

【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 (NAGAL) ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアント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アントもしくは断片。

【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アントもしくは断片。

【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

に活性なバリアントもしくは断片。

【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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

【請求項5】

前記ヒトNAGAL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アントが、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NAGAL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アントが、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NAGAL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アントが、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NAGAL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アントが、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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

【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アントもしくは断片。

**【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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

**【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ィンであり、

前記システィンが、システィン以外の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

前記システィンが、システィン以外の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

前記システィンが、システィン以外の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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

**【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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

**【請求項 10】**

配列番号1に示されるヒトNAGAL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NAGAL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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

**【請求項 11】**

前記ヒトNAGAL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アントが、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NAGAL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アントが、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アントが、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アントが、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アントもしくは断片。

#### 【請求項12】

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アントもしくは断片の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アントもしくは断片。

#### 【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アントもしくは断片。

#### 【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、脱キヤ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、脱キヤ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アントもしくは断片。

#### 【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アント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アント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アントもしくは断片、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アントもしくは断片が、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アントもしくは断片が、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12から14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20】

請求項15に記載の核酸分子または請求項16に記載の発現力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Y a r r o w i a l i p o l y t i c a またはA r x u l a a d e n i n i v o r a n s 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、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／もしくは
    - 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アント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21】

請求項1から14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アント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アントもしくは断片を発現するように、請求項20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アント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アント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、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、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り込まれる。

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アント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；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ントもしくは断片。

(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ントもしくは断片。

(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ントもしくは断片。

(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ントもしくは断片。

(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ントもしくは断片。

(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ントもしくは断片。

(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ントもしくは断片。

(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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエントもしくは断片。

(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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエントもしくは断片。

(項目10)

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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリエントもしくは断片。

(項目11)

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ントもしくは断片。

(項目12)

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ントもしくは断片。

(項目13)

前記ヒトNAGAL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ントが、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NAGAL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ントが、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NAGAL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ントが、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NAGAL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ントが、配列番号5に対して少なくとも90%の配列同一性を示す、項目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ントもしくは断片。

(項目14)

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アントもしくは断片。

(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アントもしくは断片。

(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アントもしくは断片。

(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アントもしくは断片。

(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

なバリアントもしくは断片。

(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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(項目24)

配列番号1に示されるヒトNAGAL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NAGAL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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(項目25)

前記ヒトNAGAL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アントが、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NAGAL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アントが、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アントが、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アントが、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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(項目26)

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アントもしくは断片の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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(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、脱キヤ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、脱キヤ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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片、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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片。

(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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアント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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアント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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアント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NAGALポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアント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アント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 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NAGAL ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアント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mRNA 治療方法である、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 38)

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NAGAL ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアント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mRNA 治療方法である、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 39)

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NAGAL ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片をコードする項目 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mRNA 治療方法である、方法。

(項目 40)

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NAGAL ポリペプチドまたはその機能的に活性なバリアントもしくは断片をコードする項目 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mRNA 治療方法である、方法。

(項目 41)

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を含む、医薬組成物。

(項目 42)

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を含む、宿主細胞。

(項目 43)

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 42 に記載の宿主細胞。

(項目 44)

- 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/あるいは

- 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アントもしくは断片などの、N-グリカンのマンノシリ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 42 または 43 に記載の宿主細胞。

(項目 45)

項目 42 から 44 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 46)

宿主細胞において項目 1 から 28 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アントもしくは断片の発現を達成するための、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 47)

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アントもしくは断片を产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アント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アント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アント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ヤップ化および脱マンノシリ化をさらに含み、例えば、前記脱キヤップ化および脱マンノシリ化が、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、項目 4 7 に記載の方法。