

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 2 年 2 月 6 日 (2020.2.6)

【公表番号】特表 2019-503171 (P2019-503171A)

【公表日】平成 31 年 2 月 7 日 (2019.2.7)

【年通号数】公開・登録公報 2019-005

【出願番号】特願 2018-532655 (P2018-532655)

【国際特許分類】

C 1 2 N 9/24 (2006.01)

C 1 2 N 15/56 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 15/81 (2006.01)

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

A 6 1 P 3/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 13/12 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/47 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

【 F I 】

C 1 2 N 9/24

C 1 2 N 15/56 Z N A

C 1 2 N 15/63

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 15/81

C 1 2 P 21/00 C

A 6 1 P 3/00

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 13/12

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 38/47

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 35/76

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 12 月 18 日 (2019.12.18)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト - N - アセチルガラクトサミニダーゼ ( N A G A L ) ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片であって、

配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのアスパラギン 2 1 3 に対応する第 1 のアミノ酸が、1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのシステイン 3 2 6 に対応する第 2 のアミノ酸が、1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのアスパラギン 2 1 3 に対応する第 1 のアミノ酸が、1 つまたは複数のアミノ酸によって置換され、配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのシステイン 3 2 6 に対応する第 2 のアミノ酸が、1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている、ヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

【請求項 2】

前記第 1 のアミノ酸が、1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって、好ましくは 1 つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第 2 のアミノ酸が、1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって、好ましくは 1 つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第 1 のアミノ酸が、1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって、好ましくは 1 つのアミノ酸によって置換され、前記第 2 のアミノ酸が、1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって、好ましくは 1 つのアミノ酸によって置換されている、請求項 1 に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

【請求項 3】

- 前記第 1 のアミノ酸を置換する 1 つまたは複数の前記アミノ酸が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリンからなる群から各々独立して選択される；

- 前記第 2 のアミノ酸を置換する 1 つまたは複数の前記アミノ酸が、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリンからなる群から各々独立して選択される；

- 前記第 1 のアミノ酸が、そのうち少なくとも 1 つが負に荷電した側鎖基を含む 1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている、または前記第 1 のアミノ酸が、そのうち少なくとも 1 つが負に荷電した側鎖基を含む 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって置換されている、または前記第 1 のアミノ酸が、負に荷電した側鎖基を含む 1 つのアミノ酸によって置換されており、好ましくは、負に荷電した側鎖基を含む少なくとも 1 つの前記アミノ酸が、アスパラギン酸またはグルタミン酸、好ましくはアスパラギン酸である；

- 前記第 2 のアミノ酸が、そのうち少なくとも 1 つが正に荷電した側鎖基もしくは極性非荷電側鎖基を含む 1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている、または前記第 2 のアミノ酸が、そのうち少なくとも 1 つが正に荷電した側鎖基もしくは極性非荷電側鎖基を含む 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって置換されている、または前記第 2 のアミノ酸が、正に荷電した側鎖基もしくは極性非荷電側鎖基を含む 1 つのアミノ酸によって置換されており、好ましくは正に荷電した側鎖基を含む少なくとも 1 つの前記アミノ酸が、アルギニン、ヒスチジンもしくはリシン、好ましくはアルギニンであり、または極性非荷電側鎖基を含む少なくとも 1 つの前記アミノ酸が、セリン、スレオニン、アスパラギンもしくはグルタミン、好ましくはセリンである；および/あるいは

- 前記第 1 のアミノ酸が、アスパラギン酸によって置換され、前記第 2 のアミノ酸が、アルギニンによって置換されている、または前記第 2 のアミノ酸が、アルギニンによって置換されている、または前記第 1 のアミノ酸が、アスパラギン酸によって置換され、前記第 2 のアミノ酸が、セリンによって置換されている、または前記第 2 のアミノ酸が、セリンによって置換されている、

請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的

に活性なバリエーションもしくは断片。

【請求項 4】

- 前記第 1 のアミノ酸がアスパラギンであり、

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の 1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって置換されている；または

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の 1 つのアミノ酸によって置換されている；および/あるいは

- 前記第 2 のアミノ酸がシステインであり、

前記システインが、システイン以外の 1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記システインが、システイン以外の 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって置換されている；または

前記システインが、システイン以外の 1 つのアミノ酸によって置換されている、

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

【請求項 5】

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 2 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 2 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を示す；または

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 3 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 3 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を示す；または

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 4 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 4 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を示す；または

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 5 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 5 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を示す、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

【請求項 6】

1 つまたは複数のアミノ酸のうち少なくとも 1 つが、配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのシステイン 326 に対応する第 2 のアミノ酸と直接的または間接的に相互作用することが可能であるように、配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのアスパラギン 213 に対応する第 1 のアミノ酸が、前記 1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

1 つまたは複数のアミノ酸のうち少なくとも 1 つが、配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのアスパラギン 213 に対応する第 1 のアミノ酸と直接的または間接的に相互作用することが可能であるように、配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのシステイン 326 に対応する第 2 のアミノ酸が、前記 1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記第 1 のアミノ酸を置換する前記 1 つまたは複数のアミノ酸のうち少なくとも 1 つが、前記第 2 のアミノ酸を置換する前記 1 つまたは複数のアミノ酸のうち少なくとも 1 つと直接的または間接的に相互作用することが可能であるように、配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのアスパラギン 213 に対応する第 1 のアミノ酸が、1 つまたは複数のアミノ酸によって置換され、配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのシステイン 326 に対応する第 2 のアミノ酸が、1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている、ヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

## 【請求項 7】

前記第 1 のアミノ酸が、1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって、好ましくは 1 つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第 2 のアミノ酸が、1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって、好ましくは 1 つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第 1 のアミノ酸が、1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって、好ましくは 1 つのアミノ酸によって置換され、前記第 2 のアミノ酸が、1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって、好ましくは 1 つのアミノ酸によって置換されている、請求項 6 に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

## 【請求項 8】

- 前記第 1 のアミノ酸がアスパラギンであり、

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の 1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって置換されている；または

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の 1 つのアミノ酸によって置換されている；

- 前記第 2 のアミノ酸がシステインであり、

前記システインが、システイン以外の 1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記システインが、システイン以外の 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって置換されている；または

前記システインが、システイン以外の 1 つのアミノ酸によって置換されている；および/あるいは

- 前記相互作用が、イオン性相互作用または水素結合相互作用またはファンデルワールス相互作用であり、必要に応じて、前記イオン性相互作用が、少なくとも 1 つのイオン対の形成を含み、必要に応じて、前記少なくとも 1 つのイオン対が、前記第 1 のアミノ酸を置換する前記 1 つまたは複数のアミノ酸に含まれるアミノ酸の負に荷電した側鎖基と、前記第 2 のアミノ酸を置換する前記 1 つまたは複数のアミノ酸に含まれるアミノ酸の正に荷電した側鎖基との間に形成される、または、必要に応じて、前記水素結合相互作用が、直接的相互作用である、もしくは前記水素結合相互作用が、1 つもしくは複数の溶媒分子、好ましくは 1 つもしくは複数の水分子を含む、

請求項 6 または 7 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

## 【請求項 9】

- ガラクトシダーゼ活性を獲得するなどのためにさらに改変される、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

## 【請求項 10】

配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸 171 の位置に対応するアミノ酸位置における S から E への置換、および配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸 174 の位置に対応するアミノ酸位置における A から L への置換を含む、請求項 9 に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

## 【請求項 11】

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 6 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 6 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を示す；または

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 7 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 7 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を示す；または

前記ヒトNAGALポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号8に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号8に対して少なくとも90%の配列同一性を示す；または

前記ヒトNAGALポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号9に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を示す、請求項9または10に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

【請求項12】

前記ヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片のC末端もしくはN末端のいずれかまたは両方の末端に、必要に応じて1つまたは複数のリンカーペプチドによって接続された1つまたは複数の異種アミノ酸配列などの1つまたは複数の異種アミノ酸配列をさらに含む、請求項1から11のいずれか一項に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

【請求項13】

異種シグナル配列などのシグナル配列をさらに含む、請求項1から12のいずれか一項に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

【請求項14】

1つまたは複数のN-グリカンを含み、好ましくは、前記N-グリカンのうち1つまたは複数がリン酸化され、より好ましくは、前記N-グリカンの数で40%またはそれよりも多くがリン酸化される；または

1つまたは複数の前記N-グリカンがリン酸化され、より好ましくは前記N-グリカンの数で40%またはそれよりも多くがリン酸化され、前記リン酸化されたN-グリカンのうち1つまたは複数が、脱キャップ化および脱マンノシル化され、好ましくは、前記リン酸化されたN-グリカンの数で40%またはそれよりも多くが、脱キャップ化および脱マンノシル化される、

請求項1から13のいずれか一項に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

【請求項15】

請求項1から14のいずれか一項に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片をコードする核酸配列を含む、核酸分子。

【請求項16】

請求項15に記載の核酸分子と前記核酸分子に作動可能に連結したプロモーターとを含む発現カセットまたは発現ベクターであって、好ましくは、前記発現カセットまたは発現ベクターが、宿主細胞、好ましくは真菌細胞、より好ましくは*Yarrowia lipolytica*または*Arxula adeninivorans*において、前記ヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片の発現をもたらすように構成される、発現カセットまたは発現ベクター。

【請求項17】

請求項1から14のいずれか一項に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片、あるいは請求項15に記載の核酸分子あるいは請求項16に記載の発現カセットもしくは発現ベクターを含む、医薬組成物。

【請求項18】

治療における使用のための、請求項17に記載の医薬組成物であって、必要に応じて、前記治療が遺伝子治療またはmRNA治療である、医薬組成物。

【請求項19】

請求項17に記載の医薬組成物であって、前記ヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片が、請求項9から11のいずれか一項または請求項9から11のいずれか一項に従属する請求項12から14のいずれか一項に記載されるものであり、ファブリー病を処置する方法における使用のためのものである；あるいはヒ

ト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片が、請求項 1 から 8 のいずれか一項または請求項 1 から 8 のいずれか一項に従属する請求項 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載されるものであり、シンドラー病または神崎病を処置する方法における使用のためのものである、医薬組成物。

【請求項 2 0】

請求項 1 5 に記載の核酸分子または請求項 1 6 に記載の発現カセットもしくは発現ベクターを含む、宿主細胞、あるいは前記宿主細胞の実質的に純粋な培養物であって、必要に応じて、

- 前記宿主細胞が、真菌細胞、好ましくは *Yarrowia lipolytica* または *Arxula adeninivorans* である；ならびに / または

- 前記宿主細胞が、

- N - グリカン活性の外鎖伸長における欠損、例えば、OCH1 活性における欠損を含むように遺伝子操作される；および / もしくは

- MNN4、PNO1、MNN6 またはそれらのいずれか 1 つの生物学的に活性なバリエーションもしくは断片などの、N - グリカンのマンノシルリン酸化をもたらすことが可能なポリペプチドの発現を含むように遺伝子操作される、  
宿主細胞、あるいは前記宿主細胞の実質的に純粋な培養物。

【請求項 2 1】

請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片を産生するための方法であって、

a) 宿主細胞が、前記ヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片を発現するように、請求項 2 0 に記載の宿主細胞を培養するステップ、

b) 前記宿主細胞または宿主細胞培養培地から、前記ヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片を収集するステップであって、必要に応じて単離するステップ

を含み、

必要に応じて、前記方法が、前記ヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片に含まれるリン酸化された N - グリカンの少なくとも一部を脱キヤップ化および脱マンノシル化するステップをさらに含み、例えば、前記脱キヤップ化および脱マンノシル化が、*in vitro* で、または前記宿主細胞中で、または前記宿主細胞の溶解物中で起こる、方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 4】

本発明の上記およびさらなる態様ならびに好ましい実施形態は、以下のセクションおよび添付の特許請求の範囲において記載される。添付の特許請求の範囲の主題は、本明細書で具体的に取込まれる。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

ヒト - N - アセチルガラクトサミニダーゼ (N A G A L) ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片であって、

配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのアスパラギン 2 1 3 に対応する第 1 のアミノ酸が、1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのシステイン 3 2 6 に対応する第 2 のアミノ酸が、1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのアスパラギン 2 1 3 に対応する第

1のアミノ酸が、1つまたは複数のアミノ酸によって置換され、配列番号1に示されるヒトNAGALポリペプチドのシステイン326に対応する第2のアミノ酸が、1つまたは複数のアミノ酸によって置換されている、ヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目2)

前記第1のアミノ酸が、1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第2のアミノ酸が、1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第1のアミノ酸が、1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換され、前記第2のアミノ酸が、1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換されている、項目1に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目3)

前記第1のアミノ酸が、1つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第2のアミノ酸が、1つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第1のアミノ酸が、1つのアミノ酸によって置換され、前記第2のアミノ酸が、1つのアミノ酸によって置換されている、項目1に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目4)

前記第1のアミノ酸がアスパラギンであり、

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の1つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換されている；または

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の1つのアミノ酸によって置換されている、項目1から3のいずれか一項に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目5)

前記第2のアミノ酸がシステインであり、

前記システインが、システイン以外の1つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記システインが、システイン以外の1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換されている；または

前記システインが、システイン以外の1つのアミノ酸によって置換されている、項目1から4のいずれか一項に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目6)

前記第1のアミノ酸を置換する1つまたは複数の前記アミノ酸が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリンからなる群から各々独立して選択される、項目1から5のいずれか一項に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目7)

前記第2のアミノ酸を置換する1つまたは複数の前記アミノ酸が、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリンからなる群から各々独立して選択される、項目1から6のいずれか一項に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

( 項目 8 )

前記第 1 のアミノ酸が、そのうち少なくとも 1 つが負に荷電した側鎖基を含む 1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記第 1 のアミノ酸が、そのうち少なくとも 1 つが負に荷電した側鎖基を含む 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第 1 のアミノ酸が、負に荷電した側鎖基を含む 1 つのアミノ酸によって置換されている、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

( 項目 9 )

負に荷電した側鎖基を含む少なくとも 1 つの前記アミノ酸が、アスパラギン酸またはグルタミン酸、好ましくはアスパラギン酸である、項目 8 に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

( 項目 1 0 )

前記第 2 のアミノ酸が、そのうち少なくとも 1 つが正に荷電した側鎖基もしくは極性非荷電側鎖基を含む 1 つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記第 2 のアミノ酸が、そのうち少なくとも 1 つが正に荷電した側鎖基もしくは極性非荷電側鎖基を含む 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第 2 のアミノ酸が、正に荷電した側鎖基もしくは極性非荷電側鎖基を含む 1 つのアミノ酸によって置換されている、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

( 項目 1 1 )

正に荷電した側鎖基を含む少なくとも 1 つの前記アミノ酸が、アルギニン、ヒスチジンもしくはリシン、好ましくはアルギニンであり、または極性非荷電側鎖基を含む少なくとも 1 つの前記アミノ酸が、セリン、スレオニン、アスパラギンもしくはグルタミン、好ましくはセリンである、項目 1 0 に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

( 項目 1 2 )

前記第 1 のアミノ酸が、アスパラギン酸によって置換され、前記第 2 のアミノ酸が、アルギニンによって置換されている；または

前記第 2 のアミノ酸が、アルギニンによって置換されている；または

前記第 1 のアミノ酸が、アスパラギン酸によって置換され、前記第 2 のアミノ酸が、セリンによって置換されている；または

前記第 2 のアミノ酸が、セリンによって置換されている、項目 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

( 項目 1 3 )

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 2 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を示す；または

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 3 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 3 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を示す；または

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 4 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 4 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を示す；または

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 5 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 5 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を示す、項目 1 から 1 2 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

( 項目 1 4 )

1つまたは複数のアミノ酸のうち少なくとも1つが、配列番号1に示されるヒトNAGALポリペプチドのシステイン326に対応する第2のアミノ酸と直接的または間接的に相互作用することが可能であるように、配列番号1に示されるヒトNAGALポリペプチドのアスパラギン213に対応する第1のアミノ酸が、前記1つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

1つまたは複数のアミノ酸のうち少なくとも1つが、配列番号1に示されるヒトNAGALポリペプチドのアスパラギン213に対応する第1のアミノ酸と直接的または間接的に相互作用することが可能であるように、配列番号1に示されるヒトNAGALポリペプチドのシステイン326に対応する第2のアミノ酸が、前記1つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記第1のアミノ酸を置換する前記1つまたは複数のアミノ酸のうち少なくとも1つが、前記第2のアミノ酸を置換する前記1つまたは複数のアミノ酸のうち少なくとも1つと直接的または間接的に相互作用することが可能であるように、配列番号1に示されるヒトNAGALポリペプチドのアスパラギン213に対応する第1のアミノ酸が、1つまたは複数のアミノ酸によって置換され、配列番号1に示されるヒトNAGALポリペプチドのシステイン326に対応する第2のアミノ酸が、1つまたは複数のアミノ酸によって置換されている、ヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目15)

前記第1のアミノ酸が、1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第2のアミノ酸が、1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第1のアミノ酸が、1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換され、前記第2のアミノ酸が、1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換されている、項目14に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目16)

前記第1のアミノ酸が、1つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第2のアミノ酸が、1つのアミノ酸によって置換されている；または

前記第1のアミノ酸が、1つのアミノ酸によって置換され、前記第2のアミノ酸が、1つのアミノ酸によって置換されている、項目14に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目17)

前記第1のアミノ酸がアスパラギンであり、

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の1つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換されている；または

前記アスパラギンが、アスパラギン以外の1つのアミノ酸によって置換されている、項目14から16のいずれか一項に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目18)

前記第2のアミノ酸がシステインであり、

前記システインが、システイン以外の1つまたは複数のアミノ酸によって置換されている；または

前記システインが、システイン以外の1つ、2つもしくは3つのアミノ酸によって置換されている；または

前記システインが、システイン以外の1つのアミノ酸によって置換されている、項目14から17のいずれか一項に記載のヒトNAGALポリペプチドまたはその機能的に活性

なバリエーションもしくは断片。

(項目 19)

前記相互作用が、イオン性相互作用または水素結合相互作用またはファンデルワールス相互作用である、項目 14 から 18 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 20)

前記イオン性相互作用が、少なくとも 1 つのイオン対の形成を含む、項目 19 に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 21)

前記少なくとも 1 つのイオン対が、前記第 1 のアミノ酸を置換する前記 1 つまたは複数のアミノ酸に含まれるアミノ酸の負に荷電した側鎖基と、前記第 2 のアミノ酸を置換する前記 1 つまたは複数のアミノ酸に含まれるアミノ酸の正に荷電した側鎖基との間に形成される、項目 20 に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 22)

前記水素結合相互作用が、直接的相互作用である、または前記水素結合相互作用が、1 つもしくは複数の溶媒分子、好ましくは 1 つもしくは複数の水分子を含む、項目 19 に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 23)

- ガラクトシダーゼ活性を獲得するなどのためにさらに改変される、項目 1 から 22 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 24)

配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸 171 の位置に対応するアミノ酸位置における S から E への置換、および配列番号 1 に示されるヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸 174 の位置に対応するアミノ酸位置における A から L への置換を含む、項目 23 に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 25)

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 6 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 6 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を示す；または

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 7 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 7 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を示す；または

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 8 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 8 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を示す；または

前記ヒト N A G A L ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 9 に示されるとおりであるか、もしくは前記機能的に活性なバリエーションが、配列番号 9 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を示す、項目 23 または 24 に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 26)

前記ヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片の C 末端もしくは N 末端のいずれかまたは両方の末端に、任意選択で 1 つまたは複数のリンカーペプチドによって接続された 1 つまたは複数の異種アミノ酸配列などの 1 つまたは複数の異種アミノ酸配列をさらに含む、項目 1 から 25 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 27)

1 つまたは複数の N - グリカンを含み、好ましくは、前記 N - グリカンのうち 1 つまた

は複数がリン酸化され、より好ましくは、前記 N - グリカンの数で 40 % またはそれよりも多くがリン酸化される、項目 1 から 26 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 28)

前記リン酸化された N - グリカンのうち 1 つまたは複数が、脱キャップ化および脱マンノシル化され、好ましくは、前記リン酸化された N - グリカンで 40 % またはそれよりも多くが、脱キャップ化および脱マンノシル化される、項目 27 に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 29)

治療における使用のための、項目 1 から 28 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 30)

ファブリー病を処置する方法における使用のための、項目 23 から 25 のいずれか一項または項目 23 から 25 のいずれか一項に従属する項目 26 から 28 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片、あるいはシンドラー病または神崎病を処置する方法における使用のための、項目 1 から 22 のいずれか一項または項目 1 から 22 のいずれか一項に従属する項目 26 から 28 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片。

(項目 31)

かかる処置を必要とするヒト対象においてファブリー病を処置する方法であって、項目 23 から 25 のいずれか一項または項目 23 から 25 のいずれか一項に従属する項目 26 から 28 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片の治療有効量を前記対象に投与するステップを含む方法、あるいはかかる処置を必要とするヒト対象においてシンドラー病または神崎病を処置する方法であって、項目 1 から 22 のいずれか一項または項目 1 から 22 のいずれか一項に従属する項目 26 から 28 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片の治療有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

(項目 32)

項目 1 から 28 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片を含む、医薬組成物。

(項目 33)

項目 1 から 28 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片をコードする核酸配列を含む、核酸分子。

(項目 34)

項目 33 に記載の核酸分子と前記核酸分子に作動可能に連結したプロモーターを含む発現カセットまたは発現ベクターであって、好ましくは、前記発現カセットまたは発現ベクターが、宿主細胞、好ましくは真菌細胞、より好ましくは *Yarrowia lipolytica* または *Arxula adeninivorans* において、前記ヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片の発現をもたらすように構成される、発現カセットまたは発現ベクター。

(項目 35)

治療における使用のための、項目 33 に記載の核酸分子または項目 34 に記載の発現カセットもしくは発現ベクター。

(項目 36)

前記治療が、遺伝子治療または mRNA 治療である、項目 35 に記載の使用のための、項目 33 に記載の核酸分子または項目 34 に記載の発現カセットもしくは発現ベクター。

(項目 37)

ファブリー病を処置する方法における使用のための、項目 23 から 25 のいずれか一項

または項目 2 3 から 2 5 のいずれか一項に従属する項目 2 6 から 2 8 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片をコードし、好ましくは、前記方法が、遺伝子治療方法または m R N A 治療方法である、項目 3 3 に記載の核酸分子または項目 3 4 に記載の発現カセットもしくは発現ベクター。

(項目 3 8 )

シンドラー病または神崎病を処置する方法における使用のための、項目 1 から 2 2 のいずれか一項または項目 1 から 2 2 のいずれか一項に従属する項目 2 6 から 2 8 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片をコードし、好ましくは、前記方法が、遺伝子治療方法または m R N A 治療方法である、項目 3 3 に記載の核酸分子または項目 3 4 に記載の発現カセットもしくは発現ベクター。

(項目 3 9 )

かかる処置を必要とするヒト対象においてファブリー病を処置する方法であって、項目 2 3 から 2 5 のいずれか一項または項目 2 3 から 2 5 のいずれか一項に従属する項目 2 6 から 2 8 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片をコードする項目 3 3 に記載の核酸分子または項目 3 4 に記載の発現カセットもしくは発現ベクターの治療有効量を前記対象に投与するステップを含み、好ましくは、遺伝子治療方法または m R N A 治療方法である、方法。

(項目 4 0 )

かかる処置を必要とするヒト対象においてシンドラー病または神崎病を処置する方法であって、項目 1 から 2 2 のいずれか一項または項目 1 から 2 2 のいずれか一項に従属する項目 2 6 から 2 8 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片をコードする項目 3 3 に記載の核酸分子または項目 3 4 に記載の発現カセットもしくは発現ベクターの治療有効量を前記対象に投与するステップを含み、好ましくは、遺伝子治療方法または m R N A 治療方法である、方法。

(項目 4 1 )

項目 3 3 に記載の核酸分子または項目 3 4 に記載の発現カセットもしくは発現ベクターを含む、医薬組成物。

(項目 4 2 )

項目 3 3 に記載の核酸分子または項目 3 4 に記載の発現カセットもしくは発現ベクターを含む、宿主細胞。

(項目 4 3 )

前記宿主細胞が、真菌細胞、好ましくは *Yarrowia lipolytica* または *Arxula adeninivorans* である、項目 4 2 に記載の宿主細胞。

(項目 4 4 )

- N - グリカン活性の外鎖伸長における欠損、例えば、O C H 1 活性における欠損を含むように遺伝子操作される；および / あるいは

- M N N 4、P N O 1、M N N 6 またはそれらのいずれか 1 つの生物学的に活性なバリエーションもしくは断片などの、N - グリカンのマンノシルリン酸化をもたらすことが可能なポリペプチドの発現を含むように遺伝子操作される、項目 4 2 または 4 3 に記載の宿主細胞。

(項目 4 5 )

項目 4 2 から 4 4 のいずれか一項に記載の宿主細胞の実質的に純粋な培養物。

(項目 4 6 )

宿主細胞において項目 1 から 2 8 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片の発現を達成するための、項目 3 3 に記載の核酸分子または項目 3 4 に記載の発現カセットもしくは発現ベクターの使用であって、好ましくは、前記宿主細胞が、真菌細胞、より好ましくは *Yarrowia lipolytica* または *Arxula adeninivorans* である、使用。

(項目 4 7 )

項目 1 から 2 8 のいずれか一項に記載のヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片を産生するための方法であって、

a) 宿主細胞が、前記ヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片を発現するように、項目 4 2 から 4 4 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養するステップ、

b) 前記宿主細胞または宿主細胞培養培地から、前記ヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片を収集するステップであって、必要に応じて単離するステップを含む方法。

( 項目 4 8 )

前記ヒト N A G A L ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエーションもしくは断片に含まれるリン酸化された N - グリカンの少なくとも一部の脱キャップ化および脱マンノシル化をさらに含み、例えば、前記脱キャップ化および脱マンノシル化が、i n v i t r o で、または前記宿主細胞中で、または前記宿主細胞の溶解物中で起こる、項目 4 7 に記載の方法。