

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6433424号
(P6433424)

(45) 発行日 平成30年12月5日(2018.12.5)

(24) 登録日 平成30年11月16日(2018.11.16)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 12 N 9/14	(2006.01)	C 12 N	9/14
C 12 N 9/16	(2006.01)	C 12 N	9/16
C 07 K 14/79	(2006.01)	C 07 K	14/79
C 12 N 15/12	(2006.01)	C 12 N	15/12
A 61 P 43/00	(2006.01)	A 61 P	43/00

請求項の数 6 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-525545 (P2015-525545)	(73) 特許権者	513325649 バイオアシス テクノロジーズ インコーポレイテッド カナダ国 ブイエックス 2ダブリュー 8 ブリティッシュ コロンビア, リッ チモンド, シエルブリッジ ウエイ 1 30-10691
(86) (22) 出願日	平成25年7月31日 (2013.7.31)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(65) 公表番号	特表2015-524662 (P2015-524662A)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(43) 公表日	平成27年8月27日 (2015.8.27)	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/052939	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開番号	W02014/022515		
(87) 國際公開日	平成26年2月6日 (2014.2.6)		
審査請求日	平成28年7月6日 (2016.7.6)		
(31) 優先権主張番号	61/677,959		
(32) 優先日	平成24年7月31日 (2012.7.31)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】脱リン酸化されたリソソーム蓄積症タンパク質およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ムコ多糖体沈着症Ⅰ型(ハンター症候群)の処置のための医薬の調製におけるヒトイズロン酸-2-スルファターゼ(IDS)ポリペプチドを含む組成物の使用:

ここで、前記IDSポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列若しくは配列番号2と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むか、または配列番号2のアミノ酸配列若しくは配列番号2と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列からなり、且つ前記IDSポリペプチドのマンノース-6-リン酸(M6P)含有量が約0.5pmol M6P / pmol IDSタンパク質未満である。

【請求項2】

前記ハンター症候群が、中枢神経系(CNS)合併症を有するか、またはCNS合併症を発症するリスクがある、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

前記M6P含有量が、約0.15pmol M6P / pmol IDSタンパク質または約0.15pmol M6P / pmol IDSタンパク質未満である、請求項1または2に記載の使用。

【請求項4】

前記ヒトイズロン酸-2-スルファターゼ(IDS)ポリペプチドが、1つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンを含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の使用。

【請求項5】

10

20

前記ヒトIDSポリペプチドが、7個または8個のN結合型オリゴマンノースグリカンを含む、請求項4に記載の使用。

【請求項6】

前記ヒトIDSポリペプチドが、p97ポリペプチドに共有結合性に連結されるか、または作動可能に連結され、p97結合体を形成している、請求項1～5のいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

10

この出願は、米国特許法119(e)の下、2012年7月31日に出願された米国仮出願第61/677,959号（これは、その全体が参考として援用される）に対する優先権を主張する。

【0002】

配列表に関する記述

本出願に関連する配列表を、ハードコピーの代わりにテキスト形式で提供し、この配列表は、本明細書中で参考として援用される。配列表を含むテキストファイル名は、B10S_06_01WO_ST25.txtである。このテキストファイルは約25KBであり、2013年7月31日に作成され、EFS-Web経由で電子的に提出した。

【0003】

20

背景

技術分野

本発明は、一般に、タンパク質のリン酸化形態と比較して血液脳関門（BBB）を横断するか透過する能力が高いリソーム蓄積症（LSD）タンパク質の脱リン酸化形態（イズロン酸-2-スルファターゼ（IDS、またはI2D）の脱リン酸化形態が含まれる）およびそのp97結合体に関する。かかる脱リン酸化されたLSDタンパク質およびp97結合体を含む組成物および、例えば、任意の1つ以上のリソーム蓄積症（ハンター症候群（すなわち、MPS I型）など）を処置するためのその使用方法も含まれる。

【背景技術】

【0004】

30

関連技術の記載

リソーム蓄積症（LSD）は、細胞のリソーム内の特異的な酵素またはタンパク質の活性の不在または減少に起因する。細胞内で、喪失酵素の影響は、細胞内リソーム内の未分解「貯蔵物質」の蓄積として認められる。この集積物により、リソームが膨潤して機能不全を引き起こし、それにより、細胞および組織が損傷する。リソーム蓄積症が典型的には遺伝的病因を有するので、多数の組織は問題の酵素を欠くであろう。しかし、組織が異なれば同一酵素の不在の程度も異なる。どのように組織が悪影響を受けるかは、組織が喪失酵素の基質を生成する程度によっていくらか決定される。貯蔵の負荷をもっとも受ける組織の型が、どのようにして薬物を患者に投与すべきかを決定づける。

【0005】

40

多数のリソーム蓄積症の酵素が同定され、その各疾患と関連付けられている。一旦喪失酵素または欠損酵素が同定されると、補充酵素を患者の罹患組織に有效地に送達させりうる問題に処置を集中させることができる。

【0006】

静脈内酵素代償療法（ERT）はLSD（例えば、MPS I、MPS II、MPS III）に有利であり得るが、かかる疾患におけるリソームへの治療酵素の送達の増強手段は、費用の削減および治療有効性の増加に関して有益であろう。

【0007】

1つの問題として、血液脳関門（BBB）は、血流から脳への多数の薬剤の自由な輸送を遮断する。このため、神経学的侧面が有意に認められるLSDは、静脈内ERTに応答

50

すると期待されない。かかる疾患について、B B B を通過して罹患細胞に入るリソソーム内への酵素送達の改善方法が非常に望まれるであろう。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の概要

本発明の実施形態は、哺乳動物細胞（ヒト細胞など）中に発現された（または產生された）対応するコントロール L S D タンパク質と比較して実質的に脱リン酸化された単離リソソーム蓄積症（L S D）ポリペプチドを含む。一定の実施形態では、L S D ポリペプチドは、対応する L S D タンパク質と比較して少なくとも約 75%、80%、90%、95%、98%、99%、または 100% 脱リン酸化されている。

【0009】

特定の実施形態では、L S D ポリペプチドは、1 つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンを含む。例えば、一定のL S D ポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個またはそれを超えるN結合型オリゴマンノースグリカンを含む。いくつかの実施形態では、L S D ポリペプチドは、対応する L S D タンパク質として少なくとも約 75%、80%、90%、95%、98%、99%、または 100% の数または量のN結合型オリゴマンノースグリカンを有する。特定の実施形態では、L S D ポリペプチドは、哺乳動物細胞中に発現された（または產生された）対応する L S D タンパク質と比較して、N結合型オリゴマンノースグリカンのマンノース - 6 - リン酸（M 6 P）残基を実質的に含まない。いくつかの態様では、L S D ポリペプチドは、酸性ホスファターゼまたはアルカリホスファターゼでの酵素消化によって脱リン酸化される。

【0010】

一定の実施形態では、L S D ポリペプチドは、1 つ以上のイズロン酸 - 2 - スルファターゼ、L - イズロニダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、酸性リパーゼ、システイン輸送体、L a m p - 2、- ガラクトシダーゼ A、酸性セラミダーゼ、- L - フコシダーゼ、- ヘキソサミニダーゼ A、G M 2 - ガングリオシドアクチベーター（G M 2 A）、- D - マンノシダーゼ、- D - マンノシダーゼ、アリールスルファターゼ A、サポシン B、ノイラミニダーゼ、- N - アセチルグルコサミニダーゼホスホトランスフェラーゼ、ホスホトランスフェラーゼ - サブユニット、ヘパラン - N - スルファターゼ、- N - アセチルグルコサミニダーゼ、アセチルC o A : N - アセチルトランスフェラーゼ、N - アセチルグルコサミン 6 - スルファターゼ、ガラクトース 6 - スルファターゼ、- ガラクトシダーゼ、N - アセチルガラクトサミン 4 - スルファターゼ、ヒアルロノグアルコサミニダーゼ、スルファターゼ、パルミトイロプロテインチオエステラーゼ、トリペプチジルペプチダーゼ I、酸性スフィンゴミエリナーゼ、カテプシン A、カテプシン K、- ガラクトシダーゼ B、N P C 1、N P C 2、シアリン（s i a l i n）、およびシアル酸輸送体（その活性フラグメントおよび改变体が含まれる）から選択される。いくつかの実施形態では、L S D ポリペプチドはヒトポリペプチドである。

【0011】

いくつかの実施形態では、L S D ポリペプチドは、ヒトイズロン酸 - 2 - スルファターゼ（I D S）、またはその活性フラグメントもしくは改变体である。いくつかの態様では、ヒトイ D S が、配列番号 2 と少なくとも 80%、85%、90%、95%、98%、99%、または 100% 同一であるか、配列番号 2 を含むか、配列番号 2 から本質的になるか、配列番号 2 からなるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、ヒトイ D S は、1 つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンを含む。特定の態様では、ヒトイ D S は、1、2、3、4、5、6、7、または 8 個のN結合型オリゴマンノースグリカンを含む。いくつかの態様では、ヒトイ D S は、ヒト細胞（例えば、H T - 1 0 8 0 細胞）などの哺乳動物細胞中に產生された（発現された）対応する野生型ヒトイズロン酸 - 2 - スルファターゼとして少なくとも約 75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または 100% の数または量のN結合型オリゴマンノースグリカンを有する。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態では、1つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンは、ヒト細胞などの哺乳動物細胞中に產生された（発現された）対応するヒトIDSのN結合型オリゴマンノースグリカンと比較して実質的に脱リン酸化されている。いくつかの態様では、1つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンは、少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%脱リン酸化されている。

【0012】

いくつかの実施形態では、ヒトIDSは、哺乳動物細胞中に產生された対応するIDSと比較してマンノース-6-リン酸(M6P)残基を実質的に含まない。特定の態様では、ヒトIDSは、M6P含有量が約1.2pmol M6P / pmol IDSタンパク質未満である。一定の態様では、ヒトIDSは、M6P含有量が約0.5pmol M6P / pmol IDSタンパク質未満である。特定の態様では、ヒトIDSは、M6P含有量が約0.15pmol M6P / pmol IDSタンパク質または約0.15pmol M6P / pmol IDSタンパク質未満である。

【0013】

いくつかの実施形態では、LSDポリペプチドは、ヒト-L-イズロニダーゼ(IDU)またはその活性フラグメントもしくは改变体である。いくつかの態様では、ヒトIDUは、配列番号3と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%同一であるか、配列番号3を含むか、配列番号3から本質的になるか、配列番号3からなるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、ヒトIDUは1つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンを含む。特定の態様では、ヒトIDUは、1、2、3、4、5、または6個のN結合型オリゴマンノースグリカンを含む。いくつかの実施形態では、ヒトIDUは、哺乳動物細胞、任意選択的にヒト細胞中に產生された（発現された）対応するヒトIDUとして少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%の数または量のN結合型オリゴマンノースグリカンを有する。特定の態様では、1つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンは、哺乳動物細胞、任意選択的にヒト細胞中に產生された（発現された）対応するヒトIDUのN結合型オリゴマンノースグリカンと比較して、実質的に脱リン酸化されている。特定の態様では、1つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンは、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%脱リン酸化されている。いくつかの態様では、ヒトIDUは、哺乳動物細胞中に產生された対応するIDUと比較して、マンノース-6-リン酸(M6P)残基を実質的に含まない。

【0014】

一定の実施形態では、対応するタンパク質は、野生型タンパク質（ヒト野生型IDSまたはIDSタンパク質など）である。特定の実施形態では、実質的に脱リン酸化されたIDSの対応するタンパク質は、ヒト細胞株、任意選択的にHT-1080線維肉腫細胞株中に產生されたイデュルスルファーゼである。

【0015】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、CHO細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、およびHT-1080線維肉腫細胞から選択される。

【0016】

p97結合体を形成するために本明細書中に記載の実質的に脱リン酸化されたLSDポリペプチドに共有結合性に連結されたか作動可能に連結されたp97ポリペプチドを含む結合体も含まれる。

【0017】

組成物（本明細書中に記載の単離リソソーム蓄積症（LSD）ポリペプチドまたはp97結合体を含む薬学的組成物が含まれる）も含まれる。いくつかの実施形態では、組成物は薬学的に許容され得るキャリアを含む。

【0018】

一定の実施形態は、本明細書中に記載の組成物（例えば、薬学的組成物）、実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質、または結合体を被験体に投与する工程を含む、処置を

10

20

30

40

50

必要とする被験体におけるリソソーム蓄積症 (LSD) の処置方法を含む。

【0019】

一定の方法では、LSDは、1つ以上のムコ多糖体沈着症II型（ハンター症候群）、ムコ多糖体沈着症I型（ハーラー症候群）、アスパルチルグルコサミン尿、コレステロールエステル蓄積症、ウォルマン病、シスチン蓄積症、ダノン病、ファブリー病、ファーバー脂肪肉芽腫症、ファーバー病、フコース蓄積症、ガラクトシアリドーシスII型 / II型、ゴーシェ病II型 / II型 / III型、ゴーシェ病、グロボイド細胞白質ジストロフィ（globoid cell leucodystrophy）、クラッペ病、糖原貯蔵障害II型、ポンペ病、GM1-ガングリオシドーシスII型 / II型 / III型、GM2-ガングリオシドーシスII型、ティ・サックス病、GM2-ガングリオシドーシスII型、サンドホフ病、GM2-ガングリオシドーシス、-マンノシドーシスII型 / II型、-マンノシドーシス、異染性白質ジストロフィ（metachromatic leucodystrophy）、ムコリピドーシスII型、シアリドーシスII型 / II型ムコリピドーシスII型 / II型I細胞病、ムコリピドーシスIIIC型偽性ハーラーポリジストロフィ、ムコ多糖体沈着症IIIA型、サンフィリッポ症候群、ムコ多糖体沈着症IIIB型、ムコ多糖体沈着症IIIC型、ムコ多糖体沈着症IID型、ムコ多糖体沈着症IV型、モルキオ症候群、ムコ多糖体沈着症IVB型、ムコ多糖体沈着症V型、ムコ多糖体沈着症VI型、スライ症候群、ムコ多糖体沈着症IX型、多発性スルファターゼ欠損症、神経セロイドリポフチノーシス、CLN1バッテン病、ニーマン・ピック病NB型、ニーマン・ピック病、ニーマン・ピック病C1型、ニーマン・ピック病C2型、濃化異骨症、シンドラー病II型 / II型、シンドラー病、およびシアル酸蓄積症から選択される。10

【0020】

特定の実施形態では、LSDはムコ多糖体沈着症II型（ハンター症候群）であり、実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質はヒトイズロン酸-2-スルファターゼである。20

【0021】

他の実施形態では、LSDはムコ多糖体沈着症I型（ハーラー症候群）であり、実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質はヒトL-イズロニダーゼである。

【0022】

いくつかの実施形態では、LSDが中枢神経系（CNS）合併症を有するか、被験体がLSDのCNS合併症を発症するリスクがある。30

【0023】

実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質（ヒトイズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）など）を产生する方法であって、哺乳動物細胞株、任意選択的にヒト細胞株中でLSDタンパク質を組換え的に产生する工程、および組換え的に产生されたLSDタンパク質を、同一の細胞株中で产生された未処置LSDタンパク質と比較してLSDタンパク質のマンノース-6-リン酸（M6P）含有量が少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%減少するのに十分な時間ホスファターゼで処理する工程を含む、方法も含まれる。特定の実施形態では、LSDタンパク質はヒトイDSまたはヒトイDUである。40

【0024】

特定の実施形態では、ヒト細胞株はHT-1080線維肉腫細胞株であり、タンパク質はヒトイDSである。いくつかの態様では、ヒトイDSは、配列番号2のアミノ酸配列を含むか、配列番号2のアミノ酸配列からなる。特定の態様では、ホスファターゼは仔牛腸アルカリホスファターゼ（CIP）である。特定の態様では、CIPはアクリルビーズに結合している。

【0025】

いくつかの実施形態では、LSDタンパク質（ヒトイDSなど）は、ヒトp97配列に融合している。一定の方法は、LSDタンパク質（ヒトイDSなど）をヒトp97ポリペ50

プチドに結合体化する工程をさらに含む。

【0026】

特定の実施形態は、ヒトIDSポリペプチドが配列番号2のアミノ酸配列またはその改変体を含むか配列番号2のアミノ酸配列またはその改変体からなり、マンノース-6-リン酸(M6P)含有量が約1.2pmol M6P / pmol IDSタンパク質未満である、単離ヒトイズロン酸-2-スルファターゼ(IDS)ポリペプチドを含む。特定の態様では、M6P含有量は、約0.5pmol M6P / pmol IDSタンパク質未満である。いくつかの態様では、M6P含有量は、約0.15pmol M6P / pmol IDSタンパク質未満である。

10

【0027】

本発明のこれらおよび他の態様は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照した際に明らかとなるであろう。本明細書中に開示の全ての文献は、それぞれが個別に援用されたかのように、その全体が本明細書内で参考として援用される。

特定の実施形態では、本発明は、例えば、以下を提供する。

(項目1)

哺乳動物細胞中に発現された(または産生された)対応するLSDタンパク質と比較して実質的に脱リン酸化された単離リソソーム蓄積症(LSD)ポリペプチド。

(項目2)

前記LSDポリペプチドが少なくとも約75%脱リン酸化されている、項目1に記載の単離ポリペプチド。

20

(項目3)

前記LSDポリペプチドが少なくとも約80%脱リン酸化されている、項目1に記載の単離ポリペプチド。

(項目4)

前記LSDポリペプチドが1つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンを含む、前記項目のいずれか1項に記載の単離ポリペプチド。

(項目5)

前記LSDポリペプチドが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のN結合型オリゴマンノースグリカンを含む、項目1に記載の単離ポリペプチド。

30

(項目6)

前記LSDポリペプチドが、対応するLSDタンパク質として少なくとも約75%の数または量のN結合型オリゴマンノースグリカンを有する、前記項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目7)

前記LSDポリペプチドが、哺乳動物細胞中に発現された(または産生された)対応するLSDタンパク質と比較して、N結合型オリゴマンノースグリカンのマンノース-6-リン酸(M6P)残基を実質的に含まない、項目4~6のいずれか1項に記載の単離ポリペプチド。

(項目8)

前記LSDポリペプチドが、酸性ホスファターゼまたはアルカリホスファターゼでの酵素消化によって脱リン酸化される、前記項目のいずれか1項に記載の単離ポリペプチド。

40

(項目9)

前記LSDポリペプチドが、以下のものの活性フラグメントおよび改変体を含む、イズロン酸-2-スルファターゼ、L-イズロニダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、酸性リパーゼ、システイン輸送体、Lamp-2、-ガラクトシダーゼA、酸性セラミダーゼ、-L-フコシダーゼ、-ヘキソサミニダーゼA、GM2-ガングリオシドアクトベーター(GM2A)、-D-マンノシダーゼ、-D-マンノシダーゼ、アリルスルファターゼA、サボシンB、ノイラミニダーゼ、-N-アセチルグルコサミニダーゼホストランスフェラーゼ、ホストランスフェラーゼ-サブユニット、ヘパラン

50

- N - スルファターゼ、 - N - アセチルグルコサミニダーゼ、アセチルC o A : N - アセチルトランスフェラーゼ、N - アセチルグルコサミン 6 - スルファターゼ、ガラクトース 6 - スルファターゼ、 - ガラクトシダーゼ、N - アセチルガラクトサミン 4 - スルファターゼ、ヒアルロノグルコサミニダーゼ、スルファターゼ、パルミトイルプロテインチオエステラーゼ、トリペプチジルペプチダーゼ I、酸性スフィンゴミエリナーゼ、カテプシン A、カテプシン K、 - ガラクトシダーゼ B、N P C 1、N P C 2、シアリン、およびシアル酸輸送体のうちの 1 つ以上から選択される、前記項目のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

(項目 10)

前記 L S D ポリペプチドがヒトポリペプチドである、前記項目のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

10

(項目 11)

前記 L S D ポリペプチドが、ヒトイズロン酸 - 2 - スルファターゼ (I D S)、またはその活性フラグメントもしくは改変体である、前記項目のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

(項目 12)

前記ヒト I D S が配列番号 2 と少なくとも 90 % 同一である、項目 11 に記載の単離ポリペプチド。

(項目 13)

前記ヒト I D S が 1 つ以上の N 結合型オリゴマンノースグリカンを含む、項目 12 に記載の単離ポリペプチド。

20

(項目 14)

前記ヒト I D S が、1、2、3、4、5、6、7、または 8 個の N 結合型オリゴマンノースグリカンを含む、項目 13 に記載の単離ポリペプチド。

(項目 15)

前記ヒト I D S が、哺乳動物細胞、任意選択的にヒト細胞中に產生された (発現された) 対応する野生型ヒトイズロン酸 - 2 - スルファターゼとして少なくとも約 75 % の数または量の N 結合型オリゴマンノースグリカンを有する、項目 13 または 14 に記載の単離ポリペプチド。

(項目 16)

30

前記 1 つ以上の N 結合型オリゴマンノースグリカンが、哺乳動物細胞、任意選択的にヒト細胞中に產生された (発現された) 対応するヒト I D S の N 結合型オリゴマンノースグリカンと比較して実質的に脱リン酸化されている、項目 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

(項目 17)

前記 1 つ以上の N 結合型オリゴマンノースグリカンが少なくとも 75 % 脱リン酸化されている、項目 16 に記載の単離ポリペプチド。

(項目 18)

前記ヒト I D S が、哺乳動物細胞中で產生された対応する I D S と比較してマンノース - 6 - リン酸 (M 6 P) 残基を実質的に含まない、項目 16 または 17 に記載の単離ポリペプチド。

40

(項目 19)

M 6 P 含有量が約 1 . 2 p m o l M 6 P / p m o l I D S タンパク質未満である、項目 18 に記載の単離ポリペプチド。

(項目 20)

M 6 P 含有量が約 0 . 5 p m o l M 6 P / p m o l I D S タンパク質未満である、項目 19 に記載の単離ポリペプチド。

(項目 21)

M 6 P 含有量が約 0 . 1 5 p m o l M 6 P / p m o l I D S タンパク質未満である、項目 20 に記載の単離ポリペプチド。

50

(項目 22)

前記 L S D ポリペプチドが、ヒト - L - イズロニダーゼ (I D U) またはその活性フラグメントもしくは改変体である、項目 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

(項目 23)

前記ヒト I D U が配列番号 3 と少なくとも 90 % 同一である、項目 22 に記載の単離ポリペプチド。

(項目 24)

前記ヒト I D U が 1 つ以上の N 結合型オリゴマンノースグリカンを含む、項目 22 または 23 に記載の単離ポリペプチド。

10

(項目 25)

前記ヒト I D U が、1、2、3、4、5、または 6 個の N 結合型オリゴマンノースグリカンを含む、項目 24 に記載の単離ポリペプチド。

(項目 26)

前記ヒト I D U が、哺乳動物細胞、任意選択的にヒト細胞中に產生された（発現された）対応するヒト I D U として少なくとも約 75 % の数または量の N 結合型オリゴマンノースグリカンを有する、項目 24 または 25 に記載の単離ポリペプチド。

(項目 27)

前記 1 つ以上の N 結合型オリゴマンノースグリカンが、哺乳動物細胞、任意選択的にヒト細胞中に產生された（発現された）対応するヒト I D U の N 結合型オリゴマンノースグリカンと比較して、実質的に脱リン酸化されている、項目 24 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

20

(項目 28)

前記 1 つ以上の N 結合型オリゴマンノースグリカンが少なくとも 75 % 脱リン酸化されている、項目 27 に記載の単離ポリペプチド。

(項目 29)

前記ヒト I D U が、哺乳動物細胞中に產生された対応する I D U と比較して、マンノース - 6 - リン酸 (M 6 P) 残基を実質的に含まない、項目 28 に記載の単離ポリペプチド。

30

(項目 30)

前記対応するタンパク質が野生型タンパク質である、前記項目のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

(項目 31)

前記対応するタンパク質がヒト細胞株中に產生されたイデュルスルファーゼである、前記項目のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

(項目 32)

前記哺乳動物細胞が、C H O 細胞、H E K 2 9 3 細胞、H e L a 細胞、および H T - 1 0 8 0 線維肉腫細胞から選択される、前記項目のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

40

(項目 33)

p 9 7 結合体を形成するために前記項目のいずれか 1 項に記載の実質的に脱リン酸化された L S D ポリペプチドに共有結合性に連結されたか作動可能に連結された p 9 7 ポリペプチドを含む結合体。

(項目 34)

前記項目のいずれか 1 項に記載の単離リソソーム蓄積症 (L S D) ポリペプチドまたは p 9 7 結合体を含む組成物。

(項目 35)

薬学的に許容され得るキャリアを含む、項目 34 に記載の組成物。

(項目 36)

項目 34 または 35 に記載の組成物を被験体に投与する工程を含む、処置を必要とする

50

被験体におけるリソソーム蓄積症 (L S D) を処置する方法。(項目 37)

前記 L S D が、1つ以上のムコ多糖体沈着症 I I 型（ハンター症候群）、ムコ多糖体沈着症 I 型（ハーラー症候群）、アスパルチルグルコサミン尿、コレステロールエステル蓄積症、ウォルマン病、シスチン蓄積症、ダノン病、ファブリー病、ファーバー脂肪肉芽腫症、ファーバー病、フコース蓄積症、ガラクトシリドーシス I 型 / I I 型、ゴーシェ病 I 型 / I I 型 / I I I 型、ゴーシェ病、グロボイド細胞白質ジストロフィ（g l o b o i d c e l l l e u c o d y s t r o p h y ）、クラッベ病、糖原貯蔵障害 I I 、ポンペ病、G M 1 - ガングリオシドーシス I 型 / I I 型 / I I I 型、G M 2 - ガングリオシドーシス I 型、ティ・サックス病、G M 2 - ガングリオシドーシス I I 型、サンドホフ病、G M 2 - ガングリオシドーシス、- マンノシドーシス I 型 / I I 型、- マンノシドーシス、異染性白質ジストロフィ（m e t a c h r o m a t i c l e u c o d y s t r o p h y ）、ムコリピドーシス I 型、シリドーシス I 型 / I I 型ムコリピドーシス I I 型 / I I I 型 I 細胞病、ムコリピドーシス I I I C 型偽性ハーラーボリジストロフィ、ムコ多糖体沈着症 I I I A 型、サンフィリッポ症候群、ムコ多糖体沈着症 I I I B 型、ムコ多糖体沈着症 I I I C 型、ムコ多糖体沈着症 I I I D 型、ムコ多糖体沈着症 I V A 型、モルキオ症候群、ムコ多糖体沈着症 I V B 型、ムコ多糖体沈着症 V I 型、ムコ多糖体沈着症 V I I 型、スライ症候群、ムコ多糖体沈着症 I X 型、多発性スルファターーゼ欠損症、神経セロイドリポフスチノーシス、C L N 1 バッテン病、ニーマン・ピック病 N B 型、ニーマン・ピック病、ニーマン・ピック病 C 1 型、ニーマン・ピック病 C 2 型、濃化異骨症、シンドラー病 I 型 / I I 型、シンドラー病、およびシアル酸蓄積症から選択される、項目 36 に記載の方法。

(項目 38)

前記 L S D がムコ多糖体沈着症 I I 型（ハンター症候群）であり、前記実質的に脱リン酸化された L S D タンパク質がヒトイズロン酸 - 2 - スルファターゼである、項目 37 に記載の方法。

(項目 39)

前記 L S D がムコ多糖体沈着症 I 型（ハーラー症候群）であり、前記実質的に脱リン酸化された L S D タンパク質がヒト L - イズロニダーゼである、項目 37 に記載の方法。

(項目 40)

前記 L S D が中枢神経系（C N S ）合併症を有するか、前記被験体が前記 L S D の C N S 合併症を発症するリスクがある、項目 36 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 41)

実質的に脱リン酸化されたヒトイズロン酸 - 2 - スルファターゼ（I D S ）を產生する方法であって、ヒト細胞株中で前記ヒトイ D S を組換え的に產生する工程、組換え的に產生された前記ヒトイ D S を、同一のヒト細胞株中で產生された非処理ヒトイ D S と比較して前記ヒトイ D S のマンノース - 6 - リン酸（M 6 P ）含有量が少なくとも約 50 % 、60 % 、70 % 、80 % 、90 % 、95 % 、98 % 、または 99 % 減少するのに十分な時間ホスファターゼで処理する工程を含む、方法。

(項目 42)

前記ヒト細胞株が H T - 1 0 8 0 線維肉腫細胞株である、項目 41 に記載の方法。

(項目 43)

前記 I D S が、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むか、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、項目 41 に記載の方法。

(項目 44)

前記ホスファターゼが仔牛腸アルカリホスファターゼ（C I P ）である、項目 41 に記載の方法。

(項目 45)

前記 C I P がアクリルビーズに結合している、項目 44 に記載の方法。

(項目 46)

10

20

20

30

40

50

前記ヒトIDSをヒトp97配列に融合する、項目41～44のいずれか1項に記載の方法。

(項目47)

前記IDSをヒトp97ポリペプチドに結合体化する工程をさらに含む、項目41～45のいずれか1項に記載の方法。

(項目48)

単離ヒトイズロン酸-2-スルファターゼ(IDS)ポリペプチドであって、前記ヒトIDSポリペプチドが配列番号2のアミノ酸配列またはその変形体を含むか配列番号2のアミノ酸配列またはその変形体からなり、マンノース-6-リン酸(M6P)含有量が約1.2pmol M6P/pmol IDSタンパク質未満である、単離ヒトイズロン酸-2-スルファターゼ(IDS)ポリペプチド。

10

(項目49)

前記M6P含有量が約0.5pmol M6P/pmol IDSタンパク質未満である、項目48に記載の単離ポリペプチド。

(項目50)

前記M6P含有量が約0.15pmol M6P/pmol IDSタンパク質または約0.15pmol M6P/pmol IDSタンパク質未満である、項目48に記載の単離ポリペプチド。

【図面の簡単な説明】

【0028】

20

【図1】図1は、静脈内注射後のマウスの脳実質中の試験タンパク質の蓄積レベルを示す(IDS、イズロン酸-2-スルファターゼ；d p IDS、脱リン酸化イズロン酸-2-スルファターゼ；MTf-IDS、p97-IDS結合体；MTf-d p IDS、p97-d p IDS結合体)。

【図2】図2は、静脈内感染後のマウスの脳実質(BBBの内側)と脳毛細血管(BBBの外側)との間の試験タンパク質の分布を示す。

【図3】図3は、以下の3つのN結合型グリカンを示す：マンノース残基のみがコアに付着したオリゴマンノースグリカン；N-アセチルグルコサミルトランスフェラーゼ(G1cNAcT)がコアに付着した複合グリカン；およびマンノース残基のみがコアのMan

1-6アームに付着し、1つまたは2つのアンテナがMan 1-3アーム上に存在するハイブリッドグリカン。

30

【図4】図4は、シス・ゴルジ内のオリゴマンノースN-グリカン上のマンノース残基のC-6にG1cNAc-1-Pを獲得するリソソームタンパク質の産生を示す。N-アセチル-グルコサミンを、トランス・ゴルジ内でグリコシダーゼによって除去してリン酸残基を露呈させる。

【図5】図5は、p97(MTf)への結合体化を含むか含まない(without or without)脳実質内のIDSおよびd p IDSの分布を示す。

【図6】図6は、イデュルスルファーゼ(ヒトIDS)のアミノ酸配列(配列番号2)を示し、N結合型グリコシル化部位を示す。

【発明を実施するための形態】

【0029】

40

発明の詳細な説明

本発明の実施形態は、リソソーム蓄積症(LSD)タンパク質(イズロン酸-2-スルファターゼ(IDS)など)の脱リン酸化形態が、通常のリン酸化タンパク質と比較して血液脳関門(BBB)を通過して中枢神経系(CNS)組織内に移行する能力が有意に増加させたという発見に一部基づく。p97(メラノトランスフェリン)ポリペプチド配列への結合体化により、BBBを通過したCNS組織内への脱リン酸化されたLSDタンパク質の移行をさらに改善することができる。

【0030】

多数のリソソーム酵素は、リン酸化N-グリカンの生成を含む特殊な輸送経路によって

50

リソソームを標的にする。リン酸化工程は、典型的には、シス・ゴルジで起こり、オリゴマンノースN結合型グリカンのマンノース残基のC-6へのGlcNAc-1-Pの移行を含む。トランス・ゴルジ内のグリコシダーゼがN-アセチルグルコサミンを除去してマンノース-6-リン酸残基を生成する。かかる残基がレクチン受容体（マンノース-6-リン酸受容体）によって認識されてリソソーム酵素を酸性化区画内に輸送し、この区画でこの酵素が受容体から放出され、最終的にリソソームに移行する。ここで、例えば酸性ホスファターゼとのインキュベーションによるオリゴマンノースN結合型グリカンからのリン酸基の除去により、BBBを通過する移行が増加するが依然として中枢神経系細胞内のリソソーム区画に十分に輸送される方法でLSDタンパク質（イズロン酸-2-スルファターゼなど）の薬物動態学的性質が変化するということを予想外に見出した。

10

【0031】

したがって、本明細書中に記載の脱リン酸化されたLSDタンパク質および関連するp97結合体は、酵素代償療法（ERT）によるリソソーム蓄積症（LSD）（神経系またはCNS区画を有するか有するリスクの有るLSDが含まれるが、これらに限定されない）の処置の改善で種々の用途を見出すことができる。特定の実施形態では、LSDタンパク質は、ヒトp97ポリペプチドに任意選択的に結合体化されたIDSの実質的に脱リン酸化されたバージョンであり、このバージョンは、通常のリン酸化されたタンパク質を使用するERTと比較して、例えば、ハンター症候群の処置を改善するために使用することができる。他の実施形態では、LSDタンパク質は、ヒトp97ポリペプチドに任意選択的に結合体化されたIDUの実質的に脱リン酸化されたバージョンであり、このバージョンは、通常のリン酸化されたタンパク質を使用するERTと比較して、例えば、ハーラー症候群の処置を改善するために使用することができる。

20

【0032】

他の利点および利益は、当業者に明らかであろう。

【0033】

定義

他で定義しない限り、本明細書中で使用した全ての技術用語および科学用語は、本発明の属する当業者によって一般に理解される意味を有する。本明細書中に記載の方法および材料と類似するか等価な任意の方法および材料を本発明の実施または試験で使用することができるが、好ましい方法および材料を記載する。本発明の目的のために、以下の用語を以下のように定義する。

30

【0034】

冠詞「a」および「an」を、本明細書中で、冠詞の文法上の目的語が1つまたは1つを超える（すなわち、少なくとも1つ）をいうために使用する。例として、「要素」は、1つの要素または1つを超える要素を意味する。

【0035】

「約」は、基準の量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、含量、重量、または長さの30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1%まで変化する量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、含量、重量、または長さを意味する。

40

【0036】

本明細書中で使用する場合、用語「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸の両方ならびにアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣物を意味することを意図する。天然に存在するアミノ酸には、タンパク質合成中に利用される20（L）-アミノ酸ならびに例えば4-ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、デスモシン、イソデスモシン、ホモシステイン、シトルリン、およびオルニチンなどの他のアミノ酸が含まれる。天然に存在しないアミノ酸には、例えば、当業者に公知の(D)-アミノ酸、ノルロイシン、ノルバリン、p-フルオロフェニルアラニン、およびエチオニンなどが含まれる。アミノ酸アナログには、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸の修飾形態が含まれる。かかる修飾物には、例えば、アミノ酸上の化学基および化学

50

部分の置換もしくは交換またはアミノ酸の誘導体化による修飾物が含まれ得る。アミノ酸模倣物には、例えば、基準アミノ酸の電荷および電荷間隔の特徴などの機能的に類似の性質を示す有機構造が含まれる。例えば、アルギニン (Arg または R) を模倣する有機構造は、類似の分子空間内に存在する正電荷部分を有し、天然に存在する Arg アミノ酸の側鎖の e - アミノ基と同一の可動度を有するであろう。模倣物には、アミノ酸またはアミノ酸官能基の最適な間隔および電荷相互作用を維持するための制限された構造物も含まれる。当業者は、どの構造が機能的に等価なアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣物を構成するのかを承知しているか決定することができる。

【 0 0 3 7 】

本明細書を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、用語「comprise」、「comprises」、および「comprising」は、言及した工程もしくは要素または工程もしくは要素の群を含むが、任意の他の工程もしくは要素または工程もしくは要素の群を排除しないことを意味すると理解されるであろう。「～からなる」は、句「～からなる」に続くあらゆる用語を含み、且つそれに制限されることを意味する。したがって、句「～からなる」は、列挙した要素が必要または必須であり、他の要素が存在できないことを示す。「～本質的になる」は、この句の後に列挙された任意の要素を含み、且つ、列挙した要素の開示で特定された活性または作用に干渉も寄与もしない他の要素に制限されることを意味する。したがって、句「～本質的になる」は、列挙した要素が必要とされるか必須であるが、他の要素が任意選択的であり、他の要素が列挙した要素の活性または作用に実質的に影響を及ぼすかどうかに依存して存在しても存在しなくても良いことを示す。

【 0 0 3 8 】

用語「結合体」は、薬剤または他の分子（例えば、生物学的に活性な分子）の p 97 ポリペプチドへの共有結合的または非共有結合的な付着または連結の結果として形成された物質をいうことを意図する。結合体ポリペプチドの一例は、「融合タンパク質」または「融合ポリペプチド」（すなわち、元は個別のポリペプチドをコードする 2 つ以上のコード配列の連結によって作製されたポリペプチド）であり、連結されたコード配列の翻訳によって典型的には各々の個別のポリペプチド由来の機能的性質を有する単一の融合ポリペプチドが得られる。

【 0 0 3 9 】

本明細書中で使用する場合、用語「機能」および「機能的な」などは、生物学的、酵素的、または治療的な機能をいう。

【 0 0 4 0 】

用語「グリカン」は、通常はモノサッカリドの O - グリコシド連結を含むポリサッカリドまたはオリゴサッカリドをいう。グリカンはモノサッカリド残基のホモポリマーまたはヘテロポリマーであり得、そして / または直鎖または分岐鎖であり得る。グリコシル化は、グリカンがタンパク質の官能基に付着される同時翻訳反応または翻訳後反応を含む。タンパク質会合グリカンの例には、N 結合型グリカン、O 結合型グリカン、ホスホグリカン、C 結合型グリカン、およびグリコホスファチジルイノシトール (G P I) - アンカーが含まれる。N 結合型グリカンはアスペラギン側鎖またはアルギニン側鎖の窒素に付着し、O 結合型グリカンはセリン側鎖、トレオニン側鎖、チロシン側鎖、ヒドロキシリジン側鎖、またはヒドロキシプロリン側鎖のヒドロキシ酸素に付着する。N 結合型グリカンは共通のコア糖配列 Man 1 - 6 (Man 1 - 3) Man 1 - 4 G 1 c N A c 1 - 4 G 1 c N A c 1 - A s n - X - S e r / T h r を共有し、以下の 3 つの型に分類される：(1) マンノース残基のみがコアに付着しているオリゴマンノース；(2) N - アセチルグルコサミルトランスフェラーゼ (G 1 c N A c T) から始まる「アンテナ」がコアに付着している複合体；および(3) マンノース残基のみがコアの Man 1 - 6 アームに付着し、且つ 1 つまたは 2 つのアンテナが Man 1 - 3 アーム上に存在するハイブリッド（図 3 を参照のこと）。図 4 は、シス・ゴルジ内のオリゴマンノース N - グリカン上のマンノース残基の C - 6 に G 1 c N A c - 1 - P を獲得するリソソームタンパク質（例えば

10

20

30

40

50

、 L S D タンパク質) の產生を示し ; N - アセチル - グルコサミンを、トランス・ゴルジ内でグリコシダーゼによって除去し、それにより、マンノース - 6 - リン酸残基が露呈され、これがマンノース - 6 - リン酸受容体によって認識されて酸性化プレリソーム区画に進行する。

【 0 0 4 1 】

「相同性」は、同一であるか、保存的置換を構成するアミノ酸数の百分率をいう。相同性を、 G A P (D e v e r a u x r a , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h . 1 2 , 3 8 7 - 3 9 5 , 1 9 8 4) (本明細書中で参考として援用される) などの配列比較プログラムを使用して決定することができる。この方法では、本明細書中に引用したものと類似するか実質的に異なる長さの配列を、例えば、 G A P によって使用される比較アルゴリズムによるアラインメントへのギャップ (かかるギャップは決定されている) の挿入によって比較することができる。 10

【 0 0 4 2 】

「単離された」は、未変性の状態で通常は材料に付随する成分を実質的または本質的に含まない材料を意味する。例えば、「単離ペプチド」または「単離ポリペプチド」などは、本明細書中で使用する場合、その天然の細胞環境および他の細胞成分との会合 (すなわち、 *in vivo* 基質と有意に会合していない) からのペプチド分子またはポリペプチド分子の *in vitro* 単離および / または精製を含む。

【 0 0 4 3 】

用語「連結」、「リンカー」、「リンカー部分」、または「 L 」を、目的の薬剤から p 9 7 ポリペプチドフラグメントを分離するためか、第 1 の薬剤を別の薬剤から分離するために (例えば、 2 つ以上の薬剤が連結して p 9 7 結合体を形成する場合) 使用することができるリンカーをいうために本明細書中で使用する。リンカーは、生理学的に安定であり得るか、酵素分解性リンカー (例えば、タンパク質分解性リンカー) などの放出可能なりンカーを含むことができる。一定の態様では、リンカーは、例えば、 p 9 7 融合タンパク質の一部としてのペプチドリンカーであり得る。いくつかの態様では、リンカーは、非ペプチドリンカーまたは非タンパク質リンカーであり得る。いくつかの態様では、リンカーは、ナノ粒子などの粒子であり得る。 20

【 0 0 4 4 】

用語「調整」および「変化」には、コントロールと比較して統計的に有意なまたは生理学的に有意な量または程度の「増加」、「増強」、または「刺激」および「減少」または「軽減」が含まれる。「増加」量、「刺激」量、または「増強」量は、典型的には、「統計的に有意な」量であり、組成物の非存在下 (例えば、本発明の結合体のポリペプチドの非存在下) またはコントロールの組成物、サンプル、もしくは試験被験体による產生量の 1.1 倍、 1.2 倍、 2 倍、 3 倍、 4 倍、 5 倍、 6 倍、 7 倍、 8 倍、 9 倍、 10 倍、 15 倍、 20 倍、 30 倍、またはそれを超える (例えば、 500 倍、 1000 倍) (その間の全ての整数および小数点ならびに 1 超 (例えば、 1.5 、 1.6 、 1.7 、 1.8 など) が含まれる) 増加が含まれ得る。「減少」量または「軽減」量は、典型的には、「統計的に有意な」量であり、組成物の非存在下またはコントロール組成物による產生量の 1% 、 2% 、 3% 、 4% 、 5% 、 6% 、 7% 、 8% 、 9% 、 10% 、 11% 、 12% 、 13% 、 14% 、 15% 、 16% 、 17% 、 18% 、 19% 、 20% 、 25% 、 30% 、 35% 、 40% 、 45% 、 50% 、 55% 、 60% 、 65% 、 70% 、 75% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、または 100% 減少 (その間の全ての整数が含まれる) が含まれ得る。 30 1 つの非限定的な例として、コントロールは、リソーム貯蔵タンパク質の通常のリン酸化バージョンに対する本明細書中に記載の実質的に脱リン酸化された (d p) リソーム貯蔵タンパク質またはポリペプチドのみに対する p 9 7 - ポリペプチド結合体の活性 (血液脳関門を通過する輸送 / 送達の量もしくは速度、中枢神経系組織への分布の速度および / もしくはレベル、ならびに / または血漿、中枢神経系組織、もしくは任意の他の全身または末梢の非中枢神経系組織の C m a x など) を比較することができる。比較および「統計的に有意な」量の他の例を、本明細書中に記載している。 40 50

【0045】

一定の実施形態では、組成物中の任意の所与のポリペプチド（例えば、実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質、p 97 結合体）の「純度」を、具体的に定義することができる。例えば、一定の組成物は、例えば、高压液体クロマトグラフィ（HPLC）（化合物を分離、同定、および定量するために生化学および分析化学で頻繁に使用されるカラムクロマトグラフィの周知の形態）（決して制限されない）で測定した場合に純度が少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100%（その間の全ての小数が含まれる）であるポリペプチドを含むことができる。

【0046】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」および「酵素」を、アミノ酸残基のポリマーならびにその改変体および合成アナログをいうために本明細書中で交換可能に使用する。したがって、これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が合成の天然に存在しないアミノ酸（対応する天然に存在するアミノ酸の化学的アナログなど）であるアミノ酸ポリマーおよび天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用する。本明細書中に記載のポリペプチドは、産物の特定の長さに制限されない。したがって、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質はポリペプチドの定義内に含まれ、他で具体的に示さない限り、かかる用語を、本明細書中で交換可能に使用することができる。本明細書中に記載のポリペプチドはまた、発現後修飾（グリコシル化、アセチル化、およびリン酸化など）ならびに天然に存在するおよび天然に存在しない当該分野で公知の他の修飾を含むことができる。ポリペプチドは、タンパク質全体またはそのサブシーケンス、フラグメント、改変体、または誘導体であり得る。

10

【0047】

「生理学的に切断可能な」または「加水分解可能な」または「分解可能な」結合は、生理学的条件下で水と反応する（すなわち、加水分解される）結合である。結合が水中で加水分解する傾向は、2つの中心原子を結びつける一般的な連結型だけでなく、これらの中心原子に付着する置換基にも依存するであろう。適切な加水分解的に不安定か弱い連結には、以下が含まれるが、これらに限定されない：カルボン酸エステル、リン酸エステル、無水物、アセタール、ケタール、アシルオキシアルキルエーテル、イミン、オルトエステル、チオエステル、チオールエステル、カルボナート、ならびにヒドラゾン、ペプチドおよびオリゴヌクレオチド。

20

【0048】

「放出可能なリンカー」には、生理学的に切断可能なリンカーおよび酵素分解性リンカーが含まれるが、これらに限定されない。したがって、「放出可能なリンカー」は、自発性加水分解または生理学的条件下でのいくつかの他の機構（例えば、酵素触媒、酸触媒、塩基触媒など）による切断のいずれかを経得るリンカーである。例えば、「放出可能なリンカー」は、駆動力として塩基でプロトン（例えば、イオン化水素原子、H⁺）が引き抜かれる脱離反応に関与し得る。本明細書中の目的のために、「放出可能なリンカー」は、「分解性リンカー」と同義である。「酵素分解性連結」は、連結（例えば、1つ以上の酵素酵素（例えば、ペプチダーゼまたはプロテアーゼ）による分解に供されるアミノ酸配列）を含む。特定の実施形態では、放出可能なリンカーの pH 7.4、25（例えば、生理学的 pH、ヒトの体温（例えば、in vivo）での半減期は、約 30 分間、約 1 時間、約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 12 時間、約 18 時間、約 24 時間、約 36 時間、約 48 時間、約 72 時間、または約 96 時間またはそれ未満である。

30

【0049】

用語「基準配列」は、一般に、別の配列と比較される核酸コード配列（すなわち、アミノ酸配列）をいう。本明細書中に記載の全てのポリペプチド配列およびポリヌクレオチド配列（名称によって記載されている配列および配列表中に記載の配列が含まれる）が基準配列として含まれる。

40

50

【0050】

用語「配列同一性」（例えば、「～と50%同一の配列」を含む）は、本明細書中で使用する場合、配列が比較ウィンドウにわたってヌクレオチド対ヌクレオチドを基本とするかアミノ酸対アミノ酸を基本として同一である程度をいう。したがって、「配列同一率」を、比較ウィンドウにわたる最適にアラインメントした2つの配列の比較、両方の配列中に同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）または同一のアミノ酸残基（例えば、A la、P ro、S er、T hr、G ly、V al、L eu、I le、P he、T yr、T rp、L ys、A rg、H is、A sp、G lu、A sn、G ln、C ys、およびM et）が生じる位置の数を決定して適合位置数を得ること、適合位置数を比較ウィンドウ中の総位置数（すなわち、ウィンドウサイズ）で割ること、および結果に100を掛けて配列同一率を得ることによって計算することができる。典型的にはポリペプチド改変体が基準ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を維持する、本明細書中に記載の任意の基準配列（例えば、配列表を参照のこと）と少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%配列が同一のヌクレオチドおよびポリペプチドが含まれる。10

【0051】

2つ以上のポリヌクレオチド間またはポリペプチド間の配列の関係を説明するために使用される用語には、「基準配列」、「比較ウィンドウ」、「配列同一性」、「配列同一率」および「実質的な同一性」が含まれる。「基準配列」は、少なくとも12個であるが、頻繁には15～18個、しばしば少なくとも25個の長さのモノマー単位（ヌクレオチドおよびアミノ酸残基が含まれる）である。2つのポリヌクレオチドが、それぞれ、（1）2つのポリヌクレオチド間で類似する配列（すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の一部のみ）、および（2）2つのポリヌクレオチド間で相違する配列を含むことができるので、2つ（またはそれを超える）ポリヌクレオチドの間の配列比較を、典型的には、2つのポリヌクレオチドの配列を「比較ウィンドウ」にわたって比較して配列が類似する局所領域を同定および比較することによって行う。「比較ウィンドウ」は、2配列を最適にアラインメントした後にある配列を同数の連続する位置の基準配列と比較する少なくとも6個（通常は約50個～約100個、より通常には約100個～約150個）の連続する位置の概念的セグメントをいう。比較ウィンドウは、基準配列（付加や欠失を含まない）と比較した場合に2配列の最適なアラインメントのために約20%以下の付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことができる。比較ウィンドウのアラインメントに最適な配列アラインメントを、コンピュータ化されたアルゴリズムの実行（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA中のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）または観察および選択した任意の種々の方法によって作成された最良のアラインメント（すなわち、結果として比較ウィンドウにわたって最高の相同率が得られる）によって行うことができる。例えば、Altschulら、Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997に開示のプログラムのBLASTファミリーも参考することができる。配列分析の詳細な考察を、Ausubelら、"Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15のUnit 19.3に見出すことができる。203040

【0052】

「統計的に有意な」は、結果が偶然に起こった見込みが無いことを意味する。統計的有意性を、当該分野で公知の任意の方法によって決定することができる。一般的に使用されている有意性の基準には、p値が含まれ、これは、帰無仮説が真実である場合に認められた事象が起こる頻度または確率である。得られたp値が有意水準より小さい場合、帰無仮説は棄却される。単純事例では、有意水準を0.05以下のp値で定義する。

【0053】

用語「溶解性」は、ポリペプチドなどの薬剤が液体溶媒に溶解して均一な溶液を形成する性質をいう。溶解性を、典型的には、溶媒の単位体積あたりの溶質の質量（溶媒 1 kg あたりの溶質の g 数、g / dL (100 mL)、mg / mL など）、容積モル濃度、重量モル濃度、モル分率、または濃度の他の類似の記載のいずれかによる濃度として示す。1 溶媒量あたりの溶解することができる溶質の最大平衡量は、特定の条件下（温度、圧力、pH、および溶媒の性質が含まれる）でのその溶媒への溶質の溶解性である。一定の実施形態では、溶解性を、生理学的 pH または他の pH（例えば、pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0、または pH 7.4）で測定する。一定の実施形態では、溶解性を、水または PBS もしくは NaCl (NaP を含むか含まない) などの生理学的緩衝液中で測定する。特定の実施形態では、溶解性を、相対的により低い pH（例えば、pH 6.0）および相対的により高い塩（例えば、500 mM NaCl および 10 mM NaP）で測定する。一定の実施形態では、溶解性を、血液または血清などの体液（溶媒）中で測定する。一定の実施形態では、温度はおよそ室温（例えば、約 20、21、22、23、24、25）またはおよそ体温（約 37）であり得る。一定の実施形態では、実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質または p97 結合体の室温または約 37 での溶解度は、少なくとも約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、または 30 mg / mL である。
10

【0054】

「被験体」には、本明細書中で使用する場合、本発明の実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質または p97 結合体で処置または診断することができる症状を示すか、症状を示すリスクがある任意の動物が含まれる。適切な被験体（患者）には、実験動物（マウス、ラット、ウサギ、またはモルモットなど）、家畜、および飼育動物またはペット（ネコまたはイヌなど）が含まれる。非ヒト霊長類、好ましくはヒト患者が含まれる。特定の実施形態では、被験体は、ハンター症候群などのリソソーム貯蔵障害を有する。
20

【0055】

「実質的に」または「本質的に」は、ほぼ完全または十分であることを意味する（例えば、いくつかの所与の量の約 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを超える）。いくつかの態様では、リソソーム貯蔵障害タンパク質は、例えば、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）中に産生された対応する野生型タンパク質と比較して実質的に脱リン酸化されている。
30

【0056】

「実質的に含まない」は、所与の量がほぼ完全にまたは完全に存在しないことをいう（例えば、いくつかの所与の量の約 30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5% 未満）。例えば、一定の組成物は、細胞タンパク質、膜、核酸、内毒素、または他の夾雑物を「実質的に含まない」可能性がある。いくつかの態様では、リソソーム貯蔵障害タンパク質は、リン酸基を「実質的に含まない」。

【0057】

「処置」または「処置すること」には、本明細書中で使用する場合、疾患または容態の症状または病態に及ぼす任意の所望の影響が含まれ、処置される疾患または容態の 1 つ以上の測定可能なマーカーの最小の変化または改善でさえ含まれ得る。「処置」または「処置すること」は、疾患もしくは容態またはその関連する症状の完全な根絶または治癒を必ずしも示さない。この処置を受ける被験体は、処置を必要とする任意の被験体である。臨床的改善の例示的なマーカーは、当業者に明らかであろう。
40

【0058】

用語「野生型」は、天然に存在する供給源から単離した場合に遺伝子または遺伝子産物の特徴を有する遺伝子または遺伝子産物をいう。野生型の遺伝子または遺伝子産物（例えば、ポリペプチド）は、集団中で最も頻繁に認められるものであり、したがって、遺伝子の「正常」形態または「野生型」形態が任意にデザインされる。

【0059】

実質的に脱リン酸化されたリソソーム貯蔵障害タンパク質

上述の通り、本発明の実施形態は、実質的に脱リン酸化されたリソソーム貯蔵障害（LSD）タンパク質または1つ以上のリソソーム蓄積症に関連するリソソームタンパク質を含む。例には、リソソームヒドロラーゼならびに老廃物および細胞デブリ（脂質、糖タンパク質、およびムコ多糖など）、膜貫通タンパク質、可溶性非酵素タンパク質、膜輸送タンパク質、ならびに酵素を翻訳後に修飾するタンパク質を代謝する他のリソソーム酵素が含まれる。

【0060】

例示的なリソソームタンパク質またはLSDタンパク質には、イズロン酸-2-スルファターゼ、L-イズロニダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、酸性リパーゼ、システィン輸送体、Lamp-2、-ガラクトシダーゼA、酸性セラミダーゼ、-L-フコシダーゼ、-ヘキソサミニダーゼA、GM2-ガングリオシドアクトベーター（GM2A）、-D-マンノシダーゼ、-D-マンノシダーゼ、アリールスルファターゼA、サボシンB、ノイラミニダーゼ、-N-アセチルグルコサミニダーゼホスホトランスフェラーゼ、ホスホトランスフェラーゼ-サブユニット、ヘパラン-N-スルファターゼ、-N-アセチルグルコサミニダーゼ、アセチルCoA:N-アセチルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、ガラクトース6-スルファターゼ、-ガラクトシダーゼ、N-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼ、ヒアルロノグルコサミニダーゼ、スルファターゼ、パルミトイロプロテインチオエステラーゼ、トリペプチジルペプチダーゼI、酸性スフィンゴミエリナーゼ、カテプシンA、カテプシンK、-ガラクトシダーゼB、NPC1、NPC2、シアリン、およびシアル酸輸送体が含まれる。特定の実施形態では、LSDタンパク質はヒトタンパク質である。

10

20

30

【0061】

一定の実施形態では、実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質は、対応するコントロールLSDタンパク質と比較して少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%（すなわち、完全に）脱リン酸化されている。

【0062】

いくつかの実施形態では、実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質は、リン酸基を実質的に含まない（例えば、LSDタンパク質は、対応するコントロールLSDタンパク質の約1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%未満のリン酸基を有する）。タンパク質リン酸化の変化を、当該分野の日常的な技術（全分子量を測定するためのSDS-PAGE分析、同位体標識、および質量分析（Bonenfantら, PNAS USA. 100: 880-885, 2003を参照のこと）；リンタンパク質特異的抗体を使用したウェスタンブロッティングおよびELISA；ならびに蛍光リン酸化センサー色素を使用したタンパク質リン酸化状態の定量分析（Molecular ProbesのPro-Q Diamond（登録商標）色素を参照のこと）など）にしたがって測定することができる。

【0063】

対応する「コントロール」タンパク質には、通常または野生型のグリコシル化機構およびリン酸化機構を有する哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）（例えば、CHO細胞、HEK細胞）中で組換え的に產生され、好ましくは例えばグリコシダーゼまたはホスファターゼなどの酵素で処置されていない同型のタンパク質（例えば、同一の属および/または種由来の同一のタンパク質名、同一またはほぼ同一のアミノ酸配列）が含まれる。いくつかの態様では、対応するコントロールタンパク質は、実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質の野生型バージョンである。特定の実施形態では、例えば、LSDタンパク質がイズロン酸-2-スルファターゼである場合、対応するコントロールタンパク質は、ヒト細胞（HT-1080ヒト線維肉腫細胞株など）中で產生されたイデュルスルファーゼ（Elaprase（登録商標））である（Garciaら, Mol. Genet. Metab. 91: 183-90, 2007；および図5を参照のこと）。

40

50

【0064】

脱リン酸化LSDタンパク質を、当該分野の種々の技術にしたがって調製することができる。例えば、多数のリン酸基がN結合型オリゴマンノースグリカン上のマンノース-6-リン酸残基に会合するので、LSDタンパク質上のグリカン数またはグリコシル化度の減少は、リン酸基数またはリン酸化度を同様に減少させ得る。したがって、グリカン会合リン酸化レベルの減少を、例えば、潜在的なグリコシル化部位に会合する1つ以上の残基（例えば、N結合型グリコシル化部位中の残基（Asn-X-SerまたはAsn-X-Thr（式中、XはPro以外の任意のアミノ酸である）など）の変異、酵素的脱グリコシル化（例えば、ペプチド-N-グリコシダーゼF（PNGアーゼF）、マンノシダーゼでの処置）、N-グリカンプロセシングを阻害するための細胞培養培地または細胞培養条件の操作、および/またはグリコシル化能力が変化したか、減少したか、持たない哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または他の細胞型中でのLSDタンパク質の組換え産生によって行うことができる（例えば、Hosslerら, Glycobiology. 19: 936-949, 2009；および Cummings and Eskoら, editors, Essentials of Glycobiology. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009（第8章、第46章、および第50章を含む）を参照のこと）。グリコシル化能力が有意に減少した細胞の例には、大腸菌などの多数の細菌が含まれる。

【0065】

しかし、一定の例では、そのグリコシル化状態を有意に減少させることなく（すなわち、グリカン（N結合型オリゴマンノースグリカンが含まれる）の数または量を有意に減少させることなく）LSDタンパク質のリン酸化を減少させることができが好ましい。それ故、一定の実施形態では、LSDタンパク質は、対応するコントロールタンパク質と比較して実質的に脱リン酸化されているが、コントロールタンパク質と同一または実質的に同一のグリカン数またはグリコシル化度を有する。特定の実施形態では、実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質は、対応するコントロールタンパク質と同一または実質的に同一のN結合型オリゴマンノースグリカンの数または程度を有する。例には、実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質が対応するコントロールタンパク質として少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%のグリカン（例えば、N結合型オリゴマンノースグリカン）の数またはグリコシル化度を有することが含まれる。グリコシル化状態を、当該分野の種々の技術（全分子量を測定するためのSDS-PAGE分析、PNGアーゼF（ペプチド:N-グリコシダーゼF）でのタンパク質の酵素前処理および蛍光二次元ゲルまたは二次元ゲルウェスタンプロッティングを組み合わせた蛍光二次元ベースの方法（Grahamら, Proteomics. 8: 4919-30, 2008を参照のこと）、ならびにN結合型糖タンパク質の質量分析ベースの定量方法（Rebecchiら, Current Proteomics. 8: 269-277 (9), 2011を参照のこと）など）にしたがって測定することができる。

【0066】

これらおよび関連する実施形態では、特定のグリカン（例えば、N結合型オリゴマンノースグリカン；図4を参照のこと）を、対応するコントロールタンパク質のグリカンと比較して実質的に脱リン酸化することができる。例えば、一定の実施形態では、LSDタンパク質のグリカン（例えば、N結合型オリゴマンノースグリカン）は、対応するコントロールLSDタンパク質のグリカンと比較して少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%（すなわち、完全に）脱リン酸化されている。いくつかの態様では、LSDタンパク質のグリカン（例えば、N結合型オリゴマンノースグリカン）は、リン酸基を実質的に含まない（例えば、対応するコントロールLSDタンパク質のグリカンの約1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%未満のリン酸基を有する）。一定の実施形態では、実質的に脱リン酸化されたLSDタンパ

ク質は、マンノース - 6 - リン酸 (M6P) 残基を実質的に含まない (例えば、対応するコントロール LSD タンパク質の約 1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または 50% 未満の M6P 残基を有する)。

【0067】

いくつかの実施形態では、グリコシル化およびリン酸化された LSD タンパク質を、哺乳動物細胞または他の細胞中で产生し、次いで、1つ以上のホスファターゼにて in vitro で処置して任意選択的にグリカン数またはグリコシル化度を有意に減少させることなくリン酸基 (例えば、N 結合型オリゴマンノースグリカンに会合したマンノース - 6 - リン酸残基) の数を減少させることができる (実施例 1 を参照のこと)。ホスファターゼの一般例には、酸性ホスファターゼおよびアルカリホスファターゼが含まれる。酸性ホスファターゼの例には、前立腺酸性ホスファターゼ、リソソーム酸性ホスファターゼ、赤血球酸性ホスファターゼ、マクロファージ酸性ホスファターゼ、破骨細胞酸性ホスファターゼ (acid phosphate)、およびジャガイモ酸性ホスファターゼが含まれる。一般的に使用されているアルカリホスファターゼの例には、エビアルカリホスファターゼ、仔牛腸アルカリホスファターゼ、胎盤アルカリホスファターゼ、および分泌型アルカリホスファターゼ (すなわち、胎盤アルカリホスファターゼの C 末端短縮物) が含まれる。

【0068】

いくつかの態様では、実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質は、ヒトイズロニダーゼ (-L- イズロニダーゼ; IDU)、またはその活性フラグメントもしくは改変体である。イズロニダーゼは、グリコサミノグリカン (デルマタン硫酸およびヘパラン硫酸など) の生成に関与するリソソーム酵素であり、その欠損は MPS I (すわなち、ハーラー症候群) に関連する。配列番号 3 は、ヒトイズロニダーゼの一次アミノ酸配列を提供する。

【0069】

ヒトイDUは、6つの潜在的なN結合型グリコシル化部位 (主に、「複合型」オリゴサッカリド) を有し、そのうちの少なくとも2つがマンノース - 6 - リン酸化されていることが示されている (Brooksら, Glycobiology. 11: 741 - 750, 2001; および Zhaoら, J. Biol. Chem. 272: 22758 - 22765: 1997 を参照のこと)。いくつかの実施形態では、実質的に脱リン酸化されたヒトイDUは、これらのグリコシル化部位のうちの1つ以上がN結合型グリカンおよびその会合するマンノース - 6 - リン酸残基を減少させるために変異している。それ故、これらおよび関連する実施形態では、ヒトイDUタンパク質は、野生型ヒトイDUタンパク質と比較して実質的に脱グリコシル化されており (例えば、N結合型オリゴマンノースグリカン) 且つ実質的に脱リン酸化されている。

【0070】

特定の態様では、実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質は、ヒトイズロン酸 - 2 - スルファターゼ (IDS)、またはその活性フラグメントもしくは改変体である。IDS (イズロン酸 - 2 - スルファターゼ; EC 3.1.6.13) は、グリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸およびデルマタン硫酸の分解に関与するリソソームエキソスルファターゼである。IDS 欠損により、リソソーム貯蔵障害 MPS II (ムコ多糖体沈着症 II 型) が生じる。配列番号 2 は、ヒトイDS (イデュルスルファーゼ) の一次アミノ酸配列を提供する。本明細書中に記載のように、実質的に脱リン酸化されたヒトイDSのグリコシル化改変体も含まれる (米国特許第 5,798,239 号および同第 5,932,211 号を参照のこと)。

【0071】

ヒトイDS配列は、31、115、144、246、280、325、513、および 537 の各位置に 8 つの潜在的な N 結合型グリコシル化部位 (すなわち、NXS/Tモチーフ) を含む (Parkinson-Lawrenceら, Biochem J. 386: 395 - 400, 2005; および配列番号 2 中の対応する N 結合型グリコシル化部位

10

20

30

40

50

については図6を参照のこと)。いくつかの実施形態では、実質的に脱リン酸化されたヒトIDSは、これらのグリコシル化部位のうちの1つ以上がN結合型グリカンおよびその会合するマンノース-6-リン酸残基を減少させるために変異している。それ故、これらおよび関連する実施形態では、ヒトIDSタンパク質は、野生型ヒトIDSタンパク質と比較して実質的に脱グリコシル化されており(例えば、N結合型オリゴマンノースグリカン)且つ実質的に脱リン酸化されている。

【0072】

他の態様では、実質的に脱リン酸化されたヒトIDUタンパク質またはIDSタンパク質は、対応するコントロールヒトIDSタンパク質またはIDUタンパク質(例えば、野生型タンパク質)と同一または実質的に同一のグリカン数またはグリコシル化度を有する。例えば、実質的に脱リン酸化されたヒトIDUタンパク質またはIDSタンパク質は、1、2、3、4、5、6、7、または8つの潜在的なN結合型グリコシル化部位にN結合型グリカン(例えば、オリゴマンノースグリカン)を有し得る。したがって、ヒトIDUタンパク質またはIDSタンパク質は、哺乳動物細胞、任意選択的にヒト細胞中に產生された(発現された)対応する野生型ヒトIDUまたはIDSとして少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%の数または量のN結合型オリゴマンノースグリカンを有し得る。特定の態様では、ヒトIDUまたはIDSの1つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンは、対応するコントロールヒトIDUタンパク質またはIDSタンパク質のN結合型オリゴマンノースグリカンと比較して実質的に脱リン酸化されている。例えば、ヒトIDUまたはIDSの1つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンは、対応するコントロールヒトIDSタンパク質と比較して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%(すなわち、完全に)脱リン酸化され得る。いくつかの態様では、ヒトIDUまたはIDSの1つ以上のN結合型オリゴマンノースグリカンは、リン酸基を実質的に含まない。例えば、脱リン酸化されたIDUタンパク質またはIDSタンパク質のグリカンは、対応するコントロールヒトIDUタンパク質またはIDSタンパク質のグリカンの約1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%未満のリン酸基を有する。一定の実施形態では、実質的に脱リン酸化されたIDUタンパク質またはIDSタンパク質は、マンノース-6-リン酸(M6P)残基を実質的に含まない(例えば、対応するコントロールIDUタンパク質またはIDSタンパク質の約1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%未満のM6P残基を有する)。特定の実施形態では、実質的に脱リン酸化されたIDSタンパク質のM6P含有量は、約0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、または1.5pmol M6P / pmol IDSタンパク質またはおよそそれ未満(その間の全ての範囲および整数が含まれる)である。

【0073】

特定の実施形態では、ヒトIDSタンパク質は、前記タンパク質上のリン酸基またはM6P残基の数を減少させるために1つ以上のホスファターゼ(例えば、酸性ホスファターゼ、アルカリホスファターゼ)で処置したヒト細胞(例えば、HT-1080細胞)中に產生されたイデュルスルファーゼ(Elaprase(登録商標))の実質的に脱リン酸化された形態である。

【0074】

p97ポリペプチド配列およびその結合体

本発明の実施形態はまた、本明細書中に記載の脱リン酸化されたLSDタンパク質にカップリングしたか、連結したか、そうでなければ付着したヒトp97(メラノトランスフェリン;MTf)ポリペプチドを含む結合体、かかる結合体を含む組成物、およびその関連する使用方法を含む。

10

20

30

40

50

【0075】

特定の実施形態では、p 97 ポリペプチドは、脱リン酸化された L S D タンパク質に共有結合性、非共有結合性、または作動可能にカップリングされて p 97 - 薬剤結合体を形成する。いくつかの態様では、p 97 結合体を、1つ以上のさらなる目的の薬剤（小分子および／または検出可能な物質など）にカップリングすることができる。例示的な p 97 ポリペプチド配列および薬剤を以下に記載する。p 97 ポリペプチドの脱リン酸化された L S D タンパク質または目的の他の薬剤へのカップリングのための例示的な方法および成分（リンカー基など）も記載する。

【0076】

p 97 配列。一定の実施形態では、本発明の組成物および／または結合体中で使用される p 97 ポリペプチド配列は、配列番号 1 に記載のヒト p 97 配列を含むか、配列番号 1 に記載のヒト p 97 配列から本質的になるか、配列番号 1 に記載のヒト p 97 配列からなる。その変体およびフラグメントも含まれる。 10

【0077】

いくつかの実施形態では、p 97 ポリペプチド配列は、配列番号 1 に記載のヒト p 97 配列またはその一部とその長さに沿って少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一または相同な配列を含む。

【0078】

特定の実施形態では、p 97 ポリペプチド配列は、配列番号 1 に記載のヒト p 97 配列のフラグメントを含む。一定の実施形態では、p 97 ポリペプチドフラグメントは、およそ、少なくともおよそ、またはおよそ以下の数値まで：5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、700、710、720、730、またはそれを超えるアミノ酸長（その間の全ての整数および範囲が含まれる）であり、配列番号 1 などの基準 p 97 配列の全てまたは配列の一部を含むことができる。 20 30

【0079】

一定の実施形態では、p 97 ポリペプチドフラグメントは、約 5 ~ 700、5 ~ 600、5 ~ 500、5 ~ 400、5 ~ 300、5 ~ 200、5 ~ 100、5 ~ 50、5 ~ 40、5 ~ 30、5 ~ 25、5 ~ 20、5 ~ 15、5 ~ 10、10 ~ 700、10 ~ 600、10 ~ 500、10 ~ 400、10 ~ 300、10 ~ 250、10 ~ 20、10 ~ 15、20 ~ 700、20 ~ 600、20 ~ 500、20 ~ 400、20 ~ 300、20 ~ 25、30 ~ 700、30 ~ 600、30 ~ 500、30 ~ 400、30 ~ 300、30 ~ 200、30 ~ 100、30 ~ 50、30 ~ 40、40 ~ 700、40 ~ 600、40 ~ 500、40 ~ 400、40 ~ 300、40 ~ 200、40 ~ 100、40 ~ 50、50 ~ 700、50 ~ 600、50 ~ 500、50 ~ 400、50 ~ 300、50 ~ 200、50 ~ 100、60 ~ 700、60 ~ 600、60 ~ 500、60 ~ 400、60 ~ 300、60 ~ 200、60 ~ 100、60 40 50

~70、70~700、70~600、70~500、70~400、70~300、70~200、70~100、70~80、80~700、80~600、80~500、80~400、80~300、80~200、80~100、80~90、90~700、90~600、90~500、90~400、90~300、90~200、90~100、100~700、100~600、100~500、100~400、100~300、100~250、100~200、100~150、200~700、200~600、200~500、200~400、200~300、または200~250アミノ酸長であり、配列番号1などの基準p97配列の全てまたは一部を含む。

【0080】

一定の実施形態では、目的のp97ポリペプチド配列は、目的の薬剤を血液脳関門を通過して中枢神経系(CNS)内に輸送するのに有効なp97アミノ酸配列、p97のサブシーケンス、および/または改変体を含む。特定の実施形態では、改変体またはフラグメントは、ヒトp97のN-ロープ(配列番号1の残基20~361)を含む。特定の態様では、改変体またはフラグメントは、インタクト且つ機能的なFe³⁺結合部位を含む。

10

【0081】

いくつかの実施形態では、p97ポリペプチド配列は、p97ポリペプチドの可溶性形態(Yangら, Prot Exp Purif. 34: 28-48, 2004を参照のこと)、またはそのフラグメントまたは改変体である。いくつかの態様では、可溶性p97ポリペプチドは、疎水性ドメイン(配列番号1の残基710~738)の全てまたは一部の欠失のみまたはシグナルペプチド(配列番号1の残基1~19)の全てまたは一部の欠失との組み合わせを有する。特定の態様では、可溶性p97ポリペプチドは、配列番号1の残基20~711(その改変体およびフラグメントが含まれる)を含むか、これらからなる。

20

【0082】

一定の実施形態では、例えば、リポソームを使用する場合、p97ポリペプチド配列はp97ポリペプチドの脂溶性形態である。例えば、一定のこれらおよび関連する実施形態は、任意選択的にシグナルペプチドを伴うか伴わずに疎水性ドメインの全てまたは一部を含むp97ポリペプチドを含む。

【0083】

一定の他の実施形態では、p97フラグメントまたは改変体は、p97受容体(LRP1受容体および/またはLRP1B受容体)に特異的に結合することができる。

30

【0084】

基準p97ポリペプチドおよび他の基準ポリペプチドの改変体およびフラグメントを、以下にさらに詳述している。

【0085】

p97結合体。上述の通り、一定の実施形態は、脱リン酸化されたLSDタンパク質もしくは目的の他の薬剤(例えば、小分子または検出可能な物質)またはその任意の組み合わせに連結したp97ポリペプチドを含む。1つを超える脱リン酸化されたLSDタンパク質および目的の薬剤を含む結合体(例えば、1つ以上の脱リン酸化されたLSDタンパク質および小分子に結合体化したp97フラグメント)も含まれる。

40

【0086】

共有結合性の連結が好ましいが、非共有結合性の連結(比較的強力な非共有結合性のタンパク質-リガンド相互作用(ビオチンとアビシンとの間の相互作用など)を利用する連結が含まれる)も使用することができる。p97ポリペプチドと脱リン酸化されたLSDタンパク質または目的の薬剤との間の直接的な共有結合性または非共有結合性の相互作用を必ずしも必要としない作動可能な連結も含まれ、かかる連結の例には、p97ポリペプチドおよび脱リン酸化されたLSDタンパク質ならびに任意選択的なさらなる目的の薬剤を含むリポソーム混合物が含まれる。例示的なタンパク質結合体の生成方法を本明細書中に記載しており、他の方法が当該分野で周知である。

【0087】

50

小分子。特定の実施形態では、p 97 結合体を、小分子にさらに付着または連結する。「小分子」は、合成または生物学的起源（生体分子）であるが、典型的にはポリマーではない有機化合物をいう。有機化合物は、その分子が炭素を含む化学物質の巨大なクラスをいい、典型的には炭酸塩のみを含むもの、炭素の単純酸化物、またはシアニドが除外される。「生体分子」は、一般に、生物によって産生される有機分子（高分子（バイオポリマー）（ペプチド、ポリサッカリド、および核酸なども）および小分子（一次、二次代謝産物、脂質、リン脂質、糖脂質、ステロール、グリセロ脂質、ビタミン、およびホルモンなど）が含まれる）をいう。「ポリマー」は、一般に、典型的には共有結合性の化学結合によって連結された反復構造単位から構成される大分子または高分子をいう。

【0088】

10

一定の実施形態では、小分子の分子量は、約 1000 ~ 2000 ダルトン未満、典型的には約 300 と 700 ダルトンとの間であり、約 50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、500、650、600、750、700、850、800、950、1000、または 2000 ダルトンが含まれる。

【0089】

20

リソソーム貯蔵障害の処置のために、例示的な小分子クラスには、基質還元治療および薬理学的シャペロン治療に使用される小分子、未成熟のナンセンス変異サプレッサー、およびタンパク質恒常性制御因子が含まれる (S m i d l a r a, E x p e r t O p i n . I n v e s t i g . D r u g s . 1 9 : 1 3 6 7 - 7 9, 2 0 1 0 ; a n d B e c k, I U B M B L i f e . 6 2 : 3 3 - 4 0, 2 0 1 0 を参照のこと)。

【0090】

いくつかの態様では、小分子は、抗炎症分子である。例には、ステロイドおよび糖質コルチコイド（例えば、ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、ブレドニゾン、トリアムシノロン）、非ステロイド性抗炎症薬（N S A I D S）（アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メトトレキサート、スルファサラジン、レフルノミド、抗T N F 薬、シクロホスファミド、およびミコフェノラートなど）が含まれる。

【0091】

30

検出可能な物質。いくつかの実施形態では、p 97 結合体を、「検出可能な物質」にさらに付着または連結させる。例示的な検出可能な物質には、ヨウ素ベースの標識、放射性同位体、フルオロフオア／蛍光色素、およびナノ粒子が含まれるが、これらに限定されない。

【0092】

例示的なヨウ素ベースの標識には、ジアトリゾ酸（H y p a q u e (登録商標)、G E H e a l t h c a r e) およびそのアニオン型ジアトリゾアートが含まれる。ジアトリゾ酸は、C T スキャンなどの先進X線技術で使用される放射線造影剤である。下記のヨウ素放射性同位体も含まれる。

【0093】

検出可能な物質として使用することができる例示的な放射性同位体には、³²P、³³P、³⁵S、³H、¹⁸F、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹¹¹In、¹⁶⁹Yb、⁹⁹mTc、⁵⁵Fe、およびヨウ素同位体（¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、および¹³¹Iなど）が含まれる。これらの放射性同位体は、特定のプロトコールのニーズに適合するように調整することができる異なる半減期、減衰型、およびエネルギーレベルを有する。これらの一定の放射性同位体を、例えば、かかる組織の医学的画像化を改善するために p 97 ポリペプチドに結合体化することによってC N S 組織を選択的に標的するかより良好に標的にすることができる。

【0094】

40

直接検出可能な物質として使用することができるフルオロフオアまたは蛍光色素の例には、フルオレセイン、テトラメチルローダミン、テキサスレッド、およびオレゴングリーン（登録商標）などが含まれる（例えば、H a u g l a n d , H a n d b o o k o f

50

Fluorescent Probes - 9th Ed., 2002, Molec. Probes, Inc., Eugene OR; Haugland, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies - 10th Ed., 2005, Invitrogen, Carlsbad, CA)。発光色素または他の検出可能な色素も含まれる。色素による発光は、可視光または不可視光(紫外線または赤外線など)であり得る。例示的な実施形態では、色素は、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)色素;キサンテン色素(フルオレセインおよびローダミンなど);位または位にアミノ基を有する色素(ナフチルアミン色素、1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホナート、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホナート(naphthalene sulfonate)、および2-p-トルイジニル(touidiny1)-6-ナフタレンスルホナートなど);3-フェニル-7-イソシアナトクマリンを有する色素;アクリジン(9-イソチオシアナトアクリジンおよびアクリジンオレンジなど);ピレン、ベンゾオキサジアゾール(benzoxadiazole)、およびスチルベン;3-(カルボキシペニチル)-3'-エチル-5,5'-ジメチルオキサカルボシアニン(CYA)を有する色素;6-カルボキシフルオレセイン(FAM);5および6-カルボキシローダミン-110(R110);6-カルボキシローダミン-6G(R6G);N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA);6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX);6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン(JOE);ALEXA FLUOR(商標);Cy2;テキサスレッドおよびローダミンレッド;6-カルボキシ-2',4,7,7'-テトラクロロフルオレセイン(TET);6-カルボキシ-2',4,4',5',7,7'-ヘキサクロロフルオレセイン(HEX);5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン(ZOE);NAN;NED;Cy3;Cy3.5;Cy5;Cy5.5;Cy7;およびCy7.5;IR800CW、ICG、Alexa Fluor 350;Alexa Fluor 488;Alexa Fluor 532;Alexa Fluor 546;Alexa Fluor 568;Alexa Fluor 594;Alexa Fluor 647;Alexa Fluor 680、またはAlexa Fluor 750であり得る。一定の実施形態は、検出可能な物質(フルオロフォア(例えば、オレゴングリーン(登録商標)、Alexa Fluor 488)など)で標識した化学療法薬(例えば、パクリタキセル、アドリアマイシン)への結合体化を含む。

【0095】

ナノ粒子は、通常、約1~1000nmの範囲のサイズであり、金粒子、銀粒子、および量子ドットなどの多様な化学構造が含まれる。白色光を有する入射角で照射した場合、約40~120nmの範囲の銀または金のナノ粒子は高強度で単色光を散乱するであろう。散乱光の波長は、粒子サイズに依存する。ごく近接した4~5種の異なる粒子は各々単色光を散乱し、これらが重ね合わされた場合に特異的な固有の色が得られるであろう。銀粒子または金粒子などの誘導体化ナノ粒子を、広範囲の分子(タンパク質、抗体、小分子、受容体リガンド、および核酸が含まれる)に付着させることができる。ナノ粒子の具体例には、金属ナノ粒子および金属ナノシェル(金粒子、銀粒子、銅粒子、白金粒子、カルシウム粒子、複合粒子、金中空球、金コーティングしたシリカナノシェル、およびシリカコーティングした金シェルなど)が含まれる。シリカ、ラテックス、ポリスチレン、ポリカルボナート、ポリアクリラート、PVDFナノ粒子、およびこれらの任意の材料の着色粒子も含まれる。

【0096】

量子ドットは、広範な波長にわたる光によって励起可能な直径約1~5nmの蛍光結晶である。適切な波長の光による励起の際、これらの結晶は単色光などを発光し、波長はその化学組成およびサイズに依存する。CdSe、ZnSe、InP、またはInAsなどの量子ドットは固有の光学的性質を有し、これらおよび類似の量子ドットは多数の商業的供給元(例えば、NN-Labs, Fayetteville, AR; Ocean Na

10

20

30

40

50

n o t e c h , F a y e t t e v i l l e , A R ; N a n o c o T e c h n o l o g i e s , M a n c h e s t e r , U K ; S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O) から利用可能である。

【 0 0 9 7 】

ポリペプチド改变体およびフラグメント。一定の実施形態は、名称によるか配列識別子を参照して記載される本明細書中に記載の基準ポリペプチド (p 9 7 ポリペプチドおよび L S D タンパク質が含まれる) の改变体および / またはフラグメントを含む。これらのポリペプチドの野生型配列または最も一般的な配列は当該分野で周知であり、本明細書中に記載の改变体およびフラグメントとの比較のために使用することができる。

【 0 0 9 8 】

ポリペプチド「改变体」は、この用語を本明細書中で使用する場合、1つ以上の置換、欠失、付加、および / または挿入によって本明細書中に具体的に開示のポリペプチドと典型的に異なるポリペプチドである。改变体ポリペプチドは生物学的に活性である。すなわち、これらは基準ポリペプチドの酵素活性または結合活性を保有し続ける。かかる改变体は、例えば、遺伝子多型および / または人為的操作に起因し得る。

【 0 0 9 9 】

多くの場合、生物学的に活性な改变体は、1つ以上の保存的置換を含むであろう。「保存的置換」は、あるアミノ酸を、ペプチド化学分野の当業者がポリペプチドの二次構造およびハイドロパシー特性が実質的に不变であると予想されるような類似の性質を有する別のアミノ酸と置換することである。上記のように、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造を修飾し、所望の特徴を有する改变体ポリペプチドまたは誘導ポリペプチドをコードする機能的分子を依然として得ることができる。本発明のポリペプチドの等価であるかさらに改良された改变体または一部を作製するためにポリペプチドのアミノ酸配列を変更することが望ましい場合、当業者は、典型的には、以下の表 A にしたがって、コード D N A 配列の 1 つ以上のコドンを変化させるであろう。

【 0 1 0 0 】

10

20

【表1-1】

アミノ酸	コドン					
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU
システイン	Cys	C	UGC	UGU		
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU		
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG		
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU		
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU		
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU	
リジン	Lys	K	AAA	AAG		
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC
メチオニン	Met	M	AUG			
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU		
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG		
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU
トリプトファン	Trp	W	UGG			
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU		

【0101】

例えば、一定のアミノ酸を、例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位などの構造との相互作用的結合能力を相当に喪失することなく、タンパク質構造中の他のアミノ酸と置換することができる。タンパク質の生物学的機能活性を定義するのはタンパク質の相互作用能力および相互作用性であるので、タンパク質配列、そして勿論その根底にあるDNAコード配列中で一定のアミノ酸配列置換を行うことができ、それにもかかわらず、類似の性質を有するタンパク質が得られる。したがって、開示の組成物のペプチド配列または前記ペプチドをコードする対応するDNA配列においてその有用性を大きく喪失することなく種々の変更を行うことができる期待される。

【0102】

かかる変化の作製において、アミノ酸のハイドロパシー指標を考慮することができる。タンパク質に相互作用性の生物学的機能を付与する際のアミノ酸ハイドロパシー指標の重要性は、当該分野で一般に理解されている(Kyte & Doolittle, 1982(本明細書中で参考として援用される))。アミノ酸の相対的なハイドロパシーは、得られたタンパク質の二次構造に依存し、一方でタンパク質の他の分子(例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、および抗原など)との相互作用を定義することを認めている。各アミノ酸は、疎水性および電荷特性に基づいてハイドロパシー指標が割り当てられている(Kyte & Doolittle, 1982)。これらの値は以下である: イソロイシン(+4.5); バリン(+4.2); ロイシン(+3.8); フェニルアラニン(+2.8); システイン(+2.5); メチオニン(+1.9); アラニン(+1.8); グリシン(-0.4); トレオニン(-0.7); セリン(-0.8); トリプトファン(-0.9); チロシン(-1.3); プロリン(-1.6); ヒスチジン(-3.2); グルタミン酸塩(-3.5); グルタミン(-3.5); アスパラギン酸塩(-3.5); アスパラギン(-3.5); リジン(-3.9); およびアルギニン(-4.5)。一定のアミノ酸を類似のハイドロパシーの指標またはスコアを有する他のアミノ酸と

10

20

30

40

50

置換することができ、それにより、依然として類似の生物学的活性を有するタンパク質が得られる（すなわち、依然として生物学的機能が等価のタンパク質が得られる）ことが当該分野で公知である。かかる変化の作製において、そのハイドロパシー指標が±2以内であるアミノ酸との置換が好ましく、±1以内が特に好ましく、±0.5以内がさらに特に好ましい。

【0103】

類似のアミノ酸の置換を親水性に基いて有効に行うことができることも当該分野で理解される。米国特許第4,554,101号（その全体が本明細書中で参考として特に援用される）は、タンパク質の最も高い局所平均親水性は、その隣接アミノ酸の親水性に支配されるので、そのタンパク質の生物学的性質と相關すると述べている。米国特許第4,554,101号に詳述のように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸塩（+3.0±1）；グルタミン酸塩（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；トレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；トリプトファン（-3.4）。あるアミノ酸を類似の親水性値を有する別のアミノ酸と置換することができ、それにより、依然として生物学的に等価な、特に免疫学的に等価なタンパク質が得られる理解される。かかる変化において、その親水性値が±2以内のアミノ酸置換が好ましく、±1以内が特に好ましく、±0.5以内がさらに特に好ましい。

【0104】

したがって、上記で概説のように、アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性（例えば、その疎水性、親水性、電荷、およびサイズなど）に基づく。種々の上記特徴を考慮した例示的な置換は当業者に周知であり、以下が含まれる：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸塩およびアスパラギン酸塩；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン。

【0105】

アミノ酸置換を、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および／または両親媒性の類似性に基づいてさらに行うことができる。例えば、負電荷アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ；正電荷アミノ酸にはリジンおよびアルギニンが含まれ；類似の親水性値を有する無電荷極性頭部基を有するアミノ酸には、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；ならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンが含まれる。保存的変化を示し得る他のアミノ酸群には、以下が含まれる：(1) ala、pro、gly、glu、asp、glu、asn、ser、thr；(2) cys、ser、tyr、thr；(3) val、ile、leu、met、ala、phe；(4) lys、arg、his；and (5) phe、tyr、trp、his。

【0106】

改変体は、非保存的変化も含み得るか、その代わりに含み得る。1つの好ましい実施形態では、改変体ポリペプチドは、約10、9、8、7、6、5、4、3、2アミノ酸未満、またはさらに1アミノ酸の置換、欠失、または付加が未変性の配列と異なる。改変体を、例えば、ポリペプチドの免疫原性、二次構造、酵素活性、および／またはハイドロパシーへの影響が最小のアミノ酸の欠失または付加によって改変することも（その代わりに行うこと）できる。

【0107】

一定の実施形態では、ポリペプチド配列は、およそ、少なくともおよそ、またはおよそ以下の数値まで：5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、

10

20

30

40

50

44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、またはそれを超える連続アミノ酸長（その間の全ての整数が含まれる）であり、基準配列の全てまたは一部を含むことができる（例えば、配列表を参照のこと）。 10

【0108】

他の特定の実施形態では、ポリペプチド配列は、約またはわずか約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、またはそれを超える連続アミノ酸（その間の全ての範囲が含まれる）からなり、基準配列の全てまたは一部を含むことができる（例えば、配列表を参照のこと）。 30

【0109】

さらに他の特定の実施形態では、ポリペプチド配列は、約10～1000、10～900、10～800、10～700、10～600、10～500、10～400、10～300、10～200、10～1000、10～100、10～50、10～40、10～30、10～20、20～1000、20～900、20～800、20～700、20～600、20～500、20～400、20～300、20～200、20～100、20～50、20～40、20～30、50～1000、50～900、50～800、50～700、50～600、50～500、50～400、50～300、50～200、50～100、100～1000、100～900、100～800、100～700、100～600、100～500、100～400、100～300、100～200、200～1000、200～900、200～800、200～700、200～600、200～500、200～400、または200～300の連続アミノ酸（その間の全ての範囲が含まれる）であり、基準配列の全てまたは一部を含む。一定の実施形態では、短縮ポリペプチドが基準ポリペプチドの結合特性および/または活性を保持する限り、任意の基準ポリペプチドのC末端領域またはN末端領域を、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、または800、またはそれを超えるアミノ酸、または約10～50、20～50、50～100、100～150、150～200、200～250、250～300の連続アミノ酸長（その間の全ての整数が含まれる）であり、基準配列の全てまたは一部を含むことができる（例えば、配列表を参照のこと）。 40

0 0、3 0 0 ~ 3 5 0、3 5 0 ~ 4 0 0、4 0 0 ~ 4 5 0、4 5 0 ~ 5 0 0、5 0 0 ~ 5 5 0、5 5 0 ~ 6 0 0、6 0 0 ~ 6 5 0、6 5 0 ~ 7 0 0、7 0 0 ~ 7 5 0、7 5 0 ~ 8 0 0、またはそれを超えるアミノ酸（その間の全ての整数および範囲（例えば、1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5）が含まれる）を短縮することができる。典型的には、生物学的に活性なフラグメントは、由来する生物学的に活性な基準ポリペプチドの活性の約1%、約5%、約10%、約25%、または約50%を有する。

【0110】

一般に、改変体は、基準ポリペプチド配列に対して少なくとも約30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の類似性または配列同一性または配列相同性を示すであろう。さらに、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、またはそれを超えるアミノ酸の付加（例えば、C末端付加、N末端付加、両方）、欠失、短縮、挿入、または置換によって未変性配列または親配列と異なるが、親または基準のポリペプチド配列の性質または活性を保持する配列が意図される。

【0111】

いくつかの実施形態では、改変体ポリペプチドは、基準配列と少なくとも1つであるが、50、40、30、20、15、10、8、6、5、4、3、または2アミノ酸残基未満が異なる。他の実施形態では、改変体ポリペプチドは、基準配列と少なくとも1%であるが、20%、15%、10%、または5%未満の残基が異なる。（この比較にアラインメントが必要である場合、配列を類似性が最大になるようにアラインメントしなければならない。欠失または挿入によって「除外された」配列（すなわち、ミスマッチ）を相違と見なす）

配列間の配列類似性および配列同一性（これらの用語を本明細書中で交換可能に使用する）の計算を以下のように行う。2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一率を決定するために、配列を最適に比較されるようにアラインメントする（例えば、第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列内的一方または両方にアラインメントを最適にするためのギャップを挿入することができ、比較のために非相同配列を無視することができる）。一定の実施形態では、比較のためにアラインメントした基準配列の長さは、基準配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、60%、さらにより好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%である。次いで、対応するアミノ酸の位置またはヌクレオチドの位置でアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が第2の配列中の対応する位置と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、分子はその位置で同一である。

【0112】

2配列間の同一率は、2配列の最適なアライメントのために挿入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮して、これらの配列によって共有される同一の位置の数の関数である。

【0113】

配列の比較および2配列間の同一率の決定を、数学アルゴリズムを使用して行うことができる。1つの好ましい実施形態では、2アミノ酸配列間の同一率を、G C Gソフトウェアパッケージ内のG A Pプログラム内に組み込まれたN e e d l e m a n a n d W u n s c h (J. M o l. B i o l. 4 8 : 4 4 4 - 4 5 3, 1 9 7 0)アルゴリズムを使用し、B l o s s u m 6 2行列またはP A M 2 5 0行列のいずれか、ならびにギャップの重み1 6、1 4、1 2、1 0、8、6、または4および長さの重み1、2、3、4、5、または6を使用して決定する。さらに別の好ましい実施形態では、2ヌクレオチド配列間の同一率を、G C Gソフトウェアパッケージ内のG A Pプログラムを使用し、N W S g a p d n a . C M P行列ならびにギャップの重み4 0、5 0、6 0、7 0、または8 0および長さの重み1、2、3、4、5、または6を使用して決定する。特に好ましいパラメー

10

20

30

40

50

タセット（および他で特定しない限り使用すべきセット）は、ギャップペナルティ12、ギャップ伸長ペナルティ4、およびフレームシフトギャップペナルティ5を使用したB10s s u m 62スコアリング行列である。

【0114】

2つのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列間の同一率を、A L I G Nプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているE. Meyers and W. Millerのアルゴリズム（C a b i o s . 4 : 1 1 - 1 7 , 1 9 8 9 ）を使用し、P A M 1 2 0重み残基表、ギャップ長さペナルティ12、およびギャップペナルティ4を使用して決定することができる。

【0115】

本明細書中に記載の核酸配列およびタンパク質配列を、公的データベースを検索するための「問い合わせ配列」として使用して、例えば、他のファミリーメンバーまたは関連配列を同定することができる。A l t s c h u l r a (1 9 9 0 , J . M o l . B i o l , 2 1 5 : 4 0 3 - 1 0) のN B L A S TプログラムおよびX B L A S Tプログラム（バージョン2.0）を使用してかかる検索を行うことができる。B L A S Tヌクレオチド検索を、N B L A S Tプログラム、スコア=100、ワードレンジス=12を使用して行い、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。B L A S Tタンパク質検索を、X B L A S Tプログラム、スコア=50、ワードレンジス=3を使用して行い、本発明のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較のためのギャップ挿入アラインメントを得るために、A l t s c h u l r a (N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2 , 1 9 9 7) に記載のようにG a p p e d B L A S Tを利用することができる。B L A S TプログラムおよびG a p p e d B L A S Tプログラムを利用する場合、各プログラム（例えば、X B L A S TおよびN B L A S T）のデフォルトパラメータを使用することができる。

【0116】

1つの実施形態では、上述の通り、ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドを、B L A S Tアラインメントツールを使用して評価することができる。局所アラインメントは単純に配列セグメント対からなり、各配列由来の1つを比較する。S m i t h - W a t e r m a nアルゴリズムまたはS e 1 l e r sアルゴリズムの修正により、伸長またはトリミングによってそのスコアを改善することができない全てのセグメント対（高スコアリングセグメント対（H S P）と呼ばれる）が見出されるであろう。B L A S Tアラインメントの結果は、偶然のみからB L A S Tスコアを予想することができる見込みを示すための統計的尺度を含む。

【0117】

生スコアSを各アラインメントした配列に関連するギャップ数および置換数から計算し、類似性スコアが高いほどアラインメントの有意性が高くなる。置換スコアは参照表から得られる（P A M、B L O S U Mを参照のこと）。

【0118】

ギャップスコアを、典型的には、G（ギャップ開始ペナルティ）およびL（ギャップ伸長ペナルティ）の和として計算する。ギャップの長さnについて、ギャップコストはG+L_nであろう。ギャップコスト（GおよびL）の選択は経験によるが、通例ではGについては高値（10～15）（例えば、11）およびLについては低値（1～2）（例えば、1）を選択する。

【0119】

ビットスコアS'は生アラインメントスコアSに由来し、これは使用したスコアリングシステムの統計的特性が考慮されている。ビットスコアをスコアリングシステムに関して正規化し、したがって、このスコアを使用して異なる検索由来のアラインメントスコアを比較することができる。用語「ビットスコア」および「類似度スコア」を、交換可能に使用する。ビットスコアから、アラインメントの優良度が示され、このスコアが高いほどアラインメントが優良である。

【0120】

E値(すなわち期待値)は、類似スコアを有する配列がデータベース中に偶然に生じる見込みを示す。これは、データベース中に偶然起こると期待されるSと等しいかより良好なスコアを有する異なるアラインメント数の予想である。E値が小さいほどアラインメントは有意である。例えば、E値がe⁻¹¹⁷のアラインメントは、類似のスコアを有する配列が単純に偶然に起こる可能性が極めて低いことを意味する。さらに、アミノ酸のランダム対をアラインメントするための期待スコアは負である必要があり、そうでなければ長いアラインメントはアラインメントしたセグメントが関連するかどうかとは無関係に高スコアを有する傾向があるであろう。さらに、BLASTアルゴリズムは、適切な置換行列、又クレオチド、またはアミノ酸を使用し、ギャップ挿入アラインメントについてはギャップ作製ペナルティおよびギャップ伸長ペナルティを使用する。例えば、BLASTアラインメントおよびポリペプチド配列の比較を、典型的には、BLOSUM62行列、ギャップ伸長ペナルティ11、およびギャップ伸長ペナルティ1を使用して行う。

【0121】

1つの実施形態では、配列類似度スコアを、BLOSUM62行列、ギャップ伸長ペナルティ11、およびギャップ伸長ペナルティ1を使用して行ったBLAST分析から報告する。

【0122】

特定の実施形態では、本明細書中に提供した配列同一性/類似度スコアは、以下のパラメータを使用したGAP Version 10 (GCG, Accelrys, San Diego, Calif.)を使用して得た値をいう: GAP重み50および長さ重み3、およびnwsgap dna.cmpスコアリング行列を使用した又クレオチド配列についての同一率および類似率; GAP重み8および長さ重み2、およびBLOSUM62スコアリング行列を使用したアミノ酸配列についての同一率および類似率 (Henikoff and Henikoff, PNAS USA. 89: 10915-10919, 1992)。GAPは、マッチ数を最大にし、且つギャップ数を最小にする2つの完全配列のアラインメントを見出すためにNeedleman and Wunschのアルゴリズム (J Mol Biol. 48: 443-453, 1970)を使用する。

【0123】

1つの特定の実施形態では、改変体ポリペプチドは、基準ポリペプチド配列(例えば、配列表を参照のこと)と任意選択的にアラインメントして少なくとも約50、60、70、80、90、100、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、またはそれを超える(その間の全ての整数および範囲が含まれる)BLASTビットスコアまたは配列類似度スコアを生成することができるアミノ酸配列を含み、ここで、BLASTアラインメントにはBLOSUM62行列、ギャップ伸長ペナルティ11、およびギャップ伸長ペナルティ1を使用した。

【0124】

上述の通り、基準ポリペプチドを、種々の方法(アミノ酸の置換、欠失、短縮、付加、および挿入が含まれる)で変化させることができる。かかる操作方法は、一般に、当該分野で公知である。例えば、基準ポリペプチドのアミノ酸配列改変体を、DNAの操作によって調製することができる。変異誘発および又クレオチド配列の変更の方法は、当該分野で周知である。例えば、Kunkel (PNAS USA. 82: 488-492, 1950)

85) ; Kunkelら, (Methods in Enzymol. 154: 367-382, 1987)、米国特許第4,873,192号、Watson, J. D.ら, ("Molecular Biology of the Gene," Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987)、およびこれらの引用文献を参照のこと。目的のタンパク質の生物学的活性に影響を及ぼさない適切なアミノ酸置換に関するガイドラインを、Dayhoffら, (1978)Atlas of Protein Sequence and Structure (Nat'l. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.)のモデルで見出すことができる。

【0125】

10

かかる改変によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングする方法および選択された性質を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングする方法は、当該分野で公知である。かかる方法を、基準ポリペプチドの組み合わせ変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適合させることができるとある。一例として、反復アンサンブル変異誘発(REM)(ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大させる技術)をスクリーニングアッセイと組み合わせて使用してポリペプチド改変体を同定することができる(Arkin and Yourvant, PNAS USA 89: 7811-7815, 1992; Delgraveら, Protein Engineering. 6: 327-331, 1993)。

【0126】

20

例示的な結合体化方法。p97ポリペプチド配列のリソーム貯蔵障害(LSD)タンパク質または目的の他の薬剤への結合体化またはカップリングを、標準的な化学的技術、生化学的技術、および/または分子技術を使用して行うことができる。実際に、利用可能な当該分野で認識されている方法論を使用して本開示を考慮したp97結合体の作製方法は明らかであろう。勿論、本発明のp97結合体の一次成分をカップリングした場合に使用した技術および得られた連結の化学的性質が結合体の各成分の所望の機能性または活性を実質的に妨害しないことが一般に好ましいであろう。

【0127】

30

使用した特定のカップリングの化学的性質は、生物学的に活性な薬剤(例えば、小分子、ポリペプチド)の構造、生物学的に活性な薬剤内に複数の官能基が存在する可能性、保護/脱保護工程の必要性、および薬剤の化学的安定性などに依存し、当業者はこの化学的性質を容易に決定するであろう。本発明のp97結合体の調製に有用な例示的なカップリングの化学的性質を、例えば、Wong(1991), "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton, Fla.; およびBrinkley "A Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates with Dyes, Haptens, and Crosslinking Reagents," in Bioconjug. Chem., 3: 2013, 1992に見出すことができる。好ましくは、結合体の結合能力および/または結合活性は、使用した結合体化技術の結果として、例えば、結合体化されていないLSDポリペプチドもしくは薬剤または結合体化されていないp97ポリペプチドと比較して実質的に減少しない。

【0128】

40

一定の実施形態では、p97ポリペプチド配列を、LSDポリペプチドまたは目的の他の薬剤に直接または間接的にカップリングすることができる。p97ポリペプチド配列とLSDポリペプチドまたは目的の他の薬剤との間の直接反応は、それぞれが相互反応可能な置換基を保有する場合に可能である。例えば、一方に存在する求核性基(アミノ基またはスルフヒドリル基など)は、他方に存在するカルボニル含有基(無水物または酸ハライドなど)または良好な脱離基(例えば、ハライド)を含むアルキル基と反応することができる。

50

【0129】

あるいは、リンカー基(非ペプチドリンカーおよびペプチドリンカーが含まれる)を介してp97ポリペプチド配列およびLSDポリペプチドまたは目的の他の薬剤を間接的にカップリングすることが望ましいかもしれない。リンカー基はまた、結合能力、ターゲティング能力、または他の機能性の妨害を回避するために目的の薬剤をp97ポリペプチド配列から遠ざけるためのスペーサーとして機能することができる。リンカー基はまた、薬剤上の置換基の化学反応性を増大させ、したがって、カップリング効率を増大させる働きをし得る。化学反応性の増大はまた、他の場合には増大しなければ不可能と考えられる薬剤または薬剤上の官能基の使用を容易にすることができる。放出可能または安定なリンカーを選択して、p97結合体および付着した抗体または目的の他の薬剤の薬物動態学的を变化せることもできる。例示的な連結基には、例えば、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光解離性基、ペプチダーゼ不安定基、およびエステラーゼ不安定基が含まれる。他の例示的な実施形態では、結合体は、米国特許第5,208,020号または欧洲特許第0 425 235 B1号、およびCharial, Cancer Research 52:127-131, 1992に開示の連結基などの連結基を含む。さらなる例示的なリンカーを以下に記載する。

【0130】

いくつかの実施形態では、1つを超えるp97ポリペプチド配列をLSDポリペプチドまたは他の薬剤にカップリングする(またはその逆)ことが望ましいかも知れない。例えば、一定の実施形態では、複数のp97ポリペプチド配列を1つのLSDポリペプチドまたは他の薬剤にカップリングするか、あるいは、1つ以上のp97ポリペプチドを複数のLSDポリペプチドまたは他の薬剤に結合体化する。p97ポリペプチド配列は、同一でも異なっていてもよい。特定の実施形態と無関係に、複数のp97ポリペプチド配列を含む結合体を、種々の方法で調製することができる。例えば、1つを超えるポリペプチドを薬剤に直接カップリングすることができるか、複数の付着部位を提供するリンカーを使用することができる。種々の公知のヘテロ二官能性架橋ストラテジーのうちのいずれかを、本発明の結合体の作製のために使用することができる。結合体化/架橋手順中に使用した材料の化学量論の調節によって多数のこれらの実施形態を行うことができると理解されるであろう。

【0131】

一定の例示的な実施形態では、スクシンイミジルエステル官能基を含む薬剤とアミノ基を含むp97ポリペプチドとの間の反応によりアミド連結が形成され、オキシカルボニルイミダゾール(oxycarbonylimidazole)官能基を含む薬剤とアミノ基を含むP97ポリペプチドとの間の反応によりカルバマート連結が形成され、p-ニトロフェニルカルボナート官能基を含む薬剤とアミノ基を含むP97ポリペプチドとの間の反応によりカルバマート連結が形成され、トリクロロフェニルカルボナート官能基を含む薬剤とアミノ基を含むP97ポリペプチドとの間の反応によりカルバマート連結が形成され、チオエステル官能基を含む薬剤とN末端アミノ基を含むP97ポリペプチドとの間の反応によりアミド連結が形成され、プロピオンアルデヒド(propionaldehyde)官能基を含む薬剤とアミノ基を含むP97ポリペプチドとの間の反応により第二級アミン連結が形成される。

【0132】

いくつかの例示的な実施形態では、ブチルアルデヒド官能基を含む薬剤とアミノ基を含むP97ポリペプチドとの間の反応により第二級アミン連結が形成され、アセタール官能基を含む薬剤とアミノ基を含むP97ポリペプチドとの間の反応により第二級アミン連結が形成され、ピペリドン官能基を含む薬剤とアミノ基を含むP97ポリペプチドとの間の反応により第二級アミン連結が形成され、メチルケトン官能基を含む薬剤とアミノ基を含むP97ポリペプチドとの間の反応により第二級アミン連結が形成され、トレシラート官能基を含む薬剤とアミノ基を含むP97ポリペプチドとの間の反応により第二級アミン連結が形成され、マレイミド官能基を含む薬剤とアミノ基を含むP97ポリペプチドとの間

10

20

30

40

50

の反応により第二級アミン連結が形成され、アルデヒド官能基を含む薬剤とアミノ基を含むP97ポリペプチドとの間の反応により第二級アミン連結が形成され、ヒドラジン官能基を含む薬剤とカルボン酸基を含むP97ポリペプチドとの間の反応により第二級アミン連結が形成される。

【0133】

特定の例示的な実施形態では、マレイミド官能基を含む薬剤とチオール基を含むP97ポリペプチドとの間の反応によりチオエーテル連結を形成し、ビニルスルホン官能基を含む薬剤とチオール基を含むP97ポリペプチドとの間の反応によりチオエーテル連結を形成し、チオール官能基を含む薬剤とチオール基を含むP97ポリペプチドとの間の反応によりジスルフィド連結を形成し、オルソピリジルジスルフィド官能基を含む薬剤とチオール基を含むP97ポリペプチドとの間の反応によりジスルフィド連結を形成し、ヨードアセトアミド官能基を含む薬剤とチオール基を含むP97ポリペプチドとの間の反応によりチオエーテル連結を形成する。

【0134】

特定の実施形態では、アミン-スルフヒドリル架橋剤を、結合体の調製のために使用する。1つの好ましい実施形態では、例えば、架橋剤はスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)(Thermo Scientific)であり、この架橋剤は、中程度の長さのシクロヘキサン安定化スペーサーアーム(8.3オングストローム)の反対側の末端にNHS-エステルおよびマレイミド反応基を含むスルフヒドリル架橋剤である。SMCCは、その後のp97ポリペプチド配列との反応のためのスルフヒドリル反応性のマレイミド活性化された薬剤(例えば、ポリペプチド、抗体)を作製するために使用することができる非切断性の膜透過性架橋剤である。NHSエステルは、pH7~9で第一級アミンと反応して安定なアミド結合を形成する。マレイミドは、pH6.5~7.5でスルフヒドリル基と反応して安定なチオエーテル結合を形成する。したがって、SMCCのアミン反応性NHSエステルが薬剤の第一級アミンと迅速に架橋し、次いで、得られたスルフヒドリル反応性マレイミド基がp97のシステイン残基との反応に利用されて目的の特定の結合体を得ることができる。

【0135】

一定の特定の実施形態では、p97ポリペプチド配列を、架橋を容易にするために(例えば、マレイミド活性化された薬剤への架橋を容易にするために)露呈したスルフヒドリル基を含むように改変する。より特定の実施形態では、p97ポリペプチド配列を、保護されたチオールスルフヒドリル基を付加するために第一級アミンを修飾する試薬で修飾する。さらにより特定の実施形態では、試薬N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセタート(SATA)(Thermo Scientific)を使用して、チオール化p97ポリペプチドを生成する。

【0136】

他の特定の実施形態では、マレイミド活性化された薬剤を、適切な条件下でチオール化p97ポリペプチドと反応させて本発明の結合体を生成する。これらの反応物中でのSMCC、SATA、薬剤、およびp97ポリペプチドの比を操作することによって異なる化学量論、分子量、および性質を有する結合体を生成することが可能であると理解されるであろう。

【0137】

さらに他の例示的な実施形態では、結合体を、二官能性タンパク質カッピング剤(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD-P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(IFT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジピミド酸ジメチルHCLなど)、活性エステル(スペリン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアナート(トルエン2,6-ジイソシアナートなど)、および

10

20

30

40

50

ビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)などを使用して作製する。特定のカップリング剤には、ジスルフィド連結を得るためのN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPPD) (Carls
sonら, *Biochem. J.* 173: 723-737 [1978]) およびN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)が含まれる。

【0138】

本明細書中で考察した特定の架橋ストラテジーは、本発明の結合体の生成で使用することができる適切な結合体化ストラテジーの多数の例のほんの一部である。種々の他の二官能性または多官能性の試薬(ホモ官能性およびヘテロ官能性の両方)(Pierce Chemical Co., Rockford, ILのカタログ中に記載の試薬など)をリンカー基として使用することができるが当業者に明らかであろう。例えば、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、または酸化炭水化物残基によってカップリングすることができる。かかる方法論を記載した文献が多数存在する(例えば、Rodwellらの米国特許第4,671,958号)。

10

【0139】

特定の実施形態は、p97ポリペプチドとLSDポリペプチドまたは他の薬剤との間の結合体化を容易にするための1つ以上のアルデヒドタグを使用することができる(米国特許第8,097,701号および同第7,985,783号(参考として援用される)を参照のこと)。ここで、ホルミルグリシン生成酵素(FGE)の作用によるアルデヒドタグのスルファターゼモチーフでの酵素修飾により、ホルミルグリシン(FGly)残基が生成される。次いで、FGly残基のアルデヒド部分を、目的の部分のポリペプチドへの部位特異的付着のための化学的ハンドルとして利用することができる。いくつかの態様では、目的の部分は、小分子、ペプトイド、アプタマー、またはペプチド模倣物である。いくつかの態様では、目的の部分は、別のポリペプチド(抗体など)である。

20

【0140】

したがって、特定の実施形態は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超える異種スルファターゼモチーフを含むp97ポリペプチドまたはLSDポリペプチドまたは他のポリペプチド薬剤を含み、ここで、モチーフは、以下の構造:



(式中、Z₁はシステインまたはセリンであり; Z₂はプロリン残基またはアラニン残基であり; X₁は存在しても不在でもよく、存在する場合、任意のアミノ酸であり、X₂は、異種スルファターゼモチーフがアルデヒド化ポリペプチドのN末端に存在する場合に存在することが好ましく; X₂およびX₃は、それぞれ独立して、任意のアミノ酸である)を含む。

30

【0141】

上記モチーフを有するポリペプチドを、FGE酵素によって修飾してFGly残基を有するモチーフを生成することができ、上述の通り、次いで、このモチーフを例えば、リンカー部分を介した薬剤(第2のポリペプチドなど)の部位特異的付着のために使用することができる。かかる修飾を、例えば、FGE酵素を発現する哺乳動物細胞、酵母細胞、または細菌細胞中のスルファターゼモチーフ含有ポリペプチド(例えば、p97、LSDポリペプチド)の発現または単離FGE酵素での単離ポリペプチドのin vitro修飾によって行うことができる(Wuら, *PNAS*. 106: 3000-3005, 2009; Rush and Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 12240-1, 2008; およびCarlsonら, *J. Biol. Chem.* 283: 20117-25, 2008を参照のこと)。

40

【0142】

それ故、いくつかの実施形態は、ホルミルグリシン残基を有する1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超える異種スルファターゼモチーフを含むp97ポリペプチドまたはポリペプチド薬剤(例えば、LSDポリペプチド)を含み、ここで、モチーフは、以下の構造:

50

$X_1 (FGly) X_2 Z_2 X_3$ (配列番号 5)

(式中、 $FGly$ はホルミルグリシン残基であり； Z_2 はプロリン残基またはアラニン残基であり； X_1 は存在しても不在でもよく、存在する場合、任意のアミノ酸であり、 X_1 は、異種スルファターゼモチーフがアルデヒドタグ化ポリペプチドの N 末端に存在する場合に存在することが好ましく； X_2 および X_3 は、それぞれ独立して、任意のアミノ酸である) を含む。

【0143】

特定の実施形態では、 X_1 、 X_2 、および X_3 は、それぞれ独立して、脂肪族アミノ酸、硫黄含有アミノ酸、または極性の無電荷アミノ酸である。例えば、 X_1 は、L、M、V、S、またはT であり得； X_2 および/または X_3 は、独立して、S、T、A、V、G、またはC であり得る。

【0144】

いくつかの実施形態では、異種スルファターゼモチーフは、(a) 16 アミノ酸残基長未満(約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15 残基長が含まれる) であり得るか、(b) ポリペプチドの N 末端に位置し得るか、(c) ポリペプチドの C 末端に位置し得るか、(d) ポリペプチド起源のアミノ酸配列の内部部位に位置し得るか、(e) ポリペプチドの末端ループ中に位置し得るか、(f) ポリペプチドの翻訳後修飾部位(例えば、グリコシル化部位)に位置し得るか、その任意の組み合わせであり得る。

【0145】

いくつかの実施形態は、(i) スルファターゼモチーフ(またはアルデヒドタグ)含有 p97 ポリペプチド、および(ii) 薬剤(A)(アルデヒド反応基で官能化された小分子など)の結合体に関し、ここで、(i) および(ii) は、スルファターゼモチーフの $FGly$ 残基およびアルデヒド反応基を介して共有結合性に連結している。かかる結合体は、以下の一般的構造：

$p97(FGly) - R_1 - A$

(式中、 R_1 は少なくとも 1 つのアルデヒド反応性連結であり； $FGly$ は異種スルファターゼモチーフ内のホルミルグリシン残基である) のうちの 1 つを有することができる。

【0146】

いくつかの実施形態は、(i) スルファターゼモチーフ(またはアルデヒドタグ)含有 p97 ポリペプチド、および(ii) アルデヒド反応基で官能化されたポリペプチド薬剤(pA)(逆も同じ)の結合体に関し、ここで、(i) および(ii) は、スルファターゼモチーフの $FGly$ 残基およびアルデヒド反応基を介して共有結合性に連結している。かかる結合体は、以下の一般的構造：

$p97(FGly) - R_1 - pA$ または $p97 - R_1 - (FGly)pA$

(式中、 R_1 は少なくとも 1 つのアルデヒド反応性連結であり； $FGly$ は異種スルファターゼモチーフ内のホルミルグリシン残基である) のうちの 1 つを有することができる。

【0147】

薬剤または非アルデヒドタグ含有ポリペプチド(例えば、p97 ポリペプチド、LSD ポリペプチド)を、1 つ以上のアルデヒド反応基(アミノオキシ、ヒドラジド、およびチオセミカルバジドなど)で官能化し、次いで、少なくとも 1 つの $FGly$ 残基を介してアルデヒドタグ含有ポリペプチドに共有結合性に連結してアルデヒド反応性連結を形成することができる。アミノオキシ官能化薬剤(または非アルデヒドタグ含有ポリペプチド)の付着により $FGly$ 残基と官能化薬剤(または非アルデヒドタグ含有ポリペプチド)との間にオキシム連結が作製され；ヒドラジド官能化薬剤(または非アルデヒドタグ含有ポリペプチド)との間にヒドラジン連結が作製され；チオセミカルバジド官能化薬剤(または非アルデヒドタグ含有ポリペプチド)の付着により $FGly$ 残基と官能化薬剤(または非アルデヒドタグ含有ポリペプチド)との間にヒドラジンカルボチアミド連結が作製される。それ故、これらおよび関連する実施形態では、 R_1 は、シップ塩基を含む連結(オキシム

10

20

30

40

50

連結、ヒドラジン連結、またはヒドラジンカルボチアミド連結など)であり得る。

【0148】

一定の実施形態は、(i)スルファターゼモチーフ(またはアルデヒドタグ)含有p97ポリペプチドおよび(ii)スルファターゼモチーフ(またはアルデヒドタグ)含有LSDポリペプチド薬剤(A)の結合体を含み、ここで、(i)および(ii)は、各FG1y残基を介して、任意選択的に二官能性のリンカー部分またはリンカー基を介して共有結合性に連結している。例えば、一定のp97結合体は、以下の構造:



(式中、R₁およびR₂は同一または異なるアルデヒド反応性連結であり; Lはリンカー部分であり、p97(FG1y)はアルデヒドタグ含有p97ポリペプチドであり、(FG1y)Aはアルデヒドタグ含有薬剤(LSDポリペプチド薬剤など)である)を含むことができる。

10

【0149】

単なる例として、いくつかの実施形態では、少なくとも1つの異種スルファターゼモチーフは、p97ポリペプチドのC末端およびポリペプチドベースの薬剤(例えば、LSDポリペプチド)のN末端に存在し得る。他の実施形態では、少なくとも1つの異種スルファターゼモチーフは、p97ポリペプチドのN末端およびポリペプチドベースの薬剤のC末端に存在し得る。さらなる他の実施形態では、少なくとも1つの異種スルファターゼモチーフは、p97ポリペプチドのN末端およびポリペプチドベースの薬剤のN末端に存在し得る。さらなる実施形態では、少なくとも1つの異種スルファターゼモチーフは、p97ポリペプチドのC末端およびポリペプチドベースの薬剤のC末端に存在し得る。上述の通り、少なくとも1つの異種モチーフは、p97ポリペプチドおよび/またはポリペプチドベースの薬剤中の内部位置に存在し得る。当業者は、他の組み合わせが可能であると認識するであろう。

20

【0150】

R₁およびR₂のアルデヒド反応性連結を、(i)アルデヒドタグのホルミルグリシン(FG1y)残基と(ii)前記アルデヒド反応基で官能化されたリンカー部分(例えば、2つのアルデヒド反応基(同一でも異なっていてもよい)を有する二官能化リンカー)との間の共有結合を形成する任意のアルデヒド反応基によって独立して形成することができる。アルデヒド反応基の例には、アミノオキシ基、ヒドラジド基、およびチオセミカルバジド基が含まれ、これらは、FG1y残基を有するシップ塩基含有連結(それぞれ、オキシム連結、ヒドラジン連結、およびヒドラジンカルボチアミド連結が含まれる)を形成するであろう。それ故、R₁およびR₂は、独立して、シップ塩基を含む連結(オキシム連結、ヒドラジン連結、またはヒドラジンカルボチアミド連結など)であり得る。

30

【0151】

いくつかの実施形態では、アルデヒドタグ含有p97ポリペプチドおよびアルデヒドタグ含有LSDポリペプチドまたは他の薬剤を、多官能化リンカー(例えば、二官能化リンカー)を介して連結し(例えば、共有結合的に連結し)、後者を同一または異なるアルデヒド反応基で官能化する。これらおよび関連する実施形態では、アルデヒド反応基は、リンカーによりp97ポリペプチドとLSDポリペプチドまたは他の薬剤との間にその各FG1y残基を介して共有結合性の架橋を形成可能である。リンカー部分には、1つ以上のアルデヒド反応基で官能化することができ、好ましくは二官能化または多官能化することができる任意の部分または化学的部分が含まれる。特定の例には、ペプチド、水溶性ポリマー、検出可能な物質、他の治療化合物(例えば、細胞傷害性化合物)、ビオチン/ストレプトアビシン部分、およびグリカンが含まれる(Hudakら, J Am Chem Soc. 133: 16127-35, 2011を参照のこと)。グリカン(またはグリコシド)の具体例には、アミノオキシグリカン(グリコシルN-ペントノイルヒドロキサマート中間体から構成される高次グリカンなど)が含まれる(前出)。例示的なリンカーを本明細書中に記載し、これらのリンカーを当該分野の日常的技術にしたがってアルデヒド反応基で官能化することができる(例えば、Carricola, Nat Chem Bi

40

50

○ 1 . 3 : 3 2 1 - 3 2 2 , 2 0 0 7 ; および米国特許第 8 , 0 9 7 , 7 0 1 号および同第 7 , 9 8 5 , 7 8 3 号を参照のこと)。

【 0 1 5 2 】

p 9 7 結合体を、種々の「クリック化学」技術（モジュール式であり、広範で収率が非常に高く、非クロマトグラフ法によって除去することができ、且つ立体特異的であり得るが必ずしもエナンチオ選択性ではない主に無害の副生成物を生成する反応が含まれる）によって調製することもできる（K o l b r a , A n g e w C h e m I n t E d E n g l . 4 0 : 2 0 0 4 - 2 0 2 1 , 2 0 0 1 を参照のこと）。特定の例には、アジドとアルキンのヒュスゲン 1 , 3 - 双極子付加環化を使用する結合体化技術（「アジド - アルキン付加環化」反応とも呼ばれる）が含まれる（H e i n r a , P h a r m R e s . 2 5 : 2 2 1 6 - 2 2 3 0 , 2 0 0 8 を参照のこと）。アジド - アルキン付加環化反応の非限定的な例には、銅触媒アジド - アルキン付加環化（C u A A C ）反応およびルテニウム触媒アジド - アルキン付加環化（R u A A C ）反応が含まれる。

【 0 1 5 3 】

C u A A C は、広範な温度で作用し、水性条件およびp H 4 ~ 1 2 の範囲で影響を受けず、広範な官能基を許容する（H i m o r a , J A m C h e m S o c . 1 2 7 : 2 1 0 - 2 1 6 , 2 0 0 5 を参照のこと）。活性C u (I)触媒を、例えば、還元剤としてアスコルビン酸ナトリウムを使用してC u (I)塩またはC u (I I)塩から生成することができる。この反応によって 1 , 4 置換生成物が形成され、領域特異性となる（H e i n r a , 前出を参照のこと）。

【 0 1 5 4 】

R u A A C は、アジドの末端アルキンへの付加環化を触媒することができるペントメチルシクロペンタジエニルルテニウムクロリド [C p * R u C l] 複合体を利用し、それにより、位置選択性に 1 , 5 二置換 1 , 2 , 3 - トリアゾールが得られる（R a s m u s s e n r a , O r g . L e t t . 9 : 5 3 3 7 - 5 3 3 9 , 2 0 0 7 を参照のこと）。さらに、C u A A C と対照的に、R u A A C を内部アルキンと共に使用して、全置換 1 , 2 , 3 - トリアゾールを得ることもできる。

【 0 1 5 5 】

したがって、一定の実施形態は、アジド側鎖またはアルキン側鎖を有する少なくとも 1 つの非天然アミノ酸（内部および末端（例えば、N 末端、C 末端）の非天然アミノ酸が含まれる）を含む p 9 7 ポリペプチドを含む。一定のこれらの p 9 7 ポリペプチドを、アジド側鎖またはアルキン側鎖を含む非天然アミノ酸の i n v i v o または i n v i t r o （例えば、無細胞系）組込みによって形成することができる。例示的な i n v i v o 技術には、例えば改変大腸菌を使用した細胞培養技術（T r a v i s a n d S c h u l t z , T h e J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y . 2 8 5 : 1 1 0 3 9 - 4 4 , 2 0 1 0 ; および D e i t e r s a n d S c h u l t z , B i o o r g a n i c & M e d i c i n a l C h e m i s t r y L e t t e r s . 1 5 : 1 5 2 1 - 1 5 2 4 , 2 0 0 5 を参照のこと）が含まれ、例示的な i n v i t r o 技術には無細胞系（B u n d y , B i o c o n j u g C h e m . 2 1 : 2 5 5 - 6 3 , 2 0 1 0 を参照のこと）が含まれる。

【 0 1 5 6 】

いくつかの実施形態では、アジド側鎖を有する少なくとも 1 つの非天然アミノ酸を含む p 9 7 ポリペプチドを、少なくとも 1 つのアルキン基を含む薬剤（またはリンカー）（アルキン側鎖を有する少なくとも 1 つの非天然アミノ酸を含む抗体または他のポリペプチド薬剤など）へのアジド - アルキン付加環化によって結合体化する。他の実施形態では、アルキン側鎖を有する少なくとも 1 つの非天然アミノ酸を含む p 9 7 ポリペプチドを、少なくとも 1 つのアジド基を含む抗体または他のポリペプチド薬剤（またはリンカー）（アジド側鎖を有する少なくとも 1 つの非天然アミノ酸を含むポリペプチド薬剤など）へのアジド - アルキン付加環化によって結合体化する。それ故、一定の実施形態は、1 , 2 , 3 - トリアゾール連結を介して薬剤に共有結合性に連結した p 9 7 ポリペプチドを含む結合体

10

20

30

40

50

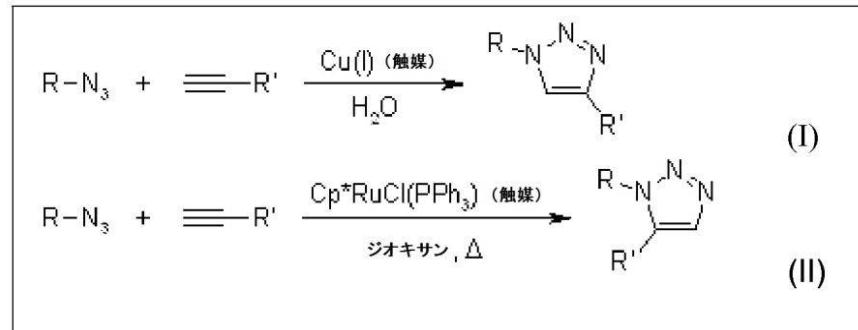
を含む。

【0157】

特異的p97結合体を、以下のそれぞれの構造(I)または(II)：

【0158】

【化1】



【0159】

(式中、Rはp97ポリペプチドであり、R¹は目的の薬剤(またはリンカー)であるか、Rは目的の薬剤(またはリンカー)であり、R¹はp97ポリペプチドである)を含めるための以下のCuAACベースの反応またはRuAACベースの反応によって形成することができる。

【0160】

一定の実施形態では、アジド側鎖を有する非天然アミノ酸および/またはアルキン側鎖を有する非天然アミノ酸は、末端アミノ酸(N末端、C末端)である。一定の実施形態では、1つ以上の非天然アミノ酸は内部非天然アミノ酸である。

【0161】

例えば、一定の実施形態は、アルキン基を含む薬剤に結合体化したアジド側鎖を有するN末端非天然アミノ酸を含むp97ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態は、アルキン基を含む薬剤に結合体化したアジド側鎖を有するC末端非天然アミノ酸を含むp97ポリペプチドを含む。特定の実施形態は、アジド側鎖を含む薬剤に結合体化したアルキン側鎖を有するN末端非天然アミノ酸を含むp97ポリペプチドを含む。さらなる実施形態は、アジド側鎖を含む薬剤に結合体化したアルキン側鎖を有するC末端非天然アミノ酸を含むp97ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態は、アルキン基を含む薬剤に結合体化したアジド側鎖を有する少なくとも1つの内部非天然アミノ酸を含むp97ポリペプチドを含む。さらなる実施形態は、アジド側鎖を含む薬剤に結合体化したアルキン側鎖を有する少なくとも1つの内部非天然アミノ酸を含むp97ポリペプチドを含む。

【0162】

特定の実施形態は、アルキン側鎖を有するN末端非天然アミノ酸を含むポリペプチド薬剤に結合体化したアジド側鎖を有するN末端非天然アミノ酸を含むp97ポリペプチドを含む。他の実施形態は、アルキン側鎖を有するC末端非天然アミノ酸を含むポリペプチド薬剤に結合体化したアジド側鎖を有するC末端非天然アミノ酸を含むp97ポリペプチドを含む。さらに他の実施形態は、アルキン側鎖を有するC末端非天然アミノ酸を含むポリペプチド薬剤に結合体化したアジド側鎖を有するN末端非天然アミノ酸を含むp97ポリペプチドを含む。さらなる実施形態は、アルキン側鎖を有するN末端非天然アミノ酸を含むポリペプチド薬剤に結合体化したアジド側鎖を有するC末端非天然アミノ酸を含むp97ポリペプチドを含む。

【0163】

他の実施形態は、アジド側鎖を有するN末端非天然アミノ酸を含むポリペプチド薬剤に結合体化したアルキン側鎖を有するN末端非天然アミノ酸を含むp97ポリペプチドを含む。なおさらなる実施形態は、アジド側鎖を有するC末端非天然アミノ酸を含むポリペプチド薬剤に結合体化したアルキン側鎖を有するC末端非天然アミノ酸を含むp97ポリペ

10

20

30

40

50

プチドを含む。さらなる実施形態は、アジド側鎖を有するC末端非天然アミノ酸を含むポリペプチド薬剤に結合体化したアルキン側鎖を有するN末端非天然アミノ酸を含むp 9 7ポリペプチドを含む。なおさらなる実施形態は、アジド側鎖を有するN末端非天然アミノ酸を含むポリペプチド薬剤に結合体化したアルキン側鎖を有するC末端非天然アミノ酸を含むp 9 7ポリペプチドを含む。

【0164】

(a) (i) アジド側鎖を有する少なくとも1つの非天然アミノ酸を含むp 9 7ポリペプチドと少なくとも1つのアルキン基を含む薬剤(例えば、アルキン側鎖を有する非天然アミノ酸)との間; または (ii) アルキン側鎖を有する少なくとも1つの非天然アミノ酸を含むp 9 7ポリペプチドと少なくとも1つのアジド基を含む薬剤(例えば、アジド側鎖を有する非天然アミノ酸)との間のアジド-アルキン付加環化反応を行う工程; および (b) 反応物からp 9 7結合体を単離し、それにより、p 9 7結合体を生成する工程を含む、p 9 7結合体の生成方法も含む。

【0165】

p 9 7結合体が融合ポリペプチドである場合、融合ポリペプチドを、一般に、標準的な技術を使用して調製することができる。しかし、好ましくは、融合ポリペプチドを、本明細書中に記載され、且つ当該分野で公知の発現系での組換えポリペプチドとして発現する。本発明の融合ポリペプチドは、p 9 7ポリペプチド配列の1つまたは複数のコピーを含むことができ、且つ目的のポリペプチドベースの薬剤(例えば、LSDポリペプチド)の1つまたは複数のコピーを含むことができる(任意の所望の配置で存在する)。

【0166】

融合タンパク質について、p 9 7ポリペプチド、ポリペプチド薬剤(例えば、LSDポリペプチド)、および任意選択的なペプチドリンカー成分をコードするDNA配列を個別にアセンブリし、次いで、適切な発現ベクターにライゲートすることができる。一方のポリペプチド成分をコードするDNA配列の3'末端を、ペプチドリンカーを使用するか使用しないで他方のポリペプチド成分をコードするDNA配列の5'末端に配列の読み枠がインフレームであるようにライゲートする。ライゲートしたDNA配列を、適切な転写調節エレメントまたは翻訳調節エレメントに作動可能に連結する。DNA発現を担う調節エレメントを、第1のポリペプチドをコードするDNA配列に対して5'方向のみで位置づける。同様に、翻訳終止シグナルおよび転写終止シグナルを終了させるのに必要な終止コドンは、ほとんどのC末端ポリペプチドをコードするDNA配列に対して3'の方向にのみ存在する。これにより、両成分ポリペプチドの生物学的活性を保持する単一の融合ポリペプチドに翻訳される。

【0167】

類似の技術(主に、プロモーター、終止コドン、および転写終止シグナルなどの調節エレメントの配置)を、非融合結合体の產生のための非融合タンパク質(例えば、p 9 7ポリペプチド)およびポリペプチド薬剤(例えば、抗体剤)の組換え產生に適用することができる。

【0168】

本発明のポリヌクレオチドおよび融合ポリヌクレオチドは、p 9 7ポリペプチド配列をコードする核酸の1つまたは複数のコピーを含むことができ、そして/またはLSDポリペプチドなどのポリペプチド薬剤をコードする核酸の1つまたは複数のコピーを含むことができる。

【0169】

いくつかの実施形態では、対象とされるp 9 7ポリペプチド、抗体、もしくは他のポリペプチド薬剤、および/またはp 9 7-ポリペプチド融合物をコードする核酸を宿主細胞に直接移入し、細胞を、コードされたポリペプチドの発現を誘導するのに十分な条件下でインキュベートする。本開示のポリペプチド配列を、当業者に周知の標準的な技術を使用して本明細書中に提供したポリペプチド配列および核酸配列と組み合わせて調製することができる。

10

20

30

40

50

【0170】

したがって、一定の関連する実施形態によれば、本明細書中に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは融合ポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞を提供する。宿主細胞中でのp97ポリペプチド、LSDポリペプチド、またはp97-LSDポリペプチド融合物の発現を、適切な条件下でのポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞の培養によって都合よく行うことができる。発現による産生後、ポリペプチドを、任意の適切な技術を使用して単離および/または精製し、次いで、必要に応じて使用することができる。

【0171】

種々の異なる宿主細胞中でのポリペプチドのクローニングおよび発現のための系は周知である。適切な宿主細胞には、細菌系、哺乳動物細胞系、酵母系、およびバキュロウイルス系が含まれる。当該分野で利用可能な異種ポリペプチド発現のための哺乳動物細胞株には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、HEK-293細胞、およびNSOマウス黒色腫細胞などが含まれる。一般的な好みしい細菌宿主は大腸菌である。大腸菌などの原核細胞中でのポリペプチドの発現は、当該分野で十分に確立されている。概説については、例えば、Pluckthun, A. B. *bio/Technology*. 9: 545-551 (1991) を参照のこと。培養における真核細胞中での発現もまた、ポリペプチドの組換え産生の選択肢として当業者が利用可能である(Ref, *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576, 1993; およびTripli, *Curr. Opinion Biotech.* 6: 553-560, 1995を参照のこと)。

【0172】

適切な調節配列(プロモーター配列、終結配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子、および必要に応じた他の配列が含まれる)を含む適切なベクターを選択するか構築することができる。ベクターは、必要に応じて、プラスミド、ウイルス(例えば、ファージ、すなわちファージミド)であり得る。さらなる詳細については、例えば、*Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2nd edition, Sambrookら, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと。例えば、核酸構築物の調製における核酸の操作、変異誘発、配列決定、細胞へのDNAの移入および遺伝子発現、ならびにタンパク質分析のための多数の公知の技術およびプロトコールは、*Current Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubelら編, John Wiley & Sons, 1992またはその後の最新情報に詳述されている。

【0173】

用語「宿主細胞」を、1つ以上の本明細書中に記載のポリペプチドをコードする核酸配列が導入されているか導入することができ、選択された目的の遺伝子(任意の本明細書中に記載のポリペプチドをコードする遺伝子など)をさらに発現するか発現することができる細胞をいうために使用する。この用語は、選択した遺伝子が存在する限り、子孫が元の親と同一の形態学的性質または遺伝子構造であるかどうか無関係な親細胞の子孫を含む。宿主細胞を、一定の特徴、例えば、スルファターゼモチーフ内のシステイン残基またはセリン残基をホルミルグリシン(FGly)残基に変換するためのホルミルグリシン生成酵素(FGE)の発現、または非天然アミノ酸(結合体化を容易にするためのアジド側鎖、アルキン側鎖、または他の所望の側鎖を有する非天然アミノ酸が含まれる)をポリペプチドに組み込むことができるアミノアシルtRNAシンテターゼの発現について選択することができる。

【0174】

したがって、かかる核酸を宿主細胞に導入する工程を含む方法も意図される。核酸の導入は、任意の利用可能な技術を使用することができる。真核細胞について、適切な技術には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、エレクトロポレ

10

20

30

40

50

ーション、リポソーム媒介トランスフェクション、およびレトロウイルスまたは他のウイルス（例えば、ワクシニア、または昆虫細胞用のバキュロウイルス）を使用した形質導入が含まれ得る。細菌細胞について、適切な技術には、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション、およびバクテリオファージを使用したトランスフェクションが含まれ得る。導入後、例えば、遺伝子発現条件下での宿主細胞の培養によって核酸から発現させることを可能にすることができる。1つの実施形態では、核酸を、宿主細胞のゲノム（例えば、染色体）に取り込む。標準的な技術にしたがってゲノムを使用した組換えを促進する配列を含めることによって取り込みを促進することができる。

【0175】

本発明はまた、一定の実施形態では、特定のポリペプチド（本明細書中に記載の p 97 ポリペプチド、LSD ポリペプチド、または p 97 - LSD ポリペプチド融合タンパク質など）を発現するために発現系中で本明細書中に記載の核酸構築物を使用する工程を含む方法を提供する。

【0176】

上述の通り、一定の p 97 結合体（融合タンパク質など）は、1つ以上のリンカー基（非ペプチドリンカー（例えば、非タンパク質リンカー）およびペプチドリンカーが含まれる）を使用することができる。かかるリンカーは安定なリンカーまたは放出可能なリンカーであり得る。

【0177】

例示的な非ペプチドの安定性連結には、スクシンイミド、プロピオン酸、カルボキシメチラート連結、エステル、カルバマート、アミド、アミン、カルバミド、イミン、脂肪族 C - C 結合、チオエーテル連結、チオカルバマート、およびチオカルバミドなどが含まれる。一般に、加水分解的に安定な連結は、生理学的条件下で約 1 ~ 2 % から 5 % / 日未満の加水分解率を示す連結である。

【0178】

例示的な非ペプチドの放出性連結には、カルボン酸エステル連結、リン酸エステル連結、無水物連結、アセタール連結、ケタール連結、アシリオキシアルキルエーテル連結、イミン連結、オルトエステル連結、チオエステル連結、チオールエステル連結、カルボナート連結、およびヒドラゾン連結が含まれる。加水分解的に不安定なまたは弱い連結のさらなる例示的な実施形態には、以下が含まれるが、これらに限定されない： - O₂C - (C H₂)_b - O - (式中、b は 1 ~ 5 である)、 - O - (C H₂)_b - C O₂ - (C H₂)_c - (式中、b は 1 ~ 5 であり、c は 2 ~ 5 である)、 - O - (C H₂)_b - C O₂ - (C H₂)_c - O - (式中、b は 1 ~ 5 であり、c は 2 ~ 5 である)、 - (C H₂)_b - O P O₃ - (C H₂)_b - (式中、b は 1 ~ 5 であり、b' は 1 ~ 5 である)、 - C (O) - (N H - C H R - C O) _a - N H - C H R - (式中、a は 2 ~ 20 であり、R は、 - アミノ酸上に見いだされる置換基である)、 - O - (C H₂)_b - C O₂ - C H C H₂ - C H₂ - (式中、b は 1 ~ 5 である)、 - O - C₆H₄ - C H = N - (C H₂)_b - O - (式中、b は 1 ~ 5 である)、および - O - (C H₂)_b - C H₂ - C H = N - (C H₂)_b - O - (式中、各 b は、独立して、1 ~ 5 である)。

【0179】

放出可能なリンカーの他の例は、ベンジル脱離ベースのリンカー、トリアルキルロックベースのリンカー（またはトリアルキルロックラクトン化ベースのリンカー）、ビシンベースのリンカー、および酸不安定性リンカーであり得る。その内で、酸不安定性リンカーは、ジスルフィド結合、ヒドラゾン含有リンカー、およびチオプロピオナート含有リンカーであり得る。

【0180】

細胞への内在化中または内在化の際に放出可能なまたは切断可能なリンカーも含まれる。これらのリンカー基からの薬剤の細胞内放出機構には、ジスルフィド結合の還元による切断（例えば、S p i t l e r の米国特許第 4,489,710 号）、光解離性結合の照射による切断（例えば、S e n t e r らの米国特許第 4,625,014 号）、誘導体化

10

20

30

40

50

アミノ酸側鎖の加水分解による切断（例えば、Kohnらの米国特許第4,638,045号）、血清補体媒介加水分解による切断（例えば、Rodwellらの米国特許第4,671,958号）、および酸触媒加水分解による切断（例えば、Blattlerらの米国特許第4,569,789号）が含まれる。1つの実施形態では、酸不安定性リンカーを使用することができる（Cancer Research 52:127-131, 1992；および米国特許第5,208,020号）。

【0181】

一定の実施形態では、「水溶性ポリマー」を、p97ポリペプチド配列の目的の薬剤へのカップリングのためのリンカーにおいて使用する。「水溶性ポリマー」は、水溶性であり、通常は実質的に非免疫原性であり、通常は原子分子量が約1,000ダルトンを超えるポリマーをいう。水溶性ポリマーを介した2つのポリペプチドの付着は、かかる修飾が血清半減期の増加（例えば、タンパク質分解安定性の増加および/または腎臓クリアランスの減少）によって治療指数を増加させることができるので、望ましい可能性がある。さらに、1つ以上のポリマーの付着により、タンパク質医薬品の免疫原性が減少し得る。水溶性ポリマーの特定の例には、ポリエチレン glycol、ポリプロピレン glycol、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレン glycolとポリプロピレン glycolとのコポリマーなどが含まれる。

【0182】

いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの有効流体学的分子量は、約10,000Da超、約20,000～500,000Da超、約40,000Da～300,000Da超、約50,000Da～70,000Da超、通常は約60,000Da超である。「有効流体学的分子量」は、水ベースのサイズ排除クロマトグラフィ（SEC）によって決定した場合のポリマー鎖の有効な水溶媒和サイズをいう。水溶性ポリマーがポリアルキレンオキシド反復単位（エチレンオキシド反復単位など）を有するポリマー鎖を含む場合、各鎖の原子分子量は、約200Daと約80,000Daとの間または約1,500Daと約42,000Daとの間であり得、2,000～約20,000Daが特に興味深い。直鎖、分枝鎖、および末端荷電水溶性ポリマーも含まれる。

【0183】

アルデヒドタグ化ポリペプチド間のリンカーとして有用なポリマーは、広範な分子量およびポリマー-サブユニットを有することができる。これらのサブユニットは、生物学的ポリマー、合成ポリマー、またはその組み合わせを含むことができる。かかる水溶性ポリマーの例には、以下が含まれる：デキストランおよびデキストラン誘導体（硫酸デキストラン、P-アミノ架橋デキストリン、およびカルボキシメチルデキストリンが含まれる）、セルロースおよびセルロース誘導体（メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースが含まれる）、デンプンおよびデキストリン、ならびにデンプンの誘導体および加水分解物（hydroxylacte）、ポリアルキレン glycol（polyalkylene glycol）およびその誘導体（ポリエチレン glycol（PEG）、メトキシポリエチレン glycol、ポリエチレン glycolホモポリマー、ポリプロピレン glycolホモポリマー、エチレン glycolのプロピレン glycolとのコポリマー（ここで、前記ホモポリマーおよびコポリマーは非置換であるか、1つの末端がアルキル基、ヘパリンおよびヘパリンのフラグメント、ポリビニルアルコールおよびポリビニルエチルエーテル、ポリビニルピロリドン、アスパルトアミド、およびポリオキシエチル化ポリオール、デキストランおよびデキストラン誘導体、デキストリンおよびデキストリン誘導体と置換されている）が含まれる）。具体的に記載した水溶性ポリマーの種々の誘導体も含まれると認識されるであろう。

【0184】

水溶性ポリマー、特に、ポリエチレン glycol「PEG」などのポリアルキレンオキシドベースのポリマーが当該分野で公知である（Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J.M. Harris, Ed., Plenum Pres

10

20

30

40

50

s, New York, N. Y. (1992); および Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications, J. M. Harris and S. Zalipsky, Eds., ACS (1997); ならびに国際特許出願: WO 90/13540号、WO 92/00748号、WO 92/16555号、WO 94/04193号、WO 94/14758号、WO 94/17039号、WO 94/18247号、WO 94/28937号、WO 95/11924号、WO 96/00080号、WO 96/23794号、WO 98/07713号、WO 98/41562号、WO 98/48837号、WO 99/30727号、WO 99/32134号、WO 99/33483号、WO 99/53951号、WO 01/26692号、WO 95/13312号、WO 96/21469号、WO 97/03106号、WO 99/45964号、および米国特許第4,179,337号; 同第5,075,046号; 同第5,089,261号; 同第5,100,992号; 同第5,134,192号; 同第5,166,309号; 同第5,171,264号; 同第5,213,891号; 同第5,219,564号; 同第5,275,838号; 同第5,281,698号; 同第5,298,643号; 同第5,312,808号; 同第5,321,095号; 同第5,324,844号; 同第5,349,001号; 同第5,352,756号; 同第5,405,877号; 同第5,455,027号; 同第5,446,090号; 同第5,470,829号; 同第5,478,805号; 同第5,567,422号; 同第5,605,976号; 同第5,612,460号; 同第5,614,549号; 同第5,618,528号; 同第5,672,662号; 同第5,637,749号; 同第5,643,575号; 同第5,650,388号; 同第5,681,567号; 同第5,686,110号; 同第5,730,990号; 同第5,739,208号; 同第5,756,593号; 同第5,808,096号; 同第5,824,778号; 同第5,824,784号; 同第5,840,900号; 同第5,874,500号; 同第5,880,131号; 同第5,900,461号; 同第5,902,588号; 同第5,919,442号; 同第5,919,455号; 同第5,932,462号; 同第5,965,119号; 同第5,965,566号; 同第5,985,263号; 同第5,990,237号; 同第6,011,042号; 同第6,013,283号; 同第6,077,939号; 同第6,113,906号; 同第6,127,355号; 同第6,177,087号; 同第6,180,095号; 同第6,194,580号; 同第6,214,966号 (参考として援用される) を参照のこと)。

【0185】

例示的な目的のポリマーには、ポリアルキレンオキシド、ポリアミドアルキレンオキシド、またはその誘導体 (式 - - (CH₂ - - CH² - - O) - - のエチレンオキシド反復単位を含むポリアルキレンオキシドおよびポリアミドアルキレンオキシドが含まれる) を含むポリマーが含まれる。さらなる例示的な目的のポリマーには、分子量が約1,000ダルトンを超える式 - - [C(O) - - X - - C(O) - - NH - - Y - - NH]_n - または - - [NH - - Y - - NH - - C(O) - - X - - C(O)]_n - - (式中、XおよびYは、同一でも異なっていてもよく、分枝鎖または直鎖であり得る2価のラジカルであり、nは2~100、通常は2~50の個別の整数であり、XおよびYのいずれかまたは両方が直鎖または分枝鎖であり得る生体適合性の実質的に非抗原性の水溶性反復単位を含む) のポリアミドが含まれる。

【0186】

さらなる例示的な水溶性反復単位は、式 - - (CH₂ - - CH₂ - - O) - - または - - (CH₂ - - CH₂ - - O) - - のエチレンオキシドを含む。かかる水溶性反復単位数は有意に変化することができ、かかる単位の通常の数は2~500、2~400、2~300、2~200、2~100、最も通常には2~50である。例示的な実施形態は、XおよびYの一方または両方が以下から選択される水溶性反復単位である: - - ((CH₂)_{n1} - - (CH₂ - - CH₂ - - O)_{n2} - - (CH₂)_{n3} - - または - - ((CH₂)_{n1} - - (O - - CH₂ - - CH₂)_{n2} - - (CH₂)_{n3} - -) (式中、n1は1~

10

20

30

40

50

6、1～5、1～4、最も通常には1～3であり、n2は、2～50、2～25、2～15、2～10、2～8、最も通常には2～5である)。さらなる例示的な実施形態は、いくつあるバリエーションのうちで、Xが--(CH₂--CH₂)--であり、Yが--(CH₂--(CH₂--CH₂--O)₃--CH₂--CH₂--CH₂)---または--(CH₂--CH₂--(O--CH₂--CH₂)₃--CH₂)--である水溶性反復単位である。

【0187】

一定の実施形態では、ペプチドリンカー配列を使用して、p97結合体の成分を分離またはカップリングすることができる。例えば、ポリペプチド-ポリペプチド結合体について、ペプチドリンカーは、確実に各ポリペプチドがその二次構造および三次構造に折りたたまれるのに十分な距離で成分を分離することができる。かかるペプチドリンカー配列を、本明細書中に記載されており、且つ当該分野で周知の標準的な技術を使用して、結合体(例えば、融合タンパク質)に組み込むことができる。適切なペプチドリンカー配列を、以下の要因に基いて選択することができる:(1)可動性の伸長高次構造を採用する能力;(2)第1および第2のポリペプチド上の機能的エピトープと相互作用することができる二次構造を採用できないこと;および(3)ポリペプチド機能性エピトープと反応し得る疎水性残基または荷電残基の欠如。リンカーとして有用に使用することができるアミノ酸配列には、Marateaら, Gene 40:39-46, 1985; Murphyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986; 米国特許第4,935,233号、および米国特許第4,751,180号に開示のアミノ酸配列が含まれる。

【0188】

一定の例示的な実施形態では、ペプチドリンカーは、約1～5アミノ酸、5～10アミノ酸、5～25アミノ酸、5～50アミノ酸、10～25アミノ酸、10～50アミノ酸、10～100アミノ酸、または任意のその間の範囲のアミノ酸である。他の例示的な実施形態では、ペプチドリンカーは、約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれを超えるアミノ酸長を含む。特定のリンカーは、約1～200アミノ酸、1～150アミノ酸、1～100アミノ酸、1～90アミノ酸、1～80アミノ酸、1～70アミノ酸、1～60アミノ酸、1～50アミノ酸、1～40アミノ酸、1～30アミノ酸、1～20アミノ酸、1～10アミノ酸、1～5アミノ酸、1～4アミノ酸、1～3アミノ酸の全アミノ酸長、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、もしくはそれを超えるアミノ酸を有することができる。

【0189】

ペプチドリンカーは、本明細書中の他の場所に記載されており、且つ当該分野で公知の任意の1つ以上の天然に存在するアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、アミノ酸アナログ、および/またはアミノ酸模倣物を使用することができる。リンカーとして有用に使用することができる一定のアミノ酸配列には、Marateaら, Gene 40:39-46, 1985; Murphyら, PNAS USA. 83:8258-8262, 1986; 米国特許第4,935,233号、および米国特許第4,751,180号に開示のアミノ酸配列が含まれる。特定のペプチドリンカー配列は、Gly残基、Ser残基、および/またはAsn残基を含む。他の中性に近いアミノ酸(ThrおよびAlaなど)も、必要に応じてペプチドリンカー配列中で使用することができる。

【0190】

一定の例示的なリンカーには、以下のGly、Ser、および/またはAsn含有リンカーが含まれる:[G]_x、[S]_x、[N]_x、[GS]_x、[GGS]_x、[GSS]_x、[GSGS]_x(配列番号6)、[GGSG]_x(配列番号7)、[GGGS]_x

10

20

30

40

50

(配列番号8)、[GGGGS]x(配列番号9)、[GN]x、[GGN]x、[GN
N]x、[GNGN]x(配列番号10)、[GGNG]x(配列番号11)、[GGG
N]x(配列番号12)、[GGGN]x(配列番号13)リンカー(式中、xは、1
、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17
、18、19、もしくは20、またはそれを超える数である)。これらのアミノ酸および
関連するアミノ酸の他の組み合わせが当業者に明らかであろう。

【0191】

特定の実施形態では、リンカー配列は、3つのグリシン残基を含むG1y3リンカー配
列を含む。特定の実施形態では、可動性リンカーを、DNA結合部位およびペプチド自
体の両方をモデリングすることができるコンピュータプログラム(Desjarlais
& Berg, PNAS. 90: 2256-2260, 1993; および PNAS. 91
: 11099-11103, 1994)を使用するかファージディスプレイ法によって合
理的にデザインすることができる。

【0192】

ペプチドリンカーは、生理学的に安定であり得るか、放出可能なリンカー(生理学的分
解性リンカーまたは酵素分解性リンカー(例えば、タンパク質分解性リンカー)など)が
含まれ得る。一定の実施形態では、1つ以上の放出可能なリンカーにより、結合体の半減
期がより短くなり、且つクリアランスがより迅速になり得る。これらおよび関連する実施
形態を使用して、例えば、血流中のp97結合体の溶解性および血液循環寿命を向上させ
ることができる一方で、薬剤を血流中に(またはBBBを通過して)送達させることもで
き、リンカーの分解後、p97配列を実質的に含まない。これらの態様は、ポリペプチド
または他の薬剤が、p97配列に持続的に結合体化した時に活性の減少が認められる場合
に特に有用である。本明細書中に提供したリンカーの使用により、かかる抗体は、結合体
化形態である場合にその治療活性を維持することができる。これらおよび他の方法では、
p97結合体の性質を、長期間にわたって抗体の生物活性および循環半減期のバランスを
とるようにより有効に調整することができる。

【0193】

本発明の特定の実施形態での使用に適切な酵素分解性連結には、以下が含まれるが、こ
れらに限定されない:セリンプロテアーゼ(トロンビン、キモトリプシン、トリプシン、
エラスターーゼ、カリクレイン、またはサブチリシン(subtilisin)など)によ
って切断されるアミノ酸配列。トロンビン切断性アミノ酸配列の実例には、以下が含
まれるが、これらに限定されない: -G1y-Arg-G1y-Asp-(配列番号14)
、-G1y-G1y-Arg-、-G1y-Arg-G1y-Asp-Asn-Pro-(配列番号15)、
-G1y-Arg-G1y-Asp-Ser-(配列番号16)、-G1y-Arg-G1y-Asp-Ser-Pro-Lys-(配列番号17)、
-G1y-Pro-Arg-、-Val-Pro-Arg-、および-Phe-Val-Arg-。
エラスターーゼ切断性アミノ酸配列の実例には、以下が含まれるが、これらに限定され
ない: -Ala-Ala-Ala-、-Ala-Ala-Pro-Val-(配列番号18)、
-Ala-Ala-Pro-Leu-(配列番号19)、-Ala-Ala-Pr
o-Phe-(配列番号20)、-Ala-Ala-Pro-Ala-(配列番号21)
、および-Ala-Tyr-Leu-Val-(配列番号22)。

【0194】

本発明の特定の実施形態での使用に適切な酵素分解性連結には、マトリックスマタロプロ
テイナーゼ(コラゲナーゼ、ストロメライシン、およびゼラチナーゼなど)によって切
断することができるアミノ酸配列も含まれる。マトリックスマタロプロテイナーゼ切断性
アミノ酸配列の実例には、以下が含まれるが、これらに限定されない: -G1y-Pro
-Y-G1y-Pro-Z-(配列番号23)、-G1y-Pro-、Leu-G1y-
Pro-Z-(配列番号24)、-G1y-Pro-Ile-G1y-Pro-Z-(配
列番号25)、および-Ala-Pro-G1y-Leu-Z-(配列番号26)(式中
、YおよびZはアミノ酸である)。コラゲナーゼ切断性アミノ酸配列の実例には、以下が

10

20

30

40

50

含まれるが、これらに限定されない：- Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg - Z - (配列番号27)、- Pro - Leu - Gly - Leu - Leu - Gly - Z - (配列番号28)、- Pro - Gln - Gly - Ile - Ala - Gly - Trp - (配列番号29)、- Pro - Leu - Gly - Cys (Me) - His - (配列番号30)、- Pro - Leu - Gly - Leu - Tyr - Ala - (配列番号31)、- Pro - Leu - Ala - Leu - Trp - Ala - Arg - (配列番号32)、および- Pro - Leu - Ala - Tyr - Trp - Ala - Arg - (配列番号33) (式中、Zはアミノ酸である)。ストロメライシン切断性アミノ酸配列の実例は、- Pro - Tyr - Ala - Tyr - Tyr - Met - Arg - (配列番号34)であり、ゼラチナーゼ切断性アミノ酸配列の例は、- Pro - Leu - Gly - Met - Tyr - Ser - Arg - (配列番号35)である。
10

【0195】

本発明の特定の実施形態での使用に適切な酵素分解性連結には、アンギオテンシン変換酵素によって切断することができるアミノ酸配列 (例えば、- Asp - Lys - Pro - 、- Gly - Asp - Lys - Pro - (配列番号36) および - Gly - Ser - Asp - Lys - Pro - (配列番号37) など) も含まれる。

【0196】

本発明の特定の実施形態での使用に適切な酵素分解性連結には、カテプシンBによって切断することができるアミノ酸配列 (例えば、- Val - Cyt - 、- Ala - Leu - Ala - Leu - (配列番号38) 、- Gly - Phe - Leu - Gly - (配列番号39) 、および - Phe - Lys - など) も含まれる。
20

【0197】

しかし、一定の実施形態では、1つ以上の非ペプチドリンカーまたはペプチドリンカーのいずれかは任意である。例えば、第1および第2のポリペプチドが機能的ドメインを分離し、且つ立体障害を防止するために使用することができる非必須N末端および/またはC末端アミノ酸領域を有する融合タンパク質ではリンカー配列は必要ないかもしれない。

【0198】

本明細書中に記載のp97ポリペプチドおよびp97ポリペプチド結合体の機能的性質を、当業者に公知の種々の方法 (例えば、親和性 / 結合アッセイ (例えば、表面プラズモン共鳴、競合阻害アッセイ) が含まれる) を使用して評価することができる。例えば、本明細書中に記載の結合体を、受容体内在化に及ぼす影響、in vitroおよびin vivoでの有効性など (血液脳関門を通過する輸送速度が含まれる) について試験することができる。かかるアッセイを、当業者に公知の十分に確立されているプロトコール (例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY) を参照のこと) または市販のキットを使用して行うことができる。
30
40

【0199】

使用方法および薬学的組成物

本発明の一定の実施形態は、本明細書中に記載の脱リン酸化されたリソソーム貯蔵障害 (LSD) タンパク質および関連するp97結合体の組成物の使用方法に関する。かかる方法の例には、例えば、一定の器官 / 組織 (神経系の器官 / 組織など) の医用画像のための脱リン酸化されたLSDタンパク質または関連するp97結合体の使用を含む処置方法および診断方法が含まれる。いくつかの実施形態は、中枢神経系 (CNS) の障害もしくは容態またはCNS成分を有する障害もしくは容態の診断および/または処置方法を含む。特定の態様は、リソソーム貯蔵障害 (LSD) (CNS成分を含む前記障害が含まれる) の処置方法を含む。

【0200】

したがって、一定の実施形態は、本明細書中に記載の実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質またはそのp97結合体を含む組成物を投与する工程を含む、処置を必要とする被験体の処置方法を含む。本明細書中に記載の実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質またはそのp97結合体を含む組成物を投与する工程を含む、被験体の神経系（例えば、中枢神経系組織）への薬剤の送達方法も含まれる。一定のこれらおよび関連する実施形態では、本方法により、例えば、比較的または通常のリン酸化LSDタンパク質または結合体化されていないLSDタンパク質を含む組成物による送達と比較して中枢神経系組織への薬剤の送達速度が増大する。

【0201】

いくつかの例では、被験体は、リソソーム蓄積症を有するか有するリスクがある。したがって、一定の方法は、処置を必要とする被験体のリソソーム蓄積症（任意選択的に中枢神経系に関連するかCNS合併症（CNS involvement）を有するリソソーム蓄積症）の処置に関する。例示的なリソソーム蓄積症には、ムコ多糖体沈着症II型（ハンター症候群）、ムコ多糖体沈着症I型（ハーラー症候群）、アスパルチルグルコサミン尿、コレステロールエステル蓄積症、ウォルマン病、シスチン蓄積症、ダノン病、ファブリー病、ファーバー脂肪肉芽腫症、ファーバー病、フコース蓄積症、ガラクトシアリドーシスI型/II型、ゴーシェ病I型/II型/III型、ゴーシェ病、グロボイド細胞白質ジストロフィ（globoid cell leucodystrophy）、クラッベ病、糖原貯蔵障害II、ポンペ病、GM1-gangliosidosis I型/II型/III型、GM2-gangliosidosis I型、サンドホフ病、GM2-gangliosidosis、-マンノシドーシスI型/II型、-マンノシドーシス、異染性白質ジストロフィ（metachromatic leucodystrophy）、ムコリピドーシスI型、シアリドーシスI型/II型ムコリピドーシスII型/III型I細胞病、ムコリピドーシスIIIC型偽性ハーラーポリジストロフィ、ムコ多糖体沈着症IIIA型、サンフィリッポ症候群、ムコ多糖体沈着症IIIB型、ムコ多糖体沈着症IIIC型、ムコ多糖体沈着症IIID型、ムコ多糖体沈着症IV型、モルキオ症候群、ムコ多糖体沈着症IVB型、モルキオ症候群、ムコ多糖体沈着症V型、ムコ多糖体沈着症VI型、スライ症候群、ムコ多糖体沈着症IX型、多発性スルファターゼ欠損症、神経セロイドリボフスチノーシス、CLN1バッテン病、ニーマン・ピック病NB型、ニーマン・ピック病、ニーマン・ピック病C1型、ニーマン・ピック病C2型、濃化異骨症、シンドラー病I型/II型、シンドラー病、およびシアル酸蓄積症が含まれる。これらおよび関連する実施形態では、本明細書中に記載のように、実質的に脱リン酸化されたLSDタンパク質を、単独および/またはp97結合体として投与することができる。

【0202】

特定の態様では、リソソーム蓄積症はムコ多糖体沈着症II型（MPS II；またはハンター症候群）であり、LSDタンパク質はヒトIDSの実質的に脱リン酸化された形態である。ハンター症候群は、グリコサミノグリカン（GAG）蓄積によって特徴付けられるX連鎖多系統障害である。罹患個体の大多数は男性であり、稀に女性キャリアが所見を示す。発症年齢、疾患重症度、および進行速度は、大きく異なり得る。

【0203】

重症疾患患者において、CNS合併症（主に進行性の認知衰退を発症する）、進行性気道疾患、および心疾患により、通常、最初の10年または次の10年で死亡する。したがって、一定の実施形態は、CNS合併症を有するハンター症候群の処置を含む。

【0204】

軽症型疾患患者では、他の器官系に及ぼすGAG蓄積の影響は進行性認知低下患者と同程度の重症度であり得るにもかかわらず、CNSは罹患していない（または最小に罹患している）。正常な知能を有する若年青年期への生存は、軽症型形態の疾患で共通である。しかし、軽症型疾患を有する被験体は、CNS組織への透過が改善される脱リン酸化され

10

20

30

40

50

た L S D タンパク質（例えば、 I D S ）の投与から依然として恩恵を受け得る（例えば、軽症型ハンター症候群から C N S 合併症を有するハンター症候群への進行リスクを軽減する）。

【 0 2 0 5 】

ハンター症候群の両形態におけるさらなる所見には、以下が含まれる：低身長；交通性水頭症を伴うか伴わない大頭症；巨舌症；嗄声；伝音性および感音性の聴力損失；肝腫大および／または脾腫；多発性骨形成不全および関節拘縮（頸関節の強直症が含まれる）；脊柱管狭窄症；および手根管症候群。したがって、本明細書中に記載の L S D タンパク質を使用した処置を受ける患者は、ハンター症候群のこれらの所見のうちの 1 つ以上を有し得る。

10

【 0 2 0 6 】

尿中 G A G および骨検索は、 M P S 容態の存在を証明することができるが M P S I I に特異的ではない。男性発端者における M P S I I 診断の客観的基準は、少なくとも 1 つの他のスルファターゼの正常な活性の存在下での白血球、線維芽細胞、または血漿中のイズロン酸スルファターゼ（ I D S ）酵素活性の欠損である。 I D S （その変異がハンター症候群に関連することが知られている唯一の遺伝子）の分子遺伝子検査を使用して、通常でない表現型または G A G 試験結果に適合しない表現型を有する男性発端者における診断を確認することができる。

【 0 2 0 7 】

ハンター症候群の一般的な処置には、発達療法、作業療法、および理学療法；水頭症シャント術；扁桃摘出術およびアデノイド切除術；陽圧換気（ C P A P または気管切開術）；手根管開放術；心臓弁置換；鼠径ヘルニア修復が含まれる。それ故、一定の態様では、本明細書中に記載の L S D タンパク質によって処置する被験体は、 1 つ以上のこれらの処置を受ける可能性があるか、受けているか、受けている。

20

【 0 2 0 8 】

疾患モニタリングは、器官系合併症および疾患重症度に依存し得、通常、年 1 回の心機能評価および心エコー図；肺機能評価（肺機能検査が含まれる）；オーディオグラム；眼の検査；発達評価；および神経学的検査が含まれる。さらなる研究には、閉塞性無呼吸についての睡眠検査；手根管症候群を評価するための神経伝導速度（ N C V ）；水頭症の評価；股疾患をモニタリングするための整形外科評価が含まれる。したがって、いくつかの態様では、本明細書中に記載の L S D タンパク質による処置のための被験体は、 1 つ以上のこれらの疾患モニタリングプロトコールを受ける可能性があるか、受けているか、受けている。

30

【 0 2 0 9 】

他の態様では、 L S D はムコ多糖体沈着症 I 型（ハーラー症候群）であり、 L S D タンパク質はヒト L - イズロニダーゼの実質的に脱リン酸化された形態である。ムコ多糖体沈着症 I 型（ M P S I ）は、一連の重症度に及ぶ特徴を有する進行性の多系統障害である。罹患個体は、伝統的には、 3 つの M P S I 症候群（ハーラー症候群、ハーラー・シャイ工症候群、またはシャイ工症候群）のうちの 1 つを有すると分類されるが、生化学的相違は同定されておらず、臨床所見は重複している。したがって、罹患個体は、ほとんどの場合、重症または軽症の M P S I （治療選択肢に影響を及ぼす特質）のいずれかを有すると説明される。

40

【 0 2 1 0 】

重症 M P S I では、乳児は出生時に正常に見え、典型的には、早期徵候は非特異的である（例えば、臍ヘルニアまたは鼠径ヘルニア、 1 歳未満の高頻度上気道の感染）。 1 歳を超えるまで粗大化顔貌は明らかになり得ない。下部脊椎の亀背が一般的である。全ての骨に関与する進行性骨格異形成（多発性骨形成不全）は汎発性である。 3 歳までに、線形の成長が停止する。知的障害が進行し、深刻になる。聴力損失が一般的である。典型的な心肺不全による死亡は、通常、 10 歳以下で起こる。一定の態様では、本明細書中に記載の L S D タンパク質での処置を受ける被験体は、任意選択的に C N S 合併症を伴う重症 M

50

P S I を有し得る。

【 0 2 1 1 】

軽症型M P S I では、疾患の重症度および疾患の進行速度は、20～30年で死に至る重症の生命を脅かす合併症から進行性の関節疾患の顕在化に起因する有意な障害を伴う通常の寿命までの範囲である。個体によっては神経学的合併症を発症せず、学齢前期に精神運動発達が正常であり得るが、学習障害が存在し得る。臨床的発症は、通常、3歳と10歳との間である。聴力損失および心臓弁疾患が一般的である。一定の態様では、本明細書中に記載のL S D タンパク質での処置を受ける被験体は、任意選択的にC N S 合併症を伴う軽症型M P S I を有し得る。

【 0 2 1 2 】

10

M P S I の診断は、典型的には、末梢血白血球、培養線維芽細胞、または血漿中のリソソーム酵素 - L - イズロニダーゼ活性の欠損が示されるかどうかに依存する。グリコサミノグリカン (G A G) (例えば、ヘパランおよびデルマタン硫酸) の尿中排泄の増加もまた、有用な予備試験である。I D U A (その変異がM P S I を引き起こすことが現在知られている唯一の遺伝子) の分子遺伝子試験が臨床的に利用可能である。配列分析により、ほとんどのM P S I 個体における両方のI D U A 変異が同定されると期待される。したがって、本明細書中に記載のL S D タンパク質での処置を受ける被験体は、1つ以上のこれらのM P S I の特徴を有し得る。

【 0 2 1 3 】

20

M P S I の一般的な徴候の処置には、乳児学習プログラム / 発達遅延のための特殊教育 ; グレアを軽減するための日除け付き帽子 / サングラス ; 必要に応じた心臓弁置換 ; 理学療法、必要に応じた整形外科 (関節置換、環椎後頭骨安定化、手根管症候群のための正中神経減圧術) ; 水頭症のための脳脊髄液 (C S F) シャント術 ; 耳管機能障害および / または上気道閉塞のための扁桃摘出術およびアデノイド切除術 ; 睡眠時無呼吸、肺高血圧症、右心不全のための気管切開術 ; P E チューブ ; および頸髄症のための外科的介入が含まれる。それ故、一定の態様では、本明細書中に記載のL S D タンパク質による処置のための被験体は、1つ以上のこれらの処置を受ける可能性があるか、受けているか、受けていた。

【 0 2 1 4 】

30

M P S I の初期の徴候の処置または防止には、造血幹細胞移植 (H S C T) が含まれ、これにより、2歳未満の重症M P S I の選択された小児の生存率を増加させ、顔貌粗大および肝脾腫を軽減し、聴覚を改善し、正常な心機能を維持することができる。H S C T は、通常、骨の徴候や角膜混濁を改善しない。H S C T は、小児において移植時に軽度であるが有意な認知障害を伴う一連の認知低下を遅延することができる。したがって、いくつかの態様では、本明細書中に記載のL S D タンパク質による処置のための被験体は、少なくとも1つのH S C T を受ける可能性があるか、受けているか、受けていた。

【 0 2 1 5 】

40

M P S I のための疾患のモニタリングは、種々の要因に依存し得るが、乳児および小児における頭部成長の早期および継続的なモニタリング ; 日常的な正中神経伝導速度検査 ; および小学校入学前の軽症型疾患児の教育評価が含まれ得る。整形外科医、神経科医 (脊髄合併症) 、眼科医、心臓病専門医 (心エコー図が含まれる) 、オージオロジスト、および耳鼻咽喉科医によって年1回の評価を行うことができる。したがって、いくつかの態様では、本明細書中に記載のL S D タンパク質による処置のための被験体は、1つ以上のこれらの疾患モニタリングプロトコールを受ける可能性があるか、受けているか、受けていた。

【 0 2 1 6 】

in vivoでの使用 (例えば、ヒト疾患の処置、医用画像、または試験) のために、本明細書中に記載の実質的に脱リン酸化されたL S D タンパク質およびp 97 結合体を、一般に、投与前に薬学的組成物に組み込む。薬学的組成物は、生理学的に許容され得るキャリアまたは賦形剤と組み合わせた1つ以上の本明細書中に記載の実質的に脱リン酸化

50

された L S D タンパク質または p 9 7 結合体を含む。

【 0 2 1 7 】

薬学的組成物を調製するために、有効量または所望の量の 1 つ以上の実質的に脱リン酸化された L S D タンパク質または p 9 7 結合体を、特定の投与様式に適切であることが当業者に公知の任意の薬学的キャリアまたは賦形剤と混合する。薬学的キャリアは、液体、半液体、または固体であり得る。非経口、皮内、皮下、または局所への適用のために使用される溶液または懸濁液には、例えば、滅菌希釈剤（水など）、生理食塩水（例えば、リン酸緩衝生理食塩水； P B S ）、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗菌薬（ベンジルアルコールおよびメチルパラベンなど）；抗酸化剤（アスコルビン酸および亜硫酸水素ナトリウムなど）およびキレート剤（エチレンジアミン四酢酸（ E D T A ）など）；緩衝液（酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、およびリン酸緩衝液など）が含まれ得る。静脈内投与する場合、適切なキャリアには、生理的食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水（ P B S ）、ならびに増粘剤および溶解補助剤（グルコース、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、およびその混合物など）を含む溶液が含まれる。

【 0 2 1 8 】

本明細書中に記載のポリペプチドおよび結合体を、純粋な形態または適切な薬学的組成物の形態で、類似の用途の薬剤の許容された任意の投与様式によって投与することができる。薬学的組成物を、ポリペプチドまたは結合体または結合体含有組成物を生理学的に許容され得るキャリア、希釈剤、または賦形剤と組み合わせることによって調製することができ、これを固体、半固体、液体、または気体の調製物（錠剤、カプセル、散剤、顆粒、軟膏、溶液、坐剤、注射液、吸入剤、ゲル、ミクロスフィア、およびエアロゾルなど）に処方することができる。さらに、他の薬学的に有効な成分（本明細書中の他の場所に記載の他の抗癌剤が含まれる）および／または適切な賦形剤（塩、緩衝液、および安定剤など）は、組成物内に存在し得るが、必須ではない。

【 0 2 1 9 】

種々の異なる経路（経口、非経口、鼻、静脈内、皮内、皮下、または局所が含まれる）によって投与することができる。好ましい投与様式は、処置または防止される容態の性質に依存する。

【 0 2 2 0 】

キャリアは、例えば、使用される投薬量および濃度で曝露される細胞または哺乳動物に無毒の薬学的に許容され得るキャリア、賦形剤、または安定剤が含まれ得る。しばしば、生理学的に許容され得るキャリアは、 p H 緩衝化水溶液である。生理学的に許容され得るキャリアの例には、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝液；抗酸化剤（アスコルビン酸が含まれる）；低分子量（約 1 0 未満の残基）ポリペプチド；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど）；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジンなど）；モノサッカリド、ジサッカリド、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンが含まれる）；キレート剤（ E D T A など）；糖アルコール（マンニトールまたはソルビトールなど）；塩形成対イオン（ナトリウムなど）；および／または非イオン性界面活性剤（ポリソルベート 2 0 （ T W E E N （商標））ポリエチレングリコール（ P E G ）、およびポロキサマー（ P L U R O N I C S （商標））など）が含まれる。

【 0 2 2 1 】

一定の実施形態では、実質的に脱リン酸化された L S D タンパク質および／または p 9 7 ポリペプチド配列を、各々か、個別にか、または依存の結合体としてか、粒子（例えば、ナノ粒子、ビーズ、脂質処方物、脂質粒子、またはリポソーム（例えば、免疫リポソーム））に結合するか、粒子内にカプセル化する。例えば、特定の実施形態では、 p 9 7 ポリペプチド配列を粒子表面に結合させ、実質的に脱リン酸化された L S D タンパク質を粒子表面に結合させ、そして／または粒子内にカプセル化する。いくつかのこれらおよび関

10

20

30

40

50

連する実施形態では、p 97 ポリペプチドおよび実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質を、粒子自体（例えば、ナノ粒子、リポソーム）のみを介して相互に共有結合性にまたは作動可能に連結させ、且つ任意の別の方法では相互に共有結合性に結合させない（すなわち、これらを同一粒子に個別に結合させる）。他の実施形態では、p 97 ポリペプチドおよび実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質を、最初に本明細書中に記載のように（例えば、リンカー分子を介して）相互に共有結合性または非共有結合性に結合体化し、次いで、粒子（例えば、免疫リポソーム、ナノ粒子）に結合させるか粒子内にカプセル化する。特定の実施形態では、粒子はリポソームであり、組成物は、1 つ以上の p 97 ポリペプチド、1 つ以上の実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質、およびリポソームを形成するための脂質混合物（例えば、リン脂質（界面活性を有する混合脂質鎖））を含む。いくつかの態様では、リポソーム構造の形成によって共有結合性の結合体化を必要とすることなく p 97 ポリペプチドおよび実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質が作動可能に連結されるように、p 97 ポリペプチドおよび実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質を脂質 / リポソーム混合物と個別に混合する。他の態様では、p 97 ポリペプチドおよび実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質を、本明細書中に記載のように最初に共有結合性または非共有結合性に相互に結合体化し、次いで、脂質と混合してリポソームを形成する。他の実施形態では、実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質を、いかなる p 97 ポリペプチドも使用せずに粒子（例えば、ナノ粒子、ビーズ、脂質処方物、脂質粒子、またはリポソーム（例えば、免疫リポソーム））に結合するか粒子内にカプセル化する。p 97 ポリペプチド、実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質、および / または p 97 - 薬剤結合体を、例えば、コアセルベーション技術または界面重合（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン - マイクロカプセルおよびポリ - (メチルメタクリラート) マイクロカプセル）によって調製したマイクロカプセル中、コロイド薬物送達系中（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）またはマクロエマルジョン中に捕捉することができる。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980) に開示されている。粒子またはリポソームは、他の治療薬または診断薬（細胞毒性薬など）をさらに含むことができる。

【0222】

30

正確な投薬量および処置の持続時間は、処置される疾患の関数であり、公知の試験プロトコールを使用するか、当該分野で公知のモデル系において組成物を試験し、それから外挿することによって経験的に決定することができる。比較臨床試験も行うことができる。投薬量はまた、緩和すべき容態の重症度によって異なり得る。薬学的組成物を、一般に、望ましくない副作用を最小にしながら治療的に有用な効果が発揮されるように処方および投与する。組成物を 1 回投与することができるか、間隔をあけて投与すべきいくつかのより小さな用量に分割することができる。任意の特定の被験体のために、特定の投薬レジメンを各必要性に応じて長期間にわたって調整することができる。

【0223】

40

したがって、これらおよび関連する薬学的組成物の典型的な投与経路には、経口、局所、経皮、吸入、非経口、舌下、口内、直腸、膣、および鼻腔内が含まれるが、これらに限定されない。用語「非経口」には、本明細書中で使用する場合、皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨内への注射または注入技術が含まれる。本発明の一定の実施形態の薬学的組成物を、患者への組成物の投与の際に組成物中に含まれる有効成分が生物学的に利用可能なように処方する。被験体または患者に投与される組成物は、例えば、錠剤が単回投薬単位であり得る場合に 1 つ以上の投薬単位の形態を取ることができ、エアロゾル形態の本明細書中に記載のポリペプチドまたは結合体の容器は複数の投薬単位を保持することができる。かかる投薬形態の実際の調製方法は公知であり、当業者に明らかであろう。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (Philadelphia College of

50

f Pharmacy and Science, 2000) を参照のこと。投与すべき組成物は、任意の事象において、目的の疾患または容態の処置のための治療有効量の実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質(すなわち、本明細書中に記載の結合体)を含むであろう。

【0224】

薬学的組成物は、固体または液体であり得る。1つの実施形態では、組成物が、例えば、錠剤または散剤の形態であるように、キャリアは粒子である。組成物が、例えば、経口用油、注射液、またはエアロゾル(例えば、吸入投与に有用)である場合、キャリアは液体であり得る。経口投与を意図する場合、薬学的組成物は固体または液体のいずれかが好ましく、本明細書中で固体または液体と見なされる範囲内に半固体、半液体、懸濁液、およびゲル形態が含まれる。

10

【0225】

経口投与のための固体組成物として、薬学的組成物を、散剤、顆粒、圧縮錠、丸薬、カプセル、チューインガム、またはウェハなどに処方することができる。かかる固体組成物は、典型的には、1つ以上の不活性希釈剤または食用キャリアを含むであろう。さらに、1つ以上の以下が存在することができる:結合剤(カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、微結晶性セルロース、トラガカントゴム、またはゼラチンなど);賦形剤(デンプン、ラクトース、またはデキストリンなど)、崩壊剤(アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、ブリモゲル、およびトウモロコシデンプンなど);潤滑剤(ステアリン酸マグネシウムまたはステロテックスなど);流動促進剤(コロイド状二酸化ケイ素など);甘味剤(スクロースまたはサッカリンなど);香味物質(ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバーなど);および着色剤。薬学的組成物がカプセル形態(例えば、ゼラチンカプセル)である場合、薬学的組成物は、上記タイプの材料に加えて、液体キャリア(ポリエチレングリコールまたは油など)を含むことができる。

20

【0226】

薬学的組成物は、液体、例えば、エリキシル、シロップ、溶液、乳濁液、または懸濁液の形態であり得る。液体は、2つの例を挙げると、経口投与用または注射による送達用であり得る。経口投与を意図する場合、好ましい組成物は、本発明の化合物に加えて、1つ以上の甘味剤、防腐剤、色素/着色剤、および香味増強剤を含む。注射による投与を意図する組成物では、1つ以上の界面活性剤、防腐剤、湿潤薬、分散剤、懸濁剤、緩衝液、安定剤、および等張剤を含めることができる。

30

【0227】

溶液、懸濁液、または他の類似の形態である液体薬学的組成物は、1つ以上の以下のアジュバントを含むことができる:滅菌希釈剤(注射用蒸留水、生理食塩水(好ましくは生理的食塩水)、リングル液、等張塩化ナトリウム、固定油(合成モノグリセリドまたはジグリセリド(溶剤または懸濁媒質としての役割を果たし得る)、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の溶剤など);抗菌薬(ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなど);抗酸化剤(アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなど);キレート剤(エチレンジアミン四酢酸など);緩衝液(酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、またはリン酸緩衝液など)、および張度を調整するための薬剤(塩化ナトリウムまたはデキストロースなど)。非経口調製物を、アンプル、使い捨てのシリンジ、またはガラス製またはプラスチック製の多用量バイアル中に封入することができる。生理的食塩水は好ましいアジュバントである。注射用薬学的組成物は無菌であることが好ましい。

40

【0228】

非経口または経口投与のいずれかを意図する液体薬学的組成物は、適切な投薬量が得られるような量の本明細書中に開示の実質的に脱リン酸化された LSD タンパク質または結合体を含むべきである。典型的には、目的の薬剤のこの量は、組成物中において少なくとも 0.01% である。経口投与を意図する場合、この量は、組成物の 0.1 重量% と約 70 重量%との間で変化し得る。一定の経口薬学的組成物は、約 4% と約 75% との間の目的の薬剤を含む。一定の実施形態では、本発明の薬学的組成物および薬学的調製物を、希

50

。 釀前に非経口投薬単位が 0.01 重量% ~ 10 重量% の目的の薬剤を含むように調製する。

【 0229 】

キャリアが溶液、乳濁液、軟膏、またはゲル基剤を適切に含むことができる場合、薬学的組成物は、局所投与を意図することができる。基剤は、例えば、1つ以上の以下を含むことができる：ペトロラタム、ラノリン、ポリエチレングリコール、蜜蠟、鉛油、希釀剤（水およびアルコールなど）、ならびに乳化剤および安定剤。増粘剤は、局所投与用の薬学的組成物中に存在することができる。経皮投与を意図する場合、組成物は、経皮貼布またはイオン導入デバイスを含むことができる。

【 0230 】

薬学的組成物は、例えば、直腸内で融解して薬物を放出する坐剤の形態で、直腸投与を意図し得る。直腸投与用組成物は、適切な非刺激性賦形剤として油脂性基剤を含むことができる。かかる基剤には、ラノリン、カカオバター、およびポリエチレングリコールが含まれるが、これらに限定されない。

【 0231 】

薬学的組成物は、固体または液体の投薬単位の物理的形態を改変する種々の材料を含むことができる。例えば、組成物は、有効成分周囲にコーティングシェルを形成する材料を含むことができる。コーティングシェルを形成する材料は、典型的には不活性であり、例えば、糖、シェラック、および他の腸溶コーティング剤から選択することができる。あるいは、有効成分を、ゼラチンカプセルにカプセル化することができる。固体または液体の薬学的組成物は、結合体または薬剤に結合し、それにより、化合物の送達を補助する薬剤を含むことができる。この能力で作用することができる適切な薬剤には、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、1つ以上のタンパク質またはリポソームが含まれる。

【 0232 】

薬学的組成物は、エアロゾルとして投与することができる投薬単位から本質的になり得る。用語「エアロゾル」を、コロイド性の系から圧縮パッケージからなる系までの範囲の種々の系を示すために使用する。液化ガスまたは圧縮ガスによるか、有効成分を分注する適切なポンプシステムによって送達することができる。エアロゾルを、有効成分を送達するための単相系、二相系、または三相系で送達することができる。エアロゾルの送達には、必要な容器、アクチベーター、バルブ、およびサブコンテナなどを含み、これらが共にキットを形成し得る。当業者は、過度に実験を行うことなく、好ましいエアロゾルを決定することができる。

【 0233 】

本明細書中に記載の実質的に脱リン酸化された L S D タンパク質または結合体を含む組成物を、身体からの急速な排出からタンパク質を防御するキャリア（持続放出性の処方物またはコーティングなど）を使用して調製することができる。かかるキャリアには、制御放出処方物（挿入物およびマイクロカプセル化送達系）および生分解性の生体適合性ポリマー（エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、ポリオルソエステル、ポリ乳酸、および当業者に公知の他のポリマーなど）などが含まれるが、これらに限定されない。

【 0234 】

薬学的組成物を、薬学分野で周知の方法論によって調製することができる。例えば、注射による投与を意図する薬学的組成物を、本明細書中に記載の実質的に脱リン酸化された L S D タンパク質または結合体、および、任意選択的に1つ以上の塩、緩衝液、および/または安定剤を含む組成物を、滅菌蒸留水と組み合わせて溶液を形成することによって調製することができる。均一な溶液または懸濁液の形成を容易にするために、界面活性剤を添加することができる。界面活性剤は、水性送達系中のタンパク質の溶解または均一な懸濁を容易にするためにタンパク質と非共有結合性に相互作用する化合物である。

【 0235 】

組成物を治療有効量で投与することができ、治療有効量は、種々の要因（使用した特定

10

20

30

40

50

の化合物（例えば、実質的に脱リン酸化された L S D タンパク質、結合体）の活性；化合物の代謝安定性および作用期間；患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、および食事；投与の様式および時間；排出速度；薬物の組み合わせ；特定の障害または容態の重症度；および治療を受ける被験体が含まれる）に応じて変化するであろう。一般に、治療有効1日量は（70 kg の哺乳動物について）、約 0.001 mg / kg（すなわち、約 0.07 mg）～約 100 mg / kg（すなわち、約 7.0 g）であり、好ましくは、治療有効用量は（70 kg の哺乳動物について）は、約 0.01 mg / kg（すなわち、約 0.7 mg）～約 50 mg / kg（すなわち、約 3.5 g）であり、より好ましくは、治療有効用量（70 kg の哺乳動物について）は、約 1 mg / kg（すなわち、約 70 mg）～約 25 mg / kg（すなわち、約 1.75 g）である。

10

【0236】

本明細書中に記載の実質的に脱リン酸化された L S D タンパク質または結合体を含む組成物を、本明細書中に記載のように、1つ以上の他の治療薬の投与と同時、投与前、または投与後に投与することもできる。例えば、1つの実施形態では、実質的に脱リン酸化された L S D タンパク質または結合体を、抗炎症剤と共に投与する。抗炎症剤または抗炎症薬には、ステロイドおよび糖質コルチコイド（ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロンが含まれる）、非ステロイド性抗炎症薬（N S A I D S）（アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メトトレキサート、スルファサラジン、レフルノミド、抗 T N F 薬、シクロホスファミド、およびミコフェノラートが含まれる）が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0237】

かかる併用療法は、本発明の化合物および1つ以上のさらなる活性薬剤を含む単一の薬学的投薬形態の投与、ならびに本発明の結合体および各活性薬剤をその個別の薬学的投薬処方物中に含む組成物の投与を含むことができる。例えば、本明細書中に記載の結合体および他の活性薬剤を、患者に錠剤またはカプセルなどの単一の経口投薬組成物中で共に投与することができるか、各薬剤を個別の経口投薬処方物で投与することができる。同様に、本明細書中に記載の結合体および他の活性薬剤を、単一の非経口投薬組成物中で（生理食塩水または他の生理学的に許容され得る溶液中など）共に患者に投与することができるか、各薬剤を個別の非経口投薬処方物で投与することができる。個別の投薬処方物を使用する場合、実質的に脱リン酸化された L S D タンパク質または結合体および1つ以上のさらなる活性薬剤を含む組成物を、本質的に同時に（すなわち、一斉に）または個別にずらした時間で（すなわち、連続的および任意の順序で）投与することができ、併用療法は全てのこれらのレジメンが含まれると理解される。

30

【0238】

以下の実施例を例示のために示すが、本発明を制限するものではない。

【実施例】

【0239】

実施例 1

脱リン酸化されたイズロニダーゼ（D P I D U）の調製

40

イズロニダーゼを、リン酸基を除去するために A f f i g e l 固定ジャガイモ酸性ホスファターゼ（P A P）で処理した。

【0240】

A f f i g e l 固定 P A P の調製。タンパク質の A f f i g e l への固定について B i o R a d によって提供されたプロトコールにしたがって、20 ml の新鮮な A f f i g e l 懸濁液を 50 ml ポリプロピレンスクリュートップチューブに入れ、M i l l i Q H₂O で5回洗浄した。3 ml の水および 0.83 ml の 3 M N a O A c (pH 5.2) を、およそ 25 ml の最終体積まで添加した。360 mg の P A P を 10 ml の 0.1 M N a O A c に溶解し、0.5 ml を、開始 O D 280 をチェックするために保持した。P A P 溶液を A f f i g e l 溶液に添加し、混合し、ロッカー上に置いて 4 で一晩イン

50

キュベートした。

【0241】

翌朝、ゲルをゆっくり沈殿させた（例えば、ベンチトップ遠心分離器にて400 rpmで1~2秒間、または静置によるゲルの沈殿）。上清を除去し、最終OD280をチェックするために（連結効率をチェックするために）保持した。20mlの1M Tris HCl / グリシン（pH 5.6）の添加およびロッカー上での4~3時間のインキュベーションによって、未連結部位をゲル上でブロッキングした。ブロッキング溶液をゲルから除去し、ゲルを0.1M NaOAc（pH 5.2）+ 0.01% ポリソルベート80（Tween 80）で4回洗浄した。ゲルを、0.02% アジ化ナトリウムを含む0.1M NaOAc（pH 5.2）+ 0.01% ポリソルベート80（Tween 80）中に10で保存した。

【0242】

固定化PAPを使用したIDUからのリン酸基の除去。緩衝液を調整済みのAffigel-1-PAPゲルからデカントした。アジ化ナトリウムを除去するために、ゲルを、15mlの0.01% Tween 80（ポリソルベート80）を含む0.1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.2）で4回洗浄した。ここで、洗浄の間にベンチトップ遠心分離器にて400 rpmまで1秒間のスピンによってゲルを穏やかに充填した。

【0243】

全実験で使用したイズロニダーゼは、OD280によって0.66mg/mlのPau1 FitzpatrickのPDSバッチ000414に由来する。Affigel-1-PAPとのインキュベーションの前に、イズロニダーゼを0.1M酢酸ナトリウム（pH 5.2）に完全に緩衝液交換して酸性PBS保存緩衝液からリン酸塩を除去した。除去しなければ、脱リン酸化を阻害するであろう。全脱リン酸化反応のための緩衝液交換を、1Lの0.1M酢酸ナトリウム（pH 5.2）を使用した12mlのIDU（Pierce Slide-alizer system, 10K MWカットオフ）（0.66mg/ml）の一晩の透析によって行った。透析緩衝液を、24時間で2回交換した。

【0244】

脱リン酸化反応のために、12mlのイズロニダーゼ（0.66mg/ml）を含む0.1M酢酸ナトリウム（pH 5.2）および10mlの0.1M酢酸ナトリウム（0.01% ポリソルベート80を含む）を、50mlスクリュートップのポリプロピレンチューブ中の15mlの調製したAffigel-PAPに添加した。混合物を、ロータリーインキュベーター上にて25~約21~24時間インキュベートし、ゲルをベンチトップ遠心分離器にて400 rpmで1~2秒間軽くスピンした。

【0245】

脱リン酸化IDUを含む上清を取り出し、0.001% ポリソルベート80を含む15mlの0.1M酢酸ナトリウム（pH 5.2）でゲルを4回洗浄し、全上清を回収した。上清（約70~75ml）をプールし、セントリコン（10Kカットオフ）で濃縮した。IDS処方物緩衝液（酸性PBS）に緩衝液を交換して、最終体積を約4~5mlにした。ポリソルベート80を、最終濃度0.001%まで添加した。次いで、0.22μMフィルターを使用して組成物を濾過滅菌した。

【0246】

実施例2

P97脱リン酸化イズロン酸-2-スルファターゼ（DPIDS）結合体の調製

標識された試験タンパク質および結合体を調製するために、dPIDSを、リン酸基数を減少させるためのアクリルビーズ結合仔牛腸アルカリホスファターゼ（CIP）での処置によって組換えIDSから調製した。

【0247】

組換えIDS（1.5mg/mlで4.5ml；ヒトHT-1080細胞中で产生）を、予め平衡化したCIP-アクリルビーズを使用して穏やかに混合しながら37~一晩処理した。CIPビーズをカラムに移し、通過画分（FT）を回収し、ビーズをおよそ2

10

20

30

40

50

5 ml の PBS で洗浄した。全 F T および洗浄画分を回収し、4.5 ml に濃縮した。次いで、C I P ビーズを 10 mM Tris、50 mM NaCl、5 mM MgCl₂ (pH 8.0) で再度平衡化し、IDS の他のサブバッチのために再利用した。結合体化のために使用した最初のバッチ中で 29 mg の C I P 处理 d p IDS (脱リン酸化IDS) が生成された。d p IDS について比活性の減少は認められなかった (表 1 を参照のこと)。しかし、プレート結合アッセイおよび Biacore 分析によって測定した場合に可溶性マンノース - 6 - リン酸受容体 (sM6PR) への結合の減少が認められた (KD2 の結合親和性の 1/7 への減少および全応答 (Rmax) の 1/2 への減少を示す表 2 を参照のこと)。PAD-HPLC によって測定した場合にマンノース - 6 - リン酸 (M6P) 含有量の減少も認められた (M6P 含有量の 1/17 への減少または約 94~95% 減少を示す表 3 を参照のこと)。 10

【0248】

【表 1 - 2】

表 1. 比活性

サンプル	活性 (U/mg)
IDS	6,143
CIP 处理 プール R1-R5 (dpIDS)	6,151

20

【0249】

【表 2】

表 2. sM6PR への結合の Biacore 分析

サンプル	KD1 (M)	KD2 (M)	Rmax1 (RU)	Rmax2 (RU)
IDS	5.82e-8	8.13e-10	123.2	70.27
dpIDS	3.21e-8	5.94e-9	71.42	43.19

【0250】

【表 3】

30

表 3. PAD-HPLC による M6P 含有量

サンプル	pmol M6P / pmol タンパク質
IDS	2.56
dpIDS	0.15

【0251】

結合体化のために、約 28 mg (1.45 mg / ml で 19.6 ml) の d p IDS を、2.6 × 33 cm Sephadex G25 F カラム上にて 6.0 ml / 分で 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 4.5) に緩衝液交換し、次いで、2つの Vivaspin 20 (10 kDa) フィルターを使用して濃縮した。このプロセスにより、280 nm での紫外可視分光光度法によって示した場合に 16.5 ml の d p IDS 溶液 (1.67 mg / ml) が得られ、この波長での 1 mg / ml 溶液の d p IDS についての吸光度は 1.33 (表示収量 = 28 mg) と推測された。最初の IDS 溶液を調製するために類似のプロトコール (通常のリン酸化) を行って、22 ml の IDS 溶液 (1.45 mg / ml) を得た。次いで、下記のように、これらのタンパク質を Allexa Fluor 647 (AF647)、ヒト p97 (メラノトランスフェリン; MTF)、またはその両方に結合体化した。 40

【0252】

d p IDS への AF647 の組込み。d p IDS の 11.6 mg (6.96 ml) 溶液

50

(上記)に、2.0 mg (400 μ l)の5.0 mg / ml溶液のAllexa Fluor 647スクシンイミドエステル(Invitrogen A20006)を含むDMSOを、AF647 : d pIDS比が10 : 1に相当するように添加した。活性化反応を20で35分間進行させて、粗AF647標識d pIDSを得た。1.08 mlの粗反応混合物(1.8 mgのd pIDSを含む)を取り出し、単一のSephadex G25M PD-10カラム上で50 mMリン酸カリウム緩衝液 + 150 mM塩化ナトリウム(pH 6.7)に精製した。このプロセスにより、2.5 mlのAF647活性化d pIDS溶液を得た。

【0253】

溶液を、Vivaspin 6 フィルターを使用して濾液の着色が認められなくなるまでダイアフィルトレーションを行い、次いで、濃縮して1.31 mlのd pIDS - AF647溶液を濃度1.15 mg / mlで得た。これは、1 mg / ml溶液d pIDSについてこの波長で吸光度1.33と推定され(収量 = 1.5 mg)、AF647 : IDS比2.08から、650 nmでのAF647のモル吸光係数は239,000 L mol⁻¹ cm⁻¹と推定された。この溶液を0.2 μ mに対して濾過した。このプロトコールを、通常のリン酸化IDSへのAF647の組み込みにも使用した。

【0254】

d pIDS - AF647へのマレイミドの組込み。粗AF647標識d pIDSの一部(9.8 mg)に、0.23 mg (113 μ l)の2.0 mg / mlの4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC, Thermo 22360)を含むDMSO溶液を、SMCC : d pIDS比が5 : 1に相当するように添加した。d pIDS - AF647活性化反応を20で60分間進行させ、次いで、126 μ lの10 mg / mlグリシン水溶液にて20で15分間反応停止させた。

【0255】

粗マレイミド活性化d pIDS - AF647を、2.6 × 23 cmのSephadex G50 Mカラムにて溶離液として50 mMリン酸カリウム、150 mM塩化ナトリウム、および5 mM EDTA緩衝液(pH 7.0)を使用して、6.0 ml / 分で精製した。このプロセスにより、14.0 mlのマレイミド活性化d pIDS - AF647溶液を濃度0.69 mg / mlで得た。これは、1 mg / mlのd pIDS溶液についてこの波長で吸光度1.33と推定され(収量 = 9.71 mg)、AF647 : d pIDS比2.01から、650 nmでのAF647のモル吸光係数は239,000 L mol⁻¹ cm⁻¹と推定された。SAMSA - フルオレセインを使用してサンプルをマレイミド収量についてアッセイし、1.04マレイミド基 / d pIDS分子の組み込みが示された。このプロトコールを、通常のリン酸化IDS - AF647へのマレイミドの組み込みにも使用した。

【0256】

p97(MTf) - d pIDS - AF647結合体化。220 mgの可溶性p97(MTf)を、6.0 mg / mlで2.6 × 34 cmのSephadex G25 Mカラムにて0.1 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)に緩衝液交換し、次いで、Vivaspin 20 (10 kDa フィルター)を使用して濃縮して、280 nmでの紫外可視分光光度法によって示した場合に15.0 mlのp97溶液(13.91 mg / ml)が得られ、この波長での1 mg / ml溶液のp97についての吸光度は1.19(表示収量 = 209 mg)と推定された。

【0257】

p97のチオール化のために、46 mg (3.31 ml)のp97を解凍し、室温に平衡化し、66 μ l (0.33 mg)の5.0 mg / mlのS-アセチルチオ酢酸およびスクシンイミジルエステル(SATA, Thermo 26102)を含むDMSO溶液を、SATA : p97比が2.5 : 1に相当するように添加した。S-アセチルチオール化反応を、20で60分間進行させた。0.05 M EDTA二ナトリウム塩および2.5 Mヒドロキシルアミンヒドロクロリドの水溶液(0.33 ml)(pH 7.0)を添加

10

20

30

40

50

してチオールを脱保護し、脱保護反応を20で15分間進行させた。

【0258】

粗チオール化p97を、溶離液として50 mMリン酸カリウム、150 mM塩化ナトリウム、5 mM EDTA緩衝液(pH 7.0)を使用して2つの使い捨てPC-10 Superdex G25カラムにて精製して低分子量副生成物を除去した。このプロセスにより、280 nmでの紫外可視分光光度法によって示した場合に6.0 mlの濃度7.48 mg/mlのチオール化p97溶液が得られ、6.0 mlのチオール化p97溶液が得られ、この波長での1 mg/ml溶液のp97についての吸光度は1.19(表示収量=45 mg)と推定された。サンプルを、エルマン試薬を使用してチオール含有量についてアッセイし、p97分子あたり0.9チオール基の組込みを示した。

10

【0259】

d pIDS-AF647へのp97の結合体化のために、9.2 mgのマレイミド活性化d pIDS-AF647および17.8 mgのチオール化p97(p97 : d pIDS比1.8 : 1に相当する)を共に20で18時間反応させた。50 μlの2.0 mg/ml 2-メルカプトエタノール水溶液(20で15分間のインキュベーション)および32 μlの10.0 mg/mlのN-エチルマレイミド水溶液(20で15分間のインキュベーション)の添加によって結合体化反応を停止させた。

【0260】

粗結合体(約16 ml)を0.2 μmに対して濾過し、Vivaspin 20(10 kDaフィルター)を使用して4.0 mlまで濃縮した。濃縮した粗結合体を、溶離液として50 mMリン酸カリウム緩衝液=150 mM塩化ナトリウム(pH 6.7)を4.0 ml/分で使用して2.6 × 62 cm Superdex 20 PGカラムを使用した高分解能サイズ排除クロマトグラフィによって精製した。このプロトコールを、通常のリン酸化IDS-AF647へのp97の結合体化のためにも使用した。

20

【0261】

実施例3

脱リン酸化イズロン酸-2-スルファターゼ(DPIDS)およびP97-DPIDS結合体の脳組織内の分布

AF647標識IDS、d pIDS、p97(MTf)-IDS結合体、およびp97(MTf)-d pIDS結合体の脳組織区画内の分布を評価するための実験を行った。AllexaFluor 647(AF647)標識タンパク質を、以下の表にしたがって、マウスに静脈内注射した。

30

【0262】

【表4】

表4. d pIDS研究のための注射用量。

薬剤	マウス	およその分子量(g/mole)	注射用量(mg/kg)	注射用量(moles/kg)
IDS-AF647	3	76,000	6	7.9e-8
d pIDS-AF647	3	76,000	6	7.9e-8
MTf-IDS-AF647	3	158,000	12.5	7.9e-8
MTf-d pIDS-AF647	3	158,000	12.5	7.9e-8

40

【0263】

標識試験タンパク質注射の約2時間後、心臓内脳灌流を行って血液脳関門を損傷することなく脳脈管構造から血液を洗い出した。この手順を、組織学的研究および生体内分布研究のための脳切開および脳組織の調製の前に行った。ここで、トマトレクチン(100 μg)を、最初に安楽死の約10分前にマウスに注射した(尾静脈注射)。マウスを、ケタミンおよびキシラジン(それぞれの用量100 mg/kgおよび10 mg/kg)のi.p.注射を用いて麻酔した。次いで、約40 μLの100単位/mlのヘパリンを腹腔内投与した。マウスの意識消失後、マウスをエタノールで湿らせ、胸郭を除去して拍動して

50

いる心臓を露呈させた。マウスを、25ゲージ針を取り付けた1mlシリンジを使用して右心室から失血させた。大静脈および/または右心房を切開して循環灌流液を排出させた。マウスを、肝臓から血液が除去されるまで25ゲージ針および注入ポンプ(4ml/分で2~5分間)を使用して左心室を介して灌流した。頭皮を、小刀を用いて眼の間から頸部まで開裂して頭蓋骨を露呈させた。脊髄を、小刀を用いて大後頭孔直下で切断した。鍼を使用して大後頭孔から眼に向かって頭蓋骨を切断し、頭蓋骨の上部を除去した。弯曲鉗子を使用して、組織を損傷することなく脳を掻き出した。

【0264】

次いで、脳を矢状面に沿って半分に切断し、各半球を秤量した。一方の半球を冷凍のためにOCTコンパウンド中に包埋し、他方の半球を均質化および組織ホモジネートにおける蛍光の測定のために調製した。 10

【0265】

結果を図1、2、および5に示す。図1は、静脈内注射後のマウスの脳実質中の試験タンパク質の蓄積レベルを示す(IDS、イズロン酸-2-スルファターゼ；d p IDS、脱リン酸化イズロン酸-2-スルファターゼ；MTf-ID S、p97-ID S結合体；MTf-d p IDS、p97-d p IDS結合体)。図2は、静脈内感染後のマウスの脳実質(BBBの内側)と脳毛細血管(BBBの外側)との間の試験タンパク質の分布を示す。図5は、p97(MTf)への結合体化を含むか含まない脳実質内のIDSおよびd p IDSのレベルを示す。 20

【0266】

これらのデータを使用して二元配置ANOVA分析も行った。結果を以下の表に示す。

【0267】

【表5】

表5. 二元配置ANOVA.

変動原因	自由度	平方和	平均平方
MTf結合体化	1	8.16E-05	8.16E-05
M6P脱リン酸化	1	3.04E-05	3.04E-05
交互作用	1	1.74E-06	1.74E-06
残差(エラー)	37	4.00E-05	1.08E-06
合計	40		

【0268】

p97(MTf)結合体化は結果に影響を及ぼすか? MTf結合体化は全分散の約53.10%を占める。F = 75.52。DFn = 1。DFd = 37。P値は<0.0001である。MTf結合体化が全く影響を及ぼさない場合、このサイズの実験でこの大きな(またはより大きな)影響が無作為に認められる偶然は0.01%未満である。この影響は非常に有意と見なされる。 30

【0269】

M6P脱リン酸化は結果に影響を及ぼすか? M6P脱リン酸化は全分散の約19.75%を占める。F = 28.09。DFn = 1。DFd = 37。P値は<0.0001である。M6P脱リン酸化が全く影響を及ぼさない場合、このサイズの実験でこの大きな(またはより大きな)影響が無作為に認められる偶然は0.01%未満である。影響は非常に有意と見なされる。 40

【0270】

これらのデータおよび分析によれば、脱リン酸化IDSは、通常のリン酸化IDSと比較して脳実質内への透過が有意に増加した。同様に、p97-d p IDS結合体は、p97と通常のリン酸化IDSとの間の結合体と比較して脳実質内への透過が有意に増加した。それ故、リン酸基の除去は、単独またはp97結合体としてのいずれの投与においてもBBBを通過するIDSの移行を有意に増加させた。 50

【0271】

本明細書中に記載の種々の実施形態を組み合わせてさらなる実施形態を提供することができる。本明細書中で言及され、そして／または出願データシートに列挙された全ての米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、および非特許刊行物は、その全体が本明細書中で参考として援用される。実施形態の様子を、必要に応じて種々の特許、出願、および刊行物の概念を使用して修正してなおさらなる実施形態を得ることができる。

【0272】

上記の詳細な説明を考慮して実施形態に対するこれらのおよび他の変更形態を得ることができる。一般に、以下の特許請求の範囲では、使用用語を、明細書および特許請求の範囲中に開示の特定の実施形態に特許請求の範囲を制限すると解釈すべきではなく、かかる特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の全範囲と共に全ての可能な実施形態が含まれると解釈すべきである。したがって、特許請求の範囲は開示によって制限されない。

10

【図1】

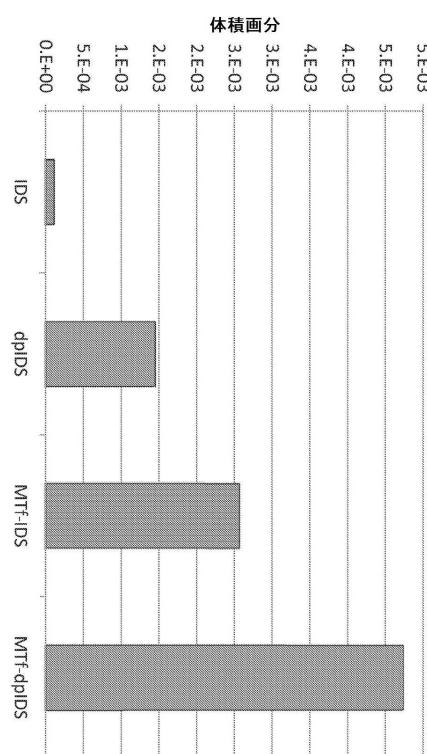


Figure 1

【図2】

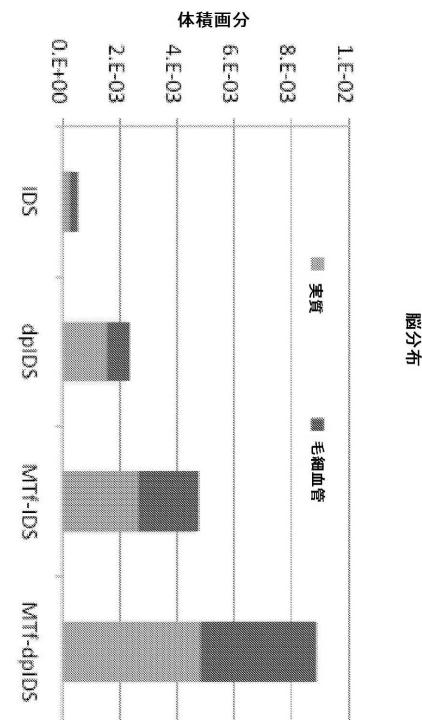


Figure 2

【図3】

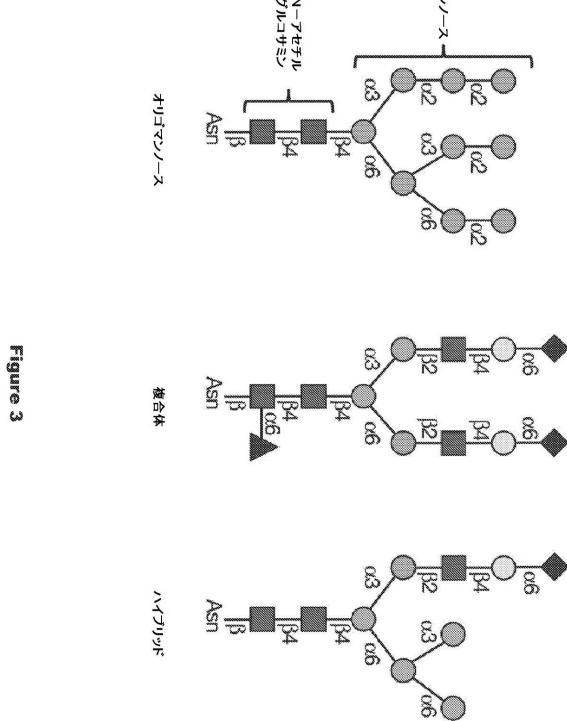


Figure 3

Figure 5

【図4】

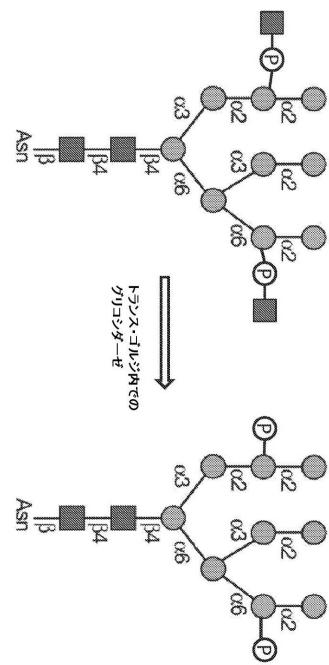


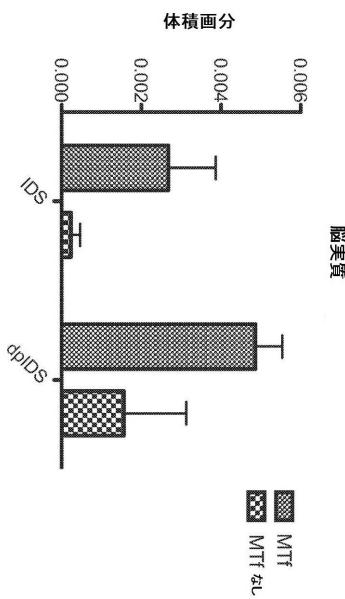
Figure 4

【 図 6 】

は、N結合型グリコシル化部位を示す。

Figure 6

THE NEW YORK TIMES
SPECIAL TO THE NEW YORK TIMES
BY RICHARD H. STONE



Figure

【配列表】

0006433424000001.app

フロントページの続き

(51)Int.CI.	F I
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 38/43
A 6 1 K 47/50 (2017.01)	A 6 1 K 47/50
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 バイタリス, ティモシー ゼット.
カナダ国 ブイ6ゼット 2エヌ1 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ハウス
トリート 609 - 1500
(72)発明者 ガバシューラー, ラインハード
カナダ国 エイチ3イー 1ゼット4 ケベック, モントリオール, シュマン ジュ ゴルフ
, 201, スイート 702

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 特表2015-523074 (JP, A)
国際公開第2011/163649 (WO, A1)
特表2006-506317 (JP, A)
BIELICKI, Julie et al., Recombinant human iduronate-2-sulphatase: correction of mucopolysaccharidosis-type II fibroblasts and characterization of the purified enzyme, Biochemical Journal, 1993年, Vol.289, Pages 241-246
KAKKIS E, SUCCESSFUL INDUCTION OF IMMUNE TOLERANCE TO ENZYME REPLACEMENT THERAPY IN CANINE MUCOPOLYSACCHARIDOSIS I, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 米国, 2004年 1月20日, V101 N3, P829-834

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

C 12 N 9 / 0 0 - 9 9
C 07 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C 12 N 1 5 / 0 0 - 9 0
A 6 1 P
J ST Plus / JM ED Plus / J ST 7580 (JDreamIII)
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)

UniProt/GenSeq