

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6194324号
(P6194324)

(45) 発行日 平成29年9月6日 (2017.9.6)

(24) 登録日 平成29年8月18日 (2017.8.18)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 9/26 (2006.01)	C 1 2 N 9/26 Z N A Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
請求項の数 15 (全 54 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2014-561541 (P2014-561541)	(73) 特許権者	509275507
(86) (22) 出願日	平成25年3月14日 (2013.3.14)		オキシレイン ユーケー リミテッド
(65) 公表番号	特表2015-516148 (P2015-516148A)		イギリス国 エム1 2 エービー マンチ
(43) 公表日	平成27年6月11日 (2015.6.11)		ェスター, ピカデリー 49, ピカデ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2013/000912		リー ハウス, スイート 313
(87) 国際公開番号	W02013/136189	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成25年9月19日 (2013.9.19)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成28年3月11日 (2016.3.11)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/611, 485		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成24年3月15日 (2012.3.15)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ポンベ病の処置のための方法および材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分子複合体を作製するための方法であって、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するポリペプチドを、配列番号 8 において示されるアミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有するプロテアーゼと接触させることを含み、前記プロテアーゼが、アミノ酸 50 とアミノ酸 74 との間の 1 またはそれより多くの部位で前記ポリペプチドを切断し、前記分子複合体は G A A 活性を有する、方法。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性を有するか、または前記ポリペプチドが配列番号 1 において示されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記接触させることが、インビトロにおいて実行される、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

前記接触させることが、組換え真菌細胞において行われる、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記真菌細胞が、*Yarrowia lipolytica*、*Arxula adeninivorans*、または *Candida*、*Hansenula*、*Oogataea*、

10

20

Pichia および *Torulopsis* からなる群から選択される属のメチロトロフの酵母などのメチロトロフの酵母である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記プロテアーゼが、アミノ酸 60 とアミノ酸 65 との間の 1 またはそれより多くの部位で前記ポリペプチドを切断する、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

アミノ酸 719 とアミノ酸 746 との間の 1 もしくはそれより多くの部位、および／またはアミノ酸 137 とアミノ酸 151 との間の 1 もしくはそれより多くの部位で、前記ポリペプチドをタンパク質分解することをさらに含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記分子複合体を、前記分子複合体の、哺乳類細胞の内部へ輸送される能力の増強をもたらす少なくとも 1 つの改変で変更することをさらに含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの改変が、細胞外受容体に対するリガンドを含むか、または前記少なくとも 1 つの改変が、ヒトインスリン様成長因子 I I の認識ドメインを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記分子複合体の前記ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つが、1 またはそれより多くのリン酸化 N-グリカンを含み、前記改変が、少なくとも 1 つのリン酸化 N-グリカンのキャップを外すことおよび脱マンノシル化を含む、請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記ポリペプチド上の N-グリカンのうちの少なくとも 40 % が、キャップを外されかつ脱マンノシル化されているか、前記ポリペプチド上の N-グリカンのうちの少なくとも 60 % がキャップを外されかつ脱マンノシル化されているか、または前記ポリペプチド上の N-グリカンのうちの少なくとも 80 % がキャップを外されかつ脱マンノシル化されているか、または前記ポリペプチド上の N-グリカンのうちの少なくとも 90 % がキャップを外されかつ脱マンノシル化されている、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

配列番号 1 において示される G A A アミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する G A A アミノ酸配列をコードする核酸および配列番号 8 において示されるアミノ酸配列と少なくとも 85 % の配列同一性を有するアルカリプロテアーゼをコードする核酸を含む単離された真菌細胞であって、前記真菌細胞が、G A A 活性を有しかつ少なくとも 2 つのポリペプチドを含む分子複合体を産生し、それぞれのポリペプチドが、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも 90 % の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、前記アルカリプロテアーゼによる、アミノ酸 50 とアミノ酸 74 との間の 1 またはそれより多くの部位での、配列番号 1 において示される アミノ酸配列 のタンパク質分解によって誘導される、単離された真菌細胞。

30

【請求項 13】

それぞれのセグメントが、前記アルカリプロテアーゼによる、アミノ酸 60 とアミノ酸 65 との間の 1 またはそれより多くの部位での、配列番号 1 において示される アミノ酸配列 のタンパク質分解によって誘導される、請求項 12 に記載の単離された真菌細胞。

40

【請求項 14】

前記真菌細胞が、

1) マンノシダーゼをコードする核酸であって、前記マンノシダーゼが、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができかつ (ii) 末端の $\alpha-1$, 2 マンノース結合、 $\alpha-1$, 3 マンノース結合、および／または $\alpha-1$, 6 マンノース結合を加水分解することができる、核酸；あるいは

2) マンノシダーゼをコードする核酸であって、前記マンノシダーゼが、マンノース-

50

1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができる、核酸；あるいは

3) マンノシダーゼをコードする核酸であって、前記マンノシダーゼが、末端の α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および／または α -1, 6マンノース結合を加水分解することができる、核酸；あるいは

4) マンノシルリン酸化を促進することができるポリペプチドをコードする核酸をさらに含む、請求項12または請求項13に記載の真菌細胞。

【請求項15】

前記真菌細胞が、OCH1活性を欠損するように遺伝子操作される、請求項12～14のいずれか一項に記載の真菌細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引用

本願は、2012年3月15日に出願された米国仮出願第61/611,485号の利益を主張する。この先の出願の開示は、本願の開示の一部（であり、その開示に参考として援用される）とみなされる。

【0002】

技術分野

本発明は、酸性 α グルコシダーゼ活性を有する単離された分子複合体、より詳細には、タンパク質分解によって前駆体分子から誘導される少なくとも2つのポリペプチドを含む分子複合体であって、この分子複合体の、哺乳類細胞の内部へ輸送される能力の増強をもたらす少なくとも1つの改変を含む、分子複合体に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

ポンペ病（糖原病II型または酸性マルターゼ欠損症とも呼ばれる）は、酸性 α グルコシダーゼ（GAA）の欠損によりリソソームにおけるグリコーゲンの蓄積をもたらす、まれな常染色体劣性疾患である。グリコーゲンの増加は、身体の至る所で進行性の筋力低下（ミオパシー）を引き起こし、心臓、骨格筋、肝臓、および神経系をはじめとする様々な体組織に影響する。

【0004】

ポンペ病は、乳児発症型形態および遅発型形態におおまかに分類される。乳児発症型形態において、乳児は、典型的に、乳児期初期（4～8ヶ月齢）の間に、虚弱および筋緊張低下（floppiness）の症状を示し、自分の頭部を持ち上げることができず、また、寝返りなどのような彼らの齢に普通の他の運動性の動作を行うことができない。処置をしなければ、ポンペ病を有する乳児は、通常、心不全および呼吸器系の虚弱により12ヶ月齢前に死んでしまう。United Pompe Foundationを参照されたい。遅発型形態（若年性（juvenile）形態および成人型形態を含む）は、より遅い発症を有し、乳児型形態よりもゆっくり進行する。組換えヒトGAA（Myozyme（登録商標）またはLumizyme（登録商標））は、ポンペ病を処置するために使用される。しかしながら、Myozyme（登録商標）またはLumizyme（登録商標）は、両方とも、非常に高価であり、費用は、1年当たり300,000ドルをはるかに上回る。そのため、ポンペ病のための処置の改善の必要性がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

概要

一態様において、本文書は、酸性 α グルコシダーゼ（GAA）活性を有し、かつ少なくとも2つのポリペプチド（例えば少なくとも3または少なくとも4つのポリペプチド）を

10

20

30

40

50

含む単離された分子複合体であって、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%（例えば少なくとも90%、95%、99%、または100%）の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の1またはそれより多くの部位での（例えば、アミノ酸56とアミノ酸68との間またはアミノ酸60とアミノ酸65との間での）、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導される、単離された分子複合体を特徴づける。分子複合体は、分子複合体の、哺乳類細胞の内部へ輸送される能力の増強をもたらす、少なくとも1つの改変を含む。配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解は、アミノ酸719とアミノ酸746との間の1またはそれより多くの部位での切断、または配列番号1において示されるアミノ酸配列のアミノ酸137とアミノ酸151との間の1またはそれより多くの部位での切断をさらに含むことができる。タンパク質分解は、配列番号1において示されるアミノ酸配列のアミノ酸719とアミノ酸746との間の1またはそれより多くの部位での切断、ならびに配列番号1において示されるアミノ酸配列のアミノ酸137とアミノ酸151との間の1またはそれより多くの部位での切断をさらに含むことができる。

10

【0006】

本明細書において記載される分子複合体のいずれかにおいて、ポリペプチドのうちの少なくとも1つは、1またはそれより多くのリン酸化N-グリカンを含むことができ、改変は、少なくとも1つのリン酸化N-グリカンのキャップを外すことおよび脱マンノシル化を含むことができる。ポリペプチドのうちの少なくとも1つの上のN-グリカンの少なくとも40%（例えば少なくとも、60%、80%、90%、95%、または99%）は、キャップを外し、かつ脱マンノシル化されることができる。

20

【0007】

本明細書において記載される分子複合体のいずれかにおいて、少なくとも2つのポリペプチドのうちの1つについて、セグメントは、配列番号1のアミノ酸22～57を含み、少なくとも2つのポリペプチドのうちの1つについて、セグメントは、配列番号1のアミノ酸66～896を含む。

【0008】

少なくとも3つのポリペプチドを含有する、本明細書において記載される分子複合体のいずれかにおいて、少なくとも3つのポリペプチドのうちの1つについて、セグメントは、配列番号1のアミノ酸22～57を含み、少なくとも3つのポリペプチドのうちの1つについて、セグメントは、配列番号1のアミノ酸66～726を含み、少なくとも3つのポリペプチドのうちの1つについて、セグメントは、配列番号1のアミノ酸736～896を含む。

30

【0009】

少なくとも4つのポリペプチドを含有する、本明細書において記載される分子複合体のいずれかにおいて、少なくとも4つのポリペプチドのうちの1つについて、セグメントは、配列番号1のアミノ酸22～57を含み、少なくとも4つのポリペプチドのうちの1つについて、セグメントは、配列番号1のアミノ酸66～143を含み、少なくとも4つのポリペプチドのうちの1つについて、セグメントは、配列番号1のアミノ酸158～726を含み、少なくとも4つのポリペプチドのうちの1つについて、セグメントは、配列番号1のアミノ酸736～896を含む。

40

【0010】

本明細書において記載される分子複合体のいずれかにおいて、少なくとも1つの改変は、分子複合体における少なくとも1つのポリペプチドに融合された以下のもののいずれか1つを含むことができる：細胞外受容体に対するリガンド、標的細胞の表面上の受容体の細胞外ドメインに結合する標的化ドメイン、ウロキナーゼ型プラスミノゲン受容体、またはヒトインスリン様成長因子IIの認識ドメイン。

【0011】

本文書はまた、本明細書において記載される分子複合体のいずれかを含む組成物であっ

50

て、分子複合体が凍結乾燥されている組成物をも特徴づける。組成物は、一回使い切りのバイアルとしてパッケージングされることができる。

【0012】

本文書はまた、本明細書において記載される分子複合体のいずれかおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む医薬組成物をも特徴づける。組成物は、静脈内投与または皮下投与のために製剤化されることができる。組成物は、静脈内注入のために製剤化されることができる。

【0013】

他の態様において、本文書は、ポンペ病を処置する方法を特徴づける。方法は、ポンペ病と診断された患者へ、本明細書において記載される組成物のいずれかを投与することを含む。患者は、乳児発症型ポンペ病または遅発型ポンペ病と診断されることができる。

10

【0014】

本文書はまた、分子複合体を作製するための方法をも特徴づける。方法は、配列番号1において示されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するポリペプチドを、配列番号8において示されるアミノ酸配列と少なくとも85%（例えば少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、または100%）の配列同一性を有するプロテアーゼと接触させることを含み、ここで、プロテアーゼが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の1またはそれより多くの部位で（例えばアミノ酸56とアミノ酸68との間またはアミノ酸60とアミノ酸65との間で）ポリペプチドを切断する。接触させるステップは、インビトロにおいて実行することができる。

20

【0015】

本文書はまた、キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含む分子複合体を作製するための方法をも特徴づける。方法は、分子複合体を、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸 (mannose-6-phosphate) に加水分解することができかつ (ii) 末端の α -1, 2 マンノース結合、 α -1, 3 マンノース結合、および/または α -1, 6 マンノース結合を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させることを含み、分子複合体が、GAA活性を有し、かつ少なくとも2つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の（例えば、アミノ酸56とアミノ酸68との間またはアミノ酸60とアミノ酸65との間の）1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導され、ここで、接触させることの前に、ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、1またはそれより多くのマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含有するリン酸化N-グリカンを含む。マンノシダーゼは、ファミリー38のグリコシルヒドロラーゼ（例えば *Canavalia ensiformis* マンノシダーゼまたは *Yarrowia lipolytica* マンノシダーゼ）であり得る。接触させることは、マンノシダーゼを発現する組換え真菌細胞において行われてもよい。

30

【0016】

本文書はまた、キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含む分子複合体を作製する方法をも特徴づける。方法は、分子複合体を、末端の α -1, 2 マンノース結合、 α -1, 3 マンノース結合、および/または α -1, 6 マンノース結合を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させることを含み、分子複合体が、GAA活性を有し、かつ少なくとも2つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の（例えば、アミノ酸56とアミノ酸68との間またはアミノ酸60とアミノ酸65との間の）1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導され、ここで、ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、接触させることの前に、キャップを外されたマンノース-6-リン酸部分を含むリン酸化N-グリカンを含む。

40

50

マンノシダーゼは、ファミリー47のグリコシルヒドロラーゼ（例えば*Aspergillus satoi*マンノシダーゼ）、ファミリー92のグリコシルヒドロラーゼ（例えば*Cellulosimicrobium cellulans*マンノシダーゼ）、またはファミリー38のグリコシルヒドロラーゼ（例えば*Canavalia ensiformis*マンノシダーゼ）とすることができる。接触させることは、マンノシダーゼを発現する組換え真菌細胞において行われてもよい。

【0017】

本文書はまた、キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含む分子複合体を作製する方法をも特徴づける。方法は、分子複合体を、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができるマンノシダーゼと接触させることを含み、分子複合体が、GAA活性を有し、かつ少なくとも2つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の（例えば、アミノ酸56とアミノ酸68との間またはアミノ酸60とアミノ酸65との間の）1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導され、ここで、ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、接触させることの前に、1またはそれより多くのマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含む。マンノシダーゼは、ファミリー38のグリコシルヒドロラーゼ（例えば*Canavalia ensiformis*マンノシダーゼまたは*Yarrowia lipolytica*マンノシダーゼ）であり得る。

【0018】

他の態様において、本文書は、キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含む分子複合体を作製する方法を特徴づける。方法は、a) 分子複合体を、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができるマンノシダーゼと接触させて、分子複合体における少なくとも1つのポリペプチド上のマンノース-6-リン酸部分のキャップを外すステップであって、分子複合体が、GAA活性を有し、かつ少なくとも2つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の（例えば、アミノ酸56とアミノ酸68との間またはアミノ酸60とアミノ酸65との間の）1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導される、ステップ、ならびにb) 分子複合体を、末端の α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および/または α -1, 6マンノース結合を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させるステップを含む。ステップ(a)およびステップ(b)は、2つの異なる酵素によって触媒されてもよく、または単一の酵素によって触媒されてもよい。接触させるステップは、一緒にまたは別々に、そしてどちらの順序でも実行することができる。接触させることは、組換え真菌宿主細胞において行うことができ、真菌宿主細胞は、ステップ(a)を触媒することができるマンノシダーゼおよびステップ(b)を触媒することができるマンノシダーゼを発現することができる。接触させることは、組換え真菌宿主細胞において行うことができ、真菌宿主は、ステップ(a)および(b)を触媒することができるマンノシダーゼを発現する。

【0019】

少なくとも1つのキャップを外されかつ脱マンノシル化したN-グリカンを含む、本明細書において記載される分子複合体のいずれも、哺乳類細胞に接触させるために使用することができ、接触させることの後に、分子複合体は、増強された効率により、哺乳類細胞の内部へ輸送される。哺乳類細胞は、ヒト細胞であり得る。

【0020】

本文書はまた、GAA活性を有する分子複合体を細胞の内部へと輸送する方法をも特徴づける。方法は、哺乳類細胞を分子複合体と接触させることを含み、分子複合体が、少なくとも2つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示さ

れるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の（例えば、アミノ酸56とアミノ酸68との間またはアミノ酸60とアミノ酸65との間の）1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導され、ここで、ポリペプチドのうちの少なくとも1つの上のリン酸化N-グリカンは、本明細書において記載される方法において示されるように、キャップを外されかつ脱マンノシル化されている。哺乳類細胞は、インビトロまたは哺乳類被験体中に存在し得る。哺乳類細胞は、ヒト細胞であり得る。

【0021】

他の態様において、本文書は、GAA活性を有する分子複合体を細胞の内部へと輸送する方法をも特徴づける。方法は、哺乳類細胞を、少なくとも2つのポリペプチドを含む分子複合体と接触させることを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の（例えば、アミノ酸56とアミノ酸68との間またはアミノ酸60とアミノ酸65との間の）1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導され、分子複合体は、分子複合体の、哺乳類細胞の内部へ輸送される能力の増強をもたらす、少なくとも1つの改変を含む。哺乳類細胞は、インビトロまたは哺乳類被験体中に存在し得る。哺乳類細胞は、ヒト細胞であり得る。改変は、分子複合体における少なくとも1つのポリペプチドに融合された以下のもののいずれか1つを含むことができる：細胞外受容体に対するリガンド、標的細胞の表面上の受容体の細胞外ドメインに結合する標的化ドメイン、ウロキナーゼ型プラスミノゲン受容体、またはヒトインスリン様成長因子IIの認識ドメイン。

【0022】

他の態様において、本文書は、配列番号8において示されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアルカリプロテアーゼをコードする外因性核酸を含む単離された真菌細胞を特徴づける。

【0023】

本文書はまた、配列番号1において示されるGAAアミノ酸配列をコードする核酸および配列番号8において示されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアルカリプロテアーゼをコードする核酸を含む単離された真菌細胞をも特徴づける。真菌細胞は、GAA活性を有しかつ少なくとも2つのポリペプチドを含む分子複合体を産生し、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アルカリプロテアーゼによる、アミノ酸50とアミノ酸74との間の（例えば、アミノ酸56とアミノ酸68との間またはアミノ酸60とアミノ酸65との間の）1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導される。一部の実施形態において、真菌細胞が、マンノシダーゼをコードする核酸をさらに含み、マンノシダーゼが、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができる。一部の実施形態において、真菌細胞が、マンノシダーゼをコードする核酸をさらに含み、マンノシダーゼが、末端の $\alpha-1, 2$ マンノース結合、 $\alpha-1, 3$ マンノース結合、および／または $\alpha-1, 6$ マンノース結合を加水分解することができる。一部の実施形態において、真菌細胞が、マンノシダーゼをコードする核酸をさらに含むことができ、マンノシダーゼが、(i)マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができかつ(ii)末端の $\alpha-1, 2$ マンノース結合、 $\alpha-1, 3$ マンノース結合、および／または $\alpha-1, 6$ マンノース結合を加水分解することができる。そのような真菌細胞のいずれも、マンノシルリン酸化を促進することができるポリペプチドをコードする核酸をさらに含むことができ、そして／またはOCH1活性を欠損するように遺伝子操作することができる。

【0024】

別段に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明の属する分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと類似のまたは等価の方法および材料を、本発明の実施または試験において使用することができるが、例示的な方法および材料を下記に説明する。本明細書において記載されている刊行物、特許出願、特許、Genbank（登録商標）受託番号、および他の参考文献はすべて、それらの内容が全体として参照により援用されている。矛盾する場合においては、定義を含む本出願が支配する。材料、方法、および実施例は、例示的であるに過ぎず、制限するよう意図するものではない。

【0025】

本発明の他の特色および利点は、以下の詳細な記載から、および特許請求の範囲から明らかである。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

酸性αグルコシダーゼ（GAA）活性を有し、かつ少なくとも2つのポリペプチドを含む単離された分子複合体であって、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導され、前記分子複合体が、前記分子複合体の、哺乳類細胞の内部へ輸送される能力の増強をもたらす少なくとも1つの改変を含む、単離された分子複合体。

(項目2)

それぞれのセグメントが、アミノ酸60とアミノ酸65との間の1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導される、項目1に記載の分子複合体。

(項目3)

前記複合体が、少なくとも3つのポリペプチドを含む、項目1に記載の分子複合体。

(項目4)

配列番号1において示されるアミノ酸配列の前記タンパク質分解が、配列番号1において示されるアミノ酸配列のアミノ酸719とアミノ酸746との間での1もしくはそれより多くの部位での切断またはアミノ酸137とアミノ酸151との間の1もしくはそれより多くの部位での切断をさらに含む、項目1～3のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目5)

前記複合体が、少なくとも4つのポリペプチドを含む、項目1～4のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目6)

前記タンパク質分解が、配列番号1において示されるアミノ酸配列のアミノ酸719とアミノ酸746との間の1またはそれより多くの部位での切断、ならびに配列番号1において示されるアミノ酸配列のアミノ酸137とアミノ酸151との間の1またはそれより多くの部位での切断をさらに含む、項目5に記載の分子複合体。

(項目7)

前記ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、1またはそれより多くのリン酸化N-グリカンを含み、前記改変が、少なくとも1つのリン酸化N-グリカンのキャップを外すことおよび脱マンノシル化を含む、項目1～6のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目8)

前記ポリペプチド上のN-グリカンの少なくとも40%が、キャップを外されかつ脱マンノシル化されている、項目5に記載の分子複合体。

(項目9)

前記ポリペプチド上のN-グリカンの少なくとも60%が、キャップを外されかつ脱マンノシル化されている、項目8に記載の分子複合体。

(項目10)

前記ポリペプチド上のN-グリカンの少なくとも80%が、キャップを外されかつ脱マンノシル化されている、項目8に記載の分子複合体。

(項目11)

前記ポリペプチド上のN-グリカンの少なくとも90%が、キャップを外されかつ脱マンノシル化されている、項目8に記載の分子複合体。

(項目12)

それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも90%の配列同一性を有する、項目1～11のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目13)

それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも95%の配列同一性を有する、項目1～11のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目14)

前記少なくとも2つのポリペプチドのうちの1つについて、前記セグメントが、配列番号1のアミノ酸22～57を含み、前記少なくとも2つのポリペプチドのうちの1つについて、前記セグメントが、配列番号1のアミノ酸66～896を含む、項目1～13のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目15)

前記少なくとも3つのポリペプチドのうちの1つについて、前記セグメントが、配列番号1のアミノ酸22～57を含み、前記少なくとも3つのポリペプチドのうちの1つについて、前記セグメントが、配列番号1のアミノ酸66～726を含み、前記少なくとも3つのポリペプチドのうちの1つについて、前記セグメントが、配列番号1のアミノ酸736～896を含む、項目3～14のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目16)

前記少なくとも4つのポリペプチドのうちの1つについて、前記セグメントが、配列番号1のアミノ酸22～57を含み、前記少なくとも4つのポリペプチドのうちの1つについて、前記セグメントが、配列番号1のアミノ酸66～143を含み、前記少なくとも4つのポリペプチドのうちの1つについて、前記セグメントが、配列番号1のアミノ酸158～726を含み、前記少なくとも4つのポリペプチドのうちの1つについて、前記セグメントが、配列番号1のアミノ酸736～896を含む、項目5～14のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目17)

前記少なくとも1つの改変が、前記ポリペプチドのうちの少なくとも1つに融合された、細胞外受容体に対するリガンドを含む、項目1～16のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目18)

前記少なくとも1つの改変が、前記ポリペプチドのうちの少なくとも1つに融合された標的化ドメインを含み、前記標的化ドメインが、標的細胞の表面上の受容体の細胞外ドメインに結合する、項目1～16のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目19)

前記少なくとも1つの改変が、前記ポリペプチドのうちの少なくとも1つに融合されたウロキナーゼ型プラスミノゲン受容体を含む、項目1～16のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目20)

前記少なくとも1つの改変が、前記ポリペプチドのうちの少なくとも1つに融合されたヒトインスリン様成長因子IIの認識ドメインを含む、項目1～16のいずれか一項に記載の分子複合体。

(項目21)

前記分子複合体が、凍結乾燥されている、項目1～20のいずれか一項に記載の分子複合

10

20

30

40

50

体を含む組成物。

(項目 2 2)

前記組成物が、一回使い切りのバイアルとしてパッケージングされている、項目 2 1 に記載の組成物。

(項目 2 3)

項目 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の分子複合体および薬学的に許容され得るキャリアを含む医薬組成物。

(項目 2 4)

前組成物が、静脈内投与または皮下投与のために製剤化されている、項目 2 3 に記載の組成物。

(項目 2 5)

前記組成物が、静脈内注入のために製剤化されている、項目 2 3 に記載の組成物。

(項目 2 6)

ポンベ病を処置するための方法であって、ポンベ病と診断された患者に対して項目 2 3 ～ 2 5 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含む、方法。

(項目 2 7)

前記患者が、乳児発症型ポンベ病と診断される、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記患者が、遅発型ポンベ病と診断される、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 9)

分子複合体を作製するための方法であって、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを、配列番号 8 において示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するプロテアーゼと接触させることを含み、前記プロテアーゼが、アミノ酸 5 0 とアミノ酸 7 4 との間の 1 またはそれより多くの部位で前記ポリペプチドを切断する、方法。

(項目 3 0)

前記接触させることが、インビトロにおいて実行される、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記プロテアーゼが、アミノ酸 6 0 とアミノ酸 6 5 との間の 1 またはそれより多くの部位で前記ポリペプチドを切断する、項目 2 9 または項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化 N-グリカンを含む分子複合体を作製するための方法であって、分子複合体を、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができかつ(ii) 末端の α -1, 2 マンノース結合、 α -1, 3 マンノース結合、および/または α -1, 6 マンノース結合を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させることを含み、前記分子複合体が、G A A 活性を有し、かつ少なくとも 2 つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも 8 5 % の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸 5 0 とアミノ酸 7 4 との間の 1 またはそれより多くの部位での、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導され、前記ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つが、1 またはそれより多くのマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含有するリン酸化 N-グリカンを含む、方法。

(項目 3 3)

前記マンノシダーゼが、ファミリー 3 8 のグリコシルヒドロラーゼである、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記マンノシダーゼが、*Canavalia ensiformis* マンノシダーゼである、項目 3 2 または 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

10

20

30

40

50

前記マンノシダーゼが、*Yarrowia lipolytica*マンノシダーゼである、項目32または33に記載の方法。

(項目36)

前記接触させることが、組換え真菌細胞において行われ、前記真菌細胞が、前記マンノシダーゼを発現する、項目32～35のいずれか一項に記載の方法。

(項目37)

キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含む分子複合体を作製する方法であって、分子複合体を、末端の α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および／または α -1, 6マンノース結合を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させることを含み、前記分子複合体が、GAA活性を有し、かつ少なくとも2つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導され、前記接触させることの前に、前記ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、キャップを外されたマンノース-6-リン酸部分を含むリン酸化N-グリカンを含む、方法。

10

(項目38)

前記マンノシダーゼが、ファミリー47のグリコシルヒドロラーゼである、項目37に記載の方法。

(項目39)

前記マンノシダーゼが、*Aspergillus satoi*マンノシダーゼである、項目37または38に記載の方法。

20

(項目40)

前記マンノシダーゼが、ファミリー92のグリコシルヒドロラーゼである、項目37に記載の方法。

(項目41)

マンノシダーゼが、*Cellulosimicrobium cellulans*マンノシダーゼである、項目37または40に記載の方法。

(項目42)

前記マンノシダーゼが、ファミリー38のグリコシルヒドロラーゼである、項目37に記載の方法。

30

(項目43)

前記マンノシダーゼが、*Canavalia ensiformis*マンノシダーゼである、項目37または項目42に記載の方法。

(項目44)

前記接触させることが、組換え真菌細胞において行われ、前記真菌細胞が、前記マンノシダーゼを発現する、項目37～43のいずれか一項に記載の方法。

(項目45)

キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含む分子複合体を作製する方法であって、分子複合体を、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができるマンノシダーゼと接触させることを含み、前記分子複合体が、GAA活性を有し、かつ少なくとも2つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導され、前記接触させることの前に、前記ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含む、方法。

40

(項目46)

前記マンノシダーゼが、ファミリー38のグリコシルヒドロラーゼである、項目45に記載の方法。

50

(項目 47)

前記マンノシダーゼが、*Canavalia ensiformis* マンノシダーゼである、項目 45 または 46 に記載の方法。

(項目 48)

前記マンノシダーゼが、*Yarrowia lipolytica* マンノシダーゼである、項目 45 または 46 に記載の方法。

(項目 49)

キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化 N-グリカンを含む分子複合体を作製する方法であって、

a) 分子複合体を、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができるマンノシダーゼと接触させて、前記分子複合体における少なくとも 1 つのポリペプチド上のマンノース-6-リン酸部分のキャップを外すステップであって、前記分子複合体が、GAA 活性を有し、かつ少なくとも 2 つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも 85 % の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸 50 とアミノ酸 74 との間の 1 またはそれより多くの部位での、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導されるステップ、ならびに

b) 前記分子複合体を、末端の α -1, 2 マンノース結合、 α -1, 3 マンノース結合、および/または α -1, 6 マンノース結合を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させるステップを含む、方法。

(項目 50)

ステップ (a) およびステップ (b) が、2 つの異なる酵素によって触媒される、項目 49 に記載の方法。

(項目 51)

ステップ (a) およびステップ (b) が、単一の酵素によって触媒される、項目 49 に記載の方法。

(項目 52)

前記接触させるステップが、組換え真菌宿主細胞において行われ、前記真菌宿主細胞が、ステップ (a) を触媒することができるマンノシダーゼおよびステップ (b) を触媒することができるマンノシダーゼを発現する、項目 49 または 50 に記載の方法。

(項目 53)

前記接触させるステップが、組換え真菌宿主細胞において行われ、前記真菌宿主が、ステップ (a) およびステップ (b) を触媒することができるマンノシダーゼを発現する、項目 49 または 51 に記載の方法。

(項目 54)

前記方法が、哺乳類細胞を、前記キャップを外されかつ脱マンノシル化した N-グリカンを含む少なくとも 1 つのポリペプチドを含む前記分子複合体と接触させるステップをさらに含み、前記接触させるステップの後に、前記分子複合体が、増強された効率により、前記哺乳類細胞の内部へ輸送される、項目 32 ~ 53 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 55)

前記哺乳類細胞が、ヒト細胞である、項目 54 に記載の方法。

(項目 56)

GAA 活性を有する分子複合体を細胞の内部へと輸送する方法であって、哺乳類細胞を、前記分子複合体と接触させることを含み、前記分子複合体が、少なくとも 2 つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも 85 % の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸 50 とアミノ酸 74 との間の 1 またはそれより多くの部位での、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導され、前記ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つの上のリン酸化 N-グリカンが、項目 33 ~ 55 のいずれか一項において示される

ように、キャップを外されかつ脱マンノシル化されている、方法。

(項目 5 7)

G A A 活性を有する分子複合体を細胞の内部へと輸送する方法であって、哺乳類細胞を、前記分子複合体と接触させることを含み、前記分子複合体が、少なくとも 2 つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも 8 5 % の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸 5 0 とアミノ酸 7 4 との間の 1 またはそれより多くの部位での、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導され、前記分子複合体が、前記分子複合体の、哺乳類細胞の内部へ輸送される能力の増強をもたらす少なくとも 1 つの改変を含む、方法。

10

(項目 5 8)

前記哺乳類細胞が、インビトロにある、項目 5 6 または項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記哺乳類細胞が、哺乳類被験体中にある、項目 5 6 または項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記哺乳類細胞が、ヒト細胞である、項目 5 8 ～ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 1)

前記改変が、前記ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つに融合された標的化ドメインを含み、前記標的化ドメインが、標的細胞の表面上の受容体の細胞外ドメインに結合する、項目 5 7 ～ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 6 2)

前記少なくとも 1 つの改変が、前記ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つに融合されたウロキナーゼ型プラスミノゲン受容体を含む、項目 5 7 ～ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 3)

前記少なくとも 1 つの改変が、前記ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つに融合された、ヒトインスリン様成長因子 I I の認識ドメインを含む、項目 5 7 ～ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 4)

配列番号 1 において示される G A A アミノ酸配列をコードする核酸および配列番号 8 において示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するアルカリプロテアーゼをコードする核酸を含む単離された真菌細胞であって、前記真菌細胞が、G A A 活性を有しかつ少なくとも 2 つのポリペプチドを含む分子複合体を産生し、それぞれのポリペプチドが、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも 8 5 % の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、前記アルカリプロテアーゼによる、アミノ酸 5 0 とアミノ酸 7 4 との間の 1 またはそれより多くの部位での、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導される、単離された真菌細胞。

30

(項目 6 5)

それぞれのセグメントが、前記アルカリプロテアーゼによる、アミノ酸 6 0 とアミノ酸 6 5 との間の 1 またはそれより多くの部位での、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導される、項目 6 4 に記載の単離された真菌細胞。

40

(項目 6 6)

前記真菌細胞が、マンノシダーゼをコードする核酸をさらに含み、前記マンノシダーゼが、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができかつ (i i) 末端の α -1, 2 マンノース結合、 α -1, 3 マンノース結合、および/または α -1, 6 マンノース結合を加水分解することができる、項目 6 4 または項目 6 5 に記載の真菌細胞。

(項目 6 7)

前記真菌細胞が、マンノシダーゼをコードする核酸をさらに含み、前記マンノシダーゼが、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解す

50

ることができる、項目64または項目65に記載の真菌細胞。

(項目68)

前記真菌細胞が、マンノシダーゼをコードする核酸をさらに含み、前記マンノシダーゼが、末端の α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および／または α -1, 6マンノース結合を加水分解することができる、項目64または項目65に記載の真菌細胞。

(項目69)

前記真菌細胞が、マンノシルリン酸化を促進することができるポリペプチドをコードする核酸をさらに含む、項目65に記載の真菌細胞。

(項目70)

前記真菌細胞が、OCH1活性を欠損するように遺伝子操作される、項目64～69のいずれか一項に記載の真菌細胞。

(項目71)

配列番号8において示されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアルカリプロテアーゼをコードする外因性核酸を含む単離された真菌細胞。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、シグナル配列の切断後のヒト酸性 α グルコシダーゼ(GAA)のアミノ酸配列(配列番号1)の記述である。

【図2A-1】図2Aは、DsbA-Cellulosimicrobium cellulansマンノシダーゼ5(CcMan5)のオープンリーディングフレーム(ORF)のヌクレオチド配列(配列番号2)の記述である。

【図2A-2】図2Aは、DsbA-Cellulosimicrobium cellulansマンノシダーゼ5(CcMan5)のオープンリーディングフレーム(ORF)のヌクレオチド配列(配列番号2)の記述である。

【図2B】図2Bは、太字のシグナル配列を有するCcMan5ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号3)の記述である。

【図2C】図2Cは、シグナル配列を有さないCcMan5ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号4)の記述である。シグナル配列を有さないCcMan5ポリペプチドの予想される分子量は173kDaである。

【図3A】図3Aおよび3Bは、CcMan5およびJbManにより処置したrhGAAのN-グリカン分析を示す一連の電気泳動図である。分析は、DNAシーケンサー支援型フルオロフォア支援型炭水化物電気泳動(DSA-FACE)を使用して実行した。Y軸は、それぞれのN-グリカン構造の量の指標としての相対的蛍光単位を示す。X軸は、キャピラリーのそれぞれのN-グリカン構造の相対的移動度を示す。図3Aおよび図3Bの両方において、パネルAは、PNGaseFによりRNaseBから放出されたN-グリカンを含む参照試料である。図3Aにおいて、パネルBおよびCは、それぞれCcMan5およびJbManによる処理の前および後のhuGAA(76kDバリエーション)由来のN-グリカン分析を含む。図3Bにおいて、パネルB、C、およびDは、それぞれhuGAA 76kD形態、95kD形態、および110kD形態由来のN-グリカン分析を含む。

【図3B】図3Aおよび3Bは、CcMan5およびJbManにより処置したrhGAAのN-グリカン分析を示す一連の電気泳動図である。分析は、DNAシーケンサー支援型フルオロフォア支援型炭水化物電気泳動(DSA-FACE)を使用して実行した。Y軸は、それぞれのN-グリカン構造の量の指標としての相対的蛍光単位を示す。X軸は、キャピラリーのそれぞれのN-グリカン構造の相対的移動度を示す。図3Aおよび図3Bの両方において、パネルAは、PNGaseFによりRNaseBから放出されたN-グリカンを含む参照試料である。図3Aにおいて、パネルBおよびCは、それぞれCcMan5およびJbManによる処理の前および後のhuGAA(76kDバリエーション)由来のN-グリカン分析を含む。図3Bにおいて、パネルB、C、およびDは、それぞれ

10

20

30

40

50

h u G A A 7 6 k D 形態、9 5 k D 形態、および 1 1 0 k D 形態由来の N-グリカン分析を含む。

【図 4】図 4 は、基質としてウサギ肝臓グリコーゲンを使用して、M y o z y m e（黒丸）、7 6 k D a G A A（上向き黒三角）、9 5 k D a G A A（下向き黒三角）、および 1 1 0 k D a G A A（黒ひし形）により 1 分あたりで形成されるグルコースの量の折れ線グラフである。

【図 5 A】図 5 A は、心臓における個々のマウスのグリコーゲンレベル（タンパク質 1 m g あたりの μ g）についての 2 つの図を含む。赤色のドットは、メスであり、黒色のドットは、オスである。線は、それぞれのグループの中央値を示す。

【図 5 B】図 5 B は、骨格筋における個々のマウスのグリコーゲンレベル（タンパク質 1 m g あたりの μ g）についての 2 つの図を含む。赤色のドットは、メスであり、黒色のドットは、オスである。線は、それぞれのグループの中央値を示す。

【図 6】図 6 は、Y a r r o w i a l i p o l y t i c a AMS 1 マンノシダーゼのアミノ酸配列（配列番号 5）の記述を含む。

【図 7】図 7 は、A s p e r g i l l u s s a t o i マンノシダーゼのアミノ酸配列（配列番号 6）の記述を含む。

【図 8】図 8 は、太字のシグナル配列を有する、C e l l u l o s i m i c r o b i u m c e l l u l a n s マンノシダーゼ 4 のアミノ酸配列（C c M a n 4、配列番号 7）の記述を含む。シグナル配列を有さない C c M a n 4 ポリペプチドの推定分子量は 1 8 4 k D a である。

【図 9】図 9 は、シグナルペプチド（2 1 アミノ酸）、プロペプチド（1 0 0 アミノ酸）、および成熟タンパク質（2 8 2 アミノ酸）を含む A s p e r g i l l u s o r y z a e アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列（配列番号 9）の記述を含む。

【図 1 0】図 1 0 は、A . o r y z a e アルカリプロテアーゼをコードする Y . l i p o l y t i c a コドン最適化配列を含有する融合構築物のヌクレオチド配列（配列番号 1 0）の記述を含む。クローニングのために使用される制限部位に下線を引く。リンカーをコードするヌクレオチド配列は、太字であり、H i s タグ（1 0 個の H i s 残基）をコードするヌクレオチド配列は、イタリック体である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 7】

詳細な説明

一般に、本文書は、酸性アルファ-グルコシダーゼ（G A A）活性、および哺乳類細胞の内部へ輸送される能力の増強をもたらす少なくとも 1 つの改変を有する単離された分子複合体を提供する。G A A は、N 結合型グリカン含有する 1 1 0 k D a 前駆体として合成される。前駆体は、タンパク質分解性にプロセシングされてシグナル配列が除去され、さらにタンパク質分解性にプロセシングされて 9 5 k D a、7 6 k D a、および 7 0 k D a の主な種にされる。しかしながら、前駆体から放出されるペプチドのうちの少なくともいくつかは、主な種と会合し続ける。例えば Moreland ら、J . B i o l . C h e m . , 2 8 0 : 6 7 8 0 - 6 7 9 1 (2 0 0 5) を参照されたい。したがって、本明細書において記載される G A A 活性を有する分子複合体は、1 またはそれより多くの部位での前駆体分子のタンパク質分解切断から誘導される、少なくとも 2 つのポリペプチド（少なくとも 2 つ、3 つ、または 4 つのポリペプチド）を含む。分子複合体における少なくとも 2 つのポリペプチドは、前駆体における 1 またはそれより多くの部位でのタンパク質分解切断から結果として生じる。例えば、配列番号 1 において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解は、アミノ酸 5 0 とアミノ酸 7 4 との間、例えば、アミノ酸 5 6 とアミノ酸 6 8 との間またはアミノ酸 6 0 とアミノ酸 6 5 との間にあることができ、少なくとも 2 つのポリペプチドを産生することができる。2 つのポリペプチドを含有する分子複合体は、本明細書において 9 5 k D a 形態と呼ばれる。

【0 0 2 8】

一部の実施形態において、分子複合体における少なくとも 3 つのポリペプチドが、前駆

体における2またはそれより多くの部位でのタンパク質分解切断から結果として生じる。例えば、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解は、アミノ酸50とアミノ酸74との間での（例えば、アミノ酸50とアミノ酸74との間のまたはアミノ酸60とアミノ酸65との間での）切断に加えて、配列番号1において示されるアミノ酸配列のアミノ酸719とアミノ酸746との間での1またはそれより多くの部位での切断またはアミノ酸137とアミノ酸151との間の1またはそれより多くの部位での切断を含むことができる。3つのポリペプチドを含有する分子複合体は、本明細書において76 kDa形態と呼ばれる。

【0029】

一部の実施形態において、分子複合体における少なくとも4つのポリペプチドが、前駆体における3またはそれより多くの部位でのタンパク質分解切断から結果として生じる。例えば、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解は、アミノ酸50とアミノ酸74との間での（例えば、アミノ酸56とアミノ酸68との間のまたはアミノ酸60とアミノ酸65との間での）切断に加えて、配列番号1において示されるアミノ酸配列のアミノ酸719とアミノ酸746との間の1またはそれより多くの部位での切断、ならびに配列番号1において示されるアミノ酸配列のアミノ酸137とアミノ酸151との間の1またはそれより多くの部位での切断を含むことができる。4つのポリペプチドを含有する分子複合体は、本明細書において70 kDa形態と呼ばれる。

【0030】

切断は、1つの分子において1またはそれより多くの部位で生じ得ること、および切断の部位は、異なる分子において異なり得ることが十分に理解される。

【0031】

*Aspergillus oryzae*由来のプロテアーゼを含有する市販で入手可能なプロテアーゼミックス（例えばSigmaまたはNovozymes Corp製）は、アミノ酸50と74との間で、例えば、アミノ酸56と68との間でまたはアミノ酸60と65との間で、配列番号1において示されるアミノ酸配列を切断するために使用することができる、その代わりに、*Aspergillus oryzae*由来のアルカリプロテアーゼ（配列番号8）と少なくとも85%（例えば少なくとも、90%、95%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有するアルカリプロテアーゼを使用することができる。例えば、本明細書において記載されるように、配列番号1において示されるアミノ酸配列を有するGAAポリペプチドは、配列番号8または配列番号9において示されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するプロテアーゼと接触させることができる。配列番号8は、成熟*Aspergillus oryzae*アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列である。配列番号9は、シグナルペプチド、プロペプチド、および成熟タンパク質を含む*Aspergillus oryzae*プロテアーゼのアミノ酸配列である。接触させることは、*Aspergillus oryzae*から単離されたかまたは組換えで産生されたプロテアーゼを使用して、インビトロにおいて行うことができる。その代わりに、真菌宿主は、GAAポリペプチドおよびアルカリプロテアーゼが両方とも培養培地へ分泌されるように、遺伝子操作することができ、アルカリプロテアーゼは、アミノ酸50とアミノ酸74との間で（例えば、アミノ酸56と68との間でまたはアミノ酸60とアミノ酸65との間で）、配列番号1において示されるアミノ酸配列を切断することができる。

【0032】

本明細書において記載される単離された分子複合体は、哺乳類細胞の内部へ輸送される能力の増強をもたらす少なくとも1つの改変を有する。複合体の、哺乳類細胞の内部へ輸送される能力を増強する改変の非限定的な例は、リン酸化N-グリカンのキャップを外すことおよび脱マンノシル化または輸送を容易にするペプチドタグを含む。方法および材料は、タグまたはキャップを外されかつ脱マンノシル化したN-グリカンを含む分子複合体を調製することについて本明細書において記載される。

【0033】

本明細書において記載される単離された分子複合体は、ポンペ病（乳児発症型ポンペ病および遅発型ポンペ病の両方）と診断された患者を含む、ポンペ病を有する患者を処置するのに特に有用である。ポンペ病は、G A A の欠損により、リソソームにおけるグリコーゲンの蓄積をもたらす。グリコーゲンの増加は、身体の至る所で進行性の筋力低下（ミオパシー）を引き起こし、心臓、骨格筋、肝臓、および神経系を包含する様々な体組織に影響する。

【0034】

分子複合体におけるそれぞれのポリペプチドは、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性（例えば少なくとも、90%、95%、97%、98%、99%、または100%）を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の（例えば、アミノ酸56とアミノ酸68との間またはアミノ酸60とアミノ酸65との間の）1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導される。特定のアミノ酸配列と配列番号1において示されるアミノ酸配列の間の同一性%は、以下のとおり決定することができる。まず、BLASTPバージョン2.0.14を含有する独立型バージョンのBLASTZ由来のBLAST 2 Sequences (Bl2seq) プログラムを使用してアミノ酸配列を整列させる。この独立型バージョンのBLASTZは、Fish & Richardsonのウェブサイト（例えば、www.fr.com/blast/）または米国政府の国立バイオテクノロジー情報センターのウェブサイト（www.ncbi.nlm.nih.gov）から得ることができる。Bl2seqプログラムを使用する方法を説明する指示は、BLASTZに添付のリードミーファイルにおいて見出すことができる。Bl2seqは、BLASTPアルゴリズムを使用して2つのアミノ酸配列間の比較を実行する。2つのアミノ酸配列を比較するために、Bl2seqのオプションは、以下のとおり設定される。-i は、比較されるべき第一のアミノ酸配列を含有するファイル（例えば、C:\seq1.txt）に対して設定され、-j は、比較されるべき第二のアミノ酸配列を含有するファイル（例えば、C:\seq2.txt）に対して設定され、-p はblastpに対して設定され、-o は任意の所望のファイル名（例えば、C:\output.txt）に対して設定され、かつ他のオプションはすべて該オプションのデフォルト設定のままである。例えば、2つのアミノ酸配列間の比較を含有する出力ファイルを生成するために、以下のコマンド、すなわちC:\Bl2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txtを使用することができる。この2つの比較される配列が相同性を共有する場合、指定された出力ファイルは、それらの相同性の領域を整列した配列として示す。この2つの比較される配列が相同性を共有しない場合、指定された出力ファイルは整列した配列を示さない。類似の手順は、blastnを使用することを除き、核酸配列について行なわれてよい。

【0035】

一旦整列すると、マッチ数は、同一のアミノ酸残基が両配列中に存在する位置の数を計数することによって決定される。同一性%は、マッチ数を全長のポリペプチドアミノ酸配列の長さによって除した後に、結果として生じる値に100を乗じることによって決定される。

【0036】

同一性%の値は、最も近い10分の1の位に丸められることは留意される。例えば、78.11、78.12、78.13、および78.14は78.1へと切り捨てられるのに対し、78.15、78.16、78.17、78.18、および78.19は78.2と切り上げられる。長さの値が常に整数であることも留意される。

【0037】

多くの核酸が特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができることは認識される。遺伝暗号の縮重は、当該技術分野に周知であり、すなわち、多くのアミノ酸について、アミノ酸のためのコドンとして機能する1つを超えるヌクレオチドのトリプ

レットがある。例えば、所与のG A Aポリペプチドについてのコード配列におけるコドン
は、特定の種（例えば、細菌または真菌）における最適な発現が、該種のための適切なコ
ドンバイアス表を使用して得られるよう改変され得る。

【0038】

一実施形態において、分子複合体が、少なくとも2つのポリペプチドを含むことができ
、ポリペプチドのうちの1つが、配列番号1のアミノ酸22～57を含み、もう1つのポリ
ペプチドが、配列番号1のアミノ酸66～896を含む。

【0039】

一実施形態において、分子複合体が、少なくとも3つのポリペプチドを含むことができ
、ポリペプチドのうちの1つが、配列番号1のアミノ酸22～57を含み、1つのポリペ
プチドが、配列番号1のアミノ酸66～726を含み、1つのポリペプチドが、配列番号
1のアミノ酸736～896を含む。

10

【0040】

一実施形態において、分子複合体が、少なくとも4つのポリペプチドを含むことができ
、ポリペプチドのうちの1つが、配列番号1のアミノ酸22～57を含み、1つのポリペ
プチドが、配列番号1のアミノ酸66～143を含み、1つのポリペプチドが、配列番号
1のアミノ酸158～726を含み、1つのポリペプチドが、配列番号1のアミノ酸73
6～896を含む。

【0041】

G A Aの生物活性のあるバリエーションは、配列番号1に示す配列に対する付加、欠失、ま
たは置換を含有することができる。置換を有するG A Aタンパク質は一般的に、10以下
（例えば、1以下、2以下、3以下、4以下、5以下、6以下、7以下、8以下、9以下
または10以下）の保存的アミノ酸置換を有する。保存的置換とは、あるアミノ酸の、類
似の特徴を有する別のアミノ酸との置換である。保存的置換には、以下の群内の置換が含
まれる：バリン、アラニン、およびグリシン；ロイシン、バリン、およびイソロイシン；
アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギンおよびグルタミン；セリン、システイ
ン、およびトレオニン；リジンおよびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロ
シン。非極性疎水性アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリ
ン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが含まれる。極性中性アミノ
酸には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、および
グルタミンが含まれる。正に帯電した（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン、お
よびヒスチジンが含まれる。負に帯電した（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およ
びグルタミン酸が含まれる。上記の極性基、塩基性基、または酸性基のうちのある構成員の
、同一群の別の構成員による任意の置換は、保存的置換であるとみなすことができる。対
照的に、非保存的置換とは、あるアミノ酸の、類似していない特徴を有する別のアミノ酸
との置換である。

20

30

【0042】

一部の実施形態においては、G A Aポリペプチドは、（a）以外のアミノ酸配列を指す
。異種性配列は、組換えタンパク質の精製のために用いられる配列（例えば、F L A G、
ポリヒスチジン（例えば、ヘキサヒスチジン）、赤血球凝集素（h e m a g l u t t a n
i n）（H A）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（G S T）、またはマルトース
結合タンパク質（M B P））のような異種アミノ酸配列との融合タンパク質であることが
できる。

40

【0043】

一部の実施形態において、異種性アミノ酸配列が、哺乳類細胞への分子複合体の輸送の
効率を増強するために使用される。例えば、複合体におけるポリペプチドの少なくとも1
つは、細胞外受容体に対するリガンド、標的細胞の表面上の受容体の細胞外ドメインに結
合する標的化ドメイン、ウロキナーゼ型プラスミノゲン受容体、またはマンノース-6-
リン酸受容体に結合するヒトインスリン様成長因子I Iのドメイン（例えば、ヒトインス
リン様成長因子のアミノ酸1～67もしくは1～87；少なくともアミノ酸48～55；

50

少なくともアミノ酸 8～28 および 41～61；または少なくともアミノ酸 8～87；ヒトインスリン様成長因子 I I のその配列バリエーション（例えば R 6 8 A）もしくはヒトインスリン様成長因子の切断型形態（例えば、位置 6 2 からの C 末端切断型）に融合することができる。異種性アミノ酸配列は、ポリペプチドの N 末端または C 末端で融合することができる。一実施形態において、ペプチドタグが、スペーサー（例えば 5～30 アミノ酸または 10～25 アミノ酸）によってポリペプチドの N 末端または C 末端に融合される。例えば米国特許第 7, 7 8 5, 8 5 6 号明細書を参照されたい。

【0044】

異種性アミノ酸配列 (heterologous amino sequence) は、診断用マーカーまたは検出可能なマーカーとして有用なタンパク質、例えば、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) であることもできる。

10

【0045】

ある宿主細胞（例えば、酵母宿主細胞）においては、標的タンパク質の発現および／または分泌は、異種性シグナル配列の使用によって増大することができる。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、例えば抗体産生のための免疫応答を惹起するのに有用なキャリア（例えば、KLH）、または小胞体もしくはゴルジ装置の保持シグナルを含有することができる。異種性配列は多様な長さであることができ、一部の場においては、異種性配列が結合する全長の標的タンパク質よりも長い配列であることができる。

【0046】

（糖タンパク質を脱マンノシル化する、または糖タンパク質のキャップを外しかつ脱マンノシル化する方法）

20

リン酸化 N-グリカンを含む糖タンパク質は脱マンノシル化され得、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含有するリン酸化 N-グリカンを含む糖タンパク質は、該糖タンパク質を (i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができかつ (ii) 末端の α -1, 2 マンノース結合、 α -1, 3 マンノース結合、および／もしくは α -1, 6 マンノース結合または末端の α -1, 2 マンノース部分、 α -1, 3 マンノース部分、および／もしくは α -1, 6 マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させることによってキャップを外されかつ脱マンノシル化され得る。このようなマンノシダーゼの非限定例としては、*Canavalia ensiformis* (タチナタマメ (Jack bean)) マンノシダーゼおよび *Yarrowia lipolytica* マンノシダーゼ（例えば、AMS1）が挙げられる。タチナタマメマンノシダーゼおよび AMS1 マンノシダーゼの両方は、ファミリー 38 のグリコシドヒドロラーゼである。

30

【0047】

タチナタマメマンノシダーゼは、例えば、Sigma-Aldrich (米国ミズーリ州セントルイス) から硫酸アンモニウム懸濁液 (カタログ番号 M7257) およびプロテオミクス等級の調製物 (カタログ番号 M5573) として市販されている。このような商業的調製物は、例えばホスファターゼのような混入物を除去するためにゲル濾過クロマトグラフィーによってさらに精製することができる。タチナタマメマンノシダーゼは、以下のアミノ酸配列 NKIPRAGWQIDPFGHSAVQG (配列番号 11) を有するセグメントを含む。Howard ら、J. Biol. Chem.、273 (4): 2067-2072、1998 を参照されたい。

40

【0048】

Yarrowia lipolytica AMS1 マンノシダーゼは、組換えで産生することができる。AMS1 ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 5 において示される (図 6 もまた参照されたい)。

【0049】

一部の実施形態においては、キャップを外すことおよび脱マンノシル化することは、2

50

つの異なる酵素によって触媒される。例えば、マンノースー1ーホスホー6マンノース結合またはマンノースー1ーホスホー6マンノース部分のキャップを外す工程は、*Cellulosimicrobium cellulans* 由来のマンノシダーゼ（例えば、CcMan5）を使用して実施することができる。CcMan5ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を配列番号2（図2Aを参照されたい）に示す。シグナル配列を含有するCcMan5ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号3（図2Bを参照されたい）に示す。シグナル配列を有さないCcMan5ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号4（図2Cを参照されたい）に示す。一部の実施形態においては、CcMan5ポリペプチドの生物活性断片を使用する。例えば、生物活性断片には、配列番号4に示すアミノ酸配列の1〜774番目の残基を含めることができる。国際公開第2011/039634号も参照されたい。CcMan5マンノシダーゼは、ファミリー92のグリコシドヒドロラーゼである。

10

【0050】

キャップを外された糖タンパク質または糖タンパク質の分子複合体の脱マンノシル化は、(*Aspergillus phoenicis*としても公知の)*Aspergillus satoi* (As) 由来のマンノシダーゼまたは*Cellulosimicrobium cellulans* 由来のマンノシダーゼ（例えば、CcMan4）を使用して触媒することができる。*Aspergillus satoi* マンノシダーゼは、ファミリー47のグリコシドヒドロラーゼであり、CcMan4マンノシダーゼは、ファミリー92のグリコシドヒドロラーゼである。*Aspergillus satoi* マンノシダーゼのアミノ酸配列を図7（配列番号6）に、およびGenBank受託番号第BAA08634号に示す。CcMan4ポリペプチドのアミノ酸配列を図8（配列番号7）に示す。

20

【0051】

キャップを外された糖タンパク質または糖タンパク質の分子複合体の脱マンノシル化は、*Canavalia ensiformis*（タチナタマメ）マンノシダーゼまたは*Yarrowia lipolytica* マンノシダーゼ（例えば、AMS1）のようなファミリー38のグリコシドヒドロラーゼ由来のマンノシダーゼを使用して触媒することもできる。例えば、CcMan5を使用して、糖タンパク質（または糖タンパク質の分子複合体）のマンノースー1ーホスホー6マンノース部分のキャップを外すことができ、タチナタマメマンノシダーゼを使用して、キャップを外された糖タンパク質（または糖タンパク質の分子複合体）を脱マンノシル化することができる。

30

【0052】

脱マンノシル化した糖タンパク質（または糖タンパク質の分子複合体）、またはキャップを外されかつ脱マンノシル化した糖タンパク質（または糖タンパク質の分子複合体）を産生するために、マンノースー1ーホスホー6マンノース結合またはマンノースー1ーホスホー6マンノース部分を含む標的分子（または分子複合体）を、好適な条件下で、好適なマンノシダーゼ（複数可）と、および／または組換え産生した好適なマンノシダーゼ（複数可）を含む細胞溶解産物と接触させる。好適なマンノシダーゼは上記している。細胞溶解産物は、真菌細胞、植物細胞、または動物細胞を含む、遺伝子操作した任意の細胞由来であることができる。動物細胞の非限定例としては、線虫、昆虫、植物、鳥類、爬虫類、および、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、アレチネズミ、イヌ、ネコ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、クジラ、サル、またはヒトのような哺乳類が挙げられる。

40

【0053】

標的分子（例えば、分子複合体）を、精製したマンノシダーゼおよび／または細胞溶解産物と接触させると、マンノースー1ーホスホー6マンノース結合またはマンノースー1ーホスホー6マンノース部分は、ホスホー6マンノースに加水分解することができ、そしてこのようなホスフェート含有グリカンの末端の α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および／もしくは α -1, 6マンノース結合または末端の α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マンノース部分、および／もしくは α -1, 6マンノース

50

ス部分は、加水分解され、キャップを外されかつ脱マンノシル化した標的分子を生成することができる。一部の実施形態においては、キャップを外す工程および脱マンノシル化する工程の両方を触媒する1つのマンノシダーゼを使用する。一部の実施形態においては、キャップを外す工程を触媒するために1つのマンノシダーゼを使用し、脱マンノシル化工程を触媒するために異なるマンノシダーゼを使用する。マンノシダーゼによる処理の後、標的分子または分子複合体を単離することができる。

【0054】

細胞溶解産物におけるマンノシダーゼ活性の活性度または完全性を保存する該細胞溶解産物を得るのに好適な方法には、該細胞溶解産物におけるN-グリコシル化活性の変化を保存または最小化する適切なバッファーならびに／またはスクレアーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、およびホスファターゼ阻害剤を含む阻害剤の使用を含めることができる。このような阻害剤は例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレングリコールビス(P-アミノエチルエーテル)N, N, N1, N1-四酢酸(EGTA)のようなキレート剤、フッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)、アプロチニン、ロイペプチン、アンチパインなどのようなプロテアーゼ阻害剤、ならびにホスフェート、フッ化ナトリウム、バナデートなどのようなホスファターゼ阻害剤が挙げられる。酵素活性を含有する溶解産物を得るのに適切なバッファーおよび条件は、例えば、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology(別冊47)、John Wiley & Sons、New York(1999); HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988); HarlowおよびLane、Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press(1999); Tietz、Textbook of Clinical Chemistry, 第3版、BurtisおよびAshwood編、W. B. Saunders、Philadelphia(1999)に記載されている。

【0055】

細胞溶解産物は適宜、干渉する物質の存在を除去または最小化するようにさらに処理することができる。所望の場合、細胞溶解産物は、細胞下分画(subcellular fractionation)、およびイオン交換クロマトグラフィー、疎水性および逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性電荷誘導クロマトグラフィーなどのようなクロマトグラフィー技術を含む、当業者に周知の種々の方法によって分画することができる。

【0056】

一部の実施形態においては、細胞溶解産物は、細胞小器官全体が無傷および／または機能的であるままで調製することができる。例えば、溶解産物は、無傷の粗面小胞体、無傷の滑面小胞体、または無傷のゴルジ装置のうちの1またはそれより多くを含有することができる。無傷の細胞小器官を含有する溶解産物を調製して、該小器官の機能性について試験するのに好適な方法は、例えば、Moreauら(1991) J. Biol. Chem. 266(7): 4329~4333; Moreauら(1991) J. Biol. Chem. 266(7): 4322~4328; Rexachら(1991) J. Cell Biol. 114(2): 219~229; およびPaulikら(1999) Arch. Biochem. Biophys. 367(2): 265~273に記載されている。

【0057】

哺乳類細胞の、キャップを外されかつ脱マンノシル化したホスフェートN-グリカン含有する分子複合体と接触すると、分子複合体は、哺乳類細胞(例えば、ヒト細胞)の内部へ輸送され得る。キャップを外されたが脱マンノシル化していないリン酸化N-グリカン含有する分子複合体は、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体を実質的に結合せず、それ自体、該細胞の内部へと効率的に輸送されない。本明細書で使用する場合、「実質的に結合しない」とは、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に糖タンパク質分

10

20

30

40

50

子の15%未満（例えば、14%未満、12%、10%、8%、6%、4%、2%、1%、0.5%、またはそれより小、または0%）が結合することを意味する。しかしながら、基礎をなすマンノースがリン酸化される場合にこのような分子複合体が、末端 α -1, 2マンノース結合または末端 α -1, 2マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触すれば、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合し、かつ該細胞の内部へ効率よく輸送される脱マンノシル化した糖タンパク質が生成される。本明細書で使用する場合、「実質的に結合する」とは、分子複合体の15%以上（例えば、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%よりも大）が哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に結合することを意味する。リン酸化N-グリカンのキャップを外すが脱マンノシル化しない酵素を含有する調製物（例えば、組換え宿主細胞または無細胞調製物）に、リン酸化N-グリカンを脱マンノシル化する酵素が混入し得ることは理解される。このような調製物との接触後の標的タンパク質試料は、キャップを外されるだけの一部のリン酸化N-グリカンを有するタンパク質分子、およびキャップを外されかつ脱マンノシル化したその他のリン酸化N-グリカンを有するタンパク質分子を含有することができる。キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含有する天然の上記タンパク質分子は、マンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合することができる。「実質的に結合しない」に関する上の定義は、タンパク質分子におけるリン酸化N-グリカンが、キャップを外されたが脱マンノシル化していないことを特徴とすることができないので、このような標的タンパク質試料に適用されない。

【0058】

したがって、本文書は、分子複合体を、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に結合しない第一の形態から、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に結合する第二の形態へ変換する方法を提供する。第一の形態においては、複合体におけるポリペプチドのうちの少なくとも1つが6位にリン酸残基を含有するマンノース残基に1位で結合する1またはそれより多くのマンノース残基を含有する1またはそれより多くのN-グリカンを含む分子複合体。このような方法においては、第一の形態の分子複合体は、末端マンノース残基を脱マンノシル化するマンノシダーゼと接触して、6位にホスフェートを含有するマンノースを結果として生じ、末端マンノースとなる。一部の実施形態においては、該マンノシダーゼは、キャップを外す活性も脱マンノシル化活性も有する（例えば、*Canavalia ensiformis*（タチナタマメ（Jack bean））マンノシダーゼまたは*Yarrowia lipolytica* AMS1マンノシダーゼ）。一部の実施形態においては、上記マンノシダーゼは、キャップを外す活性を有さない（例えば、*Aspergillus satoi*由来のマンノシダーゼまたは*Cellulosimicrobium cellulans*由来のマンノシダーゼ（例えば、CcMan4））。

【0059】

糖タンパク質または分子複合体の細胞の内部への輸送は、細胞取り込みアッセイを使用して評価することができる。例えば、キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含有する哺乳類細胞および分子複合体をインキュベートし、次に、細胞を洗浄および溶解することができる。細胞溶解産物は、GAA複合体の存在について（例えば、ウェスタンブロット法によって）、または細胞溶解産物におけるGAAの活性によって評価することができる。例えば、取り込みは、酸性 α -グルコシダーゼ活性を欠損する線維芽細胞において評価することができる。 α -グルコシダーゼの細胞内活性は、4-メチルウンベリフェリル- α -D-グルコピラノシド（4-MUG）アッセイを使用して評価することができる。グルコシダーゼによる基質4-MUGの切断は、蛍光原性産物4-MUの生成をもたらし、4-MUは、紫外光による照射によって視覚化または検出することができる。

【0060】

ポリペプチドの組換え産生

ポリペプチド（例えばマンノシダーゼ、アルカリプロテアーゼ、もしくはG A Aまたはその断片）をコードする単離された核酸分子は、標準的な技術によって產生することができる。「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において区別なく使用され、c D N A、ゲノムD N A、合成D N A、および核酸アナログを含有するD N A（またはR N A）を含め、R N AおよびD N Aの両方を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することができる。核酸は、二本鎖であってもよく、または一本鎖であってもよい（すなわち、センス鎖またはアンチセンス鎖）。ポリヌクレオチドの非限定的な例は、遺伝子、遺伝子断片、エクソン、イントロン、メッセンジャーR N A（m R N A）、トランスファーR N A、リボソームR N A、s i R N A、マイクロR N A、リボザイム、c D N A、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列についての単離されたD N A、任意の配列についての単離されたR N A、核酸プローブ、およびプライマーならびに核酸アナログを含む。

10

【0061】

「単離された核酸」は、天然に存在するゲノム（例えば酵母ゲノム）における核酸の片側または両側の側面に通常位置する核酸を含め、天然に存在するゲノムにおいて存在する他の核酸分子から分離されている核酸を指す。核酸に関して本明細書において使用される「単離された」という用語はまた、そのような天然に存在しない配列が自然界で見つけれず、また、天然に存在するゲノムにおいて直接隣接する配列を有していないので、任意の天然に存在しない核酸配列を含む。

【0062】

20

単離された核酸は、例えば、D N A分子であってもよい、ただし、天然に存在するゲノムにおけるそのD N A分子の側面に直接位置することが通常知られている核酸配列のうちの1つが、除去されているかまたは不在であることを条件とする。したがって、単離された核酸は、他の配列から独立した別々の分子として存在するD N A分子（例えば、化学的に合成された核酸またはP C Rもしくは制限エンドヌクレアーゼによる処置によって產生されたc D N AもしくはゲノムD N A断片）、ならびにベクター、自己複製プラスミド、ウイルス（例えば、任意のパラミクソウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、もしくはヘルペスウイルス）または原核生物もしくは真核生物のゲノムD N Aへ組み込まれたD N Aを包含するがこれらに限定されない。そのうえ、単離された核酸は、ハイブリッドまたは融合核酸の一部であるD N A分子などのような操作された核酸を含むことができる。例えばc D N AライブラリーもしくはゲノムライブラリーまたはゲノムD N A制限消化産物を含有するゲル切片内の何百〜何百万もの他の核酸の中で存在する核酸は、単離された核酸とみなされない。

30

【0063】

核酸および特定の宿主細胞に関連して本明細書において使用される場合、「外因性」という用語は、自然界において見つけれられるその特定の細胞において存在しない（およびそれから得ることができない）任意の核酸を指す。したがって、天然に存在しない核酸は、宿主細胞へ一度導入されたら、宿主細胞に対して外因性であると考えられる。天然に存在しない核酸は、自然界において見つけれられる核酸サブ配列または核酸配列の断片を含有することができることに留意することは重要である、ただし、核酸が全体として、自然界において存在しないことを条件とする。例えば、発現ベクター内のゲノムD N A配列を含有する核酸分子は、天然に存在しない核酸であり、したがって、その核酸分子が全体として（ベクターD N AプラスゲノムD N A）が自然界において存在しないので、宿主細胞へ一度導入されたら、宿主細胞に対して外因性である。したがって、自然界において全体として存在しない、任意のベクター、自律複製プラスミド、またはウイルス（例えばレトロウイルス、アデノウイルス、もしくはヘルペスウイルス）は、天然に存在しない核酸と考えられる。P C Rまたは制限エンドヌクレアーゼによる処理によって產生されたゲノムD N A断片およびc D N Aは、それらが自然界において見つけれられない別々の分子として存在するので、天然に存在しない核酸と考えられることになる。自然界において見つけれられない配置でプロモーター配列およびポリペプチドコード配列（例えばc D N Aまたはゲノム

40

50

DNA)を含有する任意の核酸は、天然に存在しない核酸となることにもなる。天然に存在する核酸は、特定の細胞に対して外因性であり得る。例えば、酵母xの細胞から単離された染色体全体は、一度その染色体が酵母yの細胞へ導入されたら、酵母yの細胞に関して外因性の核酸となる。

【0064】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術は、本明細書において記載されるヌクレオチド配列を含有する単離された核酸を得るために使用することができる。PCRは、全ゲノムDNAまたは全細胞RNA由来の配列を含め、DNAおよびRNA由来の特定の配列を増幅するために使用することができる。一般に、関心対象の領域の末端部またはそれを超える部分の配列情報は、増幅されることになっている鋳型の反対の鎖と配列が同一であるかまたは類似しているオリゴヌクレオチドプライマーを設計するために用いられる。部位特異的ヌクレオチド配列改変を鋳型核酸へ導入することができる様々なPCR戦略もまた、利用可能である。単離された核酸はまた、単一の核酸分子として(例えば、ホスホラミダイト技術を使用し、3'から5'の方向に自動化DNA合成を使用して)または一連のオリゴヌクレオチドとして、化学的に合成することもできる。例えば、所望の配列を含有する長いオリゴヌクレオチド(例えば>100ヌクレオチド)の1またはそれより多くのペアを、合成することができ、それぞれのペアは、オリゴヌクレオチドペアをアニールした場合に二重鎖が形成されるように、相補性の短いセグメント(例えば約15ヌクレオチド)を含有する。DNAポリメラーゼは、オリゴヌクレオチドを伸長させるために使用され、オリゴヌクレオチドペア当たり単一の二本鎖核酸分子がもたらされ、これは、次いで、ベクターヘライゲーションすることができる。単離された核酸はまた、例えば天然に存在するDNAの変異誘発によって得ることもできる。

【0065】

ポリペプチド(例えばマンノシダーゼ、アルカリプロテアーゼ、もしくはGAAまたはその断片)を組換えで産生するために、ポリペプチドをコードする核酸に対して作動可能に連結されたプロモーターを含有するベクターが、使用される。本明細書において使用される場合、「プロモーター」は、遺伝子が転写されるのを可能にするDNA配列を指す。プロモーターは、RNAポリメラーゼによって認識され、これは、次いで、転写を開始する。したがって、プロモーターは、RNAポリメラーゼが直接結合するかまたはRNAポリメラーゼの動員に関与するDNA配列を含有する。プロモーター配列はまた、「エンハンサー領域」を含むことができ、これは、タンパク質(すなわち、転写因子のセットとよく似たトランス作用性因子)と結合して遺伝子クラスターにおける遺伝子の転写レベルを増強する(よってその名前がつけられている)ことができるDNAの1またはそれより多くの領域である。エンハンサーは、典型的に、コーディング領域の5'末端部にあるが、プロモーター配列と離れていることもでき、また、例えば、遺伝子のイントロン領域内または遺伝子のコーディング領域の3'側にあってもよい。

【0066】

本明細書において使用される場合、「作動可能に連結される」は、発現コントロール配列が関心対象のコード配列の発現を有効にコントロールするように、遺伝的構築物(例えばベクター)へ組み込まれることを意味する。

【0067】

発現ベクターは、コードポリペプチドの発現のために宿主細胞へ導入することができ(例えば形質転換またはトランスフェクションによって)、これは、次いで、精製することができる。ポリペプチド(例えばマンノシダーゼ、アルカリプロテアーゼ、もしくはGAAまたはその断片)の小規模または大規模の生産に使用することができる発現系は、核酸分子を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌(例えば大腸菌)ならびに核酸分子を含有する組換え真菌発現ベクターにより形質転換された真菌(例えばYarrowia lipolytica、Arxula adeninivorans、Pichia pastoris、Hansenula polymorpha、Ogataea minuta

、*P i c h i a m e t h a n o l i c a*、*A s p e r g i l l u s n i g e r*、*T r i c h o d e r m a r e e s e i*、および*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e*) などのような微生物を包含するがこれらに限定されない。有用な発現系はまた、核酸分子を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系および核酸分子を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えばタバコモザイクウイルス）に感染したかまたは組換えプラスミド発現ベクター（例えば*T i*プラスミド）により形質転換された植物細胞系をも含む。マンノシダーゼまたはアルカリプロテアーゼのポリペプチドはまた、哺乳類発現系を使用して産生することもでき、これらは、哺乳類細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えばメタロチオネインプロモーター）または哺乳類ウイルスに由来するプロモーター（例えばアデノウイルス後期プロモーターおよびサイトメガロウイルスプロモーター）を含有する組換え発現構築物を保有する細胞（例えばCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ヒト胎児由来腎臓293細胞、および3T3 L1細胞などのような不死化細胞株）を含む。

【0068】

マンノシダーゼなどのような組換えポリペプチドは、タンパク質の精製を助けるために、FLAG、ポリヒスチジン（例えばヘキサヒスチジン）、赤血球凝集素（*h e m a g l u t t a n i n*）（HA）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、またはマルトース結合タンパク質（MBP）などのような異種性アミノ酸配列によりタグ付けすることができる。タンパク質を精製するための他の方法は、イオン交換、疎水性および逆相、サイズ排除、アフィニティー、疎水性電荷誘導クロマトグラフィーなどのようなクロマトグラフィー技術を含む。（例えば*S c o p e s , P r o t e i n P u r i f i c a t i o n : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e*、第3版、Springer-Verlag, New York (1993); BurtonおよびHarding, J. *C h r o m a t o g r . A* 814:71-81 (1998)を参照されたい）。

【0069】

（糖タンパク質のキャップを外しかつ脱マンノシル化するインビボでの方法）

本明細書において記載される遺伝子操作された細胞は、GAA活性を有する分子複合体を産生するために使用することができる。例えば、遺伝子操作された細胞は、GAA活性を有し、かつ少なくとも2つのポリペプチドを含み、それぞれのポリペプチドが、配列番号1において示されるアミノ酸配列のセグメントと少なくとも85%の配列同一性を有し、それぞれのセグメントが、アミノ酸50とアミノ酸74との間の（例えば、アミノ酸56とアミノ酸68との間またはアミノ酸60とアミノ酸65との間の）1またはそれより多くの部位での、配列番号1において示されるアミノ酸配列のタンパク質分解によって誘導される分子複合体を産生するために使用することができる。例えば、真菌細胞は、コードされるポリペプチドのそれぞれが培養培地へ分泌されるように、配列番号1において示されるアミノ酸配列をコードする核酸および配列番号8において示されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアルカリプロテアーゼをコードする核酸を含むように操作することができ、アルカリプロテアーゼは、配列番号1において示されるアミノ酸配列を切断することができる。実施例12において記載されるように、組換えGAAがアルカリプロテアーゼと共に培養培地へ分泌される場合、110kDa前駆体の95kDa形態へのプロセッシングは、完全であった、すなわち、110kDa前駆体は、検出されなかった。

【0070】

本明細書において記載される遺伝子操作された細胞はまた、キャップを外されかつ脱マンノシル化した分子複合体を産生するために使用することができる。そのような遺伝子操作された細胞は、配列番号1において示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸、本明細書において記載されるマンノシダーゼをコードする核酸、必要に応じて、配列番号8において示されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアルカリプロテアーゼをコードする核酸を含むことができる。

【0071】

キャップを外されかつ脱マンノシル化した分子複合体を産生する細胞を基にした方法は、マンノースー1ーホスホー6ーマンノース結合または部分をホスホー6ーマンノースに加水分解することができるマンノシダーゼをコードする核酸を含むように遺伝子操作された真菌細胞に、配列番号1において示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸および必要に応じて、配列番号8において示されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアルカリプロテアーゼをコードする核酸を導入することを含むことができ、細胞が、キャップを外されたリン酸化Nーグリカンを含む、本明細書において記載される分子複合体を産生する。そのようなリン酸化Nーグリカンは、上記に記載されるように脱マンノシル化することができる。一部の実施形態において、マンノシダーゼおよびG A Aが共分泌されるように、マンノシダーゼおよびG A Aをコードする核酸が、分泌配列を含む。アルカリプロテアーゼをコードする核酸を含む、遺伝子操作された細胞において、分子複合体は、95 k D a 形へとプロセッシングされることができる。

10

【0072】

細胞を基にした別の方法は、(i) マンノースー1ーホスホー6ーマンノース結合またはマンノースー1ーホスホー6ーマンノース部分をホスホー6ーマンノースに加水分解することができる工程と、(ii) ホスフェート含有グリカンの末端の α -1, 2 マンノース結合、 α -1, 3 マンノース結合、および/もしくは α -1, 6 マンノース結合または末端の α -1, 2 マンノース部分、 α -1, 3 マンノース部分、および/もしくは α -1, 6 マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼをコードする核酸を含むよう遺伝子操作された真菌細胞に配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸および場合によっては、配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアルカリプロテアーゼをコードする核酸を導入する工程であって、ここで、該細胞は、キャップを外されかつ脱マンノシル化した分子複合体を産生することを含むことができる。一部の実施形態においては、上記マンノシダーゼおよびG A Aをコードする核酸は、該マンノシダーゼおよび標的分子が共分泌されるよう、分泌配列を含む。アルカリプロテアーゼをコードする核酸を含む遺伝子操作された細胞において、分子複合体は、95 k D a の形態へとプロセッシングされ得る。

20

【0073】

標的分子または分子複合体のインビボでの産生に好適な細胞は、

30

【化3】

Yarrowia lipolytica, *Arxula adeninivorans*、メチロトロフの酵母 (*Candida*, *Hansenula*, *Oogataea*, *Pichia* または *Torulopsis* 属のメチロトロフの酵母など) または *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium* または *Chrysosporium* 属の糸状菌を含む真菌起源のものであることができる。例示的な真菌種としては、

Pichia anomala, *Pichia bovis*, *Pichia canadensis*, *Pichia carsonii*, *Pichia farinose*, *Pichia fermentans*, *Pichia fluxuum*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida valida*, *Candida albicans*, *Candida ascalaphidarum*, *Candida amphixiae*, *Candida Antarctica*, *Candida atlantica*, *Candida atmosphaerica*, *Candida blattae*, *Candida carpophila*, *Candida cerambycidarum*, *Candida chauliodes*, *Candida corydalis*, *Candida dosseyi*, *Candida dubliniensis*, *Candida ergatensis*, *Candida fructus*, *Candida*

40

【化 4】

glabrata, *Candida fermentati*, *Candida guilliermondii*, *Candida haemulonii*, *Candida insectamens*, *Candida insectorum*, *Candida intermedia*, *Candida jeffresii*, *Candida kefir*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida lyxosophila*, *Candida maltosa*, *Candida membranifaciens*, *Candida milleri*, *Candida oleophila*, *Candida oregonensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida quercitrusa*, *Candida shehatei*, *Candida temnochilae*, *Candida tenuis*, *Candida tropicalis*, *Candida tsuchiyae*, *Candida sinolaborantium*, *Candida sojae*, *Candida viswanathii*, *Candida utilis*, *Oogataea minuta*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia silvestris*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia chodati*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia menbranaefaciens*, *Pichia minuscule*, *Pichia pastoris*, *Pichia pseudopolymorpha*, *Pichia quercuum*, *Pichia robertsii*, *Pichia saitoi*, *Pichia silvestrisi*, *Pichia strasburgensis*, *Pichia terricola*, *Pichia vanriji*, *Pseudozyma Antarctica*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces momdshuricus*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces exiguous*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces mellis*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces willianus*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Saccharomycopsis capsularis*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Endomyces hordei*, *Endomycopsis fobuligera*, *Saturnispora saitoi*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces dairensis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulaspora fermentati*, *Saccharomyces fermentati*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulaspora rosei*, *Saccharomyces rosei*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces rosei*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Zygosaccharomyces mongolicus*, *Dorulaspora globosa*, *Debaryomyces globosus*, *Torulopsis globosa*, *Trichosporon cutaneum*, *Trigonopsis variabilis*, *Williopsis californica*, *Williopsis saturnus*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Debaryomyces disporua*, *Saccharomyces bisporas*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Saccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces mellis*, *Zygosaccharomyces priorianus*, *Zygosaccharomyces rouxiim*, *Zygosaccharomyces*

10

20

30

40

【化 5】

rouxii, *Zygosaccharomyces barkeri*, *Saccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces rouxii*,
Zygosaccharomyces major, *Saccharomyces rousii*, *Pichia anomala*, *Pichia bovis*, *Pichia*
Canadensis, *Pichia carsonii*, *Pichia farinose*, *Pichia fermentans*, *Pichia fluxuum*, *Pichia*
membranaefaciens, *Pichia pseudopolymorpha*, *Pichia quercuum*, *Pichia robertsii*,
Pseudozyma Antarctica, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodospiridium toruloides*,
Rhodotorula glutinis, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces*
bisporus, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces*
delbrueckii, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomycodes*
ludwigii, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Torulaspora*
delbrueckii, *Torulaspora globosa*, *Trigonopsis variabilis*, *Williopsis californica*,
Williopsis saturnus, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces mellis*, または
Zygosaccharomyces rouxii が挙げられるが、それらに限定されない。例示的な糸状菌
としては、*Aspergillus caesiellus*, *Aspergillus candidus*,
Aspergillus carneus, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus deflectus*, *Aspergillus flavus*,
Aspergillus fumigatus, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*,
Aspergillus ochraceus, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus*
penicilloides, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus*
tamari, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, または *Aspergillus versicolor* が挙げられるが、
それらに限定されない *Aspergillus* の種々の種が挙げられる。

10

20

このような細胞は、本明細書に記載されるような遺伝子操作の前に、種々の商業的供給源
および研究資源施設（例えば、米国培養細胞系統保存機関（米国メリーランド州ロックヴ
イルなど）から得ることができる。

30

【0074】

細胞の遺伝子操作は、マンノシダーゼ、G A A および／またはアルカリプロテアーゼを
コードする外来性核酸に加えて、（i）外側鎖伸長（O C H 1）タンパク質をコードする
内在性遺伝子の欠失、（i i）マンノシルリン酸化を促進してマンノース残基のリン酸化
を増大させることができるポリペプチド（例えば、*Yarrowia lipolytica*, *S. cerevisiae*, *Ogataea minuta*, *Pichia pa*
storis, もしくは *C. albicans* に由来する M N N 4 ポリペプチド、または
P. pastoris に由来する P N O 1 ポリペプチド）をコードする組換え核酸の導入
、（i i i）O C H 1 タンパク質の機能的発現に干渉する RNA 分子の導入または発現、
（i v）N-グリコシル化活性を有する野生型（例えば、内在性または外来性）タンパク
質をコードする（すなわち、N-グリコシル化活性を有するタンパク質を発現する）組換
え核酸の導入、あるいは（v）N-グリコシル化活性を有するタンパク質をコードする 1
またはそれより多くの内在性遺伝子のプロモーターエレメントまたはエンハンサーエレ
メントを変更し、したがってそれらのコードタンパク質の発現を変更などの 1 種類以上の遺
伝子改変を含むことができる。RNA 分子は、例えば、低分子干渉 RNA（*siRNA*）
、低分子ヘアピン型 RNA（*shRNA*）、アンチセンス RNA、またはマイクロ RNA
（*miRNA*）が含まれる。遺伝子操作には、N-グリコシル化活性を有して、付加（例
えば、異種性配列）、欠失、または置換（例えば、点変異のような変異、保存的変異また
は非保存的変異）を有するタンパク質を産生するタンパク質をコードする内在性遺伝子を

40

50

変更することにも含まれる。変異は、（例えば、部位特異的変異誘発または相同組換えによって）特異的に導入することができ、または無作為に導入することができる（例えば、細胞は、例えばNewmanおよびFerro-Novick（1987）J. Cell Biol. 105（4）：1587）に記載されるように化学的に変異誘発され得る）。

【0075】

本明細書に記載される遺伝子改変は結果的に、（i）遺伝子改変細胞における1種類以上の活性の増大、（ii）遺伝子改変細胞における1種類以上の活性の低下、または（iii）遺伝子改変細胞における1種類以上の活性の局在性もしくは細胞内分布の変化、のうちの1またはそれより多くを生じることができる。特定の活性の量の増大（例えば、マンノシルリン酸化を促進すること）は、マンノシルリン酸化を促進することのできる1種類以上のタンパク質を過剰発現させること、内在性遺伝子のコピー数の増加（例えば、遺伝子重複）、または内在性遺伝子によってコードされるタンパク質の発現の増大を刺激する該遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの変更によることができる。1種類以上の特定の活性の低下は、変異体形態（例えば、ドミナントネガティブ形態）の過剰発現、特定の活性を有する1種類以上のタンパク質の発現を低下させる1種類以上の干渉性RNA分子の導入もしくは発現、または特定の活性を有するタンパク質をコードする1種類以上の内在性遺伝子の欠失によることができる。

【0076】

相同組換えによって遺伝子を破壊させるために、「遺伝子置換」ベクターは、選択可能なマーカー遺伝子を含むような方法で構築することができる。選択可能なマーカー遺伝子は、5'末端および3'末端の両方で、相同組換えを仲介するのに十分な長さの遺伝子の部分に作動可能に連結され得る。選択可能なマーカーは、URA3遺伝子、LEU2遺伝子、およびHIS3遺伝子を含む、宿主細胞栄養要求性を補完するかまたは抗生物質耐性を提供するかのいずれかである任意の数の遺伝子のうちの1つであることができる。他の好適な選択可能なマーカーには、酵母細胞に対してクロラムフェニコール耐性を与えるCAT遺伝子、またはβ-ガラクトシダーゼの発現による青色コロニーを結果として生じるlacZ遺伝子が挙げられる。次に、遺伝子置換ベクターの線状化DNA断片を、当該技術分野で周知の方法を使用して上記細胞へと導入する（下記を参照されたい）。その線状断片のゲノムへの組込みおよび上記遺伝子の破壊は、選択マーカーを基にして決定することができ、例えば、サザンブロット分析によって実証することができる。選択可能なマーカーは、例えばCre-loxPシステムによって宿主細胞のゲノムから除去することができる（下記を参照されたい）。

【0077】

あるいは、遺伝子置換ベクターは、破壊されるべき遺伝子の一部を含むような方法で構築することができ、該一部は、任意の内在性遺伝子プロモーター配列がまったくなく、かつ該遺伝子のコード配列のいずれもコードせず、または該コード配列の不活性断片をコードする。「不活性断片」とは、上記遺伝子の全長のコード配列から生成されるタンパク質の活性の例えば約10%未満（例えば、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、または0%）を有するタンパク質をコードする遺伝子の断片である。上記遺伝子のこのような一部を、公知のプロモーター配列が該遺伝子配列に作動可能に連結されないものの、終止コドンおよび転写終結配列が該遺伝子配列の一部に作動可能に連結されるような方法で、ベクターに挿入する。このベクターはその後、遺伝子配列の一部において線状化し、細胞へと形質転換することができる。単一の相同組換えによって、この線状化ベクターを次に、上記遺伝子の内在性対応物に組み込む。

【0078】

発現ベクターは、自律的または組込み型であることができる。組換え核酸（例えばマンノシダーゼ、GAAまたはアルカリプロテアーゼをコードする組換え核酸）は、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、またはウイルス粒子のような発現ベクターの形態で細胞へと導入することができる。組換え核酸は、染色体外で維持することができ、

または酵母細胞染色体DNAへと組み込むことができる。発現ベクターは、所望の核酸で形質転換した細胞の検出および／または選択を可能にするために、選択された条件下で細胞生存度に必要なタンパク質をコードする選択マーカー遺伝子（例えば、ウラシル生合成に必要な酵素をコードするURA3、またはトリプトファン生合成に必要な酵素をコードするTRP1）を含有することができる（例えば、米国特許第4,704,362号を参照されたい）。発現ベクターには、自律複製配列（ARS）も含めることができる。例えば、米国特許第4,837,148号は、*Pichia pastoris*におけるプラスミドを維持するのに好適な手段を提供する自律複製配列を記載している。

【0079】

組込み型ベクターは、例えば、米国特許第4,882,279号において開示されている。組込み型ベクターには一般的に、少なくとも1つの第一の挿入可能なDNA断片、1つの選択可能なマーカー遺伝子、および1つの第二の挿入可能なDNA断片からなる連続的に配置された配列が含まれる。第一および第二の挿入可能なDNA断片は各々、長さ約200（例えば、約250、約300、約350、約400、約450、約500、または約1000、またはそれより長い）ヌクレオチドであり、かつ形質転換されるべき種のゲノムDNAの部分に対して相同的であるヌクレオチド配列を有する。発現のための関心対象の遺伝子（例えば、GAAをコードする遺伝子）を含有するヌクレオチド配列は、マーカー遺伝子の前であろうと後であろうと、このベクターにおいて、第一の挿入可能なDNA断片と第二の挿入可能なDNA断片との間に挿入される。組込み型ベクターは、関心対象のヌクレオチド配列の宿主細胞ゲノムへの組込みを促進するために、酵母形質転換前に線状化され得る。

【0080】

発現ベクターは、酵母（例えば、*Yarrowia lipolytica*、*Arxula adeninivorans*、*P. pastoris*、または他の好適な真菌種）プロモーターの制御下での組換え核酸の特色をなすことができ、該プロモーターによって、真菌細胞において発現することができる。好適な酵母プロモーターには、例えば、ADC1プロモーター、TP11プロモーター、ADH2プロモーター、hp4dプロモーター、POXプロモーター、およびGal10プロモーターが含まれる（例えば、Guarenteら（1982）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79（23）：7410を参照されたい）。追加の好適なプロモーターは、例えば、ZhuおよびZhang（1999）*Bioinformatics* 15（7～8）：608～611ならびに米国特許第6,265,185号に記載されている。

【0081】

プロモーターは、構成的または誘導性（条件的）であることができる。構成的プロモーターは、は、標準的な培養条件下で発現が一定であるプロモーターであると理解されている。誘導性プロモーターとは、1またはそれより多くの誘導指示（Cue）に対して応答性であるプロモーターである。例えば、誘導性プロモーターは、化学的に調節されることができ（例えば、アルコール、テトラサイクリン、ステロイド、金属、または他の低分子のような化学的誘導剤の存在または不在によってその転写活性が調節されるプロモーター）、または物理的に調節され得る（例えば、光または高温もしくは低温のような物理的誘導因子の存在または不在によってその転写活性が調節されるプロモーター）。誘導性プロモーターは、化学的指示または物理的指示によってそれ自体が直接的に調節される1種類以上の転写因子によって間接的に調節されることもできる。

【0082】

遺伝子操作された他の改変も条件的であることができることは理解される。例えば、遺伝子は、例えばCre-loxP系のような部位特異的DNA組換え酵素を使用して、条件的に欠失させることができる（例えば、Gossenら（2002）*Ann. Rev. Genetics* 36：153～173および米国特許出願公開第20060014264号を参照されたい）。

【0083】

組換え核酸は、スフェロプラスト技術または全細胞塩化リチウム酵母形質転換法のような種々の方法を使用して、本明細書に記載された細胞へと導入することができる。プラスミドまたは線状核酸ベクターの細胞への形質転換に有用な他の方法は、例えば、米国特許第4,929,555号、Hinnenら(1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75:1929、Itoら(1983) *J. Bacteriol.* 153:163、米国特許第4,879,231号、およびSreekrishnaら(1987) *Gene* 59:115に記載されており、これらの各々の開示は、それらのすべての内容が全体として引用により本明細書に組み込まれている。電気穿孔法およびPEG1000全細胞形質転換法も、CreggおよびRussell、*Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols*、第3章、Humana Press、Totowa、N. J.、pp. 27~39(1998)に記載されているとおり使用してもよい。

10

【0084】

形質転換した真菌細胞は、新たな表現型の選択および検出のために(細胞の栄養要求性により)必要とされる生化学的産物の不在下で形質転換後に栄養要求性細胞を培養すること、または形質転換体に含有される耐性遺伝子の不在下で酵母に対して毒性のある抗生物質の存在下で培養することを含むがこれらに限定されない適切な技術を使用することによって選択することができる。形質転換体は、例えばサザンブロットまたはPCR分析によって評価することのできる、ゲノムへの発現カセットの組み込みによって選択および/または実証することでもできる。

20

【0085】

ベクターを関心対象の標的細胞に導入する前に、ベクターは、上に記載したとおり、大腸菌(*E. coli*)のような細菌細胞において増殖させる(例えば、増幅させる)ことができる。ベクターDNAは、ベクターDNAの細菌環境からの精製を結果として生じる、当該技術分野で公知の方法のうちの何らかによって、細菌細胞から単離することができる。精製されたベクターDNAは、大腸菌タンパク質が哺乳類細胞に対して毒性であることができるので、これらのタンパク質がプラスミドDNA調製物中に存在しないことを確保するために、フェノール、クロロホルム、およびエーテルで徹底的に抽出することができる。

【0086】

一部の実施形態においては、遺伝子操作された真菌細胞は、OCH1遺伝子またはその遺伝子産物(例えば、mRNAまたはタンパク質)を欠いており、OCH1活性を欠損している。一部の実施形態においては、遺伝子操作された細胞は、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチド(例えば、*Yarrowia lipolytica*、*S. cerevisiae*、*Ogataea minuta*、*Pichia pastoris*、もしくは*C. albicans*に由来するMNN4ポリペプチド、または*P. pastoris*に由来するPNO1ポリペプチド)を発現する。例えば、真菌細胞は、*Y. lipolytica*由来のMNN4ポリペプチド(Genbank(登録商標)受託番号:XM_503217、Genolevures参照コード:YALI0D24101g)を発現することができる。一部の実施形態においては、遺伝子操作された細胞は、OCH1活性を欠損しており、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドを発現する。

30

40

【0087】

キャップを外しかつ脱マンノシル化の後、分子複合体は単離することができる。一部の実施形態においては、分子複合体は、酵母細胞内で維持され、細胞溶解の際に放出される。一部の実施形態においては、分子複合体は、上記細胞からの該分子の分泌を誘導する、(外来性核酸に対して天然であるかまたは発現ベクターへと操作されるかのいずれかである)コード配列によって提供される機序を介して培養培地へと分泌される。細胞溶解産物または培養培地中のキャップを外されかつ脱マンノシル化した分子複合体の存在は、該分子の存在を検出するための種々の標準的なプロトコル(例えば、GAAに特異的な抗体を

50

使用するイムノブロッティングまたは比活性（例えば、グリコーゲン分解）についての試験）によって実証することができる。

【0088】

一部の実施形態においては、単離後に、キャップを外されかつ脱マンノシル化した標的分子または分子複合体は、例えば酵素的手段または化学的手段を使用して異種性部分に結合することができる。「異種性部分」は、変更した標的分子に（例えば、共有結合でまたは非共有結合で）結合した任意の構成要素を指し、該構成要素は、変更した標的分子に元々存在する構成要素とは異なる。異種性部分には、例えばポリマー、キャリア、アジュバント、免疫毒素、または検出可能な（例えば、蛍光、発光、または放射性）部分を含む。一部の実施形態においては、追加のN-グリカンは、変更した標的分子に付加することができる。

10

【0089】

分子のグリコシル化を検出するための方法には、DNAシーケンサー支援型（DSA）、フルオロフォア支援型炭水化物電気泳動（FACE）または表面支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型質量分析法（SELDI-TOF MS）が挙げられる。例えば、分析は、例えば糖タンパク質を変性させた後に、例えばメンブラン上へ固定化するDSA-FACEを利用することができる。上記糖タンパク質は次に、ジチオトレイトール（DTT）またはβ-メルカプトエタノールのような好適な還元剤を用いて還元することができる。上記タンパク質のスルフヒドリル基は、ヨード酢酸のような酸を使用してカルボキシ化することができる。次に、N-グリカンは、N-グリコシダーゼFのような酵素を使用して該タンパク質から放出することができる。N-グリカンは必要に応じて、還元アミノ化によって再構成および誘導体化することができる。例えば、放出されたN-グリカンは、還元的アミノ化によって、還元性末端で、APTS（8-アミノピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸）などのようなフルオロフォアにより標識することができる。標識の化学量論は、1つのAPTS分子のみがオリゴ糖のそれぞれの分子へ付加されるようなものである。誘導体化したN-グリカンは次に濃縮することができる。N-グリカン分析に好適な計測手段には、例えば、ABI PRISM（登録商標）377 DNAシーケンサー（Applied Biosystems）が含まれる。データ分析は、例えばGENESCAN（登録商標）3.1ソフトウェア（Applied Biosystems）を使用して実施することができる。単離されたマンノプロテインは、そのN-グリカン状態を確認するために、仔ウシ腸ホスファターゼのような1種類以上の酵素を使用してさらに処理することができる。N-グリカン分析の追加の方法には、例えば、質量分析（例えば、MALDI-TOF-MS）、順相、逆相における高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）、およびイオン交換クロマトグラフィー（例えば、グリカンが標識されていない場合にはパルス電流検出を使用し、グリカンが適切に標識されている場合、紫外吸収または蛍光を使用する）が含まれる。Callewaertら（2001）Glycobiology 11（4）：275～281、およびFreireら（2006）Bioconjug. Chem. 17（2）：559～564も参照されたい。

20

30

【0090】

（操作された細胞の培養物）

40

本文書は、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞のうちの任意の実質的に純粋な培養物も提供する。本明細書において使用する場合、遺伝子操作された細胞の「実質的に純粋な培養物」とは、該培養物における生細胞の総数の約40%未満（すなわち、約35%未満、約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約2%未満、約1%未満、約0.5%未満、約0.25%未満、約0.1%未満、約0.01%未満、約0.001%未満、約0.0001%未満、またはさらにより小）が遺伝子操作された細胞、例えば細菌細胞、真菌細胞（酵母を含む）、マイコプラズマ細胞、または原生動物細胞以外の生細胞である。本文脈における用語「約」とは、関連した百分率が、指定された百分率の15%ほど指定された百分率を上回るまたは下回ることができることを意味する。したがって、例えば、約20%とは、17%～23%である

50

ことができる。遺伝子操作された細胞のこのような培養物には、細胞および、増殖媒体、保存媒体、または輸送媒体が含まれる。媒体は、液体、半固形（例えば、ゼラチン媒体）、または凍結であることができる。上記培養物には、液体または半固形媒体で増殖する細胞、または、凍結保存媒体または輸送媒体を含む保存媒体または輸送媒体中で保存または輸送される細胞が含まれる。上記培養物は、培養容器または保存容器または基材（例えば、培養皿、培養フラスコ、もしくは培養チューブ、または保存バイアルもしくは保存チューブ）の中にある。

【0091】

本明細書に記載される遺伝子操作された細胞は、例えば、凍結した細胞懸濁液として、例えば、グリセロールまたはスクロースのような凍結保護物質を含有するバッファー中に、凍結乾燥した細胞として保存することができる。あるいは、上記細胞は、例えば、流動床乾燥もしくは噴霧乾燥、または任意の他の好適な乾燥方法によって得られる乾燥した細胞調製物として保存することができる。

【0092】

（薬学的組成物および処置方法）

本明細書中に記載されたGAA分子および分子複合体（例えば、哺乳類細胞の内部への輸送を増強する少なくとも1つの改変を含む分子複合体）は、治療有効量の該分子と1種類以上のアジュバント、賦形剤、キャリア、および／または希釈剤とを含有する薬学的組成物へと組み込むことができる。許容し得る希釈剤、キャリア、および賦形剤は典型的には、受容者の恒常性（例えば、電解質平衡）に有害に影響することはない。許容し得るキャリアには、生体適合性、不活性、または生体吸収可能な塩、緩衝剤、オリゴ糖または多糖、ポリマー、粘度改善剤、保存剤などが含挙げられる。ある例示的なキャリアは、生理食塩水（0.15M NaCl、pH7.0～7.4）である。別の例示的なキャリアは、50mMリン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウムである。薬学的組成物の製剤化および投与についての技術に関するさらなる詳細は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co.、米国ペンシルバニア州イーストン)において得ることができる。補充用活性化化合物も上記組成物中に組み込むことができる。

【0093】

本明細書中に記載された1つまたは複数の改変を有する分子複合体を含有する薬学的組成物の投与は、全身性または局所性であることができる。薬学的組成物は、非経口投与および／または経口投与に好適であるよう製剤化することができる。具体的な投与様式には、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、経皮投与、髄腔内投与、経口投与、直腸投与、口腔投与、局所投与、鼻投与、眼投与、関節内投与、動脈内投与、くも膜下投与、気管支投与、リンパ投与、腔投与、および子宮内投与が含まれる。

【0094】

投与は、薬学的組成物のポラスによる周期的注入によることができるか、または外部（例えば、静脈内用の袋）または内部（例えば、生分解性埋没物、生体人工臓器、または植え込み型の改変N-グリコシル化分子産生細胞のコロニー）である貯蔵器からの静脈内投与または腹腔内投与によって中断されないでいることができ、もしくは持続的であることができる。例えば、米国特許第4,407,957号、同第5,798,113号、および同第5,800,828号を参照されたい。薬学的組成物の投与は、ポンプ（例えば、Annals of Pharmacotherapy, 27:912 (1993); Cancer, 41:1270 (1993); Cancer Research, 44:1698 (1984)を参照されたい）、マイクロカプセル封入（例えば、米国特許第4,352,883号、同第4,353,888号、および同第5,084,350号を参照されたい）、持続放出性ポリマー埋没物（例えば、Sabelの米国特許第4,883,666号を参照されたい）、マクロカプセル封入（例えば、米国特許第5,284,761号、同第5,158,881号、同第4,976,859号、および同第4,968,733号、ならびにPCT公開特許出願WO92/19195号、WO95/0545

10

20

30

40

50

2号を参照されたい)、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、もしくは他の好適な部位のいずれかへの注射、またはカプセル剤、液剤、錠剤、丸剤、もしくは持続放出製剤での経口投与のような好適な送達手段を使用して達成することができる。

【0095】

非経口送達系の例としては、エチレン-酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、植え込み可能な注入系、ポンプ送達、被包細胞送達、リポソーム送達、針送達系注射、無針注射、ネブライザー、エーロゾライザー、電気穿孔法、および経皮パッチが挙げられる。

【0096】

非経口投与に好適な製剤は、改変N-グリコシル化分子の滅菌水性調製物を便利に含有しており、好ましくは受容者の血液と等張である（例えば、生理学的塩類溶液）。製剤は、単位用量形態または複数回用量形態で提供することができる。

10

【0097】

経口投与に好適な製剤は、各々、あらかじめ決めておいた量の改変N-グリコシル化分子を含有するカプセル剤、カシェ剤、錠剤、もしくはロゼンジ、またはシロップ剤、エリキシル剤、乳剤、もしくは頓服水剤（*draught*）のような、水性リカーもしくは非水性液中の懸濁剤のような分離した単位として提供することができる。

【0098】

局所投与に好適な哺乳類細胞の内部への分子複合体の輸送を増強する少なくとも1つの改変を含む分子複合体は、哺乳類（例えば、ヒト患者）へ、例えばクリーム、スプレー、泡状物質、ジェル、軟膏、塗薬、またはドライラブ（*dry rub*）として投与することができる。ドライラブは、投与部位で再含水することができる。このような分子は、包帯、ガーゼ、またはパッチへも直接注入することができ（例えば、浸漬して、および乾燥して）、次に、それは局所的に適用することができる。このような分子は、局所投与のための包帯、ガーゼ、またはパッチに半液状、ゲル状、または完全に液状で維持することもできる（例えば、米国特許第4,307,717号を参照されたい）。

20

【0099】

治療有効量の薬学的組成物は、それを必要とする被験体へ、当業者によって確かめることのできる投与計画で投与することができる。例えば、組成物は、上記被験体へ、例えば1投薬あたり、被験体の体重1kgあたり0.01μg~10,000μgの薬用量で全身投与することができる。別の例においては、薬用量は、1投薬あたり、被験体の体重1kgあたり1μg~100μgである。別の例においては、薬用量は、1投薬あたり、被験体の体重1kgあたり1μg~30μg、例えば、1投薬あたり、被験体の体重1kgあたり3μg~10μgである。

30

【0100】

治療効能を最適化するために、本明細書中に記載される分子複合体はまず、異なる投与計画で投与することができる。単位用量および計画は、例えば、哺乳類の種、その免疫状態、該哺乳類の体重を含む因子に左右される。典型的には、組織におけるこのような分子複合体のレベルは、例えば、所与の処置計画の効能を決定するための臨床試験手順の一部として適切なスクリーニングアッセイを使用して監視することができる。

【0101】

本明細書中に記載された分子複合体についての投与頻度は、医療従事者（例えば、医師または看護師）の技術および臨床的判断のうちにある。典型的には、投与計画は、最適な投与パラメータを確立し得る臨床試験によって確立する。しかしながら、上記従事者は、被験体の年齢、健康状態、体重、性別、および医学的状态に従ってこのような投与計画を変更してもよい。投与の頻度は、処置が予防的であるかまたは治療的であるかに応じて変更することができる。

40

【0102】

このような分子複合体またはその薬学的組成物の毒性および治療的効能は、例えば細胞培養物または実験動物における公知の医薬手順によって決定することができる。これらの手順は、例えば、LD₅₀（集団の50%が致死する量）およびED₅₀（集団の50%

50

における治療有効量)を決定するために使用することができる。毒性作用と治療効果の間の用量比は治療指数であり、それは LD_{50}/ED_{50} の比として表すことができる。高い治療指数を示す薬学的組成物が好ましい。毒性のある副作用を示す薬学的組成物を使用することはできるが、正常細胞(例えば、非標的細胞)に対する潜在的な障害を最小化し、それにより副作用を低減するために、影響される組織の部位にこのような化合物を向ける送達系を設計するよう注意を払うべきである。

【0103】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータは、適切な被験体(例えば、ヒト患者)における使用のためのある範囲の薬用量を製剤化する上で使用することができる。このような薬学的組成物の薬用量は一般的に、ほとんどまたはまったく毒性を有さない ED_{50} を含むある範囲の循環濃度内に収まる。薬用量は、採用される剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で変化してもよい。(例えば、被験体における代謝障害を処置するために)本明細書に記載されるように使用される薬学的組成物については、治療有効量は、細胞培養アッセイから最初に概算することができる。用量は、細胞培養において決定されるような IC_{50} (すなわち、症状の最大半量の阻害を達成する薬学的組成物の濃度)を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、動物モデルにおいて処方することができる。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

【0104】

本明細書において定義する場合、分子複合体の「治療有効量」とは、処置された被験体における医学的に望ましい結果(例えば、ポンペ病の1種類以上の症状の改善)を生むことのできる複合体の量である。治療有効量(すなわち、有効薬用量)には、被験体の体重または試料の重量の1キログラムあたりの複合体のミリグラム量またはマイクログラム量(例えば、1キログラムあたり約1マイクログラム~1キログラムあたり約500ミリグラム、1キログラムあたり約100マイクログラム~1キログラムあたり約5ミリグラム、または1キログラムあたり約1マイクログラム~1キログラムあたり約50マイクログラム)を含めることができる。

【0105】

被験体は、任意の哺乳類、例えばヒト(例えば、ヒト患者)または非ヒト霊長類(例えば、チンパンジー、ヒヒ、またはサル)、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、アレチネズミ、ハムスター、ウマ、ある種の家畜(例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、またはヤギ)、イヌ、ネコ、またはクジラであることができる。

【0106】

本明細書に記載される分子複合体またはその薬学的組成物は、被験体へ、ポンペプチド病に使用される別の処置との併用療法として投与することができる。例えば、併用療法には、被験体(例えば、ヒト患者)へ、ポンペ病を(例えば、GAAをコードする遺伝子の変異に起因して)を発達させる危険を有するまたは該危険にある被験体へ治療上の利点を提供する1種類以上の追加の薬剤を投与することを含めることができる。したがって、上記化合物または薬学的組成物および1種類以上の追加の薬剤は、同時に投与することができる。あるいは、上記分子複合体を第一に投与し、かつ第二に上記1種類以上の追加の薬剤を投与することができ、またはその逆を行なうこともできる。

【0107】

本明細書中に記載される分子複合体のうちの任意のものが凍結乾燥されることができる。

【0108】

本明細書に記載される薬学的組成物のうちの任意のものが、投与のための指示とともに、容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。一部の実施形態においては、上記組成物は、一回使い切りのバイアルとしてパッケージングされる。

【0109】

以下は、本発明の実施例である。該実施例は、本発明の範囲をいずれかの方法で制限するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0110】

実施例1

CcMan5およびタチナタマメ α -マンノシダーゼによる組換えhuGAAのキャップを外すことおよび脱マンノシル化

組換えヒトGAA (rhGAA) は、ヒト α グルコシダーゼ遺伝子 (酸性 α グルコシダーゼまたは酸性マルターゼEC3. 2. 1. 3としても知られている) の3つのコピーおよびY. lipolytica MNN4遺伝子の2つのコピーを含有するY. lipolytica産生株OXY1589を使用して、国際公開第2011/039634号において記載されるように産生した。ヒトGAAのアミノ酸配列を図1に示す。

OXY1589株の遺伝子型は、以下のとおりである。

【化6】

MatA, leu2-958, ura3-302, xpr2-322,
gut2-744, ade2-844

POX2-Lip2pre-huGAA:URA3Ex::zeta
POX2-Lip2pre-huGAA:LEU2Ex::zeta
POX2-Lip2pre-hGM-CSF:GUTEx::zeta
YIMNN4-POX2-hp4d-YLMNN4 :ADE2::PT targeted

RhGAAは、Cellulosimicrobium cellulansマンノシダーゼ (CcMan5) およびタチナタマメ α マンノシダーゼ (JbMan) (Sigma製品M7257、3.0M硫酸アンモニウム懸濁液) によりキャップを外し、かつ脱マンノシル化した。CcMan5は、まず、DsbAシグナル配列を含有し、N末端HISタグを有するタンパク質の発現をもたらすベクターpLSAH36へ、CcMan5ポリペプチドをコードする核酸をクローニングすることによって組換えで産生した (図2A)。図2Bおよび2Cは、それぞれ、シグナル配列を有するおよびシグナル配列を有していないCcMan5ポリペプチドのアミノ酸配列を含む。プラスミドpLSAH36を、大腸菌B21細胞へクローニングし、ペリプラズム中に存在するタンパク質を、Talonカラムを使用して単離し、精製した。JbManの硫酸アンモニウム懸濁液を使用する前に、それを、混入ホスファターゼ活性を除去するSuperdex 200カラムによるゲルろ過によってさらに精製した。

【0111】

RhGAA (20mM酢酸ナトリウム (NaOAc) バッファー、pH5.0中約5mg/mLの濃度) は、huGAA: CcMan5: JbManについて100: 5: 10のw: w比で、CcMan5 (リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中約0.15~0.30mg/mL) およびJbMan (PBS中約0.5~1mg/mL) と共にインキュベートすることによって、キャップを外し、かつ脱マンノシル化した。全反応容積を、500mM NaOAc バッファー、pH5.0および100mM CaCl₂ により希釈し、100mM NaOAc および2mM CaCl₂ の最終濃度を得た。反応混合物は、16時間、30℃でインキュベートした。

【0112】

キャップを外すプロセスを評価し、精製huGAAのN-グリカンプロファイル进行分析するために、5 μ g糖タンパク質のN-グリカンは、N-グリコシダーゼF (PNGase F) により放出させ、APTS (8-アミノ-1, 3, 6-ピレントリスルホン酸; 三ナトリウム塩) により標識し、続いて、DSA-FACE (DNAシーケンサー支援型フルオロフォア支援型炭水化物電気泳動) で分析した。方法は、Laroyら、Natur

e Protocols, 1:397-405 (2006)において記載されるプロトコルに本質的に従う。

【0113】

CcMan5およびJbManによる処理の前（パネルB）および後（パネルC）のhuGAA（76kD形態）由来のN-グリカンのDSA-FACE電気泳動図を図3Aに示す。パネルAは、PNGaseFによりRNaseBから放出されたN-グリカンを含む参照試料である。キャップの付いたhuGAAから放出されるN-グリカン混合物は、主として、ManP-Man₈GlcNAc₂および（ManP）₂-Man₈GlcNAc₂から構成される（図3A、パネルB）。ManP-Man₈GlcNAc₂よりもわずかに速く流れるピークは、ManP-Man₇GlcNAc₂に帰属させることができる。キャップを外し、脱マンノシル化した後に観察される主なピークは、二重リン酸化P₂-Man₆GlcNAc₂ならびにモノリン酸化P-Man₄GlcNAc₂、P-Man₅GlcNAc₂、およびP-Man₆GlcNAc₂に帰属させることができる（パネルC）。

10

【0114】

huGAAの異なるプロセシング形態のキャップを外すことは、76kD形態（パネルB）、95kD形態（パネルC）、および110kD形態（パネルD）について、同じN-グリカンプロファイル（図3B）をもたらす。

【0115】

実施例2

20

110kDa rhGAAの精製

rhGAAの110kDa形態を、OXY1589株から以下のように単離した。回収後、ブロスを超遠心分離し、Durapore膜（Merck Millipore）を使用して、ろ過した。硫酸アンモニウム（AMS）を、1Mの濃度まで追加し、溶質を、20mMリン酸ナトリウムpH6、1M硫酸アンモニウム中で平衡化した疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）カラムにロードする前に、ろ過した。産物を、20mMリン酸ナトリウムpH6により溶出した。

【0116】

第2のクロマトグラフィーカラムにロードする前に、産物を、まず、再生セルロース膜でタンジェンシャルフローろ過（TFF）を介して濃縮し、次いで、バッファーを20mM酢酸ナトリウムpH4.5に交換した。この材料を、20mM酢酸ナトリウムpH4.5により平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）カラムにロードした。カラムにロードした後に、UV吸光度シグナルがベースラインに到達するまで、それを平衡バッファーにより洗浄し、次いで、20mM酢酸ナトリウムpH4.5、50mM NaClにより洗浄した。産物を、20mM酢酸ナトリウムpH4.5、150mM NaCl中に溶出し、濃縮し、バッファーを20mM酢酸ナトリウムpH5に交換した（下記を参照されたい）。

30

【0117】

試料を、実施例1において記載されるように、キャップを外し、かつ脱マンノシル化し、次いで、D-マンニトールを、100mMの濃度まで追加した。その材料の4分の3について、10kDa分子量カットオフ（MWCO）を有する再生セルロース膜を使用し、TFFを介して容積を減らし、25mMリン酸ナトリウムpH6、150mM NaCl、100mM D-マンニトールにより4℃で平衡化したSuperdex 200カラムでサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を介してさらに精製した。画分を、その後、変性条件下で、チバクロンブルー染色ポリアクリルアミドゲルで、純度についてスクリーニングした。プールした画分を、TFFを介して濃縮し、10kD MWCOのAmicon遠心分離フィルター（再生セルロース膜、Merck Millipore）を使用して超遠心分離した。

40

【0118】

実施例3

50

110kDa rhGAAの精製

rhGAAの110kDa形態を、OXY1589株から以下のように単離した。回収後、AMSの濃度が1Mまで増加する前に、この材料を遠心分離し、ろ過した。溶質を再びろ過し、産物を、20mMリン酸ナトリウムpH6、1M AMSにより平衡化したHICカラム上に捕捉し、20mMリン酸ナトリウムpH6バッファー中1Mから0MまでのAMSのステップ勾配で放出した。

【0119】

溶出物を、Vivaflow 200モジュール（PES膜、10kD MWCO、Sartorius）上でTFFを介して濃縮し、10mM BIS-TRIS、pH6にバッファー交換した。脱塩した材料を、陰イオン交換クロマトグラフィー（AEC）カラム上に持ってきた。UVシグナルがほぼベースラインに到達するまでカラムを洗浄した後、二相連続塩勾配を適用した；0Mから0.3MまでのNaClに進む第1の勾配、0.3Mから1MまでのNaClの第2の勾配。画分を、勾配の間に収集し、定性的4-メチルウンベリフェリル-a-D-グルコピラノシド（4-MUG）を介してGAAについてスクリーニングした。4-MUGアッセイにおいて、0.35mM 4-MUG、0.1% BSA、および100mM酢酸ナトリウムpH4からなる反応バッファーを10μlの溶出画分に対して10:1の容積の割合で追加することによって反応を開始した。37℃で30分間〜1時間インキュベートした後に、等容積の100mMグリシンpH11を、反応を停止するために追加した。蛍光発生反応産物4-メチルウンベリフェロンの放出を、UV光下で観察した。

【0120】

GAAを含有する画分をプールし、Vivaflow 200モジュール（PES膜、10kD MWCO、Sartorius）上でのTFFおよび10kD MWCOのAmicon遠心分離フィルター（再生セルロース膜、Merck Millipore）を使用する超遠心分離を介して濃縮した。

【0121】

濃縮した材料を2つに分割し、50mMリン酸ナトリウムpH6、250mM NaCl、0.05% Tween-20により4℃で平衡化したSuperdex 200カラムでさらに精製した。画分を、その後、変性条件下で、チバクロンブルー染色ポリアクリルアミドゲルで、純度についてスクリーニングし、ホスファターゼ含有量を、405nmの波長で黄色のp-ニトロフェノレート反応産物の酵素による放出を測定する、パラ-ニトロフェニルホスフェートを使用する比色定量試験を使用して決定した。

【0122】

パイロットプールを、GAAを含有する画分から作製した。パイロットプールの総タンパク質を、Bradfordアッセイを介して決定した。選択した画分を、Vivaflow 200 TFFモジュール（PES膜、10kD MWCO、Sartorius）での濃縮のためにプールした。10kD MWCOの15ml Amicon遠心分離フィルター（再生セルロース膜、Merck Millipore）を使用して、容積をさらに減らした。

【0123】

濃縮した材料を、1回目のSECステップと同じ条件を使用して、2回目のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）にかけた。画分を、変性条件下で、チバクロンブルー染色ポリアクリルアミドゲルで、純度について再びスクリーニングした。画分を、選んだパイロットプールに従ってプールし、15ml Amiconの遠心分離フィルター（10kD MWCO、再生セルロース膜、Merck Millipore）で濃縮した。

【0124】

実施例4

95kDa rhGAAの精製

rhGAAの95kDa形態を、OXY1589株から以下のように単離した。回収後、ブrossを遠心分離し、Durapore膜（Merck Millipore）を使

用して、ろ過した。産物を、その後、10 kDの分子量カットオフ(MWCO)を有する改変ポリエーテルスルホン(PES)膜でTFEを介して濃縮した。AMSを、1Mの濃度まで追加し、溶質を、20 mMリン酸ナトリウム pH 6、1M AMS中で平衡化したHICカラムにロードする前に、ろ過した。産物を、水により溶出し、溶出物のpHを、10 mMの濃度まで、100 mM BIS-TRIS pH 6のストックバッファーを追加することによって調節し、それを13日間、4℃で保存した。

【0125】

AEXカラム上にロードする前に、産物を、10 kDのMWCOを有する再生セルロース膜でTFEを介して濃縮し、10 mM BIS-TRIS pH 6にバッファー交換した。脱塩した材料を、実施例3において記載されるように実行したAEXクロマトグラフィーを介してさらに処理した。画分を、勾配の間に収集し、定性的4-MUGアッセイを介してGAAについてスクリーニングした。GAAを含有する画分を、さらなる精製のためにプールした。

10

【0126】

第3のクロマトグラフィーステップについて、AMSの濃度を1Mまで増加させ、ろ過後、この材料を、HICを介してさらに精製した。1Mから0MまでのAMSの連続塩勾配を、勾配の間に画分を収集しながら適用した。画分をすべて、定性的アッセイを介してGAAについてスクリーニングし、GAAを含有するものを、さらなる処理のためにプールした。

【0127】

20

プールを、10 kD MWCO再生セルロース膜の15 ml Amicon遠心分離フィルターを使用する超遠心分離を介して濃縮し、実施例3において記載されるものと同じ手順を使用して、SECを介してさらに精製した。画分を、その後、変性条件下で、チバクロンブルー染色ポリアクリルアミドゲルで、純度についてスクリーニングした。90%純粋なGAA画分を、プールし、TFE Vivaflow 200モジュール(PES膜、10 kD MWCO、Sartorius)でまず濃縮し、次いで、15 ml Amicon遠心分離フィルター(10 kD MWCO、再生セルロース膜、Merck Millipore)を使用する超遠心分離にかけた。濃縮した材料を、1回目のSECステップについてと同じ条件を使用して、2回目のSECにかけた。画分を、定性的4-MUG GAAアッセイを使用してGAAについてスクリーニングした。GAA活性を有する画分を、プールし、濃縮した。

30

【0128】

実施例1において示されるようにキャップを外し、脱マンノシル化した後に、D-マンニトールを、100 mMの濃度まで追加し、25 mMリン酸ナトリウム pH 6、150 mM NaCl、100 mM D-マンニトールにより4℃で平衡化した最終のSuperdex 200ゲルろ過カラムにロードする前に容積を再び減らした。画分を、4-MUG定性的アッセイを使用してGAAについてスクリーニングし、産物を含有するものを、プールし、濃縮した。

【0129】

実施例5

40

95~110 kDaのrhGAAミックスの精製

rhGAAの110 kDa前駆体および95 kDa形態の両方を、以下のようにOXY Y1589株から単離した。回収の後に、その材料を、実施例2において記載される第2のクロマトグラフィーステップで処理した。HICステップの後、産物を、濃縮し、TFEを介して10 mM BIS-TRIS pH 6にバッファーを交換し、AEXカラムにロードした。産物を、pH 6(10 mM BIS-TRIS)で0 mMから300 mMまでのNaClで単一のステップで溶出し、次いで、Pellicon XL50 TFEモジュール(10 kD MWCOを有する再生セルロース膜)を使用して濃縮した。この材料の半分を、サイズ排除クロマトグラフィーを介してさらに精製した。クロマトグラフィーステップを、実施例3において記載されるように実行したが、さらなる処理のための

50

画分の選択を、変性条件下でのチバクロンブルー染色ポリアクリルアミドゲルでの純度に基づいてのみ行った。

【0130】

プールの半分を、濃縮し、AEX材料の残りとは組み合わせた。キャップを外し、脱マンノシル化した後に、D-マンニトールの濃度を100mMまで増加させ、続く濃縮およびSECステップを、実施例2において記載されるものと同じ手順に従って行った。画分を、4-MUG定性的アッセイに基づいてプールし、実施例6からのキャップを外した産物と共にプールした。

【0131】

実施例6

95kDa rhGAAの精製

rhGAAの95kDa形態を、OXY1589株から以下のように単離した。回収の後に、この材料を、実施例3において記載されるように、AEXステップまで処理した。AEXステップにおいて、かなりの量の産物が、ローディングの間の伝導率の増加によりフロースルー画分中に存在した。そのため、フロースルー材料を、適切なバッファーに再びダイアフィルトレーションし、2回目のAEXクロマトグラフィーにかけた。両方の量（バッチAおよびバッチB）について、ここから別々に処理した。

【0132】

バッチAを、実施例5からのSECプールの残りおよび実施例2からのCEXプールの残りとは組み合わせ、プールを、続いて濃縮し、10mM BIS-TRIS pH6、300mM NaClを含有するバッファーにダイアフィルトレーションした。この材料を、65時間、30℃でインキュベートした。次いで、pHを、125mMの濃度まで、酢酸ナトリウムpH5の1Mのストックバッファーを追加することによって、pH5まで低下させ、試料を30℃で再びインキュベートした。24時間後、産物を、Aspergillus oryzae由来のプロテアーゼミックスであるFlavourzyme (Novozymes Corp)により、産物の総タンパク質含有量対プロテアーゼミックスの40:1の重量:重量比を使用して処理し、最後に30℃でインキュベートした。一晚のインキュベーションの後に、物質を、実施例3において記載されるものと同じ条件の下で実行する第1のSECステップを介して精製した。変性条件下でのチバクロンブルー染色ポリアクリルアミドゲルに基づいて純粋な産物を含有することが推定された画分をプールした。濃縮および20mM酢酸ナトリウムpH5へのバッファー交換の後に、この材料を、実施例1において示されるように、キャップを外し、かつ脱マンノシル化した。D-マンニトールを100mMの濃度まで追加し、この材料を、実施例5からのキャップを外されかつ脱マンノシル化した材料と共にプールした。最終のSECステップおよび続く試料操作を、実施例2において記載されるように実行した。

【0133】

バッチBを、実施例3からの末端材料と共にプールし、プールを、濃縮し、10mM BIS-TRIS pH6、300mM NaClを含有するバッファーにダイアフィルトレーションした。次いで、産物を、実施例5において記載されるものと同じ重量比を使用して、30℃で、一晚のインキュベーション期間の間、A. oryzaeプロテアーゼミックスにより処理し、その後、実施例3において記載されるものと同じ条件の下で実行する第1のSECステップを介して精製した。産物のさらなる処理を、実施例5において記載されるように行った。

【0134】

最終バッチにおいて、バッチAおよびバッチBからの産物を、GAA含有量において14:1の比で混合した。

【0135】

実施例7

76kDa rhGAAの精製

rhGAAの76kDa形態を、OXY1589株から以下のように単離した。回収

10

20

30

40

50

の後、培養物を、2回の連続遠心分離にかけた。上清を、プールし、AMSをおよそ1Mの濃度まで導入した。溶解した後、20mMリン酸ナトリウムpH6および1M AMSにおいてあらかじめ平衡化した1容積のHIC樹脂を、バッチ取込みモードで産物に結合するように攪拌しながら、50容積の上清に追加した。結果として生じるスラリーを、攪拌せずに4℃で一晩保存した。この期間の間に、褐色の層が、穏やかな吸引を介して午前中に除去した溶質の一番上に沈澱した。樹脂を、カラムに充填する前に、それぞれの回において3容積のリードバッファー（20mMリン酸ナトリウムpH6、1M AMS）により3回洗浄した。充填した樹脂を、UVシグナルがほぼベースラインに到達するまで洗浄し、産物を、その後、水により溶出した。溶出物のpHを、10mMの濃度まで、100mM BIS-TRIS pH6のストックバッファーを追加することによって調節した。次いで、この材料を、バッグ中で滅菌ろ過し、4℃で11日間、保存した。

10

【0136】

第2および第3のクロマトグラフィーステップならびに材料の付随する操作を、実施例4において記載されるように実行した。第3のクロマトグラフィーステップの後のプールを、まず、並行につながれた2つのTFF Vivaflow 200モジュール（PES膜、10kD MWCO、Sartorius）でおよそ7倍濃縮し、次いで、10kD MWCOの15ml Amiconの遠心分離フィルター（再生セルロース膜、Merck Millipore）を使用して、超遠心分離した。濃縮した材料を2つに分割し、実施例4で記載されるものと同じ条件を使用してSECを介してさらに精製した。画分を、その後、変性条件下で、チバクロンブルー染色ポリアクリルアミドゲルで、純度についてスクリーニングした。選択した画分を、並行につながれた2つのVivaflow 200 TFFモジュール（PES膜、10kD MWCO、Sartorius）での濃縮のためにプールした。10kD MWCOの15ml Amicon遠心分離フィルター（再生セルロース膜、Merck Millipore）を使用して、容積をさらに減らした。

20

【0137】

キャップを外し、脱マンノシル化した後に、D-マンニトールを、100mMの濃度になるように追加し、試料を、最終のSECカラム上にロードする前に、Vivaflow 50 TFFモジュール（PES膜、10kD MWCO、Sartorius）で再び濃縮し、実施例4において記載されるものと同じ方法で実行した。産物を含有する画分をプールし、濃縮した。

30

【0138】

実施例8

人工色素形成基質p-ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシドを使用する、huGAAの異なるバリエーション（76、95、および110kDバリエーション）の酵素の特徴付け。人工色素形成基質p-ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド（PNPG）を使用して、実施例2において得られた未処理huGAA（110kDa）ならびに実施例7（76kDa）、実施例6（95kDa）、および実施例4（95kDa）において得られた処理huGAAバリエーションの動態学的パラメーターを決定した。また、市販のヒト α -グルコシダーゼであるMyozyme（登録商標）（アルグルコシダーゼアルファ、Genzyme）と比較した。

40

【0139】

酵素は、0.1% BSAおよび100mM AMS（反応バッファー）を含有する100mM酢酸ナトリウムバッファーpH4.0において、20 μ g/mlになるように希釈した。10 μ lの酵素溶液を、三連で、96ウェルプレートに追加した。PNPG基質（Sigma）を、反応バッファーにおいて、様々な基質濃度（10、6、4、2、1.6、1.2、0.8、および0.4mM）に希釈し、90 μ lの希釈した基質を、それぞれのウェルに追加した。酵素反応を37℃で60分間インキュベートし、その後、100 μ l 10%炭酸ナトリウム、pH12を追加して反応を止めた。吸光度を、405nmで測定した。p-ニトロフェノール（PNP）による標準曲線を、1分あたりで形成され

50

る産物の量を計算するために測定した。 $\mu\text{M}/\text{分}$ として表現される速度を、異なる基質濃度の関数としてプロットし、ミハエリスーメンテンの曲線を生成した。Graph Pad Prismを、ミハエリスーメンテンの式に直接フィットさせることによって、 V_{max} および K_{m} を計算するために使用した。触媒定数 k_{cat} および触媒効率 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ を計算した。様々な酵素の比活性を、 U/mg として報告した。ここで、1ユニットを、100 mM酢酸ナトリウムバッファー、 $\text{pH} 4.0 \pm 0.1\%$ BSAおよび100 mM AMS中2 mMの基質濃度で、1分あたりの1 nmolの基質の加水分解を触媒する酵素の量として定義する。結果を表1に示す。

【表1】

表 1

	Myozyme	95 kDa (実施例 4)	76 kDa (実施例 7)	110 kDa (実施例 2)	95 kDa (実施例 6)
V_{max} ($\mu\text{M}/\text{分}$)	12	12	14	13	13
K_{m} (mM)	4.4	4.4	4.3	4.4	4.7
k_{cat} (分^{-1})	660	677	770	688	730
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{分}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	150	154	179	156	155
比活性 (U/mg)	2000	1910	2415	1935	1980

【0140】

huGAAの未処理形態および処理形態ならびにMyozymeは、基質PNPGに対して同等の動態学的パラメーターを有する。これは、マウス乳およびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）培地由来のヒト酸性 α -グルコシダーゼについての文献において報告されるデータと一致する（Bijvoetら（1998）、Human Molecular Genetics, 7、1815–1824）。未処理（110 kD）および処理（76 kD）の形態は、人工基質4-メチルウンベリフェリル- α -D-グルコピラノシドに対して同じ K_{m} および k_{cat} 値を有することが報告された。

【0141】

実施例 9

基質としてウサギ肝臓グリコーゲンを使用したhuGAAの異なるバリエーション（76、95、および110 kDのバリエーション）の酵素的特徴付け

未処理huGAA（110 kDバリエーション；実施例 2）ならびに処理huGAAバリエーション（76 kDa、実施例 7；および95 kD、実施例 6）の酵素パラメーターを、ウサギ肝臓グリコーゲン（ロットN° 099K37931V、Sigma）を使用して試験した。市販のヒト α -グルコシダーゼであるMyozyme（登録商標）（アルグルコシダーゼアルファ、Genzyme）と比較した。酵素を、100 mM酢酸ナトリウムバッファー $\text{pH} 4.0$ において500 ng/mlになるように希釈した。50 μl の酵素溶液を、二連、96ウェルプレートに追加した。グリコーゲン基質を、酢酸バッファーにおいて、様々な基質濃度（250、200、150、100、75、50、25 mg/ml）になるように希釈し、100 μl の希釈した基質を、それぞれのウェルに追加した。酵素反応物を、37°Cで60分間インキュベートした。グルコースの量を、amp lex 赤色基質によりグルコースオキシダーゼ法を使用して測定した。

【0142】

グルコース標準曲線を、1分あたりで形成される産物の量を計算するために測定した。 $\mu\text{M}/\text{分}$ として表現される酵素速度を、異なる基質濃度の関数としてプロットし、ミハエリスーメンテンの曲線を作成した。Graph Pad Prismを使用して、ミハエリスーメンテンの式に直接フィットさせることによって、 V_{max} および K_{m} を計算した。触媒定数 k_{cat} および触媒効率 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ を計算した。様々な酵素の比活性は、 U

／mgとして報告した。ここで、1ユニットを、100mM酢酸ナトリウムバッファー、pH4.0中50mg／mlの最終基質濃度で、1分あたり1μmolのグルコースの形成を触媒する酵素の量として定義する。結果を表2に示す。

【表2】

表2

	Myozyme	76 kDa (実施例 7)	95 kDa (実施例 6)	110 kDa (実施例 2)
Vmax (μM/分)	32 ±6	15±2	13±1	11±1
Km (mM)	600 ±140	100±10	93±8	162±17
kcat (分⁻¹)	21100	10000	8600	7260
kcat/Km (分 ⁻¹ mM ⁻¹)	35	100	92	45
比活性 (U/mg)	14	32	27	16

10

【0143】

この実験において、基質の飽和は、ウサギグリコーゲンの溶解性の限界により到達することができない(図4)。Myozymeについては、見かけ上のKmおよびkcat値のみが計算された。3つのhUGAAバリエーションについて、より低い見かけ上のKm値が、決定された。処理形態の触媒効率は、未処理hUGAAおよびMyozymeの触媒効率よりも2倍高かった。

20

【0144】

実施例10

ポンペ病のマウスモデルにおけるグリコーゲンクリアランスに対する酸性αグルコシダーゼの効果

実施例7からのGAA産物(76kDa、キャップを外されかつ脱マンノシル化した)、実施例6からのGAA産物(95kDa、キャップを外されかつ脱マンノシル化した)、および実施例2からのGAA産物(110kDa、キャップを外されかつ脱マンノシル化した)を、ポンペ病のマウスモデルに対して投与して、骨格筋および心臓からのグリコーゲンクリアランスを決定した。

30

【0145】

実験を、FVB GAAノックアウトマウスおよびFVB野生型マウスにより実行した。この動物モデルは、この疾患の早期発症乳児性形態の好適な代表であるので、試験系に選んだ。生後、KOマウスは、リソソームグリコーゲンの全身性で進行性の蓄積を有する(Bijvoetら、1998、前掲)。オスおよびメスのFVB GAA KOマウスを、Erasmus University、Rotterdamから得た。処置の開始時に、マウスは、26～49週齢であった。

【0146】

試験物質またはビヒクルを、4週間にわたって毎週1回、10ml/kg体重(bw)の用量容積で、尾静脈に、ゆっくりしたボラスによって静脈内に投与した。マウスを、剖検前に16時間にわたって絶食させた。動物を、最後の注射の4日後に屠殺した。研究グループの詳細を表3に示す。

40

【表 3】

表 3

グループ/ カラーコード	用量レベル (mg/kg bw)	用量容積 (ml/kg bw)	マウスのタイプ	マウスの数
1/白色	0	10	WT	9
2/青色	0	10	KO	16
3/緑色	20 mg/kg 76 kDa	10	KO	16
4/赤色	20 mg/kg 95 kDa	10	KO	16
5/黄色	20 mg/kg 110 kDa	10	KO	16
6/橙色	20 mg/kg Myozyme	10	KO	16

10

【0147】

器官の灌流および均質化

【0148】

心臓および骨格筋（大腿四頭筋、両側）を、PBSによる灌流の後に単離した。組織を、ultra-*trax*を使用することによって、10重量容積の氷冷PBS中でホモジナイズした。その後、ホモジネートを、15分間にわたって2度、氷上で16ミクロンで超音波処理した。12000gで30分間の遠心分離の後に、上清を、グリコーゲンの測定のために収集した。

【0149】

20

バイオ分析

それぞれの個々のマウスの心臓および骨格筋におけるグリコーゲン含有量を、検証済の定量的酵素アッセイを使用して測定した。組織を沸騰させた後に、アミログルコシダーゼと α -アミラーゼとの混合物を、グリコーゲンのグルコースへの分解のためにインビトロにおいて追加した。グルコースの量を、amp *lex* 赤色基質によりグルコースオキシダーゼ法を使用して測定した。グリコーゲンの量を、グリコーゲン μ g/タンパク質mgとして報告する。

【0150】

統計分析

グループ2、3、4、5由来の心臓におけるグリコーゲン含有量を、ANOVAによって分析し、その後、Dunnettのt検定によりグループ6（Myozyme）およびグループ2（プラセボ）に対する事後比較（post hoc comparison）した。グループ1は、WTマウスモデルにおけるグリコーゲン貯蔵がないため、統計分析から省き、品質チェックとして使用した。

30

【0151】

四頭筋データにおける異常値の存在のために、異なる産物のグリコーゲン含有量データの鑑別的な分布の可能性を評価するために、Kruskal-Wallis検定を使用した。

【0152】

四頭筋データの事後分析を、Wilcoxon順位和検定により実行した。それぞれの産物グループおよびMyozymeグループをプラセボ（グループ2）グループと比較し、それぞれの産物グループをMyozymeと比較した。

40

【0153】

結果

表4は、グループ当たり16匹のマウスの心臓（A）および骨格筋（B）における平均グリコーゲンレベル（ μ g/タンパク質mg）を示す。

【表 4】

表 4

A. 心臓における平均グリコーゲンレベル

概要	平均	sd
WT	0.58	0.95
KO/プラセボ	525.47	67.75
KO/76 kDa	377.75	80.20
KO/95 kDa	380.56	78.30
KO/110 kDa	416.56	106.77
KO/Myozyme	475.83	98.16

10

B. 骨格筋における平均グリコーゲンレベル

概要	平均	sd
WT	2.22	0.66
KO/プラセボ	191.80	34.75
KO/76 kDa	152.27	35.35
KO/95 kDa	169.27	46.68
KO/110 kDa	160.39	36.46
KO/Myozyme	186.49	40.61

20

【0154】

図5は、心臓（5A）および骨格筋（5B）における個々のマウスのグリコーゲンレベル（ $\mu\text{g}/\text{タンパク質mg}$ ）を示す。結果は、本明細書において産生されたGAA産物（110kDa、95kDa、および76kDa）が、20mg/kgでの4回の静脈内注射の後に、プラセボ処置マウスと比較して、心臓におけるグリコーゲンレベルを統計的に低下させることを示す。同じMyozyme（登録商標）用量は、心臓におけるグリコーゲンの量を低下させなかった。76kDa産物処置グループおよび95kDa処置グループの両方におけるグリコーゲンレベルは、Myozyme（登録商標）処置グループと比較して、統計的に異なっていた。統計的に、本明細書において産生された3つの異なるGAA産物の間で差はなかった。

30

【0155】

本明細書において産生された76kDa産物もまた、プラセボ処置またはMyozyme（登録商標）処置マウスと比較して、骨格筋におけるグリコーゲンの量を統計的に低下させた。95kDaおよび110kDaの両方の産物におけるグリコーゲンレベルは、おそらく、個々のマウス間のより大きな変動に起因して、プラセボおよびMyozyme（登録商標）処置マウスと比較して、統計的に異なっていなかった。20mg/kgのMyozyme（登録商標）は、プラセボと比較して、骨格筋におけるグリコーゲンレベルを低下させることができなかった。

40

【0156】

実施例11

Aspergillus oryzae由来のプロテアーゼの同定

GAAは、酸性pHで、少量のFlavourzyme（Novozymes Cor

50

p) (*Aspergillus oryzae* 由来のプロテアーゼミックス) とのインキュベーションの際に特異的なタンパク質分解切断を受ける。結果として生じる GAA 産物は、還元条件下で SDS-PAGE でおよそ 95 kD の分子量を有する。同様のタンパク質分解性活性は、産生株 (*Yarrowia lipolytica*) 由来のバックグラウンドタンパク質を含有する、特定の精製した GAA 調製物において観察された。

【0157】

タンパク質分解性の事象について評価するために、GAA の N-グリカン、タンパク質分解処理前に、EndoH を使用して除去し、N-グリコシル化部位当たり単一の N-アセチルグルコサミンにした。これは、SDS-PAGE を介してのより適切な評価を可能にする。次いで、GAA 産物を、Flavourzyme プロテアーゼカクテルまたはその精製試料と共にインキュベートした。反応を、100 mM 酢酸ナトリウムバッファー pH 5 において 30 °C で実行した。試料を、異なる時点で採取し、還元条件下で SDS-PAGE を介して分析した。GAA の 0.5 µg を含有する容積を、1 レーン当たりロードした。

【0158】

プロテアーゼカクテル中のどのプロテアーゼファミリーが GAA の特異的なタンパク質分解を担うかについて調査するために、規定のプロテアーゼファミリーに対して特異的なプロテアーゼ阻害剤を、プロテアーゼの同定を容易にするために、アッセイに含めた。プロテアーゼ阻害剤がここで反応混合物に追加されたことを除いて、反応は、上記に記載されるように実行した。それぞれ 1 mM および 10 µM の濃度の不可逆的阻害剤 PMSF (Sigma-Aldrich prod. nr. E5134-500G) および E-64 (Calbiochem prod. nr. CALB324890-5) を、タンパク質分解反応の前に、希釈したプロテアーゼカクテルと共にインキュベートした。可逆的阻害剤キモスタチン (Calbiochem prod. nr. CALB230790-5)、EDTA、およびロイペプチン (Calbiochem prod. nr. CALB108976-10MG) を、それぞれ 60 µg/ml、50 mM、および 100 µM の濃度で反応混合物に直接追加した。

【0159】

GAA の特異的なタンパク質分解は、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼの活性を消失させるプロテアーゼ阻害剤である PMSF およびキモスタチンによって阻害された。システインプロテアーゼを阻害する不可逆的阻害剤 E-64 は、タンパク質分解をブロックしなかった。これらのデータは、特異的なタンパク質分解がセリンプロテアーゼファミリーメンバーであることを示唆する。この仮説を支持するより多くの証拠が、プロテアーゼカクテルを、PMSF およびジスルフィド結合を還元するレドックス剤ジチオスレイトール (DTT) と共にインキュベートしたさらなるアッセイによってもたらされた。この還元剤の追加は、共有結合不活性システインプロテアーゼ：PMSF 付加生成物を還元し、システインプロテアーゼ活性を回復させる。PMSF によって阻害される場合、セリンプロテアーゼの活性は、DTT によって回復させることができない。挙動におけるこの差異は、GAA に対して作用するセリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼをさらに区別するために使用した。

【0160】

DTT との PMSF 阻害プロテアーゼのインキュベーションは、プロテアーゼカクテルの GAA 特異的なタンパク質分解活性を回復させなかった。GAA 特異的なタンパク質分解はまた、メタロプロテアーゼ阻害剤 EDTA および広域スペクトル阻害剤ロイペプチンによっても阻害されなかった。データはすべて、セリンプロテアーゼがこの GAA タンパク質分解性事象を担うことを示す。

【0161】

混合物からプロテアーゼを同定するために、プロテアーゼを、一連のクロマトグラフィーステップを使用して精製した。第 1 のクロマトグラフィーステップは、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂 (Qセファローズ FF、GE healthcare) を使用した

。プロテアーゼカクテル材料を、ローディングの前に、20 mM TRIS-HCl バッファー pH 7 において希釈した。20 mM TRIS-HCl バッファー中 100 mM、300 mM、および 500 mM NaCl のフローズルーおよび溶出を収集した。フローズルー画分および溶出画分はすべて、上記に記載されるアッセイを使用して分析した。GAA に対して作用するプロテアーゼは、ランのフローズルー画分中に存在し、出発材料と比較してかなり豊富であった。

【0162】

フローズルー材料を、陽イオン交換クロマトグラフィー (pH 5 10 mM 酢酸 Na の SP セファロース XL (GE Healthcare) ; 0~300 mM NaCl により溶出) を介してさらに処理した。溶出画分を、収集し、即時青色染色 SDS PAGE を介して分析し、上記に記載されるアッセイを使用して、関心対象のプロテアーゼの存在についてアッセイした。

10

活性の大部分は、CEX クロマトグラフィー溶出物の最後の画分中に存在した。最後の 2 つの画分を、以下のようにプールし、質量分析法を介して分析した。タンパク質混合物を、トリプシン消化前に脱塩し、還元し、アルキル化し、その後、LC-MS/MS 法にかけた。得られたスペクトルを、Mascot アルゴリズムを使用して、NCBI データベースとマッチさせた。以下の設定を適用した：

- ・トリプシン、キモトリプシン (4 つまでの切断ミス (miscleavage) が許容される)
- ・酸化 (M, W)、脱アミド (N, Q) (可変の改変 (variable modification))
- ・カルバミドメチル化 (固定の改変 (fixed modification))
- ・分類学上の地位：真核生物
- ・MS 許容範囲：0.05 Da、MS/MS 許容範囲：0.05 Da。

20

【0163】

Aspergillus 由来のアルカリプロテアーゼ (GenBank 受入番号 BAA00258.1 ; gi217809) を、検索から同定した。この成熟プロテアーゼの配列は以下である：

>gi217809|dbj|BAA00258.1|アルカリプロテアーゼ [*Aspergillus oryzae*]

30

GLTTQKSAPWGLGSI SHKGQSTDYIYDTSAGEGTYAYVVD SGVNV DHEEFEG RASKAYNAAGGQHVD SIHGTHVSGTI
AGKTYGI AKKASILSVKVFQGESSTSVILDGFNWAANDIVSKKRTSKAAINMSLGGGYSKAFNDAVENAFEQGVLSVVA
AGNENS DAGQTSPASAPDAITVA AIQKSNNRASFSNFGKVVDVFAPGQDILSAWIGSSSATNTISGTS MATPHIVGLSLY
LAALENLDGPAAVTKRIKELATKDVVKDVGSPNLLAYNGNA (配列番号 8)。

【0164】

A. oryzae 由来の精製プロテアーゼの SDS-PAGE ゲル分析は、30 kDa あたりの MW のバンド (成熟プロテアーゼ) および 20~10 kDa の MW を有するいくつかのバンドの存在を示す。低 MW バンドをゲルから切り取り、トリプシン消化し、ナノ LC-MS/MS によって分析した。これらのバンドは、*A. oryzae* アルカリプロテアーゼ由来の産物として同定された。これは、*A. oryzae* 由来のアルカリプロテアーゼが、自己タンパク質分解に対して感受性であることを示す。

40

【0165】

実施例 12

Yarrowia lipolytica における *Aspergillus oryzae* プロテアーゼの発現

本実施例は、成熟タンパク質 ALP を発現する *Y. lipolytica* の構築について記載する。*Aspergillus oryzae* 由来のアルカリプロテアーゼ (ALP) をコードする遺伝子 (EC. 3.4.21.63) を、*Y. lipolytica* 発現についてコドン最適化し、融合構築物として化学的に合成した。融合構築物は、シグナルペプチド (21 アミノ酸)、プロペプチド (100 アミノ酸)、および成熟タンパク

50

質（282アミノ酸）、その後続くリンカー（SGGG）およびHisタグ（10×His残基）を含むこの酵素のオープンリーディングフレーム（ORF）全体をコードした。図9を参照されたい。融合構築物の完全なヌクレオチド配列を図10に示す。

【0166】

ALPの合成ORFを、発現カセットの安定した組込みのために異なる遺伝子座を利用して、*Y. lipolytica*ゲノムへの標的化した組込みのために、BamHI/AvrII断片として、pPTベクターシリーズへクローニングした。pPTベクターにおいて、細菌部分は、プラスミドpHSS6に由来し、細菌の複製開始点（ori）およびカナマイシンに対する耐性を与えるカナマイシン耐性遺伝子（KanR）を含む。組込みカセットは、a) *Y. lipolytica*への形質転換のための選択可能なマーカー（URA3；LEU2；ADE2）、b) プロモーターから構成される発現カセット（POX2；Hp4d）、c) ALP合成構築物を挿入するためのマルチブルクローニングサイト（MCS）、およびd) YLLIP2遺伝子のターミネーターを含む。組込みカセットは、相同組換えによる*Y. lipolytica*ゲノムへの安定した単一コピー標的化組込みのための特異的な座の上流（P）および下流（T）配列が側面に位置する。2つのNotI制限部位は、形質転換前の発現カセットの単離を可能にして、細菌部分の組込みを回避する。

【0167】

*Y. lipolytica*に使用した培地および技術は、BarthおよびGaillardin（FEMS Microbiol Rev., 19（4）：219－37、1997）によって記載されており、酵母細胞を、1μgの精製された組込みカセットおよび大腸菌に使用される標準的な技術を使用して、Le Dallら（Curr Gene t., 26（1）：38－44、1994）によって記載されるように、酢酸リチウム法によって形質転換した。

【0168】

発現カセットALPの組込みを、挿入により、発酵プロセス中の望ましくない高度に分泌されるタンパク質（リパーゼ2およびリパーゼ8）の発現の排除がもたらされるという事実に基づいて、1つの自由な遺伝子座および2つの特異的な遺伝子座で実行した。最終のOXY Y2184株は、半恒常的Hp4Dプロモーターによって駆動されるALPの3つの発現カセットを含有する。

【0169】

OXY Y2184は、組換え*Aspergillus oryzae* ALP成熟形態（35kDa）を産生し、約2～2.5g/Lの発酵ブロスで平均してもたらす。総タンパク質を、Bradford技術を使用してアッセイし、プロテアーゼ活性を、基質としてアゾカゼイン（azocasein）を用いるアッセイを使用して測定した。プロテアーゼは、アゾカゼインを消化してカゼインおよび遊離アゾ染料にする。消化されたタンパク質の沈降および遠心分離は、遊離アゾ染料がアルカリ性条件で測定されるのを可能にし、これは、タンパク質分解性活性の指標である。この産物の吸光度を、OD440nmで測定する。消化されたアゾカゼインの量は、既知濃度のアゾカゼインの吸光度がOD440nmで測定されているアゾカゼイン希釈シリーズとの相関関係によって計算することができる。

【0170】

OXY Y2184株の培養上清中のALPを、SDS-PAGEによってアッセイし、抗Hisポリクローナル抗体により免疫検出した。*Y. lipolytica*において産生された組換えALPは、活性であり、精製天然酵素と同様の特性を有した。組換えALPのこれらの酵素特性は、それを使用して、rhuGAA前駆体を処理して、95kDa rhuGAA形態を得るのを可能にする。

【0171】

OXY Y2122株を、ALPおよびrhuGAAを共発現するために構築した。ALP発現カセットの1つのコピーを、rhuGAA（rhuGAAの4つのコピー）を発現

10

20

30

40

50

する受容株へ組み込んだ。h u G A Aをコードする遺伝子およびA L Pをコードする遺伝子の両方とも、誘導性P O X 2プロモーター下で駆動される。結果として生じるO X Y Y 2 1 2 2株は、r h u G A A前駆体（1 1 0 K d a）と一緒にA L Pの成熟形態を産生する。O X Y Y 2 1 2 2株の培養上清中の組換えh u G A Aを、S D S－P A G E、その後のイムノブロッティングによってアッセイし、r h G A Aが上清において9 5 k D a形態にプロセッシングされることを確認した。このプロセッシングは、完全であった；1 1 0 k D a形態は、検出されなかったが、A L Pを有していない株の同様の培養において、プロセッシングは起こらなかった。

【0 1 7 2】

実施例 1 3

Y a r r o w i a l i p o l y t i c aにおいて発現されるA s p e r g i l l u s o r y z a eアルカリプロテアーゼによるr h G A A発酵ブロスの処理の後に得られる9 5 k D a r h G A Aの精製

r h G A Aの9 5 k D a形態を、O X Y Y 1 5 8 9株から以下のように単離した。回収の後に、ブロスは、セラミック膜（P a l l C o r p o r a t i o n）を使用して清澄化した。産物を、1 0 k Dの分子量カットオフ（M W C O）を有する中空糸膜を介して濃縮した。A M Sを、1 Mの濃度まで追加し、溶質を、ろ過前に3 0 ℃まで加熱した。ろ液を、Y a r r o w i a l i p o l y t i c a（O X Y Y 2 1 8 4株）において組換えで発現されたA . o r y z a eアルカリプロテアーゼにより処理し、発酵ブロスの清澄化の後に、それ以上の精製を行わないで、使用した。総タンパク質：プロテアーゼについての2 0 0：1の重量：重量比および3 0 ℃での1 6時間のインキュベーションにより、9 5 k D a産物への完全なタンパク質分解がもたらされた。

【0 1 7 3】

さらなる精製ならびにリン酸化N－グリカンのキャップを外すことおよび脱マンノシル化の後の分析は、表1において報告されるように、P N P Gに対する同様の比活性を有する（S D S－P A G Eで観察した場合に）9 5 k D aのG A A産物を明らかにした。

【0 1 7 4】

実施例 1 4

A s p e r g i l l u s o r y z a eアルカリプロテアーゼ（A L P）による処理の後のr h G A Aにおけるタンパク質分解切断部位の同定

r h G A Aを、A s p e r g i l l u s o r y z a e A L Pにより処置し、上記の実施例において記載されるようにさらに精製した。配列分析を容易にするために、P N G a s e Fが、配列中のN－グリコシル化アスパラギン残基を脱アミノ化してアスパルテートにするので、精製した試料を、r h G A Aを脱グリコシル化するためにP N G a s e Fにより処理した。

【0 1 7 5】

r h G A Aの配列を確認するために、脱グリコシル化タンパク質を、ジスルフィド架橋の還元およびシステイン残基のアルキル化の後に、トリプシンを使用して消化した。結果として生じるペプチド混合物を、L C－M SおよびM S／M Sにかけ、データを、遺伝子コードタンパク質配列とマッチさせ、それによって同一性を決定した。精密質量（< 1 0 p p m）および断片化スペクトルは、絶対的な同定のために使用する基準であった。

【0 1 7 6】

ほぼ全部の配列範囲が、ペプチド混合物（残基2 3～6 0、6 5～5 3 5、および5 3 8～8 9 8）から得られ、タンパク質分解切断部位は、アミノ酸6 0と6 5（配列番号1に従う配列ナンバリング）との間にあることが決定された。残基6 0と6 5との間のr h G A A配列中のギャップは、G l y 6 2の前および／またはG l y 6 5の前のタンパク質分解性事象から結果として生じることができた。A s p e r g i l l u s o r y z a e由来のアルカリプロテアーゼが、L e uとG l yとの間で、合成ペプチドI l l e u－G l n－A s n－C y s－P r o－L e u－G l y－N H 2を分解することが文献において報告されている（N a k a d a iら、1 9 7 3、A g r . B i o l . C h e m . , 3 7

10

20

30

40

50

【図 2 A - 2】

FIGURE 2A (続き)

ACTGAGCGTTTATCTGGATGATTGATCCGGCTAATCCGGGTGAACCGTTGTACCGTCCGCTCCGACCAACC
GTAGCAGTTGGACCGCAGATGGCAGCAACCGTGTCTCCGGAACCGTGCAGGGCACCCTGAAGTTTTGT
TCGTCTGAGCACCAGCAGTATGACATCATCTGTATGTCGAATCTGGATAGCTGACCTTGACACGGGTGTC
CGACGAGCGTTGTGGTTGAAAGCGAAGCTGAGCAGCAATCTGCTGCTGGCTGAAATAATGATCTTACCTG
GACCTCTGCTCCGGTTACAATGTGGGTGGCACCCTGATGGCGATTGGCTGGCATATGGCGAAATGATCTGGGC
AGCGCAGCAGTGGATGACGCTGTCTGTGATTATGTTCAATCTGATGCTGCTGTAATCTGACGATGCTGTG
TATCTGGATGCTCTGATCGGCAAACTCGGGTGAACCGTTGTGACAGTGGCGCTGAGCAAAATACCGGTAGCTCTG
GACCAACGATGGTACTGCAATGTGTGATCTGCGCTTACCGCTGCTGGTAAACATCAGGTTTGGGTCGTCTGCTA
CCGAAGCATATGCGCATCCCGTATGTCGCAATCTGGATTCTATGCGCTTTTACCGATGATATGATGTGAAG
TTCTCTCCGACCGATACAGCAGCAGTGGCAGCGCTGTGTGATGACGAGTACACCGGAAGCAGAAATGACCTGAT
GGTCTGATTGATGCGCGTGTCTTACCGGTGAACCTGGCAGCAGCAGTACGCTGTCTGCGCGATGCGGTGCAACACA
GGCAGCGCAGATGAACGCTGCTGCTGCTGGTCTGGCAGCAGCAGTACGCTGGTCCGGCAGAACGCTGCTGCTG
GAAATCTGGTTGCCAGCGCAGAACCTGACCGCAGCAAGGTTATCTCCGGAAGCTGGCAGGATTTCTGACCG
CACTGGCTGCTGCAACCGGCAACCTGGATGATGACGAGCAGTCTGATGAAGCAGTGCATGATGACGCTGCTGGCGCT
CGAGGGTGCAGTGTGATGCTGGAAGAACCGCGAGATGTTGCTGGTGAAGTTGAAGTTTCTCCGCTGTGCTG
CGAGGTAACCGTATGTTGCCGTTCTGTCAGTAAATGTTTCTGATGACGCGCTGATGTTGAACCTGGCAAGCTCTCT
GGGACCCGTAGCTTGTGTTGTTGGCAGCGGTGGCAGCGCATATCAGAGCTTTCAGCGCGTACGCGCAACCGGT
GATCTGGATGTTACCGTGACCGCAACCGGTGCAGATGTTACTCAGACCGTTGAACAGGTTGTGACCGTCCGACGT

GTAGCTAATAA (配列番号2)

【図 2 B】

FIGURE 2B

ALAVVGLAPATAASAAPPEPPSADYASLVDFVGTGEGFNDMPAAQAPNGLAKVNPRTT
PGRNNTGYDYAQSKISGFTHTNLDVGSGSGGGDLVVPSTSGSYTARPGTGYAHFPHSH
DDEADGPGFYSVGLGNVAGTDGAI TGAPGTIEAEVAAATRSVHRYAFPAGSTPSLVVD
LETNNTSRSSSVQVETRADGTVELSGQVTGYFYNAAYTYTARTLQPATVQVTDGDD
RLVDATAQDGVDTGAILTFDPADAGEIGLQVTLSPVSVEQARIDQQVELGDLSDFAIRD
RTRAENATLGRVAIDASTATDPTGELQRLFYTHLYRMFAMPNNATSTSGTYRGVDGAV
HAAQGTYYDSWATWDDERKFSVIAYIDPALYRDMVQSLVYLFADAEATGTGGGLGGFV
HSVPTVRWERSSSVVADAIKAGFDGFDRLDEAPALQRLVQVQSADELRGGYVAGNPGA
SVQRGYDQYGLSVIADELGLTEEAETLREQASWP IEKLT KPGAWTAADGTQVGLLTTPRA
ADGSWQADHAKFEAAGLYQGT LWQYHWYDAYDMDALVEAMGHEAARLGMHMFGEHA
PDDKAMLSHANEIDLQAPYLFNYTGEPSLTQKWARAIYKTEWNRYYIATGSSSAVPS
GGGEFTPPLKTKVYRLDPRGMLPTMDNDAGTMSMTFVAAAVGLFPVTAGSSQFQVGSFP
FDSTITTYDDGSATFTVADGVSEDAFYVQSATLDGATFGNTWVDYATVVGADLAFRMG
EQPSDWTGDTAPAFMSMTATDEPAEGPRVSAEPTTVQTDGGALDATVTLTLDGARLAA
PAGTDLVTSGAASVVGLPDGVTAAVTVASPTALT VSLTGTASADARFPVHLRDAALADG
VAAASLQGGQVSVRSPLRLSVASABERDALAALVDDAVLVRHGNYSSTVFRDFSTALTKA
QEALGDEAATSIALRFAADRLGAAADALDLTGGGYRTLEAEQSEAWSGGELKNEANS
GNLGGVRSQVQYRDMTFFETAAGDTPRFLTVRYDTSFAPDTPSTVRVHAGDVSQV
VATVDLKGTSWGWKYTEVTAEGLDVQALVDAQVVFELLAPSGRSWGNFDFRFSAD
PAAPGQPGESPVTIEAEDWTASSGRGLKKESSWTSGPVTNVGGTADGDWIAIYGEVDL
GELPLGELSVHYVHNSNRSGNNSALSVYLDADFDPANPGEFPVTVPLPTTGSSTADGTA
TVVLETVQGTHEVFVRLSTEYADHPYVANLDSLTFAPGGPTSVVSVESAWTSNSGRG
LKNESSTWTS GPVTNVGGTADGDWILAYGEIDLGSALDQLSVHYVHNSNRSGNNSALSV
YLDADFDPANPGEFPVTVPLANTGSSWTTDGTAVVDLPSTVRGKHQVVRVRLSTEYADHP
YVANLDSMRFFTDAYDVEVPPTDTAALAAVDDAAGTPEAEIARYGRI DARVFTRELAAA
RSVLADAGATQAADERARRLGLATDQLVPAERRRLENLVASAEALTDEGYSPEWQAF
RTALAAATGTLDDAAASDEALHDARLALQGAVDALDEEPADVVLEVEVSPRCLACKPYV
AVRAVNVSDAAVDVELASSLGRTSFVGVPAGASAYQSFARSATGDLDTVTATGADGT
QVVEQVTVFPCS (配列番号3)

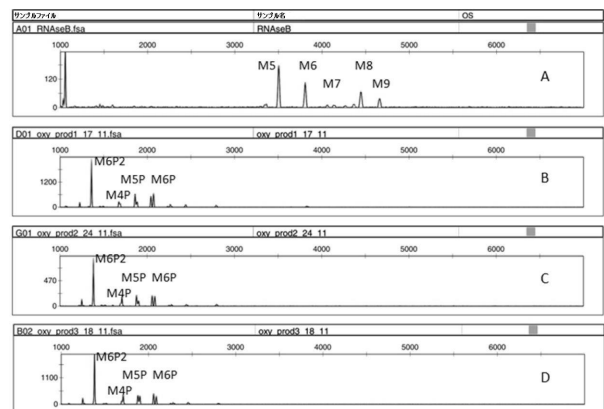
【図 2 C】

FIGURE 2C

APEPPSADYASLVDFVGTGEGFNDMPAAQAPNGLAKVNPRTT PGRNNTGYDYAQSKISG
FTHTNLDVGSGSGGGDLVVPSTSGSYTARPGTGYAHFPHSHDDEADGPGFYSVGLGNVAGTD
GAI TGAPGTIEAEVAAATRSVHRYAFPAGSTPSLVVDLETNNTSRSSSVQVETRADGTV
LSGQVTFYFNAAYTYTARTLQPATVQVTDGDDRLVDATAQDGVDTGAILTFDPADAGEI
GLQVTLSPVSVEQARIDQQVELGDLSDFAIRDTRAENATLGRVAIDASTATDPTGELQRL
FYTHLYRMFAMPNNATSTSGTYRGVDGAVHAAQGTYYDSWATWDDERKFSVIAYIDPALYR
DMVQSLVYLFADAEATGTGGGLGGFVHSVPTVRWERSSSVVADAIKAGFDGFDRLDEAPAL
QRLVQVYSADELRRGYVAGNPGASVQRGYDQYGLSVIADELGLTEEAETLREQASWP IEKLT
KPGAWTAADGTQVGLTTPRAADGSWQADHAKFEAAGLYQGT LWQYHWYDAYDMDALVEAMG
GHEAARLGMHMFGEHAPDDGKAMLSHANEIDLQAPYLFNYTGEPSLTQKWARAIYKTEW
NRYYIATGSSSAVPSGGGEFTPPLKTKVYRLDPRGMLPTMDNDAGTMSMTFVAAAVGLFPVTA
GSSQFQVGSPPFDSTITTYDDGSATFTVADGVSEDAFYVQSATLDGATFGNTWVDYATVVG
ADLAFRMCGPESDWCTDTAPAFMSMTATDEPAEGPRVSAEPTTVQTDGGALDATVTLTLDG
ARLAACTDLVTSGAASVVGLPDGVTAAVTVASPTALT VSLTGTASADARFPVHLRDAALA
DGVAAASLQGGQVSVRSPLRLSVASABERDALAALVDDAVLVRHGNYSSTVFRDFSTALTKA
QEALGDEAATSIALRFAADRLGAAADALDLTGGGYRTLEAEQSEAWSGGELKNEANS
GNLGGVRSQVQYRDMTFFETAAGDTPRFLTVRYDTSFAPDTPSTVRVHAGDVSQV
VATVDLKGTSWGWKYTEVTAEGLDVQALVDAQVVFELLAPSGRSWGNFDFRFSAD
PAAPGQPGESPVTIEAEDWTASSGRGLKKESSWTSGPVTNVGGTADGDWIAIYGEVDL
GELPLGELSVHYVHNSNRSGNNSALSVYLDADFDPANPGEFPVTVPLPTTGSSTADGTA
TVVLETVQGTHEVFVRLSTEYADHPYVANLDSLTFAPGGPTSVVSVESAWTSNSGRG
LKNESSTWTS GPVTNVGGTADGDWILAYGEIDLGSALDQLSVHYVHNSNRSGNNSALSV
YLDADFDPANPGEFPVTVPLANTGSSWTTDGTAVVDLPSTVRGKHQVVRVRLSTEYADHP
YVANLDSMRFFTDAYDVEVPPTDTAALAAVDDAAGTPEAEIARYGRI DARVFTRELAAA
RSVLADAGATQAADERARRLGLATDQLVPAERRRLENLVASAEALTDEGYSPEWQAF
RTALAAATGTLDDAAASDEALHDARLALQGAVDALDEEPADVVLEVEVSPRCLACKPYV
AVRAVNVSDAAVDVELASSLGRTSFVGVPAGASAYQSFARSATGDLDTVTATGADGT
QVVEQVTVFPCS (配列番号4)

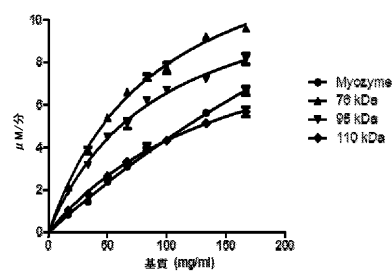
【図 3 B】

FIGURE 3B



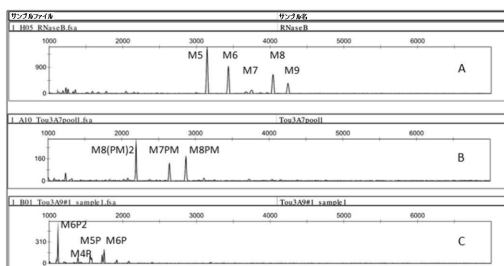
【図 4】

FIGURE 4



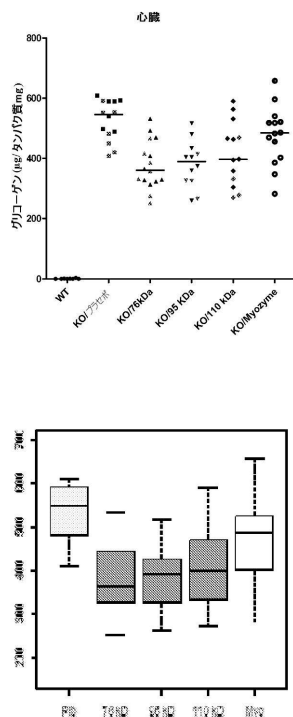
【図 3 A】

FIGURE 3A



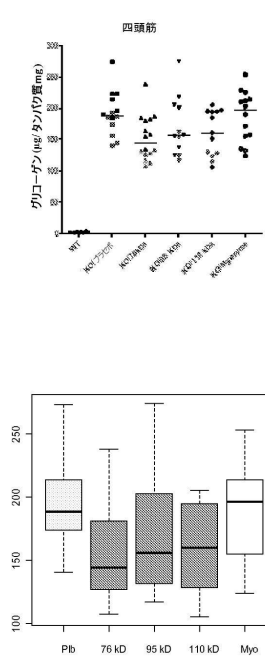
【図 5 A】

FIGURE 5A



【図 5 B】

FIGURE 5B



【図 6】

FIGURE 6

MYSHFNNEPVAKRVNNLFTDRLRQFTSDGEYRSLNLPFYERERLDGKNHVAIETYAVSD
 LRRPLFKDALKEADGHKKPAKKGSEYGPSWATHWFKIQVCVPPPEWKKNYKKGDLVVFNW
 NNLNCEGLVFSSEGEALIGSGEERREWPIPDNWFQKCHTFYIEASCNMGFNAGTSSIO
 PPSNRYFRLDSADLVVINSEARHLFVDFWLIIGDAAREFPDGSWQKALDVANKIMDAF
 DPENPDESTARGRKLAKYLGDTTKAYKQQLFPADGLVYALGNCHIDTAWLWFAETRRK
 AGRSWASQLELIDKYPEYVFAVSAQKQFQKWKEDYDPLFAKIQKQAKKGRFLPVGGAWTE
 CDTNLPSEGLLRQFLQGRFLEHFGSLSDTFWLPDTFGYSAQVQPCRLAGMDRFLTQ
 KLSNNNINSFNPSTFNWVALDGSQVLCNMPNNYTSMANFGDVSRTQKQKNLDTTRNS
 LMLYGHGDCGGGPTAEMLKLRRCRQVSVTVGELPPVIOCGQSVTDFYNELLDOTNNGKDL
 VTWVGLYFEFHRYGTYTSQAQTKKGNVSENLLEDVVELLATLASIRDSSYKYPFAQLES
 WEDVCLCQFHDVLPESCIEEMVYKDVKKIGHRVDTASHLIDKAASALGLSGHPSKDSFDC
 TPVALNTPMPSRTEVVAVPQPHWDATVELAEGVEIQEDSGNALVMMSESGFVVTQSDVL
 FKSEDAYILENSQVKVITCKDDGLTSIYDKENDRRVLSGTGNRLVLFDDQPLSWQAWDT
 EVFSLGKKQYIGAENVTRHSIVSSGFLRSTVAFTEYFNKSVVTEISLDANSPLVTFNTR
 ADWHETCKFLKVEFPVDVHSESASYESQFGVVKRPPTHYNTSWDVAKEFEVCHKEFADLSEL
 DYGVSIINDCKYGFATHGNLMRLSLRAKPAKPAHADMGHHEFYKGLAHKGPGLATTVR
 AAYFNPNPLRVKYGVLSEVSTKQAFSLKGPANLVLSQVKRAEVDKSKSTNVILRVYEAL
 GGRTRGKLVLDPNVVSVTRKCALEYSEKQVVAKSEGVTSVDISLRAFEVATYKVELA
 (配列番号 5)

【図 7】

FIGURE 7

1 mhlpslsisl talaiaspas ayphgssqp vlhsssdttq sradaikaaf shawdgylyq
 61 afphdelhvp sngygsdrrng wgasavdals tavimrnatl vngildhvgk idyaktnttv
 121 slfettitryl gmglsydlil kbpsvdlvqn sskidvlltq sknladvlkf afdtspgvpy
 181 nlnlitsqgn dgaknglavl tglalewtr lsdltgdtty adlsqkaesy llnpqksae
 241 pfpglvgsni nisngqftda qvswnggdds yyeylikmyv ydpkrfglyk drwvaasqst
 301 mghlaashps rpdltflasy nngtligass hltcfdggsf llggtvlnrt cfinfgldlv
 361 sgchdtynst ltgipgesfs wtdsdipssq qsllyekagfy itsgayilrp eviesfyayw
 421 rvtgqetyrd wiwsafavn dycrtssgfs gltdvnaang gsrydnqesf lfaevmkysy
 481 mafeadaawq vqpgsgngqv fnteahpvr sst (配列番号 6)

【図 8】

FIGURE 8

MTLRPLPPGRAVARSQSGRRARPLGLVLAALAVPLGVPLAAPAGALAAAPAAAAAEPGDFS
 SSTESGDPALPTVAERDGAPOANVGSFTAGLPGSVLQGLKGVTAQAQNLNPNEGAAN
 LADGSSGKWLAFASGTGWRVYEFABPVSVFVAYTMTSGDDAAGRDPKTTWTEGSDGSTW
 AALDRRTDEDFFNRQQTTRTFELEAPTAAYTYLRNLNVANSNGDSIVQLAGWDLADLSAG
 PSAAAPMTTKVGTGPRVSFTNKAGVGFSGHSLRYDGSGLADGETYATNVLVYDDVDVVG
 EDTRLSTYTFPELLDDLQYPSTYAAVDVLFDTGTYLSDLGARDAHETVATAQAQGEKGI
 LYADQWNSVRVLDGVAEGKTVDOVLLGYDNPPGGHAGTKFAGWLDDEVEITAEPATIDGS
 SLANYVDTRRGTLASGFSFSGNNIPATATPNGFNFWTPTYNASSQSWLYEYHKANNAN
 KPVLCQGFISHEPSPWMDRNLTLFPLSTASGTPTATLSTRGLEFDHADETARPDYYGV
 TETNGSAIEATPTDHCGLVRESYPGAQGHVLDKVDGSSSKLTQDQATGTCISQWENGSG
 LSVGRTRMFVAGTFDRSPATAVGTAGNADARFATFETSSDKTVELRVATSFISLDQAR
 KNLDLEVTGKTFTEVKAQAAQAWNDRLGVIEVEGASEDQLVTLNLYRLNLYPNSQFE
 NTGTAEQEPVYRYASPVSAATGSAATDTQTNAKIVDQKIYVNNGFWDYRTAWPAYSLLYP
 ELAABELVDGFFVQYRDGGWIARWSSPGYADLMTGTSSDVAFADAYLKGSLPTGTALAY
 DAALRNATVAPPSNAVGRKGLQTSPLFGFTPESTHESVSWGLEGLVNDPFGINMAALA
 EDPATPEERRETLREESAYFLERATHYVELFDEPVEDFFVPRHEDGTWAVDPETYDPEAW
 GGGYTFETNGNFAFHAPQDGGGLANLYGGKQGLEDKLDEFFSTPEKGAANGGIEHQREA
 RDVRMGQWMSNQVSHHIFWLYDAAGAPSKAQEKVREVRRLVFGSEIGQGYPGDEDNG
 EMSWNWIFASLGFLYPLQVGSQYAVGSLPFDKATVHLPDGLVVAENNSVDNVYVQSL
 AVDGEARTSLSQADLSGGTTLDFVMGPEPSDWGTGEDDAPPSLTEGDEPPTPVQDAT
 TAGLGTTVADGDATSAALTDNTSGTRTTFATTTPTITWAGNIRPTVGSYTLTSGA
 SGTASPSAATWLGSDGTEWTLTLDERSGEQFRWALQTRPFTVAEPTAFARYRVTVTATS
 GSGALSLAEVELLADPKESGAELTLSAAPDRDGVGREVSGSFATLTGVEGDVAALDV
 QVAFGDGSEPVAGTLRAGAFGGYAVDAHAHTWTAAPGVYPTVTVSGEGIRTVSASSYVS
 SLLREGSLLAAYDNVICDAGTTVSGSCDQGVFFDRAQLAAKGFVQGERATVPCTDLAF
 DVPFAPVAGQPDNATGDDQTEILDVPADAEQLSVIGTGTEKNQATGTLTFDDGSTQPID
 LSGFDWSGAARNPVFGNIPVAVTDSRLRGGSPQTGPAFFATAPITLPEGRKRVSLTL
 PDQPGELSRDGRHVVVAHVDGTFAEHPALEVTAAGVTLAVGQTSVLAQVAGGREG
 ADLRAAVTWGDSVAAAGAVTDGVSQSHAYTAAGTYTAYVVDDGWTQVVEVPVTVT
 EAEPAALAVDVTSTRCLAGKAYVAVRAENGEDVPLAIRLVTPFGTKEVAAPVAGANAYS
 FATRVTAVEAGTVTVEATRGTGDEEVTASIQADYAAVTCG (配列番号 7)

【図 9】

FIGURE 9

MQSIKRTLLLLGAILPAVLGAPVQETRAAEKLPKGYIVTFKPGIDEAKIQEHTTWATNI
 HQSLERRGATGSDLPVGIERNYKINKFAAYAGSPDDATIEERKNEDVAYVEEDQIYYL
 DGLTTQKSAWGLSISHKQQSTDYIYDTSAGEGTAYYVVDGNNVDHEEFGRASKAY
 NAAGQGHVDSIGHGTHVSGTIAGKTYGIAKASILSVKVPQGESSTSVILDFGNWAND
 IVSKRRTSKAAINMSLGGGYSKAFNDVAVENAFQGVLSVVAAGNENSADAGTSPASAPDA
 ITVAAIQKSNRRASFSNFGKVVDVFPAGQDILSAWIGSSSATNTISGTSMATPHIVGLSL
 YLAALENLDGPAVAKRIKELATKDVVDKVGKSPNLLAYNGNA (配列番号 9)

【図 10】

FIGURE 10

GGATCCATGCAGTCCATTAAAGCGAACTCTGCTGCTGCTGGGAGCCATTCTGCCCGCCGTG
CTGGGAGCCCCGTTTCAGGAGACCCGACGAGCCGCGGAGAAAGCTCCCGGCAAGTACATT
GTCACCTTCAAGCCTGGTATCGACGAGGCTAAGATTTCAGGAGCACCACTTGGGCCACC
AACATCCATCAGCGATCCCTCGACGACGAGGAGCCACCGGCGGTGACCTGCCCTGTGGGA
ATCGAGCGAACTACAAGATTAAACAAGTTCCCGCTTACGCTGGATCTTTGACGATGCC
ACCATCGAGGAGATTGAAAGAACGAGGACGTCGCTTACGTTGGAGGAAGACCAGATCTAC
TACCTCGATGGTCTGACCACTCAGAAGTCCGCTCCTTGGGGCTGGGCTCCATCTCTCAC
AAGGGACAGCAGTCGACTGACTACATCTACGATACCTCCGCTGGCGAGGGTACTTACGCC
TACGTCGTGGACTCCGGTGTAAACGTCGATCACGAGGAGTTTGAGGGACGAGCCTTAAG
GCTTACAACGCCGCTGGAGGCCAGCATGTGGACTCTATCGGACACGGCACCCATGTTTCG
GGTACTATTGCCGGAAGACCTACGGCATCGCCAAGAGGCTTCTATTCTCTCGGTGAAG
GTTTCCAGGGAGAGTCTCTCGACCTCTGTCACTCGGACGGCTTTAACTGGGCGCT
AACGATATTGTCTAAGAAGCGAACCTCGAAGGCCGCTATCAACATGTCCCTCGGTGGA
GGCTACTCTAAGGCCCTTCAACGACGCTGTTGAGAACGCTTTGAGCAGGGTGTCTGTCT
GTTGTGGCTGCTGTTAACGAGAACTCTGACGCTGGACAGACCTCCCTGCTTCTGCTCCT
GATGCCATCACTGTGGCCGCTATTCAAGTCCAACAACGAGCTTCGTTCTCCAACTTT
GGCAAGGTGGTTGACGTTTTTCGCCCGGACAGGATATCCTCTCTGCTTGGATTGGCTCC
TCTTCGGCCACCAACATATCTCGGGCACCTCCATGGCCACTCCCCACA TTGTCGGTCTG
TCCCTCTACCTGGCTGCTCTGGAGAACCTGGACGGACCTGCCGCTGTTCACCAAGCGAATC
AAGGAGCTGGCTACTAAGGACGTGTTGAAGGATGTCAAGGTTCTCTAACCTGCTCGCC
TACAACGGCAACGCTTCTGGCGGCGGAGGACATCACCAACCATCACCATCACCAACATCAT
TGATAACCTAGG (配列番号 10)

【配列表】

0006194324000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 38/46 (2006.01) A 6 1 K 38/46
 A 6 1 P 43/00 1 0 5

(72)発明者 フェルフェケン, ヴァウテル
 ベルギー国 ベー—9 0 5 0 ヘント—レデベルヒ, エドモント ファン ホーレベケストラート 9 0
 (72)発明者 ピーンズ, カトレーン カミラ テレスボレ アリダ マリア
 ベルギー国 ベー—9 0 0 0 ヘント, シタデルラーン 5 4
 (72)発明者 ストウト, ヤン ロベルト ルード
 ベルギー国 ベー—9 8 9 0 アスペルーガーフェレ, クラインフェルト 1 9
 (72)発明者 ペネルト, グヴェンダ ノエラ
 ベルギー国 ベー—9 8 8 0 アールテル, リートゥルストラート 7

審査官 中村 勇介

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 1 / 0 3 9 6 3 4 (WO, A 1)
 MORELAND RODENY J ET AL, Lysosomal acid alpha-glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2 0 0 5 年 2 月 2 5 日, Vol.280, No.8, p.6780-6791
 YUNXIANG ZHU ET AL, Glycoengineered Acid [alpha]-Glucosidase With Improved Efficacy at correcting the Methabolic Aberrations and Motor Function Deficits in a Mouse Model of Pompe Disease, MOLECULAR THERAPY, 2 0 0 9 年 6 月 1 日, Vol.17, No.6, p.954-963
 BIJVOET A G A ET AL, Recombinant human acid alpha-glucosidase: high level production in mouse milk, biochemical characteristics, correction of enzyme deficiency in GSDII KO mice, HUMAN MOLECULAR GENETICS, 1 9 9 8 年 1 0 月 1 日, Vol.7, No.11, p.1815-1824
 HOVE VAN J L K ET AL, High-level production of recombinant human lysosomal acid alpha-glucosidase in Chinese hamster ovary cells which targets to heart muscle and corrects glycogen accumulation in fibroblasts from patients with Pompe disease, PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 1 9 9 6 年 1 月 1 日, Vol.93, No.1, p.65-70

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)