



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103261432 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 21

(21) 申请号 201180057453. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 09. 29

C12P 19/26 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/387, 924 2010. 09. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 05. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2011/002780 2011. 09. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02012/042387 EN 2012. 04. 05

(71) 申请人 奥克西雷恩英国有限公司

地址 英国曼彻斯特

申请人 VIB 研究所

根特大学

(72) 发明人 K. C. T. A. M. 派恩斯 W. 弗维肯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

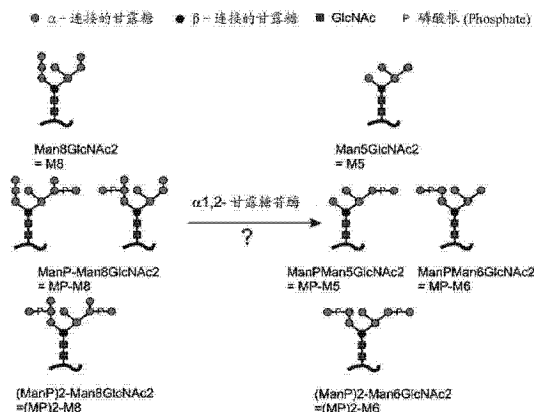
权利要求书1页 说明书26页 附图18页

(54) 发明名称

磷酸化的 N- 聚糖的脱甘露糖基化

(57) 摘要

描述了用于使糖蛋白上的磷酸化的 N- 聚糖脱甘露糖基化的方法, 其使用能够在下层甘露糖被磷酸化时水解末端 alpha-1, 2 甘露糖连接的甘露糖苷酶进行。



1. 一种用于使糖蛋白上的磷酸化的 N- 聚糖脱甘露糖基化的方法,所述方法包括:
 - a) 提供所述具有磷酸化的 N- 聚糖的糖蛋白;并
 - b) 使所述糖蛋白与甘露糖苷酶接触,所述甘露糖苷酶能够在下层甘露糖为磷酸化时水解末端 alpha-1,2 甘露糖连接。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述甘露糖苷酶来自斋藤曲霉 (*Aspergillus satoi*)。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述甘露糖苷酶来自纤维化纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*)。

磷酸化的 N-聚糖的脱甘露糖基化

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 9 月 29 日提交的美国申请流水号 61/387,924 的优先权。在先申请的公开内容通过提述完整并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及能在下层甘露糖 (underlying mannose) 被磷酸化时水解末端 α -1,2-甘露糖的 α -甘露糖苷酶。

[0004] 发明背景

[0005] 需要高性能表达系统来生产目前开发下的大多数生物药物 (例如,重组蛋白)。许多这些生物药物的生物学活性依赖于其翻译后修饰 (例如,磷酸化或糖基化)。基于酵母的表达系统组合具有分泌及修饰蛋白质的能力的微生物生物体容易遗传操作和发酵。然而,酵母细胞中生成的重组糖蛋白展现主要为异质的高甘露糖和超甘露糖聚糖结构,其对于蛋白质功能、下游加工、及随后的治疗性用途,特别地是在糖基化起生物学重要作用的情况下可以是不利的。

[0006] 发明概述

[0007] 本文件基于能够在下层甘露糖被磷酸化时水解末端 α -1,2 甘露糖连接或模块 (moiety) 的甘露糖苷酶的发现。

[0008] 在一个方面,本文件的特征在于一种用于使糖蛋白上的磷酸化的 N-聚糖脱甘露糖基化的方法。该方法包括提供具有磷酸化的 N-聚糖的糖蛋白;并使所述糖蛋白与甘露糖苷酶接触,所述甘露糖苷酶能够在下层甘露糖被磷酸化时水解末端 α -1,2 甘露糖连接或模块。甘露糖苷酶可以来自斋藤曲霉 (*Aspergillus satoii*) 或纤维化纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*)。所述方法进一步可以包括分离含有脱甘露糖基化的磷酸化 N-聚糖的糖蛋白。蛋白质可以是在真菌生物体中表达的人蛋白质。例如,真菌生物体可以是解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 或 *Arxula adenivorans*。真菌生物体也可以是甲基营养酵母 (例如,巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、甲醇毕赤酵母 (*Pichia methanolica*)、*Oogataea minuta*、或多形汉森酵母 (*Hansenula polymorpha*)) 或丝状真菌 (例如,浅蓝灰曲霉 (*Aspergillus caesiellus*)、亮白曲霉 (*Aspergillus candidus*)、肉色曲霉 (*Aspergillus carneus*)、棒曲霉 (*Aspergillus clavatus*)、弯头曲霉 (*Aspergillus deflectus*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、灰绿曲霉 (*Aspergillus glaucus*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*)、帚状曲霉 (*Aspergillus penicilloides*)、局限曲霉 (*Aspergillus restrictus*)、酱油曲霉 (*Aspergillus sojae*)、萨氏曲霉 (*Aspergillus sydowi*)、溜曲霉 (*Aspergillus tamari*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、焦曲霉 (*Aspergillus ustus*)、或杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*))。蛋白质可以是病原体蛋白质、溶酶体蛋白质、生长因子、细胞因子、趋化因子、抗体或其抗原结合

片段、或融合蛋白。例如，溶酶体蛋白质可以是溶酶体酶诸如与溶酶体贮存病 (LSD) 有关的溶酶体酶。LSD 可以是法布里 (Fabry) 氏病、粘多糖贮积症 I、法韦尔 (Farber) 病、戈谢 (Gaucher) 病、GM1- 神经节苷脂贮积病 (gangliosidosis)、泰 - 萨克斯病 (Tay-Sachs disease)、桑德霍夫 (Sandhoff) 病、GM2 激活物病 (GM2activator disease)、克拉伯 (Krabbe) 病、异染性脑白质营养不良 (metachromatic leukodystrophy)、尼曼 - 皮克 (Niemann-Pick) 病、沙伊 (Scheie) 病、亨特 (Hunter) 病、桑菲列普 (Sanfilippo) 病、莫尔丘 (Morquio) 病、马 - 拉 (Maroteaux-Lamy) 病、透明质酸酶缺乏、天冬氨酰基葡萄糖胺尿 (aspartylglucosaminuria)、岩藻糖苷贮积症 (fucosidosis)、甘露糖苷贮积症 (mannosidosis)、欣德勒 (Schindler) 病、涎酸贮积症 1 型、蓬佩 (Pompe) 病、致密性成骨不全症 (Pycnodysostosis)、蜡样脂褐质沉积症 (ceroid lipofuscinosis)、胆固醇酯贮积病 (cholesterol ester storage disease)、沃尔曼 (Wolman) 病、多种硫酸酯酶缺乏症 (Multiple sulfatase deficiency)、半乳糖涎酸贮积症 (galactosialidosis)、粘脂糖症 (mucopolysaccharidosis)、胱氨酸贮积症 (cystinosis)、唾液酸贮积病 (sialic acid storage disorder)、乳糜微粒保留病伴马里内斯科 - 舍格伦综合征 (chylomicron retention disease with **Marinesco-Sjögren** syndrome)、赫曼斯基 - 普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、切 - 东二氏 (Chediak-Higashi) 综合征、Danon 病、或 Geleophysic 发育异常。

[0009] 本文件的特征还在于在真菌生物体中生成具有脱甘露糖基化的磷酸化 N- 聚糖的靶蛋白的方法。该方法包括提供遗传工程化改造为包含编码甘露糖苷酶的核酸的真菌细胞,所述甘露糖苷酶能够在下层甘露糖被磷酸化时水解末端 alpha-1,2 甘露糖连接或模块;并将编码靶蛋白的核酸导入细胞中。

[0010] 本文件的特征还在于遗传工程化改造为生成糖蛋白的分离的真菌细胞,所述糖蛋白包含脱甘露糖基化的磷酸化 N- 聚糖。真菌细胞可以是解脂耶氏酵母或 *Arxula adenivorans*。真菌细胞液可以是甲基营养酵母 (例如,巴斯德毕赤酵母、甲醇毕赤酵母、*Oogataea minuta*、或多形汉森酵母) 或丝状真菌 (例如,浅蓝灰曲霉、亮白曲霉、肉色曲霉、棒曲霉、弯头曲霉、黄曲霉、烟曲霉、灰绿曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、赭曲霉、米曲霉、寄生曲霉、帚状曲霉、局限曲霉、酱油曲霉、萨氏曲霉、溜曲霉、土曲霉、焦曲霉、或杂色曲霉)。真菌细胞进一步可以包含编码能够促进甘露糖基磷酸化的多肽的核酸。真菌细胞可以遗传工程化改造为 OCH1 活性缺乏的。真菌细胞进一步可以包含编码能够促进甘露糖基磷酸化的多肽的核酸,且其中真菌细胞遗传工程化改造为 OCH1 活性缺乏的。

[0011] 真菌细胞进一步可以包含编码靶蛋白的核酸,其中所述靶蛋白是糖蛋白。靶蛋白可以是人蛋白质。靶蛋白可以是病原体蛋白质、溶酶体蛋白质、生长因子、细胞因子、趋化因子、抗体或其抗原结合片段、或融合蛋白。溶酶体蛋白质可以是溶酶体酶。靶蛋白可以是与 LSD 诸如法布里氏病、粘多糖贮积症 I、法韦尔病、戈谢病、GM1- 神经节苷脂贮积病、泰 - 萨克斯病、桑德霍夫病、GM2 激活物病、克拉伯病、异染性脑白质营养不良、尼曼 - 皮克病、沙伊病、亨特病、桑菲列普病、莫尔丘病、马 - 拉病、透明质酸酶缺乏、天冬氨酰基葡萄糖胺尿、岩藻糖苷贮积症、甘露糖苷贮积症、欣德勒病、涎酸贮积症 1 型、蓬佩病、致密性成骨不全症、蜡样脂褐质沉积症、胆固醇酯贮积病、沃尔曼病、多种硫酸酯酶缺乏症、半乳糖涎酸贮积症、粘脂糖症、胱氨酸贮积症、唾液酸贮积病、乳糜微粒保留病伴马里内斯科 - 舍格伦综合征、

赫曼斯基 - 普德拉克综合征、切 - 东二氏综合征、Danon 病、或 Geleophysic 发育异常有关的蛋白质。

[0012] 能够促进甘露糖基磷酸化的多肽可以是 MNN4 多肽 (例如, 解脂耶氏酵母、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)、*Ogataea minuta*、巴斯德毕赤酵母、或白念珠菌 (*C. albicans*) 多肽)。能够促进甘露糖基磷酸化的多肽可以是巴斯德毕赤酵母 PN01 多肽。

[0013] 在又一个方面, 本文件的特征在于解脂耶氏酵母、巴斯德毕赤酵母、多形汉森酵母、*Ogataea minuta*、甲醇毕赤酵母、*Arxula adenivorans*、或黑曲霉细胞的基本上纯的培养物, 大量所述细胞遗传工程化改造为生成含有脱甘露糖基化的磷酸化 N- 聚糖的糖蛋白。细胞进一步可以包含编码能够促进甘露糖基磷酸化的多肽的核酸。细胞可以遗传工程化改造为 OCH1 活性缺乏的。细胞进一步可以包含编码能够促进甘露糖基磷酸化的多肽的核酸, 并且可以遗传工程化改造为 OCH1 活性缺乏的。

[0014] 除非另有定义, 本文中所使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然与本文中所描述的那些方法和材料相似或等同的方法和材料可以在本发明的实施或测试中使用, 但是下文描述了例示性的方法和材料。通过提及而完整收录本文中提及的所有出版物、专利申请、专利、Genbank® 登录号、和其它参考文献。在矛盾的情况中, 应当以本申请, 包括定义为准。所述材料、方法和例子仅是例示性的, 而并不意图为限制性的。

[0015] 本发明的其它特征和优点从以下发明详述及权利要求书看会是显而易见的。

[0016] 附图简述

[0017] 图 1A 是具有 lip2 前序列 (为粗体) 的人 alpha 葡糖苷酶 (GAA) 的经密码子优化的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1) 的描绘。图 1B 是具有 lip2 前序列 (为粗体) 的人 GAA 的氨基酸序列的描绘, 其中 * 代表终止密码子 (SEQ ID NO:2)。

[0018] 图 2 是用于克隆 huGAA 的解脂耶氏酵母表达载体的示意图。

[0019] 图 3 是 DsbA-CcMan5 的可读框 (ORF) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:3) 的描绘。

[0020] 图 4 是 DsbA-CcMan4 的 ORF 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:4) 的描绘。

[0021] 图 5 是质粒 pLSAHCcMan5 和 pLSAHCcMan4 的示意图。

[0022] 图 6 是潜在的最终水解产物的示意图, 假设若下层甘露糖被磷酸化, α -1, 2-甘露糖苷酶也可以水解末端 α -1, 2-甘露糖。

[0023] 图 7 是使用磷酸脱帽酶 (phosphate uncapping enzyme) 获得的反应产物的示意图。

[0024] 图 8 含有用 HjMan 和 AsMan 对含有 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 和单磷酸化糖 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (小图 B) 的 N-聚糖制备物水解的 DSA-FACE 电泳图。

[0025] 图 9A 和 9B 是用 HjMan (9A) 和 AsMan (9B) 对含有 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 和单磷酸化糖 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (小图 B) 的 N-聚糖制备物水解的 DSA-FACE 电泳图, 其中首先用磷酸脱帽酶 CcMan5 处理 MNN4 糖。

[0026] 图 10 含有使用 AsMan 或 HjMan 水解 MNN4 制备物的 DSA-FACE 电泳图。

[0027] 图 11 含有 α -1, 2-甘露糖苷酶处理之前和之后的 N-聚糖概况。

[0028] 图 12A 和 12B 是周质溶液对经 (APTS) 标记的源自 MNN4 过表达菌株的 N-聚糖的活性的 DSA-FACE 电泳图。

[0029] 图 13 是与解脂耶氏酵母中表达的 huGAA 一起温育后对 CcMan4 和 CcMan5 活性的 DSA-FACE 电泳图分析。

[0030] 图 14 是与解脂耶氏酵母中表达的 huGAA 一起温育后对重组表达的 ERManI 或 GolgiManIA 活性的 DSA-FACE 电泳图分析。

[0031] 图 15 是来自斋藤曲霉 (*Aspergillus saitoi*) 的甘露糖苷酶的氨基酸序列 (SEQ ID NO:5) 的描绘。

[0032] 发明详述

[0033] 一般地,本文件提供了用于在直接下层 (immediately underlying) 甘露糖被磷酸化时水解末端 α -1, 2 甘露糖连接或模块的方法和材料。具体地,本文中所述的方法和材料可用于生成供治疗溶酶体贮积病 (LSD) 患者用的药剂,所述溶酶体贮积病 (LSD) 是多种多样的一组以溶酶体中的贮积产物积累 (由于牵涉其降解的代谢酶的活性受损所致) 为特征的遗传性代谢病症。贮积产物的积累导致细胞功能障碍和进行性临床表现。可以通过酶代替治疗 (ERT) 改正代谢酶缺乏,只要施用的酶可以靶向至患病细胞的溶酶体。溶酶体酶通常是在内质网 (ER) 中合成,经由分泌途径转运到高尔基 (Golgi), 然后募集至溶酶体的糖蛋白。使用本文中所描述的方法和材料,可以使用基于微生物的生成方法来获得具有脱甘露糖基化的磷酸化 N-聚糖的治疗性蛋白质。如此,本文中所描述的方法和材料可用于制备供治疗代谢病症诸如 LSD 用的糖蛋白。

[0034] 甘露糖苷酶

[0035] 本文件提供了编码甘露糖苷酶的分离的核酸,所述甘露糖苷酶能在下层甘露糖被磷酸化时水解末端 α -1, 2 甘露糖连接或模块。术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中可互换使用,指 RNA 和 DNA 两者,包括 cDNA、基因组 DNA、合成的 DNA、和含有核酸类似物的 DNA (或 RNA)。多核苷酸可以具有任何三维结构。核酸可以是双链或单链 (即,有义链或反义链)。多核苷酸的非限制性例子包括基因、基因片段、外显子、内含子、信使 RNA (mRNA)、转移 RNA、核糖体 RNA、siRNA、微小 RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、核酸探针、和引物,以及核酸类似物。

[0036] “多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,意指氨基酸的任何肽连接的链,而不管长度或翻译后修饰。通常,本文中所描述的多肽 (例如,甘露糖苷酶或脱甘露糖基化的靶蛋白) 在其占制备物中总蛋白质的至少 60% (按重量计),例如,占样品中总蛋白质的 60% 时是分离的。在一些实施方案中,本文中所描述的多肽由占制备物中总蛋白质的至少 75%、至少 90%、或至少 99% (按重量计) 组成。

[0037] “分离的核酸”指与存在于天然存在的基因组的其它核酸分子分开的核酸,包括通常在天然存在的基因组 (例如,酵母基因组) 中的核酸的一侧或两侧侧翼的核酸。如本文中所使用的,术语“分离的”就核酸而言还包括任何非天然存在的核酸序列,因为此类非天然存在的序列不存在于自然界,并且在天然存在的基因组中没有直接连续的序列。

[0038] 分离的核酸可以是例如 DNA 分子,只要通常刚好在天然存在的基因组中的所述 DNA 分子侧翼找到的核酸序列之一是除去或缺乏的。如此,分离的核酸包括但不限于作为不依赖于其它序列的单独分子 (例如,化学合成的核酸、或通过 PCR 或限制性内切核酸酶处理生成的 cDNA 或基因组 DNA 片段) 存在的 DNA 分子以及掺入载体、自主复制型质粒、病毒 (例如,任何副粘液病毒、逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、或疱疹病毒) 中,或掺入原核生物或

真核生物基因组 DNA 中的 DNA。另外,分离的核酸可以包括经工程化改造的核酸诸如作为杂合或融合核酸的一部分的 DNA 分子。认为存在于例如 cDNA 文库或基因组文库,或含有基因组 DNA 限制性消化物的凝胶切片内的数百至数百万个其它核酸间的核酸不是分离的核酸。

[0039] 如本文中所使用的,术语“外源的”就核酸和特定宿主细胞而言意指不存在于(并且不能获自)如存在于自然界的所述特定细胞的任何核酸。如此,认为一旦导入宿主细胞中,非天然存在的核酸对于宿主细胞而言是外源的。重要的是,注意到非天然存在的核酸可以含有自然界中找到的核酸亚序列或核酸序列片段,只要核酸作为整体不存在于自然界中。例如,在表达载体内含有基因组 DNA 序列的核酸分子是非天然存在的核酸,并且如此一旦导入宿主细胞中,对于宿主细胞而言是外源的,因为整个核酸分子(基因组 DNA 加载体 DNA)不存在于自然界中。如此,认为作为整体不存在于自然界中的任何载体、自主复制型质粒、或病毒(例如,逆转录病毒、腺病毒、或疱疹病毒)是非天然存在的核酸。由此可见,认为通过 PCR 或限制性内切核酸酶处理及 cDNA 的基因组 DNA 片段是非天然存在的核酸,因为它们以自然界中找不到的单独分子存在。由此还可见,以自然界中找不到的排列含有启动子序列和多肽编码序列(例如, cDNA 或基因组 DNA)的任何核酸是非天然存在的核酸。天然存在的核酸对于特定细胞而言可以是外源的。例如,一旦将从酵母 x 细胞分离的整个染色体导入酵母 y 的细胞中,所述染色体对于酵母 y 细胞而言是外源核酸。

[0040] 编码甘露糖苷酶的核酸与 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 中所列的核苷酸序列可以具有至少 70% 序列同一性(例如,至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、或 100% 序列同一性)。在一些实施方案中,本文中所描述的核酸可以编码甘露糖苷酶多肽,其与 SEQ ID NO:5 中所列的氨基酸序列具有至少 70%(例如,至少 75%、80%、85%、90%、95%、99%、或 100%) 同一性。特定的氨基酸序列与 SEQ ID NO:5 中所列的氨基酸序列之间的百分比同一性可以如下测定。首先,使用来自含有 BLASTP 第 2.0.14 版的 BLASTZ 单机版的 BLAST2 序列 (B12seq) 程序比对氨基酸序列。此 BLASTZ 单机版可以获自 Fish&Richardson 的网站(例如, www.fr.com/blast/) 或美国政府国立生物技术信息中心网站 (www.ncbi.nlm.nih.gov)。解释如何使用 B12seq 程序的用法说明书可以参见伴随 BLASTZ 的自述文件。B12seq 使用 BLASTP 算法来实施两种氨基酸序列间的比较。为了比较两种氨基酸序列, B12seq 的选项如下设置: -i 设置为含有要比较的第一个氨基酸序列的文件(例如, C:\seq1.txt); -j 设置为含有要比较的第二个氨基酸序列的文件(例如, C:\seq2.txt); -p 设置为 blastp; -o 设置为任何期望的文件名称(例如, C:\output.txt); 并且所有其它选项维持为其缺省设置。例如,可以使用以下命令来产生含有两种氨基酸序列间的比较的输出文件: C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt。若两个比较序列共享同源性,则指定的输出文件会呈现比对序列的那些同源性区。若两个比较序列未共享同源性,则指定的输出文件不会呈现比对序列。核酸序列可以遵循相似的规程,只是使用 blastn。

[0041] 一旦比对,通过计算这两个序列中呈现相同氨基酸残基的位置数目来测定匹配数目。通过用匹配数目除以全长甘露糖苷酶多肽氨基酸序列的长度,接着将所得的数值乘以 100 来测定百分比同一性。

[0042] 应当注意,百分比同一性数值四舍五入到最接近的十分之一。例如,78.11、78.12、78.13、和 78.14 向下四舍五入到 78.1,而 78.15、78.16、78.17、78.18、和 78.19 向上四舍五入到 78.2。还应当注意,长度数值总是整数。

[0043] 应当领会,许多核酸可以编码具有特定氨基酸序列的多肽。遗传密码的简并性对于本领域是公知的;即,对于许多氨基酸,存在着超过一种充当氨基酸密码子的核苷酸三联体。例如,可以修饰给定甘露糖苷酶多肽的编码序列中的密码子,从而使用适合于所述物种的密码子偏爱表获得特定物种(例如,细菌或真菌)中的最佳表达。

[0044] 也可以使用杂交来评估两种核酸序列间的同源性。可以依照标准的杂交技术使用本文中所描述的核酸序列,或其片段或变体作为杂交探针。感兴趣的探针(例如,含有斋藤曲霉核苷酸序列的一部分的探针)与来自测试来源的DNA或RNA的杂交指示测试来源中存在与探针对应的DNA或RNA(例如,斋藤曲霉核苷酸序列)。杂交条件是本领域技术人员已知的,并且可以参见Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N. Y., 6. 3. 1-6. 3. 6, 1991。中等杂交条件定义为等同于在2X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中于30°C杂交,接着在1X SSC, 0.1%SDS中于50°C清洗。高严格条件定义为等同于在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中于45°C杂交,接着在0.2X SSC, 0.1%SDS中于65°C清洗。

[0045] 可以通过分析核苷酸和多肽序列比对鉴定适合于本文中使用的其它甘露糖苷酶多肽候选物。例如,对核苷酸或多肽序列数据库实施询问可以鉴定甘露糖苷酶多肽的同系物和/或直向同系物。序列分析可以牵涉使用已知甘露糖苷酶氨基酸序列用BLAST、交互BLAST、或PSI-BLAST对非冗余数据库的分析。数据库中具有大于40%序列同一性的那些多肽可以鉴定为进一步评估作为甘露糖苷酶多肽的适合性的候选物。氨基酸序列相似性容许保守氨基酸取代,诸如用一种疏水性残基取代另一种或者用一种极性残基取代另一种。若想要的话,可以实施此类候选物的手动检查,以缩小要进一步评估的候选物的数目。

[0046] 本文件还提供了本文中所描述的甘露糖苷酶的(i)生物学活性变体和(ii)其生物学活性片段或生物学活性变体。相对于SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列或由SEQ ID NO:3和4中所列的核苷酸序列编码的氨基酸序列,甘露糖苷酶的生物学活性变体可以含有添加、缺失、或取代。具有取代的蛋白质一般会具有不超过50(例如,不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、或50)处保守氨基酸取代。保守取代是用一种氨基酸取代具有相似特征的另一种。保守取代包括下列组内的取代:缬氨酸、丙氨酸和甘氨酸;亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸;天冬氨酸和谷氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;丝氨酸、半胱氨酸和苏氨酸;赖氨酸和精氨酸;以及苯丙氨酸和酪氨酸。非极性疏水氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。将上文提及的极性、碱性或酸性组中的一个成员用相同组中的另一成员取代可认为是保守取代。相反,非保守取代是用一种氨基酸取代另一种具有不相似的特征的氨基酸的取代。

[0047] 缺失变体可以缺乏1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个(两个或更多个氨基酸的)氨基酸区段或不连续的单氨基酸。

[0048] 添加(添加变体)包括融合蛋白,所述融合蛋白含有:(a)由SEQ ID NO:3或4中所列的核苷酸序列编码的甘露糖苷酶或具有SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的甘露糖苷酶或其片段;和(b)内部或末端(C或N)的无关的或异源的氨基酸序列。在这些融合蛋白的背景下,术语“异源氨基酸序列”是指除(a)之外的氨基酸序列。例如,异源序列可以是用于重组蛋白的纯化的序列(例如,FLAG、多组氨酸(例如,六组氨酸)、血凝素(hemagglutinin)

(HA)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 或麦芽糖结合蛋白 (MBP))。异源序列也可以用作诊断或检测标志物的蛋白质,例如,萤光素酶、绿色荧光蛋白 (GFP) 或氯霉素乙酰转移酶 (CAT)。在一些实施方案中,融合蛋白含有来自另一蛋白质的信号序列。在某些宿主细胞(例如,酵母宿主细胞)中,靶蛋白的表达和/或分泌可以通过使用异源信号序列增加。在一些实施方案中,融合蛋白可以含有可用于例如引发免疫应答以生成抗体的载体(例如, KLH) 或内质网或高尔基体保留信号。异源序列可以具有不同的长度,并且在一些情况下可以是比与异源序列衔接的全长靶蛋白更长的序列。

[0049] 甘露糖苷酶的生物学活性片段或生物学活性变体具有野生型、全长、成熟的蛋白质的甘露糖苷酶活性(例如,脱甘露糖基化)的至少 40%(例如,至少 50%;60%;70%;75%;80%;85%;90%;95%;97%;98%;99%;99.5%、或 100% 或甚至更大)。

[0050] 可以使用本文中所描述的甘露糖苷酶来生成脱甘露糖基化的靶分子。可以在体外或在体内实施所述方法。

[0051] 使糖蛋白脱甘露糖基化的方法

[0052] 如本文中所描述的,可以使用甘露糖苷酶来使含有磷酸化 N-聚糖的糖蛋白脱甘露糖基化,所述甘露糖苷酶可以在下层甘露糖被磷酸化时水解末端 α -1,2 甘露糖连接或模块。此类甘露糖苷酶的非限制性例子包括来自斋藤曲霉 (As) (又称为海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*)) 的甘露糖苷酶或来自纤维化纤维微细菌(例如, CcMan4) 的甘露糖苷酶。斋藤曲霉甘露糖苷酶的氨基酸序列在 SEQ ID NO:5(参见图 15) 及 GenBank 登录号 BAA08634 中列出。CcMan4 多肽由 SEQ ID NO:4(参见图 4) 中所列的核苷酸序列编码。

[0053] 可以重组生成斋藤曲霉甘露糖苷酶和纤维化纤维微细菌甘露糖苷酶(例如, CcMan4)。可以通过标准技术生成编码甘露糖苷酶多肽的分离的核酸分子。例如,可以使用聚合酶链式反应 (PCR) 技术来获得含有本文中所描述的核苷酸序列的分离的核酸。可以使用 PCR 从 DNA 及 RNA(包含来自总基因组 DNA 或总细胞 RNA 的序列) 扩增特定序列。一般地,采用来自感兴趣区域末端或之外的序列信息来设计与要扩增的模板的相反链在序列上相同或相似的寡核苷酸引物。多种 PCR 策略也是可用的,通过所述 PCR 策略可以将位点特异性核苷酸序列修饰引入模板核酸中。分离的核酸也可以作为单一核酸分子(例如使用亚磷酸胺技术以 3' 至 5' 方向使用自动化 DNA 合成) 或者作为一系列寡核苷酸化学合成。例如,可以合成含有期望序列的一对或多对长的寡核苷酸(例如,大于 100 个核苷酸),其中每对含有短的互补性区段(例如,约 15 个核苷酸),使得在寡核苷酸对退火时形成双链体。使用 DNA 聚合酶来延长寡核苷酸,每个寡核苷酸对生成单一的、双链核酸分子,然后,可以将其连接到载体中。也可以通过例如对天然存在的 DNA 的诱变来获得分离的核酸。

[0054] 为了重组生成甘露糖苷酶多肽,使用含有与编码甘露糖苷酶多肽的核酸可操作连接的启动子的载体。如本文中所使用的,“启动子”指使基因能够得到转录的 DNA 序列。RNA 聚合酶识别启动子,然后其启动转录。如此,启动子含有由 RNA 聚合酶直接结合的,或者牵涉 RNA 聚合酶募集的 DNA 序列。启动子序列还可以包含“增强子区”,其是一种或多种可以与蛋白质(即,反式作用因子因子,很像一组转录因子) 结合以增强基因簇中基因的转录水平(因此得名)的 DNA 区。虽然通常在编码区的 5' 端,增强子也可以与启动子序列分开,并且可以例如在基因的内含子区内或在基因编码区的 3'。

[0055] 如本文中所使用的,“可操作连接”意指掺入遗传构建体(例如,载体)中,使得表

达控制序列有效控制感兴趣的编码序列表达。

[0056] 可以将表达载体导入宿主细胞中（例如，通过转化或转染来进行）以表达编码的多肽，然后，可以将所述编码的多肽纯化。可以用于甘露糖苷酶多肽的小规模或大规模生成的表达系统包括但不限于微生物体，诸如用含有核酸分子的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA、或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌（例如，大肠杆菌 (*E. coli*)），和用含有核酸分子的重组真菌表达载体转化的真菌（例如，酿酒酵母、解脂耶氏酵母、*Arxula adenivorans*、巴斯德毕赤酵母、多形汉森酵母、或曲霉属 (*Aspergillus*)）。有用的表达系统还包括用含有核酸分子的重组病毒表达载体（例如，杆状病毒）感染的昆虫细胞系统、和用重组病毒表达载体（例如，烟草花叶病毒）感染或用含有核酸分子的重组质粒表达载体（例如 Ti 质粒）转化的植物细胞系统。也可以使用哺乳动物表达系统来生成甘露糖苷酶多肽，所述哺乳动物表达系统包括含有重组表达构建体的细胞（例如，永生化细胞系诸如 COS 细胞、中国仓鼠卵巢细胞、HeLa 细胞、人胚肾 293 细胞、和 3T3L1 细胞），所述重组表达构建体含有源自哺乳动物细胞基因组（例如，金属硫蛋白启动子）或哺乳动物病毒（例如，腺病毒晚期启动子和巨细胞病毒启动子）的启动子。

[0057] 通常，用异源氨基酸序列诸如 FLAG、多组氨酸（例如，六组氨酸）、血凝素 (HA)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 或麦芽糖结合蛋白 (MBP) 给重组甘露糖苷酶多肽加标签以帮助纯化蛋白质。用于纯化蛋白质的其它方法包括层析技术诸如离子交换、疏水性和反相、大小排阻、亲和、疏水性电荷诱导层析，等等（参见例如 Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, third edition, Springer-Verlag, New York (1993); Burton and Harding, *J. Chromatogr. A* 814:71-81 (1998)）。

[0058] 为了生成脱甘露糖基化的糖蛋白，使靶分子在合适的条件下与甘露糖苷酶或含有重组生成的甘露糖苷酶的细胞裂解物接触，所述靶分子含有下层甘露糖被磷酸化的末端 α -1, 2 甘露糖连接或模块。上文描述了合适的甘露糖苷酶。细胞裂解物可以来自任何遗传工程化细胞，包括真菌细胞、植物细胞、或动物细胞。动物细胞的非限制性例子包括线虫、昆虫、植物、禽、爬行动物、和哺乳动物诸如小鼠、大鼠、兔、仓鼠、沙鼠、犬、猫、山羊、猪、牛、马、鲸、猴、或人。

[0059] 在使靶分子（例如，糖蛋白）与纯化的甘露糖苷酶或细胞裂解物接触后，可以水解末端 α -1, 2 甘露糖连接以生成脱甘露糖基化的靶分子。

[0060] 保持裂解物中甘露糖苷酶活性的活性或完整性的适合于获得细胞裂解物的方法可以包括使用合适的缓冲液和 / 或抑制剂，包括核酸酶、蛋白酶和磷酸酶抑制剂，其保持细胞裂解物中的 N-糖基化活性或者使细胞裂解物中的 N-糖基化活性的变化最小化。此类抑制剂包括例如螯合剂诸如乙二胺四乙酸 (EDTA)、乙二醇二 (P-氨基基醚) N, N, N1, N1-四乙酸 (EGTA)、蛋白酶抑制剂诸如苯甲磺酰氟 (PMSF)、抑肽酶、亮抑酶肽 (leupeptin)、抗蛋白酶 (antipain)，等等，及磷酸酶抑制剂诸如磷酸盐、氟化钠、钒酸盐，等等。适合于获得包含酶促活性的裂解物的缓冲液和条件记载于例如 Ausubel 等 *Current Protocols in Molecular Biology* (增补 47), John Wiley & Sons, New York (1999); Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow and Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz *Textbook of Clinical Chemistry*, 第 3 版 Burtis and

Ashwood 编 W. B. Saunders, Philadelphia, (1999)。

[0061] 在适当时,可以将细胞裂解物进一步加工以消除干扰性物质的存在或使干扰性物质的存在最小化。若想要的话,可以通过本领域技术人员公知的多种方法将细胞裂解物分级,所述方法包括亚细胞分级、和层析技术诸如离子交换、疏水性和反相、大小排阻、亲和、疏水性电荷诱导层析,等等。

[0062] 在一些实施方案中,可以制备细胞裂解物,其中整个细胞细胞器保持完整和 / 或功能性。例如,裂解物可以含有下列一种或多种:完整的糙面内质网、完整的光面内质网、或完整的高尔基体。适合于制备含有完整细胞细胞器的裂解物及测试细胞器功能性的方法记载于例如 Moreau 等 (1991) *J. Biol. Chem.* 266 (7):4329-4333; Moreau 等 (1991) *J. Biol. Chem.* 266 (7):4322-4328; Rexach 等 (1991) *J. Cell Biol.* 114 (2):219-229; 及 Paulik 等 (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 367 (2):265-273。

[0063] 如本文中所使用的,靶分子指含有下层甘露糖被磷酸化的末端 α -1,2 甘露糖连接或模块的任何分子。在一些实施方案中,靶蛋白是人糖蛋白。合适的靶蛋白可以包括病原体蛋白,诸如伤风类毒素或白喉 (diphtheria) 类毒素;病毒表面蛋白,诸如巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 B、H 和 gCIII;人免疫缺陷病毒 1 (HIV-1) 包膜糖蛋白;劳斯肉瘤病毒 (RSV) 包膜糖蛋白;单纯疱疹病毒 (HSV) 包膜糖蛋白、EB 病毒 (EBV) 包膜糖蛋白、水痘带状疱疹病毒 (VZV) 包膜糖蛋白、人乳头状瘤病毒 (HPV) 包膜糖蛋白、流感病毒糖蛋白、和肝炎家族表面抗原;溶酶体蛋白(例如,酸性 α 葡糖苷酶, α 半乳糖苷酶、葡糖脑苷酯酶、脑苷酶或半乳糖脑苷酯酶);胰岛素;胰高血糖素;生长因子;细胞因子;趋化因子;及抗体及其片段。生长因子包括,例如,血管内皮生长因子 (VEGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、骨形态发生蛋白 (BMP)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、神经生长因子 (NGF);神经营养蛋白、血小板衍生生长因子 (PDGF)、促红细胞生成素 (EPO)、血小板生成素 (TPO)、Myostatin (GDF-8)、生长分化因子 -9 (GDF9)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF 或 FGF2)、表皮生长因子 (EGF)、肝细胞生长因子 (HGF)。细胞因子包括,例如,白介素(例如, IL-1 至 IL-33, 诸如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13 或 IL-15)。趋化因子包括,例如, I-309、TCA-3、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、C10、MRP-2、MARC、MCP-3、MCP-2、MRP-2、CCF18、MIP-1 γ 、Eotaxin、MCP-5、MCP-4、NCC-1、Ck β 10、HCC-1、白细胞诱素 -1 (Leukotactin-1)、LEC、NCC-4、TARC、PARC 或 Eotaxin-2。还包括肿瘤糖蛋白(例如,肿瘤相关抗原),例如,癌胚抗原 (CEA)、人粘蛋白、HER-2/neu 和前列腺特异性抗原 (PSA) [Henderson and Finn, *Advances in Immunology*, 62, pp. 217-56 (1996)]。

[0064] 在一些实施方案中,靶蛋白可以是与溶酶体贮积病有关的靶蛋白,该靶蛋白包括例如酸性 α 葡糖苷酶、 α 半乳糖苷酶、 α -L- 艾杜糖苷酸酶、 β -D- 半乳糖苷酶、 β - 葡糖苷酶、 β - 己糖胺酶、 β -D- 甘露糖苷酶、 α -L- 岩藻糖苷酶、芳基硫酸酯酶 B、芳基硫酸酯酶 A、 α -N- 乙酰基半乳糖苷酶、天冬氨酰葡萄糖胺酶、艾杜糖醛酸 -2- 硫酸酯酶、 α - 氨基葡糖苷 -N- 乙酰基转移酶、 β -D- 葡萄糖苷酸酶、透明质酸酶、 α -L- 甘露糖苷酶、 α - 神经氨酸酶、磷酸转移酶、酸性脂肪酶、酸性神经酰胺酶、鞘磷脂酶、硫酸酯酶、组织蛋白酶 K、和脂蛋白脂肪酶。

[0065] 在一些实施方案中,靶蛋白是融合蛋白,其中靶蛋白与另一种多肽序列,或与聚合

物、载体、佐剂、免疫毒素、或可检测（例如，荧光、发光、或放射性）模块融合。例如，靶蛋白可以与聚合物诸如聚乙二醇连接以增加小蛋白质的分子量和 / 或延长循环停留时间。

[0066] 使糖蛋白脱甘露糖基化的体内方法

[0067] 可以使用本文中所描述的遗传工程化细胞来生成脱甘露糖基化的靶分子。例如，基于细胞的方法可以包括以下步骤，即将编码靶分子的核酸导入真菌细胞中，所述真菌细胞遗传工程化改造为包含编码甘露糖苷酶的核酸，所述甘露糖苷酶能够在下层甘露糖被磷酸化时水解末端 α -1, 2 甘露糖连接或模块，其中所述细胞生成含有脱甘露糖基化的磷酸化 N-聚糖的靶分子。在一些实施方案中，编码甘露糖苷酶和靶分子的核酸含有分泌序列，使得共分泌甘露糖苷酶和靶分子。

[0068] 本文中所描述的遗传工程化细胞含有编码甘露糖苷酶的核酸。适合于靶分子的体内生成的细胞可以是真菌起源的，包括解脂耶氏酵母、*Arxula adenivorans*、甲基营养酵母（诸如念珠菌属 (*Candida*)、汉森酵母属 (*Hansenula*)、*Oogataea*、毕赤酵母属 (*Pichia*) 或球拟酵母属 (*Torulopsis*) 的甲基营养酵母）或曲霉属、木霉属 (*Trichoderma*)、脉孢菌属 (*Neurospora*)、镰孢菌属 (*Fusarium*)、或金孢子菌属 (*Chrysosporium*) 的丝状真菌。例示性的真菌物种包括但不限于异常毕赤酵母 (*Pichia anomala*)、牛毕赤酵母 (*Pichia bovis*)、加拿大毕赤酵母 (*Pichia canadensis*)、卡氏毕赤酵母 (*Pichia carsonii*)、粉状毕赤酵母 (*Pichia farinose*)、发酵毕赤酵母 (*Pichia fermentans*)、*Pichia fluxuum*、膜醭毕赤酵母 (*Pichia membranaefaciens*)、膜醭毕赤酵母、粗状假丝酵母 (*Candida valida*)、白念珠菌、*Candida ascalaphidarum*、*Candida amphixiae*、南极洲假丝酵母 (*Candida Antarctica*)、大西洋假丝酵母 (*Candida atlantica*)、*Candida atmosphaerica*、蟑螂假丝酵母 (*Candida blattae*)、*Candida carpophila*、*Candida cerambycidarum*、*Candida chauliodes*、*Candida corydalis*、*Candida dosseyi*、都柏林念珠菌 (*Candida dubliniensis*)、*Candida ergatensis*、*Candida fructus*、光滑假丝酵母 (*Candida glabrata*)、发酵假丝酵母 (*Candida fermentati*)、吉利蒙假丝酵母 (*Candida guilliermondii*)、*Candida haemulonii*、*Candida insectamens*、*Candida insectorum*、中间假丝酵母 (*Candida intermedia*)、*Candida jeffresii*、乳酒假丝酵母 (*Candida kefir*)、克鲁斯念珠菌 (*Candida krusei*)、葡萄牙假丝酵母 (*Candida lusitaniae*)、*Candida lyxosophila*、麦芽糖假丝酵母 (*Candida maltosa*)、*Candida membranifaciens*、*Candida milleri*、橄榄假丝酵母 (*Candida oleophila*)、俄勒冈假丝酵母 (*Candida oregonensis*)、近平滑念珠菌 (*Candida parapsilosis*)、桔假丝酵母 (*Candida quercitrusa*)、休哈塔假丝酵母 (*Candida shehatei*)、*Candida temnochilae*、纤细念珠菌 (*Candida tenuis*)、热带念珠菌 (*Candida tropicalis*)、*Candida tsuchiyae*、*Candida sinolaborantium*、酱油念珠菌 (*Candida sojae*)、维斯假丝酵母 (*Candida viswanathii*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)、*Oogataea minuta*、膜醭毕赤酵母、*Pichia silvestris*、膜醭毕赤酵母、柯达氏毕赤酵母 (*Pichia chodatii*)、膜醭毕赤酵母、膜醭毕赤酵母、*Pichia minuscula*、巴斯德毕赤酵母、*Pichia pseudopolymorpha*、*Pichia quercuum*、*Pichia robertsii*、斋藤毕赤酵母 (*Pichia saitoi*)、*Pichia silvestrisi*、*Pichia strasburgensis*、陆生毕赤酵母 (*Pichia terricola*)、*Pichia vanriji*、*Pseudozyma Antarctica*、圆红冬孢酵母 (*Rhodosporidium toruloides*)、胶粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*)、贝酵母 (*Saccharomyces bayanus*)、

贝酵母、*Saccharomyces momdshuricus*、葡萄汁酵母 (*Saccharomyces uvarum*)、贝酵母、酿酒酵母、二孢酵母 (*Saccharomyces bisporus*)、薛瓦酵母 (*Saccharomyces chevalieri*)、德氏酵母 (*Saccharomyces delbrueckii*)、少孢酵母 (*Saccharomyces exiguus*)、发酵酵母 (*Saccharomyces fermentati*)、脆壁酵母 (*Saccharomyces fragilis*)、马克思酵母 (*Saccharomyces marxianus*)、蜂蜜酵母 (*Saccharomyces mellis*)、罗斯酵母 (*Saccharomyces rosei*)、鲁酵母 (*Saccharomyces rouxii*)、葡萄汁酵母、魏氏酵母 (*Saccharomyces willianus*)、路德类酵母 (*Saccharomycodes ludwigii*)、荚复膜孢酵母 (*Saccharomycopsis capsularis*)、扣囊复膜孢酵母 (*Saccharomycopsis fibuligera*)、扣囊复膜孢酵母、*Endomyces hordei*、*Endomycopsis fobuligera*、*Saturnispora saitoi*、八孢裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces octosporus*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、*Schwanniomyces occidentalis*、德尔布有孢圆酵母 (*Torulaspora delbrueckii*)、德尔布有孢圆酵母、乳品酵母 (*Saccharomyces dairensis*)、德尔布有孢圆酵母、发酵有孢圆酵母 (*Torulaspora fermentati*)、发酵有孢圆酵母、德尔布有孢圆酵母、罗斯有孢圆酵母 (*Torulaspora rosei*)、罗斯酵母 (*Saccharomyces rosei*)、德尔布有孢圆酵母、罗斯酵母、德尔布有孢圆酵母、德尔布酵母 (*Saccharomyces delbrueckii*)、德尔布有孢圆酵母、德尔布酵母、*Zygosaccharomyces mongolicus*、*Dorulaspora globosa*、*Debaryomyces globosus*、球状有孢圆酵母 (*Torulopsis globosa*)、皮肤毛孢子菌 (*Trichosporon cutaneum*)、变异三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*)、*Williopsis californica*、土星拟威尔酵母 (*Williopsis saturnus*)、*Zygosaccharomyces bisporus*、*Zygosaccharomyces bisporus*、*Debaryomyces disporua*、*Saccharomyces bisporas*、*Zygosaccharomyces bisporus*、*Saccharomyces bisporus*、*Zygosaccharomyces mellis*、*Zygosaccharomyces priorianus*、*Zygosaccharomyces rouxiim*、*Zygosaccharomyces rouxii*、*Zygosaccharomyces barkeri*、鲁酵母、*Zygosaccharomyces rouxii*、*Zygosaccharomyces major*、*Saccharomyces rousii*、异常毕赤酵母、牛毕赤酵母、加拿大毕赤酵母、卡氏毕赤酵母、粉状毕赤酵母、发酵毕赤酵母、*Pichia fluxuum*、膜醭毕赤酵母、*Pichia pseudopolymorpha*、*Pichia quercuum*、*Pichia robertsii*、*Pseudozyma Antarctica*、圆红冬孢酵母、圆红冬孢酵母、胶粘红酵母、贝酵母、贝酵母、二孢酵母、酿酒酵母、薛瓦酵母、德氏酵母、发酵酵母、脆壁酵母、路德类酵母、粟酒裂殖酵母、*Schwanniomyces occidentalis*、德尔布有孢圆酵母、*Torulaspora globosa*、变异三角酵母、*Williopsis californica*、土星拟威尔酵母、*Zygosaccharomyces bisporus*、*Zygosaccharomyces mellis* 或 *Zygosaccharomyces rouxii*。例示性的丝状真菌包括曲霉的多种物种，包括但不限于浅蓝灰曲霉、亮白曲霉、肉色曲霉、棒曲霉、弯头曲霉、黄曲霉、烟曲霉、灰绿曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、赭曲霉、米曲霉、寄生曲霉、帚状曲霉、局限曲霉、酱油曲霉、萨氏曲霉、溜曲霉、土曲霉、焦曲霉、或杂色曲霉。在如本文中规定的遗传工程化前，此类细胞可以获自多种商业来源和研究资源机构，诸如例如美国典型培养物保藏中心 (Rockville, MD)。靶分子包括蛋白质诸如本文中所述的任何靶蛋白 (见上文)。

[0069] 在编码甘露糖苷酶的外源核酸外，细胞的遗传工程化可以包括一种或多种遗传修饰，诸如 (i) 删除编码外部链延长 (OCH1) 蛋白的内源基因；(ii) 导入编码能够促进甘露糖基磷酸化的多肽 (例如，来自解脂耶氏酵母、酿酒酵母、*Ogataea minuta*、巴斯德毕赤酵母、或白念珠菌的 MNN4 多肽，或来自巴斯德毕赤酵母的 PN01 多肽) 的重组核酸以提高甘露糖

残基的磷酸化；(iii) 导入或表达干扰 OCH1 蛋白的功能性表达的 RNA 分子；(iv) 导入编码具有 N-糖基化活性的野生型（例如，内源或外源）蛋白质（即，表达具有 N-糖基化活性的蛋白质）的重组核酸；(v) 导入编码上文所描述的靶分子的重组核酸；或 (v) 改变一种或多种编码具有 N-糖基化活性的蛋白质的内源基因的启动子或增强子元件，如此以改变其编码蛋白质的表达。RNA 分子包括例如小干扰 RNA (siRNA)、短发夹 RNA (shRNA)、反义 RNA、或微小 RNA (miRNA)。遗传工程化还包括改变编码具有 N-糖基化活性的蛋白质的内源基因以生成具有添加（例如，异源序列）、缺失、或取代（例如，突变诸如点突变；保守或非保守突变）的蛋白质。可以将突变特异性引入（例如，通过定点诱变或同源重组来进行）或者可以随机引入（例如，可以将细胞进行化学诱变，如记载于例如 Newman and Ferro-Novick (1987) *J. Cell Biol.* 105(4):1587 的）。

[0070] 本文中所描述的遗传修饰可以导致下列一项或多项：(i) 经遗传修饰的细胞中的一种或多种活性升高，(ii) 经遗传修饰的细胞中一种或多种活性降低，或 (iii) 经遗传修饰的细胞中一种或多种活性的定位或胞内分布的变化。应当理解，特定活性（例如，促进甘露糖基磷酸化）量的变化可以是由于过表达一种或多种能够促进甘露糖基磷酸化的蛋白质、内源基因拷贝数增加（例如基因复制）、或者刺激由基因编码的蛋白质表达升高的内源基因的启动子或增强子的改变所致。一种或多种特定活性的降低可以是由于过表达突变体形式（例如，显性阴性形式）、降低一种或多种具有特定活性的蛋白质表达的一种或多种干扰 RNA 分子的导入或表达、或编码具有特定活性的蛋白质的一种或多种内源基因的缺失所致。

[0071] 为了通过同源重组破坏基因，可以以如下的方式构建“基因替换”载体，使得包括选择标志基因。选择标志基因可以在 5' 和 3' 两端与足以介导同源重组的长度的基因的一部分可操作连接。选择标志可以是许多基因之一，所述基因互补宿主细胞营养缺陷型或者提供抗生素抗性，包括 URA3、LEU2 和 HIS3 基因。其它合适的选择标志包括 CAT 基因，其对酵母细胞赋予氯霉素抗性，或 lacZ 基因，其导致由于表达 β -半乳糖苷酶所致的蓝色菌落。然后，使用本领域中公知的方法（见下文）来将基因替换载体的线性化 DNA 片段导入细胞中。可以基于选择标志来确定线性片段对基因组的整合和对基因的破坏，并且可以通过例如，Southern 印迹分析来确认。

[0072] 或者，可以以如下的方式构建基因替换载体，使得包括要破坏的基因的一部分，该部分缺乏任何内源基因启动子序列，并且编码无一基因编码序列或编码基因编码序列的无活性片段。“无活性片段”指编码具有例如自基因的全长编码序列生成的蛋白质的活性的小于约 10%（例如，小于约 9%、小于约 8%、小于约 7%、小于约 6%、小于约 5%、小于约 4%、小于约 3%、小于约 2%、小于约 1%、或 0%）的蛋白质的基因的片段。以如下的方式将基因的所述一部分插入载体中，使得无已知的启动子序列与基因序列可操作连接，但是终止密码子和转录终止序列与基因序列的一部分可操作连接。随后，可以将此载体在基因序列的一部分中线性化，并转化入细胞中。作为单一同源重组，然后将此线性化载体在基因的内源对应物中整合。

[0073] 表达载体可以是自主的或整合的。可以将重组核酸（例如，编码甘露糖苷酶的一种重组核酸）以表达载体形式诸如质粒、噬菌体、转座子、粘粒或病毒颗粒导入细胞中。可以将重组核酸在染色体外维持或者可以将其整合入酵母细胞染色体 DNA 中。表达载体可以

含有编码在选定的条件下对于细胞存活力需要的蛋白质的选择标志基因（例如，URA3，其编码尿嘧啶生物合成必需的酶，或 TRP1，其编码色氨酸生物合成需要的酶）以容许检测和/或选择用期望的核酸转化的那些细胞（见例如美国专利 No. 4, 704, 362）。表达载体还可以包含自主复制序列（ARS）。例如，美国专利 No. 4, 837, 148 描述了提供适合于维持毕赤酵母中的质粒的手段自主复制序列。

[0074] 整合性载体披露于例如美国专利 No. 4, 882, 279。整合性载体一般包含至少第一可插入 DNA 片段、选择标志基因、和第二可插入 DNA 片段的连续排列序列。第一和第二可插入 DNA 片段各为约 200（例如，约 250、约 300、约 350、约 400、约 450、约 500、或约 1000 或更多）个核苷酸的长度，并且具有与要转化的物种的基因组 DNA 的一部分同源的核苷酸序列。含有表达的感兴趣基因（例如，编码具有 N-糖基化活性的蛋白质的基因）的核苷酸序列在此载体中在第一和第二可插入 DNA 片段间插入，无论在标志物基因之前还是之后。可以将整合性载体线性化，之后进行酵母转化以便于感兴趣的核苷酸序列对宿主细胞基因组的整合。

[0075] 表达载体的特征可以在于在酵母（例如，解脂耶氏酵母、*Arxula adenivorans*、巴斯德毕赤酵母、或其它合适的真菌物种）启动子控制下的重组核酸，所述酵母启动子使它们能够在真菌细胞中得到表达。合适的酵母启动子包括例如 ADC1、TPI1、ADH2、hp4d、POX 和 Gal10（参见例如 Guarente 等（1982）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*79(23):7410）启动子。其它合适的启动子记载于例如 Zhu 和 Zhang（1999）*Bioinformatics*15(7-8):608-611 及美国专利 No. 6, 265, 185。

[0076] 启动子可以是组成性或诱导型（条件性的）。组成性启动子理解为其表达在标准的培养条件下恒定的启动子。诱导型启动子是响应一种或多种诱导信号的启动子。例如，可以将诱导型启动子化学调节（例如，其转录活性受到化学诱导剂诸如醇、四环素、类固醇、金属、或其它小分子的存在或缺乏调节的启动子）或物理调节（例如，其转录活性受到物理诱导物诸如光或高或低温的存在或缺乏调节的启动子）。也可以通过自身受到化学或物理信号直接调节的一种或多种转录因子间接调节诱导型启动子。

[0077] 应当理解，其它遗传工程修饰也可以是条件性的。例如，可以使用例如，位点特异性 DNA 重组酶诸如 Cre-loxP 系统（见例如，Gossen 等（2002）*Ann. Rev. Genetics*36:153-173 及美国申请公开文本 No. 20060014264）来条件性删除基因。

[0078] 可以使用多种方法诸如原生质球技术或全细胞氯化锂酵母转化方法来将重组核酸导入本文中所描述的细胞中。其它可用于将质粒或线性核酸载体转化入细胞中的方法记载于例如，美国专利 No. 4, 929, 555；Hinnen 等（1978）*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*75:1929；Ito 等（1983）*J. Bacteriol.* 153:163；美国专利 No. 4, 879, 231；及 Sreekrishna 等（1987）*Gene*59:115，每篇的公开内容通过提述完整并入本文。也可以使用电穿孔和 PEG1000 全细胞转化规程，如由 Cregg 和 Russel, *Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols*, 第 3 章, Humana Press, Totowa, N. J., 第 27-39 页（1998）所描述的。

[0079] 可以通过使用合适的技术，包括但不限于在转化后在缺乏需要的生物化学产物（由于细胞的营养缺陷型所致）的情况下培养营养缺陷型细胞，选择并检测新表型，或在存在抗生素的情况下培养来选择经转化的真菌细胞，所述抗生素在缺乏转化体中含有的抗性基因的情况下对于酵母是毒性。也可以通过将表达盒整合入基因组中来选择和/或确认转

化体,其可以通过例如 Southern 印迹或 PCR 分析来评估。

[0080] 在将载体导入感兴趣的靶细胞中前,可以将载体在细菌细胞诸如大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 中生长 (例如,扩增),如上文所描述的。可以通过导致载体 DNA 自细菌环境 (*milieu*) 纯化的本领域中已知的任何方法来自细菌细胞分离载体 DNA。可以用酚、氯仿、和乙醚来广泛提取纯化的载体 DNA,以确保质粒 DNA 制备物中不存在大肠杆菌蛋白质,因为这些蛋白质对于哺乳动物细胞可以是毒性的。

[0081] 在一些实施方案中,遗传工程化真菌细胞缺乏 OCH1 基因或其基因产物 (例如, mRNA 或蛋白质),并且是 OCH1 活性缺乏的。在一些实施方案中,遗传工程化细胞表达能够促进甘露糖基磷酸化的多肽 (例如,来自解脂耶氏酵母、酿酒酵母、*Ogataea minuta*、巴斯德毕赤酵母、或白念珠菌的 MNN4 多肽,或来自巴斯德毕赤酵母的 PNO1 多肽)。例如,真菌细胞可以表达来自解脂耶氏酵母的 MNN4 多肽 (Genbank® 登录号 XM_503217, *Genolevures* Ref:YAL10D24101g)。在一些实施方案中,遗传工程化细胞是 OCH1 活性缺乏的,并且表达能够促进甘露糖基磷酸化的多肽。

[0082] 在脱甘露糖基化后,可以分离靶分子。在一些实施方案中,将靶分子在酵母细胞内维持,并在细胞裂解后释放。在一些实施方案中,经由由编码序列 (对于外源核酸而言天然的或者工程化改造入表达载体中) 提供的机制将靶分子分泌入培养基中,所述编码序列指导分子从细胞分泌。可以通过用于检测分子存在的多种标准方案确认细胞裂解物或培养基中脱帽的且脱甘露糖基化的靶分子的存在。例如,在改变的靶分子是蛋白质的情况中,此类方案可以包括但不限于用对改变的靶蛋白 (或靶蛋白自身) 特异性的抗体进行的免疫印迹或放射性免疫沉淀、对改变的靶蛋白 (或靶蛋白自身) 特异性的配体的结合、或测试改变的靶蛋白 (或靶蛋白自身) 的酶比活。

[0083] 在一些实施方案中,在分离后,可以例如使用酶促或化学手段将脱甘露糖基化的靶分子附着于异源模块。“异源模块”指与改变的靶分子的连接 (例如,共价或非共价) 的任何组分,所述组分与最初存在于改变的靶分子上的组分不同。异源模块包括例如聚合物、载体、佐剂、免疫毒素、或可检测 (例如,荧光、发光、或放射性) 模块。在一些实施方案中,可以对改变的靶分子添加额外的 N- 聚糖。

[0084] 用于检测靶分子的糖基化的方法包括 DNA 测序仪辅助 (DSA)、荧光团辅助碳水化合物电泳 (FACE) 或表面增强的激光解吸 / 离子化飞行时间质谱术 (SELDI-TOF MS)。例如,分析可以利用 DSA-FACE,其中例如,将糖蛋白变性,接着在例如膜上固定化。然后,可以用合适的还原剂诸如二硫苏糖醇 (DTT) 或 β -巯基乙醇来还原糖蛋白。可以使用酸诸如碘乙酸来将蛋白质的硫氢基基团羧化。接着,可以使用酶诸如 N-糖苷酶 F 来自蛋白质释放 N-聚糖。任选地,可以将 N-聚糖重建,并通过还原性胺化来衍生化。然后,可以将衍生化的 N-聚糖浓缩。适合于 N-聚糖分析的设备包括例如,ABI PRISM® 377DNA 测序仪 (Applied Biosystems)。可以使用例如 GENESCAN® 3.1 软件 (Applied Biosystems) 来实施数据分析。可以用一种或多种酶诸如牛肠磷酸酶进一步处理分离的甘露糖蛋白 (mannoprotein) 以确认其 N-聚糖状态。N-聚糖分析的其它方法包括例如质谱术 (例如 MALDI-TOF-MS)、正常相的高压液相层析 (HPLC)、反相和离子交换层析 (例如,在未标记聚糖时通过脉冲安培计检测,且若将聚糖适当标记,则通过 UV 吸光度或荧光)。还可见 Callewaert 等 (2001)

Glycobiology 11(4):275-281 及 Freire 等 (2006) Bioconjug. Chem. 17(2):559-564。

[0085] 经工程化改造的细胞的培养物

[0086] 本文件还提供了本文中所描述的任何遗传工程细胞的基本上纯的培养物。如本文中所使用的,遗传工程细胞的“基本上纯的培养物”是所述细胞的如下培养物,其中培养物中活细胞总数的小于约 40%(即,小于约:35%;30%;25%;20%;15%;10%;5%;2%;1%;0.5%;0.25%;0.1%;0.01%;0.001%;0.0001%;或甚至更少)是与遗传工程细胞不同的活细胞,例如,细菌、真菌(包括酵母)、支原体、或原生动细胞。在本上下文中的术语“约”意味着相关百分比可以是在规定的百分比之上或之下的规定百分比的 15% 百分比。如此,例如,约 20% 可以是 17% 至 23%。遗传工程细胞的此类培养物包括细胞和生长、贮存、或转运培养基。培养基可以是液体、半固体(例如,凝胶状培养基)、或冷冻的。培养基包括在液体中或在半固体培养基中/上生长或在贮存或转运培养基,包括冷冻贮存或转运培养基中贮存或转运的细胞。培养物在培养容器或贮存容器或基片(例如,培养皿、烧瓶、或管或贮存小瓶或管)中。

[0087] 可以将本文中所描述的遗传工程细胞例如,以冷冻的细胞悬浮液在例如含有冻干保护剂诸如甘油或蔗糖的缓冲液中以冻干细胞贮存。或者,可以将它们例如以例如通过流化床干燥或喷雾干燥,或任何其它合适的干燥方法获得的干燥细胞群贮存。

[0088] 代谢病症

[0089] 可以使用脱甘露糖基化分子来治疗多种代谢病症。代谢病症是一种影响个体人(或动物)细胞内的能量生成的病症。大多数代谢病症是遗传的,尽管一些可以由于饮食、毒性、感染等而为“获得性的”。遗传性代谢病症又称为先天性代谢错误。一般地,遗传性代谢病症是由导致细胞的代谢过程中的一些步骤必需的缺少或不适当构建的酶的遗传缺陷引起的。最大类别的代谢病症是碳水化合物代谢的病症、氨基酸代谢的病症、有机酸代谢的病症(有机酸尿症)、脂肪酸氧化的病症和线粒体代谢、卟啉代谢的病症、嘌呤或嘧啶代谢的病症、类固醇代谢的病症、线粒体功能的病症、过氧化物酶体功能的病症、和溶酶体贮积病(LSD)。

[0090] 可以经由施用一种或多种脱甘露糖基化分子(或其药物组合物)治疗的代谢紊乱的例子可以包括遗传性血色病(hereditary hemochromatosis)、眼皮肤白化病(oculocutaneous albinism)、蛋白 C 缺乏(protein C deficiency)、I 型遗传性血管性水肿(type I hereditary angioedema)、先天性蔗糖酶异麦芽糖酶缺乏(congenital sucrase-isomaltase deficiency)、克里格勒-纳贾尔 II 型(Crigler-Najjar type II)、Laron 综合征、遗传性髓过氧化酶(hereditary Myeloperoxidase)、原发性甲状腺功能减退症(primary hypothyroidism)、先天性长 QT 综合征(congenital long QT syndrome)、甲状腺素-结合球蛋白缺乏(tyroxine binding globulin deficiency)、家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia)、家族性乳糜微粒血症(familial chylomicronemia)、无 β 脂蛋白血症(abeta-lipoproteinemia)、低血浆脂蛋白 A 水平(low plasma lipoprotein A levels)、伴有肝损伤的遗传性肺气肿(hereditary emphysema with liver injury)、先天性甲状腺功能减退症(congenital hypothyroidism)、成骨不全(osteogenesis imperfecta)、遗传性低纤维蛋白原血症(hereditary hypofibrinogenemia)、alpha-1 抗胰凝乳蛋白酶缺乏(antichymotrypsin deficiency)、肾性尿崩症(nephrogenic diabetes insipidus)、垂体神经部尿崩症

(neurohypophyseal diabetes insipidus)、腺苷脱氨酶缺陷 (adenosine deaminase deficiency)、佩利措伊斯-梅茨巴赫病 (Pelizaeus Merzbacher disease)、血管性血友病 (von Willebrand disease) IIA 型、组合的因子 V 和 VIII 缺乏、脊椎骨骺迟缓性发育不良 (spondylo-epiphyseal dysplasia tarda)、无脉络膜 (choroideremia)、I 细胞病 (cell disease)、巴藤病 (Batten disease)、共济失调毛细血管扩张症 (ataxia telangiectasias)、ADPKD-常染色体显性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease)、微绒毛包含病 (microvillus inclusion disease)、结节性硬化症 (tuberous sclerosis)、Lowe 眼脑肾综合征 (oculocerebro-renal syndrome of Lowe)、肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis)、骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndrome)、少淋巴细胞综合征 (Bare lymphocyte syndrome)、丹吉尔病 (Tangier disease)、家族性肝内胆汁郁积 (familial intrahepatic cholestasis)、X 连锁肾上腺脑白质营养不良 (X-linked adrenoleukodystrophy)、Scott 综合征、Hermansky-Pudlak 综合征 1 和 2 型、Zellweger 综合征、肢根性点状软骨发育不良 (rhizomelic chondrodysplasia punctata)、常染色体隐性原发性高草酸尿 (autosomal recessive primary hyperoxaluria)、Mohr Tranebjaerg 综合征、脊髓延髓肌肉萎缩症 (spinal and bulbar muscular atrophy)、原发性纤毛运动障碍 (primary ciliary dyskinesia) (Kartagener 氏综合征)、巨大症 (giantism) 和肢端肥大症 (acromegaly)、乳溢 (galactorrhea)、阿狄森氏综合征 (Addison's disease)、肾上腺性男性化 (adrenal virilism)、Cushing 氏综合征、酮酸中毒 (ketoacidosis)、原发性或继发性醛固酮增多症 (aldosteronism)、Miller Dieker 综合征、无脑回 (lissencephaly)、运动神经元病 (motor neuron disease)、Usher 氏综合征、Wiskott-Aldrich 综合征、Optiz 综合征、亨廷顿氏病 (Huntington's disease)、遗传性胰腺炎 (hereditary pancreatitis)、抗磷脂综合征 (anti-phospholipid syndrome)、重叠结缔组织病 (overlap connective tissue disease)、舍格伦氏综合征 (**Sjögren's syndrome**)、僵体综合征 (stiff-man syndrome)、Brugada 综合征、芬兰型先天性肾炎综合征 (congenital nephritic syndrome of the Finnish type)、杜宾-约翰逊综合征 (Dubin-Johnson syndrome)、X-连锁低磷血症 (X-linked hypophosphatemia)、彭德莱综合征 (Pendred syndrome)、持续性幼儿型胰岛素过度分泌低血糖症 (persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy)、遗传性球形红细胞增多症 (hereditary spherocytosis)、无血浆铜蓝蛋白 (aceruloplasminemia)、婴儿神经元蜡样质脂褐质沉积症 (infantile neuronal 蜡样脂褐质沉积症)、假性软骨发育不全 (pseudoachondroplasia) 和多发性骨骺、Stargardt 样黄斑营养不良 (multiple epiphyseal, Stargardt-like macular dystrophy)、X-连锁夏科-马里-图思病 (X-linked Charcot-Marie-Tooth disease)、常染色体显性色素性视网膜炎 (autosomal dominant retinitis pigmentosa)、Wolcott-Rallison 综合征、库兴氏病 (Cushing's disease)、角膜缘带肌营养不良 (limb-girdle muscular dystrophy)、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) IV 型、芬兰型遗传性家族型淀粉样变 (hereditary familial amyloidosis of Finish)、安徒生病 (Anderson disease)、肉瘤 (sarcoma)、慢性骨髓单核细胞性白血病 (chronic myelomonocytic leukemia)、心肌病 (cardiomyopathy)、面生殖发育异常 (faciogenital dysplasia)、Torsion 病、亨廷顿 (Huntington) 和脊髓

小脑共济失调 (spinocerebellar ataxias)、遗传性高同种半胱氨酸血症 (hereditary hyperhomocysteinemia)、多神经病 (polyneuropathy)、下位运动神经元病 (lower motor neuron disease)、色素性视网膜炎 (pigmented retinitis)、血清阴性多关节炎 (seronegative polyarthritis)、间质性肺纤维化 (interstitial pulmonary fibrosis)、雷诺氏现象 (Raynaud's phenomenon)、韦格纳氏肉芽肿病 (Wegner's granulomatosis)、蛋白尿 (preteinuria)、CDG-Ia、CDG-Ib、CDG-Ic、CDG-Id、CDG-Ie、CDG-If、CDG-IIa、CDG-IIb、CDG-IIc、CDG-IIId、Ehlers-Danlos 综合征、多发性外生骨疣 (multiple exostoses)、格里塞利综合征 (Griscelli syndrome) (1 型或 2 型)、或 X-连锁非特异性智力低下 (X-linked non-specific mental retardation)。另外,代谢紊乱还可以包括溶酶体贮积病症,诸如但不限于法布里病 (Fabry disease)、粘多糖贮积症 I、法韦尔病 (法韦尔病)、戈谢病 (戈谢病)、GM1-神经节苷脂贮积病 (神经节苷脂贮积病)、泰-萨克斯 (Tay-Sachs) 病、桑德霍夫病 (桑德霍夫病)、GM2 激活物病 (activator disease)、克拉伯病 (克拉伯病)、异染性脑白质营养不良 (异染性脑白质营养不良)、尼曼-皮克病 (尼曼-皮克病) (A、B、和 C 型)、谢伊病 (沙伊病)、亨特病 (亨特病)、桑菲列普病 (桑菲列普 disease)、莫尔丘病 (莫尔丘病)、马-拉病 (马-拉病)、透明质酸酶缺乏 (透明质酸酶缺乏)、天冬氨酰基葡萄糖胺尿 (天冬氨酰基葡萄糖胺尿)、岩藻糖苷贮积症 (岩藻糖苷贮积症)、甘露糖苷贮积症 (甘露糖苷贮积症)、欣德勒病 (欣德勒 disease)、涎酸贮积症 (涎酸贮积症) 1 型、蓬佩病 (蓬佩病)、致密性成骨不全症 (致密性成骨不全症)、蜡样脂褐质沉积症 (蜡样脂褐质沉积症)、胆固醇脂贮积病 (胆固醇酯贮积病)、沃尔曼病 (沃尔曼病)、多种硫酸酯酶缺乏症 (多种硫酸酯酶缺乏症)、半乳糖唾液酸沉积症 (半乳糖涎酸贮积症)、粘脂糖症 (粘脂糖症) (II、III、和 IV 型)、胱氨酸贮积症 (胱氨酸贮积症)、唾液酸贮积病 (唾液酸贮积病)、乳糜微粒滞留病 (chylomicron retention disease) 伴 **Marinesco-Sjögren** 综合征、Hermansky-Pudlak 综合征、Chediak-Higashi 综合征、Danon 病、或 Geleophysic 发育异常。

[0091] 代谢紊乱的症状是许多的且多种多样的,并且可以包括下列一项或多项:例如,贫血 (anemia)、疲劳 (fatigue)、容易瘀伤 (bruising easily)、低血小板 (low blood platelet)、肝增大 (liver enlargement)、脾增大 (spleen enlargement)、骨骼衰减 (skeletal weakening)、肺损伤 (lung impairment)、感染 (例如,胸感染 (chest infections) 或肺炎 (pneumonias))、肾损伤 (kidney impairment)、进行性脑损伤 (progressive brain damage)、癫痫发作 (seizures)、额外厚的胎粪 (extra thick meconium)、咳嗽 (coughing)、哮喘 (wheezing)、过多唾液或粘液生成、呼吸急促 (shortness of breath)、腹痛 (abdominal pain)、肠闭塞 (occluded bowel or gut)、生育力问题 (fertility problems)、鼻中的息肉 (polyps in the nose)、指/趾甲和皮肤的杵状肥大 (clubbing)、手或脚疼痛 (pain in the hands or feet)、毛细管扩张性疣 (angiokeratoma)、出汗减少 (decreased perspiration)、角膜和晶状体混浊 (opacities)、白内障 (cataracts)、二尖瓣脱垂 (mitral valve prolapse) 和 / 或反胃 (regurgitation)、心肥大 (cardiomegaly)、温度不耐性胃 (temperature intolerance)、步行困难 (difficulty walking)、吞咽困难 (difficulty swallowing)、进行性视觉丧失 (progressive vision loss)、进行性听觉丧失 (progressive hearing loss)、张力过低 (hypotonia)、巨舌 (macroglossia)、反射消失 (areflexia)、下腰痛 (lower back pain)、

睡眠性呼吸暂停 (sleep apnea)、端坐呼吸 (orthopnea)、瞌睡 (somnia)、脊柱前凸 (lordosis)、或脊柱侧弯 (scoliosis)。应当理解,由于缺陷的或缺乏的蛋白质的多种多样的性质和所得疾病表型 (例如,代谢紊乱的症状表现),给定病症一般会仅呈现所述特定病症特征性的症状。例如,法布里病患者可以呈现上文提及的症状的特定亚组,诸如但不限于温度不耐性、角膜涡转 (corneal whirling)、疼痛、皮疹 (skin rashes)、恶心 (nausea)、或腹泻 (diarrhea)。具有 Gaucher 综合征的患者可以呈现为伴有脾大 (splenomegaly)、硬化 (cirrhosis)、抽搐 (convulsions)、张力过高 (hypertonia)、呼吸暂停 (apnea)、骨质疏松症 (osteoporosis)、或皮肤变色 (skin discoloration)。

[0092] 在施用本文中所描述的一种或多种脱甘露糖基化分子外,也可以通过合适的营养和维生素 (例如,辅因子疗法)、物理疗法、和疼痛药物治疗代谢病症。

[0093] 根据给定的代谢病症的特定性质,患者可以在任何年龄时呈现这些症状。在许多病例中,症状可以存在于儿童或成人早期中。例如,法勃雷病 (Fabry disease) 的病症可以存在于早期年龄,例如年龄为 10 或 11 岁。

[0094] 如本文中所使用的,“有风险形成代谢病症”的受试者是具有形成病症的素因,即形成由于酶中的突变所致的代谢病症的遗传素因的受试者,所述酶诸如酸性 alpha 葡糖苷酶、alpha 半乳糖苷酶、alpha-L- 艾杜糖苷酸酶、beta-D- 半乳糖苷酶、beta- 葡糖苷酶、beta- 己糖胺酶 (己糖胺酶)、beta-D- 甘露糖苷酶、alpha-L- 岩藻糖苷酶 (fucosidase)、芳基硫酸酯酶 B、芳基硫酸酯酶 A、alpha-N- 乙酰基半乳糖苷酶、天冬氨酰氨基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2- 硫酸酯酶、alpha- 氨基葡萄糖苷-N- 乙酰转移酶、beta-D- 葡糖醛酸糖苷酶 (glucuronidase)、透明质酸酶、alpha-L- 甘露糖苷酶、alpha- 神经氨酸酶、磷酸转移酶、酸性脂肪酶、酸性神经酰胺酶、鞘磷脂酶、硫酸酯酶、组织蛋白酶 K、或脂蛋白脂肪酶。明显地,“有风险形成代谢病症”的受试者不是感兴趣物种内的所有受试者。

[0095] “怀疑患有病症”的受试者是具有代谢病症诸如本文中所描述的那些病症之任一的一种或多种症状的受试者。

[0096] 药物组合物和治疗方法

[0097] 可以将脱甘露糖基化的靶分子掺入药物组合物中,所述药物组合物含有治疗有效量的分子和一种或多种佐剂、赋形剂、载体、和 / 或稀释剂。可接受的稀释剂、载体和赋形剂通常没有不利地影响接受体的稳态 (例如,电解质平衡)。可接受载体包括生物相容性、惰性或生物可吸收盐、缓冲剂、寡或多糖、聚合物、粘性改善剂、防腐剂等。一种例示性的载体是生理盐水 (0.15M NaCl, pH7.0 至 7.4)。另一种例示性的载体是 50mM 磷酸钠、100mM 氯化钠。关于配制和施用药物组合物的技术的更多详情可参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.)。补充性活性化合物也可以掺入组合物中。

[0098] 含有脱甘露糖基化分子的药物组合物的施用可以是系统的或局部的。可以如下配制药物组合物,使得它们适合于胃肠外和 / 或非胃肠外施用。具体的施用模式包括皮下、静脉内、肌肉内、腹膜内、经皮、鞘内、口服、直肠、含服、表面、鼻、眼、关节内、动脉内、蛛网膜下、支气管、淋巴系统、阴道、和子宫内施用。

[0099] 施用可以通过周期性注射药物组合物的推注或者可以通过自外部 (例如, IV 袋) 或内部 (例如,生物可蚀性植入物、生物人工器官、或植入的经改变的 N- 糖基化分子生

成细胞的集落)的储库的静脉内或腹膜内施用而不是中断的或连续的。见例如美国专利 No. 4, 407, 957, 5, 798, 113 和 5, 800, 828。可以使用合适的投递手段来实现药物组合物的施用,诸如:泵(见例如 *Annals of Pharmacotherapy*, 27:912(1993); *Cancer*, 41:1270(1993); *Cancer Research*, 44:1698(1984);微囊化(见例如美国专利 No. 4, 352, 883; 4, 353, 888; 和 5, 084, 350);连续释放聚合物植入物(见例如 Sabel, 美国专利 No. 4, 883, 666); macroencapsulation(见例如美国专利 No. 5, 284, 761, 5, 158, 881, 4, 976, 859 和 4, 968, 733 及公布的 PCT 专利申请 W092/19195, W095/05452);注射(皮下、静脉内、动脉内、肌肉内、或对其它合适的部位);或口服施用(在胶囊、液体、片剂、丸剂、或延长释放的配制剂中)。

[0100] 胃肠外投递系统的例子包括乙烯-乙烯基乙酸酯共聚物颗粒、渗透泵、可植入输注系统、泵投递、包囊细胞投递、脂质体投递、针投递注射、无针注射、喷雾器、气雾器、电穿孔、和经皮贴片。

[0101] 适合于胃肠外施用的配制剂通常含有经改变的 N-糖基化分子的无菌水性制备物,其优选地是与接受体的血液等张的(例如,生理盐水溶液)。配制剂可以以单位剂量或多剂形式呈现。

[0102] 适合于口服施用的配制剂可以以离散单元呈现,诸如胶囊、扁囊剂、片剂、或锭剂,它们各自含有预定量的经改变的 N-糖基化分子;或水性液体或非水性液体中的悬浮液,诸如糖浆剂、酏剂、乳剂、或顿服水剂(draught)。

[0103] 可以对哺乳动物(例如,人患者)以例如膏剂、喷雾剂、泡沫、凝胶、油膏、软膏、或干擦施用适合于表面施用的脱甘露糖基化分子。干擦在施用部位可以是再水合的。此类分子也可以直接输注入(例如,浸入并干燥)绷带、纱布、或贴片,其然后可以直接表面应用。此类分子也可以以半液体、胶化、或完全液体状态在供表面施用的绷带、纱布或贴片中维持(见例如美国专利 No. 4, 307, 717)。

[0104] 可以以本领域技术人员可确定的剂量方案对此需要的受试者施用治疗有效量的药物组合物。例如,可以对受试者以每剂 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 受试者体重的剂量系统性施用组合物。在另一个例子中,剂量是每剂 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 受试者体重。在另一个例子中,剂量是每剂 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 受试者体重,例如,每剂 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 受试者体重。

[0105] 为了有效治疗效力,首先可以以不同给药方案施用脱甘露糖基化分子。单位剂量和方案取决于如下因素,其包括例如,哺乳动物物种、其免疫状态、哺乳动物的体重。通常,可以使用合适的筛选测定法作为临床测试规程的一部分来监测此类分子在组织中的水平,例如以测定给定治疗方案的功效。

[0106] 脱甘露糖基化分子的给药频率在医学从业人员(例如医生或护士)的技术和临床判断内。通常,通过可以建立最佳施用参数的临床试验来建立施用方案。然而,从业人员可以依照受试者的年龄、健康、重量、性别和医学状态来改变此类施用方案。可以根据治疗是预防性还是治疗性来改变给药频率。

[0107] 可以通过例如细胞培养物或实验动物中的已知药学规程来确定此类分子或其药物组合物的毒性和治疗效力。例如,可以使用这些规程来测定 LD50(对 50% 的群体致死的剂量)和 ED50(在 50% 的群体中治疗有效的剂量)。毒性与治疗效果之间的剂量比率是治疗系数,并且其可以表示为比率 LD50/ED50。优选展现出大的治疗系数的药物组合物。虽然可

以使用展现出毒性副作用的药物组合物,但是要注意设计如下的投递系统,其将此类化合物靶向受累组织位置以使对正常细胞(例如,非靶定细胞)的潜在损害最小化,由此降低副作用。

[0108] 可以在配制合适受试者(例如,人患者)用剂量范围中使用自细胞培养测定法和动物研究获得的数据。此类药物组合物的剂量一般位于包括具有少许毒性或没有毒性的ED50的循环浓度范围内。剂量可以在此范围内变化,这取决于所采用的剂量形式和所利用的施用路径。对于如本文中所描述的那样使用的药物组合物(例如,用于治疗受试者中的代谢紊乱),最初可以自细胞培养测定法评估治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量以达到包括IC50(即,实现对症状的半最大抑制的药物组合物的浓度)的循环血浆浓度范围,如在细胞培养中所测定的。可以使用此类信息来更精确地确定人中有用的剂量。可以例如通过高效液相层析来测量血浆中的水平。

[0109] 如本文中所定义的,脱甘露糖基化分子的“治疗有效量”是能够在经治疗的受试者中产生医学上期望的结果(例如,改善代谢紊乱的一种或多种症状)的分子的量。治疗有效量(即,有效剂量)可以包括每千克受试者或样品重量毫克或微克量的化合物(例如,每千克约1微克至每千克约500毫克、每千克约100微克至每千克约5毫克、或每千克约1微克至每千克约50微克)。

[0110] 受试者可以是任何哺乳动物,例如,人(例如,人患者)或非人灵长类(例如,黑猩猩、狒狒、或猴)、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、沙鼠、仓鼠、马、一类牲畜(例如,母牛、猪、绵羊、或山羊)、犬、猫、或鲸。

[0111] 可以对受试者以与另一种治疗,例如用于代谢紊乱(例如,溶酶体贮积病症)的治疗的联合疗法施用本文中所描述的分子或其药物组合物。例如,联合疗法可以包括对受试者(例如,人患者)施用一种或多种别的药剂,其对具有,或有风险形成,(或怀疑具有)代谢紊乱(例如,溶酶体贮积病症)的受试者提供治疗益处。如此,可以同时施用化合物或药物组合物和一种或多种别的药剂。或者,可以第一次施用所述分子,而第二次施用一种或多种别的药剂,或者反之亦然。

[0112] 应当领会,在先前的疗法是特别有毒性(例如,具有显著副作用概况的用于代谢紊乱的治疗)的情况下,可以使用本文中所描述的分子的施用来以如下的水平抵消和/或减少先前疗法的量,从而足以给出相同或改善的治疗益处,而没有毒性。

[0113] 本文中所描述的任何药物组合物可以与施用用法说明书一起包含在容器、包装、或分配器中。

[0114] 以下是本发明实施的实施例。它们不应解释为以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0115] 实施例 1

[0116] huGAA 表达菌株的生成

[0117] 构建解脂耶氏酵母菌株 OXY1589,其含有三个拷贝的人 alpha 葡糖苷酶(又称为酸性 alpha 葡糖苷酶(GAA)或酸性麦芽糖酶 EC3. 2. 1. 3)和两个拷贝的解脂耶氏酵母 MNN4 基因。菌株 OXY1589 的基因型如下:

[0118] MatA, leu2-958, ura3-302, xpr2-322,

[0119] gut2-744, ade2-844

[0120] POX2-Lip2pre-huGAA:URA3Ex::zeta

[0121] POX2-Lip2pre-huGAA:LEU2Ex::zeta

[0122] POX2-Lip2pre-hGM-CSF:GUTEx::zeta

[0123] Y1MNN4-POX2-hp4d-YLMNN4:ADE2::PT 靶向性

[0124] 依照在不同选择性标志物方面具有修改的完善建立的方案实施所有转化。在所有情况中（除非另有规定），通过 NotI 限制性消化以从表达质粒除去卡那霉素抗性基因来获得 huGAA 整合片段。通过琼脂糖凝胶电泳将所得的片段完全分离，接着用 Qiagen 柱纯化正确的 huGAA 片段。如下构建菌株 OXYY1589，首先将人 GAA (huGAA) 克隆入解脂耶氏酵母表达载体中，并构建解脂耶氏酵母 MNN4 串联表达载体。然后，实施三次稳定的整合转化以获得最终的 huGAA 生产菌株 OXYY1589。

[0125] 经解脂耶氏酵母密码子优化的 huGAA 表达载体：将编码 110kDA 人 GAA (huGAA) 前体的核苷酸序列化学合成，并针对解脂耶氏酵母表达进行密码子优化。在合成的构建体中，消除前和原 huGAA 信号肽，使得蛋白质在氨基酸 57 处开始。将 huGAA 的合成的 ORF (图 1A) 以符合读码框的方式在 5' 端与解脂耶氏酵母 LIP2 信号肽（前）的 3' 端融合，所述解脂耶氏酵母 LIP2 信号肽（前）后面有两个 Xxx-A1a 切割位点的编码序列且侧翼有 BamHI 和 AvrII 限制性位点，用于在表达载体中克隆。构建体在诱导型 POX2 启动子控制下。图 1B 上显示了融合蛋白的整个氨基酸序列。

[0126] 图 2 中呈现了表达载体的一般方案。细菌模块源自质粒 pHSS6，并且包含细菌复制起点 (ori) 和赋予对卡那霉素的抗性的卡那霉素抗性基因 (KanR)。整合盒包含 a) 用于对解脂耶氏酵母转化的选择标志物 (URA3 ;LEU2 ;GUT2)、b) 由启动子构成的表达盒、c) 与信号序列以符合读码框的方式插入 huGAA 的多克隆位点 (MCS) 和 d) LIP2 基因终止子。整合盒侧翼有 zeta 序列，用于稳定非同源整合入解脂耶氏酵母基因组中。两个 NotI 限制性位点实现转化前的表达盒分离。分别使用质粒 pRAN034、pRAN036 和 OXYP183 来生成 huGAA 表达载体 pRAN058、pRAN059 和 pRAN060，其分别含有 URA3、LEU2 和 GUT2 转化标志物。

[0127] 串联 Y1MNN4 表达载体：将 Y1MNN4 基因在诱导型 pPOX2 启动子和（半）组成性 hp4d 启动子的控制下克隆。将 Y1MNN4 的这两种表达盒作为串联构建体亚克隆入一个载体中，所述串联构建体携带用于靶向整合入基因组的 ADE2 基因座中的 ADE2 基因的侧翼区 (PT) 和作为选择标志物的 ADE2 基因。

[0128] 中间菌株 OXYY1569：第一次转化是使用 URA3 和 LEU2 标志物共转化从 pRAN058 和 pRAN059 载体纯化的表达盒以生成中间重组菌株 OXYY1569。OXYY1569 携带在菌株 G014 基因组中随机整合的 pPOX2 启动子控制下的两个 huGAA 表达构建体。

[0129] 如下选择 OXYY1569。对基因组 DNA 实施 PCR 筛选以确认外来 huGAADNA 对解脂耶氏酵母基因组的整合。引物设计为从 huGAA 核苷酸序列扩增 252bp 片段。还实施对基因组 DNA 的 Southern 印迹分析以确认至少 2 个拷贝的 huGAA DNA 的整合。特别地，用 Hind III 消化来自 OXYY1569 克隆的基因组 DNA，并用经 DIG 标记的 huGAA 特异性探针探查。

[0130] 为了选择分泌高水平 huGAA 的克隆，依照标准规程在 POX2 诱导条件下在摇瓶中培养几个随机选择的克隆，其在 PCR 筛选和 Southern 印迹中鉴定为呈阳性。在所有情况中，在诱导后 72 小时收集培养物上清液，并在标准 Western 印迹和酶活性测定分析中筛选。对

OXY1569 的 N 聚糖分析指示 OXY1569 中主要的结构是 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 。

[0131] 中间菌株 OXY1584 :转化重组菌株 OXY1569 以将两个拷贝的解脂耶氏酵母 MNN4 基因整合入其基因组中,从而生成 OXY1584。用自质粒 OXP1479B 切出的 SacII/XmaI 衍生的表达盒实施转化。设计表达盒以靶向整合入解脂耶氏酵母基因组的 ADE2 基因座中。在 Southern 印迹和聚糖分析后选择重组菌株以就升高的磷酸化而言评估菌株行为。将几个任意选择的转化体的基因组 DNA 用 SpeI 消化,并用经 DIG 标记的 MNN4 特异性探针探查。MNN4 表达盒对解脂耶氏酵母基因组的 ADE2 基因座的正确靶向整合应当给出 4207bp 和 5683bp 条带。在标准的摇瓶规程中培养 Southern 印迹阳性克隆。对分泌性蛋白质实施 N-聚糖分析以选择中间克隆 OXY1584。与亲本菌株 OXY1569 相比,MNN4 过表达后的主要结构是 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2(\text{PMan})_1$ 和 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2(\text{PMan})_2$ 。

[0132] 生产菌株 OXY1589 :为了生成最终的原养型生产菌株 OXY1589,将第三个拷贝的 huGAA 整合入重组 OXY1584 菌株的基因组中。用来自 pRAN069 的 Not I 切出的表达盒实施转化。首先,通过对 gDNA 的 PCR 对转化体筛选额外的 huGAA 拷贝的存在。为了评估 huGAA 生成,对任意选择的 PCR 阳性克隆进一步分析标准摇瓶培养后的表达。在 Western 印迹分析和酶活性测定法后选择表达最高水平的 huGAA 的克隆 (OXY1589)。还再次确认,M8 至 MP2-M8 和 MP-M8N-聚糖的转化水平不受额外 huGAA 表达盒存在的影响。

[0133] 实施例 2

[0134] 菌株 OXY1589 的补料分批培养

[0135] 为了自菌株 OXY1589 (实施例 1) 生成 huGAA,使用 10L 搅拌罐来建立补料分批工艺,工作体积是 6-8 升。将该工艺分成两个阶段:

[0136] 1) 葡萄糖上的分批生长以形成生物量

[0137] 2) 借助于有限的油酸补料通过诱导形成产物

[0138] 通常,分批阶段是约 20 小时 (h),而生产阶段是约 72 小时。在工艺结束时,将培养液离心,并收集上清液。使用上清液作为起始材料以纯化 GAA (参见实施例 3)。

[0139] 在发酵期间控制下列参数。将充气维持于恒定值 1.5vvm 空气 (每分钟每体积的体积)。最初,将溶解氧 (DO) 保持于 30%。根据 DO 水平,将搅拌从 600 增加到 1200rpm。一旦它达到最大值 1200rpm,将速度保持恒定,并将 DO 定位点设置为 10%。为了维持 10%DO,将氧气以最大百分比 50% 掺入反应器中。通过泡沫探测器控制泡沫演化。在泡沫检测的情况下,将消泡剂添加至生物反应器。通过添加 14%(v/v) 氨水 (碱) 或 10% 磷酸来控制 pH 以维持 pH6.8 的恒定值。贯穿整个过程将温育于 28° C 保持恒定。

[0140] 通过测量 600nm 的光密度 (OD600) 监测生物量。将样品在蒸馏水中稀释 2-1000 倍以获得分光光度计的线性范围中的数值。通过 Western 印迹分析和酶比活测试检测产物形成。

[0141] 实施例 3

[0142] 重组 huGAA (rhGAA) 的纯化

[0143] 经由深度过滤使培养后的上清液 (参见实施例 2) 澄清。然后,将所得的材料经由 TFF 浓缩 20 倍,并在 10kDa MWC0 膜 (Millipore) 上针对 20mM 磷酸钠 pH6 和 100mM NaCl 过滤。

[0144] 通过添加硫酸铵多至 1M 的浓度开始 rhGAA 的纯化。离心后,将上清液在

Toyopearl- 苯基 650M(Tosoh Biosciences)XK16/40 填充柱上加载。对洗脱应用 1 至 0M 硫酸铵的线性梯度。然后,将含有 rhGAA 的那些级分合并,并对 10mM BIS-TRIS pH6 中进行缓冲液更换。使用 0 至 1M NaCl 的线性盐梯度在 Source30Q Tricorn10/50 或 XK25/20 填充柱(GE Healthcare)上经由阴离子交换层析实现进一步纯化。然后,将所得的含有 GAA 的级分浓缩,之后加载到用 50mM 磷酸钠 pH6 和 200mM NaCl 预平衡的最终 HiLoad16/60Superdex200 凝胶过滤柱(GE Healthcare)上。基于比活和经考马斯染色的 SDS-PAGE 凝胶上的纯化选择级分,然后,将其组合并浓缩至终浓度 5-10mg/ml。在具有分子量截留 10kDa 的 15ml Amicon 超离心装置(Millipore)上进行蛋白质浓缩。

[0145] 通过将反应缓冲液以 10:1 或 20:1 体积比例添加至 10 或 5 μ l 洗脱级分开始 rhGAA 的定性筛选反应,所述反应缓冲液由 0.35mM 4-MUG、0.1%BSA 和 100mM 乙酸钠 pH4 组成。在 96 孔平底微量滴定板中进行所有反应。于 37 $^{\circ}$ C 在 30 分钟至 1 小时的温育期后,添加等体积的 100mM 甘氨酸 pH11 以停止反应,并在 UV 光下观察荧光反应产物 4-甲基伞形酮的释放。用合成的底物对-硝基苯基-I-D-葡萄糖吡喃糖苷(PNPG)使用比色测定法测定比活(单位/mg 蛋白质),所述比色测定法测量黄色的对-硝基酚盐反应产物的酶促释放。通过在微量滴定板的反应孔中混合 10 μ l 酶溶液和 90 μ l 底物反应缓冲液(150mM 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液 pH4, 1%BSA 中的 2mM PNPG)来开始反应,随后于 37 $^{\circ}$ C 一起温育。在 1 至 2 小时后,添加等体积的停止缓冲液,即 10%碳酸钠 pH12 以淬灭反应,并将释放的对-硝基酚(PNP)转化成其离子化状态。在 405nm 波长处测量经背景校正的吸光度和对硝基酚盐标准品,并计算比活。用二辛可宁酸(BCA)方法测定蛋白质浓度。一个单位定义为于 37 $^{\circ}$ C 在 2mM 的底物终浓度在柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液(pH4.0)中每分钟催化 1nmol PNPG 转化成 1nmol PNP 和 D-葡萄糖的酶量。

[0146] 实施例 4

[0147] CcMan5 和 CcMan4 的表达

[0148] 将 CcMan4 和 CcMan5ORF 克隆入载体 pLSAH36 中,所述载体 pLSAH36 含有 DsbA 信号序列,并且导致具有 N 端多组氨酸标签的蛋白质的表达。在大肠杆菌 BL21 细胞中实施蛋白质的表达。使用 Talon 柱分离并纯化驻留于周质中的蛋白质。图 3 和图 4 中提供了 DsbA-CcMan5 和 DsbA-CcMan4 的 ORF 的核苷酸序列。图 5 中给出质粒 pLSAHCcMan5 和 pLSAHCcMan4 的图示。

[0149] 实施例 5

[0150] 用 GH47 α -甘露糖苷酶使经 APTS 标记的磷酸化的 N-聚糖脱甘露糖基化

[0151] 来自红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*, Hj)(无性型:瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*))的 GH47 α -1, 2-甘露糖苷酶可以从 Man9GlcNAc2 寡糖序贯切割所有 4 个 α -1, 2 连接的甘露糖糖(Maras, M. 等, *J. Biotechnol*, 77:255-263(2000))。对来自斋藤曲霉(*As*)(又称为海枣曲霉)的 α -1, 2-甘露糖苷酶描述了相似的活性(Ichishima E. 等, *Biochem. J.*, 339:589-597)。

[0152] 将 HjMan(Genbank nr AAF34579)在巴斯德毕赤酵母中表达并纯化,如记载于 Maras, M. 等, *J. Biotechnol*, 77:255-263(2000)的。AsMan(Genbank nr BAA08634)的商业酶制品可获自 Prozyme-Glyco。

[0153] 对经 8-氨基-1, 3, 6-三磷酸(APTS)标记的、源自过表达 MNN4 基因的解脂耶

氏酵母细胞的糖的混合物（其含有 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (M8)、单磷酸化 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (MP-M8) 和 / 或二磷酸化 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ((MP)₂-M8) 糖) 测试来自红褐肉座菌和斋藤曲霉的 α -1, 2-甘露糖苷酶。在图 6 中, 在图示中呈现潜在的最终水解产物, 假设若下层甘露糖被磷酸化, α -1, 2-甘露糖苷酶也可以水解末端 α -1, 2-甘露糖。为了能够测试 α -1, 2-甘露糖苷酶对具有脱帽的磷酸根残基的磷酸化 N-聚糖（如此存在有末端磷酸根的寡糖）的活性, 用 CcMan5, 即具有磷酸根脱帽活性的来自纤维化纤维微细菌的 GH92 酶处理 MNN4 糖（图 7）。CcMan5 除去甘露糖-磷酸-甘露糖二酯连接中的末端甘露糖。

[0154] 除非另有叙述, 于 37° C 在具有 2mM CaCl_2 的乙酸铵缓冲液 (10mM), pH5.0 中用 AsMan 和 HjMan 对 APTS 标记的 N-聚糖将所有反应进行过夜。使用具有添加的 2mM CaCl_2 的 10mM HEPES 缓冲液于室温和 pH7.0 进行 CcMan5 反应。为了确认磷酸根脱帽的聚糖的存在, 或者为了能够鉴定快速运行的具有末端磷酸根的聚糖的结构, 随后将小牛肠磷酸酶 (CIP) 添加至反应混合物。在磷酸根水解后, 获得中性 N-聚糖, 其可以经由与来自经 APTS 标记的从 RNaseB 释放的 N-聚糖 ($\text{Man}_9\text{-5GlcNAc}_2$) 的电泳图的比较鉴定。

[0155] 在图 8 中, 呈现了 DSA-FACE 电泳图, 其关于用 HjMan 和 AsMan 水解含有 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 和单磷酸化糖 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (小图 B) 的 N-聚糖制备物。 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 通过这两种 α -1, 2-甘露糖苷酶水解为 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, 尽管对 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 的水解观察到差异。HjMan 最可能释放两个 α -1, 2-连接的甘露糖 (小图 C 中的 $\text{ManP-Man}_6\text{GlcNAc}_2$)。在 AsMan 处理后出现的略快运行的峰提示了释放三个 α -1, 2-连接的甘露糖, 如此形成 $\text{ManP-Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (小图 D)。新形成的产物在用小牛肠磷酸酶 (CIP) 处理后没有消失, 这确认磷酸根仍然是甘露糖加帽的 (小图 E 和 F)。

[0156] 为了确认小图 E 中快速运行的峰是 $\text{ManP-Man}_6\text{GlcNAc}_2$, 小图 D 中快速运行的峰是 $\text{ManP-Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (图 8), 对 MNN4 糖重复用 HjMan 和 AsMan 进行的实验, 所述 MNN4 糖首先用磷酸根脱帽酶 CcMan5 处理 (产生 $\text{P-Man}_8\text{GlcNAc}_2$, 图 8 中的小图 C)。在于 37°C 与 α -1, 2-甘露糖苷酶一起温育 20、40 和 180 分钟后, 通过于 100°C 将反应混合物加热 3 分钟来停止反应。接着, 实施 CIP 处理。图 9A 中呈现了用 HjMan 得到的结果。HjMan 将 $\text{P-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 序贯切割成 $\text{P-Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{P-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (小图 D 至 F)。AsMan 可以序贯除去三个 α -1, 2-连接的甘露糖, 导致 $\text{P-Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{P-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{P-Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 的形成。参见图 9B。

[0157] 仅在 α -1, 6 臂 (N-聚糖的右臂 (图 6A 和 6B 中示意性呈现) 被磷酸化时, 仅可以解释上述结果 (图 9A 和 9B), 连同对 MNN4 聚糖的过夜 α -1, 2-甘露糖苷酶消化 (图 8)。若下层甘露糖被磷酸化 (以甘露糖残基加帽的磷酸根残基或脱帽的), 则仅斋藤曲霉 α -1, 2-甘露糖苷酶能够水解末端 α -1, 2-甘露糖。HjMan 仅从非磷酸化的 α -1, 3 臂除去两个 α -1, 2-连接的甘露糖。

[0158] 在使用由单磷酸化 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 和二磷酸化 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 组成的 MNN4 制备物 (图 10, 小图 C) 时也确认如下的实情, 即若下层甘露糖被磷酸化, AsMan 可以除去末端 α -1, 2-甘露糖, 而 HjMan 不能。AsMan 可以水解 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$, 如从小图 D 中两个额外的快速运行的峰 (最可能是 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 和 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_6\text{GlcNAc}_2$) 的出现观察到的。HjMan 没有水解 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (图 10, 小图 E)。

[0159] 实施例 6

[0160] 用 GH47 α -甘露糖苷酶对在解脂耶氏酵母菌株中表达的具有高度磷酸化 N-聚糖

的糖蛋白的脱甘露糖基化

[0161] 在解脂耶氏酵母菌株 OXYY1589 中表达人溶酶体 α -葡糖苷酶 huGAA 以生成具有高度磷酸化 N-聚糖结构的糖蛋白。如实施例 3 中所描述,纯化 huGAA。

[0162] 将 HjMan 和 AsMan 添加至在具有 2mM CaCl_2 的 100mM 乙酸铵, pH5.0 中的 huGAA 溶液。将反应混合物于室温温育过夜。将 N-聚糖用 PNGaseF 释放,用 APTS 标记,随后在 DSA-FACE 上分析,基本上如记载于 Laroy W. 等, Nature Protocols, 1:397-405 (2006) 的。在图 11 中显示 α -1,2-甘露糖苷酶处理之前和之后的 N-聚糖概况。从纯化的 huGAA 释放的 N-聚糖混合物主要由 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 和 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 构成(图 11, 小图 B 和 E)。可以将比 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 略快运行的峰归入 $\text{ManP-Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 。仅存在非常少量的 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 。在将 huGAA 与 HjMan 一起温育后,观察到 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 向 $\text{ManP-Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{ManP-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 的转化,尽管没有水解 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (图 11, 小图 C)。小图 D 中的电泳图显示了用 AsMan 处理 huGAA 后获得的糖。AsMan 水解 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$, 在电泳图的左侧且接近 $\text{ManP-Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{ManP-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 形成 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 和 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 。还从 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 的水解形成 $\text{ManP-Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 。这些数据确认 α -1,6 臂在 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 结构中是磷酸化的,而且若下层甘露糖被磷酸化,在糖蛋白水平上,AsMan 还可以水解末端 α -1,2-甘露糖。HjMan 活性受限于从中性 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ N-聚糖释放 α -1,2-连接的甘露糖或除去 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 中非磷酸化的 α -1,3 臂上的两个 α -1,2-连接的甘露糖。

[0163] 实施例 7

[0164] 用 GH92 α -甘露糖苷酶对经 APTS 标记的磷酸化 N-聚糖脱甘露糖基化

[0165] 在大肠杆菌中表达 CcMan4 和 CcMan5,并分离不同细胞级分,如记载于实施例 4 中的。对经 (APTS) 标记的源自 MNN4 过表达菌株的 N-聚糖测试周质溶液的活性,并在 DSA-FACE 上分析(图 12)。于室温在具有 2mM CaCl_2 的 10mM HEPES 缓冲液, pH7.0 中将 N-聚糖与 CcMan4、CcMan5 或者与这两种酶的混合物一起温育过夜。包含用 AsMan 的对照实验,并将其实施,如记载于实施例 5 中的。在图 12A 中显示的实验中,使用 MNN4 级分,其主要含有 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (M8) 和单磷酸化的 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (MP-M8)(小图 B)。CcMan4 将 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 分别水解为 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{ManP-Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (小图 C)。用 AsMan 获得相同的反应产物(小图 D 和实施例 5)。CcMan5 没有水解两个 α -1,2 甘露糖间的糖苷连接(如此,没有 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 峰的转变),但是使 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 中的磷酸根脱帽,产生快速运行的峰 $\text{P-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (小图 E)。在此反应混合物与 CIP 一起温育后,仅观察到与 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 对应的峰(小图 F)。CcMan4 和 CcMan5 的混合物将 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 分别水解为 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{P-Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (小图 G)。因此,在 CIP 处理后仅观察到与 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 对应的峰(小图 H)。CcMan4 还将二磷酸化的 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 水解为 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (图 12B, 小图 J),如用 AsMan 也观察到的(小图 K 和实施例 5)。CcMan4 和 CcMan5 的混合物生成 $\text{P}_2\text{-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{P-Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (小图 N)。

[0166] 如此,CcMan4 是一种如果下层甘露糖被磷酸化也能够水解末端 α -1,2-甘露糖的 α -1,2-甘露糖苷酶。它可以与磷酸脱帽酶 CcMan5 组合使用。

[0167] 实施例 8

[0168] 用 GH92 α -甘露糖苷酶对在解脂耶氏酵母菌株中表达的具有高度磷酸化 N-聚糖

的糖蛋白的脱甘露糖基化

[0169] 将 CcMan4 和 CcMan5 与在解脂耶氏酵母中表达的 huGAA 一起温育。如实施例 6 中所描述的, 实施分析。在过夜测定法中于室温对 CcMan4 和 CcMan5 两者使用具有 2mM CaCl_2 的 100mM HEPES 缓冲液, pH7.0。图 13 中呈现了 DSA-FACE 分析。从纯化的 huGAA 释放的 N-聚糖混合物主要由 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 和 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 构成 (小图 B)。可以将比 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 略快运行的峰归入 $\text{ManP-Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 。

[0170] CcMan4 使 huGAA 糖蛋白脱甘露糖基化。在电泳图 (小图 C) 中, 观察到与 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{ManP-Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{ManP-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 对应的峰。与 CcMan5 组合, 形成磷酸脱帽产物 $\text{P}_2\text{-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{P-Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{P-Man}_6\text{GlcNAc}_2$, 如小图 E 中显示的。

[0171] 实施例 9

[0172] 用 GH47 α -甘露糖苷酶对在解脂耶氏酵母菌株中表达的具有高度磷酸化 N-聚糖的糖蛋白的脱甘露糖基化的其它例子

[0173] ERManI 和 GolgiManIA 是属于 GH47 家族的两种 I 类 α -1, 2-甘露糖苷酶。于室温将重组表达的 ERManI 和 GolgiManIA 与解脂耶氏酵母中表达的 huGAA 一起温育过夜。如实施例 6 和图 10 中所描述的, 实施分析。对 ERManI 使用具有 2mM CaCl_2 的 100mM HEPES 缓冲液, pH7.0, 而在具有 2mM CaCl_2 的 100mM MES 缓冲液 pH6.0 中实施与 GolgiManIA 的温育。图 14 中呈现了 DSA-FACE 分析。

[0174] ERManI 和 GolgiManIA 两者都可以使 huGAA 糖蛋白脱甘露糖基化, 但是其活性受限于 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 向 $\text{ManP-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 的水解 (分别为小图 D 和 E)。此结果用来自红褐肉座菌的 GH47 α -1, 2-甘露糖苷酶 (HjMan, 图 11, 小图 C) 也获得, 而来自斋藤曲霉的 GH47 α -1, 2-甘露糖苷酶 (AsMan, 图 11, 小图 F) 和 GH92CcMan4 (图 12, 小图 C) 分别将 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 修整成 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{ManP-Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 。

[0175] 其它实施方案

[0176] 尽管以结合本发明的详述描述了本发明, 但前文所述意在进行示例说明而非对本发明的范围进行限制, 本发明的范围由随附权利要求的范围限定。其它方面、优势和修饰形式在随附权利要求的范围之内。

ATGAAGCTTTCCACCATCCTCTTTCACAGCCTGCGCTACCCTGGCTGCCGCCAGCAGGGAGCCT
CTCGACCCGGACCCCGAGATGCCAGGCTCACCCCGGACGACCTCGAGCTGTGCCACCCAGTGTG
ACGTGCCCCCAACTCTCGATTGACTGTGCCCCGACAAGGCCATCACCCAGGAGCAGTGGCAGG
CCCAGGGCTGTTGTTACATCCCCGCTAAGCAGGGCCTGCAGGGCGCTCAGATGGGCCAGCCCTGGT
GTTCTTCCCCCTCTTACCCCTCCTACAAGCTGGAGAACCTGTCTCTTCGGAGATGGGCTACAC
CGCCACCCTGACCCGAACCACCCCACTTTTTCCCAAGGACATCCTGACCCTGCGACTGGACGTG
ATGATGGAGACCGAGAACCGACTGCACTTCACCATCAAGGACCCCGCCAACCGACGATACGAGGT
GCCCCTGGAGACCCCCACGTGCACTCTCGAGCCCTTCCCCCTGTACTCTGTGGAGTTCTCTGAG
GAGCCCTTCGGCGTGATCGTGCAGACAGCTGGACGGCCGAGTGCTGCTGAACACCACCGTGGCC
CCCCTGTTCTTCGCCGACCAGTTCCTGCAGCTGTCTACCTCTCTGCCCTCTCAGTACATCACCGCCT
GGCCGAGCACCTGTCCCCCTGATGCTGTCCACCTCTTGGACTCGAATCACCCCTGTGGAACCGAGA
CCTGGCCCCACCCCGGTGCCAACCTGTACGGCTCTCACCCCTTCTACCTGGCCCTGGAGGACGGC
GGCTCTGCCACGGCGTGTCTGCTGAACTCTAACGCCATGGACGTGGTGCTGCAGCCCTCTCCCG
CCCTGTCTTGGCGATCTACCGCGGCATCCTGGACGTGTACATCTTCTGGGCCCTGAGCCCAAGTC
TGTGGTCCAGCAGTACCTGGACGTGGTCCGATAACCCCTTCATGCCCCCTACTGGGGCCTGGGCTTC
CACCTGTGTCGATGGGGCTACTCTTCTACCGCCATCACCCGACAGGTGGTGGAGAACATGACCCGA
GCCACTTCCCCCTGGACGTGCAATGGAACGACCTGGACTACATGGACTCTCGACGAGACTTCACC
TTCAACAAGGACGGCTTCCGAGACTTCCCCGCCATGGTCCAGGAGCTGCACCAGGGAGGACGACG
ATACATGATGATCGTGGACCCCGCCATCTCTTCTTCCGGACCCGCCGATCTTACCGACCCCTACGAC
GAGGGCCTGCGACGAGGCGTGTTCATACCAACGAGACCCGCCAGCCCTGATCGGCAAGGTGTG
GCCCCGCTCTACCGCCTTCCCCGACTTCACCAACCCACCCGCTGGCTTGGTGGGAGGACATGGT
GGCCGAGTTCACGACCAGGTGCCCTTCGACGGCATGTGGATCGACATGAACGAGCCCTCTAACTT
CATCCGAGGCTCTGAGGACGGCTGTCCCAACAACGAGCTGGAGAACCCCCCTACGTGCCCGGCGT
GGTGGGGCGGAACCCTGCAGGCCGCCACCATCTGTGCCTCTTCGCACCAGTTTCTGTCTACCCACTAC
AACCTGCACAACCTGTACGGACTGACCGAGGCCATTGCCTCTCACCGAGCCCTGGTGAAGGCCCGA
GGCACCCGACCCTTCGTGATCTCTCGATCTACCTTCGCCGCCACGGCCGATACGCCGGACACTGG
ACCGGCGATGTGTGGTCTCTTGGGAGCAGCTGGCCTCTTCTGTGCCCGAGATCCTGCAGTTCAACC
TGCTGGGCGTGCCCTGGTGGGCGCCGACGTGTGTGGCTTCCTGGGCAACACCTCTGAGGAGCTGT
GTGTTTCGATGGACCCAGCTCGGCGCCTTCTACCCTTTCATGCGAAACCACAACCTCCCTGCTGTCTCT
GCCCCAGGAGCCCTACTCGTTCTCTGAGCCCGCTCAGCAGGCCATGCGAAAGGCTCTGACCCTGCG
ATACGCCCTGCTGCCCCACCTGTACACCCTGTTCCACCAGGCCACCGTGGCTGGAGAGACCGTGGC
CCGACCCCTGTTCTGGAGTCCCTAAGGACTCTTCTACCTGGACCGTGGACCATCAGCTGCTGTGG
GGCGAGGCCCTCTGATCACCCCGTGTCTGCAGGCCGCAAGGCTGAGGTGACCGGCTACTTCCCT
CTGGGCACCTGGTACGACCTGCAGACCGTGCCTGTGGAGGCCCTGGGATCTCTGCCCCCTCTCCCG
CCGCTCCCCGAGAGCCCGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCCGCTCCCCTGGACA
CCATCAACGTGCACCTGCGAGCCGGCTACATCATCCCTCTGCAGGGACCCGGCCTGACCACCACCG
AGTCTCGACAGCAGCCATGGCCCTGGCCGTGGCTCTGACCAAGGGCGGAGAGGCCCGAGGCGAG
CTGTTCTGGGACGATGGCGAGTCTCTGGAGGTGCTGGAGCGAGGCGCCTACACCCAGGTGATCTTT
CTGGCCCCGAAACAACACCATCGTGAACGAGCTGGTGCAGTGACCTCTGAGGGCGCTGGTCTGCAG
CTCCAGAAGGTGACCGTCTGGGCGTGGCCACCGTCCCCAGCAGGTCTGTCTAACGGCGTGGCC
GTGTCTAACTTCACTACTCTCCCGACACCAAGGTGCTGGACATCTGTGTGTCTCTGCTGATGGGCG
AGCAGTTCCTGGTGTCTTGGTGTTAAC

图 1A

MKLSTILFTACATLAAAQQGASRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDK
 AITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLRT
 TPTFFPKDILTLRLDVMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSE
 EPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTR
 ITLWNRDLAPTGANLYGSHPFYLALEDGGS AHGVFLLSNAMDVVLQPSPALSWRST
 GGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYWGGLGFHLRCRWGYSSTAITRQVVENM
 TRAHFPLDVQWDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGRRYMMIVDPAISS
 SGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDTNPTALAWWEDMVAEF
 HDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQF
 LSTHYNLHNLVGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGGRYAGHWTGDVWSSWE
 QCLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPPMRNHNSLLSLP
 QEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWT
 VDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTPVEALGSLPPPPAAPREPAI
 HSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIHLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGEL
 FWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQ
 VLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDCVSLLMGEQFLVSWC*

图 1B

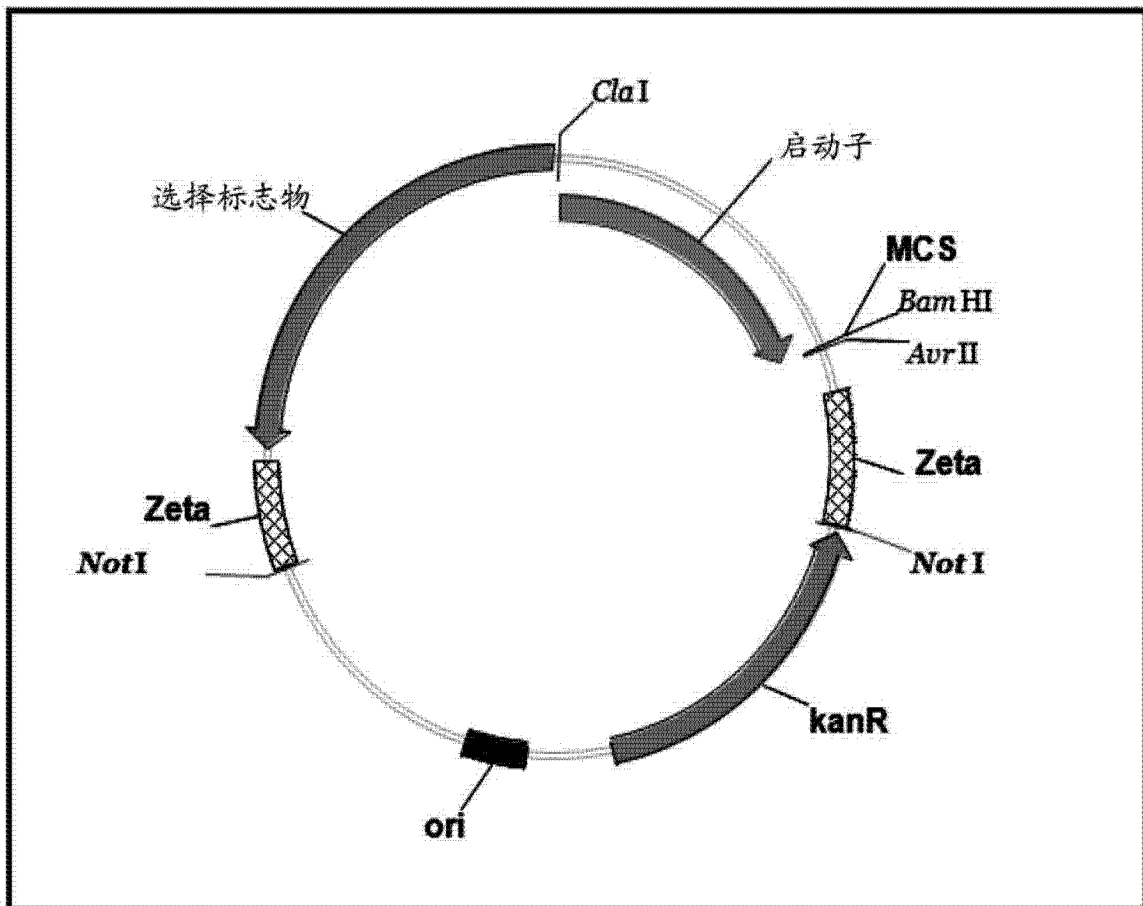


图 2

ACCGGCAGGTACAGATCTGGTTACCAGCGGTGCAGCAAGCGTTGTTGGTCTGCCGGATG
GTGTTACCGCAGCAGTTACCGTTGCAAGCCCGACCGCACTGACCGTTAGCCTGACCGGC
ACCGCATCAGCAGATGCACGTTTTTTTTGTGCATCTGCGTGATGCAGCACTGGCCGATGG
TGTTGCAGCCGCAAGCCTGCAGGGTCAGGGTGTAGCGTTCGTTCTCCGCTGCGTCTGA
GCGTTGCAAGCGCAGAACGTGATGCACTGGCAGCACTGGTTGATGATGCCGTTCTGGTT
CGTCATGGTAATTATAGCAGCGTTACCTTTGATCGTTTAGCACCGCTCTGACAAAAGCA
CAGGAAGCACTGGGCGACGAAGCAGCAACCAGCATTGCACTGCGTTTTGCAGCAGATCG
TCTGGGTGCAGCAGCAGATGCACTGGATCTGACCGGTGGTGGTTATCGTACCCTGGAAG
CAGAACAGAGCGAAGCATGGTCTGGTGGTGAAGTGAAGCAATAGCAGCAGC
GGTAATCTGGGTGGTGTTCGTAGCGGTAGCTGGGTTTCAGTATCGCGATATGACCTTTGA
AACCGCAGCCGGTGATACACCTCCGCGTTTTCTGACCGTTTCGTTATGATACCAGCTTTG
CACCGACCGATACCCCGAGCACCGTTTCGTGTTTCATGCCGGTGATGTTTCTGGTCCGGTT
GTTGCAACCGTTGATCTGAAAGGCACCAGCGGTTGGGGTAAATATACCGAAGTTACCGC
AGAACTGGGTGATGTTTCAGGCCCTGGTTGATGCCAGGTTGTTACCTTTGAACTGCTGG
CACCGAGCGGTCGTAGCTGGGTTGGTAATTTTGATTGGTTTTCGTTTTAGCGCAGAAGAT
CCGGCAGCACCGGGTCAGCCTGGTGAAAGCCCGACCGTTACCATTGAAGCCGAAGATTG
GACCGCAAGCAGCGGTCGTGGTCTGAAAAAAGAAAGCAGCACCTGGACCAGCGGTCGGG
TGACCAATGTTGGTGGTACAGCAGATGGTGAATTGGATTGCCTATGGTGAAGTTGATCTG
GGTGAAGTCCGCTGGGCGAAGTGAAGCGTTCATTATGTGCATAATAGCAATCGCAGCGG
TAATAATAGCGCACTGAGCGTTTTATCTGGATGCATTTGATCCGGCTAATCCGGGTGAAC
CGTTTTGTTACCGTTCCGCTGCCGACCACCGGTAGCAGTTGGACCGCAGATGGCACAGCC
ACCGTTGTTCTGCCGAAACCGTGCAGGGCACCCATGAAGTTTTTGTTCGTCTGAGCAC
CGAACCGTATGCAGATCATCCGTATGTTGCAAATCTGGATAGCCTGACCTTTGCACCGG
GTGGTCCGACCAGCGTTGTGGTTGAAAGCGAAGCCTGGACCAGCAATTCTGGTTCGTGGC
CTGAAAAATGAATCTTCTACCTGGACCTCTGGTCCGGTTACAAATGTGGGTGGCACC GC
TGATGGCGATTGGCTGGCATATGGCGAAATTGATCTGGGCAGCGCAGCACTGGATCAGC
TGTCTGTGCATTATGTTTATAATTCTAATCGCTCTGGTCGTAATTCTGCACTGTCTGTG
TATCTGGATGCCTTTGATCCGGCAAATCCGGGTGAACCGTTTTGTGACAGTGCCGCTGGC
AAATACCGGTAGCTCTTGGACCACCGATGGTACTGCAGTTGTGGATCTGCCGCTACCG
TTCGTGGTAAACATCAGGTTTGGGTTTCGTCTGTCTACCGAAGCATATGCCGATCATCCG
TATGTGGCCAATCTGGATTCTATGCGTTTTTTTACCGATGCATATGATGTTGAAGTTCC
TCCGACCGATACAGCAGCACTGGCAGCCGTTGTTGATGCAGCAGGTACACCGGAAGCAG
AAATTGCACGTTATGGTTCGTATTGATGCCCGTGTTTTTACCGTGAAGTGGCAGCAGCA
CGTAGCGTTCCTGGCCGATGCCGGTGCAACACAGGCACAGGCAGATGAACGTGCTCGTCG
TCTGGGTCTGGCAACCGATCAGCTGGTTCGGGCAGAACGTCGTCGTCTGGAAAACTGG
TTGCCAGCGCAGAAGCACTGACCGACGAAGGTTATTCTCCGGAAAGCTGGCAGGCATTT
CGTACCGCACTGGCTGCTGCAACCGGCACCCTGGATGATGCAGCAGCATCTGATGAAGC
ACTGCATGATGCACGTCTGGCGCTGCAGGGTGCAGTTGATGCACTGGAAGAACCAGCAG
ATGTTGTTCTGGTTGAAGTTGAAGTTTCTCCGCGTTGTCTGGCAGGTAAACCGTATGTT
GCCGTTTCGTGCAGTTAATGTTTCTGATGCAGCCGTTGATGTTGAACTGGCAAGCTCTCT
GGGCACCCGTAGCTTTGTTGGTGTGGCACCGGGTGCAGCGCATATCAGAGCTTTGCAG
CCCGTAGCGCAACCGGTGATCTGGATGTTACCGTGACCGCAACCGGTGCAGATGGTACT
CAGACCGTTGAACAGGTTGTGACCGTCCGAGCTGTAGCTAATAA

图 3 续

来自 pLSAHCcMan4 的 Dsba-6xHis-CcMan4 (107bp-5494bp, 直接的) 5388bp

ATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAGCGCATCGGCCGG
 CCATCACCATCATCACCACGTGGGGCCCGGCTCGGACGAAGTGGATGCAGAACCGGGTG
 ATTTTAGCAGCAGCTTTGAATCTGGCGATCCGGCAGCACTGCCGACCACCGTTGCAGAA
 CGTGATGGTGCACCGTGGCAGGCAAATGTTGGTAGCTTTACCGCAGGTCTGCCTGGTAG
 CGTTCTGGGTGAGCTGAAAGGTGTTACCGCAAGCGCACAGAATCTGCCGAATGAAGGTG
 CAGCAAATCTGGCAGATGGTAGCAGCGGCACCAAATGGCTGGCATTGCAAGCACCGGT
 TGGGTTCGTTATGAATTTGCAGAACCGGTTAGCTTTGTTGCATATACCATGACCAGCGG
 TGATGATGCCGCAGGTCGTGATCCGAAAACCTGGACCGTTGAAGGTAGCAATGATGGTT
 CTACCTGGGCAGCACTGGATCGTTCGTACCGATGAAGATTTTCCGAATCGTCAGCAGACC
 CGTACCTTTGAACTGGAAGCACCGACCGCAGCATATACCTATCTGCGTCTGAATGTTAC
 CGCAAATAGCGGTGATAGCATTGTTTACGCTGGCAGGTTGGGATCTGAGCGCAGATCTGT
 CTGCAGGTCCGAGCGCAGCACCGATGACCACCAAAGTTGGCACCAGGTTCCGCGTGTTAGC
 TTTACCAATAAAGCCGGTGTGGTTTTAGCGGTCTGCATAGCCTGCGTTATGATGGTAG
 CCATCTGGCCGATGGTGAACCTATGCAACCAATGTGCTGTATGATGATGTTGATGTTG
 TGGTTGGTGAAGATACCCGTCTGAGCTATACCATTTTTCCGGAACCTGCTGGATGATCTG
 CAGTATCCGAGCACCTATGCAGCAGTTGATGTTCTGTTTACCGATGGCACCTATCTGAG
 CGATCTGGGTGCACGTGATGCACATGAAACCGTTGCAACCGCACAGGCACAGGGTGAAG
 GTAAAATTCTGTATGCCGATCAGTGGAAATAGCGTTCGTGTTGATCTGGGTGATGTTGCA
 GAAGGTAAAACCGTTGATCAGGTTCTGCTGGGTTATGATAATCCGGGTGGTCATGCAGG
 CACCAAATTTGCAGGTTGGCTGGATGATGTTGAAATTACCGCAGAACCGGCAACCATTG
 ATGGTAGCTCACTGGCAAATTTATGTTGATACCCGTCTGTCGACCCCTGGCAAGCGGTAGC
 TTTAGCCGTGGTAATAATTTCCGGCAACCGCAACCCCGAATGGTTTTAATTTTTGGAC
 CCCGTATACCAATGCAAGCAGCCAGAGCTGGCTGTATGAATATCATAAAGCCAATAATG
 CGAATAATAAACCAGTTCTGCAGGGTTTTGGTATTAGCCATGAACCGAGCCCCTGGATG
 GGTGATCGTAATCAGCTGACCTTTCTGCCGAGCACCGCAAGCGGTACACCGGATGCAAC
 CCTGAGCACCCGTGGTCTGGAATTTGATCATGCAGATGAAACCGCACGTCCGGATTATT
 ATGGTGTGACCTTTACCAATGGTAGCGCAATTGAAGCAACCCCGACCGATCATGGTGCA
 GTTCTGCGTTTTAGCTATCCGGGTGCAAAAGGTCATGTTCTGGTGGATAAAGTTGATGG
 TAGCAGTAACTGACCTATGATCAGGCAACCGGCACCATTAGCGGTTGGGTTGAAAATG
 GTAGCGGTCTGAGCGTTGGTTCGTACCCGTATGTTTGTTCAGGCACCTTTGATCGTAGC
 CCCACCGCAGTTGGCACAGCAGGTAATCGTGCAGATGCACGTTTTGCAACCTTTGA
 AACCAGCAGCGATAAAAACCGTGGAACTGCGTGTGCAACCAGCTTTATTAGCCTGGATC
 AGGCACGTAAAAATCTGGATCTGGAAGTTACCGGTAAAACCTTTACCGAAGTTAAAGCA
 GCAGCAGCACAGGCATGGAATGATCGTCTGGGTGTTATTGAAGTTGAAGGTGCAAGCGA
 AGATCAGCTGGTTACCTGTATAGCAATCTGTATCGCCTGAATCTGTATCCGAATAGCC
 AGTTTGAATAACCGGCACCGCACAGGAACCGGTTTATCGTTACGCATCTCCGGTTAGC
 GCAACCACCGGTAGCGCAACCGATACCCAGACCAATGCCAAAATTGTGGATGGCAAAT
 TTATGTGAATAATGGCTTTTGGGATACCTATCGTACCGCATGGCCTGCATATAGCCTGC
 TGTATCCGGAACCTGGCAGCAGAACTGGTTGATGGTTTTGTTTCAGCAGTATCGTGATGGT
 GGTGGATTGCACGTTGGAGCAGTCCGGGTTATGCAGATCTGATGACCGGTACAAGCTC
 TGATGTTGCATTTGCAGATGCCTATCTGAAAGGTAGCCTGCCGACCGGTACAGCACTGG
 AAGCATATGATGCAGCACTGCGTAATGCAACCGTTGCACCTCCGAGCAATGCAGTTGGT
 CGTAAAGGTCTGCAGACAAGCCCCTTTCTGGGTTTACACCGGAAAGCACCCATGAAAG

图 4

CGTTAGCTGGGGTCTGGAAGGTCTGGTTAATGATTTTGGCATTGGCAATATGGCTGCAG
 CACTGGCAGAAGATCCGGCAACACCGGAAGAACGTCGTGAAACCCTGCGTGAAGAAAGC
 GCATATTTCTGGAACGTGCCACCCATTATGTTGAACTGTTTGTATCCGGAAGTGGATTT
 TTTTGTCCGCGTCATGAAGATGGTACATGGGCAGTTGATCCGGAACCTATGATCCGG
 AAGCATGGGGTGGTGGTTATACCGAAACCAATGGCTGGAATTTTGCATTTTCATGCACCG
 CAGGATGGTCAGGGTCTGGCAAATCTGTATGGTGGTAAACAGGGTCTGGAAGATAAACT
 GGATGAATTTTTTAGCACACCGGAAAAAGGTGCAGGTAATGGTGGTATTCATGAACAGC
 GTGAAGCACGTGATGTTTCGTATGGGTCAGTGGGGTATGAGCAATCAGGTTAGCCATCAT
 ATTCCGTGGCTGTATGATGCAGCCGGTGCTCCGAGCAAAGCACAGGAAAAAGTTCGCGA
 AGTTACCCGTCGTCTGTTTGTGGTAGCGAAATTGGTCAGGGTTATCCGGGTGATGAAG
 ATAATGGTGAATGTCTCTCGTGGTGGATTTTGGCAAGCCTGGGTTTTTATCCGCTGCAG
 GTTGGTAGCGATCAGTATGCAGTTGGTTCTCCGCTGTTTGATAAAGCAACCGTTCATCT
 GCCGGATGGTGTCTGGTTGTTAATGCCGAAAATAATAGCGTGGATAATGTGTATGTTT
 AGAGCCTGGCAGTTGATGGTGAAGCACGTACCAGCACCAGCCTGAGCCAGGCAGATCTG
 AGCGGTGGCACCACCCTGGATTTTGTATGGGTCCGGAACCGAGCGATTGGGGCACC
 TGAAGATGATGCACCTCCGTCCTGACTGACCGAAGGTGATGAACCTCCGACACCGGTT
 CAGGATGCAACCACCGCAGGCCTGGGCACCACCACCGTTGCCGATGGTGTATGCCACC
 ACCTCTGCAGCAGCCCTGACCGATAAATACCAGCGCACCCGTACCACCTTTGCAACC
 ACCACCCGAGCATTACATGGGCAGGTAATGGCATTTCGTCCGACCGTTGGTAGCTATA
 ACCCTGACCTCTGGTGCAGCGGCACCAGCCGTCATGGACCCTGGAAGGTTCTGATGAT
 GGC GAAACCTGGACCACACTGGATGAACGTAGCGGTGAACAGTTTCGTTGGGCACTGCAGAC
 CCGTCCGTTTACCGTTGCCGAACCGACCGCATTTGCACGTTATCGTGTACCGTTACCG
 CAACCAGCGGTTCTGGTGCAGTGCAGCCTGGCAGAAGTTGAACTGCTGGCAGATCCGAAA
 GAAAGCGGTGCAGAAGAAGTGCACCTGTCTGCAGCACCAGGATCGTGTATGGCGTT
 ACCGG TCGTGAAGTTAGCGGTTCTTTTGGCAACCCTGACCGGTGTTGAAGGTGATGTTGCCGCAC
 TGGATGTTTACCGTTGCATTTGGTGTATGGTAGCGAACCGGTTGCAGGTACACTGCCG
 TGCCGGTGCATTTGGTGGTTATGCAGTTGATGCAGCACATACTGGACCACCGGGTGT
 TTA TCCGGTTACCGTGACCGTTAGCGGTGAAGGTATTGAAACCGTTAGCGCAAGCAGCTATG
 TTAGCGTTAGCCTGCTGCGTGAAGGTTCTCTGCTGGCAGCATATGATAATGTGTGCATT
 GGTGATGCAGGTACAACCGTTGGTTCTTGTGATGGTCAGGGCGTTTTTTTTGATCGTGC
 ACAGCTGGCAGCAAAAGGTTTTGTGCAGGGTGAACGTGCAACCCTCCGGGTACAGATC
 TGGCATTGATGTTCCGGCAGTTCCGGCTGGTCAGCCTGATAATGCAACCCTGATGGT
 CAGACCATTGAACTGGATGTTCCGGCTGATGCAGAACAGCTGAGCGTTATTGGCACC
 CGG CACCGAAAAAATCAGCAGGCAACCGGTACACTGACCTTTGATGATGGTTCTACCCAGC
 CGATTGATCTGAGCTTTGGTGTATTGGAGCGGTGCAGCACGTAATCCGGTGT
 TGGTAAT ATTCCGGTTGCAGTTACCGATAGCCGTCTGCGTGGTGGTTCTCCGCAGACCGGTACACC
 GGCAGCATTTTTTGGCACCACCGATTACCCTGCCGGAAGGTAAACCTCCGGTTAGCC
 TGACCCTGCCGGATCAGCCTGGTGAACGTGAGCCGTGATGGTTCGTATTCATGTTGTTGCA
 GTTGCACATGATGGCACCTTTGCAGAACATCCTGCACTGGAAGTGACCGCAGCAGAAGG
 TGTTACCCCTGGCAGTTGGTCAGACCTCAGATGTTGCACTGGCACAGGTTGCCGGTGGT
 C GTGAAGGTGCAGATCTGCGTGCCGAGTTACCTGGGGTGTATGGTTCTGATGTGGCAGCC
 GGTGCCGTTACCGATGGTAGCGTTAGCGGTAGCCATGCATATACCGCAGCAGGCACCTA
 TACCGCATATGTTGTTGTGGATGATGGTTGGACCAGCCAGGTTGTTGAAGTTCCGGTGA
 CCGTTACAGAAGCCGAACCGGCACTGGCCGTTGATGTCACCGTTAGCACCCGTTGCCTG
 GCAGGTAAGCATATGTTGCAGTGCCTGCAGAAAATGGTGAAGATGTTCCGCTGGCAAT
 TCGTCTGGTTACCCCGTTTTGGCACCAAAGAAGTTGCAGCAGTTGCTCCGGGAGCCAATG
 CATATCAGAGCTTTGCAACCCTGTTACCGCAGTTGAAGCAGGCACCGTTACCGTTGAA

图 4 续

GCCACCCGTGGCACCGGTGATGAAGAAGTTACCGCCAGCATTTCAGGCAGATTATGCAGC
CGTTACCTGCGGTTAATAA

图 4 续

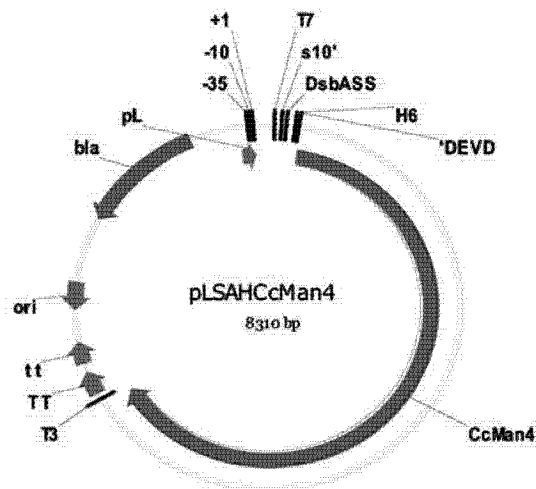
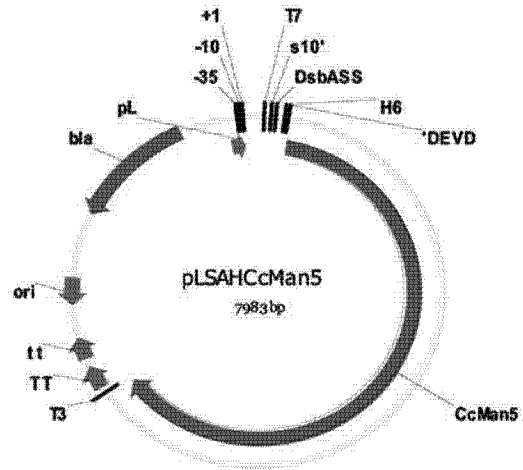


图 5

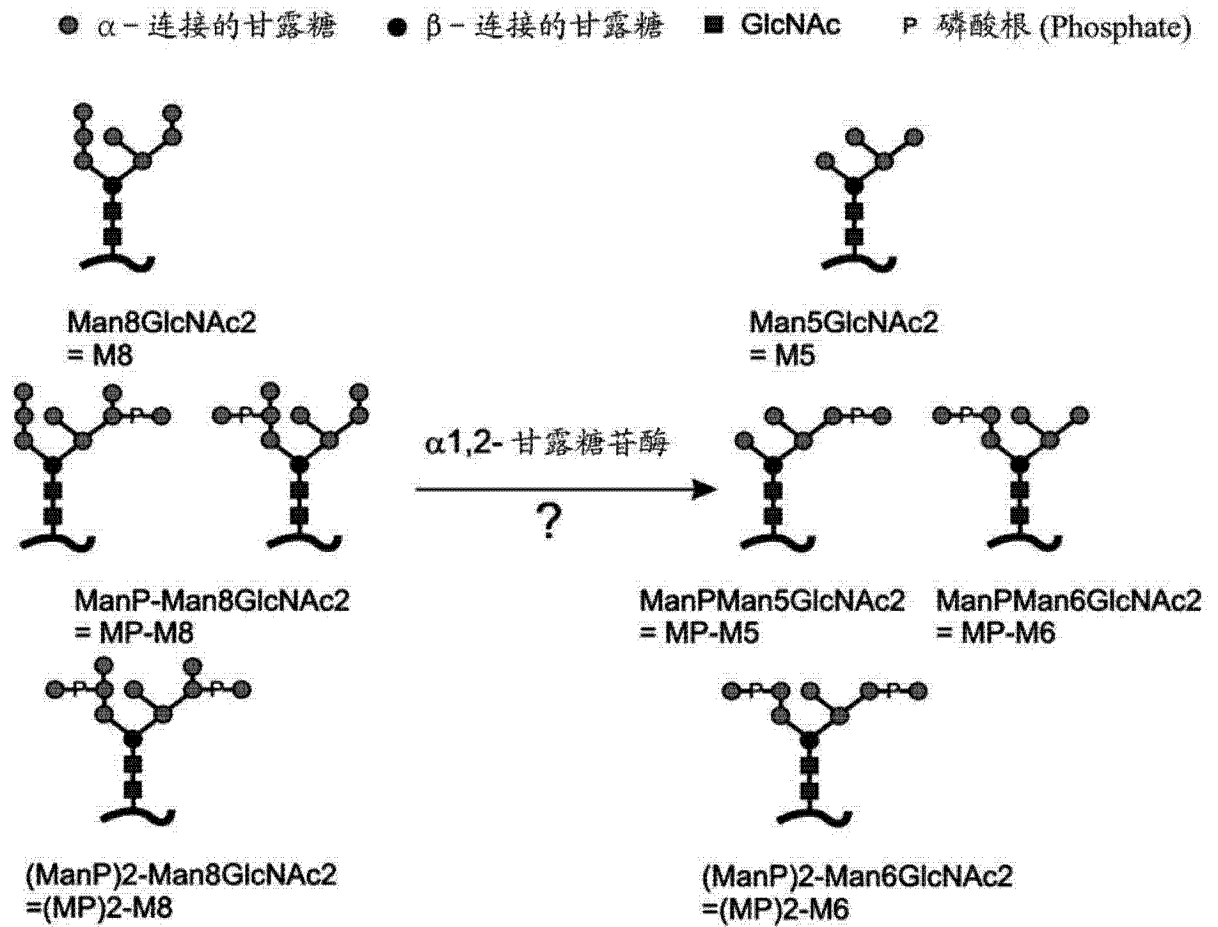


图 6

● α -连接的甘露糖 ● β -连接的甘露糖 ■ GlcNAc P 磷酸酯 (Phosphate)

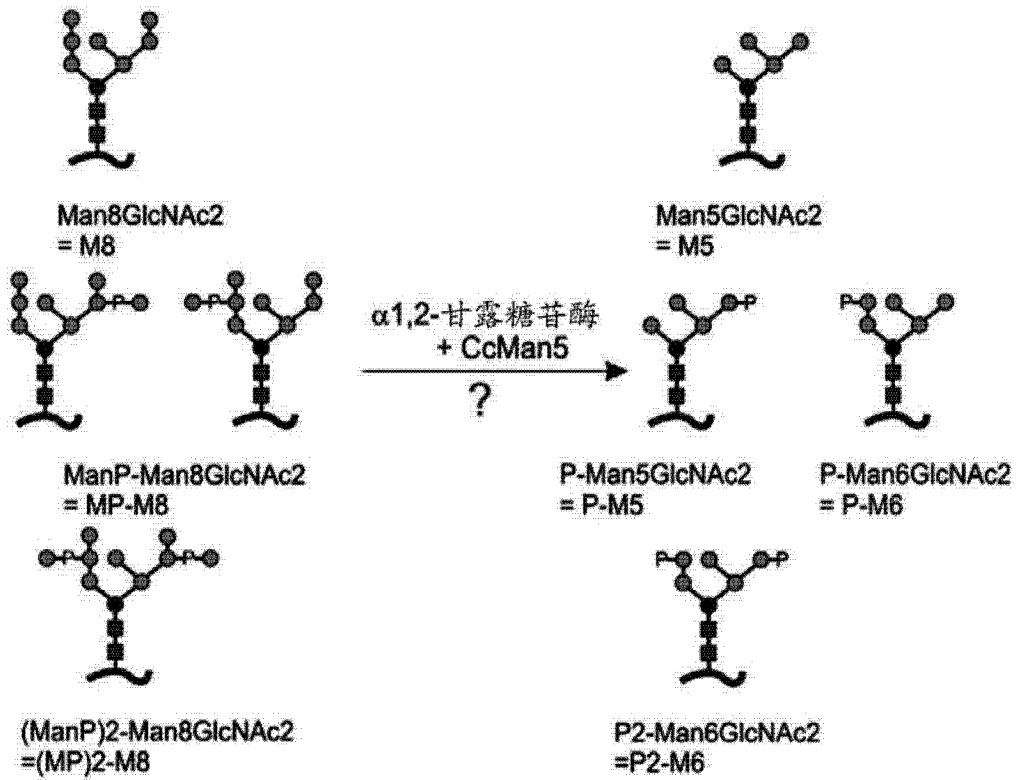


图 7

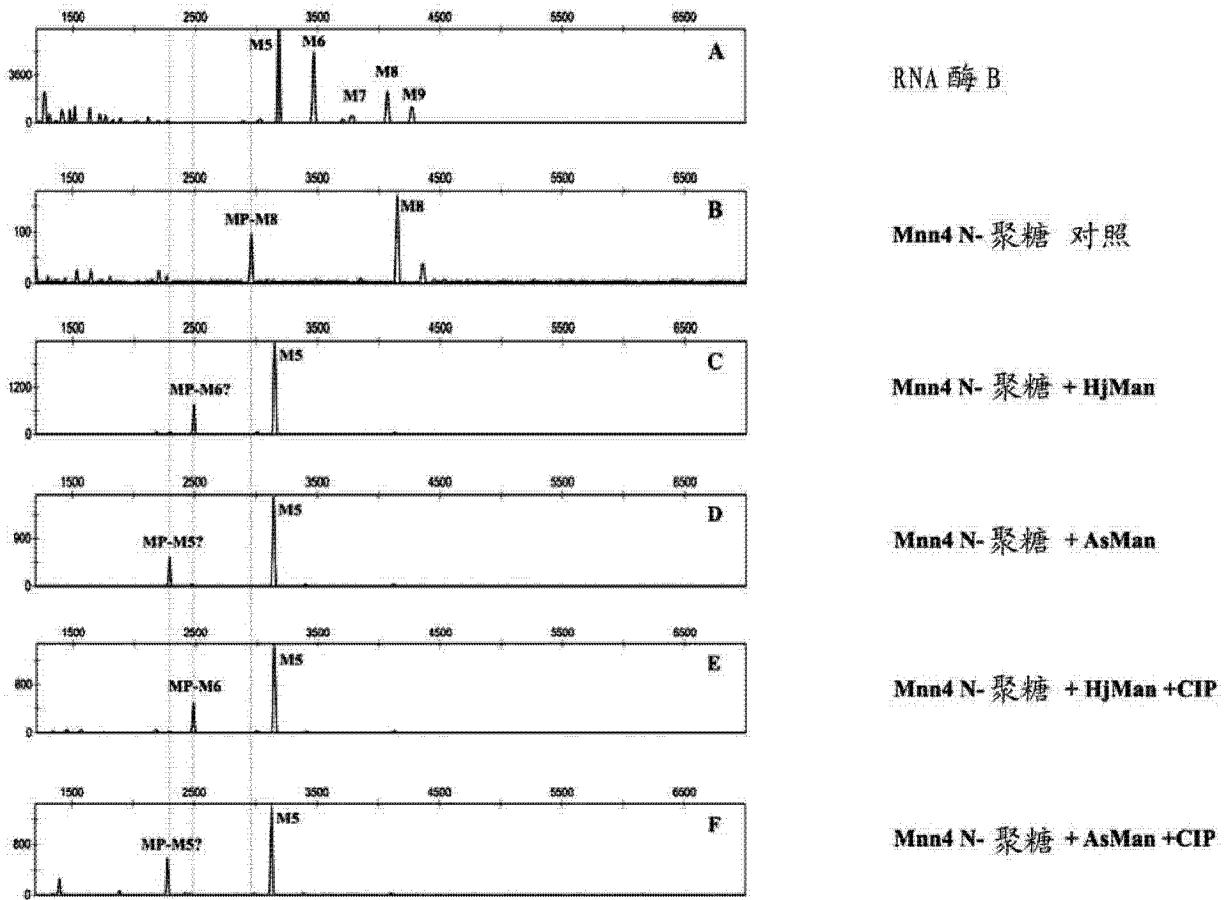


图 8

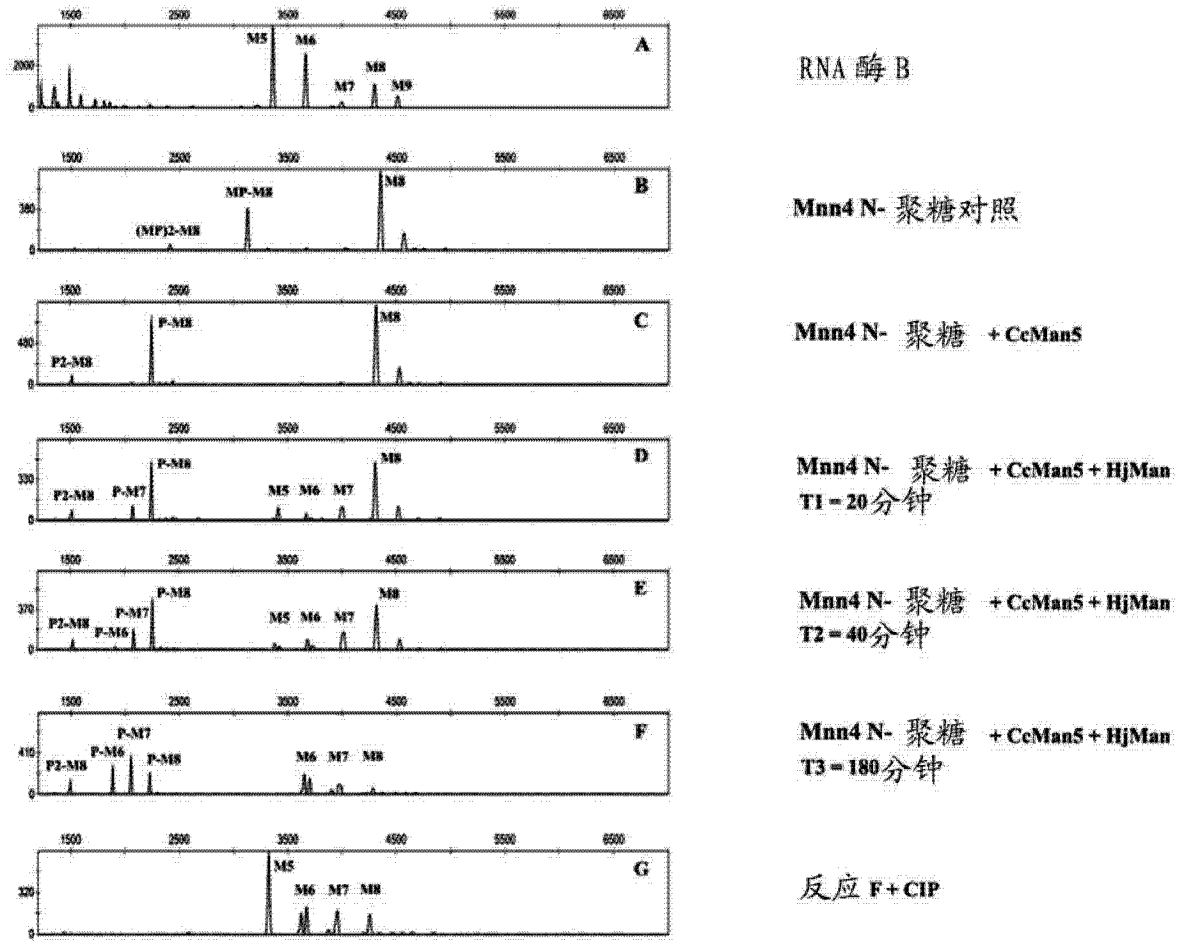


图 9A

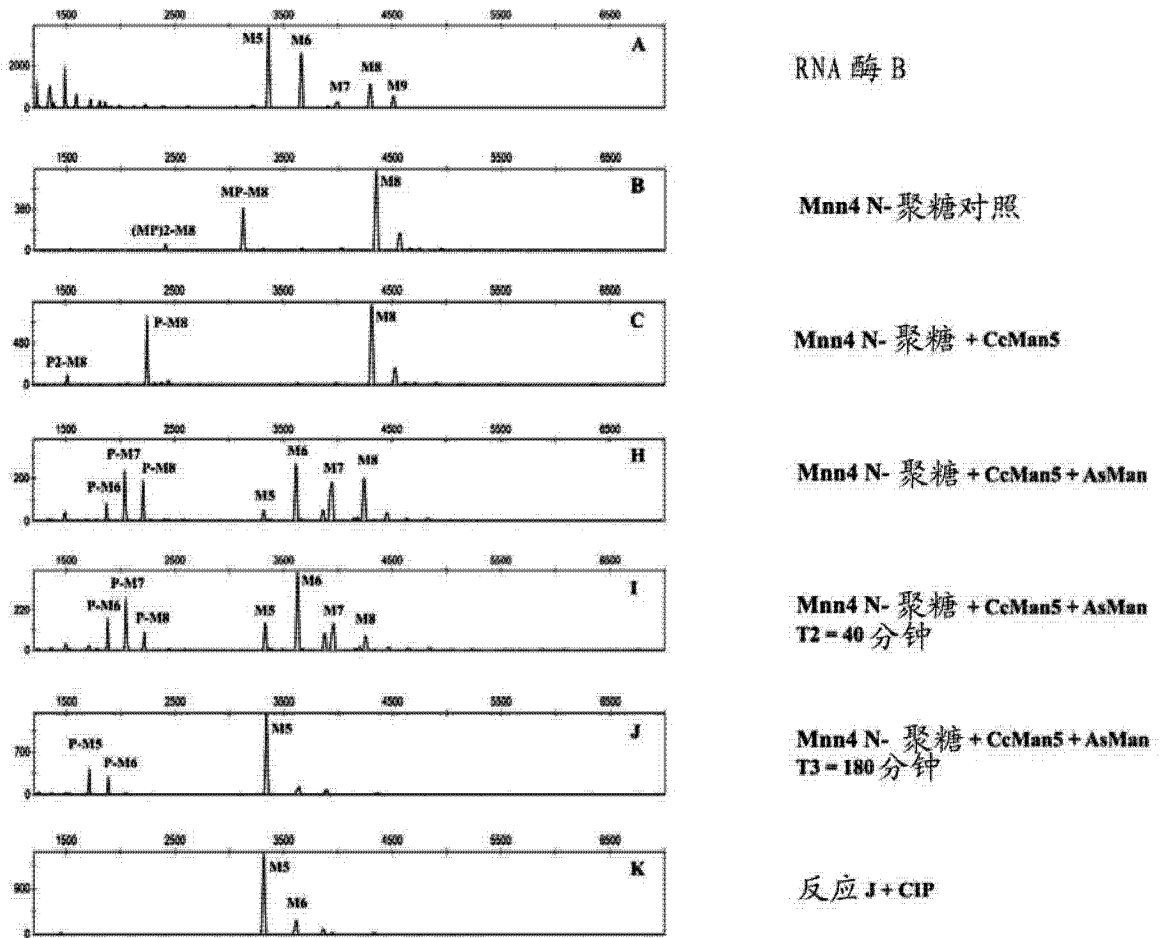


图 9B

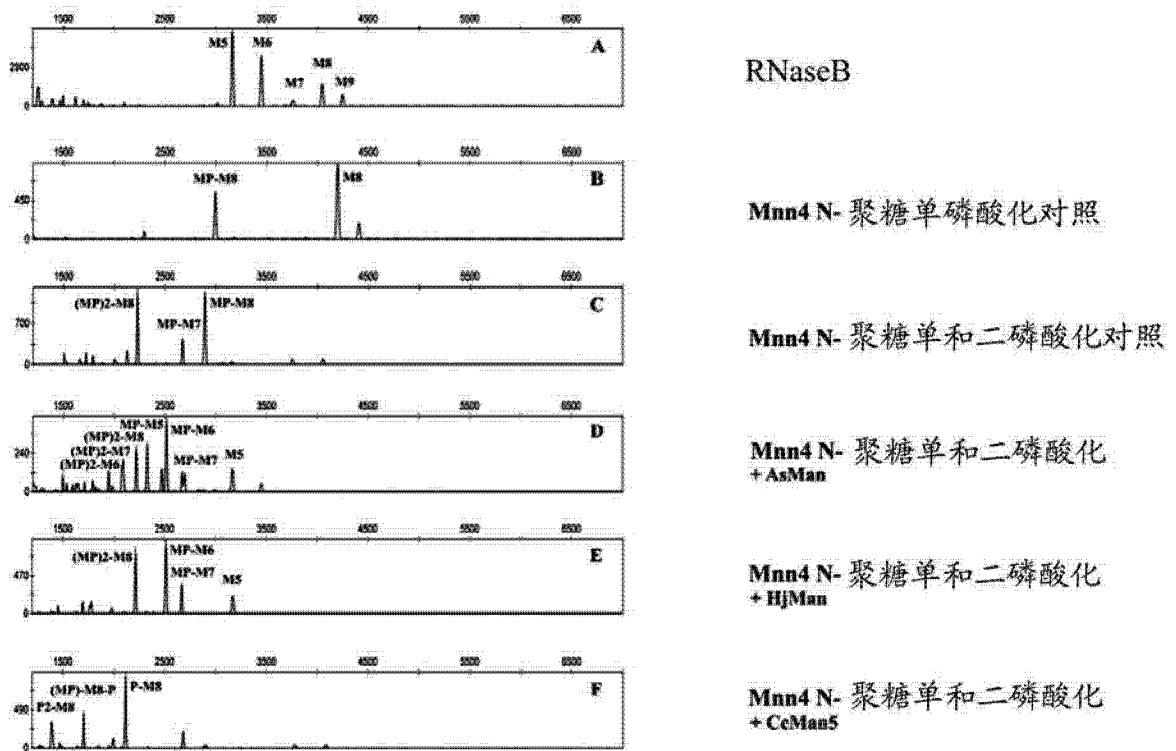


图 10

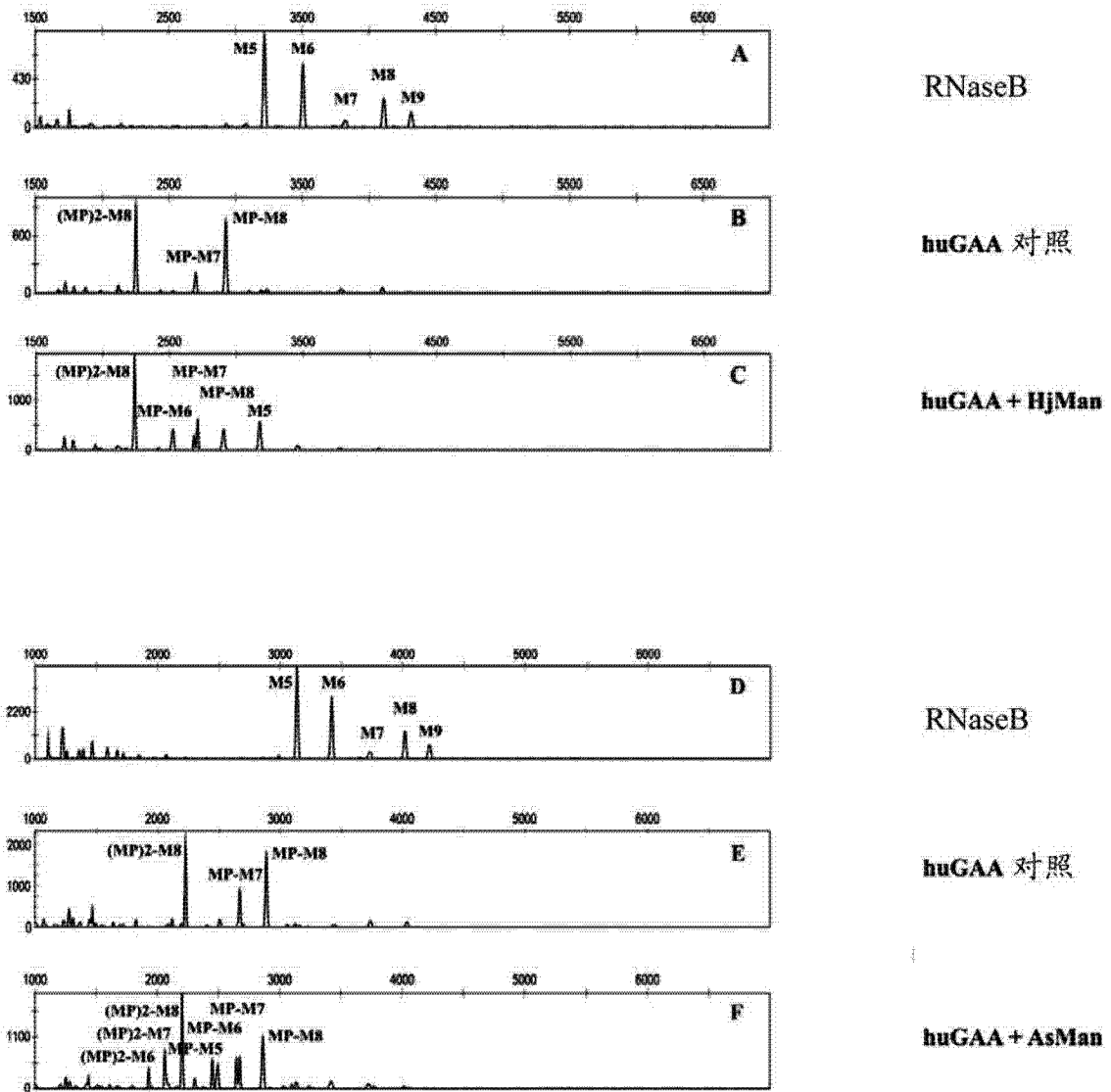


图 11

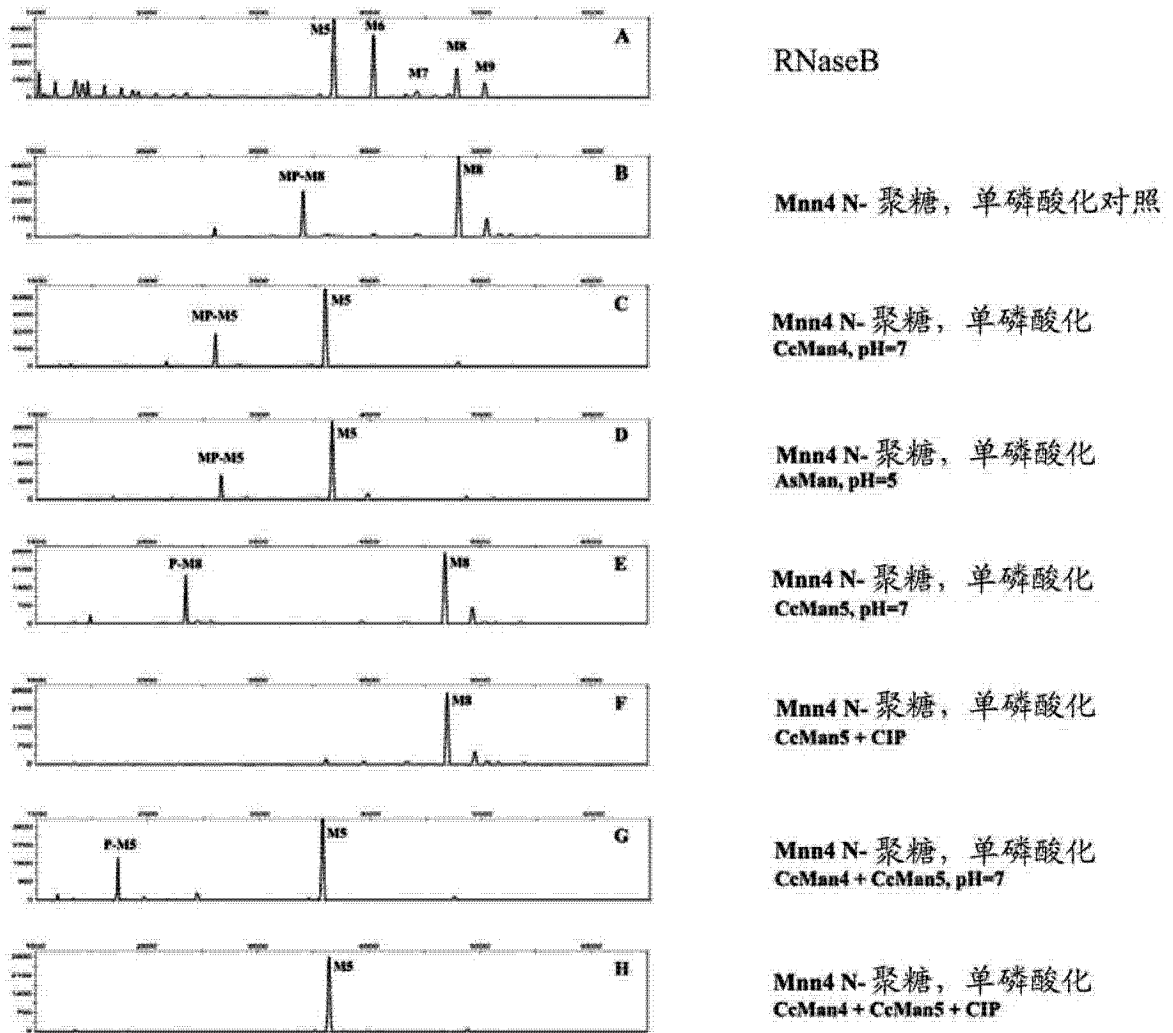


图 12A

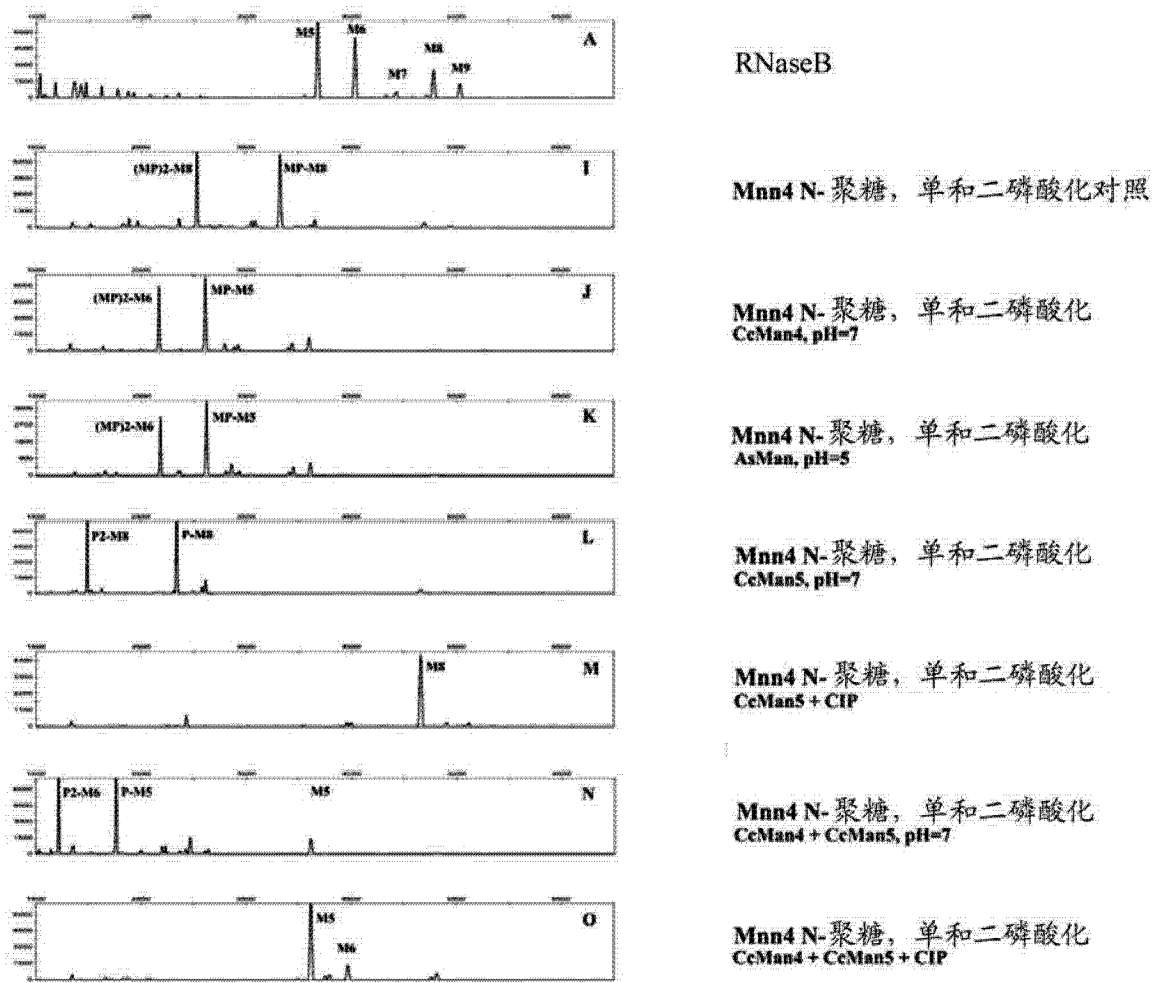


图 12B

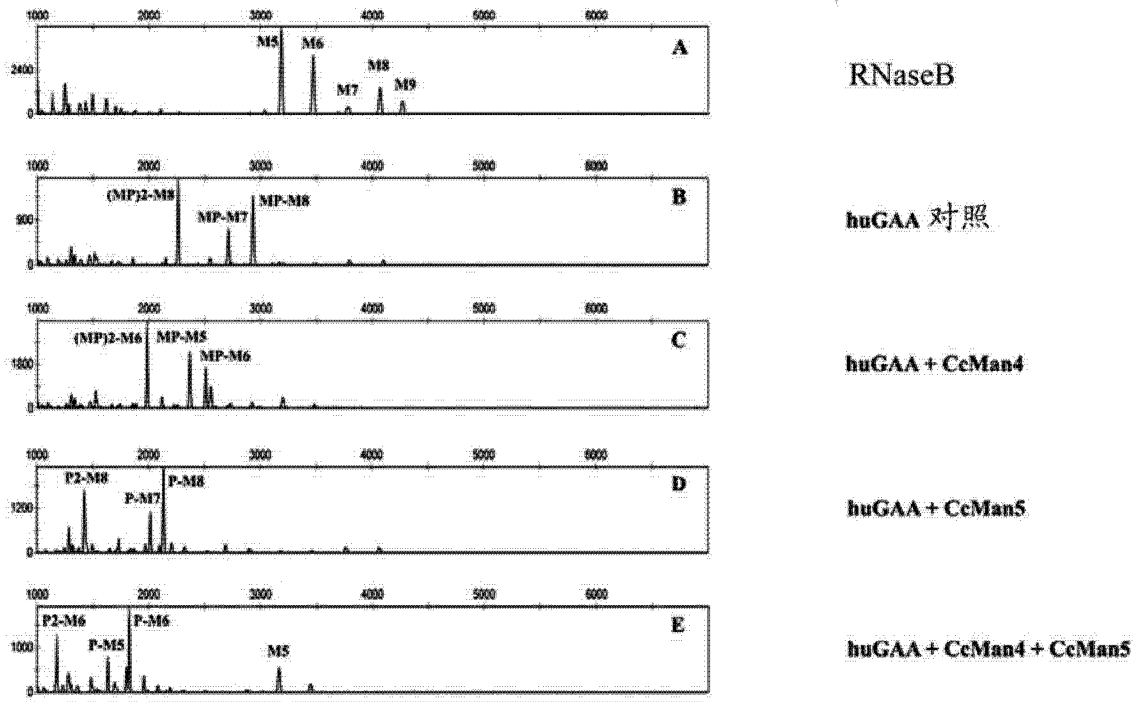


图 13

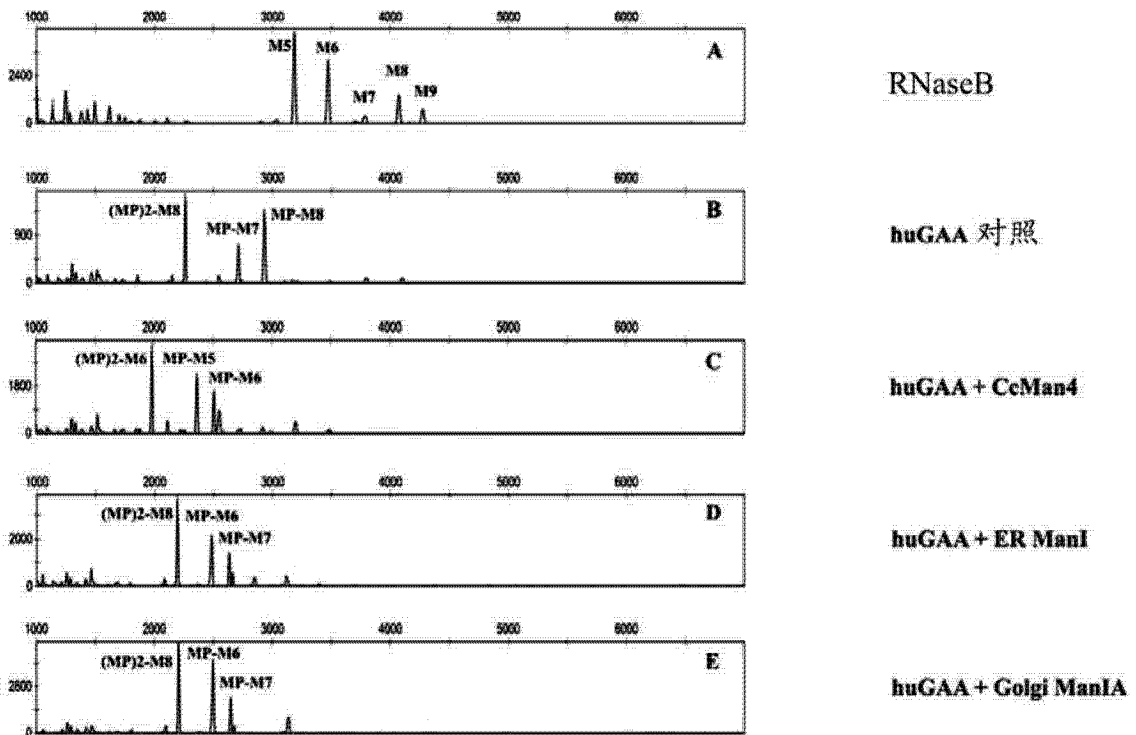


图 14

```
1 mhlpslsisl talaiaspsa ayphfgssqp vlhssdttq sradaikaaf shawdgylqy
61 afphdelhpv sngyqdsrng wgasavdals tavimrnati vnqildhvgk idysktnttv
121 sfettiryl ggmlsgydll kgpvsdlvqn sskidvlltq sknladvikf afdtpsgvpy
181 nnlnitsggn dgaktnglav tglalewtr lsdltgdttt adlsqkaesy llnpqpkxae
241 pfpglvgsni nisngqftda qvswnggdds yyeylikmyv ydpkrfglyk drwaaaqst
301 mqhlashpss rpdltflasy nngtlglssq hlctfdggsf llggtvinrt dfinfgldlv
361 sgchdtynt ltgigpesfs wdtsdipssq qslyekagfy itsgayilrp eviesfyyaw
421 rvtgqetyrd wiwsafsavn dycrtssgfs gltdvnaang gsrydnqesf lfaevmkysy
481 mafaedaawq vqpqsgnqfv fnteahprv sst
```

图 15