(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7128519号
(P7128519)

(45)発行日　令和4年8月31日(2022.8.31)

(24)登録日　令和4年8月23日(2022.8.23)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 9/84 (2006.01)		C12N	9/84	ZNA
C12N 15/55 (2006.01)		C12N	15/55	
C12N 15/70 (2006.01)		C12N	15/70	Z
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12P 21/02 (2006.01)		C12P	21/02	E

請求項の数　29　（全113頁）

(21)出願番号　特願2018-557402(P2018-557402)
(86)(22)出願日　平成29年5月5日(2017.5.5)
(65)公表番号　特表2019-514395(P2019-514395A)
(43)公表日　令和1年6月6日(2019.6.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/031342
(87)国際公開番号　WO2017/193022
(87)国際公開日　平成29年11月9日(2017.11.9)
審査請求日　令和2年3月6日(2020.3.6)
(31)優先権主張番号　62/332,103
(32)優先日　平成28年5月5日(2016.5.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
前置審査

(73)特許権者　502427921
コデクシス， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０６３， レッドウッド シティ， ペノブスコット ドライブ ２００
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(72)発明者　ネイザー， ジョヴァナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０６３， レッドウッド シティ， ペノブスコット ドライブ ２００
(72)発明者　ミッチェル， ヴェスナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ペニシリンＧアシラーゼ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号１０３６と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を有し、Ｎ２Ｌ変異を含み、ここで、前記位置は、配列番号１０３６を基準としてナンバリングされている、操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

【請求項２】

前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが、１２、１０３、１３１、２３３、４４４、４６７、４９４および／または６４６から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換をさらに含み、ここで、前記位置は、配列番号１０３６を基準としてナンバリングされている、請求項１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

【請求項３】

前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが、アミノ酸位置１２、１０３、１３１、２３３、４４４、４６７、４９４および６４６に置換をさらに含み、ここで、前記位置は、配列番号１０３６を基準としてナンバリングされている、請求項１または２に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

【請求項４】

前記ペニシリンＧアシラーゼが、表１０．１に示される少なくとも１つの配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む、請求項１に記載の操作されたペニ

シリンＧアシラーゼ。
【請求項５】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、表１０．１に示されるポリペプチド配列を含む、請求項１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。
【請求項６】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号１１９３と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。
【請求項７】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成することができる、請求項１～６のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。
【請求項８】
請求項１～７のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼをコードする、操作されたポリヌクレオチド。
【請求項９】
請求項８に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。
【請求項１０】
請求項９に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項１１】
前記宿主細胞が、原核細胞または真核細胞である、請求項１０に記載の宿主細胞。
【請求項１２】
前記原核宿主細胞が、大腸菌である、請求項１１に記載の宿主細胞。
【請求項１３】
請求項１～７のいずれかに提供されている少なくとも１つの操作されたペニシリンＧアシラーゼを含む、組成物。
【請求項１４】
請求項１～７のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼを生成するための方法であって、請求項１１および／または請求項１２に記載の宿主細胞を、前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが生成されるような条件下で培養する工程を含む、方法。
【請求項１５】
フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するための方法であって、ｉ）請求項１～７のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼおよび／または請求項１３に記載の組成物、ならびにＡ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテート保護基を含むインスリンを提供する工程；およびｉｉ）前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが、前記Ａ１、Ｂ１および／またはＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を前記インスリンから除去することによって、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するような条件下で、前記操作されたペニシリンＧアシラーゼを、Ａ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテート保護基を含む前記インスリンに曝露する工程を含む、方法。
【請求項１６】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１トリ－フェニルアセテート保護基を除去する、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ１トリ－フェニルアセテート保護基を除去する、請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を除去する、請求項１５に記載の方法。

【請求項１９】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１、Ｂ１およびＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を除去する、請求項１５に記載の方法。
【請求項２０】
フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するための方法であって、ｉ）請求項１～７のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼおよび／または請求項１３に記載の組成物、ならびに遊離インスリンを提供する工程；およびｉｉ）前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが、Ａ１、Ｂ１および／またはＢ２９位をアシル化することによって、一保護または二保護されたインスリンを生成するような条件下で、前記操作されたペニシリンＧアシラーゼを前記インスリンに曝露する工程を含む、方法。
【請求項２１】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１位をアシル化する、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ１位をアシル化する、請求項２０に記載の方法。
【請求項２３】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ２９位をアシル化する、請求項２０に記載の方法。
【請求項２４】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１、Ｂ１およびＢ２９位をアシル化する、請求項２０に記載の方法。
【請求項２５】
フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するための方法であって、ｉ）請求項１～７のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼおよび／または請求項１３に記載の組成物、ならびにインスリンを提供する工程；およびｉｉ）前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが、Ａ１、Ｂ１および／またはＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を前記インスリンに付加することによって、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するような条件下で、前記操作されたペニシリンＧアシラーゼを前記インスリンに曝露する工程を含む、方法。
【請求項２６】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１トリ－フェニルアセテート保護基を付加する、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ１トリ－フェニルアセテート保護基を付加する、請求項２５に記載の方法。
【請求項２８】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を付加する、請求項２５に記載の方法。
【請求項２９】
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１、Ｂ１およびＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を付加する、請求項２５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０１６年５月５日に出願された米国仮出願第６２／３３２，１０３の優先権を主張し、本明細書において、その全体が全ての目的について参考として援用される。
【０００２】
発明の分野
本発明は、操作されたペニシリンＧアシラーゼ（ＰＧＡ）酵素、それらの酵素をコード

するポリヌクレオチド、それらの酵素を含む組成物、およびそれらの操作されたＰＧＡ酵素を使用する方法を提供する。

【０００３】

配列表、表またはコンピュータプログラムに対する言及

配列表の公式の写しは、ファイル名が「ＣＸ２－１５４ＷＯ１＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」であり、作成日が２０１７年5月5日であり、サイズが８，９６２キロバイトである、ＡＳＣＩＩ形式のテキストファイルとして、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して本明細書と同時に提出される。ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して提出された配列表は、本明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書中に援用される。

【背景技術】

【０００４】

発明の背景

ペニシリンＧアシラーゼ（ＰＧＡ）（ペニシリンアミダーゼ、ＥＣ３．５．１．１１）は、ペニシリンＧ（ベンジルペニシリン）側鎖のアミド結合の切断を触媒する。この酵素は、６－アミノ－ペニシラン酸（６－ＡＰＡ）およびフェニル－酢酸（ＰＡＡ）の製造において商業的に使用されている。６－ＡＰＡは、アモキシシリン、アンピシリンおよびセファレキシンなどの半合成β－ラクタム抗生物質の工業生産において重要な化合物である。天然に存在するＰＧＡ酵素は、商業的プロセスにおいて不安定性を示すことから、商業的応用のためには、固体基材上への固定化が必要である。ＰＧＡは、様々な支持体に共有結合的に結合されており、ＰＧＡ固定化システムは、純粋な光学異性体を合成するための有用なツールと報告されている。しかしながら、固体表面に付着することにより、酵素特性が損なわれ、例えば、活性および／または選択性が低下し、溶質への接近が制限される。さらに、固体基材への付着によって、酵素の捕捉、およびさらなる処理サイクルにおける再利用が可能になるが、その酵素の安定性は、そのような用途が制限される恐れがあるほどである。ペニシリンＧから６－ＡＰＡへのＰＧＡによる酵素触媒は、位置特異的（それはラクタムアミド結合を切断しない）かつ立体特異的である。６－ＡＰＡの生成は、おそらく、医薬品の製造における酵素触媒の中で最も利用される。フェナセチル部分に関連するＰＧＡの酵素活性は、第１級アミンならびにアルコールの数多くの様々なフェナセチル誘導体の立体特異的加水分解を可能にする。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００５】

発明の要旨

本発明は、操作されたペニシリンＧアシラーゼ（ＰＧＡ）酵素、それらの酵素をコードするポリヌクレオチド、それらの酵素を含む組成物、およびそれらの操作されたＰＧＡ酵素を使用する方法を提供する。

【０００６】

本発明は、遊離インスリンのＡ１、Ｂ１またはＢ２９位に保護基を付加するかまたはＡ１／Ｂ１／Ｂ２９三保護インスリンから保護基を除去することによって、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成することができる操作されたペニシリンＧアシラーゼを提供する。いくつかの実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８と少なくとも約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％またはそれを超えて同一である。いくつかの実施形態において、本発明は、インスリンからＡ１、Ｂ１またはＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を除去して、フェニルアセテートで二保護されたインスリンを生成することができる操作されたペニシリンＧアシラーゼを提供し、ここで、そのペニシリンＧアシラーゼは、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８と少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、

９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一である。いくつかの実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、インスリンのＡ１トリ－フェニルアセテート保護基を除去するが、いくつかのさらなる実施形態では、本ペニシリンＧアシラーゼは、インスリンのＢ１トリ－フェニルアセテート保護基を除去し、なおもさらなる実施形態では、本ペニシリンＧアシラーゼは、インスリンのＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を除去する。いくつかの実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、インスリンのＡ１、Ｂ１およびＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を除去する。いくつかのさらなる実施形態において、操作されたペニシリンＧアシラーゼは、配列番号２のポリペプチドによるフェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンの生成と比べて、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％を超える、またはそれを超えて多い、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成する。

【０００７】

いくつかのさらなる実施形態において、本発明は、インスリンからＡ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテート保護基を除去して、遊離インスリンを生成することができる操作されたペニシリンＧアシラーゼを提供し、ここで、そのペニシリンＧアシラーゼは、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８を含む。いくつかのさらなる実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、表５．１、６．１、７．１、８．１、８．２、９，１、１０．１、１２．１、１２．２、１２．３、１２．４、１２．５、１２．６および／または１２．７に提供されているようにペニシリンＧバリアントに少なくとも１つの変異を含む。いくつかの実施形態において、本発明は、表５．１、６．１、７．１、８．１、８．２、９，１、１０．１、１２．１、１２．２、１２．３、１２．４、１２．５、１２．６および／または１２．７に示される少なくとも１つの配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一の配列を含む操作されたペニシリンＧアシラーゼを提供する。いくつかの実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、表５．１、６．１、７．１、８．１、８．２、９，１、１０．１、１２．１、１２．２、１２．３、１２．４、１２．５、１２．６および／または１２．７に提供されているバリアントを含む。

【０００８】

本発明は、配列番号８と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む操作されたペニシリンＧアシラーゼも提供し、２７、２７；２８；７１；７４；５４７、２７；７１；７４；４８４；５４７；５８４；６９７、７１；７４、１２９、２５３、２５４、２５６、３４８、３５２、３７２、３７３、３７４、３８０、３８０；４５７、３８６；３９０、３８６；３９０、３８６、３８７；３９０、４５１、４５７、４６７、４７０、４７４、６１６、６２３、７０４、７０６および７０８から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、これらの位置は、配列番号８を基準としてナンバリングされている。

【０００９】

本発明は、配列番号１４と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む操作されたペニシリンＧアシラーゼも提供し、９、９；１０３；１１９；１３１；２３３；３１２；３２４；４３２；４４４；４９４、９；１０３；１１９；１３１；３２４；４３２；４９４；６４６、９；１０３；１１９；１３１；２３３；２６９；３０４；４４４；４９４；６４６、９；１０３；１１９；１３１；３０４；３２４；４３２；４４４；４９４；６４６、９；１０３；１１９；２３３；６４６、９；１０３；１１９；４９４、９；１０３；２３３；３１２；６４６、９；１０３；２３３；４３２；６４６、９；１０３；２３３；４９４、９；１０３；２６９；３０４；３２４；４９４；６４６、９；１０３；３０４；４３２；４４４；６４６、９；１１９；１３１；２３３、９；１１９；１３１；２３３；３０４；４４４；６４６、９；１１９；１３１；２３３；４９４；６

46、9；119；131；233；494；661、9；119；131；312；444；646、9；119；131；432；444；646、9；119；233；269；273；304；312；432；444；646、9；119；233；494；646、9；119；304；444；494；646、9；131；233；269；273；312；432；444；646、9；233；273；304；494；646、9；233；304；494；646、9；233；312；432；646、9；233；494；646、9；312；444；646、9；432；444；494；646、9；494；646、28；374；380、103；119；131；233；273；304；324；432；444；494；646、103；119；131；233；304；312；432；494；646；661、103；119；131；269；312；494；646、103；119；233、103；119；233；273；432、103；119；233；304；646、103；119；233；312；646、103；119；494；646；661、103；119；646、103；131；233；304；324；444；646、103；131；269；273；444；646、103；233；273；312；324；432；444；646、103；233；273；312；432；444；646、103；269；273；444；646、103；273；304；324；444；494、103；312；444；646、103；444；494；646、119；131；444；646；661、119；131；494、119；131；646、119；131；304；432；444；646；661、119；131；444、119；233；304；312；324；432；444；646、119；233；304；646、119；233；312、119；233；646、119；269；273；312；324；494；646、119；269；273；312；432；444；646、119；273；324；444；494；646、119；312；444；646、119；432；444；646、129；254；348；457；704、129；348、129；348；467；470；704；708、129；348；470；623；704；706、129；348；470；623；704；706；708、129；380；470、129；457；470；474、129；470、129；623、131；233；273；646、131；233；304；444、131；233；432；646、131；273；432；444；494；646、185、233；269；304；312；324；432；444；646、253、253；256、253；256；352；373；374；616、253；256；352；374；380；451、253；256；374；451、253；256；380；451；616、253；352；374；616、253；352；451；616、253；374；451、253；374；451；623、253；451、253；451；457、253；254；352；374；380、253；256、253；256；352；374；451、253；256；352；380；451；616、253；256；352；451、253；256；374；380；451、253；256；374；616、253；256；380、253；256；380；451；546；616、253；352；373；374；451、253；352；373；374；451；616、253；352；374；616、253；352；623、253；373；374；451；616、253；380、254；255；352、254；256；352；451、254；256；373；374；380；451、254；256；374、254；256；374；451、254；256；451、254；352；380、254；256；380；451；616、254；352；380；451、254；352；451、254；373；374；380；451、254；373；374；451、254；374、254；374；380、254；380、254；451、254；616、256；352；374、256；352；380；451；616、256；374；380；451；616、25

６；３７４；６１６、２７３；３１２；４４４；６４６、３０４；３１２；４４４；６４６、３１２；４４４；６４６、３１２；６４６、３４８、３４８；３７２；４７０；６２３；７０８、３４８；７０４；７０８、３５２、３５２；３７３；３７４；４５１、３５２；３７３；３８０；４５１、３５２；３７３；３８０；４５１；６１６、３５２；３７３；４５１、３５２；３７４、３５２；３７４；３８０、３５２；３７４；３８０；４５１；６１６、３５２；３７４；４５１、３５２；３７４；６１６、３５２；３８０、３５２；３８０；４５１、３５２；３８０；４５１；６１６、３５２；３８０；４５１；６２３、３５２；３８０；６１６、３５２；４５１、３５２；４５１；６１６、３５２；６１６、３７２；４５７；４７０；６２３、３７３；３７４、３７３；３７４；４５１、３７３；４５１、３７３；６１６、３７４、３７４；３８０、３７４；３８０；４５１、３７４；３８０；４５１；６２３、３７４；４５１、３７４；４５１；６１６、３７４；６１６、３７４；６２３、３８０、３８０；４５１、３８０；４５１；６１６、３８０；４５１；６２３、３８０；６１６、３８０；６１６；６２３、３８０；６２３、４１５、４４３、４４４、４４４；４９４、４４４；６４６、４５１、４５１；６１６、４５１；６２３、４５７、４５７；４７０、４５７；７０４；７０８、４７０；７０８、４９２；４９３、５１７、５６０、６１６、６２３、７２３および７４８から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、これらの位置は、配列番号１４を基準としてナンバリングされている。

【００１０】

本発明は、配列番号３００と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む操作されたペニシリンＧアシラーゼも提供し、９；６１；４４４、９；１６８；１８５；５１７；５６０；７４８、９；１８５；４１５、９；１８５；４１５；４４３；４４４；５１７；７２３；７４８、９；１８５；４１５；４４３；４４４；５１７；５６０、９；１８５；４１５；４４３；４４４；５１７；７４８、９；１８５；４１５；４４４；５１７；７２３；７４８、９；１８５；４１５；４４４；５１７；７４８、９；１８５；４１５；４４４；５１７；５６０、９；１８５；４１５；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、９；１８５；４１５；４４４、９；１８５；４１５；４４４；５６０、９；１８５；４１５；４４４；７２３；７４８、９；１８５；４１５；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、９；１８５；４１５；５１７；５６０、９；１８５；４１５；５１７；７２３、９；１８５；４１５；５１７；７４８、９；１８５；４１５；７４８、９；１８５；４４３；４４４；５１７；５６０、９；１８５；４４３；４４４；７２３、９；１８５；４４３；４４４；５６０；７２３、９；１８５；４４３；４４４；５１７、９；１８５；４４４、９；１８５；４４４；５１７；５６０、９；１８５；４４４；５６０；７２３、９；１８５；４４４；５６０；７４８、９；１８５；４４４；５１７；５６０、９；１８５；４４４；５１７；５６０；７２３、９；１８５；４４４；５１７；５６０；７４８、９；１８５；４４４；５１７；７２３；７４８、９；１８５；４４４；５６０、９；１８５；４４４；７２３、９；１８５；４４４；５１７；５６０；７２３、９；１８５；５１７、９；１８５；５１７；５６０；７２３；７４８、９；１８５；７４８、９；４１５；４４３；４４４；５１７；５６０、９；４１５；４４３；４４４；５１７；７４８、９；４１５；４４３；４４４；５６０；７２３；７４８、９；４１５；４４３；４４４；５１７；５６０、９；４１５；４４３；４４４；５１７；５６０；７２３、９；４１５；４４３；４４４；５１７；７４８、９；４１５；４４３；５６０、９；４１５；４４３；５６０；７２３；７４８、９；４１５；４４４、９；４１５；４４４；５１７；５６０；７４８、９；４１５；４４４；５１７、９；４１５；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、９；４１５；４４４；５６０；７２３；７４８、９；４１５；４４４；５１７、９；４１５；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、９；４１５；４４４；５６０；７２３、９；４１５；４４４；５１７、９；４１５；４４４；５１７；５６０；７４８、９；４１５；４４４；５１７、９；４１５；４４４；５６０、９；４１５；４４４；５６０、９；４１５；４４４；５１７；５

６０；７２３、９；４１５；４４４；５６０、９；４１５；４４４；５６０；６６５；７２３；７４８、９；４１５；４４４；７２３；７４８、９；４１５；５１７、９；４１５；５１７；５６０；７２３；７４８、９；４１５；５１７；５６０；７２３；７４８、９；４１５；５１７；５６０；７４８、９；４１５；５６０、９；４１５；７４８、９；４４３；４４４；５１７；５６０；７２３、９；４４３；４４４；５６０、９；４４３；４４４；５６０；７２３；７４８、９；４４３；４４４；５１７、９；４４３；４４４；５６０；７２３、９；４４３；４４４；５１７、９；４４３；４４４；５１７；５６０、９；４４３；４４４；５１７；７４８、９；４４３；５１７；７４８、９；４４３；７２３、９；４４４；５１７；５６０、９；４４４；５６０；７２３、９；４４４；７４８、９；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、９；４４４；５６０、９；４４４；５６０；７２３、９；４４４；５６０；７４８、９；４４４；７４８、９；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、９；４４４；５１７、９；４４４；５１７；５６０；７２３、９；４４４；５１７；７２３、９；４４４；５６０；７４８、９；４４４；７２３、９；４４４、９；４４４；５１７；５６０、９；５１７、９；５１７；５６０；７２３、９；５１７；５６０；７４８、９；５１７；５６０；７４８、９；５１７；７２３、９；５１７；７４８、９；５６０；７２３；７４８、９；７２３、１０３、１０３；１１９、１０３；１１９；１２９；２５４；２５６；３４８；４９４；６４６、１０３；１１９；１２９；４４４；４９４、１０３；１１９；２５４；３４８、１０３；１１９；２５４；３４８；４４４、１０３；１１９；２５４；４４４、１０３；１１９；２５６；３４８；４４４；４９４；６４６、１０３；１１９；２５６；４９４、１０３；１１９；３４８、１０３；１１９；３４８；４５７、１０３；１１９；３４８；４５７；４９４、１０３；１１９；４５７、１０３；１１９；４９４、１０３；１１９；４９４；６４６、１０３；１２９、１０３；１２９；２５４；４４４；４５７；４９４、１０３；１２９；２５６；３４８、１０３；１２９；３４８；６４６、１０３；２５４、１０３；２５４；２５６；３４８；４４４；４９４、１０３；２５４；６４６、１０３；２５４；３４８、１０３；２５４；３４８；４９４、１０３；２５６、１０３；２５６；４４４、１０３；２５６；４５７、１０３；２５６；４９４、１０３；３４８、１０３；３４８；４４４、１０３；３４８；４９４、１０３；４４４、１０３；４９４、１０３；４９４；６４６、１１９；１２９；２５４；３４８；４９４、１１９；１２９；２５４；４５７；４９４、１１９；１２９；２５６；３４８；４５７、１１９；２５４；３４８；４５７、１１９；２５６；３４８１１９；２５６；３４８；４９４、１１９；２５６；４４４、１１９；３４８、１１９；３４８；４９４、１８５；４１５；４４３；４４４；５１７；５６０、１８５；４１５；４４３；４４４；５１７、１８５；４１５；４４４；５１７；５６０；７４８、１８５；４１５；４４４；５１７；７４８、１８５；４１５；４４４；５６０、１８５；４１５；５６０、１８５；４１５；５６０；７２３、１８５；４１５；７２３；７４８、１８５；４４３；４４４；５６０、１８５；４４４；４４６；５１７；５６０、１８５；４４４；５１７；５６０、１８５；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、１８５；４４４；５１７；７２３、１８５；４４４；５６０、１８５；５１７；５６０；７２３、１８５；５６０、１８５；５６０；７２３、１８５；５６０；７４８、２５４；４５７、２５６；３４８、２５６；４９４、３４８、３４８；４４４、３４８；４４４；６４６、３４８；４５７、３４８；４９４、４１５、４１５；４４３；４４４；５１７；７４８、４１５；４４３；４４４；５６０、４１５；４４３；５１７；５６０；７２３、４１５；４４３；５１７；７２３、４１５；４４４；７２３、４１５；４４４；５１７、４１５；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、４１５；４４４；５１７；５６０；７４８、４１５；４４４；５６０；７２３、４１５；４４４；５１７；５６０；７２３、４１５；４４４；５１７；７２３；７４８４１５；５１７；５６０；７２３；７４８、４１５；４４４；５６０、４１５；４４４；５６０；７４８、４１５；４４４、４１５；５１７、４１５；５１７；５６０、４１５；５１７；５６０；７４８、４１５；５６０；７２３、４１５；７２３；７４８、４１５；７２３；７４８、４１５；７４８、４４３；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、４４３；４４４；５１７；７４８

、４４３；４４４、４４３；４４４；５６０、４４３；４４４；７２３、４４３；５１７、４４４、４４４；５１７；５６０、４４４；５１７；７４８、４４４；７４８、４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、４４４；５６０；７２３、４４４；５６０、４４４；５６０；７２３、４４４；５１７、４４４；５１７；５６０、４４４；５１７；７２３；７４８、４４４；５６０；７４８、４４４；７２３、４４４；５１７；５６０、４４４；５６０；７２３、５１７；５６０、５１７；５６０；７４８、５１７；７２３、５１７；７４８、５１７；７４８、５６０、７２３および７２３；７４８から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、これらの位置は、配列番号３００を基準としてナンバリングされている。

【００１１】

本発明は、配列番号１２６２と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む操作されたペニシリンＧアシラーゼも提供し、２４、２４；２７；２８；７０１；７２９、２４；２８；５６；３０８；３７９；７０１、２４；２８；５６；７０１、２４；２８；７１；７０１、２４；２８；３２１；７０１、２４；２８；４５７；７０１、２４；３１；５６；３８６；７０１、２４；３１、２４；３１；５６；６９７、２４；３１；５６；７０１、２４；３１；５６；２６４；７０１；７５０、２４；３１；７１；７０１、２４；５６；１５４；２７０；６９７、２４；５６；６９７；７０１、２４；５６；７０１、２４；７１；７０１、２４；２２５；７０１、２４；４８４；７０１、２４；２８、２８；３１、３１；５６；７０１、５６；７１；７０１、５６；１１９；１４６；７０１、５６；１５４；７０１、５６；３２２；６９７；７０１、５６；６５８；７０１、５６；６９７；７０１、５６；７０１、５６；７０１；７１１、６９７、６９７；７０１、７１；７４、７１；７０１、１２９；５１１；７０１、１５４；７５４、１７７、４１０；６９７；７０１、４２３；７０１、４３１、６９７および７０１から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、これらの位置は、配列番号１２６２を基準としてナンバリングされている。

【００１２】

本発明は、配列番号１２８８と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む操作されたペニシリンＧシラーゼも提供し、２２、３１、３１；５６；２６４；３０８；３７９；４８４；５４７；７１１；７５０、３２、５０、５７、６９；７４、７１、７１；７４、７１；７４；１２９、７１；７４；１４５、７１；７４；２４８、７１；７４；４７０、７１；１４９、７５、１４１および３９４から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、これらの位置は、配列番号１２８８を基準としてナンバリングされている。

【００１３】

本発明は、配列番号１０３６と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む操作されたペニシリンＧアシラーゼも提供し、２、４７、１７６、２５３、２５５、３８４、４６０、４６７、５３６および６２３から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、これらの位置は、配列番号１０３６を基準としてナンバリングされている。

【００１４】

本発明は、配列番号１１９４と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む操作されたペニシリンＧアシラーゼも提供し、１２；１０３；１１９；１３１；２３３；３８４；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１１９；１３１；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１１９；２３３；３８４；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１１９；２３３；４４４；４６７；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１１９；２３３；４４４；４９４；５３６；Ｓ６４６、１２；１０３；１１

９；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１３１；２３３；４４４；４６７；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１３１；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１１９；２３３；３８４；４４４；４９４；Ｓ６４６、２８；２６４；３８４；４６７；４８４；５３６；５４７、１０３；１１９；１３１；２３３；３８４；４４４；４９４；Ｓ６４６、１０３；１１９；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、１０３；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、２６４；３８４；４６７；４８４；５３６；５４７、３８４；４６７；４８４；５３６；５４７および６６８から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、これらの位置は、配列番号１１９４を基準としてナンバリングされている。

【００１５】

本発明は、配列番号１２８８と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む操作されたペニシリンＧアシラーゼも提供し、２０；７０９、２７、２７；７４；２５３；２５４、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０；３８１、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３４８；３７０；３８４、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３６９；３７０、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３７０、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３７０；３８１；３８４、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３８１、２７；７４；２５３；２５４；３４８、２７；７４；２５３；２５４；３８４、２７；７４；２５３；２５５、２７；７４；２５３；２５５；３４８；３７０；３８４、２７；７４；２５３；２５５；３４８；３８１、２７；７４；２５３；２５５；３４８；３８４、２７；７４；２５３；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５３；３４８；３６９；３７０；３８１、２７；７４；２５３；３４８；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；７４；２５３；３４８；３７０、２７；７４；２５３；３８１；３８４、２７；７４；２５３；３８４、２７；７４；２５４；２５５；３４８、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０；３８１、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３７０、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３８１、２７；７４；２５４；２５５；３８１、２７；７４；２５４；３４８；３８１；３８４、２７；７４；２５４；３６９；３７０、２７；７４；２５５；３４８、２７；７４；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５５；３４８；３６９；３８１；３８４、２７；７４；２５５；３７０、２７；７４；３４８、２７；７４；３６９；３７０、２７；７４；１０７；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５３、２７；７４；２５３；２５４；２５５、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３４８；３７０、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３６９；３７０；３８１、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３６９；３８４、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３７０、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３７０；３８１、２７；７４；２５３；２５４；３６９、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３７０、２７；７４；２５３；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５３；２５５；３７０、２７；７４；２５３；３４８、２７；７４；２５３；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；７４；２５３；３６９；３８１；３８４、２７；７４；２５４、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３６９；３８１、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３７０；３８１、２７；７４；２５４；２５５；３６９、２７；７４；２５４；３４８、２７；７４；２５４；３４８；３６９；３８１；３８４、２７；７４；２５４；３４８；３７０、２７；７４；２５４；３４８；３７０；３８１、２７；７４；２５４；３８４、２７；７４；２５５；３４８；３７０、２７；７４；３４８；３８４、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３６９、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３８１；３８４、２７；７４；２５３；３７０、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３８１；３８４、２７；７４；３７０、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３４８

、２７；７４；２５３；２５５；３４８；３７０；３８１、２７；７４；２５３；２５５；３８４、２７；７４；２５３；３４８；３６９；３７０；３８４、２７；７４；２５３；３４８；３８１、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３６９；３８４、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；７４；２５４；２５５；３７０、２７；７４；２５４；３４８；３８１、２７；７４；２５４；３６９；３８４、２７；７４；２５５、２７；７４；２５５；３４８；３６９；３８１、２７；７４；３４８；３７０、２７；７４；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；２５３、２７；２５３；２５４、２７；２５３；２５４；２５５、２７；２５３；２５４；２５５；２６０；３４８；３８１；３８４、２７；２５３；２５４；２５５；３４８、２７；２５３；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；２５３；２５４；２５５；３４８；３６９；３８４、２７；２５３；２５４；２５５；３４８；３７０、２７；２５３；２５４；２５５；３４８；３７０；３８４、２７；２５３；２５４；２５５；３４８；３８１；３８４、２７；２５３；２５４；３４８、２７；２５３；２５４；３４８；３７０；３８１、２７；２５３；２５４；３４８；３７０；３８４、２７；２５３；２５４；３４８；３８１、２７；２５３；２５４；３４８；３８１；３８４、２７；２５３；２５４；３４８；３８４、２７；２５３；２５４；３８１、２７；２５３；２５４；３８１；３８４、２７；２５３；２５４；３８４、２７；２５３；２５５；３４８、２７；２５３；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；２５３；２５５；３４８；３８１、２７；２５３；２５５；３４８；３８４、２７；２５３；２５５；３７０、２７；２５３；２５５；３７０；３８１；３８４、２７；２５３；３４８、２７；２５３；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；２５３；３４８；３７０；３８４、２７；２５３；３４８；３８１；３８４、２７；２５３；３６９；３７０、２７；２５３；３８１；３８４、２７；２５４；２５５、２７；２５４；２５５；３４８、２７；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；２５４；２５５；３４８；３７０、２７；２５４；２５５；３４８；３７０；３８１、２７；２５４；２５５；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；２５４；２５５；３４８；３７０；３８４、２７；２５４；２５５；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；２５４；２５５；３７０、２７；２５４；２５５；３８１；３８４、２７；２５４；２５５；３８４、２７；２５４；３４８；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；２５４；３４８；３７０、２７；２５４；３４８；３８１；３８４、２７；２５４；３４８；３８４、２７；２５４；３６９；３８１；３８４、２７；２５４；４４９、２７；２５４；４７０、２７；２５５；３４８、２７；２５５；３４８；３７０、２７；２５５；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；２５５；３４８；３８１；３８４、２７；２５５；３７０、２７；３４８、２７；３４８；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；３４８；３８１、２７；３４８；３８４、６９、７４；２５３；２５４；３６９；３７０、７４；２５４；２５５；３４８；３８４、８４、１２８、１３１、１３２、１３３、１３４、２５３、２５３；３４８；３７０、２５４、２５５、２５５；３４８；３７０、２５６、３１７；３８０、３４８；４６７、３７０、３７３、３７７、３８１、３８１；６７２、３８３、３８４、３８８、４５３、４５７、４６７、４７２、６１５、６１６、６１８、６１９、６２０、６２３、６２７、７０１、７０５、７０６、７０８および７０９から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、これらの位置は、配列番号１２８８を基準としてナンバリングされている。

【００１６】

本発明は、配列番号１２６２と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む操作されたペニシリンＧアシラーゼも提供し、２４；３１；５６；７０１、２４；３１；５６；７０１、２４；３１；７１；７０１、２４；５６；７０１および７１；７４から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、これらの位置は、配列番号１２６２を基準としてナンバリングされている。

【００１７】
本発明は、配列番号３～１９０１の奇数番号の配列に提供されている少なくとも１つの配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一の配列を含む操作されたペニシリンＧアシラーゼを提供する。
【００１８】
本発明はさらに、本明細書中に提供される少なくとも１つのペニシリンＧアシラーゼを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態において、それらの組成物は、少なくとも１つの固定化されたペニシリンＧアシラーゼを含む。
【００１９】
本発明は、配列番号３、７、１３、２９９、１０３５、１１９３、１２６１および／または１２８７から選択される配列に対して少なくとも約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％またはそれを超える配列同一性を有するポリヌクレオチド配列によってコードされるペニシリンＧアシラーゼも提供する。いくつかの実施形態において、ペニシリンＧアシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号３、７、１３、２９９、１０３５、１１９３、１２６１および／または１２８７から選択される配列に対して少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超える配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、そのポリヌクレオチド配列は、配列番号３、７、１３、２９９、１０３５、１１９３、１２６１および／または１２８７から選択される。いくつかの実施形態において、操作されたポリヌクレオチド配列は、配列番号３～１９０１の奇数番号の配列に提供されている少なくとも１つの配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一の配列を含む。
【００２０】
本発明は、本明細書中に提供されるポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号３、７、１３、２９９、１０３５、１１９３、１２６１および／または１２８７）を含むベクターも提供する。本発明は、本明細書中に提供されるベクター（例えば、配列番号３、７、１３、２９９、１０３５、１１９３、１２６１および／または１２８７のポリヌクレオチド配列を含むベクター）を含む宿主細胞も提供する。いくつかの実施形態において、それらのベクターは、配列番号３～１９０１の奇数番号の配列に提供されている少なくとも１つの配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一の配列を含む少なくとも１つの操作されたポリヌクレオチド配列を含む。
【００２１】
本発明は、本明細書中に提供されるベクターを含む宿主細胞も提供する。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、原核細胞または真核細胞である。いくつかのさらなる実施形態において、宿主細胞は、細菌細胞である。いくつかのさらなる実施形態において、宿主細胞は、大腸菌である。
【００２２】
本発明はさらに、本明細書中に提供される少なくとも１つの操作されたペニシリンＧアシラーゼを含む組成物を提供する。さらに、本発明は、本明細書中に提供される操作されたペニシリンＧアシラーゼを生成するための方法を提供し、その方法は、本明細書中に提供される宿主細胞を、操作されたペニシリンＧアシラーゼが産生されるような条件下で培養する工程を含む。いくつかの実施形態において、それらの方法は、産生された操作されたペニシリンＧアシラーゼを回収する工程をさらに含む。
【００２３】
本発明は、フェニルアセテートで保護されたインスリンを生成するための方法も提供し、その方法は、ｉ）本明細書中に提供される少なくとも１つの操作されたペニシリンＧア

シラーゼおよび／または本明細書中に提供される少なくとも１つの操作されたペニシリンＧアシラーゼを含む組成物、ならびにＡ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテート保護基を含むインスリンまたは遊離インスリンを提供する工程；およびｉｉ）操作されたペニシリンＧアシラーゼがＡ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテート保護基を除去し、かつ遊離インスリン、二保護されたインスリンまたは一保護されたインスリンが生成されるような条件下で、操作されたペニシリンＧアシラーゼを、Ａ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテート保護基を含むインスリンに曝露する工程；ｉｉｉ）操作されたペニシリンＧアシラーゼがフェニルアセテート保護基を付加し、かつ三保護されたインスリン、二保護されたインスリンまたは一保護されたインスリンが生成されるような条件下で、操作されたペニシリンＧアシラーゼをインスリンに曝露する工程を含む。それらの方法のいくつかの実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８と少なくとも約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％またはそれを超えて同一である。それらの方法のいくつかの実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８と少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一である。それらの方法のいくつかのさらなる実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８を含む。いくつかの実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、配列番号４～１９０２に提供されている少なくとも１つの偶数番号の配列と少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一である。いくつかの実施形態において、操作されたペニシリンＧアシラーゼは、野生型ペニシリンＧアシラーゼよりも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％を超える、またはそれを超えて多い遊離インスリンを生成する。本発明は、本発明の方法を用いて生成される遊離インスリンを含む組成物も提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書中に提供されるいずれかの方法に従って生成されるフェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを含む組成物を提供する。

【００２４】

本発明は、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するための方法も提供し、その方法は、ｉ）少なくとも１つの操作されたペニシリンＧアシラーゼおよび／または本明細書中に提供される少なくとも１つの操作されたペニシリンＧアシラーゼを含む組成物、ならびに遊離インスリンを提供する工程；およびｉｉ）操作されたペニシリンＧアシラーゼが、Ａ１、Ｂ１および／またはＢ２９位をアシル化することによって、一保護または二保護されたインスリンを生成するような条件下で、操作されたペニシリンＧアシラーゼをインスリンに曝露する工程を含む。いくつかの実施形態において、ペニシリン（ｐｅｎｃｉｌｌｉｎ）Ｇアシラーゼは、インスリンのＡ１位をアシル化し、他のいくつかの実施形態では、ペニシリンＧアシラーゼは、インスリンのＢ１位をアシル化し、なおもさらなる実施形態では、ペニシリンＧアシラーゼは、インスリンのＢ２９位をアシル化する。いくつかの実施形態において、ペニシリンＧアシラーゼは、インスリンのＡ１、Ｂ１およびＢ２９位をアシル化する。いくつかのさらなる実施形態において、操作されたペニシリンＧアシラーゼは、配列番号２のポリペプチドによるフェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンの生成と比べて、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％を超える、またはそれを超えて多い、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成する。いくつかのさらなる実施形態において、Ａ１、Ｂ１および／またはＢ２９をアシル化するために使用されるペニシリンＧアシラーゼは、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８に対して少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％

、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超える同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、配列番号４～１９０２に提供されている少なくとも１つの偶数番号の配列と少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一である。

【００２５】

上記方法のいくつかのさらなる実施形態において、ペニシリンＧアシラーゼは、表５．１、６．１、７．１、８．１、８．２、９，１、１０．１、１２．１、１２．２、１２．３、１２．４、１２．５、１２．６および／または１２．７における少なくとも１つの配列に対して少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超える同一性を有する配列を含む。上記方法のなおもさらなる実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、表５．１、６．１、７．１、８．１、８．２、９，１、１０．１、１２．１、１２．２、１２．３、１２．４、１２．５、１２．６および／または１２．７のいずれかに示されている配列を含む。

【００２６】

本発明は、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するための方法も提供し、その方法は、ｉ）請求項１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼおよびインスリンを提供する工程；およびｉｉ）操作されたペニシリンＧアシラーゼが、Ａ１、Ｂ１および／またはＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基をインスリンに付加することによって、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するような条件下で、操作されたペニシリンＧアシラーゼをインスリンに曝露する工程を含む。いくつかの実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、インスリンのＡ１トリ－フェニルアセテート保護基を付加し、いくつかのさらなる実施形態では、本ペニシリンＧアシラーゼは、インスリンのＢ１トリ－フェニルアセテート保護基を付加し、なおもさらなる実施形態では、本ペニシリンＧアシラーゼは、インスリンのＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を付加する。いくつかのさらなる実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、インスリンのＡ１、Ｂ１およびＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を付加する。いくつかの実施形態において、操作されたペニシリンＧアシラーゼは、配列番号２のポリペプチドによるフェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンの生成と比べて、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％を超える、またはそれを超えて多い、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成する。いくつかのさらなる実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８に対して少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超える同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、本ペニシリンＧアシラーゼは、配列番号４～１９０２に提供されている少なくとも１つの偶数番号の配列と少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一である。

【００２７】

本発明は、本明細書中に提供される方法のいずれかに従って生成されるフェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを含む組成物も提供する。

【００２８】

本発明はさらに、ペニシリンＧアシラーゼが配列番号８３７、８９７、１２１９または１８５９を含む方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００２９】

【図１】図１は、インスリンを定量するために用いられた分析方法のクロマトグラムおよびアシル化産物の溶出順を提供している。

【００３０】

【図２Ａ】図２は、実施例１１に記載される実験の結果を提供している。
【図２Ｂ】同上。
【図２Ｃ】同上。
【図２Ｄ】同上。
【図２Ｅ】同上。
【図２Ｆ】同上。
【図２Ｇ】同上。
【図２Ｈ】同上。
【発明を実施するための形態】
【００３１】
発明の説明
本発明は、ペニシリンをフェニル酢酸および６－アミノペニシラン酸（６－ＡＰＡ）（６－ＡＰＡは、多種多様のβ－ラクタム抗生物質の合成における重要な中間体である）に切断することができる操作されたペニシリンＧアシラーゼ（ＰＧＡ）を提供する。特に、本発明は、遊離インスリンのＡ１、Ｂ１またはＢ２９位に保護基を付加することによって、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成することができるか、またはＡ１／Ｂ１／Ｂ２９で三保護されたインスリンから保護基を除去するかもしくはＡ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテート保護基を除去することにより遊離インスリンを放出することができる、操作されたＰＧＡを提供する。
【００３２】
一般に、天然に存在するＰＧＡは、アルファサブユニットおよびベータサブユニットから構成されるヘテロ二量体の酵素である。野生型ＰＧＡは、周辺質への移行を媒介するＮ末端のシグナルペプチド、およびアルファサブユニットのＣ末端をベータサブユニットのＮ末端に接続するリンカー領域を含むプレプロＰＧＡポリペプチドとして天然に合成される。タンパク分解性プロセシングによって、成熟したヘテロ二量体の酵素となる。分子間のリンカー領域は、この酵素の適切な折り畳みの促進においても機能し得る。本明細書中に提供されるＰＧＡは、Ｋｌｕｙｖｅｒａ　ｃｉｔｒｏｐｈｉｌａ由来のＰＧＡに基づき、これには、下記で詳細に説明されるような改善された酵素特性をもたらすように様々な改変が導入されている。
【００３３】
本明細書中に提供される説明に対して、別段具体的に述べられていない限り、単数形の使用は、複数を含む（逆の場合も同じである）。例えば、単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、複数の指示対象を含む。同様に、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」および「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ」は、相互交換可能であり、限定することを意図していない。様々な実施形態の説明が、用語「含む」を使用する場合、当業者であれば、いくつかの具体的な場合において、実施形態が「～から本質的になる」または「～からなる」という言語を用いて代わりに説明され得ると理解するだろうとさらに理解されるべきである。
【００３４】
図面を含む前述の全般的な説明と以下の詳細な説明は両方とも、単に例示的かつ説明的であって、本開示を限定しない。さらに、本明細書中で使用される項の見出しは、単に構成上の目的であって、説明される主題の限定として解釈されるべきでない。
【００３５】
定義
本明細書中で使用されるとき、以下の用語は、以下の意味を有すると意図されている。
【００３６】
本開示に関して、本明細書中の説明において使用される専門用語および科学用語は、別段明確に定義されない限り、当業者が通常理解している意味を有する。したがって、以下の用語は、以下の意味を有すると意図されている。本明細書中で言及されるすべての特許

および刊行物は、そのような特許および刊行物内に開示されているすべての配列を含めて、参照により明確に援用される。別段示されない限り、本発明の実施は、分子生物学、発酵、微生物学および関連分野において通常使用される、当業者に公知の従来の手法を伴う。別段本明細書中で定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似または等価な任意の方法および材料を、本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法および材料が記載される。実際に、本明細書中に記載される特定の方法、プロトコルおよび試薬は、それらが使用されている文脈に応じて変化し得るので、本発明は、これらに限定されないと意図されている。本明細書中に提供される見出しは、本発明の様々な態様または実施形態の限定ではない。

【００３７】

それにもかかわらず、本発明の理解を促すために、いくつかの用語が下記で定義される。数値範囲は、その範囲を定義している数字を含む。したがって、本明細書中に開示されるすべての数値範囲は、そのようなより広い数値範囲内に入るより狭い数値範囲がすべて、本明細書中に明確に記載されたかのように、そのようなより狭いすべての数値範囲を包含すると意図されている。本明細書中に開示されるすべての最大（または最小）の数値限界は、そのようなより低い（またはより高い）数値限界が本明細書中に明確に記載されたかのように、すべてのより低い（またはより高い）数値限界を含むことも意図されている。

【００３８】

本明細書中で使用されるとき、用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」およびその同族言語は、それらの包括的意味で使用される（すなわち、用語「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」およびその対応する同族言語と等価である）。

【００３９】

本明細書中および添付の請求項で使用されるとき、単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈が明らかに他のことを指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「宿主細胞」（ａ“ｈｏｓｔ ｃｅｌｌ”）に対する言及は、複数のそのような宿主細胞を含む。

【００４０】

別段示されない限り、核酸は、左から右に５’から３’の向きで記載され、アミノ酸配列は、左から右にアミノからカルボキシの向きで記載される。

【００４１】

本明細書中に提供される見出しは、本明細書を全体として参照することによって有され得る本発明の様々な態様または実施形態の限定ではない。したがって、下記で定義される用語は、本明細書を全体として参照することによって、より完全に定義される。

【００４２】

本明細書中で使用されるとき、用語「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、長さまたは翻訳後修飾（例えば、グリコシル化、リン酸化、脂質化、ミリストイル化（ｍｙｒｉｓｔｉｌａｔｉｏｎ）、ユビキチン化など）を問わず、アミド結合によって共有結合的に連結された少なくとも２つのアミノ酸のポリマーを表すために本明細書中で交換可能に使用される。Ｄ－アミノ酸およびＬ－アミノ酸、ならびにＤ－アミノ酸とＬ－アミノ酸との混合物が、この定義に含められる。

【００４３】

本明細書中で使用されるとき、「ポリヌクレオチド」および「核酸」とは、共に共有結合的に連結された２つまたはそれを超えるヌクレオシドのことを指す。ポリヌクレオチドは、全体的にリボヌクレオシドを含み得る（すなわち、ＲＮＡ）か、全体的に２’デオキシリボヌクレオチドを含み得る（すなわち、ＤＮＡ）か、またはリボヌクレオシドと２’デオキシリボヌクレオシドとの混合物を含み得る。ヌクレオシドは、通常、標準的なホスホジエステル結合を介して共に連結されるが、ポリヌクレオチドは、１つまたはそれを超える非標準の結合を含み得る。ポリヌクレオチドは、一本鎖もしくは二本鎖であり得るか、ま

たは一本鎖領域と二本鎖領域の両方を含み得る。さらに、ポリヌクレオチドは、通常、天然に存在するコード核酸塩基（すなわち、アデニン、グアニン、ウラシル、チミンおよびシトシン）から構成されるが、１つまたはそれを超える改変されたかつ／または合成の核酸塩基（例えば、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチンなど）を含み得る。好ましくは、そのような改変されたまたは合成の核酸塩基は、コード核酸塩基であり得る。

【００４４】

本明細書中で使用されるとき、「ハイブリダイゼーションストリンジェンシー」は、核酸のハイブリダイゼーションにおける洗浄条件などのハイブリダイゼーション条件に関する。一般に、ハイブリダイゼーション反応は、より低いストリンジェンシーの条件下で行われた後、様々なより高いストリンジェンシーの洗浄を行う。用語「中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション」とは、標的ＤＮＡが、標的ＤＮＡに対して約６０％の同一性、好ましくは、約７５％の同一性、約８５％の同一性；標的ポリヌクレオチドに対して約９０％超の同一性を有する相補的な核酸に結合できるようにする条件のことを指す。例示的な中程度にストリンジェントな条件は、４２℃の５０％ホルムアミド、５×Ｄｅｎｈａｒｔ’ｓ溶液、５×ＳＳＰＥ、０．２％ＳＤＳにおけるハイブリダイゼーションの後、４２℃の０．２×ＳＳＰＥ、０．２％ＳＤＳで洗浄するのと等価な条件である。「高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション」とは、規定のポリヌクレオチド配列に対して溶液条件下で測定されたとき、熱融解温度Ｔｍから約１０℃またはそれより低い条件のことを広く指す。いくつかの実施形態において、高ストリンジェンシー条件とは、６５℃の０．０１８Ｍ　ＮａＣｌ中で安定なハイブリッドを形成するそれらの核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能にする条件のことを指す（すなわち、ハイブリッドが、６５℃の０．０１８Ｍ　ＮａＣｌ中において安定でない場合、それは、本明細書中で企図されるとき、高ストリンジェンシー条件下で安定でない）。高ストリンジェンシー条件は、例えば、４２℃の５０％ホルムアミド、５×Ｄｅｎｈａｒｔ’ｓ溶液、５×ＳＳＰＥ、０．２％ＳＤＳと等価な条件におけるハイブリダイゼーションの後、６５℃の０．１×ＳＳＰＥおよび０．１％ＳＤＳでの洗浄によって提供され得る。別の高ストリンジェンシー条件は、６５℃の０．１％（ｗ：ｖ）ＳＤＳを含む５×ＳＳＣ中でのハイブリダイズおよび６５℃の０．１％ＳＤＳを含む０．１×ＳＳＣ中での洗浄と等価な条件におけるハイブリダイズである。他の高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、ならびに中程度にストリンジェントな条件は、当業者に公知である。

【００４５】

本明細書中で使用されるとき、「コード配列」とは、タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸（例えば、遺伝子）の一部のことを指す。

【００４６】

本明細書中で使用されるとき、「コドン最適化」とは、コードされるタンパク質が、特定の生物において効率的に発現されるように、タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコドンをその目的の生物において優先的に使用されるコドンに変更することを指す。いくつかの実施形態において、ＰＧＡ酵素をコードするポリヌクレオチドは、発現のために選択された宿主生物から最適に生成されるようにコドン最適化され得る。遺伝暗号は、ほとんどのアミノ酸が、「同義語」コドンまたは「同義」コドンと呼ばれるいくつかのコドンによって表されるという点において縮重しているが、特定の生物によるコドン使用頻度は、ランダムではなく、特定のコドントリプレットに偏っていることが周知である。このコドン使用頻度の偏りは、低コピー数のタンパク質、およびある生物のゲノムのタンパク質コード領域が集まっている領域と比較して、所与の遺伝子、共通の機能または先祖起源の遺伝子、高度に発現されるタンパク質に関して、より高いことがある。いくつかの実施形態において、ＰＧＡ酵素をコードするポリヌクレオチドは、発現のために選択された宿主生物から最適に生成されるようにコドン最適化され得る。

【００４７】

本明細書中で使用されるとき、「好ましい最適な高コドン使用頻度バイアスコドン」とは、タンパク質コード領域において、同じアミノ酸をコードする他のコドンよりも高頻度

で使用されるコドンのことを交換可能に指す。好ましいコドンは、単一の遺伝子、共通の機能または起源の遺伝子セット、高度に発現される遺伝子におけるコドン使用頻度、全生物のタンパク質コード領域が集まっている領域におけるコドン頻度、関連する生物のタンパク質コード領域が集まっている領域におけるコドン頻度、またはそれらの組み合わせに関して決定され得る。遺伝子の発現レベルとともに頻度が上昇するコドンは、通常、発現にとって最適なコドンである。特定の生物においてコドン頻度（例えば、コドン使用頻度、相対的な同義コドン使用頻度）およびコドン優先度を測定するための種々の方法が知られており、それらとしては、多変量解析、例えば、クラスター解析または対応分析を用いる多変量解析が挙げられ、また、遺伝子において使用されるコドンの有効な数を測定するための種々の方法も知られている（例えば、ＧＣＧ　ＣｏｄｏｎＰｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｐａｃｋａｇｅ；ＣｏｄｏｎＷ，Ｊｏｈｎ　Ｐｅｄｅｎ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｎｏｔｔｉｎｇｈａｍ；ＭｃＩｎｅｒｎｅｙ，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍ．，１４：３７２－７３［１９９８］；Ｓｔｅｎｉｃｏら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２２２：４３７－４６［１９９４］；およびＷｒｉｇｈｔ，Ｇｅｎｅ　８７：２３－２９［１９９０］を参照のこと）。コドン使用頻度表は、広がりつつある生物一覧で入手可能である（例えば、Ｗａｄａら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２０：２１１１－２１１８［１９９２］；Ｎａｋａｍｕｒａら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２８：２９２［２０００］；Ｄｕｒｅｔら、前出；Ｈｅｎａｕｔ　ａｎｄ　Ｄａｎｃｈｉｎ，“Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ａｎｄ　Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ，”Ｎｅｉｄｈａｒｄｔら（編），ＡＳＭ　Ｐｒｅｓｓ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｄ．Ｃ．，［１９９６］，ｐ．２０４７－２０６６を参照のこと。コドン使用頻度を得るためのデータソースは、タンパク質をコードすることができる任意の利用可能なヌクレオチド配列に依存している場合がある。これらのデータセットは、発現されるタンパク質をコードすると実際に判明している核酸配列（例えば、完全なタンパク質コード配列－ＣＤＳ）、発現配列タグ（ＥＳＴＳ）、またはゲノム配列の予測されるコード領域を含む（例えば、Ｕｂｅｒｂａｃｈｅｒ，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，２６６：２５９－２８１［１９９６］；Ｔｉｗａｒｉら、Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．，１３：２６３－２７０［１９９７］を参照のこと）。

【００４８】

本明細書中で使用されるとき、「調節配列」は、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現に必要または有益であるすべての構成要素を含むと本明細書中で定義される。各調節配列は、目的のポリヌクレオチドにとって天然または外来のものであり得る。そのような調節配列としては、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列および転写ターミネーターが挙げられるがこれらに限定されない。

【００４９】

本明細書中で使用されるとき、「作動可能に連結された」は、調節配列が、目的のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現を指示または制御するように、その調節配列が、目的のポリヌクレオチドを基準としたある位置に適切に（すなわち、機能的な関係性で）置かれる配置として本明細書中で定義される。

【００５０】

本明細書中で使用されるとき、「プロモーター配列」とは、コード配列などの目的のポリヌクレオチドの発現のために、宿主細胞によって認識される核酸配列のことを指す。調節配列は、適切なプロモーター配列を含み得る。プロモーター配列は、目的のポリヌクレオチドの発現を媒介する転写調節配列を含む。プロモーターは、変異プロモーター、切断型プロモーターおよびハイブリッドプロモーターをはじめとした、選ばれた宿主細胞において転写活性を示す任意の核酸配列であってよく、宿主細胞に対して相同または異種の細胞外または細胞内のポリペプチドをコードする遺伝子から得てよい。

【００５１】

本明細書中で使用されるとき、「天然に存在する」または「野生型」とは、天然で見ら

れる形態のことを指す。例えば、天然に存在するまたは野生型のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然における起源から単離することができ、ヒトの操作によって意図的に改変されていない、生物の中に存在する配列である。

【００５２】

本明細書中で使用されるとき、「天然に存在しない」、「操作された」および「組換え」は、（例えば、細胞、核酸またはポリペプチド）に関して本開示において使用されるとき、天然では存在しない様式で改変された材料、またはその材料の天然（ｎａｔｕｒａｌ）もしく天然（ｎａｔｉｖｅ）の形態に対応する材料のことを指す。いくつかの実施形態において、その材料は、天然に存在する材料と同一であるが、合成の材料から生成されるかもしくは合成の材料に由来し、かつ／または組換え手法を用いる操作によって生成されるかもしくは組換え手法に由来する。非限定的な例としては、とりわけ、天然（非組換え）の形態の細胞では見られない遺伝子を発現する組換え細胞、または異なるレベルで別途発現される天然の遺伝子を発現する組換え細胞が挙げられる。

【００５３】

本明細書中で使用されるとき、「配列同一性のパーセンテージ」、「同一性パーセント」および「同一パーセント」は、ポリヌクレオチド配列間またはポリペプチド配列間の比較のことを指し、最適にアラインメントされた２つの配列を比較ウィンドウにわたって比較することによって測定され、ここで、その比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の一部は、それらの２つの配列を最適にアラインメントするために、参照配列と比べて付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。このパーセンテージは、同一の核酸塩基もしくはアミノ酸残基が両方の配列に存在する位置の数、または核酸塩基もしくはアミノ酸残基がギャップとアラインメントされた位置の数を測定して、マッチした位置の数を得て、そのマッチした位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で除算し、その結果に１００を乗算することにより、配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。最適なアラインメントおよび配列同一性パーセントの測定は、ＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ２．０アルゴリズム（例えば、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０［１９９０］；およびＡｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３３８９－３４０２［１９７７］を参照のこと）を用いて行われる。ＢＬＡＳＴ解析を行うためのソフトウェアは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎのウェブサイトを通じて公的に入手可能である。

【００５４】

簡潔には、ＢＬＡＳＴ解析は、まず、データベース配列における長さWのワードとアラインメントされたとき、正値の閾値スコアＴにマッチするかまたはそれを満たす、クエリー配列内の同じ長さの短いワードを特定することによって、高スコア配列対（ｈｉｇｈ ｓｃｏｒｉｎｇ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｐａｉｒｓ）（ＨＳＰ）を特定することを含む。Ｔは、隣接ワードスコア閾値（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、前出）と称される。これらの最初の隣接ワードヒットは、それらを含むより長いＨＳＰを見つけるための検索を開始するためのシードとして働く。次いで、累積アラインメントスコアが増加し得る限り、それらのワードヒットを、各配列に沿って両方向に伸長する。累積スコアは、ヌクレオチド配列の場合、パラメータＭ（マッチする残基対に対する報酬スコア；常に＞０）およびＮ（ミスマッチの残基に対するペナルティスコア；常に＜０）を用いて計算される。アミノ酸配列の場合、スコア行列を用いて、累積スコアが計算される。各方向におけるワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアが、達成された最大値から量Ｘだけ低下したとき；累積スコアが、１つまたはそれを超える負のスコアの残基アラインメントの蓄積に起因して０またはそれ未満になったとき；またはいずれかの配列の末端に到達したとき、停止される。ＢＬＡＳＴアルゴリズムのパラメータW、ＴおよびＸは、アラインメントの感度および速度を決定する。ＢＬＡＳＴＮプログラム（ヌクレオチド配列用）は、１１というワード長（Ｗ）、１０という期待値（Ｅ）、Ｍ＝５、Ｎ＝－４および両鎖比較をデフォルトとして使用する。アミノ酸配列の場合、ＢＬＡＳＴＰプログラムは、３というワード長（Ｗ）、１

０という期待値（Ｅ）およびＢＬＯＳＵＭ６２スコア行列（例えば、Ｈｅｎｉｋｏｆｆ ａｎｄ Ｈｅｎｉｋｏｆｆ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１０９１５［１９８９］を参照のこと）をデフォルトとして使用する。

【００５５】

２つの配列に対する同一性パーセントを提供する際にＢＬＡＳＴと同様に機能する数多くの他のアルゴリズムも利用可能であり、当該分野で公知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、当該分野で公知の任意の好適な方法（例えば、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２［１９８１］のローカルホモロジーアルゴリズム；Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３［１９７０］のホモロジーアラインメントアルゴリズム；Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：２４４４［１９８８］の類似性検索法；および／またはこれらのアルゴリズム［ＧＣＧ ＷｉｓｃｏｎｓｉｎソフトウェアパッケージにおけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡおよびＴＦＡＳＴＡ］のコンピュータによる実行）を用いて、または当該分野で一般に公知の方法を用いる目視検査によって、行われ得る。さらに、配列アラインメントおよび配列同一性パーセントの測定は、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎソフトウェアパッケージ（Ａｃｃｅｌｒｙｓ，Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ）におけるＢＥＳＴＦＩＴまたはＧＡＰプログラムを、提供されているデフォルトのパラメータを使用して用いることができる。

【００５６】

本明細書中で使用されるとき、「実質的な同一性」とは、少なくとも２０残基位置の比較ウィンドウにわたって、頻繁には、少なくとも３０～５０残基のウィンドウにわたって参照配列と比べて、少なくとも８０パーセントの配列同一性、少なくとも８５パーセントの同一性および８９～９５パーセントの配列同一性、より一般的には、少なくとも９９パーセントの配列同一性を有するポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列のことを指し、ここで、その配列同一性のパーセンテージは、比較ウィンドウにわたって欠失または付加が総計で参照配列の２０パーセントまたはそれ未満となる欠失または付加を含む配列と参照配列を比較することによって計算される。ポリペプチドに適用される特定の実施形態において、用語「実質的な同一性」は、２つのポリペプチド配列が、デフォルトのギャップウェイトを用いるプログラムＧＡＰまたはＢＥＳＴＦＩＴなどによって最適にアラインメントされたとき、少なくとも８０パーセントの配列同一性、好ましくは、少なくとも８９パーセントの配列同一性、少なくとも９５パーセントの配列同一性またはそれを超える配列同一性（例えば、９９パーセントの配列同一性）を共有することを意味する。いくつかの好ましい実施形態において、同一でない残基の位置は、保存的アミノ酸置換によって異なる。

【００５７】

本明細書中で使用されるとき、「参照配列」とは、別の配列と比較される規定の配列のことを指す。参照配列は、より大きな配列のサブセット、例えば、完全長の遺伝子またはポリペプチド配列のセグメントであり得る。一般に、参照配列は、少なくとも２０ヌクレオチド長またはアミノ酸残基長、少なくとも２５残基長、少なくとも５０残基長、または完全長の核酸もしくはポリペプチドである。２つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、各々、（１）それらの２つの配列の間で類似の配列（すなわち、完全な配列の一部）を含み得、（２）それらの２つの配列の間で互いに異なる配列をさらに含み得るので、２つ（またはそれを超える）ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの間の配列比較は、通常、それらの２つのポリヌクレオチドの配列を比較ウィンドウにわたって比較して、配列が類似する局所領域を特定し、比較することによって行われる。用語「参照配列」は、野生型配列に限定されないと意図されており、操作または変更された配列を含み得る。例えば、いくつかの実施形態において、「参照配列」は、予め操作または変更されたアミノ酸配列であり得る。

【００５８】

本明細書中で使用されるとき、「比較ウィンドウ」とは、少なくとも約２０個連続した

ヌクレオチド位置またはアミノ酸残基の概念的なセグメントのことを指し、ここで、ある配列が、少なくとも２０個連続したヌクレオチドまたはアミノ酸の参照配列と比較され得、その比較ウィンドウ内のその配列の一部は、それらの２つの配列を最適にアラインメントするために、参照配列（付加または欠失を含まない）と比べて２０パーセントまたはそれ未満の付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。比較ウィンドウは、２０個連続した残基より長い場合があり、必要に応じて、３０、４０、５０、１００またはそれより長いウィンドウを含む。

【００５９】

本明細書中で使用されるとき、「～に対応する」、「～を基準として」および「～に対する」は、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列のナンバリングの文脈において使用されるとき、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列を参照配列と比較したときの、特定の参照配列の残基のナンバリングのことを指す。換言すれば、所与のポリマーの残基番号または残基位置は、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列における残基の実際の数値的な位置ではなく、参照配列を基準にして指摘される。例えば、所与のアミノ酸配列（例えば、操作されたＰＧＡのアミノ酸配列）は、その所与のアミノ酸配列と参照配列との間の残基のマッチを最適化するためにギャップを導入することによって、参照配列とアラインメントされ得る。これらの場合、ギャップが存在するが、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列における残基のナンバリングは、アラインメントされた参照配列を基準にして行われる。本明細書中で使用されるとき、下記でさらに説明されるように、「Ｘｎ」などの残基位置に対する言及は、別段明確に述べられない限り、「～に対応する残基」に対して言及していると解釈されるべきである。したがって、例えば、「Ｘ９４」とは、ポリペプチド配列における９４位の任意のアミノ酸のことを指す。

【００６０】

本明細書中で使用されるとき、「改善された酵素特性」とは、参照ＰＧＡと比べて、任意の酵素特性に改善を示すＰＧＡのことを指す。本明細書中に記載される操作されたＰＧＡポリペプチドの場合、比較は、通常、野生型ＰＧＡ酵素に対して行われるが、いくつかの実施形態において、参照ＰＧＡは、別の改善された操作されたＰＧＡであり得る。改善が望ましい酵素特性としては、酵素活性（特定の量のＰＧＡを用いたときの特定の反応時間における基質の変換パーセントに関して表現され得る）、化学選択性、熱安定性、溶媒安定性、ｐＨ活性プロファイル、補因子の必要性、阻害剤（例えば、生成物阻害）に対する不応性、立体特異性および立体選択性（エナンチオ選択性を含む）が挙げられるがこれらに限定されない。

【００６１】

本明細書中で使用されるとき、「増加した酵素活性」とは、参照ＰＧＡ酵素と比べたときの、特定の活性（例えば、生成される生成物／時間／タンパク質重量）の増加または基質から生成物への変換パーセントの上昇（例えば、特定の量のＰＧＡを用いたときの特定の時間における、出発量の基質から生成物への変換パーセント）によって表され得る、操作されたＰＧＡポリペプチドの改善された特性のことを指す。酵素活性を測定する例示的な方法は、実施例に提供される。Ｋｍ、Ｖｍａｘまたはｋｃａｔといった従来の酵素特性（その変化は酵素活性の増加をもたらし得る）をはじめとした、酵素活性に関する任意の特性が影響を受け得る。酵素活性の改善は、天然に存在するＰＧＡ、または本ＰＧＡポリペプチドが由来した別の操作されたＰＧＡよりも、対応する野生型ＰＧＡ酵素の酵素活性の約１．５倍から、２倍、５倍、１０倍、２０倍、２５倍、５０倍、７５倍、１００倍またはそれを超えて高い酵素活性であり得る。特定の実施形態において、操作されたＰＧＡ酵素は、親ＰＧＡ酵素よりも１．５～５０倍、１．５～１００倍高いという範囲の改善された酵素活性を示す。任意の酵素の活性は、触媒代謝回転速度が、任意の必要とされる補因子を含む基質の拡散速度を超えることができないような限定的な拡散であることが、当業者によって理解される。拡散限界、すなわちｋｃａｔ／Ｋｍの理論上の最大値は、通常、約１０^{8}～１０^{9}（Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$）である。ゆえに、ＰＧＡの酵素活性の任意の改善が、ＰＧＡ酵素が作用する基質の拡散速度に関する上限を有する。ＰＧＡ活性は、ペニシリ

ンＧの切断時のフェニル酢酸の放出を計測するために用いられる標準的なアッセイ（例えば、滴定）のいずれか１つによって計測され得る（例えば、Ｓｉｍｏｎｓ ａｎｄ Ｇｉｂｓｏｎ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｔｅｃｈ．，１３：３６５－３６７［１９９９］を参照のこと）。いくつかの実施形態において、ＰＧＡ活性は、切断産物である５－アミノ－２－ニトロ－安息香酸が分光光度的に検出可能である（λｍａｘ＝４０５ｎｍ）６－ニトロフェニルアセトアミド安息香酸（ＮＩＰＡＢ）を使用することによって計測され得る。酵素活性の比較は、本明細書中で詳細にさらに説明されるように、規定の酵素調製物、あるセット条件下での規定のアッセイおよび１つまたはそれを超える規定の基質を用いて行われる。通常、溶解産物が比較されるとき、宿主細胞によって産生される酵素の量および溶解産物中に存在する酵素の量のばらつきを最小限にするために、アッセイされる細胞の数およびタンパク質の量が、決定され、ならびに同一の発現系および同一の宿主細胞が使用される。

【００６２】

本明細書中で使用されるとき、「増加した酵素活性」および「増加した活性」とは、本明細書中に記載されるような参照酵素と比べたときの、特定の活性（例えば、生成される生成物／時間／タンパク質重量）の増加または基質から生成物への変換パーセントの上昇（例えば、特定の量のＰＧＡを用いたときの特定の時間における、出発量の基質から生成物への変換パーセント）によって表され得る、操作された酵素の改善された特性のことを指す。Ｋｍ、Ｖｍａｘまたはｋｃａｔといった従来の酵素特性（その変化は酵素活性の増加をもたらし得る）をはじめとした、酵素活性に関する任意の特性が影響を受け得る。いくつかの実施形態において、本明細書中に提供されるＰＧＡ酵素は、インスリンの特定の残基からトリ－フェニルアセテート保護基を除去することによって、インスリンを遊離する。酵素活性の比較は、本明細書中で詳細にさらに説明されるように、規定の酵素調製物、あるセット条件下での規定のアッセイおよび１つまたはそれを超える規定の基質を用いて行われる。通常、細胞溶解産物中の酵素が比較されるとき、宿主細胞によって産生される酵素の量および溶解産物中に存在する酵素の量のばらつきを最小限にするために、アッセイされる細胞の数およびタンパク質の量が決定され、ならびに同一の発現系および同一の宿主細胞が使用される。

【００６３】

本明細書中で使用されるとき、「変換」とは、基質から対応する生成物への酵素による変換のことを指す。

【００６４】

本明細書中で使用されるとき、「変換パーセント」とは、特定の条件下においてある時間内に生成物に変換される基質のパーセントのことを指す。したがって、例えば、ＰＧＡポリペプチドの「酵素活性」または「活性」は、基質から生成物への「変換パーセント」として表現され得る。

【００６５】

本明細書中で使用されるとき、「化学選択性」とは、化学反応または酵素反応において、１つの生成物が別の生成物よりも優先的に形成されることを指す。

【００６６】

本明細書中で使用されるとき、「熱安定性」および「耐熱性」は、ある時間（例えば、０．５～２４時間）にわたって一連の温度条件（例えば、４０～８０℃）に曝露されたとき、無処理の酵素と比べて不活性化に対して抵抗性であるがゆえに、高温に曝露された後にある特定のレベルの残留活性（例えば、６０％超から８０％）を保持するポリペプチドのことを指すために交換可能に使用される。

【００６７】

本明細書中で使用されるとき、「溶媒安定性」とは、ある時間（例えば、０．５～２４時間）にわたって様々な濃度（例えば、５～９９％）の溶媒（例えば、イソプロピルアルコール、テトラヒドロフラン、２－メチルテトラヒドロフラン、アセトン、トルエン、酢酸ブチル、メチルｔｅｒｔ－ブチルエーテルなど）に曝露された後、無処理の酵素と比べ

て同様の活性（例えば、６０％～８０％を超える）をポリペプチドが維持する能力のことを指す。

【００６８】

本明細書中で使用されるとき、「ｐＨ安定性」とは、ある時間（例えば、０．５～２４時間）にわたって高いまたは低いｐＨ（例えば、４．５～６または８～１２）に曝露された後、無処理の酵素と比べて同様の活性（例えば、６０％～８０％を超える）を維持するＰＧＡポリペプチドのことを指す。

【００６９】

本明細書中で使用されるとき、「熱および溶媒安定性」とは、熱安定性と溶媒安定性の両方であるＰＧＡポリペプチドのことを指す。

【００７０】

本明細書中で使用されるとき、「親水性アミノ酸または残基」とは、Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇらの正規化されたコンセンサス疎水性スケール（Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１７９：１２５－１４２［１９８４］）によるところの０未満の疎水性を示す側鎖を有するアミノ酸または残基のことを指す。遺伝的にコードされる親水性アミノ酸としては、Ｌ－Ｔｈｒ（Ｔ）、Ｌ－Ｓｅｒ（Ｓ）、Ｌ－Ｈｉｓ（Ｈ）、Ｌ－Ｇｌｕ（Ｅ）、Ｌ－Ａｓｎ（Ｎ）、Ｌ－Ｇｌｎ（Ｑ）、Ｌ－Ａｓｐ（Ｄ）、Ｌ－Ｌｙｓ（Ｋ）およびＬ－Ａｒｇ（Ｒ）が挙げられる。

【００７１】

本明細書中で使用されるとき、「酸性アミノ酸または残基」とは、そのアミノ酸がペプチドまたはポリペプチドの中に含められているとき約６未満のｐＫ値を示す側鎖を有する親水性アミノ酸または残基のことを指す。酸性アミノ酸は、代表的には、水素イオンの喪失に起因して、生理学的ｐＨにおいて負に帯電した側鎖を有する。遺伝的にコードされる酸性アミノ酸としては、Ｌ－Ｇｌｕ（Ｅ）およびＬ－Ａｓｐ（Ｄ）が挙げられる。

【００７２】

本明細書中で使用されるとき、「塩基性アミノ酸または残基」とは、そのアミノ酸がペプチドまたはポリペプチドの中に含められているとき約６を超えるｐＫ値を示す側鎖を有する親水性アミノ酸または残基のことを指す。塩基性アミノ酸は、代表的には、ヒドロニウムイオンとの会合に起因して、生理学的ｐＨにおいて正に帯電した側鎖を有する。遺伝的にコードされる塩基性アミノ酸としては、Ｌ－Ａｒｇ（Ｒ）およびＬ－Ｌｙｓ（Ｋ）が挙げられる。

【００７３】

本明細書中で使用されるとき、「極性アミノ酸または残基」とは、生理学的ｐＨにおいて無電荷である側鎖を有するが、２つの原子が共通して共有する電子対がそれらの原子のうちの一方によってより密接に保持されている少なくとも１つの結合を有する、親水性アミノ酸または残基のことを指す。遺伝的にコードされる極性アミノ酸としては、Ｌ－Ａｓｎ（Ｎ）、Ｌ－Ｇｌｎ（Ｑ）、Ｌ－Ｓｅｒ（Ｓ）およびＬ－Ｔｈｒ（Ｔ）が挙げられる。

【００７４】

本明細書中で使用されるとき、「疎水性アミノ酸または残基」とは、Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇらの正規化されたコンセンサス疎水性スケール（Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１７９：１２５－１４２［１９８４］）によるところの０を超える疎水性を示す側鎖を有するアミノ酸または残基のことを指す。遺伝的にコードされる疎水性アミノ酸としては、Ｌ－Ｐｒｏ（Ｐ）、Ｌ－Ｉｌｅ（Ｉ）、Ｌ－Ｐｈｅ（Ｆ）、Ｌ－Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌ－Ｌｅｕ（Ｌ）、Ｌ－Ｔｒｐ（Ｗ）、Ｌ－Ｍｅｔ（Ｍ）、Ｌ－Ａｌａ（Ａ）およびＬ－Ｔｙｒ（Ｙ）が挙げられる。

【００７５】

本明細書中で使用されるとき、「芳香族アミノ酸または残基」とは、少なくとも１つの芳香族環または芳香族複素環を含む側鎖を有する親水性または疎水性のアミノ酸または残基のことを指す。遺伝的にコードされる芳香族アミノ酸としては、Ｌ－Ｐｈｅ（Ｆ）、Ｌ－Ｔｙｒ（Ｙ）およびＬ－Ｔｒｐ（Ｗ）が挙げられる。Ｌ－Ｈｉｓ（Ｈ）は、その複素環

式芳香族窒素原子のｐＫａのせいで、時折、塩基性残基として分類されるか、またはその側鎖が芳香族複素環を含むので芳香族残基として分類されるが、本明細書中のヒスチジンは、親水性残基または「拘束（ｃｏｎｓｔｒａｉｎｅｄ）残基」（下記を参照のこと）として分類される。

【００７６】

本明細書中で使用されるとき、「拘束アミノ酸または残基」とは、拘束された配置を有するアミノ酸または残基のことを指す。本明細書中において、拘束残基としては、Ｌ－Ｐｒｏ（Ｐ）およびＬ－Ｈｉｓ（Ｈ）が挙げられる。ヒスチジンは、比較的小さいイミダゾール環を有するので、拘束された配置を有する。また、プロリンは、５員環を有するので、拘束された配置を有する。

【００７７】

本明細書中で使用されるとき、「非極性アミノ酸または残基」とは、生理学的ｐＨにおいて無電荷であり、２つの原子が共通して共有する電子対が通常それらの２つの原子の各々によって等しく保持されている結合を有する側鎖を有する（すなわち側鎖が極性でない）疎水性アミノ酸または残基のことを指す。遺伝的にコードされる非極性アミノ酸としては、Ｌ－Ｇｌｙ（Ｇ）、Ｌ－Ｌｅｕ（Ｌ）、Ｌ－Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌ－Ｉｌｅ（Ｉ）、Ｌ－Ｍｅｔ（Ｍ）およびＬ－Ａｌａ（Ａ）が挙げられる。

【００７８】

本明細書中で使用されるとき、「脂肪族アミノ酸または残基」とは、脂肪族炭化水素側鎖を有する疎水性アミノ酸または残基のことを指す。遺伝的にコードされる脂肪族アミノ酸としては、Ｌ－Ａｌａ（Ａ）、Ｌ－Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌ－Ｌｅｕ（Ｌ）およびＬ－Ｉｌｅ（Ｉ）が挙げられる。

【００７９】

システイン（または「Ｌ－Ｃｙｓ」もしくは「［Ｃ］」）は、他のＬ－Ｃｙｓ（Ｃ）アミノ酸または他のスルファニル含有アミノ酸もしくはスルフヒドリル含有アミノ酸とジスルフィド架橋を形成し得るという点において普通でないことに注意する。「システイン様残基」には、システイン、およびジスルフィド架橋の形成に利用可能なスルフヒドリル部分を含む他のアミノ酸が含まれる。Ｌ－Ｃｙｓ（Ｃ）（および－ＳＨ含有側鎖を有する他のアミノ酸）が、還元された遊離－ＳＨまたは酸化されたジスルフィド架橋型のいずれかとしてペプチドの中に存在できることは、Ｌ－Ｃｙｓ（Ｃ）が、ペプチドに対して正味の疎水性または親水性の特質を付与するか否かに影響する。Ｌ－Ｃｙｓ（Ｃ）が、Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇの正規化されたコンセンサススケール（Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇら、１９８４，前出）によるところの０．２９という疎水性を示す場合、本開示の目的で、Ｌ－Ｃｙｓ（Ｃ）は、それ自体のユニークな群にカテゴリー化されると理解されるべきである。

【００８０】

本明細書中で使用されるとき、「小さいアミノ酸または残基」とは、合計３つまたはそれより少ない炭素および／またはヘテロ原子（α－炭素および水素を除く）から構成される側鎖を有するアミノ酸または残基のことを指す。小さいアミノ酸または残基は、上記の定義に従って、脂肪族、非極性、極性または酸性の小さいアミノ酸または残基としてさらにカテゴリー化され得る。遺伝的にコードされる小さいアミノ酸としては、Ｌ－Ａｌａ（Ａ）、Ｌ－Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌ－Ｃｙｓ（Ｃ）、Ｌ－Ａｓｎ（Ｎ）、Ｌ－Ｓｅｒ（Ｓ）、Ｌ－Ｔｈｒ（Ｔ）およびＬ－Ａｓｐ（Ｄ）が挙げられる。

【００８１】

本明細書中で使用されるとき、「ヒドロキシル含有アミノ酸または残基」とは、ヒドロキシル（－ＯＨ）部分を含むアミノ酸のことを指す。遺伝的にコードされるヒドロキシル含有アミノ酸としては、Ｌ－Ｓｅｒ（Ｓ）Ｌ－Ｔｈｒ（Ｔ）およびＬ－Ｔｙｒ（Ｙ）が挙げられる。

【００８２】

本明細書中で使用されるとき、「アミノ酸相違」および「残基相違」とは、参照配列中の対応する位置におけるアミノ酸残基と比べたときの、あるポリペプチド配列のある位置

におけるアミノ酸残基の相違のことを指す。アミノ酸相違の位置は、通常、「Ｘｎ」（ここで、ｎは、その残基相違が基づく参照配列中の対応する位置のことを指す）として本明細書中で称される。例えば、「配列番号２と比べたときのＸ４０位における残基相違」とは、配列番号２の４０位に対応するポリペプチド位置におけるアミノ酸残基の相違のことを指す。したがって、配列番号２の参照ポリペプチドが、４０位にヒスチジンを有する場合、「配列番号２と比べたときのＸ４０位における残基相違」とは、配列番号２の４０位に対応するポリペプチドの位置におけるヒスチジン以外の任意の残基のアミノ酸置換のことを指す。本明細書中のほとんどの場合において、ある位置における特定のアミノ酸残基相違は、「ＸｎＹ」（ここで、「Ｘｎ」は、上に記載されたように対応する位置を特定し、「Ｙ」は、操作されたポリペプチドに見られるアミノ酸の一文字識別子（すなわち、参照ポリペプチドと異なる残基）である）として示される。いくつかの場合において、本開示は、従来の表示法「ＡｎＢ」（ここで、Ａは、参照配列における当該残基の一文字識別子であり、「ｎ」は、参照配列における当該残基の位置の番号であり、Ｂは、操作されたポリペプチドの配列における残基置換の一文字識別子である）によって表される特定のアミノ酸相違も提供する。いくつかの場合、本開示のポリペプチドは、参照配列と比べて残基相違が存在する特定の位置のリストによって示される、参照配列と比べて１つまたはそれを超えるアミノ酸残基相違を含み得る。いくつかの実施形態において、１種より多いアミノ酸が、あるポリペプチドの特定の残基位置において使用され得る場合、使用され得る様々なアミノ酸残基は、「／」によって区切られる（例えば、Ｘ１９２Ａ／Ｇ）。いくつかの実施形態において、置換セットにおける置換は、セミコロン（「；」）またはスラッシュ（「／」）によって区切られる（例えば、以下の置換セットを有するバリアントＰＧＡの場合－－配列番号８と比べてＹ２７Ｔ；Ｇ７１Ｈ；Ｄ７４Ｇ；Ｄ４８４Ｎ；Ｑ５４７Ｋ；Ｙ５８４Ｆ；Ｍ６９７Ｌ）。本開示は、保存的アミノ酸置換および非保存的アミノ酸置換のいずれか／または両方を含む１つまたはそれを超えるアミノ酸相違を含む操作されたポリペプチド配列を含む。本開示の配列表に含まれる特定の組換え炭酸脱水酵素ポリペプチドのアミノ酸配列は、開始メチオニン（Ｍ）残基を含む（すなわち、Ｍは、１位の残基である）。しかしながら、当業者は、この開始メチオニン残基が、生物学的プロセシング機構（例えば、宿主細胞またはインビトロ翻訳系において）によって除去されて、開始メチオニン残基を欠く成熟タンパク質を生成し得るが、その酵素の特性を保持することを理解する。その結果として、用語「配列番号２と比べたときのＸｎ位におけるアミノ酸残基相違」は、本明細書中で使用されるとき、開始メチオニンを欠くようにプロセシングされた参照配列における「Ｘｎ」位または対応する位置（例えば、（Ｘ－１）ｎ位）のことを指し得る。

【００８３】

本明細書中で使用されるとき、句「保存的アミノ酸置換」とは、同様の側鎖を有する残基の互換性のことを指し、ゆえに、代表的には、同じまたは同様の定義されたクラスのアミノ酸内のアミノ酸によるポリペプチド中のアミノ酸の置換を含む。例としてであって、限定されないが、いくつかの実施形態において、脂肪族側鎖を有するアミノ酸は、別の脂肪族アミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン）で置換され；ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸は、ヒドロキシル側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、セリンおよびトレオニン）で置換され；芳香族側鎖を有するアミノ酸は、芳香族側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびヒスチジン）で置換され；塩基性側鎖を有するアミノ酸は、塩基性側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、リジンおよびアルギニン）で置換され；酸性側鎖を有するアミノ酸は、酸性側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸）で置換され；かつ／または疎水性アミノ酸もしくは親水性アミノ酸は、それぞれ別の疎水性アミノ酸もしくは親水性アミノ酸で置換される。例示的な保存的置換を表１に提供する。

【表１】

表1. 例示的な保存的アミノ酸置換

残基	可能性のある保存的置換
A, L, V, I	他の脂肪族(A, L, V, I) 他の非極性(A, L, V, I, G, M)
G, M	他の非極性(A, L, V, I, G, M)
D, E	他の酸性(D, E)
K, R	他の塩基性(K, R)
N, Q, S, T	他の極性
H, Y, W, F	他の芳香族(H, Y, W, F)
C, P	非極性

【００８４】

本明細書中で使用されるとき、句「非保存的置換」とは、有意に異なる側鎖特性を有するアミノ酸によるポリペプチド中のアミノ酸の置換のことを指す。非保存的置換は、定義された群の中のアミノ酸ではなく、定義された群の間のアミノ酸を使用し得、（ａ）その置換の領域におけるペプチド骨格の構造（例えば、グリシンの場合、プロリン）（ｂ）電荷もしくは疎水性、または（ｃ）側鎖のかさ高さに影響する。例としてであって、限定されないが、例示的な非保存的置換は、塩基性アミノ酸または脂肪族アミノ酸で置換された酸性アミノ酸；小さいアミノ酸で置換された芳香族アミノ酸；および疎水性アミノ酸で置換された親水性アミノ酸であり得る。

【００８５】

本明細書中で使用されるとき、「欠失」とは、参照ポリペプチドから１つまたはそれを超えるアミノ酸を除去することによるポリペプチドの改変のことを指す。欠失は、操作された酵素の酵素活性を保持しつつかつ／または改善された特性を保持しつつ、１つもしくはそれを超えるアミノ酸、２つもしくはそれを超えるアミノ酸、５つもしくはそれを超えるアミノ酸、１０個もしくはそれを超えるアミノ酸、１５個もしくはそれを超えるアミノ酸または２０個もしくはそれを超えるアミノ酸、ポリペプチドを構成しているアミノ酸の総数の１０％までまたはアミノ酸の総数の２０％までの除去を含み得る。欠失は、ポリペプチドの内部の部分および／または末端の部分を対象とし得る。様々な実施形態において、欠失は、連続したセグメントを含み得るか、または不連続であり得る。

【００８６】

本明細書中で使用されるとき、「挿入」とは、参照ポリペプチドに１つまたはそれを超えるアミノ酸を付加することによるポリペプチドの改変のことを指す。いくつかの実施形態において、改善された操作されたＰＧＡ酵素は、天然に存在するＰＧＡポリペプチドへの１つまたはそれを超えるアミノ酸の挿入、ならびに操作されたＰＧＡポリペプチドへの１つまたはそれを超えるアミノ酸の挿入を含む。挿入は、ポリペプチドの内部の部分に存在し得るか、またはカルボキシ末端もしくはアミノ末端に存在し得る。本明細書中で使用される挿入は、当該分野で公知であるような融合タンパク質を含む。挿入は、天然に存在するポリペプチドにおいて、アミノ酸の連続したセグメントであり得るか、または１つもしくはそれを超えるアミノ酸によって分断され得る。

【００８７】

用語「アミノ酸置換セット」または「置換セット」とは、参照配列と比べたときの、ポリペプチド配列におけるアミノ酸置換の群のことを指す。置換セットは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５個またはそれを超えるアミノ酸置換を有し得る。いくつかの実施形態において、置換セットとは、実施例に提供されている表に列挙されているバリアントＰＧＡのいずれかに存在するアミノ酸の置換セットのことを指す。

【００８８】

本明細書中で使用されるとき、「フラグメント」とは、アミノ末端および／またはカルボキシ末端の欠失を有するが、残りのアミノ酸配列がその配列における対応する位置と同一である、ポリペプチドのことを指す。フラグメントは、代表的には、完全長ＰＧＡポリペプチド、例えば、配列番号２のポリペプチドの約８０％、約９０％、約９５％、約９８％または約９９％を有し得る。いくつかの実施形態において、フラグメントは、「生物学的に活性」である（すなわち、フラグメントは、完全長配列と同じ酵素活性を示す）。

【００８９】

本明細書中で使用されるとき、「単離されたポリペプチド」とは、天然ではそれとともに存在する他の夾雑物、例えば、タンパク質、脂質およびポリヌクレオチドから実質的に分離されたポリペプチドのことを指す。この用語は、天然に存在する環境または発現系（例えば、宿主細胞またはインビトロ合成）から取り出されたまたは精製されたポリペプチドを包含する。改善されたＰＧＡ酵素は、細胞内に存在し得るか、細胞培養液中に存在し得るか、または様々な形態（例えば、溶解産物または単離された調製物）で調製され得る。したがって、いくつかの実施形態において、本開示の操作されたＰＧＡポリペプチドは、単離されたポリペプチドであり得る。

【００９０】

本明細書中で使用されるとき、「実質的に純粋なポリペプチド」とは、そのポリペプチド種が、存在する優勢な種である（すなわち、モルベースまたは重量ベースで、その組成物中の他の任意の個別の高分子種よりも豊富である）組成物のことを指し、一般に、対象の種がモル基準または％重量基準で、存在する高分子種の少なくとも約５０パーセントを構成するとき、実質的に精製された組成物である。通常、実質的に純粋な操作されたＰＧＡポリペプチド組成物は、モル基準または％重量基準で、組成物中のすべての高分子種の約６０％もしくはそれを超えて、約７０％もしくはそれを超えて、約８０％もしくはそれを超えて、約９０％もしくはそれを超えて、約９１％もしくはそれを超えて、約９２％もしくはそれを超えて、約９３％もしくはそれを超えて、約９４％もしくはそれを超えて、約９５％もしくはそれを超えて、約９６％もしくはそれを超えて、約９７％もしくはそれを超えて、約９８％もしくはそれを超えて、または約９９％を構成する。溶媒種、小分子（＜５００ダルトン）および元素イオン種は、高分子種とみなされない。いくつかの実施形態において、単離された改善されたＰＧＡポリペプチドは、実質的に純粋なポリペプチド組成物である。

【００９１】

本明細書中で使用されるとき、核酸またはポリペプチドに関連して使用されるとき、用語「異種」とは、通常は生物（例えば、野生型生物）によって発現されず、分泌されない配列のことを指す。いくつかの実施形態において、この用語は、天然で通常見られるのと同じ互いに対する関係では見られない２つまたはそれを超える部分配列を含む配列を包含するか、あるいはその発現レベルまたは細胞内の他の核酸もしくは他の分子との物理的関係または構造が、天然では通常見られないように組換え的に操作された配列を包含する。例えば、異種核酸は、代表的には、組換え的に作製され、天然には見られない様式で配置された無関係の遺伝子の２つまたはそれを超える配列を有する（例えば、本発明の核酸オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、ベクターなどの発現カセットに挿入されたプロモーター配列に作動可能に連結されている）。いくつかの実施形態において、「異種ポリヌクレオチド」とは、研究室の手法によって宿主細胞に導入された任意のポリヌクレオチドのことを指し、宿主細胞から取り出され、研究室の操作に供され、次いで、宿主細胞に再導入されたポリヌクレオチドを含む。

【００９２】

本明細書中で使用されるとき、「好適な反応条件」とは、本開示のＰＧＡポリペプチドがトリ－フェニルアセテート保護基を除去することによって遊離インスリンを放出することができる、生体触媒反応溶液中の条件（例えば、酵素負荷量、基質負荷量、補因子負荷量の範囲、温度、ｐＨ、緩衝液、共溶媒など）のことを指す。例示的な「好適な反応条件」は、本開示に提供され、実施例によって例証される。

【００９３】
本明細書中で使用されるとき、「化合物負荷量」、「酵素負荷量」または「補因子負荷量」などにおける「負荷量」とは、反応の開始時の反応混合物中の構成要素の濃度または量のことを指す。
【００９４】
本明細書中で使用されるとき、生体触媒によって媒介されるプロセスの文脈における「基質」とは、その生体触媒によって作用される化合物または分子のことを指す。
【００９５】
本明細書中で使用されるとき、生体触媒によって媒介されるプロセスの文脈における「生成物」とは、生体触媒の作用から生じる化合物または分子のことを指す。
【００９６】
本明細書中で使用されるとき、本明細書中で使用される「平衡化」とは、化学反応または酵素反応の順方向速度定数および逆方向速度定数によって測定したとき、立体異性体の相互変換を含む、化学反応または酵素反応（例えば、２つの種ＡおよびＢの相互変換）において化学種の定常状態濃度をもたらすプロセスのことを指す。
【００９７】
本明細書中で使用されるとき、「アシラーゼ」および「アシルトランスフェラーゼ」は、アシル基をドナーからアクセプターに移してエステルまたはアミドを形成することができる酵素のことを指すために交換可能に使用される。アシラーゼによって媒介される逆反応は、エステルまたはアミドの加水分解をもたらす。
【００９８】
本明細書中で使用されるとき、「ペニシリンＧ」および「ベンジルペニシリン」とは、（２Ｓ，５Ｒ，６Ｒ）－３，３－ジメチル－７－オキソ－６－（２－フェニルアセトアミド）－４－チア－１－アザビシクロ［３．２．０］ヘプタン－２－カルボン酸（Ｃ１６Ｈ１８Ｎ２Ｏ４Ｓ）としても知られる抗生物質のことを指す。それは、主に、グラム陽性生物に対して有効であるが、一部のグラム陰性生物もこれの影響を受けやすい。
【００９９】
本明細書中で使用されるとき、「ペニシリンＧアシラーゼ」および「ＰＧＡ」は、ペニシリンＧ（ベンジルペニシリン）からフェニル酢酸（ＰＨＡ）および６－アミノペニシラン酸（６－ＡＰＡ）への切断を媒介する能力を有する酵素のことを指すために交換可能に使用される。いくつかの実施形態において、ＰＧＡ活性は、モデル基質の切断、例えば、６－ニトロ－３－（フェニルアセトアミド）安息香酸からフェニル酢酸および５－アミノ－２－ニトロ－安息香酸への切断に基づき得る。ＰＧＡは、アシルドナーのアシル基をアシルアクセプターに移す逆反応を行うこともできる。本明細書中で使用されるＰＧＡは、天然に存在する（野生型）ＰＧＡ、ならびにヒトの操作によって作製された１つまたはそれを超える操作されたポリペプチドを含む天然に存在しないＰＧＡ酵素を含む。野生型ＰＧＡ遺伝子は、５４アミノ酸のスペーサー領域によって連結されたアルファサブユニット（２３．８ＫＤａ）およびベータサブユニット（６２．２ＫＤａ）からなるヘテロ二量体である。スペーサー領域が存在することに起因して、活性なタンパク質を形成するために、自己プロセシング工程が必要である。
【０１００】
本明細書中で使用されるとき、「アシルドナー」とは、アシルアクセプターにアシル基を供与してエステルまたはアミドを形成するアシラーゼ基質の一部のことを指す。
【０１０１】
本明細書中で使用されるとき、「アシルアクセプター」とは、アシルドナーのアシル基を受け取ってエステルまたはアミドを形成するアシラーゼ基質の一部のことを指す。
【０１０２】
本明細書中で使用されるとき、「α鎖配列」とは、配列番号２の２７～２３５位の残基に対応する（例えば、それらの残基に対して少なくとも８５％の同一性を有する）アミノ酸配列のことを指す。本明細書中で使用されるとき、一本鎖ポリペプチドは、「α鎖配列

」およびさらなる配列を含み得る。
【０１０３】
本明細書中で使用されるとき、「β鎖配列」とは、配列番号２の２９０～８４６位の残基に対応する（例えば、それらの残基に対して少なくとも８５％の同一性を有する）アミノ酸配列のことを指す。本明細書中で使用されるとき、一本鎖ポリペプチドは、「β鎖配列」およびさらなる配列を含み得る。
【０１０４】
本明細書中で使用されるとき、「～に由来する」は、操作されたＰＧＡ酵素の文脈において使用されるとき、その操作が基づく、起源であるＰＧＡ酵素および／またはそのようなＰＧＡ酵素をコードする遺伝子を特定する。例えば、配列番号６０の操作されたＰＧＡ酵素は、配列番号２のＫ．ｃｉｔｒｏｐｈｉｌａ　ＰＧＡのアルファ鎖配列およびベータ鎖配列をコードする遺伝子を複数世代にわたって人工的に進化させることによって得られた。したがって、この操作されたＰＧＡ酵素は、配列番号２の天然に存在するまたは野生型ＰＧＡ「に由来する」。
【０１０５】
本明細書中で使用されるとき、「インスリン」とは、正常な個体における膵臓のベータ細胞によって産生されるポリペプチドホルモンのことを指す。インスリンは、血糖値を低下させることによって炭水化物の代謝を制御するために必要である。インスリンの全身欠乏（Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ　ｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ）は、糖尿病をもたらす。インスリンは、５１アミノ酸を含み、およそ５８００ダルトンの分子量を有する。インスリンは、２つのペプチド鎖（「Ａ」および「Ｂ」と命名された）を含み、１つのサブユニット内ジスルフィド結合および２つのサブユニット間ジスルフィド結合を含む。Ａ鎖は、２１アミノ酸から構成され、Ｂ鎖は、３０アミノ酸から構成される。それらの２つの鎖は、Ａ鎖とＢ鎖の両方にいくつかのアルファヘリックス領域を含む高度に規則正しい構造を形成する。単離された鎖は、不活性である。溶液中では、インスリンは、単量体、二量体または六量体である。インスリンは、皮下注射に使用される高度に濃縮された調製物中では六量体であるが、体液で希釈されると単量体になる。この定義は、一次構造の立体配座の一部または全部および天然に存在するインスリンの生物学的特性の少なくとも１つを有する、プロインスリンおよび任意の精製、単離されたポリペプチドを包含すると意図されている。この定義はさらに、グリコフォームならびにアナログ（例えば、欠失、挿入および／または置換を有するポリペプチド）を含む、天然のインスリンおよび合成由来のインスリンを包含すると意図されている。
【０１０６】
インスリンは、フェニルアセテートドナーと潜在的に反応でき、ＰＧＡによって脱保護され得る、３つの求核性アミンを含む。これらの残基としては、Ｂ鎖の２９位（Ｂ２９）におけるＬｙｓおよび２つのＮ末端遊離アミン、Ａ鎖の１位（Ａ１）におけるＧｌｙおよびＢ鎖の１位（Ｂ１）におけるＰｈｅが挙げられる。三保護されたインスリン（ヒトインスリン上のＡ１、Ｂ１、Ｂ２９残基にフェニルアセテートが化学的に付着されている）が、本明細書中に提供される。ＰＧＡは、以前に、Ｎ－フェニルアセテートで保護されたペプチドおよびインスリンの加水分解を、フェニルアセテートアミド結合に対して排他選択的に触媒して、そのタンパク質の残りのペプチド結合はインタクトなまま残すと報告された（Ｂｒｔｎｉｋら、Ｃｏｌｌ．Ｃｚｅｃｈ．Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．，４６（８），１９８３－１９８９［１９８１］；およびＷａｎｇら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍ．，２５（Ｓｕｐｐｌ．），Ｓ１０９－Ｓ１１４［１９８６］）。
【０１０７】
本明細書中で使用されるとき、「トリ－フェニルアセテート保護基」とは、フェニルアシル基で保護されたＢ１、Ｂ２９およびＡ１位に３つの第１級アミンを有するインスリン分子のことを指す。
【０１０８】
本明細書中で使用されるとき、「ジ－フェニルアセテート保護基」とは、フェニルアシ

ル基で保護されたＢ１、Ｂ２９および／またはＡ１位に２つの第１級アミンを有するインスリン分子のことを指す。

【０１０９】

本明細書中で使用されるとき、「ジ－フェニルアセテート保護基」とは、フェニルアシル基で保護されたＢ１、Ｂ２９またはＡ１位に１つの第１級アミンを有するインスリン分子のことを指す。

【０１１０】

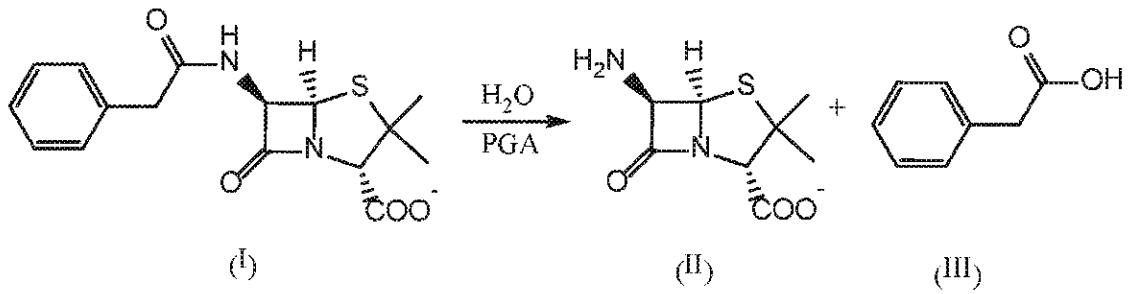
ペニシリンＧアシラーゼ

ペニシリンアシラーゼは、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｃｈｒｙｓｏｇｅｎｕｍ Ｗｉｓｃ．Ｑ１７６由来のものがＳａｋａｇｕｃｈｉおよびＭｕｒａｏによって初めて報告された（Ｓａｋａｇｕｃｈｉ ａｎｄ Ｍｕｒａｏ，Ｊ．Ａｇｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｊｐｎ．，２３：４１１［１９５０］）。ペニシリンＧアシラーゼは、ペニシリンＧ、セファロスポリンＧおよび関連する抗生物質の側鎖に対して作用して、β－ラクタム系抗生物質の中間体である６－アミノペニシラン酸および７－アミノデス－アセトキシセファロスポラニン酸を、一般的な副産物としてのフェニル酢酸とともに生成する加水分解酵素である。これらの抗生物質の中間体は、半合成抗生物質（例えば、アンピシリン、アモキシシリン、クロキサシリン、セファレキシンおよびセフォタキシム（ｃｅｆａｔｏｘｉｍｅ））の潜在的な基本単位である。

【０１１１】

上で示されたように、ペニシリンＧアシラーゼ（ＰＧＡ）は、スキーム１：

【化１】



(I) (II) (III)

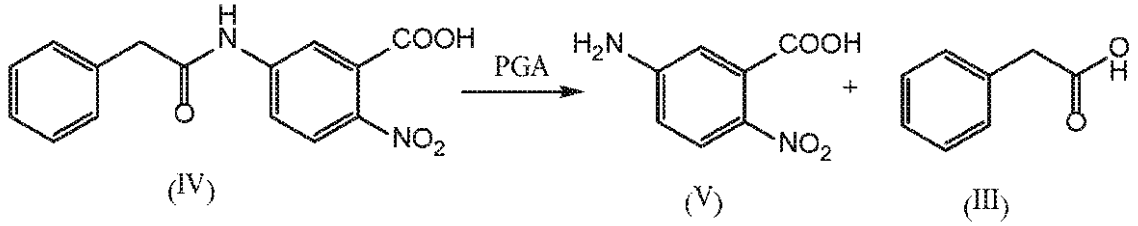
スキーム1

に示されているように、構造式（Ｉ）の共役塩基を有するペニシリンＧから、構造式（ＩＩ）の共役塩基を有する６－アミノペニシラン酸および構造式（ＩＩＩ）のフェニル酢酸に至る、加水分解性切断を触媒する能力を特徴とする。

【０１１２】

理論に拘束されるものではないが、疎水性フェニル基の認識に関連する基質特異性が見られる一方で、いくつかのＰＧＡではベータ鎖のＮ末端におけるセリン残基である求核剤が、ベーターラクタムおよび他の種々の基（例えば、ベーターアミノ酸）のアクセプターとして作用する。ＰＧＡは、スキーム２：

【化２】



(IV) (V) (III)

スキーム2

に示されているように、ペニシリンＧに類似のモデル基質を切断する能力、例えば、構造式（ＩＶ）の６－ニトロ－３－（フェニルアセトアミド）安息香酸（ＮＩＰＡＢ）から構造式（ＩＩＩ）のフェニル酢酸および構造式（Ｖ）の５－アミノ－２－ニトロ－安息香酸への切断も特徴とし得る（例えば、Ａｌｋｅｍａら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２７５：４７－５３［１９９９］を参照のこと）。５－アミノ－２－ニトロ－安息香酸は、色素生産性であるので、式（ＩＶ）の基質は、ＰＧＡ活性を計測する簡便な方法を提供する。前述の反応に加えて、ＰＧＡは、光学的に純粋なｔｅｒｔロイシンを調製するためのＤＬ－ｔｅｒｔロイシンの速度論的分割においても使用され得る（例えば、Ｌｉｕら、Ｐｒｅｐ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，３６：２３５－４１［２００６］を参照のこと）。

【０１１３】

本開示のＰＧＡは、生物Ｋｌｕｙｖｅｒａ ｃｉｔｒｏｐｈｉｌａ（Ｋ．ｃｉｔｒｏｐｈｉｌａ）から得られる酵素に基づく。他の生物由来のＰＧＡと同様に、Ｋ．ｃｉｔｒｏｐｈｉｌａのＰＧＡは、プレプロＰＧＡポリペプチドのタンパク分解性プロセシングによって生成される、アルファ－サブユニットおよびベーター－サブユニットを含むヘテロ二量体酵素である。シグナルペプチドおよびスペーサーペプチドが除去されると、成熟したヘテロ二量体が生成される（例えば、Ｂａｒｂｅｒｏら、Ｇｅｎｅ ４９：６９－８０［１９８６］を参照のこと）。Ｋ．ｃｉｔｒｏｐｈｉｌａの天然に存在するプレプロＰＧＡポリペプチドのアミノ酸配列は、公的に入手可能であり（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号Ｐ０７９４１、［ｇｉ：１２９５５１］を参照のこと）、本明細書中で配列番号２として提供される。天然に存在するＫ．ｃｉｔｒｏｐｈｉｌａ ＰＧＡのアルファ鎖配列は、配列番号２の残基２７～２３５に対応する。天然に存在するＫ．ｃｉｔｒｏｐｈｉｌａ ＰＧＡのベータ鎖配列は、配列番号２の残基２９０～８４６に対応する。配列番号２の残基１～２６は、シグナルペプチドに対応し、配列番号２の残基２３６～２８９は、連結プロペプチドに対応し、これらの両方が除去されることにより、α鎖サブユニットおよびβ鎖サブユニットを含むヘテロ二量体である天然に存在する成熟したＰＧＡ酵素が生成される。

【０１１４】

いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８に対して少なくとも約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を有する操作されたＰＧＡポリペプチドを提供する。

【０１１５】

本発明は、工業規模での使用に適したインスリン特異的脱アシル化生体触媒を提供する。定向進化を用いることにより、Ａ１／Ｂ１／Ｂ２９－トリ－フェニルアセテート保護基を除去することができるかまたはその保護基をインスリンに付加することができる効率的なアシラーゼバリアントを開発した。本明細書中に提供されるＰＧＡバリアントは、広範囲のアシル基を受け取ることができ、野生型ＰＧＡと比べて、高い溶媒安定性および改善された熱安定性を示す。本明細書中に提供されるバリアントＰＧＡは、スペーサー領域を欠く。したがって、活性な酵素を生成するために、自己プロセシング工程は必要ない。

【０１１６】

本発明は、操作されたＰＧＡポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。いくつかの実施形態において、それらのポリヌクレオチドは、そのポリペプチドを発現することができる組換えポリヌクレオチドを生成するために、遺伝子発現を調節する１つまたはそれを超える異種制御配列に作動可能に連結されている。操作されたＰＧＡポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含む発現構築物は、適切な宿主細胞に導入されることにより、対応するＰＧＡポリペプチドを発現することができる。

【０１１７】

様々なアミノ酸に対応するコドンの知識を理由に、タンパク質配列が入手可能であると

、対象物をコードすることができるすべてのポリヌクレオチドが説明される。同じアミノ酸が代替コドンまたは同義コドンによってコードされる遺伝暗号の縮重により、極端に多数の核酸が生成されることが可能になり、それらの核酸のすべてが、本明細書中に開示される改善されたＰＧＡ酵素をコードする。したがって、特定のアミノ酸配列が特定されると、当業者は、当該タンパク質のアミノ酸配列を変化させないように１つまたはそれを超えるコドンの配列を単純に改変することによって、任意の数の異なる核酸を作製することができる。この点において、本開示は、考えられるコドン選択に基づいて組み合わせを選択することによって生成され得るポリヌクレオチドの考えられるバリエーションの各々およびすべてを明確に企図し、そのようなバリエーションのすべてが、実施例５および６における表に示されているアミノ酸配列を含む、本明細書中に開示される任意のポリペプチドのために明確に開示されているとみなされるべきである。

【０１１８】

様々な実施形態において、コドンは、好ましくは、タンパク質が生成される宿主細胞に適合するように選択される。例えば、細菌において用いられている好ましいコドンが、細菌において遺伝子を発現させるために使用され；酵母において用いられている好ましいコドンが、酵母における発現のために使用され；哺乳動物において用いられている好ましいコドンが、哺乳動物細胞における発現のために使用される。

【０１１９】

ある特定の実施形態において、天然配列は、好ましいコドンを含んでおり、かつ好ましいコドンの使用が、すべてのアミノ酸残基にとって必要であるわけではない可能性があるので、ＰＧＡポリペプチドのコドン使用頻度を最適化するために、すべてのコドンが置換される必要はない。その結果として、ＰＧＡ酵素をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、完全長コード領域の約４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％超のコドン位置に、好ましいコドンを含み得る。

【０１２０】

いくつかの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、本明細書中に記載される参照の操作されたＰＧＡポリペプチドのいずれかのアルファ鎖および／またはベータ鎖に対して少なくとも約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を有するＰＧＡポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。したがって、いくつかの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８に基づく参照アルファ鎖配列および参照ベータ鎖配列と少なくとも約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８のアルファ鎖および／またはベータ鎖アミノ酸配列をコードする。

【０１２１】

いくつかの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および１２８８に対して少なくとも約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を有するＰＧＡポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。したがって、いくつかの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、配列番号３、７、１３、２９９、１０３５、１１９３、１２６１および１２８７と少なくとも約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のアミノ酸配列をコードする。

【０１２２】

いくつかの実施形態において、改善されたＰＧＡポリペプチドをコードする単離された

ポリヌクレオチドを、そのポリペプチドの改善された活性および／または発現を提供するために、種々の方法で操作した。ベクターに挿入する前に、単離されたポリヌクレオチドを操作することが、発現ベクターに応じて望ましい場合があるかまたは必要であり得る。組換えＤＮＡ法を利用してポリヌクレオチドおよび核酸配列を改変するための手法が、当該分野で周知である。

【０１２３】

例えば、突然変異誘発および定向進化法を、ポリヌクレオチドに容易に適用することにより、発現され、スクリーニングされ、アッセイされ得るバリアントライブラリーを作製することができる。突然変異誘発および定向進化法は、当該分野で周知である（例えば、米国特許第５，６０５，７９３、５，８１１，２３８、５，８３０，７２１、５，８３４，２５２、５，８３７，４５８、５，９２８，９０５、６，０９６，５４８、６，１１７，６７９、６，１３２，９７０、６，１６５，７９３、６，１８０，４０６、６，２５１，６７４、６，２６５，２０１、６，２７７，６３８、６，２８７，８６１、６，２８７，８６２、６，２９１，２４２、６，２９７，０５３、６，３０３，３４４、６，３０９，８８３、６，３１９，７１３、６，３１９，７１４、６，３２３，０３０、６，３２６，２０４、６，３３５，１６０、６，３３５，１９８、６，３４４，３５６、６，３５２，８５９、６，３５５，４８４、６，３５８，７４０、６，３５８，７４２、６，３６５，３７７、６，３６５，４０８、６，３６８，８６１、６，３７２，４９７、６，３３７，１８６、６，３７６，２４６、６，３７９，９６４、６，３８７，７０２、６，３９１，５５２、６，３９１，６４０、６，３９５，５４７、６，４０６，８５５、６，４０６，９１０、６，４１３，７４５、６，４１３，７７４、６，４２０，１７５、６，４２３，５４２、６，４２６，２２４、６，４３６，６７５、６，４４４，４６８、６，４５５，２５３、６，４７９，６５２、６，４８２，６４７、６，４８３，０１１、６，４８４，１０５、６，４８９，１４６、６，５００，６１７、６，５００，６３９、６，５０６，６０２、６，５０６，６０３、６，５１８，０６５、６，５１９，０６５、６，５２１，４５３、６，５２８，３１１、６，５３７，７４６、６，５７３，０９８、６，５７６，４６７、６，５７９，６７８、６，５８６，１８２、６，６０２，９８６、６，６０５，４３０、６，６１３，５１４、６，６５３，０７２、６，６８６，５１５、６，７０３，２４０、６，７１６，６３１、６，８２５，００１、６，９０２，９２２、６，９１７，８８２、６，９４６，２９６、６，９６１，６６４、６，９９５，０１７、７，０２４，３１２、７，０５８，５１５、７，１０５，２９７、７，１４８，０５４、７，２２０，５６６、７，２８８，３７５、７，３８４，３８７、７，４２１，３４７、７，４３０，４７７、７，４６２，４６９、７，５３４，５６４、７，６２０，５００、７，６２０，５０２、７，６２９，１７０、７，７０２，４６４、７，７４７，３９１、７，７４７，３９３、７，７５１，９８６、７，７７６，５９８、７，７８３，４２８、７，７９５，０３０、７，８５３，４１０、７，８６８，１３８、７，７８３，４２８、７，８７３，４７７、７，８７３，４９９、７，９０４，２４９、７，９５７，９１２、７，９８１，６１４、８，０１４，９６１、８，０２９，９８８、８，０４８，６７４、８，０５８，００１、８，０７６，１３８、８，１０８，１５０、８，１７０，８０６、８，２２４，５８０、８，３７７，６８１、８，３８３，３４６、８，４５７，９０３、８，５０４，４９８、８，５８９，０８５、８，７６２，０６６、８，７６８，８７１、９，５９３，３２６号、ならびに関連するすべてのＰＣＴおよび米国以外の対応物；Ｌｉｎｇら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２５４（２）：１５７－７８［１９９７］；Ｄａｌｅら、Ｍｅｔｈ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，５７：３６９－７４［１９９６］；Ｓｍｉｔｈ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．，１９：４２３－４６２［１９８５］；Ｂｏｔｓｔｅｉｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：１１９３－１２０１［１９８５］；Ｃａｒｔｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．，２３７：１－７［１９８６］；Ｋｒａｍｅｒら、Ｃｅｌｌ，３８：８７９－８８７［１９８４］；Ｗｅｌｌｓら、Ｇｅｎｅ，３４：３１５－３２３［１９８５］；Ｍｉｎｓｈｕｌｌら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．，３：２８４－２９０［１９９９］；Ｃｈｒｉｓｔｉａｎｓら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１７：２５９－２６４

［１９９９］；Ｃｒａｍｅｒｉら、Ｎａｔｕｒｅ，３９１：２８８－２９１［１９９８］；Ｃｒａｍｅｒｉら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１５：４３６－４３８［１９９７］；Ｚｈａｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，９４：４５０４－４５０９［１９９７］；Ｃｒａｍｅｒｉら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１４：３１５－３１９［１９９６］；Ｓｔｅｍｍｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ，３７０：３８９－３９１［１９９４］；Ｓｔｅｍｍｅｒ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９１：１０７４７－１０７５１［１９９４］；ＷＯ９５／２２６２５；ＷＯ９７／００７８；ＷＯ９７／３５９６６；ＷＯ９８／２７２３０；ＷＯ００／４２６５１；ＷＯ０１／７５７６７；およびＷＯ２００９／１５２３３６（これらのすべてが参照により本明細書中に援用される）を参照のこと）。

【０１２４】

いくつかの実施形態において、本発明のバリアントＰＧＡアシラーゼは、その酵素のコードされる活性を変化させないさらなる配列をさらに含む。例えば、いくつかの実施形態において、バリアントＰＧＡアシラーゼは、エピトープタグまたは精製において有用な別の配列に連結される。

【０１２５】

いくつかの実施形態において、本発明のバリアントＰＧＡアシラーゼポリペプチドは、それらが発現される宿主細胞（例えば、酵母または糸状菌宿主細胞）、およびシグナルペプチド（すなわち、ポリペプチドのアミノ末端に連結され、かつコードされたポリペプチドを細胞分泌経路に向かわせる、アミノ酸配列）を含むプレタンパク質として発現される宿主細胞から分泌される。

【０１２６】

いくつかの実施形態において、シグナルペプチドは、内在性のＫ．ｃｉｔｒｏｐｈｉｌａ　ＰＧＡアシラーゼシグナルペプチドである。他のいくつかの実施形態において、他のＫ．ｃｉｔｒｏｐｈｉｌａ分泌タンパク質由来のシグナルペプチドが使用される。いくつかの実施形態において、他のシグナルペプチドが、宿主細胞および他の因子に応じて使用される。糸状菌宿主細胞に有効なシグナルペプチドコード領域としては、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅＴＡＫＡアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ中性アミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ　ｍｉｅｈｅｉアスパラギン酸プロテイナーゼ、Ｈｕｍｉｃｏｌａ　ｉｎｓｏｌｅｎｓセルラーゼ、Ｈｕｍｉｃｏｌａ　ｌａｎｕｇｉｎｏｓａリパーゼおよびＴ．ｒｅｅｓｅｉセロビオヒドロラーゼ（ｃｅｌｌｏｂｉｏｈｙｄｒｏｌａｓｅ）ＩＩから得られるシグナルペプチドコード領域が挙げられるがこれらに限定されない。細菌宿主細胞のためのシグナルペプチドコード領域としては、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ＮＣＩＢ１１８３７マルトース生成アミラーゼ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓアルファ－アミラーゼ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓサブチリシン、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓβ－ラクタマーゼ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ中性プロテアーゼ（ｎｐｒＴ、ｎｐｒＳ、ｎｐｒＭ）および枯草菌ｐｒｓＡに対する遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかのさらなる実施形態において、他のシグナルペプチドが、本発明において使用される（例えば、Ｓｉｍｏｎｅｎ　ａｎｄ　Ｐａｌｖａ，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．，５７：１０９－１３７［１９９３］（参照により本明細書中に援用される）を参照のこと）。酵母宿主細胞のためのさらなる有用なシグナルペプチドとしては、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅアルファ因子、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅＳＵＣ２インベルターゼに対する遺伝子由来のシグナルペプチドが挙げられる（例えば、Ｔａｕｓｓｉｇ　ａｎｄ　Ｃａｒｌｓｏｎ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１１：１９４３－５４［１９８３］；ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｐ００７２４；およびＲｏｍａｎｏｓら、Ｙｅａｓｔ　８：４２３－４８８［１９９２］を参照のこと）。いくつかの実施形態において、これらのシグナルペプチドおよび他のシグナルペプチドのバリアントが使用される。実際に、当該分野で公知の任意

の好適なシグナルペプチドが本発明において使用されるので、本発明は、任意の特定のシグナルペプチドに限定されると意図されていない。

【０１２７】

いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書中に記載されるような、バリアントＰＧＡアシラーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび／またはその生物学的に活性なフラグメントを提供する。いくつかの実施形態において、そのポリヌクレオチドは、遺伝子発現を調節する１つまたはそれを超える異種制御配列または異種調節配列に作動可能に連結されることにより、ポリペプチドを発現することができる組換えポリヌクレオチドが作製される。いくつかの実施形態において、バリアントＰＧＡアシラーゼをコードする異種ポリヌクレオチドを含む発現構築物が、適切な宿主細胞に導入されることにより、バリアントＰＧＡアシラーゼが発現される。

【０１２８】

当業者は、遺伝暗号の縮重に起因して、本発明のバリアントＰＧＡアシラーゼポリペプチドをコードする数多くのヌクレオチド配列が存在することを理解する。例えば、コドンＡＧＡ、ＡＧＧ、ＣＧＡ、ＣＧＣ、ＣＧＧおよびＣＧＵはすべて、アミノ酸アルギニンをコードする。したがって、あるコドンによってアルギニンが特定される本発明の核酸におけるすべての位置において、そのコドンは、コードされるポリペプチドを変化させずに、上に記載された対応するコドンのいずれかに変更され得る。ＲＮＡ配列における「Ｕ」は、ＤＮＡ配列における「Ｔ」に対応すると理解されている。本発明は、考えられるコドン選択に基づいて組み合わせを選択することによって作製され得る、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列の各々およびすべての考えられるバリエーションを企図し、提供する。

【０１２９】

上で示されたように、ＰＧＡをコードするＤＮＡ配列は、高コドン使用頻度バイアスコドン（タンパク質コード領域において、同じアミノ酸をコードする他のコドンより高い頻度で使用されるコドン）に対してもデザインされ得る。好ましいコドンは、単一の遺伝子、共通の機能または起源の遺伝子セット、高度に発現される遺伝子におけるコドン使用頻度、全生物のタンパク質コード領域が集まっている領域におけるコドン頻度、関連する生物のタンパク質コード領域が集まっている領域におけるコドン頻度、またはそれらの組み合わせに関して決定され得る。遺伝子発現レベルとともに頻度が上昇するコドンは、通常、発現にとって最適なコドンである。特に、特定の宿主生物における発現に対してＤＮＡ配列が最適化され得る。特定の生物においてコドン頻度（例えば、コドン使用頻度、相対的な同義コドン使用頻度）およびコドン優先度を測定するための種々の方法が当該分野で周知であり、それらとしては、多変量解析（例えば、クラスター解析または対応分析を用いる多変量解析）が挙げられ、また、遺伝子において使用されるコドンの有効な数を測定するための種々の方法も当該分野で周知である。コドン使用頻度を得るためのデータソースは、タンパク質をコードすることができる任意の利用可能なヌクレオチド配列に依存している場合がある。当該分野で周知であるように、これらのデータセットは、発現されるタンパク質をコードすると実際に判明している核酸配列（例えば、完全なタンパク質コード配列－ＣＤＳ）、発現配列タグ（ＥＳＴ）、またはゲノム配列の予測されるコード領域を含む。バリアントＰＧＡをコードするポリヌクレオチドは、当該分野で公知の任意の好適な方法を用いて調製され得る。代表的には、オリゴヌクレオチドが、個別に合成され、次いで、つなぎ合わされる（例えば、酵素的もしくは化学的ライゲーション方法、またはポリメラーゼによって媒介される方法によって）ことにより、本質的に任意の所望の連続した配列が形成される。いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、当該分野で公知の任意の好適な方法（自動化された合成法を含むがこれに限定されない）を用いる化学合成によって調製される。例えば、ホスホルアミダイト法では、オリゴヌクレオチドが、合成され（例えば、自動ＤＮＡ合成装置において）、精製され、アニールされ、ライゲートされ、適切なベクターにクローニングされる。いくつかの実施形態において、次いで、相補鎖を合成し、それらの鎖を適切な条件下において共にアニーリングするこ

とによって、または適切なプライマー配列とともにＤＮＡポリメラーゼを用いて相補鎖を付加することによって、二本鎖ＤＮＡフラグメントが得られる。当業者に周知の本発明において有用な方法を提供している数多くの一般的および標準的な教科書がある。

【０１３０】

操作されたＰＧＡは、上で論じられたように、天然に存在するＰＧＡをコードするポリヌクレオチドを突然変異誘発および／または定向進化法に供することによって得ることができる。突然変異誘発は、ランダム突然変異誘発および部位特異的突然変異誘発を含む当該分野で公知の手法のいずれかに従って行われ得る。定向進化は、シャフリングを含む、改善されたバリアントをスクリーニングするための当該分野で公知の手法のいずれかを用いて行われ得る。使用される他の定向進化手順としては、付着伸長プロセス（ＳｔＥＰ）、インビトロ組換え、突然変異誘発ＰＣＲ、カセット突然変異誘発、オーバーラップ伸長によるスプライシング（ＳＯＥｉｎｇ）、ＰｒｏＳＡＲ^{TM}定向進化法など、ならびに他の任意の好適な方法が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１３１】

突然変異誘発処理の後に得られたクローンは、所望の改善された酵素特性を有する操作されたＰＧＡを求めてスクリーニングされる。発現ライブラリーからの酵素活性の計測は、生成物の形成速度をモニタリングする標準的な生化学的手法を用いて行われ得る。所望の改善された酵素特性が、熱安定性である場合、酵素活性は、酵素調製物を規定の温度に曝露し、熱処理後に残っている酵素活性の量を計測した後に、計測され得る。次いで、ＰＧＡをコードするポリヌクレオチドを含むクローンが、単離され、配列決定されることにより、ヌクレオチド配列の変化（もしあれば）が特定され、そのクローンを用いて、その酵素が宿主細胞において発現される。

【０１３２】

操作されたポリペプチドの配列が既知であるとき、上記酵素をコードするポリヌクレオチドは、公知の合成法に従って標準的な固相法によって調製され得る。いくつかの実施形態において、最大約１００塩基のフラグメントが、個別に合成され、次いで、つなぎ合わされる（例えば、酵素的もしくは化学的ライゲーション法、またはポリメラーゼによって媒介される方法によって）ことにより、任意の所望の連続した配列が形成され得る。例えば、本発明のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、化学合成によって（例えば、Ｂｅａｕｃａｇｅら、Ｔｅｔ．Ｌｅｔｔ．，２２：１８５９－６９［１９８１］によって報告された従来のホスホルアミダイト法を用いて、またはＭａｔｔｈｅｓら、ＥＭＢＯＪ．，３：８０１－０５［１９８４］によって報告された方法を用いて（通常、自動化された合成法において実施されるので））調製され得る。ホスホルアミダイト法によると、オリゴヌクレオチドが、合成され（例えば、自動ＤＮＡ合成装置において）、精製され、アニールされ、ライゲートされ、適切なベクターにクローニングされる。さらに、本質的に任意の核酸を、種々の商業的供給源（例えば、Ｔｈｅ Ｍｉｄｌａｎｄ Ｃｅｒｔｉｆｉｅｄ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｍｉｄｌａｎｄ，ＴＸ、Ｔｈｅ Ｇｒｅａｔ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｇｅｎｅ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒａｍｏｎａ，ＣＡ、ＥｘｐｒｅｓｓＧｅｎ Ｉｎｃ．Ｃｈｉｃａｇｏ，ＩＬ、Ｏｐｅｒｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ａｌａｍｅｄａ，ＣＡおよび他の多くの商業的供給源）のいずれかから入手することができる。

【０１３３】

本発明は、本明細書中に提供されるような、少なくとも１つのバリアントＰＧＡをコードする配列を含む組換え構築物も提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結されたバリアントＰＧＡポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。いくつかの実施形態において、本発明の発現ベクターを用いることにより、適切な宿主細胞が形質転換されて、その宿主細胞がバリアントＰＧＡタンパク質を発現できるようになる。真菌および他の生物におけるタンパク質の組換え発現のための方法は、当該分野で周知であり、いくつかの発現ベクターが、利用可能であるか、または通例の方法を用いて構築され得る。いくつかの実施形態において、本発明の核酸構築物は、

本発明の核酸配列が挿入されたベクター（例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）など）を含む。いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、バリアントＰＧＡポリペプチドの発現に適した種々の発現ベクターのいずれか１つに組み込まれる。好適なベクターとしては、染色体ＤＮＡ配列、非染色体ＤＮＡ配列および合成ＤＮＡ配列（例えば、ＳＶ４０の誘導体）、ならびに細菌プラスミド、ファージＤＮＡ、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドとファージＤＮＡの組み合わせに由来するベクター、ウイルスＤＮＡ（例えば、ワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス）および他の多くのベクターが挙げられるがこれらに限定されない。遺伝物質を細胞に形質導入する任意の好適なベクター、および複製が所望である場合、関連する宿主において複製可能かつ存続可能な任意の好適なベクターが、本発明において使用される。いくつかの実施形態において、その構築物は、タンパク質をコードする配列に作動可能に連結される制御配列（プロモーターを含むがこれに限定されない）をさらに含む。多数の好適なベクターおよびプロモーターが、当業者に公知である。実際に、いくつかの実施形態において、特定の宿主において高レベルの発現を得るために、異種プロモーターの支配下において本発明のバリアントＰＧＡを発現させることが有用であることが多い。いくつかの実施形態において、プロモーター配列は、当該分野で公知の任意の好適な方法を用いて、バリアントＰＧＡをコードする配列の５’領域に作動可能に連結される。バリアントＰＧＡの発現に有用なプロモーターの例としては、真菌由来のプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、真菌株においてＰＧＡ遺伝子以外の遺伝子の発現を駆動するプロモーター配列が、使用される。非限定的な例として、エンドグルカナーゼをコードする遺伝子の真菌プロモーターが使用され得る。いくつかの実施形態において、ＰＧＡが由来した真菌株以外の真菌株においてＰＧＡ遺伝子の発現を駆動するプロモーター配列が、使用される。糸状菌宿主細胞において本発明のヌクレオチド構築物の転写を指示するために有用な他の好適なプロモーターの例としては、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅＴＡＫＡアミラーゼ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉアスパラギン酸プロテイナーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ中性アルファ－アミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ酸安定性アルファ－アミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒまたはＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ａｗａｍｏｒｉグルコアミラーゼ（ｇｌａＡ）、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉリパーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅアルカリプロテアーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅトリオースリン酸イソメラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓアセトアミダーゼおよびＦｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍトリプシン様プロテアーゼ（例えば、ＷＯ９６／００７８７（参照により本明細書中に援用される）を参照のこと）に対する遺伝子から得られるプロモーター、ならびにＮＡ２－ｔｐｉプロモーター（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ中性アルファ－アミラーゼおよびＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅトリオースリン酸イソメラーゼに対する遺伝子のプロモーターのハイブリッド）、ｃｂｈ１、ｃｂｈ２、ｅｇｌ１、ｅｇｌ２、ｐｅｐＡ、ｈｆｂ１、ｈｆｂ２、ｘｙｎ１、ａｍｙおよびｇｌａＡなどのプロモーター（例えば、Ｎｕｎｂｅｒｇら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，４：２３０６－２３１５［１９８４］；Ｂｏｅｌら、ＥＭＢＯ Ｊ．，３：１５８１－８５［１９８４］；および欧州特許出願１３７２８０（これらのすべてが参照により本明細書中に援用される）を参照のこと）、ならびにそれらの変異プロモーター、切断型プロモーターおよびハイブリッドプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。

【０１３４】

酵母宿主細胞において、有用なプロモーターとしては、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅエノラーゼ（ｅｎｏ－１）、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅガラクトキナーゼ（ｇａｌ１）、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅアルコールデヒドロゲナーゼ／グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ２／ＧＡＰ）およびＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ３－ホスホグリセリン酸キ

ナーゼに対する遺伝子のプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。酵母宿主細胞にとって有用なさらなる有用なプロモーターは、当該分野で公知である（例えば、Ｒｏｍａｎｏｓら、Ｙｅａｓｔ　８：４２３－４８８［１９９２］（参照により本明細書中に援用される）を参照のこと）。さらに、真菌におけるキチナーゼ産生に関連するプロモーターも本発明において使用される（例えば、Ｂｌａｉｓｅａｕ　ａｎｄ　Ｌａｆａｙ，Ｇｅｎｅ　１２０２４３－２４８［１９９２］；およびＬｉｍｏｎら、Ｃｕｒｒ．Ｇｅｎｅｔ．，２８：４７８－８３［１９９５］（これらの両方が参照により本明細書中に援用される）を参照のこと）。

【０１３５】

細菌宿主細胞の場合、本開示の核酸構築物の転写を指示するのに適したプロモーターとしては、大腸菌ｌａｃオペロン、大腸菌ｔｒｐオペロン、バクテリオファージλ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｃｏｅｌｉｃｏｌｏｒアガラーゼ遺伝子（ｄａｇＡ）、枯草菌レバンスクラーゼ遺伝子（ｓａｃＢ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓアルファ－アミラーゼ遺伝子（ａｍｙＬ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓマルトース生成アミラーゼ遺伝子（ａｍｙＭ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓアルファ－アミラーゼ遺伝子（ａｍｙＱ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓペニシリナーゼ遺伝子（ｐｅｎＰ）、枯草菌ｘｙｌＡおよびｘｙｌＢ遺伝子ならびに原核生物のベーターラクタマーゼ遺伝子（例えば、Ｖｉｌｌａ－Ｋａｍａｒｏｆｆら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７５：３７２７－３７３１［１９７８］を参照のこと）から得られるプロモーター、ならびにｔａｃプロモーター（例えば、ＤｅＢｏｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８０：２１－２５［１９８３］を参照のこと）が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１３６】

いくつかの実施形態において、本発明のクローニングされたバリアントＰＧＡは、転写を終結するために宿主細胞によって認識される配列である好適な転写ターミネーター配列も有する。ターミネーター配列は、そのポリペプチドをコードする核酸配列の３’末端に作動可能に連結される。選ばれた宿主細胞において機能的な任意のターミネーターが、本発明において使用される。糸状菌宿主細胞に対する例示的な転写ターミネーターとしては、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅＴＡＫＡアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｄｕｌａｎｓアントラニル酸シンターゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒアルファ－グルコシダーゼおよびＦｕｓａｒｉｕｍ　ｏｘｙｓｐｏｒｕｍトリプシン様プロテアーゼの遺伝子から得られる転写ターミネーターが挙げられるがこれらに限定されない（米国特許第７，３９９，６２７号（参照により本明細書中に援用される）も参照のこと）。いくつかの実施形態において、酵母宿主細胞に対する例示的なターミネーターとしては、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅエノラーゼ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅシトクロムＣ（ＣＹＣｌ）およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子から得られるターミネーターが挙げられる。酵母宿主細胞に対する他の有用なターミネーターは、当業者に周知である（例えば、Ｒｏｍａｎｏｓら、Ｙｅａｓｔ　８：４２３－８８［１９９２］を参照のこと）。

【０１３７】

いくつかの実施形態において、好適なリーダー配列は、宿主細胞による翻訳にとって重要なｍＲＮＡの非翻訳領域である、クローニングされたバリアントＰＧＡ配列の一部である。リーダー配列は、そのポリペプチドをコードする核酸配列の５’末端に作動可能に連結される。選ばれた宿主細胞において機能的な任意のリーダー配列が、本発明において使用される。糸状菌宿主細胞に対する例示的なリーダーとしては、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅＴＡＫＡアミラーゼおよびＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｄｕｌａｎｓトリオースリン酸イソメラーゼに対する遺伝子から得られるリーダーが挙げられるがこれらに限定されない。酵母宿主細胞に対する好適なリーダーとしては、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅエノラーゼ（ＥＮＯ－１）、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃ

ｅｒｅｖｉｓｉａｅ３－ホスホグリセリン酸キナーゼ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅアルファ因子およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅアルコールデヒドロゲナーゼ／グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ２／ＧＡＰ）に対する遺伝子から得られるリーダーが挙げられるがこれらに限定されない。

【０１３８】

いくつかの実施形態において、本発明の配列は、核酸配列の３’末端に作動可能に連結された配列であって、転写されると、宿主細胞によってシグナルとして認識されて、転写されたｍＲＮＡにポリアデノシン残基を付加する、ポリアデニル化配列も含む。選ばれた宿主細胞において機能的な任意のポリアデニル化配列が、本発明において使用される。糸状菌宿主細胞に対する例示的なポリアデニル化配列としては、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅＴＡＫＡアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓアントラニル酸シンターゼ、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍトリプシン様プロテアーゼおよびＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒアルファ－グルコシダーゼに対する遺伝子から得られるポリアデニル化配列が挙げられるがこれらに限定されない。酵母宿主細胞に対する有用なポリアデニル化配列は、当該分野で公知である（例えば、Ｇｕｏ ａｎｄ Ｓｈｅｒｍａｎ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，ｌ５：５９８３－５９９０［１９９５］を参照のこと）。

【０１３９】

いくつかの実施形態において、調節配列は、ポリペプチドのアミノ末端に連結されたアミノ酸配列をコードするシグナルペプチドコード領域を含み、コードされたポリペプチドを細胞の分泌経路に向かわせる。核酸配列のコード配列の５’末端は、分泌ポリペプチドをコードするコード領域のセグメントと翻訳読み枠で天然に連結されているシグナルペプチドコード領域を本質的に含み得る。あるいは、コード配列の５’末端は、コード配列にとって外来のシグナルペプチドコード領域を含み得る。その外来のシグナルペプチドコード領域は、そのコード配列がシグナルペプチドコード領域を天然には含まない場合に必要とされる。

【０１４０】

あるいは、外来のシグナルペプチドコード領域は、ポリペプチドの分泌を増加させるために、単に、天然のシグナルペプチドコード領域に取って代わることがある。しかしながら、発現されたポリペプチドを、選ばれた宿主細胞の分泌経路に向かわせる任意のシグナルペプチドコード領域を、本発明において使用してよい。

【０１４１】

細菌宿主細胞にとって有効なシグナルペプチドコード領域としては、ＢａｃｉｌｌｕｓＮＣｌＢ１１８３７マルトース生成アミラーゼ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓアルファ－アミラーゼ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓサブチリシン、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓベータ－ラクタマーゼ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ中性プロテアーゼ（ｎｐｒＴ、ｎｐｒＳ、ｎｐｒＭ）および枯草菌ｐｒｓＡに対する遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域が挙げられるがこれらに限定されない。さらなるシグナルペプチドが、当該分野で公知である（例えば、Ｓｉｍｏｎｅｎ ａｎｄ Ｐａｌｖａ，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．，５７：１０９－１３７［１９９３］を参照のこと）。

【０１４２】

糸状菌宿主細胞にとって有効なシグナルペプチドコード領域としては、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅＴＡＫＡアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ中性アミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉアスパラギン酸プロテイナーゼ、Ｈｕｍｉｃｏｌａ ｉｎｓｏｌｅｎｓセルラーゼおよびＨｕｍｉｃｏｌａ ｌａｎｕｇｉｎｏｓａリパーゼに対する遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１４３】

酵母宿主細胞にとって有用なシグナルペプチドとしては、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅアルファ因子およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅインベルターゼに対する遺伝子が挙げられるがこれらに限定されない。他の有用なシグナルペプチドコード領域が当該分野で公知である（例えば、Ｒｏｍａｎｏｓら、［１９９２］、前出を参照のこと）。

【０１４４】

いくつかの実施形態において、調節配列は、ポリペプチドのアミノ末端に位置するアミノ酸配列をコードするプロペプチドコード領域を含む。得られるポリペプチドは、プロ酵素またはプロポリペプチド（またはいくつかの場合ではチモーゲン）として知られている。プロポリペプチドは、一般に、不活性であり、プロポリペプチドからのプロペプチドの触媒的切断または自己触媒的切断によって、成熟した活性なＰＧＡポリペプチドに変換され得る。プロペプチドコード領域は、枯草菌アルカリプロテアーゼ（ａｐｒＥ）、枯草菌中性プロテアーゼ（ｎｐｒＴ）、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅアルファ因子、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉアスパラギン酸プロテイナーゼおよびＭｙｃｅｌｉｏｐｈｔｈｏｒａ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌａラクターゼに対する遺伝子から得られ得る（例えば、ＷＯ９５／３３８３６を参照のこと）。

【０１４５】

シグナルペプチド領域とプロペプチド領域の両方が、ポリペプチドのアミノ末端に存在する場合、プロペプチド領域は、ポリペプチドのアミノ末端の隣に位置し、シグナルペプチド領域は、プロペプチド領域のアミノ末端の隣に位置する。

【０１４６】

いくつかの実施形態において、制御配列を用いることにより、宿主細胞の成長に対してポリペプチドの発現の制御も可能になる。制御系の例は、制御性化合物の存在を含む化学的刺激または物理的刺激に応答して遺伝子の発現をオンまたはオフにする制御系である。原核生物宿主細胞において、好適な制御配列としては、ｌａｃ、ｔａｃおよびｔｒｐオペレーター系が挙げられるがこれらに限定されない。酵母宿主細胞において、好適な制御系としては、例として、ＡＤＨ２系またはＧＡＬ１系が挙げられる。糸状菌において、好適な制御配列としては、ＴＡＫＡアルファ－アミラーゼプロモーター、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼプロモーターおよびＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅグルコアミラーゼプロモーターが挙げられる。

【０１４７】

制御配列の他の例は、遺伝子増幅を可能にする制御配列である。真核生物系において、これらとしては、メトトレキサートの存在下において増幅されるジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、および重金属を用いて増幅されるメタロチオネイン遺伝子が挙げられる。これらの場合、本発明のＰＧＡポリペプチドをコードする核酸配列は、制御配列と作動可能に連結され得る。

【０１４８】

したがって、さらなる実施形態において、本発明は、操作されたＰＧＡポリペプチドまたはそのバリアントをコードするポリヌクレオチド、および１つまたはそれを超える発現制御領域（例えば、プロモーターおよびターミネーター）、複製開始点などを、それらが導入される宿主タイプに応じて含む、組換え発現ベクターを提供する。いくつかの実施形態において、上に記載された様々な核酸配列および調節配列がつなぎ合わされることにより、ポリペプチドをコードする核酸配列を限酵素認識部位において挿入または置換できるようにする１つまたはそれを超える好都合な制限酵素認識部位を含み得る組換え発現ベクターが作製される。あるいは、いくつかの実施形態において、それらの核酸配列は、核酸配列またはその配列を含む核酸構築物を、発現にとって適切なベクターに挿入することによって、発現される。発現ベクターを作製する際、コード配列は、そのコード配列が発現にとって適切な調節配列と作動可能に連結されるように、ベクターに配置される。

【０１４９】

組換え発現ベクターは、組換えＤＮＡ手順に都合よく供することおよびポリヌクレオチ

ド配列を発現させることができる任意の好適なベクター（例えば、プラスミドまたはウイルス）を含む。ベクターの選択は、通常、そのベクターが導入される宿主細胞とそのベクターとの適合性に依存する。いくつかの実施形態において、ベクターは、直鎖状または閉環状のプラスミドである。

【０１５０】

いくつかの実施形態において、発現ベクターは、自己複製ベクター（すなわち、染色体外の実体として存在するベクターであって、その複製は、染色体の複製と無関係であり、例えば、プラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体または人工染色体）である。いくつかの実施形態において、ベクターは、自己複製を保証するための任意の手段を含む。あるいは、他のいくつかの実施形態では、ベクターは、宿主細胞に導入される際、ゲノムにインテグレートされ、インテグレートされた染色体とともに複製される。さらに、さらなる実施形態において、単一のベクターもしくはプラスミド、または２つもしくはそれを超えるベクターもしくはプラスミド（それらが全体として、宿主細胞のゲノムに導入される全ＤＮＡを含む）、またはトランスポゾンが、使用される。

【０１５１】

いくつかの実施形態において、本発明の発現ベクターは、１つまたはそれを超える選択可能マーカーを含み、それにより、形質転換された細胞が容易に選択される。「選択可能マーカー」は、ある遺伝子であり、その遺伝子の生成物は、殺生物剤抵抗性またはウイルス抵抗性、抗菌剤または重金属に対する抵抗性、栄養要求体に対する原栄養性などを提供する。糸状菌宿主細胞において使用するための任意の好適な選択可能マーカーが、本発明において使用され、それらとしては、ａｍｄＳ（アセトアミダーゼ）、ａｒｇＢ（オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、ｂａｒ（ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ）、ｈｐｈ（ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、ｎｉａＤ（硝酸レダクターゼ）、ｐｙｒＧ（オロチジン－５’－リン酸デカルボキシラーゼ）、ｓＣ（硫酸アデニルトランスフェラーゼ）およびｔｒｐＣ（アントラニル酸シンターゼ）、ならびにそれらの等価物が挙げられるがこれらに限定されない。Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓなどの宿主細胞において有用なさらなるマーカーとしては、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓまたはＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅのａｍｄＳおよびｐｙｒＧ遺伝子、ならびにＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｈｙｇｒｏｓｃｏｐｉｃｕｓのｂａｒ遺伝子が挙げられるがこれらに限定されない。酵母宿主細胞に対する好適なマーカーとしては、ＡＤＥ２、ＨＩＳ３、ＬＥＵ２、ＬＹＳ２、ＭＥＴ３、ＴＲＰ１およびＵＲＡ３が挙げられるがこれらに限定されない。細菌の選択可能マーカーの例としては、枯草菌もしくはＢａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓのｄａｌ遺伝子、または抗生物質耐性（例えば、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールおよびまたはテトラサイクリン抵抗性）を付与するマーカーが挙げられるがこれらに限定されない。

【０１５２】

いくつかの実施形態において、本発明の発現ベクターは、宿主細胞のゲノムへのベクターのインテグレーションを可能にするエレメント、またはそのゲノムと無関係な細胞においてベクターの自己複製を可能にするエレメントを含む。宿主細胞ゲノムへのインテグレーションを含むいくつかの実施形態において、ベクターは、ポリペプチドをコードする核酸配列、または相同組換えもしくは非相同組換えによってゲノムにベクターをインテグレーションするための他の任意のベクターエレメントに依存する。

【０１５３】

いくつかの代替の実施形態において、発現ベクターは、宿主細胞のゲノムへの相同組換えによるインテグレーションを指示するためのさらなる核酸配列を含む。それらのさらなる核酸配列は、ベクターが染色体内の正確な位置において宿主細胞ゲノムにインテグレートされるのを可能にする。正確な位置におけるインテグレーションの可能性を高めるために、インテグレーションエレメントは、好ましくは、対応する標的配列と高度に相同な十分な数のヌクレオチド（例えば、１００～１０，０００塩基対、好ましくは、４００～１０，０００塩基対、最も好ましくは、８００～１０，０００塩基対）を含み、それにより

、相同組換えの確率が高まる。インテグレーションエレメントは、宿主細胞のゲノムにおける標的配列と相同な任意の配列であり得る。さらに、インテグレーションエレメントは、非コード核酸配列であってもよいし、コード核酸配列であってもよい。他方、ベクターは、非相同組換えによって宿主細胞のゲノムにインテグレートされ得る。

【０１５４】

自己複製のために、ベクターは、ベクターが当該宿主細胞において自律的に複製するのを可能にする複製開始点をさらに含み得る。細菌の複製開始点の例は、Ｐ１５Ａ　ｏｒｉ、または大腸菌における複製を可能にするプラスミドｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１９、ｐＡＣＹＣｌ７７（このプラスミドはＰ１５Ａ　ｏｒｉを有する）もしくはｐＡＣＹＣ１８４、およびＢａｃｉｌｌｕｓにおける複製を可能にするｐＵＢ１１０、ｐＥ１９４、ｐＴＡ１０６０またはｐＡＭβ１の複製開始点である。酵母宿主細胞において使用するための複製開始点の例は、２ミクロン複製開始点、ＡＲＳ１、ＡＲＳ４、ＡＲＳ１とＣＥＮ３との組み合わせおよびＡＲＳ４とＣＥＮ６との組み合わせである。複製開始点は、宿主細胞において機能する温度感受性にする変異を有する複製開始点であり得る（例えば、Ｅｈｒｌｉｃｈ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７５：１４３３［１９７８］を参照のこと）。

【０１５５】

いくつかの実施形態において、遺伝子産物の生成を増加させるために、１コピーを超える本発明の核酸配列が宿主細胞に挿入される。核酸配列のコピー数の増加は、さらなる少なくとも１コピーの配列を宿主細胞ゲノムにインテグレートすることによって、または増幅可能な選択可能マーカー遺伝子を核酸配列とともに含めることによって、得ることができ、それにより、さらなるコピーの核酸配列が得ることができ、ここで、増幅されたコピーの選択可能マーカー遺伝子を含む細胞は、適切な選択可能な作用物質の存在下において細胞を培養することによって選択され得る。

【０１５６】

本発明において使用するための発現ベクターの多くが、商業的に入手可能である。好適な市販の発現ベクターとしては、ｐ３ｘＦＬＡＧＴＭ^{TM}発現ベクター（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）（これは、哺乳動物宿主細胞における発現のためにＣＭＶプロモーターおよびｈＧＨポリアデニル化部位、ならびに大腸菌における増幅のためにｐＢＲ３２２複製開始点およびアンピシリン抵抗性マーカーを含む）が挙げられるがこれに限定されない。他の好適な発現ベクターとしては、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩＳＫ（－）およびｐＢＫ－ＣＭＶ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ならびにｐＢＲ３２２（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ）、ｐＵＣ（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ）、ｐＲＥＰ４、ｐＣＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）またはｐＰｏｌｙ（例えば、Ｌａｔｈｅら、Ｇｅｎｅ　５７：１９３－２０１［１９８７］を参照のこと）に由来するプラスミドが挙げられるがこれらに限定されない。

【０１５７】

したがって、いくつかの実施形態において、少なくとも１つのバリアントＰＧＡをコードする配列を含むベクターは、ベクターの増殖およびバリアントＰＧＡの発現を可能にするために、宿主細胞に形質転換される。いくつかの実施形態において、バリアントＰＧＡは、シグナルペプチドが除去されるように翻訳後修飾され、いくつかの場合では、分泌後に切断され得る。いくつかの実施形態において、上に記載された形質転換された宿主細胞は、バリアントＰＧＡの発現を可能にする条件下において、好適な栄養培地中で培養される。宿主細胞の培養に有用な任意の好適な培地が、本発明において使用され、それらとしては、適切な補充物を含む最少培地または複合培地が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、ＨＴＰ培地中で生育される。好適な培地は、様々な商業的供給業者から入手可能であるか、または公開されている処方（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎのカタログにおけるもの）に従って調製され得る。

【０１５８】

別の態様において、本発明は、本明細書中に提供される改善されたＰＧＡポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供し、このポリヌクレオチドは、宿主細胞においてＰＧＡ酵素を発現させるための１つまたはそれを超える調節配列に作動可能に連結されている。本発明の発現ベクターによってコードされるＰＧＡポリペプチドを発現させる際に使用するための宿主細胞は、当該分野で周知であり、それらとしては、細菌細胞（例えば、大腸菌、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｋｅｆｉｒ、ＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓおよびＳａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ細胞）；真菌細胞（例えば、酵母細胞（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅまたはＰｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ（ＡＴＣＣアクセッション番号２０１１７８））；昆虫細胞（例えば、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ Ｓ２およびＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ Ｓｆ９細胞）；動物細胞（例えば、ＣＨＯ、ＣＯＳ、ＢＨＫ、２９３およびＢｏｗｅｓメラノーマ細胞）；および植物細胞が挙げられるがこれらに限定されない。上に記載された宿主細胞に対する適切な培養液条件および成長条件は、当該分野で周知である。

【０１５９】

ＰＧＡの発現のためのポリヌクレオチドは、当該分野で公知の様々な方法によって細胞に導入され得る。手法としては、とりわけ、エレクトロポレーション、遺伝子銃（ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ ｐａｒｔｉｃｌｅ ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ）、リポソーム媒介性トランスフェクション、塩化カルシウムトランスフェクションおよびプロトプラスト融合が挙げられる。ポリヌクレオチドを細胞に導入するための様々な方法が、当業者に公知である。

【０１６０】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、真核細胞である。好適な真核生物宿主細胞としては、真菌細胞、藻類細胞、昆虫細胞および植物細胞が挙げられるがこれらに限定されない。好適な真菌宿主細胞としては、Ａｓｃｏｍｙｃｏｔａ、Ｂａｓｉｄｉｏｍｙｃｏｔａ、Ｄｅｕｔｅｒｏｍｙｃｏｔａ、Ｚｙｇｏｍｙｃｏｔａ、不完全菌類が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、真菌宿主細胞は、酵母細胞および糸状菌細胞である。本発明の糸状菌宿主細胞は、ＥｕｍｙｃｏｔｉｎａおよびＯｏｍｙｃｏｔａ亜門のすべての糸状型を含む。糸状菌は、キチン、セルロースおよび他の複合多糖から構成される細胞壁を有する栄養菌糸を特徴とする。本発明の糸状菌宿主細胞は、酵母と形態学的に異なる。

【０１６１】

本発明のいくつかの実施形態において、糸状菌宿主細胞は、任意の好適な属および種であり、それらとしては、Ａｃｈｌｙａ、Ａｃｒｅｍｏｎｉｕｍ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ、Ａｕｒｅｏｂａｓｉｄｉｕｍ、Ｂｊｅｒｋａｎｄｅｒａ、Ｃｅｒｉｐｏｒｉｏｐｓｉｓ、Ｃｅｐｈａｌｏｓｐｏｒｉｕｍ、Ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ、Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ、Ｃｏｒｙｎａｓｃｕｓ、Ｃｒｙｐｈｏｎｅｃｔｒｉａ、Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃｏｐｒｉｎｕｓ、Ｃｏｒｉｏｌｕｓ、Ｄｉｐｌｏｄｉａ、Ｅｎｄｏｔｈｉｓ、Ｆｕｓａｒｉｕｍ、Ｇｉｂｂｅｒｅｌｌａ、Ｇｌｉｏｃｌａｄｉｕｍ、Ｈｕｍｉｃｏｌａ、Ｈｙｐｏｃｒｅａ、Ｍｙｃｅｌｉｏｐｈｔｈｏｒａ、Ｍｕｃｏｒ、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ、Ｐｏｄｏｓｐｏｒａ、Ｐｈｌｅｂｉａ、Ｐｉｒｏｍｙｃｅｓ、Ｐｙｒｉｃｕｌａｒｉａ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ、Ｒｈｉｚｏｐｕｓ、Ｓｃｈｉｚｏｐｈｙｌｌｕｍ、Ｓｃｙｔａｌｉｄｉｕｍ、Ｓｐｏｒｏｔｒｉｃｈｕｍ、Ｔａｌａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｔｈｅｒｍｏａｓｃｕｓ、Ｔｈｉｅｌａｖｉａ、Ｔｒａｍｅｔｅｓ、Ｔｏｌｙｐｏｃｌａｄｉｕｍ、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ、Ｖｅｒｔｉｃｉｌｌｉｕｍおよび／もしくはＶｏｌｖａｒｉｅｌｌａ属、ならびに／またはそれらの有性世代もしくは無性世代、ならびにそれらのシノニム、バシオニム（ｂａｓｉｏｎｙｍｓ）または分類学的等価物が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１６２】

本発明のいくつかの実施形態において、宿主細胞は、Ｃａｎｄｉｄａ、Ｈａｎｓｅｎｕｌａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｐｉｃ

hia、KluyveromycesまたはYarrowia属の種の細胞を含むがこれらに限定されない酵母細胞である。本発明のいくつかの実施形態において、酵母細胞は、Hansenula polymorpha、Saccharomyces cerevisiae、Saccharomyces carlsbergensis、Saccharomyces diastaticus、Saccharomyces norbensis、Saccharomyces kluyveri、Schizosaccharomyces pombe、Pichia pastoris、Pichia finlandica、Pichia trehalophila、Pichia kodamae、Pichia membranaefaciens、Pichia opuntiae、Pichia thermotolerans、Pichia salictaria、Pichia quercuum、Pichia pijperi、Pichia stipitis、Pichia methanolica、Pichia angusta、Kluyveromyces lactis、Candida albicansまたはYarrowia lipolyticaである。

【０１６３】

本発明のいくつかの実施形態において、宿主細胞は、Chlamydomonas属（例えば、C. reinhardtii）およびPhormidium属（P. sp. ATCC２９４０９）などの藻類細胞である。

【０１６４】

他のいくつかの実施形態において、宿主細胞は、原核細胞である。好適な原核細胞としては、グラム陽性、グラム陰性およびグラム不定細菌細胞が挙げられるがこれらに限定されない。任意の好適な細菌生物が、本発明において使用され、それらとしては、Agrobacterium、Alicyclobacillus、Anabaena、Anacystis、Acinetobacter、Acidothermus、Arthrobacter、Azobacter、Bacillus、Bifidobacterium、Brevibacterium、Butyrivibrio、Buchnera、Campestris、Camplyobacter、Clostridium、Corynebacterium、Chromatium、Coprococcus、Escherichia、Enterococcus、Enterobacter、Erwinia、Fusobacterium、Faecalibacterium、Francisella、Flavobacterium、Geobacillus、Haemophilus、Helicobacter、Klebsiella、Lactobacillus、Lactococcus、Ilyobacter、Micrococcus、Microbacterium、Mesorhizobium、Methylobacterium、Methylobacterium、Mycobacterium、Neisseria、Pantoea、Pseudomonas、Prochlorococcus、Rhodobacter、Rhodopseudomonas、Rhodopseudomonas、Roseburia、Rhodospirillum、Rhodococcus、Scenedesmus、Streptomyces、Streptococcus、Synecoccus、Saccharomonospora、Staphylococcus、Serratia、Salmonella、Shigella、Thermoanaerobacterium、Tropheryma、Tularensis、Temecula、Thermosynechococcus、Thermococcus、Ureaplasma、Xanthomonas、Xylella、YersiniaおよびZymomonas属が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、Agrobacterium、Acinetobacter、Azobacter、Bacillus、Bifidobacterium、Buchnera、Geobacillus、Campylobacter、Clostridium、Corynebacterium、Escherichia、Enterococcus、Erwinia、Flavobacterium、Lactobacillus、Lac

ｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐａｎｔｏｅａ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、ＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓまたはＺｙｍｏｍｏｎａｓ属の種である。いくつかの実施形態において、細菌宿主株は、ヒトに対して病原性でない。いくつかの実施形態において、細菌宿主株は、工業用株である。数多くの工業用細菌株が公知であり、本発明において適している。本発明のいくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属の種（例えば、Ａ．ｒａｄｉｏｂａｃｔｅｒ、Ａ．ｒｈｉｚｏｇｅｎｅｓおよびＡ．ｒｕｂｉ）である。本発明のいくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ属の種（例えば、Ａ．ａｕｒｅｓｃｅｎｓ、Ａ．ｃｉｔｒｅｕｓ、Ａ．ｇｌｏｂｉｆｏｒｍｉｓ、Ａ．ｈｙｄｒｏｃａｒｂｏｇｌｕｔａｍｉｃｕｓ、Ａ．ｍｙｓｏｒｅｎｓ、Ａ．ｎｉｃｏｔｉａｎａｅ、Ａ．ｐａｒａｆｆｉｎｅｕｓ、Ａ．ｐｒｏｔｏｐｈｏｎｎｉａｅ、Ａ．ｒｏｓｅｏｐａｒｑｆｆｉｎｕｓ、Ａ．ｓｕｌｆｕｒｅｕｓおよびＡ．ｕｒｅａｆａｃｉｅｎｓ）である。本発明のいくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ｂａｃｉｌｌｕｓ属の種（例えば、Ｂ．ｔｈｕｒｉｎｇｅｎｓｉｓ、Ｂ．ａｎｔｈｒａｃｉｓ、Ｂ．ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍ、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ、Ｂ．ｌｅｎｔｕｓ、Ｂ．ｃｉｒｃｕｌａｎｓ、Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ、Ｂ．ｌａｕｔｕｓ、Ｂ．ｃｏａｇｕｌａｎｓ、Ｂ．ｂｒｅｖｉｓ、Ｂ．ｆｉｒｍｕｓ、Ｂ．ａｌｋａｏｐｈｉｕｓ、Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ、Ｂ．ｃｌａｕｓｉｉ、Ｂ．ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｂ．ｈａｌｏｄｕｒａｎｓおよびＢ．ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ）である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ、Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ、Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ、Ｂ．ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍ、Ｂ．ｃｌａｕｓｉｉ、Ｂ．ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓまたはＢ．ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓを含むがこれらに限定されない工業用Ｂａｃｉｌｌｕｓ属株である。いくつかの実施形態において、Ｂａｃｉｌｌｕｓ属宿主細胞は、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ、Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ、Ｂ．ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍ、Ｂ．ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓおよび／またはＢ．ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓである。いくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ属の種（例えば、Ｃ．ａｃｅｔｏｂｕｔｙｌｉｃｕｍ、Ｃ．ｔｅｔａｎｉ Ｅ８８、Ｃ．ｌｉｔｕｓｅｂｕｒｅｎｓｅ、Ｃ．ｓａｃｃｈａｒｏｂｕｔｙｌｉｃｕｍ、Ｃ．ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓおよびＣ．ｂｅｉｊｅｒｉｎｃｋｉｉ）である。いくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ属の種（例えば、Ｃ．ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍおよびＣ．ａｃｅｔｏａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｍ）である。いくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属の種（例えば、大腸菌）である。いくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ｅｒｗｉｎｉａ属の種（例えば、Ｅ．ｕｒｅｄｏｖｏｒａ、Ｅ．ｃａｒｏｔｏｖｏｒａ、Ｅ．ａｎａｎａｓ、Ｅ．ｈｅｒｂｉｃｏｌａ、Ｅ．ｐｕｎｃｔａｔａおよびＥ．ｔｅｒｒｅｕｓ）である。いくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ｐａｎｔｏｅａ属の種（例えば、Ｐ．ｃｉｔｒｅａおよびＰ．ａｇｇｌｏｍｅｒａｎｓ）である。いくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属の種（例えば、Ｐ．ｐｕｔｉｄａ、Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｐ．ｍｅｖａｌｏｎｉｉおよびＰ．ｓｐ．Ｄ－０ｌ１０）である。いくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ属の種（例えば、Ｓ．ｅｑｕｉｓｉｍｉｌｅｓ、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓおよびＳ．ｕｂｅｒｉｓ）である。いくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属の種（例えば、Ｓ．ａｍｂｏｆａｃｉｅｎｓ、Ｓ．ａｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓ．ａｖｅｒｍｉｔｉｌｉｓ、Ｓ．ｃｏｅｌｉｃｏｌｏｒ、Ｓ．ａｕｒｅｏｆａｃｉｅｎｓ、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ、Ｓ．ｆｕｎｇｉｃｉｄｉｃｕｓ、Ｓ．ｇｒｉｓｅｕｓおよびＳ．ｌｉｖｉｄａｎｓ）である。いくつかの実施形態において、細菌宿主細胞は、Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ属の種（例えば、Ｚ．ｍｏｂｉｌｉｓおよびＺ．ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）である。

【０１６５】

例示的な宿主細胞は、大腸菌Ｗ３１１０である。ｌａｃＩリプレッサーの支配下のｌａ

ｃプロモーターに作動可能に連結されたプラスミドｐＣＫ１１０９００に、改善されたＰＧＡをコードするポリヌクレオチドを作動可能に連結することによって、発現ベクターを作製した。この発現ベクターは、Ｐ１５ａ複製開始点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子も含んだ。大腸菌Ｗ３１１０において主題のポリヌクレオチドを含む細胞をクロラムフェニコール選択に供することによって、その細胞を単離した。

【０１６６】

本発明において使用される多くの原核生物株および真核生物株が、いくつかの菌株保存機関（ｃｕｌｔｕｒｅ ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎｓ）（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）、Ｄｅｕｔｓｃｈｅ Ｓａｍｍｌｕｎｇ ｖｏｎ Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ ｕｎｄ Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ ＧｍｂＨ（ＤＳＭ）、Ｃｅｎｔｒａａｌｂｕｒｅａｕ Ｖｏｏｒ Ｓｃｈｉｍｍｅｌｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＣＢＳ）およびＡｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ Ｐａｔｅｎｔ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｒｅｇｉｏｎａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｅｒ（ＮＲＲＬ））から一般大衆に向けて容易に入手可能である。

【０１６７】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、タンパク質の分泌、タンパク質の安定性、ならびに／またはタンパク質の発現および／もしくは分泌にとって望ましい他の特性を改善する特色を有するように遺伝的に改変される。遺伝的改変は、遺伝子操作法および／または従来の微生物学的手法（例えば、化学的突然変異誘発またはＵＶ突然変異誘発およびその後の選択）によって達成され得る。実際に、いくつかの実施形態において、組換え改変と従来の選択法の組み合わせを用いて、宿主細胞が作製される。宿主細胞内および／または培養液中のＰＧＡバリアントの収量を増加させるように、組換え技術を用いて、核酸分子が導入され得るか、欠失され得るか、阻害され得るか、または改変され得る。例えば、Ａｌｐ１機能のノックアウトによって、プロテアーゼ欠損の細胞がもたらされ、ｐｙｒ５機能のノックアウトによって、ピリミジン欠損の表現型を有する細胞がもたらされる。１つの遺伝子操作アプローチでは、相同組換えを用いることにより、インビボにおいて遺伝子を特異的に標的化して、コードされるタンパク質の発現を抑制することによって、標的化された遺伝子改変が誘導される。代替のアプローチでは、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスおよび／またはリボザイム技術が、遺伝子発現の阻害において使用される。細胞におけるタンパク質の発現を減少させるための種々の方法が当該分野で公知であり、それらとしては、タンパク質をコードする遺伝子の全部または一部の欠失、および遺伝子産物の発現または活性を妨害する部位特異的突然変異誘発が挙げられるがこれらに限定されない（例えば、Ｃｈａｖｅｒｏｃｈｅら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２８：２２ ｅ９７［２０００］；Ｃｈｏら、Ｍｏｌｅｃ．Ｐｌａｎｔ Ｍｉｃｒｏｂｅ Ｉｎｔｅｒａｃｔ．，１９：７－１５［２００６］；Ｍａｒｕｙａｍａ ａｎｄ Ｋｉｔａｍｏｔｏ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｌｅｔｔ．，３０：１８１１－１８１７［２００８］；Ｔａｋａｈａｓｈｉら、Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｏｍ．，２７２：３４４－３５２［２００４］；およびＹｏｕら、Ａｒｃｈ．Ｍｉｃｒｉｏｂｉｏｌ．，１９１：６１５－６２２［２００９］（これらのすべてが参照により本明細書中に援用される）を参照のこと）。ランダム突然変異誘発の後の、所望の変異に対するスクリーニングも使用される（例えば、Ｃｏｍｂｉｅｒら、ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．，２２０：１４１－８［２００３］；およびＦｉｒｏｎら、Ｅｕｋａｒｙ．Ｃｅｌｌ ２：２４７－５５［２００３］（これらの両方が参照により援用される）を参照のこと）。

【０１６８】

ベクターまたはＤＮＡ構築物を宿主細胞に導入することは、当該分野で公知の任意の好適な方法を用いて達成することができ、それらの方法としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介性トランスフェクション、ＰＥＧ媒介性形質転換、エレクトロポレーション、または当該分野で公知の他の一般的な手法が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１６９】
いくつかの実施形態において、本発明の操作された宿主細胞（すなわち、「組換え宿主細胞」）は、プロモーターを活性化するため、形質転換体を選択するため、またはＰＧＡポリヌクレオチドを増幅するために必要に応じて改変された従来の栄養培地中で培養される。培養条件（例えば、温度、ｐＨなど）は、発現のために選択された宿主細胞とともに以前に用いられたものであり、当業者に周知である。述べたように、細菌、植物、動物（特に、哺乳動物の）および古細菌起源の細胞を含む多くの細胞の培養および作製のための多くの標準的な参考文献および教科書が利用可能である。
【０１７０】
いくつかの実施形態において、本発明のバリアントＰＧＡポリペプチドを発現する細胞は、回分発酵または連続発酵の条件下で生育される。従来の「回分発酵」は、閉鎖系であり、ここで、培地の組成は、発酵の開始時に設定され、発酵中に人為的な変更（ａｌｔｅｒｎａｔｉｏｎｓ）が行われない。回分系の１つのバリエーションは、「流加発酵」であり、これも本発明において使用される。このバリエーションでは、発酵が進むにつれて、基質を徐々に加える。カタボライトリプレッションが細胞の代謝を阻害する可能性があるとき、および限られた量の基質を培地中に有することが望ましい場合に、流加系は有用である。回分発酵および流加発酵は、当該分野で一般的であり、周知である。「連続発酵」は、開放系であり、規定の発酵培地がバイオリアクターに連続的に加えられ、等量の培養上清が同時にプロセシングのために取り出される。連続発酵は、一般に、細胞が主に対数期増殖にある、一定の高い密度で培養物を維持する。連続発酵系は、定常状態の増殖条件を維持することを目指す。連続発酵プロセスのために栄養分および成長因子を調節するための方法、ならびに生成物の形成速度を最大にするための手法は、工業微生物学の分野で周知である。
【０１７１】
本発明のいくつかの実施形態において、無細胞転写／翻訳系が、バリアントＰＧＡを生成する際に使用される。いくつかの系が、商業的に入手可能であり、それらの方法は、当業者に周知である。
【０１７２】
本発明は、バリアントＰＧＡポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメントを作製する方法を提供する。いくつかの実施形態において、その方法は、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８に対して少なくとも約７０％（または少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％）の配列同一性を含みかつ本明細書中に提供されるような少なくとも１つの変異を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞を提供する工程；その形質転換された宿主細胞が、コードされるバリアントＰＧＡポリペプチドを発現する条件下において、それらの宿主細胞を培養液中で培養する工程；ならびに必要に応じて、発現されたバリアントＰＧＡポリペプチドを回収もしくは単離する工程および／または発現されたバリアントＰＧＡポリペプチドを含む培養液を回収もしくは単離する工程を含む。いくつかの実施形態において、その方法は、必要に応じて、コードされたＰＧＡポリペプチドを発現した後に、形質転換された宿主細胞を溶解する工程、ならびに必要に応じて、発現されたバリアントＰＧＡポリペプチドを細胞溶解産物から回収および／または単離する工程をさらに提供する。本発明はさらに、バリアントＰＧＡポリペプチドを作製する方法を提供し、その方法は、バリアントＰＧＡポリペプチドで形質転換された宿主細胞をバリアントＰＧＡポリペプチドの生成に適した条件下において培養する工程およびそのバリアントＰＧＡポリペプチドを回収する工程を含む。代表的には、ＰＧＡポリペプチドの回収または単離は、本明細書中に記載される手法を含む当該分野で周知のタンパク質回収法を用いた、宿主細胞の培養液、宿主細胞またはその両方からの回収または単離である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、遠心分離によって収集され、物理的手段または化学的手段によって破壊され、得られた粗抽

出物が、さらなる精製のために保持される。タンパク質の発現において使用される微生物細胞は、任意の好都合な方法によって破壊され得、それらの方法としては、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊および／または細胞溶解剤の使用、ならびに当業者に周知の他の好適な多くの方法が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１７３】

宿主細胞において発現された操作されたＰＧＡ酵素は、タンパク質精製のための周知の手法のいずれか１つまたはそれを超える手法（とりわけ、リゾチーム処理、超音波処理、濾過、塩析、超遠心分離およびクロマトグラフィーを含む）を用いて、細胞および／または培養液から回収され得る。タンパク質の溶解および大腸菌などの細菌からの高効率抽出にとって好適な溶液は、商品名ＣｅｌＬｙｔｉｃ ＢＴＭ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）として商業的に入手可能である。したがって、いくつかの実施形態において、得られたポリペプチドは、回収／単離され、必要に応じて、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって精製される。例えば、いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、遠心分離、濾過、抽出、噴霧乾燥、蒸発、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー、疎水性相互作用、クロマトフォーカシングおよびサイズ排除）または沈殿を含むがこれらに限定されない従来の手順によって栄養培地から単離される。いくつかの実施形態において、所望であれば、成熟タンパク質の配置を完成させる際に、タンパク質リフォールディング工程が用いられる。さらに、いくつかの実施形態において、最後の精製工程において、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）が用いられる。例えば、いくつかの実施形態において、当該分野で公知の方法が本発明において使用される（例えば、Ｐａｒｒｙら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．，３５３：１１７［２００１］；およびＨｏｎｇら、Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，７３：１３３１［２００７］（これらの両方が参照により本明細書中に援用される）を参照のこと）。実際に、当該分野で公知の任意の好適な精製方法が、本発明において使用される。

【０１７４】

ＰＧＡポリペプチドを単離するためのクロマトグラフィー法としては、逆相クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動およびアフィニティークロマトグラフィーが挙げられるがこれらに限定されない。特定の酵素を精製するための条件は、当業者に公知の因子（例えば、正味の電荷、疎水性、親水性、分子量、分子の形状など）に部分的に依存する。

【０１７５】

いくつかの実施形態において、アフィニティー法が、改善されたＰＧＡ酵素の単離において使用される。アフィニティークロマトグラフィー精製の場合、ＰＧＡポリペプチドに特異的に結合する任意の抗体が使用され得る。抗体を作製する場合、ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない様々な宿主動物にＰＧＡを注射によって免疫し得る。ＰＧＡポリペプチドは、側鎖官能基、または側鎖官能基に付着されたリンカーを用いて、ＢＳＡなどの好適なキャリアに付着され得る。免疫学的応答を高めるために様々なアジュバントが宿主の種に応じて使用され得、それらのアジュバントとしては、フロイント（完全および不完全）、無機物ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールおよび潜在的に有用なヒトアジュバント（例えば、ＢＣＧ（Ｂａｃｉｌｌｕｓ Ｃａｌｍｅｔｔｅ Ｇｕｅｒｉｎ）およびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍ）が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１７６】

いくつかの実施形態において、ＰＧＡバリアントは、その酵素を発現している細胞の形態で、粗抽出物として、または単離もしくは精製された調製物として、調製され、使用される。いくつかの実施形態において、ＰＧＡバリアントは、凍結乾燥物として、粉末の形態（例えば、アセトン粉末）で、または酵素溶液として、調製される。いくつかの実施形態において、ＰＧＡバリアントは、実質的に純粋な調製物の形態である。

【０１７７】

いくつかの実施形態において、ＰＧＡポリペプチドは、任意の好適な固体基材に付着される。固体基材としては、固相、表面および／または膜が挙げられるがこれらに限定されない。固体支持体としては、有機ポリマー（例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリフルオロエチレン、ポリエチレンオキシおよびポリアクリルアミド）ならびにそれらのコポリマーおよびグラフトが挙げられるがこれらに限定されない。固体支持体は、無機でもあり得る（例えば、ガラス、シリカ、コントロールドポアガラス（ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　ｐｏｒｅ　ｇｌａｓｓ）（ＣＰＧ）、逆相シリカまたは金属（例えば、金または白金））。基材の形状は、ビーズ、球体、粒子、顆粒、ゲル、膜または表面の形態であり得る。表面は、平面、実質的に平面または非平面であり得る。固体支持体は、多孔性または非多孔性であり得、膨張性または非膨張性の特色を有し得る。固体支持体は、ウェル、くぼみ、または他の容器、うつわの形態、特徴もしくは区域の形状をしていることがある。複数の支持体が、ロボットによる試薬送達のためにアドレス可能な、または検出方法および／もしくは検出機器によってアドレス可能な、様々な区域のアレイの形状をしていることがある。

【０１７８】

いくつかの実施形態において、免疫学的方法を用いて、ＰＧＡバリアントが精製される。１つのアプローチでは、従来の方法を用いてバリアントＰＧＡポリペプチド（例えば、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／もしくは１２８８のいずれかを含むポリペプチドならびに／またはその免疫原性フラグメント）に対して産生された抗体をビーズ上に固定化し、バリアントＰＧＡが結合する条件下において細胞培養液と混合し、沈殿させる。関連するアプローチでは、イムノクロマトグラフィーが使用される。

【０１７９】

いくつかの実施形態において、バリアントＰＧＡは、非酵素部分を含む融合タンパク質として発現される。いくつかの実施形態において、バリアントＰＧＡ配列は、精製促進ドメインに融合される。本明細書中で使用されるとき、用語「精製促進ドメイン」とは、それに融合しているポリペプチドの精製を媒介するドメインのことを指す。好適な精製ドメインとしては、金属キレートペプチド、固定化された金属上での精製を可能にするヒスチジン－トリプトファンモジュール、グルタチオン（例えば、ＧＳＴ）に結合する配列、赤血球凝集素（ＨＡ）タグ（インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する；例えば、Ｗｉｌｓｏｎら、Ｃｅｌｌ　３７：７６７［１９８４］を参照のこと）、マルトース結合タンパク質配列、ＦＬＡＧＳ伸長／親和性精製システム（例えば、Ｉｍｍｕｎｅｘ　Ｃｏｒｐから入手可能なシステム）において利用されるＦＬＡＧエピトープなどが挙げられるがこれらに限定されない。本明細書中に記載される組成物および方法において使用するために企図される１つの発現ベクターは、エンテロキナーゼ切断部位によって分断されたポリヒスチジン領域に融合された本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質の発現を提供する。そのヒスチジン残基は、ＩＭＩＡＣ（固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー；例えば、Ｐｏｒａｔｈら、Ｐｒｏｔ．Ｅｘｐ．Ｐｕｒｉｆ．，３：２６３－２８１［１９９２］を参照のこと）上での精製を促進し、エンテロキナーゼ切断部位は、その融合タンパク質からバリアントＰＧＡポリペプチドを分離するための手段を提供する。ｐＧＥＸベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させてもよい。一般に、そのような融合タンパク質は、可溶性であり、リガンド－アガロースビーズ（例えば、ＧＳＴ融合物の場合、グルタチオン－アガロース）への吸着に続く遊離リガンドの存在下での溶出によって、溶解された細胞から容易に精製され得る。

【実施例】

【０１８０】

実験

本開示の様々な特徴および実施形態は、以下の代表的な実施例において例証されるが、それらの実施例は、例証的であると意図されているのであって、限定すると意図されてい

るのではない。

【０１８１】

下記の実験の開示では、以下の省略形が適用される：ｐｐｍ（百万分率）；Ｍ（モル濃度）；ｍＭ（ミリモル濃度）、ｕＭおよびμＭ（マイクロモル濃度）；ｎＭ（ナノモル濃度）；ｍｏｌ（モル）；ｇｍおよびｇ（グラム）；ｍｇ（ミリグラム）；ｕｇおよびμｇ（マイクログラム）；Ｌおよびｌ（リットル）；ｍｌおよびｍＬ（ミリリットル）；ｃｍ（センチメートル）；ｍｍ（ミリメートル）；ｕｍおよびμｍ（マイクロメートル）；ｓｅｃ．（秒）；ｍｉｎ（ｓ）（分）；ｈ（ｓ）およびｈｒ（ｓ）（時間）；Ｕ（単位）；ＭＷ（分子量）；ｒｐｍ（毎分回転数）；℃（摂氏温度）；ＲＴ（室温）；ＣＤＳ（コード配列）；ＤＮＡ（デオキシリボ核酸）；ＲＮＡ（リボ核酸）；ＴＢ（Ｔｅｒｒｉｆｉｃブロス；１２ｇ／Ｌバクト－トリプトン、２４ｇ／Ｌ酵母エキス、４ｍＬ／Ｌグリセロール、６５ｍＭリン酸カリウム，ｐＨ７．０、１ｍＭ ＭｇＳＯ４）；ＣＡＭ（クロラムフェニコール）；ＰＭＢＳ（硫酸ポリミキシンＢ）；ＩＰＴＧ（イソプロピルチオガラクトシド）；ＴＦＡ（トリフルオロ酢酸）；ＨＰＬＣ（高速液体クロマトグラフィー）；ＦＩＯＰＣ（ポジティブコントロールに対する改善倍率）；ＨＴＰ（ハイスループット）；ＬＢ（Ｌｕｒｉａブロス）；Ｃｏｄｅｘｉｓ（Ｃｏｄｅｘｉｓ，Ｉｎｃ．，Ｒｅｄｗｏｏｄ Ｃｉｔｙ，ＣＡ）；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）；Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｃｏｒｐ．，Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ ＭＡ）；Ｄｉｆｃｏ（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，ＢＤ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ）；Ｄａｉｃｅｌ（Ｄａｉｃｅｌ，Ｗｅｓｔ Ｃｈｅｓｔｅｒ，ＰＡ）；Ｇｅｎｅｔｉｘ（Ｇｅｎｅｔｉｘ ＵＳＡ，Ｉｎｃ．，Ｂｅａｖｅｒｔｏｎ，ＯＲ）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ，ＬＬＣ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）；Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃｏｒｐ．の一部，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）、Ａｇｉｌｅｎｔ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ）；Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃの一部，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）；（Ｉｎｆｏｒｓ；Ｉｎｆｏｒｓ－ＨＴ，Ｂｏｔｔｍｉｎｇｅｎ／Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）；Ｃｏｒｎｉｎｇ（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｉｎｃ．，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）；およびＢｉｏ－Ｒａｄ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）；Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ Ｃｏｒｐ．，Ｎｅｗｔｏｎ，ＭＡ，Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ）。

【０１８２】

実施例１

組換えＰＧＡ遺伝子を含む大腸菌発現宿主

本発明のバリアントを生成するために使用された最初のＰＧＡ酵素は、Ｃｏｄｅｘ（登録商標）Ａｃｙｌａｓｅ Ｐａｎｅｌ（Ｃｏｄｅｘｉｓ）または共同所有の米国特許仮出願第６２／１５８，１１８に開示されているバリアントから得た。ＰＧＡパネルプレートは、Ｋｌｕｙｖｅｒａ ｃｉｔｒｏｐｈｉｌａの野生型ＰＧＡと比べて改善された特性を有する操作されたＰＧＡポリペプチドのコレクションを含む。野生型ＰＧＡ遺伝子は、５４ａａスペーサー領域によって連結されたアルファサブユニット（２３．８ＫＤａ）およびベータサブユニット（６２．２ＫＤａ）からなるヘテロ二量体である。スペーサー領域が存在するので、活性なタンパク質を形成するためには、自己プロセシング工程が必要である。スペーサー領域を除去するように野生型遺伝子を改変したので、自己プロセシング工程は不要になった。Ｃｏｄｅｘ（登録商標）Ａｃｙｌａｓｅ Ｐａｎｅｌ（Ｃｏｄｅｘｉｓ）は、スペーサー領域を欠くＰＧＡバリアントを含む（例えば、米国特許出願公開第２０１０／０１４３９６８Ａ１を参照のこと）。ＰＧＡをコードする遺伝子を、ｌａｃｌリプレッサーの支配下のｌａｃプロモーターに作動可能に連結された発現ベクターｐＣＫ１１０９００（米国特許出願公開第２００６／０１９５９４７の図３を参照のこと）にク

ローニングした。その発現ベクターは、Ｐ１５ａ複製開始点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子も含む。得られたプラスミドを、当該分野で公知の標準的な方法を用いて大腸菌Ｗ３１１０に形質転換した。当該分野で公知であるように（例えば、米国特許第８，３８３，３４６号およびＷＯ２０１０／１４４１０３を参照のこと）、それらの細胞をクロラムフェニコール選択に供することによって、形質転換体を単離した。

【０１８３】

実施例２

ＨＴＰ　ＰＧＡを含む湿った細胞ペレットの調製

モノクローナルコロニー由来の組換えＰＧＡをコードする遺伝子を含む大腸菌細胞を、９６ウェル浅ウェルマイクロタイタープレートのウェル内の、１％グルコースおよび３０μｇ／ｍＬクロラムフェニコールを含む１８０μｌのＬＢに接種した。それらのプレートをO_2透過性シールで密封し、培養物を３０℃、２００ｒｐｍ、８５％湿度で一晩生育した。次いで、１０μｌの各細胞培養物を、３９０ｍＬのＴＢおよび３０μｇ／ｍＬのＣＡＭを含む９６ウェル深ウェルプレートのウェルに移した。その深ウェルプレートをO_2透過性シールで密封し、ＯＤ６００が０．６～０．８に達するまで、３０℃、２５０ｒｐｍおよび８５％湿度でインキュベートした。次いで、それらの細胞培養物を、１ｍＭという最終濃度のＩＰＴＧによって誘導し、最初に用いた条件と同じ条件下で一晩インキュベートした。次いで、それらの細胞を、１０分間の４０００ｒｐｍの遠心分離を用いてペレットにした。上清を廃棄し、ペレットを、溶解する前に－８０℃で凍結した。

【０１８４】

実施例３

ＨＴＰ　ＰＧＡ含有細胞溶解産物の調製

まず、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液，ｐＨ７．５、１ｍｇ／ｍＬリゾチームおよび０．５ｍｇ／ｍＬ　ＰＭＢＳを含む２００μｌの溶解緩衝液を、実施例２に記載したように生成された各ウェル内の細胞ペーストに加えた。それらの細胞を、卓上振盪機上で振盪しながら、室温で２時間溶解した。次いで、プレートを４０００ｒｐｍ、４℃において１５分間遠心した。透明の上清を生体触媒反応において使用して、活性レベルを測定した。

【０１８５】

実施例４

振盪フラスコ（ＳＦ）培養物からの凍結乾燥された溶解産物の調製

上に記載されたように生育された選択されたＨＴＰ培養物を、１％グルコースおよび３０μｇ／ｍｌ　ＣＡＭを含むＬＢ寒天プレート上にプレーティングし、３７℃で一晩生育した。各培養物からのシングルコロニーを、１％グルコースおよび３０μｇ／ｍｌ　ＣＡＭを含む６ｍｌのＬＢに移した。それらの培養物を３０℃、２５０ｒｐｍにおいて１８時間生育し、最終的なＯＤ$_{600}$が０．０５になるまで、３０μｇ／ｍｌ　ＣＡＭを含む２５０ｍｌのＴＢにおよそ１：５０で継代培養した。それらの培養物を、３０℃、２５０ｒｐｍにおいておよそ１９５分間、ＯＤ$_{600}$が０．６～０．８になるまで生育し、１ｍＭＩＰＴＧで誘導した。次いで、それらの培養物を３０℃、２５０ｒｐｍにおいて２０時間生育した。それらの培養物を４０００ｒｐｍ×２０分間遠心した。上清を廃棄し、ペレットを３０ｍｌの２０ｍＭ　ＴＲＩＳ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５に再懸濁した。それらの細胞をペレットにし（４０００ｒｐｍ×２０分）、－８０℃で１２０分間凍結した。凍結したペレットを３０ｍｌの２０ｍＭ　ＴＲＩＳ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５に再懸濁し、マイクロフルダイザーシステム（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ）を１８，０００ｐｓｉで使用して溶解した。それらの溶解産物をペレットにし（１０，０００ｒｐｍ×６０分）、上清を凍結し、凍結乾燥して、振盪フラスコ（ｓｈａｋｅ　ｆｌａｋｅ）（ＳＦ）酵素を生成した。

【０１８６】

実施例５

三保護インスリンのＢ２９位での脱アシル化における配列番号８を超える改善

Ｂ２９脱アシル化産物を生成するために、米国特許仮出願第６２／１５８，１１８に開示されているバリアントのスクリーニングの後、親酵素として配列番号８を選択した。操

作された遺伝子のライブラリーを、十分に確立された手法（例えば、飽和突然変異誘発、予め特定された有益な変異の組換え）を用いて作製した。各遺伝子によってコードされるポリペプチドを、実施例２に記載したようにＨＴＰで作製し、可溶性の溶解産物を、実施例３に記載したように生成した。各バリアントを、５ｇ／Ｌ　Ａ１／Ｂ１／Ｂ２９トリーフェニルアセテートインスリン、２００ｍＭ　Ｔｒｉｓ緩衝液ｐＨ＝８．３および４０μＬの粗溶解産物を含む２００μＬの反応物中で３０℃において３時間スクリーニングした。９６ウェルプレートをヒートシールし、１００ｒｐｍのＴｈｅｒｍｏｔｒｏｎ（登録商標）振盪機においてインキュベートした。それらの反応物を、２００μｌのアセトニトリルまたはジメチルアセトアミドでクエンチし、卓上振盪機を用いて５分間混合した。次いで、プレートを４０００ｒｐｍで５分間遠心し、水で２倍希釈し、解析のためにＨＰＬＣにローディングした。

【０１８７】

配列番号８と比べたときの活性（活性ＦＩＯＰ）を、配列番号８によってもたらされた変換パーセントに対する、バリアントによって形成された生成物の変換パーセントとして計算し、表５．１に示した。この変換パーセントは、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、基質、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって、計算された。

【表５－１】

表5.1 配列番号8と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号8と比べて)	活性FIOP[1] (配列番号8と比べて)
9/10	G71C;D74G	+
11/12	Y27T;G71H;D74G;D484N;Q547K;Y584F;M697L	+
13/14	Y27T;V28A;G71H;D74G;Q547K	+
39/40	L253Y	+
41/42	Y27T	+
29/30	S386G;K390S	+
17/18	L387K;K390S	+
81/82	A474C	+
45/46	S386A;K390S	+
69/70	S386H	+
15/16	S704N	+
27/28	F254N	+
63/64	A470C	+
31/32	A373R	+
23/24	T352K	+
59/60	L253H	+
37/38	A616Y	+
55/56	S372L	+
19/20	A451K	+
77/78	I708L	+
43/44	F256Y	+
35/36	L387R;K390S	+
21/22	D623Q	+
47/48	A467W	+
53/54	D623K	+
73/74	N348H	+
51/52	F254K	+
49/50	S706T	+
33/34	S374T	+
83/84	Q380M	+
75/76	T129W	+
67/68	Q380Y;N457L	+
57/58	A470E	+
61/62	N457A	+
25/26	D623A	+
65/66	N457Q	+
79/80	F256S	+
71/72	A373K	+

[1]活性増加のレベルは、配列番号8の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」>1倍であるが2.0倍未満の活性増加;「++」>2.0倍であるが3倍未満の活性増加;「+++」>3倍であるが10倍未満の活性増加;「++++」>10倍。

【０１８８】

実施例６

三保護インスリンのＢ２９位での脱アシル化における配列番号１４を超える改善

実施例５に記載されたバリアントのスクリーニングの後、親酵素として配列番号１４を選択した。操作された遺伝子のライブラリーを、十分に確立された手法（例えば、飽和突然変異誘発、予め特定された有益な変異の組換え）を用いて作製した。各遺伝子によってコードされるポリペプチドを、実施例２に記載したようにＨＴＰで作製し、可溶性の溶解産物を、実施例３に記載したように生成した。

【０１８９】

各バリアントを、１０ｇ／Ｌ　Ａ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテートインスリン、２００ｍＭ　Ｔｒｉｓ緩衝液ｐＨ＝８．３および２０μＬの粗溶解産物を含む２００μＬの反応物中で３０℃において２４時間スクリーニングした。９６ウェルプレートをヒートシールし、１００ｒｐｍのｔｈｅｒｍｏｔｒｏｎ振盪機においてインキュベートした。それらの反応物を、２００μｌのアセトニトリルまたはジメチルアセトアミドでクエンチし、卓上振盪機を用いて５分間混合した。次いで、プレートを４０００ｒｐｍで５分間遠心し、水で２倍希釈し、解析のためにＨＰＬＣにローディングした。

【０１９０】

配列番号１４と比べたときの活性（活性ＦＩＯＰ）を、配列番号１４によってもたらされた変換パーセントに対する、バリアントによって形成された生成物の変換パーセントとして計算し、表６．１に示した。この変換パーセントは、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、基質、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって、計算された。

【表６－１－１】

表 6.1 配列番号14と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号14と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号14と比べて)
419/420	N185D	+
433/434	T560G	+
443/444	A517K	+
415/416	G415H	+
441/442	G444K	+
417/418	G444T	+
421/422	R748D	+
439/440	G444R	+
447/448	T443D	+
423/424	G444S	+
427/428	S492G/G493C	+
431/432	N9D	+
437/438	G444Q	+
429/430	R748S	+
435/436	K723D	+
445/446	R748E	+

【表６－１－２】

表 6.1 配列番号14と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号14と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号14と比べて)
425/426	G444L	+
165/166	N9S;K103E;W119Y;T131D;Q233K;T269R;K304Q;G444N;N494D;S646D	+
177/178	K103E;G444N;N494D;S646D	+
119/120	K103E;W119Y;T131D;Q233K;K273A;K304Q;A324T;Q432E;G444N;N494D;S646D	+
211/212	K103E;W119Y;Q233K;E312A;S646D	+
207/208	N9S;K103E;W119Y;T131D;K304Q;A324T;Q432E;G444N;N494D;S646D	+
149/150	W119Y;Q233K;K304Q;E312A;A324T;Q432E;G444N;S646D	+
175/176	K103E;T131D;Q233K;K304Q;A324T;G444N;S646D	+
85/86	K103E;W119Y;N494D;S646D;K661Q	+
111/112	N9S;W119Y;T131A;Q233K;N494D;S646D	+
125/126	K103E;W119Y;Q233K;K304Q;S646D	+
173/174	N9S;K103E;W119Y;Q233K;S646D	+
215/216	K103E;Q233K;K273A;E312A;Q432E;G444N;S646D	+
133/134	N9S;W119Y;Q233K;N494D;S646D	+
155/156	W119Y;K273A;A324T;G444N;N494D;S646D	+
181/182	N9S;W119Y;T131A;Q233K;K304Q;G444N;S646D	+
121/122	K103E;W119Y;T131A;Q233K;K304Q;E312A;Q432E;N494D;S646D;K661Q	+
163/164	W119Y;Q233K;K304Q;S646D	+
115/116	N9S;W119Y;K304Q;G444N;N494D;S646D	+
109/110	N9S;W119Y;Q233K;T269R;K273A;K304Q;E312A;Q432E;G444N;S646D	+
123/124	W119Y;E312A;G444N;S646D	+
113/114	N9S;W119Y;T131A;E312A;G444N;S646D	+
143/144	K103E;E312A;G444N;S646D	+
103/104	K103E;W119Y;S646D	+
135/136	W119Y;Q233K;S646D	+
129/130	K103E;W119Y;Q233K	+
167/168	W119Y;T131A;G444N;S646D;K661Q	+
157/158	W119Y;Q432E;G444N;S646D	+
189/190	K103E;T269R;K273A;G444N;S646D	+
159/160	N9S;T131A;Q233K;T269R;K273A;E312A;Q432E;G444N;S646D	+
183/184	K103E;K273A;K304Q;A324T;G444N;N494D	+
105/106	E312A;G444N;S646D	+
127/128	N9S;Q233K;N494D;S646D	+
221/222	N9S;Q233K;K304Q;N494D;S646D	+
191/192	T131D;K273A;Q432E;G444N;N494D;S646D	+
219/220	N9S;Q432E;G444N;N494D;S646D	+
171/172	N9S;Q233K;K273A;K304Q;N494D;S646D	+
169/170	K103E;Q233K;K273A;E312A;A324T;Q432E;G444N;S646D	+

【表６－１－３】

表 6.1 配列番号14と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号14と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号14と比べて)
97/98	N9S;K103E;Q233K;N494D	+
201/202	W119Y;T269R;K273A;E312A;Q432E;G444N;S646D	+
187/188	T131A;Q233K;K304Q;G444N	+
101/102	N9S;K103E;W119Y;N494D	+
197/198	K103E;T131D;T269R;K273A;G444N;S646D	+
91/92	N9S;W119Y;T131D;Q233K;N494D;K661Q	+
205/206	K103E;W119Y;T131A;T269R;E312A;N494D;S646D	+
223/224	N9S;K103E;W119Y;T131A;Q233K;E312A;A324T;Q432E;G444N;N494D	+
213/214	N9S;W119Y;T131A;Q432E;G444N;S646D	+
145/146	G444N;N494D	+
95/96	W119Y;T131A;N494D	+
93/94	N9S;K103E;K304Q;Q432E;G444N;S646D	+
185/186	K304Q;E312A;G444N;S646D	+
147/148	W119Y;T131A;S646D	+
139/140	G444N;S646D	+
89/90	K273A;E312A;G444N;S646D	+
199/200	W119Y;Q233K;E312A	+
137/138	T131A;Q233K;K273A;S646D	+
153/154	N9S;E312A;G444N;S646D	+
161/162	N9S;W119Y;T131D;Q233K	+
195/196	E312A;S646D	+
193/194	N9S;K103E;T269R;K304Q;A324T;N494D;S646D	+
107/108	W119Y;T131D;K304Q;Q432E;G444N;S646D;K661Q	+
131/132	W119Y;T131D;G444N	+
209/210	T131A;Q233K;Q432E;S646D	+
99/100	N9S;Q233K;E312A;Q432E;S646D	+
141/142	N9S;K103E;Q233K;E312A;S646D	+
117/118	K103E;W119Y;Q233K;K273A;Q432E	+
179/180	Q233K;T269R;K304Q;E312A;A324T;Q432E;G444N;S646D	+
217/218	N9S;K103E;W119Y;T131A;A324T;Q432E;N494D;S646D	+
203/204	N9S;N494D;S646D	+
87/88	N9S;K103E;Q233K;Q432E;S646D	+
151/152	W119Y;T269R;K273A;E312A;A324T;N494D;S646D	+
237/238	L253Y;F256Y;T352K;A451K;	+++
299/300	L253Y;T352K;A373R;S374T;A451K;A616Y	+++
271/272	L253H;F256Y;T352K;A373R;S374T;A616Y	++
321/322	F256Y;S374T;Q380L;A451K;A616Y	++
307/308	Q380L;A451K;A616Y	++
323/324	L253H;T352K;A451K;A616Y	++
243/244	L253Y;F256Y;T352K;S374T;Q380L;A451K	++
293/294	F254N;A373R;S374T;A451K	++
273/274	T352K;A373R;S374T;A451K	++
337/338	L253Y;T352K;A373R;S374T;A451K	++

【表６－１－４】

表 6.1 配列番号14と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号14と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号14と比べて)
227/228	L253H;A451K;N457S	++
325/326	L253Y;F256Y;T352K;S374T;A451K	++
333/334	L253H;T352K;S374T;A616Y	++
363/364	L253Y;A373R;S374T;A451K;A616Y	++
275/276	T352K;S374T;A451K	++
331/332	L253Y;F254N;T352K;S374T;Q380L	++
343/344	S374T;A451K;A616Y	++
295/296	A451K;A616Y	++
351/352	T352K;S374T;Q380L;A451K;A616Y	++
367/368	T352K;Q380L;A451K;A616Y	++
349/350	L253Y;T352K;S374T;A616Y	++
401/402	L253H;F256Y;T352K;Q380L;A451K;A616Y	++
289/290	T352K;A451K;A616Y	++
381/382	L253Y;F256Y;A373R	++
383/384	L253H;F256Y;S374T;A616Y	++
253/254	S374T;Q380L;A451K	++
335/336	S374T;Q380L;A451K;D623N	++
355/356	L253Y;F256Y;T352K;Q380L	++
405/406	T352K;S374T;A616Y	++
225/226	F254N;T352K;Q380L;A451K	++
231/232	A373R;S374T;A451K	++
379/380	F254N;A616Y	++
393/394	L253H;F256Y;Q380L;A451K;A616Y	++
399/400	F254N;A373R;S374T;Q380L;A451K	++
411/412	L253H;F256Y;T352K;S374T;Q380L;A451K	++
263/264	F254N;F256Y;S374T;A451K	++
341/342	S374T;A616Y	++
283/284	L253H;S374T;A451K	++
375/376	F256Y;S374T;A616Y	++
339/340	F254N;T352K;A451K	++
407/408	L253Y;F256Y;Q380L	++
373/374	F256Y;T352K;S374T	++
409/410	L253H;S374T;A451K;D623Q	++
285/286	L253Y;T352K;D623N	++
279/280	Q380L;A451K;D623A	++
269/270	F254N;A451K	++
257/258	T352K;Q380L;A451K;D623Q	++
403/404	T352K;A373R;A451K	++
359/360	T352K;S374T	++
345/346	Q380L;A616Y	++
305/306	L253H;F256Y	++
245/246	S374T;A451K	++
377/378	L253Y;F256Y	++
385/386	T352K;S374T;Q380L	++
365/366	L253H;A373R;A451K	++
287/288	L253Y;Q380L	++

【表６－１－５】

表 6.1 配列番号14と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号14と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号14と比べて)
291/292	Q380L;A451K	++
353/354	F254N;F256Y;Q380L;A451K;A616Y	++
313/314	F254N;S374T	++
309/310	F254N;S374T;Q380L	++
239/240	T352K;Q380L;A616Y	++
361/362	T352K;Q380L;A451K	++
387/388	L253H;F256Y;S374T;A451K	++
249/250	A373R;S374T	++
371/372	L253H;A451K	++
255/256	L253Y;F256Y;Q380L;A451K;H546Y;A616Y	+
327/328	T352K;A616Y	+
267/268	A616Y	+
347/348	F256Y;T352K;Q380L;A451K;A616Y	+
329/330	S374T;Q380L	+
311/312	S374T;D623Q	+
281/282	F254N;F256Y;A373R;S374T;Q380L;A451K	+
235/236	T352K;A451K	+
319/320	T352K;A373R;Q380L;A451K;A616Y	+
229/230	D623A	+
413/414	Q380L;A616Y;D623Q	+
265/266	A373R;A451K	+
251/252	S374T	+
395/396	F254N;F256Y;T352K;A451K	+
397/398	A451K;D623N	+
247/248	F254N;F256Y;S374T	+
233/234	L253H	+
317/318	F254N;A255E;T352K	+
369/370	A28S;S374T;Q380L	+
301/302	F254N;T352K;Q380L	+
261/262	F254N;Q380L	+
241/242	A451K	+
277/278	T352K	+
259/260	T352K;Q380L	+
389/390	D623N	+
391/392	D623Q	+
303/304	T352K;A373R;Q380L;A451K	+
297/298	Q380L	+
357/358	F254N;F256Y;A451K	+
315/316	A373R;A616Y	+
451/452	N457Q;A470C	+
455/456	T129W;F254K;N348H;N457Q;S704N	+
467/468	N348H;S372L;A470E;D623K;I708L	+
457/458	N457Q;S704N;I708L	+
483/484	T129W;D623K	+
453/454	N457Q	+
485/486	T129W;N348H	+

【表６－１－６】

表 6.1 配列番号14と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号14と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号14と比べて)
461/462	N348H	+
449/450	N348H;S704N;I708L	+
459/460	T129W;Q380M;A470E	+
469/470	T129W;N457Q;A470C;A474C	+
471/472	T129W;N348H;A470E;D623K;S704N;S706T;I708L	+
475/476	T129W;N348H;A467W;A470C;S704N;I708L	+
477/478	S372L;N457Q;A470E;D623K	+
479/480	D623K	+
481/482	A470C;I708L	+
465/466	T129W;N348H;A470E;D623K;S704N;S706T	+
463/464	T129W;A470E	+
473/474	Q380M;D623K	+

[1]活性増加のレベルは、配列番号14の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=1倍超であるが2.0倍未満の活性増加;「++」=2.0倍超であるが3倍未満の活性増加;「+++」=3倍超であるが10倍未満の活性増加「++++」=10倍超。

【０１９１】

実施例７

三保護インスリンのＢ２９位での脱アシル化における配列番号３００を超える改善

実施例６に記載されたバリアントのスクリーニングの後、親酵素として配列番号３００を選択した。操作された遺伝子のライブラリーを、十分に確立された手法（例えば、飽和突然変異誘発、予め特定された有益な変異の組換え）を用いて作製した。各遺伝子によってコードされるポリペプチドを、実施例２に記載したようにＨＴＰで作製し、可溶性の溶解産物を、実施例３に記載したように生成した。

【０１９２】

各バリアントを、５０ｇ／Ｌ　Ａ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテートインスリン、２００ｍＭ　Ｔｒｉｓ緩衝液ｐＨ＝８．３および２．５μＬの粗溶解産物を含む２００μＬの反応物中で３０℃において２４時間スクリーニングした。９６ウェルプレートをヒートシールし、１００ｒｐｍのｔｈｅｒｍｏｔｒｏｎ振盪機においてインキュベートした。それらの反応物を、２００μｌのアセトニトリルまたはジメチルアセトアミドでクエンチし、卓上振盪機を用いて５分間混合した。次いで、プレートを４０００ｒｐｍで５分間遠心し、水で２倍希釈し、解析のためにＨＰＬＣにローディングした。

【０１９３】

配列番号３００と比べたときの活性（活性ＦＩＯＰ）を、配列番号３００によってもたらされた変換パーセントに対する、バリアントによって形成された生成物の変換パーセントとして計算し、表７．１に示した。この変換パーセントは、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、基質、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって、計算された。

【表７－１－１】

表 7.1 配列番号300と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号300と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号300と比べて)
837/838	N9D;N185D;G415H;G444T;A517K;T560G;K723D;R748E	+++
813/814	N9D;N185D;G415H;T443D;G444R;A517K;K723D;R748D	+++
775/776	N9D;G415H;T443D;T560G;K723D;R748D	+++
839/840	N9D;G415H;G444L;T560G;K723D;R748E	+++
719/720	N9D;G415H;T443D;G444R;T560G;K723D;R748E	+++
797/798	G415H;T443D;A517K;T560G;K723D	+++
695/696	N9D;G415H;T443D;G444T;A517K;T560G;K723D	+++
767/768	N9D;N185D;G415H;G444S;K723D;R748E	+++
597/598	N9D;N185D;G415H;T443D;G444T;A517K;T560G	+++
561/562	N9D;N185D;G415H;G444L;A517K;T560G;K723D;R748S	+++
827/828	N185D;G415H;T443D;G444R;A517K;T560G	+++
771/772	N185D;G415H;G444T;T560G	+++
773/774	N9D;N185D;T443D;G444K;T560G;K723D	+++
765/766	G415H;T443D;G444T;T560G	+++
769/770	G415H;G444Q;T560G;K723D	+++
791/792	N9D;G415H;A517K;T560G;K723D;R748D	+++
783/784	G415H;A517K;T560G;K723D;R748D	+++
673/674	N185D;G415H;T443D;G444T;A517K	++
545/546	N9D;G415H;G444Q;A517K;T560G;K723D;R748S	++
727/728	N9D;N185D;G415H;T443N;G444K;A517K;R748E	++
599/600	N9D;G415H;G444L;A517K;T560G;K723D;R748D	++
633/634	N9D;G415H;T443D;G444S;A517K;T560G	++
651/652	N9D;G415H;T443D;G444T;A517K;R748S	++
683/684	N9D;G415H;G444T;A517K;T560G;K723D	++
817/818	G415H;G444S;A517K;K723D;R748E	++
671/672	N9D;G415H;G444Q;T560G;K723D	++
557/558	N9D;N185D;G415H;G444K;A517K;K723D;R748E	++
627/628	N185D;G415H;G444R;A517K;T560G;R748D	++
699/700	N9D;G415H;T443D;G444K;A517K;T560G	++
679/680	N9D;G415H;A517K;T560G;K723D;R748E	++
569/570	N9D;T443D;G444K;T560G;K723D;R748D	++
589/590	G415H;G444Q;A517K;T560G;K723D;R748S	++
573/574	G415H;G444S;A517K;T560G;K723D	++
799/800	N9D;N185D;G415H;G444K;A517K;R748D	++
525/526	G415H;T443D;G444T;A517K;R748E	++
639/640	G415H;T443D;A517K;K723D	++
807/808	N9D;N185D;G444Q;A517K;T560G;K723D	++
749/750	N9D;N185D;G444T;A517K;T560G;K723D	++
619/620	N9D;T443D;G444K;A517K;T560G;K723D	++
543/544	N185D;G415H;T560G;K723D	++
779/780	N9D;G415H;G444L;K723D;R748S	++
707/708	N9D;N185D;G415H;G444L;A517K;T560G	++
725/726	N9D;N185D;T443D;G444K;A517K;T560G	++
523/524	N9D;G415H;G444T;T560G;S665R;K723D;R748S	++
713/714	G415H;G444S;T560G;R748E	++
587/588	N9D;N185D;T443D;G444S;K723D	++

【表７－１－２】

表 7.1 配列番号300と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号300と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号300と比べて)
539/540	N9D;N185D;G415H;G444Q;T560G	++
551/552	G415H;G444Q;A517K;T560G;R748S	++
553/554	N9D;G415H;G444T;K723D;R748E	++
741/742	N9D;G415H;G444R;A517K;T560G;R748E	++
595/596	N9D;G415H;T443D;G444R;A517K;R748E	++
655/656	N9D;N185D;G415H;A517K;K723D	++
641/642	N9D;N185D;G444Q;A517K;T560G;R748D	++
751/752	G415H;G444S;T560G	++
491/492	N9D;G415H;T443D;T560G	++
823/824	N9D;G444L;A517K;T560G;K723D;R748E	++
717/718	N9D;N185D;G415H;A517K;T560G	++
611/612	N185D;G415H;K723D;R748S	++
593/594	N9D;G415H;G444T;T560G	++
745/746	N9D;N185D;A517K;T560G;K723D;R748E	++
575/576	G415H;T560G;K723D	++
643/644	N9D;T443D;G444R;T560G;K723D	++
609/610	N9D;T443D;G444T;A517K;T560G	++
515/516	G415H;A517K;T560G;R748E	++
489/490	N9D;G415H;G444K;A517K;T560G;R748S	++
583/584	N9D;G415H;G444S;T560G	++
601/602	N185D;G444R;A517K;T560G;K723D;R748S	++
715/716	N185D;G415H;T560G	++
735/736	N185D;G415H;G444R;A517K;R748S	++
513/514	N9D;G415H;A517K;T560G;R748E	++
511/512	N9D;G61D;G444S	++
617/618	G415H;G444K;K723D	++
733/734	N9D;N185D;G444L;T560G;K723D	++
675/676	G415H;K723E;R748E	++
723/724	N9D;G415H;G444R;T560G	++
665/666	N185D;T443D;G444R;T560G	++
607/608	N9D;G444N;A517K;T560G;K723D;R748E	++
653/654	N9D;N185D;G415H;A517K;R748S	++
647/648	N9D;G444Q;A517K;T560G;K723D	++
509/510	N9D;N185D;G444S;A517K;K723D;R748S	++
691/692	N9D;N185D;G415H;R748E	++
787/788	N9D;G415H;G444Q;A517K	++
549/550	G444L;A517K;T560G;K723D;R748S	++
487/488	N185D;A517K;T560G;K723D	++
677/678	T443D;G444T;K723D	++
681/682	T443D;G444K;A517K;R748E	++
649/650	N9D;N185D;G444L;T560G;R748S	++
785/786	N9D;G415H;G444K	++
531/532	N9D;N185D;G415H;G444Q	++
621/622	G415H;K723D;R748S	++
819/820	N185D;G444L;A517K;T560G	++
795/796	G415H;G444T	++

【表７－１－３】

表 7.1 配列番号300と比べたときのバリアントの活性		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号300と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号300と比べて)
625/626	N9D;G415H;T560G	++
687/688	G444S;A517K;K723D;R748E	++
585/586	N9D;G444K;T560G;K723D	++
499/500	N9D;T443D;G444T;A517K;R748S	++
541/542	N9D;N185D;G444Q;A517K;T560G	++
753/754	N9D;N185D;G444S;T560G	++
645/646	N9D;N185D;G444L;A517K;T560G	++
581/582	N185D;G444S;A517K;K723D	++
659/660	N9D;G415H;G444L;A517K	++
535/536	T443D;G444S;T560G	++
801/802	N9D;N185D;G444S;K723D	++
579/580	N9D;T443D;G444K;T560G	++
669/670	G444T;T560G;K723D	++
689/690	G415H;G444L;A517K	++
763/764	N9D;N185D;T443D;G444R;A517K	++
777/778	N185D;T560G;K723D	++
757/758	N9D;T443D;K723D	++
637/638	N9D;T443D;G444S;A517K	++
635/636	N9D;G444L;T560G;K723D	++
503/504	N9D;G415H;G444S;A517K	++
815/816	N185D;T560G;R748E	++
825/826	N9D;Q168R;N185D;A517K;T560G;R748S	++
781/782	G444L;T560G;K723D	++
667/668	N9D;G444T;A517K;T560G	++
743/744	N9D;G444L;T560G;R748E	++
711/712	N9D;T443D;A517K;R748E	++
563/564	G444Q;T560G;K723D	++
603/604	N9D;N185D;G415H	++
821/822	G415H;G444L	++
661/662	N9D;G415H;G444R;A517K	++
623/624	N9D;A517K;T560G;K723D	++
731/732	G415H;R748E	++
663/664	N185D;T560G;R748S	++
537/538	N9D;T560G;K723D;R748S	++
793/794	G444Q;T560G	++
567/568	N9D;G444L;T560G;R748S	+
519/520	N9D;G444S;T560G;R748E	+
693/694	N9D;G415H;R748S	+
521/522	N9D;G444Q;A517K;K723D	+
755/756	N185D;G444R;T560G	+
709/710	N9D;G415H;A517K	+
615/616	N9D;A517K;T560G;R748E	+
547/548	G444T;A517K;T560G	+
729/730	N9D;A517K;T560G;R748D	+
803/804	A517K;T560G;R748E	+
555/556	G444K;A517K;T560G	+

【表７－１－４】

表 7.1 配列番号300と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号300と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号300と比べて)
497/498	N9D;G444K;A517K;T560G	+
831/832	N9D;N185D;G444K	+
591/592	G415H;A517K	+
613/614	G444K;A517K;R748E	+
737/738	N185D;T560G	+
739/740	G444S;K723D	+
493/494	G444S;T560G;R748S	+
835/836	N9D;N185D;R748E	+
829/830	N9D;G444K;R748S	+
809/810	G415H	+
701/702	N9D;G444L;T560G	+
685/686	T443D;A517K	+
705/706	N9D;G444S;K723D	+
501/502	T443D;G444S	+
761/762	N9D;N185D;A517K	+
629/630	A517K;T560G	+
805/806	N9D;A517K;K723D	+
833/834	G444K;R748S	+
505/506	N9D;T443D;G444R;A517K	+
507/508	G444R;A517K;T560G	+
747/748	A517K;K723D	+
571/572	N9D;G444Q;A517K	+
517/518	K723D;R748D	+
533/534	N185D;G444K;K446N;A517K;T560G	+
565/566	N9D;G444L;R748E	+
495/496	T443D;G444K;A517K;T560G;K723D;R748S	+
657/658	N9D;K15M;G444L;K723D	+
631/632	N9D;G444T	+
697/698	N9D;A517K;R748S	+
811/812	N9D;N185D	+
529/530	N9D;K723D	+
605/606	A517K;R748E	+
789/790	K723D	+
527/528	G415H;A517K;T560G	+
559/560	T560G	+
721/722	G444K	+
759/760	G444R;A517K	+
577/578	N9D;A517K	+
703/704	A517K;R748S	+
903/904	K103E;W119Y;N348H;N457Q;N494D	+++
897/898	K103E;W119Y;F256R;N348H;G444N;N494D;S646D	++
877/878	K103E;T129W;F254N;G444N;N457Q;N494D	++
943/944	K103E;W119Y;N348H;N457Q	++
895/896	K103E;W119Y;N457Q	++
855/856	W119Y;T129W;F256R;N348H;N457Q	++
945/946	W119Y;T129W;F254N;N457Q;N494D	++

【表７－１－５】

表 7.1 配列番号300と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号300と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号300と比べて)
935/936	K103E;F256R;N457Q	++
881/882	W119Y;F256R;N348H;N494D	++
939/940	N348H;N457Q	++
911/912	K103E;T129W;F256R;N348H	++
923/924	K103E;T129W;N348H;S646D	++
871/872	W119Y;F254N;N348H;N457Q	++
933/934	K103E;W119Y;F254N;N348H;G444N	++
891/892	W119Y;F256R;N348H	++
929/930	F256R;N348H	++
841/842	K103E;W119Y;N348H	+
879/880	K103E;N348H;N494D	+
893/894	K103E;N348H;G444N	+
937/938	K103E;W119Y;T129W;G444N;N494D	+
941/942	K103E;F256R;G444N	+
915/916	K103E;W119Y;F254N;G444N	+
873/874	F254N;N457Q	+
899/900	K103E;N348H	+
901/902	K103E;W119Y;F254N;N348H	+
865/866	K103E;W119Y;N494D;S646D	+
867/868	K103E;F254N;N348H;N494D	+
949/950	N348H;G444N;S646D	+
917/918	W119Y;F256R;G444N	+
845/846	K103E;W119Y;F256R;N494D	+
885/886	K103E;F254N;N348H	+
927/928	W119Y;T129W;F254N;N348H;N494D	+
883/884	K103E;F254N;S646D	+
849/850	W119Y;N348H;N494D	+
861/862	W119Y;N348H	+
913/914	K103E;F256R;N494D	+
925/926	N348H;N494D	+
859/860	K103E;W119Y;N494D	+
951/952	W119Y;F256R	+
857/858	W119Y;N348H;G444N	+
921/922	K103E;T129W	+
875/876	K103E;G444N	+
931/932	K103E;F256R	+
947/948	K103E;N494D;S646D	+
843/844	N348H;G444N	+
853/854	K103E;N494D	+
847/848	K103E;W119Y	+
909/910	F256R;N494D	+
905/906	K103E;W119Y;T129W;F254N;F256R;N348H;N494D;S646D	+
919/920	K103E;F254N	+
869/870	W119Y;S646D	+
887/888	N348H	+
863/864	W119Y;G444N	+

【表７－１－６】

表 7.1 配列番号300と比べたときのバリアントの活性

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号300と比べて)	活性FIOP [1] (配列番号300と比べて)
851/852	W119Y;T129W;S646D	+
907/908	K103E	+
889/890	K103E;F254N;F256R;N348H;G444N;N494D	+

[1]活性増加のレベルは、配列番号300の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=1倍超であるが2.0倍未満の活性増加;「++」=2.0倍超であるが3倍未満の活性増加;「+++」=3倍超であるが10倍未満の活性増加「++++」=10倍超。

【０１９４】

実施例８

三保護インスリンのＡ１位での脱アシル化における配列番号１２６２または１２８８を超える改善

Ｃｏｄｅｘ（登録商標）Ａｃｙｌａｓｅ　Ｐａｎｅｌ（Ｃｏｄｅｘｉｓ）からのバリアントおよび米国特許仮出願第６２／１５８，１１８に開示されているバリアントをスクリーニングすることにより、配列番号１２６２および１２８８バリアントが、Ａ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテートインスリンからＡ１位の保護基を除去する最善の酵素として特定された。三保護されたインスリンをＡ１位において脱アシル化するための、改善された活性および化学選択性を標的化するライブラリーに対する親酵素として、配列番号１２６２を含むバリアントを選択した。操作された遺伝子のライブラリーを、十分に確立された手法（例えば、飽和突然変異誘発、予め特定された有益な変異の組換え）を用いて作製した。各遺伝子によってコードされるポリペプチドを、実施例２に記載したようにＨＴＰで作製し、可溶性の溶解産物を、実施例３に記載したように生成した。各バリアントを、５ｇ／Ｌ　Ａ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテートインスリン、０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液ｐＨ＝８．０、１７ｇ／Ｌフェニル酢酸メチルおよび８０μＬの可溶性溶解産物を含む２００μＬの反応物中で３０℃において５時間スクリーニングした。９６ウェルプレートをヒートシールし、１００ｒｐｍのＴｈｅｒｍｏｔｒｏｎ（登録商標）振盪機においてインキュベートした。それらの反応物を、３００μｌのアセトニトリルでクエンチし、卓上振盪機を用いて５分間混合した。次いで、プレートを４０００ｒｐｍで５分間遠心し、解析のためにＨＰＬＣにローディングした。

【０１９５】

配列番号１２６２または１２８８と比べたときの変換パーセント（変換パーセントＦＩＯＰ）を、配列番号１２６２または１２８８によってもたらされた変換パーセントに対する、バリアントによって形成された生成物の変換パーセントとして計算し、表８．１および８．２に示した。この変換パーセントは、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、基質、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって、計算された。

【０１９６】

配列番号１２６２または１２８８と比べたときの選択性パーセント（選択性パーセントＦＩＯＰ）を、配列番号１２６２または１２８８によってもたらされた選択性パーセントに対する、バリアントによって形成された生成物の選択性パーセントとして計算し、表８．１および８．２に示した。この選択性パーセントは、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって、計算された。

【表８－１－１】

表 8.1 脱アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1262と比べて)	脱アシル化 変換パーセント FIOP [1]	脱アシル化 選択性パーセント FIOP [2]
953/954	W431R	+++	+++
955/956	F701L	+++++++	+++++++
957/958	F701A	+++++	+++++++
959/960	F24A	+++++	+++++++
961/962	F71V	+++	+++
963/964	F71K	+++	++++
965/966	F71E	+++++++	+++++++
967/968	F24Y;V28A	+++++	+++++
969/970	M697L	+++	+++
971/972	I177T	++++	++++
973/974	W154F;L754P	++	++
975/976	F71C;G74D	++	++
977/978	F701V	++++++	++++++
979/980	F701H	++++++	++++++
981/982	F701C	+++++	+++++++
983/984	F701I	+++++++	+++++++
985/986	F701M	++++	+++++
987/988	M697F	++	++
989/990	M697G	++++	++++
991/992	V28A;Y31F	++++++	+++++++
993/994	V28A;Y31L	++++++	+++++++
995/996	V28A;Y31V	+++++++	+++++++
997/998	V28A;Y31T	++++	++++
999/1000	V28A;Y31C	+++++	+++++++
1001/1002	V28A;Y31N	++++++	+++++++
1003/1004	V28A;Y31M	++++++	+++++++
1005/1006	V28A;Y31K	++++++	+++++++
1007/1008	F24A;Y31W;V56I;F701W	++++++	+++++++
1009/1010	F24A;V56I;F701W	++++++	+++++++
1011/1012	F24A;Y31C;V56I;S386P;F701Y	++	+++++++
1013/1014	F24A;F71C;F701W	++++	+++++++
1015/1016	F24A;L225V;F701Y	+++	+++++++
1017/1018	F24A;Y31W;V56T;V264A;F701W;S750G	++++++	+++++++
1019/1020	F24A;Y31W;F71C;F701W	+++	+++++++
1021/1022	F24A;D484N;F701W	++++++	+++++++
1023/1024	F24A;V56T;F701W	+++++	+++++++
1025/1026	F24A;Y31W	++++++	+++++++
1027/1028	F24A;V56I;W154F;I270V;M697L	+++	+++++++
1029/1030	F24A;V56I;M697F;F701W	+++	+++++++
1031/1032	F24A;Y31W;V56I;F701Y	++++	+++++++
1033/1034	F24A;Y31W;V56I;M697L	++++++	+++++++

【表８－１－２】

表 8.1 脱アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1262と比べて)	脱アシル化 変換パーセント FIOP [1]	脱アシル化 選択性パーセント FIOP [2]
1035/1036	F24Y;V28A;F71C;F701W	++++++	++++++
1037/1038	F24Y;V28A;V56I;A308T;T379A;F701W	++++++	++++++
1039/1040	F24Y;V28A;D321N;F701H	++++++	++++++
1041/1042	F24Y;V28A;N457Y;F701W	++++++	++++++
1043/1044	F24Y;V28A;V56I;F701W	++++++	++++++
1045/1046	F24Y;Y27C;V28T;F701W;V729F	++++++	++++++
1047/1048	V56T;F71G;F701W	++++++	++++++
1049/1050	M697L;F701Y	++++	++++
1051/1052	V56T;W658R;F701W	++	++
1053/1054	V56T;F71G;F701I	++++	++++++
1055/1056	A410P;M697F;F701W	+++++	++++++
1057/1058	V56L;K322R;M697L;F701V	+++++	++++++
1059/1060	V56L;F701H	++++++	++++++
1061/1062	Y31C;V56L;F701H	++++++	++++++
1063/1064	F71G;F701W	++++++	++++++
1065/1066	T129A;I511F;F701Y	++++	+++++
1067/1068	V56T;F701W;L711Q	++	++
1069/1070	I423T;F701W	++	++
1071/1072	V56I;W154F;F701W	+++	+++
1073/1074	V56L;W119R;K146E;F701Y	++++	++++++
1075/1076	V56T;M697L;F701W	++++++	++++++

[1]各バリアントに対する変換パーセントは、配列番号1262の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=1倍超であるが2.0倍未満の活性増加;「++」=2.0倍超であるが3倍未満の活性増加;「+++」=3倍超であるが4倍未満の活性増加;「++++」=4倍超であるが5倍未満;「+++++」=5倍超であるが6倍未満;「++++++」=6倍超。

[2]各バリアントに対する選択性パーセントは、配列番号1262の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=1倍超であるが2.0倍未満の選択性増加;「++」=2.0倍超であるが3倍未満の選択性増加;「+++」=3倍超の増加であるが4倍未満の選択性増加;「++++」=4倍超であるが5倍未満の選択性増加;「+++++」=5倍超であるが6倍未満の選択性増加;「++++++」=6倍超の選択性。

【表８－２－１】

表 8.2 脱アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1262と比べて)	脱アシル化 変換パーセント FIOP [1]	脱アシル化 選択性パーセント FIOP [2]
1077/1078	G71Y;D74K	+++++	++++++
1079/1080	Y31A	+	+++
1081/1082	G71K;D74L	+	+++
1083/1084	G71K;D74N;T129P	+	+++
1085/1086	T32R	+	++++

【表８－２－２】

表 8.2 脱アシル化の結果

配列番号	アミノ酸相違 (配列番号1262と比べて)	脱アシル化パーセント	脱アシル化パーセント
1087/1088	A69L;D74T	+	+++
1089/1090	V75H	+	++
1091/1092	R141A	+	+++
1093/1094	P22C	+	++++
1095/1096	F57W	+	++++
1097/1098	G71E	+	+++++
1099/1100	G71E;D74T	+++	++++
1101/1102	G71W;D74T	+++	++++
1103/1104	G71W;D74G	+++	++++
1105/1106	G71W;D74S	+++	++++
1107/1108	G71D;D74H	+++	++++
1109/1110	G71D;D74M	+++	++++
1111/1112	G71D;D74L	+++	++++
1113/1114	G71E;D74T;A470V	++	+++
1115/1116	G71W	++	++++
1117/1118	G71D	+++	++++
1119/1120	K394Y	++	++++
1121/1122	G71H;D74M	++	+++
1123/1124	G71I;D74Q;G145S	++	++
1125/1126	G71H;D74H	++	+++
1127/1128	F50W	+	++
1129/1130	G71I;A149V	+	++
1131/1132	G71N;D74Q	++	++
1133/1134	G71N;D74A	+	++
1135/1136	G71H	++	++
1137/1138	Y31L;V56I;V264A;A308T;T379A;D484N;Q547K;L711Q;S750G	+	++
1139/1140	G71N;D74V;Y248C	+	++
1141/1142	G71H;D74G	++	++
1143/1144	G71H;D74P	++	+++
1145/1146	G71N;D74S	++	++
1147/1148	G71F;D74E	++	++
1149/1150	G71Y;D74L	+++	+++
1151/1152	G71H;D74S	++	++
1153/1154	G71H;D74A	++	+++
1155/1156	G71L;D74M	+	+
1157/1158	G71T	++	++

[1]各バリアントに対する変換パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=1倍超であるが2.0倍未満の活性増加;「++」=2.0倍超であるが3倍未満の活性増加;「+++」=3倍超であるが4倍未満の活性増加;「++++」=4倍超であるが5倍未満;「+++++」=5倍超であるが6倍未満;「++++++」=6倍超。

[2]各バリアントに対する選択性パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=1倍超であるが2.0倍未満の選択性増加;「++」=2.0倍超であるが3倍未満の選択性増加;「+++」=3倍超の増加であるが4倍未満の選択性増加;「++++」=4倍超であるが5倍未満の選択性増加;「+++++」=5倍超であるが6倍未満の選択性増加;「++++++」=6倍超の選択性。

【０１９７】

実施例９

三保護インスリンのＡ１位での脱アシル化における配列番号１０３６を超える改善

実施例８に記載されたバリアントのスクリーニングの後、親酵素として配列番号１０３６を選択した。操作された遺伝子のライブラリーを、十分に確立された手法（例えば、飽和突然変異誘発、予め特定された有益な変異の組換え）を用いて作製した。各遺伝子によってコードされるポリペプチドを、実施例２に記載したようにＨＴＰで作製し、可溶性の溶解産物を、実施例３に記載したように生成した。

【０１９８】

各バリアントを、５ｇ／Ｌ　Ａ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテートインスリン、２００ｍＭ　Ｔｒｉｓ緩衝液ｐＨ＝８．０および１０μＬの可溶性溶解産物を含む２００μＬの反応物中で３０℃において５時間スクリーニングした。９６ウェルプレートをヒートシールし、１００ｒｐｍのＴｈｅｒｍｏｔｒｏｎ（登録商標）振盪機においてインキュベートした。それらの反応物を、２００μｌのアセトニトリルまたはジメチルアセトアミドでクエンチし、卓上振盪機を用いて５分間混合した。次いで、プレートを４０００ｒｐｍで５分間遠心し、水で２倍希釈し、解析のためにＨＰＬＣにローディングした。

【０１９９】

配列番号１０３６と比べたときの変換パーセント（変換パーセントＦＩＯＰ）を、配列番号１０３６によってもたらされた変換パーセントに対する、バリアントによって形成された生成物の変換パーセントとして計算し、表９．１に示した。この変換パーセントは、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、基質、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって、定量された。

【０２００】

配列番号１０３６と比べたときの選択性パーセント（選択性パーセントＦＩＯＰ）を、配列番号１０３６によってもたらされた選択性パーセントに対する、バリアントによって形成された生成物の選択性パーセントとして計算し、表９．１に示した。この選択性パーセントは、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって、定量された。

【表９－１－１】

表 9.1 脱アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1036と比べて)	脱アシル化 変換 パーセント FIOP [1]	脱アシル化 選択性 パーセント FIOP [2]
1175/1176	A467L	+	+

【表９－１－２】

表 9.1 脱アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1036と比べて)	脱アシル化 変換 パーセント FIOP [1]	脱アシル化 選択性 パーセント FIOP [2]
1171/1172	T384Y	+	+
1177/1178	A255Y	+	+
1165/1166	D623E	+	+
1169/1170	L253M	+	+
1183/1184	T176C	+	+
1163/1164	A255S	+	+
1181/1182	T384R	+++	+
1159/1160	T384K	+	+
1185/1186	L536T	+	+
1189/1190	L536K	+	+
1193/1194	N2L	+++	+
1179/1180	F460Y	+	+
1167/1168	A255H	+	+
1187/1188	N47R	++	+
1161/1162	L253N	+++	
1173/1174	L253Q	+	
1191/1192	L536R	+	

[1]変換パーセントは、配列番号1036の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=1倍超であるが2.0倍未満の活性増加;「++」=2.0倍超であるが2.5倍未満の活性増加;「+++」=2.5倍超の活性増加。

[2]選択性パーセントは、配列番号1036の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=1倍超であるが2.0倍未満の選択性増加;「++」=2.0倍超であるが2.5倍未満の選択性増加;「+++」=2.5倍超の選択性増加。

【０２０１】

実施例１０

三保護インスリンのＡ１位での脱アシル化における配列番号１１９４を超える改善

実施例９に記載されたバリアントのスクリーニングの後、親酵素として配列番号１１９４を選択した。操作された遺伝子のライブラリーを、十分に確立された手法（例えば、飽和突然変異誘発、予め特定された有益な変異の組換え）を用いて作製した。各遺伝子によってコードされるポリペプチドを、実施例２に記載したようにＨＴＰで作製し、可溶性の溶解産物を、実施例３に記載したように生成した。

【０２０２】

各バリアントを、１５ｇ／Ｌ　Ａ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテートインスリン、２００ｍＭ　Ｔｒｉｓ緩衝液ｐＨ＝８．０および１０μＬの可溶性溶解産物を含む２００μＬの反応物中で３０℃において５時間スクリーニングした。９６ウェルプレートをヒートシールし、１００ｒｐｍのｔｈｅｒｍｏｔｒｏｎにおいてインキュベートした。それらの反応物を、２００μｌのアセトニトリルまたはジメチルアセトアミドでクエンチし、卓上振盪機を用いて５分間混合した。次いで、プレートを４０００ｒｐｍで５分間遠心し、水で２倍希釈し、解析のためにＨＰＬＣにローディングした。

【０２０３】

配列番号１１９４と比べたときの変換パーセント（変換パーセントＦＩＯＰ）を、配列番号１１９４によってもたらされた変換パーセントに対する、バリアントによって形成された生成物の変換パーセントとして計算し、表１０．１に示した。この変換パーセントは

、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、基質、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって、計算された。

【０２０４】

配列番号１１９４と比べたときの選択性パーセント（選択性パーセントＦＩＯＰ）を、配列番号１１９４によってもたらされた選択性パーセントに対する、バリアントによって形成された生成物の選択性パーセントとして計算し、表１０．１に示した。この選択性パーセントは、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって、計算された。

【表１０－１－１】

表 **10.1** 脱アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1194と比べて)	脱アシル化 変換パーセント FIOP [1]	脱アシル化 選択性パーセント FIOP [2]
1195/1196	V264A;T384K;A467L;D484N;L536T;Q547K	+	+
1197/1198	V264A;T384R;A467L;D484N;L536T;Q547K	+	+
1199/1200	T384K;A467L;D484N;L536T;Q547K	+++	+
1201/1202	V264A;T384R;A467L;D484N;L536T;Q547K	+	+
1203/1204	V264A;T384R;A467L;D484N;L536T;Q547K	+	+
1205/1206	V264A;T384R;A467L;D484N;L536T;Q547K	+	+
1207/1208	T384R;A467L;D484N;L536T;Q547K	+++	
1209/1210	V264A;T384R;A467L;D484N;L536T;Q547K	+	+
1211/1212	A28T;V264A;T384R;A467L;D484N;L536T;Q547K	++	+
1213/1214	Q12A;K103E;W119Y;Q233K;T384R;G444N;N494D;S646D	++	
1215/1216	Q12A;K103E;T131A;Q233K;G444N;N494D;S646D	+	+
1217/1218	Q12A;K103E;W119Y;T131A;Q233K;G444N;N494D;S646D	+	+
1219/1220	Q12A;K103E;T131A;Q233K;G444N;A467L;N494D;S646D	++	+
1221/1222	Q12A;K103E;W119Y;Q233K;G444N;N494D;S646D	+	+
1223/1224	K103E;Q233K;G444N;N494D;S646D	+	+
1225/1226	Q12A;K103E;Q233K;G444N;N494D;S646D	+	
1227/1228	Q12A;K103E;W119Y;Q233K;G444N;N494D;S646D	+	+
1229/1230	K103E;W119Y;Q233K;G444N;N494D;S646D	+	+
1231/1232	Q12A;K103E;W119Y;T131A;Q233K;T384K;G444N;N494D;S646D	++	
1233/1234	Q12A;K103E;W119Y;Q233K;G444N;N494D;S646D	+	+
1235/1236	Q12A;K103E;W119Y;T131A;Q233K;G444N;N494D;S646D	+	+
1237/1238	Q12A;K103E;W119Y;T131A;Q233K;T384K;G444N;N	++	

【表１０－１－２】

表 10.1 脱アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1194と比べて)	脱アシル化変換パーセントFIOP [1]	脱アシル化選択性パーセントFIOP [2]
	494D;S646D		
1239/1240	Q12A;K103E;W119Y;T131A;Q233K;G444N;N494D;S646D	+	+
1241/1242	Q12A;K103E;W119Y;T131A;Q233K;G444N;N494D;S646D	+	+
1243/1244	Q12A;K103E;W119Y;Q233K;G444N;A467L;N494D;S646D	+	+
1245/1246	Q12A;K103E;W119Y;Q233K;G444N;A467L;N494D;S646D	+	+
1247/1248	Q12A;K103E;W119Y;Q233K;G444N;N494D;L536T;S646D	+	+
1249/1250	K103E;W119Y;T131A;Q233K;T384R;G444N;N494D;S646D	++	
1251/1252	Q12A;W119Y;Q233K;T384R;G444N;N494D;S646D	+	+
1253/1254	K668E	+	+

[1]変換パーセントは、配列番号1194の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=1倍超であるが2.0倍未満の活性増加;「++」=2.0倍超であるが2.5倍未満の活性増加;「+++」=2.5倍超の活性増加。

[2]選択性パーセントは、配列番号1194の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=1倍超であるが2.0倍未満の選択性増加;「++」=2.0倍超であるが2.5倍未満の選択性増加;「+++」=2.5倍超の選択性増加。

【０２０５】

実施例１１

Ａ１、Ｂ１およびＢ２９位でのインスリンのアシル化の改善

Ｃｏｄｅｘ（登録商標）Ａｃｙｌａｓｅ Ｐａｎｅｌ（Ｃｏｄｅｘｉｓ）におけるバリアントおよび米国特許仮出願第６２／１５８，１１８に開示されているバリアントから選んだものを、Ａ１、Ｂ１およびＢ２９位においてインスリンをアシル化する能力についてスクリーニングした。各遺伝子によってコードされるポリペプチドを、実施例２に記載したようにＨＴＰで作製し、可溶性の溶解産物を、実施例３に記載したように生成した。

【０２０６】

各バリアントを、１０ｇ／Ｌインスリン、０．１Ｍ ＣＨＥＳ緩衝液ｐＨ＝１０、１７ｇ／Ｌフェニル酢酸メチルおよび２０μＬの可溶性溶解産物を含む２００μＬの反応物中で３０℃において２０時間スクリーニングした。９６ウェルプレートをヒートシールし、３００ｒｐｍのＴｈｅｒｍｏｔｈｒｏｎ（登録商標）振盪機においてインキュベートした。それらの反応物を、２００μｌのアセトニトリルでクエンチし、卓上振盪機を用いて５分間混合した。次いで、プレートを４０００ｒｐｍで５分間遠心し、解析のためにＨＰＬＣにローディングした。

【０２０７】

変換パーセント（％変換）は、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、基質、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって計算された。選択性パーセント（％選択性）は、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによ

って計算された。結果は、図２に提供されている。

【０２０８】

実施例１２

配列番号１２８８と比べたときの、Ａ１、Ｂ１およびＢ２９位におけるインスリンのアシル化の改善

実施例１１に記載されたバリアントをスクリーニングし、インスリンをＢ２９位においてアシル化する際の最善の酵素を特定した後に、親酵素として配列番号１２８８を選択した。操作された遺伝子のライブラリーを、十分に確立された手法（例えば、飽和突然変異誘発、予め特定された有益な変異の組換え）を用いて作製した。各遺伝子によってコードされるポリペプチドを、実施例２に記載したようにＨＴＰで作製し、可溶性の溶解産物を、実施例３に記載したように生成した。

【０２０９】

各バリアントを、１０ｇ／Ｌインスリン、０．１Ｍ　ＴＲＩＳ緩衝液ｐＨ＝９．２５、２０％アセトニトリル、１７ｇ／Ｌフェニル酢酸メチルおよび１０μＬの浄化された溶解産物を含む２００μＬの反応物中で３０℃において５時間スクリーニングした。９６ウェルプレートをヒートシールし、１００ｒｐｍのＴｈｅｒｍｏｔｒｏｎ（登録商標）振盪機においてインキュベートした。それらの反応物を、２００μｌのアセトニトリルでクエンチし、卓上振盪機を用いて５分間混合した。次いで、プレートを４０００ｒｐｍで５分間遠心し、解析のためにＨＰＬＣにローディングした。

【０２１０】

配列番号１２８８に対する変換パーセント（変換パーセントＦＩＯＰ）を、配列番号１２８８によってもたらされた変換パーセントに対する、バリアントによって形成された生成物の変換パーセントとして計算し、表１２．１、１２、２、１２，３、１２．４、１２．５、１２．６および１２．７に示した。この変換パーセントは、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、基質、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって、計算された。

【０２１１】

配列番号１２８８に対する選択性パーセント（選択性パーセントＦＩＯＰ）を、配列番号１２８８によってもたらされた選択性パーセントに対する、バリアントによって形成される生成物の選択性パーセントとして計算し、表１２．１、１２、２、１２，３、１２．４、１２．５、１２．６および１２．７に示した。この選択性パーセントは、ＨＰＬＣ解析によって観察された、生成物ピークの面積を、生成物および不純物／副生成物ピークの面積の合計で除算することによって、計算された。

【表１２－１－１】

表 12.1 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1 アシル化 変換パーセント (FIOP)[1]	A1 アシル化 選択性パーセント (FIOP)[2]
1677/1678	Y27T;F254W;A470V	++	+
1679/1680	Y27T;L253V;A255G;N348R	+	+
1685/1686	Y27T;A255G;W370I	+++	

【表１２－１－２】

表 12.1 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1 アシル化 変換パーセント (FIOP)[1]	A1 アシル化 選択性パーセント (FIOP)[2]
1701/1702	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;K369C;T384P	+	+
1703/1704	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;K369C;T384P	++	+
1759/1760	L253M	+	+
1797/1798	T384R	++	+
1799/1800	D623N	+	
1811/1812	L253S	+	+
1817/1818	N457T	+	+
1819/1820	R317S;Q380P	+	+
1821/1822	A373Y	+	+
1859/1860	K128W	+	+
1901/1902	T705S	+	+

[1] 変換パーセントは、配列番号**1288**の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=**1**倍超であるが**1.5**倍未満の活性増加;「++」=**1.5**倍超であるが**2.0**倍未満の活性増加;「+++」=**2.0**倍超の活性増加。

[2] 選択性パーセントは、配列番号**1288**の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=**0.95**倍超の選択性増加。

【表１２－２－１】

表 12.2 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	B29 アシル化 変換パーセント (FIOP)[1]	B29 アシル化 選択性パーセント (FIOP)[2]
1371/1372	Y27T;N348R;D381K	+	+
1417/1418	Y27T;D74S;A255G;N348R;K369C;D381K		+
1605/1606	Y27T;D74S;A255G;N348R;D381K;T384P	+	+
1637/1638	Y27T;N348R;K369C;W370I;D381K;T384P		+
1659/1660	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;D381K		+
1689/1690	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I;D381K		+
1707/1708	Y27T;A255G;N348R;W370I;D381K;T384P		+
1711/1712	D381F	+	+
1715/1716	Q134M	+	+
1717/1718	D623W	++	+
1719/1720	L253R	+	+

【表１２－２－２】

表 12.2 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	B29 アシル化 変換パーセント (FIOP)[1]	B29 アシル化 選択性パーセント (FIOP)[2]
1721/1722	N627M	+	+
1723/1724	N627R	+	+
1725/1726	D623N	++	+
1729/1730	K615V	+	+
1731/1732	D381L	+	+
1733/1734	D381R	+	++
1735/1736	A132G	+	+
1737/1738	A467S	+	+
1741/1742	F256Y	+	+
1743/1744	D623V	+	+
1745/1746	K615H		+
1747/1748	D623A	+	+
1749/1750	D381Q	+	+
1753/1754	K615C		+
1755/1756	T384R	+	+
1761/1762	F256H	+	+
1773/1774	T453C		+
1775/1776	D381V		+
1777/1778	D381K	+	+
1779/1780	D381F;Q672K		+
1781/1782	D623Y	+	+
1785/1786	D623R	+++	++
1787/1788	D623F	+	+
1789/1790	D623K	+++	++
1793/1794	D381I		+
1823/1824	A373K	+++	++
1825/1826	S706K	+	++
1829/1830	N348K;A467T	+	+
1831/1832	D709G	+	+
1833/1834	D709A	+	+
1835/1836	F620R	+	+
1837/1838	D709N	+	++
1841/1842	D709H	+	+
1843/1844	E377A		+
1845/1846	F620K	+	+
1847/1848	S706R		+
1849/1850	D709R	+	++++
1853/1854	N20S;D709Q		+
1857/1858	D709S	+	+
1867/1868	V618C	+	+
1871/1872	A69M		+
1875/1876	F254K	+	+
1877/1878	A84V		+
1879/1880	F701H		+
1881/1882	P383K		+
1883/1884	A69L		+++
1885/1886	I708V		+

【表１２－２－３】

表 12.2 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	B29 アシル化 変換パーセント (FIOP)[1]	B29 アシル化 選択性パーセント (FIOP)[2]
1889/1890	A255K	++	++
1893/1894	A255R	++	++
1895/1896	A69V		+
1897/1898	P383R		++++

[1] 変換パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=2倍超であるが4倍未満の活性増加;「++」=4倍超であるが6倍未満の活性増加;「+++」=6倍超の活性増加。

[2] 選択性パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=2.0倍超であるが5倍未満の選択性の増加;「++」=5.0倍超であるが10倍未満の選択性の増加;「+++」=10.0倍超であるが15倍未満の選択性の増加;「++++」=15.0倍超の選択性。

【表１２－３－１】

表 12.3 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	B1 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	B1 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1315/1316	Y27T;L253V	+	
1317/1318	Y27T;D74G;L253V;F254W	++	+
1323/1324	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;W370I;T384P	++	+
1325/1326	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381K;T384P	++	++
1327/1328	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I	++	++
1335/1336	Y27T;D74G;L253V;N348R;K369C;W370I;D381F;T384P	+	+
1337/1338	Y27T;L253V;F254W;N348R	+	
1339/1340	Y27T;D74P;L253V;F254W;A255G;N348R	+	+
1345/1346	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I	++	++
1347/1348	Y27T;L253V;F254W;A255G	+	
1349/1350	Y27T;D74G;L253V;F254W;T384P	++	+
1351/1352	Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I	+	+
1353/1354	Y27T;D74S;L253V;N348R;W370I;D381K;T384P	++	+
1357/1358	Y27T;L253V;A255G;W370I	+	+
1359/1360	Y27T;D74G;F254W;A255G;D381F	+	+
1365/1366	Y27T;L253V;K369C;W370I	+	

【表１２－３－２】

表 12.3 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	B1 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	B1 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1377/1378	Y27T;L253V;F254W;N348R;D381F	+	+
1379/1380	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I	+	+
1381/1382	Y27T;D74S;L253V;A255G;T384P	+	+
1387/1388	Y27T;D74N;L253V;N348R;W370I;D381W;T384P	++	+
1393/1394	Y27T;D74P;L253V;N348R	+	+
1399/1400	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;D381F	+	+
1401/1402	Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1403/1404	Y27T;D74N;L253V;F254W;W370I;D381K	++	++
1409/1410	Y27T;D74G;L253V;T384P	+	+
1411/1412	Y27T;D74S;N348R;W370I	+	+
1413/1414	Y27T;D74S;L253V;F254W;A255G;K369C;W370I	+	+
1419/1420	Y27T;D74G;L253V;N348R;K369C;W370I	+	
1425/1426	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G	++	+
1429/1430	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R	+	+
1435/1436	Y27T;D74G;A255G;W370I	+	+
1437/1438	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;D381W	+	+
1439/1440	Y27T;D74P;L253V;W370I	++	+
1441/1442	Y27T;L253V;N348R;W370I;T384P	+	
1443/1444	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I;D381K;T384P	++	+
1447/1448	Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R;W370I;D381K	+	+
1449/1450	Y27T;D74S;L253V;N348R;K369C;W370I;T384P	+	+
1453/1454	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381F	++	++
1455/1456	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;W370I;D381F;T384P	+	+
1457/1458	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;D381K	++	++
1459/1460	Y27T;D74S;F254W;K369L;W370I	+	+
1463/1464	Y27T;L253V;F254W;D381F;T384P	+	+
1465/1466	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;K369C;W370I	+	
1467/1468	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;W370I	++	+
1469/1470	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	++	++
1471/1472	L253V;N348R;W370I	+	

【表１２－３－３】

表 12.3 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	B1 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	B1 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1475/1476	Y27T;D74N;L253V;F254W;K369C	+	+
1477/1478	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R	+	
1479/1480	Y27T;D74S;L253V;N348R;D381W	+	+
1481/1482	Y27T;D74S;L253V;N348R	+	+
1483/1484	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R	+	
1489/1490	Y27T;D74S;L253V;A255G;N348R;W370I;D381K	++	++
1491/1492	Y27T;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1493/1494	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	++	+++
1495/1496	Y27T;D74S;F254W;A255G;W370I	++	++
1497/1498	Y27T;F254W;A255G;K369C;W370I;D381F;T384P	+	
1501/1502	Y27T;L253V;F254W;D381F	++	+
1503/1504	Y27T;D74N;F254W;N348R	+	
1505/1506	Y27T;F254W;A255G;W370I	+	
1509/1510	Y27T;D74N;A107V;A255G;N348R;K369C;W370I	+	
1511/1512	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I	+	
1515/1516	Y27T;D74N;F254W	+	+
1521/1522	Y27T;D74G;L253V;D381F;T384P	+	+
1523/1524	Y27T;D74P;L253V;A255G	+	+
1525/1526	Y27T;D74S;L253V;F254W;A255G;N348R	+	+
1529/1530	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I	+	
1533/1534	Y27T;D74P;W370I	+	
1537/1538	Y27T;L253V;F254W;T384P	+	+
1543/1544	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;W370I	+++	+++
1545/1546	Y27T;D74G;L253V;N348R;W370I	++	+
1553/1554	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	+	
1555/1556	Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R	+	+
1563/1564	Y27T;L253V;A255G;W370I;D381F;T384P	+	
1565/1566	Y27T;L253V;A255G;N348R;D381K	+	+
1567/1568	Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I;T384P	+	+
1569/1570	Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I;D381K	+	+
1571/1572	Y27T;D74N;L253V;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1573/1574	Y27T;L253V;F254W;N348R;D381W;T384P	+	+
1577/1578	Y27T;L253V;F254W;A255G;G260C	+	+

【表１２－３－４】

表 12.3 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	B1 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	B1 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
	;N348R;D381F;T384P		
1579/1580	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R; D381F;T384P	+	+
1583/1584	Y27T;D74G;L253V;N348R;K369C; W370I;D381F	+	+
1585/1586	Y27T;D74N;L253V;N348R	+	+
1587/1588	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R; T384P	+	+
1589/1590	Y27T;D74N;L253V;A255G;W370I	++	++
1591/1592	Y27T;D74N;A255G;N348R;W370I	+	+
1593/1594	Y27T;L253V;N348R;D381F;T384P	+	
1603/1604	Y27T;L253V;D381F;T384P	+	
1607/1608	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R; W370I;D381W;T384P	++	+
1609/1610	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R ;W370I;T384P	+	
1627/1628	Y27T;L253V;F254W	+	+
1631/1632	Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I; D381F	++	++
1633/1634	Y27T;D74G;L253V;A255G	+	+
1635/1636	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R; W370I	+++	+++
1639/1640	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R; K369C;W370I;D381K	+	+
1643/1644	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G; N348R;K369C;W370I;D381F	+	+
1645/1646	Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R; K369C;W370I	+	+
1655/1656	Y27T;D74N;L253V	+	+
1657/1658	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G; N348R	+	+
1661/1662	Y27T;F254W;A255G;T384P	+	
1663/1664	Y27T;F254W;A255G	++	+
1667/1668	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R ;D381F;T384P	+	+
1669/1670	Y27T;F254W;A255G;N348R	+	+
1671/1672	Y27T;D74N;F254W;T384P	+	
1673/1674	Y27T;L253V;N348R	+	+
1675/1676	Y27T;D74G;A255G;N348R	+	
1677/1678	Y27T;F254W;A470V	+	
1679/1680	Y27T;L253V;A255G;N348R	+	
1681/1682	Y27T;D74N;L253V;K369C;D381K; T384P	+	+
1683/1684	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R; D381F	++	+
1685/1686	Y27T;A255G;W370I	+	
1687/1688	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R	+	

【表１２－３－５】

表 12.3 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	B1 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	B1 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1693/1694	Y27T;D74S;L253V;F254W;N348R;D381W;T384P	+++	++
1695/1696	Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R	+	
1697/1698	Y27T;D74P;L253V;F254W;A255G	++	+
1705/1706	Y27T;L253V;N348R;W370I;D381F;T384P	++	++
1709/1710	Y27T;D74S;A255G;W370I	+	
1815/1816	N388E	+	++
1865/1866	A255P	+	

[1] 変換パーセントは、配列番号**1288**の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=**2**倍超であるが**5**倍未満の活性増加;「++」=**5**倍超であるが**10**倍未満の活性増加;「+++」=**10**倍超の活性増加。

[2] 選択性パーセントは、配列番号**1288**の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=**2.0**倍超であるが**5**倍未満の選択性の増加;「++」=**5.0**倍超であるが**7**倍未満の選択性の増加;「+++」=**7.0**倍超の選択性。

【表１２－４－１】

表 12.4 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B29 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	A1/B29 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1319/1320	Y27T;D74S;F254W;N348R;D381W	+	+
1329/1330	Y27T;A255G;N348R;W370I	+	
1333/1334	Y27T;N348R;T384P	+	+
1363/1364	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;D381W	+	+
1373/1374	Y27T;D74S;N348R	+	
1499/1500	Y27T;A255G;N348R	+	+
1507/1508	Y27T;L253V;N348R;D381F;T384P	+	+
1541/1542	Y27T;L253V;F254W;N348R;T384P	+	
1551/1552	Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R;D381K;T384P	+	+
1595/1596	Y27T;N348R	+	+
1599/1600	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I;D381W;T384P	+	
1605/1606	Y27T;D74S;A255G;N348R;D381K;T384P	+	+
1613/1614	Y27T;D74G;F254W;N348R;D381W;T384P	+	+
1615/1616	Y27T;F254W;A255G;D381K;T384P	+	+

【表１２－４－２】

表 12.4 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B29 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	A1/B29 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1621/1622	Y27T;D74S;F254W;N348R;D381F	+	+
1647/1648	Y27T;A255G;N348R;D381W;T384P	+	+
1651/1652	Y27T;F254W;N348R;D381W;T384P	+	+
1653/1654	Y27T;D74G;N348R	+	+
1661/1662	Y27T;F254W;A255G;T384P	++	+
1663/1664	Y27T;F254W;A255G	++	+
1665/1666	Y27T;D74S;L253V;N348R	+++	++
1667/1668	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;D381F;T384P	+	+
1669/1670	Y27T;F254W;A255G;N348R	+	+
1671/1672	Y27T;D74N;F254W;T384P	+++	+
1673/1674	Y27T;L253V;N348R	+	
1675/1676	Y27T;D74G;A255G;N348R	++	++
1677/1678	Y27T;F254W;A470V	+	
1679/1680	Y27T;L253V;A255G;N348R	+	+
1683/1684	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;D381F	++	+
1685/1686	Y27T;A255G;W370I	++	+
1687/1688	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R	+++	++
1691/1692	Y27T;D74N;L253V;F254W	+	
1693/1694	Y27T;D74S;L253V;F254W;N348R;D381W;T384P	++	++
1695/1696	Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R	+++	++
1699/1700	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R	+++	+
1705/1706	Y27T;L253V;N348R;W370I;D381F;T384P	+	+
1707/1708	Y27T;A255G;N348R;W370I;D381K;T384P	+	+
1709/1710	Y27T;D74S;A255G;W370I	++	+
1717/1718	D623W	+	+
1719/1720	L253R	+	+
1747/1748	D623A	+	+
1757/1758	D623N	+	+
1761/1762	F256H	+	+
1763/1764	A616R	+	
1771/1772	D623L	+	+
1781/1782	D623Y	+	+
1787/1788	D623F	+	+
1789/1790	D623K	+	+
1803/1804	D381Q	+	+
1805/1806	T384R	++	++
1813/1814	D623R	++	+++
1823/1824	A373K	+	++
1851/1852	H472R	+	
1855/1856	F620R	+	+
1865/1866	A255P	+	

【表１２－４－３】

表 12.4 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B29 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	A1/B29 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1875/1876	F254K	+	+
1893/1894	A255R	+	+

[1] 変換パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=2倍超であるが5倍未満の活性増加;「++」=5倍超であるが10倍未満の活性増加;「+++」=10倍超の活性増加。

[2] 選択性パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=2.0倍超であるが5倍未満の選択性の増加;「++」=5.0倍超であるが7倍未満の選択性の増加;「+++」=7.0倍超の選択性。

【表１２－５－１】

表 12.5 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B1 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	A1/B1 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1313/1314	Y27T;L253V;A255G;N348R;T384P	+	+
1315/1316	Y27T;L253V	+	+
1317/1318	Y27T;D74G;L253V;F254W	+	+
1323/1324	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1325/1326	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381K;T384P	+	+
1327/1328	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I	+	+
1329/1330	Y27T;A255G;N348R;W370I	+	+
1331/1332	Y27T;D74P;L253V;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1335/1336	Y27T;D74G;L253V;N348R;K369C;W370I;D381F;T384P	+	+
1337/1338	Y27T;L253V;F254W;N348R	+	+
1339/1340	Y27T;D74P;L253V;F254W;A255G;N348R	+	+
1341/1342	Y27T	+	
1343/1344	Y27T;D74G;L253V;N348R;K369C;W370I	+	+
1345/1346	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I	++	+
1347/1348	Y27T;L253V;F254W;A255G	+	+
1349/1350	Y27T;D74G;L253V;F254W;T384P	+	+

【表１２－５－２】

表 12.5 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B1 アシル化 変換パーセント (FIOPC) [1]	A1/B1 アシル化 選択性パーセント (FIOPC) [2]
1351/1352	Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I	+	+
1353/1354	Y27T;D74S;L253V;N348R;W370I;D381K;T384P	+	+
1357/1358	Y27T;L253V;A255G;W370I	+	+
1359/1360	Y27T;D74G;F254W;A255G;D381F	+	+
1365/1366	Y27T;L253V;K369C;W370I	+	+
1375/1376	Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R	+	+
1377/1378	Y27T;L253V;F254W;N348R;D381F	+	+
1381/1382	Y27T;D74S;L253V;A255G;T384P	+	+
1383/1384	Y27T;D74G;A255G;W370I	+	+
1385/1386	Y27T;D74S;N348R	+	
1387/1388	Y27T;D74N;L253V;N348R;W370I;D381W;T384P	+	+
1389/1390	Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R	+	+
1393/1394	Y27T;D74P;L253V;N348R	+	+
1395/1396	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R	+	+
1397/1398	Y27T;D74S;L253V;F254W;A255G;N348R	+	+
1399/1400	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;D381F	+	+
1401/1402	Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1403/1404	Y27T;D74N;L253V;F254W;W370I;D381K	++	+
1405/1406	Y27T;D74G;F254W;K369C;W370I	+	+
1407/1408	Y27T;D74G;L253V;N348R;W370I	+	+
1409/1410	Y27T;D74G;L253V;T384P	+	+
1411/1412	Y27T;D74S;N348R;W370I	+	+
1413/1414	Y27T;D74S;L253V;F254W;A255G;K369C;W370I	+	+
1421/1422	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R	+	+
1423/1424	Y27T;L253V;N348R;W370I;T384P	+	+
1425/1426	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G	+	+
1427/1428	Y27T;L253V;F254W	+	+
1431/1432	Y27T;D74G;K369C;W370I	+	+
1433/1434	Y27T;F254W;A449V	+	+
1437/1438	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;D381W	+	+
1439/1440	Y27T;D74P;L253V;W370I	+	+
1443/1444	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I;D381K;T384P	++	+
1447/1448	Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R;W370I;D381K	+	+
1449/1450	Y27T;D74S;L253V;N348R;K369C;W370I;T384P	+	+
1451/1452	Y27T;D74N;L253V;N348R	+	+
1453/1454	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W	+	+

【表１２－５－３】

表 12.5 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B1 アシル化 変換パーセント (FIOPC) [1]	A1/B1 アシル化 選択性パーセント (FIOPC) [2]
	370I;D381F		
1455/1456	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;W370I;D381F;T384P	+	+
1457/1458	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;D381K	+	+
1459/1460	Y27T;D74S;F254W;K369L;W370I	+	+
1463/1464	Y27T;L253V;F254W;D381F;T384P	+	+
1465/1466	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;K369C;W370I	+	+
1467/1468	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;W370I	+	+
1469/1470	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1471/1472	L253V;N348R;W370I	+	+
1473/1474	Y27T;F254W;N348R;W370I	+	+
1475/1476	Y27T;D74N;L253V;F254W;K369C	+	+
1479/1480	Y27T;D74S;L253V;N348R;D381W	+	+
1485/1486	Y27T;D74S;A255G	+	+
1489/1490	Y27T;D74S;L253V;A255G;N348R;W370I;D381K	+	+
1493/1494	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1495/1496	Y27T;D74S;F254W;A255G;W370I	++	+
1497/1498	Y27T;F254W;A255G;K369C;W370I;D381F;T384P	+	+
1501/1502	Y27T;L253V;F254W;D381F	+	+
1503/1504	Y27T;D74N;F254W;N348R	+	+
1505/1506	Y27T;F254W;A255G;W370I	++	+
1509/1510	Y27T;D74N;A107V;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1511/1512	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I	+	+
1515/1516	Y27T;D74N;F254W	+	+
1517/1518	Y27T;D74S;F254W;K369C;T384P	+	+
1521/1522	Y27T;D74G;L253V;D381F;T384P	+	+
1523/1524	Y27T;D74P;L253V;A255G	+	+
1527/1528	Y27T;D74G;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1529/1530	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1531/1532	Y27T;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1533/1534	Y27T;D74P;W370I	+	+
1535/1536	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;K369C;W370I	+	+
1537/1538	Y27T;L253V;F254W;T384P	+	+
1541/1542	Y27T;L253V;F254W;N348R;T384P	+	+
1543/1544	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;W	+	+

【表１２－５－４】

表 12.5 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B1 アシル化 変換パーセント (FIOPC) [1]	A1/B1 アシル化 選択性パーセント (FIOPC) [2]
	370I		
1547/1548	Y27T;F254W;A255G;N348R	+	+
1549/1550	Y27T;D74S;F254W;N348R	+	+
1553/1554	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1557/1558	D74N;L253V;F254W;K369C;W370I	+	+
1561/1562	Y27T;D74S;K369C;W370I;D381K;T384P	+	+
1563/1564	Y27T;L253V;A255G;W370I;D381F;T384P	++	+
1567/1568	Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I;T384P	+	+
1569/1570	Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I;D381K	+	+
1571/1572	Y27T;D74N;L253V;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1573/1574	Y27T;L253V;F254W;N348R;D381W;T384P	+	+
1577/1578	Y27T;L253V;F254W;A255G;G260C;N348R;D381F;T384P	+	
1579/1580	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;D381F;T384P	+	+
1587/1588	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;T384P	+	+
1589/1590	Y27T;D74N;L253V;A255G;W370I	+	+
1591/1592	Y27T;D74N;A255G;N348R;W370I	+	+
1599/1600	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I;D381W;T384P	+	+
1601/1602	Y27T;L253V;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1603/1604	Y27T;L253V;D381F;T384P	+	+
1607/1608	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;W370I;D381W;T384P	+	+
1609/1610	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1611/1612	A255G;N348R;W370I	+	+
1613/1614	Y27T;D74G;F254W;N348R;D381W;T384P	+	
1615/1616	Y27T;F254W;A255G;D381K;T384P	+	+
1623/1624	Y27T;D74N;F254W;A255G;K369C	+	+
1625/1626	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R	+	+
1631/1632	Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I;D381F	+	+
1633/1634	Y27T;D74G;L253V;A255G	+	+
1635/1636	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I	+	+
1643/1644	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;D381F	+	+

【表１２－５－５】

表 12.5 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B1 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	A1/B1 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1645/1646	Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R;K369C;W370I	+	+
1649/1650	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I	++	+
1655/1656	Y27T;D74N;L253V	+	+
1661/1662	Y27T;F254W;A255G;T384P	++	++
1663/1664	Y27T;F254W;A255G	++	++
1665/1666	Y27T;D74S;L253V;N348R	++	++
1667/1668	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;D381F;T384P	+	+
1671/1672	Y27T;D74N;F254W;T384P	+++	++
1673/1674	Y27T;L253V;N348R	+	+
1675/1676	Y27T;D74G;A255G;N348R	+	+
1677/1678	Y27T;F254W;A470V	+	+
1679/1680	Y27T;L253V;A255G;N348R	+	+
1683/1684	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;D381F	+	+
1685/1686	Y27T;A255G;W370I	++	++
1687/1688	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R	++	+
1691/1692	Y27T;D74N;L253V;F254W	++++	++
1693/1694	Y27T;D74S;L253V;F254W;N348R;D381W;T384P	++	++
1695/1696	Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R	++	+
1697/1698	Y27T;D74P;L253V;F254W;A255G	+++	++
1699/1700	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R	++	++
1701/1702	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;K369C;T384P	+	
1703/1704	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;K369C;T384P	+	+
1705/1706	Y27T;L253V;N348R;W370I;D381F;T384P	+	+
1709/1710	Y27T;D74S;A255G;W370I	+++	++
1711/1712	D381F	+	+
1713/1714	A132S	+	+
1715/1716	Q134M	+	+
1717/1718	D623W	+	+
1727/1728	T131L	+	+
1731/1732	D381L	+	+
1735/1736	A132G	+	+
1751/1752	W370V	+	+
1765/1766	D381R	+	+
1769/1770	T384R	+	+
1791/1792	D623Y	+	+
1799/1800	D623N	+	+
1801/1802	D623R	+	+
1807/1808	S619I	+	

【表１２－５－６】

表 12.5 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B1 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	A1/B1 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1809/1810	L253V	+	+
1839/1840	T133K	+	
1865/1866	A255P	+	+
1887/1888	I708M	+	
1891/1892	F254T	+	+
1899/1900	T705S	+	

[1] 変換パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=2倍超であるが10倍未満の活性増加;「++」=10倍超であるが50倍未満の活性増加;「+++」=50倍超であるが100倍未満の活性増加;「++++」=100倍超の活性増加。

[2] 選択性パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=2倍超であるが10倍未満の選択性増加;「++」=10倍超であるが50倍未満の選択性増加;「+++」=50倍超であるが100倍未満の選択性増加;「++++」=100倍超の選択性増加。

【表１２－６－１】

表 12.6 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	B1/B29 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	B1/B29 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1323/1324	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1325/1326	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381K;T384P	+	+
1327/1328	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I	+	+
1345/1346	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I	+	
1349/1350	Y27T;D74G;L253V;F254W;T384P	+	
1353/1354	Y27T;D74S;L253V;N348R;W370I;D381K;T384P	+	+
1387/1388	Y27T;D74N;L253V;N348R;W370I;D381W;T384P	++	+
1389/1390	Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R	+	
1391/1392	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;D381W;T384P	+	+
1397/1398	Y27T;D74S;L253V;F254W;A255G;N348R	+	+
1403/1404	Y27T;D74N;L253V;F254W;W370I;D381K	+	+

【表１２－６－２】

表 12.6 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	B1/B29 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	B1/B29 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1411/1412	Y27T;D74S;N348R;W370I	+	+
1425/1426	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G	+	
1435/1436	Y27T;D74G;A255G;W370I	+	+
1437/1438	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;D381W	+	+
1439/1440	Y27T;D74P;L253V;W370I	+	+
1443/1444	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I;D381K;T384P	++	+
1445/1446	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;K369C;T384P	+	+
1447/1448	Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R;W370I;D381K	+	+
1453/1454	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381F	+	+
1455/1456	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;W370I;D381F;T384P	+	+
1457/1458	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;D381K	+	+
1467/1468	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;W370I	+	+
1469/1470	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1479/1480	Y27T;D74S;L253V;N348R;D381W	+	+
1485/1486	Y27T;D74S;A255G	+	
1489/1490	Y27T;D74S;L253V;A255G;N348R;W370I;D381K	+	+
1493/1494	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1495/1496	Y27T;D74S;F254W;A255G;W370I	+	+
1503/1504	Y27T;D74N;F254W;N348R	+	
1505/1506	Y27T;F254W;A255G;W370I	+	
1511/1512	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I	+	
1521/1522	Y27T;D74G;L253V;D381F;T384P	+	+
1533/1534	Y27T;D74P;W370I	+	
1543/1544	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;W370I	+	+
1545/1546	Y27T;D74G;L253V;N348R;W370I	+	+
1567/1568	Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I;T384P	+	+
1573/1574	Y27T;L253V;F254W;N348R;D381W;T384P	+	+
1577/1578	Y27T;L253V;F254W;A255G;G260C;N348R;D381F;T384P	+	+
1579/1580	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;D381F;T384P	+	+
1581/1582	Y27T;D74G;L253V;F254W	+	+

【表１２－６－３】

表 12.6 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	B1/B29 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	B1/B29 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1585/1586	Y27T;D74N;L253V;N348R	+	+
1587/1588	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;T384P	+	+
1589/1590	Y27T;D74N;L253V;A255G;W370I	+	+
1591/1592	Y27T;D74N;A255G;N348R;W370I	+	+
1597/1598	Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R;D381K;T384P	+	+
1599/1600	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I;D381W;T384P	+	+
1601/1602	Y27T;L253V;A255G;N348R;K369C;W370I	+	
1605/1606	Y27T;D74S;A255G;N348R;D381K;T384P	+	+
1607/1608	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;W370I;D381W;T384P	+	+
1609/1610	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1613/1614	Y27T;D74G;F254W;N348R;D381W;T384P	+	+
1617/1618	Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I	+	+
1619/1620	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;K369C	+	+
1625/1626	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R	+	
1629/1630	Y27T;F254W;K369C;D381F;T384P	+	+
1631/1632	Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I;D381F	+	+
1635/1636	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I	+	+
1641/1642	Y27T;F254W;N348R;K369C;W370I;D381N;T384P	+	+
1657/1658	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R	+	
1767/1768	D623N	+	+
1769/1770	T384R	+	+
1771/1772	D623L	+	+
1835/1836	F620R	++	+++
1837/1838	D709N	+++	+++
1859/1860	K128W	++	++
1861/1862	T705E	++	++
1869/1870	A255E	++	++
1873/1874	F254T	++	++

[1]変換パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=2倍超であるが10倍未満の活性増加;「++」=10倍超であるが50倍未満の活性増加;「+++」=50倍超であるが100倍未満の活性増加;「++++」=100倍超の活性増加。

[2]選択性パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=2倍超であるが10倍未満の選択性増加;「++」=10倍超であるが50倍未満の選択性増加;「+++」=50倍超であるが100倍未満の選択性増加;「++++」=100倍超の選択性増加。

【表１２－７－１】

表 12.7 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B1/B29 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	A1/B1/B29 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1313/1314	Y27T;L253V;A255G;N348R;T384P	+	+
1315/1316	Y27T;L253V	+	+
1317/1318	Y27T;D74G;L253V;F254W	+	+
1319/1320	Y27T;D74S;F254W;N348R;D381W	+	+
1321/1322	Y27T;D74G;A255G;N348R;K369C;D381F;T384P	+	+
1323/1324	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1325/1326	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381K;T384P	++	+
1327/1328	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I	+	+
1329/1330	Y27T;A255G;N348R;W370I	++	+
1333/1334	Y27T;N348R;T384P	+	+
1335/1336	Y27T;D74G;L253V;N348R;K369C;W370I;D381F;T384P	+	+
1339/1340	Y27T;D74P;L253V;F254W;A255G;N348R	+	+
1341/1342	Y27T	+	+
1345/1346	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I	+	+
1347/1348	Y27T;L253V;F254W;A255G	+	+
1349/1350	Y27T;D74G;L253V;F254W;T384P	+	+
1351/1352	Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I	+	+
1353/1354	Y27T;D74S;L253V;N348R;W370I;D381K;T384P	++	++
1355/1356	Y27T;L253V;N348R	+	+
1357/1358	Y27T;L253V;A255G;W370I	+	+
1359/1360	Y27T;D74G;F254W;A255G;D381F	+	+
1361/1362	Y27T;F254W;N348R;T384P	+	
1363/1364	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;D381W	+	+

【表１２－７－２】

表 12.7 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B1/B29 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	A1/B1/B29 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1367/1368	D74N;F254W;A255G;N348R;T384P	+	+
1369/1370	Y27T;F254W;A255G	+	+
1373/1374	Y27T;D74S;N348R	+	+
1375/1376	Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R	+	+
1377/1378	Y27T;L253V;F254W;N348R;D381F	+	+
1381/1382	Y27T;D74S;L253V;A255G;T384P	+	+
1383/1384	Y27T;D74G;A255G;W370I	++	+
1387/1388	Y27T;D74N;L253V;N348R;W370I;D381W;T384P	++	++
1389/1390	Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R	++	+
1393/1394	Y27T;D74P;L253V;N348R	+	+
1395/1396	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R	+	+
1397/1398	Y27T;D74S;L253V;F254W;A255G;N348R	+	+
1399/1400	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;D381F	+	+
1401/1402	Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1403/1404	Y27T;D74N;L253V;F254W;W370I;D381K	++	++
1405/1406	Y27T;D74G;F254W;K369C;W370I	+	+
1407/1408	Y27T;D74G;L253V;N348R;W370I	++	+
1409/1410	Y27T;D74G;L253V;T384P	+	+
1411/1412	Y27T;D74S;N348R;W370I	++	+
1415/1416	Y27T;D74G;A255G;N348R	+	+
1421/1422	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R	+	+
1423/1424	Y27T;L253V;N348R;W370I;T384P	++	+
1425/1426	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G	+	+
1433/1434	Y27T;F254W;A449V	+	+
1437/1438	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;D381W	+	+
1439/1440	Y27T;D74P;L253V;W370I	+	+
1443/1444	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I;D381K;T384P	++	++
1447/1448	Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R;W370I;D381K	+	+
1453/1454	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381F	++	++
1455/1456	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;W370I;D381F;T384P	++	++
1457/1458	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;D381K	++	+
1459/1460	Y27T;D74S;F254W;K369L;W370I	+	+
1461/1462	Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R;K369C;D381F	+	+
1463/1464	Y27T;L253V;F254W;D381F;T384P	++	+
1467/1468	Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;	++	++

【表１２－７－３】

表 12.7 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B1/B29 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	A1/B1/B29 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
	W370I		
1469/1470	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1471/1472	L253V;N348R;W370I	+	+
1473/1474	Y27T;F254W;N348R;W370I	+	+
1479/1480	Y27T;D74S;L253V;N348R;D381W	++	++
1481/1482	Y27T;D74S;L253V;N348R	+	+
1485/1486	Y27T;D74S;A255G	+	+
1487/1488	Y27T;L253V;A255G;N348R	+	+
1489/1490	Y27T;D74S;L253V;A255G;N348R;W370I;D381K	+	+
1493/1494	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	+	+
1495/1496	Y27T;D74S;F254W;A255G;W370I	++	+
1497/1498	Y27T;F254W;A255G;K369C;W370I;D381F;T384P	+	+
1499/1500	Y27T;A255G;N348R	+	+
1501/1502	Y27T;L253V;F254W;D381F	+	+
1503/1504	Y27T;D74N;F254W;N348R	+	+
1505/1506	Y27T;F254W;A255G;W370I	++	++
1507/1508	Y27T;L253V;N348R;D381F;T384P	+	+
1511/1512	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I	++	++
1513/1514	Y27T;L253V;F254W;N348R	+	+
1515/1516	Y27T;D74N;F254W	+	+
1519/1520	Y27T;D74N;F254W;N348R;K369C;D381F;T384P	+	+
1521/1522	Y27T;D74G;L253V;D381F;T384P	++	++
1523/1524	Y27T;D74P;L253V;A255G	+	+
1529/1530	Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I	+	+
1533/1534	Y27T;D74P;W370I	++	+
1537/1538	Y27T;L253V;F254W;T384P	+	+
1539/1540	Y27T;D74N;N348R	+	+
1541/1542	Y27T;L253V;F254W;N348R;T384P	+	+
1543/1544	Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;W370I	+	+
1547/1548	Y27T;F254W;A255G;N348R	+	+
1549/1550	Y27T;D74S;F254W;N348R	+	+
1551/1552	Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R;D381K;T384P	+	+
1553/1554	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	++	++
1559/1560	Y27T;D74N;N348R;T384P	+	+
1561/1562	Y27T;D74S;K369C;W370I;D381K;T384P	+	+
1563/1564	Y27T;L253V;A255G;W370I;D381F;T384P	++	++

【表１２－７－４】

表 12.7 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B1/B29 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	A1/B1/B29 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1567/1568	Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I;T384P	++	+
1569/1570	Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I;D381K	+	+
1573/1574	Y27T;L253V;F254W;N348R;D381W;T384P	++	+
1575/1576	Y27T;L253V;F254W	+	+
1577/1578	Y27T;L253V;F254W;A255G;G260C;N348R;D381F;T384P	+	+
1579/1580	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;D381F;T384P	++	++
1585/1586	Y27T;D74N;L253V;N348R	+	+
1587/1588	Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;T384P	+	+
1589/1590	Y27T;D74N;L253V;A255G;W370I	+	+
1591/1592	Y27T;D74N;A255G;N348R;W370I	+	+
1595/1596	Y27T;N348R	+	+
1599/1600	Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I;D381W;T384P	++	++
1603/1604	Y27T;L253V;D381F;T384P	+	+
1605/1606	Y27T;D74S;A255G;N348R;D381K;T384P	+	+
1607/1608	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;W370I;D381W;T384P	++	++
1609/1610	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P	++	+
1611/1612	A255G;N348R;W370I	+	+
1613/1614	Y27T;D74G;F254W;N348R;D381W;T384P	++	++
1615/1616	Y27T;F254W;A255G;D381K;T384P	++	++
1621/1622	Y27T;D74S;F254W;N348R;D381F	+	+
1625/1626	Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R	+	+
1631/1632	Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I;D381F	+	+
1633/1634	Y27T;D74G;L253V;A255G	+	+
1635/1636	Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I	+	+
1643/1644	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;D381F	+	+
1645/1646	Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R;K369C;W370I	+	+
1647/1648	Y27T;A255G;N348R;D381W;T384P	+	+
1649/1650	Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I	++	+
1651/1652	Y27T;F254W;N348R;D381W;T384P	+	+
1653/1654	Y27T;D74G;N348R	+	+
1655/1656	Y27T;D74N;L253V	+	+

【表１２－７－５】

表 12.7 アシル化の結果

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1288と比べて)	A1/B1/B29 アシル化 変換パーセント (FIOPC)[1]	A1/B1/B29 アシル化 選択性パーセント (FIOPC)[2]
1657/1658	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R	+	+
1717/1718	D623W	+	+
1743/1744	D623V	+	+
1747/1748	D623A	+	+
1749/1750	D381Q	+	+
1771/1772	D623L	+	+
1795/1796	D623N	+	+
1797/1798	T384R	++	+
1823/1824	A373K	+	+
1827/1828	F620R	+	+
1863/1864	F254T	+	+
1865/1866	A255P	+	+

[1] 変換パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=2倍超であるが10倍未満の活性増加;「++」=10倍超であるが50倍未満の活性増加;「+++」=50倍超の活性増加。

[2] 選択性パーセントは、配列番号1288の参照ポリペプチドと比べて判定され、以下のとおり定義された:「+」=2倍超であるが10倍未満の選択性増加;「++」=10倍超であるが50倍未満の選択性増加;「+++」=50倍超の選択性増加。

【０２１２】

実施例１３

代替アシルドナーによるインスリンのアシル化

フェニル酢酸メチルに対する代替物として（メチル２－（４－ヒドロキシフェニル）アセテートまたは２－（４－ヒドロキシフェニル）アセトアミド）を用いて、表１３．１に列挙される５つのバリアントのアシル化を評価した。振盪フラスコ粉末を、実施例４に記載したように生成した。９６ウェル深ウェルプレート（各々が、０．１Ｍ ＣＨＥＳ，ｐＨ１０、５％アセトニトリル、１５ｇ／Ｌインスリン、２６ｇ／Ｌアシルドナー（メチル２－（４－ヒドロキシフェニル）アセテートまたは２－（４－ヒドロキシフェニル）アセトアミド）および１ｇ／Ｌの凍結乾燥された酵素粉末を含む２００μＬを含む）において反応を行った。ＨＴＰプレートを、ヒートシールし、３０℃、３００ｒｐｍのＴｈｅｒｍｏｔｒｏｎ（登録商標）振盪機（３mm距離，モデル＃ＡＪ１８５，Ｉｎｆｏｒｓ）において２時間インキュベートした。それらの反応物を、２００μｌのアセトニトリルでクエンチし、卓上振盪機を用いて５分間混合した。次いで、プレートを４０００ｒｐｍで５分間遠心し、解析のためにＨＰＬＣにローディングした。

【０２１３】

各バリアントの活性を、ＨＰＬＣ解析によって測定された、すべての生成物ピークの面積を、基質および様々なインスリン生成物の面積の合計で除算することによって定量された変換パーセントとして計算する。

【表１３－１】

表 13.1

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1262と比べて)	2-(4-ヒドロキシフェニル)アセトアミド[1]	メチル2-(4-ヒドロキシフェニル) アセテート[1]
1287/1288	F71G;G74D	+++	+++
1007/1008	F24A;Y31W;V56I;F701W	++	+
1019/1020	F24A;Y31W;F71C;F701W	++	+
1023/1024	F24A;V56T;F701W	+	++
1031/1032	F24A;Y31W;V56I;F701Y	+	++
[1]変換パーセントは、以下のとおり定義された:「+」=1%超であるが10%未満の変換;「++」=10.0%超であるが20%未満の変換;「+++」=20%超の変換。			

【０２１４】

実施例１４

インスリンおよびそのアシル化産物の分析的検出

実施例５～１２に記載されたデータは、表１４．１、１４．２、１４．３、１４．４および１４．５における分析方法を用いて収集された。本明細書中に提供される方法はすべて、本発明を用いて生成されたバリアントを解析する際に使用される。図１に示されている結果は、これらの方法に対する化合物の溶出順に対応する。

【表１４－１】

表14.1　分析方法

機器	Thermo LXQ
カラム	Waters Xbridge C18カラム: 50 x 3.0 mm, 5 um, Phenomenex C18ガードありカートリッジ: 5 x 3.0 mm, 5 µm
移動相	グラジエント(A: 0.2%　ギ酸の水溶液; B: 0.2%　ギ酸のMeCN溶液) 時間(分)　%A 0.0　78 1.0　78 4.0　68 5.0　5.0 6.0　78 7.0　78
流速	0.7 mL/分
ラン時間	7分
カラム温度	45 °C
注入量	10 µL
MS検出	LXQ; 0～0.5分のMSからの分流（divert flow） BP 抽出イオン: インスリン生成物 = 968.6,1162.6,1453.0,1937.0 モノ-インスリン生成物 = 1189.5,1486.5,1981.5 ジ-インスリン生成物 = 1216.0,11519.8 トリ-インスリン生成物 = 1243.0,1553.5
MS条件	MS極性: ポジティブ; イオン化: ESI; モード: 300～2000のQ1スキャン; 電源電圧: 20; シースガス: 40; 補助ガス: 10; キャピラリー温度: 350; イオンスプレー電圧: 5000; キャピラリーV: 5; チューブレンズ: 55.

【表１４－２】

表14.2　分析方法	
機器	Agilent HPLC 1200シリーズ
カラム	Ascentis Express C18, 4.6 x 100または150 mm, 2.7 uM
移動相	グラジエント I (A: 0.05% TFAの水溶液; B: 0.05% TFAのMeCN溶液) 時間(分)　%A 0.0　95 0.1　70 8,8.5または9　50 8.1,8.6または9.1　5 8.2,8.7,または9.2　95 9,9.2または9.5　95 グラジエント II ((A: 0.05% TFAの水溶液; B: 0.05% TFAのMeCN溶液) 時間(分)　%A 0　70 7または8　50 7.1または8.1　70 9または10　70
流速	1.0 mL/分
ラン時間	約10分
生成物の溶出順	インスリン; A1-アシル化インスリン; B29-アシル化インスリン; B1-アシル化インスリン; ジ-A1, B29-アシル化インスリン; ジ- A1, B1-アシル化インスリン; ジ-B1, B29-アシル化インスリン; トリ-A1, B1, B29-アシル化インスリン
カラム温度	40 ˚C
注入量	5 µL
検出	UV 218nmおよび280nm 検出器: MWD (Agilent 1200シリーズ); スリット=4nm; ピーク幅 ＞　0.1分; 参照 = 360; BW = 8

【表１４－３】

表14.3　分析方法	
機器	Agilent HPLC 1290シリーズ
カラム	Waters Cortecs UPLC C18 2.1 x 50 mm, 1.6 uM
移動相	サンプルのためのグラジエント (A: 0.05% TFAの水溶液; B: 0.05% TFAのMeCN溶液) 時間 (分)　%A 0.0　72 2.5　50 2.51-2.7　10 2.71　72 3　72 洗浄のためのグラジエント(A: 0.05% TFAの水溶液; B: 0.05% TFAのMeCN溶液) 時間(分)　%A 0.0　72 1.7　0 1.71-2　72
流速	0.9 mL/分
ラン時間	3分
生成物の溶出順	インスリン; A1-アシル化インスリン; B29-アシル化インスリン; B1-アシル化インスリン; ジ-A1, B29-アシル化インスリン; ジ-A1, B1-アシル化インスリン; ジ-B1, B29-アシル化インスリン; トリ-A1, B1, B29-アシル化インスリン
カラム温度	40 ˚C
注入量	0.5 µL
検出	UV 218nmおよび280nm 検出器: MWD (Agilent 1290シリーズ); スリット=4nm; ピーク幅 ＞　0.1分; 参照 = 360; BW = 8

【表１４－４】

表14.4　分析方法	
機器	Agilent HPLC 1200シリーズ
カラム	Ascentis Express C18, 4.6 x 100または150 mm, 2.7 uM
移動相	グラジエント I (A: 0.05% TFAの水溶液; B: 0.05% TFAのMeCN溶液) 時間 (分)　%A 0.0　95 0.1　70 5,6または8　50 5.5,6.5,または8.1　5 5.7または6.7　5 5.8,6.8,または8.2　95 6,7,または9　95
流速	1.0 mL/分
ラン時間	約10分
生成物の溶出順	インスリン; A1-アシル化インスリン; B29-アシル化インスリン; B1-アシル化インスリン; ジ-A1, B29-アシル化インスリン; ジ-A1, B1-アシル化インスリン; ジ-B1, B29-アシル化インスリン; トリ-A1, B1, B29-アシル化インスリン
カラム温度	40 °C
注入量	5 µL
検出	UV 218nmおよび280nm 検出器: MWD(Agilent 1200シリーズ); スリット=4nm; ピーク幅 > 0.1分; 参照 = 360; BW = 8

【表１４－５】

表14.5　分析方法	
機器	Agilent HPLC 1290シリーズ
カラム	Waters Cortecs UPLC C18 2.1 x 50 mm, 1.6 uM
移動相	サンプルに対するグラジエント (A: 0.05% TFAの水溶液; B: 0.05% TFAのMeCN溶液) 時間 (分)　%A 0.0　72 1.5　50 1.51-1.7　10 1.71　72 2　72
流速	0.9 mL/分
ラン時間	3分
生成物の溶出順	インスリン; A1-アシル化インスリン; B29-アシル化インスリン; B1-アシル化インスリン; ジ-A1, B29-アシル化インスリン; ジ-A1, B1-アシル化インスリン; ジ-B1, B29-アシル化インスリン; トリ-A1, B1, B29-アシル化インスリン
カラム温度	40 °C
注入量	0.5 µL
検出	UV 218nmおよび280nm 検出器: MWD (Agilent 1290シリーズ); スリット=4nm; ピーク幅 > 0.1分; 参照 = 360; BW = 8

【０２１５】

本願において引用されたすべての刊行物、特許、特許出願および他の文書は、各個別の刊行物、特許、特許出願または他の文書があらゆる目的のために参照により援用されると個別に示されたのと同程度に、それらの全体があらゆる目的のために参照により本明細書に援用される。

【０２１６】

様々な具体的な実施形態を例証し、説明してきたが、本発明の真意および範囲から逸脱することなく、様々な変更を行うことができることが認識されるだろう。

本発明の実施形態の例として、以下の項目が挙げられる。

（項目１）

配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を有する、操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目２）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号４、８、１４、３００、１０３６、１１９４、１２６２および／または１２８８４を含む、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目３）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、表５．１、６．１、７．１、８．１、８．２、９，１、１０．１、１２．１、１２．２、１２．３、１２．４、１２．５、１２．６および／または１２．７に示される少なくとも１つの配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目４）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、表５．１、６．１、７．１、８．１、８．２、９，１、１０．１、１２．１、１２．２、１２．３、１２．４、１２．５、１２．６および／または１２．７に示されるポリペプチド配列を含む、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目５）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号８と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含み、２７、２７；２８；７１；７４；５４７、２７；７１；７４；４８４；５４７；５８４；６９７、７１；７４、１２９、２５３、２５４、２５６、３４８、３５２、３７２、３７３、３７４、３８０、３８０；４５７、３８６；３９０、３８６；３９０、３８６、３８７；３９０、４５１、４５７、４６７、４７０、４７４、６１６、６２３、７０４、７０６および７０８から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、前記位置は、配列番号８を基準としてナンバリングされている、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目６）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号１４と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含み、９、９；１０３；１１９；１３１；２３３；３１２；３２４；４３２；４４４；４９４、９；１０３；１１９；１３１；３２４；４３２；４９４；６４６、９；１０３；１１９；１３１；２３３；２６９；３０４；４４４；４９４；６４６、９；１０３；１１９；１３１；３０４；３２４；４３２；４４４；４９４；６４６、９；１０３；１１９；２３３；６４６、９；１０３；１１９；４９４、９；１０３；２３３；３１２；６４６、９；１０３；２３３；４３２；６４６、９；１０３；２３３；４９４、９；１０３；２６９；３０４；３２４；４９４；６４６、９；１０３；３０４；４３２；４４４；６４６、９；１１９；１３１；２３３、９；１１９；１３１；２３３；３０４；４４４；６４６、９；１１９；１３１；２３３；４９４；６４６、９；１１９；１３１；２３３；４９４；６６１、９；１１９；１３１；３１２；４４４；６４６、９；１１９；１３１；４３２；４４４；６４６、９；１１９；２３３；２６９；２７３；３０４；３１２；４３２；４４４；６４６、９；１１９；２３３；４９４；６４６、９；１１９；３０４；４４４；４９４；６４６、９；１３１；２３３；２６９；２７３；３１２；４３２；４４４；６４６、９；２３３；２７３；３０４；４９４；６４６、９；２３３；３０４；４９４；６４６、９；２３３；３１２；４３２；６４６、９；２３３；４９４；６４６、９；３１２；４４４；６４６、９；４３２；４４４；４９４；６４６、９；４９４；６４６、２８；３７４；３８０、１０３；１１９；１３１；２３３；２７３；３０４；３２４；４３２；４４４；４９４；６４６、１０３；１１９；１３１；２３３；３０４；３１２；４３２；４９４；６４６；６６１、１０３；１１９；１３１；２６９；３１２；４９４；６４６、１０３；１１９；２３３、１０３；１１９；２３３；２７３；４３２、１０３；１１９；２３３；３０４；６４６、１０３；１１９；２３３；３１２；６４６、１０３；１１９；４９４；６４６；６６１、１０３；１１９；６４６、１０３；１３１；２３３；３０４；３２４；４４４；６４６、１０３；１３１；２６９；２７３；４４４；６４６、１０３；２３３；２７３；３１２；３２４；４３２；４４４；６４６、１０３；２３３；２７３；３１２；４３２；４４４；６４６、１０３；２６９；２７３；４４４；６４６、１０３；２７３；３０４；３２４；４４４；４９４、１０３；３１２；４４４；６４６、１０３；４４４；４９４；６４６、１１９；１３１；４４４；６４６；６６１、１１９；１３１；４９４、１１９；１３１；６４６、１１９；１３１；３０４；４３２；４４４；６４６；６６１、１１９；１３１；４４４、１１９；２３３；３０４；３１２；３２４；４３２；４４４；６４６、１１９；２３３；３０４；６４６、１１９；２３３；３１２、１１９；２３３；６４６、１１９；２６９；２７３；３１２；３２４；４９４；６４６、１１９；２６９；２７３；３１２；４３２；４４４；６４６、１１９；２７３；

３２４；４４４；４９４；６４６、１１９；３１２；４４４；６４６、１１９；４３２；４４４；６４６、１２９；２５４；３４８；４５７；７０４、１２９；３４８、１２９；３４８；４６７；４７０；７０４；７０８、１２９；３４８；４７０；６２３；７０４；７０６、１２９；３４８；４７０；６２３；７０４；７０６；７０８、１２９；３８０；４７０、１２９；４５７；４７０；４７４、１２９；４７０、１２９；６２３、１３１；２３３；２７３；６４６、１３１；２３３；３０４；４４４、１３１；２３３；４３２；６４６、１３１；２７３；４３２；４４４；４９４；６４６、１８５、２３３；２６９；３０４；３１２；３２４；４３２；４４４；６４６、２５３、２５３；２５６、２５３；２５６；３５２；３７３；３７４；６１６、２５３；２５６；３５２；３７４；３８０；４５１、２５３；２５６；３７４；４５１、２５３；２５６；３８０；４５１；６１６、２５３；３５２；３７４；６１６、２５３；３５２；４５１；６１６、２５３；３７３；４５１、２５３；３７４；４５１、２５３；３７４；４５１；６２３、２５３；４５１、２５３；４５１；４５７、２５３；２５４；３５２；３７４；３８０、２５３；２５６、２５３；２５６；３５２；３７４；４５１、２５３；２５６；３５２；３８０；４５１；６１６、２５３；２５６；３５２；４５１、２５３；２５６；３５２；３７４；３８０；４５１、２５３；２５６；３５２；３８０、２５３；２５６；３７３、２５３；２５６；３７４；６１６、２５３；２５６；３８０、２５３；２５６；３８０；４５１；５４６；６１６、２５３；３５２；３７３；３７４；４５１、２５３；３５２；３７３；３７４；４５１；６１６、２５３；３５２；３７４；６１６、２５３；３５２；６２３、２５３；３７３；３７４；４５１；６１６、２５３；３８０、２５４；２５５；３５２、２５４；２５６；３５２；４５１、２５４；２５６；３７３；３７４；３８０；４５１、２５４；２５６；３７４、２５４；２５６；３７４；４５１、２５４；２５６；４５１、２５４；３５２；３８０、２５４；２５６；３８０；４５１；６１６、２５４；３５２；３８０；４５１、２５４；３５２；４５１、２５４；３７３；３７４；３８０；４５１、２５４；３７３；３７４；４５１、２５４；３７４、２５４；３７４；３８０、２５４；３８０、２５４；４５１、２５４；６１６、２５６；３５２；３７４、２５６；３５２；３８０；４５１；６１６、２５６；３７４；３８０；４５１；６１６、２５６；３７４；６１６、２７３；３１２；４４４；６４６、３０４；３１２；４４４；６４６、３１２；４４４；６４６、３１２；６４６、３４８、３４８；３７２；４７０；６２３；７０８、３４８；７０４；７０８、３５２、３５２；３７３；３７４；４５１、３５２；３７３；３８０；４５１、３５２；３７３；３８０；４５１；６１６、３５２；３７３；４５１、３５２；３７４、３５２；３７４；３８０、３５２；３７４；３８０；４５１；６１６、３５２；３７４；４５１、３５２；３７４；６１６、３５２；３８０、３５２；３８０；４５１、３５２；３８０；４５１；６１６、３５２；３８０；４５１；６２３、３５２；３８０；６１６、３５２；４５１、３５２；４５１；６１６、３５２；６１６、３７２；４５７；４７０；６２３、３７３；３７４、３７３；３７４；４５１、３７３；４５１、３７３；６１６、３７４、３７４；３８０、３７４；３８０；４５１、３７４；３８０；４５１；６２３、３７４；４５１、３７４；４５１；６１６、３７４；６１６、３７４；６２３、３８０、３８０；４５１、３８０；４５１；６１６、３８０；４５１；６２３、３８０；６１６、３８０；６１６；６２３、３８０；６２３、４１５、４４３、４４４、４４４；４９４、４４４；６４６、４５１、４５１；６１６、４５１；６２３、４５７、４５７；４７０、４５７；７０４；７０８、４７０；７０８、４９２；４９３、５１７、５６０、６１６、６２３、７２３および７４８から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、前記位置は、配列番号１４を基準としてナンバリングされている、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目７）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号３００と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含み、９；６１；４４４、９；１６８；１８５；５１７；５

60；748、9；185；415、9；185；415；443；444；517；723；748、9；185；415；443；444；517；560、9；185；415；443；444；517；748、9；185；415；444；517；723；748、9；185；415；444；517；748、9；185；415；444；517；560、9；185；415；444；517；560；723；748、9；185；415；444、9；185；415；444；560、9；185；415；444；723；748、9；185；415；444；517；560；723；748、9；185；415；517；560、9；185；415；517；723、9；185；415；517；748、9；185；415；748、9；185；443；444；517；560、9；185；443；444；723、9；185；443；444；560；723、9；185；443；444；517、9；185；444、9；185；444；517；560、9；185；444；560；723、9；185；444；560；748、9；185；444；517；560、9；185；444；517；560；723、9；185；444；517；560；748、9；185；444；517；723；748、9；185；444；560、9；185；444；723、9；185；444；517；560；723、9；185；517、9；185；517；560；723；748、9；185；748、9；415；443；444；517；560、9；415；443；444；517；748、9；415；443；444；560；723；748、9；415；443；444；517；560、9；415；443；444；517；560；723、9；415；443；444；517；748、9；415；443；560、9；415；443；560；723；748、9；415；444、9；415；444；517；560；748、9；415；444；517、9；415；444；517；560；723；748、9；415；444；560；723；748、9；415；444；723；748、9；415；444；517、9；415；444；517；560；723；748、9；415；444；560；723、9；415；444；517、9；415；444；517；560；748、9；415；444；517、9；415；444；560、9；415；444；560、9；415；444；517；560；723、9；415；444；560、9；415；444；560；665；723；748、9；415；444；723；748、9；415；517、9；415；517；560；723；748、9；415；517；560；723；748、9；415；517；560；748、9；415；560、9；415；748、9；443；444；517；560；723、9；443；444；560、9；443；444；560；723；748、9；443；444；517、9；443；444；560；723、9；443；444；517、9；443；444；517；560、9；443；444；517；748、9；443；517；748、9；443；723、9；444；517；560、9；444；560；723、9；444；748、9；444；517；560；723；748、9；444；560、9；444；560；723、9；444；560；748、9；444；560；748、9；444；748、9；444；517；560；723；748、9；444；517、9；444；517；560；723、9；444；517；723、9；444；560；748、9；444；723、9；444、9；444；517；560、9；517、9；517；560；723、9；517；560；748、9；517；560；748、9；517；723、9；517；748、9；560；723；748、9；723、103、103；119、103；119；129；254；256；348；494；646、103；119；129；444；494、103；119；254；348、103；119；254；348；444、103；119；254；444、103；119；256；348；444；494；646、103；119；256；494、103；119；348、103；119；348；457、103；119；348；457；494、103；119；457、103；119；494、103；119；494；646、103

；１２９、１０３；１２９；２５４；４４４；４５７；４９４、１０３；１２９；２５６；３４８、１０３；１２９；３４８；６４６、１０３；２５４、１０３；２５４；２５６；３４８；４４４；４９４、１０３；２５４；６４６、１０３；２５４；３４８、１０３；２５４；３４８；４９４、１０３；２５６、１０３；２５６；４４４、１０３；２５６；４５７、１０３；２５６；４９４、１０３；３４８、１０３；３４８；４４４、１０３；３４８；４９４、１０３；４４４、１０３；４９４、１０３；４９４；６４６、１１９；１２９；２５４；３４８；４９４、１１９；１２９；２５４；４５７；４９４、１１９；１２９；２５６；３４８；４５７、１１９；２５４；３４８；４５７、１１９；２５６；３４８、１１９；２５６；３４８；４９４、１１９；２５６；４４４、１１９；３４８、１１９；３４８；４９４、１８５；４１５；４４３；４４４；５１７；５６０、１８５；４１５；４４３；４４４；５１７、１８５；４１５；４４４；５１７；５６０；７４８、１８５；４１５；４４４；５１７；７４８、１８５；４１５；４４４；５６０、１８５；４１５；５６０、１８５；４１５；５６０；７２３、１８５；４１５；７２３；７４８、１８５；４４３；４４４；５６０、１８５；４４４；４４６；５１７；５６０、１８５；４４４；５１７；５６０、１８５；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、１８５；４４４；５１７；７２３、１８５；４４４；５６０、１８５；５１７；５６０；７２３、１８５；５６０、１８５；５６０；７２３、１８５；５６０；７４８、２５４；４５７、２５６；３４８、２５６；４９４、３４８、３４８；４４４、３４８；４４４；６４６、３４８；４５７、３４８；４９４、４１５、４１５；４４３；４４４；５１７；７４８、４１５；４４３；４４４；５６０、４１５；４４３；５１７；５６０；７２３、４１５；４４３；５１７；７２３、４１５；４４４；７２３、４１５；４４４；５１７、４１５；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、４１５；４４４；５１７；５６０；７４８、４１５；４４４；５６０；７２３、４１５；４４４；５１７；５６０；７２３、４１５；４４４；５１７；７２３；７４８、４１５；５１７；５６０；７２３；７４８、４１５；４４４；５６０、４１５；４４４；５６０；７４８、４１５；４４４、４１５；５１７、４１５；５１７；５６０、４１５；５１７；５６０；７４８、４１５；５６０；７２３、４１５；７２３；７４８、４１５；７２３；７４８、４１５；７４８、４４３；４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、４４３；４４４；５１７；７４８、４４３；４４４、４４３；４４４；５６０、４４３；４４４；７２３、４４３；５１７、４４４、４４４；５１７；５６０、４４４；５１７；７４８、４４４；７４８、４４４；５１７；５６０；７２３；７４８、４４４；５６０；７２３、４４４；５６０、４４４；５６０；７２３、４４４；５１７、４４４；５１７；５６０、４４４；５１７；７２３；７４８、４４４；５６０；７４８、４４４；７２３、４４４；５１７；５６０、４４４；５６０；７２３、５１７；５６０、５１７；５６０；７４８、５１７；７２３、５１７；７４８、５１７；７４８、５６０、７２３および７２３；７４８から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、前記位置は、配列番号３００を基準としてナンバリングされている、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目８）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号１２６２と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含み、２４、２４；２７；２８；７０１；７２９、２４；２８；５６；３０８；３７９；７０１、２４；２８；５６；７０１、２４；２８；７１；７０１、２４；２８；３２１；７０１、２４；２８；４５７；７０１、２４；３１；５６；３８６；７０１、２４；３１、２４；３１；５６；６９７、２４；３１；５６；７０１、２４；３１；５６；２６４；７０１；７５０、２４；３１；７１；７０１、２４；５６；１５４；２７０；６９７、２４；５６；６９７；７０１、２４；５６；７０１、２４；７１；７０１、２４；２２５；７０１、２４；４８４；７０１、２４；２８、２８；３１、３１；５６；７０１、５６；７１；７０１、５６；１１９；１４６；７０１、５６；１５４；７０１、５６；３２２；６９７；７０１、５６；６５８；７０１、５６；６９７；

７０１、５６；７０１、５６；７０１；７１１、６９７、６９７；７０１、７１；７４、７１；７０１、１２９；５１１；７０１、１５４；７５４、１７７、４１０；６９７；７０１、４２３；７０１、４３１、６９７および７０１から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、前記位置は、配列番号１２６２を基準としてナンバリングされている、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目９）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号１２８８と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含み、２２、３１、３１；５６；２６４；３０８；３７９；４８４；５４７；７１１；７５０、３２、５０、５７、６９；７４、７１、７１；７４、７１；７４；１２９、７１；７４；１４５、７１；７４；２４８、７１；７４；４７０、７１；１４９、７５、１４１および３９４から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、前記位置は、配列番号１２８８を基準としてナンバリングされている、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目１０）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号１０３６と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含み、２、４７、１７６、２５３、２５５、３８４、４６０、４６７、５３６および６２３から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、前記位置は、配列番号１０３６を基準としてナンバリングされている、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目１１）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号１１９４と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含み、１２；１０３；１１９；１３１；２３３；３８４；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１１９；１３１；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１１９；２３３；３８４；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１１９；２３３；４４４；４６７；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１１９；２３３；４４４；４９４；５３６；Ｓ６４６、１２；１０３；１１９；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１３１；２３３；４４４；４６７；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；１３１；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１０３；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、１２；１１９；２３３；３８４；４４４；４９４；Ｓ６４６、２８；２６４；３８４；４６７；４８４；５３６；５４７、１０３；１１９；１３１；２３３；３８４；４４４；４９４；Ｓ６４６、１０３；１１９；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、１０３；２３３；４４４；４９４；Ｓ６４６、２６４；３８４；４６７；４８４；５３６；５４７、３８４；４６７；４８４；５３６；５４７および６６８から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、前記位置は、配列番号１１９４を基準としてナンバリングされている、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目１２）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号１２８８と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含み、２０；７０９、２７、２７；７４；２５３；２５４、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０；３８１、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３４８；３７０；３８４、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３６９；３７０、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３７０、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３７０；３８１；３８４、２７；７４；２５３；２５４；２５５

；３８１、２７；７４；２５３；２５４；３４８、２７；７４；２５３；２５４；３８４、２７；７４；２５３；２５５、２７；７４；２５３；２５５；３４８；３７０；３８４、２７；７４；２５３；２５５；３４８；３８１、２７；７４；２５３；２５５；３４８；３８４、２７；７４；２５３；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５３；３４８；３６９；３７０；３８１、２７；７４；２５３；３４８；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；７４；２５３；３４８；３７０、２７；７４；２５３；３８１；３８４、２７；７４；２５３；３８４、２７；７４；２５４；２５５；３４８、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０；３８１、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３７０、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３８１、２７；７４；２５４；２５５；３８１、２７；７４；２５４；３４８；３８１；３８４、２７；７４；２５４；３６９；３７０、２７；７４；２５５；３４８、２７；７４；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５５；３４８；３６９；３８１；３８４、２７；７４；２５５；３７０、２７；７４；３４８、２７；７４；３６９；３７０、２７；７４；１０７；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５３、２７；７４；２５３；２５４；２５５、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３４８；３７０、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３６９；３７０；３８１、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３６９；３８４、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３７０、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３７０；３８１、２７；７４；２５３；２５４；３６９、２７；７４；２５３；２５４；３７０；３８１、２７；７４；２５３；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５３；２５５；３７０、２７；７４；２５３；３４８、２７；７４；２５３；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；７４；２５３；３６９；３８１；３８４、２７；７４；２５４、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３６９；３８１、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３７０；３８１、２７；７４；２５４；２５５；３６９、２７；７４；２５４；３４８、２７；７４；２５４；３４８；３６９；３８１；３８４、２７；７４；２５４；３４８；３７０、２７；７４；２５４；３４８；３７０；３８１、２７；７４；２５４；３８４、２７；７４；２５５；３４８；３７０、２７；７４；３４８；３８４、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３６９、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；７４；２５３；２５４；３４８；３８１；３８４、２７；７４；２５３；３７０、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３８１；３８４、２７；７４；３７０、２７；７４；２５３；２５４；２５５；３４８、２７；７４；２５３；２５５；３４８；３７０；３８１、２７；７４；２５３；２５５；３８４、２７；７４；２５３；３４８；３６９；３７０；３８４、２７；７４；２５３；３４８；３８１、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３６９；３８４、２７；７４；２５４；２５５；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；７４；２５４；２５５；３７０、２７；７４；２５４；３４８；３８１、２７；７４；２５４；３６９；３８４、２７；７４；２５５、２７；７４；２５５；３４８；３６９；３８１、２７；７４；３４８；３７０、２７；７４；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；２５３、２７；２５３；２５４、２７；２５３；２５４；２５５、２７；２５３；２５４；２５５；２６０；３４８；３８１；３８４、２７；２５３；２５４；２５５；３４８、２７；２５３；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；２５３；２５４；２５５；３４８；３６９；３８４、２７；２５３；２５４；２５５；３４８；３７０、２７；２５３；２５４；２５５；３４８；３７０；３８４、２７；２５３；２５４；２５５；３４８；３８１；３８４、２７；２５３；２５４；３４８、２７；２５３；２５４；３４８；３７０；３８１、２７；２５３；２５４；３４８；３７０；３８４、２７；２５３；２５４；３４８；３８１、２７；２５３；２５４；３４８；３８１；３８４、２７；２５３；２５４；３４８；３８４、２７；２５３；２５４；３８１、２７；２５３；２５４；３８１；３８４、２７；２５３；２５４；３８４、２７；２５３；２５５；３４８、２７；２５３；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；２５３；２５５；３４８；３８１、２７；２５３；２５５；３４

８；３８４、２７；２５３；２５５；３７０、２７；２５３；２５５；３７０；３８１；３８４、２７；２５３；３４８、２７；２５３；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；２５３；３４８；３７０；３８４、２７；２５３；３４８；３８１；３８４、２７；２５３；３６９；３７０、２７；２５３；３８１；３８４、２７；２５４；２５５、２７；２５４；２５５；３４８、２７；２５４；２５５；３４８；３６９；３７０、２７；２５４；２５５；３４８；３７０、２７；２５４；２５５；３４８；３７０；３８１、２７；２５４；２５５；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；２５４；２５５；３４８；３７０；３８４、２７；２５４；２５５；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；２５４；２５５；３７０、２７；２５４；２５５；３８１；３８４、２７；２５４；２５５；３８４、２７；２５４；３４８；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；２５４；３４８；３７０、２７；２５４；３４８；３８１；３８４、２７；２５４；３４８；３８４、２７；２５４；３６９；３８１；３８４、２７；２５４；４４９、２７；２５４；４７０、２７；２５５；３４８、２７；２５５；３４８；３７０、２７；２５５；３４８；３７０；３８１；３８４、２７；２５５；３４８；３８１；３８４、２７；２５５；３７０、２７；３４８、２７；３４８；３６９；３７０；３８１；３８４、２７；３４８；３８１、２７；３４８；３８４、６９、７４；２５３；２５４；３６９；３７０、７４；２５４；２５５；３４８；３８４、８４、１２８、１３１、１３２、１３３、１３４、２５３、２５３；３４８；３７０、２５４、２５５、２５５；３４８；３７０、２５６、３１７；３８０、３４８；４６７、３７０、３７３、３７７、３８１、３８１；６７２、３８３、３８４、３８８、４５３、４５７、４６７、４７２、６１５、６１６、６１８、６１９、６２０、６２３、６２７、７０１、７０５、７０６、７０８および７０９から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、前記位置は、配列番号１２８８を基準としてナンバリングされている、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目１３）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号１２６２と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含み、２４；３１；５６；７０１、２４；３１；５６；７０１、２４；３１；７１；７０１、２４；５６；７０１および７１；７４から選択される１つまたはそれを超えるアミノ酸位置に少なくとも１つの置換または置換セットを含み、ここで、前記位置は、配列番号１２６２を基準としてナンバリングされている、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目１４）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成することができる、項目１～１４のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目１５）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号４～１９０２の偶数番号の配列に提供されている少なくとも１つの配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目１６）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号３、７、１３、２９９、１０３５、１１９３、１２６１および／または１２８７と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリヌクレオチド配列によってコードされる、項目１に記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼ。

（項目１７）

項目１～１６のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼをコードする、操作されたポリヌクレオチド配列。

（項目１８）
操作されたペニシリンＧアシラーゼをコードする、操作されたポリヌクレオチド配列であって、前記操作されたポリヌクレオチド配列は、配列番号３～１９０１の奇数番号の配列に提供されている少なくとも１つの配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一である、操作されたポリヌクレオチド配列。
（項目１９）
配列番号３、７、１３、２９９、１０３５、１１９３、１２６１および／または１２８７と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超えて同一のポリペプチド配列を含む操作されたペニシリンＧアシラーゼをコードする、操作されたポリヌクレオチド配列。
（項目２０）
項目１７～１９のいずれかに記載のポリヌクレオチド配列を含む、ベクター。
（項目２１）
項目１１に記載のベクターを含む、宿主細胞。
（項目２２）
前記宿主細胞が、原核細胞または真核細胞である、項目１２に記載の宿主細胞。
（項目２３）
前記原核宿主細胞が、大腸菌である、項目１３に記載の宿主細胞。
（項目２４）
項目１～１６のいずれかに提供されている少なくとも１つの操作されたペニシリンＧアシラーゼを含む、組成物。
（項目２５）
項目１～１６のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼを生成するための方法であって、項目２２および／または項目２３に記載の宿主細胞を、前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが生成されるような条件下で培養する工程を含む、方法。
（項目２６）
フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するための方法であって、ｉ）項目１～１６のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼおよび／または項目２４に記載の組成物、ならびにＡ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテート保護基を含むインスリンを提供する工程；およびｉｉ）前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが、前記Ａ１、Ｂ１および／またはＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を前記インスリンから除去することによって、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するような条件下で、前記操作されたペニシリンＧアシラーゼを、Ａ１／Ｂ１／Ｂ２９トリ－フェニルアセテート保護基を含む前記インスリンに曝露する工程を含む、方法。
（項目２７）
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１トリ－フェニルアセテート保護基を除去する、項目２６に記載の方法。
（項目２８）
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ１トリ－フェニルアセテート保護基を除去する、項目２６に記載の方法。
（項目２９）
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を除去する、項目２６に記載の方法。
（項目３０）
前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１、Ｂ１およびＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を除去する、項目２６に記載の方法。
（項目３１）
前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが、配列番号２のポリペプチドによるフェニル

アセテートで一保護または二保護されたインスリンの生成と比べて、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％を超える、またはそれを超えて多い、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成する、項目２６～２９のいずれかに記載の方法。

（項目３２）

項目２６～３１のいずれかに記載の方法に従って生成された、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを含む、組成物。

（項目３３）

フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するための方法であって、ｉ）項目１～１６のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼおよび／または項目２４に記載の組成物、ならびに遊離インスリンを提供する工程；およびｉｉ）前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが、Ａ１、Ｂ１および／またはＢ２９位をアシル化することによって、一保護または二保護されたインスリンを生成するような条件下で、前記操作されたペニシリンＧアシラーゼを前記インスリンに曝露する工程を含む、方法。

（項目３４）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１位をアシル化する、項目３３に記載の方法。

（項目３５）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ１位をアシル化する、項目３３に記載の方法。

（項目３６）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ２９位をアシル化する、項目３３に記載の方法。

（項目３７）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１、Ｂ１およびＢ２９位をアシル化する、項目３３に記載の方法。

（項目３８）

前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが、配列番号２のポリペプチドによるフェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンの生成と比べて、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％を超える、またはそれを超えて多い、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成する、項目３２に記載の方法。

（項目３９）

項目３３～３８のいずれかに記載の方法に従って生成された、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを含む、組成物。

（項目４０）

フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するための方法であって、ｉ）項目１～１６のいずれかに記載の操作されたペニシリンＧアシラーゼおよび／または項目２４に記載の組成物、ならびにインスリンを提供する工程；およびｉｉ）前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが、Ａ１、Ｂ１および／またはＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を前記インスリンに付加することによって、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成するような条件下で、前記操作されたペニシリンＧアシラーゼを前記インスリンに曝露する工程を含む、方法。

（項目４１）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１トリ－フェニルアセテート保護基を付加する、項目４０に記載の方法。

（項目４２）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ１トリ－フェニルアセテート保護基を付加する、項目４０に記載の方法。

（項目４３）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を付加する、項目４０に記載の方法。

（項目４４）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、前記インスリンのＡ１、Ｂ１およびＢ２９トリ－フェニルアセテート保護基を付加する、項目４０に記載の方法。

（項目４５）

前記操作されたペニシリンＧアシラーゼが、配列番号２のポリペプチドによるフェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンの生成と比べて、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％を超える、またはそれを超えて多い、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを生成する、項目４０～４４のいずれかに記載の方法。

（項目４６）

項目４０～４５のいずれかに記載の方法に従って生成された、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを含む、組成物。

（項目４７）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号８３７または１２１９を含む、項目２６～３１、３３～３８および／または４０～４５のいずれかに記載の方法。

（項目４８）

前記ペニシリンＧアシラーゼが、配列番号８９７または１８５９を含む、項目２６～３１、３３～３８および／または４０～４５のいずれかに記載の方法。

（項目４９）

項目２６～３１、３３～３８および／または４０～４５のいずれかに記載の少なくとも１つの方法に従って生成された、フェニルアセテートで一保護または二保護されたインスリンを含む、組成物。

【図面】

【図１】

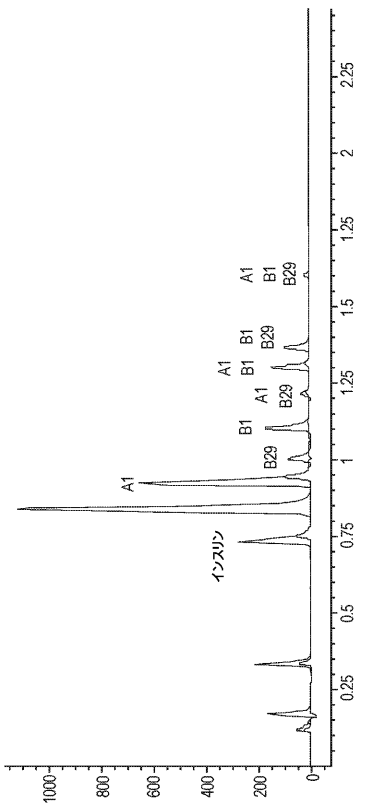


FIG. 1

【図２Ａ】

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1262と比べて)	A1		B29		B1		A1/B29		A1/B1		B1/B29	
		%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]
1263/1264	V28A;G74D;Q547K;	+	++++		+								
953/954	W431R;	+	++++		+								+
955/956	F701L;	+	++++										
957/958	F701A;	+	++++										
1265/1266	F701Y;	+	++++		+								
959/960	F24A;	+	++++		+								
1267/1268	F71L;	+	++++		+				+				
961/962	F71V;	+	++++				+						
1269/1270	F71C;	+	++++		+								
963/964	F71K;	+	+++		+				+				
1271/1272	F71R;		++++										
965/966	F71E;	+	++++		+								
967/968	F24Y;V28A;	+	++++		+				+				
969/970	M697L;	+	++++		+								

FIG. 2A

【図２Ｂ】

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 1262と比べて)	A1		B29		B1		A1/B29		A1/B1		B1/B29	
		%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]
1273/1274	V56T;	+	+++++		+								
1275/1276	V56I;	+	+++++		+								
1277/1278	V56L;	+	+++++		+								
971/972	I177T;	+	+++++		+								
1281/1282	W154F;	+	+++++		+								
973/974	W154F;L754P;	+	+++++		+								
975/976	F71C;G74D;	+	++++	+	+				+				
1285/1286	F71Q;G74D;P1064S;	+	++++	+	+				+				
1287/1288	F71G;G74D;	++	+++	+	+	+	+			+	+		
979/980	F701H;	+	+++++										
981/982	F701C;	+	+++++		+								
983/984	F701I;	++	+++++						+				
985/986	F701M;	+	+++++		+								
1289/1290	F701W;	+	+++++		+								

FIG. 2B

【図２Ｃ】

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 1262と比べて)	A1		B29		B1		A1/B29		A1/B1		B1/B29	
		%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]
1291/1292	F701V;	+	+++++						+				
987/988	M697F;	+	+++++		+				+				
989/990	M697G;	+	+++++		+				+				+
991/992	V28A;Y31F;		++++		++								
993/994	V28A;Y31L;	+	+++++		+								
995/996	V28A;Y31V;	+	++++		++								
997/998	V28A;Y31T;	+	+++++		+								
999/1000	V28A;Y31C;	+	+++++		+								
1001/1002	V28A;Y31N;		+++		+++								
1003/1004	V28A;Y31M;	+	+++++										
1005/1006	V28A;Y31K;		++++		++								
1007/1008	F24A;Y31W;V56I;F701W;	+	+++++										
1009/1010	F24A;V56I;F701W;	+	+++++						+				
1011/1012	F24A;Y31C;V56I;S386P;F701												

FIG. 2C

【図２Ｄ】

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 1262と比べて)	A1		B29		B1		A1/B29		A1/B1		B1/B29	
		%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]
	Y;												
1013/1014	F24A;F71C;F701W;	+	+++++		+								
1293/1294	F24A;P29S;V56L;T352S;N483S;		++++		++								
1261/1262		+	+++++		+								
1015/1016	F24A;L225V;F701Y;	+	+++++										+
1017/1018	F24A;Y31W;V56T;V264A;F701W;S750G;		++++		++								
1019/1020	F24A;Y31W;F701C;F701W;	+	+++++		+								
1295/1296	F24A;Q340R;V391G;		++++		++								
1021/1022	F24A;D484N;F701W;	++	+++++										
1023/1024	F24A;V56T;F7	++	+++++										

FIG. 2D

【図２Ｅ】

配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 1262と比べて)	A1		B29		B1		A1/B29		A1/B1		B1/B29	
		%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]
	01W;												
1025/1026	F24A;Y31W;	+	+++++		+								
1027/1028	F24A;V56I;W154F;I270V;M697L;		++++		++								
1297/1298	F24A;Y31H;V56I;F71C;		++++		++								+
1029/1030	F24A;V56I;M697F;F701W;	+	+++++		+								
1299/1300	F24A;V56L;W240R;F701W;		+++++										
1031/1032	F24A;Y31W;V56I;F701Y;	+	+++++		+								
1301/1302	F24A;V56T;F71C;		++++		++								
1303/1304	F24A;F71L;	+	+++++		+								
1033/1034	F24A;Y31W;V56I;M697L;	+	+++++		+								

FIG. 2E

【図２Ｆ】

配列番号（nt/aa）	アミノ酸相違（配列番号1262と比べて）	A1		B29		B1		A1/B29		A1/B1		B1/B29	
		%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]
1035/1036	F24Y;V28A;F71C;F701W;	+	+++++		+				+				
1037/1038	F24Y;V28A;V56I;A308T;T379A;F701W;	+	+++++		+				+				
1039/1040	F24Y;V28A;D321N;F701H;	+	+++++		+								
1041/1042	F24Y;V28A;N457Y;F701W;	++	+++++										
1043/1044	F24Y;V28A;V56I;F701W;	+	+++++										
1045/1046	F24Y;Y27C;V28T;F701W;V729F;	+	+++++		+								
1305/1306	V56L;I77T;F701W;	+	+++++										
1047/1048	V56T;F71G;F701W;	++	+++++										
1049/1050	M697L;F701Y;	+	+++++		+								

FIG. 2F

【図２Ｇ】

配列番号（nt/aa）	アミノ酸相違（配列番号1262と比べて）	A1		B29		B1		A1/B29		A1/B1		B1/B29	
		%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]
1307/1308	W26C;F701W;		++++		+								
1051/1052	V56T;W658R;F701W;	+	+++++		+								
1053/1054	V56T;F71G;F701I;	+	+++++		+								
1055/1056	A410P;M697F;F701W;	+	+++++		+								+
1057/1058	V56L;K322R;M697L;F701V;	+	+++++										
1059/1060	V56L;F701H;	+	+++++		+								
1061/1062	Y31C;V56L;F701H;	+	+++++						+				
1063/1064	F71G;F701W;	++	+++++										
1065/1066	T129A;I511F;F701Y;		++++		+								
1309/1310	D501N;F701W;	+	+++++		+								
1067/1068	V56T;F701W;L711Q;	+	+++++		+								

FIG. 2G

【図２Ｈ】

配列番号（nt/aa）	アミノ酸相違（配列番号1262と比べて）	A1		B29		B1		A1/B29		A1/B1		B1/B29	
		%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]	%変換[1]	%選択性[2]
1069/1070	I423T;F701W;	+	+++++		+								
1071/1072	V56I;W154F;F701W;	+	+++++		+								
1073/1074	V56L;W119R;K146E;F701Y;		++++		+								
1075/1076	V56T;M697L;F701W;	+	+++++										
1311/1312	V56T;F701W;	+	+++++		+								

[1]変換パーセントは、以下のとおり定義された：「＋」＝1%超であるが10%未満の変換；「＋＋」＝10．0%超であるが20%未満の変換；「＋＋＋」＝20%超の変換。

[2]選択性パーセントは、以下のとおり定義された：「＋」＝5%超であるが20%未満の選択性；「＋＋」＝20%超であるが40%未満の選択性；「＋＋＋」＝40%超であるが60%未満の選択性；「＋＋＋＋」＝60%超であるが80%未満の選択性；「＋＋＋＋＋」＝80%超。

FIG. 2H

10 20 30 40 50

【配列表】
0007128519000001.app

フロントページの続き

６３， レッドウッド シティ， ペノブスコット ドライブ ２００
(72)発明者 エルガート， デイビッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０６３， レッドウッド シティ， ペノブスコット ドライブ ２００
(72)発明者 レクサ， カトリーナ ダブリュー．
アメリカ合衆国 ニュージャージー ０７０６５， ローウェイ， イースト リンカーン アベニュー １２６
(72)発明者 デラス， ニッキ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０６３， レッドウッド シティ， ペノブスコット ドライブ ２００
(72)発明者 オア， ロバート ケビン
アメリカ合衆国 ニュージャージー ０７０６５， ローウェイ， イースト リンカーン アベニュー １２６
(72)発明者 アルビゾ， オスカー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０６３， レッドウッド シティ， ペノブスコット ドライブ ２００
(72)発明者 ガルシア， ラヴィ デイビッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０６３， レッドウッド シティ， ペノブスコット ドライブ ２００
(72)発明者 ヴィドゥヤ， ジュディ ヴィクトリア アントニオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０６３， レッドウッド シティ， ペノブスコット ドライブ ２００
(72)発明者 モフェット， コートニー ダイアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０６３， レッドウッド シティ， ペノブスコット ドライブ ２００
審査官 松原 寛子

(56)参考文献 米国特許出願公開第２００６／０２６４６０６（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１２／０２７０２８２（ＵＳ，Ａ１）
Biol.Chem.Hoppe-Seyler，1994年，Vol.375, p.373-378
Biopolymers，1986年，Vol.25, S109-S114

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／５５
Ｃ１２Ｎ ９／８４
Ｃ１２Ｎ １５／７０
Ｃ１２Ｎ １／２１
Ｃ１２Ｐ ２１／０２
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）