

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6017439号
(P6017439)

(45) 発行日 平成28年11月2日(2016.11.2)

(24) 登録日 平成28年10月7日(2016.10.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	Z N A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	

請求項の数 23 (全 100 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-540368 (P2013-540368)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月24日 (2011.11.24)
 (65) 公表番号 特表2014-500019 (P2014-500019A)
 (43) 公表日 平成26年1月9日 (2014.1.9)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2011/070956
 (87) 國際公開番号 WO2012/069593
 (87) 國際公開日 平成24年5月31日 (2012.5.31)
 審査請求日 平成26年11月13日 (2014.11.13)
 (31) 優先権主張番号 61/417,144
 (32) 優先日 平成22年11月24日 (2010.11.24)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 513131280
 ノバルティス・インターナショナル・ファーマシューティカル・リミテッド
 NOVARTIS INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL LTD.
 英国領バーミューダ、ハミルトン、フロント・ストリート 131

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を有する融合酵素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を有するリコンビナントタンパク質であって、アクセプター性グリカンの末端Man-3残基へのN-アセチルグルコサミンの転移を触媒し、かつ末端Man-6残基へのN-アセチルグルコサミンの転移を触媒し、そして少なくとも2種の異なる酵素由来の触媒ドメインを含む、リコンビナントタンパク質。

【請求項 2】

N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインを含む融合タンパク質である、請求項1記載のリコンビナントタンパク質。 10

【請求項 3】

N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインがヒト酵素に由来する、請求項2記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 4】

ヒトN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインおよびヒトN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメイン、ここで、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインはN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインのN末端側に位置する、触媒ドメインの間に位置するヒトN- 20

アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I ステムドメイン由来の配列を含むスペーサー配列、ならびに N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II 触媒ドメインに対して N 末端側に位置するターゲティングペプチド、ここで、ターゲティングペプチドは、ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II 由来の細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、およびステムドメインを含む、を含む請求項 1 または 2 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 5】

ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II 触媒ドメインおよび N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメイン、ここで、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II 触媒ドメインは、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインの N 末端側に位置する；触媒ドメインの間に位置するスペーサー、ここで、スペーサーは、配列番号 118、配列番号 120、配列番号 122、および配列番号 124 から成る群より選択される配列を含む；ならびに N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II 触媒ドメインに対して N 末端側に位置するターゲティングペプチド、ここで、ターゲティングペプチドは、ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II 由来の細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、およびステムドメインを含む、を含む請求項 1 または 2 記載のリコンビナントタンパク質。

10

【請求項 6】

スペーサーが、配列番号 118、配列番号 120、および配列番号 124 から成る群より選択される配列を含む、請求項 5 記載のリコンビナントタンパク質。

20

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載のリコンビナントタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 8】

プロモーターに作動可能に連結された請求項 7 記載の単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 8 記載の発現ベクターを含むホスト細胞。

【請求項 10】

複合 N - グリカンを製造する方法であって、

30

(1) N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインおよび N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II 触媒ドメインを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むホスト細胞を提供すること；そして

(2) アクセプター性グリカンの末端 Man 3 残基への N - アセチルグルコサミンの転移および末端 Man 6 残基への N - アセチルグルコサミンの転移を触媒して複合 N - グリカンを製造する融合タンパク質が発現されるようにホスト細胞を培養することを含む、方法。

【請求項 11】

アクセプター性グリカンが、異種ポリペプチドに結合している、請求項 10 記載の方法。

40

【請求項 12】

複合 N - グリカンが、GlcNAc 2 Man 3 (GlcNAc 2 Man 6) Man 4 GlcNAc 4 GlcNAc である、請求項 10 または請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

ホスト細胞が、トリコデルマ属種 (Trichoderma sp.)、アクリレモニウム属 (Acremonium)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium)、クリプトコッカス属 (Cryptococcus)、クリソスポリウムス属 (Chrysosporium)、クリソスポリウム・ラクノウェンス (Chrysosporium lucknowense)、フィリバシジウム属 (Filobasidium)、フザリウム属 (Fusarium)、ジベレラ属 (Gibberella)、マグナポルテ属

50

(*Magnaporthe*)、ムコール属(*Mucor*)、ミセリオフソラ属(*Myceliophthora*)、ミロセシウム属(*Myrothecium*)、ネオカリマスティクス属(*Neocallimastix*)、ニューロスボラ属(*Neurospora*)、ペシロミセス属(*Paecilomyces*)、ペニシリウム属(*Penicillium*)、ピロミセス属(*Piromyces*)、シゾフィラム属(*Schizophyllum*)、タラロミセス属(*Talaromyces*)、サーモアスカス属(*Thermoascus*)、チエラビア属(*Thielavia*)、およびトリポクラジウム属(*Tolypocladium*)から成る群より選択される糸状菌細胞である、請求項10～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

ホスト細胞が、さらに、UDP-GlcNAcトランスポーターをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項10～13のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項15】

ホスト細胞が、野生型ホスト細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルのドリキル-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-ドリキルマンノシルトランスフェラーゼを有するか又はalg3遺伝子が、ホスト細胞から欠失されている、請求項10～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

ホスト細胞が、野生型ホスト細胞における活性又は発現レベルに比べて低下した活性レベルの-1,6-マンノシルトランスフェラーゼ又は低下した発現レベルのoch1遺伝子を有する、請求項10～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

ホスト細胞が、さらに、
i) -1,2-マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチド；
ii) -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチド；および/または、
iii) シアリルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項10～16のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項18】

野生型糸状菌細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルのalg3遺伝子を有するか又はalg3遺伝子が欠失している、請求項2～6のいずれか一項記載のリコンビナントタンパク質を含む糸状菌細胞。

30

【請求項19】

さらに、UDP-GlcNAcトランスポーターをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項18記載の糸状菌細胞。

【請求項20】

野生型糸状菌細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルの-1,6-マンノシルトランスフェラーゼを有する、請求項18～19のいずれか一項記載の糸状菌細胞。

【請求項21】

野生型糸状菌細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルのoch1遺伝子を有する、請求項18～20記載の糸状菌細胞。

40

【請求項22】

さらに、
i) -1,2-マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチド；
ii) -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチド；および/または、
iii) シアリルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項18～21のいずれか一項記載の糸状菌細胞。

【請求項23】

トリコデルマ属種(*Trichoderma* sp.)、アクレモニウム属(*Acremonium*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)、アウレオバシジウム属(*Aureobasidium*)、クリプトコッカス

50

属 (Cryptococcus)、クリソスポリウムス属 (Chrysosporium)、クリソスポリウム・ラクノウェンス (Chrysosporium lucknowense)、フィリバシジウム属 (Filibasidium)、フザリウム属 (Fusarium)、ジベレラ属 (Gibberella)、マグナポルテ属 (Magnaporthe)、ムコール属 (Mucor)、ミセリオフソラ属 (Myceliophthora)、ミロセシウム属 (Myrothecium)、ネオカリマスティクス属 (Neocallimastix)、ニューロスボラ属 (Neurospora)、ペシロミセス属 (Paecilomyces)、ペニシリウム属 (Penicillium)、ピロミセス属 (Piromyces)、シゾフィラム属 (Schizophyllum)、タラロミセス属 (Talaromyces)、サーモアスカス属 (Thermoascus)、チエラビア属 (Thielavia)、およびトリポクラジウム属 (Tolypocladium) から成る群より選択される、請求項 18 ~ 22 のいずれか一項記載の糸状菌細胞。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2010年11月24日に出願された米国仮出願第61/417,144号の利益を主張し、その仮出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

ASCIITキストファイルでの配列リストの提出

ASCIITキストファイルでの以下の提出内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる：コンピュータ可読形態 (CRF) の配列リスト (ファイル名：61967200 1040SEQLIST.txt、記録日：2011年11月22日、サイズ：305KB)。

20

【0003】

発明の分野

本開示は、N-グリカンの製造に有用な組成物および方法に関する。

【0004】

背景

タンパク質の翻訳後修飾は、多くの場合、適正なタンパク質のフォールディングおよび機能に必要である。通常のタンパク質改変は、小胞体で新生ポリペプチドにオリゴ糖 (グリカン) が付加して糖タンパク質を形成することであり、これは、グリコシル化として知られる過程である。N-グリコシル化は、治療目的に使用されるリコンビナントタンパク質の製造に特に重要である。標準的な原核生物発現系は、そのような改変に必要な適切な機構を欠如しているので、これらの治療用タンパク質の製造には代替発現系を使用しなければならない。酵母および真菌は、単純な培地中で容易に大規模に成長できることが低い製造コストを可能にするので、タンパク質を発現させる魅力的な選択肢である。そのうえ、酵母細胞および真菌細胞の比較的単純な遺伝子構造を操作するための、ならびにより複雑な真核細胞、例えば哺乳動物細胞または昆虫細胞などを操作するためのツールが利用可能である (De Pourcq et al., Appl Microbiol Biotechnol, 87(5):1617-31)。

30

【0005】

真菌細胞および哺乳動物細胞は、マンノース (8)N-アセチルグルコサミン (2) (Man8G1cNAc2) の形成を生じるグリコシル化の初期段階で共通のステップを有する。しかし、その過程の後期段階には顕著な差が存在する。例えば酵母では、マンノシルトランスフェラーゼおよびマンナンポリメラーゼによってMan8G1cNAc2に追加的なマンノースサブユニットが付加され、高マンノース型N-グリカンが产生する。対照的に、ヒトMan8G1cNAc2からはマンノース糖が除去され、Man5G1cNAc2が产生し、酵素N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI (GnTI)、マンノシダーゼII (MnSII)、およびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnTIII) を必要とする3連続の反応が続いて、Man5G1cNAc2がG1cNAc2Man3G1cNAc2に変換される。

40

【0006】

高マンノース型N-グリカンを有する糖タンパク質がヒトでの治療用途に適さないので

50

、哺乳動物細胞と真菌細胞の間のグリコシル化過程の差は、真菌細胞を用いてグリコシル化哺乳動物タンパク質を発現させることに難題を突きつける (De Pourcq et al., 2010; Wildt and Gerngross, *Nature Reviews Microbiology*, 3: 119-128)。したがって、酵母種および真菌種でのグリコシル化経路を再操作して、それらがリコンビナントヒトタンパク質を発現できるようにするための研究が行われてきた。酵母細胞または真菌細胞の糖鎖工学での一般的なアプローチは、高マンノース型N-グリカンの形成に関与する内因性遺伝子を破壊することであった。これらの遺伝子破壊は、異なる種由来の内因性マンノシダーゼならびに/またはグリコシルトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼの過剰発現と組合せることができる (Chiba et al., 1998, *J Biol Chem* 273: 26298-304; Kainz et al., 2008, *Appl Environ Microbiol* 74: 1076-86; Maras et al., 1997, *Euro J Biochem* 249: 701-07; Maras et al., 1999, *Febs Letters* 452: 365-70; Hamilton et al., 2003, *Science* 301: 1244-6; De Pourcq et al., 2010)。しかし、非哺乳動物細胞でのグリコシル化哺乳動物タンパク質の製造は、複雑で時間のかかる遺伝子操作をまだ必要とし、所望の糖タンパク質の製造に非効率的なおそれがある。
10

【0007】

したがって、非哺乳動物細胞中に複合N-グリカンを発現させるための、より単純でより効率的な系の必要性が当技術分野において相変わらず存在する。

【0008】

概要

本明細書に記載されるのは、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を有するリコンビナントタンパク質を含む組成物である。さらに、本明細書に記載されるのは、複合N-グリカンを製造する方法およびMan3GlcNAc2グリカンを製造する方法である。
20

【0009】

したがって、一局面には、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を有するリコンビナントタンパク質であって、アクセプター性グリカンの末端Man3残基へのN-アセチルグルコサミンの転移を触媒し、かつ末端Man6残基へのN-アセチルグルコサミンの転移を触媒するリコンビナントタンパク質であって、少なくとも2種の異なる酵素由来の触媒ドメインを含有するリコンビナントタンパク質が含まれる。ある態様では、アクセプター性グリカンは、アミノ酸、ペプチド、またはポリペプチドより選択される分子に結合している。ある態様では、その分子は異種ポリペプチドである。前記態様と組合せることができる、ある態様では、アクセプター性グリカンはMan3である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、リコンビナントタンパク質は、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインを含有する融合タンパク質である。ある態様では、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインは、ヒト酵素に由来する。ある態様では、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインは、配列番号1のアミノ酸残基105~445と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一の配列を含む。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインは、配列番号21のアミノ酸残基30~447と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一の配列を含む。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインは、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインに対してN末端側にある。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインは、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラー
30
40
50

ゼ I 触媒ドメインに対して N 末端側にある。

【0010】

前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、リコンビナントタンパク質は、さらに、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインと N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインの間にスペーサーを含有する。ある態様では、スペーサーは、ステムドメイン由来配列を含有する。前記態様と組み合わせることができるある態様では、スペーサーは、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 30、少なくとも 40、または少なくとも 50 アミノ酸長である。前記態様と組み合わせができるある態様では、スペーサーは、配列番号 118、配列番号 120、配列番号 122、および配列番号 124 より選択される配列を含有する。ある態様では、スペーサーは、配列番号 118、配列番号 120、および配列番号 124 より選択される配列を含有する。ある態様では、スペーサーは、配列番号 120 または配列番号 124 の配列を含有する。ある態様では、スペーサーは、配列番号 124 の配列を含有する。

【0011】

前記態様と組み合わせができる、ある態様では、リコンビナントタンパク質は、さらに、触媒ドメインの N 末端に結合したターゲティングペプチドを含有する。ある態様では、ターゲティングペプチドは、ステムドメインを含有する。ある態様では、ステムドメインは、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素または N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素に由来する。ある態様では、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素および N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素は、ヒト酵素である。前記態様と組み合わせができる、ある態様では、ステムドメインは、マンノシダーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、2 型ゴルジ体タンパク質、MNN2、MNN4、MNN6、MNN9、MNN10、MNS1、KRE2、VAN1、または OCH1 より選択されるタンパク質に由来する。ある態様では、そのタンパク質は、アクレモニウム属 (Acremonium)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium)、クリプトコッカス属 (Cryptococcus)、クリソスボリウム属 (Chrysosporium)、クリソスボリウム・ラクノウェンス (Chrysosporium lucknowense)、フィリバシジウム属 (Filibasidium)、フザリウム属 (Fusarium)、ジベレラ属 (Gibberella)、ヒュミコラ属 (Humicola)、マグナポルテ属 (Magnaporthe)、ムコール属 (Mucor)、ミセリオフソラ属 (Myceliophthora)、ミロセシウム属 (Myrothecium)、ネオカリマスティクス属 (Neocallimastix)、ニューロスボラ属 (Neurospora)、ペシロミセス属 (Paecilomyces)、ペニシリウム属 (Penicillium)、ピロミセス属 (Piromyces)、シゾフィラム属 (Schizophyllum)、タラロミセス属 (Talaromyces)、サーモアスカス属 (Thermoascus)、チエラビア属 (Thielavia)、トリポクラジウム属 (Tolypocladium)、またはトリコデルマ属 (Trichodema) より選択される生物に由来する。前記態様と組み合わせができる、ある態様では、ターゲティングペプチドは、KRE2 ターゲティングペプチドである。ある態様では、ターゲティングペプチドは、膜貫通ドメインを含有する。前記態様と組み合わせができる、ある態様では、ターゲティングペプチドは、さらに、ステムドメインの N 末端に結合した膜貫通ドメインを含有する。前記態様と組み合わせができる、ある態様では、膜貫通ドメインは、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素または N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素に由来する。ある態様では、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素および N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素は、ヒト酵素である。前記態様と組み合わせができる、ある態様では、膜貫通ドメインは、マンノシダーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、2 型ゴルジ体タンパク質、MNN2、MNN4、MNN6、MNN9、MNN10、MNS1、KRE2、VAN1、または OCH1 より選択されるタンパク質に由来する。ある態様では、タンパク質は、アクレモニウム属 (Acremonium)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium)、ク

リプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、クリソスポリウムス属 (*Chrysosporium*)、クリソスポリウム・ラクノウェンス (*Chrysosporium lucknowense*)、フィリバシジウム属 (*Filibasidium*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、ジベレラ属 (*Gibberella*)、ヒュミコラ属 (*Humicola*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ムコール属 (*Mucor*)、ミセリオフソラ属 (*Myceliophthora*)、ミロセシウム属 (*Myrothecium*)、ネオカリマスティクス属 (*Neocallimastix*)、ニューロスボラ属 (*Neurospora*)、ペシロミセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ピロミセス属 (*Piromyces*)、シゾフィラム属 (*Schizophyllum*)、タラロミセス属 (*Talaromyces*)、サーモアスカス属 (*Thermoascus*)、チエラビア属 (*Thielavia*)、トリポクラジウム属 (*Tolypocladium*)、またはトリコデルマ属 (*Trichoderma*) より選択される生物に由来する。ある態様では、ターゲティングペプチド 10 は、細胞質ドメインを含有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ターゲティングペプチドは、さらに、ステムドメインのN末端に結合した細胞質ドメインを含有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、細胞質ドメインは、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI酵素またはN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII酵素に由来する。ある態様では、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI酵素およびN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII酵素は、ヒト酵素である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、細胞質ドメインは、マンノシダーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、2型ゴルジ体 20 タンパク質、MNN2、MNN4、MNN6、MNN9、MNN10、MNS1、KRE2、VAN1、またはOCH1より選択されるタンパク質に由来する。ある態様では、タンパク質は、アクレモニウム属 (*Acremonium*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、クリソス 30 ポリウムス属 (*Chrysosporium*)、クリソスポリウム・ラクノウェンス (*Chrysosporium lucknowense*)、フィリバシジウム属 (*Filibasidium*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、ジベレラ属 (*Gibberella*)、ヒュミコラ属 (*Humicola*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ムコール属 (*Mucor*)、ミセリオフソラ属 (*Myceliophthora*)、ミロセシウム属 (*Myrothecium*)、ネオカリマスティクス属 (*Neocallimastix*)、ニューロスボラ属 (*Neurospora*)、ペシロミセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ピロミセス属 (*Piromyces*)、シゾフィラム属 (*Schizophyllum*)、タラロミセス属 (*Talaromyces*)、サーモアスカス属 (*Thermoascus*)、チエラビア属 (*Thielavia*)、トリポクラジウム属 (*Tolypocladium*)、またはトリコデルマ属 (*Trichoderma*) より選択される生物に由来する。

【0012】

別の局面には、ヒトN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインおよびヒトN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメイン、ここで、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインは、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインに対してN末端側に位置する、触媒ドメインの間に位置する、ヒトN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIステムドメイン由来配列を含有するスペーサー配列、ならびにN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインに対してN末端側に位置するターゲティングペプチド、ここで、ターゲティングペプチドは、ヒトN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII由来の細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、およびステムドメインを含有する、を含有するリコンビナントタンパク質が含まれる。別の局面には、配列番号95と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一の配列を含有するリコンビナントタンパク質が含まれる。

【0013】

別の局面には、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインおよ 50

びN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメイン、ここで、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインは、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインに対してN末端側に位置する；触媒ドメインの間に位置するスペーサー、ここで、スペーサーは、配列番号118、配列番号120、配列番号122、および配列番号124より選択される配列を含有する；ならびにN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインに対してN末端側に位置するターゲティングペプチド、ここで、ターゲティングペプチドは、ヒトN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII由来の細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、およびステムドメインを含有する、を含有するリコンビナントタンパク質が含まれる。ある態様では、スペーサーは、配列番号118、配列番号120、および配列番号124より選択される配列を含有する。ある態様では、スペーサーは、配列番号120または配列番号124の配列を含有する。ある態様では、スペーサーは、配列番号124の配列を含有する。

【0014】

別の局面には、前記態様のいずれかのリコンビナントタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドが含まれる。別の局面には、プロモーターに作動可能に連結された、前記態様の単離されたポリヌクレオチドを含有する発現ベクターが含まれる。ある態様では、プロモーターは、構成的プロモーターである。ある態様では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。ある態様では、プロモーターは、gpdA、cbh1、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)TAKAアミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイ(*Rhizomucor miehei*)アスパラギン酸プロテイナーゼ、*Aspergillus niger*中性-アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)酸安定性-アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)グルコアミラーゼ(g1aA)、アスペルギルス・アワモリ(*Aspergillus awamori*)g1aA、リゾムコール・ミエヘイ(*Rhizomucor miehei*)リパーゼ、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)アルカリプロテアーゼ、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)トリオースリン酸イソメラーゼ、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)アセトアミダーゼ、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)アセトアミダーゼ、フザリウム・オキシスボルム(*Fusarium oxysporum*)トリプシン様プロテアーゼ、真菌エンド-*L*-アラビナーゼ(abnA)、真菌-*L*-アラビノフラノシダーゼA(abfA)、真菌-*L*-アラビノフラノシダーゼB(abfB)、真菌キシラナーゼ(xlnA)、真菌フィターゼ、真菌ATP-シンテターゼ、真菌サブユニット9(olc)、真菌トリオースリン酸イソメラーゼ(tpi)、真菌アルコールデヒドロゲナーゼ(adhA)、真菌-アミラーゼ(amy)、真菌アミログルコシダーゼ(g1aA)、真菌アセトアミダーゼ(amdS)、真菌グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(gpd)、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、酵母アルコールオキシダーゼ、酵母ラクターゼ、酵母3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、酵母トリオースリン酸イソメラーゼ、細菌-アミラーゼ、細菌Sph2、またはSSOより選択される遺伝子に由来する。別の局面には、前記態様のいずれかの発現ベクターを含有するホスト細胞が含まれる。

【0015】

別の局面には、任意の前記態様のリコンビナントタンパク質を製造する方法であって、リコンビナントタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドをホスト細胞に導入するステップ、そしてリコンビナントタンパク質が発現するようにホスト細胞を培養するステップを含む方法が含まれる。ある態様では、その方法は、さらに、ホスト細胞からリコンビナントタンパク質を精製するステップを含む。前記態様と組み合わせができる、ある態様では、ホスト細胞は真菌細胞である。ある態様では、真菌細胞は、酵母または糸状菌より選択される。

【0016】

別の局面には、複合N-グリカンを製造する方法であって、ホスト細胞を提供するステップ、ここで、ホスト細胞は、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインを含有す

10

20

30

40

50

る融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する、そして融合タンパク質が発現するようにホスト細胞を培養するステップを含む方法が含まれ、ここで、融合タンパク質は、アクセプター性グリカンの末端 Man 3 残基への N - アセチルグルコサミンおよび末端 Man 6 残基への N - アセチルグルコサミンの転移を触媒して複合 N - グリカンを製造する。ある態様では、複合 N - グリカンは、アミノ酸、ペプチド、またはポリペプチドより選択される分子に結合している。ある態様では、分子は異種ポリペプチドである。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、アクセプター性グリカンは Man 3 である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、複合 N - グリカンは、 GlcNAc 2 Man 3 (GlcNAc 2 Man 6) Man 4 GlcNAc 4 GlcNAc である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は真核細胞である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は真菌細胞である。ある態様では、真菌細胞は、サッカロミセス・セルビジエ (*S. cerevisiae*)、クリベロミセス・ラクチス (*K. lactis*)、ピキア・パストリス (*P. pastoris*)、ハンセヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*)、カンジダ・アルビカンス (*C. albicans*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、またはヤロウイア属 (*Yarrowia*) より選択される酵母細胞である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、真菌細胞は、トリコデルマ属種 (*Trichoderma* sp.)、アケレモニウム属 (*Acremonium*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、クリソスポリウムス属 (*Chrysosporium*)、クリソスポリウム・ラクノウェンス (*Chrysosporium lucknowense*)、フィリバシジウム属 (*Filibasidium*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、ジベレラ属 (*Gibberella*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ムコール属 (*Mucor*)、ミセリオフソラ属 (*Myceliophthora*)、ミロセシウム属 (*Myrothecium*)、ネオカリマスティクス属 (*Neocallimastix*)、ニューロスpora属 (*Neurospora*)、ペシロミセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ピロミセス属 (*Piromyces*)、シゾフィラム属 (*Schizophyllum*)、タラロミセス属 (*Talaromyces*)、サーモアスカス属 (*Thermoascus*)、チエラビア属 (*Thielavia*)、またはトリポクラジウム属 (*Tolypocladium*) より選択される糸状菌細胞である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は、さらに、 UDP - GlcNAc トランスポーターをコードするポリヌクレオチドを含有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は、野生型ホスト細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルのドリキル - P - Man : Man (5) GlcNAc (2) - PP - ドリキルマンノシルトランスフェラーゼを有する。ある態様では、ホスト細胞は、野生型ホスト細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルの *alg3* 遺伝子を有する。ある態様では、 *alg3* 遺伝子は、ホスト細胞から欠失されている。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は、野生型ホスト細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルの *-1,6* - マンノシルトランスフェラーゼを有する。ある態様では、ホスト細胞は、野生型ホスト細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルの *och1* 遺伝子を有する。ある態様では、 *och1* 遺伝子は、ホスト細胞から欠失している。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は、さらに、 *-1,2* - マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は、さらに、 *-1,4* - ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は、さらに、シアリルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は、野生型トリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルのドリキル - P - Man : Man (5) GlcNAc (2) - PP - ドリキルマンノシルトランスフェラーゼを有するトリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は、野生型酵母細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルのドリキル - P - Man : Man (5) GlcNAc (2) - PP - ドリキルマンノシルトランスフェラーゼ 10 20 30 40 50

および低下した活性レベルの - 1 , 6 - マンノシルトランスフェラーゼを有する酵母または真菌細胞であって、さらに、 - 1 , 2 - マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する酵母または真菌細胞である。

【 0 0 1 7 】

別の局面には、複合N - グリカンを製造する方法であって、トリコデルマ属 (Trichoderma) ホスト細胞を提供するステップ、ここで、ホスト細胞は、野生型ホスト細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルの $\alpha 1 \text{g } 3$ 遺伝子を有し、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインをコードする第 1 のポリヌクレオチドおよび N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインをコードする第 2 のポリヌクレオチドを含有する、そしてホスト細胞を培養して複合N - グリカンを製造するステップを含む方法が含まれる。

【 0 0 1 8 】

別の局面には、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインおよび N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインを含有する融合タンパク質、アクセプター性グリカン、ならびに N - アセチルグルコサミンドナーを緩衝液中と一緒にインキュベーションするステップを含む、複合N - グリカンを製造する方法が含まれ、ここで、融合タンパク質は、アクセプター性グリカンの末端 $\text{Man } 3$ 残基への N - アセチルグルコサミンおよび末端 $\text{Man } 6$ 残基への N - アセチルグルコサミンの転移を触媒して複合N - グリカンを製造する。ある態様では、アクセプター性グリカンは、アミノ酸、ペプチド、またはポリペプチドより選択される分子に結合している。ある態様では、その分子は、異種ポリペプチドである。ある態様では、アクセプター性グリカンは $\text{Man } 3$ である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、N - アセチルグルコサミンドナーは UDP - GlcNAc トランスポーターである。

【 0 0 1 9 】

別の局面には、 $\alpha 1 \text{g } 3$ 突然変異および $\text{Man } 3 \text{ GlcNAc } 2$ を含有する糸状菌細胞が含まれ、ここで、 $\text{Man } 3 \text{ GlcNAc } 2$ は、細胞によって分泌される中性N - グリカンの少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、または 100% (mol%) を構成する)。中性N - グリカンは、アミノ酸、ペプチド、およびポリペプチドから成る群より選択される分子と結合している場合がある。ある態様では、 $\alpha 1 \text{g } 3$ 突然変異は、 $\alpha 1 \text{g } 3$ の欠失である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、細胞はトリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) 細胞である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、糸状菌細胞は、さらに、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインをコードする第 1 のポリヌクレオチドおよび N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインをコードする第 2 のポリヌクレオチドを含有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、糸状菌細胞は、さらに、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインおよび N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインを含有する融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する。

【 0 0 2 0 】

別の局面には、ホスト細胞において $\text{Man } 3 \text{ GlcNAc } 2$ グリカンを製造する方法であって、野生型ホスト細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルのマンノシルトランスフェラーゼを有するホスト細胞を提供するステップ、そしてホスト細胞を培養して $\text{Man } 3 \text{ GlcNAc } 2$ グリカンを製造するステップを含む方法が含まれ、ここで、 $\text{Man } 3 \text{ GlcNAc } 2$ グリカンは、ホスト細胞により分泌された中性N - グリカンの少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、または 100% (mol%) を構成する。中性N - グリカンは、アミノ酸、ペプチド、およびポリペプチドより選択される分子に結合している場合がある。ある態様では、 $\text{Man } 3 \text{ GlcNAc } 2$ グリカンは、異種ポリペプチドに結合している。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、マンノシルトランスフェラーゼはドリキル - P - $\text{Man : Man } (5) \text{ GlcNAc } (2) - \text{PP - Drikiylman } \text{Nosekiyltrantsfearaze}$

10

20

30

40

50

である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は、野生型ホスト細胞での発現レベルに比べて低下した発現レベルの $\alpha 1 g 3$ 遺伝子を有する。ある態様では、 $\alpha 1 g 3$ 遺伝子は、ホスト細胞から欠失している。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞はトリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞における - 1 , 6 - マンノシルトランスフェラーゼの活性レベルは、野生型ホスト細胞における活性レベルに比べて低下している。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、ホスト細胞は、 - 1 , 2 - マンノシダーゼをコードする内因性ポリヌクレオチドを含有する。

【0021】

別の局面には、野生型糸状菌細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルの $\alpha 1 g 3$ 遺伝子を有する糸状菌細胞であって、前記態様のいずれかのリコンビナントタンパク質を含有する糸状菌細胞が含まれる。ある態様では、 $\alpha 1 g 3$ 遺伝子は突然変異を含有する。好ましくは、リコンビナントタンパク質は、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を有し、ここで、リコンビナントタンパク質は、アクセプター性グリカンの末端Man 3 残基へのN - アセチルグルコサミンの転移を触媒し、かつ末端Man 6 残基へのN - アセチルグルコサミンの転移を触媒し、ここで、リコンビナントタンパク質は、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインを含有する融合タンパク質である。ある態様では、 $\alpha 1 g 3$ 遺伝子の突然変異は、 $\alpha 1 g 3$ 遺伝子の欠失である。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、融合タンパク質は、プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドによりコードされる。ある態様では、プロモーターは誘導性プロモーターである。ある態様では、誘導性プロモーターはc b h 1 プロモーターである。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、糸状菌細胞は、さらに、UDP - G1cNAcトランスポーターをコードするポリヌクレオチドを含有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、糸状菌は、野生型糸状菌細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルの - 1 , 6 - マンノシルトランスフェラーゼを有する。ある態様では、糸状菌は、野生型糸状菌細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルの o c h 1 遺伝子を有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、糸状菌細胞は、さらに、 - 1 , 2 - マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、糸状菌細胞は、さらに、 - 1 , 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、糸状菌細胞は、さらに、シアリルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する。前記態様と組み合わせることができる、ある態様では、糸状菌細胞は、トリコデルマ属種 (*Trichoderma* sp.)、アクレモニウム属 (*Acremonium*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、クリソスボリウム属 (*Chrysosporium*)、クリソスボリウム・ラクノウェンス (*Chrysosporium lucknowense*)、フィリバシジウム属 (*Filibasidium*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、ジベレラ属 (*Gibberella*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ムコール属 (*Mucor*)、ミセリオフソラ属 (*Myceliophthora*)、ミロセシウム属 (*Myrothecium*)、ネオカリマスティクス属 (*Neocallimastix*)、ニューロスpora属 (*Neurospora*)、ペシロミセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ピロミセス属 (*Piromyces*)、シゾフィラム属 (*Schizophyllum*)、タラロミセス属 (*Talaromyces*)、サーモアスカス属 (*Thermoascus*)、チエラビア属 (*Thielavia*)、およびトリポクラジウム属 (*Tolypocladium*)より選択される。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1 - 1】*T. reesei* M 4 4、M 8 1、M 8 4、M 10 9、M 11 0、M 13 1、M 13 2、M 13 3、M 13 4、およびM 12 4 株での平均グリコシル化の中性N - グリカン質量分析プロファイルを示す図である。

10

20

30

40

50

【図1-2】*T. reesei* M44、M81、M84、M109、M110、M131、M132、M133、M134、およびM124株での平均グリコシル化の中性N-グリカン質量分析プロファイルを示す図である。

【図2】モノリン酸化Mann7Gn2のフラグメンテーション分析を示す図である。モノリン酸化Mann7Gn2の一構造例のみを示す。

【図3-1】*T. reesei* M44、M81、M84、M109、M110、M131、M132、M133、M134、およびM124株の酸性グリカン質量分析プロファイルを示す図である。

【図3-2】*T. reesei* M44、M81、M84、M109、M110、M131、M132、M133、M134、およびM124株の酸性グリカン質量分析プロファイルを示す図である。
10

【図4A】発酵槽中で131.4時間培養(流加培養)した*T. reesei* M44株の中性(a)および酸性(b)N-グリカンプロファイルを示す図である。

【図4B】発酵槽中で131.4時間培養(流加培養)した*T. reesei* M44株の中性(a)および酸性(b)N-グリカンプロファイルを示す図である。

【図5A】*T. reesei*培地の中性(a)および酸性(b)N-グリカン質量分析プロファイルを示す図である。

【図5B】*T. reesei*培地の中性(a)および酸性(b)N-グリカン質量分析プロファイルを示す図である。

【図6】*T. reesei* M44の分泌タンパク質のメンプランプロットを示す図である。

20

【図7】発酵槽中で培養した*T. reesei* M44のタンパク質バンドを分析した一例を示す図である。タンパク質のグリコシル化は、*T. reesei*での平均グリコシル化と有意差がなかった。スペクトルは、小さなベースラインシグナルに焦点を合わせたので、スペクトルの大きなシグナルは他のシグナルに比べて定量的でなかった。

【図8】*alg3*プローブを用いた親株由来DNAおよび*alg3*ノックアウト株由来DNAのサザンプロットを示す図である。

【図9A】予測された制限生成物のサイズを有するpTTv38構築物断片の制限酵素マップを示す図である。

【図9B】EcoRI+PvuI(E+P)またはKpnI+NheI(K+N)で消化した親株および*alg3*ノックアウト株由来ゲノムDNAのサザンプロットを示す図である。対照DNAは、NotIで消化したpTTv38プラスミドDNAであった。AmidSプローブを用いてプロットをプローブした。

30

【図10A】中性N-グリカンのMALDI分析を示す図である。図Aに、親株M124を示す。図Bに、*alg3*ノックアウト4Aを示す。四角印は、N-アセチルグルコサミンを表し、表示したグルコース1個以外、丸印はマンノースを表す。

【図10B】中性N-グリカンのMALDI分析を示す図である。図Aに、親株M124を示す。図Bに、*alg3*ノックアウト4Aを示す。四角印は、N-アセチルグルコサミンを表し、表示したグルコース1個以外、丸印はマンノースを表す。

【図11】4A*alg3*ノックアウト株由来Mann3Gn2のフラグメンテーション分析を示す図である。

40

【図12A】*alg3*ノックアウト株4A(図A)および親株M124(図B)由来He×5Gn2のフラグメンテーション分析を示す図である。枠で囲ったシグナルは、*alg3*ノックアウト株由来アイソマーとしてのみ存在する。

【図12B】*alg3*ノックアウト株4A(図A)および親株M124(図B)由来He×5Gn2のフラグメンテーション分析を示す図である。枠で囲ったシグナルは、*alg3*ノックアウト株由来アイソマーとしてのみ存在する。

【図13】-マンノシダーゼ消化後の*alg3*ノックアウト株4A由来中性N-グリカンを示す図である。

【図14】液体クロマトグラフィーによる*alg3*ノックアウト株由来の2種の主グリカン分離を示す図である。

50

【図15A】 $\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 2画分(図A)および $\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 2画分(図B)のプロトンNMRスペクトルを示す図である。クリオプローブを備えるVarian Unity INOVA 600 MHzスペクトロメーターを使用して、40°でスペクトルを収集した。

【図15B】 $\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 2画分(図A)および $\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 2画分(図B)のプロトンNMRスペクトルを示す図である。クリオプローブを備えるVarian Unity INOVA 600 MHzスペクトロメーターを使用して、40°でスペクトルを収集した。

【図16A】親株M124(図A)および $\text{A}1\text{g}3$ ノックアウト株4A(図B)の酸性画分を示す図である。2個のリン酸ユニットを有するN-グリカンに星印を付ける。

【図16B】親株M124(図A)および $\text{A}1\text{g}3$ ノックアウト株4A(図B)の酸性画分を示す図である。2個のリン酸ユニットを有するN-グリカンに星印を付ける。

【図17】フラスコ中で5日間培養したT. reesei A1g3ノックアウト株4Aの上清由来中性N-グリカンを示す図である。

【図18】発酵槽中で10日間培養したT. reesei A1g3ノックアウト株4Aの上清由来中性N-グリカンを示す図である。

【図19】GnTI反応混合物のMALDIスペクトルを示す図である。GnTIは、54%のアクセプターを、追加的な $\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ を有する生成物に変換した。

【図20】GnTIの発現のウエスタンプロット分析を示す図である。12% SDS-PAGEゲルに試料を泳動させ、ニトロセルロースメンブラン上にプロッティングした。マウス-HISモノクローナル抗体を用いてメンブラン上からヒスチジンタグ付きGnTIを検出した。左側に示した数字は、分子量マーカータンパク質のサイズ(kDa)である。

【図21】GnTI反応混合物のMALDIスペクトルを示す図である。83%のアクセプター(m/z 913.340)が生成物に変換された(m/z 1136.433)。

【図22】GnTI/GnTI融合タンパク質について観測されたGnTI活性を示す図である。

【図23】 $\text{A}1\text{g}3$ ローカスへのターゲティングにより得られたGnTI/GnTIIT. reeseiトランスフォーマント中に存在するN-グリカンを示す図である。

【図24】GnTI/GnTI融合タンパク質の酵素活性試験から精製された反応混合物のMALDIスペクトルを示す図である。

【図25】1-2, 3, 4, 6-N-アセチルグルコサミニダーゼ反応混合物のスペクトルを示す図である。

【図26】1-4GalT反応混合物のMALDIスペクトルを示す図である。

【図27A】3(A)、5(B)および7(CおよびD)日目のT. reesei M127 pTTv110トランスフォーマント($\text{A}1\text{g}3$ ローカス中にgntII/I)の上清タンパク質から観測されたN-グリカンの図である。クローン17Aは7日目に最大のG0を製造した。(E)7日間振盪フラスコ中で培養したT. reesei M127株GnTIIT.トランスフォーマントクローン17A由来の上清タンパク質の中性N-グリカンの質量スペクトル。星印を付けたシグナルは、培地起源である。

【図27B】3(A)、5(B)および7(CおよびD)日目のT. reesei M127 pTTv110トランスフォーマント($\text{A}1\text{g}3$ ローカス中にgntII/I)の上清タンパク質から観測されたN-グリカンの図である。クローン17Aは7日目に最大のG0を製造した。(E)7日間振盪フラスコ中で培養したT. reesei M127株GnTIIT.トランスフォーマントクローン17A由来の上清タンパク質の中性N-グリカンの質量スペクトル。星印を付けたシグナルは、培地起源である。

【図27C】3(A)、5(B)および7(CおよびD)日目のT. reesei M127 pTTv110トランスフォーマント($\text{A}1\text{g}3$ ローカス中にgntII/I)の上清タンパク質から観測されたN-グリカンの図である。クローン17Aは7日目に最大のG0を製造した。(E)7日間振盪フラスコ中で培養したT. reesei M127株GnTIIT.トランスフォーマントクローン17A由来の上清タンパク質の中性N-グリカンの質量スペクトル。星印を付けたシグナルは、培地起源である。

【図27D】3(A)、5(B)および7(CおよびD)日目のT. reesei M127 p T T v 110 トランスフォーマント (alg 3 ローカス中に gntII / I) の上清タンパク質から観測されたN-グリカンの図である。クローン17Aは7日目に最大のG0を製造した。(E)7日間振盪フラスコ中で培養したT. reesei M127株GnTII / I トランスフォーマントクローン17A由来の上清タンパク質の中性N-グリカンの質量スペクトル。星印を付けたシグナルは、培地起源である。

【図27E】3(A)、5(B)および7(CおよびD)日目のT. reesei M127 p T T v 110 トランスフォーマント (alg 3 ローカス中に gntII / I) の上清タンパク質から観測されたN-グリカンの図である。クローン17Aは7日目に最大のG0を製造した。(E)7日間振盪フラスコ中で培養したT. reesei M127株GnTII / I トランスフォーマントクローン17A由来の上清タンパク質の中性N-グリカンの質量スペクトル。星印を付けたシグナルは、培地起源である。10

【図28A】どちらもダイズトリプシン阻害剤存在下で培養したT. reesei M202 GnTII / I トランスフォーマントクローン(A)9A-1および(B)31A-1に由来のリツキシマブの中性N-グリカン、および振盪フラスコ中でダイズトリプシン阻害剤存在下にて5日間培養した(C)T. reesei M202株GnTII / I トランスフォーマントクローン9A-1から精製したリツキシマブの中性N-グリカンの質量スペクトルを示す図である。

【図28B】どちらもダイズトリプシン阻害剤存在下で培養したT. reesei M202 GnTII / I トランスフォーマントクローン(A)9A-1および(B)31A-1に由来のリツキシマブの中性N-グリカン、および振盪フラスコ中でダイズトリプシン阻害剤存在下にて5日間培養した(C)T. reesei M202株GnTII / I トランスフォーマントクローン9A-1から精製したリツキシマブの中性N-グリカンの質量スペクトルを示す図である。20

【図28C】どちらもダイズトリプシン阻害剤存在下で培養したT. reesei M202 GnTII / I トランスフォーマントクローン(A)9A-1および(B)31A-1に由来のリツキシマブの中性N-グリカン、および振盪フラスコ中でダイズトリプシン阻害剤存在下にて5日間培養した(C)T. reesei M202株GnTII / I トランスフォーマントクローン9A-1から精製したリツキシマブの中性N-グリカンの質量スペクトルを示す図である。30

【図29】スペーサーが改変されたGnTII / GnTI融合体の反応混合物のMALDIスペクトルを示す図である。図(A)に、3×G4Sスペーサーで改変されたGnTI / GnTIの反応混合物を示す。アクセプターの36%が、2個の追加的なHexNAcを有する生成物に変換された。図(B)に、2×G4Sスペーサーで改変されたGnTI / GnTIの反応混合物を示す。アクセプターの38%が2個の追加的なHexNAcを有する生成物に変換された。GnTI生成物Hex3HexNAc2の[M+Na]+シグナルについてのm/zの計算値(m/z計算値933.318)は、どちらのスペクトルからも検出されなかった。それは、全てのGnTI生成物がHex3HexNAc3に直接変換されたからであった(m/z計算値1136.318)。

【図30A】GnTII / Iスペーサー変異体細胞ペレット(A)、および上清(B)のウエスタンプロットを示す図である。レーン1:GnTII陽性対照、2:GY3偽株、3:GY7-2野生型GnTII / I、4:GY32-5 3×G4Sスペーサー、5:GY32-9 3×G4Sスペーサー、6:GY33-7 2×G4Sスペーサー、7:GY33-8 2×G4Sスペーサー、8:GY49-3 CBHIスペーサーおよび9:GY50-10 EGIVスペーサー。40

【図30B】GnTII / Iスペーサー変異体細胞ペレット(A)、および上清(B)のウエスタンプロットを示す図である。レーン1:GnTII陽性対照、2:GY3偽株、3:GY7-2野生型GnTII / I、4:GY32-5 3×G4Sスペーサー、5:GY32-9 3×G4Sスペーサー、6:GY33-7 2×G4Sスペーサー、7:GY33-8 2×G4Sスペーサー、8:GY49-3 CBHIスペーサーおよび9:GY50-10 EGIVスペーサー。50

: G Y 5 0 - 1 0 E G I V スペーサー。

【図31A】プロテアーゼ阻害剤存在下で3日(A)の発現期および4日(B)の発現期後に発現した、上清由来の野生型GnTI I / Iおよびスペーサー変異体のGnT活性を示す図である。x軸は、試料の正体を示し(wt = 野生型、_1、_2 = スペーサー変異体の該当クローン)、y軸は、形成した生成物のパーセンテージを示す(GnTI反応生成物とGnTI I反応生成物を合計した)。

【図31B】プロテアーゼ阻害剤存在下で3日(A)の発現期および4日(B)の発現期後に発現した、上清由来の野生型GnTI I / Iおよびスペーサー変異体のGnT活性を示す図である。x軸は、試料の正体を示し(wt = 野生型、_1、_2 = スペーサー変異体の該当クローン)、y軸は、形成した生成物のパーセンテージを示す(GnTI反応生成物とGnTI I反応生成物を合計した)。

【図32】上清、細胞および溶解液中のGnTI I / I融合タンパク質(野生型スペーサーを有する)のGnT活性を示す図である。GnTI生成物とGnTI I生成物を合計した。

【図33A】(A)上清、(B)細胞、および(C)溶解液中のGnTI I / I野生型およびスペーサー変異体のGnT活性を示す図である。

【図33B】(A)上清、(B)細胞、および(C)溶解液中のGnTI I / I野生型およびスペーサー変異体のGnT活性を示す図である。

【図33C】(A)上清、(B)細胞、および(C)溶解液中のGnTI I / I野生型およびスペーサー変異体のGnT活性を示す図である。

【図34】5日目の親株M124およびGnT1トランスフォーマントの中性N-グリカンのスペクトル例を示す図である。Gn付加を有するシグナル(m/z 1460)に矢印を付ける。(pTTv11はcbh1プロモーターを有し、pTTv13はgpdAプロモーターを有する)。

【図35】3日目および5日目の4個の陽性GnT1トランスフォーマント中のMan5およびGn1Man5の量を示す図である。内部較正物質(Hex2HexNAc4、2pmol)に対して定量を行った。

【図36】親M124株およびGnT1トランスフォーマントのリン酸化N-グリカンのスペクトル例を内部較正物質(NeuAcHex4HexNAc2、0.5pmol)と共に示す図である。GnT1生成物に矢印を付ける。

【図37A】5日目の異なるGnTI I株/クローンの中性N-グリカンの図である。図(A)にpTTv140クローンを示す。図(B)にpTTv142クローンを示す。図(C)にpTTv143クローンを示す。図(D)にpTTv141クローンを示す。

【図37B】5日目の異なるGnTI I株/クローンの中性N-グリカンの図である。図(A)にpTTv140クローンを示す。図(B)にpTTv142クローンを示す。図(C)にpTTv143クローンを示す。図(D)にpTTv141クローンを示す。

【図37C】5日目の異なるGnTI I株/クローンの中性N-グリカンの図である。図(A)にpTTv140クローンを示す。図(B)にpTTv142クローンを示す。図(C)にpTTv143クローンを示す。図(D)にpTTv141クローンを示す。

【図37D】5日目の異なるGnTI I株/クローンの中性N-グリカンの図である。図(A)にpTTv140クローンを示す。図(B)にpTTv142クローンを示す。図(C)にpTTv143クローンを示す。図(D)にpTTv141クローンを示す。

【図38A】3、5、および7日目の異なるGnTI I株/クローンおよび親株M198の中性N-グリカンの一例を示す図である。図(A)にクローン1-117Aを示す。図(B)にクローン3-11Aを示す。図(C)にクローン30Aを示す。図(D)に親株M198を示す。

【図38B】3、5、および7日目の異なるGnTI I株/クローンおよび親株M198の中性N-グリカンの一例を示す図である。図(A)にクローン1-117Aを示す。図(B)にクローン3-11Aを示す。図(C)にクローン30Aを示す。図(D)に親株M198を示す。

10

20

30

40

50

【図38C】3、5、および7日目の異なるGnTI株/クローンおよび親株M198の中性N-グリカンの一例を示す図である。図(A)にクローン1-117Aを示す。図(B)にクローン3-11Aを示す。図(C)にクローン30Aを示す。図(D)に親株M198を示す。

【図38D】3、5、および7日目の異なるGnTI株/クローンおよび親株M198の中性N-グリカンの一例を示す図である。図(A)にクローン1-117Aを示す。図(B)にクローン3-11Aを示す。図(C)にクローン30Aを示す。図(D)に親株M198を示す。

【図39】T. reesei M198株およびGnTIクローン3-17Aのタンパク質が分離されたメンプランを示す図である。50kDaタンパク質に矢印を付ける。

10

【図40A】親株M198(A)およびGnTIクローン3-17A(B)の総分泌タンパク質と個別の分泌タンパク質(一つまたは複数)を対比した柱状図である。

【図40B】親株M198(A)およびGnTIクローン3-17A(B)の総分泌タンパク質と個別の分泌タンパク質(一つまたは複数)を対比した柱状図である。

【図41】発酵槽培養した3~7日目のGnTI M329株、および5日目のM329株の振盪フラスコ培養物の柱状図である。

【図42-1】T. reesei ALG3およびALG3ホモログの複数アミノ酸配列のアライメントを示す図である。

【図42-2】T. reesei ALG3およびALG3ホモログの複数アミノ酸配列のアライメントを示す図である。

20

【図42-3】T. reesei ALG3およびALG3ホモログの複数アミノ酸配列のアライメントを示す図である。

【0023】

詳細な説明

本発明は、N-アセチルグルコサミニルトランスクエラーゼ活性を有するリコンビナントタンパク質であって、アクセプター性グリカンの末端Man 3残基へのN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の転移を触媒し、かつ末端Man 6残基へのN-アセチルグルコサミンの転移を触媒するリコンビナントタンパク質であって、少なくとも2種の異なる酵素由来の触媒ドメインを含有するリコンビナントタンパク質に関する。

【0024】

30

いくつかの態様では、本発明のリコンビナントタンパク質は、2個の触媒ドメインを含み、ここで、一方の触媒ドメインはN-アセチルグルコサミニルトランスクエラーゼI(GnTI)活性を有し(例えば末端Man 3残基と反応する)、他方の触媒ドメインは、N-アセチルグルコサミニルトランスクエラーゼII(GnTII)活性を有する(例えば末端Man 6残基と反応する)。

【0025】

いくつかの態様では、本発明のリコンビナントタンパク質は、本質的に連続的に起こる反応を触媒する。例えば、本発明のリコンビナントタンパク質は、最初にアクセプター性グリカンの末端Man 3残基へのGlcNAcの転移を触媒し、次に末端Man 6残基へのGlcNAcの転移を触媒する場合がある。一態様では、本質的に連続的な反応は、逆の順序の2反応の少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、または少なくとも100倍効果的である。ある態様では、連続反応は、GlcNAcが末端Man 3残基にまだ転移されていないならば、本質的にまたは絶対的にGlcNAcが末端Man 6残基に転移できないことを意味する。特定の一態様では、アクセプター性グリカンは、GlcNAc 2Man 3枝を含有する。

40

【0026】

いくつかの態様では、リコンビナントタンパク質は、場合により分枝アクセプター性グリカン中のMan 3およびMan 6残基の両方と特異的に反応するが、他のMan構造と、例えばMan ベンジルおよび/またはMan Ser/Thr-ペプチドを有

50

するMan 単糖コンジュゲートと実質的または絶対的に反応しない。実質的でない反応性は、好ましくは、末端Man 3およびMan 6残基を有するアクセプター性グリカンの0.1mM反応濃度の場合のVmaxの10%未満、8%未満、6%未満、4%未満、2%未満、1%未満、または0.1%未満である。特定の一態様では、リコンビナントタンパク質は、アクセプター性グリカンの末端Man 3（好ましくはGnTI反応として）および末端Man 6残基（好ましくはGnTII反応として）と実質的に類似の反応性を有する。好ましくは、どちらの触媒活性も、同条件下で反応効率が他方の触媒活性の10倍、5倍、3倍または2倍以下である。

【0027】

特定の一態様では、末端Man 3およびMan 6へのGlcNAcの転移は、Man 3グリカンの少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、または少なくとも95%が、2個の末端GlcNAcを有するグリカンに変換されることを引き起す。反応有効性は、本明細書開示の実施例に記載のようにin vitroまたはin vivoアッセイにより測定することができる。GlcNAc転移反応の有効性は、本質的に実施例に記載されたように、アクセプターが0.1mM濃度およびドナーが飽和濃度での最大反応速度Vmaxとして測定することができる。特定の一態様では、反応の有効性は、アミノ酸、ペプチド、またはポリペプチドに結合したMan 3アクセプター性グリカンを用いて測定される。

【0028】

本開示は、さらに、複合N-グリカンを製造する方法であって、ホスト細胞を提供するステップ、ここで、ホスト細胞は、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインを含有する融合タンパク質をコードする核酸を含有する、そして融合タンパク質が発現されるようにホスト細胞を培養するステップを含む、方法に関し、ここで、融合タンパク質は、アクセプター性グリカンの末端Man 3残基へのN-アセチルグルコサミンの転移および末端Man 6残基へのN-アセチルグルコサミンの転移を触媒して複合N-グリカンを製造する。

【0029】

本発明は、また、野生型糸状菌細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルのalg3遺伝子を有する糸状菌細胞に関し、ここで、糸状菌細胞は、本発明のリコンビナントタンパク質を含有する。

【0030】

定義

本明細書に使用するような「リコンビナントタンパク質」は、リコンビナント核酸から生成した任意のタンパク質を表す。本明細書に使用するような「リコンビナント核酸」は、少なくとも以下の一つが当てはまる核酸ポリマーを表す：（a）核酸配列は所与のホスト細胞と異質である（すなわちその細胞から自然に見出されない）；（b）配列は、所与のホスト細胞から自然に見出されうるが、不自然な（例えば予想よりも多い）量で存在するか、または天然発現レベルよりも多いもしくは少ないレベルで発現され；あるいは（c）核酸配列は、自然界で相互に同じ関係で見出されない2個以上の部分配列を含む。例えば、事例（c）に関して、リコンビナント核酸配列は、新しい機能性核酸を作製するために配列された無関係な遺伝子由来の2個以上の配列を有する。別の例では、リコンビナント核酸配列は、自然には相互に隣接して見出されないプロモーター配列および遺伝子コード配列を含有する。

【0031】

本明細書に使用するような「N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性」は、N-アセチルグルコサミニル残基（GlcNAc）をアクセプター性グリカンに転移する酵素の活性を表す。典型的には、この活性を有する酵素は、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（GlcNAcトランスフェラーゼ）である。ある態様では、GlcNAcトランスフェラーゼは真核生物性である。ある態様では、GlcNAcトランス

10

20

30

40

50

フェラーゼは、G 1 c N A c 残基の1位から末端マンノース残基に - 結合を形成する哺乳動物酵素である。ある態様では、G 1 c N A c トランスフェラーゼは、2 - 結合G 1 c N A c 残基(一つまたは複数)をグリカンの、特にN結合型グリカンの、末端マンノース残基2位に転移する 2 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼである。ある態様では、2 - G 1 c N A c トランスフェラーゼは、G n T I 活性およびG n T I I 活性を有する酵素である。G n T I 活性は、M a n 3 枝にG 1 c N A c 残基を転移する。M a n 3 枝は、M a n 3 G 1 c N A c 2 またはM a n 3 またはM a n 5 G 1 c N A c 2 またはM a n 5 などの、N結合型グリカンコア構造のM a n 3 (R - M a n 6) M a n 枝でありうる。G n T I 酵素は、哺乳動物酵素、植物酵素、または低級真核生物酵素でありうる。G n T I I 活性は、N結合型グリカンコア構造のM a n 6 (G 1 c N A c 2 M a n 3) M a n 枝などのM a n 6 枝にG 1 c N A c 残基を転移する。そのようなM a n 6 枝の一例は、G 1 c N A c 1 M a n 3 G 1 c N A c 2 である。

【0032】

本明細書に使用するような「N - アセチルグルコサミン」は、N - アセチルグルコサミン残基(G 1 c N A c)を表す。G 1 c N A cは、グリカン構造の部分でありうる。アミン基は2位にあり、D - 配置を有し、残基としてピラノース構造を有する。または、それは、2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - D - グルコピラノース(D - G 1 c p N A c)と称されることもある。G 1 c N A cは、また、遊離還元单糖でありうる(すなわちグリカンの部分ではない)。

【0033】

本明細書に使用するような「M a n」は、マンノース残基を表す。「末端M a n 3」または「末端M a n 6」は、非還元末端の末端残基が別の一つまたは複数の单糖残基により置換されていないマンノースを表す。

【0034】

本明細書に使用するような「グリカン」は、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、脂質または還元末端コンジュゲートなどの担体に結合することができるオリゴ糖鎖を表す。ある態様では、本発明は、アスパラギン残基(A s n)の側鎖アミド性窒素にN結合により - A s n - X x x - S e r / T h r - (ここで、X x xはP r o以外の任意のアミノ酸残基である)などのポリペプチド性Nグリコシル化部位にコンジュゲーションしたN結合型グリカンに関する。本発明は、さらに、真核細胞小胞体におけるN結合型グリカンの前駆体である、ドリコールホスホオリゴ糖(D o 1 - P - P - O S)前駆体脂質構造の部分としてのグリカンに関する場合がある。前駆体オリゴ糖は、それらの還元末端からドリコール脂質上の2個のリン酸残基に結合している。例えば、3 - マンノシルトランスフェラーゼA 1 g 3は、N - グリカンのD o 1 - P - P - オリゴ糖前駆体を改変する。一般に、本明細書記載のグリカン構造は、非還元残基が一つまたは複数の他の单糖残基によって改変されていない末端グリカン構造である。

【0035】

本明細書に使用するような「糖タンパク質」は、グリカンに結合したペプチドまたはポリペプチドを表す。グリカンは、共翻訳修飾または翻訳後修飾でペプチドまたはポリペプチドに結合されうる。

【0036】

本明細書に使用するような「糖脂質」は、グリカンに結合している脂質を表し、糖脂質にはグリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、およびグリコシルホスファチジルイノシトールが含まれる。

【0037】

本開示にわたり使用するような糖脂質および糖質という命名法は、本質的に、I U P A C - I U B 生化学命名法委員会による勧告に従う(例えばCarbohydrate Res. 1998, 312, 167; Carbohydrate Res. 1997, 297, 1; Eur. J. Biochem. 1998, 257, 29)。G a 1 (ガラクトース)、G 1 c (グルコース)、G 1 c N A c (N - アセチルグルコサミン)、G a 1 N A c (N - アセチルガラクトサミン)、M a n (マンノース)、およびN e u 5

10

20

30

40

50

A c は D - 配置であり、 F u c は L - 配置であり、全ての单糖ユニットはピラノース形態であることが仮定される (D - G a l p 、 D - G l c p 、 D - G l c p N A c 、 D - G a l p N A c 、 D - M a n p 、 L - F u c p 、 D - N e u p 5 A c) 。アミン基は、天然ガラクトースおよびグルコサミンについて定義された通り、 G a l N A c または G l c N A c の 2 位にある。グリコシド結合は、一部は短い方の命名で、一部は長い方の命名で示され、シアル酸 S A / N e u 5 X 残基の結合 3 および 6 は、それぞれ 2 - 3 および 2 - 6 と同じことを意味し、ヘキソース单糖残基について 1 - 3 、 1 - 6 、 1 - 2 、 1 - 3 、 1 - 4 、および 1 - 6 は、それぞれ 3 、 6 、 2 、 3 、 4 、および 6 と短縮することができる。ラクトサミンは、 I I 型 N - アセチルラクトサミン、 G a l 4 G l c N A c 、および / または I 型 N - アセチルラクトサミンを表す。 G a l 10 3 G l c N A c およびシアル酸 (S A) は、 N - アセチルノイラミン酸 (N e u 5 A c) 、 N - グリコリルノイラミン酸 (N e u 5 G c) 、または N e u 5 X の誘導体を含む任意の他の天然シアル酸を表す。シアル酸は、 N e u N X または N e u 5 X と呼ばれる (ここで、好ましくは、 X は A c または G c である) 。場合により、 N e u 5 A c / G c / X は N e u N A c / N e u N G c / N e u N X と呼ばれうる。

【 0038 】

本発明のリコンビナントタンパク質

本明細書における発明は、 N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を有するリコンビナントタンパク質であって、アクセプター性グリカンの末端 M a n 3 残基への N - アセチルグルコサミンの転移を触媒し、かつ末端 M a n 6 残基への N - アセチルグルコサミンの転移を触媒するリコンビナントタンパク質に関する。本発明のリコンビナントタンパク質には、非限定的に、 N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を有する完全長タンパク質、 N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質フラグメント、 N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を有する触媒ドメイン、および N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を有する融合タンパク質が含まれうる。本発明の単一のリコンビナントタンパク質は、 N - アセチルグルコサミンの両方の転移を触媒する能力を有する。末端 M a n 3 残基への N - アセチルグルコサミンの転移は、末端 M a n 6 残基への N - アセチルグルコサミンの転移の前または後に起こりうる。または、転移は同時に起こりうる。 20 30

【 0039 】

アクセプター性グリカンは、アミノ酸、ペプチド、またはポリペプチドなどの分子に結合している場合がある。ある態様では、アミノ酸はアスパラギン残基である。アスパラギン残基は、側鎖アミドからのアミノグリコシド結合 (生物学的哺乳動物ポリペプチド N - グリカン結合構造) の場合があり、ジペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドなどのペプチド鎖の部分の場合がある。グリカンは、還元末端誘導体、例えば還元性 G l c N A c または M a n の N 、 O 、または C 結合型誘導体、好ましくはグリコシド誘導体、例えばアミノ酸、アルキル、ヘテロアルキル、アシル、アルキルオキシ、アリール、アリールアルキル、およびヘテロアリールアルキルの群より選択される、あるグリカン結合型構造を有するスペーサーまたは末端有機残基などでありうる。スペーサーは、さらに、多価担体または固相に結合している場合がある。ある態様では、アルキル含有構造には、メチル、エチル、プロピル、および C 4 - C 2 6 アルキル、グリセロ脂質、リン脂質、ドリコール - リン脂質およびセラミドなどの脂質、ならびに誘導体が含まれる。還元末端は、また、第二級アミン結合または誘導体構造への還元アミノ化により誘導体化することができる。ある担体には、 (ポリ) ペプチド、多糖、例えばデキストラン、セルロース、アミロースもしくはグリコサミノグリカンなどの生体高分子またはオリゴマー、ならびにポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド (例えばナイロンもしくはポリスチレン) 、ポリアクリルアミド、およびポリ乳酸を含めたプラスチック、 P A M A M 、 Starburst もしくは Starfish デンドリマーなどのデンドリマー、またはポリリシンおよびポリエチレングリコール (P E G) などのポリアルキルグリコールなどの他の有機ポリマーまたはオリゴマーが含まれる。固相には、マイクロタイターウェル、シリカ粒子、ガラス、金属 (鋼、金、 40 50)

および銀が含まれる)、ポリスチレンまたは樹脂ビーズ、ポリ乳酸ビーズ、多糖ビーズまたは有機スペーサー含有磁気ビーズなどのポリマービーズが含まれる。

【0040】

ある態様では、アクセプター性グリカンは、異種ポリペプチドに結合している。本明細書に使用するような「ペプチド」および「ポリペプチド」は、複数の連続重合アミノ酸残基を含むアミノ酸配列である。本発明のために典型的には、ペプチドは、最大50個のアミノ酸残基を含む分子であり、ポリペプチドは、50個よりも多いアミノ酸残基を含む。ペプチドまたはポリペプチドは、改変アミノ酸残基、コドンによってコードされない天然アミノ酸残基、および非天然アミノ酸残基を含みうる。本明細書に使用するような「タンパク質」は、任意のサイズのペプチドまたはポリペプチドを表しうる。「異種ポリペプチド」という用語は、所与のホスト細胞中に自然には見出されず、所与のホスト細胞に内因性でないポリペプチドを表す。ある態様では、異種ポリペプチドは、治療用タンパク質である。治療用タンパク質には、例えば、モノクローナル抗体、エリスロポイエチン、インターフェロン、成長ホルモン、酵素、または凝固因子が含まれる。例えば、アクセプター性グリカンは、リツキシマブなどの治療用タンパク質に結合している場合がある。

【0041】

アクセプター性グリカン

ある態様では、アクセプター性グリカンの構造は、以下の構造 $[R_1]_y Man_3 ([R_2]_z Man_6) Man \{ 4 GlcNAc(Fuc_x)_n [4 GlcNAc]_m \}_q$ (式中、q、y、z、nおよびmは、0または1であり；xは、随意のフコース残基の結合位置3または6であり；R1はGlcNAc、好ましくはGlcNAc2であり；R2は分枝構造Man3(Man6)である)を有し、但し、zが1の場合、yは0であり、zが0の場合、yは0または1である。()は、存在または不在のいずれかである規則的N-グリカンコア構造中の枝を定義する。[]および{}は、直鎖配列中に存在または不在のいずれかであるグリカン構造の一部を定義する。zが0でyが0の場合、その構造はMan3グリカンであり、zが0でありyが1である場合、その構造はGlcNAcMan3グリカンである。yが0でありzが1である場合、グリカンはMan5グリカンである。アクセプター性グリカンは、好ましくは還元末端GlcNAcからAsn残基に-グリコシド結合している場合がある。一態様では、アクセプター性グリカンは、ポリペプチド結合型N-グリカン(式中、mおよびqは1である)であり、アクセプター構造は、 $[R_1]_y Man_3 ([R_2]_z Man_6) Man_4 GlcNAc(Fuc_x)_n 4 GlcNAc$ の誘導体を含有する。場合による誘導体には、GlcNAcまたはキシロースなどの单糖残基による置換が含まれる。

【0042】

アクセプター性グリカンは、Man3、GlcNAcMan3、またはMan5である。ある態様では、アクセプター性グリカンは、Man3またはGlcNAcMan3である。Man3は、Man3またはMan6残基の少なくとも一方を含むトリマンノシリグリカンであり、好ましくはMan3(Man6)Manなどの分枝オリゴ糖である。他の特定のMan3オリゴ糖は、Man3(Man6)Man、Man3(Man6)Man4GlcNAc、およびポリペプチド結合型Man3(Man6)Man4GlcNAc4GlcNAcである。加えて、ホスト細胞に応じて、グリカンは、Man3(Man6)Man4GlcNAc4(Fucx)nGlcNAc [式中、xは3または6であり、nは0または1であり、これは、Man3GlcNAc2(n=0)およびMan3GlcNAc2Fuc(n=1)のように末端マンノース構造および還元末端組成を示す单糖組成式によっても表現される]のように、Manおよび/またはGlcNAc残基にFuc、XylまたはGlcNAcを含有する。ある態様、特にポリペプチド結合構造を有する態様では、Man3構造はMan3(Man6)Man4GlcNAc4(Fuc6)nGlcNAcである。ある態様では、ポリペプチド結合型GlcNAcMan3構造は、GlcNAc2Man3(Man6)Man4GlcNAc4(Fuc6)nGlcNAc [单糖組

10

20

30

40

50

成式 $G1cNAcMan3G1cNAc2$ ($n = 0$) および $G1cNAcMan3G1cNAc2Fuc$ ($n = 1$) によって表現される] である。ある態様では、ポリペプチド結合型 $Man5$ 構造は、 $Man3\{Man3(Man6)Man6\}Man4G1cNAc4(Fuc6)_nG1cNAc$ である [式中、{}および()は枝を示し、nは0または1であり、これは、単糖組成式 $Man5G1cNAc2$ ($n = 0$) および $Man5G1cNAc2Fuc$ ($n = 1$) によって表現される]。

【0043】

したがって、ある $Man3$ グリカンは、次式： $Man3(Man6)Man4G1cNAc(Fucx)_nG1cNAc$ [式中、nは0または1であって、分子の部分の存在または不在を示し、xは3または6であり、()は構造中の枝を定義する] による構造を有する。アクセプター性グリカンが $Man3$ である本発明の態様では、リコンビナントタンパク質は、 $Man3$ の末端 $Man3$ および $Man6$ への N - アセチルグルコサミンの転移を触媒する結果、 $G1cNAc2Man3$ 、 $G1cNAc2Man3(G1cNAc2Man6)Man4G1cNAc4(Fucx)_nG1cNAc$ [式中、nは0または1であり、これは、単糖組成式 $G1cNAc2Man3G1cNAc2$ ($n = 0$) および $G1cNAc2Man3G1cNAc2Fuc$ ($n = 1$) によって表現される] が生じる。

【0044】

アクセプター性グリカンが $Man5$ である本発明の態様では、リコンビナントタンパク質は、 $Man5$ の末端 $Man3$ への N - アセチルグルコサミンの転移を触媒する。2個のマンノースが(例えばマンノシダーゼIIにより) $G1cNAcMan5$ から除去されて $G1cNAcMan3$ が形成した後に、リコンビナントタンパク質が末端 $Man6$ への N - アセチルグルコサミンの転移を触媒する結果、 $G1cNAc2Man3$ [構造 $G1cNAc2Man3(G1cNAc2Man6)Man4G1cNAc4(Fucx)_nG1cNAc$ (式中、nは0または1である)を有し、抗体に結合している場合は $G0$ とも呼ばれる] が生じる。

【0045】

N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ触媒ドメインを含有する融合タンパク質 ある態様では、本発明のリコンビナントタンパク質は、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメイン および N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメイン を含有する融合タンパク質である。「融合タンパク質」という用語は、異種アミノ酸に結合したタンパク質またはポリペプチドを含有する任意のタンパク質またはポリペプチドを表す。

【0046】

N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI ($G1cNAc-TI$; $GnTI$; $EC2.4.1.101$) は、反応 $UDP-N - \text{アセチル} - D - \text{グルコサミン} + 3 - (- D - \text{マンノシル}) - - D - \text{マンノシル} - R \xrightarrow{UDP + 3 - (2 - (N - \text{アセチル} - D - \text{グルコサミニル}) - - D - \text{マンノシル}) - - D - \text{マンノシル} - R}$ (式中、Rは、グリカン性アクセプターにおけるN結合型オリゴ糖の残りを表す) を触媒する。N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインは、この反応を触媒することができる、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI酵素の任意の部分である。様々な生物由来のN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI酵素についてのアミノ酸配列は、配列番号1~19に列挙されている。追加的な $GnTI$ 酵素は、CAZyデータベース中のグリコシルトランスフェラーゼファミリー13に列挙されている (cazy.org/GT13_all)。酵素的に特徴づけられた種には、*A. thaliana* A A R 7 8 7 5 7 . 1 (米国特許第6,653,459号)、*C. elegans* A A D 0 3 0 2 3 . 1 (Chen S. et al J. Biol. Chem. 1999;274(1):288-97)、*D. melanogaster* A A F 5 7 4 5 4 . 1 (Sarkar & Schachter Biol. Chem. 2001 Feb;382(2):209-17) ; *C. griseus* A A C 5 2 8 7 2 . 1 (Puthalakath H. et al J. Biol. Chem. 1996 271(44):27818-22) ; *H. sapiens* A A A 5 2 5 6 3 . 1 (Kumar R. et al Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Dec;87(24):9948-52)

10

20

30

40

50

) ; *M. auratus* A A D 0 4 1 3 0 . 1 (Opat As et al. *Biochem J.* 1998 Dec 15;336 (Pt 3):593-8)、(非活性化突然変異体の一例を含む)、ウサギ、*O. cuniculus* A A A 3 1 4 9 3 . 1 (Sarkar M et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jan 1;88(1):234-8)が含まれる。特徴づけられた活性酵素の追加的な例は、cazy.org/GT13_characterizedに見出すことができる。ウサギ G n T I 触媒ドメインの 3 D 構造は、Unligil UM et al. *EMBO J.* 2000 Oct 16;19(20):5269-80 に X 線結晶学により規定された。G n T I についての Protein Data Bank (P D B) 構造は、1 F O 8 、 1 F O 9 、 1 F O A 、 2 A M 3 、 2 A M 4 、 2 A M 5 、 および 2 A P C である。ある態様では、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインは、ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素 (配列番号 1) 、またはその変異体に由来する。ある態様では、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインは、配列番号 1 のアミノ酸残基 8 4 ~ 4 4 5 と少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % 同一の配列を含有する。いくつかの態様では、より短い配列を触媒ドメインとして使用することができる (例えは、ヒト酵素のアミノ酸残基 1 0 5 ~ 4 4 5 またはウサギ酵素のアミノ酸残基 1 0 7 ~ 4 4 7 ; Sarkar et al. (1998) *Glycoconjugate J* 15:193-197) 。G n T I 触媒ドメインとして使用することができる追加的な配列には、ヒト酵素の約 3 0 ~ 4 4 5 番アミノ酸のアミノ酸残基またはヒト酵素のアミノ酸残基 3 0 ~ 1 0 5 から開始し約 4 4 5 番アミノ酸まで連続する任意の C 末端ステムドメイン、あるいは別の G n T I またはその触媒活性変異体もしくは突然変異体の対応する相同配列が含まれる。触媒ドメインは、ステムドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞質ドメインの全てまたは部分などの、酵素の N 末端部分を含みうる。
10
20

【 0 0 4 7 】

本明細書に使用するような「細胞質」は、細胞の細胞質と相互作用するタンパク質の部分を表すために使用される。

【 0 0 4 8 】

N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I (G l c N A c - T I I ; G n T I I ; E C 2 . 4 . 1 . 1 4 3) は、反応 U D P - N - アセチル - D - グルコサミン + 6 - (- D - マンノシル) - - D - マンノシル - R U D P + 6 - (2 - (N - アセチル - - D - グルコサミニル) - - D - マンノシル) - - D - マンノシル - R (式中 、 R は、グリカン性アクセプターにおける N 結合型オリゴ糖の残りを表す) を触媒する。N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインは、この反応を触媒することができる、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素の任意の部分である。様々な生物由来の N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素についてのアミノ酸配列を、配列番号 2 0 ~ 3 3 に列挙する。ある態様では、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインは、ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素 (配列番号 2 0) に由来する。追加的な G n T I I 種は、C A Z y データベース中のグリコシルトランスフェラーゼファミリー 1 6 に列挙されている (cazy.org/GT16_all) 。酵素的に特徴づけられた種には、カエノラブディティス・エレガンス (*C. elegans*) 、ドロソフィラ・メラノガスター (*D. melanogaster*) 、ホモ・サピエンス (*Homo sapiens*) 、ラット・ノルベギグス (*Rattus norvegicus*) 、スス・スクロファ (*Sus scrofa*) の G n T I I が含まれる (cazy.org/GT16_characterized) 。ある態様では、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインは、配列番号 2 1 のアミノ酸残基約 3 0 ~ 約 4 4 7 と少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % 同一の配列を含有する。触媒ドメインは、ステムドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞質ドメインの全てまたは部分などの、酵素の N 末端部分を含みうる。
30
40

【 0 0 4 9 】

ある態様では、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインは、N
50

- アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインに対して N 末端側である。他の態様では、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインは、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインの N 末端側である。「N 末端側」という用語は、参照アミノ酸残基セットに比べて、遊離アミン基 (- NH₂) を有するアミノ酸で終結したポリペプチド末端付近のアミノ酸残基セットの位置づけを表す。

【 0 0 5 0 】

スペーサー

本発明のある態様では、リコンビナントタンパク質は、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインと N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインの間にスペーサーを含有する。「スペーサー」という用語は、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインと N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインを分離している連続アミノ酸であって、それによりスペーサーが触媒ドメインの酵素機能に影響を及ぼさない、任意の配列の任意のいくつかの連続アミノ酸を表す。典型的には、スペーサーは、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 30、少なくとも 40、または少なくとも 50 アミノ酸長である。ある態様では、スペーサーは、ステムドメイン由来の配列を含有する。「ステムドメイン」は、グリコシルトランスフェラーゼまたはグリコシルヒドロラーゼなどのネイティブな酵素の膜貫通ドメインに隣接して位置するタンパク質ドメインまたはそのフラグメントであって、場合によりその酵素を E R / ゴルジ体にターゲティングするかまたは E R / ゴルジ体でのその酵素の貯留を支援するタンパク質ドメインまたはそのフラグメントを表す。ステムドメインは、一般に、第 1 のアミノ酸で開始し、疎水性膜貫通ドメインが続き、触媒ドメインで終止する。例示的なステムドメインには、非限定的に、ヒト G n T I のステムドメイン、ヒト G n T I I についてのアミノ酸残基約 30 ~ 約 83 もしくは約 30 ~ 約 105、または T. reesei K R E 2 についてのアミノ酸残基約 26 ~ 約 106 もしくは約 26 ~ 約 83 が含まれる。スペーサーがステムドメイン由来の配列を含有するある態様では、スペーサーは、ヒト G n T I 配列のアミノ酸 30 ~ 83 番 (配列番号 34) を含む。他の態様では、スペーサーは、配列番号 35 ~ 38 に列挙する任意の配列を含みうる。

【 0 0 5 1 】

適切なスペーサーのさらなる例には、非限定的に、フレキシブルスペーサー 3 × G 4 S (配列番号 118)、フレキシブルスペーサー 2 × G 4 S (配列番号 120)、T. reesei C B H I についてのスペーサー (配列番号 122)；および T. reesei E G I V セルラーゼについてのスペーサー (配列番号 124) が含まれる。

【 0 0 5 2 】

ある態様では、スペーサーの長さは、G n T I のステムドメインの長さとほぼ同じである。ある態様では、長さは、アミノ酸残基約 74 個 ± アミノ酸約 37 個である。例えば、スペーサーの長さは、アミノ酸約 30 個 ~ アミノ酸約 110 個、またはアミノ酸約 35 個 ~ アミノ酸約 100 個、または本明細書記載の実施例に例示するように、アミノ酸 ± 2、3、4、または 5 個である。一態様では、スペーサー長は、G n T I の切断型ステムドメインに対応し、例えば、アミノ酸 25 ~ アミノ酸 104 番から、またはアミノ酸 30 番からアミノ酸 101 番の間から開始し、G n T I ステムドメイン終止部までである。ある態様では、スペーサーは、ヒト G n T I のステムドメインの一部を含む場合があり、それは、アミノ酸 70 番からアミノ酸 87 番の間 (配列番号 34 での番号付けによる)、またはアミノ酸 76 番からアミノ酸 104 番の間に位置するアミノ酸から開始し、またはアミノ酸 30、35、40、45、50、60、70、73、74、75、76、80、83、84、85、86、87、100、101、102、103、または 104 番から開始し、ヒト G n T I ステムドメインの終末部まででありうる。他の態様では、スペーサーは、異種スペーサーペプチドを含む場合があり、それには、真菌スペーサーペプチドおよび/または反復オリゴマースペーサーペプチドが含まれうる。

10

20

30

40

50

【0053】

典型的には、スペーサーは、特異的コンフォメーションを有さない伸長ペプチドであり、高い柔軟性（例えば、GlyおよびAla）、親水性（例えば、SerおよびThr）を可能にするアミノ酸残基、および場合によりコンフォメーションを阻止するためのProを含有する。スペーサーは、グリコシル化されている場合がある。ある態様では、スペーサーは、真菌O-マンノシル化を含めて、O-グリコシル化されている。ある態様では、スペーサーは、タンパク質ドメインを自然に分離するスペーサーなどの、内因性真菌、糸状菌、またはトリコデルマ属 (Trichoderma) のスペーサーペプチドである。スペーサーは、糸状菌（例えばT. reesei）などの真菌の分泌酵素もしくはセルロース分解性酵素、そのフラグメント、またはそのスペーサーの多量体、および/またはそのフラグメントもしくはその突然変異アナログもしくは等価物から得ることができる。天然真菌スペーサーは、二量体性またはオリゴマー性のプロリンおよび/もしくはグリシンおよび/もしくはセリンおよび/もしくはトレオニン、ならびに/またはSer、Thr、Gly、ProもしくはAlaより選択される1~10または1~5個のアミノ酸残基、および場合によりマイナス荷電残基GluもしくはAspまたはプラス荷電残基LysもしくはArgより選択される荷電アミノ酸残基を有するモノマーを含有する反復オリゴマーである。ある態様では、荷電残基はマイナス荷電している。ある態様では、モノマーは、二量体もしくはオリゴマー性アミノ酸残基、ならびに/またはSer、Thr、Gly、ProおよびAlaより選択される複数の単一アミノ酸残基を含有する。ある態様では、オリゴマーは、グリシンの二量体またはオリゴマーと、Ser、Thr、Gly、ProおよびAlaより選択される単一残基とのモノマーを含有する。ある態様では、単一の残基はSerまたはThrである。ある態様では、残基はSerである。ある態様では、反復スペーサーの配列は、{(Yyy)_nXXX}_mである[式中、nは2~10であり、mは2~10であり、XXXおよびYyyは、Ser、Thr、Gly、ProおよびAlaより選択され、但し、XXXおよびYyyは、同じアミノ酸残基ではない]。ある態様では、反復スペーサーは{(Gly)_nXXX}_mである[式中、nは2~10であり、mは2~10であり、XXXは、Ser、Thr、Gly、ProおよびAlaより選択される]。ある態様では、XXXはSerまたはThrである。ある態様では、XXXはSerである。

【0054】

ターゲティングペプチド

ある態様では、本発明のリコンビナントタンパク質は、触媒ドメインに結合したターゲティングペプチドを含む。本明細書に使用するような「結合した」という用語は、ポリペプチドの場合は2個のアミノ酸残基ポリマー、またはポリヌクレオチドの場合は2個のヌクレオチドポリマーが、相互に直接隣り合うようにカップリングされているか、または同じポリペプチドもしくはポリヌクレオチド内であるが介在性のアミノ酸残基もしくはヌクレオチドにより分離されているかのいずれかであることを意味する。本明細書に使用するような「ターゲティングペプチド」は、ホスト細胞内の小胞体 (ER) またはゴルジ装置 (Golgi) にリコンビナントタンパク質を局在化することができるリコンビナントタンパク質の任意の数の連続アミノ酸残基を表す。ターゲティングペプチドは、触媒ドメインに対してN末端側またはC末端側でありうる。ある態様では、ターゲティングペプチドは、触媒ドメインに対してN末端側である。ある態様では、ターゲティングペプチドは、ERまたはゴルジ成分 (Golgi component) への、例えばマンノシダーゼⅠⅡ酵素への結合を提供する。他の態様では、ターゲティングペプチドは、ERまたはゴルジ膜への直接結合を提供する。

【0055】

ターゲティングペプチドの成分は、普通はERまたはゴルジ装置にある任意の酵素に由来しうる。そのような酵素には、マンノシダーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、2型ゴルジタンパク質、ならびにMNN2、MNN4、MN

10

20

30

40

50

N 6、MNN9、MNN10、MNS1、KRE2、VAN1、およびOCH1酵素が含まれる。そのような酵素は、アクレモニウム属 (*Acremonium*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、クリソスボリウムス属 (*Chrysosporium*)、クリソスボリウム・ラクノウェンス (*Chrysosporium lucknowense*)、フィロバシジウム属 (*Filobasidium*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、ジベレラ属 (*Gibberella*)、ヒュミコラ属 (*Humicola*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ムコール属 (*Mucor*)、ミセリオフソラ属 (*Myceliophthora*)、ミロセシウム属 (*Myrothecium*)、ネオカリマスティクス属 (*Neocallimastix*)、ニューロスボラ属 (*Neurospora*)、ペシロミセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ピロミセス属 (*Piromyces*)、シゾフィラム属 (*Schizophyllum*)、タラロミセス属 (*Talaromyces*)、サーモアスカス属 (*Thermoascus*)、チエラビア属 (*Thielavia*)、トリポクラジウム属 (*Tolypocladium*)、およびトリコデルマ属 (*Trichoderma*) 種などの酵母または真菌種に由来しうる。そのような酵素についての配列は、GenBank配列データベースから見出すことができる。
10

【0056】

ある態様では、ターゲティングペプチドは、リコンビナントタンパク質の触媒ドメインの一つと同じ酵素および生物に由来する。例えば、リコンビナントタンパク質がヒトGnTI触媒ドメインを含む場合、リコンビナントタンパク質のターゲティングペプチドはヒトGnTI酵素に由来する。他の態様では、ターゲティングペプチドは、リコンビナントタンパク質触媒ドメインとは異なる酵素および／または生物に由来しうる。
20

【0057】

本発明のターゲティングリコンビナントタンパク質に使用することができる、ERまたはゴルジへのタンパク質のターゲティングに使用するための様々なターゲティングペプチドの例には：ガラクトシルトランスフェラーゼに融合したKre2/Mnt1N末端ペプチド (Schwientek, JBC 1996, 3398)、酵母細胞のERにマンノシダーゼを局在化してMan5を製造するためのHDEL (Chiba, JBC 1998, 26298-304; Callewaert, FEBS Lett 2001, 173-178)、GnTI触媒ドメインに融合したOCH1ターゲティングペプチド (Yoshida et al, Glycobiology 1999, 53-8)、2-マンノシダーゼに融合した酵母Mns1N末端ペプチド (Martinet et al, Biotech Lett 1998, 1171)、GnTIまたは4GalTの触媒ドメインに結合したKre2のN末端部分 (Vervecken, Appl. Environ Microb 2004, 2639-46)、WildtおよびGerngross (Nature Rev Biotech 2005, 119) に総説された様々なアプローチ、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) での完全長GnTI (Kalsner et al, Glycocon. J 1995, 360-370)、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) での完全長GnTI (Kasajima et al, Biosci Biotech Biochem 2006, 2662-8)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) においてC. elegans GnTIに融合した酵母Sec12局在化構造の部分 (Kainz et al 2008)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) においてヒトGnTIに融合した酵母Mnn9のN末端部分 (Kainz et al 2008)、ヒトGnTIに融合したアスペルギルス属 (*Aspergillus*) Mnn10のN末端部分 (Kainz et al, Appl. Environ Microb 2008, 1076-86)、およびT. reeseiでの完全長ヒトGnTI (Maras et al, FEBS Lett 1999, 365-70) が含まれる。
30
40

【0058】

ある態様では、ターゲティングペプチドは、配列番号115または配列番号116のアミノ酸配列を有するKre2/Mnt1(すなわちKre2)ターゲティングペプチドである。

【0059】

ターゲティングペプチドのために使用することができる配列のさらなる例には、下表1に列挙する配列が含まれる。

【0060】

【表 1】

表 1: ターゲティングペプチド。推定上の膜貫通ドメインに下線を付ける。KRE2 では、ゴルジ局在化を可能にするシステムドメインに下線を付け、二重下線を付ける。Other1 および Other02 は推定上のマンノシリ化関連タンパク質である。

相同体	細胞質	膜貫通	内腔	
KRE2 estExt_fgenesh1_pm.C_30039	MASTNARYVR 配列番号 39	<u>YLLIAFFTILVFYF</u> <u>VSN</u> 配列番号 40	<u>SKYEGVDLNKGFTTAPDSTKTPKPPATGDAKDFPLALTPNDP</u> <u>GFNDLvgiAPGPRMNAFTVTLARNSDVWDIARSIRQVEDRFNRRYNY</u> DWVFLNDKPFNTFKVTTSLVSGKTHYGEIAPEHWSFPDWIDQDKA KKVREDMAERKIIYGDSVSYRHMCRFESGFFFRQPLMMNYEYYWRV EPSIELYCDIHYDPFRLMVEQGKKYSFVISLYEYPATIALWESTKKFM KNHPEHIAPDNSMRFLSDDGGETYNNCHFWSNFEIGSLEWLRSKQYI DFFESLDKDGFFYERWGADPVHSIAAGLMLNRSEIHFFNDIAYWHV PFTHCPTGEKTRLDLKCHCDPKENFDWKGSCTSRRFEMNGMDKPE GWENQQD 配列番号 41	10
KRE2 代替ペプチド 1 e_gw1.28.231.1	MAIARPVR 配列番号 42	<u>ALGGLAAILWCFF</u> <u>LY</u> 配列番号 43	QLLRPSSSYNSPGDRYINFERDPNLDPTGEPEGILVRTSDRYAPDAK DTDRASATLLALVRNEEVDDMVASMVLDERTWNSKFNPWTFFNDK PFSEEFKKKTSAVTNATCNYELIPKEHWADPSWIDPAIFEESAABLKK NGVQYANMMSYHQMCRWNSGMFYKHPALKDVRYYWRVEPKVHFF CDVYDYDVFRYMQDNNKTYGFTINLYDDPHTLPTLWPQTAKFADHPN YLHEHSAIKWVIDDARRPQHNREAQGFSTCHFWSNFEVADMEFWRS KVYEDYFEHLDRAGGFFYERWGADPVHSIALGLFEDSSKIHWFRDIG YQHIPFFNCNPNSPKCKGCVTGR LTDGEFLHREDCRPNWFKYAGMG 配列番号 44	20
OCH1 e_gw1.16.371.1	MLNPRR 配列番号 45	<u>ALIAAAFILTVFFLI</u> 配列番号 46	SRSHNSESASTSEPKDAEAEALSAANAQRAAPPPPKPMIDMSG MSTYDKLAYAYEYDIESKFPAYIWQTWRKTPSEGDFEFREQEASWSI EHPGFIHEVITDSVADTLLQLLYGSIPEVLEAYHALPLPVKADLFRLYIL YARGGIYSDIDTYAIRSALEWIPPPQIPKETVGLVIGIEADPDRPDWADW YSRRIQFCQWTIQSKPGHPVLRDIISRTINQTEKKSGKLSAFQGNR VVDLTGPAAWTDIMDYFNDERYFDMENSKGRIDYRNFTGMETSKRV GDVVLPIITSFSPGVGQMGAKDYDDPMASFVKHDFEGTWKPESERHI GEIVQELGEGQGEAPKEQ 配列番号 47	30
OCH1 代替ペプチド 1 fgenesh1_pm.C_s_caffold_13000080	MGMGQCQWSPF RNKVPTQMRRC 配列番号 48	<u>LPLYITVVCVFLVI</u> <u>V</u> 配列番号 49	NFDWILAPNPASVLRREP KAPPLPGSTFPQKIWQTWKVDPLNFDERD LVTARTWTINPGMRYEVVTDANE MAYIEDRYGPNGFDRPDIVEFYK MINLPIIKADLLRYMIMYAE GGIYADIDVETMKPFHRFIPDRYDEKDIDIII GVEIDQPDFKDHPILGKKSMSFCQWTFVARPQQPVMMRLIENIMKWF KTVARDQGVPLGEVQLDFDQVISGTGPSAFTKAMLEEMNRKTKGPKV TWDAFHNLDESKLVGGVLVTVEAFCAGQGHSDSGNHNARNALVKH HFHASNWPSRHPRYKHPAYGQVEDCNWVPECVRKWDEDTSNWDK YSENEQKKILQDIENARLERERQQQALAALP 配列番号 50	

相同体	細胞質	膜貫通	内腔	
MNN9 e_gw1.5.262.1	MARPMGSVRLKK ANPST 配列番号 51	<u>LILGAVLCIFIIIFLV</u> 配列番号 52	SPSSPASASRLSIVSAQHHLSPPTPYQSPRSGAVQGPPPVTYNLN KVTVTSDPVRNQEHIILTPMARFYQEYWDNLLRNYPHELITLGFILP KTKEGNQATSMQKQIQKTQNYGPEKDRFKSIIILRQDFDPAVVSQDE SERHKLANQKARREVMAKARNSSLFTTLLGPSTSWVLWLDADITETAP TLIQDLASHDKPIIVANCFQKYDPESKMAERPYDFNSWQDSETALK MAEQMGPDDILLEGYAEMATYRTLLAYMSTPGGSKDLVPLDGVG TALLVKADVHRDGAMFPPFAFYHLIESEGFAKMAKRLGWQPYGLPNY KVYHYNE 配列番号 53	
MNN9 代替ペプチ ド 1 estExt_GeneWise Plus.C_230146	MLLPKGGLDWRS ARAQIPPTRAL WNAVTRTR 配列番号 54	<u>FILLVGITGLLLLLW</u> 配列番号 55	RGVSTSASEMQSFYCWGPAKPPMEMSPNEHNRWNGHLQTPVIFNH HAPVEVNSSTIEHVDLNPINSTKQAVTKEERILITPLKDAAPYLSKYFE LLAELTYPHRLIDLAFLVSDSTDTLAVLASELDRIQKRPDQIPFHSATV IEKDFGFKLSQNVEERHSFEAQGPRRKAMGRARNYLLYTALKPEHSH VYWRDVIDVDSPTGILEDFIAHDRDILVPNWFHRYRDGVIEGRFDYN SWVESDKGRKLANSLDKVVLAEGYKQYDTGRTYMAKMGDWRENK DVELELDGIGGVNILVKADVRSGINFPCYAFENQAETEGFAKMAKRA GYEVYGLPNYVVWHIDTEEKGGNA 配列番号 56	10
MNN9 代替ペプチ ド 2 estExt_GeneWise Plus.C_400029	MMPRHHSSGSN GYPRADTFEI SPHRFQPRATLPP HRKRKRTAIR 配列番号 57	<u>VGIAVVVILVVLW</u> WFG 配列番号 58	QPRSVASLISLGILSGYDDLKLETVRYYDLSNVQGTARGWEREERILL CVPLRDAEQHLPMPFFSHLKKNFTYPHNLDLAFVSDSKDHTLESLTEH LEAIQADPDKQPYGEISIIEKDFGQKVNVQDVESRHGFAQASRRKLM AQARNWLLSAALRPYHSWVYWRDVDTAPFTILEDLMRHNKDVIP NVWRPLPDWLGEQPYDLNSWQESETALALADTLDEDAIVEGYAE YATWRPHLAYLRDPYGDPMEMEIDGVGGVSILAKAKVFRAGVHFPA FSFEKHAETEGFGKMAKRMHFSVGLPHYTIWHLYEPSVDDIKHME MERERIAREKEEEERKKKEAQIKEFGDANSQWEQDKQQMQDLKLQ DRGGDKAAAAAGVNQGAAAKAAGAMEGQKN 配列番号 59	20
MNN10 fgenesh5_pg.C_s caffold_5000342	MSLSRSPSPVPG GGWSSPGLNINS GRSSPSNAAGSS VSWESAKMRKQG ANGYPSFSTQNQ GFFTRHMRRI SSSLPRFAAGPG NTYAEREKYERG GHSPHAGGGRLR AFLARIGRRLKWR 配列番号 60	<u>ILLPLIICTIVAYY</u> 配列番号 61	GTHEAPGFVHWWRRISMGGGGKEFVIIILGANVGGGMWKGAREW AIERDSVRNKRKYATRWDGYDLEIVDMKTKRYAHEWRESWEKDFIR AAMRKYPKAWEFWWLDLNTYMEPSYSLQRHLFNHLDHVYRDINV FNPLNITHPPTEEYLDAEARSPVGDGNINSVNLMLTQDCSGFNLSFF IRRSAWTEQLLDIWWDPVLYEQKHMWEWEHQDALEQLYRTQPWIR QHTGFLPQRLLNSFPPAACADESGLNNTRIHYNEKDRDFVNMAGCE WGRDCWGEMYHYREFSYWLNRNPWELFKEEIVAVIWYKLTGQRVKL 配列番号 62	30
MNN10 代替ペプ チ ド 1 estExt_GeneWise Plus.C_150339	MHFAYPSRKSSN PPPFRPRSTRLPG LRRSRIKT 配列番号 63	<u>I GIVLFLVLAATLWF</u> F 配列番号 64	SNPRVPRPDPERVPSGRPPVVLTVIDPTQYPNAYLKTIKENREQYAA KHGYEAFIVKAYDYDTQGAPQSWSKLMAMRHALTKECRFVWYLD QDAYIMDMSKSLEEQLLNQRKLESIMKYNPVPVPPDSIIKTFSHLRPDE VDLIVSQDSSGLVAGSVVVRNSQWSKFLLETWMDPLYRSYNFQKAE RHALEHIVQWHPTILSKLALVPQRTLGPYTRTDQGDAYQDGDFVVMF TGCTKSGEQSCETVSASYYQKWSSSL 配列番号 65	40

相同体	細胞質	膜貫通	内腔
MNS1 fgenesh1_pm.C_s caffold_3000175	MIRDPFGIHSKNA FKATALRAARDIK EAATQAGANALE MSFLPKHVPDF GDPSRALEDRAW AALLPMYKDKPYA YAPSMRLRPWWR RRK 配列番号 66	<u>V</u> LMIAAAVMFVL <u>Y</u> VTGFF 配列番号 67	SSGQTEEAKKKASGSAFSWLGLSQERGGVDWDERRKSVVEAFEVW DAYERYAWGKDEFHPISKNGRNMAPKGLGWIIDSLDTMMLMNQTTTR LQHAREWISTSLTDQDQDVNTFETTIRMLGGLLSAHYLSTEFPELAP LTEDDEGAPGEDLYLEKAKDLADRLLSAFESES GIPYASVNIGEYKGP SHSDNGASSTAETTLQLEFKYLAKLTGEKNFWDKVEKVMEVDDN QPEDGLVPIYIATTGEFRGQNIRLGSRGDSYYEYLIKQYLQTNKQEP YEEMWDEALAGVRKHLVTYTEPSEFTIIAERPDGLEHPMSPKMDHLV CFMPGTIALAATGGLTEAEARKLSTWNKKDDDMQLARELMHTCWG MYKYMKTGLAPEIMYFNIPNPPPESAPHQAPAAFDEDPHAEWRKDF VWHSNDVHNLQRQPETVESLFYMWRTGDVKYREWGWDMFKSFVN YAVEDQGGFTSLDANSIPPTPKDNMFSFWLAETLKYMFLSPNDVLP LHKIVLNTEAHPFPRFDGMPLFSTGWKRKPRDGSAKKKATTAATTDA E 配列番号 68
MNS1 代替ペプチ ド 1 estExt_fgenesh1_ pm.C_80182	MARRRYR 配列番号 69	<u>L</u> FMICA AVILFLLY R 配列番号 70	VSQNTWDDSAHYATLRHPPASNPPAAGGESPLKPAAKP EHEHEHEN GYAPESKPKPQSEPKPESKPAPEHAAGGQKSQGKPSYEDDEETGK NPPKSAVIPS DTRLPPDNKVHWRPVKEHF PVSESVISLPTGKPLKVPR VQHEFGVESPEAKSRRVARQ ERVGKEIERAWSGYKKFAWMHDELSP VSAKHRDPFCGWAATLVDSDLTLWIAGLKEQFDEA RAVEQIDFTT RNNIPVFETTIRYLGGLLGA FDVSGGH DGGYPM LLTKA VELAEILM GIF DTPNRMP ILYYQW QPEYASQ PHRAG GSV GIA ELG TLS M E F TR LA QL TS QYK YDA VDR ITD ALI ELQ KQG TSIP GLF PEN LDAS GCN HTA LRSS LEA AQK QMD EDLS NPK ENYR PGK NSK ADP QT VEK QPA KQ NEP VKE AKV P TQ TA RK GK PP F GANG FTAN WDC VPQ GLV VGG YGF QQY HMG GGQ DSAY EYFP KEY LLL GGLES KYQ KLY VDA E A I N WLL YR TDG DW DIL FPA V STAG NPS QDL VAT F EV T H L C I G M Y G L G K I F RE K D L E T A K R L D G C V W A Y Q S T V S G I M P E G S Q V L A C P T L E K C D F N E T L W W E K L D P A K D W R D K Q V A D D K D K A T V G E A L K E T A N S H D A A G G S K A K K G T Q R A D D S M S G A A G G T L C M E F T R L S Q I T G D P K Y Y D A T E R I K Q F Y R F Q N E T T L P G M W P V M M N R E E T M V E S R Y S M G G S A D S L Y E I L V K M P A L L G L D P Q Y P E M A I R A L D T A R D N L L F R P M T E K G D N I L A G N A L V D H G N V Q R I T E M Q H L T C F A G G M Y A M A G K L F K R D D Y V D L G R R P H G F I H V K S R H Y L L R P E A I S V F Y M W R I T G D Q V W R D T A W R M W E N I V R E A E T H A F A I V E D V T R T A S K L T N N Y L L Q T F W L A E T L K Y F Y L I F D D E S A I D L D K W V F N T E A H P F K R P A V 配列番号 71
MNS1 代替ペプチ ド 2 estExt_GeneWise Plus.C_120298	MLNQLQGRVPRR Y 配列番号 72	<u>I</u> ALVAFAFFVAFL <u>W</u> 配列番号 73	SGYDFVPRATVGRFKYVPSSYDW SKAKVYYPVKDMKTLPGTPV TP F P R L Q L R N Q S E A Q D D T T K A R K Q A V K D A F V K S W E A Y K T Y A W T K D Q L Q P L S L S G K E T F S G W A Q L V D A L T W I M D L K D D F F L A V K E A V I D W S K T K D N K V I N L F E T I R Y L G G L I A Y D L S Q E P V L R A K I E L G D T L Y A T F D T P N R P H W L D Y S K A K K G T Q R A D D S M S G A A G G T L C M E F T R L S Q I T G D P K Y Y D A T E R I K Q F Y R F Q N E T T L P G M W P V M M N R E E T M V E S R Y S M G G S A D S L Y E I L V K M P A L L G L D P Q Y P E M A I R A L D T A R D N L L F R P M T E K G D N I L A G N A L V D H G N V Q R I T E M Q H L T C F A G G M Y A M A G K L F K R D D Y V D L G R R P H G F I H V K S R H Y L L R P E A I S V F Y M W R I T G D Q V W R D T A W R M W E N I V R E A E T H A F A I V E D V T R T A S K L T N N Y L L Q T F W L A E T L K Y F Y L I F D D E S A I D L D K W V F N T E A H P F K R P A V 配列番号 74

10

20

30

40

相同体	細胞質	膜貫通	内腔
MNS1 代替ペプチド 3 estExt_GeneWise Plus.C_160228	MLVGRPRLVRNS 配列番号 75	<u>IILTLAISIWHLGL</u> L 配列番号 76	<p>SRPTASALVSASVSASSEWSRLERLMNRGAPLTPYPSNSFDW SAIPFRYPPHNTTHLPPRHQPPPLPRIQHFRGPESPAAKERIKRLKA VKQVFRLAWQAYKGAYWKDALLPISGGGREQFSGWAATLVDALDT LWIMGLREEFDEAVAAVAEDFSGSSTSSRVNIFETNIRYLGGLAAAYDL SGREVLKKAVELGDLIYAGFNTENGMPVDLNFYSAKSGEGLVVES SVSASPGLTSLLEAHLSQVTGDDKYYSAVSQVMDVYQGQNKTRLP GVWPIDVNMRRAKDVVSGSRFTLGGCADSLYEYLPKMHQLLGGEPK YETMSRTFLQAADRHFVFRPMLPGAEEDVLMPGNVNVEDSGEAVL DPETEHLACFVGGMFGLAGRLFSRPDDVETVRLNGCVYAYRAFP TGMMPPERLDLAPCRDRSSRCPWDEEHWLEERAKRPEWEPHLPRG TSAKDPRYLLRPEAIESVFYSYRITGRQEFQTAADMFTAVERGTRT QFANAALDVTRADELQEDYMEFWLAETLKIFYLMFTTPDIISLD DYVLNTEAHPKLKG 配列番号 77</p>
MNS1 代替ペプチド 4 e_gw1.13.279.1	-	<u>MVMLVAIALAWL</u> <u>GCSLL</u> 配列番号 78	<p>RPVDAMRADYLAQLRQETVDMFYHGNSNYMEHAFPEDELRPISCTPL TRDRDNPGRISLNDAALGNYSLTLDSLSTLAILAGGPQNGPYTGPQAL SDFQDGVAEAEVFRHYGDGRSGPSGAGIRARGFDLDSKVQVFETVIRG VGGLLSAHLFAIGELPITGYVPRPEGVAGDDPLELAPIWPNGFRYDG QLLRLALDLSERLLPAFYPTGIPYPRVNLRSGIPFYVNSPLHQNLGEA VEEQSGRPEITETCSAGAGSLVLEFTVLSRLTG DARFEQA KRAFW VWHRRSEIGLIGNGIDAERGLWIGPHAGIGAGMDSFFEYALKSHILLS GLGMPNASTSRRQSTTSWLDPNSLHPPPEMHTSDAFLQAWHQAH ASVKRYLYTDRSHFPYYSNNHRATGQPYAMWIDSLGA FYPGLLAG EVEEAIEANLVYTALWTRY SALPERWSVREGNVEAGIGWWPGRPEFI ESTYHIYRATRDPWYLHVGEMLVRDIRRRCYAE CGWAGLQDVQTGE KQDRMESFFLGETAKYMYLLFDPDHPLNKLDAAVYFTTEGHPLIIPKS KRGSGSHNRQDRARKAKKSRDVAVYTYDESFTNSCPAPRPPSEHH LIGSATAARPDLSVSRSRFTDLYRTPNVHGLEK VEMRDKKGRV/V RATSNTIFPWTLPPAMLPENGTCAPPERIISLIEFPANDITSGITSRF GNHLSWQTHLGPTVNILEGRLQLEQVSDPATGEDKWRITHIG NTQLGRHETVFFHAEHVRHLKDEVFSCRRRDAVEIELLVDKPSDTN NNNTLASSDDVVVDAKAEQDGMLADDGDTLNAETLSSNSLFQSL LRAVSSVFEVYTAIPESDPSAGTAKVYSFDAYTSTGPGAYPMPSI SDTPIPGNPFYNFRRNPASNFPWSTVFLAGQACEGPLPASAPREHQVI VMLRGGCSFSRKLDNIPSPSPHDRALQLVVLDEPPPPPPPPANDR RDVTRPLLDTEQTTPKGMKRLHGIPMVLVRAARGDYELFGHAIGVG MRRKYRVESQGLVVENAVL 配列番号 79</p>
VAN1 estExt_GeneWise Plus.C_400029	MMPRHSSGFSN GYPRADTFEISPH RFQPRATLPPHRK RKRTAIR 配列番号 80	<u>VGIAVVVILVVL</u> <u>WFG</u> 配列番号 81	<p>QPRSVASLISLGLSGYDDLKLET VRYYDLSNVQGTARGW EERILL CVPLRDAEQHLPMMFFSHLKNFTYPHNLIDLAFLVSDSKDHTLESLTEH LEAIQADPDPKQPYGEISIIEKDFGQKVNVQDVESRHGFAQASRRKLM AQARNWLLSAALRPYHSWVYWRDVETAPFTILEDLMRHKNKD VIVP NVWRPLPDWLGEQPYDLSNQWESETALALADTLEDAVIVEGYAE YATWRPHLAYLRLDPYGDPMEMEIDGVGGVSILAKAKVFRAGVHFPA FSFEKAETEGFGKMAKRMHFSVVLPHYTWHLYEPSVDDIKHME MERERIAREKEEEERKKKEAQIKEFGDANSQWEQDKQQMQDLKLQ DRGGDKEAAAAGVNQGAAAKAAGAMEGQKN 配列番号 82</p>

10

20

30

40

相同体	細胞質	膜貫通	内腔		
VAN1 代替ペプチド 1 estExt_GeneWise Plus.C._230146	MLLPKGGLDWRS ARAQIPPTR ALWNAVTRTR 配列番号 83	<u>F</u> ILLVGITGLI <u>L</u> LLW 配列番号 84	RGVSTSASEM Q SFYCWGP A KPP M ESPNEHNRWN G H L QTPV I FNH HAPVEVNSSTIEHVDLNPINST K QAVT K EE R IL L TPL K DA A P Y LS K YF ELLAELTYPH R LI D LAFL V SD S TD D TLAV L AS E LD R IQ K R P D Q IP F HS S VIEKDFGFKLSQNVEERHS F EA Q G P RR K AM G R A RY L LY T ALK P EH S WVYWRDV D IV D SPT G ILED F IA H DR D IL V P N I W F H RY R D G V D IE G RF D YNSWVESDKGRKLANS L DK V V L AE G Y K Q Y DT G RT Y MA K MG D W R N K D V E L ED G IG G V N IL V K A D V H R SG I N F PC Y A F EN Q A E TE G FA K MA K RAG Y EV Y GL P NY V V W H I D E TE K GG N A 配列番号 85		
VAN1 代替ペプチド 2 e_gw1.5.262.1	MARPMGSVRLKK ANPST 配列番号 86	<u>L</u> ILGAVLCI <u>F</u> II <u>I</u> FLV 配列番号 87	SPSSPASRSL S IV S A Q HH L S P P T SPY Q SP R SG A V Q G PP P V TRY N LN KVT V TS D P V R N Q E H I L I L T PM A RF Y Q E W D N L LL R LN Y P H E L I T LG F IL P KT K EG N Q A T S ML Q K Q I K Q T Q N Y G P E K D RF K SI I IR Q DF D PA V V S Q D E SER H KL A N Q K A R E V M AK A R N SL F TT L GP S TS W V L W L D A D I T E T A P TL I Q D L A SH D K P I I V A N C F Q K Y Y D P E S K MA E R P Y D F N SW Q D S E T ALK MAEQ M GP D D I L E LEG Y AE M AT Y RT L AY M ST P GG S K D LV V PL D GV G T A LL V K A D V H R D G AM F PP F A F Y H L I E S E G FA K MA K RL G W Q P Y GL P NY K V Y H Y N E 配列番号 88	10	
Other01 estExt_GeneWise Plus.C._150339	MHFAYPSRKSSN PPPFRPRSTRLPG LRRSIKT 配列番号 89	<u>I</u> GIVLFLV <u>L</u> ATL W F 配列番号 90	SNPRVPRPD P ERVPSGRPPVVLV T IDPT Q Y P NA L K T I K EN R EQ Y AA KH G Y E A F I V K A D Y D T Q G AP Q SW S KL M AM R HAL T K F PE C RF V W Y LD Q D AY I MD M SK S LEE Q LL N R Q K L ES L MI K N Y P V PP D SI I K T FS H LP D E VD L IV S Q D SS G LV A GS V VV R N S Q W SK F LL E T W MD P LY R SY N F Q K A E RH A LE H IV Q W H P T IL S KL A L V P Q R T LG P Y T RT D Q G DAY Q D G F V VM F TG C TK S GE Q S C ET V S A S Y Y Q K W SSL 配列番号 91	20	
Other02 fgenesh5_pg.C_s_ccaffold_5000342	MSLSRSPSPVPG GGWSSPGLNINS GRSSPSNAAGSS VSWESAKMRKQG ANGYPSFSTQNQ GFFTRHMRISSS LPRFAAGPGNTYA EREKYERGGHSP HAGGGRRLRAFLA RIGRRLKWR 配列番号 92	<u>I</u> LLPLII <u>I</u> CTIVAYYG 配列番号 93	THEAPGFV H WW R RISM GG GE K F V I I LG A N V GG V ME W KG A RE W I ERD S VRN K R K Y A TR W GY D LE V D M K T K R Y A H EW R ES W E K V D F I RA AM R K Y P K A E WF W W L DL N T Y V M EP S Y S LR H LF N HL D R H V R D I N V N P L I TH P P T E Y LD E AR S P V G D G N I N S V N L ML T Q D CS G FN L GS F I RR S AW T E Q LL D I W W D P V LY E Q K ME W EH K EQ D AL Q LY R T Q P W IR Q H T G FL P Q R LI N S F PP A AC A DE S GL N TR I H Y NE K DR F V V N M AG C E W G R D C W G E MY H Y R EF S Y W LN R N P W E LF K EE I V A V I W Y K L T G Q R V K L 配列番号 94	30	

【 0 0 6 1 】

ホスト細胞におけるグリコシル化経路内のタンパク質を発現させること（ここで、タンパク質の一つが、特徴づけられていない配列を唯一のターゲティングペプチドとして含有する）およびグリカン生合成の細胞質局在化を考慮して、生成したグリカンを測定すること（例えばSchwientek JBC 1996 3398のように）によって、またはターゲティングペプチドと融合した蛍光レポータータンパク質を発現させること、および免疫蛍光によりゴルジでのタンパク質局在化を分析することによって、またはゴルジの細胞質膜を分画することおよびタンパク質の局在化を測定することによって、特徴づけられていない配列をターゲティングペプチドとしての使用について試験することができる。

【 0 0 6 2 】

ターゲティングペプチドは、ステムドメインを含みうる。ある態様では、ステムドメインは、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素またはN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素に由来する。とりわけある態様では、ステムドメインは、ヒトN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素またはヒトN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素に由来する。ヒトN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素由来のステムドメインに対応する配列は、配列番号 3 4 である。ヒトN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素由来のステムドメイン

40

50

ンに対応する配列は、配列番号 20 の残基 30 ~ 85 である。

【0063】

ターゲティングペプチドは、膜貫通ドメインを含みうる。「膜貫通ドメイン」は、膜内で三次元構造として熱力学的に安定な任意のアミノ酸残基配列を表す。ターゲティングペプチドがステムドメインも含む態様では、膜貫通ドメインはステムドメインに対して N 末端側である。ある態様では、膜貫通ドメインは、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素または N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素に由来する。特にある態様では、膜貫通ドメインは、ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素またはヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素に由来する。ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素由来の膜貫通ドメインに対応する配列は、配列番号 1 の残基 7 ~ 29 である。ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素由来の膜貫通ドメインに対応する配列は、配列番号 20 の残基 10 ~ 29 である。

【0064】

ターゲティングペプチドは、細胞質ドメインを含みうる。「細胞質ドメイン」という用語は、細胞質環境内で三次元構造として熱力学的に安定なアミノ酸配列を表す。ターゲティングペプチドがステムドメインも含む態様では、細胞質ドメインはステムドメインに対して N 末端側である。ターゲティングペプチドが膜貫通ドメインも含む態様では、細胞質ドメインは、膜貫通ドメインに対して N 末端側である。ある態様では、細胞質ドメインは、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素または N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素に由来する。特にある態様では、細胞質ドメインは、ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素またはヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素に由来する。ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素由来の細胞質ドメインに対応する配列は、配列番号 1 の残基 1 ~ 6 である。ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素由来の細胞質ドメインに対応する配列は、配列番号 20 の残基 1 ~ 9 である。

【0065】

ある態様では、リコンビナントタンパク質は、触媒ドメインの間にヒト G n T I ステムドメイン配列を含有するスペーサー配列と共に、ヒト G n T I 触媒ドメインに対して N 末端側にヒト G n T I I 触媒ドメインを含有する。この態様では、リコンビナントタンパク質は、また、ヒト G n T I I 由来の細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、およびステムドメインと共に、G n T I I 触媒ドメインに対して N 末端側にターゲティングペプチドを含む。この態様におけるリコンビナントタンパク質の配列は、配列番号 95 と少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一であり、この態様のリコンビナントタンパク質をコードする、ありうる cDNA の配列は、配列番号 96 である。

【0066】

他の態様では、リコンビナントタンパク質は、スペーサー配列と共に、ヒト G n T I 触媒ドメインに対して N 末端側にヒト G n T I I 触媒ドメインを含有する。スペーサー配列には、非限定的に、配列番号 118、120、122、または 124 に少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一の配列が含まれる。この態様では、リコンビナントタンパク質は、また、ヒト G n T I I 由来の細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、およびステムドメインと共に、G n T I I 触媒ドメインに対して N 末端側にターゲティングペプチドを含む。したがって、ある態様では、リコンビナントタンパク質の配列は、配列番号 119、121、123、および 125 より選択される配列に、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 %

同一である。ある態様では、配列番号 119 のリコンビナントタンパク質をコードする、ありうる cDNA の配列は、配列番号 141 である。他の態様では、配列番号 121 のリコンビナントタンパク質をコードする、ありうる cDNA の配列は、配列番号 139 である。なお他の態様では、配列番号 123 のリコンビナントタンパク質をコードする、ありうる cDNA の配列は、配列番号 143 である。さらなる態様では、配列番号 125 のリコンビナントタンパク質をコードする、ありうる cDNA の配列は、配列番号 145 である。

【 0067 】

本発明のリコンビナントタンパク質の製造

本発明の別の局面には、本発明のリコンビナントタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドが含まれる。本明細書に使用するような用語「ポリヌクレオチド」、「核酸配列」、「核酸の配列」およびその変形は、DNA および RNA で見られるように塩基対形成および塩基スタッキングを可能にする配置で核酸塩基を含有することを条件として、ポリデオキシリボヌクレオチド (2 - デオキシ - D - リボースを含有する)、ポリリボヌクレオチド (D - リボースを含有する)、プリンまたはピリミジン塩基の N - グリコシドである任意の他のタイプのポリヌクレオチド、および非ヌクレオチド骨格を含有する他のポリマーの一般名である。したがって、これらの用語には、既知のタイプの核酸配列改変、例えば、アナログによる一つまたは複数の天然ヌクレオチドの置換；ヌクレオチド間改変、例えば、非荷電結合を用いた改変 (例えば、ホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメートなど)、マイナス荷電結合を用いた改変 (例えば、ホスホロチオエート、ホスホジチオエートなど)、およびプラス荷電結合を用いた改変 (例えば、アミノアルキルホスホロアミデート、アミノアルキルホスホトリエステル)；例えばタンパク質などのペンドント部分を含有する改変 (ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ - L - リシンなどを含む)；インターラーカーを用いた改変 (例えば、アクリジン、ソラレンなど)；およびキレート剤を含有する改変 (例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など) が含まれる。本明細書に使用するような、ヌクレオチドおよびポリヌクレオチドについての記号は、IUPAC - IUB 生化学命名法委員会 (Biochem. 9:4022, 1970) によって推奨される記号である。

【 0068 】

単離されたポリヌクレオチドの配列は、例えば直接化学合成またはクローニングなどの、当業者に公知の任意の適切な方法によって調製される。直接化学合成のために、核酸ポリマーの形成は、典型的には、伸長途中のヌクレオチド鎖の末端 5' - ヒドロキシル基への、3' - ブロックおよび 5' - ブロックされたヌクレオチドモノマーの連続付加を伴い、ここで、各付加は、添加されたモノマー (典型的には、ホスホトリエステル、ホスホラミダイトなどのリン誘導体である) の 3' 位に対する伸長途中の鎖の末端 5' - ヒドロキシル基の求核攻撃によって果たされる。そのような方法は、当業者に公知であり、関連する文書および文献に記載されている [例えば、Matteucci et al., (1980) Tetrahedron Lett 21:719-722 ; 米国特許第 4,500,707 号 ; 同第 5,436,327 号 ; および同第 5,700,637 号]。加えて、所望の配列は、適切な制限酵素を使用して DNA を開裂させること、ゲル電気泳動法を用いてフラグメントを分離すること、およびその後に、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR ; 例えば米国特許第 4,683,195 号) の利用などの、当業者に公知の技法によりゲルから所望の核酸配列を回収することによって、天然供給源から単離することができる。

【 0069 】

本発明の各ポリヌクレオチドは、発現ベクターに組み込むことができる。「発現ベクター」または「ベクター」は、ホスト細胞にトランスクレプション、トランスフォーメーション、または感染することによって、その細胞にネイティブなもの以外の、またはその細胞にネイティブではない方法で、核酸および / またはタンパク質をその細胞に発現させる、化合物および / または組成物を表す。「発現ベクター」は、ホスト細胞により発現されるべき核酸配列 (通常 RNA または DNA) を含有する。場合により、発現ベクターは、ま

10

20

30

40

50

た、ウイルス、リポソーム、タンパク質コーティングなどの、ホスト細胞への核酸の移行を達成することを助ける物質を含む。本発明での使用に考えられている発現ベクターには、核酸配列を任意のある種のまたは必要な作動エレメントと一緒に挿入できる発現ベクターが含まれる。さらに、発現ベクターは、ホスト細胞に導入されてその中で複製できる発現ベクターでなければならない。ある種の発現ベクターは、プラスミドであって、特に、文書により十分に立証された制限部位を有し、特にある種のまたは核酸配列の転写に必要な作動エレメントを含有するプラスミドである。そのようなプラスミドおよび他の発現ベクターは、当業者に周知である。

【0070】

個別のポリヌクレオチドの組み込みは、例えば、発現ベクター、例えばプラスミド中の特定部位を切断するための制限酵素 (BamHI、EcoRI、HhaI、XhoI、XmaIなど) の使用を含む公知の方法により達成することができる。制限酵素は、1本鎖末端を生成し、その1本鎖末端は、切断された発現ベクターの末端に対して配列が相補的な終端を有するまたは有するように合成されたポリヌクレオチドにアニーリングすることができる。アニーリングは、適切な酵素、例えばDNAリガーゼを使用して行われる。当業者に理解されているように、多くの場合、発現ベクターおよび所望のポリヌクレオチドの両方を同じ制限酵素で切断することによって、発現ベクターの末端とポリヌクレオチドの末端が相互に相補的であることが保証される。加えて、DNAリンクマーを使用して、発現ベクターへの核酸配列の結合を容易にすることができる。

【0071】

当業者に公知の方法 (例えば、米国特許第4,683,195号) を利用することによって、一連の個別のポリヌクレオチドを組み合わせることもできる。

【0072】

例えば、所望のポリヌクレオチドのそれを最初に別々のPCRで産生することができる。その後、PCR生成物の末端が相補的配列を含有するような特異的プライマーを設計する。PCR生成物を混合し、変性させ、再アニーリングすると、その3'末端でマッチする配列を有する鎖が重複し、相互に対するプライマーとして作用することができる。DNAポリメラーゼによるこの重複の伸長により、最初の配列が一緒に「スプライシング」された分子が生成する。このように、一連の個別のポリヌクレオチドを一緒に「スプライシング」し、続いて、ホスト細胞に同時にトランスクレプションすることができる。したがって、複数のポリヌクレオチドのそれぞれの発現が果たされる。

【0073】

個別のポリヌクレオチド、または「スプライシングされた」ポリヌクレオチドは、次に発現ベクターに組み込まれる。本発明は、ポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込む過程に関して限定されない。当業者は、発現ベクターにポリヌクレオチドを組み込むために必要なステップを熟知している。典型的な発現ベクターは、一つまたは複数の調節領域が先行する所望のポリヌクレオチドをリボソーム結合部位と共に含有し、リボソーム結合部位は、例えば、3~9ヌクレオチド長のヌクレオチド配列であって、エシェリキア・コリ (E. coli) において開始コドンの3~11ヌクレオチド上流に位置する。Shine and Dahlgarno (1975) Nature 254(5495):34-38およびSteitz (1979) Biological Regulation and Development (ed. Goldberger, R. F.), 1:349-399 (Plenum, New York)を参照されたい。

【0074】

本明細書に使用するような「作動可能に連結された」という用語は、制御配列がポリペプチドの発現を指令するように、その制御配列がDNA配列のコード配列またはポリヌクレオチドのコード配列に対して適切な位置に位置付けられる配置を表す。

【0075】

調節領域には、例えばプロモーターおよびオペレーターを含有する領域が含まれる。プロモーターは、ポリペプチドをコードする所望のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド部分に作動可能に連結されることにより、RNAポリメラーゼ酵素を介して、ポリペプ

10

20

30

40

50

チドをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド部分の転写を開始する。オペレーターは、プロモーターに隣接する核酸配列であって、リプレッサータンパク質が結合できるタンパク質結合ドメインを含有する。リプレッサータンパク質の不在下で、転写はプロモーターを介して開始する。存在下では、オペレーターのタンパク質結合ドメインに特異的なリプレッサータンパク質は、オペレーターに結合することによって転写を阻害する。このように、使用される特定の調節領域および対応するリプレッサータンパク質の有無に基づいて、転写制御が達成される。例には、ラクトースプロモーター (L a d リプレッサータンパク質は、ラクトースと接触するとコンフォメーションを変化することで、L a d リプレッサータンパク質がオペレーターに結合することを阻止する) およびトリプトファンプロモーター (トリプトファンと複合体を形成しているとき、T r p R リプレッサータンパク質はオペレーターと結合するコンフォメーションを有し；トリプトファン不在下ではT r p R リプレッサータンパク質はオペレーターに結合しないコンフォメーションを有する) が含まれる。別の例は、t a c プロモーターである (de Boer et al., (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80(1):21-25 参照)。当業者に理解されているように、これらの調節領域および他の調節領域を本発明に使用することができ、本発明はこの点に限定されない。

【0076】

本発明のリコンビナントタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドに連結するための特定のプロモーターの例には、以下の遺伝子由来のプロモーターが含まれる：g p d A、c b h 1、アスペルギルス・オリザエ (Aspergillus oryzae) T A K A アミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイ (Rhizomucor miehei) アスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) 中性 - アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) 酸安定性 - アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) グルコアミラーゼ (g l a A)、アスペルギルス・アワモリ (Aspergillus awamori) g l a A、リゾムコール・ミエヘイ (Rhizomucor miehei) リパーゼ、アスペルギルス・オリザエ (Aspergillus oryzae) アルカリプロテアーゼ、アスペルギルス・オリザエ (Aspergillus oryzae) トリオースリン酸イソメラーゼ、アスペルギルス・ニデュラーンス (Aspergillus nidulans) アセトアミダーゼ、アスペルギルス・オリザエ (Aspergillus oryzae) アセトアミダーゼ、フザリウム・オキシスポルム (Fusarium oxysporum) トリプシン様プロテアーゼ、真菌エンド - L - アラビナーゼ (a b n A)、真菌 - L - アラビノフラノシダーゼ A (a b f A)、真菌 - L - アラビノフラノシダーゼ B (a b f B)、真菌キシラナーゼ (x l n A)、真菌フィターゼ、真菌 A T P - シンテターゼ、真菌サブユニット 9 (o l i C)、真菌トリオースリン酸イソメラーゼ (t p i)、真菌アルコールデヒドロゲナーゼ (a d h A)、真菌 - アミラーゼ (a m y)、真菌アミログルコシダーゼ (g l a A)、真菌アセトアミダーゼ (a m d S)、真菌グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (g p d)、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、酵母ラクターゼ、酵母 3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ、酵母トリオースリン酸イソメラーゼ、細菌 - アミラーゼ、細菌 S p o 2、および S S O。ある態様では、本発明のリコンビナントタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドは、構成的プロモーターに作動可能に連結されている。他の態様では、本発明のリコンビナントタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドは、誘導性プロモーターに作動可能に連結されている。特定の好ましい態様では、誘導性プロモーターは c b h 1 遺伝子に由来する。

【0077】

所望の配列を組み込むために任意の適切な発現ベクターを使用することができるものの、容易に利用可能な発現ベクターには、非限定的に：p S C 1 O 1、p B R 3 2 2、p B B R 1 M C S - 3、p U R、p E X、p M R 1 O O、p C R 4、p B A D 2 4、p U C 1 9 などのプラスミド；M 1 3 ファージおよび ファージなどのバクテリオファージが含まれる。もちろん、そのような発現ベクターは、特定のホスト細胞だけに適切でありうる。しかし、当業者は、任意の特定の発現ベクターが任意の所与のホスト細胞に適するかどうかを日常的な実験作業により容易に判定することができる。例えば、発現ベクターをホス

10

20

30

40

50

ト細胞に導入し、次に生存率およびそのベクターに含有される配列の発現についてそのホスト細胞をモニターすることができる。加えて、発現ベクターおよび任意の特定のホスト細胞に対するその適合性について記載している関連文書および文献を参照することができる。

【 0 0 7 8 】

本発明の別の局面には、本発明のリコンビナントタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを含有するホスト細胞が含まれる。本明細書に使用するような「ホスト細胞」は、リコンビナントDNAまたはRNAの挿入によりトランسفォーメーションできる、生きた生物学的細胞を表す。そのようなリコンビナントDNAまたはRNAは、発現ベクター中にありうる。したがって、本明細書記載のホスト細胞は、原核生物（例えば、真正細菌界の生物）または真核細胞でありうる。当業者によって理解されているように、原核細胞は膜結合型の核を欠如しており、一方で真核細胞は膜結合型の核を有する。ある態様では、本発明のリコンビナントタンパク質の製造のために使用されるホスト細胞は、酵母または糸状菌などの真菌細胞である。他の態様では、ホスト細胞は哺乳動物細胞である。そのような細胞は、ヒト性または非ヒト性でありうる。

10

【 0 0 7 9 】

本発明の別の局面には、本発明のリコンビナントタンパク質を製造する方法が含まれる。その方法は、リコンビナントタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドをホスト細胞に導入するステップ、およびリコンビナントタンパク質が発現されるようにホスト細胞を培養するステップを含む。その方法は、ホスト細胞からリコンビナントタンパク質を精製するステップも含みうる。

20

【 0 0 8 0 】

本発明のリコンビナントタンパク質を製造する方法は、ホスト細胞中への本発明のリコンビナントポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの導入または移行を含みうる。ホスト細胞中に発現ベクターを移行させるためのそのような方法は、当業者に周知である。例えば、エシェリキア・コリ (E. coli) に発現ベクターをトランسفォーメーションするための一方法は、発現ベクターがカルシウム沈殿を経て導入される塩化カルシウム処理を伴う。他の塩、例えばリン酸カルシウムも、類似の手順により使用されうる。加えて、エレクトロポレーション（すなわち、核酸配列への細胞透過性を増加させる電流の適用）を使用してホスト細胞にトランسفエクションすることができる。同様に、核酸配列のマイクロインジェクションは、ホスト細胞にトランسفエクションする能力を提供する。複合脂質、リボソーム、およびデンドリマーなどの他の手段も採用してもよい。当業者は、これらのこと方法または他の方法を使用して、ホスト細胞に所望の配列をトランسفエクションすることができる。

30

【 0 0 8 1 】

ベクターは、自律的複製ベクター、すなわち染色体外実体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しないベクター、例えば、プラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体、または人工染色体でありうる。ベクターは、自己複製を保証するための任意の手段を含有しうる。または、ベクターは、ホストに導入されたときにゲノムに組み込まれ、それが組み込まれた染色体（一つまたは複数）と一緒に複製されるベクターでありうる。さらに、単一のベクターもしくはプラスミド、またはホストのゲノムに導入されるべき総DNAを一緒にになって含有する2種以上のベクターまたはプラスミド、またはトランスポゾンを使用することができる。

40

【 0 0 8 2 】

ベクターは、トランسفォーメーションされたホストの容易な選択を許す一つまたは複数の選択マーカーを含有しうる。選択マーカーは、その生成物が、例えば生命破壊またはウイルス耐性、重金属耐性、原栄養性から栄養要求株までなどを提供する遺伝子である。細菌細胞の選択は、amp、gpt、neo、およびhrg遺伝子などの遺伝子により付与された微生物耐性に基づきうる。

【 0 0 8 3 】

50

酵母ホストのために適切なマーカーは、例えば、A D E 2、H I S 3、L E U 2、L Y S 2、M E T 3、T R P 1、およびU R A 3である。糸状菌ホストに使用するための選択マーカーには、非限定的に、a m d S (アセトアミダーゼ)、a r g B (オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ)、b a r (ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ)、h p h (ヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ)、n i a D (硝酸還元酵素)、p y r G (オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼ)、s C (硫酸アデニルトランスフェラーゼ)、およびt r p C (アントラニル酸シンターゼ)、ならびにその等価物が含まれる。アスペルギルス属 (*Aspergillus*) に使用するためのいくつかは、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) またはアスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) のa m d S およびp y r G 遺伝子ならびにストレプトマイセス・ハイグロスコピクス (*Streptomyces hygroscopicus*) のb a r 遺伝子である。トリコデルマ属 (*Trichoderma*) に使用するためのいくつかは、b a r、p y r 4、およびa m d S である。

【0084】

ベクターは、ホストのゲノムへのベクター組み込み、またはそのゲノムと無関係な細胞中のベクターの自律的複製を許すエレメント（一つまたは複数）を含有しうる。

【0085】

ベクターは、ホストのゲノムへの組み込みのために、遺伝子配列に依存する場合があり、または相同もしくは非相同組み換えによるゲノムへのベクターの組み込みのために、ベクターの任意の他のエレメントに依存する場合がある。または、ベクターは、相同組み換えによるホストゲノムへの組み込みを指令するために、追加的なヌクレオチド配列を含有しうる。追加的なヌクレオチド配列は、ベクターが染色体（一つまたは複数）中の正確な位置（一つまたは複数）でホストゲノムに組み込みできるようにする。組み込みエレメントは、正確な位置での組み込みの見込みを増加させるために、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塩基対などの十分な数の核酸を含有する場合があり、それらは、相同組み換えの確率を高めるために、対応するターゲット配列と高度に相同である。組み込みエレメントは、ホストのゲノム中のターゲティング配列と相同的な任意の配列でありうる。さらに、組み込みエレメントは、非コードまたはコードヌクレオチド配列でありうる。他方で、ベクターを、非相同組み換えによりホストのゲノムに組み込んでもよい。

【0086】

自律的複製のために、ベクターは、さらに、そのベクターが問題となるホスト中で自律的複製できるようにする複製起点を含みうる。複製起点は、細胞内で機能する、自律的複製を仲介する任意のプラスミドレプリケーターでありうる。「複製起点」または「プラスミドレプリケーター」という用語は、本明細書において、プラスミドまたはベクターがin vivo複製できるようにする配列として定義される。酵母ホストに使用するための複製起点の例は、2ミクロン複製起点、A R S 1、A R S 4、A R S 1とC E N 3の組み合わせ、およびA R S 4とC E N 6の組み合わせである。糸状菌細胞において有用な複製起点の例は、A M A 1およびA N S 1 (Gems et al., 1991; Cullen et al., 1987; 国際公開公報第00/24883号)である。A M A 1遺伝子の単離およびその遺伝子を含むプラスミドまたはベクターの構築は、国際公開公報第00/24883号に開示された方法に従って達成することができる。

【0087】

他のホストについて、トランスフォーメーション手順は、例えばクリベロマイセス属 (*Kluyveromyces*) についてJeremiah D. Read, et al., *Applied and Environmental Microbiology*, Aug. 2007, p. 5088-5096に、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) についてOsvaldo D elgado, et al., *FEMS Microbiology Letters* 132, 1995, 23-26に、ピキア・スチピチス (*Pichia stipitis*) について米国特許第7,501,275号に、クロストリジウム属 (*Clostridium*) について国際公開公報第2008/040387号に見出すことができる。

【0088】

10

20

30

40

50

1コピーよりも多い遺伝子をホストに挿入して遺伝子生成物の生成を増加させることができる。遺伝子のコピー数の増加は、遺伝子の少なくとも1個の追加的なコピーをホストゲノムに組み込むことにより、または增幅可能な選択マーカー遺伝子をヌクレオチド配列と一緒に入れることにより得ることができ、その際、選択マーカー遺伝子の増幅コピーを含有する細胞、すなわち遺伝子の追加的なコピーを含有する細胞を、適切な選択剤の存在下で培養することにより選択することができる。

【0089】

上記エレメントをライゲーションして本発明のリコンビナント発現ベクターを構築するために使用される手順は、当業者に周知である（例えば、Sambrook et al., 1989、上記参照）。

10

【0090】

ホスト細胞に少なくとも一つの発現ベクターがトランスフォーメーションされる。発現ベクターを一つだけ使用する場合（中間体の添加なし）、ベクターは、必要な核酸配列の全てを含有する。

【0091】

ホスト細胞に発現ベクターをトランスフォーメーションしたら、ホスト細胞を成長させる。本発明の方法は、細胞中でリコンビナント核酸が発現されるようにホスト細胞を培養することを含みうる。微生物ホストについて、このプロセスは、細胞を適切な培地で培養することを必要とする。典型的には、細胞は適切な培地で35にて成長される。本発明におけるある種の成長培地には、例えば、Luria-Bertani (LB) プロス、Sabouraud デキストロース (SD) プロスまたは酵母培地 (YM) プロスなどの一般的な市販の調製済み培地が含まれる。他の限定成長培地または合成成長培地も使用することができ、特定のホスト細胞の成長に適切な培地は、微生物学または発酵科学の技術者に公知であろう。成長に適切な温度範囲および他の条件は、当技術分野において公知である（例えば、Bailley and Ollis 1986参照）。

20

【0092】

ホスト細胞から本発明のリコンビナントタンパク質を精製するための方法は、当技術分野において周知である（E. L. V. Harris and S. Angel, Eds. (1989) Protein Purification Methods: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, England参照）。そのような方法には、非限定的に、分取用ディスクゲル電気泳動、等電点電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、逆相HPLC、ゲル濾過、イオン交換および分配クロマトグラフィー、ならびに向流分配、ならびにその組み合わせが含まれる。ある態様では、リコンビナントタンパク質は、精製を容易にするために追加的な配列タグを有する。そのようなマーカーには、エピトープタグおよびタンパク質タグが含まれる。エピトープタグの非限定的な例には、c-myc、ヘマグルチニン (HA)、ポリヒスチジン (6x-HIS)、GLU-GLU、およびDYKDDDDK (FLAG) (配列番号117) エピトープタグが含まれる。エピトープタグは、いくつかの確立された方法によりペプチドに付加することができる。エピトープタグのDNA配列は、オリゴヌクレオチドとして、またはPCR增幅に使用されるプライマーにより、リコンビナントタンパク質コード配列に挿入することができる。代替として、ペプチドコード配列は、エピトープタグとの融合体を生み出す特異的ベクター；例えばpRSSETベクター (Invitrogen Corp., San Diego, Calif.) にクローニングすることができる。タンパク質タグの非限定的な例には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、およびマルトース結合タンパク質 (MBP) が含まれる。タンパク質タグは、いくつかの周知の方法によりペプチドまたはポリペプチドに結合される。アプローチでは、ポリペプチドまたはペプチドのコード配列は、ポリペプチドまたはペプチドと、関心がもたれるタンパク質タグとの間の融合体を生み出すベクターにクローニングすることができる。適切なベクターには、非限定的に、例示的なプラスミドpGEX (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N.J.)、pEGFP (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, Calif.)、およびpMAL (商標) (New England BioLabs, Inc., Beverly, Mass.) が含まれ

30

40

50

る。発現に続いて、適切な固相マトリックスを用いたクロマトグラフィーにより、ホスト細胞の粗溶解液からエピトープタグまたはタンパク質タグの付いたポリペプチドまたはペプチドを精製することができる。いくつかの場合では、精製に続いてエピトープタグまたはタンパク質タグを除去する（すなわちプロテアーゼ切断による）ことが好ましい場合がある。

【0093】

複合グリカンを製造する方法

本発明の別の局面には、ホスト細胞を提供するステップ（ここで、ホスト細胞は、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する）および融合タンパク質が発現されるようにホスト細胞を培養するステップ（ここで、融合タンパク質は、アクセプター性グリカンの末端Man₃残基へのN-アセチルグルコサミンおよび末端Man₆残基へのN-アセチルグルコサミンの転移を触媒して複合N-グリカンを製造する）を含む、複合N-グリカンを製造する方法が含まれる。ある態様では、この局面には、トリコデルマ属（Trichoderma）細胞においてヒト様N-グリカンを製造する方法が含まれる。

【0094】

本明細書に使用するような、「複合N-グリカン」という用語は、末端GlcNAc₂Man₃構造を含むN-グリカンを表す。

【0095】

複合N-グリカンには、式 [GlcNAc₂]_zMan₃([GlcNAc₂]_wMan₆)Man_{{4GlcNAc(Fucx)}_n[4GlcNAc]_m}_p（式中、n、m、およびpは、0または1であり、分子の部分の存在または不在を示すが、但し、mが0の場合、nは0であり（コースは、GlcNAcに結合した枝である）、xは3または6であり、（）は構造中の枝を定義し、[]は直鎖配列中に存在するかまたは不在のグリカン構造の一部を定義し、zおよびwは0または1である）を有する任意のグリカンが含まれる。好ましくは、wおよびzは1である。ある態様では、複合N-グリカンには、}

GlcNAc₂Man₃(GlcNAc₂Man₆)Man₄GlcNAc
4GlcNAc、
GlcNAc₂Man₃(Man₆)Man₄GlcNAc₄GlcNAc、
GlcNAc₂Man₃(GlcNAc₂Man₆)Man₄GlcNAc
4(Fuc₆)GlcNAc、
GlcNAc₂Man₃(Man₆)Man₄GlcNAc₄(Fuc₆)
GlcNAc、および

Man₃(Man₆)Man₄GlcNAc₄GlcNAc

が含まれる。ある態様では、複合N-グリカンは、真菌非フコシル化GlcNAcMan₃、GlcNAc₂Man₃、および/またはMan₃である。

【0096】

ある態様では、複合N-グリカンを製造する方法は、異なるグリカンの混合物を產生する。複合N-グリカンは、そのようなグリカン混合物の少なくとも1%、少なくとも3%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、または少なくとも75%以上を構成しうる。

【0097】

アクセプター性グリカン、したがって複合N-グリカンは、アミノ酸、ペプチド、またはポリペプチドなどの分子に結合している場合がある。ある態様では、アミノ酸誘導体は、アスパラギン残基である。アスパラギン残基は、側鎖アミドからのアミノグリコシド結合（生物学的哺乳動物ポリペプチドN-グリカン結合構造）の場合があり、ジペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドなどのペプチド鎖の部分の場合がある。グリカンは、還元末端誘導体、例えば還元性GlcNAcまたはManのN、O、またはC結合型誘

10

20

20

30

40

50

導体、好ましくはグリコシド誘導体、アミノ酸、アルキル、ヘテロアルキル、アシリル、アルキルオキシ、アリール、アリールアルキル、およびヘテロアリールアルキルの群より選択される、あるグリカン結合型構造を有するスペーサーまたは末端有機残基などである。スペーサーは、さらに、多価担体または固相に結合している場合がある。ある態様では、アルキル含有構造には、メチル、エチル、プロピル、およびC4-C26アルキル、グリセロ脂質、リン脂質、ドリコール-リン脂質およびセラミドなどの脂質、ならびに誘導体が含まれる。還元末端は、また、第二級アミン結合または誘導体構造への還元アミノ化により誘導体化することができる。ある担体には、例えば(ポリ)ペプチド、多糖、例えばデキストラン、セルロース、アミロース、またはグリコサミノグリカンなどの生体高分子またはオリゴマー、ならびにポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド(例えばナイロンまたはポリスチレン)、ポリアクリルアミド、およびポリ乳酸を含めたプラスチック、PAMAM、StarburstまたはStarfishデンドリマーなどのデンドリマー、またはポリリシンおよびポリエチレングリコール(PEG)などのポリアルキルグリコールなどの他の有機ポリマーまたはオリゴマーが含まれる。固相には、マイクロタイターウェル、シリカ粒子、ガラス、金属(銅、金および銀が含まれる)、ポリスチレンまたは樹脂ビーズ、ポリ乳酸ビーズ、多糖ビーズまたは有機スペーサー含有磁気ビーズなどのポリマービーズが含まれる。

【0098】

ある態様では、アクセプター性グリカンは、異種ポリペプチドに結合している。ある態様では、異種ポリペプチドは、治療用タンパク質である。治療用タンパク質には、モノクローナル抗体、エリスロポエチン、インターフェロン、成長ホルモン、酵素、または凝固因子が含まれる場合があり、治療用タンパク質は、ヒトまたは動物の処置に有用である。例えば、アクセプター性グリカンは、リツキシマブなどの治療用タンパク質に結合している場合がある。

【0099】

アクセプター性グリカンは、「本発明のリコンビナントタンパク質」という標題の節に記載された任意のアクセプター性グリカンでありうる。

【0100】

ある態様では、アクセプター性グリカンは、Man5でありうる。そのような態様では、ランダム組み込みを用いて、またはMan5グリコシル化に影響しないことが知られている公知の部位へのターゲット組み込みによって、Man5発現性T. reesei株にGnTII/GnTI融合酵素をトランスフォーメーションする。GlcNAcMan5を生成する株を選択する。選択された株に、さらに、Man5構造を切断することができるマンノシダーゼII型マンノシダーゼの触媒ドメインをトランスフォーメーションする。ある態様では、マンノシダーゼII型酵素はグリコシドヒドロラーゼファミリー38(cazy.org/GH38_all.html)に属する。特徴づけられた酵素には、cazy.org/GH38_characterized.htmlに列挙された酵素が含まれる。特に有用な酵素は、サブファミリー-マンノシダーゼII(Man2A1; ManA2)の酵素のような、糖タンパク質を切断するゴルジ型酵素である。そのような酵素の例には、ヒト酵素AAC50302、ドロソフィラ・メラノガスター(D. melanogaster)酵素(Van den Elsen J.M. et al (2001) EMBO J. 20: 3008-3017)、PDB参照名1HTYに従う3D構造を有する酵素、およびPDBにおいて触媒ドメインで参照された他の酵素が含まれる。細胞質での発現のために、マンノシダーゼの触媒ドメインは、典型的にはN末端ターゲティングペプチドと融合されるか、または動物もしくは植物マンノシダーゼII酵素の内因性動物もしくは植物ゴルジ体ターゲティング構造と共に発現される。マンノシダーゼII型マンノシダーゼの触媒ドメインをトランスフォーメーション後に、GlcNAc2Man3を効率的に製造している株を選択する。

【0101】

ホスト細胞

複合N-グリカンを製造する方法は、ホスト細胞を提供する第1のステップを含む。核

10

20

30

40

50

酸配列をトランスフォーメーション後に生存性を維持する限り、任意の原核または真核ホスト細胞を本発明に使用することができる。好ましくは、ホスト細胞は、必要な核酸配列のトランスタクション、その後のリコンビナントタンパク質の発現、または生じた中間体によって不利に影響されない。適切な真核細胞には、非限定的に、真菌、植物、昆虫または哺乳動物細胞が含まれる。

【0102】

ある態様では、ホストは真菌株である。本明細書に使用するような「真菌」には、門囊菌門 (Ascomycota)、担子菌門 (Basidiomycota)、ツボカビ門 (Chytridiomycota)、および接合菌門 (Zygomycota) (Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UKにより定義されている) ならびに卵菌 (Oomycota) (Hawksworth et al., 1995、上記、171ページに引用されている) ならびに全ての栄養胞子形成菌 (Hawksworth et al., 1995、上記) が含まれる。

10

【0103】

特定の態様では、真菌ホストは酵母株である。本明細書に使用するような「酵母」には、子囊菌酵母 (Endomycetales)、担子菌酵母、および不完全菌に属する酵母 (Blastomycetes) が含まれる。酵母の分類が将来変わるおそれがあるので、本発明のために、酵母を Biology and Activities of Yeast (Skinner, F. A., Passmore, S. M., and Davenport, R. R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980) に記載されている 20 ように定義するものとする。

20

【0104】

ある態様では、酵母ホストは、カンジダ属 (Candida)、ハンセヌラ属 (Hansenula)、クリヴェロマイセス属 (Kluyveromyces)、ピキア属 (Pichia)、サッカロミセス属 (Saccharomyces)、シゾサッカロミセス属 (Schizosaccharomyces)、またはヤロウイア属 (Yarrowia) 株である。

【0105】

ある態様では、酵母ホストは、サッカロミセス・セルビジエ (Saccharomyces cerevisiae)、クリベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、ピキア・パストリス (Pichia pastoris)、カンジダ・アルビカンス (Candida albicans)、ハンセヌラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha)、シゾサッカロミセス属 (Schizosaccharomyces)、またはヤロウイア属 (Yarrowia) である。

30

【0106】

別の特定の態様では、真菌ホスト細胞は糸状菌株である。「糸状菌」には、全ての糸状形態の亜門EumycotaおよびOomycota (Hawksworth et al., 1995、上記によって定義されている) が含まれる。糸状菌は、一般に、キチン、セルロース、グルカン、キトサン、マンナン、および他の複合多糖から構成される菌糸体壁によって特徴づけられる。栄養成長は菌糸の伸長によるものであり、炭素異化は偏性好気性である。対照的に、サッカロミセス・セルビジエ (Saccharomyces cerevisiae) などの酵母による栄養成長は、単細胞性葉状体の出芽によるものであり、炭素異化は発酵によるものでありうる。

【0107】

40

糸状菌ホスト細胞は、例えば、アクレモニウム属 (Acremonium)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、フザリウム属 (Fusarium)、ヒュミコラ属 (Humicola)、ムコール属 (Mucor)、ミセリオフソラ属 (Myceliophthora)、ニューロスボラ属 (Neurospora)、ペニシリウム属 (Penicillium)、スキタリジウム属 (Scyphalidium)、チエラビア属 (Thielia)、トリポクラジウム属 (Tolypocladium)、またはトリコデルマ属 (Trichoderma) 株でありうる。

【0108】

ある態様では、糸状菌ホスト細胞は、トリコデルマ属種 (Trichoderma sp.)、アクレモニウム属 (Acremonium)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium)、クリプトコッカス属 (Cryptococcus)、クリソスボリウムス属 (Chr

50

ysosporium)、クリソスボリウム・ラクノウェンス (*Chrysosporium lucknowense*)、フィリバシジウム属 (*Filibasidium*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、ジベレラ属 (*Gibberella*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ムコール属 (*Mucor*)、ミセリオフソラ属 (*Mycoleliophthora*)、ミロセシウム属 (*Myrothecium*)、ネオカリマスティクス属 (*Neocallimastix*)、ニューロスボラ属 (*Neurospora*)、ペシロミセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ピロミセス属 (*Piromyces*)、シゾフィラム属 (*Schizophyllum*)、タラロミセス属 (*Talaromyces*)、サーモアスカス属 (*Thermoascus*)、チエラビア属 (*Thielavia*)、またはトリポクラジウム属 (*Tolypocladium*) 株である。

【0109】

ある態様では、ホスト細胞は哺乳動物細胞である。そのような細胞は、ヒトまたは非ヒト細胞でありうる。 10

【0110】

他のある態様では、ホスト細胞は、原核性であり、ある態様では、その原核生物は、エシェリキア・コリ (*E. coli*)、バチルス・サブティリス (*Bacillus subtilis*)、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*)、クロストリジウム種 (*Clostridium* sp.)、クロストリジウム・フィトフェルメンタス (*Clostridium phytofermentans*)、クロストリジウム・サーモセラム (*Clostridium thermocellum*)、クロストリジウム・ベイジェリンキイ (*Clostridium beijerinckii*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (モーレラ・サーモアセティカ) (*Clostridium acetobutylicum* (*Moorella thermoacetica*))、サーモアナEROバクテリウム・サッカロリティカム (*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*)、またはクレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) である。他の態様では、原核ホスト細胞は、カルボキシドセラカルボキシドセラ種 (*Carboxydocella* sp.)、コルネバクテリウム・グルタミクム (*Corynebacterium glutamicum*)、エンテロバクテリアセ工科 (Enterobacteriaceae)、エルウィニア・クリサンテミ (*Erwinia chrysanthemi*)、ラクトバチルス種 (*Lactobacillus* sp.)、ペディオコッカス・アシデラクティシ (*Pediococcus acidilactici*)、ロドシュードモナス・カプスラタ (*Rhodopseudomonas capsulata*)、ストレプトコッカス・ラクティス (*Streptococcus lactis*)、ビブリオ・ファーニシイ (*Vibrio furnissii*)、ビブリオ・ファーニシイ M1 (*Vibrio furnissii M1*)、カルディセルロシルブター・サッカロリティカス (*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*)、またはザントモナス・カンペストリス (*Xanthomonas campestris*) である。他の態様では、ホスト細胞はシアノバクテリアである。細菌ホスト細胞の追加的な例には、非限定的に、エシェリキア属 (*Escherichia*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*)、アゾトバクター属 (*Azotobacter*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、バチルス属 (*Bacillus*)、シユードモナス属 (*Pseudomonas*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、プロテウス属 (*Proteus*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、シゲラ属 (*Shigella*)、リゾビア属 (*Rhizobia*)、ビトレシラ属 (*Vitreoscilla*)、シネココックス属 (*Synechococcus*)、シネコシスティス属 (*Synechocystis*)、およびパラコッカス属 (*Paracoccus*) 分類網に割当てられる種が含まれる。 30

【0111】

複合N-グリカンを製造するための本発明の方法において、その方法は、融合タンパク質が発現されるようにホスト細胞を培養するステップを含む。微生物ホストについて、このプロセスは、細胞を適切な培地で培養することを必要とする。典型的には、細胞は適切な培地で35度で成長される。本発明におけるある成長培地には、例えば、Luria-Bertani (LB) プロス、Sabouraudデキストロース (SD) プロスまたは酵母培地 (YM) プロスなどの一般的な市販の調製済み培地が含まれる。他の限定成長培地または合成成長培地も使用することができ、特定のホスト細胞の成長に適切な培地は、微生物学または発酵科学の技術者に公知である。成長に適切な温度範囲および他の条件は、当技術分野において公知である (例えば、Bailey and Ollis 1986参照)。ある態様では、細胞培養物のpHは3.5から7.5の間、4.0から7.0の間、4.5から6.5の間、5から5.5の間、または5.5である。 40 50

【0112】

複合N-グリカンを製造する方法に使用されるホスト細胞は、「発明のリコンビナントタンパク質」という標題の節に記載された任意の本発明のリコンビナントタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する。ある態様では、ホスト細胞は、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有し、ここで、融合タンパク質は、アクセプター性グリカンの末端Man 3残基へのN-アセチルグルコサミンおよび末端Man 6残基へのN-アセチルグルコサミンの転移を触媒して複合N-グリカンを製造する。

【0113】

ある態様では、ホスト細胞は、UDP-GlcNAcトランスポーターをコードするポリヌクレオチドを含有する。UDP-GlcNAcトランスポーターをコードするポリヌクレオチドは、ホスト細胞に内因性（すなわち、自然に存在する）であってもよく、またはそのポリヌクレオチドは、ホスト細胞に異種であってもよい。

【0114】

ある態様では、ホスト細胞は、-1,2-マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する。-1,2-マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチドは、ホスト細胞に内因性であってもよく、またはそのポリヌクレオチドは、ホスト細胞に異種であってもよい。これらのポリヌクレオチドは、効率的なエキソ-1,2-マンノシダーゼ切断をされずにゴルジ体からERに移行した高マンノースグリカンを発現しているホスト細胞に特に有用である。-1,2-マンノシダーゼは、グリコシドヒドロラーゼファミリー47 (cazy.org/GH47_all.html) に属するマンノシダーゼI型酵素でありうる。ある態様では、-1,2-マンノシダーゼは、cazy.org/GH47_characterized.htmlに列挙された酵素である。特に、-1,2-マンノシダーゼは、ER性-1-マンノシダーゼI EC 3.2.1.113酵素サブファミリー中の酵素などの、糖タンパク質を切断するER型酵素でありうる。そのような酵素の例には、ヒト-2-マンノシダーゼ1B (AAC26169)、哺乳動物ERマンノシダーゼの組み合わせ、または-1,2-マンノシダーゼ (MDS1) などの糸状菌酵素が含まれる (T. reesei AAC34579; Maras M et al. J Biotech. 77, 2000, 255)。細胞質発現のために、マンノシダーゼの触媒ドメインは、典型的には、HDEL、KDEL、またはERタンパク質もしくは初期ゴルジ体タンパク質の部分などのターゲティングペプチドと融合されるか、あるいは動物または植物マンノシダーゼI酵素の内因性ERターゲティング構造と共に発現される。

【0115】

ある態様では、ホスト細胞は、ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する。ガラクトシルトランスフェラーゼは、末端N-アセチルグルコサミニル残基に-結合型ガラクトシル残基を転移する。ある態様では、ガラクトシルトランスフェラーゼは-4-ガラクトシルトランスフェラーゼである。一般に、-4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、CAYグリコシルトランスフェラーゼファミリー7に属し (cazy.org/GT7_all.html)、これには、N-アセチルラクトサミンシターゼ (EC 2.4.1.90) としても知られている、-N-アセチルグルコサミニル-グリコペプチド-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (EC 2.4.1.38) が含まれる。有用なサブファミリーには、4-GalT1、4-GalT-II、-III、-IV、-V、および-VI、例えば哺乳動物もしくはヒト4-GalT-Iもしくは4-GalT-II、-III、-IV、-V、および-VI、またはその任意の組み合わせが含まれる。4-GalT1、4-GalTII、または4-GalTIIIは、特に、GlcNAcMan3、GlcNAc2Man3、またはGlcNAcMan5などのN-グリカン上の末端GlcNAc2構造のガラクトシル化にとって有用である (Guo S. et al. Glycobiology 2001, 11:813-20)。触媒領域の三次元構造が公知であり（例えば(2006) J.Mol.Biol. 357: 1619-1633）、その構造は、PDBデータベース中にコード2FYDで描写されている。CAYデータベースは、ある種の酵素の例を含

10

20

30

40

50

んでいる。特徴づけられた酵素もまた、cazy.org/GT7_characterized.htmlのCAZyデータベース中に列挙されている。有用な4GalT酵素の例には、4GalT1、例えばウシBos taurus酵素A A A 3 0 5 3 4 . 1 (Shaper N.L. et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 (6), 1573-1577 (1986))、ヒト酵素 (Guo S. et al. Glycobiology 20 01, 11:813-20)、およびMus musculus酵素A A A 3 7 2 9 7 (Shaper, N.L. et al. 1998 J. Biol. Chem. 263 (21), 10420-10428) ; 4GalTII酵素、例えばヒト 4GalTII BAA75819 . 1、チャイニーズハムスター-Cricetulus griseus AAM77195、Mus musculus酵素 BAA34385、およびニホンメダカOryzias latipes BAH36754 ; ならびに 4GalTIII酵素、例えばヒト 4GalTIII BAA75820 . 1、チャイニーズハムスター-Cricetulus griseus AAM77196 10 およびMus musculus酵素AAF22221が含まれる。

【0116】

ガラクトシルトランスフェラーゼは、ホスト細胞の細胞質中に発現されうる。Schwientek J. Biol. Chem 1996 3398に記載されたKre2ペプチドなどの異種ターゲティングペプチドを使用することができる。ガラクトシルトランスフェラーゼの発現のために使用することができるプロモーターには、gpdなどの構成的プロモーター、ゴルジ体またはERでN-グリカンを合成する内因性グリコシル化酵素およびマンノシルトランスフェラーゼなどのグリコシルトランスフェラーゼのプロモーター、ならびにcbh1プロモーターなどの高収量内因性タンパク質の誘導性プロモーターが含まれる。

【0117】

ホスト細胞がガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する本発明のある態様では、ホスト細胞は、UDP-Galおよび/またはUDP-Galトランスポーターをコードするポリヌクレオチドも含有する。ホスト細胞がガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する本発明のある態様では、ホスト細胞を培養する場合にグルコースの代わりにラクトースを炭素源として使用してもよい。培地は、pH 4.5から7.0の間または5.0から6.5の間でありうる。ホスト細胞が、ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドおよびUDP-Galおよび/またはUDP-Galトランスポーターをコードするポリヌクレオチドを含有する本発明のある態様では、Mn2+、Ca2+またはMg2+などの二価陽イオンが細胞培養培地に添加される場合がある。

【0118】

ある態様では、ホスト細胞は、シアリルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する。シアリルトランスフェラーゼは、Neu5Acなどの3-または6-結合型シアリル酸をガラクトシル化複合グリカンの末端Galに転移する。適切なシアリルトランスフェラーゼの例は、グリコシル化タンパク質ファミリー29 (cazy.org/GT29.html) から見出すことができる。有用な3-または6-シアリルトランスフェラーゼには、特定のサブファミリーST6Gal-Iを有する-ガラクトシド-2,6-シアリルトランスフェラーゼ(EC2.4.99.1)、および-ガラクトシド-2,3-シアリルトランスフェラーゼ(EC2.4.99.4)との交差反応性がありうるN-アセチルラクトサミニド-2,3-シアリルトランスフェラーゼ(EC2.4.99.6)が含まれる。有用なサブタイプの3-シアリルトランスフェラーゼには、ST3Gal-I IIIおよびST3Gal-I Vが含まれる。これらのうち、ある酵素学的に特徴づけられた種は、グリコシル化酵素のCAZyデータベースに特徴づけられたように列挙されている (cazy.org/GT29_characterized.html)。3-または6-結合型シアリルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドは、ホスト細胞に内因性であってもよく、またはホスト細胞に異種であってもよい。ホスト細胞でのシアリル化は、特に真菌、植物、線虫/寄生虫、または昆虫細胞における、CMP-Neu5AcなどのドナーCMP-シアリル酸を合成する酵素の発現を必要としうる。

【0119】

ホスト細胞は、増加または低下した活性レベルの様々な内因性酵素を有しうる。低下し

10

20

30

40

50

た活性レベルは、阻害剤、抗体などを用いて内因性酵素の活性を阻害することにより提供されうる。ある様では、ホスト細胞は、様々な内因性酵素の活性を増加または低下するやり方で遺伝的に改変される。「遺伝的に改変」は、ポリペプチドを増加したレベルで、低下したレベルで、または突然変異した形態で発現する原核または真核ホスト細胞を生み出すために使用される任意のリコンビナントDNAまたはRNA法を表す。言い換えると、リコンビナントポリヌクレオチド分子がホスト細胞にトランスフェクション、トランスフォーメーション、またはトランスタクションされ、その結果、所望のタンパク質の発現を変更するように、その細胞は変更されている。

【0120】

遺伝子発現、遺伝子の機能、または遺伝子生成物（すなわち、遺伝子によってコードされるタンパク質）の機能低下を生じる遺伝的改変は、遺伝子発現の不活性化（完全または部分的）、欠失、中断、遮断、サイレンシング、またはダウンレギュレーション、または減弱と呼ぶことができる。例えば、遺伝子によりコードされるタンパク質の機能低下を生じる、そのような遺伝子における遺伝的改変は、遺伝子の完全欠失（すなわち、その遺伝子が存在しないことにより、タンパク質が存在しない）、タンパク質の不完全な翻訳もしくは無翻訳を生じる（例えば、タンパク質が発現されない）遺伝子突然変異、またはタンパク質の自然機能を低下させるもしくは打ち消す遺伝子突然変異（例えば、酵素活性もしくは作用が減少もしくは消失したタンパク質が発現される）の結果でありうる。より具体的には、本明細書に論じられたタンパク質の作用を減少させることへの参照は、一般に、タンパク質の発現および/または機能性（生物学的活性）の低下を生じる、問題となるホスト細胞における任意の遺伝的改変を表し、それには、タンパク質の活性低下（触媒作用減少）、タンパク質の阻害または分解の増加、およびタンパク質の発現の低下または消失が含まれる。例えば、本発明のタンパク質の作用または活性は、タンパク質の生成を遮断もしくは低下させること、タンパク質の作用を低下させること、またはタンパク質の作用を阻害することによって減少させることができる。これらの改変のいくつかの組み合わせも可能である。タンパク質の生成を遮断または低下させることは、そのタンパク質をコードする遺伝子を、成長培地中に誘導化合物の存在を必要とするプロモーターのコントロール下に置くことを含みうる。誘導因子が培地から枯渇するように条件を確立することによって、タンパク質をコードする遺伝子の発現（したがって、タンパク質合成）を止めることが可能である。タンパク質の作用を遮断または低下させることは、また、米国特許第4,743,546号に記載の技法に類似した切り出し技法のアプローチを使用することを含む場合がある。このアプローチを使用するために、関心がもたれるタンパク質をコードする遺伝子が特異的遺伝子配列の間にクローニングされ、ゲノムからの遺伝子の特異的でコントロールされた切り出しが可能になる。切り出しが、例えば、米国特許第4,743,546号のように培養物の培養温度の変化によって、または何か他の物理学的もしくは栄養学的シグナルによって促進することができる。

【0121】

一般に、本発明によると、突然変異タンパク質または改変タンパク質の所与の特徴（例えば酵素活性）における増加または減少は、同じ生物から（同じ起源または親配列から）得られた野生型（すなわち正常な未改変）タンパク質の同じ特徴に関して起こり、その特徴は、同じまたは等価の条件下で測定または達成される。同様に、遺伝的に改変されたホスト細胞の特徴（例えば、タンパク質の発現および/もしくは生物学的活性、または生成物の生成）における増加または減少は、同種の、好ましくは同株の、野生型ホスト細胞の同じ特徴に関して、同じまたは等価の条件下で起こる。そのような条件下には、タンパク質の活性（例えば、発現もしくは生物学的活性）またはホスト細胞の他の特徴が測定されるアッセイ条件または培養条件（例えば培地組成、温度、pHなど）、および使用されるアッセイの種類、評価されるホスト細胞などが含まれる。上述のように、等価の条件は、類似であるが、必ずしも同一ではなく（例えば、条件における幾分の保守的変化を許容することができる）、同条件下で行われた比較に比べて、細胞成長または酵素発現または生物学的活性に及ぼす作用を実質的には変化しない条件（例えば培養条件）である。

【0122】

好ましくは、所与のタンパク質（例えば酵素）の活性を増加または減少させる遺伝的改変を有する、遺伝的に改変されたホスト細胞は、それぞれ、野生型ホスト細胞における野生型タンパク質の活性に比べて、タンパク質の活性または作用（例えば、発現、生成および／または生物学的機能）の少なくとも約5%、より好ましくは少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約15%、より好ましくは少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約25%、より好ましくは少なくとも約30%、より好ましくは少なくとも約35%、より好ましくは少なくとも約40%、より好ましくは少なくとも約45%、より好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約55%、より好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約65%、より好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%、または5%から100%の間の全整数での任意のパーセンテージ（例えば、6%、7%、8%など）の増加または減少を有する。単離された改変核酸分子またはタンパク質を単離された野生型核酸分子またはタンパク質と直接比較する場合（例えば、*in vitro*と*in vivo*の比較を行う場合）、同じ差異が確実である。

10

【0123】

本発明の別の局面では、所与のタンパク質（例えば酵素）の活性を増加または減少させる遺伝的改変を有する、遺伝的に改変されたホスト細胞は、それぞれ、野生型ホスト細胞における野生型タンパク質の活性に比べて、タンパク質の活性または作用（例えば、発現、生成および／または生物学的活性）の少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも約5倍、より好ましくは少なくとも約10倍、より好ましくは約20倍、より好ましくは少なくとも約30倍、より好ましくは少なくとも約40倍、より好ましくは少なくとも約50倍、より好ましくは少なくとも約75倍、より好ましくは少なくとも約100倍、より好ましくは少なくとも約125倍、より好ましくは少なくとも約150倍、または少なくとも約2倍から始まる任意の全整数変化分（例えば、3倍、4倍、5倍、6倍など）の増加または減少を有する。

20

【0124】

ある態様では、ホスト細胞は、野生型ホスト細胞における活性レベルに比べて、低下した活性レベルのドリキル-*P*-Man:Man(5)G1cNAc(2)-PP-ドリキルマンノシルトランスフェラーゼを有する。ドリキル-*P*-Man:Man(5)G1cNAc(2)-PP-ドリキルマンノシルトランスフェラーゼ(EC2.4.1.130)は、-D-マンノシル残基をドリキル-リン酸D-マンノースから膜脂質結合型オリゴ糖に転移する。典型的には、ドリキル-*P*-Man:Man(5)G1cNAc(2)-PP-ドリキルマンノシルトランスフェラーゼ酵素は、*alg3*遺伝子によってコードされる。ある態様では、ホスト細胞は、野生型ホスト細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルの*alg3*遺伝子を有する。ある態様では、*alg3*遺伝子は、ホスト細胞から欠失されている。

30

【0125】

ある態様では、ホスト細胞は、野生型ホスト細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルの-1,6-マンノシルトランスフェラーゼを有する。-1,6-マンノシルトランスフェラーゼ(EC2.4.1.232)は、-D-マンノシル残基をGD*P*-マンノースからタンパク質結合型オリゴ糖に転移し、ゴルジ装置で- (1,6)-D-マンノシル-D-マンノース結合を引き起こす伸長を形成する。典型的には、-1,6-マンノシルトランスフェラーゼ酵素は、*och1*遺伝子によってコードされる。ある態様では、ホスト細胞は、野生型ホスト細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルの*och1*遺伝子を有する。ある態様では、*och1*遺伝子はホスト細胞から欠失されている。

40

【0126】

ある態様では、ホスト細胞は、低下したレベルのプロテアーゼ活性を有する。ある態様

50

では、様々なプロテアーゼをコードする遺伝子が、ホスト細胞から欠失されている。これらの遺伝子には、例えば、*p e p 1* (アスペルギルス属 (*Aspergillus*) での *p e p A*)などのプロテアーゼおよびセロビオヒドロラーゼ 1 (*c b h 1*)などのセルロース分解酵素をコードする遺伝子が含まれる。

【0127】

ある態様では、ホスト細胞は、相同組み換えの効率を高めるために、低下した活性レベルの非相同末端結合 (NHEJ) 関連タンパク質を有しうる。ある態様では、これらのタンパク質をコードする遺伝子は、ホスト細胞から欠失されている。遺伝子およびそれらのホモログには、非限定的に、例えばNinomiyaら (2004)、Ishibashiら (2006)、Villalbaら (2008)、およびMizutaniら (2008) に記載されているような *K u 7 0*、*K u 8 0*、*L i g 4*、*R a d 5 0*、*X r s 2*、*S i r 4*、*L i f 1*、または*N e i 1*が含まれる。

10

【0128】

複合N-グリカンを製造する方法のある態様では、ホスト細胞は、野生型トリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルのドリキル-P-Man:Man (5) GlcNAc (2) - PP - ドリキルマンノシルトランスフェラーゼを有するトリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞である。

【0129】

複合N-グリカンを製造する方法の他のある態様では、ホスト細胞は、野生型酵母細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルのドリキル-P-Man:Man (5) GlcNAc (2) - PP - ドリキルマンノシルトランスフェラーゼおよび低下した活性レベルの - 1, 6 - マンノシルトランスフェラーゼを有する酵母細胞であって、さらに、 - 1, 2 - マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチドを含む酵母細胞である。

20

【0130】

複合N-グリカンを *in vitro* 製造する方法

別の局面では、本発明は、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II 触媒ドメインを含む融合タンパク質、アクセプター性グリカン、ならびにN-アセチルグルコサミンドナーと一緒に緩衝液中でインキュベーションするステップを含む、複合N-グリカンを製造する方法を提供し、ここで、融合タンパク質は、アクセプター性グリカンの末端Man 3 残基へのN-アセチルグルコサミンの転移および末端Man 6 残基へのN-アセチルグルコサミンの転移を触媒して複合N-グリカンを製造する。ある態様では、アクセプター性グリカンは、アミノ酸、ペプチド、またはポリペプチドに結合している。ある態様では、アクセプター性グリカンは、異種ポリペプチドに結合している。ある態様では、アクセプター性グリカンはMan 3 である。ある態様では、N-アセチルグルコサミンドナーは、UDP-GlcNAcトランスポーターである。典型的には、緩衝液は、Mn²⁺、Ca²⁺、またはMg²⁺などの二価陽イオンを濃度1 μM~100 mM、100 μM~50 mM、または0.1 mM~2.5 mMの濃度で含有する。N-アセチルグルコサミン性ドナーは、典型的には、アクセプター性グリカン上の反応性アクセプター部位に関して1.1~100倍過剰などのモル過剰で使用される。アクセプター性グリカンの濃度は、典型的には、1 μMから100 mM、100 μMから50 mM、または1から2.5 mMの間である。アクセプター性グリカンがポリペプチドに結合している場合、分子量がより高くなることから、その濃度範囲は典型的には下限にある。反応成分の濃度は、緩衝液中のそれらの溶解度に基づき調整することができる。酵素活性の量 (ユニット) は、妥当な反応時間内に効率的な反応が可能になるように調整することができる。妥当な反応時間は、典型的には数分~数日である。ある態様では、反応時間は、約0.5時間~1日または1~6時間であろう。

30

【0131】

有用な緩衝液には、約5~8.5、5.5~8.0、または6.0および7.5のpH範囲のTRIS、HEPES、MOPSなどの、融合タンパク質に適切な緩衝液が含まれる。典型的には、TRIS、HEPES、またはMOPS緩衝液の濃度は、pHを維持するために調整された、5から150 mMの間、10から100 mMの間、または10から6

40

50

0 mMの間であろう。反応は、10～200 mMのNaClなどの塩および/または酵素を安定化するがグリコシル化できないタンパク質（例えば、純粋な非グリコシル化アルブミンまたはアクセプター性グリカン不含アルブミン）を添加することによって最適化することができる。特定の一態様では、*in vitro*反応は、細胞培養培地中で行われるように調整される。反応速度を低下させるために、リン酸緩衝液を使用してもよい。

【0132】

Man₃GlcNAc₂グリカンを製造するための細胞および方法

別の局面では、本発明は、*alg3*突然変異およびMan₃GlcNAc₂を含有する糸状菌細胞を提供し、ここで、Man₃GlcNAc₂には、細胞によって分泌される中性N-グリカンの少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または100% (mol%) が含まれる。中性N-グリカンは、アミノ酸、ペプチド、またはポリペプチドに結合している場合がある。*alg3*遺伝子は、点突然変異または*alg3*遺伝子全体の欠失などの、当技術分野で公知の任意の手段により突然変異誘発することができる。好ましくは、*alg3*タンパク質の機能は、*alg3*突然変異により低下または消失している。糸状菌細胞は、アクレモニウム属 (Acremonium)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium)、クリプトコッカス属 (Cryptococcus)、クリソスボリウムス属 (Chrysosporium)、クリソスボリウム・ラクノウェンス (Chrysosporium lucknowense)、フィリバシジウム属 (Filobasidium)、フザリウム属 (Fusarium)、ジベレラ属 (Gibberella)、ヒュミコラ属 (Humicola)、マグナポルテ属 (Magnaporthe)、ムコール属 (Mucor)、ミセリオソラ属 (Myceliophthora)、ミロセシウム属 (Myrothecium)、ネオカリマスティクス属 (Neocallimastix)、ニューロスボラ属 (Neurospora)、ペシロミセス属 (Paecilomyces)、ペニシリウム属 (Penicillium)、ピロミセス属 (Piromyces)、シゾフィラム属 (Schizophyllum)、スキタリジウム属 (Scytalidium)、タラロミセス属 (Talaromyces)、サーモアスカス属 (Thermoascus)、チエラビア属 (Thielavia)、トリポクラジウム属 (Tolypocladium)、またはトリコデルマ属 (Trichoderma) 細胞でありうる。ある態様では、糸状菌細胞は *T. reesei* 細胞である。ある態様では、糸状菌細胞は、さらに、任意の本発明のリコンビナントタンパク質をコードする一つまたは複数のポリヌクレオチドを含有する。例えば、糸状菌細胞は、さらに、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインをコードする第1のポリヌクレオチドおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインをコードする第2のポリヌクレオチドを含有しうる。または、糸状菌細胞は、さらに、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有しうる。

【0133】

なお別の局面では、本発明は、ホスト細胞においてMan₃GlcNAc₂グリカンを製造する方法であって、野生型ホスト細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルのマンノシリルトランスフェラーゼを有するホスト細胞を提供するステップ、およびホスト細胞を培養してMan₃GlcNAc₂グリカンを製造するステップを含む方法を提供し、ここで、Man₃GlcNAc₂グリカンは、ホスト細胞により分泌される中性N-グリカンの少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または100% (mol%) を構成する。

【0134】

Man₃GlcNAc₂グリカンは、アミノ酸、ペプチド、またはポリペプチドなどの分子に結合している場合がある。ある態様では、アミノ酸はアスパラギン残基である。アスパラギン残基は、側鎖アミドからアミノグリコシド結合している場合があり（生物学的哺乳動物タンパク質N-グリカン結合構造）、ジペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドなどのペプチド鎖の部分でありうる。グリカンは、還元末端誘導体、例えば還元性GlcNAcまたはManのN、O、またはC結合型誘導体、好ましくはグリコシド誘導体、アミノ酸、アルキル、ヘテロアルキル、アシル、アルキルオキシ、アリール、アリ

10

20

30

40

50

ールアルキル、およびヘテロアリールアルキルの群より選択される、あるグリカン結合型構造を有するスペーサーまたは末端有機残基などでありうる。スペーサーは、さらに、多価担体または固相に結合している場合がある。ある態様では、アルキル含有構造には、メチル、エチル、プロピル、およびC₄ - C₂₆アルキル、グリセロ脂質、リン脂質、ドリコール-リン脂質およびセラミドなどの脂質ならびに誘導体が含まれる。還元末端は、また、第二級アミン結合または誘導体構造への還元的アミノ化により誘導体化することができる。特定の担体には、(ポリ)ペプチド、多糖、例えばデキストラン、セルロース、アミロース、またはグリコサミノグリカンなどの生体高分子またはオリゴマー、ならびにポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド(例えば、ナイロンもしくはポリスチレン)、ポリアクリルアミド、およびポリ乳酸を含めたプラスチック、PAMAM、StarburstもしくはStarfishデンドリマーなどのデンドリマー、またはポリリシン、およびポリエチレングリコール(PEG)などのポリアルキルグリコールなどの他の有機ポリマーまたはオリゴマーが含まれる。固相には、マイクロタイターウェル、シリカ粒子、ガラス、金属(鋼、金および銀が含まれる)、ポリマービーズ、例えばポリスチレンまたは樹脂ビーズ、ポリ乳酸ビーズ、多糖ビーズまたは有機スペーサー含有磁気ビーズが含まれうる。

【0135】

ある態様では、Man₃GlcNAc₂グリカンは、異種ポリペプチドに結合している。ある態様では、異種ポリペプチドは、治療用タンパク質である。治療用タンパク質には、モノクローナル抗体、エリスロポイエチン、インターフェロン、成長ホルモン、酵素、または凝固因子が含まれる場合があり、治療用タンパク質は、ヒトまたは動物の処置に有用でありうる。例えば、Man₃GlcNAc₂グリカンは、リツキシマブなどの治療用タンパク質に結合している場合がある。典型的には、Man₃GlcNAc₂グリカンは、さらに改変されて複合グリカンになる。そのような改変は、ホスト細胞においてin vivoで、またはin vitro法により行われうる。

【0136】

ある態様では、マンノシルトランスフェラーゼは、ドリキル-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-ドリキルマンノシルトランスフェラーゼである。典型的には、ドリキル-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-ドリキルマンノシルトランスフェラーゼ酵素は、alg3遺伝子によりコードされる。ある態様では、ホスト細胞は、野生型ホスト細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルのalg3遺伝子を有する。ある態様では、alg3遺伝子は、ホスト細胞から欠失されている。配列番号97および98は、それぞれ、T. reeseiにおけるalg3遺伝子の核酸配列およびアミノ酸配列を提供する。

【0137】

ある態様では、ホスト細胞における-1,6-マンノシルトランスフェラーゼの活性レベルは、野生型ホスト細胞における活性レベルに比べて低下していない。典型的には、-1,6-マンノシルトランスフェラーゼ酵素は、och1遺伝子によりコードされる。ある態様では、ホスト細胞は、-1,2-マンノシダーゼをコードする内因性ポリヌクレオチドを含有する。

【0138】

ある態様では、ホスト細胞はトリコデルマ属(Trichoderma)細胞であり、ある態様では、ホスト細胞はトリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)細胞である。

【0139】

発明の糸状菌細胞

さらなる一局面では、本発明は、野生型糸状菌細胞におけるalg3遺伝子の発現レベルに比べて低下した発現レベルの本発明のalg3遺伝子を有する糸状菌細胞を提供し、ここで、その糸状菌細胞は、「発明のリコンビナントタンパク質」という標題の節に記載されたような任意の本発明のリコンビナントタンパク質も含有する。例えばある態様では、糸状菌細胞は、さらに、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインを含む融合タ

10

20

30

40

50

ンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する。融合タンパク質の発現は、ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターによってコントロールされうる。プロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターでありうる。ある好ましい態様では、プロモーターは、c b h 1 誘導性プロモーターなどの誘導性プロモーターである。

【0140】

別の局面では、本発明は、野生型糸状菌細胞におけるa l g 3 遺伝子の発現レベルに比べて低下した発現レベルの本発明のa l g 3 遺伝子を有する糸状菌細胞を提供し、ここで、糸状菌細胞は、また、リコンビナントN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインをコードする第1のポリヌクレオチドおよびリコンビナントN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインをコードする第2のポリヌクレオチドを含有する。そのような態様では、リコンビナントN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインの発現は、第1のポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターによりコントロールされ、リコンビナントN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインの発現は、第2のポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターによりコントロールされる。プロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターでありうる。特定の好ましい態様では、プロモーターは、c b h 1 誘導性プロモーターなどの誘導性プロモーターである。

【0141】

他の態様では、リコンビナントN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインおよびリコンビナントN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインが別々のポリペプチドとして発現されるように、単一のポリヌクレオチドが、それらのドメインの両方をコードしうる。そのような態様では、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドからの各触媒ドメインの別々の翻訳を可能にする配列内リボソーム進入部位を含有しうる。そのような態様では、リコンビナントN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインの発現は、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインをコードするポリヌクレオチドの部分に作動可能に連結されたプロモーターによってコントロールされ、リコンビナントN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインの発現は、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインをコードするポリヌクレオチドの部分に作動可能に連結されたプロモーターによってコントロールされる。プロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターでありうる。ある好ましい態様では、プロモーターは、c b h 1 誘導性プロモーターなどの誘導性プロモーターである。

【0142】

本明細書に開示するようなN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI (G 1 c N A c - T I ; G n T I ; E C 2 . 4 . 1 . 1 0 1)は、反応U D P - N - アセチル - D - グルコサミン + 3 - (- D - マンノシル) - - D - マンノシル - R U D P + 3 - (2 - (N - アセチル - - D - グルコサミニル) - - D - マンノシル) - - D - マンノシル - R を触媒する(式中、Rは、グリカンアクセプター中のN - 結合型オリゴ糖の残りを表す)。N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインは、この反応を触媒することができるN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI酵素の任意の部分である。様々な生物由来のN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI酵素についてのアミノ酸配列を、配列番号1 ~ 19に列挙する。追加的なG n T I酵素は、C A Z y データベースのグリコシルトランスフェラーゼファミリー13 (cazy.org/GT13_all)に列挙されている。酵素的に特徴づけられた種には、アラビドブシス・タリアナ (A . thaliana) A A R 7 8 7 5 7 . 1 (米国特許第6 , 6 5 3 , 4 5 9号)、カエノラブディティス・エレガヌス (C. elegans) A A D 0 3 0 2 3 . 1 (Chen S. et al J. Biol. Chem. 1999;274(1):288-97)、ドロソフィラ・メラノガスター (D. melanogaster) A A F 5 7 4 5 4 . 1 (Sarkar & Schachter Biol. Chem. 2001 Feb;382(2):209-17) ; クリセツルス・グリセウス (C. griseus) A A C 5 2 8 7 2 . 1 (Puthalakath H. et al J. Biol. Chem. 1996 271(44):27818-22) ; ホモ・サピエンス (H. sapiens) A A A 5 2 5 6 3 . 1

10

20

30

40

50

(Kumar R. et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Dec;87(24):9948-52) ; メラノクロミス・アウラツス (M. auratus) A A D 0 4 1 3 0 . 1 (Opat As et al. Biochem J. 1998 Dec 15;336 (Pt 3):593-8) (非活性化突然変異体の一例を含む) 、ウサギ、オリクトラグス・クニクルス (O. cuniculus) A A A 3 1 4 9 3 . 1 (Sarkar M et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jan 1;88(1):234-8) が含まれる。特徴づけられた活性酵素の追加的な例は、cazy.org/GT13_characterizedに見出すことができる。ウサギ G n T I 触媒ドメインの 3 D 構造は、Unligil UM et al. EMBO J. 2000 Oct 16;19(20):5269-80 に X 線結晶学によって規定された。G n T I についてのProtein Data Bank (P D B) 構造は、1 F O 8 、 1 F O 9 、 1 F O A 、 2 A M 3 、 2 A M 4 、 2 A M 5 、および 2 A P C である。ある態様では、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインは、ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 酵素 (配列番号 1) 、またはその変異体に由来する。ある態様では、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインは、配列番号 1 のアミノ酸残基 8 4 ~ 4 4 5 と少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % 同一の配列を含有する。いくつかの態様では、より短い配列を触媒ドメインとして使用することができる (例えは、ヒト酵素のアミノ酸残基 1 0 5 ~ 4 4 5 またはウサギ酵素のアミノ酸残基 1 0 7 ~ 4 4 7 ; Sarkar et al. (1998) Glycoconjugate J 15:193-197) 。G n T I 触媒ドメインとして使用することができる追加的な配列には、ヒト酵素のアミノ酸約 3 0 ~ 4 4 5 番のアミノ酸残基またはヒト酵素のアミノ酸残基 3 0 ~ 1 0 5 から開始しアミノ酸約 4 4 5 番まで連続する任意の C 末端ステムドメイン、あるいは別の G n T I またはその触媒活性変異体もしくは突然変異体の対応する相同配列が含まれる。触媒ドメインは、ステムドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞質ドメインの全てまたは部分などの、酵素の N 末端部分を含みうる。 10 20

【 0 1 4 3 】

本明細書に開示するような N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I (G 1 c N A c - T I I ; G n T I I ; E C 2 . 4 . 1 . 1 4 3) は、反応 U D P - N - アセチル - D - グルコサミン + 6 - (- D - マンノシル) - - D - マンノシル - R U D P + 6 - (2 - (N - アセチル - - D - グルコサミニル) - - D - マンノシル) - - D - マンノシル - R を触媒する (式中、 R は、グリカンアクセプター中の N - 結合型オリゴ糖の残りを表す) 。 N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインは、この反応を触媒することができる N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素の任意の部分である。様々な生物由来の N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素についてのアミノ酸配列を、配列番号 2 0 ~ 3 3 に列挙する。ある態様では、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインは、ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 酵素 (配列番号 2 0) 、またはその変異体に由来する。追加的な G n T I I 種は、C A Z y データベースのグリコシルトランスフェラーゼファミリー 1 6 に列挙されている (cazy.org/GT16_all) 。酵素的に特徴づけられた種には、カエノラブディティス・エレガヌス (C. elegans) 、ドロソフィラ・メラノガスター (D. melanogaster) 、ホモ・サピエンス (Homo sapiens) 、ラツス・ノルベギグス (Rattus norvegicus) 、スス・スクロファ (Sus scrofa) (cazy.org/GT16_characterized) の G n T I I が含まれる。ある態様では、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインは、配列番号 2 1 の約 3 0 ~ 約 4 4 7 番アミノ酸残基と少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % 同一の配列を含有する。触媒ドメインは、ステムドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞質ドメインの全てまたは部分などの酵素の N 末端部分を含みうる。 30 40

【 0 1 4 4 】

糸状菌細胞が本発明の融合タンパク質を含有する態様では、融合タンパク質は、さらに

、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインとN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインの間にスペーサーを含有しうる。「スペーサー」という標題の節に記載されたような本発明の任意のスペーサーを使用することができる。ある好ましい態様では、スペーサーは、EGIVスペーサー、2×G4Sスペーサー、3×G4Sスペーサー、またはCBHIスペーサーである。他の態様では、スペーサーは、ステムドメイン由来の配列を含有する。

【0145】

ER / ゴルジ体に発現させるために、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIおよび/またはN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインは、典型的にはターゲティングペプチドと、またはERタンパク質もしくは初期ゴルジタンパク質の一部と融合されるか、あるいは動物または植物N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ酵素の内因性ERターゲティング構造と共に発現される。ある好ましい態様では、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIおよび/またはN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII触媒ドメインは、「ターゲティングペプチド」という標題の節に記載されたような本発明の任意のターゲティングペプチドを含有する。好ましくは、ターゲティングペプチドは、触媒ドメインのN末端に結合している。いくつかの態様では、ターゲティングペプチドは、「ターゲティングペプチド」という標題の節に記載されたような本発明の任意のステムドメインを含有する。ある好ましい態様では、ターゲティングペプチドはKre2ターゲティングペプチドである。他の態様では、ターゲティングペプチドは、さらに、ステムドメインのN末端に結合した膜貫通ドメインまたはステムドメインのN末端に結合した細胞質ドメインを含有する。ターゲティングペプチドがさらに膜貫通ドメインを含有する態様では、ターゲティングペプチドは、さらに、膜貫通ドメインのN末端に結合した細胞質ドメインを含有しうる。

【0146】

本発明のalg3遺伝子の発現レベルは、非限定的にalg3遺伝子を突然変異誘発することを含めた、当技術分野で公知の任意の適切な方法により低下させることができる。alg3は、例えば、点突然変異またはalg3遺伝子全体の欠失によって突然変異誘発することができる。好ましくは、alg3タンパク質の機能は、alg3の突然変異により低下または消失している。alg3遺伝子は、ドリキル-P-Man:Man(5)G1cNAc(2)-PP-ドリキル-1,3-マンノシルトランスフェラーゼをコードする。本明細書に開示されたように、本発明のドリキル-P-Man:Man(5)G1cNAc(2)-PP-ドリキルマンノシルトランスフェラーゼは、-D-マンノシル残基をドリキルリン酸D-マンノースから膜脂質結合型オリゴ糖に転移する。

【0147】

ある態様では、糸状菌細胞は、UDP-GlcNAcトランスポーターをコードするポリヌクレオチドを含有しうる。UDP-GlcNAcトランスポーターをコードするポリヌクレオチドは、糸状菌細胞に内因性の（すなわち自然に存在する）場合があり、または糸状菌細胞に異種の場合がある。

【0148】

他の態様では、糸状菌細胞は、また、「ホスト細胞」という標題の節に記載されたような、本発明の-1,2-マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチドを含有しうる。

-1,2-マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチドは、糸状菌細胞に内因性の場合があり、または糸状菌細胞に異種の場合がある。これらのポリヌクレオチドは、特に、効率的なエキソ- -2-マンノシダーゼ切断をされずにゴルジ体からERに移行した高マンノース性グリカンを発現している糸状菌細胞に有用である。細胞質発現のために、マンノシダーゼの触媒ドメインは、典型的には、HDEL、KDEL、またはERタンパク質もしくは初期ゴルジタンパク質の部分などのターゲティングペプチドと融合されるか、あるいは動物または植物マンノシダーゼI酵素の内因性ERターゲティング構造と共に発現される。

【0149】

10

20

30

40

50

さらなる態様では、糸状菌細胞は、また、「ホスト細胞」という標題の節に記載されたような、本発明のガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有しうる。ガラクトシルトランスフェラーゼは、-結合型ガラクトシル残基を末端N-アセチルグルコサミニル残基に転移する。ある態様では、ガラクトシルトランスフェラーゼは-4-ガラクトシルトランスフェラーゼである。ガラクトシルトランスフェラーゼは、糸状菌の細胞質中に発現されうる。Schwientek J.Biol. Chem 1996 3398に記載されたKre2ペプチドのような異種ターゲティングペプチドを使用してもよい。ガラクトシルトランスフェラーゼの発現のために使用することができるプロモーターには、gpdなどの構成的プロモーター、ゴルジ体またはERでN-グリカンを合成する内因性グリコシル化酵素およびマンノシルトランスフェラーゼなどのグリコシルトランスフェラーゼのプロモーター、ならびにcbeh1プロモーターなどの高収量内因性タンパク質の誘導性プロモーターが含まれる。ホスト細胞がガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する本発明の態様では、ホスト細胞は、また、UDP-Galおよび/またはUDP-Galトランスポーターをコードするポリヌクレオチドを含有する。糸状菌細胞がガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有する本発明のある態様では、糸状菌細胞を培養する場合にグルコースの代わりにラクトースを炭素源として使用してもよい。培地は、pH 4.5から7.0の間または5.0から6.5の間でありうる。糸状菌細胞が、ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドおよびUDP-Galおよび/またはUDP-Galトランスポーターをコードするポリヌクレオチドを含有する本発明のある態様では、Mn²⁺、Ca²⁺またはMg²⁺などの二価陽イオンが細胞培養培地に添加される場合がある。

【0150】

他の態様では、糸状菌細胞は、また、「ホスト細胞」という標題の節に記載されたような、本発明のシアリルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含有しうる。シアリルトランスフェラーゼは、Neu5Acなどの3-または6-結合型シアリル酸をガラクトシル化複合グリカンの末端Galに転移する。3-または6-結合型シアリルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドは、糸状菌細胞に内因性の場合があり、または糸状菌細胞に異種の場合がある。糸状菌細胞でのシアリル化は、特に真菌、植物、線虫/寄生虫、または昆虫細胞での、CMP-Neu5AcなどのドナーCMP-シアリル酸を合成する酵素の発現を必要としうる。

【0151】

追加的に、糸状菌細胞は、増加または低下した活性レベルの様々な追加的な内因性酵素を有しうる。低下した活性レベルは、阻害剤、抗体などを用いて内因性酵素の活性を阻害することにより提供されうる。ある態様では、糸状菌細胞は、一つまたは複数の内因性酵素の活性を増加または低下するやり方で遺伝的に変更される。糸状菌細胞を遺伝的に変更して一つまたは複数の内因性酵素の活性を増加または低下させる方法は、当技術分野において周知であり、それには、非限定的に、「ホスト細胞」という標題の節に記載の方法が含まれる。ある態様では、糸状菌細胞は、野生型糸状菌細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルの-1,6-マンノシルトランスフェラーゼを有する。ゴルジ装置での-1,6-マンノシルトランスフェラーゼ(EC2.4.1.232)は、伸長を開始する-D-マンノシル残基をGDP-マンノースからタンパク質結合型N-グリカンオリゴ糖に転移して、-(1,6)-D-マンノシル-D-マンノース結合を形成する。典型的には、-1,6-マンノシルトランスフェラーゼ酵素は、och1遺伝子によってコードされる。ある態様では、糸状菌細胞は、野生型糸状菌細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルのoch1遺伝子を有する。ある態様では、och1遺伝子は、糸状菌細胞から欠失されている。

【0152】

糸状菌細胞は、例えば、アクレモニウム属(Acremonium)、アスペルギルス属(Aspergillus)、アウレオバシジウム属(Aureobasidium)、クリプトコッカス属(Cryptococcus)、クリソスポリウムス属(Chrysosporium)、クリソスポリウム・ラクノウェンス(Chr

10

20

30

40

50

ysosporium lucknowense)、フィリバシジウム属 (Filibasidium)、フザリウム属 (Fusarium)、ジベレラ属 (Gibberella)、ヒュミコラ属 (Humicola)、マグナポルテ属 (Magnaporthe)、ムコール属 (Mucor)、ミセリオフソラ属 (Myceliophthora)、ミロセシウム属 (Myrothecium)、ネオカリマスティクス属 (Neocallimastix)、ニューロスボラ属 (N eurospora)、ペシロミセス属 (Paecilomyces)、ペニシリウム属 (Penicillium)、ピロミセス属 (Piromyces)、シゾフィラム属 (Schizophyllum)、スキタリジウム属 (Scytalidium)、タラロミセス属 (Talaromyces)、サーモアスカス属 (Thermoascus)、チエラビア属 (Thielavia)、トリポクラジウム属 (Tolypocladium)、またはトリコデルマ属 (Trichoderma) 細胞でありうる。ある態様では、糸状菌細胞は *T. reesei* 細胞である。

【0153】

10

発明の方法により製造された複合N-グリカンを含有する薬学的組成物

別の局面では、本発明は、薬学的に許容されうる担体と一緒に製剤化された、本発明の方法により製造された異種分子に結合した一つまたは複数の複合N-グリカンを含有する組成物、例えば薬学的組成物を提供する。本発明の薬学的組成物は、また、併用療法で、すなわち他の薬剤と組み合わせて投与することができる。例えば、併用療法は、本発明による異種分子に結合した複合N-グリカンを、少なくとも一つの他の治療剤と共に含みうる。

【0154】

20

本明細書に使用するような、「薬学的に許容される担体」には、生理学的に適合性の、任意および全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗細菌および抗真菌剤、等張化および吸収遅延剤などが含まれる。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与（例えば、注射または注入による）に適する。投与経路に応じて、活性化合物、すなわち本発明による異種分子に結合した複合N-グリカンは、その化合物を不活性化するおそれのある酸の作用および他の自然条件からその化合物を保護するための材料でコーティングされる場合がある。

【0155】

30

本発明の薬学的組成物は、一つまたは複数の薬学的に許容されうる塩を含みうる。「薬学的に許容されうる塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を保持する塩であって、望まれない毒性学的作用を全く与えない塩を表す（例えば、Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19参照）。そのような塩の例には、酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。酸付加塩には、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの無毒の無機酸から、ならびに脂肪族モノカルボン酸およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族スルホン酸および芳香族スルホン酸などの無毒の有機酸から得られるものが含まれる。塩基付加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属から、ならびにN, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの無毒の有機アミンから得られるものが含まれる。

【0156】

40

本発明の薬学的組成物には、また、薬学的に許容されうる抗酸化剤が含まれうる。薬学的に許容される抗酸化剤の例には：(1) アスコルビン酸、システィン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの水溶性抗酸化剤；(2) パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール (BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、-トコフェロールなどの油溶性抗酸化剤；および(3) クエン酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート剤が含まれる。

【0157】

50

本発明の薬学的組成物に採用されうる、適切な水性および非水性担体の例には、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびその適切な混合物、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルな

どの注射用有機エステルが含まれる。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング物質の使用により、分散物の場合は必要な粒子径の維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。

【0158】

これらの組成物は、また、保存料、湿潤剤、乳化剤および分散剤などの佐剤を含有する。微生物の存在の防止は、滅菌手順により、および様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などを入れることにより保証することができる。糖、塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物に入れることも望ましい場合がある。加えて、注射用薬学的剤形の持続吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収遅延剤を入れることによって引き起すことができる。

10

【0159】

薬学的に許容される担体には、無菌水溶液または無菌分散物、および無菌注射液または無菌注射用分散物の即時調製用の無菌粉末が含まれる。薬学的活性物質のためのそのような媒質および薬剤の使用は、当技術分野において公知である。任意の従来の媒質または薬剤が活性化合物と不適合性である場合を除き、本発明の薬学的組成物にそれを使用することが考えられている。補充的な活性化合物も組成物に混ぜ込むことができる。

【0160】

治療用組成物は、典型的には製造および保存の条件で無菌および安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルション、リポソーム、または高い薬物濃度に適した他の秩序化構造として製剤化することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体プロピレングリコールなど）、およびその適切な混合物を含有する溶媒または分散媒でありうる。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散物の場合は必要な粒子径の維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。多くの場合、等張化剤を、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウムを、組成物に入れることが望ましい。注射用組成物の持続吸収は、組成物にモノステアリン酸塩およびゼラチンなどの吸収遅延剤を入れることにより引き起こされる。

20

【0161】

無菌注射液は、必要量の活性化合物を、必要に応じて上に列挙した成分の一つまたは組み合わせと共に適切な溶媒中で混ぜ合わせ、続いてマイクロ濾過滅菌することにより調製することができる。一般に、分散物は、基本分散媒および上に列挙した成分からの必要な他の成分を含有する無菌ビヒクル中に活性化合物を混ぜ合わせることにより調製される。無菌注射液調製用の無菌粉末の場合、ある調製方法は、活性成分に加えて任意の追加的な所望の成分の粉末を、予め濾過滅菌されたその溶液から回収する、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。

30

【0162】

1回投与剤形を製造するために担体物質と組み合わせることができる活性成分の量は、処置される対象および特定の投与様式に応じて変動する。1回投与剤形を製造するために担体物質と組み合わせることができる活性成分の量は、一般に、治療効果を生じる組成物の量である。一般に、この量は、薬学的に許容される担体と活性成分を合計した100%のうち、約0.01%～約99%、好ましくは約0.1%～約70%、最も好ましくは約1%～約30%に及ぶ。

40

【0163】

投薬計画は、最適な所望の応答（例えば治療応答）を提供するように調整される。例えば、単回ボーラス投与を行ってもよく、経時的に数回の分割投与を行ってもよく、または治療状況の緊急性によって示されるように用量を比例的に減少または増加させてもよい。投与の容易さおよび薬用量の均一性のために、非経口組成物をユニット投薬剤形で製剤化することが特に好都合である。本明細書に使用するようなユニット投薬剤形は、処置される対象のためのユニット投薬量として適切な、物理的に別個のユニットを表し、各ユニットは、必要な薬学的担体と共同して所望の治療効果を生じるように計算された、所定量の

50

活性化合物を含有する。本発明のユニット投薬形態についての規格は、(a)活性化合物の獨特の特徴および達成されるべき特定の治療効果、ならびに(b)個体での感受性を取り扱うための、そのような活性化合物を配合する技術に固有の制限によって決定され、それらに直接依存する。

【0164】

異種分子に結合した複合N-グリカンの投与のために、特に、異種分子が抗体である場合、薬用量は、ホストの体重に対して約0.0001~100mg/kg、より通常には0.01~5mg/kgに及ぶ。例えば、薬用量は、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重もしくは10mg/kg体重、または1~10mg/kgの範囲内でありうる。例示的な処置方式は、1週間1回、隔週1回、3週間に1回、4週間に1回、1ヶ月1回、3ヶ月に1回または3~6ヶ月に1回の投与を必要とする。異種抗体に結合した複合N-グリカンのための特定の投薬方式には、1mg/kg体重または3mg/kg体重の静脈内投与が含まれ、抗体は、以下の投薬スケジュールの一つを用いて与えられる：(i)4週間毎の投薬を6回、次に3ヶ月毎；(ii)3週間毎；(iii)3mg/kg体重を1回、続いて3週間に毎に1mg/kg体重。

【0165】

または、本発明による異種分子に結合した複合N-グリカンは、徐放製剤として投与することができ、その場合、より回数の少ない投与が必要とされる。薬用量および回数は、患者での投与された物質の半減期に応じて変動する。一般に、ヒト抗体が最長の半減期を示し、ヒト化抗体、キメラ抗体、および非ヒト抗体がそれに続く。投与の投薬量および回数は、その処置が予防的であるか治療的であるかに応じて変動しうる。予防的適用では、比較的低い薬用量が比較的数少ない時間で長期間投与される。一部の患者は、余命の間、処置を受け続ける。治療適用では、疾患の進行が減速または終了するまで、好ましくは患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで、比較的短い間隔で比較的高用量が必要な場合がある。その後、患者に予防的方式を投与することができる。

【0166】

本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の薬用量レベルは、患者に毒性を有さずに、特定の患者、組成物、および投与様式に関して所望の治療応答を達成するために有効な活性成分の量を得るために変動させることができる。選択された薬用量レベルは、採用された本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、採用される特定の化合物の排泄速度、処置期間、採用された特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物および/または材料、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康状態および病歴などの、医学分野で周知の要因を含めた多様な薬物動態要因に依存する。

【0167】

本発明の免疫グロブリンの「治療有効薬用量」は、好ましくは、疾患症状の重症度の減少、無症状期の回数および期間の増加、または病苦による障害もしくは不能の予防を生じる。例えば、腫瘍の処置について「治療有効薬用量」は、好ましくは、未処置の対象に比べて、細胞の成長または腫瘍の成長を少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、なにより好ましくは少なくとも約60%、いっそうより好ましくは少なくとも約80%阻害する。化合物が腫瘍の成長を阻害する能力は、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系で評価することができる。または、組成物のこの性質は、化合物が、当業者に公知のアッセイによりそのような阻害をin vitro阻害する能力を検討することによって評価することができる。治療用化合物の治療有効量は、腫瘍径を減少させるか、またはさもないと対象における症状を改善しうる。当業者は、対象のサイズ、対象の症状の重症度、および選択された特定の組成物または投与経路のような要因に基づき、そのような量を決定することができよう。

【0168】

本発明の組成物は、当技術分野において公知の多様な一つまたは複数の方法を用いて、一つまたは複数の投与経路を介して投与することができる。当業者に理解されるように、

10

20

30

40

50

投与経路および／または投与様式は、所望の結果に応じて変動する。本発明の結合部分のためのある種の投与経路には、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または他の非経口投与経路、例えば注射または注入によるものが含まれる。本明細書に使用するような「非経口投与」という語句は、経腸投与および局所投与以外の投与様式、通常は注射によるものを意味し、それには、非限定的に、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、関節包内、眼窩内、心腔内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、囊下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内の注射および注入が含まれる。

【0169】

または、本発明による異種分子に結合した複合N-グリカンは、局所、上皮または粘膜投与経路、例えば、鼻腔内、経口、経膣、直腸、舌下または局所などの非腸管外(nonparenteral)経路を介して投与することができる。

【0170】

活性化合物は、植込剤、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化デリバリーシステムを含めた徐放製剤などの、化合物を迅速放出から保護する担体を用いて調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの、生分解性の生体適合性ポリマーを使用することができる。そのような製剤を調製するための多数の方法が特許を得ているか、または一般に当業者に公知である。例えば、*Sustained and Controlled Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0171】

治療用組成物は、当技術分野において公知の医療用具を用いて投与することができる。例えば、ある態様では、本発明の治療用組成物は、米国特許第5,399,163号；同第5,383,851号；同第5,312,335号；同第5,064,413号；同第4,941,880号；同第4,790,824号；または同第4,596,556号に開示された用具などの、無針皮下注射用具を用いて投与することができる。本発明に有用な周知の植込剤およびモジュールの例には：米国特許第4,487,603号（この特許は、コントロールされた速度で薬物（medication）を分配するための植込み可能なマイクロ注入ポンプを開示している）；米国特許第4,486,194号（これは、皮膚を経由して医薬を投与するための治療用具を開示している）；米国特許第4,447,233号（これは、正確な注入速度で薬物を送達するための薬物注入ポンプを開示している）；米国特許第4,447,224号（これは、連続薬物デリバリーのための変流量の植込み可能な注入装置を開示している）；米国特許第4,439,196号（これは、多チャンバー区画を有する浸透圧薬物デリバリーシステムを開示している）；および米国特許第4,475,196号（これは、浸透圧薬物デリバリーシステムを開示している）が含まれる。

【0172】

ある態様では、本発明による異種分子に結合した複合N-グリカンの使用は、治療用抗体で処置されうる任意の疾患の処置のためである。

【0173】

本発明をそのいくつかの具体的な態様と一緒に説明したが、前述の説明は、本発明の範囲を例示するつもりであって、限定するつもりではないことを理解されたい。本発明の範囲内の他の局面、利点、および改変は、本発明が属する技術分野の専門家に明らかであろう。

【0174】

本発明を説明したが、主題発明を限定としてではなく、例証として例示するために以下の実施例を提供する。

【0175】

実施例

実施例1 - 糖鎖工学のためのホスト株の選択

本実施例の目的は、糖鎖工学のために最適なT. reesei株を同定することであった。最

10

20

30

40

50

適な株は、多量のM a n 5 N - グリカンおよび少量の酸性グリカンを製造する。

【 0 1 7 6 】

試料

M 4 4 (V T T - D - 0 0 7 7 5 ; Selinheimo et al., FEBS J. 2006, 273(18): 4322 -35) 、 M 8 1 、 M 8 4 、 M 1 0 9 、 M 1 1 0 、 M 1 3 1 、 M 1 3 2 、 M 1 3 3 、 M 1 3 4 および M 1 2 4 (M 4 4 の m u s 5 3 欠失株) を含めた様々な T. reesei 株を分析した。10 株のそれぞれを振盪フラスコ培養で成長させた。試料を 3 日、 5 日、および 7 日の異なる 3 時点で採取した。上清 (分泌タンパク質) および細胞ペレットの両方を収集し、グリカン分析を行うまで - 2 0 で凍結保存した。

【 0 1 7 7 】

表示された時点からの分泌タンパク質から N - グリカンを単離し、続いてマトリックス支援レーザー脱離 / イオン化 - 飛行時間型 (M A L D I - T O F) グリカンプロファイリングを行った。5 日の時点からの細胞ペレットを N - グリカンプロファイリングに供した。合計 8 0 個の試料 (中性および酸性上清画分各 3 0 個、および中性および酸性ペレット画分各 1 0 個) を分析に供した。

【 0 1 7 8 】

振盪フラスコ培養と発酵槽培養の間のグリカンプロファイルの差を判断するために、 M 4 4 株も回分培養および流加発酵槽培養に供した。グリカン分析のために、異なる 3 時点からの試料を、合計 1 2 個の試料について分析した (6 個の中性画分および 6 個の酸性画分) 。対照として培地を分析した。

【 0 1 7 9 】

質量分析法

Bruker Ultraflex T O F / T O F 装置 (Bruker Daltonics, Germany) で M A L D I - T O F 質量分析を行った。中性 N - グリカンは、陽イオンリフレクター モードで [M + N a] ⁺ イオンとして検出し、酸性 N - グリカンは、陰イオンリニアモードで [M - H] ⁻ イオンとして検出した。中性 N - グリカン成分の相対的モル存在量は、スペクトルの相対シグナル強度に基づき割当てた。提示されたグリカンプロファイル中の発生したグリカンシグナルを 1 0 0 % に基準化し、試料間の比較を可能にした。

【 0 1 8 0 】

タンパク質特異的グリコシル化法

発酵槽培養した試料からのタンパク質を S D S - P A G E で分離し、 P V D F メンブランにプロッティングした。関心がもたれるタンパク質バンドを切り出し、 P N G a s e F を用いた酵素的放出により N - グリカンを遊離させた。

【 0 1 8 1 】

T. reesei 株の中性 N - グリカンプロファイル

所望の M a n 5 構造は、図 1 に示した質量スペクトルの m / z 値 1 2 5 7 . 4 に [M + N a] ⁺ シグナルとして観測することができる。分析された T. reesei 株の中性グリコームは、主要な中性グリカン種として M a n 5 または M a n 8 のいずれかを有することが見出された (表 2 の H 5 N 2 および H 8 N 2) 。

【 0 1 8 2 】

10

20

30

40

【表2】

表2: 分析された *T. reesei* 株の種々の中性 N-グリカンシグナルのパーセンテージ

組成	m/z	株									
		M44	M81	M84	M109	M110	M131	M132	M133	M134	M124
H3N2	933	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
H4N2	1095	1.2	0.0	0.0	1.8	0.9	0.0	2.3	0.0	2.3	4.1
H5N2	1257	81.0	70.8	4.0	78.9	5.8	78.8	84.1	10.7	73.2	77.9
H6N2	1419	5.8	5.3	0.0	5.3	0.9	4.8	4.6	0.9	6.0	7.3
H7N2	1581	4.8	7.3	1.5	4.7	3.0	4.8	3.9	3.8	5.8	4.8
H8N2	1743	3.7	8.6	81.5	5.1	68.2	5.9	2.6	68.1	6.3	3.3
H9N2	1905	2.9	8.0	9.0	3.4	16.0	4.6	2.0	12.8	5.7	2.3
H10N2	2067	0.5	0.0	2.5	0.8	3.7	1.1	0.4	2.5	0.7	0.4
H11N2	2229	0.0	0.0	1.5	0.0	1.4	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0
H12N2	2391	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

【0183】

中性 N - グリカン画分中にいくつかの酸性 N - グリカンが観測された。これは、リン酸化グリカンの特異的性質、例えばホスホジエステル構造の存在、またはこの研究に使用された実験条件下の中性画分への酸性種の漏出につながりうるホスホグリカンの他の性質が原因であるおそれがあった。対応する構造をチェックするために、関心がもたれるシグナルを MS / MS 分析に供した。グリカンの質量分析フラグメンテーションは、Bruker Ult 10 raflex TOF / TOF を MS / MS 分析モードで使用して行った（図2）。グリカンが完全メチル化（permethylate）されなかったので、MS / MS データに基づく最終的な構造決定を得ることはできなかった。

【0184】

T. reesei 株の酸性 N - グリカンプロファイル

糖鎖工学目的には、最少量の酸性 N - グリカンを有する株を有することが有用であった。したがって、スクリーニングのために使用された株から酸性 N - グリカンプロファイルを分析した。分析された株の酸性 N - グリカンスペクトルを図3および下表3に示す。

【0185】

【表3】

表3: 分析された *T. reesei* 株の種々の酸性 N-グリカンシグナルのパーセンテージ

	m/z	M44	M81	M84	M109	M110	M131	M132	M133	M134	M124
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Hex3HexNAc2SP	989	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hex4HexNAc2SP	1151	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hex5HexNAc2SP	1313	4.0	5.2	0.0	3.7	0.0	2.8	7.4	0.0	5.2	2.8
Hex5HexNAc2SP2	1393	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0
Hex6HexNAc2SP	1475	23.7	27.3	2.2	18.1	2.1	22.4	21.0	3.9	24.9	26.3
Hex6HexNAc2SP2	1555	0.0	2.8	0.0	2.4	0.0	3.2	1.1	0.0	3.6	1.7
Hex7HexNAc2SP	1637	30.3	18.8	1.1	16.2	2.0	14.9	24.7	0.0	17.2	23.3
Hex7HexNAc2SP2	1717	0.0	7.7	0.0	8.6	0.0	10.7	2.5	0.0	10.4	7.0
Hex8HexNAc2SP	1799	18.4	11.8	17.9	12.8	9.7	9.1	19.7	14.5	8.8	11.2
Hex8HexNAc2SP2	1879	5.1	8.8	0.0	11.0	0.0	14.8	4.0	0.0	12.4	10.0
Hex9HexNAc2SP	1961	7.3	6.4	49.1	9.5	37.9	5.9	6.1	53.9	4.1	3.5
Hex9HexNAc2SP2	2041	4.2	5.0	0.0	5.7	0.0	7.3	5.1	0.0	5.9	7.2
Hex10HexNAc2SP	2123	2.8	2.9	19.7	4.5	28.1	2.6	2.3	19.3	2.1	1.6
Hex10HexNAc2SP2	2203	2.8	2.1	0.0	2.2	0.0	2.7	3.6	0.0	1.9	3.3
Hex11HexNAc2SP	2285	1.5	1.3	3.7	2.1	9.5	1.2	0.9	5.0	1.0	0.8
Hex11HexNAc2SP2	2365	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	1.3	1.5	0.0	0.8	1.3
Hex12HexNAc2SP	2447	0.0	0.0	1.3	1.0	1.6	1.0	0.0	0.0	0.5	0.0
Hex12HexNAc2SP2	2527	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0
Hex13HexNAc2SP	2609	0.0	0.0	1.2	0.4	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hex14HexNAc2SP	2771	0.0	0.0	0.6	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

【0186】

発酵槽培養したM44株からのN-グリカンプロファイル

異なる培養条件がM44株のグリカンプロファイルに変化を引き起こしうるかどうかを

10

20

30

40

50

見出すために、M 4 4 株を発酵槽中で培養した。発酵槽中で培養した試料（回分培養；4 1 時間 10 分、8 8 時間 45 分および 11 2 時間 50 分、および流加培養；4 5 時間 50 分、13 1 時間 40 分および 21 7 時間 20 分）について N-グリカン分析を行い、振盪フラスコ培養の N-グリカンと比較した。発酵槽中で培養した *T. reesei* M 4 4 株の分泌タンパク質の中性および酸性 N-グリカンを図 4 に示す。フラスコ培養と発酵槽培養の間の N-グリカンのパーセンテージの比較を下表 4 に示す。

【0187】

【表 4】

表 4: フラスコおよび発酵槽中で培養した *T. reesei* M44 株の N-グリカンシグナルのパーセンテージ

10

組成	m/z	フラスコ	発酵槽
		%	%
H3N2	933	0.0	0.0
H4N2	1095	1.2	0.0
H5N2	1257	81.0	91.3
H6N2	1419	5.8	4.5
H7N2	1581	4.8	4.2
H8N2	1743	3.7	0.0
H9N2	1905	2.9	0.0
H10N2	2067	0.5	0.0
H11N2	2229	0.0	0.0
H12N2	2391	0.0	0.0

【0188】

振盪フラスコ培養の培地の N-グリカン分析

対照実験として、*T. reesei* の培地（真菌との接触なし）を分析した。図 5 a に、中性 N-グリカンの分析を示すが、その分析で N-グリカンは観測されなかった。ヘキソースオリゴマーの小さなシグナル（最もありそうなことには、培地に使用された植物材料に由来する）が、ベースラインの上に認識できた。図 5 b（酸性グリカン）では、N-グリカンに対応するシグナルは観測されなかった。

20

【0189】

分泌タンパク質の N-グリコシル化

個別の分泌タンパク質の間のグリコシル化に変動があるかどうかをチェックするために、発酵培養上清からの試料を SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブランにプロッティングした。次に、選択されたバンドの N-グリカンを、メンブラン上の酵素放出を用いて取り外した。結果を図 6 および 7 に示す。

30

【0190】

結論：中性グリカン

本研究の目的は、最高量の Man 5 N-グリカンおよび最低量の酸性グリカンを有する、糖鎖工学用の *T. reesei* 株を同定することであった。質量分析での主ピークとして Man 5 を有する株は、より高い内因性 -1, 2- マンノシダーゼ活性を有しうる。*T. reesei* の N-グリコシル化に関する背景情報に基づき、Man 5 に関して有望な構造は、Man 3 [Man 3 (Man 6) Man 6] Man 4 GlcNAc 4 GlcNAc である (Salovuori et al. 1987; Stals et al. Glycobiology 14, 2004, page 725)。

40

【0191】

いくつかの株は、主な中性グリコフォームとして H 8 N 2 を含有した。文献に基づくと、このグリコフォームは、Glc 3 Man 2 Man 2 Man 5 構造である可能性が最も高かった (Stals et al. Glycobiology 14, 2004, page 725)。これらの株でのグル

50

コシダーゼ欠乏が、より小さなグリコフォームへのグリカンのトリミングを阻止している可能性がある。

【0192】

いくつかの株では、中性スペクトル中に酸性N-グリカンが観測された。この状況は、酸性N-グリカンの比率がより高いこと、または酸性グリカンから中性グリカンを分離する際に中性画分中に特異的構造が漏出したことが原因であるおそれがあった。

【0193】

株のグリカンプロファイルは、振盪フラスコよりも発酵槽中で培養したときの方が糖鎖工学にとって少しだけ好都合であった。発酵槽培養された試料からの個別のタンパク質のグリコシル化は、平均的グリコシル化と有意差がなかった。分析された全タンパク質は、主グリコフォームとしてMan5を含有した。この観測は、全ての分泌タンパク質が類似のグリカンプロセッシングを受けることを示唆した。したがって、大部分の分泌タンパク質がT. reeseiホスト細胞によって同様にグリコシル化されたように見えた。哺乳動物細胞の場合、このことは必ずしも当てはまらない。

【0194】

酸性グリカン

末端リン酸残基は抗体などの標準的な治療用タンパク質に存在しないことから、一般に、N-グリカンのリン酸化は、糖鎖工学のために望ましくない。この決まりのいくつかの例外は、リソソームグリコシル化貯蔵障害のために使用される少数の専門タンパク質である。N-グリカンのリン酸化は、真菌においてタンパク質特異的でありうる。動物では、20 マンノースリン酸化が、保存されたリソソームターゲティングシグナルである。

【0195】

今日まで、T. reesei N-グリカンの硫酸化の報告はなかった。したがって、本報告において言及される酸性構造は、リン酸化グリカンが有望であった。

【0196】

リン酸化は、フラスコ培養の場合のようにT. reeseiを低pH値で培養したときの方がよく見られるが、これは、低pHストレスおよび菌糸体破損と関係する可能性がある (Stals et al., 2004, Glycobiology 14:713-724)。この研究では、フラスコ培養試料と発酵槽培養試料の間に明らかな差が観測された。酸性N-グリカンが振盪フラスコ培養試料から観測され、その全てがリン酸化N-グリカンであった。発酵槽試料中の酸性N-グリカンの量は、検出限界未満であったおそれがあるか、またはより高いpHのせいでグリカンの有意なリン酸化がなかったおそれがある。中性グリカン種と酸性グリカン種の間でイオン化効率が異なることから、この研究に使用した方法でN-グリカン全量に対する酸性N-グリカンの比率を検証できなかった。

【0197】

リン酸化レベルを決定するために、回分培養および流加発酵槽中で培養されたT. reeseiの分泌タンパク質10 μgから、N-グリカナーゼによりN-グリカンを放出させた。Bradfordに基づく方法を使用して、標準としてBSAを用いてタンパク質濃度を測定した。1 pmolの標準分子NeuAcHex4HeXNAc2を酸性N-グリカンに添加してからMALDI-TOF分析を行った。培養物のpHを低下させた場合、主グリコフォームの量(発酵槽についてHex7HeXNAc2Pおよびフラスコ培養についてHex6-8HeXNAc2P)は、回分培養の分泌タンパク質に対して0.9 pmol/10 μg、流加培養の分泌タンパク質に対して0.6 pmol/10 μg、およびフラスコ培養の分泌タンパク質に対して160 pmol/10 μgであった。中性N-グリカン試料に添加した標準グリカンHex2HeXNAc4 10 pmolを使用して、中性N-グリカンの量を測定し、その後MALDI-TOF分析を行った。主グリコフォームHex5HeXNAc2の量は、回分培養および流加培養の分泌タンパク質に対して87 pmol/10 μgであり、フラスコ培養の分泌タンパク質に対して145 pmol/10 μgであった。したがって、N-グリカン全量に対する酸性N-グリカンの比率は、回分培養で1%、流加培養で0.7%、およびフラスコ培養で5.2%であった。定量は、MALDI-TOFのデータを用いたシグナル強度

10

20

30

40

50

の比較のみに基づいた。

【0198】

N-グリカンは、また、酸性画分の方が大型であった。これは、1個のヘキソースユニットを伴うリンがグリカン骨格に結合されるホスホマンノシル化反応が原因であったおそれがある。いくつかのニリン酸化構造が酸性スペクトルに認められた。この説明は、以前に公表された、*T. reesei*に見出されたリン酸化グリカンに関するデータと一致する (Stals et al. 2004, Glycobiology 14:725-737)。発酵槽中で培養したとき、酸性N-グリカンの比率は、非常に低く、検出限界未満であった。

【0199】

*T. reesei*培地のN-グリカンスペクトルからは、*T. reesei*のN-グリコームに植物材料含有培地由来のグリカンが混入していることが明らかにならなかった。

【0200】

結論として、異なる*T. reesei*株のN-グリカン分析は、M44、M109、M131、M132およびM124株における主グリコフォームがMan5またはMan3[Man3(Man6)Man6]Man4GlcNAc4GlcNAcであることを明らかにした。Man5生成株における副成分としてのH8N2を含めて、グルコースが存在する可能性が考えられた。2株(M109およびM131)は、H7N2よりも大量のH8N2を含有した。豊富なH8N2は、グルコシダーゼの部分的欠乏を示した可能性がある。

【0201】

M44株は、リン酸化グリカンをほとんど含有しなかった。中性グリカン画分からm/z1521およびm/z1683でのシグナルとして観測された漏出性酸性グリカンは、M131、M109、M132およびM124株からの試料で観測され、それは、より高いリン酸化レベルおよび潜在的ホスホジエステル構造の存在を示した。

【0202】

本研究の目的は、Man5Gn2構造の最大生成および酸性(リン酸化)N-グリカンの低レベル生成を有する株を見出すことであった。最良の株は、pHコントロールした振盪フラスコ培養条件下で80%を超えるMan5を有した。最良の株は、また、ニリン酸化グリカン生成および/またはより大型のリン酸化構造の生成が低下していた(表3参照)。

【0203】

実施例2 - A1g3欠損*Trichoderma*株の產生

ベクターの構築および株の產生

ALG3マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を*Trichoderma reesei*ゲノム配列から同定した。a1g3遺伝子の1000bpの5'および3'フランキング領域フラグメントの間にアセトアミダーゼ選択マーカーを挿入するために破壊構築物を設計した。フランキング領域フラグメントをPCRにより増幅し、*Saccharomyces cerevisiae*での相同組み換えクローニングにより構築物を作製した。消化により破壊力セットをその骨格ベクターから放出させ、*T. reesei* M124株にトランスフォーメーションした。トランスフォーマントをアセトアミダーゼ培地で選択し、その構築物の5'フランキング領域フラグメント外側のフォワードプライマーおよびAmdS選択マーカー内部のリバースプライマーを用いたPCRによりスクリーニングした。

【0204】

トランスフォーマントのスクリーニング

62個のスクリーニング済みトランスフォーマントのうち58個から、a1g3ローカスへの構築物の組み込みに予想されたサイズのPCR生成物が得られた。9個のPCR陽性トランスフォーマントを単一胞子培養により精製して単核クローンにし、それらから胞子懸濁液を調製した。これらの9個のクローンを、破壊力セットが正しく組み込まれたかについて、サザンハイブリダイゼーションにより分析した。親株および9個のクローンからのEcoRI消化ゲノムDNAを、標準ハイブリダイゼーション条件下でa1g3プロ

10

20

30

40

50

ープとハイブリダイゼーションした。プローブは、任意のクローン由来のDNAとではなく、親株由来のDNAとハイブリダイゼーションし、alg3欠失が成功したことを示した(図8)。

【0205】

AmidSプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによりさらなる分析を行った。AmidS遺伝子を欠失カセット中に入れ、その遺伝子は、親株由来のDNAからではなく、トランスフォーマント由来のDNAから検出可能であると予測された。親株M124および9個のトランスフォーマントのゲノムDNAをEcoRI+PvuI(E+P)およびKpnI+NheI(K+N)で消化した。alg3-AmidS欠失カセットを有するNotI消化プラスミドを陽性対照として使用した。プローブは、陽性対照由来の予想される約2.7kbフラグメント(Amids)を認識したが、親株とハイブリダイゼーションしなかった。全てのトランスフォーマントから、予想されたシグナルが得られ(E+Pについて1.6+2.8kbおよびK+Nについて1.7+3.4kb、図9Bに矢印で示す)、欠失カセットの正しい組み込みを示した。クローン11Aおよび15Aは、いくつかの追加的なフラグメントのハイブリダイゼーションも示したが、これは、ゲノムへの欠失カセットの非特異的組み込みを示唆している(図9B)。

【0206】

N-グリカンの分析論

5個の異なるAlg3ノックアウト株(4A、5A、6A、10Aおよび16A)ならびに親株M124の振盪フラスコ培養物をN-グリカンについて分析した。3、5、7、および9日の時点から試料を収集した。全ての培養物を二つ組で成長させた。

【0207】

ランダムに選択したノックアウト株(4A)からの分泌タンパク質のタンパク質濃度を、全ての時点から、プラッドフォードに基づくアッセイを用いてBSA標準曲線と対比させて測定した。最高タンパク質濃度は5日目に検出された。したがって、全部で5個のノックアウト株について5日目の試料をN-グリカン分析のために使用した。二つ組の培養物を含む全試料を三つ組みで分析した。N-グリカン分析のために10μgを使用した。中性および酸性N-グリカンの両方をMALDI-TOFにより分析した。

【0208】

親株M124での主グリコフォームはMan5Gn2であった。全てのAlg3ノックアウト株において、主グリコフォームはMan3であった(図10)。親株M124からMan3は見出されなかった。異なるAlg3ノックアウト株で、Man3の量は、pH低下させた振盪フラスコ培養物中に49.7%から55.2%の間となった。Hex6Gn2は親株で増加した。観測された中性N-グリカンシグナルのパーセンテージとしてのシグナル強度を下表5に示す。

【0209】

【表5】

表5: Alg3ノックアウト株の中性N-グリカン含量

組成	m/z	株											
		親M124		4A		5A		6A		10A		16A	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Hex3HexNAc2	933.31	0.0	0.0	53.6	0.2	55.2	4.2	49.7	0.5	53.3	0.9	53.4	0.9
Hex4HexNAc2	1095.37	1.6	0.1	2.7	0.0	2.9	0.7	3.4	0.1	3.2	0.4	3.4	0.4
Hex5HexNAc2	1257.42	70.2	3.3	8.5	0.2	7.3	1.1	10.4	0.5	8.6	0.9	9.7	0.9
Hex6HexNAc2	1419.48	7.9	1.1	35.0	0.3	34.4	1.9	36.1	0.6	34.9	0.5	33.2	0.7
Hex7HexNAc2	1581.53	7.8	0.6	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	0.0	0.0	0.3	0.4
Hex8HexNAc2	1743.58	5.9	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hex9HexNAc2	1905.63	6.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hex10HexNAc2	2067.69	0.7	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

【0210】

各グリコフォームの種々のアイソマーが存在することは、MALDI-MS分析では観測できないので、さらなるタンデム質量分析研究を行った。最初に、Man3およびHe

10

20

30

40

50

$\times 5$ G n 2 構造を検討した。M a n 3 について、M a n 3 構造が分枝であるか直鎖であるかが問われた。この分析のために、これらの両構造を含有する試料を完全メチル化し、Br uker Ultraflex III T O F / T O F 装置を製造業者の説明書に従って使用して質量分析フラグメンテーションにより分析した（図 1 1 および 1 2）。

【 0 2 1 1 】

次に、H e x 6 G n 2 構造の非還元末端上のヘキソースユニットがマンノースであるかグルコースであるかを判定した。全てのノックアウト株および親株に - マンノシダーゼ消化を行った（図 1 3）。骨格から - マンノースを切断し、- マンノースを無影響のまま残すナタマメ - マンノシダーゼを使用した。生じた構造はM a n 1 G n 2 と予想された。

10

【 0 2 1 2 】

M A L D I での低分子量領域効果のせいで、M a n 1 G 1 c N A c 2 グリカンの相対強度は幾分低下していたおそれがあり、このことは、H e x 6 の相対量のわずかな増加を説明した。- マンノシダーゼ消化後に、M a n 3 およびM a n 4 グリコフォームは消失した。M a n 2 構造は観測されなかった。しかし、H e x 6 (m / z 1 4 1 9) は消化されず（表 6）、構造の非還元末端にグルコースユニットがあったことを示した。いくらかの難消化性H e x 5 も存在したが、これは、おそらくH e x 6 の立体障害されたM a n 6 枝が除去される弱い反応により生成したものと思われる。

【 0 2 1 3 】

【表 6】

20

表 6: α -マンノシダーゼ消化前（ネイティブ）および消化後の Alg3 ノックアウト株 4A の中性 N-グリカン

組成	m/z	4A	
		ネイティブ	α -マンノシダーゼ
Hex1HexNAc2	609.21	0.0	53.2
Hex2HexNAc2	771.26	0.0	0.0
Hex3HexNAc2	933.31	47.5	0.0
Hex4HexNAc2	1095.37	3.8	0.0
Hex5HexNAc2	1257.42	11.7	5.0
Hex6HexNAc2	1419.48	36.8	41.0
Hex7HexNAc2	1581.53	0.2	0.8
Hex8HexNAc2	1743.58	0.0	0.0
Hex9HexNAc2	1905.63	0.0	0.0
Hex10HexNAc2	2067.69	0.0	0.0

【 0 2 1 4 】

Alg3 ノックアウト株から見出された種々の構造の最終分析のために、Alg3 ノックアウト株 4A に大規模 P N G a s e F 消化を行った。2 種の主グリカンを H P L C で精製し（図 1 4）、N M R により分析した（図 1 5）。

30

【 0 2 1 5 】

図 1 5 A に示したデータに基づき、H e x 3 H e x N A c 2 種は、M a n 1 - 3 (M a n 1 - 6) M a n 1 - 4 G 1 c N A c 1 - 4 G 1 c N A c として明確に同定された。M a n 3 およびM a n 6 のH - 1 ユニットは、それぞれ 5 . 1 0 5 および 4 . 9 1 4 ppm で共鳴した。M a n 4 のH - 2 ユニットは 4 . 2 4 5 ppm で観測された。このシグナルは、隣接するM a n 3 - O H 置換が原因で非常に特徴的であった。コア G 1 c N A c ユニットのN - アセチル基のC H 3 シグナルは、2 . 0 3 8 および 2 . 0 7 5 で観測された。これらの値は、Sugabase データベース（www.boc.chem.uu.nl/sugabase/sugabase.html）におけるこの五糖について報告された値とよく一致した。さらに、商業的に製造されたM a n 1 - 3 (M a n 1 - 6) M a n 1 - 4 G 1 c N A c 1 - 4 G 1 c N

40

50

A c (Glycoseparations, Inc.)について同一実験条件でプロトン-NMRスペクトルを測定し、ほぼ同一の化学シフトが得られた。

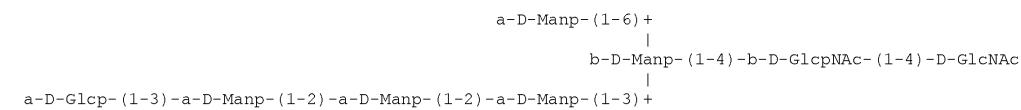
【0216】

H e x 6 H e x N A c 2 成分のNMRスペクトルを図15Bに示す。このデータは、この成分が八糖Glc 1 - 3 Man 1 - 2 Man 1 - 2 Man 1 - 3 (Man 1 - 6) Man 1 - 4 Glc NAc 1 - 4 Glc NAcを表すことを意味する。グルコースユニットの存在は、典型的な Glc の 2.4 Hz カップリングを示す 5.255 シグナルから明らかであった。全ての Man シグナルは、典型的にはエカトリアル H-2 配置が原因の < 1 Hz カップリングを示している。Sugabase データに比べて小さな差が観測されたが（表7）、これは、このNMR測定に使用された温度が異なることに起因する可能性がある（40 に対して 26）。

【0217】

【表7】

表7: Glc α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3(Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc の公表されたNMRデータ。データは Sugabase から得た (boc.chem.uu.nl/sugabase/sugabase にある)。



残基	結合	プロトン	PPM	J	Hz	20
D-GlcNAc		H-1a	5.189			
		H-1b	4.694			
		H-2a	3.867			
		H-2b	3.692			
		NAc	2.038			
b-D-GlcNAc	4	H-1	4.606			
		H-2	3.792			
		NAc	2.077			
b-D-Manp	4, 4	H-1	4.773			
		H-2	4.237			
a-D-Manp	6, 4, 4	H-1	4.913			
		H-2	3.964			
a-D-Manp	3, 4, 4	H-1	5.346			30
		H-2	4.080			
a-D-Manp	2, 3, 4, 4	H-1	5.304			
		H-2	4.103			
a-D-Manp	2, 2, 3, 4, 4	H-1	5.038			
		H-2	4.224			
a-D-Glc	3, 2, 2, 3, 4, 4	H-1	5.247			
		H-2	3.544			

【0218】

最終的に、ランダムに選択されたノックアウト株 4 A の N-グリカンプロファイルを種々の時点で分析した（3、5、7 および 9 日目）。振盪フラスコ培養の pH は開始時点で 4.8 であり、終了時点で 2.6 であった。二つ組の培養物の各時点から三つ組みの試料を分析した。二つ組の両方で、pH 低下のせいで Man 3 Glc 2 シグナルの相対量が成長時間の関数として減少したことが観測された。しかし、Hex 6 Glc 2 シグナルの量は、成長時間の関数として増加した（表8）。

【0219】

10

30

40

【表 8】

表 8: Alg3 4A ノックアウト株から観測された中性グリカンシグナルからのシグナル強度のパーセンテージ。異なる4時点(3, 5, 7および9日目)から二つ組の培養物(3Aおよび4A)を分析した。

Alg3 ノックアウト株 4A (フラスコ 3A)									
組成	m/z	3 日目, 3A		5 日目, 3A		7 日目, 3A		9 日目, 3A	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Hex3HexNAc	730.24	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hex2HexNAc2	771.26	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hex3HexNAc2	933.31	61.7	3.7	61.3	0.8	61.1	1.9	52.7	7.7
Hex4HexNAc2	1095.37	2.6	0.2	2.5	0.1	2.1	0.4	3.7	1.0
Hex5HexNAc2	1257.42	4.3	0.6	6.5	0.4	5.7	0.6	6.4	1.0
Hex6HexNAc2	1419.48	31.4	3.5	29.8	0.4	31.1	1.6	37.2	5.7

10

Alg3 ノックアウト株 4A (フラスコ 4A)									
組成	m/z	3 日目, 4A		5 日目, 4A		7 日目, 4A		9 日目, 4A	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Hex3HexNAc	730.24	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	1.2
Hex2HexNAc2	771.26	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.5
Hex3HexNAc2	933.31	61.7	3.2	58.6	1.1	55.6	1.9	54.8	5.9
Hex4HexNAc2	1095.37	3.4	1.0	2.6	0.2	3.1	0.2	2.6	0.5
Hex5HexNAc2	1257.42	5.2	1.5	6.7	0.4	7.1	0.4	7.6	3.7
Hex6HexNAc2	1419.48	29.7	0.9	32.1	0.8	34.3	1.5	34.0	3.6

20

【0220】

クローン 4 A (5 日目) での Man 3 のパーセンテージに関するこれら二つの分析(表 4 および 7) の間の差異に注目した。この差異は、分析手順の差異によるおそれがあった。凍結解凍サイクル(1 回または複数)後に、異種培地タンパク質調製物のいくぶんの不安定性が観測されたが、これは、グリカンおよび/またはタンパク質の分解が、比較的大型のグリカンの量の低下を招いたことが原因の可能性があった。表 5 でのデータ取得は、追加的な凍結解凍サイクルを含んだ。

30

【0221】

MALDI によって酸性 N - グリカン画分も分析した(図 16)。親株 M124 での種々の酸性化合物の存在度は、全 Alg3 ノックアウト株と異なり、ノックアウト株の間では酸性画分は非常に類似しているように見えた。

30

【0222】

親株における 3 種の主グリカンは H6N2P1、H7N2P1 および H8N2P1 であった。Alg3 ノックアウトでは、サイズがより小さなグリカンに移行して H5N2P1、H6N2P1 および H4N2P1 であった。追加的に、ニリン酸化グリカンは親株の方が豊富であった。これは、リン酸化マンノースをグリカンに結合させる特定の酵素にふさわしい基質が欠如していることが原因であった可能性がある。リン酸化マンノースは、他のマンノース残基によりさらに伸長することができる。リン酸化は、発酵条件下で生成した親 M124 株のグリカン中に実質的には存在しなかった。

40

【0223】

発酵槽成長試料と振盪フラスコ成長試料との比較

一つの Alg3 ノックアウト株(トランスフォーマント 4 A)を、ラクトース - 穀粒粕(spent grain)エキス培地を用いた回分発酵で成長させた。培地は、20 g/l 穀粒粕エキスを有する 60 g/l ラクトースであって、植菌後体積は 7 リットル(発酵槽の運転 bio0161

50

6) であった。他の培地成分は、 KH_2PO_4 および $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ であった。培養 pH は 5.5 から 5.8 の間にコントロールした。運転の経過中にバイオマスおよび培養上清を採取し、-20°C で保存した。起こりうる RNA 分析のために菌糸体試料も収集し、直ちに液体窒素中で凍結させ、-70°C に移した。これらの発酵の全経過から収集した試料を N-グリカン組成について分析した。トランスフォーマント 4A の発酵槽の運転 (b001616) について、および振盪フラスコ培養からの 5 日目の試料について、N-グリカンの分析を実施した (図 17 および 18)。振盪フラスコ培養での主シグナルは Man 3 (59%) であった。発酵槽培養では、主シグナルは Man 3 (85%) であり、Hex 6 の比率は 8% に減少した。

【0224】

10

結論

Alg 3 ノックアウトは、予想される Man 3 グリコフォームを 50% 以上製造することに成功した。Man 3 (Man 6) Man - の所望の分枝構造を、フラグメンテーション質量分析および NMR 法により検証した。

【0225】

Alg 3 ノックアウトの他の生成物には、Man 4 (マンノース含有副生成物)、Hex 5 (図 13 に示す Hex 6 の分解生成物) および 2 番目に大きな成分であった Hex 6 が含まれた。Hex 6 成分は、マンノシダーゼ耐性および Glc 3 Man 末端を含むという特異的 NMR シグナルにより、末端 Glc を含有することが特徴づけられた。グリカン構造は、末端 Glc の量を低下するための方法によりさらに最適化することができると考えられたが、そのことは、末端 Glc は、分子の Man 6 アーム上にマンノースを欠如するグリカンへのグルコシダーゼ II の効力を最適以下にする見込みがあった。発酵条件のさらなる最適化で、末端 Glc の量が低下する可能性がある。

20

【0226】

このデータから、*Aspergillus* (Kainz et al., Appl Environ Microb. 2008 1076-86) および *P. pastoris* (Davidson et al., Glycobiology 2004, 399-407) での Alg 3 ノックアウトについての初期のデータよりも、*T. reesei* の Alg 3 ノックアウトの方が、良好なグリコシル化の結果が示された。Kainz らおよび Davidson らの研究では、類似またはより高い Hex 6 対応生成物レベルが報告された。それらの研究は、2-マンノース、OCH 1 生成物およびより大きなサイズに伴う追加的な問題、ならびに *P. pastoris* 生成された細胞型特異的グリカンも報告した。結論として、*T. reesei* Alg 3 ノックアウトの N-グリカン分析は、ノックアウト株での主グリコフォームが、哺乳動物型 N-グリカンの効率的な産生のために望まれる出発点である、Man 3 Gn 2 であることを明らかにした。

30

【0227】

実施例 3 - 個別の GnTI および GnTII 酵素の精製および活性

ヒト GnTI および GnTII (N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I および N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II) のアクセプター特異性および活性を研究するために、それらの酵素を *Pichia pastoris* において可溶性分泌タンパク質として発現させた。

40

【0228】

P. Pastoris での製造のための GnTI 構築物の產生

ヒト GnTI (P26572) 配列を完全長配列として得て、*Trichoderma reesei* over-express 過剰発現ベクターにサブクローニングした。酵素学的研究用に *Pichia pastoris* で分泌型タンパク質を生成させるために、ヒト GnTI の可溶性部分をコードするタンパク質コード配列 (CDS) を pBLARG-SX 発現ベクターにクローニングした。クローニング手順の際に、His タグをコードする配列をフレームの 5' 末端に付加して切断型タンパク質の N 末端にタグを得た。配列を配列解析により検証した。生じたベクター pTTg5 を線状化し、エレクトロポレーションにより *P. pastoris* GY190 細胞にトランスフォーメーションし、GY4 株を回収した。Arg⁺ トランスフォーマントを釣り上げ、P

50

C R によりスクリーニングした。組み込まれたプラスミドを含有する G Y 4 クローンをタンパク質発現について試験した。

【 0 2 2 9 】

可溶性 G n T I の発現および精製

最初に、可溶性 G n T I を発現している P. pastoris G Y 4 株を B M G Y 培地 (1 % 酵母エキス、 2 % ペプトン、 1 0 0 mM リン酸カリウム (pH 6.0) 、 1 . 3 4 % 酵母ニトロゲンベース、 4 × 1 0 ~ 5 % ビオチン、 1 % グリセロール) 中で + 3 0 にて振盪しながら O D ₆₀₀ が 2 ~ 6 になるまで一晩成長させた。次に、遠心分離により細胞を採取し、 O D ₆₀₀ が 1 になるように B M M Y 培地 (B M G Y と同様であるが、 1 % グリセロールの代わりに 0 . 5 % メタノールを有する) 中に再懸濁した。培養物をバッフル付きフラスコ中に入れ、 + 1 6 の振盪恒温槽に戻した。 1 0 0 % メタノールを終濃度 0 . 5 % になるように 2 4 時間毎に添加し、誘導を維持した。発現培養試料 1 mL を誘導の 0 、 2 4 、 4 8 、および 7 2 時間後に採取し、細胞ペレットおよび上清の両方を分析のために保存した。誘導の 3 日後に、培養物全体からの細胞を遠心分離により採取し、上清を収集し、 G n T I のさらなる精製に供した。

【 0 2 3 0 】

活性アッセイのための粗 G n T I 試料の調製

可溶性 H i s - タグ付き G n T I を含有する Pichia pastoris 細胞培養物を、濃縮および緩衝液交換により活性アッセイ用に処理した。簡潔には、 M e O H を用いた誘導の 3 日後に、 5 0 mL Falcon チューブ (Eppendorf 5810R 、 3 2 2 0 rcf 、 + 4 で 5 分間) 中で細胞をペレットにし、上清を収集することによって、振盪フラスコ培養から P. pastoris 上清 4 0 mL を採取した。次に、 Millipore Amicon Ultraclel 30K コンセントレーターを用いた連続遠心分離 (Eppendorf 5810R または同等物、 3 2 2 0 rcf 、 + 4 で 1 0 分間) により上清を < 2 . 5 mL に濃縮した。濃縮物の体積を 1 0 0 mM M E S (pH 6.1) で 2 . 5 mL に調整した。 P D - 1 0 ゲル濾過カラム (GE Healthcare 17-0851-01) を用いて濃縮物を緩衝液交換に供した。最初にカラムを 1 0 0 mM M E S (pH 6.1) で平衡化し、次に試料 (2 . 5 mL) を添加し、流出液を捨て、 M E S 緩衝液 2 . 2 5 mL で溶離液を収集した。最後に、溶離液 5 0 0 μ L を Millipore Biomax 30K コンセントレーター (Eppendorf 5417 、 1 2 , 0 0 0 rcf 、 + 4 で 5 分間) で 1 0 0 μ L に濃縮し、活性アッセイに直接使用した。

【 0 2 3 1 】

G n T I 酵素の活性アッセイ

M a n 1 - 6 (M a n 1 - 3) M a n 1 - 4 G l c N A c (M a n ₃ G n) を、 G n T I 活性アッセイでの G n T I に対するアクセプターとして使用した。 G n T I 反応は、 0 . 1 mM アクセプター性 M a n ₃ G l c N A c 、 2 0 mM U D P - G l c N A c 、 5 0 mM G l c N A c 、 1 0 0 mM M n C l ₂ 、 0 . 5 % B S A および 8 μ L G n T I を 1 0 0 mM M E S (pH 6.1) 中に含有する反応混合物を総体積 1 0 μ L で室温にて一晩インキュベーションすることにより実施した。反応物を 1 0 0 で 5 分間インキュベーションすることにより反応を停止した。

【 0 2 3 2 】

G n T I 活性アッセイに平行して、粗酵素調製物中にありうる H e x N A c ' a s e 活性を確認した。 G l c N A c 1 - 2 M a n 1 - 6 (G l c N A c 1 - 2 M a n 1 - 3) M a n 1 - 4 G l c N A c 1 - 4 G l c N A c - A s n (= G n ₂ M a n ₃ G n ₂ - A s n) を H e x N A c ' a s e に対する基質として使用した。 M a n ₃ G n および U D P - G l c N A c の代わりに 1 0 0 pmol の G n ₂ M a n ₃ G n ₂ - A s n を添加した以外は、 G n T I と同様に反応を実施した。 H e x N A c ' a s e 活性は検出されなかった。

【 0 2 3 3 】

HyperSep 9 6 ウェル真空マニフォールド (Thermo Scientific) を用いた Hypersep C ₁₈ (1 0 0 mg 、 Thermo Scientific 、 カタログ番号: 60300-428) および Hypercarb (1 0

10

20

30

40

50

mg/96 ウェルプレート/1パッケージ、カタログ番号60302-606) 連続クロマトグラフィーにより、反応混合物を MALDI 分析用に精製した。Hypersep C₁₈ は、EtOH 300 μl および MQ 水 300 μl を用いて調製し、次に収集プレートを下に入れ、試料をロードし、MQ 水 50 μl で溶離した。Hypercarb を MeOH 300 μl および MQ 水 300 μl を用いて調製した。Hypersep C₁₈ からの溶離液をロードし、0.5 M NH₄Ac 150 μl で塩類を除去し、MQ 水 2 × 300 μl でウェルを洗浄した。GnTI 反応生成物を 25% ACN 150 μl で溶離し、HexNAc'ase 反応生成物を 25% ACN および 0.05% TFA で溶離した。試料を Speedvac 中で乾燥させた。

【0234】

マトリックス支援レーザー脱離イオン化時間飛行型 (MALDI-TOF) 質量分析 (10 MS) を Bruker Ultraflex TOF/TOF 装置 (Bruker Daltonics, Germany) で行った。アクセプター糖および生成物をポジティブイオンリフレクター モードで [M + Na]⁺ イオンとして検出した。Hex₃HexNAc₁ および Hex₃HexNAc₂ の [M + Na]⁺ シグナルについての計算された m/z 値は、それぞれ 733.238 および 933.318 であった。アクセプターと生成物のパーセント比は、Hex₃HexNAc₁ および Hex₃HexNAc₂ に対応するシグナルから計算した (図 19)。

【0235】

P. pastoris での製造用の GnTI I 構築物の產生

それぞれ KpnI および EcoRI 制限部位を含有するプライマー GP3 および GP13 を用いて、ヒト GnTI I をコードするスクレオチド配列を PCR 増幅した。EcoRI / KpnI 消化した PCR フラグメントを、同様に消化した pBLARG-SX クローニングベクターにライゲーションした。配列を検証後に、最終構築物を P. pastoris GS190 株にトランスフォームーションして GY22 株を得た。陽性酵母トランスフォーマントを PCR によりスクリーニングした。2 種のクローン (その一方だけを図 20 に示す) を、+16 および +30 におけるメタノール誘導性 AOX1 プロモーターのコントロール下での GnTI I 発現について検討した。

【0236】

可溶性 GnTI I の発現

ウエスタンプロット分析によると (図 20)、P. pastoris GY22 株は可溶性リコンビナント GnTI I 酵素を生成した。GnTI I は、計算分子量 49049.0 Da および 2 個の推定上の N-グリコシル化部位を有する。リコンビナント GnTI I は +16 で培地中に分泌された (レーン 9)。+30 で成長させると、リコンビナント GnTI I は細胞内に拘束された (レーン 4)。

【0237】

可溶性 GnTI I の活性アッセイ

GnTI について上記のように、可溶性 His タグ付き GnTI I を含有する P. pastoris 細胞培養物を活性アッセイ用に処理した。細胞培養物を遠心分離し、上清を採集および濃縮し、100 mM MES (pH 6.1) に緩衝液交換を行い、生じた試料をさらに濃縮してから活性試験を行った。

【0238】

活性アッセイは、GnTI と同様に実施した。GnMan3Gn を GnTI I アクセプターとして使用した。

【0239】

100 mM MES (pH 6.1) 中に 0.1 mM アクセプター性 GnMan3Gn、20 mM UDP-GlcNAc、50 mM GlcNAc、100 mM MnCl₂、0.5% BSA、および GnTI I の存在下で GnTI I の反応を実施した。MALDI-TOF MS 分析のための反応混合物の精製は、GnTI について上記のように、真空マニホールド上の 96 ウェルプレートでの Hypersep C18 および Hypercarb 連続クロマトグラフィーにより行った。

【0240】

10

20

30

40

50

Bruker Ultraflex TOF / TOF 装置 (Bruker Daltonics, Germany) で MALDI - TOF MS を行った。アクセプター性糖および生成物をポジティブイオンリフレクターモードで [M + Na]⁺ イオンとして検出した。反応終了時の生成物とアクセプターの比をそれらのシグナル強度から計算した (GnMan3Gn アクセプターおよび 1 個の GlcNAc が付加された生成物の [M + Na]⁺ シグナルについての計算 m/z 値は、それぞれ 933.318 および 1136.397 である)。

【0241】

GnTI を生成している *P. pastoris* の培養を繰り返し、上清からの GnTI 濃縮物 (60×) を調製し、その活性を上記方法により測定した。2.5 時間、5 時間、および一晩経過時点の試料の MALDI スペクトルは、アクセプターの 80%、83%、および 82% がそれぞれ生成物に変換されたことを示した。2.5 時間で最大に近い反応に到達した。

【0242】

加えて、粗 GnTI 試料を調製し、粗 GnTI 試料について上記のように、活性アッセイを実施した。反応混合物を一晩インキュベーションし、精製し、MALDI 分析に供した。MALDI スペクトルは、GnTI 活性を明らかにした (図 21)。HexNAc'ase 活性は粗 GnTI 試料から検出されなかった。

【0243】

上記 GnTI 活性アッセイに使用するための GnTI アクセプターを合成するために使用した方法は以下の通りであった。上記のように *P. pastoris* 培養液から GnTI 試料を調製した。この GnTI 試料は、高い GnTI 活性を示したので、それを約 40 nmol の Man3Gn から GnMan3Gn への変換に使用することができた。0.5 mM Man3Gn、2.0 mM UDP-GlcNAc、5.0 mM GlcNAc、1.00 mM MnCl₂、0.5% BSA、および GnTI 試料の存在下で反応を実施した。反応混合物を室温で 3 日間インキュベーションした。約 1% の試料を Hypercarb クロマトグラフィーによる精製および MALDI 分析に供した。MALDI スペクトルによると、GnTI の反応は、ほぼ全ての Man3Gn アクセプターを GnMan3Gn 生成物に変換した。2.8% のアクセプターだけが変換されなかった。

【0244】

実施例 4 - GnTI / GnTI 融合タンパク質

GnTI / GnTI 融合構築物の产生

フレーム内融合部位 (天然 AleI 制限部位を含有し、終止コドンが除去され、GnTI 配列と重複した GnTI 由来短鎖配列) を含有する 5' 末端 65 塩基長融合プライマーと、SpeI または NdeI 制限部位のいずれかを含有する、GnTI に相同な 3' 末端プライマーとを用いて、1313 bp の GnTI / II 融合タンパク質を構築した。この融合部位は、cbh1 プロモーターのコントロール下の野生型 GnTI を有する (AleI / NdeI を用いてクローニング)、または gpd プロモーターのコントロール下の野生型 GnTI を有する (AleI / SpeI を用いてクローニング) *T. reesei* 過剰発現ベクターに融合フラグメントを直接クローニングすることを可能にした。高忠実度 Phusion ポリメラーゼ (Finnzymes) ならびに標準的な増幅およびクローニング手順を使用した。発現ベクターから直接配列決定することにより配列を検証した。生じたベクターを使用して、*T. reesei* での膜貫通タンパク質として融合体を発現させた。

【0245】

融合タンパク質の機能性に関してより多くの情報を得るために、融合 GnTI / II タンパク質を、*P. pastoris* での可溶性タンパク質としても発現させた。酵素研究用のタンパク質を生成するために、タンパク質の可溶性部分をコードする GnTI / II 融合体の CDS を pBLARG-SX 発現ベクターにクローニングした。クローニング手順の際に、His タグをコードする配列をフレームの 5' 末端に付加して、切断型タンパク質の N 末端にタグを得た。配列解析により配列を検証した。生じたベクターを線状にし、エレク

10

20

30

40

50

トロポレーションにより *P. pastoris* GS190 株にトランスフォーメーションして GY6 株を回収した。Arg⁺ トランスフォーマントを釣上げ、PCR によりスクリーニングした。組み込みされたプラスミドを含有する *P. pastoris* クローンをタンパク質発現について試験した。

【0246】

*P. pastoris*において生成した可溶性 GNTI / GTI の精製

P. pastoris での発現および精製手順は、リコンビナント GNTI タンパク質を用いて上記のように実施した。

【0247】

GNTI / GTI 融合タンパク質の酵素活性試験

10

活性アッセイは、アクセプターとして Man3Gn オリゴ糖および UDP-GlcNAc ドナーを用いて、GNTI アッセイについて上記のように実施した。反応生成物を MALDI-TOF 質量分析により分析した。GNTI / GNTII 融合タンパク質について GNTI 活性だけが観測された（図 22）。

【0248】

ランダム組み込みによる GNTI / GNTII 構築物を用いた *T. reesei* のトランスフォーメーション

gpdA プロモーターを有するキメラヒト GNTI / GNTII プラスミドをランダム組み込みで *T. reesei* M124 株に共トランスフォーメーションした。アセトアミダーゼマーカー 遺伝子を含有するプラスミドの共トランスフォーメーションにより選択を行った。PCR 陽性トランスフォーマント 20 個を精製して単核クローンにし、振盪フラスコ培養で成長させ、グリカン分析に供した。全てのトランスフォーマントおよび親株 M124 を、4% ラクトースおよび 2% 穀粒粕エキスを補充した *Trichoderma* 最少培地（TrMM）（pH 4.8）中で培養した。上清および菌糸体試料を 3、5、および 7 日目に収集し、分析まで凍結保存した。加えて、対照として、*T. reesei* に GNTI 構築物をランダム組み込みによりトランスフォーメーションした。

20

【0249】

ランダム組み込みにより得られた *T. reesei* GNTI / GNTII 株のグリカン分析

T. reesei M124 株 GNTI / GNTII トランスフォーマントからの異なる 3 時点（3、5 および 7 日目）の異なる 20 個のクローンからの試料を分析した。対照について、二つの親 M124 株からの試料を分析した。SDS 変性なしの N-グリカナーゼ反応を、上清タンパク質 5 μg に関して三つ組みにして 96 ウェルプレートで行った。上清のタンパク質濃度は、標準として BSA を使用してブレッドフォードに基づくアッセイ（Bio-Rad Quick Start Bradford Protein Assay）により測定した。中性および酸性 N-グリカンの両方を MALDI-TOF MS により分析した。任意の時点の任意のクローンでの GNTI / GNTII 構築物を用いて、および gpdA プロモーターを有する GNTI トランスフォーマントのクローンにおいて、GO 生成物は検出されなかった。

30

【0250】

ターゲット組み込みによる GNTI / GNTII 構築物を用いた *T. reesei* のトランスフォーメーション

40

キメラ GNTI / GNTII 配列を、アセトアミダーゼマーカー 遺伝子ならびに a1g3 ローカス組み込み用の 5' - および 3' - フランкиング配列部位を含有するベクターである pTTv3.8 骨格にサブクローニングした。そのベクターを消化されたフラグメントとして *T. reesei* M124 株にトランスフォーメーションした。このトランスフォーメーションから、a1g3 ローカスへの正しい組み込みを示す PCR フラグメントをもたらす 18 個の PCR 陽性トランスフォーマントが検出された。1 回の胞子精製後に、これらのトランスフォーマントを振盪フラスコ中で培養し、下記のように分析した。

【0251】

a1g3 ローカスへのターゲティングにより得られた *T. reesei* GNTI / GNTII 株のグリカン分析

50

alg 3T. reesei G n T I / G n T I I トランスフォーマントの異なる 3 時点 (3 、 5 および 7 日目) での 10 個の異なるクローンの上清試料を得た。 2 種類の異なる培地組成でクローンを振盪フラスコ中で培養しておいた。 2 % 穀粒粕エキス、 4 % ラクトース、およびフタル酸 K 緩衝剤を有する T r M M (pH 5.5) を全てのクローンについて使用し、平行して 2 % 穀粒粕エキス、 4 % ラクトース、 1 % カザミノ酸、およびフタル酸 K 緩衝剤を有する T r M M (pH 5.5) を 5 個のクローンについて使用した。培養を 7 日間、 5 日間は + 28 で、ならびに 6 および 7 日目は + 24 で継続した。

【 0252 】

N - グリカン分析は、上清タンパク質 5 μ g について三つ組みにして、 96 ウエルプレート中で行った。 3 、 5 、および 7 日目から試料を分析した。上清のタンパク質濃度は、標準として B S A を使用してブラッドフォードに基づくアッセイ (Bio-Rad Quick Start Bradford Protein Assay) により測定した。中性および酸性 N - グリカンの両方を M A L D I - T O F M S により分析した。

【 0253 】

検出可能な量のグリコフォーム G 0 が各クローンから見出された。クローン 201A が最大量を含有し、 G n 2 M a n 3 が 1.2 % であった (図 23 および表 9) 。加えて、この特定のクローンでは H e x 6 の量が最低であった。 1 % カザミノ酸を有する第 2 の培地は、 G 0 / G 1 c N A c 2 M a n 3 (G 1 c N A c 2 M a n 6) M a n 4 G 1 c N A c 4 G 1 c N A c の余分な生成をまったく示さなかった。 3 および 7 日目の試料の結果は、 5 日目の試料についての結果と本質的に同じであった。

【 0254 】

10

20

【表9】

表9: *T. reesei* GnTI/II トランスフォーマント (*alg3* ローカスに組み込まれた GnTI/II) の分泌タンパク質から観測された N-グリカンのシグナル強度のパーセンテージ。名称に文字 A が付いているクローンは培地 A) 中で、B が付いているクローンを培地 B) (培地 A) に比べて余分に 1% カザミノ酸を有していた) 中で培養した。

組成	クローン 210A, 5 日目					クローン 202A, 5 日目					クローン 208A, 5 日目					クローン 210A, 5 日目					
	m/z	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX
Man2	771.3	0.6	0.5	86.8	0.0	1.0	0.4	0.7	173.2	0.0	1.1	0.6	0.6	92.3	0.0	1.1	0.1	0.2	173.2	0.0	0.4
Man3	933.3	47.9	14.5	30.2	39.0	64.6	41.3	0.2	0.4	41.1	41.5	38.2	1.1	2.8	37.0	38.9	38.2	1.1	3.0	37.5	39.5
Man4	1095.4	7.9	2.9	36.5	5.9	11.3	6.4	0.6	8.7	6.0	7.0	5.3	0.2	4.0	5.0	5.5	6.0	0.4	6.6	5.5	6.2
GnMan3	1136.4	1.4	0.7	46.9	1.0	2.2	1.1	0.3	23.5	0.8	1.3	1.0	0.2	17.0	0.9	1.2	1.1	0.1	8.9	1.0	1.2
Man5	1257.4	10.5	2.5	23.5	8.7	13.3	8.6	0.8	9.7	7.7	9.4	8.2	0.3	4.0	7.8	8.5	8.9	0.3	3.7	8.6	9.3
Gn2Man3	1339.5	1.2	0.8	69.1	0.6	2.2	0.6	0.1	21.0	0.5	0.8	0.6	0.1	21.5	0.5	0.7	0.6	0.1	17.5	0.6	0.8
Hex6	1419.5	27.3	23.7	86.7	0.0	42.0	40.5	0.6	1.5	39.9	41.1	44.7	0.7	1.6	43.9	45.2	43.2	0.7	1.6	42.7	44.0
Hex7	1581.5	2.9	3.0	103.3	1.1	6.4	1.0	0.1	11.0	1.0	1.2	1.1	0.1	11.7	1.0	1.2	1.2	0.0	3.7	1.2	1.2
Hex8	1743.6	0.1	0.2	173.2	0.0	0.4	0.2	0.3	173.2	0.0	0.5	0.3	0.2	87.0	0.0	0.4	0.6	0.3	57.0	0.3	1.0
クローン 212A, 5 日目																					
組成	m/z	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX
Man2	771.3	0.4	0.4	86.8	0.0	0.7	0.6	0.6	94.4	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Man3	933.3	45.6	1.3	2.8	44.2	46.8	40.0	2.8	7.0	37.3	42.9	43.4	1.9	4.4	41.3	45.1	42.6	2.0	4.6	40.5	44.4
Man4	1095.4	5.6	0.3	5.1	5.4	5.9	6.5	0.6	8.8	6.0	7.1	6.3	0.5	8.5	5.7	6.8	6.1	0.6	10.3	5.4	6.7
GnMan3	1136.4	0.9	0.2	22.4	0.7	1.1	0.9	0.1	8.5	0.8	1.0	1.1	0.1	6.9	1.0	1.2	1.1	0.2	14.1	0.9	1.2
Man5	1257.4	7.2	0.5	7.0	6.8	7.7	9.5	0.4	3.8	9.1	9.8	8.5	0.4	4.2	8.2	8.9	7.7	0.6	8.4	7.0	8.3
Gn2Man3	1339.5	0.5	0.1	11.9	0.5	0.6	0.6	0.1	18.3	0.5	0.7	0.7	0.2	29.3	0.6	1.0	0.7	0.2	26.4	0.5	0.9
Hex6	1419.5	38.6	1.2	3.0	37.4	39.7	40.7	2.5	6.1	38.2	43.2	38.5	1.8	4.6	37.4	40.5	40.5	1.7	4.2	39.0	42.4
Hex7	1581.5	0.8	0.0	4.1	0.8	0.8	1.0	0.1	10.8	0.9	1.2	1.1	0.1	4.5	1.1	1.2	1.0	0.1	6.4	0.9	1.0
Hex8	1743.6	0.4	0.1	34.8	0.3	0.5	0.1	0.2	173.2	0.0	0.3	0.4	0.3	88.5	0.0	0.6	0.4	0.3	87.6	0.0	0.6
クローン 217A, 5 日目																					
組成	m/z	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX
Man2	771.3	0.9	0.0	5.0	0.9	1.0	0.5	0.4	96.7	0.0	0.9	0.4	0.7	173.2	0.0	1.1	0.6	1.1	173.2	0.0	1.8
Man3	933.3	54.1	1.1	1.9	53.0	55.0	44.0	1.8	4.1	42.4	45.9	46.9	0.2	0.5	46.6	47.1	40.6	1.7	4.3	38.6	41.8
Man4	1095.4	5.2	0.3	6.5	4.9	5.5	5.7	0.1	1.5	5.6	5.8	6.9	0.9	12.7	6.0	7.8	8.5	0.9	10.0	7.7	9.4
GnMan3	1136.4	0.9	0.2	17.4	0.7	1.0	1.0	0.2	16.6	0.9	1.2	1.2	0.4	32.1	0.9	1.6	1.3	0.4	0.0	0.9	1.8
Man5	1257.4	5.8	0.1	2.6	5.6	5.9	8.0	1.2	15.6	6.7	9.2	8.1	0.5	5.7	7.8	8.6	10.0	0.6	6.2	9.5	10.6
Gn2Man3	1339.5	0.7	0.1	14.7	0.6	0.7	0.9	0.1	14.2	0.8	1.0	0.8	0.1	7.1	0.8	0.9	0.7	0.5	70.8	0.3	1.3
Hex6	1419.5	31.5	1.5	4.7	30.5	33.3	38.5	1.1	2.8	37.3	39.2	34.2	0.7	2.1	33.8	35.1	37.5	1.1	2.8	36.7	38.7
Hex7	1581.5	0.9	0.1	12.9	0.8	1.0	1.0	0.2	15.4	0.8	1.1	1.1	0.1	5.2	1.0	1.2	0.8	0.7	86.9	0.0	1.2
Hex8	1743.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.1	17.9	0.3	0.5	0.4	0.3	90.7	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
クローン 208B, 5 日目																					
組成	m/z	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX
Man2	771.3	0.9	0.8	87.1	0.0	1.5	0.8	0.7	86.7	0.0	1.2	1.2	0.1	10.3	1.0	1.3					
Man3	933.3	48.4	1.2	2.4	47.3	49.6	39.6	1.1	2.7	38.6	40.8	34.9	1.8	5.2	33.2	36.8					
Man4	1095.4	7.2	0.2	2.2	7.0	7.3	7.9	0.6	8.0	7.3	8.5	8.1	0.3	4.1	7.8	8.4					
GnMan3	1136.4	0.6	0.6	92.1	0.0	1.1	1.0	0.1	12.7	0.9	1.1	1.1	0.1	12.1	1.0	1.2					
Man5	1257.4	8.7	0.7	7.6	7.9	9.1	9.6	0.2	2.0	9.4	9.8	11.3	0.8	7.5	10.7	12.3					
Gn2Man3	1339.5	0.4	0.2	44.3	0.2	0.6	0.6	0.2	32.4	0.4	0.8	0.6	0.1	13.9	0.5	0.6					
Hex6	1419.5	32.4	0.4	1.4	32.1	32.9	38.5	0.3	0.8	38.3	38.9	40.6	0.7	1.8	39.8	41.1					
Hex7	1581.5	1.0	0.2	15.5	0.8	1.1	1.5	0.1	8.2	1.4	1.6	1.4	0.2	13.5	1.2	1.5					
Hex8	1743.6	0.4	0.4	87.7	0.0	0.7	0.5	0.5	92.4	0.0	0.9	0.8	0.1	16.3	0.7	0.9					

【0255】

実施例5 - GnTI/II / GnTI 融合タンパク質

GnTI/II / GnTI 発現構築物の作製

PCR 重複技法を適用することにより GnTI/II / GnTI 融合発現構築物を產生した。融合部位に 50 bp のフレーム内重複を含有するプライマーを用いて、融合フラグメントを GnTI/II および GnTI テンプレートから別々に増幅した。フラグメントをアガロースゲルから精製し、標準的な手順により融合構築物の増幅用の PCR テンプレートとして使用した。融合構築物を、Apal / SpeI 制限部位を有するベクターにクローニングした。生じた構築物を配列分析により検証した。P. pastoris においてターゲットタンパク質の N 末端に His タグを有する可溶型 GnTI/II / GnTI を発現させるためにベクターを產生した。このベクターは、GnTI / II 融合構築物について上記したものと類似の方法で產生した。

【0256】

P. pastoris において生成した可溶性 GnTI/II / GnTI の精製

P. pastoris における発現および精製手順を、リコンビナント GnTI タンパク質につ

10

30

40

50

いて上記したように実施した。

【0257】

GnTII/GnTI 融合タンパク質の酵素活性試験

GnTIIについて上記したように、Man3Gnオリゴ糖をアクセプターとして使用して、活性アッセイを実施した。GnTII/GnTI反応からの精製反応混合物のMALDIスペクトルは、2個のGalNAc残基がアクセプターに転移したことを示した(図24)。

【0258】

【表10】

表10: GnTII/GnTI融合タンパク質の活性の概要

10

		形成した生成物	
GnTII/GnTI トランスフォーマント	アクセプター濃度		
トランスフォーマント1	0.5 mM	47%	5%
トランスフォーマント1	0.1 mM	-	11%
トランスフォーマント2	0.5 mM	3%	2.4%

【0259】

-N-アセチルグルコサミニダーゼによる特徴づけ

GnTII/GnTI活性反応において形成した混合物を*Streptococcus pneumoniae*由来 1-2, 3, 4, 6-N-アセチルグルコサミニダーゼで処理した。転移した-N-結合型GalNAc残基の両方が切断されたことを判定するためにMALDI-MS分析を用いた(図25)。

【0260】

1-4GalTによるガラクトシル化

GnTII/GnTI活性反応で形成した混合物を牛乳由来 1-4GalTで処理した。1-4GalTは、生成混合物中の末端GalNAc残基をガラクトシル化すると予想される。1-4GalT反応混合物のMALDIスペクトルによると、両方の生成物はガラクトシル化されていた。2個のガラクトースがGn2Man3Gn生成物に転移しており、これは、GalNAc残基が別々のマンノース枝に結合していることを示した(図26)。

【0261】

ランダム組み込みによるGnTII/GnTI構築物を用いたT. reeseiのトランスフォーメーション

20

キメラGnTII/GnTI配列を設計し、gpdAプロモーターを含有するベクターにクローニングした。プラスミド配列の検証後、それをヒグロマイシンマーカー遺伝子と共にT. reesei M124株に共トランスフォーメーションした。13個のPCR陽性トランスフォーマントを同定した。全ての陽性トランスフォーマントおよび親株M124を、4%ラクトースおよび2%穀粒粕エキスを補充したTrMM(pH4.8)中で培養した。加えて、4%ラクトース、2%穀粒粕エキス、および1%カザミノ酸を補充し、100 mM PIPPS(ピペラジン1,4ビス2プロパンスルホン酸)で緩衝化したTrMM(pH5.5)中で7個のトランスフォーマントおよび親株を培養した。株の成長速度をモニターするためにpH測定を用いた。上清および菌糸体試料を3、5、および7日目に収

30

40

50

集し、凍結保存し、グリカン構造について分析した。c b h 1 プロモーターを含有するプラスミドにG n T I I / G n T I 配列もクローニングした。加えて、対照としてランダム組み込みによりT. reeseiにG n T I 構築物をトランスフォーメーションした。

【0262】

ランダム組み込みにより得られたT. reesei G n T I I / G n T I 株のグリカン分析

2種の異なる培地中で培養したT. reesei M 1 2 4 株G n T I I / G n T I トランスフォーマントおよび親M 1 2 4 株の156個の上清試料を分析した。第1の培地は、2%穀粒粕エキスおよび4%ラクトースを補充したT r M M (p H 4.8)であり、第2の培地は、2%穀粒粕エキス、4%ラクトース、100mM P I P P S、および1%カザミノ酸を補充したT r M M (p H 5.5)であった。両方の種類の培地中で細胞を3、5および7日間成長させた。

10

【0263】

S D S 変性なしのN - グリカナーゼ反応は、3および5日の時点の試料の上清タンパク質5μgについて三つ組みにして96ウェルプレートで実施した。上清のタンパク質濃度は、標準としてB S Aを使用してブラッドフォードに基づくアッセイ (Bio Rad Quick Start Bradford Protein Assay) により測定した。中性および酸性N - グリカンの両方をM A L D I - T O F M S により分析した。

【0264】

3および5日の時点のいずれのクローンにも、予想されるG n T I I / G n T I 生成物の徴候を見ることができなかった。加えて、ランダム組み込みにより産生した、g p d A プロモーターを有するG n T I およびG n T I / I I トランスフォーマントから生成物は観測されなかった。

20

【0265】

ターゲット組み込みによるG n T I I / G n T I 構築物を用いたT. reeseiのトランスフォーメーション

c b h 1 プロモーターのコントロール下のキメラG n T I I / G n T I 配列をp y r 4 遺伝子ループアウトマーカーと一緒に有するベクターを構築し、ターゲット組み込みのためにバックボーンベクターのa l g 3 フランкиング領域フラグメントの間にサブクローニングした。P m e I 消化した発現カセットをT. reesei M 1 2 7 株 (M 1 2 4 のp y r 4 - 株) にトランスフォーメーションした。プレート選択後に、クローンをP C R でスクリーニングし、単一胞子を介して精製した。グリカン分析用の材料を得るために、既述のように振盪フラスコ培養を行った。M 1 2 7 トランスフォーメーションでのa l g 3 ローカスへの正しい組み込みを示す5個のP C R 陽性トランスフォーマントを、40g/lラクトース、20g/l穀粒粕エキス、および100mM P I P P S を補充したT r M M (p H 5.5) を含有する体積300mlの培地中で+28にて7日間培養した。細菌の混入を避けるために、植菌時に100mg/lアンピシリンをフラスコに添加した。グリカン分析用の試料を3、5および7日目に収集した。

30

【0266】

a l g 3 ローカスへのターゲティングにより得られたT. reesei G n T I I / G n T I 株のグリカン分析

40

T. reesei M 1 2 4 株 (対照)、M 1 2 7 G n T I I / G n T I トランスフォーマントの5個の異なるクローンの上清試料、および対照培地試料を、上清タンパク質5μgについて三つ組みにして96ウェルプレートで調製した。上清のタンパク質濃度を、標準としてB S Aを使用してブラッドフォードに基づくアッセイ (Bio-Rad Quick Start Bradford Protein Assay) により測定した。P N G a s e F の反応を既述のように行なったが、S D S 変性は行わなかった。放出されたN - グリカンを、最初にHypersep C - 1 8 を用いて、次にHypersep Hypercarb (どちらもThermo Scientific製) を用いて精製し、その際、中性および酸性グリカンを分離した。両方の精製を96ウェル形式で行なった。中性N - グリカンをM A L D I - T O F M S により分析した。

【0267】

50

T. reesei M 1 2 7 G n T I I / G n T I トランスフォーマント由来の中性N - グリカンの比率を、p y r 4 陽性である以外はM 1 2 7 株と同じであるM 1 2 4 株からの比率と比較した。5個のG n T I I / G n T I トランスフォーマントのうち4個は、全ての時点(3、5および7日目)で主グリコフォームとしてG 0 を生成した。クローン4 6 A だけがG 0 陰性であった(図27)。各クローンでのM a n 3 G n の比率は全ての時点で小さかったが、H e x 6 の比率はまだ極めて大きかった。7日目に、クローン1 7 A は他のクローンに比べて最も多いG 0 および最も少ないH e x 6 を生成した(図27)。振盪フラスコ条件で5日目にG n T I I / G n T I トランスフォーマントの4個のクローンが約40%のグリコフォームG 0 を生成した(図27)。p H コントロールした発酵条件は、a l g 3 ノックアウトでのG 0 生成物の量を増加させ、H e x 6 の量を減少させる可能性がある。 10

【0268】

培地試料中で、一連の植物型N - グリカンが観測されたが、G 0 に対応するシグナルは観測されなかった。

【0269】

ターゲット組み込みによるG n T I I / G n T I 構築物を用いたリツキシマブ生成T. reeseiのトランスフォーメーション

「ターゲット組み込みによるG n T I I / G n T I 構築物を用いたT. reeseiのトランスフォーメーション」という標題の節に記載の発現カセットを、T. reesei M 2 7 9 株(M 2 0 2 のp y r 4 - 株)にトランスフォーメーションした。M 1 2 4 からp e p 1 プロテアーゼを欠失させること、およびリツキシマブ重鎖および軽鎖を導入すること(K e x 2 切断部位を有する)によりM 2 0 2 を得た。プレート選択後に、クローンをP C R でスクリーニングし、単一胞子を介して精製した。グリカン分析用の材料を得るために、「ターゲット組み込みによるG n T I I / G n T I 構築物を用いたT. reeseiのトランスフォーメーション」という標題の節に記載の振盪フラスコ培養を行い、加えて、一部の培地に0.3 mg/mlダイズトリプシン阻害剤(S B T I)および1%カザミノ酸を補充した。S B T I を最初は植菌時に、次に3~6日目に毎日添加した。P M S F およびペプスタチンAを凍結前に全ての試料に添加した。 20

【0270】

a l g 3 ローカスへのターゲティングにより得られたリツキシマブ生成T. reesei G n T I I / G n T I 株のグリカン分析

S B T I 存在下の5日目の上清試料ならびにS B T I 不在下の5および7日目の試料から、プロテインG アフィニティークロマトグラフィーでリツキシマブを精製した。変性タンパク質約10 μgについてP N G a s e F 反応を行った。放出されたN - グリカンを最初にHypersep C-18で、次にHypersep Hypercarb(どちらもThermo Scientific製)で精製し、そこで中性および酸性グリカンを分離した。精製ステップは96ウェル形式で行った。中性および酸性N - グリカンをM A L D I - T O F M S により分析した。2個のG n T I I / G n T I トランスフォーマントクローン、9 A - 1 および3 1 A - 1 は、G 0 グリコフォームをそれぞれ約30%および約24%生成した。しかし、適度な量のH e x 6 およびG n M a n 3 もなお観測された(図28)。他のクローンからのリツキシマブは、ほとんどまたは全くG 0 を含有しなかった。 40

【0271】

スペーサーの最適化

G n T I I / G n T I 融合タンパク質について一連のスペーサー変更を構築した。これらの変異体をPichiaで生成させ、酵素の安定性および活性についてin vitroで検討した。

【0272】

G n T I I / G n T I 融合タンパク質をクローニングするための材料および方法をここに記載する。T 4 5 配列をP C R 重複戦略を用いて二つの部分に分けて増幅した。最初にG P 1 3 5 ' プライマーおよびG P 9 3 3 ' プライマーを用いてフラグメントを増幅し、G P 9 2 5 ' プライマーおよびG P 2 3 ' プライマーを用いて第2のフラグメントを 50

増幅した。Phusion高忠実度P C Rポリメラーゼ(Finnzymes)を用いて、供給業者により提供された標準条件下で増幅を実施した。サイクリング条件は以下の通りであった：最初に98で30秒間変性、98で5秒間変性、65で30秒間アニーリング、72で45秒間伸長を20回繰り返し、最後に72で20分間伸長。生じたP C R生成物をFermentas GeneJETゲル抽出キットでアガロースゲルから精製した。重複する改変配列を有するこれらのフラグメントを、プライマーなしの標準条件で同じ反応混合物中に混ぜ合わせた。10回のアニーリング/伸長サイクルを以下のように実施した：最初に98で30秒間変性、98で5秒間変性、65で30秒間アニーリング、72で45秒間伸長を10回繰り返し、最後に72で20分間伸長。プライマーG P 1 3 (5')およびG P 2 (3')を添加し、サイクリングを上記のように20増幅サイクル継続した。増幅されたT 4 5フラグメントをFermentas GeneJET P C R精製キットで精製し、E c o R I / K p n I (New England Biolabs)で標準プロトコールにより消化し、E c o R I / K p n I消化した酵母発現ベクターp B L A R G - S Xにクローニングした。生じたベクターを、プライマー3' A O X、5' A O X、G P 9、G P 3 7、G P 3 8およびG P 1 2 2を用いて配列決定した。配列は正しいことが分かった。

【0273】

この、生じたプラスミドを、3×G 4 Sスペーサー改変用のテンプレートとして使用した。T 4 6配列のクローニングを、T 4 5に関して上記のように行つた。G P 1 3 5'プライマーおよびG P 9 5 3'プライマーを最初のフラグメント合成のために使用し、G P 9 4 5'プライマーおよびG P 2 3'プライマーを第2のフラグメント合成のために使用した。フラグメントを混ぜ合わせ、プライマーG P 1 3 (5')およびG P 2 (3')を増幅のために添加した。増幅されたフラグメントT 4 6を次にE c o R I / K p n Iで消化し、酵母発現ベクターp B L A R G - S Xにクローニングした。生じたベクターを、上記プライマーを用いて配列決定し、配列は正しいことが分かった。

【0274】

セルラーゼ関連天然スペーサーを類似のP C R重複法で構築した。C B H I関連スペーサーについて、第1のフラグメントを、G P 1 3 5'プライマーおよびG P 1 0 7 3'プライマーを用いて増幅した。第2のフラグメントをG P 1 0 8 5'プライマーおよびG P 2 3'プライマーを用いて増幅した(表11)。E G I V関連スペーサーについて、第1のフラグメントをG P 1 3 5'プライマーおよびG P 1 0 9 3'プライマーを用いて増幅した。第2のフラグメントを、G P 1 1 0 5'プライマーおよびG P 2 3'プライマーを用いて増幅した(表11)。どちらの場合も、P C R生成物をアガロースゲルから精製し、混ぜ合わせ、次のP C R反応のためのテンプレートとして使用して配列T 5 0およびT 5 1を増幅した。次に、T 5 0およびT 5 1 P C R生成物をE c o R I / K p n Iで消化し、酵母発現ベクターp B L A R G - S Xにクローニングした。

【0275】

全てのP C R増幅は、高忠実度Phusionポリメラーゼ(Finnzymes)を用いて行った。プライマー(表11)は、MWG Operonから取り寄せた。配列決定は、ヘルシンキ大学バイオテクノロジー研究所D N A配列決定研究室(DNA Sequencing Laboratory of the Institute of Biotechnology, University of Helsinki)が商業サービスとして行った。

【0276】

【表 1 1】

表 11: プライマー配列

プライマー 配列 5'-3'

3'AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC (配列番号 99)	
5'AOX	GACTGGTCCAATTGACAAGC (配列番号 100)	
GP2	CAGTGGTACCTAATTCCAGCTAGGATCATAGCCCTCCCACG (配列番号 101)	
GP9	CGGACCAACCGCAAGTTCC (配列番号 102)	
GP13	ATGCGGAATTCTGCATCATCATCATCGCCAGCGTAAGAACGAGGCCCT (6× HIS) (配列番号 103)	
GP37	CCTTTCTCTATCCAACCTCTACC (配列番号 104)	10
GP38	GGAACTTGCAGGTGGTCCCG (配列番号 105)	
GP92	CCGCCGGCTCCAGGGAGGTGGGGGCAGTGGAGGTGGCGGCAGTGGGAGGGTGCCCACC GCCGCC (配列番号 106)	
GP93	GCGGTGGGCACCCCTCCCACGTGCCGCCACCTCCACTGCCCCCCACCTCCCTGGAGGCCGGCGG TAAGAC (配列番号 107)	
GP94	AGGTGGGGGCAGTGGAGGTGGCGGCAGTGGCGGCAGTGGCGGCAGTGGGAGGGTGCCCACC GCCGCC (配列番号 108)	
GP95	CGGGTGGGCACCCCTCCCACCTCCACCGGCCACTGCCGCCACCTCCACTGCCCCCCACCTC CCTG (配列番号 109)	
GP107	GTTCGGCCGGAGGGTTGCCGCCGCTAGGTTGCCGGTGCTCTGGAGCCGGCGTAAG ACTTGC (配列番号 110)	
GP108	GCAACCCCTCCCGCGGAAACCCGCCTGGCAGCACCGGGAGGGTGCCCACCGCCGCC CCCC (配列番号 111)	
GP109	CCGCCTCCAGGAACAGTGGCGCTGGCGGTGGCCGTCGCGCGGAGCTCTGGAGCCGGCG GTAAGACTTGC (配列番号 112)	20
GP110	CGCCACTGTTCTGGAGGCAGTAGCGGCCACCAGCGGGAGGGTGCCCACCGCCGCC CTCCCGCCAGC (配列番号 113)	
GP122	CATTAGCGAGAAGTTACGG (配列番号 114)	

【0277】

スペーサー改変された (3 × G 4 S および 2 × G 4 S) G n T I I / G n T I 融合酵素を、実施例 3 での G n T I について記載したものと類似の方法で濃縮および緩衝液交換により活性アッセイ用に処理した。活性アッセイを、M a n 3 G n アクセプターを用いて実施し、反応混合物を G n T I 活性アッセイに記載したように精製した。M A L D I 分析も G n T I 反応混合物に関して記載したように行ったが、加えて G n T I I 生成物 H e x 3 H e x N A c 3 の形成を追跡した。H e x 3 H e x N A c 3 の [M + N a] + シグナルについての計算 m / z 値は 1136, 318 であった (図 29)。

【0278】

スペーサー変異体

G n T I I / I スペーサー変異体を G n T I I / I 融合タンパク質の野生型スペーサー配列から改変した。改変されたスペーサーを表 12 に列挙する。全部で 4 個のスペーサー変異体株 (G Y 3 2、G Y 3 3、G Y 4 9、および G Y 5 0)、野生型 G n T I I / I 融合株 (G Y 7 - 2)、および偽 (mock) 株 (G Y 3) を、プロテアーゼ阻害剤存在下で + 16 で発現させた。株を B M G Y 培地 6 0 ml に + 3 0 、2 2 0 rpm で一晩 (o / n) 植菌した。一晩培養物をペレットにし、細胞を B M M Y 培地 6 0 ml 中に再懸濁した。M e O H 誘導の開始と同時に、およびその後は 1 日 1 回、プロテアーゼ阻害剤である 1 mM E D T A、1.5 μM ペプチドスタチン A (Sigma) および完全 E D T A 不含プロテアーゼ阻害剤カクテル錠剤 1 個 (Roche) を培養液に添加した。3 日目および 4 日目に試料 2 5 ml を培養液から採取し、濃縮チューブ (Millipore) を使用して上清試料を濃縮し、P D - 1 0 カラムで緩衝液を 1 0 0 mM M E S (p H 6.1) に交換し、最終的に 5 0 倍濃縮した。野生型の細胞ペレット (3 番目) 以外、細胞ペレットを 1 × P B S 5 0 0 μ l 中に再懸濁し、野生型の細胞ペレットは、1 0 0 mM M E S (p H 6.1) および完全 (E D T A 不含) 阻害剤カクテル 5 0 0 μ l 中に再懸濁した。

【0279】

10

20

30

40

50

3 × G 4 S スペーサーを含有する G n T I I / G n T I 融合タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 119 に示す。3 × G 4 S スペーサーを含有する G n T I I / G n T I 融合タンパク質のヌクレオチド配列を配列番号 141 に示す。2 × G 4 S スペーサーを含有する G n T I I / G n T I 融合タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 121 に示す。2 × G 4 S スペーサーを含有する G n T I I / G n T I 融合タンパク質のヌクレオチド配列を配列番号 139 に示す。C B H I スペーサーを含有する G n T I I / G n T I 融合タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 123 に示す。C B H I スペーサーを含有する G n T I I / G n T I 融合タンパク質のヌクレオチド配列を配列番号 143 に示す。E G I V スペーサーを含有する G n T I I / G n T I 融合タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 125 に示す。E G I V スペーサーを含有する G n T I I / G n T I 融合タンパク質のヌクレオチド配列を配列番号 145 に示す。
10

【0280】

遠心分離を繰返すことおよび完全 (E D T A 不含) 阻害剤カクテルを有する 100 mM M E S (p H 6.1) 中に細胞を再懸濁することにより、細胞懸濁物試料 200 μl を洗浄した。洗浄した細胞試料 200 μl を採取すること、ガラスビーズ 50 μl およびトリトン X-100 2 μl を添加すること、ならびにビーズ攪拌器中に 6 分間入れることによって細胞溶解液を調製した。50 倍濃縮した P. pastoris 培養上清、細胞試料および細胞溶解液の G n T I 活性アッセイを上記のように行った。

【0281】

【表 12】

20

表 12: 酵母株の説明

酵母株	説明	スペーサー変異体の配列
GY3	偽株	
GY7-2	野生型 G n T I I / I 融合体	
GY32-5	G n T I I / I fusion 3xG4S スペーサー変異体	配列番号 118
GY32-9		
GY33-7	G n T I I / I fusion 2xG4S スペーサー変異体	配列番号 120
GY33-8		
GY49-3	G n T I I / I fusion C B H I スペーサー変異体	配列番号 122
GY50-7	G n T I I / I fusion E G I V スペーサー変異体	配列番号 124
GY50-10		

30

【0282】

3 日目からの細胞ペレットおよび 50 倍濃縮培養上清のウエスタンプロット分析を図 30 に示す。C B H I スペーサー変異体 (G Y 4 9) は、上清からではなく、細胞ペレット試料から強いシグナルを発した。E G I V スペーサー変異体 (G Y 5 0) を上清から検出し、かすかなシグナルだけが得られた。上清試料からのかすかなシグナルは、野生型 G n T I I / I 融合株 (G Y 7 - 2) ならびに 2 × G 4 S スペーサー変異株 G Y 3 3 - 7 および G Y 3 3 - 8 でも得られた (図 30)。
40

【0283】

次に、スペーサー変異体を含有する G n T I I / I 融合タンパク質の活性を、野生型スペーサーを含有する G n T I I / I 融合タンパク質の活性と比較した。

【0284】

上清中の融合 G n T I I / I の活性。G n T I 基質 M a n 3 G n を提供すると、反応生成物 G n M a n 3 G n は、融合タンパク質の G n T I I 活性についてのアクセプターとして作用した。3 日および 4 日の発現期の後に、活性アッセイ用の試料を採取した。図 31 に、野生型スペーサーまたはスペーサー変異体のいずれかを含有する G n T I I / I 融合タンパク質の培養物の活性アッセイの結果を示す。試料の培養は、阻害剤 (1.5 μM ペプチダーゼ A、1 mM E D T A、1 錠 / 50 ml の完全 E D T A 不含プロテアーゼ阻害剤カク

50

テル錠剤)の存在下で行った。分かり易くするために、GnTIおよびGnTI Iの反応生成物を一緒に添加した。全ての活性アッセイ試料は、GnTI生成物GnMan3Gnを少量(<5%)だけ含有し、GnTI IがGnMan3GnをGn2Man3Gnに活性に変換したことを示した。

【0285】

全部で4個のスペーサー変異体がGnT活性を示したものの、クローン間および培養日数間で幾分変動があった。2×G4S(クローン_1)、3×G4S(クローン_1およびクローン_2)、またはEGIVスペーサー変異体を含有するGnTI I / I融合タンパク質は、野生型スペーサーを有する酵素よりも高い活性を示した(図31)。CBH Iスペーサー変異体を含有するGnTI I / I融合タンパク質は、野生型スペーサーを有する酵素に匹敵する活性を示した(図31)。2×G4S変異体を含有するGnTI I / I融合タンパク質(クローン_2)は、野生型スペーサーを有する酵素よりも低い活性を有した(図31)。4日目の試料は、3日目の試料よりも高い活性を有したが、例外として、3×G4Sスペーサー変異体を含有するGnTI I / I融合タンパク質(クローン_1およびクローン_2)は3日目の方が高い活性を示した(図31)。EGIVスペーサー変異体を含有するGnTI I / I融合タンパク質は、4日目に最高の活性を有した(図31)。

【0286】

細胞および細胞溶解物中の融合GnTI I / I活性。野生型スペーサーを有するGnTI I / I融合タンパク質を含有する細胞からの細胞試料、細胞溶解物試料、および上清試料の活性アッセイは、細胞溶解物試料が最高の活性を有したことを示した(図32)。2番目に高い活性は、細胞表面上にあり、最低の活性は、上清試料に見られた(図32)。したがって、大部分のGnTI I / I融合タンパク質が細胞中または細胞表面上に局在し、少量だけが分泌されたと思われる。

【0287】

野生型スペーサーまたはスペーサー変異体のいずれかを有するGnTI I / I融合タンパク質を含有する細胞のGnT活性を図33に示す。完全EDTA不含阻害剤カクテルを有する100mM MES(pH 6.1)500μl中に細胞を、およびPBS 500μl中にスペーサー変異体を再懸濁し、活性試験用の細胞および溶解物を、上記のように調製した。

【0288】

図33に示すように、スペーサー変異体を含有するGnTI I / I融合タンパク質は、上清よりも細胞中の方がずっと高いGnTI I / I活性を有した。溶解物中で、酵素は、不活性に見えた。この活性の欠如は、放出されたプロテアーゼの作用が原因と考えられる。CBH Iスペーサー変異体を含有するGnTI I / I融合タンパク質は、細胞および溶解物の方が高い活性を示したが(図33)、これは、細胞ペレット試料の方が高いシグナルを示したウエスタンプロット分析に関係する(図30)。

【0289】

考察。上清において、2×G4Sおよび3×G4Sスペーサー変異体を含有するGnTI I / I融合タンパク質は、野生型スペーサーを含有するGnTI I / I融合タンパク質よりも高い活性を有し、一方でCBH Iスペーサー変異体は、野生型スペーサーを含有するGnTI I / I融合タンパク質に匹敵する活性を有した。その上、EGIVスペーサー変異体を含有するGnTI I / I融合タンパク質は、最高のGnT活性を示した。3日目の試料のウエスタンプロット分析は、4日目の活性の結果と幾分相関を有した。ウエスタンプロット分析は、野生型、2×G4SおよびEGIVの両クローンの上清試料でかすかなバンドを示した。活性は以下の順序で検出された：EGIV > 2×G4S(クローン_1) > 3×G4S(クローン_2) > 3×G4S(クローン_1) CBH I = 野生型 = 2×G4S(クローン_2)。

【0290】

野生型スペーサーを含有するGnTI I / I融合タンパク質の上清、細胞、および細胞

10

20

30

40

50

溶解物試料中の G n T I I / I 融合タンパク質活性の決定は、大部分の活性が細胞内に関連し、より少ない量が分泌されることを示した。このことは、ウエスタンプロット分析において、なぜ上清画分よりも細胞画分の方にずっと良好な H i s タグ付き G n T I I / I シグナルが認められたかを説明すると考えられる。

【 0 2 9 1 】

完全 E D T A 不含阻害剤錠剤によるセリンおよびシステインプロテアーゼの、 E D T A によるメタロプロテイナーゼの、ならびにペプスタチン A によるアスパラギン酸プロテアーゼの阻害は、 G n T I I / I 融合タンパク質の収率を改善した。セリンプロテアーゼ阻害剤の使用に関するこの観測は、 P. pastoris の培地中のセリン型プロテアーゼ活性が P M S F で完全に阻害されたことを示した Salamin ら (Appl. Environ. Microbiol. , 76 (2010) 4269-4276) の研究に一致する。加えて、 Vad ら (J. Biotechnol. 116 (2005) 251-260) は、 P. pastoris において 10 mM E D T A の存在下で、 Saccharomyces cerevisiae タンパク質であるジスルフィドイソメラーゼの共発現と組み合わせて、インタクトなヒト副甲状腺ホルモンが 300 mg/l を超える高い生成を示したことを報告した。

【 0 2 9 2 】

4 個のスペーサー変異体のそれぞれを含有する全ての G n T I I / I 融合タンパク質が G n T I I / I 活性を有し、 2 × G 4 S および E G I V スペーサー変異体を有する酵素の活性が、野生型スペーサーを含有する G n T I I / I 融合タンパク質よりも高い活性を有した。

【 0 2 9 3 】

実施例 6 - アクセプター性グリカンとしての M a n 5 への融合タンパク質の使用
M a n 5 型 N - グリコシル化を有するリツキシマブ発現 T. reesei 株の構築

ネイティブなリツキシマブ配列はコドンが調和している。合成されたリツキシマブ軽鎖および重鎖を含有する原型プラスミドを產生した。抗体鎖および C B H I 融合タンパク質は、 40 ヌクレオチド重複配列を有するように設計し、酵母相同組み換えを用いたクローニングを可能にするために、重鎖についての発現ベクター p H H O 1 (アセトアミダーゼ選択マーカー c b h 1 が c b h 1 ローカスへの組み込み用に隣接する) または軽鎖についての p H H O 2 (ヒグロマイシン選択マーカー e g 1 1 が e g 1 1 ローカスへの組み込み用に隣接する) も同じく設計する。

【 0 2 9 4 】

得られた遺伝子プラスミドを E. coli にトランスフォーメーションする。 D N A を調製し、合成遺伝子を消化し、プラスミド骨格から単離する。発現ベクターを、 C B H I 融合タンパク質および重鎖または軽鎖のいずれかを有する T. reesei 発現ベクターを用いた酵母相同組み換えにより、発現ベクターを構築する。組み換えされたプラスミドを酵母からレスキューし、 E. coli にトランスフォーメーションする。 P C R スクリーニング後に、正しいクローナーを単離し、配列決定する。発現カセットフラグメントを消化し、プラスミド骨格から単離し、重鎖構築物について約 10 . 2 kb のフラグメントおよび軽鎖構築物について 10 . 8 kb フラグメントが生じる。重鎖および軽鎖フラグメントを T. reesei M 1 2 4 株に共トランスフォーメーションする。ヒグロマイシン耐性および単独窒素源としてアセトアミドで成長する能力についてトランスフォーマントを選択する。連続する 2 回のラウンドで二重選択培地上にトランスフォーマントを画線し、ゲノムへの発現構築物の組み込みについて P C R により試験する。

【 0 2 9 5 】

リツキシマブ抗体を発現している T. reesei 株への G n T I I / I タンデム酵素およびマノシダーゼ I I の導入

リコンビナント G n T I I / I を M 1 2 4 などの M a n 5 產生株に導入することに加え、 G n T I I / I がアクセプター分子として G 1 c N A c M a n 3 を利用することができるよう G 1 c N A c M a n 5 グリカン構造から 2 個のマンノースを除去するために、マノシダーゼ I I 活性がさらに必要である。

【 0 2 9 6 】

10

20

30

40

50

上記の方法を本質的に用いて、上述の実施例に記載された G n T I I / I 発現カセットを、例えば *T. reesei* の c b h 2 ローカスにターゲティングすることができる。次に、G n T I I / I 融合タンパク質用の G 1 c N A c M a n 3 アクセプター分子を產生するために、上記トランスフォーメーション法を用いて、マンノシダーゼ I I 活性をその株に導入する。

【 0 2 9 7 】

マンノシダーゼ発現を推進するためのプロモーターを有する所望のマンノシダーゼ含有発現カセットを設計することにより、マンノシダーゼ I I 活性をリツキシマブ抗体発現 M 1 2 4 株に導入する。有用なプロモーターは、g p d A または c b h 1 由来である。マンノシダーゼ I I 活性は、ランダム組み込みに続く、最も適切な発現レベルを有する株のスクリーニングによりトランスフォーメーションすることができる。発現カセットを、専売の選択マーカー遺伝子と連結するか、または選択マーカーを、別々の発現カセットとして共トランスフォーメーションする。トランスフォーメーションは、上記方法にしたがって行う。

【 0 2 9 8 】

マンノシダーゼ I I 融合構築物を、*T. reesei* の細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよびステムドメイン、または K R E 2 ターゲティングペプチドから得て、ヒトマンノシダーゼ I I の N 末端アミノ酸欠失にフレーム内結合することができる。コードされた融合タンパク質は、そのマンノシダーゼ触媒ドメイン活性を保持しながら、K R E 2 ターゲティングペプチド配列により E R / ゴルジ体に局在し、G 1 c N A c M a n 5 G 1 c N A c 2 を G 1 c N A c M a n 3 G 1 c N A c 2 に加水分解することができる。ある態様では、完全長ヒトマンノシダーゼ I I は、M 1 2 4 で発現させることができる。

【 0 2 9 9 】

K R E 2 ターゲティングペプチドは、K R E 2 のアミノ酸約 1 ~ 約 1 0 6 番または約 1 ~ 約 8 3 番を含む。

K r e 2 a a 1 ~ 1 0 6

M A S T N A R Y V R Y L L I A F F T I L V F Y F V S N S K Y E G V D L N K G T F
T A P D S T K T T P K P P A T G D A K D F P L A L T P N D P G F N D L V G I A P
G P R M N A T F V T L A R N S D V W D I A R S I R Q (配列番号 1 1 5)

K r e 2 a a 1 ~ 8 3

M A S T N A R Y V R Y L L I A F F T I L V F Y F V S N S K Y E G V D L N K G T F
T A P D S T K T T P K P P A T G D A K D F P L A L T P N D P G F N D L V G I A P
G P R (配列番号 1 1 6)

【 0 3 0 0 】

Trichoderma に上記マンノシダーゼ I I 構築物をトランスフォーメーション後、*Trichoderma* 株を選択し、2 回の連続するラウンドで選択培地上に画線し、ゲノムへの発現構築物の組み込みについて P C R により試験する。次に、M a n 5 生成性で、G n T I I / I 融合タンパク質、マンノシダーゼ I I 、およびリツキシマブ抗体を発現する、選択された *Trichoderma* 株トランスフォーマントを振盪フラスコ中または培養槽条件で培養し、上記のようにグリカン含量について分析した。

【 0 3 0 1 】

実施例 7 - *T. reesei* における G n T I および G n T I I の発現

ランダム組み込みによる G n T I 構築物を用いた *T. reesei* M 1 2 4 のトランスフォーメーション

コドン最適化されたヒト G n t I を *T. reesei* M 1 2 4 株にトランスフォーメーションした。G n t I 遺伝子を二つの異なるプロモーターのコントロール下のベクターにクローニングした：(1) c b h 1 遺伝子の誘導性プロモーター；および(2) g p d A 遺伝子の構成的発現されたプロモーター。二つのプロモーターのいずれかの下で G n t I を含有するベクターを、それぞれアセトアミダーゼ遺伝子またはヒグロマイシン耐性マーカー遺伝子のいずれかを含有するプラスミドと共に *T. reesei* M 1 2 4 株に共トランスフォーメ

10

20

30

40

50

ーションした。

【0302】

g p d A プロモーター下およびアセトアミド選択下の G n t I を有する 34 個のトラン

スフォーマントを P C R によりスクリーニングし、全てが G n t I 陽性であった。 c b h 1 プロモーター下およびアセトアミド選択下の G n t I を有するトランスフォーマントについて、26 個中 19 個が G n t I 構築物について P C R 陽性であった。加えて、初回の D N A 抽出は、c b h 1 プロモーター下およびヒグロマイシン選択下の G n t I を有する 5 株について行った。これらの株の全てが P C R 陽性であった。25 個の g p d A プロモータートランスフォーマントおよび全ての c b h 1 プロモータートランスフォーマント (14 + 5) を単核クローンに精製し、胞子懸濁物を調製した。

10

【0303】

初回分析目的のために、23 個の g p d A プロモータートランスフォーマントおよび 19 個の c b h 1 プロモータートランスフォーマント (14 個はアセトアミドから、5 個はヒグロマイシン選択から成長した)、ならびに親株 M 1 2 4 を、2% 穀粒粕エキスおよび 4% ラクトースを補充した Trichoderma 最少培地 50 ml を有する 250 ml 振盪フラスコ中で培養した。株の成長を pH 測定によりモニターした。試料 (上清および菌糸体) を 3、5、および 7 日目に収集し、グリカン構造分析のために使用するまで凍結保存した。

【0304】

ランダム組み込みにより得られた T. reesei G n T I 株のグリカン分析

全ての上清試料のタンパク質濃度を、標準として B S A を使用してブラッドフォードに基づくアッセイ (BioRad Quickstart Bradford Protein Assay) により測定した。N-グリカン分析に供された試料の分泌タンパク質含量を 5 μg または 10 μg に調整した。上清タンパク質 5 μg について 96 ウェルプレート、または上清タンパク質 10 μg について 1.5 ml チューブのいずれかで、N-グリカン分析を行った。全ての N-グリカン分析を三つ組みで行った。中性および酸性 N-グリカンの両方を M A L D I - T O F M S で分析した。

20

【0305】

4 個の G n T 1 トランスフォーマント (3 および 5 日目) において生成された G n T 1 生成物 G n 1 H e x 5 の量および同じく生成した酸性 N-グリカンの量のより正確な測定を行うために、M A L D I スペクトルに公知のグリカンを添加した。中性および酸性 N-グリカンについて、1177 Da の質量値の 2 pmol / スペクトルの内部較正剤 H e x 2 H e x N A c 4 および 1362 Da の質量値の 0.5 pmol のモノシアリル化 H e x 4 H e x N A c 2 をそれぞれ使用した。分析を三つ組みで行った。

30

【0306】

いずれの g p d A プロモータートランスフォーマントからも G n T 1 生成物は観測されなかった。しかし、8 個の c b h 1 プロモータートランスフォーマント (5 個はヒグロマイシン選択され、3 個はアセトアミド選択されたもの) が G n T 1 生成物 G n 1 M a n 5 を生成した (図 34 および 35、ならびに表 13)。

【0307】

【表 1 3】

表 13: 4 個の陽性 **GnT1** トランスフォーマントおよび親 **M124** 株での 3 および 5 日目の **Man5** および **Gn1Man5** のシグナル強度を内部較正剤 **Hex2HexNAc4** と比較したパーセンテージ。 **Man5** は親 **M124** 株における主グリコフォームである。

組成	m/z	M124 1., 3日目					M124 1., 5日目					M124/GNT1, クローンHM1, 3日目					M124/GNT1, クローンHM1, 5日目				
		平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX
Hex2HexNAc4	1177.42	97.7	0.5	0.5	97.1	98.0	36.5	0.8	2.3	35.9	37.1	78.5	14.5	18.4	68.2	88.7	50.1	10.6	21.2	42.6	57.6
Hex5HexNAc2	1257.42	2.3	0.5	22.5	2.0	2.9	63.5	0.8	1.3	62.9	64.1	14.5	9.9	68.0	7.5	21.5	44.0	9.6	21.9	37.2	50.8
Hex5HexNAc3	1460.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.1	4.6	65.6	3.8	10.3	5.9	1.0	16.7	5.2	6.6
M124/GNT1, クローン8, 3日目 M124/GNT1, クローン8, 5日目 M124/GNT1, クローン39, 3日目 M124/GNT1, クローン39, 5日目																					
組成	m/z	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX
Hex2HexNAc4	1177.42	77.3	7.6	9.8	72.0	82.7	67.3	10.0	14.9	56.5	76.3	83.7	1.5	1.8	82.7	84.8	40.0	1.9	4.6	37.9	41.1
Hex5HexNAc2	1257.42	15.0	5.2	34.4	11.4	18.7	18.9	6.2	32.5	12.8	25.1	8.3	1.0	11.7	7.6	8.9	46.9	1.8	3.8	45.6	49.0
Hex5HexNAc3	1460.5	7.6	2.4	31.6	5.9	9.3	13.8	4.0	29.1	10.8	18.3	8.0	0.6	6.9	7.6	8.4	13.1	0.3	2.1	12.7	13.3
M124/GNT1, クローン90, 3日目 M124/GNT1, クローン90, 5日目																					
組成	m/z	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX	平均	SD	RSD	MIN	MAX
Hex2HexNAc4	1177.42	93.8	1.6	1.7	92.4	95.6	92.6	2.7	2.9	89.8	95.3										
Hex5HexNAc2	1257.42	3.7	1.0	25.9	2.6	4.5	4.7	1.4	30.9	3.2	6.0										
Hex5HexNAc3	1460.5	2.5	0.7	26.2	1.8	3.1	2.7	1.3	47.8	1.5	4.1										

【0 3 0 8】

GnT1 生成物 Gn1Man6P1、Gn1Man7P1、および Gn1Man8P1 も、全ての陽性トランスフォーマントのリン酸化 N - グリカン中に見出された。リン酸化 N - グリカンの量は、GnT1 トランスフォーマントで増加し、プロファイルはより大きな N - グリカンに偏り、Man7P1 または Man8P1 が最も強いシグナルを有した（親 M124 では Man6P1）（図 36）。

【0 3 0 9】

8 個の GnT1 トランスフォーマントが Gn1Man5 構造を生成した。Gn1Man5 はクローン 39 で最も存在度が高かった。しかし、2 番目に高いレベルの Gn1Man5 を生成したが、高い比率の Man5 および Gn1Man5 を有したクローン 8 が最良のクローンであると思われた（図 35）。cbh1 プロモーターのコントロール下で GnT1 を含有するクローン 8 を M198 株と名付け、分析継続のために選択した。

【0 3 1 0】

ターゲット組み込みによる GnT1 I 構築物を用いた *T. reesei* M198 株のトランスフォーメーション

5 個の GnT1 I 保有ベクターを生み出した（表 14）。2 個のベクターが GnT1 I 中にネイティブな哺乳動物ゴルジ体ターゲティングペプチドを含有した。残りの 3 個のベクターでは、哺乳動物ターゲティングペプチドが *T. reesei* MNT1 (-1, 2 - マンノシルトランスフェラーゼ) ターゲティングペプチドに置き換えられていた。全部で 5 個のベクターが cbh1 プロモーターまたは gpdA プロモーターのいずれかおよび pyr4 ループアウトマーカーを含有した。追加的に、全部で 5 個のベクターが、alg3 ローカスに組み込むようにターゲティングされ、したがって alg3 遺伝子を欠失していた。cbh1 プロモーター下の MNT1 / GnT1 I 構築物のうち、2 個の異なる大きさの GnT1 I 配列欠失を試験した。

【0 3 1 1】

【表 14】

表14: 構築されたGNT2ベクター

プラスミド名	プロモーター	ターゲティングペプチド	N 末端欠失 (GnTII)
pTTv140	cbh1	哺乳動物	N/A
pTTv141	gpdA	哺乳動物	N/A
pTTv142	cbh1	<i>Trichoderma</i> MNT1	74 個アミノ酸
pTTv143	cbh1	<i>Trichoderma</i> MNT1	104 個アミノ酸
pTTv144	gpdA	<i>Trichoderma</i> MNT1	74 個アミノ酸

10

20

30

40

50

【0312】

pTTv144ベクターを除くこれらのベクターを、最良のp_y4陰性GnTI生成株M198(M319)にPmeIフラグメントとしてトランスフォーメーションした。トランスフォーメントを精製して単核クローンにし、PCRをスクリーニングした。次に、両端に正しい組み込みを示しているクローンを分析継続のために選択した。

【0313】

産生したGnTI I発現株の成長特性を研究するために、大量の振盪フラスコ培養物を調製した。振盪フラスコ培養物を2回の別々の回分培養で調製した。最初の回分培養物はpTTv140、pTTv142、およびpTTv143を含有した。2回目の回分培養物はpTTv141を含有した。親株M198を対照株として使用した。40g/lラクトース、20g/l穀粒粕エキス、および100mMPIPSSを補充したTrMM培地(pH5.5)中で細胞を成長させた。構築物1個あたり5個のトランスフォーメントを培養した。pTTv140、pTTv142、およびpTTv143培養物を3、5、7、および9日目にサンプリングした。pTTv141培養物を3、5、7、および10日目にサンプリングした。各試料のpHおよび細胞乾燥重量を測定し、培養上清試料をグリカン構造分析のために使用した。

【0314】

T. reesei M198株のalg3ローカスにGnTI Iをターゲティングすることにより得られたT. reesei株のグリカン分析

pTTv140ベクター(ネイティブなターゲティングペプチドおよびc_bh_Iプロモーターを含有)、pTTv142ベクター(MNT1ターゲティングペプチド、GnTI Iの74aa N末端欠失、およびc_bh_Iプロモーターを含有)、pTTv143ベクター(MNT1ターゲティングペプチド、GnTI Iの110aa N末端欠失、およびc_bh_Iプロモーターを含有)、およびpTTv141ベクター(ターゲティングペプチドおよびgpdAプロモーターを含有)を含有する5個の異なるクローンを分析した。

【0315】

5日目の試料については三つ組みで、3および7日目の試料については二つ組で、上清タンパク質5μgについて96ウェルプレートを用いてN-グリカン分析を準備した。上清のタンパク質濃度を、BSAを標準として使用してブラッドフォードに基づくアッセイ(BioRad Quickstart Bradford Protein Assay)により測定した。PNGase F反応は既述のように行った。放出されたN-グリカンを最初にHypersep C-18 100mgで、次にHypersep Hypercarb 10mg(どちらもThermo Scientific製)で精製し、そこで中性および酸性グリカンを分離した。両方の精製を96ウェル形式で行った。中性N-グリカンをMALDI-TOF MSにより分析した。

【0316】

GnTI Iをトランスフォーメーションされた4個の異なる株のN-グリカンを分析した。

クローン

1-117A、pTTv140ベクターをトランスフォーメーションされたことにより、ネイティブなターゲティングペプチドおよびc_bh_Iプロモーターを含有し、約40%のG0および約13%のH_{ex}6を生成した(図37A)。pTTv143ベクターをトランスフォーメーションされたことにより、MNT1ターゲティングペプチド、GnTI Iの110aa N末端欠失、およびc_bh_Iプロモーターを含有するクローンは、約10%のG0を生成した(図37C)。gpdAプロモーターを含有したクローン3Bは、約28%のG0および約19%のH_{ex}6を生成した(図37D)。

【0317】

pTTv140、pTTv141、およびpTTv142ベクターを含有する代表的なクローンのグリコシル化パターンも、時間の関数として安定であることが示された(図38)。

【0318】

10

20

30

40

50

タンパク質の特異的グリコシル化

グリコシル化におけるタンパク質特異的変化を分析するために、pTTv142ベクター含有クローン3-17Aおよび親株M198由来の試料をSDS-PAGEで分離し、PVDFメンブランにプロッティングした。関心がもたれるタンパク質バンド(M198のバンド4本および3-17Aクローンの4本)を切り出し、PNGase Fを用いたメンブラン上酵素放出でN-グリカンを遊離させた(図39)。

【0319】

剥離および精製した中性N-グリカンを、MALDI-TOF MSを用いて分析した。総分泌タンパク質のグリコシル化パターンは、M198親株の分離された50kDaタンパク質に類似していた(図40)。最小サイズのタンパク質バンドはグリコシル化されていなかった。

10

【0320】

GnTIIクローン3-17Aでは、典型的でないシグナルの大部分が消失し、それらのシグナルが培地起源であることが確認された。追加的に、クローン3-17Aのグリコシル化パターンは、総分泌タンパク質のグリカンパターンと異なった(図40B)。クローン3-17AからのG0の量は、約35~36%であった(図40B)。

【0321】

GnTII株の発酵槽培養

GnTII 1-117A M329株(pTTv140ベクターを含有する)の発酵培養は、TrMM(pH5.5)+2%穀粒粕エキス+6%ラクトース+0.5%KH₂PO₄+0.5% (NH₄)₂SO₄中で+28(pH5.5)にて行った。3日目に採取した試料に関して、上記「タンパク質特異的グリコシル化」の節に記載の分泌タンパク質5μgについて三組みでN-グリカン分析を行った。3日目にG0の量は約48%であり、Hex6の量は約19%であった(図41)。

20

【0322】

実施例8 - T. reesei ALG3ホモログ

ランダム組み込みによるGnTII構築物を用いたT. reesei M124のトランスフォームーション

他の生物からT. reesei ALG3ホモログを同定した。これらのホモログは、T. reesei以外の糸状菌細胞用のALG3欠失構築物を設計するために使用することができる。ALG3ホモログを表15に列挙する。T. reesei ALG3およびALG3ホモログの複数のアミノ酸配列アライメントを図42に示す。

30

【0323】

【表15】

表15: ALG3ホモログ

参照配列	生物	配列番号
Trire2 104121 fgenesh5_pg.C_scaffold_3000076	<i>Trichoderma reesei</i>	126
Triat2 270085 fgenesh1_pg.contig_14 # 149	<i>Trichoderma atroviride</i>	127
TriviGv29_8_2 194462 fgenesh1_pm.87 # 115	<i>Trichoderma virens</i>	128
EGU81920.1	<i>Fusarium oxysporum</i> Fo5176	129
XP_389829.1	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	130
AEO60805.1	<i>Myceliophthora thermophila</i>	131
XP_962259.1	<i>Neurospora crassa</i> OR74A	132
XP_001824044.1	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	133
XP_001259497.1	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	134
XP_001398696.2	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	135
XP_362427.2	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	136
NP_593853.1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h	137

40

【0324】

50

実施例 9 - G n T I I / G n T I 融合タンパク質変異体

G n T I I / G n T I 発現構築物の產生

誘導性プロモーター c b h 1 のコントロール下であり、4 個のスペーサー変異体のうち 1 個を含有するリコンビナント G n T I / I I 融合タンパク質を、実施例 4 および 5 に記載するように構築した。4 個のスペーサー変異体は、2 × G 4 S スペーサー、3 × G 4 S スペーサー、C B H I スペーサー、および E G I V スペーサーである。

【0325】

簡潔には、融合部位で 50 bp フレーム内重複を含有するプライマーを用いて、G n T I I および G n T I テンプレートから融合フラグメントを別々に増幅する。フラグメントをアガロースゲルから精製し、標準的な手順により融合構築物の増幅用の P C R テンプレートとして使用する。融合構築物を、誘導性プロモーター c b h 1 のコントロール下で A p a I / S p e I 制限部位を有するベクターにクローニングする。追加的に、G N T I I ドメイン中のネイティブな哺乳動物 G o l g i ターゲティングペプチドを T. reesei M N T 1 (- 1 , 2 - マンノシルトランスフェラーゼ) ターゲティングペプチドによって置き換えた。

【0326】

融合タンパク質に 2 × G 4 S スペーサー変異体を導入するために、P C R 重複戦略を用いて T 4 5 配列を二つの部分に分けて増幅する。最初に、A K T 1 - 6 - 1 5 ' プライマー (G G T A C C G G G C C C A C T G C G C A T C A T G C G C T T C C G A A T C T A C A A G C G (配列番号 146)) および G P 9 3 3 ' プライマーを用いてフラグメントを増幅し、G P 9 2 5 ' プライマーおよび A K T 1 - 6 - 4 3 ' プライマー (G G C G C G C C A C T A G T C T A A T T C C A G C T G G G A T C A T A G C C (配列番号 147)) を用いて第 2 のフラグメントを増幅する。Phusion 高忠実度 P C R ポリメラーゼ (Finnzymes) を用いて、供給業者によって提供される標準条件下で増幅を実施する。サイクリング条件は実施例 5 に記載する通りである。生じた P C R 生成物をアガロースゲルから精製し、重複する改変配列を有するフラグメントを、プライマーを有さない標準条件と同じ反応混合物中に混ぜ合わせる。10 回のアニーリング / 伸長サイクルは実施例 5 に記載するように実施する。プライマー A K T 1 - 6 - 1 (5 ') および A K T 1 - 6 - 4 (3 ') を添加し、実施例 5 に記載するようにサイクルを 20 増幅サイクルにわたり継続する。次に、増幅した T 4 5 フラグメントを精製し、A p a I / S p e I (New England Biolabs) で標準プロトコールにしたがって消化し、Trichoderma reesei 発現ベクターにクローニングする。次に、クローニングされたフラグメントを、適切なプライマーセットを用いた配列決定により検証し、產生した配列を、2 × G 4 S プロモーターおよび a l g 3 ターゲティングを有する T. reesei 発現ベクターの構築のために使用する。

【0327】

生じたプラスミドを、3 × G 4 S スペーサー改変用のテンプレートとして使用する。T 4 6 配列のクローニングは、T 4 5 に関して上記したように行う。A K T 1 - 6 - 1 5 ' プライマーおよび G P 9 5 3 ' プライマーを第 1 のフラグメント合成のために使用し、G P 9 4 5 ' プライマーおよび A K T 1 - 6 - 4 3 ' プライマーを第 2 のフラグメント合成のために使用する。フラグメントを混ぜ合わせ、プライマー A K T 1 - 6 - 1 (5 ') および A K T 1 - 6 - 4 (3 ') を増幅のために添加する。次に、増幅したフラグメント T 4 6 を A p a I / S p e I で消化し、Trichoderma reesei 発現ベクターにクローニングする。次に、クローニングされたフラグメントを、適切なプライマーセットを用いた配列決定により検証し、產生した配列を、3 × G 4 S プロモーターおよび a l g 3 ターゲティングを有する T. reesei 発現ベクターの構築のために使用する。

【0328】

C B H I および E G I V スペーサーを、類似の P C R 重複法で構築する。C B H I スペーサーについて、第 1 のフラグメントは、A K T 1 - 6 - 1 5 ' プライマーおよび G P 1 0 7 3 ' プライマーを用いて増幅する。第 2 のフラグメントは、G P 1 0 8 5 ' プライマーおよび A K T 1 - 6 - 4 3 ' プライマーを用いて増幅する (表 11)。E G I V

10

20

30

40

50

スペーサーについて、第1のフラグメントは、A K T 1 - 6 - 1 5' プライマーおよびG P 1 0 9 3' プライマーを用いて増幅する。第2のフラグメントは、G P 1 1 0 5' プライマーおよびA K T 1 - 6 - 4 3' プライマーを用いて増幅する(表11)。両方の場合、P C R生成物をアガロースゲルから精製し、混ぜ合わせ、次のP C R反応用のテンプレートとして使用して、配列T 5 0およびT 5 1を増幅する。次に、T 5 0およびT 5 1のP C R生成物をA p a I / S p e Iで消化し、*Trichoderma reesei*発現ベクターにクローニングする。次に、クローニングされたフラグメントを、適切なプライマーセットを用いた配列決定により検証し、產生した配列を、C B H IまたはE G I Vプロモーターのいずれかおよびa l g 3ターゲティングを有するT. *reesei*発現ベクターの構築のために使用する。

10

【0329】

全てのP C R増幅は、高忠実度Phusionポリメラーゼ(Finnzymes)を用いて行う。プライマー(表11)はMWG Operonから取寄せる。配列決定は、ヘルシンキ大学バイオテクノロジー研究所D N A配列決定研究室が商業サービスとして行う。

【0330】

スペーサー変異(2×G 4 S、3×G 4 S、C B H I、およびE G I V)を有する既述のキメラG n T I I / G n T I配列を有するTrichoderma *reesei*発現ベクターを、c b h 1プロモーターのコントロール下でp y r 4遺伝子ループアウトマーカーと共にサブクローニングし、次に、骨格へのターゲット組み込みのためのa l g 3フランкиング領域フラグメントを構築する。発現カセットをT. *reesei* M 2 7 9株(M 2 0 2のp y r 4-株)にトランスフォーメーションする。プレート選択後に、クローンをP C Rでスクリーニングし、単一胞子を介して精製する。グリカン分析用の材料を得るために、既述の振盪フラスコ培養を行う。

20

【0331】

リツキシマブ抗体発現性T. *reesei*株へのG n T I I / I融合タンパク質変異体の導入

リコンビナントG n T I I / I融合タンパク質変異体を、実施例5に記載のリツキシマブ発現性T. *reesei* M 2 7 9株に導入する。

【0332】

簡潔には、c b h 1プロモーターのコントロール下でのG n T I I / G n T I融合タンパク質、M N T Iターゲティングペプチド、p y r 4ループアウトマーカー、および4個のスペーサー変異体のうち1個を有するベクターを、それぞれターゲット組み込みのために骨格ベクター中のa l g 3フランкиング領域フラグメントの間にサブクローニングすることで、a l g 3遺伝子を欠失させる。P m e I消化された発現カセットをT. *reesei* M 2 7 9株(p y r 4-株)にトランスフォーメーションする。プレート選択後、クローンをP C Rでスクリーニングし、単一胞子を介して精製する。

30

【0333】

a l g 3ローカスへのターゲティングにより得られたリツキシマブ產生T. *reesei* G n T I I / G n T I変異体株のグリカン分析

グリカン分析用の材料を得るために、実施例5に記載の振盪フラスコ培養を行い、加えて一部の培地に0.3mg/mlダイズトリプシン阻害剤(S B T I)および1%カザミノ酸を補充する。S B T Iを最初に植菌時に、次に3~6日目に毎日添加する。P M S FおよびペプスタチンAを全ての試料に添加してから凍結する。

40

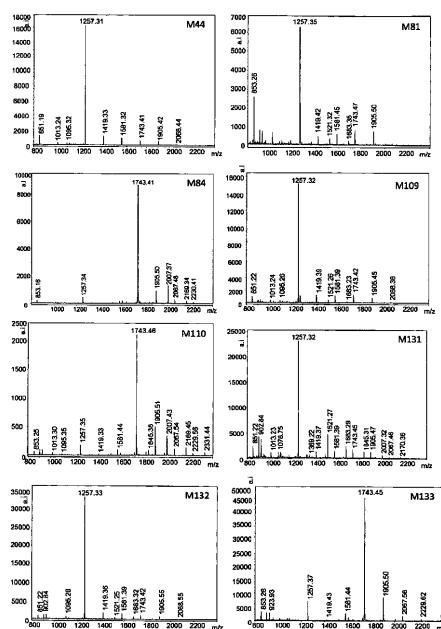
【0334】

リツキシマブは、S B T Iを有する5日目の上清試料ならびにS B T Iを有さない5および7日目の試料からプロテインGアフィニティークロマトグラフィーで精製する。P N G a s e Fの反応を変性タンパク質約10μgについて行う。放出されたN-グリカンを最初にHypersep C - 1 8で、次にHypersep Hypercarb(両方ともThermo Scientific製)で精製し、その際、中性および酸性グリカンを分離する。精製ステップを96ウェル形式で行う。中性および酸性N-グリカンをM A L D I - T O F M Sにより分析して、リツキシマブ抗体上のG 0グリコフォームの存在について試験する。

50

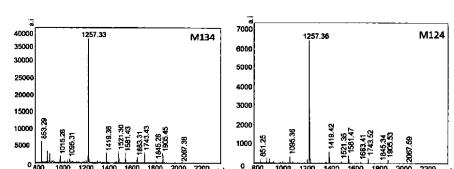
【図 1 - 1】

Figure 1

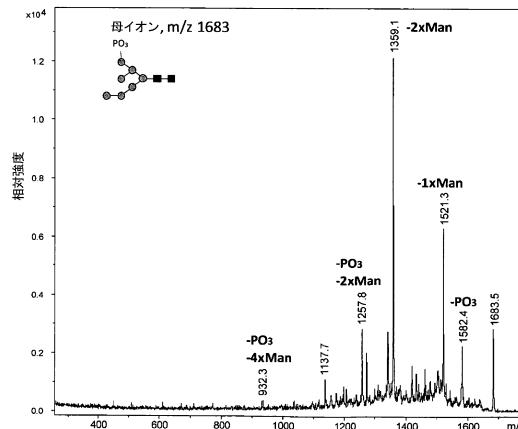


【 図 1 - 2 】

Figure 1, cont.

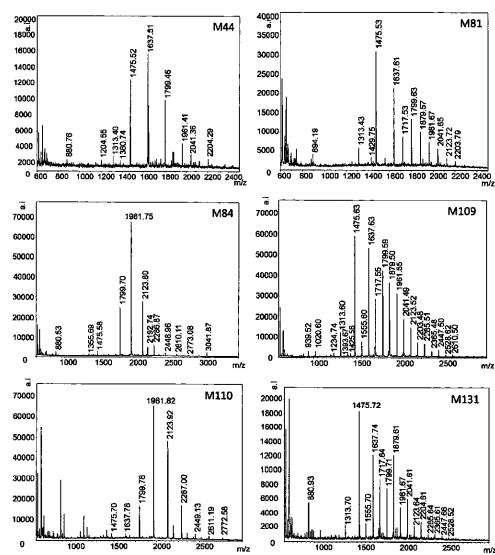


【 図 2 】



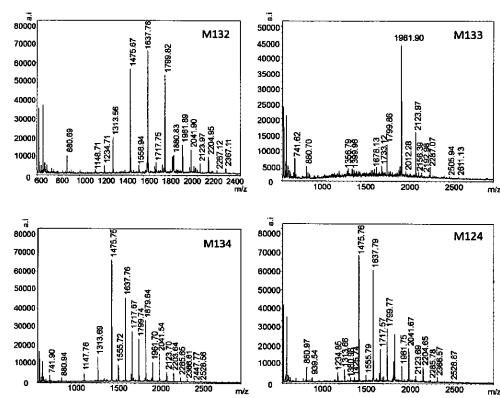
【図3-1】

Figure 3



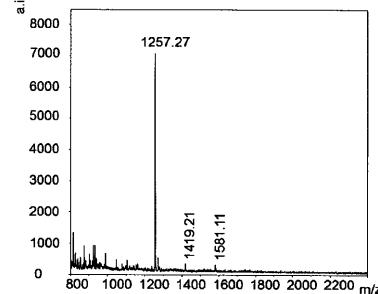
【図3-2】

Figure 3, cont.

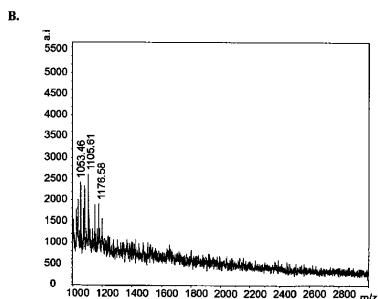


【図4A】

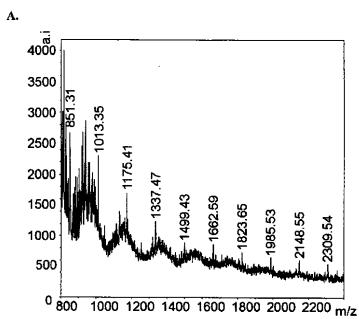
A.



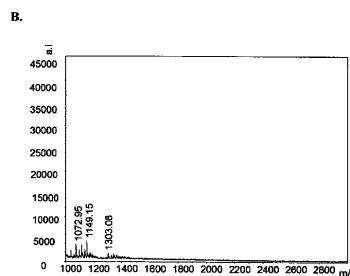
【図4B】



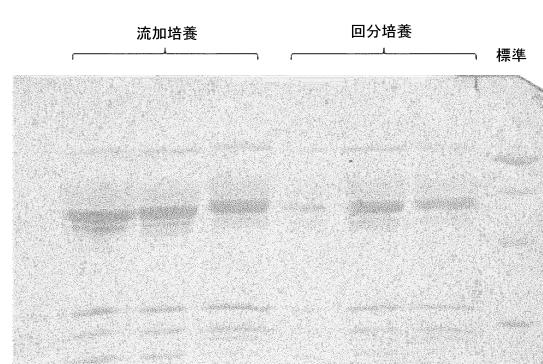
【図5A】



【図5B】

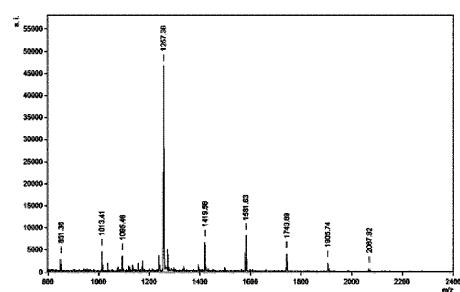


【図6】



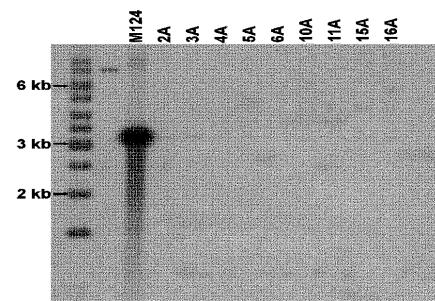
【図7】

Figure 7



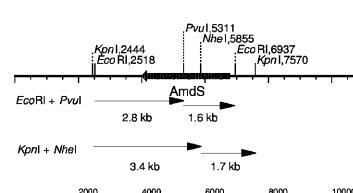
【図8】

Figure 8



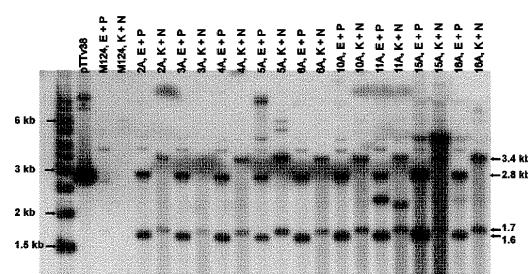
【図9A】

A.

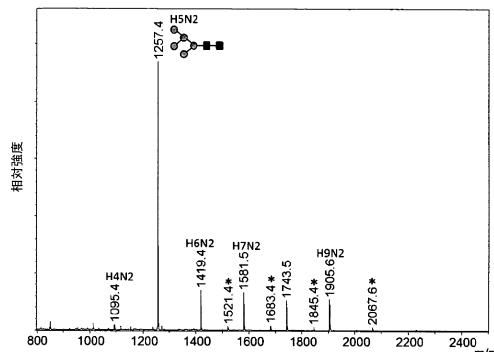


【図9B】

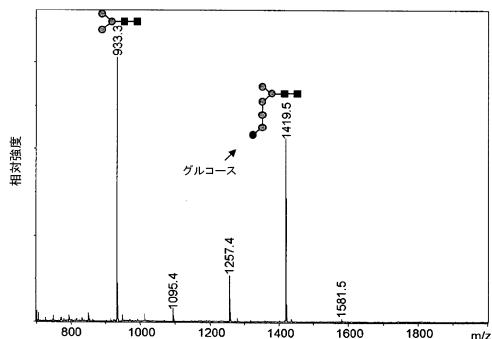
B.



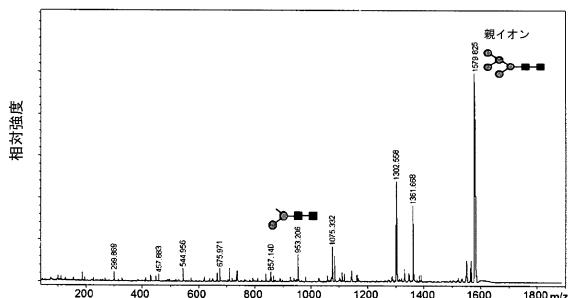
【図10A】



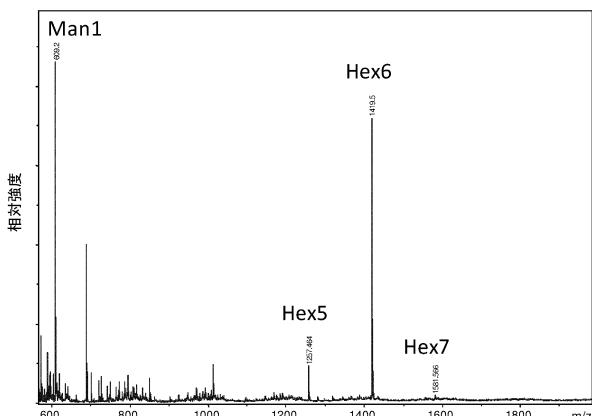
【図10B】



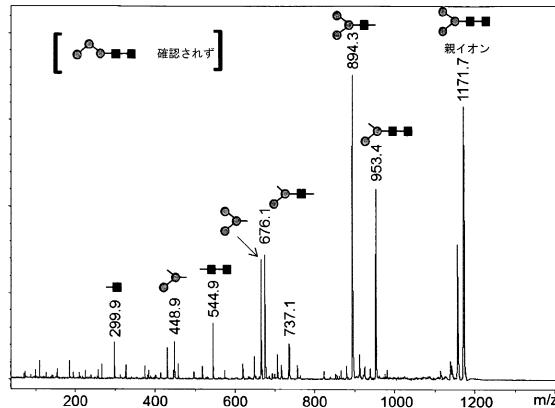
【図12B】



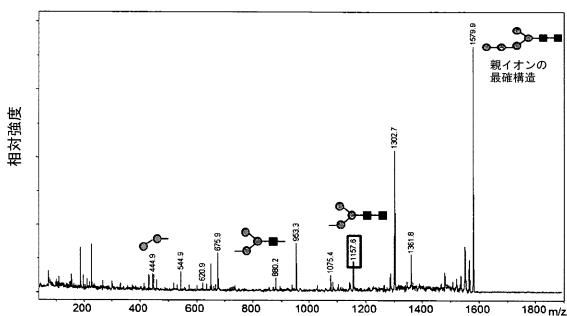
【図13】



【図 1 1 】

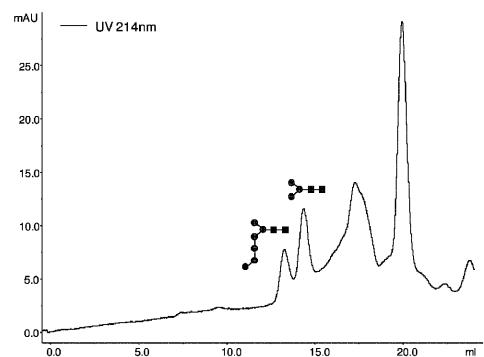


【図12A】

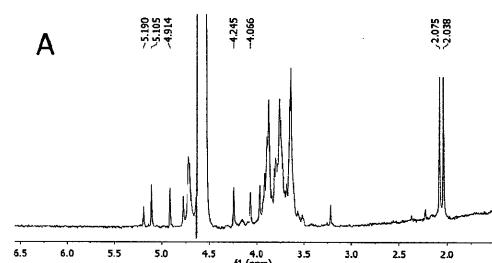


【図14】

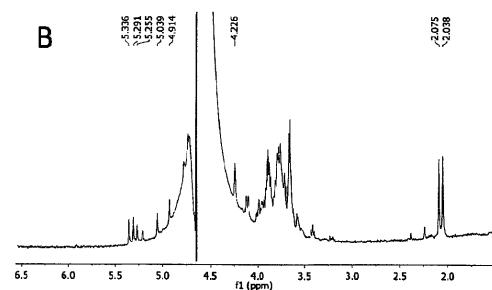
Figure 14



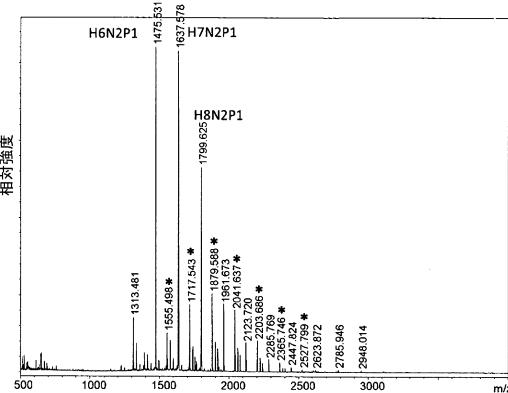
【図 15A】



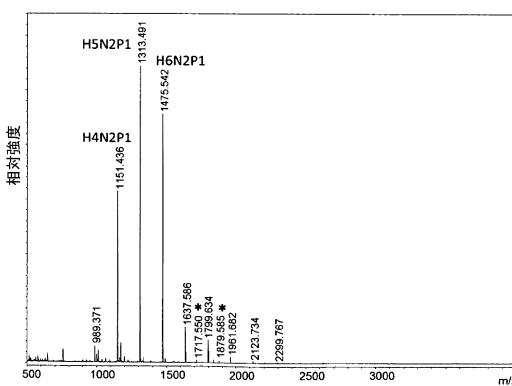
【図 15 B】



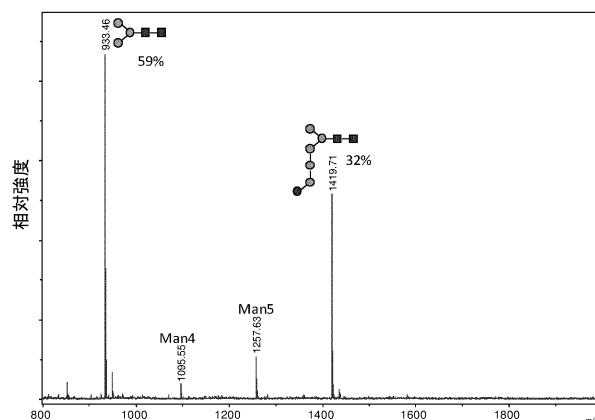
【図 16 A】



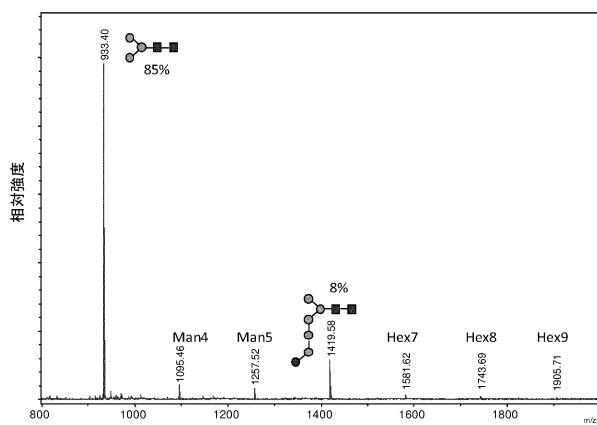
【図 16 B】



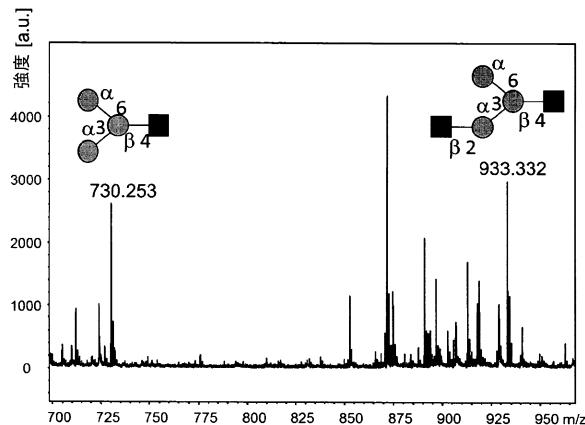
【図 17】



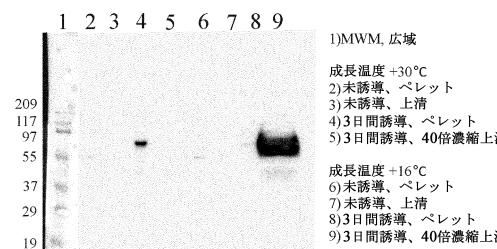
【図 18】



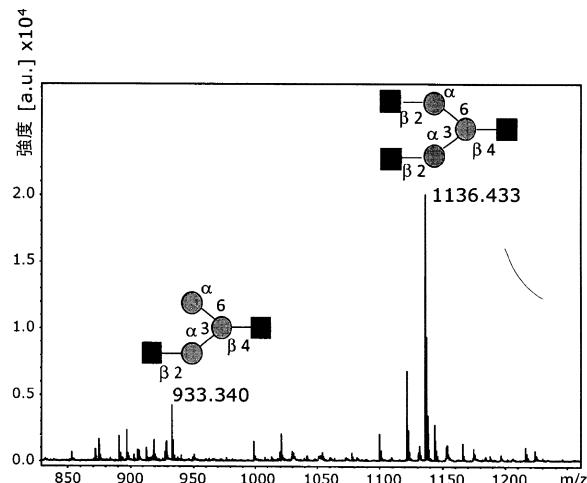
【図 19】



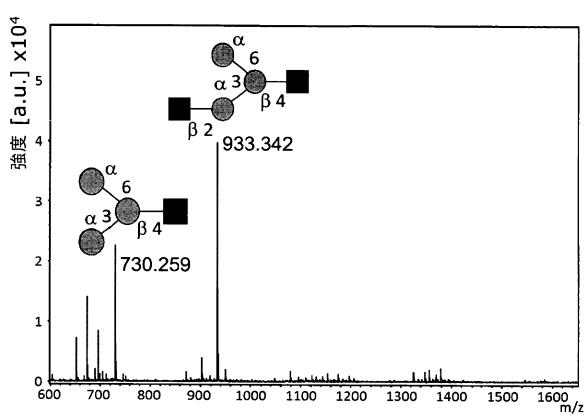
【図 20】



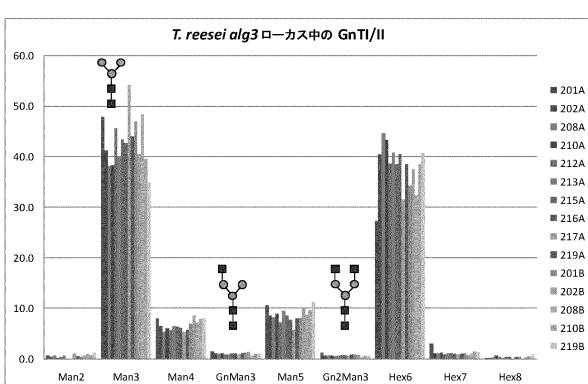
【図21】



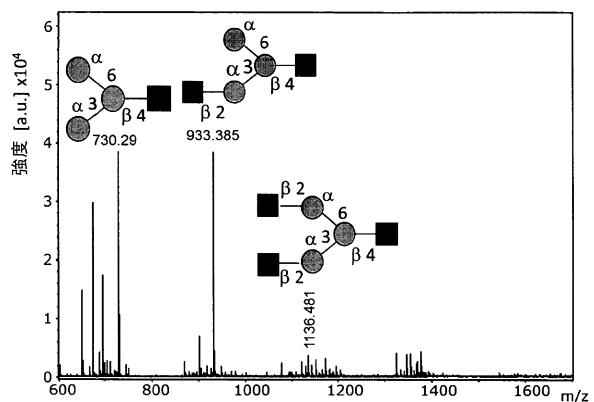
【図22】



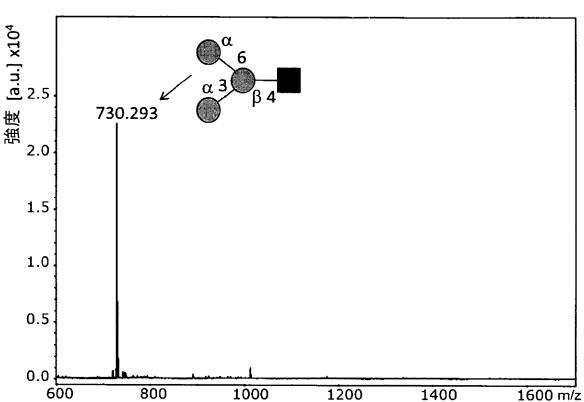
【図23】



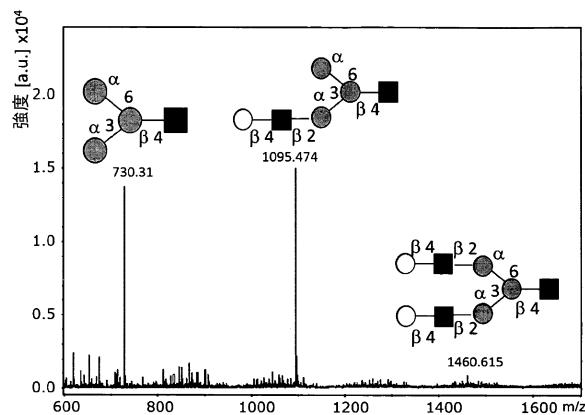
【図24】



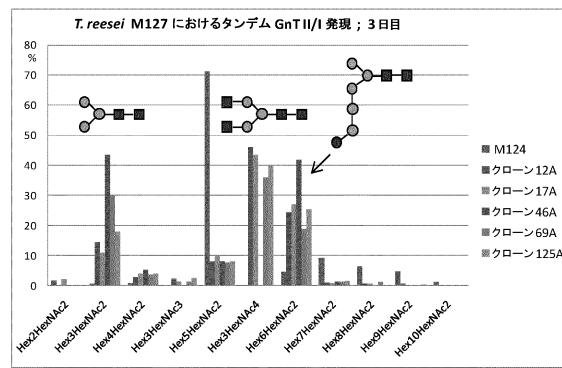
【図25】



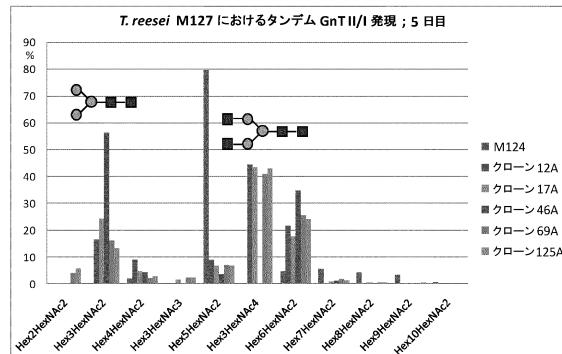
【図26】



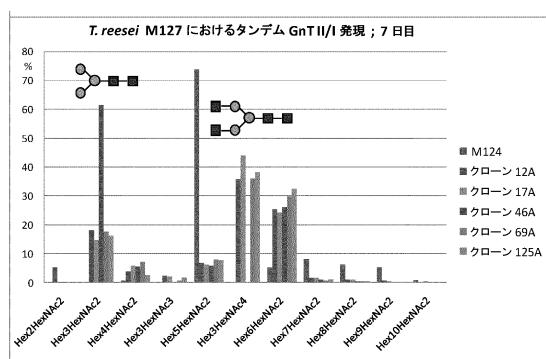
【図27A】



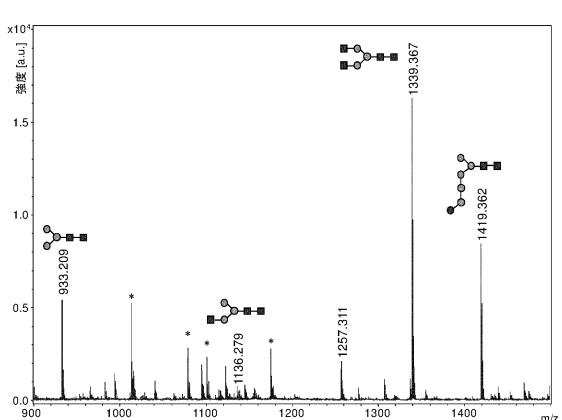
【図27B】



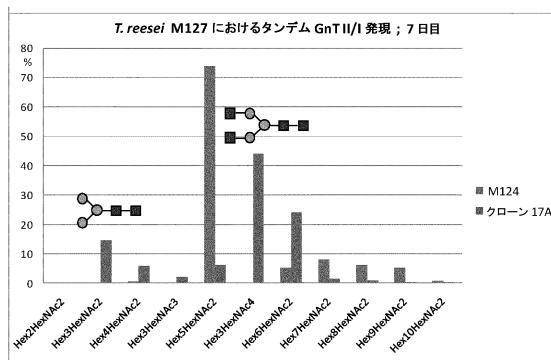
【図27C】



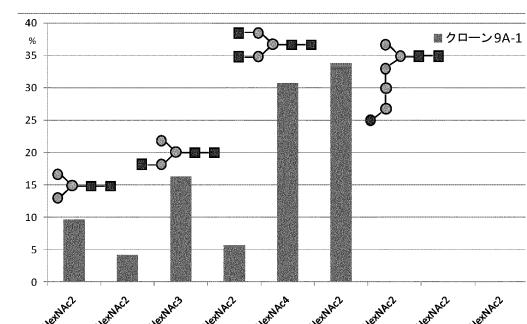
【図27E】



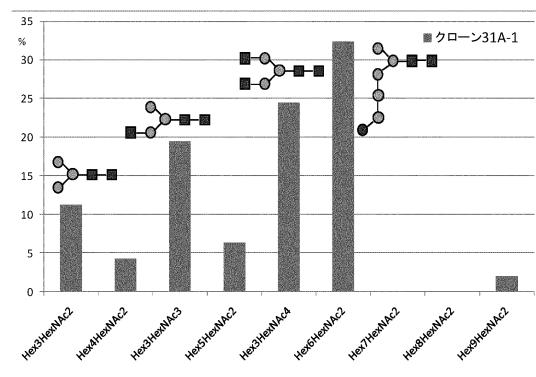
【図27D】



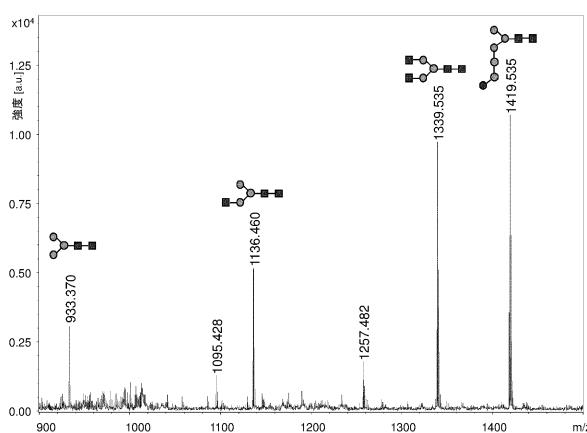
【図28A】



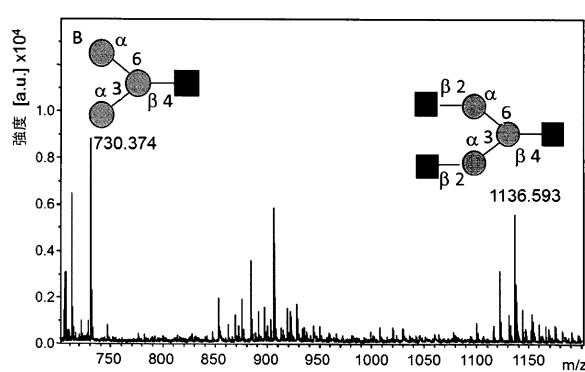
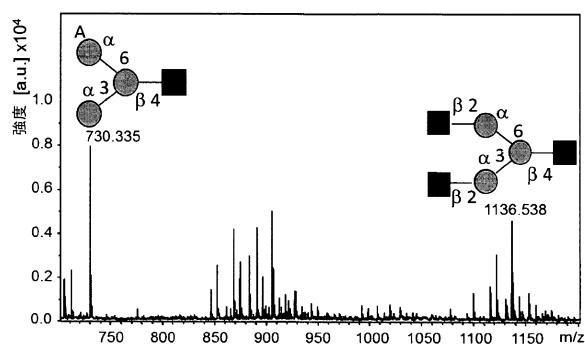
【図 2 8 B】



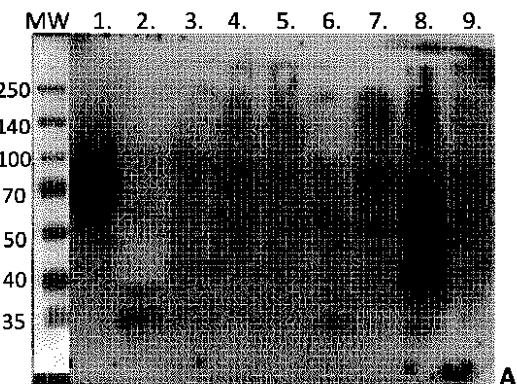
【図 2 8 C】



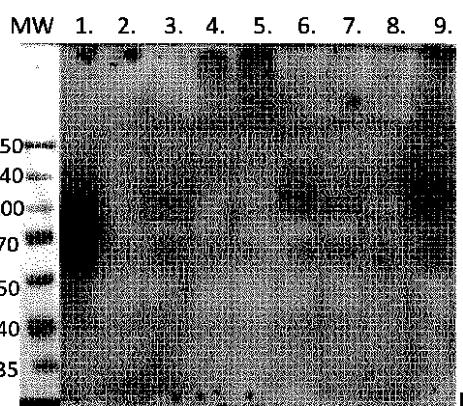
【図 2 9】



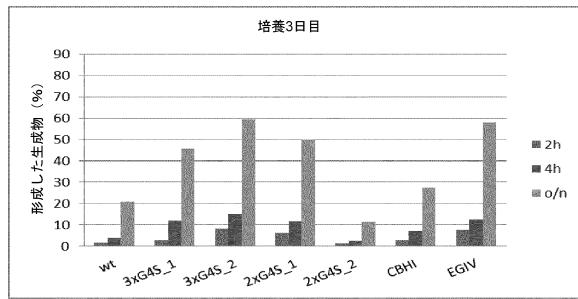
【図 3 0 A】



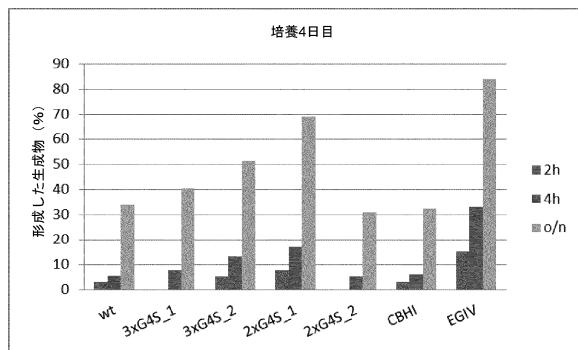
【図 3 0 B】



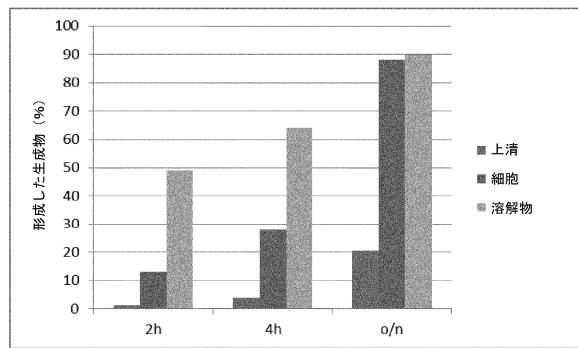
【図31A】



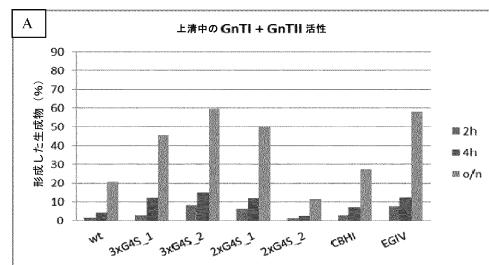
【図31B】



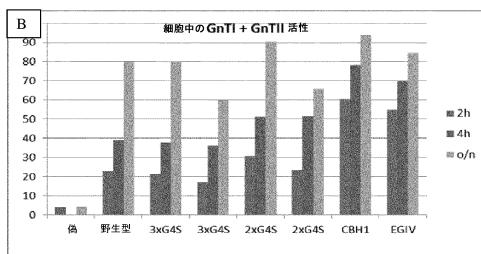
【図32】



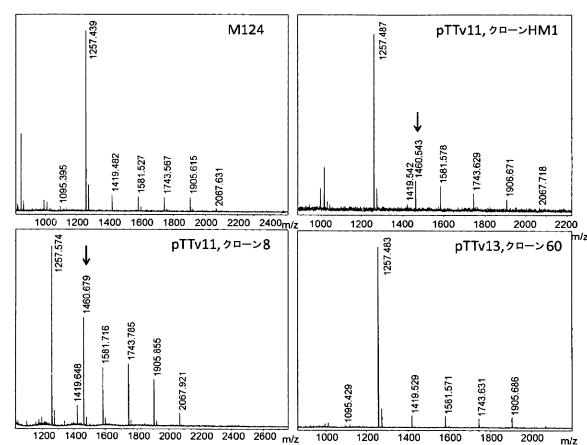
【図33A】



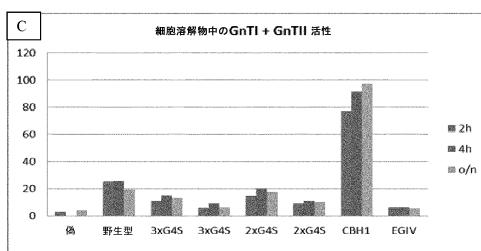
【図33B】



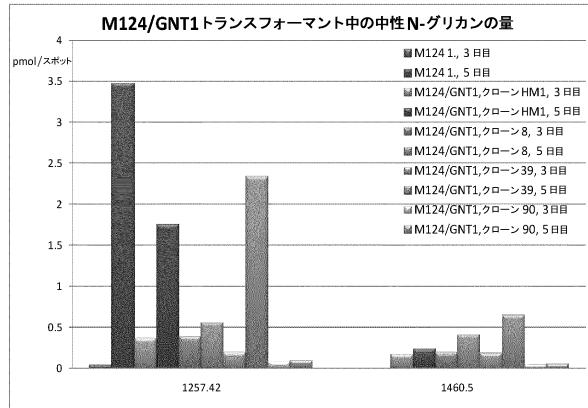
【図34】



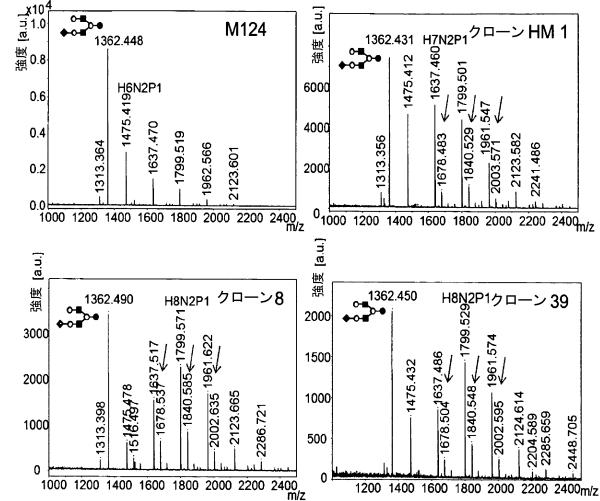
【図33C】



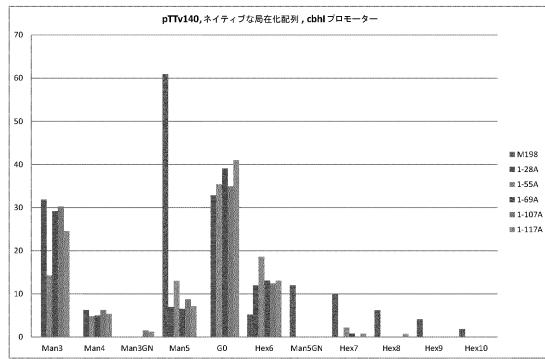
【図35】



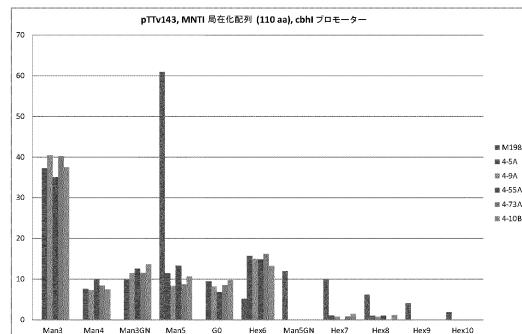
【図36】



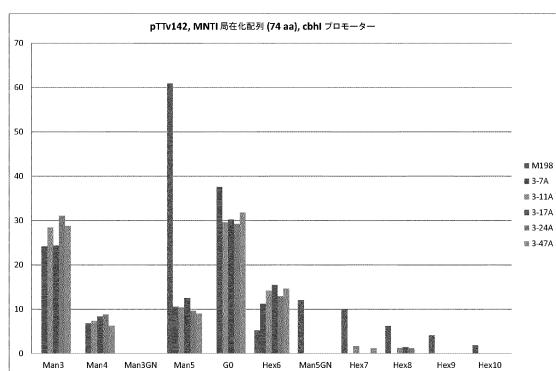
【図37A】



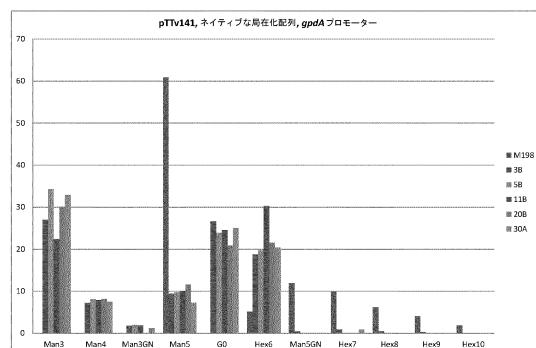
【図37C】



【図37B】

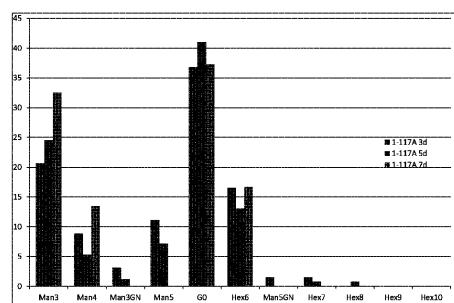


【図37D】



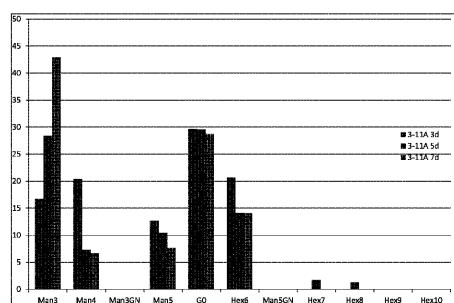
【図38A】

A.



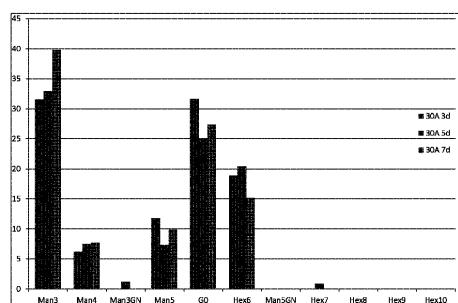
【図38B】

B.



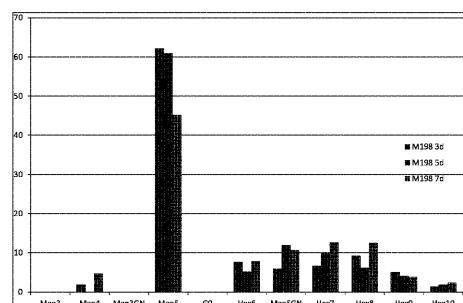
【図38C】

C.



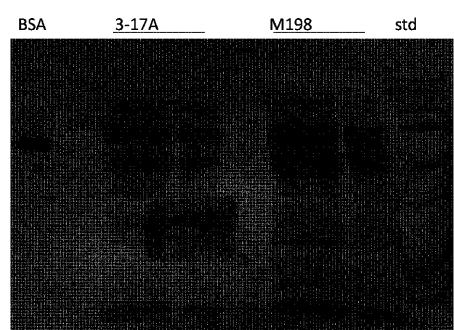
【図38D】

D.



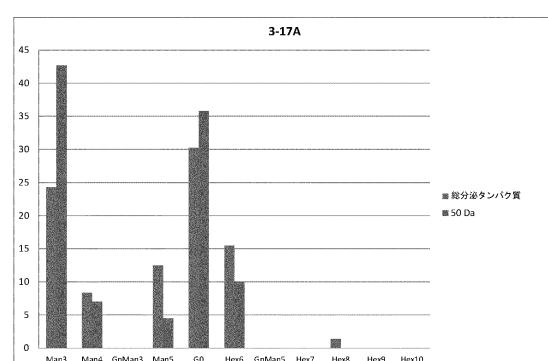
【図39】

Figure 39

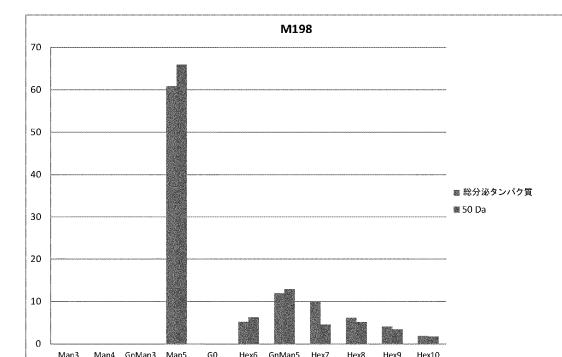


【図40B】

3-17A

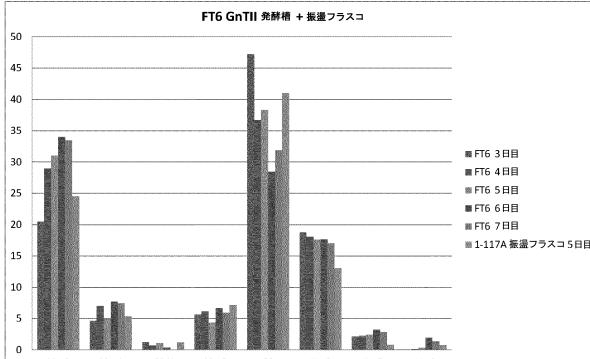


【図40A】



【図41】

FT6 GnTII 発酵槽 + 振盪フラスコ



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10
C 12 P 19/28 (2006.01)	C 12 P 19/28
C 12 N 9/10 (2006.01)	C 12 N 9/10

(73)特許権者 510172996

グリコス・フィンランド・オーワイ
 Glykos Finland Oy
 フィンランド国、エフアイ-00790 ヘルシンキ、ビーキンカーリ 6
 Viikinkaari 6, FI-00790 Helsinki, Finland

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(74)代理人 100078662

弁理士 津国 肇

(74)代理人 100131808

弁理士 柳橋 泰雄

(74)代理人 100135873

弁理士 小澤 圭子

(74)代理人 100116528

弁理士 三宅 俊男

(74)代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100146031

弁理士 柴田 明夫

(74)代理人 100181102

弁理士 後藤 孝明

(72)発明者 ナトゥネン, ヤリ

フィンランド国、エフイー-01520 ヴァンター、オーランニンティエ 10エ-18

(72)発明者 カネルヴァ, アンネ

フィンランド国、エフイー-00890 ヘルシンキ、リーヒカリオンクヤ 8

(72)発明者 ヒルトゥネン, ユッカ

フィンランド国、エフイー-00530 ヘルシンキ、ハカニエメンランタ 28ベ-72

(72)発明者 サロヘイモ, マルック

フィンランド国、エフイー-00390 ヘルシンキ、キュンタヤンティエ 18ベ-

(72)発明者 ヴィスカリ, ヘリ

フィンランド国、エフイー-03100 ヌンメラ、ペンカスクヤ 3

(72)発明者 フースコネン, アンネ

フィンランド国、エフイー-00250 ヘルシンキ、メチェリニンカトウ 47ア-29

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 特表2006-518597 (JP, A)

特表2005-514021 (JP, A)

国際公開第2010/049177 (WO, A1)

国際公開第01/014522 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

Capplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)

UniProt/GenSeq