

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6175372号
(P6175372)

(45) 発行日 平成29年8月2日(2017.8.2)

(24) 登録日 平成29年7月14日(2017.7.14)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N 9/24	(2006.01)	C 12 N	9/24	
C 07 K 14/65	(2006.01)	C 07 K	14/65	
C 07 K 19/00	(2006.01)	C 07 K	19/00	
A 61 K 38/30	(2006.01)	A 61 K	38/30	

請求項の数 3 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-556654 (P2013-556654)
(86) (22) 出願日	平成24年3月2日(2012.3.2)
(65) 公表番号	特表2014-515595 (P2014-515595A)
(43) 公表日	平成26年7月3日(2014.7.3)
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/027561
(87) 國際公開番号	W02012/122042
(87) 國際公開日	平成24年9月13日(2012.9.13)
審査請求日	平成27年2月26日(2015.2.26)
(31) 優先権主張番号	61/449,225
(32) 優先日	平成23年3月4日(2011.3.4)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	PCT/US2011/041928
(32) 優先日	平成23年6月25日(2011.6.25)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	507159304 シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2421 レキシントン シャイアー ウ エイ 300
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ポリペプチド組成物用ペプチドリンカーおよびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む第 1 のペプチド、
 b) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む第 2 のペプチド、ならびに
 c) 該第 1 のペプチドと該第 2 のペプチドとの間に配置された配列番号 2 のアミノ酸配列
 を含むリンカー
 を含む、ポリペプチド組成物。

【請求項 2】

配列番号 2 のアミノ酸配列 (G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P G G G G G A
 A A A A G G G G G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P) からなるポリペプチ
 ドリンカー。 10

【請求項 3】

治療用ポリペプチドを送達する必要のある被験体に治療用ポリペプチドを送達するための組成物であって、

a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む第 1 のペプチド、
 b) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む第 2 のペプチド、ならびに
 c) 該第 1 のペプチドと該第 2 のペプチドとの間に配置された配列番号 2 のアミノ酸配列
 を含むリンカー
 を含むポリペプチド組成物を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2011年3月4日に出願された米国仮出願第61/449,225号（代理人文書番号S H I R - 018 - 001）に対する優先権を主張し、そして本願は2011年6月25日に出願された米国出願第13/168,969号および2011年6月25日に出願された国際出願第P C T / U S 2011/041928号の一部継続出願である。これらの教示全体は、本明細書に参考として援用される。

【0002】

発明の分野

10

本発明は、新規なペプチドリンカーならびにそのようなリンカーを含むポリペプチド組成物（例えばキメラポリペプチド）ならびにそれらを使用および調製する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

リソーム蓄積障害は、特定のリソーム酵素の欠損または不活性によって引き起こされる、40を超えるまれな遺伝性の代謝障害のグループを表す。特に、リソーム蓄積障害は、脂質またはグリコサミノグリカンとして知られている複合糖タンパク質の段階的な代謝を触媒するリソーム酵素の欠損または不活性によって引き起こされる。この代謝欠損の結果として、代謝前駆体は、細胞、組織、特に、罹患被験体の細胞リソーム中に進行的に蓄積する。このタンパク質蓄積は、外観、身体能力、器官および系の機能、ならびにほとんどの症例において、罹患被験体の精神発達に影響を及ぼす、永久的で進行性の細胞の損傷を引き起こす。この酵素欠損症は、あらゆる組織に影響を及ぼすが、患者の臨床的発現は、例えば、酵素欠損症または機能障害の程度に依存して、頻繁に変化し得る。リソーム蓄積障害はまた、ある程度のニューロン細胞損失にも関連し得、精神遅滞、重度の運動障害、身体障害、寿命の短縮、および/または前述のものの組み合わせを始めとする神経症状を主にもたらす。

20

【0004】

リソーム蓄積障害に対する治療法はなく、治療は、多くの場合待機療法であり、主として、被験体の生活の質を改善するために被験体に提供される。酵素補充療法（E R T）は、リソーム性蓄積症を有する被験体に対する有用な治療選択肢であった。E R Tは、一般的に、天然の、または組換えによって誘導された、タンパク質および/または酵素を患者へ非経口投与することを含む。承認された療法は、患者に静脈内投与され、根底にある酵素欠損症の身体症状または末梢症状を治療するのに一般的に有効である。リソーム蓄積障害を有效地に治療するために、投与された治療剤（例えば欠損したリソーム酵素）は、患者の血流に注入された後に、罹患細胞および罹患組織に分布しなければならない。

30

【0005】

罹患細胞および罹患組織への必要とされる酵素の分布を達成するために、この酵素は、受容体媒介性エンドサイトーシスを通して細胞の中にこの酵素を輸送する特異的な細胞表面受容体へと一般的に標的化される。例えば、ゴーシェ病において、欠損した酵素であるグルコセレブロシダーゼは、標的細胞（細網内皮細胞（r e t i c u l o e n d o t h e i l i a l c e l l ））上に豊富に発現されるマンノース受容体への、酵素上の露出したマンノース残基の結合を通して、適切な細胞へと標的化される。マンノース受容体を欠く細胞では、インスリン様増殖因子/カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体（I G F - I I / C I - M P R ）の使用が、欠損したリゾチームの細胞への送達に提唱された（非特許文献1）。I G F - I I / C I - M P R 受容体は、多くの哺乳動物細胞型の表面上に存在し、したがって、この受容体のリガンド（例えばI G F I I またはマンノース-6リン酸）を含有するタンパク質が中枢神経系を始めとする種々様々の細胞および組織を標的にする手段を提供する。しかしながら、欠乏しているリソーム酵素を適切な組織へと標的化する方法についてのいくらかの知識にもかかわらず、多くのリソーム蓄積障

40

50

害（例えばサンフィリポ症候群、ファーバー病、およびその他同種のもの）にとって有効な療法はまだない。したがって、組成物、特に非経口的に投与することができる組成物、および疾患（例えばリソソーム蓄積症）を治療するために、必要な組織に作用因子（agent）を導くのに有用な方法についての必要性が当該技術分野において残っている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Kornfeld, S., 1987 Biochem Soc Trans 18: 367-374

【発明の概要】

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

所望の組織への機能的な治療剤（例えばタンパク質、ポリペプチド）の輸送および送達を促進する組成物および方法についての必要性がある。そのような組成物および方法は、多くの疾患または障害の治療において、特に、サンフィリポ症候群のようなリソソーム蓄積障害の治療において有用であってもよい。

【0008】

20

ペプチドリンカーを含む新規な組成物、ペプチドリンカーによってつながれるポリペプチドを含むポリペプチド組成物、ならびに関係するポリヌクレオチド、ベクター、細胞、および医薬組成物が本明細書において記載される。記載されるリンカー配列は、リンカーによって接続されるポリペプチドの発現および活性（例えば受容体結合および/または酵素活性）に耐久性があり、最適であるように、目的の2つのペプチド/ポリペプチドを作動可能につなぐ。ペプチドリンカーを含むポリペプチド組成物は、特定の細胞および/または組織への目的のポリペプチド/タンパク質の標的化された送達を促進する。

【0009】

30

したがって、本発明の1つの実施形態は、第1のペプチド/ポリペプチド、第2のペプチド/ポリペプチド、ならびに第1のペプチドと第2のペプチドとの間に配置される配列番号1のアミノ酸配列（GAPGGGGAAAAAGGGGG）の1個以上のシーケンシャルリピートまたはタンデムリピートを含むリンカーを含むポリペプチド組成物を提供する。いくつかの実施形態では、ポリペプチド組成物のリンカーが、配列番号1の3つのシーケンシャルリピートまたはタンデムリピートを含み、いくつかの実施形態では、リンカーが、配列番号1の3'末端にアミノ酸配列グリシン アラニン プロリン（GAP）をさらに含む。他の実施形態では、リンカーの1個以上のアラニン残基が、1個以上のセリン残基で置換されてもよい。ある実施形態では、ポリペプチド組成物の第1のペプチドが、配列番号4のアミノ酸配列を含む。さらに他の実施形態では、第2のペプチドが、受容体結合ドメインを含み、さらなる実施形態では、第2のペプチドが、配列番号6のアミノ酸配列を含む。

【0010】

40

ある実施形態では、ポリペプチド組成物が、配列番号4のアミノ酸配列を含む第1のペプチド；配列番号6のアミノ酸配列を含む第2のペプチド；ならびに第1のペプチドと第2のペプチドとの間に配置される配列番号1のアミノ酸配列の1個以上のシーケンシャルリピートまたはタンデムリピートを含むリンカーを含む。いくつかの実施形態では、このリンカーが、配列番号1の3つのシーケンシャルリピートを含む。他の実施形態では、このリンカーが、配列番号1の3'末端にアミノ酸配列グリシン アラニン プロリン（GAP）をさらに含んでいてもよい。さらに他の実施形態では、このリンカーの1個以上のアラニン残基が、1個以上のセリン残基で置換されている。

【0011】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド組成物が、配列番号4のアミノ酸配列を含む第1のペプチド；配列番号6のアミノ酸配列を含む第2のペプチド；ならびに第1のペプチ

50

ドと第2とのペプチドの間に配置される配列番号2のアミノ酸配列を含むリンカーを含む。ある実施形態では、このリンカーの1個以上のアラニン残基が、1個以上のセリン残基で置換されている。

【0012】

本発明はまた、本明細書において記載されるペプチド/ポリペプチドリンカーをも提供する。例えば、いくつかの実施形態では、ポリペプチドリンカーが、18個連続したアミノ酸残基を含み、ここで、このリンカーが、このリンカーの最初の5個のアミノ酸残基内の1つのプロリン残基ならびに1個以上のグリシン残基および1個以上のアラニン残基からなる群から選択される17個のアミノ酸残基を含む。他の実施形態では、このポリペプチドリンカーの3'末端が、1つのプロリン残基ならびにグリシンおよびアラニンからなる群から選択される2つのアミノ酸残基を含む3個連続したアミノ酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、このリンカーの1個以上のアラニン残基が、1個以上のセリン残基で置換されている。

【0013】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドリンカーが、21個連続したアミノ酸残基を含み、このリンカーが、このリンカーの最初の5個のアミノ酸残基内にある第1のプロリン残基；1個以上のグリシン残基および1個以上のアラニン残基からなる群から選択される19個のアミノ酸残基；ならびにこのリンカーの最後の5個のアミノ酸内にある第2のプロリン残基を含む。

【0014】

ある実施形態では、このリンカーの1個以上のアラニン残基が、1個以上のセリン残基で置換されている。さらに他の実施形態では、このポリペプチドリンカーが、アラニン残基の2倍の数のグリシン残基およびセリン残基を含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、このポリペプチドリンカーが、配列番号7のアミノ酸配列(G G G G G A A A A A G G G G G G)からなる。

【0016】

他の実施形態では、本発明は、配列番号7のアミノ酸配列からなるポリペプチドリンカーの1個以上のシーケンシャルリピートを含むポリペプチドリンカー組成物を提供する。他の実施形態では、このポリペプチドリンカー組成物の5'末端が、1つのプロリン残基ならびにグリシンおよびアラニンからなる群から選択される2つのアミノ酸残基を含む3個連続したアミノ酸をさらに含む。

【0017】

さらに他の実施形態では、ポリペプチドリンカーが、配列番号1のアミノ酸配列からなる。ある実施形態では、本発明は、配列番号1からなるポリペプチドリンカーの1個以上のシーケンシャルリピートを含むポリペプチドリンカー組成物を提供する。

【0018】

さらなる実施形態では、上記のポリペプチドリンカー組成物の3'末端が、1つのプロリン残基ならびにグリシンおよびアラニンからなる群から選択される2つのアミノ酸残基を含む3個連続したアミノ酸をさらに含む。ある実施形態では、この3個連続したアミノ酸残基が、アミノ酸配列グリシンアラニンプロリン(G A P)を含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドリンカーが、配列番号2のアミノ酸配列(G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P G G G G G A A A A A G G G G G G G A P)からなる。

【0020】

ある実施形態では、本発明は、第1のペプチド；第2のペプチド；ならびに第1のペプチドと第2のペプチドとの間に配置されるポリペプチドリンカーを含むポリペプチド組成物であって、ここで、このリンカーが、前述のポリペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカー組成物のいずれかを含むポリペプチド組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0021】

他の実施形態では、本発明はまた、本明細書において記載されるポリペプチドリンカーおよび／またはポリペプチド組成物をコードするポリヌクレオチドをも提供する。したがって、いくつかの実施形態は、配列番号1；配列番号2；または配列番号1の1個以上のシーケンシャルリピートの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提供する。いくつかの実施形態では、このポリペプチドの1個以上のアラニン残基が、1個以上のセリン残基で置換されており、このポリヌクレオチドが、この1個以上の置換されたセリン残基をコードする。

【0022】

他の実施形態では、ポリヌクレオチドが、第1のペプチド；第2のペプチド；ならびにこの第1のペプチドとこの第2のペプチドとの間に配置される配列番号1のアミノ酸配列の1個以上のシーケンシャルリピートを含むリンカーのアミノ酸配列を含むポリペプチド組成物をコードする。ある実施形態では、このポリペプチド組成物のリンカーが、配列番号1の3つのシーケンシャルリピートまたはタンデムリピートを含む。さらに他の実施形態では、このポリペプチド組成物のリンカーの1個以上のアラニン残基が、1個以上のセリン残基で置換されており、このポリヌクレオチドが、この1個以上の置換されたセリン残基をコードする。前述のポリヌクレオチドのさらなる実施形態では、このポリペプチド組成物のリンカーの3'末端が、アミノ酸配列グリシン アラニン プロリン(GAP)をさらに含み、このポリヌクレオチドが、GAPアミノ酸配列をコードする。

【0023】

ある実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチド組成物の第1のペプチドをコードする。他の実施形態では、このポリヌクレオチドが、受容体結合ドメインを含むポリペプチド組成物の第2のペプチドをコードし、いくつかの実施形態では、この第2のペプチドが、配列番号6のアミノ酸配列を含む。

【0024】

本明細書において記載されるポリペプチド組成物をコードする前述のポリヌクレオチドを含む発現ベクターもまた、本明細書において記載される。本明細書において記載される他の実施形態は、前述のポリヌクレオチドおよび発現ベクターを含む組換え細胞に関する。

【0025】

さらに、本発明は、本明細書において記載されるポリペプチド組成物および薬学的に許容され得るキャリアを含む医薬組成物を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、この医薬組成物が、配列番号4のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号6のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むポリペプチド組成物を含む。これらの実施形態のうちのいくつかでは、この第1のペプチドとこの第2のペプチドとの間に配置されるリンカーが、配列番号1の1個以上のシーケンシャルリピートまたはタンデムリピート（例えば、配列番号1の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれより多くのシーケンシャルリピートまたはタンデムリピート）を含み、これらの実施形態のうちの他のものでは、このリンカーが、配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0026】

ある実施形態では、本発明はまた、本明細書において記載されるポリヌクレオチドおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む医薬組成物をも提供する。本発明は、本明細書において記載される組換え細胞および薬学的に許容され得るキャリアを含む医薬組成物をさらに提供する。

【0027】

ポリペプチド組成物を产生する方法であって、このポリペプチドの発現に適した条件下で本明細書において記載される組換え細胞を培養することを含む方法もまた、本明細書において記載される。

【0028】

治療用ポリペプチドを送達する必要のある被験体に治療用ポリペプチドを送達する方法

10

20

30

40

50

もまた、本明細書において記載される。したがって、本明細書において開示されるいくつかの実施形態は、治療用ポリペプチドを送達する必要のある被験体に治療用ポリペプチドを送達する方法であって、本明細書において記載される前述のポリペプチド組成物のいずれかをこの被験体に投与することを含む方法である。

【0029】

他の実施形態では、治療用ポリペプチドを送達する必要のある被験体に治療用ポリペプチドを送達する方法は、配列番号4のアミノ酸配列を含む第1のペプチド；配列番号6のアミノ酸配列を含む第2のペプチド；ならびにこの第1のペプチドとこの第2のペプチドとの間に配置される配列番号1のアミノ酸配列の1個以上のシーケンシャルリピートを含むリンカーを含むポリペプチド組成物をこの被験体に投与することを含む。この方法の他の実施形態では、このリンカーが、配列番号1の3'末端にGAPをさらに含む。この方法のある実施形態では、このリンカーが、配列番号2のアミノ酸配列を含む。この方法のさらに他の実施形態では、このリンカーの1個以上のアラニン残基が、1個以上のセリン残基で置換されている。

10

【0030】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドを送達する必要のある被験体に治療用ポリペプチドを送達する方法は、本明細書において記載される前述の発現ベクターのうちの1個以上をこの被験体に投与することを含む。ある他の実施形態は、治療用ポリペプチドを送達する必要のある被験体に治療用ポリペプチドを送達する方法であって、本明細書において記載される前述の組換え細胞のうちの1個以上をこの被験体に投与することを含む方法に関する。

20

【0031】

リソソーム蓄積症を治療する方法であって、いくつかの実施形態では、その必要のある被験体に対して、有効量の、本明細書において記載されるいずれか1つのまたは前述の医薬組成物（例えば、本明細書において記載されるポリペプチド組成物、ポリヌクレオチド、および/または宿主細胞を含む）を投与することを含む、方法もまた、本明細書において記載される。ある実施形態では、リソソーム蓄積症が、サンフィリポ症候群である。

【0032】

本明細書において記載されるさらに他の実施形態は、サンフィリポ症候群を治療する方法に関する。いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書において記載される有効量の前述の医薬組成物をその必要のある患者に投与することを含む。

30

【0033】

他の実施形態では、サンフィリポ症候群を治療する方法は、その必要のある患者に対して、配列番号4のアミノ酸配列を含む第1のペプチド；配列番号6のアミノ酸配列を含む第2のペプチド；ならびにこの第1のペプチドとこの第2のペプチドとの間に配置される配列番号1の1個以上のシーケンシャルリピートを含むリンカーを含む、有効量の医薬組成物を投与することを含む。この方法のある実施形態では、このリンカーが、配列番号1の3'末端にアミノ酸配列g a pをさらに含む。この方法の他の実施形態では、このリンカーが、配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0034】

40

この方法のある実施形態では、この医薬組成物が、非経口的に投与される。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

a) 第1のペプチド、
b) 第2のペプチド、ならびに
c) 該第1のペプチドと該第2のペプチドとの間に配置された配列番号1のアミノ酸配列の1個以上のシーケンシャルリピートを含むリンカーを含む、ポリペプチド組成物。

(項目2)

前記リンカーが、配列番号1の3つのシーケンシャルリピートを含む、項目1に記載のポ

50

リペプチド組成物。

(項目3)

前記リンカーが、配列番号1の3'末端にアミノ酸配列グリシン-アラニン-プロリン(GAP)をさらに含む、項目1または2に記載のポリペプチド組成物。

(項目4)

前記リンカーの1個以上のアラニン残基が、1個以上のセリン残基で置換されている、項目3に記載のポリペプチド組成物。

(項目5)

前記第1のペプチドが、配列番号4のアミノ酸配列を含む、項目1~4のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。

10

(項目6)

前記第2のペプチドが、受容体結合ドメインを含む、項目1~5のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。

(項目7)

前記第2のペプチドが、配列番号6のアミノ酸配列を含む、項目1~6のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。

(項目8)

a) 配列番号4のアミノ酸配列を含む第1のペプチド、

b) 配列番号6のアミノ酸配列を含む第2のペプチド、ならびに

c) 該第1のペプチドと該第2のペプチドとの間に配置された配列番号1のアミノ酸配列の1個以上のシーケンシャルリピートを含むリンカーを含む、ポリペプチド組成物。

20

(項目9)

前記リンカーが、配列番号1の3つのシーケンシャルリピートを含む、項目8に記載のポリペプチド組成物。

(項目10)

前記リンカーが、配列番号1の3'末端にアミノ酸配列グリシン-アラニン-プロリン(GAP)をさらに含む、項目8または9に記載のポリペプチド組成物。

(項目11)

前記リンカーの1個以上のアラニン残基が、1個以上のセリン残基で置換されている、項目8~10のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。

30

(項目12)

a) 配列番号4のアミノ酸配列を含む第1のペプチド、

b) 配列番号6のアミノ酸配列を含む第2のペプチド、ならびに

c) 該第1のペプチドと該第2のペプチドとの間に配置された配列番号2のアミノ酸配列を含むリンカーを含む、ポリペプチド組成物。

(項目13)

前記リンカーの1個以上のアラニン残基が、1個以上のセリン残基で置換されている、項目12に記載のポリペプチド組成物。

40

(項目14)

18個連續したアミノ酸残基を含むポリペプチドリンカーであって、該リンカーが、該リンカーの最初の5個のアミノ酸残基内の1個のプロリン残基ならびに1個以上のグリシン残基および1個以上のアラニン残基からなる群から選択される17個のアミノ酸残基を含む、ポリペプチドリンカー。

(項目15)

前記リンカーの3'末端が、1個のプロリン残基ならびにグリシンおよびアラニンからなる群から選択される2つのアミノ酸残基を含む3個連續したアミノ酸をさらに含む、項目14に記載のポリペプチドリンカー。

(項目16)

50

2 1 個連続したアミノ酸残基を含むポリペプチドリンカーであって、該リンカーが、

a) 該リンカーの最初の 5 個のアミノ酸内の第 1 のプロリン残基、

b) 1 個以上のグリシン残基および 1 個以上のアラニン残基からなる群から選択される 1
9 個のアミノ酸残基、ならびに

c) 該リンカーの最後の 5 個のアミノ酸内の第 2 のプロリン残基
を含む、ポリペプチドリンカー。

(項目 17)

前記 1 個以上のアラニン残基のいずれかが、1 個以上のセリン残基で置換されている、項目
14 ~ 16 のいずれか一項に記載のポリペプチドリンカー。

(項目 18)

前記リンカーが、アラニン残基の 2 倍の数のグリシン残基およびセリン残基を含む、項目
17 に記載のポリペプチドリンカー。

(項目 19)

配列番号 7 のアミノ酸配列 (G G G G G A A A A A G G G G G) からなるポリペプチドリ
ンカー。

(項目 20)

項目 19 に記載のポリペプチドリンカーの 1 個以上のシーケンシャルリピートを含む、ポ
リペプチドリンカー組成物。

(項目 21)

前記ポリペプチドリンカー組成物の 5 ' 末端が、1 つのプロリン残基ならびにグリシンお
よびアラニンからなる群から選択される 2 つのアミノ酸残基を含む 3 個連続したアミノ酸
をさらに含む、項目 20 に記載のポリペプチドリンカー組成物。

(項目 22)

配列番号 1 のアミノ酸配列 (G A P G G G G G A A A A A G G G G G) からなるポリペプ
チドリンカー。

(項目 23)

項目 22 に記載のポリペプチドリンカーの 1 個以上のシーケンシャルリピートを含む、ポ
リペプチドリンカー組成物。

(項目 24)

前記ポリペプチドリンカー組成物の 3 ' 末端が、1 つのプロリン残基ならびにグリシンお
よびアラニンからなる群から選択される 2 つのアミノ酸残基を含む 3 個連続したアミノ酸
をさらに含む、項目 21 または 23 に記載のポリペプチドリンカー組成物。

(項目 25)

前記 3 個連続したアミノ酸が、アミノ酸配列グリシン アラニン プロリン (G A P) を
含む、項目 21 、 23 、または 24 に記載のポリペプチドリンカー組成物。

(項目 26)

配列番号 2 のアミノ酸配列 (G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P G G G G G A
A A A A G G G G G G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P) からなるポリペプチ
ドリンカー。

(項目 27)

a) 第 1 のペプチド、

b) 第 2 のペプチド、ならびに

c) 該第 1 のペプチドと該第 2 のペプチドとの間に配置されたリンカー

を含み、該リンカーが、項目 14 ~ 26 に記載のポリペプチドリンカーまたはポリペプチ
ドリンカー組成物のいずれか 1 つを含む、ポリペプチド組成物。

(項目 28)

a) 配列番号 1 、

b) 配列番号 2 、または

c) 配列番号 1 に記載の 1 個以上のシーケンシャルリピート

のアミノ酸配列を含むポリペプチドリンカーをコードするポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

(項目 29)

前記リンカーの 1 個以上のアラニン残基が、1 個以上のセリン残基で置換されており、前記ポリヌクレオチドが、前記 1 個以上の置換されたセリン残基をコードする、項目 23 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 30)

- a) 第 1 のペプチド、
 - b) 第 2 のペプチド、ならびに
 - c) 該第 1 のペプチドと該第 2 のペプチドとの間に配置される配列番号 1 のアミノ酸配列の 1 個以上のシーケンシャルリピートを含むリンカー
- のアミノ酸配列を含むポリペプチド組成物をコードするポリヌクレオチド。

10

(項目 31)

前記ポリペプチド組成物の前記リンカーが、配列番号 1 の 3 つのシーケンシャルリピートを含む、項目 30 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 32)

前記ポリペプチド組成物の前記リンカーの 3' 末端が、アミノ酸配列グリシン アラニン プロリン (G A P) をさらに含み、前記ポリヌクレオチドが、前記 G A P アミノ酸配列をコードする、項目 30 または 31 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 33)

前記ポリペプチド組成物の前記リンカーが、配列番号 2 を含む、項目 31 に記載のポリヌクレオチド。

20

(項目 34)

前記ポリペプチド組成物の前記リンカーの 1 個以上のアラニン残基が、1 個以上のセリン残基で置換されており、前記ポリヌクレオチドが、該 1 個以上の置換されたセリン残基をコードする、項目 30 ~ 33 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 35)

前記ポリペプチド組成物の前記第 1 のペプチドが、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、項目 30 ~ 34 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

(項目 36)

前記ポリペプチド組成物の前記第 2 のペプチドが、受容体結合ドメインを含む、項目 30 ~ 35 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

30

(項目 37)

前記第 2 のペプチドが、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、項目 28 ~ 36 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

(項目 38)

項目 28 ~ 37 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

(項目 39)

項目 28 ~ 37 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む組換え細胞。

(項目 40)

項目 38 に記載の発現ベクターを含む組換え細胞。

40

(項目 41)

項目 1 ~ 7 または 27 のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物および薬学的に許容され得るキャリアを含む、医薬組成物。

(項目 42)

項目 8 ~ 13 のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物を含む医薬組成物。

(項目 43)

項目 28 ~ 34 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む、医薬組成物。

(項目 44)

項目 35 ~ 37 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む医薬組成物。

(項目 45)

50

項目 39 または 40 に記載の組換え細胞および薬学的に許容され得るキャリアを含む医薬組成物。

(項目 46)

ポリペプチド組成物を产生する方法であって、該ポリペプチドの発現に適した条件下で項目 39 または 40 に記載の組換え細胞を培養することを含む、方法。

(項目 47)

治療用ポリペプチドを送達する必要のある被験体に治療用ポリペプチドを送達する方法であって、項目 1 ~ 13 または項目 27 に記載のポリペプチド組成物のいずれか 1 つを該被験体に投与することを含む、方法。

(項目 48)

治療用ポリペプチドを送達する必要のある被験体に治療用ポリペプチドを送達する方法であって、

a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む第 1 のペプチド、

b) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む第 2 のペプチド、ならびに

c) 該第 1 のペプチドと該第 2 のペプチドとの間に配置される配列番号 1 のアミノ酸配列の 1 個以上のシーケンシャルリピートを含むリンカー

を含むポリペプチド組成物を該被験体に投与することを含む、方法。

(項目 49)

前記リンカーが、配列番号 1 の 3' 末端にアミノ酸配列グリシン アラニン プロリン (GAP) をさらに含む、項目 48 に記載の方法。

(項目 50)

前記リンカーが、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、項目 48 に記載の方法。

(項目 51)

前記リンカーの 1 個以上のアラニン残基が、1 個以上のセリン残基で置換されている、項目 48 ~ 50 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 52)

治療用ポリペプチドを送達する必要のある被験体に治療用ポリペプチドを送達する方法であって、項目 38 に記載の 1 つ以上の発現ベクターを該被験体に投与することを含む、方法。

(項目 53)

治療用ポリペプチドを送達する必要のある被験体に治療用ポリペプチドを送達する方法であって、項目 39 または 40 に記載の 1 つ以上の組換え細胞を該被験体に投与することを含む、方法。

(項目 54)

リソソーム蓄積症を治療する方法であって、その必要のある被験体に、有効量の、項目 41 ~ 45 に記載の医薬組成物のいずれか 1 つを投与することを含む、方法。

(項目 55)

前記リソソーム蓄積症が、サンフィリポ症候群である、項目 54 に記載の方法。

(項目 56)

サンフィリポ症候群を治療する方法であって、有効量の、項目 42 ~ 45 に記載の医薬組成物のいずれか 1 つをその必要のある患者に投与することを含む、方法。

(項目 57)

サンフィリポ症候群を治療する方法であって、その必要のある患者に対して、

a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む第 1 のペプチド、

b) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む第 2 のペプチド、ならびに

c) 該第 1 のペプチドと該第 2 のペプチドとの間に配置された配列番号 1 のアミノ酸配列の 1 個以上のシーケンシャルリピートを含むリンカー

を含むポリペプチド組成物を含む有効量の医薬組成物を投与することを含む、方法。

(項目 58)

前記リンカーが、配列番号 1 の 3' 末端にアミノ酸配列グリシン アラニン プロリン (

10

20

30

40

50

G A P) をさらに含む、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記リンカーが、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記リンカーの 1 個以上のアラニン残基が、1 個以上のセリン残基で置換されている、項目 5 4 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 1)

前記医薬組成物が、非経口的に投与される、項目 5 4 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の方法

。

(項目 6 2)

前記医薬組成物が、経口的に投与される、項目 5 4 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【0035】

本発明の上記に議論される特徴および付随する利点、ならびに他の多くの特徴および付随する利点は、添付の実施例と共に解釈される場合、以下の発明の詳細な説明に対する参照によってよく理解されるようになるであろう。本明細書において記載される様々な実施形態は、補足的な (complementary) ものであり、本明細書において含有される教示を考慮して、当業者によって理解されるように、ともに組み合わせるまたは使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図 1】図 1 は、グリシン アラニン グリシン (GAG) リピート配列につながれたグリシン アラニン プロリン (GAP) 配列を含むペプチドリンカーのアミノ酸配列を示す (配列番号 1)。

【図 2】図 2 は、GAP の配列に 3' 末端でつながれた配列番号 1 の 3 つのシーケンシャルリピートまたはタンデムリピートを含むペプチドリンカーのアミノ酸配列を示す (配列番号 2)。

【図 3】図 3 A は、GAP リンカーによってつながれた - N - アセチルグルコサミニダーゼ - インスリン様増殖因子 (NAG1u - IGFII) 構築物を示す。図 3 B は、配列番号 2 のリンカーによってつながれる NAG1u - IGFII 構築物を示す (NAG1u - GAG₃ - IGFII)。

【図 4 A - 1】図 4 A は、ヒト NAG1u のヌクレオチド配列 (配列番号 3) を示す。図 4 B は、ヒト NAG1u のアミノ酸配列 (配列番号 4) を示す。

【図 4 A - 2】図 4 A は、ヒト NAG1u のヌクレオチド配列 (配列番号 3) を示す。図 4 B は、ヒト NAG1u のアミノ酸配列 (配列番号 4) を示す。

【図 4 B】図 4 A は、ヒト NAG1u のヌクレオチド配列 (配列番号 3) を示す。図 4 B は、ヒト NAG1u のアミノ酸配列 (配列番号 4) を示す。

【図 5】図 5 A は、ヒト IGFII のヌクレオチド配列 (配列番号 5) を示す。図 5 B は、ヒト IGFII のアミノ酸配列 (配列番号 6) を示す。

【図 6】図 6 は、GAG リピート配列を含むペプチドリンカーのアミノ酸配列 (配列番号 7) を示す。

【図 7】図 7 は、図 3 A において示される NAG1u - IGFII 構築物のアミノ酸配列 (配列番号 8) を示す。

【図 8】図 8 は、図 3 B において示される NAG1u - IGFII 構築物のアミノ酸配列 (配列番号 9) を示す。

【図 9】図 9 は、HT1080 細胞における 2 つの異なる NAG1u - IGFII タンパク質構築物 (NAG1u - GAG₃ - IGFII および NAG1u - IGFII) の活性レベルの比較を示し、野生型 NAG1u と比較して、NAG1u - GAG₃ - IGFII は非常に高いレベルの活性を有するが、NAG1u - IGFII は活性をほとんど有していないことを実証する。

【図 10】図 10 は、ウエスタンプロットによる NAG1u - GAG₃ - IGFII およ

10

20

30

40

50

び N a G l u - I G F I I ポリペプチドの発現を示し、 N a G l u - I G F I I タンパク質は分解を受けたが、野生型 N a G l u および N a G l u - G A G₃ - I G F I I は受けなかったことを示す。

【図 1 1】図 1 1 は、ヒト線維芽細胞 (H F 1 1 5 6) による N a G l u - G A G₃ - I G F I I ポリペプチドの取込みを示し、 N a G l u - G A G₃ - I G F I I がヒト細胞によって容易に取り込まれたことを実証する。

【図 1 2】図 1 2 は、ペプチドリンカーのアミノ酸配列 (配列番号 1 0) を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、ペプチドリンカーのアミノ酸配列 (配列番号 1 1) を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、ペプチドリンカーのアミノ酸配列 (配列番号 1 2) を示す。

【発明を実施するための形態】

10

【0 0 3 7】

(発明の詳細な説明)

キメラポリペプチドまたは融合ポリペプチドを作製する (例えば設計する、操作する) 手段を提供する組成物が、本明細書において記載される。このポリペプチド組成物はまた、目的の細胞、組織、または器官への、作用因子 (例えばポリペプチド/ペプチド、タンパク質、および/または酵素) の送達を促進する手段を提供することもできる。特に、この組成物および方法は、その必要のある被験体の適切な組織に作用因子を選択的に送達し、それによって、疾患または障害を治療するために使用することができる。これらの治療用組成物は、治療剤および/または標的化作用因子の適切な発現、フォールディング、および活性を可能にするリンカー配列によって標的化作用因子 (例えば、細胞受容体リガンドタンパク質) につながれた治療剤 (例えば、タンパク質/酵素) を含むポリヌクレオチドまたはポリペプチドであってもよい。いくつかの態様では、この治療用組成物が、リンカー配列によって細胞表面受容体リガンドタンパク質に接続されたリソソームタンパク質またはリソソーム酵素を含む。この治療用ポリペプチド組成物は、リソソーム蓄積症のような障害を治療するために使用することができる。

20

【0 0 3 8】

本明細書において使用される場合、語句「リソソーム蓄積障害」 (lysosomal storage disorder) または「リソソーム蓄積症」 (lysosomal storage disease) は、1つ以上のリソソーム酵素の異常な発現または欠損に関係する遺伝病のクラスを指す。これらの酵素欠損症は、罹患被験体のリソソームにおいて代謝産物の有害な蓄積をもたらす。代表的なリソソーム蓄積障害は、アスパルチルグルコサミン尿症、コレステリルエステル貯蔵病、シスチン蓄積症、ダノン病、ファブリー病、ファーバー病、フコース蓄積症、フラクトシアリドーシス (f a l a c t o s i a l i d o s i s) I / I I 型、ゴーシエ病 1、2、3 型、グロボイド細胞白質ジストロフィー (g l o b o i d c e l l l e u c o d y s t r o p h y) / クラッベ病、グリコーゲン蓄積症 I I / ポンペ病、G M 1 - ガングリオシドーシス I / I I I 型、G M 2 - ガングリオシドーシス I 型 / テイ - サックス病、G M 2 - ガングリオシドーシス I I 型 / サンドホフ病、- マンノシドーシス I / I I 型、- マンノシドーシス、異染性白質ジストロフィー (M L D) 、ムコリピドーシス I 型 / シアリドーシス I / I I 型、ムコリピドーシス I I / I I I 型、ムコリピドーシス I I I 型偽ハーラー多発性ジストロフィー、ムコ多糖症 (例えば I 、 I I 、 I I I A 、 I I I B 、 I I I C 、 I I I D 、 I V A 、 I V B 、 V I 、 V I I 、 および I X 型) 、多発性スルファターゼ欠損症 (m u l t i p l e s u l p h a t a s e d e f i c i e n c y) 、神経セロイドリポフスチン症 (例えば、バッテン、小児性、遅発型小児性、および成人型) 、ニーマン - ピック病 (例えば、A 、 B 、 C 1 、 C 2 型) 、シンドラー病 I / I I 型、シアル酸蓄積症、サンフィリпп病 (S a n f i l i p p o d i s e a s e) 、ならびにウォルマン病 (酸性リバーゼ欠損症) を含む。本発明の一態様では、この組成物が、その欠損がリソソーム蓄積障害に関連づけられる治療剤を含む。

30

【0 0 3 9】

ポリペプチド組成物およびこのポリペプチド組成物をコードするポリヌクレオチドが、

40

50

本明細書において記載され、このポリペプチド組成物は、本明細書において開示されるリンカー配列によって接続された第1および第2のペプチド/ポリペプチドを含む。本発明者らは、2つのタンパク質配列（例えば第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチド）を接続する配列番号1（G A P G G G G A A A A A G G G G G）の1個以上のシーケンシャルリピートまたはタンデムリピートを含むリンカーが、十分に発現され、かつ非常に活性が高い（例えば、生物学的に活性である）ポリペプチドの產生をもたらすことを驚くべきことに見出した。本明細書において使用される場合、用語「ポリペプチド」または「ペプチド」は、自然に（例えば単離する、本質的に精製する、もしくは精製する）または合成的に（例えば化学合成によって）產生することができる、もっぱらペプチド結合によって典型的につながれるアミノ酸残基のポリマーを指す。非宿主DNA分子の発現によって產生されるポリペプチドは、「異種」のペプチドまたはポリペプチドである。このポリペプチドを含む「アミノ酸残基」は、ペプチド結合および/またはペプチド結合とは異なる結合によって連結された天然または非天然アミノ酸残基であってもよい。これらのアミノ酸残基は、D-立体配置またはL-立体配置にあってもよい。いくつかの態様では、本明細書において言及されるポリペプチドが、組換え核酸の発現によって產生されるタンパク質、ペプチド、またはその断片である。いくつかの実施形態では、本明細書において記載されるポリペプチド組成物が、リンカー配列（例えば配列番号2）によって接続された2つのポリペプチドを含み、この2つのポリペプチドのうちの一方は、疾患または障害を治療するために投与することができるペプチド（例えば治療用ペプチド）であり、他方のポリペプチドは、標的細胞、組織、または器官に治療用ペプチドを送達するために使用することができるペプチド（例えば標的化ペプチド）である。
10

【0040】

本明細書において記載されるリンカーまたはポリペプチドリンカーは、2つのタンパク質配列を接続する（例えばつなぐ、連結する）ように設計されたペプチド配列を指し、このリンカーペプチド配列は典型的に、自然界においてこの2つのタンパク質配列の間に配置されていない。本発明との関連において、語句「連結される」または「つながれる」または「接続される」は、一般的に自然界において存在しないポリペプチドを產生するための、2つの連続したかまたは隣接したアミノ酸配列の間の機能的なリンクエージを一般的に指す。ある実施形態では、リンクエージが、例えば、1つ以上の治療用ペプチド作用因子および1つ以上の標的化作用因子（例えば結合ペプチドまたは受容体リガンドペプチド）のアミノ酸配列の共有結合を指すために使用されてもよい。一般的に、連結されたタンパク質は、互いに連結しているかまたは隣接しており、つながれた場合にそれらのそれぞれの使用可能性および機能を保持する。本明細書において開示されるキメラポリペプチドを含むペプチドは、1個以上のアミノ酸を含む、介在したペプチドリンカーによって連結される。そのようなリンカーは、キメラポリペプチドの所望の発現、活性、および/または立体配置的な位置決めを可能にするために望ましい可撓性（flexibility）を提供してもよい。典型的なアミノ酸リンカーは、可撓性となるように、またはこの2つのタンパク質部分の間に、アルファ-ヘリックスのような構造を介在させるために、一般的に設計される。リンカーは、リソソーム酵素をコードするポリペプチドのN末端もしくはC末端に融合するかまたは内部に挿入することができる。リンカーはまた、スペーサーとも呼ばれる。
20

【0041】

リンカーペプチド配列は、目的の1個以上のタンパク質を接続するために任意の適切な長さのものであることができ、好ましくは、それが接続するペプチドのうちの一方または両方の適切なフォールディングおよび/または機能および/または活性を可能にするために、十分に可撓性となるように設計される。したがって、このリンカーペプチドは、3以下の、5以下の、10以下の、15以下の、20以下の、25以下の、30以下の、35以下の、40以下の、45以下の、50以下の、55以下の、60以下の、65以下の、70以下の、75以下の、80以下の、85以下の、90以下の、95以下の、または100以下のアミノ酸の長さを有することができる。いくつかの実施形態では、このリンカ
30
40
50

ーペプチドが、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 12、少なくとも 15、少なくとも 18、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 35、少なくとも 40、少なくとも 45、または少なくとも 50 のアミノ酸の長さを有することができる。いくつかの実施形態では、このリンカーが、少なくとも 10 であります 60 以下のアミノ酸、少なくとも 10 であります 55 以下のアミノ酸、少なくとも 10 であります 50 以下のアミノ酸、少なくとも 10 であります 45 以下のアミノ酸、少なくとも 10 であります 40 以下のアミノ酸、少なくとも 10 であります 35 以下のアミノ酸、少なくとも 10 であります 30 以下のアミノ酸、少なくとも 10 であります 25 以下のアミノ酸、少なくとも 10 であります 20 以下のアミノ酸、または少なくとも 10 であります 15 以下のアミノ酸を含む。ある実施形態では、このリンカーが、12 ~ 57 のアミノ酸を含み、特定の実施形態では、57 個のアミノ酸を含む。リンカーを含むポリペプチド組成物において、このリンカーペプチド配列（例えばアミノ酸配列）の 5' 末端（5' end）（例えば末端部（terminal））は、あるタンパク質配列（例えば完全長タンパク質もしくはタンパク質ドメイン、断片、または変体）の 3' 末端に隣接し、かつ共有結合しており、さらに、このリンカーアミノ酸配列の 3' 末端は、別のタンパク質配列の 5' 末端に隣接し、かつ共有結合している。このようにして産生されたポリペプチド組成物は、一般に、融合またはキメラのタンパク質 / ポリペプチドを指し、適切な系における、ポリペプチド組成物をコードする核酸配列の発現（例えば転写、翻訳）によって典型的に作製される。融合および / またはキメラのポリペプチドを作製するための手段は、当該技術分野においてよく知られている（例えば、その全体が本明細書において参照によって組み込まれる *Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Springs Harbor Laboratory、1992*） New York を参照されたい）。

【0042】

ある実施形態では、このリンカーアミノ酸配列は、グリシン、アラニン、および / またはセリンアミノ酸残基から構成される。本発明者らは、これらのアミノ酸上に分岐側鎖がないことにより、このリンカー内で、したがってポリペプチド組成物内で、より優れた可撓性（例えば二次元または三次元可撓性）がもたらされるので、単純アミノ酸（例えば、単純側鎖（例えば H、CH₃、もしくは CH₂OH）を有するアミノ酸および / または非分岐のアミノ酸）が、ペプチドリンカーにおいて使用するのに好都合であることを見出した。さらに、本発明者らは、グリシン残基、アラニン残基、および / またはセリン残基が交互に存在することにより、このリンカー内に、さらにより優れた秩序およびより優れた可撓性がもたらされることを見出した。これらのアミノ酸は、このリンカーが機能的なまま存続する（例えば、発現される、および / または活性ポリペプチドをもたらす）のと適合する任意の様式で、交互に存在する / 繰り返すことができる。このリンカーのいずれにおいても、アラニンアミノ酸残基は、セリンで置換され得る。したがって、このリンカー中のアミノ酸は、1 個おきに（例えば GAGA、GSGS）、2 個おきに（例えば GGAAGGAA、GGSSGGSS）、3 個おきに、4 個おきに、5 個おきに、6 個おきに、7 個おきに、8 個おきに、9 個おきに、もしくは 10 個おきに、またはそれより多くのアミノ酸おきに繰り返すことができるか、またはこれらのアミノ酸は、前述のものの任意の組み合わせで繰り返すことができる。ある実施形態では、これらのアミノ酸が、5 アミノ酸おきに繰り返され、このリンカーが、1 個以上のグリシン アラニン グリシンの繰り返しからなる。例えば、このペプチドリンカーは、GGGGGAGAAAAGGGGG（配列番号 7）または GGGGGSSSSGGGGG（配列番号 10）の繰り返しからなることができる。

【0043】

さらに、本発明者らは、このリンカーの最初の（例えば 5' 末端）および / または最後の（例えば 3' 末端）5 個のアミノ酸内にプロリン残基を配置することにより、このリンカー内にさらなる利点がもたらされることを見出した。例えば、リンカーまたはスペーサ

10

20

30

40

50

ーは、G A P (配列番号11) またはG G G G G P (配列番号12) であり得る。理論によって拘束されるものではないが、可撓性のアミノ酸であるグリシン、アラニン、およびセリンと異なり、その環状側鎖が非可撓性をもたらすプロリンは、そうでなければ可撓性のリンカーの末端の近くにねじれをもたらし得、それによって、このリンカーによって接続されたポリペプチドを適切に分離させ得ると考えられる。したがって、このリンカーのアミノ酸配列は、このリンカー内の、1番目の、2番目の、3番目の、4番目の、もしくは5番目のアミノ酸残基にプロリンを有することができる、および/または最後の、最後から2番目の、最後から3番目の、最後から4番目の、もしくは最後から5番目のアミノ酸残基内にプロリンを有することができる。ある実施形態では、このペプチドリンカーが、18個連続したアミノ酸残基を含むことができ、アミノ酸残基のうちの1つが、このリンカーの最初の5つのアミノ残基のいずれか1つに位置するプロリンであり、残りの17個のアミノ酸残基が、グリシン残基およびアラニン残基(例えば1個以上のグリシン残基および1個以上のアラニン残基)から構成される。このリンカーのグリシンアミノ酸残基およびアラニンアミノ酸残基は、前述のグリシン アラニン グリシンのリピートを含む、グリシン残基およびアラニン残基の任意の組み合わせを含むことができる。このリンカーは、21個のアミノ酸を含むペプチドリンカーを产生するために、第2のプロリン、グリシン残基、および/またはアラニン残基を含む3個連続したアミノ酸をさらに含むことができる。この第2のプロリンもまた、リンカーアミノ酸配列における最後の5個のアミノ酸のいずれか1つであってもよい。

【0044】

前述のペプチドリンカーは、所望の制限エンドヌクレアーゼ部位によってコードされる、1個以上のアミノ酸配列が側面に位置することができる。多数のエンドヌクレアーゼ切断部位(例えば、E c o R I、B a m H I、H i n d I I I、A s c I 部位、およびその他同種のもの)は、当該技術分野においてよく知られており、このリンカー(および/またはポリペプチド)核酸配列中にどの切断部位を含めるかについての選択は、当業者によって最良に決定され、この部位は、連結されるそれぞれの核酸配列に関して一般的に選ばれる。このエンドヌクレアーゼ制限部位は、必要に応じておよび/または所望される場合、このリンカー配列のそれぞれの末端上の同じ部位であってもよく、または異なる制限部位であってもよい。いくつかの実施形態では、リンカーのグリシン アラニン グリシンというアミノ酸のリピートは、リンカーアミノ酸配列(例えば配列番号2)の5'末端および/または3'末端でグリシン アラニン プロリン(G A P)というアミノ酸配列が側面に位置する。この例におけるG A Pの配列は、A s c I制限エンドヌクレアーゼ部位を表す核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、このリンカーアミノ酸配列が、配列番号1(G A P G G G G G A A A A A G G G G G)を含む。他の実施形態では、このリンカーアミノ酸配列が、配列番号1の1個以上の(例えば1、2、3、4、またはそれより多くの)シーケンシャルリピートを含む。本発明者らは、配列番号1の1個のリピートでさえ、リンカーの機能性を改善し、配列番号1の3個および4個のリピートが、連結されたポリペプチドの発現および/または活性を可能にするのに最も有効であることを見出した。ある実施形態では、配列番号1の1個以上のシーケンシャルリピートが、このリンカーのアミノ酸配列の3'末端/末端部のg a p配列からさらに構成される。いくつかの実施形態では、このリンカーアミノ酸配列が、配列番号2(G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P G G G G G A A A A A G G G G G A P)を含む。

【0045】

いくつかの実施形態では、適したリンカーまたはスペーサーが、配列番号2の配列と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一の配列を含有していてもよい。

【0046】

本明細書において記載されるポリペプチド組成物において、2つのポリペプチド(例えば第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチド)は、上記に記載されるリンカーゴリペ

10

20

30

40

50

プチドのいずれかによって組換えによりつなぐことができ、このリンカーは、この2つのポリペプチドの間に配置される。例えば、ある実施形態では、これらのポリペプチドまたは組成物が、配列番号1または配列番号2を含むリンカーによって組換えによりつながれた第1および第2のポリペプチドを含む。この2つのポリペプチドは、2つの異なるタンパク質または同じタンパク質のいずれかの完全長タンパク質、タンパク質断片または部分、機能タンパク質断片または部分、機能タンパク質ドメイン、およびその他同種のものを含む任意のアミノ酸配列とすることができます。本明細書において使用される場合、「機能的断片」または「部分」は、成熟タンパク質またはネイティブ(*n a t i v e*)タンパク質の所望の生物学的活性のうちの1つ以上を保持するのに十分である(例えば、治療されることとなる障害に関する治療上のまたは寛解性の生物学的活性を保持するのに十分である)、成熟またはネイティブなタンパク質全体とはいえないタンパク質を指すことが意図される。したがって、アミノ酸配列またはポリペプチドは、改変することができる、例えば、改変が機能的な作用因子をコードするポリペプチドの能力を実質的に妨害しない様式で、アミノ酸を挿入した、欠失させた、および/または置換したポリペプチド配列とすることができる。

【0047】

いくつかの実施形態では、このポリペプチド組成物の1つのタンパク質が、所望の活性を有するペプチドであり、一方、他方のポリペプチドが、特定の細胞または組織に、所望の活性を有するポリペプチドを送達するかまたは標的化する。本明細書において使用される場合、標的化リガンドまたは結合ペプチドという語句は、所望の活性について特定の部位に作用因子(例えば、タンパク質、ポリペプチド)を導き、送達するように働くアミノ酸配列を指す。特定の実施形態では、これらのポリペプチドのうちの1つの所望の活性が、治療上のまたは予防的な活性(例えば治療、置換、阻害、予防、増強、低下、または改善)である。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書において記載されるポリペプチド組成物が、リソソーム蓄積症/リソソーム蓄積障害において欠損している1つ以上の酵素および/またはタンパク質を含む。例えば、開示される組成物は、アスパルチルグルコサミニダーゼ、酸性リパーゼ、システイントランスポーター、L a m p - 2、-ガラクトシダーゼA、リポタンパク質リパーゼ(L P L)、セラミダーゼ、-L-フコシダーゼ、-ヘキソサミニダーゼA、-グルクロニダーゼ(-glucoronidase)、G M 2 ガングリオシドアクチベータータンパク質、-D-マンノシダーゼ、-D-マンノシダーゼ、アリールスルファターゼA、サボシンB、ノイラミニダーゼ、-N-アセチルグルコサミニダーゼ、ホスホトランスフェラーゼ、ホスホトランスフェラーゼ、L-イズロニダーゼ、イズロネート-2-スルファターゼ、イズルスルファーゼ、ヘパラン-N-スルファターゼ、ヘパリンスルファミダーゼ、-N-アセチルグルコサミニダーゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、ガラクトース6-スルファターゼ、-ガラクトシダーゼ、N-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、ヒアルロノ-グルコサミニダーゼ、多種スルファターゼ、パルミトイルタンパク質チオエステラーゼ、トリペプチジルペプチダーゼI、酸性スフィンゴミエリナーゼ、-ガラクトシダーゼB、シアル酸、ならびに上記の機能的断片、サブユニット、および組み合わせのうちの1つに由来するアミノ酸配列を含むまたはそれからなる1つ以上の治療剤を含んでいてよい。ある実施形態では、ポリペプチド組成物のタンパク質(例えば治療用タンパク質)のうちの1つが、N-アセチル-アルファ-グルコサミニダーゼ(N a G l u)、特にヒトN a G l u、またはN a G l uの機能的部分、断片、改変体、変異体、もしくは誘導体を含む。リソソーム酵素N a G l uの損失は、リソソーム蓄積障害、サンフィリポ症候群の原因であると考えられる。

【0048】

いくつかの実施形態では、このポリペプチド組成物のポリペプチドのうちの1つが、細胞表面受容体リガンドを含み、特定の実施形態では、このポリペプチドが、I G F I I /カチオン非依存性マンノース6-リン酸受容体(I G F I I / C I - M P R)のリガンド

10

20

30

40

50

のうちの 1 つである I G F I I である。この I G F I I / C I - M P R は、哺乳動物細胞において新しく合成されたリソソーム酵素上のオリゴ糖に追加されたマンノース 6 - リン酸 (M a n 6 - P) 部分を認識する。この I G F I I / C I - M P R との M a n 6 - P 相互作用が、新しく合成された酵素をリソソームに運ぶ正常な細胞内輸送を調節するので、I G F I I / C I - M P R は、このリソソーム酵素を細胞に送達するために使用することができる受容体メカニズムであると考えられる。上記に記載される組成物は、その後、受容体媒介性トランスサイトーシスメカニズムを頼りにして、目的の細胞（例えば、内皮細胞、マクロファージ、またはニューロン細胞）に対して、連結されたタンパク質（例えば治療用タンパク質）を送達するであろう。生理学的に、受容体媒介性の輸送は、細胞内に高分子（例えば、タンパク質、ポリペプチド）を輸送するために頼りにされ、一般的に、標的とされた細胞上の特異的な受容体結合ドメイン（例えばカチオン非依存性マンノース 6 - リン酸受容体（C I - M P R ）、I G F I 受容体、I G F I I 受容体、または I G F I I / C I - M P R ）への高分子（例えば I G F I または I G F I I 部分）のリガンド認識および結合を伴う。この受容体上のこの結合ドメインへのこのリガンドの認識および結合の後に、受容体 - リガンド複合体は、この細胞（例えば内皮細胞またはマクロファージ）によるエンドサイトーシスを受け、この複合体はそれによって内部移行される。このリガンドは、その後、細胞（例えば、内皮細胞、ニューロン細胞、グリア細胞、脈管周囲細胞、および / または髄膜細胞）の反管腔側の膜を横切り、適切な組織（例えば、脳または脊髄組織のような中枢神経系の組織）の中に輸送され得る。本明細書において記載されるある実施形態では、ポリペプチド組成物の結合ペプチドまたは標的化ペプチドが、配列番号 4、I G F I I のアミノ酸残基 8 ~ 6 7 を含む。
10

【 0 0 4 9 】

翻訳されたポリペプチドまたはタンパク質を単離するおよび / または検出するさらなる手段を提供するための、開示される組成物の中への機能タンパク質標識またはタグを含めることもまた、本明細書において企図される。適した標識およびタグは、当該技術分野においてよく知られており、例えば、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、m y c - タグ、F L A G タグ、e T a g 、およびポリヒスチジンタグを含むが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、そのような標識およびタグが、例えば、所望の細胞および組織（例えば C N S 組織）内にそのポリペプチド組成物をコードするアミノ酸配列が分布する際に、そのような標識またはタグの同定を促進する、検出可能なシグナルを提供することができる。
20

【 0 0 5 0 】

リンカー配列によって接続される 2 つのポリペプチドを含む、本明細書において記載されるポリペプチド組成物は、合成的に產生することができる（例えば化学合成によって）またはポリヌクレオチド（例えば核酸）配列によってコードし、発現する（例えば転写し、翻訳する）ことができる。本明細書において使用される場合、「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボ核酸（D N A ）もしくはリボ核酸（R N A ）、オリゴヌクレオチド、当該技術分野において知られている任意の適切な手段（例えばライゲーションもしくはポリメラーゼ連鎖反応（P C R ））によって生成される断片、ならびに / またはライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用、およびエキソヌクレアーゼ作用のいずれかによって生成される断片のような連続した共有結合した核酸または核酸分子を指す。ポリヌクレオチド分子は、天然に存在するヌクレオチド（D N A およびR N A のような）である単量体から構成することができる。いくつかの実施形態では、本明細書において記載されるポリペプチド組成物が、相同なポリヌクレオチド配列によってコードされる。ポリヌクレオチドは、当業者らに知られている組換え D N A 技術を使用して產生される（例えば S a m b r o o k ら、1 9 9 2 を参照されたい）。一般的に、本発明に従って、1 つ以上の標的化作用因子（例えば I G F I I のようなリガンド / 結合タンパク質またはその生物学的に活性な断片）は、治療剤（例えば酵素 N a G l u またはその生物学的に活性な断片）をコードする核酸またはアミノ酸配列に作動可能に連結される。リンカー配列によってつながれる少なくとも 2 つの遺伝子のヌクレオチド配列から構成される、本明細書において記載され
30

るポリヌクレオチド分子のうちのいくつかは、2つのタンパク質のハイブリッドを表し得る融合ポリペプチドまたはキメラポリペプチドを产生することができる。本明細書において記載されるポリペプチド組成物はまた、発現ベクターの中にクローニングし、適した宿主において発現させることができる適した調節エレメントを含んでいてもよい。融合タンパク質を設計し、発現し、精製するための組換え方法は、当該技術分野において知られている（例えばSambrookら、1992を参照されたい）。

【0051】

上記に記載されるポリヌクレオチドを含有する発現ベクターおよびポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含む組換え細胞もまた、本明細書において企図される。「発現ベクター」は、宿主細胞において発現される遺伝子をコードするポリヌクレオチド分子である。典型的に、発現ベクターは、転写プロモーター、遺伝子、および転写ターミネーターを含む。遺伝子発現は、通常、プロモーターの制御下に置かれ、そのような遺伝子は、このプロモーター「に作動可能に連結されている」と言われる。同様に、調節エレメントがプロモーターの活性を調整する場合、調節エレメントおよびプロモーターは、作動可能に連結することができる。ベクターの発現に使用される「組換え」または「宿主」細胞は、本明細書において記載されるポリヌクレオチドのようなポリヌクレオチド分子を含有する細胞である。大量のタンパク質が、そのような発現ベクターおよび/または組換え細胞を使用して、インビトロにおいて產生されてもよく、したがって、開示されるポリペプチド組成物を产生するための方法が、本明細書において企図される。そのような方法は、ポリヌクレオチドからのポリペプチドの発現に適した条件下でポリヌクレオチド（例えば発現ベクター）を含む組換えおよび/または宿主の細胞を培養することを含む。タンパク質合成能力を有する任意の細胞が、この目的のために使用されてもよい（例えば動物、細菌、酵母、または昆虫細胞）。特定のタンパク質改変が必要とされる場合、動物細胞、特に哺乳動物細胞が必要であってもよい。そのポリペプチド組成物を発現するために使用されてもよい細胞は、HT1080、HF1156、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、CHO-K1細胞、HeLa細胞、Vero細胞、FAO（肝細胞）、ヒト3T3細胞、A20細胞、EL4細胞、HepG2細胞、J744A細胞、Jurkat細胞、P388D1細胞、RC-4B/c細胞、SK-N-SH細胞、Sp2/ml-6細胞、SW480細胞、3T6 Swiss細胞、およびその他同種のものが挙げられるが、これらに限定されない。様々な細胞/系におけるタンパク質発現に適した条件は、細胞/系に依存性であり、当該技術分野においてよく知られている（Sambrookら、1992）。

【0052】

所望の治療効果（例えば目的の細胞および組織内への分布）を達成するために、被験体（例えば疾患または障害を有する被験体）に投与することができる医薬組成物もまた、企図される。本明細書において企図される医薬組成物は、例えば、1つ以上の標的化リガンド（例えばIGFIIの断片）に作動可能に連結された1つ以上の治療剤（例えばリソソーム酵素NaGlu）をコードする核酸配列もしくはアミノ酸配列、またはこの核酸配列もしくはアミノ酸配列を含むベクターもしくは細胞を含む。そのようなアミノ酸または核酸は、単独で投与されてもよいが、少なくとも1つの他の作用因子または賦形剤（例えば緩衝化食塩水、デキストロース、および精製水のような薬学的に許容され得るキャリア）と組み合わせて好ましくは投与される。

【0053】

適した薬学的に許容され得るキャリアは、その中に懸濁されたかまたは溶解されたタンパク質、酵素、核酸、アミノ酸、および/またはポリペプチドを好ましくは安定化し、被験体に投与され得る医薬組成物への、そのようなタンパク質、酵素、核酸、アミノ酸、および/またはポリペプチドの加工を促進する。記載される医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、鞘内、室内、経皮的、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、局所（topical）、舌下、または直腸手段が挙げられるが、これらに限定されない任意の数の経路によって投与することができる。

10

20

30

40

50

【0054】

非経口投与に適した医薬製剤は、水溶液中で、好ましくは、生理学的緩衝化食塩水のような生理学的に適合性の緩衝液中で製剤とすることができます。水性注射用懸濁液は、カルボキシルメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランのような懸濁液の粘度を増大させる物質を含有することができる。必要に応じて、この懸濁液はまた、化合物の溶解度を増大させて高濃縮溶液の調製を可能にする、適した安定剤または作用因子をも含有することができる。製剤および投与についての技術についてのさらなる詳細は、Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Co., Easton, Pa.) の最新版において見つけることができる。医薬組成物が調製された後に、それらは、適切な容器中に入れ、示される状態の治療について（例えばサンフィリポ症候群の治療について）ラベルを付けることができる。そのようなラベリングは、被験体に投与されることとなる医薬組成物の有効量を計算するための説明書、適切な投薬スケジュール、許容され得る投与経路、および予想される副作用を含んでいてもよいが、これらに限定されない。

【0055】

本明細書において開示されるポリペプチド組成物および/または発現ベクターおよび/または組換え細胞をその必要のある被験体に投与することによって、治療用ポリペプチドを送達する必要のある被験体に治療用ポリペプチドを送達する方法もまた、企図される。有効量の、開示されるポリペプチド組成物をリソソーム蓄積障害（例えばサンフィリポ症候群）を治療する必要のある被験体に投与することによって、リソソーム蓄積障害（例えばサンフィリポ症候群）を治療する方法が、さらに企図される。本明細書において使用される場合、用語「被験体」は、任意の哺乳動物（例えばヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ブタ、サル、ウマ）、特にヒトを指すことを意味する。ある実施形態では、その被験体が、成体、青年、または乳児である。この組成物の投与および/または子宮内の治療方法の実行もまた、本発明によって企図される。本明細書において開示される組成物および方法は、上記に記載される投与経路のいずれを使用して投与されてもよく、ある実施形態では、このポリペプチド組成物が、非経口的に投与される。

【0056】

本明細書において使用される場合、語句「有効量」は、所望の臨床効果を達成するために必要とされる治療剤および/またはポリペプチドの量を指し、医薬組成物中に含有される治療剤の総量に基づいて概して決定される。一般的に、治療剤の有効量は、被験体にとって意味のある利点を達成する（例えば根底にある疾患または状態を治療する、調整する、治癒する、予防する、および/または改善する）のに十分である。例えば、本明細書において記載される医薬組成物の有効量は、リソソーム酵素受容体またはそれらの活性を調整し、それによって、そのようなリソソーム蓄積障害またはその症状を治療するのに十分な量のような、所望の治療および/または予防の効果を達成するのに十分な量であってもよい。一般的に、その必要のある被験体に投与される治療剤（例えば組換えリソソーム酵素）の量は、この被験体の特徴に依存する。そのような特徴としては、この被験体の状態、全般的健康状態、年齢、性別、および体重が挙げられる。当業者は、これらのおよび他の関係する要因に依存して、適切な投薬量を容易に決定することができる。さらに、客観的アッセイおよび主観的アッセイの両方が、最適な投薬量範囲を同定するために必要に応じて用いられてもよい。

【実施例】

【0057】

（例示）

リソソーム酵素N-アセチル-アルファ-グルコサミニダーゼ(Naglu)の取り込みを最大限にするために、成熟IGFIIの残基8~67をコードするカセットを、完全長ヒトNagluオープンリーディングフレームのC末端にインフレームで融合した。この構築物の設計は、Lebowitzら(PNAS 101(9):3083-3088, 2004)によって記載される同様のグルクロニダーゼ(glucuronidase)

10

20

30

40

50

- I G F I I 融合タンパク質とし、彼らは、 I G F I I カチオン非依存性マンノース - 6 - リン酸受容体を通してのグルクロニダーゼ (glucoronidase) の細胞取込みが、その受容体上の別個の部位に高い親和性で結合する I G F I I に融合された場合に非常に改善されたことを観察した。そのような融合タンパク質の利点を確立するために、一方は完全長野生型ヒト N a g l u を発現し、他方は 3 つの残基 (グリシン アラニン プロリン (G A P)) からなるリンカー領域を有する N a g l u - I G F I I 融合タンパク質を発現する 2 つの発現プラスミドを生成した (図 3 A) (LeBowitz, 2004)。

【 0 0 5 8 】

H T 1 0 8 0 哺乳動物安定細胞株を、野生型 N a g l u および N a g l u - I G F I I の両方について生成した。 1×10^6 細胞 / ml での安定細胞株の播種および 33 での 24 時間の培養の後に、タンパク質発現を、ウエスタンプロットによって馴化培地中でモニターし、活性を、蛍光発生基質 4 M U - N - アセチル - アルファ - D - グルコサミニドの切断を測定することによって決定した。 N a g l u - I G F I I の、細胞数によって標準化した活性は、タグ付けされていない N a g l u について観察されたものの 10 分の 1 であったことが決定された (図 9 を参照されたい)。ウエスタンプロットによって、試料充填量を細胞数によって標準化した場合、 N a g l u - I G F I I 発現が、タグ付けされていない N a g l u よりも著しく低かったことが明らかであった (図 10)。さらに、ウエスタンプロットの N a g l u - I G F I I レーン中の上方のバンドの下に広がる、より低分子量のバンドによって証明されるように、かなりの量の分解もまた、 N a g l u - I G F I I 発現の間に起こっていた (矢印、図 10)。この発現および崩壊のレベルは、3 つの別々の安定したトランスフェクションを含め、開発したすべての N a g l u - I G F I I 安定クローニング中で観察された。実際に、様々な N a g l u - I G F I I クローニングの発現レベルおよび活性を分析する場合、ウエスタンプロットによって観察された分解の量および試料中の N a g l u - I G F I I 活性のレベルの間に非常に明白な相関性があった。したがって、馴化培地中でより高度なレベルの N a g l u - I G F I I を示すクローニングは、典型的に、ウエスタンプロットにおいて対応する、より高度なレベルの分解を有した。 N a g l u - I G F I I は、 I G F I I タンパク質の配置により比較的不活性であり、 N a g l u - I G F I I クローニングから採取された試料中で観察された活性のレベルは、主として、 I G F I I タンパク質が切り取られたことによるものであり、細胞馴化培地試料において、活性でタグ付けされていない N a g l u のレベルの増加がもたらされたことが疑われた。

【 0 0 5 9 】

N a g l u と I G F I I との間のリンカーの長さを増加させることにより、より立体配置的に安定したフォールドされたタンパク質を可能にすることによって、 N a g l u - I G F I I 融合タンパク質の発現および活性が改善されるかもしれません、ならびに / または I G F I I 活性部位と N a g l u 活性部位との間のあらゆる妨害の可能性を予防するかもしれませんと仮定した。リンカーの長さを増加させるために、 A s c I 制限エンドヌクレアーゼ部位によってコードされるもともとの g a p リンカーが側面に位置する、グリシン アラニン グリシンのリピートからなる補足的なオリゴを生成した。このオリゴを、その後、 A s c I 部位にライゲーションした。このライゲーションにおいて、3 つの g a g オリゴをこのリンカーに組み込み、57 アミノ酸長のリンカーがもたらされた (図 3 B および図 8)。この構築物から生成された安定したクローニングは、 N a g l u と同じくらい活性であり (図 9)、 N a g l u と同様のレベルまで発現された (図 10)、 N a g l u - G A G₃ - I G F I I タンパク質を生じた。これにより、より長いリンカーが、 N a g l u - I G F I I 融合タンパク質の適切なフォールディングおよび酵素活性を可能にしたことが確認された。さらに、組換え N a g l u - G A G₃ - I G F I I および N a g l u を、ヒト線維芽細胞 (H F 1 1 5 6) における取り込みについて試験した。 N a g l u - G A G₃ - I G F I I は、この細胞によって容易に取り込まれ、その取り込みは、 I G F I I によって用量依存性の様式で阻害されたが、マンノース 6 - リン酸 (M 6 P) によっては阻害さ

10

20

30

40

50

れなかった(図11)。予期されるように、M6Pを欠く組換えNagluはこの細胞における取込みを示さなかった(図11)。

【0060】

したがって、本発明者らは、驚くべきことに、高度に発現された活性なNaglu-IGFIIポリペプチドをもたらしたペプチドリンカーを見出した。この研究から、より長いリンカー(例えば、3アミノ酸よりも長い)が、タンパク質の適切なフォールディング/活性をもたらし、その分解を予防したと考えられる。したがって、このペプチドリンカーおよび同様のペプチドリンカーは、他のタンパク質を連結し、かつ異種ポリペプチドを作り出すために一般的に使用することができる。

【0061】

本発明のある組成物および方法が、ある実施形態に従って特定して記載されたが、以下の例は、本発明の化合物を例示するためのみの役目をし、本発明の化合物を限定するようには意図されない。

【0062】

本明細書および請求項において、本明細書において使用される場合、冠詞「1つの(a)」および「1つの(an)」は、反対のことが明らかに示されない限り、複数の指示物を含むことが理解されるべきである。1つの群の1つ以上のメンバーの間に「または」を含む請求項または説明は、反対のことが示されるかまたは文脈からそうでないことが明白でない限り、群のメンバーのうちの1つ、1つを超えるもの、またはすべてが、所定の産物またはプロセスにおいて存在する、用いられる、またはさもなければ関連しているならば、満たされるものであると考えられる。本発明は、その群のまさに1つのメンバーが、所定の産物またはプロセスにおいて存在する、用いられる、またはさもなければ関連している実施形態を含む。本発明はまた、群の1つを超えるメンバーまたは群の全メンバーが、所定の産物またはプロセスにおいて存在する、用いられる、またはさもなければ関連している実施形態をも含む。さらに、本発明は、他に指定のない限りまたは矛盾もしくは不整合性が生じることが当業者に明白でない限り、列挙される請求項のうちの1つ以上からの1つ以上の限定、エレメント、節、記述的な用語などが、同じ基本請求項(または適宜、任意の他の請求項)に依存して、別の請求項に導入されるバリエーション、組み合わせ、および並べ換えをすべて包含することを理解されたい。エレメントがリストとして(例えばマーカッシュグループまたは同様の形式で)示される場合、エレメントのそれぞれのサブグループもまた開示され、任意のエレメントをその群から取り除くことができることを理解されたい。一般に、本発明または本発明の態様が、特定のエレメント、特徴などを含むと言及される場合、本発明のある実施形態または本発明の態様は、そのようなエレメント、特徴などからなる、または、から本質的になることが理解されるべきである。簡潔さの目的のために、それらの実施形態は、すべての場合において、本明細書において、あまり多くの単語では詳細には記載しなかった。具体的な除外が本明細書において記載されているかどうかにかかわらず、本発明の任意の実施形態または態様を、請求項から明示的に除外することができることもまた、理解されるべきである。本発明の背景を記載し、かつその実施に関するさらなる詳細について提供するために本明細書において参照された刊行物、ウェブサイト、および他の参考資料は、参照によって本明細書に援用される。

10

20

30

40

【図1】

FIGURE 1

GAPGGGGAAAAAGGGGG (配列番号1)

【図2】

FIGURE 2

GAPGGGGAAAAAGGGGG
 GAPGGGGAAAAAGGGGG
 GAPGGGGAAAAAGGGGG
 GAP (配列番号2)

【図3】

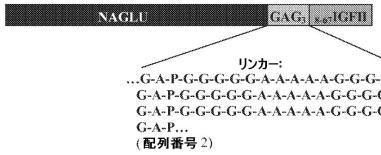
FIGURE 3A

pXD671-NAGLU

NAGLU

FIGURE 3B

pXD671-NAGLU-IGFII



...G-A-P...
 (配列番号2)

【図4A-1】

【図4A-1】

FIGURE 4A

ATGGAGGCGGTGGCGGTGGCGCGGGTGGGGGTCTCTCTCTGGCCG
 GGGCGGGGGCGCGCGCAGCGACGAGGCCGGAGCGCGCGCGCG
 GGCCTCGTGGCCCGGCTGGCTGGGGCAGGCCCCGGGGACTCTCC
 GTGCTGGTGGAGCGCGCTGGCTGCAAGCAAGCCGGCTGGACACCTA
 GCGCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGACTCTCC
 CGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 TGCCACGTGGCTGGTCCGGCTCTAGCTGCGCCTCCCGCGCCACTGC
 CAGCGCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 TTACAGAAGATGTCAGCAGAACATCTCTTCGTGTGGGACTGG
 GCGCGCTGGAGCGAGAGATAGACTGTGATGGCGCTGAATGGCATAAC
 TGGCACTGGCTGGAGCGCCAGGAGGCATCTGCAGCGGGTGTACCT
 GGCCTTGGCGCTGACCCAGCGACATCAATGAGTTCTTACTGCT
 GCCTCTGGCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CCCTGCCCCCTCTGGCACATCAACAGCGCTTACCTGCAACCTGGGATGGCC
 CCTGGACACATGCGCTCCCTGGCATGACCCAGTGTGCGCTGCATTC
 GCGGGCATCTTCCCAGCGCTGACCCAGCTGGCTTCCCTACGGTAATG
 TCACAGAAGATGGCGAGTGGGGCACTTAACTGTTCTACTCCCTGCTC
 CTTCTCTGGCTGGAGACCCATATTCCCATCATGGGAGCT
 TCCTGCGAGAGCTGATCAAAGAGTTGGCACAGACCACATATGGGC
 CGACACTTCAATGACATGAGCGCACCTCTGGAGGCGCCCTAACCT
 GCGGAGGCGACCACTGGCTCATGGCCAGTGCAGTGCAGTGCAGTGC
 AGGCTGTGCGCTCCAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CTGGGGCGCCCGCCAGATCAGGGCTGTGCTGGAGGCTGTGCCCCGTGCG
 CGCGCTCCCTCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GCACTGGCTCTTCCAGGGCGAGCCCTCATCTGGTGCATGTCGACAA
 CTTTGGGGAACACATGGCTTTTGAGGCCCTAGGGCTGTGACCGA
 GGCGCAGAAGCTGCCCTCTTCCCAACTCCACCATGGTAGGCACCG
 GCATGGCCCGGAGGGCATAGCCAGAACAGCTGGCTTACCTCCCTCAT
 GGCTGAGCTGGCTGGCGAGGACCGAGCTGGCAGATTGGCAGGCTGG
 GTGAGCAGCTTGGCCCGGGCGGTGGGGTCTCCACCCGGAGCGAG
 GGGCAGCGTGGAGGCTACTGTCGGAGTGTACAACGTCCGGGGGA
 GCGCTGGCGGGGCCACAATCTAGCCCGCTGCTCAGCGGGCGCTCC
 CAGATGAATACCAGCATCTGGTACAACCGGATCTGATGTTGAGGCCT
 GGCCTGGCTCATCATCTCCCTGGCCACAGCCCCGGCG
 CCGCTACGACCTGCGACCTACTGGCAGGCAGTGCAGGAGCTGGTC
 AGCTGTAATGAGCGAGGAAGAGCCCTACCTGAGCAAGGAACCTGG
 CCTCCCTGGTGGAGGCTGGCCCTGGCTATGAGCTGCTGGGGGA
 ACTGGCACGAGGTGCTGGCTACTGACAGCCCTTCTGCTGGCAGCTGG
 CTAGAGCAGGGCCGAGCACCGGACTAGTGGAGGCCAGGGGATTCT
 ACGACAGAACAGCCCTACAGCTCACCTGTGGGGGAGAAGGAA

【図4A-2】

【図6】

FIGURE 6

CATCCCTGACTATGCCAACAAAGCAGCTGGCGGGGGTGGTGGCCAACATAC
 TACACCCCTCGCTGGCGCTTCTGGAGGCCTGGTGTGACAGTGTGG
 CCCAGGCCATCTTCCAAACAGCACCAGTTGACAAAATGCTTCCA
 ACTGGAGAGCAGGCCCTCGTCTCAGCAAGCAGAGGTACCCAGCCG
 CGAGGAGACACTGTGGACCTGGCAAGAAGATTCCTCAAATATTAC
 CCCGCTGGGTGGCGCGCTTGG (配列番号3)

【図4B】

FIGURE 4B

MEAVAVAAVGVLLAGAGGAAGDEAREAAVRALVARLLGPGPAADFS
 VSVERALAAKPGLDTYSLGAAAARVRVRGSGTVAAGLHRYLRFDCG
 CHVAWSGSQLRLPRLPAPVGPTELATPNRYRYQNVCQSYFVWWDW
 ARWEREIDWMAINCINLALAWSQEEAIWQRVYLALGLTQAEINEFFTGP
 AFLAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIKQLYLQHRVLQDMRSFGMTPVLP
 AGHVPEAVTRVFPQVNVTKGWSGHNFNCNSYSCSFLAEPDPIFFIIGSL
 FLRELIKFGTDHIYGADTFNEMQPPSSEPSYLAATTAVYEAMTAVDT
 EA伟LLQGWLFQHOPFWGPAQTRAVLGAVPRGRLLVLDLFAESOPV
 RTASFQGQPFIWCMLNHFGGNHGLFGALEAVNGGPEAARLFPNSTM
 GMAPEGISQNEVVYSLMAELGWRKDPVPLAAWVTSFAARRYGVSHPD
 GAAWRLLRSVYNCSGEACRGHNRSPVRRPSLQMNNTSIWYNSRD
 WRLLLTSAPLSATSPAFRYDLRQLQAVQELVSLYYEARSAYLSKEL
 ASLLRAGGVLAYELLPALDEVLASDRSFLLGWSLEQARAAVSEAEADF
 YEONSRYQLTLWGPENGNILDYANKQLAGLVANYTPRWRLFLEALVDS
 AQGIPFQHQFDKNUFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVDLAKKIFLKY
 PRWAGSGWAPLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRASPVSRRSRGIVEEE
 CCFRSCDLALLETYCATPAKSE (配列番号4)

【図5】

FIGURE 5A

CTTGCAGGGGGAGCTGGGACACCCCTCAGTCGCTGTGGGGACC
 GCGCTTCTACTTCAGCAGGCCCAAGGCCGTGAGCCGTCGCCAGCG
 TGGCATCGTGGAGGAGTGTGCTGTTCCGAGCTGTGACCTGGCCCTCG
 GAGACGTACTGTGCTACCCCGCCAAGTCCGAGTGA (配列番号5)

FIGURE 5B

LCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRASPVSRRSRGIVEECCFRSCDLALL
 ETYCATPAKSE (配列番号6)

【図7】

FIGURE 7

MEAVAVAAVGVLLAGAGGAAGDEAREAAVRALVARLLGPGPAADFS
 VSVERALAAKPGLDTYSLGAAAARVRVRGSGTVAAGLHRYLRFDCG
 CHVAWSGSQLRLPRLPAPVGPTELATPNRYRYQNVCQSYFVWWDW
 ARWEREIDWMAINCINLALAWSQEEAIWQRVYLALGLTQAEINEFFTGP
 AFLAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIKQLYLQHRVLQDMRSFGMTPVLP
 AGHVPEAVTRVFPQVNVTKGWSGHNFNCNSYSCSFLAEPDPIFFIIGSL
 FLRELIKFGTDHIYGADTFNEMQPPSSEPSYLAATTAVYEAMTAVDT
 EA伟LLQGWLFQHOPFWGPAQTRAVLGAVPRGRLLVLDLFAESOPV
 RTASFQGQPFIWCMLNHFGGNHGLFGALEAVNGGPEAARLF
 GPNSTM
 GMAPEGISQNEVVYSLMAELGWRKDPVPLAAWVTSFAARRYGVSHPD
 GAAWRLLRSVYNCSGEACRGHNRSPVRRPSLQMNNTSIWYNSRD
 WRLLLTSAPLSATSPAFRYDLRQLQAVQELVSLYYEARSAYLSKEL
 ASLLRAGGVLAYELLPALDEVLASDRSFLLGWSLEQARAAVSEAEADF
 YEONSRYQLTLWGPENGNILDYANKQLAGLVANYTPRWRLFLEALVDS
 AQGIPFQHQFDKNUFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVDLAKKIFLKY
 PRWAGSGWAPLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRASPVSRRSRGIVEEE
 CCFRSCDLALLETYCATPAKSE (配列番号8)

【図 8】

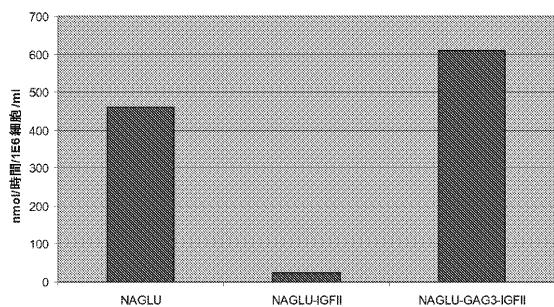
FIGURE 8

MEAVAVAAVGVILLLAGAGGAAGGDEAREAAAVRALVARLLGPGPAADFS
VSVERALAAKPGLDTYSLGAAAARVRVRGSGTVAAAAGLHRYLRLDFCG
CHVAWSGSQRLPRLPAVPGELTEATPNRYRYYQNVCSTQSYSFVWWDW
ARWEREIDWMALINGINLALAWSGQEAIWQRVYLAQGLTQAEINEFFTGP
AFLAWGRMGNLHTWDGPLPSPWHIKQLYQHRVLDQMRSGMTPVLPAG
AGHVPPEAVTRVFPQVNVTKMGSGWHFNCSYSCSFLLAPEPDIFPIIGSL
FLRELIKEFGTDHYYGADTFNEMQPPSSEFSYLAATTAVYEAMTAVDT
EAVWLLQGWLFQHQFQFWGPAQIRAVLGAVPRGRILVLDLFAESQPVYT
RTASFQGQPFIWCMHLHNFGGNHGLFGALEAVNGGPEAARLFPNSTMVGT
GMAPEGISQEVVYSLMAELGWRKDPVPLAAWVTSFAARRYGVSHPDA
GAAWRLLLRSVYNCSEACRGHNRSPVLRPSSLQMTSIWYNRSVDVFEA
WRLLLTSAPLATSPAFLYDLDLTRQAVQELVSLYYEARSAYLSKEL
ASLIRRAGGVLAYELLPADEVLSADSRILLGSLEQARAAAVSEAEADF
YEQNSRYQLTLWGPEGNLDYANKQLAGLVANYYTPRWRFLFLEALVDSV
AQGIPFQHQFQFDKNVFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVDLAKKIFLKYY
PRVWAGSWAPGGGGAAAAGGGGGAPGGGGAAAAGGGGGAPGG
GGGAAAAGGGGGAPLCCGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSR
GIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE (配列番号 9)

【図 9】

FIGURE 9

33°Cで増殖させた、安定した細胞株の上清中の標準化 Naglu 活性



【図 13】

FIGURE 13

GAP (配列番号 11)

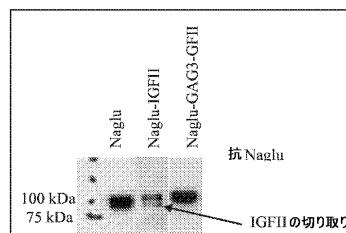
【図 14】

FIGURE 14

GGGGGP (配列番号 12)

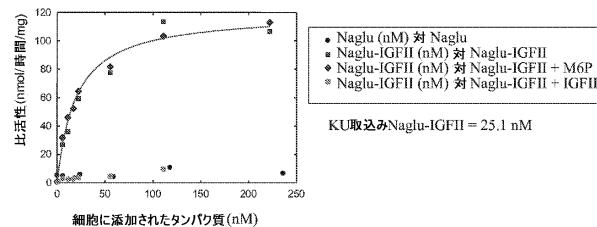
【図 10】

FIGURE 10



【図 11】

FIGURE 11



【図 12】

FIGURE 12

GGGGGSSSSGGGGG (配列番号 10)

【配列表】

0006175372000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 38/47 (2006.01) A 6 1 K 38/47
A 6 1 P 25/00 (2006.01) A 6 1 P 25/00

(31)優先権主張番号 13/168,969
(32)優先日 平成23年6月25日(2011.6.25)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 マーティーニ, パオロ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02118, ボストン, マサチューセッツ アベニュー
662, ユニット 3
(72)発明者 コンシーノ, マイケル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01740, ボルトン, ロング ヒル ロード 297

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0249021(US, A1)
特表2010-536370(JP, A)
国際公開第2010/060095(WO, A1)
J. Invest. Med.(Meet. Abst.), 2011年 1月, vol.59, no.1, pp.91-92[no.14]
J. Invest. Med.(Meet. Abst.), 2011年 1月, vol.59, no.1, pp.108[no.73]

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 12 N 15 / 00 - 15 / 90
C 12 N 9 / 24
C 07 K 14 / 65
C 07 K 19 / 00
UniProt/GenSeq
DDBJ/GenSeq
Capplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/
WPIDS(STN)
JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)
PubMed