

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6329483号
(P6329483)

(45) 発行日 平成30年5月23日(2018.5.23)

(24) 登録日 平成30年4月27日(2018.4.27)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 38/46 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027
C 1 2 N 9/24 (2006.01)	C 1 2 N 9/24
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15

請求項の数 21 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-535865 (P2014-535865)
(86) (22) 出願日	平成24年10月11日 (2012.10.11)
(65) 公表番号	特表2014-534962 (P2014-534962A)
(43) 公表日	平成26年12月25日 (2014.12.25)
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/059708
(87) 國際公開番号	W02013/055888
(87) 國際公開日	平成25年4月18日 (2013.4.18)
審査請求日	平成27年10月6日 (2015.10.6)
(31) 優先権主張番号	61/546,248
(32) 優先日	平成23年10月12日 (2011.10.12)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	500176090 シナジエバ・バイオファーマ・コーポレイ ション S y n a g e v a B i o p h a r m a C o r p. アメリカ合衆国O 2 4 2 1 マサチューセッ ツ州 レキシントン、スプリング・ストリ ート 1 2 8 番、スウィート 5 2 0
(74) 代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(74) 代理人	100121511 弁理士 小田 直
(74) 代理人	100191086 弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組換えヒトNAGLUタンパク質およびその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

組換えヒトN-アセチル-アルファ-D-グルコサミニダーゼ(rhNAGLU)タンパク質の単離された混合物を含む組成物であって、前記rhNAGLUタンパク質が配列番号1のアミノ酸配列24~743からなり、マンノース-6-リン酸塩(M6P)を含むグリカン構造を含有し、前記rhNAGLUタンパク質が、rhNAGLUタンパク質の1モル当たり少なくとも1モルのマンノース-6-リン酸塩(M6P)を含む、NAGLU欠乏症を治療するための組成物であって、

NAGLU欠乏症を有する対象に前記組成物の治療上有効量を静脈内投与することを特徴とする、組成物。

【請求項2】

前記rhNAGLUタンパク質が、rhNAGLUタンパク質1モル当たり1から6モルのM6Pを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記rhNAGLUタンパク質が、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記rhNAGLUタンパク質が、ガラクトースを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記rhNAGLUタンパク質が、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を含

む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 *r h N a G 1 u* タンパク質が、遺伝子導入鳥類の卵管細胞から產生される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記対象が哺乳動物であり、前記 *r h N a G 1 u* タンパク質が、M 6 P 受容体介在エンドサイトーシスを介して前記哺乳動物の細胞内に取り込まれ、内因性 *N a G 1 u* を発現する同じタイプの野生型細胞中で観察される *N a G 1 u* 活性の少なくとも 50 % を復元する、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 *r h N a G 1 u* タンパク質が、N 結合型グリコシル化されている、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 *r h N a G 1 u* タンパク質が、O 結合型グリコシル化されている、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記 *r h N a G 1 u* タンパク質が、*r h N a G 1 u* タンパク質 1 モル当たり約 2、3、4、5、または 6 モルの M 6 P を含む、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

N a G 1 u 欠乏症の治療するための組成物であって、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の *r h N a G 1 u* タンパク質を含み、*N a G 1 u* 欠乏症を有する対象に前記組成物の治療上有効量を静脈内投与することを特徴とする、組成物。

【請求項 12】

前記対象が哺乳動物であり、投与が前記哺乳動物の脳に前記 *r h N a G 1 u* タンパク質が効果的に送達することを特徴とする、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の組成物を、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤の 1 つ以上と組み合わせて含む、*N a G 1 u* 欠乏症を治療するための薬学的製剤であって、

N a G 1 u 欠乏症を有する対象に前記組成物の治療上有効量を静脈内投与することを特徴とする、薬学的製剤。

【請求項 14】

前記 *N a G 1 u* 欠乏症が、サンフィリポ症候群 B である、請求項 11 から 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記対象がヒト対象であり、前記 *N a G 1 u* タンパク質が、ヒト対象に、約 1 ~ 約 30 mg / kg 体重の投薬量で静脈内投与される、請求項 11 から 12 および 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記対象がヒト対象であり、前記治療上有効量が、前記ヒト対象の脳、腎臓、または肝臓内のヘパラン硫酸塩レベルを低減するのに有効な量である、請求項 11 から 12 および 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記対象がヒト対象であり、前記治療上有効量が、前記ヒト対象の脳または肝臓内の *N a G 1 u* 活性を増加させるのに有効な量である、請求項 11 から 12 および 14 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 18】

組成物がさらに第 2 の治療剤を含むか、または第 2 の治療剤と共に投与するためのものであることを特徴とする、請求項 11 から 12 および 14 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

前記第2の治療剤が、免疫抑制剤である、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

前記細胞がヒト細胞である、請求項7に記載の組成物。

【請求項21】

前記ヒト細胞が皮膚線維芽細胞、神経細胞、肝細胞またはマクロファージである請求項20に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

10

本出願は、2011年10月12日に出願された米国仮出願第61/546,248号に關し、またそれに対する優先権を主張し、その内容全体は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

サンフィリポ症候群B(LSD)は、N-アセチル-アルファ-D-グルコサミニダーゼ(NaGlu)として知られているリソソーム酵素の欠乏によって引き起こされる、常染色体劣性リソソーム蓄積症である。NaGluは、リソソーム内のグリコサミノグリカン(GAG)の段階的崩壊の一部として、ヘパラン硫酸塩の分解に必要とされる。NaGluの欠乏または不在は、ヘパラン硫酸塩の蓄積および尿中排泄につながる。これまでに70を超える異なる突然変異が特定されており、サンフィリポ症候群Bは、広範な分子および遺伝子多様性を示す。

20

【0003】

200,000件の出生のうちおよそ1件は、サンフィリポ症候群Bの影響を受け、この欠乏は、主に幼児において現れる。初期の無症状期間の後、サンフィリポ症候群Bを患う患者は、通常、精神発達の遅延、行動上の問題を呈し、続いて進行性の知能低下の結果、重度の精神遅滞、痴呆症、および運動疾患をもたらす。言語の習得は、遅く、不完全である。重度に侵された患者は、2歳という早期に精神運動および言語発達の遅延を呈する場合がある。疾患は、通常、高まる行動障害および睡眠障害に進行する。臨床特徴は、主に神経性であるが、患者はしばしば、下痢、齶蝕歯、肝臓および脾臓肥大、関節のこわばり、多毛性のおよび/または粗い髪を発達し、血液凝固の問題を示す場合がある。疾病的最終段階においては、患者は、運動不能で無応答性となり、嚥下困難および発作を発症する。侵された小児の寿命は、典型的に、10代後半から20代前半を越えては延長しない。

30

【0004】

患者において欠損している酵素を提供するための異なるアプローチが試みられてきた。酵素補充療法(ERT)用のNaGluを产生するために、ヒトNaGluは、種々の哺乳類細胞培養系において発現してきた。しかしながら、リソソームへと細胞内部に通行する、天然に生じるNaGluとは対照的に、哺乳類細胞から产生および分泌される組換えNaGluタンパク質は、マンノース6-リン酸(M6P)を含有しないか、または微量のマンノース6-リン酸(M6P)しか含有しないことが見出された。分泌されたNaGluにおけるM6P部分の不在または不足は、その形質膜の表面上にM6P受容体を有する、標的細胞(例えば、ヒト皮膚線維芽細胞)中へのその効率的な内部取り込みを妨害することが知られてきた(Zhao et al., Protein Expression and Purification, 19:202-211 (2000)、およびWeber et al., Protein Expression and Purification, 21:251-259 (2001)を参照されたい)。低度のリン酸化が、CHO細胞中で発現される分泌マウスNaGlu、HeLa細胞中で発現される分泌ヒトNaGlu、ヒト線維芽細胞中で発現される分泌ヒトNaGlu、およびヒト胎児腎臓(HEK)細胞株293において発現される分泌ヒトNaGluにおいて見

40

50

られた (Zhao et al., Protein Expression and Purification, 19:202-211 (2000)、Yogalingam et al., Biochim Biophys. Acta 1502:415-425、およびWeber et al., Protein Expression and Purification, 21:251-259 (2001) を参照されたい)。哺乳類細胞から分泌されるNaGluタンパク質におけるNグリカンのリン酸化がないことまたはリン酸化が弱いことは、内部取り込みされたタンパク質の濃度が、そもそも検出可能であったとしても、野生型レベルよりも1000倍近く低いので、全ての上述の試みにより標的細胞によって効率的に取り込まれる酵素を產生することに失敗しているため、酵素補充療法に好適な組換えヒトNaGluタンパク質の開発にとって主要な妨害となる (Zhao et al., Protein Expression and Purification, 19:202-211 (2000) を参照されたい)。現在までに、サンフィリポ症候群Bの治療のために利用可能な製品は何ら認可されていない。

【0005】

天然アミノ酸配列を有する哺乳類細胞により產生される組換えヒトNaGluタンパク質 (rhNaGlu) の、NaGlu欠乏マウスの中枢神経系 (CNS) への直接投与 (例えば、脳脊髄液 (CSF) 中への髄腔内投与) が試みられてきたが、脳室の脳室上皮上のタンパク質の過剰な蓄積ならびに効率的な細胞取り込みに必須のM6P残基の欠如に起因して、脳への酵素の生体分布の成功を実証することに失敗している。同様に、天然アミノ酸配列を有する哺乳類細胞により產生されるrhNaGluの全身投与 (すなわち、静脈 (IV) 注射) もまた、脳へのタンパク質の局在化の成功を実証することに失敗している。高侵襲性の髄腔内投与に関連する既知の危険性に加えて、脳にrhNaGluの標的を定める際のこれらの妨害は、サンフィリポ症候群Bの治療のための有効な治療法を達成するには大きすぎる課題となってきた。

【0006】

したがって、酵素的に活性であり、かつタンパク質が血液脳関門 (BBB) を通過すること、および標的細胞のリソソーム中へのタンパク質の効果的な内部移行を可能にする生理的特性を有する、安定なNaGluタンパク質を提供する必要性が存在する。血液脳関門を効果的に横断し、ヒト標的細胞の内部に効率的に取り込まれる、組換えヒトNaGluを提供することができる、高発現の強固なタンパク質產生プラットフォームに対する必要性もまた存在する。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、例えば、サンフィリポ症候群Bの治療における、治療法に有用な組換えヒトNaGluタンパク質 (rhNaGlu) を含む、組成物に向けられる。本発明は、本明細書に記載されるrhNaGluが1つ以上のグリコシリ化パターンを有し、そのグリコシリ化パターンが、rhNaGluが血液脳関門 (BBB) を効率的に横断し、その酵素が欠乏した動物の中枢神経系 (CNS) 内の細胞中に取り込まれることを可能にし、脳内の -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性の劇的な増加、ならびに基質レベルの低減をもたらすという、驚くべき予想外の発見に基づく。更に、本明細書に記載されるrhNaGluは、哺乳類細胞 (例えば、ヒト細胞) 中に効率的に取り込まれて、特定のグリコシリ化をもたらすように設計されていない無修飾の哺乳類細胞から產生および分泌されるNaGluタンパク質と比較して、増加した酵素活性をもたらす。NaGluタンパク質の増加した細胞取り込みはまた、増加した投薬量および頻度に対する必要性を最小化し、それによって免疫原性の潜在的な危険性を大幅に低減することによって、サンフィリポ症候群Bを患うヒト患者のための酵素補充療法において使用するための便益も提供する。

【0008】

本明細書に記載されるrhNaGluタンパク質は、マンノースおよび/またはM6P

10

20

30

40

50

受容体介在性エンドサイトーシスを介した効率的な細胞取り込みを可能にし、ヒト細胞へと正しく標的を定められるのに十分な量のオリゴ糖（例えば、マンノースおよびリン酸化マンノース（すなわち、M6P））を含有する。一実施形態において、rhNaG1uは、タンパク質1モル当たり、少なくとも1モルのタンパク質、例えば、1、2、3、4、5、または6モルのM6Pを含有する。一実施形態において、rhNaG1uは、NaG1u欠乏ヒト細胞中に内部移行され得、その結果、内部移行されたタンパク質は、NaG1u欠乏細胞におけるNaG1u活性の正常なレベル（すなわち、野生型レベル）を完全に（100%以上）復元する。

【0009】

また、マンノースのリン酸化から便益を得る、rhNaG1uを発現する遺伝子導入鳥類を産生するための方法も本明細書に開示される。詳細には、卵管細胞中でrhNaG1uタンパク質を発現する遺伝子導入鳥類が、タンパク質を卵管の内腔中に分泌し、卵白中に沈着させる。かかるrhNaG1uを含有する鳥類卵もまた、本発明に含まれる。

10

【0010】

本発明はまた、rhNaG1uをコードする導入遺伝子を含有するベクターおよび宿主細胞、ならびにサンフィリポ症候群Bの治療のためのかかるrhNaG1uの適用において使用されるrhNaG1uを含む、薬学的組成物も企図する。

【0011】

一態様において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列24～743を含む組換えヒトN-アセチル-アルファ-D-グルコサミニダーゼ（rhNaG1u）の単離された混合物を含む、組成物を提供し、その混合物中のrhNaG1uの少なくとも10%は、マンノース-6-リン酸塩（M6P）を有する少なくとも1つのグリカン構造を含む。一実施形態において、M6Pを有するrhNaG1uは、NaG1uが欠乏した哺乳類細胞中に取り込まれることが可能であり、その結果、内部移行されたrhNaG1uは、同じタイプの野生型哺乳動物細胞中で観察される正常なNaG1u活性の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、または100%を復元する。別の実施形態において、グリカン構造は、N結合型グリカンである。

20

【0012】

一実施形態において、rhNaG1uは、タンパク質1モル当たり少なくとも1モルのM6Pを含有する。別の実施形態において、rhNaG1uは、タンパク質1モル当たり約1～約6モルのM6Pを含有する。別の実施形態において、rhNaG1uは、タンパク質1モル当たり約2モルのM6Pを含有する。なおも別の実施形態において、rhNaG1uは、タンパク質1モル当たり約3モルのM6Pを含有する。別の実施形態において、rhNaG1uは、タンパク質1モル当たり約4モルのM6Pを含有する。別の実施形態において、rhNaG1uは、タンパク質1モル当たり約5モルのM6Pを含有する。なおも別の実施形態において、rhNaG1uは、タンパク質1モル当たり約6モルのM6Pを含有する。

30

【0013】

一実施形態において、NaG1uが欠乏した哺乳類細胞は、ヒト細胞である。別の実施形態において、NaG1uが欠乏したヒト細胞は、皮膚線維芽細胞、肝細胞、またはマクロファージである。一実施形態において、NaG1uが欠乏したヒト細胞は、神経細胞である。

40

【0014】

一実施形態において、rhNaG1uは、全身投与されるとき、NaG1u欠乏症を有する哺乳動物の脳に効果的に送達される。1つの特定の実施形態において、静脈内投与されるとき、rhNaG1uは、NaG1u欠乏症を有する哺乳動物の脳に効果的に送達される。一実施形態において、rhNaG1uは、髄腔内投与されるとき、NaG1u欠乏症を有する哺乳動物の脳に効果的に送達される。

【0015】

一実施形態において、M6Pを有するrhNaG1uは、NaG1u欠乏細胞によって

50

内部移行され、体内で正常なNaGlu活性の少なくとも100%を復元する。一実施形態において、M6Pを有するrhNaGluは、タンパク質1モル当たり少なくとも25モルのマンノースを含有する。

【0016】

一実施形態において、その混合物中のrhNaGluの少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%が、M6Pを含有する。別の実施形態において、その混合物中のrhNaGluの少なくとも20%が、少なくとも1つのM6Pを含有する。別の実施形態において、その混合物中のrhNaGluの少なくとも30%が、少なくとも1つのM6Pを含有する。別の実施形態において、その混合物中のrhNaGluの少なくとも40%が、少なくとも1つのM6Pを含有する。別の実施形態において、その混合物中のrhNaGluの少なくとも50%が、少なくとも1つのM6Pを含有する。別の実施形態において、その混合物中のrhNaGluの少なくとも60%が、少なくとも1つのM6Pを含有する。

【0017】

別の態様において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列24～743を含む組換えヒトN-アセチル-アルファ-D-グルコサミニダーゼ(rhNaGlu)の単離された混合物を含む、組成物を提供し、その混合物は、マンノース-6-リン酸塩(M6P)を含む1つ以上のグリカン構造を含有する十分な量のrhNaGluを含み、その結果、M6Pを含有するrhNaGluは、M6P受容体介在性エンドサイトーシスを介して、NaGlu欠乏症を有する哺乳類細胞中に内部移行され、内因性NaGluを発現する同じタイプの野生型細胞中で観察されるNaGlu活性の少なくとも50%を復元する。一実施形態において、rhNaGluは、N結合型グリコシル化されている。別の実施形態において、rhNaGluは、O結合型グリコシル化されている。

【0018】

一実施形態において、rhNaGluは、rhNaGlu1モル当たり少なくとも1モルのM6Pを含む。別の実施形態において、rhNaGluは、rhNaGlu1モル当たり約1、2、3、4、5、または6モルのM6Pを含む。別の実施形態において、rhNaGluは、rhNaGlu1モル当たり約3モルのM6Pを含む。別の実施形態において、rhNaGluは、rhNaGlu1モル当たり約4モルのM6Pを含む。

【0019】

一実施形態において、rhNaGluは、マンノースを含む。別の実施形態において、rhNaGluは、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を含む。別の実施形態において、rhNaGluは、ガラクトースを含む。別の実施形態において、rhNaGluは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を含む。別の実施形態において、rhNaGluは、フコースを含有しない。別の実施形態において、rhNaGluは、グルコースを含有しない。一実施形態において、rhNaGluは、正常なNaGlu酵素活性の少なくとも60、70、80、90、95、または100%を復元する。

【0020】

別の実施形態において、rhNaGluは、全身投与されるとき、NaGlu欠乏症を有する哺乳動物の脳に効果的に送達される。一実施形態において、rhNaGluは、静脈内投与されるとき、NaGlu欠乏症を有する哺乳動物の脳に効果的に送達される。別の実施形態において、rhNaGluは、髄腔内投与されるとき、NaGlu欠乏症を有する哺乳動物の脳に効果的に送達される。

【0021】

一実施形態において、NaGluが欠乏した哺乳類細胞は、ヒト細胞である。別の実施形態において、ヒト細胞は、皮膚線維芽細胞、肝細胞、またはマクロファージである。一実施形態において、NaGluが欠乏したヒト細胞は、神経細胞である。

【0022】

一実施形態において、rhNaGluは、第2の部分を含む融合タンパク質である。一実施形態において、第2の部分は、ポリペプチドである。別の実施形態において、ポリペ

10

20

30

40

50

プチドは、トランスフェリン受容体リガンド（TfRL）、インスリン様成長因子受容体（IGF2R）リガンド、低比重リポタンパク質（LDL）受容体リガンド、および酸性アミノ酸（AAA）残基からなる群から選択される。

【0023】

一実施形態において、rhNaG1uは、遺伝子導入鳥類から產生される。一実施形態において、遺伝子導入鳥類は、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、またはウズラである。一実施形態において、遺伝子導入鳥類は、ニワトリである。一実施形態において、rhNaG1uは、卵管細胞から產生される。

【0024】

別の態様において、本発明は、M6P受容体介在性エンドサイトーシスを介して、NaG1u欠乏症を有する哺乳類細胞中へのrhNaG1uの内部移行を可能にし、その結果、体内で内部移行されるときに、rhNaG1uが、内因性NaG1uを発現する同じタイプの野生型細胞中で観察されるNaG1u活性の少なくとも50%を復元する、十分な量のマンノース-6-リン酸塩（M6P）を有する1つ以上のグリカン構造を含む単離された組換えヒトN-アセチル-アルファ-D-グルコサミニダーゼ（rhNaG1u）を含む、組成物を提供する。

【0025】

一実施形態において、rhNaG1uタンパク質は、N結合型グリコシル化されている。別の実施形態において、rhNaG1uタンパク質は、O結合型グリコシル化されている。一実施形態において、rhNaG1uは、rhNaG1u 1モル当たり約2、3、4、5、または6モルのM6Pを含む。

【0026】

一実施形態において、rhNaG1uは、全身投与されるとき、NaG1u欠乏症を有する哺乳動物の脳に効果的に送達される。別の実施形態において、rhNaG1uは、静脈内投与されるとき、NaG1u欠乏症を有する哺乳動物の脳に効果的に送達される。別の実施形態において、rhNaG1uは、髄腔内投与されるとき、NaG1u欠乏症を有する哺乳動物の脳に効果的に送達される。

【0027】

別の態様において、本発明は、組換えヒトNaG1u（rhNaG1u）をコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターを含有する導入遺伝子を含む、遺伝子導入鳥類を提供し、その導入遺伝子は、遺伝子導入鳥類のゲノム中に含まれ、遺伝子導入鳥類の卵管細胞中で発現され、その結果、rhNaG1uが、遺伝子導入鳥類の卵管細胞中でグリコシル化され、遺伝子導入鳥類の卵管の内腔中に分泌され、卵の卵白中に沈着される。

【0028】

一実施形態において、rhNaG1uは、rhNaG1u 1モル当たり約2、3、4、または6モルのM6Pを含む。別の実施形態において、プロモーター構成要素は、卵管特異的プロモーターである。別の実施形態において、卵管特異的プロモーターは、卵白アルブミンプロモーターである。なおも別の実施形態において、遺伝子導入鳥類は、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、およびウズラからなる群から選択される。

【0029】

別の態様において、本発明は、本発明の遺伝子導入鳥類によって生み出される卵を提供する。

【0030】

なおも別の態様において、本発明は、次のことを含む、組換えヒトNaG1u（rhNaG1u）を產生する方法を提供する：a)配列番号1の24～743に記載されるrhNaG1uをコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター構成要素を有する導入遺伝子を含む、遺伝子導入鳥類を產生することであって、その導入遺伝子が、遺伝子導入鳥類のゲノム中に含有され、卵管細胞中で発現され、その結果、rhNaG1uが、遺伝子導入鳥類の卵管細胞中でグリコシル化され、卵管の内腔中に分泌され、遺伝子導入

10

20

30

40

50

鳥類によって産卵された卵の卵白中に沈着されること、および b) r h N a G 1 u を卵白から単離すること。

【 0 0 3 1 】

一実施形態において、プロモーター構成要素は、卵管特異的プロモーターである。別の実施形態において、卵管特異的プロモーターは、卵白アルブミンプロモーターである。一実施形態において、鳥類は、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、およびウズラからなる群から選択される。一実施形態において、鳥類は、ニワトリである。

【 0 0 3 2 】

別の態様において、本発明は、卵白アルブミンプロモーターに作動可能に連結されたヒト N a G 1 u をコードするヌクレオチド配列を含む、ベクターを提供する。別の態様において、本発明は、本発明のベクターを含む宿主細胞を提供する。別の態様において、本発明は、配列番号 4 の 5 2 3 2 ~ 1 0 2 4 8 の核酸配列を含む、単離された核酸を提供する。
10

【 0 0 3 3 】

一態様において、本発明は、本発明の組成物を、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて含む、薬学的製剤を提供する。

別の態様において、本発明は、静脈内投与されるとき、N a G 1 u 欠乏症を有する哺乳動物の血液脳関門を横断する組換えヒト N a G 1 u タンパク質を含む、組成物を提供する。

【 0 0 3 4 】

なおも別の態様において、本発明は、N a G 1 u 欠乏症を患う対象を治療する方法を提供し、本方法は、対象に、治療上有効量の本発明の組成物を投与することを含む。
20

【 0 0 3 5 】

なおも別の態様において、本発明は、組換えヒト N a G 1 u タンパク質を、N a G 1 u 欠乏症を患う対象の脳に送達する方法を提供し、本方法は、組換えヒト N a G 1 u タンパク質を対象に静脈内投与することを含む。

【 0 0 3 6 】

別の態様において、本発明は、組換えヒト N a G 1 u タンパク質を、治療上有効量で、循環から血液脳関門を渡って輸送する方法を提供し、本方法は、組換えヒト N a G 1 u タンパク質を、N a G 1 u 欠乏症を有する対象に静脈内投与することを含む。

【 0 0 3 7 】

一実施形態において、N a G 1 u 欠乏症は、サンフィリロ症候群 B である。別の実施形態において、対象は、ヒトである。
30

【 0 0 3 8 】

別の実施形態において、組換えヒト N a G 1 u タンパク質は、対象に、約 0 . 5 ~ 約 5 0 m g / k g 体重の投薬量で静脈内投与される。別の実施形態において、組換えヒト N a G 1 u タンパク質は、対象に、約 1 ~ 約 3 0 m g / k g 体重の投薬量で静脈内投与される。別の実施形態において、組換えヒト N a G 1 u タンパク質は、対象に、約 6 ~ 約 2 7 m g / k g 体重の投薬量で静脈内投与される。

【 0 0 3 9 】

なおも別の実施形態において、組換えヒト N a G 1 u タンパク質は、対象に髄腔内投与される。一実施形態において、組換えヒト N a G 1 u タンパク質は、少なくとも約 0 . 3 、 0 . 4 、 0 . 5 、 0 . 6 、 0 . 7 、 0 . 8 、または 0 . 9 m g / k g 体重の投薬量で髄腔内投与される。別の実施形態において、組換えヒト N a G 1 u タンパク質は、約 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、または 1 0 m g / k g 体重の投薬量で髄腔内投与される。別の実施形態において、組換えヒト N a G 1 u タンパク質は、約 1 0 ~ 約 3 0 m g / k g 体重の投薬量で髄腔内投与される。
40

【 0 0 4 0 】

別の実施形態において、治療上有効量は、対象の脳、腎臓、または肝臓内のヘパラン硫酸塩レベルを低減するのに有効な量である。別の実施形態において、治療上有効量は、対象の脳または肝臓内の N a G 1 u 活性を増加させるのに有効な量である。
50

【0041】

別の実施形態において、方法は、第2の治療剤を投与することを更に含む。一実施形態において、第2の治療剤は、免疫抑制剤である。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】ヒト組換えNaG1uのアミノ酸配列（アミノ酸残基1～23、シグナルペプチド）を図示する。

【図2】シグナルペプチドをコードする核酸配列を含む、ヒト組換えNaG1uの核酸配列（cDNA）を図示する。 10

【図3】1.1kb卵白アルブミンプロモーターの核酸配列を図示する。

【図4A】鳥類の遺伝子導入に使用されるpSIN-OV-1.1-I-rhNaG1uベクターの核酸配列を図示する。

【図4B】同上。

【図4C】同上。

【図4D】同上。

【図5】pSIN-OV-1.1-I-rhNaG1uベクターの略図。

【図6】遺伝子導入野鶏属の卵白から単離され、精製されたrhNaG1uのウエスタン分析を図示する。

【図7】遺伝子導入野鶏属の卵白に沈着したrhNaG1uの平均濃度を図示する。 20

【図8】HPAEC-PADを使用した、遺伝子導入野鶏属から產生されたrhNaG1uのオリゴ糖プロフィールを図示する。

【図9】ヒト皮膚線維芽細胞によるrhNaG1uの取り込み分析を図示する（MPS I I I B、NaG1u欠乏；正常、野生型ヒト皮膚線維芽細胞；1Uの酵素活性 = nmolのタンパク質 / 時間）。

【図10】M6P単糖の種々の濃度を使用した、rhNaG1u（野鶏属）の取り込み阻害分析を図示する（1Uの酵素活性 = 1 μmolのタンパク質 / 分）。

【図11】組換えヒトNaG1u融合構築物（AAA-NaG1u：完全長NaG1uのN末端に融合された酸性アミノ酸残基）を含有するpTT22ベクターの略図を図示する。 30

【図12】組換えヒトNaG1u融合構築物（NaG1u-TfRL：完全長NaG1uのC末端に融合されたトランスフェリン受容体リガンド）を含有するpTT22ベクターの略図を図示する。

【図13】野鶏属から產生されたrhNaG1uと比較した、HEK293から產生されたAAA-NaG1uの酵素活性を図示する。

【図14】HEK293から產生されたAAA-NaG1uと比較した、HEK293から產生されたNaG1u-TfRLの酵素活性を図示する。

【図15】経時的な（48時間）、マクロファージ細胞株（NR8383）中へのrhNaG1u（野鶏属）の取り込みレベルを図示する。細胞NaG1u活性を、タンパク質の単位 / mgで測定した。 40

【図16】ビヒクル（KO）、6.25mg/kgの投薬濃度での野鶏属rhNaG1u、または27mg/kgの投薬濃度での野鶏属rhNaG1uの静脈内投与後の、nag1u（-/-）マウスの腎臓内のヘパラン硫酸塩基質レベル（μg / mg組織）を図示する。野生型（WT）マウスは、無処置であった。

【図17】ビヒクル（KO）、6.25mg/kgの投薬濃度での野鶏属rhNaG1u、または27mg/kgの投薬濃度での野鶏属rhNaG1uの静脈内投与後の、nag1u（-/-）マウスの脳内のヘパラン硫酸塩基質レベル（μg / mg組織）を図示する。野生型（WT）マウスは、無処置であった。

【図18】ビヒクル（KO）、6.25mg/kgの投薬濃度での野鶏属rhNaG1u、または27mg/kgの投薬濃度での野鶏属rhNaG1uの静脈内投与後の、nag 50

l u (- / -) マウスの肝臓内のヘパラン硫酸塩基質レベル (μ g / mg 細胞) を図示する。野生型 (W T) マウスは、無処置であった。

【図 19】ビヒクル (K O) または 0 . 3 1 m g / k g の投薬濃度での野鶏属 *r h N a G l u* の髄腔内投与後の、 *n a g l u* (- / -) マウスの脳内のヘパラン硫酸塩基質レベル (μ g / mg 細胞) を図示する。野生型 (W T) マウスは、無処置であった。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 3 】

本発明は、 *N a G l u* 関連疾患、例えば、サンフィリポ症候群 B の治療における、治療法に有用な組換えヒト *N a G l u* タンパク質 (*r h N a G l u*) を含む、組成物を提供する。本発明は、本明細書に記載される *r h N a G l u* タンパク質が、マンノースおよび / 10 または *M 6 P* 受容体介在性エンドサイトーシスを介した効率的な細胞取り込みを可能にし、ヒト細胞へと正しく標的を定められるのに十分な量のオリゴ糖 (例えば、マンノースおよびリン酸化マンノース (すなわち、 *M 6 P*)) を含有するという発見に基づく。本発明の *r h N a G l u* は、ヒト細胞中により効率的に取り込まれるので、本発明の *r h N a G l u* は、特定のグリコシリ化をもたらすように設計されていない無修飾の哺乳類細胞から産生および分泌される *N a G l u* タンパク質と比較して、増加した酵素活性を示す。更に、本明細書に記載される *r h N a G l u* は、 *r h N a G l u* が、静脈内投与されるとき、血液脳関門 (BBB) を効率的に横断することを可能にする、 1 つ以上のグリコシリ化パターンを有する。本発明の *r h N a G l u* タンパク質の増加した細胞取り込みは、大量かつ頻繁な投薬に対する必要性を最小化し、それによって免疫原性の潜在的な危険性を大幅に低減する。 20

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される定義および略号のうちの幾つかには、次のものが含まれる : a a 、アミノ酸 (複数可) ; b p 、塩基対 (複数可) ; C D S 、コード配列 c D N A 、 R N A に相補的な D N A ; G a l N a c 、 N - アセチルガラクトサミン ; G a l 、ガラクトース ; G l c N a c 、 N - アセチルグルコサミン ; n t 、ヌクレオチド (複数可) ; k b 、 1 , 0 0 0 塩基対 ; μ g 、マイクログラム ; m L 、ミリリットル ; n g 、ナノグラム ; および n t 、ヌクレオチド。

【 0 0 4 5 】

ある特定の定義は、本明細書で本発明を説明するために使用される種々の用語の意味および範囲を例示し、定義するために、本明細書に記載される。 30

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される「鳥類」という用語は、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、キジ、オウム、フィンチ、タカ、カラス、ならびにダチョウ、エミュー、およびヒクイドリを含む走鳥類等であるが、これらに限定されない、分類学上のクラス a v a の生物の任意の種、亜種、または系統を指す。その用語には、セキショクヤケイ (*G a l l u s g a l l u s*) またはニワトリの種々の既知の系統 (例えば、白色レグホン、褐色レグホン、バードロック (Barred - Rock) 、サセックス (S u s s e x) 、ニューハンプシャー (New Hampshire) 、ロードアイランド (R h o d e I s l a n d) 、オーストラローブ (A u s s t r a l o r p) 、ミノルカ (M i n o r c a) 、アムロックス (A m r o x) 、カリフォルニアグレイ (C a l i f o r n i a G r a y) 、イタリアンパートリッジカラード (I t a l i a n P a r t r i d g e - c o l o r e d)) 、ならびにシチメンチョウ、キジ、ウズラ、アヒル、ダチョウ、および一般に商業的な量で飼育される他の家禽の系統が含まれる。 40

【 0 0 4 7 】

「に基づく」および「に由来する」という語句は典型的に、全体的にまたは部分的に、そこから得られることを意味する。例えば、レトロウイルスベクターが、特定のレトロウイルスに基づくもしくはそれに由来する、または特定のレトロウイルスのヌクレオチド配列に基づくとは、レトロウイルスベクターのゲノムが、特定のレトロウイルスのゲノムのヌクレオチド配列の実質的な部分を含有することを意味する。当業者の知識として本明細 50

書の文脈から明らかであるように、実質的な部分は、g a g、p o l、および／もしくはe n vタンパク質をコードするヌクレオチド配列等の特定の遺伝子もしくはヌクレオチド配列、または長い末端反復（L T R）をコードする配列等のウイルスゲノムの他の構造的もしくは機能的ヌクレオチド配列であり得るか、あるいは実質的に完全なレトロウイルスゲノム、例えば、レトロウイルスゲノムのほとんど（例えば、60%超、70%超、80%超、90%超）または全てであり得る。レトロウイルスに基づくもしくはそれに由来するレトロウイルスベクターの例は、Cosset et al., Journal of Virology (1991) vol. 65, p 3388-3394に開示される、トリ白血病レトロウイルス（「ALV」）に由来するNLレトロウイルスベクター（例えば、NL B）である。

10

【0048】

本明細書で使用される「コード配列」および「コード領域」という用語は、RNA、タンパク質、またはRNAもしくはタンパク質の任意の部分の合成のための遺伝子情報をコードする、RNAおよびDNAの両方を含む、ヌクレオチド配列および核酸配列を指す。

【0049】

天然には特定の生物のゲノムの一部でない、または生物のゲノムにおける非天然部位に導入されるヌクレオチド配列は、「外来性」ヌクレオチド配列、「異種性」ヌクレオチド配列、「組換え」ヌクレオチド配列、または「外因性」ヌクレオチド配列と称される。加えて、単離され、次いで同じタイプ（例えば、同じ種）の生物中に再導入されたヌクレオチド配列は、特定の生物のゲノムの自然に生じる部分であるとはみなされず、したがって外因性または異種性であるとみなされる。

20

「異種性タンパク質」または「外因性タンパク質」は、外来性、異種性、または外因性ヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質であり得、したがってしばしば、宿主生物の細胞中で天然に発現されない。

【0050】

本明細書で使用されるとき、DNAおよびRNA等の核酸を参照する「外因性」、「異種性」、および「外来性」という用語は、交換可能に使用され、核酸が天然に生じる場所（複数可）および／または量とは異なる場所（複数可）においておよび／または量で、それが存在するか、または見出される、染色体、ゲノム、または細胞の一部として天然に生じない核酸を指す。それは、ゲノム、染色体、または細胞に内因性でなく、かつ外因性でゲノム、染色体、または細胞中に導入されている、核酸であり得る。異種性DNAの例としては、例えば、コードされたタンパク質の産生のために、目的の遺伝子産物（単数または複数）をコードするDNAが挙げられるが、これらに限定されない。異種性DNAの例としては、追跡可能なマーカータンパク質をコードするDNA、治療用タンパク質をコードするDNAが挙げられるが、これらに限定されない。「異種性」および「外因性」という用語は、生物によって産生されるある特定の細胞、組織、または材料において通常は見いだされない、あるいは生物によって産生されるある特定の細胞、組織、または材料において、天然に生じることが見出される量もしくは場所と同じ量もしくは場所で通常は見いだされない、核酸またはタンパク質等の生体分子を指すことができる。例えば、卵に異種性または外因性であるタンパク質は、卵において通常は見いだされないタンパク質である。

30

【0051】

本明細書で使用される「構築物」という用語は、天然源から単離されているか、もしくは化学合成されているか、またはそれらの組み合わせであるヌクレオチド配列の1つを超えるセグメントから組み立てられたDNA等の、線形または環状ヌクレオチド配列を指す。

【0052】

本明細書で使用される「相補的な」という用語は、互いに特異的な相互作用を形成できる2つの核酸分子を指す。その特異的な相互作用において、2つの核酸鎖が反対方向を向いているとき、核酸の1つの鎖内のアデニン塩基は、第2の核酸鎖内のチミンと2つの水

40

50

素結合を形成することができる。特異的な相互作用においてはまた、2つの核酸鎖が反対方向を向いているとき、核酸の1つの鎖内のグアニン塩基は、第2の核酸鎖内のシトシンと3つの水素結合を形成することができる。

本明細書で言及されるとき、相補的な核酸は、修飾された塩基を更に含むことができ、ここで、修飾されたアデニンは、チミンまたは修飾されたチミンと水素結合を形成し得、修飾されたシトシンは、グアニンまたは修飾されたグアニンと水素結合を形成し得る。

【0053】

本明細書で使用される「発現される」または「発現」という用語は、コード配列の2つの核酸鎖のうちの一方の領域に対して少なくとも部分的に相補的なRNA分子をもたらすための、コード配列の転写を指す。本明細書で使用される「発現される」または「発現」という用語はまた、タンパク質またはペプチドを産生するためのmRNAの翻訳を指すこともできる。

10

【0054】

本明細書で使用される「発現ベクター」という用語は、少なくとも1つのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された、プロモーターまたはプロモーター構成要素等の遺伝子発現制御領域を含む核酸ベクターを指す。

【0055】

本明細書で使用される「断片」という用語は、人工的に（例えば、化学合成によって）、または制限エンドヌクレアーゼもしくは機械的せん断を用いて天然の産物を複数の片へと切断することによって、または酵素的に、例えば、PCRもしくは当該技術分野で既知の任意の他の重合技法によって構築された、あるいは当業者に既知の組換え核酸技術によって宿主細胞内で発現された、例えば、少なくとも約10、20、50、75、100、150、200、250、300、500、1000、2000、5000、6,000、8,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、または60,000ヌクレオチド長の核酸の部分を指すことができる。本明細書で使用される「断片」という用語はまた、Nagluに対する完全長未満のアミノ酸配列（すなわち、配列番号1のアミノ酸配列24～743）の、例えば、少なくとも約5、10、15、20、25、30、40、または50アミノ酸残基を指すこともでき、その部分は、少なくとも1つのプロテアーゼによるタンパク質切断によって天然に生じるアミノ酸配列から切断されるか、または当業者に既知の化学的方法によってもしくは組換えDNA技術を使用して合成される（例えば、天然に生じるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の一部分から発現される）、天然に生じるアミノ酸配列の部分である。「断片」はまた、特定のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の、例えば、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、または約99%の部分を指してもよい。

20

【0056】

「機能性部分」および「機能性断片」は、交換可能に使用され得、本明細書で使用されるとき、全体の機能を全体的にまたは部分的に行うことが可能な、全体の一部分または断片を意味する。例えば、分子の生物学的機能性部分は、全分子または無傷の分子の生物学的機能を行う分子の一部分を意味する。機能性部分は、任意の有用なサイズのものであってもよい。例えば、機能性断片は、約20塩基の長さから、指定される配列の全長より1ヌクレオチドを引いたものに等しい長さまでの範囲のサイズであってもよい。別の例において、機能性断片は、約50塩基の長さから、指定される配列の全長より1ヌクレオチドを引いたものに等しい長さまでの範囲のサイズであってもよい。別の例において、機能性断片は、約50塩基の長さから約20kbの長さまでの範囲のサイズであってもよい。別の例において、機能性断片は、約500塩基の長さから約20kbの長さまでの範囲のサイズであってもよい。別の例において、機能性断片は、約1kbの長さから約20kbの長さまでの範囲のサイズであってもよい。別の例において、機能性断片は、約0.1kbの長さから約10kbの長さまでの範囲のサイズであってもよい。別の例において、機能性断片は、約20塩基kbの長さから約10kbの長さまでの範囲のサイズであってもよい。

30

40

50

【0057】

「完全遺伝子導入」または「生殖系列遺伝子導入」という用語は、その細胞の本質的に全てにおいて導入遺伝子の少なくとも1つのコピーを含有する、鳥類等の動物を指す。

【0058】

本明細書で使用される「遺伝子発現制御領域」という用語は、コード配列に関連し、全体的にまたは部分的に、コード配列の発現を調節する、例えば、全体的にまたは部分的に、コード配列の転写を調節する、ヌクレオチド配列を指す。遺伝子発現制御領域は、天然に生じる源から単離されてもよく、または化学的に合成されてもよく、また核酸ベクター中に組み込まれて、適切な細胞中で調節された転写を可能にすることができる。「遺伝子発現制御領域」は、mRNAへと転写され得るコード配列の末端の領域5'にある核酸配列の領域に先行してもよいが、その先行に限定されない。

10

【0059】

本明細書で使用されるとき、「宿主細胞」は、組換えDNA技法を使用して構築され、少なくとも1つの異種性遺伝子をコードするベクターを包含する、細胞を指す。

【0060】

本明細書で使用される「単離された核酸」という用語は、例えば、(a)天然に生じるゲノム分子の部分の配列を有するが、それが天然に生じる種のゲノムにおける分子のその部分に隣接する配列の少なくとも1つが隣接していない、DNA、(b)結果として生じるベクターまたはゲノムDNAが、その核酸が得られた天然に生じるDNAと同一でないような様態で、ベクター中または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA中に組み込まれた、核酸、(c)cDNA、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、もしくは化学合成によって產生される断片、または制限断片等の、別個の分子、(d)ハイブリッド遺伝子、すなわち、融合タンパク質をコードする遺伝子の部分である、組換えヌクレオチド配列、および(e)天然には生じないハイブリッド配列の部分である、組換えヌクレオチド配列を包含する。本発明の単離された核酸分子は、例えば、天然対立遺伝子変異体、ならびにヌクレオチド欠失、挿入、逆位(inversions)、または置換によって修飾された核酸分子を含むことができる。

20

【0061】

本明細書で使用される「核酸」という用語は、任意の線形もしくは連続的な一連のヌクレオチドおよびヌクレオシド、例えば、cDNA、ゲノムDNA、mRNA、tRNA、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、およびそれらの誘導体を指す。議論を簡単にするために、非天然の核酸は、本明細書で構築物と称され得る。核酸は、改变アデノウイルス、インフルエンザウイルス、ポリオウイルス、ポックスウイルス、トリ白血症ウイルス(ALV)レトロウイルスベクター、マウス白血病ウイルス(MLV)レトロウイルスベクター、およびレンチウイルスベクター等のレトロウイルス等であるが、これらに限定されない、動物ウイルスベクター等の、発現、クローニング、コスミド、および形質転換ベクターを含む細菌のプラスミドベクター、ならびにそれらの断片を含むことができる。加えて、核酸は、トリ白血症ウイルス(ALV)レトロウイルスベクター、マウス白血病ウイルス(MLV)レトロウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターのLTRおよびそれらの断片であり得る。核酸はまた、NLB、NLD およびNLA等のNLベクター、ならびにそれらの断片、ならびに化学的に合成されたDNAまたはRNA等の合成オリゴヌクレオチドを含むこともできる。核酸は、5'-ブロモウラシル等であるが、これだけではないハロゲン化されたヌクレオチド、ならびにビオチン標識されたヌクレオチド等の誘導体化されたヌクレオチド等であるが、これらに限定されない、修飾または誘導体化されたヌクレオチドおよびヌクレオシドを含むことができる。

30

【0062】

本明細書で使用されるとき、「グリカン」、「グリカン構造」、「グリカン部分」、「オリゴ糖」、「オリゴ糖構造」、「グリコシル化パターン」、「グリコシル化プロフィール」、および「グリコシル化構造」という用語は、本質的に同じ意味を有し、各々は、糖残基から形成され、ヒトNag1u等のグリコシル化タンパク質に結合する、1つ以上の

40

50

構造を指す。例えば、「Nグリカン」または「N結合型グリカン」は、グリコシル化タンパク質のアスパラギンまたはアルギニン側鎖の窒素に結合する、グリカン構造を指す。「Oグリカン」または「O結合型グリカン」は、グリコシル化タンパク質のセリン、スレオニン、チロシン、ヒドロキシリジン、またはヒドロキシプロリン側鎖のヒドロキシル酸素(hydroxyl oxygen)に結合する、グリカン構造を指す。

【0063】

本明細書で使用される「ベクター」および「核酸ベクター」という用語は、細胞に形質移入または形質転換され得、宿主細胞ゲノムから独立して、または宿主細胞ゲノム内で複製する、天然または合成の1本鎖または2本鎖プラスミドまたはウイルス核酸分子を指す。環状2本鎖ベクターは、ベクターのヌクレオチド配列に基づく適切な制限酵素での処理によって線形化することができる。核酸は、当該技術分野で理解されるように、ベクターを制限酵素で切断し、所望の片と一緒にライゲートすることによってベクターに挿入することができる。典型的なベクターは、機能性遺伝子発現を可能にするのに適切な距離で作動可能に連結された、次の要素から構成され得る：複製起源、プロモーター、エンハンサー、5' mRNAリーダー配列、リボソーム結合部位、核酸カセット、終結およびポリアデニル化部位、ならびに選択可能なマーカー配列。これらの要素のうちの1つ以上は、特定の適用において省略することができる。核酸カセットは、発現対象の核酸配列の挿入のための制限部位を含むことができる。機能性ベクターにおいて、核酸カセットは、翻訳開始および終結部位を含む発現対象の核酸配列を含有する。イントロンを任意に、構築物に、例えば、コード配列に対して5'に含むことができる。ベクターは、特定のコード配列が適切な調節配列と共にベクター内に位置するように構築され、制御配列に対するコード配列の位置付けおよび向きは、コード配列が制御配列または調節配列の「制御」下で転写されるようなものである。この目的を達成するために、目的の特定のタンパク質をコードする配列の修飾が望ましい場合がある。例えば、幾つかの事例において、配列が適切な向きで制御配列に結合し得るように、またはリーディングフレームを維持するように、配列を修飾が必要であり得る。制御配列および他の調節配列は、ベクターへの挿入前に、コード配列にライゲートすることができる。代替的に、コード配列は、制御配列、および制御配列の調節制御と共にかつその下でリーディングフレーム内にある適切な制限部位をすでに含有する、発現ベクター中に直接クローニングすることができる。

【0064】

「作動可能に連結された」という用語は、そのように記載される構成要素がそれらの通常の機能を行うように構成される、要素の配列を指す。コード配列に作動可能に連結された遺伝子発現制御領域またはプロモーター(複数可)(例えば、プロモーター構成要素)は、コード配列の発現を達成することが可能である。制御配列(複数可)またはプロモーターは、それらがコード配列の発現を導くように機能する限り、コード配列に隣接している必要はない。故に、例えば、介在する翻訳されていないがなおかつ転写された配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そのプロモーター配列は、依然としてコード配列に「作動可能に連結された」と見なされ得る。

【0065】

本明細書で使用される「過剰発現」は、正常な生物または非形質転換生物における産生のレベルを超える、遺伝子導入された生物における遺伝子産物の産生を指す。

【0066】

「卵管」または「卵管組織」という用語は、肝臓または腎臓組織等の鳥類の他の組織において産生されるタンパク質の量に対して、増加した量のマンノースならびにマンノース(mammose)-6-リン酸塩(M6P)および実質的に低減された量のガラクトースおよび/またはシアル酸を含有する、N結合型オリゴ糖によりタンパク質が産生される、筒部等の鳥類卵管の組織、例えば、管状腺細胞を指す。

【0067】

本明細書で使用される「卵管特異的プロモーター」という用語は、機能的である、すなわち、かなりの程度まで、例えば、トリの卵管細胞中で主に(すなわち、転写産物の50

10

20

30

40

50

%超が、動物において、卵管細胞中で產生されている特定のプロモーター タイプによって產生される）、または排他的に、コード配列の転写を提供する、プロモーターおよびプロモーター構成要素を指す。卵管特異的プロモーターの例としては、卵白アルブミンプロモーター、オボムコイドプロモーター、オボインヒビタープロモーター、リゾチームプロモーター、およびオボトランスフェリンプロモーター、ならびにこれらのプロモーターの機能性部分、例えば、プロモーター構成要素が挙げられるが、これらに限定されない。卵管特異的プロモーターを使用して、NaGluタンパク質の発現を筒部に限定することによって、トリの他の組織内のこれらの酵素の発現の結果としてのトリへの有害な生理作用を最小化することができる。

【0068】

10

「配列同一性パーセント」、「同一性パーセント」、「同一性%」、「配列相同性パーセント」、「相同性パーセント」、「相同性%」、および「配列類似性パーセント」という用語は各々、2つの核酸配列または2つのアミノ酸配列間で一致する配列の程度を指すことができる。かかる配列一致は、Karlin & Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 2264-2268のアルゴリズムを使用して、Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 5873-5877にあるように修正して、決定することができる。かかるアルゴリズムは、Altschul et al. (1990) T. Mol. Biol. Q15: 403-410のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれる。本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12により行なう。参照アミノ酸配列に相同なアミノ酸配列を得るために、BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3により行なう。比較目的のためのギャップアライメントを得るために、Gapped BLASTを、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載されるように利用する。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用するときには、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータ（例えば、XBLASTおよびNBLAST）が使用される。他のアルゴリズム、プログラム、およびデフォルト設定もまた、好適であり得、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列比較のためのプログラムを含む、U.K. Human Genome Mapping Project Resource CentreのGCG-Sequence Analysis Package等があるが、これだけではない。配列は、別の配列、例えば、本明細書に特定されるNaGluタンパク質配列と少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを超えて同一であってもよい。

20

【0069】

30

「鳥類由来」という用語は、トリ、家禽、もしくは鳥類によって產生される、またはそれから得られる組成物または材料を指す。「鳥類」は、ニワトリ、アヒル、シチメンチョウ、ウズラ、および走鳥類を含むが、これらに限定されない、家畜として飼育され得るトリを指す。例えば、「鳥類由来」とは、ニワトリ由来、シチメンチョウ由来、および/またはウズラ由来を指すことができる。

40

【0070】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、および「核酸配列」という用語は、本明細書で交換可能に使用され得、コード配列、すなわち、適切な調節配列または制御配列、すなわち、例えば、翻訳開始および停止コドン、プロモーター配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル、転写因子結合部位、転写終結配列、上流および下流調節ドメイン、エンハンサー、サイレンサー、転写因子（複数可）が結合して、正に（誘導）または負に（抑制）のいずれかで遺伝子のプロモーターの活性を変化させるDNA配列等の制御配列の、制御下に置かれたときに体外または体内でポリペプチドに転写および翻訳される、ポリヌクレオチド（複数可）または核酸配列（複数可）

50

を含むが、これらに限定されない。長さまたは合成起源に関する限定は、本明細書に記載される用語によって何ら示唆されない。

【0071】

本明細書で使用されるとき、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸の重合体、例えば、連続した配列で、ペプチド結合を通じて連結された、3つ以上のアミノ酸を指す。「ポリペプチド」という用語は、タンパク質、タンパク質断片、タンパク質類似体、オリゴペプチド等を含む。「ポリペプチド」という用語は、組換え技術を通じて産生される（例えば、遺伝子導入トリから単離される）か、または合成される核酸によってコードされる、上に定義されるポリペプチドを含む。「ポリペプチド」という用語は、標識リガンドに共有または非共有結合された、化学修飾されたアミノ酸（単数または複数）を含む、上に定義されるポリペプチドを更に企図する。

10

【0072】

本明細書で使用される「プロモーター」という用語は、鳥類細胞中のRNAポリメラーゼによって転写を開始するのに有用なDNA配列を指す。「プロモーター構成要素」は、それ自体によってまたは他のDNA配列と組み合わせて、転写を達成または促進することができるDNA配列である。プロモーター構成要素は、プロモーターの機能性断片であり得る。

【0073】

「組換え核酸」および「組換えDNA」という用語は、真核細胞または原核細胞中で天然に見出されない、少なくとも2つの核酸配列の組み合わせを指す。核酸配列には、核酸ベクター、遺伝子発現調節要素、複製起源、発現されるときに抗生物質に対する耐性を付与する好適な遺伝子配列、タンパク質コード配列等が含まれ得るが、これらに限定されない。「組換えポリペプチド」という用語は、その場所、純度、または構造のいずれかにおいて天然に生じるポリペプチドとは明確に異なるように、組換えDNA技法によって産生される、ポリペプチドを含むように意図される。一般に、かかる組換えポリペプチドは、細胞中に、自然界で通常観察される量とは異なる量で存在するであろう。

20

【0074】

本明細書で使用されるとき、「調節」配列または要素という用語は、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、停止コドン、および遺伝子発現を制御することができる他の要素を含む。

30

【0075】

「レトロウイルス」、「レトロウイルス粒子」、「形質導入粒子」、または「形質導入粒子」は、非ウイルスDNAまたはRNAを細胞中に形質導入することができる、複製欠損または複製可能ウイルスを指す。

【0076】

「SINベクター」は、自己不活性化ベクターを指す。詳細には、SINベクターは、標的細胞（例えば、鳥類胚細胞）のゲノムDNA中に組み込まれると、組み込まれたレトロウイルスベクターの5'LTRがプロモーターとして機能しなくなるように、変化したゲノムを有するレトロウイルスベクターである。例えば、一旦、組み込まれると、レトロウイルスベクターの5'LTRのU3領域をもたらす、レトロウイルスベクターのヌクレオチド配列の一部分または全ては、5'LTRのプロモーター活性を低減または排除するために欠失または変化させることができる。ある特定の例において、当該技術分野で理解されるように、5'LTRのU3からのCAATボックスおよび/またはTAAATAボックスの欠失は、SINベクターをもたらし得る。

40

【0077】

本明細書で使用される「センス鎖」という用語は、RNAへと転写され、その遺伝子の天然ポリペプチド産物へと翻訳され得る、ゲノムDNAからの1本鎖DNA分子を指す。本明細書で使用される「アンチセンス鎖」という用語は、その遺伝子のセンス鎖と相補的な、ゲノムDNAの1本鎖DNA分子を指す。

【0078】

50

「治療用タンパク質」または「薬学的タンパク質」は、薬物を全体的にまたは部分的に構成する材料である。詳細には、「治療用タンパク質」および「薬学的タンパク質」は、薬物を全体的にまたは部分的に構成するアミノ酸配列を含む。

【0079】

本明細書で使用される「プロモーター」、「転写調節配列」、および「プロモーター構成要素」という用語は、コード配列の転写発現を調節するヌクレオチドを指す。例となる転写調節配列には、エンハンサー要素、ホルモン応答要素、ステロイド応答要素、負の調節要素等が含まれる。「転写調節配列」は、単離され、ベクター中に組み込まれて、ベクターDNAの部分の適切な細胞中において転写を調節することができる。「転写調節配列」は、限定されないが、mRNAへと転写される、タンパク質コード配列の末端の領域5'にある核酸配列の領域に先行することができる。転写調節配列はまた、タンパク質コード領域内、例えば、「イントロン」領域として特定される遺伝子の領域内に位置することができる。

【0080】

本明細書で使用される「形質転換」および「形質移入」という用語は、核酸を宿主中に挿入するプロセスを指す。核酸の原核または真核生物中の形質転換または形質移入を促進するための多くの技法が、当業者に周知である。これらの方は、細胞をある特定の濃度の塩、例えば、限定されないが、カルシウム塩またはマグネシウム塩で処理するか、あるいは細胞を電場、界面活性剤、またはリボソーム物質に曝露して、宿主細胞が核酸分子を取り込み可能になるようにすること等の様々な技法を伴う。

【0081】

本明細書で使用されるとき、「遺伝子導入動物」は、ニワトリを含む鳥類種等の、任意の非ヒト動物であり、その動物の細胞のうちの1つ以上は、本明細書に開示されるものを含む、当該技術分野で既知の遺伝子導入技法によって等、人間の介入を用いて導入された異種性核酸を含有する（例えば、2007年10月18日に公開された米国特許公開第2007/0243165号を参照されたく、その開示は参考によりその全体が本明細書に組み込まれる）。核酸は、マイクロインジェクションによってまたは組換えウイルスでの感染によって等の意図的な遺伝子操作を用いる、細胞（例えば、卵または胚細胞）中への導入によって、動物に直接または間接的に導入される。遺伝子操作という用語は、伝統的な交雑、または体外受精を含まないが、むしろそれは、組換えDNA分子の導入に向けられる。この分子は、染色体内に組み込むことができるか、またはそれは、染色体外で複製するDNAであってもよい。典型的な遺伝子導入動物において、導入遺伝子は、細胞に、標的タンパク質またはポリペプチドの組換え型を発現させることができる。「キメラ動物」または「モザイク動物」という用語は、本明細書で、動物の幾つかの細胞であるが全てではない細胞中において、導入遺伝子が見出される、または組換えヌクレオチド配列が発現される、動物を指すように使用される。生殖系列キメラ動物は、その生殖細胞中に導入遺伝子を含有し、遺伝子導入動物の子孫を生じさせることができ、その子孫のほとんどまたは全ての細胞が、導入遺伝子を含有するであろう。

【0082】

本明細書で使用されるとき、「導入遺伝子」という用語は、それが導入される動物または細胞に対して部分的にまたは全体的に異種性、すなわち、外来性であるか、あるいはそれが導入される遺伝子導入動物または細胞の内因性遺伝子に対して部分的にまたは全体的に相同であるが、それが挿入される生物のゲノムを変化させる（例えば、それが天然の遺伝子とは異なる場所に挿入されるか、またはその挿入がノックアウトをもたらす）ような方式で、動物または細胞ゲノム中に挿入されるように設計されるか、またはそれに挿入される、核酸配列（例えば、ヒトNagluタンパク質をコードする）を意味する。

【0083】

本明細書で使用されるとき、「酵素補充療法（ERT）」という用語は、欠損している酵素を対象に投与することによって、対象における酵素欠乏症を直すための治療的戦略を指す。リソソーム酵素補充療法が有効であるためには、治療的酵素は、蓄積欠陥が現れて

10

20

30

40

50

いる組織内の適切な細胞中のリソソームに送達されなければならない。一実施形態において、酵素は、対象に、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、または実質内投与されてもよい。一実施形態において、酵素は、血液脳関門（B B B）を横断可能である。機構によって限定されることを意図するものでないが、血液が患者の組織を灌流するとき、酵素が細胞によって取り込まれ、リソソームに輸送され、そこで酵素が、酵素欠乏症に起因してリソソーム内に蓄積した物質を排除するように作用すると考えられる。

【0084】

I. N a G 1 u の組成物

本発明は、例えば、サンフィリポ症候群B（ムコ多糖症（M P S）I I I B）の治療における、治療法に特に有用な、増加した細胞取り込みおよび増加した細胞下の活性を付与するグリコシリ化のパターンを有する、組換えヒトN a G 1 u（r h N a G 1 uまたはN a G 1 u）（配列番号1に記載されるアミノ酸配列24～743）の新規組成物を提供する。

10

【0085】

幾つかの態様において、組成物は、配列番号1のアミノ酸配列24～743を含むr h N a G 1 uの単離された混合物であり得る。一実施形態において、混合物は、リン酸化マンノース（例えば、M 6 P）またはマンノースを含有する少なくとも1つのグリカン構造を有する十分な量のr h N a G 1 uを含有し、その結果、M 6 Pまたはマンノースを含有するr h N a G 1 uは、N a G 1 uが欠乏したヒト細胞中に内部移行され、内因性N a G 1 uを活発に発現する同じタイプの野生型ヒト細胞中で観察されるN a G 1 u活性の少なくとも50%を復元する。一態様において、混合物中のr h N a G 1 uの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%が、リン酸化マンノースおよび/またはマンノースを有する少なくとも1つのグリカン構造を含有する。一実施形態において、混合物中のr h N a G 1 uの少なくとも10%が、リン酸化マンノースおよび/またはマンノースを有する少なくとも1つのグリカン構造を含有する。一実施形態において、混合物中のr h N a G 1 uの少なくとも20%が、リン酸化マンノースおよび/またはマンノースを有する少なくとも1つのグリカン構造を含有する。一実施形態において、混合物中のr h N a G 1 uの少なくとも30%が、リン酸化マンノースおよび/またはマンノースを有する少なくとも1つのグリカン構造を含有する。一実施形態において、混合物中のr h N a G 1 uの少なくとも30%が、リン酸化マンノースおよび/またはマンノースを有する少なくとも1つのグリカン構造を含有する。一実施形態において、混合物中のr h N a G 1 uの少なくとも40%が、リン酸化マンノースおよび/またはマンノースを有する少なくとも1つのグリカン構造を含有する。一実施形態において、混合物中のr h N a G 1 uの少なくとも50%が、リン酸化マンノースおよび/またはマンノースを有する少なくとも1つのグリカン構造を含有する。一実施形態において、混合物中のr h N a G 1 uの少なくとも60%が、リン酸化マンノースおよび/またはマンノースを有する少なくとも1つのグリカン構造を含有する。

20

【0086】

30

幾つかの態様において、N a G 1 uは、1つ以上のN結合型グリカン構造を含有する。N a G 1 uは、タンパク質がマンノース6-リン酸受容体（M 6 P受容体）によって認識され、その後、M 6 P受容体介在性エンドサイトーシスを介して、皮膚線維芽細胞、内皮、神経細胞、肝細胞、マクロファージ、または細胞表面上でM 6 P受容体を発現する任意の細胞を含むが、これらに限定されない、ヒト細胞中に取り込まれルことを可能にする、少なくとも1つのリン酸化マンノース（例えば、M 6 Pまたはビス-M 6 P）を含有する。一実施形態において、N a G 1 uは、少なくとも1つのマンノース（M a n）を含有する。別の実施形態において、N a G 1 uは、少なくとも1つのN-アセチルグルコサミン（G l c N A c）を含有する。

40

【0087】

50

幾つかの態様において、NaG1uは、リン酸化マンノース(M6P)を含むグリカン構造を含有する。本明細書で使用されるとき、M6Pは、任意のリン酸化マンノース残基を包含することができ、モノ-およびビス-リン酸化マンノースを含む。一実施形態において、M6Pは、タンパク質1モル当たり約1、約2、約3、約4、約5、または約6モル(複数可)である濃度で存在する。一実施形態において、NaG1uは、タンパク質1モル当たり約2、約3、約4、または約5モルである濃度でM6Pを含有する。一実施形態において、NaG1uは、タンパク質1モル当たり約2モルである濃度でM6Pを含有する。一実施形態において、NaG1uは、タンパク質1モル当たり約3モルである濃度でM6Pを含有する。一実施形態において、NaG1uは、タンパク質1モル当たり約4モルである濃度でM6Pを含有する。一実施形態において、NaG1uは、タンパク質1モル当たり約5モルである濃度でM6Pを含有する。一実施形態において、NaG1uは、タンパク質1モル当たり約6モルである濃度でM6Pを含有する。

【0088】

幾つかの態様において、rhNaG1uは、M6P受容体介在性エンドサイトシスを介した、細胞表面上にM6P受容体を有するヒト細胞中への細胞取り込みのために十分な量のM6Pを含有する。一実施形態において、ヒト細胞中への取り込みのために十分な量のM6Pは、タンパク質1モル当たり約1、2、3、4、5、または6モルである。rhNaG1uは、NaG1uが欠乏したヒト細胞中に内部移行され得、その結果、内部移行されたタンパク質は、NaG1uが欠乏したヒト細胞中においてNaG1u活性の正常なレベルを完全に(100%以上)復元する。一実施形態において、内部移行されたrhNaG1uタンパク質は、少なくとも0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、または1.0μg/mLである濃度で、ヒト細胞中においてNaG1u活性の正常なレベルを完全に復元する。一実施形態において、内部移行されたタンパク質は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10μg/mLである濃度で、NaG1uが欠乏したヒト細胞中においてNaG1u活性の正常なレベルを完全に復元する。一実施形態において、内部移行されたタンパク質は、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、または100μg/mLである濃度で、ヒト細胞中においてNaG1u活性の正常なレベルを完全に復元する。本明細書で使用されるとき、NaG1u活性の正常なレベルは、正常なNaG1u酵素を活性に発現する同じタイプの野生型ヒト細胞中において測定されるNaG1u活性のレベルである。

【0089】

幾つかの態様において、rhNaG1uは、NaG1uが欠乏したヒト細胞中に内部移行され得、その結果、タンパク質は、同じタイプの正常なヒト細胞のNaG1u活性の少なくとも約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%を復元する。幾つかの実施形態において、rhNaG1uは、NaG1uが欠乏したヒト細胞中に内部移行され得、その結果、内部移行されたrhNaG1uは、同じタイプの正常なヒト細胞中で観察される酵素活性よりも高い酵素活性を提供する。一実施形態において、rhNaG1uは、NaG1uが欠乏したヒト細胞中に内部移行され、その結果、内部移行されたrhNaG1uは、同じタイプの正常なヒト細胞中で観察される酵素活性よりも、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、および約10倍高い活性を提供する。一実施形態において、rhNaG1uは、NaG1uが欠乏したヒト細胞中に内部移行され、その結果、内部移行されたrhNaG1uは、正常なヒト細胞中で観察される活性よりも、約15、約20、約25、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、または約100倍高い活性を提供する。

【0090】

一実施形態において、NaG1uが欠乏したヒト細胞は、細胞表面上で1つ以上のM6P受容体を発現するNaG1uが欠乏した任意のヒト細胞である。一実施形態において、NaG1uが欠乏したヒト細胞は、ヘパラン硫酸塩を蓄積するヒトムコ多糖症(MPS)IIIB線維芽細胞である。一実施形態において、NaG1uが欠乏したヒト細胞は、肝細胞である。一実施形態において、NaG1uが欠乏したヒト細胞は、神経細胞である。

10

20

30

40

50

一実施形態において、NaGluが欠乏したヒト細胞は、内皮細胞である。一実施形態において、NaGluが欠乏したヒト細胞は、マクロファージである。

【0091】

幾つかの態様において、ヒト細胞中へのrhNaGluの取り込みは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、または約10mMの競合するM6P単糖の存在によって阻害される。幾つかの態様において、rhNaGluの細胞取り込みは、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、または約1.0mMのM6P単糖の存在によって阻害される。一実施形態において、rhNaGluの細胞取り込みは、約0.01、約0.02、約0.03、約0.04、約0.05、約0.06、約0.07、約0.08、または約0.09mMのM6P単糖の存在によって阻害される。 10

【0092】

幾つかの態様において、rhNaGluは、そのグリカン構造中に、タンパク質1モル当たり約17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または35モルである濃度でマンノースを含有する。一実施形態において、rhNaGluは、タンパク質1モル当たり約20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30モルである濃度でマンノースを有する。rhNaGluは、タンパク質1モル当たり約22、23、24、25、26、27、または28モルである濃度でマンノースを含有する。rhNaGluは、タンパク質1モル当たり約24モルである濃度でマンノースを含有する。rhNaGluタンパク質は、タンパク質1モル当たり約25モルである濃度でマンノースを含有する。rhNaGluは、タンパク質1モル当たり約26モルである濃度でマンノースを含有する。rhNaGluは、タンパク質1モル当たり約27モルである濃度でマンノースを含有する。一実施形態において、rhNaGluは、タンパク質1モル当たり約20～約30モルである濃度でマンノースを有する。 20

【0093】

幾つかの態様において、rhNaGluは、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を含む。一実施形態において、rhNaGluは、タンパク質1モル当たり約28～約42モルである濃度でGlcNAcを含有する。一実施形態において、NaGluタンパク質は、タンパク質1モル当たり約30～約40モルである濃度でGlcNAcを有する。一実施形態において、NaGluタンパク質は、タンパク質1モル当たり約32～約38モルである濃度でGlcNAcを含む。一実施形態において、NaGluタンパク質は、タンパク質1モル当たり約34～約36モルである濃度でGlcNAcを含む。一実施形態において、NaGluタンパク質は、タンパク質1モル当たり約35モルである濃度でGlcNAcを有する。一実施形態において、rhNaGluタンパク質は、タンパク質1モル当たり約30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40モルである濃度でGlcNAcを含有する。 30

【0094】

幾つかの態様において、rhNaGluは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)および/またはガラクトース(Gal)を含有する。GalNAcおよびGalの存在は、典型的に、NaGluが、ゴルジ体領域内のタンパク質に追加される1つ以上のO結合型グリカン構造を含有し得ることを示す。したがって、本発明は、任意に、1つ以上のO結合型グリカン構造を含有する組換えヒトNaGluを含む組成物を含む。 40

【0095】

一実施形態において、rhNaGluは、タンパク質1モル当たり約1、2、3、4、5、6、または7モルである濃度でガラクトースを含有する。一実施形態において、rhNaGluは、タンパク質1モル当たり約2、3、4、5、または6モルである濃度でガラクトースを有する。一実施形態において、rhNaGluは、タンパク質1モル当たり約3モルである濃度でガラクトースを有する。一実施形態において、rhNaGluは、タンパク質1モル当たり約4モルである濃度でガラクトースを有する。 50

【0096】

一実施形態において、NaG1uは、タンパク質1モル当たり少なくとも1つのGalNAc分子を含む。一実施形態において、NaG1uは、タンパク質1モル当たり約1または2モルである濃度でGalNAcを含む。

【0097】

一実施形態において、NaG1uは、フコースを含有しない。なおも別の実施形態において、NaG1uは、グルコースを含有しない。なおも別の実施形態において、rhNaG1uは、フコースもグルコースも含有しない。

【0098】

本発明はまた、修飾されたrhNaG1uの核配列から產生される、修飾されたrhNaG1uタンパク質の組成物を企図する。修飾された核酸配列は、機能的に同等のポリヌクレオチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをもたらす、異なるヌクレオチドの欠失、挿入、または置換を含む。コードされたタンパク質はまた、サイレント変化を生み出し、機能的に同等のタンパク質またはポリペプチドをもたらす、アミノ酸残基の欠失、挿入、または置換を含有し得る。意図的なアミノ酸置換は、NaG1uの生物学的活性が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性性質における類似性に基づいて行うことができる。例えば、負電荷性のアミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ得、正電荷性のアミノ酸には、リジンおよびアルギニンが含まれ得、同様の親水性値を有する非電荷性の極性頭基を持つアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、およびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；セリンおよびスレオニン；フェニルアラニンおよびチロシンが含まれ得る。

【0099】

他の態様において、rhNaG1uは、それが追加の部分または第2のペプチドを含有するように修飾することができる。無修飾のNaG1uタンパク質は、高い血清濃度で、血液脳関門を横断し得るが、タンパク質の修飾を行って、中枢神経系(CNS)標的化の効率を増加させることができる。一実施形態において、トランスフェリン受容体リガンド(TfRL)には、NaG1uタンパク質のN末端またはC末端においてヒトNaG1uが結合することができる。TrRLの非限定的な例は、THRPMPMWSPVWP(配列番号5)である。一実施形態において、トランスフェリン受容体リガンドには、NaG1uタンパク質のヒトNaG1u-C末端が結合することができる。別の実施形態において、ヒトNaG1uは、NaG1uタンパク質のN末端またはC末端においてインスリン様成長因子受容体(IGF2R)リガンドに融合される。なおも別の実施形態において、NaG1uタンパク質は、NaG1uタンパク質のN末端またはC末端において低比重リボタンパク質(LDL)受容体リガンドに融合される。一実施形態において、NaG1uタンパク質は、5~10個の連続した酸性アミノ酸残基の広がりに融合される。酸性アミノ酸残基には、アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)が含まれ得る。

【0100】

一実施形態において、rhNaG1uは、NaG1uタンパク質をコードする導入遺伝子を含有する遺伝子導入鳥類において產生される。一実施形態において、rhNaG1uは、遺伝子導入鳥類(例えば、ニワトリ(野鶏属))の卵管細胞(例えば、管状腺細胞)中で產生される。一実施形態において、rhNaG1uは、遺伝子導入鳥類の卵管細胞(例えば、管状腺細胞)中でグリコシル化される。一実施形態において、rhNaG1uは、遺伝子導入鳥類の卵管細胞中で產生されているrhNaG1uからもたらされるグリコシル化パターンを有する。一実施形態において、rhNaG1uは、遺伝子導入鳥類によって産卵された硬殻卵の内容物から単離し、精製することができる。一実施形態において、rhNaG1uは、遺伝子導入鳥類の卵白から単離し、精製することができる。

【0101】

本発明はまた、1つ以上の断片および完全長rhNaG1u(例えば、配列番号1に記載される24~743)の混合物等の、NaG1uタンパク質の単離された混合物の組成

10

20

30

40

50

物も含む。一実施形態において、混合物の実質的な部分が、リン酸化M6Pを含有する。一実施形態において、その混合物中のrhNaG1uの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%が、M6Pを含有する。なおも別の実施形態において、混合物中の単離されたrhNaG1uの少なくとも50%が、M6Pを含有する。なおも別の実施形態において、混合物中の単離されたrhNaG1uの少なくとも60%が、M6Pを含有する。なおも別の実施形態において、混合物中の単離されたrhNaG1uの少なくとも70%が、M6Pを含有する。なおも別の実施形態において、混合物中の単離されたrhNaG1uの少なくとも80%が、M6Pを含有する。なおも別の実施形態において、混合物中の単離されたrhNaG1uの少なくとも90%が、M6Pを含有する。なおも別の実施形態において、混合物中の単離されたrhNaG1uの少なくとも95%が、M6Pを含有する。なおも別の実施形態において、混合物中の単離されたrhNaG1uの少なくとも96%が、M6Pを含有する。なおも別の実施形態において、混合物中の単離されたrhNaG1uの少なくとも97%が、M6Pを含有する。なおも別の実施形態において、混合物中の単離されたrhNaG1uの少なくとも98%が、M6Pを含有する。なおも別の実施形態において、混合物中の単離されたrhNaG1uの少なくとも99%が、M6Pを含有する。

【0102】

任意に、鳥類または哺乳類発現系（例えば、CHO、HEK293、またはヒト皮膚線維芽細胞株）から產生されるrhNaG1uタンパク質は、生物学的活性を保持しながら、細胞取り込みのために好ましいグリコシル化パターン（すなわち、増加した量のM6P）を達成するように更に修飾することができる。追加の末端M6Pを、米国特許第6,679,165号、米国特許第7,138,262号、または米国出願第2009/0022702号に記載されるような他の加水分解酵素に適用される一般的方法によって、rhNaG1uに導入することができ、それらの各々の教示全体は、参照により本明細書に組み込まれる。例えば、高度にリン酸化されたマンノピラノシルオリゴ糖化合物を、カルボニル反応基を含有する化学化合物により誘導体化し、続いてrhNaG1uタンパク質を酸化して、タンパク質の1つのグリカン構造上にカルボニル（アルデヒド）基を生成し、グリカンを含む酸化されたNaG1uタンパク質を、誘導体化された、高度にリン酸化されたマンノピラノシルオリゴ糖化合物と反応させて、ヒドラジン結合を有する新たな化合物を形成することができる。

【0103】

I I . ベクター

当業者に周知である方法を使用して、NaG1uをコードする配列、ならびに適切な転写および翻訳制御要素を含有する、発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、体外組換えDNA技法、合成技法、および体内遺伝子組換えが含まれる。かかる技法は、例えば、Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.、およびAusubel, F. M. et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.に記載され、それらの教示全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0104】

様々な発現ベクター/宿主系を利用して、rhNaG1uをコードする核酸配列を発現させることができる。これらには、組換えバクテリオファージ、プラスミド、もしくはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌等の微生物；酵母発現ベクターにより形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）によりもしくは細菌発現ベクター（例えば、TiまたはpBR322プラスミド）により感染された

10

20

30

40

50

昆虫細胞系；または哺乳類細胞培養系（例えば、pTT22ベクター）が含まれるが、これらに限定されない。酸性アミノ酸残基およびTfRLをコードする核酸配列に融合されたヒトNaGlu cDNAを含有するpTT22ベクターの非限定的な例が、図11および12に示される。

【0105】

本発明のポリヌクレオチドおよび核酸コード領域は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を導く、分泌ペプチドまたはシグナルペプチドをコードする追加のコード領域に関連付けられてもよい。シグナル仮説によると、脊椎動物（例えば、鳥類または哺乳類）細胞によって分泌されるタンパク質は、一旦、成長しているタンパク質鎖の粗面小胞体（ER）を渡る搬出が開始されると、成熟タンパク質から切断される、シグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有する。当業者は、脊椎動物によってERにおいて產生されるポリペプチド細胞が一般に、完全なまたは「完全長」ポリペプチドから切断されて、ポリペプチドの分泌形態または「成熟」形態を產生する、ポリペプチドのN末端に融合されたシグナルペプチドを有することを承知している。ある特定の実施形態において、天然シグナルペプチド、例えば、ヒトNaGluのMEAVAVAAVGVLLLAGAGGAAG（配列番号1の1～23シグナルペプチド、またはそれと作動可能に関連付けられているポリペプチドの分泌を導く能力を保持する、その配列の機能性誘導体が使用される。代替的に、異種性シグナルペプチド（例えば、異種性哺乳類または鳥類シグナルペプチド）、またはその機能性誘導体が使用されてもよい。例えば、野生型リーダー配列は、例えば、ヒト組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）またはマウス-グルクロニダーゼのリーダー配列と置換されてもよい。

【0106】

制御要素または調節配列には、宿主細胞タンパク質と相互作用して、転写および翻訳を行う、ベクターエンハンサー、プロモーターのそれらの非翻訳領域、5'および3'非翻訳領域が含まれ得る。かかる要素は、それらの強度および特異性において異なり得る。利用されるベクター系および宿主細胞に応じて、任意の数の好適な転写要素および翻訳要素を使用することができる。例えば、細菌系中にクローニングするとき、Bluescript（商標）ファージミド（Stratagene, La Jolla, California）またはpSport1（商標）プラスミド（Gibco BRL）のハイブリッドlac-Zプロモーター等の誘導性プロモーターを使用することができる。哺乳類細胞系において、哺乳動物遺伝子からのまたは哺乳動物ウイルスからのプロモーターが好ましい。NaGluをコードする配列の複数コピーを含有する細胞株を生成するが必要な場合、SV40またはEBVに基づくベクターもまた、ピューロマイシンおよびアンピシリン等の適切な選択可能なマーカーと共に使用することができる（例えば、図11および12を参照されたい）。

【0107】

rhNaGluが遺伝子導入鳥類において產生されるとき、本発明は、rhNaGlu配列がプロモーターの下流に配置され、その結果、rhNaGluをコードする配列が、遺伝子導入鳥類において組織特異的様態で発現され得ることを企図する。例えば、プロモーターは、卵白アルブミン、リゾチーム、コンアルブミン、オボムコイド、オボムコイド、オボムチン、およびオボトランスフェリンプロモーターを含むが、これらに限定されない、卵管特異的プロモーター等の、全面的にではないが、概して筒部に特異的である、卵管特異的プロモーターであり得る。一実施形態において、プロモーターは、卵白アルブミンプロモーター、リゾチームプロモーター、コンアルブミンプロモーター、オボムコイドプロモーター、オボムチンプロモーター、および/もしくはオボトランスフェリンプロモーター、またはそれらの任意の機能性部分である。

【0108】

代替的に、構成的プロモーターを使用して、鳥類においてヒトNaGluのコード配列を発現させることができる。この事例において、発現は、筒部に限定されず、発現はまた、鳥類内部の他の組織（例えば、血液）においても生じる。NaGluの構成的プロモー

10

20

30

40

50

ターおよびコード配列を含む、かかる導入遺伝子の使用もまた、卵管におけるタンパク質の発現、およびその後のタンパク質の卵中への分泌を達成または駆動するのに好適である。一実施形態において、構成的プロモーターは、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、マウス白血病ウイルス(MLV)プロモーター、および-アクチンプロモーターであり得る。一実施形態において、プロモーターは、それらの任意の機能性部分のCMVプロモーター、MDOTプロモーター、RSVプロモーター、MLVプロモーター、またはマウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーターである。

【0109】

本発明はまた、本明細書に記載されるプロモーターの任意の有用な断片または構成要素も企図する。プロモーターは、卵白アルブミン、リゾチーム、コンアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、CMV、RSV、またはMLVプロモーター領域のセグメント等の、プロモーター領域の少なくとも1つのセグメント、断片、または構成要素であり得る。好ましい実施形態において、プロモーターは、管状腺細胞中におけるコード配列の発現を導くために必須の要素を含有する、卵管特異的プロモーター領域のセグメントである。例えば、卵管特異的プロモーターのセグメント、部分、もしくは断片および/またはそれが卵管の筒部の管状腺細胞中における発現に必要とされる配列を保持するように、卵管特異的プロモーターの必要不可欠な調節要素を凝縮することが、本発明の範囲に含まれる。一実施形態において、卵白アルブミンプロモーター領域のセグメントが使用される。このセグメントは、卵白アルブミン遺伝子の5'隣接領域を含む。

【0110】

ヒトNaGluに対するコード配列を含有するベクターを、鳥類または哺乳類細胞の胚盤葉細胞を形質移入するために使用して、鳥類または哺乳類ゲノム中への安定な組み込みを得、生殖系列遺伝子導入鳥類または哺乳類細胞株を作り出すことができる。かかるベクターの非限定的な例が、図4A~Dおよび5に示される。鳥類発現系において、ヒトNaGluコード配列は、遺伝子導入鳥類において、特に鳥類卵管の筒部の管状腺細胞中においてコード配列を発現する位置関係で、プロモーターに作動可能に連結され、その結果、組換えヒトNaGluタンパク質は、遺伝子導入鳥類によって産卵された硬殻卵の卵白中で発現され、そこに沈着する。鳥類系においてrhNaGluを発現させるための追加の好適ベクターおよびベクターを作製する方法はまた、米国特許第6,730,822号、米国特許第6,825,396号、米国特許第6,875,588号、米国特許第7,294,507号、米国特許第7,521,591号、米国特許第7,534,929号、米国出願第2008/0064862A1号、および米国特許公開第2006/0185024号にも開示され、それらの教示全体は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明においてまた有用であり得る他のプロモーターの非限定的な例としては、H1プロモーター、U6プロモーター、tRNAプロモーター、RNase MPRプロモーター等のPol IIIプロモーター(例えば、1型、2型、および3型Pol IIIプロモーター)、およびこれらのプロモーターの各々の機能性部分が挙げられる。典型的に、機能性ターミネーター配列は、用いられるプロモーターに従って、本発明において使用するために選択される。

【0111】

一実施形態において、ベクターは、レトロウイルスベクターであり、そのコード配列およびプロモーターは両方とも、レトロウイルスベクターの5'LTRと3'LTRとの間に位置付けられる。1つの有用な実施形態において、LTRまたはレトロウイルスベクターは、鳥類白血病ウイルス(ALV)、マウス白血病ウイルス(MLV)、またはレンチウイルスに由来する。導入遺伝子を鳥類ゲノム中に無作為に導入するために有用な1つのレトロウイルスは、複製欠損ALV、複製欠損MLV、または複製欠損レンチウイルスである。

【0112】

本発明はまた、自己不活性化(SIN)ベクターの使用を企図する。SINベクターは

10

20

30

40

50

、遺伝子導入鳥類の卵管において產生されるヒトNaGluの量を増加させるために有用であり得る。この効果は、SINベクターが、機能性プロモーターを有するいずれの選択可能なマーカーカセットも含有しない(SIN / SCネガティブベクター)とき、更に強化され得る。一実施形態において、SINベクターは、組み込まれたレトロウイルスベクターの5'LTRがプロモーターとして機能しないように、変化させられたゲノムを有する、レトロウイルスベクターである。1つの特定の実施形態において、一旦、組み込まれると、レトロウイルスベクターの5'LTRのU3領域をもたらす、レトロウイルスベクターのヌクレオチド配列の一部分または全ては、5'LTRのプロモーター活性を低減または排除するために欠失または変化させることができる。ヒトrhNaGluのコード配列に融合された卵白アルブミンプロモーター領域を含有する、SINベクターの非限定的な例が、図4A～Dおよび5に示される。そのベクターの機能性構成要素もまた、表1において表にされる。

【表1】

表1 pSIN-OV-1. 1kb-I-rhNaGluにおける機能性構成要素

機能性構成要素	配列番号4におけるヌクレオチド配列
ポリA部位	634-639
部分的gag	692-945
LTR(RAV2)	1243-1588
部分的LTR(RAV2)	4691-4863
ALV CTE	4899-4986
1.1kb卵白アルブミンプロモーター	5232-6363
DHS II	5334-5714
DHS I	6064-6364
エクソンL	6364-6410
イントロン1	6411-7999
NaGlu	8017-10248

10

20

30

【0113】

本明細書に記載されるベクターのいずれも、例えば、鳥類の卵管の管状腺細胞からの、ベクターのコード配列によって発現されるタンパク質の分泌を導くシグナルペプチドをコードする配列を含むことができる。組換えヒトNaGluタンパク質がさもなければ分泌されないのであろう場合、コード配列を含有するベクターは、例えば、リゾチーム遺伝子から、シグナルペプチドをコードする約60bpを含むDNA配列を含むように修飾される。シグナルペプチドをコードするDNA配列は、それが、DNAによってコードされるrhNaGluのタンパク質のN末端に位置するように、ベクターに挿入される。

【0114】

更に、本発明の方法のいずれかにおいて使用されるベクターのコード配列には、產生されるRNAに安定性を付与するための3'非翻訳領域(3'UTR)が提供され得る。3'UTRがレトロウイルスベクターに付加されるとき、プロモーター、コード配列、および3'UTRの向きは、好ましくは、3'UTRの付加が完全長ゲノムRNAの転写を干渉しないように、3'UTRの方向に対して逆にされる。一実施形態において、3'UTRは、卵白アルブミン遺伝子、リゾチーム遺伝子の3'UTR、または筒部細胞中、すなわち、SV40後期領域で機能性である任意の3'UTRであってもよい。

40

【0115】

I.I.I. 遺伝子導入鳥類

本明細書に記載される導入遺伝子を、鳥類胚性胚盤葉細胞中に導入して、その生殖系列

50

組織のゲノム内に組換えヒトNaGluをコードする導入遺伝子を担持する、遺伝子導入ニワトリ、遺伝子導入シチメンチョウ、遺伝子導入ウズラ、および他の鳥類種を產生することができる。本発明の一態様において、rhNaGluを產生する遺伝子導入鳥類は、レトロウイルスベクターの5'LTRと3'LTRとの間に導入遺伝子を担持する、複製欠損または複製可能レトロウイルス粒子による胚性胚盤葉細胞の形質導入によって作り出される。例えば、鳥類白血病ウイルス(ALV)レトロウイルスベクターまたはマウス白血病ウイルス(MLV)レトロウイルスベクターを使用することができる。ウイルス粒子中にパッケージ化される修飾されたレトロウイルスベクターのRNAコピーを使用して、遺伝子導入鳥類へと発達する胚性胚盤葉を感染させることができる。

【0116】

10

本発明の方法によって、導入遺伝子は、種々の鳥類種の胚性胚盤葉細胞中に導入することができる。例えば、本方法は、本発明のタンパク質を產生するためにその生殖系列組織のゲノム内に導入遺伝子を担持する、遺伝子導入ニワトリ、遺伝子導入シチメンチョウ、遺伝子導入ウズラ、遺伝子導入管、および他の鳥類種を產生するために適用することができる。胚盤葉細胞は、典型的に、Eyal-Giladi and Kochav (1976)、またはその均等物によって定義されるところのVII~XII期細胞である。好ましい実施形態において、胚盤葉細胞は、X期時点またはその付近である。

【0117】

胚盤葉細胞形質移入する1つの方法において、パッケージ化されたレトロウイルスに基づくベクターを使用して、ベクターが鳥類ゲノム内に組み込まれるように、ベクターを胚性胚盤葉細胞中に送達することができる。かかるウイルス粒子(すなわち、形質導入粒子)は、ベクターのために產生され、胚に注射するために使用され得る適切な濃度を決定するために滴定される。一実施形態において、鳥類卵は、米国特許第5,897,998号に記載され、その開示が参照によりその全体で本明細書に組み込まれる手順に従って窓を付けられ、その卵は、X期時点またはその付近で形質導入粒子を注射される。

20

【0118】

rhNaGluを產生する本発明の遺伝子導入鳥類は、ベクターが導入された胚盤葉細胞から発達させられる。結果として生じる胚は、発達させられ、ヒヨコは、成熟させられる。この段階で、胚盤葉細胞から生み出される遺伝子導入鳥類は、創始者として知られ、導入遺伝子を担持する細胞に対するキメラであり、G0の参照を付けられる。G0創始者鳥類は、典型的に、各々挿入された導入遺伝子のキメラである。つまり、G0遺伝子導入トリの細胞の一部のみが、導入遺伝子を含有する。幾つかの創始者は、それらの卵管の筒部における管状腺細胞中に導入遺伝子を担持する。これらの鳥類は、それらの卵管において導入遺伝子によってコードされるrhNaGluタンパク質を発現する。NaGluタンパク質はまた、卵管に加えて他の組織(例えば、血液)中でも発現され得る。幾つかの創始者は、生殖系列組織のゲノム内に導入遺伝子を担持する生殖系列創始者であり、それはまた、外因性タンパク質を発現する卵管筒部管状腺細胞中に導入遺伝子を担持し得る。

30

【0119】

遺伝子導入鳥類は、その生殖系列において導入遺伝子を担持することができ、メンデル様式で安定に、外因性導入遺伝子の、鳥類の子孫への伝達を提供する。G0世代は、典型的に、rhNaGluをコードする導入遺伝子に対してヘミ接合である。G0世代を、非遺伝子導入動物と繁殖させて、導入遺伝子に対して同様にヘミ接合であり、トリの細胞の本質的に全てにおいて導入遺伝子を含有する、G1遺伝子導入子孫を生じさせることができ。G1ヘミ接合子孫を、非遺伝子導入動物と繁殖させて、G2ヘミ接合子孫を生じさせることができ、あるいは、一緒に繁殖させて、導入遺伝子に対してホモ接合のG2子孫を生じさせてもよい。G1子孫に由来する導入遺伝子に対して陽性である鳥類の細胞の実質的に全てが、導入遺伝子を含有する。一実施形態において、同じ系列からのヘミ接合のG2子孫を繁殖させて、導入遺伝子に対してホモ接合のG3子孫を生み出すことができる。別の実施形態においては、例えば、ヘミ接合G0またはG1動物を一緒に繁殖させて、動物の各細胞中に導入遺伝子(複数可)の2つのコピーを含有するホモ接合G1子孫を生

40

50

じさせる。これらは、ある特定の有用な繁殖方法の例にすぎず、本発明は、当業者に既知の方法等の任意の有用な繁殖方法の利用を企図する。

【0120】

I V. r h N a G l u の產生

r h N a G l uは、ゲノム内にr h N a G l uをコードする導入遺伝子を含有する、遺伝子導入鳥類を使用して產生することができる。一実施形態において、遺伝子導入鳥類は、生殖系列遺伝子導入ニワトリ、ウズラ、アヒル、またはシチメンチョウである。1つの特に有用な実施形態において、本発明は、ニワトリの卵管において產生され得るN a G l uの產生に向けられる。

10

【0121】

鳥類系における（例えば、鳥類卵管における）修飾を伴うまたは伴わないr h N a G l uの產生が、本発明の範囲内である。一実施形態において、無修飾のr h N a G l uは、ヒト細胞による効率的な取り込みを可能にするグリコシリ化構造（すなわち、M 6 P）を有する野生型アミノ酸配列（配列番号1の24～743）を含む。別の実施形態において、修飾されたタンパク質は、ヒト細胞による効率的な取り込みを可能にするグリコシリ化パターン（すなわち、M 6 P）を有するr h N a G l u融合タンパク質であり得る。

【0122】

ニワトリ卵管中におけるコード配列の発現を駆動する組織特異的または構成的プロモーターに作動可能に連結された、N a G l uタンパク質をコードする核酸配列を含有する好適な鳥類ベクターは、本明細書に記載されるるX期時点またはその付近のニワトリ胚性細胞中に導入される。形質転換胚性細胞は、生きたヒヨコを孵化することを促す条件下でインキュベートされる。生きたヒヨコは、成熟キメラニワトリへと養育され、自然にまたは人工授精を介して非遺伝子導入ニワトリと交配させる。遺伝子導入ニワトリは、タンパク質コード配列の生殖系列組み込みについて、子孫をスクリーニングすることによって特定される。遺伝子導入子孫を、別の遺伝子導入または非遺伝子導入ニワトリと交配させて、卵を産卵する完全生殖系列遺伝子導入メンドリを產生することができる。

20

【0123】

r h N a G l uは、組織特異的様態で產生することができる。例えば、r h N a G l uは、遺伝子導入鳥類の卵管、血液、および／または他の細胞もしくは組織中で発現され得る。一実施形態において、N a G l uは、遺伝子導入鳥類の卵管の筒部の管状腺細胞中で発現され、卵管の内腔中に分泌され、卵白に沈着される。一実施形態において、r h N a G l uを含有する卵白は、採取され、4～20の範囲の温度で大量に保管される。N a G l uは次いで、当該技術分野で既知の種々の方法を使用して、卵の内容物から単離され、精製される。

30

【0124】

本発明の一態様は、r h N a G l uタンパク質を含有する鳥類硬殻卵（例えば、ニワトリ硬殻卵）に関する。遺伝子導入鳥類によって產生され、分泌されるr h N a G l uは、ヒト細胞による細胞取り込みに好ましい様態でグリコシリ化される。タンパク質は、任意の有用な量で存在してもよい。一実施形態において、タンパク質は、1硬殻卵当たり約0.01μg～1硬殻卵当たり約1グラムの範囲の量で存在する。別の実施形態において、タンパク質は、1硬殻卵当たり約1μg～1硬殻卵当たり約1グラムの範囲の量で存在する。例えば、タンパク質は、1硬殻卵当たり約10μg～1硬殻卵当たり約1グラムの範囲（例えば、1硬殻卵当たり約10μg～1硬殻卵当たり約400ミリグラムの範囲）の量で存在してもよい。

40

【0125】

一実施形態において、r h N a G l uは、卵の卵白中に存在する。一実施形態において、r h N a G l uは、1ミリリットルの卵白当たり約1ng～1ミリリットルの卵白当たり約0.2グラムの範囲の量で存在する。例えば、r h N a G l uは、1ミリリットルの卵白当たり約0.1μg～1ミリリットルの卵白当たり約0.2グラムの範囲の量で存在

50

してもよい(例えば、r h N a G 1 uは、1ミリリットルの卵白当たり約1 μ g～1ミリリットルの卵白当たり約100ミリグラムの範囲の量で存在してもよい。一実施形態において、r h N a G 1 uは、1ミリリットルの卵白当たり約1 μ g～1ミリリットルの卵白当たり約50ミリグラムの範囲の量で存在する。例えば、r h N a G 1 uは、1ミリリットルの卵白当たり約1 μ g～1ミリリットルの卵白当たり約10ミリグラムの範囲の量で存在してもよい(例えば、r h N a G 1 uは、1ミリリットルの卵白当たり約1 μ g～1ミリリットルの卵白当たり約1ミリグラムの範囲の量で存在してもよい)。一実施形態において、r h N a G 1 uは、1ミリリットルの卵白当たり約0.1 μ gを超える量で存在する。一実施形態において、r h N a G 1 uは、1ミリリットルの卵白当たり約0.5 μ gを超える量で存在する。一実施形態において、r h N a G 1 uは、1ミリリットルの卵白当たり約1 μ gを超える量で存在する。一実施形態において、タンパク質は、1ミリリットルの卵白当たり約1.5 μ gを超える量で存在する。一実施形態において、r h N a G 1 uは、1ミリリットルの卵白当たり約0.5 μ gを超える量で存在する。一実施形態において、タンパク質は、1ミリリットルの卵白当たり約0.1 μ gを超える量で存在する。 10

【0126】

一実施形態において、r h N a G 1 uは、20mg/L、30mg/L、40mg/L、50mg/L、60mg/L、70mg/L、80mg/L、90mg/L、100mg/L、120mg/L、130mg/L、140mg/L、150mg/L、160mg/L、170mg/L、200mg/L、300mg/L、400mg/L、500mg/L、600mg/L、700mg/L、800mg/L、900mg/L、または1,000mg/L卵白の量で存在する。一実施形態において、r h N a G 1 uは、約100mg/Lの卵白の量で存在する。一実施形態において、r h N a G 1 uは、約200mg/Lの卵白の量で存在する。 20

【0127】

V. 宿主細胞

本発明はまた、限定なしに、細胞培養(例えば、鳥類細胞、CHO細胞、HEK293細胞、およびCOS細胞)、酵母、細菌、および植物を含む、任意の有用なタンパク質発現系において産生されるr h N a G 1 uも企図する。

【0128】

宿主細胞株は、挿入された配列の発現を調節する、または発現されたN a G 1 uを所望の様式でプロセスする、その能力について選定することができる。N a G 1 uのポリペプチドのかかる修飾には、限定なしに、グリコシル化、リン酸化、または脂質付加が含まれる。かかる翻訳後活性のための特異的細胞機構および特徴的機構を有するCHO、COS、HeLa、MDCK、HEK293、およびW138等の異なる宿主細胞を、本発明の融合タンパク質の正しい修飾およびプロセシングを確実にするために選定することができる。鳥類腫瘍細胞株もまた、本発明のポリペプチドを発現するための宿主細胞として企図される。有用鳥類細胞株(例えば、鳥類卵管腫瘍細胞株)の例は、米国特許公開第2009/0253176号に記載され、それらの教示全体は、参照により本明細書に組み込まれる。 40

【0129】

V I . 薬学的組成物

本発明はまた、単離され、実質的に精製されたr h N a G 1 uまたはその薬学的に許容される塩を含む、薬学的組成物を特色とする。組換えヒトN a G 1 uタンパク質は、例えば、薬学的製剤の一部として1つ以上の担体を使用して、または担体を用いずに、投与されてもよい。担体(複数可)は、製剤の他の成分と適合であり、そのレシピエントに有害でないという意味で「許容され」なければならない。複合分子を含む、かかる担体を含む組成物は、周知の従来方法(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 14th Ed., Mack Publishing 50

Co., Easton, Pa. を参照されたい) によって製剤化され、それらの教示全体は、参照により本明細書に組み込まれる。担体は、希釈剤を含んでもよい。一実施形態において、薬学的担体は、液体であり得、タンパク質は、溶液の形態であってもよい。薬学的担体は、ワックス、脂肪、またはアルコールであり得る。別の実施形態において、薬学的に許容される担体は、固体の形態粉末、凍結乾燥粉末、または錠剤であってもよい。一実施形態において、担体は、リポソームまたはマイクロカプセルを含んでもよい。

【0130】

幾つかの実施形態において、組換えヒトNaGluタンパク質を含む薬学的組成物は、緩衝液を更に含む。例となる緩衝液としては、酢酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、およびグルタミン酸塩緩衝液が挙げられる。例となる緩衝液としてはまた、クエン酸リチウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、クエン酸カルシウム、乳酸リチウム、乳酸ナトリウム、乳酸カリウム、乳酸カルシウム、リン酸リチウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸カルシウム、マレイン酸リチウム、マレイン酸ナトリウム、マレイン酸カリウム、マレイン酸カルシウム、酒石酸リチウム、酒石酸ナトリウム、酒石酸カリウム、酒石酸カルシウム、コハク酸リチウム、コハク酸ナトリウム、コハク酸カリウム、コハク酸カルシウム、酢酸リチウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸カルシウム、およびそれらの混合物が挙げられる。幾つかの実施形態において、緩衝液は、クエン酸三ナトリウム二水和物である。幾つかの実施形態において、緩衝液は、クエン酸一水和物である。幾つかの実施形態において、薬学的組成物は、クエン酸三ナトリウム二水和物およびクエン酸一水和物を含む。

10

20

【0131】

幾つかの実施形態において、組換えヒトNaGluタンパク質を含む薬学的組成物は、安定剤を更に含む。例となる安定剤としては、アルブミン、トレハロース、糖、アミノ酸、ポリオール、シクロデキストリン、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、および塩化カルシウム等の塩、凍結乾燥保護剤、ならびにそれらの混合物が挙げられる。幾つかの実施形態において、薬学的組成物は、ヒト血清アルブミンを含む。

【0132】

幾つかの実施形態において、界面活性剤を薬学的組成物に添加することが望ましい。例となる界面活性剤としては、ポリソルベート(例えば、ポリソルベート 20 または 80)；ポロキサマー(例えば、ポロキサマー 188)；Trition 等の非イオン性界面活性剤；ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)；ラウリル硫酸ナトリウム；オクチルグルコシドナトリウム；ラウリルスルホベタイン、ミリスチルスルホベタイン、リノレイルスルホベタイン、またはステアリルスルホベタイン；ラウリルサルコシン、ミリスチルサルコシン、リノレイルサルコシン、またはステアリルサルコシン；リノレイルベタイン、ミリスチルベタイン、またはセチルベタイン；ラウロアミドプロピル(lauroamidopropyl)ベタイン、コカミドプロピルベタイン、リノレアミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルベタイン、パルミドプロピルベタイン、またはイソステアラミドプロピルベタイン(例えば、ラウロアミドプロピル)；ミリスタミドプロピルジメチルアミン、パルミドプロピルジメチルアミン、またはイソステアラミドプロピルジメチルアミン；メチルココイルタウレートナトリウム、またはメチルオレイル(ofeyl)タウレートニナトリウム；ならびにMONAQUAT(商標)シリーズ(Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.)、ポリエチルグリコール、ポリプロピルグリコール、およびエチレンとプロピレングリコールとの共重合体(例えば、Pluronics, PF 68 等)が挙げられる。典型的に、添加される界面活性剤の量は、それがタンパク質の凝集を低減し、微粒子または泡立の形成を最小化するような量である。例えば、界面活性剤は、製剤中に約 0.001 ~ 0.5% (例えば、約 0.005 ~ 0.05%、または 0.005 ~ 0.01%) の濃度で存在してもよい。詳細には、界面活性剤は、製剤中におよそ 0.005%、0.01%、0.02%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、または 0.5% 等の濃度で存在してもよい。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

30

40

50

【0133】

幾つかの実施形態において、本発明の好適な薬学的組成物は、特に、凍結乾燥製剤のために、1つ以上の增量剤を更に含んでもよい。「增量剤」は、凍結乾燥混合物に質量を追加し、凍結乾燥ケーキの物理的構造に寄与する化合物である。例えば、增量剤は、凍結乾燥ケーキの外観を改善し得る（例えば、本質的に均一の凍結乾燥ケーキ）。好適な增量剤には、塩化ナトリウム、乳糖、マンニトール、グリシン、ショ糖、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプンが含まれるが、これらに限定されない。增量剤の例となる濃度は、約1%～約10%（例えば、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、および10.0%）である。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。薬学的組成物は、希釈剤により再構築される、注射用の滅菌凍結乾燥粉末の形態であり得る。希釈剤は、注射用水、注射用静菌水、または滅菌食塩水であり得る。凍結乾燥（lyophilized）粉末は、融合タンパク質の溶液を凍結乾燥（freeze drying）させて、乾燥形態のタンパク質を生産するによって生産されてもよい。当該技術分野で既知であるように、凍結乾燥タンパク質は、一般に、タンパク質の液体溶液よりも増加した安定性およびより長い貯蔵寿命を有する。10

【0134】

薬学的製剤には、経口、直腸、経鼻、局所（頬側および舌下を含む）、腔内または非経口投与に好適な製剤が含まれる。好ましくは、本発明の薬学的製剤には、髄腔内、実質内、脳内、脳室内、筋肉内、皮下、および静脈内投与を含む、注射による投与に好適な製剤が含まれる。一実施形態において、本発明の製剤は、静脈内投与に好適である。別の実施形態において、本発明の製剤は、髄腔内投与に好適である。本発明の薬学的製剤にはまた、吸入またはガス注入による投与に好適な製剤が含まれる。製剤は、適切な場合、個別的な投与単位で好都合に提示することができ、薬学の技術分野で周知の方法のいずれによっても調製することができる。薬学的製剤を產生する方法は、典型的に、治療用タンパク質を液体担体と混合するステップもしくは固体担体を微細に分割するステップ、またはその両方のステップ、次いで、必要な場合、製品を所望の製剤に成形するステップを含む。20

【0135】

本発明の組換えヒトNaGluタンパク質はまた、非経口投与（例えば、注射、例えば、ボーラス注射または連續注入による）用に製剤化することもでき、また、アンプル、プレフィルドシリンジ、少容量注入中の単位用量形態で、または防腐剤が添加された複数回用量容器中に、提示することができる。治療用タンパク質は、例えば、皮下注射、筋肉内注射、髄腔内注射、脳内注射、実質内注射、脳室内注射、および静脈内（IV）注入または注射によって注射することができる。30

【0136】

一実施形態において、組換えヒトNaGluタンパク質は、任意の有用な方法によるIV注入によって静脈内投与される。一例では、組換えヒトNaGluタンパク質は、末梢ラインを通じる静脈内注入によって投与することができる。別の例において、組換えヒトNaGluタンパク質は、末梢挿入中心静脈カテーテルを通じる静脈内注入によって投与することができる。別の例において、組換えヒトNaGluタンパク質は、静脈血管アクセスポートに結合された携行式注入機械によって容易にされる、静脈内注入によって投与することができる。静脈内注入の一実施形態において、薬は、当該技術分野に精通する医師によって決定される、注入される薬の量および患者の以前の注入関連の反応履歴に応じて、1～8時間の期間にわたって投与される。別の実施形態において、組換えヒトNaGluタンパク質は、IV注射によって静脈内投与される。別の実施形態において、組換えヒトNaGluタンパク質は、腹腔内または髄腔内注射を介して投与することができる。40

【0137】

幾つかの実施形態において、治療用タンパク質は、注入によって投与され、その注入は、延長した時間枠、例えば、30分間～10時間にわたって生じ得る。故に、注入は、例50

えば、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、または約5時間の期間にわたって生じ得る。注入はまた、種々の速度で生じ得る。故に、例えば、注入速度は、1時間当たり約1mL～1時間当たり約20mLであり得る。幾つかの実施形態において、注入速度は、1時間当たり5mL～10mLである。一実施形態において、注入速度は、1時間当たり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20mLである。一実施形態において、注入速度は、0.1～5mg/kg/時間である。一実施形態において、注入速度は、約0.1、約0.2、約0.3、約0.5、約1.0、約1.5、約2.0、または約3mg/kg/時間である。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

10

【0138】

治療用タンパク質は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、またはエマルション等の形態をとることができ、また、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤等の調合剤を含有できる。組換えヒトNaGluタンパク質は、使用前の、好適なビヒクル、例えば、滅菌発熱性物質除去水による構築のために、滅菌固体の無菌単離によってまたは溶液からの凍結乾燥によって得られる、粉末形態であり得る。

【0139】

本発明による製剤は、製品品質分析、再構築時間（凍結乾燥の場合）、再構築の品質（凍結乾燥の場合）、高分子量、水分、およびガラス転移温度に基づいて評価することができる。典型的に、タンパク質品質および製品分析には、サイズ排除HPLC（SEC-HPLC）、陽イオン交換HPLC（CEX-HPLC）、X線回折（XRD）、変調示差走査熱量測定（MDSC）、逆相HPLC（RP-HPLC）、多角度光散乱法（MALS）、蛍光、紫外線吸収、比濁法、キャピラリー電気泳動（CE）、SDS-PAGE、およびそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない方法を使用する、製品分解速度分析が含まれる。幾つかの実施形態において、本発明による製品の評価は、外観（液体またはケーキいずれかの外観）を評価するステップを含んでもよい。

20

【0140】

一般に、製剤（凍結乾燥または水性）は、室温で延長した一定期間にわたって保管することができる。蓄積温度は、典型的に0～45（例えば、4、20、25、または45）の範囲であり得る。製剤は、数ヶ月の期間から数年の期間にわたって保管され得る。保管期間は、一般に24ヶ月、12ヶ月、6ヶ月、4.5ヶ月、3ヶ月、2ヶ月、または1ヶ月であろう。製剤は、投与に使用される容器中に直接保管することができ、転移ステップを排除する。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

30

【0141】

製剤は、凍結乾燥容器（凍結乾燥の場合）中に直接保管することができ、それがまた、再構築の入れ物として機能し得、転移ステップを排除する。代替的に、凍結乾燥品製剤は、保管用に、より小さい増分へと計量されてもよい。保管は、一般に、日光への曝露、UV放射、他の形態の電磁放射、過度の暑さまたは寒さ、急激な熱衝撃、および機械的衝撃を含むが、これらに限定されない、タンパク質の分解につながる状況を回避すべきである。本発明による薬学的組成物はまた、下でより詳細に論じられる、免疫抑制剤、抗菌剤、または防腐剤等の他の活性成分を含有することができる。

40

【0142】

VII. 治療方法

本発明はまた、NaGlu-関連疾患、例えば、サンフィリпп症候群Bを治療する方法も提供する。本発明により利用される組換えNaGluは、限定なしに、細胞培養（例えば、CHO細胞、COS細胞）、大腸菌等の細菌、哺乳動物および鳥類（例えば、ニワトリ、アヒル、およびシチメンチョウ）等の遺伝子導入動物を含む任意の有用なタンパク質発現系において、ならびに植物系（例えば、アオウキクサおよびタバコ植物）において産

50

生され得る、組換えN a G 1 uを含む。一実施形態において、組換えN a G 1 uは、鳥類等の遺伝子導入動物において産生される。

【0143】

一実施形態において、方法は、対象に、N a G 1 u欠乏症またはN a G 1 u関連疾患の1つ以上の症状を治療する（例えば、低減する、寛解させる）または予防するのに十分な量で、組換えヒトN a G 1 uタンパク質（r h N a G 1 u）、例えば、十分な量のオリゴ糖（例えば、マンノースおよびリン酸化マンノース（すなわち、M 6 P））を含有する組換えヒトN a G 1 uタンパク質を投与することを含む。組換えヒトN a G 1 uタンパク質は、治療的にもしくは予防的に、または両方として投与することができる。組換えヒトN a G 1 uタンパク質（r h N a G 1 u）は、対象に、単独でまたは本明細書に記載される他の治療様式と組み合わせて、投与することができる。10

【0144】

「治療する」、「治療すること」、および「治療」という用語は、疾患もしくは症状を緩和する、弱める、もしくは寛解させる、追加の症状を予防する、症状の根底にある原因を寛解させるもしくは予防する、疾患もしくは病態を阻害する、疾患もしくは病態の発症を阻む、疾患もしくは病態を軽減する、疾患もしくは病態の退縮を引き起こす、疾患もしくは病態によって引き起こされる病態を軽減する、または予防的におよび／もしくは症状が生じた後のいずれかで疾患もしくは病態の症状を止める方法を指す。

【0145】

「治療上有効用量」という用語は、意図される治療的応答（例えば、標的組織内のヘパラン硫酸塩レベルの低減および／またはN a G 1 u活性における増加）をもたらすのに必要とされる薬物の用量（例えば、量および／または間隔）を指す。治療上有効用量は、かかる用量を受けたことがない対応する対照と比較して、疾患、障害、もしくは副作用の改善された治療、治癒、予防、もしくは寛解、または疾患もしくは障害の発生率もしくは進行における減少をもたらす用量を指す。この用語にはまた、その範囲内に、生理機能を強化するのに有効な用量も含まれる。20

【0146】

本明細書で使用されるとき、「対象」または「患者」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含むように意図される。非ヒト動物には、非ヒト靈長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ニワトリ、両生類、および爬虫類等の全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物が含まれる。好ましい対象には、N a G 1 u欠乏症またはN a G 1 u関連疾患を有するヒト対象が含まれる。30

【0147】

本明細書で使用されるとき「N a G 1 u関連疾患」は、N a G 1 u活性によって媒介される、または異常なN a G 1 u発現もしくは活性に関連する疾患または病態である。N a G 1 u関連疾患の例としては、N a G 1 u欠乏症等のサンフィリポ（S a n f l i p p o）症候群B（ムコ多糖症I I I B型としても知られる）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0148】

本発明の治療方法は、関連臓器および組織中への組換えヒトN a G 1 uタンパク質の取り込みまたは輸送を容易にする、任意の投与経路を包含する。一実施形態において、本発明の方法は、本発明の組換えヒトN a G 1 uタンパク質を、N a G 1 u関連疾患（例えば、N a G 1 u欠乏症）の治療のために、対象のC N S（中枢神経系）、腎臓、または肝臓に送達することを含む。例えば、組換えヒトN a G 1 uタンパク質は、患者に、静脈内に（例えば、静脈内注射または静脈内注入を介して）投与されてもよく、驚くべきことに、N a G 1 u欠乏症を有する対象の血液脳関門（B B B）を横断する。本発明の別の実施形態において、組換えヒトN a G 1 uタンパク質は、患者の髄腔内に投与される。40

【0149】

A . 髄腔内送達用デバイス

種々のデバイスが、本発明により、髄腔内送達用に使用されてもよい。幾つかの実施形態において、髄腔内投与用のデバイスは、流体アクセスポート（例えば、注射用ポート）、流体アクセスポートと流体連通している第1の流動開口部および脊髄中への挿入のために構成される第2の流動開口部を有する中空体（例えば、カテーテル）、ならびに脊髄の中空体の挿入を固定するための固定機構を含有する。非限定的な例として、好適な固定機構は、中空体の表面上に載置される1つ以上のノブ、および中空体（例えば、カテーテル）が脊髄から滑り落ちることを防止するために1つ以上のノブ上で調整可能な縫合されたりングを含有する。種々の実施形態において、流体アクセスポートは、リザーバを含む。幾つかの実施形態において、流体アクセスポートは、機械的ポンプ（例えば、注入ポンプ）を含む。幾つかの実施形態において、移植されるカテーテルは、リザーバ（例えば、ボーラス送達用）、または注入ポンプのいずれかに接続される。流体アクセスポートは、移植されても、外部であってもよい。

【0150】

幾つかの実施形態において、髄腔内投与は、腰椎穿刺（すなわち、緩徐ボーラス）によって、またはポート・カテーテル送達系（すなわち、注入またはボーラス）を介して行われてもよい。幾つかの実施形態において、カテーテルは、腰椎の弓板の間に挿入され、先端は、腱鞘空間に所望のレベル（一般にL3～L4）まで上方に螺入される。

【0151】

静脈内投与に対して、髄腔内投与に好適な単回用量体積は、典型的に小さい。典型的に、本発明による髄腔内送達は、CSFの組成ならびに対象の頭蓋内圧の均衡を維持する。幾つかの実施形態において、髄腔内送達は、対象からのCSFの対応する除去なしに行われる。幾つかの実施形態において、好適な単回用量体積は、例えば、約10mL、8mL、6mL、5mL、4mL、3mL、2mL、1.5mL、1mL、または0.5mL未満であってもよい。幾つかの実施形態において、好適な単回用量体積は、約0.5～5mL、0.5～4mL、0.5～3mL、0.5～2mL、0.5～1mL、1～3mL、1～5mL、1.5～3mL、1～4mL、または0.5～1.5mLであってもよい。幾つかの実施形態において、本発明による髄腔内送達は、最初に所望の量のCSFを除去するステップを伴う。幾つかの実施形態において、髄腔内投与前に、約10mL未満（例えば、約9mL未満、約8mL未満、約7mL未満、約6mL未満、約5mL未満、約4mL未満、約3mL未満、約2mL未満、約1mL未満）のCSFが最初に除去される。それらの事例において、好適な単回用量体積は、例えば、約3mL超、約4mL超、約5mL超、約6mL超、約7mL超、約8mL超、約9mL超、約10mL超、約15mL超、または約20mL超であってもよい。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

【0152】

種々の他のデバイスを使用して、治療的組成物の髄腔内投与を達成してもよい。例えば、所望の酵素を含有する製剤は、髄膜癌腫症に対する薬物を髄腔内投与するために一般的に使用されるOmmayaリザーバを使用して与えられてもよい（Lancet 2:983-84, 1963）。より具体的には、この方法において、脳室管が、前角に形成された孔を通じて挿入され、頭皮下に設置されたOmmayaリザーバに接続され、リザーバが皮下穿刺されて、リザーバ中に注射される、補充されている特定の酵素を髄腔内送達する。治療的組成物または製剤の、個体への髄腔内投与用の他のデバイスは、米国特許第6,217,552号に記載され、その内容全体は、それらがこれらのデバイスに関するため、参照により本明細書に組み込まれる。代替的に、薬物は、例えば、単回注射または連続注入によって、髄腔内に与えられてもよい。投薬治療は、単回用量投与または複数回用量の形態であってもよいことが理解されるべきである。

【0153】

注射用に、本発明の製剤は、液体溶液中に製剤化することができる。加えて、Naglu酵素は、固体形態で製剤化され、使用直前に再溶解または懸濁させられてもよい。凍結乾燥形態もまた含まれる。注射は、例えば、Naglu酵素のボーラス

10

20

30

40

50

注射または連続注入（例えば、注入ポンプを使用する）の形態であり得る。

【0154】

本発明の一実施形態において、NaGlu酵素は、側脳室注射によって対象の脳に投与される。注射は、例えば、対象の頭蓋骨に形成された穿頭孔を通じて行われてもよい。別の実施形態において、酵素および／または他の薬学的製剤は、外科的に挿入されるシャントを通じて対象の脳室中に投与される。例えば、注射は、より大きい、側脳室中へと行うことができる。幾つかの実施形態において、第3および第4のより小さい脳室中への注射もまた行うことができる。

【0155】

なおも別の実施形態において、薬学的組成物本発明において使用されるは、注射によって対象の大槽、または腰部中に投与される。

10

【0156】

本発明の方法の別の実施形態において、薬学的に許容される製剤は、本発明において使用される酵素または他の薬学的組成物の持続性送達、例えば、「緩徐放出」を対象に、薬学的に許容される製剤が対象に投与された後、少なくとも1、2、3、4週間、またはより長い一定期間にわたって提供する。

【0157】

本明細書で使用されるとき、「持続性送達」という用語は、体内での本発明の薬学的製剤の、投与後、一定期間、好ましくは少なくとも数日間、1週間、または数週間にわたる連続送達を指す。組成物の持続性送達は、例えば、酵素の経時的な継続的治療効果によって実証することができる（例えば、酵素の持続性送達は、対象における蓄積顆粒の量の継続的低減によって実証することができる）。代替的に、持続性送達酵素のは、体内の経時的な酵素の存在を検出することによって実証されてもよい。

20

【0158】

B. 静脈内送達

上で論じられるように、本発明の驚くべき特徴の1つは、本発明の組換えヒトNaGluタンパク質がまた、静脈内投与されるとき、血液脳関門（ BBB ）および脳表面を渡つて効果的かつ広範囲に拡散し、脳の深部を含む、脳の種々の層または領域を浸透可能であるということである。本発明の方法は、rhNaGluタンパク質を、既存のCNS送達方法によっては標的とすることが困難である、中枢神経系（ CNS ）の種々の組織、ニューロン、または細胞に効果的に送達する。更に、本発明の方法は、十分な量の組換えヒトNaGluタンパク質を、血流ならびに種々の末梢臓器および組織に送達する。

30

【0159】

しばしば医学的にIVブッシュまたはボーラス注射と称される「静脈内注射」は、シリンジが、IVアクセスデバイスに接続され、薬が、典型的に急速に、また時には、それが静脈に刺激または急速過ぎる効果を引き起こす場合、最大15分間の期間で直接注射される、投与経路を指す。一旦、薬品がIV管類の輸液流の中に注射されると、それが管類から患者へと達することを確実にする何らかの手段が存在しなければならない。通常、これは、輸液流が正常に流れ、それによって薬品を血流中へと運ぶことを可能にすることによって達成される。しかしながら、幾つかの事例において、薬品が血流中に進入することを容易にするために、「フラッシュ」と時に呼ばれる第2の輸液注射が、第1の注射に続いて使用される。

40

【0160】

「静脈内注入」は、薬が延長した一定期間にわたって送達される投与経路を指す。例えば、薬は、患者に、1～8時間の一定期間にわたって送達することができる。薬はまた、患者に、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、または約8時間の期間にわたって送達することもできる。静脈内注入を遂行するために、IV重力点滴またはIVポンプを使用することができる。IV注入は、患者が、ある特定の時点のみに薬を必要とし、電解質、血液糖、および水分損失を復元するもの等の、追加の静脈内輸液（例えば、ナトリウム

50

、塩化物、グルコース、またはそれらの任意の組み合わせを含有し得る水溶液)を必要としないときに、典型的に使用される。

【0161】

C. 標的組織

幾つかの実施形態において、本発明の rhNaGlu は、対象の中枢神経系 (CNS) に送達される。幾つかの実施形態において、本発明の rhNaGlu は、脳、脊髄、および / または末梢臓器の標的組織のうちの 1 つ以上に送達される。本明細書で使用されるとき、「標的組織」という用語は、治療されるべき NaGlu 関連疾患によって侵された任意の組織、または欠乏した NaGlu が通常発現される任意の組織を指す。幾つかの実施形態において、標的組織は、検出可能なまたは異常に高い量の酵素基質が、例えば、組織の細胞リソーム内、NaGlu 関連疾患を患有またはその影響を受けやすい患者において貯蔵される、組織を含む。幾つかの実施形態において、標的組織は、疾患関連病理、症状、または特徴を示す組織を含む。幾つかの実施形態において、標的組織は、欠乏した NaGlu が亢進したレベルで通常発現される、組織を含む。本明細書で使用されるとき、標的組織は、脳標的組織、脊髄標的組織、および / または末梢標的組織であってもよい。例となる標的組織が、下に更に詳細に記載される。

【0162】

D. 脳標的組織

一般に、脳は、異なる領域、層、および組織に分割され得る。例えば、髄膜組織は、脳を含む、中枢神経系を包囲する、膜の系である。髄膜は、硬膜、クモ膜、および軟膜を含む、3 つの層を含有する。一般に、髄膜および脳脊髄液の主な機能は、中枢神経系を保護することである。幾つかの実施形態において、本発明による治療用タンパク質は、髄膜 1 つ以上の層に送達される。

【0163】

脳は、大脳、小脳、および脳幹を含む、3 つの主な下位区分を有する。他の脳構造の上に位置する大脳半球は、皮質層で被覆される。大脳の下部に、大脳が上に結合される柄に類似した、脳幹が位置する。脳の後部、大脳の下、および脳幹の後ろに、小脳がある。

【0164】

脳の正中部付近および中脳の上に位置する、間脳は、視床、視床後部、視床下部、視床上部、視床前部 (prethalamus)、および視蓋前域を含有する。中脳 (midbrain) とも呼ばれる中脳 (mesencephalon) は、視蓋、被蓋野 (tegmentum)、脳室間膜 (ventricular mesocoeilia)、および大脳脚、赤核、および第 III 脳神経核を含有する。中脳は、視覚、聴覚、運動制御、睡眠 / 覚醒、注意力、および温度調節に関連する。

【0165】

脳を含む中枢神経系の組織の領域は、組織の深度に基づいて特徴付けることができる。例えば、CNS (例えば、脳) 組織は、表面もしくは浅部組織、中深度組織、および / または深部組織として特徴付けることができる。

【0166】

本発明によれば、本発明の rhNaGlu は、対象において治療されるべき特定の疾患に関連する、任意の適切な脳標的組織 (複数可) に送達されてもよい。幾つかの実施形態において、本発明の rhNaGlu は、表面または浅部脳標的組織に送達される。幾つかの実施形態において、本発明の rhNaGlu は、中深度脳標的組織に送達される。幾つかの実施形態において、本発明の rhNaGlu は、深部脳標的組織に送達される。幾つかの実施形態において、本発明の rhNaGlu は、表面もしくは浅部脳標的組織、中深度脳標的組織、および / または深部脳標的組織の組み合わせに送達される。幾つかの実施形態において、本発明の rhNaGlu は、脳の外表面の少なくとも 4 mm、5 mm、6 mm、7 mm、8 mm、9 mm、10 mm 以上下 (またはその内部) の深部脳組織に送達さ

10

20

30

40

50

れる。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

【0167】

幾つかの実施形態において、本発明の r h N a G l u は、大脳の 1 つ以上の表面または浅部組織に送達される。幾つかの実施形態において、大脳の標的とされる表面または浅部組織は、大脳の表面から 4 mm 以内に位置する。幾つかの実施形態において、大脳の標的とされる表面または浅部組織は、軟膜組織、大脳皮質リボン組織、海馬、ウィルヒョウ・ロビン腔、V R 腔内の血管、海馬、脳の下面上の視床下部の部分、視神経および視神経路、嗅球および突起、ならびにそれらの組み合わせから選択される。

【0168】

幾つかの実施形態において、本発明の r h N a G l u は、大脳の 1 つ以上の深部組織に送達される。幾つかの実施形態において、大脳の標的とされる表面または浅部組織は、大脳の表面の少なくとも 4 mm (例えば、5 mm、6 mm、7 mm、8 mm、9 mm、または 10 mm) 下 (またはその内部) に位置する。幾つかの実施形態において、大脳の標的とされる深部組織は、大脳皮質リボンを含む。幾つかの実施形態において、大脳の標的とされる深部組織は、間脳 (例えば、視床下部、視床、視床前部、または視床腹部) 、後脳、レンズ核、基底核、尾状、被殻、扁桃体、淡蒼球、およびそれらの組み合わせのうちの 1 つ以上を含む。

【0169】

幾つかの実施形態において、本発明の r h N a G l u は、小脳の 1 つ以上の組織に送達される。ある特定の実施形態において、小脳の標的とされる 1 つ以上の組織は、分子層の組織、ブルキン工細胞層の組織、顆粒細胞層の組織、小脳脚、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。幾つかの実施形態において、治療剤 (例えば、酵素) は、ブルキン工細胞層の組織、顆粒細胞層の組織、深部小脳白質組織 (例えば、顆粒細胞層に対する深部) 、および深部小脳核組織を含むが、これらに限定されない、小脳の 1 つ以上の深部組織に送達される。

【0170】

幾つかの実施形態において、本発明の r h N a G l u は、脳幹の 1 つ以上の組織に送達される。幾つかの実施形態において、脳幹の標的とされる 1 つ以上の組織は、脳幹白質組織および / または脳幹核組織を含む。

【0171】

幾つかの実施形態において、本発明の r h N a G l u は、灰白質、白質、脳室周囲部、軟膜 / モ膜、髓膜、新皮質、小脳、大脳皮質における深部組織、分子層、尾状 / 被殻領域、中脳、橋または髓質の深部の領域、およびそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない、種々の脳組織に送達される。

【0172】

幾つかの実施形態において、本発明の r h N a G l u は、ニューロン、グリア細胞、血管周囲細胞、および / または髓膜細胞を含むが、これらに限定されない、脳内の種々の細胞に送達される。幾つかの実施形態において、治療用タンパク質は、深部白質の乏突起膠細胞に送達される。

【0173】

E. 脊髄標的組織

一般に、脊髄の領域または組織は、組織の深度に基づいて特徴付けることができる。例えば、脊髄組織は、表面もしくは浅部組織、中深度組織、および / または深部組織として特徴付けることができる。

【0174】

幾つかの実施形態において、本発明の r h N a G l u は、脊髄の 1 つ以上の表面または浅部組織に送達される。幾つかの実施形態において、脊髄の標的とされる表面または浅部組織は、脊髄の表面から 4 mm 以内に位置する。幾つかの実施形態において、脊髄の標的と

10

20

30

40

50

される表面または浅部組織は、軟膜および／または白質路を含有する。

【0175】

幾つかの実施形態において、本発明の r h N a G 1 u は、脊髄の 1 つ以上の深部組織に送達される。幾つかの実施形態において、脊髄の標的とされる深部組織は、脊髄の表面から 4 mm 内部に位置する幾つかの実施形態において、脊髄の標的とされる深部組織は、脊髄灰白質および／または上皮細胞を含有する。

【0176】

幾つかの実施形態において、補充酵素（例えば、N a G 1 u 融合タンパク質）は、脊髄のニューロンに送達される。

10

【0177】

F. 末梢標的組織

本明細書で使用されるとき、末梢臓器または組織は、中枢神経系（C N S）の一部でない任意の臓器または組織を指す。末梢標的組織は、血液系、肝臓、腎臓、心臓、内皮、骨髄および骨髄由来の細胞、脾臓、肺、リンパ節、骨、軟骨、卵巣、ならびに精巣を含んでもよいが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、本発明の r h N a G 1 u は、末梢標的組織のうちの 1 つ以上に送達される。

【0178】

G. 生体分布および生体利用能

20

種々の実施形態において、一旦、標的組織に送達されると、本発明の r h N a G 1 u は、細胞内に局在化される。例えば、本発明の r h N a G 1 u は、標的細胞（例えば、プルキンエ細胞等のニューロン）のエクソン、軸索、リソソーム、ミトコンドリア、または空胞に局在化されてもよい。例えば、幾つかの実施形態において、本発明の r h N a G 1 u は、r h N a G 1 u が血管周囲腔に移動する（例えば、脈拍補助による対流機構によって）ような移行ダイナミクスを示す。加えて、投与されるタンパク質または酵素とニューロフィラメントとの会合に関する活性軸索輸送機構はまた、中枢神経系のより深部の組織中への本発明の r h N a G 1 u タンパク質の分布に寄与するか、あるいはそれを容易にし得る。

【0179】

30

幾つかの実施形態において、本発明により送達される本発明の r h N a G 1 u は、本明細書に記載される種々の標的組織内の治療上または臨床上有効レベルまたは活性を達成し得る。本明細書で使用されるとき、治療上または臨床上有効レベルまたは活性は、標的組織内の治療効果を付与するのに十分なレベルまたは活性である。治療効果は、客観的（すなわち、幾つかの試験またはマーカーによって測定可能）であっても、主観的（すなわち、対象が効果の指標または感じを提供する）であってもよい。例えば、治療上または臨床上有効レベルまたは活性は、標的組織内の疾患（例えば、G A G 蓄積）に関連する症状を寛解させるのに十分な酵素レベルまたは活性であってもよい。

【0180】

40

幾つかの実施形態において、本発明により送達される本発明の r h N a G 1 u は、標的組織内の対応する N a G 1 u 酵素の正常なレベルまたは活性の少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % である、酵素レベルまたは活性を達成し得る。幾つかの実施形態において、本発明により送達される本発明の r h N a G 1 u は、対照（例えば、治療なしでの内因性レベルまたは活性）と比較して、少なくとも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、または 10 倍増加する、酵素レベルまたは活性を達成し得る。幾つかの実施形態において、本発明により送達される r h N a G 1 u は、標的組織内で少なくともおよそ 10 nmol / 時間 / mg、20 nmol / 時間 / mg、40 nmol / 時間 / mg、50 nmol / 時間 / mg、60 nmol / 時間 / mg、70 nmol / 時間 / mg、80 nmol / 時間 / mg、90 nm

50

0.1 / 時間 / mg、100 nmol / 時間 / mg、150 nmol / 時間 / mg、200 nmol / 時間 / mg、250 nmol / 時間 / mg、300 nmol / 時間 / mg、350 nmol / 時間 / mg、400 nmol / 時間 / mg、450 nmol / 時間 / mg、500 nmol / 時間 / mg、550 nmol / 時間 / mg、または600 nmol / 時間 / mg の増加した酵素レベルまたは活性を達成し得る。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

【0181】

幾つかの実施形態において、本発明による発明的方法は、化腰椎領域を標的とするのに特に有用である。幾つかの実施形態において、本発明により送達される rhNaGlu は、腰椎の領域において、少なくともおよそ 500 nmol / 時間 / mg、600 nmol / 時間 / mg、700 nmol / 時間 / mg、800 nmol / 時間 / mg、900 nmol / 時間 / mg、1000 nmol / 時間 / mg、1500 nmol / 時間 / mg、2000 nmol / 時間 / mg、3000 nmol / 時間 / mg、4000 nmol / 時間 / mg、5000 nmol / 時間 / mg、6000 nmol / 時間 / mg、7000 nmol / 時間 / mg、8000 nmol / 時間 / mg、9000 nmol / 時間 / mg、または 10,000 nmol / 時間 / mg の増加した酵素レベルまたは活性を達成し得る。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

【0182】

一般に、本発明により送達される治療剤（例えば、rhNaGlu）は、CSF ならびに脳、脊髄、および末梢臓器の標的組織において、十分に長い半減期を有する。幾つかの実施形態において、本発明により送達される rhNaGlu は、少なくともおよそ 30 分間、45 分間、60 分間、90 分間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、8 時間、9 時間、10 時間、12 時間、16 時間、18 時間、20 時間、25 時間、30 時間、35 時間、40 時間、最大 3 日間、最大 7 日間、最大 14 日間、最大 21 日間、または最大 1 ヶ月の半減期を有し得る。幾つかの実施形態において、幾つかの実施形態において、本発明により送達される rhNaGlu は、投与の 12 時間、24 時間、30 時間、36 時間、42 時間、48 時間、54 時間、60 時間、66 時間、72 時間、78 時間、84 時間、90 時間、96 時間、102 時間、または 1 週間後に、CSF または血流中で検出可能なレベルまたは活性を保持してもよい。検出可能なレベルまたは活性は、当該技術分野で既知の種々の方法を使用して決定してもよい。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

ある特定の実施形態において、本発明により送達される rhNaGlu は、投与後（例えば、対象への薬学的組成物の投与後 1 週間、3 日間、48 時間、36 時間、24 時間、18 時間、12 時間、8 時間、6 時間、4 時間、3 時間、2 時間、1 時間、30 分間、またはそれ未満）に、対象の CNS 組織および細胞中で少なくとも 30 μg / mL の濃度を達成する。ある特定の実施形態において、本発明により送達される rhNaGlu は、かかる対象への投与後（例えば、対象へのかかる薬学的組成物の投与後 1 週間、3 日間、48 時間、36 時間、24 時間、18 時間、12 時間、8 時間、6 時間、4 時間、3 時間、2 時間、1 時間、30 分間、またはそれ未満）に、対象の標的とされる組織または細胞（例えば、脳組織またはニューロン）中で少なくとも 2 μg / mL、少なくとも 15 μg / mL、少なくとも 1 μg / mL、少なくとも 7 μg / mL、少なくとも 5 μg / mL、少なくとも 2 μg / mL、少なくとも 1 μg / mL または少なくとも 0.5 μg / mL の濃度を達成する。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

【0183】

H. サンフィリポ症候群の治療

サンフィリポ症候群、またはムコ多糖症 I II (MPS I II) は、グリコサミノグリカン (GAG) の分解に関与する酵素の欠乏によって特徴付けられる、まれな遺伝子障害

10

20

30

40

50

である。酵素の不在下で、部分的に分解されたGAG分子は、身体から除去することができず、種々の組織のリソーム内に蓄積して、進行性の広範囲の全身機能不全をもたらす(Neufeld and Muenzer, 2001)。

【0184】

MPS IIIA、B、C、およびDと表記される、MPS IIIの4つの特有の型が特定されている。各々は、GAGヘパラン硫酸塩の分解に関する4つの酵素のうちの1つにおける欠乏症を表す。全ての型は、粗い顔立ち、肝脾腫大、角膜混濁、および骨格変形を含む、様々な程度の同じ臨床症状を含む。しかしながら、最も顕著には、ニューロンにおけるヘパラン硫酸塩の蓄積のみでなく、一次GAG蓄積によって引き起こさるガングリオシドGM2、GM3、およびGD2のその後の亢進(Walkley 1998)にも関係する、重度かつ進行性の認知能力の喪失である。

【0185】

ムコ多糖症IIIB型(MPS IIIB、サンフィリポ症候群B)は、酵素アルファ-N-アセチル-グルコサミニダーゼ(NaGlu)の欠乏によって特徴付けられる、常染色体劣性障害である。この酵素の不在下で、GAGヘパラン硫酸塩は、ニューロンおよびグリア細胞のリソームに蓄積し、脳の外側での蓄積はそれより低い。

【0186】

この障害の決定的な臨床特徴は、主な発達の重要な段階の喪失またはその到達の失敗をもたらす、中枢神経系(CNS)変性である。進行性の認知低下は、痴呆症および若年死に至る。疾患は、典型的に、幼児において現れ、侵された個体の寿命は、一般に、10代後半から20代前半を越えては延長しない。

10

20

【0187】

本発明の組成物および方法を使用して、サンフィリポ症候群Bを患うまたはその影響を受けやすい個体を効果的に治療してもよい。本明細書で使用される「治療する」または「治療」という用語は、疾患に関連する1つ以上の症状の寛解、疾患の1つ以上の症状の発症の予防もしくは遅延、および/または疾患の1つ以上の症状の重症度もしくは頻度を減らすことを指す。

【0188】

幾つかの実施形態において、治療は、サンフィリポ症候群B患者における、部分的もしくは完全な緩和、寛解、軽減、阻害、発症の遅延、重症度および/または神経障害の発生率の低減を指す。本明細書で使用されるとき、「神経障害」という用語は、中枢神経系(例えば、脳および脊髄)の障害に関連する種々の症状を含む。神経障害の症状は、とりわけ、例えば、発達遅延、進行性の認知機能障害、聴力損失、障害言語発達、運動技能の不足、多動性、攻撃性、および/または睡眠障害を含んでもよい。

30

【0189】

故に、幾つかの実施形態において、治療は、種々の組織内の減少したリソーム蓄積(例えば、GAGの)を指す。幾つかの実施形態において、治療は、脳標的組織、脊髄ニューロン、および/または末梢標的組織内の減少したリソーム蓄積を指す。ある特定の実施形態において、リソーム蓄積は、対照と比較して、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、またはそれを超えて減少する。幾つかの実施形態において、リソーム蓄積は、対照と比較して、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍減少する。幾つかの実施形態において、リソーム蓄積は、LAMP-1染色によって決定される。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

40

【0190】

幾つかの実施形態において、治療は、ニューロン(例えば、ブルキンエ細胞を含有するニューロン)における低減された空胞形成を指す。ある特定の実施形態において、ニューロンにおける空胞形成は、対照と比較して、約5%、10%、15%、20%、25%、3

50

0 %、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、またはそれを超えて減少する。幾つかの実施形態において、空胞形成は、対照と比較して、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍減少する。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

【0191】

幾つかの実施形態において、治療は、種々の組織内の増加したNaGlu酵素活性を指す。幾つかの実施形態において、治療は、脳標的組織、脊髄ニューロン、および/または末梢標的組織内の増加したNaGlu酵素活性を指す。幾つかの実施形態において、NaGlu酵素活性は、対照と比較して、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、またはそれを超えて増加する。幾つかの実施形態において、NaGlu酵素活性は、対照と比較して、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍増加する。幾つかの実施形態において、増加したNaGlu酵素活性は、少なくともおよそ10nmol/時間/mg、20nmol/時間/mg、40nmol/時間/mg、50nmol/時間/mg、60nmol/時間/mg、70nmol/時間/mg、80nmol/時間/mg、90nmol/時間/mg、100nmol/時間/mg、150nmol/時間/mg、200nmol/時間/mg、250nmol/時間/mg、300nmol/時間/mg、350nmol/時間/mg、400nmol/時間/mg、450nmol/時間/mg、500nmol/時間/mg、550nmol/時間/mg、600nmol/時間/mg、またはそれを超える。幾つかの実施形態において、NaGlu酵素活性は、腰椎領域において増加する。幾つかの実施形態において、腰椎領域において増加したNaGlu酵素活性は、少なくともおよそ2000nmol/時間/mg、3000nmol/時間/mg、4000nmol/時間/mg、5000nmol/時間/mg、6000nmol/時間/mg、7000nmol/時間/mg、8000nmol/時間/mg、9000nmol/時間/mg、10,000nmol/時間/mg、またはそれを超える。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

10

20

30

【0192】

ある特定の実施形態において、本発明による治療は、NaGlu関連疾患に関連する1つ以上の病理学的または生物学的マーカーの存在、あるいはその蓄積の低減（例えば、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、97.5%、99%、またはそれを超える低減）または完全な排除をもたらす。かかる低減または排除は、CNSの細胞および組織（例えば、ニューロンおよび乏突起膠細胞）内で特に明白であり得る。例えば、幾つかの実施形態において、対象に投与されると、本発明の薬学的組成物は、対象のCNS細胞および組織（例えば、大脳皮質、小脳、尾状核および被殻、白質および/または視床）内の、バイオマーカーであるリソソーム関連膜タンパク質1（LAMP1）の蓄積における低減を実証または達成する。LAMP1は、リソソーム膜内で高度に発現される糖タンパク質であり、その存在は、リソソーム蓄積障害を有する多くの患者において亢進される（Meikle et al., Clin. Chem. (1997) 43: 1325-1335）。リソソーム蓄積疾患を有する患者におけるLAMP1の存在または不在（例えば、LAMP染色によって決定される）は、したがって、リソソーム活性の有用な指標ならびにリソソーム蓄積疾患の診断および監視の両方のためのマーカーを提供し得る。

40

【0193】

したがって、本発明の幾つかの実施形態は、NaGlu関連疾患に関連する1つ以上の病理学的または生物学的マーカーの存在または蓄積を低減あるいは排除する方法に関する。同様に、本発明の幾つかの実施形態は、リソソーム蓄積疾患に関連する1つ以上の病理学

50

的または生物学的マーカー（例えば、LAMP1）の分解（または分解速度）を増加させる方法に関する。

【0194】

幾つかの実施形態において、治療は、認知能力の喪失の減少した進行を指す。ある特定の実施形態において、認知能力の喪失の進行は、対照と比較して、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、またはそれを超えて減少する。幾つかの実施形態において、治療は、減少した発達遅延を指す。ある特定の実施形態において、発達遅延は、対照と比較して、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、またはそれを超えて減少する。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

10

【0195】

幾つかの実施形態において、治療は、増加した生存率（例えば、生存時間）を指す。例えば、治療は、患者の増加した余命をもたらすことができる。幾つかの実施形態において、本発明による治療は、治療なしでの同様の疾患を有する1人以上の対照個体の平均余命と比較して、約5%超、約10%超、約15%超、約20%超、約25%超、約30%超、約35%超、約40%超、約45%超、約50%超、約55%超、約60%超、約65%超、約70%超、約75%超、約80%超、約85%超、約90%超、約95%超、約100%超、約105%超、約110%超、約115%超、約120%超、約125%超、約130%超、約135%超、約140%超、約145%超、約150%超、約155%超、約160%超、約165%超、約170%超、約175%超、約180%超、約185%超、約190%超、約195%超、約200%超、またはそれを超えて、患者の増加した余命をもたらす。幾つかの実施形態において、本発明による治療は、治療なしでの同様の疾患を有する1つ以上の対照個体の平均余命と比較して、約6ヶ月超、約7ヶ月超、約8ヶ月超、約9ヶ月超、約10ヶ月超、約11ヶ月超、約12ヶ月超、約2年超、約3年超、約4年超、約5年超、約6年超、約7年超、約8年超、約9年超、約10年超、またはそれを超えて、患者の増加した余命をもたらす。幾つかの実施形態において、本発明による治療は、患者の長期生存率をもたらす。本明細書で使用されるとき、「長期生存率」という用語は、約40年よりも長い、約45年よりも長い、約50年よりも長い、約55年よりも長い、約60年よりも長い、またはより長い生存時間または余命を指す。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

20

【0196】

本明細書で使用される「改善する」、「増加させる」、または「低減する」という用語は、対照と比べた値を示す。幾つかの実施形態において、好適な対照は、本明細書に記載される治療の開始前の同じ個体における測定値、本明細書に記載される治療の不在下でのある対照個体（または複数の対照個体）における測定値等の、ベースライン測定値である。「対照個体」は、サンフィリポ症候群Bに罹患した個体は、（治療される個体および対照個体（複数可）における病期が同等であることを確実にするために）治療されている個体とおよそ同年齢および/または性別である。

30

【0197】

治療されている個体（「患者」または「対象」とも称される）は、サンフィリポ症候群Bを有するまたはサンフィリポ症候群Bを発症する可能性を有する個体（胎児、幼児、小児、青年、または成人のヒト）である。個体は、残存の内因性NAG1u発現および/もしくは活性を有するか、または測定可能な活性を有しない場合がある。例えば、サンフィリポ症候群Bを有する個体は、正常なNAG1u発現レベルの約30～50%未満、約25～30%未満、約20～25%未満、約15～20%未満、約10～15%未満、約5～10%未満、約0.1～5%未満であるNAG1u発現レベルを有し得る。上に列挙

40

50

される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

【0198】

幾つかの実施形態において、個体は、その疾患であると最近診断された個体である。典型的に、疾患の影響を最小限に抑え、治療の便益を最大限にするために、早期治療（診断後可能な限り速やかに開始する治療）が重要である。

【0199】

I. 併用療法

組換えヒトNaGluタンパク質、例えば、十分な量のオリゴ糖（例えば、マンノースおよびリン酸化マンノース（すなわち、M6P））を含有する組換えヒトNaGluタンパク質は、NaGlu関連疾患（例えば、サンフィリポ症候群B）を治療するために単独でまたは組み合わせて使用され得る。本発明の組換えヒトNaGluタンパク質は、単独で、あるいは追加の処置、例えば、外科的処置、または薬剤、例えば、治療剤、追加の処置、もしくはその意図される目的のために当業者によって選択されている薬剤と組み合わせて使用され得ることが理解されるべきである。例えば、追加の処置または薬剤は、本発明の組換えヒトNaGluタンパク質によって治療されている疾患または病態を治療するのに有用であるとして当該技術分野で認識される、治療的処置または薬剤であり得る。追加の処置または薬剤はまた、治療的組成物に有益な属性を付与する薬剤、例えば、組成物の粘度に影響を及ぼす薬剤もあり得る。

10

【0200】

本発明内に含まれる組み合わせは、それらの意図される目的のために有用な組み合わせであることもまた理解されるべきである。下に記載される薬剤および処置は、例示目的のためのものであり、本発明に対して限定的であるようには意図されない。本発明の一部である、組み合わせは、本発明の組換えヒトNaGluタンパク質および下の一覧から選択される少なくとも1つの追加の薬剤または処置であり得る。その組み合わせが、形成された組成物がその意図される機能を行うことができるようなものである場合、組み合わせはまた、1つを超える追加の薬剤または処置、例えば、2つまたは3つの追加の薬剤を含むこともできる。

20

【0201】

併用療法は、外科的処置、遺伝子療法、または酵素補充療法を含むことができる。更に、組換えヒトNaGluタンパク質は、1つ以上の追加の治療剤、例えば、未分解の基質の蓄積を予防または抑制可能である（例えば、基質抑制療法）他の組換えタンパク質または抗体または薬物と共に製剤化（coformulated）することができる。

30

【0202】

1つ以上の実施形態において、併用療法は、下に更に詳細に論じられるように、免疫抑制剤との共投与を含むことができる。例えば、アナフィラキシー反応または有害な免疫応答が、患者によって予想されるかまたは経験される場合、抗ヒスタミン剤、コルチコステロイド、シロリムス、ボクロスボリン、シクロスボリン、メトトレキサート、IL-2受容体指向性抗体、T細胞受容体指向性抗体、TNF-アルファ指向性抗体または融合タンパク質（例えば、インフリキシマブ、エタネルセプト、またはアダリムマブ）、CTLA-4-Ig（例えば、アバタセプト）、抗OX-40抗体等であるが、これらに限定されない、免疫抑制剤もまた、組換えヒトNaGluタンパク質等の組換えヒトタンパク質の投与の前、その最中、またはその後に投与することができる。

40

【0203】

J. 免疫原性

本発明の薬学的組成物は、それらの認容性によって特徴付けられる。本明細書で使用されるとき、「容認できる」とおよび「認容性」という用語は、かかる組成物が投与される対象において有害反応を引き出さない、あるいはかかる組成物が投与される対象において重大

50

な有害反応を引き出さない、本発明の薬学的組成物の能力を指す。幾つかの実施形態において、本発明の薬学的組成物は、かかる組成物が投与される対象によって十分に容認される。

【0204】

一般に、本発明によるrhNagluタンパク質の投与は、対象において重度の有害作用をもたらさない。本明細書で使用されるとき、重度の有害作用は、実質的な免疫応答、毒性、または死を誘発するが、これらに限定されない。本明細書で使用されるとき、「実質的な免疫応答」という用語は、適応T細胞免疫応答等の、重度のまたは重大な免疫応答を指す。

【0205】

故に、多くの実施形態において、本発明による発明的方法は、並行の免疫抑制剤療法（すなわち、前治療／プレコンディショニングとして、または方法と並行して使用される、任意の免疫抑制剤療法）を伴わない。幾つかの実施形態において、本発明による発明的方法は、治療されている対象における免疫寛容誘導を伴わない。幾つかの実施形態において、本発明による発明的方法は、T細胞免疫抑制剤を使用する、対象の前治療またはプレコンディショニングを伴わない。

【0206】

しかしながら、幾つかの実施形態において、対象は、本発明のrhNagluを投与された後に免疫応答を始める。故に、幾つかの実施形態において、本発明のrhNagluを受ける対象を、酵素補充療法に対して認容性があるようにすることが有用であり得る。免疫寛容は、当該技術分野で既知の種々の方法を使用して導入されてもよい。例えば、低用量の所望の補充酵素の毎週の髄腔内注入と組み合わせて、シクロスボリンA（CsA）等のT細胞免疫抑制剤およびアザチオプリン（Azta）等の抗増殖剤の最初の30～60日間のレジメンが使用されてもよい。

【0207】

当業者に既知の任意の免疫抑制剤が、本発明の併用療法と一緒に利用されてもよい。かかる免疫抑制剤には、シクロスボリン、FK506、ラパマイシン、CTLA4-Ig、およびエタネルセプト等の抗TNF薬剤が含まれるが、これらに限定されない（例えば、M oder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284、Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150、Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230、Ideguchi et al., 2000, Neuroscience 95, 217-226、Potter et al., 1999, Ann. N.Y. Acad. Sci. 875, 159-174、Slavik et al., 1999, Immunol. Res. 19, 1-24、Gaziev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696、Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220、Gummert et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380、Qi et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283を参照されたい）。移植患者において有効であることが実証されている、抗IL2受容体（-サブユニット）抗体ダクリズマブ（例えば、Zenapax（商標））もまた、免疫抑制剤として使用することができる（例えば、Wiseman et al., 1999, Drugs 58, 1029-1042、Beniaminovitz et al., 2000, N. Engl. J. Med. 342, 613-619、Ponticelli et al., 1999, Drugs R. D. 1, 55-60、Berard et al., 1999, Pharmacotherapy 19, 1127-1137、Eckhoff et al., 2000, Transplantation 69, 1867-1872、Ekberg et al., 2000, Transpl. 50

10

20

30

40

50

Int. 13, 151-159を参照されたい)。追加の免疫抑制剤には、抗CD2 (Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596、Przeplorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071)、抗CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644、Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152)、および抗CD40リガンド (Hong et al., 2000, Semin. Nephrol. 20, 108-125、Chirmule et al., 2000, J. Virol. 74, 3345-3352、Ito et al., 2000, J. Immunol. 164, 1230-1235) が含まれるが、これらに限定されない。 10

【0208】

他の実施形態において、本発明は、本発明のNaGluタンパク質と、NaGluタンパク質に対する免疫応答を減少または抑制する薬剤、例えば、免疫抑制剤との共投与を含む方法を含む。例えば、アナフィラキシー反応または有害な免疫応答が、患者によって予想されるかまたは経験される場合、抗ヒスタミン剤、コルチコステロイド、シロリムス、ボクロスボリン、シクロスボリン、メトトレキサート、IL-2受容体指向性抗体、T細胞受容体指向性抗体、TNF-アルファ指向性抗体または融合タンパク質(例えば、インフリキシマブ、エタネルセプト、またはアダリムマブ)、CTL4-Ig(例えば、アバタセプト)、抗OX-40抗体等であるが、これらに限定されない、免疫抑制剤もまた、組換えヒトNaGluタンパク質等の組換えヒトタンパク質の投与の前、その最中、またはその後に投与することができる。 20

【0209】

一実施形態において、本発明は、本発明による組換えタンパク質の投与によって招かれる場合がある、任意の潜在的なアナフィラキシー反応を最小化または予防するための前治療処置を提供する。一実施形態において、潜在的なアナフィラキシー反応を予防するために、抗ヒスタミン剤(例えば、ジフェンヒドラミン)としても知られるH-1受容体アンタゴニストが、患者に投与される。一実施形態において、H-1受容体アンタゴニストは、体重1キログラム当たり約1mg～約10mgの用量で投与される。例えば、抗ヒスタミン剤は、1キログラム当たり約5mgの用量で投与することができる。一実施形態において、抗ヒスタミン剤は、体重1キログラム当たり約0.1mg～約10mgの用量で投与される。一実施形態において、抗ヒスタミン剤は、体重1キログラム当たり約1mg～約5mgの用量で投与される。例えば、用量は、体重1キログラム当たり1mg、2mg、3mg、4mg、または5mgであり得る。抗ヒスタミン剤は、任意の有用な方法によって投与することができる。一実施形態において、抗ヒスタミン剤は、静脈内投与される。別の実施形態において、抗ヒスタミン剤は、薬学的に許容されるカプセル中で投与される。 30

【0210】

抗ヒスタミン剤の投与は、本発明による組換えNaGluの投与前であり得る。一実施形態において、H-1受容体アンタゴニストは、組換えNaGluの投与の約10～約90分、例えば、約30～約60分前に投与される。H-1受容体アンタゴニストは、血管アクセスポートに接続された携行式システムを使用して投与することができる。一実施形態において、抗ヒスタミン剤は、組換えNaGluの投与の約90分前に投与される。一実施形態において、抗ヒスタミン剤は、組換えNaGluの投与の約10～約60分前に投与される。別の実施形態において、抗ヒスタミン剤は、組換えNaGluを投与する約20～約40分前に投与される。例えば、抗ヒスタミン剤は、組換えNaGluの投与の20、25、30、35、または40分前に投与することができる。 40

【0211】

一実施形態において、投与される抗ヒスタミン剤は、ジフェンヒドラミンである。任意の有用な抗ヒスタミン剤を使用することができる。かかる抗ヒスタミン剤には、限定なしに 50

、クレマスチン、ドキシラミン、ロラチジン、デスロラチジン、フェキソフェナジン、フェニラミン、セチリジン、エバスチン、プロメタジン、クロルフェニラミン、レボセチリジン、オロパタジン、クエチアピン、メクリジン、ジメンヒドリナート、エンプラミン、ジメチンドン (dimethidine) 、およびデキスクロルフェニラミン (dexchloropheniramine) が含まれる。

【0212】

別の実施形態において、静脈内注入を参照して、アナフィラキシー反応に対する可能性は、ランプアッププロトコルを使用して注入を投与することによって、低減することができる。この関連において、ランプアッププロトコルは、患者を薬の注入に対して脱感作するために、注入速度を、注入経過にわたって緩徐に増加させることを指す。

10

【0213】

K. 投与

本発明の方法は、治療上有効量の、本明細書に記載される本発明の rhNaGlu の単回ならびに複数回投与を企図する。本発明の rhNaGlu は、対象の病態の性質、重症度、および範囲に応じて、定期間隔で投与することができる。幾つかの実施形態において、治療上有効量の本発明の rhNaGlu タンパク質は、定期間隔で（例えば、年に1回、6ヶ月に1回、5ヶ月に1回、3ヶ月に1回、隔月（2ヶ月に1回）、毎月（1ヶ月に1回）、隔週（2週間に1回）、または毎週）、周期的に静脈内または髄腔内投与されてもよい。

20

【0214】

幾つかの実施形態において、髄腔内投与は、他の投与経路（例えば、静脈内、皮下に、筋肉内に、非経口で、経皮的に、または経粘膜的に（例えば、経口でまたは経鼻的に））と併用されてもよい。幾つかの実施形態において、それらの他の投与経路（例えば、静脈内投与）は、隔週、毎月、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、4ヶ月に1回、5ヶ月に1回、6ヶ月に1回、毎年の投与にすぎない頻度で行われてもよい。

【0215】

本明細書で使用されるとき、「治療上有効量」という用語は、概して、本発明の薬学的組成物中に含有される治療剤の総量に基づいて決定される。一般に、治療上有効量は、対象にとって意義のある便益（例えば、根底にある疾患または病態を治療すること、調節すること、治癒させること、予防すること、および／または寛解させること）を達成するのに十分である。例えば、治療上有効量は、リソソーム酵素受容体またはそれらの活性を調節して、それによってかかるリソソーム蓄積疾患またはその症状を治療する（例えば、対象への本発明の組成物の投与後の「ゼブラ小体」または細胞空胞形成の存在または発生率における低減またはその排除）のに十分な量等の、所望の治療的および／または予防的効果を達成するのに十分な量であってもよい。一般に、必要性のある対象に投与される治療剤（例えば、本発明の rhNaGlu ）の量は、対象の特性に依存するであろう。かかる特性には、対象の病態、疾患重症度、全般的な健康、年齢、性別、および体重が含まれる。当業者であれば、これらのおよび他の関連する要因に応じて、適切な投薬量を容易に決定可能であろう。加えて、客観的アッセイおよび主観的アッセイの両方を任意に利用して、最適な投薬範囲を特定してもよい。

30

【0216】

治療上有効量は、一般的に、複数回単位用量を含み得る投薬レジメンにおいて投与される。任意の特定の治療用タンパク質について、治療上有効量（および／または有効な投薬レジメン内の適切な単位用量）は、例えば、投与経路、他の薬学的薬剤との組み合わせに応じて、変動し得る。また、任意の特定の患者のための特定の治療上有効量（および／または単位用量）は、治療されている障害および障害の重症度；利用される特定の薬学的薬剤の活性；利用される特定の組成物；患者の年齢、体重、全般的な健康、性別、および食生活；利用される特定の融合タンパク質の投与時間、投与経路、および／または排泄もしくは代謝速度；治療の持続期間；ならびに医療技術分野で周知である同様の要因を含む、様

40

50

々な要因に依存してもよい。

【0217】

幾つかの実施形態において、治療上有効用量は、約0.005mg/kg体重～500mg/kg体重、例えば、約0.005mg/kg体重～400mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～300mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～200mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～100mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～90mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～80mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～70mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～60mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～50mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～40mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～30mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～25mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～20mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～15mg/kg体重、約0.005mg/kg体重～10mg/kg体重 (bra) 身体の重量の範囲である。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値 (例えば、10～50mg/kg、1～5mg/kg、2～8mg/kg、5～10mg/kg、0.1～10mg/kg、0.3～30mg/kg、0.3～50mg/kg、0.5～10mg/kg、5～30mg/kg、または6～27mg/kg) もまた、本発明の一部であるように企図される。

【0218】

幾つかの実施形態において、治療上有効用量は、約0.1mg/kg体重以上、約0.2mg/kg体重以上、約0.3mg/kg体重以上、約0.4mg/kg体重以上、約0.5mg/kg体重以上、約1.0mg/kg体重以上、約3mg/kg体重以上、約5mg/kg体重以上、約6mg/kg体重以上、約7mg/kg体重以上、約10mg/kg体重以上、約15mg/kg体重以上、約20mg/kg体重以上、約30mg/kg体重以上、約40mg/kg体重以上、約50mg/kg体重以上、約60mg/kg体重以上、約70mg/kg体重以上、約80mg/kg体重以上、約90mg/kg体重以上、約100mg/kg体重以上である。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

【0219】

幾つかの実施形態において、治療上有効用量はまた、mg/kg脳重量によって定義されてもよい。当業者であれば、脳重量および体重が相関し得ることを理解するであろう (例えば、Dekaban AS. "Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights," Ann Neurol 1978; 4:345-56を参照されたい)。

【0220】

幾つかの実施形態において、治療上有効用量はまた、mg/CSF 15ccによって定義されてもよい。当業者であれば、脳重量および体重に基づく治療上有効用量がmg/CSF 15ccに変換され得ることを理解するであろう。例えば、成人のヒトにおけるCSFの体積は、およそ150mLである (Johanson CE, et al. "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease," Cerebrospinal Fluid Res. 2008 May 14; 5: 10)。したがって、成人への0.1mg～50mgタンパク質の単回用量注射は、成人においておよそ0.01mg/CSF 15cc (0.1mg)～5.0mg/CSF 15cc (50mg) 用量であろう。

【0221】

任意の特定の対象に対して、特定の投薬レジメンは、個体の必要性、および酵素補充療法の施与を管理または監督している者の専門家としての判断に従って、経時的に調整されるべきであること、ならびに本明細書に記載される投薬範囲は、例となるものにすぎず、特

10

20

30

40

50

許請求される本発明の範囲または実施を限定するようには意図されないことを更に理解されたい。

【0222】

V I I I . キット

本発明は更に、本発明の組換えヒトNaGluを含有し、その再構築（凍結乾燥の場合）および／または使用のための指示書を提供する、キットまたは他の製品を提供する。キットまたは他の製品は、容器、カテーテル、ならびに髄腔内投与および関連する外科手術において有用な任意の他の物品、デバイス、または機器を含んでもよい。好適な容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ（例えば、プレフィルドシリンジ）、アンプル、カートリッジ、リザーバ、またはリオジェクトを含む。容器は、ガラスまたはプラスチック等の様々な材料から形成されてもよい。幾つかの実施形態において、容器は、プレフィルドシリンジである。好適なプレフィルドシリンジには、焼成シリコーンコーティングを含むホウケイ酸ガラスシリンジ、散布シリコーンを含むホウケイ酸ガラスシリンジ、またはシリコーンを含まないプラスチック樹脂シリンジが含まれるが、これらに限定されない。

【0223】

典型的に、容器上の、または容器に関連付けられたラベルは、使用および／または再構築のための指図を指定し得る。例えば、ラベルは、製剤が上述のタンパク質濃度に再構築されることを指定し得る。ラベルは、製剤が、例えば、静脈内または髄腔内投与に有用であるか、またはそのために意図されることを更に指定し得る。幾つかの実施形態において、容器は、補充酵素（例えば、組換えNaGluタンパク質）を含有する、安定な製剤の単回用量を含有してもよい。種々の実施形態において、安定な製剤の単回用量は、約15mL、10mL、5.0mL、4.0mL、3.5mL、3.0mL、2.5mL、2.0mL、1.5mL、1.0mL、または0.5mL未満の体積で存在する。代替的に、製剤を保有する容器は、製剤の反復投与（例えば、2～6回の投与）を可能にする、複数回使用バイアルであってもよい。キットまたは他の製品は、好適な希釈剤（例えば、BWF I、食塩水、緩衝食塩水）を含む、第2の容器を更に含んでもよい。希釈剤および製剤を混合すると、再構築された製剤中の最終タンパク質濃度は、一般に、少なくとも1mg/mL（例えば、少なくとも5mg/mL、少なくとも10mg/mL、少なくとも25mg/mL、少なくとも50mg/mL、少なくとも75mg/mL、少なくとも100mg/mL）となろう。

【0224】

キットまたは他の製品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、カテーテル、シリンジ、および使用のための指示書を有するパッケージ挿入物を含む、商業的およびユーザの立場から望ましい他の材料を更に含んでもよい。上に列挙される範囲および値に対して中間の範囲および値もまた、本発明の一部であるように企図される。

【実施例】

【0225】

以下の特定の実施例は、本発明を例示することを意図し、特許請求の範囲を制限するものとして解釈されるべきではない。本出願を通じて引用される全ての図、ならびに全ての参考文献、特許、および公開特許出願、ならびに図は、参照によりその全体が本明細書に明確に組み込まれる。

【0226】

実施例1

r h NaGluの精製

r h NaGluタンパク質を、当該技術分野で既知の方法を使用して精製した。r h NaGluを含有する卵白（EW）を、pH6で一晩可溶化し、遠心分離および／または深層濾過によって浄化した。EWを、1M NaOAc緩衝液（pH4）で、pH6に調整した。深層濾過プロセスについては、T2600フィルター（Pal1（商標）、40um）を、第1の濾過として使用し、次いで、PDF1（Pal1（商標）、K200P、15um+EKS、0.22um）を、第2の濾過ステップとして使用した。フィルター

10

20

30

40

50

は、各々のフィルターが 60 L EW / m² の最適化容積を有する、単回使用の膜である。膜の保持量は、T 2600 については 2 L / m² であり、PDF1 については 4 ~ 5 L / m² である。このプロセスでは、保持量は、濾過した EW を収集する前に廃棄した。膜保持量と同量の緩衝液 (20 mM リン酸 / 137 mM NaCl、pH 6) を使用して、フィルター上に残った EW を追跡した。

【0227】

フェニル-HIC (疎水性相互作用クロマトグラフィー) カラムを、捕捉ステップとして適用した。卵白タンパク質のほとんどが親水性であるため、卵白タンパク質の 99% は、HIC カラムを通過して、フロースルーに流れた。rhNaGlu は、フェニル-HIC に対してより高い疎水性結合を有する。

10

【0228】

rhNaGlu を含有する卵白を、30 : 1 の比率でカラムに充填した。充填が完了した後、カラムを、平衡緩衝液、5 mM リン酸緩衝液、pH 6、および 5 mM Tris 緩衝液、pH 7.2 で洗浄した。rhNaGlu を、30% プロピレン glycole、pH 7.2 で溶出した。充填が完了した後、カラムを、平衡緩衝液および 5 mM リン酸緩衝液 (pH 6) で洗浄した。rhNaGlu を、5 mM Tris 緩衝液 (pH 7.2) と 30% プロピレン glycole で溶出した。カラム結合容積は、およそ 4.5 mg / mL である。フェニル-HIC カラムを通した rhNaGlu の純度は、> 95% に達し得る (950 倍の増加)。回収率は、30% のプロピレン glycole 溶出で、およそ 80% である。

20

【0229】

溶出した rhNaGlu の画分を、1 M 酢酸で pH 5 に調整し、次いで Giagacap S カラムに充填した (EW : カラム寸法 = 10 : 1)。カラムを、50 mM NaOAc 緩衝液 (pH 5) で平衡化した。充填が完了した後、カラムを、平衡緩衝液で洗浄した。rhNaGlu を、50 mM NaOAc / 60 mM NaCl (pH 5) で溶出した。

【0230】

タンパク質の特徴付けを、精製した rhNaGlu を使用して行った。卵白から精製された rhNaGlu の分子量 (約 90 kDa) を、SDS-PAGE において分析した (図 6)。卵白中の rhNaGlu の平均発現レベルを、図 7 に示す。遺伝子導入鳥類から產生される rhNaGlu の特徴を、表 2 に要約する。

30

【表 2】

	rhNaGlu (野鶏属)
見掛けの分子量	約 90kDa
pI	6.1 ~ 6.9
pH 安定性	pH 5 ~ 8
卵白中での安定性	>50 日

40

【0231】

実施例 2

卵白中の rhNaGlu の安定性

産卵 7 日後に、1 つの卵を割り、活性について分析した。内容物を半分に分割し、各々半分を、標準的な卵白浄化に供した。無処置および浄化の両方の卵白を、アリコートに分け、酵素活性安定性のために、4 および -20 で保管した。卵白中の rhNaGlu は、少なくとも 50 日まで、安定な酵素活性を示した。

【0232】

50

凍結 / 解凍サイクルの安定性を評価した。精製した *r h N a G l u* を、10秒間液体窒素中で凍結させ、37℃で2分間解凍した。酵素活性は、10回のサイクルの間、変化を示さなかった。

精製した *r h N a G l u* を、異なる pH 緩衝液中に透析し、純粋な酵素の安定性を測定した。結果は、純粋な *r h N a G l u* が、pH 5 ~ 8 で 12 日間安定であったことを示した。

【 0 2 3 3 】

実施例 3

オリゴ糖のプロフィール分析

10

マンノース - 6 - リン酸塩 (M6P) は、糖タンパク質の三次構造の重要な部分である N 結合型オリゴ糖の末端の单糖であり、糖タンパク質の最終的なオリゴ糖に組み込まれると、細胞表面上に存在する M6P 受容体およびそれへの結合によって認識され、その後でリソソーム中の内部移行を可能にする。故に、M6P は、糖タンパク質のリソソームへの標的化に有効なエピトープである。

【 0 2 3 4 】

タンパク質グリコシル化の分析は、糖タンパク質の特徴付けの重要な部分である。オリゴ糖は、O 結合型グリカンとしてセリンもしくはスレオニンを通じて、または N 結合型グリカンとしてアスパラギンを通じて、タンパク質に結合し得る。

【 0 2 3 5 】

オリゴ糖の構造を分析するために、種々のクロマトグラフィーおよび分光法を行った。パルスアンペロメトリック検出を有する高性能アニオン交換クロマトグラフィー (H P A E C - P A D) を用いた。この技法を使用して、オリゴ糖を、急速に、電荷 (すなわち、中性、一価、または多価) に基づいて一般的な群に分け、それらの構造を、純粋な標準物との比較によって判定した。

20

【 0 2 3 6 】

全ての方法は、Hardy および Townsend によって記載されるプロトコルに基づくものであった (Hardy, M. R., and Townsend, R. R., 'High-pH anion-exchange chromatography of glycoprotein-derived carbohydrates', 1994, Methods Enzymol. 230: 208 - 225)。遺伝子導入鳥類由來の *r h N a G l u* の精製された試料を、Tube - O - Dialyzer を使用して、4

30

で約 24 時間、ナノ純水 (nanopure water) に対して透析して、塩および他の混入物質を除去した。ナノ純水を、全透析期間中に 4 回置き換えた。透析後、試料の各々を、3 つのアリコートに分割した。中性糖およびアミノ糖の分析を目的とするアリコートを、100℃で 4 時間、2N トリフルオロ酢酸 (TFA) で加水分解し、マンノース - 6 - リン酸塩分析のためのアリコートを、100℃で 1.5 時間、6.75N TFA で加水分解した。加水分解物を、次いで、N₂ 下で乾燥させ、50 μL H₂O で再溶解し、氷中に 7 分間超音波分解し、注射バイアルに移した。

40

【 0 2 3 7 】

中性糖およびアミノ糖のための標準物、ならびにマンノース - 6 - リン酸塩のための標準物の既知のモル数での混合物を、試料と同じ方式で、同じ時間、加水分解した。4 つの異なる濃度の中性糖およびアミノ糖の標準混合物、ならびにマンノース - 6 - リン酸塩を調製して、キャリブレーション方程式を確立させた。試料中の各々の糖のモル数を、キャリブレーション方程式からの線形補間によって定量化した。

【 0 2 3 8 】

オリゴ糖プロフィールおよびマンノース - 6 - リン酸塩プロフィールを、H P A E C - P A D によって別個に分析した。機器の制御およびデータの取得は、Dionex chromatleon ソフトウェアを使用して達成した。加水分解した *r h N a G l u* の H P A E C - P A D 分析により M6P を検出した。M6P の平均測定量は、加水分解したタン

50

パク質 210 µg 当たり 3.8 µg (C V 3.7%) であった。モルに変換した結果、タンパク質 2.8 nmol 当たり M6P13.4 nmol となり、これは、タンパク質 1 モル当たり M6P3.2 モルの比率に相当した。

【0239】

r h N a G l u (野鶏属) のオリゴ糖プロフィールもまた、H P A E C - P A D を使用して取得した (図 8 を参照されたい)。プロフィールは、単一の試料における P N G a s e F 反応の良好な再現性を示した。ピーク束は、中性オリゴ糖に対応する領域において観察された (約 10 分 ~ 約 20 分)。約 25 ~ 約 35 分の間に溶出した、非常に小さなピークの群もまた観察され、これは、一価の種に起因する可能性があった。

【0240】

遺伝子導入鳥類 (野鶏属) から產生される r h N a G l u の試料から得られた单糖組成物分析の結果を、表 3 に要約し、これは、r h N a G l u について分析された各々の单糖の平均モル比を表にしたものである。

【表 3】

r h N a G l u (野鶏属) 中の单糖のモル比

N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)	1.1*
N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)	35.6*
ガラクトース(Gal)	4*
マンノース(Man)	25.5*
マンノース-6-リン酸塩(M6P)	3.2*
フコース	検出されず
グルコース	検出されず

* タンパク質 1 モル当たりの单糖のモル

【0241】

実施例 4

線維芽細胞への細胞取り込み

野生型ヒト線維芽細胞およびムコ多糖症 I I I B (N a G l u 欠乏) ヒト線維芽細胞を、24 ウエルプレートに蒔き (1 ウエル当たり 2.5×10^4 細胞)、5% CO₂ 下において 37 °C で一晩インキュベートした。線維芽細胞基礎培地を含有する条件培地および低血清の線維芽細胞成長キットを使用した。種々の量の r h N a G l u (30、10、3.0、1.0、0.3、および 0 µg / mL) を、5% CO₂、37 °C で 24 時間、共インキュベートして、ヒト線維芽細胞による細胞取り込みのレベルを判定した (図 9 を参照されたい)。ウェルを、P B S で 3 回洗浄した。100 µL の溶解緩衝液を、ウェル毎に添加し、プレートを、37 °C で 10 分間インキュベートした。細胞溶解物を、1.5 mL の遠心管に移した。凍結および解凍サイクルを 1 回行った。細胞溶解物を、10,000 rpm で 10 分間遠心分離した。25 µL の上清を、アッセイに使用した。アッセイ時間は 2 時間であった。酵素活性を、当該技術分野で既知の方法を使用して、Marsh et al., Clinical Genetics (1985) 27: 258 - 262、Chow et al., Carbohydrate Research (1981) 96: 87 - 93、Weber et al., Protein Expression and Purification, (2001) 21: 251 - 259) に記載の方法に従って、測定した。

【0242】

図 9 に示されるように、陰性対照 (すなわち、M P S I I I B) は、いずれの N a G l u 活性も示さなかつたが、陽性対照 (すなわち、野生型ヒト線維芽細胞) は、N a G l u

10

20

30

40

50

u 活性を示した。0.3 μg / mL の rhNaGlu で処置した MPS-IIB 細胞は、野生型線維芽細胞中で観察される正常な活性レベルのおおよそ 50% を示した。1 μg / mL の rhNaGlu で処置した MPS-IIB 細胞は、野生型細胞中で観察されるものよりもおおよそ 4 倍高い NaGlu 活性を示した。驚くべきことに、30 μg / mL の rhNaGlu で処置した MPS-IIB 細胞は、野生型細胞中で観察されるものよりも少なくとも 40 倍高い NaGlu 活性を示した。この結果は、遺伝子導入鳥類（野鶏属）から產生される rhNaGlu が、高いレベルで効率的にヒト線維芽細胞中に内部移行されたことを示した。

【0243】

rhNaGlu の内部移行が、M6P 受容体介在エンドサイトーシスを介するかどうかを判定するために、M6P 阻害アッセイを行った。M6P 阻害アッセイのために、種々の濃度の遊離 M6P を、30 μg / mL の rhNaGlu で処置したヒト MPS-IIB 線維芽細胞に添加し、酵素活性を、上述のように測定した。図 10 に示されるように、ヒト MPS-IIB 線維芽細胞は、NaGlu 活性を全く示さず、遊離 M6P による NaGlu 取り込みの有効な阻害を示唆した。対照的に、30 μg / mL の rhNaGlu で処置した MPS-II 線維芽細胞は、遊離 M6P の不在下で、高レベルの酵素活性を示し、タンパク質が効率的に NaGlu 欠乏線維芽細胞中に内部移行され、活性を保持したことを示唆した。この酵素活性は、培地中の 0.03 mM 以上の濃度の M6P 単糖の存在によって阻害される。条件培地中の 1 mM の M6P 単糖の存在は、タンパク質の細胞取り込みを 90% を上回って阻害した。

10

20

【0244】

これらの結果は、遺伝子導入鳥類から產生される rhNaGlu が、M6P 受容体介在性エンドサイトーシスを介して効率的に MPS-IIB 線維芽細胞中に内部移行され、rhNaGlu が、受容体の認識について、M6P 単糖と競合したことを示した。結果は、遺伝子導入鳥類から產生される rhNaGlu 上の M6P 構造の存在を明らかにしたグリカン分析と一致した。

【0245】

実施例 5

活性な NaGlu 融合タンパク質の生成

30

2 つの異なる rhNaGlu 融合構築物を設計し、鳥類発現系において rhNaGlu 融合タンパク質を発現する可能性を検証した。

【0246】

一方の構築物において、8 つの連続するアスパラギン酸残基 (D D D D D D D D) をコードする核酸配列を、従来的な PCR および DNA 組換え技術を使用して、全長 NaGlu-cDNA 配列（配列番号 2）の 5' 末端で、NaGlu タンパク質をコードする核配列に融合した。もう一方の構築物において、TfRL をコードする核酸配列（すなわち、THRPMPMWSPVWP、配列番号 5）を、全長 NaGlu-cDNA 配列の 3' 末端で、NaGlu をコードする核配列に融合した。各々の構築物を、EcoRI および HindIII 制限部位を使用して、pTT22 発現ベクターに挿入した。結果として得られたベクターを、各々、ヒト胎児腎臓（HEK）293 細胞に形質移入し、高レベルの融合 NaGlu タンパク質を発現する安定なクローンを得た。N 末端で一続きの 8 つの連続するアスパラギン酸残基に融合された rhNaGlu タンパク質 (AAA-NaGlu) と、C 末端でトランスフェリン受容体リガンド (TfRL) に融合された rhNaGlu タンパク質 (NaGlu-TfRL) とを、条件培地から単離した。

40

【0247】

AAA-NaGlu および NaGlu-TfRL の酵素活性を、当該技術分野で既知の方法を使用して測定した（例えば、Marsh et al., Clinical Genetics (1985) 27: 258-262、Chow et al., Carbohydrate Research, (1981) 96: 87-93、Weber et

50

al., Protein Expression and Purification (2001) 21:251-259、Neufeld et al., Protein Expression and Purification (2000) 19:202-211、およびWeber et al., Human Molecular Genetics (1996) 5:771-777を参照されたい。

【0248】

図13および14に示されるように、HEK293細胞から産生されるAAA-NaG1uおよびNaG1u-TfRL融合タンパク質は、高レベルの酵素活性を示した。これらの結果は、これらの構築物を使用して、増加したレベルのリン酸化マンノースを有し、同時に遺伝子導入鳥類発現系に由来する酵素活性を保持する、NaG1u融合タンパク質を産生することができる可能性を確認した。 10

【0249】

実施例6

マクロファージへの細胞取り込み

野鶏属から産生されるrhNaG1uのヒトマクロファージ細胞中への内部移行もまた、測定した。NR8383マクロファージ細胞を、F12成長培地中、5%CO₂、37で0、4、8、24、32、および48時間、10μg/mLのrhNaG1uとともにインキュベートした。試料を回収し、溶解の前にPBSで洗浄した。2.5×10⁵細胞を、1mLの溶解緩衝液(10mMのNaリン酸、pH6.0、0.05%NP40)中に溶解し、溶解物を、1.5mLの遠心管に移し、10,000rpmで10分間遠心分離した。タンパク質濃度を、Bradfordアッセイによって判定し、アリコートを、NaG1u酵素アッセイのために凍結させた。 20

【0250】

酵素活性を、標準的な方法を使用して測定した。25mMの基質(4-メチルウンベリフェリル2-アセトアミド-2-デオキシ-a-D-グルコピラノシド)を、2mMのナノ純水中に希釈して、作業用基質ストックを形成した。試料の希釈物を、アッセイ緩衝液(1%ウシ血清アルブミン)中に調製した。25μLの200mM酢酸ナトリウムを、マルチウェルプレートのウェルに分配した。25μLの標準物および25μLの試料を、指定のウェルに添加した。50μLの作業用基質ストックを各々のウェルに添加し、プレートを優しく叩いて混合させた。プレートを接着フィルムで密封し、37で30分間インキュベートした。反応を、次いで、50μLの停止溶液(1Mグリシン、pH12.5)の添加によって終了させた。プレートを、蛍光底部を使用してマイクロプレートリーダーに載置し、強度を、励起360nmおよび放出460nmで測定した。放出された4-メチルウンベリフェロン(4-MU)のレベルを、0.25mM、0.125mM、0.0625mM、0.0312mM、0.0156mM、および0.0078mMでの4-MUの標準物との比較によって、測定した。 30

【0251】

図15に図示されるように、10μg/mLのrhNaG1uとともにインキュベートしたマクロファージにおけるNaG1u活性のレベルは、48時間の期間にわたり、ほぼ線形で増加した：マクロファージによるrhNaG1u取り込みは、測定された期間全体を通じて、ゆっくりだが一定していた。比較的ゆっくりとした、長期間のNaG1u活性の取り込みは(それらのグリコシル化構造にM6Pおよび/またはマンノースを含有する他のリソーム酵素と比較して)、予想外であり、驚くべきことであった。多量のrhNaG1uタンパク質が、長期間にわたってマクロファージ中に取り込まれ、rhNaG1uに曝露されていない野生型マクロファージにおいて観察される基礎レベルよりも、少なくとも10、50、100、200、300、500、またはさらには1,000倍高い細胞内酵素活性レベルをもたらしたことは、同様に驚くべきことであり、予想外であった。結果は、rhNaG1uが、細胞外ならびに細胞内の環境において、極めて安定であることを示す。さらに、これらの結果は、rhNaG1uが、中枢神経系(CNS)への取 40 50

り込みの強化に理想的な特性である、体内でのより長い血清半減期（例えば、より長い循環）および高い血清濃度を可能にする物理化学的特徴を有し得ることを示唆する。

【表4】

表4 NaGluの特徴の要約

	鳥類（野鶴属）産生 rhNaGlu	天然のヒトNaGlu	CHO産生ヒト NaGlu
見掛けの分子量 (kDa)	約85～約90	約86	約79～約89
酵素活性(nmol/分 /mg)	>1,000	約500	約1,057
マンノース-6-リ ン酸	高い	高い	なし、または非常に 低い

10

【0252】

実施例7

NaGlu欠乏マウスへのrhNaGluの投与

ホモ接合体nullマウスを、B6.129S6-NaGlu^{tm1Efn/J}株の交配対から生成した。対照野生型マウスを、同じ方式で生成した。遺伝子型決定を、標準的なPCRプロトコルに従って行った。当該技術分野では、出生時、ホモ接合体na^{g1u}(-/-)nullマウスは、生存能力があり、寸法が正常であり、いずれの全体的な身体的または行動的異常も示さないと言われるが、それらは、全ての組織においてNaGluを全く呈さない(Liet al., (1999) Proc., Natl. Acad. Sci. USA 96: 14505-14510を参照されたい)。1か月齢で、空胞化したマクロファージが、ほとんどの組織に見出される。腎臓および脳のいくつかの部分のニューロン内の上皮細胞もまた、影響されている。空胞化は、年齢とともにより顕著となる。4～5か月で、マウスは、オープンフィールド試験で、異常行動を示す。より高齢の動物は、尿閉および歩行困難を有し得る。ホモ接合体na^{g1u}(-/-)マウスの典型的な寿命は、8～12か月である(Liet al., (1999) Proc., Natl. Acad. Sci. USA 96: 14505-14510を参照されたい)。

20

30

40

【0253】

静脈内(IV)投与

尾静脈注射による試験品目およびビヒクルの静脈内投与を、次のように達成した。注射の前に、動物を白熱灯によって徐々に温めるか、または尾をおおよそ43℃の温水に浸漬することによって、血管拡張を達成した。動物を、次いで、拘束装置に載置した。尾の表面を、注射の前に、70%イソプロパノールで消毒した。尾の側脈は、皮膚のすぐ下にあり、尾の遠位部において、張力の適用によって特定される。27Gの注射針を、上向きに傾けて、3～4分間静脈に挿入した。試験品目またはビヒクルを、次いで、観察された静脈からの除去によって明らかのように、投与した液体が瞬間に血管腔を満たすように、10秒間にわたってゆっくりとしたボーラス注射として投与した。注射針の除去後、軽い圧力を穿刺部位に印加して、止血を行った。動物を、処置後すぐに監視して、正常な活動を確認した。

40

【0254】

髄腔内(IT)投与

腰椎穿刺注射による試験品目およびビヒクルの髄腔内投与を、次のように達成した。注射の前に、動物にイソフルランを使用して麻酔を行い、それを処置の間、ノーズコーンを

50

介して維持した。各々の注射前に、必要に応じて剃毛することによって注射部位の準備を行った。動物を、腹臥位で台に載置し、確実に、後肢が台をまたいで動物の背部が凸曲面を形成するようにした。背部表面に、70%イソプロパノールを塗布し、注射前に乾燥させた。脊柱および寛骨に触診を行い、L4-L5またはL5-L6の臼縁の位置を特定した。30Gの注射針を、頭側に向かって傾けて、椎間腔に挿入した。尾の軽打の観察によって、配置を確認した。試験品目またはビヒクルを、次いで、ボーラス注射として投与した。動物を、麻酔から回復させ、処置後すぐに監視して、正常な活動および四肢の使用を確認した。

【0255】

10

結果

12週齢のnag1u^{-/-}マウス(B6.129S6-Nag1u^{tm1Efn/J})に、尾静脈注射(IV投与)を介して、6.75または27mg/kgの投薬量レベルで、1日おきに合計5回の投薬量(それぞれ、1.125または4.5mg/mLのrhNaG1u濃度)のrhNaG1u(野鶲属)を投与した。同様に、12週齢のnag1u^{-/-}マウスに、腰椎穿刺注射(IT投与)を介して、0.31mg/kgの投薬量レベルで、1日おきに1.54mg/mLのNaG1u濃度で合計5回の投薬量のrhNaG1u(野鶲属)を投与した。ビヒクル(10mMのリン酸緩衝液、150mMのNaClおよび0.02%のTween 80、pH 5.5~5.8)は、同じ投薬濃度で、1日おきに5回の投薬量をnag1u^{-/-}ノックアウトマウスに投与した。無処置の野生型およびnag1u^{-/-}ノックアウトマウスもまた、研究期間中、維持した。

20

【0256】

動物を、5回目の最終注射の4時間後に、殺処理した。全ての動物を解剖し、肝臓、脳、脾臓、心臓、肺、および腎臓を摘出した。各々の器官を、矢状に分割し、凍結(-80)およびホルマリン固定保管の両方のために試料を提供した。

【0257】

組織試料を、(1)ヘパラン硫酸二糖類のSAX-HPLC分析に基づく分析方法を使用して、ヘパラン硫酸塩濃度について、および(2)細胞に基づく酵素活性アッセイを使用して-N-アセチルグルコサミニダーゼ酵素活性について、分析した。

30

【0258】

脳、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、および肺の組織の組織病理学的評価を、パラフィンに埋め込み、4μmに切断し、ガラス製スライド上に載置し、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)で染色した、ホルマリン固定組織試料を使用して行った。

【0259】

nag1u^{-/-}マウスへのrhNaG1u(野鶲属)の6.25および27mg/kg(体重)の投薬量レベルでの反復静脈内投与(10日間の期間にわたって5回の投薬)の後、nag1u^{-/-}マウスの脳、肝臓、および腎臓におけるヘパラン硫酸塩の濃度に明らかな用量依存性減少が見られた(表5、図16~18)。相対-N-アセチルグルコサミニダーゼ活性は、静脈内投与後に、脳および肝臓において増加した(表6)。これらの結果は、NaG1u酵素活性および結果としてもたらされた基質の除去が、IV投与で処理したnag1u^{-/-}マウスの脳において観察されたため、予想外かつ驚くべきことであり、全身投与されたrhNaG1u(野鶲属)が、nag1u^{-/-}マウスの脳に分配され、血液脳関門(BBB)の存在下でさえも有効性を誘起するのに効果的であったことを示唆する。

40

【0260】

nag1u^{-/-}マウスへのrhNaG1u(野鶲属)の0.31mg/kgの投薬量レベルでの髄腔内投与(10日間の期間にわたって5回の投薬)の後、nag1u^{-/-}マウスの脳内のヘパラン硫酸塩濃度に減少が見られ(表5、図19)、rhNaG1u(野鶲属)が、脳を標的とし、nag1u^{-/-}マウスの脳内に蓄積された基質を抑制するのに有効であったことを示唆する。

50

【表5】

表5 組織基質レベル (野鶏属 r h N a G l u)

組織	動物番号	遺伝子型	殺処理時の週齢(週)	処置	投薬量 (mg/kg)	経路	ヘパラソ硫酸塩 ug/mg(組織)	平均	標準偏差
腎臓	253	WT	4	na	-	-	0.1		
	155	WT	12	na	-	-	0.045	0.0725	0.03889
	178	KO	12	na	-	-	1.882		
	242	KO	4	na	-	-	1.687		
	145	KO	13	na	-	-	1.904		
	474	KO	13	ビヒクル	0	IV	1.501		
	479	KO	13	ビヒクル	0	IV	1.983		
	484	KO	13	ビヒクル	0	IV	1.839	1.7993	0.17590
	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.928		
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.737	0.8325	0.13505
30	481	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.591		
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.311		
	490	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.585	0.4956	0.15995
	86	KO	15	ビヒクル	0	IT	2.105		
	91	KO	14	ビヒクル	0	IT	1.704	1.9045	0.28355
	94	KO	14	rhNaGlu	0.31	IT	1.324		
	101	KO	14	rhNaGlu	0.31	IT	2.233	1.7785	0.64276
40	肝臓	253	WT	4	na	-	-	0.045	
		155	WT	12	na	-	-	0.092	0.0685
									0.03323

10

20

30

40

									4
	243	WT	4	na	-	-	0.045		
	178	KO	12	na	-	-	1.85		
	242	KO	4	na	-	-	2.263	2.0565	0.29203
									5
	255	KO	4	na	-	-	1.85		
	474	KO	13	ビヒク ル	0	IV	1.822		
	479	KO	13	ビヒク ル	0	IV	1.981		
	484	KO	13	ビヒク ル	0	IV	2.004	1.9616	0.16577
								67	9
	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.748		
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.444		
	504	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.494	0.562	0.16300
									9
	481	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.491		
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.172	0.3315	0.22556
									7
脳	253	WT	4	na	-	-	0.021		
	155	WT	12	na	-	-	0.013		
	243	WT	4	na	-	-	0.014308		
	10	WT	36	na	-	-	0.012649	0.0152	0.00390
								39	6
	239	KO	4	na	-	-	0.095		
	178	KO	12	na	-	-	0.084		
	242	KO	4	na	-	-	0.099		
	255	KO	4	na	-	-	0.094538		
	165	KO	24	na	-	-	0.084015		
	474	KO	13	ビヒク ル	0	IV	0.085447		
	479	KO	13	ビヒク ル	0	IV	0.072		
	484	KO	13	ビヒク	0	IV	0.073	0.0858	0.00997

10

20

30

40

				ル				75	2
487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.045			
492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.044119			
504	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.044	0.0443	0.00054	
							73	6	
481	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.017796			
485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.016668			
490	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.028	0.0208	0.00624	
							21	2	
86	KO	15	ビヒク ル	0	IT	0.094521			
91	KO	14	ビヒク ル	0	IT	0.072623	0.0835	0.01548	
							72	4	
94	KO	14	rhNaGlu	0.31	IT	0.038866			
101	KO	14	rhNaGlu	0.31	IT	0.028229	0.0335	0.00752	
							48	1	

n a : 該当なし (マウスは無処置であった)。

10

20

【表6】

表6：組織酵素活性（野鶏属rhNaGlu、U/ng（タンパク質））

組織	動物番号	遺伝子型	殺処理時の週齢(週)	処置	投薬量(mg/kg)	経路	酵素活性(U/ug(タンパク質))
脳	253	WT	4	na	-	-	7.7
	178	KO	12	na	-	-	0
	474	KO	13	ビヒクル	0	IV	0
	479	KO	13	ビヒクル	0	IV	0
	484	KO	13	ビヒクル	0	IV	0.575
	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	10.58
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	5.066666667
	504	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	4.033333333
	481	KO	13	rhNaglu	27	IV	87.91666667
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	90.15
肝臓	490	KO	13	rhNaGlu	27	IV	17.35
	253	WT	4	na	-	-	36.69
	178	KO	12	na	-	-	0
	474	KO	13	ビヒクル	0	IV	0
	479	KO	13	ビヒクル	0	IV	0
	484	KO	13	ビヒクル	0	IV	0
30	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	512.92
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	378.805
	504	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	607.9225
	481	KO	13	rhNaGlu	27	IV	659.6825
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	654.2475
	490	KO	13	rhNaGlu	27	IV	677.8725

na：該当なし（マウスは無処置であった）。

* * *

【0261】

上述の明細書内の各々の例は、本発明を制限するものではなく、本発明の説明の目的で提供される。実際に、本発明の範囲または趣旨から逸脱することなく、本発明において種々の修正、組み合わせ、追加、削除、および変形が行われ得ることが、当業者には明らかであろう。例えば、1つの実施形態の一部として例示または記載される特徴を、別の実施形態において使用して、なおもさらなる実施形態をもたらすことが可能である。本発明がかかる修正、組み合わせ、追加、削除、および変形を包含することが意図される。

【0262】

本明細書に引用される全ての刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、および受託番号/データベースの配列（ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の両方を

10

20

30

40

50

含む)は、各々の個々の刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、または受託番号/データベースの配列が、個別に、参照により組み込まれるのと同程度に、あらゆる目的で、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

(1)

ヒト NaGlu アミノ酸配列(シグナルペプチド: 1~23、下線)

MEARVAVAAV GVLLLAGGG AAGDEAREAA AVRVALVARL GPGPAADFV SVERALAAP	60
GLDTYSLGGG AAGARVNGG TGAAVGGAGG RYLRDFCOCH VANSQSSRL PEPLPEVGE	120
LTATPNTYR YVQNCCTSYF GSTWEDMARN EREIDMUNA GINLALAWG QATENWVRL	180
ALGCTQAEIN EFTFTGPAFLA WGRMGNLHNT DGEFLPPSHI KQJNLYQHBL DQMSPGKNTP	240
VLFPAFVQFV ATERTVTFQV NTUKNGWNSH FNCSYCSFL ALADEPFFI G1SPLFIRL	300
FGKFTGDHYZ ATDNEPMCPF SPSYELPA TTYATEVAM VDTEAWLQQ HGLFQHQMF	360
WGPAGTIAV RAVFLPGRQLL DLFASFQGQ YRTTASFQGQ FWTFLCMHNG GNGLGFAL	420
AVANGPEOKE ALFLNPNTSTM GNGAPESGQ NEVYVLSLMA LGKRDPRVFD LAUWVTSYPA	480
RYKGVSHPDA GAMWLLLRS VYNCSEBRQ GHNSRSPVLR PBLQMTNTSW YNRSDFVWEA	540
TSPLNTAPS1 ATAPSATFRL DDLTTRQAVQE LVSLTYEEBAR SALTKEELAS LLRAGGVLY	600
ELLPADELVI ASDSKFLWSL QLEZQARAAV SZAEEADPQY NSEYQULTEW PEGILYNTD	660
QDVTWLAKKI YTRWRLFL ALUDVSAQCI PFOHQFDKU VFOLEQAFUL SKQRYPSPQR	720
GDTVWLAKKI FLCYPRWVA QDVTWLAKKI YTRWRLFL ALUDVSAQCI PFOHQFDKU VFOLEQAFUL SKQRYPSPQR	780

(配列番号:1)

〔 図 2 〕

ヒト NaGlu コード配列(cDNA)

（配列番号：2）

〔 図 3 〕

1.1 kb OV プロモーター

(配列番号 : 3)

【図4A】

pSIN-OV-1.1-l-rhNaGlu

60
120
180
240
300
360
420
480
540
600
660
720
780
840
900
960
1020
1080
1140
1200
1260
1320
1380
1440
1500
1560
1620
1680
1740
1800
1860
1920
1980
2040
2100
2160

Fig. 4A

【図4B】

【図4C】

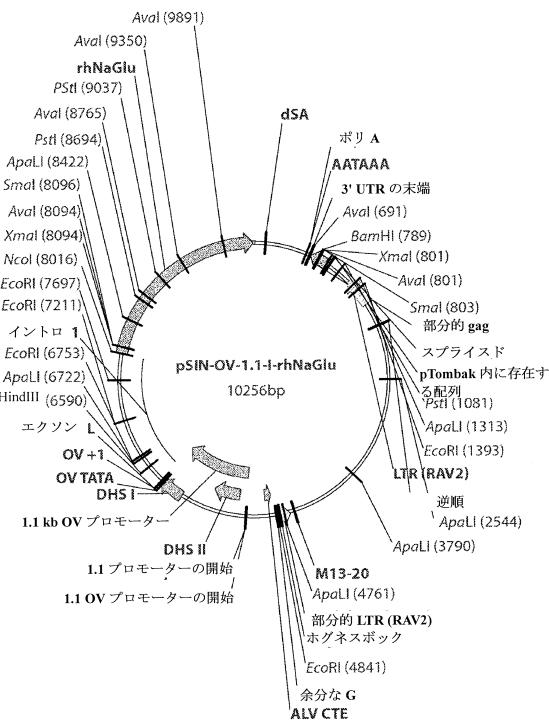
5160
5220
5280
5340
5400
5460
5520
5580
5640
5700
5760
5820
5880
5940
6000
6060
6120
6180
6240
6300
6360
6420
6480
6540
6600
6660
6720
6780
6840
6900
6960
7020
7080
7140
7200
7260
7320
7380
7440
7500
7560
7620
7680
7740
7800
7860
7920

Fig. 4C

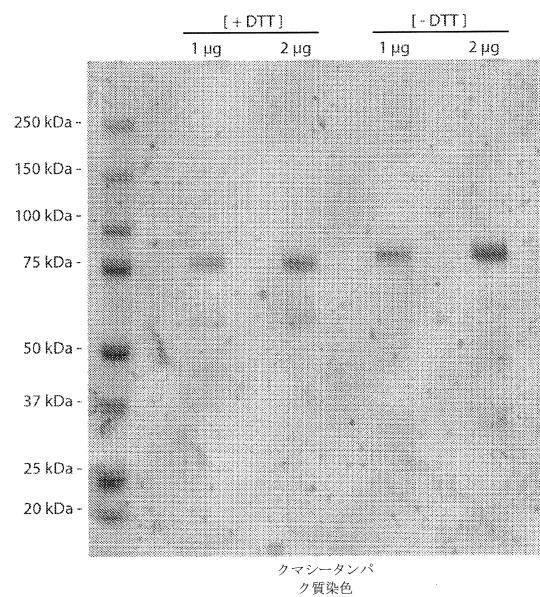
【図4D】

(配列番号:4)

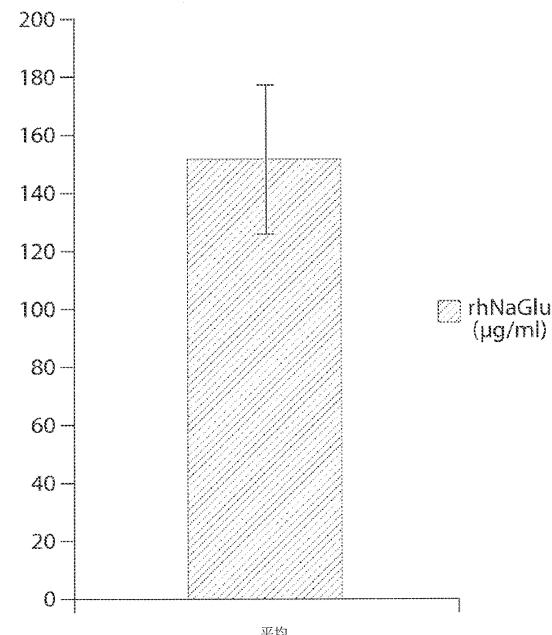
【図5】



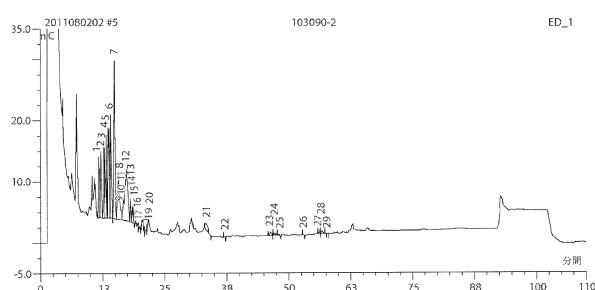
【 図 6 】



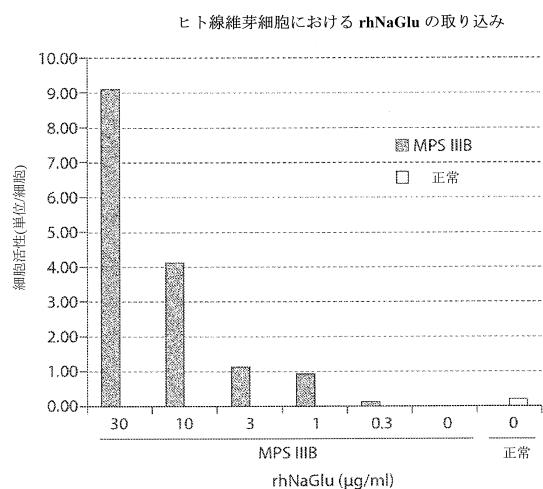
【圖 7】



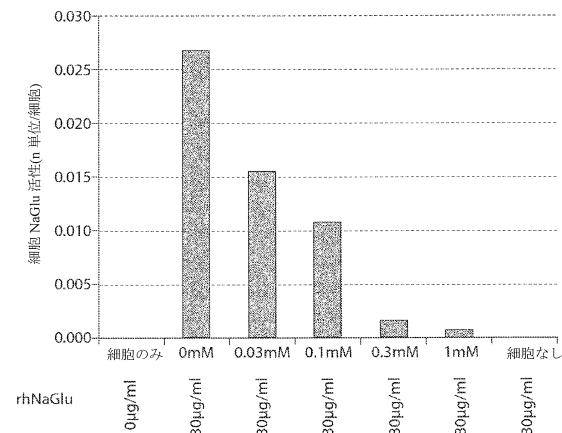
【図8】



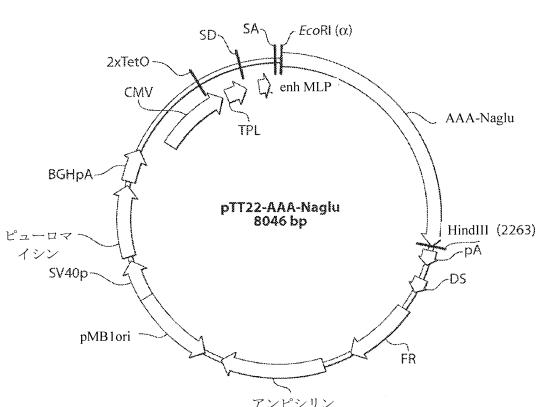
【図9】



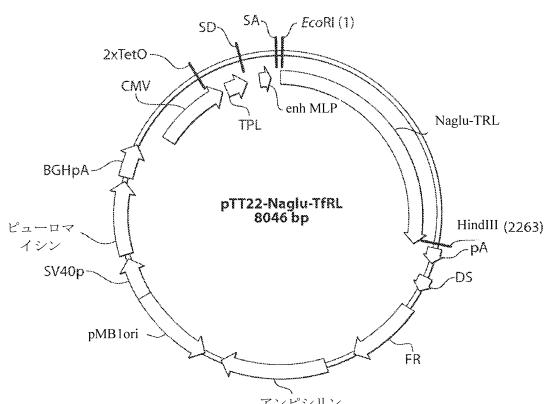
【図10】



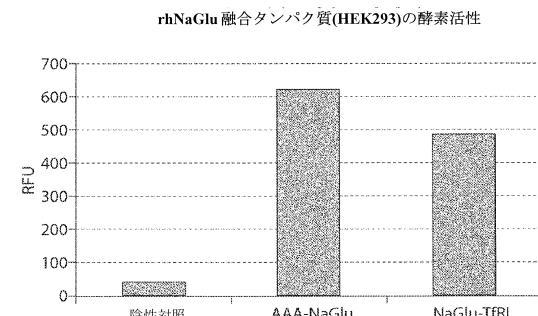
【図11】



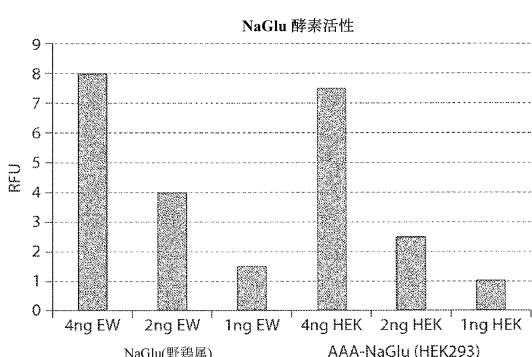
【図12】



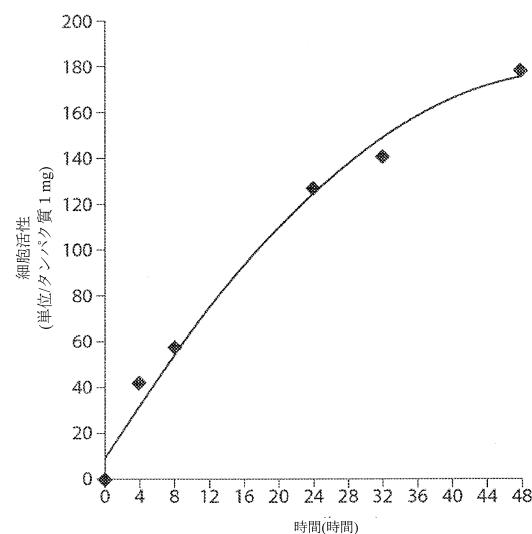
【図14】



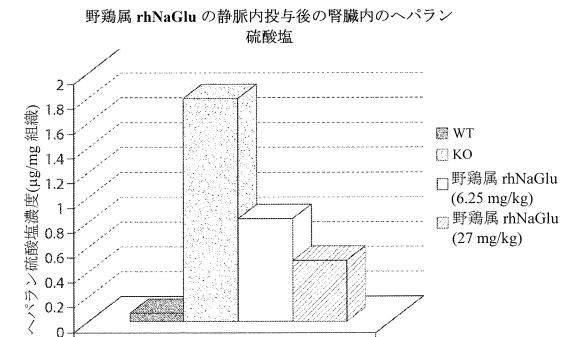
【図13】



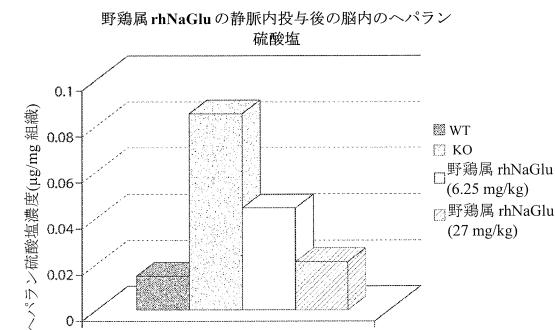
【図15】



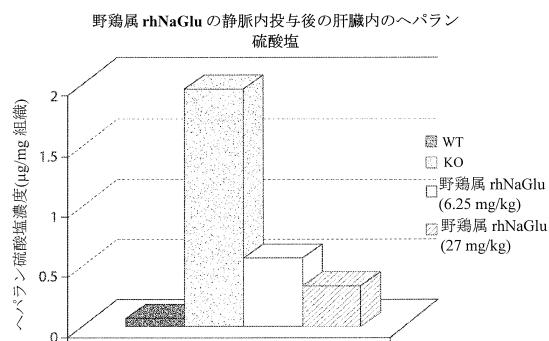
【図16】



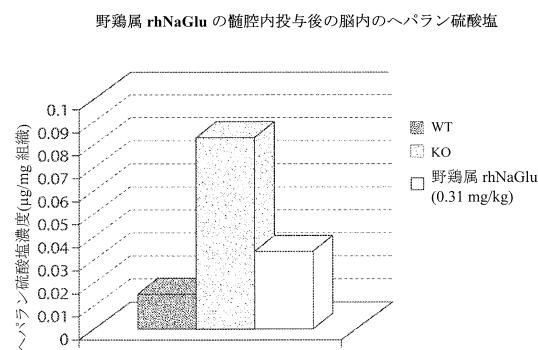
【図17】



【図18】



【図19】



【配列表】

0006329483000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/20	(2006.01)	A 6 1 P	25/20
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/02
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02
A 6 1 P	1/12	(2006.01)	A 6 1 P	1/12
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00

(72)発明者 クイン, アンソニー

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02467, チェスナット ヒル, 107 マネ ロード

(72)発明者 リービット, マークリー, シー.

アメリカ合衆国, ジョージア州 30677, ワトキンズビル, 1140 ラッサム ドライブ

(72)発明者 シア, ジーナン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02481, ウエルスレー, 29 バーク レーン

(72)発明者 ルトコウスキー, ジョセフ, ピクター

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02421, レキシントン, スイート 520, 128
スプリング ストリート, シナジェバ バイオファーマ コーポレイション

審査官 岩下 直人

(56)参考文献 国際公開第2009/131698 (WO, A1)

特表2011-508603 (JP, A)

米国特許出願公開第2005/0208090 (US, A1)

PNAS, 1996年, 93, 6101-5

Protein Expr Purif, 2001年, 21, 251-9

Biochem J, 2005年, 388, 639-46

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 38 / 46

A 0 1 K 67 / 0 2 7

A 6 1 K 45 / 0 0

A 6 1 P 1 / 0 0

A 6 1 P 1 / 0 2

A 6 1 P 1 / 1 2

A 6 1 P 1 / 1 6

A 6 1 P 7 / 0 2

A 6 1 P 17 / 0 0

A 6 1 P 19 / 0 2

A 6 1 P 25 / 0 0

A 6 1 P 25 / 2 0

C 1 2 N	1 / 1 5
C 1 2 N	1 / 1 9
C 1 2 N	1 / 2 1
C 1 2 N	5 / 1 0
C 1 2 N	9 / 2 4
C 1 2 N	1 5 / 0 9
C 0 7 K	1 9 / 0 0