

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6151183号
(P6151183)

(45) 発行日 平成29年6月21日 (2017. 6. 21)

(24) 登録日 平成29年6月2日 (2017. 6. 2)

(51) Int. Cl.	F I		
C 1 2 P 21/00 (2006. 01)	C 1 2 P 21/00	Z N A A	
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10		
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15		
A 6 1 K 38/14 (2006. 01)	A 6 1 K 38/14		
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00	1 O 5	
請求項の数 30 (全 61 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2013-530817 (P2013-530817)	(73) 特許権者	509275507
(86) (22) 出願日	平成23年9月29日 (2011. 9. 29)		オキシレイン ユーケー リミテッド
(65) 公表番号	特表2013-539974 (P2013-539974A)		イギリス国 エム1 2 エービー マンチ
(43) 公表日	平成25年10月31日 (2013. 10. 31)		ェスター, ピカデリー 49, ピカデ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/002770		リー ハウス, スイート 313
(87) 国際公開番号	W02012/042386	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成24年4月5日 (2012. 4. 5)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成26年9月22日 (2014. 9. 22)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/477, 014		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成23年4月19日 (2011. 4. 19)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
(31) 優先権主張番号	61/387, 940	(74) 代理人	100181641
(32) 優先日	平成22年9月29日 (2010. 9. 29)		弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合からキャップを外すことおよびリン酸化N-グリカンからマンノシル化することができるマンノシダーゼならびに哺乳動物細胞による糖タンパク

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

糖タンパク質におけるマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分のキャップを外して、リン酸化N-グリカンからマンノシル化するための方法であって、

a) 該マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含有するリン酸化N-グリカンを含む糖タンパク質を提供する工程と、

b) 該糖タンパク質を、単一の酵素として (i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解し、かつ (ii) 末端α-1, 2マンノース結合、α-1, 3マンノース結合、および/またはα-1, 6マンノース結合を加水分解するマンノシダーゼと接触させる工程

とを含み、該マンノシダーゼはファミリー38のグリコシルヒドロラーゼである、前記方法。

【請求項2】

リン酸化N-グリカンからマンノシル化する方法であって、

a) リン酸化N-グリカンを含む糖タンパク質を提供する工程と、

b) 該糖タンパク質を、単一の酵素として (i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解し、かつ (ii) 末端α-1, 2マンノース結合、α-1, 3マンノース結合、および/またはα-1, 6マンノース結合を加水分解するマンノシダーゼと接触させる工程

とを含み、該マンノシダーゼはファミリー38のグリコシルヒドロラーゼである、前記方

法。

【請求項3】

前記マンノシダーゼは、*Canavalia ensiformis*由来であるか、または

前記マンノシダーゼは、*Yarrowia lipolytica*由来である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

工程(a)および工程(b)の後に、哺乳類細胞を、インビトロで前記脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含む前記糖タンパク質と接触させる工程であって、ここで、該接触させる工程の後に、該糖タンパク質は、該哺乳類細胞の内部へ輸送される工程をさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項5】

前記哺乳類細胞がヒト細胞である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

糖タンパク質を哺乳類細胞の内部へ向けるインビトロでの方法であって、

a) 基礎をなすマンノース残基に $\alpha 1, 2$ 結合によって結合された末端マンノース残基を含むリン酸化N-グリカンを含む糖タンパク質を提供する工程であって、ここで、該基礎をなすマンノースは、6位でリン酸化されており、該基礎をなすマンノースに結合しているリン酸残基は、キャップされておらず、かつ該糖タンパク質は該細胞のマンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合しない工程と、

20

b) 該糖タンパク質を、単一の酵素として、該基礎をなすマンノースがリン酸化される場合に末端 $\alpha - 1, 2$ マンノース結合を加水分解し、かつ、マンノース残基の6位に結合しているリン酸残基のキャップを外すマンノシダーゼと接触させて、脱マンノシル化した糖タンパク質を生成する工程であって、ここで、該糖タンパク質は該脱マンノシル化の後、該細胞における該マンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合する工程と、

c) インビトロで該細胞を該脱マンノシル化した糖タンパク質と接触させる工程とを含み、ここで、該マンノシダーゼが、ファミリー38のグリコシルヒドロラーゼである、前記方法。

【請求項7】

前記マンノシダーゼは*Canavalia ensiformis*もしくは*Yarrowia lipolytica*由来である、請求項6に記載の方法。

30

【請求項8】

糖タンパク質を、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合しない第一の形態から、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合する第二の形態へと変換するインビトロでの方法であって、該第一の形態の該糖タンパク質を、単一の酵素として1つ以上の末端マンノース残基を除去し、かつ、マンノース残基の6位に結合しているリン酸残基のキャップを外すマンノシダーゼと接触させる工程を含み、ここで、該第一の形態において、該糖タンパク質は、それぞれ、その6位にリン酸残基を含有する基礎をなすマンノース残基に対しその1位で結合している末端マンノース残基を1つ以上含有する1つ以上のN-グリカンを含み、かつ該リン酸残基は、キャップされておらず、ここで、該マンノシダーゼはファミリー38のグリコシルヒドロラーゼである、方法。

40

【請求項9】

前記マンノシダーゼは*Canavalia ensiformis*もしくは*Yarrowia lipolytica*由来である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含む糖タンパク質を哺乳類細胞の内部へ向けるインビトロでの方法であって、ここで、6位に結合しているリン酸残基を有するマンノース残基は、末端マンノース残基の1位において該末端マンノース残基に結合しており、該方法は、糖タンパク質に

(a) 該糖タンパク質における該マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノ

50

ースー6ーリン酸へとキャップを外す工程、および、(b) 該末端マンノース残基を除去する工程

を行った後にインビトロで該糖タンパク質を該細胞と接触させる工程を含み、

ここで、(a) を行ってかつ (b) を行っていないかまたは (b) を行ってかつ (a) を行っていない糖タンパク質は、該細胞のマンノースー6ーリン酸受容体に実質的に結合せず、

ここで、(a) および (b) を行った糖タンパク質は該細胞のマンノースー6ーリン酸受容体に実質的に結合し、そして

ここで、工程 (a) と (b) とは、単一のマンノシダーゼ酵素によって触媒され、該マンノシダーゼは、ファミリー38のグリコシルヒドロラーゼである、方法。

10

【請求項11】

前記糖タンパク質はヒトタンパク質である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記糖タンパク質は、病原体タンパク質、リソソームタンパク質、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、抗体もしくはその抗原結合断片、または融合タンパク質である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記リソソームタンパク質はリソソーム酵素である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記リソソームタンパク質は、酸性 α グルコシダーゼまたは α ガラクトシダーゼであるリソソーム酵素である、請求項13に記載の方法。

20

【請求項15】

前記糖タンパク質はLSDと関連している、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記LSDは、ファブリー病、ムコ多糖症I型、ファーバー病、ゴーシェ病、GM1ガングリオシドーシス、テイ・サックス病、サンドホフ病、GM2活性化因子疾患、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン・ピック病、シェイエ病、ハンター病、サンフィリポ病、モルキオ病、マロトー・ラミー病、ヒアルロニダーゼ欠損症、アスパルチルグルコサミン尿症、フコース蓄積症、マンノース蓄積症、シンドラー病、1型シアリドーシス、ポンペ病、濃化異骨症、セロイドリポフスチン沈着症、コレステロールエステル貯蔵病、ウォルマン病、多発性スルファターゼ欠損症、ガラクトシアリドーシス、ムコリビドーシス、シスチン症、シアル酸蓄積障害、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイロミクロン蓄積症、ヘルマンズキー・パドラック症候群、チェディアック・東症候群、ダノン病、または幸福顔貌骨異形成症である、請求項15に記載の方法。

30

【請求項17】

脱マンノシル化したリン酸化Nーグリカンを含む糖タンパク質を産生するよう遺伝子操作された単離された真菌細胞であって、マンノシダーゼをコードする核酸を含み、該マンノシダーゼが、単一の酵素として、(i) マンノースー1ーホスホー6ーマンノース部分をマンノースー6ーリン酸に加水分解することができかつ(ii) 末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および/または α -1, 6マンノース結合を加水分解することができ、該マンノシダーゼはファミリー38のグリコシルヒドロラーゼである、真菌細胞。

40

【請求項18】

前記真菌細胞はさらに、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドをコードする核酸を含むか、または

前記真菌細胞は、OCH1活性を欠損しているよう遺伝子操作されているか、または

前記真菌細胞は、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドをコードする核酸をさらに含み、該真菌細胞が、OCH1活性を欠損しているように遺伝子操作されて

50

いる、請求項 17 に記載の真菌細胞。

【請求項 19】

標的タンパク質をコードする核酸をさらに含む請求項 17 または 18 のいずれか一項に記載の真菌細胞であって、ここで、該標的タンパク質が糖タンパク質である、該真菌細胞。

【請求項 20】

前記標的タンパク質はヒトタンパク質である、請求項 19 に記載の真菌細胞。

【請求項 21】

前記標的タンパク質は、病原体タンパク質、リソソームタンパク質、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、抗体もしくはその抗原結合断片、または融合タンパク質である、請求項 19 に記載の真菌細胞。

10

【請求項 22】

前記リソソームタンパク質はリソソーム酵素である、請求項 21 に記載の真菌細胞。

【請求項 23】

前記リソソーム酵素は、酸性 α グルコシダーゼまたは α ガラクトシダーゼであるリソソーム酵素である、請求項 22 に記載の真菌細胞。

【請求項 24】

前記糖タンパク質は、LSD と関連しているタンパク質である、請求項 19 に記載の真菌細胞。

【請求項 25】

前記 LSD は、ファブリー病、ムコ多糖症 I 型、ファーバー病、ゴーシェ病、GM1 ガングリオシドーシス、テイ・サックス病、サンドホフ病、GM2 活性化因子疾患、クラブ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン・ピック病、シェイエ病、ハンター病、サンフィリポ病、モルキオ病、マロトー・ラミー病、ヒアルロニダーゼ欠損症、アスパルチルグルコサミン尿症、フコース蓄積症、マンノース蓄積症、シンドラー病、1 型シアリドーシス、ポンペ病、濃化異骨症、セロイドリポフスチン沈着症、コレステロールエステル貯蔵病、ウォルマン病、多発性スルファターゼ欠損症、ガラクトシアリドーシス、ムコリピドーシス、シスチン症、シアル酸蓄積障害、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイトミクロン蓄積症、ヘルマンズキー・パドラック症候群、チェディアック・東症候群、ダノン病、または幸福顔貌骨異形成症である、請求項 24 に記載の真菌細胞。

20

【請求項 26】

前記真菌細胞は、*Yarrowia lipolytica* 細胞または *Arxula adenivorans* 細胞である、請求項 17 ~ 25 のいずれか一項に記載の真菌細胞。

30

【請求項 27】

マンノシルリン酸化を促進することのできる前記ポリペプチドは MNN4 ポリペプチドであるか、または

マンノシルリン酸化を促進することのできる前記ポリペプチドは、*P. pastoris* PNO1 ポリペプチドである、請求項 18 に記載の真菌細胞。

【請求項 28】

前記 MNN4 ポリペプチドは、*Yarrowia lipolytica* ポリペプチド、*S. cerevisiae* ポリペプチド、*Ogataea minuta* ポリペプチド、*Pichia pastoris* ポリペプチド、もしくは *C. albicans* ポリペプチドである、請求項 27 に記載の真菌細胞。

40

【請求項 29】

前記マンノシダーゼは分泌シグナルを含むか、または

前記マンノシダーゼは、該マンノシダーゼを細胞内区画へ導くためのターゲティングシグナルを含む、請求項 17 ~ 28 のいずれか一項に記載の真菌細胞。

【請求項 30】

前記マンノシダーゼが *Canavalia ensiformis* 由来であるか、または前記マンノシダーゼが *Yarrowia lipolytica* 由来である、請求項 17

50

～29のいずれか一項に記載の真菌細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をホスホ-6-マンノースに加水分解することができかつ、(ii) このようなホスフェート含有グリカンの末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および/もしくは α -1, 6マンノース結合または末端 α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マンノース部分、および/もしくは α -1, 6マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼに関する。本発明は、糖タンパク質の哺乳類細胞への取り込みを促進する方法にも関する。

10

【背景技術】

【0002】

高性能発現系は、現に開発下にある大部分の生物薬剤(bio pharmaceutical)(例えば、組換えタンパク質)を産生するのに必要とされる。これらの生物薬剤のうちの多くの生物活性は、それらの翻訳後修飾(例えば、リン酸化またはグリコシル化)に左右される。酵母を基にした発現系は、微生物の遺伝子操作および発酵の簡便さを、タンパク質を分泌および改変する能力と組み合わせている。しかしながら、酵母細胞において産生された組換え糖タンパク質は、主として異種性の高マンノースおよび過剰マンノースのグリカン構造を示し、該構造は、タンパク質の機能、下流のプロセッシング、およびその後の治療的使用に有害である可能性があり、特に酵母細胞においては、グリコシル化は生物学的に重要な役割を担っている。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本文書は、とりわけ、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をホスホ-6-マンノース(本明細書においては「マンノース-6-リン酸」とも呼ばれる)に加水分解する(「キャップを外す」)ことができかつ、このようなホスフェート含有グリカンの末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および/もしくは α -1, 6マンノース結合または末端 α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マンノース部分、および/もしくは α -1, 6マンノース部分を加水分解する(「脱マンノシル化する」)ことのできるマンノシダーゼの発見、ならびに(ii)(個別の酵素または単一の酵素のいずれかによる)キャップを外すことおよび脱マンノシル化の両方が糖タンパク質の哺乳類細胞への取り込みを達成するために必要とされるという発見を基にしている。

30

【0004】

一態様においては、本文書は、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分のキャップを外して、糖タンパク質におけるリン酸化N-グリカン脱マンノシル化するための方法を特色にする。上記方法は、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含有するリン酸化N-グリカンを含む糖タンパク質を提供する工程、ならびに該糖タンパク質を、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができかつ(ii) 末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および/もしくは α -1, 6マンノース結合または末端 α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マンノース部分、および/もしくは α -1, 6マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させる工程を含む。上記マンノシダーゼは、ファミリー38のグリコシルヒドロラーゼであり得る。上記マンノシダーゼは、*Canavalia ensiformis*または*Yarrowia lipolytica*由来であり得る。

40

【0005】

50

本文書は、リン酸化N-グリカンを脱マンノシル化する方法も特色にする。本方法は、リン酸化N-グリカンを含む糖タンパク質を提供する工程、ならびに該糖タンパク質を、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができかつ(ii) 末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および/もしくは末端 α -1, 6マンノース結合または α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マンノース部分、および/もしくは α -1, 6マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させる工程を含む。上記マンノシダーゼは、ファミリー38のグリコシルヒドロラーゼであり得る。上記マンノシダーゼは、*Canavalia ensiformis*または*Yarrowia lipolytica*由来であり得る。

10

【0006】

本明細書に記載されている方法はさらに、提供工程および接触工程の後に、哺乳類細胞を、脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含む糖タンパク質と接触させる工程であって、ここで、該接触後、該糖タンパク質は該哺乳類細胞（例えば、ヒト細胞）の内部に輸送される工程を含むことができる。

【0007】

本明細書に記載されている方法はさらに、上記方法において産生される糖タンパク質を単離する工程を含むことができる。上記タンパク質は、真菌において発現するヒトタンパク質であり得る。例えば、真菌は、*Yarrowia lipolytica*または*Arxula adeninivorans*であり得る。上記真菌は、

20

【0008】

【化1】

メチロトロフの酵母（例えば、*Pichia*

pastoris, *Pichia methanolica*, *Oogataea minuta*, もしくは *Hansenula polymorpha*)

または糸状菌（例えば、*Aspergillus caesiellus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus carneus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus deflectus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus penicilloides*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus tamari*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, もしくは *Aspergillus versicolor*)でもあり得る。

30

【0009】

上記タンパク質は、病原体タンパク質、リソソームタンパク質、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、抗体もしくはその抗原結合断片、または融合タンパク質であり得る。例えば、上記リソソームタンパク質は、リソソーム蓄積障害(LSD)と関連したリソソーム酵素のようなリソソーム酵素であり得る。LSDは、ファブリー病、ムコ多糖症I型、ファーバー病、ゴーシェ病、GM1ガングリオシドーシス、テイ・サックス病、サンドホフ病、GM2活性化因子疾患、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン・ピック病、シェイエ病、ハンター病、サンフィリポ病、モルキオ病、マロトー・ラミー病、ヒアルロニダーゼ欠損症、アスパルチルグルコサミン尿症、フコース蓄積症、マンノース蓄積症、シンドラー病、1型シアリドーシス、ポンペ病、濃化異骨症、セロイドリポフスチン沈着症、コレステロールエステル貯蔵病、ウォルマン病、多発性スルファターゼ欠損症、ガラクトシアリドーシス、ムコリピドーシス、シスチン症、シアル酸蓄積障害、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイロミクロン蓄積症、ヘルマンスキー・パドラック症候群、チェディアック・東症候群、ダノン病、または幸福顔貌骨異形成症(*Gleophsyic dysplasia*)であり得る。

40

【0010】

50

本文書は、真菌におけるキャップを外されたマンノースー6ーリン酸結合またはマンノースー6ーリン酸部分および脱マンノシル化したリン酸化Nーグリカンを含む糖タンパク質を産生する方法も特色にする。上記方法は、マンノースー1ーホスホー6ーマンノース結合またはマンノースー1ーホスホー6ーマンノース部分をホスホー6ーマンノース部分に加水分解することができかつこのようなホスフェート含有グリカンの末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および／もしくは α -1, 6マンノース結合または末端 α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マンノース部分、および／もしくは α -1, 6マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼをコードする核酸を含むよう遺伝子操作された真菌細胞を提供する工程、ならびに標的タンパク質をコードする核酸を該細胞へ導入する工程を含む。

10

【0011】

本文書は、キャップを外されたマンノースー6ーリン酸および脱マンノシル化したリン酸化Nーグリカンを含む糖タンパク質を産生するよう遺伝子操作された単離された真菌細胞も特色にする。上記真菌細胞は、*Yarrowia lipolytica*または*Arxula adeninivorans*であり得る。上記真菌細胞は、

【0012】

【化2】

メチロトロフの酵母（例えば、*Pichia*

pastoris, *Pichia methanolica*, *Oogataea minuta*, もしくは *Hansenula polymorpha*)

20

または糸状菌（例えば、*Aspergillus caesiellus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus carneus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus deflectus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus penicilloides*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus tamari*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, もしくは *Aspergillus versicolor*) であり得る。

【0013】

30

上記真菌細胞は、マンノシダーゼをコードする核酸を含むことができ、該マンノシダーゼは (i) マンノースー1ーホスホー6ーマンノース結合またはマンノースー1ーホスホー6ーマンノース部分をマンノースー6ーリン酸に加水分解することができかつ (ii) 末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および／もしくは α -1, 6マンノース結合または末端 α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マンノース部分、および／もしくは α -1, 6マンノース部分を加水分解することのできる。上記真菌細胞はさらに、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドをコードする核酸を含むことができる。上記真菌細胞は、OCH1活性を欠損しているよう遺伝子操作され得る。上記真菌細胞はさらに、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドをコードする核酸を含むことができ、ここで、該真菌細胞は、OCH1活性を欠損しているよう遺伝子操作される。上記マンノシダーゼは、該マンノシダーゼを細胞内区画へ導くための分泌シグナルおよび／またはターゲッティングシグナルを含むことができる。

40

【0014】

真菌細胞はさらに、糖タンパク質である標的タンパク質をコードする核酸を含むことができる。上記標的タンパク質はヒトタンパク質であり得る。上記標的タンパク質は、病原体タンパク質、リソソームタンパク質、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、抗体もしくはその抗原結合断片、または融合タンパク質であり得る。上記リソソームタンパク質は、リソソーム酵素であり得る。上記標的タンパク質は、ファブリー病、ムコ多糖症I型、ファーバー病、ゴーシェ病、GM1ガングリオシドーシス、テイ・サックス病、サンドホフ病、GM2活性化因子疾患、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン・ピッ

50

ク病、シェイエ病、ハンター病、サンフィリポ病、モルキオ病、マロトー・ラミー病、ヒアルロニダーゼ欠損症、アスパルチルグルコサミン尿症、フコース蓄積症、マンノース蓄積症、シンドラー病、1型シアリドーシス、ポンペ病、濃化異骨症、セロイドリポフスチン沈着症、コレステロールエステル貯蔵病、ウォルマン病、多発性スルファターゼ欠損症、ガラクトシアリドーシス、ムコリピドーシス、シスチン症、シアル酸蓄積障害、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイロミクロン蓄積症、ヘルマンスキー・パドラック症候群、チェディアック・東症候群、ダノン病、または幸福顔貌骨異形成症のようなLSDと関連したタンパク質であり得る。

【0015】

マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドは、MNN4ポリペプチド（例えば、*Yarrowia lipolytica*ポリペプチド、*S. cerevisiae*ポリペプチド、*Ogataea minuta*ポリペプチド、*Pichia pastoris*ポリペプチド、または*C. albicans*ポリペプチド）であり得る。マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドは、*P. pastoris* PNO1ポリペプチドであり得る。

【0016】

さらに別の態様においては、本文書は、*Yarrowia lipolytica*細胞、*Pichia pastoris*細胞、*Hansenula polymorpha*細胞、*Ogataea minuta*細胞、*Pichia methanolica*細胞、*Arxula adeninivorans*細胞、または*Aspergillus niger*細胞の実質的に純粋な培養物を特色にし、かなりの数の該細胞が遺伝子操作されて、キャップを外されたマンノースー6ーリン酸結合またはキャップを外されたマンノースー6ーリン酸部分および脱マンノシル化したリン酸化Nーグリカンを含む糖タンパク質を生成する。かなりの数とは、上記培養物における生細胞の総数の約40%超が遺伝子操作されていることを示す。上記細胞は、(i)マンノースー1ーホスホー6ーマンノース結合またはマンノースー1ーホスホー6ーマンノース部分をマンノースー6ーリン酸に加水分解することができかつ、(ii)末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および／もしくは α -1, 6マンノース結合または末端 α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マンノース部分、および／もしくは α -1, 6マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼをコードする核酸を含むことができる。上記細胞はさらに、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドをコードする核酸を含むことができる。上記細胞は、OCH1活性を欠損しているよう遺伝子操作され得る。上記細胞はさらに、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドをコードする核酸を含むことができ、かつOCH1活性を欠損しているよう遺伝子操作され得る。上記マンノシダーゼは、該マンノシダーゼを細胞内区画へ導くための分泌シグナルおよび／またはターゲッティングシグナルを含むことができる。

【0017】

本文書は、糖タンパク質を哺乳類細胞の内部へ向ける方法も特色にする。上記方法は、マンノースー6ーリン酸結合が脱マンノシル化した糖タンパク質を提供する工程、および該細胞を脱マンノシル化した糖タンパク質と接触させる工程を含む。上記糖タンパク質は、ファミリー47またはファミリー92のグリコシルヒドロラーゼを使用して脱マンノシル化され得る。上記糖タンパク質は、*Aspergillus satoii*または*Cellulosimicrobium cellulans*由来のマンノシダーゼを使用して脱マンノシル化され得る。上記糖タンパク質は、*Canavalia ensiformis*または*Yarrowia lipolytica*由来のマンノシダーゼのようなファミリー38のグリコシルヒドロラーゼを使用して脱マンノシル化され得る。

【0018】

別の態様においては、本文書は、糖タンパク質を哺乳類細胞の内部へ向ける方法を特色にする。上記方法には、上記細胞のマンノースー6ーリン酸受容体に実質的に結合しない、リン酸化Nーグリカンを含む糖タンパク質を提供する工程と、該糖タンパク質を、末

10

20

30

40

50

端 $\alpha-1, 2$ マンノース結合または末端 $\alpha-1, 2$ マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させる工程であって、基礎をなすマンノースがリン酸化される場合に脱マンノシル化した糖タンパク質を生成し、ここで、該脱マンノシル化の後、該糖タンパク質は該細胞のマンノース-6-リン酸受容体を実質的に結合する工程と、該細胞を該脱マンノシル化した糖タンパク質と接触させる工程とが含まれる。上記糖タンパク質は、ファミリー47またはファミリー92のグリコシルヒドロラーゼを使用して脱マンノシル化され得る。上記マンノシダーゼは、*Aspergillus satoii*または*Cellulosimicrobium cellulans*由来であり得る。上記糖タンパク質は、*Canavalia ensiformis*または*Yarrowia lipolytica*由来のマンノシダーゼのようなファミリー38のグリコシルヒドロラーゼを使用して脱マンノシル化され得る。

10

【0019】

なおも別の態様においては、本文書は、糖タンパク質を、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体を実質的に結合しない第一の形態から、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体を実質的に結合する第二の形態へ変換する工程であって、ここで、該第一の形態においては、該糖タンパク質は、6位にリン酸残基を含有するマンノース残基に1位で結合する1つ以上の末端マンノース残基を含有する1つ以上のN-グリカンを含む。上記方法は、上記第一の形態の糖タンパク質を、末端マンノース残基を脱マンノシル化するマンノシダーゼと接触させる工程を含む。上記マンノシダーゼは、キャップを外す活性および脱マンノシル化する活性を有することができる。例えば、上記マンノシダーゼは、*Canavalia ensiformis*または*Yarrowia lipolytica*由来であり得る。一部の実施形態においては、上記マンノシダーゼは、キャップを外す活性を有していない（例えば、*Aspergillus satoii*または*Cellulosimicrobium cellulans*由来のマンノシダーゼ）。

20

【0020】

本文書は、1つ以上のマンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含む糖タンパク質を哺乳類細胞の内部へ向ける方法も特色にする。上記方法は、(a) 該糖タンパク質における該1つ以上のマンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸へとキャップを外す工程であって、ここで、キャップを外した後、該糖タンパク質は該細胞のマンノース-6-リン酸受容体を実質的に結合しない工程および、工程(a)の後、(b) 該糖タンパク質におけるリン酸化N-グリカンを脱マンノシル化する工程であって、ここで、該キャップを外す工程および該脱マンノシル化する工程の両者の後に、該糖タンパク質は該細胞のマンノース-6-リン酸受容体を実質的に結合する工程、の後に該細胞を該糖タンパク質と接触させる工程を含む。工程(a)および工程(b)は、2つの異なる酵素（例えば、CcMan5のような*Cellulosimicrobium cellulans*マンノシダーゼ、および*Canavalia ensiformis*マンノシダーゼ）によって、または単一の酵素によって触媒され得る。

30

【0021】

別の態様においては、本文書は、糖タンパク質を哺乳類細胞の内部へ向ける方法を特色にする。上記方法には、キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを有する糖タンパク質を提供する工程、および該哺乳類細胞を該糖タンパク質と接触させる工程が含まれる。

40

【0022】

本明細書に記載される方法においては、前記糖タンパク質はヒトタンパク質であり得る。

【0023】

本明細書に記載される方法においては、前記糖タンパク質は、病原体タンパク質、リソソームタンパク質、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、抗体もしくはその抗原結合断片、または融合タンパク質であり得る。上記リソソームタンパク質は、リソソーム酵素（

50

例えば、酸性 α グルコシダーゼまたは α ガラクトシダーゼ）であり得る。上記糖タンパク質は、LSD（例えば、ファブリー病、ムコ多糖症Ⅰ型、ファーバー病、ゴーシェ病、GM1ガングリオシドーシス、テイ・サックス病、サンドホフ病、GM2活性化因子疾患、クラッベ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン・ピック病、シェイエ病、ハンター病、サンフィリポ病、モルキオ病、マロトー・ラミー病、ヒアルロニダーゼ欠損症、アスパルチルグルコサミン尿症、フコース蓄積症、マンノース蓄積症、シンドラー病、Ⅰ型シアリドーシス、ポンペ病、濃化異骨症、セロイドリポフスチン沈着症、コレステロールエステル貯蔵病、ウォルマン病、多発性スルファターゼ欠損症、ガラクトシアリドーシス、ムコリピドーシス、シスチン症、シアル酸蓄積障害、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイロミクロン蓄積症、ヘルマンスキー・パドラック症候群、チェディアック・東症候群、ダノン病、または幸福顔貌骨異形成症）と関連し得る。

10

【0024】

本文書は、本明細書に記載されている方法のうちのいずれかで処理されている、哺乳類細胞の内部へ輸送することのできる糖タンパク質、およびこのような糖タンパク質を含む哺乳類細胞（例えば、ヒト細胞）も特色にする。別の態様においては、本文書は、このような糖タンパク質を投与することを必要とする被験体へ該糖タンパク質を投与する工程を含む処置の方法を特色にする。

【0025】

別段に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明の属する分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと類似のまたは等価の方法および材料を、本発明の実施または試験において使用することができるが、例示的な方法および材料を下記に説明する。本明細書において記載されている刊行物、特許出願、特許、Genbank（登録商標）受託番号、および他の参考文献はすべて、それらの内容が全体として参照により援用されている。矛盾する場合においては、定義を含む本出願が支配する。材料、方法、および実施例は、例示的であるに過ぎず、制限するよう意図するものではない。

20

【0026】

本発明の他の特色および利点は、以下の詳細な記載から、および特許請求の範囲から明らかである。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

30

（項目1）

糖タンパク質におけるマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分のキャップを外して、リン酸化N-グリカンを脱マンノシル化するための方法であって、

a) 該マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含有するリン酸化N-グリカンを有する該糖タンパク質を提供する工程と、

b) 該糖タンパク質を、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができかつ(ii) 末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および/または α -1, 6マンノース結合を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させる工程

とを含む、前記方法。

40

（項目2）

リン酸化N-グリカンを脱マンノシル化する方法であって、

a) リン酸化N-グリカンを含む糖タンパク質を提供する工程と、

b) 該糖タンパク質を、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができかつ(ii) 末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および/または α -1, 6マンノース結合を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させる工程

とを含む、前記方法。

（項目3）

前記マンノシダーゼは、ファミリー38のグリコシルヒドロラーゼである、項目1または

50

2に記載の方法。

(項目4)

前記マンノシダーゼは、*Canavalia ensiformis*由来である、項目1～3のいずれか一項に記載の方法。

(項目5)

前記マンノシダーゼは、*Yarrowia lipolytica*由来である、項目1～3のいずれか一項に記載の方法。

(項目6)

工程(a)および工程(b)の後に、哺乳類細胞を、前記脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含む前記糖タンパク質と接触させる工程であって、ここで、該接触させる工程の後に、該糖タンパク質は、該哺乳類細胞の内部へ輸送される工程をさらに含む、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目7)

前記哺乳類細胞はヒト細胞である、項目6に記載の方法。

(項目8)

糖タンパク質を哺乳類細胞の内部へ向ける方法であって、a) マンノース-6-リン酸部分が脱マンノシル化した糖タンパク質を提供する工程と、b) 該細胞を該脱マンノシル化した糖タンパク質と接触させる工程とを含む、方法。

(項目9)

前記マンノシダーゼはファミリー47のグリコシルヒドロラーゼである、項目8に記載の方法。

20

(項目10)

前記糖タンパク質は、*Aspergillus satoi*由来のマンノシダーゼを使用して脱マンノシル化される、項目8または項目9に記載の方法。

(項目11)

前記マンノシダーゼは、ファミリー92のグリコシルヒドロラーゼである、項目8に記載の方法。

(項目12)

前記糖タンパク質は、*Cellulosimicrobium cellulans*由来のマンノシダーゼを使用して脱マンノシル化される、項目8または項目11に記載の方法。

30

(項目13)

前記マンノシダーゼは、ファミリー38のグリコシルヒドロラーゼである、項目8に記載の方法。

(項目14)

前記マンノシダーゼは、*Canavalia ensiformis*または*Yarrowia lipolytica*由来である、項目8または項目13に記載の方法。

(項目15)

糖タンパク質を哺乳類細胞の内部へ向ける方法であって、

a) リン酸化N-グリカンを含む糖タンパク質を提供する工程であって、ここで、該糖タンパク質は該細胞のマンノース-6-リン酸受容体を実質的に結合しない工程と、

40

b) 該糖タンパク質を、末端 α -1, 2マンノース結合を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させる工程であって、基礎をなすマンノースがリン酸化される場合に脱マンノシル化した糖タンパク質を生成し、ここで、該糖タンパク質は該脱マンノシル化の後、該細胞における該マンノース-6-リン酸受容体を実質的に結合する工程と、

c) 該細胞を該脱マンノシル化した糖タンパク質と接触させる工程

とを含む、前記方法。

(項目16)

前記マンノシダーゼはファミリー47のグリコシルヒドロラーゼである、項目15に記載の方法。

50

(項目 17)

前記マンノシダーゼは *Aspergillus satoii* 由来である、項目 15 または項目 16 に記載の方法。

(項目 18)

前記マンノシダーゼはファミリー 92 のグリコシルヒドロラーゼである、項目 15 に記載の方法。

(項目 19)

前記マンノシダーゼは *Cellulosimicrobium cellulans* 由来である、項目 15 または項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

前記マンノシダーゼはファミリー 38 のグリコシルヒドロラーゼである、項目 15 に記載の方法。

(項目 21)

前記マンノシダーゼは *Canavalia ensiformis* または *Yarrowia lipolytica* 由来である、項目 15 または項目 20 に記載の方法。

(項目 22)

糖タンパク質を、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合しない第一の形態から、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合する第二の形態へと変換する方法であって、該第一の形態の該糖タンパク質を、末端マンノース残基を脱マンノシル化するマンノシダーゼと接触させる工程を含み、ここで、該第一の形態において、該糖タンパク質は、その 6 位にリン酸残基を含有するマンノース残基に対しその 1 位で結合するマンノース残基を 1 つ以上含有する 1 つ以上の N-グリカンを含む、方法。

(項目 23)

前記マンノシダーゼは、キャップを外してかつ脱マンノシル化する活性を有する、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

前記マンノシダーゼはファミリー 38 のグリコシルヒドロラーゼである、項目 22 または項目 23 に記載の方法。

(項目 25)

前記マンノシダーゼは *Canavalia ensiformis* または *Yarrowia lipolytica* 由来である、項目 22 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 26)

前記マンノシダーゼはキャップを外す活性を有しない、項目 22 に記載の方法。

(項目 27)

前記マンノシダーゼは、ファミリー 47 またはファミリーの 92 グリコシルヒドロラーゼである、項目 22 または項目 26 に記載の方法。

(項目 28)

前記マンノシダーゼは、*Aspergillus satoii* または *Cellulosimicrobium cellulans* 由来である、項目 22、項目 26、または項目 27 に記載の方法。

(項目 29)

1 つ以上のマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含む糖タンパク質を哺乳類細胞の内部へ向ける方法であって、(a) 該糖タンパク質における該 1 つ以上のマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸へとキャップを外す工程であって、ここで、キャップを外した後、該糖タンパク質は該細胞のマンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合しない工程、および、工程 (a) の後、(b) 該糖タンパク質におけるリン酸化 N-グリカンを脱マンノシル化する工程であって、ここで、該キャップを外す工程および該脱マンノシル化する工程の両者の後に、該糖タンパク質は該細胞のマンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合する工程、の後に該細胞を該糖タンパク質と接触させる工程を含む、方法。

10

20

30

40

50

(項目 3 0)

工程 (a) および工程 (b) は 2 つの異なる酵素によって触媒される、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

工程 (a) および工程 (b) は単一の酵素によって触媒される、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 2)

糖タンパク質を哺乳類細胞の内部へ向ける方法であって、キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化 N-グリカンを含む糖タンパク質を提供する工程と、該哺乳類細胞を該糖タンパク質と接触させる工程とを含む、方法。

(項目 3 3)

前記糖タンパク質はヒトタンパク質である、項目 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4)

前記糖タンパク質は、病原体タンパク質、リソソームタンパク質、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、抗体もしくはその抗原結合断片、または融合タンパク質である、項目 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 5)

前記リソソームタンパク質はリソソーム酵素である、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記リソソーム酵素は、酸性 α グルコシダーゼまたは α ガラクトシダーゼである、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記糖タンパク質は L S D と関連している、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記 L S D は、ファブリー病、ムコ多糖症 I 型、ファーバー病、ゴーシェ病、G M 1 ガングリオシドーシス、テイ・サックス病、サンドホフ病、G M 2 活性化因子疾患、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン・ピック病、シェイエ病、ハンター病、サンフィリポ病、モルキオ病、マロトー・ラミー病、ヒアルロニダーゼ欠損症、アスパルチルグルコサミン尿症、フコース蓄積症、マンノース蓄積症、シンドラー病、1 型シアリドーシス、ポンペ病、濃化異骨症、セロイドリポフスチン沈着症、コレステロールエステル貯蔵病、ウォルマン病、多発性スルファターゼ欠損症、ガラクトシアリドーシス、ムコリピドーシス、シスチン症、シアル酸蓄積障害、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイロミクロン蓄積症、ヘルマンズキー・パドラック症候群、チェディアック・東症候群、ダノン病、または幸福顔貌骨異形成症である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

項目 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法で処理された、哺乳類細胞の内部へ輸送されることのできる糖タンパク質。

(項目 4 0)

項目 3 9 に記載の糖タンパク質を含む哺乳類細胞。

(項目 4 1)

前記細胞はヒト細胞である、項目 4 0 に記載の哺乳類細胞。

(項目 4 2)

項目 3 9 に記載の糖タンパク質の投与を必要とする被験体に、該糖タンパク質を投与する工程を含む、処置方法。

(項目 4 3)

脱マンノシル化したリン酸化 N-グリカンを含む糖タンパク質を産生するよう遺伝子操作された単離された真菌細胞であって、マンノシダーゼをコードする核酸を含み、該マンノシダーゼが、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができかつ (i i) 末端 α -1, 2 マンノース結合、 α -1, 3 マンノース結合、および/または α -1, 6 マンノース結合を加水分解することができる、真菌細胞。

10

20

30

40

50

(項目 4 4)

前記真菌細胞はさらに、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドをコードする核酸を含む、項目 4 3 に記載の真菌細胞。

(項目 4 5)

前記真菌細胞は、O C H 1 活性を欠損しているよう遺伝子操作される、項目 4 3 または項目 4 4 に記載の真菌細胞。

(項目 4 6)

標的タンパク質をコードする核酸をさらに含む項目 4 3 ～ 4 5 のいずれか一項に記載の真菌細胞であって、ここで、該標的タンパク質が糖タンパク質である、該真菌細胞。

(項目 4 7)

前記標的タンパク質はヒトタンパク質である、項目 4 6 に記載の真菌細胞。

(項目 4 8)

前記標的タンパク質は、病原体タンパク質、リソソームタンパク質、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、抗体もしくはその抗原結合断片、または融合タンパク質である、項目 4 6 に記載の真菌細胞。

(項目 4 9)

前記リソソームタンパク質はリソソーム酵素である、項目 4 8 に記載の真菌細胞。

(項目 5 0)

前記リソソーム酵素は酸性 α グルコシダーゼまたは α ガラクトシダーゼである、項目 4 9 に記載の真菌細胞。

(項目 5 1)

前記糖タンパク質は、L S D と関連しているタンパク質である、項目 4 7 に記載の真菌細胞。

(項目 5 2)

前記 L S D は、ファブリー病、ムコ多糖症 I 型、ファーバー病、ゴーシェ病、G M 1 ガングリオシドーシス、テイ・サックス病、サンドホフ病、G M 2 活性化因子疾患、クラブ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン・ピック病、シェイエ病、ハンター病、サンフィリポ病、モルキオ病、マロトー・ラミー病、ヒアルロニダーゼ欠損症、アスパルチルグルコサミン尿症、フコース蓄積症、マンノース蓄積症、シンドラー病、1 型シアリドーシス、ポンペ病、濃化異骨症、セロイドリポフスチン沈着症、コレステロールエステル貯蔵病、ウォルマン病、多発性スルファターゼ欠損症、ガラクトシアリドーシス、ムコリビドーシス、シスチン症、シアル酸蓄積障害、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイロミクロン蓄積症、ヘルマンスキー・パドラック症候群、チェディアック・東症候群、ダノン病、または幸福顔貌骨異形成症である、項目 5 1 に記載の真菌細胞。

(項目 5 3)

前記真菌細胞は、*Yarrowia lipolytica* 細胞または *Arxula adenivorans* 細胞である、項目 3 2 ～ 4 1 のいずれか一項に記載の真菌細胞。

(項目 5 4)

マンノシルリン酸化を促進することのできる前記ポリペプチドは M N N 4 ポリペプチドである、項目 3 3 に記載の真菌細胞。

(項目 5 5)

前記 M N N 4 ポリペプチドは、*Yarrowia lipolytica* ポリペプチド、*S. cerevisiae* ポリペプチド、*Ogataea minuta* ポリペプチド、*Pichia pastoris* ポリペプチド、または *C. albicans* ポリペプチドである、項目 4 3 に記載の真菌細胞。

(項目 5 6)

マンノシルリン酸化を促進することのできる前記ポリペプチドは、*P. pastoris* P N O 1 ポリペプチドである、項目 4 4 に記載の真菌細胞。

(項目 5 7)

10

20

30

40

50

前記マンノシダーゼは分泌シグナルを含む、項目43～56のいずれか一項に記載の真菌細胞。

(項目58)

前記マンノシダーゼは、該マンノシダーゼを細胞内区画へ導くためのターゲッティングシグナルを含む、項目43～56のいずれか一項に記載の真菌細胞。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A】図1Aは、太字のlip2プレ配列を有するヒトαグルコシダーゼ(GAA)のコドン最適化ヌクレオチド配列(配列番号1)の記述である。

【図1B】図1Bは、太字のlip2プレ配列を有するヒトGAAのアミノ酸配列(配列番号2)の記述であり、ここで*は、終止コドンを表す。

【図2】図2は、huGAAのクローン化に使用したY. lipolytica発現ベクターの概略図である。

【図3A】図3Aは、C末端Hisタグを有するYarrowia lipolytica AMS1のオープンリーディングフレーム(ORF)のヌクレオチド配列(配列番号3)の記述である。

【図3B】図3Bは、N末端Hisタグを有するYarrowia lipolytica AMS1のORFのヌクレオチド配列(配列番号4)の記述である。

【図3C】図3Cは、Yarrowia lipolytica AMS1ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号5)の記述である。

【図4】図4は、Man₈GlcNAc₂(M8)、一リン酸化ManP-Man₈GlcNAc₂(MP-M8)、および/または二リン酸化(ManP)₂-Man₈GlcNAc₂((MP)₂-M8)糖(MNN4糖またはMNN4 N-グリカンと呼ぶ)を含有する、MNN4を過剰発現するYarrowia lipolytica株に由来する、8-アミノ-1, 3, 6-ピレントリスルホン酸(APTS)標識した糖からの潜在的な最終加水分解産物の概略図であり、α-マンノシダーゼはまたマンノース残基をMNN4 N-グリカンから完全に除去できると仮定している。

【図5】図5は、タチナタマメ(Jb)α-マンノシダーゼで処理したMNN4 N-グリカンのN-グリカン分析を記述する一連の電気泳動図である。DNAシークエンサー支援型、フルオロフォア支援型の炭水化物電気泳動(DSA-FACE)を使用して、分析を実施した。「M1」、「M2」、「M3」、「M4」、「M5」、「M6」、「M8」、および「M9」は、基礎となるN-アセチルグルコサミンの構造に結合したマンノース残基の数を指す。Y軸は、各N-グリカン構造の量の指標としての相対蛍光単位を表す。X軸は、キャピラリーを通過した各N-グリカン構造の相対移動度を表す。

【図6】図6は、Yarrowia lipolytica由来のAMS1(YlAms1)を使用して脱マンノシル化およびホスフェートのキャップ外し活性(phosphate uncapping activity)を示す一連の電気泳動図である。

【図7】図7は、タチナタマメα-1, 2-マンノシダーゼ処理の前および後のhuGAAのN-グリカン特性を記述する一連の電気泳動図である。

【図8A-1】図8Aは、DsbA-Cellulosimicrobium cellulansマンノシダーゼ5(CcMan5)のオープンリーディングフレーム(ORF)のヌクレオチド配列(配列番号6)の記述である。

【図8A-2】図8Aは、DsbA-Cellulosimicrobium cellulansマンノシダーゼ5(CcMan5)のオープンリーディングフレーム(ORF)のヌクレオチド配列(配列番号6)の記述である。

【図8B】図8Bは、太字のシグナル配列を有するCcMan5ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号7)の記述である。

【図8C】図8Cは、シグナル配列を有さないCcMan5ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号8)の記述である。シグナル配列を有さないCcMan5ポリペプチドの予想される分子量は173kDaである。

10

20

30

40

50

【図9A-1】図9Aは、DsbA-C. cellulansマンノシダーゼ4 (CcMan4) のORFのヌクレオチド配列 (配列番号9) の記述である。

【図9A-2】図9Aは、DsbA-C. cellulansマンノシダーゼ4 (CcMan4) のORFのヌクレオチド配列 (配列番号9) の記述である。

【図9A-3】図9Aは、DsbA-C. cellulansマンノシダーゼ4 (CcMan4) のORFのヌクレオチド配列 (配列番号9) の記述である。

【図9B-1】図9Bは、太字のシグナル配列を有するCcMan4ポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号10) の記述である。シグナル配列を有さないCcMan4ポリペプチドの予想される分子量は184kDaである。

【図9B-2】図9Bは、太字のシグナル配列を有するCcMan4ポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号10) の記述である。シグナル配列を有さないCcMan4ポリペプチドの予想される分子量は184kDaである。

【図10】図10は、プラスミドpLSAHCcMan5およびpLSAHCcMAN4の概略図である。

【図11】図11は、CcMan4および／またはCcMan5で処理したヒトαグルコシダーゼ (GAA) のN-グリカン分析を記述する一連の電気泳動図である。

【図12】図12は、キャップ形成されたN-グリカンの概略図であり、図中、Pはホスフェートを指し、黒四角はGlcNAc部分を指し、白丸はβ結合型マンノースを指し、黒丸はα結合型マンノースを指す。

【図13】図13は、CcMan4で処理したミオザイム (Myozyme) (登録商標) のN-グリカン分析を記述する一連の電気泳動図である。

【図14】図14は、CcMan4および／またはCcMan5で処理したヒトαグルコシダーゼ (GAA) のN-グリカン分析を記述する一連の電気泳動図である。

【図15】図15は、JbManで処理したヒトGAAのN-グリカン分析を記述する一連の電気泳動図である。

【図16】図16は、JbManで処理したヒトGAAのN-グリカン分析を記述する一連の電気泳動図である。

【図17】図17は、示された濃度の酵素 (U/mL) でのミオザイム (登録商標) (菱形) またはCcMan5 (四角)、CcMan4 (三角)、CcMan4およびCcMan5 (×)、もしくはJbMan (*) で処理されたヒトGAAに関する細胞内GAA活性 (U/mg) の線グラフである。各データ点は、用量あたりの二つ組の平均±標準偏差を表す。星印で標識したデータ点は、用量あたりの単一の刺激条件に由来する結果である。

【図18】図18は、ミオザイム (登録商標) (菱形)、ミオザイム (登録商標) にM6Pを加えたもの (四角)、CcMan4で処理されたミオザイム (登録商標) (三角形)、CcMan4で処理されたミオザイム (登録商標) にM6Pを加えたもの (×)、CcMan4およびCcMan5で処理されたヒトGAA (*), CcMan4およびCcMan5で処理されたヒトGAAにM6Pを加えたもの (丸)、JbManで処理されたヒトGAA (l)、またはJbManで処理されたヒトGAAに提示濃度の酵素 (U/mL) でM6Pを加えたもの () に関する細胞内GAA活性 (U/mg) の線グラフである。各データ点は、用量あたりの二つ組の平均±標準偏差を表す。星印で標識したデータ点は、用量あたりの単一の刺激条件に由来する結果である。

【図19】図19は、ミオザイム、JbMan、またはCcMan4およびCcMan5の組み合わせとともに14時間または46時間のいずれかでインキュベートしたポンペの線維芽細胞における細胞内GAA活性 (U/mg) の棒グラフである。二つ組の平均±標準偏差を表している。

【図20】図20は、CcMan5およびJbManで処理したヒトGAAのN-グリカン分析を記述する一連の電気泳動図である。

【図21】図21は、huGAAおよびミオザイムそれぞれを使用した細胞の細胞外刺激の後の、精製され、キャップを外され、かつ脱マンノシル化したhuGAAの細胞内活性

10

20

30

40

50

とミオザイム（登録商標）の細胞内活性との線グラフである。細胞に添加される酵素の量（酵素活性単位として表される）を酵素濃度（nMとして表される）に変換し、 $K_{\text{取り込み}}$ の算出のために比活性（U/mgで表される）に対してプロットした。 $K_{\text{取り込み}}$ および標準偏差をh u G A Aについては14データ点（濃度あたり2データ点）によって、ミオザイム（登録商標）については12データ点によって非線形回帰を使用してGraph Prismで算出した。

【図22】図22は、*Aspergillus saitoi*由来のマンノシダーゼのアミノ酸配列（配列番号11）の記述である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

10

（詳細な説明）

一般に、本文書は、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をホスホ-6-マンノース（本明細書においては「マンノース-6-リン酸」とも呼ぶ）に加水分解すること（「キャップを外すこと」）、かつこのようなホスフェート含有グリカンの末端 $\alpha-1$, 2マンノース結合、 $\alpha-1$, 3マンノース結合、および／もしくは $\alpha-1$, 6マンノース結合または末端 $\alpha-1$, 2マンノース部分、 $\alpha-1$, 3マンノース部分、および／もしくは $\alpha-1$, 6マンノース部分を加水分解すること（「脱マンノシル化すること」）のための方法および材料を提供する。（個別の酵素または単一の酵素のいずれかによる）キャップを外すことおよび脱マンノシル化の両方が糖タンパク質の哺乳類細胞への取り込みを達成するために必要とされる場合に哺乳類細胞による糖タンパク質の取り込みを促進する方法も提供される。本明細書に記載される方法および材料は、リソソーム中の蓄積産物の分解に関与する触媒酵素のそこなわれた活性によるリソソーム中の該蓄積産物の蓄積を特徴とする遺伝性代謝障害の1つの異なる群であるリソソーム蓄積障害（LSD）を有する患者を処置するための薬剤を生成するのに特に有用である。蓄積産物の集積は、細胞の機能障害および進行性の臨床症状をもたらす。異化酵素の欠損は、酵素補充療法（ERT）によって修正することができるが、但し、投与される酵素が罹患した細胞のリソソームへ導かれることができることを条件とする。リソソーム酵素は、典型的には、小胞体（ER）において合成され、分泌経路を介してゴルジ体へ輸送され、次いでリソソームへ動員される糖タンパク質である。本明細書に記載される方法および材料を用いて、微生物を基にしたプロセスは、脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを含む治療タンパク質を得るために使用することができる。したがって、本明細書に記載される方法および材料は、LSDのような代謝障害の処置のために糖タンパク質を調製するのに有用である。

20

30

【0029】

（マンノシダーゼ）

本文書は、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合もしくはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をホスホ-6-マンノースに加水分解することができる、かつ／または(ii) このようなホスフェート含有グリカンの末端 $\alpha-1$, 2マンノース結合、 $\alpha-1$, 3マンノース結合、および／もしくは $\alpha-1$, 6マンノース結合または末端 $\alpha-1$, 2マンノース部分、 $\alpha-1$, 3マンノース部分、および／もしくは $\alpha-1$, 6マンノース部分を加水分解することができるマンノシダーゼをコードする単離された核酸を提供する。用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、本明細書においては互換可能に使用され、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、および核酸類似体を含むDNA（またはRNA）を含む、RNAおよびDNAの両方を指す。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を有することができる。核酸は、二本鎖または一本鎖（すなわち、センス鎖またはアンチセンス鎖）であることができる。ポリヌクレオチドの非限定例としては、遺伝子、遺伝子断片、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、siRNA、マイクロRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、枝分かれポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマー、な

40

50

らびに核酸類似体が挙げられる。

【0030】

「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本明細書においては互換可能に使用され、長さまたは翻訳後修飾に関わらず、アミノ酸の任意のペプチド結合鎖を意味する。典型的には、本明細書に記載されるポリペプチド（例えば、マンノシダーゼまたはキャップを外されかつ脱マンノシル化した標的タンパク質）は、該ポリペプチドが、調製物中の総タンパク質の少なくとも60重量%、例えば、試料中の総タンパク質の60%を構成する場合、単離されている。一部の実施形態においては、本明細書に記載される「ポリペプチドは、調製物中の総タンパク質の少なくとも75重量%、少なくとも90重量%、または少なくとも99重量%からなる。

10

【0031】

「単離された核酸」は、天然に存在するゲノム（例えば、酵母ゲノム）における核酸の片側または両側に正常に隣接している核酸を含む、天然に存在するゲノムに存在する他の核酸分子から分離された核酸を指す。用語「単離された」は核酸に関して本明細書で使用する場合、天然に存在しない任意の核酸配列も含んでおり、なぜなら、このような非天然の配列は天然には見出されず、かつ天然に存在するゲノムにおいてじかに接触する配列を有さないからである。

【0032】

単離された核酸は、例えば、DNA分子であることができるが、但し、天然に存在するゲノムにおける該DNA分子にじかに隣接することが通常見出されている核酸配列のうちの1つは、除去されており、または不在であることを条件とする。したがって、単離された核酸は、他の配列とは独立した別個の分子（例えば、化学的に合成された核酸、またはPCRもしくは制限エンドヌクレアーゼ処理によって生成されたcDNAもしくはゲノムDNA断片）として存在するDNA分子、およびベクター、自律的に複製するプラスミド、ウイルス（例えば、任意のパラミクソウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、もしくはヘルペスウイルス）へと、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAへと組み込まれたDNAを含むが、これらに限定されない。加えて、単離された核酸は、ハイブリッド核酸または融合核酸の一部であるDNA分子のような操作された核酸を含むことができる。例えばcDNAライブラリーもしくはゲノムライブラリー内に、またはゲノムDNA制限消化物を含有するゲルスライス内にある何百〜何百万もの他の核酸のうちに存在する核酸は、単離された核酸とはみなされない。

20

30

【0033】

用語「外来性」は、核酸および特定の宿主細胞に関して本明細書において使用する場合、天然に見出されるような特定の細胞において生じない（かつその細胞から得ることができない）任意の核酸を指す。したがって、天然に存在しない核酸は、宿主細胞へと一旦導入されると該宿主細胞に対して外来性であるとみなされる。天然に存在しない核酸が、天然に見出される核酸配列の核酸部分配列または断片を含有することができることを留意することは重要であり、但し、該核酸は全体として天然には存在しないことを条件とする。例えば、発現ベクター内にゲノムDNA配列を含有する核酸分子は天然に存在しない核酸であり、したがって、宿主細胞へと一旦導入されると該宿主細胞に対して外来性であり、なぜなら、該核酸分子は全体（ゲノムDNAにベクターDNAを加えたもの）として天然には存在しないからである。したがって、全体として天然には存在しない任意のベクター、自律的に複製するプラスミド、またはウイルス（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、またはヘルペスウイルス）は、天然に存在しない核酸であるとみなされる。PCRもしくは制限エンドヌクレアーゼ処理によって生成されたゲノムDNA断片ならびにcDNAは、天然には見出されない別個の分子として存在するので、天然に存在しない核酸であるとみなされるということになる。天然には見出されない配置のプロモーター配列およびポリペプチドをコードする配列（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）を含有する任意の核酸が天然に存在しない核酸であることにもなる。天然に存在する核酸は、特定の細胞に対して外来性ともなり得る。例えば、酵母xの細胞から単離された全染色体は、一旦

40

50

、該染色体が酵母 *y* の細胞へと導入されると、酵母 *y* の細胞に関して外来性の核酸である。

【0034】

マンノシダーゼをコードする核酸は、配列番号3、配列番号4、配列番号6、または配列番号9において示されるヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性（例えば、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性）を有することができる。一部の実施形態においては、本明細書に記載される核酸は、配列番号5、7、8、10、または11において示されるアミノ酸配列と少なくとも70%（例えば、少なくとも75、80、85、90、95、99、または100%）の同一性を有するマンノシダーゼポリペプチドをコードすることができる。例えば、核酸は、配列番号5、7、8、10、11において示されるアミノ酸配列、またはその一部と少なくとも90%（例えば、少なくとも95または98%）の同一性を有するマンノシダーゼをコードすることができる。例えば、核酸は、配列番号8の1～774番目のアミノ酸残基と少なくとも90%の同一性を有するマンノシダーゼをコードすることができる。特定のアミノ酸配列と配列番号5、配列番号7、配列番号8、配列番号10、または配列番号11において示されるアミノ酸配列の間の%同一性は、以下のとおり決定することができる。まず、BLASTPバージョン2.0.14を含有する独立型バージョンのBLASTZ由来のBLAST 2 Sequences (Bl2seq) プログラムを使用してアミノ酸配列を整列させる。この独立型バージョンのBLASTZは、Fish & Richardsonのウェブサイト（例えば、www.fr.com/blast/）または米国政府の国立バイオテクノロジー情報センターのウェブサイト（www.ncbi.nlm.nih.gov）から得ることができる。Bl2seqプログラムを使用する方法を説明する指示は、BLASTZに添付のリードミーファイルにおいて見出すことができる。Bl2seqは、BLASTPアルゴリズムを使用して2つのアミノ酸配列間の比較を実行する。2つのアミノ酸配列を比較するために、Bl2seqのオプションは、以下のとおり設定される。-i は、比較されるべき第一のアミノ酸配列を含有するファイル（例えば、C:\seq1.txt）に対して設定され、-j は、比較されるべき第二のアミノ酸配列を含有するファイル（例えば、C:\seq2.txt）に対して設定され、-p はblastpに対して設定され、-o は任意の所望のファイル名（例えば、C:\output.txt）に対して設定され、かつ他のオプションはすべて該オプションのデフォルト設定のままである。例えば、2つのアミノ酸配列間の比較を含有する出力ファイルを生じるために、以下のコマンド、すなわちC:\Bl2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txtを使用することができる。この2つの比較される配列が相同性を共有する場合、指定された出力ファイルは、それらの相同性の領域を整列した配列として示す。この2つの比較される配列が相同性を共有しない場合、指定された出力ファイルは整列した配列を示さない。類似の手順は、blastnを使用することを除き、核酸配列について行なわれてよい。

【0035】

一旦整列すると、マッチ数は、同一のアミノ酸残基が両配列中に存在する位置の数を計数することによって決定される。%同一性は、マッチ数を全長のマンノシダーゼポリペプチドアミノ酸配列の長さによって除した後に、結果として生じる値に100を乗じることによって決定される。

【0036】

%同一性の値は、最も近い10分の1の位に丸められることは留意される。例えば、78.11、78.12、78.13、および78.14は78.1へと切り捨てられるのに対し、78.15、78.16、78.17、78.18、および78.19は78.2と切り上げられる。長さの値が常に整数であることも留意される。

【0037】

多くの核酸が特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができること

10

20

30

40

50

は認識される。遺伝暗号の縮重は、当該技術分野に周知であり、すなわち、多くのアミノ酸について、アミノ酸のためのコドンとして機能する1つを超えるヌクレオチドのトリプレットがある。例えば、所与のマンノシダーゼポリペプチドについてのコード配列におけるコドンは、特定の種（例えば、細菌または真菌）における最適な発現が、該種のための適切なコドンバイアス表を使用して得られるよう改変され得る。

【0038】

2つの核酸配列間の相同性を評価するために、ハイブリダイゼーションを使用することもできる。本明細書に記載される核酸配列、またはその断片もしくはバリエーションは、標準的なハイブリダイゼーション技術に従ってハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。関心対象のプローブ（例えば、*Yarrowia lipolytica* AMS1ヌクレオチド配列の一部を含有するプローブ）の、試験源由来のDNAまたはRNAとのハイブリダイゼーションは、該試験源におけるプローブに対応するDNAまたはRNA（例えば、AMS1ヌクレオチド配列）の存在の指標である。ハイブリダイゼーション条件は当業者に公知であり、*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y., 6.3.1~6.3.6, 1991において得ることができる。中程度のハイブリダイゼーション条件は、30℃での2×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）におけるハイブリダイゼーションに続く50℃での1×SSC、0.1% SDSにおける洗浄と等価として定義される。高度にストリンジェントな条件は、45℃での6×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）におけるハイブリダイゼーションに続く、65℃での0.2×SSC、0.1% SDSにおける洗浄と等価として定義される。

【0039】

本明細書における使用に好適なマンノシダーゼポリペプチドの他の候補物は、ヌクレオチドおよびポリペプチドの配列アラインメントの分析によって同定することができる。例えば、ヌクレオチド配列またはポリペプチド配列のデータベースに関する質問を実行することにより、マンノシダーゼポリペプチドのホモログおよび／またはオルトログを同定することができる。配列分析は、公知のマンノシダーゼアミノ酸配列を使用する非重複データベースのBLAST分析、Reciprocal BLAST分析、またはPSI-BLAST分析を包含することができる。40%超の配列同一性を有するデータベースにおけるマンノシダーゼポリペプチドは、マンノシダーゼポリペプチドとしての好適性についてのさらなる評価のための候補物として同定することができる。アミノ酸配列類似性は、ある疎水性残基の別の疎水性残基との置き換えまたはある極性残基の別の極性残基との置き換えのような保存的アミノ酸置換を可能にする。所望の場合、さらに評価されるべき候補物の数を絞るために、このような候補物の手動点検を実施することができる。

【0040】

本文書は、本明細書に記載されるマンノシダーゼの(i)生物活性のあるバリエーションおよび(ii)その生物活性のある断片または生物活性のあるバリエーションも提供する。マンノシダーゼの生物活性のあるバリエーションは、配列番号5、7、8、10、および11に示す配列に対する付加、欠失、または置換を含有することができる。置換を有するタンパク質は一般的に、50以下（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、または50を超えない）の保存的アミノ酸置換を有する。保存的置換とは、あるアミノ酸の、類似の特徴を有する別のアミノ酸との置換である。保存的置換には、以下の群内の置換が含まれる：バリン、アラニン、およびグリシン；ロイシン、バリン、およびイソロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギンおよびグルタミン；セリン、システイン、およびトレオニン；リシンおよびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロシン。非極性疎水性アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが含まれる。極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれる。正に帯電した（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リシン、およびヒスチジンが含まれる。負に帯電した

(酸性) 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る。上記の極性基、塩基性基、または酸性基のうちのある構成員の、同一群の別の構成員による任意の置換は、保存的置換であるとみなすことができる。対照的に、非保存的置換とは、あるアミノ酸の、類似していない特徴を有する別のアミノ酸との置換である。

【0041】

欠失バリエーションは、(2つ以上のアミノ酸の) 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20のアミノ酸セグメントまたは非連続的な単一のアミノ酸を欠失することができる。

【0042】

付加(付加バリエーション)には、(a) 配列番号5、7、8、10、11に示すマンノシダーゼまたはその断片と、(b) 内部または末端(CまたはN)の無関係のまたは異種性のアミノ酸配列とを含有する融合タンパク質が含まれる。このような融合タンパク質の文脈においては、用語「異種性アミノ酸配列」は、(a) 以外のアミノ酸配列を指す。異種性配列は例えば、組換えタンパク質(例えば、FLAG、ポリヒスチジン(例えば、ヘキサヒスチジン)、赤血球凝集素(hemagglutinin)(HA)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、またはマルトース結合タンパク質(MBP))の精製に使用される配列であることができる。異種性配列は、診断用マーカーまたは検出可能なマーカーとして有用なタンパク質、例えば、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)であることもできる。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、別のタンパク質由来のシグナル配列を含有する。ある宿主細胞(例えば、酵母宿主細胞)においては、標的タンパク質の発現および/または分泌は、異種性シグナル配列の使用によって増大することができる。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、例えば抗体産生のための免疫応答を惹起するのに有用なキャリア(例えば、KLH)、または小胞体もしくはゴルジ装置の保持シグナルを含有することができる。異種性配列は多様な長さであることができ、一部の場合においては、異種性配列が結合する全長の標的タンパク質よりも長い配列であることができる。

【0043】

マンノシダーゼの生物活性のある断片または生物活性のあるバリエーションは、野生型の全長の成熟タンパク質のマンノシダーゼ活性(例えば、キャップを外すことおよび/または脱マンノシル化すること)の少なくとも40%(例えば、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは100%、またはさらにそれより大)を有する。例えば、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をホスホ-6-マンノースに加水分解することのできるマンノシダーゼの生物活性断片は、配列番号8の第1~774番目の残基を含有することができる。

【0044】

キャップを外されかつ脱マンノシル化した標的分子を生成するために、本明細書に記載されるマンノシダーゼを使用することができる。上記方法は、インビトロまたはインビボで実施することができる。

【0045】

(糖タンパク質を脱マンノシル化する、または糖タンパク質のキャップを外しかつ脱マンノシル化する方法)

本明細書に記載されるとおり、リン酸化N-グリカン含有糖タンパク質は脱マンノシル化され得、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分を含有するリン酸化N-グリカン含有糖タンパク質は、該糖タンパク質を(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をマンノース-6-リン酸に加水分解することができかつ(ii) 末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および/もしくは α -1, 6マンノース結合または末端 α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マン

10

20

30

40

50

ノース部分、および／もしくは $\alpha-1$, 6マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させることによってキャップを外されかつ脱マンノシル化され得る。このようなマンノシダーゼの非限定例としては、*Canavalia ensiformis* (タチナタマメ (*Jack bean*)) マンノシダーゼおよび *Yarrowia lipolytica* マンノシダーゼ (例えば、AMS1) が挙げられる。タチナタマメマンノシダーゼおよび AMS1 マンノシダーゼの両方は、ファミリー38のグリコシドヒドラーゼである。

【0046】

タチナタマメマンノシダーゼは、例えば、Sigma-Aldrich (米国ミズーリ州セントルイス) から硫酸アンモニウム懸濁液 (カタログ番号M7257) およびプロテオミクス等級の調製物 (カタログ番号M5573) として市販されている。実施例8に記載するように、このような商業的調製物は、例えばホスファターゼのような混入物を除去するためにゲル濾過クロマトグラフィーによってさらに精製することができる。タチナタマメマンノシダーゼは、以下のアミノ酸配列NKIPRAGWQIDPFGHSAVQG (配列番号12) を有するセグメントを含有する。Howardら、*J. Biol. Chem.*、273 (4) : 2067-2072、1998を参照されたい。

【0047】

Yarrowia lipolytica AMS1 マンノシダーゼは組換え産生することができる。C末端もしくはN末端のポリヒスチジンタグを有するAMS1をコードする核酸配列を配列番号3および配列番号4にそれぞれ示す (図3Aおよび図3Bも参照されたい)。上記AMS1ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号5に示す (図3Cも参照されたい)。マンノシダーゼポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、標準的な技術によって生成することができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術は、本明細書に記載されるヌクレオチド配列を含有する単離された核酸を得るために使用することができる。PCRは、全ゲノムDNAまたは全細胞RNAに由来する配列を含む、DNAならびにRNAに由来する特定の配列を増幅するために使用することができる。一般的には、関心対象の領域の末端からのまたはそれを越えたところからの配列情報を使用して、増幅されるべきテンプレートの反対鎖と配列が同一または類似であるオリゴヌクレオチドプライマーを設計する。種々のPCR戦略も利用可能であり、該戦略によって、部位特異的ヌクレオチド配列改変は、テンプレート核酸へと導入することができる。単離された核酸は、単一の核酸分子として (例えば、ホスホルアミダイト技法を使用する3'から5'への方向における自動DNA合成を使用して)、または一連のオリゴヌクレオチドとしてのいずれかで、化学的に合成することもできる。例えば、オリゴヌクレオチド対がアニリングされる場合に二本鎖が形成されるよう、各対が相補性のある短いセグメント (例えば、約15ヌクレオチド) を含有する所望の配列を含有する、1対以上の長いオリゴヌクレオチド (例えば、100ヌクレオチド超) を合成することができる。DNAポリメラーゼを使用してオリゴヌクレオチドを伸長し、結果として、オリゴヌクレオチド対あたり単一の二本鎖核酸分子を生じ、それを次にベクターへと連結することができる。単離された核酸は、例えば、天然に存在するDNAの変異誘発によって得ることもできる。

【0048】

マンノシダーゼポリペプチドを組換え生成するために、マンノシダーゼポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーターを含有するベクターを使用する。本明細書で使用する場合、「プロモーター」は、遺伝子が転写されるようにすることができるDNA配列を指す。プロモーターは、RNAポリメラーゼによって認識され、そのRNAポリメラーゼが転写を開始する。したがって、プロモーターは、RNAポリメラーゼが直接結合するかまたはRNAポリメラーゼの動員に関与するかのいずれかであるDNA配列を含有する。プロモーター配列は、「エンハンサー領域」も含まれ得、該領域は、タンパク質 (すなわち、トランス作用因子であり、ほとんどが1群の転写因子のようである) と結合して遺伝子クラスターにおける遺伝子の転写レベルを高めることのできるDNAの1つ以上の領域 (したがって、その名前を有する) である。エンハンサーは、コード領域

10

20

30

40

50

の5'末端では典型的に、プロモーター配列とも異なることができる一方で、例えば、遺伝子のイントロン領域内または該遺伝子のコード領域に対して3'内にあることができる。

【0049】

本明細書で使用する場合、「作動可能に連結された」は、発現制御配列が関心対象のコード配列の発現を有効に制御するよう、遺伝子コンストラクト（例えば、ベクター）へと組み込まれることを意味する。

【0050】

発現ベクターは、コードされたポリペプチドの発現のために宿主細胞へと（例えば、形質転換またはトランスフェクションによって）導入したのち、精製することができる。マンノシダーゼポリペプチドの小規模または大規模な産生のために使用することのできる発現系は、上記核酸分子を含有する組換えバクテリオファージDNA発現ベクター、プラスミドDNA発現ベクター、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*））、および該核酸分子を含有する組換え真菌発現ベクターで形質転換された真菌（例えば、*S. cerevisiae*、*Yarrowia lipolytica*、*Arxula adeninivorans*、*Pichia pastoris*、*Hansenula polymorpha*、または*Aspergillus*のような微生物を含むが、これらに限定されない。有用な発現系は、上記核酸分子を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞系、および組換えウイルス発現ベクター（例えば、タバコモザイクウイルス）に感染させたまたは該核酸分子を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換した植物細胞系も含む。マンノシダーゼポリペプチドは、哺乳類細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）もしくは哺乳類ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーターおよびサイトメガロウイルスプロモーター）を含有する組換え発現コンストラクトを有する細胞（例えば、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ヒト胎児由来腎臓293細胞、および3T3 L1細胞のような不死化した細胞系）を含む哺乳類発現系を使用して産生することもできる。

【0051】

典型的には、組換えマンノシダーゼポリペプチドに、FLAG、ポリヒスチジン（例えば、ヘキサヒスチジン）、赤血球凝集素（hemagglutinin）（HA）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、またはマルトース結合タンパク質（MBP）のような異種性アミノ酸配列をタグ付けして、該タンパク質を精製するのを支援する。タンパク質を精製するための他の方法には、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性および逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性電荷誘導クロマトグラフィーなどのようなクロマトグラフィー技術が含まれる（例えば、Scopes、Protein Purification: Principles and Practice、第3版、Springer-Verlag、New York（1993）；BurtonおよびHarding、J. Chromatogr. A 814:71~81（1998）を参照されたい）。

【0052】

一部の実施形態においては、キャップを外す工程および脱マンノシル化する工程は、2つの異なる酵素によって触媒される。例えば、マンノース-1-ホスホ-6マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6マンノース部分のキャップを外す工程は、*Cellulosimicrobium cellulans*由来のマンノシダーゼ（例えば、CcMan5）を使用して実施することができる。シグナル配列を含有するCcMan5ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号7に示す。シグナル配列を有さないCcMan5ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号8に示す。CcMan5ポリペプチドをコードする核酸配列を配列番号6に示す。一部の実施形態においては、CcMan5ポリペプチドの生物活性断片を使用する。例えば、生物活性断片には、配列番号8に示すアミノ酸配列の

1～774番目の残基を含めることができる。国際公開第2011/039634号も参照されたい。CcMan5マンノシダーゼは、ファミリー92のグリコシドヒドロラーゼである。

【0053】

キャップを外された糖タンパク質の脱マンノシル化は、(*Aspergillus phoenicis*としても公知の)*Aspergillus satoii* (As)由来のマンノシダーゼまたは*Cellulosimicrobium cellulans*由来のマンノシダーゼ(例えば、CcMan4)を使用して触媒することができる。*Aspergillus satoii*マンノシダーゼは、ファミリー47のグリコシドヒドロラーゼであり、CcMan4マンノシダーゼは、ファミリー92のグリコシドヒドロラーゼである。*Aspergillus satoii*マンノシダーゼのアミノ酸配列を配列番号11(図22参照)に、およびGenBank受託番号第BAA08634号に示す。CcMan4ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号10に示す。配列番号9に示すヌクレオチド配列は、配列番号10のポリペプチドをコードする。

10

【0054】

キャップを外された糖タンパク質の脱マンノシル化は、*Canavalia ensiformis* (タチナタマメ)マンノシダーゼまたは*Yarrowia lipolytica*マンノシダーゼ(例えば、AMS1)のようなファミリー38のグリコシドヒドロラーゼ由来のマンノシダーゼを使用して触媒することもできる。例えば、CcMan5を使用して、糖タンパク質のマンノース-1-ホスホ-6マンノース部分のキャップを外すことができ、タチナタマメマンノシダーゼを使用して、キャップを外された糖タンパク質を脱マンノシル化することができる。

20

【0055】

脱マンノシル化した糖タンパク質、またはキャップを外されかつ脱マンノシル化した糖タンパク質を産生するために、マンノース-1-ホスホ-6マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6マンノース部分を含有する標的分子を、好適な条件下で、好適なマンノシダーゼ(複数可)と、および/または組換え産生した好適なマンノシダーゼ(複数可)を含有する細胞溶解産物と接触させる。好適なマンノシダーゼは上記している。細胞溶解産物は、真菌細胞、植物細胞、または動物細胞を含む、遺伝子操作した任意の細胞由来であることができる。動物細胞の非限定例としては、線虫、昆虫、植物、鳥類、爬虫類、および、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、アレチネズミ、イヌ、ネコ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、クジラ、サル、またはヒトのような哺乳類が挙げられる。

30

【0056】

標的分子(例えば、糖タンパク質)を、精製したマンノシダーゼおよび/または細胞溶解産物と接触させると、マンノース-1-ホスホ-6マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6マンノース部分は、ホスホ-6マンノースに加水分解することができる、そしてこのようなホスフェート含有グリカンの末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および/もしくは α -1, 6マンノース結合または末端 α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マンノース部分、および/もしくは α -1, 6マンノース部分は、加水分解され、キャップを外されかつ脱マンノシル化した標的分子を生成することができる。一部の実施形態においては、キャップを外す工程および脱マンノシル化する工程の両方を触媒する1つのマンノシダーゼを使用する。一部の実施形態においては、キャップを外す工程を触媒するために1つのマンノシダーゼを使用し、脱マンノシル化工程を触媒するために異なるマンノシダーゼを使用する。標的分子がキャップを外されかつ脱マンノシルしたかどうかを決定するために、実施例5に記載される方法を使用することができる。マンノシダーゼによる処理の後、標的分子を単離することができる。

40

【0057】

細胞溶解産物におけるマンノシダーゼ活性の活性度または完全性を保存する該細胞溶解産物を得るのに好適な方法には、該細胞溶解産物におけるN-グリコシル化活性の変化を保存または最小化する適切なバッファならびに/またはヌクレアーゼ阻害剤、プロテアー

50

ゼ阻害剤、およびホスファターゼ阻害剤を含む阻害剤の使用を含めることができる。このような阻害剤は例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、エチレングリコールビス（P-アミノエチルエーテル）N, N, N1, N1-四酢酸（EGTA）のようなキレート剤、フッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF）、アプロチニン、ロイペプチン、アンチパインなどのようなプロテアーゼ阻害剤、ならびにホスフェート、フッ化ナトリウム、バナデートなどのようなホスファターゼ阻害剤が挙げられる。酵素活性を含有する溶解産物を得るのに適切なバッファおよび条件は、例えば、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology（別冊47）、John Wiley & Sons、New York（1999）；HarlowおよびLane、Antibodies：A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press（1988）；HarlowおよびLane、Using Antibodies：A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press（1999）；Tietz、Textbook of Clinical Chemistry, 第3版、BurtisおよびAshwood編、W. B. Saunders、Philadelphia（1999）に記載されている。

【0058】

細胞溶解産物は適宜、干渉する物質の存在を除去または最小化するようにさらに処理することができる。所望の場合、細胞溶解産物は、細胞下分画（subcellular fractionation）、およびイオン交換クロマトグラフィー、疎水性および逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性電荷誘導クロマトグラフィーなどのようなクロマトグラフィー技術を含む、当業者に周知の種々の方法によって分画することができる。

【0059】

一部の実施形態においては、細胞溶解産物は、細胞小器官全体が無傷および／または機能的であるままで調製することができる。例えば、溶解産物は、無傷の粗面小胞体、無傷の滑面小胞体、または無傷のゴルジ装置のうちの1つ以上を含有することができる。無傷の細胞小器官を含有する溶解産物を調製して、該小器官の機能性について試験するのに好適な方法は、例えば、Moreauら（1991）J. Biol. Chem. 266（7）：4329～4333；Moreauら（1991）J. Biol. Chem. 266（7）：4322～4328；Rexachら（1991）J. Cell Biol. 114（2）：219～229；およびPaulikら（1999）Arch. Biochem. Biophys. 367（2）：265～273に記載されている。

【0060】

標的分子は、本明細書で使用する場合、（i）末端マンノース-1-ホスホ-6マンノース結合もしくは末端マンノース-1-ホスホ-6マンノース部分を含有する任意の分子、（ii）真菌起源の細胞において発現する場合、マンノース-1-ホスホ-6マンノース結合もしくはマンノース-1-ホスホ-6マンノース部分を含有する任意の分子、（iii）ホスフェートを含有するグリカンの末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および／もしくは α -1, 6マンノース結合、または末端 α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マンノース部分、および／もしくは α -1, 6マンノース部分を含有する任意の分子、あるいは（iv）真菌起源の細胞において発現する場合、ホスフェートを含有するグリカンの末端 α -1, 2マンノース結合、 α -1, 3マンノース結合、および／もしくは α -1, 6マンノース結合、または末端 α -1, 2マンノース部分、 α -1, 3マンノース部分、および／もしくは α -1, 6マンノース部分を含有する任意の分子を指す。一部の実施形態においては、標的タンパク質は、ヒト糖タンパク質である。好適な標的タンパク質には、破傷風トキソイドまたはジフテリア（diphtheria）トキソイドのような病原体タンパク質；サイトメガロウイルス（CMV）糖タンパク質B、H、およびgCII、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）エンベロープ糖タンパク質、ラウス肉腫ウイルス（RSV）エンベロープ糖タンパク質、単純ヘルペスウイル

ス (H S V) エンベロープ糖タンパク質、エプスタイン・バーウイルス (E B V) エンベロープ糖タンパク質、水痘帯状疱疹ウイルス (V Z V) エンベロープ糖タンパク質、ヒトパピローマウイルス (H P V) エンベロープ糖タンパク質、インフルエンザウイルス糖タンパク質、ならびに肝炎ファミリー表面抗原のようなウイルス表面タンパク質、リソソームタンパク質 (例えば、酸性 α グルコシダーゼ、 α ガラクトシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、セレブロシダーゼ、またはガラクトセレブロシダーゼ)、インスリン、グルカゴン、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、ならびにこれらの抗体または断片を挙げることができる。増殖因子には、例えば、血管内皮増殖因子 (V E G F)、インスリン様増殖因子 (I G F)、骨形態形成因子 (B M P)、顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)、神経成長因子 (N G F)、ニューロトロフィン、血小板由来増殖因子 (P D G F)、エリトロポエチン (E P O)、トロンボポエチン (T P O)、ミオスタチン (G D F - 8)、増殖分化因子 9 (G D F 9)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F または F G F 2)、上皮増殖因子 (E G F)、肝細胞増殖因子 (H G F) が含まれる。サイトカインには、例えば、I L - 1 ~ I L - 3 3 (例えば、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 10、I L - 12、I L - 13、または I L - 15) のようなインターロイキンが含まれる。ケモカインには、例えば、I - 309、T C A - 3、M C P - 1、M I P - 1 α 、M I P - 1 β 、R A N T E S、C 10、M R P - 2、M A R C、M C P - 3、M C P - 2、M R P - 2、C C F 18、M I P - 1 γ 、エオタキシン、M C P - 5、M C P - 4、N C C - 1、C k β 10、H C C - 1、ロイコタクチン - 1、L E C、N C C - 4、T A R C、P A R C、またはエオタキシン - 2 が含まれる。腫瘍糖タンパク質 (例えば、腫瘍関連抗原)、例えば、がん胎児性抗原 (C E A)、ヒトムチン、H E R - 2 / n e u、および前立腺特異抗原 (P S A) も含まれる [H e n d e r s o n および F i n n, A d v a n c e s i n I m m u n o l o g y, 62, p p. 217 ~ 56 (1996)]。

【0061】

一部の実施形態においては、標的タンパク質は、リソソーム蓄積障害と関連したものであることができ、該標的タンパク質は、例えば酸性 α グルコシダーゼ、 α ガラクトシダーゼ、 α - L - イズロニダーゼ、 β - D - ガラクトシダーゼ、 β - グルコシダーゼ、 β - ヘキソサミニダーゼ、 β - D - マンノシダーゼ、 α - L - フコシダーゼ、アリールスルファターゼ B、アリールスルファターゼ A、 α - N - アセチルガラクトサミニダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ、 α - グルコサミニド - N - アセチルトランスフェラーゼ、 β - D - グルクロニダーゼ (g l u c o r o n i d a s e)、ヒアルロニダーゼ、 α - L - マンノシダーゼ、 α - ノイラミニダーゼ、ホスホトランスフェラーゼ、酸性リパーゼ、酸性セラミダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、チオエステラーゼ、カテプシン K、およびリポタンパク質リパーゼを含む。

【0062】

一部の実施形態においては、標的タンパク質は、それが別のポリペプチド配列に、またはポリマー、キャリア、アジュバント、免疫毒素、もしくは検出可能な (例えば、蛍光、発光、または放射性) 部分に融合した融合タンパク質である。例えば、標的タンパク質は、低分子タンパク質の分子量を増加させるために、および/または循環滞留時間を延長するために、ポリエチレングリコールのようなポリマーに結合することができる。

【0063】

哺乳類細胞の、キャップを外されかつ脱マンノシル化したホスフェート N - グリカン含有する標的分子と接触すると、標的分子は、哺乳類細胞 (例えば、ヒト細胞) の内部へ輸送され得る。キャップを外されたが脱マンノシル化していないリン酸化 N - グリカン含有する糖タンパク質は、哺乳類細胞のマンノース - 6 - リン酸受容体を実質的に結合せず、それ自体、該細胞の内部へと効率的に輸送されない。本明細書で使用する場合、「実質的に結合しない」とは、哺乳類細胞のマンノース - 6 - リン酸受容体に糖タンパク質分子の 15 % 未満 (例えば、14 % 未満、12 %、10 %、8 %、6 %、4 %、2 %、1 %、

10

20

30

40

50

0.5%、またはそれより小、または0%)が結合することを意味する。しかしながら、基礎をなすマンノースがリン酸化される場合にこのような糖タンパク質が、末端 α -1,2マンノース結合または末端 α -1,2マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼと接触すれば、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合しかつ該細胞の内部へ効率よく輸送される脱マンノシル化した糖タンパク質が生成される。本明細書で使用する場合、「実質的に結合する」とは、糖タンパク質分子の15%以上(例えば、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%よりも大)が哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に結合することを意味する。リン酸化N-グリカンのキャップを外すが脱マンノシル化しない酵素を含有する調製物(例えば、組換え宿主細胞または無細胞調製物)に、リン酸化N-グリカンを経由して脱マンノシル化する酵素が混入し得ることは理解される。このような調製物との接触後の標的タンパク質試料は、キャップを外されるだけの一部のリン酸化N-グリカンを経由して有するタンパク質分子、およびキャップを外されかつ脱マンノシル化したその他のリン酸化N-グリカンを経由して有するタンパク質分子を含有することができる。キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを経由して含有する天然の上記タンパク質分子は、マンノース-6-リン酸受容体に実質的に結合することができる。「実質的に結合しない」に関する上の定義は、タンパク質分子におけるリン酸化N-グリカンが、キャップを外されたが脱マンノシル化していないことを特徴とすることができないので、このような標的タンパク質試料に適用されない。

【0064】

実施例9および実施例12に示すように、キャップを外されかつ脱マンノシル化した標的分子は、キャップを外されたリン酸化N-グリカンを経由して含有する標的分子よりも、哺乳類細胞によって効率よく取り込まれる。例えば、キャップを外されかつ脱マンノシル化した標的分子は、キャップを外されていない糖タンパク質よりも少なくとも10倍(例えば、少なくとも15、20、25、または30倍)効率的に取り込まれ得る。

【0065】

したがって、本文書は、糖タンパク質を、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に結合しない第一の形態から、哺乳類細胞のマンノース-6-リン酸受容体に結合する第二の形態へ変換する方法を提供する。第一の形態においては、糖タンパク質は、6位にリン酸残基を含有するマンノース残基に1位で結合する1つ以上のマンノース残基を含有する1つ以上のN-グリカンを含む。このような方法においては、第一の形態の糖タンパク質は、末端マンノース残基を経由して脱マンノシル化するマンノシダーゼと接触して、6位にホスフェートを含有するマンノースを経由して生じ、末端マンノースとなる。一部の実施形態においては、該マンノシダーゼは、キャップを外す活性も脱マンノシル化活性も有する(例えば、*Canavalia ensiformis* (タチナタマメ (Jack bean)) マンノシダーゼまたは*Yarrowia lipolytica* AMS1マンノシダーゼ)。一部の実施形態においては、上記マンノシダーゼは、キャップを外す活性を有さない(例えば、*Aspergillus satoi*由来のマンノシダーゼまたは*Cellulosimicrobium cellulans*由来のマンノシダーゼ(例えば、CcMan4))。

【0066】

糖タンパク質の細胞の内部への輸送は、実施例9に示す細胞取り込みアッセイのような細胞取り込みアッセイを使用して評価することができる。例えば、キャップを外されかつ脱マンノシル化したリン酸化N-グリカンを経由して含有する哺乳類細胞および標的分子をインキュベートし、次に、細胞を洗浄および溶解することができる。細胞溶解産物は、標的分子の存在について(例えば、ウェスタンブロット法によって)、または細胞溶解産物における標的分子の活性によって評価することができる。例えば、標的分子がヒト α グルコシダーゼのようなグルコシダーゼである場合、取り込みは、酸性 α グルコシダーゼ活性を欠損する線維芽細胞において評価することができる。 α グルコシダーゼの細胞内活性は、4-

メチルウンベリフェリル- α -D-グルコピラノシド (4-MUG) アッセイを使用して評価することができる。実施例 3 を参照されたい。グルコシダーゼによる基質 4-MUG の切断は、蛍光原性産物 4-MU の生成をもたらし、4-MU は、紫外光による照射によって視覚化または検出することができる。

【0067】

(糖タンパク質のキャップを外しかつ脱マンノシル化するインビボでの方法)

本明細書に記載される遺伝子操作された細胞は、キャップを外されかつ脱マンノシル化した標的分子を産生するために使用することができる。例えば、細胞を基にした方法は、マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をホスホ-6-マンノースに加水分解することのできるマンノシダーゼをコードする核酸を含むよう遺伝子操作された真菌細胞に標的分子をコードする核酸を導入する工程であって、ここで、該細胞は、キャップを外されたリン酸化N-グリカンを含む標的分子を産生する工程を含むことができる。このようなリン酸化N-グリカンは、上に記載したとおり脱マンノシル化され得る。細胞を基にした別の方法は、(i) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース部分をホスホ-6-マンノースに加水分解することのできる工程と、(ii) ホスフェート含有グリカンの末端 α -1, 2 マンノース結合、 α -1, 3 マンノース結合、および/もしくは α -1, 6 マンノース結合または末端 α -1, 2 マンノース部分、 α -1, 3 マンノース部分、および/もしくは α -1, 6 マンノース部分を加水分解することのできるマンノシダーゼをコードする核酸を含むよう遺伝子操作された真菌細胞に標的分子をコードする核酸を導入する工程であって、ここで、該細胞は、キャップを外されかつ脱マンノシル化した標的分子を産生する工程を含むことができる。一部の実施形態においては、上記マンノシダーゼおよび標的分子をコードする核酸は、該マンノシダーゼおよび標的分子が共分泌されるよう、分泌配列を含む。

【0068】

本明細書に記載される遺伝子操作された細胞は、マンノシダーゼをコードする核酸を含む。標的分子のインビボでの産生に好適な細胞は、

【0069】

【化3】

Yarrowia lipolytica, *Arxula adeninivorans*、メチロトロフの酵母 (*Candida*, *Hansenula*, *Oogataea*, *Pichia* または *Torulopsis* 属のメチロトロフの酵母など) または *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium* または *Chrysosporium* 属の糸状菌を含む真菌起源のものであることができる。例示的な真菌種としては、

Pichia anomala, *Pichia bovis*, *Pichia canadensis*, *Pichia carsonii*, *Pichia farinose*, *Pichia fermentans*, *Pichia fluxuum*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida valida*, *Candida albicans*, *Candida ascalaphidarum*, *Candida amphixiae*, *Candida Antarctica*, *Candida atlantica*, *Candida atmosphaerica*, *Candida blattae*, *Candida carpophila*, *Candida cerambycidarum*, *Candida chauliodes*, *Candida corydalis*, *Candida dosseyi*, *Candida dubliniensis*, *Candida ergatensis*, *Candida fructus*, *Candida*

【0070】

【化 4】

glabrata, *Candida fermentati*, *Candida guilliermondii*, *Candida haemulonii*, *Candida insectamens*, *Candida insectorum*, *Candida intermedia*, *Candida jeffresii*, *Candida kefir*,
Candida krusei, *Candida lusitanae*, *Candida lyxosophila*, *Candida maltosa*, *Candida membranifaciens*, *Candida milleri*, *Candida oleophila*, *Candida oregonensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida quercitrusa*, *Candida shehatei*, *Candida temnochilae*, *Candida tenuis*, *Candida tropicalis*, *Candida tsuchiyae*, *Candida sinolaborantium*, *Candida sojae*,
Candida viswanathii, *Candida utilis*, *Oogataea minuta*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia silvestris*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia chodati*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia menbranaefaciens*, *Pichia minuscule*, *Pichia pastoris*, *Pichia pseudopolymorpha*, *Pichia quercuum*, *Pichia robertsii*, *Pichia saitoi*, *Pichia silvestrisi*, *Pichia strasburgensis*, *Pichia terricola*, *Pichia vanriji*, *Pseudozyma Antarctica*, *Rhodospiridium toruloides*,
Rhodotorula glutinis, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces momdshuricus*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces exiguous*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces mellis*, *Saccharomyces rosei*,
Saccharomyces rouxii, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces willianus*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Saccharomycopsis capsularis*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Endomyces hordei*, *Endomycopsis fobuligera*. *Saturnispora saitoi*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces dairensis*,
Torulaspora delbrueckii, *Torulaspora fermentati*, *Saccharomyces fermentati*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulaspora rosei*, *Saccharomyces rosei*, *Torulaspora delbrueckii*,
Saccharomyces rosei, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Zygosaccharomyces mongolicus*, *Dorulaspora globosa*, *Debaryomyces globosus*, *Torulopsis globosa*, *Trichosporon cutaneum*,
Trigonopsis variabilis, *Williopsis californica*, *Williopsis saturnus*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Debaryomyces disporua*. *Saccharomyces bisporas*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Saccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces mellis*, *Zygosaccharomyces priorianus*, *Zygosaccharomyces rouxiim*, *Zygosaccharomyces*

【 0 0 7 1 】

【化 5】

rouxii, *Zygosaccharomyces barkeri*, *Saccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces rouxii*,
Zygosaccharomyces major, *Saccharomyces rousii*, *Pichia anomala*, *Pichia bovis*, *Pichia*
Canadensis, *Pichia carsonii*, *Pichia farinose*, *Pichia fermentans*, *Pichia fluxuum*, *Pichia*
membranaefaciens, *Pichia pseudopolymorpha*, *Pichia quercuum*, *Pichia robertsii*,
Pseudozyma Antarctica, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodospiridium toruloides*,
Rhodotorula glutinis, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces*
bisporus, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces*
delbrueckii, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomycodes*
ludwigii, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Torulaspora*
delbrueckii, *Torulaspora globosa*, *Trigonopsis variabilis*, *Williopsis californica*,
Williopsis saturnus, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces mellis*, または
Zygosaccharomyces rouxii が挙げられるが、それらに限定されない。例示的な糸状菌
 としては、*Aspergillus caesiellus*, *Aspergillus candidus*,
Aspergillus carneus, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus deflectus*, *Aspergillus flavus*,
Aspergillus fumigatus, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*,
Aspergillus ochraceus, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus*
penicilloides, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus*
tamari, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, または *Aspergillus versicolor* が挙げられるが、
 それらに限定されない *Aspergillus* の種々の種が挙げられる。

10

20

【0072】

このような細胞は、本明細書に記載されるような遺伝子操作の前に、種々の商業的供給源
 および研究資源施設（例えば、米国培養細胞系統保存機関（米国メリーランド州ロックヴ
 ィルなど）から得ることができる。標的分子には、本明細書に記載される任意の標的タン
 パク質などのタンパク質が含まれる（上を参照されたい）。

30

【0073】

細胞の遺伝子操作は、マンノシダーゼをコードする外来性核酸に加えて、（i）外側鎖
 伸長（OCH1）タンパク質をコードする内在性遺伝子の欠失、（ii）マンノシルリン
 酸化を促進してマンノース残基のリン酸化を増大させることができるポリペプチド（例え
 ば、*Yarrowia lipolytica*、*S. cerevisiae*、*Ogataea minuta*、*Pichia pastoris*、もしくは *C. albicans* に
 由来する MNN4 ポリペプチド、または *P. pastoris* に由来する PNO1 ポリペ
 プチド）をコードする組換え核酸の導入、（iii）OCH1 タンパク質の機能的発現に
 干渉する RNA 分子の導入または発現、（iv）N-グリコシル化活性を有する野生型（
 例えば、内在性または外来性）タンパク質をコードする（すなわち、N-グリコシル化活
 性を有するタンパク質を発現する）組換え核酸の導入、（v）上記の標的分子をコードす
 る組換え核酸の導入、あるいは（v）N-グリコシル化活性を有するタンパク質をコード
 する 1 つ以上の内在性遺伝子のプロモーターエレメントまたはエンハンサーエレメントを
 変更し、したがってそれらのコードタンパク質の発現を変更などの 1 種類以上の遺伝子
 改変を含むことができる。RNA 分子は、例えば、低分子干渉 RNA（siRNA）、低
 分子ヘアピン型 RNA（shRNA）、アンチセンス RNA、またはマイクロ RNA（miRNA）
 が含まれる。遺伝子操作には、N-グリコシル化活性を有して、付加（例えば
 、異種性配列）、欠失、または置換（例えば、点変異のような変異、保存的変異または非

40

50

保存的変異)を有するタンパク質を産生するタンパク質をコードする内在性遺伝子を変更することも含まれる。変異は、(例えば、部位特異的変異誘発または相同組換えによって)特異的に導入することができ、または無作為に導入することができる(例えば、細胞は、例えばNewmanおよびFerro-Novick(1987)J. Cell Biol. 105(4):1587)に記載されるように化学的に変異誘発され得る)。

【0074】

本明細書に記載される遺伝子改変は結果的に、(i)遺伝子改変細胞における1種類以上の活性の増大、(ii)遺伝子改変細胞における1種類以上の活性の低下、または(iii)遺伝子改変細胞における1種類以上の活性の局在性もしくは細胞内分布の変化、のうちの1つ以上を生じることができる。特定の活性の量の増大(例えば、マンノシルリン酸化を促進すること)は、マンノシルリン酸化を促進することのできる1種類以上のタンパク質を過剰発現させること、内在性遺伝子のコピー数の増加(例えば、遺伝子重複)、または内在性遺伝子によってコードされるタンパク質の発現の増大を刺激する該遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの変更によることができる。1種類以上の特定の活性の低下は、変異体形態(例えば、ドミナントネガティブ形態)の過剰発現、特定の活性を有する1種類以上のタンパク質の発現を低下させる1種類以上の干渉性RNA分子の導入もしくは発現、または特定の活性を有するタンパク質をコードする1種類以上の内在性遺伝子の欠失によることができる。

【0075】

相同組換えによって遺伝子を破壊させるために、「遺伝子置換」ベクターは、選択可能なマーカー遺伝子を含むような方法で構築することができる。選択可能なマーカー遺伝子は、5'末端および3'末端の両方で、相同組換えを仲介するのに十分な長さの遺伝子の部分に作動可能に連結され得る。選択可能なマーカーは、URA3遺伝子、LEU2遺伝子、およびHIS3遺伝子を含む、宿主細胞栄養要求性を補完するかまたは抗生物質耐性を提供するかのいずれかである任意の数の遺伝子のうちの1つであることができる。他の好適な選択可能なマーカーには、酵母細胞に対してクロラムフェニコール耐性を与えるCAT遺伝子、またはβ-ガラクトシダーゼの発現による青色コロニーを結果として生じるlacZ遺伝子が挙げられる。次に、遺伝子置換ベクターの線状化DNA断片を、当該技術分野で周知の方法を使用して上記細胞へと導入する(下記を参照されたい)。その線状断片のゲノムへの組込みおよび上記遺伝子の破壊は、選択マーカーを基にして決定することができ、例えば、サザンブロット分析によって実証することができる。選択可能なマーカーは、例えばCre-loxPシステムによって宿主細胞のゲノムから除去することができる(下記を参照されたい)。

【0076】

あるいは、遺伝子置換ベクターは、破壊されるべき遺伝子の一部を含むような方法で構築することができ、該一部は、任意の内在性遺伝子プロモーター配列がまったくなく、かつ該遺伝子のコード配列のいずれもコードせず、または該コード配列の不活性断片をコードする。「不活性断片」とは、上記遺伝子の全長のコード配列から生成されるタンパク質の活性の例えば約10%未満(例えば、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、または0%)を有するタンパク質をコードする遺伝子の断片である。上記遺伝子のこのような一部を、公知のプロモーター配列が該遺伝子配列に作動可能に連結されないものの、終止コドンおよび転写終結配列が該遺伝子配列の一部に作動可能に連結されるような方法で、ベクターに挿入する。このベクターはその後、遺伝子配列の一部において線状化し、細胞へと形質転換することができる。単一の相同組換えによって、この線状化ベクターを次に、上記遺伝子の内在性対応物に組み込む。

【0077】

発現ベクターは、自律的または組込み型であることができる。組換え核酸(例えばマンノシダーゼをコードする組換え核酸)は、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、またはウイルス粒子のような発現ベクターの形態で細胞へと導入することができる

。組換え核酸は、染色体外で維持することができ、または酵母細胞染色体DNAへと組み込むことができる。発現ベクターは、所望の核酸で形質転換した細胞の検出および／または選択を可能にするために、選択された条件下で細胞生存度に必要なタンパク質をコードする選択マーカー遺伝子（例えば、ウラシル生合成に必要な酵素をコードするURA3、またはトリプトファン生合成に必要な酵素をコードするTRP1）を含有することができる（例えば、米国特許第4,704,362号を参照されたい）。発現ベクターには、自律複製配列（ARS）も含めることができる。例えば、米国特許第4,837,148号は、*Pichia pastoris*におけるプラスミドを維持するのに好適な手段を提供する自律複製配列を記載している。

【0078】

統合型ベクターは、例えば、米国特許第4,882,279号において開示されている。統合型ベクターには一般的に、少なくとも1つの第一の挿入可能なDNA断片、1つの選択可能なマーカー遺伝子、および1つの第二の挿入可能なDNA断片からなる連続的に配置された配列が含まれる。第一および第二の挿入可能なDNA断片は各々、長さ約200（例えば、約250、約300、約350、約400、約450、約500、または約1000、またはそれより長い）ヌクレオチドであり、かつ形質転換されるべき種のゲノムDNAの部分に対して相同的であるヌクレオチド配列を有する。発現のための関心対象の遺伝子（例えば、N-グリコシル化活性を有するタンパク質をコードする遺伝子）を含有するヌクレオチド配列は、マーカー遺伝子の前であろうと後であろうと、このベクターにおいて、第一の挿入可能なDNA断片と第二の挿入可能なDNA断片の間に挿入される。統合型ベクターは、関心対象のヌクレオチド配列の宿主細胞ゲノムへの組込みを促進するために、酵母形質転換前に線状化され得る。

【0079】

発現ベクターは、酵母（例えば、*Yarrowia lipolytica*、*Arxula adeninivorans*、*P. pastoris*、または他の好適な真菌種）プロモーターの制御下での組換え核酸の特色をなすことができ、該プロモーターによって、真菌細胞において発現することができる。好適な酵母プロモーターには、例えば、ADC1プロモーター、TP11プロモーター、ADH2プロモーター、hp4dプロモーター、POXプロモーター、およびGal10プロモーターが含まれる（例えば、Guarenteら（1982）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79（23）：7410を参照されたい）。追加の好適なプロモーターは、例えば、ZhuおよびZhang（1999）*Bioinformatics* 15（7～8）：608～611ならびに米国特許第6,265,185号に記載されている。

【0080】

プロモーターは、構成的または誘導性（条件的）であることができる。構成的プロモーターは、標準的な培養条件下で発現が一定であるプロモーターであると理解されている。誘導性プロモーターとは、1つ以上の誘導指示（*Cue*）に対して応答性であるプロモーターである。例えば、誘導性プロモーターは、化学的に調節されることができ（例えば、アルコール、テトラサイクリン、ステロイド、金属、または他の低分子のような化学的誘導剤の存在または不在によってその転写活性が調節されるプロモーター）、または物理的に調節され得る（例えば、光または高温もしくは低温のような物理的誘導因子の存在または不在によってその転写活性が調節されるプロモーター）。誘導性プロモーターは、化学的指示または物理的指示によってそれ自体が直接的に調節される1種類以上の転写因子によって間接的に調節されることもできる。

【0081】

遺伝子操作された他の改変も条件的であることができることは理解される。例えば、遺伝子は、例えばCre-loxP系のような部位特異的DNA組換え酵素を使用して、条件的に欠失させることができる（例えば、Gossenら（2002）*Ann. Rev. Genetics* 36：153～173および米国特許出願公開第20060014264号を参照されたい）。

10

20

30

40

50

【0082】

組換え核酸は、スフェロプラスト技術または全細胞塩化リチウム酵母形質転換法のような種々の方法を使用して、本明細書に記載された細胞へと導入することができる。プラスミドまたは線状核酸ベクターの細胞への形質転換に有用な他の方法は、例えば、米国特許第4,929,555号、Hinnenら(1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75:1929、Itoら(1983) *J. Bacteriol.* 153:163、米国特許第4,879,231号、およびSreekrishnaら(1987) *Gene* 59:115に記載されており、これらの各々の開示は、それらのすべての内容が全体として引用により本明細書に組み込まれている。電気穿孔法およびPEG1000全細胞形質転換法も、CreggおよびRussel、*Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols*、第3章、Humana Press、Totowa、N. J.、pp. 27~39(1998)に記載されているとおり使用してもよい。

10

【0083】

形質転換した真菌細胞は、新たな表現型の選択および検出のために(細胞の栄養要求性により)必要とされる生化学的産物の不在下で形質転換後に栄養要求性細胞を培養すること、または形質転換体に含有される耐性遺伝子の不在下で酵母に対して毒性のある抗生物質の存在下で培養することを含むがこれらに限定されない適切な技術を使用することによって選択することができる。形質転換体は、例えばサザンブロットまたはPCR分析によって評価することのできる、ゲノムへの発現カセットの組込みによって選択および/または

20

【0084】

ベクターを関心対象の標的細胞に導入する前に、ベクターは、上に記載したとおり、大腸菌(*E. coli*)のような細菌細胞において増殖させる(例えば、増幅させる)ことができる。ベクターDNAは、ベクターDNAの細菌環境からの精製を結果として生じる、当該技術分野で公知の方法のうちの何らかによって、細菌細胞から単離することができる。精製されたベクターDNAは、大腸菌タンパク質が哺乳類細胞に対して毒性であることができるので、これらのタンパク質がプラスミドDNA調製物中に存在しないことを確保するために、フェノール、クロロホルム、およびエーテルで徹底的に抽出することができる。

30

【0085】

一部の実施形態においては、遺伝子操作された真菌細胞は、OCH1遺伝子またはその遺伝子産物(例えば、mRNAまたはタンパク質)を欠いており、OCH1活性を欠損している。一部の実施形態においては、遺伝子操作された細胞は、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチド(例えば、*Yarrowia lipolytica*、*S. cerevisiae*、*Ogataea minuta*、*Pichia pastoris*、もしくは*C. albicans*に由来するMNN4ポリペプチド、または*P. pastoris*に由来するPNO1ポリペプチド)を発現する。例えば、真菌細胞は、*Y. lipolytica*由来のMNN4ポリペプチド(Genbank(登録商標)受託番号:XM_503217、Genolevures参照コード:YALI0D24101g)を発現することができる。一部の実施形態においては、遺伝子操作された細胞は、OCH1活性を欠損しており、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドを発現する。

40

【0086】

キャップを外しかつ脱マンノシル化の後、標的分子は単離することができる。一部の実施形態においては、標的分子は、酵母細胞内で維持され、細胞溶解の際に放出される。一部の実施形態においては、標的分子は、上記細胞からの該分子の分泌を誘導する、(外来性核酸に対して天然であるかまたは発現ベクターへと操作されるかのいずれかである)コード配列によって提供される機序を介して培養培地へと分泌される。細胞溶解産物または培養培地中のキャップを外されかつ脱マンノシル化した標的分子の存在は、該分子の存在

50

を検出するための種々の標準的なプロトコルによって実証することができる。例えば、変更した標的分子がタンパク質である場合、このようなプロトコルは、変更した標的タンパク質に特異的な抗体（または該標的タンパク質自体）を使用するイムノブロッティングまたは放射性免疫沈降、変更した標的タンパク質に特異的なリガンド（または該標的タンパク質自体）の結合、または変更した標的タンパク質（または該標的タンパク質自体）の酵素の比活性についての試験が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0087】

一部の実施形態においては、単離後に、キャップを外されかつ脱マンノシル化した標的分子は、例えば酵素的手段または化学的手段を使用して異種性部分に結合することができる。「異種性部分」は、変更した標的分子に（例えば、共有結合でまたは非共有結合で）結合した任意の構成要素を指し、該構成要素は、変更した標的分子に元々存在する構成要素とは異なる。異種性部分には、例えばポリマー、キャリア、アジュバント、免疫毒素、または検出可能な（例えば、蛍光、発光、または放射性）部分を含む。一部の実施形態においては、追加のN-グリカン、または変更した標的分子に付加することができる。

【0088】

標的分子のグリコシル化を検出するための方法には、DNAシーケンサー支援型（DSA）、フルオロフォア支援型炭水化物電気泳動（FACE）または表面支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析法（SELDI-TOF MS）が挙げられる。例えば、分析は、例えば糖タンパク質を変性させた後に、例えばメンブラン上へ固定化するDSA-FACEを利用することができる。上記糖タンパク質は次に、ジチオトレイトール（DTT）またはβ-メルカプトエタノールのような好適な還元剤を用いて還元することができる。上記タンパク質のスルフヒドリル基は、ヨード酢酸のような酸を使用してカルボキシ化することができる。次に、N-グリカンは、N-グリコシダーゼFのような酵素を使用して該タンパク質から放出することができる。N-グリカンは必要に応じて、還元アミノ化によって再構成および誘導体化することができる。誘導体化したN-グリカンは次に濃縮することができる。N-グリカン分析に好適な計測手段には、例えば、ABI PRISM（登録商標）377 DNAシーケンサー（Applied Biosystems）が含まれる。データ分析は、例えばGENESCAN（登録商標）3.1ソフトウェア（Applied Biosystems）を使用して実施することができる。単離されたマンノプロテインは、そのN-グリカン状態を確認するために、仔ウシ腸ホスファターゼのような1種類以上の酵素を使用してさらに処理することができる。N-グリカン分析の追加の方法には、例えば、質量分析（例えば、MALDI-TOF-MS）、順相、逆相における高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）、およびイオン交換クロマトグラフィー（例えば、グリカンが標識されていない場合にはパルス電流検出を使用し、グリカンが適切に標識されている場合、紫外吸収または蛍光を使用する）が含まれる。Callaertら（2001）Glycobiology 11（4）：275～281、およびFreireら（2006）Bioconj. Chem. 17（2）：559～564も参照されたい。

【0089】

（操作された細胞の培養物）

本文書は、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞のうちの任意の実質的に純粋な培養物も提供する。本明細書において使用する場合、遺伝子操作された細胞の「実質的に純粋な培養物」とは、該培養物における生細胞の総数の約40%未満（すなわち、約35%未満、約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約2%未満、約1%未満、約0.5%未満、約0.25%未満、約0.1%未満、約0.01%未満、約0.001%未満、約0.0001%未満、またはさらにより小）が遺伝子操作された細胞、例えば細菌細胞、真菌細胞（酵母を含む）、マイコプラズマ細胞、または原生動物細胞以外の生細胞である。本文脈における用語「約」とは、関連した百分率が、指定された百分率の15%ほど指定された百分率を上回るまたは下回ることができることを意味する。したがって、例えば、約20%とは、17%～23%である

ことができる。遺伝子操作された細胞のこのような培養物には、細胞および、増殖媒体、保存媒体、または輸送媒体が含まれる。媒体は、液体、半固形（例えば、ゼラチン媒体）、または凍結であることができる。上記培養物には、液体または半固形媒体で増殖する細胞、または、凍結保存媒体または輸送媒体を含む保存媒体または輸送媒体中で保存または輸送される細胞が含まれる。上記培養物は、培養容器または保存容器または基材（例えば、培養皿、培養フラスコ、もしくは培養チューブ、または保存バイアルもしくは保存チューブ）の中にある。

【0090】

本明細書に記載される遺伝子操作された細胞は、例えば、凍結した細胞懸濁液として、例えば、グリセロールまたはスクロースのような凍結保護物質を含有するバッファ中に、凍結乾燥した細胞として保存することができる。あるいは、上記細胞は、例えば、流動床乾燥もしくは噴霧乾燥、または任意の他の好適な乾燥方法によって得られる乾燥した細胞調製物として保存することができる。

【0091】

（代謝障害）

キャップを外されかつ脱マンノシル化した分子は、種々の代謝障害を処置するために使用することができる。代謝障害とは、個々のヒト（または動物）細胞内でのエネルギー産生に影響する障害である。ほとんどの代謝障害は遺伝性であるが、一部は、食事、毒素、感染症などの結果として「後天的」であることができる。遺伝性代謝障害は、先天性代謝異常としても公知である。一般に、遺伝性代謝障害は、細胞の代謝過程における一部のプロセスに必要な酵素を失うことまたは不適切に構成されることを結果的に生じる遺伝的欠陥に起因する。最大のクラスの代謝障害は、炭水化物代謝の障害、アミノ酸代謝の障害、有機酸代謝の障害（有機酸性尿）、脂肪酸酸化およびミトコンドリア代謝の障害、ポルフィリン代謝の障害、プリン代謝もしくはピリミジン代謝の障害、ミトコンドリア機能におけるステロイド代謝障害の障害、ペルオキシソーム機能の障害、およびリソソーム蓄積障害（LSD）である。

【0092】

キャップを外されかつ脱マンノシル化した1つ以上の分子（または該分子の薬学的組成物）の投与によって処置することのできる代謝障害の例としては、遺伝性ヘモクロマトーシス、眼皮膚型白皮症、プロテインC欠乏症、遺伝性血管性浮腫I型、先天性スクラーゼイソマルターゼ欠損症、クリグラー・ナジャーII型、ラロン症候群、遺伝性ミエロペルオキシダーゼ、原発性甲状腺機能低下症、先天性QT延長症候群、チロキシン結合グロブリン欠損症、家族性高コレステロール血症、家族性乳糜血症、無ベータリポタンパク血症（*abeta-lipoproteinemia*）、低い血漿リポタンパク質Aレベル、肝損傷を伴う遺伝性気腫、先天性甲状腺機能低下症、骨形成不全症、遺伝性低フィブリノゲン血症、 $\alpha 1$ -アンチキモトリプシン欠損症、腎性尿崩症、神経下垂体性尿崩症、アデノシンデアミナーゼ欠損症、ペリツェウス・メルツバッハー病、フォンウィルブランド病IIA型、複合第V因子・第VII因子欠損症、遅発性脊椎骨端異形成、コロイデレミア、I細胞病、バッテン病、毛細管拡張性運動失調、ADPKDすなわち常染色体優性多発嚢胞腎症、微絨毛性封入体病、結節硬化症、ローの眼脳腎症候群、筋萎縮性側索硬化症、骨髄異形成症候群、不全リンパ球症候群、タンジアー病、家族性肝内胆汁鬱滞、X染色体連鎖副腎白質ジストロフィー、スコット症候群、ヘルマンズキー・パドラック症候群1型および2型、ツェルヴェーガー症候群、近接短縮性点状軟骨異形成症、常染色体劣性原発性高シュウ酸尿症、モール・トラネビャエルグ（*Tranebjærg*）症候群、脊髄性および延髄性筋萎縮症（*spinal and bulbar muscular atrophy*）、原発性線毛運動不全（カルタゲナー症候群）、巨人症および先端巨大症、乳汁漏出、アジソン病、副腎性男性化、クッシング症候群、ケトアシドーシス、原発性または続発性アルドステロン症、ミラー・ディカー症候群、滑沢脳、運動ニューロン疾患、アッシャー症候群、ヴィスコット・オールドリッチ症候群、オピッツ症候群（*Optiz syndrome*）、ハンチントン病、遺伝性膵炎、抗リン脂質抗体症候群、オーバ

ーラップ結合組織病 (overlap connective tissue disease)、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、ブルガダ症候群、フィンランド型先天性腎炎症候群、デュービン・ジョンソン症候群、X染色体連鎖低リン酸血症 (X-linked hypophosphatemia)、ペンドレッド症候群、新生児持続性高インスリン性低血糖症、遺伝性球状赤血球症、無セルロプラスミン血症、乳児神経セロイドリポフスチン沈着症、偽性軟骨形成不全症および多発性骨端骨形成不全症 (multiple epiphyseal)、シュタルガルト様黄斑ジストロフィー、X染色体連鎖シャルコー・マリー・ツース病、常染色体優性網膜色素変性、ウォルコット・ラリソン症候群 (Wolcott-Rallison syndrome)、クッシング病、肢帯筋ジストロフィー、ムコ多糖症 (mucopolysaccharidos 10
is) IV型、フィンランド型遺伝性家族性アミロイドーシス (hereditary familial amyloidosis of Finish)、アンダーソン病、肉腫、慢性骨髄単球性白血病、心筋症、顔面生殖器形成不全症 (faciogenital dysplasia)、捻転症、ハンチントン運動失調および脊髄小脳性運動失調、遺伝性高ホモシステイン血症 (hereditary hyperhomocysteinemia)、多発ニューロパチー、下位運動ニューロン疾患、色素性網膜炎 (pigmented retinitis)、セロネガティブ多発性関節炎、間質性肺線維症、レイノー現象、ウエグナー肉芽腫症 (Wegner's granulomatosis)、タンパク尿 (preproteinuria)、CDG-Ia型、CDG-Ib型、CDG-Ic型、CDG-Id型、CDG-Ie型、CDG-If型、CDG-IIa型、CDG-IIb型、CDG-IIc型、CDG-IId型、エーラース・ダンロス症候群、多発性外骨腫症、グリセリ症候群 (1型または2型)、またはX染色体連鎖非特異的精神遅滞を挙げることができる。加えて、代謝障害には、ファブリー病、ムコ多糖症I型、ファーバー病、ゴーシェ病、GM₁ ガングリオシドーシス、テイ・サックス病、サンドホフ病、GM₂ 活性化因子疾患、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン・ピック病 (A型、B型、およびC型)、シェイエ病、ハンター病、サンフィリポ病、モルキオ病、マロトー・ラミー病、ヒアルロニダーゼ欠損症、アスパルチルグルコサミン尿症、フコース蓄積症、マンノース蓄積症、シンドラー病、1型シアリドーシス、ポンペ病、濃化異骨症、セロイドリポフスチン沈着症、コレステロールエステル貯蔵病、ウォルマン病、多発性スルファターゼ欠損症、ガラクトシアリドーシス、ムコリピドーシス (II型、III型 20
、およびIV型)、シスチン症、シアル酸蓄積障害、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイロミクロン蓄積症、ヘルマンスキー・パドラック症候群、チェディアック・東症候群、ダノン病、または幸福顔貌骨異形成症などだがこれらに限定されないリソソーム蓄積障害も含めることができる。

【0093】

代謝障害の症状は多岐にわたっており、例えば、貧血、疲労、容易な紫斑形成、少ない血小板、肝腫脹、脾腫脹、骨格の弱化、肺の欠陥、感染症 (例えば、胸部の感染症または肺炎)、腎臓の欠陥、進行性脳障害、発作、非常に濃い胎便、咳嗽、喘鳴、唾液または粘液の過剰産生、息切れ、腹痛、腸閉塞または消化管閉塞、妊孕性の問題、鼻の中のポリープ、指/足指の爪および皮膚の太鼓ばち指形成、手または足の疼痛、被角血管腫、少ない 40
発汗、角膜およびレンズの混濁、白内障、僧帽弁逸脱症および/または僧帽弁逆流、心肥大、温度不耐症 (temperature intolerance)、歩行困難、嚥下困難、進行性失明、進行性聴覚喪失、緊張低下、巨舌、反射消失、腰痛、睡眠時無呼吸、起座呼吸、傾眠、脊柱前弯、あるいは脊柱側弯のうちの1種類以上を含むことができる。欠損しているタンパク質または存在しないタンパク質の多様な性質および結果として生じる疾患の表現型 (例えば、代謝障害の症候的呈示) により、所与の障害が一般的には、その特定の障害に対して特徴的な症状のみを示すことは理解される。例えば、ファブリー病患者は、温度不耐症、角膜回転、疼痛、皮疹、吐き気、または下痢のような、しかしこれらに限定されない上記の症状の特定の部分集合を示し得る。ゴーシェ症候群患者は、巨脾腫症、硬変、痙攣、緊張亢進、無呼吸、骨粗鬆症、または皮膚変色を示し得る。 50

【0094】

本明細書に記載されるキャップを外されかつ脱マンノシル化した1つ以上の分子の投与に加えて、代謝障害は、適切な栄養およびビタミン類（例えば、補因子療法）、理学療法、および疼痛用薬物適用によっても処置することができる。

【0095】

所与の代謝障害の具体的な性質に応じて、患者は、いずれかの齢においてこれらの症状を示し得る。多くの症例においては、症状は、小児期にまたは青年期に示し得る。例えば、ファブリー病の症状は、少年期、例えば10歳または11歳で示し得る。

【0096】

本明細書で使用する場合、「代謝障害を発達させる危険にある」被験体とは、障害を発達させる素因、すなわち、酸性 α グルコシダーゼ、 α ガラクトシダーゼ、 α -L-イズロニダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ヘキソサミニダーゼ、 β -D-マンノシダーゼ、 α -L-フコシダーゼ、アリアルスルファターゼB、アリアルスルファターゼA、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、イズロン酸-2-スルファターゼ、 α -グルコサミニド-N-アセチルトランスフェラーゼ、 β -D-グルクロニダーゼ (glucuronidase)、ヒアルロニダーゼ、 α -L-マンノシダーゼ、 α -ノイラミニダーゼ、ホスホトランスフェラーゼ、酸性リパーゼ、酸性セラミダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、チオエステラーゼ、カテプシンK、またはリポタンパク質リパーゼのような酵素における変異の結果として代謝障害を発達させる遺伝素因を有する被験体である。明らかに、「代謝障害を発達させる危険にある」被験体とは、関心対象の種内の被験体すべてではない。

【0097】

「障害を有すると疑われる」被験体とは、本明細書に記載される代謝障害のうちのいずれかなど代謝障害の1つ以上の症状を有する被験体である。

【0098】

(薬学的組成物および処置方法)

キャップを外されかつ脱マンノシル化した標的分子は、治療有効量の該分子と1種類以上のアジュバント、賦形剤、キャリア、および／または希釈剤とを含有する薬学的組成物へと組み込むことができる。許容し得る希釈剤、キャリア、および賦形剤は典型的には、受容者の恒常性（例えば、電解質平衡）に有害に影響することはない。許容し得るキャリアには、生体適合性、不活性、または生体吸収可能な塩、緩衝剤、オリゴ糖または多糖、ポリマー、粘度改善剤、保存剤などが含挙げられる。ある例示的なキャリアは、生理食塩水 (0.15M NaCl、pH 7.0~7.4) である。別の例示的なキャリアは、50mMリン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウムである。薬学的組成物の製剤化および投与についての技術に関するさらなる詳細は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co.、米国ペンシルバニア州イーストン) において得ることができる。補充用活性化化合物も上記組成物中に組み込むことができる。

【0099】

キャップを外されかつ脱マンノシル化した分子を含有する薬学的組成物の投与は、全身性または局所性であることができる。薬学的組成物は、非経口投与および／または経口投与に好適であるよう製剤化することができる。具体的な投与様式には、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、経皮投与、髄腔内投与、経口投与、直腸投与、口腔投与、局所投与、鼻投与、眼投与、関節内投与、動脈内投与、くも膜下投与、気管支投与、リンパ投与、膣投与、および子宮内投与が含まれる。

【0100】

投与は、薬学的組成物のポーラスによる周期的注入によることができるか、または外部（例えば、静脈内用の袋）または内部（例えば、生分解性埋没物、生体人工臓器、または植え込み型の改変N-グリコシル化分子産生細胞のコロニー）である貯蔵器からの静脈内投与または腹腔内投与によって中断されないでいることができ、もしくは持続的であるこ

10

20

30

40

50

とができる。例えば、米国特許第4,407,957号、同第5,798,113号、および同第5,800,828号を参照されたい。薬学的組成物の投与は、ポンプ（例えば、*Annals of Pharmacotherapy*, 27:912 (1993); *Cancer*, 41:1270 (1993); *Cancer Research*, 44:1698 (1984)を参照されたい）、マイクロカプセル封入（例えば、米国特許第4,352,883号、同第4,353,888号、および同第5,084,350号を参照されたい）、持続放出性ポリマー埋没物（例えば、Sabelの米国特許第4,883,666号を参照されたい）、マクロカプセル封入（例えば、米国特許第5,284,761号、同第5,158,881号、同第4,976,859号、および同第4,968,733号、ならびにPCT公開特許出願WO92/19195号、WO95/05452号を参照されたい）、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、もしくは他の好適な部位のいずれかへの注射、またはカプセル剤、液剤、錠剤、丸剤、もしくは持続放出製剤での経口投与のような好適な送達手段を使用して達成することができる。

10

【0101】

非経口送達系の例としては、エチレン-酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、植え込み可能な注入系、ポンプ送達、被包細胞送達、リポソーム送達、針送達系注射、無針注射、ネブライザー、エーロゾライザー、電気穿孔法、および経皮パッチが挙げられる。

【0102】

非経口投与に好適な製剤は、改変N-グリコシル化分子の滅菌水性調製物を便利に含有しており、好ましくは受容者の血液と等張である（例えば、生理学的塩類溶液）。製剤は、単位用量形態または複数回用量形態で提供することができる。

20

【0103】

経口投与に好適な製剤は、各々、あらかじめ決めておいた量の改変N-グリコシル化分子を含有するカプセル剤、カシェ剤、錠剤、もしくはロゼンジ、またはシロップ剤、エリキシル剤、乳剤、もしくは頓服水剤（*draught*）のような、水性リカーもしくは非水性液中の懸濁剤のような分離した単位として提供することができる。

【0104】

局所投与に好適なキャップを外されかつ脱マンノシル化した分子は、哺乳類（例えば、ヒト患者）へ、例えばクリーム、スプレー、泡状物質、ジェル、軟膏、塗薬、またはドライラブ（*dry rub*）として投与することができる。ドライラブは、投与部位で再含水することができる。このような分子は、包帯、ガーゼ、またはパッチへも直接注入することができる（例えば、浸漬して、および乾燥して）、次に、それは局所的に適用することができる。このような分子は、局所投与のための包帯、ガーゼ、またはパッチに半液状、ゲル状、または完全に液状で維持することもできる（例えば、米国特許第4,307,717号を参照されたい）。

30

【0105】

治療有効量の薬学的組成物は、それを必要とする被験体へ、当業者によって確かめることのできる投与計画で投与することができる。例えば、組成物は、上記被験体へ、例えば1投薬あたり、被験体の体重1kgあたり0.01μg~10,000μgの薬用量で全身投与することができる。別の例においては、薬用量は、1投薬あたり、被験体の体重1kgあたり1μg~100μgである。別の例においては、薬用量は、1投薬あたり、被験体の体重1kgあたり1μg~30μg、例えば、1投薬あたり、被験体の体重1kgあたり3μg~10μgである。

40

【0106】

治療効能を最適化するために、キャップを外されかつ脱マンノシル化した分子はまず、異なる投与計画で投与することができる。単位用量および計画は、例えば、哺乳類の種、その免疫状態、該哺乳類の体重を含む因子に左右される。典型的には、組織におけるこのような分子のレベルは、例えば、所与の処置計画の効能を決定するための臨床試験手順の一部として適切なスクリーニングアッセイを使用して監視することができる。

【0107】

50

キャップを外されかつ脱マンノシル化した分子についての投与頻度は、医療従事者（例えば、医師または看護師）の技術および臨床的判断のうちにある。典型的には、投与計画は、最適な投与パラメータを確立し得る臨床試験によって確立する。しかしながら、上記従事者は、被験体の年齢、健康状態、体重、性別、および医学的状态に従ってこのような投与計画を変更してもよい。投与の頻度は、処置が予防的であるかまたは治療的であるかに応じて変更することができる。

【0108】

このような分子またはその薬学的組成物の毒性および治療的効能は、例えば細胞培養物または実験動物における公知の医薬手順によって決定することができる。これらの手順は、例えば、LD₅₀（集団の50%が致死する量）およびED₅₀（集団の50%における治療有効量）を決定するために使用することができる。毒性作用と治療効果の間の用量比は治療指数であり、それはLD₅₀/ED₅₀の比として表すことができる。高い治療指数を示す薬学的組成物が好ましい。毒性のある副作用を示す薬学的組成物を使用することはできるが、正常細胞（例えば、非標的細胞）に対する潜在的な障害を最小化し、それにより副作用を低減するために、影響される組織の部位にこのような化合物を向ける送達系を設計するよう注意を払うべきである。

【0109】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータは、適切な被験体（例えば、ヒト患者）における使用のためのある範囲の薬用量を製剤化する上で使用することができる。このような薬学的組成物の薬用量は一般的に、ほとんどまたはまったく毒性を有さないED₅₀を含むある範囲の循環濃度内に収まる。薬用量は、採用される剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で変化してもよい。（例えば、被験体における代謝障害を処置するために）本明細書に記載されるように使用される薬学的組成物については、治療有効量は、細胞培養アッセイから最初に概算することができる。用量は、細胞培養において決定されるようなIC₅₀（すなわち、症状の最大半量の阻害を達成する薬学的組成物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、動物モデルにおいて処方することができる。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

【0110】

本明細書において定義する場合、キャップを外されかつ脱マンノシル化した分子の「治療有効量」とは、処置された被験体における医学的に望ましい結果（例えば、代謝障害の1種類以上の症状の改善）を生むことのできる分子の量である。治療有効量（すなわち、有効薬用量）には、被験体の体重または試料の重量の1キログラムあたりの化合物のミリグラム量またはマイクログラム量（例えば、1キログラムあたり約1マイクログラム～1キログラムあたり約500ミリグラム、1キログラムあたり約100マイクログラム～1キログラムあたり約5ミリグラム、または1キログラムあたり約1マイクログラム～1キログラムあたり約50マイクログラム）を含めることができる。

【0111】

被験体は、任意の哺乳類、例えばヒト（例えば、ヒト患者）または非ヒト霊長類（例えば、チンパンジー、ヒヒ、またはサル）、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、アレチネズミ、ハムスター、ウマ、ある種の家畜（例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、またはヤギ）、イヌ、ネコ、またはクジラであることができる。

【0112】

本明細書に記載される分子またはその薬学的組成物は、被験体へ、別の処置、例えば、代謝障害（例えば、リソソーム蓄積障害）のための処置との併用療法として投与することができる。例えば、併用療法には、被験体（例えば、ヒト患者）へ、代謝障害（例えば、リソソーム蓄積障害）を発達させる（または有すると疑われる）危険を有するまたは該危険にある被験体へ治療上の利点を提供する1種類以上の追加の薬剤を投与することを含めることができる。したがって、上記化合物または薬学的組成物および1種類以上の追加の

10

20

30

40

50

薬剤は、同時に投与することができる。あるいは、上記分子を第一に投与し、かつ第二に上記１種類以上の追加の薬剤を投与することができ、またはその逆を行なうこともできる。

【０１１３】

以前の治療薬が特に毒性である場合（例えば、重大な副作用特性を有する、代謝障害に対する処置）においては、本明細書に記載される分子の投与を用いて、以前の治療薬の量を、毒性を有さずに同じかまたは改良された治療上の利点を与えるのに十分なレベルまで代償するおよび／または低下させることができる。

【０１１４】

本明細書に記載される薬学的組成物のうちの任意のものが、投与のための指示とともに、容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

10

【０１１５】

以下は、本発明の実施例である。該実施例は、本発明の範囲をいずれかの方法で制限するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【０１１６】

実施例１

（ヒトαグルコシダーゼ発現株の生成）

Y. lipolytica株OXY Y1589を以下のとおり構築した。上記株は、3コピーのヒトαグルコシダーゼ遺伝子（huGAA、酸性αグルコシダーゼまたは酸性マルターゼEC3.2.1.3としても公知）および2コピーのY. lipolytica MN N4遺伝子を含む。OXY Y1589株の遺伝子型は、以下のとおりである。

20

【０１１７】

【化６】

MatA, leu2-958, ura3-302, xpr2-322,
gut2-744, ade2-844

POX2-Lip2pre-huGAA:URA3Ex::zeta
POX2-Lip2pre-huGAA:LEU2Ex::zeta
POX2-Lip2pre-hGM-CSF:GUTEx::zeta
YIMNN4-POX2-hp4d-YLMNN4 :ADE2::PT targeted

30

【０１１８】

形質転換はすべて、異なる選択的マーカーのための改変を使用する十分に確立されたプロトコルに従って実施した。別段の指定がない限り、huGAA組込み断片を発現プラスミドのNot I制限消化によって得て、カナマイシン耐性遺伝子を除去した。制限消化から結果的に生じる断片をアガロースゲル電気泳動によって分離した後、huGAA断片をQiagenカラム精製した。3つの安定した組込み型形質転換を実施して、最終のhuGAA産生株OXY Y1589を得た。

【０１１９】

40

（Y. lipolyticaコドン最適化huGAA発現ベクター）

110kDaのhuGAA前駆体をコードするヌクレオチド配列を化学的に合成し、Y. lipolytica発現についてコドン最適化した。表1は、Y. lipolyticaについてのコドン使用頻度を示す。データは、5,967のコード配列に存在する2,945,919のコドンに由来した。表1の内容は、kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=284591におけるワールドワイドウェブ見出すことのできるコドン使用頻度データベースから得た。

【０１２０】

【表 1】

表 1

Yarrowia lipolytica のコドン使用頻度表

UUU 15.9(46804)	CU 21.8(64161)	AU 6.8(20043)	GU 6.1(17849)
UUC 23.0(67672)	CC 20.6(60695)	AC 23.1(68146)	GC 6.1(17903)
UUA 1.8(5280)	CA 7.8(22845)	AA 0.8(2494)	GA 0.4(1148)
UUG 10.4(30576)	CG 15.4(45255)	AG 0.8(2325)	GG 12.1(35555)
CUU 13.2(38890)	CU 17.4(51329)	AU 9.6(28191)	GU 6.0(17622)
CUC 22.6(66461)	CC 23.3(68633)	AC 14.4(42490)	GC 4.4(12915)
CUA 5.3(15548)	CA 6.9(20234)	AA 9.8(28769)	GA 21.7(63881)
CUG 33.5(98823)	CG 6.8(20042)	AG 32.1(94609)	GG 7.7(22606)
AUU 22.4(66134)	CU 16.2(47842)	AU 8.9(26184)	GU 6.7(19861)
AUC 24.4(71810)	CC 25.6(75551)	AC 31.3(92161)	GC 9.8(28855)
AUA 2.2(6342)	CA 10.5(30844)	AA 12.4(36672)	GA 8.4(24674)
AUG 22.6(66620)	CG 8.5(25021)	AG 46.5(136914)	GG 2.4(7208)
GUU 15.8(46530)	CU 25.5(75193)	AU 21.5(63259)	GU 16.6(48902)
GUC 21.5(63401)	CC 32.7(96219)	AC 38.3(112759)	GC 21.8(64272)
GUA 4.0(11840)	CA 11.2(32999)	AA 18.8(55382)	GA 20.9(61597)
GUG 25.7(75765)	CG 8.9(26190)	AG 46.2(136241)	GG 4.4(12883)

表フィールドは、[三文字表記][1000個あたりの頻度][数]として示す。

【0 1 2 1】

合成コンストラクトにおいては、上記タンパク質がアミノ酸 57 において開始するよう、プレ h u G A A シグナルペプチドおよびプロ h u G A A シグナルペプチドを除去した。h u G A A の合成オープンリーディングフレーム (O R F) (図 1 A) を *Y. l i p o l y t i c a* L I P 2 シグナル配列 (プレ) の 5' 末端から 3' 末端までをインフレームで融合させ、2つの X x x - A l a 切断部位のコード配列をその後に続け、発現ベクターへのクローニングのための B a m H I 制限部位および A v r I I 制限部位を隣接させた。上記コンストラクトにおいては、融合ポリペプチドをコードする配列は、誘導性 P O X 2 プロモーターの制御下にあった。融合コンストラクトの完全なアミノ酸配列を図 1 B に示す。

【0 1 2 2】

Y. l i p o l y t i c a 発現ベクターの一般的な概略図を図 2 に示す。細菌部分は、p H S S 6 プラスミドに由来しており、細菌複製起点 (o r i) およびカナマイシンに対する耐性を与えるカナマイシン耐性遺伝子 (K a n R) を含有する。組込みカセットは、a) *Yarrowia l i p o l y t i c a* への形質転換のための選択マーカー (U R A 3、L E U 2、G U T 2)、b) プロモーターから構成される発現カセット、c) インフレームでシグナル配列とともに h u G A A を挿入するためのマルチブルクローニングサイト (M C S)、および d) L I P 2 遺伝子のターミネーターを含む。組込みカセットは、*Y. l i p o l y t i c a* ゲノムへの安定した非相同組込みのための 2 配列によって隣接される。2つの N o t I 制限部位は、形質転換前の発現カセットの単離を可能にする。p R A N 0 3 4 プラスミド、p R A N 0 3 6 プラスミド、および O X Y P 1 8 3 プラスミドを使用して、U R A 3 形質転換マーカー、L E U 2 形質転換マーカー、および G U T 2 形質転換マーカーをそれぞれ含有する h u G A A 発現ベクター p R A N 0 5 8、p R A N 0 5 9、および p R A N 0 6 0 をそれぞれ生成した。

【0 1 2 3】

(縦列 Y l M N N 4 発現ベクター O X Y P 1 4 7 0 B)

Y. lipolytica MNN4 (Y1MNN4) 遺伝子を、誘導性 pPOX2 プロモーターの制御下で、かつ (半) 構成的 hp4d プロモーターの制御下でクローン化した。Y1MNN4 のこれら 2 つの発現カセットを 1 つのベクターにおいて、ゲノムの ADE2 遺伝子座への標的化組込みのための ADE2 遺伝子と選択的マーカーとしての ADE2 遺伝子からなる隣接領域 (PT) を保有する縦列コンストラクトとしてサブクローニングした。

【0124】

(中間株 OXY Y1569)

第一の形質転換は、中間の組換え株 OXY Y1569 を作製するため、URA3 マーカーおよび LEU2 マーカーを使用して、pRAN058 ベクターおよび pRAN059 ベクターから精製した発現カセットを有する *Y. lipolytica* の G014 株の共形質転換であった。したがって、OXY Y1569 は、G014 株のゲノムに無作為に組み込まれた pPOX2 プロモーターの制御下で hUGAA の 2 つの発現コンストラクトを保有している。

10

【0125】

OXY Y1569 を以下のとおり選択した。*Y. lipolytica* のゲノムへの hUGAA DNA の組込みは、ゲノム DNA の PCR スクリーニングによって確認した。PCR 反応のためのプライマーは、hUGAA スクレオチド配列の 2552 塩基対の断片を増幅させるよう設計した。少なくとも 2 コピーの hUGAA DNA の組込みを確認するために、ゲノム DNA のサザンブロット分析も実施した。詳細には、OXY Y1569 クローン由来のゲノム DNA を HindIII で消化し、hUGAA DIG 標識した特異的プローブを使用して探査した。

20

【0126】

高レベルの hUGAA を分泌するクローンを選択するために、少なくとも 2 コピーの hUGAA DNA の組込みの確認された無作為に選択したいくつかのクローンを、1 % 酵母抽出物、2 % ペプトン、および 5 % 乳化オレイン酸を含有する培地を使用する POX2 誘導条件下で、振盪フラスコ中で増殖させた。すべての場合において、培養上清を誘導 72 時間後に回収し、標準的なウェスタンブロットおよび実施例 3 に記載される 4-MUG アッセイを使用する酵素活性アッセイ分析においてスクリーニングした。OXY Y1569 の N-グリカン分析は、OXY Y1569 における支配的な構造が Man₈GlcNAc₂ であることを示した。

30

【0127】

(中間の株 OXY Y1584)

Y. lipolytica MNN4 遺伝子の 2 つのコピーをそのゲノムに組み込んで、OXY Y1584 を生成するために、プラスミド OXYP1479B から切り出した発現カセットを使用して組換え株 OXY Y1569 を形質転換した。プラスミド OXYP1479B から SacI/XmaI 制限消化を使用して、発現カセットを切り出した。*Y. lipolytica* ゲノムの ADE2 遺伝子座への標的化組込みのために発現カセットを設計した。組換え株をサザンブロット法およびグリカン分析の後に選択して、増大したリン酸化に関する該株の挙動を評価した。任意に選択したいくつかの形質変換体のゲノム DNA を SpeI で消化し、MNN4 特異的な DIG 標識したプローブを使用して探査した。*Y. lipolytica* ゲノムの ADE2 遺伝子座への MNN4 発現カセットの正確な標的化組込みは、SpeI 消化後に 4207 塩基対および 5683 塩基対のバンドを生じた。陽性クローンを標準的な振盪フラスコ手順で増殖させた。中間のクローン OXY Y1584 を選択するために、分泌したタンパク質の N-グリカン分析を実施した。親株 OXY Y1569 と比較して、MNN4 過剰発現後の支配的な構造は、Man₈GlcNAc₂ (PMan)₁ および Man₈GlcNAc₂ (PMan)₂ であった。

40

【0128】

(産生株 OXY Y1589)

最終の原栄養体産生株 OXY Y1589 を生成するために、hUGAA の第三のコピー

50

を組換えOXY Y 1 5 8 4株のゲノムに組み込んだ。p R A N 0 6 9からN o t Iで切り出した発現カセットを使用して形質転換を実施した。最初に、h u G A Aの追加のコピーの存在について、形質転換体のゲノムDNAをPCRによってスクリーニングした。h u G A A産生を評価するために、標準的な振盪フラスコ培養後の発現について、任意に選択したPCR陽性クローンをさらに分析した。最高レベルのh u G A Aを発現するクローン(OXY Y 1 5 8 9)をウェスタンブロット分析および酵素活性アッセイ(実施例3に記載される4-MUGアッセイ)後に選択した。M8のMP2-M8 N-グリカンおよびMP-M8 N-グリカンへの転換レベルが追加のh u G A A発現カセットの存在によって影響されないことも再確認した。

【0129】

実施例2

(OXY Y 1 5 8 9株の流加培養)

OXY Y 1 5 8 9株(実施例1)からh u G A Aを産生するために、作業容積6~8 Lを有する攪拌した10 Lタンクを使用して流加プロセスを確立した。上記プロセスを2つの相に分割した。

【0130】

- 1) バイオマス形成のためのグルコースに関するバッチ増殖
- 2) 限定されたオレイン酸供給の支援による誘導による産物形成。

【0131】

典型的には、バッチ相は約20時間(h)であり、産生相はおよそ72時間であった。上記プロセスの終了時点で、培養ブロスと遠心分離し、上清を回収した。上清をh u G A Aの精製のための出発材料として使用した(実施例3を参照されたい)。

【0132】

以下のパラメータを発酵中に制御した。エアレーションを1.5 vvm空気(1分間あたり1容積あたりの容積)の一定値で維持した。溶存酸素(DO)を初期には30%で維持した。攪拌を600 rpmから1200 rpmへとDOレベルに応じて増大させた。一旦攪拌が最大値1200 rpmに到達すると、その速度を一定のままにし、DO設定値を10%に設定した。10% DOを維持するために、酸素を50%の最大百分率で反応器へと加えた。泡沫の発生(foam evolution)を泡沫プローブによって制御した。泡沫を検出した場合、消泡剤をバイオリアクターへ添加した。pH 6.8の一定値を維持するために、14%(v/v)アンモニア(塩基)または10%リン酸を添加することによって、pHを制御した。全プロセスの間中、温度を28℃で一定のままにした。

【0133】

バイオマスを、600 nmでの光学密度(OD600)の測定によって監視した。試料を蒸留水で2~1000倍希釈して、分光光度計の直線範囲で値を得た。産物形成をウェスタンブロット分析および特異的酵素活性試験によって検出した。

【0134】

実施例3

(組換えh u G A A (r h G A A)の精製)

培養後の上清(実施例2を参照されたい)を、デプス濾過を介して清澄化した。次に、結果として生じる材料を、タンジェンシャルフロー濾過(TFF)を介して20倍濃縮し、10 kDaのMNCOメンブラン(Millipore)を使用して、20 mMリン酸ナトリウム(pH 6)および100 mM NaClに対して透析濾過した。

【0135】

r h G A Aの精製を、最高1 M濃度までの硫酸アンモニウムを添加することによって開始した。遠心分離後、上清をToyopearl-Phenyl 650M(Tosoh Biosciences)を充填したXK16/40カラムにのせた。1 Mから0 Mへの硫酸アンモニウムの直線勾配を溶出に適用した。次に、r h G A Aを含有する画分をプールし、10 mM BIS-TRIS(pH 6)へのバッファ交換に供した。0 Mから1 MへのNaClの直線塩勾配を使用する、ソース30Qを充填したTricorn 10

10

20

30

40

50

／50またはXK25／20カラム（GE Healthcare）の陰イオン交換クロマトグラフィーを介して、さらなる精製を達成した。次に、結果として生じるGAA含有画分を濃縮した後、50mMリン酸ナトリウム（pH6）および200mM NaClであらかじめ平衡化しておいた最終のHiLoad 16／60superdex200ゲル濾過カラム（GE Healthcare）にのせた。比活性およびクマシー染色したSDS-PAGEゲルにおける純度を基にして画分を選択した後、合一して、5～10mg/mlの終濃度へと濃縮した。10kDaのMWCOを備えた15mlのAmicon超遠心分離デバイス（Millipore）を使用して、タンパク質を濃縮した。

【0136】

4-メチルウンベリフェリル- α -D-グルコピラノシド（4-MUG）アッセイを使用して、rhGAAをスクリーニングした。グルコシダーゼによる基質4-MUGの切断は、蛍光原性産物4-MUの生成をもたらし、4-MUは、紫外光による照射によって視覚化または検出することができる。rhGAAについての定性的スクリーニングの反応を、10：1または20：1の容積比で、0.35mM 4-MUG、0.1% BSA、および100mM酢酸ナトリウム（pH4）からなる反応緩衝液を10 μ lまたは5 μ lの溶出画分へ添加することによって開始した。すべての反応を96ウェル平底マイクロタイタープレートにおいて実施した。37℃で30分間～1時間のインキュベーション時間後、等容積の100mMグリシン（pH11）を添加して、反応を停止させ、蛍光原性反応産物4-メチルウンベリフェロン（4MU）の放出を紫外光の下で観察した。比活性（単位／mgタンパク質）を、黄色のp-ニトロフェノール反応産物の酵素放出を測定する合成基質p-ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド（PNPG）を用いる比色アッセイを使用して決定した。上記反応は、10 μ lの酵素溶液および90 μ lの基質反応緩衝液（150mMクエン酸-リン酸緩衝液（pH4）、1% BSA中の2mM PNPG）をマイクロタイタープレートの反応ウェル中で混合することによって開始し、その後37℃でインキュベートした。1～2時間インキュベートした後、等容積の停止バッファ10%炭酸ナトリウム（pH12）を添加して、その反応をクエンチし、放出されたp-ニトロフェノール（PNP）をイオン化状態にした。バックグラウンド補正した吸光度およびp-ニトロフェノール標準物質を405nmの波長で測定し、比活性を算出した。タンパク質濃度をビシンコニン酸（BCA）法によって決定した。1単位を、クエン酸-リン酸緩衝液（pH4.0）中の2mMの最終基質濃度において37℃、1分間当たり1nmolのPNPGから1nmolのPNPおよびD-グルコースへの変換を触媒する酵素の量として定義した。

【0137】

実施例4

（YlAMS1のクローニングおよび発現）

Yarrowia lipolytica由来のAms1遺伝子（YlAms1）を、YarrowiaゲノムDNAから、遺伝子特異的プライマーを使用してPCR増幅した。C末端Hisタグを有するYlAMS1タンパク質が生成され得るよう、HIS6タグ付きコード配列をYlAms1のORFの3'末端に融合し、かつN末端Hisタグを有するYLAMS1タンパク質が生成され得るよう、YlAms1 ORFの5'末端へも融合した。両ORFを半構成的hp4dプロモーターの制御下でクローン化し（図3Aおよび図3B）、発現カセットをYarrowia lipolyticaへと形質転換した。細胞を複合培地（YPD）中で増殖させ、72時間の増殖後に収穫した。細胞を超音波処理によってばらばらにした後、AMS1タンパク質を、NTAカラムを使用して精製した。精製した材料を、PNP-マンノースを基質として使用して活性について分析した。活性のある画分をプールし、グリカン分析のために維持した。

【0138】

実施例5

（APTS標識したリン酸化N-グリカンのGH38 α -マンノシダーゼを用いた脱マンノシル化およびホスフェートのキャップ外し）

タチナタマメ α -マンノシダーゼ (Canavalia ensiformis) を Sigma-Aldrich から得た。3.0 M 硫酸アンモニウム懸濁液 (Sigma-M7257) およびプロテオミクス等級のタチナタマメ α -マンノシダーゼ (Sigma-M5573) の両方を N-グリカン分析において使用した。両パッチは、同一の結果を与えたので、さらなる記載においては JbMan と命名する。実施例 4 に記載したとおり、YlAms1 を発現させ精製した。JbMan および YlAMS1 を、MNN4 を過剰発現する *Yarrowia lipolytica* 株に由来する、8-アミノ-1, 3, 6, -ピレントリスルホン酸 (APTS) で標識した糖の混合物で試験した。上記糖は、Man₈GlcNAc₂ (M8)、一リン酸化 ManP-Man₈GlcNAc₂ (MP-M8)、および/または二リン酸化 (ManP)₂-Man₈GlcNAc₂ ((MP)₂-M8) 糖 (MNN4 糖または MNN4 N-グリカンと呼ぶ) を含有している。図 4 においては、潜在的な最終加水分解産物を概略的に示し、ここで、 α -マンノシダーゼは、MNN4 N-グリカンも完全に刈り込むことができることを想定しており、これには、非リン酸化アームの加水分解、基礎をなすマンノースがリン酸化されている場合の、末端 α -1, 2-マンノースの加水分解、および/またはマンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合におけるホスフェートのキャップ外しを含む。

【0139】

別段の記載がない限り、APTS 標識した N-グリカンに関する JbMan および YlAMS1 との反応はすべて、2 mM CaCl₂ を含む 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) 中で 37 °C、一晚実施した。

【0140】

図 5 においては、MNN4 N-グリカンの JbMan による加水分解を示す DSA-FA CE 電気泳動図を示す。試料には、新たに現れるピークを同定することができるよう、Man₈GlcNAc₂ を基質として含んでいた (パネル B)。JbMan は、一晚のインキュベーション後に Man₁GlcNAc₂ しか得られなくなるまで (パネル D)、Man₈GlcNAc₂ を連続的に加水分解した (パネル C)。Man₈GlcNAc₂ および ManP-Man₈GlcNAc₂ を含有する基質溶液の加水分解 (パネル E) はより複雑であった。脱マンノシル化活性およびホスフェートのキャップ外し活性は両方とも、基質を JbMan とともに 2 時間インキュベートすると、電気泳動図の左側に迅速に泳動されるピークの出現に関与した (パネル F)。末端のホスフェートの過剰の電荷は脱マンノシル化とともに、迅速な電気泳動移動度を示すピークの出現に関与した。それにもかかわらず、一晚のインキュベーション後、Man₁GlcNAc₂ として同定されるピークのみが観察された (パネル G)。市販の JbMan 調製物中に存在するホスファターゼ活性は、この結果に関与する。

【0141】

JbMan による MNN4 糖の消化を、ManP-Man₈GlcNAc₂ および (ManP)₂-Man₈GlcNAc₂ を含有する基質溶液を用いて反復した (パネル H)。2 時間インキュベートした後、潜在的なキャップの外れたピークが現れ、それを、パネル I においては「P-Mx」および「P2-Mx」と示している。迅速な電気泳動移動度領域においては、ピークの分離はより小さく、キャップの外れた一リン酸化構造および二リン酸化構造、例えば、P-Man₄GlcNAc₂ および P2-Man₆GlcNAc₂ は一緒に泳動された可能性がある。一晚の消化後の結果は、さらなる脱マンノシル化を示唆している。パネル J において P-My および P2-My で示されるこれらのピークは、P-Man₃GlcNAc₂ および P2-Man₅GlcNAc₂ である可能性があるが、中性の Man₁GlcNAc₂、Man₂GlcNAc₂、および Man₃GlcNAc₂ もパネル J において観察することができる。Man₈GlcNAc₂ は基質溶液中に存在しなかったため、これらのピークは、潜在的な混入ホスファターゼ活性とマンノースのさらなる刈り込みの結果である。

【0142】

パネル J のキャップを外されたピークを同定するために、反応混合物を仔ウシ腸ホスフ

10

20

30

40

50

ァターゼ (CIP) で処理した。キャップを外された (従って、末端のホスフェートを含有している) グリカンの処理は、電気泳動図において非常により遅く泳動し右側へとより多く現れる中性オリゴ糖を結果として生じた。実際、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2 \sim \text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ はパネル K に現れている。その活性は、市販の JbMan 調製物中のホスファターゼ活性の存在によって阻害されたが、示されたデータは、完全に脱マンノシル化しかつホスフェートがキャップを外された構造 (すなわち、 $\text{P-Man}_3\text{GlcNAc}_2$ および $\text{P2-Man}_5\text{GlcNAc}_2$) が、APTS 標識した MN4 糖を JbMan で処理した場合に得ることができることを明らかにしている。

【0143】

脱マンノシル化およびホスフェートのキャップ外し活性は、図 6 に示すように、YlAMS1 を使用しても観察される。YlAMS1 は、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2 \sim \text{Man}_{11}\text{GlcNAc}_2$ を完全に加水分解することができる (パネル C)。YlAMS1 の、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ および $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ を含有する基質溶液とのインキュベーション (パネル D) は、おそらくホスフェートがキャップを外されたグリカンである迅速な電気泳動移動度を有する産物を生じる (パネル E)。反応を希釈した YlAMS1 試料で 2 時間のインキュベーションの間に反復した場合の、一連のキャップを外された N-グリカンを観察した (パネル F)。ホスフェートがキャップを外されたグリカンの存在を、反応混合物を CIP で処理することで一連の中性 N-グリカンが生じることによって確認した (パネル G)。したがって、YlAMS1 は、パネル I において観察されるように、 $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ のキャップを外すことはできるが、 $\text{P2-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ またはさらにマンノースで刈り込んだグリカンのいずれの産物を形成するのかは未明のままである。

【0144】

実施例 6

(より高次のリン酸化 N-グリカンを生ずる *Yarrowia lipolytica* 株において発現した糖タンパク質の GH38 α -マンノシダーゼを使用した脱マンノシル化およびホスフェートのキャップ外し)

ヒトリソソーム α -グルコシダーゼ huGAA を *Y. lipolytica* 株 OXY1589 において発現させ、高次のリン酸化 N-グリカン構造を生ずる糖タンパク質を生じた。huGAA を実施例 3 に記載したとおり精製した。

【0145】

タチナタマ α -マンノシダーゼ (JbMan) を、2 mM CaCl_2 を有する 100 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.0) 中の huGAA の溶液に添加した。反応混合物を室温で一晩インキュベートした。本質的には Laroey ら、*Nature Protocols*, 1:397~405 (2006) に記載したとおり、N-グリカンを PNGase F で放出させ、APTS で標識した後、DSA-FACE において分析した。 α -1,2-マンノシダーゼ処理の前および後の N-グリカン特性を図 7 に示す。精製された huGAA から放出された N-グリカン混合物は主として、 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ および $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ から構成されていた (パネル B)。 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ よりもわずかに迅速に泳動されるピークは、 $\text{ManP-Man}_7\text{GlcNAc}_2$ と定めた。非常に微量の $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ および $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ しか存在しなかった。JbMan は糖タンパク質であるので、タチナタマ特異的 N-グリカンについて補正することのできるよう、対照試料をパネル C に示す。パネル D においては、huGAA を JbMan とインキュベートした後に得られる N-グリカンを示す。 $\text{ManP-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ および $(\text{ManP})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ に対応するピークはもはや存在しなかった。代わりに、いくつかのピークが電気泳動図の左側に (潜在的にホスフェートがキャップを外された N-グリカン) $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2$ とともに現れた。後者は主として、市販の JbMan 調製物中に存在するホスファターゼ活性および得られた中性 N-グリカンのさらなる脱マンノシル化から結果として生じた。

【0146】

実施例7

(組換えヒト α -グルコシダーゼ (huGAA) のCcMan5およびCcMan4を用いたキャップ外しおよび脱マンノシル化)

Cellulosimicrobium cellulansマンノシダーゼ4 (CcMan4) およびCellulosimicrobium cellulansマンノシダーゼ5 (CcMan5) をコードする核酸を、DsbAシグナル配列を含有して結果的にN末端HISタグを有するタンパク質の発現を生じるpLSAH36ベクターへとクローニング化した。DsbA-CcMan5およびDsbA-CcMan4のオープンリーディングフレームのヌクレオチド配列を図8および図9にそれぞれ提供する。これらのタンパク質を大腸菌 (E. coli) B21細胞において発現させ、ペリプラズムに存するタンパク質を、Talonカラムを使用して単離および精製した。pLSAHCcMan5プラスミドおよびpLSAHCcMan4プラスミドの図解表示を図10に与える。

10

【0147】

一連のCcMan5キャップ外し実験およびCcMan4脱マンノシル化実験を、実施例3に記載したとおり精製した100 μ gバッチのhuGAAを使用して実施した。30 μ LのhuGAA (100mMマンニトールを有する25mMリン酸緩衝液 (pH6.0) における3.7mg/mL) を、3mM CaCl₂を有する46 μ Lの100mM HEPES緩衝液 (pH7.0) に添加した。(huGAA__CcMan4と呼ばれる) ある実験においては、100:1の重量:重量 (w:w) 比のhuGAA:CcMan4を使用し、14 μ LのCcMan4 (PBS中で調製される (formulated) 80 μ g/mL) をhuGAA溶液に添加した。(huGAA__CcMan5と呼ばれる) 別の実験においては、100:2のw:w比のhuGAA:CcMan5を使用し、14 μ LのCcMan5 (PBS中で調製される154 μ g/mL) をhuGAA溶液に添加した。(huGAA__CcMan4/5と呼ばれる) 組み合わせ実験においては、100:2:1のw:w比のhuGAA:CcMan5:CcMan4を使用し、14 μ LのCcMan5および14 μ LのCcMan4を30 μ LのhuGAAおよび3mM CaCl₂を有する32 μ Lの100mM HEPES緩衝液 (pH7.0) に添加した。対照実験 (huGAA__対照) においては、10 μ LのhuGAAを3mM CaCl₂を有する20 μ Lの100mM HEPES緩衝液 (pH7.0) で希釈した。試料をすべて30°Cで16時間インキュベートした後、試料を4°Cで使用時まで維持した。

20

30

【0148】

2 μ Lの各試料を実施例6に記載したとおり、N-グリカン分析に使用した。huGAA処理した試料のDSA-FACE電気泳動図を図11に示す。CcMan4処理は結果的に、ManP-Man₈GlcNAc₂、および (ManP)₂-Man₈GlcNAc₂の完全な脱マンノシル化を生じ、産物ManP-Man₅GlcNAc₂、ManP-Man₆GlcNAc₂、および (ManP)₂-Man₆GlcNAc₂が形成された (図11、第三のパネル)。上記の反応条件の下で、CcMan5によるホスフェートのキャップ外しは、ManP-Man₈GlcNAc₂ N-グリカンについて完全であり、P-Man₈GlcNAc₂が形成された。二リン酸化N-グリカン (ManP)₂-Man₈GlcNAc₂を加水分解して、完全にキャップの外れたP2-Man₈GlcNAc₂にしたが、匹敵するピーク高を有してよりゆっくりと泳動されるピークも観察され、該ピークは、部分的にキャップの外れた (ManP)-Man₈-(P)GlcNAc₂ (N-グリカンの α -1, 6アームにおいてキャップの外されたホスフェート、および α -1, 3アームにおいてキャップ形成されたホスフェートを潜在的に有する) に相当した (図11、第四のパネル)。CcMan5およびCcMan4による処理の後に、キャップを外されかつ脱マンノシル化したhuGAAを得、該huGAAは結果的に、P₂-Man₆GlcNAc₂、(ManP)-Man₆-(P)GlcNAc₂、およびP-Man₅GlcNAc₂を有するN-グリカン特性を生じた。Man₅ならびにP-Man₆GlcNAc₂、P-Man₇GlcNAc₂、ManP-Man₇GlcNA

40

50

c₂（後者のリン酸化N-グリカンに潜在的に、α-1, 3アームがリン酸化されている）に相当する小さなピークを観察した（図11、第五のパネル）。キャップを外されたN-グリカンの概略図を図12の（B）に示す。

【0149】

別のCcMan5/CcMan4のキャップ外しおよび脱マンノシル化実験を、同じ精製バッチ由来のhuGAAを使用して実施した。huGAAのための調製緩衝液が、（100mMマンニトールを有する25mMリン酸緩衝液（pH6.0）よりもむしろ）2mM CaCl₂および100mMマンニトールを有する100mM HEPES（pH7.0）である以外は、本実験を本質的には上記のとおり実施した。huGAA：CcMan5：CcMan4について100：3：0.5のw：w比を使用した。反応物を37℃で24時間インキュベートした。市販のヒトα-グルコシダーゼであるミオザイム（登録商標）（アルグルコシダーゼα、Genzyme社）の試料を、同一条件下、ミオザイム：CcMan4について100：0.5のw：w比で、CcMan4を使用して処理した。これらの試料のN-グリカン分析を上で詳論したとおり実施した。本様式で精製しかつCcMan5およびCcMan4で処理したhuGAAについてのN-グリカン特性は、図11に示されるものと類似していた。CcMan4で処理したミオザイム（登録商標）についてのDSA-FACE電気泳動図を図13に示す。

【0150】

細胞内huGAAプロセッシング（実施例10を参照されたい）を理解するために、CcMan5/CcMan4によるキャップ外しおよび脱マンノシル化実験を、異なる精製バッチ由来のhuGAAを使用して実施した。上記のものと類似の条件下で精製を実施し、これもまた2mM CaCl₂および100mMマンニトールを有する100mM HEPES（pH7.0）をhuGAA調製緩衝液として使用した。キャップ外しおよび脱マンノシル化を、huGAA：CcMan5：CcMan4について100：3：0.5のw：w比で実施し、反応混合物を30℃で24時間インキュベートした。N-グリカン特性を図14に示す。この実験においては、二リン酸化N-グリカンであるP₂-Man₆GlcNAc₂および（ManP）-Man₆-（P）GlcNAc₂をP-Man₆GlcNAc₂、（ManP）-Man₆GlcNAc₂へとそれぞれ部分的に脱リン酸化した。huGAA試料中のホスファターゼ活性を、1mM MgCl₂を有する100mM HEPES緩衝液（pH7.5）中の一般的なホスファターゼ基質パラニトロフェニルリン酸（PNPP）を使用して検出した。

【0151】

実施例8

（タチナタマメα-マンノシダーゼを使用した組換えhuGAAのキャップ外しおよび脱マンノシル化）

実施例6のキャップ外し実験および脱マンノシル化実験を、JbManの硫酸アンモニウム懸濁液をSuperdex200カラムによるゲル濾過によってさらに精製して、混入しているホスファターゼ活性を除去した後に反復した。

【0152】

huGAA-JbManと呼ばれるある実験においては、huGAA：JbManの100：15のw：w比を使用した。10μLのJbMan（PBS中1.5mg/ml）を、30μLのhuGAA（100mMマンニトールを有する25mMリン酸緩衝液（pH6.0）中3.7mg/ml）および50μLの100mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）を含有する溶液に添加した。対照試料（huGAA_対照）は、huGAAを含有していたが、JbManは含有していなかった。30℃での16時間のインキュベーション後、試料を4℃でさらなる使用まで維持した。N-グリカン分析については、2μLの各試料を使用して、実施例6に記載したとおり、N-グリカンを放出させ標識した。JbManで処理したhuGAA由来のN-グリカンのDSA-FACE電気泳動図を図15に示す。JbManによる処理は結果的に、huGAAのManP-Man₈GlcNAc₂および（ManP）₂-Man₈GlcNAc₂の部分的なキャップ外しおよび

脱マンノシル化を生じ、主としてP-Man₅GlcNAc₂および(ManP)-Man₆-(P)GlcNAc₂を形成した。後者のN-グリカン、電気泳動図においてP-Man₅GlcNAc₂とともに泳動する。完全にキャップを外された少量のP2-Man₆GlcNAc₂も存在している。P-Man₅GlcNAc₂よりもゆっくり泳動されるピークは、中性Man₃GlcNAc₂である可能性がある。P2-Man₆GlcNAc₂およびP-Man₄GlcNAc₂は、JbManによってさらに脱マンノシル化されることはない(図15、第三のパネル)。

【0153】

第二のJbManによるキャップ外しおよび脱マンノシル化実験を、同じ精製バッチ由来のhuGAAを使用して実施した。本実験を本質的には上記のとおり実施し、huGAA調製バッファとしては、1mM ZnCl₂および100mMマンニトールを有する100mM酢酸ナトリウム(pH5.0)であった。huGAA:JbManについて100:10のw:w比を使用した。反応物を37℃で24時間インキュベートした。JbMan処理後のこれらの試料のN-グリカン特性は、図15に示すN-グリカン特性と類似していた。

【0154】

細胞内huGAAプロセッシング(実施例10を参照されたい)を理解するために、JbManを使用するキャップ外しおよび脱マンノシル化実験を、異なる精製バッチ由来のhuGAAを使用して実施した。上記のものと類似の反応条件を使用した。使用したhuGAA調製バッファは、1mM ZnCl₂および100mMマンニトールを有する100mM酢酸ナトリウム(pH5.0)であり、huGAA:JbManについて100:10のw:w比を使用し、反応混合物を30℃で24時間インキュベートした。N-グリカン特性を図16に示す。二リン酸化N-グリカンであるP₂-Man₆GlcNAc₂は、本電気泳動図において観察されていない。huGAA試料中のホスファターゼ活性の存在により、部分的な脱リン酸化が生じ、結果的に、中性N-グリカンであるMan₃GlcNAc₂~Man₆GlcNAc₂とともに、一リン酸化した比較的多量のP-Man₆GlcNAc₂およびManP-Man₆GlcNAc₂の存在がもたらされた。

【0155】

実施例9

(ポンペ線維芽細胞への組換えhuGAAの取り込み)

実施例7および実施例8由来のキャップを外されかつ脱マンノシル化したhuGAAおよびミオザイム(登録商標)(CcMan4で未処理および処理済み)を細胞取り込み実験において使用した。キャップされたhuGAAまたは、CcMan5(huGAA__CcMan5)、Ccman4(huGAA__CcMan4)、CcMan4およびCcMan5の併用(huGAA__CcMan4/5)、またはタチナタマメマンノシダーゼ(huGAA__JbMan)のいずれかで処理したhuGAAの酵素比活性(実施例7および実施例8を参照されたい)を、4-MUGアッセイを使用して試験した。グルコシダーゼによる基質4-MUGの切断は、蛍光原性産物4-MUの生成をもたらす、この4-MUは、紫外光による照射によって可視化または検出することができる。実施例3を参照されたい。huGAAの活性をミオザイム(登録商標)の活性と比較した。上記酵素を3つの異なる濃度(125ng/ml、62.5ng/ml、および31.25ng/ml)へ、0.1%BSAを含有する100mMの酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)(反応緩衝液)において希釈し、50μlの各希釈物を96ウェルプレートへ三つ組で入れた。4-MUG基質(Sigma)を反応緩衝液で4mMに希釈し、この希釈した基質50μlを各ウェルに添加した。酵素反応物を37℃で60分間インキュベートした後、100μlの150mM EDTA-Na₂塩(pH11.5)を添加して、この反応をクエンチした。蛍光を励起360/40nmおよび発光460/40nmで測定した。4-メチルウンベリフェロン(4-MU)を使用した標準曲線を適応させて、比活性を算出した。種々の酵素の活性をU/mgとして報告した。ここで、1単位は、100mM酢酸ナトリウムバッファ(pH4.0)+0.1%BSA中の2mM基質濃度での1時間あたりの1

nmol 基質の加水分解を触媒する酵素の量として定義する。上記酵素の各々の比活性は、約 $200 \times 10^3 \text{ U/mg}$ であった。

【0156】

CcMan5 (huGAA_CcMan5)、Ccman4 (huGAA_CcMan4)、CcMan4 および CcMan5 の併用 (huGAA_CcMan4/5)、またはタチナタママンノシダーゼで処理した huGAA の取り込みを、ヒトポンペ線維芽細胞系である GM00248 線維芽細胞 (Coriell Cell Repository、米国ニュージャージー州カムデン) において評価した。GM00248 線維芽細胞は、酸性 α グルコシダーゼ活性が欠損しており (正常の 0.27%)、かつ GAA の mRNA もタンパク質も検出可能なレベルを有していない。15% FCS および 2mM グルタミンを補充したイーグル塩および非必須アミノ酸を含有する最少必須培地 (MEM、Invitrogen 社) において、GM00248 線維芽細胞を播種しおよび集密になるまで増殖させた。酵素投与前日、熱失活させた 5% FCS (56°C で 30 分間) を補充した Ham の F10 培地を有する 24 ウェルプレートに細胞を播種した。

10

【0157】

実験当日、キャップ形成した huGAA およびキャップを外された huGAA を、種々の酵素活性まで取り込み媒体で希釈した後、0.22 μm のフィルターで濾過した。取り込み媒体中の各酵素希釈物の活性を、4-MUG アッセイを使用して再度測定し、実際の酵素活性を決定し、該酵素活性を細胞に添加した。

20

【0158】

GM00248 線維芽細胞を上記酵素とともに 16 時間インキュベートし、氷冷 PBS で 2 回洗浄し、次に、プロテアーゼインヒビターを補充した 0.5ml PBS + 0.5% Triton X 100 で溶解した (4°C、30 分間)。細胞溶解産物を 10000 $\times g$ で回転させ、細胞残屑を除去した。huGAA の細胞内活性を、上記のとおり 4-MUG 活性アッセイを使用して測定した。タンパク質濃度を製造元のプロトコルに従って、ビシンコニン酸法 (マイクロ BCA キット、Pierce) によって決定した。huGAA の細胞内活性を総タンパク質 1mg あたりの単位 (U/mg) として表す。

【0159】

図 17 は、GM00248 ヒトポンペ線維芽細胞における huGAA の細胞内活性を示す。ManP-Man₈GlcNAc₂ N-グリカンおよび (ManP)₂-Man₈GlcNAc₂ N-グリカンの混合物を含有するキャップ形成された huGAA (図 11、第二のパネルを参照されたい) は、細胞に入らなかった。キャップ形成された huGAA で処理した細胞の細胞内活性は、非処理の細胞と同様であった (データ非表示)。完全に脱マンノシル化されている huGAA_CcMan4 (図 11、第三のパネルを参照されたい) も、ポンペ線維芽細胞における取り込みを示さなかった。CcMan5 処理は結果的に、キャップを外された一リン酸化の P-Man₈GlcNAc₂ および完全にキャップを外された二リン酸化の P₂-Man₈GlcNAc₂ の形成をもたらしたが、細胞の取り込みは試験した用量範囲にわたって観察されなかった (図 17)。用量依存性細胞取り込みは、CcMan4 および CcMan5 の併用 (huGAA_CcMan4/5) またはタチナタママンノシダーゼ (huGAA_JBMan) のいずれかによりキャップを外されかつ脱マンノシル化した huGAA である HuGAA について観察された。CcMan4/5 または JbMan のいずれかにより処理された huGAA の細胞内活性は、約 500~1000 U/ml でプラトーレベルに到達したのに対し、ミオザイム (登録商標) の細胞内活性は、2500 U/ml でプラトーに到達しなかった。ホスフェートがキャップを外されかつ脱マンノシル化した huGAA は、ミオザイム (登録商標) よりもおよそ 2.5 倍効率的に取り込まれた。

30

40

【0160】

取り込みがマンノース-6-リン酸 (M6P) 受容体への結合によるのかどうかを調べるために、第二のセットの実験を実施した。これらの実験については、上記の実験で使

50

ーリン酸－6－マンノース結合型グリカンのキャップを外すためのC c M a n 4マンノシダーゼおよびC c M a n 5マンノシダーゼで、または実施例8に記載されているようなタチナタマメマンノシダーゼで処理した。ミオザイム（登録商標）を対照標準として使用した。h u G A Aの取り込み効率に及ぼす末端 α -1, 2マンノースの効果を調べるために、ミオザイム（登録商標）をC c M a n 4マンノシダーゼにより処理した。この酵素の比活性を、上記のような4-MUGアッセイを使用して決定した。取り込みアッセイを上記のとおり実施した。この酵素を取り込み媒体における等しい酵素活性に希釈し、濾過し、および種々の用量をGM00248線維芽細胞に、5mM M6P（Sigma社）を存在させて添加し、またはそれを存在さないで添加し、16時間インキュベートした。各細胞取り込み実験を二つ組で実施した。インキュベーション後、細胞を氷冷PBSで洗浄し、プロテアーゼインヒビターを補充した0.5mlのPBS+0.5% Triton X 100で溶解し、4-MUGアッセイを使用して細胞内h u G A A活性についてアッセイした。

10

【0161】

図18は、GM00248線維芽細胞におけるh u G A A酵素の取り込みを示す。C c M a n 4によるミオザイム（登録商標）の処理は、ミオザイム（登録商標）のN-グリカン特性を変化させることも（図13、第三のパネルを参照されたい）、その取り込みの効率性を変化させることもなかった。ミオザイム（登録商標）の取り込みは、遊離M6Pの添加によって阻害された。図18における結果は、キャップを外されかつ脱マンノシル化したh u G A A（h u G A A__C c M a n 4/5、h u G A A__J B M a n）の用量依存性取り込みを示しており、これはM6Pの添加によって阻害される。これらの結果は、キャップを外されかつ脱マンノシル化したh u G A Aの取り込みがM6P受容体を介して仲介されることを示している。

20

【0162】

実施例10

（ボンペ線維芽細胞のリソソームにおけるh u G A Aのプロセッシング）

h u G A Aは、小胞体において110kDa前駆体として産生される。該h u G A Aは、ゴルジ装置においてN-グリカンプロセッシングを受け、リソソームにおいてさらに、中間の分子形態の95kDaを経て76kDaおよび70kDaの活性のあるタンパク質へとタンパク質分解でプロセッシングされる。この活性のあるタンパク質は、その天然基質であるグリコーゲンの分解に関与する。以下の実験においては、Y. l i p o l y t i c aで110kDaタンパク質として産生される、精製された組換えh u G A Aの細胞内プロセッシングを調べた。これらの実験については、調製緩衝液を2mM C a C l₂および100mMマンニトールを有する100mM HEPES（pH7）へと交換して、実施例9において使用されたものとは異なる精製バッチ由来のh u G A A（実施例7を参照されたい）を、実施例7に記載したとおり、C c M a n 4およびC c M a n 5を併用して、またはタチナタマメマンノシダーゼで処理した。キャップを外された酵素の比活性を、4-MUGアッセイを使用して決定した。実験前日、GM00248線維芽細胞を、上記のとおり、取り込み媒体中 5×10^5 細胞/ウェルの密度で6ウェルプレートに播種した。翌日、線維芽細胞を2ml取り込み媒体中1000U/mlのh u G A A__C c M a n 4/5またはh u G A A__J B M a nとともに14時間または46時間インキュベートした。対照標準として、細胞をミオザイム（登録商標）とともにインキュベートし、酵素とともにインキュベートしなかった細胞を陰性対照として使用した。各細胞取り込み実験を二つ組で実施した。インキュベーション後、GM00248線維芽細胞を氷冷PBSで洗浄し、トリプシン処理（0.53mM E D T Aを有する0.05%トリプシン）によって収穫した。細胞を遠心分離し、プロテアーゼインヒビターを補充した0.5ml PBS+0.5% T r i t o n X 100に溶解した。細胞溶解産物を遠心分離して細胞残屑を除去し、上記のような4-MUGアッセイを使用して細胞内G A A活性についてアッセイした。タンパク質濃度をBCA法によって決定した。

30

40

【0163】

50

図19は、細胞内h u G A A活性を示す。h u G A A__C c m a n 4 / 5は部分的に脱リン酸化されてP - M a n ₆ G l c N A ₂および(M a n P) - M a n ₆ G l c N a c ₂となり(図14、第三のパネル)、この酵素は、試験した両インキュベーション時間でミオザイム(登録商標)よりも1.8倍良好に取り込まれた。h u G A A__J B M a nもミオザイム(登録商標)より良好に取り込まれたが、おそらく二リン酸化したN-グリカンであるP 2 - M a n ₆ G l c N A c ₂が存在しないことにより、h u G A A__C c M a n 4 / 5と比較してあまり効率的ではなかった(図16、第三のパネル)。

【0164】

この実験の目的は、線維芽細胞によって取り込まれたh u G A Aが76kDaおよび70kDaの活性型へとプロセシングされるかどうかを試験することであった。それゆえ、細胞試料をトリクロロ酢酸(TCA)/デオキシコール酸(DOC)法によって沈殿させた。試料(500μl、160μgのタンパク質を含有)を50μLの0.5%DOCと混合し、氷上で30分間インキュベートした。TCA100%(100μl)を添加して15%のTCA終濃度を得た後、試料を混合して-20℃で一晩沈殿させた。沈殿物を微量遠心分離機において13000rpmで30分間遠心分離した後、ペレットからTCAを吸引した。上記ペレットを500~700μlの氷冷アセトンで洗浄し、混合して、13000rpmで遠心分離した。ペレットを50℃で10分間乾燥させた後、NuPAGE(登録商標)試料還元剤を含有する1×NuPAGE(登録商標)LDS試料バッファ中で再度可溶化した。試料を100℃で3分間煮沸した後、20μgのタンパク質(10μl)を、500μlのNuPAGE(登録商標)抗酸化剤を含有する1×MOPSSDS泳動バッファを有する4~12%のNuPAGE(登録商標)Bis-Trisゲル(Invitrogen社)にのせた。ミオザイム(登録商標)(50ng)を対照標準として上記ゲルにのせた。試料をニトロセルロースメンブラン上に一晩ブロットし、細胞内h u G A Aを、ポリクローナルウサギ抗h u G A A血清(1/2000希釈)を一次抗体として、かつヤギ抗ウサギIgGペルオキシダーゼ結合抗体(1/5000希釈、Sigma社)を二次抗体として使用して検出した。このメンブランをPBS/Tweenで洗浄した後、メンブランを、ECLウェスタンブロットティング検出試薬(GeHealthcare社)を使用して顕色した。キャップを外された酵素との、およびミオザイム(登録商標)との14時間のインキュベーション時間は結果的に、主として前駆体タンパク質の存在を生じた。h u G A A__C c m a n 4 / 5処理した細胞においては、少量の76kDaタンパク質が観察された。46時間のインキュベーション後、キャップを外された酵素を活性のある76kDaポリペプチドへとプロセシングされた。ミオザイム(登録商標)も活性のあるポリペプチドへとプロセシングされているが、バンドはあまり濃くなかった。

【0165】

実施例11

(C c M a n 5およびタチナタマメα-マンノシダーゼによる組換えh u G A Aのキャップ外しおよび脱マンノシル化)

h u G A A : C c M a n 5 : J b M a nについて100:5:10のw:w比でC c M a n 5およびJ B M a nによって組換えh u G A Aのキャップを外しかつ脱マンノシル化した。1.08mlのh u G A A(40mM NaClを有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)中4.8mg/ml)の溶液に、1.69mlのC c M a n 5(PBS緩衝液中0.154mg/ml)および1.04mlのJ b M a n(PBS緩衝液中0.5mg/ml)を添加した。総反応容積を、2mM CaCl₂を含有する100mM酢酸ナトリウムバッファ(pH5.0)により5.2mlに調整した。反応混合物を30℃で15時間インキュベートした。キャップを外されかつ脱マンノシル化したh u G A Aを、実施例3に記載したとおり、H i l o a d 16/60 s u p e r d e x 200ゲル濾過カラム(GE Healthcare)を使用して精製した。

【0166】

実施例6に記載されるとおり、10μgの精製された最終のh u G A AからN-グリカ

ンが放出され、そして標識された。CcMan5およびJbManの両方で処理したhuGAA由来のN-グリカンのD S A - F A C E電気泳動図を図20に示す。キャップ外しおよび脱マンノシル化の後に観察される主要ピークは、二リン酸化のP2-Man₆GlcNAc₂および一リン酸化のP-Man₄GlcNAc₂、P-Man₅GlcNAc₂、およびP-ManGlcNAc₂であった。

【0167】

実施例12

(CcMan5およびJbManによってキャップを外されかつ脱マンノシル化した組換えhuGAAのポンベ線維芽細胞への取り込み)

実施例9に記載したとおりGM00248線維芽細胞系を使用して、キャップを外され、脱マンノシル化し、かつ精製されたhuGAA(実施例11に記載されたとおりJbManおよびCcMan5で処理した)の細胞取り込みを、ミオザイム(登録商標)の細胞取り込みと比較した。

【0168】

図21は、ミオザイム(登録商標)の細胞内活性に対する、キャップを外されかつ脱マンノシル化した精製されたhuGAAの細胞内活性を示す。細胞に添加される酵素の量(酵素活性単位として表される)を酵素濃度(nMとして表される)へ変換し、K_{取り込み}の計算のために、その比活性(U/mgで表される)に対してプロットした。K_{取り込み}および標準偏差をhuGAAについては14のデータ点(濃度あたり2データ点)を、およびミオザイム(登録商標)については12のデータ点によって非線形回帰を使用するGraph Prismで算出した。用量依存性細胞取り込みをhuGAAについて観察し、約25nMでプラトーレベルに達し、そしてK_{取り込み}が1.7±0.2nMであったのに対し、ミオザイムの細胞内活性は、200nMでプラトーに到達せず、かつ64±5nMのK_{取り込み}を有している。Yarrowia lipolyticaにおいて産生されるキャップを外され、脱マンノシル化したhuGAAは、ポンベ線維芽細胞において、ミオザイム(登録商標)よりも30倍効率的に取り込まれた。

【0169】

実施例13

(CcMan5およびJbManによってキャップを外されかつ脱マンノシル化した組換えhuGAAのポンベ線維芽細胞のリソソームにおけるプロセッシング)

実施例11に記載されたようにCcMan5およびJbManで処理したYarrowia産生huGAAがリソソーム中で該huGAAの成熟形態へとプロセッシングされるかどうかを決定するために、細胞取り込みアッセイを実施した。実験前日、GM00248線維芽細胞を、取り込み媒体中3×10⁵細胞/ウェルの密度で6ウェルプレートに播種した。翌日、線維芽細胞を2ml取り込み媒体中2000U/ml huGAAで8時間もしくは24時間刺激し、または24時間刺激した(「パルス」期間)後、細胞を洗浄し、2mlの増殖培地を細胞へ最長100時間のチェイス期間にわたって添加した。酵素で処理されていない細胞を陰性対照として使用した。

【0170】

インキュベーション後、細胞を洗浄し、細胞溶解産物を実施例10に記載したようなDOC/TCA法を使用して沈殿させ、ウェスタンブロット法に供した。対照標準として、精製huGAA(30ng)をゲルにのせた。試料を一晩ブロットし、ポリクローナルウサギ抗huGAA血清(1/2000希釈)を一次抗体として、かつヤギ抗ウサギIgGペルオキシダーゼ結合抗体(1/8000希釈、Abcam社)を二次抗体として使用して、細胞内huGAAを検出した。ECLウェスタンブロット法検出試薬(GeHealthcare)を使用してメンブランを顕色させた。

【0171】

キャップを外されかつ脱マンノシル化した酵素との8時間のインキュベーション期間は結果的に、前駆体タンパク質(110kDa)の存在を生じた。24時間のインキュベーション期間は結果的に、前駆体タンパク質およびプロセッシングされたタンパク質(76k

【図 3 B】

FIGURE 3B

[illegible]

【図 5】

FIGURE 5

A

RNaseB

B

Man₈GlcNAc₆ 対照

C

Man₈GlcNAc₆ + JbMan
T = 120分

D

Man₈GlcNAc₆ + JbMan
T = 24 時間

E

Man4 N-グリカンリン酸化型
対照

F

Man4 N-グリカンリン酸化型
+JbMan
T=120分

G

Man4 N-グリカンリン酸化型 + JbMan
T = 24時間

H

Man4 N-グリカンリン酸化型および
ニリン酸化型 対照

I

Man4 N-グリカンリン酸化型および
ニリン酸化型 + JbMan
T = 120分

J

Man4 N-グリカンリン酸化型およびニリン
酸化型 + JbMan
T = 24時間

K

反応 3 + CIP

[illegible]

**Man4 N-グリカン-リシン酸化型
対照**

**Man4 N-グリカン-リシン酸化型
+JbMan
T=120分**

**Man4 N-グリカン-リシン酸化型+JbMan
T=24時間**

**Man4 N-グリカン-リシン酸化型および
ニリン酸化型 対照**

**Man4 N-グリカン-リシン酸化型および
ニリン酸化型 +JbMan
T=120分**

**Man4 N-グリカン-リシン酸化型およびニリン
酸化型 +JbMan
T=24時間**

○ α 結合型マンノース ● β 結合型マンノース ■ GlcNAc P ホスフェート

Man8GlcNAc2
= M8

Man1GlcNAc2
= M1

α -1,2/3/6-マンノシダーゼ

ManPMan8GlcNAc2
= MPM8

ManPMan3GlcNAc2
= MPM3

P2Man3GlcNAc2
= PM3

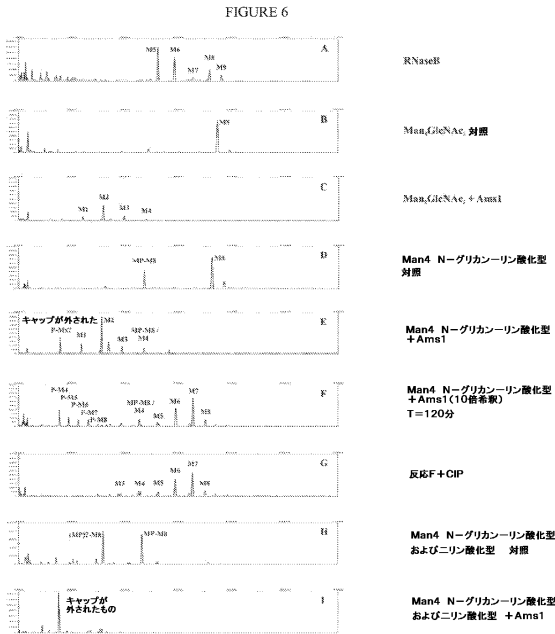
(ManP)2Man8GlcNAc2
= MPM2M8

(ManP)2Man5GlcNAc2
= MPM2M5

P2Man5GlcNAc2
= P2M5

および/または

【図 6】

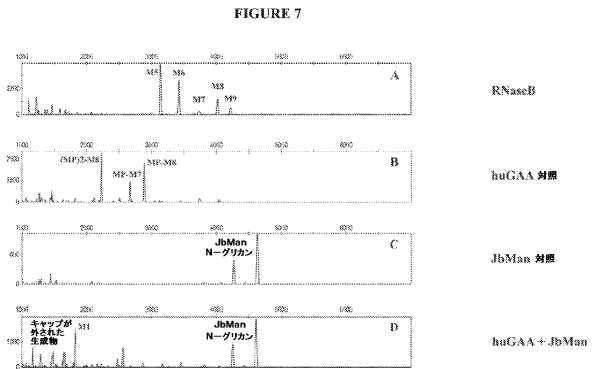


【図 8 A - 1】

FIGURE 8A

>DsbA-6xHis-CcMan5 (107bp - 5167bp, 直接) pLSAHCcMan5 由来の 5061bp
ATGAAAAAGATTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTAGTTTACGCTTTAGCGCATCGGCCGG
CCATCACCATTATCACCACCTGGGGCCCGGCTCGGACGAAGTGGATGCACCGGAACCTC
CGAGCGCAGATTATGCAAGCCTGGTTGATGTTTTTTGGCACCAAGGTGATTTTGGT
AATGATATGCTCGACGACAGGCAACCGAATGGTCTGGCAAAAGTTAATCCGGTACACC
ACCGGGTCGTAATAATACCGGTATGATTATGCCAGAGCAAAATTAGCGGTTTTACCC
ATACCAATCTGGATGGTGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTATCTGGTGGTGGTGGT
ACCGAGCGTAGCTATACCGCAGCTCCGGGTACAGGCACCTATGCACATCCGTTTAGGCA
TGATGATGAAGATGCGAGTCCGGGTTTTATAGCGTTGGTCTGGGTAATGTCAGGCA
CCGATGGTGCAATTACCGGTGCTCCGGGTACAATTGAAGCAGAAAGTTGCAGCAGCAACC
CGTAGCGGTGTTTCATCGTTATGCAATTCGGCGAGGTAGCACCCGAGCTGGTTGTTGA
TCTGGAACCAATAATACCGCGCTCGTAGCAGCAGCGTTAGGTTGAAACCCGTCGAG
ATGGACCGCTTGAACCTGAGCGGTGAGGTTACCGGCTATTTTATAATGCAAGCTATACC
CTGTATATACCGCAGCAGCCTCGACGCTGCAACCGTTAGACCTGGGGTGGTATGATGA
TCGCTGGTGGTATGATGCAACCGCAGGATGGTTGATACCGGTGCAATTCAGACCTTTG
ATCCGCGAGATGCGCGTGAAATGGTCTGCGAGTTACCTGTTCTCCGGTTAGCGTTGAA
CAGGCACCTATGATCAGCAGGTTGAACCTGGGTGATCTGAGCTTTGATGCAATTCCTGA
TCGTACCCGTCGAGAAATGGAATGCAACCTGGGTGCTGTTGCAATGATGCAAGCAGCG
CAACCGATCCGACCGGTGAATGCAAGCAGCTGCTTTTATACCATCTGATGCAATGTTG
GCAATCCGATGAATGCAACCGACACCGCGCACCTATCGTGGTGGTATGATGGTGGATG
TCATGCGACGACAGGCTTTACCTATTTATGATAGCTGGGCAACCTGGGATGATTTTCGCA
AATTTAGCGTGATTGCTATATATGATCCGCGACTGATGCTGATATGTTTCAGAGCTTG
GTTTACCTGTTTCAGATGCAAGCAACCGGTACAGCGGTGGTCTGGGTGGTGGTGGT
TCATAGCGTTCCGACCGTTGTTGGGAACGTAGCAGCGTTGTTGTTGCAATGCAATTT
CCAAAGGCTTTGATGGTTTTGATGCTGATGAGCATATCCGCGACTGCAGCGCGCTG
GTTGGTCAGTATAGCGCAGATGAACCTGGTGGTGGTATGTTGCAAGTAACTCCGGTGC
AAGCGTTCAGCGTGGTTATGATCAGTATGGTCTGAGCGTTATGCCGATGAACCTGGGTG
TGACCGAAGAACGAGCAACCTCGCGGAACAGGCAAGCTGGCCGATTGAAAACTGACCC
AAACCGGGTGCATGGAACCGCAGCAGATGGTACACAGGTTGGTCTGCTGACACCGCGTGC
AGCGCATGGTACCTGCGCAGAGCGAGATCATGCCAAATTTGAACGACAGGCTCTGTATC
AGGGCACCTCTGGCAGTATCATTTGGTATGATGCTATGATGATGATGATGATGATGATG
GCAATGGGTGGTCAAGAGCAGCGCGTCTGGGTATGCGTATGTTGTTGGTGAACATGC
ACCGGATGATGGTAAAGCAATGCTGCATAGCAATGCCAATGAAATGATCTGCGAGCGAC
CTACCTGTTTATATATACCGGTGAACCGAGGCTGACCCAGAAATGGGCAAGTGCATTT
TATACCAAGAAACCTGGATGCTATATTTGCAACCGGTAGCAGCTCTGCGATTCGGT
AGGTGGTGGTGAATTTACACCTCCGTTGAAACCAAAAGTTTATCGTCTGACCCCTCGT
GTTGCTGCGCAGCAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
GCCGTGGTCTGTTTCCGGTTACCGCAGGTAGCAGCGAGTTTACGGTTGGTATGCCGCT
TTTTGATAGCAGCAGCATTACCTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
GTGTTAGCAGAGATGCTTTATGTTTACAGGCGCAACCTGGATGATGATGATGATGATG
AATACCTGGGTGATTTATGCAACCGTTGTTGGTGGTGCAGATCTGGATTTTCCTATGG
TGAACAGCGAGCGATTGGGGCACCGATACCGCACCGGCAATTTAGCATGAGCACCGCCCA

【図 7】



【図 8 A - 2】

FIGURE 8A (続き)

CCGATGAACCGGCAGAAAGTCTCGGTTAGCGCAGAACCGACACCGTGCAGACCGGT
GATGGTGGTGCAGTGGATGCAACCGTTACCGTGCAGTGGATGGCGCAGCTGGCAGC
ACCGGCAGGTACAGATCTGGTTACCGCGGTGCAGCAAGCGTTGTTGGTCTGCCCGGATG
GTGTACCGGCAGCAGTTACCGTTGCAAGCCGACCGCAGTGCAGCTGACCGTTAGCTGACCGGC
ACCGCATCAGCAGATGCAGCTTTTTTTTGGTATCTGGTGTATGCGAGCACTGGCCGATGG
TGTTGCGAGCCGCAAGCCTCGAGGTCAGGTTGTTAGCGTTCTCGCTCCGCTGCGTCTGA
CGGTTGCAAGCGCAGAACGTGATGCACTGGCAGCACTGGTTGATGATGCGCTTCTGGTT
CGTATGGTAAATATAGCAGCGTTACCTTTGATGCTTTAGCAGCGCTCTGCAGCAAGCA
CAGGAAGCACTGGGCGCAGAACGAGCAGCAACCGCATTGCACTGGCTTTTGCAGCAGATCG
TCTGGTGCAGCAGCAGATGCAGCTGGATCTGACCGGTGGTGGTTATGTAACCTTGAAG
CAGAACAGAGCGAAGCATGGTCTGGTGGTGAACCTGAAATGAAGCAATAGCAGCAGC
GGTAATCTGGTGGTGGTCTGATGAGCGGTAGCTGGGTCAGTATGCGATATGACCTTTGA
AACCAGCAGCGGTGATACACCTCCGCTTTTCTGACCGTTGCTGATGATGACAGCTTTG
CACCAGCCGATACCCGAGCAGCGTTGCTGTTTCATGCGCGGTGATGTTCTGGTCCGCTT
GTTGCAACCGTTGATCTGAAAGGACACAGCGGTTGGGTAATATAGCGAAGTTACCGC
AGAACTGGGTGATGTTGAGGCGCTGGTTGATGCGCGAGTTGTTACCTTTGAACTGCTGG
CACCAGCGCTGCTAGCTGGGTGGTAAATTTGATGTTGGTTTTCGCTTTAGCCGACAGAT
CCGCGCAGCAGCGGTGACCGTTGGTGAAGCCGACCGCTTACCATGAAAGCGAAGATTG
GACCGAAGCAGCGGTGCTGGTCTGAAAGAAAGAGCAGCAGCTGAGCAGCGGTCCGG
TGACCAATGTTGGTGGTACAGCAGATGGTATGGATTGCTATGGTGAAGTTGATCTG
GGTGAACCTGCCGTGGCGCACTGAGCGTTTATGATGCAATATAGCAATCGCAGCGG
TAATATAGCGCACTGAGCGTTTATCTGGATGGATTTGATCGCGGTAACTCCGGGTGAC
CGTTTGTGTTACCGTCTCGCTGCCGACCGCGGTAGCAGTTGGACCGCAGATGGCAGAGCC
ACCGTGGTCTGCCGGAACCGTGCAGGCGACCGATGAAGTTTGTGCTGCTGAGCAG
CGAACCGTATGCAATCATCCGTATGTTTGAACATCTGGATAGCTGACCTTTGCGACCGG
GTGGTCCGACCGAGCTTTGGTGAAGCGAAGCCTGGACAGCAATTTGGTGGTGGC
CTGAAAAATGAATCTTCTACCTGGACCTCTGGTCCGGTTACAAATGGGGTGGCAGCCG
TGATGGCGATTGGCTGGCATATGGCGAAATGATCTGGGCGAGCGCAGCACTGGATCAGC
TGCTCTGCGATATGTTTATGATATCTAATCGCTCTGGTCGTAATCTGCACTGCTGTG
TATCTGGATGCTTTGATCGGCAAACTCCGGGTGAACCGTTTGTGACAGTGGCGCTGGC
AAATACCGGTAGCTTTGGACCCAGGATGGTACTGCACTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
TCTGGTGAACATCAGGTTGGGTTGCTGCTGCTACCGAAGCATATGCCGATCATCCG
TATGGGCGCAATCTGGATCTATGCGCTTTTTTACCGATGATATGATGTTGAAGTTCC
TCCGACCGATACAGCAGCACTGGCAGCGCTTGTGATGCAAGCAGGTACACCGCAAGCAG
CAATTCGACCTTATGGTGGTATGATGCGCTTTTTTACCGGTGAACTTCGCGCAGCA
CGTAGGTTCTGGCGCATGCGCGTGCAACACAGGCAAGCAGATGAACTGGCTCTGCTG
TCTGGTCTGGCAACCGATCAGCTGGTTCCGCGCAGACCTGGATGATGCAAGCAGCTCTG
TGCGCAGCGCAGAGCACTGACCGCAGAGGTTTATCTCCGGAAGCTGGCAGCGATTTG
GCTGTTCTGGTGAAGTTGAAGTTTCTCCGCGTTGCTGGCAGGTAAACCGTATGTT
GCGTTCTGGTGAAGTTGAAGTTTCTGATGAGCGCTGGTGGTGAAGTGAAGTGAAGTGA
GGGACCGCTAGCTTTGTTGGTGGTGGCAGCGGTCGAGCGCATATCAGAGCTTTGACG
CCGATGAGCGCAACCGGTGATCTGGATGTTACCGTGACCGCAACCGGTGAGATGGTACT
CAGACCGTGAACAGGTGTTGACCGTCTCCGAGCTGTAGCTAATAA

【図 8 B】

FIGURE 8B

ALAVVGLAPATAASAAPEPPSADYASLVDFVGTGEGDFGNDMPAAQAPNGLAKVNFRTT
 PGRNNTGYDYAQSKISGFTHNLNDGVGGSGGGDLVVPVTSYSGSYTARPGTGYAHFPFSH
 DEEDAGPGFYSVGLGNVAGTDGAIATGAPGTIEAEVAAATRSVHRYAFPAGSTFSLVVD
 LPTNNTSRSSSVQVETRADGTVELSGQVTGYFYNAAYTLYYTARTLQPATVQTWGGDD
 RLVDATAQDGVDTGAILTFDPADAGEIGLQVTLSPVSVQEARIDQQVELGDLSEDAIRD
 RTRAEWNATLGRVAIDASTATDPTGELQRLFYTHLYRMFAMPNATSTSGTYRGVDGAV
 HAAQGTYYDSDWATWDDFRKFSVIAYIDPALYRDMVQSLVYLFADAEATGTGGGLGGFV
 HSPVTVRWEKSSVVVADAIAKGFDFGLDEAYPALQRLVGGYSADELRRGYVAGNPGA
 SVQRGYDQYGLSVIADELGLTEEAETLREQASWPIEKLTKPGAWTAADGTQVGLLTTPRA
 ADGSWQSAADHAKFEAAGLYQGLTWQYHWYDAYDMDALVEAMGGHEAARLGMRFMGEHA
 PDDGKAMLSHNSANEIDLQAPYLFNYTGPESLTQKWARAIYTKETWNRYYIATGSSSAVPS
 GGGFTPLKTKVYRLDPRGMLPTMDNDAGTMTMFVAAAVGLFPVTAGSSQFQVGSFP
 FDSITTYYDDGSAFTVTDGVEDAFYVQSATLDGATFGNTWVDYATVVGADLAFRMG
 EQPFDWGTDTAFAPMSMTATDEPAEGPRVSAEPTTVQTDGGALDATTVLTLDGARLAA
 PAGTDLVTSGAASVVLPGDVTAAVTVASPTALTVSITGTASADARFFVHLRDAALADG
 VAAASLQCGQSVRSPLRLSVASAEERDALAALVDDAVLVRHGNYSVTFDRFSTALTKA
 QEALG05AATSIALRFAADRLGAADALDLTGGGYRTLEAEQSEANSGGELKNEANSSS
 GNLGGVRSQSVQYRDMTFETAAGDTPPRFLTTRYDTSFAPTDTPSTVRVHAGDVSGGTV
 VATVDLKGTSQWQKYTEVTAELGDVQALVDQAVTFELLAPSGRSWVGNDFWFRFSAED
 PAAPQPGESPTVTEAEADWTASSGRGLKKESSWTSGPVTNVGGTAGDWDIAYGEVDL
 GELPLGELSVHYVHNSNRSGNNSALSVYLDADFANPGEFPVTVPLPTTGSSTWADGTGTA
 TVVLPETVQGTHEVFVRLSTEPYADHPYVANLDSLTFAPGGPSTSVVVESEANTSNRGR
 LKNESSWTSGPVTNVGGTAGDWDIAYGEVDLGTGSAALDQLSVHYVHNSNRSGNNSAL
 YLDADFANPGEFPVTVPLANTGSSWTDTGTAVVDLPSTVRGHQVWVRLSTEAYADHP
 YVANLDSMRFTTDYDVEYGTDTAALAAVDAAGTPEAEIARYGRDARVTEAYADHP
 RSVLADAGATQAQADERARRLGLATDQLVPAERRLLENLVAEAEALDEGYSPEWQAF
 RTALAAATGTLDAAASDEALHDAFLAQGAVALDEEPAADVILVEVEVSRCLAGKPYV
 AVRAVNVSDAAVDVLELASSLGRSFGVAGASAYQSFARSATGDLDTVTATGADGT
 QTVEQVTVFPSCS (配列番号 7)

【図 8 C】

FIGURE 8C

APEPPSADYASLVDFVGTGEGDFGNDMPAAQAPNGLAKVNFRTTPGRNNTGYDYAQSKISGF
 THTNLDGVGGSGGGDLVVPVTSYSGSYTARPGTGYAHFPFSHDEEDAGPGFYSVGLGNVAGTD
 GAITGAPGTIEAEVAAATRSVHRYAFPAGSTFSLVVDLENTNNTSRSSSVQVETRADGTVE
 LSGQVTGYFYNAAYTLYYTARTLQPATVQTWGGDDRLVDATAQDGVDTGAILTFDPADAGE
 LQVTLSPVSVQEARIDQQVELGDLSDAIRDTRAEWNATLGRVAIDASTATDPTGELQRL
 FYTHLYRMFAMPNATSTSGTYRGVDGAVHAAQGTYYDSDWATWDDFRKFSVIAYIDPALYR
 DMVQSLVYLFADAEATGTGGGLGGFVHSPVTVRWEKSSVVVADAIAKGFDFGLDEAYPAL
 QRLVGGYSADELRRGYVAGNPGASVQRGYDQYGLSVIADELGLTEEAETLREQASWPIEKL
 KPGAWTAADGTQVGLLTTPRADGSWQSAADHAKFEAAGLYQGLTWQYHWYDAYDMDALVEAMG
 GHEAARLGMRFMGEHAPDDGKAMLSHNSANEIDLQAPYLFNYTGPESLTQKWARAIYTKETW
 NRYIATGSSSAVPSGGGFTPLKTKVYRLDPRGMLPTMDNDAGTMTMFVAAAVGLFPVT
 GSSQFQVGSFPFDSITTITYDDGSAFTVTDGVEDAFYVQSATLDGATFGNTWVDYATVVG
 ADLAFFRMGEQPSDWGTDATAPAFMSMTATDEPAEGPRVSAEPTTVQTDGGALDATTVLTLDG
 ARLAAPAGTDLVTSGAASVVLPGDVTAAVTVASPTALTVSITGTASADARFFVHLRDAALA
 DGVAASLQCGQSVRSPLRLSVASAEERDALAALVDDAVLVRHGNYSVTFDRFSTALTKAQ
 EALGDEAATSIALRFAADRLGAADALDLTGGGYRTLEAEQSEANSGGELKNEANSSGNL
 GVRSGSVQYRDMTFETAAGDTPPRFLTTRYDTSFAPTDTPSTVRVHAGDVSGPVTAVDILK
 GTSGWQKYTEVTAELGDVQALVDQAVTFELLAPSGRSWVGNDFWFRFSAEDPAAPQPGES
 PTVTEAEADWTASSGRGLKKESSWTSGPVTNVGGTAGDWDIAYGEVDLGLCELGLSVHYV
 HNSNRSGNNSALSVYLDADFANPGEFPVTVPLPTTGSSTWADGTGTA TVVLPETVQGT
 ATTCCTGGCTGTATGATGACGACCGGTGCTCGAGCAAGACACAGGAAAAAGTTCCGCA
 AGTTACCCGTGCTGTTGTTGGTAGCGAAATTTGGTCAGGGTTATCCGGGTGATGAAG
 ATAAATGGTGAAGTTCCTCGTGGTGGATTTTGGCAAGCTGGGTTTTTATCCGCTGCAG
 GTTGGTAGCGATCAGTATGCAGTTGGTTCTCCGCTGTTTGATAAAGCAACCGTTTCATCT
 GCCGGATGGTGATCTGGTTGTTAATGCCGAAATAATAGCGTGATATGTTGATGTTTC
 AGAGCTGGCAGTTGATGGTAGAGCACGTACAGCACCGAGCTGAGCCAGGCAGATCTG
 AGCGGTGGCACCACTGGATTTGTTGTTGGTGGGTAAGCAACCGAGGATTTGGGACCGG
 TGAAGATGATGCACCTCCGTCACGTACCGAAGGTGATGAACCTCCGACACCGGTTCCAG
 ATGCAACCAACCGAGCGCTGGGCACCAACCGTTGCCGATGGTATGTCGACCACTCT
 GCAGCAGCCCTGACCGATAATACCAGCGGCACCCGTTACCACTTTGCAACCAACCAACCC
 GAGCATTTACATGGGCAGGTAATGGCATTCGTCGACCGGTGGTAGCTATACCTGACCT
 CTGGTGCAGCGGCACCGCAAGCCGCTCGCATGGACCTGGAAAGGTTCTGATGATGGC
 GAAACCTGGACCACTCGATGAACGTAGCGGTGAACAGTTTCGTTGGGCAGTCGACAGC
 CGTCCGTTTACCCTTGGCGAACCGACCGCATTTGACACGTTATCGTGTACCCTTACCG
 CAACCGAGCGTTCGTGTCAGTGGCAGAGTTGAATCTGCTGCAGATCCGAAA
 GAAAGCGGTGCAGAAGAACTGACCTGCTGCAGCACCAGGATCGTATGGCGTTAACCGG
 TCGTGAAGTTAGCGGTTCTTTGCAACCTTGACCGGTGTTGAAGGTGATGTTGCCGCAC
 TGGATGTTAGGTTGCAATTTGGTGATGGTAGCGAACCGGTTGCAAGTACACTGCTGTC
 GGTGATTTGGTGGTTATGCAGTTGATGCAAGCATATACCTGGACCGCACCGGTGTTTA
 TCCGGTTACCGTGACCGTTAGCGGTGAAGGTATGAAACCGTTAGCGCAAGCAGATGATG
 TTAGCGTTAGCGTGTGCTGCTGAAGGTTCCTGCTGGCAGCATATGATAATGTGTCAT
 GGTGATGTCAGATACACCTGGTTCCTGATGGTACCGGTTTATGTCGCTGTCG
 ACAGCTGGCAGCAAAAGTTTTGTCGAGGTTGAACGTGCAACCGTTCGGGTACAGAT
 GAGCATTTGATGTTCCGGCAGTTCCGGCTGGTCAGCTGATTAATGCAACCGGTGATGGT
 CAGACCATTTGAATGGATGTTCCGGCTGATGCAAGACAGCAAGCTGACCGGTATTTGGCAGCGG
 CACCGAAAAAATACGACAGGCAACCGGTACACTGACCTTTGATGATGGTTCTACCCAGC
 CGATTGATCTGAGCTTTGGTGATGGAGCGGTGACCGGTAACCGTTGCTGTTGATTAAT
 ATCCGGTTGCGATGACGATAGCCGCTGCTGGTGGTGGTTCTCCGACAGACCGGTACACC
 GTCAGCATTTTGGCCACCGCATTAACCTGACCGATTAACCTGACCGGTTATGCGTTAGCC
 TGACCTGCCGGATCAGCTGGTGAACCTGAGCGGTGATGGTGTATTCATGTTGTTGCA
 TCCGCATGATGGACCTTTGCAAGACATCTCCGATGGAGCTGACAGCTGACCGGACAGAGG
 TGTATCCCTGGCAGTTGGTGACAGCTCAGATGTTGCACTGGCAGGCAAGGTGCGGTGGT
 GTAGAGGTGACAGATCTGCGTGGCGCAGTTACCTGGGGGTGATGGTTCTGATGTCGACGCC
 GGTGCCGTTACCGATGGTAGGTTAGCGTTAGCGGTAGCCATGCATATACCGCAGCAGCACCTA

【図 9 A - 1】

FIGURE 9A

DsbA-6xHis-CcMan4 (107bp - 5494bp, 直接) pLSAHcCMan4 由来の 5388bp

ATGAAAGAGATTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTACTTTTAGCGTTTAGCGCATCGGCCCGG
 CCAATCAACCATCATCACACCTGGGGCCCGGCTCGGACGAAGTGGATGCAGAACCCGGGTG
 ATTTTAGCAGCAGCTTGAATCTGGCGATCCGGCAGCACTGCGCAGCACCGGTTCAGAA
 CGTATGGTGCACCGCTGGCAGGCAAAATGTTGGTAGCTTACCGCAGGTCGTGCTGGTAG
 CGTCTGGGTGAGCTGAAAGGTTTACCGCAAGCGCAGCAATCTGCCGAATGAAGGTVG
 CAGCAAACTGGACAGATGTTGACGAGCGGACCAAAATGGCTGGCATTTGCAAGCAGCGGT
 TGGGTTCGTTGATTAATTTGCAAGACCGGTAGCTTTGTTGCATATACCATGACCAAGCGG
 TGAATGATCCCGCAGCTCGTATCCGAAACCTGACACCGTTPVAGGTAGCAATGADGTT
 CTACCTGGGCAGCACTGGATCGTCTGACCGATGAAGATTTTCCGAATCTGTCAGCAGAC
 CGTACCTTTGAATCTGGAGACCCGACCGCAGCATATACCTATCTGCGTCTGAATGTTAC
 CGCAAAATAGCGGTGATAGCATTTGTTACGTGGCAGGTTGGGATCTGAGCGCAGATCTGT
 CTCAGGTTCCGAGCGCAGCAGCAGTACCAACCAAGTTGGCAGCGCTCCGCTGTGTTAGC
 TTTACCAATAAAGCGGTGTTGGTTTACCGGCTGCATAGCCTGCGTTATGATGGTAG
 CCATCTGGCGGATGGTGAACACTATGCAACCAATGCTGATGATGATGTTGATGTTG
 TGGTGGTGAAGATACCCGCTGAGGCTATACCATTTTTCGGAAGTCTGGATGATCTG
 CAGTATCCGAGCACTATGACGCACTTGTATGTTCTGTTTACCGATGCGACCTATCTGAG
 CGATCTGGGTGCACGTGATGCACATGAACCGTTCGCAACCGCACAGGCACAGGTTGAAG
 GTAATAATCTGTATGCCGATCAGTGAAGTACGCTTGGTGTGATCTGGGTGATGTTGCA
 GAAGGTAAAACCGTTGATCAGGTTCTGCTGGGTATGATAATCCGGGTGGTCTATGAGG
 CACCAAAATTTGACAGGTTGGCTGGATGATGTTGAAATTAACCGAGAACCGGCAACCATGT
 ATGGTAGCTCACTGGCAAAATTAATGTTGATACCCGCTGTCGACACCTGGCAAGCGGTAGC
 TTTAGCCGTTGGTAAATAATTTCCGGCAACCGCAACCCGAATGGTTTAAATTTTGGAC
 CCGGTATACCAATGCAAGCAGCCAGAGCTGGCTGTATGAATATCATAAAGCCAATAATG
 CGAATAATAAACCGGTTCTGACAGGTTTGGTATTAAGCAATGAACCGACCGCTGGATGAC
 GGTGATCGTAATCAGCTGACCTTTCTGCGCAGCAGCCGAAGCGGTACACCGGATGCAAC
 CCTGAGCACCGGTGCTGGAATTTGATCATGACAGATGAACCGCACGCTCCGGATTAAT
 ATGGTGTGACCTTTACCAATGTTAGTACGCAATTAAGAGCAACCCGACCGATCATGGTGCA
 GTTCTCGCTTTTAGCTATCCCGGTGCAAAAGGTCATGTTCTGGTGGATGAAGTTGATGG
 TAGCATAAAGTACCTATGATGACGCAACCGGACCACTTAGCGGTGGGTTGAAATG
 GTAGCGGCTGAGCGTTGGTGGTACCGGATGTTTGGTGGCAGGCACTTTGATCGGTAGC
 CCGACCGCGTGGTGGCAGCAGCAGGTAATGCTGCAGATGCAAGTTTGGCAACCTTTGA
 AACCGCAGCGATGAACCGTGGAACTGCGGTGGCAACCGCTTATTAGCTGGATGAT
 AGGCAGCTAAAAATCTGGATCTGGAAGTTACCGGTAAAAACCTTTACCGAAGTTAAAGCA
 GCAGCAGCAGCGCATGGAATGATCCGTTGGGTGTTATGAAGTTGAAGGTCGAAGCA
 AGATCAGCTGGTACCCCTGTATGACCAATCTGTATCCGCTGAATCTGTATCCGAATAGCC
 AGTTTGAATAAACCGCAGCAGCAAGAAACCGGTTTATCGCTTACGCACTCCCGGTTAGC
 GCACCCAGCGGTAGCGCAACCGATACCGAGCAATGCAAAATTTGGGATGGCAAAAT
 TTTATGTGAATAATGCTTTTGGGATGACCTTATCGCCGATGGCTGCATATGAGCTGTC
 TGTATCCGGAACCTGGCAGCAAGATGCTGGTGGTGGTTTGTGTCAGCAGTATCGTGAATG
 GGTGGATGTCAGCTGGCAGCTGGCGGTGATGTCAGATCTGATGACCGGTGACAGCTG
 TGTATGTTGCAATTTGCAATGCTATCTGAAAGGTAGCTGCGCGACCGGTACAGCACTGG
 AAGCATATGATGACGACCTGCGTAAATGCAACCGTTGACACTCCGAGCAATGCAAGTTGGT

【図 9 A - 2】

FIGURE 9A (続き)

CGTAAAGGCTGCAGACAAGCCCGTTTCTGGGTTTTACCCGGAAGAACCCCATGAAG
 CCTTAGCTGGGGCTTGGGAAGGTCGTGTTAATGATTTTGGCATTTGGCAATATGGCTGCAG
 CAGTGCAGAGAAGATCCGGCAACACCGGAAGAACGTCGTGAAACCCCTGGGTGAAGAAAGC
 GCATATTTTCTGGAACGTCGCCACCATATGTTGAATCTTTGATCCGGAAGTGATTT
 TTTTCTTCCCGCTCATGAAGATGTTACATGGCAGCTGATCCGGAACCATGATGATCCG
 AAGCATGGGCTGGTGGTTATACCGAAACCAATGGCTGGAATTTTGCATTTTCATGCACCG
 CAGGATGGTCAAGGCTCGGCAATCTGATGGTGGTAAACAGGCTCGGAAGATAAATCT
 GGATGAAATTTTATGACCAACCGGAAAAAGGTGCAGGTAAATGGTGGTATTCATGCAACAGC
 GTGAAGCAGCTGATGTTGATGGGTGAGTGGGTGATGAGCAATCAGGTTAGCCATCAT
 ATTCCTGGCTGATGATGACGACCGGTGCTCGGAGCAAGACACAGGAAAAAGTTCCGCA
 AGTTACCCGTGCTGTTGTTGGTAGCGAAATTTGGTCAGGGTTATCCGGGTGATGAAG
 ATAAATGGTGAAGTTCCTCGTGGTGGATTTTGGCAAGCTGGGTTTTTATCCGCTGCAG
 GTTGGTAGCGATCAGTATGCAGTTGGTTCTCCGCTGTTTGATAAAGCAACCGTTTCATCT
 GCCGGATGGTGATCTGGTTGTTAATGCCGAAATAATAGCGTGATATGTTGATGTTTC
 AGAGCTGGCAGTTGATGGTAGAGCACGTACAGCACCGAGCTGAGCCAGGCAGATCTG
 AGCGGTGGCACCACTGGATTTGTTGTTGGTGGGTAAGCAACCGAGGATTTGGGACCGG
 TGAAGATGATGCACCTCCGTCACGTACCGAAGGTGATGAACCTCCGACACCGGTTCCAG
 ATGCAACCAACCGAGCGCTGGGCACCAACCGTTGCCGATGGTATGTCGACCACTCT
 GCAGCAGCCCTGACCGATAATACCAGCGGCACCCGTTACCACTTTGCAACCAACCAACCC
 GAGCATTTACATGGGCAGGTAATGGCATTCGTCGACCGGTGGTAGCTATACCTGACCT
 CTGGTGCAGCGGCACCGCAAGCCGCTCGCATGGACCTGGAAAGGTTCTGATGATGGC
 GAAACCTGGACCACTCGATGAACGTAGCGGTGAACAGTTTCGTTGGGCAGTCGACAGC
 CGTCCGTTTACCCTTGGCGAACCGACCGCATTTGACACGTTATCGTGTACCCTTACCG
 CAACCGAGCGTTCGTGTCAGTGGCAGAGTTGAATCTGCTGCAGATCCGAAA
 GAAAGCGGTGCAGAAGAACTGACCTGCTGCAGCACCAGGATCGTATGGCGTTAACCGG
 TCGTGAAGTTAGCGGTTCTTTGCAACCTTGACCGGTGTTGAAGGTGATGTTGCCGCAC
 TGGATGTTAGGTTGCAATTTGGTGATGGTAGCGAACCGGTTGCAAGTACACTGCTGTC
 GGTGATTTGGTGGTTATGCAGTTGATGCAAGCATATACCTGGACCGCACCGGTGTTTA
 TCCGGTTACCGTGACCGTTAGCGGTGAAGGTATGAAACCGTTAGCGCAAGCAGATGATG
 TTAGCGTTAGCGTGTGCTGCTGAAGGTTCCTGCTGGCAGCATATGATAATGTGTCAT
 GGTGATGTCAGATACACCTGGTTCCTGATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 GGTGATGTCAGATACACCTGGTTCCTGATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 ACAGCTGGCAGCAAAAGTTTTGTCGAGGTTGAACGTGCAACCGTTCGGGTACAGAT
 GAGCATTTGATGTTCCGGCAGTTCCGGCTGGTCAGCTGATTAATGCAACCGGTGATGGT
 CAGACCATTTGAATGGATGTTCCGGCTGATGCAAGACAGCAAGCTGACCGGTATTTGGCAGCGG
 CACCGAAAAAATACGACAGGCAACCGGTACACTGACCTTTGATGATGGTTCTACCCAGC
 CGATTGATCTGAGCTTTGGTGATGGAGCGGTGACCGGTAACCGTTGCTGTTGATTAAT
 ATCCGGTTGCGATGACGATAGCCGCTGCTGGTGGTGGTTCCTCCGACAGACCGGTACACC
 GTCAGCATTTTGGCCACCGCATTAACCTGACCGATTAACCTGACCGGTTATGCGTTAGCC
 TGACCTGCCGGATCAGCTGGTGAACCTGAGCGGTGATGGTGTATTCATGTTGTTGCA
 TCCGCATGATGGACCTTTGCAAGACATCTCCGATGGAGCTGACAGCTGACCGGACAGAGG
 TGTATCCCTGGCAGTTGGTGACAGCTCAGATGTTGCACTGGCAGGCAAGGTGCGGTGGT
 GTAGAGGTGACAGATCTGCGTGGCGCAGTTACCTGGGGGTGATGGTTCTGATGTCGACGCC
 GGTGCCGTTACCGATGGTAGGTTAGCGTTAGCGGTAGCCATGCATATACCGCAGCAGCACCTA

【図 9 A - 3】

FIGURE 9A (続き)

TACCGCATATGTTGTTGGATGATGGTTGGACACCGAGTTGTTGAAGTCCGGTGA
CCGTTACAGAAAGCCGACCGGCACTGGCCGTTGATGTCACCGTTAGCACCCGTTGCCGTG
GCAGGTAAGCATATGTTGCAGTGGTGCAGAAATGGTGAAGATGTTCCGCTGGCAAT
TCGCTCGTTACCCCGTTGGGCACCAAGAGTTGCAGCAGTTGCTCCGGGAGCCAAATG
CATATCAGAGCTTTGCAACCCGTTACCGCAGTTGAAGCAGGCACCGTTACCGTTGAA
GCCACCGTGGCACCGGTGATGAAGAAGTTACCGCCAGCATTCAGGCAGATTATGCAGC
CGTTACCTGCGGTTAATAA

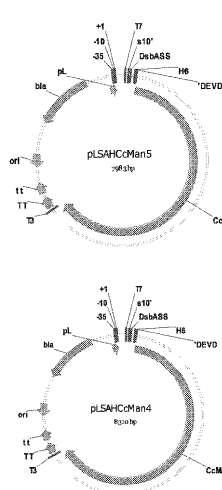
【図 9 B - 1】

FIGURE 9B

MTRPLPPGRAVARSGSGRRARPLGLVLAAALAVPLGVPLAAPAGALAAAPAAAAEFGDFS
SSFESGDFALFTTVAERDGAPOANVGSTTAGLPGSVLGLKGVTAQAQLNPEGAAN
LADGSSGTKWLAFASTGWVRYEFAEPVSFVAYTMTSGDDAAGRDPKWTVEGSDNGSTW
AALDRRTDEDFPNRQQTTFLEAFTAAATYTLRLNVTANSGLSIVLAGWDLSDLSAG
PSAAMTTKVGTGPRVSTFNKAGVGFSGHLSRLYDGSHLADGETYATNVLDDVDVVVG
EDTRLSTYTFPELLDDQLQYPTAAVVDVLTGTYLSDLGARDAHETVATAQAQGEKGI
LYADQWNSVRVDLGDVAEGKTVDQVLLGYDNPGGHAGTKFAGWLDDEVEITAEPATIDGS
SLANYVDTRRGTLASGFSFRGNIPATATPNGFNFWTPTYNASSQSWLYEYHKANNANN
KPVLLQGFISHEPSPWMGDRNQLTFLPSTASGTPDNLSTRGLEFDHDETRAPDYGV
TFTNGSAIEATPTDHGAVLRFSPYPAKGHVLVDKVDGSSKLTVDQATGTISGWVENGSG
LSVGRTRMFVAGTFDRSPTAVGTAAGNRADARFATFETSSDKTVELRVATSFISLDQAR
KNLDLEVTGKTFTEVKAQAAQAWNDRLGVIEVEGASEDQLVTLYSLNLYRLNLYPNSQFE
NTGTAQEPVYRYASFPVSATTSATDTQNAKIVDGKIYVNNGFWDYRTAWPAYSLLYP
ELAABLVDGVQVQYRDGWIARWSSPGYADLMTGTSDDVAFADAYLKGSFLTGTALAY
DAALRNATVAFPSNAVGRKGLQTSPLFGFTPESTHESVWGLEGLVNDFGIGNMAAALA
EDPATPEERRETLEESAYFLERATHYVELFDPEVDFVPRHEDGTWAVDPETYDPEAW
GGGYTETNGWNPAPHAQDQGLANLYGGKQGLDEKLDDEFFSTPEKGAGNGGIEHQREA
RDVRMGQWMSNQVSHHWPWLYDAAGAPSKAQEKVREVTRRLFVSGEIGQGYGDEDNG
EMSSWWIFASLGFYPLQVGSQYAVGSPFLDKATVHLEFDGLVVAENNSVDNVYQSL
AVDGEARTSTLSQADLSGGTTLDFVMGPEPSDWGTGEDDAPPSLTEGDEPPTFPVQDAT
TAGLGTITVADGATTSAAALTDNTSGTRTTFATTPSITWAGNIRPTVGSYTLTSGA
SGTASPSAWTLEGSDDGETWTTLDERSGEQFRWALQTRPFTVAEPTAFARYRVTVTATS
GSGALSLAEVELLADPKESGAEBLTLAAPDRDGVTVREVSGSFATLTGVEGDVAALDV
QVAFGDGSEFVAGTLRAGAFGGYAVDAHTWTAPGVYPTVTVSGEGIEVTSASSYVSV
SLLREGSLLAAYDNVICGDAGTVGSCDQGVFFDRAQLAAGFVQGERATVPGTDLAF
DVPVAVAGQPDNATGDGQTIELDVADAEQLSVIGTTEKNQATGTLTFDDGSTQPID
LSFGDWSGAARNPVFGNIPVAVTDSRLRGSSPQTGTAAFFATAPITLPEGRFVSLTL
PDQFGLSRDGRHVVAVAHGDTFAEHPALEVTAAGVTLAVGQTSVVALAQVAGGREG
ADLRAAVTWGDSDVAAAGAVTDGVSVSGSHAYTAAGTYTAYVVVDGWTQVVEVPVTVT
EAEFALAVDVTVSTRCLAGKAYVAVRAENGEDVPLAIRLVTPFCTKEVAAVAPGANAYQ
SFATRVTAVEAGTVTVEATRGTDGEVVTASIQADYAAVTCG (配列番号10)

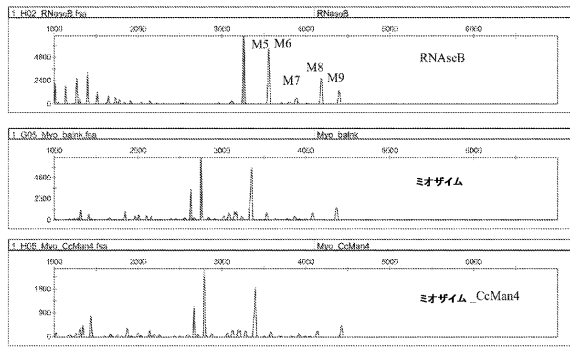
【図 10】

FIGURE 10



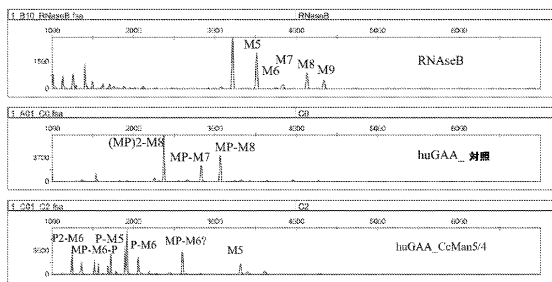
【図 13】

FIGURE 13



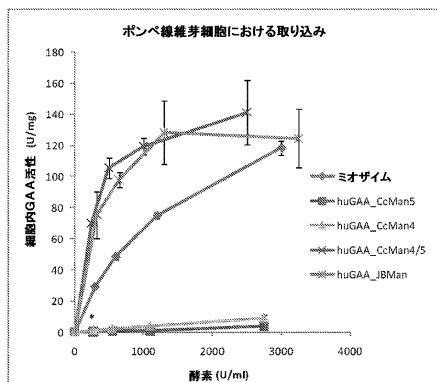
【図 14】

FIGURE 14



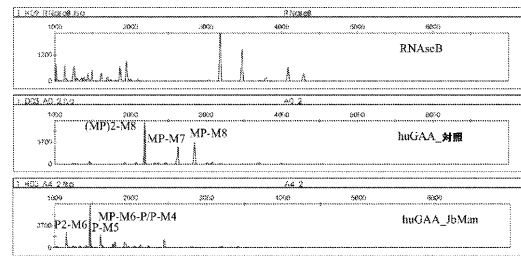
【図 17】

FIGURE 17



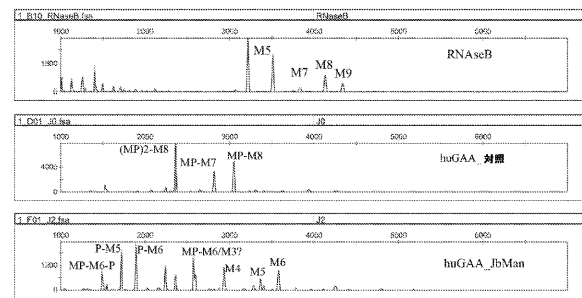
【図 15】

FIGURE 15



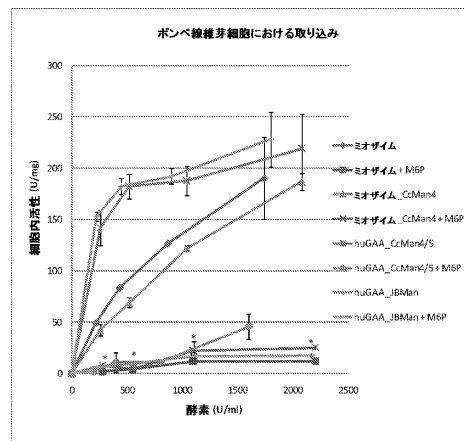
【図 16】

FIGURE 16



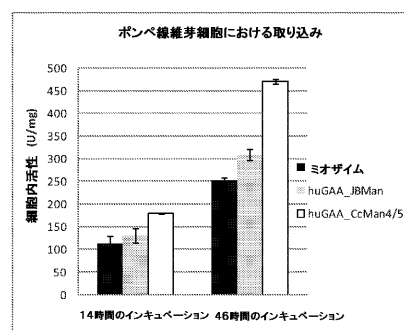
【図 18】

FIGURE 18

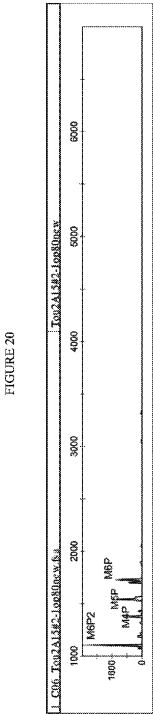


【図 19】

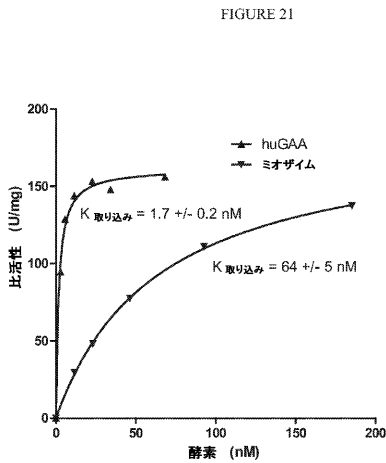
FIGURE 19



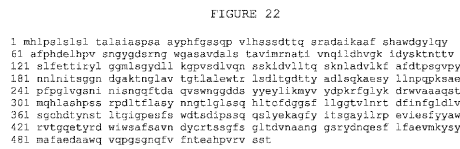
【図 2 0】



【図 2 1】



【図 2 2】



【配列表】

0006151183000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/24 (2006.01) C 1 2 N 9/24

(72)発明者 ピーンズ, カトレーン カミラ テレスボレ アリダ マリア
ベルギー国 ベー9000 ヘント, シタデルラーン 54

(72)発明者 フェルフェケン, ヴァウテル
ベルギー国 ベー9050 ヘントーレデベルヒ, エドモント ファン ホーレベケストラート 90

(72)発明者 ヴァレフスカ, アルベナ ヴェルギリエヴァ
ベルギー国 ベー9000 ヘント, マールテブルヘストラート 197

(72)発明者 ペネルト, グヴェンダ ノエラ
ベルギー国 ベー9880 アールテル, リートゥルストラート 7

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献 特開2002-369679 (JP, A)
国際公開第2008/120107 (WO, A1)
特表2006-518599 (JP, A)
特開2002-369692 (JP, A)
Glycobiology, 2002年, Vol.12, No.12, p.821-828
Biochimica et Biophysica Acta, 1997年, Vol.1336, No.2, p.132-146
Glycobiology, 1998年, Vol.8, No.12, p.1183-1194
The Journal of Biological Chemistry, 1996年, Vol.271, No.45, p.28348-28358

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 P 21/00
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 9/24
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)

(54)【発明の名称】マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合からキャップを外すことおよびリン酸化N-グリカンで脱マンノシル化することができるマンノシダーゼならびに哺乳動物細胞による糖タンパク質の取り込みを促進する方法