

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7129715号  
(P7129715)

(45)発行日 令和4年9月2日(2022.9.2)

(24)登録日 令和4年8月25日(2022.8.25)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/60 (2006.01)	C 1 2 N 15/60 Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 1 2 N 9/88
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
請求項の数 26 外国語出願 (全119頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2020-138453(P2020-138453)	(73)特許権者	502427921 コデクシス, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 63, レッドウッド シティ, ペノブ スコット ドライブ 200
(22)出願日	令和2年8月19日(2020.8.19)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(62)分割の表示	特願2018-149210(P2018-149210) )の分割	(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
原出願日	平成26年4月17日(2014.4.17)	(72)発明者	ジャルト ダブリュー. ユイスマン アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 63, レッドウッド シティ, ペノブ スコット ドライブ 200
(65)公開番号	特開2020-185016(P2020-185016 A)	(72)発明者	ニコラス ジェイ. アガード アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(43)公開日	令和2年11月19日(2020.11.19)		
審査請求日	令和2年9月17日(2020.9.17)		
(31)優先権主張番号	61/813,586		
(32)優先日	平成25年4月18日(2013.4.18)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	61/897,932		
(32)優先日	平成25年10月31日(2013.10.31)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 操作されたフェニルアラニンアンモニアリアーゼポリペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

参照配列の配列番号4に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む操作されたポリペプチドであって、該アミノ酸配列が、位置290においてグリシンを含み、該操作されたポリペプチドが、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有し、該アミノ酸配列が、以下:

- a) A 2 5 6 G / N 2 9 0 G / P 4 0 4 A / L 4 0 7 V / N 4 7 4 Q / K 5 2 2 F、
- b) A 3 9 V / A 9 1 V / Y 1 5 8 H / S 1 8 0 A / K 1 9 5 E / A 2 5 6 G / N 2 9 0 G / S 3 9 9 N / Y 4 5 9 F / T 4 6 3 N、
- c) A 9 1 V / Y 1 5 8 H / T 2 4 3 I / A 2 5 6 G / N 2 9 0 G / S 3 9 9 N / L 4 0 7 V / Y 4 5 9 F / T 4 6 3 N / N 4 7 4 Q / K 5 2 2 N / T 5 2 4 S、
- d) A 3 9 V / A 9 1 V / A 2 5 6 G / N 2 9 0 G / A 3 9 4 V / S 3 9 9 N / P 4 0 4 A / L 4 0 7 V / K 5 2 2 Y / T 5 2 4 S、および
- e) A 3 9 V / A 9 1 V / A 2 5 6 G / N 2 9 0 G / S 3 9 9 N / P 4 0 4 A / L 4 0 7 V / K 5 2 2 Y

から選択される置換を含み、該アミノ酸配列における該位置は、配列番号4を参照している、操作されたポリペプチド。

【請求項2】

前記操作されたポリペプチドが、参照配列の配列番号4と比較して、タンパク質分解に対する低下した感受性、酸性pHに対する増加した耐性、低下した免疫原性、またはそれ

らの組み合わせから選択される改善された特性を示す、請求項 1 に記載の操作されたポリペプチド。

【請求項 3】

前記改善された特性が、タンパク質分解に対する低下した感受性および/または酸性 pH に対する増加した耐性から選択される、請求項 2 に記載の操作されたポリペプチド。

【請求項 4】

前記操作されたポリペプチドが、タンパク質分解に対して抵抗性であり、酸安定的であり、および/または脱免疫化されている、請求項 1 に記載の操作されたポリペプチド。

【請求項 5】

前記操作されたポリペプチドが、少なくとも 1 種の消化管酵素によるタンパク質分解に抵抗性であり、前記操作されたポリペプチドが、キモトリプシン、トリプシン、カルボキシペプチダーゼおよび/またはエラスターゼによるタンパク質分解に抵抗性である、請求項 4 に記載の操作されたポリペプチド。

10

【請求項 6】

前記操作されたポリペプチドが脱免疫化されている、請求項 4 に記載の操作されたポリペプチド。

【請求項 7】

前記ポリペプチドが精製されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の操作されたポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種の操作されたポリペプチドを含む組成物。

20

【請求項 9】

前記組成物が医薬組成物である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記組成物が、フェニルケトン尿症の処置に適している、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記組成物がヒトへの経口投与に適している、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記組成物が、丸剤、錠剤、カプセル、ジェルキャップ、液体またはエマルションの形態である、請求項 11 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 13】

前記丸剤、錠剤、カプセル、またはジェルキャップが、腸溶コーティングをさらに含む、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記組成物が、ヒトへの非経口的注射に適している、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記組成物が、少なくとも 1 種の追加的な治療上有効な化合物と同時投与されることを特徴とする、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

ポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドの配列が、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種の操作されたポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

40

【請求項 17】

前記ポリヌクレオチドの配列が、制御配列に作動可能に連結されている、請求項 16 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 18】

前記ポリヌクレオチドが、コドン最適化されている、請求項 16 または 17 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 19】

請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種のポリヌクレオチドと、少な

50

くとも1種の制御配列とを含む発現ベクター。

【請求項20】

前記制御配列が、プロモーターである、請求項19に記載の発現ベクター。

【請求項21】

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

【請求項22】

請求項16～18のいずれか一項に記載の少なくとも1種のポリヌクレオチド、または請求項19～21のいずれか一項に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項23】

前記宿主細胞がE. coliである、請求項22に記載の宿主細胞。

10

【請求項24】

宿主細胞において操作されたPALポリペプチドを産生する方法であって、少なくとも1種の操作されたPALポリペプチドが産生されるように適した培養条件下で、請求項1～7のいずれか一項に記載の少なくとも1種の操作されたポリペプチドをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチド、または請求項16～18のいずれか一項に記載の少なくとも1種のポリヌクレオチド、または請求項19～21のいずれか一項に記載の少なくとも1種のベクターを含む宿主細胞を培養するステップを含む方法。

【請求項25】

培養物および/または宿主細胞から、少なくとも1種の操作されたポリペプチドを回収するステップをさらに含む、請求項24に記載の方法。

20

【請求項26】

産生された前記少なくとも1種の操作されたポリペプチドを精製するステップをさらに含む、請求項25に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2013年4月18日に出願された米国仮特許出願第61/813,586号、および2013年10月31日に出願された米国仮特許出願第61/897,932号に基づく優先権を主張し、その両方は、すべての目的についてその全体が参照によって組み込まれる。

30

【0002】

ASCIIテキストファイルとして提出された「配列表」、表またはコンピュータプログラム表付録の参照

2014年4月15日に作成された、127,412バイト、マシンフォーマットIBM-PC、MS-ウィンドウズ(登録商標)オペレーティングシステムの、ファイルCX7-131WO2\_\_ST25.TXTにおいて書き出された配列表は、参照により本明細書に組み込まれる。

本発明は、操作されたフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)ポリペプチドおよびその組成物ならびに操作されたフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、増強された触媒活性と共に、タンパク質分解に対する低下した感受性および酸性pHレベルに対する増加した耐性をもたらすよう最適化される。一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、脱免疫化(deimmunized)されている。本発明は、治療および産業目的のための、操作されたPALポリペプチドを含む組成物の使用にも関する。

40

【背景技術】

【0003】

フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)は、ヒスチジンアンモニアリアーゼ(HAL)およびチロシンアンモニアリアーゼ(TAL)と共に、芳香族アミノ酸リアーゼファミリーのメンバーである(EC4.3.1.23~1.25および4.3.1.3)

50

。より詳細には、PAL活性を有する酵素（EC 4.3.1.23～1.25および以前に分類されたEC 4.3.1.5）は、L-フェニルアラニンの非酸化的脱アミノ化を触媒して（E）-桂皮酸とする。PALは、植物に広く分布した非哺乳動物酵素であり、真菌および限られた数の細菌においても同定された。PAL酵素は、代謝性障害、フェニルケトン尿症（PKU）の処置のための治療タンパク質として使用することができる。PKUは、肝酵素フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）、または補助因子テトラヒドロピオプテリンの合成もしくは再利用に関与する酵素のうち1種もしくは複数、相当する遺伝子のうち1種における突然変異のため非機能性となった常染色体代謝性遺伝障害である。このような機能性の欠如は、血流における高レベルのフェニルアラニンをもたらす。フェニルアラニンは、フェニルピルビン酸塩（フェニルケトン）および他の誘導体に変換される。ヒトにおいて、PKUが早期に処置されないと、高レベルのフェニルアラニンおよびその分解産物の一部が、知的障害、小頭症および発作を含む顕著な医学的問題を引き起こし得る。多数の研究が、酵素置換によるPKUの処置におけるPALの使用に着目してきた（Ambrusら、*Science* 201巻：837～839頁[1978年]；Bourgetら、*Appl. Biochem. Biotechnol.*、10巻：57～59頁[1984年]；およびSarkissianら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96巻：2339～2344頁[1999年]）。

10

#### 【0004】

血流中のフェニルアラニンを解毒する一方法は、注射用組換えPALおよびペグ化によって修飾されたPALバリエント（PEG-PAL）の使用である。ペグ化は、酵素半減期を改善し、対象の抗原応答を低下させることが示されてきた（例えば、WO2008/153776、WO2011/097335および米国特許第7,531,341号を参照）。PEG-PAL組成物において有用なPALバリエントは、野生型*Nostoc punctiforme*（NpPAL）；*Anabaena variabilis*（AvPAL）および*Rhodospiridium toruloides*（RtPAL）のバリエントとして記載されてきた。特に、位置64、318、503および565におけるシステイン残基がセリンに置換された、野生型AvPALのバリエントが記載されてきた（例えば、米国特許第7,790,433号；同第7,560,263号；および同第7,537,923号を参照）。

20

#### 【0005】

PKU対象におけるL-フェニルアラニンの血漿中濃度を低下させる手段としてのPAL投与の代替的経路は、経口製剤等、非観血的製剤である（Sarkissianら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96巻：2339～2344頁[1999年]）。PALの経口送達重要な利点は、酵素が免疫系へと曝露されるのを低下し、これにより、注射用PEG-PALに観察される免疫応答を最小化することである。しかし、PALの経口製剤に関する主な制限は、胃および腸管腔における酵素活性の損失である。有効かつ機能的となるために、PALは、タンパク質性の食物を正常に分解してオリゴペプチドおよびアミノ酸とする、酸性pHならびにトリプシン、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼおよびペプシン等のプロテアーゼによる分解に抵抗しなければならない。いくつかの以前の研究（Sarkissian、上記参照）において、一部にはプロテアーゼによる酵素分解が原因で、また一部にはpH7.0における相対的に低い特異的活性が原因で、PALの経口投与の有意な効果を達成するためには、大量の酵素が必要とされた。消化によるPAL分解を抑制するために様々な手段が模索された（Kimら、*Molec. Therap.*、10巻：220～224頁[2004年]；およびShahら、*Int. J. Pharmaceut.*、356巻：61～68頁[2008年]）。

30

40

#### 【0006】

消化管の過酷な条件下においてPALの有効性を増加させるための一アプローチは、固有の過酷な条件に耐容性を示す操作されたPALポリペプチドを提供することである。Kangらは、AvPALのキモトリプシン切断部位の部位特異的突然変異誘発および表面リシンのペグ化を使用して、タンパク質分解不活性化を低下させた（Kangら、*Mol. Gen.*

50

Metabol., 99巻: 4~9頁[2010年]を参照)。これらの研究において、10個の切断部位を特異的に突然変異させ、これらの得られた突然変異体のうち2個(F18AおよびR94G)を除く全てが、本来の酵素活性の50%超を失った。これらの突然変異体のうち、活性増加を示したものはなく、F18A突然変異体は、トリプシン抵抗性の僅かな増加を示した(Kangら、上記参照)。PALによるさらに別の研究は、有効ではあったが、一般に、より長寿命の酵素をもたらさなかった。したがって、以前に記載されたPAL突然変異体およびその誘導体の経口投与は、有効なPKU処置をもたらさない。

【0007】

PALの様々な製剤により為された進歩にもかかわらず、依然として、経口投与のために改善された特性を有するPALポリペプチドの必要がある。このような改善された特性は、より優れた半減期、増加した触媒活性、消化路における条件に対する改善された安定性および低下した凝集を限定することなく含む。

10

【0008】

治療適用に加えて、PAL酵素は、L-フェニルアラニンおよび他の置換されたL-フェニルアラニン誘導体の産業的合成において使用することもできる。続いて、このような誘導体は、医薬品前駆物質として使用することができる(Glogeら、Chem., 6巻: 3386~3390頁[2000年]; Bartschら、Prot. Eng. Des. Sel., 23巻: 929~933頁[2010年]; およびTurner、Curr. Opin. Chem. Biol., 234~240頁[2011年])。

PAL酵素は、農業適用において使用することもできる。PALは、植物、真菌および細菌におけるフェニルプロパノイド(フラボノイドおよびリグニン等)の生合成において顕著な役割を果たし、防御関連の酵素として作用することができる(Bateら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻: 7608~7612頁[1994年])。PAL活性を有する組換えポリペプチドを使用することによるPAL活性のモジュレーションは、有効な除草剤をもたらす可能性がある。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【文献】国際公開第2008/153776号

国際公開第2011/097335号

米国特許第7,531,341号明細書

米国特許第7,790,433号明細書

米国特許第7,560,263号明細書

米国特許第7,537,923号明細書

【非特許文献】

【0010】

【文献】Ambrusら、Science 201巻: 837~839頁[1978年]

Bourgetら、Appl. Biochem. Biotechnol., 10巻: 57~59頁[1984年]

Sarkissianら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96巻: 2339~2344頁[1999年]

Kimら、Molec. Therap., 10巻: 220~224頁[2004年]

Shahら、Int. J. Pharmaceut., 356巻: 61~68頁[2008年]

Kangら、Mol. Gen. Metabol., 99巻: 4~9頁[2010年]

Glogeら、Chem., 6巻: 3386~3390頁[2000年]

Bartschら、Prot. Eng. Des. Sel., 23巻: 929~933頁[2010年]

Turner、Curr. Opin. Chem. Biol., 234~240頁[2011年]

Bateら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻: 7608~7612頁[1994年]

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

30

40

50

本発明は、操作されたフェニルアラニンアンモニアラーゼ（P A L）ポリペプチドおよびその組成物ならびに操作されたフェニルアラニンアンモニアラーゼ（P A L）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態において、操作されたP A Lポリペプチドは、増強された触媒活性と共に、タンパク質分解に対する低下した感受性および酸性p Hレベルに対する増加した耐性をもたらすよう最適化される。一部の実施形態において、操作されたP A Lポリペプチドは、脱免疫化されている。本発明は、また、治療および産業目的のための、操作されたP A Lポリペプチドを含む組成物の使用に関する。一部の実施形態において、本発明は、酸性p Hに対する増加した耐性および/またはタンパク質分解に対する低下した感受性等、改善された特性を有する、操作されたフェニルアラニンアンモニアラーゼ（P A L）ポリペプチドならびにその生物学的活性を有する断片および類似体を対象とする。

10

## 【0012】

本発明は、基本的に同じ条件下で野生型P A L酵素または参照P A Lポリペプチドと比較した場合に改善された特性を有する、操作されたP A Lポリペプチドならびにその生物学的活性を有する断片および類似体を対象とする。本発明は、治療的および/または産業的組成物ならびに治療および/または産業目的で斯かる組成物を使用する方法において、操作されたP A Lポリペプチドならびにその生物学的活性を有する断片および類似体を使用する方法をさらに対象とする。

## 【0013】

第1の態様において、本発明は、操作されたフェニルアラニンアンモニアラーゼ（P A L）ポリペプチドであって、基本的に同じ条件下で測定された参照配列と比較して、i) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解に対する低下した感受性、iii) 酸性p Hに対する増加した耐性、iv) 低下した凝集、またはi)、ii)、iii) もしくはiv) のいずれかの組合せの群から選択される改善された特性を有する操作されたP A Lポリペプチドを提供する。一部の特異的な実施形態において、操作されたP A Lポリペプチドは、2種の改善された特性を有する。他の特異的な実施形態において、改善された特性は、タンパク質分解に対する低下した感受性であり、さらに他の特異的な実施形態において、改善された特性は、酸性p Hに対する増加した耐性である。

20

## 【0014】

第2の態様において、操作されたP A Lポリペプチドは、配列番号4またはその機能的断片に対し少なくとも85%のアミノ酸配列の同一性を含むタンパク質を含み、配列番号4のポリペプチドと最適に整列された場合、位置X39; X91; X158; X180; X195; X243; X245; X256; X257; X270; X290; X307; X308; X326; X349; X364; X394; X399; X400; X404; X407; X443; X453; X459; X460; X463; X474; X522; X524; およびX528に相当する位置にアミノ酸残基の差異を含む。

30

## 【0015】

第1および第2の態様の一部の特異的な実施形態において、操作されたP A Lポリペプチドは、配列番号4のポリペプチドと最適に整列された場合、A39; A91; Y158; S180; K195; T243; I245; A256; L257; N270; N290; H307; E308; I326; L349; L364; A394; S399; N400; P404; L407; F443; N453; Y459; T460; T463; N474; K522; T524; およびP528に相当する1個または複数のアミノ酸残基位置のアミノ酸残基の差異を少なくとも含む。一部の特異的な実施形態において、操作されたP A Lポリペプチドは、配列番号4のアミノ酸配列を含む参照ポリペプチドから、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15および少なくとも20個のアミノ酸残基の差異を含む。

40

## 【0016】

第1および第2の態様の他の特異的な実施形態において、操作されたP A Lポリペプチ

50

ドは、配列番号4に対し少なくとも90%（少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%および99%）のアミノ酸配列の同一性を含む。またさらなる特異的な実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、配列番号4に対し少なくとも90%（少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%および99%）のアミノ酸配列の同一性を含み、次の置換A39V；A91V；Y158H；S180A；K195E；T243I/L；I245L；A256G；L257W/A；N270K；N290G；H307G/Q/M；E308Q；I326F；L349M；L364Q；A394V；S399N；N400K；P404A；L407V；F443H；N453G；Y459F；T460G；T463N；N474Q；K522Y/F/N；T524S；およびP528Lのうち1種または複数を含む。

10

【0017】

他の特異的な実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、野生型 *Anabaena variabilis* PAL (ATCC 29413；NCBIタンパク質参照配列YP\_324488.1；配列番号4等)に由来する。

【0018】

第3の態様において、本発明に包含されるフェニルアラニンアンモニアラーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号10またはその機能的断片に対し少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0019】

第4の態様において、本発明に包含されるフェニルアラニンアンモニアラーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号10またはその機能的断片に対し少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、1、2、3、4、5もしくは6個またはそれを超えるアミノ酸位置に、配列番号10と比較したアミノ酸残基の差異をさらに含む。

20

【0020】

第5の態様において、本発明は、本明細書に記載されている操作されたPALポリペプチドのうちいずれか1種をコードするポリヌクレオチド配列を提供する。

【0021】

第6の態様において、本発明は、本明細書に記載されている操作されたPALポリペプチドのうちいずれか1種を含む医薬組成物または産業的組成物を提供する。

30

【0022】

一部の実施形態において、本発明は、a) 参照配列の配列番号4またはその機能的断片に対し少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列；b) 1個または複数のアミノ酸位置に、配列番号4またはその機能的断片と比較したアミノ酸残基の差異を含み、c) 参照配列と比較して、i) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解に対する低下した感受性、iii) 酸性pHに対する増加した耐性、iv) 低下した凝集、またはi)、ii)、iii) もしくはiv) のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアラーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドを提供する。一部の実施形態において、1個または複数のアミノ酸位置は、配列番号4のアミノ酸配列と最適に整列された場合、X39；X54；X59；X73；X91；X158；X112、X134、X180；X195；X240；X243；X245；X256；X257；X270；X290；X304、X305；X307；X308；X326；X349；X353；X364；X394；X399；X400；X404；X407；X443；X453；X459；X460；X463；X474；X509；X521；X522；X524；X528；X546；X564；および/またはこれらの組合せから選択される。一部の追加的な実施形態において、改善された特性は、タンパク質分解に対する低下した感受性および/または酸性pHに対する増加した耐性から選択される。さらに追加的な実施形態において、参照配列は、*Anabaena variabilis* に由来する野生型PALである。一部のさらなる実施形態において、配列番号4の参照配列のアミノ酸残基は、A39；T54；G59、S73；A91；Y158；S

40

50

1 8 0 ; K 1 9 5 ; A 1 1 2 ; R 1 3 4 ; Q 2 4 0 ; T 2 4 3 ; I 2 4 5 ; A 2 5 6 ; L 2 5 7 ; N 2 7 0 ; N 2 9 0 ; Y 3 0 4 ; R 3 0 5 ; H 3 0 7 ; E 3 0 8 ; I 3 2 6 ; L 3 4 9 ; D 3 5 3 ; L 3 6 4 ; A 3 9 4 ; S 3 9 9 ; N 4 0 0 ; P 4 0 4 ; L 4 0 7 ; F 4 4 3 ; N 4 5 3 ; Y 4 5 9 ; T 4 6 0 ; T 4 6 3 ; N 4 7 4 ; E 5 0 9 ; Q 5 2 1 ; K 5 2 2 ; T 5 2 4 ; P 5 2 8 ; S 5 4 6 ; および / または P 5 6 4 に相当する。一部の実施形態において、配列番号 4 と比較したアミノ酸残基の差異は、配列番号 4 のポリペプチドと最適に整列された場合、次の置換 A 3 9 V ; T 5 4 K ; G 5 9 R ; S 7 3 K ; A 1 1 2 C ; R 1 3 4 Q ; A 9 1 V ; Y 1 5 8 H ; S 1 8 0 A ; K 1 9 5 E ; Q 2 4 0 R / W ; T 2 4 3 I / L ; I 2 4 5 L ; A 2 5 6 G ; L 2 5 7 W / A ; N 2 7 0 K ; N 2 9 0 G ; Y 3 0 4 H ; R 3 0 5 M ; H 3 0 7 G / Q / M ; E 3 0 8 Q ; I 3 2 6 F ; L 3 4 9 M ; D 3 5 3 A / N ; L 3 6 4 Q ; A 3 9 4 V ; S 3 9 9 N ; N 4 0 0 K ; P 4 0 4 A ; L 4 0 7 V ; F 4 4 3 H ; N 4 5 3 G ; Y 4 5 9 F ; T 4 6 0 G ; T 4 6 3 N ; N 4 7 4 Q ; E 5 0 9 L ; Q 5 2 1 K / S ; K 5 2 2 Y / F / N ; T 5 2 4 S ; P 5 2 8 L ; S 5 4 6 R ; および P 5 6 4 G / L / M のうち 1 種または複数から選択される。一部のさらなる実施形態において、操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号 4 に対し、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 % または約 1 0 0 % の配列同一性を有する。一部のさらなる実施形態において、操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号 4 に対し、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、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 % の配列同一性を有する。一部の追加的な実施形態において、操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号 4 に対し少なくとも約 9 0 % の配列同一性を有する。一部の追加的な実施形態において、操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号 4 に対し少なくとも約 9 5 % の配列同一性を有する。一部のさらなる実施形態において、操作されたポリペプチドは、配列番号 4 に対し少なくとも約 9 0 % の配列同一性を有し；位置 H 3 0 7 にアミノ酸残基の差異を有する。一部のさらなる実施形態において、操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号 4 に対し少なくとも約 9 0 % の配列同一性を有する。一部の追加的な実施形態において、操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号 4 に対し少なくとも約 9 5 % の配列同一性を有する。一部のさらなる実施形態において、操作されたポリペプチドは、配列番号 4 に対し少なくとも約 9 0 % の配列同一性を有し；位置 H 3 0 7 にアミノ酸残基の差異を有する。一部の追加的な実施形態において、アミノ酸残基の差異は、H 3 0 7 G / Q / M である。一部のさらなる実施形態において、アミノ酸残基の差異は、A 3 9 ; A 9 1 ; Q 2 4 0 ; A 2 5 6 ; N 2 9 0 ; Y 3 0 4 ; R 3 0 5 ; H 3 0 7 ; D 3 5 3 ; A 3 9 4 ; S 3 9 9 ; P 4 0 4 ; L 4 0 7 ; Q 5 2 1 ; K 5 2 2 ; および T 5 2 4 のうち 1 種または複数の組合せから選択される。

#### 【 0 0 2 3 】

本発明は、配列番号 6、8、10、12 および / または 14、またはこれらの機能的断片に対し、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 % または少なくとも約 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドも提供する。一部の実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号 6、8、10、12 および / または 14、またはこれらの機能的断片に対し少なくとも約 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

#### 【 0 0 2 4 】

一部のさらなる実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号 6、8、10、12 および / または 14、またはこれらの機能的断片に対し少なくとも約 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配

10

20

30

40

50



列を含む。

【0025】

本発明は、配列番号6、8、10、12および/または14、またはこれらの機能的断片に対し、少なくとも約90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または少なくとも100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、フェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドも提供する。一部の実施形態において、フェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号6、8、10、12および/または14、またはこれらの機能的断片に対し少なくとも約95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部のさらなる実施形態において、フェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号6、8、10、12および/または14、またはこれらの機能的断片に対し少なくとも約99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部のさらなる実施形態において、フェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号6、8、10、12および/または14、またはこれらの機能的断片に対し少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部のさらなる実施形態において、フェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号6、8、10、12および/または14、またはこれらの機能的断片に対し少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

20

【0026】

本発明は、配列番号4またはその機能的断片に対し、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または少なくとも約100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、フェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドであって、脱免疫化された操作されたポリペプチドも提供する。本発明は、配列番号4またはその機能的断片に対し、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、フェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドであって、脱免疫化された操作されたポリペプチドも提供する。一部の実施形態において、フェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号4またはその機能的断片に対し少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記操作されたポリペプチドは、脱免疫化されている。一部の追加的な実施形態において、フェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、表9-1から9-7のいずれかに提示されているバリエーションPALである。一部の実施形態において、フェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)活性を有する、脱免疫化された操作されたポリペプチドは、配列番号6、8、10、12および/または14に対し少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

40

【0027】

本発明は、本明細書に提示されているPAL活性を有する操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列も提供する。一部の実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、制御配列に作動可能に連結されている。本発明は、PAL活性を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドをコードする、少なくとも1種のポリヌクレオチド配列を含むベクターをさらに提供する。本発明は、本明細書に提示されている、PAL活性を有する操作されたポリペプチドをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチド配列により形質転換された宿主細胞も提供する。

【0028】

50

本発明は、宿主細胞において操作された P A L ポリペプチドを産生する方法であって、適した培養条件下で、少なくとも 1 種の操作された P A L ポリペプチドをコードする少なくとも 1 種のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養するステップを含む方法をさらに提供する。本発明は、宿主細胞において操作された P A L ポリペプチドを産生する方法であって、適した培養条件下で、操作された P A L ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養するステップを含む方法をさらに提供する。一部の実施形態において、本方法は、培養物および/または宿主細胞から操作された P A L ポリペプチドを回収するステップをさらに含む。

【 0 0 2 9 】

本発明は、本明細書に提示されている、 P A L 活性を有する少なくとも 1 種の操作されたポリペプチドを含む組成物も提供する。一部の実施形態において、本組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物である。本発明は、このような組成物の使用をさらに提供する。

【 0 0 3 0 】

本発明は、 a ) フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する参照配列またはその機能的断片に対し、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 6 %、少なくとも約 8 7 %、少なくとも約 8 8 %、少なくとも約 8 9 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 % またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列 ; b ) 1 個または複数のアミノ酸位置に、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する参照配列またはその機能的断片と比較して少なくとも 1 個のアミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を含み、 c ) フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する参照配列と比較して、 i ) 増強された触媒活性、 i i ) タンパク質分解に対する低下した感受性、 i i i ) 酸性 p H に対する増加した耐性、 i v ) 低下した凝集、 v ) 低下した免疫原性、または i )、 i i )、 i i i )、 i v ) もしくは v ) のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドも提供する。一部の実施形態において、参照配列は、原核生物の P A L であるが、一部の他の実施形態において、参照配列は、真核生物の P A L である。一部の実施形態において、参照配列は、細菌の P A L (例えば、 *Anabaena variabilis* の P A L ) であるが、一部の他の実施形態において、これは、ヒトまたは他の P A L である。一部のさらなる実施形態において、参照配列は、野生型配列 (例えば、野生型 *A. variabilis* の P A L ) であるが、一部の代替的实施形態において、参照配列は、バリエーション酵素 (例えば、 P A L 活性を有する操作されたポリペプチド) である。

【 0 0 3 1 】

一部の実施形態において、本発明のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドは、 a ) 参照配列の配列番号 4 またはその機能的断片に対し、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 6 %、少なくとも約 8 7 %、少なくとも約 8 8 %、少なくとも約 8 9 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 % またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列 ; b ) 1 個または複数のアミノ酸位置に、配列番号 4 またはその機能的断片と比較して少なくとも 1 個のアミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を含み、 c ) 参照配列の配列番号 4 と比較して、 i ) 増強された触媒活性、 i i ) タンパク質分解に対する低下した感受性、 i i i ) 酸性 p H に対する増加した耐性、 i v ) 低下した凝集、 v ) 低下した免疫原性、または i )、 i i )、 i i i )、 i v ) もしくは v ) のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す。

【 0 0 3 2 】

一部の追加的な実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活

10

20

30

40

50

性を有する操作されたポリペプチドは、a) 参照配列の配列番号4またはその機能的断片に対し、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列；b) 1個または複数のアミノ酸位置に、配列番号4またはその機能的断片と比較して少なくとも1個のアミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を含み、c) 参照配列の配列番号4と比較して、i) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解に対する低下した感受性、iii) 酸性pHに対する増加した耐性、iv) 低下した凝集、v) 低下した免疫原性、またはi)、ii)、iii)、iv)もしくはv)のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す。

10

## 【0033】

一部の実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性(PAL)を有する操作されたポリペプチドは、次のアミノ酸位置：20、24、27、39、43、45、47、54、58、59、62、70、73、80、82、91、94、98、104、105、110、112、115、117、118、119、121、123、124、125、126、127、128、129、130、131、133、134、135、139、140、141、142、143、144、145、146、147、149、150、151、153、154、156、157、158、159、172、174、175、176、177、178、180、187、191、195、199、205、206、210、212、213、214、232、240、243、245、247、248、250、256、257、266、270、275、278、279、285、286、289、290、292、304、305、307、308、309、319、321、326、331、332、334、349、353、355、364、365、369、370、371、372、374、375、377、378、379、381、382、383、384、385、387、389、394、396、399、400、403、404、407、417、418、425、431、432、433、434、435、436、437、438、439、443、446、447、453、456、459、460、461、463、471、472、473、474、475、476、477、478、479、482、483、503、507、509、521、522、524、525、528、538、546、547、551、558、560、564、565および/またはこれらのいずれかの組合せのうち1種または複数に少なくとも1個の置換(複数可)を含み、アミノ酸位置は、配列番号4を参照して番号付けされている。一部の実施形態において、配列番号4の参照配列のアミノ酸残基は、A39、T54、G59、S73、A91、Y158、S180、K195、A112、R134、Q240、T243、I245、A256、L257、N270、N290、Y304、R305、H307、E308、I326、L349、D353、L364、A394、S399、N400、P404、L407、F443、N453、Y459、T460、T463、N474、E509、Q521、K522、T524、P528、S546、および/またはP564に相当する。一部の追加的な実施形態において、配列番号4と比較したアミノ酸残基の差異は、配列番号4のポリペプチドと最適に整列された場合、次の置換A39V、T54K、G59R、S73K、A112C、R134Q、A91V、Y158H、S180A、K195E、Q240R/W、T243I/L、I245L、A256G、L257W/A、N270K、N290G、Y304H、R305M、H307G/Q/M、E308Q、I326F、L349M、D353A/N、L364Q、A394V、S399N、N400K、P404A、L407V、F443H、N453G、Y459F、T460G、T463N、N474Q、E509L、Q521K/S、K522Y/F/N、T524S、P528L、S546R、およびP564G/L/Mのうち1種または複数から選択される。一部のさらなる実施形態において、操作されたポリペプチドは、配列番号4に対し少なくとも約90%の配列同一性を有し；位置H307にアミノ

20

30

40

50

酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、アミノ酸残基の差異は、H307G/Q/Mである。一部のまたさらなる実施形態において、アミノ酸残基の差異は、A39、A91、Q240、A256、N290、Y304、R305、H307、D353、A394、S399、P404、L407、Q521、K522およびT524のうち1種または複数の組合せから選択される。一部の追加的な実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性(PAL)を有する操作されたポリペプチドの改善された特性は、タンパク質分解に対する低下した感受性および/または酸性pHに対する増加した耐性から選択される。

#### 【0034】

本発明は、a) 参照配列の配列番号10またはその機能的断片に対し少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列；b) 1個または複数のアミノ酸位置に、配列番号10またはその機能的断片と比較して少なくとも1個のアミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を含み、c) 参照配列の配列番号10と比較して、i) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解に対する低下した感受性、iii) 酸性pHに対する増加した耐性、iv) 低下した凝集、v) 低下した免疫原性、またはi)、ii)、iii)、iv) もしくはv) のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドも提供する。

#### 【0035】

一部の実施形態において、本発明は、a) 参照配列の配列番号10またはその機能的断片に対し少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列；b) 1個または複数のアミノ酸位置に、配列番号10またはその機能的断片と比較して少なくとも1個のアミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を含み、c) 参照配列の配列番号10と比較して、i) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解に対する低下した感受性、iii) 酸性pHに対する増加した耐性、iv) 低下した凝集、v) 低下した免疫原性、またはi)、ii)、iii)、iv) もしくはv) のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドも提供する。

#### 【0036】

一部の実施形態において、本発明は、a) 参照配列の配列番号10またはその機能的断片に対し少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列；b) 1個または複数のアミノ酸位置に、配列番号10またはその機能的断片と比較して少なくとも1個のアミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を含み、c) 参照配列の配列番号10と比較して、i) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解に対する低下した感受性、iii) 酸性pHに対する増加した耐性、iv) 低下した凝集、v) 低下した免疫原性、またはi)、ii)、iii)、iv) もしくはv) のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドも提供する。

#### 【0037】

一部の実施形態において、本発明は、参照配列の配列番号10に対し少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列、および配列番号10と比較して少なくとも1個のアミノ酸残基の差異を含み、配列番号10と比較して、増強された触媒活性、タンパク質分解に対する低下した感受性、酸性pHに対する増加した耐性、低下した凝集および/または低下した免疫原性から選択される少なくとも1種の改善された特性を示す、フェニルア

ラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドも提供する。

【 0 0 3 8 】

一部の実施形態において、本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドであって、配列番号 1 0 と比較したアミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット：

I27E/V39A; I27E/V39A/R43L/V105C/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q; I27E/V39A/R43L/L214E/A547D; I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/A551D; I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P210C/P266H/C503Q/A547D; I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P266H/I285E/C503Q/A551D; I27E/V39A/V105C/A112C/L214E/I285E/C503Q/A547D; I27E/V39A/V105C/S131N/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/R134Q/A153R/P210C/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/P210C/L278D/C503Q/A547D;

10

I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E; I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C; I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E; I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/I285E/A547D; I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/L278D/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q; I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/C503Q/C565N; I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/I285E/C503Q; I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/I285E/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/C503Q/A551D; I27E/V39A/V105C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/A153R/L214E; I27E/V39A/V105C/A153R/I285E; I27E/V39A/V105C/A153R/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/A153R/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L214E/L278D/A547D; I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/C503Q; I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/A547D; I27E/V39A/V105C/Q205T/L214E/L278D/C503Q/A547D; I27E/V39A/V105C/Q205T/L278D/C503Q/A547D; I27E/V39A/V105C/P210C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/P210C/L214E/P266H/L278D; I27E/V39A/V105C/L214E/P266H/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/L214E/L278D/L309P/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/L278D/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/I285E/A547D; I27E/V39A/V105C/C503Q/A551D; I27E/V39A/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/P266H/A551D; I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D; I27E/V39A/A112C/R134Q/P266H/I285E; I27E/V39A/A112C/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/A112C/Q205T/L278D/I285E; I27E/V39A/A112C/L214E; I27E/V39A/A112C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/A112C/I285E; I27E/V39A/A112C/A547D; I27E/V39A/R134Q; I27E/V39A/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q; I27E/V39A/R134Q/A153R/P210C/L214E/L278D/I285E/A547D/C565N; I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/R134Q/A153G/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/C503Q/A547D; I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D; I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D/A547D/A551D; I27E/V39A/R134Q/A153R/A547D; I27E/V39A/R134Q/Q205T/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/R13

20

30

40

50

4Q/Q205T/P266H/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/R134Q/P210C/L214E/  
C503Q; I27E/V39A/R134Q/P210C/C503Q/A551D; I27E/V39A/R134Q/L214E  
/P266H/A551D; I27E/V39A/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D; I2  
7E/V39A/R134Q/L278D/C503Q/A547D; I27E/V39A/R134Q/C503Q/A547D; I  
27E/V39A/R134Q/A547D/C565N; I27E/V39A/Q205T/L214E/C503Q/C565N;  
I27E/V39A/Q205T/P266H/I285E/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/Q205T/  
P266H/A551D; I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39  
A/Q205T/L278D/C503Q/C565N; I27E/V39A/Q205T/C503Q/A547D/C565N; I  
27E/V39A/P210C/T212S; I27E/V39A/P210C/L214E/L278D/C503Q/A551D;  
I27E/V39A/P210C/L214E/I285E/C503Q/A551D; I27E/V39A/P210C/P266H/I  
285E/C503Q/A547D; I27E/V39A/P210C/P266H/C503Q/A551D; I27E/V39A/  
L214E; I27E/V39A/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27  
E/V39A/L214E/L278D/C503Q; I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q/A547D/C56  
5N; I27E/V39A/L214E/C503Q/A551D; I27E/V39A/P266H; I27E/V39A/P26  
6H/L278D; I27E/V39A/L278D; I27E/V39A/L278D/A547D; I27E/V39A/L278  
D/I285E/C503Q/A547D; I27E/V39A/L278D/C503Q/C565N; I27E/V39A/C50  
3Q; I27E/G45D/Q205T/P266H/C565N; I27E/V105C; I27E/V105C/R134Q/A  
153R/P210C/L214E/C503Q/A547D; I27E/V105C/R134Q/A153R/I285E/A547  
D; I27E/V105C/R134Q/A153R/C503Q; I27E/V105C/R134Q/Q205T/P210C/C  
503Q; I27E/V105C/R134Q/Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/C565N; I27  
E/V105C/Q205T/P266H/C503Q; I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/P266H/  
L278D/A551D/C565N; I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C5  
65N; I27E/V105C/R134Q/P210C/P266H/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565  
N; I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D; I27E/V105C/R134Q/L  
214E/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/Q205T; I27E/V105  
C/Q205T/L214E/P266H; I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H/A551D/C565N;  
I27E/V105C/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27  
E/V105C/Q205T/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/L214E; I27E/V  
105C/L214E/P266H/C503Q; I27E/V105C/L214E/I285E/A551D/C565N; I27  
E/V105C/L214E/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/L214E/A551D/C565N;  
I27E/V105C/P266H; I27E/V105C/P266H/I285E/C503Q/A547D/C565N; I27  
E/V105C/L278D/A547D; I27E/V105C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;  
I27E/V105C/C503Q/A547D/C565N; I27E/V105C/C503Q/A547D/A551D/C56  
5N; I27E/A112C/R134Q/A153R/L214E/P266H/C503Q; I27E/A112C/R134Q/  
L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N; I27E/A112C/R134Q/Q205T/L278D/C50  
3Q; I27E/A112C/R134Q/Q205T/I285E/C503Q; I27E/A112C/Q205T/P266H/  
L278D/I285E/C503Q; I27E/A112C/P210C/L214E/C503Q/A547D; I27E/R13  
4Q; I27E/R134Q/A153R/I285E/C503Q/A547D; I27E/R134Q/Q205T/I285E/C  
503Q/A551D; I27E/R134Q/Q205T/P266H/L278D/A547D; I27E/R134Q/P21  
0C; I27E/R134Q/L214E/C503Q; I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D; I27E/R  
134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; I27E/R134Q/L214E/C503Q/C565N; I27  
E/R134Q/L278D/I285E/A551D/C565N; I27E/R134Q/I285E/C503Q; I27E/A1  
53R/L214E/L278D/I285E/A551D/C565N; I27E/A153R/L214E/L278D/A551D;  
I27E/Q205T; I27E/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/C565N; I27E/Q205T  
/L214E/C503Q/A547D/C565N; I27E/Q205T/P266H/L278D/I285E/A551D/C5  
65N; I27E/Q205T/L278D/A551D; I27E/P210C; I27E/P210C/L214E/C503Q/  
A547D; I27E/P210C/L278D/C503Q; I27E/P210C/C503Q; I27E/P210C/C503  
Q/C565N; I27E/P210C/A551D; I27E/L214E; I27E/L214E/P266H/L278D/I2  
85E/A551D;

10

20

30

40

I27E/L214E/L278D; I27E/L214E/L278D/C503Q; I27E/L214E/C503Q; I27

50

E/L214E/C503Q/A547D; I27E/L214E/C503Q/A547D/C565N; I27E/L214E/A551D; I27E/P266H/L278D/C503Q; I27E/P266H/A547D/A551D; I27E/L278D/C503Q/A551D; I27E/L278D/C503Q/A551D/C565N; I27E/A547D/C565N; V39A/G45S/L278D/C503Q/A551D; V39A/V105C/R134Q/A153R/Q205T/A551D; V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/A551D; V39A/V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; V39A/V105C/A153R/P266H/A547D/A551D; V39A/V105C/Q205T/C503Q; V39A/V105C/Q205T/A551D; V39A/V105C/P210C/A547D; V39A/V105C/L214E/P266H/A547D/C565N;

V39A/V105C/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N; V39A/A112C/R134Q/Q205T/L214E/L278D;

10

V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; V39A/A112C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D; V39A/R134Q; V39A/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/C565N; V39A/R134Q/P210C/L214E/A547D/C565N; V39A/A153R/C503Q/A547D; V39A/Q205T/L278D/A547D/A551D; V39A/P210C/L214E/L278D/I285E/C503Q/A551D; V39A/P266H; V39A/P275R/L278D/C503Q/A551D; V39A/C503Q; V39A/C503Q/A551D/C565N; V105C; V105C/A112C/R134Q/Q205T/L214E/Y492H/C503Q/A547D; V105C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/C503Q; V105C/R134Q/Q205T/L214E/A547D; V105C/R134Q/Q205T/P266H/L278D; V105C/R134Q/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N; V105C/R134Q/L214E/L278D/C565N; V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D; V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; V105C/R134Q/C503Q; V105C/R134Q/C503Q/A547D; V105C/R134Q/C503Q/A547D/C565N; V105C/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A547D; V105C/A153R/Q205T/P266H/I285E/A547D/C565N; V105C/Q205T/P210C/L214E/C503Q/A547D; V105C/Q205T/L214E/L278D; V105C/Q205T/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N; V105C/Q205T/C503Q/A551D; V105C/L214E/P266H/L278D/A547D; V105C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D; V105C/L214E/I285E; V105C/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; V105C/L214E/I285E/A547D/C565N; V105C/L278D/C503Q/A551D; V105C/I285E; V105C/I285E/A547D; V105C/C503Q; V105C/A547D/A551D; A112C/R134Q/A153R/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N; A112C/L214E/L278D; A112C/L278D/C503Q/A547D; R134Q/Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N; R134Q/Q205T/C503Q; R134Q/P210C/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N; R134Q/P210C/L214E/C503Q/A547D/A551D; R134Q/L214E; R134Q/L214E/L278D/C503Q; R134Q/L214E/L278D/C503Q/A551D; R134Q/L214E/I285E/C503Q; R134Q/C503Q; R134Q/C503Q/A547D/A551D; A153R; Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D; Q205T/L214E/I285E/C503Q/C565N; Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N; Q205T/L278D/I285E/A547D/A551D; P210C/L214E; P210C/L214E/P266H; L214E/P266H; L214E/P266H/C503Q/A547D/A551D/C565N; L214E/C503Q/A547D; L214E/A547D; P266H/L278D/C503Q; P266H/C565N; L278D/A547D; C503Q; C503Q/A547D; C503Q/A547D/A551D/C565N; C503Q/A547D/C565N; C503Q/A551D; C503Q/A551D/C565N; A547D;および/またはC565Nのうち1種または複数から選択される操作されたポリペプチドも提供する。

20

30

40

#### 【 0 0 3 9 】

一部の追加的な実施形態において、本発明は、フェニルアラニンアンモニアラーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドであって、配列番号10と比較したアミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット: V 8 0 I / R 1 3 4 C / P 5 6 4 Q ; V 1 2 1 C ; A 1 2 3 G ; A 1 2 4 G ; M 1 2 5 L ; L 1 2 6 I / T ; L 1 2 6 M / R 1 3 4 L ; L 1 2 7 A ; A 1 2 9 G / L ; N 1 3 0 Q ; N 1 3 0 C / M 3 7 0 I R 1 3 4 W ;

50

M 1 3 3 R ; R 1 3 4 I ; R 1 3 4 N / G 3 0 7 C ; G 1 3 5 C / S ; および / または G 1 3 5 A / A 3 9 4 E のうち 1 種または複数から選択される操作されたポリペプチドも提供する。

【 0 0 4 0 】

一部の追加的な実施形態において、本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドであって、配列番号 1 0 と比較したアミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット : G 2 0 S / I 1 4 4 L ; R 4 3 S ; L 4 7 M / I 1 4 4 L ; L 4 7 M / R 1 4 6 E ; L 4 7 M / M 1 4 7 G / A 3 8 3 E ; L 4 7 M / P 1 5 7 C ; Q 5 8 H / L 1 4 3 V ; Q 5 8 K / P 1 5 7 D / G 3 6 9 C ; A 6 2 S / M 1 4 7 V ; S 8 2 I / G 1 3 5 C / P 1 5 7 F / W 2 7 9 L ; R 9 4 C / I 1 4 9 E ; T 1 1 0 I / I 1 3 9 R ; L 1 1 8 M / L 1 4 1 H ; A 1 1 9 E / T 1 5 6 H / A 2 8 9 D ; I 1 3 9 M / V ; R 1 4 0 D / G / M ; R 1 4 0 N / A 1 9 9 E ; R 1 4 0 E / A 3 3 4 S / A 5 5 1 D ; L 1 4 1 K / Q / P / T ; E 1 4 2 H / P / V ; E 1 4 2 D / G 3 7 1 D ; L 1 4 3 F / M ; I 1 4 4 L / N / V ; K 1 4 5 N / Q / R ; K 1 4 5 G / P 1 5 7 T ; R 1 4 6 H / L ; R 1 4 6 W / D 1 9 1 Y ; M 1 4 7 A ; I 1 4 9 L / R ; F 1 5 0 K / L / M ; L 1 5 1 M ; A 1 5 3 C / G ; A 1 5 3 S / H 2 5 0 N ; G 1 5 4 R ; G 1 5 4 Y / L 1 7 4 M / Q 3 2 1 K / S 4 5 6 I / G 4 8 3 C ; T 1 5 6 K / G 4 8 3 C ; P 1 5 7 D / F / H / Y ; Y 1 5 8 E ; V 1 5 9 C / H / L / M ; M 2 4 7 I ; L 3 1 9 M ; および / または Q 3 8 9 K のうち 1 種または複数から選択される操作されたポリペプチドも提供する。

【 0 0 4 1 】

また一部の追加的な実施形態において、本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドであって、配列番号 1 0 と比較したアミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット : P 1 1 7 T / Y 1 7 6 Q ; V 1 7 2 I / C / L ; L 1 7 4 M ; S 1 7 5 G ; Y 1 7 6 E / I / M / R / V ; I 1 7 7 M / V ; T 1 7 8 L / A 4 7 7 S ; および / または S 1 8 0 C / T のうち 1 種または複数から選択される操作されたポリペプチドも提供する。

【 0 0 4 2 】

一部の追加的な実施形態において、本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドであって、配列番号 1 0 と比較したアミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット : R 4 3 S / H 3 7 4 K ; R 4 3 S / H 3 7 4 R ; A 1 1 2 S / M 3 7 0 A / A 5 0 7 E ; M 1 4 7 I / H 3 7 4 S ; S 1 8 7 R / L 3 8 1 V ; D 1 9 1 Y / H 3 8 5 N ; A 2 3 2 S ; Q 2 4 0 K / H 3 7 4 R ; A 2 5 6 S / L 3 8 1 N ; P 2 7 5 Q / M 3 7 0 S ; P 2 7 5 T / H 3 7 4 R ; Q 3 3 2 K / Y 3 7 7 M ; A 3 3 4 S / H 3 7 4 V ; L 3 4 9 M ; Q 3 5 5 K / H 3 7 4 S ; M 3 7 0 G / I / S ; G 3 7 1 H / N / Q / S ; M 3 7 2 A / V ; H 3 7 4 A / D / G / L / N / R / S / T ; H 3 7 4 Q / P 3 9 6 Q ; H 3 7 4 R / G 4 1 7 C ; L 3 7 5 I ; L 3 7 5 M ; Y 3 7 7 C / I / N ; Y 3 7 8 C / D / E / I / L / N / S ; Y 3 7 8 F / P 4 0 4 Q ; I 3 7 9 C / H / L / M / N ; L 3 8 1 G / V ; L 3 8 1 M / Q 5 6 0 K ; L 3 8 2 C / H / I / M / S ; A 3 8 3 S / V ; K 3 8 4 R ; H 3 8 5 C / G / N ; H 3 8 5 M / P 4 0 3 H ; H 3 8 5 S / P 4 0 3 H ; D 3 8 7 S ; L 4 1 8 M ; G 4 2 5 V ; A 4 4 7 S ; S 4 6 1 G ; および / または S 5 2 5 L のうち 1 種または複数から選択される操作されたポリペプチドも提供する。

【 0 0 4 3 】

一部の追加的な実施形態において、本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドであって、配列番号 1 0 と比較したアミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット : A 2 4 S / F 4 3 4 M ; A 6 2 S / T 4 3 3 N ; S 9 8 I ; L 2 1 3 M / S 4 3 8 L ; Q 2 4 0 K / T 4 3 3 Y ; S 2 8 6 R / Y 4 3 5 T ; A 2 8 9 S / L 4 3 1 E ; S 3 3 1 I ; L 4 3 1 C / E / G / P / S / V ; L 4 3 2 C / V ; T 4 3 3 A / I / L / N / P / Q / R / S / V / W ; F 4 3 4 C ; Y 4 3 5



L ; Y 4 3 5 Q / H 4 4 6 N ; G 4 3 6 M ; G 4 3 6 D / T ; N 4 3 7 E / G / Q ; N 4 3 7 T / L 5 3 8 M ; S 4 3 8 C / F / M / R / T ; I 4 3 9 C / F / L / V ; および / または A 4 7 7 S のうち 1 種または複数から選択される操作されたポリペプチドも提供する。

【 0 0 4 4 】

一部の追加的な実施形態において、本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドであって、配列番号 1 0 と比較したアミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット : A 2 4 E ; Q 5 8 R / Y 4 7 5 H ; A 7 0 S / N 4 7 4 E ; L 1 0 4 M / V 4 7 6 L ; A 1 1 9 E / G 3 6 5 A ; L 2 0 6 M ; P 2 7 5 Q ; G 2 7 6 V ; Q 2 9 2 H / A 4 7 9 G ; Q 3 5 5 H / I 4 7 8 C ; P 4 0 4 T / A 4 7 7 V ; I 4 7 1 F / G / K / M / N / R / V / W ; F 4 7 2 G ; Q 4 7 3 H / K / M / R / S ; Q 4 7 3 H / A 5 0 7 S ; N 4 7 4 A / H / R / W ; N 4 7 4 D / R 4 9 0 H ; Y 4 7 5 C / F / L / Q ; V 4 7 6 C / I / L ; I 4 7 8 N / S ; A 4 7 9 G / S ; F 4 8 2 C / L ; G 4 8 3 C / H / S ; G 4 8 3 A / S 5 2 4 I ; G 4 8 3 R / G 5 3 7 C ; および / または A 5 5 8 S のうち 1 種または複数から選択される操作されたポリペプチドも提供する。

10

【 0 0 4 5 】

一部の追加的な実施形態において、本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドであって、配列番号 1 0 と比較したアミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット : V 3 9 A / K 1 1 5 E / M 1 3 3 R / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 3 3 R / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 3 3 R / F 4 7 2 G / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 3 3 R / C 5 0 3 Q ; V 3 9 A / M 1 3 3 R / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / Y 3 7 8 E / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / Y 3 7 8 E / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / L 3 8 1 G / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / L 3 8 1 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / F 4 7 2 G / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / G 2 4 8 C / L 3 8 1 G / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / Y 3 7 8 E / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / Y 3 7 8 E / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / L 3 8 1 G ; V 3 9 A / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; M 1 3 3 R / L 3 8 1 G / C 5 6 5 N ; M 1 3 3 R / C 5 0 3 Q ; Y 3 7 8 D / C 5 0 3 Q ; Y 3 7 8 E / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; L 3 8 1 G / F 4 7 2 G C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; および / または F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N のうち 1 種または複数から選択される操作されたポリペプチドも提供する。

20

30

【 0 0 4 6 】

また一部のさらなる実施形態において、本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチドであって、配列番号 1 0 と比較したアミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット : I 2 7 E / V 3 9 A ; I 2 7 E / V 3 9 A / R 4 3 L / V 1 0 5 C / A 1 5 3 R / L 2 1 4 E / P 2 6 6 H / L 2 7 8 D / C 5 0 3 Q ; I 2 7 E / V 3 9 A / R 4 3 L / L 2 1 4 E / A 5 4 7 D ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / A 1 1 2 C / R 1 3 4 Q / L 2 1 4 E / L 2 7 8 D / C 5 0 3 Q / A 5 4 7 D / C 5 6 5 N ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / A 1 1 2 C / R 1 3 4 Q / A 1 5 3 R / Q 2 0 5 T / L 2 1 4 E / P 2 6 6 H / L 2 7 8 D / C 5 0 3 Q / A 5 5 1 D ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / A 1 1 2 C / Q 2 0 5 T / P 2 1 0 C / P 2 6 6 H / C 5 0 3 Q / A 5 4 7 D ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / A 1 1 2 C / Q 2 0 5 T / P 2 6 6 H / I 2 8 5 E / C 5 0 3 Q / A 5 5 1 D ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / A 1 1 2 C / L 2 1 4 E / I 2 8 5 E / C 5 0 3 Q / A 5 4 7 D ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / S 1 3 1 N / R 1 3 4 Q / Q 2 0 5 T / L 2 1 4 E / C 5 0 3 Q / A 5 4 7 D / C 5 6 5 N ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / R 1 3 4 Q / A 1 5 3 R / P 2 1 0 C / L 2 7 8 D / I 2 8 5 E / C 5 0 3 Q / A 5 4 7 D / A 5 5 1 D ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / R 1 3 4 Q / Q 2 0 5 T / P 2 1 0 C / L 2 7 8 D / C 5 0 3 Q / A 5 4 7 D ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / R 1 3 4 Q / Q 2 0 5 T / L 2 1 4 E ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / R 1 3 4 Q / Q 2 0 5 T / L 2 1 4 E / A 5 5 1 D / C 5 6 5 N ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / R 1 3 4 Q / Q 2 0 5 T / L 2 7 8 D / I 2 8 5 E / C 5 0 3 Q / A 5 4 7 D / A 5 5 1 D / C 5 6 5 N ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / R 1 3 4 Q / P 2 1 0 C ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / R 1 3 4 Q / P 2 1 0 C / L 2 1 4 E ; I 2 7 E / V 3 9 A / V 1 0 5 C / R 1

40

50

34Q/P210C/L214E/I285E/A547D; I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/L278D/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q; I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/C503Q/C565N; I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/I285E/C503Q; I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/I285E/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/C503Q/A551D; I27E/V39A/V105C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/A153R/L214E; I27E/V39A/V105C/A153R/I285E; I27E/V39A/V105C/A153R/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/A153R/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L214E/L278D/A547D; I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/C503Q; I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/A547D; I27E/V39A/V105C/Q205T/L214E/L278D/C503Q/A547D;

10

I27E/V39A/V105C/Q205T/L278D/C503Q/A547D; I27E/V39A/V105C/P210C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/P210C/L214E/P266H/L278D; I27E/V39A/V105C/L214E/P266H/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/L214E/L278D/L309P/C503Q/A547D/A551D;

I27E/V39A/V105C/L278D/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/I285E/A547D; I27E/V39A/V105C/C503Q/A551D; I27E/V39A/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/A112C/R134Q/Q205T/P210C/L214E/A551D/C565N; I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/P266H/A551D;

20

I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D; I27E/V39A/A112C/R134Q/P266H/I285E; I27E/V39A/A112C/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/A112C/Q205T/L278D/I285E; I27E/V39A/A112C/L214E; I27E/V39A/A112C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D;

I27E/V39A/A112C/I285E; I27E/V39A/A112C/A547D; I27E/V39A/R134Q; I27E/V39A/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q; I27E/V39A/R134Q/A153R/P210C/L214E/L278D/I285E/A547D/C565N; I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/R134Q/A153G/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/C503Q/A547D; I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D; I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D/A547D/A551D; I27E/V39A/R134Q/A153R/A547D; I27E/V39A/R134Q/Q205T/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/R134Q/Q205T/P266H/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/R134Q/P210C/L214E/C503Q; I27E/V39A/R134Q/P210C/C503Q/A551D; I27E/V39A/R134Q/L214E/P266H/A551D; I27E/V39A/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/R134Q/L278D/C503Q/A547D; I27E/V39A/R134Q/A547D/C565N; I27E/V39A/Q205T/L214E/C503Q/C565N; I27E/V39A/Q205T/P266H/I285E/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/Q205T/P266H/A551D; I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/C565N; I27E/V39A/Q205T/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/P210C/T212S; I27E/V39A/P210C/L214E/L278D/C503Q/A551D; I27E/V39A/P210C/L214E/I285E/C503Q/A551D; I27E/V39A/P210C/P266H/I285E/C503Q/A547D; I27E/V39A/P210C/P266H/C503Q/A551D; I27E/V39A/L214E; I27E/V39A/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q; I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N;

30

I27E/V39A/L214E/C503Q/A551D; I27E/V39A/P266H; I27E/V39A/P266H/L278D; I27E/V39A/L278D; I27E/V39A/L278D/A547D; I27E/V39A/L278D/I

50

285E/C503Q/A547D; I27E/V39A/L278D/C503Q/C565N; I27E/V39A/C503Q; I27E/G45D/Q205T/P266H/C565N; I27E/V105C; I27E/V105C/R134Q/A153R/P210C/L214E/C503Q/A547D; I27E/V105C/R134Q/A153R/I285E/A547D; I27E/V105C/R134Q/A153R/C503Q; I27E/V105C/R134Q/Q205T/P210C/C503Q; I27E/V105C/R134Q/Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/C565N; I27E/V105C/Q205T/P266H/C503Q; I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/P266H/L278D/A551D/C565N; I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V105C/R134Q/P210C/P266H/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D; I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/Q205T; I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H; I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H/A551D/C565N; I27E/V105C/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/Q205T/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/L214E;

10

I27E/V105C/L214E/P266H/C503Q; I27E/V105C/L214E/I285E/A551D/C565N; I27E/V105C/L214E/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/L214E/A551D/C565N; I27E/V105C/P266H; I27E/V105C/P266H/I285E/C503Q/A547D/C565N; I27E/V105C/L278D/A547D; I27E/V105C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/C503Q/A547D/C565N; I27E/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/A112C/R134Q/A153R/L214E/P266H/C503Q; I27E/A112C/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N; I27E/A112C/R134Q/Q205T/L278D/C503Q; I27E/A112C/R134Q/Q205T/I285E/C503Q; I27E/A112C/Q205T/P266H/L278D/I285E/C503Q; I27E/A112C/P210C/L214E/C503Q/A547D; I27E/R134Q; I27E/R134Q/A153R/I285E/C503Q/A547D; I27E/R134Q/Q205T/I285E/C503Q/A551D; I27E/R134Q/Q205T/P266H/L278D/A547D; I27E/R134Q/P210C; I27E/R134Q/L214E/C503Q; I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D; I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; I27E/R134Q/L214E/C503Q/C565N; I27E/R134Q/L278D/I285E/A551D/C565N; I27E/R134Q/I285E/C503Q; I27E/A153R/L214E/L278D/I285E/A551D/C565N; I27E/A153R/L214E/L278D/A551D; I27E/Q205T; I27E/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/C565N;

20

I27E/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N; I27E/Q205T/P266H/L278D/I285E/A551D/C565N;

30

I27E/Q205T/L278D/A551D; I27E/P210C; I27E/P210C/L214E/C503Q/A547D; I27E/P210C/L278D/C503Q; I27E/P210C/C503Q; I27E/P210C/C503Q/C565N; I27E/P210C/A551D; I27E/L214E; I27E/L214E/P266H/L278D/I285E/A551D; I27E/L214E/L278D; I27E/L214E/L278D/C503Q; I27E/L214E/C503Q; I27E/L214E/C503Q/A547D; I27E/L214E/C503Q/A547D/C565N; I27E/L214E/A551D; I27E/P266H/L278D/C503Q; I27E/P266H/A547D/A551D; I27E/L278D/C503Q/A551D; I27E/L278D/C503Q/A551D/C565N; I27E/A547D/C565N; V39A/G45S/L278D/C503Q/A551D; V39A/V105C/R134Q/A153R/Q205T/A551D; V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/A551D; V39A/V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; V39A/V105C/A153R/P266H/A547D/A551D; V39A/V105C/Q205T/C503Q; V39A/V105C/Q205T/A551D; V39A/V105C/P210C/A547D; V39A/V105C/L214E/P266H/A547D/C565N; V39A/V105C/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N; V39A/A112C/R134Q/Q205T/L214E/L278D; V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; V39A/A112C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D; V39A/R134Q; V39A/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/C565N; V39A/R134Q/P210C/L214E/A547D/C565N; V39A/A153R/C503Q/A547D; V39A/Q205T/L278D/A547D/A551D; V39A/P210C/L214E/L278D/I285E/C503Q/A551D; V39A/P266H; V39A/P275R/L278D/C503Q/A551D; V39A/C503Q; V39A/C503Q/A551D/C565N;

40

50

V105C; V105C/A112C/R134Q/Q205T/L214E/Y492H/C503Q/A547D; V105C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/C503Q; V105C/R134Q/Q205T/L214E/A547D; V105C/R134Q/Q205T/P266H/L278D;

V105C/R134Q/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N; V105C/R134Q/L214E/L278D/C565N; V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D; V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; V105C/R134Q/C503Q; V105C/R134Q/C503Q/A547D; V105C/R134Q/C503Q/A547D/C565N; V105C/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A547D; V105C/A153R/Q205T/P266H/I285E/A547D/C565N; V105C/Q205T/P210C/L214E/C503Q/A547D; V105C/Q205T/L214E/L278D; V105C/Q205T/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N; V105C/Q205T/C503Q/A551D; V105C/L214E/P266H/L278D/A547D; V105C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D; V105C/L214E/I285E; V105C/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; V105C/L214E/I285E/A547D/C565N; V105C/L278D/C503Q/A551D; V105C/I285E; V105C/I285E/A547D; V105C/C503Q; V105C/A547D/A551D; A112C/R134Q/A153R/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N; A112C/L214E/L278D; A112C/L278D/C503Q/A547D; R134Q/Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N; R134Q/Q205T/C503Q; R134Q/P210C/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N; R134Q/P210C/L214E/C503Q/A547D/A551D; R134Q/L214E; R134Q/L214E/L278D/C503Q; R134Q/L214E/L278D/C503Q/A551D; R134Q/L214E/I285E/C503Q; R134Q/C503Q; R134Q/C503Q/A547D/A551D; A153R; Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D; Q205T/L214E/I285E/C503Q/C565N; Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N; Q205T/L278D/I285E/A547D/A551D; P210C/L214E; P210C/L214E/P266H; L214E/P266H; L214E/P266H/C503Q/A547D/A551D/C565N; L214E/C503Q/A547D; L214E/A547D; P266H/L278D/C503Q; P266H/C565N; L278D/A547D; C503Q; C503Q/A547D; C503Q/A547D/A551D/C565N; C503Q/A547D/C565N;

10

20

C503Q/A551D; C503Q/A551D/C565N; A547D; C565N; V80I/R134C/P564Q; V121C; A123G; A124G; M125L; L126I/T; L126M/R134L; L127A; A129G/L; N130Q; N130C/M370I R134W; M133R; R134I; R134N/G307C; G135C/S; G135A/A394E; G20S/I144L;

30

R43S; L47M/I144L; L47M/R146E; L47M/M147G/A383E; L47M/P157C; Q58H/L143V; Q58K/P157D/G369C; A62S/M147V; S82I/G135C/P157F/W279L; R94C/I149E; T110I/I139R; L118M/L141H; A119E/T156H/A289D; I139M/V; R140D/G/M; R140N/A199E; R140E/A334S/A551D; L141K/Q/P/T; E142H/P/V; E142D/G371D; L143F/M; I144L/N/V; K145N/Q/R; K145G/P157T; R146H/L; R146W/D191Y; M147A; I149L/R; F150K/L/M; L151M; A153C/G; A153S/H250N; G154R; G154Y/L174M/Q321K/S456I/G483C; T156K/G483C;

P157D/F/H/Y; Y158E; V159C/H/L/M; M247I; L319M; Q389K; P117T/Y176Q; V172I/C/L; L174M; S175G; Y176E/I/M/R/V; I177M/V; T178L/A477S; S180C/T; R43S/H374K; R43S/H374R; A112S/M370A/A507E; M147I/H374S; S187R/L381V; D191Y/H385N;

40

A232S; Q240K/H374R; A256S/L381N; P275Q/M370S; P275T/H374R; Q332K/Y377M; A334S/H374V; L349M; Q355K/H374S; M370G/I/S; G371H/N/Q/S; M372A/V; H374A/D/G/L/N/R/S/T; H374Q/P396Q; H374R/G417C; L375I; L375M; Y377C/I/N; Y378C/D/E/I/L/N/S; Y378F/P404Q; I379C/H/L/M/N; L381G/V; L381M/Q560K; L382C/H/I/M/S; A383S/V; K384R; H385C/G/N; H385M/P403H; H385S/P403H; D387S; L418M; G425V;

A447S; S461G; S525L; A24S/F434M; A62S/T433N; S98I; L213M/S438L;

50

Q240K/T433Y; S286R/Y435T; A289S/L431E; S331I; L431C/E/G/P/S/V; L432C/V; T433A/I/L/N/P/Q/R/S/V/W; F434C; Y435L; Y435Q/H446N; G436M; G436D/T; N437E/G/Q; N437T/L538M; S438C/F/M/R/T; I439C/F/L/V; A477S; A24E; Q58R/Y475H; A70S/N474E;

L104M/V476L; A119E/G365A; L206M; P275Q; G276V; Q292H/A479G; Q355H/I478C;

P404T/A477V; I471F/G/K/M/N/R/V/W; F472G; Q473H/K/M/R/S; Q473H/A507S; N474A/H/R/W; N474D/R490H; Y475C/F/L/Q; V476C/I/L; I478N/S; A479G/S; F482C/L; G483C/H/S; G483A/S524I; G483R/G537C; A558S; V39A/K115E/M133R/C565N; V39A/M133R/F472G/C503Q/C565N; V39A/M133R/F472G/C565N; V39A/M133R/C503Q; V39A/M133R/C503Q/C565N; V39A/M147A/Y378E/C503Q/C565N; V39A/M147A/Y378E/C565N; V39A/M147A/L381G/F472G/C503Q/C565N; V39A/M147A/L381G/C503Q/C565N; V39A/M147A/F472G/C503Q/C565N; V39A/M147A/C565N; V39A/G248C/L381G/F472G/C503Q/C565N; V39A/Y378E/C503Q/C565N; V39A/Y378E/C565N; V39A/L381G; V39A/F472G/C503Q/C565N; V39A/C503Q/C565N; M133R/L381G/C565N; M133R/C503Q; Y378D/C503Q; Y378E/F472G/C503Q/C565N; L381G/F472G/C503Q/C565N;および/またはF472G/C503Q/C565Nの

うち1種または複数から選択される操作されたポリペプチドも提供する。

#### 【0047】

本発明は、a)参照配列の配列番号26またはその機能的断片に対し少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列; b)1個または複数のアミノ酸位置に、配列番号26またはその機能的断片と比較して少なくとも1個のアミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を含み、c)参照配列の配列番号26と比較して、i)増強された触媒活性、ii)タンパク質分解に対する低下した感受性、iii)酸性pHに対する増加した耐性、iv)低下した凝集、v)低下した免疫原性、またはi)、ii)、iii)、iv)もしくはv)のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドも提供する。

#### 【0048】

一部の実施形態において、本発明は、a)参照配列の配列番号26またはその機能的断片に対し少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列; b)1個または複数のアミノ酸位置に、配列番号26またはその機能的断片と比較して少なくとも1個のアミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を含み、c)参照配列の配列番号26と比較して、i)増強された触媒活性、ii)タンパク質分解に対する低下した感受性、iii)酸性pHに対する増加した耐性、iv)低下した凝集、v)低下した免疫原性、またはi)、ii)、iii)、iv)もしくはv)のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドも提供する。

#### 【0049】

一部の追加的な実施形態において、本発明は、a)参照配列の配列番号26またはその機能的断片に対し少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列; b)1個または複数のアミノ酸位置に、配列番号26またはその機能的断片と比較して少なくとも1個の

アミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を含み、c) 参照配列の配列番号26と比較して、i) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解に対する低下した感受性、iii) 酸性pHに対する増加した耐性、iv) 低下した凝集、v) 低下した免疫原性、またはi)、ii)、iii)、iv) もしくはv) のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドを提供する。一部の実施形態において、本発明のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号26に対し少なくとも85%の配列同一性、および配列番号126と比較して少なくとも1個のアミノ酸残基の差異を有し、配列番号26と比較して、増強された触媒活性、タンパク質分解に対する低下した感受性、酸性pHに対する増加した耐性、低下した凝集および/または低下した免疫原性から選択される少なくとも1種の改善された特性を示す、アミノ酸配列を含む。操作されたポリペプチドの一部の実施形態において、配列番号26と比較したアミノ酸残基の差異は、次の置換または置換セットA24E/G381L; L127V; A129I/V; S131C/T; H132L/S; R134C/F/H/K; R134H/Y378E/G381L; R134H/Y378E/G381L/V388T; R134H/V388T; A136K; A289S; M372L; H374G/M/Q; G381A/C/F/I/L/M/N/Q/S/T; A383C/M; V388C/T; L431M; および/またはL563Mのうち1種または複数から選択される。

10

#### 【0050】

一部の実施形態において、本発明のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号4に対し、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%の配列同一性を有する。一部の実施形態において、本発明のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号4に対し少なくとも約90%の配列同一性を有するが、一部のさらなる実施形態において、操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号4に対し少なくとも約95%の配列同一性を有する。一部の実施形態において、本発明のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号4に対し、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する。一部の実施形態において、本発明のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号4に対し少なくとも90%の配列同一性を有するが、一部のさらなる実施形態において、操作されたポリペプチドは、参照配列の配列番号4に対し少なくとも95%の配列同一性を有する。一部のさらなる実施形態において、操作されたポリペプチドは、本発明のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有するポリペプチド(例えば、本明細書の表に提示されているバリエーションのいずれか)の機能的断片を含む。

20

30

#### 【0051】

一部の実施形態において、本発明のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24および/または26に対し、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%の配列同一性を有する。一部の実施形態において、本発明のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24および/または26に対し、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少な

40

50

くとも 99% の配列同一性を有する。一部の実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 および / または 26 に対し少なくとも約 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドは、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 および / または 26、またはこれらの機能的断片に対し少なくとも約 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部のさらなる実施形態において、操作されたポリペプチドは、本発明のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有するポリペプチドの機能的断片 (例えば、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 および / または 26 ならびに本明細書の表に提示されているバリエーションのいずれかの機能的断片) を含む。

10

#### 【0052】

本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドであって、表 2 - 1 から 2 - 5 および / または表 9 - 1 から 9 - 7 のいずれかに提示されているバリエーション PAL である操作されたポリペプチドも提供する。

#### 【0053】

一部の実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドは、*Anabaena variabilis* 酵素である。一部の追加的な実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドは、熱安定的である。一部の実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドは、タンパク質分解に対し抵抗性である。一部の追加的な実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドは、少なくとも 1 種の消化管酵素によるタンパク質分解に対し抵抗性である。一部のさらなる実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドは、キモトリプシン、トリプシン、カルボキシペプチダーゼおよび / またはエラスターゼによるタンパク質分解に対し抵抗性である。一部のさらなる実施形態において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドは、酸安定的である。

20

#### 【0054】

本発明は、脱免疫化された、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチドも提供する。一部の実施形態において、脱免疫化された操作されたポリペプチドは、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 および / または 26 に対し少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の追加的な実施形態において、脱免疫化された操作されたポリペプチドは、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 および / または 26 に対し少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、脱免疫化された操作されたポリペプチドは、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 および / または 26 に対し少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、脱免疫化された操作されたポリペプチドは、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 および / または 26 に対し 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

40

#### 【0055】

また一部のさらなる実施形態において、本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する、精製された操作されたポリペプチドを提供する。

50

## 【0056】

本発明は、本明細書に表記されているフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列も提供する。一部の実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、制御配列に作動可能に連結されている。一部の追加的な実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、コドン最適化されている。

## 【0057】

本発明は、本明細書に提示されているフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドをコードする、少なくとも1種のポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターも提供する。一部の実施形態において、発現ベクターは、少なくとも1種の制御配列をさらに含む。一部の実施形態において、制御配列は、プロモーターである。一部の追加的な実施形態において、プロモーターは、異種プロモーターである。

10

## 【0058】

本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチド配列、および/またはフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチド配列および少なくとも1種の制御配列を含む少なくとも1種の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞も提供する。一部の実施形態において、宿主細胞は、コドン最適化された、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドを含む。一部の実施形態において、宿主細胞はE. coliである。

20

## 【0059】

本発明は、宿主細胞において少なくとも1種の操作されたPALポリペプチドを産生する方法であって、操作されたPALポリペプチドが産生されるように、適した培養条件下で、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチド、および/またはフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチド配列および少なくとも1種の制御配列を含む少なくとも1種の発現ベクターを含む宿主細胞を培養するステップを含む方法も提供する。一部の実施形態において、方法は、培養物および/または宿主細胞から、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドを回収するステップをさらに含む。一部のさらなる実施形態において、方法は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドを精製するステップをさらに含む。

30

## 【0060】

本発明は、本明細書に提示されているフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドを含む組成物も提供する。一部の実施形態において、組成物は、医薬組成物である。一部の実施形態において、組成物は、食物性および/または栄養性補助食品である。一部のさらなる実施形態において、医薬組成物は、少なくとも1種の薬学的に許容される賦形剤および/または担体をさらに含む。一部の追加的な実施形態において、組成物は、フェニルケトン尿症の処置に適する。一部のさらなる実施形態において、医薬組成物は、ヒトへの経口投与に適する。一部の実施形態において、組成物は、丸剤、錠剤、カプセル、ジェルキャップ、液体またはエマルションの形態である。なお一部のさらなる実施形態において、丸剤、錠剤、カプセルまたはジェルキャップは、腸溶コーティングをさらに含む。一部の追加的な実施形態において、医薬組成物は、ヒトへの非経口的注射に適する。一部の実施形態において、医薬組成物は、少なくとも1種の追加的な治療上有効な化合物と同時投与される。一部のさらなる実施形態において、医薬組成物は、少なくとも1種の追加的な治療上有効な化合物を含む。一部の追加的な実施形態において、医薬組成物は、食物性および/または栄養性補助食品中に

40

50



存在する。

【 0 0 6 1 】

本発明は、対象におけるフェニルケトン尿症の症状を処置および/または防止するための方法であって、フェニルケトン尿症を有する対象を用意するステップと、本明細書に提示されている少なくとも1種の組成物を対象に与えるステップとを含む方法も提供する。一部の実施形態において、組成物は、医薬組成物を含むが、一部の代替的实施形態において、組成物は、食物性/栄養性補助食品を含む。方法の一部の実施形態において、フェニルケトン尿症の症状は寛解される。一部の追加的な実施形態において、処置された対象は、フェニルアラニンの症状を示す対象に必要とされる食事よりも、そのメチオニン、フェニルアラニンおよび/またはチロシン含量が制限されない食事を摂ることができる。一部の

10

実施形態において、処置された対象（即ち、本明細書に提示されているフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドを含む少なくとも1種の組成物を与えた対象）は、本明細書に提示されている少なくとも1種の組成物を与えなかった対象に必要とされる食事よりも、そのメチオニン、フェニルアラニンおよび/またはチロシン含量が制限されない食事を摂ることができる。一部の

20

実施形態において、対象に与えられる組成物は、医薬組成物を含むが、一部の代替的实施形態において、組成物は、食物性/栄養性補助食品を含む。本発明は、処置された対象であって、本明細書に提示されているフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドを含む少なくとも1種の組成物および/または医薬組成物を投与した対象も提供する。一部の実施形態において、対象は、霊長類

20

、齧歯類およびウサギ目動物（lagamorph）から選択される動物である。一部の追加的な実施形態において、対象は、マウスである。一部のさらなる実施形態において、対象は、ヒトである。また一部のさらなる実施形態において、対象は、ヒト乳児または小児であるが、一部の代替的实施形態において、対象は、ヒト成人または若年成人である。I

【 0 0 6 2 】

本発明は、本明細書に提示されているフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性を有する少なくとも1種の操作されたポリペプチドを含む組成物の使用も提供する。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

（項目1）

a) 参照配列の配列番号4またはその機能的断片に対し少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列、b) 1個または複数のアミノ酸位置に、配列番号4またはその機能的断片と比較した少なくとも1個のアミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を含み、c) 該参照配列の配列番号4と比較してi) 増強された触媒活性、ii) タンパク質分解に対する低下した感受性、iii) 酸性pHに対する増加した耐性、iv) 低下した凝集、v) 低下した免疫原性、またはi)、ii)、iii)、iv) もしくはv) のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性を有する操作されたポリペプチド。

（項目2）

前記1個または複数のアミノ酸位置が、20、24、27、39、43、45、47、54、58、59、62、70、73、80、82、91、94、98、104、105、110、112、115、117、118、119、121、123、124、125、126、127、128、129、130、131、133、134、135、139、140、141、142、143、144、145、146、147、149、150、151、153、154、156、157、158、159、172、174、175、176、177、178、180、187、191、195、199、205、206、210、212、213、214、232、240、243、245、247、248、250、256、257、266、270、275、278、279、285、286、289、290、292、304、305、307、308、309、319、321、326、331、332、334、349、353、355、364、365、369、370、371、372、374、375、377、378、379、381、382

10

20

30

40

50

、 3 8 3、 3 8 4、 3 8 5、 3 8 7、 3 8 9、 3 9 4、 3 9 6、 3 9 9、 4 0 0、 4 0 3  
 、 4 0 4、 4 0 7、 4 1 7、 4 1 8、 4 2 5、 4 3 1、 4 3 2、 4 3 3、 4 3 4、 4 3 5  
 、 4 3 6、 4 3 7、 4 3 8、 4 3 9、 4 4 3、 4 4 6、 4 4 7、 4 5 3、 4 5 6、 4 5 9  
 、 4 6 0、 4 6 1、 4 6 3、 4 7 1、 4 7 2、 4 7 3、 4 7 4、 4 7 5、 4 7 6、 4 7 7  
 、 4 7 8、 4 7 9、 4 8 2、 4 8 3、 5 0 3、 5 0 7、 5 0 9、 5 2 1、 5 2 2、 5 2 4  
 、 5 2 5、 5 2 8、 5 3 8、 5 4 6、 5 4 7、 5 5 1、 5 5 8、 5 6 0、 5 6 4、 5 6 5  
 および/またはこれらのいずれかの組合せから選択され、前記アミノ酸位置が、配列番号  
 4 を参照して番号付けされている、項目 1 に記載の操作されたポリペプチド。

(項目 3)

配列番号 4 の前記参照配列の前記アミノ酸残基が、 A 3 9、 T 5 4、 G 5 9、 S 7 3、  
 A 9 1、 Y 1 5 8、 S 1 8 0、 K 1 9 5、 A 1 1 2、 R 1 3 4、 Q 2 4 0、 T 2 4 3、 I  
 2 4 5、 A 2 5 6、 L 2 5 7、 N 2 7 0、 N 2 9 0、 Y 3 0 4、 R 3 0 5、 H 3 0 7、 E  
 3 0 8、 I 3 2 6、 L 3 4 9、 D 3 5 3、 L 3 6 4、 A 3 9 4、 S 3 9 9、 N 4 0 0、 P  
 4 0 4、 L 4 0 7、 F 4 4 3、 N 4 5 3、 Y 4 5 9、 T 4 6 0、 T 4 6 3、 N 4 7 4、 E  
 5 0 9、 Q 5 2 1、 K 5 2 2、 T 5 2 4、 P 5 2 8、 S 5 4 6、 および/または P 5 6 4  
 に相当する、先行する項目のいずれかに記載の操作されたポリペプチド。

10

(項目 4)

配列番号 4 と比較した前記アミノ酸残基の差異が、配列番号 4 のポリペプチドと最適に  
 整列された場合、次の置換 A 3 9 V、 T 5 4 K、 G 5 9 R、 S 7 3 K、 A 1 1 2 C、 R 1  
 3 4 Q、 A 9 1 V、 Y 1 5 8 H、 S 1 8 0 A、 K 1 9 5 E、 Q 2 4 0 R / W、 T 2 4 3 I  
 / L、 I 2 4 5 L、 A 2 5 6 G、 L 2 5 7 W / A、 N 2 7 0 K、 N 2 9 0 G、 Y 3 0 4 H  
 、 R 3 0 5 M、 H 3 0 7 G / Q / M、 E 3 0 8 Q、 I 3 2 6 F、 L 3 4 9 M、 D 3 5 3 A  
 / N、 L 3 6 4 Q、 A 3 9 4 V、 S 3 9 9 N、 N 4 0 0 K、 P 4 0 4 A、 L 4 0 7 V、 F  
 4 4 3 H、 N 4 5 3 G、 Y 4 5 9 F、 T 4 6 0 G、 T 4 6 3 N、 N 4 7 4 Q、 E 5 0 9 L  
 、 Q 5 2 1 K / S、 K 5 2 2 Y / F / N、 T 5 2 4 S、 P 5 2 8 L、 S 5 4 6 R、 および  
 P 5 6 4 G / L / M のうち 1 種または複数から選択される、先行する項目のいずれかに記  
 載の操作されたポリペプチド。

20

(項目 5)

前記アミノ酸残基の差異が、 A 3 9、 A 9 1、 Q 2 4 0、 A 2 5 6、 N 2 9 0、 Y 3 0  
 4、 R 3 0 5、 H 3 0 7、 D 3 5 3、 A 3 9 4、 S 3 9 9、 P 4 0 4、 L 4 0 7、 Q 5 2  
 1、 K 5 2 2 および T 5 2 4 のうち 1 種または複数の組合せから選択される、項目 1 ~ 4  
 のいずれかに記載の操作されたポリペプチド。

30

(項目 6)

配列番号 4 に対する少なくとも約 9 0 % の配列同一性；および位置 H 3 0 7 におけるア  
 ミノ酸残基の差異を有する、先行する項目のいずれかに記載の操作されたポリペプチド。

(項目 7)

前記アミノ酸残基の差異が、 H 3 0 7 G / Q / M である、項目 6 に記載の操作されたポ  
 リペプチド。

(項目 8)

前記改善された特性が、タンパク質分解に対する低下した感受性および/または酸性 p  
 H に対する増加した耐性から選択される、先行する項目のいずれかに記載の操作されたポ  
 リペプチド。

40

(項目 9)

前記参照配列が、 *Anabaena variabilis* に由来する野生型 P A L で  
 ある、先行する項目のいずれかに記載の操作されたポリペプチド。

(項目 10)

a) 参照配列の配列番号 10 またはその機能的断片に対し少なくとも 8 5 % の配列同一  
 性を有するアミノ酸配列、 b) 1 個または複数のアミノ酸位置に、配列番号 10 またはそ  
 の機能的断片と比較した少なくとも 1 個のアミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を  
 含み、 c) 該参照配列の配列番号 10 と比較して i) 増強された触媒活性、 i i) タンパ

50

ク質分解に対する低下した感受性、i i i) 酸性pHに対する増加した耐性、i v) 低下した凝集、v) 低下した免疫原性、またはi)、i i)、i i i)、i v) もしくはv) のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチド。

(項目11)

参照配列の配列番号10に対し少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列、および配列番号10と比較した少なくとも1個のアミノ酸残基の差異を含み、配列番号10と比較して増強された触媒活性、タンパク質分解に対する低下した感受性、酸性pHに対する増加した耐性、低下した凝集および/または低下した免疫原性から選択される少なくとも1種の改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性を有する操作されたポリペプチド。

10

(項目12)

配列番号10と比較した前記アミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット：I27E/V39A; I27E/V39A/R43L/V105C/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q; I27E/V39A/R43L/L214E/A547D; I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/A551D; I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P210C/P266H/C503Q/A547D; I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P266H/I285E/C503Q/A551D; I27E/V39A/V105C/A112C/L214E/I285E/C503Q/A547D; I27E/V39A/V105C/S131N/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/R134Q/A153R/P210C/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/P210C/L278D/C503Q/A547D; I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E; I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E/A551D/C565N;

20

I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C; I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E; I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/I285E/A547D; I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/L278D/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q; I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/C503Q/C565N; I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/I285E/C503Q; I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/I285E/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/R134Q/C503Q/A551D; I27E/V39A/V105C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/A153R/L214E; I27E/V39A/V105C/A153R/I285E; I27E/V39A/V105C/A153R/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/A153R/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L214E/L278D/A547D; I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/C503Q; I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/A547D; I27E/V39A/V105C/Q205T/L214E/L278D/C503Q/A547D; I27E/V39A/V105C/Q205T/L278D/C503Q/A547D; I27E/V39A/V105C/P210C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/V105C/P210C/L214E/P266H/L278D; I27E/V39A/V105C/L214E/P266H/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/L214E/L278D/L309P/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/V105C/L278D/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/V105C/I285E/A547D; I27E/V39A/V105C/C503Q/A551D; I27E/V39A/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/A112C/R134Q/Q205T/P210C/L214E/A551D/C565N; I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/P266H/A551D; I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D; I27E/V39A/A112C/R134Q/P266H/I285E; I27E/V39A/A112C/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/A112C/Q205T/L278D/I285E; I27E/V39A/A112C/L214E; I27E/V39A/

30

40

50

A112C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/A112C/I285E; I27E/V39A/A112C/A547D; I27E/V39A/R134Q; I27E/V39A/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q; I27E/V39A/R134Q/A153R/P210C/L214E/L278D/I285E/A547D/C565N; I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/R134Q/A153G/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/

C565N; I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/C503Q/A547D; I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D;

I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D/A547D/A551D; I27E/V39A/R134Q/A153R/A547D; I27E/V39A/R134Q/Q205T/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/R134Q/Q205T/P266H/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/R134Q/P210C/L214E/C503Q; I27E/V39A/R134Q/P210C/C503Q/A551D; I27E/V39A/R134Q/L214E/P266H/A551D; I27E/V39A/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D; I27E/V39A/R134Q/L278D/C503Q/A547D; I27E/V39A/R134Q/C503Q/A547D; I27E/V39A/R134Q/A547D/C565N; I27E/V39A/Q205T/L214E/C503Q/C565N; I27E/V39A/Q205T/P266H/I285E/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/Q205T/P266H/A551D; I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/A551D/C565N; I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/C565N; I27E/V39A/Q205T/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/P210C/T212S; I27E/V39A/P210C/L214E/L278D/C503Q/A551D; I27E/V39A/P210C/L214E/I285E/C503Q/A551D; I27E/V39A/P210C/P266H/I285E/C503Q/A547D; I27E/V39A/P210C/P266H/C503Q/A551D; I27E/V39A/L214E; I27E/V39A/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q; I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/L214E/C503Q/A551D; I27E/V39A/P266H; I27E/V39A/P266H/L278D; I27E/V39A/L278D; I27E/V39A/L278D/A547D; I27E/V39A/L278D/I285E/C503Q/A547D; I27E/V39A/L278D/C503Q/C565N; I27E/V39A/C503Q; I27E/G45D/Q205T/P266H/C565N; I27E/V105C; I27E/V105C/R134Q/A153R/P210C/L214E/C503Q/A547D;

I27E/V105C/R134Q/A153R/I285E/A547D; I27E/V105C/R134Q/A153R/C503Q; I27E/V105C/R134Q/Q205T/P210C/C503Q; I27E/V105C/R134Q/Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/C565N;

I27E/V105C/Q205T/P266H/C503Q; I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/P266H/L278D/A551D/C565N; I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V105C/R134Q/P210C/P266H/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N; I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D;

I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/Q205T; I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H; I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H/A551D/C565N; I27E/V105C/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/Q205T/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/L214E; I27E/V105C/L214E/P266H/C503Q; I27E/V105C/L214E/I285E/A551D/C565N; I27E/V105C/L214E/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/L214E/A551D/C565N; I27E/V105C/P266H; I27E/V105C/P266H/I285E/C503Q/A547D/C565N; I27E/V105C/L278D/A547D; I27E/V105C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/C503Q/A547D/C565N; I27E/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/A112C/R134Q/A153R/L214E/P266H/C503Q; I27E/A112C/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N; I27E/A112C/R134Q/Q205T/L278D/C503Q; I27E/A112C/R134Q/Q205T/I285E/C503Q; I27E/A112C/Q205T/P266H/L278D/I285E/C503Q; I27E/A112C/P210C/L214E/C503Q/A547D; I27E/R134Q; I27E/R134Q/A153R/I285E/C503Q/A547D; I27E/R134Q/Q205T/I285E/C503Q/A551D; I27E/R134Q/Q205T/P266H/L278D/A

10

20

30

40

50

547D; I27E/R134Q/P210C; I27E/R134Q/L214E/C503Q; I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D; I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; I27E/R134Q/L214E/C503Q/C565N; I27E/R134Q/L278D/I285E/A551D/C565N; I27E/R134Q/I285E/C503Q; I27E/A153R/L214E/L278D/I285E/A551D/C565N; I27E/A153R/L214E/L278D/A551D; I27E/Q205T; I27E/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/C565N; I27E/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N; I27E/Q205T/P266H/L278D/I285E/A551D/C565N; I27E/Q205T/L278D/A551D; I27E/P210C; I27E/P210C/L214E/C503Q/A547D; I27E/P210C/L278D/C503Q; I27E/P210C/C503Q; I27E/P210C/C503Q/C565N; I27E/P210C/A551D; I27E/L214E; I27E/L214E/P266H/L278D/I285E/A551D; I27E/L214E/L278D; I27E/L214E/L278D/C503Q; I27E/L214E/C503Q; I27E/L214E/C503Q/A547D; I27E/L214E/C503Q/A547D/C565N; I27E/L214E/A551D; I27E/P266H/L278D/C503Q;

10

I27E/P266H/A547D/A551D; I27E/L278D/C503Q/A551D; I27E/L278D/C503Q/A551D/C565N; I27E/A547D/C565N; V39A/G45S/L278D/C503Q/A551D; V39A/V105C/R134Q/A153R/Q205T/A551D; V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/A551D; V39A/V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; V39A/V105C/A153R/P266H/A547D/A551D; V39A/V105C/Q205T/C503Q; V39A/V105C/Q205T/A551D; V39A/V105C/P210C/A547D; V39A/V105C/L214E/P266H/A547D/C565N; V39A/V105C/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N; V39A/A112C/R134Q/Q205T/L214E/L278D; V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; V39A/A112C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D; V39A/R134Q; V39A/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/C565N; V39A/R134Q/P210C/L214E/A547D/C565N; V39A/A153R/C503Q/A547D; V39A/Q205T/L278D/A547D/A551D; V39A/P210C/L214E/L278D/I285E/C503Q/A551D; V39A/P266H; V39A/P275R/L278D/C503Q/A551D; V39A/C503Q; V39A/C503Q/A551D/C565N; V105C; V105C/A112C/R134Q/Q205T/L214E/Y492H/C503Q/A547D; V105C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/C503Q; V105C/R134Q/Q205T/L214E/A547D; V105C/R134Q/Q205T/P266H/L278D; V105C/R134Q/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N;

20

V105C/R134Q/L214E/L278D/C565N; V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D; V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; V105C/R134Q/C503Q; V105C/R134Q/C503Q/A547D; V105C/R134Q/C503Q/A547D/C565N; V105C/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A547D; V105C/A153R/Q205T/P266H/I285E/A547D/C565N; V105C/Q205T/P210C/L214E/C503Q/A547D; V105C/Q205T/L214E/L278D; V105C/Q205T/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N; V105C/Q205T/C503Q/A551D; V105C/L214E/P266H/L278D/A547D; V105C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D; V105C/L214E/I285E; V105C/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; V105C/L214E/I285E/A547D/C565N; V105C/L278D/C503Q/A551D; V105C/I285E; V105C/I285E/A547D; V105C/C503Q; V105C/A547D/A551D; A112C/R134Q/A153R/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N; A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N; A112C/L214E/L278D; A112C/L278D/C503Q/A547D; R134Q/Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N; R134Q/Q205T/C503Q; R134Q/P210C/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N; R134Q/P210C/L214E/C503Q/A547D/A551D;

30

R134Q/L214E; R134Q/L214E/L278D/C503Q; R134Q/L214E/L278D/C503Q/A551D; R134Q/L214E/I285E/C503Q; R134Q/C503Q; R134Q/C503Q/A547D/A551D; A153R; Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D; Q205T/L214E/I285E/C503Q/C565N; Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N; Q205T/L278D/I285E/A547D/A551D; P210C/L214E; P210C/L214E/P266H; L214E/P266H; L214E/P266H/C503Q/A547D/A551D/C565N; L214E/C503Q/A547D; L214E/A5

40

50

47D; P266H/L278D/C503Q; P266H/C565N; L278D/A547D; C503Q; C503Q/A547D; C503Q/A547D/A551D/C565N; C503Q/A547D/C565N; C503Q/A551D; C503Q/A551D/C565N; A547D;および/

またはC565Nのうち1種または複数から選択される、項目10および/または11に記載の操作されたポリペプチド。

(項目13)

配列番号10と比較した前記アミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット: V80I/R134C/P564Q; V121C; A123G; A124G; M125L; L126I/T; L126M/R134L; L127A; A129G/L; N130Q; N130C/M370I R134W; M133R; R134I; R134N/G307C; G135C/S; および/またはG135A/A394Eのうち1種または複数から選択される、項目10および/または11に記載の操作されたポリペプチド。

10

(項目14)

配列番号10と比較した前記アミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット: G20S/I144L; R43S; L47M/I144L; L47M/R146E; L47M/M147G/A383E; L47M/P157C; Q58H/L143V; Q58K/P157D/G369C; A62S/M147V; S82I/G135C/P157F/W279L; R94C/I149E; T110I/I139R; L118M/L141H; A119E/T156H/A289D; I139M/V; R140D/G/M; R140N/A199E; R140E/A334S/A551D; L141K/Q/P/T; E142H/P/V; E142D/G371D; L143F/M; I144L/N/V; K145N/Q/R; K145G/P157T; R146H/L; R146W/D191Y; M147A; I149L/R; F150K/L/M; L151M; A153C/G; A153S/H250N; G154R; G154Y/L174M/Q321K/S456I/G483C; T156K/G483C; P157D/F/H/Y; Y158E; V159C/H/L/M; M247I; L319M; および/またはQ389Kのうち1種または複数から選択される、項目10および/または11に記載の操作されたポリペプチド。

20

(項目15)

配列番号10と比較した前記アミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット: P117T/Y176Q; V172I/C/L; L174M; S175G; Y176E/I/M/R/V; I177M/V; T178L/A477S; および/またはS180C/Tのうち1種または複数から選択される、項目10および/または11に記載の操作されたポリペプチド。

30

(項目16)

配列番号10と比較した前記アミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット: R43S/H374K; R43S/H374R; A112S/M370A/A507E; M147I/H374S; S187R/L381V; D191Y/H385N; A232S; Q240K/H374R; A256S/L381N; P275Q/M370S; P275T/H374R; Q332K/Y377M; A334S/H374V; L349M; Q355K/H374S; M370G/I/S; G371H/N/Q/S; M372A/V; H374A/D/G/L/N/R/S/T; H374Q/P396Q; H374R/G417C; L375I; L375M; Y377C/I/N; Y378C/D/E/I/L/N/S; Y378F/P404Q; I379C/H/L/M/N; L381G/V; L381M/Q560K; L382C/H/I/M/S; A383S/V; K384R; H385C/G/N; H385M/P403H; H385S/P403H; D387S; L418M; G425V; A447S; S461G; および/またはS525Lのうち1種または複数から選択される、項目10および/または11に記載の操作されたポリペプチド。

40

(項目17)

配列番号10と比較した前記アミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット: A24S/F434M; A62S/T433N; S98I; L213M/S438L; Q24

50

O K / T 4 3 3 Y ; S 2 8 6 R / Y 4 3 5 T ; A 2 8 9 S / L 4 3 1 E ; S 3 3 1 I ; L 4 3 1 C / E / G / P / S / V ; L 4 3 2 C / V ; T 4 3 3 A / I / L / N / P / Q / R / S / V / W ; F 4 3 4 C ; Y 4 3 5 L ; Y 4 3 5 Q / H 4 4 6 N ; G 4 3 6 M ; G 4 3 6 D / T ; N 4 3 7 E / G / Q ; N 4 3 7 T / L 5 3 8 M ; S 4 3 8 C / F / M / R / T ; I 4 3 9 C / F / L / V ; および / または A 4 7 7 S のうち 1 種または複数から選択される、項目 1 0 および / または 1 1 に記載の操作されたポリペプチド。

(項目 1 8 )

配列番号 1 0 と比較した前記アミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット : A 2 4 E ; Q 5 8 R / Y 4 7 5 H ; A 7 0 S / N 4 7 4 E ; L 1 0 4 M / V 4 7 6 L ; A 1 1 9 E / G 3 6 5 A ; L 2 0 6 M ; P 2 7 5 Q ; G 2 7 6 V ; Q 2 9 2 H / A 4 7 9 G ; Q 3 5 5 H / I 4 7 8 C ; P 4 0 4 T / A 4 7 7 V ; I 4 7 1 F / G / K / M / N / R / V / W ; F 4 7 2 G ; Q 4 7 3 H / K / M / R / S ; Q 4 7 3 H / A 5 0 7 S ; N 4 7 4 A / H / R / W ; N 4 7 4 D / R 4 9 0 H ; Y 4 7 5 C / F / L / Q ; V 4 7 6 C / I / L ; I 4 7 8 N / S ; A 4 7 9 G / S ; F 4 8 2 C / L ; G 4 8 3 C / H / S ; G 4 8 3 A / S 5 2 4 I ; G 4 8 3 R / G 5 3 7 C ; および / または A 5 5 8 S のうち 1 種または複数から選択される、項目 1 0 および / または 1 1 に記載の操作されたポリペプチド。

10

(項目 1 9 )

配列番号 1 0 と比較した前記アミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット : V 3 9 A / K 1 1 5 E / M 1 3 3 R / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 3 3 R / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 3 3 R / F 4 7 2 G / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 3 3 R / C 5 0 3 Q ; V 3 9 A / M 1 3 3 R / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / Y 3 7 8 E / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / L 3 8 1 G / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / L 3 8 1 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / F 4 7 2 G / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / M 1 4 7 A / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / G 2 4 8 C / L 3 8 1 G / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / Y 3 7 8 E / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / Y 3 7 8 E / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / L 3 8 1 G ; V 3 9 A / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; V 3 9 A / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; M 1 3 3 R / L 3 8 1 G / C 5 6 5 N ; M 1 3 3 R / C 5 0 3 Q ; Y 3 7 8 D / C 5 0 3 Q ; Y 3 7 8 E / F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; L 3 8 1 G / F 4 7 2 G C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N ; および / または F 4 7 2 G / C 5 0 3 Q / C 5 6 5 N のうち 1 種または複数から選択される、項目 1 0 および / または 1 1 に記載の操作されたポリペプチド。

20

30

(項目 2 0 )

a ) 参照配列の配列番号 2 6 またはその機能的断片に対し少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、 b ) 1 個または複数のアミノ酸位置に、配列番号 2 6 またはその機能的断片と比較した少なくとも 1 個のアミノ酸残基の差異を含むポリペプチド配列を含み、 c ) 該参照配列の配列番号 2 6 と比較して i ) 増強された触媒活性、 i i ) タンパク質分解に対する低下した感受性、 i i i ) 酸性 pH に対する増加した耐性、 i v ) 低下した凝集、 v ) 低下した免疫原性、または i ) 、 i i ) 、 i i i ) 、 i v ) もしくは v ) のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチド。

40

(項目 2 1 )

参照配列の配列番号 2 6 に対し少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、および配列番号 2 6 と比較した少なくとも 1 個のアミノ酸残基の差異を含み、配列番号 2 6 と比較して増強された触媒活性、タンパク質分解に対する低下した感受性、酸性 pH に対する増加した耐性、低下した凝集および / または低下した免疫原性から選択される少なくとも 1 種の改善された特性を示す、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) 活性を有する操作されたポリペプチド。

(項目 2 2 )

50

配列番号 26 と比較した前記アミノ酸残基の差異が、次の置換または置換セット：A 24 E / G 3 8 1 L ; L 1 2 7 V ; A 1 2 9 I / V ; S 1 3 1 C / T ; H 1 3 2 L / S ; R 1 3 4 C / F / H / K ; R 1 3 4 H / Y 3 7 8 E / G 3 8 1 L ; R 1 3 4 H / Y 3 7 8 E / G 3 8 1 L / V 3 8 8 T ; R 1 3 4 H / V 3 8 8 T ; A 1 3 6 K ; A 2 8 9 S ; M 3 7 2 L ; H 3 7 4 G / M / Q ; G 3 8 1 A / C / F / I / L / M / N / Q / S / T ; A 3 8 3 C / M ; V 3 8 8 C / T ; L 4 3 1 M ; および / または L 5 6 3 M のうち 1 種または複数から選択される、項目 20 および / または 21 に記載の操作されたポリペプチド。

(項目 23)

参照配列の配列番号 4 に対し少なくとも約 90% の配列同一性を有する、先行する項目のいずれかに記載の操作されたポリペプチド。

10

(項目 24)

参照配列の配列番号 4 に対し少なくとも約 95% の配列同一性を有する、項目 23 に記載の操作されたポリペプチド。

(項目 25)

配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 および / または 26、またはこれらの機能的断片に対し少なくとも約 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチド。

(項目 26)

配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 および / または 26、またはこれらの機能的断片に対し少なくとも約 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 25 に記載のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチド。

20

(項目 27)

表 2 - 1 から表 2 - 5 および / または表 9 - 1 から表 9 - 7 のいずれかに示されているバリエーション PAL である、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチド。

(項目 28)

*Anabaena variabilis* 酵素である、項目 1 ~ 27 のいずれかに記載のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチド。

30

(項目 29)

熱安定的である、項目 1 ~ 28 のいずれかに記載のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチド。

(項目 30)

タンパク質分解に対し抵抗性である、項目 1 ~ 29 のいずれかに記載のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチド。

(項目 31)

少なくとも 1 種の消化管酵素によるタンパク質分解に対し抵抗性である、項目 30 に記載のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチド。

40

(項目 32)

キモトリプシン、トリプシン、カルボキシペプチダーゼおよび / またはエラスターゼによるタンパク質分解に対し抵抗性である、項目 31 に記載のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチド。

(項目 33)

酸安定的である、項目 1 ~ 32 のいずれかに記載のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する操作されたポリペプチド。

(項目 34)

脱免疫化されている、項目 1 ~ 33 のいずれかに記載の操作されたポリペプチド。

(項目 35)

50



配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 および / または 26 に対し少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 34 に記載の脱免疫化された操作されたポリペプチド。

(項目 36)

精製されている、項目 1 ~ 35 のいずれかに記載の操作されたポリペプチド。

(項目 37)

先行する項目 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種の操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

(項目 38)

制御配列に作動可能に連結されている、項目 37 に記載のポリヌクレオチド配列。

10

(項目 39)

前記ポリヌクレオチドが、コドン最適化されている、項目 37 および / または 38 に記載のポリヌクレオチド配列。

(項目 40)

項目 37 ~ 39 のいずれかに記載の少なくとも 1 種のポリヌクレオチド配列と、少なくとも 1 種の制御配列とを含む発現ベクター。

(項目 41)

前記制御配列が、プロモーターである、項目 40 に記載の発現ベクター。

(項目 42)

前記プロモーターが、異種プロモーターである、項目 41 に記載の発現ベクター。

20

(項目 43)

項目 35 ~ 37 のいずれかに記載の少なくとも 1 種のポリヌクレオチド配列および / または項目 40 ~ 42 のいずれかに記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

(項目 44)

E. coli である、項目 43 に記載の宿主細胞。

(項目 45)

宿主細胞において操作された P A L ポリペプチドを産生する方法であって、少なくとも 1 種の操作されたフェニルアラニンアンモニアラーゼ ( P A L ) ポリペプチドが産生されるように適した培養条件下で、項目 1 ~ 36 のいずれかに記載の P A L 活性を有する少なくとも 1 種の操作されたポリペプチドをコードする少なくとも 1 種のポリヌクレオチド、および / または項目 37 および / または 39 に記載の少なくとも 1 種のポリヌクレオチド配列、および / または項目 40 ~ 42 のいずれかに記載の少なくとも 1 種のベクターを含む宿主細胞を培養するステップを含む方法。

30

(項目 46)

培養物および / または宿主細胞から、フェニルアラニンアンモニアラーゼ ( P A L ) を有する少なくとも 1 種の操作されたポリペプチドを回収するステップをさらに含む、項目 45 に記載の方法。

(項目 47)

産生されたフェニルアラニンアンモニアラーゼ ( P A L ) を有する前記少なくとも 1 種の操作されたポリペプチドを精製するステップをさらに含む、項目 46 に記載の方法。

40

(項目 48)

項目 1 ~ 36 のいずれかに記載のフェニルアラニンアンモニアラーゼ ( P A L ) 活性を有する少なくとも 1 種の操作されたポリペプチドを含む組成物。

(項目 49)

医薬組成物である、項目 48 に記載の組成物。

(項目 50)

少なくとも 1 種の薬学的に許容される賦形剤および / または担体をさらに含む、項目 49 に記載の医薬組成物。

(項目 51)

フェニルケトン尿症の処置に適した、項目 48 ~ 50 のいずれかに記載の組成物。

50

(項目 5 2)

ヒトへの経口投与に適した、項目 4 9 ~ 5 1 のいずれかに記載の医薬組成物。

(項目 5 3)

丸剤、錠剤、カプセル、ジェルキャップ、液体またはエマルションの形態である、項目 4 9 ~ 5 2 のいずれかに記載の医薬組成物。

(項目 5 4)

前記丸剤、錠剤、カプセルまたはジェルキャップが、腸溶コーティングをさらに含む、項目 5 3 に記載の医薬組成物。

(項目 5 5)

ヒトへの非経口的注射に適した、項目 4 9 ~ 5 1 のいずれかに記載の医薬組成物。

10

(項目 5 6)

少なくとも 1 種の追加的な治療上有効な化合物と同時投与される、項目 4 9 ~ 5 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

(項目 5 7)

少なくとも 1 種の追加的な治療上有効な化合物を含む、項目 5 6 に記載の医薬組成物。

(項目 5 8)

対象におけるフェニルケトン尿症の症状を処置および/または防止するための方法であって、フェニルケトン尿症を有する対象を用意するステップと、項目 4 9 ~ 5 7 のいずれかに記載の医薬組成物を前記対象に与えるステップとを含む方法。

(項目 5 9)

フェニルケトン尿症の前記症状が寛解される、項目 5 8 に記載の方法。

20

(項目 6 0)

前記対象が、項目 1 ~ 3 6 に表記されているフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を有する少なくとも 1 種の操作されたポリペプチドを含む少なくとも 1 種の医薬組成物を与えられなかった対象に必要なとされる食事よりも、メチオニン、フェニルアラニンおよび/またはチロシン含量が制限されない食事を摂ることができる、項目 5 8 および/または 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記対象が、乳児または小児である、項目 5 8 ~ 6 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 2)

前記対象が、成人または若年成人である、項目 5 8 ~ 6 0 のいずれかに記載の方法。

30

(項目 6 3)

項目 4 8 ~ 5 7 のいずれかに示されている組成物の使用。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図 1 - 1】図 1 は、野生型 PAL タンパク質配列のアライメントを提示する： *Anabaena variabilis* PAL (NCBI YP\_\_324488.1 (配列番号 4))； *Nostoc punctiforme* フェニルアラニン/ヒスチジンアンモニアリアーゼ「NpPHAL」(NCBI YP\_\_001865631.1 (配列番号 30))； *Rivularia* sp. ヒスチジンアンモニアリアーゼ「RspHAL」(NCBI YP\_\_007056096.1 (配列番号 31))； *Oscillatoria* sp. ヒスチジンアンモニアリアーゼ「OspHAL」(NCBI YP\_\_07108482.1 (配列番号 32))； および *Gloeocapsa* sp. ヒスチジンアンモニアリアーゼ「GspHAL」(NCBI YP\_\_007127054.1) (配列番号 33)。

40

【0064】

【図 1 - 2】図 1 は、野生型 PAL タンパク質配列のアライメントを提示する： *Anabaena variabilis* PAL (NCBI YP\_\_324488.1 (配列番号 4))； *Nostoc punctiforme* フェニルアラニン/ヒスチジンアンモニアリアーゼ「NpPHAL」(NCBI YP\_\_001865631.1 (配列番号 30))； *Rivularia* sp. ヒスチジンアンモニアリアーゼ「RspHAL」(NC

50

BI YP\_\_007056096.1 (配列番号31); *Oscillatoria* sp.  
ヒスチジンアンモニアラーゼ「Osp HAL」(NCBI YP\_\_07108482  
.1 (配列番号32)); および *Gloeocapsa* sp. ヒスチジンアンモニア  
ラーゼ「Gsp HAL」(NCBI YP\_\_007127054.1) (配列番号33)。

【0065】

【図2】図2Aは、実施例4にさらに記載されている通りの、野生型AvPALと比較した、バリエーション番号22 (配列番号8)、バリエーション番号30 (配列番号6) およびバリエーション番号36 (配列番号10) に関するpH7.0で検査したタンパク質分解に対する低下した感受性(キモトリプシンおよびトリプシン耐性として発現)を示す。図2Bは、実施例4にさらに記載されている通りの、野生型AvPALと比較した、バリエーション番号22、30および36に関するpH4.0~5.2で検査した酸性pHに対する増加した耐性を示すグラフを提示する。

10

【0066】

【図3】図3は、野生型PALおよびバリエーション番号36の $K_M$ 結果を提示する。

【0067】

【図4】図4は、野生型PALおよびバリエーション番号36のアミノ酸特異性を示すデータを提示する。

【0068】

【図5】図5は、ヒトキモトリプシンおよびトリプシンに曝露された野生型PALおよびバリエーション番号36の相対的安定性を示す結果を提示する。

20

【0069】

【図6】図6は、ブタ膵臓抽出物に曝露された野生型PALならびにバリエーション番号36、42および43の相対的安定性を示す結果を提示する。

【図7】図7は、実施例5について得られた結果を示すグラフを提示する。

【図8】図8は、実施例8について得られた結果を示すグラフを提示する。

【発明を実施するための形態】

【0070】

本発明は、操作されたPALポリペプチド、その突然変異体、生物学的活性を有する断片および類似体、ならびにこれを含む医薬および産業的組成物を提供する。

【0071】

本発明は、操作されたフェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)ポリペプチドおよびその組成物ならびに操作されたフェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、増強された触媒活性と共に、タンパク質分解に対する低下した感受性および酸性pHレベルに対する増加した耐性をもたらすよう最適化される。一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、脱免疫化されている。本発明は、治療および産業目的のための、操作されたPALポリペプチドを含む組成物の使用にも関する。

30

【0072】

略語および定義：

他に規定がなければ、本明細書に使用されているあらゆる技術および科学用語は一般に、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。一般に、本明細書に使用されている命名法ならびに後述する細胞培養、分子遺伝学、微生物学、有機化学、分析化学および核酸化学の研究室の手順は、周知であり、本技術分野において一般的に用いられている。斯かる技法は周知であり、当業者に周知の多数の教科書および参考文献に記載されている。標準技法またはその修正が、化学合成および化学分析のために使用される。上記および下記の両方で本明細書に言及されているあらゆる特許、特許出願、論文および刊行物は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

40

【0073】

本明細書に記載されているものと同様または均等のいかなる適した方法および材料も、

50

本発明の実施における使用を見出す、一部の方法および材料を本明細書に記載する。記載されている特定の方法論、プロトコルおよび試薬は、当業者によってこれらが使用される文脈に応じて変動し得るため、本発明が、記載されている特定の方法論、プロトコルおよび試薬に限定されないことを理解されたい。したがって、このすぐ下に定義されている用語は、本願を全体として参照することにより、より十分に説明される。上記および下記の両方で本明細書に言及されているあらゆる特許、特許出願、論文および刊行物は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【0074】

また、本明細書において、単数形（「a」、「an」および「the」）は、文脈がそれ以外の事柄を明らかに示さない限り、複数の参照を含む。

10

【0075】

数の範囲は、範囲を規定する数を包括する。よって、本明細書に開示されている全ての数値範囲は、より狭い数値範囲が全て本明細書に明確に記述されているかのように、より広い数値範囲内に収まるより狭い数値範囲を全て包含するよう企図される。本明細書に開示されている全ての最大（または最小）数値限界が、下限（または上限）の数値限界が本明細書に明確に記述されているかのように、全ての下限（または上限）の数値限界を含むことも企図される。

【0076】

用語「約」は、特定の値に許容される誤差を意味する。一部の事例において、「約」は、所定の値の範囲の0.05%、0.5%、1.0%または2.0%以内を意味する。一部の事例において、「約」は、所定の値の1、2、3または4標準偏差以内を意味する。

20

【0077】

さらに、本明細書に提示されている見出しは、本発明の様々な態様または実施形態を限定するものではなく、本願を全体として参照することにより分かる。したがって、このすぐ下に定義されている用語は、本願を全体として参照することにより、より十分に定義される。にもかかわらず、本発明の理解を助けるために、多数の用語を下に定義する。

【0078】

他に断りがなければ、それぞれ、核酸は、5'から3'の向きで左から右に書かれる；アミノ酸配列は、アミノからカルボキシの向きで左から右に書かれる。

【0079】

本明細書において、用語「を含む（comprising）」およびその同族言語は、その包括的な意味において使用される（即ち、用語「含む（including）」およびその相当する同族言語と均等）。

30

【0080】

「EC」番号は、国際生化学分子生物学連合の命名委員会（Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology）（NC-IUBMB）の酵素命名法を指す。IUBMB生化学的分類は、酵素が触媒する化学反応に基づく酵素の数的分類体系である。

【0081】

「ATCC」は、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（American Type Culture Collection）を指し、そのバイオレポジトリコレクションは、遺伝子および株を含む。

40

【0082】

「NCBI」は、国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biological Information）およびそれに提供される配列データベースを指す。

【0083】

本明細書において、用語「フェニルアラニンアンモニリアーゼ（PAL）ポリペプチド」は、芳香族アミノ酸リアーゼファミリー内の酵素のクラスを指し（EC4.3.1.23、EC4.3.1.24およびEC4.3.1.25）、このファミリーは、ヒスチジンアンモニリアーゼおよびチロシンアンモニリアーゼも含む。一部のPAL酵素は、フェニルアラニンと同様にチロシンを基質として使用することができるため、PALが

50

リペプチドは、フェニルアラニン/チロシンアンモニアアレーゼと称されることもある。しかし、本明細書に開示および請求されているA v P A Lおよびバリエーションは、基質としてチロシンを使用しない。P A Lポリペプチドは、L - フェニルアラニンからトランス - 桂皮酸およびアンモニアへの変換を触媒する。P A L活性は、P A Lポリペプチドの酵素活性を指す。一部の好ましい実施形態において、P A L酵素は、補助因子3, 5 - ジヒドロ - 5 - メチリデン - 4 H - イミダゾール - 4 - オン ( M I O ) も含有する。この補助因子は、触媒活性に要求される場合があり、保存された活性部位A l a 1 6 7 - S e r 1 6 8 - G l y 1 6 9トリペプチドセグメントの環化および脱水によって形成される。

【 0 0 8 4 】

「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、長さまたは翻訳後修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）にかかわらず、アミド結合によって共有結合により連結された少なくとも2個のアミノ酸のポリマーを表示するよう、本明細書において互換的に使用される。

10

【 0 0 8 5 】

「アミノ酸」は、本明細書において、I U P A C - I U B 生化学命名委員会 ( Biochemical Nomenclature Commission ) によって推奨される、その一般的に公知の3文字記号または1文字記号のいずれかで言及されている。ヌクレオチドも同様に、その一般的に受け入れられた一文字コードで言及することができる。

【 0 0 8 6 】

用語「操作された」、「組換え」、「非天然起源の」および「バリエーション」は、細胞、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに関して使用される場合、他の仕方では自然に存在しない様式で修飾されたまたはそれと同一であるが産生されたまたは合成材料に由来するおよび/または組換え技法を使用した操作による、材料または該材料の天然もしくはネイティブ型に相当する材料を指す。

20

【 0 0 8 7 】

本明細書において、「野生型」および「天然起源の」は、自然に存在する形態を指す。例えば、野生型ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、自然における供給源から単離することができる、ヒトの操作によって意図的に修飾されていない、生物に存在する配列である。

【 0 0 8 8 】

「脱免疫化」は、本明細書において、野生型または参照タンパク質ほど免疫原性ではないバリエーションを作製するためのタンパク質の操作を指す。一部の実施形態において、バリエーションタンパク質が、該バリエーションタンパク質が投与された患者における免疫応答を刺激しないという点において、脱免疫化は完全である。この応答は、タンパク質の投与による中和（即ち、抗薬物抗体）の存在もしくは存在量、アナフィラキシー応答の存在、またはサイトカイン放出の普及もしくは強度等が挙げられるがこれらに限定されない、様々な方法によって測定することができる。一部の実施形態において、バリエーションタンパク質は、野生型または参照タンパク質よりも免疫原性が低い。一部の実施形態において、脱免疫化は、T細胞受容体によって認識されるタンパク質（例えば、エピトープ）の修飾に関与する。一部の実施形態において、脱免疫化されたバリエーションタンパク質を産生するために、T細胞エピトープが、野生型または参照タンパク質から除去される。一部の実施形態において、脱免疫化されたタンパク質は、樹状細胞T細胞活性化アッセイまたはヒト白血球抗原（H L A）ペプチド結合アッセイを含む、ヒト免疫学的応答の生化学的および細胞生物学的予測因子においてより低いレベルの応答を示す。

30

40

【 0 0 8 9 】

「コード配列」は、タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸の部分（例えば、遺伝子）を指す。

【 0 0 9 0 】

用語「パーセント（%）の配列同一性」は、本明細書において、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド間の比較を指すよう使用され、比較ウィンドウにわたり2種の最適に整列

50

された配列を比較することにより決定され、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、2配列の最適アライメントのための参照配列と比較して付加または欠失（即ち、ギャップ）を含むことができる。パーセンテージは、両方の配列に同一核酸塩基またはアミノ酸残基が生じる位置の数を決定してマッチした位置の数を得て、マッチした位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数で割り、この結果に100を掛けて、配列同一性のパーセンテージを得ることにより計算することができる。あるいは、パーセンテージは、両方の配列に同一核酸塩基またはアミノ酸残基が生じる位置の数を決定し、あるいは核酸塩基またはアミノ酸残基がギャップと共に整列されて、マッチした位置の数を得て、マッチした位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数で割り、この結果に100を掛けて、配列同一性のパーセンテージを得ることにより計算することができる。当業者であれば、2配列の整列に利用できる多くの確立されたアルゴリズムが存在することを認める。比較のための配列の最適アライメントは、例えば、本技術分野において公知の通り、SmithとWatermanの局所的相同性アルゴリズム（SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math.、2巻：482頁[1981年]）、NeedlemanとWunschの相同性アライメントアルゴリズム（NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol.、48巻：443頁[1970年]）、PearsonとLipmanの類似性探索方法（PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85巻：2444頁[1988年]）、これらのアルゴリズムのコンピュータ処理された実行（例えば、GCG Wisconsin Software PackageにおけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA）または目視検査により行うことができる。パーセントの配列同一性および配列類似性の決定に適したアルゴリズムの例として、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズム（例えば、Altschulら、J. Mol. Biol.、215巻：403～410頁[1990年]；およびAltschulら、Nucleic Acids Res.、3389～3402頁[1977年]を参照）が挙げられるがこれらに限定されない。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）ウェブサイトによって公開されている。このアルゴリズムは、まず、データベース配列における同じ長さのワードと整列すると、ある正の値の閾値スコア「T」にマッチするまたは満たす、問い合わせ配列における長さ「W」の短いワードを同定することによる、高スコアリング配列ペア（HSP）の同定に参与する。Tは、近隣ワードスコア閾値と称される（Altschulら、上記参照）。このような初期近隣ワードヒットは、これを含有するより長いHSPを発見するための探索を開始するためのシードとして作用する。次に、ワードヒットは、累積的アライメントスコアが増加できるところまで、各配列に沿って両方向に伸長される。累積的スコアは、ヌクレオチド配列に関して、パラメータ「M」（マッチする残基ペアのための報酬スコア；常に>0）および「N」（ミスマッチ残基のための罰則スコア；常に<0）を使用して計算される。アミノ酸配列に関して、スコアリングマトリックスを使用して、累積的スコアを計算する。累積的アライメントスコアが、その最大達成値から含量「X」だけ離れる；1または複数の負のスコアリング残基アライメントの蓄積により、累積的スコアがゼロまたはそれを下回る；あるいはいずれかの配列の終わりに達した場合に、各方向におけるワードヒットの伸長は停止する。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、アライメントの感度およびスピードを決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列用）は、デフォルトとして、ワード長（W）11、予想（E）10、M=5、N=-4および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列のため、BLASTPプログラムは、デフォルトとしてワード長（W）3、予想（E）10およびBLOSUM62スコアリングマトリックス（例えば、HenikoffおよびHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89巻：10915頁[1989年]を参照）を使用する。配列アライメントおよび%配列同一性の例示的な決定は、提供されているデフォルトパラメータを使用して、GCG Wisconsin Software package（Accelrys、ウィスコンシン州マディソン）におけるBESTFITまたはGAPプログラムを用いることができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 1 】

「参照配列」は、配列比較のための基盤として使用される定義された配列を指す。参照配列は、より大型の配列のサブセット、例えば、全長遺伝子またはポリペプチド配列のセグメントとなり得る。一般に、参照配列は、少なくとも20ヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の長さ、少なくとも25残基の長さ、少なくとも50残基の長さ、少なくとも100残基の長さであるまたは核酸もしくはポリペプチドの全長である。2種のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、それぞれ(1)2配列の間で類似の配列(即ち、完全配列の一部)を含むことができ、(2)2配列間で多岐にわたる配列をさらに含むことができるため、2種(またはそれを超える)ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの間の配列比較は、「比較ウィンドウ」にわたり2種のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列を比較して、配列類似性の局所的領域を同定および比較することにより典型的に行われる。一部の実施形態において、「参照配列」は、参照配列が一次配列に1個または複数の変化を有し得る配列である、一次アミノ酸配列に基づくことができる。例えば、語句「X39に相当する残基にバリンを有する配列番号4に基づく参照配列」は、配列番号4における位置X39における相当する残基(例えば、アラニン)がバリンに変化した参照配列を指す。

10

## 【 0 0 9 2 】

「比較ウィンドウ」は、少なくとも約20個の近接ヌクレオチド位置またはアミノ酸残基の概念的セグメントを指し、配列は、少なくとも20個の近接ヌクレオチドまたはアミノ酸の参照配列と比較することができ、比較ウィンドウにおける配列の一部は、2配列の最適アライメントのための参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して、20パーセントまたはそれに満たない付加または欠失(即ち、ギャップ)を含むことができる。比較ウィンドウは、20個の近接残基よりも長くなることができ、任意選択で30、40、50、100またはそれよりも長いウィンドウを含む。

20

## 【 0 0 9 3 】

「に相当する」、「を参照」および「と比べて」は、所定のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列のナンバリングの文脈において使用される場合、所定のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列が参照配列と比較される際の指定の参照配列の残基のナンバリングを指す。換言すると、所定のポリマーの残基数または残基位置は、所定のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列内の残基の実際の数値位置ではなく、参照配列に関して命名される。例えば、操作されたPALの配列等、所定のアミノ酸配列は、ギャップを導入して、2配列間の残基マッチを最適化することにより、参照配列と整列することができる。このような場合、ギャップが存在していても、所定のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列における残基のナンバリングは、それと整列された参照配列に関して為される。

30

## 【 0 0 9 4 】

「アミノ酸の差異」および「残基の差異」は、参照配列の相当する位置におけるアミノ酸残基と比べた、ポリペプチド配列の位置におけるアミノ酸残基の差異を指す。アミノ酸の差異の位置は一般に、本明細書において、「Xn」(式中、nは、残基の差異に基づく参照配列における相当する位置を指す)と称される。例えば、「配列番号4と比較した位置X91における残基の差異」は、配列番号4の位置91に相当するポリペプチド位置におけるアミノ酸残基の差異を指す。よって、配列番号4の参照ポリペプチドが、位置91にアラニンを有する場合、「配列番号4と比較した位置X91における残基の差異」は、配列番号4の位置91に相当するポリペプチドの位置におけるアラニン以外のいずれかの残基のアミノ酸置換を指す。本明細書における大部分の事例において、ある位置における特異的なアミノ酸残基の差異は、「XnY」(式中、「Xn」は、参照ポリペプチドの相当する残基および位置を指定し(上述通り)、「Y」は、操作されたポリペプチドに存在するアミノ酸の一文字識別子である(即ち、参照ポリペプチドのものとは異なる残基))と示す。一部の事例において(例えば、実施例中の表における)、本開示は、従来の表示法「AnB」(式中、Aは、参照配列における残基の一文字識別子であり、「n」は、参照配列における残基位置の数であり、Bは、操作されたポリペプチドの配列における残基置換の一文字識別子である)によって表示される、特異的なアミノ酸の差異も提示する。

40

50

一部の事例において、本開示のポリペプチドは、参照配列と比べて1個または複数のアミノ酸残基の差異を含むことができ、これは、参照配列と比べて残基の差異が存在する指定の位置のリストによって示される。一部の実施形態において、ポリペプチドの特異的な残基位置において2種以上のアミノ酸が使用され得る場合、使用され得る様々なアミノ酸残基は、「/」によって隔てられる（例えば、X307G/X307QまたはX307G/Q）。本開示は、保存的および非保存的アミノ酸置換のいずれか一方/または両方を含む、1個または複数のアミノ酸の差異を含む操作されたポリペプチド配列を含む。

**【0095】**

用語「アミノ酸置換セット」および「置換セット」は、ポリペプチド配列内のアミノ酸置換の群を指す。一部の実施形態において、置換セットは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個またはそれを超えるアミノ酸置換を含む。一部の実施形態において、置換セットは、実施例中の表のいずれかに記載されているバリエーションAvPALポリペプチドのいずれかに存在するアミノ酸置換のセットを指す。例えば、バリエーション36に存在する置換セットは、A39V/A91V/N290G/H307G/L407V/T524Sであり、アミノ酸位置は、配列番号4と比べたものである。

10

**【0096】**

「保存的アミノ酸置換」は、同様の側鎖を有する異なる残基による残基の置換を指し、よって、典型的に、同じまたは同様の定義されたアミノ酸クラス内のアミノ酸による、ポリペプチドにおけるアミノ酸の置換に関与する。限定するのではなく例として、脂肪族側鎖内のアミノ酸は、別の脂肪族アミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン）と置換することができ；ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸は、ヒドロキシル側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、セリンおよびスレオニン）と置換され；芳香族側鎖を有するアミノ酸は、芳香族側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびヒスチジン）と置換され；塩基性側鎖を有するアミノ酸は、塩基性（basic）側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、リシンおよびアルギニン）と置換され；酸性側鎖を有するアミノ酸は、酸性側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸）と置換され；疎水性または親水性アミノ酸は、それぞれ別の疎水性または親水性アミノ酸に置き換えられる。

20

**【0097】**

「非保存的置換」は、有意に異なる側鎖特性を有するアミノ酸による、ポリペプチドにおけるアミノ酸の置換を指す。非保存的置換は、定義された群内ではなく群間のアミノ酸を使用することができ、（a）置換の区域におけるペプチド骨格の構造（例えば、グリシンに対しプロリン）；（b）電荷もしくは疎水性；および/または（c）側鎖の体積に影響を与え得る。限定するのではなく例として、例示的な非保存的置換は、塩基性または脂肪族アミノ酸に置換された酸性アミノ酸；小型のアミノ酸に置換された芳香族アミノ酸；および疎水性アミノ酸に置換された親水性アミノ酸を含む。

30

**【0098】**

「欠失」は、参照ポリペプチドからの1個または複数のアミノ酸の除去による、ポリペプチドの修飾を指す。欠失は、酵素活性を保持しつつ、および/または操作されたトランスアミナーゼ酵素の改善された特性を保持しつつ、参照酵素を構成する1個もしくはそれを超えるアミノ酸、2個もしくはそれを超えるアミノ酸、5個もしくはそれを超えるアミノ酸、10個もしくはそれを超えるアミノ酸、15個もしくはそれを超えるアミノ酸または20個もしくはそれを超えるアミノ酸、アミノ酸総数の最大10%またはアミノ酸総数の最大20%の除去を含むことができる。欠失は、ポリペプチドの内部部分および/または末端部分を対象とすることができる。様々な実施形態において、欠失は、連続的セグメントを含むことができる、あるいは不連続となり得る。

40

**【0099】**

「挿入」は、参照ポリペプチドへの1個または複数のアミノ酸の付加による、ポリペプチドの修飾を指す。挿入は、ポリペプチドの内部部分において為しても、カルボキシまた

50



はアミノ末端に為してもよい。挿入は、本明細書において、本技術分野において公知の融合タンパク質を含む。挿入は、アミノ酸の近接セグメントであっても、天然起源のポリペプチドにおける1個または複数のアミノ酸に隔てられてもよい。

【0100】

用語「機能的断片」および「生物学的活性を有する断片」は、アミノ末端および/またはカルボキシ末端の欠失（複数可）および/または内部欠失を有するが、残るアミノ酸配列が、これと比較されている配列（例えば、本発明の全長の操作されたPAL）における相当する位置と同一であり、全長ポリペプチドの活性を実質的に全て保持する、ポリペプチドを指すよう本明細書において互換的に使用される。

【0101】

「単離されたポリペプチド」は、天然においてはこれに付随する他の夾雑物（例えば、タンパク質、脂質およびポリヌクレオチド）から実質的に分離されたポリペプチドを指す。この用語は、その天然起源の環境または発現系（例えば、宿主細胞または*in vitro*合成）から除去または精製されたポリペプチドを包接する。組換えPALポリペプチドは、細胞内に存在し得る、細胞培地に存在し得る、あるいはライセートまたは単離された調製物等、様々な形態で調製され得る。そのようなものとして、一部の実施形態において、本明細書に提示されている組換えPALポリペプチドは、単離されたポリペプチドである。

【0102】

「実質的に純粋なポリペプチド」は、ポリペプチド種が、存在する優勢種である（即ち、モル濃度または重量基盤で、組成物中の他のいかなる個々の高分子種よりも豊富である）組成物を指し、対象種が、モルまたは%重量で存在する高分子種の少なくとも約50パーセントを構成する場合、一般に、実質的に精製された組成物である。一般に、実質的に純粋なPAL組成物は、モルまたは%重量で組成物中に存在する全高分子種の約60%またはそれ超、約70%またはそれ超、約80%またはそれ超、約90%またはそれ超、約95%またはそれ超および約98%またはそれ超を構成することになる。一部の実施形態において、対象種は、本質的均一性となるまで（即ち、従来の検出方法によって組成物中に夾雑物種を検出できなくなるまで）精製され、組成物は、単一の高分子種から本質的になる。溶媒種、小分子（<500ダルトン）および元素イオン種は、高分子種と考慮されない。一部の実施形態において、単離された組換えPALポリペプチドは、実質的に純粋なポリペプチド組成物である。

【0103】

「改善された酵素特性」は、野生型PALポリペプチド（例えば、配列番号4を有するAvPAL野生型）または別の操作されたPALポリペプチド等、参照PALポリペプチドと比較していずれかの酵素特性における改善を示す、操作されたPALポリペプチドを指す。改善された特性として、増加したタンパク質発現、増加した熱活性、増加した熱安定性、増加したpH活性、増加した安定性、増加した酵素活性、増加した基質特異性および/または親和性、増加した特異的活性、基質および/または最終産物阻害に対する増加した抵抗性、増加した化学的安定性、改善された官能基選択性、改善された溶媒安定性、酸性pHに対する増加した耐性、タンパク質分解活性に対する増加した耐性（即ち、タンパク質分解に対する低下した感受性）、低下した凝集、増加した溶解度、低下した免疫原性ならびに変更された温度プロファイル等の特性が挙げられるがこれらに限定されない。

【0104】

「増加した酵素活性」および「増強された触媒活性」は、操作されたPALポリペプチドの改善された特性を指し、これは、参照PAL酵素（例えば、野生型AvPALおよび/または別の操作されたAvPAL）と比較した、特異的活性（例えば、産生される産物/時間/重量タンパク質）の増加および/または基質から産物へのパーセント変換の増加（例えば、指定された量のPALを使用した指定された期間における基質の出発量から産物へのパーセント変換）によって表すことができる。酵素活性を決定するための例示的な方法は、実施例に提示されている。その変化が酵素活性の増加をもたらし得る、 $K_m$ 、 $V$

10

20

30

40

50

maxまたはkcatの古典的酵素特性を含む、酵素活性に関するいかなる特性が影響されてもよい。酵素活性における改善は、相当する野生型酵素の酵素活性の約1.1倍から、PALポリペプチドが由来する天然起源のPALまたは別の操作されたPALの2倍、5倍、10倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍またはそれを超える大きさの酵素活性となり得る。

#### 【0105】

一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、少なくとも0.1/秒、少なくとも0.2/秒、少なくとも0.3/秒、少なくとも0.5/秒、少なくとも1.0/秒、一部の好ましい実施形態においては、1.0/秒を超えるkcatを有する。一部の実施形態において、Kmは、約1µm~約5mMの範囲内；約5µm~約2mMの範囲内；約10µm~約2mMの範囲内；または約10µm~約1mMの範囲内である。一部の特異的な実施形態において、操作されたPAL酵素は、参照PAL酵素の1.5~10倍、1.5~25倍、1.5~50倍、1.5~100倍またはそれを超える範囲内の改善された酵素活性を示す。PAL活性は、本技術分野において公知のいずれかの標準アッセイにより測定することができる（例えば、反応物または産物の分光光度的特性の変化をモニターすることにより）。一部の実施形態において、産生された産物の量は、直接的にまたはo-フタルジアルデヒド（OPA）誘導体化後に、UV吸光度または蛍光検出と組み合わせた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分離により測定される。一部の実施形態において、酵素活性の比較は、本明細書において詳細にさらに記載されている通り、定義された酵素調製物、セット条件下の定義されたアッセイおよび1種または複数の定義された基質を使用して為される。一般に、ライセートが比較される場合、宿主細胞によって産生され、ライセート中に存在する酵素の量の変動を最小化するために、同一発現系および同一宿主細胞を使用すると共に、細胞の数およびアッセイされるタンパク質の量が決定される。

#### 【0106】

用語「酸性pHに対する改善された耐性」は、本発明に係る組換えPALが、参照PALと比較して増加した安定性を示すことを意味する（即ち、指定された期間[1時間、最大24時間]酸性pHに曝露した後の、約pH7.0におけるより高い保持活性）。

#### 【0107】

「生理的pH」は、本明細書において、対象（例えば、ヒト）の小腸に一般に存在するpH範囲を意味する。通常、幽門弁から大腸へと、約6.0~7.5の範囲内の勾配pHが存在する。

#### 【0108】

酸性pH条件に対する改善された安定性または酸性pHに対する増加した耐性に関して使用される用語「酸性pH」は、約1.5~6.8のpH範囲を意味する。

#### 【0109】

本明細書において互換的に使用される用語「タンパク質分解活性」および「タンパク質分解」は、タンパク質のより小型のポリペプチドまたはアミノ酸への分解を指す。タンパク質の分解は、一般に、プロテアーゼ（プロテイナーゼ）酵素によるペプチド結合の加水分解の結果である。プロテアーゼ酵素として、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ；カルボキシペプチダーゼAおよびBならびにペプチダーゼ（例えば、アミノペプチダーゼ、ジペプチダーゼおよびエンテロペプチダーゼ）が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0110】

語句「タンパク質分解に対する感受性を低下」および「タンパク質分解感受性を低下」は、本明細書において互換的に使用されており、本発明に係る操作されたPALポリペプチドが、1種または複数のプロテアーゼで処理した後に、標準アッセイ（例えば、実施例に開示）において参照PALと比較してより高い酵素活性を有することになることを意味する。

#### 【0111】

10

20

30

40

50

「凝集」は、P A Lポリペプチドの集塊または沈殿を意味する。凝集は、酵素の不活性化をもたらし得る。用語「低下した凝集」は、操作されたP A Lポリペプチドが、参照P A Lと比較して、凝集する傾向が少なくなることを意味する。凝集を評価するための方法が、本技術分野において公知であり、適切な色素（例えば、チオフラビンTまたはナイルレッド）による蛍光顕微鏡の使用、動的散乱、適切な色素（例えば、ボディパイ）によるフローサイトメトリー、濾過ならびにS D S - P A G Eおよび/またはウエスタンブロットによる分析、蛍光相関分光測定、ならびに電子顕微鏡等が挙げられるがこれらに限定されない。凝集を評価するための市販のキットが存在する（例えば、P r o t e o S t a t（登録商標）タンパク質凝集アッセイキット[ E n z o ]）。

#### 【0112】

「変換」は、基質（複数可）から相当する産物（複数可）への酵素変換（または生体内変換）を指す。「パーセント変換」は、指定された条件下である期間内に産物へと変換される基質のパーセントを指す。よって、P A Lポリペプチドの「酵素活性」または「活性」は、特異的な期間における基質から産物への「パーセント変換」として表現することができる。

#### 【0113】

「ハイブリダイゼーションストリンジェンシー」は、核酸のハイブリダイゼーションにおける洗浄条件等のハイブリダイゼーション条件に関する。一般に、ハイブリダイゼーション反応は、より低いストリンジェンシーの条件下で行われ、続いて変動するがより高いストリンジェンシーの洗浄が為される。用語「中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション」は、標的D N Aに対し約60%同一性、好ましくは、約75%同一性、約85%同一性、標的ポリヌクレオチドに対し約90%を超える同一性を有する相補的核酸に、標的D N Aが結合することを可能にする条件を指す。例示的な中程度にストリンジェントな条件は、50%ホルムアミド、5×デンハルト（Denhart）溶液、5×S S P E、0.2% S D Sにおける42のハイブリダイゼーションと、続く0.2×S S P E、0.2% S D Sにおける42の洗浄に均等な条件である。「高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション」は、一般に、定義されたポリヌクレオチド配列のための溶液条件下で決定される熱融解温度 $T_m$ から約10またはそれより低い条件を指す。一部の実施形態において、高ストリンジェンシー条件は、0.018M N a C lにおいて65で安定的ハイブリッドを形成する核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能にする条件を指す（即ち、0.018M N a C lにおける65でハイブリッドが安定的でない場合、本明細書で考慮される高ストリンジェンシー条件下で安定的ではない）。高ストリンジェンシー条件は、例えば、50%ホルムアミド、5×デンハルト（Denhart）溶液、5×S S P E、0.2% S D S、42に均等な条件におけるハイブリダイゼーションと、続く0.1×S S P Eおよび0.1% S D Sにおける65の洗浄により示すことができる。別の高ストリンジェンシー条件は、0.1%（w：v）S D Sを含有する5×S S Cにおける65のハイブリダイズに均等な条件におけるハイブリダイズおよび0.1% S D Sを含有する0.1×S S Cにおける65の洗浄である。他の高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件と共に中程度にストリンジェントな条件は、上に引用されている参考文献に記載されている。

#### 【0114】

「コドン最適化」は、コードされるタンパク質が、特定の生物においてより効率的に発現されるように、タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコドンを、該生物において優先的に使用されるコドンに変化させることを指す。「シノニム」または「同義」コドンと呼ばれる複数のコドンによって大部分のアミノ酸が表されるという点において、遺伝暗号は縮重するが、特定の生物によるコドン使用が非ランダムであり、特定のコドントリプレットに偏向していることが周知である。このようなコドン使用の偏向は、所定の遺伝子、共通機能または祖先起源の遺伝子、高度に発現されるタンパク質対低コピー数タンパク質、および生物のゲノムの凝集したタンパク質コード領域に関してより高くなり得る。一部の実施形態において、P A L酵素をコードするポリヌクレオチドは、発現のために選択

10

20

30

40

50

された宿主生物からの最適な産生のためにコドン最適化される。

【0115】

「制御配列」は、本明細書において、本開示のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの発現に必要なまたは有利なあらゆる構成成分を含むことを指す。各制御配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列に対してネイティブであっても外来性であってもよい。斯かる制御配列として、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター配列、シグナルペプチド配列、開始配列および転写ターミネーターが挙げられるがこれらに限定されない。最小でも、制御配列は、プロモーターならびに転写および翻訳終止シグナルを含む。一部の実施形態において、制御配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列のコード領域と制御配列とのライゲーションを容易にする特異的制限部位を導入する目的のリンカーと共に与えられる。

10

【0116】

「作動可能に連結」は、本明細書において、制御配列が、目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を方向づけるまたは調節するように、目的のポリヌクレオチドに応じた位置に制御配列が適切に（即ち、機能的関係性で）配置された構成として定義される。

【0117】

「プロモーター配列」は、コード配列等、目的のポリヌクレオチドの発現のために宿主細胞によって認識される核酸配列を指す。プロモーター配列は、目的のポリヌクレオチドの発現を媒介する転写制御配列を含有する。プロモーターは、突然変異体、トランケート型およびハイブリッドプロモーターを含む、最適な宿主細胞において転写活性を示すいかなる核酸配列となることもでき、宿主細胞と同種または異種のいずれかの細胞外または細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得ることができる。

20

【0118】

「適した反応条件」は、本開示のPALポリペプチドが、基質を所望の産物化合物に変換することができる、酵素変換反応溶液における条件を指す（例えば、酵素ロード、基質ロードの範囲、温度、pH、バッファー、共溶媒等）。例示的な「適した反応条件」は、本明細書に提示されている（実施例を参照）。

【0119】

「化合物ロード」または「酵素ロード」等における「ロード」は、反応開始の際の反応混合物における構成成分の濃度または量を指す。酵素変換反応プロセスの文脈における「基質」は、PALポリペプチドによって作用される化合物または分子を指す。酵素変換プロセスの文脈における「産物」は、基質におけるPALポリペプチドの作用に起因する化合物または分子を指す。

30

【0120】

本明細書において、用語「培養」は、いずれか適した培地（例えば、液体、ゲルまたは固体）を使用した、適した条件下での微生物細胞の集団の育成を指す。

【0121】

組換えポリペプチド（例えば、PAL酵素バリエーション）は、本技術分野において公知のいずれか適した方法を使用して産生することができる。例えば、当業者に周知の多種多様な異なる突然変異誘発技法が存在する。加えて、多くの商業的分子生物学サプライヤーから突然変異誘発キットを入手することもできる。定義されたアミノ酸における特異的な置換（部位特異的）、遺伝子の局在化された領域における特異的もしくはランダム突然変異（領域（regio）特異的）または遺伝子全体にわたるランダム突然変異誘発（例えば、飽和突然変異誘発）を作製するための方法を利用することができる。PCRを使用した一本鎖DNAもしくは二本鎖DNAの部位特異的突然変異誘発、カセット突然変異誘発、遺伝子合成、エラープローンPCR、シャッフリングおよび化学的飽和突然変異誘発、または本技術分野において公知の他のいずれかの適した方法等が挙げられるがこれらに限定されない、酵素バリエーションを作製するための多数の適した方法が当業者に公知である。DNAおよびタンパク質操作のために使用される方法の非限定例は、次の特許に示されている：

40

50

米国特許第 6, 117, 679 号；米国特許第 6, 420, 175 号；米国特許第 6, 376, 246 号；米国特許第 6, 586, 182 号；米国特許第 7, 747, 391 号；米国特許第 7, 747, 393 号；米国特許第 7, 783, 428 号；および米国特許第 8, 383, 346 号。バリエーションが産生された後に、バリエーションは、いずれか所望の特性に関してスクリーニングすることができる（例えば、高いもしくは増加した活性、または低いもしくは低下した活性、増加した熱活性、増加した熱安定性、および/または酸性 pH 安定性等）。一部の実施形態において、「組換え PAL ポリペプチド」（本明細書において、「操作された PAL ポリペプチド」、「バリエーション PAL 酵素」および「PAL バリエーション」とも称される）は、使用を見出す。

#### 【0122】

本明細書において、「ベクター」は、細胞に DNA 配列を導入するための DNA 構築物である。一部の実施形態において、ベクターは、DNA 配列にコードされたポリペプチドの適した宿主における発現をもたらすことができる適した制御配列に作動可能に連結した発現ベクターである。一部の実施形態において、「発現ベクター」は、宿主細胞における発現を駆動するために、DNA 配列（例えば、導入遺伝子）に作動可能に連結したプロモーター配列を有し、一部の実施形態において、転写ターミネーター配列も含む。

#### 【0123】

本明細書において、用語「発現」は、転写、転写後修飾、翻訳および翻訳後修飾等が挙げられるがこれらに限定されない、ポリペプチドの産生に関与するいずれかのステップを含む。一部の実施形態において、この用語は、細胞からのポリペプチドの分泌も包含する。

#### 【0124】

本明細書において、用語「産生」は、細胞によるタンパク質および/または他の化合物の産生を指す。この用語が、転写、転写後修飾、翻訳および翻訳後修飾等が挙げられるがこれらに限定されない、ポリペプチドの産生に関与するいずれかのステップを包含することが企図される。一部の実施形態において、この用語は、細胞からのポリペプチドの分泌も包含する。

#### 【0125】

本明細書において、アミノ酸またはヌクレオチド配列（例えば、プロモーター配列、シグナルペプチド、ターミネーター配列等）が、これと作動可能に連結した別の配列と自然において関連していない場合、この 2 配列は「異種」である。

#### 【0126】

本明細書において、用語「宿主細胞」および「宿主株」は、本明細書に提示されている DNA（例えば、少なくとも 1 種の A v P A L バリエーションをコードするポリヌクレオチド配列）を含む発現ベクターに適した宿主を指す。一部の実施形態において、宿主細胞は、本技術分野において公知の組換え DNA 技法を使用して構築されたベクターにより形質転換またはトランスフェクトされた原核または真核細胞である。

#### 【0127】

用語「類似体」は、参照ポリペプチドと 70% を超える配列同一性だが 100% に満たない配列同一性（例えば、75%、78%、80%、83%、85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% を超える配列同一性）を有するポリペプチドを意味する。一部の実施形態において、類似体は、天然起源のアミノ酸と共に、ホモアルギニン、オルニチンおよびノルバリン等が挙げられるがこれらに限定されない非天然起源のアミノ酸残基を含む。一部の実施形態において、類似体は、1 種または複数の D - アミノ酸残基と共に、2 個またはそれを超えるアミノ酸残基の間の非ペプチド連結も含む。

#### 【0128】

用語「治療薬」は、有益なまたは望ましい医学的効果を有する、病理の徴候または症状を示す対象に投与される化合物を指す。

#### 【0129】

用語「医薬組成物」は、本発明に包含される薬学的有効量の操作された PAL ポリペプ

10

20

30

40

50

チドと、許容される担体とを含む、哺乳動物対象（例えば、ヒト）における医薬品使用に適した組成物を指す。

【0130】

用語「有効量」は、所望の結果を生じるために十分な量を意味する。当業者であれば、ルーチン実験法を使用することにより有効量について決定することができる。

【0131】

用語「単離された」および「精製された」は、それと天然において関連する少なくとも1種の他の構成成分から除去された分子（例えば、単離された核酸、ポリペプチド等）または他の構成成分を指すように使用される。用語「精製された」は、絶対的な純度を要求するものではなく、むしろ相対的な定義として企図される。

10

【0132】

用語「対象」は、ヒト、非ヒト霊長類、家畜、コンパニオンアニマルおよび研究用動物（例えば、齧歯類およびウサギ目動物）等、哺乳動物を包含する。この用語は、雌と雄とを包含することが企図される。

【0133】

本明細書において、用語「患者」は、疾患を評価されている、これを処置されている、またはこれを経験しているいずれかの対象を意味する。

【0134】

用語「乳児」は、生後1カ月からおよそ一（1）歳の期間の小児を指す。本明細書において、用語「新生児」は、出生から生後28日目の期間の小児を指す。用語「未熟児」は、妊娠期間満20週目の後に、ただし満期の前に産まれた、一般に、出生時にほぼ500～ほぼ2499グラムの体重の乳児を指す。「極低出生時体重乳児」は、出生時に1500g未満の体重の乳児である。

20

【0135】

本明細書において、用語「小児」は、処置または研究手順の同意のための法定年齢に達していない者を指す。一部の実施形態において、この用語は、出生時と青年期との間にある者を指す。

【0136】

本明細書において、用語「成人」は、関連する管轄権の法定年齢に達した者を指す（例えば、米国では18歳）。一部の実施形態において、この用語は、いずれかの完全に成長し成熟した生物を指す。一部の実施形態において、用語「若年成人」は、18歳未満の、ただし性的成熟に達した者を指す。

30

【0137】

本明細書において、「組成物」および「製剤」は、いずれか適した使用（例えば、医薬組成物、食物性/栄養性補助食品、飼料等）のために企図された、本発明の少なくとも1種の操作されたPALを含む産物を包含する。

【0138】

組成物の「投与」およびこれを「投与する」という用語は、本発明の組成物を対象（例えば、PKUの効果を患う者）に与えることを意味する。

【0139】

用語「担体」は、医薬組成物に関して使用される場合、安定剤、保存剤およびアジュバント等、標準医薬品担体、バッファーおよび賦形剤のいずれかを意味する。

40

【0140】

用語「薬学的に許容される」は、いかなる望ましくない生物学的効果を引き起こすこともなく、またはこれが含有される構成成分のいずれかと有害な様式で相互作用することもなく対象に投与することができ、所望の生物学的活性を保有する材料を意味する。

【0141】

本明細書において、用語「賦形剤」は、活性医薬品成分（API；例えば、本発明の操作されたPALポリペプチド）以外の、いずれかの薬学的に許容される添加物、担体、希釈剤、アジュバントまたは他の成分を指す。賦形剤は、典型的に、製剤化および/または

50

投与目的のために含まれる。

【0142】

用語「治療有効量」は、疾患／状態の症状に関して使用される場合、疾患／状態の1種または複数の症状を寛解、減弱または排除する、あるいは症状（複数可）（例えば、PKU）の発病を防止または遅延する、化合物（例えば、操作されたPALポリペプチド）の量および／または濃度を指す。一部の実施形態において、この用語は、研究者、医師、獣医師または他の臨床医によって探索される、組織、系または動物対象による生物学的（例えば、医学的）応答を誘発する組成物の量に関する使用である。

【0143】

用語「治療有効量」は、疾患／状態に関して使用される場合、疾患／状態を寛解、減弱または排除する、組成物の量および／または濃度を指す。

10

【0144】

用語「処置している」、「処置する」および「処置」は、防止的（例えば、予防的）および対症的処置を包含することが企図される。

【0145】

操作されたPALポリペプチド：

本発明の操作されたPALポリペプチドが由来する親PALポリペプチドは、*Anabaena*（例えば、*A. variabilis*）、*Nostoc*（例えば、*N. punctiforme*）、*Rhodospiridium*（例えば、*R. toruloides*）、*Streptomyces*（例えば、*S. maritimus*または*S. verticillatus*）、*Oscillatoria* sp.、*Gloeocapsa* sp. および*Rivularia* sp.等、細菌株を含む。これらの株に由来するPAL酵素が同定されており、周知のものである。*Anabaena* (*A. variabilis*) ATCC 29413およびNCBI YP\_\_324488.1; *Nostoc* (*N. punctiforme*) ATCC 29133およびNCBI YP\_\_00186563.1; *Oscillatoria* sp. PCC 6506およびNCBI ZP\_\_07108482.1ならびに*Gloeocapsa* sp. PCC 7428およびNCBI YP\_\_007127054.1由来の相同酵素配列を図1に示す。*Nostoc punctiforme* フェニルアラニン/ヒスチジンアンモニアリアーゼ「NpPHAL」(NCBI YP\_\_001865631.1 (配列番号30)); *Rivularia* sp. ヒスチジンアンモニアリアーゼ「RspPHAL」(NCBI YP\_\_007056096.1 (配列番号31)); *Oscillatoria* sp. ヒスチジンアンモニアリアーゼ「OspPHAL」(NCBI YP\_\_07108482.1 (配列番号32)); および*Gloeocapsa* sp. ヒスチジンアンモニアリアーゼ「GspPHAL」(NCBI YP\_\_007127054.1) (配列番号33)は、AvPAL (配列番号4)と70%を超える相同性を有する。

20

30

【0146】

さらに、特定のPALバリエント（即ち、操作されたPALポリペプチド）が、野生型PALまたは参照PALの配列における特定のアミノ酸残基の修飾の参照により言及される場合、均等な位置（複数可）（それぞれのアミノ酸配列間の任意選択のアミノ酸配列アライメントから決定される）において修飾された別のPALのバリエントが、本明細書に包含されることを理解されたい。一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、上述の細菌株（即ち、*Nostoc* [*N. punctiforme*]、*Rhodospiridium* [*R. toruloides*]、*Streptomyces* [*S. maritimus*または*S. verticillatus*]、*Oscillatoria* sp.、*Gloeocapsa* sp.および*Rivularia* sp.)に収載されているポリペプチドのうちいずれか1種に由来する。一部の追加的な実施形態において、本発明の操作されたPALポリペプチドは、保存された活性部位Ala167-Ser168-Gly169を含み、配列番号4に対し少なくとも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91%、少なくとも9

40

50

2%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を含む。一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、PAL活性を含むだけでなく、チロシンおよび/またはヒスチジン基質における活性も含む。

【0147】

一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、少なくとも1種の操作されたPALポリペプチドをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチド配列を含む微生物を、操作されたPALポリペプチドの産生の助けになる条件下で培養することにより産生される。一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、その結果得られた培養培地および/または細胞からその後回収される。

10

【0148】

本発明は、PAL活性を有する例示的な操作されたPALポリペプチドを提供する。実施例は、操作されたPALポリペプチドの機能活性と特異的アミノ酸配列特色を相関させる、配列構造情報を示す表を提供する。この構造-機能相関情報は、配列番号4の参照の操作されたポリペプチドと比べた特異的アミノ酸残基の差異と共に、例示的な操作されたPALポリペプチドの関連する実験的に決定された活性データの形態で提供される。

【0149】

一部の実施形態において、PAL活性を有する本発明の操作されたPALポリペプチドは、a)参照配列の配列番号4に対し少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列；b)1個または複数のアミノ酸位置における配列番号4と比較したアミノ酸残基の差異を含み、c)参照配列と比較してi)増強された触媒活性、ii)低下したタンパク質分解感受性、iii)酸性pHに対する増加した耐性、iv)低下した凝集、またはi)、ii)、iii)もしくはiv)のいずれかの組合せから選択される改善された特性を示す。

20

【0150】

一部の実施形態において、少なくとも1種の改善された特性を示す操作されたPALポリペプチドは、配列番号4と少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、1個または複数のアミノ酸位置（配列番号4、または配列番号4と少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、20個またはそれを超えるアミノ酸位置等に配列番号4と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、1個または複数の位置における配列番号4と比較した残基の差異は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれを超える保存的アミノ酸置換を含む。一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドは、実施例に提示されている表に記載されたポリペプチドである。

30

40

【0151】

一部の実施形態において、少なくとも1種の改善された特性を示す操作されたPALポリペプチドは、配列番号4と少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、1個または複数のアミノ酸位置における配列番号4と比較したアミノ酸残基の差異は、配列番号4のアミノ酸配列と最適に整列された場合、X39；X54；X59；X73；X91；X158；X112、X134、X180；X195；X240；X243；X245；X256；X257；X270；X290；X304、X305；X307；X308；X326；X349；X353；

50



X 3 6 4 ; X 3 9 4 ; X 3 9 9 ; X 4 0 0 ; X 4 0 4 ; X 4 0 7 ; X 4 4 3 ; X 4 5 3 ;  
 X 4 5 9 ; X 4 6 0 ; X 4 6 3 ; X 4 7 4 ; X 5 0 9 ; X 5 2 1 ; X 5 2 2 ; X 5 2 4 ;  
 X 5 2 8 ; X 5 4 6 ; X 5 6 4 ; またはこれらのいずれかの組合せから選択される。一部  
 の実施形態において、アミノ酸の差異は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、  
 15もしくは20個またはそれを超えるアミノ酸位置である。

【0152】

一部の実施形態において、少なくとも1種の改善された特性を示す操作されたPALポリ  
 リペプチドは、配列番号4に対し少なくとも85%（少なくとも88%、90%、91%  
 、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性を  
 有し、位置H307におけるアミノ酸残基の差異と、任意選択で、1、2、3、4、5、  
 6、7、8、9、10個またはそれを超えるアミノ酸位置におけるアミノ酸残基の差異を  
 含む。一部の実施形態において、位置307におけるアミノ酸残基の差異は、H307/  
 G/Q/Mである。

10

【0153】

一部の実施形態において、少なくとも1種の改善された特性を示す操作されたPALポリ  
 リペプチドは、配列番号4に対し少なくとも85%（少なくとも88%、90%、91%  
 、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性を  
 有し、A39；T54；G59、S73；A91；Y158；S180；K195；A1  
 12；R134；Q240；T243；I245；A256；L257；N270；N2  
 90；Y304；R305；H307；E308；I326；L349；D353；L3  
 64；A394；S399；N400；P404；L407；F443；N453；Y4  
 59；T460；T463；N474；E509；Q521；K522；T524；P5  
 28；S546；および/またはP564のうち1種または複数の組合せから選択される  
 少なくとも1個のアミノ酸残基の差異を含む。一部の追加的な実施形態において、1、2  
 、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれを超えるアミノ酸位置に、アミノ酸残  
 基の差異が存在する。

20

【0154】

一部の実施形態において、改善された特性を示す操作されたPALポリペプチドは、配  
 列番号4に対し少なくとも85%（少なくとも88%、90%、91%、92%、93%  
 、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性を有し、配列番号4  
 と最適に整列された場合、A39V；T54K；G59R；S73K；A112C；R1  
 34Q；A91V；Y158H；S180A；K195E；Q240R/W；T243I  
 /L；I245L；A256G；L257W/A；N270K；N290G；Y304H  
 ；R305M；H307G/Q/M；E308Q；I326F；L349M；D353A  
 /N；L364Q；A394V；S399N；N400K；P404A；L407V；F  
 443H；N453G；Y459F；T460G；T463N；N474Q；E509L  
 ；Q521K/S；K522Y/F/N；T524S；P528L；S546R；および  
 P564G/L/Mのうち1種または複数の組合せから選択されるアミノ酸残基の差異を  
 含む。

30

【0155】

一部の実施形態において、アミノ酸残基の差異は、配列番号4と最適に整列された場合  
 、A39V；A91V；A256G；N290G；A394V；S399N；P404A  
 ；L407V；K522Y/F/N；および/またはT524Sのうち1種または複数の  
 組合せから選択される。

40

【0156】

一部の実施形態において、本発明は、操作されたPALポリペプチドの機能的断片を提  
 供する。一部の実施形態において、機能的断片は、これが由来する操作されたPALポリ  
 ペプチド（即ち、親操作されたPAL）の活性の少なくとも約90%、少なくとも約95  
 %、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約  
 99%を構成する。一部の実施形態において、機能的断片は、操作されたPALの親配列

50

の少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98% または少なくとも約 99% を構成する。一部の実施形態において、機能的断片は、5 個未満、10 個未満、15 個未満、10 個未満、25 個未満、30 個未満、35 個未満、40 個未満、45 個未満および 50 個未満のアミノ酸がトランケートされることになる。

**【0157】**

一部の実施形態において、本発明は、操作された P A L ポリペプチドの機能的断片を提供する。一部の実施形態において、機能的断片は、これが由来する操作された P A L ポリペプチド（即ち、親操作された P A L）の活性の少なくとも約 95%、96%、97%、98% または 99% を構成する。一部の実施形態において、機能的断片は、操作された P A L の親配列の少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% を構成する。一部の実施形態において、機能的断片は、5 個未満、10 個未満、15 個未満、10 個未満、25 個未満、30 個未満、35 個未満、40 個未満、45 個未満、50 個未満、55 個未満、60 個未満、65 個未満または 70 個未満のアミノ酸がトランケートされることになる。

10

**【0158】**

一部の実施形態において、少なくとも 1 種の改善された特性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 6 と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 6、または配列番号 6 と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した 1 個または複数のアミノ酸位置（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15 個またはそれを超えるアミノ酸位置等）に、配列番号 6 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、操作された P A L は、配列番号 6 に対し少なくとも 90% の配列同一性を含み、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸位置の、配列番号 6 と比較したアミノ酸の差異を含む。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 6 の配列からなる。

20

30

**【0159】**

一部の実施形態において、少なくとも 1 種の改善された特性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 10 またはその機能的断片と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 10、または配列番号 10 と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した 1 個または複数のアミノ酸位置（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15 個またはそれを超えるアミノ酸位置等）に、配列番号 10 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、操作された P A L は、配列番号 10 に対し少なくとも 95% の配列同一性を含み、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸位置の、配列番号 10 と比較したアミノ酸の差異を含む。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 10 の配列からなる。

40

**【0160】**

一部の実施形態において、少なくとも 1 種の改善された特性を示す操作された P A L ポ

50

リペプチドは、配列番号 1 2 またはその機能的断片と少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、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 % またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 1 2、または配列番号 1 2 と少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、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 % もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した 1 個または複数のアミノ酸位置 ( 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15 個またはそれを超えるアミノ酸位置等 ) に、配列番号 1 2 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、操作された P A L は、配列番号 1 2 に対し少なくとも 9 5 % の配列同一性を含み、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸位置の、配列番号 1 2 と比較したアミノ酸の差異を含む。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 1 2 の配列からなる。

10

#### 【 0 1 6 1 】

一部の実施形態において、少なくとも 1 種の改善された特性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 1 4 またはその機能的断片と少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、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 % またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 1 4、または配列番号 1 4 と少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、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 % もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した 1 個または複数のアミノ酸位置 ( 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15 個またはそれを超えるアミノ酸位置等 ) に、配列番号 1 4 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、操作された P A L は、配列番号 1 4 に対し少なくとも 9 5 % の配列同一性を含み、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸位置の、配列番号 1 4 と比較したアミノ酸の差異を含む。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 1 4 の配列からなる。

20

30

#### 【 0 1 6 2 】

一部の実施形態において、少なくとも 1 種の改善された特性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 1 6 またはその機能的断片と少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、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 % またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 1 6、または配列番号 1 6 と少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、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 % もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した 1 個または複数のアミノ酸位置 ( 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15 個またはそれを超えるアミノ酸位置等 ) に、配列番号 1 6 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、操作された P A L は、配列番号 1 6 に対し少なくとも 9 5 % の配列同一性を含み、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸位置の、配列番号 1 6 と比較したアミノ酸の差異を含む。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 1 6 の配列からなる。

40

#### 【 0 1 6 3 】

一部の実施形態において、少なくとも 1 種の改善された特性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 1 8 またはその機能的断片と少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少な

50

くとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 18、または配列番号 18 と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した 1 個または複数のアミノ酸位置 (1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15 個またはそれを超えるアミノ酸位置等) に、配列番号 18 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、操作された P A L は、配列番号 18 に対し少なくとも 95% の配列同一性を含み、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸位置の、配列番号 18 と比較したアミノ酸の差異を含む。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 18 の配列からなる。

10

【0164】

一部の実施形態において、少なくとも 1 種の改善された特性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 20 またはその機能的断片と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 20、または配列番号 20 と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した 1 個または複数のアミノ酸位置 (1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15 個またはそれを超えるアミノ酸位置等) に、配列番号 20 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、操作された P A L は、配列番号 20 に対し少なくとも 95% の配列同一性を含み、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸位置の、配列番号 20 と比較したアミノ酸の差異を含む。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 20 の配列からなる。

20

【0165】

一部の実施形態において、少なくとも 1 種の改善された特性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 22 またはその機能的断片と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 22、または配列番号 22 と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した 1 個または複数のアミノ酸位置 (1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15 個またはそれを超えるアミノ酸位置等) に、配列番号 22 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、操作された P A L は、配列番号 22 に対し少なくとも 95% の配列同一性を含み、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸位置の、配列番号 22 と比較したアミノ酸の差異を含む。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 22 の配列からなる。

30

40

【0166】

一部の実施形態において、少なくとも 1 種の改善された特性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 24 またはその機能的断片と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 24、

50

または配列番号 24 と少なくとも 85 %、少なくとも 88 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した 1 個または複数のアミノ酸位置 (1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15 個またはそれを超えるアミノ酸位置等) に、配列番号 24 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、操作された P A L は、配列番号 24 に対し少なくとも 95 % の配列同一性を含み、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸位置の、配列番号 24 と比較したアミノ酸の差異を含む。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 24 の配列からなる。

10

## 【0167】

タンパク質分解に対する低下した感受性を有するバリエーション：

一部の実施形態において、本発明の操作された P A L ポリペプチドは、P A L 活性を有し、タンパク質分解に対する低下した感受性を示し、a) 参照配列の配列番号 4 に対し少なくとも 85 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；および b) 1 個または複数のアミノ酸位置に、配列番号 4 と比較したアミノ酸残基の差異を含む。

## 【0168】

一部の実施形態において、タンパク質分解に対する低下した感受性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 4 と少なくとも 85 %、少なくとも 88 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、1 個または複数のアミノ酸位置 (配列番号 4、または配列番号 4 と少なくとも 85 %、少なくとも 88 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、20 個またはそれを超えるアミノ酸位置等) に、配列番号 4 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。

20

## 【0169】

一部の実施形態において、タンパク質分解に対する低下した感受性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 4 と少なくとも 85 %、少なくとも 88 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 4 のアミノ酸配列と最適に整列された場合、X 3 9 ; X 5 4 ; X 5 9 ; X 7 3 ; X 9 1 ; X 1 5 8 ; X 1 1 2、X 1 3 4、X 1 8 0 ; X 1 9 5 ; X 2 4 0 ; X 2 4 3 ; X 2 4 5 ; X 2 5 6 ; X 2 5 7 ; X 2 7 0 ; X 2 9 0 ; X 3 0 4、X 3 0 5 ; X 3 0 7 ; X 3 0 8 ; X 3 2 6 ; X 3 4 9 ; X 3 5 3 ; X 3 6 4 ; X 3 9 4 ; X 3 9 9 ; X 4 0 0 ; X 4 0 4 ; X 4 0 7 ; X 4 4 3 ; X 4 5 3 ; X 4 5 9 ; X 4 6 0 ; X 4 6 3 ; X 4 7 4 ; X 5 0 9 ; X 5 2 1 ; X 5 2 2 ; X 5 2 4 ; X 5 2 8 ; X 5 4 6 ; X 5 6 4 ; またはこれらのいずれかの組合せから選択される 1 個または複数のアミノ酸位置に、配列番号 4 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、アミノ酸の差異は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 もしくは 20 個またはそれを超えるアミノ酸位置である。

30

40

## 【0170】

一部の実施形態において、タンパク質分解に対する低下した感受性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 4 に対し少なくとも 85 %、少なくとも 88 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の配列同一性を有し、位置 X 3 0 7 ; X 3 2 6 ; X 4 6 0 ; X 3 0 7 ; および / または X 5 2 8 におけるアミノ酸残基の差異、ならびに任意選択で 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸位置におけるアミノ酸残基の差異を含む。一部の実

50

施形態において、アミノ酸残基の差異は、配列番号4と整列された場合、Y304H/W ; R305L/M ; H307G/M/Q ; I326F ; Q240W ; T460G ; P528L ; および組合せたこれらの置換のいずれかから選択される。

【0171】

一部の実施形態において、タンパク質分解に対する低下した感受性を示す操作されたPALポリペプチドは、配列番号10、12、14、16、18、20、22および/または24、またはこれらの機能的断片のうちいずれかと少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号10、12、14、16、18、20、22および/または24、あるいは配列番号10、12、14、16、18、20、22および/または24と少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した1個または複数のアミノ酸位置(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15またはそれを超えるアミノ酸位置等)に、配列番号10、12、14、16、18、20、22および/または24と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、操作されたPALは、配列番号10、12、14、16、18、20、22および/または24に対し少なくとも95%の配列同一性を含み、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれを超えるアミノ酸位置の、配列番号10、12、14、16、18、20、22および/または24と比較したアミノ酸の差異を含む。一部の実施形態において、PALは、配列番号10、12、14、16、18、20、22および/または24の配列を含むまたはこれからなる。

【0172】

一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドのタンパク質分解感受性は、野生型PAL(例えば、配列番号4を有するAvPAL)の、または基本的に同じ条件下で参照PALポリペプチドと比較して、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30%、少なくとも40%、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85%、少なくとも90%または少なくとも95%低下する。タンパク質分解活性は、実施例に記載されている方法等が挙げられるがこれらに限定されない、本技術分野において公知のいずれか適した方法を使用して測定することができる。

【0173】

一部の実施形態において、参照PALおよび低下した感受性を有する操作されたPALの両方が比較され、基本的に同じ条件下で基本的に同じ量および種類のプロテアーゼに曝露される場合、タンパク質分解に対する低下した感受性を有する操作されたPALポリペプチドは、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼAおよびB、ペプチダーゼ(例えば、アミノペプチダーゼ、ジペプチダーゼおよびエンテロペプチダーゼ)等が挙げられるがこれらに限定されない、1種または複数のプロテアーゼを含む組成物に対する低下した感受性を有する。

【0174】

一部の実施形態において、タンパク質分解に対する低下した感受性を有する操作されたPALポリペプチドは、参照PAL(例えば、AvPAL)の酵素活性の約1.0倍、2倍、5倍、10倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍またはそれを超える酵素活性レベルを有する。一部の実施形態において、活性が、4.5~7.5のpH範囲において測定される場合;活性が、4.5~6.5のpH範囲において測定される場合;活性が、5.0~7.5のpH範囲において測定される場合;活性が、5.0~6.5のpH範囲において測定される場合;活性が、5.5~7.5のpH範囲において測定される場合;および/または同様に活性が、5.5~6.5のpH範囲にお

10

20

30

40

50

いて測定される場合、操作されたポリペプチドは、参照 P A L と比較してより大きい酵素活性を有する。一部の他の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、 $1 \mu\text{M} \sim 5 \text{mM}$  の範囲内の  $K_m$  値を有する。

【0175】

酸性 pH に対する増加した耐性を有するバリエーション：

一部の実施形態において、本発明の操作された P A L ポリペプチドは、P A L 活性を有し、酸性 pH レベルに耐性を示し、a) 参照配列の配列番号 4 またはその断片に対し少なくとも 85% の配列同一性を有するアミノ酸配列；および b) 1 個または複数のアミノ酸位置に、配列番号 4 と比較したアミノ酸残基の差異を含む。

【0176】

一部の実施形態において、野生型 A v P A L および/または別の参照ポリペプチドと比較して酸性 pH に対する増加した耐性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 4 と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 4、または配列番号 4 と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% もしくはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列と比較した 1 個または複数のアミノ酸位置 (1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、20 個またはそれを超えるアミノ酸位置等) に、配列番号 4 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。

【0177】

一部の実施形態において、野生型 A v P A L および/または別の参照ポリペプチドと比較して酸性 pH に対する増加した耐性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 4 と少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し、配列番号 4 のアミノ酸配列と最適に整列された場合、X 3 9 ; X 5 4 ; X 5 9 ; X 7 3 ; X 9 1 ; X 1 5 8 ; X 1 1 2、X 1 3 4、X 1 8 0 ; X 1 9 5 ; X 2 4 0 ; X 2 4 3 ; X 2 4 5 ; X 2 5 6 ; X 2 5 7 ; X 2 7 0 ; X 2 9 0 ; X 3 0 4、X 3 0 5 ; X 3 0 7 ; X 3 0 8 ; X 3 2 6 ; X 3 4 9 ; X 3 5 3 ; X 3 6 4 ; X 3 9 4 ; X 3 9 9 ; X 4 0 0 ; X 4 0 4 ; X 4 0 7 ; X 4 4 3 ; X 4 5 3 ; X 4 5 9 ; X 4 6 0 ; X 4 6 3 ; X 4 7 4 ; X 5 0 9 ; X 5 2 1 ; X 5 2 2 ; X 5 2 4 ; X 5 2 8 ; X 5 4 6 ; X 5 6 4 ; またはこれらのいずれかの組合せから選択される 1 個または複数のアミノ酸位置に、配列番号 4 と比較したアミノ酸残基の差異を有する。一部の実施形態において、アミノ酸の差異は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 もしくは 20 個またはそれを超えるアミノ酸位置である。

【0178】

一部の実施形態において、野生型 A v P A L および/または別の参照ポリペプチドと比較して酸性 pH に対する増加した耐性を示す操作された P A L ポリペプチドは、配列番号 4 に対し少なくとも 85%、少なくとも 88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性を有し、位置 X 3 9 ; X 5 4 ; X 5 9 ; X 7 3 ; X 9 1 ; X 1 5 8 ; X 1 1 2、X 1 3 4、X 1 8 0 ; X 1 9 5 ; X 2 4 0 ; X 2 4 3 ; X 2 4 5 ; X 2 5 6 ; X 2 5 7 ; X 2 7 0 ; X 2 9 0 ; X 3 0 4、X 3 0 5 ; X 3 0 7 ; X 3 0 8 ; X 3 2 6 ; X 3 4 9 ; X 3 5 3 ; X 3 6 4 ; X 3 9 4 ; X 3 9 9 ; X 4 0 0 ; X 4 0 4 ; X 4 0 7 ; X 4 4 3 ; X 4 5 3 ; X 4 5 9 ; X 4 6 0 ; X 4 6 3 ; X 4 7 4 ; X 5 0 9 ; X 5 2 1 ; X 5 2 2 ; X 5 2 4 ; X 5 2 8 ; X 5 4 6 ; X 5 6 4 ; またはこれらのいずれかの組合せにおけるアミノ酸残基の差異；および任意選択で、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸位置に

10

20

30

40

50

おけるアミノ酸残基の差異を含む。一部の実施形態において、アミノ酸残基の差異は、配列番号4と整列した場合、A39; T54; G59、S73; A91; Y158; S180; K195; A112; R134; Q240; T243; I245; A256; L257; N270; N290; Y304; R305; H307; E308; I326; L349; D353; L364; A394; S399; N400; P404; L407; F443; N453; Y459; T460; T463; N474; E509; Q521; K522; T524; P528; S546; および/またはP564である。一部の実施形態において、酸性pHに対する増加した耐性を示す操作されたPALポリペプチドは、配列番号4に対し少なくとも85%、少なくとも88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有し、配列番号4と整列された場合、1個または複数の位置A39V; T54K; G59R; S73K; A112C; R134Q; A91V; Y158H; S180A; K195E; Q240R/W; T243I/L; I245L; A256G; L257W/A; N270K; N290G; Y304H; R305M; H307G/Q/M; E308Q; I326F; L349M; D353A/N; L364Q; A394V; S399N; N400K; P404A; L407V; F443H; N453G; Y459F; T460G; T463N; N474Q; E509L; Q521K/S; K522Y/F/N; T524S; P528L; S546R; および/またはP564G/L/Mにアミノ酸残基の差異を含む。

10

## 【0179】

一部の実施形態において、他のあらゆるアッセイ条件が基本的と同じである場合、参照PALポリペプチドと比較して酸性pHに対する増加した耐性を有する操作されたPALポリペプチドは、1.5~6.5の間; 1.5~5.0の間; 2.0~5.5の間; 3.0~6.8の間; 3.0~5.5の間; 4.0~6.5の間; 4.0~4.5の間; 4.5~5.0の間; 4.5~5.5の間、4.5~6.0の間; 4.5~6.5の間; 5.0~6.5の間; 5.0~6.0の間; 5.0~5.5の間; 5.5~6.0の間; 6.0~6.5の間; および/または6.5~7.0の間のpH範囲において増加した耐性を有する。一部の実施形態において、酸性pHに対する増加した耐性は、約3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0および/または6.5のpHにおいて示される。

20

## 【0180】

一部の実施形態において、酸性pHに対する増加した耐性を有する操作されたPALポリペプチドは、標準アッセイにより測定する場合、参照PALと比較してより優れたPAL活性も示す。本明細書に提示されているアッセイ等が挙げられるがこれらに限定されない、いずれか適したアッセイが、本発明における使用を見出す。

30

## 【0181】

例示的な操作されたポリペプチド(即ち、バリエーション番号1~バリエーション番号1010)のいずれかが、例えば、本明細書に記載されている他のポリペプチドおよび他の残基位置から様々なアミノ酸の差異の新たな組合せを加えることによる進化のその後のラウンドにより、他の操作されたPALポリペプチドを合成するための出発アミノ酸配列としての使用を見出すことがさらに考慮される。一部の実施形態において、進化のより初期のラウンドを通して未変化として維持された残基位置にアミノ酸の差異を含むことにより、追加的な改善が為される。本明細書に提示されている方法等が挙げられるがこれらに限定されない、いずれか適した方法が使用を見出すため、本発明が、操作されたPALポリペプチドを産生するためのいずれか特定の方法に限定されることは企図されない。

40

## 【0182】

操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、発現ベクターおよび宿主細胞:  
本発明は、本明細書に記載されている操作されたPALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現することができる組換えポリヌクレオチドを作製するために、遺伝子発現を制御する1種または複数の異種調節配列に動作可能に連結されている。一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチド(複数可)をコードする少なくとも1種の異種ポリヌク

50



レオチドを含有する発現構築物が、適切な宿主細胞に導入されて、相当する P A L ポリペプチド（複数可）を発現する。

【 0 1 8 3 】

当業者には明らかな通り、タンパク質配列の利用能および様々なアミノ酸に相当するコドンの知識は、対象ポリペプチドをコードすることができるあらゆるポリヌクレオチドの説明を提供する。同じアミノ酸が、代替的または同義コドンによってコードされるという遺伝暗号の縮重は、その全てが操作された P A L ポリペプチドをコードする極めて多数の核酸が作製されることを可能にする。よって、本発明は、可能なコドン選択に基づく組合せを選択することにより本明細書に記載されている P A L ポリペプチドをコードするよう作製することができる、P A L ポリヌクレオチドのありとあらゆる可能な変種の産生のための方法および組成物を提供し、斯かる変種は全て、実施例に（例えば、様々な表中で）示されているアミノ酸配列を含む、本明細書に記載されているいずれかのポリペプチドのために特に開示されていると考慮されるべきである。

10

【 0 1 8 4 】

一部の実施形態において、コドンは、好ましくは、タンパク質産生に選ばれた宿主細胞による利用のために最適化される。例えば、細菌において使用される好ましいコドンは、細菌における発現のために典型的に使用される。結果的に、操作された P A L ポリペプチドをコードするコドン最適化されたポリヌクレオチドは、全長コード領域におけるコドン位置の約 4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % または 9 0 % 超に好ましいコドンを含有する。

20

【 0 1 8 5 】

一部の実施形態において、P A L ポリヌクレオチドは、本明細書に開示されている特性を有する P A L 活性を有する操作されたポリペプチドであって、配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 および / または 2 3 から選択される参照配列、またはいずれかのバリエーション（例えば、実施例に提示）のアミノ酸配列に対し少なくとも 8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % またはそれを超える同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 および / または 2 3 の参照ポリヌクレオチド、または実施例に開示されているいずれかのバリエーションのアミノ酸配列と比較して 1 個または複数の残基の差異を含む（例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれを超えるアミノ酸残基位置）ポリペプチドをコードする。一部の実施形態において、参照配列は、配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 および / または 2 3 から選択される。

30

【 0 1 8 6 】

一部の実施形態において、P A L ポリヌクレオチドは、本明細書に開示されている特性を有する P A L 活性を有する操作されたポリペプチドであって、参照配列の配列番号 4 に対し少なくとも 8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 4 のポリペプチドと最適に整列された場合、X 3 9 ; X 5 4 ; X 5 9 ; X 7 3 ; X 9 1 ; X 1 5 8 ; X 1 1 2、X 1 3 4、X 1 8 0 ; X 1 9 5 ; X 2 4 0 ; X 2 4 3 ; X 2 4 5 ; X 2 5 6 ; X 2 5 7 ; X 2 7 0 ; X 2 9 0 ; X 3 0 4、X 3 0 5 ; X 3 0 7 ; X 3 0 8 ; X 3 2 6 ; X 3 4 9 ; X 3 5 3 ; X 3 6 4 ; X 3 9 4 ; X 3 9 9 ; X 4 0 0 ; X 4 0 4 ; X 4 0 7 ; X 4 4 3 ; X 4 5 3 ; X 4 5 9 ; X 4 6 0 ; X 4 6 3 ; X 4 7 4 ; X 5 0 9 ; X 5 2 1 ; X 5 2 2 ; X 5 2 4 ; X 5 2 8 ; X 5 4 6 ; および / または X 5 6 4 の残基位置に、配列番号 4 と比較した 1 個または複数の残基の差異を含むポリペプチドをコードする。

40

【 0 1 8 7 】

一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 および / または 2 3 から選択されるポリヌクレオチド配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。一

50

部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号2、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21および/または23に対し少なくとも80%、85%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%のヌクレオチド残基同一性を有する。

#### 【0188】

一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、高度にストリンジェントな条件下で、配列番号2、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21および/または23から選択される参照ポリヌクレオチド配列またはその相補体、または本明細書に提示されているバリエーションPALポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができる。一部の実施形態において、高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、X39; X54; X59; X73; X91; X158; X112、X134、X180; X195; X240; X243; X245; X256; X257; X270; X290; X304、X305; X307; X308; X326; X349; X353; X364; X394; X399; X400; X404; X407; X443; X453; X459; X460; X463; X474; X509; X521; X522; X524; X528; X546; および/またはX564から選択される残基位置に、配列番号4と比較した1個または複数の残基の差異を有するアミノ酸配列を含むPALポリペプチドをコードする。

#### 【0189】

一部の実施形態において、本明細書における操作されたPALポリペプチドのいずれかをコードする単離されたポリヌクレオチドは、種々の仕方で操作されて、PALポリペプチドの発現を容易にする。一部の実施形態において、PALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、PALポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの発現を調節するための1種または複数の制御配列が存在する発現ベクターを含む。ベクターへのその挿入に先立つ単離されたポリヌクレオチドの操作は、利用される発現ベクターに応じて望ましくまたは必要となり得る。組換えDNA方法を利用した、ポリヌクレオチドおよび核酸配列を修飾するための技法は、本技術分野において周知のものである。一部の実施形態において、制御配列は、プロモーター、リーダー配列、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、シグナルペプチド配列および転写ターミネーターをとりわけ含む。一部の実施形態において、適したプロモーターは、宿主細胞選択に基づき選択される。細菌宿主細胞に関して、本開示の核酸構築物の転写を導くために適したプロモーターとして、*E. coli lac* オペロン、*Streptomyces coelicolor* アガラゼ遺伝子 (*dagA*)、*Bacillus subtilis* レバンスクラゼ遺伝子 (*sacB*)、*Bacillus licheniformis* アルファ - アミラーゼ遺伝子 (*amyL*)、*Bacillus stearothermophilus* マルトース生成型アミラーゼ遺伝子 (*amyM*)、*Bacillus amyloliquefaciens* アルファ - アミラーゼ遺伝子 (*amyQ*)、*Bacillus licheniformis* ペニシリナーゼ遺伝子 (*penP*)、*Bacillus subtilis xylA* および *xylB* 遺伝子ならびに原核生物ベータ - ラクタマーゼ遺伝子から得られるプロモーター (例えば、Villa-Kamaroffら、Proc. Natl Acad. Sci. USA 75巻: 3727~3731頁 [1978年] を参照) と共に *tac* プロモーター (例えば、DeBoerら、Proc. Natl Acad. Sci. USA 80巻: 21~25頁 [1983年] を参照) が挙げられるがこれらに限定されない。糸状真菌宿主細胞のための例示的なプロモーターとして、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、*Aspergillus niger* 中性アルファ - アミラーゼ、*Aspergillus niger* 酸安定的アルファ - アミラーゼ、*Aspergillus niger* または *Aspergillus awamori* グルコアミラーゼ (*glaA*)、*Rhizomucor miehei* リパーゼ、*Aspergillus oryzae* アルカリプロテアーゼ、*Aspergillus oryzae* トリオスリン酸イソメラーゼ、*Aspergillus nidulans* ア

10

20

30

40

50

セトアミダーゼおよび *Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼの遺伝子から得られるプロモーター（例えば、WO96/00787を参照）と共に NA2-tpi プロモーター（*Aspergillus niger* 中性アルファ-アミラーゼおよび *Aspergillus oryzae* トリオースリン酸イソメラーゼの遺伝子由来のプロモーターのハイブリッド）、ならびにこれらの突然変異体、トランケート型およびハイブリッドプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。例示的な酵母細胞プロモーターは、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ（ENO-1）、*Saccharomyces cerevisiae* ガラクトキナーゼ（GAL1）、*Saccharomyces cerevisiae* アルコール脱水素酵素/グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（ADH2/GAP）および *Saccharomyces cerevisiae* 3-ホスホグリセリン酸キナーゼの遺伝子から得ることができる。酵母宿主細胞のための他の有用なプロモーターは、本技術分野において公知である（例えば、Romanosら、*Yeast* 8巻：423～488頁[1992年]を参照）。【0190】

10

一部の実施形態において、制御配列は、適した転写ターミネーター配列（即ち、転写を終結させるよう宿主細胞に認識される配列）でもある。一部の実施形態において、ターミネーター配列は、PALポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端に作動可能に連結される。最適な宿主細胞において機能的ないずれか適したターミネーターは、本発明における使用を見出す。糸状真菌宿主細胞のための例示的な転写ターミネーターは、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans* アントラニル酸合成酵素、*Aspergillus niger* アルファ-グルコシダーゼおよび *Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼの遺伝子から得ることができる。酵母宿主細胞のための例示的なターミネーターは、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ、*Saccharomyces cerevisiae* チトクロムC（CYC1）および *Saccharomyces cerevisiae* グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の遺伝子から得ることができる。酵母宿主細胞のための他の有用なターミネーターは、本技術分野において公知である（例えば、Romanosら、上記参照）。【0191】

20

30

一部の実施形態において、制御配列は、適したリーダー配列（即ち、宿主細胞による翻訳に重要なmRNAの非翻訳領域）でもある。一部の実施形態において、リーダー配列は、PALポリペプチドをコードする核酸配列の5'末端に作動可能に連結される。最適な宿主細胞において機能的ないずれか適したリーダー配列は、本発明における使用を見出す。糸状真菌宿主細胞のための例示的なリーダーは、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼおよび *Aspergillus nidulans* トリオースリン酸イソメラーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞に適したリーダーは、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ（ENO-1）、*Saccharomyces cerevisiae* 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、*Saccharomyces cerevisiae* アルファ-因子および *Saccharomyces cerevisiae* アルコール脱水素酵素/グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（ADH2/GAP）の遺伝子から得られる。【0192】

40

一部の実施形態において、制御配列は、ポリアデニル化配列（即ち、核酸配列の3'末端に作動可能に連結される配列であって、転写されると、転写されたmRNAにポリアデニン残基を付加するためのシグナルとして宿主細胞によって認識される配列）でもある。最適な宿主細胞において機能的ないずれか適したポリアデニル化配列は、本発明における使用を見出す。糸状真菌宿主細胞のための例示的なポリアデニル化配列として、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans* アントラニル酸合成酵

50

素、*Fusarium oxysporum*トリプシン様プロテアーゼおよび*Aspergillus niger*アルファ - グルコシダーゼの遺伝子が挙げられるがこれらに限定されない。酵母宿主細胞に有用なポリアデニル化配列は、公知のものである（例えば、GuoおよびSherman、*Mol. Cell. Bio.*、15巻：5983～5990頁[1995年]を参照）。

#### 【0193】

一部の実施形態において、制御配列は、シグナルペプチド（即ち、ポリペプチドのアミノ末端に連結され、コードされたポリペプチドを細胞の分泌経路へと方向づける、アミノ酸配列をコードするコード領域）でもある。一部の実施形態において、核酸配列のコード配列の5'端は、分泌型ポリペプチドをコードするコード領域のセグメントと翻訳読み枠において天然に連結された、シグナルペプチドコード領域を固有に含有する。あるいは、一部の実施形態において、コード配列の5'端は、該コード配列にとって外来性のシグナルペプチドコード領域を含有する。最適な宿主細胞の分泌経路へと発現されたポリペプチドを方向づけるいずれか適したシグナルペプチドコード領域は、操作されたポリペプチド（複数可）の発現のための使用を見出す。細菌宿主細胞のための有効なシグナルペプチドコード領域は、*Bacillus NC1B 11837*マルトース生成型アミラーゼ、*Bacillus stearothermophilus*アルファ - アミラーゼ、*Bacillus licheniformis*スプチリシン、*Bacillus licheniformis*ベータ - ラクターゼ、*Bacillus stearothermophilus*中性プロテアーゼ（nprT、nprS、nprM）および*Bacillus subtilis prsA*の遺伝子から得られる領域等が挙げられるがこれらに限定されないシグナルペプチドコード領域である。さらに別のシグナルペプチドは、本技術分野において公知である（例えば、SimonenおよびPalva、*Microbiol. Rev.*、57巻：109～137頁[1993年]を参照）。一部の実施形態において、糸状真菌宿主細胞のための有効なシグナルペプチドコード領域として、*Aspergillus oryzae* T A K Aアミラーゼ、*Aspergillus niger*中性アミラーゼ、*Aspergillus niger*グルコアミラーゼ、*Rhizomucor miehei*アスパラギン酸プロテイナーゼ、*Humicola insolens*セルラーゼおよび*Humicola lanuginosa*リパーゼの遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域が挙げられるがこれらに限定されない。酵母宿主細胞のための有用なシグナルペプチドとして、*Saccharomyces cerevisiae*アルファ - 因子および*Saccharomyces cerevisiae*インベルターゼの遺伝子由来のシグナルペプチドが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0194】

一部の実施形態において、制御配列は、ポリペプチドのアミノ末端に配置されたアミノ酸配列をコードする、プロペプチドコード領域でもある。その結果得られるポリペプチドは、「プロ酵素」、「プロポリペプチド」または「チモーゲン」と称される。プロポリペプチドは、プロポリペプチドからのプロペプチドの触媒性または自己触媒性切断によって、成熟活性ポリペプチドへと変換され得る。プロペプチドコード領域は、*Bacillus subtilis*アルカリプロテアーゼ（aprE）、*Bacillus subtilis*中性プロテアーゼ（nprT）、*Saccharomyces cerevisiae*アルファ - 因子、*Rhizomucor miehei*アスパラギン酸プロテイナーゼおよび*Myceliophthora thermophila*ラクターゼの遺伝子等が挙げられるがこれらに限定されない、いずれか適した供給源から得ることができる（例えば、WO95/33836を参照）。ポリペプチドのアミノ末端にシグナルペプチドおよびプロペプチド領域の両方が存在する場合、プロペプチド領域は、ポリペプチドのアミノ末端の隣に配置され、シグナルペプチド領域は、プロペプチド領域のアミノ末端の隣に配置される。

#### 【0195】

一部の実施形態において、調節配列も利用される。この配列は、宿主細胞の増殖に対す

10

20

30

40

50

るポリペプチドの発現の調節を容易にする。調節系の例は、調節化合物の存在を含む化学的または物理的刺激に応答して遺伝子の発現をオンまたはオフにする調節系である。原核生物宿主細胞において、適した調節配列として、*lac*、*tac*および*trp*オペレーター系が挙げられるがこれらに限定されない。酵母宿主細胞において、適した調節系として、*ADH2*系または*GAL1*系が挙げられるがこれらに限定されない。糸状真菌において、適した調節配列として、*TAKA*アルファ-アミラーゼプロモーター、*Aspergillus niger*グルコアミラーゼプロモーターおよび*Aspergillus oryzae*グルコアミラーゼプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0196】

別の態様において、本発明は、操作されたPALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、これを導入しようとする宿主の種類に応じて、プロモーターおよびターミネーター等の1種または複数の発現調節領域や複製起点等を含む組換え発現ベクターを対象とする。一部の実施形態において、本明細書に記載されている様々な核酸および制御配列が一体に接続されて、当該部位にPALポリペプチドをコードする核酸配列の挿入または置換を可能にする、1種または複数の簡便な制限部位を含む組換え発現ベクターを産生する。あるいは、一部の実施形態において、本発明の核酸配列は、発現のための適切なベクターへと核酸配列または該配列を含む核酸構築物を挿入することにより発現される。一部の実施形態において、発現ベクターの作製に關与して、コード配列は、該コード配列が、発現のための適切な制御配列と作動可能に連結され得るように、ベクター内に位置する。

#### 【0197】

組換え発現ベクターは、組換えDNA手順に簡便に付され、PALポリヌクレオチド配列の発現をもたらすことができる、いずれか適したベクター（例えば、プラスミドまたはウイルス）となり得る。ベクターの選択は、典型的に、ベクターと、該ベクターを導入しようとする宿主細胞との適合性に依存する。ベクターは、直鎖状または閉環状プラスミドとなり得る。

#### 【0198】

一部の実施形態において、発現ベクターは、自律的に複製するベクター（即ち、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等、染色体外の実体として存在するベクターであり、その複製は、染色体の複製から独立している）である。ベクターは、自己複製を保証するためのいずれかの手段を含有することができる。一部の代替的实施形態において、ベクターは、宿主細胞に導入されると、ゲノム内に組み込まれ、それが組み込まれた染色体（複数可）と共に複製されるベクターである。さらに、一部の実施形態において、単一のベクターもしくはプラスミド、または宿主細胞のゲノムに導入しようとする全DNAを共に含有する2個もしくはそれを超えるベクターもしくはプラスミド、および/またはトランスポゾンが利用される。

#### 【0199】

一部の実施形態において、発現ベクターは、形質転換された細胞の容易な選択を可能にする、1種または複数の選択可能マーカ含有する。「選択可能マーカー」は、その産物が、殺生物剤またはウイルス抵抗性、重金属に対する抵抗性、栄養要求株に原栄養性その他をもたらす遺伝子である。細菌の選択可能マーカの例として、*Bacillus subtilis*もしくは*Bacillus licheniformis*由来の*dal*遺伝子、またはアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールもしくはテトラサイクリン抵抗性等、抗生物質抵抗性を付与するマーカーが挙げられるがこれらに限定されない。酵母宿主細胞のための適したマーカーとして、*ADE2*、*HIS3*、*LEU2*、*LYS2*、*MET3*、*TRP1*および*URA3*が挙げられるがこれらに限定されない。糸状真菌宿主細胞における使用のための選択可能マーカーとして、*amdS*（アセトアミダーゼ；例えば、*A. nidulans*または*A. oryzae*に由来）、*argB*（オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、*bar*（ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ；例えば、*S. hygroscopicus*に由来）、*hph*（ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、*niaD*（硝酸レダクターゼ）、*pyrG*（オロチジン

10

20

30

40

50

- 5' - リン酸デカルボキシラーゼ；例えば、*A. nidulans* または *A. oryzae* に由来)、*sC* (硫酸アデニルトランスフェラーゼ) および *trpC* (アントラニル酸合成酵素) ならびにこれらの均等物が挙げられるがこれらに限定されない。別の態様において、本発明は、本発明の少なくとも1種の操作されたPALポリペプチドをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドであって、宿主細胞における操作されたPAL酵素(複数可)の発現のための1種または複数の制御配列に動作可能に連結されているポリヌクレオチド(複数可)を含む宿主細胞を提供する。本発明の発現ベクターにコードされるポリペプチドの発現における使用に適した宿主細胞は、本技術分野において周知のものであり、その例として、*E. coli*、*Vibrio fluvialis*、*Streptomyces* および *Salmonella typhimurium* 細胞等、細菌細胞；酵母細胞(例えば、*Saccharomyces cerevisiae* または *Pichia pastoris* (ATCC受託番号201178))等、真菌細胞；*Drosophila S2* および *Spodoptera Sf9* 細胞等、昆虫細胞；CHO、COS、BHK、293 および Bowesメラノーマ細胞等、動物細胞；ならびに植物細胞が挙げられるがこれらに限定されない。例示的な宿主細胞は、様々な *Escherichia coli* 株(例えば、W3110 (*fhuA*) および BL21) も含む。

10

## 【0200】

したがって、別の態様において、本発明は、操作されたPALポリペプチドを産生する方法であって、ポリペプチドの発現に適した条件下で、操作されたPALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現することができる宿主細胞を培養するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態において、本方法は、本明細書に記載されているPALポリペプチドを単離および/または精製するステップをさらに含む。

20

## 【0201】

宿主細胞のための適切な培養培地および増殖条件は、本技術分野において周知のものである。PALポリペプチドの発現のためのポリヌクレオチドを細胞に導入するためのいずれか適した方法が、本発明において使用を見出すことが考慮される。適した技法として、電ポレーション、遺伝子銃・微粒子銃、リボソーム媒介性トランスフェクション、塩化カルシウムトランスフェクションおよびプロトプラスト融合が挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0202】

本明細書に開示されている特性を有する操作されたPALポリペプチドは、天然起源または操作されたPALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、本技術分野において公知のおよび/または本明細書に記載されているいずれか適した突然変異誘発および/または定向進化方法に付すことにより得ることができる。例示的な定向進化技法は、突然変異誘発および/またはDNAシャッフリングである(例えば、Stemmer、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻：10747~10751頁[1994年]；WO95/22625；WO97/0078；WO97/35966；WO98/27230；WO00/42651；WO01/75767および米国特許第6,537,746号を参照)。使用することができる他の定向進化手順は、ねじれ型伸長プロセス(ステップ)、*in vitro*組換え(例えば、Zhaoら、Nat. Biotechnol.、16巻：258~261頁[1998]を参照)、変異原性PCR(例えば、Caldwellら、PCR Methods Appl.、3巻：S136~S140頁[1994年]を参照)およびカセット突然変異誘発(例えば、Blackら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93巻：3525~3529頁[1996年]を参照)をとりわけ含む。

30

40

## 【0203】

突然変異誘発および定向進化方法をPALコードポリヌクレオチドに容易に適用して、発現、スクリーニングおよびアッセイすることができるバリエーションライブラリーを作製することができる。いずれか適した突然変異誘発および定向進化方法が、本発明における使用を見出し、これは本技術分野において周知のものである(例えば、これら全てここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する、米国特許第5,605,793

50

号、同第5, 830, 721号、同第6, 132, 970号、同第6, 420, 175号、同第6, 277, 638号、同第6, 365, 408号、同第6, 602, 986号、同第7, 288, 375号、同第6, 287, 861号、同第6, 297, 053号、同第6, 576, 467号、同第6, 444, 468号、同第5, 811238号、同第6, 117, 679号、同第6, 165, 793号、同第6, 180, 406号、同第6, 291, 242号、同第6, 995, 017号、同第6, 395, 547号、同第6, 506, 602号、同第6, 519, 065号、同第6, 506, 603号、同第6, 413, 774号、同第6, 573, 098号、同第6, 323, 030号、同第6, 344, 356号、同第6, 372, 497号、同第7, 868, 138号、同第5, 834, 252号、同第5, 928, 905号、同第6, 489, 146号、同第6, 096, 548号、同第6, 387, 702号、同第6, 391, 552号、同第6, 358, 742号、同第6, 482, 647号、同第6, 335, 160号、同第6, 653, 072号、同第6, 355, 484号、同第6, 03, 344号、同第6, 319, 713号、同第6, 613, 514号、同第6, 455, 253号、同第6, 579, 678号、同第6, 586, 182号、同第6, 406, 855号、同第6, 946, 296号、同第7, 534, 564号、同第7, 776, 598号、同第5, 837, 458号、同第6, 391, 640号、同第6, 309, 883号、同第7, 105, 297号、同第7, 795, 030号、同第6, 326, 204号、同第6, 251, 674号、同第6, 716, 631号、同第6, 528, 311号、同第6, 287, 862号、同第6, 335, 198号、同第6, 352, 859号、同第6, 379, 964号、同第7, 148, 054号、同第7, 629, 170号、同第7, 620, 500号、同第6, 365, 377号、同第6, 358, 740号、同第6, 406, 910号、同第6, 413, 745号、同第6, 436, 675号、同第6, 961, 664号、同第7, 430, 477号、同第7, 873, 499号、同第7, 702, 464号、同第7, 783, 428号、同第7, 747, 391号、同第7, 747, 393号、同第7, 751, 986号、同第6, 376, 246号、同第6, 426, 224号、同第6, 423, 542号、同第6, 479, 652号、同第6, 319, 714号、同第6, 521, 453号、同第6, 368, 861号、同第7, 421, 347号、同第7, 058, 515号、同第7, 024, 312号、同第7, 620, 502号、同第7, 853, 410号、同第7, 957, 912号、同第7, 904, 249号ならびにあらゆる関連する非米国特許対応文献; Lingら、Anal. Biochem.、254巻(2号): 157~78頁[1997年]; Daleら、Meth. Mol. Biol.、57巻: 369~74頁[1996年]; Smith、Ann. Rev. Genet.、19巻: 423~462頁[1985年]; Botsteinら、Science、229巻: 1193~1201頁[1985年]; Carter、Biochem. J.、237巻: 1~7頁[1986年]; Kramerら、Cell.、38巻: 879~887頁[1984年]; Wellsら、Gene.、34巻: 315~323頁[1985年]; Minshullら、Curr. Op. Chem. Biol.、3巻: 284~290頁[1999年]; Christiansら、Nat. Biotechnol.、17巻: 259~264頁[1999年]; Crameriら、Nature.、391巻: 288~291頁[1998年]; Crameriら、Nat. Biotechnol.、15巻: 436~438頁[1997年]; Zhangら、Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.、94巻: 4504~4509頁[1997年]; Crameriら、Nat. Biotechnol.、14巻: 315~319頁[1996年]; Stemmer、Nature.、370巻: 389~391頁[1994年]; Stemmer、Proc. Nat. Acad. Sci. USA.、91巻: 10747~10751頁[1994年]; W O 9 5 / 2 2 6 2 5 ; W O 9 7 / 0 0 7 8 ; W O 9 7 / 3 5 9 6 6 ; W O 9 8 / 2 7 2 3 0 ; W O 0 0 / 4 2 6 5 1 ; W O 0 1 / 7 5 7 6 7 ; W O 2 0 0 9 / 1 5 2 3 3 6 および米国特許第6, 537, 746号を参照)。

【0204】

一部の実施形態において、突然変異誘発処理後に得られる酵素クローンは、酵素調製物

10

20

30

40

50

を規定の温度（または他のアッセイ条件）に付し、熱処理または他の適したアッセイ条件後に残存する酵素活性の量を測定することによりスクリーニングされる。次に、遺伝子からPALポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するクローンを単離し、配列決定してヌクレオチド配列変化（あるとすれば）を同定し、宿主細胞における酵素の発現に使用する。発現ライブラリーからの酵素活性の測定は、本技術分野において公知のいずれか適した方法（例えば、HPLC分析等、標準生化学技法）を使用して行うことができる。

#### 【0205】

公知配列の操作されたポリペプチドのため、酵素をコードするポリヌクレオチドは、公知合成方法に従った標準固相方法により調製することができる。一部の実施形態において、最大約100塩基の断片を個々に合成し、続いて接続（例えば、酵素もしくは化学的ライゲーション（ligation）方法またはポリメラーゼ媒介性方法により）して、いずれか所望の連続的配列を形成することができる。例えば、本明細書に開示されているポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、自動合成方法において典型的に実施されることから、古典的ホスホラミダイト方法（例えば、Beaucageら、Tet. Lett.、22巻：1859～69頁[1981年]；およびMatthesら、EMBO J.、3巻：801～05頁[1984年]を参照）を使用した化学合成により調製することができる。ホスホラミダイト方法に従って、オリゴヌクレオチドは、合成（例えば、自動DNA合成機において、精製、アニール、ライゲーションおよび適切なベクターにクローニング）される。

#### 【0206】

したがって、一部の実施形態において、操作されたPALポリペプチドを調製するための方法は、（a）本明細書に記載されているいずれかのバリエーションのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを合成するステップと、（b）ポリヌクレオチドにコードされたPALポリペプチドを発現させるステップを含むことができる。本方法の一部の実施形態において、ポリヌクレオチドにコードされたアミノ酸配列は、1個または数個（例えば、最大3、4、5または最大10個）のアミノ酸残基欠失、挿入および/または置換を任意選択で有することができる。一部の実施形態において、アミノ酸配列は、1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～15、1～20、1～21、1～22、1～23、1～24、1～25、1～30、1～35、1～40、1～45または1～50個のアミノ酸残基欠失、挿入および/または置換を任意選択で有する。一部の実施形態において、アミノ酸配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、30、35、40、45または50個のアミノ酸残基欠失、挿入および/または置換を任意選択で有する。一部の実施形態において、アミノ酸配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20、21、22、23、24または25個のアミノ酸残基欠失、挿入および/または置換を任意選択で有する。一部の実施形態において、置換は、保存的または非保存的置換である。

#### 【0207】

発現された操作されたPALポリペプチドは、本明細書に記載されているアッセイおよび条件等が挙げられるがこれらに限定されない、本技術分野において公知のいずれか適したアッセイを使用して、いずれか所望の改善された特性または特性の組合せ（例えば、活性、選択性、安定性、酸耐性、プロテアーゼ感受性等）に関して評価することができる。

#### 【0208】

一部の実施形態において、宿主細胞において発現された操作されたPALポリペプチドのいずれかは、リゾチーム処理、超音波処理、濾過、塩析、超遠心およびクロマトグラフィーをとりわけ含む、タンパク質精製のための周知技法のうちいずれか1種または複数を使用して、細胞および/または培養培地から回収される。

#### 【0209】

PALポリペプチドの単離のためのクロマトグラフィー技法は、逆相クロマトグラフィー



一、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、ゲル電気泳動およびアフィニティークロマトグラフィーをとりわけ含む。特定の酵素を精製するための条件は、一部には、正味電荷、疎水性、親水性、分子量、分子形状等の因子に依存し、当業者であれば明らかとなる。一部の実施形態において、親和性技法を使用して、改善されたP A L酵素を単離することができる。アフィニティークロマトグラフィー精製のため、目的のP A Lポリペプチドに特異的に結合するいずれかの抗体が、使用を見出すことができる。抗体の産生のため、ウサギ、マウス、ラット等が挙げられるがこれらに限定されない様々な宿主動物が、P A Lポリペプチドまたはその断片の注射により免疫化される。一部の実施形態において、P A Lポリペプチドまたは断片は、側鎖官能基または側鎖官能基に取り付けられたリンカーによって、B S A等の適した担体に取り付けられる。

10

#### 【0210】

一部の実施形態において、本明細書に記載されている操作されたP A Lポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞（例えば、E . c o l i株）を、操作されたP A Lポリペプチドの産生の助けになる条件下で培養するステップと、細胞および/または培養培地から操作されたP A Lポリペプチドを回収するステップとを含む方法によって、操作されたP A Lポリペプチドは、宿主細胞において産生される。一部の実施形態において、宿主細胞は、2種以上の操作されたP A Lポリペプチドを産生する。

#### 【0211】

一部の実施形態において、本発明は、操作されたP A Lポリペプチドを産生する方法であって、参照配列の配列番号4に対し少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有し、配列番号4のアミノ酸配列と最適に整列された場合、X39; X91; X158; X180; X195; X243; X245; X256; X257; X270; X290; X307; X308; X326; X349; X364; X394; X399; X400; X404; X407; X443; X453; X459; X460; X463; X474; X522; X524; およびX528またはこれらの組合せから選択される、配列番号4と比較した1個または複数のアミノ酸残基の差異を有する操作されたP A Lポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む組換え細菌細胞を、操作されたP A Lポリペプチドの産生に適した培養条件下で培養するステップと、培養物および/または培養された細菌細胞から操作されたP A Lポリペプチドを任意選択で回収するステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態において、宿主細胞は、2種以上の操作されたP A Lポリペプチドを産生する。

20

30

#### 【0212】

一部の実施形態において、組換え宿主細胞および/または培養培地から操作されたP A Lポリペプチドが回収されたら、本技術分野において公知のいずれか適した方法（複数可）によりこれをさらに精製する。一部の追加的な実施形態において、精製されたT A Lポリペプチドは、他の成分および化合物と組み合わせられて、異なる適用および使用（例えば、医薬組成物）の必要に応じて、操作されたP A Lポリペプチドを含む組成物および製剤をもたらす。

#### 【0213】

組成物：

本発明は、多数の組成物における使用に適した操作されたP A Lポリペプチドを提供する。このような組成物は、医薬品、食物性/栄養性補助食品、食物、飼料および精製化学製品産生等が挙げられるがこれらに限定されない、多くの分野における使用を見出す。例えば、一部の実施形態において、本発明は、少なくとも1種の操作されたP A Lバリエーションおよび/または少なくとも1種のP A Lバリエーションをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチド配列を含む食物および/または飼料を提供する。一部の実施形態において、本発明は、少なくとも1種の操作されたP A Lバリエーションを含む飲料を提供する。

40

#### 【0214】

一部の実施形態において、食物、飼料および/または栄養性/食物性補助食品における

50

操作された P A L バリエーションは、グリコシル化されている。さらに、操作された P A L バリエーションは、いずれか適した食用酵素送達マトリックスにおける使用を見出す。一部の実施形態において、操作された P A L バリエーションは、バリエーション摂取後の動物の消化管内における P A L バリエーションの迅速な分散のために設計された食用酵素送達マトリックス中に存在する。

#### 【 0 2 1 5 】

本発明は、精製化学製品および他の産業的に重要な化合物の産生における使用に適した操作された P A L ポリペプチドも提供する（例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 4 0 1 1 9 号、同第 2 0 1 3 / 0 0 0 5 0 1 2 号および同第 2 0 0 5 / 0 2 6 0 7 2 4 号ならびに W O 2 0 1 2 / 1 2 2 3 3 3 を参照）。

10

#### 【 0 2 1 6 】

医薬品および他の組成物

本発明は、食物性 / 栄養性補助食品等、医薬品および他の組成物における使用に適した操作された P A L ポリペプチドを提供する。

#### 【 0 2 1 7 】

投与機序に応じて、本発明に係る治療有効量の操作された P A L を含むこのような組成物は、固体、半固体または液体の形態である。一部の実施形態において、組成物は、希釈剤、バッファー、賦形剤、塩、乳化剤、保存剤、安定剤、充填剤および他の成分等、他の薬学的に許容される構成成分を含む。製剤および投与のための技法に関する詳細は、本技術分野において周知のものであり、文献に記載されている。

20

#### 【 0 2 1 8 】

一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、経口医薬組成物における使用のために製剤化される。操作された P A L ポリペプチドの送達における使用のためのいずれか適した形式が、本発明における使用を見出し、その例として、丸剤、錠剤、ジェルトブ、カプセル、ロゼンジ、糖衣錠、粉末、軟ゲル、ゾル - ゲル、ゲル、エマルション、植込剤、パッチ、スプレー、軟膏、リニメント、クリーム、ペースト、ゼリー、ペイント、エアゾール、チューインガム、粘滑剤、スティック、懸濁液（油ベースの懸濁液、水中油型エマルションが挙げられるがこれらに限定されない）、スラリー、シロップ、制御放出製剤、坐剤等が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、注射に適した形式で提供される（即ち、注射用製剤において）。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、シリカベースの（例えば、オキシシラン）ゾル - ゲルを含むゾル - ゲル等、生体適合性マトリックス中に提供される。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、カプセル包埋される。一部の代替的实施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、ナノ構造（例えば、ナノチューブ、ナノ細管、ナノカプセルまたはマイクロカプセル、マイクロスフェア、リポソーム等）中にカプセル包埋される。実際に、本発明が、いずれか特定の送達製剤および / または送達手段に限定されることは企図されない。操作された P A L ポリペプチドが、非経口、経口、外用、経皮、鼻腔内、眼内、くも膜下腔内、植込剤経路等が挙げられるがこれらに限定されない、本技術分野において公知のいずれか適した手段により投与されることが企図される。

30

40

#### 【 0 2 1 9 】

一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、グリコシル化、ペグ化（即ち、ポリエチレングリコール [ P E G ] または活性化された P E G 等により修飾）または他の化合物によって化学修飾される（例えば、Ikeda、Amino Acids 29 巻：283 ~ 287 頁 [ 2 0 0 5 年 ] ; 米国特許第 7 , 5 3 1 , 3 4 1 号、同第 7 , 5 3 4 , 5 9 5 号、同第 7 , 5 6 0 , 2 6 3 号および同第 7 , 5 3 , 6 5 3 号 ; 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 0 3 9 8 9 8 号、同第 2 0 1 2 / 0 1 7 7 7 2 2 号等を参照）。実際に、本発明が、いずれか特定の送達方法および / または機構に限定されることは企図されない。

#### 【 0 2 2 0 】

一部の追加的な実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、マトリックス安

50

定化された酵素結晶を含む製剤中に提供される。一部の実施形態において、製剤は、架橋された結晶性の操作された P A L 酵素と、酵素結晶に接着する反応性部分を有するポリマーを含む。本発明は、ポリマーにおける操作された P A L ポリペプチドも提供する。

#### 【0221】

一部の実施形態において、本発明の操作された P A L ポリペプチドを含む組成物は、糖（例えば、ラクトース、スクロース、マンニトールおよび/またはソルビトール）、デンプン（例えば、トウモロコシ、コムギ、イネ、ジャガイモまたは他の植物のデンプン）、セルロース（例えば、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボキシ-メチルセルロース）、ガム（例えば、アラビア、トラガント、グアー等）および/またはタンパク質（例えば、ゼラチン、コラーゲン等）等が挙げられるがこれらに限定されない、1種または複数の一般的に使用される担体化合物を含む。経口製剤における追加的な構成成分は、着色および/または甘味料（例えば、グルコース、スクロースおよびマンニトール）および潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム）ならびに腸溶コーティング（例えば、メタクリレートポリマー、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートおよび/または本技術分野において公知の他のいずれかの適した腸溶コーティング）を含むことができる。一部の実施形態において、崩壊または可溶化剤が含まれる（例えば、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸またはアルギン酸ナトリウム等のその塩）。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、保存剤、懸濁化剤、増粘剤、湿潤剤、アルコール、脂肪酸および/または乳化剤（特に液体製剤において）等が挙げられるがこれらに限定されない、様々な追加的な構成成分と組み合わせられる。

10

20

#### 【0222】

一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、保存剤、懸濁化剤、増粘剤、湿潤剤、アルコール、脂肪酸および/または乳化剤（特に液体製剤において）等が挙げられるがこれらに限定されない、様々な追加的な構成成分と組み合わせられる。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、K U V A N（登録商標）テトラヒドロピオプテリン（BioMarin Pharmaceutical, Inc.、カリフォルニア州ノバト）、制酸剤（例えば、オメプラゾール、エソメプラゾールおよび他のプラゾール類）および他のいずれか適した化合物等が挙げられるがこれらに限定されない、P K U の処置において使用される他の化合物と組み合わせて対象に投与される。

30

#### 【0223】

一部の実施形態において、本発明は、血液や脳脊髄液等の流体におけるフェニルアラニンの濃度の減少における使用に適した、操作された P A L ポリペプチドを提供する。動物に投与される操作された P A L ポリペプチド（複数可）の投薬量は、動物の状態または疾患、全身状態および当業者に公知の他の因子に依存する。一部の実施形態において、組成物は、動物への単一または複数投与に企図される。一部の実施形態において、動物（例えば、P K U のヒト）に投与される組成物（複数可）における操作された P A L ポリペプチド（複数可）の濃度は、疾患（例えば、P K U および/または P K U 関連の状態、疾患および/または症状）を有効に処置、寛解および/または防止するのに十分であることが考慮される。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、他の医薬品および/または食物性組成物と組み合わせて投与される。

40

#### 【0224】

##### 産業的組成物

本発明の操作された P A L ポリペプチドが、産業的組成物における使用を見出すことが考慮される。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、食品および/または飼料産業における使用のために製剤化される。一部の実施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、追加的な酵素（例えば、セルラーゼ、ラッカーゼおよびアマラーゼ）等、動物飼料構成成分と混合される、顆粒化またはペレット化された産物において製剤化される。一部の代替的实施形態において、操作された P A L ポリペプチドは、液体の動物飼料組成物（例えば、水性または油ベースのスラリー）において使用される。よっ

50

て、一部の実施形態において、本発明の操作されたPALバリエーションは、ペレットおよび他の加工される飼料/食品の産生に使用される処理に耐えるために十分に熱耐性および熱安定的である。

【0225】

本発明の操作されたPALバリエーションは、フェニルアラニンおよび/またはフェニルアラニン誘導体の産生においても使用を見出す。

【0226】

本発明の前述および他の態様は、次の非限定例に関してよりよく理解することができる。実施例は、単なる説明目的のために提供されており、決して本発明の範囲の限定を企図するものではない。

【0227】

実験

実験および達成された結果を含む次の実施例は、単なる説明目的のために提供されており、本発明を限定するものと解釈するべきではない。

【0228】

後述する実験の開示において、次の略語が適用される：ppm（百万分率）；M（モル濃度）；mM（ミリモル濃度）、uMおよびμM（マイクロモル濃度）；nM（ナノモル濃度）；mol（モル）；gmおよびg（グラム）；mg（ミリグラム）；ugおよびμg（マイクログラム）；Lおよびl（リットル）；mlおよびmL（ミリリットル）；cm（センチメートル）；mm（ミリメートル）；umおよびμm（マイクロメートル）；sec.（秒間）；min（複数可）（分間（複数可））；h（複数可）およびhr（複数可）（時間（複数可））；U（ユニット）；MW（分子量）；rpm（毎分回転数）；psiおよびPSI（ポンド/平方インチ）；（セ氏温度）；RTおよびrt（室温）；CDS（コード配列）；DNA（デオキシリボ核酸）；RNA（リボ核酸）；E. coli W3110（一般的に使用される研究用E. coli株、Coli Genetic Stock Center [CGSC]、コネチカット州ニューヘイブンから入手）；HTP（ハイスループット）；HPLC（高圧液体クロマトグラフィー）；CFSE（カルボキシフルオセインサクシニミジルエステル）；IPTG（イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド）；PES（ポリエーテルスルホン）；PHEおよびphe（フェニルアラニン）；BSA（ウシ血清アルブミン）；PBMC（末梢血単核細胞）；PKU（フェニルケトン尿症）；MHC（主要組織適合遺伝子複合体）；HLA（ヒト白血球抗原）；HLA-DR（染色体番号6におけるHLA複合体にコードされる、MHCクラスII細胞表面受容体）；FIOPC（陽性対照を上回る倍数改善）；LB（ルリアブロス（Luria broth））；Athens Research（Athens Research Technology、ジョージア州アセンズ）；ProSpec（ProSpec Tany Technogene、ニュージャージー州イーストブランズウィック）；Sigma-Aldrich（Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイス）；Ram Scientific（Ram Scientific, Inc.、ニューヨーク州ヨンカーズ）；Pall Corp.（Pall, Corp.、ニューヨーク州ポートワシントン）；Millipore（Millipore, Corp.、マサチューセッツ州ビレリカ）；Difco（Difco Laboratories、BD

Diagnostic Systems、ミシガン州デトロイト）；Molecular Devices（Molecular Devices, LLC、カリフォルニア州サンバーベル）；Kuhner（Adolf Kuhner、AG、スイス、バーゼル）；Cambridge Isotope Laboratories（Cambridge Isotope Laboratories, Inc.、マサチューセッツ州テュークスベリー）；Applied Biosystems（Applied Biosystems、Life Technologies, Corp.の一部、ニューヨーク州グランドアイランド）；Agilent（Agilent Technologies, Inc.、カリフォルニア州サンタクララ）；Thermo Scientific（Thermo

10

20

30

40

50

Fisher Scientificの一部、マサチューセッツ州ウォルサム) ; Corning (Corning、Inc.、カリフォルニア州パロアルト) ; Constant Systems (Constant Systems Ltd.、英国ダベントリー) ; Megazyme (Megazyme International、アイルランド、ウィックロー) ; Enzo (Enzo Life Sciences、Inc.、ニューヨーク州ファーマーグデール) ; GE Healthcare (GE Healthcare Bio-Sciences、ニュージャージー州ピスカタウェイ) ; Harlan (Harlan Laboratories、インディアナ州インディアナポリス) ; AB Sciex (AB Sciex、マサチューセッツ州フレイミングハム) ; ならびに Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories、カリフォルニア州ハーキュリーズ)。

10

## 【0229】

次のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、本発明における使用を見出す。場合によっては(下に示す通り)、ポリヌクレオチド配列に続き、コードされるポリペプチドを記す。

## 【化1】

pET16b-AvPAL発現ベクターのポリヌクレオチド配列(配列番号1) :

TCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATT  
 GCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCA  
 CCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGGCTCTTGC  
 GGGATATCCGGATATAGTTCCTCCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGC  
 CCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACCTCAGCTTCCTTTTCG  
 GGCTTTGTTAGCAGCCGGATCCTTAATGCAGACACGGCAGAATGTCCTGAACGGCCTGA  
 ACAATAACACCACCGGCTGCAATATCTGCACTAATACGTGCAATATGTTTCATCCAGACCC  
 TGTTCAATTATCATTCCAAATATACGGACGATCTGAGGTCGGTTTCTGACCAACAACATGA  
 CGAACTGCGCTATACAGACGTTCCGGTTGCCGGTGACAGACAGGCACGTGCATCATAATG  
 ACCGGTTTTTTTTGTAGGTACGCAGATCAACTGCCTGAACACCAAACATCAGGGCAATGGC  
 AACATAATTCTGAAAAATATCAACGCTACGACGTGCCAGGGTTGCGCTGGTATAACCCTG  
 GCTGTTAATATTCTGGTTAAACTGTTCCGGCATGGGTCCGAAAACGATCTGCAATACTATT  
 ACCATAAAAGGTCAGCAGCGGCATAATGCTATTACCGCAAATCTGCAGACCTTTTCAGAC  
 CCATATTAACCTTACGTTACGATTACCCAGCAGACTCGGAGGCAGACCATTGCTAAATT  
 CCGGTGATGCCAGCAGTGCAATCTGAACATCCAGATGTTTTGCCAGCAGACCGATATAAT  
 AGCGCAGATGATCCATACCCATACCAACATACTGACCCAGAAAATTACCACCATGATAG  
 CTTGCCTGATTATCAACATCAATCAGCGGGTTATCGGTAACGCTGTTAATCTCAATTTTCG  
 ATTTGTTTGGCAATCTGGCTAATACCATCAACAATCGGACCCAGATACTGCGGCAGACAA  
 CGCAGGCTATAACGATCCTGGATCAGTTCATGATCACGATAATCATGTTTACCATCCAGT  
 TCATCACGAACCAGCTGGCTATTGGCCAGCAGGCTAATCATCTGATCTGCTGCCACAGC

20

30

40

50

【化 2】

TGACCCGGATGCGGTTTGTCTGTTATGGATAAACGGATGAAAAGCTCTGATTTGTACCATTC  
 AGTGCCTGAATATCCAGTGCATGAACACCCATTGCAATTGCGGTCAGAATCTGGGTATCA  
 TAAACACAATTTGCTGCAATACCGGTCATAACGCTGGTGCCATTTCATTGCCAGACCT  
 TCTTTCCGGCAGCAGGGTCAGCGGACTCAGATTAGCTGACGCAGTGCGGTCCGGTGCCTCC  
 ATTTCTTTGCCATTAATAAACAACCTTTAAAGCTCGGGTCCAGGCCAATCAGGCTACCGGTA  
 ATATAGCTCAGCGGAACCAGATCACCGCTGGCACCAATGCTACCAAATTCATAAACATA  
 CGGGGTAAACACCGGCATTAGAAAAGATTTCCATGCGTTTAATCAGTTCCAGACGAATACC  
 GCTTGACCCACGCATGTGGCTATTTGCACGCAGCAGCATTGCTGCACGAACATCTGCCAG  
 CGGCAGTTTATTACCTGCACCGGTTTTTCAGAAAACCAACCAGATTGGTCTGCAGTTCGCT  
 TGCCTGTTACAGGCTAATTGCAACATTTGCCATACCACCAAAAACCGCTGGTAACACCATA  
 AATCGGTTACCGCTTTCAACTGCATTATTGATATAATCACAGCTGGCCTGAATACCCTG  
 CAGAATATCGGTATTATTGGTCAGGCTAACAGGGTGCCATTACGGGCAACACGTGCAA  
 CATCATTGATGGTCAGTTTCTGATTACCAATAATCACATTTGCGCTGCTATTGCCGGTAAA  
 GCTAAACTGCTGGCTGCTGGTTTTGCTCTGTGCCCTGGCTCAGGGTTTTTCATATGACGACCT  
 TCGATATGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGCCATGGTATAT  
 CTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTGTTATCCGCTCACAAATTC  
 CCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCCGGGATCGAGATCTCGATCCTCTACGCCGGACGCA  
 TCGTGGCCGGCATCACCGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCTATATCGCCGACATCA  
 CCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTA  
 TGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCC  
 TTGCGGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGT  
 CGCATAAGGGAGAGCGTGCAGATCCCGGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTCCGCG  
 TATGGCATGATAGCGCCCGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAA  
 CGTTATACGATGTCGAGATATGCCGGTGTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGA  
 ACCAGGCCAGCCAGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGAAGCGGCGATGGCGGA  
 GCTGAATTACATTCACCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGA  
 TTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTTGTCGCGGCGATTA  
 AATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGC  
 GTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAAGTGGGCTGAT  
 CATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGT  
 TCCGGCGTTATTTCTGTATGTCTCTGACCAGACCCCATCAACAGTATTATTTCTCCCAT  
 GAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTGCATTGGGTCACCAGCAAATCGC  
 GCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCTGCTGCTGCTGGCTGGCTGGCATAA  
 ATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCA  
 TGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGC  
 TGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTG  
 CGCGTTGGTGGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTAT  
 ATCCCAGCGTTAACACCATCAAACAGGATTTTCGCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGAC  
 CGCTTGTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCA  
 CTGGTGAAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT  
 GGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAAGCGGGCAGTGAG  
 CGCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCGGGATCTCGACCGATGCC  
 TTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCC  
 GCATTTATGACTGTCTTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGG  
 GTCATTTTCCGGCAGGACCGCTTTCCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGTTGCG  
 GTATTCCGAATCTTGACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCAGCCACCAAACGT  
 TTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTT  
 GCTGGCGTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCATTATGATTCTTCTCGCTCCGG

10

20

30

40

50

【化 3】

CGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATC  
 AGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTTTACCAGCCTAACTTCGATCACTGGACCGC  
 TGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTG  
 TAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGCCGGG  
 CCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGCGGCGACCTCGCTAACGGATTACCACTCCAAGAA  
 TTGGAGCCAATCAATTCTTGCAGGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCTTGGCAGAAC  
 ATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGACGCGGCGCATCTCGGGCAGCGTTGGG  
 TCCTGGCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCTGTGCTTGGAGACCCGGCTAGGCTGGCGG  
 GGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTG  
 CTGCTGCAAAAACGTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTCCCGTGTTC  
 GTAAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGC  
 AGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTG  
 ACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAA  
 CGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTT  
 TCATCGGTATCATTACCCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCA  
 AACAGGAAAAAACCGCCCTTAAACATGGCCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTT  
 CTGGAGAAAACCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCA  
 CGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAA  
 CCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGA  
 GCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATG  
 ACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG  
 ATTGTAAGTACTGAGAGTGACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGA  
 AAATACCGCATCAGGCGCTTCCGCTTCCCTCGCTACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTT  
 GGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA  
 GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTA  
 AAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAA  
 ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTT  
 CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGT  
 CCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAG  
 TTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCCG  
 CCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATC  
 GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA  
 CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCT  
 GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAA  
 AAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA  
 AAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA  
 ACTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTT  
 TAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACA  
 GTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTATCCAT  
 AGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCC  
 CAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAA  
 ACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATC  
 CAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGGC  
 AACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCAT  
 TCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAG  
 CGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCAC  
 TCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC  
 TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTG

10

20

30

40

50

## 【化 4】

CTCTTGGCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCT  
 CATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATC  
 CAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGC  
 GTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGA  
 CACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGG  
 TTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGT  
 TCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGAC  
 ATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAAT( 配列番号 1)

## A v P A L O R F のポリヌクレオチド配列 (配列番号 2) :

ATGAAAACCCTGAGCCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGG  
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAAACTGACCATCAATGATGTTGCAC  
 GTGTTGCCGTAATGGCACCCCTGGTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTA  
 TTCAGGCCAGCTGTGATTATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTG  
 TTACCAGCGTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGCAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAA  
 CTGCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCA  
 GATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGAAGCGGTATT  
 CGTCTGGAAGTGAATAACGCATGGAAATCTTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTT  
 TATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCGCTGAGCTATATTACCGGT  
 AGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTAATGGCAAAGAAATGGACGC  
 ACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCT  
 GGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTATGATAC  
 CCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACTGAATGG  
 TACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGCTGTG  
 GGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCAATAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGG  
 ATGGTAAACATGATTATCGTGATCATGAACTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTC  
 TGCCGCAATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAA  
 TTGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATC  
 ATGGTGGTAATTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATAT  
 CGTCTGCTGGCAAAACATCTGGATGTTGAGATTGCACTGCTGGCATCACCGAATTTAG  
 CAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGCTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAA  
 AGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTAT  
 TGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTA  
 TACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAATTATGTTGCCATTGC  
 CCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAAACCGGTCATTATGA  
 TGCACGTGCCCTGTCTGTACCCGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTTCGTATGTTGT  
 TGGTCAGAAACCGACCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGG  
 ATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTACAGGCCG  
 TTCAGGACATCTGCCGTGCTGTCAT( 配列番号 2)

## W T A v P A L のポリヌクレオチド配列 (配列番号 3) :

ATGAAAACCCTGAGCCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGG  
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAAACTGACCATCAATGATGTTGCAC

10

20

30

40

50



## 【化 5】

GTGTTGCCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTA  
 TTCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTG  
 TTACCAGCGGTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGCAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAA  
 CTGCAGACCAATCTGGTTTTGGTTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCA  
 GATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGAACGCGTATT  
 CGTCTGGAAGTGAATAAACGCATGGAAATCTTTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTT  
 TATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTCCGCTGAGCTATATTACCGGT  
 AGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGACGC  
 ACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCT  
 GGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTATGATAC  
 CCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACTGAATGG  
 TACAAATCAGAGCTTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAGCTGTG  
 GGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCAATAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGG  
 ATGGTAAACATGATTATCGTGATCATGAACTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTC  
 TGCCGAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAA  
 TTGAGATTAACAGCGTTACCGATAAACCCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATC  
 ATGGTGGTAATTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATAT  
 CCGTCTGCTGGCAAACATCTGGATGTTGAGATTGCACTGCTGGCATCACCAGGAAATTTAG  
 CAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGCTGGGTAATCGTGAACGTAAGTTAATATGGGTCTGAA  
 AGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCGCGTCTGACCTTTTATGGTAATAGTAT  
 TGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACGTTAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTA  
 TACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAATTATGTTGCCATTG  
 CCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAAACCGGTATTATGA  
 TGCACGTGCCTGTCTGTCAACCGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTTCGTATGTTGT  
 TGGTCAGAAACCGACCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGG  
 ATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTATTGTTTCAGGCCG  
 TTCAGGACATTCTGCCGTGTCTGCAT ( 配列番号 3)

10

20

WT AvPALのポリペプチド配列 (配列番号 4) :

MKTLSSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS  
 CDYINNAVESGEPIYGVTSQFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA  
 MLLRANSHMRGASGIRLELIKRMIEIFLNAGVTPYVYEFQSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPF  
 KVDENKEMDAFTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVVYDQILTAIAMGV  
 HALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWAADQMISLLANSQVLRDELGKHHDYRDHELIQ  
 DRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDH  
 LRYIIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMLKGLQICGNSIMPLLTFYGN  
 SIADRFPPTHAEQFNQINSQGYTSATLARRSVDFQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKTGHYD  
 ARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNENEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDI  
 LPCLH ( 配列番号 4)

30

AvPALバリエント番号30のポリヌクレオチド配列 (配列番号5) :

ATGAAAACCCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACAGCAGCCAGCAGTTTACGTTTACCGG  
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAAACTGACCATCAATGATGTTGTACG  
 TGTTGCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTAT  
 TCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTGT  
 TACCAGCGGTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACT

40

## 【化 6】

GCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAG  
 ATGTTCTGTCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTC  
 GTCGGAACCTGATTAACGCATGGAATCTTTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTTT  
 ATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTCCGCTGAGCTATATTACCGGTA  
 GCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTAATGGCAAAGAAATGGACGCAC  
 CGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCTG  
 GCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTTGTGTTTATGATAACC  
 CAGATTTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTATGCACTGGATATTCAGGGACTGAATGGT  
 ACAAATCAGAGCTTTTATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAGCTGTGG  
 GCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGA  
 TGGTAAACATGATTATCGTGATCATGAACTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCT  
 GCCGCAGTATCTGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAAT  
 TGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCA  
 TGGTGGTAATTTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATC  
 GGTCTGCTGGCAAACATCTGGATGTTTCACTGCTGCTGGTATCACCAGGAAATTAAC  
 AATGGTCTGCTGCGAGTCTGGTGGGTAATCGTGAACGTAAGTTAATATGGGTCTGAAA  
 GGTCTGCAATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAAATAGTATT  
 GCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTAT  
 ACCAGCGCAACCCGCGTACGTCAGCGTTGATATTTTTTTCAGAATTATGTTGCCATTGCC  
 CTGATGTTTGGTGTTCAGCGAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCATTATGAT  
 GCACGTGCCTGTCTGTCACCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCGTATGTTGTT  
 GGTGAGTATCCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGAT  
 GAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTATTATTGTTACAGCCGTT  
 CAGGACATTCTGCCGTGTCTGCAT ( 配列番号 5)

10

20

A v P A Lバリエント番号30のポリペプチド配列 (配列番号6) :

MKTLTSAQSKTSSQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVVRVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS  
 CDYINNAVESGEPIYGVTSFGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA  
 MLLRANSHMRGASGIRLELIKMEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYTTGSLIGLDPSF  
 KVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGV  
 HALDIQGLNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDDGKHDIRDHELIQ  
 DRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDH  
 LRYIYIGLLAKHLDVQIALLSPEFNGLPASLVGNRERKVNMGKGLQICGNSIMPLLTFYG  
 NSIADRFPTHAEQFNQINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKTGHIY  
 DARACLSPATERLYSAVRHVVGQYPSSDRPYIWNQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ  
 DILPCLH ( 配列番号 6)

30

A v P A Lバリエント番号22のポリヌクレオチド配列 (配列番号7) :

ATGAAAACCCCTGAGCCAGGCACAGAGCAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGG  
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCAC  
 GTGTTGCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTA  
 TTCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTG  
 TTACCAGCGGTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGCAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAA

40

50

【化7】

CTGCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCA  
 GATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATT  
 CGTCTGGAATGATTAACCGCATGGAAATCTTTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTT  
 TATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTCCGCTGAGCTATATTACCGGT  
 AGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGACGC  
 ACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCTGCTGCCGAAAGAAGGTCT  
 GGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTATGATAC  
 CCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTATGCACTGGATATTCAGGCACTGAATGG  
 TACAAATCAGAGCTTTTATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGCTGTG  
 GCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCAATAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGG  
 ATGGTAAACATGATTATCGTGATGGTGAACCTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTC  
 TGCCGCGATATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAA  
 TTGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATC  
 ATGGTGGTAATTTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATAT  
 CCGTCTGCTGGCAAACATCTGGATGTTGATGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAG  
 CAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGCTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAA  
 AGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTAT  
 TGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTA  
 TACCAGCGCAACCCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAATTATGTTGCCATTGC  
 CCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCAATTATGA  
 TGCAGTGCCTGTCTGTACCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCGTGATGTTGT  
 TGGTCAGAAACCGACCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGG  
 ATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTAGGCGC  
 TTCAGGACATTCTGCCGTGTCTGCAT ( 配列番号 7)

10

A v P A Lバリエント番号22のポリペプチド配列 (配列番号8) :

MKTLSPAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS  
 CDYINNAVESGEPIYGVTSFGFGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA  
 MLLRANSHMRGASGIRLELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSP  
 KVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIMGV  
 HALDIQALNGTNSQSFPHFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLANSQLVRELDGKHHDYRDGELIQ  
 DRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIENSVDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDH  
 LRYIYGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPSSLGNRERKVNMLKGLQICGNSIMPLLTIFYGN  
 SIADRFPTHAEQFNQINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRTRYKKTGHYD  
 ARACLSPATERLYSAVRHVVGKQKPSDRPYIWNENEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDI  
 LPCLH ( 配列番号 8)

20

30

A v P A Lバリエント番号36のポリヌクレオチド配列 (配列番号9) :

ATGAAAACCCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAAACCGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGG  
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAAACTGACCATCAATGATGTTGTACG  
 TGTTGCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTAT  
 TCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTGT  
 TACCAGCGTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACT  
 GCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAG  
 ATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTCT  
 GTCTGGAATGATTAACCGCATGAAATCTTTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTTT  
 ATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCGCTGAGCTATATTACCGGTA

40

50

【化 8】

GCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGACGCAC  
 CGACCGACTGCGCTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCTG  
 GCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTATGATACC  
 CAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACCTGGATATTCAGGCCACTGAATGGT  
 ACAAATCAGAGCTTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCCGCATCCGGGTCAGCTGTGG  
 GCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGA  
 TGGTAAACATGATTATCGTGATGGTGAACCTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCT  
 GCCGCAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAAT  
 TGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCA  
 TGGTGGTAATTTTCTGGGTCAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATC  
 GGTCTGCTGGCAAACATCTGGATGTTTCAGATTGCACCTGCTGGCATCACCGGAATTTAGC  
 AATGGTCTGCTCCGAGTCTGGTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAA  
 GGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATT  
 GCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTAT  
 ACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAATTATGTTGCCATTGCC  
 CTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCCGGTCATTATGAT  
 GCACGTGCCTGTCTGTCACCGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCGTTCATGTTGTT  
 GGTGAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGA  
 TGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCCGT  
 TCAGGACATTCTGCCGTGTCTGCAT ( 配列番号 9)

10

A v P A Lバリエント番号36のポリペプチド配列 (配列番号10) :

20

MKTLQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVVRVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS  
 CDYINNAVESGEPIYGVTSFGFGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA  
 MLLRANSHMRGASGIRLELIKREIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPF  
 KVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGV  
 HALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDDGKHDIRDGLIQ  
 DRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIENSVDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDH  
 LRYIYGLLAKHLVDQIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVNMGKGLQICGNSIMPLLTFYGN  
 SIADRFPTHAEQFNQNSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKTGHYD  
 ARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPSDRPYIWNQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDI  
 LPCLH ( 配列番号 10)

30

A v P A Lバリエント番号42のポリヌクレオチド配列 (配列番号11) :

ATGAAAACCCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAAACCCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGC  
 AATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAAACTGACCATCAATGATGTTGTACGT  
 GTTGCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATAAAGATATTCTGCAGCGTATTCAGGC  
 CAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAAAGGTGAACCGATTTATGGTGTACCAGCGGTT  
 TTGGTGGTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGT  
 TTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTTCGTGCAGCAATGCTGC  
 TCGTGCAGCAATAGCCACATGCGTGGTGAACGGGATTCGTCTGGAAGTATTAAACGCATGGA  
 AATCTTTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTG  
 ATCTGGTCCGCTGAGCTATATTACCCGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGAT  
 TTTAATGGCAAAGAAATGGACGCACCGACCCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCC  
 TGCTGCCGAAAGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGTATTGCAGCAA

40

【化 9】

TTGTGTTTATGATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGG  
 CACTGAATGGTACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAG  
 CTGTGGGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGG  
 ATGGTAAACATGATTATATGGATGGTGAACCTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCCG  
 CAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTAA  
 CAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATTTTC  
 TGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTCTGCTGGCAAAACAT  
 CTGGATGTTGAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGGT  
 GGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTGCGGTAATAGCATT  
 ATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATTGACAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTT  
 TAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTT  
 TTCAGAATTATGTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAA  
 AAAACCGGTCAATTATGATGCACGTGCCAGCTGTACCAGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAG  
 TTCGTCATGTTGTTGGTAAAAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAG  
 GGTCTGGATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTATTATTGTTCA  
 GGCCGTTCAGGACATTCTGCCGCCGCTGCAT ( 配列番号 11)

10

A v P A Lバリエント番号 4 2 のポリペプチド配列 (配列番号 1 2) :

MKTL SQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVVRVARNGTLVSLTNNKDILQRIQASCDYIN  
 NAVEKGEPIYGVTSGFGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHM  
 RGASGIRLELIKRMIEIFLNAGVTPYVYEFSGISASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTA  
 LRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSMVTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPIH  
 NSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDDGKHDYMDGELIQDRYSLRCLP  
 QYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYIYIGLLAKHLDV  
 QIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVNMLKGLQICGNSIMPLLTFYGN SIADRFP THAEQFNQINISQ  
 GYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKTGHYDARAQLSPATERLYSAVRHVVGKKP  
 SSDRPYIWNENEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDILPLH ( 配列番号 12)

20

A v P A Lバリエント番号 4 3 のポリヌクレオチド配列 (配列番号 1 3) :

ATGAAAACCTGAGTCAGGCACAGAGCAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTACCAGCAATA  
 GCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGTACGTGTTGCCCGT  
 AATGGCACCTGGTTAGCCTGACCAATAATAAGATATTCTGCAGCGTATTAGGCCAGCTGTG  
 ATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAAACCGATTATGGTGTACCAGCGGTTTTGGTGGT  
 ATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTGGTTCT  
 GAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTCTGTCAGCAATGCTGCTGCCGTGCA  
 AATAGCCACATGCGTGGTGAAGCGGTATTCTGCTGGAAGTATTAAACGCATGGAAATCTTCT  
 GAATGCCGGTGTACCCTGATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTC  
 CGCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCC TGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAAATG  
 GCAAAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGC  
 GTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCAC  
 CAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTATGATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAA  
 TGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACTGAATGGTACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATC  
 CATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAGCTGTGGGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCG  
 GTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGATGGTAAACATGATTATATGGATGGTGAACCTGATCCA  
 GGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCCGAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGA  
 TTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAAT  
 CAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATTTCTGGGTGAGTA  
 TGTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTCTGCTGGCAAAACATCTGGATGTTT  
 AGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGGTGGGTAATCGT  
 GAACGTAAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCT

30

40

【化 1 0】

GACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAACCAGAATA  
 TTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTTCAGAATTAT  
 GTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCA  
 TTATGATGCACGTGCCAGCTGTCACCCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCGTCATGTTG  
 TTGGTAAAAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGATGA  
 ACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCCGTTTCAGGACA  
 TTCTGCCGAACCTGCAT ( 配列番号 13)

A v P A Lバリエント番号 4 3 のポリペプチド配列 (配列番号 1 4) :

10

MKTL SQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVVRVARNGTLVSLTNNKDILQRIQASCDYIN  
 NAVESGEPIYGVTSFGFGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHM  
 RGASGIRLELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGSASGLVPLSYITGSLIGLDPSPFKVDFNGKEMDAPTA  
 LRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSMVTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPIH  
 NSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDTGKHDMYDGLIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQ  
 IEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYIIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPP  
 SLVGNRERKVNMGKGLQICGNSIMPLLTFYGNISADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDF  
 QNYVAIALMFGVQAVDLRITYKKTGHYDARAQLSPATERLYSAVRHVVGKKPSSDRPYIWNENEQ  
 LDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDILPNLH ( 配列番号 14)

A v P A Lバリエント番号 1 0 0 2 のポリヌクレオチド配列 (配列番号 1 5) :

20

ATGAAAACCTGAGTCAGGCACAGAGCAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGCAATA  
 GCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCGCGTGTGCCCCGT  
 AATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTATTCAGGCCAGCTGTGA  
 TTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTGTACCAGCGGTTTTGGTGGTA  
 TGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTTGGTTCTG  
 AAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTCTGTCAGCAATGCTGCTGCGTGCAA  
 ATAGCCACATGCATGGTGCAAGCGGTATTCTGCTGGAAGTAAACGCGCGGAAATCTTTCTG  
 AATGCCGGTGTACCCTGATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCC  
 GCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTAATGGCA  
 AAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCTGCTGCCGAA  
 AGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTAT  
 GATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACCTGAATGG  
 TACAAATCAGAGCTTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGCTGTGGGCAG  
 CAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGATGGTAAACA  
 TGATTATCGTGATGGTGAACCTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTGTCTGCCGAGTATCTGG  
 GTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTAACAGCGTTACC  
 GATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAAATTTCTGGGTGAGTA  
 TGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTGGCCTGGCAAACATCTGGATGTTT  
 AGATTGCACTGCTGGCATACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGGTGGGTAATCGT  
 GAACGTAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCT  
 GACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAACCAGAATA  
 TTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTGGCCAGAATTAT  
 GTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCA  
 TTATGATGCACGTGCCAGCTGTCACCCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCGTCATGTTG  
 TTGGTCAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGATGA  
 ACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCCGTTTCAGGACA  
 TTCTGCCGAACCTGCAT ( 配列番号 15)

30

40

【化 1 1】

A v P A Lバリエント番号1002のポリペプチド配列 (配列番号16) :

MKTLSPAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS  
 CDYINNAVESGEPIYGVTSFGFGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA  
 MLLRANSHMHGASGIRLELIKRAEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDP  
 KVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTALAMGV  
 HALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDDGKHHDYRDGELIQ  
 DRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDH  
 LRYIYIGGLAKHLVDQIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVNMGKGLQICGNSIMPLLTIFYGN  
 SIADRFPTHAEQFNQINSQGYTSATLARRSVDIGQNYVAIALMFGVQAVDLRTRYKKTGHYD  
 ARAQLSPATERLYSAVRHVVGKPPSSDRPYIWNNDNEQGLDE  
 HIARISADIAAGGVIVQAVQDILPNLH (配列番号 16)

10

A v P A Lバリエント番号1008のポリヌクレオチド配列 (配列番号17) :

ATGAAAACCCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGCAATA  
 GCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCGCGTGTGCCCCGT  
 AATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTATTACAGGCCAGCTGTGA  
 TTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTATGGTGTACCAGCGGTTTTGGTGGTA  
 TGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTGGTTCTG  
 AAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTCTGTCAGCAATGCTGCTGCGTGCAA  
 ATAGCCACATGCATGGTGAAGCGGTATTCTGCTGGAAGTATTAACGCGCGGAAATCTTTCTG  
 AATGCCGGTGTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTCCAGCGGTGATCTGGTTCC  
 GCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAAATGGCA  
 AAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCCTGCTGCCGAA  
 AGAAGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTTGTGTTTAT  
 GATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGTGTTCATGCACTGGATATTGAGGCACTGAATGG  
 TACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGCTGTGGGCGAG  
 CAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGATGGTAAACA  
 TGATTATCGTGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCCGAGTATCTGG  
 GTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTAACAGCGTTACC  
 GATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATTTTCTGGGTCAGTA  
 TGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTGGCCTGGCAAACATCTGGATACCC  
 AGATTGCATGCTGGCACCAGCAACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCTCCGAGTCTGGTGGTAAATCGT  
 GAACGTAAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCT  
 GACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAACCAGAATA  
 TTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTGGCCAGAATTAT  
 GTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCA  
 TTATGATGCACGTGCCAGCTGTACCCGCAACCGAAGTCTGTATAGCGCAGTTTCTGTCATGTTG  
 TTGGTCAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGATGA  
 ACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTGAGGCCGTTGAGGACA  
 TTCTGCCGAACCTGCAT (配列番号 17)

20

30

A v P A Lバリエント番号1008のポリペプチド配列 (配列番号18) :

MKTLSPAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGI  
 QASCDYINNAVESGEPIYGVTSFGFGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRA  
 AAMLLRANSHMHGASGIRLELIKRAEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDP  
 SFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTALAM  
 GVALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDDGKHHDYRDGE  
 LIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGM

40

## 【化 1 2】

DHLRYYYIGGLAKHLDTQIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVNMGKGLQICGNSIMPLLLTFY  
 GNSIADRFPHTAEQFNQINNSQGYTSATLARRSVDIGQNYVAIALMFGVQAVDLRTRYKKTGH  
 YDARAQLSPATERLYSAVRHVVGQKPSSDRPYIWNDNEQGLDE  
 HIARISADIAAGGVIVQAVQDILPNLH ( 配列番号 18)

## A v P A Lバリエント番号1009のポリヌクレオチド配列 (配列番号19) :

ATGAAAACCCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAAACAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGCAATA  
 GCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCGCGTGTGCCCCGT  
 AATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTATTCAGGCCAGCTGTGA  
 TTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTGTACCAGCGGTTTTGGTGGTA  
 TGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTG  
 AAAACCGGTGCAGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAA  
 ATAGCCACATGCATGGTGAAGCGGTATTCGTCTGGAAGTAAACGCGCGGAAATCTTTCTG  
 AATGCCGGTGTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCC  
 GCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAAATGGCA  
 AAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAA  
 AGAAGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTAT  
 GATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCAGTGAATGG  
 TACAAATCAGAGCTTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAGCTGTGGGCAG  
 CAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGATGGTAAACA  
 TGATTATCGTGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCCGCAGTATCTGG  
 GTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTAACAGCGTTACC  
 GATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATTTTCTGGGTCAGTA  
 TGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATGAAATCGGTCTGCTGGCAAACATCTGGATGTTT  
 AGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGGTGGGTAATCGT  
 GAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCT  
 GACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAAACCAGAATA  
 TTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTGGCCAGAATTAT  
 GTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCA  
 TTATGATGCACGTGCCAGCTGTCACCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTTCGTCATGTTG  
 TTGGTCAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGATGA  
 ACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCCGTTTCAGGACA  
 TTCTGCCGAACCTGCAT ( 配列番号 19)

10

20

30

## A v P A Lバリエント番号1009のポリペプチド配列 (配列番号20) :

MKTLQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGI  
 QASCDYINNAVESGEPIYGVTSFGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVR  
 AAMLLRANSHMHGASGIRLELIKRAEIFLNAGVTPYVYEFSGISGDLVPLSYITGSLIGLDP  
 SFKVDNFKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAM  
 GVHALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELKHDYRDGE  
 LIQDRYSLRCLPQYLGPVVDGISQIAKQIEIENSVDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGM  
 DHLRYEIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVNMGKGLQICGNSIMPLLLTFY  
 GNSIADRFPHTAEQFNQINNSQGYTSATLARRSVDIGQNYVAIALMFGVQAVDLRTRYKKTGH  
 YDARAQLSPATERLYSAVRHVVGQKPSSDRPYIWNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAV  
 QDILPNLH ( 配列番号 20)

40

50



## 【化 1 3】

A v P A Lバリエント番号1010のポリヌクレオチド配列 (配列番号21) :

ATGAAAACCTGAGTCAGGCACAGAGCAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGCAATA  
 GCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCGCGTGTGCCCCGT  
 AATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTATTAGGCCAGCTGTGA  
 TTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTATGGTGTACCAGCGGTTTTGGTGGTA  
 TGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTG  
 AAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAA  
 ATAGCCACATGCATGGTGCAAGCGGTATTCTGTCTGGAAGTAAACGCGCGGAAATCTTTCTG  
 AATGCCGGTGTACCCCCGATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCC  
 GCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAAGTTGATTTAATGGCA  
 AAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAA  
 AGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTAT  
 GATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTAGGCCACTGAATGG  
 TACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGCTGTGGGCAG  
 CAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGATGGTAAACA  
 TGATTATCGTGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCCGAGTATCTGG  
 GTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTAACAGCGTTACC  
 GATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATTTCTGGGTGAGTA  
 TGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATGAAATCGGTCTGCTGGCAAAACATCTGGATACCC  
 AGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCTCCGAGTCTGGTGGGTAATCGT  
 GAACGTAAGGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCT  
 GACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTAAACCAGAATA  
 TTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTGGCCAGAATTAT  
 GTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCA  
 TTATGATGCACGTGCCAGCTGTCACCGGCAACCGAACGTCGTATAGCGCAGTTCGTCATGTTG  
 TTGGTCAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGATGA  
 ACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAAGCCGTTTCAAGGACA  
 TTCTGCCGAACCTGCAT (配列番号 21)

10

20

A v P A Lバリエント番号1010のポリペプチド配列 (配列番号22) :

MKTLTSAQSKTSSQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGI  
 QASCDYINNAVESGEPIYGVTSFGGMANVVISREQASELQTNLWFLKTGAGNKLPLADVR  
 AAMLLRANSHMHGASGIRLELIKRAEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDP  
 SFKVDENFKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSMVTGIAANCVYDTQILTAIAM  
 GVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELGKHHDYRDGE  
 LIQDRYSRLRCLPQYLGPVVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGM  
 DHLRYEIGLLAKHLDLTIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVNMGKGLQICGNSIMPLLTIFY  
 GNSIADRFPTHAEQFNQINNSQGYTSATLARRSVDIGQNYVAIALMFGVQAVDLRITYKKTGH  
 YDARAQLSPATERLYSAVRHVVGQKPSDRPYIWNQGLDE  
 HIARISADIAAGGVIVQAVQDILPNLH (配列番号 22)

30

A v P A Lバリエント番号1084のポリヌクレオチド配列 (配列番号23) :

ATGAAAACCTGAGTCAGGCACAGAGCAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCCATACCGGCAAT  
 AGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGTACGTGTTGCCCCG  
 TAATGGCACCCGCGTTAGCCTGACCAATAATAAAGATATTCTGCAGCGTATTAGGCCAGCTGT  
 GATTATATCAATAATGCAGTTGAAAAAGGTGAACCGATTATGGTGTACCAGCGGTTTTGGTGG  
 TATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTGGTTTC  
 TGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGC  
 AAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTCTGTCTGGAAGTAAACGCATGGAATCTTT

40

50

【化 1 4】

CTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGT  
 TCCGCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTAATG  
 GAAAAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCGTCAGCC  
 GAAAGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTTGTGTT  
 TATGATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCAATGCACTGGATATTCAGGCACTGAA  
 TGGTACAAATCAGAGCTTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAGCTGTGGG  
 CAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGATGGTAA  
 ACATGATTATATGGATGGTGAACCTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCCGAGTATC  
 TGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTAACAGCGTT  
 ACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATTTTCTGGGTCA  
 GTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTCTGCTGGCAAAACATCTGGATG  
 TTCAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCCTCCGAGTCTGGTGGGTAAT  
 CGTGAACGTAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCT  
 GCTGACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAAACCAGA  
 ATATTAACAGCCAGGGTTATACCGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAAT  
 TATGTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAAGTTCGTGCGTACCTACAAAAAACCGG  
 TCATTATGATGCACGTGCCAGCTGTCACCGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCGTCATG  
 TTGTTGGTAAAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGA  
 TGAACATATTGCACGTATTAGTCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCCGTTTCAGG  
 ACATTCTGCCGCCGCTGCAT

10

A v P A Lバリエント番号1084のポリペプチド配列 (配列番号24) :

MKTLQAQSKTSSQFSHTGNSSANVVIIGNQKLTINDVVRVARNGTAVSLTNNKDILQRI  
 QASCDYINNAVEKGEPIYGVTSGFGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADV  
 RAAMLLRANSHMRGASGIRLELIKRMIEIFLNAGVTPYVYEFSGISASGDLVPLSYITGSLIGLD  
 PSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLQPKGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIA  
 MGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELKGKHDYMD  
 GELIQDRYSRLCPQYLGPIVDGISQIAKQIEIINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGM  
 GMDHLRYIYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPSSLVGNRERKVNMLKGLQICGNSIMPLL  
 TFYGNISADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRITYKK  
 TGHYDARAQLSPATERLYSAVRHVVGKKPSSDRPYIWNENEQGLDE  
 HIARISADIAAGGVIVQAVQDILPPLH (配列番号 24)

20

A v P A Lバリエント番号967のポリヌクレオチド配列 (配列番号25) :

ATGAAAACCCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTACGTTTACCGG  
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAAACTGACCATCAATGATGTTGCGC  
 GTGTTGCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTCAGGGTA  
 TTCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTG  
 TTACCAGCGGTTTTGGTGGTATGGCAAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAAC  
 TGCAGACCAATCTGGTTTGGTTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAG  
 ATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTC  
 GTCTGAACTGATTAACCGCGCGGAAATCTTTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTTT  
 ATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCGGCTGAGCTATATTACCGGTA  
 GCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGACGCAC  
 CGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCTG  
 GCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTTGTGTTTATGATACC  
 CAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTATGCACTGGATATTCAGGCACTGAATGGT  
 ACAAATCAGAGCTTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAGCTGTGG  
 GCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGA

30

40

## 【化 1 5】

TGGTAAACATGATTATCGTGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCT  
 GCCGCAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAAT  
 TGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCA  
 TGGTGGTAATTTCTGGGTCAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATC  
 GGTGGCCTGGCAAAACATCTGGATGTTGAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGC  
 AATGGTCTGCCTCCGAGTCTGGTGGTAATCGTGAACGTAAGTAAATATGGGTCTGAAA  
 GGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATT  
 GCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTAT  
 ACCAGCGCAACCCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTGGCCAGAATTATGTTGCCATTGCC  
 CTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCATTATGAT  
 GCACGTGCCAGCTGTCACCGCAACCGAACGTCGTATAGCGCAGTTTCGTCATGTTGTT  
 GGTGAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGA  
 TGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTATTGTTTCAGGCCGT  
 TCAGGACATTCTGCCAACCTGCAT ( 配列番号 25)

10

## バリエーション番号 967 のポリペプチド配列 (配列番号 26) :

MKTLTSAQSKTSSQFSTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS  
 CDYINNAVESGEPIYGVTSFGGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA  
 MLLRANSHMRGASGIRLELIKRAEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSPFK  
 VDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCYDQTILTAIAMGVH  
 ALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDDGKHDIRDGEIQLD  
 RYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHL  
 RYYIGGLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVNMLKGLQICGNSIMPLLTFFYGNS  
 IADRFPTHAEQFNQINSQGYTSATLARRSVDIGQNYVALALMFGVQAVDLRKYKKTGHYDA  
 RAQLSPATERLYSAVRHVVGQKPSDRPYIWNNDNEQGLDE  
 HIARISADIAAGGVIVQAVQDILPNLH ( 配列番号 26)

20

## 発現ベクター pCK100900 i :

TGGCCACCATCACCATCACCATAGGGAAGAGCAGATGGGCAAGCTTGACCTGTGAAGT  
 GAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTTGAATTCTACGTAAAAAGCAGCCGATA  
 CATCGGCTGCTTTTTTTTGNNGAGGTTCCAACCTGTGGTATAATGAAATAAGATCACT  
 CCGGAGCGTATTTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAGGAACTAAAATGGA  
 GAAAAAATCACTGGATATAACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTT  
 TGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTCAGCTGGATATTAC  
 GGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTATCCGGCCTTTATTACAT  
 TCTTGCCCGCTGATGAATGCTCATCCGGAGTTCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCT  
 GGTGATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTACACCGTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTT  
 TTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCA  
 AGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATAT  
 GTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAAT  
 ATGGACAACCTTCTCGCCCCGTTTTACCAGTGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAG  
 GTGCTGATGCCGCTGGCGATTGAGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCATGTCGGC  
 AGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAACTGCA  
 GGAGCTCAAACAGCAGCCTGTATTACAGGCTGCTTTTTTCGTTTTGGTCTGCGCGTAATCTC

30

40

50

【化 1 6】

TTGCTCTGAAAACGAAAAACCGCCTTGCAGGGCGGTTTTTCGAAGGTTCTCTGAGCTAC  
CAACTCTTTGAACCGAGGTAACCTGGCTTGGAGGAGCGCAGTCACCAAAAACCTTGCCTTTC  
AGTTTAGCCTTAACCGGCGCATGACTTCAAGACTAACTCCTCTAAATCAATTACCAAGTGG  
CTGCTGCCAGTGGTGCTTTTGCATGTCTTTCCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGG  
ATAAGGCGCAGCGGTCCGACTGAACGGGGGGTTTCGTGCATACAGTCCAGCTTGGAGCGA  
ACTGCCTACCCGGAAGTGAAGTGTGAGGCGTGAATGAGACAAAACCGGGCCATAACAGCG  
GAATGACACCGGTAAACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCCGCCAGG  
GGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTTCGCCACCACTGATTTGAGCGTCA  
GATTTTCGTGATGCTTGTGAGGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGGCTTTGCCGCGGCCCT  
CTCACTTCCCTGTTAAGTATCTTCCCTGGCATCTTCCAGGAAATCTCCGCCCCGTTTCGTAAG  
CCATTTCCGCTCGCCGACGTCGAACGACCGAGCGTAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCG  
GAATATATCCTGTATCACATATTCTGCTGACGCACCGGTGCAGCCTTTTTTCTCCTGCCAC  
ATGAAGCACTTCACTGACACCCTCATCAGTGAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTA  
GGCCTATGGCCTTTTTTTTTNTGNNAACCTTTTCGCGGTATGGNATNANAGCGCCCGGA  
AGAGAGTCAATTAAGAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGCAGA  
GTATGCCCGGTGTCTTTATCAGACCGTTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTT  
TGCGAAAACCGGGGAAAAAGTGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACC  
GCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTC  
TGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATGTGCGCGGCGATTAATCTCGCGCCGATCAACTGG  
GTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCAAGCCTGTAAAGCGGGC  
GTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGAC  
CAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCT  
CTGACCAGACACCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCG  
TGGAGCATCTGGTTCGATTGGGTACCAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCATTAAGTT  
CTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTC  
AGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATG  
CAAATGCTGAATGAGGGCATCGTCCCCTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGC  
GCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGGCGACATCTCGGT  
AGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCAACATCA  
AACAGGATTTTCGCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGTGCAACTCTCTCAGG  
GCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCGTCTCACTGGTGAAGAAACCAACACC  
CTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTG  
GCACGACAGGTTTTCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGGTACCCGATAAAAAGCGGCTT  
CCTGACAGGAGGCCGTTTTGTTTTCTCGAGTTAATTAAGGCAAGTGAAGCGCAACGCAATTA  
TGTGAGTTAGTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATG  
TTGTGTGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC  
GGATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAATCTAGAGGCCAGCCTGGCCATAAGGAGATATACAT  
ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGCCATATCGAAGGTCGT  
CATATGAAAACCTGAGCCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTAC  
CGGCAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAAACTGACCATCAATGATGTTG  
CACGTGTTGCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGG  
GTATTCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATG  
GTGTTACCAGCGGTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGCAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCG  
AACTGCAGACCAATCTGGTTTTGGTTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGG  
CAGATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGT  
ATTCGTCTGGAACCTGATTAACGCATGGAATCTTTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTAT  
GTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCCGCTGAGCTATATTACC  
GGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAAATGGCAAAGAAATGGAC  
GCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGG  
TCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTTGTGTTTATGA  
TACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACTGAA  
TGGTACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGCT  
GTGGGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCAATAGCCAGCTGGTTTCGTGATGAAC  
TGGATGGTAAACATGATTATCGTGATCATGAACTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTT  
GTCTGCCGACGATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCG

10

20

30

40

50

## 【化 17】

AAATTGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCT  
 ATCATGGTGGTAATTTCTGGGTCAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTA  
 TATCGGTCGCTGGCAAAACATCTGGATGTTGAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATT  
 TAGCAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGCTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCT  
 GAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAG  
 TATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAAACCAGAATAATTAACAGCCAGGG  
 TTATACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAATTATGTTGCCATT  
 GCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCATTAT  
 GATGCACGTGCCTGTCTGTCACCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCGTCATGTT  
 GTTGGTCAGAAACCGACCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTG  
 GATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCC  
 GTTCAGGACATTCTGCCGTGTCTGCATTAAGGCCAAAC ( 配列番号 27)

10

## 【実施例】

## 【0230】

( 実施例 1 )

PAL 遺伝子獲得および発現ベクターの構築

Anabaena variabilis フェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( AvPAL ) プラスミド DNA を得て、AvPAL をコードする合成遺伝子を E. coli における発現のためにコドン最適化し、E. coli 発現ベクター pET16b にクローニングして、pET16b-AvPAL ( 配列番号 1 ) を用意した。オリゴヌクレオチド：PAL-pCK-F および PAL-pCK-R を使用した PCR により、AvPAL オープンリーディングフレーム ( 配列番号 2 ) を増幅し、発現ベクター pCK100900i ( 配列番号 27 ) にサブクローニングした。

20

## 【表 1】

プライマー	配列5'から3'	配列番号
PAL-pCK-F	CTAGAGGCCAGCCTGGCCATAAGGAGATATACAT ATGAAAACCCTGAGCCAGGCAC	配列番号28
PAL-pCK-R	GATGGTGTGGTGGCCAGTTTGGCCTTAATGCAG ACACGGCAGAATG	配列番号29

30

## 【0231】

このプラスミド構築物で W3110 に由来する E. coli 株を形質転換した。当業者によって一般に公知の定向進化技法を使用して、このプラスミド構築物から遺伝子バリエーションのライブラリーを作製した ( 例えば、米国特許第 8,383,346 号および WO2010/144103 を参照 )。

## 【0232】

( 実施例 2 )

ハイスループット ( HTP ) 増殖およびアッセイ

PAL および PAL バリエーションのハイスループット ( HTP ) 増殖

1% グルコース および 30  $\mu$ g / ml クロラムフェニコール を含有する LB 寒天プレート上にプレーティングすることにより、形質転換された E. coli 細胞を選択した。37 における一晩インキュベーション後に、NUNC ( 商標 ) ( Thermo-Scientific )、1% グルコース および 30  $\mu$ g / ml クロラムフェニコール を補充した 180  $\mu$ l / ウェルの LB を充填した 96 ウェル浅平底プレートのウェルにコロニーを置いた。振盪機 ( 200 rpm、30、85% 相対湿度 ; Kuhnert ) において培養物を一晩、18 ~ 20 時間育成させた。一晩育成した試料 ( 20  $\mu$ L ) を、30  $\mu$ g / ml クロラムフェニコール を補充した 380  $\mu$ L の Terrific プロスを充填した Costar 96 ウェル深プレートに移した。振盪機 ( 250 rpm、30、85% 相対湿度 ; Kuhnert ) においてプレートを 135 分間インキュベートした。次に、滅菌水に溶

40

50

解した40  $\mu$ Lの10 mM IPTGで細胞を誘導し、振盪機(250 rpm、30、85%相対湿度; Kuhnert)において一晩、20~24時間インキュベートした。2回複製した培養物を組み合わせ、細胞をペレット化し(4000 rpm x 20分間)、上清を廃棄し、分析に先立ち細胞を-80 で凍結した。

#### 【0233】

##### HTPペレットの溶解

まず、500  $\mu$ Lの溶解バッファー(20 mM Tris pH7.5、1 mM MgSO<sub>4</sub>、1 mg/ml リゾチームおよび0.5 mg/ml ポリミキシンB硫酸塩)を細胞ペレットに加えた。この混合物を1.5時間室温で揺動し、本明細書に記載されている様々なHTPアッセイにおける清澄化ライセートの使用に先立ち、ペレット化した(4000 rpm x 5分間)。SDS-PAGEによるこのようなライセートの分析は、ほぼ60 kDaの見かけ上のMWにおける過剰発現されたタンパク質の存在を明らかにし、これは、PALの予想されるMWと一貫した。

10

#### 【0234】

##### 清澄化ライセートの分析

経時的に290 nmにおける吸光度の変化によって決定される桂皮酸の生成を測定することにより、PALバリエーション活性を決定した。本アッセイのため、100  $\mu$ Lの200 mM Tris / 50 mMフェニルアラニン、pH7.5または200 mMリン酸ナトリウム / 50 mMフェニルアラニン pH7.0のいずれか、80  $\mu$ Lの水および20  $\mu$ Lの清澄化ライセートを、ポリアクリレート96ウェルプレート(Costar番号3635、Corning)のウェルに加えた。反応物を短時間混合し、SpectraMax(登録商標) Plus<sup>384</sup>またはSpectraMax(登録商標) 190(Molecular Devices)吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290 nmにおける吸光度を経時的に追跡することにより活性を決定した(5~20分間にあたり12~20秒毎に)。

20

#### 【0235】

##### プロテアーゼで前処理した清澄化ライセートのHTP分析

PALバリエーションに、キモトリプシンおよびトリプシンを負荷して、腸管下部の環境をシミュレートした。まず、30  $\mu$ Lのプロテアーゼミックス(0.01~100 mg/mlキモトリプシン(C4129 Sigma Aldrich)、0.01~100 mg/mlトリプシン(T7409 Sigma Aldrich)、1 mM CaCl<sub>2</sub>および1 mM HCl)、500 mMリン酸ナトリウム pH7.0に溶解した0~30  $\mu$ Lの200 mMタウロコール酸ナトリウムおよび90~120  $\mu$ Lの清澄化ライセートを、96ウェル丸底プレート(Costar番号3798、Corning)のウェルに加えた。このプレートを封着し、分析に先立ち37、400 rpm、1"スロー(throw)で1時間インキュベートした。アッセイのため、100  $\mu$ Lの200 mM Tris / 50 mMフェニルアラニン pH7.5または200 mMリン酸ナトリウム / 50 mMフェニルアラニン pH7.0のいずれかおよび100  $\mu$ Lのプロテアーゼ処理ライセートを、ポリアクリレート96ウェルプレート(Costar番号3635、Corning)のウェルに加えた。反応物を短時間混合し、SpectraMax(登録商標) Plus<sup>384</sup>またはSpectraMax(登録商標) 190(Molecular Devices)吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290 nmにおける吸光度を経時的に追跡することにより活性を決定した(5~20分間にあたり12~20秒毎に)。結果を次表に示す。

30

40

#### 【0236】

##### 酸で前処理した清澄化ライセートのHTP分析

本アッセイにおいて、胃の環境をシミュレートするために、PALバリエーションを酸性条件下で負荷した。まず、20  $\mu$ Lの1 Mクエン酸ナトリウム(pH3.7~4.5)および30  $\mu$ Lの水または50  $\mu$ Lの400 mMクエン酸ナトリウム pH3.7~4.8および50  $\mu$ Lの清澄化ライセートを、96ウェル丸底プレート(Costar番号3798

50

、Corning)のウェルに加えた。このプレートを封着し、分析に先立ち37、400rpm、1"スローで1時間インキュベートした。アッセイのため、100μLの200mM Tris、50mMフェニルアラニンpH7.5および80μL 1M Tris pH7.5または200mMリン酸ナトリウム/50mMフェニルアラニンpH7.0および80μL 1.0Mリン酸ナトリウムpH7.0のいずれかならびに20μLの酸処理ライセートを、ポリアクリレート96ウェルプレート(Costar番号3635、Corning)のウェルに加えた。反応物を短時間混合し、SpectraMax(登録商標)Plus<sup>384</sup>またはSpectraMax(登録商標)190(Molecular Devices)吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290nmにおける吸光度を経時的に追跡することにより活性を決定した(5~20分間にわたり12~20秒毎に)。結果を次表に示す。

10

## 【0237】

ペプシンで前処理した清澄化ライセートのHTP分析

追加的なアッセイにおいて、PALバリエーションに、酸性条件およびペプシンを負荷して、胃内環境を模倣する条件下でバリエーションをさらに検査する。まず、400mMクエン酸ナトリウムpH1.5~4に溶解した50μLの0.01~100mg/mlペプシンおよび50μLの清澄化ライセートを、96ウェル丸底プレート(Costar番号3798、Corning)のウェルに加えた。このプレートを封着し、分析に先立ち37、400rpm、1"スローで1~12時間インキュベートする。アッセイのため、100μLの200mM Tris/50mMフェニルアラニンpH7.5および80μL 1M Tris pH7.5または200mMリン酸ナトリウム/50mMフェニルアラニンpH7.0のいずれかならびに20μLの酸処理ライセートを、ポリアクリレート96ウェルプレート(Costar番号3635、Corning)のウェルに加える。反応物を短時間混合し、SpectraMax(登録商標)Plus<sup>384</sup>またはSpectraMax(登録商標)190(Molecular Devices)吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290nmにおける吸光度を経時的に追跡することにより活性を決定する(5~20分間にわたり12~20秒毎に)。

20

## 【表2-1-1】

表2-1. 未負荷(U-C)、プロテアーゼ負荷(P-C)および酸負荷(A-C)した場合の PALバリエーションの相対活性				
バリエーション 番号	U-C	P-C	A-C	配列番号4と比べた アミノ酸の差異
1	+	+	+	A39V/A91V/Y158H/S180A/N290G/A394V/S399N/ N474Q/K522Y/T524S
2	+	+	++	A39V/A91V/Y158H/A256G/A394V/P404A/N474Q
3	+	++	++	A39V/A91V/S180A/A394V/K522F/T524S
4	+	+	++	A39V/A91V/Y158H/T243I/A256G/S399N/P404A/L407 V/N474Q
5	+	+	++	E308Q
6	+	++	+	N400K
7	+	+	+	L364Q
8	+	+	++	A256G/N290G/P404A/L407V/N474Q/K522F
9	+	+	++	Y158H/S180A/A394V/T463N/N474Q/T524S
10	+	+	++	A39V/A91V/Y158H/S180A/K195E/A256G/S399N/ L407V/Y459F/T463N/K522N/T524S
11	+	+	++	A39V/A91V/Y158H/S180A/K195E/A256G/ N290G/S399N/Y459F/T463N
12	+	++	++	A39V/A91V/Y158H/S180A/K195E/T243I/A394V
13	+	++	++	A39V/A91V/Y158H/K195E/T243I/A256G/A394V/ S399N/N474Q/K522Y/T524S
14	+	++	++	A39V/A91V/Y158H/S180A/K195E/I245L/S399N/ L407V/Y459F/T463N/N474Q/T524S
15	+	++	+	H307M

30

40

50

【表 2 - 1 - 2】

表2-1. 未負荷(U-C)、プロテアーゼ負荷(P-C)および酸負荷(A-C)した場合の PALバリエントの相対活性				
バリエント 番号	U-C	P-C	A-C	配列番号4と比べた アミノ酸の差異
16	+	+	++	A39V/A91V/Y158H/S180A/T243L/A394V/S399N/ T463N/K522F
17	+	+	++	A91V/N474Q
18	++	+	++	S180A/K195E
19	++	+	++	A91V/Y158H/T243I/A256G/N290G/S399N/L407V/ Y459F/ T463N/N474Q/K522N/T524S
20	++	++	++	A39V/Y158H/S180A/S399N
21	++	++	++	A91V/N270K
22	++	+++	++	H307G
23	++	++	+	N453G
24	++	++	++	H307Q
25	++	++	+	L257W
26	++	+	+++	A91V/Y158H/I245L/A256G/S399N/Y459F/T463N/ K522Y/T524S
27	++	++	+	F443H
28	++	++	++	A91V/Y158H/S180A
29	++	++	+	A91Y/ Y158H/ K195E/ S399N
30	++	++	+++	A39V/ A91V/ A256G/ N290G/ A394V/ S399N/ P404A/ L407V/K522Y/ T524S
31	++	++	+	L257A
32	++	+	+++	Y158H/K195E/T243L/A256G/A394V/S399N/ L407V/N474Q/ K522F/T524S
33	++	++		L349M
34	+++	+++	+	I326F
35	+++	+++	+++	T460G/ P528L

- 1.相対活性は、バリエントの活性/配列番号4(配列番号3にコード)の活性として計算した。
- 2.バリエント番号22は、配列番号7のポリヌクレオチド配列および配列番号8のポリペプチド配列を有し、バリエント番号30は、配列番号5のポリヌクレオチド配列および配列番号6のポリペプチド配列を有する。
- 3.+ =野生型AvPALを上回る0.1~1.0相対活性;  
++=>野生型AvPALを上回る1.0~2.0相対活性;および  
+++=>野生型AvPALを上回る2.0相対活性。

10

20

30

40

50



【表 2 - 2】

表2-2. 未負荷(U-C)、プロテアーゼ負荷(P-C)および酸負荷(A-C) PALバリエントの相対活性				
バリエント 番号	U-C	P-C	A-C	アミノ酸の差異 - 野生型 AvPAL(配列番号4)と比べた
36	++	+++	++	A39V/A91V/N290G/H307G/L407V/ T524S
37	++	+++	++	A39V/A91V/N290G/H307G/L407V
38	+	++	+	A39V/A91V/A256G/N290G/H307G/S399N/P404A/ L407V/K522Y/T524S
39	++	+	++	A39V/A91V/A256G/N290G/S399N/P404A/L407V/K522 Y
40	+	++	+	A39V/A256G/N290G/H307G/P404A/L407V
41	+	++	+	A39V/A91V/A256G/N290G/H307G/P404A/L407V/T524S

- 1.相対活性は、バリエントの活性/バリエント番号30の活性として計算した。
- 2.バリエント番号36は、配列番号9のポリヌクレオチド配列および配列番号10のポリペプチド配列を有する。
- 3.+=>バリエント30を上回る1.0~3.0相対活性;  
++=>バリエント30を上回る3.0~10相対活性;および  
+++=>バリエント30を上回る10~35相対活性。

10

【表 2 - 3】

表2-3. 未負荷(U-C)、プロテアーゼ負荷(P-C)および酸負荷(A-C) PALバリエントの相対活性				
バリエント 番号	U-C	A-C	P-C	突然変異(バリエント番号36と比べた)
42	+	+	+	T54K/G59R/S73K/R305M/C503Q/Q521K/C565P
43	+	+++	++	T54K/G59R/R305M/C503Q/Q521K/C565N
44	++	+++	++	G59R/C503Q
45	++	+++	++	K32P/G59R/S73K/Q240W/C503Q/C565N
46	+	+	+	K32P/G59R/S73K/Q240W/C565P
47	+	+++	++	K32P/T54K/S73K/R305M/C503Q/Q521K/C565N
48	+++	+++	++	Y304H/D353A
49	++	+++	+++	S73K/D353A
50	+	+	++	A112C/S546R
51	++	+	++	S73K/Q240W/Y304H
52	+	+	++	R134Q/Q240W/Y304H/D353A/E509L

- 1.相対活性は、バリエントの活性/バリエント番号36の活性として計算した。
- 2.バリエント番号42は、配列番号11のポリヌクレオチド配列および配列番号12のポリペプチド配列を有する。バリエント番号43は、配列番号13のポリヌクレオチド配列および配列番号14のポリペプチド配列を有する。
- 3.+=>バリエント36を上回る0.5~1.5相対活性;  
++=>バリエント36を上回る1.5~3相対活性;および  
+++=>バリエント36を上回る3~10相対活性。

30

40

50

【表 2 - 4】

表2-4. 未負荷(U-C)、プロテアーゼ負荷(P-C)および酸負荷 (A-C)PALバリエントの相対活性				
バリエント 番号	U-C	P-C	A-C	バリエント番号30 と比べた突然変異
53	+	+	+	D303R
54	+	+	++	E308A
55	+	+	+	E308D
56	++	++	+	G256A
57	+	++	+	H307A
58	+	+++	+	H307D
59	+	++	+	H307E
60	+	++	+	H307F
61	+	+++	+	H307G
62	+	+	+	H307I
63	+	+	+	H307L
64	++	+++	++	H307M
65	+	++	+	H307N
66	++	++	++	H307R
67	+	+	+	H307Y
68	+	+++	+	R305L
69	+	+++	+	R305M
70	+	+++	+	R305Q
71	++	++	+	V91A/G256A
72	+	++	+	Y304H
73	+	+	+	Y304W
74	+	+	+	C503K
75	+	+	+	C503Q
76	+	+	+	C565A
77	+	+	+	C565G
78	+	+	+	C565I
79	+	+	+	C565K
80	+	+	+	C565L
81	+	++	+	C565N
82	+	+	+	C565P
83	+	+	+	C565T

1.相対活性は、バリエントの活性/バリエント番号30(バリエント53～73)または配列番号4(配列番号3にコード)(バリエント74～83)の活性として計算した。

2.+=>バリエント30を上回る0.5～1.5相対活性;+>=>バリエント30を上回る1.5～3相対活性;および+>=>バリエント30を上回る3～10相対活性。

10

20

30

40

50

【表 2 - 5 - 1】

表2-5. 未負荷(U-C)、プロテアーゼ負荷(P-C)および酸負荷(A-C)PALバリエントの相対活性				
バリエント 番号	U-C	P-C	A-C	バリエント42と比べた突然変異
42	+	+	+	
1011	+	+	+	R59G/R134Q/Q240R/K521Q/P564L
1012	+	+	++	R59G/P564M
1013	+	+	+	R59G/Q240W/E509L/K521Q/P564M
1014	++	++	+	Q240W/Y304H/D353N/E509L/K521S/P564L
1015	+	++	+	R59G/R134Q/Q240R/K521Q/P565N
1016	+	+++	+	Y304H/D353A/E509L
1017	+	++	+	R59G/R134Q/Y304H/D353N/K521Q
1018	+	+++	+	R59G/R134Q/Q240R/K521S
1019	+	+	+	R134Q/Y304H/D353A/K521S/P565N
1020	+	+	+	R59G/R134Q/Q240R/Y304H/D353A/K521Q/P564M
1021	++	+++	++	Q240W/D353A/E509L/K521Q
1022	+	++	+	R134Q/Q240W/E509L/K521S
1023	++	++	++	R134Q/Q240R/D353A/K521Q/P564G
1024	+	+	+	R134Q/K521Q
1025	+	+++	+	K521Q
1026	+	+++	+	R134Q/D353A/K521S/P564M
1027	+	+++	+	R59G/R134Q/Q240W/D353A
1028	++	++	+	R59G/K521S
1029	+	++	+	R59G/D353A
1030	+	+	+	Q240R/D353A/K521S
1031	+	+	+	R59G/D353A/E509L/P564L
1032	+	+	+	R59G/D353A/K521Q
1033	+	+	+	R59G/R134Q/D353A/E509L/K521Q
1034	+	+	+	Q240R/Y304H/E509L
1035	+	+	+	R59G/Q240R/D353A/E509L
1036	+	+	+	R59G/R134Q/E509L
1037	+	+	+	Q240W/Y304H/E509L/K521S
1038	+	+	+	Q240W/D353A/E509L/K521S/P564L/P565N
1039	+	+	+	R59G/Q240R/D353A/P564M/P565N
1040	+	+	+	R134Q/D353A/K521S
1041	+	+	+	R134Q/Q240W/Y304H/D353A/P564L
1042	+	+	+	Q240R/E509L/P565N
1043	+	+	+	Q240R/K521S/P564M/P565N

10

20

30

40

50

【表 2 - 5 - 2】

表2-5. 未負荷(U-C)、プロテアーゼ負荷(P-C)および酸負荷(A-C)PALバリエントの相対活性				
バリエント 番号	U-C	P-C	A-C	バリエント42と比べた突然変異
1044	+	+	+	R134Q/D353A/P564L
1045	+	+	+	R59G/R134Q
1046	+	+	+	R59G/Q240R
1047	+	+	+	Y304H/E509L
1048	+	+	+	R134Q/Q240R/D353A/E509L/K521Q/P564L
1049	+	+	+	Q240W/E509L/P564L/P565N
1050	+	+	+	R59G/E509L/P564L
1051	+	+	+	R134Q/D353A/E509L/P564L
1052	+	+	+	R59G/D353A/P565N
1053	+	+	+	Q240R/E509L
1054	+	+	+	Q240R
1055	+	+	+	D353A/K521Q
1056	+	+	+	Q240W/D353A/E509L
1057	+	+	+	F18H/L47A/L214Q/E540D
1058	+	+	+	F18H/L47A/L214Q/E308K/F450Y/S546R
1059	+	+	+	F18H/L47A/F450Y/P528L/S546R
1060	+	+	+	L214Q/E308Q/T460G
1061	+	+	+	F18H/F450Y/E540D
1062	+	+	+	P528L/S546R
1063	+	+	+	F18H/L214Q/F450Y
1064	+	+	+	E308Q/F450Y/R467G
1065	+	+	+	F18H/E540D
1066	+	+	+	L47A/L214Q/S546R
1067	+	+	+	F18H/L214Q/E308Q
1068	+	+	+	L47A/L214Q/E308Q
1069	+	+	+	F18H/L47E/L214Q/R467G/E540D/S546R
1070	+	+	+	L47A/F450Y
1071	+	+	+	L47A/L214Q
1072	+	+	+	F18H/L47A/L214Q/S546R
1073	+	+	+	F18H/L214Q
1074	+	+	+	L214Q/F450Y/P528L
1075	+	+	+	F18H/L214Q/E308Q/F450Y/R467G
1076	+	+	+	L47A/L214Q/E540D
1077	+	+	+	L214Q/E540D
1078	+	+	+	F18H/L47A/E308Q/S546R
1079	+	+	+	F18H

10

20

30

40

50

【表 2 - 5 - 3】

表2-5. 未負荷(U-C)、プロテアーゼ負荷(P-C)および酸負荷(A-C)PALバリエントの相対活性				
バリエント 番号	U-C	P-C	A-C	バリエント42と比べた突然変異
1080	+	+	+	F18H/L47A/F450Y/S546R
1081	+	+	+	F18H/L47A/L214Q/F450Y
1082	+	+	+	F18H/L47A
1083	+	+	+	L47A
1084	+	+	+	F18H/L47A/L214Q
1085	+	+	+	L214Q/S546R
1086	+	+	+	F18H/L214Q/R467G/S546R
1087	+	+	+	F18H/L47A/L214Q/E308Q
1088	+	+	+	F18H/L214Q/T460G
1089	+	+	+	F18H/L47A/F450Y
1090	+	+	+	F18H/L214Q/E540D

1.相対活性は、バリエントの活性/バリエント番号42の活性として計算した。

2. -<バリエント番号42を上回る0.5相対活性;+=>バリエント番号42を上回る0.5~1.5相対活性;+>=>バリエント番号42を上回る1.5~3相対活性。

## 【 0 2 3 8】

(実施例 3)

PALバリエントのタンパク質凝集を決定するためのアッセイ

凝集するPALバリエントの傾向は、ProteoStat(登録商標)タンパク質凝集アッセイキット(Enzo)を使用してメーカーの説明書に従って決定される。簡潔に説明すると、0~100 $\mu$ Mの精製されたPALを、ProteoStat(登録商標)検出試薬(1:2000)と混合し、フローサイトメトリーにより分析する。本技術分野において公知のProteoStat(登録商標)凝集標準と一貫して、蛍光に関して試料を評価する(例えば、Bershteinら、Mol. Cell、133~144頁[2013年を参照])。

## 【 0 2 3 9】

(実施例 4)

振盪フラスコ(SF)培養物から凍結乾燥されたライセート

上述の通り育成した選択されたHTP培養物を、1%グルコースおよび30 $\mu$ g/mlクロラムフェニコールを有するLB寒天プレート上にプレーティングし、一晚37 $^{\circ}$ Cで育成した。各培養物から単一コロニーを、1%グルコースおよび30 $\mu$ g/mlクロラムフェニコールを有する50mlのLBに移した。18時間30、250rpmで培養物を育成し、30 $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールを有する250mlのTerrificブロスにおいておよそ1:10の希釈で継代培養して、最終OD600を0.2とした。135分間30、250rpmで培養物をインキュベートして、OD600を0.6とし、1mMのIPTGで誘導した。誘導された培養物を20時間、30、250rpmでインキュベートした。このインキュベーション期間の後に、培養物を4000rpm $\times$ 10分間で遠心分離した。上清を廃棄し、30mlの50mMリン酸ナトリウムpH7.5にペレットを再懸濁した。細胞をペレット化し(4000rpm $\times$ 10分間)、12mlの50mMリン酸ナトリウムpH7.5に再懸濁し、One Shot Cell Disruptionシステム(Constant Systems)を17,000psiで使用して溶解させた。ライセートをペレット化し(10,000rpm $\times$ 30分間)、上清を凍結および凍結乾燥して、酵素含有粉末を生成した。

## 【0240】

振盪フラスコ培養物からのPALの精製

上述の通り、飽和するまで振盪フラスコ培養においてPALバリエーション番号42を育成した。飽和した培養物を遠心分離(4000rpm×20分間)によりペレット化し、精製に先立ち細胞ペレットを-80℃で貯蔵した。細胞ペレットを室温で解凍し、5mLバッファー/1g細胞となるよう、130mM NaClを有する25mM Tris、pH8に再懸濁した。圧力設定110psiのマイクロフルイダイザーを使用して、この試料スラリーを溶解した。10,000rpm、1時間の遠心分離と、続く0.2µm PESフィルター(Millipore)を通した濾過により、得られたライセートを清澄化した。

10

## 【0241】

濾過後に、得られたライセートを、10mM Pheの存在または非存在下において70~85℃で1.5~2時間加熱した。ライセートを熱から取り出し、10,000rpm、4℃、1時間の遠心分離により清澄化した。次に、クロマトグラフィーカラムへのロードに先立ち、可溶性PALを含有する上清を、0.2µm PESフィルターを通して濾過した。

## 【0242】

80~100mgの総タンパク質を含有する、熱処理し濾過したライセートを、25mM Tris、pH8と1.2M硫酸アンモニウムを使用して2倍に希釈した。25mM Tris、pH8と0.6M硫酸アンモニウムで前平衡化したHiPrep16/10フェニルFF(Hisub)カラム(GE Healthcare)に試料をロードした。試料ロード後に、3カラム容量の同じバッファーと、続いて1カラム容量の25mM Tris、pH8に溶解した直線勾配の0.6M~0M硫酸アンモニウムでカラムを洗浄した。3カラム容量の25mM Tris、pH8による定組成溶離を使用して、緊密に結合したPALをカラムから溶出した。活性および純粋PALを含有する画分をプールした。

20

## 【0243】

フェニルカラムから得た精製されたPALを0.5M Tris、pH8.5へとバッファー交換し、濃縮した。濃縮されたPALをSDS-PAGEにより分析したところ、ほぼ60kDaのバンドに存在することを見出した。0.45µm PESフィルターを使用して、精製されたPAL試料を濾過し、使用準備が整うまで-80℃で貯蔵した。

30

## 【0244】

(実施例5)

精製されたPALおよびPALバリエーションの特徴付け

本実施例において、野生型およびバリエーションPALを特徴付けるために行われたアッセイが記載されている。

## 【0245】

酸性pHに対する耐性：

PALバリエーションを含有する凍結乾燥された粉末を、2g/Lとなるよう20mMリン酸ナトリウムpH7.0に溶解した。次に、この酵素溶液の50µLを、50µLの400mMクエン酸(pH4.0~5.2)または100mMリン酸ナトリウムと混合し、反応物を37℃で1時間、400rpm(1"スロー)にてインキュベートした。続いて、この溶液の20µLを、80µLの1Mリン酸ナトリウムpH7.0および100µLの200mM Tris/50mMフェニルアラニンpH7.5と短時間混合した。SpectraMax(登録商標)Plus<sup>384</sup>またはSpectraMax(登録商標)190(Molecular Devices)吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290nmにおける吸光度を経時的に追跡することにより、酸性条件下の酵素活性を決定した(5~20分間にわたり12~20秒毎に)。結果を図2に示す。図2に示す通り、バリエーション番号30および36は、野生型PALと比較して、pHおよそ4~4.8でインキュベートされた後により高い活性を維持した。

40

50

## 【0246】

$K_M$ の決定：

バリエーションPALにおける突然変異が、フェニルアラニンに対するPALバリエーションの親和性を変更したか評価するために、野生型酵素およびバリエーション36のミカエリス定数を決定した。まず、100mM Tris pH8.0に溶解した100 $\mu$ Lの15 $\mu$ g/ml PALおよび100mM Tris、pH8.0に溶解した100 $\mu$ Lの0~32mMフェニルアラニンを、ポリアクリレート96ウェルプレート(Costar 番号3625、Corning)のウェルに加えた。反応物を短時間混合し、SpectraMax(登録商標)Plus<sup>384</sup>またはSpectraMax(登録商標)190(Molecular Devices)吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290nmにおける吸光度を経時的に追跡することにより初速度を決定した(5~20分間にあたり12~20秒毎に)。本技術分野において公知のラインウィーバーパーク(Lineweaver-Burke)プロットにデータを適合させることにより、検査したPALバリエーション毎の $K_M$ を決定した。結果を図3に示す。図示されている通り、 $K_M$ は、野生型酵素は74 $\mu$ M、バリエーション36は60 $\mu$ Mであった。

10

## 【0247】

アミノ酸特異性：

いくつかのフェニルアラニンアンモニアラーゼは、フェニルアラニンに加えてチロシンおよび/またはヒスチジンに対する活性を実証する。PALバリエーションに存在する突然変異が、フェニルアラニンに対するPALバリエーションの特異性を変更したか評価するために、これらの3アミノ酸における野生型酵素およびバリエーション36の活性を評価した。まず、10mMリン酸ナトリウムpH7.0に溶解した100 $\mu$ Lの5g/L PAL含有凍結乾燥粉末および200mMリン酸ナトリウムpH7.5に溶解した100 $\mu$ Lの50mMフェニルアラニンもしくはヒスチジンまたは2.5mMチロシンを、ポリアクリレート96ウェルプレート(Costar 番号3635、Corning)のウェルに加えた。溶液を短時間混合し、SpectraMax(登録商標)Plus<sup>384</sup>またはSpectraMax(登録商標)190(Molecular Devices)吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290nmにおける吸光度を経時的に追跡することにより初速度を決定した(5~20分間にあたり12~20秒毎に)。結果を図4に示す。図示されている通り、WT酵素またはバリエーション番号36のいずれに対しても、ヒスチジンまたはチロシンによる検出可能な活性は観察されず、これらの酵素がフェニルアラニンに特異的であることを示す。

20

30

## 【0248】

ブタおよびウシプロテアーゼに対する抵抗性：

実施例4に記載されている通りに調製されたPALバリエーション試料を、2g/Lとなるよう100mMリン酸ナトリウムpH7.0に溶解した。ブタトリプシンおよびウシキモトリプシン(各100mg)を2mlの100mMリン酸ナトリウムpH7.0に溶解し、100mMリン酸ナトリウムにおいて11回2倍系列希釈した。次に、80 $\mu$ LのPALバリエーション酵素溶液を、20 $\mu$ Lのトリプシンおよびキモトリプシン溶液と混合した。反応混合物を37 $^{\circ}$ Cで1時間400rpm(1"スロー)にてインキュベートした。続いて、20 $\mu$ Lの反応物を、80 $\mu$ Lの水および100 $\mu$ Lの100mMリン酸ナトリウム、50mMフェニルアラニンpH7.0と混合した。各溶液を短時間混合し、SpectraMax(登録商標)Plus<sup>384</sup>またはSpectraMax(登録商標)190(Molecular Devices)吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290nmにおける吸光度を経時的に追跡することにより活性を決定した(5~20分間にあたり12~20秒毎に)。結果を図2に示す。この図に示されている通り、検査したバリエーションは全て、野生型PALと比較して改善したプロテアーゼ抵抗性を示し、タンパク質分解に対しバリエーション番号36が最も安定的であった。

40

## 【0249】

ヒトプロテアーゼに対する抵抗性：

50

上述の通り、いくつかの進化した P A L バリエントをブタトリプシンおよびウシキモトリプシンに対しクリーニングして、胃腸管に存在する酵素によるタンパク質分解に対するその抵抗性を評価した。進化した P A L バリエントのうちいくつかは、ヒト酵素を使用して検査して、これらがブタまたはウシ酵素のヒトホモログに対し抵抗性であることも確認した。これらのアッセイにおいて、W T P A L およびバリエント番号 36 の凍結乾燥した粉末 ( 2 . 4 g / L となるよう 100 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 0 に溶解) をヒトキモトリプシン ( A t h e n s R e s e a r c h ) 0 ~ 80 B T E E ユニット / m l またはヒトトリプシン ( P r o S p e c ) ( 0 ~ 10 , 000 B A E E ユニット / m l ) と共に 37 °C で 2 時間インキュベートした。次に、この混合物の 100 μ L をポリアクリレート 96 ウェルプレート ( C o s t a r 番号 3635、C o r n i n g ) のウェルに加え、続いて 100 μ L の 50 m M フェニルアラニン、200 m M リン酸ナトリウム p H 7 . 0 を加えた。溶液を短時間混合し、S p e c t r a M a x ( 登録商標 ) P l u s <sup>384</sup> または S p e c t r a M a x ( 登録商標 ) 190 ( M o l e c u l a r D e v i c e s ) 吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290 n m における吸光度を経時的に追跡することにより初速度を決定した ( 5 ~ 20 分間にわたり 12 ~ 20 秒毎に ) 。結果を図 5 に示す。図 5 に示す通り、バリエント番号 36 は、野生型 P A L 酵素よりも安定的であった。

10

#### 【 0 2 5 0 】

粗臍臓抽出物に対する抵抗性 :

進化した P A L バリエントを検査して、臍臓酵素に対するその抵抗性も決定した。W T P A L の凍結乾燥した粉末、バリエント番号 36、バリエント番号 42 およびバリエント番号 43 の凍結乾燥した粉末 ( 実施例 4 に記載されている通りに調製 ; 12 g / L となるよう 50 m M リン酸カリウム p H 6 . 8 に溶解) を、ブタパンクレアチン ( 4 x S i g m a - A l d r i c h、ミズーリ州セントルイス) と 1 : 1 混合し、37 °C で振盪しつつ ( 400 r p m、1 " スロー) 最大 23 時間インキュベートした。表示の時点において、反応物の 10 μ L アリコートをし、ポリアクリレート 96 ウェルプレート ( C o s t a r 番号 3635、C o r n i n g ) のウェル内の 190 μ L の 50 m M フェニルアラニン、190 m M リン酸ナトリウム p H 7 . 0 に加えた。反応物を短時間混合し、S p e c t r a M a x ( 登録商標 ) P l u s <sup>384</sup> または S p e c t r a M a x ( 登録商標 ) 190 ( M o l e c u l a r D e v i c e s ) 吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290 n m における吸光度を経時的に追跡することにより初速度を決定した ( 5 ~ 20 分間にわたり 12 ~ 20 秒毎に ) 。結果を図 6 に示す。図 6 に示す通り、バリエント番号 36、バリエント番号 42 およびバリエント番号 43 は全て、野生型 P A L 酵素と比較して、このようなアッセイ条件下で有意な安定性を示した。

20

30

#### 【 0 2 5 1 】

腸洗浄剤の影響 :

進化した P A L バリエントを、腸胆汁酸および脂肪酸の存在または非存在下におけるタンパク質分解に対するその感受性に関して検査して、これらの酸が、その安定性に影響を与えるかも評価した。バリエント番号 36 を含有する凍結乾燥された粉末 ( 実施例 4 に記載されている通りに調製) を、50 μ g / m l となるよう 0 ~ 16 m M タウロコール酸ナトリウム、100 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 0 に溶解した。ブタトリプシンおよびウシキモトリプシン ( 各 80 m g ) を 2 m l の 100 m M リン酸ナトリウム p H 7 . 0 に溶解し、100 m M リン酸ナトリウムにおいて 11 回 2 倍系列希釈した。このアッセイのため、50 μ L の P A L 溶液を、50 μ L のプロテアーゼ溶液と混合した。この混合物を 37 °C で 1 時間、400 r p m ( 1 " スロー) にてインキュベートした。次に、この混合物の 50 μ L を 150 μ L の 200 m M リン酸ナトリウム、50 m M フェニルアラニン p H 7 . 0 と混合した。各反応物を短時間混合し、S p e c t r a M a x ( 登録商標 ) P l u s <sup>384</sup> または S p e c t r a M a x ( 登録商標 ) 190 ( M o l e c u l a r D e v i c e s ) 吸光度マイクロプレートリーダーを使用して、290 n m における吸光度を経時的に追跡することにより活性を決定した ( 5 ~ 20 分間にわたり 12 ~ 20 秒毎に ) 。結

40

50



果を図7に示す。この図に示す通り、追加的なタウロコール酸ナトリウムは、タンパク質分解に対するバリエーション番号36の感受性を増加させる。

【0252】

(実施例6)

#### バリエーションPALの腸安定性

動物の腸を通過する際のPALバリエーションの安定性および活性を評価するために、マウスに精製した酵素バリエーションを経管栄養で与えた。10~12週齢、20~26gの体重の健康なC57Bl/6マウスをメタボリックケージ内で維持し、15時間絶食させた。水は適宜与えた。一晩絶食後に、21ゲージ経管栄養針を使用して、動物に0.3mlの0.5M Tris-HCl pH8.5および8mg/mlの0.5M Tris-HCl pH8.5に溶解したWT PAL(実施例4に記載されている通りに調製)または8mg/mlの0.5M Tris-HCl pH8.5に溶解したバリエーション番号42(実施例4に記載されている通りに調製)の混合物を経管栄養した。経管栄養後0.5、2または6時間目に、動物を断頭し、グリーントップ(green-top)キャピラリー血液採取チューブ(Ram Scientific)を使用して血漿を採取し、胃、十二指腸(胃からほぼ1~8cm)、空腸(胃からほぼ10~18cm)、回腸(盲腸のほぼ8cm上)および結腸(盲腸のほぼ5cm下)の内容物を採取した。これらの内容物の重量を記録し、分析に先立ち内容物を-80℃で貯蔵した。

10

【0253】

胃または腸の内容物を100mMリン酸ナトリウムpH7.0で4x希釈し、短時間混合し、14,000rpm x 2分間で遠心分離した。上清を350µL、0.45µM AcroPrep(商標)Advanced96ウェルフィルタープレート(Pall Corp)に移し、真空濾過により微粒子を除去した。清澄化した濾液を、以前の実施例に記載されている通りに酵素活性に関して、また、SDS-PAGEによりインタクトPALタンパク質の存在に関して評価した。結果は、十二指腸および空腸における酵素活性が、野生型PAL酵素および陰性対照と比較して、進化したPALバリエーションの方がより高いと思われることを示した。

20

【0254】

(実施例7)

#### 血漿フェニルアラニンレベル

実施例6に記載されているマウスから採取された血漿試料を評価して、検査したマウスの血流中に存在するフェニルアラニンの含量を決定した。マウス血漿(50µL)を、0.6mMのd1-フェニルアラニン(Ring D5)(即ち、芳香環炭素と結合した水素ではなく重水素を含む同位体標識バージョンのフェニルアラニン; Cambridge Isotope Laboratories)を含有する250µLのアセトニトリル(acetonitrile)と組み合わせた。この試料をRTで5分間混合し、3200xgで10分間、4℃で遠心分離し、上清を試料分析のためのプレートに移した。分析のため、10µLの各試料をa3200 QTRAP(登録商標)LC/MS/MSシステム(AB Sciex)に注射し、DISCOVERY(登録商標)C18カラム(150x2.1mm, 5µmビーズ)(Supelco、現Sigma-Aldrich)を通して、水(A)およびアセトニトリル(B)における0.1%ギ酸で溶出させた。5分間の勾配(t=0、97%A; 3分、50%A; 3.5分、5%A; 4分、97%A; 5分、95%A)を通して試料を溶出させて、内在性フェニルアラニンは166から120、同位体標識した標準は171から125の移行を探す。結果は、血漿フェニルアラニンレベルが、野生型PAL酵素および陰性対照と比較して、進化したPALバリエーション(即ち、バリエーション番号42)を与えたマウス由来の試料において30分間の時点でより低かったことを示した。

30

40

【0255】

(実施例8)

#### バリエーションPALの治療機能

50

PALバリエントが、*in vivo*で血清Pheレベルを低下させるか評価するために、PKUのマウスモデルを使用した。これらの実験において、PALタンパク質を経管栄養で罹患動物に与えた。まず、食事から3日間Pheを除去し、続いて公知含量のPhe含有溶液を注射することにより、マウスにおける一貫したベースラインPheレベルを確立した。C57Bl/6バックグラウンドを有する3~6月齢のホモ接合性PAHenu-2マウス(McDonaldら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87巻:1965~1967頁[1990年]を参照)を、フェニルアラニンフリーの食事(TD.97152, Harlan)と飲料水に入れた0.03g/LのPheに72時間移した。時間=0時間目に処置を開始する前に、マウスに、0.15mg/g体重のPhe(10g/LのPhe水溶液から調製)を注射した。注射後55分目に、およそ20μLの血液を尾静脈穿刺により採取し、濾紙上にスポットした。その後、注射後1時間、3時間および5時間目に、マウスに0.3mLの50~100g/LのWT AvPAL、WT AvPALプラスアプロチニン、BSAまたはバリエント番号42を経管栄養で与えた。注射後6時間、7時間および9時間目に、追加的な血液スポットを濾紙上に採取した。血液スポットを乾燥させ、本技術分野において公知の方法を使用したPheおよびTyrレベルのLC-MS/MS分析に先立ち-20で貯蔵した(Chaseら、Clin. Chem., 39巻:66~71頁[1993年]を参照)。

10

【0256】

結果を図8に示す。この図に示す通り、不活性タンパク質(BSA)の経管栄養は、血清Pheレベルの増加をもたらした。対照的に、タンパク質分解感受性WT AvPALによる処置は、一定のPheレベルを生じた一方、プロテアーゼ阻害剤アプロチニンと組み合わせた同じタンパク質は、Pheレベルの有意な降下を生じた。結果は、操作されたPALバリエント番号42の投与が、プロテアーゼ阻害剤の非存在下で血清Pheレベルの減少を生じたことも示す。

20

【0257】

(実施例9)

PALの脱免疫化

本実施例において、PALからT細胞エピトープを除去することになる多様性を同定するために行われた実験が記載されている。

【0258】

脱免疫化多様性の同定:

突然変異されるとT細胞エピトープを除去することができるアミノ酸を同定するために、計算的方法を使用して、T細胞応答を誘発することが予測されるPAL配列を同定した。並行して、特に、未負荷アッセイ(例えば、実施例2に記載されているアッセイ)においてタンパク質活性を維持するアミノ酸に関して、許容できる有害でない突然変異の実験による探索も行った。次に、予測される免疫原性における突然変異の効果に関して活性バリエントを分析した。

30

【0259】

バリエントAvPALにおける推定T細胞エピトープの計算的同定:

本技術分野において公知のImmune Epitope Database (IEDB; Immune Epitope Database and Analysis Resourceウェブサイト)ツールおよび専用の統計分析ツール(例えば、iedb.orgおよびVitaら、Nucl. Acids Res., 38巻(データベース版):D854~62頁[2010年]Epub2009年11月11日]を参照)を使用して、AvPALバリエント番号36における推定T細胞エピトープを同定した。AvPALバリエントをあらゆる可能な15-mer分析フレームへと構文解析し、各フレームは、最後が14アミノ酸重複する。IEDBウェブサイトにおいて推奨される方法を使用して、ヒトの人口のほぼ95%をまとめて網羅する8種の共通クラスII HLA-DRアレル(DRB1\*0101、DRB1\*0301、DRB1\*0401、DRB1\*0701、DRB1\*0801、DRB1\*1101、DRB1\*1301およびDRB1\*1501)への予測される結合

40

50

に関してその 9 - m e r コア領域をスコアリングすることにより、免疫原性潜在力に関して 15 - m e r 分析フレームを評価した（例えば、Southwoodら、J. Immunol.、160巻：3363～3373頁[1998年]を参照）。本技術分野において公知の統計分析ツールを使用して、バリエーション A v P A L 内に含有される潜在的 T 細胞エピートープクラスター（即ち、免疫原性の異常に高い潜在力を有するバリエーション A v P A L 内に含有されるサブ領域）を同定した。公知エピートープの I E D B データベースおよび G e n B a n k タンパク質データベースに対し、同定された T 細胞エピートープクラスターをスクリーニングした。これらのスクリーニングは、バリエーション A v P A L バリエーション番号 36 における 10（十）個の推定 T 細胞エピートープを同定した。これらのエピートープは、後述する T C E - I、I I、I I I、I V、V、V I、V I I、V I I I、I X および X と称される。  
【0260】

10

脱免疫化ライブラリーの設計：

まず、上述通りに同定された 10 個の推定 T 細胞エピートープ領域における、バリエーション A v P A L の作製に使用された定向進化のラウンドから同定された、あらゆる中立で有益な突然変異を含有するコンビナトリアルライブラリーを開発した。8 種の共通クラス I I H L A - D R アレルへの予測される結合におけるこれらの突然変異の効果を分析した。複数の突然変異が、T C E - I、I I、V I、V I I を除去または低下させると予測された。これらの突然変異をコンビナトリアルライブラリーにおいて組み合わせた。次に、飽和突然変異誘発を使用してライブラリーを設計して、残る 6 種の T 細胞エピートープ（即ち、T C E - I I I、I V、V、V I I I、I X および X）内の全単一アミノ酸に突然変異を誘発した。最後に、P A L バリエーションの凝集状態に影響を与えることが報告された 2 個のアミノ酸である C 5 0 3 および C 5 6 5 と共に、T C E - I、I I I、I V、V I I I および X を標的とした複数ラウンドの進化から同定された有益な多様性を含有する、コンビナトリアルライブラリーを作製した。このライブラリー由来の最良のヒットを、T C E - I I I および V I I I を標的とするさらなる飽和突然変異誘発ならびに数個の位置における追加的な標的化突然変異誘発に付した。

20

【0261】

脱免疫化ライブラリーの構築およびスクリーニング：

上述通りに設計されたコンビナトリアルおよび飽和突然変異誘発ライブラリーを本技術分野において公知の方法により構築し、実施例 2 に記載されている未負荷アッセイにおける活性に関して検査した。活性バリエーションを同定し、配列決定した。A v P A L バリエーション番号 36 および多数の A v P A L バリエーションに関するその活性および突然変異を、下表 9 - 1 から 9 - 7 に示す。

30

【0262】

脱免疫化多様性の同定：

上述の 8 種の共通クラス I I H L A - D R アレルへのその結合を評価することにより、活性バリエーションをその免疫原性レベルに関して分析した。総免疫原性スコアおよび免疫原性ヒットカウントを表 9 - 1 から 9 - 7 に示す。総免疫原性スコアは、バリエーションの全体的な予測される免疫原性を反映する（即ち、より高いスコアは、より高いレベルの予測される免疫原性を示す）。免疫原性「ヒットカウント」は、免疫原性の異常に高い潜在力を有する 15 - m e r 分析フレームの数を示す（即ち、より高いヒットカウントは、免疫原性のより高い潜在力を示す）。より低い総予測免疫原性スコアおよび/または参照バリエーションに満たない免疫原性ヒットカウントを有する突然変異は、「脱免疫化突然変異」と考慮した。最良であると同定された脱免疫化突然変異を組換えて、活性を有し、出発参照バリエーション A v P A L よりも有意に免疫原性が低いと予測される多数のバリエーションを作製した。次表において、F I O P 結果は、未負荷アッセイから得られ；総免疫原性スコア（T I S）および免疫原性ヒットカウント（I H C）に関して、P A L タンパク質全体（表 9 - 1、9 - 8 および 9 - 9）または表示のエピートープ（表 9 - 2 から 9 - 7）の結果を示す。

40

50

【表 9 - 1 - 1】

表9-1.TCE-I、II、VIおよびVIIを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS)および免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOP	TIS	IHC
バリエーション 36		+	680	52
100	I27E/L214E	+	634	51
101	V105C/R134Q/Q205T/P266H/L278D	+	645	48
102	I27E/L214E/C503Q/A547D	+	629	51
103	V105C/Q205T/P210C/L214E/C503Q/A547D	+	619	49
104	I27E/A112C/R134Q/Q205T/I285E/C503Q	+	622	45
105	V39A/P266H	+	665	45
106	I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C	+	607	41
107	I27E/V39A/V105C/P210C/L214E/P266H/L278D	+	590	42
108	V39A/V105C/L214E/P266H/A547D/C565N	+	613	42
109	I27E/V39A/A112C/L214E	+	616	42
110	I27E/V39A/R134Q/A153G/L214E/P266H/I285E/C503Q/ A551D/ C565N	+	572	37
111	I27E/R134Q/L278D/I285E/A551D/C565N	+	626	48
112	I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P266H/I285E/C503Q/A551D	+	594	39
113	I27E/V105C/L214E/P266H/C503Q	+	614	49
114	I27E/V39A/R134Q	+	637	44
115	C503Q/A547D	+	675	52
116	V105C/C503Q	+	660	50
117	I27E/R134Q/Q205T/P266H/L278D/A547D	+	641	50
118	I27E/V105C/R134Q/P210C/P266H/L278D/I285E/C503Q/A551D/C 565N	+	596	45
119	I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L278D/I285E/C503Q/A547D/A 551D/C565N	+	585	38
120	V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D	+	619	48
121	I27E/V39A/V105C/L214E/L278D/L309P/C503Q/A547D/A551D	+	587	42
122	V105C/L278D/C503Q/A551D	+	655	50
123	I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/P266H/L278D/A551D/C565N	++	591	48
124	I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D	++	620	50
125	R134Q/P210C/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N	+	630	50
126	I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L214E/L278D/A547D	+	585	42
127	V39A/Q205T/L278D/A547D/A551D	+	654	44
128	V105C/R134Q/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N	+	598	45
129	I27E/V105C/L214E/A547D/A551D/C565N	+	609	49
130	I27E/V39A/V105C/Q205T/L278D/C503Q/A547D	+	615	42
131	I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D	+	564	38

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 - 2】

表9-1.TCE-I、II、VIおよびVIIを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS) )および免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション 番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOP	TIS	IHC
132	C503Q/A547D/A551D/C565N	+	675	52
133	V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D	+	619	48
134	I27E/V105C/Q205T/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	630	49
135	I27E/V39A	+	646	45
136	I27E/V39A/V105C/L214E/P266H/C503Q/A547D/C565N	+	594	42
137	A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	636	48
138	I27E/A112C/R134Q/A153R/L214E/P266H/C503Q	+	619	47
139	C503Q/A551D	+	675	52
140	I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/C503Q/C565N	+	617	42
141	R134Q/Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N	+	613	47
142	V105C/L214E/I285E/A547D/C565N	+	607	46
143	I27E/V39A/R43L/L214E/A547D	+	625	45
144	I27E/V39A/P210C/L214E/I285E/C503Q/A551D	+	584	41
145	I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D	+	620	50
146	V39A/V105C/A153R/P266H/A547D/A551D	+	637	42
147	V39A/C503Q	+	665	45
148	I27E/V39A/V105C/P210C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	590	39
149	R134Q/L214E/L278D/C503Q/A551D	+	639	50
150	I27E/V39A/R134Q/C503Q/A547D	+	632	44
151	A153R	+	677	51
152	I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N	+	585	41
153	C503Q/A547D/C565N	+	675	52
154	I27E/V39A/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	614	44
155	L278D/A547D	+	675	52
156	V39A/G45S/L278D/C503Q/A551D	+	667	45
157	V39A/A153R/C503Q/A547D	+	657	44
158	R134Q/P210C/L214E/C503Q/A547D/A551D	+	630	50
159	I27E/A547D/C565N	+	656	52
160	V39A/R134Q/P210C/L214E/A547D/C565N	+	615	43
161	I27E/V39A/P210C/P266H/I285E/C503Q/A547D	+	610	41
162	I27E/V39A/R134Q/L278D/C503Q/A547D	+	632	44
163	I27E/V105C/R134Q/Q205T/P210C/C503Q	+	622	48
164	I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D	+	600	48
165	I27E/V105C/C503Q/A547D/C565N	+	636	50
166	I27E/L214E/C503Q	+	634	51
167	V105C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D	+	628	49
168	I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H	+	609	49
169	V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D	+	621	41
170	I27E/R134Q/L214E/C503Q/C565N	+	625	50
171	I27E/V39A/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q	+	602	42
172	I27E/V39A/L214E/C503Q/A551D	+	614	44
173	V39A/V105C/Q205T/A551D	+	634	42
174	I27E/V39A/Q205T/C503Q/A547D/C565N	+	635	44

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 - 3】

表9-1.TCE-I、II、VIおよびVIIを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS )および免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション 番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOP	TIS	IHC
175	A547D	+	675	52
176	I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N	+	576	41
177	V39A/P275R/L278D/C503Q/A551D	+	667	45
178	I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/A547D	+	611	42
179	V105C/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A547D	+	620	48
180	V105C/A112C/R134Q/Q205T/L214E/Y492H/C503Q/A547D	+	614	48
181	I27E/P210C/L278D/C503Q	+	651	51
182	I27E/P210C/C503Q	+	651	51
183	I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/C503Q/A547D	+	602	42
184	I27E/P266H/A547D/A551D	+	656	52
185	V105C/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	607	46
186	I27E/V105C/P266H/I285E/C503Q/A547D/C565N	+	615	47
187	Q205T/L278D/I285E/A547D/A551D	+	648	48
188	V39A/V105C/Q205T/C503Q	+	639	42
189	I27E/V39A/Q205T/P266H/I285E/A547D/A551D/C565N	+	614	41
190	V105C/L214E/I285E	+	612	46
191	V105C/R134Q/C503Q/A547D/C565N	+	646	49
192	I27E/V39A/V105C/R134Q/C503Q/A551D	+	612	42
193	I27E/R134Q/Q205T/I285E/C503Q/A551D	+	620	47
194	I27E/V39A/A112C/Q205T/L278D/I285E	+	616	39
195	I27E/V39A/A112C/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A551D/C565N	+	606	42
196	I27E/V39A/L278D/A547D	+	641	45
197	I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E/A551D/C565N	+	580	41
198	I27E/G45D/Q205T/P266H/C565N	+	656	51
199	I27E/V39A/A112C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D	+	611	42
200	I27E/Q205T	+	655	51
201	I27E/A112C/R134Q/Q205T/L278D/C503Q	+	643	48
202	C565N	+	680	52
203	I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/P210C/L278D/C503Q/A547D	+	602	41
204	V105C/L214E/P266H/L278D/A547D	+	628	49
205	V105C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/C503Q	+	616	47
206	V105C/R134Q/C503Q	+	651	49
207	I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/C565N	+	640	44
208	I27E/V39A/V105C/S131N/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N	+	579	41
209	Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D	+	622	48
210	I27E/L214E/L278D/C503Q	+	634	51
211	V105C/R134Q/L214E/L278D/C565N	+	624	48
212	I27E/V39A/L214E	+	619	44
213	L214E/C503Q/A547D	+	648	51
214	L214E/P266H	+	653	51
215	I27E/V39A/C503Q	+	646	45
216	P210C/L214E	+	644	51
217	V105C	+	660	50

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 - 4】

表9-1.TCE-I、II、VIおよびVIIを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS) および免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション 番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOP	TIS	IHC
218	A112C/R134Q/A153R/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	612	44
219	I27E/Q205T/L278D/A551D	+	650	51
220	I27E/L214E/A551D	+	629	51
221	R134Q/L214E/I285E/C503Q	++	623	47
222	I27E/V39A/V105C/C503Q/A551D	+	621	43
223	A112C/L278D/C503Q/A547D	+	672	50
224	I27E/R134Q/A153R/I285E/C503Q/A547D	++	623	47
225	I27E/V39A/V105C/A153R/I285E	+	602	39
226	I27E/V39A/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D	++	611	41
227	R134Q/C503Q	+	671	51
228	V39A/C503Q/A551D/C565N	+	660	45
229	I27E/V39A/P266H	+	646	45
230	V105C/I285E	+	639	47
231	I27E/V39A/V105C/A153R/L214E	+	596	41
232	A112C/L214E/L278D	+	650	49
233	I27E/R134Q/P210C	+	642	50
234	I27E/A153R/L214E/L278D/A551D	+	626	50
235	V105C/I285E/A547D	+	634	47
236	I27E/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/C565N	+	608	48
237	I27E/V39A/P210C/T212S	+	636	44
238	I27E/P266H/L278D/C503Q	+	661	52
239	I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H/A551D/C565N	+	604	49
240	I27E/A112C/P210C/L214E/C503Q/A547D	+	617	49
241	I27E/V39A/R134Q/P210C/C503Q/A551D	+	622	43
242	I27E/V39A/V105C/I285E/A547D	+	600	40
243	I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/A551D/C565N	+	635	44
244	I27E/R134Q/I285E/C503Q	+	631	48
245	I27E/V39A/P210C/L214E/L278D/C503Q/A551D	+	605	44
246	V39A/A112C/R134Q/Q205T/L214E/L278D	+	621	41
247	I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q	+	619	44
248	I27E/V105C/L214E	+	614	49
249	I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q/A547D/A551D	+	612	42
250	I27E/V39A/P210C/P266H/C503Q/A551D	+	631	44
251	I27E/V39A/V105C/A153R/C503Q/A547D/C565N	+	618	42
252	V39A/V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D	+	604	41
253	I27E/L214E/L278D	+	634	51
254	I27E/V39A/V105C/R134Q/A153R/P210C/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D	+	578	37
255	V105C/R134Q/Q205T/L214E/A547D	+	614	48
256	I27E/V105C/R134Q/A153R/C503Q	+	629	48
257	V105C/R134Q/C503Q/A547D	+	646	49
258	I27E/V39A/L278D/I285E/C503Q/A547D	+	620	42
259	I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D	+	634	43
260	I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D	+	602	41

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 - 5】

表9-1.TCE-I、II、VIおよびVIIを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS) および免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション 番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOP	TIS	IHC
261	I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D/A547D/A551D	+	629	43
262	I27E/V39A/L278D/C503Q/C565N	+	646	45
263	Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N	+	643	51
264	R134Q/L214E	+	644	50
265	I27E/V39A/P266H/L278D	+	646	45
266	R134Q/Q205T/C503Q	+	665	50
267	V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/A551D	+	595	41
268	V105C/A153R/Q205T/P266H/I285E/A547D/C565N	+	625	45
269	I27E/V39A/R134Q/L214E/P266H/A551D	+	605	43
270	L214E/P266H/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	648	51
271	V39A/V105C/P210C/A547D	+	630	42
272	I27E/V105C	+	641	50
273	I27E/V39A/R134Q/Q205T/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N	+	579	40
274	I27E/V39A/R134Q/Q205T/P266H/C503Q/A551D/C565N	+	626	43
275	I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N	+	591	48
276	I27E/L214E/C503Q/A547D/C565N	+	629	51
277	I27E/V39A/R134Q/A153R/P210C/L214E/L278D/I285E/A547D/C565N	+	572	39
278	I27E/V39A/A112C/I285E	+	622	40
279	I27E/A112C/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N	+	623	46
280	I27E/L214E/P266H/L278D/I285E/A551D	+	608	48
281	I27E/V39A/V105C/A153R/A551D/C565N	+	618	42
282	V39A/V105C/R134Q/A153R/Q205T/A551D	+	622	40
283	I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E	+	585	41
284	I27E/V105C/Q205T	+	635	49
285	I27E/Q205T/P266H/L278D/I285E/A551D/C565N	+	629	48
286	I27E/R134Q/L214E/C503Q	+	625	50
287	V105C/Q205T/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	623	49
288	V39A/V105C/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N	+	592	39
289	I27E/V39A/V105C/L278D/C503Q/A547D/C565N	+	621	43
290	I27E/V39A/V105C/R134Q/I285E/A547D/A551D	+	591	39
291	I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/P266H/A551D	+	602	41
292	I27E/L278D/C503Q/A551D	+	656	52
293	I27E/V39A/R134Q/A153R/A547D	+	629	43
294	P266H/C565N	+	680	52
295	I27E/V105C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	615	47
296	I27E/V39A/L278D	+	646	45
297	P210C/L214E/P266H	+	644	51
298	I27E/V39A/R134Q/P210C/L214E/C503Q	+	601	43
299	I27E/V39A/R43L/V105C/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q	+	607	42
300	I27E/V105C/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	583	46
301	I27E/V39A/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	621	43
302	I27E/V105C/L214E/I285E/A551D/C565N	+	588	46

10

20

30

40

50



【表 9 - 1 - 6】

表9-1.TCE-I、II、VIおよびVIIを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS)および免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOP	TIS	IHC
303	I27E/P210C/A551D	+	646	51
304	I27E/V39A/V105C/Q205T/L214E/L278D/C503Q/A547D	+	589	42
305	I27E/V105C/L278D/A547D	+	636	50
306	C503Q	+	680	52
307	I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/L278D/A547D/A551D	+	585	41
308	I27E/R134Q	+	652	51
309	V39A/R134Q	+	656	44
310	I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P210C/P266H/C503Q/A547D	+	611	42
311	V39A/A112C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D	+	648	41
312	I27E/V105C/P266H	+	641	50
313	I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E	+	581	41
314	I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/A551D	+	612	42
315	I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/A551D	+	577	40
316	I27E/V105C/R134Q/A153R/I285E/A547D	+	603	45
317	I27E/V39A/A112C/A547D	+	638	43
318	I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/C565N	+	602	42
319	I27E/V105C/Q205T/P266H/C503Q	+	635	49
320	I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/I285E/C503Q	+	596	39
321	C503Q/A551D/C565N	+	675	52
322	I27E/V39A/A112C/R134Q/Q205T/P210C/L214E/A551D/C565N	+	593	41
323	R134Q/C503Q/A547D/A551D	+	666	51
324	I27E/A112C/Q205T/P266H/L278D/I285E/C503Q	+	631	46
325	P266H/L278D/C503Q	+	680	52
326	I27E/V39A/Q205T/P266H/A551D	+	635	44
327	Q205T/L214E/I285E/C503Q/C565N	+	627	48
328	I27E/V105C/R134Q/Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/C565N	+	600	48
329	I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q	+	617	42
330	I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/I285E/A547D	+	555	38
331	I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/C503Q	+	616	42
332	I27E/V39A/R134Q/A547D/C565N	+	632	44
333	V105C/A547D/A551D	+	655	50
334	I27E/V105C/R134Q/A153R/P210C/L214E/C503Q/A547D	+	588	47
335	I27E/P210C/L214E/C503Q/A547D	++	620	51
336	I27E/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	636	50
337	I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	600	48
338	I27E/V39A/V105C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D/A551D	+	612	41
339	I27E/V39A/V105C/A112C/L214E/I285E/C503Q/A547D	+	573	39
340	L214E/A547D	+	648	51
341	V105C/Q205T/L214E/L278D	+	628	49
342	I27E/V39A/Q205T/L214E/C503Q/C565N	+	614	44
343	I27E/P210C	+	651	51
344	V105C/Q205T/C503Q/A551D	+	649	49
345	I27E/V39A/A112C/R134Q/P266H/I285E	+	613	39

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 - 7】

表9-1.TCE-I、II、VIおよびVIIを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS)および免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション 番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOP	TIS	IHC
346	V39A/P210C/L214E/L278D/I285E/C503Q/A551D	+	603	41
347	I27E/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N	+	624	51
348	I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N	+	614	44
349	I27E/P210C/C503Q/C565N	+	651	51
350	I27E/L278D/C503Q/A551D/C565N	+	656	52
351	R134Q/L214E/L278D/C503Q	+	644	50
352	I27E/A153R/L214E/L278D/I285E/A551D/C565N	+	605	47
353	I27E/V105C/L214E/A551D/C565N	+	609	49
354	V39A/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/C565N	+	624	43

10

【表 9 - 2】

表9-2.TCE-IIIを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS)および免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOPC	TIS	IHC
バリエーション36		+	71	7
400	V80I/R134C/P564Q	+	60	5
401	V121C	+	44	6
402	R134L	+	78	7
403	A124G	+	58	7
404	R134W	+	63	5
405	L126M	+	56	5
406	N130C/M370I	+	62	6
407	N130Q	+	65	7
408	A123G	+	67	8
409	A129G	+	64	9
410	G135A/A394E	+	76	7
411	A129L	+	82	9
412	M133R	+	52	3
413	G135S	+	78	9
414	L126T	+	62	8
415	L127A	+	46	6
416	R134I	+	82	7
417	R134N/G307C	+	60	5
418	L126I	++	80	12
419	G135C	+	67	6
420	M125L	+	72	8

20

30

40

50

【表 9 - 3 - 1】

表9-3.TCE-1Vを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS) および免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOPC	TIS	IHC
バリエーション36		+	74	11
500	P157H	+	69	8
501	R140M	+	72	11
502	P157F	+	80	12
503	A153C	+	56	7
504	E142V	+	84	14
505	K145G/P157T	+	62	8
506	R140D	+	63	8
507	E142D/G371D	+	79	13
508	M147A	+	48	1
509	T156K/G483C	+	83	12
510	P157D	+	64	8
511	A62S/M147V	+	62	8
512	R146L	+	81	14
513	Y158E	+	72	11
514	G154Y/L174M/Q321K/S456I/G483C	+	75	10
515	S82I/G135C/P157F/W279L	+	77	11
516	I144N	+	61	7
517	T110I/I139R	+	65	8
518	L47M/I144L	+	67	8
519	L47M/M147G/A383E	+	48	4
520	G20S/I144L	+	67	8
521	R146W/D191Y	+	62	5
522	P157Y	+	73	9
523	L47M/P157C	+	68	8
524	E142P	+	68	9
525	F150K	+	59	6
526	L141T	+	55	7
527	V159H	+	67	8
528	I144L	+	67	8
529	A119E/T156H/A289D	+	78	11
530	Q58K/P157D/G369C	+	64	8
531	L47M/R146E	+	58	6
532	E142H	+	79	13
533	R140N/A199E	+	67	8
534	I144V	+	72	13
535	I149L	+	69	9
536	R146H	+	77	12
537	I139M	+	74	11
538	A153S/H250N	+	73	10
539	L319M	+	74	11
540	R140E/A334S/A551D	+	63	8
541	F150L	+	79	12
542	L143M	+	72	11
543	A153G	+	62	8
544	I139V	+	74	11
545	Q58H/L143V	+	72	11
546	G154R	+	81	13
547	K145Q	+	72	11
548	L143F	+	74	11
549	R140G	+	67	8
550	V159C	+	72	11

10

20

30

40

50

【表 9 - 3 - 2】

表9-3.TCE-1Vを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS) および免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOPC	TIS	IHC
551	Q389K	+	74	11
552	L141P	+	58	5
553	M247I	+	74	11
554	F150M	+	77	12
555	L141Q	+	59	7
556	L151M	+	68	9
557	V159L	+	74	11
558	R94C/I149E	+	53	6
559	V159M	+	74	11
560	L118M/L141H	+	58	7
561	K145N	+	71	11
562	I149R	+	72	11
563	K145R	+	84	15
564	L141K	+	59	7
565	R43S	+	74	11

10

【表 9 - 4】

表9-4.TCE-Vを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS) および免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOPC	TIS	IHC
バリエーション 36		+	36	2
600	Y176R	+	51	4
601	S180C	+	27	0
602	S180T	+	27	0
603	V172L	+	30	1
604	I177V	+	24	0
605	V172I	+	29	1
606	I177M	+	30	1
607	Y176I	+	54	4
608	Y176M	+	33	2
609	Y176V	+	41	3
610	L174M	+	21	0
611	P117T/Y176Q	+	37	2
612	S175G	+	26	0
613	T178L/A477S	+	43	5
614	V172C	+	26	0
615	Y176E	+	20	0

20

30

40

50

【表 9 - 5 - 1】

表9-5.TCE-VIIIを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS)および 免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション 番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOPC	TIS	IHC
バリエーション 36		+	83	10
700	A232S	+	83	10
701	A112S/M370A/A507E	+	71	10
702	Q240K/H374R	+	83	10
703	S461G	+	83	10
704	H374D	+	83	10
705	M372A	+	74	10
706	L349M	+	83	10
707	Y378S	+	74	7
708	G371H	+	91	11
709	Y377N	+	82	10
710	I379N	+	80	8
711	D191Y/H385N	+	81	10
712	I379L	+	83	10
713	R43S/H374R	+	83	10
714	Q355K/H374S	+	83	10
715	P275T/H374R	+	83	10
716	H374Q/P396Q	+	99	14
717	H385N	+	81	10
718	Y378L	+	78	9
719	I379C	+	70	7
720	M370G	+	64	10
721	M372V	+	76	10
722	K384R	+	87	10
723	A383V	+	88	13
724	M147I/H374S	+	83	10
725	Y378F/P404Q	+	85	10
726	H374S	+	83	10
727	Y378E	+	55	2
728	H374R/G417C	+	83	10
729	L418M	+	83	10
730	S525L	+	83	10
731	Y378D	+	60	4
732	A383S	+	88	10
733	D387S	+	96	11
734	L382H	+	78	10
735	L382C	+	76	8
736	G371Q	+	84	10
737	H374L	+	85	11
738	Y378C	+	58	5
739	H374A	+	83	10
740	L375M	+	77	10
741	H385C	+	74	8
742	A334S/H374V	+	85	11
743	H374R	+	83	10
744	H385M/P403H	+	83	11
745	Y378I	+	83	10
746	Y377I	+	86	10
747	H385G	+	74	7
748	H385S/P403H	+	79	9

10

20

30

40

50

【表 9 - 5 - 2】

表9-5.TCE-VIIIを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS)および 免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション 番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOPC	TIS	IHC
749	H374N	+	83	10
750	S187R/L381V	+	78	7
751	L382S	+	77	9
752	Y377C	+	75	7
753	L381V	+	78	7
754	G371S	+	88	10
755	A256S/L381N	+	70	6
756	I379M	+	80	10
757	R43S/H374K	+	83	10
758	I379H	+	76	7
759	M370S	+	64	10
760	P275Q/M370S	+	64	10
761	G425V	+	83	10
762	A447S	+	83	10
763	L382M	+	80	10
764	G371N	+	84	10
765	L381M/Q560K	+	79	10
767	L382I	+	77	8
768	H374G	+	83	10
769	M370I	+	76	10
770	Q332K/Y377M	+	86	10
771	Y378N	+	64	5
772	L375I	+	83	10
773	H374T	+	83	10
774	L381G	+	60	4

10

20

30

40

50

【表 9 - 6】

表9-6.TCE-IXを標的とするバリエーションのFIOP、総免疫原性(TIS)および 免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOP C	TIS	IHC
バリエーション36		+	45	4
800	I439V	+	49	4
801	I439C	+	39	1
802	S438F	+	50	4
803	T433S	+	44	0
804	T433A	+	35	0
805	Y435Q/H446N	+	43	2
806	L431V	+	28	0
807	N437Q	+	40	0
808	L213M/S438L	+	46	4
809	L432C	+	39	2
810	L432V	+	47	4
811	T433L	+	50	4
812	L431P	+	18	0
813	I439F	+	47	4
814	S286R/Y435T	+	53	4
815	S98I	+	45	4
816	S438R	+	48	4
817	S331I	+	45	4
818	S438M	+	44	4
819	Q240K/T433Y	+	41	0
820	T433I	+	46	3
821	T433N	+	38	0
822	L431S	+	27	0
823	N437G	+	38	0
824	L431E	+	26	0
825	L431C	+	25	0
826	G436T	+	45	0
827	G436D	+	42	1
828	T433V	+	59	7
829	N437T/L538M	+	52	4
830	A289S/L431E	+	26	0
831	T433Q	+	37	0
832	I439L	+	46	4
833	F434C	+	34	0
834	T433P	+	35	0
835	A24S/F434M	+	69	8
836	L431G	+	18	0
837	S438C	+	45	1
838	T433W	+	33	0
839	Y435L	+	57	5
840	A62S/T433N	+	38	0
841	N437E	+	46	3
842	A477S	+	45	4
843	G436M	+	87	11
844	T433R	+	70	10
845	S438T	+	46	4

10

20

30

40

50

【表 9 - 7】

表9-7.TCE-Xを標的とするバリアントのFIOP、総免疫原性(TIS)および 免疫原性ヒットカウント(IHC) (「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリアント 番号	活性突然変異 (バリアント番号36と比較)	FIOPC	TIS	IHC
バリアント36		+	47	7
900	I471V	+	45	7
901	F472G	+	16	0
902	G483S	+	60	9
903	G483A/S524I	+	64	10
904	Y475C	+	20	0
905	I478N	+	44	6
906	V476I	+	30	2
907	N474D/R490H	+	29	3
908	P275Q	+	47	7
909	Q473K	+	55	7
910	G483H	+	58	8
911	Q473H/A507S	+	52	7
912	N474H	+	49	7
913	Y475F	+	58	7
914	I478S	+	46	6
915	Q473M	+	69	9
916	V476C	+	23	0
917	L104M/V476L	+	36	3
918	A119E/G365A	+	47	7
919	N474W	+	51	7
920	I471K	+	29	2
921	Q292H/A479G	+	35	2
922	G276V	+	47	7
923	I471N	+	26	1
924	A479S	+	53	7
925	A558S	+	47	7
926	Q473S	+	56	8
927	Q473R	+	62	8
928	Y475Q	+	33	5
929	I471G	+	32	3
930	A479G	+	35	2
931	A70S/N474E	+	32	3
932	I471F	+	48	7
933	Q58R/Y475H	+	32	5
934	F482L	+	56	9
935	V476L	+	36	3
936	A24E	+	47	7
937	N474R	+	55	7
938	G483C	+	49	6
939	Q473H	+	52	7
940	I471M	+	46	7
941	I471R	+	31	2
942	P404T/A477V	+	47	6
943	G483R/G537C	+	78	13
944	F482C	+	45	6
945	Q355H/I478C	+	31	1
946	L206M	+	47	7
947	N474A	+	48	7
948	Y475L	+	60	7
949	I471W	+	34	4

10

20

30

40

50



【表 9 - 8】

表9-8.TCE-I、III、IV、VIIIおよびXを標的とするバリエーションのFIOP、 総免疫原性(TIS)および免疫原性ヒットカウント(IHC)				
(「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエーション番号	活性突然変異 (バリエーション番号36と比較)	FIOP	TIS	IHC
バリエーション36		+		
950	F472G/C503Q/C565N	+	651	45
951	L381G/F472G/C503Q/C565N	+	628	39
952	M133R/C503Q	+	663	48
953	M133R/L381G/C565N	+	640	42
954	V39A/C503Q/C565N	+	667	45
955	V39A/F472G/C503Q/C565N	+	636	38
956	V39A/G248C/L381G/F472G/C503Q/C565N	+	613	32
957	V39A/K115E/M133R/C565N	++	646	39
958	V39A/L381G	+	644	39
959	V39A/M133R/C503Q	+	648	41
960	V39A/M133R/C503Q/C565N	+	648	41
961	V39A/M133R/F472G/C503Q/C565N	+	617	34
962	V39A/M133R/F472G/C565N	+	617	34
963	V39A/M147A/C565N	+	641	35
964	V39A/M147A/F472G/C503Q/C565N	+	610	28
965	V39A/M147A/F472G/C565N	+	610	28
966	V39A/M147A/L381G/C503Q/C565N	+	618	29
967	V39A/M147A/L381G/F472G/C503Q/C565N	+	587	22
968	V39A/M147A/Y378E/C503Q/C565N	+	613	27
969	V39A/M147A/Y378E/C565N	+	613	27
970	V39A/Y378E/C503Q/C565N	+	639	37
971	V39A/Y378E/C565N	+	639	37
972	Y378D/C503Q	+	659	46
973	Y378E/F472G/C503Q/C565N	+	623	37

10

20

30

40

50

【表 9 - 9】

表9-9.TCE-IIIおよびVIIIを標的とするバリエントのFIOP、 総免疫原性(TIS)および免疫原性ヒットカウント(IHC)				
(「-」=FIOP<0.7; 「+」=FIOP0.7<FIOP<1.4; 「++」=FIOP>1.4)				
バリエント番号	活性突然変異 (バリエント番号967と比較)	FIOP	TIS	IHC
バリエント967		+		
974	A129I	-	598	26
975	A129V	-	595	24
976	A136K	++	595	22
977	A24E/G381L	+	604	28
978	A289S	+	590	23
979	A383C	+	577	18
980	A383M	++	602	28
981	G381A	++	598	24
982	G381C	-	580	22
983	G381F	+	601	25
984	G381I	++	610	27
985	G381L	++	610	28
986	G381M	+	606	28
987	G381N	+	597	24
988	G381Q	+	590	23
989	G381S	+	601	24
990	G381T	+	590	23
991	H132L	-	603	25
992	H132S	-	592	23
993	H374G	+	587	22
994	H374M	+	589	23
995	H374Q	-	587	22
996	L127V	-	576	22
997	L431M	+	591	22
998	L563M	-	587	22
999	M372L	-	580	22
1000	R134C	-	576	20
1001	R134F	+	588	21
1002	R134H	+	579	21
1003	R134K	-	585	21
1004	S131C	-	579	21
1005	S131T	+	580	21
1006	V388C	+	577	21
1007	V388T	+	578	21
1008	R134H/V388T	+	570	20
1009	R134H/Y378E/G381L	+	574	19
1010	R134H/Y378E/G381L/V388T	+	566	19

## 【 0 2 6 3 】

脱免疫化PALバリエントの*in vitro*検査:

樹状T細胞アッセイにおいて脱免疫化PALバリエントを検査して、T細胞応答を誘発するその能力を経験的に検査する。標準技法を使用して、ヒトドナーから末梢血単核細胞(PBMC)を単離する。この細胞は、未成熟樹状細胞を作製するために限定培地において培養され単球の供給源として使用する。この未成熟樹状細胞(DC)に、脱免疫化PALバリエントをロードし、続いて限定培地においてさらに培養することにより、より成熟した表現型に誘導して、抗原刺激されたDCをもたらす。DCと同じドナー試料から得られたCD8+T細胞枯渇されたドナーPBMCを、CFSEで標識し、続いて抗原刺激さ

10

20

30

40

50

れたDCと共に7日間培養し、その後8回複製物(octuplicate)を検査する。各DC-T細胞培養物は、未処理対照(即ち、陰性対照)のセットを含む。アッセイは、2種の強力な全タンパク質抗原を含む参照抗原対照(即ち、陽性対照)も取り込む。多様な主要組織適合遺伝子複合体クラスIIアレルを有する50名のヒトドナーから単離された細胞を利用するアッセイは、T細胞応答を誘発するPALバリエントの能力の統計的に関連する評価をもたらす。

【0264】

特異的な実施形態を参照しつつ本発明について記載してきたが、様々な変更を行うことができ、均等物に置換して、特定の状況、材料、組成物、プロセス、プロセスステップ(単数または複数)に適応させることができ、これにより、特許請求の範囲から逸脱することなく、本発明の利益を達成することができる。

10

【0265】

アメリカ合衆国におけるあらゆる目的のため、本開示に引用されているありとあらゆる刊行物および特許文書は、あたかも斯かる刊行物または文書のそれぞれが、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用されていると特にかつ個々に示されているかのように、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する。刊行物および特許文書の引用は、斯かる文書のいずれかが関連する先行技術であるという指示として企図されておらず、また、その内容または日付に関する承認を構成するものでもない。

20

30

40

50



【 図 4 】

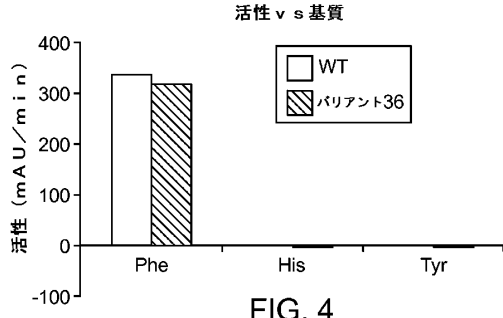


FIG. 4

【 図 5 】

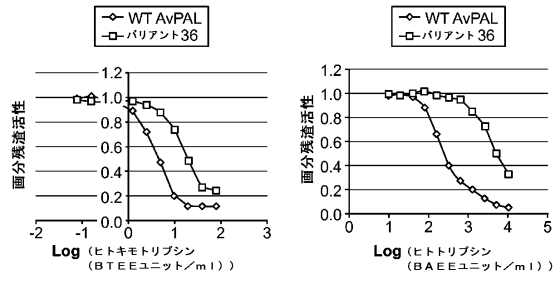


FIG. 5

【 図 6 】

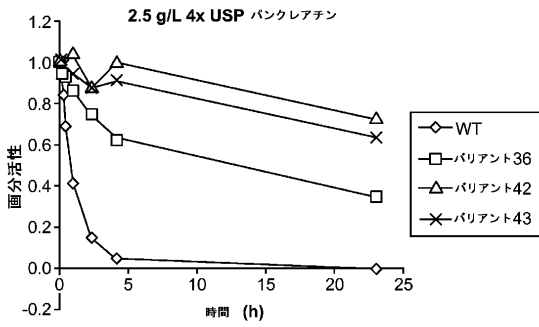


FIG. 6

【 図 7 】

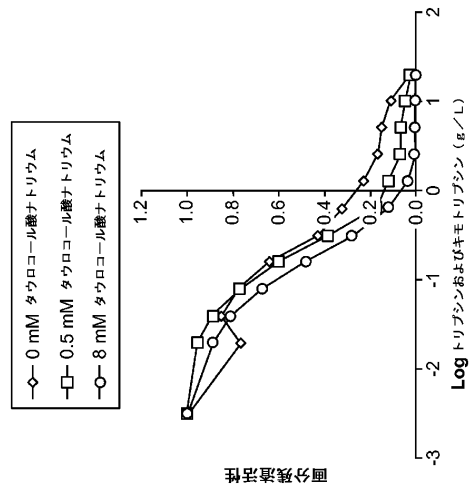


FIG. 7

10

20

30

40

50

【 図 8 】

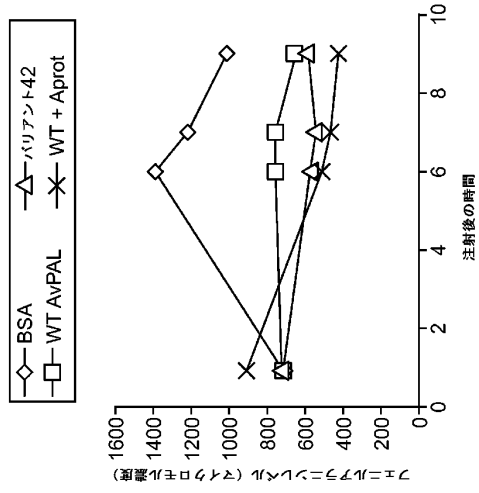


FIG. 8

【 配列表 】

0007129715000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

		F I		
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	C
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/51 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>38/51</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>3/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>3/00</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	1 1 1

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

6 3 , レッドウッド シティ , ペノブスコット ドライブ 2 0 0

## (72)発明者 ベンジャミン ミジツ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3 , レッドウッド シティ , ペノブスコット ドライブ 2 0 0

## (72)発明者 ジョナサン ブルーム

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3 , レッドウッド シティ , ペノブスコット ドライブ 2 0 0

## (72)発明者 シュン ザン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3 , レッドウッド シティ , ペノブスコット ドライブ 2 0 0

審査官 小金井 悟

## (56)参考文献 特表2010-529835(JP,A)

特表2008-513027(JP,A)

Mol. Genet. Metab. , 2010年01月 , Vol.99, No.1 , pp.4-9

Biochemistry , 2007年01月30日 , Vol.46, No.4 , pp.1004-1012

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

P u b M e d

G o o g l e / G o o g l e S c h o l a r