

(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 1	テーマコード (参考)
A 61 K 38/46 (2006.01)	A 61 K 37/54	4 B 05 O
C 12 N 9/16 (2006.01)	C 12 N 9/16	Z N A Z 4 B 06 S
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A 4 C 07 S
A 01 K 67/027 (2006.01)	A 01 K 67/027	4 C 08 S
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10	4 C 08 S

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 128, スイート 520 , 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 原出願日 平成23年4月23日 (2011.4.23)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	61/432,372	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(32) 優先日	平成23年1月13日 (2011.1.13)	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(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リ化パターンを有する組換えヒトリソーム酸リバーゼの組成物、ヒトリソーム酸リバ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、組換えヒトリソーム酸リバーゼを含む医薬組成物、およびリソソーム酸リバ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バーゼ (LAL) を含む、組成物が提供される。

【選択図】図16

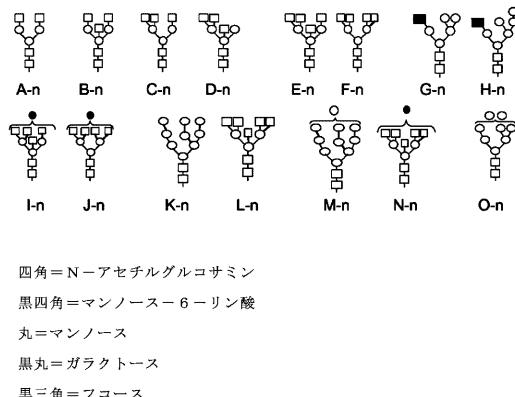


図16

【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G1cNAcまたはマンノース末端のN-グリカンを有するタンパク質の結合、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年内に致命的となる。生後1年内に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の特徴であり、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、抗生素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ボタンパク質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ーム区画に対して効率的に標的化されたLALタン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。

20

【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。

30

【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Asn¹⁻⁵、Asn⁵⁻¹、Asn⁸⁻⁰、Asn¹⁻⁴⁻⁰、Asn²⁻⁵⁻²およびAsn³⁻⁰⁻⁰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LALがシアル酸部分を含まない。

【0012】

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。

【0013】

さらに別の態様では、LAL含有組成物を產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。

【0014】

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

【0015】

別の実施形態では、成熟LAL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)。

【0016】

別の実施形態では、成熟LAL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)。

【0017】

別の実施形態では、成熟LALは以下のアミノ酸配列を有する：

10

20

30

40

50

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 19)。 10

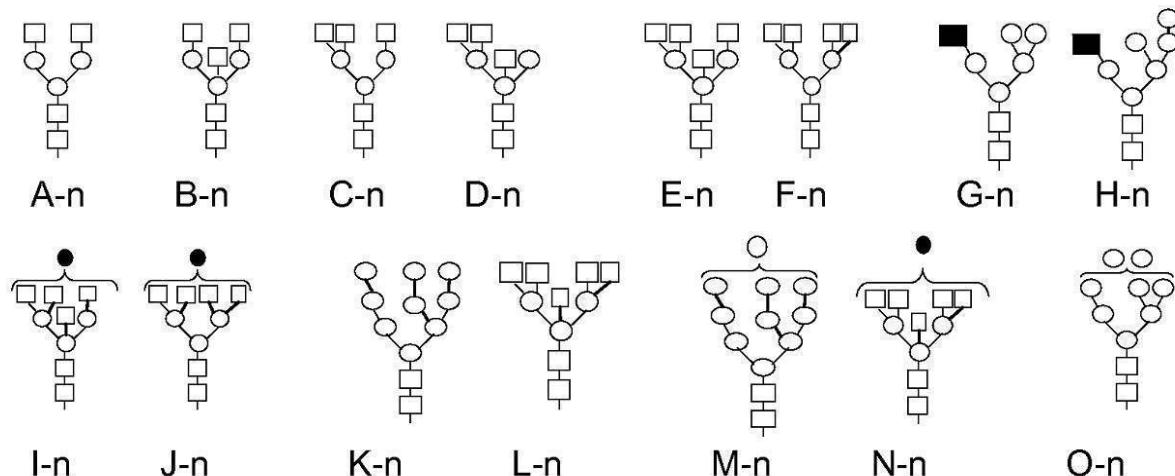
【0018】

別の実施形態では、成熟 L A L 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 L A L 分子を含有する L A L 分子、例えばヒト L A L 分子の単離された混合物を提供する： 20

【化 1】



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。

【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

10

20

30

40

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。

【0021】

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。

【0022】

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-結合グリコシリ化されている、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-グリコシリ化されている、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30%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50%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10)

前記L A Lが、ニ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11)

A s n^{8 0}に関連したN-グリカン構造の少なくとも50%がニリン酸化マンノースを含む、項目5に記載の組成物。

(項目12)

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13)

A s n^{1 4 0}に関連したN-グリカン構造の約10%～約50%がM 6 Pを含む、項目5に記載の組成物。

(項目14)

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 Asn^{2 5 2}において含む、項目 5 に記載の組成物。

(項目 15)

Asn^{2 5 2}における N - グリカン構造の少なくとも 50% が M 6 P を含む、項目 14 に記載の組成物。

(項目 16)

前記 L A L が、高マンノース基を含む N - グリカン構造を Asn^{8 0} または Asn^{2 5 2}において含む、項目 5 に記載の組成物。

(項目 17)

前記高マンノース基が 6、7、8、9 または 10 個のマンノースを含む、項目 16 に記載の組成物。 10

(項目 18)

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 17 に記載の組成物。 。

(項目 19)

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 Asn^{8 0} において含む、項目 18 に記載の組成物。

(項目 20)

Asn^{8 0}における N - グリカン構造の少なくとも 80% が 7、8 または 9 個のマンノースを含む、項目 18 に記載の組成物。 20

(項目 21)

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 Asn^{2 5 2}において含む、項目 18 に記載の組成物。

(項目 22)

Asn^{2 5 2}における N - グリカン構造の少なくとも 70% が 7、8 または 9 個のマンノースを含む、項目 18 に記載の組成物。

(項目 23)

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 Asn^{1 5}、Asn^{1 4 0} または Asn^{3 0 0} において含む、項目 5 に記載の組成物。

(項目 24)

Asn^{1 5}に関連した N - グリカン構造の約 2% ~ 約 10% が末端ガラクトースを含む、項目 5 に記載の組成物。 30

(項目 25)

Asn^{1 4 0}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 26)

Asn^{3 0 0}に関連した N - グリカン構造の 100% 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 27)

前記 L A L の Asn^{5 1} 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。 40

(項目 28)

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 15% 未満がシアアル酸を含む、項目 1 に記載の組成物。

(項目 29)

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 10% 未満がシアアル酸を含む、項目 1 に記載の組成物。

(項目 30)

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% 未満がシアアル酸を含む、項目 1 に記載の組成物。 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 50 % 未満、40 % 未満、30 % 未満、20 % 未満、10 % 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 30 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % および 95 % がリン酸化マンノース (M6P) を含む、項目 1 に記載の組成物。

10

(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 90 % がリン酸化マンノース (M6P) を含む、項目 1 に記載の組成物。

(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：

20

g) Asn¹⁻⁵において、

GlcNAc4Man3GlcNAc2 または

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2；

h) Asn⁸⁻⁰において、

Phos2Man7GlcNAc2；

i) ¹⁻⁴₀において、

Phos1Man6GlcNAc2、

GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2、

30

Man3GlcNAc2、

GlcNAc2Man3GlcNAc2、

GlcNAc3Man3GlcNAc2、

GlcNAc4Man3GlcNAc2 または

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2；

j) Asn²⁻⁵₂において、

Man7GlcNAc2、

Man8GlcNAc2、

Man9GlcNAc2、

Phos1Man8GlcNAc2 または

40

Phos1Man9GlcNAc2；および

k) Asn³⁻⁰₀において、

GlcNAc2Man3GlcNAc2、

GlcNAc3Man3GlcNAc2、

GlcNAc4Man3GlcNAc2、

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2、

GlcNAc5Man3GlcNAc2、

Gal1GlcNAc5Man3GlcNAc2、

GlcNAc6Man3GlcNAc2 または

Gal1GlcNAc6Man3GlcNAc2

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38)

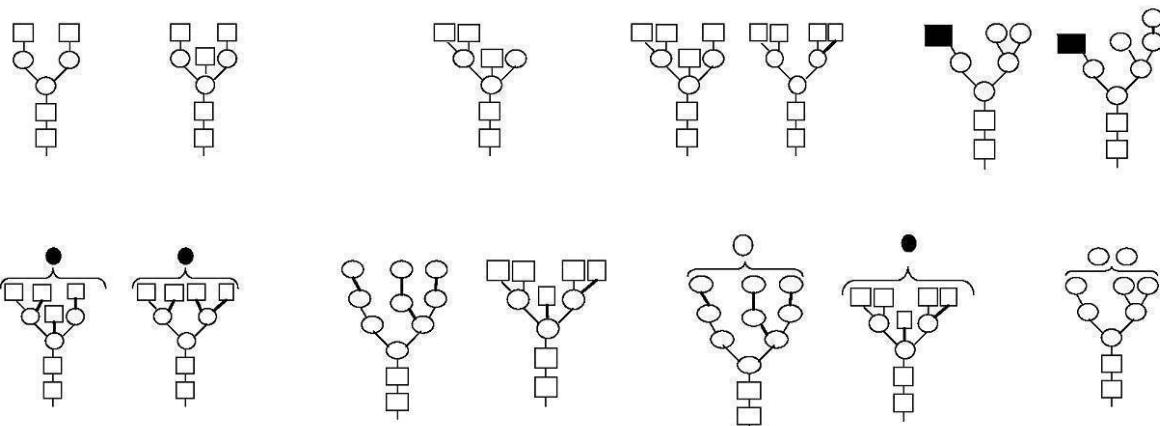
前記 L A L が、配列番号2のA s n^{1 5}、A s n^{5 1}、A s n^{8 0}、A s n^{1 4 0}、A s n^{2 5 2}およびA s n^{3 0 0}においてN - 結合グリコシル化されている、項目1に記載の組成物。

10

(項目39)

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

30

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40)

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產生される、項目39に記載の組成物。

40

(項目41)

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產生される、項目40に記載の組成物。

(項目42)

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43)

前記トリがニワトリである、項目42に記載の組成物。

(項目44)

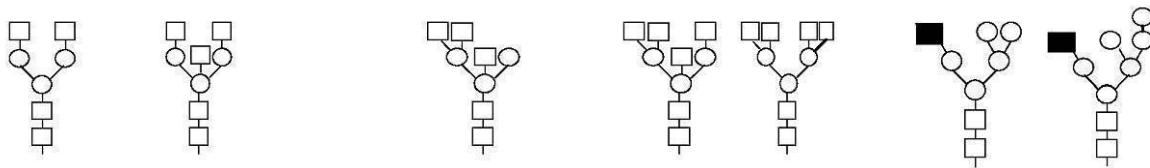
組換えヒトリソーム酸リパーゼ(L A L)の混合物を含み、前記混合物が、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号19からなる群より選択される少なくとも2つのヒトL A Lを含む、組成物。

50

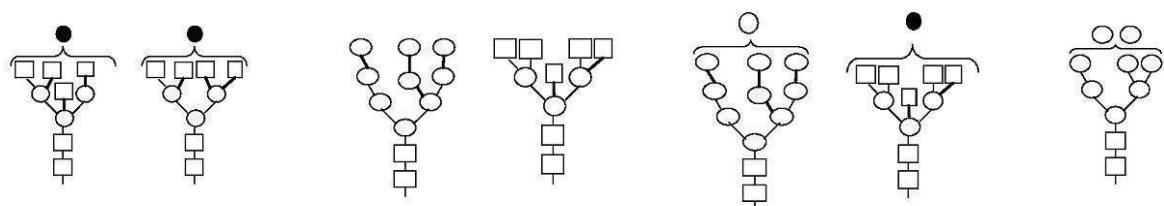
(項目45)

前記ヒトLAL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44に記載の組成物：

(化2)



10



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)。

(項目46)

前記LALが、以下のN-結合グリコシル化プロファイルを含む、項目44に記載の組成物：

a) 配列番号2、3、4および19のそれぞれAsn¹⁻⁵、Asn¹⁻³、Asn¹⁻⁰およびAsn⁹において、

GlcNAc4Man3GlcNAc2または

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2；

b) 配列番号2、3、4および19のそれぞれAsn⁸⁻⁰、Asn⁷⁻⁸、Asn⁷⁻⁵およびAsn⁷⁻⁴において、

Phos2Man7GlcNAc2；

c) 配列番号2、3、4および19のそれぞれAsn¹⁻⁴⁻⁰、Asn¹⁻³⁻⁸、Asn¹⁻³⁻⁵およびAsn¹⁻³⁻⁴において、

Phos1Man6GlcNAc2、

GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2、

Man3GlcNAc2、

GlcNAc2Man3GlcNAc2

GlcNAc3Man3GlcNAc2

GlcNAc4Man3GlcNAc2または

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2；

d) 配列番号2、3、4および19のそれぞれAsn²⁻⁵⁻²、Asn²⁻⁵⁻⁰、Asn²⁻⁴⁻⁷およびAsn²⁻⁴⁻⁶において、

Man7GlcNAc2、

Man8GlcNAc2、

Man9GlcNAc2、

30

40

50

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
 e) 配列番号 2 、 3 、 4 および 19 のそれぞれ A s n ^{3 0 0} 、 A s n ^{2 9 8} 、 A s n ²
^{9 5} および A s n ^{2 9 4} 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 。

10

(項目 47)

単離リソソーム酸リパーゼ (L A L) 分子を含み、前記 L A L が、トランスジェニックニワトリの輸卵管細胞内で產生され、前記 L A L 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 L A L がヒト L A L 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。

20

(項目 50)

前記単離ヒト L A L 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)

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を含む方法。

(項目 52)

前記組換えヒト L A L 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 (C E S D) である、項目 51 に記載の方法。

30

(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 m g / k g ~ 約 5 . 0 m g / k g の間の前記 L A L 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 m g / k g ~ 約 3 . 0 m g / k g の間の前記 L A L 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 m g / k g ~ 3 . 0 m g / k g 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ーム酸リパーゼ (L A L) 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 L A L をコードする導入遺伝子を含み、かつ輸卵管細胞

40

50

内で前記ヒトLAL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LAL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61)

グリコシル化ヒトリソーム酸リバーゼ(LAL)を产生する、トランスジェニックトリ。

(項目62)

項目61に記載のトランスジェニックトリが産む卵。

(項目63)

項目61に記載のトランスジェニックトリにより產生されたヒトLALを含有する、卵白。 10

(項目64)

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

(項目65)

項目64に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

(項目66)

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と、第二の治療剤を前記患者に投与することとを含む、方法。 20

(項目67)

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66に記載の方法。

(項目68)

前記第二の治療剤が免疫抑制剤である、項目66に記載の方法。

(項目69)

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70)

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69に記載の医薬製剤。 30

(項目71)

pH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69に記載の医薬製剤。

(項目72)

pHが5.7～6.1の間に維持されている、項目71に記載の医薬製剤。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】ヒトLALのアミノ酸配列を表す図である。組換えhLALのアミノ酸配列は、天然ヒトLALの配列と100%の相同性を示す。成熟型のhLALに下線が施してある。

【図2】pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSAのrhlAL導入遺伝子である組換えhLALのヌクレオチド配列を表す図である。

【図3】図3Aおよび3B。pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSAおよびそのプロウイルス領域の略図である。図3Aは、形質導入粒子の作製に使用したヒトLAL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DNA配列は添付書類Aにある)。図3Aは、ゲノム内に組み込まれたpALVIN-OVR1-I-hLAL-dSAのプロウイルス領域の図である。SINLTRは自己活性化型の長い末端反復配列; OV DHSIIIエンハンサーはオボアルブミン遺伝子のDNアーゼ高感受性部位II

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 はヒト L A L c DNA ; 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。

【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。

【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。

【図 11】X L L 1 0 9 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 2 2 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 3 4 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 1 p I 部位の既知の位置および隣接ゲノム B 1 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 1 0 . 6 k b の位置が、4 . 3 k b および 1 0 . 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 1 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

ラグメント(10.6 kb)の位置およびサイズが示されている。図12Dは、4.1 kbおよび4.3 kbバンドの存在を示すために、図12B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13】図13A。ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA導入遺伝子の略図である。OVプローブおよびhLALプローブにより検出されることが予測されるApal Iバンドのサイズも示してある。図13Bは、導入遺伝子サイズ確認のためのALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA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、Apal Iで消化し、OVプローブ(左パネル)またはhLALプローブ(右パネル)でプローブした。WT CTRL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G1のID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(kb)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(OVプロモータープローブ、3.6 kb; hLALプローブ、3.8 kb)および内在性オボアルブミン遺伝子(7.7 kb)の位置およびサイズが示されている。

【図14】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(G0、G1またはG2)、識別番号、性別および孵化日が示されている。他のG1ニワトリは他系統のものである。

【図15】卵白からのhLALの精製段階を表す図である。

【図16】本発明に従って產生されたLAL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17】配列番号1で記述されるLAL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18】PNGアーゼにより解離し、MALDI-TOF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19】N-グリカンのHPAEC-PAD保持時間に対するLALの脱リン酸化の効果を表す図である。本発明に従って產生されたLAL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HPAEC-PADにより解析した。

【図20】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LAL(SBC-102)とリソソームマーカーの共局在を表す図である。

【図21】マクロファージ細胞系のNR8383を用いた競合結合アッセイにより評価した、組換えヒトLAL(SBC-102)のG1cNAc/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22】in vitroでの正常およびLAL欠損細胞における細胞中の組換えヒトLALの活性を表す図である。

【図23】LAL欠損ラットの内部臓器質量に対する組換えヒトLAL(SBC-102)処置の効果を表す図である。臓器サイズは、LAL^{-/-}ラットおよびLAL^{+/+}ラットにおいて、溶剤またはSBC-102を5 mg/kg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24】溶剤またはSBC-102を5 mg·kg⁻¹で週1回、4週間投与した後の野生型およびLAL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いる。

【図25】WTおよびLAL欠損ラットにおいて、溶剤または組換えヒトLAL(SBC-102)を5 mg·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す図である。

【図26】LAL欠損ラットにおいて、組換えヒトLAL(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、組織のコレステリ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。

【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。

【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バ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、天然のヌクレオシ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。

【0028】

本明細書で使用される「トリ」という用語は、分類学上のavagaro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)、オーストラロープ(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もこの用語に包含される。

【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

10

20

30

40

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有する合成配列）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見なされる。

【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バーゼ」、「SBC-102」または「ヒトリソソーム酸リバーゼ分子」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。

10

【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。Sam brook, 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。

20

【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當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、適當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當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。

30

【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

40

50

開始するよう指令することに關与し、後者は転写速度を決定すると考えられ、TATA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シ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分子の产生を阻止し得る、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を产生し得る、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。

20

【0044】

「家禽由来」または「トリ由来」という用語は、家禽により產生される、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。

30

【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、漏斗と峡部の間にあり、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。

【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的に指すことがある。

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Wiscow

50

sin Package、Version 9.1 の BACKTRANSLATE プログラム (Genetics Computer Group Inc.、Madison、Wis.) 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。

【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对照と比べて、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。

【0052】

LAL 組成物

本発明は概略的には、治療、例えばリ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リ化パターンを有する LAL のようなリ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。

【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 - 結合グリコシリ化パターンを有する、LAL を含めたリ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

【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

10

20

30

40

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、リソゾーム酸リバ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產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產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、本発明に従って產生された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

含まれない。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、本発明に従って產生された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-結合オリゴ糖の約50%以上がフコースを含まない。

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LAL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LAL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LAL中にN-アセチルガラクトサミン(GalNac)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LALの組成物を含む。

【0069】

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つの可能性がある部位、例えば、配列番号1のようにAsn^{3 6}、Asn^{7 2}、Asn^{1 0 1}、Asn^{1 6 1}、Asn^{2 7 3}およびAsn^{3 2 1}を有する。そのうちの5つ、Asn^{3 6}、Asn^{1 0 1}、Asn^{1 6 1}、Asn^{2 7 3}およびAsn^{3 2 1}はグリコシル化されているが、Asn^{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、LAL分子の混合物中、Asn^{3 6}、Asn^{1 0 1}、Asn^{1 6 1}、Asn^{2 7 3}およびAsn^{3 2 1}のいずれよりも少ない数のAsn^{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、Asn^{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LALの組成物である。グリコシル化Asn^{7 2}を有するLALは本発明の範囲内である。本明細書に記載のAsnの位置は、配列番号1で記述されるLALアミノ酸配列に基づくものである。Asnの番号付け(すなわち、アスパラギンの位置)は個々のLAL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LAL分子のような他のLAL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

【0070】

本発明に従って産生されるLAL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Asn^{1 0 1}、Asn^{1 6 1}およびAsn^{2 7 3}にM6P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、Asn^{1 0 1}、Asn^{1 6 1}またはA
40

$s n^{2\ 7\ 3}$ のいずれか 1 つに存在する M 6 P 修飾 N - グリカンを有する L A L の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 $A s n^{2\ 7\ 3}$ に存在する M 6 P 修飾 N - グリカンを有する L A L の組成物を含む。別の実施形態では、本発明は、 $A s n^{1\ 0\ 1}$ 、 $A s n^{1\ 6\ 1}$ または $A s n^{2\ 7\ 3}$ のいずれか 1 つに存在する一リン酸化 N - グリカン (M 6 P) を有する L A L の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 $A s n^{1\ 6\ 1}$ および $A s n^{2\ 7\ 3}$ に存在する一リン酸化 N - グリカンを有する L A L の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 $A s n^{1\ 0\ 1}$ および $A s n^{2\ 7\ 3}$ に存在する一リン酸化 N - グリカンを有する L A L の組成物を含む。特定の一実施形態では、本発明に従って產生された L A L は、 $A s n^{1\ 0\ 1}$ にニリン酸化マンノース (ビス - M 6 P) を含み得る。

10

【 0 0 7 1 】

本発明に従って產生される L A L は、減少したレベルのガラクトース (例えば、「G a 1」) を含み得る。本発明の一態様は、 $A s n^{3\ 6}$ 、 $A s n^{1\ 6\ 1}$ または $A s n^{3\ 2\ 1}$ のいずれか 1 つに末端ガラクトースを有する L A L の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 $A s n^{3\ 6}$ および $A s n^{1\ 6\ 1}$ に末端ガラクトースを有する L A L の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 $A s n^{1\ 6\ 1}$ および $A s n^{3\ 2\ 1}$ に末端ガラクトースを有する L A L の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 $A s n^{3\ 6}$ および $A s n^{3\ 2\ 1}$ に末端ガラクトースを有する L A L の組成物を含む。さらに別の実施形態では、本発明は、 $A s n^{3\ 6}$ 、 $A s n^{1\ 6\ 1}$ および $A s n^{3\ 2\ 1}$ に末端ガラクトースを有する L A L 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 L A L の組成物を含む。

20

【 0 0 7 2 】

各種タイプの N - グリカンが L A L 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 (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。具体的には、本発明の一実施形態では、L A L 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 $A s n^{3\ 6}$) に G 1 c N A c 4 M a n 3 G 1 c N A c 2 または G a 1 1 G 1 c N A c 4 M a n 3 G 1 c N A c 2 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、L A L 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 $A s n^{7\ 2}$) 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、L A L 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 $A s n^{1\ 0\ 1}$) に Ph o s 2 M a n 7 G 1 c N A c 2 を含む。さらに別の実施形態では、L A L 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 $A s n^{1\ 6\ 1}$) に、Ph o s 1 M a n 6 G 1 c N A c 2、G 1 c N A c 1 Ph o s 1 M a n 6 G 1 c N A c 2、M a n 3 G 1 c N A c 2、G 1 c N A c 2 M a n 3 G 1 c N A c 2、G 1 c N A c 3 M a n 3 G 1 c N A c 2、G 1 c N A c 4 M a n 3 G 1 c N A c 2 または G a 1 1 G 1 c N A c 4 M a n 3 G 1 c N A c 2 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、L A L 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 $A s n^{2\ 7\ 3}$) に、M a n 7 G 1 c N A c 2、M a n 8 G 1 c N A c 2、M a n 9 G 1 c N A c 2、Ph o s 1 M a n 8 G 1 c N A c 2 または Ph o s 1 M a n 9 G 1 c N A c 2 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、L A L 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 $A s n^{3\ 2\ 1}$) に、G 1 c N A c 2 M a n 3 G 1 c N A c 2、G 1 c N A c 3 M a n 3 G 1 c N A c 2、G 1 c N A c 4 M a n 3 G 1 c N A c 2、G 1 c N A c 5 M a n 3 G 1 c N A c 2、G a 1 1 G 1 c N A c 6 M a n 3 G 1 c N A c 2 または G a 1 1 G 1 c N A c 6 M a n 3 G 1 c N A c 2 から選択される N - グリカン構造を含む。

30

【 0 0 7 3 】

本発明のある特定の態様によれば、L A L の組成物は、配列番号 1 の $A s n^{3\ 6}$ 、 $A s n^{7\ 2}$ 、 $A s n^{1\ 0\ 1}$ 、 $A s n^{1\ 6\ 1}$ 、 $A s n^{2\ 7\ 3}$ および $A s n^{3\ 2\ 1}$ (または配列番

40

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) Asn³⁻⁶にGal1GlcNAc4Man3GlcNAc2または

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2があり;

b) Asn⁷⁻²にグリコシル化がなく;

c) Asn¹⁰⁻¹にPhos2Man7GlcNAc2があり;

d) Asn¹⁶⁻¹にPhos1Man6GlcNAc2、

GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2、

Man3GlcNAc2、

GlcNAc2Man3GlcNAc2、

GlcNAc3Man3GlcNAc2、

GlcNAc4Man3GlcNAc2または

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2があり;

e) Asn²⁷⁻³にMan7GlcNAc2、

Man8GlcNAc2、

Man9GlcNAc2、

Phos1Man8GlcNAc2または

Phos1Man9GlcNAc2があり;

f) Asn³²⁻¹にGlcNAc2Man3GlcNAc2、

GlcNAc3Man3GlcNAc2、

GlcNAc4Man3GlcNAc2、

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2、

GlcNAc5Man3GlcNAc2、

Gal1GlcNAc5Man3GlcNAc2、

GlcNAc6Man3GlcNAc2または

Gal1GlcNAc6Man3GlcNAc2

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Asn³⁻⁶、Asn¹⁶⁻¹またはAsn³²⁻¹のいずれか1つにおいて、Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2がグリカン成分として見られる。特定の一実施形態では、Asn³⁻⁶、Asn¹⁶⁻¹およびAsn³²⁻¹のグリカン成分としてGal1GlcNAc4Man3GlcNAc2が見られる。

【0075】

本発明のLALにおいて、Asn¹⁰⁻¹およびAsn²⁷⁻³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MAN6-MAN10)を示す。したがって、本発明の一態様は、Asn¹⁰⁻¹またはAsn²⁷⁻³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、Asn¹⁰⁻¹またはAsn²⁷⁻³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、Asn¹⁰⁻¹またはAsn²⁷⁻³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、Asn¹⁰⁻¹およびAsn²⁷⁻³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、Asn¹⁰⁻¹およびAsn²⁷⁻³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Asn^{3 6}は、配列番号2のAsn^{1 5}、配列番号3のAsn^{1 3}、配列番号4のAsn^{1 0}および配列番号19のAsn⁹に対応する。配列番号1のAsn^{7 2}は、配列番号2のAsn^{5 1}、配列番号3のAsn^{4 9}、配列番号4のAsn^{4 6}および配列番号19のAsn^{4 5}に対応する。配列番号1のAsn^{1 0 1}は、配列番号2のAsn^{8 0}、配列番号3のAsn^{7 8}、配列番号4のAsn^{7 5}および配列番号19のAsn^{7 4}に対応する。配列番号1のAsn^{1 6 1}は、配列番号2のAsn^{1 4 0}、配列番号3のAsn^{1 3 8}、配列番号4のAsn^{1 3 5}および配列番号19のAsn^{1 3 4}に対応する。配列番号1の^{2 7 3}は、配列番号2のAsn^{2 5 2}、配列番号3のAsn^{2 5 0}、配列番号4のAsn^{2 4 7}および配列番号19のAsn^{2 4 6}に対応する。配列番号1のAsn^{3 2 1}は、配列番号2のAsn^{3 0 0}、配列番号3のAsn^{2 9 8}、配列番号4のAsn^{2 9 5}および配列番号19のAsn^{2 9 4}に対応する。
10

【0077】

例えば、一実施形態では、LALは、配列番号2のAsn^{1 5}、Asn^{5 1}、Asn^{8 0}、Asn^{1 4 0}、Asn^{2 5 2}およびAsn^{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Asn^{1 5}、Asn^{8 0}、Asn^{1 4 0}、Asn^{2 5 2}およびAsn^{3 0 0}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%、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。
20

【0078】

一実施形態では、LALは、配列番号3のAsn^{1 3}、Asn^{4 9}、Asn^{7 8}、Asn^{1 3 8}、Asn^{2 5 0}およびAsn^{2 9 8}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Asn^{1 3}、Asn^{7 8}、Asn^{1 3 8}、Asn^{2 5 0}およびAsn^{2 9 8}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。
30

【0079】

一実施形態では、LALは、配列番号4のAsn^{1 0}、Asn^{4 6}、Asn^{7 5}、Asn^{1 3 5}、Asn^{2 4 7}およびAsn^{2 9 5}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Asn^{1 0}、Asn^{7 5}、Asn^{1 3 5}、Asn^{2 4 7}およびAsn^{2 9 5}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。
40

【0080】

一実施形態では、LALは、配列番号19のAsn⁹、Asn^{4 5}、Asn^{7 4}、Asn^{1 3 4}、Asn^{2 4 6}およびAsn^{2 9 4}からなる群より選択される少なくとも1つの
50

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19のAsn⁹、Asn⁷⁻⁴、Asn¹⁻³⁻⁴、Asn²⁻⁴⁻⁶およびAsn²⁻⁹⁻⁴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。

【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(*Lemna minor*)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、数多くの方法で產生され得る。

10

【0082】

また本発明はペグ化LALを含む組成物も企図する。本明細書に記載のLAL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產生されたリソソーム蓄積症酵素上に存在することが示されている。

20

【0084】

本発明に従って產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產生されたヒトLAL(hLAL)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LAL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、卵白を產生するトリ(例えば、ニワトリ、シチメンチョウおよびウズラ)を含む。

30

【0086】

トリでのLAL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-リン酸の付加が有效である(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(LAL)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LALも本明細書に開示される。

40

【0087】

本発明の一態様はLAL、すなわち本発明に従って產生されたLAL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、LAL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LALが取り出されている。特に有効な一実施形態では、LALはヒトLALである。一実施形態では、本発明のLALは、トリの輸卵管細胞内で產生されるLAL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產生され、卵白から単離された

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。

【 0 0 8 8 】

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產生される。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）内で產生され、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。

【 0 0 8 9 】

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產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。

【 0 0 9 0 】

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產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。

【 0 0 9 1 】

本発明の一態様では、レトロウイルスベクターの5'LTRと3'LTR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pNLBプラスミドを含む、トリ白血症ウイルス(ALV)レトロウイルスベクターまたはマウス白血病ウイルス(MLV)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RNA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。

【 0 0 9 2 】

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関係にある、ベクターが提供される。このようなベクターとしては、トリ白血症ウイルス(ALV)レトロウイルスベクター、マウス白血病ウイルス(MLV)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、トリ白血症ウイルス(ALV)レトロウイルスベクター、マウス白血病ウイルス(MLV)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LTR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バーゼ(TPD-LAL)などのような外来性タンパク質をコードする。

【 0 0 9 3 】

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、-アクチンプロモーター(例えば、ニワトリ-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。

10

【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。

20

【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(Gal1us Gal1us)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.)用いてコドン最適化され得る。

30

【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0.01μg~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1μg~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10μg~1硬殻卵当たり約400ミリグラムの範囲(例えば、1硬殻卵当たり約10μg~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。

40

【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1ng~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0.1μg~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1μg~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

50

約 1 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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、トリ白血症ウイルス(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関係で含み、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。

10

20

30

40

50

【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よい。

10

20

【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無作為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。

30

【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のであろう場所で、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。

40

【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、ジストロニックまたはポリジストロニックな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。

50

【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できる酵素を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

【0115】

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。

10

【0116】

医薬組成物および治療法

本明細書に記載の通りに產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LALのようなグリコシリ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／または予防成分とと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。

20

【0117】

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の方法（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LALは溶液の形態であり得る。医薬担体はロウ、脂肪またはアルコールであり得る。一実施形態では、ロ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、担体はリポソームまたはマイクロカプセルを含み得る。

30

【0118】

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のが含まれる。医薬製剤には、経口、経直腸、経鼻、局所（バッカルおよび舌下を含む）、経膣または非経口に適したもののが含まれる。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。

40

【0119】

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、従来の添加剤、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リ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、従来の添加剤、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。

50

【0120】

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による得られる、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、本発明に従って產生された 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。本発明に従って產生された 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 ± 0.2 に維持する。

【0123】

皮膚への局所投与用には、本発明に従って產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。

30

【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。

【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、加圧パ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パック、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。加圧パ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

【0129】

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、吸入器もしくは吹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・パック中の単位投与剤形で提供し得る。

【0130】

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。

【0131】

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

【0132】

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1kg当たり約1mg～約10mgの間の用量で投与する。例えば、抗ヒスタミン剤を体重1kg当たり約5mg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、リソソーム酸リバーゼの投与前の約10分～約90分の間、例えば約30分～約60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

【0133】

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、LAL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、ボクロスボリン、シクロスボリン、メトトレキサート、IL-2受容体に対する抗体、T細胞受容体に対する抗体、TNF- α 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）、CTL4-Ig（例えば、アバタセプト）、抗-OX-40抗体なども投与することもできる。30

【0134】

また本発明は、1つ以上のコレステロール低化剤（例えば、HMG-CoA還元酵素阻害剤）を併用するLAL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（Lipitor（登録商標））およびTorvastat（登録商標））、フルバスタチン（Lescol（登録商標））、ロバスタチン（Mevacor（登録商標）、Altocor（登録商標）、Altoprev（登録商標））、ピタバスタチン（Livalo（登録商標）、Pitava（登録商標））、プラバスタチン（Pravachol（登録商標）、Selektine（登録商標）、Liposat（登録商標））、ロスバスタチン（Crestor（登録商標））およびシンバスタチン（Zocor（登録商標）、Lipex（登録商標））が挙げられる。40

【0135】

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リ化パターンを含有する治療用タンパク質（例えば、LAL）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LALを用いて、LAL欠損症または不全症（合わせて「LAL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（CESD）などを治療することができる。本明細書に記載

10

20

30

40

50

の L A L 欠損症では、L A L の発現が、体内で產生される 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產生された 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產生された 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產生された L A L を用いて、脾炎、例えば慢性脾炎および／または急性脾炎、ならびにアルコール性脾炎のようなアルコールによる脾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。本発明に従って產生された L A L を用いて、例えば、組織がリソソーム酸リバーゼの產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。

【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ると考えられる。
30

【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バーゼを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

10

20

30

40

50

ソーム酸リバーゼの用量は、体重1kg当たり約0.1mg～約50mgの間であり、例えば、用量は1kg当たり約1mg～5mgの間であり得る。

【0142】

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1kg当たり約0.1mg～1.0mgの間の用量のリソソーム酸リバーゼを投与することによる、状態の治療法を提供する。

【0143】

本発明は、治療有効量のLALの投与が有用であり得るLAL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、LAL欠損症患者で見られる合併症を治療し得る。

10

【0144】

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產生され得る組換えLAL（例えば、組換えヒトLAL）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。

【0145】

本発明は、組換えLAL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。

20

【0146】

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CESD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（stool chart）、血漿メバロン酸、免疫原性、血漿リソソーム酸リバーゼ、キトリオシダーゼ、PARC、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て構成される。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。

30

【実施例】

【0147】

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。

【0148】

実施例1

組換えヒトリソソーム酸リバーゼ（rhLAL）コード配列を担持するベクター（pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA）の構築

pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSAベクター中のhLAL遺伝子のヌクレオチド配列は、ヒトリソソーム酸リバーゼ遺伝子（GenBankアクセスション番号：NP_000226）により產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mRNAの翻訳により399アミノ酸の前駆体タンパク質が产生され、これがプロセシングされて、配列番号1で記述されるヒトLAL（GenBankアクセスション番号：NP_000226）（図1）と同一の成熟した378アミノ酸タンパク質になる。本実施例のhLAL遺伝子（cDNA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产生する。ニワトリオボアルブミンプロモーターの活性は、卵白を产生する

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 p ALVIN - 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 (XL109) 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】

p ALVIN - 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領域の錫型として働くため、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p ALVIN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。p ALVIN - 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p ALVINに挿入して、p ALVIN - 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。p ALVIN - 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ラー挿入フラグメントである。スタッフラーの後には、ポリアデニル化を含めたmRNAの適切なプロセ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。一般にスタッフラーフラグメントは、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】

p ALVIN - 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】

p ALVIN - 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ファー領域をhLAL CDSに置き換えて、pALVIN-OV-1.1-I-hLALを作製した。

【0155】

10

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'-AGAAACTGAGAGTGTCTTAT-3'(配列番号12)およびプライマー5'-TGACAGCTGTGGATCCAGAACAAACATG-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】

20

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, 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プロモーターとを含む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BlpIでの消化により単離した。サブクローニングを容易にするために、プライマー5'-GCCGCTCGAGCGAGGAATATAAAAAATT-3'(配列番号14)および5'-TCCGCGCACATTCCCCGAA-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/BlpI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/BlpI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(pAVIJCRA395.22.3.1-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。

30

【0157】

40

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の產生が含まれる。

【0158】

50

実施例2

ウイルス粒子作製

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XL109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-p01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-p01はトリ白血症ウイルスのRAVI株のgagおよびp01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ミクリロンのフィルター(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発現力セットの組込みを、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発現力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ーを孵化時に付けた。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'-ACGACTGGCTTGCAAGATGTC-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釀物が含まれていた(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XL109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XLL109雄をG0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、G1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G1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XLL109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ついて、hLAL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、1μlのDNA溶液には、陽性増幅シグナルを生じるのに十分な50~400ngのDNAが含まれる。XLL109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ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA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。

【0162】

実施例6

高発現系統の同定および特徴付け

G1ニワトリの1羽である1LL7466が、卵白中に他のG1ニワトリに比べて有意に高いレベルのrhLALタンパク質を含む卵を産んだ。1LL7466および同胞のG1雄に関してサザンプ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(B1pI)により消化を行い、サザンプ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hLAL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、OVプローブまたはhLALプローブにより検出されるB1pIバンドのサイズは、生じた各系統に固有のものである。

【0163】

OVプローブにより、野生型ニワトリ由来のB1pI消化DNAにおいて4.1kb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B1pI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1LL7466で4.3kb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1LL10409、1LL10686および1LL12058、ならびに3羽の追加の雄同胞1LL8922、1LL9330および1LL11217が4.3kb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)。

【0164】

ニワトリリソーム酸リバーゼ遺伝子のDNA配列および組換えヒトリソーム酸リバ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ハイブリダイゼーションが起こ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hLALプローブによりバンドが検出されなかった(図12C)。OVプローブにより検出された4.3kbバンドに関して陽性であった同じニワトリ由来のB1pI消化ゲノムDNAにおいて、hLALプローブにより約10.6kbの単一バンドが検出されたが、このことは、これら7羽のG1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。

【0165】

他のバンドが検出されなかつたので、1LL7466、1LL10409、1LL10686、1LL12058、1LL8922、1LL9330および1LL11217はすべて単一の組込み部位を有することが示された。

【0166】

10

20

30

40

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込み導入遺伝子の予想される構造および B 1 p I 部位の位置を表すマップを図 12 A に示す。

【0167】

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 13 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 13 B）。

10

【0168】

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 14 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 14）。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。

20

【0169】

実施例 8

h L A L トリの遺伝子解析

30

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；上記のように組込み部位 P C R により導入遺伝子組込み部位を確認した。P C R 配列決定および組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。

40

【0170】

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。

【0171】

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

50

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pH5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(pH5)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(pH5)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pH6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(pH6)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(pH6)でカラムを洗浄した。5mMトリス緩衝液(pH7.2)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(pH8.2)中、37で18時間、トリプシンおよびキモトリプ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50μlの20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)中、37で18時間、2μl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、AnnumulaおよびTaylorの方法によりペルメチル化した(Annumula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-D-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-結合グリコシリ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、その内容全体が参考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-結合グリコシリ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、本発明に従って產生されたLALにおいてはN-結合グリコシリ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、本発明に従って產生された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 1 1

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 µg / 試料) を、Tube - O - Dialyzer (4.0 kDa カットオフ膜; G Biosciences) を用いて 4 度で約 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 度で 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 度で 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 µL の H₂O に再び溶解させ、氷中で 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 µl 当たり 0.2、0.4、0.8 および 1.6 ナノモルの Fuc と GalNAc; 10 µl 当たり 0.5、1.0、2.0 および 4.0 ナノモルの GlcNAc; 10 µl 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 µl 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 µl 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 ICS 3000 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 PA 20 (3 × 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 µL / 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" 50

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 chroomelon 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】

H P A E C による対照および L A L の単糖組成

試料 ID	分析物	ナノモル	ナノモル / μg	モル%	
対照	フコース	n d	—	—	10
	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	n d	—	—	
	マンノース	16. 565	0. 066	31. 6	
	マンノース-6-リン酸	n d	—	—	
	N-アセチルノイタミン酸	n d m	—	—	
	N-グリコリルノイタミン酸	n d m	—	—	20
トランスジェニックトリ由来 h L A L	フコース	n d	—	—	
	N-アセチルガラクトサミン	n d	—	—	
	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	n d	—	—	
	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-アセチルノイタミン酸	n d m	—	—	30
	N-グリコリルノイタミン酸	n d m	—	—	

n d = 検出されず ; n d m = 測定されず。

【 0186 】

L A L の構造的特徴

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 つの可能性のある部位、すなわち Asn^{3 6} 、 Asn^{7 2} 、 Asn^{1 0 1} 、 Asn^{1 6 1} 、 Asn^{2 7 3} および Asn^{3 2 1} を有する。このうちの 5 つ、すなわち Asn^{3 6} 、 Asn^{1 0 1} 、 Asn^{1 6 1} 、 Asn^{2 7 3} および Asn^{3 2 1} がグリコシル化されているのに対し、 Asn^{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、 Asn^{3 6} 、 Asn^{1 0 1} 、 Asn^{1 6 1} 、 Asn^{2 7 3} および Asn^{3 2 1} のいずれよりも少ない Asn^{7 2} 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、 Asn^{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 （例えば、ヒト L A L ） 、ならびにそのような L A L の產生および使用である。ただし、グリコシル化 Asn^{7 2} を有する L A L 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、 Asn^{1 0 1} 、 Asn^{1 6 1} および Asn^{2 7 3} 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	10
Asn ⁷²	検出されず	
Asn ¹⁰¹	Phos2Man7GlcNAc2	
Asn ¹⁶¹	Phos1Man6GlcNAc2 GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2 Man3GlcNAc2 GlcNAc2Man3GlcNAc2 GlcNAc3Man3GlcNAc2 GlcNAc4Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc4Man3GlcNAc2	20
Asn ²⁷³	Man7GlcNAc2 Man8GlcNAc2 Man9GlcNAc2 Phos1Man8GlcNAc2 Phos1Man9GlcNAc2	
Asn ³²¹	GlcNAc2Man3GlcNAc2 GlcNAc3Man3GlcNAc2 GlcNAc4Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc4Man3GlcNAc2 GlcNAc5Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc5Man3GlcNAc2 GlcNAc6Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc6Man3GlcNAc2	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を含めた单糖組成を、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。

【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

10

20

30

40

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】

H P A E C - P A D 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かを決定するために、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、中性およびアミノ单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H P A E C - P A D クロマトグラムにおけるピークの多様性の一因となる。

20

【0194】

実施例12

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バーゼの活性を、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オレアートアッセイを用いて決定した。

30

【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 μl、12.5 μlの卵白試料および25 μlの2.5 mM 4 - MUOを含むマイクロタイ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 °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 μl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じプレートリーダー（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 μmol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產生された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 (GalNAc / 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】

10

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 Wolmann 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。

20

【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 µg / 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。

30

【0203】

マンナンによる競合阻害 : 蛍光標識した SBC - 102 (5 µg / 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、上記細胞のリソーム内でのトランスジェニックトリ由来 LAL とリソームマーカーの共局在を調べた (図 20)。LAL はリ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 rLAL を用いた同様の *in vitro* 実験と一致する。

40

【0205】

GalNAc / 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 の結合特異性を、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 µg / 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

50

度を用いた蛍光標示式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 LAL の結合 / 取込みにおけるマンノース用量依存的な阻害が観察されたが、このことは、トランスジェニックトリ由来 LAL : GlcNAcR 相互作用と一致する。

【0206】

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）。

【0207】

トランスジェニックトリ由来 LAL への曝露が細胞内の LAL 活性を増加させる能力を、正常細胞および LAL 欠損細胞の両方を用いて vitro で調べた。Wolmann 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（NIH - 3T3）を、0、0.16 または 0.5 μg / mL の濃度のトランスジェニックトリ由来 LAL 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-MUO 基質を用いて、細胞溶解物を LAL 活性に関してアッセイした。内因性の細胞結合型 LAL 活性は、NIH - 3T3 に比べて Wolmann 病線維芽細胞で低く、またトランスジェニックトリ由来 LAL 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增加が見られた（図 22）。

【0208】

実施例 14

トランスジェニックトリ由来 LAL の in vivo 解析

LAL 欠損 Yoshida ラット（すなわち、ホモ接合型）（Kuriyama (1990) , Journal of Lipid Research, vol. 31, p 605-1611; Nakagawa (1995) , Journal of Lipid Research, vol. 36, p 2212-2218；ならびに Yoshida および Kuriyama (1990) , Laboratory Animal Science, vol. 40, p 486-489 を参照されたい）を、4 週齢から始めて週 1 回で 4 週間、SBC - 102 (5 mg / kg, IV) またはプラセボで処置した。各投与では、SBC - 102 を 30 分おきに 2 つの等しい用量 (2.5 mg / kg) 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。

【0209】

SBC - 102 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。SBC - 102 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。LAL - / - 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 SBC - 102 処置ラットでは減少していた（不掲載）。

【0210】

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 23 に示す。臓器サイズは、LAL - / - ラットおよび LAL + / + ラットにおいて、溶剤または SBC - 102 を 5 mg / kg 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百分比として表されている。

【0211】

図 24 に示すように、SBC - 102 処置または溶剤処置 Yoshida ラットの体重を野生型ラットのものと比較した。LAL - / - ラットには、SBC - 102 (5 mg / kg) 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、IV 注射により投与した。LAL + / + ラットは同齢の同腹子対照である。

【0212】

実施例 15

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 SBC - 102 処置のラットの肝臓および脾臓組織につい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

10

20

30

40

50

法（すなわち、MBL International社のTriglyceride Quantification Kit、カタログ番号JM-K622-100）を用いて、三重反復で行った。

【0213】

【表3】

野生型およびLAL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)	SBC-102 (n = 3)
肝臓	48	84	57
脾臓	3	22	4

【0214】

肝臓の基質レベル

図25は、WTおよびLAL欠損ラットにおいて、溶剤またはSBC-102を5mg·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

上で行った研究に基づき、LAL（「SBC-102」）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（PD）効果をLAL^{-/-}ラットで調べた。これらの実験では、SBC-102を0.2、1、3および5mg/kgで隔週または0.35、1および5mg/kgで週1回の用量で、4週齢から始めて1か月間、IV注射により投与した。結果は、体重（BW）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SBC-102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LALの投与

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ーム酸リパーゼ（LAL）反復投与の効果を、YoshidaおよびKuriyama（1990），Laboratory Animal Science, vol. 40, p 486-489に記載されているLAL欠損Donryuラット（Kuriyamaら（1990）Journal of Lipid Research, vol. 31, p 1605-1611；Nakagawaら（1995），Journal of Lipid Research, vol. 36, p 2212-2218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】

LAL欠失に関してホモ接合型（LAL^{-/-}）の4週齢のDonryuラットを、トランジェニックニワトリ輸卵管系で產生された組換えヒトLAL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。LAL^{-/-}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。LALの用量は1mg/kgまたは5mg/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（Shullら（1994），Proceedings of the National Academy of Science, vol. 91, p. 12937；Bieliwickiら（1999），The

10

20

30

40

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(5mg/kg)を前処置した。

【0218】

図29は、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	仔ラットの離乳
24日目	
25日目	
27日目	
28日目	週1回および隔週1回投与の最初の注射
31日目	
32日目	
34日目	
35日目	週1回投与の2回目の注射
38日目	
39日目	
41日目	
42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
45日目	
48日目	
49日目	週1回投与の4回目の注射
55日目	
56日目	剖検

10

20

30

40

【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樂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】

50

実施例 18**組換えLAL投与によるウォルマン病(WD)の治療**

生後の体重増加が困難で発育が悪いいため、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3.6kg(出生時体重が3.7kg)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、6cmの硬い肝腫大および約4cm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。

【0223】

最初のヘモグロビンレベルが9.2gml、血小板数が506,000および白血球が11,550である。尿検査は正常であり、骨髄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834mg/100ml、リン脂質が176mg/100ml、トリグリセリドが141mg/100ml、コレステロールが129mg/100ml、ビリルビンが0.3mg/100ml、アルカリホスファターゼが9.0BU%、SGOTが90単位、SGPTが50単位、コリンエステラーゼが20単位、尿素窒素が8.3mg、空腹時血糖が45mg/100mlである。腹部CT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。

【0224】

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、発生し得るなアナフィラキシー性の注入反応を抑えるために、LAL注入の20分前に患者を1mg/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LALを1mg/kg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。

【0225】

最初のLAL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、LALの注入により、患者のリソソーム酸リバーゼ活性が回復し、関連する異常が修正されたことを示す。

【0226】**実施例 19****組換えLAL投与によるコレステリルエステル蓄積症(CESD)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。

【0227】

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。III型グリコーゲン蓄積症(脱分枝酵素欠損症)の作業診断(working diagnosis)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。

【0228】

10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。線維芽細胞の酸リバーゼ活性は正常の7%であることがわかり、CESDの診断が確定される。総コレステロール(TC)、トリグリセリド(TG)、低密度リポタンパク質コレステロール(LDL-C)の各血漿中濃度はそれぞれ7.51、3.24および5.58mmol/Lで、その年齢・性別の95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(HDL-C)は0.47mmol/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。

【0229】

10

20

30

40

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、LAL注入の20分前に患者を5mg/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LALを5mg/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LAL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、LALの注入により、患者のリソソーム酸リバーゼ活性が回復し、関連する異常が修正されることを示す。

10

【0231】

実施例20

医薬品の説明および組成

本明細書に記載のLAL（「SBC-102」）の原薬は、トランスジェニックニワトリにより產生された卵白から精製された組換えヒトリソーム酸リバーゼ（rhLAL）である。SBC-102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（LSD）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】

SBC-102は無色透明で無菌の液体であり、F1uroTec（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プ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。SBC-102は、SBC-102（2mg/mL）、クエン酸三ナトリウム二水和物（13.7mg/mL、USP）、クエン酸一水和物（1.57mg/mL、USP）、ヒト血清アルブミン（10mg/mL、USP）および注射用水（最終体積分、USP）で構成される水溶液として提供される。SBC-102のpHは5.9±0.2である。SBC-102は保存剤を含まず、バイアルは単回使用が意図される。

20

【0233】

【表5】

【表5】

SBC-102（LAL）中の添加剤

30

添加剤	CAS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	USP	緩衝剤
クエン酸一水和物	5949-29-1	USP	緩衝剤
ヒト血清アルブミン	70024-90-7	USP	安定化剤

【0234】

製剤の成分

【表6】

【表6】

SBC-102製剤

40

成分	濃度
SBC-102（rhLAL）	2mg/mL*
クエン酸三ナトリウム二水和物	13.7mg/mL
クエン酸一水和物	1.57mg/mL
ヒト血清アルブミン	10mg/mL
注射用水、十分量	1.0mL

【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

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	MRKMRFLGLVVCILVLNTLHSEGS GGGKLTAVDPETNMNVSEIIISYNGFPSEEYLVETEDGYI	60
天然		MKMRFLGLVVCILVLNTLHSEGS GGGKLTAVDPETNMNVSEIIISYNGFPSEEYLVETEDGYI	
rhLAL	61	LCLMRIPHGRNRNSDKGPKPVVFLQHGILLADSSNNWVTNLANSSLGFI LADAGFDVWMGNS	120
天然		LCLMRIPHGRNRNSDKGPKPVVFLQHGILLADSSNNWVTNLANSSLGFI LADAGFDVWMGNS	
rhLAL	121	RGNNTWSRKHKTLVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILNKTGQEOVYVYGHSGQTFIG	180
天然		RGNNTWSRKHKTLVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILNKTGQEOVYVYGHSGQTFIG	
rhLAL	181	FIAFSQIPELAKRIKMMFFALGPVAVAFCTSPMAKLGRLPDHLIKDLFGDEFLPQS AFL	240
天然		FIAFSQIPELAKRIKMMFFALGPVAVAFCTSPMAKLGRLPDHLIKDLFGDEFLPQS AFL	
rhLAL	241	KWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLMSRVDVYTTHSPACTSVQNNMLHWSQAV	300
天然		KWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLMSRVDVYTTHSPACTSVQNNMLHWSQAV	
rhLAL	301	KFQKFQAFDWGSSAKNYHYNQSYPPTYNVKDMLVPTAVNSGGHDNLADYDVNILLTQI	360
天然		KFQKFQAFDWGSSAKNYHYNQSYPPTYNVKDMLVPTAVNSGGHDNLADYDVNILLTQI	
rhLAL	361	TNLVFHESIPENWEHLDINGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ	399
天然		TNLVFHESIPENWEHLDINGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ	(配列番号1)

図1

【図2】

1	ATGAAAATGC	GGTTCTTGGG	GTTGGTGGTC	TCTGGACCTC
51	GCATCCGAG	GGGTCCGGAG	GGAAACTGAC	AGCTGTGGAT
101	ACATGAATGT	CAGTGAATT	ATCTCTACT	GGGGATTCCC
151	TACCTAGTTG	AGACAGAAGA	TGGATATATT	CTGTGCCTTA
201	TCATGGGAGG	AAGAACATT	CTGACAAAGG	TCCCAAACCA
251	TGCAACATGG	CTTCTGCGA	GATTCTAGTA	ACTGGGTAC
301	AACACGAGCC	TGGGCTTCAT	TCTTGTGTAT	GCTGGTTTG
351	GGCAACAGC	AGAGGAATA	CCTGGTCTCG	GAACACATAAG
401	TTTCTAGGA	TGAATTCTGG	CTTTCTAGGT	ATGATGAGAT
451	GACCTACAG	CTTCATTTCTG	AATAAGACTG	GCACAAAGAAC
501	AGTGTATTAT	GTGGGTATT	CTCAAGGCAC	CACTATAGGT
551	TTTCACAGAT	CCCTGAGCTG	GCTAAAGGA	TTAAATGTT
601	GGTCCCTGG	CTTCCGTCGC	CTTCTGTACT	AGCCCTATGG
651	ACGACTGCGA	GATCATCTCA	TAAAGGACT	CTTGGAGAC
701	TTCCCCAGAG	TGCCTTTTG	AAGTGGCTGG	GTACCCACGT
751	GTCATCTGA	AGGAGCTCTG	TGGAATCTC	TGTGTTCTC
801	TAATGAGAGA	AATTTAAATA	TGCTTAGAGT	GGATGTGAT
851	CTCCCTGCTGG	AACTCTGTG	AAACACATGT	TACACTGGAG
901	AAATCCAAAG	AGTTCAACG	CTTGTACTGG	GGAGGCAGTC
951	TTTCATTAC	AACCAAGAGT	ATCTCCAC	ATACAATGTC
1001	TTGTCGCGAC	TGCAGCTGG	AGCGGGGGTC	ACGACTGGCT
1051	TACGACGTCA	ATATCTTACT	GACTCAGATC	ACCAACTTGG
1101	GAGCATTCCG	GAATGGGAGC	ATCTTGACTT	CATTGGGGC

(配列番号5)

図2

【 図 4 - 1 】

```

p A L V I N - O V R I - I - S B C 1 0 2 - d S A の配列 (1 0 8 8 2 b p)
          特徴                                位置 (b p)
          SIN LTR                            521-693 (相補鎖)
          OV DHS III エンハンサー           1069-2720
          O V プロモーター                  2720-3851
          イントロン                      3899-5487
          hAL LCDS                         5505-6704
          OV 3'UTR                          6719-7392
          部分的 g a g   C D S             7404-7657 (相補鎖)
          LTR                               7955-8300 (相補鎖)
          アンピシリコン酸性遺伝子          9764-10621 (相補鎖)

```

【図4-2】

2821 TCACTGGTGT AGATGGAGAA GATTAATCTGC
2822 GTCCTGAAAG ATTATTTGTT ATCTTTTCCTC
2841 AGGTGCGAGT GGTTCTTTA CTGTTGTC
3001 TCTATACATG AAATTATTTAT GTCTTGTAT
3061 CCTCCAGTC AAATTCTAAC CTCCTGCG
3121 GATCTTGAG GACACTACG ATGTCATAC
3181 SGATGTTG GACCTATGTT TGTCGTTG
3241 AACCAATTG AAAAGATAGT TAAATATTC
3301 ICACCTAGT CTACGGTGGC TCTTCATAC
3361 AGAAAATTA AGGTGCACTG TGTTGCT
3421 CATGGTACAT AACAGAAGGA TAAAGATG
3481 TAATGACG ACTAAACTAT ATTGTGCT
3541 TTCTGTTTCT CTTAAAGATC CCAATATC
3601 AATATTCCTC AGTCCTTCATC CTCCTAC
3661 AACATCATG TTTTCTGTT CTTAAACAT
3721 CTATGGAA AACAAATGCTT CCACTACCC
3781 ATCTGGAG GGAACCTGTC HGGTGGC
3841 CCAGCTTCATC TGGAAATGAG TAGAAAGTC
3901 AACGAACTCT CTGAAATTCAC TCTTCCTC
3961 AAAATAAAC ATTATGNGC TGTTGTTG
4021 CCCCTATCAA ATAACCTTCG CTGTTGATG
4081 TTCTGGTTG TTTCAGGAG GCTTATCTC
4141 CATCTTACCA GTCGGTCTAC TGTATGAT
4201 CCTACAGGC GCAAGAGAG CAAATATCG
4261 ATGGAATAT TCTCTAGAGA TTAAATTCCT
4321 ATAAAATGT GGGGGGTC
3831 TATACGAAAG AAAAGATAGG CAAAGGTG
4441 ATCTTGTAG GGGTTTAATG CAAAGGTG
4501 ATRAAGGCTT GGGCTCTGAA
4561 CAACTAGAT CAGTCGGTCT
4621 ATCTGGACG TCTACGCTG
4681 GTCATGTC TGAAACAGAA TICATTCTAG
4741 TATCATGTC GCATTCTTC TCTGTTG
4801 TTGTATACAT CAGATCACAT
4861 TAGGACGAA TAGATGATT
4921 TACATCCCTT ATCTATCTTC
4981 CTATAGACG TGATGTGCA
5041 AATAAGAATAA AAAATAGTC
5101 TTCTAGGAAT TTCTGCTG
5161 CAGGAGTCTT GAAAGATATC
5221 ATAGCTGTC TGGACGAGCT
5281 TTGTATGAA TGGTTTGTAA
5341 ACAGATATT TTTAAACAT
5401 CTGTGTTAGC CTACATAGA
5461 TTCTACATG TCTGCTGTTG
5521 TGGTTGTTG
5581 TGACAGCTGT GGATCCAGAA
5641 CCTCTTAGTG GAGAACATCA
5701 TCTCTGAAAG GAGGAAGGAA
5761 ATGGCTGTC GGGAGATCT
5821 TCATCTGTC TGATGCTGTT
5881 CTGGAAAGAA GAGAACACTC
5941 ATGAGCCAAAT ATGAGCTTA
6001 AACAGCTTA
6061 AGATCCCTG GTCCTGGT
6121 CTCCTGCTTG TACTACCTT
5181 ACCCTTGTG AGAACAGAA
5241 AGCTTGGAC CTATGCTATA
5301 GTTAAATGAG GAGAAATTAA
5361 CTGGAACTC TGTGCAAAAC
5421 AAGCTTGTG GGGHAGGAGC

【 図 4 - 3 】

6481 CACACATTC TGTGAGGAC TATCTGCCTGC GCGACTGAGT CTGGAGGGGC TTGGCAGACT
6541 GCTTGTGAGA TGTCTGAGCA TGCATTAATCT TACGTGACTCA GATGCCAAC TTGGTTGTCG
6601 ATGAGGACAT CCGGGATGAG GAGCATCTTG ACTTGTATTC GGCGCCGGAT TTGGCTTGGGA
6661 GGGCTTATAA TAAGATTATT AATCTAATCA GAAAGATATCA TGATGATGCA GGGCGCCGAA
6721 GAAAAGAAAT GAAAAGCTT CGTCCTCCCA ACAGACCCCA GAGACTGTA TTGATCAGGG
6781 TAAATGAAAG AGTATGTTAT CTGCTGCATC GACAGCTCA AAAAGCTGGA CCTTATCTA
6841 GAAAAGAAAT CAGGAAAGAA TATCTACGTC AGAACAGCTG CATTACACTG TTCTCTTCA
6901 CAGCATGAA CTGGTGAATC ATGAGGAAGG GCTTAAAGGG ATGATATGGC ACCTACAGA
6961 CTGAGCTAC TACAGTAAAG ATGCAACCTG ATGACATCGC TATGAGGAA TTGATGAGG
7021 ATGAGCCTG CATTCTAAGA CAGCATGAA TATCTACGTC CAGTACATCA TTATGACCC
7081 CAAATCTCT CAGCAATTAAT ATGCAACCTG ATGACATCGC CACCAACAT TTATGACCC
7141 TGCTTGTCTG CTGTTGTTCT GAGCATACCA TGATCTCTC GGCCTCTCTC GATCTTCA
7201 TAAATGAAAT CAAATTCAGA TTCTCTCTCA ATTGTGTTCTG ATGAGCTGAT CAGTCATG
7261 ATATGGTATA TTAATCTGCA ATTGTGTTCTG CTTGTACCCA TATGATGAA TTGATGAA
7321 TGWGGCTTG TGTTCTCTCA ATGCAATAAAG AAAAGCTGGA AACGAACTGG CTTGTTCTG
7381 TAGTATTGGA AGGTAGCCGG TCGTGGAGCC CTCCTGAGTG CCCCCAAACG ATTTCTACG
7441 TTTTATTAAT CTCGGGATTT CAAAGTACCA TCGGGCGCTG AGAGAGGGCC GGGGTAAAG
7501 GATCCCCAGG CCGGGGGGAA TATTCCTCTG TATGAGGAA GGTTTTCCTGG CAATGGCT
7561 ACAGGGCAAC TACATGGCTCC ATTTCCTCTG TATGAGGAA GGTTTTCCTGG CAATGGCT
7621 TACAGGGCA CCAAATTCAC TTTTACGGC CTTCAGCTGT GATTCACCC GGGAGCGGA
7681 ATACAGGGCA CCAAACGGGA TCAAGCTCTG GAGTTCTCTG TATGAGGAA GGTTTTCCTGG
7741 CGGCTTCGA ACAGCTCTCTG GAGTTCTCTG TATGAGGAA GGTTTTCCTGG CAATGGCT
7801 CCCCTGGCGG CCAACTCTGC TATGGCTCTC AACAGGGCCG CCCCCCTCTG CAGTAGGGCT
7861 GTGCTGGCTC CCAATGAGG CAAAGGGCCG GAGGGAGGA GGGAGGGCC CCGGGGGCA
7921 CCACTATGG CTAACGAGCA TCGGGGGTCA AACAGGGCCG AACAAATGAA GGTCTTCTG
7981 GCTCTGAGTC GTGAGGGAAAT CAAAGGGCCG GGGCTAACG CAGTCGAGT TTGATGAGG
8041 GATGTGCTCA AGGGCTCTTA TTGTATGAGA TCTGACACTG AACATACATA TTGATGAGG
8101 CGGCAATTCG GTGGCTGCTG AACATCTCTG TACAGCGCTG AACCAATCTG TTGATGAGG
8161 AGCATCATAC CAGCATCAAA CACCTCTACT AACATCTCTG TACAGCGCTG AACCAATCTG
8221 TCRCTTCTG AAGCCGCTCA TCAACGATC TTGACATGAA AACATCTCTG TTGATGAGG
8281 GTATGCTCA AGTACATGAA TCCCGCTCTG TATGAAAGG AACATCTCTG TTGATGAGG
8343 CGGACCTCTG AACGGCTGCA AACAGGGCCG AACAGGGCCG CGGTITGGC
8401 TCACTGCAAGC CTGGCGCTG AACCAAGGGT AACAGGGCCG CGGTITGGC
8461 TAGTATTGAA TCTGAGCTACT CAACTGAGCT CAACTGAGCT AACAGGATA
8521 TAACTGTTA CTAATGAGG AACCTCTCTA TTCTCGGTCG TACAGCGCTG AACATCTCTG
8581 CGCGCTTGGC GHAATGCTGC AACATCTCTG TCTCTGTTG AACATCTCTG TTGATGAGG
8641 TCTCACACAA CATACGAGGC ATTAATGGCC TCGCTCTG AACATCTCTG TTGATGAGG
8701 GGCACCTAC TTAAGGATTC GCAACAGGGC CGGGGGAGGG CGGTITGGC
8761 CGGACCTGGC TTAAGGATTC GCAACAGGGC CGGGGGAGGG CGGTITGGC
8821 CTTCGGCTG CGGGGGAGGG AACATCTCTG AACATCTCTG TTGATGAGG
8881 CAGCTCACTC AACAGGGCCG AACATCTCTG AACATCTCTG TTGATGAGG
8941 ATCATGGCGC AAAGGGCCG AACATCTCTG AACAGGAGTC AACAGGATA
9001 TTTTCTCATG GTCTGGCCCG CTTCAGACGG AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG
9061 GGGCAACCCG GACAGACCTA AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9121 CTCTCTGGC TCGGGCTCTG AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9181 CGGGTGGGGT CTTCTCATG AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9241 CAACTGGCTG CTGGTGGGG AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9301 ACTATGCTT TGAGTCCAAAC AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9361 TAACAGACCG TACAGGAGGG AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9421 CTAACTACGG CTACATCTAGA AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG
9481 CTCTGGAAA AGAACATGGT AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG
9541 GTTTTCTTGTG TIGCAAGGC AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9601 TATGCTTCTG AACGGCTCTG AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9661 TCACTGAGTAA TATCAAAAGG AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9721 AAATCACTCA AAAGTATATAC AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9781 AGGGCACTAT CTCAGGAGGA AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9841 TGYTATGATCA TACATGATCAGG AACGGCTCTG AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG
9901 GAGACCGAACG CTCAGCCGGT AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
9961 AGGGCAAGA TGCTGCTG AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
10021 AAGCTGAGT AGGTAGTGGT AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC
10081 CGATCTGGT CGCTGGCTG AACATCTCTG AACAGGAGTC AACATCTCTG AACAGGAGTC

【図4-4】

10141	CAAGGGCAGT	TACATGATCC	CCCATGTGTC	GAAAAAAAGC	GGTAGCTTC	TTCGGCTTC
10201	CGATCTCTCT	CAAGACTAAT	TTCGGCCCGAT	GTATTACACT	CGACCTTGA	GCACCATGTC
10261	ATAATTCTCT	TACTGTCATC	CCATCGCTTA	GAGCTTCTTC	TGTAGCTTGT	GAGTACTCTA
10321	CCAAGTATTC	CTGAGAACAT	TGTAGCGGCC	GACCGGCTTG	CTCTTCGCCC	GGCTCATCAC
10381	GGGATAATTC	CGCCGCCATAT	AGCAGAACCT	TAAGAGTCCT	CATCATGGTA	AAACCTTCAT
10441	CGGGGGGAAA	ACTTCIAAGG	ATTCATTCGGC	TGTGAGATC	CAGTGGATGA	TTAACCCACTG
10501	GTGCCCCCAA	CTGTGATGAA	GCATCTTTTA	CTTCTTACACG	CTTCTTGGG	TAACCCACTG
10561	CAGGGAGGCA	AAATGGCGCA	AAAAGGGAA	TAAGGGCAG	ACGGAAATGT	TGAATACCTA
10621	TACTCTCTCT	TTTCTTCAAT	TATTGAGGCA	TTTATCAGGG	TTATGTCCT	ATGAGCGGAT
10681	ACATATTCTA	ATGTTTTAGT	AAAAAATACAC	ATAAGGGGTC	TCCCGGCCAA	TTTCCCCGCA
10741	AAAGTCGACC	TCAGCGGCG	TGTAGCGGCC	CATTAAGGGC	GCGGGGTGIG	TTGGTTACCG
10801	CGACGGCTAC	CGCTTACACTT	GGCCAGGCC	TAGCCGCC	TCTCTTCGCG	TTCTTCCCTA
10861	CTCTTCTCGC	CACCTTGC	GG			

(配列番号 6)

図 4

【 図 5 - 1 】

プロウイルス領域のDNA配列 (7780 bp)			
特徴		位置	(bp)
SIN LTR		1-173	(相補鎖)
D H S I I I 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	
HIAL CDS		4985-6184	
OV 3'UTR		6199-6872	
部分的 g a g C D S		6884-7137	(相補鎖)
LTR		7435-7780	(相補鎖)
1 AATGAGGGCT	TCTGCGTTOAT	GCAATGGTC	GTAGTGCG
61 TCAACCCAGG	TGCACACCCA	TGTCTGATG	GCTTCAACG
121 GCACTTAAAT	AAGATAATCT	TGCAATGGGS	ATTATCGG
181 CCTATGCA	AAGGCACACT	ACTATATCCT	GAGGGACAGA
241 CCCCGCTT	GGCTTAACT	TGCTATGTC	CCCTGAGG
301 GATTGCCAG	TCTTCGCCC	CAACCATAT	CTCTAGAC
361 GCTACAGAG	TAATCTGAT	CCTGATGCAA	GCTTACAA
421 ATATTCGCCG	TGGACAGGA	CAATACCTAA	ATTCACCC
481 ACTGCGCTAC	TCTTCCTCTT	GGGGCTGTT	GCGACGACG
541 CGCTCGAGC	TCTTCAGAT	GCTTACGAT	CGCTGAGAAC
601 ATICAGAAC	AAAGGGATC	GACCTGATAC	TCTTGTATTC
661 ATAACTACAA	AGAACCTG	AGAHAGAAC	ICAGTACG
721 ATGGCAAACT	ATTGCGAT	CATCTGCG	CTGAGACG
781 GTGTTCTTC	TCTTCCTGAT	AAAAGGCAAT	TTTCAACACA
841 ACAGAACAA	TTAAATGTC	CCCTCTCTAA	TTTCAACACA
901 AAAATCTCAA	TCTTGATGAA	TTTTTTAGTC	ATTTGAAATA
961 ACCCTGACTT	CATATCTAC	TTAGGAAAAA	GGGTTTTGTC
1021 TTTATTCATG	AGACTTTGG	TTAGGGACCA	GGGTTTTGTC
1081 GGGCAGCAGA	GGCTTATG	ACACCTTTCT	CTGGGAGACG
1141 AAACATTTTC	TACTGTTG	ACACCGTGTG	CTGGGAGACG
1201 CAGGAACTT	AGGATCTG	AGAAAGATG	TGCTTACG
1261 CCAACTAATG	AGGTATGTC	ACAMACACTA	GATGACAACT
1321 TTGTCAAGG	ACAAATTGTT	TGCTTGCG	CTGTGTTG
1381 ATCTTCCTCA	TCTTCAGACAA	ACAGGAAAGA	TTCTGAGC
1441 TTAAACACC	GCGCTTAC	TTGGAGGAT	TTCTGAGC
1501 GCTCTCGAG	TAACTGAT	ACAAACAGT	TTCTGAGC
1561 GAAGCTAAAT	AGAGACGAT	TTAAAGACCT	TTCTGAGC
1621 AGCATGATAC	AGACGATGA	ACTGATCAA	CTTCATCAC
1681 CTAAAGATAC	AGAACATAC	GATGAGCGTA	AAAGATGAG
1741 GTCTGGTGT	TGATCTGAT	AAAAGGAGAT	AAAGGAGAG
1801 GGGCTTCAGG	GAGCTTCTG	AGGCAGATTG	GACTGAATG
1861 TATGTACCAA	TGGAAAGTC	TTATTTGAGA	ATAATAATA
1921 GACCTGACCA	AGGAAACAA	TATGGAGTGA	TTTATGAGA
1981 ATATACATG	GGCTCGAGA	GGCTGAGATG	CTTCACAC
2041 GAACCTCTG	TCTACATCA	GGACGATCTC	TTTCTTCTC
2101 CAGGGCTGT	TCTTCACAT	TTCTCACTC	ACCTTCTC
2161 GTTCTTACAT	ATTGCTCAG	GGGATGACAT	TTTCTTCTC
2221 AGGAGAAATG	AGATTTCCAC	AGATATATAT	TTTCTTCTC
2281 AAAATGCGAC	TGACTAACT	CGCTGAGTGS	TTTCTTCTC
2341 TTGCTGAT	CTTCATGAT	GGCTCGAAGA	TTTCTTCTC
2401 ATAAACACAG	TGGCTTACAG	AGGTCAAGAT	TTTCTTCTC
2461 TTCAATCACAG	AAACATACAT	TCTTAACTAC	TTTCTTCTC
2521 TCTCTCTGAC	GAATGAGCA	CCTCAGCGT	TTTCTTCTC
2581 CCATTAAGTT	ATTCATGGAA	TTCTTTGAG	GGACATCTC
2641 TTGAATTTGA	TTGATTTG	GCATGTTGAT	GGACATCTC
2701 AAGTTTGTAA	TAACGATCT	ACACCCATAA	AAAGATAAGA
2761 AAAGAAAGTC	TGCTGCTC	TCACTCTAGT	TTCTGAGC
2821 TTATTTCTCC	TATTTTGC	AAAGAAAAAT	GGCTGAGA

【図5-2】

2681 TCTAGCGGG CTCAGATGCA CATTGTGAC ACAGAAAGGA TCAAATGAA CAGACTCTG
2941 GTCGTTTACT ACACCCATG TAAATGACAC ACTAACTAAT AATTGCTAT GTATTGTTCT
3001 ATCTACCGAAG TTCCACCATG TTTCGTTTT CTAAAGAACG CCTACATTCG GTTGAACTCG
3061 AACGTCAGCA GAACTGAGC AAAATTTCCC ATCTTCTCTC CCTACATCACG AGCTGCTTC
3121 GATTAGCAGA CGACCGAGA AACACATGT TACCCGAAAT TAAATACATAA TATTGTCCT
3181 CCTACATTG CAAAATGGCA CTATTGAAAC ATCTTCAAGG GNGAACCTG TGCGGGCAAC
3241 TCTATGGTGT CAAAGGCGA ATCTTCAAGG GGAACTCTG GNGGGTCGAC AATTGACGCT
3301 ATATATTCGC CAGGGCTGC CAGAGCTGCTC TACATACAGC TGAAGACG TGATTGCTG
3361 AGGACGTCAG CTGAAAGGT CAAAGCCTAC CTGGAAATTC TCTTCCTCA TATAGCTCT
3421 TACTTGCACCC TAAATCTTA CAAATTAACAA ATTATGTTGC TATGTTGTTGT ATCTTCAAG
3481 GFGAACTGGC TGGCTGATAC CCCCTTAAAGA AACTCTTCA CTGTTGATCG ATTCTGACCT
3541 ATTATTTATG GTTAAAGAAC TTGTTGTTTG TTCTTCAAGG CCTTACATCTT GCTTGTGAA
3601 ATATGTTTTT AATTTCAAGC CAACCTATG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG CCTTCTGAG
3661 TGTCTGGTATG AACTTCTGC CAACTGAGT TCTGTTGTCAG CGACAGAGG CAAAATCTG
3721 AATTGTCGG AGTATTTTG ATCTGAAAGA TCCTTCAAGG TCTTACAGG CCTTCTGAG
3781 GCTGCTGGAAC ATACACAAAC AAAAAATGGT GGGGGGGCA TAAACGATTA TCTTCATAC
3841 ATAGATAGCA TGTTGACTTA TATCAGAACG AAAAAATGGG AAAGAACATTC GGTGTTGATAC
3901 TCAACACCGG GFGCACTGG AACTTCTGG GGGTTTTAAGA CAAAGAAATTC AGTCTTCAAG
3961 CCCACAGCG CAGTGGCAAT AATTAAGGGC GGGCTCTGA GGGCTCTGA TCTTACAG
4021 TTATATAATG CTCAAGGAA CAACTGAGT TCTGTTGCTG ATCTTCTGTT ATCTTCTG
4081 AGAACACTCG GCTATTAACAI ATGGTCAACG TGTCTGTTCA TCTGTTGTCAG CGACAGAGG
4141 CARGTGATTA TCTCTTGTGTTG CTCTTGTGTTG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG CCTTCTGAG
4201 TATRATTAAC ATTCTCTTGTG TCTCTTGTGTTG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG CCTTCTGAG
4261 AAATTTAAC TCCACGAAAR GTTTATACAGA CAGTACACAT TCTGTTGTCAG CGACAGAGG
4321 AACATTACCTT GAAAGTCCG TCTGTTGTCAG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG CCTTCTGAG
4381 CTACATGAGC CCATTAATAT TACATCTTCTG ATCTTCTGTT ATCTTCTG
4441 AAAATTTCTT GGAAAGTCAT CTCATGAACTG TGTCTGTTCA TCTGTTGTCAG CGACAGAGG
4501 ATTATTTTTT AAGGAATAAA AATTAAGAA AAAAAATGGCA CCTACATCTG ATCTTCTG
4561 ATATCTGCTC AAAAACTTAAG TTTCTTACAG GAAAGGTTAC GAAAGGATTC ATCTTCTG
4621 CTACATGAGT GTTGTGTTG CAGAGGTACT GAAAGGATTC ATCTTCTG
4681 GAAACAAATAAT ATGAGTGGACG AACTGGCTTC GGGGGAGCT TCTGTTGTCAG CGACAGAGG
4741 ATGCAATAAC TAACTTATAGA TTCTTAAAGA TGGTTTTGAA CTGTCACACG AAGACAGCT
4801 ATGCAACAGC ACACATTACCC AGAACATGAA TCTGTTGTCAG CGACAGAGG CCTTCTGAG
4861 TAAATACCTG TGCTGTTCTG ATCTTCTGTT ATCTTCTGTT ATCTTCTG
4921 TACAGCTTCA CTCAGCTTCA TTCTTCAAGG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG CCTTCTGAG
4981 CACCATGATTA ATGCGGGCTC GGGGGGGGGT GGTCTGTTG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG
5041 CGAGGGGTTCC GGGGGGGGGT GACAGCTGTT GGTCTGTTG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG
5101 ATTATTCCTT TACTGGGGAT CTTCTTCAAGG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG CCTTCTGAG
5161 TATTCTGTCG CTAAACGGCA TTCTCCATGG AGCTCTTGG GGGGGGGGGT GGTCTGTTG
5221 ACCAGGTGTC TTCTGGTCAAC AGCTCTGGCTC TTCTCCATGG GGGGGGGGGT GGTCTGTTG
5281 TGCACCAACG AGCTCTGGCTC TTCTGGTCAAC AGCTCTGGCTC TTCTCCATGG GGTCTGTTG
5341 CAGCAGGGAG ATAACTCTGGC TTCTGGTCAAC AGCTCTGGCTC TTCTCCATGG GGTCTGTTG
5401 CTGGCTCTTC AGTGTATGATG AGTGTGTTCA TTCTCCATGG GGTCTGTTG TCTGTTGTCAG
5461 TCTGAAATG ATGCTGGCAAG AAGCTGGCA AGCTCTGGCTC TTCTCCATGG GGTCTGTTG
5521 AGGGTTTATAA GGGGGGGGGT GGGGGGGGGT GGTCTGTTG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG
5581 CTCGGCTCTG GTGGCTCTGG ACAGCTTCTGG TTCTCCATGG TGTCTGTTG TCTGTTGTCAG
5641 CGGCGATCATC CTCAATTAGG ACCTCTTCTGG AGCAAAAGAA TTCTTCTCTC AGACTCTG
5701 TTGAGATGTTG CGGGCTTCCG AGTGTGTCAC TCTGTTCTGG TGTCTGTTG TCTGTTGTCAG
5761 TCTCTGTTTCTT CTCTGTTGTCAG GGTGTTTCAAGA GAAAGGTTTA ATATGTCAG GAGTGTGATG
5821 GTATACAACA CATTCTCTGCTG CTGGAACTTC TTGTTGAAAGA ATCTTCTGTT ATCTTCTG
5881 TGTAAATTCG CAAATTTGGG CCTGGGGGGGGT CGGGGGGGGGT GGTCTGTTG TCTGTTGTCAG
5941 TAACCAACG AGTATCTCTG CCTACATACAA GGTGTTGAAAGA ATCTTCTGTT ATCTTCTG
6001 CTGGAGGGGGT GGGGGGGGGT GGTCTGTTG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG ATTATTTCTG
6061 GATCCACAACT TTGTTGTTCTG ATGAGACATCT GGGGGGGGGT GGTCTGTTG TCTGTTGTCAG
6121 GGGGGCTGGT GGGGGGGGGT GGTCTGTTG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG ATTATTTCTG
6181 GTGTTGTTGG CGGGGGGGGGT GGTCTGTTG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG ATTATTTCTG
6241 GAGCAGCTGG CTGATACAGGG AAAAAATGGCA TGGTCAACG TGTCTGTTG TCTGTTGTCAG
6301 AAAAGCTGGT GGTCTTCAAA GAAAAATGGCA TGGTCAACG TGTCTGTTG TCTGTTGTCAG
6361 CAATCACTTCTT CTCCTTCAAGA GCAAGATTA TGGTCAACG TGTCTGTTG TCTGTTGTCAG
6421 ATGAAATTTG ACTACATCAAG TGGTCAACG TGTCTGTTG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG
6481 AGAAAGTTG TGGGGGGGGT ATGCAAGCTT GGTCTGTTG TCTGTTGTCAG CGACAGAGG

【 図 5 - 3 】

6541 CTGCTGGCA AATTAGGCAAT CAAAATTCCTC CAGATTAAAT TAACTAACGT
 6601 TCTTATCTCG ACAAAGCCAT TGCCTTGTCT GTTGTTCTCCT
 6661 GACTTCTCAA AGATGCTTCA TAAAATTCCTC ATTAATTCACA
 6721 CAATCTAGTG ATRTGGCTCA ATRTGGCTATA TRATTACTCA
 6781 TATGTAARGG RTGCTTGTCA TGTTGCTCTT
 6841 AACGACAAAC TTTCATCTGCT TGTAGTTGTA
 6901 CCCAAACAAAC AATCCCGCACT TTTCATCTGCT
 6961 AGAGGCGGCC GGCGTAAATGC GAACCCAGGA
 7021 AAAGCACCCCT TCCCTTGTGA ACAGGGACAA
 7081 GTTGTTCGCG CAAATAGCTC TACAGCGGGA
 7141 TATGCAACCG CGGCAGCGGA ATACAGCGGA
 7201 TACGTGCTGG CGGCTTCCTC CGCTTCTCCA
 7261 TGGCCCCCTGC CAGTAGGGCT
 7321 CCCCTCTTAC TGGAGCTC
 7381 CGGACCGCGC CTGGCGGCC
 7441 GCTCTCTGCT ATCACTGATC GTCTGCTAGTC
 7501 CAGCTGGCA CCAAATGGGT
 7561 AAATACATAA TCTCTGCAAT CGGAATGATCA
 7621 TTGTCTCTC CAACTAACGG
 7681 GGCACTGCAAG GCTGCTTCTT
 7741 CAATGTCGCA GACTAACAGA
 7761 CTTGATGCA
 7821 CTTGATGCA
 7881 CTTGATGCA
 7941 CTTGATGCA
 8001 CTTGATGCA
 8061 CTTGATGCA
 8121 CTTGATGCA
 8181 CTTGATGCA
 8241 CTTGATGCA
 8301 CTTGATGCA
 8361 CTTGATGCA
 8421 CTTGATGCA
 8481 CTTGATGCA
 8541 CTTGATGCA
 8601 CTTGATGCA
 8661 CTTGATGCA
 8721 CTTGATGCA
 8781 CTTGATGCA
 8841 CTTGATGCA
 8901 CTTGATGCA
 8961 CTTGATGCA
 9021 CTTGATGCA
 9081 CTTGATGCA
 9141 CTTGATGCA
 9201 CTTGATGCA
 9261 CTTGATGCA
 9321 CTTGATGCA
 9381 CTTGATGCA
 9441 CTTGATGCA
 9501 CTTGATGCA
 9561 CTTGATGCA
 9621 CTTGATGCA
 9681 CTTGATGCA
 9741 CTTGATGCA
 9801 CTTGATGCA
 9861 CTTGATGCA
 9921 CTTGATGCA
 9981 CTTGATGCA

【 図 6 - 1 】

p A L V I N - O V - 1 . 1 - I の DNA 配列 (1 0 7 6 2 b p)	
特徴	位置 (b p)
スタッフラー	1-2734
OV 3'UTR	2750-3423
部分的 g a g C D S	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)
ノンプロモーター	9154-9237 (相補鎖)

【図 6 - 2】

2881 AGATGTTTA TCTGTCATC CCAGACTTCA TAAAGCTGG AGCTTAAATCT AGAAAAAAA
 2881 TCAGAAAGAA ATTACACTGT GAGAACAGGT GCAATTCACT TTCTCTTAC ACAGAGTAAAT
 2941 ACTGGTAACT CATGGATGAGG GGCTTJAAGGG ATAGAATG GACTCACAGT ACTGAGTCAT
 3001 CACATGAAA ATAGGAAACCT GATAACATCG CAGAAGGTTT ATGGGGAAA ATAGCAGCCT
 3061 TCCAATTAG CGAGATTTCT GTATGACCAA CTGCTCTTCA AATTAGTCAC TCAAATCTC
 3121 TAGATTAAA TTATCAATG TCAACCAACCA TTCTCTATGCT GACAAGGCA TTGCTGTTG
 3181 TCTGTGTC TGATACATCA AGGCCTCTTC TGACTCTCA AAGATGCAAT TAAAGAATCT
 3241 TATAATTCA ATTCTCTCC AAACATTGAC TCAATCATGG TAGTTGCGCA ATATGTTGAT
 3301 ATTACTATC AAAATGTTT CCTTGATCCC ATATGTAATG GTCTTGTGGA ATGTTGCTT
 3361 TGTGTTTTAATC ATTATGATTA AAACATGTT TAAGCAAACCA TTCTTCACTT GTAGATTGTT
 3421 AAAGTACCGC ATCTGAGGC GCTTCAAGG CCCCAAAAC CAATCCCCAG GTTTTAACCT
 3481 CTCCGGATTG ATAGGAGG PACC ATAGGCCGCT GAGAGAGGCC CGCGGATAGTGGGATCCAG
 3541 ACCCCCCGGG ATATAATGTT GAGGGGAGC TAAAGCAACC TTCTCTTGTG AACAGGAGCA
 3601 ACATAGGACG TATTCTCTT GAGGGGAGC AGGTTTTCCTC GAAATAGGC TTACAGGGG
 3661 AGCAAAATCAC CTTTATGAG GCTTCAATG TCAATGCAAC GGGCGAGCG AACAGCAGG
 3721 GGGATGCGCCTT GGTGAGGACG CTAGTGTGCT GGGCTTCTT CCGCTTCTTCC
 3781 AACGACTCTC TGAGTCTG TGAGGTTGAT GTGGGCCCCCT CAGTAGGGG CTCCTCCGAC
 3841 GCGCACTCAG TCTGCGCCCTA CTAAAGGCA GCGCCCGCC CGTCGCGCC
 3901 CGGAAAGAG GAGAGGAGT AGGAGCAAGG CGCCGCGCC CGCTGGCCG ACCACTATTTC
 3961 CCGGAGGAA ATGGGGGGT CACCAAGGAA AGCCCTTCTG TCACTGATCG TGCTGTTAGT
 4021 CGTCAGGGAA TCAAGGCTC GGCACTTCAAC CGAGGTCAC GAAATGTTGG TGAATGTTCA
 4081 ATGAGGTTT ATGTAATGAG GCTAGGACT TAAATACATG ATCTCTGCA TTGCGGAATT
 4141 ATGTTGTTGTT CAAATCTGGT TTAGAGCGCTT CTGTTGCTTCA TCAACAGGG CAGGATCAT
 4201 CCAAGATCAT ACCACCTTAA TCCACCAAT CGGCATGAC GGGCTTCTT CTCCTCTTAT
 4261 AAGGACTGTTG GCTAATCATC CGTATCACATG GATGTTGCA AGACTAACAG AGTATGATC
 4321 AGAACATCAT TTCTGCTTCA CTAAAGGAA AGGAAACATAC TATACTCTGAG GGGGACTCTT
 4381 ACCCGGCTAC ACCGGAGGC CGCTTCTTC CTTAAACATG CTGCTGCTCC CTAGTCAAG
 4441 CCTTGGCTTAC TACAGGCTC TTGCGGAGC TACCATTTCTC TCACTGATTT
 4501 TTCTCTAGCG TCACTGAGGAGT ACCTCTGCT GTAGGAACTG TCACTGTTT
 4561 GCTACACTG GACCTCTTAA ATTCAGGCTC ATTACCAAT GGGCGCTTGG
 4621 CGTAATCATG GTATGCTGTT TTCTCTGTTG GAAATGTTGA TCCGCTCAACCA
 4681 ACATACGATC CGGAGGATCA AGTGTGATG TGAGGTTGAGT GCTTAATCTA
 4741 CATTAAATGCG TTGCGGCTCA CTGAGGCTGCG AACCTGCGG
 4801 ATAGGATGAGT CGGGAGGAGC TGGGGTTGGC TATTTGGCGC TTGCTGCTT
 4861 CCTCGCTTCA TGACTGCTG CGCTCGCTG TTGCGGAGGAGC CGAGGCGGCA
 4921 CAAAGGGGAA ATAGGTTTA TCCACAGGAA AGGGGAGGAG AAGATGTTGAG
 4981 CAAAGGGCA CGAAAGGCGG AGGAAGGCAAA AAGAGGCGGCG TTGCTGCTG
 5041 GCGCTCCGGG CGCTGAGGA CTCAGACAGGAA ATTCAGGCTG GGGGAGGAA
 5101 CGACAGGAGCT AATAGAGATAC CAGGCGTTCA CTCCTCTGAG
 5161 TTGCGACCTT GCGGATTTAAC CGGATCTTCTC CTCCTCTGAGG AGGCGGCG
 5221 TTCTGCTACAG CTGAGGCTGAG AGGGAGCTGCTG GTCGCTGCG
 5281 GCTGTTGCGA CGAACAGCCC GTTACAGCGG AGCGGCTGGC AGTACATGTC
 5341 TTGAGTCACA CGGAGGAAATG CGCACGATC CGGCACTTCACT GGAACAGGA
 5401 TTAGCGAGCG GAGGATGAGT GGGGAGGCTCA CAGAGTGTCTT
 5461 GCTACACTG AGGAGCTGTA TTGGTGTATCT GGGCTCTGCT
 5521 AAAGGTTGG TACCTCTTCA TCCGACCAACCA AAACCCAGGC
 5581 TTGCGAACAGA CGACAGGATAG CGCAGAGGAA AGGGATCTCA AGGGATTTCT
 5641 CTACGGGGTC TGACGCTACAG TGGAAAGGAA AGCTACGTTCA
 5701 TATCAAAAG GTCAGTCAAC TAAATGTTTAA TAAATGTTTAA ATATCAATCT
 5761 AAAGTATATA TGAGTACATG TGAGTACAGA GTTACCAAGT CTTAACTGAG
 5821 TTACAGGATC CTGTTGCTTCA CGTGTGCTG ACCTCTGCG
 5881 CTACGAGAGC GGGGGCTTCA CTCATGCGG CGAGGAGGAG
 5941 TTGCGACCTG TCCAGGTTTA TCAAGCAACCA AGGAGGCGG
 6001 GTGGCTCCAG AACTTCTTCA GCTTCATCCAG ATGCTTAAAT
 6061 TTAGTGTGTC GCGGAGTAAAT AGTGTGCGCA AGTGTGTC
 6121 TGTCAGGCTC TGCTGTTGG AGTGGCTTCA CGAGGCTGG
 6181 TTACATGATC CCCATGTTG TGCAAGGAAAG CGGGTAGCTC CCGAGTCGTT
 6241 TTAGCAAGTA GTGTTGGCGA GTGTTATCATC CTAGGCTTAT
 6301 TTACTGTCTC GCTGCACTGTT CTGAGTCTCA ACCAGCTAT
 6361 TTGCGAGATA TGTTGCGG CGACGGAGT GCTCTGGCC
 6421 CGCGGCCACCA TAGCAGAACT TTAAAGTGTG TCATCATGG CGGGGGCGA

【図 6 - 3】

6481 AACCTCTGAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTGCGAT GTAACCCACT CGTGACCCA
 6541 ACTGATCTTGG AGCATCTTTT ACTTACCAAG CGGTTCCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC
 6601 AAAATGGCCG AAAAAGGGG ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAAATCTC ATACTCTTC
 6661 TTTTCAATAA TTATGAGC GAAATGTTTCTC CATTGAGCGGA TACATATTG
 6721 AATGATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGG TTCCGCGCAG ATTTCCTCCGAA ATAGCTGC
 6781 CTGAGGGGCC CTGAGCGGC TTACAGGGCC CGTCAAGCTC TAAATCGGGG CTICCCCTTA GGGTCCGAT
 6841 CGCGTACACT TGCCAGCGC CTAGCGCCG CTCTTCTTCC TTCTCTTCG
 6901 CCAAGCTTCC CGCGCTTCCC CGTCAAGCTC TAAATCGGGG CTICCCCTTA GGGTCCGAT
 6961 TTAGTGTGTTT ACAGGACCTC GACCCAAA AACTGATTA GGGTGTAGGT CGTACGTG
 7021 GCGCTGCGG CTGATAGAGC GTTTTCTGGC CTTTGGAGTTA GGGAGTCCACO TTCTTTAATA
 7081 GTGCTACTT GTTCAAACTT GGAACACAC CAAACCTTCTT CTGGCTCAT TCTTTGATT
 7141 TATAAGGGAT TTGGGGATT GTTACCTTAT GGGTAAAAAA TGAGCTGTGTT TAAACAAAT
 7201 TTACGGGAA TTAAACAAAT ATATTAACGC TTACATTTTC CATTGGCCAT TACAGCTGG
 7261 CAACTCTGGA GAAAGCGAT CGGTGCGGC CTCTCCGCTA TTACGCGAGC TGCGGAAAGG
 7321 GGGATGCTGTT GAAAGCGAT CGGTGCGGC TTACGCGAGC TAAAGCATAC GGGATCTGG
 7381 TAAACAGGAG CGAGTGTGAG CGGATTTCCC TAAACATAC GTCGGGGTCA CCAAATGAAG
 7441 CCTCTGCTTGT CGATGAGCTG CTGCTGAGC TCAAGGAACTC AACGGCTCCGG CCATCAACCC
 7501 AGGTGCAAC CAAATGGTGG ATAGTCAAC TGGCGTTAT TGTATGAGC TGAGGACCTTA
 7561 AATACAAATAT CTCTGCTTCA CGGAATGGG ATAGTCAAC TGGCGTTAT TGTATGAGC
 7621 CAAAGGGAA ACTACTATAT CTGAGGGGA CTCTCAACCG CGTACCAACCG AGGCCCG
 7681 TTTCGCTTAA ACATGCTTAT GTCCGGCTAT TCAAGGCTT CCGGTTTACAA CCCGATTGCG
 7741 AGACCTTGCCT CTCCTCCACAT TTACGTTAGC ATATTCTCTC AGACGTCATC AGACGATCAG
 7801 AAAGTACTAT ATCTGCTGAG CGACTGCTTCA AGTGTACTAT TCAAGGACCTT CCTATATTCC
 7861 GGGGCGGAGC CGATCAATTA CAACTCCAC CAGCTATCAC AGCGGAATACAC AGAACCTCG
 7921 TACGCTGAT TTCTGCTTCA CTATAAGGCA TCCCTGTTAT TTGTTTATAT TCTCTGTTAAG
 7981 TCCCTGAGACT TGCCAGGAG ATAGTGTAGTT TCCAGGATCT ATATGTTTC TCAAAGGAA
 8041 GGAGGAGAA AAAAGAAAAT GGGACTGACT AACATCTGAG TACTGTTGTTA GGGAAAGTAAT
 8101 TTCTGTTCTG TCACTGATCT GTAGGAACTG TGTGCTCTC TGTGTTGTT
 8161 TTTCGCTTCA TTAAATACAC CAACATGCTG AGRAATGTTGTT TTFTACTGTT
 8221 CGTCAATCTC ATTATGATCAAC TACAGGAAACAGA TACGTTCTTAC AGTGTCTTAC
 8281 TGTATTTATG GTATGCGCTT CGGAGGATTA AGACTCTCC AGCTGAATTC AGCAGGAAATCT
 8341 CCTGCTGCTG CGGGCCGCTT CAGGGCTTCA AGTATGATCA TGGAGGATCT TTGAGGAACTC
 8401 ATATCAATTA CACATTTGAA ATAGTGTAGTT GTTGTGATT GTTGTGAGCT ATGTTTGT
 8461 GTATGATCTG CAAATGAAAGG TGTGTTGAGT CATTGACACCA CATAAAAGGA TAGATTTAA
 8521 TATTCGCACT ATAGGAACTG AGTGGTGTCT GCTCTTACACT
 8581 BACAGGAGCG CTCCTCTTCA TTCTGCTTAT GTGCAAGAAA ATAAATAGGTC AGACTCTGTT
 8641 CTCAATTATG TTGCTGCTAG CGTGGCTCAG ATGACATTCAG PACATACAG AGGATCAAA
 8701 TGAAGGATTA CGGGCTTCA TTCTGCTTCA TTACATCTACAG TATGATTAAGA CTAATTAATG
 8761 CTAAATATG TTCTGCTTC CGAGGTTCC CACATTTTCTC AGTATGTTCTA AGATCCATT
 8821 ATCTGTTGTT AGTCAAGACT CGATGAACTT TGTGAGGATCT TTCCAGGCTCT TCTCTCCCAT
 8881 CCAACATCTG TTGCTGTTCA CGAGAACAGC ATGTTTACCC AGAAATTA
 8941 ATCTAATTTT CTGCTCTTCA CGAACATTTA AGTCAACCAAGA TGGGACTTATT TCTAACCCAA
 9001 TTCTTAAATAA TTGTTCTTAT GTGTTCAAGG CGTACCAACTT TGAGGGAGC CTGTTGGTT
 9061 GTCAACATTT AGACATGTTA TICCTCTGAG CGTACGAGCT GTCTGCTACAT ACAGCTAGAA
 9121 AGCTGTTGTT CTCTTCTGAG TCAAGCTGAGA ATGAGTCAAGC ACCTCTCTGGA ATTACCTCT
 9181 CTCTTAAATAA GTCTCTTCACT GCAACCTAAAGGTTTAAATTAATTT TGTGCTATG
 9241 GTGTTGTTCTT TTGAGGGTGA TGTACCTGGT GATACCTGGT
 9301 TATGTTGTTCTT CGACTATTTT ATATGTTGTA TGTGTTGTTCTT AGGAGGCTTA
 9361 TTCTTCTGTT TTGTTTATTT TTGTTTATTT TGTGTTGTTCTT AGGAGGCTTA
 9421 GATATGCTT CGAGTGTGTT GTATTAACCTT CTAGCCCTAC AGAGTGCACAGAGGAG
 9481 TACAGTGGATA CGTGTGTT GTGGGGAGTT TTGTTATGTTG AGAAATTTAA
 9541 TTCTGTTAA GTGTCAGTGC TGATCATAC ACAGAATTTAA AGATGTTGGGG GIGGATCAAA
 9601 GTATATTTCTT ACATAATTTAG ATACATAGTG AGTATATATAC AGAAAAGAAA ATGAGAAA
 9661 TTGTTGTTGTT TATACATCAAC CAGCTGGTCA
 9721 AACATCACTC TTGAGGCCCCA CGACTCTGAG CGCATATAAA GGCGCTGGCT TCGAGGACT
 9781 TCTGACTTT ACAGGATTTA TAAATCTCAG AGAACACT AGATTCAGC TGCTCTTAA
 9841 AGCTGTTCTG TTATATAACG TAAATCTCAG AGTGTGCTAC TACATGTTCTA
 9901 TAAAGACAGA CGAACATGAGT TAAATCTCAG TAAATCTCAG TGTGATGAC AGAAATCAT
 9961 TGTGTTGCTC TTGTTTATGAG TAAACATTCAG TATTTTATCA TGCTGCTAC TCTCTCTGTT
 10021 CTGAATGTTGTC CAACTAAATTA TAAATCTCAG AGAAATGTTA TACTAGAGT CACATGCTA
 10081 TCTTGGAGCA AGCAACACCA TACCTGAAAG TGCAATAGAG CAGAAATATGA ATTACATGCG

【図 6 - 4】

10141 TGTCTTCTC CTAGACTACA TGACCCATA TAAATTACAT TCTCTGCCATC
 10201 ACCAAACAA AGGTAAATAT ACTTTGAG ATCTACTCAT AGCAAGTACT GTGCAACAAA
 10261 CAGATTTTCTC TCTACATTTA TTGTTAGGGA ATAAAATAAA GAAATTTAAAG ATGCAAGG
 10321 CCTCTGCTTCA CTATCATATC TTGCAACCAACCA TAAAGTTTAC TCTTGTGAAAT
 10381 TCACTGTTG AGGAGCTTAC AGTATGTTT TAAATCAGAGA GTACTGAAAAG GTATCAATGA
 10441 ATCTGTTGTT CGTACTGAAACCA AAACATGTTA GAGGGCAACTG GCTCTCTGGGA CAGTTCTGCT
 10501 CCAAGGAGAC AACTGTAATGCA AAACATGAAACCA TTACAGGAGA ATCTTACTTAA AACTCTGTT
 10561 ACATGAGGG TGGTATAGC AGAACAGACCA TTACAGGAGA ATCTTACTTAA AGTCTGTT
 10621 TAACTATTAAG TTGCTCTTAAAG ACTGCTCTGA ATTTACTGTT GTAGCTTACCC ATAGGAGTAC
 10681 CTGCGATGTTA CTATGAGACAG CTCATCCATCC TTACATTTTC AGTGTGTTCTG TTGTTGCT
 10741 AGAACACTCA GAGTCAACCA TG

(配列番号 8)

図 6

【図 7】

S B C 1 0 2 のDNA配列 (1575 bp)
 特徴 位置 (bp)
 部分のO V プロモーター 1-355
 hLALCDS 356-1575

1 CCGGGGGTGT TAACATTTAA TTGCGCTAAA ACTGCTGTA ATTACTGTT GPGAGCTTAC
 6 ATAGAGTACG CTGCGATGTTA CTATGATACG CATTCCATCC TTACATTTTC AGTCTGTTG
 121 TTGTTGCTC AGACAACTCA GAGTCAACCA TGAAAATGCG TTGTTGTTGTT
 181 GTTGGGTTCTG CATTCCATCC GAGTCAACCA CGGGGGGGAG
 241 CTGAGGCTTC AGATTCAGACT ATATATCCAGC CAGGGCTCAG CGAGTGTCTG
 301 TAAAGACGTC TGTGCTTCA AGTACGCTT
 361 CGTCTGCTTGG TTGAGGGTGG AGTGTGTTCTT
 421 CGGAGGGAAA CTGACAGCTG GATAGCTGCA
 481 TTCTGGCTTGG TTCTCTGAGTGGTGG
 541 CCTTAAACCGA ATTCCTCTGAG GAGGAGGAG
 601 CTCTCTGAGA CTAGTGTGCG TGGCAGAGT
 661 CAGGGCTGGG TTCTCTTCACT GTGAGCTG
 721 AAAACCTGGC TTCTGGAAAC ATAAAGACAG
 781 CAGTGTGTTAG GAGATGAGCA
 841 GACTGGCCAA GAACAGGAGT ATTATGTTGG
 901 AGCATTTTCA CAGATCTTCA AGTGTGCTAG
 951 TTGCTGCTTGG TTCTCTCTCT
 1021 TCTCAATTAC GACCTCTTCA GAGGAGAAGA
 1081 GCTGGGTTAC CAGCTTCTGCA CTCTGCTAC
 1141 TTCTCTGTTGGT GGTAAATTATG AGAGAATTT
 1201 ACATCTCTCTG CTGCAAGCTT
 1261 CCAAAAGTTT CAAGCTTCTG ACTGGGGAG
 1321 GAGTTATCTC CCCACATACA ATGTTGAGGA
 1381 GGGTCAGAC GGGCTTGGAG ATGTTGAGCA
 1441 CTGTTGTTGGT CTAGGAGAGA TTGCTGAGCA
 1501 TGGCCCTTGG AGGCTTATAA ATAAAGATT
 1561 AGCGGGCCCG CGGG

(配列番号 9)

図 7

【図 8】

Syn S B C 1 0 2 のDNA配列 (1575 bp)
 特徴 位置 (bp)
 部分のO V プロモーター 1-355
 hLALCDS 356-1575

1 CCATTATCTG GTGTTAAGT GAGCTTCAAGT GAACTGAGC AGATATTCTCC AGTCTTCTCT
 61 CCTCATCACCG AGTCCTGAGT GATTAGCAGA ACAGCGAGAA AACACATGTT TACCCAGAAT
 121 TAAACAACTA TATTGTTCTC CCATCTCACT CAAATGGAC CTTATGAAAC TAAATCTAA
 181 CCCATCTCCA TAAATGATCA AGTATGGCTG TTATGGTGTG
 241 GTGTTGCTC AGATTCAGACT ATATATCCAGC CAGGGCTCAG CGAGTGTCTG
 301 TAAAGACGTC TGTGCTTCA AGTACGCTT
 361 CGTCTGCTTGG TTGAGGGTGG AGTGTGTTCTT
 421 CGGAGGGAAA CTGACAGCTG GATAGCTGCA
 481 TTCTGGCTTGG TTCTCTGAGTGGTGG
 541 CCTTAAACCGA ATTCCTCTGAG GAGGAGGAG
 601 CTCTCTGAGA CTAGTGTGCG TGGCAGAGT
 661 CAGGGCTGGG TTCTCTTCACT GTGAGCTG
 721 AAAACCTGGC TTCTGGAAAC ATAAAGACAG
 781 CAGTGTGTTAG GAGATGAGCA
 841 GACTGGCCAA GAACAGGAGT ATTATGTTGG
 901 AGCATTTTCA CAGATCTTCA AGTGTGCTAG
 951 TTGCTGCTTGG TTCTCTCTCT
 1021 TCTCAATTAC GACCTCTTCA GAGGAGAAGA
 1081 GCTGGGTTAC CAGCTTCTGCA CTCTGCTAC
 1141 TTCTCTGTTGGT GGTAAATTATG AGAGAATTT
 1201 ACATCTCTCTG CTGCAAGCTT
 1261 CCAAAAGTTT CAAGCTTCTG ACTGGGGAG
 1321 GAGTTATCTC CCCACATACA ATGTTGAGGA
 1381 GGGTCAGAC GGGCTTGGAG ATGTTGAGCA
 1441 CTGTTGTTGGT CTAGGAGAGA TTGCTGAGCA
 1501 TGGCCCTTGG AGGCTTATAA ATAAAGATT
 1561 AGCGGGCCCG CGGG

(配列番号 10)

図 8

【図9】

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

```

1 CTCGAGTCTTC TTCAGAATGG CACAGCACCG CTGCAGAAA ATGCCAGGTG GACTATGAAC
61 TCACATCCAA AGGAGCTTGA CCTGATACCTT GATTTTCTTC AAACAGGGG AACACACAA
121 TCCCACAAAG CGACTCAGG AGAACACCATC ACTGATGCC1 ACAGCACCAA GTTATGCCAT
181 GGCAATCATC TCGACATTC TCTTGACCTT GAGCAAATG ATTATATCTC CCATGAATGG
241 TTGCTCTT CCCCICATGAA AAGGCCATTTC CCACACTCAC AATAIGCAAC AAAGCACAAAC
301 AGAGAACAT TAATGTCCTC CTTCCTTAATG TTAAAATGT AGTGGCAAG AGGAGACAAAC
361 AATTCAGTCA CTGAGTAGGTTTTAGAT TGAGTAAGAG GCTTTGACCT GTGAGCTCAC
421 CTGGACTCTA TATCCCTTTGAT GATAAAAGG GCTTTTATATG CTTCAGGTC TCCGGACTCT
481 TATTCAATGAG ACTCTTGGCA CGGACAGGAG CCCACAAATG AATGCCCTGGC ATAGGAAGGG
541 GCAGGAGAG CTTAGCTGAG CTTCCTTGGC GACAAGCATI GTCAAACAT GTGTGACAAA
601 ACTATTTGTA CGTCTTGGCA CGAGCTGCTC GGGCAGGGCA ATCCATGCC ACCTATCCCA
661 GGTAACTTCG CTTAGCTGAG AAGATTTGTT CTTACTCTCT CTAGACGCC AGTCAACARCC
721 AACTATGCA GATATGCTGAG AACACTATGAG TGACAGCCCTG TTCTGATCRA GATTCATTTT
781 GTTCATGGAA AATTTTGTGTT GCTTGGACGCT GGTCTTCCAT TGAGAAAGAG TGAGATGATAT
841 CTTCTCATG TGACAGAAAGG GCAAGAAATTG TCAATGCTCA CAGCTATATG ACATTTGTTA
901 AAAACCGGAGG CTTTGGCTTGGG AATGGCTTGA ATGGGCTTGA TAAAGCTACAG AACACACAC
961 TCTTCAGTC AACATGCTAC AACACTCTTC TGAGGCTTGA TAAATCTTAA TTTATGCGAC
1021 AGTCATGAGC ACCAGCTTTA AAAAGCTTC TGAGGCTTGA TAAATCTTAA TTTATGCGAC
1081 GNTACTATGAG CAGTGAACAC TGACAPACT GCAACATTT GCTTGAGATT TTATTTGCTC
1141 TAATGACACAGA GACATAGAGA TGAGCACTAA GATGACATTA TGACTCAAGS CTGGACAGGT
1201 CGCTGGCTCA TGTATGATTA AGAGGATGAA GGGAGAGGA ATGGAGACAG TGCTGAGAGG
1261 GCTTCAGGGA CTTTCTGAGG CGCAGATTGAG CTGAATCAGN TGACTCTGAGG AAGCTCTATA
1321 TGAGCAATG GAGGGCTGTGTT ATTGGGGATA TAAAGGAAAGA TGCTCTGAA CTGAAAGTGT
1381 CCCCTAGGAGG TGAGAGGATA TGAGGTTAA ATAATGTCAC AGAMCTGAGG TTATATGAT
1441 ATACCATGGG CTTTACAGGGG TCAGAGTCTC CCTCCATGGG CCTCTCTCGG GCTGAGGGGA
1501 ACTCTCTGTT TACACCTGGG ACACACTTC CGCTCTCCCG CACTGACCTTC AGTGTCACTA
1561 GGGCTGTGTT TCTCACATTT TCTCACATCCTC CTTCCTCCAC CCTCATGTGA CAGCAGTTG
1621 TCTTACATATG TCTCTCTCCC GAGGATCACATC TAGCATGTT AATGCCCCATG ACTTGGCAAG
1681 GAGAATGAG ATTTCACACAG TATATATGTT TTACAAAGAG GAGGAGAGA AACAAAAAGAA
1741 AATGGCACATG ACTAAACTTC AGCTACTGGT ATAGGAAGAT AATTCCTGCTT AACAGAGATT
1801 GCAGTGATCT CTATGTATGT CCTGAAGAAAT TATGTTGATC TTTTTTCCCC CATTTTTAA
1861 TCAAACAGGT CTTTACAGAGG GTCAAGATGG TTCTTCTACT GTTGTGCAAT TCATATATTT
1921 CAAATCAGAG CAATAGCTTC TAACTACTGAA TATATAATGG TATTTGATATA TATGATGTC
1981 CCTCTGACCTC TGAAACACTTC TCCAGCTGAA TTTCACAAAT CCTCTGTCAT CTGCCAGGCC
2041 ATTAAGTTAT CTATGAAAGC TCTTGGAGGA ACACTCGAC CCTCATATCA AACACACATT
2101 GAAATTGAGT ATTGTTTGTG ATTGTATGGC GCTATGTTT GCITGATTCCT CAGAATAAAAA
2161 GTTGTATATA AAGCATTCAC ACCAAATTAAGA AGATAGATTI AATATATCCA ACTTATGAGA
2221 AGAAATGTTG TCTGCTCTTC ACTCTGACTC CAGTGGCTC CTTCACATGC ACSCFTCTT
2281 ATTCTCTCA TTTTGTCAAG AAAATAATG GTCAAGCTT GTTCTCATTT ATGZCCCTGTC
2341 TAGCGTGGT CAGATGCCAA TTGTPACATG AGAGAGGATC AATATGAAACCA GACTTCCTGG
2401 CTGTTACTAT AACCATGATG AATAGGACAC TAACAAATAN TTGCTAATTA TTGTTTCCAT
2461 CTCAAGGT CCCACATTTT TCTGTTTCTC TAAAGATGCCC ATTATCTGGT TGTAACCTGAA
2521 GCTCAATGGG ACATGAGCAT TATTTCGGCA CCTCTCTCC CACCAACAG CCTGATGAGGA
2581 TTAGGAGAAC AGGAGAAGAAAC CATATGTTA CCCAGAAATT AAAACTAATAA TTGCTCTCC
2641 ATTCAATCCA AAAAGGACCT ATTGAACACTA AAATCTAACCA ATCCCATTAAT AATGATTC
2701 TATGGGTGCA AAGGCAAAAC TCTGTAAGGGG AACCTGTGGG TGGGTGACAA TTCAGACTAT
2761 ATATCCCCCA GGGCTCAGGG AGTGTCTGT

```

(配列番号 1-1)

図9

【図14】

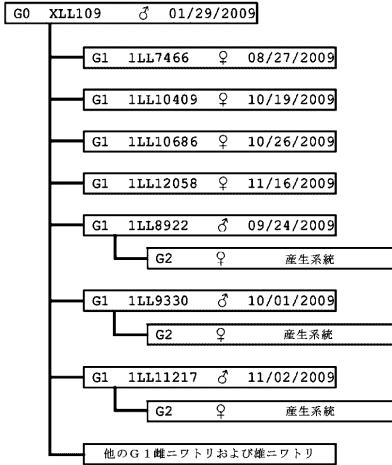


図14

【図15】

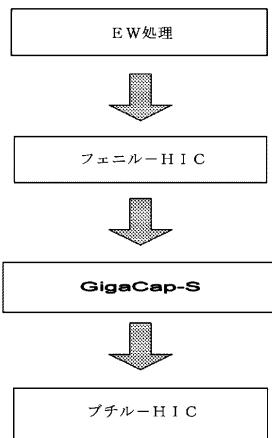
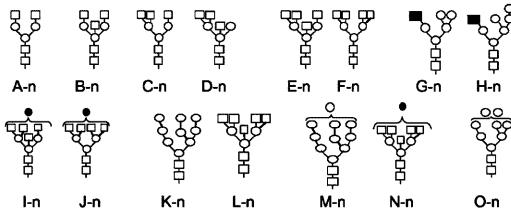


図15

【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

【図 1 8】

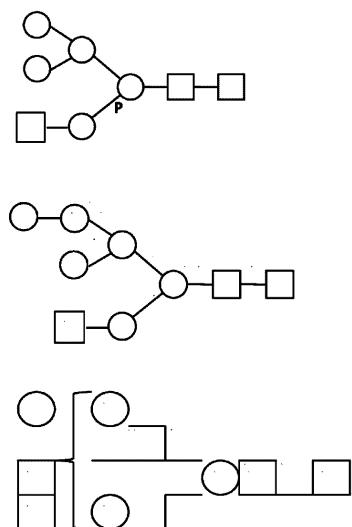


図 1 8

【図 2 1】

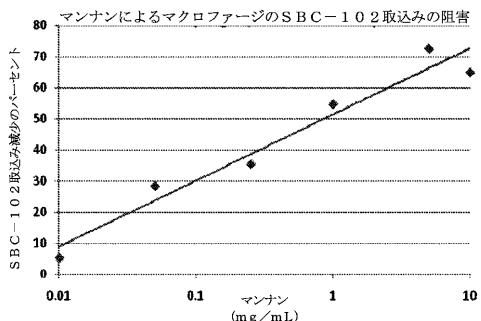


図 2 1

【図 2 2】

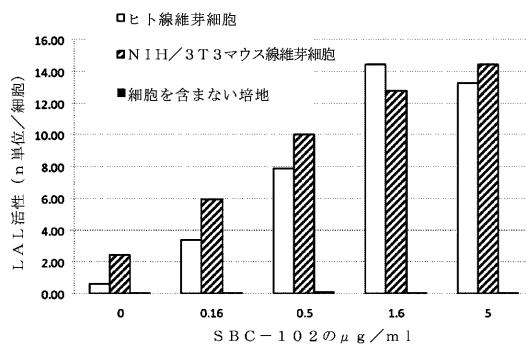


図 2 2

【図 2 6】

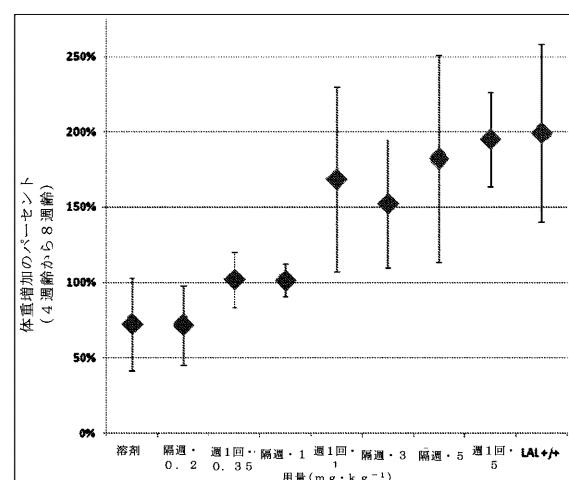


図 2 6

【図 2 9】

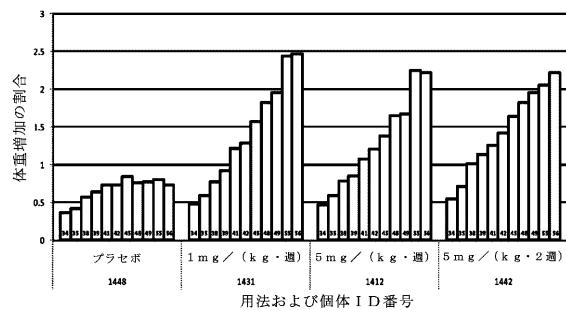


図 2 9

【図 3】

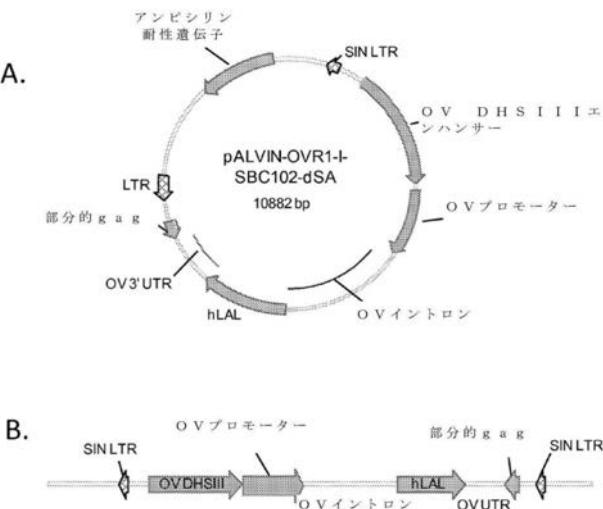


図 3

【図 1 0】

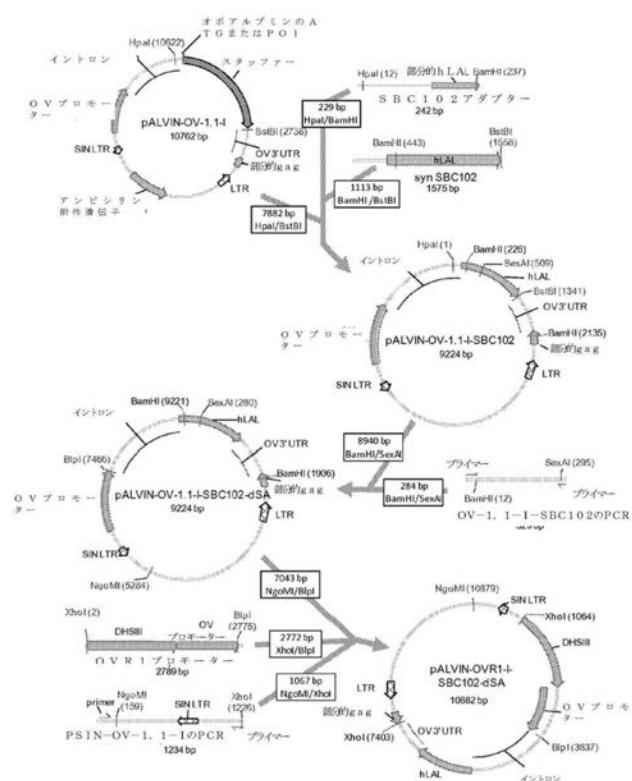


図 1 0

【図 1 1】

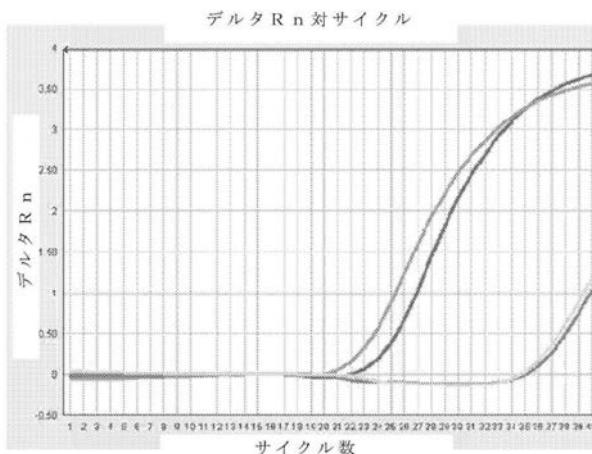


図 1 1

【図 1 2】

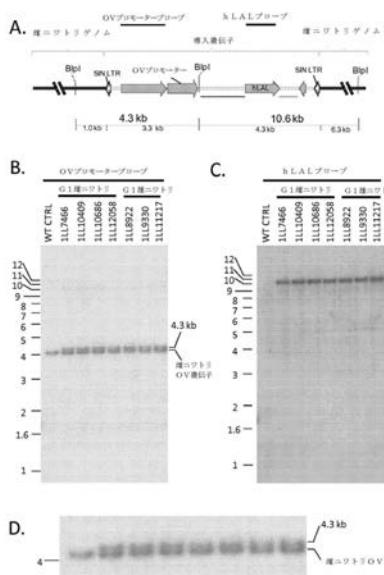


図 1 2

【図 1 3】

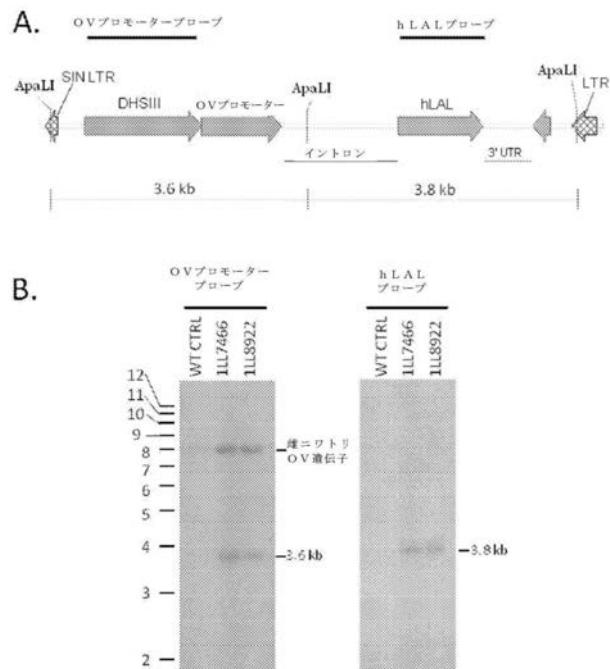


図 1 3

【図 1 7】

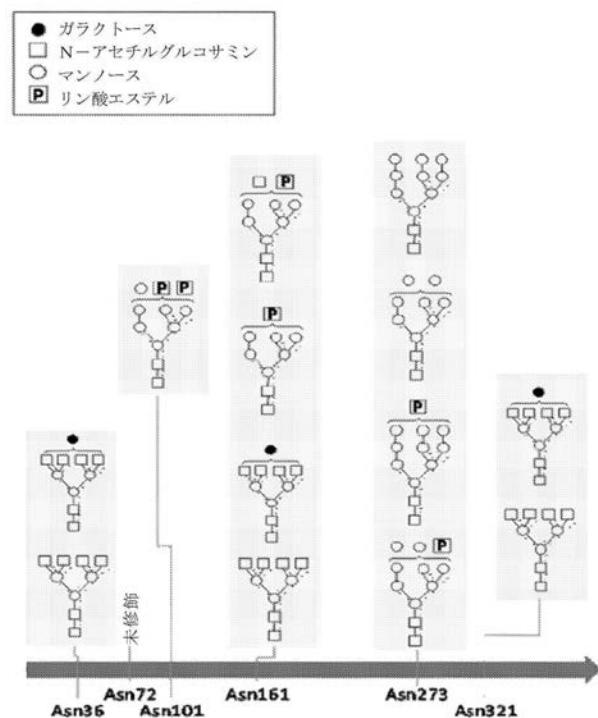
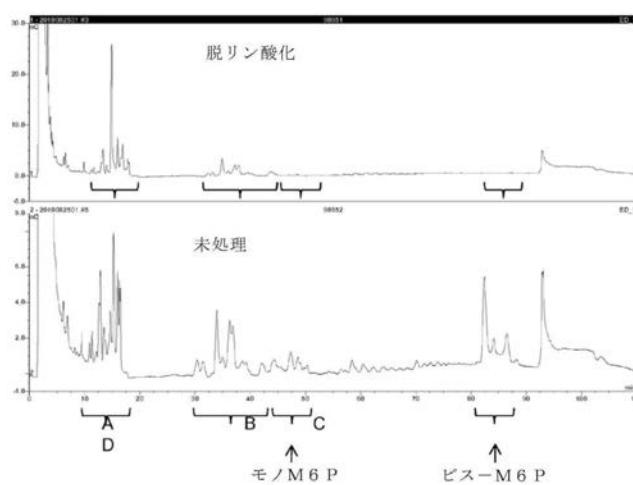


図 1 7

【図 1 9】



【図 2 0】

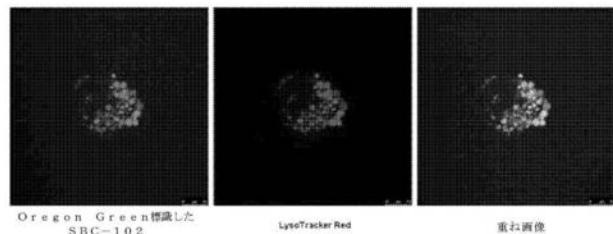


図 2 0

【図 2 3】

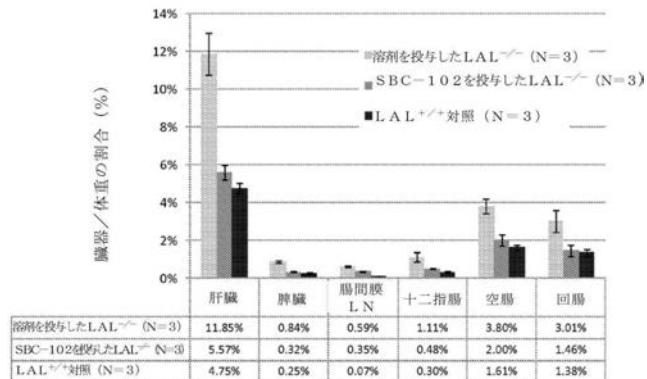


図 2 3

【図 2 4】

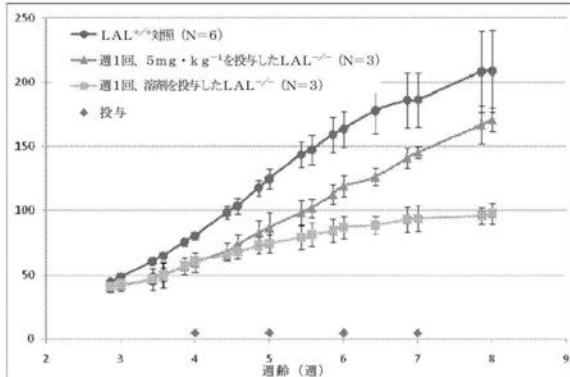


図 2 4

【図 2 5】

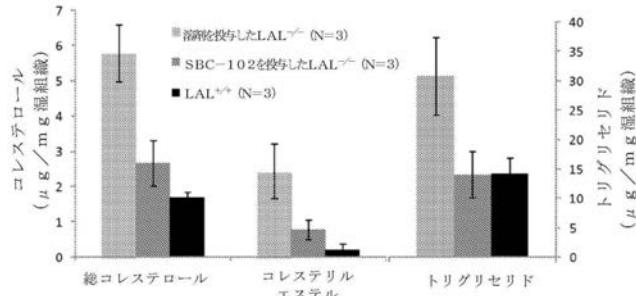
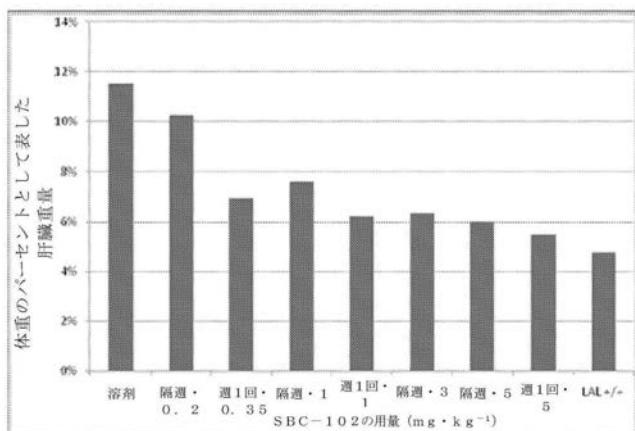


図 2 5

【図 27】



【図 28】

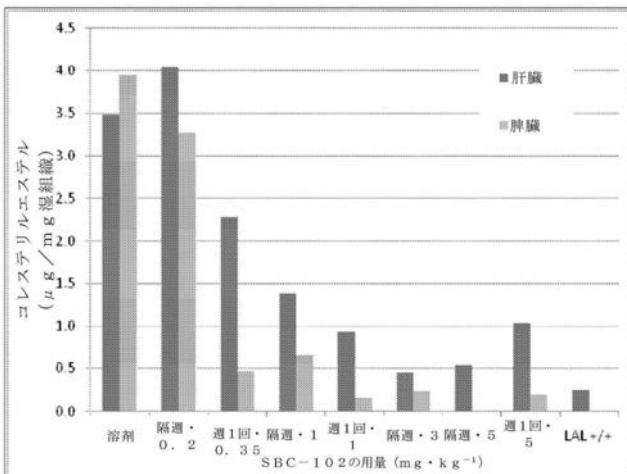


図 27

図 28

【図 30】

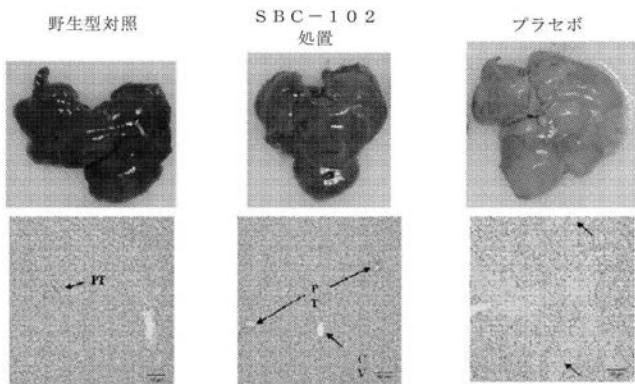


図 30

【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 02467, チェスナット ヒル, マネ ロード 10
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 30606, アセンズ, フォックス トレース 106

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 ZC3324C086 AA01 AA02 BA17 BC05 BC13 BC20 BC28 BC42 MA02 MA03
MA04 MA05 MA17 NA13 ZC19 ZC334C206 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