがＩｇＧ分子のＣＨ２ドメイン中のアスパラギン（Ａｓｎ）２９７でＮ－グルカンのトリマンノシルコアの分岐マンノースの４－Ｏ位に結合したＮ－アセルチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）残基を含むか否かに支配されている。この残基は「バイセクティング（ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ）ＧｌｃＮＡｃ」として知られている。バイセクティングＧｌｃＮＡｃを天然なまたは組換えＩｇＧ分子もしくはＩｇＧ－Ｆｃ含有キメラ構築物のＮ－グリカン鎖に加える目的は、分子のＦｃ部分のＦｃ免疫エフェクター機能を至適化することにある。そのようなエフェクター機能には、抗体－依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）およびＦｃγＲレセプターへの効率的結合を必要とする他の生物学的効果、および補体のＣ１成分への結合を含むことができる。ＩｇＧ分子の最大の免疫エフェクター機能を達成するために、バイセクティングＧｌｃＮＡｃの重要性が記載された（Ｌｉｆｅｌｙ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ ５（８）：８１３－８２２；Ｊｅｆｆｒｉｓ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２６８（３）：５２９－５３７）。

【１１６６】

ＩｇＧ分子のＣＨ２ドメインのＡｓｎ２９７のＮ－グリコシル化部位に見いだされるグリカンは、ヒトおよび動物血漿中で循環中していることが分かったＩｇＧ分子、骨髄腫細胞、ハイブリドーマ細胞および種々のトランスフェクトされた不死化哺乳動物および昆虫細胞系により生産されるＩｇＧについて構造的に特性が決定された。すべての場合でＮ－グリカンは高マンノース鎖または完全（Ｍａｎ３、ＧｌｃＮＡｃ４、Ｇａｌ２、ＮｅｕＡｃ２、Ｆｕｃｌ）またはバイセクティングＧｌｃＮＡｃを持つか持たない可変性の不完全な２アンテナ鎖のいずれかである（Ｒａｊｕ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １０（５）：４７７－４８６；Ｊｅｆｆｒｉｓ ｅｔ ａｌ．，１９９８，

Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ．Ｒｅｖ．１６３Ｌ５９－７６；Ｌｅｒｏｕｇｅ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３８：３１－４８；Ｊａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ１３：５９２－５９６）。

【１１６７】

本発明はインビトロでカスタマイズされたグリコシル化免疫グロブリン分子を提供する。免疫グロブリン分子は限定するわけではないが、モノクローナル抗体、合成抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体等を含む任意の免疫グロブリン分子でよい。抗体分子を生成し、そしてそれらを特徴付けるための具体的方法は、本明細書のいたるところに記載する。好ましくは免疫グロブリンはＩｇＧであり、そしてより好ましくはＩｇＧはヒト化またはヒトＩｇＧ、最も好ましくはＩｇＧ１である。

【１１６８】

本発明は、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）をＩｇＧ分子のＣＨ２ドメインのＡｓｎ２９７でＮ－グリカンのトリマンノシルコアの分岐マンノースの４－Ｏ位にグリコシド結合で連結するために、インビトロの試薬としてβ１，４－マンノシル－糖ペプチドβ１，４－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、ＧｎＴ－ＩＩＩ：ＥＣ２．４．１．１４４を使用することを具体的に意図している。しかし本明細書に提供される開示から、本発明がバイセクティングＧｌｃＮＡｃを免疫グロブリン分子に提供するためにこの酵素の使用だけを含むと解釈すべきではないことは明らかである。むしろ抗体分子のグリコシル化パターンは、抗体分子が強化された生物学的活性、すなわち他の特性、例えば安定性等の強化の可能性に加えて、エフェクター機能を有するように調節することが可能であることが見いだされた。

【１１６９】

本発明では、Ｆｃ－ガンマＲＩＩＩＡへの結合を強化し、そして強化された抗体－依存性細胞傷害性を目的として、Ａｓｎ（２９７）Ｎ－結合グリカンからフコース分子を除去する一般的方法を提供する（Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７：２６７３３－２６７４０を参照にされたい）。この方法は抗体分子を、抗体グリカン（１つまたは複数）上のフコース分子（１つまたは複数）の結合に適当なフコシダーゼと接触させることを必要とする。あるいは組換え抗体を、ＣＨＯ細胞のＬｅｃ１３変異体のようなフコシルトランスフェラーゼを発現する細胞で発現させることができる。抗体のグリカン（１つまたは複数）からのフコースの除去は単独で、あるいはバイセクティングＧｌｃＮＡｃを付加するような他のグリカン改造方法と組み合わせて行うことができる。ＧｎＴ－Ｉを欠く細胞中での抗体の発現もコアフコースを欠いたＦｃグリカンを生成し、これは本発明によりさらに修飾することができる。

【１１７０】

本発明では、ＣＨ２ドメイン中、多くはＡｓｎ２９７でＮ－結合オリゴ糖を含むＩｇＧ分子の調製物において、Ｆｃ免疫エフェクター機能を強化する目的で、バイセクティングＧｌｃＮＡｃの一般的導入法を提供する。この方法ではＩｇＧ分子の群は、グリカン鎖がＧｎＴ－ＩＩＩの受容体となるようなグリコシル化の状態になることが必要である。これは３つの方法の任意の１つにより達成される：１）ＧｎＴ－ＩＩＩの基質であるＮ－グリカン鎖を持つＩｇＧを分泌する宿主発現系の選択または遺伝子操作による；２）エキソグリコシダーゼ処理後に残るグリカン構造（１つまたは複数）がＧｎＴ－ＩＩＩの受容体となるような、ＩｇＧグリコフォーム群をエキソグリコシダーゼで処理することによる；３）上記１）および２）におけるような宿主選択およびエキソグリコシダーゼ処理の幾つかの組み合わせに加えて、ＧｎＴ－ＩＩＩの受容体を作成するためにＧｎＴ－ＩおよびＧｎＴ－ＩＩによる連続的なＧｌｃＮＡｃの付加。

【１１７１】

例えばニワトリの血漿から得たＩｇＧは主に高マンノース鎖を含有し、そしてＧｌｃＮＡｃをトリマンノシルコアのα１，３マンノース枝にＧｎＴ－Ｉにより付加するための基質を作成するためには、１以上のα－マンノシダーゼで消化する必要がある。この基質は基本的なトリマンノシルコア、Ｍａｎ３ＧｌｃＮＡｃ２であることができる。このコア構

造をＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃを糖供与体として使用して、ＧｎＴ－Ｉ、続いてＧｎＴ－ＩＩ、続いてＧｎＴ－ＩＩＩで順次処理することにより、図２に示すようなＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ５を生成する。場合によりこの構造はβ１，４ガラクトシルトランスフェラーゼを用いた処理により延長することができる。必要ならばガラクトシル化オリゴ糖は、α２，３－またはα２，６－シアリルトランスフェラーゼを用いてさらに延長して、完全な２アンテナ状構造を達成することができる。この方法を使用して、２アンテナ状グリカン鎖は、開発中の任意の治療用ＩｇＧの最適なＦｃ免疫エフェクター機能に必要性であるように改造することができる（図４）。

【１１７２】

あるいはほとんどの動物の血漿中に見いだされるＩｇＧ分子、またはほとんどの動物細胞によるもしくはトランスジェニック動物による組換え産物として分泌されるＩｇＧは、多くは完全な（ＮｅｕＡｃ２、Ｇａｌ２、ＧｌｃＮＡｃ４、Ｍａｎ３、±Ｆｕｃｌ）（図４）およびバイセクティングＧｌｃＮＡｃを含むかまたは含まない変動性の不完全な形態を含む２アンテナ状グリコフォームのスペクトルを含む（Ｒａｊｕ ｅｔ ａｌ．，２００，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １０（５）：４７７－４８６；Ｊｅｆｆｒｉｓ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖ．１６３：５９－７６）。バイセクティングＧｌｃＮＡｃがそのように生産された免疫グロブリン分子の群全体に存在することを確実とするために、分子の混合物を以下のエキソグリコシダーゼと連続的に、または混合物で処理することができる：ノイラミニダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコサミニダーゼ、α－フコシダーゼ。生成したトリマンノシルコアは次いで上記のようにグリコシルトランスフェラーゼを使用して改造することができる。

【１１７３】

さらにトランスジェニック動物により分泌されるか、またはトランスジェニック植物により「植物体」として貯蔵されるＩｇＧを特性決定した。β１，２結合キシロースおよび／またはα１，３結合フコースを含むＮ－グリカンを有するトランスジェニック植物中で生産されるＩｇＧ分子は、トリマンノシルコアまたはＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ４構造を作成するために上記エキソグリコシダーゼに加えて、エキソグリコシダーゼで処理してそれら残基を除去することができ、次いでそれらをグリコシルトランスフェラーゼで処理して上記のようにＮ－グリカンを改造する。

【１１７４】

本発明の主な新規観点は、事前のエキソグリコシダーゼ処理を含むか、または含まずに、抗体のエフェクター機能を至適化するために正しい順序で適用される、適切なグリコシルトランスフェラーゼの適用である。１つの例示態様では、バイセクティングＧｌｃＮＡｃは、バイセクティングＧｌｃＮＡｃが必要なＩｇＧ分子または他のＩｇＧ－Ｆｃ－キメラ構築物のグリカンに導入される。別の例示態様では、コアフコースがＩｇＧ分子または他のＩｇＧ－Ｆｃ－キメラ構築物のグリカンから除去される。

【１１７５】

ＴＮＦレセプター－ＩｇＧ　Ｆｃ融合タンパク質

７５ｋＤａのヒトＴＮＦレセプターのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、本明細書でそれぞれ配列番号３１および配列番号３２として説明する（それぞれ図７１Ａおよび７１Ｂ）。キメラ抗－ＨＥＲ２の軽および重可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号３５および配列番号３６として説明する（それぞれ図７２Ａおよび７２Ｂ）。キメラ抗－ＲＳＶの軽および重可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号３８および配列番号３７として説明する（それぞれ図７３Ａおよび７３Ｂ）。抗－ＴＮＦの非－ヒト可変領域のアミノ酸配列を、本明細書中でそれぞれ配列番号４１および配列番号４２として説明する（それぞれ図７４Ａおよび７４Ｂ）。ヒトＩｇＧのＦｃ部分のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、配列番号４９および配列番号５０として説明する（それぞれ図７５Ａおよび７５Ｂ）。

【１１７６】

ＭＡｂ抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ

マウス抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体の可変領域のアミノ酸配列を、配列番号５２（マウス成熟可変軽鎖、図７６）および配列番号５４（マウス成熟可変重鎖、図７７）で説明する。これらのマウス配列は、米国特許第５，７７７．０８５号明細書に見いだされる手順に従い、ヒトＩｇＧアミノ酸配列の配列番号５１（ヒト成熟可変軽鎖、図７８）、配列番号５３（ヒト成熟可変重鎖、図７９）、配列番号５５（ヒト軽鎖、図８０）および配列番号５６（ヒト重鎖、図８１）と組み合わせて、キメラヒト化マウス抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体を作成することができる。他の抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａヒト化抗体は、米国特許第５，８７７，００６号明細書に見いだされる。抗－糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩＩａ　ＭＡｂ　７Ｅ３を発現する細胞系は、ＡＴＣＣ（マナッサス、バージニア州）から寄託番号ＨＢ－８８３２で商業的に得ることができる。

【１１７７】

ＭＡｂ抗－ＣＤ２０

キメラ抗－ＣＤ２０抗体の核酸およびアミノ酸配列は、配列番号５９（マウス可変領域軽鎖の核酸配列、図８２Ａ）、配列番号６０（マウス可変領域軽鎖のアミノ酸配列、図８２Ｂ）、配列番号６１（マウス可変領域重鎖の核酸配列、図８３Ａ）および配列番号６２（マウス可変領域重鎖のアミノ酸配列、図８３Ｂ）に説明する。マウス抗体をヒト化するために、ヒトＩｇＧ重および軽定常ドメインを含むＴＣＡＥ８（配列番号５７、図８４Ａ－８４Ｅ）を都合よく使用することができる。上記マウス可変領域コードＤＮＡを、米国特許第５，７３６，１３７号明細書に与えられた使用説明に従いＴＣＡＥ８ベクターにクローニングすることにより、哺乳動物細胞系で形質転換した時、キメラ抗－ＣＤ２０抗体を発現するベクターが作成される（配列番号５８、図８５Ａ－８５Ｅ）。他のヒト化抗－ＣＤ２０抗体は、米国特許第６，１２０，７６７号明細書に見いだされる。抗－ＣＤ２０ＭＡｂ　Ｃ２７３を発現する細胞系は、ＡＴＣＣ（マナッサス、バージニア州）から寄託番号ＨＢ－９３０３で商業的に得ることができる。

【１１７８】

当業者は本明細書中で説明する配列が網羅的ではなく、むしろ可変領域、レセプターおよび他のキメラ抗体の結合部分の例であると直ちに考えるだろう。さらにキメラまたは「ヒト化」抗体を構築するための方法は当該技術分野では周知であり、そして例えば米国特許第６，３２９，５１１号および同第６，２１０，６７１号明細書に記載されている。本開示および当該技術分野を通して周知な方法と組み合わせて、当業者は本発明が本明細書に開示した配列に限定されないことを認識するだろう。

【１１７９】

キメラ抗体の発現は当該技術分野では周知であり、そして例えば米国特許第６，３２９，５１１号明細書に詳細に記載されている。発現系は原核、真核等であることができる。さらにバキュロウイルス発現系を使用した昆虫細胞でのキメラ抗体の発現が、Ｐｕｔｌｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０．Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　８：６５１－６５４）に記載されている。したがって融合またはキメラタンパク質をコードする核酸の発現法は当該技術分野では周知であり、そして例えばＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（２００１、モレキュラークローニング：ア　ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、ニューヨーク）およびＡｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７、分子生物学の現在のプロトコール、グリーン＆ウィリー、ニューヨーク）に記載されている。

【１１８０】

本発明の方法に従い生産されたキメラ抗体の機能および生物学的活性の測定は、当業者には同様に基本的操作である。競合アッセイによる抗体の親和性を決定する方法は、Ｂｅｒｚｏｆｓｋｙ（Ｊ．Ａ．Ｂｅｒｚｏｆｓｋｙ　ａｎｄ　Ｉ．Ｊ．Ｂｅｒｋｏｗｅｒ、１９８４、基本的免疫学（Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）、（Ｗ．Ｅ．Ｐａｕｌ編集）、ラベン（Ｒａｖｅｎ）出版（ニューヨーク）、５９５）に詳細に記載されている。簡単に説明すると、キメラ抗体の親和性はそれが由来するモノクローナル抗体の親和性と、放射－ヨード化モノクローナル抗体を使用して比較する。

【１１８１】
ＶＩＩ．製薬学的組成物
別の観点では、本発明は製薬学的組成物を提供する。製薬学的組成物には、製薬学的に許容され得る希釈剤および天然には存在しない、水溶性ポリマー、治療部分または生体分子とグリコシル化または非グリコシル化ペプチドとの間の共有結合物を含む。ポリマー、治療部分または生体分子は、ペプチドとポリマー、治療部分または生体分子との間に挿入され、そして両方を共有結合する完全なグリコシル連結基を介してペプチドに結合される。
【１１８２】
本発明の製薬学的組成物は様々な薬剤送達系での使用に適している。本発明での使用に適する製剤は、レミングトンの製薬科学（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ）、メース（Ｍａｃｅ）出版社、フィラデルフィア、ペンシルバニア州、第１７版、（１９８５）に見いだせる。薬剤送達に関する方法の簡単な総説については、Ｌａｎｇｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ２４９：１５２７－１５３３（１９９０）を参照にされたい。
【１１８３】
製薬学的組成物は、例えば局所、経口、鼻、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下または筋肉内を含む任意の適切な投与様式に配合することができる。皮下注射のような非経口投与には、担体は好ましくは水、塩水、アルコール、脂肪、蝋またはバッファーを含んでなる。経口投与には任意の上記の担体またはマンニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、シュクロースおよび炭酸マグネシウムのような固体担体を使用することができる。生分解性微小球（例えばポリラクテートポリグリコレート）を本発明の製薬学的組成物に担体として使用することもできる。適当な生分解性微小球は、例えば米国特許第４，８９７，２６８号および同第５，０７５，１０９号明細書に開示されている。
【１１８４】
一般に製薬学的組成物は非経口的、例えば静脈内に投与される。すなわち本発明は許容されうる担体、好ましくは水性担体、例えば水、緩衝化水、塩水、ＰＢＳ等に溶解または懸濁された化合物を含んでなる非経口投与用の組成物を提供する。組成物はｐＨ調整および緩衝化剤、張性調節剤、湿潤剤、界面活性剤等のような生理学的状態に近づけるため必要な製薬学的に許容され得る補助物質を含むことができる。
【１１８５】
これらの組成物は通例の滅菌技術により滅菌することができ、または滅菌濾過してもよい。生成した水溶液はそのまま使用するために包装されることができ、または凍結乾燥され、凍結乾燥された調製物は滅菌水性担体と投与前に合わせられる。調製物のｐＨは典型的には３から１１の間、より好ましくは５から９、そして最も好ましくは７から８である。
【１１８６】
幾つかの態様では、本発明のペプチドは標準的な小胞－形成脂質から形成されたリポソームに包含することができる。様々な方法が、例えばＳｚｏｋａ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｙｓ．Ｂｉｏｅｎｇ．９：４６７（１９８０）、米国特許第４，２３５，８７１号、同第４，５０１，７２８号および同第４，８３７，０２８号明細書に記載されているようにリポソームを調製するために利用可能である。様々な標的化剤（例えば本発明のシアリルガラクトシド）を使用したリポソームの標的化は当該技術分野で周知である（例えば米国特許第４，９５７，７７３号および同第４，６０３，０４４号明細書を参照にされたい）。
【１１８７】
標的化剤をリポソームにカップリングする標準的な方法を使用することができる。これらの方法は一般に、標的化剤の結合を活性化することができるホスファチジルエタノールアミンのような脂質成分、または本発明の脂質－誘導化ペプチドのような誘導化された親

油性化合物のリポソームへの包含が関与する。

【１１８８】

標的化メカニズムは一般に、標的部分が標的、例えば細胞表面レセプターとの相互作用に利用できるような様式で、標的化剤をリポソームの表面上に配置することが必要である。本発明の炭水化物は当業者に既知の方法（例えば炭水化物上に存在するヒドロキシル基の、長鎖アルキルハライドまたは脂肪酸を用いたそれぞれアルキル化またはアシル化）を使用して、リポソームが形成される前に脂質分子に結合することができる。あるいはリポソームはコネクター部分を最初に、膜を形成する時点で膜に包含させるような様式に工夫することができる。コネクター部分は親油性部分を持たなければならず、コネクター部分は膜中に堅く包埋され、そしてしっかり固定される。これはまた反応性部分を持たなければならず、反応性部分はリポソームの水性表面上で化学的に利用可能である。反応性部分はこれが安定な化学結合を後に加える標的化剤または炭水化物と形成するために、化学的に適するように選択される。場合により標的剤をコネクター分子に直接付けることも可能であるが、ほとんどの場合で化学的ブリッジとして作用するための第３分子を使用することが適当であり、すなわち膜中にあるコネクター分子を、３次元的に小胞表面から離れて伸びる標的剤または炭水化物に連結する。本発明のペプチドの投与の投薬範囲は、免疫応答の症状がある程度の抑制を示す、所望する効果を生じるために十分に多い量である。投薬用量は副作用を引き起こすほど多くてはならない。一般に投薬用量は動物の年齢、状態、性別および疾患の程度で変動し、そして当業者により決定され得る。投薬用量は反対の徴候の出来事で、個々の医師により調整されることができる。

【１１８９】

さらなる製薬学的方法を使用して、作用期間を制御することができる。放出制御調製物は、結合物に対するポリマーの使用、複合体、またはペプチドの吸収により達成することができる。制御された送達は、適当な高分子（例えばポリエステル、ポリアミノカルボキシメチルセルロースおよび硫酸プロタミン）および高分子の濃度ならびに放出を制御するための包含法を選択することにより果たすことができる。放出制御調製物により作用期間を制御するための別の可能な方法は、ペプチドをポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ（乳酸）またはエチレンビニル酢酸コポリマーのようなポリマー性材料の粒子に包含させることである。

【１１９０】

ペプチドを血漿タンパク質の結合から保護するために、ペプチドはコアセルベーション法により、または界面重合法により調製したマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン－マイクロカプセルおよびポリ（メチメタクリレート）マイクロカプセルに、あるいはコロイド状薬剤送達系、例えばリポソーム、アルブミン微小球、ミクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセルに、またはマクロエマルジョンに封入することが好適である。そのような教示は、レミングトンの製薬科学（第１６版、Ａ．Ｏｓｌｏ編集、マック、イーストン、ペンシルバニア州、１９８０）に開示されている。

【１１９１】

本発明のペプチドは、高分子量複合体、ナノカプセル、微小球またはビーズ状の合成または天然のポリマー、および水中油型のエマルジョン、ミセル、混合ミセル、リポソームおよび再封入赤血球（ｒｅｓｅａｌｅｓ　ｅｒｙｔｈｒｏｃｙｔｅ）を含む脂質に基づく系、のような標的可能な薬剤送達系での使用によく適している。これらの系は集合的にコロイド状薬剤送達系として知られている。典型的にはそのような分散したペプチドを含有するコロイド状粒子は、直径約５０ｎｍ～２μｍである。コロイド状粒子のサイズは、それらが注射によるように静脈内に、またはエーロゾルとして投与できるようにする。コロイド系の調製物に使用する材料は典型的には、濾過滅菌を介して滅菌可能な、非毒性の、生分解可能な、例えばアルブミン、エチルセルロース、カゼイン、ゼラチン、レシチン、リン脂質およびダイズ油である。ポリマー性のコロイド系はマイクロカプセル化のコアセルベーションに類似する方法により調製される。

【１１９２】
例示態様では、ペプチドは標的化送達系として使用するリポソームの成分である。リン脂質が水性媒質にゆるやかに分散した時、それらは膨潤し、水和し、そして脂質二重層を分ける水性媒質の層を含むマルチラメラ同心二重層小胞（ｍｕｌｔｉｌａｍｅｌｌａｒ ｃｏｎｃｅｎｔｒｉｃ ｂｉｌａｙｅｒ ｖｅｓｉｃｌｅ）を天然に形成する。そのような系は通常、多重層リポソームまたは多重層小胞（ＭＬＶ）と呼ばれ、そして約１００ｎｍから約４μｍの範囲の直径を有する。ＭＬＶが超音波処理される時、直径が約２０～約５０ｎｍの範囲の小１枚膜リポソーム（ＳＵＶＳ）が形成され、これはＳＵＶのコアに水溶液を含む。
【１１９３】
リポソーム生成に有用な脂質の例には、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルエタノールアミンのようなホスファチジル化合物を含む。特に有用であるのは、ジアシルホスファチジルグリセロールであり、ここで脂質部分は１４～１８個の炭素原子、特に１６～１８個の炭素原子を含み、そして飽和されている。具体的例のリン脂質には卵のホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンを含む。
【１１９４】
本発明のペプチドを含有するリポソームの調製では、ペプチドのカプセル化効率、ペプチドの不安定性（ｌａｂｉｌｉｔｙ）、生成されるリポソーム群の均一性およびサイズ、ペプチド－対－脂質比、調製物の浸透不安定性、および製剤の製薬学的な許容性のような変数を考慮すべきである。Ｓｚｏｋａ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃｓ ａｎｄ Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，９：４６７（１９８０）；Ｄｅａｍｅｒ，ｅｔ ａｌ．，リポソーム（ＬＩＰＯＳＯＭＥ）で、マルセルデッカー、ニューヨーク、１９８３、２７：Ｈｏｐｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓ．Ｌｉｐｉｄｓ，４０：８９（１９８６）。
【１１９５】
本発明のペプチドを含有する標的化送達系は、宿主、特に哺乳動物宿主に、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、血管内、局所的、空隙内、経皮的、鼻内、および吸入のような種々の方法で投与することができる。ペプチドの濃度は特定の応用、疾患の性質、投与頻度等により変動するだろう。標的化送達系－カプセル化ペプチドは、適当な他の化合物および水性の生理学的に許容され得る媒体、例えば塩水、リン酸緩衝化生理食塩水等を含んでなる製剤で提供され得る。
【１１９６】
本発明の方法により調製された化合物は、診断試薬としても使用を見いだすことができる。例えば標識した化合物は炎症を有することが疑われる患者の炎症または腫瘍の転移の領域を決めるために使用することができる。この使用のために、化合物は^{125}Ｉ、^{14}Ｃまたはトリチウムで標識することができる。
【１１９７】
実験例
本発明をこれから以下の実施例を参照にして記載する。これらの実施例は具体的説明の目的のみに提供し、そして本発明がこれらの実施例に限定されるべきでは全くなく、むしろ本明細書に提供する教示の結果として明らかになるありとあらゆる変更を包含すると解釈すべきである。
【１１９８】
Ａ．グリコシル化
この実施例で提示するこの実験に使用する材料および方法をこれから記載する。
【１１９９】
１．ＴＰ１０のシアリル化およびフコシル化
この実施例は、シアリルルイスＸ部分を用いたＴＰ１０の調製および強化された生物学的活性の分析を説明する。

【１２００】
脳への血流を妨害することはたとえ短時間でも、大脳組織傷害を悪化させ得る大脳の微小血管内に炎症性の反応を誘発する可能性がある。天然に生じる組織傷害は、炎症および凝固カスケードの両方の活性化により増幅する。発作のマウスモデルでは、Ｐ－セレクチンおよびＩＣＡＭ－１の発現増加が白血球の動員（ｒｅｃｒｕｉｔｍｅｎｔ）を促進する。ｓＣＲ１は補体受容体－１（ＣＲ－１）の細胞外ドメインの組換え形である。ｓＣＲ－１は補体活性化の有力なインヒビターである。ｓＣＲ１ｓＬｅ^{X}（ＣＤ２０）は、選択的に（ａｌｔｅｒｎａｔｅｌｙ）グリコシル化されてシアリル化ルイス^{X}抗原を表示する選択的にグリコシル化されたｓＣＲ１形態である。以前は、工作されたＬｅｃ１１　ＣＨＯ細胞中でインビボで発現され、そしてグリコシル化されたｓＣＲ－１ｓＬｅＸが虚血性の大脳微小血管およびＣ１ｑ－発現ニューロンに正しく局在することが見いだされ、これにより好中球および血小板の蓄積を阻害し、そして大脳の梗塞容量を減少させた（Ｈｕａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８５：５９５－５９９）。本実施例では、グリカンを改造することによりインビトロで調製されたｓＣＲ１ｓＬｅ^{X}が、インビボでグリコシル化されたｓＣＲｓＬｅ^{X}と同様の強化された生物学的活性を現した。
【１２０１】
ＴＰ１０ペプチドはＤＵＫ　Ｂ１１　ＣＨＯ細胞で発現された。このＣＨＯ細胞系は典型的なＣＨＯ細胞のグリコシル化を有するＴＰ１０ペプチドを生産し、すべてではないが多くのグリカンがシアル酸でキャップされている。
【１２０２】
６６ｍｇのＴＰ１０のシアリル化。ＴＰ１０（２．５ｍｇ／ｍＬ）、ＣＭＰＳＡ（５ｍＭ）およびＳＴ３Ｇａｌ３（０．１Ｕ／ｍＬ）を３２℃で、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％アジ化ナトリウム、ｐＨ７．２中で４８時間、インキューベーションした。放射性標識したＣＭＰシアル酸を少量のアリコートに加えて取り込みを監視した。ＴＰ１０はＳＥＣ　ＨＰＬＣによりヌクレオチド糖から分離した。２４時間および４８時間で分析したサンプルは、反応が２４時間後には完了したことを示した。次いで反応混合物を凍結した。反応生成物をフルオロフォア支援炭水化物電気泳動（Ｆｌｕｏｒｏｐｈｏｒｅ　Ａｓｓｉｓｔｅｄ　Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ　Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ）（ＦＡＣＥ（商標）；グリコ社、ノバト、カリフォルニア州）分析にかけた（図８６）。
【１２０３】
薬物動態学的実験。ラットは頸動脈カニューレと購入した。１０ｍｇ／ｋｇの前シアリル化または後シアリル化ＴＰ１０ペプチドは、各処置で（ｎ＝３）尾の静脈注射を介して３匹のラットに与えた。１４の血液サンプルを０～５０時間で採血した。血液中の後シアリル化ＴＰ１０ペプチドの濃度は、前シアリル化ＴＰ１０よりも０時間以降、いつも高かった（図８７）。シアル酸の付加は出発原料に比べて、薬物動態学的曲線の血漿濃度－時間曲線下の面積（ＡＵＣ）を二倍にした（図８８）。
【１２０４】
シアリル化ＴＰ１０のフコシル化。上記シアリル化ミックスの１０ｍＬ（２５ｍｇのＴＰ１０）を解凍し、そしてＧＤＰ－フコースを５ｍＭまで、$MnCl_2$を５ｍＭまで、そしてＦＴＶＩ（フコシルトランスフェラーゼ）を０．０５Ｕ／ｍＬまで加えた。反応物は３２℃で４８時間インキューベーションした。反応生成物をフルオロフォア支援炭水化物電気泳動（（ＦＡＣＥ（商標）；グリコ社、ノバト、カリフォルニア州）分析にかけた（図８９）。少量のアリコートに放射性標識したＧＤＰ－フコースを加え、取り込みを監視した。ＴＰ１０はＳＥＣ　ＨＰＬＣによりヌクレオチド糖から分離した。２４時間および４８時間で分析したサンプルは、反応が２４時間後には完了したことを示した。Ｅ－セレクチンへの結合を測定するインビトロアッセイは、フコースの付加が生物学的に活性なＥ－セレクチンリガンドを生成できることを示す（図９０）。
【１２０５】
２．組換え糖タンパク質のシアリル化

この実施例では、数種の組換えペプチドのシアリル化形態の調製を説明する。

【１２０６】

ＳＴ３ＧａｌＩＩＩを使用した組換え糖タンパク質のシアリル化。数種の糖タンパク質はそれらが組換えラットＳＴ３ＧａｌＩＩＩによりシアリル化される能力について調査された。これら各々の糖タンパク質について、シアリル化は市販品としての各糖タンパク質の開発において、貴重な方法となるであろう。

【１２０７】

反応条件。反応条件は表９にまとめた。シアリルトランスフェラーゼ反応は室温から３７℃の間の温度で２４時間行った。シアリル化の程度は糖タンパク質－結合オリゴ糖に取り込まれた^{14}Ｃ－ＮｅｕＡｃの量を測定することにより確立した。各タンパク質に関する反応条件については表９を参照にされたい。

【１２０８】

【表９】

表9. 反応条件

ﾀﾝﾊﾟｸ質	供給源	総ﾀﾝﾊﾟｸ質 (mg)	ﾀﾝﾊﾟｸ質 濃度 (mg/ml)	ST (mU/mL)	ST/ﾀﾝﾊﾟｸ質 (mU/mg)	CMP-NeuAc of “ｻｲｸﾙ”[1]
ATIII	ｼﾞｪﾝｻﾞｲﾑ ﾄﾗﾝｽｼﾞｪﾆｯｸｽ	8.6	4.3	210	48	ｻｲｸﾙ
ATIII	ｼﾞｪﾝｻﾞｲﾑ ﾄﾗﾝｽｼﾞｪﾆｯｸｽ	860	403	53	12	ｻｲｸﾙ
ｱｼｱﾛ-ﾌｪﾁｭｲﾝ	ｼｸﾞﾏ	0.4	105	20	13	10 mM
ｱｼﾗｵｰ (asilao) AAAT	PPL	0.4	0.5	20	20	20 mM

【１２０９】

[1]「サイクル」は明細書に記載した標準的条件を使用した酵素的な「その場」でのＣＭＰ－ＮｅｕＡｃの生成を指す（２０ｍＭ　ＮｅｕＡｃおよび２ｍＭ　ＣＭＰ）。バッファーは０．１Ｍ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５であった。

【１２１０】

表１０に表す結果は、低レベルの酵素を使用したにもかかわらず、顕著な程度のシアリル化が各々の場合で達成されたことを示す。本質的に利用可能な末端ガラクトースの推定に基づき、完全なシアリル化が得られた。表１０はシアリル化反応の結果を示す。様々な実験を比較する基礎として、１ｍｇのタンパク質あたり酵素量を使用した（ｍＵ／ｍｇ）。示す幾つかの実施例では、ｍｇのタンパク質あたりわずか７～１３ｍＵのＳＴ３ＧａｌＩＩＩが２４時間後に本質的に完全なシアリル化を与えるために必要であった。

【１２１１】

【表１０】

表10. 分析結果

タンパク質	供給源	末端 Gal[1] モル/モル	NeuAc 取り込み[2] モル/モル	% Rxn[3]	他の特徴決定
ATIII[4]	ジェンザイム トランスジェニックス	102	104	117	無し
ATIII[4]	ジェンザイム トランスジェニックス	102	1.3	108	SDS-ゲル：タンパク質純度 FACs：炭水化物 グリコフォーム
アシアロ-フェチュイン	シグマ	802	905	116	無し
アシラオ-(asilao) AAAT[5]	PPL	7	7.0	100	SDS-ゲル：タンパク質純度

【１２１２】

[1]供給元、または文献値（フェチュイン、アシアロ－ＡＡＡＴ）から決定されたＮ－結合オリゴ糖上の末端（露出）Ｇａｌ含量。

[2]遊離放射性標識前駆体からゲル濾過により分離した後に、１４Ｃ－ＮｅｕＡｃの取り込みにより測定された取り込まれたＮｅｕＡｃ。

[3]％Ｒｘｎは理論的な最大値として末端Ｇａｌ含量に基づく反応の％完成を示す。

[4]アンチトロンビンＩＩＩ。

[5]α１アンチトリプシン。

【１２１３】

これらの結果は、２４時間内に５０ｍＵ／ｍｇ未満のタンパク質が５０％未満のシアリル化を与え、そして１０７０ｍＵ／ｍｇのタンパク質が約８５～９０％のシアリル化を与えるウシＳＴ６Ｇａｌを用いた実験で詳細に報告した結果とは顕著な対照をなす。Ｐａｕｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９７７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５２：２３６３－２３７１；Ｐａｕｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９７８）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５３：５６１７－５６２４。別の群によるラットα２，３およびα２，６シアリルトランスフェラーゼの実験は、アシアロ－ＡＧＰの完全なシアリル化に、１５０～２５０ｍＵ／ｍｇタンパク質の酵素濃度が必要であることが明らかとなった（Ｗｅｉｎｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５７：１３８４５－１３８５３）。これらの初期の実験と一緒にすると、ＳＴ６ＧａｌＩシアリルトランスフェラーゼは、完全なシアリル化を達成するために５０ｍＵ／ｍｇより高く、そして最高１５０ｍＵ／ｍｇが必要であることを示唆した。

【１２１４】

この実施例は、ＳＴ３ＧａｌＩＩＩシアリルトランスフェラーゼを使用した組換え糖タンパク質のシアリル化には予想されるよりもはるかに少ない酵素が必要であるとを示す。１キログラムの規模の反応については、初期の実験が示した１００，０００～１５０，０００単位の代わりに約７，０００単位のＳＴ３ＧａｌＩＩＩシアリルトランスフェラーゼが必要となる。天然な供給源からのこれら酵素の精製は禁じられており、１～２カ月の作業の後の大規模調製についてわずか１～１０単位の収量である。ＳＴ６ＧａｌＩおよびＳＴ３ＧａｌＩＩＩシアリルトランスフェラーゼの両方が組換えシアリルトランスフェラーゼとして生産され、２つの酵素で等レベルの発現が達成されると仮定すると、ＳＴ３ＧａｌＩＩＩシアリルトランスフェラーゼに対して１４～２１倍より大きな発酵規模（またはそれ以上）が、ＳＴ６ＧａｌＩシアリルトランスフェラーゼでは必要となるだろう。ＳＴ６ＧａｌＩシアリルトランスフェラーゼについては、酵母で０．３Ｕ／リットルの発現レベルが報告された（Ｂｏｒｓｉｇ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐ

ｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２１０：１４－２０）。ＳＴ３ＧａｌＩＩＩシアリルトランスフェラーゼの１０００Ｕ／リットルの発現レベルが、アスペルギルス　ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）で達成された。現行の発現レベルで、ＳＴ６ＧａｌＩシアリルトランスフェラーゼを使用して１ｋｇの糖タンパク質をシアリル化するために十分な酵素を生産するためには、３００～４５０，０００リットルの酵母の発酵が必要である。対照的にアスペルギルス　ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）の１０リットル未満の発酵が、ＳＴ３ＧａｌＩＩＩシアリルトランスフェラーゼを使用した１ｋｇの糖タンパク質のシアリル化には必要となるだろう。このように大規模シアリル化反応のためのＳＴ３ＧａｌＩＩＩシアリルトランスフェラーゼを生産するために必要とされる発酵能力は、ＳＴ６Ｇａｌを生産するために必要とされるものより１０～１００倍低くなるだろう；シアリルトランスフェラーゼの生産コストは比例して減少するだろう。

【１２１５】

３．シアリルルイスＸを作成するためのフコシル化

この実施例は、Ｎ－結合シアリルルイスＸ抗原を持つ組織組織プラスミノーゲンアクチベーター（ＴＰＡ）の調製を説明する。

【１２１６】

シアリル化。哺乳動物細胞で発現したＴＰＡは、ほとんどがシアル酸で終わるグリカンを含むことが多いが、完全なシアリル化を確実にするために、最初にインビトロでシアリル化を行うことが有利である。適当なバッファー（最も好ましくはｐＨ５．５から９の間、例えばＴｒｉｓ緩衝化塩溶液、ｐＨ７．２）中のＴＰＡを、ＣＭＰシアル酸およびシアリルトランスフェラーゼと、シアル酸を欠く任意のグリカンがシアリル化された種に転換するために十分な時間、インキューベーションする。典型的な条件は１ｍｇ／ｍＬ　ＴＰＡ、３ｍＭ　ＣＭＰシアル酸、０．０２Ｕ／ｍＬＳＴ３Ｇａｌ３、３２℃で２４時間となるだろう。微生物の成長は滅菌濾過または０．０２％のアジ化ナトリウムを包含するどちらかにより止めることができる。ＴＰＡ濃度は最も好ましくは０．１ｍｇ／ｍＬからペプチドの溶解限界の範囲である。ＣＭＰ－ＳＡの濃度も、利用可能な部位を越えて過剰にあるように十分となるべきであり、そして５０μＭから５０ｍＭまでの範囲、そして２℃から４０℃までの温度となるだろう。完全な反応に必要な時間は温度、受容体基質に対する酵素の相対的量、供与体基質濃度、およびｐＨに依存するだろう。２，３結合でシアル酸を加えることができる他のシアリルトランスフェラーゼにはＳＴ３Ｇａｌ４を含み；微生物トランスフェラーゼも使用することができる。

【１２１７】

フコシル化。フコシル化の典型的な条件は、１ｍｇ／ｍＬ　ＴＰＡ、３ｍＭ　ＧＤＰ－フコース、０．０２Ｕ／ｍＬ　ＦＴＶＩ、５ｍＭ　$MnCl_2$、３２℃で２４時間、Ｔｒｉｓ緩衝化塩中となるだろう。微生物の成長は滅菌濾過または０．０２％のアジ化ナトリウムを包含することにより抑えることができる。ＴＰＡ濃度は最も好ましくは０．１ｍｇ／ｍＬからペプチドの溶解限界の範囲である。ＧＤＰ－フコースの濃度も、利用可能な部位を越えて過剰にあるように十分となるべきであり、そして５０μＭから５０ｍＭまでの範囲、そして２℃から４０℃までの温度となるだろう。完全な反応に必要な時間は温度、受容体基質に対する酵素の相対的量、供与体基質濃度、およびｐＨに依存するだろう。シアリルルイスｘを作成することができる他のフコシルトランスフェラーゼにはＦＩＶＩＩ、ＦＴＶ、ＦＴＩＩＩを含み；ならびに微生物トランスフェラーゼも使用することができる。

【１２１８】

４．高マンノースのトリ－マンノースコア構造への改作；ＣＨＯで生産された組織プラスミノーゲンアクチベーター

この実施例は、高マンノースグリカンからの戻し改作によりトリマンノースコアを持つ組織プラスミノーゲンアクチベータの調製を説明する。

【１２１９】

組織プラスミノーゲンアクチベータ（ＴＰＡ）は現在、チャイニーズハムスター卵巣

（ＣＨＯ）細胞で生産され、そして少量の高マンノースＮ－結合オリゴ糖を含む。マンノースは種々の特異的マンノシダーゼを使用して改作される（ｔｒｉｍｍｅｄ　ｄｏｗｎ）ことができる。第１段階はＭａｎ９ＧｌｃＮＡｃ２（Ｆｕｃ０－１）からＭａｎ５ＧｌｃＮＡｃ２（Ｆｕｃ０－１）を生成することである。これはマンノシダーゼＩを使用して行うことができる。ＧｌｃＮＡｃＴ１（ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ）を使用してＧｌｃＮＡｃ１Ｍａｎ５ＧｌｃＮＡｃ２（Ｆｕｃ０－１）を作成するか、またはマンノシダーゼＩＩＩを使用してＭａｎ３ＧｌｃＮＡｃ２（Ｆｕｃ０－１）を作成する。Ｍａｎ３ＧｌｃＮＡｃ２（Ｆｕｃ０－１）から、ＧｌｃＮＡｃ１Ｍａｎ３ＧｌｃＮＡｃ２（Ｆｕｃ０－１）はＧｌｃＮＡｃＴＩを使用して生成することができ、あるいはＧｌｃＮＡｃ１Ｍａｎ５ＧｌｃＮＡｃ２（Ｆｕｃ０－１）から、ＧｌｃＮＡｃ１Ｍａｎ３ＧｌｃＮＡｃ２（Ｆｕｃ０－１）はマンノシダーゼＩＩを使用して生成することができる。次いでＧｌｃＮＡｃ１Ｍａｎ３ＧｌｃＮＡｃ２（Ｆｕｃ０－１）は、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩＩ（ＧｌｃＮＡｃＴＩＩ）を使用してＧｌｃＮＡｃ２Ｍａｎ３ＧｌｃＮＡｃ２（Ｆｕｃ０－１）に転換される。次いで２つの末端ＧｌｃＮＡｃ残基をＧａｌＴＩを使用してガラクトシル化し、次いでＳＡ－ＰＥＧでＳＴ３ＧａｌＩＩＩを使用してシアリル化する。

【１２２０】

逆に、ＴＰＡは酵母または真菌系で生産することができる。同様の方法が真菌に由来する材料には必要である。

【１２２１】

５．ＧｌｃＮＡｃのＥＰＯへの付加

この実施例は、ＧｌｃＮＡｃ残基のトリマンノシルコア上への付加を説明する。

【１２２２】

ＧｌｃＮＡｃのＥＰＯへの付加。ＥＰＯはＳＦ－９昆虫細胞で発現し、そして精製した（プロテインサイエンス（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、メリデン、コネチカット州）。ＥＰＯのトリ－マンノシルグリコフォームから「トリ－マンノシルコア＋２ＧｌｃＮＡｃ」への１００％の転換（ピーク１、図９１のＰ１）は、３２℃で１００ｍＵ／ｍｌのＧｌｃＮＡｃＴ－Ｉおよび１００ｍＵ／ｍｌのＧｌｃＮＡｃＴ－ＩＩと２４時間、以下の反応最終濃度でインキューベーションすることにより達成された：

１００ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ６．５、または１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．５
５ｍＭ　ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃ
２０ｍＭ　$MnCl_2$
１００ｍＵ／ｍｌ　ＧｌｃＮＡｃＴ－Ｉ
１００ｍＵ／ｍｌ　ＧｌｃＮＡｃＴ－ＩＩ
１ｍｇ／ｍｌ　ＥＰＯ（精製され、Ｓｆ９細胞で発現した、
プロテインサイエンスから購入）

【１２２３】

グリコフォームの分析。このアッセイはＫ－Ｒ　Ａｎｕｍｕｌａ　ａｎｄ　ＳＴ　Ｄｈｕｍｅ，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ８（１９９８）６８５－６９のわずかな変法である。Ｎ－グリカナーゼ（ＰＮＧａｓｅ）放出Ｎ－グリカンを、アントラニル酸で還元的に標識した。還元的にアミノ化したＮ－グリカンをＳｈｏｄｅｘ　Ａｓａｈｉｐａｋ　ＮＨ２Ｐ－５０　４Ｄアミノカラム（４．６ｍｍｘ１５０ｍｍ）に注入した。２つの溶媒を分離に使用した：Ａ）水中、５（容量／容量）％酢酸、１％テトラヒドロフラン、および３％トリエチルアミン、およびＢ）アセトニトリル中、２％酢酸および１％テトラヒドロフラン。次いでカラムを７０％Ｂで２．５分間のイソクラティック溶出、続いて９７．５分間にわたり７０から５％Ｂに進行する直線勾配、そして最後に５％Ｂで１５分間のイソクラフィック溶出により溶出した。溶出したピークは、２３０ｎｍの励起、そして４２０ｎｍの発光波長で蛍光検出を使用して検出した。

【１２２４】

これらの条件下で、トリマンノシルコアは２２．３分の保持時間を有し、そしてＧｎＴ反応の生成物は２６．３分の保持時間を有する。出発原料はコアＧｌｃＮＡｃを持つ排他

的なトリマンノシルコアであった（図９１）。

【１２２５】

６．高マンノースＮ－グリカンのハイブリッドおよび複合（ｃｏｍｐｌｅｘ）Ｎ－グリカンへの改造：ウシ膵臓ＲＮａｓｅ

この実施例はハイブリッドまたは複雑なＮ－グリカンを持つウシ膵臓ＲＮａｓｅの調製について説明する。ＲＮａｓｅの高マンノースＮ－結合グリカンを酵素的に消化し、そしてハイブリッドＮ－結合グリカンを作成するために仕上げる（ｅｌａｂｏｒａｔｅｄ）。さらにＲＮａｓｅの高マンノースＮ－結合グリカンを酵素的に消化して、複合Ｎ－結合グリカンを作成するために仕上げる。

【１２２６】

糖ペプチド中のＮ－結合オリゴ糖の高マンノース構造は、α－マンノシダーゼおよびグリコシルトランスフェラーゼの組み合わせを使用してハイブリッドまたは複合形態に修飾することができる。この例はモデル基質として単純なＮ－グリカンを使用してそのような試みがもたらした結果をまとめる。

【１２２７】

ウシ膵臓から精製したリボヌクレアーゼＢ（ＲＮａｓｅＢ）（シグマ）は、１２４アミノ酸残基からなる糖ペプチドである。これは高マンノース構造で修飾された１つのＮ－グリコシル化部位を有する。その単純さおよび低分子量（１３．７ｋＤａ～１５．５ｋＤａ）故に、リボヌクレアーゼＢは高マンノース構造からハイブリッドまたは複合Ｎ－結合オリゴ糖へＮ－グリカンを改造する可能性を証明する良い候補である。ＲＮａｓｅＢのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトルおよびＮ－グリカナーゼによるＲＮａｓｅＢから開裂されたオリゴ糖のＨＰＬＣプロフィール（図９２）は、非－修飾ペプチドの小部分以外、ペプチドのＮ－グリコシル化部位の大部分が５～９マンノース残基からなる高マンノースオリゴ糖で修飾されていることを示した。

【１２２８】

高マンノースＮ－グリカンからハイブリッドＮ－グリカンへの転換。高マンノースＮ－グリカンは、図９３に示すようにα１，２－マンノシダーゼ、ＧｌｃＮＡｃＴ－Ｉ（β－１，２－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ）、ＧａｌＴ－Ｉ（β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ）およびα２，３－シアリルトランスフェラーゼ／またはα２，６－シアリルトランスフェラーゼの組み合わせを使用してハイブリッドＮ－グリカンに転換した。

【１２２９】

例として、ＲＮａｓｅＢの高マンノース構造は成功裏にハイブリッド構造に転換された。

【１２３０】

$Man_5GlcNAc_2$－Ｒは、トリコデルマ　レーゼイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ）からクローン化された単一のα１，２－マンノシダーゼにより触媒された$Man_{5-9}GlcNAc_2$－Ｒから得た（図９４）。ＲＮａｓｅＢ（１ｇ、約６７マイクロモル）を３０℃で４５時間、１５ｍＵの組換えＴ．レーゼイ（ｒｅｅｓｅｉ）のα１，２－マンノシダーゼと、１０ｍＬの総容量のＭＥＳバッファー（５０ｍＭ、ｐＨ６．５）中でインキューベーションした。$Man_{6-9}GlcNAc_2$－タンパク質構造は、組換えマンノシダーゼにより高効率で$Man_5GlcNAc_2$－タンパク質に成功裏に転換された。

【１２３１】

あるいは$Man_5GlcNAc_2$－Ｒは、アスペルギルス　サイトイ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｓａｉｔｏｉ）から精製した単一のα１，２－マンノシダーゼにより触媒された$Man_{5-9}GlcNAc_2$－Ｒから得た（図９５）。ＲＮａｓｅＢ（４０μｇ、約２．７ナノモル）を３７℃で４２．５時間、２５μＵの市販のＡ．サイトイ（ｓａｉｔｏｉ）のα１，２－マンノシダーゼ（グリコまたはカルビオケム）と、２０μｌの総容量のＮａＯＡｃバッファー（１００ｍＭ、ｐＨ５．０）中でインキューベーションした。Ｍａｎ

$_{6-9}$ＧｌｃＮＡｃ$_{2}$－タンパク質構造は、市販のマンノシダーゼによりＭａｎ$_{5}$ＧｌｃＮＡｃ$_{2}$－タンパク質に成功裏に転換された。しかしＧｌｃＮＡｃ－タンパク質に対応する新規ピークがスペクトル中に表れ、調製物中にエンドグリコシダーゼＨの混入の可能性を示す。数種の哺乳動物アルファ－マンノシダーセがこの工程を行うために必要であったが、真菌のα１，２－マンノシダーゼはすべてのα１，２－結合マンノース残基を除去するために大変効率的であった。

【１２３２】

次いでＧｌｃＮＡｃＴ－Ｉは、ＧｌｃＮＡｃ残基をＭａｎ$_{5}$ＧｌｃＮＡｃ$_{2}$－Ｒに加えた（図９６）。ＲＮａｓｅＢ（６００μｇ、約４０ナノモル）を含むＴ．レーゼイ（ｒｅｅｓｅｉ）のα１，２－マンノシダーゼ反応後の反応混合物を、非－精製組換えＧｌｃＮＡｃＴ－Ｉ（３４ｍＵ）と、ＭｎＣｌ$_{2}$（２０ｍＭ）およびＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃ（５ｍＭ）を含有する４００μｌの総容量のＭＥＳバッファー（５０ｍＭ、ｐＨ６．５）中で、３７℃で４２時間、インキューベーションした。ＧｌｃＮＡｃ残基は組換えＧｌｃＮＡｃＴ－ＩによりＭａｎ$_{5}$ＧｌｃＮＡｃ$_{2}$－タンパク質に定量的に加えられた。

【１２３３】

次いでＧａｌ残基をＧａｌＴ１を使用して加えた（図９７）。ＲＮａｓｅＢ（１２０μｇ、約８ナノモル）を含むＧｎＴ－Ｉ反応後の反応混合物を３７℃で２０時間、３．３ｍＵの組換えＧａｌＴ－１と、ＵＤＰ－Ｇａｌ（７．５ｍＭ）およびＭｎＣｌ$_{2}$（２０ｍＭ）を含有する１００μｌの総容量のＴｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（１００ｍＭ、ｐＨ７．３）中でインキューベーションした。Ｇａｌ残基を約９８％のＧｌｃＮＡｃ－Ｍａｎ$_{5}$ＧｌｃＮＡｃ$_{2}$－タンパク質に、組換えＧａｌＴ１により加えた。

【１２３４】

次の工程はα２．３－シアリルトランスフェラーゼまたはα２，６－シアリルトランスフェラーゼを使用したシアル酸の付加であった（図９８）。例としてＳＴ３ＧａｌＩＩＩ、α２．３－シアリルトランスフェラーゼを使用した。ＲＮａｓｅＢ（１３μｇ、約０．８７ナノモル）を含むＧａｌＴ－Ｉ反応後の反応混合物を３７℃で１６時間、８．９ｍＵの組換えＳＴ３ＧａｌＩＩＩと、ＣＭＰ－シアル酸（５ｍＭ）およびＭｎＣｌ$_{2}$（２０ｍＭ）を含有する２０μｌの総容量のＴｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（１００ｍＭ、ｐＨ７．３）中でインキューベーションした。シアル酸残基を約９０％のＧａｌ－ＧｌｃＮＡｃ－Ｍａｎ$_{5}$ＧｌｃＮＡｃ$_{2}$－タンパク質に、組換えＳＴ３ＧａｌＩＩＩにより供与体としてＣＭＰ－ＳＡを使用して加えた。収量は反応条件を調整することによりさらに改善することができる。

【１２３５】

都合がよいことに、上記の各反応後に精製または透析工程は必要ではない。より興味深いことには、ＧａｌＴ１およびＳＴ３ＧａｌＩＩＩは１ポット反応で組み合わせることができる。別個の反応と比べて同様な収量が得られた。ＲＮａｓｅＢ（６０μｇ、約４ナノモル）を含むＧｌｃＮＡｃＴ－Ｉ反応後の反応混合物を３７℃で２０時間、１．７ｍＵの組換えＧａｌＴ１、９．８ｍＵの組換えＳＴ３ＧａｌＩＩＩと、ＵＤＰ－Ｇａｌ（７．５ｍＭ）、ＣＭＰ－シアル酸（５ｍＭ）およびＭｎＣｌ$_{2}$（２０ｍＭ）を含有する６０μｌの総容量のＴｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（１００ｍＭ、ｐＨ７．３）中でインキューベーションした。

【１２３６】

図９９に示すように、ＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）は、成功裏にＲＮａｓｅＢに加えられた。ＲＮａｓｅＢ（６．７μｇ、約０．４５ナノモル）を含むＧａｌＴ－Ｉ反応後の反応混合物をＨ$_{2}$Ｏに対して１時間、室温で透析し、そして３７℃で１５．５時間、５５ｍＵの組換えＳＴ３ＧａｌＩＩＩと、ＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）（０．２５ｍＭ）およびＭｎＣｌ$_{2}$（２０ｍＭ）を含有する２０μｌの総容量のＴｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（５０ｍＭ、ｐＨ７．３）中でインキューベーションした。ＰＥＧ－修飾シアル酸残基はＧａｌ－ＧｌｃＮＡｃ－Ｍａｎ$_{5}$ＧｌｃＮＡｃ$_{2}$－ペプチドに、組換えＳＴ３ＧａｌＩＩＩにより成功裏に加えられた。収量は反応条件を調整することによりさらに改善する

ことができる。

【１２３７】

高マンノースＮ－グリカンの複合Ｎ－グリカンへの転換。この転換を達成するために、ＧｌｃＮＡｃβ１，２－Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$－ペプチド中間体を得る。図１００に示すように、Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$－ペプチドからこの中間体への反応を行うために少なくとも４つの可能な経路がある。

【１２３８】

経路Ｉ：真菌のα１，２－マンノシダーゼにより生産されたＭａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$－ペプチドは、１つのＧｌｃＮＡｃを加えるＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ（ＧｌｃＮＡｃＴ－Ｉ、酵素２）の基質である。ＧｌｃＮＡｃＭａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$－ペプチドの末端α１，３－およびα１，６－結合マンノース残基を、ゴルジα－マンノシダーゼＩＩ（ＭａｎＩＩ、酵素５）により除去する。この経路は高等な生物で行われるＮ－結合オリゴ糖のプロセッシングに関する天然な経路の一部である。

【１２３９】

経路ＩＩ：２つのマンノース残基を最初にα－マンノシダーゼ（酵素６）により除去し、次いでＧｌｃＮＡｃをＧｌｃＮＡｃＴ－Ｉ（酵素２）により加える。天然の受容体Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$－Ｒ以外では、ＧｌｃＮＡｃＴ－ＩはＭａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$－Ｒもその基質として認識し、そして１つのＧｌｃＮＡｃをマンノースコア構造に加えて、ＧｌｃＮＡｃＭａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$－ペプチドを形成する。

【１２４０】

経路ＩＩＩ：α１，６－結合マンノースをα１，６－マンノシダーゼにより除去し、続いてＧｌｃＮＡｃをＧｌｃＮＡｃＴ－Ｉにより加え、そして末端α１，３－結合マンノースをα１，３－マンノシダーゼにより除去する。得られた実験データから、ＧｌｃＮＡｃＴ－ＩはこのＭａｎ$_4$ＧｌｃＮＡｃ$_2$－ペプチドを受容体として認識し、そして１つのＧｌｃＮＡｃ残基を加えてＧｌｃＮＡｃＭａｎ$_4$ＧｌｃＮＡｃ$_2$－ペプチドを形成する。

【１２４１】

経路ＩＶ：経路ＩＩＩと同様に、α１，３－結合マンノースをα１，３－マンノシダーゼにより除去し、続いてＧｌｃＮＡｃＴ－Ｉ反応を行う。次いで末端α１，６－結合マンノースをα１，６－マンノシダーゼにより除去することができる。

【１２４２】

ＧｌｃＮＡｃＴ－Ｉ（ＧｌｃＮＡｃβ１，２－結合をマンノースコアのα１，３－マンノースに加える原因である）、およびＧｌｃＮＡｃＴ－ＩＩ（第２のＧｌｃＮＡｃβ１，２－結合をマンノースコアのα１，６－マンノースに加える原因である）の機能後、ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$－ペプチドをＧａｌＴ１およびシアリルトランスフェラーゼにより処理して、２アンテナ状の複合Ｎ－グリカンを形成することができる。ＧｌｃＮＡｃＴ－ＩＶ、ＧｌｃＮＡｃＴ－Ｖおよび／またはＧｌｃＮＡｃＴ－ＶＩのような他のＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼ（図１００および図１０１）も、ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$－ペプチドをグリコシル化することができる。ＧａｌＴ１およびシアリルトランスフェラーゼによるさらなるグリコシル化は、多アンテナ状の複合Ｎ－グリカンを形成する。酵素ＧｌｃＮＡｃＴ－ＩＩＩはバイセクティングＧｌｃＮＡｃの挿入を触媒し、したがってＭａｎＩＩ、ＧｌｃＮＡｃＴ－ＩＩ、ＧｌｃＮＡｃＴ－ＩＶおよびＧｌｃＮＡｃＴ－Ｖの作用を防止する。

【１２４３】

７．多アンテナ状の複合グリカンを持つＥＰＯの調製

この実施例は、昆虫細胞が発現したＥＰＯからＰＥＧ化された２アンテナ状ＥＰＯ、および３アンテナ状のシアリル化されたＥＰＯの調製を説明する。

【１２４４】

バキュロウイルス／Ｓｆ９発現系（プロテイン　サイエンス社、メリデン、コネチカット州）からの組換えヒトエリトロポエチン（ｒｈＥＰＯ）をグリカン分析に供し、そして生成したグリカンは主にコアフコースを持つトリマンノシルコアであり、わずかな割合の

グリカンが１つのＧｌｃＮＡｃも有する（ＥＰＯ１）ことが示された。

【１２４５】

ＧｎＴ－ＩおよびＧｎ－ＩＩを用いたＮ－アセチルグルコサミンの付加。２ロットのｒｈＥＰＯ（１ｍｇ／ｍＬ）をＧｎＴ－ＩおよびＧｎ－ＩＩ、５ｍＭ　ＵＤＰ－ｇｌｃＮＡｃ、２０ｍＭ　$MnCl_2$および０．０２％アジ化ナトリウムと、１００ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ６．５中で３２℃で２４時間インキューベーションした。ロットＡは２０ｍｇのＥＰＯおよび１００ｍＵ／ｍＬのＧｎＴ－Ｉおよび６０ｍＵ／ｍＬのＧｎＴ－ＩＩを含んだ。ロットＢは４１ｍｇのＥＰＯおよび４１ｍＵ／ｍＬのＧｎＴ－Ｉ＋５０ｍＵ／ｍＬのＧｎＴ－ＩＩを含んだ。反応後、サンプルはゲル濾過（ＰＤ１０カラム、ファルマシアＬＫＢバイオテクノロジー社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）により脱塩した。

【１２４６】

２－ＡＡ　ＨＰＬＣプロファイリングにより分析したＥＰＯグリカン。このアッセイはＡｎｕｍｕｌａ　ａｎｄ　Ｄｈｕｍｅ，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ８（１９９８）６８５－６９のわずかな変法である。還元的にアミノ化したＮ－グリカンを、Ｓｈｏｄｅｘ　Ａｓａｈｉｐａｋ　ＮＨ２Ｐ－５０　４Ｄアミノカラム（４．６ｍｍｘ１５０ｍｍ）に注入した。２つの溶媒を分離に使用した、Ａ）水中、５（容量／容量）％酢酸、１％テトラヒドロフラン、および３％トリエチルアミン、およびＢ）アセトニトリル中、２％酢酸および１％テトラヒドロフラン。次いでカラムを７０％Ｂで２．５分間のイソクラティック溶出、続いて１００分間にわたり７０から５％Ｂに進行する直線勾配、そして最後に５％Ｂで２０分間のイソクラティック溶出により溶出した。溶出したピークは、２３０ｎｍの励起、そして４２０ｎｍの発光波長で蛍光検出を使用して検出した。非－シアリル化Ｎ－結合グリカンは、２３～３４分のＬＣ範囲にあり、モノシアル化は３４～４２分、ジシアリル化は４２～５２分、トリシアリル化は５５～６５分、そしてテトラシアリル化は６８～７８分にある。

【１２４７】

２ＡＡ　ＨＰＬＣによるグリカンのプロファイリングは、ロットＡが９２％、２つのＧｌｃＮＡｃを持つ２アンテナ状の構造（１つのＧｌｃＮＡｃを有するバランス）に転換されたことが分かった。ロットＢは所望の生成物に９７％転換されたことが示された（図１０２Ａおよび１０２Ｂ）。

【１２４８】

ＧｎＴ－Ｖを使用した第３アンテナ枝の導入。ＧｎＴ－ＩおよびＧｎＴ－ＩＩ反応の生成物からＥＰＯ（ロットＢの１ｍｇ／ｍＬ）を、ＰＤ－１０カラムで脱塩し、そして続いて濃縮した後、１０ｍＵ／ｍＬのＧｎＴ－Ｖおよび５ｍＭ　ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃと、５ｍＭ　$MnCl_2$および０．０２％アジ化ナトリウムを含有する１００ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ６．５中で３２℃にて２４時間インキューベーションした。２ＡＡ　ＨＰＬＣ分析では転換が９２％の効率で起こったことが示された（図１０３）。

【１２４９】

脱塩（ＰＤ－１０）そして濃縮後、ガラクトースをｒＧａｌＴＩを用いて加えた：ＥＰＯ（１ｍｇ／ｍＬ）を０．１Ｕ／ｍＬのＧａｌＴ１、５ｍＭ　ＵＤＰ－ガラクトース、５ｍＭ　$MnCl_2$と３２℃にて２４時間インキューベーションした。

【１２５０】

ＥＰＯから還元的にアミノ化されたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ分析。アントラニル酸で還元的に標識したＥＰＯからのＰＮＧａｓｅ放出Ｎ－グリカンの小アリコートを、水上に浮いたＭＦ－ミリポア膜フィルター（０．０２５μｍ孔、４７ｍｍ直径）で４５分間、透析した。透析したアリコートをスピードバック（ｓｐｅｅｄｖａｃ）中で乾燥させ、少量の水に再溶解し、そして水／アセトニトリル（５０：５０）に溶解した２，５－ジヒドロキシ安息香酸（１０ｇ／Ｌ）溶液と混合した。混合物を標的上で乾燥させ、そして直線／陰－イオンモードで操作したアプライドバイオシステムズ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）のＤＥ－Ｐｒｏ　ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマススペクトロメトリーを使用して分析した。オリゴ糖を観察された質量－対－荷電比および文献の手順に基づき割り当てた。

【１２５１】
放出されたグリカンのＭＡＬＤＩによる分析は、ガラクトースがすべての利用可能な部位に定量的に加えられたことを示した（図１０４）。上記からのガラクトシル化ＥＰＯを次いでＳｕｐｅｒｄｅｘ１．６／６０カラムでのゲル濾過により５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ６中で精製した。
【１２５２】
シアリル化。濃縮および脱塩（ＰＤ－１０）後、１０ｍｇのガラクトシル化ＥＰＯ（１ｍｇ／ｍＬ）をＳＴ３Ｇａｌ３（０．０５Ｕ／ｍＬ）およびＣＭＰ－ＳＡ（３ｍＭ）と、０．０２％のアジ化ナトリウムを含む５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．２中でインキューベーションした。別個のアリコートは放射性標識ＣＭＰ－ＳＡを含んだ。生じた取り込み標識および遊離標識は、イソクラティックなサイズ排除クロマトグラフィー／ＨＰＬＣにより、０．５ｍＬ／分で４５％ＭｅＯＨ、０．１％ＴＦＡ（７．８ｍｍｘ３０ｃｍカラム、粒子サイズ５μｍ、ＴＳＫ　Ｇ２０００ＳＷ$_{XL}$、トーソーハース（Ｔｏｓｏ　Ｈａａｓ）、アンシステクノロジーズ（Ａｎｓｙｓ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、レイクフォレスト、カリフォルニア州）中にて分離した。この手順を使用して、１２％のカウントが取り込まれた（３６０マイクロモル、３３マイクロモルのＥＰＯで、すなわち約１０．９モル／モル）。理論的（３Ｎ－結合部位、３－アンテナ状）は約９モル／モルの取り込みである。これらはこの方法の限界に相当する。ＳＴ３Ｇａｌ３の代わりにＳＴ６Ｇａｌ１を用いた同一反応では、５．７％の放射性標識、すなわちＳＴ３Ｇａｌ３に比べて約４８％がガラクトシル化ＥＰＯに取り込まれた。
【１２５３】
Ｂ．グリコＰＥＧ化
８．ＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧの調製
この実施例はＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧの調製を説明する。
【１２５４】
２－（ベンジルオキシカルボキサミド）－グリシルアミド－２－デオキシ－Ｄ－マンノピラノースの調製。Ｎ－ベンジルオキシカルボニル－グリシル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（３．１２５ｇ、１０．２ミリモル）を、Ｄ－マンノサミン－ＨＣｌ（２ｇ、９．３ミリモル）およびトリエチルアミン（１．４２ｍＬ、１０．２ミリモル）を含む溶液（１０ｍＬのＭｅＯＨおよび６ｍＬのH_2Oに溶解）に加えた。反応物を室温で１６時間撹拌し、そしてロト蒸発（ｒｏｔｏｅｖａｐｏｒａｔｉｏｎ）を使用して濃縮した。クロマトグラフィー（シリカ、１０％ＭｅＯＨ／CH_2Cl_2）は１．７１ｇ（５０％収率）の生成物を白色固体として得た：R_f＝０．６２（シリカ；$CHCl_3$：ＭｅＯＨ：H_2O，６／４／１）；^{1}ＨＮＭＲ（CD_3OD，５００　ＭＨｚ）３．２４－　３．２７（ｍ，２Ｈ），３．４４（ｔ，１Ｈ），３．５５（ｔ，１Ｈ），３．６３－３．６６（ｍ，１Ｈ），３．７６－３．９０（ｍ，６Ｈ），３．９１（ｓ，２Ｈ），４．０（ｄｄ，２Ｈ），４，２８（ｄ，１Ｈ，Ｊ＝４．４），４．４１（ｄ，１Ｈ，Ｊ＝３．２），５．０３（ｓ，１Ｈ），５．１０（ｍ，３Ｈ），７．２９－７．３８（ｍ，１０Ｈ）。
【１２５５】
５－（Ｎ－ベンジルオキシカルボキサミド）グリシルアミド－３，５－ジデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネートの調製。２－（Ｎ－ベンジルオキシカルボキサミド）グリシルアミド－２－デオキシ－Ｄ－マンノピラノース（１．５９ｇ、４．３ミリモル）を、０．１Ｍ　ＨＥＰＥＳ（１２ｍＬ、ｐＨ７．５）およびピルビン酸ナトリウム（４．７３ｇ、４３ミリモル）の溶液に溶解した。ノイラミン酸アルドラーゼ（０．１Ｍ　ＮａＣｌを含有する４５ｍＬの１０ｍＭリン酸緩衝化溶液、ｐＨ６．９中、５４０Ｕの酵素）、および反応物混合物を３７℃で２４時間加熱した。次いで反応混合物を遠心し、そして上清をクロマトグラフィーにかけた（Ｃ１８シリカ、H_2O（１００％）から３０％　ＭｅＯＨ／水への勾配）。適切な画分をプールし、濃縮し、そして残渣をクロマトグラフィーにかけた（シリカ、１０％ＭｅＯＨ／CH_2Cl_2からCH_2Cl_2／ＭｅＯＨ／H_2O　６／４／１への勾配）。適切な画分を集め、濃縮し、そして残

渣を水に再懸濁した。凍結乾燥後、生成物（１．６７ｇ、８７％収率）を白色固体として得た：R_f＝０．２６（シリカ，$CHCl_3$／ＭｅＯＨ／H_2O　６／４／１）；^{1}ＨＮＭＲ（D_2O，５００ＭＨｚ）１．８２（ｔ，１Ｈ），２．２０（ｍ，１Ｈ），３．４９（ｄ，１Ｈ），３．５９（ｄｄ，１Ｈ），３．６７－３．８６（ｍ，２Ｈ），３．８７（ｓ，２Ｈ），８．８９－４．０５（ｍ，３Ｈ），５．１６（ｓ，２Ｈ），７．４５（ｍ，５Ｈ）。

【１２５６】

５－グリシルアミド－３，５－ジデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネートの調製。５－（Ｎ－ベンジルオキシカルボキサミド）グリシルアミド－３，５－ジデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネート（１．６６ｇ、３．６ミリモル）を、２０ｍＬの５０％水／メタノールに溶解した。フラスコを繰り返し真空とし、そしてアルゴン下に置き、次いで１０％Ｐｄ／Ｃ（０．２２５ｇ）を加えた。繰り返し真空にした後、次いで水素（約１気圧）をフラスコに加え、そして反応混合物を１８時間撹拌した。反応混合物はセライト（ｃｅｌｉｔｅ）を通して濾過し、ロータリーエバポレーションにより濃縮し、そして凍結乾燥させて１．２４ｇ（１００％収率）の生成物を白色固体として得た：R_f＝０．２５（シリカ，ＩＰＡ／H_2O／NH_4OH　７／２／１）；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（D_2O，５００　ＭＨｚ）１．８３（ｔ，１Ｈ，Ｊ＝９．９），２．２３（ｄｄ，１Ｈ，Ｊ＝１２．９，４．６９），３．５１－３．７０（ｍ，２Ｈ），３．６１（ｓ，２Ｈ），３．７５－３．８４（ｍ，２Ｈ），３．９５－４．０６（ｍ，３Ｈ）。

【１２５７】

シチジン－５’－モノホスホリル－［５－（Ｎ－フルオレニルメトキシ－カルボキサミド）グリシルアミド－３，５－ジデオキシ－β－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネート］の調製。２０ｍＬのH_2Oに溶解した５－グリシルアミド－３，５－ジデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネート（０．５５ｇ、１．７０ミリモル）の溶液を、Ｔｒｉｓ（１．３８ｇ、１１．４ミリモル）、１Ｍ　$MgCl_2$（１．１ｍＬ）およびＢＳＡ（５５ｍｇ）の溶液に加えた。溶液のｐＨを１Ｍ　ＮａＯＨ（２ｍＬ）で８．８に調整し、そしてＣＴＰ－２Na^+（２．２３ｇ、４．２ミリモル）を加えた。反応混合物のｐＨは、必要に応じて１Ｍ　ＮａＯＨを送るｐＨコントローラーで制御してｐＨ８．８を維持した。融合タンパク質（シアリルトランスフェラーゼ／ＣＭＰ－ノイラミン酸シンテターゼ）を溶液に加え、そして反応混合物を室温で撹拌した。２日後、さらなる量の融合タンパク質を加え、そして反応物をさらに４０時間撹拌した。反応混合物をＥｔＯＨ中で沈殿させ、そして沈殿物を冷ＥｔＯＨで５回洗浄して、２．３グラムの白色固体を得た。約１．０ｇの粗生成物を１，４－ジオキサン（４ｍＬ）、H_2O（４ｍＬ）および飽和$NaHCO_3$（３ｍＬ）に溶解し、そして２ｍｌのジオキサンに溶解したＦＭＯＣ－Ｃｌ（３０８ｍｇ、１．２ミリモル）の溶液を滴下した。室温で１６時間撹拌した後、反応混合物はロータリーエバポレーションにより約６ｍＬに濃縮し、そしてクロマトグラフィー（Ｃ１８シリカ、１００％H_2Oから３０％ＭｅＯＨ／H_2Oへの勾配）を使用して精製した。適切な画分を合わせ、そして濃縮した。残渣を水に溶解し、そして凍結乾燥して２５３ｍｇの白色固体を得た：R_f＝０．５０（シリカ，ＩＰＡ／H_2O／NH_4OH　７／２／１）；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（D_2O，５００　ＭＨｚ）１．６４（ｄｔ，１Ｈ，Ｊ＝１２．０，６．０），２．５０（ｄｄ，１Ｈ，Ｊ＝１３．２，４．９），３．３８（ｄ，Ｊ＝９．６７，１Ｈ），３．６０（ｄｄ，Ｊ＝１１．６５，６．６４，１Ｈ），３．７９（ｄ，Ｊ＝４．１１，１Ｈ），３．８７（ｄｄ，Ｊ＝１２．２４，１．０，１Ｈ），３．９７（ｍ，２Ｈ），４．０７（ｔｄ，Ｊ＝１０．７５，４．８４，１Ｈ），４．１７（ｄｄ，Ｊ＝１０．６８，１．０，１Ｈ），４．２５（ｓ，２Ｈ），４．３２（ｔ，Ｊ＝４．４，１Ｈ），４．３７（ｔ，Ｊ＝５．８　１Ｈ），４．６－４．７（ｍ，溶媒ピークにより不明瞭），５．９５（ｄ，Ｊ＝４，１Ｈ），６．０３（ｄ，Ｊ＝７．４，１Ｈ），７．４３－７．５３（ｍ，３Ｈ），７．７４（ｍ，２Ｈ），７．９４（ｑ，Ｊ＝７，３Ｈ）．ＭＳ（ＥＳ）；理論値　$C_{35}H_{42}N_5O_{18}P$（［Ｍ－Ｈ

］⁻），８５１．７；測定値　８５０．０。
【１２５８】
シチジン－５’－モノホスホリル－（５－グリシルアミド－３，５－ジデオキシ－β－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネートの調製）。ジイソプロピルアミン（８３μＬ、０．５８７マイクロモル）を、水（３ｍＬ）およびメタノール（１ｍＬ）に溶解したシチジン－５’－モノホスホリル－［５－（Ｎ－フルオレニルメトキシカルボキサミド）グリシルアミド－３，５－ジデオキシ－β－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネート］（１００ｍｇ、０．１１７ミリモル）の溶液に加えた。反応混合物を室温で１６時間撹拌し、そして反応メタノールを反応混合物からロータリーエバポレーションにより除去した。粗反応混合物は水を使用してＣ１８シリカゲルカラムを通して濾過し、そして溶出液を集め、そして凍結乾燥して（８７ｍｇ、１００％）の生成物を白色固体として得た：R_f＝０．２１（シリカ，ＩＰＡ／H_2O／NH_4OH　７／２／１）；^1H　ＮＭＲ（D_2O，５００　ＭＨｚ）１．６６（ｔｄ，１Ｈ，Ｊ＝５．３），２．５０（ｄｄ，１Ｈ，Ｊ＝１３．２，４．６），３．４３（ｄ，Ｊ＝９．５８，１Ｈ），３．６３（ｄｄ，Ｊ＝１１．９，６．４４，１Ｈ），３．８８（ｄｄ，Ｊ＝１１．８，１．０，１Ｈ），３．９５（ｔｄ，Ｊ＝９．０，２．３，１Ｈ），４．１０（ｔ，Ｊ＝１０．４２，１Ｈ），４．１２（ｔｄ，Ｊ＝１０．３４，４．６６，１Ｈ），４．１８（ｄ，Ｊ＝１０．３６，１Ｈ），４．２４（ｍ，２Ｈ），４．３１（ｔ，Ｊ＝４．６４，１Ｈ），４．３５（ｔ，１Ｈ），６．００（ｄ，Ｊ＝４．３７，１Ｈ），６．１３（ｄ，Ｊ＝７．７１，１Ｈ），７．９８（ｄ，Ｊ＝７．６４，１Ｈ）．ＭＳ（ＥＳ）；理論値　$C_{21}H_{32}N_5O_{11}P$（［Ｍ－Ｈ］⁻），６２９．４７；測定値　６２７．９。
【１２５９】
シチジン－５’－モノホスホリル－［５－（Ｎ－メトキシ－ポリオキシエチレン－（１ＫＤａ）－３－オキシプロピオンアミド）－グリシルアミド－３，５－ジデオキシ－β－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネート］の調製。ベンジルトリアゾール－１－イルオキシ－トリス（ジメチルアミノ）－ホスホニウム　ヘキサフルオロホスフェート（ＢＯＰ、２１ｍｇ、４８マイクロモル）を、無水ＤＭＦ（７００μＬ）およびトリエチルアミン（１３μＬ、９５マイクロモル）に溶解したメトキシポリオキシエチレン－（１ＫＤａの平均分子量）－３－オキシプロピオン酸（４８ｍｇ、４８マイクロモル）溶液に加えた。３０分後、シチジン－５’－モノホスホリル－（５－グリシルアミド－３，５－ジデオキシ－β－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネート）（３０ｍｇ、４８マイクロモル）、水（４００μＬ）およびトリエチルアミン（１３μＬ、９５マイクロモル）を含む溶液を加えた。この溶液を２０分間、室温で撹拌し、そして次いでクロマトグラフィーにかけた（Ｃ１８シリカ、メタノール／水の勾配）。適切な画分を集め、濃縮し、残渣を水に溶解し、そして凍結乾燥して白色固体として４０ｍｇ（５０％収率）を得た：R_f＝０．３６（シリカ，ＩＰＡ／H_2O／NH_4OH　７／２／１）；^1H　ＮＭＲ（D_2O，５００ＭＨｚ）１．６６（ｔｄ，１Ｈ，Ｊ＝５．３），２．５０（ｄｄ，１Ｈ，Ｊ＝１３．２，４．６），２．６４（ｔ，Ｊ＝５．９９，３Ｈ）３．４３（ｄ，Ｊ＝９．５８，１Ｈ），３．６３（ｍ，１Ｈ），３．７１（ｓ，７０Ｈ），３．７９（ｍ，３．７１　ピークにより不明瞭）、３．８２（ｔ，Ｊ＝６．１９，１Ｈ）３．８８（ｄｄ，Ｊ＝１１．８，１．０，１Ｈ），３．９５（ｔｄ，Ｊ＝９．０，２．３，１Ｈ），３．９８（ｔ，Ｊ＝５．０６，１Ｈ），４．１２（ｔｄ，Ｊ＝１０．３４，４．６６，１Ｈ），４．１８（ｄ，Ｊ＝１０．３６，１Ｈ），４．２３（ｄ，Ｊ＝４．８５，２Ｈ），４．３１（ｔ，Ｊ＝４．６４，１Ｈ），４．３５（ｔ，１Ｈ），６．００（ｄ，Ｊ＝４．５５，１Ｈ），６．１３（ｄ，Ｊ＝７．５６，１Ｈ），７．９８（ｄ，Ｊ＝７．５４，１Ｈ）．ＭＳ（ＭＡＬＤＩ），観測値　［Ｍ－Ｈ］；１５９４．５，１６３８．５，１６８２．４，
１７２６．４，１７７０．３，１８１４．４，１８５８．２，１８８１．５，１９０３．５，１９４７．３。
【１２６０】

シチジン－５’－モノホスホリル－［５－（Ｎ－メトキシ－ポリオキシエチレン－（１０ＫＤａ）－オキシカルボキサミド）－グリシルアミド－３，５－ジデオキシ－β－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネート］の調製。シチジン－５’－モノホスホリル－（５－グリシルアミド－３，５－ジデオキシ－β－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネート）（２．５ｍｇ、４マイクロモル）および水（１８０μＬ）を、トリエチルアミン（１．１μＬ、８マイクロモル）を含有する無水ＤＭＦ（８００μＬ）中の（メトキシポリオキシエチレン－（１０ＫＤａ、平均分子量）－オキシカルボニル－（Ｎ－オキシベンゾトリアゾール）エステル（４０ｍｇ、４マイクロモル）の溶液に加え、そして反応混合物を室温で１時間撹拌した。反応混合物を水（８ｍＬ）で希釈し、そして逆層フラッシュクロマトグラフィーにより精製した（Ｃ１８シリカ、メタノール／水の勾配）。適切な画分を合わせ、濃縮し、残渣を水に溶解し、そして凍結乾燥して白色固体として２０ｍｇの生成物（４６％収率）を得た：R_f＝０．３５（シリカ，ＩＰＡ／H_2O／NH_4OH　７／２／１）；^1H　ＮＭＲ（D_2O，５００　ＭＨｚ）δ１．６６（ｔｄ，１Ｈ），２．５０（ｄｄ，１Ｈ），２．６４（ｔ，３Ｈ）３．５５－３．７（ｍ，３．７１ピークのより不明瞭）、３．７１（ｓ，４８８Ｈ），３．７２－４．０（ｍ，３．７１ピークのより不明瞭），４．２３（ｍ，３Ｈ），４．３１（ｔ，１Ｈ），４．３５（ｔ，１Ｈ），６．００（ｄ，Ｊ＝４．７７，１Ｈ），６．１２（ｄ，Ｊ＝７．５２，１Ｈ），７．９８（ｄ，Ｊ＝７．８９，１Ｈ）．ＭＳ（ＭＡＬＤＩ），観測値［ＭＣＭＰ＋Ｎａ］；１０７８０。

【１２６１】

９．ヒト下垂体由来ＦＳＨのグリコＰＥＧ化

この実施例は本発明の結合物の集成体を説明する。濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）は脱シアリル化し、そしてＣＭＰ－（シアル酸）－ＰＥＧを結合した。

【１２６２】

濾胞刺激ホルモンの脱シアリル化。濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）（ヒト下垂体、カルビオケム、カタログ番号８６９００１）１ｍｇを、５００μＬの５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　$CaCl_2$に溶解した。この溶液３７５μＬを小さいプラスチック製の試験管に移し、そして２６３ｍＵのノイラミニダーゼＩＩ（ビブリオ　コレラ：Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａｅ）をそれに加えた。反応混合物は１５時間、３２℃で穏やかに振盪した。反応混合物を、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌおよび０．０５％NaN_3で前平衡化したＮ－（ｐ－アミノフェニル）オキサミン酸－アガロースゲル結合体、６００μＬに加え、そして６．５時間、４℃で穏やかに回転した。懸濁液を２分間、１４，０００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集めた。ビーズを０．５ｍＬのバッファーで５回洗浄し、そしてすべての上清をプールした。酵素溶液を１５時間、４℃で２リットルの溶液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3を含有する）を用いて透析し（７０００ＭＷＣＯ）、そして４時間、４℃で５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3で２回、透析した。次いで溶液を２μｇ／μＬにＳｐｅｅｄ　Ｖａｃで濃縮し、そして－２０℃で保存した。反応サンプルをＩＥＦゲルで分析した（ｐＨ３～７）（インビトロゲン：Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）（図１０５）。

【１２６３】

ヒト下垂体－由来ＳＡ－ＦＳＨおよびＰＥＧ－ＳＡ－濾胞刺激ホルモンの調製。脱シアリル化したＦＳＨ（１００μｇ、５０μＬ）およびＣＭＰ－シアル酸またはＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａまたは１０ｋＤａ）（０．０５マイクロモル）を、０．５ｍＬのプラスチック製試験管中の１３．５μＬのH_2O（ＮａＯＨでｐＨ８に調整）に溶解した。試験管を簡単にボルテックス混合し、そして４０ｍＵのＳＴ３Ｇａｌ３（３６．５μＬ）を加えた（総容量１００μＬ）。試験管を再度、ボルテックス混合し、そして２４時間、３２℃で穏やかに振盪した。反応は－８０℃に凍結することにより止めた。１５μｇの反応サンプルをＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図１０６）、ＩＥＦゲル（図１０７）およびＭＡＬＤＩ－ＴＯＦにより分析した。天然なＦＳＨはＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した（図１０８）。

【１２６４】
反応生成物のＳＤＳ　ＰＡＧＥおよびＩＥＦゲルの分析。ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析用のノベックス（Ｎｏｖｅｘ）のＴｒｉｓ－グリシン８～１６％１ｍｍゲルをインビトロゲンから購入した。７．５μＬ（１５μｇ）のＦＳＨ反応サンプルを５μＬの５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　NaN_3バッファーで希釈し、１５μＬのサンプル添加バッファーおよび１μＬの９Ｍ　μ－メルカプトエタノールと混合し、そして６分間、８５℃で加熱した。ゲルはインビトロゲンの指示に従い泳動し、そしてコロイダルブルーステイン（Ｃｏｌｌｏｉｄａｌ　Ｂｌｕｅ　Ｓｔａｉｎ）（インビトロゲン）で染色した。
【１２６５】
ＦＳＨサンプル（１５μｇ）を５μＬのＴｒｉｓバッファーで希釈し、そして１５μＬのサンプル添加バッファーと混合した（図１０５）。次いでサンプルは等電点電気泳動ゲル（ｐＨ３－７）（インビトロゲン）に乗せた（図１０８）。ゲルはインビトロゲンの指示に従い泳動そして固定し、次いでコロイダルブルーステインにより染色した。
【１２６６】
１０．ＣＨＯ細胞で組換え的に生産された組換えＦＳＨのグリコＰＥＧ化
この実施例は本発明の結合物の集成体を説明する。ジシアリル化ＦＳＨにＣＭＰ－（シアル酸）－ＰＥＧを結合した。
【１２６７】
組換えアシアロ－濾胞刺激ホルモンの調製。ＣＨＯから生産した組換え濾胞刺激ホルモン（ｒＦＳＨ）をこれらの実験に使用した。７，５００ＩＵのゴナル－Ｆ（Ｇｏｎａｌ－Ｆ）を８ｍＬの水に溶解した。ＦＳＨ溶液を５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　$CaCl_2$中で透析し、そして５００μＬにＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　Ｐｌｕｓ２０遠心フィルター中で濃縮した。この溶液の一部（４００μＬ）（～０．８ｍｇＦＳＨ）を小さいプラスチック製試験管に移し、そして２７５ｍＵのノイラミニダーゼＩＩ（ビブリオ　コレラ：Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａｅ）をそれに加えた。反応混合物は１６時間、３２℃で混合した。反応混合物を、前洗浄したＮ－（ｐ－アミノフェニル）オキサミン酸－アガロース結合体（８００μＬ）に加え、そして２４時間、４℃で穏やかに回転した。混合物を１０，０００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集めた。ビーズを０．６ｍＬのＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで３回洗浄し、０．４ｍＬのＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで１回、そして０．２ｍＬのＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで１回洗浄し、そしてすべての上清をプールした。上清は４℃で２リットルの５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対して透析し、そして５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対してさらに２回透析した。次いで透析した溶液はＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　Ｐｌｕｓ２０遠心フィルター中で４２０μＬに濃縮し、そして－２０℃で保存した。
【１２６８】
天然な、および脱シアリル化ｒＦＳＨサンプルを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ（図１０９）により分析した。ノベックスのＴｒｉｓ－グリシン８～１６％１ｍｍゲルをインビトロゲンから購入した。サンプル（７．５μ、１５μｇ）サンプルは、５μＬの５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　NaN_3バッファーで希釈し、１５μＬのサンプル添加バッファーおよび１μＬの９Ｍ　β－メルカプトエタノールと混合し、そして６分間、８５℃で加熱した。ゲルはインビトロゲンの指示に従い泳動し、そしてコロイダルブルーステイン（インビトロゲン）で染色した。等電点電気泳動ゲル（ｐＨ３－７）はインビトロゲンから購入した。サンプル（７．５μＬ、１５μｇ）を５μＬのＴｒｉｓバッファーで希釈し、そして１５μＬのサンプル添加バッファーと混合した。ゲルはインビトロゲンの指示に従い乗せ、泳動し、そして固定した。ゲルをコロイダルブルーステインにより染色した。天然な、および脱シアリル化ＦＳＨは水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦにより分析した。
【１２６９】

組換え濾胞刺激ホルモンのシアリル－ＰＥＧ化。脱シアリル化したＦＳＨ（１００μｇ、５４μＬ）およびＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａまたは１０ｋＤａ）（０．０５マイクロモル）を、０．５ｍＬのプラスチック製試験管中の２８μＬのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解した。試験管を簡単にボルテックス混合し、そして２０ｍＵのＳＴ３Ｇａｌ３を加えた（総容量１００μＬ）。試験管を再度、ボルテックス混合し、２４時間、３２℃で穏やかに混合し、そして反応は－８０℃に凍結することにより止めた。この反応のサンプルを上記のようにＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（図１１０）、ＩＥＦゲル（図１１１）およびＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析した。

【１２７０】

ＭＡＬＤＩはＰＥＧ化ｒＦＳＨについても行った。イオン化中、ＳＡ－ＰＥＧは糖タンパク質のＮ－グリカン構造から排除される。天然なＦＳＨは１３９２８にピークを与えた；ＡＳ－ｒＦＳＨ（１３２８２）；再シアリル化　ｒ－ＦＳＨ（１３３３２）；ＰＥＧ１００－ｒＦＳＨ（１３５１５；１４９６０（１）；１６４５５（２）；１７７９６（３）；１９３２１（４））；およびＰＥＧ　１００００（２３５６０（１）；２４７９０（２）；４５６７０（３）；および５６７６０（４））。

【１２７１】

１１．グリコＰＥＧ化ＦＳＨの薬物動態学的実験

この実施例は非－ＰＥＧ化ＦＳＨと比べて、本発明の方法に従い調製したグリコＰＥＧ化濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）の薬物動態学的特性の試験を説明する。

【１２７２】

ＦＳＨ、ＦＳＨ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａ）およびＦＳＨ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）は、標準的条件を使用して放射性ヨウ素化し（アマーシャム　バイオサイエンス、アーリントンハイツ、イリノイ州）、そして０．１％ＢＳＡを含有するリン酸緩衝化生理食塩水に配合した。リン酸バッファーで適切な濃度に希釈した後、各試験ＦＳＨタンパク質（それぞれ０．４μｇ）をメスのＳｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラット（２５０～３００ｇ体重）に静脈内注射し、そして０～８０時間の時点で採血した。血液サンプル中の放射活性は、ガンマカウンターを使用して分析し、そして標準的方法を使用して薬物動態学を分析した（図１１２）。ＦＳＨはＦＳＨ－ＰＥＧ（１ＫＤａ）よりもかなり急速に血液から排除され、これは次いでＦＳＨ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）よりも幾分く排除された。

【１２７３】

１２．ＦＳＨペプチドのバイオアッセイ

この実施例は培養したセルトリー（Ｓｅｒｔｏｒｉ）細胞に基づく濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）活性に関するバイオアッセイを説明する。このアッセイは複合糖質化を含むグリカン改造後のＦＳＨの生物活性を測定するために有用である。

【１２７４】

このバイオアッセイは、黄体形成ホルモン（ＬＨ）ではなくＦＳＨが、非成熟老ラットから得られた培養したセルトリー細胞に加えられた時、生産されるエストラジオールの量との間に存在する用量－応答関係に基づく。外因性テストステロンはＦＳＨの存在下で１７β－ヒストラジオールに転換される。

【１２７５】

７～１０日齢のＳｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラットをセルトリー細胞を得るために使用した。屠殺後、精巣を被膜剥離し、そして組織はコラゲナーゼ（１ｍｇ／ｍｌ）、トリプシン（１ｍｇ／ｍｌ）、ヒアルロニダーゼ（１ｍｇ／ｍｌ）およびＤＮａｓｅ（５μｇ／ｍｌ）中で５～１０分間、インキューベーションすることにより分散させた。細管フラグメントはフラスコの底に沈み、そしてＰＢＳで洗浄した（１ｘ）。細管フラグメントは２０分間、同じ酵素を含有する媒質で再インキューベーションした：コラゲナーゼ（１ｍｇ／ｍｌ）、トリプシン（１ｍｇ／ｍｌ）、ヒアルロニダーゼ（１ｍｇ／ｍｌ）およびＤＮａｓｅ（５μｇ／ｍｌ）。

【１２７６】

細管フラグメントを均一化し、そして２４ウェルプレート中の無血清培地に入れた。ウェルあたり５ｘ１０^{5}細胞を分散させた。３７℃および５％ＣＯ$_{2}$で４８時間のインキューベーション後、新しい培地を細胞に加えた。無血清培地の組成：ＤＭＥＭ（１容量）、ハムの（Ｈａｍ’ｓ）Ｆ１０栄養混合物（１容量）、インスリン　１μｇ／ｍｌ、トランスフェリン　５μｇ／ｍｌ、ＥＧＦ　１０ｎｇ／ｍｌ、Ｔ４　２０ｐｇ／ｍｌ、ヒドロコルチゾン１０$^{-8}$Ｍ、レチン酸　１０$^{-6}$Ｍ。

【１２７７】

刺激実験は、標準ＦＳＨまたはサンプルとの３７℃および５％ＣＯ$_{2}$での２４時間のインキューベーションからなる。変動の平均アッセイ内係数は９％であり、そして変動の平均アッセイ間係数は１１％である。

【１２７８】

１７Ｂ－エストラジオールＥｌｉｓａキットＤＥ２０００（Ｒ＆Ｄシステムズ（Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ミネアポリス、ミネソタ州）を使用して、ＦＳＨ、ＦＳＨ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ＫＤａ）およびＦＳＨ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）とのインキューベーション後のエストラジオールレベルを定量した。

【１２７９】

手順は以下の通りであった：１００μｌのエストラジオール標準（キットにより提供され、そしてキットの使用説明書により調製した）、またはサンプルを１７Ｂ－エストラジオールＥＬｉｓａプレート（１つまたは複数）のウェルにピペットで加えた：５０μｌの１７Ｂ－エストラジオール結合物（キットにより提供され、そしてキットの使用説明書により調製した）を各ウェルに加えた；５０μｌの１７Ｂ－エストラジオール抗体溶液（キットにより提供され、そしてキットの使用説明書により調製した）を各ウェルに加えた；プレートを２時間、室温で２００ｒｐｍにてインキューベーションした；液体を各ウェルから吸引した；ウェルを４回、洗浄溶液を使用して洗浄した；すべての液体をウェルから除去した；２００μｌのｐＮＰＰ基質（キットにより提供され、そしてキットの使用説明書により調製した）をすべてのウェルに加え、そして４５分間インキューベーションした；５０μｌの停止溶液（キットにより提供され、そしてキットの使用説明書により調製した）を加え、そしてプレートを４０５ｎｍで読んだ（図１１３）。ＦＳＨ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）は１μｇ／ｍｌでセルトリー細胞の穏やかな刺激を現したが、ＦＳＨ－ＰＥＧ（１ＫＤａ）は非ＰＥＧ化ＦＳＨよりも最高５０％多くセルトリー細胞を刺激した。

【１２８０】

１３．トランスフェリンのグリコＰＥＧ化

この実施例はアシアロトランスフェリンの調製およびＰＥＧ－ＣＭＰ－シアル酸でのそのシアリル化を説明する。

【１２８１】

アシアロ－トランスフェリンの調製。ヒト－由来ホロ－トランスフェリン（１０ｍｇ）を５００μＬの５０ｍＭ　ＮａＯＡｃ、５ｍＭ　ＣａＣｌ$_{2}$、ｐＨ５．５に溶解した。この溶液に、５００ｍＵのノイラミニダーゼＩＩ（ビブリオ　コレラ：Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａｅ）を加え、そして反応混合物を２０．５時間、３７℃で穏やかに振盪した。反応混合物を、前洗浄したＮ－（ｐ－アミノフェニル）オキサミン酸－アガロース結合体（６００μＬ）に加え、そして２４時間、４℃で穏やかに回転させてビーズを洗浄した。混合物を１０，０００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集めた。反応混合物は１００μＬの３０ｍＭ　ＥＤＴＡを、２０時間、４℃で穏やかに回転させた洗浄ビーズに加えることにより５ｍＭ　ＥＤＴＡに合わせた。上清を２分間、１０，０００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集めた。ビーズを０．３５ｍＬの５０ｍＭ　ＮａＯＡｃ、５ｍＭ　ＣａＣｌ$_{2}$、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ５．５で５回洗浄し、そしてすべての上清をプールした。酵素溶液は４℃で２回、１５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４中で透析した。０．３ｍＬのトランスフェリン溶液（全部で３．３ｍＬ）を除去し、そして水に対して２回、透析した。残りは４℃でさらに２回、リン酸緩衝化生理食塩水に透析した。透析した溶液は－２０℃で保存した。タンパク質サンプルはＩＥＦ電気泳動により分析した。サ

ンプル（９μＬ、２５μｇ）を１６μＬのＴｒｉｓバッファーで希釈し、そして２５μＬのサンプル添加バッファーと混合し、そして等電点電気泳動ゲル（ｐＨ３－７）に乗せた。ゲルは標準的な手順を使用して泳動し、そして固定した。ゲルをコロイダルブルーステインにより染色した。

【１２８２】

アシアロートランスフェリンのシアリル－ＰＥＧ化。脱シアリル化トランスフェリン（２５０μｇ）およびＣＭＰ－シアル酸またはＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１ｋＤａまたは１０ｋＤａ）（０．０５マイクロモル）を、１．５ｍＬのプラスチック製試験管中の６９μＬの５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解した。試験管を簡単にボルテックス混合し、そして１００ｍＵのＳＴ３Ｇａｌ３を（９０μＬ）加えた（総容量２５０μＬ）。試験管を再度、ボルテックス混合し、そして２４時間、３２℃で穏やかに混合した。反応は－８０℃に凍結することにより止めた。ノベックスのＴｒｉｓ－グリシン８～１６％１ｍｍゲルをＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析に使用した（図１１４）。サンプル（２５μＬ、２５μｇ）は、２５μＬのサンプル添加バッファーおよび０．４μＬのβ－メルカプトエタノールと混合し、そして６分間、８５℃で加熱した。ゲルは標準条件を使用して泳動し、そしてコロイダルブルーステインで染色した。ＩＥＦゲルも上記のように行った図１１５）。サンプルを水に対して透析し、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦにより分析した。

【１２８３】

結果。ＭＡＬＤＩも行った。天然なトランスフェリン（７８７２９）；アシアロトランスフェリン（７８１９７）；再シアリル化トランスフェリン（７９６２６／８０７０３）；ＳＡ－ＰＥＧ　１ｋを含む（７９０３７（１）；８０９６１（２）；８２５３５（３）；８４７７８（４））；ＳＡ－ＰＥＧ　５ｋを含む（９０００３（２）；９６１１７（３）；９６１１７（４））；ＳＡ－ＰＥＧ　１０ｋを含む（１００３３６（２）；１１１４２１（３）；１２２５１０（４））。

【１２８４】

１４．ＢＨＫ細胞で生産された組換え第ＶＩＩａ因子のグリコＰＥＧ化

この実施例はＣＨＯ細胞で作られた組換え第ＶＩＩａ因子のＰＥＧ化を説明する。

【１２８５】

アシアロ－第ＶＩＩａ因子の調製。組換え第ＶＩＩａ因子はＢＨＫ細胞（乳児ハムスターの腎臓細胞）で生産された。第ＶＩＩａ因子（１４．２ｍｇ）を１ｍｇ／ｍｌでバッファー溶液（ｐＨ７．４、０．０５Ｍ　Ｔｒｉｓ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．００１Ｍ$CaCl_2$、０．０５％　NaN_3）に溶解し、そして３００ｍＵ／ｍＬのシアリダーゼ（ビブリオ　コレラ：Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａｅ）－アガロース結合体と３日間、３２℃でインキューベーションした。反応を監視するために、反応の少量のアリコートを適当なバッファーで希釈し、そしてインビトロゲンの手順に従いＩＥＦゲルを行った（図１１６）。混合物を３，５００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集めた。樹脂を３回（３×２ｍＬ）、上記バッファー溶液（ｐＨ７．４、０．０５Ｍ　Ｔｒｉｓ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％　NaN_3）で洗浄し、そして合わせた洗浄液をＣｅｎｔｒｉｃｏｎ－Ｐｌｕｓ－２０で濃縮した。残る溶液は０．０５Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．４）、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％　NaN_3とバッファー交換して１４．４ｍＬの最終容量とした。

【１２８６】

第ＶＩＩａ因子－ＳＡ－ＰＥＧ（１ＫＤａおよび１０ＫＤａ）の調製。脱シアリル化したｒ第ＶＩＩａ因子溶液を２つの７．２ｍｌの等量サンプルに分けた。各サンプルに、ＣＭＰ－ＳＡ－５－ＰＥＧ（１ＫＤａ）（７．４ｍｇ）またはＣＭＰ－ＳＡ－５－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）（７．４ｍｇ）のいずかれを加えた。ＳＴ３Ｇａｌ３（１．５８Ｕ）を両方の試験管に加え、そして反応混合物を３２℃で９６時間インキューベーションした。反応はインビトロゲンにより記載された試薬および条件を使用して、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルにより監視した。反応が完了した時、反応混合物をトーソー　ハースＴＳＫ－Ｇｅｌ－３０

００調製用カラムを使用して、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集めた。生成物を含む合わせた画分を４℃でＣｅｎｔｒｉｃｏｎ－Ｐｌｕｓ－２０遠心フィルター（ミリポア、ベットフォード、マサチューセッツ州）中で濃縮し、そして濃縮した溶液を再配合して１．９７ｍｇの第ＶＩＩａ因子－ＰＥＧを得た（ビシンクロニン酸タンパク質アッセイ、ＢＣＡアッセイ、シグマ－アルドリッチ、セントルイス、ミズーリ州）。反応生成物は、インビトロゲンにより供給された手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析した。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦにより分析した。図１１７は天然な第ＶＩＩａ因子に関するＭＡＬＤＩの結果を示す。図１１８は、１ＫＤａＰＥＧでＰＥＧ化された第ＶＩＩａ因子に関するＭＡＬＤＩの結果を含み、ここで１ＫＤａＰＥＧでＰＥＧ化された第ＶＩＩａ因子のピークが明らかである。図１１９は、１０ＫＤａＰＥＧでＰＥＧ化された第ＶＩＩａ因子に関するＭＡＬＤＩの結果を含み、ここで１０ＫＤａＰＥＧでＰＥＧ化された第ＶＩＩａ因子のピークが明らかである。図１２０はすべての反応生成物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を表し、ここで第ＶＩＩ因子－ＳＡ－ＰＥＧ（１０－ＫＤａ）のバンドが明らかである。

【１２８７】

１５．ＣＨＯ細胞で生産された第ＩＸ因子のグリコＰＥＧ化

この実施例はアシアロ第ＩＸ因子の調製およびＰＥＧ－ＣＭＰ－シアル酸を用いたそのシアリル化を説明する。

【１２８８】

ｒ第ＩＸ因子の脱シアリル化。凝固第ＩＸ因子（ｒ第ＩＸ因子）の組換え形は、ＣＨＯ細胞で作成した。６０００ＩＵのｒ第ＩＸ因子を全部で１２ｍｌのＵＳＰ H_2Oに溶解した。この溶液をＣｅｎｔｒｉｃｏｎ－Ｐｌｕｓ－２０、さらに６ｍＬのＵＳＰ H_2Oを含むＰＬ－１０遠心フィルターに移した。溶液を２ｍＬに濃縮し、そして１５ｍＬの５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、５ｍＭ $CaCl_2$、０．０５％NaN_3で希釈し、そして再濃縮した。希釈／濃縮を４回繰り返してバッファー交換を効率的に行って３．０ｍＬの最終容量とした。この容液から２．９ｍＬ（約２９ｍｇのｒ第ＩＸ因子）を小さいプラスチック製試験管に移し、そしてこれに５３０ｍＵのα２－３，６，８－ノイラミニダーゼ－アガロース結合体（ビブリオ コレラ：Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ、カルビオケム、４５０μＬ）を加えた。反応混合物を２６．５時間、３２℃で穏やかに回転させた。混合物を２分間、１０，０００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集めた。アガロースビーズ（ノイラミニダーゼを含む）を６回、０．５ｍＬの５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．１２、１Ｍ ＮａＣｌ、０，０５％ NaN_3で洗浄した。プールした洗浄液および上清を２分間、１０，０００ｒｐｍで再遠心して残存するアガロース樹脂を除去した。プールした脱シアリル化タンパク質溶液を同バッファーで１９ｍＬに希釈し、そしてＣｅｎｔｒｉｃｏｎ Ｐｌｕｓ２０ ＰＬ－１０遠心フィルター中で～２ｍＬに濃縮した。溶液を２回、１５ｍＬの５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3で希釈し、そして２ｍＬに再濃縮した。最後に脱シアリル化されたｒ第ＩＸ因子溶液は３ｍＬの最終容量（～１０ｍｇ／ｍＬ）にＴｒｉｓバッファーで希釈した。天然な、および脱シアリル化ｒ第ＩＸ因子のサンプルは、ＩＥＦ電気泳動により分析した。等電点電気泳動ゲル（ｐＨ３－７）は、最初に１０μＬのＴｒｉｓバッファーで希釈し、そして１２μＬのサンプル添加バッファーと混合した１．５μＬ（１５μｇ）のサンプルを使用して泳動した。標準的手順を使用してゲルを乗せ、泳動し、そして固定した。ゲルはコロイダルブルーステインにより染色し（図１２１）、脱シアリル化第ＩＸ因子に関するバンドを示した。

【１２８９】

ＰＥＧ（１ＫＤａおよび１０ＫＤａ）－ＳＡ－第ＩＸ因子の調製。脱シアリル化したｒ第ＩＸ因子（２９ｍｇ、３ｍＬ）を、２つの１５ｍＬの遠心管中の２つの１．５ｍＬ（１４．５ｍｇ）サンプルに分けた。各溶液を１２．６７ｍＬの５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3で希釈し、そしてＣＭＰ－Ｓ

Ａ－ＰＥＧ－１ｋまたは１０ｋ（７．２５マイクロモル）のどちらかを加えた。試験管を穏やかに上下して混合し、そして２．９UのＳＴ３Ｇａｌ３（３２６μＬ）を加えた（１４．５ｍＬの総容量）。試験管を再度、上下し、そして６５時間、３２℃で穏やかに回転した。反応は－２０℃で凍結することにより止めた。反応の１０μｇのサンプルをＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。ＰＥＧ化タンパク質はトーソー ハース Ｂｉｏｓｅｐ Ｇ３０００ＳＷ（２１．５×３０ｃｍ、１３μｍ）ＨＰＬＣカラムで、ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水、ｐＨ７．１（ギブコ）、６ｍＬ／分を使用して精製した。反応および精製は、ＳＤＳＰａｇｅおよびＩＥＦゲルを使用して監視した。ノベックスのＴｒｉｓ－グリシン４－２０％１ｍｍゲルに、２μＬの５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3バッファーで希釈し、そして１２μＬのサンプル添加バッファーおよび１μＬの０．５ＭＤＴＴと混合し、そして８５℃で６分間加熱した後の１０μＬ（１０μｇ）のサンプルを乗せた。ゲルはコロイダルブルーステインにより染色し（図１２２）、ＰＥＧ（１ＫＤａおよび１０ｋＤａ）－ＳＡ－第ＩＸ因子に関するバンドを示した。

【１２９０】

１６．第ＩＸ因子の直接シアリル－グリコＰＥＧ化

この実施例は、事前のシアリダーゼ処理無しのペプチドのシアリル－グリコＰＥＧ化の調製を説明する。ここで第ＩＸ因子は例示ペプチドである。

【１２９１】

第ＩＸ因子の直接シアリル－ＰＥＧ化（１０ＫＤａ）。第ＩＸ因子（１１００ＩＵ）を５ｍＬの２０ｍＭ ヒスチジン、２％シュクロースを含む５２０ｍＭ グリシンバッファー、０．０５％NaN_3および０．０１％ポリソルベート８０、ｐＨ５．０に溶解した。次いでＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）（２７．８ｍｇ、３．５マイクロモル）をこの溶液に加え、反応混合物を上下して穏やかに混合し、そして１．４UのＳＴ３Ｇａｌ３を加えた。反応混合物を１９時間、３２℃で穏やかに回転し、そして反応を凍結により止めた。反応混合物は、インビトロゲンにより記載された展開および染色（コロイダルブルー）条件を使用してＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルにより分析した。簡単に説明すると、サンプル（１０μＬ）を１２μＬのサンプル添加バッファーおよび２μＬの０．５Ｍ ＤＴＴと混合し、そして６分間、８５℃で加熱した（図１２３、レーン８、９および１０）。生成物はＳｕｐｅｒｄｅｘ２００ １０／２０カラム（アマーシャム、ウプサラ、スウェーデン）カラムで、ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水、ｐＨ７．１（ギブコ）、６ｍＬ／分で精製した。図（図１２３はＨＰＬＣで精製したＰＥＧ化第ＩＸ因子のバンド（レーン５）を含む。

【１２９２】

１７．グリコＰＥＧ化第ＩＸ因子のシアル酸キャッピング

この実施例は、シアリル－グリコＰＥＧ化ペプチドのシアル酸キャッピングの手順を説明する。ここで第ＩＸ因子は例示ペプチドである。

【１２９３】

第ＩＸ－ＳＡ－ＰＥＧのＮ－結合およびＯ－結合グリカンのシアル酸キャッピング（１０ＫＤａ）。精製したｒ第ＩＸ因子－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）（２．４ｍｇ）を、Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ（商標）Ｐｌｕｓ２０ＰＬ－１０（ミリポア社、ベッドフォード、マサチューセッツ州）遠心フィルター中で濃縮し、そしてバッファーを５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．２、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に交換して１．８５ｍＬの最終容量とした。タンパク質溶液を３７２μＬの同Ｔｒｉｓバッファーで希釈し、そして７．４ｍｇのＣＭＰ－ＳＡ（１２マイクロモル）を固体で加えた。溶液は上下することにより穏やかに混合し、そして０．１UのＳＴ３Ｇａｌ１および０．１ＵＳＴ３Ｇａｌ３を加えた。反応混合物を４２時間、３２℃で穏やかに回転した。

【１２９４】

反応の１０μｇのサンプルをＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。ノベックスのＴｒｉｓ－グリシン４－１２％１ｍｍゲルをインビトロゲンにより記載されているように行い、そ

してコロイダルブルーを使用して染色した。簡単に説明すると、サンプル、１０μＬ（１０μｇ）を１２μＬのサンプル添加バッファーおよび１μＬの０．５Ｍ　ＤＴＴと混合し、そして６分間、８５℃で加熱した（図１２３、レーン４）。

【１２９５】

１８．哺乳動物または昆虫系で発現したタンパク質のグリコＰＥＧ化：ＥＰＯ、インターフェロンαおよびインターフェロンβ

この実施例は哺乳動物または昆虫系で発現したＰＥＧ化ペプチドの調製を説明する。

【１２９６】

哺乳動物発現系から受容体の調製。ＣＭＰ－シアル酸ＰＥＧを使用してグリコＰＥＧ化されるペプチドは、ガラクトースで終結するグリカンを持つ必要がある。哺乳動物発現系からのほとんどのペプチドは、最初に除去される必要がある末端シアル酸を有する。

【１２９７】

シアリダーゼ消化。ペプチドはシアリダーゼを使用して脱シアリル化する。典型的な手順には、１ｍｇ／ｍＬ溶液のペプチド（Ｔｒｉｓ－緩衝化塩溶液中、ｐＨ７．２、５ｍＭ　$CaCl_2$を加えて含む）を、０．２Ｕ／ｍＬの固定化シアリダーゼ（ビブリオ　コレラ：Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａｅ由来、カルビオケム）と３２℃で２４時間インキューベーションすることを含む。微生物の成長は、滅菌濾過または０．０２％のアジ化ナトリウムを包含することにより止めることができる。次いで樹脂を遠心または濾過により取り出し、次いで洗浄してトラップされたペプチドを回収する。この時点で、ＥＤＴＡを溶液に加えて樹脂から浸出したシアリダーゼは阻害することができる。

【１２９８】

昆虫発現系の調製。ＥＰＯ、インターフェロン－アルファおよびインターフェロン－ベータは、酵母、植物または昆虫細胞のような非哺乳動物系でも発現させることができる。ＣＭＰ－シアル酸ＰＥＧを使用してグリコＰＥＧ化されるペプチドは、ガラクトースで終結するグリカンを持つ必要がある。例えば昆虫細胞で発現されるペプチド上のＮ－グリカンのほとんどは、トリマンノシルコアである。これらのグリカンはそれらがシアリルトランスフェラーゼの受容体である前に、最初にガラクトースで終結するグリカンに改築される。

【１２９９】

トリマンノシルコアから受容体グリカンの構築。５ｍＭ　$MnCl_2$、５ｍＭ　ＵＤＰ－ｇｌｃＮＡｃ、０．０５Ｕ／ｍＬ　ＧＬＣＮＡＣＴ　Ｉ、０．０５Ｕ／ｍＬ　ＧＬＣＮＡＣＴ　ＩＩを含むＴｒｉｓ－緩衝化塩溶液、ｐＨ７．２中のペプチド（１ｍｇ／ｍＬ）を３２℃で２４時間、または反応が実質的に完了するまでインキューベーションする。微生物の成長は、滅菌濾過または０．０２％のアジ化ナトリウムを包含することにより止めることができる。バッファー交換をしてＵＤＰおよび他の低分子を除去した後、ＵＤＰ－ガラクトースおよび$MnCl_2$をそれぞれ５ｍＭまで加え、ガラクトシルトランスフェラーゼを０．０５Ｕ／ｍＬまで加え、そして３２℃で２４時間、または反応が実質的に完了するまでインキューベーションする。微生物の成長は、滅菌濾過または０．０２％のアジ化ナトリウムを包含することにより止めることができる。このペプチドはこれでグリコＰＥＧ化の準備ができている。

【１３００】

Ｏ－結合グリカンの構築。同様の方法をインターフェロン　アルファについて使用して、酵素的に所望するＯ－グリカンＧａｌ－ＧａｌＮＡｃを生成することができる。必要ならば、セリンまたはトレオニンに連結したＧａｌＮＡｃを、適当なペプチドＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼ（例えばＧａｌＮＡｃ　Ｔ１、ＧａｌＮＡｃ　Ｔ２、Ｔ３、Ｔ４等）およびＵＤＰ－ＧａｌＮＡｃを使用して加えることができる。また必要ならば、ガラクトースをガラクトシルトランスフェラーゼおよびＵＤＰ－ガラクトースを使用して加えることができる。

【１３０１】

シアリルトランスフェラーゼを使用したグリコＰＥＧ化。Ｔｒｉｓ緩衝化塩溶液＋０．

０２％アジ化ナトリウム中の末端ガラクトースを持つ糖ペプチド（１ｍｇ／ｍＬ）を、ＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（０．７５ｍＭ）および０．４Ｕ／ｍＬシアリルトランスフェラーゼ（ＥＰＯおよびインターフェロンベータ上のＮ－グリカンにはＳＴ３Ｇａｌ３またはＳＴ３Ｇａｌ４；インターフェロンアルファ上のＯ－グリカンについてはＳＴ３Ｇａｌ４またはＳＴ３Ｇａｌ１）と、３２℃で２４時間インキューベーションする。使用できる他のトランスフェラーゼには、フォトバクテリウム　ダムセーラ（Ｐｈｏｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｄａｍｓｅｌｌａ）に由来する２，６－シアリルトランスフェラーゼを含む。受容体ペプチド濃度は、最も好ましくは０．１ｍｇ／ｍＬからペプチドの溶解度の限界までの範囲である。ＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧの濃度は利用可能な部位を越えて過剰にあるように十分であるべきであるが、ＰＥＧによるペプチドの溶解度の問題を引き起こすほど高いべきではなく、そして５０μＭから５ｍＭまでの範囲でよく、そして温度は２℃から４０℃の範囲でよい。反応が完了するために必要な時間は、温度、受容体基質に対する酵素の相対的量、供与体基質濃度およびｐＨに依存するだろう。

【１３０２】

１９．昆虫細胞で生産されたＥＰＯのグリコＰＥＧ化

この実施例は昆虫細胞が発現したＥＰＯからＰＥＧ化２アンテナ状ＥＰＯの調製法を説明する。

【１３０３】

バキュロウイルス／Ｓｆ９発現系（プロテインサイエンス社、メリデン、コネチカット州）に由来する組換えヒトエリトロポエチン（ｒｈＥＰＯ）をグリカン分析に供し、そして得られたグリカンは、コアフコースを含む主にトリマンノシルコアであり、少ない割合で単一ＧｌｃＮＡｃを有するグリカンも存在することが示された（図１２４）。

【１３０４】

ＧｎＴ－ＩおよびＧｎＴ－ＩＩを用いたＮ－アセチルグルコサミンの付加。２ロットのｒｈＥＰＯ（１ｍｇ／ｍＬ）をＧｎＴ－ＩおよびＧｎＴ－ＩＩ、５ｍＭ　ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃ、２０ｍＭ　$MnCl_2$および０．０２％アジ化ナトリウムと、１００ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ６．５中で３２℃にて２４時間インキューベーションした。ロットＡは２０ｍｇのＥＰＯおよび１００ｍＵ／ｍＬのＧｎＴ－Ｉおよび６０ｍＵ／ｍＬのＧｎＴ－ＩＩを含んだ。ロットＢは４１ｍｇのＥＰＯおよび４１ｍＵ／ｍＬのＧｎＴＩ＋５０ｍＵ／ｍＬのＧｎＴ－ＩＩを含んだ。反応後、サンプルはゲル濾過（ＰＤ１０カラム、ファルマシアＬＫＢバイオテクノロジー社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）により脱塩した。

【１３０５】

２ＡＡ　ＨＰＬＣによるグリカンのプロファイリングは、ロットＡが９２％、２つのＧｌｃＮＡｃを持つ２アンテナ状構造（１つのＧｌｃＮＡｃを有するバランス）に転換されたことを明らかにした。ロットＢは所望の生成物に９７％転換されたことが示された（図１０２Ａおよび１０２Ｂ）。

【１３０６】

ＥＰＯロットＡのガラクトシル化。ＥＰＯ（ロットＡの～１６ｍｇ）を、ＧｎＴＩＩで処理してＧｌｃＮＡｃの付加を完成した。反応は１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ＥＰＯｍｇ／ｍｌ、１ｍＭ　ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃ、５ｍＭ　$MnCl_2$、０．０２％アジ化ナトリウムおよび０．０２Ｕ／ｍｌＧｎＴＩＩを含む５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．２中で、３２Ｃにて４時間行った。ＥＰＯのガラクトシル化は３ｍＭまでのＵＤＰ－ガラクトースおよび０．５Ｕ／ｍｌまでのＧａｌＴを添加して行い、そしてインキューベーションを３２Ｃにて４８時間続行した。

【１３０７】

次いでガラクトシル化ＥＰＯは、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ６中、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ１．６／６０カラムでのゲル濾過により精製した。次いでＥＰＯを含むピークを２ＡＡ　ＨＰＬＣにより分析した。ＨＰＬＣデータに基づき、グリカンの～８５％が２個のガラクトースを含み、そしてグリカンの～１５％がガラクトシル化反応後にガラクトースを持たなかった。

【１３０８】
ガラクトシル化ＥＰＯのシアリル化。ガラクトシル化ＥＰＯのシアリル化は、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、０．５ｍｇ／ｍｌ ＥＰＯ、２００ｍＵ／ｍｌ ＳＴ３Ｇａｌ３および０．５ｍＭ ＣＭＰ－ＮＡＮまたはＣＭＰ－ＮＡＮ－ＰＥＧ（１ＫＤａ）またはＣＭＰ－ＮＡＮ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）のいずれかを含む１００ｍＭ Ｔｒｉｓ、ｐＨで、４８時間、３２Ｃで行った。２個のガラクトース残基を有するほとんどすべてのグリカンが、ＣＭＰ－ＮＡＮとの反応後に完全にシアリル化された（２個のシアル酸／グリカン）。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ分析はＨＰＬＣデータを確認した。

【１３０９】
ガラクトシル化ＥＰＯのＰＥＧ化。ＣＭＰ－ＮＡＮ－ＰＥＧ（１ＫＤａ）およびＣＭＰ－ＮＡＮ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）を使用したＰＥＧ化反応については、反応混合物のアリートをＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した（図１２５）。ＥＰＯペプチドの分子量は各糖の付加で増加し、そしてＰＥＧ化反応後には分子量がさらに劇的に増加した。

【１３１０】
ＥＰＯのインビトロバイオアッセイ。インビトロのＥＰＯバイオアッセイ（Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇ ｅｔ ａｌ，１９９６，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ａｎａｌ．１４：１４５５－１４６９から調整）は、多レベルのＥＰＯに対するＴＦ－１細胞系の反応性に基づく。ＴＦ－１細胞は骨髄腫前駆体細胞の増殖および分化を調査するために良い系を提供する。この細胞系はＴ．Ｋｉｔａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．により１９８７年１０月に重篤な再生不良性貧血の３５歳の日本人男性に由来するヘパリン処理した骨髄吸引サンプルで樹立された。これらの細胞はインターロイキン３または顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）に完全に依存している。

【１３１１】
ＴＦ－１細胞系（ＡＴＣＣ、カタログ番号ＣＲＬ－２００３）をＰＲＭＩ＋ＦＢＳ１０％＋ＧＭ－ＣＳＦ（１２ｎｇ／ｍｌ）中で成長させ、そして３７Ｃ５％CO_2でインキューベーションした。細胞を５０００細胞／ｍｌ（培地）の濃度に懸濁し、そして２００μｌを９６ウェルプレートに分配した。細胞を種々の濃度のＥＰＯ（０．１μｇ／ｍｌ～１０μｇ／ｍｌ）と４８時間インキューベーションした。次に２５μｌのＭＴＴ（シグマＭ５６５５）を５ｍｇ／ｍｌで加え、プレートを３７℃で２０分～４時間インキューベーションし、１００μｌのイソプロパノール／ＨＣｌ溶液（１００ｍｌのイソプロパノール＋３３３μｌのＨＣｌ ６Ｎ）を加え、５７０ｎｍ、および６３０ｎｍまたは６９０ｎｍのＯＤを読み、そして５７０ｎｍの読み取りから６３０ｎｍまたは６９０ｎｍの読み取りを引くことによりＭＴＴ生存能アッセイを行った。

【１３１２】
図１２６は、シアリル化ＥＰＯおよび１ＫＤａまたは１０ＫＤａのＰＥＧでグリコＰＥＧ化されたＥＰＯをインビトロのＥＰＯ生物活性試験に供した時の結果を含む。１ＫＤａのＰＥＧでグリコＰＥＧ化されたＥＰＯは、両方とも約５μｇ／ｍｌの濃度である時に非グリコＰＥＧ化ＥＰＯとほとんど同じ活性を有した。１０ＫＤａのＰＥＧでグリコＰＥＧ化されたＥＰＯは、両方とも約５μｇ／ｍｌの濃度である時に非グリコＰＥＧ化ＥＰＯの約半分の活性を有した。

【１３１３】
２０．ＣＨＯ細胞で生産されたインターフェロンαのグリコＰＥＧ化

アシアロ－インターフェロンαの調製。ＣＨＯ細胞から生産されたインターフェロンαを２．５ｍｇ／ｍＬで５０ｍＭ Ｔｒｉｓ ５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ７．４、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、５ｍＭ $CaCl_2$に溶解し、そして５００μＬにＣｅｎｔｒｉｃｏｎ Ｐｌｕｓ２０遠心フィルター中で濃縮する。この溶液を３００ｍＵ／ｍＬのノイラミニダーゼＩＩ（ビブリオ コレラ：Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）と１６時間、３２℃インキューベーションする。反応を監視するために、反応の小アリコートを適当なバッファーで希釈し、そしてＩＥＦゲルを行う。次いで反応混合物を、前洗浄したＮ－（ｐ－アミノフェニル）オキサミン酸－アガロース結合体（８００μＬ／ｍＬ反応容量）に

加え、そして洗浄したビーズを２４時間、４℃で穏やかに回転する。混合物を１０，０００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集める。ビーズをＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで３回洗浄し、０．４ｍＬのＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで１回、そして０．２ｍＬのＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで１回洗浄し、すべての上清をプールする。上清は４℃で５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対して透析し、そして５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対してさらに２回透析する。次いで透析した溶液はＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　Ｐｌｕｓ２０遠心フィルターを使用して濃縮し、そして－２０℃で保存する。ＩＥＦゲルに関する条件は、インビトロゲンにより提供される手順および試薬に従い泳動する。天然な、および脱シアリル化Ｇ－ＣＳＦのサンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３１４】

インターフェロン－アルファ－（アルファ２，３）－シアリル－ＰＥＧの調製。脱シアリル化インターフェロンアルファを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を１ｍＭ　ＣＭＰ－シアル酸－ＰＥＧおよび０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ１と３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸－ＰＥＧの取り込みを監視するために、反応の小アリコートにＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ－蛍光リガンドを加え；ペプチドへ取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。ペプチドへの蛍光標識の取り込みは、イン－ラインの蛍光検出器を使用して定量する。２日後、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。天然な、および脱シアリル化インターフェロン－アルファのサンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３１５】

インターフェロン－アルファ－（アルファ２，８）－シアリル－ＰＥＧの調製。アルファ２，３－シアリル化Ｏ－結合グリカンを含むＣＨＯで生産されたインターフェロン－アルファを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を１ｍＭ　ＣＭＰ－シアル酸－ＰＥＧおよび０．１Ｕ／ｍＬのＣＳＴ－ＩＩと３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸－ＰＥＧの取り込みを監視するために、反応の小アリコートにＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ－蛍光リガンドを加え；ペプチドへの取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。ペプチドへの蛍光標識の取り込みは、イン－ラインの蛍光検出器を使用して定量する。２日後、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。天然な、およびＰＥＧ化インターフェロン－アルファのサンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３１６】

インターフェロン－アルファ－（アルファ２，６）－シアリル－ＰＥＧの調製。Ｏ－結合ＧｌｃＮＡｃのみを含むインターフェロン－アルファを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を１ｍＭ　ＣＭＰ－シアル酸－ＰＥＧおよび０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ６ＧｌｃＮＡｃＩまたはＩＩと３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸－ＰＥＧの取り込みを監視するために、反応の小アリコートにＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ－蛍光リガンドを加え；ペプチドへの取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してト

ーソー ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。ペプチドへの蛍光標識の取り込みは、インーラインの蛍光検出器を使用して定量する。２日後、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。天然な、およびＰＥＧ化インターフェロンーアルファのサンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ ＭＳにより分析する。

【１３１７】

２１．ＣＨＯ細胞で生産されたＧ－ＣＳＦのグリコＰＥＧ化

アシアロ－顆粒球－コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）の調製。ＣＨＯ細胞で生産されたＧ－ＣＳＦを２．５ｍｇ／ｍＬで５０ｍＭ Ｔｒｉｓ ５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、５ｍＭ $CaCl_2$に溶解し、そして５００μＬにＣｅｎｔｒｉｃｏｎ Ｐｌｕｓ２０遠心フィルター中で濃縮する。この溶液を３００ｍＵ／ｍＬのノイラミニダーゼＩＩ（ビブリオ コレラ：Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）と１６時間、３２℃でインキューベーションする。反応を監視するために、反応の小アリコートを適当なバッファーで希釈し、そしてＩＥＦゲルを行う。次いで反応混合物は前洗浄したＮ－（ｐ－アミノフェニル）オキサミン酸－アガロース結合体（８００μＬ／ｍＬ反応容量）に加え、そして洗浄したビーズを２４時間、４℃で穏やかに回転する。混合物を１０，０００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集める。ビーズをＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで3回洗浄し、０．４ｍＬのＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで１回、そして０．２ｍＬのＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで１回洗浄し、すべての上清をプールする。上清は４℃で５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対して透析し、そして５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対してさらに２回透析する。次いで透析した溶液はＣｅｎｔｒｉｃｏｎ Ｐｌｕｓ２０遠心フィルターを使用して濃縮し、そして－２０℃で保存する。ＩＥＦゲルに関する条件は、インビトロゲンにより提供される手順および試薬に従い泳動する。天然な、および脱シアリル化Ｇ－ＣＳＦのサンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ ＭＳにより分析する。

【１３１８】

Ｇ－ＣＳＦ－（アルファ２，３）－シアリル－ＰＥＧの調製。脱シアリル化Ｇ－ＣＳＦを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を１ｍＭ ＣＭＰ－シアル酸－ＰＥＧおよび０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ１と３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸－ＰＥＧの取り込みを監視するために、反応の小アリコートにＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ－蛍光リガンドを加え；ペプチドへ取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。ペプチドへの蛍光標識の取り込みは、インーラインの蛍光検出器を使用して定量する。２日後、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。天然な、およびＰＥＧ化Ｇ－ＣＳＦのサンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ ＭＳにより分析する。

【１３１９】

Ｇ－ＣＳＦ－（アルファ２，８）－シアリル－ＰＥＧの調製。アルファ２，３－シアリル化Ｏ－結合グリカンを含むＣＨＯ細胞で生産されたＧ－ＣＳＦを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を１ｍＭ ＣＭＰ－シアル酸－ＰＥＧおよび０．１Ｕ／ｍＬのＣＳＴ－ＩＩと３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸－ＰＥＧの取り込みを監視するために、反応の小アリコートにＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ－蛍光リガンドを加え；ペプチドへの取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー ハ

ースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。ペプチドへの蛍光標識の取り込みは、イン－ラインの蛍光検出器を使用して定量する。２日後、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。天然な、およびＰＥＧ化Ｇ－ＣＳＦのサンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３２０】

Ｇ－ＣＳＦ－（アルファ２，６）－シアリル－ＰＥＧの調製。Ｏ－結合ＧａｌＮＡｃのみを含むＧ－ＣＳＦを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を１ｍＭ　ＣＭＰ－シアル酸－ＰＥＧおよび０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ６ＧａｌＮＡｃＩまたはＩＩと３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸－ＰＥＧの取り込みを監視するために、反応の小アリコートにＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ－蛍光リガンドを加え；ペプチドへ取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。ペプチドへの蛍光標識の取り込みは、イン－ラインの蛍光検出器を使用して定量する。２日後、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。天然な、およびＰＥＧ化Ｇ－ＣＳＦのサンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３２１】

２２．ＣＨＯ細胞で生産されたＥＰＯのＯ－結合グリカンのグリコＰＥＧ化

Ｏ－結合ＥＰＯ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ｋＤａ）の調製。元々ＣＨＯ細胞で生産されたアシアロ－ＥＰＯを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を５ｍＭ　ＣＭＰ－ＳＡおよび０．１Ｕ／ｍＬ　ＳＴ３Ｇａｌ３と３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸のＮ－結合グリカンへの取り込みを監視するために、反応の小アリコートにＣＭＰ－ＳＡ－^{14}Ｃを加え；ペプチドは、メタノール、水を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により分離し、そして生成物は放射能検出器を使用して検出する。反応が完了した時、溶液はＣｅｎｔｒｉｃｏｎ－２０フィルターを使用して濃縮する。残る溶液はＣＭＰ－ＳＡがもはや検出できなくなるまで０．０５Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．２）、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3とバッファーと交換して７．２ｍＬの最終容量とする。次いで残りを０．０５Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．２）、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に２．５ｍｇ／ｍＬタンパク質で再懸濁する。溶液はＯ－結合部位をグルコシル化するために、１ｍＭのＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）およびＳＴ３Ｇａｌ１と３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸－ＰＥＧの取り込みを監視するために反応の小アリコートは、トーソー　ハースＴＳＫ－ｇｅｌ－３０００分析カラムを使用したゲル濾過により分離し、ＰＢＳｐＨ７．０で溶出し、そしてＵＶ検出により分析する。反応が完了した時、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．０）を使用してトーソー　ハースＴＳＫ－ｇｅｌ－３０００調製カラムを使用して精製し、ＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３２２】

２３．抗体のグリコＰＥＧ化

この実施例は、抗体分子のＯ－結合グリカンをＰＥＧ化するための手順を説明する。ここでＥｎｂｒｅｌ（商標）は例として使用するが、当業者はこの手順が多くの抗体分子に使用できると考えるだろう。

【１３２３】
Ｅｎｂｒｅｌ（商標）－ＳＡ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）の調製。ＰＥＧ化の前にシアリル化されたＯ－結合グリカンを持つか、または持たないいずれかのＥｎｂｒｅｌ（商標）（ＴＮＦ－レセプター－ＩｇＧ$_1$－キメラ）を、２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＭｎＣｌ$_2$、０．０５％ＮａＮ$_3$、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を５ｍＭのＵＤＰ－ガラクトースおよび０．１Ｕ／ｍＬのガラクトシルトランスフェラーゼと３２℃で２日間インキューベーションしてＦｃ領域グルカンをガラクトースでキャップする。ガラクトースの取り込みを監視するために、反応の小アリコートに^{14}Ｃ－ガラクトース－ＵＤＰリガンドを加え；ペプチドへ取り込まれた標識は、メタノールおよび水でトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。放射性標識のペプチドへの取り込みは、イン－ライン検出器を使用して定量する。

【１３２４】
反応が完了した時、溶液を１ｍＭのＣＭＰ－シアル酸－リンカーＰＥＧ（１０ＫＤａ）および０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３と３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸－リンカー－ＰＥＧの取り込みを監視するために、ペプチドはＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用したトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでゲル濾過により分離する。反応が完了した時、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＴＳＫ－Ｇｅｌ－３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。生成物を含む画分を合わせ、濃縮し、バッファー交換し、そして凍結乾燥する。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３２５】
２４．Ｒｅｍｉｃａｄｅ（商標）抗体のグリコＰＥＧ化

この実施例は、ＰＥＧ分子をＦｃ領域グリカンに導入することにより組換え抗体分子をグリコＰＥＧ化するための手順を説明する。ここでＲｅｍｉｃａｄｅ（商標）、ＴＮＦ－Ｒ：ＩｇＧＦｃ領域融合タンパク質は例示ペプチドである。

【１３２６】
Ｒｅｍｉｃａｄｅ（商標）－Ｇａｌ－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）の調製。Ｒｅｍｉｃａｄｅｌ（商標）を、２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＭｎＣｌ$_2$、０．０５％ＮａＮ$_3$、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を１ｍＭのＵＤＰ－ガラクトース－ＰＥＧ（１０ＫＤａ）および０．１Ｕ／ｍＬのガラクトシルトランスフェラーゼと３２℃で２日間インキューベーションしてＦｃ領域グルカンにＰＥＧを導入する。ガラクトースの取り込みを監視するために、反応の小アリコートに^{14}Ｃ－ガラクトース－ＵＤＰリガンドを加え；ペプチドへ取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用したトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。放射性標識のペプチドへの取り込みは、イン－ライン放射能検出器を使用して定量する。

【１３２７】
反応が完了した時、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＴＳＫ－Ｇｅｌ－３０００調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。生成物を含む画分を合わせ、濃縮し、バッファー交換し、そして凍結乾燥する。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３２８】
２５．ＧｌｃＮＡｃ－ＡＳＮ構造の生成およびＰＥＧ化：酵母で生産されたＴＰＡ

この実施例は、酵母で発現されたＴＰＡのようなペプチド上のＰＥＧ化ＧｌｃＮＡｃ－ＡＳＮ構造の調製を説明する。

【１３２９】
酵母での発現は、１つのＮ－結合マンナン型構造を含むＴＰＡを生じると予想される。この組換え糖タンパク質は最初にエンドグリコシダーゼＨで処理してペプチドのアスパラギン（Ａｓｎ）残基上にＧｌｃＮＡｃ構造を生成する。
【１３３０】
次いでペプチド／タンパク質骨格上のＧｌｃＮＡｃ－Ａｓｎ構造は、ガラクトースまたはガラクトース－ＰＥＧで、それぞれＵＤＰ－ガラクトースまたはＵＤＰ－ガラクトース－６－ＰＥＧ、およびＧａｌＴ１のようなガラクトシルトランスフェラーゼを使用して修飾する。１例では、ガラクトース－ＰＥＧは末端残基である。２例目はガラクトースがさらにＳＡ－ＰＥＧでＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ供与体およびＳＴ３ＧａｌＩＩＩのようなシアリルトランスフェラーゼを使用して修飾される。別の態様では、ペプチド／タンパク質骨格上のＧｌｃＮＡｃ－Ａｓｎ構造が上記のようにガラクトシル化およびシアリル化され、そしてさらにＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧおよびカンピロバクター　ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）ｃｓｔ－ＩＩ遺伝子によりコードされる酵素のようなα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してシアリル化される。
【１３３１】
２６．ＧｌｃＮＡｃ－ＡＳＮ構造の生成およびＰＥＧ化：サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）で生産されたＧＭ－ＣＳＦ
この実施例は、ＰＥＧ化されたＧｌｃＮＡｃ－Ａｓｎ構造を持つ組織アクチベーターの調製を説明する。
【１３３２】
酵母で発現される組換えＧＭ－ＣＳＦは、２Ｎ－結合および２Ｏ－結合グリカンを含むと予想される。Ｎ－結合グリカンは分枝マンナン型であるはずである。この組換え糖タンパク質は、エンドグリコシダーゼＨ、エンドグリコシダーゼ－Ｆ１、エンドグリコシダーゼ－Ｆ２、エンドグリコシダーゼ－Ｆ３、エンドグリコシダーゼ－Ｍからなる群から選択されるエンドグリコシダーゼ単独で、またはマンノシダーゼＩ、ＩＩおよびＩＩＩと組み合わせて処理してペプチド／タンパク質骨格上のアスパラギン（Ａｓｎ）残基上にＧｌｃＮＡｃ結節（ｎｕｂ）を生成する。
【１３３３】
次いでペプチド／タンパク質骨格上のＧｌｃＮＡｃ－Ａｓｎ構造は、ガラクトースまたはガラクトース－ＰＥＧで、それぞれＵＤＰ－ガラクトースまたはＵＤＰ－ガラクトース－６－ＰＥＧ、およびＧａｌＴ１のようなガラクトシルトランスフェラーゼを使用して修飾される。１例では、ガラクトース－ＰＥＧは末端残基である。２例目はガラクトースがさらにＳＡ－ＰＥＧでＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ供与体およびＳＴ３ＧａｌＩＩＩのようなシアリルトランスフェラーゼを使用して修飾される。別の態様では、ペプチド／タンパク質骨格上のＧｌｃＮＡｃ－Ａｓｎ構造がガラクトシル化され、そして上記のようにシアリル化され、次いでＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧおよびカンピロバクター　ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）ｃｓｔ－ＩＩ遺伝子によりコードされる酵素のようなα２，８－シアリルトランスフェラーゼを使用してさらにシアリル化される。
【１３３４】
Ｃ．低分子の複合糖質化（Ｇｌｙｃｏ－ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）
２７．ＣＭＰ－ＳＡ－レブリネートの合成
この実施例はＣＭＰ－ＳＡ－レブリネートの合成手順を説明する。
【１３３５】
２－レブリンアミド－２－デオキシ－Ｄ－マンノピラノースの調製。イソブチルクロロホルメート（１００μＬ、０．７７ミリモル）を、レブリン酸（８６μＬ、０．８４ミリモル）、無水ＴＨＦ（３ｍＬ）およびトリエチルアミン（１２７μＬ、０．９１ミリモル）の溶液に滴下した。この溶液を３時間、室温で撹拌し、次いでＤ－マンノサミンヒドロクロライド（１５１ｍｇ、０．７ミリモル）、トリエチルアミン（１２７μＬ、０．９１ミリモル）、ＴＨＦ（２ｍＬ）および水（２ｍＬ）を含む溶液に滴下した。反応混合物を

１５時間撹拌し、次いでロータリーエバポレーションにより濃縮乾固した。クロマトグラフィー（シリカ、５～１５％のＭｅＯＨ／CH_2Cl_2の段階勾配）を使用して生成物を単離し、０．１５６ｇ（７３％収率）の白色固体を得た：R_f＝　０．４１（シリカ，$CHCl_3$／ＭｅＯＨ／　水　６／４／１）；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（D_2O，５００　ＭＨｚ）２．２３（ｓ，３Ｈ），２．２４（ｓ，３Ｈ），２．５７（ｔｄ，Ｊ＝６．５４，３．６８，２Ｈ）２．６３（ｔ，Ｊ＝６．７１，２Ｈ），２．８６－２．９０（ｍ，４Ｈ），３．４２（ｍ，１Ｈ），３．５３（ｔ，Ｊ＝９．７６，１Ｈ），３．６４（ｔ，Ｊ＝９．４３，１Ｈ），３．８０－３．９１（ｍ，４Ｈ），４．０４（ｄｄ，Ｊ＝９．７９，４．７１，１Ｈ），４．３１（ｄｄ，Ｊ＝４．６３，１．１４，１Ｈ），４．４５（ｄｄ，Ｊ＝４．１６，１．１３，１Ｈ），５．０２（ｄ，Ｊ＝１．２９，１Ｈ），５．１１（ｓ，Ｊ＝１．３０，１Ｈ），ＭＳ（ＥＳ）；理論値　$C_{11}H_{19}NO_7$，２７７．２７；測定値［Ｍ＋１］　２７７．９。

【１３３６】

５－レブリンアミド－３，５－ジデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネートの調製。ピルビン酸ナトリウム（０．６１６ｇ、５．６ミリモル）およびＮ－アセチルノイラミン酸アルドラーゼ（５０Ｕ）を、２－レブリンアミド－２－デオキシ－Ｄ－マンノピラノース（０．１５６ｇ、０．５６ミリモル）の溶液（０．１Ｍ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５中）に加えた。反応混合物を３７℃に２０時間加熱し、その後、凍結した。次いで反応混合物はＣ１８シリカを通して濾過し、凍結し、そして凍結乾燥させた。粗固体はフラッシュクロマトグラフィー（シリカ、最初に１０～４０％ＭｅＯＨ／CH_2Cl_2、次いでCH_2Cl_2／ＭｅＯＨ／H_2O　６／４／０．５を使用する）を使用して精製した。適切な画分を合わせ、そして濃縮して４５ｍｇ（８０％収率）の白色固体を得た：R_f＝０．１５（シリカ，$CHCl_3$／ＭｅＯＨ／水　６／４／１）；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（D_2O，５００ＭＨｚ）８１．８２（ｔ，Ｊ＝１１．９，１Ｈ），２．２１（ｄｄ，Ｊ＝１３．７６，４．８４，１Ｈ），２．２３（ｓ，３Ｈ），２．５７（ａｐｐ　ｑ，Ｊ＝６．６，２Ｈ），２．８６－２．９５（ｍ，２Ｈ），３．１５－３．１８（ｍ，１Ｈ），３．２８－３．６１（複合，１Ｈ），３．６０（ｄｄ，Ｊ＝１１．９１，６．６６，１Ｈ），３．７５（ｔｄ，Ｊ＝６．６５，２．６２，１Ｈ），３．８４（ｄｄ，Ｊ＝１１．８９，２．６５，１Ｈ），３．８８－４．０１（複合，２Ｈ），４．０４（ｔｄ，Ｊ＝１１．８，４．６７，１Ｈ），ＭＳ（ＥＳ）；理論値　$C_{14}H_{23}NO_{10}$，３６５．３３；測
定値（［Ｍ－１］$^-$），３６３．９７。

【１３３７】

シチジン－５’－モノホスホリル－（５－レブリンアミド－３，５－ジデオキシ－β－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネート）の調製。５－レブリンアミド－３，５－ジデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－２－ノヌロピラノスロネート（５０ｍｇ、１３７マイクロモル）を２ｍＬの１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５バッファーに溶解し、そして１ＭのＭｎCl_2（３００μＬ、３００マイクロモル）を加えた。ＣＴＰ－２Na^+（７９ｍｇ、１．５マイクロモル）を５ｍＬのＨＥＰＥＳバッファーに溶解し、そして糖に加えた。シアリルトランスフェラーゼ／ＣＭＰ－ノイラミン酸シンターゼ融合酵素（１１Ｕ）を加え、そして反応混合物を室温で４５時間撹拌した。反応混合物を１０，０００ＭＷＣＯフィルターに通して濾過し、そして濾液（これは反応の生成物を含む）をさらに精製せずに直接使用した：R_f＝０．３５（シリカ、ＩＰＡ／水／NH_4OH　７／２／１）。

【１３３８】

２８．ＣＨＯ細胞で生産されるグルコセレブロシダーゼ－マンノース－６－ホスフェート

この実施例はマンノース－６－ホスフェートをＣＨＯ細胞で生産されたグルコセレブロシダーゼのようなペプチドに複合糖質化する手順を説明する。

【１３３９】

アシアロ－グルコセラミダーゼの調製。ＣＨＯ細胞で生産されたグルコセレブロシダー

ゼを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．４、０．１５Ｍ　ＮａＣｌに溶解し、これを３００ｍＵ／ｍＬのシアリダーゼ－アガロース結合体と１６時間、３２℃でインキューベーションする。反応を監視するために、反応の小アリコートを適当なバッファーで希釈し、そしてＩＥＦゲルおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥをインビトロゲンの手順に従い行う。混合物を１０，０００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集める。ビーズはＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで３回、０．４ｍＬのＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで１回、そして０．２ｍＬのＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで１回洗浄する。すべての上清をプールする。上清は４℃で５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対して透析し、そしてさらに２回、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対して透析する。次いで透析した溶液はＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　Ｐｌｕｓ２０遠心フィルターを使用して濃縮する。反応の生成物はインビトロゲンにより供給される手順および試薬に従い、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３４０】

グルコセレブロシダーゼ－ＳＡ－リンカー－マンノース－６－ホスフェートの調製（手順１）。上からのアシアロ－グルコセレブロシダーゼを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を１ｍＭのＣＭＰ－シアル酸－リンカー－Ｍａｎ－６－ホスフェートおよび０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３と３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸－リンカー－Ｍａｎ－６－ホスフェートの取り込みを監視するために、反応の小アリコートにＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ－蛍光リガンドを加え；ペプチドへ取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＴＳＫ－Ｇｅｌ－３０００分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。蛍光標識のペプチドへの取り込みは、イン－ライン蛍光検出器を使用して定量する。反応が完了した時、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用したトーソー　ハース　ＴＳＫ－Ｇｅｌ－３０００調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３４１】

グルコセレブロシダーゼ－ＳＡ－リンカー－マンノース－６－ホスフェートの調製（手順２）。ＣＨＯで生産されたが不完全にシアリル化されているグルコセレブロシダーゼを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を１ｍＭのＣＭＰ－シアル酸－リンカー－Ｍａｎ－６－ホスフェートおよび０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３と３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸－リンカー－Ｍａｎ－６－ホスフェートの取り込みを監視するために、反応の小アリコートにＣＭＰ－ＳＡ－ＰＥＧ－蛍光リガンドを加え；ペプチドへ取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＴＳＫ－Ｇｅｌ－３０００分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。蛍光標識のペプチドへの取り込みは、イン－ライン蛍光検出器を使用して定量する。反応が完了した時、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用したトーソー　ハース　ＴＳＫ－Ｇｅｌ－３０００調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３４２】

２９．ミトラマイシンの抗体への複合糖質化

この実施例は、ミトラマイシンのような低分子を哺乳動物細胞で生産された抗体分子のＦｃ領域グリカンへ複合糖質化するため手順を説明する。ここで抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ

（商標）を使用するが、当業者はこの方法が多くの他の抗体に使用できると考えるだろう。

【１３４３】

Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）－Ｇａｌ－リンカー－ミトラマイシンの調製。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）を２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　$MnCl_2$、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を１ｍＭのＵＤＰ－ガラクトース－リンカー－ミトラマイシンおよび０．１Ｕ／ｍＬのガラクトシルトランスフェラーゼと３２℃で２日間インキューベーションしてミトラマイシンをＦｃ領域のグリカンに導入する。ガラクトースの取り込みを監視するために、反応の小アリコートに^{14}Ｃ－ガラクトース－ＵＤＰリガンドを加え；ペプチドへ取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。放射性標識のペプチドへの取り込みは、イン－ライン放射能検出器を使用して定量する。

【１３４４】

反応が完了した時、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用したトーソーハース　ＴＳＫ－Ｇｅｌ－３０００調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。生成物を含む画分を合わせ、濃縮し、バッファー交換し、そして凍結乾燥する。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３４５】

３０．ゲルダナマイシンの抗体への複合糖質化

この実施例は、ゲルダナマイシンのような低分子をＣＨＯ細胞で生産されたＲｉｔｕｘａｎ（商標）のような抗体のＦｃ領域グリカンへ複合糖質化するための手順を説明する。ここで抗体Ｒｉｔｕｘａｎ（商標）を使用するが、当業者はこの方法が多くの他の抗体に使用できると考えるだろう。

【１３４６】

Ｒｉｔｕｘａｎ（商標）－Ｇａｌ－リンカー－ゲルダナマイシンの調製。Ｒｉｔｕｘａｎ（商標）を２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　$MnCl_2$、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を１ｍＭのＵＤＰ－ガラクトース－リンカー－ゲルダナマイシンおよび０．１Ｕ／ｍＬのガラクトシルトランスフェラーゼと３２℃で２日間インキューベーションしてゲルダナマイシンをＦｃ領域のグリカンに導入する。ガラクトースの取り込みを監視するために、反応の小アリコートに^{14}Ｃ－ガラクトース－ＵＤＰリガンドを加え；ペプチドへの標識の取り込みは、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。放射性標識のペプチドへの取り込みは、イン－ライン放射能検出器を使用して定量する。

【１３４７】

反応が完了した時、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用したトーソーハース　ＴＳＫ－Ｇｅｌ－３０００調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。生成物を含む画分を合わせ、濃縮し、バッファー交換し、そして凍結乾燥する。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３４８】

Ｄ．ペプチドの複合糖質化（Ｇｌｙｃｏ－ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）

３１．トランスフェリン－ＧＤＮＦ

この実施例はタンパク質の複合糖質化、そして特にトランスフェリンをＧＤＮＦに複合糖質化する手順について説明する。トランスフェリン－ＳＡ－リンカー－Ｇａｌ－ＵＤＰ－はトランスフェリンから調製する。ガラクトース残基をＧＮＤＦグリカンから除去し、

そしてトランスフェリン－ＳＡ－リンカー－Ｇａｌ－ＵＤＰをＧＮＤＦグリカンにガラクトシルトランスフェラーゼを使用して結合する。

【１３４９】

アガラクト－ＧＤＮＦの調製。ＮＳＯ細胞（ＮＳＯマウス骨髄腫細胞）で生産されたＧＤＮＦを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、０．１５Ｍ　ＮａＣｌに溶解し、そして３００ｍＵ／ｍＬのベーターガラクトシダーゼ－アガロース結合体と１６時間、３２℃でインキューベーションする。反応を監視するために、反応の小アリコートを適当なバッファーで希釈し、そしてＩＥＦゲルをインビトロゲンの手順に従い行う。混合物を１０，０００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集める。上清は４℃で５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対して透析し、そしてさらに２回、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対して透析する。透析した溶液は次いでＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　Ｐｌｕｓ２０遠心フィルターを使用して濃縮し、そして－２０℃で保存する。ＩＥＦゲルの条件はインビトロゲンにより提供される手順および試薬に従い泳動する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦにより分析する。

【１３５０】

トランスフェリン－ＳＡ－リンカー－Ｇａｌ－ＵＤＰの調製。アシアロ－トランスフェリンを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液をＣＭＰ－シアル酸－リンカー－Ｇａｌ－ＵＤＰ（１モル当量のヌクレオチド糖をトランスフェリンに加えるモル量）および０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３と３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸の取り込みを監視するために、反応の小アリコートに^{14}Ｃ－ＳＡ－ＵＤＰリガンドを加え；ペプチドへ取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。放射能標識のペプチドへの取り込みは、イン－ライン放射能検出器を使用して定量する。

【１３５１】

この溶液を５ｍＭのＣＭＰ－シアル酸および０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３（未反応トランスフェリングリカンをキャップするために）と３２℃で２日間インキューベーションする。ペプチドへの取り込みは、イン－ラインＵＶ検出器を使用して定量する。２日後、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用したトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳにより分析する。

【１３５２】

トランスフェリン－ＳＡ－リンカー－Ｇａｌ－ＧＤＮＦの調製。上記のように調製したトランスフェリン－ＳＡ－リンカー－Ｇａｌ－ＵＤＰを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　$MnCl_2$、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を２．５ｍｇ／ｍＬのアガラクト－ＧＤＮＦおよび０．１Ｕ／ｍＬのガラクトシルトランスフェラーゼと３２℃で２日間インキューベーションする。ガラクトースの取り込みを監視するために、反応の小アリコートに^{14}Ｃ－ガラクトース－ＵＤＰリガンドを加え；ペプチドへ取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。放射性標識のペプチドへの取り込みは、イン－ライン放射能検出器を使用して定量する。

【１３５３】

反応が完了した時、溶液を５ｍＭのＵＤＰ－Ｇａｌおよび０．１Ｕ／ｍＬのガラクトシルトランスフェラーゼ（未反応トランスフェリングリカンをキャップするために）と３２℃で２日間インキューベーションし、続いて５ｍＭのＣＭＰ－ＳＡおよび０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３を加える。さらに２日後、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１

）を使用したトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、ＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３５４】

３２．グルコセレブロシダーゼ－トランスフェリン

この実施例はタンパク質の複合糖質化、そして特にトランスフェリンをグルコセレブロシダーゼに複合糖質化する手順について説明する。ＧｌｃＮＡｃ－ＡＳＮ構造をグルコセレブロシダーゼ上に構築し、そしてトランスフェリン－ＳＡ－リンカー－Ｇａｌ－ＵＤＰはＧＮＤＦ　ＧｌｃＮＡｃ－ＡＳＮ構造にガラクトシルトランスフェラーゼを使用して結合する。

【１３５５】

ＧｌｃＮＡｃ－グルコセレブロシダーゼ（Ｃｅｒｅｚｙｍｅ（商標））の調製。ＣＨＯ細胞で生産されたＣｅｒｅｚｙｍｅ（商標）（グルコセレブロシダーゼ）を２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、０．１５Ｍ　ＮａＣｌに溶解し、そして３００ｍＵ／ｍＬのエンド－Ｈ－アガロース結合体と１６時間、３２℃でインキューベーションする。反応を監視するために、反応の小アリコートを適当なバッファーで希釈し、そしてＩＥＦゲルおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥをインビトロゲンの手順に従い行う。混合物を１０，０００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集める。ビーズはＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで３回、０．４ｍＬのＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで１回、そして０．２ｍＬのＴｒｉｓ－ＥＤＴＡバッファーで１回洗浄し、そしてすべての上清をプールする。上清は４℃で５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対して透析し、そしてさらに２回、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3に対して透析する。次いで透析した溶液はＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　Ｐｌｕｓ２０遠心フィルターを使用して濃縮する。反応の生成物はインビトロゲンにより供給される手順および試薬に従い、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３５６】

トランスフェリン－ＳＡ－リンカー－Ｇａｌ－グルコセレブロシダーゼの調製。上からのトランスフェリン－ＳＡ－リンカー－Ｇａｌ－ＵＤＰを２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　$MnCl_2$、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を２．５ｍｇ／ｍＬのＧｌｃＮＡｃ－グルコセレブロシダーゼおよび０．１Ｕ／ｍのガラクトシルトランスフェラーゼと３２℃で２日間インキューベーションする。グルコセレブロシダーゼの取り込みを監視するために、ペプチドは、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により分離し、そしてＵ吸収により生成物を検出する。反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用したトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、ＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３５７】

３３．ＥＰＯ－トランスフェリン

この実施例はタンパク質のＯ－結合グリカンへの複合糖質化、そして特にトランスフェリンをＥＰＯに複合糖質化する手順について説明する。シアル酸残基はＥＰＯのＯ－結合グリカンから除去し、そしてＥＰＯ－ＳＡ－リンカー－ＳＡ－ＣＭＰを調製する。ＥＰＯ－ＳＡ－リンカー－ＳＡ－ＣＭＰをアシアロトランスフェリンにＳＴ３Ｇａｌ３で複合糖質化する。

【１３５８】

Ｏ－結合アシアロ－ＥＰＯの調製。ＣＨＯ細胞で生産されたＥＰＯ（エリトロポエチン

）を２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．４、０．１５Ｍ　ＮａＣｌに溶解し、これを３００ｍＵのシアリダーゼ（ビブリオ　コレラ：Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａ）－アガロース結合体と１６時間、３２℃でインキューベーションする。反応を監視するために、反応の小アリコートを適当なバッファーで希釈し、そしてインビトロゲンの手順に従いＩＥＦゲルを行う。混合物を１０，０００ｒｐｍで遠心し、そして上清を集める。上清は約２．５ｍｇ／ｍＬのＥＯＰ濃度に５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２中で濃縮する。この溶液を５ｍＭのＣＭＰ－シアル酸および０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３と３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸の取り込みを監視するために、反応の小アリコートにＣＭＰ－ＳＡ－蛍光リガンドを加え；ペプチドへ取り込まれた標識は、ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により遊離標識から分離する。反応が完了した時、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用したトーソー　ハース　Ｇ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３５９】

ＥＰＯ－ＳＡ－リンカー－ＳＡ－ＣＭＰの調製。５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２中のＯ－結合アシアロ－ＥＰＯ２．５ｍｇ／ｍＬ。この溶液を１ｍＭのＣＭＰ－シアル酸－リンカー－ＳＡ－ＣＭＰおよび０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３と３２℃で２日間インキューベーションする。シアル酸－リンカー－ＳＡ－ＣＭＰの取り込みを監視するために、ペプチドはＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により分離する。

【１３６０】

２日後、反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用したトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そしてＵＶ吸収に基づき画分を集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３６１】

トランスフェリン－ＳＡ－リンカー－ＳＡ－ＥＰＯの調製。上からのＥＰＯ－ＳＡ－リンカー－ＳＡ－ＣＭＰは２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％NaN_3、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を２．５ｍｇ／ｍＬのアシアロ－トランスフェリンおよび０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３と３２℃で２日間インキューベーションする。トランスフェリンの取り込みを監視するために、ペプチドはＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により分離し、そして生成物をＵＶ吸収により検出する。反応が完了した時、溶液を５ｍＭのＣＭＰ－ＳＡおよび０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３（未反応のトランスフェリングリカンをキャップするために）と３２℃で２日間インキューベーションする。反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そして画分をＵＶ吸収に基づき集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３６２】

３４．ＥＰＯ－ＧＤＮＦ

この実施例はペプチドの複合糖質化の手順、そして特にＥＰＯ－ＳＡ－リンカー－ＳＡ－ＧＤＮＦの調製について説明する。

【１３６３】

ＥＰＯ－ＳＡ－リンカー－ＳＡ－ＧＤＮＦの調製。上からのＥＰＯ－ＳＡ－リンカー－ＳＡ－ＣＭＰは２．５ｍｇ／ｍＬで、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％ＮａＮ$_3$、ｐＨ７．２に溶解する。この溶液を２．５ｍｇ／ｍＬのＧＤＮＦ（ＮＳＯで生産）および０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３と３２℃で２日間インキューベーションする。ＧＤＮＦの取り込みを監視するために、ペプチドはＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用してトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ分析カラムでのゲル濾過により分離し、そして生成物をＵＶ吸収により検出する。反応が完了した時、溶液を５ｍＭのＣＭＰ－ＳＡおよび０．１Ｕ／ｍＬのＳＴ３Ｇａｌ３（未反応のＧＤＮＦグリカンをキャップするために）と３２℃で２日間インキューベーションする。反応混合物はＰＢＳバッファー（ｐＨ７．１）を使用したトーソー　ハースＧ３０００ＳＷ調製カラムを使用して精製し、そして画分をＵＶ吸収に基づき集める。反応の生成物は、インビトロゲンにより供給される手順および試薬に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＩＥＦ分析を使用して分析する。サンプルを水に対して透析し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析する。

【１３６４】

本明細書に引用するすべての特許、特許出願、および公報の開示は、引用により全部、本明細書に編入する。

【１３６５】

本発明は具体的な態様に関して開示してきたが、本発明の他の態様および変更は本発明の精神および範囲から逸脱することなく当業者により考案され得ることは明らかである。添付する特許請求の範囲は、すべてのそのような態様および均等な変更物を含むと解釈されるものとする。

【図１Ａ】

12AP1/E5 -- Viventia Biotech
1964 -- Aventis
20K成長ホルモン -- AMUR
28P6/E6 -- Viventia Biotech
3-ヒドロキシフタロイル－β－ラクトグロブリン－
4-IBBリガンド遺伝子治療－
64-Cu MAb複合物TETA-1A3 -- Mallinckrodt Institute of Radiology
64-Cu MAb複合物TETA-cT84.66
64-Cuトラスツズマブ TETA複合物－ Genentech
A 200 -- Amgen
A10255 – Eli Lilly
A1PDX – Hedral THerapeutics
A6 -- Angstrom
aaAT-III -- Genzyme
アブシキシマブ -- Centocor
ABI.001 – Atlantic BioPharmaceuticals
ABT-828 – Abbott
アクチン(Accutin)
アクチノヒビン
アクチビン -- Biotech Australia, Human Therapeutics
アクチビン – Curis
AD 439 – Tanox
AD 519 – Tanox
アダリムマブ -- Cambridge Antibody Tech.
腺癌ワクチン – Biomira -- NIS
アデノシンA2B 受容体アンタゴニスト -- Adenosine Therapeutics
ADP-001 – Axis Genetics
AF 13948 – Affymax
アフェリモマブ – Knoll
AFP-SCAN – Immunomedics
AG 2195 – Corixa
アガルシダーゼα(アルファ) -- Transkaryotic Therapies
アガルシダーゼβ(ベータ) -- Genzyme
AGENT– Antisoma
AI 300 – AutoImmune
AI-101 – Teva
AI-102 – Teva
AI-201 – AutoImmune
AI-301 – AutoImmune
AIDSワクチン -- ANRS, CIBG, Hesed Biomed, Hollis-Eden, Rome, United Biomedical, American Home Products, マキシゲン(Maxygen)
気道受容体リガンド -- iC Innovations
AJvW 2 -- Ajinomoto
AK 30 NGF -- Alkermes
アルブフェロン(Albuferon) -- Human Genome Sciences
アルプミシ – Biogen, DSM Anti-Infectives, Genzyme Transgenics, PPL Therapeutics, TranXenoGen, Welfide Corp.
アルテスロイキン -- Chiron
アレファセプト -- Biogen
アレムツズマブ(Alemtuzumab) –
アレルギー治療 -- ALK-Abello/Maxygen, ALK-Abello/RP Scherer
アレルギーワクチン -- Allergy Therapeutics
アルニドフィバチド(Alnidofibatide) -- Aventis Pasteur
アルノリン -- SRC VB VECTOR
ALP 242 -- Gruenenthal
α－アンチトリプシン -- Arriva/Hyland Immuno/ProMetic/Protease Sciences
α－1 アンチトリプシン – Cutter, Bayer, PPL Therapeutics, Profile, ZymoGenetics, Arriva
α－1 プロテアーゼインヒビター -- Genzyme Transgenics, Welfide Corp.
α－ガラクトース融合タンパク質 – Immunomedics
α－ガラクトシダーゼA -- Research Corporation Technologies
α－グルコシダーゼ – Genzyme, Novazyme
α－ラクトアルブミン
α－L－イズロニダーゼ -- Transkaryotic Therapies, BioMarin
アルテプラーゼ -- Genentech
アルビルセプト スドトックス -- NIH
ALX1-11 –sNPS Pharmaceuticals
アルツハイマー病遺伝子治療 –

FIG. 1A

【図１Ｂ】

AM-133 -- AMRAD
Amb a 1免疫刺激複合物 -- Dynavax
AMD 3100 -- AnorMED -- NIS
AMD 3465 – AnorMED -- NIS
AMD 3465 -- AnorMED -- NIS
AMD Fab – Genentech
アメジプラーゼ(Amediplase) -- Menarini, Novartis
AM-F9
アメーバ赤痢(Amoebiasis)ワクチン
アムフィレギュリン(Amphiregulin) -- Octagene
アナキンラ -- Amgen
鎮痛剤 -- Nobex
アンセスチム -- Amgen
アネルギックス(Anergix) RA – Corixa, Organon
アンジオシジン(Angiocidin) -- InKine
新脈管形成阻害剤 – ILEX
アンジオマブ – Antisoma
アンジオポエチン – Regeneron/Procter & Gamble
アンジオスタチン -- EntreMed
アンジオスタチン/エンドスタチン遺伝子治療 -- Genetix Pharmaceuticals
アンジオテンシン-II, 局所 -- Maret
炭疽菌 -- EluSys Therapeutics/US Army Medical Research Institute
炭疽菌ワクチン
抗血小板由来成長ホルモンDヒトモノクローナル抗体 -- CuraGen
抗-17-1A MAb 3622W94 -- GlaxoSmithKline
抗-2C4 MAb -- Genentech
抗-4-1BB モノクローナル抗体 -- Bristol-Myers Squibb
抗-接着プラットフォーム技術 -- Cytovax
抗-脂肪細胞 MAb -- Cambridge Antibody Tech./ObeSys
抗アレルギー薬 -- Maxygen
抗アレルギーワクチン -- Acambis
抗－α－4－インテグリンMAb
抗新脈管形成モノクローナル抗体 -- KS Biomedix/Schering AG
抗-B4 MAb-DC1複合物 -- ImmunoGen
抗-B7 抗体霊長類化 -- IDEC
抗-B7-1 MAb 16-10A1
抗-B7-1 MAb 1G10
抗-B7-2 MAb GL-1
抗-B7-2-ゲノニムノトキシン－
抗菌剤/抗真菌剤 -- Diversa/IntraBiotics
抗－β－アミロイドモノクローナル抗体 -- Cambridge Antibody Tech., Wyeth-Ayerst
抗-BLyS 抗体 -- Cambridge Antibody Tech. /Human Genome Sciences
抗体－薬物複合物 -- Seattle Genetics/Eos
抗-C5 MAb BB5-1 -- Alexion
抗-C5 MAb N19-8 -- Alexion
抗-C8 MAb
抗癌性サイトカイン -- BioPulse
抗癌マトリックス -- Telios Integra
抗癌性モノクローナル抗体 – ARIUS, Immunex
抗癌性ペプチド – Maxygen, Micrologix
抗癌性プロドラッグ技術 -- Alexion Antibody Technologies
抗癌性Troy体 -- Affilte -- Affitech
抗癌ワクチン -- NIH
抗癌剤 -- Epimmune
抗-CCR5/CXCR4 sheep MAb -- KS Biomedix Holdings
抗-CD11a MAb KBA –
抗-CD11a MAb M17
抗-CD11a MAb TA-3 –
抗-CD11a MAb WT.1 –
抗-CD11b MAb -- Pharmacia
抗-CD11b MAb LM2
抗-CD154 MAb -- Biogen
抗-CD16-抗-CD30 MAb -- Biotest
抗-CD18 MAb -- Pharmacia
抗-CD19 MAb B43 –
抗-CD19 MAb -リボソーム酪酸ナトリウム複合物 –

FIG. 1B

【図１Ｃ】

抗-CD19 MAb-ｻﾎﾞﾆﾝ複合物－
抗-CD19-dsFv-PE38-ｲﾑﾉﾄｷｼﾝ－
抗-CD2 MAb 12-15－
抗-CD2 MAb B-E2 -- Diaclone
抗-CD2 MAb OX34－
抗-CD2 MAb OX54－
抗-CD2 MAb OX55－
抗-CD2 MAb RM2-1
抗-CD2 MAb RM2-2
抗-CD2 MAb RM2-4
抗-CD20 MAb BCA B20
抗-CD20-抗-Fc α RI 二重特異性MAb－Medarex, Tenovus
抗-CD22 MAb-ｻﾎﾞﾆﾝ-6 複合体
抗-CD3ｲﾑﾉﾄｷｼﾝ－
抗-CD3 MAb 145-2C11 -- Pharming
抗-CD3 MAb CD4IgG複合物--Genentech
抗-CD3 MAb人化－Protein Design, RW Johnson
抗-CD3 MAb WT32
抗-CD3 MAb-ﾘｼﾝA鎖複合物－
抗-CD3 MAb-ｷｻﾝﾁﾝ酸化酵素複合物－
抗-CD30 MAb BerH2 -- Medac
抗-CD30 MAb-ｻﾎﾟﾘﾝ複合物
抗-CD30-scFv-ETA'-ｲﾑﾉﾄｷｼﾝ
抗-CD38 MAb AT13/5
抗-CD38 MAb-ｻﾎﾟﾘﾝ複合物
抗-CD3-抗-CD19二重特異性MAb
抗-CD3-抗-EGFR MAb
抗-CD3-抗-ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-2-受容体 MAb
抗-CD3-抗-MOv18 MAb -- Centocor
抗-CD3-抗-SCLC二重特異性MAb
抗-CD4ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟﾜｸﾁﾝ
抗-CD4 MAb－Centocor, IDEC Pharmaceuticals, Xenova Group
抗-CD4 MAb 16H5
抗-CD4 MAb 4162W94 -- GlaxoSmithKline
抗-CD4 MAb B-F5 -- Diaclone
抗-CD4 MAb GK1-5
抗-CD4 MAb KT6
抗-CD4 MAb OX38
抗-CD4 MAb PAP複合物-- Bristol-Myers Squibb
抗-CD4 MAb RIB 5-2
抗-CD4 MAb W3/25
抗-CD4 MAb YTA 3.1.2
抗-CD4 MAb YTS 177-9
抗-CD40ﾘｶﾞﾝﾄﾞMAb 5c8 -- Biogen
抗-CD40 MAb
抗-CD40 MAb 5D12－Tanox
抗-CD44 MAb A3D8
抗-CD44 MAb GKWA3
抗-CD44 MAb IM7
抗-CD44 MAb KM81
抗 -CD44変異体ﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- Corixa/Hebrew University
抗-CD45 MAb BC8-I-131
抗-CD45RB MAb
抗-CD48 MAb HuLy-m3
抗-CD48 MAb WM-63
抗-CD5 MAb -- Becton Dickinson
抗-CD5 MAb OX19
抗-CD6 MAb
抗-CD7 MAb-PAP複合物
抗-CD7 MAb-ﾘｼﾝA鎖複合物
抗-CD8 MAb－Amerimmune, Cytodyn, Becton Dickinson
抗-CD8 MAb 2-43
抗-CD8 MAb OX8
抗-CD80 MAb P16C10 -- IDEC
抗-CD80 MAb P7C10 -- ID Vaccine
抗-CD8-ｲﾀﾞﾙﾋﾞｼﾝ複合物
抗-CEA MAb CE-25
抗-CEA MAb MN 14－Immunomedics
抗-CEA MAb MN14-PE40複合物－Immunomedics
抗-CEA MAb T84.66-ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-2 複合物
抗-CEAﾋﾂｼﾞMAb -- KS Biomedix Holdings

FIG. 1C

【図１Ｄ】

抗細胞表面ﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- Cambridge Antibody Tech. /Pharmacia
抗-c-erbB2-抗-CD3二重特異性 MAb -- Otsuka
抗-CMV MAb -- Scotgen
抗-CTLA-4 MAb
抗-EGFR 触媒性抗体 -- Hesed Biomed
抗-EGFRｲﾑﾉﾄｷｼﾝ-- IVAX
抗-EGFR MAb -- Abgenix
抗-EGFR MAb 528
抗-EGFR MAb KSB 107 -- KS Biomedix
抗-EGFR MAb-DM1複合物--ImmunoGen
抗-EGFR MAb-LA1－
抗-EGFRﾋﾂｼﾞMAb -- KS Biomedix
抗-FAP MAb F19-I-131
抗-Fas IgM MAb CH11
抗-Fas MAb Jo2
抗-Fas MAb RK-8
抗-Flt-1ﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- ImClone
抗-真菌ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ -- State University of New York
抗真菌性ﾄﾘﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ-- BTG
抗ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞGD2抗体-ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-2融合ﾀﾝﾊﾟｸ質-- Lexigen
抗-GM2 MAb -- Kyowa
抗-GM-CSF受容体ﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体-- AMRAD
抗-gp130 MAb -- Tosoh
抗-HCAﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- AltaRex/Epigen
抗-hCG抗体-- Abgenix/AVI BioPharma
抗-ﾍﾍﾟﾗｰｾﾞﾋﾄﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- Oxford Glycosciences/Medarex
抗C型肝炎ｳｲﾙｽﾋﾄﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- XTL Biopharmaceuticals
抗-HER-2抗体遺伝子治療
抗ﾍﾙﾍﾟｽ抗体 -- Epicyte
抗-HIV抗体－Epicyte
抗-HIV触媒性抗体-- Hesed Biomed
抗-HIV融合ﾀﾝﾊﾟｸ質-- Idun
抗-HIVﾀﾝﾊﾟｸ質-- Cangene
抗-HM1-24 MAb -- Chugai
抗-hR3 MAb
抗-Human-癌腫抗原 MAb -- Epicyte
抗-ICAM-1 MAb -- Boehringer Ingelheim
抗-ICAM-1 MAb 1A-29 -- Pharmacia
抗-ICAM-1 MAb HA58
抗-ICAM-1 MAb YN1/1.7.4
抗-ICAM-3 MAb ICM3 -- ICOS
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ乳癌ﾜｸﾁﾝ11D10
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ乳癌ﾜｸﾁﾝ ACA14C5－
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ癌ﾜｸﾁﾝ -- ImClone Systems/Merck KGaA ImClone, Viventia Biotech
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ癌ﾜｸﾁﾝ1A7 -- Titan
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ癌ﾜｸﾁﾝ3H1 -- Titan
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ癌ﾜｸﾁﾝTriAb -- Titan
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟﾄﾗｺｰﾏｸﾗﾐｼﾞｱ(Chlamydia trachomatis)ﾜｸﾁﾝ
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ大腸癌ﾜｸﾁﾝ -- Novartis
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ大腸癌ﾜｸﾁﾝ -- Onyvax
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ黒色腫ﾜｸﾁﾝ-- IDEC Pharmaceuticals
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ卵巣癌ﾜｸﾁﾝACA 125
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ卵巣癌ﾜｸﾁﾝAR54 -- AltaRex
抗ｲﾃﾞｨｵﾀｲﾌﾟ卵巣癌ﾜｸﾁﾝCA-125－AltaRex, Biomira
抗-IgE触媒性抗体-- Hesed Biomed
抗-IgE MAb E26 -- Genentech
抗-IGF-1 MAb
抗炎症性 -- GeneMax
抗炎症性ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ-- BTG

FIG. 1D

【図１Ｅ】

抗-ｲﾝﾃｸﾞﾘﾝﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ-- Burnha
抗ｲﾝﾀｰﾌｪﾛﾝα受容体MAb 64G12－Pharma Pacific Management
抗ｲﾝﾀｰﾌｪﾛﾝｧMAb -- Protein Design Labs
抗ｲﾝﾀｰﾌｪﾛﾝｧﾎﾟﾘｸﾛｰﾅﾙ抗体--Advanced Biotherapy
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-10 MAb－
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-12 MAb－
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-1-βﾎﾟﾘｸﾛｰﾅﾙ抗体--R&D Systems
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-2受容体 MAb 2A3
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-2受容体 MAb 33B3-1 -- Immunotech
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-2 受容体 MAb ART-18
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-2 受容体 MAb LO-Tact-1
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-2 受容体 MAb Mikbeta1
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-2 受容体 MAb NDS61
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-4 MAb 11B11
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-5 MAb -- Wallace Laboratories
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-6 MAb－Centocor, Diaclone, Pharmadigm
抗ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-8 MAb -- Xenotech
抗 -JL1 MAb
抗ｸﾚﾌﾞｼｴﾗﾋﾂｼﾞMAb -- KS Biomedix Holdings
抗ﾗﾐｼﾝ受容体MAb-ﾘﾎﾞｿｰﾑﾄﾞｷｿﾙﾋﾞｼﾝ複合物
抗-LCG MAb -- Cytoclonal
抗ﾘﾎﾞ多糖MAb -- VitaResc
抗-Lｰｾﾚｸﾁﾝﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- Protein Design Labs, Abgenix, Stanford University
抗-MBLﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- Alexion/Brigham and Women's Hospital
抗-MHCﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体
抗-MIF抗体. 人化－IDEC, Cytokine PharmaSciences
抗-MRSA/VRSAﾋﾂｼﾞMAb -- KS Biomedix Holdings
抗-mu MAb -- Novartis
抗-MUC-1 MAb
抗-Nogo-A MAb IN1
抗-核自己抗体-- Procyon
抗-抗卵巣癌ﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- Dompe
抗-p185ﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体
抗-p43 MAb
抗寄生虫ﾜｸﾁﾝ
抗-PDGF/bFGFﾋﾂｼﾞMAb -- KS Biomedix
抗ﾌﾟﾛﾍﾟﾙｼﾞﾝﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- Abgenix/Gliatech
抗-PSMA MAb J591 -- BZL Biologics
抗-Rev MAb遺伝子治療－
抗-RSV抗体－Epicyte, Intracell
抗-RSVﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- Medarex/MedImmune, Applied Molecular Evolution/MedImmune
抗-RSV MAb,吸入-- Alkermes/MedImmune
抗-RT遺伝子治療
ｱﾝﾁｾﾝｽK-ras RNA遺伝子治療
抗-SF-25 MAb
抗精子抗体 -- Epicyte
抗-Tac(Fv)-PE38複合物
抗-TAPA/CD81 MAb AMP1
抗-tat遺伝子治療
抗-TCR-α βMAb H57-597
抗-TCR-α βMAb R73
抗ﾃﾅｼﾝMAb BC-4-I-131
抗-TGF-βﾋﾄﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- Cambridge Antibody Tech., Genzyme
抗-TGF-βMAb 2G7 -- Genentech
ｱﾝﾁﾄﾛﾝﾋﾞﾝIII -- Genzyme Transgenics, Aventis, Bayer, Behringwerke, CSL, Myriad
抗-Thy1 MAb
抗-Thy1.1 MAb

FIG. 1E

【図１Ｆ】

抗組織因子/第VIIA因子ﾋﾂｼﾞMAb -- KS Biomedix
抗-TNFﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体－Centocor, Chiron, Peptech, Pharacia, Serono
抗-TNFﾋﾂｼﾞMAb -- KS Biomedix Holdings
抗-TNFα MAb -- Genzyme
抗-TNFα MAb B-C7 -- Diaclone
抗う食 MAb -- Planet BioTech.
抗腫瘍RNｱｰｾﾞ-- NIH
抗-VCAM MAb 2A2 -- Alexion
抗-VCAM MAb 3F4 -- Alexion
抗-VCAM-1 MAb
抗-VEC MAb -- ImClone
抗-VEGF MAb -- Genentech
抗-VEGF MAb 2C3
抗-VEGFﾋﾂｼﾞMAb -- KS Biomedix Holdings
抗-VLA-4 MAb HP1/2 -- Biogen
抗-VLA-4 MAb PS/2
抗-VLA-4 MAb R1-2
抗-VLA-4 MAb TA-2
抗-VREﾋﾂｼﾞMAb -- KS Biomedix Holdings
ANUP -- TranXenoGen
ANUP-1 -- Pharis
AOP-RANTES -- Senetek
Apan-CH -- Praecis Pharmaceuticals
APC-8024 -- Demegen
ｱﾎﾟA-1 -- Milano, Pharmacia
ｱﾎﾟｼﾞｪﾝ-- Alexion
ｱﾎﾟﾘﾎﾟﾀﾝﾊﾟｸ質A1 -- Avanir
ｱﾎﾟﾘﾎﾟﾀﾝﾊﾟｸ質 E -- Bio-Tech. General
ｱﾌﾟﾗｷﾞﾝ(Applaggin)-- Biogen
ｱﾌﾟﾛﾁﾆﾝ-- ProdiGene
APT-070C -- AdProTech
AR 177 -- Aronex Pharmaceuticals
AR 209 -- Aronex Pharmaceuticals, Antigenics
AR545C
ARGENT遺伝子送達系-- ARIAD
Arresten
ART-123 -- Asahi Kasei
ｱﾘｰﾙｽﾙﾌｧﾀｰｾﾞB -- BioMarin
ｱﾘｰﾙｽﾙﾌｧﾀｰｾﾞB,組換えﾋﾄ-- BioMarin
AS 1051 -- Ajinomoto
ASI-BCL -- Intracell
ATL-101 -- Alizyme
心房性ﾅﾄﾘｳﾑ利尿ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ-- Pharis
ｵｰﾘﾝﾄﾘｶﾙﾎﾟﾝ酸-高分子量

自己免疫障害-- GPC Biotech/MorphoSys
自己免疫障害および移植片拒絶 -- Bristol-Myers Squibb/Genzyme Tra
自己免疫障害/癌 -- Abgenix/Chiron, /CuraGen
ｵｰﾄﾀｷｼﾝ(Autotaxin)
ｱﾋﾞｼﾞﾝ(Avicidin)-- NeoRx
軸索発生因子-1 -- Boston Life Sciences
ｱｸﾘｶｲﾝ(Axokine)-- Regeneron
B細胞ﾘﾝﾊﾟ腫ﾜｸﾁﾝ-- Biomira
B7-1遺伝子治療 --
BABSﾀﾝﾊﾟｸ質-- Chiron
BAM-002 -- Novelos Therapeutics
Bay-16-9996 -- Bayer
Bay-39-9437 -- Bayer
Bay-50-4798 -- Bayer
BB-10153 -- British Biotech
BBT-001 -- Bolder BioTech.
BBT-002 -- Bolder BioTech.
BBT-003 -- Bolder BioTech.
BBT-004 -- Bolder BioTech.
BBT-005 -- Bolder BioTech.
BBT-006 -- Bolder BioTech.
BBT-007 -- Bolder BioTech.
BCH-2763 -- Shire
BCSF -- Millenium Biologix
BDNF -- Regeneron -- Amgen

FIG. 1F

【図１Ｇ】

ﾍﾞｶﾌﾟﾚﾙﾐﾝ-- Johnson & Johnson, Chiron
ﾍﾞｸｻﾓﾏﾌﾞ – Immunomedics
β-ｱﾄﾞﾚﾅﾘﾝ作動性受容体遺伝子治療 -- University of Arkansas
BI 51013 -- Behringwerke AG
BIBH 1 -- Boehringer Ingelheim
BIM-23190 -- Beaufour-Ipsen
ｶﾊﾞﾉｷ花粉免疫療法 -- Pharmacia
二重特異性融合ﾀﾝﾊﾟｸ質 -- NIH
二重特異性MAb 2B1 -- Chiron
ﾋﾞﾁｽﾀﾁﾝ
BIWA 4 -- Boehringer Ingelheim
代用血液 – Northfield, Baxter Intl.
BLP-25 -- Biomira
BLS-0597 -- Boston Life Sciences
BLyS -- Human Genome Sciences
BLyS放射標識 -- Human Genome Sciences
BM 06021 -- Boehringer Mannheim
BM-202 -- BioMarin
BM-301 -- BioMarin
BM-301 -- BioMarin
BM-302 -- BioMarin
BMP 2 – Genetics Institute/Medtronic-Sofamor Danek, Genetics Institute/Collagenesis, Genetics Institute/Yamanouch
BMP 2遺伝子治療
BMP 52 -- Aventis Pasteur, Biopharm
BMP-2 -- Genetics Institute
BMS 182248 -- Bristol-Myers Squibb
BMS 202448 -- Bristol-Myers Squibb
骨成長因子 -- IsoTis
BPC-15 -- Pfizer
脳ﾅﾄﾘｳﾑ利尿ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞｰ
乳癌 -- Oxford GlycoSciences/Medarex
乳癌ﾜｸﾁﾝ -- Therion Biologics, Oregon
BSSL -- PPL Therapeutics
BST-2001 – BioStratum
BST-3002 -- BioStratum
BTI 322 –
ﾌﾞﾁﾘﾙｺﾘﾝｴｽﾃﾗｰｾﾞ -- Shire
C 6822 -- COR Therapeutics
C1 ｴｽﾃﾗｰｾﾞｲﾝﾋﾋﾞﾀｰ -- Pharming
C3d ｱｼﾞｭﾊﾞﾝﾄ -- AdProTech
CAB-2.1 -- Millennium
ｶﾙｼﾄﾆﾝ – Inhale Therapeutics Systems, Aventis, Genetronics, TranXenoGen, Unigene, Rhone Poulenc Rohrer
ｶﾙｼﾄﾆﾝ -- 経口 – Nobex, Emisphere, Pharmaceutical Discovery
ｶﾙｼﾄﾆﾝ遺伝子関連ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ -- Asahi Kasei -- Unigene
ｶﾙｼﾄﾆﾝ, ﾋﾄ -- Suntory
ｶﾙｼﾄﾆﾝ, 鼻 – Novartis, Unigene
ｶﾙｼﾄﾆﾝ, Panoderm -- Elan
ｶﾙｼﾄﾆﾝ, Peptitrol – Shire
ｶﾙｼﾄﾆﾝ, ｻｹ -- Therapicon
ｶﾙﾝ -- Biopharm
ｶﾙﾎﾞﾋﾞﾝｼﾞﾝ I
ｶﾙﾎﾞﾋﾞﾝｼﾞﾝ I -- Kowa
ｶﾙﾚﾁｷｭﾘﾝ -- NYU
ｶﾝﾊﾟｽ -1G
ｶﾝﾊﾟｽ -1M
癌治療 -- Cangene
癌ﾜｸﾁﾝ – Aixlie, Aventis Pasteur, Center of Molecular Immunology ,YM BioSciences, Cytos, Genzyme, Transgenics, GlobeImmune, Igeneon, ImClone, Virogenetics, InterCell, Iomai, Jenner Biotherapies, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Sydney Kimmel Cancer Center, Novavax, Protein Sciences, Argonex, SIGA
癌ﾜｸﾁﾝALVAC-CEA B7.1 -- Aventis Pasteur/Therion Biologics
癌ﾜｸﾁﾝ CEA-TRICOM -- Aventis Pasteur/Therion Biologics
癌ﾜｸﾁﾝ遺伝子治療 -- Cantab Pharmaceuticals

FIG. 1G

【図１Ｈ】

癌ﾜｸﾁﾝHER-2/neu -- Corixa
癌ﾜｸﾁﾝ THERATOPE -- Biomira
癌ﾜｸﾁﾝ, PolyMASC -- Valentis
ｶﾝｼﾞﾀﾞﾜｸﾁﾝ – Corixa, Inhibitex
ｶﾝｽﾀﾁﾝ -- ILEX
CAP-18 -- Panorama
心血管系遺伝子治療 -- Collateral Therapeutics
ｶﾙﾍﾟﾘﾁﾄﾞ -- Suntory
ｶﾝｼｼﾞﾝ-1 -- Pharis
CAT 152 -- Cambridge Antibody Tech.
CAT 192 -- Cambridge Antibody Tech.
CAT 213 -- Cambridge Antibody Tech.
ｶﾀﾗｰｾﾞ -- Enzon
Cat-PAD -- Circassia
CB 0006 -- Celltech
CCK(27-32) -- Akzo Nobel
CCR2-641 -- NIH
CD, Procept -- Paligent
CD154 遺伝子治療
CD39 -- Immunex
CD39-L2 -- Hyseq
CD39-L4 -- Hyseq
CD4融合ﾄｷｼﾝ -- Senetek
CD4 IgG -- Genentech
CD4受容体ｱﾝﾀｺﾞﾆｽﾄ -- Pharmacopeia/Progenics
CD4可溶性 -- Progenics
CD4,可溶性 -- Genzyme Transgenics
CD40ﾘｶﾞﾝﾄﾞ -- Immunex
CD4-ﾘｼﾝA鎖 -- Genentech
CD59遺伝子治療 -- Alexion
CD8 TIL 細胞治療 -- Aventis Pasteur
CD8,可溶性 -- Avidex
CD95ﾘｶﾞﾝﾄﾞ -- Roche
CDP 571 -- Celltech
CDP 850 -- Celltech
CDP 870 -- Celltech
CDS-1 -- Ernest Orlando
ｾﾃﾞﾘｽﾞﾏﾌﾞ -- Ortho-McNeil
ｾﾃﾙﾐﾝ -- Insmed
CETPﾜｸﾁﾝ -- Avant
ｾﾄﾛﾚﾘｯｸｽ
ｾﾂｷｼﾏﾌﾞ
CGH 400 -- Novartis
CGP 42934 -- Novartis
CGP 51901 – Tanox
CGRP -- Unigene
CGS 27913 -- Novartis
CGS 32359 -- Novartis
ｼｬｰｶﾞｽ病ﾜｸﾁﾝ -- Corixa
ｹﾓｶｲﾝ -- Immune Response
CHH 380 -- Novartis
ｷﾁﾅｰｾﾞ – Genzyme, ICOS
ｸﾗﾐｼﾞｱ肺炎病原体(Chlamydia pneumoniae)ﾜｸﾁﾝ -- Antex Biologics
ﾄﾗｺｰﾏｸﾗﾐｼﾞｱ(Chlamydia trachomatis)ﾜｸﾁﾝ -- Antex Biologics
ｸﾗﾐｼﾞｱ(Chlamydia)ﾜｸﾁﾝ -- GlaxoSmithKline
ｺﾚﾗ(Cholera)ﾜｸﾁﾝCVD 112 -- Swiss Serum and Vaccine Institute Berne
ｺﾚﾗ(Cholera)ﾜｸﾁﾝCVD 103-HgR -- Swiss Serum and Vaccine Institute Berne
ｺﾚﾗ(Cholera)ﾜｸﾁﾝ, 不活性化, 経口 -- SBL Vaccin
ｸﾘｻﾘﾝ – Chrysalis BioTech.
CI-782 -- Hitachi Kase
毛様体神経栄養性因子 – Fidia, Roche
CIMﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄ -- Active Biotech
CL 329753 -- Wyeth-Ayerst
CL22, Cobra -- ML Laboratories
ｸﾚﾉﾘｷｼﾏﾌﾞ(Clenoliximab) -- IDEC
Clostridium difficile 抗体 -- Epicyte
凝固因子 -- Octagene
CMB 401 -- Celltech
CNTF -- Sigma-Tau
ｺｶｲﾝ濫用ﾜｸﾁﾝ – Cantab, ImmuLogic, Scripps
ｺｸｼｼﾞｵｲﾃﾞｽ真菌症ﾜｸﾁﾝ -- Arizo
ｺﾗｰｹﾞﾝ --ﾀｲﾌﾟI -- Pharming
ｺﾗｰｹﾞﾝ形成阻害剤 -- FibroGen

FIG. 1H

【図１Ｉ】

ｺﾗｰｹﾞﾝ/ﾋﾄﾛｷｼｱﾊﾟﾀｲﾄ/骨成長因子 -- Aventis Pasteur, Biopharm, Orquest
ｺﾗｹﾞﾅｰｾﾞ -- BioSpecifics
大腸癌ﾜｸﾁﾝ -- Wistar Institute
成分B,組換え -- Serono
結合組織成長因子阻害剤 -- FibroGen/Taisho
ｺﾝﾄﾙﾄﾛｽﾀﾁﾝ
避妊ﾜｸﾁﾝ -- Zonagen
避妊ﾜｸﾁﾝ hCG
避妊ﾜｸﾁﾝ男性, 可逆的 -- IMMUCON
避妊ﾜｸﾁﾝ透明層 -- Zonagen
銅-64 標識MAb TETA-1A3 -- NCI
ｺﾗﾘﾝ
ｺﾙｾﾋﾞﾝM
C-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ類似物 -- Schwarz
CPI-1500 – Consensus
CRF -- Neurobiological Tech.
cRGDfVﾍﾟﾝﾀﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ –
CRL 1095 -- CytRx
CRL 1336 -- CytRx
CRL 1605 -- CytRx
CS-560 -- Sankyo
CSF -- ZymoGenetics
CSF-G – Hangzhou, Dong-A, Hanmi
CSF-GM – Cangene, Hunan, LG Chem
CSF-M -- Zarix
CT 1579 – Merck Frosst
CT 1786 – Merck Frosst
CT-112^ -- BTG
CTB-134L -- Xenova
CTC-111 -- Kaketsuken
CTGF -- FibroGen
CTLA4-Ig -- Bristol-Myers Squibb
CTLA4-Ig遺伝子治療 –
CTP-37 -- AVI BioPharma
C-型ﾅﾄﾘｳﾑ利尿ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ -- Suntory
CVS 995 – Corvas Intl.
CX 397 – Nikko Kyodo
CY 1747 -- Epimmune
CY 1748 -- Epimmune
ｼｱﾉﾋﾞﾘﾝ-N
表皮性繊維症治療 -- CBR/IVAX
CYT 351
ｻｲﾄｶｲﾝﾄﾗｯﾌﾟ -- Regeneron
ｻｲﾄｶｲﾝ– Enzon, Cytoclonal
ｻｲﾄﾒｶﾞﾛｳｲﾙｽ糖ﾀﾝﾊﾟｸ質ﾜｸﾁﾝ– Chiron, Aquila Biopharmaceuticals, Aventis Pasteur, Virogenetics
ｻｲﾄﾒｶﾞﾛｳｲﾙｽﾜｸﾁﾝ, 生菌 -- Aventis Pasteur
ｼﾄｼﾝﾃﾞｱﾐﾅｰｾﾞ遺伝子治療 -- GlaxoSmithKline
DA-3003 -- Dong-A
DAB389ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-6 -- Senetek
DAB389ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-7
DAMP^ -- Incyte Genomics
ﾀﾞﾆﾌﾟﾚｽﾁﾝ – Pharmacia
ﾀﾞﾙﾍﾞﾎﾟｴﾁﾝ α -- Amgen
DBI-3019 -- Diabetogen
DCC -- Genzyme
DDF -- Hyseq
ﾃﾞｺﾘﾝ– Integra, Telios
ﾃﾞﾌｪﾝｼﾝ -- Large Scale Biology
DEGR-VIIa
脱免疫化抗体3B6/22 AGEN
脱免疫化抗癌抗体 -- Biovation/Viragen
ﾃﾞﾝﾄﾞﾛﾏｲﾄﾞA
ﾃﾞﾝｸﾞﾜｸﾁﾝ -- Bavarian Nordic, Merck
ﾃﾞﾆﾛｲｷｼﾞﾌﾃｨｯｸｽ -- Ligand
DES-1101 -- Desmos
ﾃﾞｽﾙﾙｼﾝ -- Novartis
ﾃﾞｽﾓﾃﾌﾟﾚﾝｼﾝ -- Unigene
ﾃﾞｽﾓﾃﾌﾟﾗｰｾﾞ(Desmoteplase) – Merck, Schering AG
ﾃﾞｽﾀﾋﾞﾗｰｾﾞ(Destabilase)
糖尿病遺伝子治療 -- DeveloGen, Pfizer
糖尿病治療 -- Crucell
I型糖尿病ﾜｸﾁﾝ -- Diamyd Therapeutics

FIG. 1I

【図１Ｊ】

DiaCIM -- YM BioSciences
ﾀﾞｲｱﾘﾃｯｸｵﾘｺﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ(dialytic oligopeptides) -- Research Corp
ﾀﾞｲｱﾐﾄﾞ(Diamyd) -- Diamyd Therapeutics
DiaPep227 -- Pepgen
DiavaX -- Corixa
ｼﾞﾌﾃﾘｱ・破傷風・百日咳・B型肝炎ﾜｸﾁﾝ -- GlaxoSmithKline
DIR治療 -- Solis Therapeutics --
DNｱｰｾﾞ -- Genentech
ﾄﾞﾙﾅｰｾﾞ α(Dornase alfa) -- Genentech
ﾄﾞﾙﾅｰｾﾞ α(Dornase alfa), 吸入 -- Genentech
ﾄﾞｷｿﾙﾋﾞｼﾝ-抗-CEA MAb複合物 – Immunomedics
DP-107 -- Trimeris
ﾄﾞﾛﾄﾚｺｷﾝ α -- Eli Lilly
DTctGMCSF
DTP-ﾎﾟﾘｵﾜｸﾁﾝ -- Aventis Pasteur
DU 257-KM231 antibody conjugate -- Kyowa
硬膜移植片ﾏﾄﾘｯｸｽ -- Integra
ﾃﾞｭﾃﾌﾟﾗｰｾﾞ Baxter Intl.
DWP-401 -- Daewoong
DWP-404 -- Daewoong
DWP-408 -- Daewoong
大腸菌(E.Coli)O157ﾜｸﾁﾝ -- NIH
E21-R -- BresaGen
東部ウマ脳炎ウイルスワクチン –
ｴｷｾﾁﾝ(Echicetin) –
ｴｷﾝﾋﾋﾞﾝ(Echinhibin)1 –
ｴｷｽﾀﾁﾝ(Echistatin) -- Merck
ｴｷﾀﾐﾝ(Echitamine) –
EC-SOD -- PPL Therapeutics
EDF -- Ajinomoto
EDN 誘導体 -- NIH
EDNA -- NIH
ｴﾄﾞﾊﾞｺﾏﾌﾞ(Edobacomab) -- XOMA
ｴﾄﾞﾚｺﾛﾏﾌﾞ(Edrecolomab) -- Centocor
EF 5077
ｴﾌｧﾘｽﾞﾏｽ(Efalizumab) -- Genentech
EGF 融合ﾄｷｼﾝ – Seragen, Ligand
EGF-P64kﾜｸﾁﾝ -- Center of Molecular Immunology
EL 246 -- LigoCyte
ｴﾗｽﾀｰｾﾞ阻害剤 -- Synergen
ｴﾙｶﾄﾆﾝ -- Therapicon
EMD 72000 -- Merck KGaA
ｴﾑﾄﾞｹﾞｲﾝ(Emdogain) – BIORA
ｴﾑﾌｨﾚﾙﾐﾝ -- AMRAD
ｴﾓｸﾀｷﾝ(Emoctakin) -- Novartis
ｴﾅﾒﾙﾏﾄﾘｯｸｽﾀﾝﾊﾟｸ質 -- BIORA
ｴﾝﾄﾞIII -- NYU
ｴﾝﾄﾞｽﾀﾁﾝ – EntreMed, Pharis
ｴﾝﾊﾝｼﾝ(Enhancins) -- Micrologix
ｴﾝﾘﾓﾏﾌﾞ(Enlimomab) -- Isis Pharm.
ｴﾉｷｻﾊﾟﾘﾝﾅﾄﾘｳﾑ -- Pharmuka
酵素結合抗体栄養枯渇治療 -- KS Biomedix Holdings
抗酸球由来中和剤 –
EP-51216 -- Asta Medica
EP-51389 -- Asta Medica
EPH ﾌｧﾐﾘｰﾘｶﾞﾝﾄﾞ -- Regeneron
表皮増殖因子 -- Hitachi Kasei, Johnson & Johnson
表皮増殖因子融合ﾀﾝﾊﾟｸ質 -- Senetek
表皮増殖因子-ｹﾞﾆｽﾃｲﾝ –
EPI-HNE-4 -- Dyax
EPI-KAL2 -- Dyax
ｴﾎﾟｴﾁﾝ α(Epoetin alfa) – Amgen, Dragon Pharmaceuticals, Nanjing Huaxin
ｴﾌﾟﾗﾂｽﾞﾏﾌﾞ(Epratuzumab) -- Immunomedics
ｴﾌﾟｽﾀｲﾝ-ﾊﾞｰ-ウイルスワクチン -- Aviron/SmithKline Beecham, Bioresearch
ｴﾌﾟﾀｺｸﾞ α(Eptacog alfa) -- Novo Nordisk
ｴﾌﾟﾁﾌｨﾊﾞﾁﾄﾞ(Eptifibatide) -- COR Therapeutics
erb-38 –
ｴﾙﾘｽﾞﾏﾌﾞ(Erlizumab) -- Genentech

FIG. 1J

【図１Ｋ】

エリトロポエチン -- Alkermes, ProLease, Dong-Fas A, Elanex, Genetics Institute, LG Chem, Protein Sciences, Serono, Snow Brand, SRC VB VECTOR, Transkaryotic Therapies
エリトロポエチンβ -- Hoffman La Roche
エリトロポエチン/エポエチンα -- Chugai
大腸菌(Escherichia coli)ワクチン -- North American Vaccine, SBL Vaccin, Swiss Serum and Vaccine Institute Berne
エタネルセプト -- Immunex
エキサモレリン -- Mediolanum
エキソスクレアーゼVII
F 105 -- Centocor
F-992 -- Fornix
第ＩＸ因子 -- Alpha Therapeutics, Welfide Corp., CSL, enetics Institute/AHP, Pharmacia, PPL Therapeutics
第IX因子遺伝子治療 -- Cell Genesys
第ＶＩＩ因子 -- Novo Nordisk, Bayer, Baxter Intl.
第VIIa因子 -- PPL Therapeutics, ZymoGenetics
第ＶＩＩＩ因子 -- Bayer Genentech, Beaufour-Ipsen, CLB, Inex, Octagen, Pharmacia, Pharming
第ＶＩＩＩ因子 -- PEGylated -- Bayer
第ＶＩＩＩ因子フラグメント -- Pharmacia
第ＶＩＩＩ因子遺伝子治療 -- Targeted Genetics
第ＶＩＩＩ因子シュ糖製剤 -- Bayer, Genentech
第ＶＩＩＩ因子-2 -- Bayer
第ＶＩＩＩ因子-3 -- Bayer
第Ｘａ因子阻害剤 -- Merck, Novo Nordisk, Mochida
第ＸＩＩＩ因子 -- ZymoGenetics
第ＶＩＩＩおよびＩＸ因子遺伝子治療 -- Genetics Institute/Targeted Genetics
ファモキシン(Famoxin) -- Genset
Fas (δ) TMタンパク質 -- LXR BioTech.
TR -- Human Genome Sciences
フェルビズマブ -- Scotgen
FFR-VIIa -- Novo Nordisk
FG-001 -- F-Gene
FG-002 -- F-Gene
FG-004 -- F-Gene
FG-005 -- F-Gene
FGF + フィブリン -- Repair
フィブリメージ(Fibrimage) -- Bio-Tech. General
フィブリン結合ペプチド -- ISIS Innovation
フィブリノーゲン -- PPL Therapeutics, Pharming
線維芽細胞増殖因子 -- Chiron, NYU, Ramot, ZymoGenetics
フィブロラーゼ複合物 -- Schering AG
フィルグラスチム(Filgrastim) -- Amgen
フィルグラスチム(Filgrastim) -- PDA modified -- Xencor
FLT-3リガンド -- Immunex
FN18 CRM9 --
フォリスタチン -- Biotech Australia, Human Therapeutics
フォリトロピンα(Follitropin alfa) -- Alkermes, ProLease, PowderJect, Serono, Akzo Nobel
フォリトロピンβ(Follitropin Beta) -- Bayer, Organon
FP 59
FSH -- Ferring
FSH + LH -- Ferring
F-スポンジン -- CeNeS
融合タンパク質送達系 -- UAB Research Foundation
融合トキシン -- Boston Life Sciences
G 5598 -- Genentech
GA-II -- Transkaryotic Therapies
ガーインターフェロン類似物 -- SRC VB VECTOR
ガニレリックス -- Roche
胃リパーゼ -- Meristem
ガビリモマブ --
G-CSF -- Amgen, SRC VB VECTOR
GDF-1 -- CeNeS
GDF-5 -- Biopharm
GDNF -- Amgen

FIG. 1K

【図１Ｌ】

ゲルソリン -- Biogen
ゲムツズマブオゾガミシン -- Celltech
遺伝子活性型エポエチンα -- Aventis Pharma -- Transkaryotic Therapies
グランツマン血小板無力症遺伝子治療 --
酢酸グラチラマー -- Yeda
膠細胞増殖因子２ -- CeNeS
GLP-1 -- Amylin, Suntory, TheraTech, Watson
GLP-1ペプチド類似物 -- Zealand Pharaceuticals
グルカゴン -- Eli Lilly, ZymoGenetics
グルカゴン様ペプチド-1 7-36アミド -- Suntory
グルコセレブロシダーゼ -- Genzyme
グルタミン酸脱炭酸酵素 -- Genzyme Transgenics
糖タンパク質S3 -- Kureha
GM-CSF -- Immunex
GM-CSF腫瘍ワクチン -- PowderJect
GnRH免疫療法剤 -- Protherics
gp75抗原 -- ImClone
gp96 -- Antigenics
GPI 0100 -- Galenica
GR 4991W93 -- GlaxoSmithKline
顆粒球コロニー刺激因子 -- Dong-A
顆粒球コロニー刺激因子コンジュゲート
草アレルギー治療 -- Dynavax
GRF1-44 -- ICN
成長因子 -- Chiron, Atrigel, Atrix, Innogenetics, ZymoGenetics, Novo
成長因子ペプチド -- Biotherapeutics
成長ホルモン -- LG Chem
成長ホルモン,組換えヒト -- Serono
GT 4086 -- Gliatech
GW 353430 -- GlaxoSmithKline
GW-278884 -- GlaxoSmithKline
H 11 -- Viventia Biotech
H5N1インフルエンザAウイルスワクチン -- Protein Sciences
ヘモグロビン -- Biopure
ヘモグロビン3011,組換え -- Baxter Healthcare
ヘモグロビンクロスフマリル -- Baxter Intl.
ヘモグロビン安定化 -- Ajinomoto
ヘモグロビン, 組換え -- Apex
HAF -- Immune Response
ハンタウイルスワクチン
HB 19
HBNF -- Regeneron
HCC-1 -- Pharis
hCG -- Milkhaus
hCGワクチン -- Zonagen
HE-317 -- Hollis-Eden Pharmaceuticals
熱ショックタンパク質癌およびインフルエンザワクチン -- StressGen
ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)ワクチン -- Acambis, AstraZeneca/CSL, Chiron, Provalis
ヘリスタット(Helistat)-G -- GalaGen
ヘモリンク(Hemolink) -- Hemosol
ヘパボエチン -- Snow Brand
ヘパラナーゼ -- InSight
ヘパリナーゼI -- Ibex
ヘパリナーゼIII -- Ibex
A型肝炎ウイルス -- American Biogenetic Sciences
A型肝炎ウイルスワクチン, 不活性化
A型肝炎ワクチンNothav -- Chiron
A型肝炎-B型肝炎ワクチン -- GlaxoSmithKline
B型肝炎治療 -- Tripep
B型肝炎ワクチン -- Amgen, Chiron SpA, Meiji Milk, NIS, Prodeva, PowderJect, Rhein Biotech
B型肝炎ワクチン, 組換え -- Evans Vaccines, Epitec Combiotech, Genentech, MedImmune, Merck Sharp & Dohme, Rhein Biotech, Shantha Biotechnics, Vector, Yeda

FIG. 1L

【図１Ｍ】

B型肝炎ワクチン, 組換えTGP 943 -- Takeda
C型肝炎ワクチン -- Bavarian Nordic, Chiron, Innogenetics Acambis,
D型肝炎ワクチン -- Chiron Vaccines
E型肝炎ワクチン組換え -- Genelabs/GlaxoSmithKline, Novavax
肝細胞増殖因子 -- Panorama, Sosei
肝細胞増殖因子クリングルフラグメント -- EntreMed
Her-2/Neuペプチド -- Corixa
単純疱疹(Herpes simplex)糖タンパク質DNAワクチン -- Merck, Wyeth-Lederle Vaccines-Malvern, Genentech, GlaxoSmithKline, Chiron, Takeda
単純疱疹(Herpes simplex)ワクチン -- Cantab Pharmaceuticals, CEL-SCI, Henderson Morley
単純疱疹(Herpes simplex)ワクチン生菌 -- ImClone Systems/Wyeth-Lederle, Aventis Pasteur
HGF誘導体 -- Dompe
hIAPPワクチン -- Crucell
Hib-B型肝炎ワクチン -- Aventis Pasteur
HIC 1
HIP -- Altachem
ヒルジン(Hirudins) Biopharma, Cangene, Dongkook, Japan Energy Corporation, Pharmacia Corporation, SIR International, Sanofi-Synthelabo, Sotragene, Rhein Biotech
HIV可食ワクチン -- ProdiGene
HIV gp120ワクチン -- Chiron, Ajinomoto, GlaxoSmithKline, ID Vaccine, Progenics, VaxGen
HIV gp120ワクチン遺伝子治療 --
HIV gp160 DNAワクチン -- PowderJect, Aventis Pasteur, Oncogen, Hyland Immuno, Protein Sciences
HIV gp41ワクチン -- Panacos
HIV HGP-30Wワクチン -- CEL-SCI
HIV免疫グロブリン -- Abbott, Chiron
HIVペプチド -- American Home Products
HIVワクチン -- Applied bioTech., Axis Genetics, Biogen, Bristol-Myers Squibb, Genentech, Korea Green Cross, NIS, Oncogen, Protein Sciences Corporation, Terumo, Tonen Corporation, Wyeth-Ayerst, Wyeth-Lederle Vaccines-Malvern, Advanced BioScience Laboratories, Bavarian Nordic, Bavarian Nordic/Statens Serum Institute, GeneCure, Immune Response, Progenics, Therion Biologics, United Biomedical, Chiron
HIVワクチンvCP1433 -- Aventis Pasteur
HIVワクチンvCP1452 -- Aventis Pasteur
HIVワクチンvCP205 -- Aventis Pasteur
HL-9 -- American BioScience
HM-9239 -- Cytran
HML-103 -- Hemosol
HML-104 -- Hemosol
HML-105 -- Hemosol
HML-109 -- Hemosol
HML-110 -- Hemosol
HML-121 -- Hemosol
hNLP -- Pharis
鉤虫ワクチン
宿主-ベクターワクチン -- Henogen
HPM 1 -- Chugai
HPVワクチン -- MediGene
HSA -- Meristem
HSF -- StressGen
HSP担体 -- Weizmann, Yeda, Peptor
HSPPC-70 -- Antigenics
HSPPC-96 -- pathogen-derived -- Antigenics
HSV 863 -- Novartis
HTLV-I DNA vaccine
HTLV-Iワクチン
HTLV-IIワクチン -- Access
HU 901 -- Tanox
Hu23F2G -- ICOS
HuHMFG1

FIG. 1M

【図１Ｎ】

ヒトLYM -- Intracell
ヒトkrebs statika -- Yamanouchi
ヒトモノクローナル抗体 -- Abgenix/Biogen, Abgenix/ Corixa, Abgenix/Immunex, Abgenix/Lexicon, Abgenix/ Pfizer, Athersys/Medarex, Biogen/MorphoSys, CAT/Searle, Centocor/Medarex, Corixa/Kirin Brewery, Corixa/Medarex, Eos BioTech./Medarex, Eos/Xenerex, Exelixis/Protein Design Labs, ImmunoGen/ Raven, Medarex/B.Twelve, MorphoSys/ImmunoGen, XTL Biopharmaceuticals/Dyax,
ヒトモノクローナル抗体 -- Medarex/Northwest Biotherapeutics, Medarex/Seattle Genetics
ヒトネツリン-1 -- Exelixis
ヒトパピローマウイルス抗体 -- Epicyte
ヒトパピローマウイルスワクチン -- Biotech Australia, IDEC, StressGen
ヒトパピローマウイルスワクチンMEDI 501 -- MedImmune/GlaxoSmithKline
ヒトパピローマウイルスワクチンMEDI 503/MEDI 504 -- MedImmune/GlaxoSmithKline
ヒトパピローマウイルスワクチンTA-CIN -- Cantab Pharmaceuticals
ヒトパピローマウイルスワクチンTA-HPV -- Cantab Pharmaceuticals
ヒトパピローマウイルスワクチンTH-GW -- Cantab/GlaxoSmithKline
ヒトポリクローナル抗体 -- Biosite/Eos BioTech./ Medarex
ヒトII型抗第VIII因子モノクローナル抗体 -- ThromboGenics
ヒト化抗糖タンパク質IIbマウスモノクローナル抗体 -- ThromboGenics
HumaRAD -- Intracell
HuMax EGFR -- Genmab
HuMax-CD4 -- Medarex
HuMax-IL15 -- Genmab
HYB 190 -- Hybridon
HYB 676 -- Hybridon
I-125 MAb A33 -- Celltech
イブリツモマブチウキセタン -- IDEC
IBT-9401 -- Ibex
IBT-9402 -- Ibex
IC 14 -- ICOS
イダルビシン抗-Ly-2.1 --
IDEC 114 -- IDEC
IDEC 131 -- IDEC
IDEC 152 -- IDEC
IDM 1 -- IDM
IDPS -- Hollis-Eden Pharmaceuticals
イズロン酸-2-スルファターゼ -- Transkaryotic Therapies
IGF/IBP-2-13 -- Pharis
IGN-101 -- Igeneon
IK HIR02 -- Iketon
IL-11 -- Genetics Institute/AHP
IL-13-PE38 -- NeoPharm
IL-17受容体 -- Immunex
IL-18BP -- Yeda
IL-1Hy1 -- Hyseq
IL-1ß -- Celltech
IL-1ßアジュバント -- Celltech
IL-2 -- Chiron
IL-2 + IL-12 -- Hoffman La-Roche
IL-6/sIL-6R融合物 -- Hadasit
IL-6R誘導体 -- Tosoh
IL-7-Dap 389融合トキシン -- Ligand
IM-862 -- Cytran
IMC-1C11 -- ImClone
イミグルセラーゼ -- Genzyme
免疫グロブリン静脈内(ヒト) -- Hoffman La Roche
免疫特権因子 -- Proneuron
Immunocal -- Immunotec
免疫遺伝子治療 -- Briana Bio-Tech
免疫リポソーム性ジパルミチン酸5-フルオロデオキシウリジン-

FIG. 1N

【図１Ｏ】

免疫抑制剤ワクチン -- Aixlie
イムノトキシン – Antisoma, NIH
ImmuRAIT-Re-188 – Immunomedics
イムレグ-1 -- Imreg
不妊症 -- Johnson & Johnson, E-TRANS
インフルエンザウイルスワクチン-- Aventis Pasteur, Protein Sciences
インヒビン-- Biotech Australia, Human Therapeutics
阻害剤Gプロテイン遺伝子治療
INKP-2001 -- InKine
イノリモマブ -- Diaclone
インスリン-- AutoImmune, Altea, Biobras, BioSante, Bio-Tech. General, Chong Kun Dang, Emisphere, Flamel, Provalis, Rhein Biotech, TranXenoGen
インスリン(ウシ) -- Novartis
インスリン類似物 -- Eli Lilly
インスリンAspart -- Novo Nordisk
インスリンdetemir -- Novo Nordisk
インスリンglargine -- Aventis
インスリン吸入型– Inhale Therapeutics Systems, Alkermes
インスリン経口 -- Inovax
インスリン, AeroDose -- AeroGen
インスリン, AERx -- Aradigm
インスリン, BEODAS -- Elan
インスリン, Biphasix -- Helix
インスリン, 頬側 -- Generex
インスリン, I2R -- Flemington
インスリン, 鼻内 -- Bentley
インスリン, 経口 – Nobex, Unigene
インスリン, Orasome -- Endorex
インスリン, ProMaxx -- Epic
インスリン, Quadrant -- Elan
インスリン, 組換え -- Aventis
インスリン, Spiros -- Elan
インスリン, トランスファーソム -- IDEA
インスリン, Zymo, 組換え -- Novo Nordisk
インスリノトロピン-- Scios
インスリン遺伝子治療 –
インテグリンアンタゴニスト-- Merck
インターフェロン(α2) -- SRC VB VECTOR, Viragen, Dong-A, Hoffman La-Roche, Genentech
インターフェロン– BioMedicines, Human Genome Sciences
インターフェロン(α-n3)—Interferon Sciences Intl.
インターフェロン(α), Biphasix -- Helix
インターフェロン(α)—Amgen, BioNative, Novartis, Genzyme Transgenics, Hayashibara, Inhale Therapeutics Systems, Medusa, Flamel, Dong-A, GeneTrol, Nastech, Shantha, Wassermann, LG Chem, Sumitomo, Aventis, Behring EGIS, Pepgen, Servier, Rhein Biotech,
インターフェロン(α2A)
インターフェロン(α2B) – Enzon, Schering-Plough, Biogen, IDEA
インターフェロン(α-N1) -- GlaxoSmithKline
インターフェロン(β) – Rentschler, GeneTrol, Meristem, Rhein Biotech, Toray, Yeda, Daiichi, Mochida
インターフェロン(β1A) – Serono, Biogen
インターフェロン(β1A) ,inhale -- Biogen
インターフェロン(ß1b)-- Chiron
インターフェロン(tau)-- Pepgen
インターフェロンアルファコン-1 -- Amgen
インターフェロン アルファ-2a ワクチン
インターフェロンβ1b -- Schering/Chiron, InterMune
インターフェロンγ -- Boehringer Ingelheim, Sheffield, Rentschler, Hayashibara
インターフェロン受容体, タイプI -- Serono
インターフェロン(γ1B) -- Genentech
インターフェロン-α-2b+リバビリン– Biogen, ICN
インターフェロン-α-2b遺伝子治療 -- Schering-Plough
インターフェロンーコン1遺伝子治療

FIG. 1O

【図１Ｐ】

インターロイキン-1 アンタゴニスト -- Dompe
インターロイキン-1 受容体アンタゴニスト-- Abbott Bioresearch, Pharmacia
インターロイキン-1 受容体タイプI -- Immunex
インターロイキン-1 受容体タイプII-- Immunex
インターロイキン-10 – DNAX, Schering-Plough
インターロイキン-10 遺伝子治療
インターロイキン-12 -- Genetics Institute, Hoffman La-Roche
インターロイキン-13-- Sanofi
インターロイキン-13 アンタゴニスト-- AMRAD
インターロイキン-13-PE38QQR
インターロイキン-15-- Immunex
インターロイキン-16-- Research Corp
インターロイキン-18 -- GlaxoSmithKline
インターロイキン-1-α -- Immunex/Roche
インターロイキン-2 -- SRC VB VECTOR, Ajinomoto, Biomira
インターロイキン-3 -- Cangene
インターロイキン-4 -- Immunology Ventures, Sanofi Winthrop, Schering-Plough, Immunex/ Sanofi Winthrop, Bayer, Ono
インターロイキン-4 + TNF-α -- NIH
インターロイキン-4 アゴニスト -- Bayer
インターロイキン-4 融合トキシン fusion toxin -- Ligand
インターロイキン-4 受容体 – Immunex, Immun
インターロイキン-6 – Ajinomoto, Cangene, Yeda, Genetics Institute, Novartis
インターロイキン-6 融合タンパク質–
インターロイキン-6 融合トキシン – Ligand, Serono
インターロイキン-7 -- IC Innovations
インターロイキン-7 受容体 -- Immunex
インターロイキン-8 アンタゴニスト-- Kyowa Hakko/Millennium/Pfizer
インターロイキン-9 アンタゴニスト-- Genaera
インターロイキンs -- Cel-Sci
ヨウ素I 131トシツモマブ -- Corixa
ior EPOCIM -- Center of Molecular Immunology
Ior-P3 -- Center of Molecular Immunology
IP-10 – NIH
IPF -- Metabolex
IR-501 -- Immune Response
ISIS 9125 -- Isis Pharmaceuticals
ISURF No. 1554 -- Millennium
ISURF No. 1866 – Iowa State Univer.
ITF-1697 -- Italfarmaco
IxC 162 -- Ixion
J 695 -- Cambridge Antibody Tech., Genetics Inst., Knoll
Jagged + FGF -- Repair
JKC-362 -- Phoenix Pharmaceuticals
JTP-2942 – Japan Tobacco
Jumanモノクローナル抗体 -- Medarex/Raven
K02 -- Axys Pharmaceuticals
ケリキシマブ(Keliximab)-- IDEC
キーホールリンペットヘモシアニン
KGF -- Amgen
KM 871 -- Kyowa
KPI 135 -- Scios
KPI-022 -- Scios
クリングル(Kringle)5
KSB 304
KSB-201 -- KS Biomedix
L 696418 -- Merck
L 703801 -- Merck
L1 -- Acorda
L-761191 -- Merck
ラクトフェリン – Meristem, Pharming, Agennix
ラクトフェリン cardio -- Pharming
LAG-3 -- Serono
LAIT -- GEMMA
LAK細胞サイトトキシン -- Arizona
ラメラリン -- PharmaMar/University of Malaga
ラミニンAペプチド-- NIH
ラテノプラーゼ -- Genetics Institute
ラロニダーゼ-- BioMarin
ラッサ熱ワクチン
LCAT -- NIH
LDP 01 -- Millennium

FIG. 1P

【図１Ｑ】

LDP 02 -- Millennium
レシチン化スーパーオキシドジスムターゼ -- Seikagaku
LeIF アジュバント -- Corixa
リーシュマニアワクチン -- Corixa
レネルセプト -- Hoffman La-Roche
レノグラスチム – Aventis, Chugai
レビルジン-- Aventis
レプチン– Amgen, IC Innovations
レプチン遺伝子治療 -- Chiron Corporation
レプチン, 第2世代 – Amgen
レリジスチム-- Pharmacia
リューブロリド, ProMaxx -- Epic
リューブロリン, 経口 -- Unigene
LeuTech -- Papatin
LEX 032 -- SuperGen
LiDEPT -- Novartis
リバーゼ-- Altus Biologics
リビドAワクチン-- EntreMed
脂質結合アンカー技術 – ICRT, ID Biomedical
リポソーム-CD4 技術 -- Sheffield
リステリア菌(Listeria monocytogenes)ワクチン
LMB 1
LMB 7
LMB 9 -- Battelle Memorial Institute, NIH
LM-CD45 -- Cantab Pharmaceuticals
ロバスタチン-- Merck
LSA-3
LT-ß受容体 -- Biogen
肺癌ワクチン-- Corixa
ルスブルチド -- Scios
L-Vax -- AVAX
LY 355455 -- Eli Lilly
LY 366405 -- Eli Lilly
LY-355101 -- Eli Lilly
ライム病DNAワクチン -- Vical/Aventis Pasteur
ライム病ワクチン-- Aquila Biopharmaceuticals, Aventis, Pasteur, Symbicom, GlaxoSmithKline, Hyland Immuno, MedImmune
リンパ球脈絡髄膜炎ウイルスワクチン
リンパ腫ワクチン-- Biomira, Genitope
LYP18
lysプラスミノーゲン, 組換え
リソソーム蓄積症遺伝子治療 -- Avigen
リソスタフィン-- Nutrition 21
M 23 -- Gruenenthal
M1モノクローナル抗体 -- Acorda Therapeutics
MA 16N7C2 – Corvas Intl.
マラリアワクチン -- GlaxoSmithKline, AdProTech, Antigenics, Apovia, Aventis Pasteur, Axis Genetics, Behringwerke, CDCP, Chiron Vaccines, Genzyme Transgenics, Hawaii, MedImmune, NIH, NYU, Oxxon, Roche/Saramane, Biotech Australia, Rx Tech
マラリアワクチン CDC/NIIMALVAC-1
マラリアワクチン, 多能性
マンマグロビン -- Corixa
マンマスタチン -- Biotherapeutics
マンナン結合レクチン-- NatImmu
マンナン-MUC1 -- Psiron
MAP 30
マリノビル -- Phytera
MARstem -- Maret
MB-015 -- Mochida
MBP -- ImmuLogic
MCI-028 -- Mitsubishi-Tokyo
MCIF -- Human Genome Sciences
MDC -- Advanced BioScience -- Akzo Nobel, ICOS
MDX 11 -- Medarex
MDX 210 -- Medarex
MDX 22 -- Medarex
MDX 22

FIG. 1Q

【図１Ｒ】

MDX 240 -- Medarex
MDX 33
MDX 44 -- Medarex
MDX 447 -- Medarex
MDX H210 -- Medarex
MDX RA -- Houston BioTech., Medarex
ME-104 -- Pharmexa
麻疹ワクチン
メカセルミン(Mecasermin) -- Cephalon/Chiron, Chiron
MEDI 488 -- MedImmune
MEDI 500
MEDI 507 -- BioTransplant
メラニン濃縮ホルモン -- Neurocrine Biosciences
メラノコルチン -- OMRF
黒色腫モノクローナル抗体 -- Viragen
黒色腫ワクチン -- GlaxoSmithKline, Akzo Nobel, Avant, Aventis Pasteur, Bavarian Nordic, Biovector, CancerVax, Genzyme Molecular Oncology, Humbolt, ImClone Systems, Memorial, NYU, Oxxon
黒色腫ワクチンMagevac -- Therion
記憶増強剤 -- Scios
髄膜炎菌Bワクチン – Chiron
髄膜炎菌ワクチン -- CAMR
髄膜炎菌B群ワクチン複合物 - - North American Vaccine
髄膜炎菌B群ワクチン組換え -- BioChem Vaccines, Microscience
髄膜炎菌Y群ワクチン複合物 - - North American Vaccine
髄膜炎菌A, BおよびC群ワクチン複合物 -- North American Vaccine
メボリズマブ -- GlaxoSmithKline
メタスタチン – EntreMed, Takeda
Met-CkB7 -- Human Genome Sciences
met-エンケファリン -- TNI
METH-1 -- Human Genome Sciences
メチオニナーゼ -- AntiCancer
メチオニン分解酵素遺伝子治療 -- AntiCancer
Met-RANTES – Genexa Biomedical, Serono
メトレレプチン
MGDF -- Kirin
MGV -- Progenics
ミクリン – Endocrine
マイクロプラスミン-- ThromboGenics
MIF -- Genetics Institute
移動阻害因子 -- NIH
Mim CD4.1 – Xycte Therapies
ミロスチベン-- Human Genome Sciences
MK 852 -- Merck
モベナキン -- NIS
モルグラモスチム -- Genetics Institute, Novartis
モノクローナル抗体 -- Abgenix/Celltech, Immusol/ Medarex, Viragen/ Roslin Institute, Cambridge Antibody Tech./Elan
MAb 108 –
MAb 10D5 –
MAb 14.18-インターロイキン-2 免疫サイトカイン -- Lexigen
MAb 14G2a –
MAb 15A10 –
MAb 170 -- Biomira
MAb 177Lu CC49 –
MAb 17F9
MAb 1D7
MAb 1F7 – Immune Network
MAb 1H10-ドキソルビシン複合物
MAb 26-2F
MAb 2A11
MAb 2E1 -- RW Johnson
MAb 2F5
MAb 31.1 -- International BioImmune Systems
MAb 32 -- Cambridge Antibody Tech., Peptech
MAb 323A3 -- Centocor
MAb 3C5

FIG. 1R

【図１Ｓ】

MAb 3F12
MAb 3F8
MAb 42/6
MAb 425 -- Merck KGaA
MAb 447-52D -- Merck Sharp & Dohme
MAb 45-2D9- -- ﾍﾏﾄﾎﾞﾙﾌｨﾘﾝ複合物
MAb 4B4
MAb 4E3-CPA 複合物 -- BCM Oncologia
MAb 4E3-ﾀﾞｳﾉﾙﾋﾞｼﾝ複合物
MAb 50-6
MAb 50-61A -- Institut Pasteur
MAb 5A8 -- Biogen
MAb 791T/36-ﾒﾄﾄﾚｷｾｰﾄ複合物
MAb 7c11.e8
MAb 7E11 C5-ｾﾚﾉｼｽﾀﾐﾝ複合物
MAb 93KA9 -- Novartis
MAb A5B7-ｼｽﾌﾟﾗﾁﾝ複合物 -- Biodynamics Research, Pharmacia
MAb A5B7-I-131
MAb A7
MAb A717 -- Exocell
MAb A7-ｼﾞﾉｽﾀﾁﾝ複合物
MAb ABX-RB2 -- Abgenix
MAb ACA 11
MAb AFP-I-131 -- Immunomedics
MAb AP1
MAb AZ1
MAb B3-LysPE40 conjugate
MAb B4 -- United Biomedical
MAb B43 ｹﾞﾆｽﾃｲﾝ複合物
MAb B43.13-Tc-99m -- Biomira
MAb B43-PAP 複合物
MAb B4G7-ｹﾞﾛﾆﾝ複合物
MAb BCM 43-ﾀﾞｳﾉﾙﾋﾞｼﾝ複合物 -- BCM Oncologia
MAb BIS-1
MAb BMS 181170 -- Bristol-Myers Squibb
MAb BR55-2
MAb BW494
MAb C 242-DM1複合物 -- ImmunoGen
MAb C242-PE複合物
MAb c30-6
MAb CA208-ｻｲﾄﾛｼﾞﾝ-S 複合物 -- Hoechst Japan
MAb CC49 -- Enzon
MAb ch14.18 --
MAb CH14.18-GM-CSF 融合ﾀﾝﾊﾟｸ質 -- Lexigen
MAb chCE7
MAb CI-137 -- AMRAD
MAb ｼｽﾌﾟﾗﾁﾝ複合物
MAb CLB-CD19
MAb CLB-CD19v
MAb CLL-1 -- Peregrine
MAb CLL-1-GM-CSF 複合物
MAb CLL-1-IL-2 複合物 -- Peregrine
MAb CLN IgG --ﾄﾞｷｿﾙﾋﾞｼﾝ複合物
MAb 複合物 -- Tanox
MAb D612
MAb Dal B02
MAb DC101 -- ImClone
MAb EA 1 --
MAb EC708 -- Biovation
MAb EP-5C7 -- Protein Design Labs
MAb ERIC-1 -- ICRT
MAb F105 遺伝子治療
MAb FC 2.15
MAb G250 -- Centocor
MAb GA6
MAb GA733
MAb ｸﾞﾘｵﾏﾌﾞ-H -- Viventia Biotech
MAb HB2-ｻﾎﾟﾘﾝ複合物
MAb HD 37 --
MAb HD37-ﾘｼﾝA鎖複合物
MAb HNK20 -- Acambis
MAb huN901-DM1複合物 -- ImmunoGen
MAb I-131 CC49 -- Corixa
MAb ICO25
MAb ICR12-CPG2複合物
MAb ICR-62

FIG. 1S

【図１Ｔ】

MAb IRac-ﾘｼﾝA複合物
MAb K1
MAb KS1-4-ﾒﾄﾄﾚｷｾｰﾄ複合物
MAb L6 -- Bristol-Myers Squibb, Oncogen
MAb LiCO 16-88
MAb LL2-I-131 -- Immunomedics
MAb LL2-Y-90
MAb LS2D617 -- Hybritech
MAb LYM-1-ｹﾞﾛﾆﾝ複合物
MAb LYM-1-I-131
MAb LYM-1-Y-90
MAb LYM-2 -- Peregrine
MAb M195
MAb M195-ﾋﾞｽﾏｽ213複合物 -- Protein Design Labs
MAb M195-ｹﾞﾛﾆﾝ複合物
MAb M195-I-131
MAb M195-Y-90
MAb MA 33H1 -- Sanofi
MAb MAD11
MAb MGb2
MAb MINT5
MAb MK2-23
MAb MOC31 ETA(252-613)複合物
MAb MOC-31-In-111
MAb MOC-31-PE複合物
MAb MR6 --
MAb MRK-16 -- Aventis Pasteur
MAb MS11G6
MAb MX-DTPA BrE-3
MAb MY9
MAb Nd2 -- Tosoh
MAb NG-1 -- Hygeia
MAb NM01 -- Nissin Food
MAb OC 125
MAb OC 125-CMA複合物
MAb OKI-1 -- Ortho-McNeil
MAb OX52 -- Bioproducts for Science
MAb PMA5
MAb PR1
MAb prost 30
MAb R-24
MAb R-24 α ﾋﾄ GD3 -- Celltech
MAb RFB4-ﾘｼﾝA鎖複合物
MAb RFT5-ﾘｼﾝA鎖複合物
MAb SC 1
MAb SM-3 -- ICRT
MAb SMART 1D10 -- Protein Design Labs
MAb SMART ABL 364 -- Novartis
MAb SN6f
MAb SN6f-脱ｸﾞﾘｺｼﾙ化ﾘｼﾝA鎖複合物 --
MAb SN6j
MAb SN7-ﾘｼﾝA鎖複合物
MAb T101-Y-90複合物 -- Hybritech
MAb T-88 -- Chiron
MAb TB94 -- Cancer ImmunoBiology
MAb TEC 11
MAb TES-23 -- Chugai
MAb TM31 -- Avant
MAb TNT-1 -- Cambridge Antibody Tech., Peregrine
MAb TNT-3
MAb TNT-3 -- IL2融合ﾀﾝﾊﾟｸ質 --
MAb TP3-At-211
MAb TP3-PAP複合物 --
MAb UJ13A -- ICRT
MAb UN3
MAb ZME-018-ｹﾞﾛﾆﾝ複合物
MAb-BC2 -- GlaxoSmithKline
MAb-DM1 複合物 -- ImmunoGen
MAb-ﾘｼﾝA鎖複合物 -- XOMA
MAb-ﾃﾓﾎﾞﾙﾌｨﾝ複合物
Monopharm C -- Viventia Biotech
ﾓﾝﾃﾌﾟﾗｰｾﾞ -- Eisai
ﾓﾝﾃﾘﾙﾘﾝ水和物 -- Gruenenthal
ﾓﾛｸﾄｺｸﾞ α -- Genetics Institute
ﾓﾛｸﾄｺｸﾞ α -- Pharmacia
MP 4
MP-121 -- Biopharm
MP-52 -- Biopharm
MRA -- Chugai

FIG. 1T

【図１Ｕ】

MS 28168 -- Mitsui Chemicals, Nihon Schering
MSH 融合ﾄｷｼﾝ -- Ligand
MSI-99 -- Genaera
MT 201 -- Micromet
Muc-1 ﾜｸﾁﾝ -- Corixa
粘膜耐性 -- Aberdeen
抗ﾐｭｰﾗｰ管ホルモン
ﾑﾌﾟﾚｽﾁﾑ -- Genetics Institute, Novartis, DSM Anti-Infectives
マウス MAb -- KS Biomedix
突然変異体ｿﾏﾄﾛﾋﾟﾝ -- JCR Pharmaceutical
MV 833 -- Toagosei
肺ﾏｲｺﾌﾟﾗｽﾏ(Mycoplasma pulmonis)ﾜｸﾁﾝ
Mycoprex -- XOMA
ﾐｴﾛﾍﾟﾙｵｷｼﾀﾞｰｾﾞ -- Henogen
ﾐｵｽﾀﾁﾝ -- Genetics Institute
ﾅｺﾛﾏﾌﾞﾀﾌｪﾅﾄｯｸｽ -- Pharmacia
ﾅｸﾞﾚｽﾁﾍﾟﾝ -- British Biotech
NAP-5 -- Corvas Intl.
NAPc2 -- Corvas Intl.
ﾅﾙﾄｸﾞﾗｽﾁﾑ -- Kyowa
ﾅﾀﾘｽﾞﾏﾌﾞ -- Protein Design Labs
ﾅﾃﾌﾟﾗｰｾﾞ -- NIH, Nihon Schering
ﾅﾃﾌﾟﾗｰｾﾞ -- Schering AG
NBI-3001 -- Neurocrine Biosci.
NBI-5788 -- Neurocrine Biosci.
NBI-6024 -- Neurocrine Biosci.
Nef 阻害剤 -- BRI
淋菌(Neisseria gonorrhoea)ﾜｸﾁﾝ -- Antex Biologics
ﾈｵﾏｲｼﾝB-ｱﾙｷﾆﾝ複合物
ﾈﾚﾘﾓﾏﾌﾞ -- Chiron
神経成長因子 -- Amgen -- Chiron, Genentech
神経成長因子遺伝子治療
ｸｴﾝ酸ﾈｼﾘﾁﾄﾞ -- Scios
ﾆｭｰﾚｷﾞｭﾘﾝ-2 -- CeNeS
ﾆｭｰﾛｶﾝ -- NYU
ﾆｭｰﾛﾝ送達系 -- CAMR
神経保護ﾜｸﾁﾝ -- University of Auckland
神経栄養性キメラ -- Regeneron
神経栄養性因子 -- NsGene, CereMedix
NeuroVax -- Immune Response
ﾆｭｰﾙﾂﾘﾝ -- Genentech
中性ｴﾝﾄﾍﾟﾌﾟﾁﾀﾞｰｾﾞ -- Genentech
NGF 増強因子 -- NeuroSearch
NHL ﾜｸﾁﾝ -- Large Scale Biology
NIP45 -- Boston Life Sciences
NKI-B20
NM 01 -- Nissin Food
NMI-139 -- NitroMed
NMMP -- Genetics Institute
NN-2211 -- Novo Nordisk
ﾉｷﾞﾝ(Noggin) -- Regeneron
ﾉﾅｸﾞ α
ﾉﾚﾘﾝ(Norelin) -- Biostar
ﾉｰｳｫｰｸｳｲﾙｽ(Norwalk virus)ﾜｸﾁﾝ
NRLU 10 -- NeoRx
NRLU 10 PE -- NeoRx
NT-3 -- Regeneron
NT-4/5 -- Genentech
NU 3056
NU 3076
NX 1838 -- Gilead Sciences
NY ESO-1/CAG-3 antigen -- NIH
NYVAC-7 -- Aventis Pasteur
NZ-1002 -- Novazyme
肥満治療 -- Nobex
OC 10426 -- Ontogen
OC 144093 -- Ontogen
OCIF -- Sankyo
Oct-43 -- Otsuka
OK PSA - liposomal
OKT3-ｹﾞ-1-ala-ala
OM 991
OM 992
ｵﾏﾘｽﾞﾏﾌﾞ(Omalizumab) -- Genentech
ｵﾝｺｲﾑﾆﾝ(oncoimmunin)-L -- NIH
ｵﾝｺﾘｼﾝ(Oncolysin)B -- ImmunoGen

FIG. 1U

【図１Ｖ】

ｵﾝｺﾘｼﾝCD6 -- ImmunoGen
ｵﾝｺﾘｼﾝ M -- ImmunoGen
ｵﾝｺﾘｼﾝ S -- ImmunoGen
ｵﾝｺﾌｧｰｼﾞｪﾝ -- Antigenics
ｵﾝｺｽﾀﾁﾝ M -- Bristol-Myers Squibb
ｵﾝｺﾊﾞｯｸｽ-CL -- Jenner Biotherapies
ｵﾝｺﾊﾞｯｸｽ-P -- Jenner Biotherapies
ｵﾈﾙｾﾌﾟﾄ -- Yeda
爪真菌症ﾜｸﾁﾝ -- Boehringer Ingelheim
ｵﾍﾟｶﾝ -- XOMA
ｵﾋﾟｵｲﾄﾞ -- Arizona
ｵﾌﾟﾚﾙﾍﾟｷﾝ -- Genetics Institute
Org-33408 b-- Akzo Nobel
ｵﾛﾘｯﾌﾟDP -- EpiCept
ｵﾘｻﾞｽﾀﾁﾝ
OSAﾍﾌﾟﾁﾄﾞ -- GenSci Regeneration
骨芽細胞-ｶﾙﾍﾘﾝ GF -- Pharis
ｵｽﾃｵｶﾙｼｰ ﾁﾐｼﾞﾝ ｷﾅｰｾﾞ 遺伝子治療
骨形成性ﾀﾝﾊﾟｸ質 -- Curis
ｵｽﾃｵﾎﾝﾁﾝ -- OraPharma
骨粗鬆症ﾍﾌﾟﾁﾄﾞ -- Integra, Telios
ｵｽﾃｵﾌﾟﾛﾃｸﾞﾘﾝ -- Amgen, SnowBrand
中耳炎ﾜｸﾁﾝ -- Antex Biologics
卵巣癌 -- University of Alabama
OX40-IgG 融合ﾀﾝﾊﾟｸ質 -- Cantab, Xenova
P 246 -- Diatide
P 30 -- Alfacell
p1025 -- Active Biotech
P-113^ -- Demegen
P-16ﾍﾌﾟﾁﾄﾞ -- Transition Therapeutics
p43 -- Ramot
P-50ﾍﾌﾟﾁﾄﾞ -- Transition Therapeutics
p53 + RAS ﾜｸﾁﾝ -- NIH, NCI
PACAP(1-27) 類似物
小児科用ﾜｸﾁﾝ -- Chiron
ﾊﾟﾌｧｰｾﾞ(Pafase) -- ICOS
PAGE-4 ﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞ DNA -- IDEC
PAI-2 -- Biotech Australia, Human Therapeutics
ﾊﾟﾘﾋﾞｽﾞﾏﾌﾞ(Palivizumab) -- MedImmune
PAM 4 -- Merck
ﾊﾟﾐﾃﾌﾟﾗｰｾﾞ(pamiteplase) -- Yamanouchi
ﾊﾟﾝｸﾚｱﾁﾝ(pancreatin), ﾐﾆ錠剤 -- Eurand
ﾊﾟﾝｹﾞﾝ(Pangen) -- Fournier
ﾊﾟﾝﾀﾘﾝ(Pantarin) -- Selective Genetics
ﾊﾟﾗｲﾝﾌﾙｴﾝｻﾞﾜｸﾁﾝ -- Pharmacia, Pierre Fabre
ﾊﾟﾗｷｻﾅｰｾﾞ -- Esperion
副甲状腺ホルモン -- Abiogen, Korea Green Cross
副甲状腺ホルモン(1-34) -- Chugai/Suntory
ﾊﾟｰｷﾝｿﾝ病遺伝子治療 -- Cell Genesys/ Ceregene
ﾊﾟﾙﾎﾞｳｲﾙｽﾜｸﾁﾝ -- MedImmune
PCP-Scan -- Immunomedics
PDGF ｶｸﾃﾙ -- Theratechnologies
ﾗｯｶｾｲｱﾚﾙｷﾞｰ治療 -- Dynavax
PEG 抗-ICAM MAb -- Boehringer Ingelheim
PEGｱｽﾊﾟﾗｷﾞﾅｰｾﾞ -- Enzon
PEGｸﾞﾙｺｾﾚﾌﾞﾛｼﾀﾞｰｾﾞ
PEG ﾋﾙｼﾞﾝ -- Knoll
PEGｲﾝﾀｰﾌｪﾛﾝ- α -2a -- Roche
PEGｲﾝﾀｰﾌｪﾛﾝ- α -2b + ribavirin -- Biogen, Enzon, ICN Pharmaceuticals, Schering-Plough
PEG MAb A5B7 --
ﾍﾟｶﾞｶﾘｽﾁﾑ(Pegacaristim) -- Amgen -- Kirin Brewery -- ZymoGenetics
ﾍﾟｶﾞﾙﾃﾞｽﾛｲｷﾝ(Pegaldesleukin) -- Research Corp
ﾍﾟｶﾞｽﾊﾟﾗｰｾﾞ -- Enzon
ﾍﾟｸﾞﾌｨﾙｸﾞﾗｽﾁﾑ -- Amgen
PEG-ｲﾝﾀｰﾌｪﾛﾝ α -- Viragen
PEG-ｲﾝﾀｰﾌｪﾛﾝ α 2A -- Hoffman La-Roche
PEG-ｲﾝﾀｰﾌｪﾛﾝ α 2B -- Schering-Plough
PEG-r-ﾋﾙｼﾞﾝ -- Abbott
PEG-ｳﾘｶｰｾﾞ -- Mountain View
ﾍﾟｸﾞﾋﾞｿﾏﾝﾄ(Pegvisomant) -- Genentech

FIG. 1V

【図１Ｗ】

ﾍﾟｷﾞﾙ化ﾀﾝﾊﾟｸ質, PolyMASC -- Valentis
ﾍﾟｷﾞﾙ化組換え天然ﾋﾄﾚﾌﾞﾁﾝ -- Roche
ﾍﾟﾑﾂﾓﾏﾌﾞ
ﾍﾟﾈﾄﾗﾁﾝ-- Cyclacel
ﾍﾟﾌﾟｽｷｬﾝ-- Antisoma
ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞG – Peptech, ICRT
ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾜｸﾁﾝ-- NIH ,NCI
ﾍﾟｷｾﾘｽﾞﾏﾌﾞ
酢酸ﾍﾟｷｼｶﾞﾅﾝ-- Genaera
Pharmaprojects No. 3179 -- NYU
Pharmaprojects No. 3390 -- Ernest Orlando
Pharmaprojects No. 3417 -- Sumitomo
Pharmaprojects No. 3777 -- Acambis
Pharmaprojects No. 4209 -- XOMA
Pharmaprojects No. 4349 – Baxter Intl.
Pharmaprojects No. 4651
Pharmaprojects No. 4915 -- Avanir
Pharmaprojects No. 5156 -- Rhizogenics
Pharmaprojects No. 5200 -- Pfizer
Pharmaprojects No. 5215 -- Origene
Pharmaprojects No. 5216 -- Origene
Pharmaprojects No. 5218 -- Origene
Pharmaprojects No. 5267 -- ML Laboratories
Pharmaprojects No. 5373 -- MorphoSys
Pharmaprojects No. 5493 -- Metabolex
Pharmaprojects No. 5707 -- Genentech
Pharmaprojects No. 5728 -- Autogen
Pharmaprojects No. 5733 -- BioMarin
Pharmaprojects No. 5757 -- NIH
Pharmaprojects No. 5765 -- Gryphon
Pharmaprojects No. 5830 -- AntiCancer
Pharmaprojects No. 5839 -- Dyax
Pharmaprojects No. 5849 -- Johnson & Johnson
Pharmaprojects No. 5860 -- Mitsubishi-Tokyo
Pharmaprojects No. 5869 – Oxford GlycoSciences
Pharmaprojects No. 5883 -- Asahi Brewery
Pharmaprojects No. 5947 -- StressGen
Pharmaprojects No. 5961 -- Theratechnologies
Pharmaprojects No. 5962 -- NIH
Pharmaprojects No. 5966 -- NIH
Pharmaprojects No. 5994 -- Pharming
Pharmaprojects No. 5995 -- Pharming
Pharmaprojects No. 6023 -- IMMUCON
Pharmaprojects No. 6063 -- Cytoclonal
Pharmaprojects No. 6073 -- SIDDCO
Pharmaprojects No. 6115 -- Genzyme
Pharmaprojects No. 6227 -- NIH
Pharmaprojects No. 6230 -- NIH
Pharmaprojects No. 6236 -- NIH
Pharmaprojects No. 6243 -- NIH
Pharmaprojects No. 6244 -- NIH
Pharmaprojects No. 6281 -- Senetek
Pharmaprojects No. 6365 -- NIH
Pharmaprojects No. 6368 -- NIH
Pharmaprojects No. 6373 -- NIH
Pharmaprojects No. 6408 – Pan Pacific
Pharmaprojects No. 6410 -- Athersys
Pharmaprojects No. 6421 – Oxford GlycoSciences
Pharmaprojects No. 6522 -- Maxygen
Pharmaprojects No. 6523 -- Pharis
Pharmaprojects No. 6538 -- Maxygen
Pharmaprojects No. 6554 -- APALEXO
Pharmaprojects No. 6560 -- Ardana
Pharmaprojects No. 6562 -- Bayer
Pharmaprojects No. 6569 -- Eos
ﾌｪﾉｷｻｼﾞﾝ(Phenoxazine)
ﾌｪﾆﾗｰｾﾞ -- Ibex
色素上皮由来因子 –
ﾌﾟﾗｽﾐﾉｰｹﾞﾝｱｸﾁﾍﾞｰﾀｰ ｲﾝﾋﾋﾞﾀｰｰ1, 組換え -- DuPont Pharmaceuticals

FIG. 1W

【図１Ｘ】

ﾌﾟﾗｽﾐﾉｰｹﾞﾝｱｸﾁﾍﾞｰﾀｰ -- Abbott Laboratories, American Home Products, Boehringer Mannheim, Chiron Corporation, DuPont Pharmaceuticals, Eli Lilly, Shionogi, Genentech, Genetics Institute, GlaxoSmithKline, Hemispherx Biopharma, Merck & Co, Novartis, Pharmacia Corporation, Wakamoto, Yeda
ﾌﾟﾗｽﾐﾉｰｹﾞﾝ関連ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ -- Bio-Tech. General/MGH
血小板因子 4 -- RepliGen
血小板由来増殖因子 – Amgen -- ZymoGenetics
ﾌﾞﾙｿﾈﾙﾐﾝ -- Hayashibara
PMD-2850 -- Protherics
肺炎球菌ﾜｸﾁﾝ-- Antex Biologics, Aventis Pasteur
肺炎球菌ﾜｸﾁﾝ, 鼻内 -- BioChem Vaccines/Biovector
PR1A3
PR-39
ﾌﾟﾗﾙﾓﾚﾘﾝ -- Kaken
ﾌﾟﾚﾀｰｹﾞｯﾄﾘﾝﾊﾟ腫 -- NeoRx
ﾌﾟﾘﾘｷｼﾏﾌﾞ-- Centocor
PRO 140 -- Progenics
PRO 2000 -- Procept
PRO 367 -- Progenics
PRO 542 -- Progenics
ﾌﾟﾛｰｱﾎﾞA-I -- Esperion
ﾌﾟﾛﾗｸﾁﾝ-- Genzyme
Prosaptide TX14(A) -- Bio-Tech. General
前立腺癌抗体 – Immunex, UroCor
前立腺癌抗体治療 -- Genentech/UroGenesys, Genotherapeutics
前立腺癌免疫療法剤 -- The PSMA Development Company
前立腺癌ﾜｸﾁﾝ-- Aventis Pasteur, Zonagen, Corixa, Dendreon, Jenner Biotherapies, Therion Biologics
前立腺特異的抗原 -- EntreMed
ﾌﾟﾛﾃｲﾝA -- RepliGen
ﾀﾝﾊﾟｸ質接着剤 -- Enzon
ﾌﾟﾛﾃｲﾝC -- Baxter Intl., PPL Therapeutics, ZymoGenetics
ﾌﾟﾛﾃｲﾝC活性化因子 – Gilead Sciences
ﾀﾝﾊﾟｸ質ｷﾅｰｾﾞR ｱﾝﾀｺﾞﾆｽﾄ -- NIH
ﾌﾟﾛﾁﾚﾘﾝ-- Takeda
ﾌﾟﾛﾄｶﾄﾞﾍﾘﾝ 2 -- Caprion
ﾌﾟﾛｳﾛｷﾅｰｾﾞ – Abbott, Bristol-Myers Squibb, Dainippon, Tosoh -- Welfide
P-セレクチン糖ﾀﾝﾊﾟｸ質ﾘｶﾞﾝﾄﾞ-1 -- Genetics Institute
ｼｭｰﾄﾞﾓﾅｽ感染症 – InterMune
ｼｭｰﾄﾞﾓﾅｽﾜｸﾁﾝ -- Cytovax
PSGL-Ig -- American Home Products
PSP-94 -- Procyon
PTH 1-34 -- Nobex
Quilimmune-M -- Antigenics
R 101933
R 125224 -- Sankyo
RA 治療 -- Cardion
狂犬病ﾜｸﾁﾝ, 組換え -- Aventis Pasteur, BioChem Vaccines, Kaketsuken Pharmaceuticals
RadioTheraCIM -- YM BioSciences
Ramot ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄ No. 1315 -- Ramot
Ramot ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄ No. K-734A -- Ramot
Ramot ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄ No. K-734B -- Ramot
RANK -- Immunex
ﾗﾝﾋﾞﾙﾅｰｾﾞ-- Alfacell
ﾗﾝﾋﾞﾙﾅｰｾﾞ-抗 -CD22 MAb -- Alfacell
RANTES 阻害剤 -- Milan
RAPID 薬物送達系 -- ARIAD
ﾗｽﾌﾞﾘｶｰｾﾞ-- Sanofi
rBPI-21, 局所 -- XOMA
RC 529 -- Corixa
rCFTR -- Genzyme Transgenics
RD 62198
rDn ｱｰｾﾞ -- Genentech
RDP-58 -- SangStat

FIG. 1X

【図１Ｙ】

RecepTox-Fce -- Keryx
RecepTox-GnRH – Keryx, MTR Technologies
RecepTox-MBP – Keryx, MTR Technologies
recFSH – Akzo Nobel, Organon
REGA 3G12
ﾚｶﾞﾋﾞﾙﾏﾌﾞ -- Teijin
ﾘﾗｷｼﾝ-- Connetics Corp
腎癌ﾜｸﾁﾝ -- Macropharm
ﾚﾋﾞﾌｪﾙﾐﾝ-- Human Genome Sciences
RSｳｲﾙｽ PFP-2 ﾜｸﾁﾝ -- Wyeth-Lederle
RSｳｲﾙｽﾜｸﾁﾝ – GlaxoSmithKline, Pharmacia, Pierre Fabre
RSｳｲﾙｽﾜｸﾁﾝ 不活性化
RSｳｲﾙｽﾊﾟﾗｲﾝﾌﾙｴﾝｻﾞ ｳｲﾙｽﾜｸﾁﾝ-- Aventis Pasteur, Pharmacia
Reteplase -- Boehringer Mannheim, Hoffman La-Roche
Retropep -- Retroscreen
RFB4 (dsFv) PE38
RFI 641 -- American Home Products
RFTS -- UAB Research Foundation
RG 12986 -- Aventis Pasteur
RG 83852 -- Aventis Pasteur
RG-1059 -- RepliGen
rGCR -- NIH
rGLP-1 -- Restoragen
rGRF -- Restoragen
rh ｲﾝｽﾘﾝ– Eli Lilly
RHAMM ﾀｰｹﾞｯﾃｨﾝｸﾞﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ -- Cangene
rHb1.1 – Baxter Intl.
rhCC10 -- Claragen
rhCG -- Serono
慢性関節ﾘｳﾏﾁ遺伝子治療
慢性関節ﾘｳﾏﾁﾜｸﾁﾝ -- Veterans Affairs Medical Center
rhLH -- Serono
ﾘﾎﾞｻﾞｲﾑ遺伝子治療 -- Genset
ﾘｹｯﾁｱﾜｸﾁﾝ, 組換え
RIGScan CR -- Neoprobe
RIP-3 -- Rigel
RK-0202 -- RxKinetix
RLT ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ -- Esperion
rM/NEI -- IVAX
rmCRP -- Immtech
RN-1001 -- Renovo
RN-3 -- Renovo
RNAｱｰｾﾞ複合物 -- Immunomedics
RO 631908 -- Roche
ﾛﾀｳｲﾙｽﾜｸﾁﾝ -- Merck
RP 431 -- DuPont Pharmaceuticals
RP-128 -- Resolution
RPE65 遺伝子治療 –
RPR 110173 -- Aventis Pasteur
RPR 115135 -- Aventis Pasteur
RPR 116258A -- Aventis Pasteur
rPSGL-Ig -- American Home Products
r-SPC 界面活性剤 -- Byk Gulden
rV-HER-2/neu -- Therion Biologics
SA 1042 -- Sankyo
ｻﾙｺﾝﾀﾞｰｾﾞ– Orphan Medical
Sant 7
ｻﾙｸﾞﾗﾓｽﾁﾑ(Sargramostim)-- Immunex
ｻﾙﾌﾞﾗｰｾﾞ-- Gruenenthal
ｻﾂﾓﾏﾌﾞ(Satumomab)-- Cytogen
SB 1 -- COR Therapeutics
SB 207448 -- GlaxoSmithKline
SB 208651 -- GlaxoSmithKline
SB 240683 -- GlaxoSmithKline
SB 249415 -- GlaxoSmithKline
SB 249417 -- GlaxoSmithKline
SB 6 -- COR Therapeutics
SB RA 31012 –
SC 56929 -- Pharmacia
SCA 結合ﾀﾝﾊﾟｸ質 – Curis, Enzon
scFv(14E1)-ETA Berlex Laboratories, Schering AG
ScFv(FRP5)-ETA –

FIG. 1Y

【図１Ｚ】

ScFv6C6-PE40 –
SCH 55700 -- Celltech
住 血吸虫症ﾜｸﾁﾝ -- Glaxo Wellcome/Medeva, Brazil
SCPF – Advanced Tissue Sciences
scuPA-suPAR complex -- Hadasit
SD-9427 -- Pharmacia
SDF-1 -- Ono
SDZ 215918 -- Novartis
SDZ 280125 -- Novartis
SDZ 89104 -- Novartis
SDZ ABL 364 -- Novartis
SDZ MMA 383 -- Novartis
ｾﾘﾝﾌﾟﾛﾃｱｰｾﾞｲﾝﾋﾋﾞﾀｰ-- Pharis
酢酸ｾﾙﾓﾚﾘﾝ -- Serono
SERP-1 -- Viron
ｾﾙﾈﾌｰ-- Dainippon
血清ｱﾙﾌﾞﾐﾝ, 組換えﾋﾄ-- Aventis Behring
血清由来因子 -- Hadasit
ｾﾋﾞﾙﾏﾌﾞ -- Novartis
SGN 14 -- Seatle Genetics
SGN 15 -- Seatle Genetics
SGN 17/19 -- Seatle Genetics
SGN 30 -- Seatle Genetics
SGN-10 -- Seatle Genetics
SGN-11 -- Seatle Genetics
SH 306 -- DuPont Pharmaceuticals
Shanvac-B -- Shantha
ﾌﾚｸﾞｽﾅｰ赤痢菌(Shigella flexneri)ﾜｸﾁﾝ– Avant, Acambis, Novavax
ｿﾝﾈ赤痢菌(Shigella sonnei)ﾜｸﾁﾝ–
sICAM-1 – Boehringer Ingelheim
ｼﾙﾃﾌﾟﾗｰｾﾞ-- Genzyme
SIV ﾜｸﾁﾝ – Endocon, Institut Pasteur
SK 896 -- Sanwa Kagaku Kenkyusho
SK-827 -- Sanwa Kagaku Kenkyusho
ｽｹﾚﾃｯｸｽ-- CellFactors
SKF 106160 -- GlaxoSmithKline
S-ﾆﾄﾛｿ-AR545C –
SNTP -- Active Biotech
ｿﾏﾄﾒｼﾞﾝ-1 – GroPep, Mitsubishi-Tokyo, NIH
ｿﾏﾄﾒｼﾞﾝ-1 担体ﾀﾝﾊﾟｸ質 -- Insmed
ｿﾏﾄｽﾀﾁﾝ-- Ferring
ｿﾏﾄﾄﾛﾋﾟﾝ /
ﾋﾄ成長ﾎﾙﾓﾝ -- Bio-Tech. General, Eli Lilly
ｿﾏﾄﾛﾋﾟﾝ-- Bio-Tech. General, Alkermes, ProLease, Aventis Behring, Biovector, Cangene, Dong-A, Eli Lilly, Emisphere, Enact, Genentech, Genzyme Transgenics, Grandis/InfiMed, CSL, InfiMed, MacroMed, Novartis, Novo Nordisk, Pharmacia Serono, TranXenoGen
ｿﾏﾄﾛﾋﾟﾝ誘導体-- Schering AG
ｿﾏﾄﾛﾋﾟﾝ , AIR -- Eli Lilly
ｿﾏﾄﾛﾋﾟﾝ, 吸入 -- Eli Lilly/Alkermes
ｿﾏﾄﾛﾋﾟﾝ , Kabi -- Pharmacia
ｿﾏﾄﾛﾋﾟﾝ , Orasome -- Novo Nordisk
ｿﾒﾙﾐﾝ -- Dainippon Pharmaceutical
SP(V5.2)C -- Supertek
SPf66
ｽﾌｨﾝｺﾞﾐｴﾘﾅｰｾﾞ-- Genzyme
SR 29001 -- Sanofi
SR 41476 -- Sanofi
SR-29001 -- Sanofi
SS1(dsFV)-PE38 -- NeoPharm
ß2 ﾐｸﾛｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ -- Avidex
ß2-ﾐｸﾛｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ融合ﾀﾝﾊﾟｸ質 -- NIH
ß-ｱﾐﾛｲﾄﾞﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ -- CeNeS
ß-ﾃﾞﾌｪﾝｼﾝ – Pharis
黄色ﾌﾞﾄﾞｳ球菌(Staphylococcus aureus)感染症 -- Inhibitex/ZLB
黄色ﾌﾞﾄﾞｳ球菌(Staphylococcus aureus)ﾜｸﾁﾝ複合物 - Nabi
ﾌﾞﾄﾞｳ球菌(Staphylococcus)治療 -- Tripep
ｽﾀﾌｨﾛｷﾅｰｾﾞ – Biovation, Prothera, Thrombogenetics
A群連鎖球菌ﾜｸﾁﾝ-- M6 Pharmaceuticals, North American Vaccine
B群連鎖球菌ﾜｸﾁﾝ-- Microscience

FIG. 1Z

【図１ＡＡ】

B群連鎖球菌ﾜｸﾁﾝ組換え -- Biochem Vaccines
化膿連鎖球菌(Streptococcus pyogenes)ﾜｸﾁﾝ
STRL-33 -- NIH
Subalin -- SRC VB VECTOR
SUIS -- United Biomedical
SUIS-LHRH -- United Biomedical
SUN-E3001 -- Suntory
超高親和性ﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体 -- YM BioSciences
ｽｰﾊﾟｰｵｷｼﾄﾞｼﾞｽﾑﾀｰｾﾞ -- Chiron, Enzon, Ube Industries, Bio-Tech, Yeda
ｽｰﾊﾟｰｵｷｼﾄﾞｼﾞｽﾑﾀｰｾﾞ-2 -- OXIS
ｻﾌﾞﾚｼﾝ -- UAB Research Foundation
SY-161-P5 -- ThromboGenics
SY-162 -- ThromboGenics
全身性ｴﾘﾃﾏﾄｰﾃﾞｽﾜｸﾁﾝ -- MedClone/VivoRx
T 細胞受容体ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾜｸﾁﾝ
T4N5 ﾘﾎﾞｿｰﾑ -- AGI Dermatics
TACI, 可溶性 -- ZymoGenetics
標的ｱﾎﾞﾄｰｼｽ -- Antisoma
ﾀｿﾈﾙﾐﾝ -- Boehringer Ingelheim
TASP
TASP-V
Tatﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ類似物 -- NIH
TBP I -- Yeda
TBP II
TBV25H -- NIH
Tc 99m ior cea1 -- Center of Molecular Immunology
Tc 99m P 748 -- Diatide
Tc 99m ﾎﾞﾂﾏﾌﾞ -- Intracell
Tc-99m rh-ｱﾈｷｼﾝ V -- Theseus Imaging
ﾃｾﾛｲｷﾝ -- Biogen
ﾃﾈｸﾃﾌﾟﾗｰｾﾞ -- Genentech
ﾃﾘﾊﾟﾗﾁﾄﾞ(Teriparatide) -- Armour Pharmaceuticals, Asahi Kasei, Eli Lilly
ﾃﾙﾘﾌﾞﾚｼﾝ -- Ferring
ﾃｽﾁｼﾝ -- AMRAD
ﾃﾄﾗﾌｨﾌﾞﾘｼﾝ(Tetrafibricin) -- Roche
TFPI -- EntreMed
tgD-IL-2 -- Takeda
TGF-Alpha -- ZymoGenetics
TGF-ß -- Kolon
TGF-ß2 -- Insmed
TGF-ß3 -- OSI
ｻﾗｾﾐｱ遺伝子治療 -- Crucell
TheraCIM-h-R3 -- Center of Molecular Immunology, YM BioSciences
Theradigm-HBV -- Epimmune
Theradigm-HPV -- Epimmune
Theradigm-ﾏﾗﾘｱ -- Epimmune
Theradigm-黒色腫 -- Epimmune
TheraFab -- Antisoma
ThGRF 1-29 -- Theratechnologies
ThGRF 1-44 -- Theratechnologies
ﾄﾛﾝﾎﾞﾓｼﾞｭﾘﾝ -- Iowa, Novocastra
ﾄﾛﾝﾎﾞﾎﾟｴﾁﾝ(Thrombopoietin) -- Dragon Pharmaceuticals, Genentech
ﾄﾛﾝﾎﾞﾎﾟｴﾁﾝ, Pliva -- Receptron
ﾄﾛﾝﾎﾞｽﾎﾟﾝｼﾞﾝ(Thrombospondin)2 -
ﾄﾛﾝﾎﾞｽﾀﾁﾝ -- Thromgen
ｻｲﾏﾙﾌｧｼﾝ -- SciClone
ｻｲﾓｶﾙﾁﾝ -- Gedeon Richter
ｻｲﾓｼﾝα1 -- NIH
甲状腺刺激ﾎﾙﾓﾝ -- Genzyme
tICAM-1 -- Bayer
Tick 抗凝固ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ -- Merck
TIF -- Xoma
ﾃｨﾌｧｺｷﾞﾝ(Tifacogin) -- Chiron, NIS, Pharmacia
組織因子 -- Genentech
組織因子経路阻害剤
TJN-135 -- Tsumura
TM 27 -- Avant
TM 29 -- Avant
TMC-151 -- Tanabe Seiyaku
TNF 腫瘍壊死因子 -- Asahi Kasei
TNF α -- CytImmune
TNF 抗体 -- Johnson & Johnson
TNF 結合ﾀﾝﾊﾟｸ質 -- Amgen
TNF 分解生成物 -- Oncotech

FIG. 1AA

【図１ＢＢ】

TNF 受容体 -- Immunex
TNF 受容体1, 可溶性 -- Amgen
TNF 腫瘍壊死因子-α -- Asahi Kasei, Genetech, Mochida
TNF-α 阻害剤 -- Tripep
TNFR:Fc 遺伝子治療 -- Targeted Genetics
TNF-SAM2
ﾄﾚﾘﾏﾌﾞ(ToleriMab) -- Innogenetics
ﾄｷｿﾌﾟﾗｽﾞﾏ(Toxoplasma gondii)ﾜｸﾁﾝ -- GlaxoSmithKline
TP 9201 -- Telios
TP10 -- Avant
TP20 -- Avant
tPA -- Centocor
ﾄﾗﾌｪﾙﾐﾝ -- Scios
TRAIL/Apo2L -- Immunex
ﾄﾗﾝｽﾌｪﾘﾝ結合ﾀﾝﾊﾟｸ質 -- CAMR
ﾄﾗﾝｽﾌｫｰﾐﾝｸﾞ増殖因子-β-1 -- Genentech
輸送ﾀﾝﾊﾟｸ質 -- Genesis
TRH -- Ferring
ﾄﾘｱﾋﾞﾝ -- Schering AG
ﾄﾘｺﾅｰﾙ
ﾄﾘﾌﾗﾋﾞﾝ
ﾄﾛﾎﾞﾆﾝ ! -- Boston Life Sciences
TRP-2^ -- NIH
ﾄﾘﾌﾟｼﾝｲﾝﾋﾋﾞﾀｰ -- Mochida
TSP-1 遺伝子治療 --
TT-232
TTS-CD2 -- Active Biotech
結核ﾜｸﾁﾝ -- Aventis Pasteur, Genesis
腫瘍標的ｽｰﾊﾟｰ抗原 -- Active Biotech -- Pharmacia
腫瘍ﾜｸﾁﾝ -- PhotoCure
腫瘍活性化型ﾌﾟﾛﾄﾞﾗｯｸﾞ抗体複合物 -- Millennium/ImmunoGen
ﾂﾑｽﾀﾁﾝ -- ILEX
ﾂﾋﾞﾙﾏﾌﾞ(Tuvirumab) -- Novartis
TV-4710 -- Teva
TWEAK受容体 -- Immunex
TXU-PAP
TY-10721 -- TOA Eiyo
I 型糖尿病ﾜｸﾁﾝ -- Research Corp
ﾁﾌｽﾜｸﾁﾝ CVD 908
U 143677 -- Pharmacia
U 81749 -- Pharmacia
UA 1248 -- Arizona
UGIF -- Sheffield
UIC 2
UK 101
UK-279276 -- Corvas Intl.
ｳﾛｼﾞﾗﾁﾝ -- Pharis
ｳﾛﾌｧﾘﾄﾛﾌｨﾝ -- Serono
ｳﾃﾛﾌｪﾘﾝ -- Pepgen
V 20 -- GLYCODesign
V2ﾊﾞｿﾌﾟﾚｼﾝ受容体遺伝子治療
ﾜｸﾁﾝ -- Active Biotech
帯状疱疹(Varicella zoster)糖ﾀﾝﾊﾟｸ質ﾜｸﾁﾝ -- Research Corporation Technologies
帯状疱疹(Varicella zoster)ｳｲﾙｽﾜｸﾁﾝ生存 -- Cantab Pharmaceuticals
血管内皮増殖因子 -- Genentech, University of California
血管内皮増殖因子 - R&D Systems
血管ﾀｰｹﾞｯﾃｨﾝｸﾞ剤 -- Peregrine
血管浸透増強剤 -- Peregrine
ﾊﾞｿｽﾀﾁﾝ -- NIH
VCL -- Bio-Tech. General
VEGF -- Genentech, Scios
VEGF 阻害剤 -- Chugai
VEGF-2 -- Human Genome Sciences
VEGF-Trap -- Regeneron
ﾋﾞｽｸﾐ, 組換え -- Madaus
ﾋﾞﾀｷｼﾝ
ﾋﾞﾄﾗｰｾﾞ -- ISTA Pharmaceuticals
西ナイルウイルスワクチン -- Bavarian Nordic
WP 652
WT1ﾜｸﾁﾝ -- Corixa
WX-293 -- Wilex BioTech.

FIG. 1BB

【図１ＣＣ】

WX-360 -- Wilex BioTech.
WX-UK1 -- Wilex BioTech.
XMP-500 -- XOMA
XomaZyme-791 -- XOMA
XTL 001 -- XTL Biopharmaceuticals
XTL 002 -- XTL Biopharmaceuticals
酵母送達系 -- GlobeImmune
ﾍﾟｽﾄ菌(Yersinia pestis)ﾜｸﾁﾝ
YIGSR-Stealth -- Johnson & Johnson
Yissum ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄ No. D-0460 -- Yissum
YM 207 -- Yamanouchi
YM 337 -- Protein Design Labs
ｲｯﾄﾘｳﾑ-90標識ﾋﾞｵﾁﾝ
ｲｯﾄﾘｳﾑ-90-標識抗-CEA MAb T84.66 -
ZD 0490 -- AstraZeneca
ｼﾞｺﾉﾁﾄﾞ -- Elan
ZK 157138 -- Berlex Laboratories
ｿﾞﾘﾓﾏﾌﾞｱﾘﾄｯｸｽ
ｿﾞﾙｾﾙ -- Immune Response
ZRXLﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ -- Novartis

FIG. 1CC

【図２】

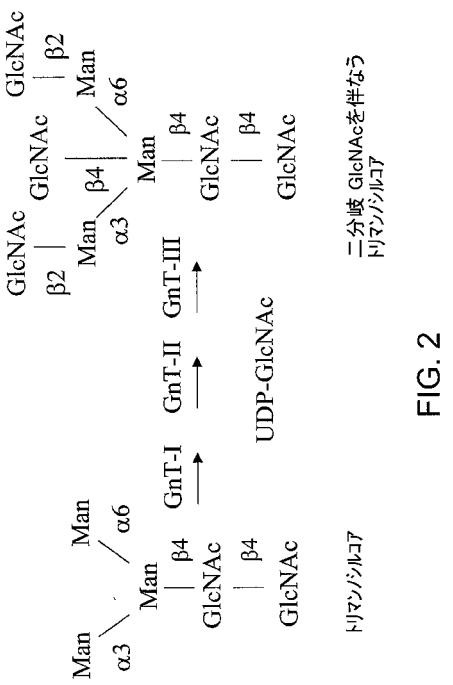


FIG. 2

【図３】

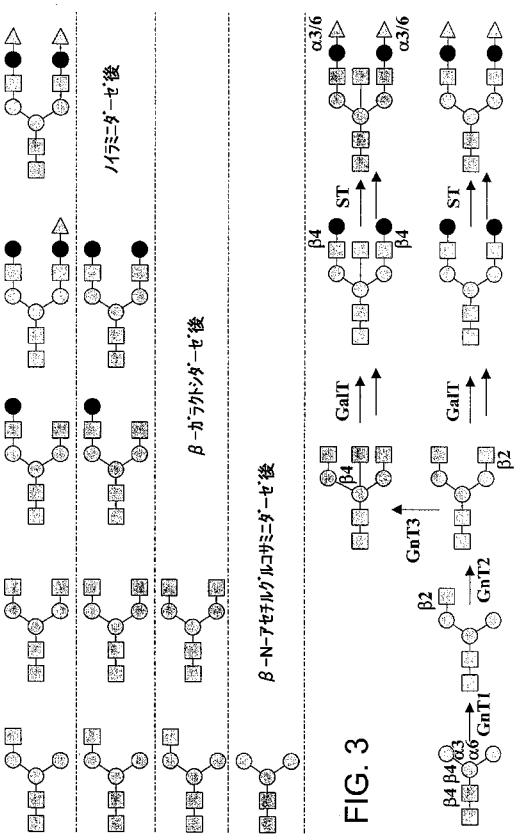


FIG. 3

【図４】

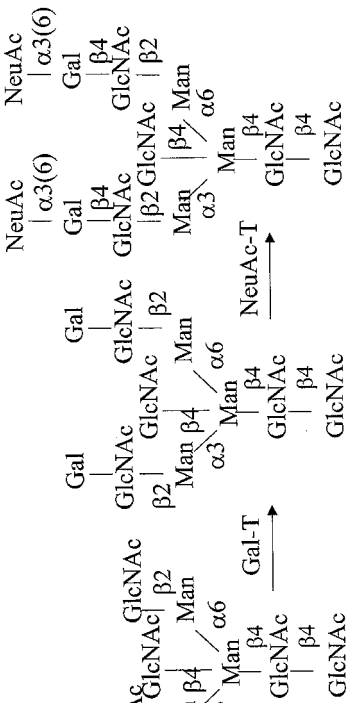


FIG. 4

【図５】

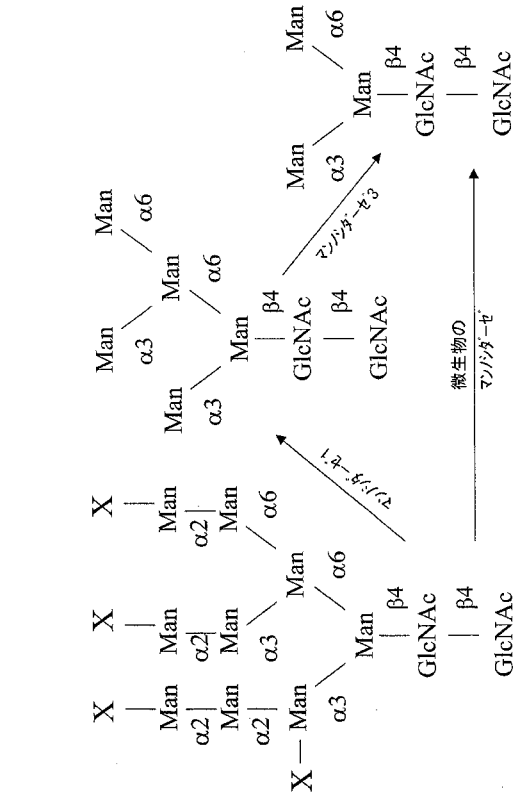


FIG. 5

【図６】



FIG. 6

【図７】

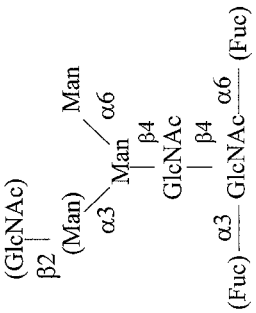


FIG. 7

【図８】

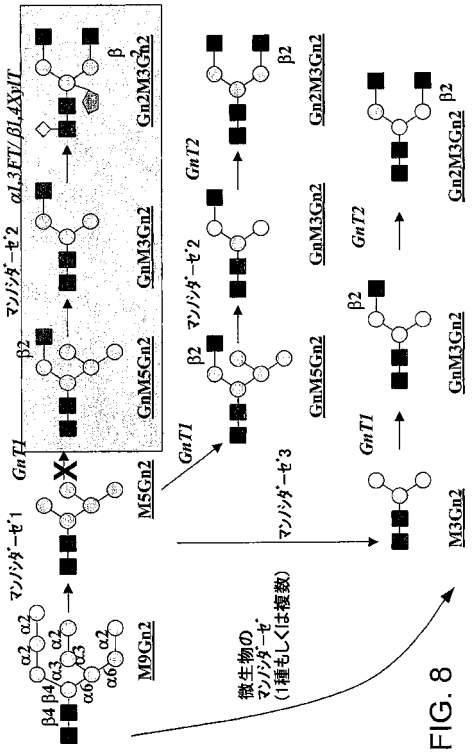


FIG. 8

【図９】

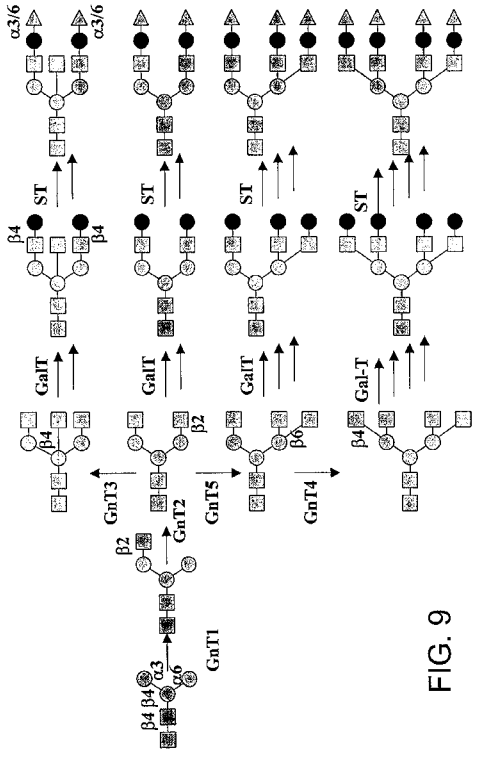


FIG. 9

【図１０】

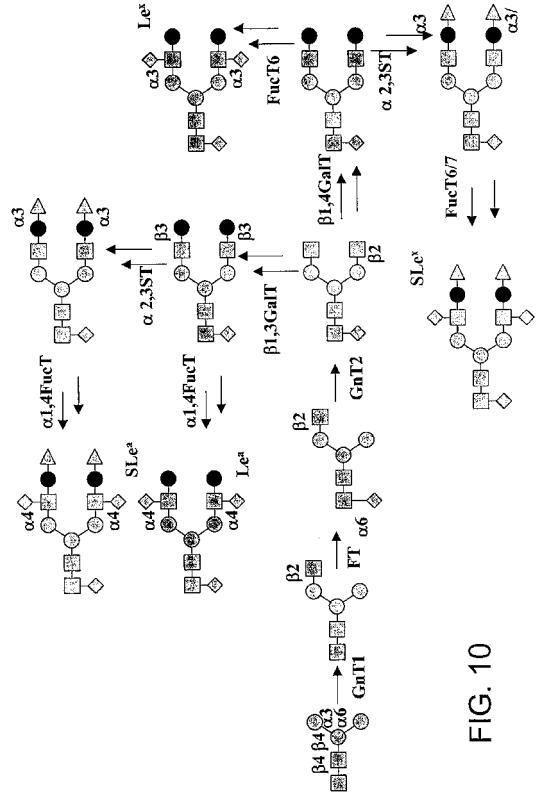


FIG. 10

【図１１】

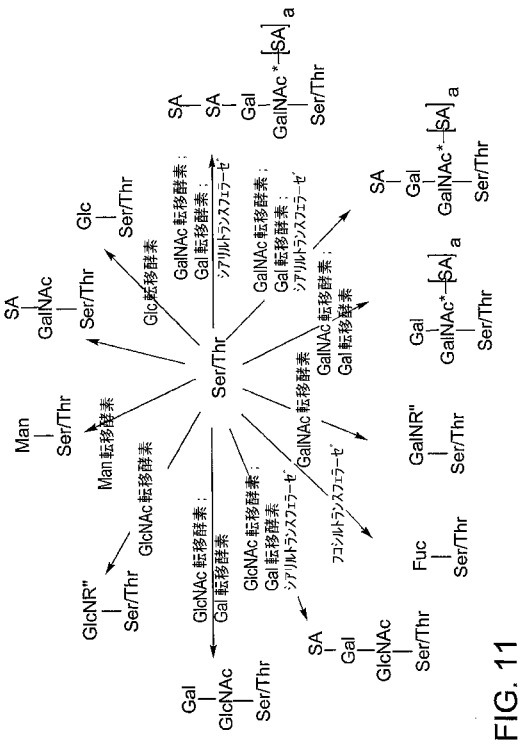


FIG. 11

【図１２】

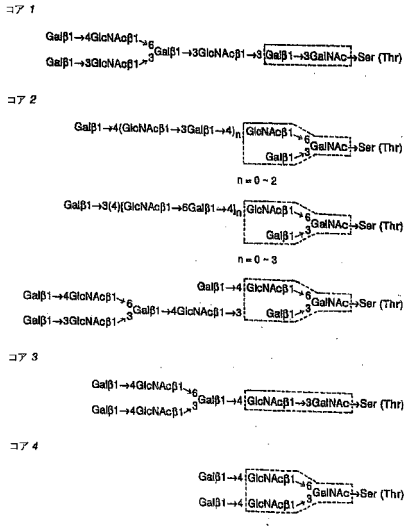


FIG. 12

【図１３Ａ】

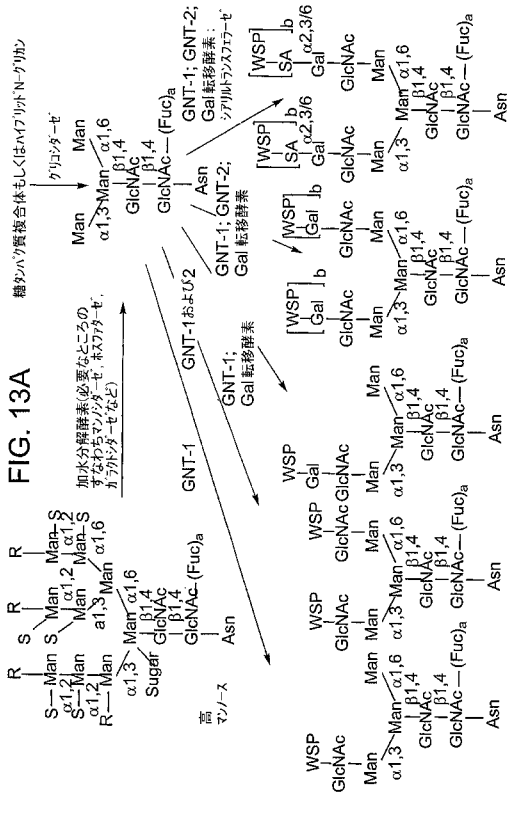


FIG. 13A

【図１３Ｂ】

FIG. 13B

【図１４】

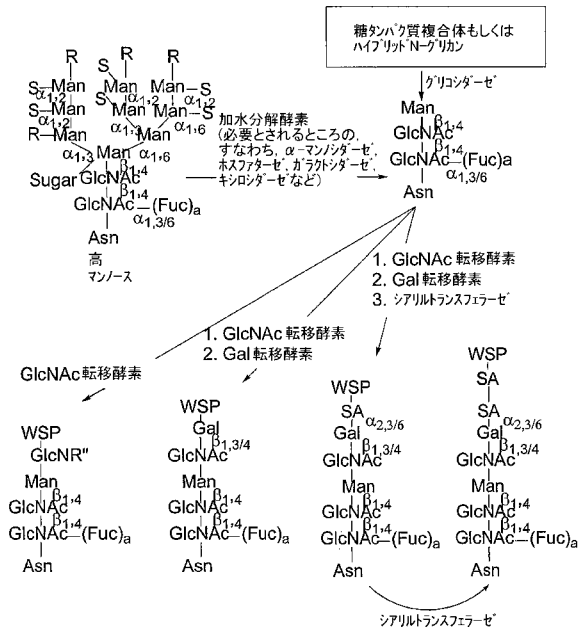


FIG. 14

【図１５】

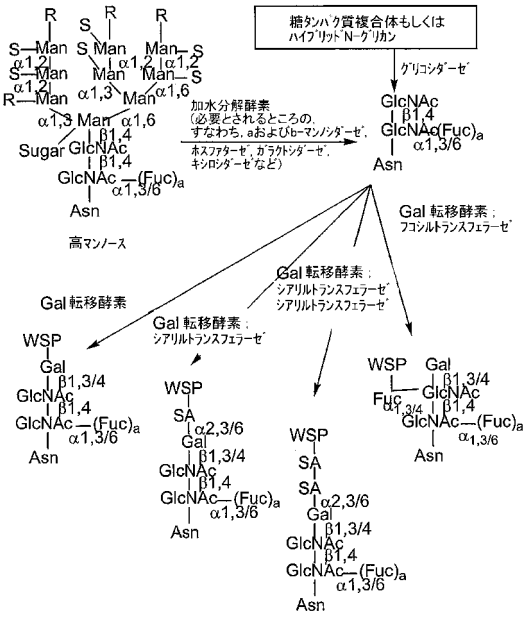


FIG. 15

【図１６】

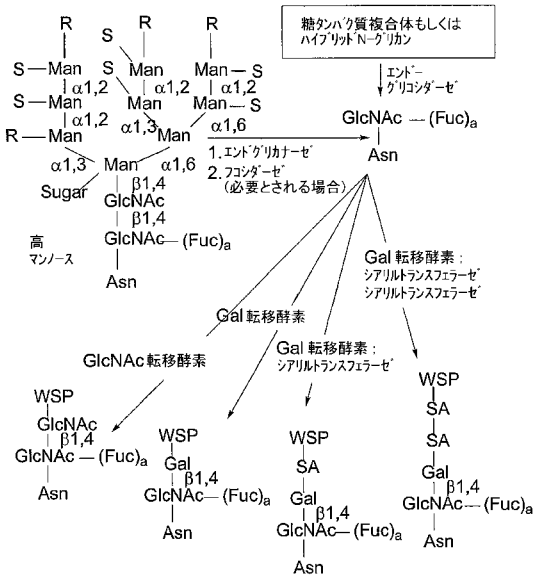


FIG. 16

【図１７Ａ】

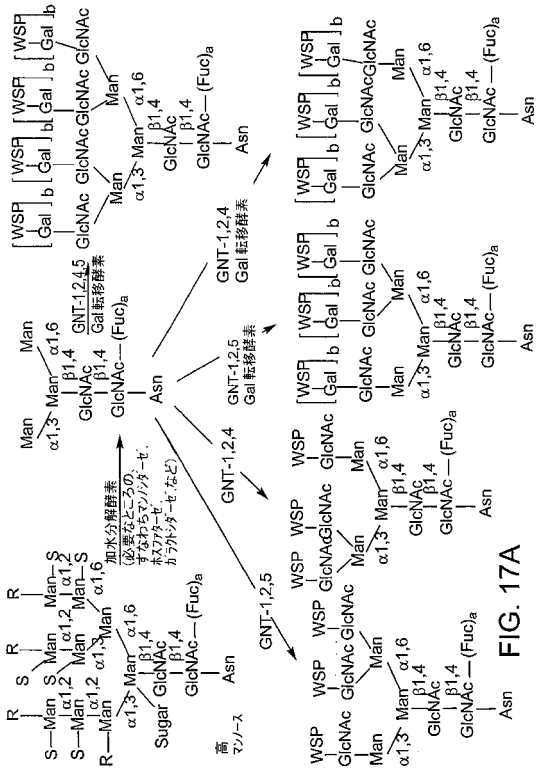


FIG. 17A

【図１７Ｂ】

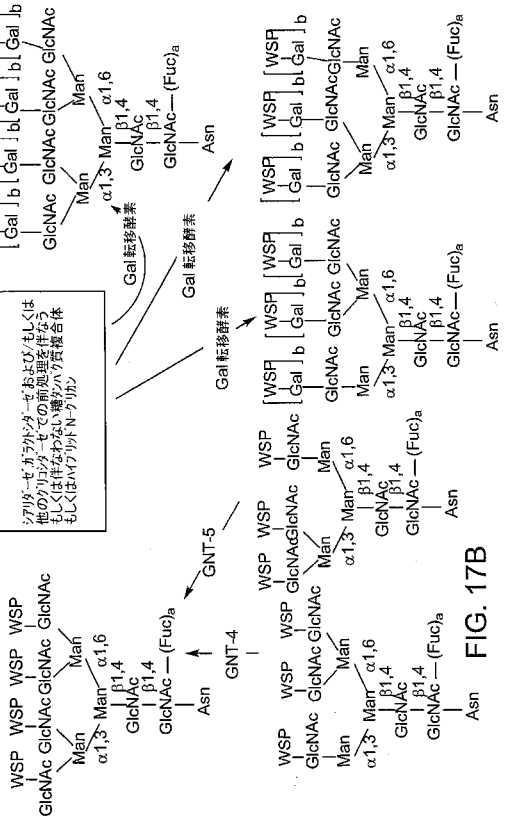


FIG. 17B

【図１８Ａ】

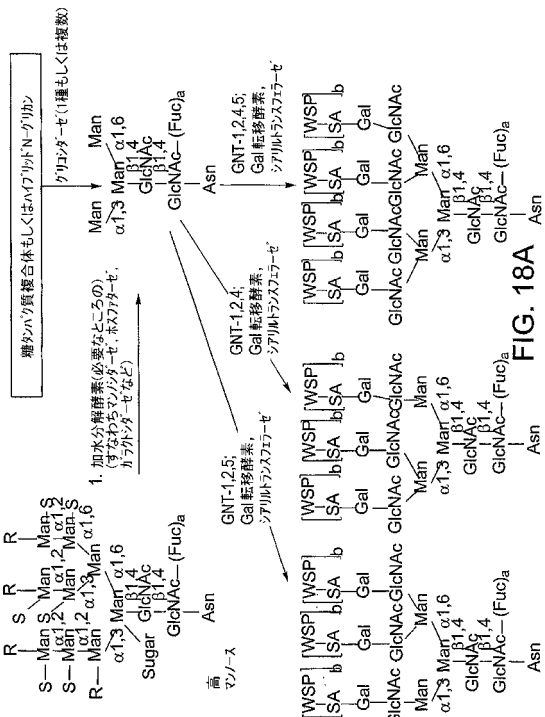


FIG. 18A

【図１８Ｂ】

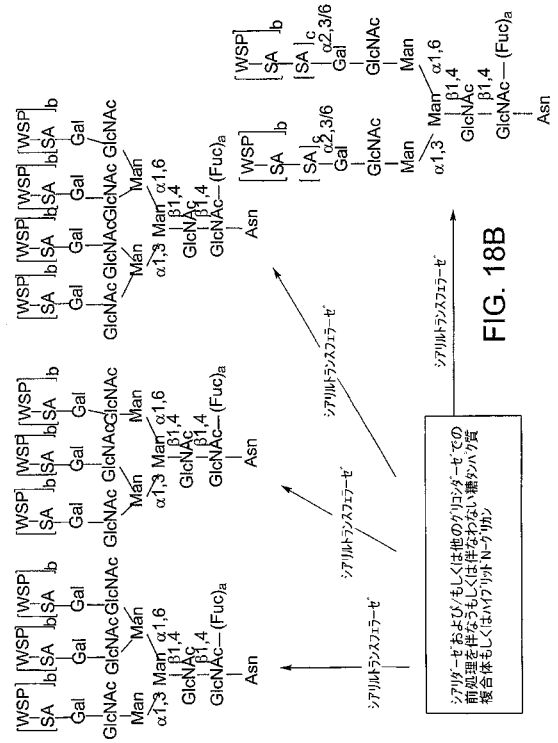


FIG. 18B

【図１９】

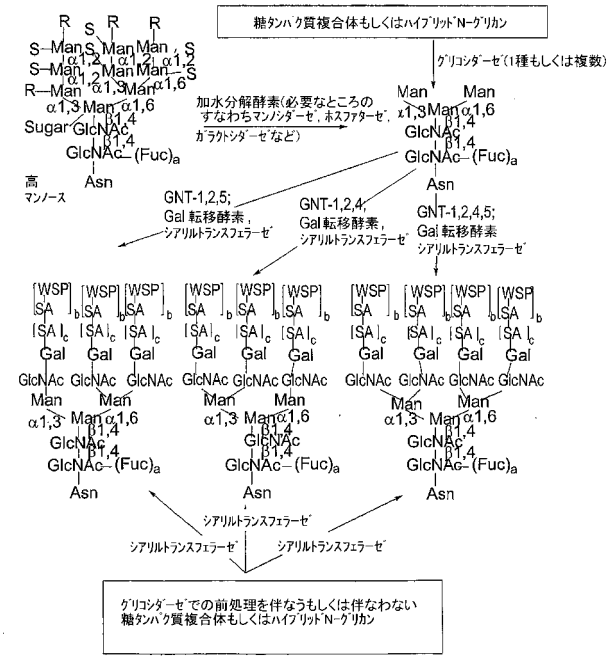


FIG. 19

【図２０】

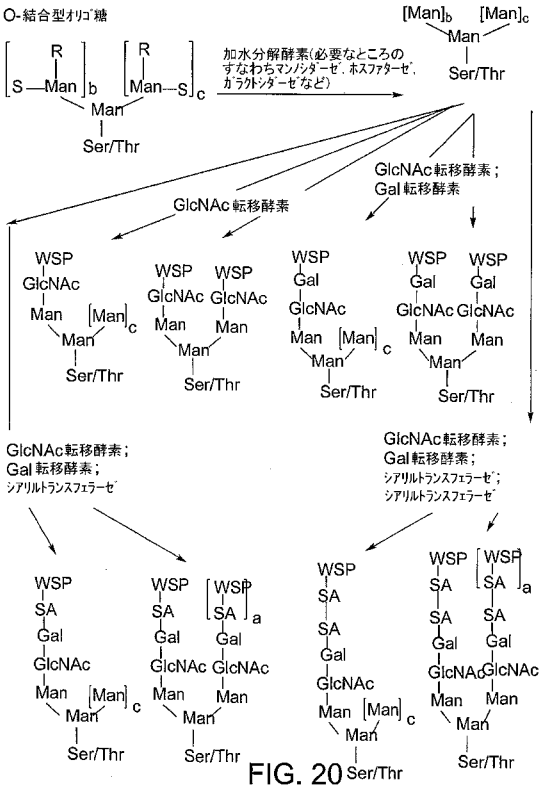


FIG. 20

【図２１】

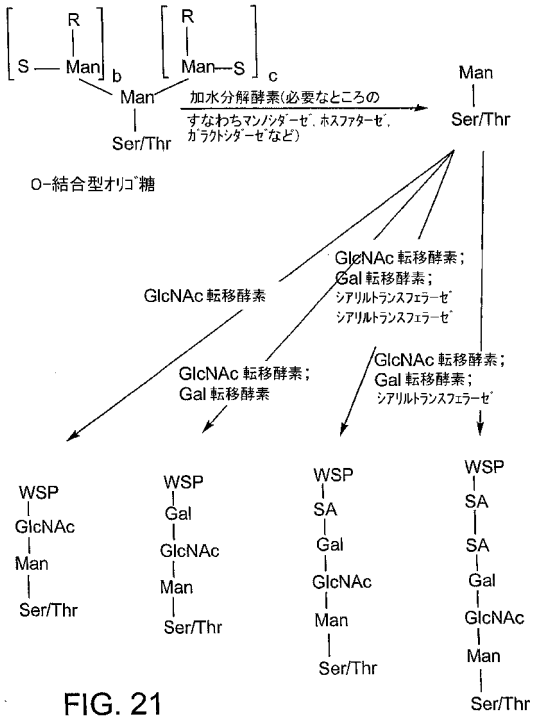


FIG. 21

【図２２Ａ】

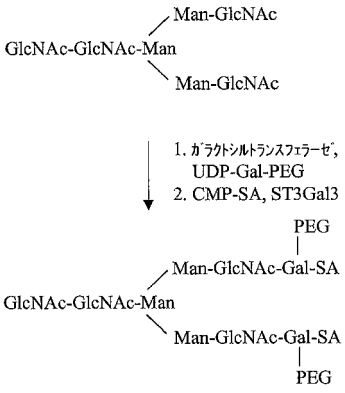


FIG. 22A

【図２２Ｂ】

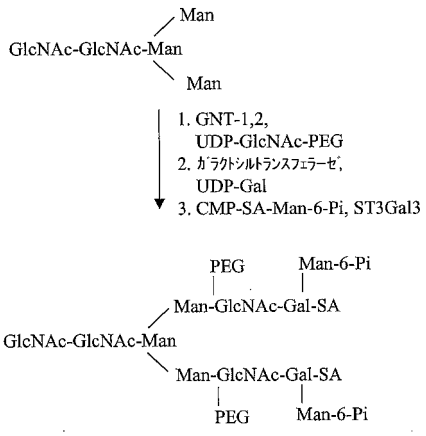


FIG. 22B

【図２２Ｃ】

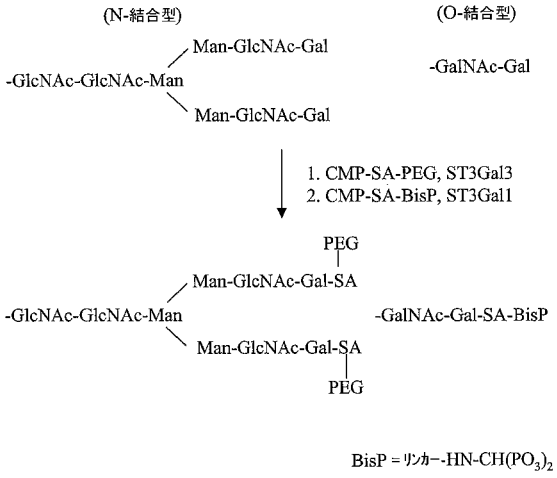


FIG. 22C

【図２３】

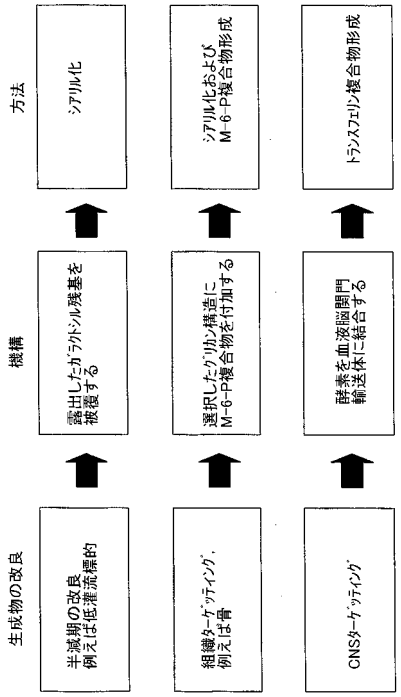


FIG. 23

【図２４】

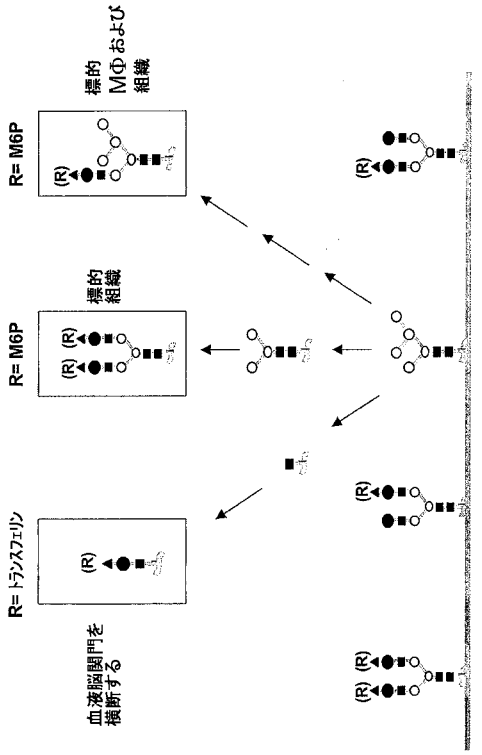


FIG. 24

【図２５】

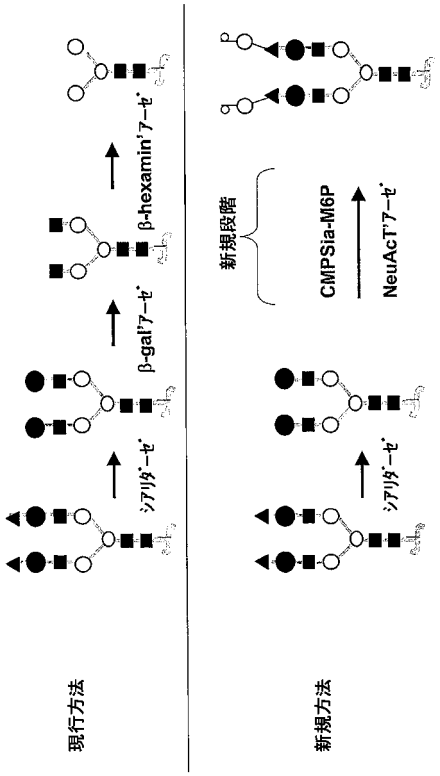


FIG. 25

【図２６】

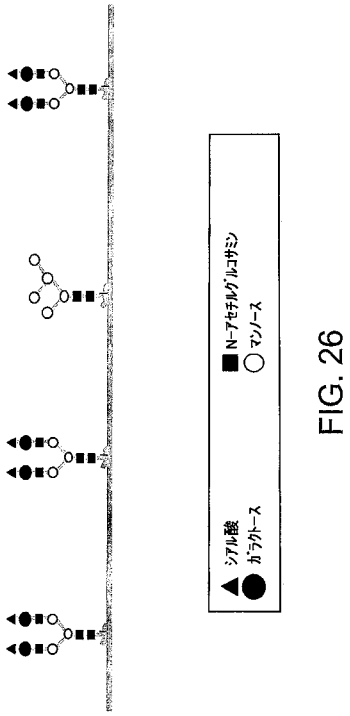
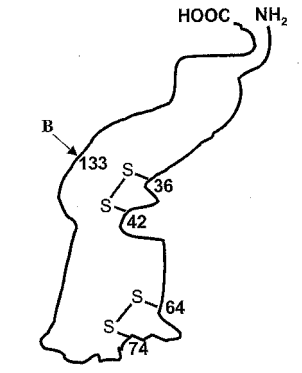
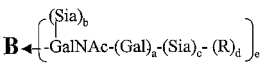


FIG. 26

【図２７Ａ】





a-c, e (独立に選択される) = 0もしくは1;
d = 0;
R = 修飾基,マンノース,オリゴ−マンノース

FIG. 27A

【図２７Ｂ】

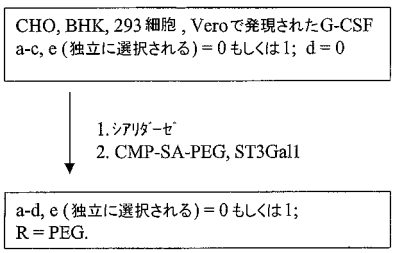


FIG. 27B

【図２７Ｃ】

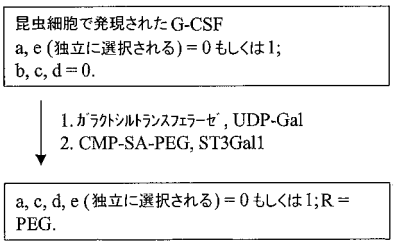


FIG. 27C

【図２７Ｄ】

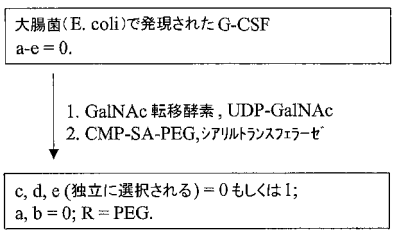


FIG. 27D

【図２７Ｅ】

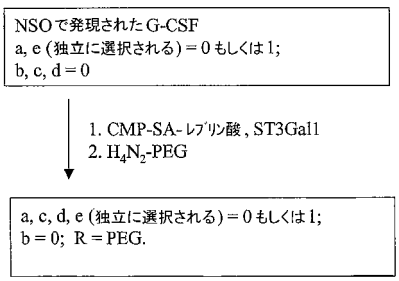


FIG. 27E

【図２７Ｆ】

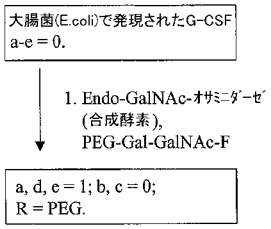


FIG. 27F

【図２７Ｇ】

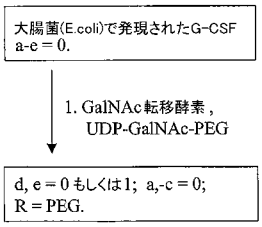
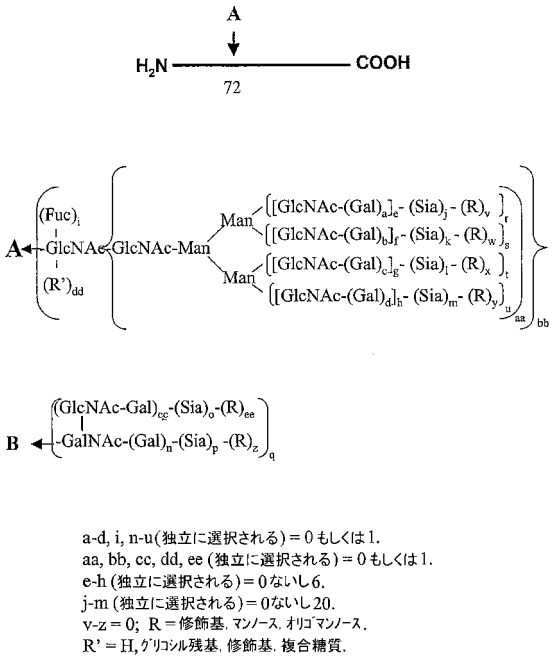


FIG. 27G

【図２８Ａ】



a-d, i, n-u(独立に選択される) = 0もしくは1.
aa, bb, cc, dd, ee (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし20.
v-z = 0; R = 修飾基, ﾏﾝﾉｰｽ, ｵﾘｺﾞﾏﾝﾉｰｽ.
R' = H, ｸﾞﾘｺｼﾙ残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 28A

【図２８Ｂ】

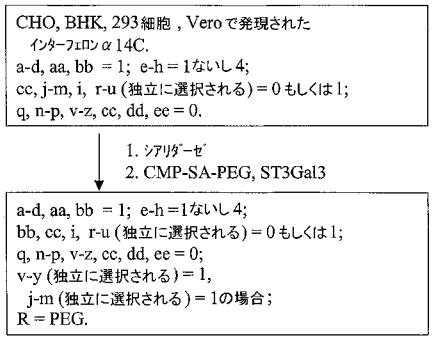


FIG. 28B

【図２８Ｃ】

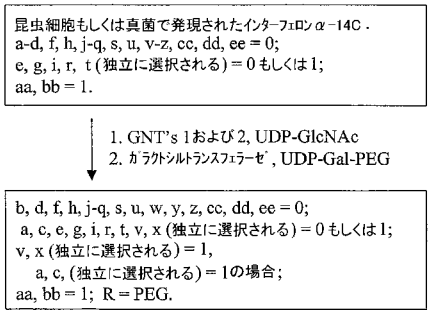


FIG. 28C

【図２８Ｄ】

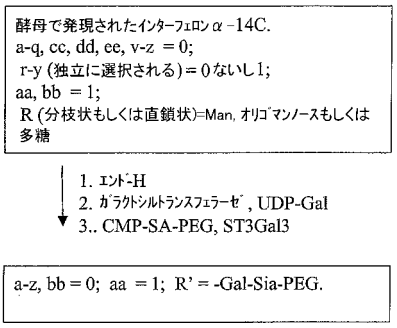
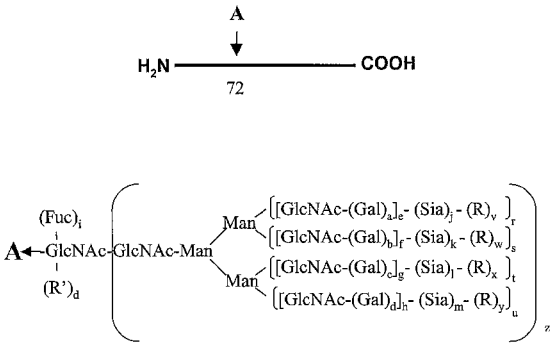


FIG. 28D

【図２８Ｅ】



a-d, i, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0 ないし 4.
j-m (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
n, v-y = 0; z = 0 もしくは 1.
R = ポリマー; R' = 糖、複合糖質.

FIG. 28E

【図２８Ｆ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたインターフェロンα-14C.
h = 1 ないし 3;
a-g, j-m, i (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
n, v-y = 0; z = 1.

↓ 1. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

h = 1 ないし 3;
a-g, i (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
j-m, v-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
z = 1; n = 0; R = PEG.

FIG. 28F

【図２８Ｇ】

昆虫細胞もしくは真菌で発現されたインターフェロンα-14C.
a-d, f, h, j-n, s, u, v-y = 0;
e, g, i, r, t (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
z = 1.

↓ 1. GNT's 1,2,4,5, UDP-GlcNAc
2. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal
3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-m, r-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
z = 1; n = 0; R = PEG.

FIG. 28G

【図２８Ｈ】

酵母で発現されたインターフェロンα-14C.
a-n = 0; r-y (独立に選択される) = 0 ないし 1;
z = 1; R (分枝状もしくは直鎖状)=Man, オリゴマンノース.

↓ 1. マンノシダーゼ
2. GNT's 1,2,4,5, UDP-GlcNAc
3. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal
4.. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-m, r-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
z = 1; n = 0; R = PEG.

FIG. 28H

【図２８Ｉ】

NSOで発現されたインターフェロンα14C.
a-i, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
j-m, n, v-y = 0; z = 1.

↓ 1. CMP-SA-レプリン酸, ST3Gal3, 緩衝剤, 塩
2. H_4N_2-PEG

a-i, j-m, r-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
n = 0; z = 1; R = PEG.

FIG. 28I

【図２８Ｊ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたインターフェロンα-14C.
h = 1 ないし 3;
a-g, j-m, i (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
n, v-y = 0; z = 1.

↓ 1. CMP-SA-PEG, α2,8-ST

h = 1 ないし 3;
a-g, i, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
j-m (独立に選択される) = 0 ないし 2;
v-y (独立に選択される) = 1,
j-m (独立に選択される) が2である場合:
z = 1; n = 0; R = PEG.

FIG. 28J

【図２８Ｋ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたインターフェロンα-14C.
a-g, j-m, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
h = 1 ないし 3; n, v-y = 0; z = 1.

↓ 1. シアリダーゼ
2. Trans-シアリダーゼ, PEG-Sia-乳糖

a-g, j-m, r-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
h = 1 ないし 3; n = 0; z = 1; R = PEG.

FIG. 28K

【図２８Ｌ】

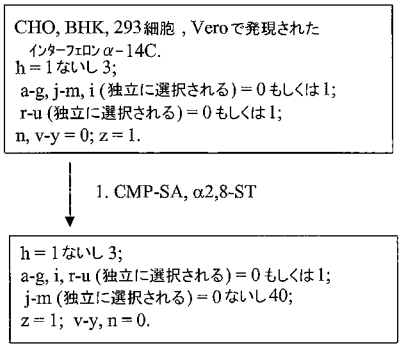


FIG. 28L

【図２８Ｍ】

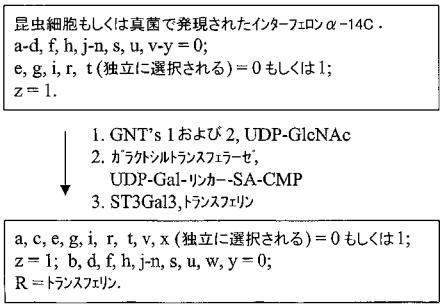


FIG. 28M

【図２８Ｎ】

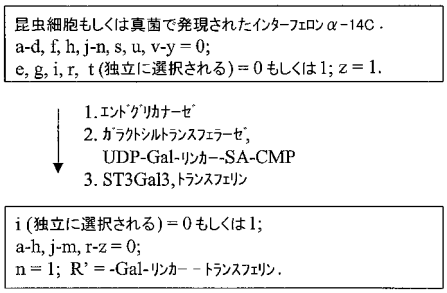
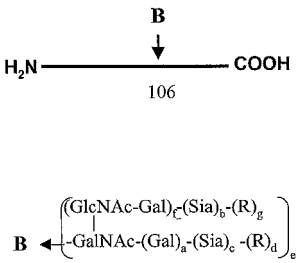


FIG. 28N

【図２８Ｏ】



a-c, e, f (独立に選択される)＝0もしくは1;
d, g＝0; R＝ﾎﾟﾘﾏｰ,複合糖質.

FIG. 28O

【図２８Ｐ】

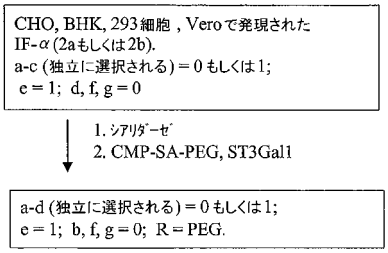


FIG. 28P

【図２８Ｑ】

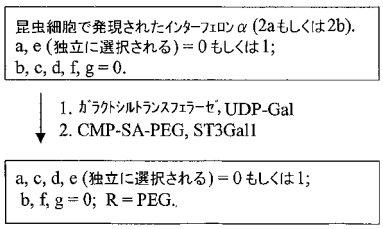


FIG. 28Q

【図２８Ｒ】

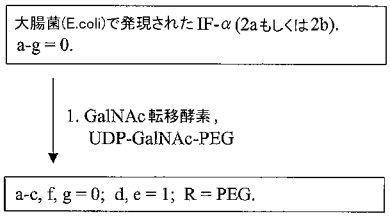


FIG. 28R

【図２８Ｓ】

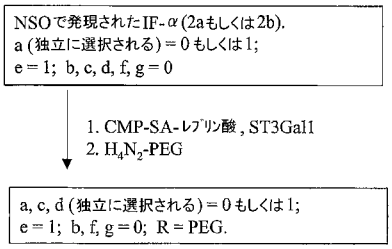


FIG. 28S

【図２８Ｔ】

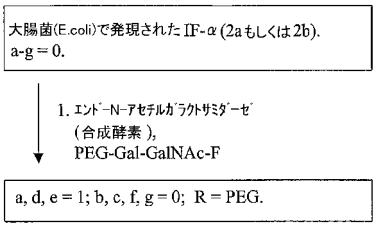


FIG. 28T

【図２８Ｕ】

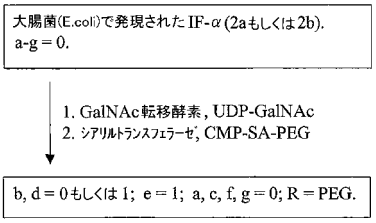


FIG. 28U

【図２８Ｖ】

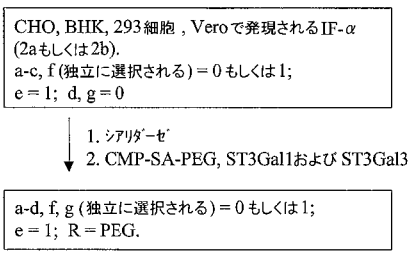


FIG. 28V

【図２８Ｗ】

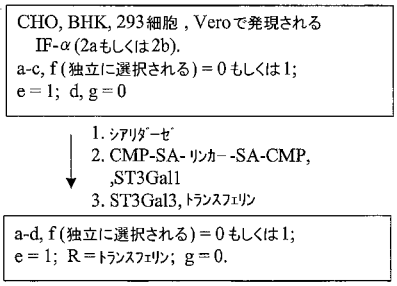


FIG. 28W

【図２８Ｘ】

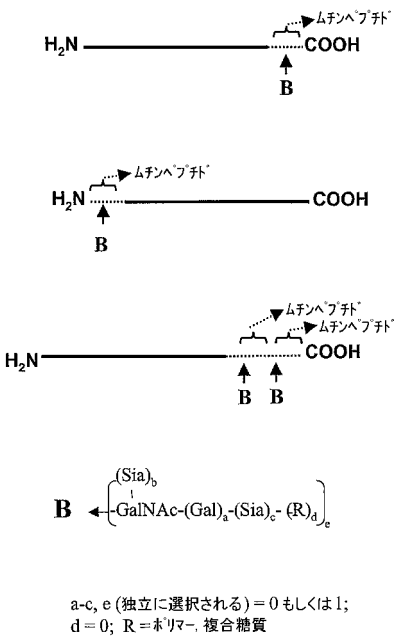


FIG. 28X

【図２８Ｙ】

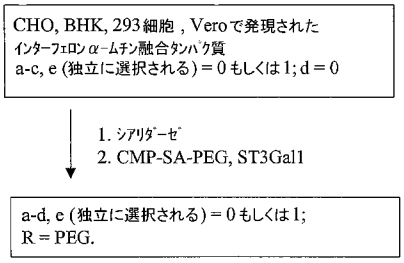


FIG. 28Y

【図２８Ａ Ａ】

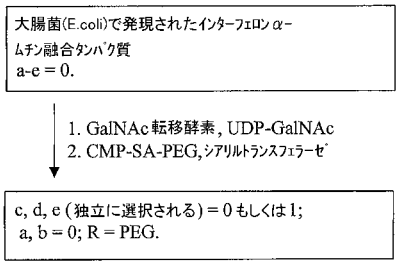


FIG. 28AA

【図２８Ｚ】

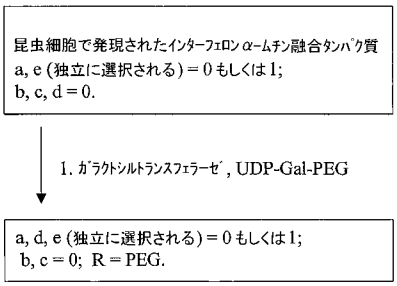


FIG. 28Z

【図２８ＢＢ】

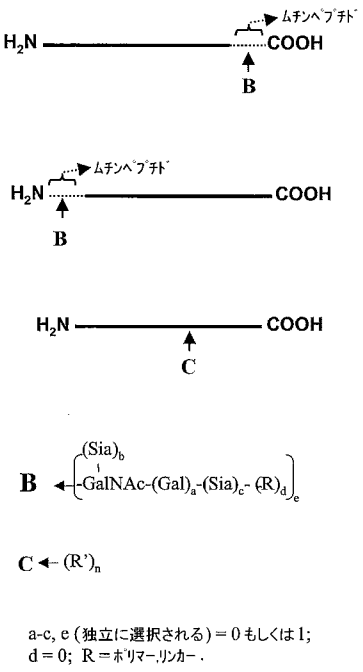


FIG. 28BB

【図２８ＣＣ】

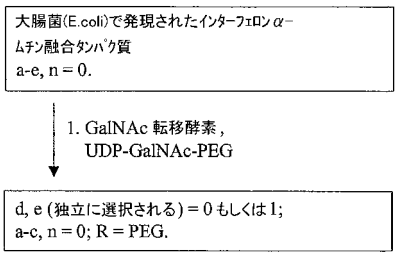


FIG. 28CC

【図２８ＤＤ】

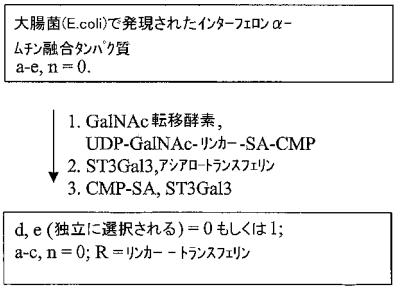


FIG. 28DD

【図２８ＥＥ】

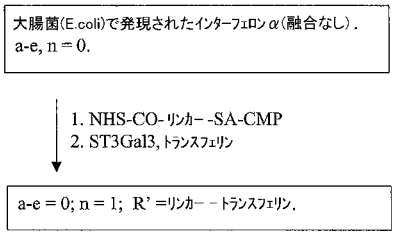


FIG. 28EE

【図２９Ａ】

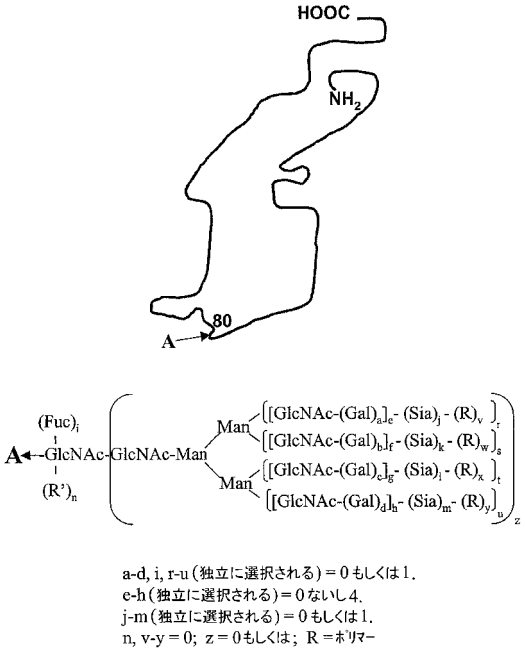


FIG. 29A

【図２９Ｂ】

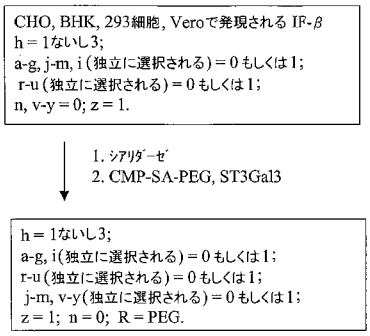


FIG. 29B

【図２９Ｃ】

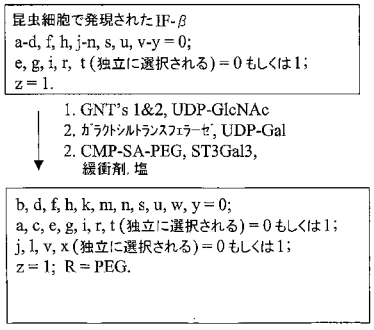


FIG. 29C

【図２９Ｄ】

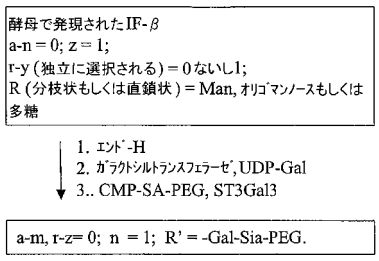


FIG. 29D

【図２９Ｅ】

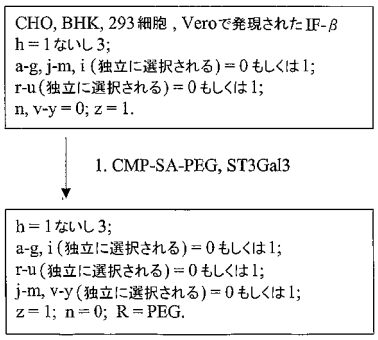


FIG. 29E

【図２９Ｆ】

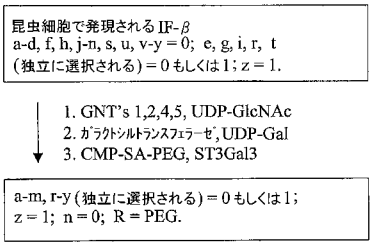


FIG. 29F

【図２９Ｇ】

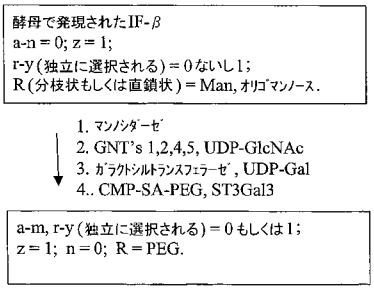


FIG. 29G

【図２９Ｈ】

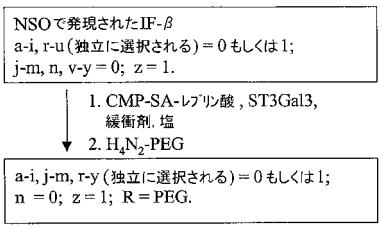


FIG. 29H

【図２９Ｉ】

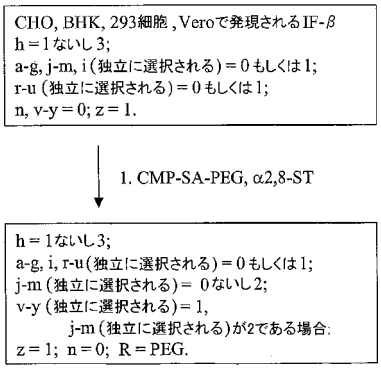


FIG. 29I

【図２９Ｊ】

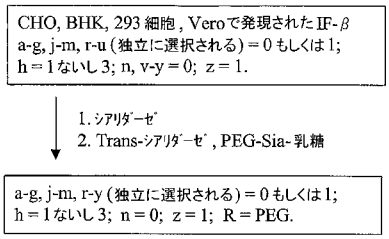


FIG. 29J

【図２９Ｋ】

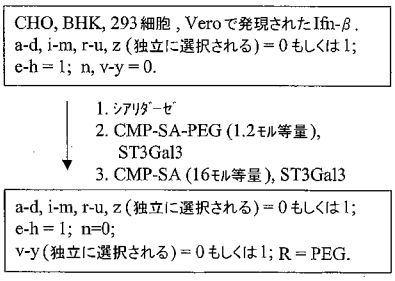


FIG. 29K

【図２９Ｌ】

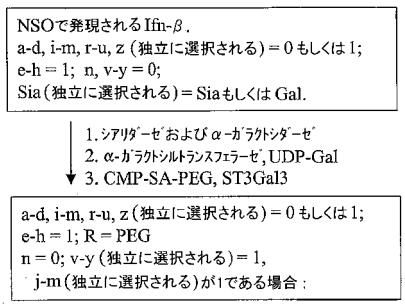


FIG. 29L

【図２９Ｍ】

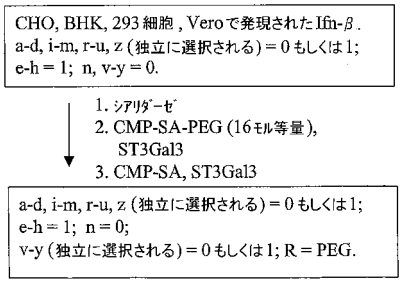


FIG. 29M

【図２９Ｎ】

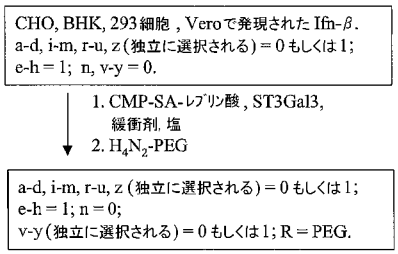


FIG. 29N

【図２９Ｏ】

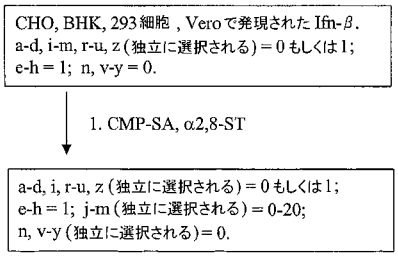
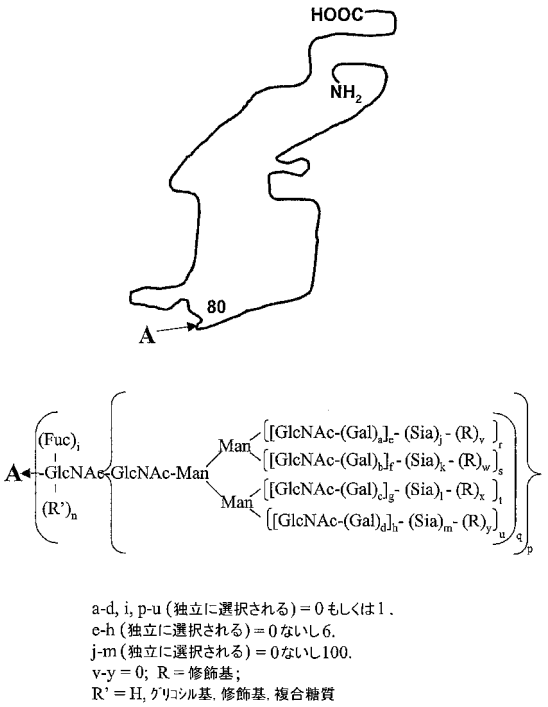


FIG. 29O

【図２９Ｐ】



a-d, i, p-u(独立に選択される)=0もしくは1.
e-h(独立に選択される)=0ないし6.
j-m(独立に選択される)=0ないし100.
v-y=0; R=修飾基;
R'=H, ｸﾞﾘｺｼﾙ基, 修飾基, 複合糖質

FIG. 29P

【図２９Ｑ】

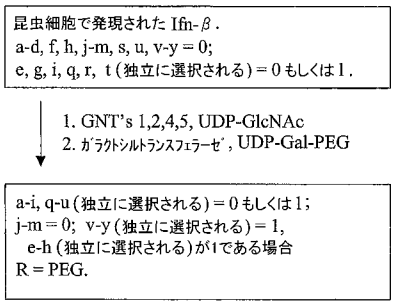


FIG. 29Q

【図２９Ｒ】

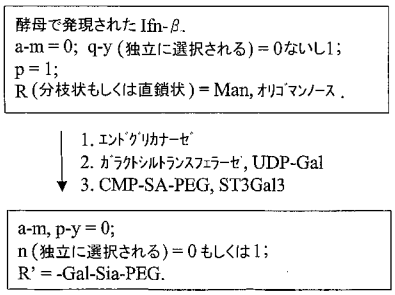


FIG. 29R

【図２９Ｓ】

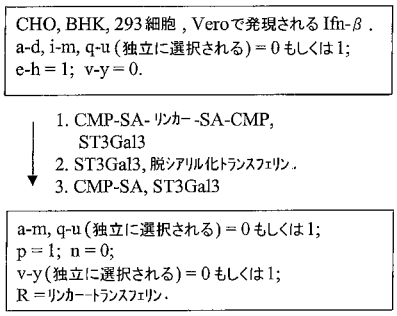
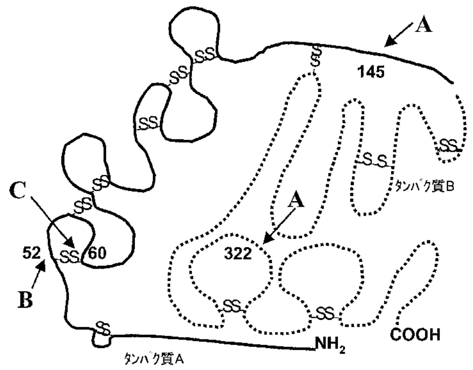
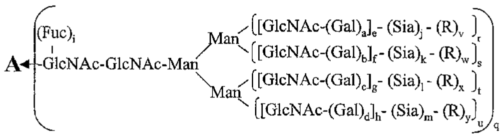
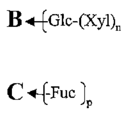


FIG. 29S

【図３０Ａ】







a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
o, p (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h, n (独立に選択される) = 0 ないし 6.
j-m (独立に選択される) = 0 ないし 20.
v-y = 0;
R = 修飾基,マンノース,オリゴ-マンノース,
Sia-Lewis X, Sia-Lewis A..

FIG. 30A

【図３０Ｂ】

BHKで発現された第ＶＩＩもしくはＶＩＩa因子
a-d, e, i, g, q, j, l, o, p (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, v-y = 0; n = 0-4.

↓ 1. シアリダーゼ
2. CMP-SA-PEG (16モル等量),
ST3Gal3

a-d, e, g, i, q, j, l, o, p (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, w, y = 0; n = 0-4;
v, x, (独立に選択される) = 1,
j, l (それぞれ,独立に選択される)が1である場合:
R = PEG.

FIG. 30B

【図３０Ｃ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現された第ＶＩＩもしくはＶＩＩa因子
a-d, e, i, g, q, j, l, o, p (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, v-y = 0; n = 0-4.

↓ 1. シアリダーゼ
2. CMP-SA-PEG (1.2モル等量),
ST3Gal3
3. CMP-SA (8モル等量), ST3Gal3

a-d, e, g, i, q, j, l, o, p (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, w, y = 0; n = 0-4;
v もしくは x, (独立に選択される) = 1,
j もしくは l, (それぞれ,独立に選択される)が1である場合:
R = PEG.

FIG. 30C

【図３０Ｄ】

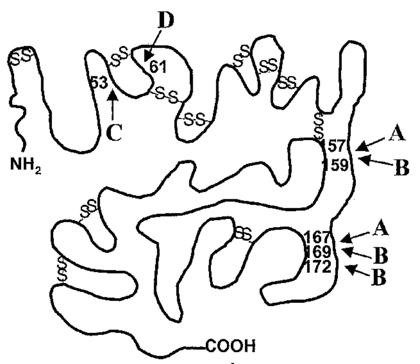
NSOで発現された第ＶＩＩもしくはＶＩＩa因子
a--u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
v-y = 0; n = 0-4;
Sia (独立に選択される) = Sia もしくは Gal.

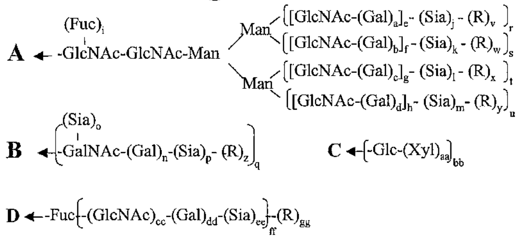
↓ 1. シアリダーゼおよびα-ガラクトシダーゼ
2. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal
3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-m, o-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
n = 0-4; v-y (独立に選択される) = 1,
j-m (独立に選択される)が1である場合:
Sia = Sia; R = PEG.

FIG. 30D

【図３１Ａ】





a-d, i, n-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
bb, cc, dd, ee, ff, gg (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h, aa (独立に選択される) = 0 ないし 6.
j-m (独立に選択される) = 0 ないし 20.
v-z = 0; R = 修飾基, マンノース, オリゴマンノース .

FIG. 31A

【図３１Ｂ】

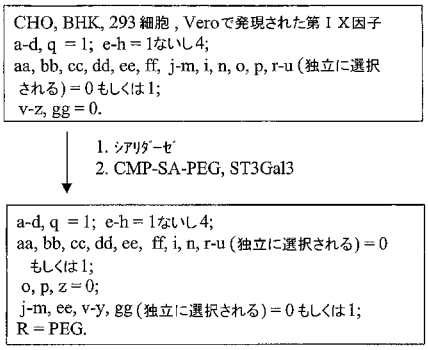


FIG. 31B

【図３１Ｃ】

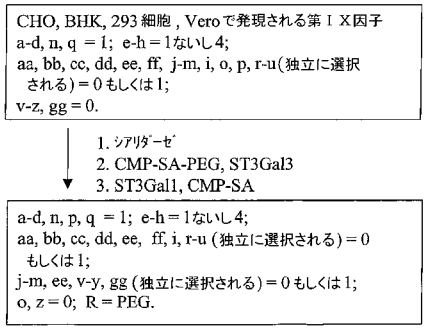


FIG. 31C

【図３１Ｄ】

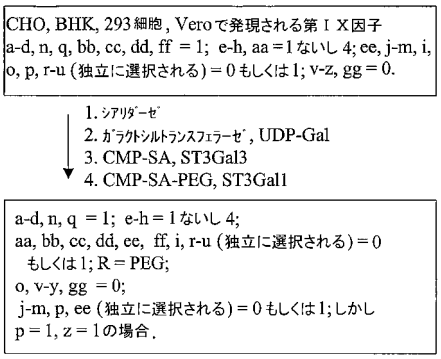


FIG. 31D

【図３１Ｅ】

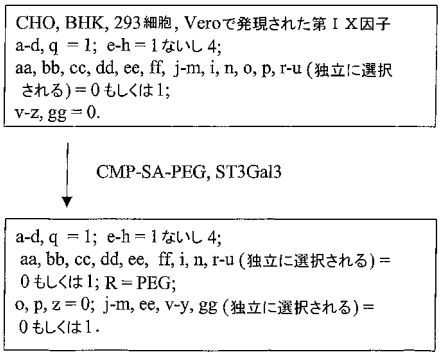


FIG. 31E

【図３１Ｆ】

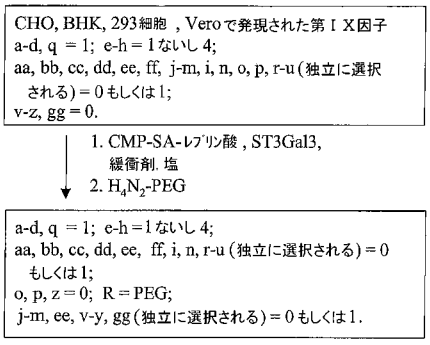


FIG. 31F

【図３１Ｇ】

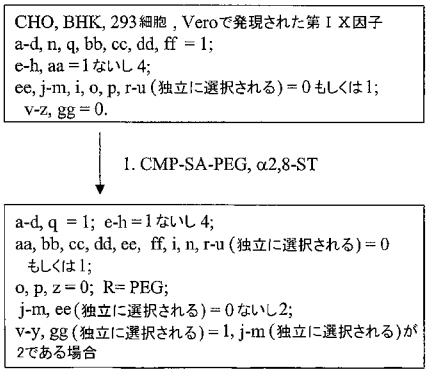
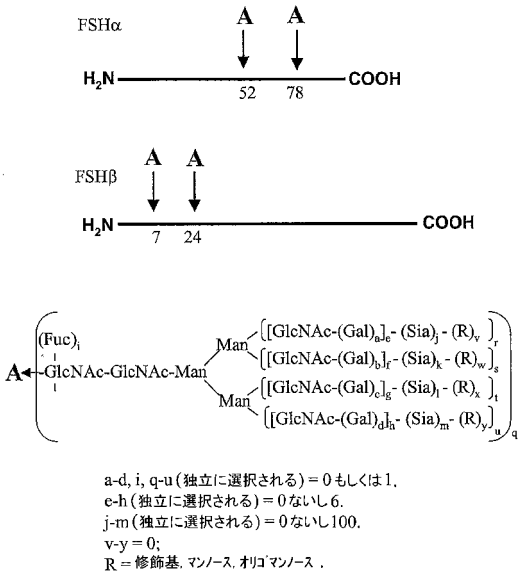


FIG. 31G

【図３２Ａ】



a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0;
R = 修飾基, マンノース, オリゴマンノース.

FIG. 32A

【図３２Ｂ】

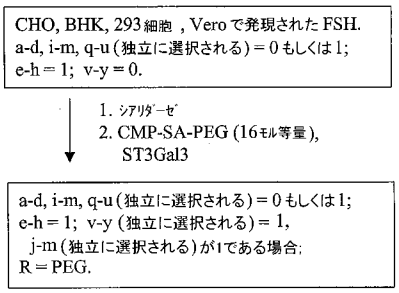


FIG. 32B

【図３２Ｃ】

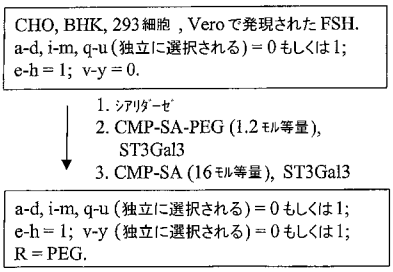


FIG. 32C

【図３２Ｄ】

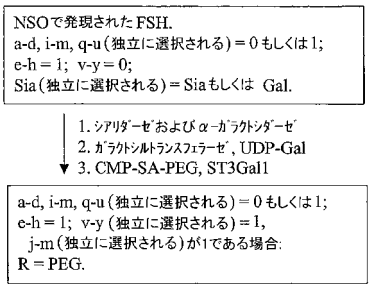


FIG. 32D

【図３２Ｅ】

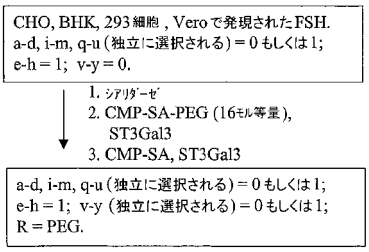


FIG. 32E

【図３２Ｆ】

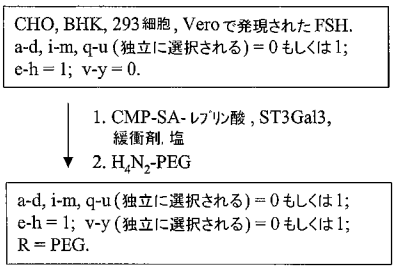


FIG. 32F

【図３２Ｇ】

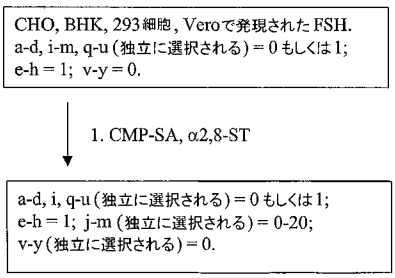


FIG. 32G

【図３２Ｈ】

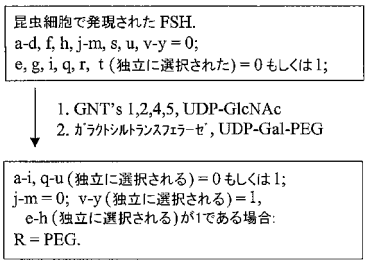


FIG. 32H

【図３２Ｉ】

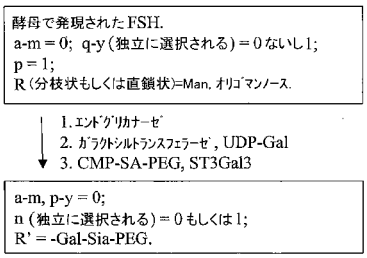


FIG. 32I

【図３２Ｊ】

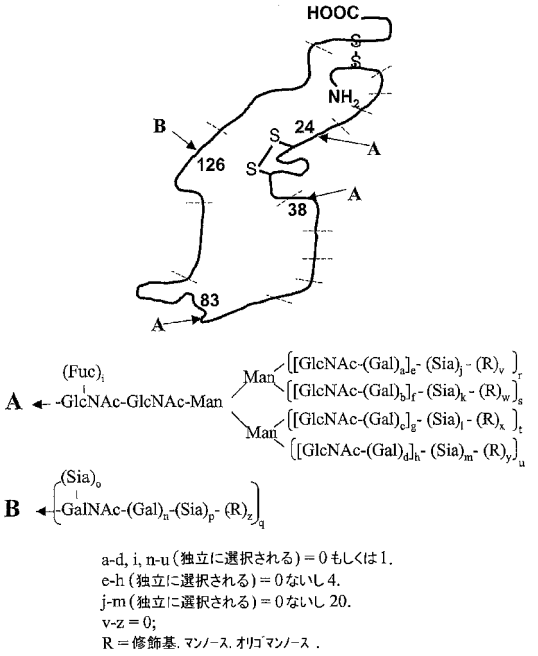
CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたFSH.
a-d, i-m, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
e-h＝1; v-y＝0.

↓
1. CMP-SA-ﾘﾝｶｰ-SA-CMP, ST3Gal3
2. ST3Gal1, CHO中で産生された脱シアリル化
絨毛性性線刺激ﾎﾙﾓﾝ(CG)
3. CMP-SA, ST3Gal3, ST3Gal1

a-m, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
p＝1; n＝0;
v-y(独立に選択される)＝0もしくは1;
R＝ﾘﾝｶｰ-CG.

FIG. 32J

【図３３Ａ】



a-d, i, n-u(独立に選択される)＝0もしくは1.
e-h(独立に選択される)＝0ないし4.
j-m(独立に選択される)＝0ないし20.
v-z＝0;
R＝修飾基. ﾏﾝﾉｰｽ. ｵﾘｺﾞﾏﾝﾉｰｽ.

FIG. 33A

【図３３Ｂ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたEPO
a-g, n, q ＝1; h＝1ないし3;
j-m, i, o, p(独立に選択される)＝0もしくは1;
r-u(独立に選択される)＝0ないし1; v-z＝0

↓
1.ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞ
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-g, n, q ＝1; h＝1ないし3;
i, o, p(独立に選択される)＝0もしくは1;
r-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
j-m, v-y(独立に選択される)＝0もしくは1;
R＝PEG; z＝0.

FIG. 33B

【図３３Ｃ】

昆虫細胞で発現されたEPO
a-d, f, h, j-q, s, u, v-z＝0;
e, g, i, r, t(独立に選択される)＝0もしくは1.

↓
1. GNT's 1および2, UDP-GlcNAc
2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

b, d, f, h, k, m-q, s, u, w, y, z＝0;
a, c, e, g, i, r, t(独立に選択される)＝0もしくは1;
j, l, v, x(独立に選択される)＝0もしくは1;
R＝PEG.

FIG. 33C

【図３３Ｄ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたEPO
a-q, r-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
v-z＝0.

↓
1. ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞ
2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal
3. CMP-SA, ST3Gal3
4. CMP-SA-PEG, ST3Gal1

a-h, n, q＝1;
i-m, o, r-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
v-y＝0; p, z＝0もしくは1; R＝PEG.

FIG. 33D

【図３３Ｅ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されるEPO
a-g, n, q ＝1; h＝1ないし3;
j-m, i, o, p(独立に選択される)＝0もしくは1;
r-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
v-z＝0

↓
1. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-g, n, q ＝1; h＝1ないし3;
i, o, p(独立に選択される)＝0もしくは1;
r-u(独立に選択される)＝0ないし1;
j-m, v-y(独立に選択される)＝0もしくは1;
R＝PEG; z＝0.

FIG. 33E

【図３３Ｆ】

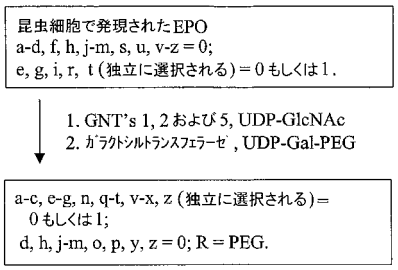


FIG. 33F

【図３３Ｇ】

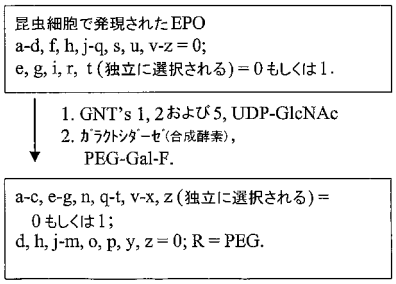


FIG. 33G

【図３３Ｈ】

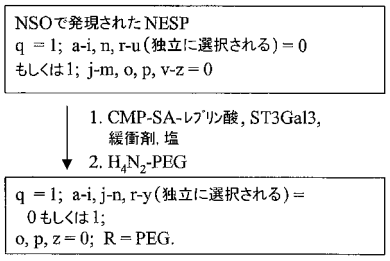


FIG. 33H

【図３３Ｉ】

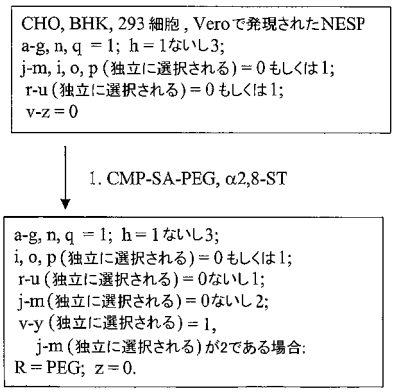


FIG. 33I

【図３３Ｊ】

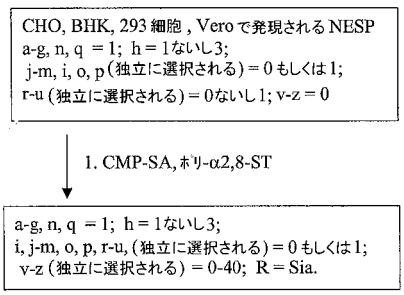


FIG. 33J

【図３４Ａ】

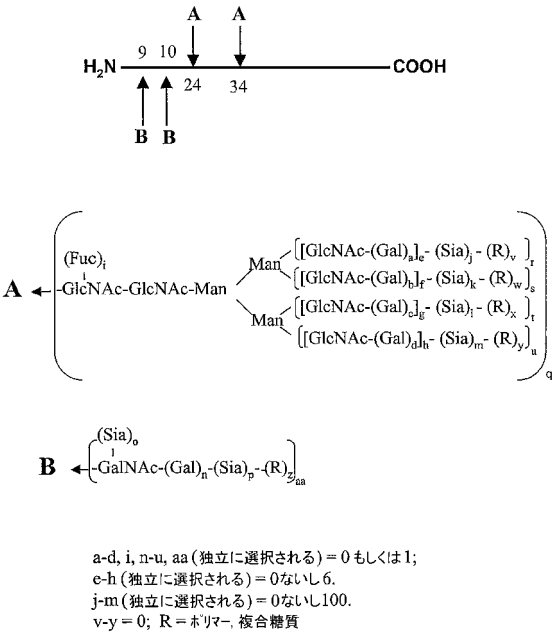


FIG. 34A

【図３４Ｂ】

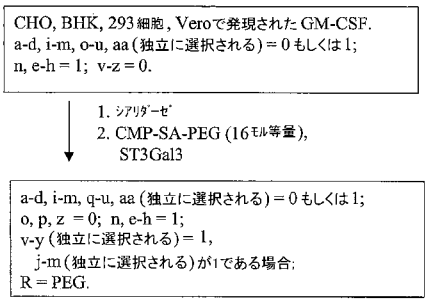


FIG. 34B

【図３４Ｃ】

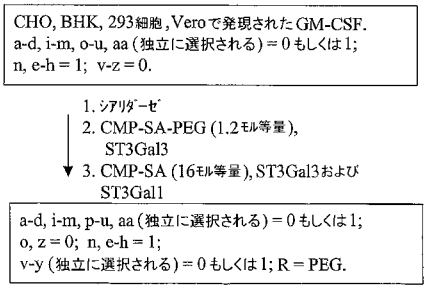


FIG. 34C

【図３４Ｄ】

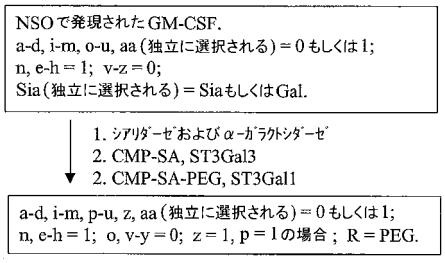


FIG. 34D

【図３４Ｅ】

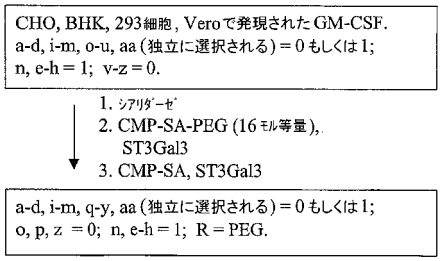


FIG. 34E

【図３４Ｆ】

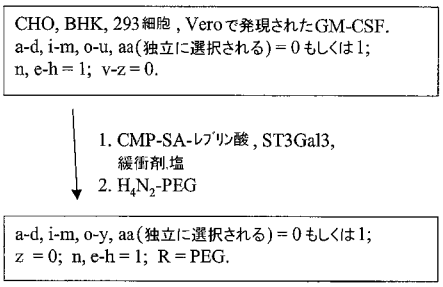


FIG. 34F

【図３４Ｇ】

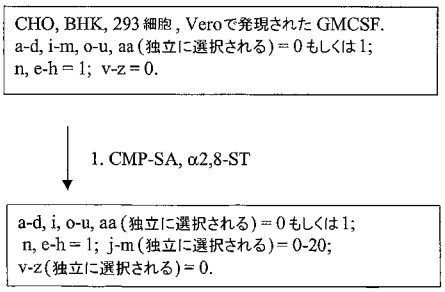
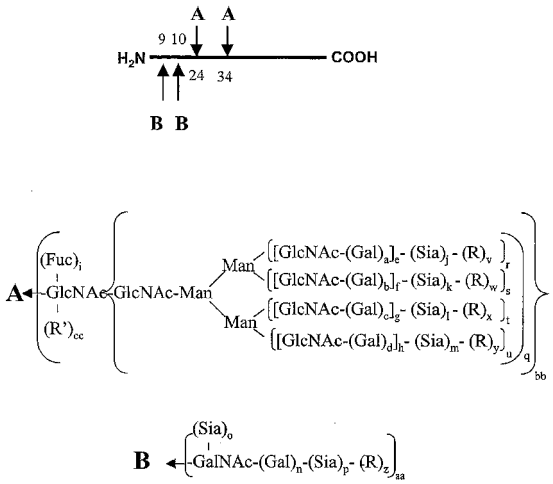


FIG. 34G

【図３４Ｈ】



a-d, i, n-u, aa, bb, cc(独立に選択される)＝0もしくは1.
e-h(独立に選択される)＝0ないし6.
j-m(独立に選択される)＝0ないし100.
v-y＝0; R＝修飾基, マンノース, オリゴマンノース.
R'＝H, グリコシル残基.修飾基.複合糖質.

FIG. 34H

【図３４Ｉ】

昆虫細胞で発現されたGM-CSF.
a-d, f, h, j-m, o, p, s, u, v-z = 0;
e, g, i, n, q, r, t, aa(独立に選択される) = 0もしくは1.

↓ 1. GNT's 1,2,4,5, UDP-GlcNAc
↓ 2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal-PEG

a-i, n, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
j-m = 0; v-y(独立に選択される) = 1,
e-h (独立に選択される)が1である場合 ;
R = PEG.

FIG. 34I

【図３４Ｊ】

酵母で発現されたGM-CSF.
a-p, z, cc = 0;
q-y, aa(独立に選択される) = 0ないし1;
bb = 1; R(分枝状もしくは直鎖状)=Man, ｵﾘｺﾞﾏﾝﾉｰｽ;
GalNAc = Man.

↓ 1. ｴﾝﾄﾞｸﾞﾘｶﾅｰｾﾞ
↓ 2. ﾏﾝﾉｼﾀﾞｰｾﾞ(aa=1の場合).
↓ 3. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal-PEG

a-p, r-z, aa, bb = 0;
q, cc(独立に選択される) = 0もしくは1;
R' = -Gal-PEG.

FIG. 34J

【図３４Ｋ】

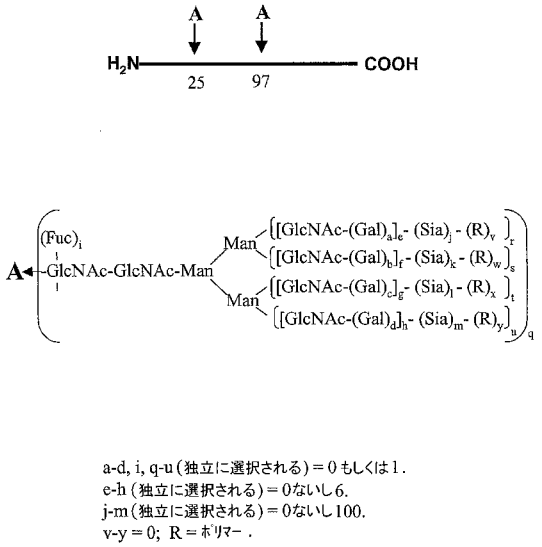
CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたGM-CSF.
a--m, o-u, aa, bb(独立に選択される) = 0もしくは1;
n, v-z, cc = 0.

↓ 1. ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞ
↓ 2. CMP-SA, ST3Gal3
↓ 2. CMP-SA- ﾘﾝｶｰ -SA-CMP, ST3Gal1
↓ 3. ST3Gal3,ﾄﾗﾝｽﾌｪﾘﾝ

a--m, p-u, z, aa (独立に選択される) = 0もしくは1;
o, v-y, cc = 0; bb, n = 1; R =ﾄﾗﾝｽﾌｪﾘﾝ.

FIG. 34K

【図３５Ａ】



a-d, i, q-u(独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h(独立に選択される) = 0ないし6.
j-m(独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0; R = ﾎﾟﾘﾏｰ .

FIG. 35A

【図３５Ｂ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたIF-γ.
a-d, i-m, q-u(独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓ 1. ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞ
↓ 2. CMP-SA-PEG (16ﾓﾙ等量),
ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 1,
j-m(独立に選択される)が1である場合:
R = PEG.

FIG. 35B

【図３５Ｃ】

CHO, BHK, 293細胞 , Veroで発現されたIF-γ.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓ 1. ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞ
↓ 2. CMP-SA-PEG (1.2ﾓﾙ等量),
ST3Gal3
↓ 3. CMP-SA (16ﾓﾙ等量), ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
R = PEG.

FIG. 35C

【図３５Ｄ】

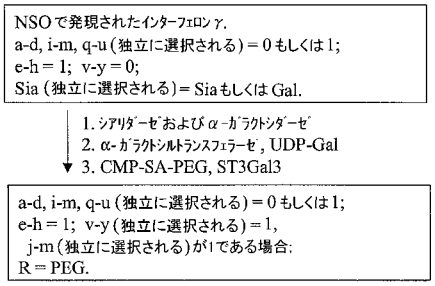


FIG. 35D

【図３５Ｅ】

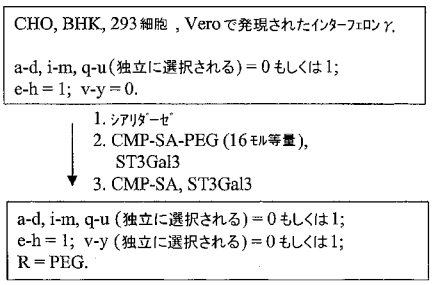


FIG. 35E

【図３５Ｆ】

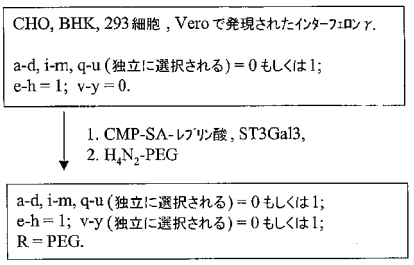


FIG. 35F

【図３５Ｇ】

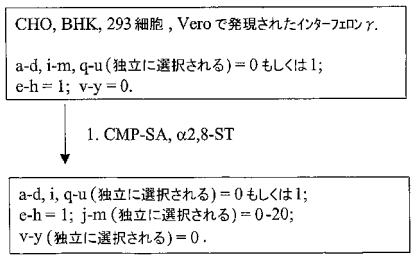
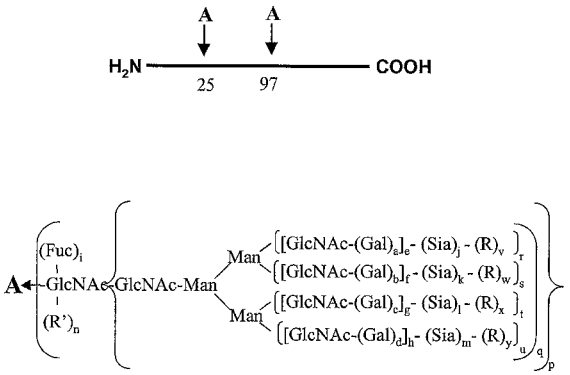


FIG. 35G

【図３５Ｈ】



a-d, i, n, p-u (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0;
R = 修飾基, マンノース, オリゴマンノース;
R' = H, グリコシル残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 35H

【図３５Ｉ】

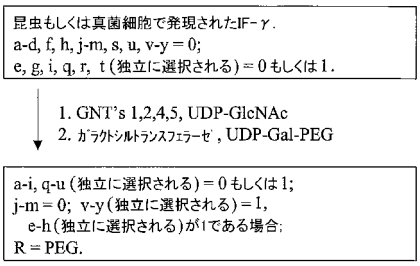


FIG. 35I

【図３５Ｊ】

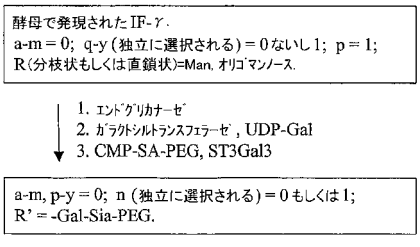


FIG. 35J

【図３５Ｋ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたIF-γ.
a-d, i-m, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
e-h＝1; v-y＝0.

↓ 1. CMP-SA-リンカー-Gal-UDP, ST3Gal3
↓ 2. ガラクトシルトランスフェラーゼ, エンドグリカナーゼで処理されたトランスフェリン

a-m, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
p＝1; n＝0;
v-y(独立に選択される)＝0もしくは1;
R＝リンカートランスフェリン.

FIG. 35K

【図３５Ｌ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたインターフェロンγ.

a-d, i-m, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
e-h, p＝1; n, v-y＝0.

↓ 1. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
e-h, p＝1;
n, v-y(独立に選択される)＝0もしくは1;
R＝PEG.

FIG. 35L

【図３５Ｍ】

昆虫もしくは真菌細胞で発現されたIF-γ.
a-d, f, h, j-n, s, u, v-y＝0;
e, g, i, q, r, t(独立に選択される)＝0もしくは1.

↓ 1. GNT's 1および2, UDP-GlcNAc-PEG

a-d, f, h, j-n, s, u, w, y ＝0;
e, g, i, r, t, q(独立に選択される)＝0もしくは1;
p＝1; v, x(独立に選択される)＝1,
e, g(独立に選択される)が1である場合;
R＝PEG.

FIG. 35M

【図３５Ｎ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたインターフェロンγ.

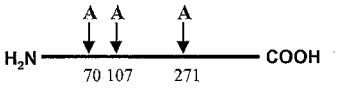
a-d, i-m, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
e-h＝1; v-y＝0.

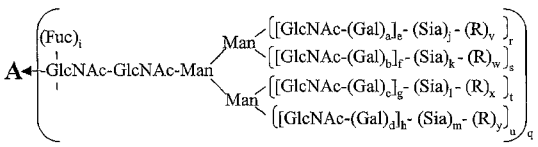
↓ 1. CMP-SA-PEG, α2,8-ST

a-d, i, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
e-h＝1; j-m(独立に選択される)＝0-2;
v-y(独立に選択される)＝1,
j-m(独立に選択される)が2の場合;
R＝PEG.

FIG. 35N

【図３６Ａ】





a-d, i, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1.
e-h(独立に選択される)＝0ないし6.
j-m(独立に選択される)＝0ないし100.
v-y＝0; R＝ホリマー.

FIG. 36A

【図３６Ｂ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroもしくはトランスジェニック動物で発現されたα1アンチトリプシン
a-d, i-m, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
e-h＝1; v-y＝0.

↓ 1. シアリダーゼ
↓ 2. CMP-SA-PEG (16モル等量), ST3Gal3

a-d, i-m, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
e-h＝1; v-y(独立に選択される)＝1,
j-m(独立に選択される)が1である場合;
R＝PEG.

FIG. 36B

【図３６Ｃ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroもしくはトランスジェニック動物で発現されたα1アンチトリプシン
a-d, i-m, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
e-h＝1; v-y＝0.

↓ 1. シアリダーゼ
↓ 2. CMP-SA-PEG (1.2モル等量), ST3Gal3
↓ 3. CMP-SA (16モル等量), ST3Gal3

a-d, i-m, q-u(独立に選択される)＝0もしくは1;
e-h＝1; v-y(独立に選択される)＝0もしくは1;
R＝PEG.

FIG. 36C

【図３６Ｄ】

NSOで発現されたα_1-アンチトリプシン.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; v-y = 0;
Sia (独立に選択される) = Sia もしくは Gal.

↓
1. シアリダーゼおよびα-ガラクトシダーゼ
2. α-ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal
3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1;
v-y (独立に選択される) = 1,
j-m (独立に選択される) が1である場合;
R = PEG.

FIG. 36D

【図３６Ｅ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroもしくはトランスジェニック動物で発現された α-1 アンチトリプシン.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓
1. シアリダーゼ
2. CMP-SA-PEG (16モル等量), ST3Gal3
3. CMP-SA, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R = PEG.

FIG. 36E

【図３６Ｆ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroもしくはトランスジェニック動物で発現された α_1-アンチトリプシン
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓
1. CMP-SA-レプリン酸, ST3Gal3, 緩衝剤, 塩
2. H_4N_2-PEG

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R = PEG.

FIG. 36F

【図３６Ｇ】

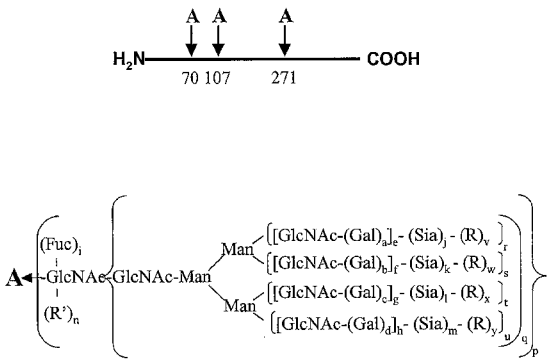
CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現された α_1-アンチトリプシン.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓
1. CMP-SA, α2,8-ST

a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1; e-h = 1;
j-m (独立に選択される) = 0-20;
v-y (独立に選択される) = 0.

FIG. 36G

【図３６Ｈ】



a-d, i, n, p-u (独立に選択される) = 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0;
R = 修飾基, マンノース, オリゴマンノース;
R' = H, グリコシル残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 36H

【図３６Ｉ】

昆虫もしくは真菌細胞で発現された α_1-アンチトリプシン.
a-d, f, h, j-m, s, u, v-y = 0;
e, g, i, q, r, t (独立に選択される) = 0 もしくは 1.

↓
1. GNT's 1,2,4,5, UDP-GlcNAc
2. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal-PEG

a-i, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1; j-m = 0;
v-y (独立に選択される) = 1,
e-h (独立に選択される) が1である場合;
R = PEG.

FIG. 36I

【図３６Ｊ】

酵母で発現された α_1-アンチトリプシン.
a-m = 0; q-y (独立に選択される) = 0ないし1;
p = 1; R (分枝状もしくは直鎖状)=Man, オリゴマンノース.

↓
1. エンドグリカナーゼ
2. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal
3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-m, p-y = 0; n (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R' = -Gal-Sia-PEG.

FIG. 36J

【図３６Ｋ】

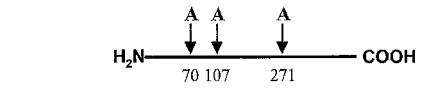
CHO, BHK, 293 細胞, Veroで発現された α_1-アンチトリプシン.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; v-y = 0.

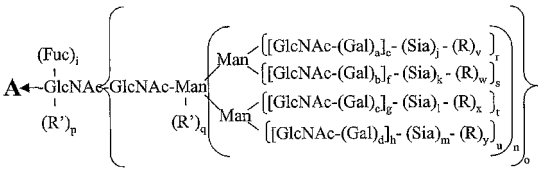
↓ 1. CMP-SA-リンカー-Gal-UDP, ST3Gal3
2. ガラクトシルトランスフェラーゼ, エンドグリカナーゼで処理されたトランスフェリン

a-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
p = 1; n = 0;
v-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R = リンカートランスフェリン.

FIG. 36K

【図３６Ｌ】





a-d, i, n-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし 4.
j-m (独立に選択される) = 0ないし 20.
R = ポリマー;
R', R" (独立に選択される) = 糖, 複合糖質.

FIG. 36L

【図３６Ｍ】

酵母で発現された α-1アンチトリプシン.
a-h, i-m, p, q = 0;
R (独立に選択される) = マンノース, オリゴマンノース, ポリマンノース;
r-u, v-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1; n, o = 1.

↓ 1. エンドグリカナーゼ
2. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal-PEG

a-h, i-o, q, r-u, v-y = 0; p = 1.
R" = Gal-PEG.

FIG. 36M

【図３６Ｎ】

植物で発現された α-1アンチトリプシン.
a-d, f, h, j- m, s, u, v-y = 0;
e, g, i, q, r, t (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
n =1; R' = キシロース

↓ 1. ヘキソサミニダーゼ
2. αマンノシダーゼおよびキシロシダーゼ
3. GlcNAc 転移酵素, UDP-GlcNAc-PEG

a-d, f, h, j-n, s, u, v-y = 0;
e, g, i, r, t (独立に選択される) = 0;
q = 1; R' = GlcNAc-PEG.

FIG. 36N

【図３６Ｏ】

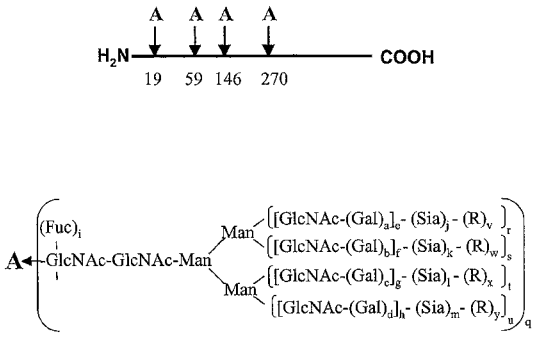
CHO, BHK, 293 細胞, Vero, トランスジェニック動物で発現された α_1 アンチトリプシン.
a-h, i-o, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
p, q, v-y = 0.

↓ 1. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-h, i-o, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
p, q = 0; v-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R = PEG.

FIG. 36O

【図３７Ａ】



a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0; R = ポリマー.

FIG. 37A

【図３７Ｂ】

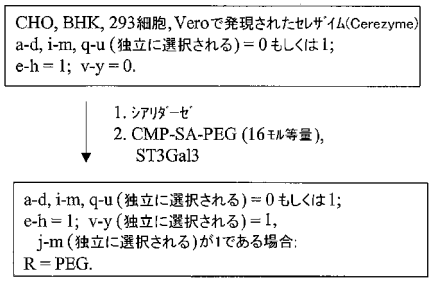


FIG. 37B

【図３７Ｃ】

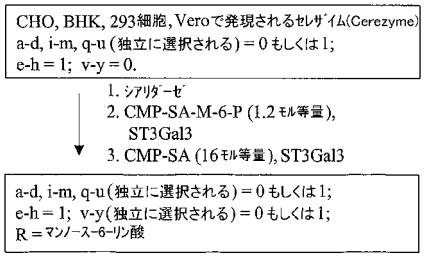


FIG. 37C

【図３７Ｄ】

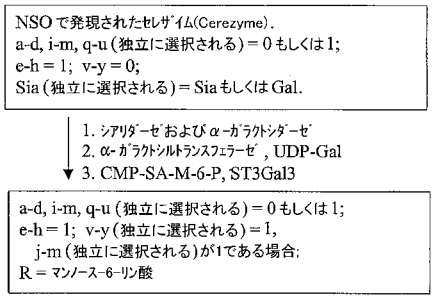


FIG. 37D

【図３７Ｅ】

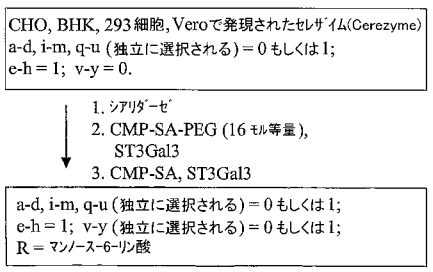


FIG. 37E

【図３７Ｆ】

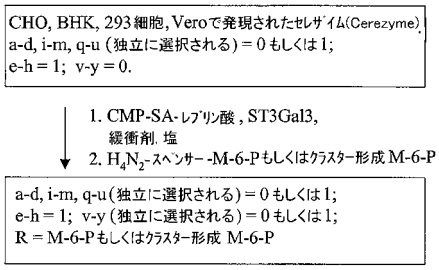


FIG. 37F

【図３７Ｇ】

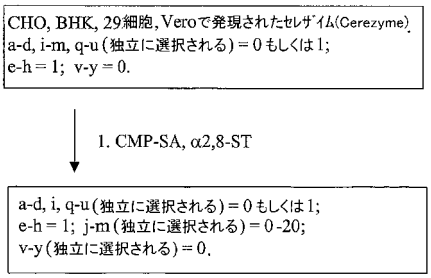
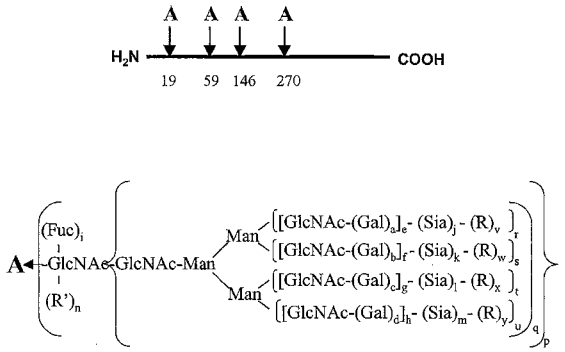


FIG. 37G

【図３７Ｈ】



a-d, i, n, p-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0;
R = 修飾基, マンノース, オリゴマンノース;
R' = H, グリコシル残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 37H

【図３７Ｉ】

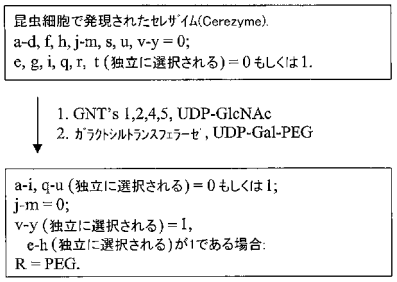


FIG. 37I

【図３７Ｊ】

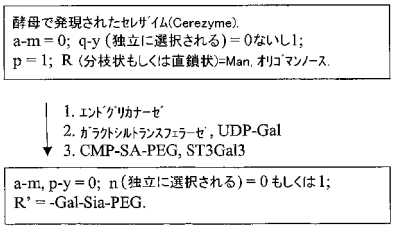


FIG. 37J

【図３７Ｋ】

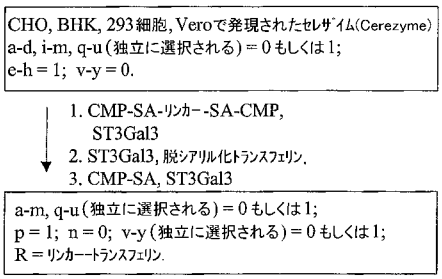
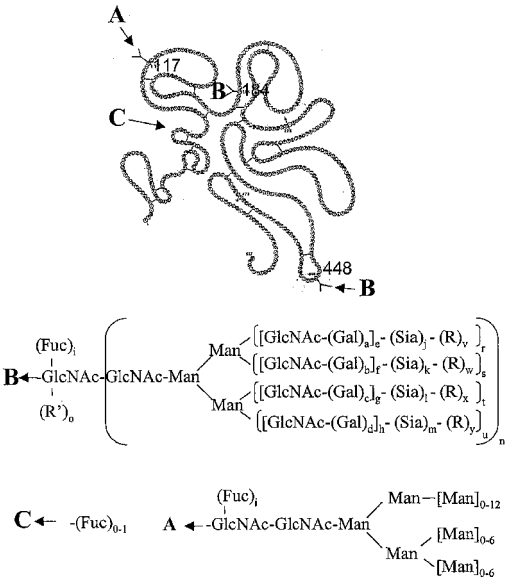


FIG. 37K

【図３８Ａ】



a-d, i, n-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし4.
j-m (独立に選択される) = 0ないし 20.
R = ポリマー; R' = 糖, 複合糖質.

FIG. 38A

【図３８Ｂ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたtPA
a-g, n = 1; h = 1ないし3;
j-m, i, (独立に選択される) = 0もしくは1;
r-u (独立に選択される) = 0ないし1; o, v-y = 0.

↓ 1. ﾏﾝﾉｼﾀﾞｰｾﾞ(1種もしくは複数), ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞ
2. GNT1,2 (4および/もしくは5) UDP-GlcNAc
3. Gal転移酵素, UDP-Gal
4. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

A = B; a-g, n = 1; h = 1ないし3;
i, r-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
o = 0; j-m, v-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
R = PEG

FIG. 38B

【図３８Ｃ】

昆虫もしくは真菌細胞で発現されたtPA
A = B; a-d, f, h, j-o, s, u, v-y = 0;
e, g, i, n, r, (独立に選択される) = 0もしくは1.

↓ 1. GNT's 1および2, UDP-GlcNAc
2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal
3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

A = B; b, d, f, h, k, m, o, s, u, w, y = 0;
a, c, e, g, i, r, t (独立に選択される) = 0もしくは1;
n = 1; j, l, v, x (独立に選択される) = 0もしくは1;
R = PEG.

FIG. 38C

【図３８Ｄ】

酵母で発現されたtPA
B = A; i = 0.

↓ 1. ｴﾝﾄﾞｸﾞﾘｶﾅｰｾﾞ
2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ,
UDP-Gal-PEG

A = B; a-n, r-y = 0; o = 1; R' = Gal-PEG.

FIG. 38D

【図３８Ｅ】

昆虫もしくは真菌細胞で発現されたtPA
A = B; a-d, f, h, j-o, s, u, v-y = 0;
e, g, i, n, r, t (独立に選択される) = 0もしくは1.

↓ 1. αおよびβﾏﾝﾉｼﾀﾞｰｾﾞ
2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal-PEG

A = B; a-n, r-y = 0; o = 1; R' = Gal-PEG.

FIG. 38E

【図３８Ｆ】

昆虫もしくは真菌細胞で発現されたtPA
A = B; a-d, f, h, j-o, s, u, v-y = 0;
e, g, i, n, r, t (独立に選択される) = 0もしくは1.

↓ 1. GNT's 1および2, UDP-GlcNAc
2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal-PEG

A = B; b, d, f, h, j-o, s, u, w, y = 0;
a, c, e, g, i, r, t, v, x (独立に選択される) = 0もしくは1;
n = 1; R = PEG.

FIG. 38F

【図３８Ｇ】

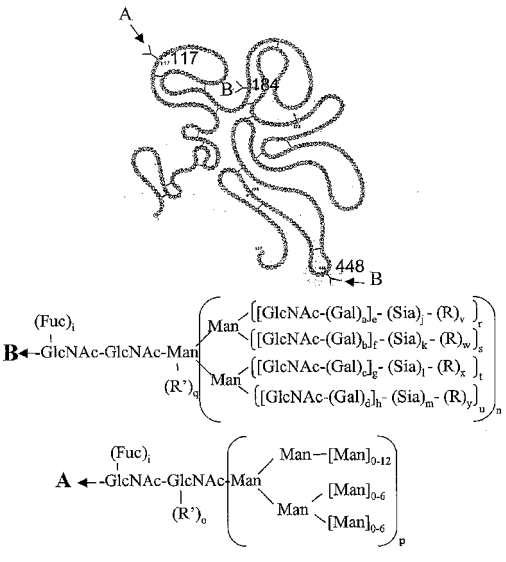
昆虫もしくは真菌細胞で発現されたtPA
A = B; a-d, f, h, j-o, s, u, v-y = 0;
e, g, i, n, r, t (独立に選択される) = 0もしくは1.

↓ 1. GNT's 1および2, UDP-GlcNAc
2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾀﾞｰｾﾞ(合成酵素)
PEG-Gal-F.

A = B; b, d, f, h, j-o, s, u, w, y = 0;
a, c, e, g, i, r, t, v, x (独立に選択される) = 0もしくは1;
n = 1; R = PEG.

FIG. 38G

【図３８Ｈ】



a-d, i, n-u (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし4.
j-m (独立に選択される) = 0ないし20.
R = ﾎﾟﾘﾏｰ; R' = 糖, 複合物質

FIG. 38H

【図３８Ｉ】

NSOで発現されたtPA
A = B; a-m, r-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
n = 1; o, p, q, v-y = 0

↓ 1. ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞ, α-ｶﾞﾗｸﾄｼﾀﾞｰｾﾞ
2. CMP-SA-ﾚﾌﾟﾘﾝ酸, ST3Gal3,
3. H_4N_2-PEG

A = B; a-m, r-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
n = 1; o, p, q = 0;
v-y (独立に選択される) = 1,
j-m (独立に選択される)が1である場合;
R = PEG.

FIG. 38I

【図３８Ｊ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたtPA
a-g, n, p = 1; h = 1ないし3;
j-m, i, (独立に選択される) = 0もしくは1;
r-u (独立に選択される) = 0ないし1; q, o, v-y = 0.

↓ 1. αおよびβﾏﾝﾉｼﾀﾞｰｾﾞ
2. CMP-SA, ST3Gal3
3. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal-PEG

a-g, n = 1; h = 1ないし3;
i, r-u (独立に選択される) = 0もしくは1; o = 1;
q, p, v-y = 0; j-m (独立に選択される) = 0もしくは1;
R' = Gal-PEG

FIG. 38J

【図３８Ｋ】

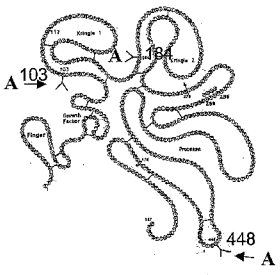
植物で発現されたtPA
A = B; a-d, f, h, j- m, s, u, v-y = 0;
e, g, i, q, r, t (独立に選択される) = 0もしくは1;
n = 1; R' = ｷｼﾛｰｽ

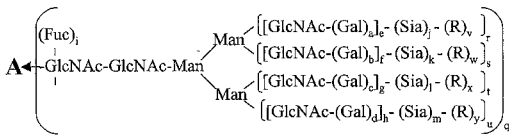
↓ 1. ﾍｷｿｻﾐﾆﾀﾞｰｾﾞ,
2. αﾏﾝﾉｼﾀﾞｰｾﾞおよびｷｼﾛｼﾀﾞｰｾﾞ
3. GlcNAc 転移酵素, UDP-GlcNAc-PEG

A = B; a-d, f, h, j-n, s, u, v-y = 0;
e, g, i, r, t (独立に選択される) = 0;
q = 1; R' = GlcNAc-PEG.

FIG. 38K

【図３８Ｌ】





a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0; R = ﾎﾟﾘﾏｰ.

FIG. 38L

【図３８Ｍ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたTNK tPA
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓ 1. ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞ
2. CMP-SA-PEG (16ﾓﾙ等量), ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 1,
j-m (独立に選択される)が1である場合;
R = PEG.

FIG. 38M

【図３８Ｎ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたTNK tPA
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓ 1. ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞ
2. CMP-SA-PEG (1.2ﾓﾙ等量), ST3Gal3
3. CMP-SA (16ﾓﾙ等量), ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
R = PEG.

FIG. 38N

【図３８Ｏ】

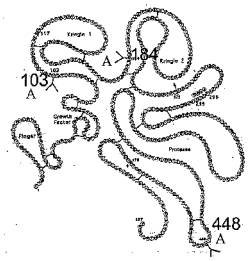
NSOで発現されたTNK tPA
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0;
Sia (独立に選択される) = SiaもしくはGal.

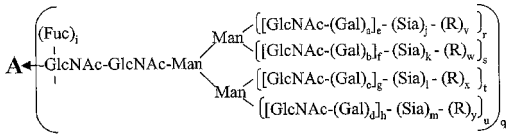
↓ 1. ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞおよびα-ｶﾞﾗｸﾄｼﾀﾞｰｾﾞ
↓ 2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal
↓ 3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 1,
j-m (独立に選択される)が1である場合;
R = PEG.

FIG. 38O

【図３８Ｐ】





a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0; R = ﾎﾟﾘﾏｰ.

FIG. 38P

【図３８Ｑ】

CHO, BHK, 293細胞 , Veroで発現されたTNK tPA
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓ 1. ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞ
↓ 2. CMP-SA-PEG (16ﾓﾙ等量),
ST3Gal3
↓ 3. CMP-SA, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
R = PEG.

FIG. 38Q

【図３８Ｒ】

CHO, BHK, 293細胞 , Veroで発現されたTNK tPA
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓ 1. CMP-SA-ﾚﾌﾟﾘﾝ酸, ST3Gal3,
緩衝剤, 塩
↓ 2. H_4N_2-PEG

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
R = PEG.

FIG. 38R

【図３８Ｓ】

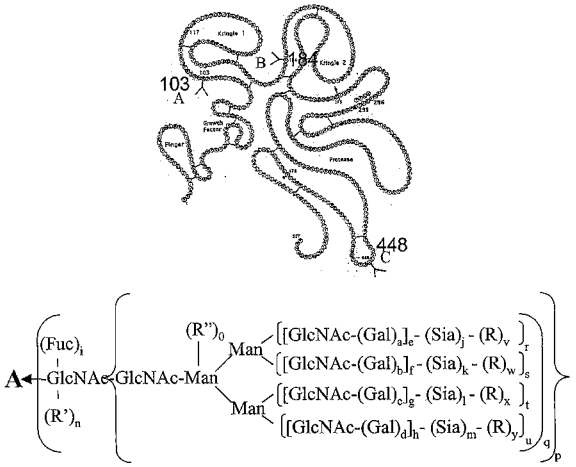
CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたTNK tPA
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓ 1. CMP-SA, α2,8-ST

a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; j-m (独立に選択される) = 0 -20;
v-y (独立に選択される) = 0.

FIG. 38S

【図３８Ｔ】



a-d, i, n-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし 6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし 100.
R = 修飾基, ﾏﾝﾉｰｽ, ｵﾘｺﾞﾏﾝﾉｰｽ;
R' = H, ｸﾞﾘｺｼﾙ残基, 修飾基, 複合糖質.
R" = ｸﾞﾘｺｼﾙ残基 .

FIG. 38T

【図３８Ｕ】

昆虫細胞で発現されたTNK tPA
a-d, f, h, j-m, s, u, v-y = 0;
e, g, i, q, r, t (独立に選択される) = 0 もしくは 1.

↓ 1. GNT's 1,2,4,5, UDP-GlcNAc
↓ 2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal-PEG

a-i, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
j-m = 0; v-y (独立に選択される) = 1,
e-h (独立に選択される) が1である場合;
R = PEG.

FIG. 38U

【図３８Ｖ】

酵母で発現されたTNK tPA
a-m = 0; q-y (独立に選択される) = 0ないし1; p = 1;
R (分枝状もしくは直鎖状)=Man, ｵﾘｺﾞﾏﾝﾉｰｽ.

↓ 1. ｴﾝﾄﾞｸﾞﾘｶﾅｰｾﾞ
↓ 2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal-PEG

a-m, p-y = 0; n (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R' = -Gal-PEG.

FIG. 38V

【図３８Ｗ】

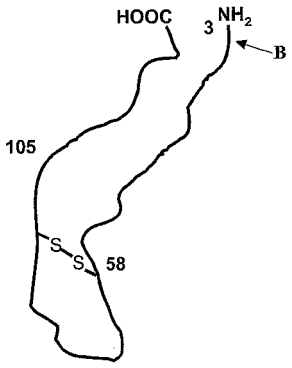
CHO, BHK, 293細胞 ,Veroで発現されたTNK tPA
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; v-y = 0.

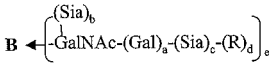
↓ 1. CMP-SA-ﾘﾝｶｰ-Gal-UDP, ST3Gal3
↓ 2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ ,CHO中で産生された抗-TNF IGｷﾒﾗ.

a-m, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1; p, q = 1;
n = 0; v-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R = ﾘﾝｶｰ-抗-TNF IG ｷﾒﾗﾀﾝﾊﾟｸ質 .

FIG. 38W

【図３９Ａ】





a-c, e (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
d = 0;
R = 修飾基, ﾏﾝﾉｰｽ, ｵﾘｺﾞﾏﾝﾉｰｽ;

FIG. 39A

【図３９Ｂ】

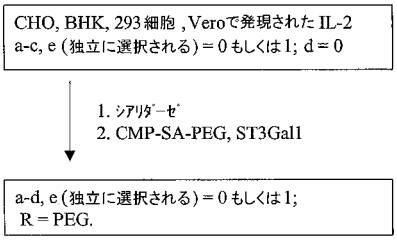


FIG. 39B

【図３９Ｃ】

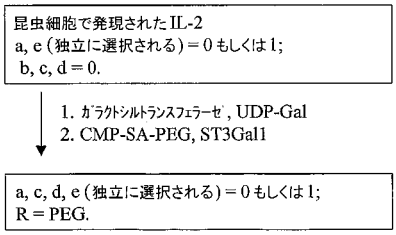


FIG. 39C

【図３９Ｄ】

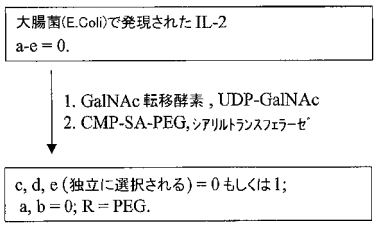


FIG. 39D

【図３９Ｅ】

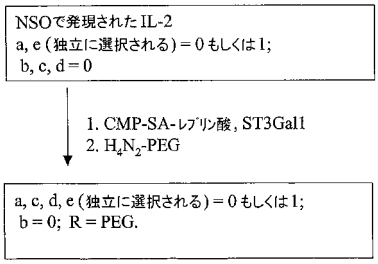


FIG. 39E

【図３９Ｆ】

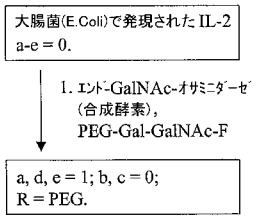


FIG. 39F

【図３９Ｇ】

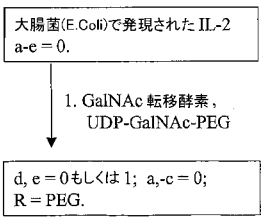
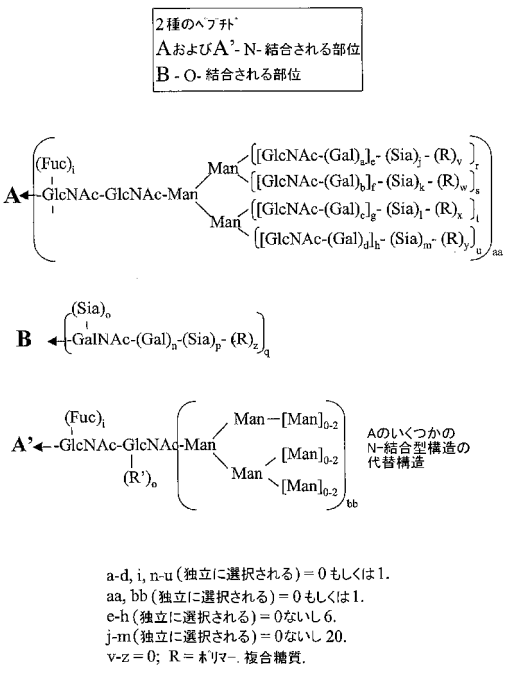


FIG. 39G

【図４０Ａ】



a-d, i, n-u (独立に選択される) = 0もしくは1.
aa, bb (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし20.
v-z = 0; R = ポリマー. 複合糖質.

FIG. 40A

【図４０Ｂ】

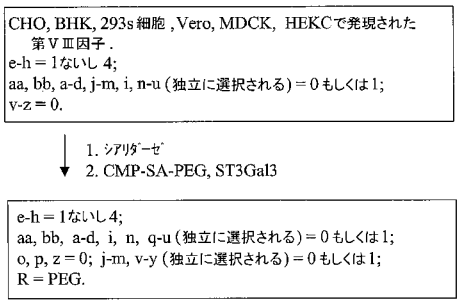


FIG. 40B

【図４０Ｃ】

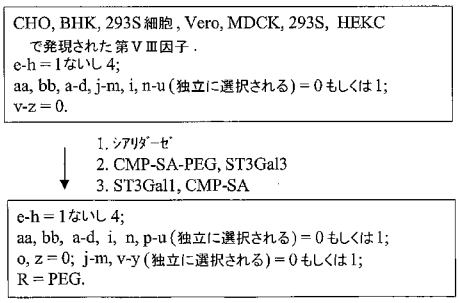


FIG. 40C

【図４０Ｄ】

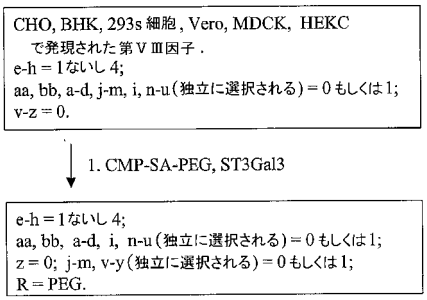


FIG. 40D

【図４０Ｅ】

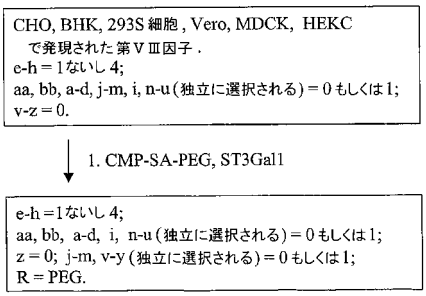


FIG. 40E

【図４０Ｆ】

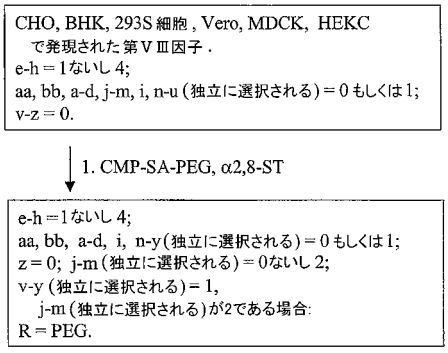
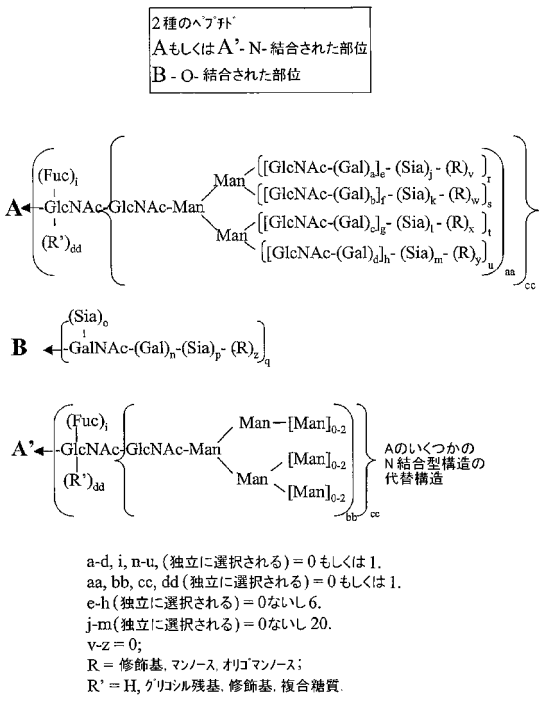


FIG. 40F

【図４０Ｇ】



a-d, i, n-u, (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
aa, bb, cc, dd (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし 6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし 20.
v-z = 0;
R = 修飾基, ﾏﾝﾉｰｽ, ｵﾘｺﾞﾏﾝﾉｰｽ;
R' = H, ｸﾞﾘｺｼﾙ残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 40G

【図４０Ｈ】

CHO, BHK, 293S細胞, Vero, MDCK, HEKC
で発現された第ＶＩＩＩ因子.
e-h = 1ないし4;
aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
dd, v-z = 0.

↓ 1. CMP-SA-ﾚﾌﾞﾘﾝ酸, ST3Gal3,
2. H_4N_2-PEG

e-h = 1ないし4;
aa, bb, cc, a-d, i, n-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
dd, z = 0; j-m, v-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
R = PEG.

FIG. 40H

【図４０Ｉ】

CHO, BHK, 293S細胞, Vero, MDCK, HEKC
で発現された第ＶＩＩＩ因子.
e-h = 1ないし4;
aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
dd, v-z = 0.

↓ 1. ｴﾝﾄﾞ-H
2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal-PEG

e-h = 1ないし4;
aa, bb, dd, a-d, i, j-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
cc, v-z = 0; R' = -Gal-PEG.

FIG. 40I

【図４０Ｊ】

CHO, BHK, 293S細胞, Vero, MDCK, HEKC
で発現された第ＶＩＩＩ因子.
e-h = 1ないし4;
aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
dd, v-z = 0.

↓ 1. ST3Gal3, CMP-SA
2. ｴﾝﾄﾞ-H
3. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal-PEG

e-h = 1ないし4;
aa, bb, dd, a-d, i, j-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
cc, v-z = 0; R' = -Gal-PEG.

FIG. 40J

【図４０Ｋ】

CHO, BHK, 293S細胞, Vero, MDCK, HEKC
で発現された第ＶＩＩＩ因子.
e-h = 1ないし4;
aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
dd, v-z = 0.

↓ 1. ﾏﾝﾉｼﾀﾞｰｾﾞ
2. GNT 1 & 2, UDP-GlcNAc
3. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal-PEG

e-h = 1ないし4;
aa, a-d, i, j-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
bb, cc, dd, z = 0; R = PEG.

FIG. 40K

【図４０Ｌ】

CHO, BHK, 293S細胞, Vero, MDCK, HEKC
で発現された第ＶＩＩＩ因子.
e-h = 1ないし4;
aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
dd, v-z = 0.

↓ 1. ﾏﾝﾉｼﾀﾞｰｾﾞ
2. GNT-1,2, 4および5; UDP-GlcNAc
3. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal
4. ST3Gal3, CMP-SA

e-h = 1ないし4;
aa, bb, cc, a-d, i, j-q (独立に選択される) = 0もしくは1;
dd, v-z = 0.

FIG. 40L

【図４０Ｍ】

CHO, BHK, 293S細胞, Vero, MDCK, HEKC
で発現された第ＶＩＩＩ因子.
e-h = 1ないし4;
aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
dd, v-z = 0.

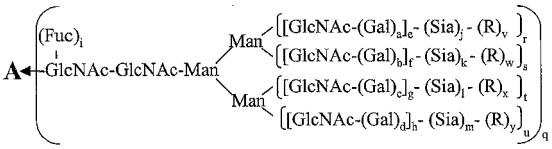
↓ 1. ﾏﾝﾉｼﾀﾞｰｾﾞ
2. GNT-1, UDP-GlcNAc-PEG

e-h = 0ないし4;
aa, a-d, i, j-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
bb, cc, dd, z = 0.

FIG. 40M

【図４１Ａ】





a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0; R = ﾎﾟﾘﾏｰ.

FIG. 41A

【図４１Ｂ】

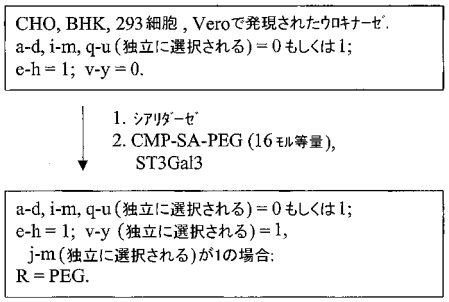


FIG. 41B

【図４１Ｃ】

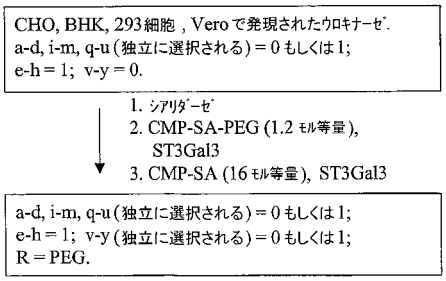


FIG. 41C

【図４１Ｄ】

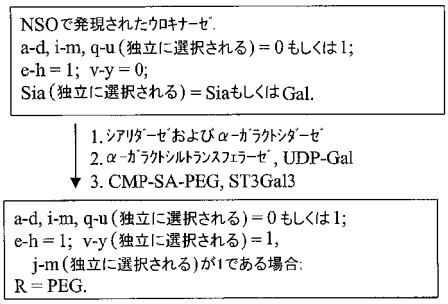


FIG. 41D

【図４１Ｅ】

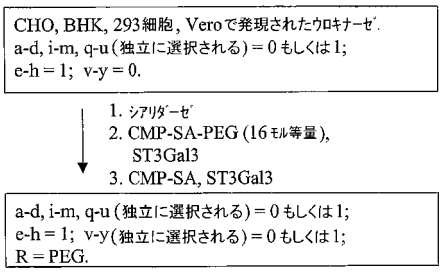


FIG. 41E

【図４１Ｆ】

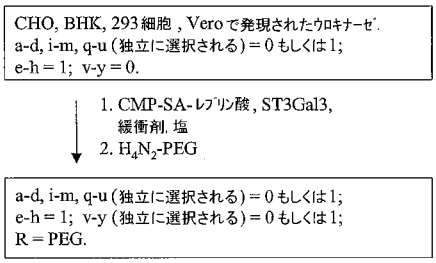


FIG. 41F

【図４１Ｇ】

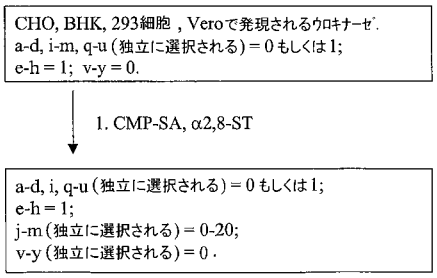
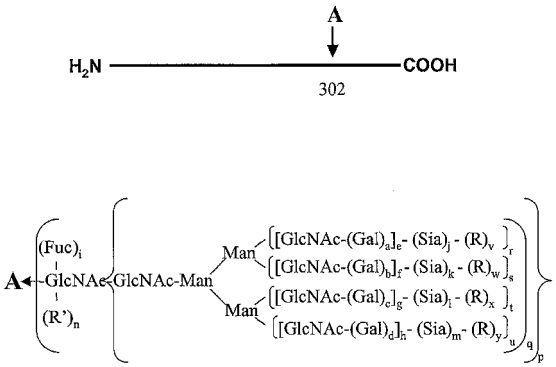


FIG. 41G

【図４１Ｈ】



a-d, i, n, p-u (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0;
R = 修飾基, マンノース, オリゴマンノース;
R' = H, グリコシル残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 41H

【図４１Ｉ】

昆虫細胞で発現されたｳﾛｷﾅｰｾﾞ
a-d, f, h, j-n, s, u, v-y = 0;
e, g, i, q, r, t (独立に選択される) = 0 もしくは 1.

↓ 1. GNT's 1,2,4,5, UDP-GlcNAc
2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal-PEG

a-i, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
j-n = 0; v-y (独立に選択される) = 1,
e-h (独立に選択される) が1である場合:
R = PEG.

FIG. 41I

【図４１Ｊ】

酵母で発現されたｳﾛｷﾅｰｾﾞ
a-n = 0;
q-y (独立に選択される) = 0ないし1;
p = 1; R (分枝状もしくは直鎖状)=Man, ｵﾘｺﾞﾏﾝﾉｰｽ.

↓ 1. ｴﾝﾄﾞｸﾞﾘｶﾅｰｾﾞ
2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal
3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-m, p-y = 0; n (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R' = -Gal-Sia-PEG.

FIG. 41J

【図４１Ｋ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されるｳﾛｷﾅｰｾﾞ
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; n, v-y = 0.

↓ 1. CMP-SA-ﾘﾝｶｰ-SA-CMP, ST3Gal3
2. ST3Gal1,CHO中で産生された脱ｼｱﾘﾙ化ｳﾛｷﾅｰｾﾞ
3. CMP-SA, ST3Gal3, ST3Gal1

a-m, q-u(独立に選択される) = 0 もしくは 1;
p = 1; n = 0;
v-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R = ﾘﾝｶｰ-ｳﾛｷﾅｰｾﾞ

FIG. 41K

【図４１Ｌ】

単離されたｳﾛｷﾅｰｾﾞ
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; v-y = 0; n = 0;
Sia (独立に選択される) = Siaもしくは SO_4;
Gal (独立に選択される) = Galもしくは GalNAc;
GlcNAc (独立に選択される) = GlcNAcもしくは GlcNAc-Fuc.

↓ 1. ｽﾙﾎﾋﾄﾞﾛﾗｰｾﾞ
2. CMP-SA-PEG, ｼｱﾘﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
n = 0; e-h = 1; Sia = Sia;
Gal (独立に選択される) = Gal もしくは GalNAc;
GlcNAc (独立に選択される) = GlcNAc もしくは GlcNAc-Fuc.
v-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R = PEG.

FIG. 41L

【図４１Ｍ】

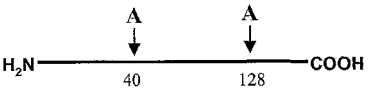
単離されたｳﾛｷﾅｰｾﾞ
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; n = 0; v-y = 0;
Sia (独立に選択される) = Siaもしくは SO_4;
Gal (独立に選択される) = Galもしくは GalNAc;
GlcNAc (独立に選択される) = GlcNAcもしくは GlcNAc-Fuc.

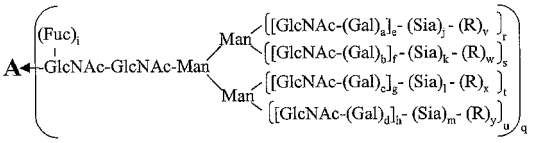
↓ 1. ｽﾙﾎﾋﾄﾞﾛﾗｰｾﾞ, ﾍｷｿｻﾐﾆﾀﾞｰｾﾞ
2. UDP-Gal-PEG, ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ

a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; j-n = 0; Gal (独立に選択される) = Gal;
GlcNAc (独立に選択される) = GlcNAcもしくは GlcNAc-Fuc;
v-y (独立に選択される) = 0もしくは1; R = PEG.

FIG. 41M

【図４２Ａ】





a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし 6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0; R = ﾎﾟﾘﾏｰ, 複合糖質

FIG. 42A

【図４２Ｂ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたDNアーゼＩ.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓ 1. シアリダーゼ
2. CMP-SA-PEG (16モル等量),
ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1;
v-y (独立に選択される) = 1,
j-m (独立に選択される)が1である場合;
R = PEG.

FIG. 42B

【図４２Ｃ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたDNアーゼＩ.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓ 1. シアリダーゼ
2. CMP-SA-PEG (1.2モル等量), ST3Gal3
3. CMP-SA (16モル等量), ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
R = PEG.

FIG. 42C

【図４２Ｄ】

NSOで発現されたDNアーゼＩ.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0;
Sia (独立に選択される) = Siaもしくは Gal.

↓ 1. シアリダーゼおよびα-ガラクトシダーゼ
2. α-ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal
3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 1,
j-m (独立に選択される)が1である場合;
R = PEG.

FIG. 42D

【図４２Ｅ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されるDNアーゼＩ.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓ 1. シアリダーゼ
2. CMP-SA-PEG (16モル等量), ST3Gal3
3. CMP-SA, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
R = PEG.

FIG. 42E

【図４２Ｆ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたDNアーゼＩ.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓ 1. CMP-SA-レプリン酸, ST3Gal3,
緩衝剤, 塩
2. H_4N_2-PEG

a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y (独立に選択される) = 0もしくは1;
R = PEG.

FIG. 42F

【図４２Ｇ】

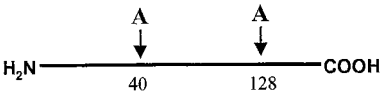
CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたDNアーゼＩ.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-y = 0.

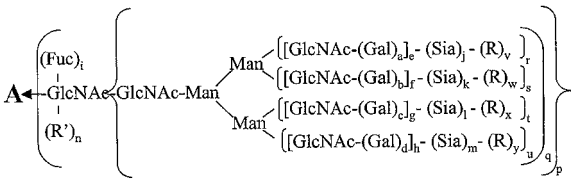
↓ 1. CMP-SA, α2,8-ST

a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1;
j-m (独立に選択される) = 0-20;
v-y (独立に選択される) = 0.

FIG. 42G

【図４２Ｈ】





a-d, i, n, p-u (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし100.
v-y = 0;
R = 修飾基, マンノース, オリゴマンノース;
R' = H, グリコシル残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 42H

【図４２Ｉ】

昆虫細胞で発現されたDNアーゼＩ.
a-d, f, h, j-n, s, u, v-y = 0;
e, g, i, q, r, t (独立に選択される) = 0 もしくは 1.

↓ 1. GNT's 1,2,4,5, UDP-GlcNAc
2. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal-PEG

a-i, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1; j-n = 0;
v-y (独立に選択される) = 1,
e-h (独立に選択される) が1である場合;
R = PEG.

FIG. 42I

【図４２Ｊ】

酵母で発現されたDNアーゼＩ.
a-n = 0;
q-y (独立に選択される) = 0ないし1;
p = 1; R (分枝状もしくは直鎖状)=Man, オリゴマンノース.

↓ 1. エンドグリカナーゼ
2. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal
3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-n, p-y = 0; n (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R' = -Gal-Sia-PEG.

FIG. 42J

【図４２Ｋ】

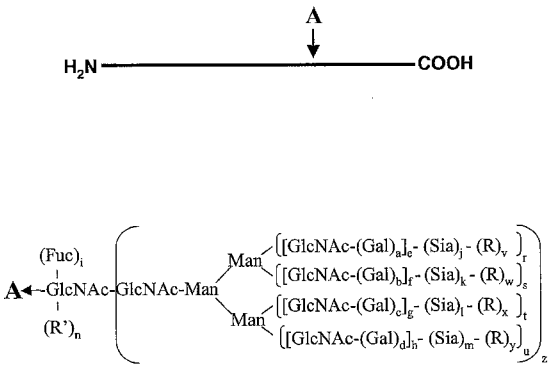
CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたDNアーゼＩ.
a-d, i-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e-h = 1; n, v-y = 0.

↓ 1. CMP-SA-リンカー-SA-CMP, ST3Gal3
2. ST3Gal1, 脱シアリル化 αプロテイナーゼインヒビター
3. CMP-SA, ST3Gal3, ST3Gal1

a-m, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
p = 1; n = 0;
v-y (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
R = リンカー-α-1-プロテイナーゼ

FIG. 42K

【図４３Ａ】



a-d, i, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし 4.
j-m (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
n, v-y = 0; z = 0 もしくは1;
R = 修飾基, マンノース, オリゴマンノース;
R' = H, グリコシル残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 43A

【図４３Ｂ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたインスリン
a-m, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
n = 0; v-y = 0; z = 1.

↓ 1. シアリダーゼ
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-m, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
v-y (独立に選択される) = 1,
j-m (独立に選択される) が1である場合;
n = 0; R = PEG; z = 1.

FIG. 43B

【図４３Ｃ】

昆虫細胞で発現されたインスリン
a-h, j-n, s-y = 0;
i, r (独立に選択される) = 0 もしくは 1; z = 1.

↓ 1. GNT's 1および2, UDP-GlcNAc-PEG

a-d, f, h, j-n, s, u, w, y = 0;
e, g, i, r, t, v, x (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
v, x (独立に選択される) = 1,
e, g (独立に選択される) が1である場合;
z = 1; R = PEG.

FIG. 43C

【図４３Ｄ】

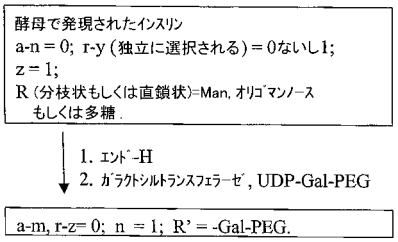


FIG. 43D

【図４３Ｅ】

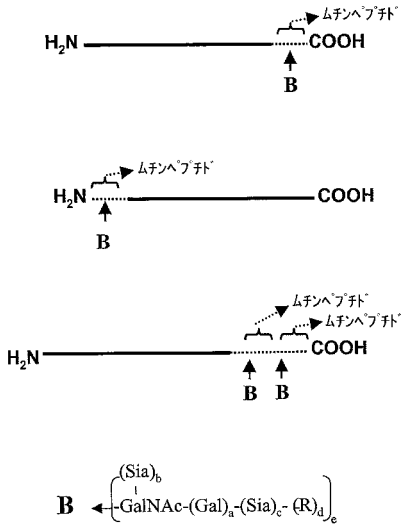


FIG. 43E

【図４３Ｆ】

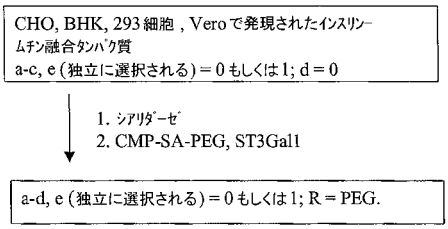


FIG. 43F

【図４３Ｇ】

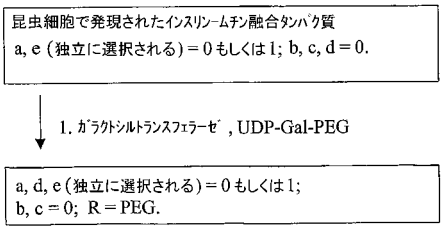


FIG. 43G

【図４３Ｈ】

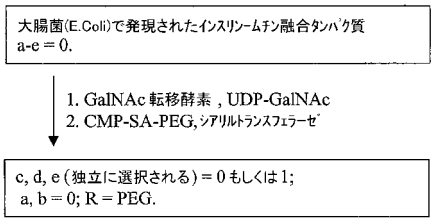


FIG. 43H

【図４３Ｉ】

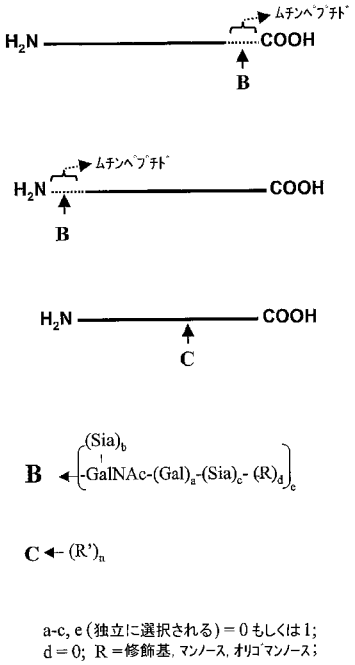


FIG. 43I

【図４３Ｊ】

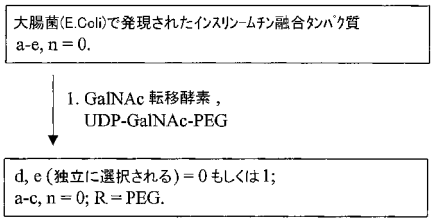


FIG. 43J

【図４３Ｋ】

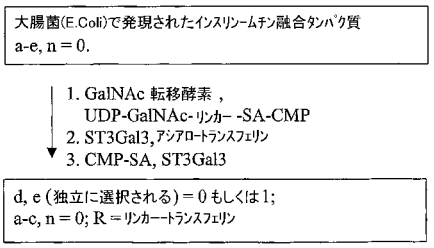


FIG. 43K

【図４３Ｌ】

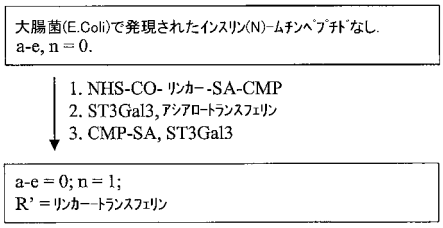


FIG. 43L

【図４４Ａ】

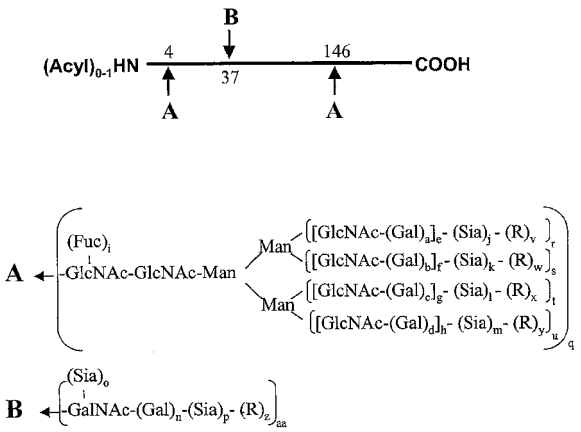


FIG. 44A

【図４４Ｂ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたM-抗原.
a-d, i-m, o-u, aa(独立に選択される) = 0もしくは1;
n, e-h = 1; v-z = 0.

↓ 1. シアリダーゼ
2. CMP-SA-リンカー-リピド-A,
ST3Gal3

a-d, i-m, q-u, aa (独立に選択される) = 0もしくは1;
o, p, z = 0; n, e-h = 1;
v-y (独立に選択される) = 1,
j-m(独立に選択される)が1である場合;
R = リンカー-リピド-A.

FIG. 44B

【図４４Ｃ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたM-抗原.
a-d, i-m, o-u, aa (独立に選択される) = 0もしくは1;
n, e-h = 1; v-z = 0.

↓ 1. シアリダーゼ
2. CMP-SA-リンカー-破傷風トキシン, ST3Gal1
3. CMP-SA, ST3Gal3

a-d, i-m, p-u, z, aa (独立に選択される) = 0もしくは1;
o, v-y = 0; n, e-h = 1; R = 破傷風トキシン.

FIG. 44C

【図４４Ｄ】

NSOで発現されたM-抗原.
a-d, i-n, o-u, aa (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-z = 0;
Sia (独立に選択される) = Siaもしくは Gal.

↓ 1. α-ガラクトシダーゼ
2. CMP-SA, ST3Gal3
2. CMP-SA-KLH, ST3Gal1

a-d, i-n, p-u, z, aa (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; o, v-y = 0;
z = 1, p = 1の場合;
R = KLH.

FIG. 44D

【図４４Ｅ】

酵母で発現されたM-抗原.
a-p, z = 0; q-y, aa (独立に選択される) = 0ないし1;
R(分枝状もしくは直鎖状)=Man, オリゴマンノース;
GalNAc = Man.

↓ 1. α1,2-マンノシダーゼ.
2. GNT 1,
UDP-GlcNAc-リンカー-ジフテリアトキシン.

e, q, l, m, r, t, u, v, aa(独立に選択される) = 0もしくは1;
a-d, f-h, j, k, n-p, s, w-z = 0;
Sia = Man; R = リンカー-ジフテリアトキシン.

FIG. 44E

【図４４Ｆ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたM-抗原.
a-d, i-m, o-u, aa (独立に選択される) = 0もしくは1;
n, e-h = 1; v-z = 0.

↓ 1. CMP-SA-レプリン酸, ST3Gal3,
2. H_4N_2-リンカー -DNA

a-d, i-m, o-y, aa (独立に選択される) = 0もしくは1;
z = 0; n, e-h = 1; R = リンカー-DNA.

FIG. 44F

【図４４Ｇ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたM-抗原.
a-d, i-n, o-u, aa (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; v-z = 0.

↓ 1. CMP-SA, ポリ-α2,8-ST

a-d, i, n-u, aa (独立に選択される) = 0もしくは1;
e-h = 1; j-m (独立に選択される) = 0-100;
v-z (独立に選択される) = 0.

FIG. 44G

【図４４Ｈ】

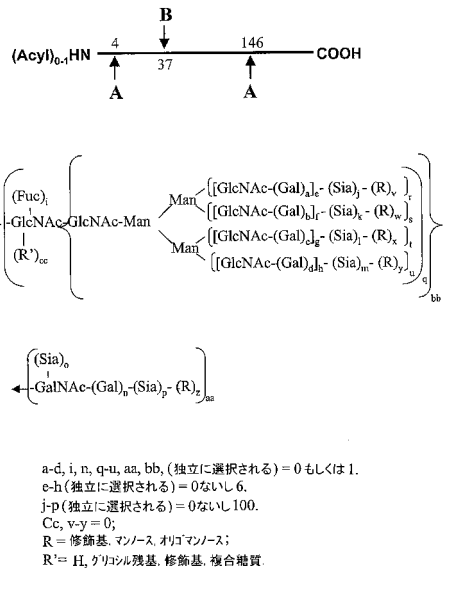


FIG. 44H

【図４４Ｉ】

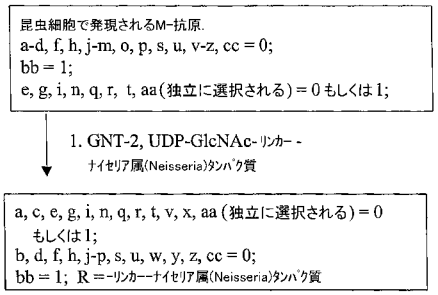


FIG. 44I

【図４４Ｊ】

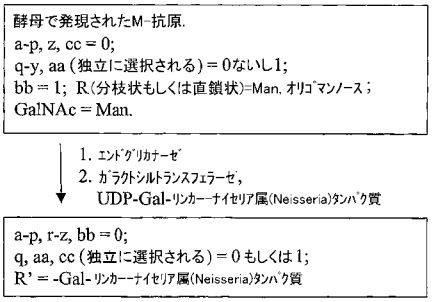


FIG. 44J

【図４４Ｋ】

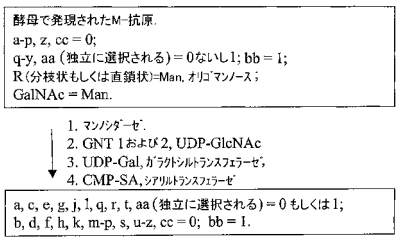
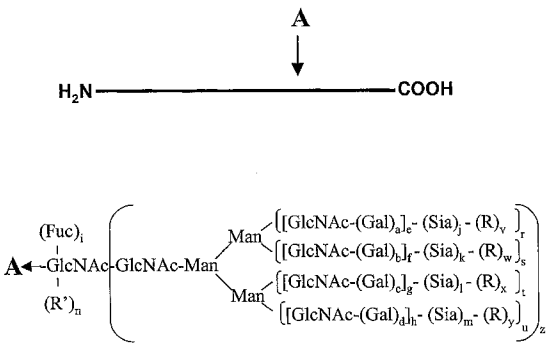


FIG. 44K

【図４５Ａ】



a-d, i, r-u (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし4.
j-m (独立に選択される) = 0もしくは1.
n, v-y = 0; z = 0もしくは1;
R = 修飾基, マンノース, オリゴマンノース;
R' = H, グリコシル残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 45A

【図４５Ｂ】

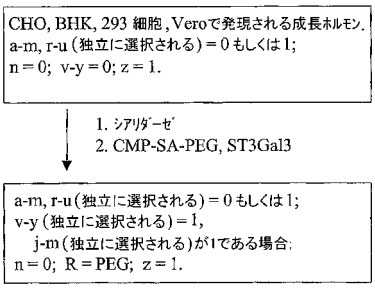


FIG. 45B

【図４５Ｃ】

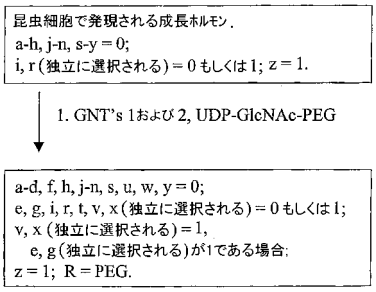


FIG. 45C

【図４５Ｄ】

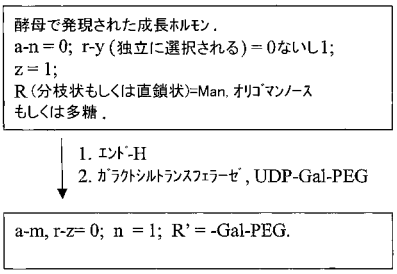


FIG. 45D

【図４５Ｅ】

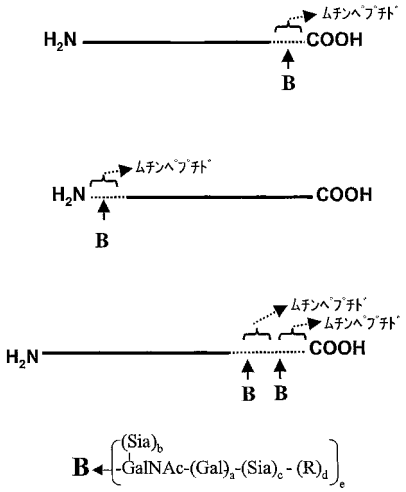


FIG. 45E

【図４５Ｆ】

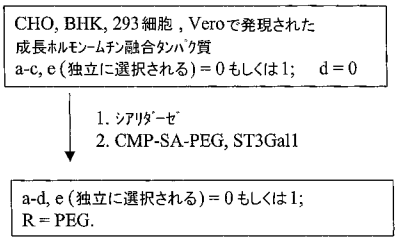


FIG. 45F

【図４５Ｇ】

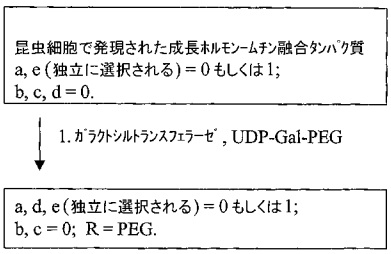


FIG. 45G

【図４５Ｈ】

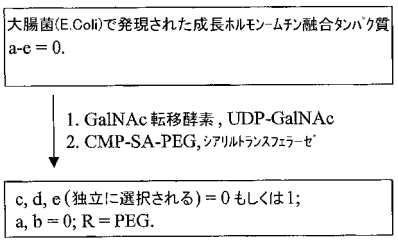


FIG. 45H

【図４５Ｉ】

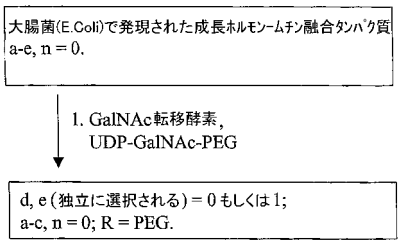


FIG. 45I

【図４５Ｊ】

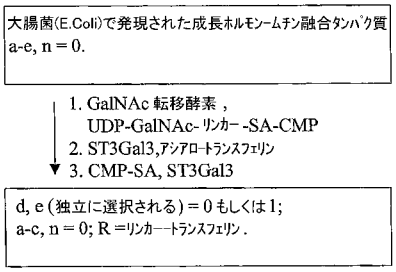


FIG. 45J

【図４５Ｋ】

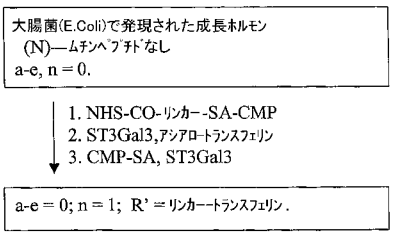


FIG. 45K

【図４６Ａ】

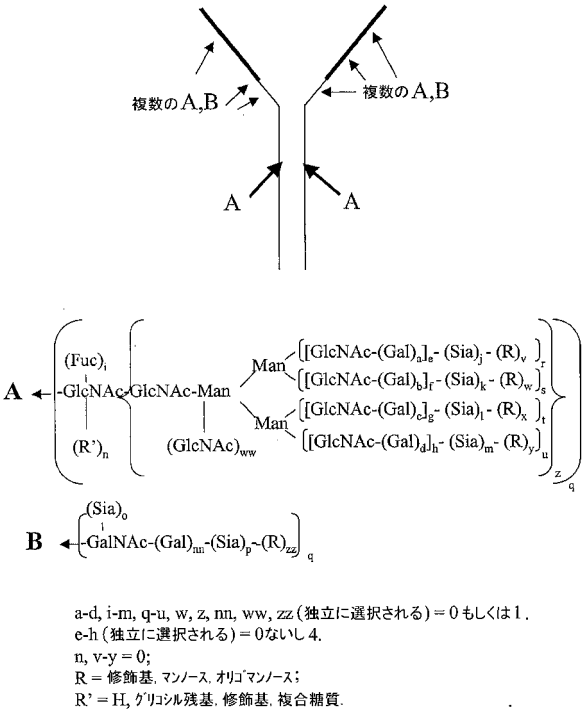


FIG. 46A

【図４６Ｂ】

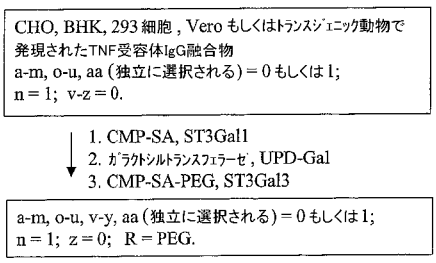


FIG. 46B

【図４６Ｃ】

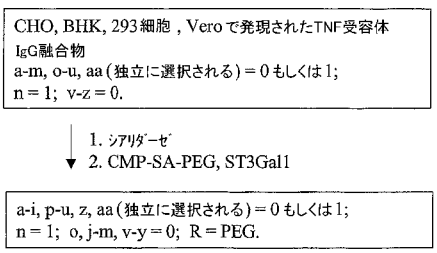


FIG. 46C

【図４６Ｄ】

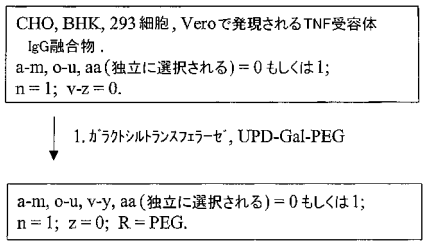


FIG. 46D

【図４６Ｅ】

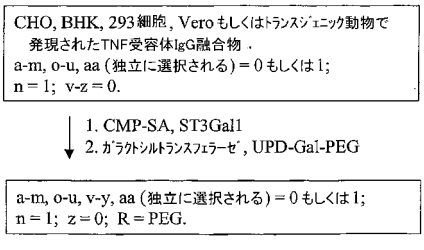


FIG. 46E

【図４６Ｆ】

CHO, BHK, 293細胞，Veroもしくはトランスジェニック動物で発現されたTNF受容体IgG融合物．
a-m, o-u, aa（独立に選択される）＝0もしくは1;
n＝1; v-z＝0.

↓ 1. CMP-SA-レプリン酸, ST3Gal1
↓ 2. H_4N_2-PEG

a-m, o-u, v-y, aa（独立に選択される）＝0もしくは1;
n＝1; z＝0; R＝PEG.

FIG. 46F

【図４６Ｇ】

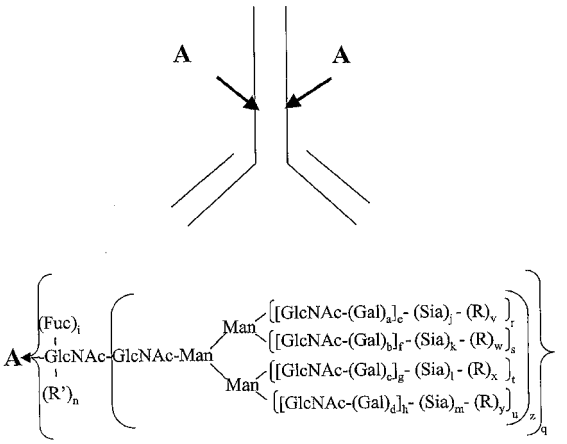
CHO, BHK, 293細胞，Veroで発現されたTNF受容体IgG融合．
a-m, o-u, aa（独立に選択される）＝0もしくは1;
n＝1; v-z＝0.

↓ 1. CMP-SA-PEG, α2,8-ST

a-i, o, q-u, v-z, aa（独立に選択される）＝0もしくは1;
n＝1; j-m, p（独立に選択される）＝0ないし2;
v-z（独立に選択される）＝1,
j-m, p（独立に選択される）が2である場合；
R＝PEG.

FIG. 46G

【図４７Ａ】



a-d, i, l, q-u（独立に選択される）＝0もしくは1.
e-h（独立に選択される）＝0ないし4.
j-k（独立に選択される）＝0もしくは1.
M＝0ないし20.
n, v-y＝0; z＝0もしくは1;
R＝ポリマー，トキシン，放射性同位元素複合体，薬物，マンノース，オリゴマンノース．
R'＝H，グリコシル残基，修飾基，複合糖質．

FIG. 47A

【図４７Ｂ】

CHO, BHK, 293細胞，Veroで発現されたハーセプチン(Herceptin)
a, c, i（独立に選択される）＝0もしくは1;
e, g, r, t＝1; b, d, f, h, j-m, n, s, u-y＝0;
q, z＝1.

↓ 1. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UPD-Gal
↓ 2. CMP-SA-トキシン, ST3Gal3

a, c, i, j, l（独立に選択される）＝0もしくは1;
e, g, r, t＝1; R＝トキシン；
f, h, k, m, n, s, u-y＝0; q, z＝1;
v-y（独立に選択される）＝51,
j, l（独立に選択される）が1である場合．

FIG. 47B

【図４７Ｃ】

CHO, BHK, 293細胞，Veroもしくは真菌で発現されたハーセプチン(Herceptin).
a, c, i（独立に選択される）＝0もしくは1;
e, g, r, t＝1; b, d, f, h, j-m, n, s, u-y＝0;
q, z＝1.

↓ 1. ガラクトシルトランスフェラーゼ,
UPD-Gal-トキシン

a, c, i（独立に選択される）＝0もしくは1;
e, g, r, t＝1; f, h, j-m, n, s, u-y＝0;
q, z＝1; v-y（独立に選択される）＝1,
a, c（独立に選択される）が1である場合；
R＝トキシン．

FIG. 47C

【図４７Ｄ】

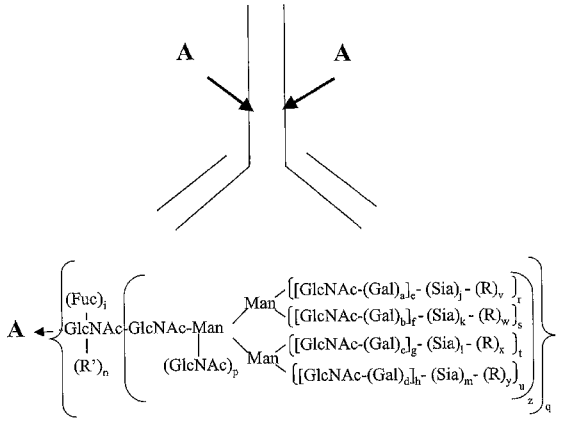
真菌で発現されたハーセプチン(Herceptin).
e, g, i, r, t（独立に選択される）＝0もしくは1;
a-d, f, h, j-m, n, s, u-y＝0; q, z＝1.

↓ 1. エンド-H
↓ 2. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal
↓ 3.. CMP-SA-放射性同位元素複合体, ST3Gal3

a-m, r-z＝0; q, n ＝1;
R'＝-Gal-Sia-放射性同位元素複合体.

FIG. 47D

【図４８Ａ】



a-d, i, p-u, (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし 4.
j-m (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
n, v-y = 0; z = 0もしくは1;
R = ポリマー, トキシン, 放射性同位元素複合体, 薬物, マンノース, オリゴ-マンノース,
R' = H, グリコシル残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 48A

【図４８Ｂ】

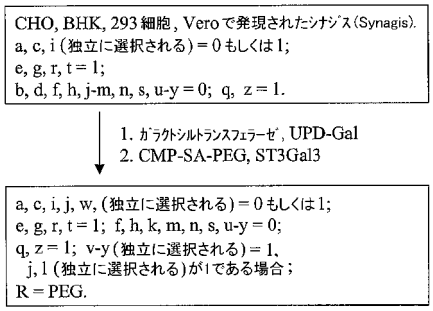


FIG. 48B

【図４８Ｃ】

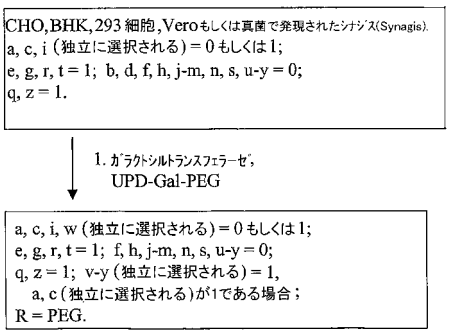


FIG. 48C

【図４８Ｄ】

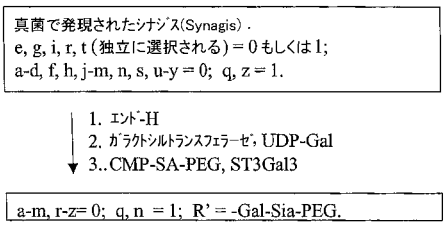
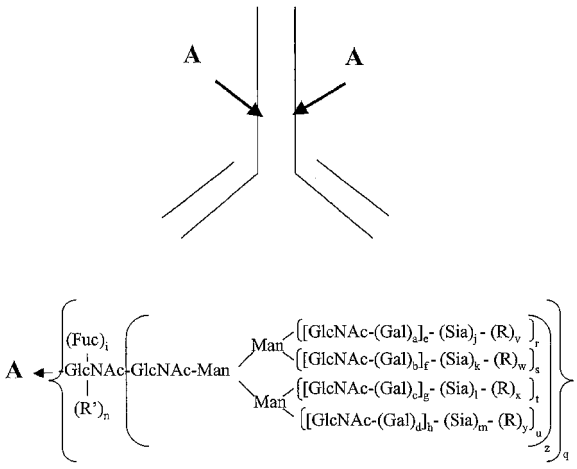


FIG. 48D

【図４９Ａ】



a-d, i, q-u, w (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし 6.
j-m (独立に選択される) = 0ないし 20.
n, v-y = 0; z = 0もしくは1;
R = ポリマー, トキシン, 放射性同位元素複合体, 薬物, マンノース, オリゴマンノース,
R' = H, グリコシル残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 49A

【図４９Ｂ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたﾚﾐｹｰﾄﾞ(Remicade).
a, c, i (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e, g, r, t = 1; b, d, f, h, j-m, n, s, u-y = 0;
q, z = 1.

↓ 1. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UPD-Gal
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a, c, i, j, l (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e, g, r, t = 1; f, h, k, m, n, s, u-y = 0;
q, z = 1; v-y (独立に選択される) = 1,
j, l (独立に選択される)が1である場合;
R = PEG.

FIG. 49B

【図４９Ｃ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroもしくは真菌で発現されたﾚﾐｹｰﾄﾞ(Remicade).
a, c, i (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e, g, r, t = 1; b, d, f, h, j-m, n, s, u-y = 0;
q, z = 1.

↓ 1. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ,
UPD-Gal-PEG

a, c, i (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
e, g, r, t = 1; f, h, j-m, n, s, u-y = 0;
q, z = 1; v-y (独立に選択される) = 1,
a, (独立に選択される)が1である場合;
R = PEG.

FIG. 49C

【図４９Ｄ】

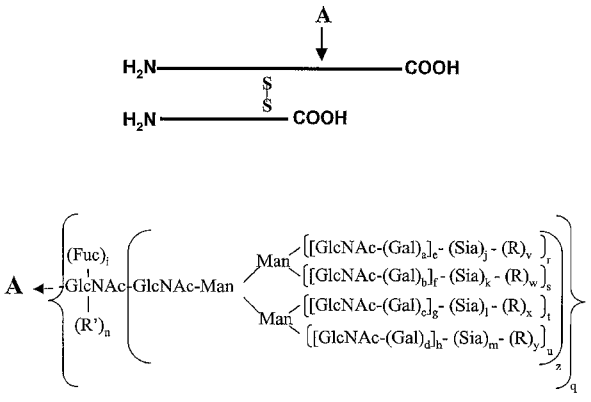
真菌で発現されたﾚﾐｹｰﾄﾞ(Remicade).
e, g, i, r, t (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
a-d, f, h, j-m, n, s, u-y = 0; q, z = 1.

↓ 1. ｴﾝﾄﾞ-H
2. ｶﾞﾗｸﾄｼﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ, UDP-Gal
3.. CMP-SA-放射性同位元素複合体, ST3Gal3

a-m, r-z= 0; q, n = 1;
R' = -Gal-Sia-放射性同位元素複合体.

FIG. 49D

【図５０Ａ】



a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし 4.
j-m (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
n, v-y = 0; z = 0もしくは1;
R = 修飾基, ﾏﾝﾉｰｽ, ｵﾘｺﾞﾏﾝﾉｰｽ;
R' = H, ｸﾞﾘｺｼﾙ残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 50A

【図５０Ｂ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroで発現されたﾚｵﾌﾟﾛ(Reopro).
a-m, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
n = 0; v-y = 0; z = 1.

↓ 1. ｼｱﾘﾀﾞｰｾﾞ
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-m, r-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
v-y (独立に選択される) = 1,
j-m (独立に選択される)が1である場合;
n = 0; R = PEG; z = 1.

FIG. 50B

【図５０Ｃ】

昆虫細胞で発現されたﾚｵﾌﾟﾛ(Reopro).
a-h, j-n, s-y = 0; i, r (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
z = 1.

↓ 1. GNT's 1および2, UDP-GlcNAc-PEG

a-d, f, h, j-n, s, u, w, y = 0;
e, g, i, r, t, v, x (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
v, x (独立に選択される) = 1,
e, g(独立に選択される)が1である場合;
z = 1; R = PEG.

FIG. 50C

【図５０Ｄ】

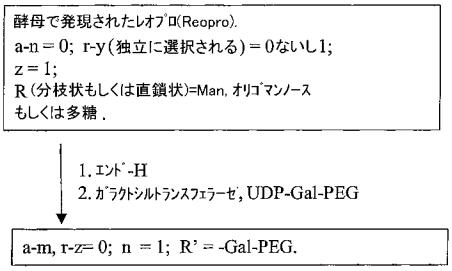


FIG. 50D

【図５０Ｅ】

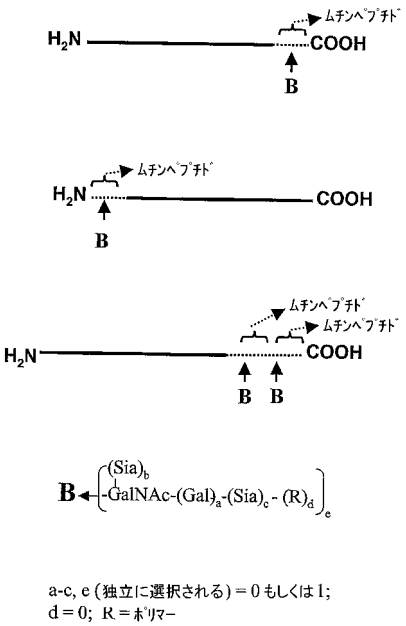


FIG. 50E

【図５０Ｆ】

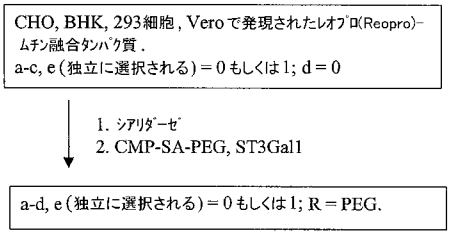


FIG. 50F

【図５０Ｇ】

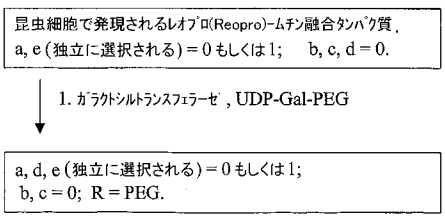


FIG. 50G

【図５０Ｈ】

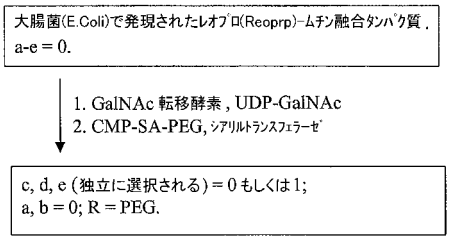
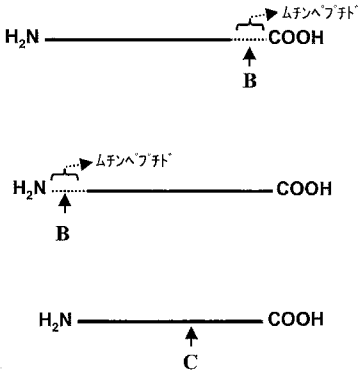


FIG. 50H

【図５０Ｉ】



a-c, e (独立に選択される) = 0 もしくは 1;
d = 0; R = ポリマー, リンカー.

FIG. 50I

【図５０Ｊ】

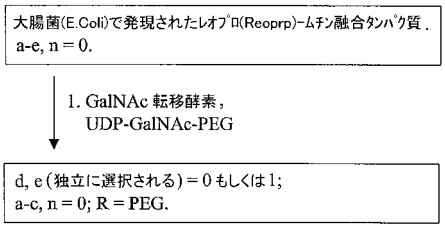


FIG. 50J

【図５０Ｋ】

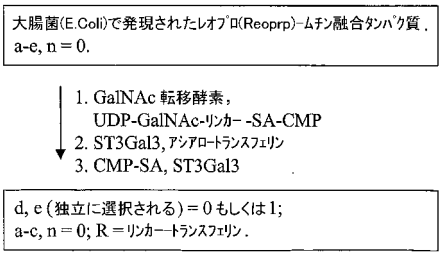


FIG. 50K

【図５０Ｌ】

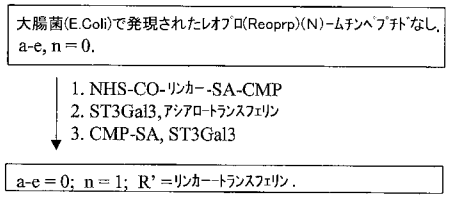
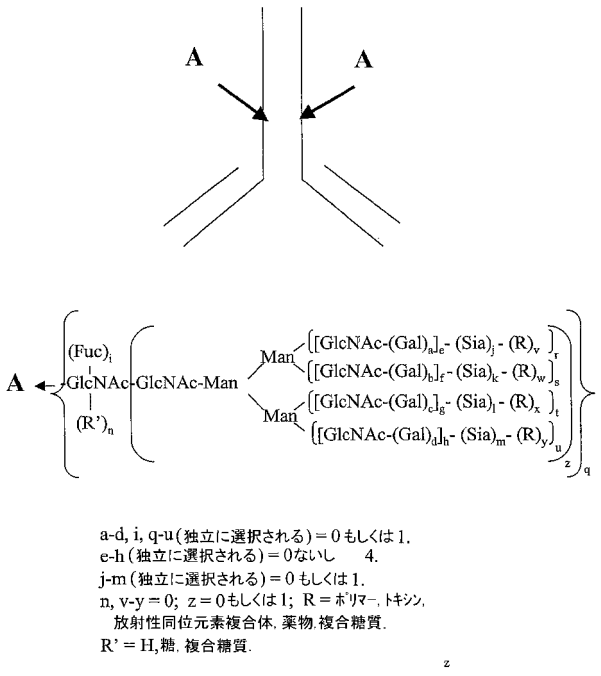


FIG. 50L

【図５１Ａ】



a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし 4.
j-m (独立に選択される) = 0 もしくは 1.
n, v-y = 0; z = 0もしくは 1; R = ポリマー, トキシン,
放射性同位元素複合体, 薬物, 複合糖質.
R' = H, 糖, 複合糖質.

FIG. 51A

【図５１Ｂ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroもしくはトランスジェニック動物で発現されたリタキサン(Rituxan).
a, c, i (独立に選択される) = 0もしくは1;
e, g, r, t = 1; b, d, f, h, j-m, n, s, u-y = 0; q, z = 1.

↓ 1. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UPD-Gal
2. CMP-SA-トキシン, ST3Gal3

a, c, i, j, l (独立に選択される) = 0もしくは1;
e, g, r, t = 1;
f, h, k, m, n, s, u-y = 0; q, z = 1;
v-y (独立に選択される) = 1,
j, l (独立に選択される)が1である場合;
R = トキシン.

FIG. 51B

【図５１Ｃ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroもしくは真菌で発現されたリタキサン(Rituxan).
a, c, e, g, i, r, t (独立に選択される) = 0もしくは1;
b, d, f, h, j-m, n, s, u-y = 0; q, z = 1.

↓ 1. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UPD-Gal-drug

a, c, i (独立に選択される) = 0もしくは1;
e, g, r, t = 1; f, h, j-m, n, s, u-y = 0; q, z = 1;
v-y (独立に選択される) = 1,
a, c (独立に選択される)が1である場合;
R = トキシン.

FIG. 51C

【図５１Ｄ】

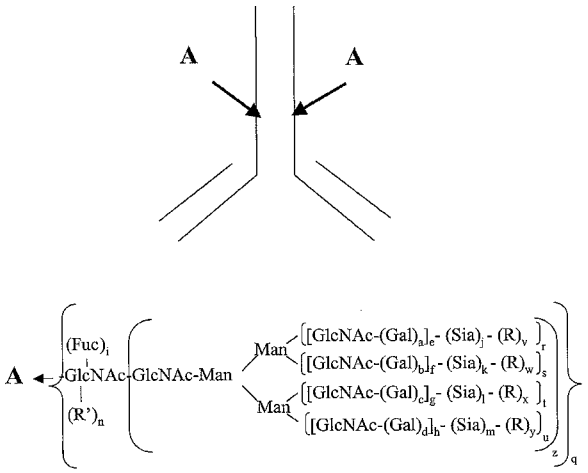
真菌で発現されたリタキサン(Rituxan).
e, g, i, r, t (独立に選択される) = 0もしくは1;
a-d, f, h, j-m, n, s, u-y = 0; q, z = 1.

↓ 1. エンド-H
2. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal
3. CMP-SA-放射性同位元素複合体, ST3Gal3

a-m, r-z = 0; q, n = 1;
R' = -Gal-Sia-放射性同位元素複合体.

FIG. 51D

【図５１Ｅ】



a-d, i, q-u (独立に選択される) = 0もしくは1.
e-h (独立に選択される) = 0ないし4.
j-m (独立に選択される) = 0もしくは1.
n, v-y = 0; z = 0もしくは1;
R = ポリマー, トキシン, 放射性同位元素複合体, 薬物, 複合糖質, マンノース, オリゴマンノース.
R' = H, グリコシル残基, 修飾基, 複合糖質.

FIG. 51E

【図５１Ｆ】

CHO, BHK, 293細胞, Veroもしくはトランスジェニック動物で発現されたリタキサン(Rituxan).
a, c, i (独立に選択される) = 0もしくは1;
e, g, r, t = 1; b, d, f, h, j-m, n, s, u-y = 0;
q, z = 1.

↓ 1. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UPD-Gal
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a, c, i, j, l (独立に選択される) = 0もしくは1;
e, g, r, t = 1; f, h, k, m, n, s, u-y = 0;
q, z = 1; v-y (独立に選択される) = 1,
j, l (独立に選択される)が1である場合;
R = PEG.

FIG. 51F

【図５１Ｇ】

真菌, 酵母もしくはCHOで発現されたリタキサン(Rituxan).
e, g, i, r, t, v, x (独立に選択される) = 0もしくは1;
a-d, f, h, j-m, n, s, u, w, y = 0; q, z = 1;
R (独立に選択される) = マンノース, オリゴマンノース, ポリマンノース.

↓ 1. マンノシダーゼ (αおよびβ)
2. GNT-I,II, UDP-GlcNAc
3. ガラクトシルトランスフェラーゼ, UDP-Gal-放射性同位元素

a-m, r-z = 0; q, n = 1;
R' = -Gal-放射性同位元素複合体.

FIG. 51G

【図５２Ａ】

FIG. 52A

ACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAT
GCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAG
GAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGT
GCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTG
CCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATA
GCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCT
CCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCG
ACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCC
CCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCT
TTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAG
CTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGCCCTG
A

【図５２Ｂ】

FIG. 52B

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu
Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr
Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro
Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser
Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe
Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro
Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val
Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His
Leu Ala Gln Pro

【図５３Ａ】

FIG. 53A

GCGCCTCTTATGTACCCACAAAAATCTATTTTCAAAAAAGTTGCTCTA
AGAATATAGTTATCAAGTTAAGTAAAATGTCAATAGCCTTTTAATTTA
ATTTTTAATTGTTTTATCATTCTTTGCAATAATAAAACATTAACTTTAT
ACTTTTTAATTTAATGTATAGAATAGAGATATACATAGGATATGTAAA
TAGATACACAGTGTATATGTGATTAAAATATAATGGGAGATTCAATC
AGAAAAAAGTTTCTAAAAAGGCTCTGGGGTAAAAGAGGAAGGAAAC
AATAATGAAAAAAATGTGGTGAGAAAAACAGCTGAAAACCCATGTA
AAGAGTGTATAAAGAAAGCAAAAAGAGAAGTAGAAAGTAACACAGG
GGCATTTGGAAAATGTAAACGAGTATGTTCCCTATTTAAGGCTAGGC
ACAAAGCAAGGTCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCAC
CCATTTCAACCAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACAATGGCCTTGA
CCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCTCAGCTGCAAGTCAAGCT
GCTCTGTGGGCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGG
AGGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCC
TGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTTGG
CAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCCTCCATGAGATGA
TCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTT
GGGATGAGACCCTCCTAGACAAATTCTACACTGAACTCTACCAGCAG
CTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGA
GACTCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACT
TCCAAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGT
GCCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTCTTTGTCA
ACAAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAATGAAAACTGGTTCA
ACATGGAAATGATTTTCATTGATTCGTATGCCAGCTCACCTTTTTATG
ATCTGCCATTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTATGACCATGACACGATT
TAAATCTTTTCAAATGTTTTTAGGAGTATTAATCAACATTGTATTCAG
CTCTTAAGGCACTAGTCCCTTACAGAGGACCATGCTGACTGATCCATT
ATCTATTTAAATATTTTTAAAATATTATTTATTTAACTATTTATAAAAC
AACTTATTTTTGTTCATATTATGTCATGTGCACCTTTGCACAGTGGTTA
ATGTAATAAAATGTGTTCTTTGTATTTGGTAAATTTATTTTGTGTTGTT
CATTGAACTTTTGCTATGGAACTTTTGTACTTGTTTATTCTTTAAAATG
AAATTCCAAGCCTAATTGTGCAACCTGATTACAGAATAACTGGTACA
CTTCATTTGTCCATCAATATTATATTCAAGATATAAGTAAAAATAAAC
TTTCTGTAAACCAAGTTGTATGTTGTACTCAAGATAACAGGGTGAACC
TAACAAATACAATTCTGCTCTCTTGTGTATTTGATTTTTGTATGAAAA
AAACTAAAAATGGTAATCATACTTAATTATCAGTTATGGTAAATGGT
ATGAAGAGAAGAAGGAACG

【図５３Ｂ】

FIG. 53B

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys Lys Ser
Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr
Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala
Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr
Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu
Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe
Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu
Arg Ser Lys Glu

【図５４Ａ】

FIG. 54A

ATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAATTGCTCTCCTGTTGTGCTTCTCC
ACTACAGCTCTTTCCATGAGCTACAACTTGCTTGGATTCCTACAAAGA
AGCAGCAATTTTCAGTGTCAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAG
GCTTGAATATTGCCTCAAGGACAGGATGAACTTTGACATCCCTGAGG
AGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGCATTGACC
ATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCA
TCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAA
TGTCTATCATCAGATAAACCATCTGAAGACAGTCCTGGAAGAAAAAC
TGGAGAAAGAAGATTTTACCAGGGGAAAACTCATGAGCAGTCTGCAC
CTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGA
GTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGA
ACTTTTACTTCATTAACAGACTTACAGGTTACCTCCGAAACTGAAGAT
CTCCTAGCCTGTCCCTCTGGGACTGGACAATTGCTTCAAGCATTCTTC
AACCAGCAGATGCTGTTTAAGTGACTGATGGCTAATGTACTGCAAAT
GAAAGGACACTAGAAGATTTTGAAATTTTTATTAAATTATGAGTTATT
TTTATTTAT TTAAATTTTATTTTGGAAAATAAATTATTTTTGGTGC

【図５４Ｂ】

FIG. 54B

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser Thr Thr Ala
Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly ArgLeu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp
Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu
Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln
Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp
Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val
Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

【図５５Ａ】

FIG. 55A

ATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCAG
GGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGCGT
CCTGCACCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGC
CGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGA
GGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTC
TGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCA
GAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCT
GCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAACTGTGAGACGCACAAGGATGAC
CAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG
TGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACT
CTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCCTGCACACCCACAGTTGAATATCCA
TGTGGAAAAATACCTATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCA
AGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGGGGAGTGTCCA
TGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGGGGGGAC
CCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAA
AATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGAC
CTCAGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGG
TCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATC
GCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTGGTG
CCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTC
GTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGG
CGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTGCTCAACGTGCCCCGGCTGATGA
CCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAAT
ATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCCACATGCCACCCACTACCGGG
GCACGTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCA
ACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTACACCAGGGTCTCCCAGTACATCGA
GTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCCAGGAGTCCTCC
TGCGAGCCCCATTTCCC

【図５５Ｂ】

FIG. 55B

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln Gly Cys
Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg
Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys
Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys
Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val
Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg
Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro
Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln
Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile
Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp
Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu
Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser
Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu
Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg
Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp
Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg
Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met
Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro

【図５６Ａ】

FIG. 56A

ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAAGCCTCATCAC
CATCTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTT
GATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAA
TTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAAT
GTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAACCACGAGAAGTTTTTGAA
AACACTGAAAAGACAACTGAATTTTGGAAGCAGTATGTTGATGGAGA
TCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATG
ACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGA
ACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAG
CAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACT
GAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGT
GCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAAACTTCTAAGCTCAC
CCGTGCTGAGGCTGTTTTTCCTGATGTGGACTATGTAAATCCTACTGA
AGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAGGCACCCAATCATTTA
ATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAA
TTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGA
GGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAACTGCTGCCCACTGTGTT
GAAACTGGTGTTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGA
GGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCGAGCAATT
ATTCCTCACCACAACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGA
CATTGCCCTTCTGGAACTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACG
TTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCA
AATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGCAAGAGTCTTCCACAAA
GGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGAC
CGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACAT
GTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAG
ATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTA
ACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATA
TGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAA
AAACAAAGCTCACTTAATGAAAGATGGATTTCCAAGGTTAATTCATT
GGAATTGAAAATTAACAG

【図５６Ｂ】

FIG. 56B

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Ser Leu Ile Thr Ile Cys Leu
Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe LeuAsp His Glu Asn Ala
Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe
Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu
Pro Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr
Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys
Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn
Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys
Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu
Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser
Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr
Val Asn Pro Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Gly Thr Gln Ser
Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val
Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr
Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn
Val Ile Arg Ala Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn
His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr
Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly
Tyr Val Ser Gly Trp Ala Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln
Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe
Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser
Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu
Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr
Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr

【図５７Ａ】

FIG. 57A

ATGGATTACTACAGAAAATATGCAGCTATCTTTCTGGTCACATTGTCG
GTGTTTCTGCATGTTCTCCATTCCGCTCCTGATGTGCAGGATTGCCCA
GAATGCACGCTACAGGAAAACCCATTCTTCTCCCAGCCGGGTGCCCC
AATACTTCAGTGCATGGGCTGCTGCTTCTCTAGAGCATATCCCACTCC
ACTAAGGTCCAAGAAGACGATGTTGGTCCAAAAGAACGTCACCTCAG
AGTCCACTTGCTGTGTAGCTAAATCATATAACAGGGTCACAGTAATG
GGGGGTTTCAAAGTGGAGAACCACACGGCGTGCCACTGCAGTACTTG
TTATTATCACAAATCTTAAATGTTTTACCAAGTGCTGTCTTGATGACT
GCTGATTTTCTGGAATGGAAAATTAAGTTGTTTAGTGTTTATGGCTTT
GTGAGATAAAACTCTCCTTTTCCTTACCATACCACTTTGACACGCTTC
AAGGATATACTGCAGCTTTACTGCCTTCCTCCTTATCCTACAGTACAA
TCAGCAGTCTAGTTCTTTTCATTTGGAATGAATACAGCATTAAGCTTG
TTCCACTGCAAATAAAGCCTTTTAAATCATC

【図５７Ｂ】

FIG. 57B

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser Val Phe Leu
His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu
Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe
Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn
Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met
Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His
Lys Ser

【図５７Ｃ】

FIG. 57C

ATGAAGACACTCCAGTTTTTCTTCCTTTTCTGTTGCTGGAAAGCAATC
TGCTGCAATAGCTGTGAGCTGACCAACATCACCATTGCAATAGAGAA
AGAAGAATGTCGTTTCTGCATAAGCATCAACACCACTTGGTGTGCTG
GCTACTGCTACACCAGGGATCTGGTGTATAAGGACCCAGCCAGGCCC
AAAATCCAGAAAACATGTACCTTCAAGGAACTGGTATATGAAACAGT
GAGAGTGCCCGGCTGTGCTCACCATGCAGATTCCTTGTATACATACCC
AGTGGCCACCCAGTGTCACTGTGGCAAGTGTGACAGCGACAGCACTG
ATTGTACTGTGCGAGGCCTGGGGCCCAGCTACTGCTCCTTTGGTGAAA
TGAAAGAATAA

【図５８Ｂ】

FIG. 58B

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser
Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr
Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys
Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val
Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu
Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Gln Lys Glu Ala Ile
Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe
Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr
Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg

【図５９Ａ】

FIG. 59A

ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCAT
CTCTGCACCCGCCCGCTCGCCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGC
ATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGA
GACACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAAT
GTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAGCTGT
ACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCCTTG
ACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGA
AACTTCCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGA
ACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTCATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAG
TCCAGGAGTGA

【図５９Ｂ】

FIG. 59B

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile Ser Ala Pro
Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu
Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr
Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg
Leu Glu Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro
Leu Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu
Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu

【図５７Ｄ】

FIG. 57D

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile Cys Cys
Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu Cys Arg Phe
Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val
Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val
Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr
Pro Val Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu

【図５８Ａ】

FIG. 58A

CCCGGAGCCGGACCGGGGCCACCGCGCCCGCTCTGCTCCGACACCGC
GCCCCCTGGACAGCCGCCCTCTCCTCCAGGCCCGTGGGGCTGGCCCT
GCACCGCCGAGCTTCCCGGGATGAGGGCCCCCGGTGTGGTCACCCGG
CGCGCCCCAGGTCGCTGAGGGACCCCGGCCAGGCGCGGAGATGGGG
GTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTCG
CTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCTGT
GACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCG
AGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAAT
ATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGAT
GGAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTG
CTGTCGGAAGCTGTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCC
CAGCCGTGGGAGCCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCAGTGG
CCTTCGCAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGCGAGCCCAGAAGG
AAGCCATCTCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACA
ATCACTGCTGACACTTTCCGCAAACTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTC
CTCCGGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAG
GGGACAGATGACCAGGTGTGTCCACCTGGGCATATCCACCACCTCCC
TCACCAACATTGCTTGTGCCACACCCTCCCCCGCCACTCCTGAACCCC
GTCGAGGGGCTCTCAGCTCAGCGCCAGCCTGTCCCATGGACACTCCA
GTGCCAGCAATGACATCTCAGGGGCCAGAGGAACTGTCCAGAGAGC
AACTCTGAGATCTAAGGATGTCACAGGGCCAACTTGAGGGCCCAGAG
CAGGAAGCATTCAGAGAGCAGCTTTAAACTCAGGGACAGAGCCATG
CTGGGAAGACGCCTGAGCTCACTCGGCACCCTGCAAAATTTGATGCC
AGGACACGCTTTGGAGGCGATTTACCTGTTTTCGCACCTACCATCAGG
GACAGGATGACCTGGAGAACTTAGGTGGCAAGCTGTGACTTCTCCAG
GTCTCACGGGCATGGGCACTCCCTTGGTGGCAAGAGCCCCCTTGACA
CCGGGGTGGTGGGAACCATGAAGACAGGATGGGGGCTGGCCTCTGG
CTCTCATGGGGTCCAAGTTTTGTGTATTCTTCAACCTCATTGACAAGA
ACTGAAACCACCAAAAAAAAAAAAAAA

【図６０Ａ】

FIG. 60A

ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTTTCAGCTCTGCATCGTTTTG
GGTTCTCTTGGCTGTTACTGCCAGGACCCATATGTAAAAGAAGCAGA
AAACCTTAAGAAATATTTTAATGCAGGTCATTCAGATGTAGCGGATA
ATGGAACTCTTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGT
GACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCCTTTTACTTCAAACT
TTTTAAAAACTTTAAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGA
CCATCAAGGAAGACATGAATGTCAAGTTTTTCAATAGCAACAAAAAG
AAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCGGTAACTGACTT
GAATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACTCATCCAAGTGATGGCTG
AACTGTCGCCAGCAGCTAAAACAGGGAAGCGAAAAAGGAGTCAGAT
GCTGTTTCGAGGTCGAAGAGCATCCCAGTAA

【図６０Ｂ】

FIG. 60B

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu Gly Ser Leu
Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr
Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser
Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val
Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys
Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln
Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys
Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln

【図６１Ａ】

FIG. 61A

CTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCT
CCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGGA
TCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCCACCATGATC
AGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTC
GCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAA
TATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTC
CCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGA
ATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTC
CAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCT
GACCACCGGCAATGGCCTGTTCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGG
ATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTC
ACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACG
ATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAG
GAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTT
AAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAG
AGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATG
AAGCGTTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAG
CTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCT
TCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATGAACTCACC
CACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGC
CAGCTTACATTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAA
GAGCGTCCTGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGG
CTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAG
GCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGC
TGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCCGA
GGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATAC
CAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAAAAT
AACTGCCTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCC
CTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGG

【図６１Ｂ】

FIG. 61B

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys Cys Leu Val
Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser
His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe
Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe
Ser Pro Val Ser Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp
Thr His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu Ala
Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp Ser Gln
Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val
Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val
Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys
Gly Thr Gln Gly Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val
Phe Ala LeuVal Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val
Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val Lys Val
Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys Lys Leu Ser
Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro
Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys
Phe Leu Glu Asn Glu AspArg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile
Thr Gly Thr Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe
Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys Leu Ser Lys
Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala
Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro
Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val
Val Asn Pro Thr Gln Lys

【図６２Ａ－１】

FIG. 62A-1

GCTAACCTAGTGCCTATAGCTAAGGCAGGTACCTGCATCCTTGTTTTT
GTTTAGTGGATCCTCTATCCTTCAGAGACTCTGGAACCCCTGTGGTCT
TCTCTTCATCTAATGACCCTGAGGGGATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCA
GAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGGC
AGCCTCACAGGTTTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCGTGGGCATCAGGT
GCCCGCCCCTGCATCCCTAAAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGT
GTCTGCAATGCCACATACTGTGACTCCTTTGACCCCCCGACCTTTCCT
GCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATGAGAGTACACGCAGTGGGCGACG
GATGGAGCTGAGTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCACAG
GCCTGCTACTGACCCTGCAGCCAGAACAGAAGTTCCAGAAAGTGAAG
GGATTTGGAGGGGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTTGCC
CTGTCACCCCCTGCCCAAAATTTGCTACTTAAATCGTACTTCTCTGAA
GAAGGAATCGGATATAACATCATCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGA
CTTCTCCATCCGCACCTACACCTATGCAGACACCCCTGATGATTTCCA
GTTGCACAACTTCAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATAC
CCCTGATTCACCGAGCCCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCCGTTTCACTCC
TTGCCAGCCCCTGGACATCACCCACTTGGCTCAAGACCAATGGAGCG
GTGAATGGGAAGGGGTCACTCAAGGGACAGCCCGGAGACATCTACC
ACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTG
AGCACAAGTTACAGTTCTGGGCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCT
GCTGGGCTGTTGAGTGGATACCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCT
GAACATCAGCGAGACTTCATTGCCCGTGACCTAGGTCCTACCCTCGCC
AACAGTACTCACCACAATGTCCGCCTACTCATGCTGGATGACCAACGC
TTGCTGCTGCCCCACTGGGCAAAGGTGGTACTGACAGACCCAGAAGC
AGCTAAATATGTTCATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTTCT
GGCTCCAGCCAAAGCCACCCTAGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCCA
ACACCATGCTCTTTGCCTCAGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCTGGG
AGCAGAGTGTGCGGCTAGGCTCCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGC
CACAGCATCATCACGAACCTCCTGTACCATGTGGTCGGCTGGACCGAC
TGGAACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCCAATTGGGTGCGTAA
CTTTGTCGACAGTCCCATCATTGTAGACATCACCAAGGACACGTTTTA
CAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGGCCACTTCAGCAAGTTCATTCC
TGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACC
TGGACGCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCG
TGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGTGCCTCTTACCATCAAGGATCCTG
CTGTGGGCTTCCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTCACACCT
ACCTGTGGCATCGCCAGTGATGGAGCAGATACTCAAGGAGGCACTGG
GCTCAGCCTGGGCATTAAAGGGACAGAGTCAGCTCACACGCTGTCTG
TGACTAAAGAGGGCACAGCAGGGCCAGTGTGAGCTTACAGCGACGT

【図６２Ａ－２】

FIG. 62A-2

AAGCCCAGGGGCAATGGTTTGGGTGACTCACTTTCCCCTCTAGGTGGT
GCCCAGGGCTGGAGGCCCCTAGAAAAAGATCAGTAAGCCCCAGTGTC
CCCCCAGCCCCCATGCTTATGTGAACATGCGCTGTGTGCTGCTTGCTT
TGGAAACT

【図６２Ｂ】

FIG. 62B

Met Glu Phe Ser Ser Pro Ser Arg Glu Glu Cys Pro Lys Pro Leu Ser Arg Val Ser
Ile Met Ala Gly Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Leu Gln Ala Val Ser Trp Ala Ser
Gly Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys Val Cys
Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro Ala Leu Gly Thr
Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg Met Glu Leu Ser Met Gly
Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln
Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu
Asn Ile Leu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser
Glu Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe Ser
Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu His Asn Phe Ser
Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu Ile His Arg Ala Leu Gln Leu
Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys
Thr Asn Gly Ala Val Asn Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile
Tyr His Gln Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu
His Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln Arg Asp
Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr His His Asn Val Arg
Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val
Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu
Asp Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro
Asn Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser
Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile Thr Asn
Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu
Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr
Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys
Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu
Asp Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn
Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu Glu
Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp His Arg Gln

【図６３Ａ】

FIG. 63A

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGG
AGCAGTCTTCGTTTCGCCCAGCCAGGAAATCCATGCCCGATTCAGAA
GAGGAGCCAGATCTTACCAAGTGATCTGCAGAGATGAAAAAACGCA
GATGATATACCAGCAACATCAGTCATGGCTGCGCCCTGTGCTCAGAA
GCAACCGGGTGGAATATTGCTGGTGCAACAGTGGCAGGGCACAGTGC
CACTCAGTGCCTGTCAAAAGTTGCAGCGAGCCAAGGTGTTTCAACGG
GGGCACCTGCCAGCAGGCCCTGTACTTCTCAGATTTCGTGTGCCAGTG
CCCCGAAGGATTTGCTGGGAAGTGCTGTGAAATAGATACCAGGGCCA
CGTGCTACGAGGACCAGGGCATCAGCTACAGGGGCACGTGGAGCAC
AGCGGAGAGTGGCGCCGAGTGCACCAACTGGAACAGCAGCGCGTTG
GCCCAGAAGCCCTACAGCGGGCGGAGGCCAGACGCCATCAGGCTGG
GCCTGGGGAACCACAACTACTGCAGAAACCCAGATCGAGACTCAAA
GCCCTGGTGCTACGTCTTTAAGGCGGGGAAGTACAGCTCAGAGTTCT
GCAGCACCCCTGCCTGCTCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGG
AATGGGTCAGCCTACCGTGGCACGCACAGCCTCACCGAGTCGGGTGC
CTCCTGCCTCCCGTGGAATTCCATGATCCTGATAGGCAAGGTTTACAC
AGCACAGAACCCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATAATT
ACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTG
AAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTC
CACCTGCGGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAG
GAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCT
TTGCCAAGCACAGGAGGTCGCCGGGAGAGCGGTTCCTGTGCGGGGGC
ATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGCCCACTGCTTCCAG
GAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAACATA
CCGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAA
TACATTGTCCATAAGGAATTCGATGATGACACTTACGACAATGACAT
TGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGATTCGTCCCGCTGTGCCCAGGAGA
GCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCCGGCGGACCTGCAGCTG
CCGGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAGGC
CTTGTCTCCTTTCTATTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGACT
GTACCCATCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAACAGAACAG
TCACCGACAACATGCTGTGTGCTGGAGACACTCGGAGCGGCGGGCCC
CAGGCAAACTTGCACGACGCCTGCCAGGGCGATTCGGGAGGCCCCCT
GGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGGCATCATCAGCT
GGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACCAAG
GTTACCAACTACCTAGACTGGATTCGTGACAACATGCGACCGTGACC
AGGAACACCCGACTCCTCAAAAGCAAATGAGATCC

【図６３Ｂ】

FIG. 63B

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly Ala Val
Phe Val Ser Pro Ser Gln Glu Ile His Ala Arg Phe Arg Arg Gly Ala Arg Ser Tyr
Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp
Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly
Arg Ala Gln Cys His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn
Gly Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro
Glu Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr Glu
Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser Gly Ala Glu Cys
Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp
Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp
Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser
Thr Pro Ala Cys Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr
Arg Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met
Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu
Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His
Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser
Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe
Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser
Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser
Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly
Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys
Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu
Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg
Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu
Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys
Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn
Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro
Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly
Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg
Asp Asn Met

【図６４Ａ】

FIG. 64A

ATCACTCTCTTTAATCACTACTCACATTAACCTCAACTCCTGCCACAA
TGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAATTCTTGCACTTG
TCACAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCGACAAAGAAAACAAAGAAA
ACACAGCTACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTG
AATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAGGATGCTCAC
ATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACAGCTTC
AGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTGAATTTA
GCTCAAAGCAAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAA
TATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCA
TGTGTGAATATGCAGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAAC
AGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACTTGATAA
TTAAGTGCTTCCCACTTAAAACATATCAGGCCTTCTATTTATTTATTTA
AATATTTAAATTTTATATTTATTGTTGAATGTATGGTTGCTACCTATTG
TAACTATTATTCTTAATCTTAAAACTATAAATATGGATCTTTTATGAT
TCTTTTTGTAAGCCCTAGGGGCTCTAAAATGGTTTACCTTATTTATCC
CAAAAATATTTATTATTATGTTGAATGTTAAATATAGTATCTATGTAG
ATTGGTTAGTAAAACTATTTAATAAATTTGATAAATATAAAAAAAAA
AAACAAAAAAAAAAA

【図６４Ｂ】

FIG. 64B

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu Val Thr Asn
Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
Glu Leu Lys Gln Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser
Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys
Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

【図６５Ａ－１】

FIG. 65A-1

ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCT
GCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCA
TGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAG
ATTTCCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTTCCATTCAACACCTCAGTCGT
GTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTCACGGATCACCTTTTCAACAT
CGCTAAGCCAAGGCCACCCTGGATGGGTCTGCTAGGTCCTACCATCC
AGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCT
TCCCATCCTGTCAGTCTTCATGCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCT
TCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAG
AAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAGCCATACATATGTCTGGCAG
GTCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTAC
CTACTCATATCTTTCTCATGTGGACCTGGTAAAAGACTTGAATTCAGG
CCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAAGGGAGTCTGGCCAAGG
AAAAGACACAGACCTTGCACAAATTTATACTACTTTTTGCTGTATTTG
ATGAAGGGAAAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCA
GGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCCTAAAATGCACACAG
TCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAGGTCTGATTGGATGCCACA
GGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGGCACCACTCCTGAA
GTGCACTCAATATTCCTCGAAGGTCACACATTTCTTGTGAGGAACCAT
CGCCAGGCGTCCTTGGAAATCTCGCCAATAACTTTCCTTACTGCTCAA
ACACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTTGTCATATCTCTT
CCCACCAACATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGT
CCAGAGGAACCCCAACTACGAATGAAAAATAATGAAGAAGCGGAAG
ACTATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTTG
ATGATGACAACTCTCCTTCCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGA
AGCATCCTAAAACTTGGGTACATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGAC
TGGGACTATGCTCCCTTAGTCCTCGCCCCCGATGACAGAAGTTATAAA
AGTCAATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAA
AAAAGTCCGATTTATGGCATACACAGATGAAACCTTTAAGACTCGTG
AAGCTATTCAGCATGAATCAGGAATCTTGGGACCTTTACTTTATGGGG
AAGTTGGAGACACACTGTTGATTATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGA
CCATATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCTTTGTAT
TCAAGGAGATTACCAAAAGGTGTAAAACATTTGAAGGATTTTCCAAT
TCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATAAATGGACAGTGACTGTAGAAG
ATGGGCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTA
GTTTCGTTAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTC
TCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAGAGGAAACCAGATA
ATGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAAC
CGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACAACGCTTTCTCCCCAATCCA
GCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCAT
GCACAGCATCAATGGCTATGTTTTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGTTTG
TTTGCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGA
CTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGATATACCTTCAAACACAAAAT

【図６５Ａ－２】

FIG. 65A-2

GGTCTATGAAGACACACTCACCCTATTCCCATTCTCAGGAGAAACTGT
CTTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACA
ACTCAGACTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTTCT
AGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTATTACGAGGACAGTTATGAAGA
TATTTCAGCATACTTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGAA
GCTTCTCCCAGAATTCAAGACACCGTAGCACTAGGCAAAAGCAATTT
AATGCCACCACAATTCCAGAAAATGACATAGAGAAGACTGACCCTTG
GTTTGCACACAGAACACCTATGCCTAAAATACAAAATGTCTCCTCTA
GTGATTTGTTGATGCTCTTGCGACAGAGTCCTACTCCACATGGGCTAT
CCTTATCTGATCTCCAAGAAGCCAAATATGAGACTTTTTCTGATGATC
CATCACCTGGAGCAATAGACAGTAATAACAGCCTGTCTGAAATGACA
CACTTCAGGCCACAGCTCCATCACAGTGGGGACATGGTATTTACCCC
TGAGTCAGGCCTCCAATTAAGATTAAATGAGAAACTGGGGACAACTG
CAGCAACAGAGTTGAAGAAACTTGATTTCAAAGTTTCTAGTACATCA
AATAATCTGATTTCAACAATTCCATCAGACAATTTGGCAGCAGGTACT
GATAATACAAGTTCCTTAGGACCCCCAAGTATGCCAGTTCATTATGAT
AGTCAATTAGATACCACTCTATTTGGCAAAAAGTCATCTCCCCTTACT
GAGTCTGGTGGACCTCTGAGCTTGAGTGAAGAAAATAATGATTCAAA
GTTGTTAGAATCAGGTTTAATGAATAGCCAAGAAAGTTCATGGGGAA
AAAATGTATCGTCAACAGAGAGTGGTAGGTTATTTAAAGGGAAAAGA
GCTCATGGACCTGCTTTGTTGACTAAAGATAATGCCTATTCAAAGTT
AGCATCTCTTTGTTAAAGACAAACAAAACTTCCAATAATTCAGCAACT
AATAGAAAGACTCACATTGATGGCCCATCATTATTAATTGAGAATAG
TCCATCAGTCTGGCAAAATATATTAGAAAGTGACACTGAGTTTAAAA
AAGTGACACCTTTGATTCATGACAGAATGCTTATGGACAAAAATGCT
ACAGCTTTGAGGCTAAATCATATGTCAAATAAAACTACTTCATCAAA
AAACATGGAAATGGTCCAACAGAAAAAAGAGGGCCCCATTCCACCA
GATGCACAAAATCCAGATATGTCGTTCTTTAAGATGCTATTCTTGCCA
GAATCAGCAAGGTGGATACAAAGGACTCATGGAAAGAACTCTCTGAA
CTCTGGGCAAGGCCCCAGTCCAAAGCAATTAGTATCCTTAGGACCAG
AAAAATCTGTGGAAGGTCAGAATTTCTTGTCTGAGAAAAACAAAGTG
GTAGTAGGAAAGGGTGAATTTACAAAGGACGTAGGACTCAAAGAGA
TGGTTTTTCCAAGCAGCAGAAACCTATTTCTTACTAACTTGGATAATT
TACATGAAAATAATACACACAATCAAGAAAAAAAAATTCAGGAAGA
AATAGAAAAGAAGGAAACATTAATCCAAGAGAATGTAGTTTTGCCTC
AGATACATACAGTGACTGGCACTAAGAATTTCATGAAGAACCTTTC
TTACTGAGCACTAGGCAAAATGTAGAAGGTTCATATGACGGGGCATA
TGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATTAAATGATTCAACAAATAG
AACAAAGAAACACACAGCTCATTTCTCAAAAAAAGGGGAGGAAGAA
AACTTGGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAGCAAATTGTAGAGAAATAT
GCATGCACCACAAGGAATATCTCCTAATACAAGCCAGCAGAATTTTG
TCACGCAACGTAGTAAGAGAGCTTTGAAACAATTCAGACTCCCACTA

【図６５Ａ－３】

FIG. 65A-3

GAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAATTGTGGATGACACCTCAAC
CCAGTGGTCCAAAAACATGAAACATTTGACCCCGAGCACCCTCACAC
AGATAGACTACAATGAGAAGGAGAAAGGGGCCATTACTCAGTCTCCC
TTATCAGATTGCCTTACGAGGAGTCATAGCATCCCTCAAGCAAATAGA
TCTCCATTACCCATTGCAAAGGTATCATCATTTCCATCTATTAGACCTA
TATATCTGACCAGGGTCCTATTCCAAGACAACTCTTCTCATCTTCCAG
CAGCATCTTATAGAAAGAAAGATTCTGGGGTCCAAGAAAGCAGTCAT
TTCTTACAAGGAGCCAAAAAAAATAACCTTTCTTTAGCCATTCTAACC
TTGGAGATGACTGGTGATCAAAGAGAGGTTGGCTCCCTGGGGACAAG
TGCCACAAATTCAGTCACATACAAGAAAGTTGAGAACACTGTTCTCCC
GAAACCAGACTTGCCCAAAACATCTGGCAAAGTTGAATTGCTTCCAA
AAGTTCACATTTATCAGAAGGACCTATTCCCTACGGAAACTAGCAATG
GGTCTCCTGGCCATCTGGATCTCGTGGAAGGGAGCCTTCTTCAGGGAA
CAGAGGGAGCGATTAAGTGGAATGAAGCAAACAGACCTGGAAAAGT
TCCCTTTCTGAGAGTAGCAACAGAAAGCTCTGCAAAGACTCCCTCCAA
GCTATTGGATCCTCTTGCTTGGGATAACCACTATGGTACTCAGATACC
AAAAGAAGAGTGGAAATCCCAAGAGAAGTCACCAGAAAAAACAGCT
TTTAAGAAAAAGGATACCATTTTGTCCCTGAACGCTTGTGAAAGCAAT
CATGCAATAGCAGCAATAAATGAGGGACAAAATAAGCCCGAAATAG
AAGTCACCTGGGCAAAGCAAGGTAGGACTGAAAGGCTGTGCTCTCAA
AACCCACCAGTCTTGAAACGCCATCAACGGGAAATAACTCGTACTAC
TCTTCAGTCAGATCAAGAGGAAATTGACTATGATGATACCATATCAGT
TGAAATGAAGAAGGAAGATTTTGACATTTATGATGAGGATGAAAATC
AGAGCCCCCGCAGCTTTCAAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTG
CAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCCACATGTT
CTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGT
TGTTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTTACTCAGCCCTTATACCGT
GGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCCTGGGGCCATATATAAGAGC
AGAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACTTTCAGAAATCAGGCCTCTC
GTCCCTATTCCTTCTATTCTAGCCTTATTTCTTATGAGGAAGATCAGAG
GCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAACTTGTCAAGCCTAATGAAACCA
AAACTTACTTTTGGAAAGTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGAT
GAGTTTGACTGCAAAGCCTGGGCTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGAA
AAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTTCTGGTCTGCCACACT
AACACACTGAACCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATT
TGCTCTGTTTTTCACCATCTTTGATGAGACCAAAAGCTGGTACTTCACT
GAAAATATGGAAAGAAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGA
AGATCCCACTTTTAAAGAGAATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTA
CATAATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGA
TTCGATGGTATCTGCTCAGCATGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCT
ATTCATTTCAGTGGACATGTGTTCACTGTACGAAAAAAAGAGGAGTA
TAAAATGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTGTTTTTGAGACAGTGGA

【図６５Ａ－４】

FIG. 65A-4

AATGTTACCATCCAAAGCTGGAATTTGGCGGGTGGAATGCCTTATTGG
CGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTTCTGGTGTACAGCAA
TAAGTGTCAGACTCCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTT
TCAGATTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGGCCCCAAAGCTGG
CCAGACTTCATTATTCCGGATCAATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAG
CCCTTTCTTGGATCAAGGTGGATCTGTTGGCACCAATGATTATTCAC
GGCATCAAGACCCAGGGTGCCCGTCAGAAGTTCTCCAGCCTCTACAT
CTCTCAGTTTATCATCATGTATAGTCTTGATGGGAAGAAGTGGCAGA
CTTATCGAGGAAATTCCACTGGAACCTTAATGGTCTTCTTTGGCAATG
TGGATTCATCTGGGATAAAACACAATATTTTTAACCCTCCAATTATTG
CTCGATACATCCGTTTGCACCCAACTCATTATAGCATTCGCAGCACTC
TTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATTTAAATAGTTGCAGCATGCCAT
TGGGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCTTCA
TCCTACTTTACCAATATGTTTGCCACCTGGTCTCCTTCAAAAGCTCGA
CTTCACCTCCAAGGGAGGAGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGAATAA
TCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCA
CAGGAGTAACTACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTAT
GTGAAGGAGTTCCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGAC
TCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAGGTTTTTCAGGGAAATCAAGA
CTCCTTCACACCTGTGGTGAACTCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCG
CTACCTTCGAATTCACCCCCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAG
GATGGAGGTTCTGGGCTGCGAGGCACAGGACCTCTACTGAGGGTGGC
CACTGCAGCACCTGCCACTGCCGTCACCTCTCCCTCCTCAGCTCCAGG
GCAGTGTCCCTCCCTGGCTTGCCTTCTACCTTTGTGCTAAATCCTAGC
AGACACTGCCTTGAAGCCTCCTGAATTAACTATCATCAGTCCTGCATT
TCTTTGGTGGGGGGCCAGGAGGGTGCATCCAATTTAACTTAACTCTTA
CCTATTTTCTGCAGCTGCTCCCAGATTACTCCTTCCTTCCAATATAACT
AGGCAAAAAGAAGTGAGGAGAAACCTGCATGAAAGCATTCTTCCCTG
AAAAGTTAGGCCTCTCAGAGTCACCACTTCCTCTGTTGTAGAAAAACT
ATGTGATGAAACTTTGAAAAAGATATTTATGATGTTAACATTTCAGGT
TAAGCCTCATACGTTTAAAATAAAACTCTCAGTTGTTTATTATCCTGA
TCAAGCATGGAACAAAGCATGTTTCAGGATCAGATCAATACAATCTT
GGAGTCAAAAGGCAAATCATTTGGACAATCTGCAAAATGGAGAGAA
TACAATAACTACTACAGTAAAGTCTGTTTCTGCTTCCTTACACATAGA
TATAATTATGTTATTTAGTCATTATGAGGGGCACATTCTTATCTCCAA
AACTAGCATTCTTAAACTGAGAATTATAGATGGGGTTCAAGAATCCC
TAAGTCCCCTGAAATTATATAAGGCATTCTGTATAAATGCAAATGTGC
ATTTTTCTGACGAGTGTCCATAGATATAAAGCCATTTGGTCTTAATTCT
GACCAATAAAAAAATAAGTCAGGAGGATGCAATTGTTGAAAGCTTTG
AAATAAAATAACAATGTCTTCTTGAAATTTGTGATGGCCAAGAAAGA
AAATGATGA

【図６５Ｂ－１】

FIG. 65B-1

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe Cys Phe Ser
Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr Met Gln Ser
Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe
Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His
Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile
Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro
Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr
Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly
Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro
Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn
Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys
Thr Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser
Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg
Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu
Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro
Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln
Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp
Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met Glu
Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn
Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val
Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys
Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr
Ala Pro Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro
Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg
Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile
Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg
Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser
Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn
Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg
Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln
Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys
His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val
Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe
Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr
Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn
Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Arg Ser Thr Arg Gln
Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp

【図６５Ｂ－２】

FIG. 65B-2

Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu
Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu
Ala Lys Tyr Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly Thr Thr
Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu
Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu
Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly
Lys Lys Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn
Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp Gly
Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Gly Lys Arg Ala His Gly
Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu
Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp
Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser
Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser
Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala
Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg
Trp Ile Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro
Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe Leu
Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly
Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp
Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile
Glu Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr
Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg Gln
Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg
Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys
Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val
Glu Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe
Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu Glu
Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn
Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu
Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile
Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser Ile
Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro
Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu
Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr
Gly Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr
Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr Ser
Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe Pro
Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu

【図６５Ｂ－３】

FIG. 65B-3

Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys
Val Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu
Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu Glu
Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile
Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly
Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg
Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg
Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu
Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg
Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp
Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val
Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro
Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg
Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro
Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu
Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr
Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu
Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln
Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr
Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro
Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly
Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys
Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr
Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu
His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr
Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln
Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala
Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile
Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly
Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile
Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr
His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn
Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr
Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu
His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu
Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln
Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser
Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu
Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His

【図６５Ｂ－４】

FIG.65B-4

Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu
Ala Gln Asp Leu Tyr

【図６６Ａ】

FIG. 66A

TCCACCTGTCCCCGCAGCGCCGGCTCGCGCCCTCCTGCCGCAGCCACC
GAGCCGCCGTCTAGCGCCCCGACCTCGCCACCATGAGAGCCCTGCTG
GCGCGCCTGCTTCTCTGCGTCCTGGTCGTGAGCGACTCCAAAGGCAGC
AATGAACTTCATCAAGTTCCATCGAACTGTGACTGTCTAAATGGAGGA
ACATGTGTGTCCAACAAGTACTTCTCCAACATTCACTGGTGCAACTGC
CCAAAGAAATTCGGAGGGCAGCACTGTGAAATAGATAAGTCAAAAAC
CTGCTATGAGGGGAATGGTCACTTTTACCGAGGAAAGGCCAGCACTG
ACACCATGGGCCGGCCCTGCCTGCCCTGGAACTCTGCCACTGTCCTTC
AGCAAACGTACCATGCCCACAGATCTGATGCTCTTCAGCTGGGCCTGG
GGAAACATAATTACTGCAGGAACCCAGACAACCGGAGGCGACCCTGG
TGCTATGTGCAGGTGGGCCTAAAGCCGCTTGTCCAAGAGTGCATGGT
GCATGACTGCGCAGATGGAAAAAAGCCCTCCTCTCCTCCAGAAGAAT
TAAAATTTCAGTGTGGCCAAAAGACTCTGAGGCCCCGCTTTAAGATTA
TTGGGGGAGAATTCACCACCATCGAGAACCAGCCCTGGTTTGCGGCC
ATCTACAGGAGGCACCGGGGGGGCTCTGTCACCTACGTGTGTGGAGG
CAGCCTCATCAGCCCTTGCTGGGTGATCAGCGCCACACACTGCTTCAT
TGATTACCCAAAGAAGGAGGACTACATCGTCTACCTGGGTCGCTCAA
GGCTTAACTCCAACACGCAAGGGGAGATGAAGTTTGAGGTGGAAAAC
CTCATCCTACACAAGGACTACAGCGCTGACACGCTTGCTCACCACAAC
GACATTGCCTTGCTGAAGATCCGTTCCAAGGAGGGCAGGTGTGCGCA
GCCATCCCGGACTATACAGACCATCTGCCTGCCCTCGATGTATAACGA
TCCCCAGTTTGGCACAAGCTGTGAGATCACTGGCTTTGGAAAAGAGA
ATTCTACCGACTATCTCTATCCGGAGCAGCTGAAGATGACTGTTGTGA
AGCTGATTTCCCACCGGGAGTGTCAGCAGCCCCACTACTACGGCTCTG
AAGTCACCACCAAAATGCTGTGTGCTGCTGACCCACAGTGGAAAACA
GATTCCTGCCAGGGAGACTCAGGGGGACCCCTCGTCTGTTCCCTCCAA
GGCCGCATGACTTTGACTGGAATTGTGAGCTGGGGCCGTGGATGTGC
CCTGAAGGACAAGCCAGGCGTCTACACGAGAGTCTCACACTTCTTAC
CCTGGATCCGCAGTCACACCAAGGAAGAGAATGGCCTGGCCCTCTGA
GGGTCCCCAGGGAGGAAACGGGCACCACCCGCTTTCTTGCTGGTTGTC
ATTTTTGCAGTAGAGTCATCTCCATCAGCTGTAAGAAGAGACTGGGA
AGAT

【図６６Ｂ】

FIG. 66B

Met Arg Ala Leu Leu Ala Arg Leu Leu Leu Cys Val Leu Val Val Ser Asp Ser
Lys Gly Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp Cys Leu Asn Gly
Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys
Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn
Gly His Phe Tyr Arg Gly Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro
Trp Asn Ser Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu
Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg Arg Arg
Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln Glu Cys Met Val His
Asp Cys Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu Glu Leu Lys Phe Gln Cys
Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile
Glu Asn Gln Pro Trp Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr
Tyr Val Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala Thr His Cys
Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val Tyr Leu Gly Arg Ser Arg Leu
Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys Phe Glu Val Glu Asn Leu Ile Leu His Lys
Asp Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Ala His His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg
Ser Lys Glu Gly Arg Cys Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro
Ser Met Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys
Glu Asn Ser Thr Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val Val Lys
Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly Ser Glu Val Thr Thr
Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp
Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu Gln Gly Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val
Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Leu Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser
His Phe Leu Pro Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu

【図６７Ａ】

FIG.67A

TCCTGCACAGGCAGTGCCTTGAAGTGCTTCTTCAGAGACCTTTCTTCA
TAGACTACTTTTTTTTCTTTAAGCAGCAAAAGGAGAAAATTGTCATCA
AGGATATTCCAGATTCTTGACAGCATTCTCGTCATCTCTGAGGACATC
ACCATCATCTCAGGATGAGGGGCATGAAGCTGCTGGGGGCGCTGCTG
GCACTGGCGGCCCTACTGCAGGGGGCCGTGTCCCTGAAGATCGCAGC
CTTCAACATCCAGACATTTGGGGAGACCAAGATGTCCAATGCCACCCT
CGTCAGCTACATTGTGCAGATCCTGAGCCGCTATGACATCGCCCTGGT
CCAGGAGGTCAGAGACAGCCACCTGACTGCCGTGGGGAAGCTGCTGG
ACAACCTCAATCAGGATGCACCAGACACCTATCACTACGTGGTCAGT
GAGCCACTGGGACGGAACAGCTATAAGGAGCGCTACCTGTTCGTGTA
CAGGCCTGACCAGGTGTCTGCGGTGGACAGCTACTACTACGATGATG
GCTGCGAGCCCTGCGGGAACGACACCTTCAACCGAGAGCCAGCCATT
GTCAGGTTCTTCTCCCGGTTCACAGAGGTCAGGGAGTTTGCCATTGTT
CCCCTGCATGCGGCCCCGGGGGACGCAGTAGCCGAGATCGACGCTCT
CTATGACGTCTACCTGGATGTCCAAGAGAAATGGGGCTTGGAGGACG
TCATGTTGATGGGCGACTTCAATGCGGGCTGCAGCTATGTGAGACCCT
CCCAGTGGTCATCCATCCGCCTGTGGACAAGCCCCACCTTCCAGTGGC
TGATCCCCGACAGCGCTGACACCACAGCTACACCCACGCACTGTGCCT
ATGACAGGATCGTGGTTGCAGGGATGCTGCTCCGAGGCGCCGTTGTTC
CCGACTCGGCTCTTCCCTTTAACTTCCAGGCTGCCTATGGCCTGAGTG
ACCAACTGGCCCAAGCCATCAGTGACCACTATCCAGTGGAGGTGATG
CTGAAGTGAGCAGCCCCTCCCCACACCAGTTGAACTGCAG

【図６７Ｂ】

FIG. 67B

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu Leu Gln
Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys
Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile
Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu
Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro
Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln
Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn
Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val
Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile
Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp
Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln
Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser
Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly
Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln
Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val
Glu Val Met Leu Lys

【図６８Ａ】

FIG. 68A

GCTGCATCAGAAGAGGCCATCAAGCACATCACTGTCCTTCTGCCATGG
CCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTCTGGG
GACCTGACCCAGCCGCAGCCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCAC
ACCTGGTGGAAGCTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCT
ACACACCCAAGACCCGCCGGGAGGCAGAGGACCTGCAGGTGGGGCA
GGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTGG
CCCTGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGT
ACCAGCATCTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAGACG
CAGCCCGCAGGCAGCCCCCCACCCGCCGCCTCCTGCACCGAGAGAGA
TGGAATAAAGCCCTTGAACCAGC

【図６８Ｂ】

FIG. 68B

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Trp Gly
Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val
Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile
Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

【図６９Ａ】

FIG. 69A

ATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGACAAGGCATGGGGACGAATCT
TTCTGTTCCCAATCCTCTGGGATTCTTTCCCGATCACCAGTTGGACCCT
GCGTTCGGAGCCAACTCAAACAATCCAGATTGGGACTTCAACCCCAA
CAAGGATCACTGGCCAGAGGCAATCAAGGTAGGAGCGGGAGACTTC
GGGCCAGGGTTCACCCCACCACACGGCGGTCTTTTGGGGTGGAGCCC
TCAGGCTCAGGGCATATTGACAACAGTGCCAGCAGCGCCTCCTCCTG
TTTCCACCAATCGGCAGTCAGGAAGACAGCCTACTCCCATCTCTCCAC
CTCTAAGAGACAGTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAACTCCACAACA
TTCCACCAAGCTCTGCTAGATCCCAGAGTGAGGGGCCTATATTTTCCT
GCTGGTGGCTCCAGTTCCGGAACAGTAAACCCTGTTCCGACTACTGTC
TCACCCATATCGTCAATCTTCTCGAGGACTGGGGACCCTGCACCGAAC
ATGGAGAGCACAACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACA
GGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGTCT
AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAGCACCCACGTG
TCCTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTC
TTGTCCTCCAATTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
ATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTC
TTCTGGACTACCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTACTTCCAGGAA
CATCAACTACCAGCACGGGACCATGCAAGACCTGCACGATTCCTGCT
CAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCTTGTTGCTGTACAAAACCTTCGGAC
GGAAACTGCACTTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGCAAGA
TTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTA
GTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGCAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTT
CAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAACATCT
TGAGTCCCTTTTTACCTCTATTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATAC
ATTTGA

【図６９Ｂ】

FIG. 69B

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro
Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn
Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Ile
Lys Val Gly Ala Gly Asp Phe Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu
Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro
Val Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg
Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu
Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val
Asn Pro Val Pro Thr Thr Val Ser Pro Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr Gly Asp
Pro Ala Pro Asn Met Glu Ser Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu
Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser
Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser
Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr
Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu
Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu
Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala
Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn
Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp
Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Ala
Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro
Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu
Trp Val Tyr Ile

【図７０Ａ】

FIG. 70A

CGAACCACTCAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCTAGCTGCAATGGCTA
CAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGC
CCTGGCTTCAAGAGGGCAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTATCCAGGC
CTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCT
TTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAG
AAGTATTCATTCCTGCAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGTTTCTCAGAG
TCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCAA
CCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGGCTGGA
GCCCGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGG
CGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAG
GCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGACT
GGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAAACTCACA
CAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAG
GAAGGACATGGCAAGGTCGAGACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCG
CTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGCTGCCCGGGTGGCATCCCTG
TGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGT
GCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATC

【図７０Ｂ】

FIG. 70B

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu Cys Leu
Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Pro Phe Asp
Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln
Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr
Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala
Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu
Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr
Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly
Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile
Val Gln CysArg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

【図７１Ａ】

FIG. 71A

ATGGCGCCCGTCGCCGTCTGGGCCGCGCTGGCCGTCGGACTGGAGCT
CTGGGCTGCGGCGCACGCCTTGCCCGCCCAGGTGGCATTTACACCCTA
CGCCCCGGAGCCCGGGAGCACATGCCGGCTCAGAGAATACTATGACC
AGACAGCTCAGATGTGCTGCAGCAAATGCTCGCCGGGCCAACATGCA
AAAGTCTTCTGTACCAAGACCTCGGACACCGTGTGTGACTCCTGTGAG
GACAGCACATACACCCAGCTCTGGAACTGGGTTCCCGAGTGCTTGAG
CTGTGGCTCCCGCTGTAGCTCTGACCAGGTGGAAACTCAAGCCTGCAC
TCGGGAACAGAACCGCATCTGCACCTGCAGGCCCGGCTGGTACTGCG
CGCTGAGCAAGCAGGAGGGGTGCCGGCTGTGCGCGCCGCTGCGCAAG
TGCCGCCCGGGCTTCGGCGTGGCCAGACCAGGAACTGAAACATCAGA
CGTGGTGTGCAAGCCCTGTGCCCCGGGGACGTTCTCCAACACGACTTC
ATCCACGGATATTTGCAGGCCCCACCAGATCTGTAACGTGGTGGCCAT
CCCTGGGAATGCAAGCATGGATGCAGTCTGCACGTCCACGTCCCCCA
CCCGGAGTATGGCCCCAGGGGCAGTACACTTACCCCAGCCAGTGTCC
ACACGATCCCAACACACGCAGCCAACTCCAGAACCCAGCACTGCTCC
AAGCACCTCCTTCCTGCTCCCAATGGGCCCCAGCCCCCCAGCTGAAGG
GAGCACTGGCGACTTCGCTCTTCCAGTTGGACTGATTGTGGGTGTGAC
AGCCTTGGGTCTACTAATAATAGGAGTGGTGAACTGTGTCATCATGAC
CCAGGTGAAAAAGAAGCCCTTGTGCCTGCAGAGAGAAGCCAAGGTGC
CTCACTTGCCTGCCGATAAGGCCCGGGGTACACAGGGCCCCGAGCAG
CAGCACCTGCTGATCACAGCGCCGAGCTCCAGCAGCAGCTCCCTGGA
GAGCTCGGCCAGTGCGTTGGACAGAAGGGCGCCCACTCGGAACCAGC
CACAGGCACCAGGCGTGGAGGCCAGTGGGGCCGGGGAGGCCCGGGC
CAGCACCGGGAGCTCAGATTCTTCCCCTGGTGGCCATGGGACCCAGG
TCAATGTCACCTGCATCGTGAACGTCTGTAGCAGCTCTGACCACAGCT
CACAGTGCTGCTCCCAAGCCAGCTCCACAATGGGAGACACAGATTCC
AGCCCCTCGGAGTCCCCGAAGGACGAGCAGGTCCCCTTCTCCAAGGA
GGAATGTGCCTTTCGGTCACAGCTGGAGACGCCAGAGACCCTGCTGG
GGAGCACCGAAGAGAAGCCCCTGCCCCTTGGAGTGCCTGATGCTGGG
ATGAAGCCCAGTTAACCAGGCCGGTGTGGGCTGTGTCGTAGCCAAGG
TGGGCTGAGCCCTGGCAGGATGACCCTGCGAAGGGGCCCTGGTCCTT
CCAGGC

【図７１Ｂ】

FIG. 71B

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu Trp Ala Ala
Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys
Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys
Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys
Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln
Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr
Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val
Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr
Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln
His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro
Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly
Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val
Ile Met Thr Gln Val Lys Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro
His Leu Pro Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Ala Leu Asp Arg
Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly
Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln
Val Asn Val Thr Cys Ile Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys
Ser Ser Gln Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser Gln Leu Glu
Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro Leu Pro Leu Gly Val Pro
Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser

【図７２Ａ】

FIG. 72A

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

【図７２Ｂ】

FIG. 72B

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr
Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

【図７３Ａ】

FIG. 73A

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr
Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp
Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp
Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

【図７３Ｂ】

FIG. 73B

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

【図７４Ａ】

FIG. 74A

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGA
GAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGTTCGTTGGCTCAAGC
ATCCACTGGTATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATA
AAGTATGCTTCTGAGTCTATGTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGTGGC
AGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACACTGTGGAGTCT
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTCATAGCTGGCCATTC
ACGTTCGGCTCGGGGACAAATTTGGAAGTAAAAGAAGTGAAGCTTGA
GGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCT
CCTGTGTTGCCTCTGGATTCATTTTCAGTAACCACTGGATGAACTGGG
TCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGA
TCAAAATCTATTAATTCTGCAACACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGG
AGGTTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTGCTGTCTACCTGCAA
ATGACCGACTTAAGAACTGAAGACACTGGCGTTTATTACTGTTCCAGG
AATTACTACGGTAGTACCTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTC
ACAGTCTCC

【図７４Ｂ】

FIG. 74B

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val
Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln
Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly
Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
Thr Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Trp Pro
Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Val Lys Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser
Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
Phe Ile Phe Ser Asn His Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ala Val Tyr
LeuGln Met Thr Asp Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

【図７５Ａ】

FIG. 75A

ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCA
GGTTCCACTGGTGACGTCAGGCGAGGGCCCCGGAGCCTGCGGGGCAG
GGACGCGCCAGCCCCCACGCCCTGCGTCCCGGCCGAGTGCTTCGACC
TGCTGGTCCGCCACTGCGTGGCCTGCGGGCTCCTGCGCACGCCGCGGC
CGAAACCGGCCGGGGCCAGCAGCCCTGCGCCCAGGACGGCGCTGCAG
CCGCAGGAGTCGGTGGGCGCGGGGGCCGGCGAGGCGGCGGTCGACA
AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA
CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA
TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCCGGGAAATGA

【図７５Ｂ】

FIG. 75B

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser
Thr Gly Asp Val Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala
Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val Ala
Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro
Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Val
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

【図７６】

FIG. 76

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val
Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro Asp Gly Ile Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

【図７７】

FIG. 77

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gly Pro Gly Thr Ser Val Arg
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys
Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly
Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe
Cys Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
Leu Val Thr Val Ser Ala

【図７８】

FIG. 78

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu
Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys

【図７９】

FIG. 79

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly
Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser
Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
Phe Cys Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

【図８０】

FIG. 80

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu
Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

【図８１】

FIG. 81

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly
Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser
Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
Phe Cys Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

【図８２Ａ】

FIG. 82A

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCA
GTCATAATGTCCAGAGGGCAAATTGTTCTCTCCCAGTCTCCAGCAATC
CTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAG
CTCAAGTGTAAGTTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTC
CCCCAAACCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCC
TGTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAAT
CAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGT
GGACTAGTAACCCACCCACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATC
AAA

【図８２Ｂ】

FIG. 82B

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser
Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu
Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln
Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn
Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

【図８３Ａ】

FIG. 83A

ATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTCGCTGTTGCTACGCGTG
TCCTGTCCCAGGTACAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAG
CCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTT
ACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGTCGGGGCCT
GGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCCTACAA
TCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCA
GCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCG
GTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTC
AATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTGCA

【図８３Ｂ】

FIG. 83B

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg Val Leu Ser
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys
Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp
Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly
Thr Thr Val Thr Val Ser Ala

【図８４Ａ】

FIG. 84A

CAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTG
ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG
AGCTGGGTACGTCCTCACATTCAGTGATCAGCACTGAACACAGACCC
GTCGACATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTCGCTGTTGCTA
CGCGTGTCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCT
CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGC
CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA
AGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACA
TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGACTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAGGAACCAGGTCAGCCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
TAAATGAGGATCCGTTAACGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCGTG
ACAACATGCGGCCGTGATATCTACGTATGATCAGCCTCGACTGTGCCT
TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA
CCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA
TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGG
TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA
TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGCTCGACAGC
GCTGGATCTCCCGATCCCCAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCATA
ATGAGAAAAAAAGGAAAATTAATTTTAACACCAATTCAGTAGTTGAT
TGAGCAAATGCGTTGCCAAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTTCTCT
GCACAGATAAGGACAAACATTATTCAGAGGGAGTACCCAGAGCTGAG
ACTCCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTT
GTCATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACCTTGGTAAGGGCC
AATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCAT
ATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTCTGACATAG
TTGTGTTGGGAGCTTGGATAGCTTGGACAGCTCAGG

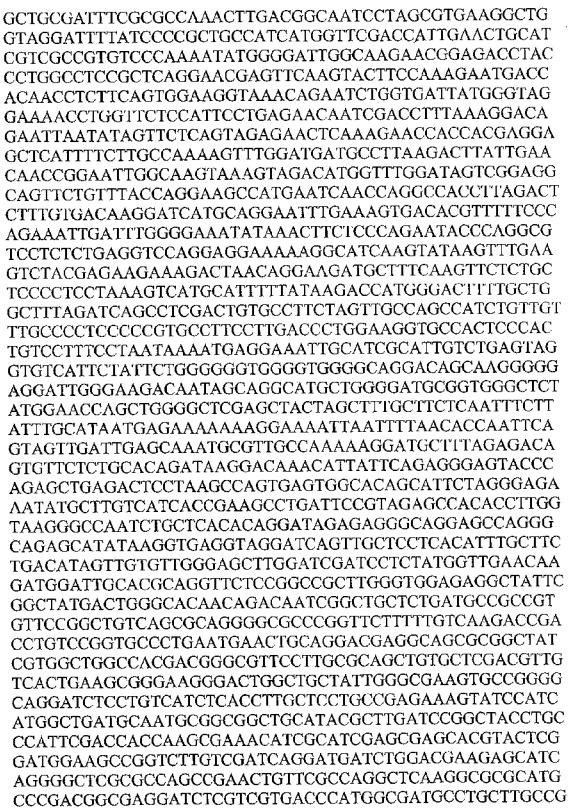
【図８４Ｂ】

FIG. 84B

CAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTG
ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG
AGCTGGGTACGTCCTCACATTCAGTGATCAGCACTGAACACAGACCC
GTCGACATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTCGCTGTTGCTA
CGCGTGTCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCT
CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGC
CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA
AGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACA
TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGACTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAGGAACCAGGTCAGCCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
TAAATGAGGATCCGTTAACGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCGTG
ACAACATGCGGCCGTGATATCTACGTATGATCAGCCTCGACTGTGCCT
TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA
CCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA
TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGG
TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA
TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGCTCGAGCAGC
GCTGGATCTCCCGATCCCCAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCATA
ATGAGAAAAAAAGGAAAATTAATTTTAACACCAATTCAGTAGTTGAT
TGAGCAAATGCGTTGCCAAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTTCTCT
GCACAGATAAGGACAAACATTATTCAGAGGGAGTACCCAGAGCTGAG
ACTCCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTT
GTCATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACCTTGGTAAGGGCC
AATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCAT
ATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTCTGACATAG
TTGTGTTGGGAGCTTGGATAGCTTGGACAGCTCAGG

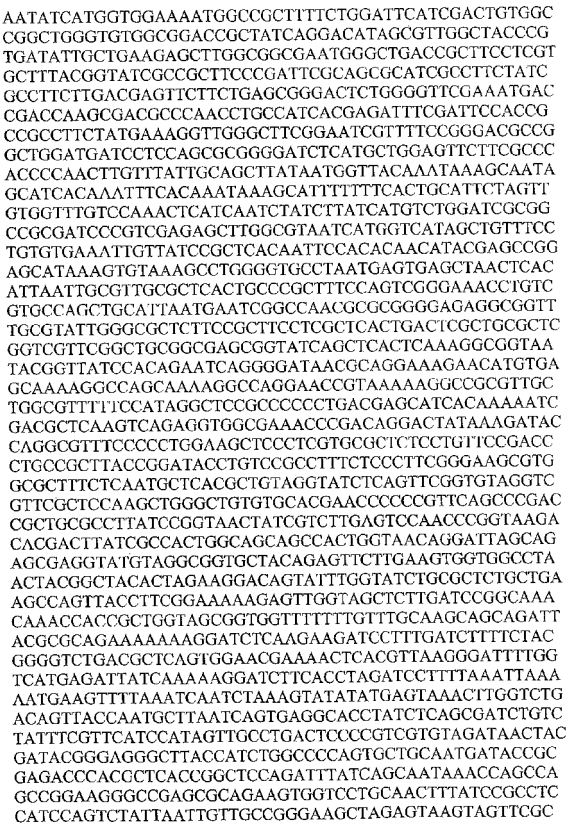
【図８４Ｃ】

FIG. 84C



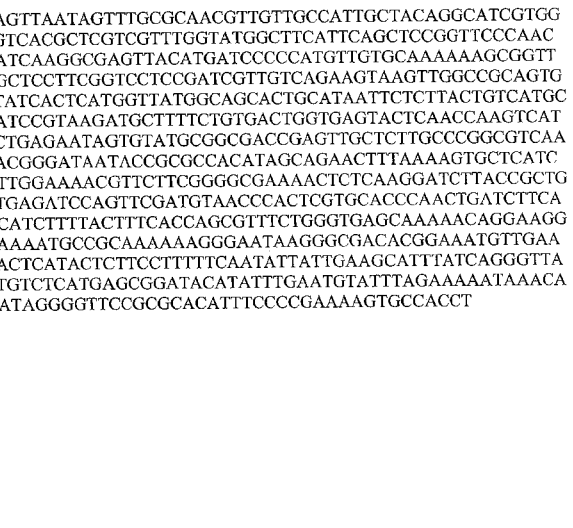
【図８４Ｄ】

FIG. 84D



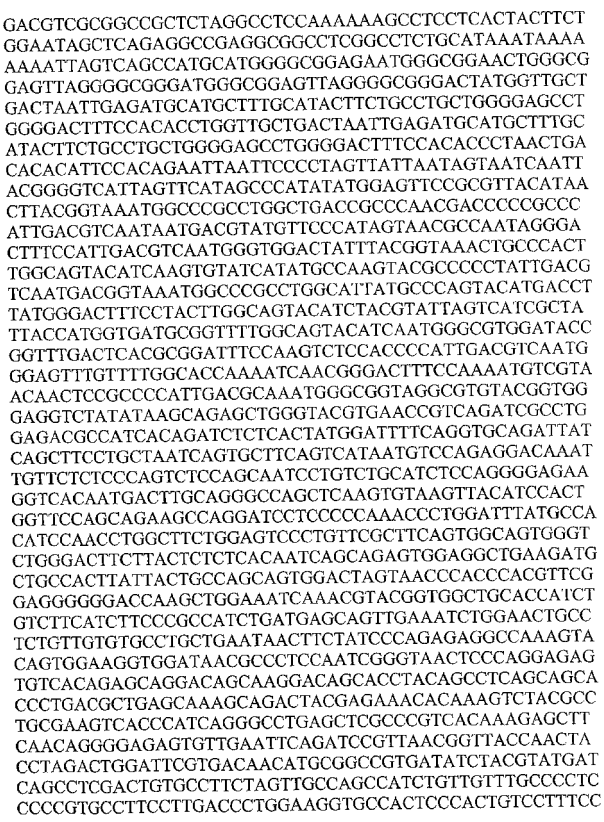
【図８４Ｅ】

FIG. 84E



【図８５Ａ】

FIG. 85A



【図８５Ｂ】

FIG. 85B

TAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT
ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCA
GCTGGGGCTCGACAGCTATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG
ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTG
ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTT
TGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACT
CCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC
TATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCCTCACATTCAGTGATCAGCACTGA
ACACAGACCCGTCGACATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGT
CGCTGTTGCTACGCGTGTCCTGTCCCAGGTACAACTGCAGCAGCCTGG
GGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGG
CTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGA
CACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAAT
GGTGATACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGAC
TGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGA
CATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACG
GCGGTGACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACC
GTCTCTGCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAG
GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
AAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACAC
ATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT
CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG
TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT
GCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAATGAGGATCCGTTAACGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCGT

【図８５Ｃ】

FIG. 85C

GACAACATGCGGCCGTGATATCTACGTATGATCAGCCTCGACTGTGCC
TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTG
ACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAA
ATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG
GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGC
ATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGCTCGACAG
CGCTGGATCTCCCGATCCCCAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCAT
AATGAGAAAAAAAGGAAAATTAATTTTAACACCAATTCAGTAGTTGA
TTGAGCAAATGCGTTGCCAAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTTCTCT
GCACAGATAAGGACAAACATTATTCAGAGGGAGTACCCAGAGCTGAG
ACTCCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTT
GTCATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACCTTGGTAAGGGCC
AATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCAT
ATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTCTGACATAG
TTGTGTTGGGAGCTTGGATAGCTTGGACAGCTCAGGGCTGCGATTTCG
CGCCAAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATC
CCCGCTGCCATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCC
CAAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCT
CAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAG
TGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTC
TCCATTCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTT
CTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGC
CAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGG
CAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGTTCTGTTTACC
AGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTTAGACTCTTTGTGACAAGG
ATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTTG
GGGAAATATAAACTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTCCTCTCTGA
GGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACGAGA
AGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCCTCCTAA
AGCTATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATCA
GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCC
CCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTA
ATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTAT
TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA
GACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGC
TGGGGCTCGAGCTACTAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCATAATG
AGAAAAAAAGGAAAATTAATTTTAACACCAATTCAGTAGTTGATTGA
GCAAATGCGTTGCCAAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTTCTCTGCA
CAGATAAGGACAAACATTATTCAGAGGGAGTACCCAGAGCTGAGACT
CCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTTGTC
ATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACCTTGGTAAGGGCCAAT
CTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCATATA
AGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTCTGACATAGTTG

【図８５Ｄ】

FIG. 85D

TGTTGGGAGCTTGGATCGATCCTCTATGGTTGAACAAGATGGATTGCA
CGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTG
GGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTC
AGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGC
CCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCA
CGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGG
GAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTG
TCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCA
ATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCAC
CAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGG
TCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGC
CAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAG
GATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTG
GAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTG
GCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGA
AGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTAT
CGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGA
GTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGAC
GCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGA
AAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCT
CCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTT
TATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT
CACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAA
ACTCATCAATCTATCTTATCATGTCTGGATCGCGGCCGCGATCCCGTC
GAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGT
TATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
TAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT
GCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCA
TTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGC
GCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCT
GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCA
CAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA
GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
ATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGT
CAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCC
CCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTAC
CGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCA
ATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAA
GCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTT
ATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATC

【図８５Ｅ】

FIG. 85E

GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG
TAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC
TTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGC
TGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA
AAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
TCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC
AAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAA
ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG
CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCC
ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
CTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTC
ACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCG
AGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTA
ATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC
GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGT
TTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA
CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTC
CGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTA
TGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCT
TTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTA
TGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACC
GCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCT
TCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCG
ATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCA
CCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAA
AAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCT
TTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG
ATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGC
GCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT

【図８６】

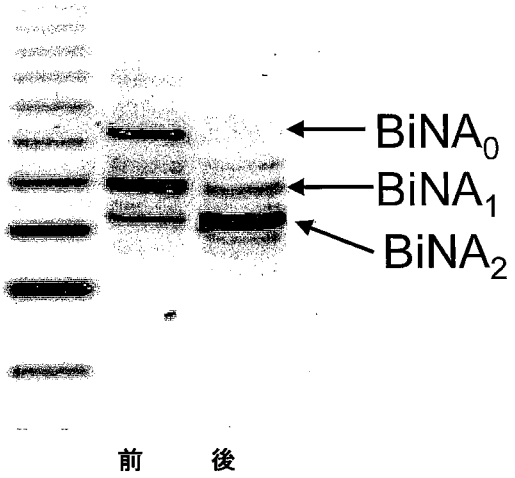


FIG. 86

【図８７】

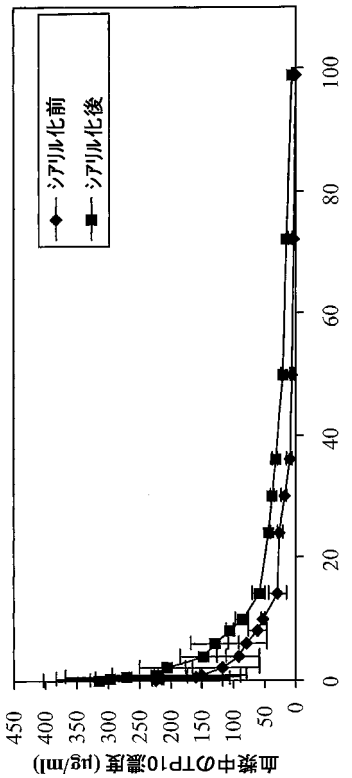


FIG. 87

【図８８】

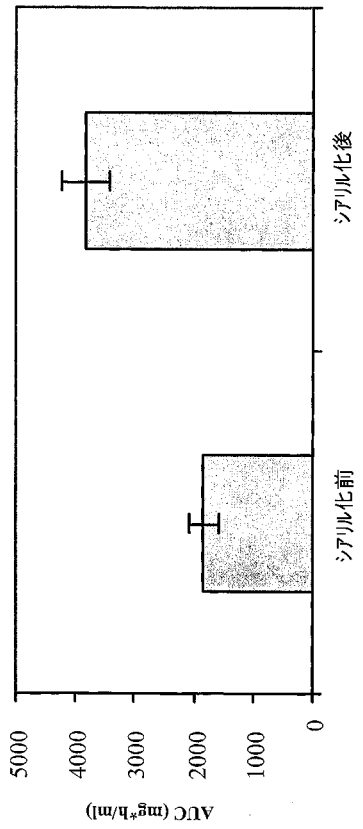


FIG. 88

【図８９】

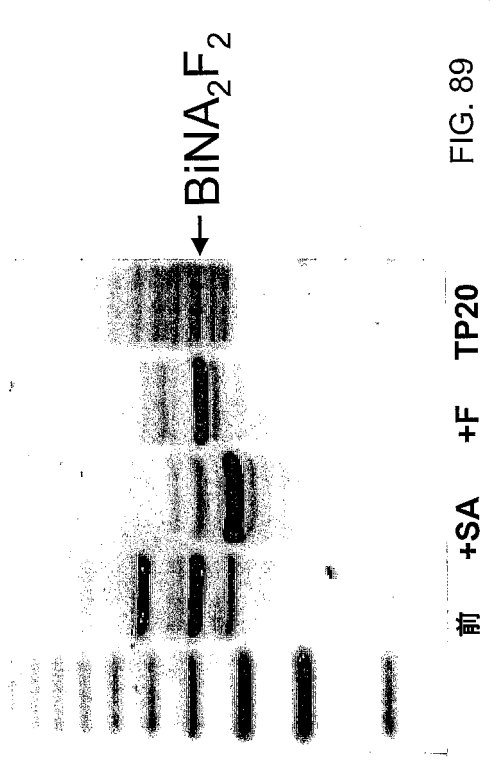


FIG. 89

【図９０】

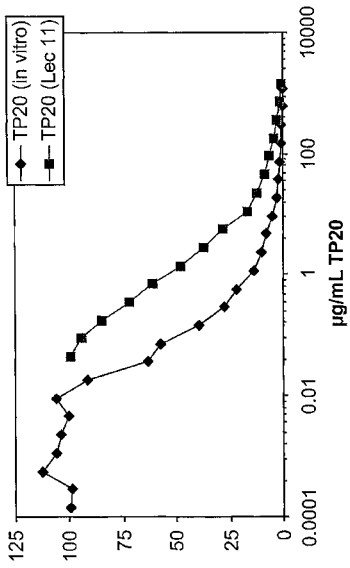


FIG. 90

【図９１】

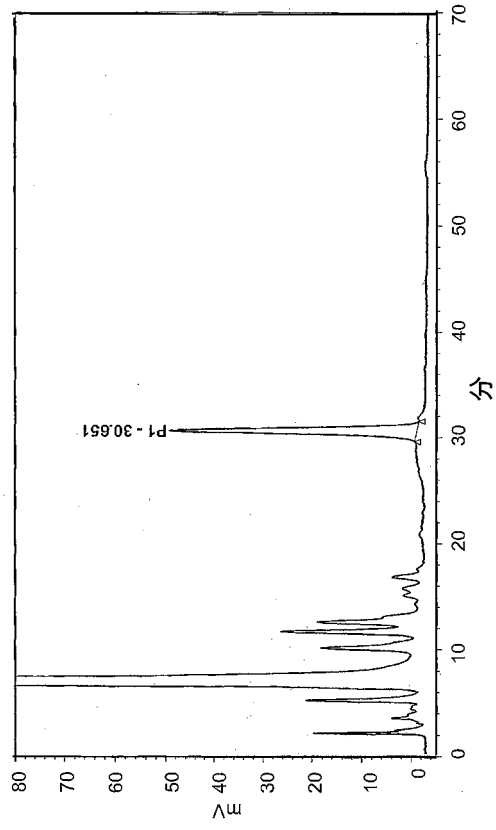


FIG. 91

【図９２Ａ】

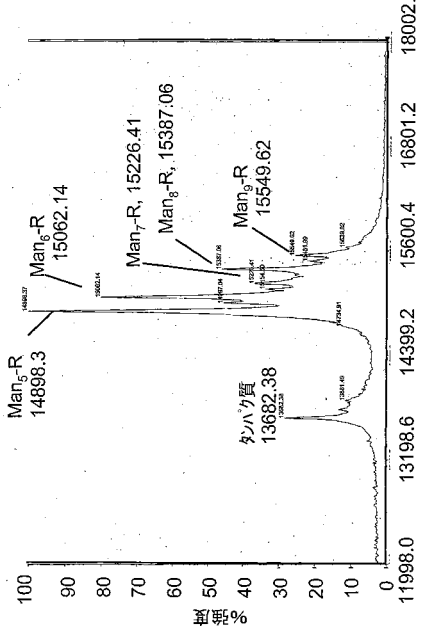


FIG. 92A

【図９２Ｂ】

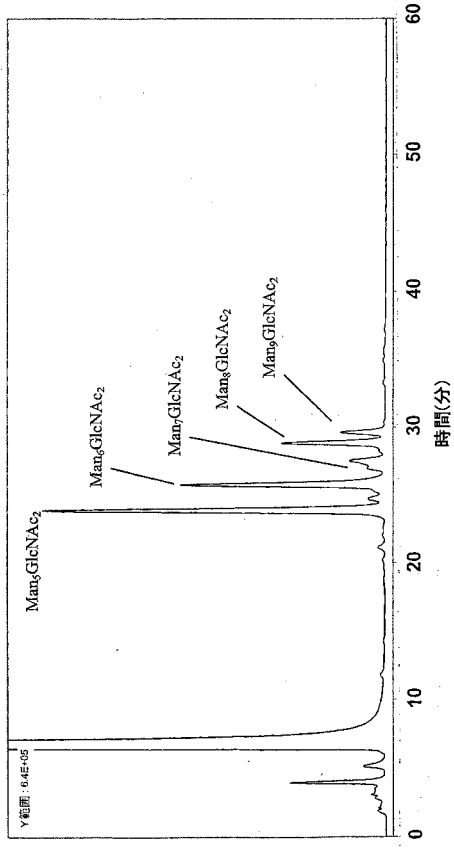


FIG. 92B

【図９３】

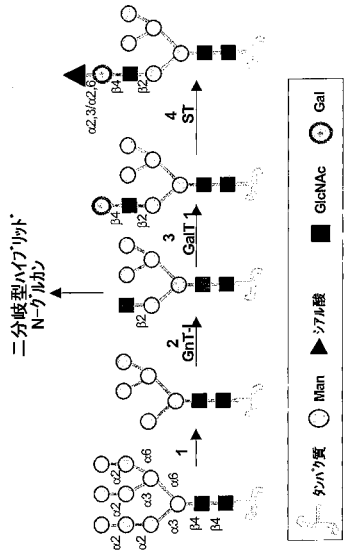


FIG. 93

【図９４Ａ】

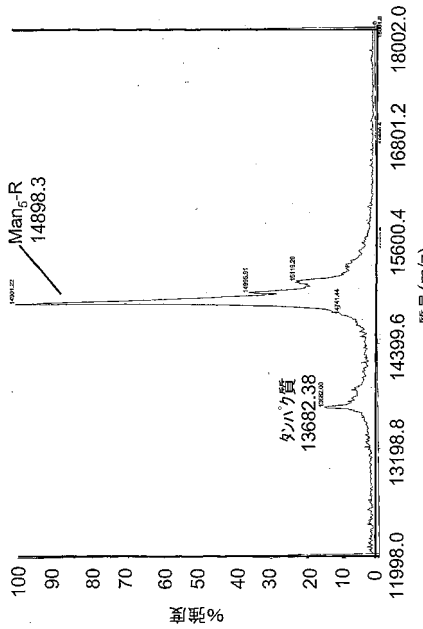


FIG. 94A

【図９４Ｂ】

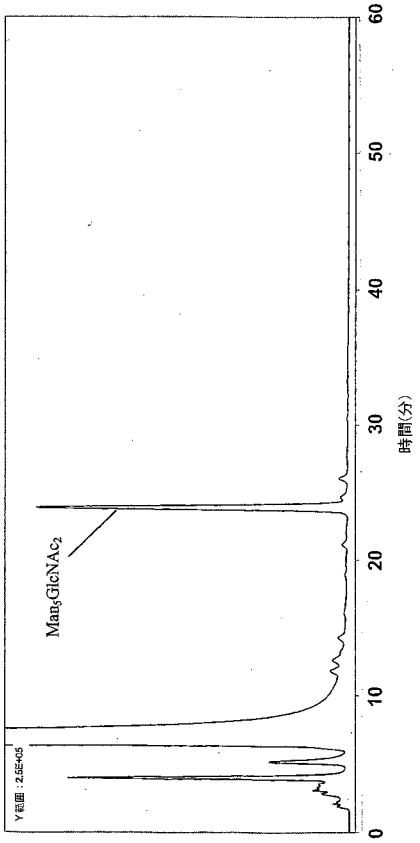


FIG. 94B

【図９５】

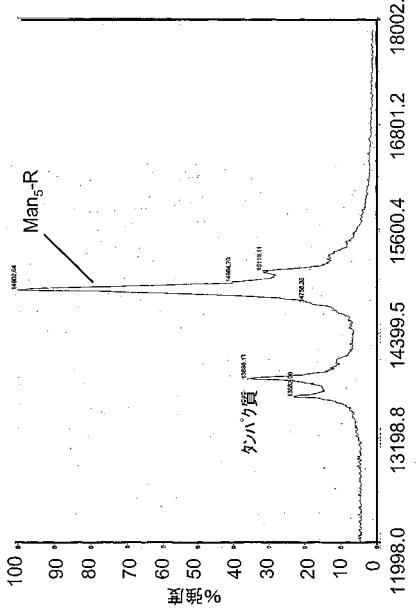


FIG. 95

【図９６】

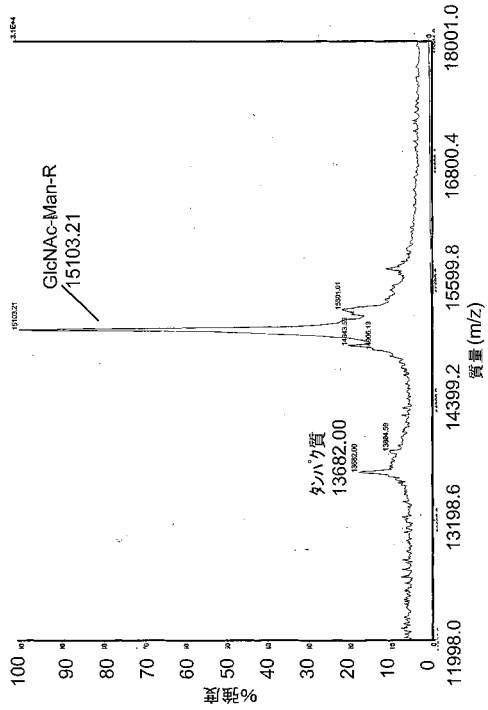


FIG. 96

【図９７】

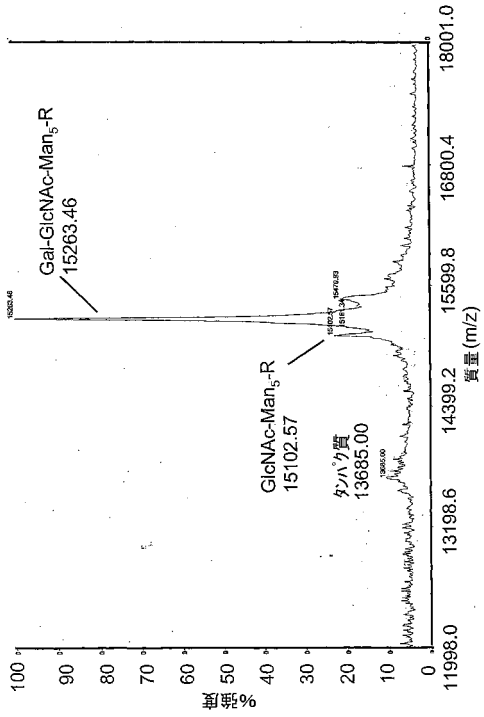


FIG. 97

【図９８】

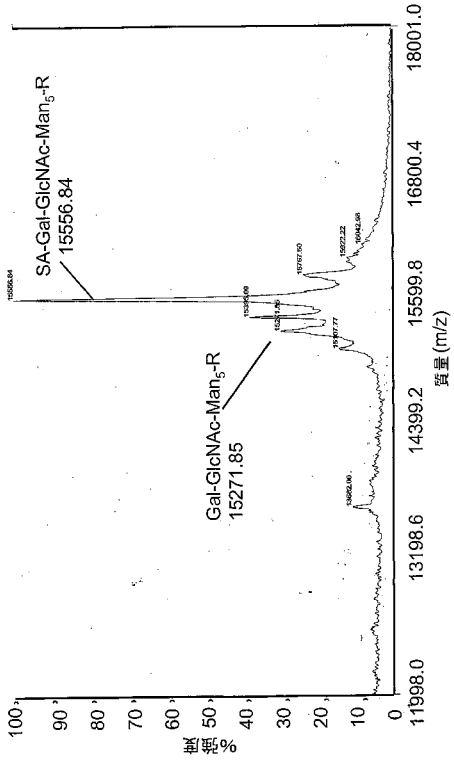


FIG. 98

【図９９Ａ】

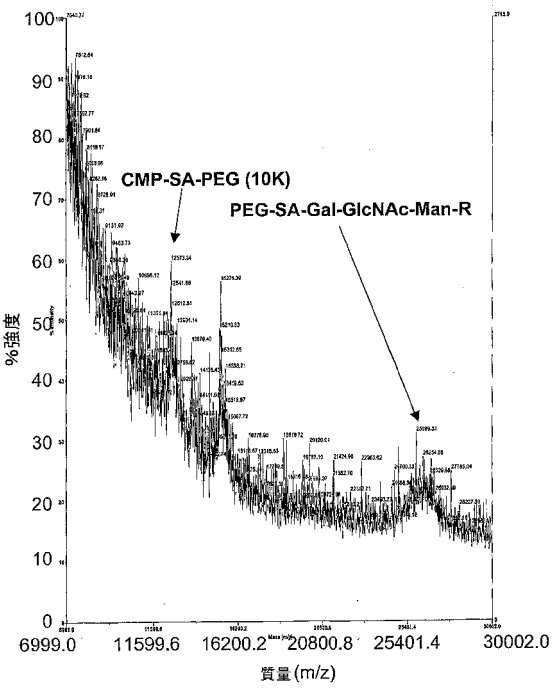


FIG. 99A

【図９９Ｂ】

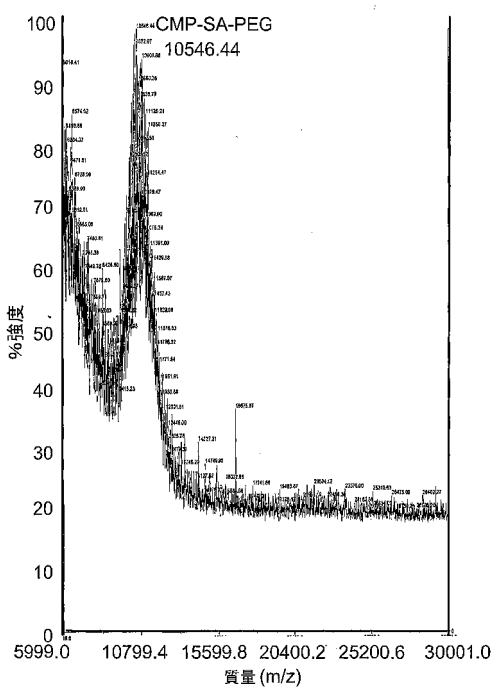


FIG. 99B

【図１００】

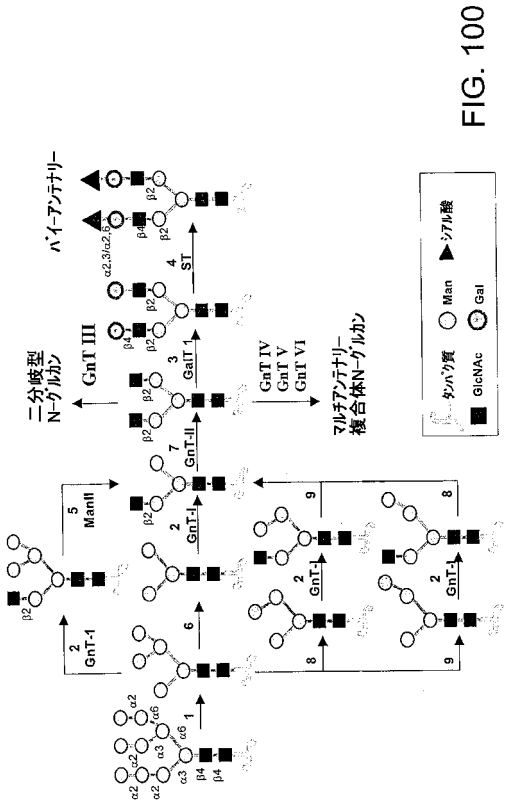


FIG. 100

【図１０１】

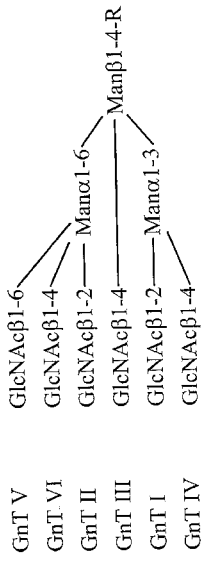


FIG. 101

【図１０２Ａ】

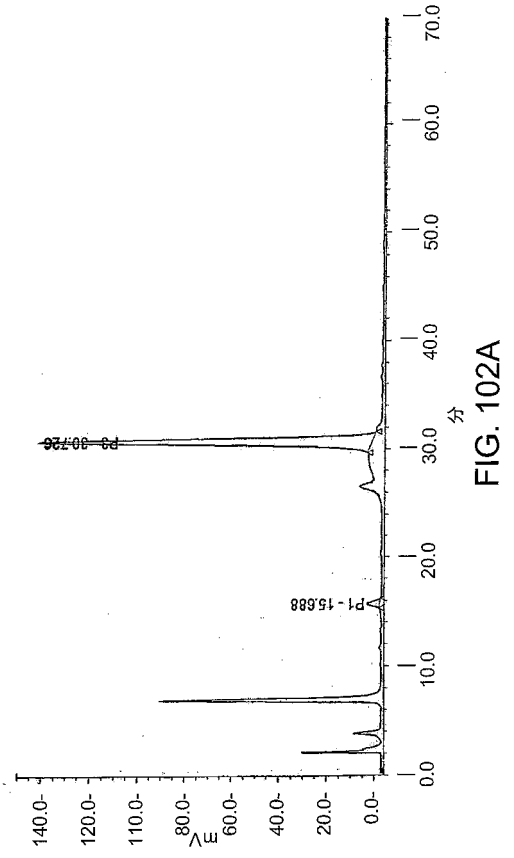


FIG. 102A

【図１０２Ｂ】

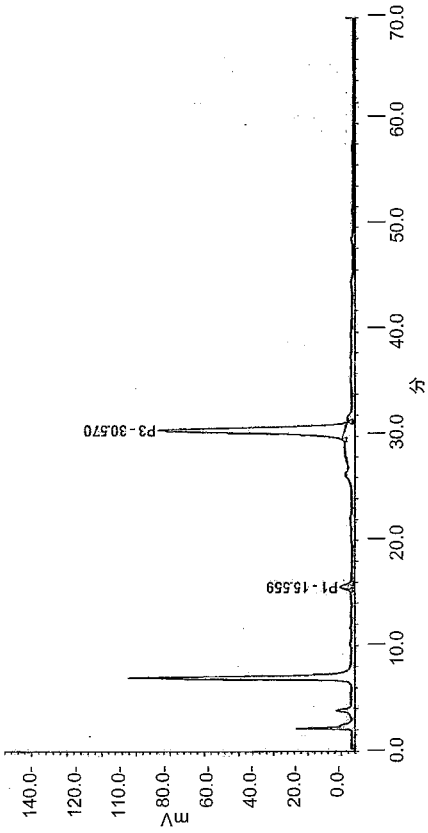


FIG. 102B

【図１０３】

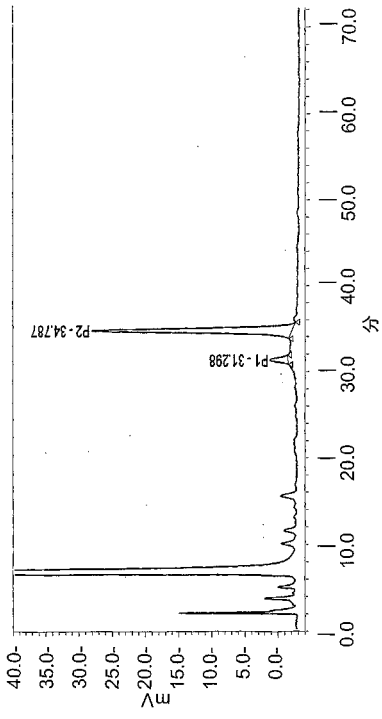


FIG. 103

【図１０４】

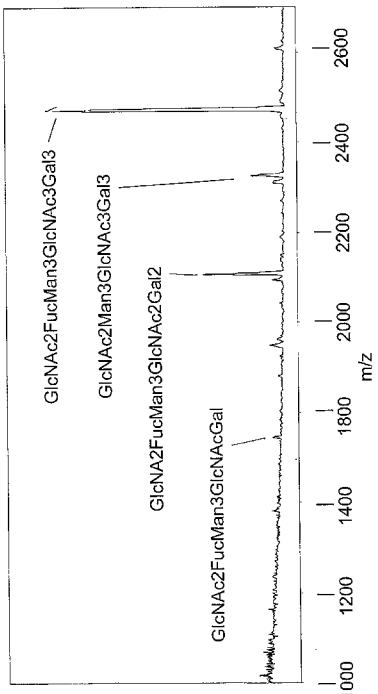


FIG. 104

【図１０５】

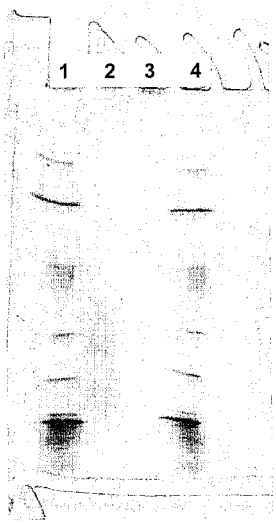


FIG. 105

【図１０６】

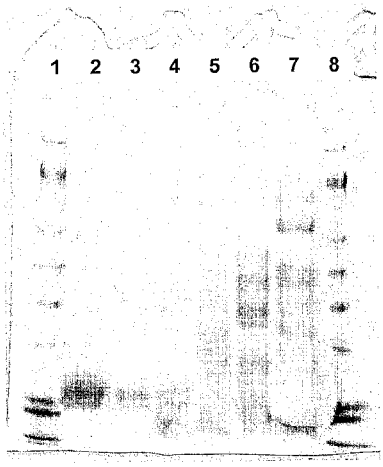


FIG. 106

【図１０７】

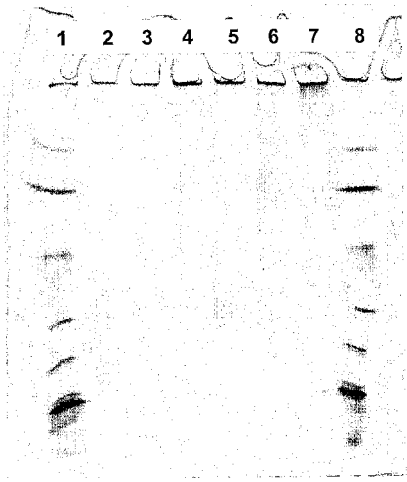


FIG. 107

【図１０８】

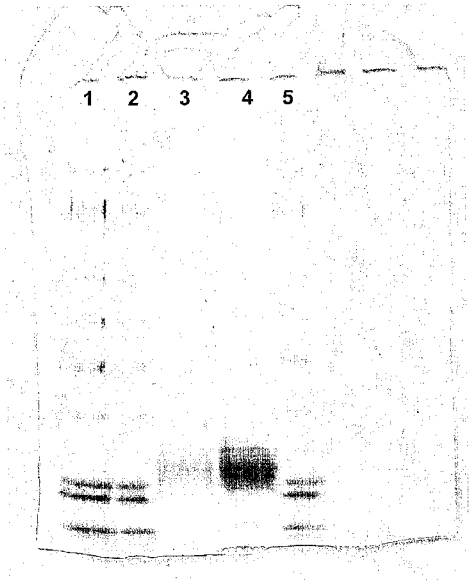


FIG. 108

【図１０９】

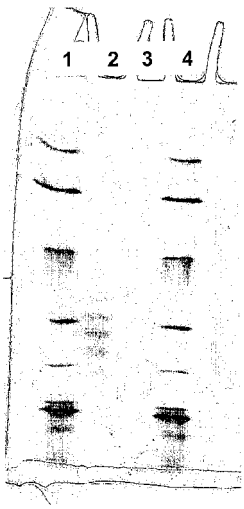


FIG. 109

【図１１０】

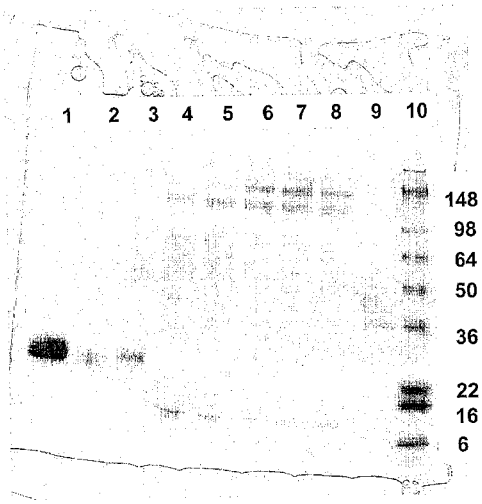


FIG. 110

【図１１１】

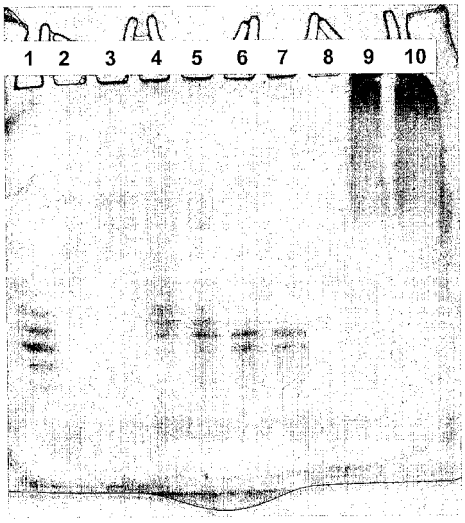


FIG. 111

【図１１２】

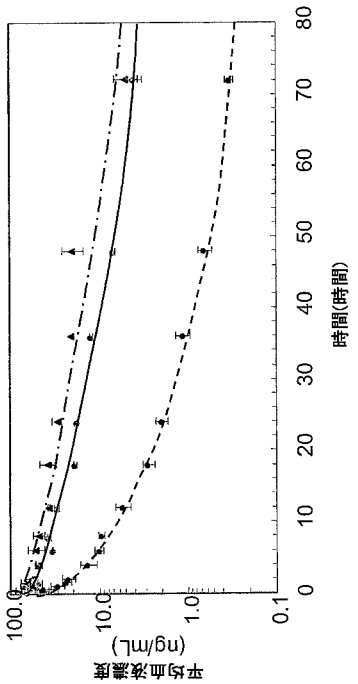


FIG. 112

【図１１３】

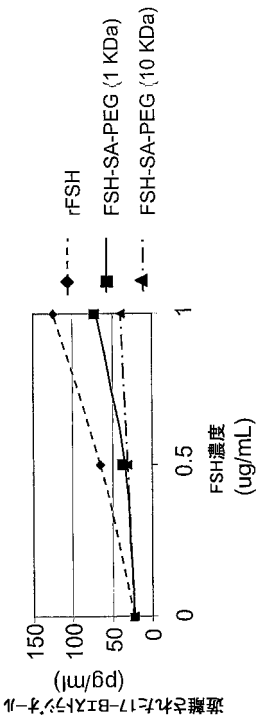


FIG. 113

【図１１４】

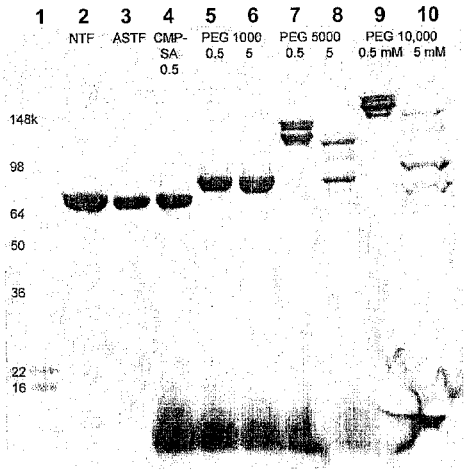


FIG. 114

【図１１５】

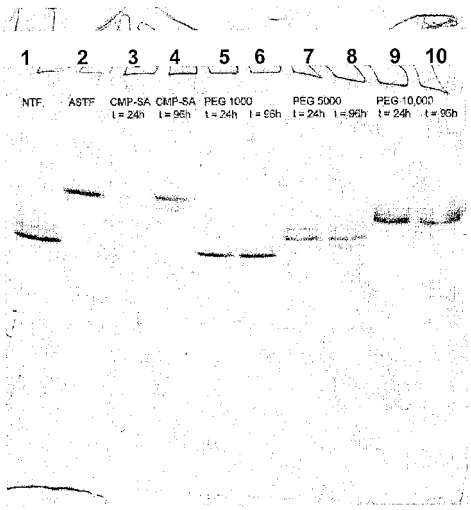


FIG. 115

【図１１６】

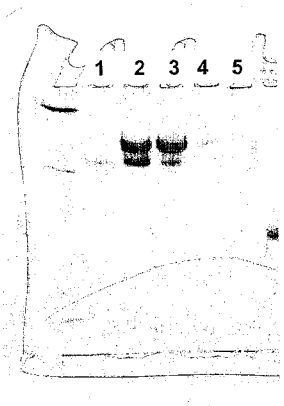


FIG. 116

【図１１７】

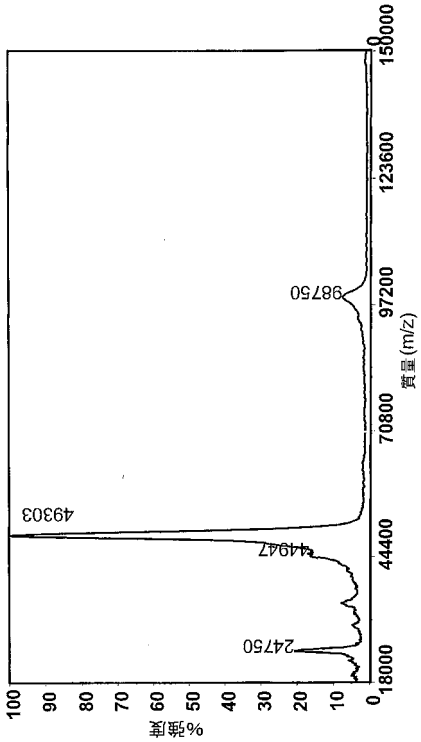


FIG. 117

【図１１８】

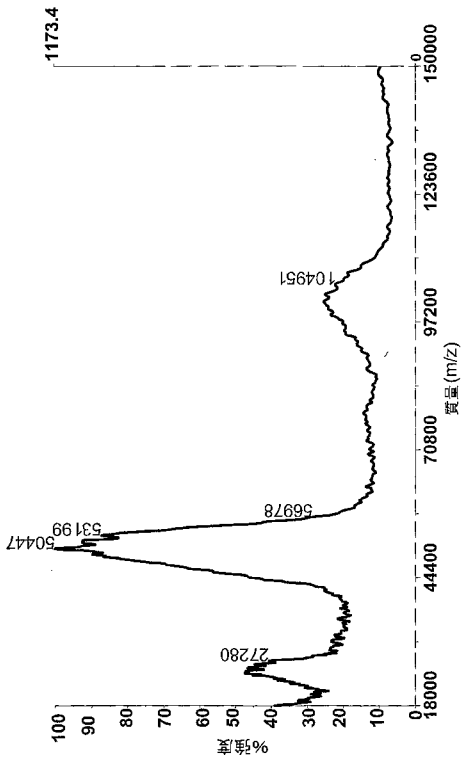


FIG. 118

【図１１９】

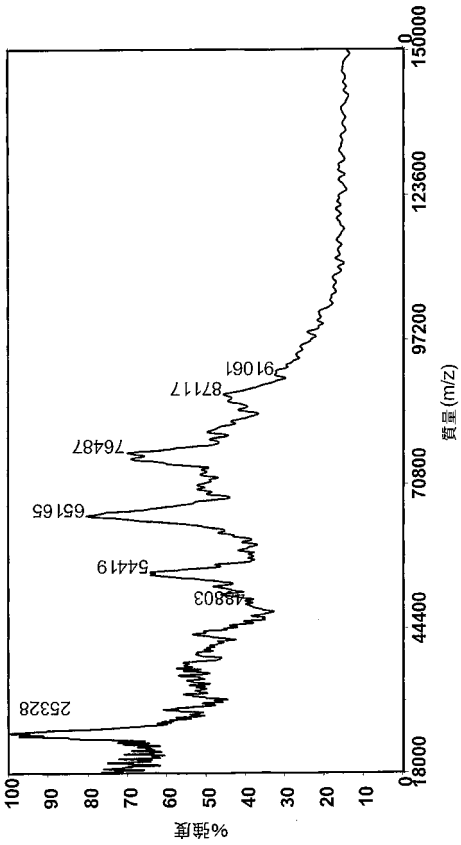


FIG. 119

【図１２０】



FIG. 120

【図１２１】

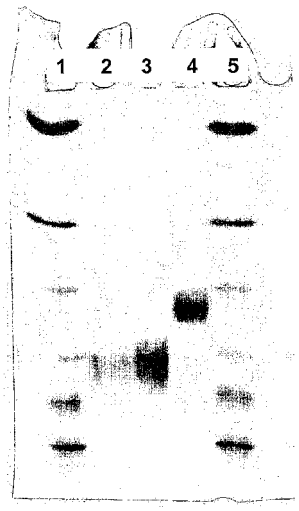


FIG. 121

【図１２２】

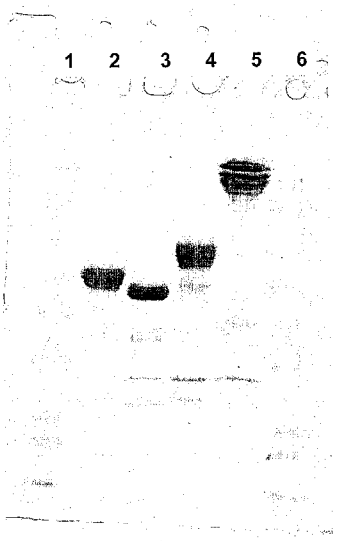


FIG. 122

【図１２３】

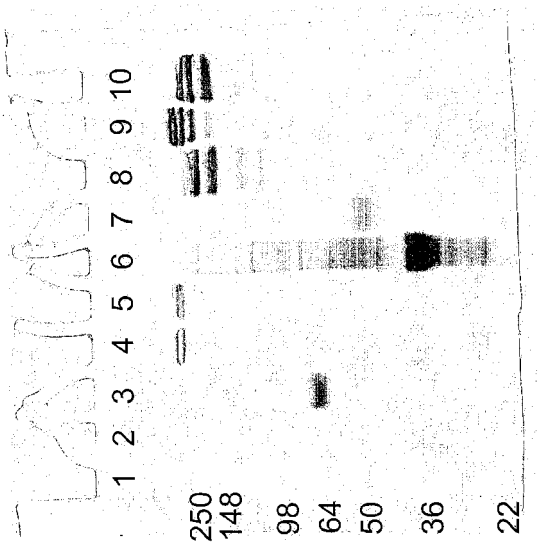


FIG. 123

【図１２４】

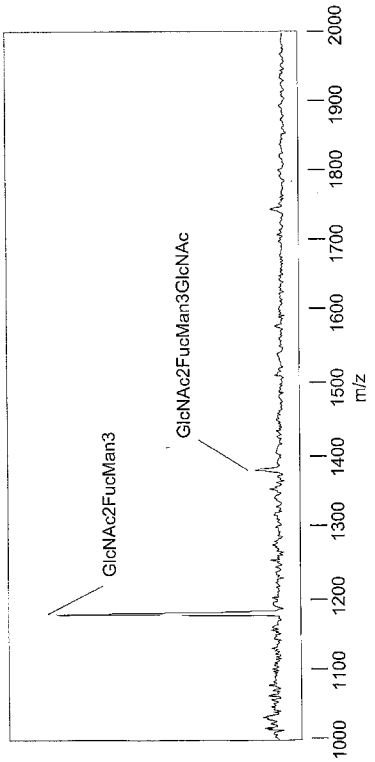


FIG. 124

【図１２５】

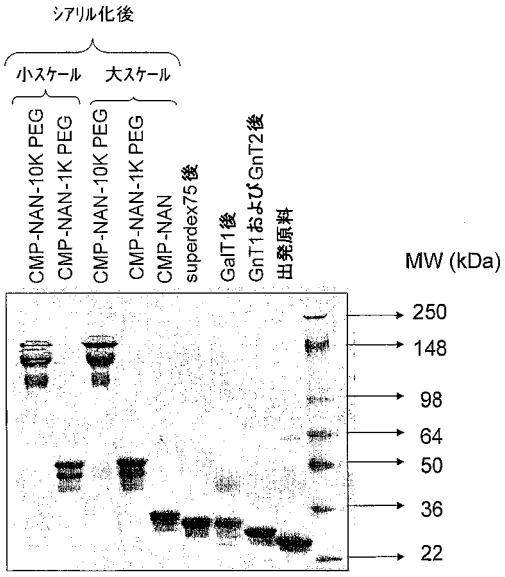


FIG. 125

【図１２６】

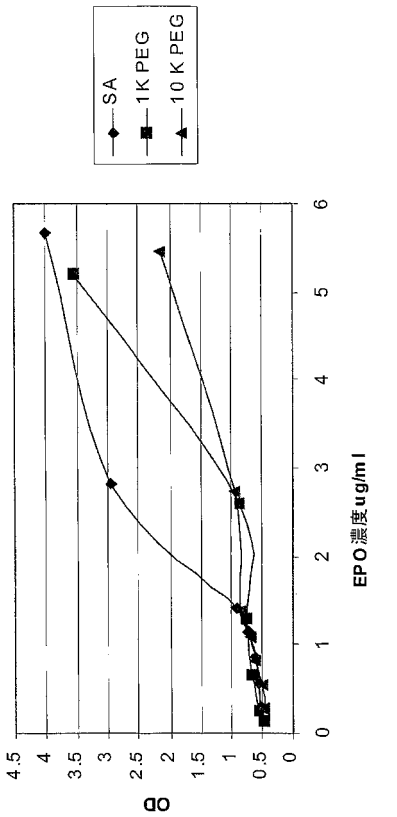
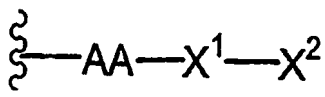


FIG. 126

【配列表】
2016178938000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成28年7月13日(2016.7.13)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
式：
【化１】



式中、
ＡＡはペプチドの末端または内部アミノ酸残基であり；
X^1-X^2は該ＡＡに共有結合したサッカリドであり、ここで
X^1は第１グリコシル残基であり；そして
X^2はX^1に共有結合した第２グリコシル残基であり、ここでX^1およびX^2は単糖およびオリゴ糖残基から選択される、
を有するペプチドの無細胞のインビトロ改造方法であって；

（ａ）X^2またはその糖サブユニットを該ペプチドから除去し、これにより短縮化グリカンを形成し；そして
（ｂ）該短縮化グリカンを、少なくとも１つのグリコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも１つのグリコシル供与体と、該少なくとも１つのグリコシル供与体を該短縮化グリカンへ転移させるために適する条件下で接触させ、これにより該ペプチドを改造する、
ことを含んでなる上記方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/26*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/34	
Ａ６１Ｐ	*7/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/26	
			Ａ６１Ｐ	7/00	

(31)優先権主張番号 60/334,301
(32)優先日 平成13年11月28日(2001.11.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/387,292
(32)優先日 平成14年6月7日(2002.6.7)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/391,777
(32)優先日 平成14年6月25日(2002.6.25)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/396,594
(32)優先日 平成14年7月17日(2002.7.17)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/404,249
(32)優先日 平成14年8月16日(2002.8.16)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/407,527
(32)優先日 平成14年8月28日(2002.8.28)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ド・フリース，シヨーン
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９４５４ノースウエールズ・フイリードライブ１２６
(72)発明者 ゾプフ，デイビツド
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９０８７ウエイン・ウエストビーチツリーレーン５６０
(72)発明者 ベイヤー，ロバート
アメリカ合衆国カリフオルニア州９２１２２サンデイエゴ・デイラクストリート６１０５
(72)発明者 ボエ，カリン
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１８９０１ドイルスタウン・チエリーレーン２７６
(72)発明者 ヘイクス，デイビツド
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９０９０ウイローグローブ・フアーンアベニユー１４
(72)発明者 チエン，シー
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９４４６ランズデイル・ホイツトニープレイス１０７

Ｆターム(参考) 4B064 AG01 AG15 AG18 AG26 AG31 CA10 CA19 CA21 CC06 CC07
CC09 CC24 CD09 CD12 DA01
4C076 EE23 EE30 EE59
4C084 AA06 AA07 BA01 BA08 BA22 BA34 DA19 DC50 NA03 ZA51

【外国語明細書】
2016178938000001.pdf