

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-190867

(P2016-190867A)

(43) 公開日 平成28年11月10日(2016.11.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54	4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16	Z N A Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A 4 C 0 7 6
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 6

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-151739 (P2016-151739)	(71) 出願人	512268527 シナジーバ バイオファーマ コーポ アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 4 2 1, レキシントン, スプリング ストリート 1 2 8, スイート 5 2 0 , シナジーバ バイオファーマ コーポ レーション
(22) 出願日	平成28年8月2日(2016.8.2)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(62) 分割の表示	特願2015-160139 (P2015-160139) の分割	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
原出願日	平成23年4月23日(2011.4.23)	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(31) 優先権主張番号	61/432, 372	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(32) 優先日	平成23年1月13日(2011.1.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/456, 014		
(32) 優先日	平成22年10月29日(2010.10.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/403, 011		
(32) 優先日	平成22年9月9日(2010.9.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

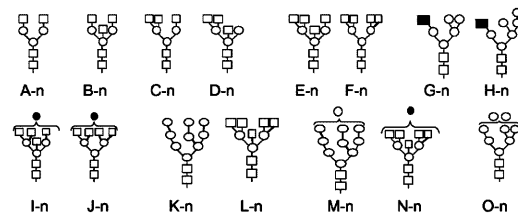
(54) 【発明の名称】 リソソーム蓄積症酵素

(57) 【要約】

【課題】 リソソーム蓄積症酵素の提供。

【解決手段】 本発明は、標的細胞内への内部移行のための特定のグリコシル化パターンを有する組換えヒトリソソーム酸リパーゼの組成物、ヒトリソソーム酸リパーゼをコードする核酸を含むベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、組換えヒトリソソーム酸リパーゼを含む医薬組成物、およびリソソーム酸リパーゼ欠損症に関連した状態の治療法を提供する。例えば、1つ以上のN-グリカン構造を含む単離ヒト組換えリソソーム酸リパーゼ(LAL)を含む、組成物が提供される。

【選択図】 図 1 6



四角＝N-アセチルグルコサミン
黒四角＝マンノース-6-リン酸
丸＝マンノース
黒丸＝ガラクトース
黒三角＝フコース

図 1 6

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リソソーム蓄積症酵素など。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2010年4月23日に出願された米国特許仮出願第61/343,177号、2010年5月26日に出願された米国特許仮出願第61/396,376号、2010年9月9日に出願された米国特許仮出願第61/403,011号、2010年10月29日に出願された米国特許仮出願第61/456,014号、2011年1月13日に出願された米国特許仮出願第61/432,372号の利益を主張する。上記出願の教示はすべて参照により本明細書に組み込まれる。

10

【背景技術】

【0002】

リソソーム酸リパーゼ (LAL) 欠損症は、酵素の欠損によるリソソーム内でのコレステリルエステル (CE) およびトリグリセリド (TAG) の分解の不全を特徴とする、極めて稀なリソソーム蓄積症 (LSD) である。LAL 欠損症は、数多くの組織および細胞型内に基質が蓄積される他のリソソーム蓄積障害と類似している。LAL 欠損症では、肝臓の Kupffer 細胞、脾臓の組織球および小腸の固有層を含めた細網内皮系の細胞内での基質の蓄積が最も著しい。細網内皮細胞はマクロファージマンノース / N - アセチルグルコサミン受容体 (マクロファージマンノース受容体すなわち MMR、CD206 としても知られる) を発現し、この受容体は GlcNAc またはマンノース末端の N - グリカンを含むタンパク質の結合、細胞内取込みおよびリソソーム内への移行を仲介し、上記の鍵となる細胞型における酵素欠損の潜在的な矯正のための経路をもたらす。

20

【0003】

LAL 欠損症は、最も多くは胃腸管、肝臓および心血管の合併症を伴って発症し、罹患率および死亡率の高い多系統疾患である。LAL 欠損症の臨床的影響は、多数の組織におけるリソソーム内での大量の脂質物質の蓄積、ならびに肝コレステロール合成の大幅な増加を含めたコレステロールおよび脂質の恒常性維持機構の重度の攪乱によるものである。LAL 欠損症には、ウォルマン病 (WD) およびコレステリルエステル蓄積症 (CESD) の少なくとも2つの表現型がある。

30

【0004】

ウォルマン病は LAL 欠損症の最も悪性の症状である。この表現型は、成長不全、吸収不良、脂肪便、重度の体重減少および肝腫大を含めた、胃腸管および肝臓での発症を特徴とする。ウォルマン病は急速進行性であり、通常は生後1年以内に致命的となる。生後1年以内に LAL 欠損症による成長不全を示す患者が12か月齢よりも長く生存することは非常に稀であることが、症例報告レビューで示されている。この最も悪性の型では、成長不全が最も顕著な臨床上的特徴であり、かつ早期死亡率の鍵となる要因である。肝腫大およびトランスアミナーゼ上昇により明らかである肝合併症も乳児でよく見られる。身体所見としては肝腫大および脾腫による腹部膨張が挙げられ、また放射線検査で副腎の石灰化が明らかになることが多い。実験室評価では通常、血中トランスアミナーゼレベルの上昇および LAL 酵素活性の欠損または顕著な減少が明らかとなる。コレステロールおよびトリグリセリドの血中濃度の上昇も患者において見られる。

40

【0005】

ウォルマン病に対する現在の治療選択は極めて限られたものである。発熱および / または感染の証拠が見られれば、抗生物質を乳児に投与する。副腎機能不全に対するステロイド補充療法および特殊な栄養補給を処方する場合もあるが、こうした介入が死亡を防ぐという証拠はなく、またこれらが短期間の生存に影響を与えるか否かも現在のところ不明である。骨髄移植の治療を受けた4人の一連の LAL 欠損症患者では、全4患者が治療の合

50

併症により移植の数か月以内に死亡した。

【0006】

またLAL欠損症の患者は、後年に顕著な肝臓および心血管の合併症を発症する場合もあり、これは多くの場合コレステリルエステル蓄積症(CESD)と呼ばれる。CESDでは、著しい肝腫大、肝細胞の壊死、トランスアミナーゼ上昇、肝硬変および線維症により、肝臓が重篤な影響を受ける。またLAL欠損症では、CEおよびTGレベルの上昇により、高脂血症および進行性アテローム性動脈硬化症も見られる。具体的には、生後間もなく動脈壁に脂肪性沈着物が蓄積することが記載されている。この沈着物により動脈内腔が狭まり、血管閉塞が生じて、心筋梗塞および脳卒中を含めた重篤な心血管事象危険性が高まる可能性がある。CESDの症候は極めて多様であり、患者によっては、成人後期に合併症が発症するまで診断されない場合もあれば、早期幼児期に肝障害が発症する場合もあり得る。CESDは短命と関連する重篤な健康障害であり、CESD患者の平均余命は併発する合併症の重症度によって異なる。

10

【0007】

CESD表現型に対する現在の治療選択は、コレステロールおよびトリグリセリドの多い食物を排除した食事による脂質蓄積の制御、ならびにコレステロール低下薬の投与によるコレステロール合成およびアポリポタンパク質B産生の抑制に重点を置いたものである。臨床改善が見られる場合もあるが、基礎疾患の発症は持続し、依然として疾患は進行する。

20

【0008】

多くの場合、LAL欠損症の治療法では生涯にわたる治療が必要とされる。さらに、タンパク質療法の費用が高いため、最小有効量の治療剤を投与してLAL欠損症を治療することが望ましい。しかし現在のところ、LAL欠損症、特にウォルマン病およびCESD罹患している患者を治療する有効な治療法は存在しない。したがって、患者の生活に質を改善するために投与頻度を最小限にした有効な治療法が大いに必要とされている。また、安定であり、かつ患者の罹患組織細胞内のリソソーム区画に対して効率的に標的化されたLALTANパク質を産生することができる、高発現で堅固なタンパク質産生プラットフォームも必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

30

【0009】

例えばLAL欠損症に関連する状態を治療する治療法での使用に特に適した、LALの組成物が本明細書に開示される。本明細書に記載のLAL分子は、対象、例えばヒト対象に投与した場合に細胞のリソソーム内への効率的かつ迅速な取り込みを生じる、特定のグリカン構造を含む。

【0010】

一態様では、本明細書に開示される組成物はヒトLALを含み、かなりの割合のヒトLALが、例えば肝細胞上に見られる細胞表面上のマンノース-6-リン酸受容体による内部移行のためのリガンドとして働き得る、少なくとも1つのマンノース-6-リン酸グリカン部分を含む。一実施形態では、組成物中に含まれるLALの30%以上、例えば、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90%、少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも99%が、少なくとも1つのマンノース-6-リン酸部分を含む。マンノース-6-リン酸部分は、例えば、配列番号2のAsn¹⁵、Asn⁵¹、Asn⁸⁰、Asn¹⁴⁰、Asn²⁵²およびAsn³⁰⁰からなる群より選択される1つ以上の残基に位置するN-グリカン構造上に見ることができる。

40

【0011】

別の態様では、本明細書に開示される組成物はヒトLALを含み、かなりの割合のヒトLALが、そのN-グリカン構造のいずれにも、細胞内への酵素の内部移行に干渉し得るシアル酸部分を含まない。一実施形態では、組成物中のLALの15%以下、例えば、1

50

0 % 以下、5 % 以下、2 % 以下、1 % 以下がその N - グリカン構造にシアル酸部分を含むか、または実質的にすべての L A L がシアル酸部分を含まない。

【 0 0 1 2 】

別の態様では、本明細書に開示される組成物はヒト L A L を含み、かなりの割合のヒト L A L が、その N - グリカン構造のいずれにもフコース部分を含まない。一実施形態では、組成物中に含まれる L A L の 5 0 % 以下、例えば、5 0 % 以下、4 0 % 以下、3 0 % 以下、2 0 % 以下、1 0 % 以下、5 % 以下、2 % 以下、1 % 以下がその N - グリカン構造にフコース部分を含むか、または実質的にすべての L A L がフコース部分を含まない。

【 0 0 1 3 】

さらに別の態様では、L A L 含有組成物を産生するのに適したベクター、宿主細胞、発現系および関連する方法が記載される。

【 0 0 1 4 】

一般に、本明細書で述べられ開示される本発明の L A L はヒト L A L である。一実施形態では、L A L を含む組成物は以下のアミノ酸配列を有する成熟 L A L を含む：

S G G K L T A V D P E T N M N V S E I I S Y W G F P S E E Y L V E T E D G Y I L
C L N R I P H G R K N H S D K G P K P W F L Q H G L L A D S S N W V T N L A N S
S L G F I L A D A G F D V W M G N S R G N T W S R K H K T L S V S Q D E F W A F
S Y D E M A K Y D L P A S I N F I L N K T G Q E Q V Y Y V G H S Q G T T I G F I
A F S Q I P E L A K R I K M F F A L G P V A S V A F C T S P M A K L G R L P D H
L I K D L F G D K E F L P Q S A F L K W L G T H V C T H V I L K E L C G N L C F
L L C G F N E R N L N M S R V D V Y T T H S P A G T S V Q N M L H W S Q A V K F
Q K F Q A F D W G S S A K N Y F H Y N Q S Y P P T Y N V K D M L V P T A V W S G
G H D W L A D V Y D V N I L L T Q I N L V F H E S I P E W E H L D F I W G L D A
P W R L Y N K I I N L M R K Y Q (配列番号 2) 。

【 0 0 1 5 】

別の実施形態では、成熟 L A L は以下のアミノ酸配列を有する：

G K L T A V D P E T N M N V S E I I S Y W G F P S E E Y L V E T E D G Y I L C L
N R I P H G R K N H S D K G P K P W F L Q H G L L A D S S N W V T N L A N S S L
G F I L A D A G F D V W M G N S R G N T W S R K H K T L S V S Q D E F W A F S Y
D E M A K Y D L P A S I N F I L N K T G Q E Q V Y Y V G H S Q G T T I G F I A F
S Q I P E L A K R I K M F F A L G P V A S V A F C T S P M A K L G R L P D H L I
K D L F G D K E F L P Q S A F L K W L G T H V C T H V I L K E L C G N L C F L L
C G F N E R N L N M S R V D V Y T T H S P A G T S V Q N M L H W S Q A V K F Q K
F Q A F D W G S S A K N Y F H Y N Q S Y P P T Y N V K D M L V P T A V W S G G H
D W L A D V Y D V N I L L T Q I N L V F H E S I P E W E H L D F I W G L D A P W
R L Y N K I I N L M R K Y Q (配列番号 3) 。

【 0 0 1 6 】

別の実施形態では、成熟 L A L は以下のアミノ酸配列を有する：

T A V D P E T N M N V S E I I S Y W G F P S E E Y L V E T E D G Y I L C L N R I
P H G R K N H S D K G P K P W F L Q H G L L A D S S N W V T N L A N S S L G F I
L A D A G F D V W M G N S R G N T W S R K H K T L S V S Q D E F W A F S Y D E M
A K Y D L P A S I N F I L N K T G Q E Q V Y Y V G H S Q G T T I G F I A F S Q I
P E L A K R I K M F F A L G P V A S V A F C T S P M A K L G R L P D H L I K D L
F G D K E F L P Q S A F L K W L G T H V C T H V I L K E L C G N L C F L L C G F
N E R N L N M S R V D V Y T T H S P A G T S V Q N M L H W S Q A V K F Q K F Q A
F D W G S S A K N Y F H Y N Q S Y P P T Y N V K D M L V P T A V W S G G H D W L
A D V Y D V N I L L T Q I T N L V F H E S I P E W E H L D F I W G L D A P W R L
Y N K I I N L M R K Y Q (配列番号 4) 。

【 0 0 1 7 】

別の実施形態では、成熟 L A L は以下のアミノ酸配列を有する：

AVDPETNMNVSEIISYWGFPSSEELYLVETEDGYILCLNRI PHGRKNHSDKGPKPWFLQHGLLADSSSNWVTNLANSSSLGFILADAGFDVWMGNSRGNTWSRKHKTL SVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILNK TGQE QVYYVGH S QGTTIGFIAFSQIPELAKRIKMFFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDHLIKDLFGDKEFLPQSAFLKWL GTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYTTTHSPAGTSVQNM L HWSQAVKFQKFQAFDWGSSSAKNYFHYNQSYPP TYNVK DMLVP TAVWSGGH DWLADVYDVNI LLTQITNLVFHESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLY NKIINLMRKYQ (配列番号19)。

10

【0018】

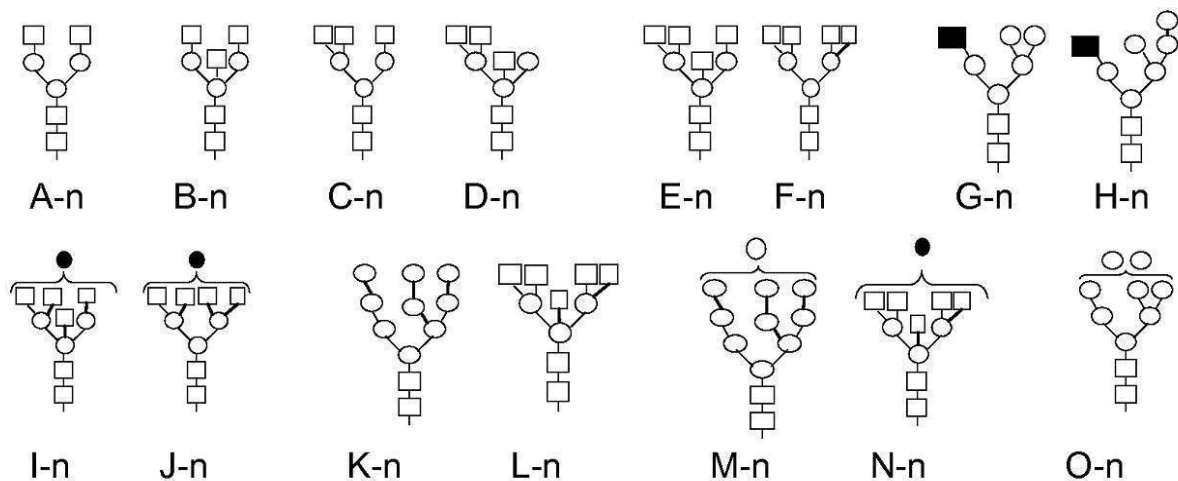
別の実施形態では、成熟LALは、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号19からなる群より選択される少なくとも2つのポリペプチドの混合物である。

【0019】

また本発明は、本明細書に開示されるタンパク質のような個々の種類の有用なタンパク質分子の、単離された混合物を含有する組成物を提供し、混合物中に含有される1つ以上のタンパク質分子には、特定のオリゴ糖構造、具体的には本明細書に開示されるオリゴ糖構造が結合している。例えば、本発明は、1つ以上の以下の構造A-n~O-nによりグリコシル化されたLAL分子を含有するLAL分子、例えばヒトLAL分子の単離された混合物を提供する：

20

【化1】



30

四角 = N - アセチルグルコサミン

黒四角 = マンノース - 6 - リン酸

= マンノース

黒丸 = ガラクトース

黒三角 = フコース。

40

【0020】

本発明の一態様では、組成物は任意の単離された個々の上記ポリペプチドまたは上記ポリペプチドの組合せを含む。一実施形態では、組成物は医薬組成物、例えば、組成物が、例えば対象（例えばヒト、特に、ある状態に罹患しているまたは状態を有すると診断された患者）への投与に適するように、薬学的に許容される担体をさらに含む製剤であり得る。組成物は、静脈内投与を含めた様々な方法で投与することができる。別の実施形態では、組成物は第二の薬剤をさらに含むことができる。このような薬剤は、薬物、または対象に投与されたときに生物学的過程に影響を与え得るもしくはそれを調節し得る薬剤であり得る。例えば、第二の薬剤は免疫調節剤であり得る。このような免疫調節剤としては、本

50

明細書に記載の任意の L A L 組成物とともに投与された場合（すなわち、同時に、または直前もしくは直後に投与された場合）に、対象における L A L 組成物の免疫原性を低減する作用を有し得る任意の薬剤（例えば、リツキシマブ、または他の任意の B 細胞枯渇抗体）を挙げることができる。

【 0 0 2 1 】

最後の態様では、L A L 欠損症に関連した症状を治療する方法および組成物が開示される。

【 0 0 2 2 】

以下の詳細な記載を添付の図面および配列と合わせて再考すれば、本発明のさらなる目的および態様がより明らかになるであろう。

例えば、本願発明は以下の項目を提供する。

（項目 1）

1 つ以上の N - グリカン構造を含む単離ヒト組換えリソソーム酸リパーゼ（L A L）を含む、組成物。

（項目 2）

前記 L A L が実質的に配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、項目 1 に記載の組成物。

（項目 3）

前記 L A L が配列番号 2 で記載されるアミノ酸配列からなる、項目 2 に記載の組成物。

（項目 4）

前記 L A L が、配列番号 2 の A s n ^{1 5}、A s n ^{5 1}、A s n ^{8 0}、A s n ^{1 4 0}、A s n ^{2 5 2} および A s n ^{3 0 0} からなる群より選択される少なくとも 1 つの位置において N - 結合グリコシル化されている、項目 3 に記載の組成物。

（項目 5）

前記 L A L が、配列番号 2 の A s n ^{1 5}、A s n ^{8 0}、A s n ^{1 4 0}、A s n ^{2 5 2} および A s n ^{3 0 0} において N - グリコシル化されている、項目 4 に記載の組成物。

（項目 6）

前記 L A L が、リン酸化マンノースを含む N - グリカン構造を配列番号 2 の A s n ^{8 0}、A s n ^{1 4 0} または A s n ^{2 5 2} において含む、項目 5 に記載の組成物。

（項目 7）

前記 L A L が、リン酸化マンノースを含む N - グリカン構造を A s n ^{8 0} において含む、項目 5 に記載の組成物。

（項目 8）

A s n ^{8 0} に関連した N - グリカン構造の少なくとも 3 0 % がリン酸化マンノースを有する、項目 5 に記載の組成物。

（項目 9）

A s n ^{8 0} に関連した N - グリカン構造の少なくとも 5 0 % がリン酸化マンノースを有する、項目 5 に記載の組成物。

（項目 1 0）

前記 L A L が、二リン酸化マンノースを含む N - グリカン構造を A s n ^{8 0} において含む、項目 5 に記載の組成物。

（項目 1 1）

A s n ^{8 0} に関連した N - グリカン構造の少なくとも 5 0 % が二リン酸化マンノースを含む、項目 5 に記載の組成物。

（項目 1 2）

前記 L A L が、リン酸化マンノース（M 6 P）を含む N - グリカン構造を A s n ^{1 4 0} において含む、項目 5 に記載の組成物。

（項目 1 3）

A s n ^{1 4 0} に関連した N - グリカン構造の約 1 0 % ~ 約 5 0 % が M 6 P を含む、項目 5 に記載の組成物。

（項目 1 4）

10

20

30

40

50

前記 L A L が、リン酸化マンノース (M 6 P) を含む N - グリカン構造を $A s n^{252}$ において含む、項目 5 に記載の組成物。

(項目 1 5)

$A s n^{252}$ における N - グリカン構造の少なくとも 5 0 % が M 6 P を含む、項目 1 4 に記載の組成物。

(項目 1 6)

前記 L A L が、高マンノース基を含む N - グリカン構造を $A s n^{80}$ または $A s n^{252}$ において含む、項目 5 に記載の組成物。

(項目 1 7)

前記高マンノース基が 6、7、8、9 または 1 0 個のマンノースを含む、項目 1 6 に記載の組成物。

(項目 1 8)

前記高マンノース基が 7、8 または 9 個のマンノースを含む、項目 1 7 に記載の組成物。

(項目 1 9)

前記 L A L が、7、8 または 9 個のマンノースを含む N - グリカン構造を $A s n^{80}$ において含む、項目 1 8 に記載の組成物。

(項目 2 0)

$A s n^{80}$ における N - グリカン構造の少なくとも 8 0 % が 7、8 または 9 個のマンノースを含む、項目 1 8 に記載の組成物。

(項目 2 1)

前記 L A L が、7、8 または 9 個のマンノースを含む N - グリカン構造を $A s n^{252}$ において含む、項目 1 8 に記載の組成物。

(項目 2 2)

$A s n^{252}$ における N - グリカン構造の少なくとも 7 0 % が 7、8 または 9 個のマンノースを含む、項目 1 8 に記載の組成物。

(項目 2 3)

前記 L A L が、末端ガラクトースを含む N - グリカン構造を $A s n^{15}$ 、 $A s n^{140}$ または $A s n^{300}$ において含む、項目 5 に記載の組成物。

(項目 2 4)

$A s n^{15}$ に関連した N - グリカン構造の約 2 % ~ 約 1 0 % が末端ガラクトースを含む、項目 5 に記載の組成物。

(項目 2 5)

$A s n^{140}$ に関連した N - グリカン構造の 5 % 未満が末端ガラクトースを含む、項目 5 に記載の組成物。

(項目 2 6)

$A s n^{300}$ に関連した N - グリカン構造の 1 0 0 % 未満が末端ガラクトースを含む、項目 5 に記載の組成物。

(項目 2 7)

前記 L A L の $A s n^{51}$ が非グリコシル化または実質的に非グリコシル化である、項目 5 に記載の組成物。

(項目 2 8)

前記 L A L が、キシロースを有さない N - グリカン構造を含み、かつ前記 N - グリカン構造の 1 5 % 未満がシアル酸を含む、項目 1 に記載の組成物。

(項目 2 9)

前記 L A L が、キシロースを有さない N - グリカン構造を含み、かつ前記 N - グリカン構造の 1 0 % 未満がシアル酸を含む、項目 1 に記載の組成物。

(項目 3 0)

前記 L A L が、キシロースを有さない N - グリカン構造を含み、かつ前記 N - グリカン構造の 5 % 未満がシアル酸を含む、項目 1 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

(項目 3 1)

前記 L A L が、キシロースを有さない N - グリカン構造を含み、かつ前記 N - グリカン構造の 1 % 未満がシアル酸を含む、項目 1 に記載の組成物。

(項目 3 2)

前記 L A L が、シアル酸およびキシロースを実質的に含まない、項目 1 に記載の組成物。

(項目 3 3)

前記 L A L が N - グリカン構造を含み、前記 N - グリカン構造の 5 0 % 未満、4 0 % 未満、3 0 % 未満、2 0 % 未満、1 0 % 未満、5 % 未満または 1 % 未満がフコースを含む、項目 1 に記載の組成物。

10

(項目 3 4)

前記 L A L がフコースを含まない、項目 1 に記載の組成物。

(項目 3 5)

前記 L A L が N - グリカン構造を含み、前記 N - グリカン構造の少なくとも 3 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % および 9 5 % がリン酸化マンノース (M 6 P) を含む、項目 1 に記載の組成物。

(項目 3 6)

前記 L A L が N - グリカン構造を含み、前記 N - グリカン構造の少なくとも 9 0 % がリン酸化マンノース (M 6 P) を含む、項目 1 に記載の組成物。

20

(項目 3 7)

前記 L A L が、以下の N - 結合グリコシル化プロファイルを含む、項目 5 に記載の組成物：

g) A s n ^{1 5} において、

G l c N A c 4 M a n 3 G l c N A c 2 または

G a l 1 G l c N A c 4 M a n 3 G l c N A c 2 ;

h) A s n ^{8 0} において、

P h o s 2 M a n 7 G l c N A c 2 ;

i) ^{1 4 0} において、

P h o s 1 M a n 6 G l c N A c 2 、

G l c N A c 1 P h o s 1 M a n 6 G l c N A c 2 、

M a n 3 G l c N A c 2 、

G l c N A c 2 M a n 3 G l c N A c 2 、

G l c N A c 3 M a n 3 G l c N A c 2 、

G l c N A c 4 M a n 3 G l c N A c 2 または

G a l 1 G l c N A c 4 M a n 3 G l c N A c 2 ;

j) A s n ^{2 5 2} において、

M a n 7 G l c N A c 2 、

M a n 8 G l c N A c 2 、

M a n 9 G l c N A c 2 、

P h o s 1 M a n 8 G l c N A c 2 または

P h o s 1 M a n 9 G l c N A c 2 ; および

k) A s n ^{3 0 0} において、

G l c N A c 2 M a n 3 G l c N A c 2 、

G l c N A c 3 M a n 3 G l c N A c 2 、

G l c N A c 4 M a n 3 G l c N A c 2 、

G a l 1 G l c N A c 4 M a n 3 G l c N A c 2 、

G l c N A c 5 M a n 3 G l c N A c 2 、

G a l 1 G l c N A c 5 M a n 3 G l c N A c 2 、

G l c N A c 6 M a n 3 G l c N A c 2 または

G a l 1 G l c N A c 6 M a n 3 G l c N A c 2

30

40

50

(式中、

M a n = マンノース、
G l c N A c = N - アセチルグルコサミン、
P h o s = リン酸、
G a l = ガラクトース
である)。

(項目 3 8)

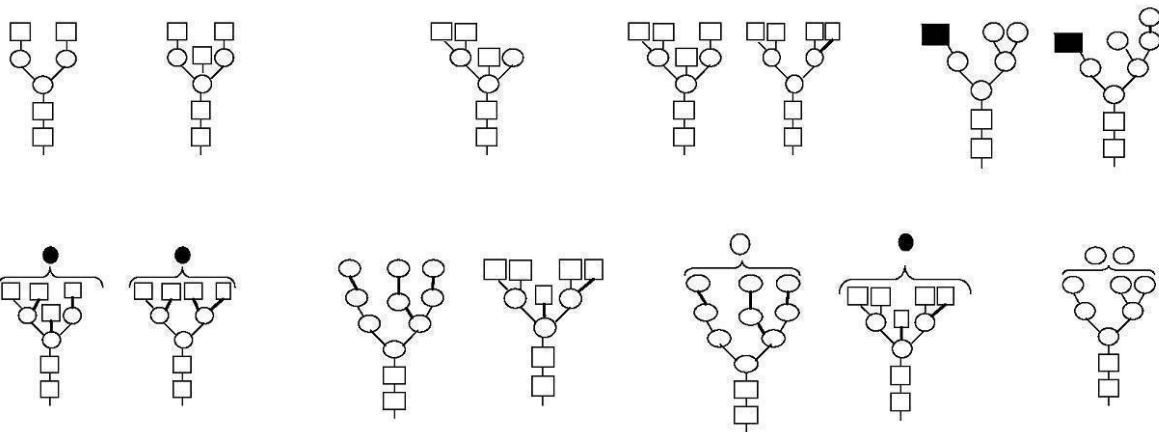
前記 L A L が、配列番号 2 の A s n ^{1 5}、A s n ^{5 1}、A s n ^{8 0}、A s n ^{1 4 0}、A s n ^{2 5 2} および A s n ^{3 0 0} において N - 結合グリコシル化されている、項目 1 に記載の組成物。

10

(項目 3 9)

前記 L A L が、以下の構造から選択される N - グリカンを含む、項目 1 に記載の組成物：

(化 1)



20

(式中、

四角 = N - アセチルグルコサミン
黒四角 = マンノース - 6 - リン酸
丸 = マンノース
黒丸 = ガラクトース
黒三角 = フコース
である)。

30

(項目 4 0)

前記 L A L が生殖系列トランスジェニックトリにおいて産生される、項目 3 9 に記載の組成物。

(項目 4 1)

前記 L A L が前記生殖系列トランスジェニックトリの輸卵管細胞から産生される、項目 4 0 に記載の組成物。

40

(項目 4 2)

前記オリゴ糖構造がトリ由来である、項目 1 に記載の組成物。

(項目 4 3)

前記トリがニワトリである、項目 4 2 に記載の組成物。

(項目 4 4)

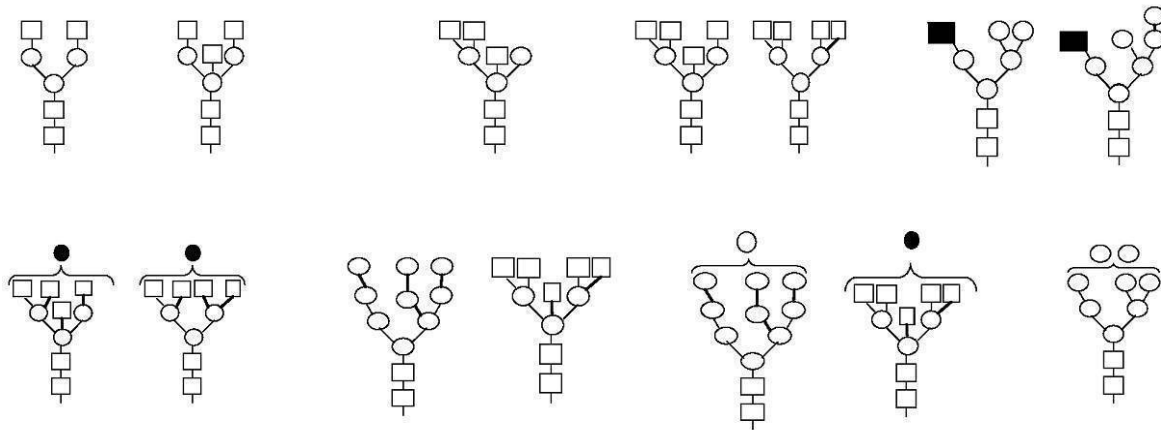
組換えヒトリソソーム酸リパーゼ (L A L) の混合物を含み、前記混合物が、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 および配列番号 1 9 からなる群より選択される少なくとも 2 つのヒト L A L を含む、組成物。

50

(項目 4 5)

前記ヒト L A L の混合物が、以下の構造から選択される N - グリカンを含む、項目 4 4 に記載の組成物：

(化 2)



10

(式中、

四角 = N - アセチルグルコサミン

黒四角 = マンノース - 6 - リン酸

丸 = マンノース

黒丸 = ガラクトース

黒三角 = フコース

である)。

(項目 4 6)

前記 L A L が、以下の N - 結合グリコシル化プロファイルを含む、項目 4 4 に記載の組成物：

a) 配列番号 2、3、4 および 19 のそれぞれ Asn^{15} 、 Asn^{13} 、 Asn^{10} および Asn^9 において、

$GlcNAc_4Man_3GlcNAc_2$ または

$Gal_1GlcNAc_4Man_3GlcNAc_2$ ；

b) 配列番号 2、3、4 および 19 のそれぞれ Asn^{80} 、 Asn^{78} 、 Asn^{75} および Asn^{74} において、

$Phos_2Man_7GlcNAc_2$ ；

c) 配列番号 2、3、4 および 19 のそれぞれ Asn^{140} 、 Asn^{138} 、 Asn^{135} および Asn^{134} において、

$Phos_1Man_6GlcNAc_2$ 、

$GlcNAc_1Phos_1Man_6GlcNAc_2$ 、

$Man_3GlcNAc_2$ 、

$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$

$GlcNAc_3Man_3GlcNAc_2$

$GlcNAc_4Man_3GlcNAc_2$ または

$Gal_1GlcNAc_4Man_3GlcNAc_2$ ；

d) 配列番号 2、3、4 および 19 のそれぞれ Asn^{252} 、 Asn^{250} 、 Asn^{247} および Asn^{246} において、

$Man_7GlcNAc_2$ 、

$Man_8GlcNAc_2$ 、

$Man_9GlcNAc_2$ 、

40

50

- Phos 1 Man 8 GlcNAc 2 または
Phos 1 Man 9 GlcNAc 2 ; および
e) 配列番号 2、3、4 および 19 のそれぞれ Asn³⁰⁰、Asn²⁹⁸、Asn²⁹⁵ および Asn²⁹⁴ において、
GlcNAc 2 Man 3 GlcNAc 2、
GlcNAc 3 Man 3 GlcNAc 2、
GlcNAc 4 Man 3 GlcNAc 2、
Gal 1 GlcNAc 4 Man 3 GlcNAc 2、
GlcNAc 5 Man 3 GlcNAc 2、
Gal 1 GlcNAc 5 Man 3 GlcNAc 2、
GlcNAc 6 Man 3 GlcNAc 2 または
Gal 1 GlcNAc 6 Man 3 GlcNAc 2。
(項目 47)
単離リソソーム酸リパーゼ (LAL) 分子を含み、前記 LAL が、トランスジェニックニワトリの輸卵管細胞内で産生され、前記 LAL をコードする導入遺伝子を含む前記トランスジェニックニワトリの卵白から単離される、組成物。
(項目 48)
前記 LAL がヒト LAL である、項目 47 に記載の組成物。
(項目 49)
前記輸卵管細胞が管状腺細胞である、項目 48 に記載の組成物。
(項目 50)
前記単離ヒト LAL がニワトリ由来のグリコシル化パターンを含む、項目 49 に記載の組成物。
(項目 51)
LAL 欠損症に関連した状態に罹患している患者を治療する方法であって、組換えヒト LAL を含む組成物の治療有効量を前記患者に投与することを含む方法。
(項目 52)
前記組換えヒト LAL が項目 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の組成物である、項目 51 に記載の方法。
(項目 53)
前記状態がコレステリルエステル蓄積症 (CESD) である、項目 51 に記載の方法。
(項目 54)
前記状態がウォルマン病である、項目 51 に記載の方法。
(項目 55)
前記患者に約 0.35 mg/kg ~ 約 5.0 mg/kg の間の前記 LAL 組成物を投与する、項目 51 に記載の方法。
(項目 56)
前記患者に約 0.35 mg/kg ~ 約 3.0 mg/kg の間の前記 LAL 組成物を投与する、項目 51 に記載の方法。
(項目 57)
前記患者に 7 日に 1 回 ~ 45 日に 1 回投与する、項目 51 に記載の方法。
(項目 58)
前記患者に、3 日に 1 回、5 日に 1 回、1 週間に 1 回、2 週間に 1 回、20 日に 1 回、28 日に 1 回、30 日に 1 回または 1 か月に 1 回投与する、項目 51 に記載の方法。
(項目 59)
前記患者に約 1.0 mg/kg ~ 3.0 mg/kg の間の有効量を隔週で投与する、項目 51 に記載の方法。
(項目 60)
グリコシル化ヒトリソソーム酸リパーゼ (LAL) を作製する方法であって、プロモーターと作動可能に連結されたヒト LAL をコードする導入遺伝子を含み、かつ輸卵管細胞

内で前記ヒト L A L を発現する生殖系列トランスジェニックトリを作製し、前記 L A L が、前記輸卵管細胞内でグリコシル化され、前記トランスジェニックトリが産む硬殻卵内に蓄積される、方法。

(項目 6 1)

グリコシル化ヒトリソソーム酸リパーゼ (L A L) を産生する、トランスジェニックトリ。

(項目 6 2)

項目 6 1 に記載のトランスジェニックトリが産む卵。

(項目 6 3)

項目 6 1 に記載のトランスジェニックトリにより産生されたヒト L A L を含有する、卵白。

(項目 6 4)

項目 1 に記載のヒト組換えリソソーム酸リパーゼをコードする核酸配列を担持する、ベクター。

(項目 6 5)

項目 6 4 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

(項目 6 6)

L A L 欠損症に関連した状態に罹患している患者を治療する方法であって、組換えヒト L A L を含む組成物の治療有効量を前記患者に投与することと、第二の治療剤を前記患者に投与することを含む、方法。

(項目 6 7)

前記第二の治療剤が、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチンおよびシンバスタチンからなる群より選択されるコレステロール低化剤である、項目 6 6 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記第二の治療剤が免疫抑制剤である、項目 6 6 に記載の方法。

(項目 6 9)

項目 1 に記載の組成物を薬学的に許容される担体、希釈剤または添加剤とともに含む、医薬製剤。

(項目 7 0)

クエン酸三ナトリウム脱水和物、クエン酸およびヒト血清アルブミンからなる群より選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む、項目 6 9 に記載の医薬製剤。

(項目 7 1)

p H が約 5 . 6 ~ 約 6 . 2 の間に維持された水溶液で提供される、項目 6 9 に記載の医薬製剤。

(項目 7 2)

p H が 5 . 7 ~ 6 . 1 の間に維持されている、項目 7 1 に記載の医薬製剤。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 3 】

【図 1】ヒト L A L のアミノ酸配列を表す図である。組換え h L A L のアミノ酸配列は、天然ヒト L A L の配列と 1 0 0 % の相同性を示す。成熟型の h L A L に下線が施してある。

【図 2】p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A の r h L A L 導入遺伝子である組換え h L A L のヌクレオチド配列を表す図である。

【図 3】図 3 A および 3 B。p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A およびそのプロウイルス領域の略図である。図 3 A は、形質導入粒子の作製に使用したヒト L A L レトロウイルス発現ベクターを表す略図である (プラスミドの D N A 配列は添付書類 A にある)。図 3 A は、ゲノム内に組み込まれた p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A のプロウイルス領域の図である。S I N L T R は自己活性化型の長い末端反復配列 ; O V D H S I I I エンハンサーはオボアルブミン遺伝子の D N A アーゼ高感受性部位 I I

10

20

30

40

50

I ; O V イントロンはオボアルブミン 5' 非翻訳領域およびイントロン 1 ; h L A L は h L A L c D N A ; O V 3' U T R はオボアルブミン遺伝子 3' 非翻訳領域 ; 部分的 g a g は部分的 g a g 遺伝子 ; L T R は長い末端反復配列である。

【図 4 - 1】図 4。p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A のヌクレオチド配列を表す図である。

【図 4 - 2】図 4。p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A のヌクレオチド配列を表す図である。

【図 4 - 3】図 4。p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A のヌクレオチド配列を表す図である。

【図 4 - 4】図 4。p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A のヌクレオチド配列を表す図である。

10

【図 5 - 1】図 5。ゲノム内に組み込まれた p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A プロウイルス領域のヌクレオチド配列を表す図である。

【図 5 - 2】図 5。ゲノム内に組み込まれた p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A プロウイルス領域のヌクレオチド配列を表す図である。

【図 5 - 3】図 5。ゲノム内に組み込まれた p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A プロウイルス領域のヌクレオチド配列を表す図である。

【図 6 - 1】図 6。p A L V I N - O V - 1 . 1 - I ベクターのヌクレオチド配列を表す図である。

【図 6 - 2】図 6。p A L V I N - O V - 1 . 1 - I ベクターのヌクレオチド配列を表す図である。

20

【図 6 - 3】図 6。p A L V I N - O V - 1 . 1 - I ベクターのヌクレオチド配列を表す図である。

【図 6 - 4】図 6。p A L V I N - O V - 1 . 1 - I ベクターのヌクレオチド配列を表す図である。

【図 7】r h L A L アダプターのヌクレオチド配列を表す図である。

【図 8】部分的オボアルブミンプロモーターを含む r h L A L のヌクレオチド配列を表す図である。

【図 9】O V R 1 プロモーターのヌクレオチド配列を表す図である。

【図 10】p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A ベクターを構築するために使用した段階の略図である。

30

【図 11】X L L 109 のヘミ接合性トランスジェニック G 1 子孫由来の血液 D N A 試料のリアルタイム P C R 解析を表す図である。ヘミ接合性 G 1 子孫である 1 L L 7 4 6 6 の複製 D N A 試料由来のシグナルは、サイクル 22 の前にデルタ R n の増加が始まる曲線により示される。2 つの非トランスジェニック子孫の曲線が示されているが、これらの曲線は少なくとも 34 サイクルの間はベースライン付近にとどまっている。

【図 12】図 12 A ~ 12 D。A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A 導入遺伝子を担持する G 1 ニワトリのサザン解析を表す図である。図 12 A は組み込まれた導入遺伝子の略図を示し、隣接ゲノム領域が、導入遺伝子 B l p I 部位の既知の位置および隣接ゲノム B l p I 部位の予測位置とともに示されている。O V プロモータープローブおよび h L A L コード配列プローブ (h L A L プローブ) の位置が黒線で示されている。サザン解析で検出された 4 . 3 k b および 10 . 6 k b の位置が、4 . 3 k b および 10 . 6 k b バンドのゲノム遺伝子および導入遺伝子部分の予測サイズとともに示されている。図 12 B は、B l p I で消化し O V プローブでプローブしたゲノム D N A のサザンプロットを図示している。W T C T R L は非トランスジェニックニワトリから単離されたゲノム D N A である。レーンの上には G 1 トランスジェニックの I D 番号が示されている。プロットの左側には分子量マーカーの位置およびサイズ (k b) が示されている。プロットの右側には検出された導入遺伝子フラグメント (4 . 3 k b) および内在性オボアルブミン遺伝子 (4 . 1 k b) の位置およびサイズが示されている。図 12 C は h L A L プローブでプローブしたサザンプロットを表す図である。プロットの右側には検出された導入遺伝子フ

40

50

ラグメント (10 . 6 k b) の位置およびサイズが示されている。図 1 2 D は、4 . 1 k b および 4 . 3 k b バンドの存在を示すために、図 1 2 B で示される図の一部分を縮尺を拡大して図示したものである。

【図 1 3】図 1 3 A。A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A 導入遺伝子の略図である。O V プローブおよび h L A L プローブにより検出されることが予測される A p a L I バンドのサイズも示してある。図 1 3 B は、導入遺伝子サイズ確認のための A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A 導入遺伝子のサザンプロット解析の略図である。ゲノム DNA のサザンプロットでは、A p a L I で消化し、O V プローブ (左パネル) または h L A L プローブ (右パネル) でプローブした。W T C T R L は非トランスジェニックニワトリから単離されたゲノム DNA である。各レーンの上には G 1 の I D 番号が示されている。プロットの左側には分子量マーカーの位置およびサイズ (k b) が示されている。プロットの右側には、検出された導入遺伝子フラグメント (O V プロモータープローブ、3 . 6 k b ; h L A L プローブ、3 . 8 k b) および内在性オボアルブミン遺伝子 (7 . 7 k b) の位置およびサイズが示されている。

【図 1 4】トランスジェニックニワトリの系統を表す図である。各ニワトリの世代数 (G 0、G 1 または G 2)、識別番号、性別および孵化日が示されている。他の G 1 ニワトリは他系統のものである。

【図 1 5】卵白からの h L A L の精製段階を表す図である。

【図 1 6】本発明に従って産生された L A L 中に N - 結合グリコシル化構造として見られる N - グリカンを表す図である。四角は N - アセチルグルコサミン ; 黒四角はマンノース - 6 - リン酸 ; 丸はマンノース ; 黒丸はガラクトース ; 黒三角はフコースを表す。

【図 1 7】配列番号 1 で記述される L A L ポリペプチド (矢印) 上に予測 N - グリカン部位の相対的位置を示した図である。各部位で検出された N - グリカンの代表的な構造が示されている。四角は N - アセチルグルコサミン ; 黒四角はマンノース - 6 - リン酸 ; 丸はマンノース ; 黒丸はガラクトース ; 黒三角はフコースである。

【図 1 8】P N G アーゼにより解離し、M A L D I - T O F により解析したリン酸化 N - グリカンを表す図である。構造が示されている。

【図 1 9】N - グリカンの H P A E C - P A D 保持時間に対する L A L の脱リン酸化の効果を表す図である。本発明に従って産生された L A L を、細菌アルカリホスファターゼで脱リン酸化する (上パネル) か、または未処理のままにした (下パネル)。解離された N - グリカンを H P A E C - P A D により解析した。

【図 2 0】共焦点蛍光顕微鏡により連続スキャンモードを用いて調べた細胞のリソソーム内での組換えヒト L A L (S B C - 1 0 2) とリソソームマーカーの共局在を表す図である。

【図 2 1】マクロファージ細胞系の N R 8 3 8 3 を用いた競合結合アッセイにより評価した、組換えヒト L A L (S B C - 1 0 2) の G l c N A c / マンノース受容体に対する結合特異性を表す図である。

【図 2 2】i n v i t r o での正常および L A L 欠損細胞における細胞中の組換えヒト L A L の活性を表す図である。

【図 2 3】L A L 欠損ラットの内部臓器質量に対する組換えヒト L A L (S B C - 1 0 2) 処置の効果を表す図である。臓器サイズは、L A L ^{-/-} ラットおよび L A L ^{+/+} ラットにおいて、溶剤または S B C - 1 0 2 を 5 m g / k g で週 1 回、4 週間投与した後に、8 週齢で決定された体重のパーセントとして表されている。

【図 2 4】溶剤または S B C - 1 0 2 を 5 m g · k g ⁻¹ で週 1 回、4 週間投与した後の野生型および L A L 欠損ラットの体重を表す図である。X 軸上には、投与を行ったことが 4 週目から始まるひし形で強調してある。

【図 2 5】W T および L A L 欠損ラットにおいて、溶剤または組換えヒト L A L (S B C - 1 0 2) を 5 m g · k g ⁻¹ で週 1 回、4 週間投与した後に 8 週齢で決定された、肝臓のコレステロール、コレステリルエステルおよびトリグリセリドレベルを示す図である。

【図 2 6】L A L 欠損ラットにおいて、組換えヒト L A L (S B C - 1 0 2) を示された

10

20

30

40

50

レベルおよびスケジュールで4週間投与した後に8週齢で決定された、体重増加のパーセントを表す図である。

【図27】LAL欠損ラットにおいて、SBC-102を示されたレベルおよびスケジュールで4週間投与した後に8週齢で決定された、体重のパーセントとして表した肝臓重量を示す図である。

【図28】SBC-102を示されたレベルおよびスケジュールで4週間投与した後に8週齢で決定された、組織のコレステルエステルレベルを表す図である。

【図29】1週間当たり1mg/kgのLAL、1週間当たり5mg/kgのLALまたは2週間当たり5mg/kgのLALを投与したラットの毎日の体重増加の経過を示す図である。

10

【図30】処置個体の肉眼的病理検査を表す図であり、上側パネルの解剖に見られるように、肝臓のサイズおよび色がかなり正常化したこと示している。また下側パネルは肝臓組織の組織病理学検査であり、処置ラットのLALの肝臓組織は正常な肝臓組織像を示し、泡沫状のマクロファージがかなり蓄積しているプラセボ処置ラットとは極めて対照的である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

定義

本明細書において本発明を記載するのに使用される各種用語の意味および範囲を説明および定義するために、ある特定の定義を本明細書にここに記載する。

20

【0025】

本明細書で使用される製剤、組成物または成分に関する「許容される」という用語は、本明細書で使用される場合、治療される対象の全般的健康状態に対して持続的な有害作用を有さないことを意味する。

【0026】

本明細書で使用される「投与」という用語は、治療を必要とする対象に本発明の組換えヒトリソソーム酸リパーゼを与えることを指す。

【0027】

「核酸」または「ポリヌクレオチド配列」は、特に限定されないが、天然のヌクレオチド塩基であるアデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシルを含む、真核mRNA、cDNA、ゲノムDNAならびに合成DNAおよびRNA配列を包含する。またこの用語は、1つ以上の修飾塩基を有する配列も包含する。

30

【0028】

本明細書で使用される「トリ」という用語は、分類学上のava綱の生物であるあらゆる種、亜種または品種、例えば、特に限定されないがニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、キジ、オウム、フィンチ、タカ、カラス、ならびにダチョウ、エミューおよびヒクイドリを含めた走禽類などを指す。この用語は、ニワトリ(Gallus Gallus)(例えば、白色レグホン、褐色レグホン、横斑ロック(Barred-Rock)、サセックス(Sussex)、ニューハンプシャー(New Hampshire)、ロードアイランド(Rhode Island)、オーストラロップ(Australorp)、ミノルカ(Minorca)、アムロックス(Amrox)、カリフォルニアグレイ(California Gray)、ならびにシチメンチョウ、キジ、ウズラ、アヒル、ダチョウおよび商業量で一般的に飼育されているその他の家禽の種々の既知の系統を包含する。また、胚および胎仔の段階を含めたすべての発生段階の個々のトリ生物体もこの用語に包含される。

40

【0029】

「治療用タンパク質」または「医薬タンパク質」は、薬物の全体または一部を占めるアミノ酸配列を包含する。

【0030】

「コード配列」または「オープンリーディングフレーム」は、適当な調節配列の制御下

50

に置かれた場合に、*in vitro*または*in vivo*で転写されてポリペプチドへ翻訳され得る（DNAの場合）か、またはポリペプチドへ翻訳され得る（mRNAの場合）ポリヌクレオチド配列または核酸配列を指す。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の翻訳開始コドンおよび3'（カルボキシ）末端の翻訳停止コドンにより定められる。転写終止配列は通常、コード配列の3'側に位置する。コード配列の5'末端および/または3'末端には非翻訳領域が隣接し得る。

【0031】

「エクソン」は、核転写物へ転写される際に、核スプライシングによるイントロンまたは介在配列の除去後に細胞質mRNA中に「発現される」遺伝子の部分を指す。

【0032】

核酸「制御配列」または「調節配列」は、定められた宿主細胞内の所与のコード配列の転写および翻訳に必要なかつ十分なプロモーター配列、翻訳開始および停止コドン、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル、転写終止配列、上流調節ドメイン、エンハンサーなどを指す。真核細胞に適した制御配列の例は、プロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーである。所望の遺伝子の転写および翻訳に必要なかつ十分な制御配列が存在する限り、組換えベクター中にこれらの制御配列がすべて存在しなければならないわけではない。

【0033】

「作動可能に連結されている」は、所望の機能が遂行されるようにコード配列と制御配列が配置されていることを指す。したがって、コード配列と作動可能に連結されている制御配列は、コード配列の発現をもたらすことができる。DNAポリメラーゼがプロモーター配列と結合して、コードタンパク質に翻訳可能なmRNAへコード配列を転写すれば、そのコード配列は細胞内で転写調節領域と作動可能に連結されている、またはその制御下にあることになる。制御配列がコード配列の発現を指令するように機能する限り、制御配列がコード配列と隣接している必要はない。したがって、例えば、翻訳されていないが転写されている介在配列がプロモーター配列とコード配列の間に存在していてもよく、それでもプロモーター配列はコード配列と「作動可能に連結されている」と見なすことができる。

【0034】

コード配列および制御配列のような核酸配列に関連した「異種性」および「外来性」という用語は、組換え構築物の領域もしくは特定の染色体遺伝子座とは通常関連しない、および/または特定の細胞とは通常関連しない配列を表す。したがって、核酸構築物の「外来性」領域は、天然では一緒には見られない、別の核酸分子内にあるかまたはそれに結合している、特定可能な核酸のセグメントである。例えば、構築物の外来性領域は、天然ではコード配列と一緒に見られない配列が隣接しているコード配列を含み得る。外因性コード配列のもう1つの例は、コード配列自体が天然に見られない（例えば、天然遺伝子とは異なるコドンを含む合成配列）構築物である。同様に、宿主細胞内に通常存在しない構築物または核酸により形質転換された宿主細胞は、本発明の目的のために外来性と思われる。

【0035】

本明細書で使用される「N-グリカン」、「オリゴ糖」、「オリゴ糖構造」、「グリコシル化パターン」、「グリコシル化プロファイル」および「グリコシル化構造」という用語は実質的に同義であり、それぞれ糖残基から形成されグリコシル化タンパク質と結合している1つ以上の構造を指す。

【0036】

本明細書で使用される「外来性タンパク質」は、特定の組織もしくは細胞中に天然には存在しないタンパク質、外来性発現構築物もしくは導入遺伝子の発現産物であるタンパク質、または特定の組織もしくは細胞中に所与の量で天然には存在しないタンパク質を指す。卵に対して外来性のタンパク質とは、卵中には通常見られないタンパク質のことである。例えば、卵に対して外来性のタンパク質は、その卵を産む動物の導入遺伝子中に存在す

10

20

30

40

50

るコード配列の発現の結果として卵中に存在するタンパク質であり得る。

【0037】

「内因性遺伝子」は、特定の細胞に通常関連する天然の遺伝子またはそのフラグメントを指す。

【0038】

「LAL」は、「ヒトリソソーム酸リパーゼ」、「SBC-102」または「ヒトリソソーム酸リパーゼ分子」を意味し、これらの用語は本明細書全体を通して互換的に使用される。

【0039】

本明細書に記載の発現産物は、定められた化学構造を有するタンパク質性物質から構成され得る。しかし、詳細な構造は多数の因子、特にタンパク質に共通の化学修飾によって決まる。例えば、すべてのタンパク質はイオン化可能なアミノ基とカルボキシル基とを含んでいるため、タンパク質は酸性または塩基性の塩形態または中性形態をとり得る。一次アミノ酸配列は、糖分子を用いて（グリコシル化）、または多くの場合は糖類との結合により生じる、例えば脂質、リン酸、アセチル基などとの共有結合もしくはイオン結合を含む他の化学的誘導体化により、誘導体化され得る。これらの修飾は *in vitro* または *in vivo* で生じ得るが、後者は宿主細胞により翻訳後プロセッシング系を通して行われる。このような修飾は分子の生物学的活性を増加または減少させる場合があり、このような化学修飾された分子も本発明の範囲内にあるものとする。

【0040】

クローニング、増幅、発現および精製の代替方法が当業者には明らかであろう。Sambrook, Fritsch および Maniatis, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) に代表的な方法が開示されている。

【0041】

「ベクター」は、一本鎖の、二本鎖の、環状の、またはスーパーコイル化されたDNAまたはRNAで構成されるポリヌクレオチドを意味する。典型的なベクターは、機能的な遺伝子発現を可能にする適切な距離で作動可能に連結された以下の要素で構成され得る：複製起点、プロモーター、エンハンサー、5' mRNA リーダー配列、リボソーム結合部位、核酸カセット、終止およびポリアデニル化部位、ならびに選択マーカー配列。特定の用途では上記要素の1つ以上がなくてもよい。核酸カセットは、発現される核酸配列を挿入するための制限部位を含み得る。機能性ベクターでは、核酸カセットは、翻訳開始および終止部位を有する、発現される核酸配列を含む。任意に構築物中に、例えばコード配列の5'側にイントロンが含まれていてもよい。特定のコード配列が適当な調節配列とともにベクター中に配置され、コード配列が制御配列に対して、制御または調節配列の「制御」下でコード配列が転写される位置および方向であるようにベクターを構築する。このような結果を得るために、特定の目的タンパク質をコードする配列を改変することが望ましい場合がある。例えばいくつかの場合には、適当な方向で制御配列と結合し得るように配列を改変すること、またはリーディングフレームを維持することが必要な場合がある。ベクターに挿入する前に、制御配列および他の調節配列をコード配列と連結させてもよい。あるいは、制御配列と、制御配列を有しその調節制御下にあるリーディングフレーム内にある適当な制限部位とを既に含んでいる発現ベクター中に、コード配列を直接クローニングしてもよい。

【0042】

「プロモーター」とは、RNAポリメラーゼが結合して遺伝子の転写を開始する、DNA上の部位のことである。いくつかの実施形態では、プロモーターを、配列の付加もしくは削除により改変するか、または天然配列および合成配列ならびに合成配列と天然配列の組合せであり得る配列を含めた別の配列に置き換えることができる。多くの真核プロモーターは2種類の認識配列、すなわちTATAボックスおよび上流プロモーター要素を含んでいる。前者は転写開始部位の上流に位置し、RNAポリメラーゼが正確な部位で転写を

開始するよう指令することに関与し、後者は転写速度を決定すると考えられ、T A T Aボックスの上流にある。またエンハンサー要素も、連結したプロモーターからの転写を刺激し得るが、多くのものは特定の細胞型においてのみ機能する。多くのウイルス由来のエンハンサー/プロモーター要素、例えば、SV40プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターおよびマウス白血病ウイルス(MLV)プロモーターはすべて広範な細胞型において活性であり、「偏在する」と呼ばれる。あるいは、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーターのような非構成的プロモーターも本発明で使用し得る。クローニング部位に挿入された核酸配列は目的ポリペプチドをコードする任意のオープンリーディングフレームを有し得るが、ただしコード配列が目的ポリペプチドをコードする場合、それは適切なmRNA分子の産生を阻止し得る、および/または異常にスプライスされたもしくは異常なmRNAを産生し得る、潜在的スプライス部位を欠いているべきである。

10

【0043】

本明細書で使用される「医薬組成物」という用語は、本明細書に記載の化合物と、他の化学成分、例えば担体、安定化剤、希釈剤、分散剤、懸濁化剤、増粘剤および/または賦形剤などとの混合物を指す。

【0044】

「家禽由来」または「トリ由来」という用語は、家禽により産生される、または家禽から得られる組成物または物質を指す。「家禽」は、特に限定されないが、ニワトリ、アヒル、シチメンチョウ、ウズラおよび走禽類を含めた、家畜として飼育され得るトリを指す。例えば、「家禽由来」はニワトリ由来、シチメンチョウ由来および/またはウズラ由来を指し得る。

20

【0045】

「レトロウイルス粒子」または「形質導入粒子」は、細胞内に非ウイルスのDNAまたはRNAを形質導入することができる複製欠損型または複製型ウイルスを指す。特に有用な一実施形態では、本発明に従ってトランスジェニックトリを作製するために使用するレトロウイルス粒子を、2009年4月28日に発行された米国特許第7,524,626号に開示されている通りに作製する。前述特許の開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0046】

「形質転換」、「形質導入」および「トランスフェクション」という用語はいずれも、トリ胚盤葉細胞にポリヌクレオチドを導入することを表す。「筒部」とは、漏斗と峽部の間にあり、卵の卵白タンパク質を合成および分泌する管状腺細胞を含む、輸卵管の部分のことである。

30

【0047】

「導入遺伝子」という用語は、本発明に従ってトリゲノム内に挿入された異種性ヌクレオチド配列を指す。「導入遺伝子」は、外来性コード配列、外来性のプロモーターまたは他の調節配列と連結した外来性コード配列、2つのレトロウイルスLTRの間にあるすべてのヌクレオチド配列および/またはレトロウイルスLTR、ならびに導入遺伝子を導入するために使用されるレトロウイルスのLTRの間にあるヌクレオチド配列を特定の指すことがある。

40

【0048】

「最適化」という用語は「最適化コード配列」という文脈で使用され、ここでは、卵白タンパク質であるオボアルブミン、リゾチーム、オボムコイドおよびオボトランスフェリンに見られる特定の各アミノ酸に最もよく使用されるコドンが、本発明のベクター内に挿入される最適化ヒトインターフェロン-2b(IFN-2b)ポリヌクレオチド配列の設計において使用される。より特定的には、最適化ヒトIFN-2bのためのDNA配列は、雌ニワトリの輸卵管に最適化されたコドン使用頻度に基づくものであり、ニワトリ(Gallus gallus)のオボアルブミン、リゾチーム、オボムコイドおよびオボトランスフェリンタンパク質から収集されたコドン使用頻度表によってWiscon

50

sin Package、Version 9.1のBACKTRANSLATEプログラム(Genetics Computer Group Inc.、Madison、Wis.)を用いて作製される。例えば、4つの卵白タンパク質におけるアミノ酸アラニンの4つのコドンの使用割合は、GCUが34%、GCCが31%、GCAが26%およびGCGが8%である。したがって、最適化コード配列中の大部分のアラニンのコドンとしてGCUを使用する。ヒトタンパク質を最適化するための遺伝子を含んでいるベクターを用いて、トランスジェニック家禽由来のタンパク質を自らの組織および卵内で発現するトランスジェニックトリを作製する。

【0049】

本明細書で使用される「対象」という用語は、哺乳動物および非哺乳動物を包含する。哺乳動物の例としては、特に限定されないが、ヒト、チンパンジー、無尾猿類、有尾猿類、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモットなどが挙げられる。

10

【0050】

本明細書で使用される「治療有効量」という用語は、その量を服用していない対応する対照と比べて、疾患、障害もしくは副作用の治療、治癒、予防もしくは軽減の向上、または疾患もしくは障害の進行速度の低減をもたらす、化合物の任意の量を指す。また正常な生理機能を増強するのに有効な量も、この用語の範囲内に包含される。

【0051】

「治療する」、「治療すること」または「治療」という用語は、予防的および/または治療的に、疾患または状態の症状を緩和、寛解もしくは軽減する、さらなる症状を予防する、症状の根本原因を軽減または予防する、疾患もしくは状態を抑制する、疾患もしくは状態の発達を阻止する、疾患もしくは状態を緩和する、疾患もしくは状態を退縮させる、疾患もしくは状態により引き起こされる状態を緩和する、または疾患もしくは状態の症状を停止させる方法を指す。

20

【0052】

LAL組成物

本発明は概略的には、治療、例えばリソソーム蓄積症の治療に有用な酵素を含む組成物に関する。一態様では、本発明は、分子を特定の細胞型による内部移行を受けやすくするグリコシル化パターンを有するLALのようなリソソーム蓄積症酵素に関する。また、単離または精製形態のLALを含む組換えヒトタンパク質も本発明に含まれる。リソソーム蓄積症酵素(LALなど)の単離は、タンパク質精製の当業者に容易にわかる方法論により行われ得る。

30

【0053】

一実施形態では、本発明は、限定されないが、本明細書に記載のN-結合グリコシル化パターンを有する、LALを含めたリソソーム蓄積症酵素に関する。

【0054】

一態様では、本明細書に開示される組成物はヒトLALを含み、かなりの割合のヒトLALが、例えば肝細胞上に見られる細胞表面上のマンノース-6-リン酸受容体による内部移行のためのリガンドとして働き得る、マンノース-6-リン酸グリカン部分を含む。一実施形態では、組成物中に含まれるLALの30%以上、例えば、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90%、少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも99%が、少なくとも1つのマンノース-6-リン酸部分を含む。マンノース-6-リン酸部分は、例えば、配列番号2のAsn¹⁵、Asn⁵¹、Asn⁸⁰、Asn¹⁴⁰、Asn²⁵²およびAsn³⁰⁰からなる群より選択される1つ以上の残基に位置するN-グリカン構造上に見ることができる。マンノース-6-リン酸部分を含むグリカン構造としては、例えば、図16に示されるG-nおよびH-nが挙げられる

40

【0055】

本発明による組換えヒトLALは、複数のN-結合炭水化物鎖(例えば、約5つまたは

50

6つの炭水化物鎖)を含む。5つまたは6つの各部位におけるN-結合グリコシル化構造は、図16に示されるA-n、B-n、C-n、D-n、E-n、F-n、G-n、H-n、I-n、J-n、K-n、L-n、M-n、N-nおよびO-nのうちの1つから選択され得る。

【0056】

また、LAL分子の混合物(例えば、配列番号2、3、4および19で記述されるLAL分子のようなLAL分子が混合物中に2つ以上存在し得る)も本明細書に記載され、ここではLAL分子のいくつか、またはすべてが、構造A-n、構造B-n、構造C-n、構造D-n、構造E-n、構造F-n、構造G-n、構造H-n、構造I-n、構造J-n、構造K-n、構造L-n、構造M-n、構造N-nおよび構造O-n(図16)から選択される1つ以上のグリコシル化構造を有する。一実施形態では、リソソーム酸リパーゼ分子の混合物を精製または単離し、例えば、トランスジェニックトリで産生された卵から単離する、またはトランスジェニックトリで産生された卵白から精製もしくは単離する。

10

【0057】

本発明は、構造A-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造B-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造C-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造D-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造E-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造F-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造G-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造H-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造I-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造J-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造K-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造L-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造M-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造N-nを含む個々のLAL分子も含む。本発明は、構造O-nを含む個々のLAL分子も含む。

20

【0058】

本発明によるヒトLALと結合しているN-結合オリゴ糖は、末端シアル酸およびガラクトース残基が不足している。すなわち、少数のN-結合オリゴ糖構造のみが末端でシアル酸化されており、ガラクトース残基も少数しか存在しない。さらに、本明細書に記載のLALのN-結合オリゴ糖構造上に末端N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が広く存在する。したがって、本発明に従って産生されたLALを単球マクロファージおよびKupffer細胞のような細胞に対して標的化することができる。

30

【0059】

本発明の一態様では、実質的にシアル酸を有さないLALの組成物が提供される。別の態様では、本明細書に開示される組成物は組換えヒトLALを含み、そのN-グリカン構造のいずれにも、細胞内への酵素の内部移行に干渉し得るシアル酸部分を含まない。一実施形態では、組成物中に含まれるLALの15%以下、例えば、10%以下、5%以下、2%以下、1%以下がそのN-グリカン構造にシアル酸部分を含むか、または実質的にすべてのLALがシアル酸部分を含まない。

40

【0060】

別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約95%以上がシアル酸を含まない。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約90%以上がシアル酸を含まない。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約80%以上がシアル酸を含まない。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約70%以上がシアル酸を含まない。

【0061】

さらに別の実施形態では、本発明のLAL分子上に存在する実質的にすべてのN-結合オリゴ糖構造タイプがシアル酸を含まない。別の実施形態では、本発明のLAL分子と結合していることがわかっているN-結合オリゴ糖構造タイプの約90%以上がシアル酸を

50

含まない。例えば、20のオリゴ糖構造タイプが存在すれば、18以上の構造タイプがシアル酸を含まない。別の実施形態では、本発明のLAL分子と結合していることがわかっているN-結合オリゴ糖構造タイプの約80%以上がシアル酸を含まない。別の実施形態では、本発明のLAL分子と結合していることがわかっているN-結合オリゴ糖構造タイプの約70%以上がシアル酸を含まない。別の実施形態では、本発明のLAL分子と結合していることがわかっているN-結合オリゴ糖構造タイプの約60%以上がシアル酸を含まない。別の実施形態では、本発明のLAL分子と結合していることがわかっているN-結合オリゴ糖構造タイプの約50%以上がシアル酸を含まない。

【0062】

本発明の一態様によれば、本明細書に記載のLALは高レベルの末端N-アセチルグルコサミンを含む。一態様では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約95%以上が末端N-アセチルグルコサミンを含む。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約90%以上が末端N-アセチルグルコサミンを含む。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約80%以上が末端N-アセチルグルコサミンを含む。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約70%以上が末端N-アセチルグルコサミンを含む。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約60%以上が末端N-アセチルグルコサミンを含む。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約50%以上が末端N-アセチルグルコサミンを含む。

10

20

【0063】

一実施形態では、本発明のLAL分子上に存在するすべてのN-結合オリゴ糖構造タイプが末端N-アセチルグルコサミンを含む。別の実施形態では、本発明のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖構造タイプの約90%以上が末端N-アセチルグルコサミンを含む。例えば、20のオリゴ糖構造タイプが存在すれば、18以上のオリゴ糖構造タイプが末端N-アセチルグルコサミンを含まない。別の実施形態では、本発明のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖構造タイプの約80%以上が末端N-アセチルグルコサミンを含む。別の実施形態では、本発明のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖構造タイプの約70%以上が末端N-アセチルグルコサミンを含む。別の実施形態では、本発明のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖構造タイプの約60%以上が末端N-アセチルグルコサミンを含む。別の実施形態では、本発明のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖構造タイプの約50%以上が末端N-アセチルグルコサミンを含む。

30

【0064】

本発明の別の態様では、本明細書に開示される組成物はヒトLALを含み、かなりの割合のヒトLALが、そのN-グリカン構造のいずれにもフコース部分を含まない。一実施形態では、組成物中に含まれるLALの50%以下、例えば、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、2%以下、1%以下がそのN-グリカン構造にフコース部分を含むか、または実質的にすべてのLALがフコース部分を含まない。

40

【0065】

一実施形態では、本発明に従って産生されたLALのN-結合オリゴ糖構造上にフコースが実質的に存在しない。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約95%以上がフコースを含まない。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約90%以上がフコースを含まない。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約85%以上がフコースを含まない。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約80%以上がフコースを含まない。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約70%以上がフコースを含まない。別の実施形態では、本発明の個々のLAL分子上に存在するN-結合オリゴ糖の約60%以上がフコースを含まない。別の実施形態では、本発明のLAL分子上に存在するN-結合オリ

50

ゴ糖の約 50% 以上がフコースを含まない。

【0066】

一実施形態では、本発明の L A L 分子上に存在する実質的にすべての N - 結合オリゴ糖構造タイプがフコースを含まない。別の実施形態では、本発明の L A L 分子上に存在する N - 結合オリゴ糖構造タイプの約 95% 以上がフコースを含まない。例えば、20 のオリゴ糖構造タイプが存在すれば、19 以上の構造タイプがフコースを含まない。別の実施形態では、本発明の L A L 分子上に存在する N - 結合オリゴ糖構造タイプの約 90% 以上がフコースを含まない。別の実施形態では、本発明の L A L 分子上に存在する N - 結合オリゴ糖構造タイプの約 85% 以上がフコースを含まない。別の実施形態では、本発明の L A L 分子上に存在する N - 結合オリゴ糖構造タイプの約 80% 以上がフコースを含まない。別の実施形態では、本発明の L A L 分子上に存在する N - 結合オリゴ糖構造タイプの約 70% 以上がフコースを含まない。

10

【0067】

上で述べたように、本発明に従って産生された L A L 分子中には、ある特定の単糖類が多く存在する。分析される全単糖種としては、フコース、N - アセチルガラクトサミン、N - アセチルグルコサミン、ガラクトース、グルコース、マンノース、マンノース - 6 - リン酸、N - アセチルノイラミン酸および N - グリコリルノイラミン酸が挙げられる。フコースは、全単糖類組成の約 0% ~ 約 1% の間で存在し得る。N - アセチルガラクトサミンは、全単糖類組成の約 0% ~ 約 1% の間で存在し得る。N - アセチルグルコサミンは、全単糖類組成の約 35% ~ 約 50% の間で存在し得る。ガラクトースは、全単糖類組成の約 1 ~ 10% の間で存在し得る。グルコースは、全単糖類組成の 0% で存在し得る。マンノースは、全単糖類組成の約 32% ~ 約 50% の間で存在し得る。マンノース - 6 - リン酸は、全単糖類組成の約 1% ~ 約 11% の間で存在し得る。

20

【0068】

一実施形態では、本発明に従って産生された L A L はキシロースを含まない。さらに、本発明に従って産生された L A L 中に N - アセチルガラクトサミン (G a l N a c) が実質的に全く存在しないため、本発明の一態様は、O - 結合グリコシル化を有さない L A L の組成物を含む。

【0069】

L A L は、そのアミノ酸配列中に N - 結合グリコシル化のための 6 つの可能性がある部位、例えば、配列番号 1 のように A s n ^{3 6}、A s n ^{7 2}、A s n ^{1 0 1}、A s n ^{1 6 1}、A s n ^{2 7 3} および A s n ^{3 2 1} を有する。そのうちの 5 つ、A s n ^{3 6}、A s n ^{1 0 1}、A s n ^{1 6 1}、A s n ^{2 7 3} および A s n ^{3 2 1} はグリコシル化されているが、A s n ^{7 2} は非グリコシル化または実質的に非グリコシル化であり得る (実質的に非グリコシル化であるとは、L A L 分子の混合物中、A s n ^{3 6}、A s n ^{1 0 1}、A s n ^{1 6 1}、A s n ^{2 7 3} および A s n ^{3 2 1} のいずれよりも少ない数の A s n ^{7 2} がグリコシル化されているという意味である) (図 17 を参照されたい)。したがって、本発明の一態様は、A s n ^{7 2} において非グリコシル化および / または実質的に非グリコシル化である L A L の組成物である。グリコシル化 A s n ^{7 2} を有する L A L は本発明の範囲内である。本明細書に記載の A s n の位置は、配列番号 1 で記述される L A L アミノ酸配列に基づくものである。A s n の番号付け (すなわち、アスパラギンの位置) は個々の L A L 分子によって異なり得るものであり、アミノ酸配列が配列番号 2、3、4 および 19 で記述される L A L 分子のような他の L A L 分子において容易に決定され得ることが、当業者には明らかであろう。

30

40

【0070】

本発明に従って産生される L A L は、主要糖として N - アセチルグルコサミン、マンノースおよびマンノース - 6 - リン酸 (M 6 P) を有する二分岐、三分岐および四分岐構造の混合物を含む N - グリカン構造を含む (図 16 および 17)。本発明の一態様によれば、少なくとも A s n ^{1 0 1}、A s n ^{1 6 1} および A s n ^{2 7 3} に M 6 P 修飾 N - グリカンが存在する。したがって、本発明の一実施形態は、A s n ^{1 0 1}、A s n ^{1 6 1} または A

50

Asn^{273} のいずれか 1 つに存在する M6P 修飾 N - グリカンを含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 Asn^{273} に存在する M6P 修飾 N - グリカンを含む。別の実施形態では、本発明は、 Asn^{101} 、 Asn^{161} または Asn^{273} のいずれか 1 つに存在する一リン酸化 N - グリカン (M6P) を有する LAL の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 Asn^{161} および Asn^{273} に存在する一リン酸化 N - グリカンを含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 Asn^{101} および Asn^{273} に存在する一リン酸化 N - グリカンを含む。特定の一実施形態では、本発明に従って産生された LAL は、 Asn^{101} に二リン酸化マンノース (ビス - M6P) を含み得る。

10

【0071】

本発明に従って産生される LAL は、減少したレベルのガラクトース (例えば、「Gal」) を含み得る。本発明の一態様は、 Asn^{36} 、 Asn^{161} または Asn^{321} のいずれか 1 つに末端ガラクトースを有する LAL の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 Asn^{36} および Asn^{161} に末端ガラクトースを有する LAL の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 Asn^{161} および Asn^{321} に末端ガラクトースを有する LAL の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 Asn^{36} および Asn^{321} に末端ガラクトースを有する LAL の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 Asn^{36} 、 Asn^{161} および Asn^{321} に末端ガラクトースを有する LAL の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、末端ガラクトースを有さない LAL の組成物を含む。

20

【0072】

各種タイプの N - グリカンが LAL 中の様々な N - 結合グリコシル化部位に見られた。N - グリカン構造は、主要糖として N - アセチルグルコサミン、マンノースおよびマンノース - 6 - リン酸 (M6P) を有する二分岐、三分岐および四分岐構造の混合物を含む。具体的には、本発明の一実施形態では、LAL は、第一の N - 結合グリコシル化部位 (例えば、配列番号 1 における Asn^{36}) に $GlcnAc4Man3GlcnAc2$ または $Gal1GlcnAc4Man3GlcnAc2$ から選択される N - グリカン構造を含む。別の実施形態では、LAL は、第二の N - 結合グリコシル化部位 (例えば、配列番号 1 における Asn^{72}) において、グリコシル化を含まないか、または実質的に非グリコシル化である。さらに別の実施形態では、LAL は、その第三の N - 結合グリコシル化部位 (例えば、配列番号 1 における Asn^{101}) に $Phos2Man7GlcnAc2$ を含む。さらに別の実施形態では、LAL は、その第四の N - 結合グリコシル化部位 (例えば、配列番号 1 における Asn^{161}) に、 $Phos1Man6GlcnAc2$ 、 $GlcnAc1Phos1Man6GlcnAc2$ 、 $Man3GlcnAc2$ 、 $GlcnAc2Man3GlcnAc2$ 、 $GlcnAc3Man3GlcnAc2$ 、 $GlcnAc4Man3GlcnAc2$ または $Gal1GlcnAc4Man3GlcnAc2$ から選択される N - グリカン構造を含む。さらに別の実施形態では、LAL は、その第五の N - 結合グリコシル化部位 (例えば、配列番号 1 における Asn^{273}) に、 $Man7GlcnAc2$ 、 $Man8GlcnAc2$ 、 $Man9GlcnAc2$ 、 $Phos1Man8GlcnAc2$ または $Phos1Man9GlcnAc2$ から選択される N - グリカン構造を含む。さらに別の実施形態では、LAL は、その第六の N - 結合グリコシル化部位 (例えば、配列番号 1 における Asn^{321}) に、 $GlcnAc2Man3GlcnAc2$ 、 $GlcnAc3Man3GlcnAc2$ 、 $GlcnAc4Man3GlcnAc2$ 、 $Gal1GlcnAc4Man3GlcnAc2$ 、 $GlcnAc5Man3GlcnAc2$ 、 $GlcnAc6Man3GlcnAc2$ または $Gal1GlcnAc6Man3GlcnAc2$ から選択される N - グリカン構造を含む。

30

40

【0073】

本発明のある特定の態様によれば、LAL の組成物は、配列番号 1 の Asn^{36} 、 Asn^{72} 、 Asn^{101} 、 Asn^{161} 、 Asn^{273} および Asn^{321} (または配列番

50

号 2、3、4 および 19 内の対応するアスパラギン残基)においてグリコシル化された LAL を含み、1つの N - グリカンが、以下に示すように指定された Asn 位置にある：

a) Asn^{3 6} に GlcNAc 4 Man 3 GlcNAc 2 または

Gal 1 GlcNAc 4 Man 3 GlcNAc 2 があり；

b) Asn^{7 2} にグリコシル化がなく；

c) Asn^{1 0 1} に Phos 2 Man 7 GlcNAc 2 があり；

d) Asn^{1 6 1} に Phos 1 Man 6 GlcNAc 2、

GlcNAc 1 Phos 1 Man 6 GlcNAc 2、

Man 3 GlcNAc 2、

GlcNAc 2 Man 3 GlcNAc 2、

GlcNAc 3 Man 3 GlcNAc 2、

GlcNAc 4 Man 3 GlcNAc 2 または

Gal 1 GlcNAc 4 Man 3 GlcNAc 2 があり；

e) Asn^{2 7 3} に Man 7 GlcNAc 2、

Man 8 GlcNAc 2、

Man 9 GlcNAc 2、

Phos 1 Man 8 GlcNAc 2 または

Phos 1 Man 9 GlcNAc 2 があり；

f) Asn^{3 2 1} に GlcNAc 2 Man 3 GlcNAc 2、

GlcNAc 3 Man 3 GlcNAc 2、

GlcNAc 4 Man 3 GlcNAc 2、

Gal 1 GlcNAc 4 Man 3 GlcNAc 2、

GlcNAc 5 Man 3 GlcNAc 2、

Gal 1 GlcNAc 5 Man 3 GlcNAc 2、

GlcNAc 6 Man 3 GlcNAc 2 または

Gal 1 GlcNAc 6 Man 3 GlcNAc 2

があり、式中、

Man = マンノース

GlcNAc = N - アセチルグルコサミン

Phos = リン酸エステル

Gal = ガラクトース

である。

【0074】

一実施形態では、本発明に従って産生された LAL 中の Asn^{3 6}、Asn^{1 6 1} または Asn^{3 2 1} のいずれか 1 つにおいて、Gal 1 GlcNAc 4 Man 3 GlcNAc 2 がグリカン成分として見られる。特定の一実施形態では、Asn^{3 6}、Asn^{1 6 1} および Asn^{3 2 1} のグリカン成分として Gal 1 GlcNAc 4 Man 3 GlcNAc 2 が見られる。

【0075】

本発明の LAL において、Asn^{1 0 1} および Asn^{2 7 3} が、主要成分として約 6 ~ 約 10 個のマンノース分子を有する高マンノースタイプ (本明細書に記載の MAN 6 - MAN 10) を示す。したがって、本発明の一態様は、Asn^{1 0 1} または Asn^{2 7 3} において高マンノース構造を有する LAL の組成物を含む。別の実施形態では、本発明の LAL の組成物は、Asn^{1 0 1} または Asn^{2 7 3} に少なくとも 6 個のマンノースを有する N - グリカン構造を含み得る。別の実施形態では、LAL の組成物は、Asn^{1 0 1} または Asn^{2 7 3} に 7、8 または 9 個のマンノースを有する N - グリカンを含む。さらに別の実施形態では、本発明は、Asn^{1 0 1} および Asn^{2 7 3} に 7、8 または 9 個のマンノースを有する LAL の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、Asn^{1 0 1} および Asn^{2 7 3} に 7、8 または 9 個のマンノースを有し、マンノースの 1 つがリン酸化されている LAL の組成物を含む。

10

20

30

40

50

【0076】

上記グリコシル化部位およびAsnに付随する数字が、配列番号1で記述されるLALのアミノ酸配列に基づくものであるということ、また対応するAsnの番号付けはLAL分子によって異なり得るが、配列番号1に関する上記グリコシル化プロファイルが、配列番号2、3、4および19で記述されるLAL分子にも当てはまるということが理解されるべきである。例えば、配列番号1のAsn³⁶は、配列番号2のAsn¹⁵、配列番号3のAsn¹³、配列番号4のAsn¹⁰および配列番号19のAsn⁹に対応する。配列番号1のAsn⁷²は、配列番号2のAsn⁵¹、配列番号3のAsn⁴⁹、配列番号4のAsn⁴⁶および配列番号19のAsn⁴⁵に対応する。配列番号1のAsn¹⁰¹は、配列番号2のAsn⁸⁰、配列番号3のAsn⁷⁸、配列番号4のAsn⁷⁵および配列番号19のAsn⁷⁴に対応する。配列番号1のAsn¹⁶¹は、配列番号2のAsn¹⁴⁰、配列番号3のAsn¹³⁸、配列番号4のAsn¹³⁵および配列番号19のAsn¹³⁴に対応する。配列番号1のAsn²⁷³は、配列番号2のAsn²⁵²、配列番号3のAsn²⁵⁰、配列番号4のAsn²⁴⁷および配列番号19のAsn²⁴⁶に対応する。配列番号1のAsn³²¹は、配列番号2のAsn³⁰⁰、配列番号3のAsn²⁹⁸、配列番号4のAsn²⁹⁵および配列番号19のAsn²⁹⁴に対応する。

【0077】

例えば、一実施形態では、LALは、配列番号2のAsn¹⁵、Asn⁵¹、Asn⁸⁰、Asn¹⁴⁰、Asn²⁵²およびAsn³⁰⁰からなる群より選択される少なくとも1つの位置でN-結合グリコシル化されている。別の実施形態では、LALは、配列番号2のAsn¹⁵、Asn⁸⁰、Asn¹⁴⁰、Asn²⁵²およびAsn³⁰⁰においてN-結合グリコシル化されている。さらに別の実施形態では、配列番号2のLALのN-グリカン構造はキシロースを有さないが、15%、10%、5%または1%未満のN-グリカン構造がシアル酸を含み；50%、40%、30%、20%、10%、5%または1%未満のN-グリカン構造がフコースを含み；少なくとも30%、50%、60%、70%、80%、90%および95%のN-グリカン構造がリン酸化マンノース(M6P)を含む。

【0078】

一実施形態では、LALは、配列番号3のAsn¹³、Asn⁴⁹、Asn⁷⁸、Asn¹³⁸、Asn²⁵⁰およびAsn²⁹⁸からなる群より選択される少なくとも1つの位置でN-結合グリコシル化されている。別の実施形態では、LALは、配列番号3のAsn¹³、Asn⁷⁸、Asn¹³⁸、Asn²⁵⁰およびAsn²⁹⁸においてN-結合グリコシル化されている。さらに別の実施形態では、配列番号3のLALのN-グリカン構造はキシロースを有さないが、15%、10%、5%または1%未満のN-グリカン構造がシアル酸を含み；50%、40%、30%、20%、10%、5%または1%未満のN-グリカン構造がフコースを含み；少なくとも30%、50%、60%、70%、80%、90%および95%のN-グリカン構造がリン酸化マンノース(M6P)を含む。

【0079】

一実施形態では、LALは、配列番号4のAsn¹⁰、Asn⁴⁶、Asn⁷⁵、Asn¹³⁵、Asn²⁴⁷およびAsn²⁹⁵からなる群より選択される少なくとも1つの位置でN-結合グリコシル化されている。別の実施形態では、LALは、配列番号4のAsn¹⁰、Asn⁷⁵、Asn¹³⁵、Asn²⁴⁷およびAsn²⁹⁵においてN-結合グリコシル化されている。さらに別の実施形態では、配列番号4のLALのN-グリカン構造はキシロースを有さないが、15%、10%、5%または1%未満のN-グリカン構造がシアル酸を含み；50%、40%、30%、20%、10%、5%または1%未満のN-グリカン構造がフコースを含み；少なくとも30%、50%、60%、70%、80%、90%および95%のN-グリカン構造がリン酸化マンノース(M6P)を含む。

【0080】

一実施形態では、LALは、配列番号19のAsn⁹、Asn⁴⁵、Asn⁷⁴、Asn¹³⁴、Asn²⁴⁶およびAsn²⁹⁴からなる群より選択される少なくとも1つの

位置でN - 結合グリコシル化されている。別の実施形態では、L A L は、配列番号 19 の A s n⁹、A s n^{7 4}、A s n^{1 3 4}、A s n^{2 4 6} および A s n^{2 9 4} においてN - 結合グリコシル化されている。さらに別の実施形態では、配列番号 4 の L A L のN - グリカン構造はキシロースを有さないが、15%、10%、5%または1%未満のN - グリカン構造がシアル酸を含み；50%、40%、30%、20%、10%、5%または1%未満のN - グリカン構造がフコースを含み；少なくとも30%、50%、60%、70%、80%、90%および95%のN - グリカン構造がリン酸化マンノース (M 6 P) を含む。

【0081】

本発明による組成物は、トランスジェニックトリ、トランスジェニックサカナ、トランスジェニック哺乳動物、例えばトランスジェニックヤギの使用により、またはタバコおよびコウキクサ (L e m n a m i n o r) のようなトランスジェニック植物ならびに特定のタイプの培養細胞においてなど、数多くの方法で産生され得る。

【0082】

また本発明はペグ化 L A L を含む組成物も企図する。本明細書に記載の L A L 酵素を、例えば、2007年4月26日に公表された米国特許出願公開第20070092486号に開示されているようにペグ化することができる。上記特許の開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0083】

一実施形態では、誘導されたグリコシル化パターンを、例えばトリ輸卵管細胞、例えば管状腺細胞由来の発現特化発現系から得る。例えば、本明細書に開示されるグリコシル化パターンは、本発明に従ってニワトリのようなトリの輸卵管細胞中で産生されたりソソーム蓄積症酵素上に存在することが示されている。

【0084】

本発明に従って産生されるタンパク質を、タンパク質精製の当業者に明らかな方法のような任意の有用な方法で卵白から精製することができる。例えば、本発明に従ってトランスジェニックトリで産生されたヒト L A L (h L A L) を、タンパク質精製の当業者に明らかな方法により卵白から精製することができる。卵白中に存在する L A L のための精製プロトコルの例を実施例に記載する。

【0085】

本発明は、本明細書に開示されるグリコシル化構造を1つ以上含む本発明のリソソーム酸リパーゼ分子を含有する、卵および卵白、ならびに卵を産み、卵白を産生するトリ (例えば、ニワトリ、シチメンチョウおよびウズラ) を含む。

【0086】

トリでの L A L 発現

トリゲノム内に外来性核酸配列を安定に導入して、マンノース - 6 - リン酸の付加が有効である (例えば、有効性の増加が得られる) タンパク質、例えば、リソソーム酸リパーゼ (L A L) および本明細書に具体的に開示される他のタンパク質を非限定的に含めたりソソーム酵素などのような所望のタンパク質を発現させるためのベクターおよび方法が本明細書に開示される。具体的には、輸卵管内で外来性配列を発現して、卵内に医薬タンパク質のような外来性タンパク質を蓄積するトランスジェニックトリを作製する。このような外来性タンパク質を含有するトリの卵も本明細書に記載される。また、トランスジェニックトリの輸卵管内で効率的に発現されて、トリの卵内に蓄積される新規な形態の L A L も本明細書に開示される。

【0087】

本発明の一態様は L A L 、すなわち本発明に従って産生された L A L 分子を含有する組成物に関する。特に有効な実施形態では、L A L は精製または単離される。例えば、トランスジェニックトリが産んだ硬殻卵の内容物から L A L が取り出されている。特に有効な一実施形態では、L A L はヒト L A L である。一実施形態では、本発明の L A L は、トリの輸卵管細胞内で産生される L A L に由来するグリコシル化パターンを有する。例えば、組成物は、本発明に従ってトリ、例えばニワトリにおいて産生され、卵白から単離された

10

20

30

40

50

L A L 分子の混合物を含有し得る。有効な一実施形態では、L A L 含有組成物は医薬製剤である。

【0088】

一態様では、本発明は単離されたL A L 分子、例えばヒトL A L 分子を含有する組成物に関するものであり、L A L は、L A L をコードする導入遺伝子を担持するトリにおいて産生される。一実施形態では、L A L はトランスジェニックトリ（例えば、トランスジェニックニワトリ）の輸卵管細胞（例えば、管状腺細胞）内で産生され、そのL A L をトランスジェニックトリの卵白から単離する。一実施形態では、L A L はトリ、例えばニワトリの輸卵管細胞（例えば、管状腺細胞）内でグリコシル化される。

【0089】

別の態様では、リソソーム蓄積症酵素のような外来性タンパク質、例えばL A L をトリの特定の組織において産生させる方法が提供される。このような外来性タンパク質は、トリの輸卵管、血液ならびに／または他の細胞および組織において発現され得る。一実施形態では、目的タンパク質が輸卵管筒部の管状腺細胞内で発現され、管腔内に分泌されて硬殻卵の卵白中に蓄積されるように、例えば、X 期近くで胚盤葉細胞に導入遺伝子を導入してトランスジェニックトリを作製する。このように作製されたトランスジェニックトリは、その生殖系列中に導入遺伝子を担持して、メンデル方式で外来性導入遺伝子をその子孫に安定に伝達することができる。

【0090】

本発明は、トリ輸卵管内でL A L のような外来性タンパク質を産生させる方法を包含する。この方法は、コード配列と、コード配列と作動可能に連結されたプロモーターとを含み、プロモーターがトリ輸卵管内での核酸発現もたらし得る、ベクターを提供する第一の段階を含み得る。トランスジェニック細胞および／または組織を作製することができ、ここでは、ベクターを新たに単離された、培養されている、または胚内にあるトリ胚盤葉細胞に導入して、ベクター配列がトリゲノム内に挿入されるようにする。そのトランスジェニック細胞および／または組織から、輸卵管内でL A L のような外来性タンパク質を発現する成熟トランスジェニックトリを得ることができる。

【0091】

本発明の一態様では、レトロウイルスベクターの5' L T R と3' L T R の間に導入遺伝子を担持する複製欠損型または複製型レトロウイルス粒子を用いた胚盤葉細胞の形質導入により、トランスジェニックトリの作製を行う。例えば、プロモーター領域のセグメントの下流に挿入された外来遺伝子を含む改変p N L B プラスミドを含む、トリ白血病ウイルス（A L V）レトロウイルスベクターまたはマウス白血病ウイルス（M L V）レトロウイルスベクターを用い得る。ウイルス粒子内にパッケージされた改変レトロウイルスベクターのR N A コピーを用いて、トランスジェニックトリになる胚盤葉に感染させることができる。

【0092】

本発明の別の態様では、コード配列とプロモーターとを含み、それらは、コード配列がトリ輸卵管内で発現されるような方向的および位置的關係にある、ベクターが提供される。このようなベクターとしては、トリ白血病ウイルス（A L V）レトロウイルスベクター、マウス白血病ウイルス（M L V）レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。さらにベクターは、トリ白血病ウイルス（A L V）レトロウイルスベクター、マウス白血病ウイルス（M L V）レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターのL T R を含む核酸配列であってもよい。プロモーターは、トリ輸卵管内でのコード配列の発現をもたらすのに十分なものである。コード配列は、硬殻卵の卵白中に蓄積される外来性タンパク質をコードする。したがって、コード配列は、トランスジェニック家禽由来のタンパク質、例えばトランスジェニック家禽由来のリソソーム酸リパーゼ（T P D L A L）などのような外来性タンパク質をコードする。

【0093】

一実施形態では、本発明の方法で使用するベクターは、特にトリおよびトリの卵内での

10

20

30

40

50

外来性タンパク質の発現に適したプロモーターを含む。したがって、外来性コード配列の発現は、トランスジェニックトリの輸卵管および血液内ならびにトランスジェニックトリの卵の卵白内で生じ得る。プロモーターとしては、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、 γ -アクチンプロモーター (例えば、ニワトリ γ -アクチンプロモーター)、マウス白血病ウイルス (MLV) プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV) プロモーター、オボアルブミンプロモーター、リゾチームプロモーター、コンアルブミンプロモーター、オボムコイドプロモーター、オボムチンプロモーターおよびオボトランスフェリンプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。任意に、プロモーターは少なくとも1つのプロモーター領域のセグメント、例えばオボアルブミン、リゾチーム、コンアルブミン、オボムコイド、オボムチンおよびオボトランスフェリンプロモーター領域などのセグメントであってよい。一実施形態では、プロモーターは、例えばオボアルブミン、リゾチーム、コンアルブミン、オボムコイド、オボムチンおよびオボトランスフェリンプロモーターなどのプロモーターの1つ以上の組合せもしくは融合物、または1つ以上のプロモーターの一部分の融合物である。

【0094】

一実施形態では、ベクターはシグナルペプチドコード配列を含み、このコード配列は、細胞内での翻訳の際に、ベクターにより発現されたヒトLALのような外来性タンパク質の、硬殻卵の卵白中への分泌をシグナルペプチドが指令するように、コード配列と作動可能に連結されている。

【0095】

本発明の一態様では、本明細書に開示されるように産生される外来性タンパク質のコード配列が提供され、ここでは、コード配列はトリ、例えばニワトリにおける発現に対してコドン最適化されている。コドン最適化は、トリ細胞 (例えば、ニワトリ細胞) 内で発現される少なくとも1つ、好ましくは2つ以上のタンパク質のコドン使用頻度から決定され得る。例えば、コドン使用頻度は、ニワトリのタンパク質であるオボアルブミン、リゾチーム、オボムチンおよびオボトランスフェリンをコードする核酸配列から決定され得る。例えば、外来性タンパク質のDNAコード配列は、ニワトリ (Gal11us Gal11us) のオボアルブミン、リゾチーム、オボムコイドおよびオボトランスフェリンタンパク質から収集されたコドン使用頻度表により、Wisconsin Package、Version 9.1のBACKTRANSLATE (登録商標) プログラム (Genetics Computer Group Inc., Madison, Wis.) を用いてコドン最適化され得る。

【0096】

本発明の重要な一態様は、特に限定されないがヒトLALを含めた外来性のペプチドまたはタンパク質を含有する、トリ硬殻卵 (例えば、ニワトリ硬殻卵) に関する。ヒトLALのような外来性のペプチドまたはタンパク質は、トランスジェニックトリの導入遺伝子によりコードされ得る。多くの場合、外来性のペプチドまたはタンパク質 (例えば、LAL) はグリコシル化されている。タンパク質は任意の有用量で存在し得る。一実施形態では、タンパク質は1硬殻卵当たり約0.01 μ g ~ 1硬殻卵当たり約1グラムの範囲の量で存在する。別の実施形態では、タンパク質は1硬殻卵当たり約1 μ g ~ 1硬殻卵当たり約1グラムの範囲の量で存在する。例えば、タンパク質は1硬殻卵当たり約10 μ g ~ 1硬殻卵当たり約1グラムの範囲 (例えば、1硬殻卵当たり約10 μ g ~ 1硬殻卵当たり約400ミリグラムの範囲) の量で存在し得る。

【0097】

一実施形態では、本発明の外来性タンパク質は卵の卵白中に存在する。一実施形態では、タンパク質は卵白1ミリリットル当たり約1 ng ~ 卵白1ミリリットル当たり約0.2グラムの範囲の量で存在する。例えば、タンパク質は卵白1ミリリットル当たり約0.1 μ g ~ 卵白1ミリリットル当たり約0.2グラムの範囲の量で存在し得る (例えば、タンパク質は卵白1ミリリットル当たり約1 μ g ~ 卵白1ミリリットル当たり約100ミリグラムの範囲の量で存在し得る。一実施形態では、タンパク質は卵白1ミリリットル当たり

約 $1 \mu\text{g}$ ~ 卵白 1 ミリリットル 当たり 約 50 ミリグラムの範囲の量で存在する。例えば、タンパク質は卵白 1 ミリリットル 当たり 約 $1 \mu\text{g}$ ~ 卵白 1 ミリリットル 当たり 約 10 ミリグラムの範囲の量で存在し得る（例えば、タンパク質は卵白 1 ミリリットル 当たり 約 $1 \mu\text{g}$ ~ 卵白 1 ミリリットル 当たり 約 1 ミリグラムの範囲の量で存在し得る）。一実施形態では、タンパク質は卵白 1 ミリリットル 当たり $0.1 \mu\text{g}$ を上回る量で存在する。一実施形態では、タンパク質は卵白 1 ミリリットル 当たり $0.5 \mu\text{g}$ を上回る量で存在する。一実施形態では、タンパク質は卵白 1 ミリリットル 当たり $1 \mu\text{g}$ を上回る量で存在する。一実施形態では、タンパク質は卵白 1 ミリリットル 当たり $1.5 \mu\text{g}$ を上回る量で存在する。

【0098】

ベクターが導入された胚盤葉細胞から発生した、本明細書に開示される外来性タンパク質（例えば、LAL）を産生する本発明のトリは G0 世代であり、「創始動物」と呼ばれることがある。創始トリは通常、挿入された各導入遺伝子に関してキメラである。つまり、G0 トランスジェニックトリの一部の細胞のみが導入遺伝子（1 つまたは複数）を担持する。G0 世代は通常、導入遺伝子（1 つまたは複数）に関してヘミ接合性でもある。G0 世代を非トランスジェニック動物と交配して、同様に導入遺伝子に関してヘミ接合性であり、かつ実質的にトリの全細胞中に導入遺伝子（1 つまたは複数）を担持する G1 トランスジェニック子孫を生じ得る。G1 ヘミ接合性子孫を非トランスジェニック動物と交配して、G2 ヘミ接合性子孫を生じ、また G1 ヘミ接合性子孫同士を交配して、導入遺伝子に関してホモ接合型である G2 子孫を生じ得る。G1 子孫に由来する導入遺伝子に関して陽性である実質的にすべてのトリ細胞が導入遺伝子（1 つまたは複数）を担持する。一実施形態では、同じ系統由来のヘミ接合性 G2 子孫を交配して、導入遺伝子に関してホモ接合型の G3 子孫を得ることができる。一実施形態では、ヘミ接合性の G0 または G1 個体を、例えば、互いに交配して、個体の各細胞中に 2 コピーの導入遺伝子（1 つまたは複数）を担持するホモ接合型の G1 子孫を産生することができる。これらはある特定の有効な交配方法の例に過ぎず、本発明は、当業者に公知の方法のような任意の有効な交配方法の使用を企図する。

【0099】

一実施形態では、本発明は単離される LAL を提供する。つまり、組成物中に含有される LAL は単離 LAL であり得る。例えば、LAL を卵白から単離し得る。単離 LAL は、LAL 分子内で各種のグリコシル化構造を有する LAL 分子であり得る。

【0100】

本発明の方法により、トリ胚盤葉細胞に導入遺伝子を導入して、本発明のタンパク質を産生するために生殖系組織の遺伝物質中に導入遺伝子を担持する、トランスジェニックニワトリ、トランスジェニックシチメンチョウ、トランスジェニックウズラおよび他の種のトリを作製することができる。胚盤葉細胞は通常、VII ~ XII 期の細胞またはそれに相当する細胞であり、一実施形態では、X 期近くの細胞である。

【0101】

本発明の方法を実施するのに有用なベクターを本明細書にいくつか記載する。一実施形態では、ベクターのコード配列およびプロモーターはともに、胚盤葉細胞に導入する前に 5' LTR と 3' LTR の間に位置している。一実施形態では、ベクターはレトロウイルスであり、コード配列およびプロモーターはともに、レトロウイルスベクターの 5' LTR と 3' LTR の間に位置している。有用な一実施形態では、LTR またはレトロウイルスベクターは、トリ白血病ウイルス（ALV）、マウス白血病ウイルス（MLV）またはレンチウイルス由来である。

【0102】

一実施形態では、胚盤葉細胞をトランスフェクトして、トリゲノム内への安定な挿入をもたらすために使用されるベクターは、コード配列とプロモーターとを、トリ輸卵管筒部の管状腺細胞内でコード配列が発現されるような方向的および位置的關係で含み、ここでは、リソソーム酵素（例えば、LAL）のような外来性タンパク質が硬殻卵の卵白中に蓄積される。

【0103】

プロモーターは任意選択で、管状腺細胞内でのコード配列の発現を指令するのに十分な大きさであるオボアルブミンプロモーター領域のセグメントであってよい。オボアルブミンプロモーターを切り詰めることおよび/またはオボアルブミンプロモーターの重要な調節要素を集約して、プロモーターが輸卵管筒部の管状腺細胞内での発現に必要な配列を保持し、かつベクターへ容易に組み込まれ得るように十分に小型であるようにさせることは、本発明の範囲内に含まれる。一実施形態では、オボアルブミンプロモーター領域のセグメントを使用し得る。このセグメントはオボアルブミン遺伝子の5'隣接領域を含む。

【0104】

またプロモーターは、リゾチームプロモーターのような全部ではないが大部分が筒部に特異的なプロモーターであってもよい。またプロモーターはマウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーターであってもよい。あるいは、プロモーターは構成的プロモーター(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、マウス白血病ウイルス(MLV)プロモーターなど)であってもよい。一実施形態では、プロモーターはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、MDOTプロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、マウス白血病ウイルス(MLV)プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、オボアルブミンプロモーター、リゾチームプロモーター、コンアルブミンプロモーター、オボムコイドプロモーター、オボムチンプロモーターおよび/またはオボトランスフェリンプロモーターである。任意に、プロモーターはプロモーター領域の少なくとも1つのセグメント、例えばオボアルブミン、リゾチーム、コンアルブミン、オボムコイド、オボムチンおよびオボトランスフェリンプロモーター領域のセグメントなどであってもよい。

【0105】

胚盤葉細胞をトランスフェクトする1つの方法では、トリゲノム内に組み込まれるように、パッケージされたレトロウイルス系ベクターを用いて胚盤葉細胞内にベクターを送達する。

【0106】

トリゲノム内に導入遺伝子を実質的に導入するのに有用なレトロウイルスは、複製欠損型トリ白血症ウイルス(ALV)、複製欠損型マウス白血病ウイルス(MLV)またはレンチウイルスである。一実施形態では、レトロウイルスゲノムの5'および3'の長い末端反復配列(LTR)の間にオボアルブミンプロモーターと1つ以上の外来性遺伝子とを挿入することにより、pNLBベクターを改変する。本発明は、管状腺細胞内で活性なプロモーターの下流にある任意のコード配列が管状腺細胞内で発現され得ることを企図する。例えば、オボアルブミンプロモーターは、オボアルブミンタンパク質の発現を駆動し、輸卵管の管状腺細胞内で活性であるため、輸卵管筒部の管状腺細胞内で発現され得る。

【0107】

また本明細書に記載の任意のベクターは、ベクターのコード配列により発現されたタンパク質の、輸卵管の管状腺細胞からの分泌を指令するシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に含み得る。本態様は、本明細書に記載の方法を用いてトリの卵内に蓄積され得る外来性タンパク質の範囲を効果的に拡大する。外来性タンパク質がそれ無しは分泌されないであろう場所で、コード配列を含むベクターを改変して、リゾチーム遺伝子由来のシグナルペプチドをコードする約60bpを含むDNA配列を含ませる。シグナルペプチドをコードするDNA配列が、DNAによりコードされているタンパク質のN末端にそれが位置するようにベクターに挿入される。

【0108】

本発明の別の態様は、本発明の任意のベクターにおいて、ジシストロニックまたはポリシストロニックなmRNAからの2種類以上のタンパク質の翻訳を可能にする配列内リボソーム進入部位(IRES)要素を使用することを含む。IRES単位を1つ以上の追加のコード配列の5'末端に融合し、次いでこれをベクター内の元のコード配列の末端に挿入することにより、コード配列がIRESにより互いに分離されるようになる。

【0109】

一実施形態では、IRESを使用すると、他のコード配列の産生物を修飾することが可能な酵素を1つのコード配列がコードすることができるため、産生物の翻訳後修飾が容易になる。例えば、第一のコード配列がコラーゲンをコードし、このコラーゲンが第二のコード配列によりコードされている酵素によりヒドロキシル化され活性化され得るが、ここでは当該技術分野において理解されている通りにIRESを使用する。

【0110】

別の態様では、本発明のいずれの方法で使用するベクターのコード配列にも3'非翻訳領域(3'UTR)を加えて、産生されるRNAを安定にする。3'UTRをレトロウイルスベクターに付加する場合、3'UTRの付加が完全長ゲノムRNAの転写に干渉しないように、構築物中でのプロモーター、遺伝子Xおよび3'UTRの方向を逆にしなければならない。一実施形態では、3'UTRは、オボアルブミンもしくはリゾチーム遺伝子の3'UTR、または筒部細胞内で機能する任意の3'UTR、すなわちSV40後期領域であり得る。

10

【0111】

一実施形態では、構成的プロモーターを用いて、導入遺伝子のコード配列をトリにおいて発現させる。この場合、発現は筒部に限定されず、トリ内の他の組織(例えば、血液)中でも生じる。構成的プロモーターとコード配列とを含むこのような導入遺伝子の使用は、輸卵管内でのタンパク質発現と、それに続く卵内へのタンパク質の分泌を生じさせるまたは駆動することに特に適している。

20

【0112】

形質を導入するための粒子(すなわち、形質導入粒子)をベクター用に作製して力価を測定し、胚に注入するために使用することができる適切な濃度を決定する。Speksnijderの手順(米国特許第5,897,998号、この開示はその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)に従ってトリの卵に孔を開け、卵に形質導入粒子を注入する。注入の約21日後に卵が孵化し、交配用に雄のトリを選別する。精子に導入遺伝子を含むG0雄ニワトリをスクリーニングするために、雄ニワトリ精子の試料からDNAを抽出する。精子試料中に導入遺伝子を最も高レベルで含むG0雄ニワトリを、人工授精により非トランスジェニック雌ニワトリと交配させる。血液DNA試料を導入遺伝子の有無に関してスクリーニングする。外来性タンパク質の有無に関してトランスジェニック雄ニワトリの血清を試験する。外来性タンパク質が確認されれば、そのトランスジェニック雄ニワトリの精子を非トランスジェニック雌ニワトリの人工授精に使用する。その結果、特定の割合の子孫が導入遺伝子を担持する(例えば、50%を上回る)。本発明に従って産生された卵内に外来性タンパク質が存在すれば、そのタンパク質を単離してよい。またそのタンパク質の生物学的活性を試験してもよい。

30

【0113】

トリ輸卵管内での外来性タンパク質の産生および外来性タンパク質を含有する卵の産生を提供する本発明の方法は、適当なベクターを提供し、胚盤葉細胞にベクターを導入することに続いて、そのベクターがトリゲノム内に組み込まれるように、さらなる段階を含む。次の段階は、前段階で作製されたトランスジェニック胚盤葉細胞から成熟トランスジェニックトリを得ることである。成熟トランスジェニックトリは、胚内にベクターが直接トランスフェクトまたは形質導入された胚盤葉胚の細胞から得ることができる。得られた胚を成長させ、ニワトリを成熟させる。

40

【0114】

胚盤葉細胞から作製されたトランスジェニックトリは、創始動物として知られる。創始動物の一部は、輸卵管筒部の管状腺細胞内に導入遺伝子を担持している。これらのトリは、導入遺伝子によりコードされた外来性タンパク質を輸卵管内で発現する。また外来性タンパク質は、輸卵管に加えて他の組織(例えば、血液)でも発現され得る。外来性タンパク質が適当なシグナル配列(1つまたは複数)を含んでいれば、そのタンパク質は輸卵管の管腔内に、そして卵の卵白中に分泌される。

50

【 0 1 1 5 】

創始動物の中には生殖系列の創始動物がある。生殖系列の創始動物とは、生殖系列組織の遺伝物質中に導入遺伝子を担持し、また外来性タンパク質を発現する輸卵管筒部管状腺細胞内にも導入遺伝子を担持し得る創始動物のことである。したがって、本発明に従うと、トランスジェニックトリは外来性タンパク質を発現する管状腺細胞を有し得、またそのトランスジェニックトリの子孫も外来性タンパク質を発現する輸卵管筒部管状腺細胞を有し得る。あるいは、その子孫は、トリの特定組織（１つまたは複数）内での外来性遺伝子の発現により決定される表現型を発現する。一実施形態では、トランスジェニックトリはニワトリまたはシチメンチョウである。

【 0 1 1 6 】

医薬組成物および治療法

本明細書に記載の通りに産生された治療用タンパク質を、未加工の形態で投与して治療に使用することも可能であるが、治療用タンパク質を医薬製剤の一部として投与することが好ましい。したがって、家禽由来の L A L のようなグリコシル化治療用タンパク質またはその薬学的に許容される誘導体を、１つ以上の薬学的に許容される担体と、任意に他の治療および／または予防成分とを一緒に含む医薬製剤、ならびにこのような医薬製剤の投与方法がさらに提供される。担体（１つまたは複数）は、製剤の他の成分と適合性があり、かつその被投与者に有害でないという意味で「許容される」ものでなければならない。本発明の医薬組成物を用いた患者の治療法（例えば、投与する医薬タンパク質の量、投与の頻度、および治療期間の長さ）は、当業者である医師に公知の標準的な方法を用いて決定することができる。

【 0 1 1 7 】

複合分子を含めた担体を含む組成物を、その教示が参照により本明細書に組み込まれる公知の従来する方法（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第14版, Mack Publishing Co., Easton, Pa. を参照されたい）により製剤化する。担体は希釈剤を含み得る。一実施形態では、医薬担体は液体であり得、組換えヒト L A L は溶液の形態であり得る。医薬担体は口ウ、脂肪またはアルコールであり得る。一実施形態では、口ウまたは脂肪ベースの担体はエステルを含有しない。別の実施形態では、薬学的に許容される担体は、粉末、凍結乾燥粉末または錠剤形態の固体であり得る。一実施形態では、担体はリボソームまたはマイクロカプセルを含み得る。

【 0 1 1 8 】

医薬製剤には、筋肉内、皮下および静脈内投与を含めた注射による投与に適したものが含まれる。医薬製剤には、経口、経直腸、経鼻、局所（バツカルおよび舌下を含む）、経膈または非経口に適したものが含まれる。また医薬製剤には、吸入または吹送による投与に適したものも含まれる。製剤は、必要に応じて、都合よく個別の投与単位で提供することができ、製薬分野で公知の任意の方法により調製し得る。医薬製剤の製造方法は通常、治療用タンパク質を液体担体もしくは微粉化した固体担体、またはその両方と混ぜ、次いで必要に応じて、製品を所望の製剤に成形する段階を含む。

【 0 1 1 9 】

経口投与に適した医薬製剤は、それぞれが所定量の活性成分を含むカプセル剤、カシェ剤または錠剤のような個別の単位；粉末もしくは顆粒剤；液剤；懸濁剤；または乳剤として好都合に提供し得る。活性成分を大形丸剤、舐剤またはペースト剤として提供し得る。経口投与用の錠剤およびカプセル剤は、従来 of 添加剤、例えば結合剤、賦形剤、滑沢剤、崩壊剤または湿潤剤を含有し得る。錠剤を当該技術分野で公知の方法によりコーティングし得る。経口液体製剤は、例えば水性もしくは油性懸濁剤、液剤、乳剤、シロップ剤またはエリキシル剤の形態であり得、また使用前に水もしくは他の適当な溶剤で構成する乾燥製品として提供し得る。このような液体製剤は、従来 of 添加剤、例えば懸濁化剤、乳化剤、非水性溶剤（食用油を含み得る）または保存剤など含有し得る。

【 0 1 2 0 】

また L A L を非経口投与（例えば、注射、例えばボーラス注射または持続注入による）用に調製してもよく、アンプル、予め充填したシリンジ、少量の注入物中の単位用量形態で、または保存剤を添加した多回用量容器中で提供し得る。治療用タンパク質を、例えば、皮下注射、筋肉内注射および静脈内注入または注射により注射することができる。

【0121】

L A L は、油性または水性溶剤による懸濁剤、液剤または乳剤の形態であり得、懸濁化剤、安定化剤および / または分散剤のような製剤用剤を含有し得る。治療用タンパク質が、無菌固体からの無菌単離または溶液からの凍結乾燥により得られる、使用前に適当な溶剤、例えば無菌無発熱物質水で構成するための粉末形態であり得るということも企図される。

10

【0122】

静脈内注入または注射用には、本発明に従って産生された L A L を水性懸濁剤または液剤として製剤することができる。静脈内注入または注射用の製剤に適した添加剤は、クエン酸三ナトリウム脱水和物、クエン酸およびヒト血清アルブミンのうちの 1 つを含み得る。また医薬製剤は、リソソーム蓄積障害用の他の製品に使用される当該技術分野で公知の他の適当な添加剤も含み得る。本発明に従って産生された L A L の pH を約 5 . 6 ~ 約 6 . 2 の間に維持する。好ましくは、L A L 製剤の pH を $5 . 9 \pm 0 . 2$ に維持する。

【0123】

皮膚への局所投与用には、本発明に従って産生された本発明の治療用タンパク質を、軟膏剤、クリーム剤もしくはローション剤として、または経皮パッチとして製剤化し得る。軟膏剤およびクリーム剤は、例えば、適当な増粘剤および / またはゲル化剤を加えて水性または油性基剤で製剤化し得る。ローション剤は、水性または油性基剤で製剤化することができ、また 1 つ以上の乳化剤、安定化剤、分散剤、懸濁化剤、増粘剤または着色剤を含有し得る。

20

【0124】

口腔内の局所投与に適した製剤としては、風味を加えた基剤、通常はスクロースとアラビアゴムまたはトラガカントに活性成分を含むトローチ剤；ゼラチンとグリセリンまたはスクロースとアラビアゴムのような不活性な基剤に活性成分を含む香錠剤；および適当な液体担体中に活性成分を含む口腔洗浄剤が挙げられる。

【0125】

担体が固体である経直腸投与に適した医薬製剤は、単位用量の坐剤であることが最も好ましい。適当な担体としては、カカオバターおよび当該技術分野において一般に使用される他の材料が挙げられ、また坐剤は、活性化化合物を軟化または溶解させた担体（1 つまたは複数）と混合した後、鋳型に入れて冷却し成形して形成することが好都合であり得る。

30

【0126】

経膣投与に適した製剤は、活性成分に加えて、適切であることが当該技術分野で公知である担体を含有する、膣坐剤、タンポン剤、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、泡状剤またはスプレー剤として提供され得る。

【0127】

鼻腔内投与用には、本発明の治療用タンパク質を液体スプレーもしくは分散粉末として、または滴剤の形態で使用し得る。滴剤は、1 つ以上の分散剤、可溶化剤または懸濁化剤も含む水性または非水性基剤で製剤化し得る。液体スプレー剤は、加圧バックから送達するのが好都合である。

40

【0128】

吸入による投与用には、本発明による治療用タンパク質を吹入器、噴霧器もしくは加圧バック、またはエアロゾルスプレーを送達するのに都合のよい他の手段から都合よく送達することができる。加圧バックは適当な噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適当なガスなどを含み得る。加圧エアロゾルの場合、投与単位は、計量された量を送達するための弁を備え付けることにより決定され得る。

50

【 0 1 2 9 】

吸入または吹送による投与用には、本発明による治療用タンパク質は、乾燥粉末組成物、例えば、化合物とラクトースまたはデンプンのような適当な粉末基剤との混合粉末の形態をとり得る。粉末組成物を、例えば、カプセルもしくは薬包中の、または例えば、吸入器もしくは吸入器により粉末が投与され得るゼラチンもしくはプリスターバック中の単位投与剤形で提供し得る。

【 0 1 3 0 】

必要に応じて、活性成分を徐放することに適合させた上記製剤を使用し得る。

【 0 1 3 1 】

また本明細書に記載の医薬組成物は、抗菌剤または保存剤のような他の活性成分も含有し得る。

10

【 0 1 3 2 】

さらに、本明細書に開示される治療用タンパク質を他の治療剤と併用し得ることが企図される。例えば、本発明は、潜在的な注入関連のアナフィラキシー反応を最小化または予防するための薬学的に有効量の抗ヒスタミン剤による前処置の方法を提供する。例えば、抗ヒスタミン剤は、本明細書に開示されるおよび当該技術分野で公知である任意の薬学的に許容される抗ヒスタミン剤（例えば、ジフェンヒドラミン）であり得る。一実施形態では、抗ヒスタミン剤を体重 1 k g 当たり約 1 m g ~ 約 1 0 m g の間の用量で投与する。例えば、抗ヒスタミン剤を体重 1 k g 当たり約 5 m g の用量で投与し得る。一実施形態では、血管アクセスポートと接続された携帯型システムを用いて、抗ヒスタミン剤を、リソソーム酸リパーゼの投与前の約 1 0 分 ~ 約 9 0 分の間、例えば約 3 0 分 ~ 約 6 0 分の間に投与する。一実施形態では、ジフェンヒドラミンの投与により潜在的アナフィラキシー性の注入反応を効果的に抑える。

20

【 0 1 3 3 】

患者がアナフィラキシー反応または有害な免疫応答を経験する場合、L A L 投与の前、間または後に免疫抑制剤、例えば抗ヒスタミン剤、副腎皮質ステロイド剤、シロリムス、ボクロスポリン、シクロスポリン、メトトレキサート、I L - 2 受容体に対する抗体、T 細胞受容体に対する抗体、T N F - に対する抗体または融合タンパク質（インフリキシマブ、エタネルセプトまたはアダリムマブ）、C T L A 4 - I g （例えば、アバタセプト）、抗 - O X - 4 0 抗体なども投与することもできる。

30

【 0 1 3 4 】

また本発明は、1 つ以上のコレステロール低化剤（例えば、H M G - C o A 還元酵素阻害剤）を併用する L A L 含有組成物の投与を含む治療法も企図する。このような薬剤の非限定的な例としては、アトルバスタチン（L i p i t o r （登録商標）および T o r v a s t （登録商標））、フルバスタチン（L e s c o l （登録商標））、ロバスタチン（M e v a c o r （登録商標））、A l t o c o r （登録商標）、A l t o p r e v （登録商標））、ピタバスタチン（L i v a l o （登録商標）、P i t a v a （登録商標））、プラバスタチン（P r a v a c h o l （登録商標）、S e l e k t i n e （登録商標）、L i p o s t a t （登録商標））、ロスバスタチン（C r e s t o r （登録商標））およびシンバスタチン（Z o c o r （登録商標）、L i p e x （登録商標））が挙げられる。

40

【 0 1 3 5 】

本明細書に記載の組成物またはタンパク質を用いて各種状態を治療することができる。例えば、その治療法が当業者である医師に公知の状態がある。本発明は、トリ系で産生され、家禽由来のグリコシル化パターンを含有する治療用タンパク質（例えば、L A L ）を使用して、このような状態を治療し得ることを企図する。つまり、従来の方法で作製された治療用タンパク質により治療可能であることが知られている状態を、本明細書に記載の通りに産生された治療用タンパク質により治療することも企図される。例えば、本明細書に記載の通りに産生された L A L を用いて、L A L 欠損症または不全症（合わせて「L A L 欠損症」と呼ぶ）を原因とするまたはこれと関連する状態、例えばウォルマン病およびコレステリルエステル蓄積症（C E S D ）などを治療することができる。本明細書に記載

50

の L A L 欠損症では、L A L の発現が、体内で産生される L A L の減少または欠損を生じる状態（例えば、遺伝子突然変異）、生理的因子または環境因子により減少している状態も考慮される。本明細書に記載の通りに産生された L A L を用いて、他の状態、例えばアテローム性動脈硬化症、脂肪肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）および肝硬変なども治療することができる。また本明細書に記載の通りに産生された L A L を用いて、2005 年 2 月 1 日に発行された米国特許第 6,849,257 号（この開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）；2009 年 12 月 3 日に公開された米国特許出願公開第 2009/0297496 号；2004 年 11 月 11 日に公開された米国特許出願公開第 2004/0223960 号；2009 年 11 月 15 日に公開された米国特許出願公開第 2007/0264249 号（これらの開示（すなわち、上記 4 つの各特許公開）は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている状態のような他の状態も治療することができる。

10

【0136】

本明細書に開示される通りに産生された L A L を用いて、膵炎、例えば慢性膵炎および／または急性膵炎、ならびにアルコール性膵炎のようなアルコールによる膵臓損傷を含めた特定の状態を治療し得ることも企図される。

【0137】

本明細書に開示される方法のような任意の有用な方法により作製された L A L を用いて、特に限定されないが、体組織、例えば、特に限定されないが肝臓、脾臓、消化管および心血管組織などに脂質エステルの蓄積を生じるアルコールによる細胞損傷を含めたアルコールによる細胞損傷が原因の疾患を治療することが企図される。また本発明は、L A L 投与による吸収不良の治療も企図する。

20

【0138】

本発明の一態様は、本明細書に記載の組換えヒト L A L を含む治療有効量の組成物を患者に投与することを含む、患者を治療する方法に関する。患者は、L A L 欠損症に関連した状態を含めたあらゆる状態に罹患しているか、またはそのような状態に罹患し得る。一実施形態では、治療有効量とは、患者の赤血球数を所望の量だけ増加させる量のことである。本発明に従って産生された L A L を用いて、例えば、組織がリソソーム酸リパーゼの産生を維持することができない慢性腎疾患を治療し得ることが企図される。

30

【0139】

また任意の有効な方法により作製された L A L が、タンジール病および家族性低アルファリポタンパク血症を有する患者の治療に有用であり得ることも企図される。タンジール病／家族性低アルファリポタンパク血症は、マクロファージ内でのコレステロールエステルの蓄積に関連し、肝脾腫大および／またはリンパ節腫脹とともに、L A L の投与により治療可能な高密度リポタンパク質（H D L）の低下を伴う。例えば、本発明が特定の作用理論または作用機序に限定されることを望むものではないが、L A L 活性の障害により A B C A 1 発現が減少し、逆に、タンジール病／家族性低アルファリポタンパク血症の患者への L A L の投与により得られた L A L 活性の増加により A B C A 1 発現が増加し、多型性により機能活性が低下した A B C A 1 遺伝子の影響が克服されと考えられる。

40

【0140】

一般に状態の治療では、投与量は既知の要因、例えば被投与者の年齢、健康状態、体重、併用する治療の種類、治療頻度などによって異なり得る。通常、活性成分の用量は体重 1 k g 当たり約 0.0001～約 10 ミリグラムの間であり得る。正確な用量、投与頻度および治療期間は、各治療用タンパク質投与の分野において熟練した医師により決定され得る。

【0141】

さらに、L A L 欠損症の治療では 1 m g / k g 以下が有効であり得ることが見出されている。本発明は、治療有効量のリソソーム酸リパーゼを 5 日に 1 回から 25 日に 1 回の間、例えば、7 日に 1 回から 14 日に 1 回の間で哺乳動物（例えば、患者、好ましくはヒト患者）に投与することを含む、状態の治療法を提供する。一実施形態では、投与するリソ

50

ソーム酸リパーゼの用量は、体重 1 k g 当たり約 0 . 1 m g ~ 約 5 0 m g の間であり、例えば、用量は 1 k g 当たり約 1 m g ~ 5 m g の間であり得る。

【 0 1 4 2 】

特に有用な一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の投薬計画のような任意の治療的に有効な投薬計画に従って、体重 1 k g 当たり約 0 . 1 m g ~ 1 . 0 m g の間の用量のリソソーム酸リパーゼを投与することによる、状態の治療法を提供する。

【 0 1 4 3 】

本発明は、治療有効量の L A L の投与が有用であり得る L A L 欠損症の任意の合併症を治療する方法を提供する。一実施形態では、本明細書に記載の方法により吸収不良および成長不全を治療し得る。別の実施形態では、本明細書で提供される方法を用いて、特に限定されないが肝腫大および肝障害を含めた、L A L 欠損症患者で見られる合併症を治療し得る。

【 0 1 4 4 】

本発明は、当該技術分野において理解されているような任意の有効なタンパク質発現系、例えば、トランスジェニック哺乳動物およびトランスジェニックトリにより産生され得る組換え L A L (例えば、組換えヒト L A L) による治療を提供する。他のタンパク質発現系としては、細胞培養系、細菌系および植物系を挙げ得るが、これらに限定されない。

【 0 1 4 5 】

本発明は、組換え L A L を薬学的に許容される組成物の一部として、当該技術分野において熟練した医師により判定される意図した治療効果を達成し得る任意の経路で投与することを包含する。例えば、血管アクセスポート (例えば、留置ポート) と接続された携帯型注入ポンプにより注入が容易になり得る。

【 0 1 4 6 】

また本発明は、哺乳動物 (例えば、ヒト患者) における状態、例えばウォルマン病および C E S D の臨床的および病理学的発症の監視も含む。一実施形態では、評価は、特に限定されないが脂質分析、胸部 X 線、肝機能検査、大便チャート (s t o o l c h a r t)、血漿メバロン酸、免疫原性、血漿リソソーム酸リパーゼ、キトトリオシダーゼ、P A R C、門脈圧亢進、身体計測、例えば画像技術を用いた肝臓、脾臓および消化管の体積および特徴付けで構成される。例えば、上記画像技術は、超音波、磁気共鳴画像法および核磁気共鳴分光測定で構成され得る。

【実施例】

【 0 1 4 7 】

本発明を以下の実施例によりさらに例示する。実施例は単なる例示を目的とするものであり、いかなる形でも本発明を限定する意図はなく、また限定するものであると解釈されるべきではない。

【 0 1 4 8 】

実施例 1

組換えヒトリソソーム酸リパーゼ (r h L A L) コード配列を担持するベクター (p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A) の構築

p A L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A ベクター中の h L A L 遺伝子のヌクレオチド配列は、ヒトリソソーム酸リパーゼ遺伝子 (G e n B a n k アクセション番号: N P _ 0 0 0 2 2 6) により産生されるタンパク質のアミノ酸配列と同一のタンパク質をコードする (図 1)。この配列の転写と、それに続く得られた m R N A の翻訳により 3 9 9 アミノ酸の前駆体タンパク質が産生され、これがプロセッシングされて、配列番号 1 で記述されるヒト L A L (G e n B a n k アクセション番号: N P _ 0 0 0 2 2 6) (図 1) と同一の成熟した 3 7 8 アミノ酸タンパク質になる。本実施例の h L A L 遺伝子 (c D N A 配列に関する図 2 を参照) の発現は、エンハンサー配列、プロモーター配列、イントロン配列、ならびに 5 ' および 3 ' 非翻訳配列を含むオボアルブミン遺伝子由来の非コード要素により制御される。オボアルブミン遺伝子は、卵白の主要なタンパク質成分であるオボアルブミンを産生する。ニワトリオボアルブミンプロモーターの活性は、卵白を産生する

10

20

30

40

50

ニワトリ輸卵管内の細胞に極めて特異的であり、他の組織での発現は極めて少ない。

【0149】

プラスミドベクター pALVIN - OVR1 - I - hLAL - dSA (図3A;ヌクレオチド配列は図4に示されている)を用いて、創始動物(XLL109)のゲノム内にhLAL導入遺伝子を安定に組み込む複製欠損型レトロウイルス(RDR)を作製した。このプラスミドベクターは、ウイルスRNAのパッケージング、逆転写および組込みに必要なレトロウイルスヌクレオチド配列を含むが、ウイルスのgag、polおよびenv遺伝子のためのインタクトな配列は含まない。レトロウイルスベクターを作製するために用いる方法およびそれに続く遺伝子導入手順でのその使用を本明細書に記載する。

【0150】

pALVIN - OVR1 - I - hLAL - dSAのレトロウイルス部分はALVベクターであるpNLBに基づく。LTRが自己不活性となるようにpNLBを改変した(SIN)(図3B)。これを達成するために、U3領域のエンハンサーおよびCAATボックスを含む273bpの3'LTRを削除した。レトロウイルス配列の3'末端の不活性化されたU3領域は、組み込まれたプロウイルスの5'末端に存在する新たなU3領域の鋳型として働くため、5'LTRも通常は不活性化される。SIN構築物中にあるLTR配列の削除により、内部プロモーターに対するLTRからのプロモーターの干渉が低下し、配列組換えによる複製型レトロウイルスの形成の可能性が最小限になる。新たなベクターを、ALV不活性化ベクターにちなんでpALVINと命名する。

【0151】

5'LTRの下流は、pNLBベクターから引き継がれた部分的gagおよびenvコード配列である。pALVIN - OVR1 - I - hLAL - dSA中には、gagタンパク質前駆体配列の小さな一部(12%)が残り(p19成熟ペプチド配列の55%)、またRAV2のenv前駆体配列の小さな一部(1.7%)が残っている(GenBankアクセション番号:AF033808)。これらの切り詰められたgagおよびenv領域は、複製型レトロウイルスを生じるのに必要な機能性タンパク質を産生することができない(Cosset, 1991)。

【0152】

ニワトリオボアルブミン遺伝子の転写制御要素および翻訳制御要素をpALVINに挿入して、pALVIN - OV - 1.1 - I(配列は図6に示されている;配列番号8)を作製した。pALVIN - OV - 1.1 - Iの第一の部分は、1.1kbの近位プロモーター領域、第一エクソン、第一イントロンおよび第二エクソンの一部を含むニワトリオボアルブミン遺伝子の連続した部分で構成されている。次の部分は、オボアルブミンタンパク質コード配列の代わりとなるスタッファー挿入フラグメントである。スタッファーの後には、ポリアデニル化を含めたmRNAの適切なプロセッシングを促進する配列を含む、ニワトリオボアルブミン遺伝子の3'非翻訳領域(UTR)が続いている。一般にスタッファーフラグメントは、所望のタンパク質、この場合はhLALをコードするDNAフラグメントに置き換えられる。その結果、トランスジェニックニワトリ輸卵管内でのmRNAの制御された転写発現および翻訳を促進する特定の要素を有し、内因性オボアルブミンmRNAの調節を忠実に模倣し、卵白での目的タンパク質の高度な発現を可能にするベクターが得られる。

【0153】

pALVIN - OV - 1.1 - Iベクターはオボアルブミン遺伝子の第一イントロンを含む。イントロンはレトロウイルスRNAゲノムの生成およびパッケージングの間にスプライシングを受けやすいため、本発明者らはLTRに対して逆方向に発現カセットを挿入した。このようにして、イントロンはレトロウイルスRNA内で認識されなくなり、スプライシングされずにパッケージされる。便宜上、本明細書のすべてのマップは、LTRを反対方向にし、発現カセットを正方向または時計回りの方向にして描いてある。

【0154】

pALVIN - OV - 1.1 - Iを基本ベクターにして、そこにhLALのコード配列

10

20

30

40

50

(CDS)を挿入した。hLAL CDSおよびpALVIN-OV-1.1-Iとの適合性のために必要とされる配列を構成するhLALアダプターおよびSyn hLALの2つのDNAフラグメントをIntegrated DNA Technologies (Coralville、Iowa)において合成した(図7および8を参照されたい; 配列番号9および10)。hLALアダプターの229bpのHpaI/BamHIフラグメントおよびSyn hLALの1113bpのBamHI/BstBIフラグメントをpALVIN-OV-1.1-Iの7882 HpaI/BstBIフラグメントに挿入することによりスタッパー領域をhLAL CDSに置き換えて、pALVIN-OV-1.1-I-hLALを作製した。

【0155】

インタクトなレトロウイルスRNAのパッケージングを妨げる不可解なスプライス部位がhLAL CDSのアンチセンス鎖内に存在するということが明らかになった。この不可解なスプライス部位を、hLALのアミノ酸配列を変化させずにDNA配列を改変することにより取り除いた。この改変をプライマー5'-AGAAACTGAGAGTGTC TTAT-3'(配列番号12)およびプライマー5'-TGACAGCTGTGGAT CCAGAAACAAACATG-3'(配列番号13)を用いたpALVIN-OV-1.1-I-hLALの領域232~534のポリメラーゼ鎖増幅により行い、329bpのアンプリコンが作製された。このアンプリコンをBamHIおよびSexAIで消化し、pALVIN-OV-1.1-I-hLALの8940bpのBamHI/SexAIフラグメントに連結して、pALVIN-OV-1.1-I-hLAL-dSAを作製した。

【0156】

ニワトリオボアルブミン遺伝子のDNアーゼ高感受性部位III(DHSIII)を含む推定プロモーターエンハンサー(OVプロモーター開始部位から-3819~-2169の位置)(Kaye、Bellardら、1984)をpALVIN-OV-1.1-I-hLAL-dSAに挿入して、pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSAを作製した。これは以下のように行った。DHSIIIエンハンサーと1.1kbのOVR1プロモーターと呼ばれる近位OVプロモーターを含むDNAフラグメント(図9を参照されたい; 配列は配列番号11)をXhoIおよびBlnIでの消化により単離した。サブクロニングを容易にするために、プライマー5'-GCCGCTCGAGCGAGG AATATAAATAAT-3'(配列番号14)および5'-TCCGCGCAC ATTTCCCCGA-3'(配列番号15)を用いたpALVIN-OV-1.1-Iの領域6752~7974のPCR増幅、次いでNgoMIおよびXhoIでの消化により、アダプターフラグメントであるpSIN-OV-1.1-IのPCRを作製した。OVR1プロモーターの2772bpのXhoI/BlnIフラグメントおよびpSIN-OV-1.1-IのPCRの1067bpのNgoMI/XhoIフラグメントをpALVIN-OV-1.1-I-hLAL-dSAの7043bpのNgoMI/BlnIフラグメントに挿入して、pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSAを作製した(pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSAの構築の略図に関する図10を参照されたい)。pALVINと呼ばれる(pAVIJCR-A395.22.3.1-KMまたはpALV-SINとしても知られる)ベクターのレトロウイルスベクターセグメントの構築は、米国特許出願第2008/0064862号に記載されている。

【0157】

さらに、2008年3月13日に公開された米国特許出願公開第2008/0064862号(この開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)に開示されているプロモーターおよび/またはベクターを用いた、本発明によるLALの産生が含まれる。

【0158】

実施例2

ウイルス粒子作製

10

20

30

40

50

レトロウイルス遺伝子導入法を以下のように用いて、G0創始動物である、hLAL導入遺伝子をゲノム中に担持するトランスジェニック雄のXL L 109を作製した。不死化したニワトリ線維芽細胞系の一過性トランスフェクションにより、pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSAベクターを担持する複製欠損型ウイルス粒子を作製した。これらのニワトリ線維芽細胞を、pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA、pCMV-gag-polおよびpCMV-VSV-Gの3つのプラスミドで同時にトランスフェクトした。pCMV-gag-polはトリ白血症ウイルスのRAVI株のgagおよびpol遺伝子を発現する。pCMV-VSV-Gは水疱性口内炎ウイルスのエンベロープタンパク質を発現する。トランスフェクションの4時間後に、培地を、10%のウシ胎仔血清、100単位/mLのペニシリンおよび100μg/mLのストレプトマイシンを添加したDMEMに置き換えた。トランスフェクションの48時間後に培地を回収し、0.45ミクロンのフィルター(Millipore)でろ過し、超遠心分離により濃縮した。濃縮したALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA導入遺伝子を担持するレトロウイルスを収集し、初期段階の胚の形質導入に使用した。「p」はプラスミド型のベクターの記号であるため、導入遺伝子が一度、パッケージされたベクターまたは組み込まれた導入遺伝子の形態になれば、その導入遺伝子の名称には「p」が付かないことに留意されたい。

10

【0159】

実施例3

胚への遺伝子導入

20

胚ゲノム内へのALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA発現カセットの組み込みを、初期段階の胚の形質導入により行った(SpeksnijderおよびIvarie, 2000)。産んだばかりの白色レグホンの受精した卵を繁殖コロニーから入手した。胚に接触できるように殻に孔を開けた。上記ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA発現カセットを担持する濃縮された複製欠損型レトロウイルス粒子を胚の胚下腔に7マイクロリットル注入した。熱接着剤で卵を密封し、次いで標準条件下でインキュベートして孵化させた。識別し追跡できるように、上記注入により作製された子孫に個体識別マーカを孵化時に付けた。子孫の血液試料を、hLALコード配列に特異的なPCRプライマーを用いたリアルタイムPCRによりhLAL導入遺伝子を解析したところ、これらは導入遺伝子に関して陽性であった(以下に記載する)。これにより、遺伝子導入手順が成功したことが示された。hLAL導入遺伝子のリアルタイムPCRアッセイでは、Taqman(登録商標)化学(Applied Biosystems)を用いる。順方向および逆方向プライマーは、それぞれ5'-ACGACTGGCTTGCAGATGTCCT-3'(配列番号16)および5'-CCCCAAATGAAGTCAAGATGCT-3'(配列番号17)であった。Taqman(登録商標)プローブ配列は5'-CCGGAAATGCTCTCATGGAACACCAA-3'(配列番号18)であり、5'末端がFAMで(エミッターとして)、3'末端がIowa Blackで(クエンチャーとして)標識されていた。プライマー、プローブおよび1μlの抽出DNAを30μlのTaqman(登録商標)Universal Master Mix(Applied Biosystems)に加えた。対照反応には、hLAL配列と野生型ニワトリ由来DNAとを有するプラスミドの各種希釈物が含まれていた(データ不掲載)。Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systemに標準的なサイクリングパラメータを用いた。

30

40

【0160】

実施例4

G0創始動物の同定

性成熟した雄から精液を採取してDNAを抽出し、hLALリアルタイムPCRアッセイを用いてアッセイした。負の対照の精液DNAと混合した既知の基準物質(hLAL遺伝子を有するプラスミド)を用いて、各試料中の導入遺伝子コピー数を推定した。リアルタイムPCRによる推定では、雄XL L 109の導入遺伝子カセットDNAの含有量は、

50

その子孫に導入遺伝子を伝達することが可能なレベルであった。このX L L 1 0 9 雄をG 0 トランスジェニック創始動物とし、非トランスジェニックニワトリと交配させて、G 1 ヘミ接合性トランスジェニックニワトリを産ませた。

【0161】

実施例 5

ヘミ接合性G 1 ヘトリの繁殖および特徴付け

トランスジェニック創始動物X L L 1 0 9 を親として産まれた子孫を、血液細胞DNA中の導入遺伝子の有無に関して、h L A L リアルタイムPCRアッセイを用いて試験した。1 ~ 2 週齢の子孫から血液を採取し、ハイスループット技術を用いてDNAを抽出した(Harveyら, 2002)。ハイスループットスクリーニングを容易にするために、Taqmanアッセイの前にDNA溶液を定量化しなかった。通常、1 μ l のDNA溶液には、陽性増幅シグナルを生じるのに十分な50 ~ 400 ngのDNAが含まれる。X L L 1 0 9 を親とする合計1, 322羽のニワトリを試験し、陽性子孫から再び採血して確認のための試験を行った。PCRの結果から、22羽の子孫がA L V I N - O V R 1 - I - h L A L - d S A 導入遺伝子に関して陽性であった。Taqmanの結果の例を図11に示す。

10

【0162】

実施例 6

高発現系統の同定および特徴付け

G 1 ニワトリの1羽である1 L L 7 4 6 6 が、卵白中に他のG 1 ニワトリに比べて有意に高いレベルのr h L A L タンパク質を含む卵を産んだ。1 L L 7 4 6 6 および同胞のG 1 雄に関してサザンブロット解析を行って、高発現ニワトリと同じ組込み部位を有する同胞雄を同定した。導入遺伝子内で1回だけ切断する制限酵素(B l p I)により消化を行い、サザンブロットをオボアルブミンプロモーターのセグメントまたはh L A L コード配列でプローブした(図12A ~ 12D)。第二制限部位の位置は隣接ゲノム領域内にあり、組み込みの部位によって異なる。したがって、O V プローブまたはh L A L プローブにより検出されるB l p I バンドのサイズは、生じた各系統に固有のものである。

20

【0163】

O V プローブにより、野生型ニワトリ由来のB l p I 消化DNAにおいて4.1 kbの単一バンドが検出され、これはニワトリゲノムの内因性オボアルブミン遺伝子のB l p I セグメントの予測サイズに相当するものであった(図12Bおよび12D)。ニワトリ1 L L 7 4 6 6 で4.3 kbの第二のバンドが検出され、これは導入遺伝子バンドに相当するものであった。3羽の追加の雌同胞1 L L 1 0 4 0 9、1 L L 1 0 6 8 6 および1 L L 1 2 0 5 8、ならびに3羽の追加の雄同胞1 L L 8 9 2 2、1 L L 9 3 3 0 および1 L L 1 1 2 1 7 が4.3 kbのバンドを示したが、このことは、これらの同胞が同じ系統であり得ることを示している(図12Bおよび12D)。

30

【0164】

ニワトリリソソーム酸リパーゼ遺伝子のDNA配列および組換えヒトリソソーム酸リパーゼのコード配列が、上記サザンアッセイで使用する条件下でハイブリダイゼーションが起らないように十分に分化しているため、予想どおり、野生型ニワトリ由来のDNAではh L A L プローブによりバンドが検出されなかった(図12C)。O V プローブにより検出された4.3 kb バンドに関して陽性であった同じニワトリ由来のB l p I 消化ゲノムDNAにおいて、h L A L プローブにより約10.6 kbの単一バンドが検出されたが、このことは、これら7羽のG 1 ニワトリが同じ組込み部位を有し、したがって同じ系統であることを示している。

40

【0165】

他のバンドが検出されなかったので、1 L L 7 4 6 6、1 L L 1 0 4 0 9、1 L L 1 0 6 8 6、1 L L 1 2 0 5 8、1 L L 8 9 2 2、1 L L 9 3 3 0 および1 L L 1 1 2 1 7 はすべて単一の組込み部位を有することが示された。

【0166】

50

O Vおよびh L A Lプローブにより検出されたバンドはサイズが異なり、また単独の導入遺伝子由来のバンドよりもサイズが大きいことから、導入遺伝子が組み込まれたということもサザン解析により示された。隣接ゲノム領域内での組み込み導入遺伝子の予想される構造およびB l p I部位の位置を表すマップを図1 2 Aに示す。

【0 1 6 7】

導入遺伝子がインタクトであることを、2つの段階を踏んで確認した。最初に、P C Rによりh L A Lコード配列を1 L L 7 4 6 6から単離した。P C R産物の両鎖に関して、h L A L開始コドンから停止コドンまで配列決定を行った。D N A配列は全く予想どおりであり、このことは導入遺伝子内のコード領域のD N A配列が全く変化していないことを示していた。次に、インタクトな導入遺伝子を2つのセグメントである3 . 6 k bおよび3 . 8 k bに消化する制限酵素A p a L Iを用いて、サザンプロット解析を行った(図1 3 A)。G 1由来のA p a L I消化ゲノムD N Aにおいて3 . 6 k bおよび3 . 8 k bのバンドがともに検出され、これにより、導入遺伝子が完全にインタクトな形で組み込まれたことが示された(図1 3 B)。

【0 1 6 8】

実施例 7

G 2の繁殖および特徴付け

単一のG 0創始動物X L L 1 0 9に由来するh L A L G 2の系統を図1 4に示す。G 1の段階では、コピー数、整合性、h L A L配列および組み込み部位に関して導入遺伝子の特徴付けを行い、7羽のG 1トランスジェニックが同定され特徴付けされた(4羽のニワトリおよび3羽の雄ニワトリ)。G 1雄親1 L L 8 9 2 2、1 L L 9 3 3 0および1 L L 1 1 2 1 7から採取した精液で非トランスジェニックニワトリを人工授精してG 2の繁殖を行った(図1 4)。受精させた各ニワトリ、その卵および次の子孫を他の子孫と隔離して飼育した。孵化した子孫を、h L A L導入遺伝子の有無に関してh L A LリアルタイムP C Rアッセイを用いて試験した。G 1創始動物は導入遺伝子に関してヘミ接合性であるため、子孫の半数がトランスジェニックG 2であることが予想された。これまでに解析した6 1 0羽のG 2子孫のうち、3 3 0羽すなわち5 4 %がトランスジェニックであった。

【0 1 6 9】

実施例 8

h L A Lトリの遺伝子解析

各G 2ニワトリを血液D N Aのh L A LリアルタイムP C Rアッセイにより同定した後、産生系統に対して以下の遺伝子アッセイを行った：血液D N Aからh L A L遺伝子をP C R増幅して配列決定を行い、ヒト配列との1 0 0 %同一性を確認し；上記のように組み込み部位P C Rにより導入遺伝子組み込み部位を確認した。P C R配列決定および組み込み部位解析を以下のニワトリに対して行った：1 0羽未満のニワトリ産生系統の各ニワトリ；1 1 ~ 1 0 0羽のニワトリ産生系統の1 0 %のニワトリ(最低1 0羽)；1 0 1 ~ 1 0 0 0羽のニワトリ産生系統の5 %のニワトリ(最低1 0羽)；1 0 0 1 ~ 1 0 , 0 0 0羽のニワトリ産生系統の1 %のニワトリ(最低5 0羽)；1 0 , 0 0 1を超えるニワトリ産生系統の0 . 1 %のニワトリ(最低1 0 0羽)。成長および産生の段階ごとに詳細な記録を続けた。

【0 1 7 0】

実施例 9

卵白からのh L A Lの精製

L A Lを含有する卵白(E W)をp H 6で一晩可溶化し、0 . 2 μ mろ過を用いた遠心分離(または深層ろ過)により清澄化した。E Wを1 M N a O A c緩衝液(p H 4)でp H 6に調整した。

【0 1 7 1】

清澄化したE Wを、2 0 m Mリン酸 / 1 3 7 m M N a C l緩衝液(p H 6)で平衡化したフェニル - H I Cカラム(E W：カラムサイズ = 2 : 1)に負荷した。負荷完了後、平衡化緩衝液および5 m Mリン酸緩衝液(p H 6)でカラムを洗浄した。5 m Mトリス緩

衝液 (pH 7.2) を含む 30% プロピレングリコールで LAL を溶出させた。

【0172】

溶出した LAL 画分を 1M の酸で pH 5 に調整した後、GigaCap S カラム (EW: カラムサイズ = 10:1) に負荷した。カラムを 50mM NaOAc 緩衝液 (pH 5) で平衡化した。負荷完了後、平衡化緩衝液でカラムを洗浄した。50mM NaOAc / 60mM NaCl (pH 5) で LAL を溶出させた。

【0173】

GigaCap S カラムからの LAL 画分を 1M トリス緩衝液で pH 6 に調整した後、ブチル-HIC カラム (EW: カラムサイズ = 10:1) に負荷した。20mM リン酸 / 137mM NaCl 緩衝液 (pH 6) でカラムを平衡化した。負荷完了後、平衡化緩衝液および 5mM リン酸緩衝液 (pH 6) でカラムを洗浄した。5mM トリス緩衝液 (pH 7.2) を含む 50% プロピレングリコールで純粋な LAL を溶出させた。卵白からの hLAL の精製段階を図 15 に図示する。

10

【0174】

実施例 10

トランスジェニックトリ由来 hLAL の炭水化物分析

当業者に公知の以下の分析技術を用いて、トリ由来ヒト LAL のオリゴ糖構造を決定した。

【0175】

200 マイクログラムを、1mM CaCl₂ を含有する 0.1M トリス-HCl (pH 8.2) 中、37 で 18 時間、トリブシンおよびキモトリブシンにより消化した。C18 カートリッジカラムにより、消化産物を濃縮し夾雑物を除去した。濃縮後、グリコペプチドを 50 μl の 20mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 中、37 で 18 時間、2 μl の PNG アーゼ F (7.5 単位 / ml) により消化した。解離したオリゴ糖を Sep-Pak C18 カートリッジカラムに通してペプチドおよび酵素から分離した。

20

【0176】

グリカン画分をジメチルスルホキシドに溶解させた後、Anumula および Taylor の方法によりペルメチル化した (Anumula および Taylor, 1992)。水を加えて反応を停止させ、ジクロロメタンでペル-O-メチル化炭水化物を抽出した。ペル-O-メチル化グリカンを窒素流下で乾燥させた。

30

【0177】

MALDI / TOF-MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法) を、マトリックスとして -ジヒドロキシ安息香酸 (DHBA、50% メタノール: 水に溶かした 20mg / mL 溶液) を用いて、反射装置陽イオンモードで行った。Microflex LRF (Bruker) を用いて全スペクトルを得た。

【0178】

ペプチド主鎖からの解離および精製の後、オリゴ糖に関して MALDI-TOF-MS 分析および ESI-MS / MS (エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析) を当該技術分野において理解されている通りに行った。また個々の多糖種の試料を特定の酵素で消化し、消化産物を当該技術分野において理解されている通りに HPLC で分析した。

40

【0179】

ヒト LAL 上には約 6 個の N-結合グリコシル化部位が存在すると考えられている。Zschenker ら (2005) J. Biochem., Vol 137, p 387-394 を参照されたい (この開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)。またこの参照文献は、ヒト LAL 上には O-結合グリコシル化部位が存在し得るということも示唆している。同定された N-結合オリゴ糖構造を図 16 に示す。

【0180】

多くのまたはすべてのこれらの構造が、本発明に従って産生された LAL においては N-結合グリコシル化構造として見られるということが、データから明らかになった (図 16)。例えば、本発明に従って産生された LAL には A-n が結合していることが見出さ

50

れる。例えば、本発明に従って產生されたL A LにはO - nが結合していることが見出される。例えば、本発明に従って產生されたL A Lには、B - n、C - nおよびD - nのうちの少なくとも1つが結合していることが見出される。例えば、本発明に従って產生されたL A Lには、E - nおよびF - nのうちの少なくとも1つが結合していることが見出される。例えば、本発明に従って產生されたL A Lには、I - nおよびJ - nのうちの少なくとも1つが結合していることが見出される。例えば、本発明に従って產生されたL A Lには、K - nおよびL - nのうちの少なくとも1つが結合していることが見出される。例えば、本発明に従って產生されたL A Lには、M - nおよびN - nのうちの少なくとも1つが結合していることが見出される。例えば、本発明に従って產生されたL A LにはG - nが結合していることが見出される。例えば、本発明に従って產生されたL A LにはH - nが結合していることが見出される。

10

【0181】

実施例11

トランスジェニックトリ由来L A LのN - グリカン種

トランスジェニックトリ由来h L A Lの精製試料(600 μ g / 試料)を、Tube - O - Dialyzer (4.0 kDa カットオフ膜; G Biosciences)を用いて4 で約24時間、超純水(nanopure water)に対して透析し、塩およびその他の夾雑物を除去した。全透析時間の間に超純水を4回交換した。

【0182】

透析後、各試料を3つのアリコートに、すなわち、試料重量の約1/4を中性およびアミノ糖分析用に、試料重量の約1/4をマンノース - 6 - リン酸分析用に、試料重量の約1/2をオリゴ糖プロファイリング用に分けた。中性およびアミノ糖分析用のアリコートを100 で4時間、2 Nトリフルオロ酢酸(TFA)により加水分解し、マンノース - 6 - リン酸分析用のアリコートを100 で1.5時間、6.75 N TFAにより加水分解した。次いで、加水分解物をN₂下で乾燥させ、50 μ LのH₂Oに再び溶解させ、水中で7分間超音波処理し、注入バイアルに移した。ただし、中性およびアミノ糖試料は、元の溶解加水分解物から得られたピークが大き過ぎたため、希釈を2回行った。

20

【0183】

中性およびアミノ糖用の標準品とマンノース - 6 - リン酸用の標準品との既知のモル数の混合物を、試料と同じ方法で同じ時間だけ加水分解した。4種類の濃度の中性およびアミノ糖標準品混合物(10 μ L当たり0.2、0.4、0.8および1.6ナノモルのFucとGalNAc; 10 μ L当たり0.5、1.0、2.0および4.0ナノモルのGlcNAc; 10 μ L当たり0.3、0.6、1.2および2.4ナノモルのGalとMan; ならびに10 μ L当たり0.1、0.2、0.4および0.8ナノモルのGlc)ならびにマンノース - 6 - リン酸(10 μ L当たり640、1280、2560、5120ピコモル)を調製し、較正方程式を確立した。試料中の各糖のモル数を直線補間により較正方程式から定量化した。

30

【0184】

中性およびアミノ糖ならびにマンノース - 6 - リン酸を、グラジエントポンプと、電気化学検出器と、オートサンプラーとを備えたDionex ICS3000システムを用いて、HPAECにより分析した。アミノトラップを有するDionex CarboPac PA20(3 x 150 mm)分析カラムにより、個々の中性およびアミノ糖ならびにマンノース - 6 - リン酸を分離した。グラジエントプログラムには、中性およびアミノ糖に溶離液A(脱気したナノピュア水)と溶離液B(200 mM NaOH)、マンノース - 6 - リン酸に溶離液C(100 mM NaOH)と溶離液D(100 mM NaOH中1 Mの酢酸ナトリウム)を用いた。注入(10 μ L / 注入)を中性およびアミノ糖測定では40分毎に、マンノース - 6 - リン酸測定では35分毎に行った。すべての方法は、HardyおよびTownsend(Hardy, M. R. およびTownsend, R. R., "High - pH anion - exchange chromatography of glycoprotein - derived carbohydrates

40

50

”, 1994, Methods Enzymol. 230: 208-225) により記載されているプロトコルを基にした。機器制御およびデータ収集はDionex chromleonソフトウェアを用いて行った。結果を下の表1に示す。対照試料はEWから精製したオボムコイドである。

【0185】

【表1】

【表1】

HPAECによる対照およびLALの単糖組成

試料ID	分析物	ナノモル	ナノモル/ μ g	モル%
対照	フコース	nd	—	—
	N-アセチルガラクトサミン	5.066	0.020	9.6
	N-アセチルグルコサミン	26.947	0.108	51.4
	ガラクトース	3.876	0.016	7.4
	グルコース	nd	—	—
	マンノース	16.565	0.066	31.6
	マンノース-6-リン酸	nd	—	—
	N-アセチルノイラミン酸	ndm	—	—
	N-グリコリルノイラミン酸	ndm	—	—
トランスジェニックトリ由来hLAL	フコース	nd	—	—
	N-アセチルガラクトサミン	nd	—	—
	N-アセチルグルコサミン	17.932	0.120	37.6
	ガラクトース	0.879	0.006	1.8
	グルコース	nd	—	—
	マンノース	23.290	0.155	48.8
	マンノース-6-リン酸	5.642	0.038	11.8
	N-アセチルノイラミン酸	ndm	—	—
	N-グリコリルノイラミン酸	ndm	—	—

nd = 検出されず; ndm = 測定されず。

【0186】

LALの構造的特徴

LALは、そのアミノ酸配列中にN-結合グリコシル化のための6つの可能性のある部位、すなわちAsn³⁶、Asn⁷²、Asn¹⁰¹、Asn¹⁶¹、Asn²⁷³およびAsn³²¹を有する。このうちの5つ、すなわちAsn³⁶、Asn¹⁰¹、Asn¹⁶¹、Asn²⁷³およびAsn³²¹がグリコシル化されているのに対し、Asn⁷²は非グリコシル化または実質的に非グリコシル化である（実質的に非グリコシル化であるとは、LAL分子の混合物中、Asn³⁶、Asn¹⁰¹、Asn¹⁶¹、Asn²⁷³およびAsn³²¹のいずれよりも少ないAsn⁷²がグリコシル化されているという意味である）ことがわかった。したがって、本発明の一態様は、Asn⁷²において非グリコシル化および/または実質的に非グリコシル化であるLAL（例えば、ヒトLAL）、ならびにそのようなLALの産生および使用である。ただし、グリコシル化Asn⁷²を有するLALは本発明の範囲内にある。N-グリカン構造は主として、主要糖としてN-アセチルグルコサミン、マンノースおよびマンノース-6-リン酸（M6P）を有する二分岐、三分岐および四分岐構造の混合物で構成されている。各部位は、本発明の一態様である有利な一式の構造（表2および図17）を有すると思われる。例えば、M6P修飾N-グリカンは、Asn¹⁰¹、Asn¹⁶¹およびAsn²⁷³に存在する。非リン酸

化構造は、内因性卵白タンパク質に見られる N - グリカンの典型である。N - アセチルガラクトサミン (GalNAc) がいないことから判断されるように、O - 結合グリカンは検出されなかった。シアル酸は検出されず、これは、本発明に従って産生された他の内因性および外来性タンパク質のすでに決定されている N - グリカン構造と一致する。本発明は、1 つ以上の本明細書に開示されるオリゴ糖構造でグリコシル化された LAL を含む。

【0187】

【表 2】

【表 2】

グリコペプチドの LC/MS により決定された LAL グリカン構造の存在部位

部位	グリカン構造
Asn ³⁶	GlcNAc4Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc4Man3GlcNAc2
Asn ⁷²	検出されず
Asn ¹⁰¹	Phos2Man7GlcNAc2
Asn ¹⁶¹	Phos1Man6GlcNAc2 GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2 Man3GlcNAc2 GlcNAc2Man3GlcNAc2 GlcNAc3Man3GlcNAc2 GlcNAc4Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc4Man3GlcNAc2
Asn ²⁷³	Man7GlcNAc2 Man8GlcNAc2 Man9GlcNAc2 Phos1Man8GlcNAc2 Phos1Man9GlcNAc2
Asn ³²¹	GlcNAc2Man3GlcNAc2 GlcNAc3Man3GlcNAc2 GlcNAc4Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc4Man3GlcNAc2 GlcNAc5Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc5Man3GlcNAc2 GlcNAc6Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc6Man3GlcNAc2

10

20

30

Hex = ガラクトース ; Phos = リン酸 ; Man = マンノース ; GlcNAc2 = N - アセチルグルコサミン

【0188】

方法

中性糖、アミノ糖および M6P を含めた単糖組成を、高 pH 陰イオン交換クロマトグラフィー - パルスアンペロメトリック検出 (HPAEC - PAD) を用いて定性的および定量的に決定した。

40

【0189】

いくつかの質量分析法 (MALDI - TOF、NSI - MS/MS およびグリコペプチド LC - MS) のデータを用いて優勢なグリカンの構造を決定した。

【0190】

MALDI - TOF は中性 N - グリカンの決定に有効であり、リン酸化 N - グリカンを検出することができた (図 18)。NSI - MS/MS を用いて MALDI - TOF スペクトル中の微小ピークの性質を決定したが、そのうちのいくつかはリン酸化 N - グリカンによるものであった (図 19)。MALDI - TOF のリン酸化 N - グリカン検出能力を

50

向上させる努力は実らなかった。

【0191】

グリコペプチドのLC/MSでは、中性およびリン酸化構造を決定することができ、またLALのアミノ酸配列中での特定の構造の位置を決定することができた(図17および表2にデータをまとめる)。

【0192】

HPLC-PAADクロマトグラムのどのピークがリン酸化N-グリカンによるものを決定するために、LALをホスファターゼで処理して分析した(図3)。グループCおよびDのピークは曲線下面積(AUC)が減少したのに対し、グループAのピークはより顕著になった。グループBのピークは他のピークに比べて変化がなかった。保持時間が荷電(リン酸化またはシアリル化によるもの)の程度に比例するという知識に基づけば、グループCは1つのリン酸を有するN-グリカン(モノM6P)で構成され、グループDは2つのリン酸を有するN-グリカン(ビス-M6P)で構成されていると考えられる。

10

【0193】

また保持時間は、中性およびアミノ単糖の組成および相対的な構造上の位置にも影響された。このような例としては、ガラクトースの存在、二分岐GlcNacの存在およびGlcNac置換の程度が挙げられる。このような要素はHPLC-PAADクロマトグラムにおけるピークの多様性の一因となる。

【0194】

実施例12

20

卵白中のトランスジェニックトリ由来hLALの*in vitro*酵素活性解析

卵白中のリソソーム酸リパーゼの活性を、基本的にはYanら(2006), *American Journal of Pathology*, Vol. 169, No. 3, p 916-926(この開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている通りに蛍光発生基質4-メチルウンベリフェリルオレアートアッセイを用いて決定した。

【0195】

4% Triton X-100中2.5 mMの4-MUOからなる4-メチルウンベリフェリルオレアート(4-MUO)のストック溶液を調製した。各ウェルが0.01% Tween 80中0.2 Mのクエン酸ナトリウム(pH 5.5)62.5 μ l、12.5 μ lの卵白試料および25 μ lの2.5 mM 4-MUOを含むマイクロタイタープレートでアッセイを行った。Bio-Tek Synergy HT蛍光測定マイクロプレートリーダー(励起360 nmおよび発光460 nm)を用いて37 °Cで30分間、蛍光の変化をモニターした。アッセイ前に、hLALを含有する卵白を、直線的に少なくとも30分間続く反応を生じる酵素濃度になるまで希釈した。50 μ lの0.75 M トリスHCl(pH 8.0)により反応を停止させ、上で使用したものと同一プレートリーダー(励起360 nmおよび発光460 nm)でエンドポイント蛍光シグナルを測定した。

30

【0196】

標準として4-メチルウンベリフェリルを用いて活性単位を決定した。1単位(U)は、上記アッセイ条件下で1分間当たり1 μ molの4-メチルウンベリフェリルの形成を生じる酵素量と定義される。hLALを含有しない卵白を負の対照として使用した。

40

【0197】

hLALに関して陽性の卵白試料は、卵白1 mL当たり1 U~100 Uの間の活性を有していた。21羽のG1ニワトリの卵白を解析した。10羽のニワトリの卵白が、hLAL活性の試験で陽性であった。

【0198】

実施例13

トランスジェニックトリ由来LALの*in vitro*解析

トランスジェニックトリの輸卵管細胞内で産生されたLAL(本明細書では「SBC-102」、「トリ由来LAL」、「LAL」または「hLAL」と呼ぶ)が細胞と結合す

50

る能力およびリソソーム区画へ内部移行する能力を、マクロファージおよび線維芽細胞を用いて *in vitro* で調べた。マクロファージ細胞とインキュベートした場合、蛍光標識された SBC - 102 がリソソームに局在していた。この作用はマンノース多糖競合物を用いて弱めることができたが、このことは、認識機序としての N - アセチルグルコサミン / マンノース (GlcNAc / マンノース) 受容体およびこれらの細胞による取込みを示唆している。SBC - 102 は *in vitro* において、インキュベーション後に LAL 欠損ヒト線維芽細胞および正常マウス線維芽細胞の細胞結合型 LAL 活性を増加させたが、このことは、SBC - 102 への曝露が、欠損した酵素活性の実質的な置き換えを生じ得ることを示している。

【0199】

マンノース - 6 - リン酸 (M6P) は、遍在する M6P 受容体を介した多種多様な細胞型へのリソソーム酵素送達に関与することが示されている SBC - 102 のオリゴ糖構造内に存在する。

【0200】

LAL を雌ニワトリトランスジェニックの卵白から精製した。Oregon Green NHS を Invitrogen (商標) (#0 - 10241) から入手した。ラット肺細胞マクロファージ系 NR8383 およびマウス線維芽細胞系 NIH - 3T3 を ATCC から入手した。LAL 欠損 Wolman 病線維芽細胞を Coriell Institute for Medical Research から入手し、LysoTracker (登録商標) Red を Invitrogen (商標) から入手した。

【0201】

酵素標識：PBS 中の 4 mg のトランスジェニックトリ由来 LAL を、製造者の推奨に従って Oregon Green で標識し、次いで反応物を PBS に対して透析した後、濃縮した。

【0202】

マクロファージによる取込み：蛍光標識したトランスジェニックトリ由来 LAL (5 μ g / mL) および LysoTracker (登録商標) Red を NR8383 細胞とともに 2 時間インキュベートした。細胞を共焦点蛍光顕微鏡により、488 nm、次いで 514 nm において連続スキャンモードを用いて調べた。

【0203】

マンナンによる競合阻害：蛍光標識した SBC - 102 (5 μ g / mL) およびマンナンを NR8383 細胞とともに 2 時間インキュベートした。細胞をトリプシン処理し、エンドポイントとして中央値の蛍光強度を用いた蛍光標示式細胞分取法により、LAL 取込みを測定した。

【0204】

トランスジェニックトリ由来 LAL が取り込まれた後、標的細胞のリソソーム内に取り込まれる能力を、マクロファージ細胞系 NR8383 を用いて調べた。蛍光標識したトランスジェニックトリ由来 LAL およびリソソームマーカー「LysoTracker (登録商標) Red」(Invitrogen (商標)) を細胞とともに 2 時間インキュベートした。次いで、連続スキャンモードを用いた共焦点蛍光顕微鏡により、上記細胞のリソソーム内でのトランスジェニックトリ由来 LAL とリソソームマーカーの共局在を調べた (図 20)。LAL はリソソームへの局在を示したが、このことは、各種入手源由来の rhLAL を用いた同様の *in vitro* 実験と一致する。

【0205】

GlcNAc / マンノース受容体に対するトランスジェニックトリ由来 LAL の結合特性を、マクロファージ細胞系 NR8383 を用いた競合結合アッセイにより評価した (図 21)。5 μ g / mL の蛍光標識した (Oregon Green) トランスジェニックトリ由来 LAL および各種濃度のマンノース含有オリゴ糖であるマンナンを細胞とともに 2 時間、共インキュベートした。無マンナン対照と比較した、トランスジェニックトリ由来 LAL 取込みのマンナンによる相対的阻害を、エンドポイントとして中央値の蛍光強

10

20

30

40

50

度を用いた蛍光標示細胞分取解析により定量化した。トランスジェニックトリ由来 L A L の結合 / 取込みにおけるマンノース用量依存的な障害が観察されたが、このことは、トランスジェニックトリ由来 L A L : G l c N A c R 相互作用と一致する。

【 0 2 0 6 】

さらに、マンノース - 6 - リン酸を用いた競合実験により、線維芽細胞でのマンノース - 6 - リン酸仲介による取り込みが示された (結果は不掲載) 。

【 0 2 0 7 】

トランスジェニックトリ由来 L A L への曝露が細胞内の L A L 活性を増加させる能力を、正常細胞および L A L 欠損細胞の両方を用いて *v i t r o* で調べた。W o l m a n 病患者から分離された線維芽細胞および正常マウス線維芽細胞 (N I H - 3 T 3) を、0、0 . 1 6 または 0 . 5 μ g / m L の濃度のトランスジェニックトリ由来 L A L の存在下で 5 時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄して非特異的シグナルを除去し、4 - M U O 基質を用いて、細胞溶解物を L A L 活性に関してアッセイした。内因性の細胞結合型 L A L 活性は、N I H - 3 T 3 に比べて W o l m a n 病線維芽細胞で低く、またトランスジェニックトリ由来 L A L とのインキュベーション後に、両細胞型で活性の用量依存的増加が見られた (図 2 2) 。

10

【 0 2 0 8 】

実施例 1 4

トランスジェニックトリ由来 L A L の *i n v i v o* 解析

L A L 欠損 Y o s h i d a ラット (すなわち、ホモ接合型) (K u r i y a m a ら (1 9 9 0) , J o u r n a l o f L i p i d R e s e a r c h , v o l . 3 1 , p 1 6 0 5 - 1 6 1 1 ; N a k a g a w a ら (1 9 9 5) , J o u r n a l o f L i p i d R e s e a r c h , v o l . 3 6 , p 2 2 1 2 - 2 2 1 8 ; ならびに Y o s h i d a および K u r i y a m a (1 9 9 0) , L a b o r a t o r y A n i m a l S c i e n c e , v o l . 4 0 , p 4 8 6 - 4 8 9 を参照されたい) を、4 週齢から始めて週 1 回で 4 週間、S B C - 1 0 2 (5 m g / k g 、 I V) またはプラセボで処置した。各投与では、S B C - 1 0 2 を 3 0 分おきに 2 つの等しい用量 (2 . 5 m g / k g) でラット尾静脈内に注射した。最終投与の 1 週間後にラットおよび同齢野生型対照を調べた。三重反復で解析を行った。

20

【 0 2 0 9 】

S B C - 1 0 2 処置個体の肉眼的病理検査では、臓器サイズの減少に加えて、肝臓の色の正常化が示された。S B C - 1 0 2 処置ラットは、泡沫状のマクロファージがかなり蓄積している溶剤処置ラットとは極めて対照的に、実質的に正常な肝臓組織増を示した。L A L \cdot / \cdot ラットにおいて上昇する血中アラニントランスフェラーゼおよびアスパラギン酸トランスフェラーゼレベルも S B C - 1 0 2 処置ラットでは減少していた (不掲載) 。

30

【 0 2 1 0 】

各ラットの内部臓器および組織の質量を決定した。そのデータを図 2 3 に示す。臓器サイズは、L A L \cdot / \cdot ラットおよび L A L $+$ / $+$ ラットにおいて、溶剤または S B C - 1 0 2 を 5 m g / k g で週 1 回、4 週間投与した後に、8 週齢で決定された体重のパーセントとして表されている。

40

【 0 2 1 1 】

図 2 4 に示すように、S B C - 1 0 2 処置または溶剤処置 Y o s h i d a ラットの体重を野生型ラットのものと比較した。L A L \cdot / \cdot ラットには、S B C - 1 0 2 (5 m g / k g) または溶剤を単回用量または分割用量 (4 時間以内に投与) として、I V 注射により投与した。L A L $+$ / $+$ ラットは同齢の同腹子対照である。

【 0 2 1 2 】

実施例 1 5

トリグリセリド解析

野生型、ホモ接合型プラセボ処置およびホモ接合型 S B C - 1 0 2 処置のラットの肝臓および脾臓組織に関してトリグリセリド解析を行った。トリグリセリド解析は標準的な方

50

法（すなわち、M B L International社のTriglyceride Quantification Kit、カタログ番号J M - K 6 2 2 - 1 0 0）を用いて、三重反復で行った。

【0213】

【表3】

【表3】

野生型およびL A L欠損ラットの肝臓および脾臓トリグリセリドレベル

トリグリセリド ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 湿組織)			
	野生型 (n=3)	プラセボ (n=3)	S B C - 1 0 2 (n=3)
肝臓	4 8	8 4	5 7
脾臓	3	2 2	4

10

【0214】

肝臓の基質レベル

図25は、W TおよびL A L欠損ラットにおいて、溶剤またはS B C - 1 0 2を $5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ で週1回、4週間投与した後に8週齢で決定された、肝臓のコレステロール、コレステリルエステルおよびトリグリセリドレベルを示している。

【0215】

実施例16

用量反応実験

20

上で行った研究に基づき、L A L（「S B C - 1 0 2」）の用量範囲および投与計画（週1回および隔週）の薬力学的（P D）効果をL A L^{-/-}ラットで調べた。これらの実験では、S B C - 1 0 2を0.2、1、3および $5\text{mg}/\text{kg}$ で隔週または0.35、1および $5\text{mg}/\text{kg}$ で週1回の用量で、4週齢から始めて1か月間、I V注射により投与した。結果は、体重（B W）増加（図26）、臓器肥大（図27）および組織基質レベル（図28）の改善を示した。血中トランスアミナーゼレベルもS B C - 1 0 2用量の増加に伴って減少し、高用量ではそのレベルは実質的に野生型のレベルに達した。

【0216】

実施例17

ラットモデルにおける組換えL A Lの投与

30

体重、組織中トリグリセリドおよびコレステロール、肝腫大、脾腫、リンパ節腫脹、腸重量、ならびに他のパラメーターに対する組換えヒトリソソーム酸リパーゼ（L A L）反復投与の効果を、Y o s h i d aおよびK u r i y a m a（1990），L a b o r a t o r y A n i m a l S c i e n c e , v o l . 4 0 , p 4 8 6 - 4 8 9に記載されているL A L欠損D o n r y uラット（K u r i y a m aら（1990）J o u r n a l o f L i p i d R e s e a r c h , v o l . 3 1 , p 1 6 0 5 - 1 6 1 1 ; N a k a g a w aら（1995），J o u r n a l o f L i p i d R e s e a r c h , v o l . 3 6 , p 2 2 1 2 - 2 2 1 8も参照されたい）（この開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）において評価した。

【0217】

40

L A L欠失に関してホモ接合型（L A L^{-/-}）の4週齢のD o n r y uラットを、トランスジェニックニワトリ輸卵管系で産生された組換えヒトL A Lまたは生理食塩水プラセボを投与する群に振り分けた。野生型で同齢の同腹子ラットを対照として用いた。L A L^{-/-} L A L^{-/-}ラットには、週1回で4週間（合計で4用量）または隔週で4週間（合計で2用量）、単回用量として、または30分おきに投与する2つの等しい用量で尾静脈注射により投与した。L A Lの用量は $1\text{mg}/\text{kg}$ または $5\text{mg}/\text{kg}$ であった。投与計画を表4に示す。潜在的なアナフィラキシー反応を抑えるために、リソソーム蓄積症治療のための酵素置換療法の動物モデルにおける以前の実験（S h u l l r a（1994），P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e , v o l . 9 1 , p . 1 2 9 3 7 ; B i e l i c k i r a（1999），T h e

50

Journal of Biological Chemistry, 274, p. 36335; Voglerら(1999), Pediatric Research, 45, p. 838) (この開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)に基づく手順で、ラットにジフェンヒドラミン(5 mg / kg)を前処置した。

【0218】

図29は、1週間当たり1 mg / kgのLAL、1週間当たり5 mg / kgのLALまたは2週間当たり5 mg / kgのLALを投与したラットの毎日の体重増加の経過を示している。図では、2つの用量サイズおよび頻度の間で治療効果にほとんどまたは全く差がないことがわかる。

【0219】

【表4】

【表4】

体重測定および投与計画

出生後の日数	評価／行った注射
13日目	体重測定
14日目	
20日目	
21日目	
24日目	
25日目	
27日目	
28日目	
31日目	
32日目	
34日目	
35日目	仔ラットの離乳
38日目	週1回および隔週1回投与の最初の注射
39日目	
41日目	
42日目	
45日目	
48日目	週1回投与の2回目の注射
49日目	
55日目	
56日目	週1回投与の3回目の注射；隔週1回投与の2回目の注射
	週1回投与の4回目の注射
	剖検

【0220】

組換えLALで処置したLAL-/-ラットの病理学検査

実施例1に記載されている実験の終わりに、実験動物を人道的に安楽死させて剖検を行い、肉眼的病理、組織病理および臨床化学の検査を行った。肉眼的剖検には、体の外表面、すべての開口部、ならびに頭蓋腔、胸腔、腹腔およびそれらの内容物の検査が含まれていた。ラットの内部臓器および組織の質量を決定し、臓器および組織を採取して、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。固定後、組織を処理してヘマトキシリン/エオシン染色切片のスライドを作製し、評価した。

【0221】

分析した処置個体の肉眼的病理検査では、図30の解剖で見られるように、肝臓のサイズおよび色がかなり正常化しているが示された。器官対体重の重量比を決定し、これにより、プラセボ処置ラットに比べて、治療が成功した解剖個体の肝臓、脾臓、腸間膜組織、十二指腸、空腸および回腸の相対的な臓器サイズの減少が示された(図23)。分析した処置ラットのLALの肝臓組織の組織病理は、基本的に正常な肝臓組織像を示し、泡沫状のマクロファージがかなり蓄積しているプラセボ処置ラットとは極めて対照的であることを示している(図30)。

【0222】

10

20

30

40

50

実施例 18

組換え L A L 投与によるウォルマン病 (W D) の治療

生後の体重増加が困難で発育が悪いため、女児患者を生後 7 週間で入院させる。最初の身体検査で、患者は体重が 3 . 6 k g (出生時体重が 3 . 7 k g) で痩せており、弛緩性皮膚によるしわが見られる。腹部は膨張し、6 c m の硬い肝腫大および約 4 c m の硬い脾腫大が見られる。鼠径部にリンパ節肥大が認められ、筋肉活動が弱い。

【 0 2 2 3 】

最初のヘモグロビンレベルが 9 . 2 g m 、血小板数が 5 0 6 , 0 0 0 および白血球が 1 1 , 5 5 0 である。尿検査は正常であり、骨髓塗抹標本では空胞のあるリンパ球および多数の泡状細胞が見られる。血化学測定値は、総脂質が 8 3 4 m g / 1 0 0 m l 、リン脂質が 1 7 6 m g / 1 0 0 m l 、トリグリセリドが 1 4 1 m g / 1 0 0 m l 、コレステロールが 1 2 9 m g / 1 0 0 m l 、ビリルビンが 0 . 3 m g / 1 0 0 m l 、アルカリホスファターゼが 9 . 0 B U % 、S G O T が 9 0 単位、S G P T が 5 0 単位、コリンエステラーゼが 2 0 単位、尿素窒素が 8 . 3 m g 、空腹時血糖が 4 5 m g / 1 0 0 m l である。腹部 C T スキャンでは、肝脾腫大および石灰化を伴った左右相称の副腎肥大が見られる。

10

【 0 2 2 4 】

患者に投薬用の静脈アクセスポートを外科手術により埋め込む。ポートを携帯型注入機に接続した後、発生し得るアナフィラキシー性の注入反応を抑えるために、L A L 注入の 2 0 分前に患者を 1 m g / k g のジフェンヒドラミンで前処置する。次いで、静脈内注入により L A L を 1 m g / k g で 5 時間にわたって患者に投与する。この治療法を 7 日に 1 回、無期限で繰り返す。

20

【 0 2 2 5 】

最初の L A L 投与の 2 週間以内に、患者は体重増加および超音波により判定される重要な腹部臓器のサイズの正常化における著しい改善を経験する。検査結果は、L A L の注入により、患者のリソソーム酸リパーゼ活性が回復し、関連する異常が修正されたことを示す。

【 0 2 2 6 】

実施例 19

組換え L A L 投与によるコレステリルエステル蓄積症 (C E S D) の治療

そう痒性の腹部発疹を有する 3 歳男児をかかりつけの小児科医が検査する。腹部の検査では、医師により肝腫大が認められ、超音波により確認される。この時点で診断は下されず、患者は定期的にモニターされる。

30

【 0 2 2 7 】

8 歳で患者は胃腸炎で入院する。肝生検の光学顕微鏡検査では、肝細胞の細胞質内グリコーゲンおよび小脂肪滴の増加が見られる。電子顕微鏡検査では、小型で高電子密度の顆粒を有する、膜で囲まれた脂肪滴が見られる。I I I 型グリコーゲン蓄積症 (脱分枝酵素欠損症) の作業診断 (w o r k i n g d i a g n o s i s) が下されるが、皮膚線維芽細胞の脱分枝酵素活性は正常である。

【 0 2 2 8 】

1 0 歳で肝腫大は続き、2 回目の肝生検を行う。光学顕微鏡検査では肝臓実質の小葉構造の変化が見られ、肝細胞が細胞質顆粒および空胞を含んで腫脹し、軽度の門脈周囲線維症を伴っている。線維芽細胞の酸リパーゼ活性は正常の 7 % であることがわかり、C E S D の診断が確定される。総コレステロール (T C) 、トリグリセリド (T G) 、低密度リポタンパク質コレステロール (L D L - C) の各血漿中濃度はそれぞれ 7 . 5 1 、3 . 2 4 および 5 . 5 8 m m o l / L で、その年齢・性別の 9 5 パーセンタイルを上回り、また血漿中高密度リポタンパク質コレステロール (H D L - C) は 0 . 4 7 m m o l / L で 5 パーセンタイルを下回っており、患者は複合型の高脂血症 (高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、低アルファリポタンパク血症および高ベータリポタンパク血症) である。

40

【 0 2 2 9 】

50

患者に投薬用の静脈アクセスポートを外科手術により埋め込む。ポートを携帯型注入機に接続した後、発生し得るアナフィラキシー性の注入反応を抑えるために、L A L注入の20分前に患者を5 mg / kg のジフェンヒドラミンで前処置する。次いで、静脈内注入によりL A Lを5 mg / kg で5時間にわたって患者に投与する。この治療法を14日に1回、無期限で繰り返す。

【0230】

最初のL A L投与の2週間以内に、患者は体重増加および超音波により判定される重要な腹部臓器のサイズの正常化における著しい改善を経験する。検査結果は、L A Lの注入により、患者のリソソーム酸リパーゼ活性が回復し、関連する異常が修正されることを示す。

【0231】

実施例20

医薬品の説明および組成

本明細書に記載のL A L (「S B C - 1 0 2」) の原薬は、トランスジェニックニワトリにより産生された卵白から精製された組換えヒトリソソーム酸リパーゼ (r h L A L) である。S B C - 1 0 2で使用される添加剤は、現在市販されているリソソーム蓄積障害 (L S D) 用の他の製品で使用されているものと同様であり、製剤の安定性を維持するように選択されている。

【0232】

S B C - 1 0 2は無色透明で無菌の液体であり、F l u r o T e c (登録商標) でコーティングした非天然ラテックス (ブチル) 製ストッパーとアルミニウム製クリンブシールとを備えた透明なI型ホウケイ酸ガラスバイアルに入れて提供される。S B C - 1 0 2は、S B C - 1 0 2 (2 mg / mL)、クエン酸三ナトリウム二水和物 (13.7 mg / mL、U S P)、クエン酸一水和物 (1.57 mg / mL、U S P)、ヒト血清アルブミン (10 mg / mL、U S P) および注射用水 (最終体積分、U S P) で構成される水溶液として提供される。S B C - 1 0 2のpHは5.9 ± 0.2である。S B C - 1 0 2は保存剤を含まず、バイアルは単回使用が意図される。

【0233】

【表5】

【表5】

S B C - 1 0 2 (L A L) 中の添加剤

添加剤	C A S 番号	グレード	機能
クエン酸三ナトリウム二水和物	6132-04-03	U S P	緩衝剤
クエン酸一水和物	5949-29-1	U S P	緩衝剤
ヒト血清アルブミン	70024-90-7	U S P	安定化剤

【0234】

製剤の成分

【表6】

【表6】

S B C - 1 0 2 製剤

成分	濃度
S B C - 1 0 2 (r h L A L)	2 mg / mL *
クエン酸三ナトリウム二水和物	13.7 mg / mL
クエン酸一水和物	1.57 mg / mL
ヒト血清アルブミン	10 mg / mL
注射用水、十分量	1.0 mL

【0235】

上記明細書の各例は本発明を説明するために提供されるものであり、本発明を限定するものではない。実際、本発明の範囲または趣旨を逸脱することなく、本発明における種々の修正、組合せ、追加、削除および変更が可能であることが、当業者には明らかである

10

20

30

40

50

う。例えば、1つの実施形態の一部として説明または記載されている特徴を別の実施形態で用いて、さらなる実施形態をもたらすことが可能である。本発明は、このような修正、組合せ、追加、削除および変更を包含するものとする。

【0236】

上記明細書に引用されている文献（例えば、米国特許、米国特許出願、刊行物）はすべて、参照により本明細書に組み込まれる。本発明の種々の修正および変更は、本発明の範囲および趣旨を逸脱することなく、当業者には明らかであろう。

【0237】

本発明は、その例となる実施形態に触れながら具体的に示され、記載されているが、当業者は、添付の特許請求の範囲に包含される本発明の範囲を逸脱することなく、本発明において形態および詳細の種々の変更を行い得るということを理解するであろう。

10

【図1】

rhLAL	1	60
天然	<u>MKMRFLGLVVCILVLTILHSEGSGGKLTAVDPETRMNVSEIISYWGFPSEXYLVETEDGYI</u>	
	<u>MKMRFLGLVVCILVLTILHSEGSGGKLTAVDPETRMNVSEIISYWGFPSEXYLVETEDGYI</u>	
rhLAL	61	120
天然	<u>LCINRIPHGRKNHSDKGPVVFVFLQEGILLADSSNWVTNLANSLSGLFILADAGFDVVMGNS</u>	
	<u>LCINRIPHGRKNHSDKGPVVFVFLQEGILLADSSNWVTNLANSLSGLFILADAGFDVVMGNS</u>	
rhLAL	121	180
天然	<u>RGNTWSRKHKTLVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFLNKTYGQEVYVYVGHSGQGTIG</u>	
	<u>RGNTWSRKHKTLVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFLNKTYGQEVYVYVGHSGQGTIG</u>	
rhLAL	181	240
天然	<u>FIATFSQIPELAKRIKMFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDHLIKDLFGDKEFLPQSAFL</u>	
	<u>FIATFSQIPELAKRIKMFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDHLIKDLFGDKEFLPQSAFL</u>	
rhLAL	241	300
天然	<u>KMLGTHVCTHVILKELCGNLCLFLCGFMERNLMSRVVDVYTHSPAGTSVQNMHLWSQAV</u>	
	<u>KMLGTHVCTHVILKELCGNLCLFLCGFMERNLMSRVVDVYTHSPAGTSVQNMHLWSQAV</u>	
rhLAL	301	360
天然	<u>KFKQFQAFDWSGSAKNYFHYNQSYPPPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDNLADVDVNNILLTQI</u>	
	<u>KFKQFQAFDWSGSAKNYFHYNQSYPPPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDNLADVDVNNILLTQI</u>	
rhLAL	361	399
天然	<u>TNLVFRESIPEWEHLDPIGLDAPWRLYNKIINLARKYQ</u> (配列番号1)	
	<u>TNLVFRESIPEWEHLDPIGLDAPWRLYNKIINLARKYQ</u> (配列番号20)	

図1

【図2】

1	ATGAAAATGC	GGTTCTTGGG	GTGTGTGGTC	TGTTTGGTTC	TCTGGACCCT
51	GCATTCCGAG	GGGTCCGGAG	GGAAACTGAC	AGCTGTGGAT	CCTGAAACAA
101	ACATGAATGT	CAGTGAAATT	ATCTCTTACT	GGGGATTCCC	TAGTGAGGAA
151	TACCTAGTTG	AGACAGAAGA	TGGATATATT	CTGTGCCTTA	ACCGAATTCC
201	TCATGGGAGG	AAGAACCATT	CTGACAAAGG	TCCCAAAACCA	GTGTCTTCC
251	TGCAACATGG	CTTGTGCGCA	GATTCTAGTA	ACTGSGTCAC	AAACCTTGCC
301	AACAGCAGCC	TGGGCTTCAT	TCTTGTGAT	GCTGGTTTTG	ACGTGTGGAT
351	GGGCAACAGC	AGAGGAAATA	CCTGTCTCG	GAAACATAAG	ACACTCTCAG
401	TTTCTCAGGA	TGAATTCTGG	GCTTTCAGTT	ATGATGAGAT	GGCAAAATAT
451	GACCTACCAG	CTTCCATTAA	CTTCATTCTG	AATAAGACTG	GCCAAGAACA
501	AGTGATTAT	GTGGGTCAAT	CTCAAGGCAC	CACATATAGT	TTTATAGCAT
551	TTTACAGAT	CCCTGAGCTG	GCTAAAGGA	TTAAATGTT	TTTTGCCCTG
601	GGTCTGTGG	CTTCCGTCGC	CTTCTGTACT	AGCCCTATGG	CCAACTGGG
651	ACGACTGCCA	GATCATCTCA	TTAAGGACCT	CTTTGGAGAC	AAAGAATTTT
701	TTCCCCAGAG	TGCGTTTTTG	AAGTGGCTGG	GTACCCACGT	TTGCACTCAT
751	GTCATACTGA	AGGAGCTCTG	TGGAATCTC	TGTTTTCTTC	TGTGTGGATT
801	TAATGAGAGA	AATTTAAATA	TGTCTAGAGT	GGATGTGTAT	ACAACACATT
851	CTCCTGCTGG	AACCTCTGTG	CAAAACATGT	TACACTGGAG	CCAGGCTGTT
901	AAATTCCAAA	AGTTTCAAGC	CTTTGACTGT	GGAAGCAGTG	CCAAGAATTA
951	TTTTTATTAC	AACAGAGATT	ATCCTCCAC	ATACAATGTG	AAGGACATGC
1001	TTGTGCCGAC	TGCAGCTGAG	AGCGGGGGTC	ACGACTGGCT	TGCAGATGTC
1051	TACGACGTCA	ATATCTTACT	GACTCAGATC	ACCAACTTGG	TGTTCCATGA
1101	GAGCATTCGG	GAATGGGAGC	ATCTTGACTT	CATTGSGGCG	CTGATGCCCC

(配列番号5)

図2

【図 4 - 1】

p ALVIN-OVR1-I-SBC102-dSAの配列 (10882bp)

特徴	位置 (bp)
SIN LTR	521-693 (相補鎖)
OV DHSIIエンハンサー	1069-1720
Oプロモーター	2720-3851
イントロン	3899-5487
HLAL CDS	5505-6704
OV3'UTR	7169-7392
部分的 g a g CDS	7404-7557 (相補鎖)
LTR	7955-8300
アンピシリン耐性遺伝子	9764-10621 (相補鎖)

1	CTTCTCCCGCT	CAAGCTCTAA	ATCGGGGGCT	CCCTTTAGGG	TTCCGATTAA	GTGCTTTACG
61	GCACCTCGAC	CCCAAAAAC	TTGATTAGGG	TGATGGTTCA	CGTAGTGGCG	CATCGCGCTG
121	ATAGAGGGTT	TTTCCGCCCT	TGACGTTTGA	GTCCACGTTT	TTTAATAGTG	GACTCTTGTG
181	CCAAACTGGA	ACACACCTCA	ACCCATTCTC	GGTCTATTCT	TTTGATTAT	AGCGGAATTT
241	GCGATTTCGG	GCTTATTTGG	TAAAATAATG	CGGATTTTAA	CAAAAATTTA	ACGGGAATTT
301	TACAAATGAA	TTAAGCGCTT	CAATTCCAT	TGCGCATCA	GGCTGGCA	CTGTGGGA
361	GGGGATGCG	TGGCGGCTTC	TTGCTATTAT	GGCCAGCTGG	CGAAAGGGGG	ATGTGCTGCA
421	AGGCGATTAA	GTGGGTAAAC	GGCAGGGTGT	TCCCGATCAC	GACGTTGTAA	ACACGGCCGA
481	AGTGAGCGGG	TATTCCTTAA	CGATCAGCTC	GGGGTACCA	AATGAAGCCT	TCGCTGTCAT
541	GCATGTGCTC	TGATGTGCTC	GGGAATCAAC	GTGTCGGCGA	TCAACCCAGG	TGCACACCAA
601	TGTGGTGAAT	GGTCAAAATG	CGTTTATTTG	ATCGAGCTAG	GCACTTAAAT	ACAAATATCTC
661	TGCAATGCGG	AATTCAGTGG	TGTGTCCTAT	CCGTCCCTCT	CCCTATGCAA	AGCGAATATC
721	ACTATATTCCT	GAGGGGACTC	CTACCCCGCT	ACACCCGAGG	CCCGCTTTT	CGCTTAJACA
781	TGCTATTGTC	CCCTCAGCTA	AGCCTTGCCC	GTACACCC	GATTGCAAG	CCTTGCCCTC
841	CCACATTTAT	CCGTAGCTAT	ATTTCTCGAT	AGTCATCAGA	GTACAGAGAT	ATACTCTATG
901	CTGTAGCCAA	GTCTACAGT	TTACTATTCA	CGACCTCCTC	ATATTCCGGG	TGCCAGCGGA
961	TCAATTACCA	ATCCCAACAG	CTATCAGCAG	GAATACAGA	ACTCGCTCAT	GCTCTTCTGT
1021	CGGGCTGCTT	ATGAGCTCCG	TGTAATTTTT	TTATATTCTT	CGCTCGAGTC	TTCTCAGAAAT
1081	GGCACACACG	CGCTGCGAGA	AAATGCCACG	TGGACTATGA	ACTCATCTCC	AAAGAGCTT
1141	GACCTTGATC	CTGATTTTCT	TAAACAGGAG	GAACACAC	AATCCACCAA	ACACAGCTAG
1201	AGAGAAACCA	TCACTATTGG	CTACAGCTAG	AAAGTATGCA	ATGGCAATCC	ATTCGACATT
1261	CATCTGTGAC	CTGGGCAAAA	TGATTTTATC	TCCTATGAAT	GGTTGCTCTT	TTCCCTCATG
1321	AAAGGCGCAAT	TCCCAACTCT	ACAAATATGA	ACAAAGACAA	ACAGAGACAA	ATTAATGTGC
1381	TCCTTCTCAA	TGTTAAATAT	GTAGTGAGAG	AGAGGAGAAC	AAATATCTAA	TTCTCAGTGA
1441	GGTTTATATG	ATGCTTAAGG	AGGCTTTGAC	CTGTGAGCTC	ACCTGAGCTT	GTATATCTTT
1501	TGGATATAAA	GTGCTTTTCT	TAATTTCTAG	CTCTCGCTCT	TTTATATCAT	AGATCTGTGG
1561	TTTAGGAGCA	TGGGCAACAT	GAATGTCCCT	CGATAGGAAA	GGGCGACAGA	GCCTTAGCTG
1621	ACCTTTTCTT	GGGACACAGA	TGTGCAACAA	ATGTGTGACA	AAACTATTGG	TACTGCTTTG
1681	CACAGCTGTG	CTTGAGGACG	CAATCAATTC	CCACCTATCC	CAGTAATCTC	TCCACTGTGA
1741	AGAAGATTGT	TGCTTACTCT	CTGTAGACCC	CCAACTGATA	CCAACTATGC	AGGTATGTGC
1801	ACACATGATC	GATGACAGCC	TGTTCTGATC	AGAGTCTCAT	TGTGTCATGG	ACAAATTTCT
1861	TTCCTGTGAG	TGCTGCTTCC	ATTTGGGAAG	AGTGTAGTAT	ATCTCTCTCA	TCTGACAGAA
1921	AAGCAGAAAT	TCTCATCTGC	CCACATTAAT	CTCATTTGTT	TAAACCAACC	GGCTACTTCT
1981	TGGAGAGGAA	GAATGGCTCT	TATAGCTACT	ACAAAACAAA	GCTCTGCAAG	TCAAAATGCTAT
2041	ACAAAAGCTT	TCTGTAGGTC	TGGAATCAGG	ACACTATTGT	GAGTCAAAAT	AGAGCAGCTT
2101	TAAAAAGGCT	TGGGATCAT	TCTATCTTGA	TTTTCGACG	ACGATACTAT	GACAGTATTA
2161	ACTGACATAA	CTGCATCAAT	TTCTTTGATA	TTTTTATTTG	CTTAAAGTAC	GATGACATGA
2221	GATGAGACTA	AAGATGAGCA	TATGACTCAG	GTCTGGAGAG	GTCTGTGGTG	AGCATATGAT
2281	AAAGGAGGTA	AGGAGAGGCA	GATTTAGAGC	GTCTTGAAGA	GGCTCTGAGA	GAGGCTTCTG
2341	AGGACAGATT	GACTGACATA	GATGTACTGT	CCAACTCTCA	TATGTAGCAA	TGGAGGCTGT
2401	ATATTGAGAA	TAATTAAGAA	AATGGCTGTG	AACTCAAGT	GACCTGGAAC	AGAAAAGGGA
2461	TATGAGAGTA	AAATAATGTC	ACAGAACCTG	GGTTTATATG	ATATACCATG	GGCTCGCAGG
2521	GATCAGAGTG	GGTCAAGCTC	GGGCTCTCTT	GGGCTGCAAG	GAACCTTCTG	TCTACACCTG
2581	GAACACCTTG	TGGCCTCTCT	CGCACTAGCT	TCAGGCTCAT	TCGCTTCAAT	TTCTTCAATC
2641	TTTCTCATCT	ACCTCTCACA	GTACATCAAT	TACAGAGCTC	GTCTGCTCTC	TTCTGCTCTC
2701	CTGACGTACA	TCTAGCACTA	TAAATGCTTC	AGACTTGGCA	AGGAAATGAT	AGATTTCCAC
2761	AGTATATATG	TTTTACACAA	AGGAGGAGA	GAACAAAAG	AAATGGCAC	TGACTAAACT

【図 4 - 3】

6481	CCACATACAA	TGTGAGGAC	ATGCTGTGCG	CGACTGCAGT	CTGGAGCGGG	GGTCACGACT
6491	GGCTTGCAGA	TGCTTACAGC	GTCAATATCT	TACTGACTCA	GATCACCAAC	TTGGTGTTC
6501	ATGAGAGCAAT	TCCGGAATGG	GAGCATCTTG	ATCTTATTGG	GGGCTTGGAT	GCCTCTTGA
6561	GGCTTTATIA	TAAATATTAT	AATCTAATGA	GAATATTCGA	GTGATTCGAA	CGGGCGCAAA
6721	GAAGAGATTA	AGGATGAGCA	TGTGCTTCCA	AGACTGCTCA	GACACATCTG	AGATGATGAT
6781	TAAATATGAA	AGTATTGTAT	AGCTGCTCTG	CAGACTTATC	AGACTCTGGA	GTATATCTTA
6841	GAATAAATAA	CAGAAAGAAA	TACACTGTGG	GAACAGAGTG	CAATTCACCT	TTCCCTTACA
6901	CAGAGTAAAT	CTGTGAAGTC	ATGGATGAAG	ATGAAATTGG	ACTTCAACCT	AGCTTCAAGT
6961	CTGAGTCAAT	CCACTGAAAA	ATGACACCTG	ATACATCAGC	AGAAGGTTTA	TGGGGGAAAA
7021	ATGACGCTCT	ACAAATTAGC	CAGATATAGT	TATGACCAAG	GTCTCCAGA	GAGCTTCTGA
7081	CAAAATCTCT	CAGATTAAT	TATCAACTGT	CACCAACCAT	TCTTATGCTG	ACAGGCAAT
7141	TGCTTGTCTT	CGTGTTCCTT	GATACACAAA	GGCTCTTCTT	AGTTCGATTA	ATTTGCAATTA
7201	TAAAAATCTT	ATATATCTCA	TGTTCCTCTA	ATATGCTCTT	ATGTTGCTCT	ATGTTGCTCT
7261	ATATGGTATA	TATCTATTGA	ATTTGTCTTC	CTTGAACCA	TATGTAATGG	ATGTTGAGAA
7321	TGTGCTCTTT	TGTTCTTTTA	ATCAATAATA	AAACATGTTT	AGCAAAAC	CTCATCTG
7381	TAGTATTGTA	AGGTACCGGA	TCTCGAGCGC	CCCTTAATGC	CCCCAAAC	AATCCCGAG
7441	TTTTTAACTT	TCCCGATTTT	CCAAGTACCA	TAGCCCGCTG	AGAGAGCGCC	CGATTAATGG
7501	GATCCCGAGA	CCCGGGGAAA	TATAAGTCTG	AGGGGGAGCT	AGGCAACCTT	TCTTTTGTGA
7561	ACAGGGACAA	CATAGCCCTT	ATTTCTCTCT	TAGAAGGAGA	GGTTTTCGGC	CAATAGGCTC
7621	TACACCGGGA	CGAAATCACC	TTTATGACGG	CTTCCATGCT	TGATCCACCG	GGGAGCCGGA
7681	ATCACCGGGA	GCACCGGAAA	TGACGGCTGG	GGTGGACGCT	TGAGTGTGCG	GGTTTCTCTT
7741	CCGCTTCTCA	AGCATCTGCT	GAGCTCTGCG	TAGGGTATGT	TGCGGCTGCG	CAGTCACTCT
7801	CCCTCGAGAG	CCACTCAGCT	TCCTGCCCTC	TAGCGCCAGC	CCCCCTTAC	TAGGGCTCAT
7861	GTCCGCTCCC	CGAATAAGCG	AGACGGATGA	GGACAGGATC	GCCACGCGCG	CTGTGGCCGA
7921	CCACTATTCC	CTAACGATCA	CGTCCGGGTC	ACCAATAGAA	GCCTTCTGCT	TCATGCATGT
7981	GCCTGTAGTC	GTACGGGAAT	CAACGGTCCG	GCCATCAACC	CAGGTGCACA	CCAAATGTGG
8041	GAATGGTCAA	ATGGCGTTTA	TGTATCGAG	TAGGCACTT	AAATACAATA	TCTCTGCAAT
8101	CGGGAATTGA	CTGTGTGCTC	CAATCGTGTG	TAGACCGCTG	TGTTGCTCTG	CTAACAGGCG
8161	ACGATCATTC	CAGCATCATTA	CCACCTTACT	CCCAACATCT	GGCATGCAAG	GTGCTTTTTC
8221	TCTCTTATA	AGGCAAGTGG	CTACTCATC	GTACATAGAT	CATGTGCAA	GATCTACAGA
8281	GTATTGCTATA	AGACTACATT	TCCCTCTCCC	TATGCAAAAG	CGAACTACT	ATATCTTGAG
8341	GGGACTCTTA	ACCGGCTACA	ACCGAAGCCC	CGCTTTTCCG	CTAAACATGC	TATTTGCCCC
8401	TCAGTCAAGC	CTTCCCGGTT	ACAAACCGAT	TGCGAAGCCT	TGCCCTTCCC	ACATTATCCG
8461	TAGCATTAAT	TCTTAGCAGT	CATCAGAGCT	ACAGAAAGTA	CTCTATGCTG	TAGCCAAAGT
8521	TACAAGTTTA	CTATTACAGG	ACCTCCTATA	TTCCGCGTGC	CAGCCGATCA	ATTACCAATG
8581	CGCGCTTGGC	GTAATCATGG	TGATAGCTGT	TTCTGTGTGT	AAATTTGTTAT	CCGCTCACAA
8641	TTCCACACAA	CATACGAGCC	GGAAAGCATAA	AGTGTAAAGC	CTGGGGTGCC	TATAGAGTGA
8701	GCTAATCTAG	ATTATATTCG	TGCGCTCATC	TGCCCGCTTT	CCAGTGGGGA	AACTGTTCGT
8761	GGCAGCTGCA	TTAATGAATC	GGCCAAAGCG	GGGGAGAGAG	CGGTTTGGCT	ATTGCGGCGT
8821	CTTCCGCTTC	CGCTCTACT	CTGTGCTGCG	CGTCCGCTGT	TGCGCTTCCG	GGAGCGGATAT
8881	CAGCTCAGTC	AAAGCGGGTA	ATACGGTTAT	CCACAGATCT	AGGGGATTAAC	CGAGGAAAGA
8941	ACATGTGAGC	AAAGGCGGAC	CAAAAGGCCA	GAAACCGTAA	AAAGGCGCGG	TTGCTGGCGT
9001	TTTTTCCATG	GCTCCGCCCC	CCTGACGAGC	ATCACAAAAA	TGACAGCTCA	AGTCAAGAGT
9061	GGCGAAACCC	GACAGGACTA	TAAAGATACC	AGGCGTTTCC	CCCTGGAAGC	TCCCTGTGTC
9121	GCTCTCCGTT	TCCGACCCCTG	CCGCTTACCG	GATACCTGTC	GGCTTTTCTC	CTTCTGGGAA
9181	GGGCGGCGCT	TTCTCATAGC	GGTATCTTAC	GGTATCTTAC	TGCGGTGAG	TTGCTTGGCT
9241	CCAAAGCTGAG	CTTCAAGCTC	GACCCCGCG	TGCGGCGGCT	TTATCCGCTG	TTATCCGCTG
9301	ACTATCGCTC	TGAGTCCAA	CCGCTTAAGC	ACGACTTATC	GGCAGTGCA	CGACCACTG
9361	GTAAAGAGAT	TAGCAGAGCG	AGGTATGTAG	CGGCTGCTAC	AGAGTTTCTG	AAGTGGTGGC
9421	CTAACTACCG	CTACACTAGA	AGGACAGTAT	TTGATATCTG	CGCTTGTGCT	AAGCCAGTTA
9481	CTTCCGGAJA	AAAGATTGTT	AGCTCTTGAT	CGCGCAJACA	AACCAACGCT	GGTATCCGCTG
9541	GTTTTTTTTG	TGCAAGCAG	CAGATTACCG	CGAGAAAAA	AGGATCTCAA	GAGATCTCTT
9601	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	GAGCTCAGT	GGAACGAAAA	CTACGTTTAA	GGGATTTTGG
9661	CTCATGAGAT	ATCAAAAGAG	ATCTTCACCT	AGATCTCTTT	AAATTAATAA	TGAGATTTTA
9721	AATCAATCTA	AGATATATCT	GAGTCTGATC	TACCAAGGCT	TTATCCGCTG	TTATCCGCTG
9781	AGGCACCTAT	CTCAGCGATC	TGTCATTCTT	GTCTATCCAT	AGTGTCCGTA	CTCCCGCTCG
9841	TGTAGATAAC	TACGATACCG	GAGGCGTTAC	CATCTGGGCT	CAGTGTGCA	ATGATACCGC
9901	GAGACCCACG	CTCACCGGCT	CCAGATTAT	AGCAATAJAA	CCAGCCAGCC	GGAGAGGCGC
9961	AGGCGAGAGT	TGTTCTTGCA	ACTTTATCCG	CTCCATCTCA	GCTTATTAAT	TGTTGCGCGG
10021	AAGCATAGAT	AAAGATTGTC	CCAGTTAATA	GTTTGCGCAA	CGTTTGTGCC	ATGCTAACAG
10081	GCATCGTGGT	GTACAGCTCG	TGCTTTGGTA	TGCTTTCATT	CAGCTCCGGT	TCCCAAGCAT

【図 4 - 2】

2821	TCAGCTAGTG	ATTAAGGAAA	GTAATTCGCG	TAAACAGAGA	TTCGAGTGAT	CTCTATGTAT
2881	GTCTCGAAGA	ATTAATGTTG	ACTTTTTTCC	CCCATTTTTA	AATCAACAGC	TGCTTTACAG
2941	AGGTCAGAAAT	GGTTTCTTTA	CTGTTTGTCA	ATTTCTATTAT	TTCAATACAG	ACCAATAGCT
3001	TCTATAACTG	AAATATATTT	GCTATTGTAT	ATTATGATTG	TCCCTCGAAC	CATGACATCT
3061	CTCCAGCGTG	AATTTACAAA	TTCTCTGTCT	ATCTGCCAGG	CCATTAAAGT	ATTCTATGAA
3121	GATCTTTTGG	GAACACTGCA	AGTTCATATC	ATAAACACAT	TGGAATTTGA	GTATTTGTTT
3181	GCATTTGAGT	GAATCTGATC	TGCTGATATC	CTCAGATATA	AGTTTGTATA	TAGGATCTAT
3241	ACACCCATAA	AAAGATAGAT	TAAATATAGG	CAACTATAGG	AAAGAAAGTG	TGCTGTGCTCT
3301	TCACTCTAGT	CTCAGTTGCG	TCCCTCACAT	GCACGCTTCT	TATTTTCTCT	TATTTTGTCA
3361	AGAAAATAAT	AGGTCAAGTC	TGTTTCTCAT	TTATGTCCCTG	TCTAGCGTGG	CTCAGATGCA
3421	TATGTATGAT	ACAAGAGAGA	TCAATGTAAA	CAGACTTCTG	GTCTGTACT	ACACCATATG
3481	TAATAAGCAG	ACTAACTAAT	AATGCTTAAT	TATGTTTTCC	GTCCCAAGG	TCCCAACATT
3541	TTTCTGTGTT	CTAAAGATCT	CCATTATCTG	GTGTAAGCT	AGGCTCAATG	GAACATGAGC
3601	AATATTTCCT	AGTCTTCTCT	CCCATCCAC	AGTCCGTATG	GATTTCAGCA	ACAGGACGAA
3661	AACACATTGT	TACCCAGAAAT	TAAAACTAAA	TATTTGCTCT	CCATTCAATC	CAAAATGGAC
3721	CTATTGAAC	TAAATCTTAA	CCCAATCCCA	TTAAAAGATT	TCTATGTGTT	AGAAAGCTCA
3781	ACTTCTGAAG	GGAACTCTGG	GGTGGGCTAC	AATTCAGACT	ATATATTCCT	CAGGCGCTCA
3841	CAAGTCTCTG	TACTATACAG	TAGAAAGCTG	TATTTGCTTT	ASGACTCAG	CTCGAAGGCT
3901	AAGCAACTCT	CTGGAATTAC	CTTCTCTCTA	TATGACTCTT	TACTTGCACC	TAAACTTTAA
3961	AAATTAACAA	ATTAATTGTC	TATGTGTTGT	ATCTTTAAGG	GTGAAGTACC	TGCGTGATAC
4021	CCCTATAAAA	AACCTCTCAC	CTGTGTATCG	ATTTGCTGACT	ATTTTATTAT	GTGTAAAGGC
4081	TTTGTGTTTG	TTTTCAGGAG	GCTTATCTCT	TGTTGTAAA	ATATGTTTTT	AATTTACAGAA
4141	CATCTTATCC	TGCTGCTTAC	TATCTGATAT	TGCTGTGATT	TGTTCTGATG	ATTCTCTAGG
4201	CTCAGAGAGT	GCACAGAGAG	CAAAATCATG	GTGTCTAGT	AATCTGGGG	AGTTATTTTA
4261	ATGTGAAAAAT	TCTTAGAGAG	TTTAATTCTC	GCAAAGTGCA	GATCTGTAGC	ATCCACAGAT
4321	ATAAAAAATG	GGGGGGTGCA	TAAAGCTATA	TCTTCAACT	ATAAGATATA	TGTGACTATA
4381	TATACAGAAA	AGAAAATGAG	AAAAATGTGT	GTGTGATATC	TACACACAGT	GTCAGTAAAG
4441	AATTTTGGG	AGTCTGATC	AATCTGAGG	CCCCAGCAT	CCCCAGCAT	CATGACGAT
4501	ATAAAGGCT	GGGCTCTGAA	GGAATCTGTA	CTTTCACAGA	TATATAAAT	CTCAGAAAG
4561	CAACTAGATT	CATCTGAGCT	CCAAAAGTGT	TGCTTATAT	AAGCAGACTG	GTATACAAAT
4621	AGTTGTACAG	TTGAGCTCTT	TATAATAGAA	ACAGACAGAA	CAAGTATATA	TCTTCTATTG
4681	GTCTATGCA	TGAACAGAAA	TTCATTGACT	GGCTCTGTTT	TATAGTAAAC	TTGCTGATTT
4741	TATCATGCT	GCATTTCTCT	TCTGTCTGAA	TGTCACACT	AAAAATTAAT	TCCACAGAAA
4801	GTTTATACTA	CAGTACACAT	GCATATCTT	GATCAAGGTA	AACCATTAAC	GTGCTGATTA
4861	TAGAGACAGAA	TATGAATTAC	ATGCGTGTCT	TCTCTTAGA	CTCATGACC	CCATATAAAT
4921	TACATTCCTT	ATCTTATCTG	CATACACAAA	AAACAAAGTA	AAAAATCTT	TGAGACTCTA
4981	CTCATAGCAA	GTAGTGTGCA	ACAAACAGAT	ATTTCTCTAC	ATTTATTTTT	AGGGAATCAA
5041	ATTAAGAAAT	AGTCTGATCT	GTCTGCTCAT	GTCTGCTCAT	GTCTGCTCAT	GTCTGCTCAT
5101	TTTACTGAAA	TGTGCTCTTT	GAATTTCCAG	TTTGGCAGC	CTATGCTTAA	GTTGTTTAAT
5161	CAGAGTGTCT	GAAGAATATC	AATGAATCT	AGCTTCACT	GAACAAAAAT	ATGTAGAGCG
5221	AAGTGGCTTC	TGGGACGATT	TGCTACCCAA	AGAGCAGTAT	CATTAATAA	CATTAATAA
5281	TTTATGAATA	TGGTTTTGAA	CATGACAGAT	AGAGGTGGAT	TATAGACAGC	ACACATATCC
5341	ACAGAAATAC	TTTAAACATA	CTTGTATACA	TTTATTTGCC	TAACAACTGC	TGCTAATTTA
5401	CTGTTGTAGC	CTACATAGTA	GTACCTTGCA	TGTCATAGT	TACAGACTAT	CATCTCTTCC
5461	TTTTACTGTA	TCTGCTGTTT	GCTCTAGACA	GCACCATATT	CACCATGAAA	ATGCGTTTCT
5521	TGGGGTTGTT	GGTCTGTTG	GTCTCTGGA	CCCTGCATT	CGAGGGGCTC	GGAGGGAATC
5581	TGACAGCTGT	GGATTCAGAA	ACAAACAGAT	ATGTCAGTGA	AATTTATCTT	TACTGGGAT
5641	TCCCTTAGTA	GGAATACATA	GTGAGACAG	AGATGTGCTG	TATCTGTGTC	CTTACAGGAT
5701	TCTCTATGCG	GAGGAGAGAC	CACTTCTGAC	AAAGTCCCAA	ACAGGTTGCT	TCTCTGCAAC
5761	ATGGCTTGCT	GGCAGATTCT	AGTAACTGGG	TACAAACACT	TGCCACAGCT	AGCGTTGCACT
5821	TCATTCTTGC	TGATCTGTGT	TTTGACGTTG	GAGATGGCCAA	CAGCAGAGGA	AATACTGGT
5881	CTCGGAAACA	TAGAGACATC	TCAGTCTTCT	GGATGTGAGT	CTGGGCTCTT	AGTTATGATG
5941	AGATGGCCAA	TATAGATCTA	CAGCTCTCCA	TATGCTTCAT	TCTGAATGAT	ATCGGCCAGC
6001	AACAAGATGA	TTTATGGGCT	AGATCTCAAG	GCACCATCT	AGGTTTATTA	GCATTTTCAC
6061	AGATGCCCTGA	GCTGGGCTAAA	AGGATATAAA	TGTTTTTGGC	CTCGGGGCTG	GTGGTCTTAT
6121	TGCGGCTTCT	TATAGACTCT	ATGSCGCAAT	TGTTGCTGACT	TGCTAGTACT	CTCATTAAGG
6181	AGGATGCTCT	AGGATGCTCT	AGGATGCTCT	AGGATGCTCT	AGGATGCTCT	AGGATGCTCT
6241	ACGTTTGAAC	TACTGTGCTA	CTGAAGAGG	CTTCTGTGAA	TCTCTGTCTT	CTTCTGTCTT
6301	GATTTATAGCA	GAGAAATTTA	ATGATTGCTA	GAGTGGGAAT	TATGACAACA	CATTTCTCTG
6361	CTGGAACCTT	CTGTGCAAAAC	ATGTTCAGAT	GGAGCCGAGC	TGTTAAATCT	CAAAATGTTT
6421	ACAGCTTTTG	CTGGGGAAGG	AGTGGCAGAT	TATATTTTCA	TATACAACAG	AGATTGCTCT

【図 5 - 1】

プロウイルス領域のDNA配列(7780bp)

特徴	位置 (bp)
SIN LTR	1-173 (相補鎖)
DHSEIIエンハンサー	549-2200
O.Vプロモーター	2200-3331
イントロン	3379-4967
HLAL CDS	4985-6184
OV 3'UTR	6199-6872
部分的 g a g CDS	6884-7137 (相補鎖)
LTR	7435-7780 (相補鎖)

1	AATGAAGCCT	TCGTCTTCAT	GCAATGTGCT	GTAGTCGTCA	GGGAATCAAC	GGTCCGGCCA
61	TCACCCGAGG	TGCACACCAA	TGTGGTGAAT	GGTCAAAATGG	GGTTTATTGT	ATCGAGCTAG
121	GCCTTAATAA	ACAAATATCT	TGCAATGCGG	AATTCAAGTGG	TCGTCCCAAT	CGGTCCCGCT
181	CCCTATGCAA	AAGCGAAACT	ACTATATCCT	GAGGGGACTCG	CTAACCGGCT	ACAAACGAG
241	CCCGCGTTTT	CGCTAAACAA	TGCTATATGT	CCCTCAGTCA	AGCCTTGCCC	GTACAAACCC
301	GATTGCGAAG	CTTGCCTCCT	CCCACTATAT	ATTTCTTAGC	AGTCATCAGA	AGTCATCAGA
361	GCTACAGAGG	ACTATCTATG	CSTGAGCCAA	GTCTACAGAT	TTACTATTCA	GGAGCCGACT
421	ATATTCGCGG	TGCCAGCCGA	TCAAATPACA	CTATACACAG	CTATACACAG	GAATACAGAA
481	ATCTGCGCTAC	GCTCTCTTCT	CGGGCTGCTT	ATAAGCCTCC	TGTAAATTTT	TTATATTCTCT
541	CGCTCGAGTC	TCTTCAGAT	GGCACAGCAC	CGCTGACGAA	AAATGCCAGG	TGGATATGTA
601	ATCATCACATC	AAAGAGCCTT	GACCTGATAT	CTGATTTTCT	TCAAACAGAG	GAAACACAC
661	AATCCACAAA	AACAGCTCAG	AGAGAAACCA	TCATCATATG	CTACAGCACC	AAGGTATGCA
721	ATGGCAATCC	ATCTGCATCT	CATCTGATAC	CTGAGCAAAA	TGATTTATCT	CTCCATGAAT
781	GGTTGCTTCT	TTTCCCTCAT	AAAAGGCAT	TTCCACATCT	ACAAATATGCA	ACAAAGACAA
841	ACAGAGACAA	ATTAAATGTG	TCCTTCTCTA	TGTTAAATTT	GTATGGCAA	AGAGAGAGAC
901	AAATCTCAA	GTCTGAGTA	GGTTTATGTA	ATTGATATAG	AGGCTTTGAC	CTGTGAGCTC
961	ACCTGGACTT	CAATCTCTTT	TGGATAAAJA	GTGCTTTTAT	AACCTTCAGG	TCCTCGAGTC
1021	TTTATTCATG	AGACTGTGGT	TTTAGGGACA	GACCCAAAT	GAAATGCCTG	GCATAGGAAA
1081	GGGACAGCAG	GCTTAGCTGT	ACCTTTCTTT	GGGACAAACA	TTGTCAAACA	ATATGTGATA
1141	AAACTATTTG	ATCTGAGTTC	CACAGCTGTC	TGCGGACGGG	CAATCCATGT	CCACCTATGC
1201	CAGGTAACTC	CTACAGCTGA	AGAAAGATTG	TGCTTACTCT	CTCTAGCCAG	CCAAATGAAA
1261	CCAACTATGC	AGGATATGCT	AGACATGATC	GATGACAGCC	TGTTCTGATC	AGATATCTAT
1321	TGTTTCATGG	ACAAATTTTG	TGCTTTGACG	CTGGCTTCTC	ATTGSGAAGG	AGTGTAGTAT
1381	ATCCTCTCAA	TCGTGACAGA	AGCAGAAAT	TCTCATGCTC	CACATCTAAT	CTACATCTAAT
1441	TTAAACCAAC	GGCTACTTCT	TGGAGAGGAA	AAATGCTTTT	TATAAGCTCT	ACAAACAAJA
1501	GCTCTGCAAG	TCAAATGCAAT	ACAAATAGCT	TCTGTAGGTC	TGGAATCAGG	ACACATATGTG
1561	GAAGTCAAA	AGAGCAGTGT	TAAAGAGCTT	TGGGATCAT	TCCTCATCTA	TTTTATTGTT
1621	ACGATACAT	GACAGTGAT	ACTGACATTA	CTGCTATGTA	TTCTTTATTT	TTTTATTGTT
1681	CTTAAGATAC	AGACGATAGA	GATGAGGACA	AGATAGGACA	TATGACTCAG	GTCTGACAG
1741	GTCCGTGGTC	CATGTATGAT	AAAAGAGATG	AAGGGAAGGA	GAATGTAGAC	TGCTTAGAAA
1801	GGGCTTCAGG	GAGGCTCTGA	AGGCAAGATT	GACTGAATCA	GATGACTGTG	CCAAAGTCTA
1861	TATGTAGCAA	TGGAAGGCTG	AAATGAGGAA	AATGTAGGAA	AATGTAGGAA	AACTCAAAAT
1921	GACCTCGAAC	AGAAAGGGGA	TATGGATGTA	AAATATATGT	ACAGAACTGA	GGTTTATATG
1981	ATATACCATG	GCTTGCAGAG	GGTCGAGGTA	GTCCACATAG	GGCCTCTCTT	GGGTCGAGG
2041	GAATCTCTGT	TCTACACCTG	GAACCACTCC	TGCCCTCTCT	CGCCTGACCT	TCAGTGTCTAT
2101	CAGGGCTGTG	TTCTCTACAT	TTTCTCAGTC	ACCTCTCCCA	ACTAGCATGT	TACAGCATGT
2161	GTCTTACAT	GTCTCTCTCT	CTGAGGTACA	TCTAGCATCG	TTAAGTCTCT	AGACTTGGCA
2221	AGGAGATAGT	AGATTTCAC	AGATATATGT	TTTTACAAA	AGGAAGGAGA	GAACAAAGAG
2281	AAATAGGCA	TGACTTAAGT	TACAGTAGTG	GTATAGGAAA	GAATTTCTCT	TTAAACAGAT
2341	TTGCTAGCAA	CTCTATATGT	GTCTGAGGAA	ATTATGTTGT	ACTTTTCTCC	CCCATATGTA
2401	ATCAAAACAG	GCTTCTGAC	AGGTCAGAT	GGTTCTTTA	CTGTCTGTCA	ATTCTAGTAT
2461	TTCAATACAG	ACAAATAGCT	TCTATAAGTC	AAATATATTT	GCTATTTGAT	ATTATGATTT
2521	TCCTCTGAAC	CATGAACTCT	CTCTCAGCTC	AATTTACAAA	TTCTCTGTCT	ATCTGCGACT
2581	CCATTAAGTT	ATTATAGGAA	GATGTTTGG	GAACACTGCA	AGTTCTATAT	ATAACACAT
2641	TTGAAATGTA	GTATTTGTTT	GCAATGTATG	GAGCTATGTT	TGCTGTATCT	CTCAGATGTA
2701	AAATTTGTTA	TAAAGATTTT	ACACCCATTA	AAAGATAGAT	TAAATATTTT	CAACTATAGG
2761	AAAGAAAGTG	TGTGCTGCTT	TCACCTAGAT	CTCAGTTGCT	CTGCTTCACT	GACGCTTTCT
2821	TTATTTCTCC	TATTTTGTCA	AGAAATATAT	AGGTCAGGTC	TTGTTCTCAT	TTATGTCCTG

【図 5 - 3】

6541	CTGCTCAGAA	ATTAGTCACT	CAAAAATCTCT	CAGATTAAT	TATCAACTGT	CACCAACCAT
6601	TCTATGCTG	ACAAGGCAAT	TGCTTGTCTCT	CTGTGTTCTCT	GATACATCAA	GGCTTGTCTCT
6661	GACTTCTCAA	AGATGCAATTA	TAAAAATCTT	ATAATTCACA	TTTCTCCCTA	AACTTTTGACT
6721	CAATCATGGT	ATGTGCGCAA	ATATGGTATA	TTACTATCTA	AAATGTTTTT	CTTGTACCCA
6781	TATGTAAATG	GCTCTGTGAA	TGTCTCTTTT	TGTTCTCTTA	ATCATATAAA	AAACATGTTT
6841	AGCAAAACAC	TTTTCACTGT	TAGTATTGTA	AGGTACCGGA	TCTCGAGCCG	CCCTCAATGT
6901	CCCAAAAGC	ATCTCCAGG	TTTTCATCT	TCCCGATTTT	CCAAATACCA	TAGCCGCTGT
6961	AGAGAGCGCC	CGGCTAATG	GATCCGAGGA	CCCGCGGAG	ATATAGCTTG	AGGCGGAGCT
7021	AGCAACCCCT	CTCTTTTGTG	ACAGGAGGAA	CATAGCCCTT	ATTCTCTCTT	TAGAAAGGCT
7081	GGTTTTCGCC	CAATGATGCT	TACAGCGGGA	CGAAATCACC	TTTATGACCG	CTTCCATGCT
7141	TGATCCACCG	GGGACGCGGA	ATCAGCGGGA	CGAACCGGAA	TCACGCTCGG	GGTGGACCGG
7201	TGAGTGTGCG	GGCTTCTCTT	CGGCTTCCGA	ACGACTCTCG	GAGTCTCTGG	TAAAGCTATG
7261	TGCGCCCTCT	CAGTAGGGCT	CCCTCCGAGC	CCACTCAGCT	TCTGCGCTCT	TAGGCCGAGT
7321	CCCGCTCTAC	TAGGGTCACT	GTCCGCTCCC	CGAATTAAGG	AGACGGATGA	GGACAGGATC
7381	GGCAGCGCCG	CTTGGCGCGA	CCACTATCTC	CTAACGATCA	CGTCCGGGCT	ACCAAAATGA
7441	GGCTTCTGCT	TCACTGATGT	GTCTGCTAGT	CTCAGGGAGT	CAACGGTCCG	GGCATCAACC
7501	CAGGTGCACA	CCAAATGGGT	GAATGGTCAA	ATTGGCTTTA	TTGTATCGAG	CTAGGCACTT
7561	AAATACAAATA	TCTCTGCACT	CGGGAATTTA	GTGGTTCGTC	CAACTCGGTG	TAGACCCGTC
7621	TGTTGCTCTC	CTAACAGGCG	ACGATCATCA	CACGATCTAT	CCCCCAATCT	CCCAATCTAT
7681	GGCATGCAAC	GTGCTTTTTC	TCTCTTATTA	AGCATGTTG	CTACTCATCT	GTTCATAGG
7741	CATGTTGCAA	GACTACAAGA	GTATGTCATA	AGACTACAT		

(配列番号7)

図 5

【図 5 - 2】

2881	TCTAGCGTGG	CTCAGATGCA	CATTGTACAT	ACAAGAAGGA	TCAAATGAAA	CAGACTTCTG
2941	GTCTGTTACT	ACAACCATAG	TAATAAGCAC	ACTAACTAAT	AATGTGTAAT	TATGTTTTCT
3001	ATCTCCGAGG	TTCCCAACTT	TTTCTGTTTT	CTTAAAGATC	CGATTATCTG	GTGTTAACTG
3061	AGGCTCAATG	GAACATGAGC	AATATTTCCT	AGCTCTCTCT	CCCATCCAAC	AGTCTCGATG
3121	GATTAGCAGA	ACAGGCGAGAA	AAACACATTG	TACCCAGAT	TACCCAGAT	TATTCCTGAT
3181	CCATTCAATC	CAAAATGAGC	CTATTGAAC	TAAATATCTA	CCCAATCTCT	TTAAATGATT
3241	TCATATGCTG	CAAGAGTCAA	ACTCTGAGG	CTCCTGAGG	GTGCTGCTAC	ATCTGCAACT
3301	ATATATTCCC	CAGGCTGCTG	CCAGTGTCTG	TACATACAG	TAGAAAGCTG	TATTTGCTTT
3361	AGGAGCTCAAG	CTCGAAAGGT	AAGCAACTCT	CTGGAATATC	CTTCTCTCTA	TATTTGCTCT
3421	TACTTGCACC	TAAACTTTAA	AAAATTAACA	ATTATTGTGC	TATGTTGTTG	ATCTTTAAGG
3481	GTGAAGTACC	TGCGTGATAC	CCCCCTATAA	AACTCTCTAC	CTGTGTATGC	ATTTCTGCACT
3541	ATTTTATTAT	GTGTAAGAGC	TTTGTGTTTT	TTTTACAGAG	CTATTTCTTT	TGCTTTTAAA
3601	ATATGTTTTT	AATTTACAGAA	CATCTTATCC	TGTCGTCTAC	TATCTGATAT	CGTTTGCAGT
3661	TTGCTTGATT	AACCTCTAGC	CCTACAGAGT	GCACAGAGAG	CAAAATCATG	TGCTGACGTG
3721	AATCTCGGGG	AGTTATTTTA	ATGTGAAAT	TCTTAGAAG	TTTAATTCCT	GCAGAGTGCA
3781	GGTCTGATC	ACTACACAG	ATAAAATATG	GGGGGTGCA	TAAACGTATA	TTCTTACAT
3841	AATAGATACA	TGTGAACATTA	TATACAGAAA	AGAAATGAG	AAAAATGTTG	GTGTGTATAC
3901	TCACACAGT	GGTCAGTAAA	ACTCTTGAG	GGGTTTATA	CAGAAATCTC	AATCTGAGG
3961	CCCGACAGC	CATAGCGAT	ATAAGGGCT	GGGCTCTGGA	GGGCTCTGGA	CTTTACAGAG
4021	TTATATAAAT	CTACAGAAAG	CAACTAGATT	CTACTGCTCT	CCAAAGCTG	TGCTTTATAT
4081	AAGCACTGCT	GCTATACAA	AGTTGTACAG	TATGATGCTT	TTAATATAGA	ACAGACAGAA
4141	CAAGTATAAA	TCTTCTATTG	GTCTATGTCA	TGACAAAGAA	TTCAATCAGT	GGCTCTGTTT
4201	TATAGTAAAC	ATTGCTATTT	TATCATGTCT	GGATCTGCT	TGCTCAGACT	TGCTCAGACT
4261	AAAATTTAAT	TCACAGAAA	GTTTATACCT	CAGTACACAT	GCATATCTTT	GAGCAAGAGA
4321	ACCATATACCT	GAAAGTGCAA	TAGAGCAGAA	TATGAATTAC	ATGCGTGCTCT	TTCTCTAGTA
4381	CTCATAGACC	CCATATAAAT	ATCTATCTCT	ATCTATCTCT	CACATCACC	ACAAAGCTG
4441	AAAATACTTT	TGAAGATCTA	CTCATAGCAA	CCAAACAGAT	AAAAACAGAT	ATTTCTCTAC
4501	ATTTATTTTT	AGGGAATAAA	AATAGAAAT	AAAATAGTCA	GAAGGCTCTT	GCTTTCTCAT
4561	ATATCTGTCC	AAACCTAAGG	TTTATGAAA	TTTCTGCTCT	GAATTTCCG	TTTTGCAAGC
4621	CTATACGAT	GTTTATTAAT	CAGAGTACT	GAAGATGATC	AATGATCT	ACCTTTACT
4681	GAACAAAAT	ATGTAGAGG	AACTGGCTCT	TGGGACATTT	TGCTACCCAA	AGACACATG
4741	AATGCAAAAT	CATAAATAGA	TTTATGAAT	TGGGTTTGA	CATGCAACAT	AGAGGTTGAT
4801	ATAGCAACAG	ACACATATCC	ACAGAAATAC	TTTAAATCTA	CTTGTTAACA	TTTAAATGCC
4861	TAAACAACTG	TCGTAATTTA	CTGTGTAGC	CTTACATAGA	GTACCTCTGA	TGGTACTATG
4921	TACAGCATTC	CATCTTTACA	TTTCACTGT	CTGCTGTGT	GTCTTAGAGA	ACTCAGAGTT
4981	CACCATGAAA	ATGCGGTTCT	TGGGTTGTTG	GGGCTGTTG	GTCTCTAGCA	CCCTGACTTC
5041	CGAGGGGCTC	GGAGGGAAC	TGACAGCTGT	GGATCCAGAA	ACAAACATGA	ATGTCAAGTA
5101	AATATCTCT	TACTGGGAT	TCCCTATGTA	GGATACCTA	CTTGAAGAGA	AGATAGGATA
5161	TACTTGTGCT	CTTAACCGAA	TTCTCTATGG	GAGGAAGAG	CATTTCTGCA	AGGTCGCCAA
5221	ACAGTTTGTG	TTCTCTGCA	ATGCTTGTCT	GGGAGATCT	AGTAACTGGA	TCGCAAACTT
5281	TGCTCAAGC	AGTATCTCT	TCAATCTGCT	TGACCTGCT	TTGACCTGCT	GGGCTGCTG
5341	CAGCAGAGGA	AACTACTGCT	CTCGGAACCA	TAGACACTCT	TAGACACTCT	AGGATTAATT
5401	CTGGGCTTTC	AGTTATGAT	AGATGGGCAA	ATATGACCTA	CCAGCTTCCA	TTAATCTTCA
5461	TCGTAATAG	ACTGGCCAG	AACAAGTGT	TTATGTGGT	CATTTCTGAG	GCACACTAT
5521	AGTTTATTATA	GCAATTTTCA	AGATCCCTGA	GGTGGCTAAA	GGTGGCTAAA	TTTTTTTGGC
5581	CGGAGGTCTC	GTGGCTTCCG	TGCGCTTCTG	TACTAGCCCT	ATGGCCAAAC	TGGGACGACT
5641	CCCATGACAT	CTCATTAAGG	ACCTCTTTGG	AGACAAAGCA	TTTCTTCCCC	AGAGTGGCTT
5701	TTTGAAGTGG	CTGGGTACCC	ACGTTTGATC	TGCTCATATA	CTGAAGAGG	CTGTGGGAAA
5761	CTTCTGTTT	TTTCTGTGTC	GATTAAATGA	GAGAAATTTA	AGTGTCTCTA	TACTGTCTGT
5821	GTATACACA	CATTTCTCTG	CTGGAACCTC	TGTCGAAAC	ATGTTTACAT	GGAGCCGAGC
5881	TGTTAAATTC	CAAAAGTTTC	AGGCTTTGGA	CTGGGGAAGC	AGTGGCAAGA	ATTATTTTCA
5941	TTACACAGC	AGTATCTCT	CCACATACAA	TGTCAGGCT	ATGCTGTGCT	GGGCTGCTG
6001	CTGAGCGGG	GGTCAGCAT	GGCTTGCAGA	TGCTACAGC	GACATATCT	TACTGACTCA
6061	GACTACCAAC	CTTGTGTTCT	ATGAGAGCAT	TCGGAATATG	GGCATCTTCT	ACTTATTTTG
6121	GGGCTGGAT	GGCCCTTGA	GGCTTTATA	TAAATGATT	AATCTATGTA	GGAAATATCA
6181	GTGATTGGA	GGGCGCGCAA	GAAAGAACT	GGCCCTTCCA	ACAAAGTCCA	ATGATATCCA
6241	GAGCATGTA	GTATCAGGGG	TAAATGAAA	AGTATGTTAT	CTGCTGATCT	CAGACTTTAT
6301	AAAGACTTGA	GCTTAATCTA	GAAAGAAAT	CAGAAAGAAA	TTTACTGTGT	AGAACAGGTC
6361	CAATTCATCT	TTCTTTTACA	CAGAGTAAAT	CTGTGATCT	ATGATGAGG	CGTTAAGGGA
6421	ATGAAATGG	ACTCAGATG	ATGATGATC	CTGAGTAAA	ATCATACCTG	ATCATACAG
6481	AGAGAGTTTA	TGGGGGAAA	ATGAGCTTT	CCAAATTAAG	CAGATATCTG	TATGACCAAG

【図 6 - 1】

pALVIN-OV-1, 1-1のDNA配列(10762bp)

特徴	位置 (bp)
スタッフター	1-2734
OV 3'UTR	2750-3423
部分的 g a g CDS	3435-3688 (相補鎖)
LTR	3986-4331 (相補鎖)
アンピシリン耐性遺伝子	5795-6652 (相補鎖)
SIN LTR	7434-7606 (相補鎖)
O.Vプロモーター	7975-9106 (相補鎖)
イントロン	9154-10742
オポアルブミンまたはPOI	10760-10762

1	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
61	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
121	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
181	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
241	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
301	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
361	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
421	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
481	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
541	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
601	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
661	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
721	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
781	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
841	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
901	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
961	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1021	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1081	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1141	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1201	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1261	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1321	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1381	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1441	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1501	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1561	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1621	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1681	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1741	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1801	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1861	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1921	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1981	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2041	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2101	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2161	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2221	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2281	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2341	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2401	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2461	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2521	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2581	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2641	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2701	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2761	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2821	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2881	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
2941	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3001	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3061	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3121	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3181	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3241	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3301	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3361	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3421	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3481	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3541	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3601	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3661	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3721	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3781	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3841	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3901	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
3961	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4021	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4081	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4141	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4201	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4261	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4321	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4381	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4441	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4501	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4561	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4621	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4681	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4741	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4801	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4861	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4921	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
4981	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5041	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5101	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5161	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5221	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5281	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5341	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5401	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5461	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5521	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5581	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5641	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5701	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5761	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5821	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5881	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
5941	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6001	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6061	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6121	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6181	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6241	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6301	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6361	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6421	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6481	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6541	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6601	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6661	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6721	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6781	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6841	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6901	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
6961	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7021	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7081	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7141	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7201	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7261	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7321	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7381	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7441	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7501	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7561	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7621	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7681	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7741	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7801	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7861	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7921	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
7981	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8041	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8101	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8161	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8221	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8281	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8341	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8401	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8461	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8521	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8581	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8641	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8701	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8761	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8821	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8881	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
8941	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9001	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9061	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9121	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9181	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9241	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9301	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9361	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9421	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9481	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9541	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9601	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9661	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9721	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9781	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9841	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9901	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
9961	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
10021	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
10081	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
10141	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	

【図 6 - 2】

```
2821 AAGTATGTTA TCTGCTGCAT CCAGACTTCA TAAAAGCTGG AGCTTAATCT AGAAAAAATA
2881 TCAGAAAGAA ATTACACTGT GAGACAGGTG GCAATTCATC TTTCCTTTAC ACAGAGATAT
2941 ACTGGTAATC CATGATGAAG GGCTTAAGGG AATGAATTTG GACTCAGACT ACTGAGTTCAT
3001 CACACTGAAG AATGCAACCT GATACATCAG CAGAGAGTTT ATGGGGGAAA AATGACAGCT
3061 TCCAAATTAAG CCAGATATCT GTATGACCAA GCTGCTCCAG AATTAGTCAC TCAGAAATCTC
3121 TCAGATTAAG TTATCAACTG TCACACACCA TTCTATAGCT GACAGAGCAA TTGCTGTGTC
3181 TCTGTGTTCG TGAATCACTCA AGGCTATCTC TGACTTCTTA AAGATGCAAT ATAAAAATCT
3241 ATAATATTCAT ATTCTTCCTCT AAACCTTGAC TCAATCATGG TAGTGTGGCA AATAGATGAT
3301 ATTACTATTC AAATGTTTTC CTCTGTACCC ATATGTAAATG GGTCTGTGTA ATGTGCTCTT
3361 TTGTTCCTTT TGTTCCTTTC TTATGATTAATA AAAACATGTT TTCTTCACTT CTGATATTTG
3421 AAGGTACCGG ATCTCGAGCC GCCTTCAATG CCCCCAAAAC CAATCCCCAG GTTTTTAACT
3481 CTCCCAGATT TCCAAGTACC ATAGCCCGCT GAGAGAGCGC GCGGTAATG GGTATCCAGG
3541 ACCCGGGGGA ATATAGTCTC GAGGGGGAGC TAAGCAACCC TTCTTTTGT ATACAGGAGA
3601 ACATAGCCCC TATTTTCCTC TTAGAAGSAG AGGTTTTCOC GAAATAGGTC TTACAGCGGG
3661 AGCAATATCC CTTTATAGCG GCTTCATGSC TTGATCCATC GGGGACCGGG AATCACGAGG
3721 AGCAACCGGA ATCAGCCGCTG GGGTGGACGC CTACGTCGTC GGGCTTCCTT CCGCTCTTCC
3781 AACGACTCTC TGAGTTCCTG TAGGGTATG TTGGCCOCTT GCAGTAGGGC TCCCTCGACG
3841 CGCACTCAGC TTCTGGCCTC CTAAGCGCGA GCGCCCTCTA CTAGGGTCAAT CGCTCGCTCG
3901 CGCAATTAAG GAGACGAGAT AGGACAGGAT CCGCAGCGCC CCGTGTGGCC ACCACTATTC
3961 CTAACAGCAT ACCTCGGGGT CACCAATAGA AGCCTTCTGC TTCTGATGTC TGCTGTGATG
4021 CGTCAGGGAA GACCTCGTAT TCCAGCGGTG CCAAGCGGAT ACCAATGTGG TGAATGGTCA
4081 AATGGCGTTC ATTGTATGGA GCTAGGACAT TAAATACAT ATCTCTGCAA TCGCGAATTC
4141 AGTGAGTCTG CCAATTCGTG TTAGACCCGT CTGTGTGCTT CTTAACAGG CAGGATCAT
4201 CCAAGTATAC ACCACTTAC TCCCAACAT CCGCATGAC GGTGCTTTT CTCTCTTAT
4261 AAGGATGTT GTTAACTCAT CTTTACATAA CAGTGTGCA AGACTACAAG AGGATTTGCT
4321 AAGACTACAT TTTCOCTCTC TTGCGGCTAT TATACTGGA GGTATGCTAT
4381 AACCGCGTAC AACCGAGGCC CCGCTTTTTC CTCTAACATG CTAATTGTCC CTACGTAGTC
4441 CTCTGCGCTC TACAACCGGA TTGCAAGGCC TTGCGCTCCC CACATTATCC GTAGCATTAAT
4501 TTCTTAGCAG TCATCAGAGC TACAGAGATG ACTCTATGCT GTAGCCAACT CTACAAAGTT
4561 ACTATTACAG GACCTCTCAT ATTCCGCGTG CCAAGCGGAT AATTACCAAT CGCGCTTTGG
4621 CGTAATCATG CTTATAGCTG TTTCCTGTGT GAAATTTGTA TCCGCTGACA ATTCACAGCA
4681 ACATACAGAG CGAGAGCATTA AAGTGTAAAG CTTGGGGTGC CTAATGAGTG ACTCAATCTA
4741 CATTAATATG GTTGGCTCA CTGCGCGCTT TCCAGTGGG AACTCTGCG TGCCAGCTGC
4801 ATTAATGAAT CGGCGCAACG CGGGGAGAG GCGTGTGCG TATTGGGCGC TCTTCCGCTT
4861 CTTGCTCTAC TGACGTGCTG GCGTGGTGG TTGCGCTGCG GCGAGCGGTA TCGACTCACT
4921 CAAAGGGGAT AATACGGTTA TCCACAGAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG
4981 CAAAGAGGCA GCAAAGGCC CATCAAAAA ATCAGCGCTC AAGTCAGAGG TGCCGAAACC
5041 GGGTCCGCGC CCGTACGAGG CATTCAAAAA ATCAGCGCTC AAGTCAGAGG TGCCGAAACC
5101 CGCAGGAGAT ATAAAGATAC CAGGCTGCTT CCGCTGGGAG CTCCCTGCTG TCGCTTCTG
5161 TTGCGACCTT CCGCGTTTAC GGAATCTGTG CCGCTTTTCT CCGTCTGGGA AGCGTGGGCG
5221 TTCTCTCARG CTACGCGTCT AGGATCTCTA GTTGGTGSTA GCGCTGTCG TCGAGCTCTG
5281 GCTGCTGCTA CGACGCCGCG GTTACGCGCG ACTCGTGGG CTTATCGGCT ANCTATCTG
5341 TTGAGTCCAA CCGGTAAGA CACAGCTTAT CCGCATGSC AGCAGCCACT GGTACAGGA
5401 TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGCGTCTGA CAGAGTCTT GAAGTGTGG CTCTAATCAG
5461 GCTACACTAG AAGGACAGTA TTGCTATCT CCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA
5521 AAGAGTTTGG TAGCTCTTGA TCCGCGAAAC AACACACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTGG
5581 TTTCAGAGA CGAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCTT TTGATCTTTT
5641 CTACGCGGCT TGACGCTCAG TGGACGAAA ACTCACGTTA AGGATTTTGG GTCATGAGAT
5701 TATCAAAAGG GATCTCTCAC TAGATCTCTT TAAATTAATA ATGAAGTTTT AAATCAATCT
5761 AAGTATATA TGATCTTATG TGTCTGACA TTATGCAATG CTTATCGCTA GAGGACATCA
5821 TCTCAGGAT CTGTCTATT TTGATCTCCA TAGTGTGCTG ACTCCCGCTC GTATCAATGA
5881 CTACGATACG GAGGGGCTTA CCATCTGGCC CAGGTGCTCG AATGATACCG CGAGACCCAC
5941 GCTCACCGCG TCCAGATTGA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCCGAGAA
6001 GTGGTCTCTG AACCTTATCC GCCTTCAATC AGTCTATTAA TTGTTGCGGG GAGACTAGAG
6061 TAAGTAGTTC GCGGCTTAAT AGTTTGCAGA ATTTACTGTT CATTTGTCG GAGACTCTGG
6121 TGTCACGCTC GCGTGTGTT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCGAAGCGAG
6181 TTATCATGAT CCGCATTAAT TGGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTGCGTCTG CCGATCGTGG
6241 TCAGAAAGTA GTTGGCGCGA GTGTATTCAC TCAAGTGTAT GGCAGCACTG CATATCTCTC
6301 TTACTCTCAT GCCATCTGTA AGATCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAGATGAT
6361 TCTGAGATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGGCC GGGCTCAATA CGGATTAATA
6421 CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAGATGTC TCATCATTTG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
```

【図 6 - 4】

```
10141 TGCTGTTTCTC CTAGACTACA TGACCCCATTA TAAATACAT TCCTTATCTA TTCTGCCATC
10201 ACCAAAAACAA AGGTAAAAAT ACTTTTAGGA ATCTACTCAT AGCAAGTAGT GTGCAACAAA
10261 CAGATATTTTC TCTACATTTA TTTTTAGGGA ATAAAAATAA GAAATAAAAT AGTCAGCAAG
10321 CCTCTGCTTT CTATATATTA TGTCCAAACC TAAAGTTTAC TGAATTTTGC TCTTTGAAAT
10381 TCTCAGGTTT CAAGCTATATC AGATTGTGTT TTAATCAGAG GTACTGAAA GTATCAATGA
10441 ATTCTAGCTT TCATCTGAACA AAAATATGTA GAGGCAACTG GCTTCTGGGA CAGTTTGTCTA
10501 CCGAAAAAGAC AACTGATATG AAATACATAA ATAGATTTAT GARTATGTT TTGACATGTC
10561 ACATGAGAGG TGGATATAGC AACAGACACA TTACCCAGA ATTACTTTAA AACTACTTGT
10621 TAACATTTAA TTGCTTAATA ACTGCTTAATA ATTTACTGTT GTAGGCTAAC ATGAGTAGCC
10681 CTGATGGTGA CTATGTACAG CATTCCTATC TTACATTTTC ACTGTCTGTC TGTTTGCTCT
10741 AGACAACTCA GAGTTCACCA TG
```

(配列番号 8)

図 6

【図 7】

SBC102 アダプターの DNA 配列 (242 bp)

特徴	位置 (bp)
○ V 遺伝子由来	1-149
部分的 hLAL	150-242

```
1 CCGGGTGTG TAAACATTTA TTGCTTAATA ACTGCTGTA ATTTACTGTT GTAGCCTACC
61 ATAGAGTACC CTGATCGGTA CTATGTACAG CATTCATGCG ACTGTTCTGC
121 TGTGTGCTCT AGACAACCTA GAGTTCACCA GATTAATGCG GTTCTTGGGG TTGTTGGTCT
181 GTTGTGCTCT TCGGACCCCTG CATTCGCGAGG GGATCCGAGG GAAACTGACA CCGTGTGGAT
241 CT
```

(配列番号 9)

図 7

【図 6 - 3】

```
6481 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCGATTTCGAT GTAACCCACT CGTGCAACCA
6541 ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTTACCA CGGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC
6601 AAAATGCGCCG AAAAAAGGGA ATAAAGGGGA CCGTGGAAATG GTGGAATCTC ATACTCTTCC
6661 TTTTTCATAA TTATTGAGAG ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG
6721 AATGATTTTA GAAAAATATA CAAATAGGGG TTCCCGGAGC ATTTCCCGGA AAGATGAC
6781 CTGACCGCGC CTGTGACGGC GCATTAGGGG CGGCGGTGCT TGGGTGATGA CGACGTGGA
6841 CGGCTACACT TGCCAGGGCC CTAGCGCGCC TCTTCTCCG TTCTTCTCTG TCCTTCTCTG
6901 CCAAGCTTGC CGGCTTTCCC CGTCAAGCTC GCTCCCTTTA GGGTTCOGAT GGGTTCOGAT
6961 TTAGTGCTTT ACGGCAGCTC GACCCCAAAA AACTTGATTA GGGTGTGTTG TCACGTAGTA
7021 GGCACCTCGC CTGATAGACG GTTTTTCGCC CTTTGACGTT TGGAGTCACG TCTTTTAATA
7081 GTGAGACTCT GTTCCAAACT GGAACAACAC TCAACCCAT TCTGCTCTAT TCTTTTATG
7141 TATAAGGGAT TTGCGCATT TTGCGCTATT TGGTAAAAAA TGAGCTGAT TTACAAAAAT
7201 TTAACGGGAA TTTTAACAAA ATATTAAAGC TTACAATTTC CATTCGCCAT TCAGGCTGCG
7261 CAACTGTTGG GAAGGGCAT CGGTGCGGGC CTCTTCGCTA TTACGCCAGC TGGCGAAGAG
7321 GGGATGTGCT GCAAGGCGAT TAAGTGGGTG AACGCCAGGG TTTTCCGAGT CACGACGTTG
7381 TAAACAGACG CCGATGTGAG GCGTATTCCC TAACGATCAC GTCGGGGTCA CCAATGAAG
7441 CCTTCTGCTT CATGATATG CTGCTAGTGG TCAAGGAATC AACGCTCCGG CACTCAACCC
7501 AGGTGCAACAC CAATGTGCTT AATGGCTAAA TGGGTTTAT TGTATCGAGC TAGGACTCTA
7561 AATGCAATG CTCTCAATG CGGATTTGAG TGGTGTGCT AATCGTCCC ATCTCTATG
7621 CAAAGCGGAA ACTACTATAT CCGTAGGGGA TCTTAAAGC CTCTAACCG GTACACAGC
7681 TTGCGCTACA AACTGCTATT GTCCCTTAC GTCCGCTTG CCGGTTACAA CCGGATTCGC
7741 AAGGCTTGCC CTCCCCACAT TATCCGTAGC ATTTATTCTT AGCAGTCATC AGAGCTACAG
7801 AAGATACTCT ATGCTGTAGC CAACTCTACA GATTACTAT TCAGGTCACG CTCTATATTC
7861 GCGTGGCAGC CGATCAATTA CCAATCCAA CAGCTATCAC ACCGAATACA AGACTCGCC
7921 TTTGCTCTTC TTTCGGCTG CTTATAAGCC GTTATGAT TTGCTGAT TTCTGTTAAG
7981 TCTCTAGACT TGGCAAGGAG ATGTAGATT TTCCAGATAT ATATGTTTTT ACAAAAGGAA
8041 GGAAGAGAAC AAAAGAAAAA GGCAGTCACT AAGCTTACG TACTGCTAGA GGAATGTAAT
8101 TCTGCTTAAC AGAGATTGCA GTGATCTCTA TGTATGCTT TGTATGCTT GTTGACTTT
8161 TTTTCCCATC TTTTAAATCA AACAGTGTCT TACGAGGTC CTTTACTGTT TTTTACTGTT
8221 TGTCATCTCT ATTAATTCAA TCAGAGAACAA TACGTTCTAT AACTGAAAAA TATTTGCTAT
8281 TGTATTTATG GATGTGCTCT CAGACCATGA AGCTCCCTC TGTATGATTT CACTATTTCT
8341 CTCTGCTGCTA TGAAGATCTA TGAAGATCTA TGAAGATCTA TGAAGATCTA CTGAGATTC
8401 ACTATATAAA CACATTTGAA ATGTAGATT GTTTGCTAT GTATGAGCT ATGTTTGTCT
8461 GTATCTCAG AATAAAGTT TGTATTAAG CACTCACACC CATAAAAAGA TAGATTAA
8521 TATCTCAACT ATAGGAAGA AAGTGTGCT GTCTCTCAT CTAGTCTCAG TTGGCTCTT
8581 CATGACGACG CTCTTTTATT TCTCTTATT TGTCAAGAAA ATATAGAGTC AAGTCTTGT
8641 CTTATTTATG TCTGTCTAG CCGTGGCTAG ATGCAATATG TACATACAG AAGGATCAAA
8701 TGAAGACAGC TTCTGCTGCT TTAATACAAC AGCTTAATA TACAGATCA CTATATATG
8761 CTAATATGAT TTTCATCTC CAAAGTCCC ACATTTTCT GTTTTCTTAA AGATCCCAT
8821 ACTGCTGTTG AACTGAAGCT CAATGGAACA TGAGCAATAT TCGCCAGCT TCTCTCCCAT
8881 CCAACAGCTC TGATGGAAT TGAAGAACAG CAGAAACAC ATGTTTACCC AGAATTAATA
8941 AACTAATATT GCTCCTCAT CAATCCTAAA GACTCAATTT TGTAACTAAA TCTAACCCAA
9001 TCCCATTAAT TGATTTCTAT GGTGTCAAG GTCAAACTCT TGAAGGAAC CTGTGGGTGG
9061 GTCACAATTC AGCATATAGA TTTCCCGAG CTCACCGCTG CTCTGCTAT ACAGTAGTGA
9121 GCTGATGTTG CTTTAGCAG TCAAGTATCA AGCTCTGGA ACTCTGGA ATACTCTCT
9181 CTCTATATTA GCTCTACTT GCACCTAAAC TTTAAAAAT TAACTATAT GTCTATGAT
9241 GTTCTTTCT TAAGSGTGA GTACCTGGGT GATACCCCTT TTAATAACT CTACCTGTG
9301 TATGATCTCT GCATATATT ATTAATGTA AAGCTTTGT GTTTGTTTCT AGGAGGCTTA
9361 TCTTTTGTGCT TTAATAATCT TTTTAAAT TTCTCTGTG ATATCTATCT ATACTATCT
9421 GATATGTTT GCAGTTTGT TGAATTAATT CTAGCCCTAG AGAGTGTCCA GAGAGCAAAA
9481 TTTATGCTGT CAGTGAATC TGGGGAGTTA TTTTATGTG AAAATTTCT AGAAGTTTAA
9541 TTTCTGCAA GTGACAGTGC TGATCACTAC ACAGATATA TGTGTGGGG GTGCAATAAC
9601 GTATATTTCT ACAATAAG ATACATGTA ATCATATATA AAGAAAGAAA ATGAGAAAAA
9661 TGTGTGTGTT TATACTACA CAGTGTGTA GTAAAACTT TTGAGGGGTT TATACAGAA
9721 AACTAAATCC TGAGGCCCCA GCACTCAGT TACGATGTA GCGATGAGT TCGATGAGT
9781 TCTGACTTTC ACAGATTATA TAAATCTCAG GAAAGCACT AGATTCTATG TGGCTCCAAA
9841 AGCTGTGCTT TATATAGCA CACTGGCTAT ACATATGAT TTGATGATG CTCTTATATA
9901 TGAAGACGA CAGACAGTGT ATAACTGCTA TATGTGCTA TGCTATGAT TCTCTATG
9961 CAGGCTGCT TGTGTTTGT TAACTGCTG TATTTTATC TGTGCTGAT TCTCTATG
10021 CTGAATGTCA CCACTAAAT TTAACCTCAC AGAAGTTTA TACTACGTA CACTGCTA
10081 TCTTTAGACA AAGCAACCA TACCTGAAG TGAATAGAG CAGAATATGA ATTACATGCG
```

【図 8】

Syn SBC102 の DNA 配列 (1575 bp)

特徴	位置 (bp)
部分的 O V プロモーター	1-355
hLAL CDS	356-1575

```
1 CCAATTATCT GTTGTAACTG AAGCTCAATG GAACATGAGC AATATTTCCC AGTCTTCTCT
61 CCAATCCAA AGTCTGATGT GATTAGCAGA ACAGGCGAGA AACACATTGT TACCAGAGAT
181 TAAAAACTTA TATTTGTATC CATTCAATC CAAATAGGAC CTATTTGAAC TAAATCTTAA
241 GGTGGGTGAC AATTGAGAT ATATATTCCC CAGGCGTCAG CAGGTGCTG TACTATACAG
301 TAGAAGCTG TATTGCTTTT AGCAGTCAAG CTGCAAGAGC CACTCAGAT TACCAATGAA
361 AATGCGGTTT TTGGGGTTGG TGGTCTGTT GTTCTCTGG ACCTCGCAT CCGAGGGGCT
421 CGGAGGGAAA CTGACAGCTG TGGATCTGTA AACAACTCAT AATGTCAAGT AAATATATCT
481 TTACTGGGGA TTCCCTAGTG AGGAATACCT AGTTGAGACA GAAATGGAT ATATTCTGTT
541 CTTTAAACGA ATTCTCATG GGAGGAAGAA CCAATTCTGAC AAAGGTCCCA AACCACTGTT
601 CTCTCTGCAA CATGGCTTGC TGGCAGATTC TAGTAACTGG GTCAACAACC TTGCAACAG
661 CAGCTTGGCC TTCTATCTG TTTTACGCTG TTTTACGCTG TGAAGGGCA ACACAGAGG
721 AAATACCTGG TCTGGAAAC ATAGACACT CTGAGTTCT CAGATGAAT TCTGGGCTG
781 CAGTTATGAT GAGATGGCAA AATATGACCT ACCAGCTTCC ATTAATCTCA TTCTGAATTA
841 GACTGGCCAA GAACAAGTGT ATTAATGTTG TCAATTCTCA GGCACCACTA TAGGTTTAT
901 AGCATTTTCA CAGATCCCTG AGCTGGCTAA AAGGATTAAT ATGTTTTTGG CCTGTGCTC
961 TGTGGCTTCC GTCCGCTTCT GTACTAGCCC TATGGCCAAA CTGGGAGGAC TGCCAGATCA
1021 TCTCAATGAG GACCTTTTGG GAGACAAAGA ATTTCTTCCC CAGAGTGGGT TTTTGAAGTG
1081 CTGGGTACC CAGCTTGTG CTGATCTCAT ACTGAGGAG CTCTGTGGA ATCTGTGTT
1141 TCTTCTGTGT GGATTTAAGT AAGAGAAATT AAATATGCTT AAGATGTGAT TGTATACAG
1201 ACATTTCTCT GCTGGAACCT CTGTGAAA CAGTGTACAC CAGTGGCAGG CTGTAAAT
1261 CCAAAAGTTT CAAAGCTTTT ACTGGGGAAG CAGTGGCAGG ATTTATTTT ATTACACCA
1321 GAGTTATCTT CCAACATACA ATGTGAAGGA CATGCTGTG CCGACTGCACT TCTGGAGCGG
1381 GGGTCACGAC TGGCTTGCAG ATGTCTACA GCTCAATATC TTACTGACTC AGATCAACCA
1441 CTGGGTGTTT CATGAGACGA TCCGCGAATG GAGGACTCTT GACTCTATT TGGGCTCGA
1501 TGCCCTTGG AGGCTTTATA ATAGATTAT TAATCTAATG AGGAAATATC AGTGAATCA
1561 AGCGGCCGCC CCGGG
```

(配列番号 10)

図 8

【図 9】

OVR1プロモーターのDNA配列(2789bp)
 特徴
 OV遺伝子のDHSII領域由来
 OVRプロモーター
 位置 (bp)
 7-1658
 1658-2789

1 CTCGAGTCTC TTCAGAATGG CACAGACGCG CTCGAGAAAA ATGCCAGGTG GACTATGAC
 61 TCACATCCAA AGGAGCTTGA CCTGATACCT GATTTCCTTC AAACAGGGGA AACACACAA
 121 TCCCAACAAA CAGCTCAGAG AGAACCACAT ACTGATGGCT ACAGCACCAA GGTATGCAT
 181 GGCATTCAT TCGACATTC TCTGTGACCT GAGCAAAATG ATTTATCTCT CCATGAATGG
 241 TTGCTTCTTT CCTCATGAA AAGGCAATTT CCACACTCAC AATATGCAAC AAAGACAAAC
 301 AGAGAACAA TAAATGCTCT CTTCCTAATG TTAATAATGT AGTGGCAAG AGGAGAACAA
 361 AATCTCAAGT TCTGATGAG TTTTASTGAT TGAATAAGAG GCTTTGACCT GTGAGCTCAC
 421 CTGGACTTCA TATCCTTTTG GATTAATAAGT GCTTTTAA AATTCTGAGT TCGAGTCTTT
 481 TATTCATGAG ACTGTGGTT TAGGACAGAG CCAACAATGA AATGCCCTGGC ATAGGAAGG
 541 GCAGCAGAGC CTTAGCTGAC CTTTCTTGG GACAAGCATT GTCAACAAT GTGTACCAA
 601 ACTATTGTGA CTGCTTTGCA CAGCTGTGCT GGGCAGGGCA ATCCATGCCC ACCTATCCCA
 661 GGTAACTTTC CAATGCAAG AAGATTGTTG CTTACTCTCT CTAGACCCCC AAGTCAAAAC
 721 AACTATGAG GTATGCTGAC AACACTATGA TGACAGGCTG TCTGATCAA GATCTCATTT
 781 GTTCATGAC AATTTTTGT GCTTGCAGCT GGTCTTCCAT TGGGAAGAG TGTAGTATA
 841 CCTTCTCATC TGACAGAAA GCAGAAATTC TCACTGCTCA CACTTAACTC AATTTGTTT
 901 AAACCAACCG CTACTTCTTG GAGAGGAAA ATGGCTTTTA TAAGACTCAC AAAACAAGC
 961 TCTGCAAGTC AAATGCATAC AAAACTGTTG TGTAGTCTG GAATCAGGAC ACTATGTGGA
 1021 AGTCAATAG AGCAGCTTTA AAAAGCCTTT GGGATCATTC TCACTTATA TTTGAGCAC
 1081 GATACATGA CAGTGAATC TGACATAACT GCATCAATTT CCTTGATATT TTATTGTCT
 1141 TAAAGTACAA GACATAGAGA TGGACGTAAA GATGGACATA TGACTCAGGT CTGAGCAGGT
 1201 CGGTGTCCA TGTATGATA AAGAGATGAA GGGAGAGAGA ATTGAGACTG TCTAAGAGG
 1261 GCTTCAGGGA CGTTCTGAG GCAGATTGGA CTGAATCAGA TGTACTGTCC AAGTCTCATA
 1321 TGTAGCAATG GAAGGCTGAT ATTGGAGAAA TATAAGAAA TGGCTGTGAA CTCAGAGTGA
 1381 CCTGAAACAG AAAAGGATA TGGAGTAAA ATAAATGTC AGAATGAGG TTTATATGAT
 1441 ATACCATGGG CTGCAGAGG TCAAGTCTCT CCACCATGGG CCTCTCTTGG GCTGCAGGGA
 1501 ACTTCTGTTT TACACTGGA ACACCTCTG CCTCTCTCG CACTGACCTC AGTGTATCA
 1561 GGGCTGTCTC TCTCACTTT TCTCACTAC CTCTCCAACT TACATTTGTA CAGCAAGTGT
 1621 TCTTACATAT TGCTCTCTCT GAGGTACATC TAGCATGTT AAGTCTCAG ACTTGGCAG
 1681 GAGAATGTAG ATTTCCACAG TATATATGTT TTCACAAAAG GAAGGAGAGA AACAAAAGAA
 1741 AATGGCACTG ACTAACTTC AGCTAGTGGT ATAGGAAAGT AATTCTGCTT AACAGAGATT
 1801 GCAGTGTCT CTATGTATGT CCTGAAGAAT TATGTTGTAC TTTTTTCCCC CATTTTTTAA
 1861 TCAACAGTG CTTTACAGAG GTCAGAAATGG TTTCTTTACT GTTTGTCAAT TCTATTTAT
 1921 CAATACAGAA CAATAGCTTC TATAACTGAA ATATATTGC TATGTATAT TATGATTGTC
 1981 CCTGAGACCA TGAACACTC TCGAGTGA TTTCAATAT TCTCTGCTC CTGCGAGGCG
 2041 ATTAAGTTAT TCAATGAGA TCTTTGAGGA ACATGCAAG TCTCATCAT AAACACATT
 2101 GAAATTGAGT ATTGTTTGC ATTGTATGGA GCTATGTTT GCTGTATCTC CAGAATATAA
 2161 GTTTGTATTA AAGCATTCAC ACCCAATAA AGATAGATTT AAATATTCCA ACTATAGGAA
 2221 AGAAAGTGTG TCTGCTTTC ACTCTAGTCT CAGTTGGCTC CTTACATGTC AGCTTCTTT
 2281 ATTCTCTCTA TTTTGTCAAG AAAATAATAG GTCAAGTCTT GTTCTCATTT ATGCTCTGTC
 2341 TAGCTGTGCT CAGATGACA TTGTACATAC AAGAGGATC AAATGAACA GACTTCTGCT
 2401 CTGTACTTAC AACATAGTA ATAGGACAC TACTAATAA TTGCTATTA TGTCTTCCAT
 2461 CTCAGAGTT CCCACATTT TCTGTTTCTC TAAAGATCCC ATTTATCTGT TGTAACTGAA
 2521 GCTCAATGGA ACATAGGCAA TATTTCCAG TCTTCTCTCC CATCCACAG TCTGTATGGA
 2581 TTAGCAGAAC AGGCAGAAA CACATTTGTA CCCAGAAATTA AAAACTAATA TTTGCTCTCC
 2641 ATTCAATCCA AAATGAGCT ATTGAACTA AAATCTAAC CAATCCATT AAATGATTTC
 2701 TATGTTGTCA AAGTCAAC TTCTGAAGG AACCTGTGG TGGGTACAA TTCAGACTAT
 2761 ATATTCCCA GGGCTAGCC AGTGTCTGT

(配列番号 11)

図 9

【図 14】

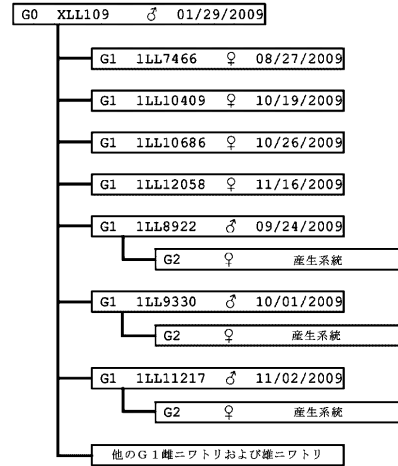


図 14

【図 15】

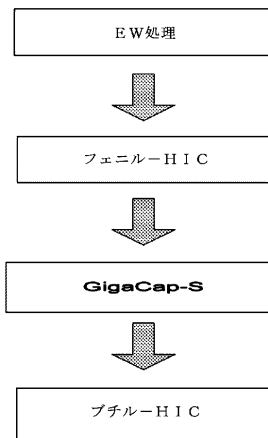
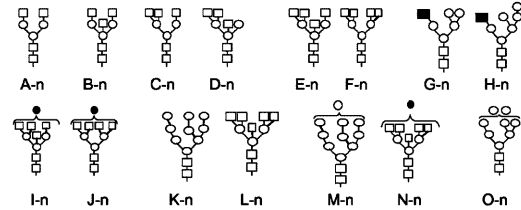


図 15

【図 16】



四角＝N-アセチルグルコサミン
 黒四角＝マンノース-6-リン酸
 丸＝マンノース
 黒丸＝ガラクトース
 黒三角＝フコース

図 16

图 18

マンナンによるマクロファージのSBC-102取込みの阻害

マンナン (mg/mL)	SBC-102取込み減少のパーセント (%)
0.01	5
0.04	28
0.08	35
1.0	55
4.0	72
10.0	65

図 2 1

SBC-102 Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Control (White)	Cells with SBC-102 (Hatched)	Cells without SBC-102 (Black)
0	0.8	2.5	0.0
0.16	3.5	6.2	0.0
0.5	8.0	10.2	0.0
1.6	14.5	12.8	0.0
5	13.2	14.5	0.0

图 2 2

用量 (mg · kg ⁻¹)	体重量増加のパーセント (4週齢から8週齢)
溶剤	75
隔週・0.2	75
週1回・0.35	105
隔週・1	105
週1回・3	170
隔週・5	155
週1回・10	185
LAL+/+	200

图 2 6

【図 29】

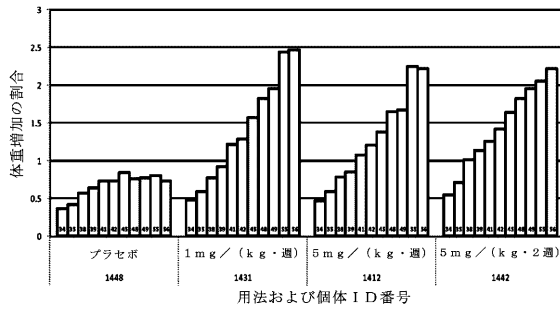


図 29

【図 3】

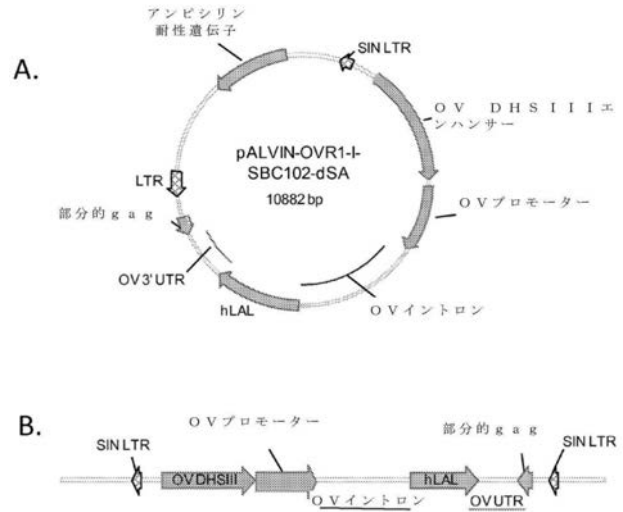


図 3

【図 10】

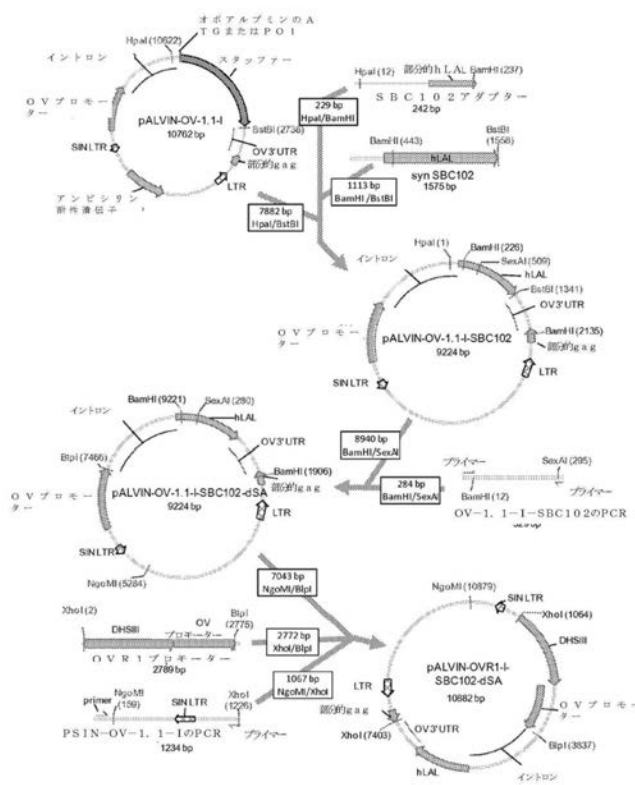


図 10

【図 11】

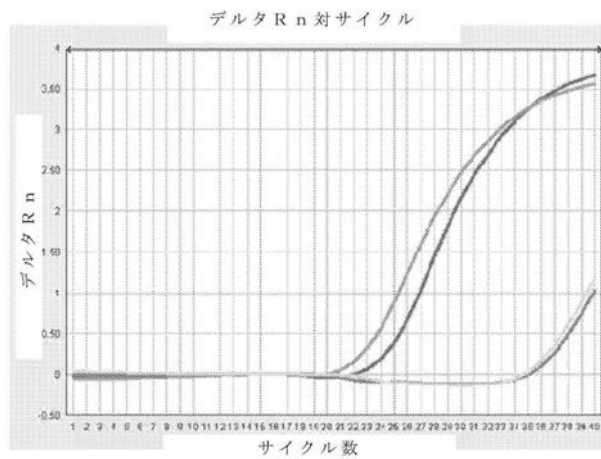


図 11

【 図 1 3 】

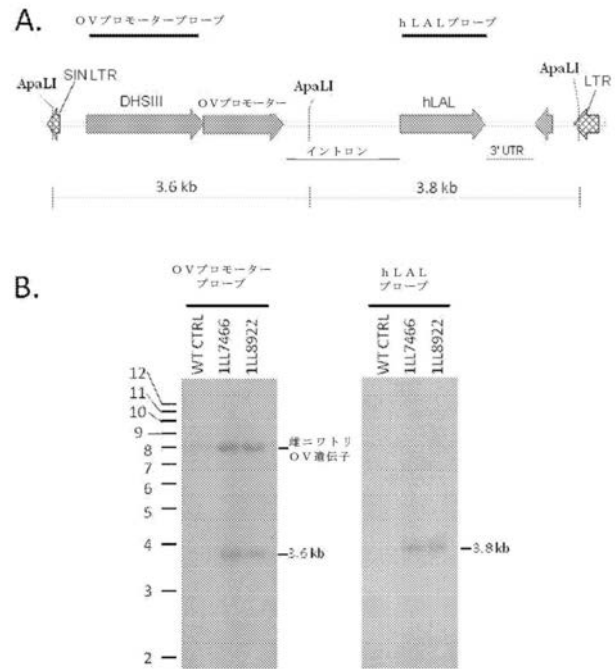


图 13

【 図 1 9 】

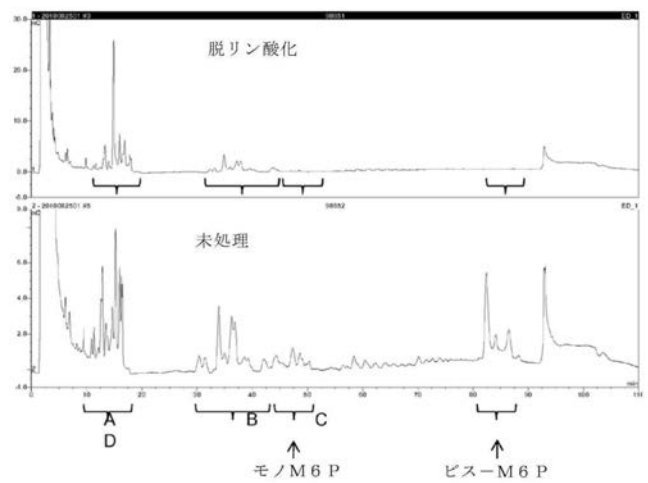


图 1-7

【図 20】

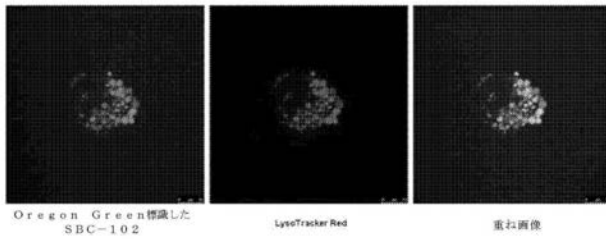


図 20

【図 23】

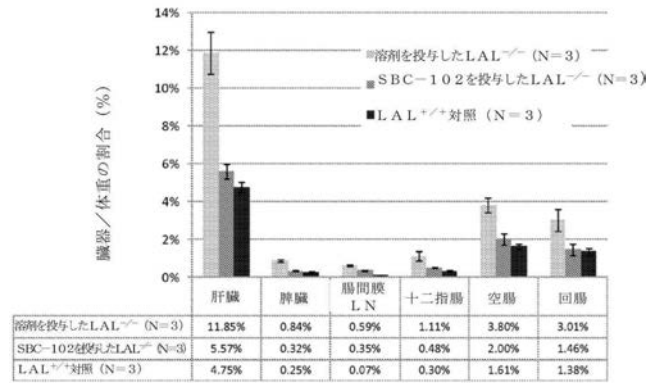


図 23

【図 24】

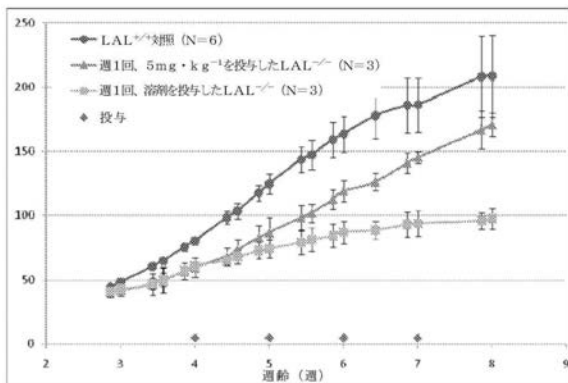


図 24

【図 25】

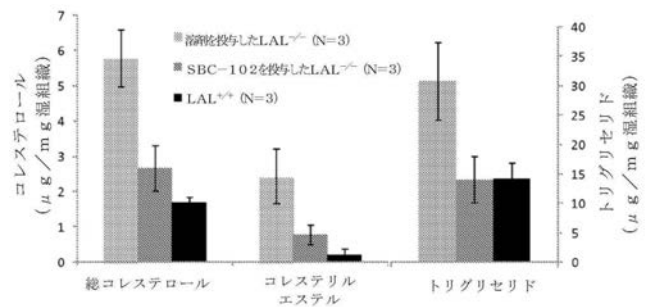


図 25

【図 27】

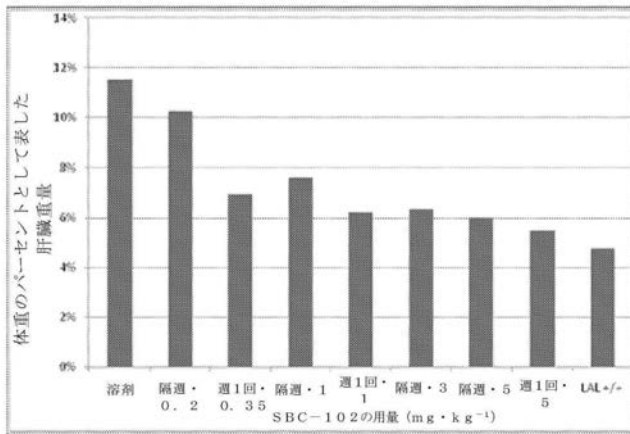


図 27

【図 28】

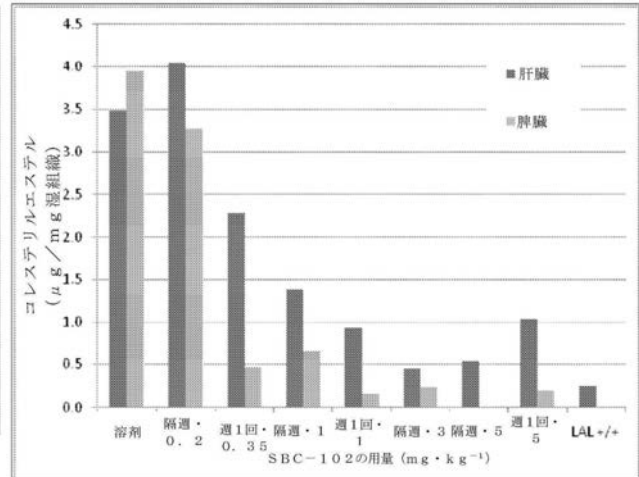


図 28

【図 30】

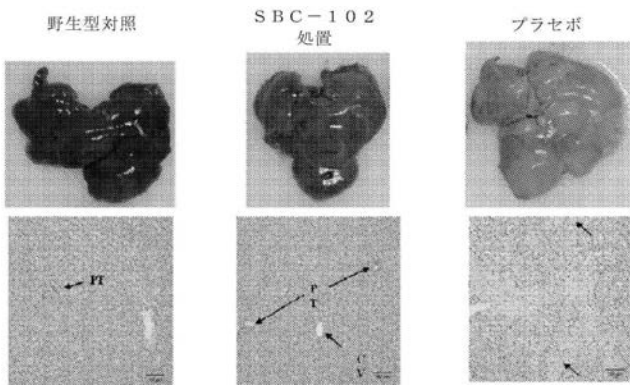


図 30

【配列表】

2016190867000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	4 C 2 0 6	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 0 7 K	14/465	(2006.01)	C 0 7 K	14/465		
C 0 7 K	14/76	(2006.01)	C 0 7 K	14/76		
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	31/40	(2006.01)	A 6 1 K	31/40		
A 6 1 K	31/404	(2006.01)	A 6 1 K	31/404		
A 6 1 K	31/366	(2006.01)	A 6 1 K	31/366		
A 6 1 K	31/47	(2006.01)	A 6 1 K	31/47		
A 6 1 K	31/22	(2006.01)	A 6 1 K	31/22		
A 6 1 K	31/505	(2006.01)	A 6 1 K	31/505		
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08		
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/12		
A 6 1 K	47/42	(2006.01)	A 6 1 K	47/42		

(31)優先権主張番号 61/396,376

(32)優先日 平成22年5月26日(2010.5.26)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/343,177

(32)優先日 平成22年4月23日(2010.4.23)

(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 アンソニー クイン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 6 7 , チェスナット ヒル , マネ ロード 1 0 7

(72)発明者 アレックス ジェイ . ハーベイ

アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 6 0 6 , アセンズ , フォックス トレース 1 0 6

F ターム(参考) 4B050 CC04 CC06 DD11 KK20 LL01

4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA27 CA44

4C076 AA12 BB13 CC14 DD43 EE01

4C084 AA02 AA19 BA01 BA02 BA22 BA23 BA34 CA41 CA53 DC22

MA17 NA13 ZC191 ZC192 ZC331 ZC332

4C086 AA01 AA02 BA17 BC05 BC13 BC20 BC28 BC42 MA02 MA03

MA04 MA05 MA17 NA13 ZC19 ZC33

4C206 AA01 AA02 DB03 DB56 MA02 MA03 MA04 MA05 MA37 NA13

ZC19 ZC33

4H045 AA10 AA20 AA30 BA53 CA40 DA89 EA20 FA74

【外国語明細書】
2016190867000001.pdf