【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成20年10月9日(2008.10.9)

【公表番号】特表2004-506438(P2004-506438A)
【公表日】平成16年3月4日(2004.3.4)
【年通号数】公開・登録公報2004-009
【出願番号】特願2002-520848(P2002-520848)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　9/24　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　3/06　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　9/99　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/43　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　9/24
Ａ６１Ｐ　3/06
Ｃ１２Ｎ　9/99
Ｃ１２Ｎ　15/00　Ａ
Ｃ１２Ｎ　5/00　Ｂ
Ａ６１Ｋ　37/48

【手続補正書】
【提出日】平成20年8月18日(2008.8.18)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】特許請求の範囲
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】　高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法であって、
グルコセレブロシダーゼ（ＧＣＢ）を発現することのできる細胞を提供し、
前記細胞をＧＣＢの前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の少なくとも一つのマンノース残基の除去が防止されるようにキフネンシンと接触させ、
前記細胞にｈｍＧＢＣを産生させ、それによって、ｈｍＧＣＢ製剤を製造する、各工程を含む方法。
【請求項２】　前記５糖コアに遠位の一つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする請求項１記載の方法。
【請求項３】　前記５糖コアに遠位の一つのα１，３マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする請求項１記載の方法。
【請求項４】　前記５糖コアに遠位の一つのα１，６マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする請求項１記載の方法。
【請求項５】　前記キフネンシンが約０．０５から２０．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする請求項１記載の方法。
【請求項６】　前記キフネンシンが約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする請求項１記載の方法。
【請求項７】　前記細胞をクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤と接触させることをさらに含むことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項８】　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシＤＩＭ、６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ、およびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする請求項７記載の方法。

【請求項９】　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニンであることを特徴とする請求項７記載の方法。

【請求項１０】　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、約０．０５から２０．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする請求項７記載の方法。

【請求項１１】　前記ｈｍＧＣＢが５個のマンノース残基を有する糖鎖を少なくとも一本含むことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項１２】　前記ｈｍＧＣＢが８個のマンノース残基を有する糖鎖を少なくとも一本含むことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項１３】　前記ｈｍＧＣＢが９個のマンノース残基を有する糖鎖を少なくとも一本含むことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項１４】　前記５糖コアに遠位の一つまたはそれ以上のマンノース残基の除去がｈｍＧＣＢの少なくとも二本の糖鎖上で防止されていることを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項１５】　前記製剤のｈｍＧＣＢの少なくとも６０％が、前記５糖コアに遠位の一つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている一本以上の糖鎖を有することを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項１６】　前記５糖コアに遠位の三つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されていることを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項１７】　前記製剤中の少なくとも約２０％のｈｍＧＣＢが、少なくとも８個のマンノース残基を有する一本またはそれ以上の糖鎖を持つことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項１８】　前記製剤中の少なくとも約４０％のｈｍＧＣＢが、少なくとも８個のマンノース残基を有する一本またはそれ以上の糖鎖を持つことを特徴とする請求項１７記載の方法。

【請求項１９】　前記製剤中の少なくとも約６０％のｈｍＧＣＢが、少なくとも８個のマンノース残基を有する一本またはそれ以上の糖鎖を持つことを特徴とする請求項１８記載の方法。

【請求項２０】　前記ｈｍＧＣＢ製剤中の少なくとも約８０％の糖鎖が６個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項２１】　前記細胞が少なくとも一つのクラス２プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項２２】　前記細胞がクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子を含むことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項２３】　前記細胞が、ＧＣＢコード化領域を含む外来性核酸配列を含むことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項２４】　前記細胞が、ＧＣＢコード化領域の発現を調節するように作用する外来性調節配列をさらに含むことを特徴とする請求項２３記載の方法。

【請求項２５】　前記細胞が、内在性ＧＣＢコード化配列の発現を調節するように作用する外来性調節配列を含むことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項２６】　前記細胞が初代細胞であることを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項２７】　前記細胞が２次細胞であることを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項２８】　前記細胞がほ乳類の細胞であることを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項２９】　前記細胞がヒトの細胞であることを特徴とする請求項２８記載の方法。

【請求項３０】　前記細胞が線維芽細胞または筋原細胞であることを特徴とする請求項２９記載の方法。

【請求項３１】　前記細胞が不死化細胞であることを特徴とする請求項２９記載の方法。

【請求項３２】　前記細胞がＨＴ－１０８０細胞であることを特徴とする請求項３１記載の方法。

【請求項３３】　前記細胞が培地中に含まれるキフネンシンと接触せしめられることを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項３４】　前記ｈｍＧＣＢが、前記細胞が培養されている前記培地から得られることを特徴とする請求項３３記載の方法。

【請求項３５】　サンプルからｈｍＧＣＢを精製する方法であって、

収穫したｈｍＧＣＢ生成物を提供することと、

ｈｍＧＣＢ生成物を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）または疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に付し、それによって精製したｈｍＧＣＢを得ること、

とを含む、サンプルからｈｍＧＣＢを精製する方法。

【請求項３６】　前記ｈｍＧＣＢ生成物をイオン交換クロマトグラフィーに付すことをさらに含むことを特徴とする請求項３５記載の方法。

【請求項３７】　イオン交換クロマトグラフィーに先立ち、前記ｈｍＧＣＢ生成物がＨＣＩＣまたはＨＩＣに付されることを特徴とする請求項３６記載の方法。

【請求項３８】　ＨＣＩＣまたはＨＩＣに先立ちｈｍＧＣＢ生成物がイオン交換クロマトグラフィーに付されることを特徴とする請求項３６記載の方法。

【請求項３９】　前記ｈｍＧＣＢ生成物が一つまたはそれ以上のイオン交換クロマトグラフィーステップに付されることを特徴とする請求項３６記載の方法。

【請求項４０】　前記イオン交換クロマトグラフィーが陰イオン交換クロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーからなる群から選択されることを特徴とする請求項３６記載の方法。

【請求項４１】　前記ｈｍＧＣＢ生成物をサイズ排除クロマトグラフィーに付すことをさらに含むことを特徴とする請求項３６記載の方法。

【請求項４２】　前記ｈｍＧＣＢ生成物を、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、およびサイズ排除クロマトグラフィーの内の１つ以上に付すことをさらに含むことを特徴とする請求項３５記載の方法。

【請求項４３】　前記ＨＣＩＣまたはＨＩＣに付されて精製されたｈｍＧＣＢ生成物を陰イオン交換クロマトグラフィーに付し、陰イオン交換された精製ｈｍＧＣＢを陽イオン交換クロマトグラフィーに付し、陽イオン交換された精製ｈｍＧＣＢをサイズ排除クロマトグラフィーに付すことをさらに含むことを特徴とする請求項３５記載の方法。

【請求項４４】　ＭＥＰ　Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）がＨＣＩＣに用いられることを特徴とする請求項３５、４２または４３記載の方法。

【請求項４５】　ＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）がＨＩＣに用いられることを特徴とする請求項３５、４２または４３記載の方法。

【請求項４６】　陰イオン交換クロマトグラフィーがＱ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｈｉｇｈ　Ｑ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）、ＤＥＡＥ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　ＤＥＡＥ（登録商標）のうちの一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする請求項３５、４２または４３記載の方法。

【請求項４７】　陽イオン交換クロマトグラフィーがＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｓｏｕｒｃｅ　３０Ｓ（登録商標）、ＣＭ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　ＣＭ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　Ｈｉｇｈ　Ｓ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）のうちの一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする請求項３５、４２または４３記載の方法。

【請求項４８】　前記サイズ排除クロマトグラフィーがＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００（

登録商標）、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－２００　ＨＲ（登録商標）およびＢｉｏ－Ｇｅｌ　Ａ　１．５ｍ（登録商標）の一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする請求項４１または４３記載の方法。

【請求項４９】　高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法であって、

外来性調節配列を含む核酸配列を、この調節配列が内在性ＧＣＢコード化領域の発現を調節するように導入した細胞を提供することと、

前記細胞を、ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の少なくとも一つのマンノース残基の除去を防止する物質と接触させることと、

前記細胞にｈｍＧＣＢを産生させ、それによってｈｍＧＣＢ製剤を製造することと、

を含む方法。

【請求項５０】　前記５糖コアに遠位の一つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項５１】　前記５糖コアに遠位の一つのα１，３マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項５２】　前記５糖コアに遠位の一つのα１，６マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項５３】　前記物質がクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項５４】　前記クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤がキフネンシンであることを特徴とする請求項５３記載の方法。

【請求項５５】　前記キフネンシンが約０．０５から２０．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする請求項５４記載の方法。

【請求項５６】　前記キフネンシンが約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする請求項５５記載の方法。

【請求項５７】　前記細胞をクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤と接触させることをさらに含むことを特徴とする請求項５４記載の方法。

【請求項５８】　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシＤＩＭ、６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ、およびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする請求項５７記載の方法。

【請求項５９】　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤がスワインソニンであることを特徴とする請求項５７記載の方法。

【請求項６０】　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が０．０５から２０．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする請求項５７記載の方法。

【請求項６１】　前記細胞が少なくとも一つのクラス２プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項６２】　前記細胞がクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子を含むことを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項６３】　前記ｈｍＧＣＢが、前記前駆体オリゴ糖の６個のマンノース残基を有する少なくとも一つの糖鎖を持つことを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項６４】　前記ｈｍＧＣＢが、前記前駆体オリゴ糖の８個のマンノース残基を有する少なくとも一つの糖鎖を持つことを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項６５】　前記ｈｍＧＣＢが、前記前駆体オリゴ糖の９個のマンノース残基を有する少なくとも一つの糖鎖を持つことを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項６６】　前記物質が、ＧＣＢの前記前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の少なくとも３個のマンノース残基の除去を防ぐことを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項６７】　前記５糖コアに遠位の一つまたはそれ以上のマンノース残基の除去がｈｍＧＣＢの少なくとも二本の糖鎖上で防止されていることを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項６８】　前記製剤のｈｍＧＣＢの少なくとも６０％が、前記５糖コアに遠位

の三つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている一本以上の糖鎖を有することを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項６９】 前記製剤中の少なくとも約２０％のｈｍＧＣＢが、少なくとも８個のマンノース残基を有する一本またはそれ以上の糖鎖を持つことを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項７０】 前記製剤中の少なくとも約４０％のｈｍＧＣＢが、少なくとも８個のマンノース残基を有する一本またはそれ以上の糖鎖を持つことを特徴とする請求項６９記載の方法。

【請求項７１】 前記製剤中の少なくとも約６０％のｈｍＧＣＢが、少なくとも８個のマンノース残基を有する一本またはそれ以上の糖鎖を持つことを特徴とする請求項７０記載の方法。

【請求項７２】 前記ｈｍＧＣＢ製剤中の少なくとも約８０％糖鎖が６個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項７３】 前記細胞が初代細胞であることを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項７４】 前記細胞が２次細胞であることを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項７５】 前記細胞がほ乳類の細胞であることを特徴とする請求項４９記載の方法。

【請求項７６】 前記細胞がヒトの細胞であることを特徴とする請求項７５記載の方法。

【請求項７７】 前記細胞が線維芽細胞または筋原細胞であることを特徴とする請求項７６記載の方法。

【請求項７８】 前記細胞が不死化細胞であることを特徴とする請求項７６記載の方法。

【請求項７９】 前記細胞がＨＴ－１０８０細胞であることを特徴とする請求項７８記載の方法。

【請求項８０】 前記細胞が培地中に含まれるキフネンシンと接触せしめられることを特徴とする請求項５４記載の方法。

【請求項８１】 前記ｈｍＧＣＢが、前記細胞が培養されている前記培地から得られることを特徴とする請求項８０記載の方法。

【請求項８２】 高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）製剤であって、各ｈｍＧＣＢが四本の糖鎖を持ち、前記ｈｍＧＣＢ製剤中の少なくとも約１０％の糖鎖が前駆体オリゴ糖の６個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とするｍｈＧＣＢ製剤。

【請求項８３】 前記ｈｍＧＣＢ製剤中の少なくとも約３０％の糖鎖が前駆体オリゴ糖の６個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とする請求項８２記載のｍｈＧＣＢ製剤。

【請求項８４】 前記ｈｍＧＣＢ製剤中の少なくとも約６０％の糖鎖が前駆体オリゴ糖の６個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とする請求項８３記載のｍｈＧＣＢ製剤。

【請求項８５】 前記ｈｍＧＣＢ製剤中の少なくとも約１０％の糖鎖が前駆体オリゴ糖の８個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とする請求項８２記載のｍｈＧＣＢ製剤。

【請求項８６】 前記ｈｍＧＣＢ製剤中の少なくとも約３０％の糖鎖が前駆体オリゴ糖の８個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とする請求項８５記載のｍｈＧＣＢ製剤。

【請求項８７】 前記ｈｍＧＣＢ製剤中の少なくとも約６０％の糖鎖が前駆体オリゴ糖の８個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とする請求項８６記載のｍｈＧＣＢ製剤。

【請求項８８】　前駆体オリゴ糖鎖の６個またはそれ以上のマンノース残基を有する少なくとも一本の糖鎖を含む高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）製剤。
【請求項８９】　少なくとも二本の糖鎖が前駆体オリゴ糖のマンノース残基を６個またはそれ以上有することを特徴とする請求項８８記載のｍｈＧＣＢ。
【請求項９０】　前記糖鎖が前駆体オリゴ糖のマンノース残基を８個またはそれ以上有することを特徴とする請求項８９記載のｍｈＧＣＢ。
【請求項９１】　請求項８２から９０いずれか１項記載のｈｍＧＣＢ製剤をゴーシェ病の治療に適した量含む、製剤組成物。
【請求項９２】　製剤的に許容されている担体または希釈剤をさらに含むことを特徴とする請求項９１記載の組成物。

【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２０４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２０４】
その他の実施態様は、特許請求の範囲内のものである。
以下、本発明のさらに別の実施態様を項分け記載する。
（実施態様１）　グルコセレブロシダーゼ（ＧＣＢ）を発現することのできる細胞を提供し、
ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の少なくとも一つのマンノース残基の除去を防止する条件の下で前駆体オリゴ糖を有するＧＣＢの生産を行い、ｈｍＧＣＢ製剤を製造することを含む、高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法。
（実施態様２）　前記５糖コアに遠位の一つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする実施態様１記載の方法。
（実施態様３）　前記５糖コアに遠位の一つのα１，３マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする実施態様１記載の方法。
（実施態様４）　前記５糖コアに遠位の一つのα１，６マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする実施態様１記載の方法。
（実施態様５）　前記方法がＧＣＢの前記前駆体の５糖コアに遠位の少なくとも一つのマンノース残基の除去を防止する物質と前記細胞とを接触させることを含むことを特徴とする実施態様１記載の方法。
（実施態様６）　前記物質がマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様５記載の方法。
（実施態様７）　前記マンノシダーゼ阻害剤がクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様６記載の方法。
（実施態様８）　前記マンノシダーゼ阻害剤がクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様６記載の方法。
（実施態様９）　前記クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、キフネンシン、デオキシマンノジリマイシンおよびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様７記載の方法。
（実施態様１０）　前記クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤がキフネンシンであることを特徴とする実施態様７記載の方法。
（実施態様１１）　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシＤＩＭ、６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ、およびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様８記載の方法。
（実施態様１２）　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤がスワインソニンであることを特徴とする実施態様８記載の方法。

（実施態様１３）　前記マンノシダーゼ阻害剤が約０．０５から２０．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする実施態様６記載の方法。

（実施態様１４）　前記マンノシダーゼ阻害剤が約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする実施態様１３記載の方法。

（実施態様１５）　前記細胞をクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤と接触させることをさらに含むことを特徴とする実施態様７記載の方法。

（実施態様１６）　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニン、マンノスタチンおよびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様１５記載の方法。

（実施態様１７）　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニンであることを特徴とする実施態様１５記載の方法。

（実施態様１８）　前記細胞が少なくとも一つのマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様１９）　前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様１８記載の方法。

（実施態様２０）　前記細胞がクラス２プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様１８記載の方法。

（実施態様２１）　前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼおよびクラス２プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様１８記載の方法。

（実施態様２２）　前記細胞がアンチセンスマンノシダーゼ分子を含むことを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様２３）　前記アンチセンス分子が、クラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子、クラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子、クラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子およびクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子の両方、とからなる群から選択されることを特徴とする実施態様２２記載の方法。

（実施態様２４）　前記ｈｍＧＣＢが少なくとも４個のマンノース残基を有する糖鎖を一本含むことを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様２５）　前記ｈｍＧＣＢが５個のマンノース残基を有する糖鎖を少なくとも一本含むことを特徴とする実施態様２４記載の方法。

（実施態様２６）　前記ｈｍＧＣＢが８個のマンノース残基を有する糖鎖を少なくとも一本含むことを特徴とする実施態様２４記載の方法。

（実施態様２７）　前記ｈｍＧＣＢが９個のマンノース残基を有する糖鎖を少なくとも一本含むことを特徴とする実施態様２４記載の方法。

（実施態様２８）　生成された前記ｈｍＧＣＢにおいてマンノース残基のＧｌｃＮＡｃ残基に対する比がＧｌｃＮＡｃ残基２に対しマンノース残基が３以上であることを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様２９）　前記５糖コアに遠位の一つまたはそれ以上のマンノース残基の除去がｈｍＧＣＢの少なくとも二本の糖鎖上で防止されていることを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様３０）　前記製剤のｈｍＧＣＢの少なくとも６０％が、前記５糖コアに遠位の一つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている一本以上の糖鎖を有することを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様３１）　前記細胞が、ＧＣＢコード化領域を含む外来性核酸配列を含むことを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様３２）　前記細胞が、ＧＣＢコード化領域の発現を調節するように作用する外来性調節配列をさらに含むことを特徴とする実施態様３１記載の方法。

（実施態様３３）　前記細胞が、内在性ＧＣＢコード化配列の発現を調節するように作用する外来性調節配列を含むことを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様３４）　前記細胞が初代細胞であることを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様３５）　前記細胞が２次細胞であることを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様３６）　前記細胞がほ乳類の細胞であることを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様３７）　前記細胞がヒトの細胞であることを特徴とする実施態様３６記載の方法。

（実施態様３８）　前記細胞が線維芽細胞または筋原細胞であることを特徴とする実施態様３７記載の方法。

（実施態様３９）　前記細胞が不死化細胞であることを特徴とする実施態様３７記載の方法。

（実施態様４０）　前記細胞がＨＴ－１０８０細胞であることを特徴とする実施態様３９記載の方法。

（実施態様４１）　ＧＣＢ発現可能な細胞集団が提供され、これら細胞の少なくとも１０％が特定数のマンノース残基を有する４本の糖鎖を有するＧＣＢを生産することを特徴とする実施態様１記載の方法。

（実施態様４２）　前記細胞が少なくとも一つのマンノシダーゼ阻害剤を含む培地中で培養されていることを特徴とする実施態様５記載の方法。

（実施態様４３）　前記マンノシダーゼ阻害剤がクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様４２記載の方法。

（実施態様４４）　前記クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤がキフネンシン、デオキシマンノジリマイシンおよびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様４３記載の方法。

（実施態様４５）　前記マンノシダーゼ阻害剤がクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様４２記載の方法。

（実施態様４６）　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシ－ＤＩＭ、６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ、およびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様４５記載の方法。

（実施態様４７）　前記培地がさらにクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤を含むことを特徴とする実施態様４３記載の方法。

（実施態様４８）　前記ｈｍＧＣＢが前記細胞が培養されている培地から得られることを特徴とする実施態様４２記載の方法。

（実施態様４９）　高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法であって、

グルコセレブロシダーゼ（ＧＣＢ）を発現することのできる細胞を提供することと、

ＧＣＢの前記前駆体オリゴ糖の５糖コアから遠位の少なくとも一つのマンノース残基の除去が防がれるように、クラス１プロセシングマンノシダーゼ活性とクラス２プロセシングマンノシダーゼ活性を阻害する条件の下で前駆体オリゴ糖を有するＧＣＢの生産を行い、それによってｈｍＧＣＢ製剤を製造することと、

を含む高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法。

（実施態様５０）　前記細胞を、クラス１プロセシングマンノシダーゼを阻害する物質およびクラス２プロセシングマンノシダーゼを阻害する物質と接触させることを特徴とする実施態様４９記載の方法。

（実施態様５１）　前記５糖コアに遠位の一つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする実施態様４９記載の方法。

（実施態様５２）　前記５糖コアに遠位の一つのα１，３マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする実施態様４９記載の方法。

（実施態様５３）　前記５糖コアに遠位の一つのα１，６マンノース残基を除去する

ことが防止されていることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
（実施態様５４） 前記物質がクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
（実施態様５５） 前記物質がクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様４９記載の方法
（実施態様５６） 前記クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、キフネンシン、デオキシマンノジリマイシンおよびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様５４記載の方法。
（実施態様５７） 前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシＤＩＭ、６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ、およびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様５５記載の方法。
（実施態様５８） 前記マンノシダーゼ阻害剤が約０．０５から２０．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする実施態様５６または５７記載の方法。
（実施態様５９） 前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
（実施態様６０） 前記細胞がクラス２プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
（実施態様６１） 前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼおよびクラス２プロセシングマンノシダーゼ両方のノックアウトであることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
（実施態様６２） 前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子を含むことを特徴とする実施態様４９記載の方法。
（実施態様６３） 前記細胞がクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子を含むことを特徴とする実施態様４９記載の方法。
（実施態様６４） 前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子とクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子とを含むことを特徴とする実施態様６３記載の方法。
（実施態様６５） 前記細胞がＧＣＢコード化領域を含む外来性核酸配列を含むことを特徴とする実施態様４９記載の方法。
（実施態様６６） 前記細胞がＧＣＢコード化領域の発現を調節するように作用する外来性調節配列をさらに含むことを特徴とする実施態様６５記載の方法。
（実施態様６７） 前記細胞が内在性ＧＣＢコード化配列の発現を調節するように作用する外来性調節配列を含むことを特徴とする実施態様４９記載の方法。
（実施態様６８） 前記細胞が少なくとも一つのクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤および少なくとも一つのクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤を含む培地中で培養されていることを特徴とする実施態様５０記載の方法。
（実施態様６９） 前記細胞が培養されている培地から前記ｈｍＧＣＢを得ることをさらに含むことを特徴とする実施態様６８記載の方法。
（実施態様７０） 高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法であって、
外来性調節配列を含む核酸配列を、この調節配列が内在性ＧＣＢコード化領域の発現を調節するように導入した細胞を提供することと、
ＧＣＢの前記前駆体オリゴ糖の５糖コアから遠位の少なくとも一つのマンノース残基の除去を防止する条件下で前駆体オリゴ糖を有するＧＣＢの生産を行い、それによってｈｍＧＣＢ製剤を製造することと、
を含む高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法。
（実施態様７１） 前駆体オリゴ糖鎖の少なくとも４個のマンノース残基を有する少なくとも一本の糖鎖を含む高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）製剤。
（実施態様７２） 前記ｈｍＧＣＢが５個のマンノース残基を有する少なくとも一本

の糖鎖を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ製剤。
（実施態様７３） 前記ｈｍＧＣＢが８個のマンノース残基を有する少なくとも一本の糖鎖を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ製剤。
（実施態様７４） ｈｍＧＣＢが９個のマンノース残基を有する少なくとも一本の糖鎖を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ製剤。
（実施態様７５） 生成された前記ｈｍＧＣＢが、マンノース残基のＧｌｃＮＡｃ残基に対する比がＧｌｃＮＡｃ残基２に対しマンノース残基が３以上である、少なくとも一本の糖鎖を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ製剤。
（実施態様７６） ｈｍＧＣＢの少なくとも二本の糖鎖が前駆体オリゴ糖鎖の少なくとも４個のマンノース残基を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ製剤。
（実施態様７７） 前記製剤のｈｍＧＣＢの少なくとも８５％が前記５糖コアに遠位の一つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている４本の糖鎖を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ製剤。
（実施態様７８） 実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ製剤をゴーシェ病の治療に適した量含む、製剤組成物。
（実施態様７９） 製剤的に許容されている担体または希釈剤をさらに含むことを特徴とする実施態様７８記載の組成物。
（実施態様８０） 実施態様７８記載の組成物を前記患者に投与し、それによってゴーシェ病を治療することを含む、ゴーシェ病の患者を治療する方法。
（実施態様８１） サンプルからｈｍＧＣＢを精製する方法であって、
収穫したｈｍＧＣＢ生成物を提供することと、
ｈｍＧＣＢ生成物を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）または疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に付し、それによって精製したｈｍＧＣＢを得ること、
とを含む、サンプルからｈｍＧＣＢを精製する方法。
（実施態様８２） ＭＥＰ Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）がＨＣＩＣに用いられることを特徴とする実施態様８１記載の方法。
（実施態様８３） ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）がＨＩＣに用いられることを特徴とする実施態様８１記載の方法。
（実施態様８４） 前記ｈｍＧＣＢ生成物をイオン交換クロマトグラフィーに付すことをさらに含むことを特徴とする実施態様８１記載の方法。
（実施態様８５） イオン交換クロマトグラフィーに先立ち、前記ｈｍＧＣＢ生成物がＨＣＩＣまたはＨＩＣに付されることを特徴とする実施態様８４記載の方法。
（実施態様８６） ＨＣＩＣまたはＨＩＣに先立ちｈｍＧＣＢ生成物がイオン交換クロマトグラフィーに付されることを特徴とする実施態様８４記載の方法。
（実施態様８７） 前記ｈｍＧＣＢ生成物が一つまたはそれ以上のイオン交換クロマトグラフィーステップに付されることを特徴とする実施態様８４記載の方法。
（実施態様８８） 前記イオン交換クロマトグラフィーが陰イオン交換クロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーからなる群から選択されることを特徴とする実施態様８４記載の方法。
（実施態様８９） 陰イオン交換クロマトグラフィーがＱ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｑ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）、ＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＤＥＡＥ（登録商標）のうちの一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様８８記載の方法。
（実施態様９０） 陽イオン交換クロマトグラフィーがＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｓｏｕｒｃｅ ３０Ｓ（登録商標）、ＣＭ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＣＭ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｓ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録

商標）のうちの一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様８８記載の方法。

（実施態様９１） 前記ｈｍＧＣＢ生成物をサイズ排除クロマトグラフィーに付すことをさらに含むことを特徴とする実施態様８４記載の方法。

（実施態様９２） 前記サイズ排除クロマトグラフィーがＳｕｐｅｒｄｅｘ ２００（登録商標）、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－２００ ＨＲ（登録商標）およびＢｉｏ－Ｇｅｌ Ａ １．５ｍ（登録商標）の一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９１記載の方法。

（実施態様９３） ｈｍＧＣＢの精製方法であって、

収穫したｈｍＧＣＢ生成物を提供することと、

該ｈｍＧＣＢ生成物を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）または疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に付すことと、

該ｈｍＧＣＢ生成物を陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーの一つまたはそれ以上に付し、それによって精製されたｈｍＧＣＢを得ることと、

を含むｈｍＧＣＢの精製方法。

（実施態様９４） ＭＥＰ Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）をＨＣＩＣに用いることを特徴とする実施態様９３記載の方法。

（実施態様９５） ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）をＨＩＣに用いることを特徴とする実施態様９３記載の方法。

（実施態様９６） 陰イオン交換クロマトグラフィーがＱ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｑ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）、ＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＤＥＡＥ（登録商標）のうちの一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９３記載の方法。

（実施態様９７） 陽イオン交換クロマトグラフィーが、ＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｓｏｕｒｃｅ ３０Ｓ（登録商標）、ＣＭ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＣＭ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｓ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）のうちの一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９３記載の方法。

（実施態様９８） 前記サイズ排除クロマトグラフィーが、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００（登録商標）、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－２００ ＨＲ（登録商標）およびＢｉｏ－Ｇｅｌ Ａ １．５ｍ（登録商標）の一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９３記載の方法。

（実施態様９９） ｈｍＧＣＢの精製方法であって、

収穫したｈｍＧＣＢ生成物を提供することと、

該ｈｍＧＣＢ生成物を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）または疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に付すことと、

該ＨＣＩＣまたはＨＩＣ精製ｈｍＧＣＢ生成物を陰イオン交換クロマトグラフィーに付すことと、

該陰イオン交換クロマトグラフィー精製ｈｍＧＣＢ生成物を陽イオン交換クロマトグラフィーに付すことと、

該陽イオン交換クロマトグラフィー精製ｈｍＧＣＢ生成物をサイズ排除クロマトグラフィーに付し、それによって精製されたｈｍＧＣＢを得ることと、

を含むｈｍＧＣＢの精製方法。

（実施態様１００） ＭＥＰ Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）をＨＣＩＣに用いることを特徴とする実施態様９９記載の方法。

（実施態様１０１） ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）をＨＩＣに用いることを特徴とする実施態様９９記載の方法。

（実施態様１０２）　陰イオン交換クロマトグラフィーが、Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｈｉｇｈ　Ｑ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）、ＤＥＡＥ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　ＤＥＡＥ（登録商標）のうちの一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９９記載の方法。

（実施態様１０３）　陽イオン交換クロマトグラフィーが、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｓｏｕｒｃｅ　３０Ｓ（登録商標）、ＣＭ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　ＣＭ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　Ｈｉｇｈ　Ｓ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）のうちの一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９９記載の方法。

（実施態様１０４）　前記サイズ排除クロマトグラフィーが、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００（登録商標）、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－２００　ＨＲ（登録商標）およびＢｉｏ－Ｇｅｌ　Ａ　１．５ｍ（登録商標）の一つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９９記載の方法。