

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6594896号
(P6594896)

(45) 発行日 令和1年10月23日 (2019. 10. 23)

(24) 登録日 令和1年10月4日 (2019. 10. 4)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 9/14 (2006. 01)	C 1 2 N 9/14 Z N A
C 1 2 N 15/55 (2006. 01)	C 1 2 N 15/55
A 6 1 K 38/46 (2006. 01)	A 6 1 K 38/46
A 6 1 P 25/00 (2006. 01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5

請求項の数 33 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2016-560417 (P2016-560417)	(73) 特許権者	516291103
(86) (22) 出願日	平成27年4月1日 (2015. 4. 1)		スウェディッシュ オーファン バイオビ
(65) 公表番号	特表2017-514462 (P2017-514462A)		トラム アクティエボラーグ (ペーウー
(43) 公表日	平成29年6月8日 (2017. 6. 8)		ペーエル)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/057256		スウェーデン国, エスー 1 1 2 7 6 ス
(87) 国際公開番号	W02015/150490		トックホルム
(87) 国際公開日	平成27年10月8日 (2015. 10. 8)	(74) 代理人	100099759
審査請求日	平成30年2月27日 (2018. 2. 27)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	14162996. 4	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成26年4月1日 (2014. 4. 1)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾スルファミダーゼ及びその製造

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリカン認識受容体に対するエピトープを実質的に含まない、修飾スルファミダーゼであって、前記スルファミダーゼの天然グリカン部分が、単結合切断及び二重結合切断によって破壊されたものであって、全結合切断あたりの単結合切断の程度がオリゴマンノースグリカンにおいて少なくとも60%であり、それにより、哺乳動物の血液脳関門を通じた前記スルファミダーゼの輸送を可能にするものであり、ここで、前記スルファミダーゼが、前記哺乳動物の脳において触媒活性を有する、修飾スルファミダーゼ。

【請求項 2】

非修飾組換えスルファミダーゼの天然グリカン部分の含量に対する天然グリカン部分の相対含量が約25%である、請求項1に記載の修飾スルファミダーゼ。

10

【請求項 3】

前記エピトープが、マンノースー6ーリン酸部分、マンノース部分及びガラクトース部分から選択される少なくとも1つのタイプの部分を示す、請求項1又は2に記載の修飾スルファミダーゼ。

【請求項 4】

マンノースー6ーリン酸部分、マンノース部分及びガラクトース部分を含まない、請求項3に記載の修飾スルファミダーゼ。

【請求項 5】

前記エピトープが、マンノースー6ーリン酸受容体タイプ1及び2、マンノース受容体及

20

びガラクトース受容体から選択される少なくとも1つのグリカン認識受容体によって認識される、請求項3又は4に記載の修飾スルファミダーゼ。

【請求項6】

配列番号1で定義されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号1で定義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ポリペプチドを含む、請求項1～5のいずれかに記載の修飾スルファミダーゼ。

【請求項7】

前記エピトープが、5つのN-グリコシル化部位：配列番号1の位置21のN(N(21))、位置122のN(N(122))、位置131のN(N(131))、位置244のN(N(244))及び位置393のN(N(393))、の少なくとも4つを有さない、請求項6に記載の修飾スルファミダーゼ。

10

【請求項8】

前記エピトープが、前記修飾スルファミダーゼポリペプチドのN-グリコシル化部位N(21)、N(122)、N(244)、及びN(393)を有さない、請求項7に記載の修飾スルファミダーゼ。

【請求項9】

N(131)部位のオリゴマンノースグリカンを含み、前記オリゴマンノースグリカンが単結合切断及び二重結合切断によって破壊されており、前記破壊が、全結合切断あたりの少なくとも60%の単結合切断の程度を特徴とする、請求項6～8のいずれか1項に記載の修飾スルファミダーゼ。

20

【請求項10】

前記スルファミダーゼは、そのC末端部分が無傷であって、前記C末端部分が任意の方法で、配列番号1のアミノ酸436～484によって表される、請求項6～9のいずれか1項に記載の修飾スルファミダーゼ。

【請求項11】

前記触媒活性を提供する配列番号1の位置50のC α -ホルミルグリシン残基(FGly50)を含む、請求項6～9のいずれか1項に記載の修飾スルファミダーゼ。

【請求項12】

前記触媒活性が、リソソーム蓄積症を罹患している前記哺乳動物の脳におけるリソソーム蓄積の減少を提供する、請求項1～11のいずれか1項に記載の修飾スルファミダーゼ。

30

【請求項13】

過ヨウ素酸アルカリ金属塩(alkali metal periodate)及び水素化ホウ素アルカリ金属塩(alkali metal borohydride)との逐次反応によりスルファミダーゼが調製され、それによりスルファミダーゼのグリカン認識受容体に対するエピトープを修飾し、哺乳動物の脳において前記スルファミダーゼの触媒活性を保持する一方、前記受容体に対するスルファミダーゼの活性を低下させた、修飾スルファミダーゼであって、前記スルファミダーゼの天然グリカン部分が、単結合切断及び二重結合切断によって破壊されたものであって、全結合切断あたりの単結合切断の程度がオリゴマンノースグリカンにおいて少なくとも60%であって、前記グリカン認識受容体に対するエピトープを実質的に含まない修飾スルファミダーゼ。

40

【請求項14】

グリカン認識受容体のためのエピトープを実質的に有さない修飾スルファミダーゼを含む、スルファミダーゼ組成物であって、前記スルファミダーゼの天然グリカン部分が、単結合切断及び二重結合切断によって破壊されたものであって、全結合切断あたりの単結合切断の程度がオリゴマンノースグリカンにおいて少なくとも60%であり、それにより哺乳動物の血液脳関門を通じた前記スルファミダーゼの輸送を可能にし、活性部位において1を超えるC α -ホルミルグリシン(FGly)対セリン(Ser)比を有し、それにより前記哺乳動物の脳において触媒活性を提供する、スルファミダーゼ組成物。

【請求項15】

50

請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の修飾スルファミダーゼを含む、請求項 1 4 に記載のスルファミダーゼ組成物。

【請求項 1 6】

1 0^{1 0} k Da 超の分子量を有する多量体形態のスルファミダーゼを 5 % 以下（重量）含む、請求項 1 4 又は 1 5 のいずれか 1 項に記載のスルファミダーゼ組成物。

【請求項 1 7】

修飾スルファミダーゼを調製する方法であって、前記方法が：

a) 4 時間以内の時間、グリコシル化スルファミダーゼを過ヨウ素酸アルカリ金属塩と反応させ、及び、

b) 前記スルファミダーゼを水素化ホウ素アルカリ金属塩と 2 時間以下の時間反応させることであって、前記水素化ホウ素アルカリ金属塩が、1 0 ～ 8 0 mM の濃度で使用されること；を含み、

それによって前記スルファミダーゼのグリカン部分を修飾し、前記スルファミダーゼの触媒活性を保持する一方、グリカン認識受容体に対する前記スルファミダーゼの活性を低下させることであり、前記修飾スルファミダーゼは哺乳動物の脳において触媒活性を示すものであって、

ここで前記修飾スルファミダーゼの天然グリカン部分が、単結合切断及び二重結合切断によって破壊されたものであって、全結合切断あたりの単結合切断の程度がオリゴマンノースグリカンにおいて少なくとも 6 0 % であり、前記修飾スルファミダーゼは、前記グリカン認識受容体に対するエピトープを実質的に含まない、方法。

【請求項 1 8】

前記工程 a) が、3 時間以下、例えば 2 時間以下、例えば 1 時間以下、例えば約 0. 5 時間実施される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

工程 a) 及び工程 b) が中間工程を実行することなく順番に実施される、請求項 1 7 又は 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記工程 a) が、以下の i) ～ i i i)：

i) 前記過ヨウ素酸アルカリ金属塩が、メタ過ヨウ素酸ナトリウムである；

i i) 前記過ヨウ素酸塩が、2 0 mM 以下、例えば 1 5 mM 以下、例えば約 1 0 mM の濃度で使用される、及び、

i i i) 前記反応が、0 ～ 2 2 °C の温度、例えば 0 ～ 8 °C の温度、例えば 0 ～ 4 °C の温度、例えば約 8 °C、例えば約 0 °C にて実施される、
の少なくとも 1 つ、例えば少なくとも 2 つ、例えば全てによって、さらに特徴づけられる、請求項 1 7 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

工程 a) の前記反応が、p H 3 ～ 7 で実施される、請求項 1 7 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記工程 b) が、以下の i) ～ i v)：

i) 前記水素化ホウ素アルカリ金属塩が、水素化ホウ素ナトリウムであり；

i i) 前記水素化ホウ素塩が、前記過ヨウ素酸塩の濃度の 4 倍以下、例えば前記過ヨウ素酸塩の濃度の 3 倍以下、例えば前記過ヨウ素酸塩の濃度の 2. 5 倍以下、例えば前記過ヨウ素酸塩の濃度の 0. 5 ～ 4 倍の濃度で使用される；

i i i) 前記反応が、1. 5 時間以下、例えば 1 時間以下、例えば 0. 7 5 時間以下、例えば約 0. 5 時間の期間実施される；

i v) 前記反応が、0 ～ 8 °C の温度で実施される、
の少なくとも 1 つ、例えば少なくとも 2 つ、例えば全てによってさらに特徴づけられる、請求項 1 7 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記工程 a) 及び工程 b) の各々が、個別に 2 時間以下の期間実施され、かつ、前記水素化ホウ素塩が、任意に、前記過ヨウ素酸塩の 0.5 ～ 4 倍の濃度で使用される、請求項 17 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記工程 a) が 3 時間以下の期間実施され、かつ、前記工程 b) が 1 時間以下実施され、かつ、前記水素化ホウ素塩が、任意に、前記過ヨウ素酸の 4 倍以下の濃度で使用される、請求項 17 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

a2) 工程 a) より生じる反応を反応停止すること (quenching)、をさらに含む、請求項 17 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 26】

b2) 工程 b) より生じる反応を反応停止すること、をさらに含む、請求項 17 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記グリコシル化スルファミダーゼポリペプチドが、少なくとも 4 つのアスパラギン残基にグリカン部分を含む、請求項 17 ～ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記過ヨウ素酸アルカリ金属塩が、グリカン部分のシスグリコール基をアルデヒド基に酸化する、請求項 27 に記載の方法。

20

【請求項 29】

前記水素化ホウ素アルカリ金属塩が、前記アルデヒドをアルコールに還元する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

請求項 17 ～ 29 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られる修飾スルファミダーゼ。

【請求項 31】

治療に使用するための、請求項 1 ～ 16 及び 30 のいずれか 1 項に記載の修飾スルファミダーゼ又はスルファミダーゼ組成物。

【請求項 32】

リソソーム蓄積症、特にムコ多糖症 I I I A (MPS I I I A) に罹患した哺乳動物の治療に使用するための、請求項 31 に記載の修飾スルファミダーゼ又はスルファミダーゼ組成物。

30

【請求項 33】

リソソーム蓄積症、例えばムコ多糖症 I I I A (MPS I I I A) に罹患している哺乳動物を治療するための医薬組成物であって、治療上有効な量の修飾スルファミダーゼを含み、前記修飾スルファミダーゼが：

a) 請求項 1 ～ 13 及び 30 のいずれか 1 項に記載の修飾スルファミダーゼ；

b) 請求項 14 ～ 16 のいずれか 1 項に記載のスルファミダーゼ組成物、及び、

c) 修飾スルファミドであって、ここで、前記修飾が、前記修飾スルファミダーゼを過ヨウ素酸アルカリ金属塩及び水素化ホウ素アルカリ金属塩で逐次処理することを含み、それにより、触媒活性を維持する一方でグリカン認識受容体に対する活性を低下させるように化学的に修飾されたグリカン部分を有する、修飾スルファミド、から選択される、医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、修飾スルファミダーゼ、修飾スルファミダーゼを含む組成物、及び修飾スルファミダーゼを調製する方法に関する。さらに、リソソーム蓄積症の処置のような治療における修飾スルファミダーゼの使用が開示される。

【背景技術】

50

【0002】

リソソーム蓄積症

リソソームコンパートメントは、細胞内の廃棄物を分解する異化機構として機能する。分解は、リソソームに特異的に区画されたいくつかの加水分解酵素及び輸送体によって達成される。今日、リソソームタンパク質をコードする遺伝子における突然変異と疾患との間に関連性が確立されている遺伝性疾患が40以上同定されている。これらの疾患は、リソソーム蓄積症(LSD)と定義され、不十分な分解能力により分解することができない代謝産物(又は代謝産物(複数))を蓄積することを特徴とする。代謝産物の過剰なリソソーム蓄積の結果として、リソソームはサイズが増加する。蓄積された蓄積物質がどのように病理を引き起こすかについては完全には理解されていないが、オートファジーの阻害及び細胞アポトーシスの誘導などの機構を含む可能性がある(Cox & Cachon-Gonzalez, J Pathol 226:241-254 (2012))。

10

【0003】

酵素補充療法

蓄積は、異種の供給源からのリソソーム酵素の投与によって減少させることができる。リソソーム酵素の静脈内投与は、受容体媒介エンドサイトーシスと呼ばれる機構を介した、細胞による迅速な取り込みをもたらすことが十分に確立されている。このエンドサイトーシスは、細胞表面上の受容体が媒介しており、特に、2つのマンノース-6リン酸受容体(M6PR)は、特定のリソソーム酵素の取り込みに重要であることが示されている(Neufeld; Birth Defects Orig 16:77-84 (1980))。M6PRは、リソソームタンパク質に特徴的なリン酸化オリゴマンノースグリカン

20

【0004】

受容体媒介性エンドサイトーシスの原理に基づいて、6つのLSDに対し酵素置換療法(ERT)が今日利用可能である(Gaucher, Fabrys, Pompe and the Mucopolysaccharidosis type I, II and VI)。これらの療法は、様々な末梢器官におけるリソソーム蓄積を減少させるのに有効であり、それによって病理に関連するいくつかの症状を改善する。

【0005】

しかし、LSDの大部分は中枢神経系(CNS)においてリソソーム蓄積を引き起こし、結果としてCNS関連の徴候及び症状のレパートリーを提示する。静脈内投与されたERTの主な欠点は、CNSへの不良分布である。CNSは、CNS血管内皮によって形成された血液脳関門(BBB)によって、血液を介する化合物への暴露から保護される。傍細胞の通過を妨げるタイトジャンクションを示すBBBの内皮細胞は、制限した受動的エンドサイトーシスを示し、さらに、他の組織に見られるいくつかの受容体媒介トランスサイトーシス能力を欠く。特に、マウスにおいて、BBBを通過するM6PR媒介輸送は、出生後2週間までしか観察されない(Urayama et al, Mol Ther 16:1261-1266 (2008))。

30

【0006】

リソソーム酵素のグリコシル化

一般に、N-グリコシル化は、Asn-X-Ser/Thr配列モチーフで起こり得る。このモチーフに対して、N-グリカンの最初のコア構造は、グリコシルトランスフェラーゼオリゴサッカリルトランスフェラーゼによって、網状管腔内(reticular lumen)に転移される。すべてのN-結合型グリカンのこの共通基盤は14残基;3グルコース、9マンノース、及び2N-アセチルグルコサミン、から構成されている。この前身は、次に、初期コアをトリミングして新しい糖部分を追加する多数の酵素の作用により、3つの一般的なタイプのN-グリカン;オリゴマーノース、複合体及びハイブリッド(図7)へと変換される。各成熟N-グリカンは、Asnがタンパク質への結合点である共通のコア、Man(Man)2-GlcNAc-GlcNAc-Asnを含んでいる。

40

50

【0007】

さらに、リソソームを指向するタンパク質は、リン酸化された1つ以上のN-グリカンを持する。リン酸化はゴルジ体で起こり、オリゴマンノース型N-グリカンのマンノース残基のC-6にN-アセチルグルコサミン-1-リン酸の付加によって開始される。N-アセチルグルコサミンは、M6PRによって認識され、リソソームタンパク質のリソソームへの輸送を開始するマンノース-6-リン酸(M6P)残基を生成するように切断される。次いで、得られたN-グリカンを、M6PがN-グリカン鎖の末端基であるポイントまでトリミングする(Essentials of Glycobiology, 2nd edition, Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al, editors. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009)。

10

【0008】

糖部分及びリン酸基の両方が受容体への結合に関与するので、M6PRの結合部位は、完全な末端M6P基を必要とする(Kim et al, Curr Opin Struct Biol 19(5):534-42(2009))。

【0009】

グリカン修飾による脳を標的とする酵素補充療法

リソソーム酵素のCNSへの分布を増加させる潜在的な戦略は、国際公開第2008/109677号に開示されている。この公開された出願では、メタ過ヨウ素酸ナトリウム及び水素化ホウ素ナトリウムを使用するβ-グルクロニダーゼの化学修飾が記載されている(Grubb et al, Proc Natl Acad Sci USA 105:2616-2621(2008)も参照のこと)。20mMの過ヨウ素酸ナトリウムによる6.5時間の酸化、その後の反応停止(quenching)、透析及び100mMの水素化ホウ素ナトリウムでの一晩の還元(以後、既知の方法と呼ぶ)からなるこの修飾は、β-グルクロニダーゼのCNS分布を実質的に改善し、LSDムコ多糖症VIIのマウスモデルにおける神経記憶のクリアランスをもたらす。脳の分布の根底にあるメカニズムは不明であるが、化学修飾がβ-グルクロニダーゼ上のグリカン構造を破壊することに注目し、M6PRによる受容体媒介エンドサイトーシスが著しく減少することがさらに証明された。

20

【0010】

化学修飾戦略は、他のリソソーム酵素についても研究されている。例えば、既知の方法による修飾は、静脈内投与されたプロテアーゼトリペプチジルペプチダーゼIの脳への分布を改善しなかった(Meng et al, PLoS One(2012))。スルファミダーゼについても満足のいく結果は実証されていない。既知の方法に従って化学的に修飾されたスルファミダーゼは、実際にはマウスで半減期の増加を示したが、MPS IIIAマウスの脳では効果を示さなかった。化学的に修飾されたスルファミダーゼは、静脈内投与によって繰り返し投与された場合、脳実質には分布しなかった(Rozaklis et al, Exp Neurol 230:123-130(2011))。

30

【0011】

従って、例えばMPS IIIAのような、神経学的に関与があるLSDの治療に有効なERTは依然として存在しない。酵素活性を維持したまま、BBBを通過して輸送することができる新規スルファミダーゼ化合物は、MPS IIIAのようなCNS関連病気を有するLSDを治療するための酵素補充療法用の全身投与化合物の開発において多大な価値がある。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

発明の開示

本発明の目的は、MPS IIIAのようなLSDのための酵素補充療法の開発を可能にする新規スルファミダーゼ化合物を提供することである。

50

【0013】

本発明の別の目的は、哺乳動物の血液脳関門を通過して輸送され得、該哺乳動物の脳において酵素的（触媒的）活性を呈し得る新規なスルファミダーゼ化合物を提供することである。

【0014】

本発明のさらに別の目的は、改善された安定性を示す新規なスルファミダーゼ化合物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本開示から当業者には明らかであろうこれらの目的及び他の目的は、添付の特許請求の範囲において定義され、本明細書に一般的に開示される本発明の異なる態様によって達成される。

【0016】

本発明の1つの態様では、グリカン認識受容体のエピトープを実質的に含まない修飾スルファミダーゼが提供され、それにより哺乳動物の血液脳関門を通じた前記スルファミダーゼの輸送を可能にし、ここで、前記スルファミダーゼは、前記哺乳動物の脳において触媒活性を有している。

【0017】

従って、本発明の修飾スルファミダーゼは、例えば修飾されていないスルファミダーゼ（配列番号1）と比較して、グリカン認識受容体のエピトープが除去されている点で修飾されている。例えば、添付の実施例において出願人によって実証されたように、そのような修飾スルファミダーゼは、2つのマンノース-6リン酸受容体（M6PR）のようなグリカン認識受容体のエピトープの除去の結果、細胞取り込みを受けにくい（実施例6及び7参照）。前記エピトープのほぼ完全な欠如は、グリカン認識受容体に対する修飾スルファミダーゼの親和性を低下させる。特に、これは末梢組織中の修飾スルファミダーゼの受容体媒介性エンドサイトーシスを減少させる可能性があり、例えば、哺乳動物に静脈内投与される時に、次々に血漿から修飾スルファミダーゼの除去を減少させ得る。これはおそらく、少なくとも部分的に、スルファミダーゼの化学修飾後の末梢組織における受容体媒介性取り込みの阻害によるものであろう（実施例6の細胞摂取試験において実証される）。投与の観点からは、修飾スルファミダーゼのクリアランスの減少は、患者にあまり頻繁に投与することができない長時間作用させる医薬品の開発を有利にし得る。

【0018】

グリカン認識受容体とは、主としてタンパク質のグリカン部分を介してタンパク質を認識して結合する受容体を意味する。そのような受容体は、マンノース6-リン酸受容体に加えて、マンノース受容体によって例示され得；グリカンが露出した末端マンノース残基を示すタンパク質に選択的に結合する。レクチンは、グリカン上の末端ガラクトース残基を認識するアシアロ糖タンパク質受容体1を認識する末端ガラクトースによって例示され得るグリカン認識受容体の別の大きなファミリーを構成する。従って、グリカン認識受容体のエピトープは、そのような受容体によって認識される（一部の）グリカン部分として理解され得る。

【0019】

これに関連して、グリカン認識受容体のエピトープを実質的に含まない修飾スルファミダーゼは、好ましくは、グリカン認識受容体のエピトープをほとんど含まないか、又は少量のそのようなエピトープを含む修飾スルファミダーゼとして理解されるべきである。好ましい実施形態では、修飾スルファミダーゼは、グリカン認識受容体のための（検出可能な）エピトープを含まない。特に、修飾スルファミダーゼは、エンドサイトーシスM6PRタイプ1及び2、マンノース受容体及びガラクトース受容体それぞれのエピトープを構成する（検出可能な）マンノース-6-リン酸部分、マンノース部分又はガラクトース部分を含まない。従って、一実施形態において、前記エピトープは、M6PRタイプ1及び2、マンノース受容体及びガラクトース受容体から選択される少なくとも1つのグリカン

認識受容体によって認識され得る。特に、前記少なくとも1つのグリカン認識受容体は、M6PRタイプ1及び2から選択することができる。上記で定義したものに对应して、天然グリカン部分に見出される前記エピトープは、マンノースー6ーリン酸部分、マンノース部分及びガラクトース部分から選択される少なくとも1つのタイプの部分を示す。特定の実施形態において、これらは、本明細書中に開示される修飾スルファミダーゼには存在しない。

【0020】

さらに、本明細書に記載の態様による修飾スルファミダーゼは、哺乳動物の脳に分布するだけでなく、該哺乳動物の脳内において（保持された）酵素活性又は触媒活性を示す。修飾スルファミダーゼの酵素活性は、少なくとも部分的に未修飾形態のスルファミダーゼから保持される。さらに、酵素活性は、マウスの脳において（分布も）酵素活性も示さない先行技術の方法に従って修飾されたスルファミダーゼと比較して、保持されている。従って、本明細書中に開示される修飾スルファミダーゼは、リソソーム蓄積、例えば、実施例8において実証されるように、ヘキササミンN-硫酸[α -1, 4]ウロン酸(HNS-U A)のリソソーム蓄積を減少させるなど、哺乳動物の脳におけるリソソーム蓄積に影響し得る。保持された触媒活性は、例えば、スルファミダーゼの活性部位における触媒アミノ酸残基の修飾に対する保存レベルに依存し得る。

【0021】

スルファミダーゼは、スルファターゼのタンパク質ファミリーに属する。スルファターゼは、種々の基質からの硫酸エステル結合の加水分解を触媒する共通の進化的起源を有するタンパク質ファミリーである。従って、本明細書で使用する修飾スルファミダーゼの「触媒活性」は、好ましくは哺乳動物の脳における末梢組織のリソソーム及び／又はリソソームにおける、硫酸エステル結合の加水分解を指してもよい。従って、修飾スルファミダーゼの触媒活性は、リソソーム蓄積症に罹患している哺乳動物の脳におけるヘパラン硫酸蓄積などのリソソーム蓄積の減少をもたらす得る。触媒活性は、例えば、実施例8に概説されるように、動物モデルにおいて測定され得る。

【0022】

スルファターゼは、10個の β 鎖からなる中央の β シートと共通の折り畳みを共有する。スルファミダーゼの活性部位は中央の β シートの末端に位置し、C α -ホルミルグリシン(FGly)に翻訳後修飾された配列番号1の位置50に保存されたシステインを含む。この反応は、小胞体においてFGly生成酵素によって起こる。位置50のこのFGly残基(FGly50)は、硫酸エステル結合の加水分解に直接関与しており、該修飾が活性化には必要であるようである。特に、アリアルスルファターゼA及びB中の保存されたシステインからセリン(Ser)への変異は、FGlyの形成を妨げ、不活性酵素を生じる(Recksieket al, J Biol Chem 13; 273(11): 6096-103(1998))。本明細書において活性部位の保存について述べられる場合、それは主として配列番号1の翻訳後FGly50の保存として理解されるべきである。従って、このような場合、修飾スルファミダーゼは、配列番号1で定義されるアミノ酸配列又はこのようなアミノ酸配列で以下に定義される配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むものとして理解されるべきである。

【0023】

一実施形態において、前記活性部位は、前記触媒活性を提供する配列番号1の位置50に対応する位置に触媒残基を含んでいる。この触媒残基はさらなる実施形態ではFGly50である。

【0024】

一実施形態では、修飾スルファミダーゼは、非修飾組換えスルファミダーゼの天然グリカン部分の含量に対する天然グリカン部分の相対含量が約25%である。従って、グリカン認識受容体に対する前記エピトープは、天然グリカン部分上に見出され得、従って、このような天然グリカン部分は、本明細書に記載の修飾スルファミダーゼにおいて実質的に存在しない。修飾スルファミダーゼ中の天然グリカン部分の相対的含量は、好ましい実施

10

20

30

40

50

形態では25%未満、例えば20%未満、例えば15%未満、例えば10%未満、例えば5%未満であり得る。特定の実施形態では、天然グリカン部分の含量は1%未満である。グリカン部分の相対的含量は、スルファミダーゼの修飾後に残存する無傷の天然グリカン部分の含量として理解することができる。添付の実施例に示すように、糖ペプチドの相対定量は、LC-MS及び再構成イオンクロマトグラムのピーク面積に基づくことができる。別の定量方法は当業者に公知である。25%未満のレベルの天然グリカンの相対的含量は、グリカン認識受容体を介してスルファミダーゼの受容体媒介性エンドサイトーシスを有利に低下させ、血液脳関門を通じた輸送を改善し得る。以下にさらに例示されるように、天然グリカンの25%のレベルの相対含量は、1つの天然グリカンによって表され得る。天然グリカン部分は、この点において、真核細胞の小胞体及びゴルジコンパートメントにおいて、翻訳後に修飾されたスルファミダーゼに自然に生じるグリカン部分として理解されるべきである。

10

【0025】

一実施形態では、前記天然のグリカン部分は、単結合の切断によるグリカンの破壊が優位である、前記修飾されたスルファミダーゼ中の単結合切断及び二重結合切断によって破壊される。特に、前記スルファミダーゼの天然グリカン部分は、単結合切断及び二重結合切断によって破壊され、ここで、該単結合切断の程度は、オリゴマンノースグリカンにおいて少なくとも60%である。特定の実施形態では、単結合切断の程度は、オリゴマンノース型のグリカンの少なくとも65%、例えば少なくとも70%、例えば少なくとも75%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも82%、例えば少なくとも85%である。単結合切断対二重結合切断の程度は、実施例10及び11において記載されるように測定され得る。本明細書の他の態様に記載されているように、スルファミダーゼは、スルファミダーゼ上に天然に生じるグリカン部分の構造を破壊するように、過ヨウ素酸塩(periodate)との反応によって修飾されてもよい。修飾スルファミダーゼの残存するグリカン構造は、少なくとも1つの過ヨウ素酸塩触媒による切断、すなわち少なくとも1つの単結合切断が自然に生じるグリカン部分のそれぞれに起こり、少なくとも部分的に破壊されている可能性がある。前記修飾スルファミダーゼの「修飾」とは、非天然スルファミダーゼと比較して、少なくとも部分的に天然グリカン部分の前記破壊によって表される。

20

【0026】

一実施形態では、修飾スルファミダーゼは、配列番号1で定義されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号1で定義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ポリペプチドを含む。非限定的な例において、前記ポリペプチドは、配列番号1で定義されるアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性、例えば配列番号1で定義されるアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性、例えば配列番号1に定義されるアミノ酸配列と少なくとも98%の配列同一性を有する。従って、本発明の修飾スルファミダーゼは、配列番号1に高度に類似するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み得る。しかし、前記ポリペプチドは、例えば、1以上のC末端及び／又はN末端アミノ酸(単数又は複数)によって伸長され、実際の修飾スルファミダーゼ配列を配列番号1の配列よりも長くすることができる。同様に、他の場合には、修飾スルファミダーゼは配列番号1のアミノ酸配列よりも短いアミノ酸配列を有していてもよく、例えば、その配列の特定の位置(単数又は複数)にあるアミノ酸残基(単数又は複数)の欠損に起因する。

30

40

【0027】

一実施形態では、前記エピートープは、5つのNグリコシル化部位：配列番号1の位置21(N(21))のアスパラギン(N)、位置122のN(N(122))、位置131のN(N(131))、位置244のN及び位置393のN(N(393))、の少なくとも4つにおいて存在しない。代替的に製剤化された、前記修飾スルファミダーゼは、前記N-グリコシル化部位のわずか1つの天然のグリカン部分を含む。特定の実施形態では、前記修飾スルファミダーゼは、前記N-グリコシル化部位の1つに天然グリカン部分を含み；該N-グリコシル化部位は、任意にN(131)である。あるいは、前記エピートー

50

プ又はグリカン部分は、前記修飾スルファミダーゼポリペプチドのN(21)、N(122)、N(244)及びN(393)には存在しない。同定された部位においてグリカン部分を欠くこのような修飾スルファミダーゼの利点は、上記で説明されている。すなわち、細胞取り込みがさらに減少し、血液脳関門を通じた輸送がさらに促進される可能性がある。

【0028】

一実施形態では、前記スルファミダーゼの前記天然のグリカン部分は、配列番号1の位置21のN(N(21))、位置131のN(131)、位置244のN(244)及び位置393のN(N(393))に相当する。従って、未修飾スルファミダーゼは、これらの4つの部位で天然にグリコシル化され得る。この実施形態では、修飾スルファミダーゼは、未修飾組換えスルファミダーゼの対応する位置におけるグリカン部分の含有量の約25%又は25%未満であるこれらの位置における天然グリカン部分の相対含量を有し得る。修飾スルファミダーゼの1つの特定の実施形態において、上記で同定された4つの天然に存在するグリコシル化部位の少なくとも3つは、グリカン認識受容体のエピトープを欠く。

10

【0029】

上記のように、スルファミダーゼのN-グリコシル化部位N(131)のグリカン部分は、未修飾の組換えスルファミダーゼ上に天然に存在するグリカン部分である。N(131)は、グリコシル化されると、他のグリコシル化部位と比較して末梢組織における受容体媒介性の取り込みの大部分を引き起こすと考えられる、スルファミダーゼ上のグリコシル化部位である。従って、オリゴマンノース型のN(131)上に天然に存在するグリカン部分の破壊は、血漿由来の修飾スルファミダーゼのクリアランスに影響し得る。前記N(131)オリゴマーゼの破壊は、少なくとも60%の単結合切断の程度を特徴とし得る。従って、単結合切断による破壊は、二重結合切断による破壊よりも頻出する。

20

【0030】

一実施形態では、前記エピトープは、修飾スルファミダーゼの前記5つのN-グリコシル化部位の全てに存在しない。従って、グリカン部分は、5つのN-グリコシル化部位：配列番号1の位置21のN(N(21))、位置122のN(N(122))、位置131のN(N(131))、位置244のN(N(244))及び位置393のN(N(393))、の全てが存在しない。これらの5つの部位におけるグリカン部分を欠く修飾スルファミダーゼは、例えば、哺乳動物における血漿クリアランスをさらに低下させることができるなど、修飾酵素の薬物動態をさらに改善し得る。結果として、修飾されたスルファミダーゼの投薬頻度もまた、さらに低減され得る。

30

【0031】

ヒトスルファミダーゼ(EC3.10.1.1;配列番号1)は、SGSH遺伝子によってコードされる。スルファミダーゼはまた、スルファミダーゼ、N-スルホグルコサミンスルホヒドラーゼ(N-sulphoglucosamine sulphohydrolase)、N-スルフォグルコサミンスルフォヒドラーゼ(N-sulfo-glucosamine sulfohydrolase)、スルファメートスルホヒドラーゼ、ヘパラン硫酸スルファターゼ、ヘパリンスルファミダーゼ、2-デスオキシ-D-グルコシド-2-スルファメートスルホヒドラーゼ及びN-スルホ-D-グルコサミンスルホヒドラーゼの名称で知られており、本明細書で使用する用語「スルファミダーゼ」は、これらの代替名と同等であると理解されるべきである。

40

【0032】

一実施形態では、前記修飾スルファミダーゼが単離される。

【0033】

一実施形態では、前記スルファミダーゼはヒトスルファミダーゼである。

【0034】

一実施形態では、修飾前の前記スルファミダーゼはグリコシル化されている。

【0035】

50

一実施形態では、前記修飾スルファミダーゼは例えば実施例1に記載されるように組換え体である。スルファミダーゼは、これらに限定されないが、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胎児腎臓細胞、又はネズミ由来のリンパ系細胞株などの、真核細胞中において産生され得る。さらに、スルファミダーゼは、昆虫細胞、植物細胞、又は酵母細胞において産生され得る。組換えヒトスルファミダーゼは、例えば、米国特許第5,863,782号；米国特許第5,972,333号；米国特許第6,200,563号；米国特許第6,458,579号；及び米国特許第6,491,913号のものが知られている。本発明の目的のために、ヒトスルファミダーゼは、引用された米国特許のいずれかの記載のように産生され得ることが理解されるべきであり、参照により本明細書に援用される。

10

【0036】

一実施形態では、前記修飾スルファミダーゼは、配列番号1で定義されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号1で定義されるポリペプチドと少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含み、ここで、グリカン部分が、5つのN-グリコシル化部位：配列番号1の位置21のN（N（21））、位置122のN（N（122））、位置131のN（N（131））、位置244のN及び位置393のN（N（393））、の少なくとも4つが存在せず、前記スルファミダーゼは、任意に、完全なC末端を有している。その一実施形態では、配列番号1のアミノ酸436～484によって表されるC末端部分は無傷である。

【0037】

20

1つの態様では、グリカン認識受容体のエピトープを実質的に有さない修飾スルファミダーゼを含むスルファミダーゼ組成物が提供されるものであり、それにより該スルファミダーゼを哺乳動物の血液脳関門を通じて輸送することを可能にし、C α -ホルミルグリシン（FGly）対セリン（Ser）比が1よりも大きく、それにより哺乳動物の脳内で触媒活性を提供する。例えば、前記修飾スルファミダーゼは、配列番号1で定義されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号1で定義されるポリペプチドと少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。そのような例では、FGly対Serの比は、FGly50対Ser50比と呼ばれることがある。このように、定義された比は、FGly50がSer50より大きい程度に存在することを意味する。好ましくは、比は1.5より大きく、より好ましくは2.3より大きく、より好ましくは4より大きく、最も好ましくは、比は約9である。より大きな比は、より大きいほど、修飾スルファミダーゼの触媒活性が、スルファミダーゼの未修飾形態から維持され得ることを示す。

30

【0038】

修飾スルファミダーゼを含む組成物の利点は、それ自体修飾されたスルファミダーゼの利点と同様である。従って、修飾スルファミダーゼを含む組成物は、未修飾スルファミダーゼ又は未修飾スルファミダーゼを含む組成物と比較して、血漿中で改善された半減期を示し得る。さらに、前記修飾スルファミダーゼは、例えば、未修飾スルファミダーゼと比較して、哺乳動物の脳への改善された分布、並びに脳における保持された触媒活性を示しうる。

【0039】

40

一実施形態では、スルファミダーゼ組成物は、非修飾組換えスルファミダーゼにおける天然グリカン部分の含量に対する天然グリカン部分の相対含量が約25%のである。従って、グリカン認識受容体に対する前記エピトープは、天然のグリカン部分上に見出され得、このような天然グリカン部分は、本明細書に記載のスルファミダーゼ組成物において実質的に存在しない。組成物の天然グリカン部分の相対含量が約25%である修飾スルファミダーゼの組成物は、例えば、各スルファミダーゼが1つの天然のグリカン、例えば前述のN-グリコシル化部位の1つの天然のグリカン部分を含む、修飾スルファミダーゼの組成物によって表すことができる。スルファミダーゼ組成物中の天然グリカンエピトープの相対的含量は、好ましい実施形態では20%未満、15%未満、10%未満、5%未満であり得る。場合によっては、天然グリカン部分の相対含量は、4%未満、3%、2%、1

50

%、0.5%、例えば0.1%未満、例えば0.01%未満である。これらのレベルにおける天然グリカン部分の相対含量を有するスルファミダーゼの組成物は、微量の天然グリカン部分のみが見出される組成物である。従って、組成物は、天然のグリカン部分が多かれ少なかれ破壊されている修飾スルファミダーゼの混合物である。特定の実施形態では、天然のグリカン部分の含量は1%未満である。約25%又は25%未満のレベルの天然グリカンの相対含量は、グリカン認識受容体を介して細胞中へのスルファミダーゼの受容体媒介性エンドサイトーシスを有利に低下させ、血液脳関門を通じた輸送を改善し得る。

【0040】

組成物の態様の1つの特定の実施形態では、前記エピトープは、5つのN-グリコシル化部位：配列番号1の位置21のアスパラギン(N)(N(21))、位置122のN(N(122))、位置131(N(131))のN、位置244のN(N(244))及び位置393(N(393))、の少なくとも4つに存在せず、好ましくは、前記エピトープはN(21)、N(122)、N(244)及びN(393)には存在しない。選択的に製剤化された、組成物の前記修飾スルファミダーゼは、前記N-グリコシル化部位のわずか1つの天然のグリカン部分を含み、前記N-グリコシル化部位は、任意にN(131)である。

10

【0041】

組成物の態様の1つの実施形態において、5%(重量)以下の前記スルファミダーゼは、 10^{10} kDaを超える分子量を有する多量体型で存在する。

【0042】

20

組成物の態様の1つの実施形態では、前記修飾されたスルファミダーゼの5%(重量)以下はオリゴマー形態で存在し、該オリゴマー形態は180~480 kDaの分子量を有する。オリゴマー、多量体又は凝集形態の存在は、例えば、動的光散乱によって又はサイズ排除クロマトグラフィーによって決定することができる。この文脈において、凝集形態は、ネイティブに折り畳まれたモノマーから折り畳まれていないモノマーまでの範囲の構造から構成される高分子量タンパク質形態として理解されるべきである。タンパク質の凝集形態は、タンパク質のモノマー形態に対する免疫応答を増強することができる。増強された免疫応答の最も可能性の高い説明は、抗原の多価提示がB細胞受容体にクロスリンクし、従って免疫応答を誘導することである。これは、高い免疫応答を確実にするために、凝集形態にて抗原が宿主に提示されるワクチン製造に利用されている現象である。治療用タンパク質の場合、定説(dogma)とは反対である。免疫応答を最小限に抑えるために、高分子量形態の任意の含量を最小限にするか、又は避けるべきである(Rosenberg, AAPS J, 8: E501-7 (2006))。従って、オリゴマー、多量体及び/又は凝集体の形態の減少は、治療における使用により適した酵素を提供し得る。

30

【0043】

凝集の別の態様は、試料中に少量の発生が、正常に折りたたまれたタンパク質の凝集を誘導し得ることである。凝集した材料は、一般に、残存活性がない、又は低い残存活性であり、不十分な溶解性を有する。凝集体の出現は、生物学的薬剤の貯蔵寿命を決定する因子の1つであり得る(Wang, Int J Pharm, 185: 129-88 (1999))。

40

【0044】

本明細書で使用される用語「組成物」は、固体及び液体の形態を含むものとして理解されるべきである。組成物は、好ましくは、患者(例えば、哺乳動物)に、例えば注射又は経口投与するのに適した医薬組成物であり得る。

【0045】

さらに、修飾スルファミダーゼの態様に関連して開示された実施形態及びその利点は、組成物の態様の実施形態でもあることを理解すべきである。同様に、組成物の態様の実施形態は、適用可能である修飾スルファミダーゼの態様の実施形態とみなされるべきである。

【0046】

50

一実施形態では、前記修飾スルファミダーゼ又は前記スルファミダーゼ組成物は、治療に使用するものである。

【0047】

一実施形態では、前記哺乳動物の脳は、ヒトの脳である。関連する実施形態では、前記哺乳動物はヒトである。

【0048】

一実施形態では、前記哺乳動物の脳はマウスの脳である。関連する実施形態では、前記哺乳動物はマウスである。

【0049】

一実施形態では、前記修飾スルファミダーゼ又はスルファミダーゼ組成物は、リソソーム蓄積症、特にムコ多糖症 I I I A (M P S I I I A) に罹患した哺乳動物の治療に使用するものである。

【0050】

一実施形態では、使用のための前記修飾スルファミダーゼ又はスルファミダーゼ組成物は、前記哺乳動物の脳におけるヘパラン硫酸蓄積を減少させる。特に、前記ヘパラン硫酸蓄積は、例えば動物モデルにおいて、少なくとも30%、例えば少なくとも35%、少なくとも40%、又は少なくとも50%減少する。

【0051】

1つの態様において、修飾スルファミダーゼを提供するものであって、ここで、前記スルファミダーゼは、過ヨウ素酸アルカリ金属塩 (a l k a l i m e t a l p e r i o d a t e) 及び水素化ホウ素アルカリ金属塩 (a l k a l i m e t a l b o r o h y d r i d e) との逐次反応によって調製され、それによってスルファミダーゼのグリカン認識受容体のエピトープを修飾し、スルファミダーゼの触媒活性を保持しながら、前記グリカン認識受容体に対する前記スルファミダーゼの活性を低下させる。従って、スルファミダーゼは、修飾前のその天然のグリコシル化形態で存在するそのエピトープ又はグリカン部分が前記修飾によって本質的に不活性化されている点で修飾されている。従って、グリカン認識受容体に対するエピトープの存在は、修飾スルファミダーゼにおいて低減されている。修飾スルファミダーゼ、組成物及び調製方法に関連する態様のような、本明細書に開示される他の態様に関連して開示される実施形態及びその利点は、この態様の実施形態でもあることを理解すべきである。特に、以下に開示される様々な方法の実施形態は、特異的反応条件の点で前記修飾スルファミダーゼの調製のさらなる例示的な定義を提供する。同様に、上記の修飾スルファミダーゼ及び組成物の態様に関して開示された実施形態は、修飾スルファミダーゼのさらなる例示的な定義を提供する。

【0052】

一態様では、修飾スルファミダーゼを調製する方法であって、前記方法が：a) グリコシル化スルファミダーゼを過ヨウ素酸アルカリ金属塩と反応させ、b) 前記スルファミダーゼを水素化ホウ素アルカリ金属塩と2時間以上反応させ；それによって前記スルファミダーゼのグリカン部分を修飾し、前記スルファミダーゼの触媒活性を保持しながら、グリカン認識受容体に対する前記スルファミダーゼの活性を低下させる。前記ホウ水素化物は、任意に10~80mMの濃度で、例えば10~80mMの濃度で使用される。

【0053】

従って、上記の方法は、グリカン認識受容体のエピトープの存在を減少させるスルファミダーゼのマイルドな化学修飾を提供し、前記エピトープは、例えば、本明細書に記載の天然のグリカン部分によって表される。これは、有利には、哺乳動物の脳の標的化するのに適した修飾スルファミダーゼを提供し得る。マイルドな方法はさらにスルファミダーゼの触媒活性を実質的に変えることなく前記エピトープを修飾する。特に、スルファミダーゼの活性部位にF G I y 5 0を保持することにより、触媒活性を保持することができる。従って、酵素の分布特性を改善する一方で、この方法は触媒活性を排除しない。マイルドな方法によって調製された修飾スルファミダーゼの更なる利点は、上記に説明されているように、例えば、スルファミダーゼ及び組成物の態様に対するものである。

【0054】

この方法は、グリカン（炭水化物）部分の2つの隣接するヒドロキシル基間の炭素結合の過ヨウ素酸切断によるグリカン修飾を可能にする。一般に、過ヨウ素酸酸化開裂は、隣接のジオールが存在する場所で起こる。ジオールは、赤道－赤道又は軸－赤道位置に存在しなければならない。ジオールが剛性軸－軸位置に存在する場合、反応は起こらない（Kristiansen et al., Car. Res (2010)）。過ヨウ素酸塩処理は、M6P部分のC2とC3及び／又はC3とC4の間の結合を切断し、M6P受容体に結合することができない構造を生じる。一般的に、他の末端ヘキソースも同様の方法で処理される。非末端の1－4結合残基は、C2とC3の間のみが切断されるが、一方で、非末端（1－3）結合残基は、切断に耐性である。図7において、可能性がある修飾のポイントは、3つの一般的なタイプのN－グリカン；オリゴマンノース、複合体及びハイブリッド、にアスタリスクでマークされている。添付の図8～10にさらに示されるように、本明細書に開示される方法は、既知の方法に従って修飾されたスルファミダーゼと比較して、限られた数の結合の切断によって天然のグリカン部分が破壊された修飾スルファミダーゼを提供する。現在開示されている方法は、主にスルファミダーゼのグリカン部分の糖部分において単一タイプの結合破壊をもたらす（図8参照）。グリカン部分の糖部分における優先的に単結合切断を伴う部分的なグリカン酸化は、本明細書に記載の比較的マイルドな化学修飾方法の特徴である。グリカン部分の糖部分において部分的グリカン酸化及び主に単結合切断を伴うスルファミダーゼを達成するために、下記に記載される条件及び実施例4に例示される条件を用いることができる。

10

20

【0055】

本明細書に記載の修飾スルファミダーゼを調製する方法、及び修飾スルファミダーゼは、従来技術の方法及び化合物よりも改善されている。主に、本発明者らは驚くべきことに、新規な修飾スルファミダーゼが哺乳動物の脳に分布して触媒活性を示すことを見出した。実施例3及び5はさらに、先行技術の方法及びスルファミダーゼと、本明細書中に開示される方法及びスルファミダーゼとの比較を提供する。これらの実施例の結果は、既知の方法に従って修飾されたスルファミダーゼがアミノ酸残基修飾を含み、ポリペプチド鎖切断及びタンパク質凝集を示すことを示す。特に興味深いのは、先の方法に従って修飾されたスルファミダーゼ中の活性部位の触媒F G l y残基からS e r残基への変換が観察されたことである。新規方法における還元工程の比較的短い期間は、修飾酵素の触媒活性に正の影響を与えるようである。

30

【0056】

方法の態様の一実施形態において、前記グリコシル化スルファミダーゼポリペプチドは、少なくとも4つのアスパラギン残基（Nグリコシル化部位）にグリカン部分を含む。

【0057】

方法の態様の一実施形態において、前記グリコシル化アスパラギン残基は：配列番号1の位置21のN（N（21））、位置131のN（N（131））、位置244のN（N（244））及び位置393のN（N（393））である。従って、これらのN－グリコシル化部位は、天然のグリカン部分に対応する。

【0058】

方法の態様の一実施形態において、前記過ヨウ素酸アルカリ金属塩は、グリカン部分のシス－グリコール基をアルデヒド基に酸化する。

40

【0059】

方法の態様の一実施形態において、前記水素化ホウ素アルカリ金属塩は、前記アルデヒドをアルコールに還元する。

【0060】

方法の態様の一実施形態において、工程a）及び工程b）は、中間工程を実行することなく、順番に実行される。本発明者らは、工程b）が、工程a）の直後に、又は以下に記載される任意の反応停止工程a2）の後に実施され得、それによって反応試薬の除去するための中間工程、例えば、限外濾過、沈殿又は緩衝液の交換が省かれることを見出した。

50

これにより、スルファミダーゼが反応性アルデヒド中間体に長時間さらされることを回避する。工程 a)、又は任意に a 2) の後に工程 b) を進行させると、全体の反応時間も有利に短縮される。

【0061】

以下の段落において、工程 a) の特定の実施形態が開示される。他に定義されない限り、本明細書に開示される態様の特定の実施形態を組み合わせることができることを理解すべきである。

【0062】

一実施形態では、前記過ヨウ酸アルカリ金属塩はメタ過ヨウ素酸ナトリウムである。

【0063】

一実施形態では、工程 a) の前記反応は、4 時間以下、例えば 3 時間以下、例えば 2 時間以下、例えば 1 時間以下、例えば約 0.5 時間、実施される。特定の実施形態において、工程 a) の反応は、少なくとも 0.5 時間実施される。反応は、好ましくは、約 3 時間、2 時間、1 時間、又は 1 時間未満の持続時間を有する。本発明者らは、工程 a) の持続時間が 4 時間以下であることにより、グリカン認識受容体のエピトープを効率的に不活性化することを見出した。さらに、4 時間以下の持続時間は、既知の方法に従って製造されたスルファミダーゼに観察された鎖切断の程度と比較して、ポリペプチド鎖の鎖切断の程度をなお低下させる。これは、例えば実施例 4 及び 5 において本発明者らによって実証されている。

【0064】

一実施形態では、前記過ヨウ素酸塩は、(最終)濃度が 20 mM 以下、例えば 15 mM 以下、例えば約 10 mM で使用される。過ヨウ素酸塩は、8 ~ 20 mM、好ましくは約 10 mM の濃度で使用する事ができる。あるいは、過ヨウ素酸塩は、20 mM 未満、例えば 10 mM ~ 19 mM の濃度で実施される。より低濃度の過ヨウ素酸アルカリ金属塩、例えばメタ過ヨウ素酸ナトリウムが、ポリペプチド鎖の鎖切断の程度、並びにアミノ酸側鎖上の関連する酸化、例えば、配列番号 1 の位置 226 のメチオニン残基 (Met 226) の酸化を減少させることを見出した。

【0065】

一実施形態では、工程 a) の前記反応は、周囲温度、好ましくは 0 ~ 22 °C の温度で実施される。好ましい実施形態において、前記工程 a) の反応は、0 ~ 8 °C の温度、例えば 0 ~ 4 °C の温度で実施される。好ましい実施形態において、工程 a) の反応は、約 8 °C の温度、約 4 °C の温度又は約 0 °C の温度で実施される。

【0066】

一実施形態では、工程 a) の前記反応は、pH 3 ~ 7 ので実施される。当該 pH は、反応の開始時の pH として理解されるべきである。特定の実施形態では、工程 a) で使用される pH は 3 ~ 6、例えば 4 ~ 5 である。特定の実施形態において、工程 a) で使用される pH は、約 6、約 5、又は約 4 である。工程 a) の pH を低下させることによって、過ヨウ素酸塩の濃度又は工程 a) の反応時間を短縮してもよい。

【0067】

一実施形態では、前記過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムであり、20 mM 以下、例えば 15 mM 以下、例えば約 10 mM の (最終) 濃度で実施される。一実施形態では、前記メタ過ヨウ素酸ナトリウムは、8 ~ 20 mM の濃度で実施される。好ましい実施形態において、メタ過ヨウ素酸ナトリウムは、約 10 mM の濃度で実施される。

【0068】

一実施形態では、前記過ヨウ素酸塩はメタ過ヨウ素酸ナトリウムであり、20 mM 以下、例えば 15 mM 以下、例えば約 10 mM の (最終) 濃度で実施され、工程 a) の前記反応が、4 時間以下、例えば 3 時間以下、例えば 2 時間以下、例えば 1 時間以下、例えば約 0.5 時間実施される。従って、従来技術の方法と比較して、20 mM の過ヨウ素酸塩の濃度及び 4 時間以下の反応時間は、より少ない鎖切断 (strand-break) 及び酸化をもたらす得る。比較的短い反応時間を維持しながら過ヨウ素酸塩濃度をさらに低下

10

20

30

40

50

させることは、鎖切断及び酸化にさらに影響を及ぼす。20 mM未満の濃度では、鎖切断及び酸化がさらに少なくなり、15 mM以下の濃度では鎖切断及び酸化がさらに少なくなり、約10 mMの濃度では鎖切断及び酸化が最も少なくなる。実施例5に示されるように、本明細書に記載の態様による修飾スルファミダーゼは、特に、例えば、配列番号1のアミノ酸436～484によって示されような、スルファミダーゼのc末端部分において、より少ない鎖切断を示す。このc末端部分は、本明細書に記載のように調製されたスルファミダーゼにおいて無傷であることが見出された。さらに、位置226 (Met 226) のメチオニンの酸化は、それほど頻出ではない。

【0069】

一実施形態では、前記過ヨウ素酸塩はメタ過ヨウ素酸ナトリウムであり、20 mM以下、例えば15 mM以下、例えば約10 mMの（最終）濃度で使用され、工程a)の前記反応が4時間以下の時間、例えば3時間以下、例えば2時間以下、例えば1時間以下、例えば約0.5時間、0～22℃の温度で、例えば約8℃、例えば約0℃で実施される。

【0070】

一実施形態では、前記過ヨウ素酸塩は、20 mM以下の濃度、例えば15 mM以下、例えば約10 mMで使用され、工程a)の前記反応は、4時間以下、例えば約3時間以下、例えば2時間以下、例えば1時間以下、例えば約0.5時間の期間、0～22℃の温度で、例えば0～8℃の温度で、例えば0～4℃の温度で、例えば約8℃で、例えば約0℃で実施される。

【0071】

一実施形態では、前記過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムであり、前記工程a)の反応は、4時間以下、例えば約3時間以下、例えば2時間以下、例えば1時間以下、例えば約0.5時間の期間、0～22℃の温度で、例えば0～8℃の温度で、例えば0～4℃の温度で、例えば約8℃で、例えば約0℃で実施される。

【0072】

一実施形態では、前記過ヨウ素酸塩は、20 mM以下の濃度、例えば15 mM以下、例えば約10 mMで使用されるメタ過ヨウ素酸ナトリウムであり、前記工程a)の反応は、0～22℃の温度で、例えば0～8℃の温度で、例えば0～4℃の温度で、例えば約8℃で、例えば約0℃で、実施される。

【0073】

一実施形態では、前記過ヨウ素酸塩は、約10 mMの濃度で使用されるメタ過ヨウ素酸ナトリウムであり、前記工程a)の反応は、約8℃の温度で、2時間以下の期間実施される。

【0074】

一実施形態では、前記過ヨウ素酸塩は、約10 mMの濃度で使用されるメタ過ヨウ素酸ナトリウムであり、前記工程a)の反応は、0～8℃の温度で、3時間以下の期間実施される。

【0075】

以下の段落において、工程b)の特定の実施形態が開示される。他に定義されない限り、特定の実施形態、特に工程a)及び工程b)の特定の実施形態を組み合わせることができ、これを理解されたい。

【0076】

一実施形態では、前記水素化ホウ素アルカリ金属塩は、水素化ホウ素ナトリウムである。

【0077】

いくつかの例において、工程b)に使用される条件は、工程a)に使用される条件に部分的に依存することが見出されている。工程b)において使用される水素化ホウ素塩 (borohydride) の量は、好ましくは、できるだけ低く保たれる一方、水素化ホウ素塩対過ヨウ素酸塩 (periodate) のモル比は、そのような場合0.5～4:1である。従って、工程b)において、水素化ホウ素塩は、工程a)において使用される過

10

20

30

40

50

ヨウ素酸塩の量の4倍のモルで使用される。一実施形態では、前記水素化ホウ素塩は、前記過ヨウ素酸塩の（最終）濃度の4倍以下の（最終）モル濃度で使用される。例えば、水素化ホウ素塩は、過ヨウ素酸塩の濃度の3倍以下の濃度、例えば過ヨウ素酸塩の濃度の2.5倍以下、例えば過ヨウ素酸塩の濃度の2倍以下、前記過ヨウ素酸塩の濃度の1.5倍以下、例えば前記過ヨウ素酸塩の濃度におおよそ対応する濃度で使用されてもよい。しかし、特定の実施形態では、過ヨウ素酸塩濃度の半分、又は過ヨウ素酸塩濃度の0.5倍に相当する濃度で、水素化ホウ素塩が使用される。従って、過ヨウ素酸塩が約20mMの濃度で使用される場合、水素化ホウ素塩は、80mM以下の濃度、又は10～80mMの濃度、例えば10～50mMの濃度で使用されてもよい。過ヨウ素酸塩が10～20mMの濃度で使用される場合、水素化ホウ素塩は25～80mM、例えば50mMの濃度で使用され得る。同様に、過ヨウ素酸塩が約10mMの濃度で使用される場合、水素化ホウ素塩は、40mM以下の濃度、例えば、25mM以下の濃度で使用され得る。さらに、そのような実施形態において、水素化ホウ素塩は、好ましくは、12mM～50mMの濃度で使用され得る。本発明者らは、水素化ホウ素塩の濃度がスルファミダーゼの活性部位における触媒アミノ酸残基の保存度に影響を及ぼし、従って比較的低い濃度の水素化ホウ素塩が触媒活性を保持する修飾スルファミダーゼを提供し得ることを見出した。

10

【0078】

一実施形態では、前記工程b)の反応は、1.5時間以下、例えば1時間以下、例えば0.75時間以下、例えば約0.5時間の期間実施される。反応時間は、好ましくは約1時間、又は1時間未満である。さらなる例において、工程b)の反応は、約0.25時間の持続時間を有する。さらなる実施形態において、工程b)の反応は、0.25時間～2時間の期間実施することができる。上記で説明されるように、還元工程の持続時間は、スルファミダーゼの触媒活性に影響を与えることが見出されている。従って、比較的短い反応時間は、Ser50ではなくFGly50を含む修飾スルファミダーゼを提供し得る。より短い反応時間は、酵素の全体的な構造的完全性に有利に影響することが見出されている。特に、スルファミダーゼの高分子量形態並びに鎖切断の発生を生じるタンパク質凝集は、少なくとも部分的に反応時間と関連しているようである。従って、工程b)の比較的短い反応時間は、凝集の発生及び鎖切断を減少させ得る。本明細書の他の箇所では説明されているように、凝集した形態の存在が減少すると、治療に使用するのに適したタンパク質になり得る。

20

30

【0079】

一実施形態では、前記工程b)の反応は、0～8℃の温度で実施される。工程b)の反応温度は、反応生成物の触媒活性に少なくとも部分的に影響を及ぼすことが見出されている。特に、スルファミダーゼの活性部位における触媒残基の変換は、反応温度に関連する。従って、工程b)を8℃未満の温度で実施することが有利であり得る。温度は好ましくは約0℃である。

【0080】

一実施形態では、前記水素化ホウ素アルカリ金属塩は、前記過ヨウ素酸塩の濃度の0.5倍～4倍の濃度、例えば前記過ヨウ素酸塩の濃度の2.5倍以下の濃度で使用される水素化ホウ素ナトリウムである。

40

【0081】

一実施形態では、前記水素化ホウ素アルカリ金属塩は、前記過ヨウ素酸塩の濃度の0.5倍～4倍の濃度、例えば前記過ヨウ素酸塩の濃度の2.5倍以下の濃度で使用される水素化ホウ素ナトリウムであり、前記工程b)の反応は、1時間以下、例えば約0.5時間の期間実施される。

【0082】

一実施形態では、前記水素化ホウ素アルカリ金属塩は、前記過ヨウ素酸塩の濃度の0.5倍～4倍の濃度、例えば前記過ヨウ素酸塩の濃度の2.5倍以下の濃度で使用される水素化ホウ素ナトリウムであり、前記工程b)の反応は、1時間以下、例えば約0.5時間の期間、0～8℃の温度で実施される。

50

【0083】

一実施形態では、前記過ヨウ素酸アルカリ金属塩は、前記過ヨウ素酸塩の濃度の0.5倍～4倍の濃度で、例えば前記過ヨウ素酸塩の濃度の2.5倍以下の濃度で使用され、前記工程b)の反応は1時間以下、例えば約0.5時間、0～8℃の温度で実施される。

【0084】

一実施形態では、前記水素化ホウ素アルカリ金属塩は水素化ホウ素ナトリウムであり、前記工程b)の反応は、1時間以下、例えば約0.5時間、0～8℃の温度で実施される。

【0085】

一実施形態では、前記水素化ホウ素アルカリ金属塩は、前記過ヨウ素酸塩の濃度の0.5倍～4倍の濃度、例えば前記過ヨウ素酸塩の濃度の2.5倍以下の濃度で使用される水素化ホウ素ナトリウムであり、前記工程b)の反応は0～8℃の温度で実施される。

10

【0086】

一実施形態では、前記水素化ホウ素アルカリ金属塩は、前記過ヨウ素酸塩の濃度の0.5倍～4倍の濃度、例えば前記過ヨウ素酸塩の濃度の2.5倍の濃度で使用される水素化ホウ素ナトリウムであり、前記工程b)の反応は、約0℃の温度で約0.5時間の期間実施される。

【0087】

一実施形態では、前記過ヨウ素酸塩はメタ過ヨウ素酸ナトリウムであり、前記水素化ホウ素アルカリ金属塩は水素化ホウ素ナトリウムである。

20

【0088】

一実施形態では、工程a)及び工程b)のそれぞれは、2時間以下、例えば1時間以下、例えば約1時間又は約0.5時間の期間、個別に実施される。任意に、前記水素化ホウ素塩は、前記過ヨウ素酸塩の濃度の0.5～4倍、好ましくは前記過ヨウ素酸塩の濃度の0.5～2.5倍の濃度で使用される。特定の実施形態において、前記水素化ホウ素塩は、過ヨウ素酸塩の濃度の0.5倍の濃度で、又は前記過ヨウ素酸塩の濃度の2.5倍の濃度で使用される。

【0089】

一実施形態では、工程a)は3時間以下の期間実施され、工程b)は1時間以下実施される。任意に、前記水素化ホウ素塩は、前記過ヨウ素酸塩の濃度の4倍以下、好ましくは前記過ヨウ素酸塩の濃度の2.5倍以下で使用される。

30

【0090】

当業者は、化学反応の反応持続時間、例えば工程a)及びb)のそれぞれの反応持続時間を制御する方法を認識している。従って、一実施形態では、前記方法の態様は、a2)工程a)から生じる反応の反応停止(quenching)をさらに含む。前記反応停止は、30分未満、例えば15分未満の持続時間を有する。いくつかの例において、前記反応停止は、工程a)の直後に実施される。反応停止は、例えば、エチレングリコールの添加によって実施してもよい。エチレングリコールは、192mMの最終濃度まで添加されてもよい。好ましくは、工程b)は、反応停止の直後に続く。これにより、スルファミダーゼが反応性アルデヒド基に暴露される期間を最短にすることができる。反応性アルデヒドは、タンパク質の不活性化及び凝集を促進することができる。

40

【0091】

一実施形態では、前記方法は、b2)工程b)から生じる反応の停止をさらに含む。この反応停止は、ケトン又はアルデヒド基、例えばシクロヘキサノン又はアセトンを含む分子を添加することによって実施することができ、前記分子は好ましくは水に可溶性である。あるいは、前記反応停止は、酢酸又は他の酸の添加によって反応混合物をpH6以下に低下させることによって行うことができる。いくつかの例において、前記反応停止は、約0.1Mの最終濃度までのアセトンの添加によって実施される。任意の反応停止工程は、工程b)の反応時間の正確な制御を可能にする。このようにして反応時間を制御することは、FGly50含量に関してプロセスの再現性をさらに提供し得る。

50

【0092】

従って、本明細書に開示される方法は、先行技術に従って修飾されたスルファミダーゼに対して多くの利点を有する修飾スルファミダーゼを提供する。従って、本発明者らは、スルファミダーゼポリペプチド鎖の構造的完全性に対する最小の負の影響を伴うスルファミダーゼの化学修飾条件を見出し、同時に、触媒活性を保持しながら4つの天然グリコシル化部位すべてにおいて、グリカンのほぼ完全な修飾を示唆する天然グリカン構造の実質的な欠如をもたらすことを見出した。驚くべきことに、特定の例において、工程a)に使用される条件は、工程b)を実施するための条件を促進することを見出した。この方法の例示的な実施形態は、図1B、1C及び1Dに示す。

【0093】

1つの態様では、上記で定義した方法の態様による方法によって得ることができる修飾スルファミダーゼが提供される。

【0094】

1つの態様では、治療に使用するための上記方法の態様によって得ることができる修飾スルファミダーゼが提供される。

【0095】

一態様では、リソソーム蓄積症、特にムコ多糖症IIIA(MPS IIIA)の治療に使用するための上記方法の態様によって得られる修飾スルファミダーゼが提供される。

【0096】

一態様では、哺乳動物の脳における、リソソーム蓄積症、例えばムコ多糖症IIIA(MPS IIIA)を治療するために血液脳関門を通過する、修飾のスルファミダーゼの薬物製造における使用が提供されるものであって、前記修飾は、酵素を過ヨウ素酸アルカリ金属塩及び水素化ホウ素アルカリ金属塩で逐次処理することによって化学的に修飾されたグリカン部分を有することを含み、それによって、前記スルファミダーゼの触媒活性を維持する一方、グリカン認識受容体、例えばマンノース及びマンノース-6-リン酸細胞送達系に対するスルファミダーゼの活性を減少させる。

【0097】

一態様では、リソソーム蓄積症、例えばムコ多糖症IIIA(MPS IIIA)に罹患した哺乳動物を治療する方法が提供され、該方法は、哺乳動物に、治療上有効量の修飾スルファミダーゼを投与することを含み、前記修飾スルファミダーゼは、以下：

- a) 本明細書の態様及び実施形態に記載の修飾スルファミダーゼ；
- b) 本明細書の態様及び実施形態に記載のスルファミダーゼ組成物、及び
- c) 修飾スルファミダーゼであって、ここで、該修飾が、前記修飾スルファミダーゼと、過ヨウ素酸アルカリ金属塩及び水素化ホウ素アルカリ金属塩で逐次処理することにより、該スルファミダーゼが、触媒酵素活性を維持する一方で、グリカン認識受容体、例えばマンノース及びマンノース6リン酸細胞送達系に対するその活性を減少させるように化学的に修飾されたそのグリカン部分を有する、から選択される。

【0098】

その1つの実施形態では、前記治療が、70日間の期間にわたり、10用量の修飾スルファミダーゼの投与後に、哺乳動物の脳からの少なくとも約48%のリソソーム蓄積のクリアランスをもたらす。さらに、前記治療は、25日間の期間にわたり、13用量の修飾スルファミダーゼの投与後に、哺乳動物の脳からの少なくとも約30%のリソソーム蓄積のクリアランスをもたらす。

【0099】

本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1】図1は、実施例4に開示される発明者によって開発された化学修飾方法と、国際公開第2008/109677号に開示されている既知の方法との違いを概説する図であ

10

20

30

40

50

る。

【図2A】図2Aは、既知の方法に従って修飾されたスルファミダーゼのSDS-PAGEゲルを示す。グリカン修飾手順によって生成された4つのタンパク質バンド（1～4で示す）が同定された。

【図2B】図2Bは、既知の方法に従って修飾されたスルファミダーゼ並びに本明細書に開示される新規な方法1に従って修飾されたスルファミダーゼのSDS-PAGEゲルを示す。

【図3A】図3Aは、既知の方法に従って修飾されたスルファミダーゼのSECクロマトグラムを示す。

【図3B】図3Bは、本明細書に開示される新規方法1に従って修飾されたスルファミダーゼのSECクロマトグラムを示す。矢印によって示されているのは、修飾されたスルファミダーゼの多量体形態の量である。

【図4A】図4Aは、既知の方法に従って修飾されたスルファミダーゼの動的光散乱によって測定された散乱強度を示す。

【図4B】図4Bは、本明細書に記載の新規方法1に従って修飾されたスルファミダーゼの動的光散乱によって測定された散乱強度を示す。

【図5】図5は、未修飾組換えスルファミダーゼ、既知の方法に従って修飾されたスルファミダーゼ、及び本明細書に記載の新規方法1及び2に従って修飾されたスルファミダーゼのMEF-1細胞における受容体媒介エンドサイトーシスを視覚化する図である。

【図6A】図6Aは、MPS III欠損マウスのインビボ処置の結果を示す。この図は、新規方法1に従って修飾されたスルファミダーゼを30mg/kgで1日おきにi.v.投与（13回投与）した後のマウスの脳におけるヘパラン硫酸蓄積のクリアランスを示す。

【図6B】図6Bは、MPS III欠損マウスのインビボ処置の結果を示す。この図は、新規方法1に従って修飾されたスルファミダーゼを30mg/kgで1日おきにi.v.投与（13回投与）した後のマウスの脳におけるヘパラン硫酸蓄積のクリアランスを示す。

【図6C】図6Cは、MPS III欠損マウスのインビボ処置の結果を示す。この図は、新規方法1に従って修飾されたスルファミダーゼを30mg/kg及び10mg/kgそれぞれを、毎週1回i.v.投与（10回投与）した後のマウスの脳におけるヘパラン硫酸蓄積のクリアランスを示す。

【図7】図7は、タンパク質中に一般的に存在する3つの典型的なN-グリカン構造の概略図である。左のグリカンはオリゴマンノース型、中央は複合型、右はハイブリッド型を表す。図では、以下の化合物が示されている：黒塗りのダイヤモンドは、N-アセチルノイラミン酸に対応する；黒塗りの円はマンノースに対応する；四角はN-アセチルグルコサミンに対応する；黒塗りの三角はフコースに対応する；円はガラクトースに対応する。アスタリスクでマークされた糖部分は、本明細書に開示されている過ヨウ素酸/水素化ホウ素塩処理によって修飾され得る。

【図8A】図8Aは、化学修飾後のマンノースの予想される結合切断を示す概略図である。

【図8B】図8Bは、Man-6グリカンのモデルを示す概略図である。過ヨウ素酸塩で酸化した場合に結合の切断に感受性が有する糖部分が示される。灰色の円はマンノースに対応し、黒い四角はN-アセチルグルコサミンに対応し、T13はN-グリコシル化部位N(131)を含むトリプシンペプチドNITRに対応する。

【図9】図9は、既知の方法に従って化学修飾する前（A）及び化学修飾後（B～D）のN(131)に結合したMan-6グリカンを有するトリプシンペプチドT13（T13+Man-6グリカン）に対応する二価荷電イオンの質量スペクトルを示す（S. = 単結合切断；D. = 二重結合切断；例えばD. x 3 = 三重結合切断）。

【図10A】図10Aは、既知の方法（黒色バー）、新規方法1（黒色ドット）、新規方法3（白色）、及び新規方法4（クロスチェッカー）に従って化学修飾した後のトリプシ

10

20

30

40

50

ンペプチド T13+Man-6 グリカンの結合切断合の程度を視覚化する図である。

【図10B】図10Bは、既知の方法（黒色バー）、新規方法1（黒色ドット）、新規方法3（白色）、及び新規方法4（クロスチェッカー）に従って化学修飾した後のトリプシンペプチド T13+Man-6 グリカンの単結合切断の相対的存在量を視覚化する図である。

【図11】図11は、ヒトスルファミダーゼのアミノ酸配列を列挙する表であって、ここで、配列番号1はヒトスルファミダーゼのアミノ酸配列に対応し、配列番号2はGS-スルファミダーゼに対応し、配列番号3はスルファミダーゼ-GSに対応する。

【実施例】

【0101】

実施例

以下の実施例は、本開示による修飾スルファミダーゼポリペプチドの開発を開示する。

【0102】

実施例1

スルファミダーゼの培養、精製及び特性評価

【0103】

材料と方法

スルファミダーゼ発現ベクターの構築：ヒトスルファミダーゼをコードする合成遺伝子は、ホモサピエンス又はC. グリセウス（CHO細胞）及び元のヒト配列の両方にコドン最適化されたバージョンであり、Geneart（Life Technologies）によって合成された。合成遺伝子をpcDNA3.1（+）（Invitrogen）又はpQMCF1（Icosagen）などの異なる哺乳動物発現ベクターにクローニングした。

【0104】

スルファミダーゼの産生：スルファミダーゼ産生、pcDNA3.1（+）ベクターを用いたHEK293細胞における一過性発現及びpQMCF1ベクターを用いた及びQuattro Med Cell Factory（QMCF）エピソーム発現系（Icosagen AS）の2つの一過性発現系を評価した。両方の系において、細胞を標準培地中で増殖させ、トランスフェクションの6～8日後に典型的には分泌タンパク質を採取した。さらに、市販のCHO発現系を用いて確立された安定な細胞系のスルファミダーゼの産生について評価した。

【0105】

スルファミダーゼは、20mMトリス、1mM EDTA、pH8.0で平衡化したQセファロースカラム（GE Healthcare）上の陰イオン交換クロマトグラフィー（AIE X）によって培地から捕獲し、NaCl勾配で溶出させた。捕獲されたスルファミダーゼを、4-メルカプトエチルピリジン（MEP）クロマトグラフィーによりさらに精製した。スルファミダーゼ含有画分を、MEP HyperCelクロマトグラフィーカラムにロードし、続いて50mM NaAc、0.1M NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、pH4.6の定組成溶出によって溶出した。最後の磨き工程（polishing）は、25mM NaAc、2mM DTT、pH4.5で平衡化したSP Sepharose FF（GE Healthcare）カラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー（CIE X）によって達成した。溶出にはNaCl勾配を用いた。様々な発現系からのスルファミダーゼバッチの純度及び同一性を、SDS-PAGE及びMALDI-TOF-MSによって分析した（データは示さず）。

【0106】

グリコシル化分析：生成された種々のスルファミダーゼバッチについてグリコシル化パターンを決定した。糖ペプチド分析の前に、スルファミダーゼ（約10μg）を還元し、アルキル化し、トリプシンで消化した。タンパク質の還元は、70℃で1時間、50mM NH₄HCO₃中の5μLのDTT 10mM中でインキュベーションした。その後のアルキル化を50mMのNH₄HCO₃中の55mMヨードアセトアミド5μLを用いて

10

20

30

40

50

室温 (R T) 及び暗所で 4 5 分間行った。最後に、トリプシン消化を、3 0 μ L の 5 0 m M NH₄ HCO₃、5 m M CaCl₂、p H 8、及び 5 0 m M 酢酸中の 0. 2 μ g / μ L トリプシン (プロテアーゼ : タンパク質比 1 : 2 0 (w / w)) の添加によって実施した。消化は 3 7 °C で一晩行った。

【0107】

トリプシン消化スルファミダーゼの 5 つのペプチド断片は潜在的な N-グリコシル化部位を含んでいた。潜在的なグリコシル化部位 N (x) (式中、x は配列番号 1 で定義されたスルファミダーゼアミノ酸配列中のアスパラギンの位置を示す) を含むこれらのペプチドフラグメントは :

【0108】

N (2 1) 含有フラグメント (配列番号 1 の残基 4 ~ 3 5、3269.63Da)、
N (1 2 2) 含有フラグメント (配列番号 1 の残基 1 0 5 ~ 1 3 0、2910.38Da)、
N (1 3 1) 含有フラグメント (配列番号 1 の残基 1 3 1 ~ 1 3 4、502.29Da)、
N (2 4 4) 含有フラグメント (配列番号 1 の残基 2 3 9 ~ 2 6 2、2504.25Da)、
N (3 9 3) 含有フラグメント (配列番号 1 の残基 3 7 4 ~ 3 9 4、2542.22Da)
である。

【0109】

各潜在的グリコシル化部位のアスパラギンは太字で示され、各ペプチドフラグメントの分子量を示す。

【0110】

5 つのトリプシンペプチドフラグメントの可能なグリコシル化変異体を、糖ペプチド分析によって調べた。これは、液体クロマトグラフィーに続き、A g i l e n t 6 5 1 0 四極子 (Q u a d r u p o l e) 飛行時間型質量分析計 (Q-T O F-M S) に連結した A g i l e n t 1 2 0 0 H P L C システムを用いた質量分析 (L C-M S) によって行った。いずれのシステムも M a s s H u n t e r W o r k s t a t i o n によって制御した。W a t e r s X S E L E C T C S H 1 3 0 C 1 8 カラム (1 5 0 x 2. 1 m m) を用いて L C 分離を行い、カラム温度を 4 0 °C に設定した。移動相 A は、5 % アセトニトリル、0. 1 % プロピオン酸、及び 0. 0 2 % T F A から成り、移動相 B は、9 5 % アセトニトリル、0. 1 % プロピオン酸及び 0. 0 2 % T F A からなる。0 % ~ 1 0 % B の勾配で 1 0 分間、次いで 1 0 % ~ 7 0 % B でさらに 2 5 分間、0. 2 m L / 分の流速で使用した。注入量は 1 0 μ L であった。Q-T O F は、正のエレクトロスプレーイオンモードで操作した。データ取得の過程で、フラグメンター電圧、スキマー電圧、及びオクトポール R F はそれぞれ 9 0、6 5 及び 6 5 0 V に設定した。質量範囲は 3 0 0 ~ 2 8 0 0 m / z であった。

【0111】

結果

H E K 2 9 3 細胞における一過性発現は、低レベルの分泌スルファミダーゼが得られた (0. 3 m g / L 培地未満、配列番号 3)。Q M C F 安定エピソーム発現系 (I c o s a g e n A S) は、C H O 細胞において 1 0 m g / L を超える力価でスルファミダーゼ (配列番号 2) 産生をもたらした。C H O 発現系から確立された安定な細胞系は、4 0 m g / L を超えるスルファミダーゼ (配列番号 1) 力価をもたらした。

【0112】

スルファミダーゼは、6 1 ~ 6 3 k D a の範囲の分子量にて、見かけ上均質に精製された。5 5 k D a の理論上のペプチド鎖質量から、これは総分子量 6 ~ 8 k D a のグリカンの存在を示している。スルファミダーゼバッチの純度及び同一性は、S D S-P A G E 及び M A L D I-T O F-M S によって分析した (結果は示さず)。

【0113】

トリプシン消化ペプチドのグリコシル化分析は、L C-M S によって実施した。各糖ペプチド上の 3 0 種類のグリコシル化の手動検索を行った。相対定量は、再構成されたイオンクロマトグラム (イオン化効率の補正なし) のピーク面積を測定することによって行っ

10

20

30

40

50

た。5つの推定N-グリコシル化部位のうち、4つ（N（21）、N（131）、N（244）及びN（393））は、全てのスルファミダーゼバッチを介して一貫してグリコシル化されていた。N（21）及びN（393）は、複合型グリカンによって占められていたが、フルシアル化の程度は低かった。N（131）はオリゴマンノース型グリカンによって完全に占有されていた。グリカンのリン酸化の程度は、全てのバッチについて約50%であった。N（131）部位は、アルカリホスファターゼによる脱リン酸化に耐性であった。CHO細胞（配列番号2）とHEK293細胞（配列番号3）の比較で異なる第4の部位であるN（244）は、CHO細胞バッチ中ではオリゴマンノース、HEK293バッチ中ではオリゴマンノース／複合型混合のスルファミダーゼを産生した。N（122）を含むトリプシンペプチドは、いかなるグリカンも結合していなかった。

10

【0114】

実施例2：

既知の方法によるスルファミダーゼの化学修飾

【0115】

材料と方法

公知の方法による化学的修飾（国際公開第2008/109677号）：スルファミダーゼのグリカン部分を修飾するために、Quatromed Cell Factory（QMC F）エピソーム発現系（Icosagen AS）を用いて、実施例1に記載したようにして製造したスルファミダーゼ（配列番号2）は、20mMリン酸ナトリウム、100mM NaCl（pH6.0）中、0℃で6.5時間、20mMメタ過ヨウ素酸ナトリウムとともに最初にインキュベートした。エチレングリコールを最終濃度192mMになるように添加することにより、グリカン酸化を停止（quench）した。反応停止を0℃で15分間進行させた後、20mMリン酸ナトリウム、100mM NaCl（pH6.0）に対して4℃で一晩透析を行った。透析後、反応混合物を100mMの最終濃度まで水素化ホウ素ナトリウムを添加して還元を行った。還元反応を一晩進行させた。最後に、酵素調製物を20mMリン酸ナトリウム、100mM NaCl（pH7.5）に対して透析した。全てのインキュベーションは暗所で行った。

20

【0116】

結果

修飾スルファミダーゼは、図1Aに示された一連の工程に従ってトリプリケートで生成された。

30

【0117】

実施例3：

既知の方法に従って修飾されたスルファミダーゼの分析

【0118】

材料と方法

既知の方法に対応する実施例2により修飾されたスルファミダーゼを以下の分析に供した。

【0119】

SDS-PAGE分析：5μgの修飾スルファミダーゼをNuPAGE 4～12%Bis-Trisゲル上の各ウェルに充填した。シーブルー2プラスマーカーを使用し、ゲルをインスタンブルー（C. B. Sサイエンティフィック）で着色した。

40

【0120】

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による分析：修飾酵素をAKTAmicroシステム（GE Healthcare）で実施した、分析サイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。40μL／分の製剤緩衝液の流速を有するSuperdex 200 PC 3.2/30カラムを使用した。サンプル量は10μLであり、10μgの酵素を含有していた。

【0121】

動的光散乱（DLS）分析：修飾スルファミダーゼを12000rpmで3分間室温（

50

R T) 遠心分離することによって脱気した。DynaPro Titan装置 (Wyatt Technology社) 上で25%レーザー出力を用いて、それぞれ75 μ Lを3回反復でDLS実験を行った。

【0122】

ゲル内消化及びMALDI-TOF MS分析：SDS-PAGE分析により、いくつかの余分なバンドが明らかとなり、切り取り、脱染色し、トリプシンを用いたゲル内消化で処理した。手順は以下の通り行った：

【0123】

i. クーマシーの脱染色：切り出したゲルバンドをエッペンドルフチューブに入れた。チューブを50%アセトニトリル中の100mM NH_3HCO_3 中で30℃にて1時間2回攪拌した。上清を捨てた。

10

【0124】

ii. 還元及びアルキル化：ゲル片をアセトニトリル中で脱水し、Speed Vacで乾燥させ、続いて100mM NH_3HCO_3 中の10mM DTTでカバーした。還元を57℃で1時間進行させた。上清を捨て、100mMの NH_3HCO_3 中の55mMヨードアセトアミドで置換した。アルキル化は、暗所で、わずかに攪拌しながら、RTで45分間行った。上清をもう一度捨てた。ゲルを50%アセトニトリル中100mMの NH_3HCO_3 で30℃にて20～30分間洗浄し、その後上清を捨てた。ゲル片をSpeed Vacで完全に乾燥させた。

20

【0125】

iii. トリプシンによるゲル内消化：2～5 μ Lの50mM NH_3HCO_3 を乾燥ゲル片に添加し、その後5 μ Lのトリプシン溶液 (1%酢酸中0.1 μ g/ μ L) を添加した。50mM NH_3HCO_3 をさらに添加してゲルを膨潤させた。37℃で一晩 (攪拌しながら) 消化した。上清を新しいチューブに移し、室温で60%アセトニトリル、0.1%TFA (3×20分) で抽出した。得られた上清をSpeed Vacで乾燥近くまで蒸発させた。濃縮溶液を α -シアノー4-ヒドロキシケイ皮酸溶液 (10mg/mL) と1:1で混合し、0.6 μ LをMALDIプレートに適用した。

【0126】

Sciex 5800マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/TOF MS) を用いてトリプシンペプチドフラグメントの分子質量を測定した。分析は、3550ショット及び400ショットのレーザーエネルギーを用いた陽イオンリフレクトロンモードで行った。

30

【0127】

活性部位の保存：スルファミダーゼの活性部位に対する化学修飾の影響をLC-MS及びLC-MS/MS分析を用いて調べた。サンプルは、実施例1のグリコシル化分析セクションに記載されたLC-MS法に従って調製した。システイン50変異体 (システイン50 (アルキル化)、酸化システイン50、FGly50及びSer50) を含む得られたトリプシンペプチドを、再構成されたイオンクロマトグラムを利用して半定量化した。ペプチドの同一性は、MSMSシーケンスによって行った。MSMSパラメータは、以下の通りであった：衝突エネルギーを10、15、20V、走査範囲100～1800m/z、スキャン速度1スキャン/秒に設定した。

40

【0128】

結果

SDS-PAGE分析：SDS-PAGE分析で明らかのように、全長スルファミダーゼとは異なるサイズのいくつかのペプチドが、化学修飾の結果、形成された (図2A)。

【0129】

SEC及びDLSによる分析：化学修飾手順は、図3Aのクロマトグラムのプレピークとして示されるように、スルファミダーゼの凝集を促進することが見出された。クロマトグラムにおけるプレピークのピーク高さは、主ピークの高さの約3%であることが見出された。

50

【0130】

さらに、DLS分析は、同じ物質が、高分子量形態（すなわち、 10^{10} kDaを超える）の全タンパク質含量の15～20%のタンパク質を含有することを明らかにした（図4A）。

【0131】

SDS-PAGEバンドの分析：MALDI-TOF MS分析により、SDS-PAGEで観察された4つのゲルバンド#1-4（図2A）は、化学修飾中に鎖切断によって生成されたスルファミダーゼのフラグメントとして同定することができた。

【0132】

図2Aのゲルバンド#1及び#2は、化学修飾の結果形成された、6 kDa及び30 kDaの分子量を有する2つのC末端トランケーションとして、ゲルバンド#3は1つの41 kDaのN末端トランケーションとして、及びゲルバンド#4は1つのスルファミダーゼの二量体フォームのとして（111 kDaバンド）決定された（MALDIスペクトルは示されていない）。

【0133】

従って、既知の方法に従ってスルファミダーゼの化学修飾がグリカン修飾するだけでなく、スルファミダーゼポリペプチド鎖の特定の位置で鎖切断を生成することも見出された。

【0134】

また、公知の方法による化学修飾により、スルファミダーゼ上のいくつかのメチオニン残基、特に、ほぼ完全に酸化された、メチオニン184及びメチオニン443に酸化が導入されることも見出された。メチオニン226（アミノ酸残基226～238に対応するトリプシンペプチドT23に見出される）は、はるかに低い程度しか酸化されないが、この酸化はスルファミダーゼよりも不安定なタンパク質を生じ、41 kDaのN末端トランケーション（図2Aのゲルバンド#3）を生じる。従って、MS分析で観察されるように、メチオニン226の酸化及び鎖切断は相関しているようであった。さらに、二量体バンド（図2Aの#4）はまた、主に酸化メチオニン226を含有していた（図2A）。

【0135】

その結果、グリカンの修飾の既知の手順は、酵素の構造的完全性に重要なアミノ酸残基の酸化を触媒する。

【0136】

活性部位の保存：さらに、LC-MSMSの使用により、還元工程（図1A）は、配列番号1の活性部位50位のFGly残基をSerに還元することが判明した。この位置のSerは、効率的な触媒作用に適合しない（Recksiek et al, J Biol Chem 273(11):6096-103(1998)）。FGlyから生成した相対量のSerを、FGly50及びSer50を含む2つのトリプシンペプチド断片に対応する、質量スペクトル中の二価荷電イオンのピーク面積測定に基づいて推定した。ピーク面積は、イオン化効率の補正を伴わないMS反応に基づくものであった。以下の表1は、既知の方法（実施例5、表2も参照のこと）に従って修飾後、FGlyからSerへの変換率が約56%であることを示す。

【0137】

【表1】

表1. 活性部位におけるFGlyからSerへの変換

スルファミダーゼの化学的修飾	Ser形成 (%)	FGly/Ser比
無し	0	
既知の方法	56.0 ± 0.3 (n=3)	0.8

10

20

30

40

50

【0138】

従って、上記の修飾に加えて、既知の化学修飾手順は、酵素の触媒活性にとって重要なアミノ酸残基の還元を引き起こす。

【0139】

実施例4：スルファミダーゼの化学修飾の新規方法

【0140】

材料及び方法

新規方法1：実施例1に記載のQuattromed Cell Factory (Q MCF) エピソーム発現系 (Icosagen AS) で産生したスルファミダーゼを、
pH 6.0 のリン酸緩衝液中にて、20 mM のメタ過ヨウ素酸ナトリウムと0℃で120
分間暗所にてインキュベートすることにより酸化した。エチレングリコールを最終濃度1
92 mM になるように添加することにより、グリカン酸化を停止させた。反応液に水素化
ホウ素ナトリウムを最終濃度が50 mM になるまで6℃で15分間反応停止を進行させた
。暗所にて0℃で120分間インキュベートした後、得られたスルファミダーゼ調製物を
20 mM リン酸ナトリウム、100 mM NaCl, pH 6.0 に対して限外濾過を行っ
た。化学修飾のための新規方法1を図1Bに示す。

10

【0141】

新規方法2：還元工程における水素化ホウ素ナトリウムの濃度が10 mMであったことを
除き、新規方法1のように実施した。化学修飾の新規方法2を図1Cに示す。

20

【0142】

新規方法3：実施例1の安定細胞株で産生されたスルファミダーゼを、初期のpHが4
.5～5.7の酢酸塩緩衝液中、0℃、暗所で180分間、メタ過ヨウ素酸ナトリウム1
0 mMと共にインキュベートすることによって酸化させた。エチレングリコールを最終濃
度192 mM になるように添加することにより、グリカン酸化を反応停止した。反応混合
液に水素化ホウ素ナトリウムを25 mMの最終濃度まで添加する前に、6℃で15分間反
応停止を進行させた。暗所にて0℃で60分間インキュベートした後、得られたスルファミ
ダーゼ調製物を10 mM リン酸ナトリウム、100 mM NaCl, pH 7.4 に対し
て限外濾過した。化学修飾の新規方法3を図1Dに示す。

【0143】

30

新規方法4：実施例1に記載の安定細胞株で産生されたスルファミダーゼを、初期pH
4.5の酢酸塩緩衝液中、暗所で8℃にて、10 mMメタ過ヨウ素酸ナトリウムと共に60
分間インキュベートすることによって酸化させた。エチレングリコールを最終濃度192
mM になるように添加することにより、グリカン酸化を反応停止した。反応混合液に水素
化ホウ素ナトリウムを25 mMの最終濃度まで添加する前に、6℃で15分間反応停止を
進行させた。暗所にて0℃で60分間インキュベートした後、得られたスルファミダーゼ
調製物を10 mM リン酸ナトリウム、100 mM NaCl, pH 7.4 に対して限外濾
過した。

【0144】

第2の反応停止工程の調査：第2工程の反応停止の効果を、新規方法1の水素化ホウ素
ナトリウムのインキュベーション工程の後に0.1 Mのアセトンを添加することによって
調べた。材料は、水素化ホウ素ナトリウムの添加及びインキュベーションを含む新規方法
1に従って、並行して製造した後、1つのサンプル中の反応をアセトンの添加により停止
させた。次に両方のサンプルを新規方法1の限外濾過工程に従って処理した。

40

【0145】

新規方法5：実施例1の安定細胞株で産生されたスルファミダーゼを、初期pH 4.5
の酢酸塩緩衝液中、暗所にて8℃で、10 mMメタ過ヨウ素酸ナトリウムと共にインキュ
ベートすることにより酸化させた。エチレングリコールを最終濃度192 mM になるよう
に添加することにより、グリカン酸化を反応停止した。反応混合液に水素化ホウ素ナトリ
ウムを25 mMの最終濃度まで添加する前に、6℃で15分間反応停止を進行させた。暗

50

所にて0℃で45分間インキュベートし、反応を0.1Mアセトンで反応停止した後、得られたスルファミダーゼ調製物を10mMリン酸ナトリウム、100mM NaCl、pH7.4に対して限外濾過を行った。

【0146】

結果

既に本明細書の他の部分で説明したように、メタ過ヨウ素酸ナトリウムは、炭水化物のシスグリコール基をアルデヒド基に変換する酸化剤であるのに対し、水素化ホウ素塩は、アルデヒドをより不活性なアルコールに還元する還元剤である。従って、炭水化物構造は不可逆的に破壊される。

【0147】

グリカンの化学修飾の改良方法を提供するために、特に改善された特性を有する修飾スルファミダーゼを提供する手順を提供するために、異なる反応条件が評価された。メタ過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化と水素化ホウ素ナトリウムによる還元の両方が、触媒活性及び免疫原性傾向に悪影響を与える特性の、ポリペプチドの修飾及び凝集を導入したと結論付けることができた。

【0148】

改善された化学修飾手順についての条件が発見された。驚くべきことに、これらの条件は、緩衝液の交換及びスルファミダーゼの反応性アルデヒド中間体への長時間の曝露を省略して、エチレングリコール反応停止工程の直後に還元工程を実施できることを促進した。新規化学修飾手順を図1B、図1C及び図1Dに示す。

【0149】

実施例5：

新規方法に従って修飾されたスルファミダーゼの分析

【0150】

材料と方法

実施例4の新規方法に従って修飾されたスルファミダーゼを以下の分析に供した。

【0151】

S D S - P A G E 分析：既知の方法（実施例2）並びに新規方法1及び2（実施例4）に従って修飾した5μgのスルファミダーゼを、実施例3の記載に従って個別のウェルに充填した。同様に、新規方法1（実施例4）並びに新規方法3、4及び5に従って修飾した5μgのスルファミダーゼを、実施例3の記載に従って個別のウェルに充填した。

【0152】

サイズ排除クロマトグラフィー（S E C）による分析：新規方法1～4に従って修飾されたスルファミダーゼを、実施例3に従って分析用サイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。

【0153】

動的光散乱（D L S）分析：新規方法1に従って修飾されたスルファミダーゼを実施例3に従ってD L Sにより分析した。

【0154】

活性部位の保存：実施例3の記載に従って、新規方法1～5並びに第2の調査された反応停止工程に従って製造されたスルファミダーゼの活性部位に対する化学修飾の影響を調査した。

【0155】

結果

S D S - P A G E 分析：新規化学修飾法1の結果として、全長スルファミダーゼとは異なるサイズのいくつかのペプチドが形成された（図2B）。しかし、既知の方法に従って修飾されたスルファミダーゼと比較して、新規方法1は、より少ないフラグメント化を生じた。C末端アミノ酸434～482として同定されたフラグメント#1（図2A）は、新規方法1、3及び4によって生成されたスルファミダーゼ試料では検出されず、他のフラグメント量が大幅に減少した。この傾向は、新規方法2によって生成された物質におい

10

20

30

40

50

てさらに顕著であった。しかしながら、新規方法2では、ゲル上により高分子量の形態が存在し、還元剤の量が酸化工程で生成される全ての反応性アルデヒドを還元するのに不十分であることを示唆している（データは示さず）。新規方法3、4及び5は、新規方法1によって産生されたものと類似した修飾スルファミダーゼ物質を産生した（データ示さず）。

【0156】

従って、新規方法によって調製されたスルファミダーゼポリペプチドの鎖切断は、実施例2に従って調製されたスルファミダーゼにおける鎖切断の発生と比較して制限される。

【0157】

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による分析：新規方法1に従って修飾されたスルファミダーゼは、既知の方法によって修飾されたスルファミダーゼと比較して凝集体が少ないことが見出された。これは、図3のクロマトグラムで実証されており、高分子量の形態がクロマトグラムにプレピークとして存在している。図3Bのプレピークのピーク高さは、メインピーク高さに対して0.5%であり、図3Aのピーク高さ（3%）と比較して減少している。これは、新規方法3、4及び5によって修飾されたスルファミダーゼの場合にも当てはまる（データ示さず）。

【0158】

動的光散乱（DLS）分析：DLS分析（図4B）は、SEC分析の結果を確認した。新規方法に従って製造されたスルファミダーゼは、高分子量形態（ 10^{10} kDa以上）で5%のタンパク質を含有した。従って、スルファミダーゼの凝集形態の形成は、公知の方法と比較して新規方法によって制限されると結論づけることができた（実施例3参照）。

【0159】

活性部位の保存：スルファミダーゼの活性部位における位置50のFGlyからSerへの還元をLC-MS/MSによって決定し、FGly及びSerを含有するトリプシンペプチドを陽性に同定した。ペプチドフラグメントの相対量を、二重荷電イオンの再構成イオンクロマトグラムからのピーク面積（イオン化効率の補正なし）を測定することによりLC-MSで分析した。化学修飾のために実施例4で使用された方法から生成された試料を調製し分析した。（表2）

【0160】

【表2】

表2. 活性部位におけるFGlyからSerへの変換

スルファミダーゼの化学的修飾	Ser形成 (%)	FGly/Ser比
無し	0	
新規方法1	45.4 ± 0.9 (n=3)	1.2
新規方法2	11.5 ± 1.3 (n=3)	7.7
新規方法3	44.1 ± 2.0 (n=2)	1.2
新規方法4	36.1 (n=1)	1.6
新規方法5	41.7 ± 1.1 (n=2)	1.4

【0161】

活性部位FGlyの欠損は、新規方法によってかなり制限される。スルファミダーゼ上のグリカン修飾を新規方法は、既知の方法を用いた56%（表1、実施例3参照）から、45%、44%、36%及び42%（それぞれ新規方法1、3、4及び5、表2）までSer形成量を有意に減少させた。新規方法2のSer形成は約11%であり、従ってFGlyのSerへの変換は水素化ホウ素ナトリウム濃度に大きく依存することが示された。

【0162】

反応の第2反応停止工程は、反応を停止させることなく生成されたスルファミダーゼに匹敵する修飾スルファミダーゼを提供した（新規方法1に従って生成された修飾スルファミダーゼは、第2反応をアセトンで反応停止した後、43%Ser形成と比較して、45%Ser形成であった）。これは、新規方法5によってさらに確認され、これもまた、反応停止工程を包含する。

【0163】

実施例6：

インビトロでの受容体媒介エンドサイトーシス

【0164】

材料と方法

スルファミダーゼは、実施例1、2及び4に記載のように調製され、Quattromed Cell Factory (QMC F) エピソーム発現系 (Icosagen AS) で産生し、公知の方法及び新規方法1及び2に従って修飾した。エンドサイトーシスはM6P受容体を発現するMEF-1線維芽細胞で評価した。MEF-1細胞を、75nMのスルファミダーゼを補充したDMEM培地中で24時間インキュベートした。細胞をDMEMで2回、0.9%NaClで1回洗浄した後、1%Triton X100を用いて細胞溶解した。溶解物スルファミダーゼ活性及び総タンパク質含量を決定し、溶解物比活性を計算した。活性は、14.5mMジエチルバルビツール酸、14.5mM酢酸ナトリウム、0.34% (w/v) NaCl、及び0.1%BSA中の基質として、0.25mM 4メチルウンベリフェリル- α -D-N-スルホグルコサミニドを用いて、460nmの蛍光強度でモニターした。全タンパク質濃度は、標準としてBSAを含むBCAキット (Pierce) を用いて測定した。データは、平均 $\pm$ SD (n=4) として示される。

【0165】

結果

エンドサイトーシスアッセイで評価された全ての調製物について、細胞ホモジネート中でスルファミダーゼ活性を検出することができた。既知の方法並びに新規の方法1及び2によって調製された修飾スルファミダーゼは、非修飾組換えスルファミダーゼで得られたものの10%未満の細胞ホモジネートで特異的活性を示した（図5）。スルファミダーゼとともに最初にロードされ、次いでスルファミダーゼの非存在下で2日間増殖された細胞に保持された活性は、化学修飾がリソソームの安定性に悪影響を及ぼさないことを示す全ての調製物と同等であった。

【0166】

従って、化学修飾により、M6PRとしてのグリカン認識受容体に対するエピトープの除去の結果、スルファミダーゼの細胞への取り込みが起これにくくなると結論付けることができる。巨視的レベルでは、この分子相互作用の喪失は、静脈内投与された場合に、血漿からのクリアランスの減少につながる。タンパク質クリアランスの減少は、患者への投与頻度を低減することが可能となる。

【0167】

実施例7：

新規方法1により製造された修飾スルファミダーゼのインビボ血漿クリアランス

【0168】

材料と方法

実施例1に記載のように、Quattromed Cell Factory (QMC F) エピソーム発現系 (Icosagen AS) で産生し、実施例4の新規方法1に従って修飾した、未修飾及び修飾組換えスルファミダーゼの血漿クリアランス (CL) をマウス (C57BL/6J) で調べた。マウスに、10mg/kgのスルファミダーゼ及び10mg/kgの修飾スルファミダーゼを尾静脈に単回静脈内投与した。スルファミダーゼ及び修飾スルファミダーゼを2mg/mLで処方し、5mL/kgで投与した。投与後24時間までの異なる時点（時間点あたり3匹のマウス）で、血液サンプルを静脈伏在静

脈又は大静脈から採取した。血液を氷上に保存したEDTAチューブに集め、血漿を遠心分離によって調製した。スルファミダーゼ及び修飾スルファミダーゼの血漿レベルをECLにより分析した。血漿クリアランスは、WinNonlinソフトウェアバージョン6.3（非コンパートメント分析、Phoenix、Pharsight Corp.、USA）を用いて計算した。

【0169】

電気化学発光（ECL）イムノアッセイによるスルファミダーゼ及び修飾スルファミダーゼの定量：血漿中のスルファミダーゼ及び修飾スルファミダーゼPKサンプルを、Meso Scale Discovery（MSD）プラットフォームを用いたECLイムノアッセイにより決定した。ストレプトアビジン被覆MSDプレートをPBS中の5%ブロッカーAでブロックした。プレートを洗浄し、標準及びPKサンプルの異なる希釈液をプレートに分注した。ビオチン化抗スルファミダーゼマウスモノクローナル抗体とSulfo-Ru-標識ウサギ抗スルファミダーゼ抗体との混合物を加え、プレートを室温でインキュベートした。スルファミダーゼ及び標識抗体の複合体は、ビオチン化mAbを介してストレプトアビジン被覆プレートに結合する。洗浄後、ウェルに読み取り緩衝液を添加することによって結合複合体量を決定し、プレートをMSD SI 2400装置で読み取った。記録されたECLカウントは、試料中のスルファミダーゼの量に比例し、比較のスルファミダーゼ標準に対して評価した。

【0170】

結果

修飾スルファミダーゼのマウスにおける血漿クリアランスは、未修飾スルファミダーゼと比較して約10倍低かった（下記表3参照）。これはおそらく、少なくとも部分的に、スルファミダーゼの化学修飾後の末梢組織における受容体媒介性取り込み阻害によるものであろう（実施例6の細胞摂取試験において実証される）。

【0171】

実施例1の安定細胞株で産生され、実施例4の新規方法3に従って修飾された修飾スルファミダーゼに対して得られたマウスのクリアランスに関するデータは、QMCFシステムで産生され、新規方法1によって修飾された修飾スルファミダーゼに対して表3に提示されたデータと一致した。タンパク質のクリアランスが減少することにより、患者への投与回数が減少させる可能性がある。

【0172】

【表3】

表3. スルファミダーゼ及び修飾スルファミダーゼの血漿クリアランス

試験物	用量 (mg/kg)	血漿 CL (L/(h·kg))
スルファミダーゼ（配列番号2）	10	0.17
修飾スルファミダーゼ(新規方法1、配列番号2)	10	0.014

【0173】

実施例8：

脳へパラン硫酸蓄積に対する修飾スルファミダーゼのインビボ効果

【0174】

材料及び方法

インビボでの脳へパラン硫酸蓄積に関し、実施例1に記載のようにQuattro Med Cell Factory（QMCF）エピソード発現系（Icosagen AS）で産生し、実施例4の新規方法1に従って修飾した修飾スルファミダーゼの静脈内（iv）投与の効果を調べた。

【0175】

試験物の調製：修飾スルファミダーゼを6mg/mLで調製し、滅菌濾過し、使用するまで-70℃で凍結させた。凍結修飾スルファミダーゼ及び対応するビヒクル溶液を、注射する日に使用前に室温で最低1時間、最高2時間解凍した。クロロフェニラミンを等張食塩水に0.5mg/mLの濃度で溶解し、-20℃で保存した。

【0176】

動物：mps3a遺伝子に自発的ホモ接合突然変異を有する雄マウス、B6.Cg-Sgsh^{mps3a}/PstJ(MPS IIIA)(Jackson Laboratories、ME、USA)を使用した。動物は23±1℃及び湿度40～60%のケージに単独で飼育し、水及び標準実験室用飼料を自由に摂取した。12時間/12時間の明/暗サイクルは、午後7時に点灯するように設定した。研究を開始する前に、動物を少なくとも2週間調整した。同じ育種単位由来の野生型兄弟を対照として含めた。研究Aでは、マウスは23～24週齢であったが、研究Bではマウスは9～10週齢であった。

【0177】

実験手順研究A：30mg/kg(n=8)及びビヒクル(n=7)の修飾スルファミダーゼを、MPS IIIAマウスに25日間、2日に1度(13回の注射)静脈内投与した。修飾スルファミダーゼ又はビヒクルの投与の30～45分前に、クロロフェニラミンを皮下投与した(2.5mg/kg)。投薬は、朝の7時頃に開始した。試験品及びビヒクルを5mL/kgで投与した。最終投与量は、各投与機会において実際の体重に対して補正した。このスキームはビヒクルにも繰り返した。この試験は、最後の注射の2時間後に終了した。未処置の月齢が一致した野生型マウス(n=5)を、試験物質処置群と併せて含めた。マウスをイソフルランで麻酔した。血液は後眼窩叢から採取した。灌流後、心臓の左心室に20mLの生理食塩水を流した。組織を解剖(脳、肝臓、脾臓、肺、及び心臓)し、秤量し、液体窒素中で急速に凍結させた。組織及び血液は、LC-MS/MSを用いてヘキソサミンN-硫酸[α-1, 4]ウロン酸(HNS-UA)レベルを測定するために調製した。HNS-UAはヘパラン硫酸蓄積の二糖マーカーであり、従ってHNS-UAレベルの減少はヘパラン硫酸の分解を反映する。HNS-UAデータは、mg組織当たりで表され、対照群の平均に対して標準化し、相対的単位対内部標準で計算した。全体的な有意性が、グループ間の有意性の試験のためのBonferroniの多重比較事後検定でも実証された場合、データは一元配置ANOVA検定によって分析した(*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001)。

【0178】

実験手順研究B：30mg/kg(n=6)、10mg/kg(n=6)の修飾スルファミダーゼ及びビヒクル(n=6)をMPS IIIAマウスに週1回10週間(10回)静脈内投与した。修飾スルファミダーゼ又はビヒクルの投与の30～45分前に、クロロフェニラミンを皮下投与した(2.5mg/kg)。最終投与量は、各投与機会において実際の体重に対して補正した。このスキームをビヒクルにも繰り返した。研究は最後の注射の24時間後に終了した。未処置の月齢が一致した野生型マウス(n=6)を、試験物処置群と併せて含めた。マウスをイソフルランで麻酔した。血液は後眼窩叢から採取した。灌流後、心臓の左心室に20mLの生理食塩水を流した。組織を解剖(脳、肝臓、脾臓)し、秤量し、液体窒素中で迅速に凍結させた。LC-MS/MSを用いてHNS-UAレベルを測定するために組織及び血液を調製した。HNS-UAデータは、mg組織当たりで表し、対照群の平均に対して標準化し、相対的単位対内部標準で計算した。全体的な有意性が、グループ間の有意性の試験のためのBonferroniの多重比較事後検定でも実証された場合、データは一元配置ANOVA検定によって分析した(*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001)。

【0179】

組織試料のHNS-UAのLC-MS/MS分析：組織試料中のヘキソサミンN-硫酸[α-1, 4]ウロン酸(HNS-UA)の液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)分析は、Fullerら(Pediatr Res 56:733-

10

20

30

40

50

738 (2004)) 及び Ramsay ら (Mol Genet Metab 78:193-204 (2003)) に記載された方法に従って部分的に実施した。Lysing Matrix D 装置 (MP Biomedicals、LCC、Ohio、US) を用いて、基質緩衝液 (29 mM ジエチルサルベツール酸、29 mM 酢酸ナトリウム、0.68% (w/v) NaCl、100 mL 水、pH 6.5) 中でホモジナイズした。Savant Fast Prep FP120/Bio101 ホモジナイザー (LabWrench、ON、Canada) で 25 秒間ホモジナイズし、ホモジネートを 10000 rpm にてエッペンドルフ遠心分離機 5417R で遠心分離した。上清を蒸発乾固させた。150 µL の誘導化溶液 (250 mM の 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン (PMP)、400 mM の NH₃、pH 9.1) 及び内部標準コンドロイチン二糖 Δジ-4S ナトリウム (ΔUA-GalNAc4S、0.1 mg/mL) ストック溶液を添加した。誘導は、70 °C で 90 分間攪拌した後、溶液を 200 µL の 800 mM ギ酸で酸性化した。脱イオン水を試料に加えて最終容量 500 µL とし、抽出をクロロホルム (3×500 µL) で行い、過剰の PMP を除去した。遠心分離を 13000×g で 5 分間行い、上相を新しいバイアルに移した。過剰のギ酸及び NH₄COOH を除去するために、水相をスピードバック (Savant Instruments Inc.、Farmingdale、NY) で蒸発乾固させた。サンプルを合計 100 µL の 5% アセトニトリル/0.1% 酢酸/0.02% TFA に再構成した。

10

【0180】

LC-MS/MS 分析は、Sciex API 4000 三重四重極質量分析計に連結した Waters Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) で行った。機器の制御、データの取得と評価は Analyst ソフトウェアで行った。

20

【0181】

Acquity C18 CSH カラム (50×2.1 mm、1.7 µm) を用いて LC 分離を行った。移動相 A は 5% アセトニトリル/0.5% ギ酸から成り、移動相 B は 95% アセトニトリル/0.5% ギ酸から構成された。7 分間で 1%~99% B の勾配を流速 0.35 mL/分 で使用した。注入量は 10 µL であった。API 4000 は、エレクトロスプレー陰イオン多重反応モニタリング (MRM) モードで操作した。イオンスプレー電圧は 4.5 kV で動作し、ソース温度は 450 °C であった。アルゴンを衝突ガスとして使用した。衝突エネルギーは 34 V であった。MRM 遷移は 764.4/331.2 (PMP-HNS-UA) 及び 788.3/534.3 (PMP-内部標準) であった。HNS-UA の相対量は、内部標準のレベルに対して計算した。

30

【0182】**結果**

図 6A に示される研究 A の結果は、新規方法 1 に従って修飾されたスルファミダーゼが、30 mg/kg の用量で 25 日間、1 日おき (13 回) に静脈内投与を繰り返した後に脳内の HNS-UA のレベルを 30% 減少させることを示している。

【0183】

さらに、修飾スルファミダーゼによる処理は、肝臓 (図 6B) 及び肺 (図示せず) における HNS-UA レベルを完全に消失させた。

40

【0184】

研究 B の結果は図 6C に示されており、新規方法 1 による修飾スルファミダーゼは、週 30 mg/kg 及び 10 mg/kg で 10 週間それぞれ繰り返し静脈内投与した後、脳内の HNS-UA レベルを 48% 及び 14% 減少させることを示している。

【0185】

従って、これらの結果は、本明細書に記載の新規方法 1 に従って修飾されたスルファミダーゼタンパク質が、長期治療後に、脳における HNS-UA レベルの堅牢な低下、並びに末梢器官における HNS-UA レベルの本質的に完全な低下を引き起こすことを実証する。

50

【0186】

実施例9：

スルファミダーゼ修飾の最適化

【0187】

化学修飾工程は、酸化工程が第1工程であり（以下ではR1と称される）、還元が第2工程である（R2で表される）2つの部分に分けられる。2つの工程を最適化するために、2つの工程の温度、濃度、及び時間の影響を調べる完全な設計の実験（D o E）を設定した。

【0188】

材料及び方法

Quattromed Cell Factory (QMCF) エピソーム発現系 (Icosagen AS) において実施例1に記載のように製造したスルファミダーゼは、新規方法1に関して本質的に実施例4に記載したように修飾したが、調査するパラメータは、表4（以下）に従って変化させた。R1の調査は、実施例4（方法1）に記載されていると同様の減少及びパラメータ精密検査（work-up）を実施した。分析のエンドポイントは、実施例1に記載されたグリカンの酸化の程度、及び実施例6に記載の修飾タンパク質の細胞取り込みのレベルである。

【0189】

【表4】

表4：R1及びR2中で変えたパラメータ

変数	R1	R2
T (°C)	0, 8, 22	0, 8, 22
t (分)	30, 60, 120	30, 60, 120
c (mol/L)	10, 20, 40	1.2x(R1のc)、2.5x(R1のc)、5x(R1のc)

【0190】

パラメータの数及び選択された設計のタイプにより、各工程について10回の実験が行われ、その結果はMODDE 10ソフトウェア (Umetrics AB) を用いて評価した。

【0191】

さらに、第2の反応停止工程の影響を、R1パラメータ8°C、60分及び20mMのメタ過ヨウ素酸ナトリウムで生成したスルファミダーゼについて試験した。D o E実験と並行して2つのさらなる反応を行い、0.1Mアセトンを用いて、又はpH6.0以下になるまで酢酸を添加することによって反応停止した。最後の精密検査は、他の反応のスキームに従った。このようにして製造されたスルファミダーゼを、実施例5に記載のSDS-PAGE法を用いて評価した。

【0192】

R2実験は、R1のD o E分析後に最適であることが判明したパラメータに従って修飾されたスルファミダーゼを用いて行った。

【0193】

結果

R1の結果を以下の表5に要約する。

【0194】

【表 5】

表 5 : R 1 実験及び結果

変化させたパラメータ			残存する元の (天然) N-グリカン (%)				細胞取込み
T (° C)	t (分)	c (mmol/L)	N(21)	N(131)	N(244)	N(393)	非修飾スルファミダーゼ取り込み %
0	30	10	0	0.9	0	0	12
0	120	10	0	0.4	0	0	9.5
22	30	10	0	0.2	0	0	7.1
22	120	10	0	0.1	0	0	8.5
0	30	40	0	0.3	0	0	3.8
0	120	40	0	0.1	0	0	3.5
22	30	40	0	0.1	0	0	2.7
22	120	40	0	0.01	0	0	3.5
8	60	20	0	0.2	0	0	6.1
8	60	20	0	0.2	0	0	6.5

【0195】

さらに、実施例 1 によるグリコシル化分析は、既知の方法に従って修飾されたスルファミダーゼについて実施した。残存する元の N-グリカンは、N-グリコシル化部位 N (21)、N (131)、N (244) 及び N (393) で検出されなかった。

【0196】

R 1 (酸化) の MODDE 評価は、約 8 °C の温度、約 1 時間の反応持続時間及び約 10 mmol / L のメタ過ヨウ素酸ナトリウムの濃度で R 1 に最適性を示した。タンパク質全体の健康状態 (例えば、構造的完全性) は、グリカン認識受容体を介した細胞取り込みを新規方法 1 のレベルに制限する、可能な限り低い酸化剤濃度より利益を得るようである (詳細については実施例 6 を参照)。

【0197】

R 1 反応時間に関して開示された種々の条件が、グリカン修飾の程度の重要なパラメータと考えられた。さらに、過ヨウ素酸濃度は、グリカン修飾の程度に影響を及ぼし得る。

【0198】

従って、R 2 (還元) 設計は、R 1 についての上記同定された好ましいパラメータを使用した。すなわち、スルファミダーゼの酸化に使用した。R 2 の重要な終点は、修飾スルファミダーゼの活性に影響を及ぼすことが判明している (実施例 3 及び 5 参照)、F G l y 含量である。結果は下記の表 6 を参照のこと。F G l y 50 及び S e r 50 を含有するペプチドフラグメントの相対量を、L C - M S を用いて再構成されたイオンクロマトグラム (イオン化効率の補正なし) からピーク面積を測定することによって分析した。

【0199】

【表 6】

表 6. R2 及び確認実験の D o E の概要

変化させたパラメータ			活性部位	
t (min)	T (° C)	c (mmol/L)	Ser 形成 (%)	FGly/Ser 比
30	0	12	10	9.0
90	0	12	11	8.1
30	22	12	15	5.7
90	22	12	17	4.9
30	0	50	40	1.5
90	0	50	50	1.0
30	22	50	64	0.6
90	22	50	72	0.4
60	8	25	42	1.4
30	0	20	25	3.0
30	0	50	45	1.2
60	0	15	15	5.7
60	0	25	33	2.0
60	8	12	15	5.7
60	8	50	62	0.6

【0200】

R2 の D o E は、S e r 形成が水素化ホウ素ナトリウムの濃度及び温度に関連することを示した。S e r 形成及び高分子量形態の存在を考慮に入れると（データは示さない、結果は実施例 4 の新規方法 2 について得られたものと類似している）、R2 の好ましい条件は、約 0 °C の温度、反応時間が約 1 時間以下、及び水素化ホウ素ナトリウム濃度が 12 mmol/L 超 50 mmol/L 以下であることが好ましい。

【0201】

還元工程が反応停止された反応で生成されたスルファミダーゼが、反応停止なしで生成されたスルファミダーゼに匹敵することが SDS-PAGE（データ示さず）で確認された。これは、0.1 M アセトンで反応停止すること、又は酢酸を添加して pH 6 未満に低下させることによる第 2 の反応停止工程の導入が、材料の品質に悪影響を及ぼさないことを示す。

【0202】

実施例 10：

既知の方法によるスルファミダーゼの化学修飾後のグリカン構造解析

【0203】

材料と方法

既知の方法による化学修飾：既知の方法によるスルファミダーゼの化学修飾は、実施例 2 に記載したように実施した。

【0204】

グリコシル化分析：化学修飾後のスルファミダーゼ上のグリカン構造の分析を、実施例 1 に記載の LC-MS 法に従って実施した。

【0205】

実施例 1 に記載された N グリコシル化部位 N (21)、N (131)、N (244) 及び N (393) を含む 4 つのトリプシンペプチド断片上のグリカン部分の得られた修飾を LC-MS 分析によって調べた。

【0206】

結果

グリコシル化分析：実施例1に記載したように、化学修飾前の4つのグリコシル化部位に見出されるグリコシル化のタイプは、主にN(21)及びN(393)上では複合型グリカン、及び、N(131)及びN(244)上ではオリゴマンノース型グリカンであった。

【0207】

化学修飾の後、最も豊富に化学的に修飾された糖ペプチド上に対し、修飾されたグリカン構造の詳細な特徴付けを実施した（化学的に修飾した後のグリカンの不均一性が増加した結果、有意な感度の低下が理由でグリカンは検出されなかった）。この実施例では、既知の方法による化学修飾後のMan-6グリカンの修飾が調べられる。

10

【0208】

グリカンの過ヨウ素酸塩処理は、炭水化物部分の2つの隣接するヒドロキシル基間の炭素結合を切断し、グリカン鎖の分子量を変化させる。図8Aは、化学修飾後のマンノースの予想される結合切断の例を示す。図8Bは、過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化後に起こりうる理論的な結合切断を示すMan-6グリカンのモデルを示す。

【0209】

図9には、既知の方法による化学修飾の前後に、N(131)に結合したMan-6グリカンを持つトリプシンペプチドNITR(T13+Man-6グリカン)の質量スペクトルが示されている。様々な程度の結合切断を持つ化学修飾された糖ペプチドに対応するイオンが同定された。Man-6グリカンについては、理論的には、最大で3個の二重結合切断及び1個の単結合切断があり得る。修飾が既知の方法に従って行われた場合、マスマススペクトルにおいて最も強いイオンシグナルは、2重結合切断及び2個の単結合切断に対応し、一方で2番目に強いイオンシグナルは3個の二重結合切断及び1個の単結合切断に相当することが見出され、それらは、最も可能性のある広範囲な結合切断である。既知の方法に従って化学修飾後のT13+Man-6グリカンに見られる結合切断の程度を可視化する図を図10Aに示す（観察されたイオンからの同位体分布により、結果は近似的であるが比較可能である）。化学修飾の再現性は、以前に知られている方法に従って製造された化学的に修飾されたスルファミダーゼの3つの異なるバッチを用いて試験された。異なる程度の結合切断に対応するイオンは、3つの異なるバッチからのMSスペクトルにおいて非常に類似した分布を示した。

20

30

【0210】

実施例11：新規方法1、3及び4によるスルファミダーゼの化学修飾後のグリカン構造の分析

【0211】

新規方法1、3及び4：新規方法によるスルファミダーゼの化学修飾を、実施例4の記載のように実施した。

【0212】

グリコシル化分析：グリコシル化分析は、実施例1に記載のLC-MS法に従って実施した。Nグリコシル化部位N(21)、N(131)、N(244)及びN(393)を含む4つのトリプシンペプチド断片のグリカン変異体上の得られる修飾をLC-MS分析によって調べた。

40

【0213】

結果

グリコシル化分析：新規方法1、3及び4に従って化学的に修飾されたスルファミダーゼ上の修飾されたグリカンプロファイルの詳細な特徴付けを、最も豊富に化学的に修飾された糖ペプチドに対して実施した。この実施例11では、新規方法1、3及び4による化学修飾後のMan-6グリカンの修飾を調べた。

【0214】

様々な程度の結合切断を伴う化学的に修飾された糖ペプチドT13+Man-6グリカ

50

ンに対応するイオンが同定された。理論的には、最大で3個の二重結合切断及び1個の単結合切断が存在し得る（図8B参照、Man-6グリカンのモデルは、過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化後に起こり得る結合切断を示す）。修飾を新規方法1に従って行った場合、質量スペクトルにおける最も強いイオンシグナルは、1つの二重結合切断及び3つの単結合切断に対応することが見出され、2番目に強いイオンシグナルは、2つの二重結合切断及び2つの単結合が切断に対応することが見出された。新規方法3及び4に従って修飾を行った場合、Man-6グリカンの結合切断は、さらに優先的に単結合切断へとシフトした。図10Aには、化学修飾後のトリプシンペプチドT13+Man-6グリカンの結合切断の程度を視覚化する図を示す。

【0215】

化学的修飾の再現性は、化学的に修飾されたスルファミダーゼのトリプリケート（新規方法1）又はデュプリケート（新規方法3）を使用することによって試験した。

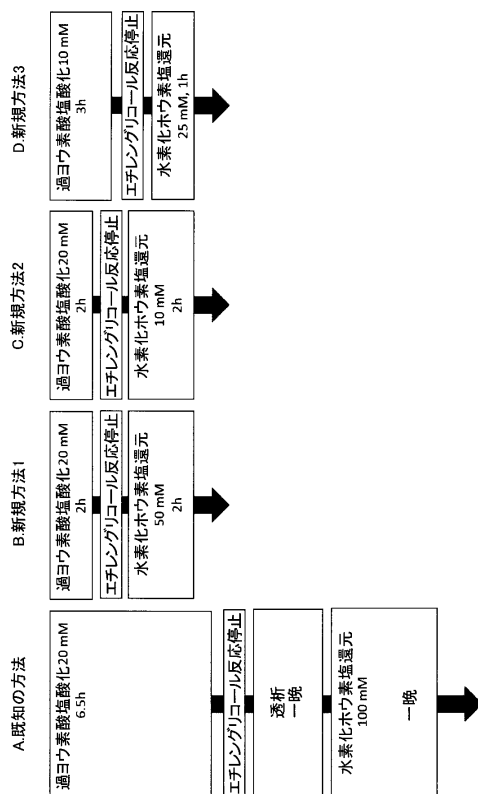
【0216】

既知の方法に従って化学的に修飾されたスルファミダーゼに由来するMan-6グリカン修飾と、新規方法1、3及び4に従って化学的に修飾されたスルファミダーゼに由来するMan-6グリカン修飾とを比較すると、結合切断の程度に大きな違いがあった。これは図10Aに示されており、異なる程度の結合切断の分布が4つの方法についてプロットされている（観察されたイオンからの同位体分布のため、結果は近似的であるが比較可能である）。

【0217】

図10Bは、使用された方法に対する単結合切断の相対的存在量を示す。既知の方法は、調べられたMan-6グリカン中に45%の単結合切断を有する修飾スルファミダーゼを提供するが、新規方法1、3及び4は、化学修飾後にそれぞれ70、80及び82%を有する。

【図1】



【図2A】

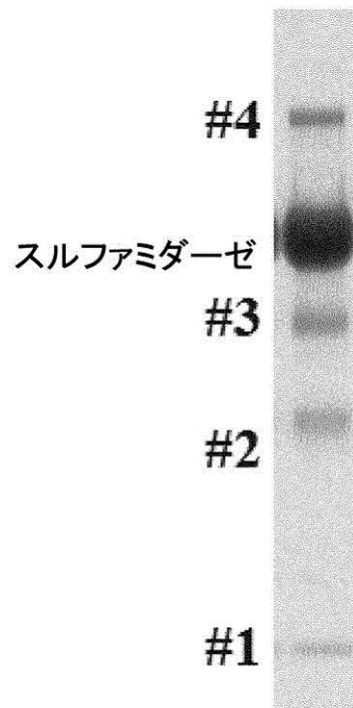
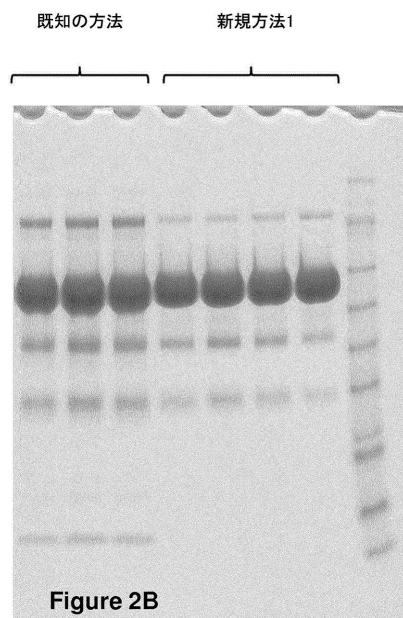
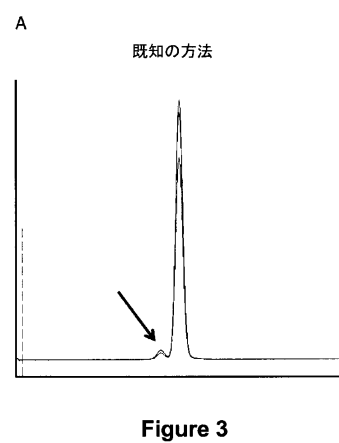


Figure 2A

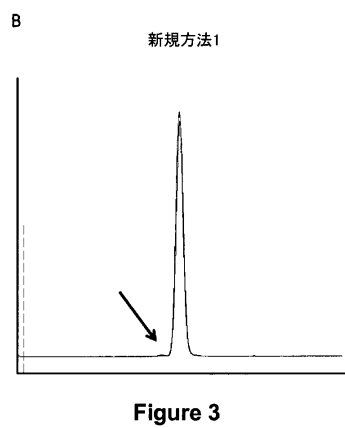
【図 2 B】



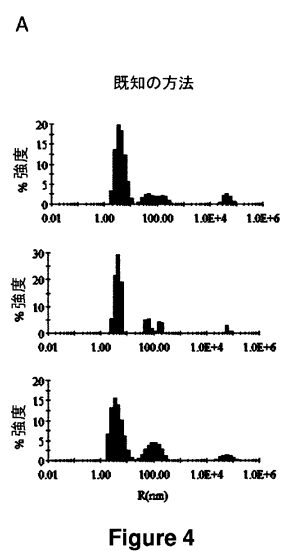
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 4 A】



【図 4 B】

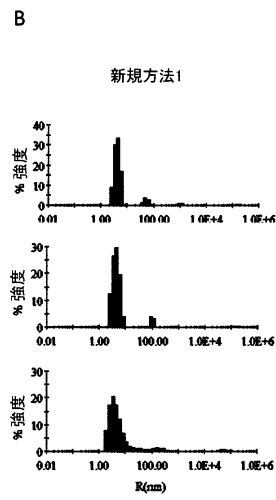


Figure 4

【図 5】

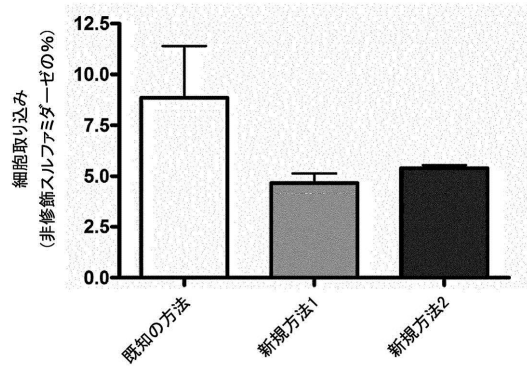


Figure 5

【図 6 A】

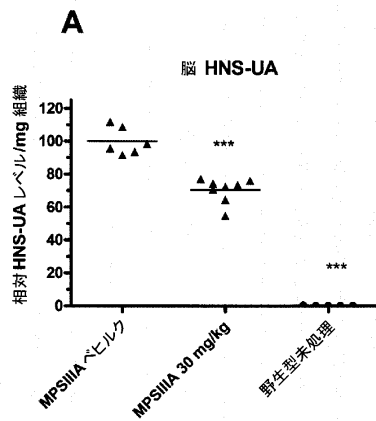


Figure 6

【図 6 B】

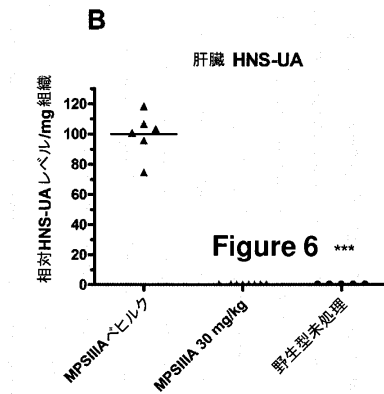


Figure 6

【図 6 C】

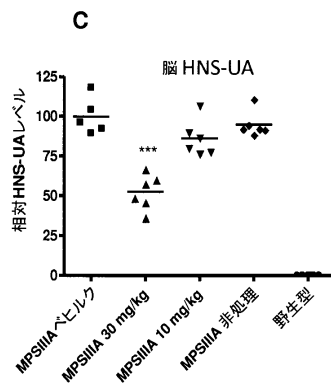


Figure 6

【図 7】

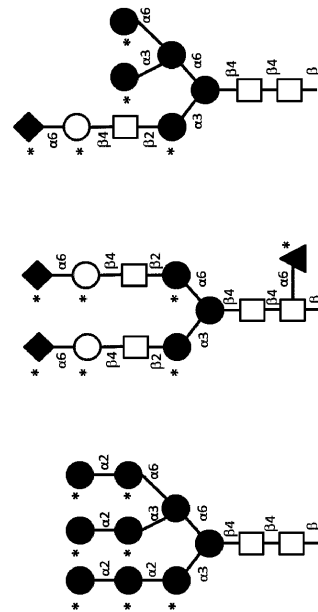


Figure 7

【図 8 A】

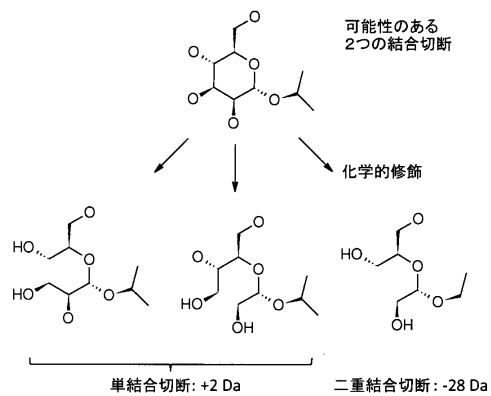


Figure 8A

【図 8 B】

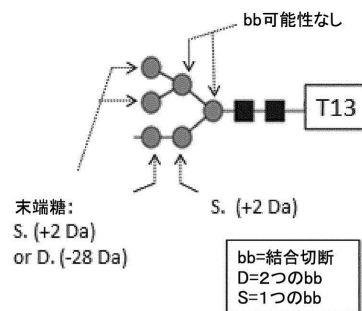


Figure 8B

【図 9】

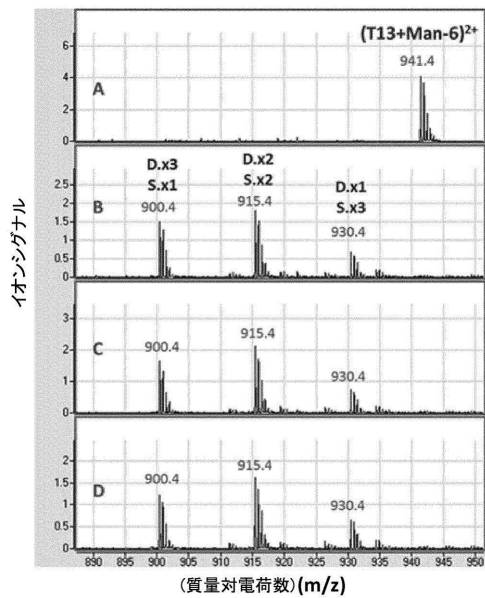


Figure 9

【図 10 A】

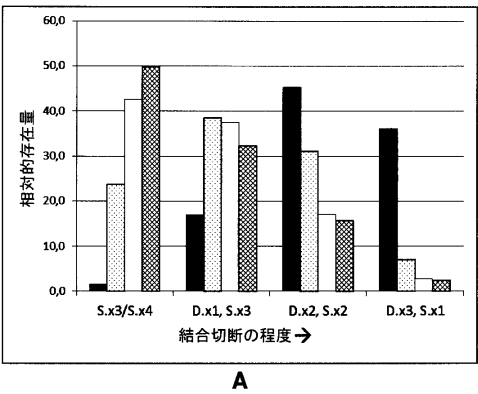


Figure 10

【図 10 B】

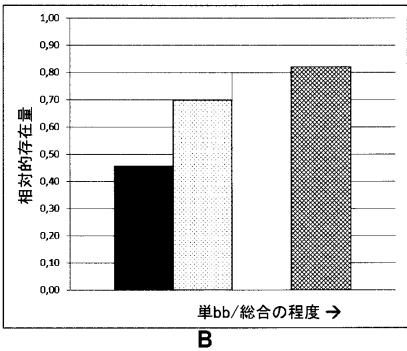


Figure 10

【図 11】

配列番号	アミノ酸配列	名称
1	RPRLALLLADGGFESGAYNNISAATPHLDALARRSLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHNG MYGLHQDVHHFNSFDKVRSLPLLSQAGVTRIGIKKHGVPETVYPDFAYTEENGSLVQVGRNTRI KLLVRKFLQTDQDRPFLLYAFHDPHRCGHSQPGYGTCEKFGNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDV LVPYVPNTPAARADLAQYTTVGRMDQGVGLVQLERDAGVLDLTVFTSDNGIPFSGRTNLYW PGTAEPVLLVSSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPITLDWFSIPYPSYAFGSKTHLTGRSLPALEAE LWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLLVNLNFKMPPIQODFYSPFTQDOLLNRTTAGQPTG WYKDLRHHYYRAREWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV LEEKLSPQCQPLHNEL	PBV2351
2	GSRPRNALLLADGGFESGAYNNISAATPHLDALARRSLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHNG NGMYGLHQDVHHFNSFDKVRSLPLLSQAGVTRIGIKKHGVPETVYPDFAYTEENGSLVQVGRNTRI KLLVRKFLQTDQDRPFLLYAFHDPHRCGHSQPGYGTCEKFGNGESGMGRIPDWTPQAYDPL DVLVYVPNTPAARADLAQYTTVGRMDQGVGLVQLERDAGVLDLTVFTSDNGIPFSGRTNLYW YWFGTAEPVLLVSSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPITLDWFSIPYPSYAFGSKTHLTGRSLPALEAE EPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLLVNLNFKMPPIQODFYSPFTQDOLLNRTTAGQPTG TGWYKDLRHHYYRAREWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPD GVLEEKLSPQCQPLHNEL	pBV1968
3	RPRLALLLADGGFESGAYNNISAATPHLDALARRSLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHNG MYGLHQDVHHFNSFDKVRSLPLLSQAGVTRIGIKKHGVPETVYPDFAYTEENGSLVQVGRNTRI KLLVRKFLQTDQDRPFLLYAFHDPHRCGHSQPGYGTCEKFGNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDV LVPYVPNTPAARADLAQYTTVGRMDQGVGLVQLERDAGVLDLTVFTSDNGIPFSGRTNLYW PGTAEPVLLVSSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPITLDWFSIPYPSYAFGSKTHLTGRSLPALEAE LWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLLVNLNFKMPPIQODFYSPFTQDOLLNRTTAGQPTG WYKDLRHHYYRAREWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV LEEKLSPQCQPLHNELGS	pBV1803

Figure 11

【配列表】

0006594896000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100197169

弁理士 柴田 潤二

(72)発明者 カルロッタ パーリハルド

スウェーデン国, エス-113 39 ストックホルム, トムテボガタン 10

(72)発明者 エーリク ノルディング

スウェーデン国, エス-182 35 ダンデリェド, スポーツトゥゲベーゲン 14アー

(72)発明者 ステファン スベンソン ゲリウス

スウェーデン国, エス-125 53 エルブシェ, セーゲルトープスベーゲン 48

(72)発明者 アグネータ シャーンバリ

スウェーデン国, エス-112 21 ストックホルム, クングショルムストルグ 11

審査官 堂畑 厚志

(56)参考文献 国際公開第2008/109677 (WO, A1)

特表2014-507934 (JP, A)

国際公開第2011/154520 (WO, A1)

Experimental Neurology, 2011年, vol. 230, p. 123-130

the Journal of Biological Chemistry, 1998年, vol. 273, no. 11, p. 6096-6103

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 9/00-9/99

C07K

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)