(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5008245号
(P5008245)

(45)発行日　平成24年8月22日(2012.8.22)　(24)登録日　平成24年6月8日(2012.6.8)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 9/24	(2006.01)	C12N	9/24	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12N 15/113	(2010.01)	C12N	15/00	G
C12N 9/99	(2006.01)	C12N	9/99	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C

請求項の数 46　(全 52 頁)

(21)出願番号　特願2002-520848 (P2002-520848)
(86)(22)出願日　平成13年8月17日 (2001.8.17)
(65)公表番号　特表2004-506438 (P2004-506438A)
(43)公表日　平成16年3月4日 (2004.3.4)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/025882
(87)国際公開番号　WO2002/015927
(87)国際公開日　平成14年2月28日 (2002.2.28)
審査請求日　平成20年8月18日 (2008.8.18)
(31)優先権主張番号　09/641,471
(32)優先日　平成12年8月18日 (2000.8.18)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　501358172
シャイア　ヒューマン　ジェネティック　セラピーズ　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２４２１　レキシントン　シャイア　ウェイ　３００
(74)代理人　100073184
弁理士　柳田　征史
(74)代理人　100090468
弁理士　佐久間　剛
(72)発明者　キノシタ，キャロル　エイ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０１７３０　ベッドフォード　デイヴィス　ロード　４０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】高マンノースタンパク質および高マンノースタンパク質の製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法であって、
グルコセレブロシダーゼ（ＧＣＢ）を発現することのできる細胞を提供し、
前記細胞を、ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去が防止されるようにキフネンシンと接触させ、
前記細胞にｈｍＧＣＢを産生させ、それによって、ｈｍＧＣＢ調製物を製造する、
各工程を含む方法。
【請求項２】
前記細胞が、ＧＣＢコード化領域を含む外来性核酸配列を含むことを特徴とする請求項１記載の方法。
【請求項３】
前記細胞が、ＧＣＢコード化領域の発現を高めるように作用する外来性調節配列をさらに含むことを特徴とする請求項２記載の方法。
【請求項４】
前記細胞が、内在性ＧＣＢコード化配列の発現を高めるように作用する外来性調節配列を含むことを特徴とする請求項１記載の方法。
【請求項５】
高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法であって、
外来性調節配列を含む核酸配列を、この調節配列が内在性ＧＣＢコード化領域の発現を

高めるように導入した細胞を提供し、
前記細胞を、ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去が防止されるように、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤と接触させ、
前記細胞にｈｍＧＣＢを産生させ、それによってｈｍＧＣＢ調製物を製造する、
各工程を含む方法。
【請求項６】
前記クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤がキフネンシンであることを特徴とする請求項５記載の方法。
【請求項７】
前記キフネンシンが０．０５から２０．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする請求項１または６記載の方法。
【請求項８】
前記キフネンシンが０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする請求項７記載の方法。
【請求項９】
前記細胞が培地中に含まれるキフネンシンと接触せしめられることを特徴とする請求項１から４および６から８いずれか１項記載の方法。
【請求項１０】
前記ｈｍＧＣＢが、前記細胞が培養されている前記培地から得られることを特徴とする請求項９記載の方法。
【請求項１１】
前記前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする請求項１から１０いずれか１項記載の方法。
【請求項１２】
前記前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の１つのα１，３マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする請求項１から１０いずれか１項記載の方法。
【請求項１３】
前記前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の１つのα１，６マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする請求項１から１０いずれか１項記載の方法。
【請求項１４】
前記細胞を、クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤と接触させることをさらに含むことを特徴とする請求項１から１３いずれか１項記載の方法。
【請求項１５】
前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシＤＩＭ、６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ、およびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする請求項１４記載の方法。
【請求項１６】
前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニンであることを特徴とする請求項１４記載の方法。
【請求項１７】
前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、０．０５から２０．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする請求項１４から１６いずれか１項記載の方法。
【請求項１８】
前記ｈｍＧＣＢが、５個のマンノース残基を有する少なくとも１つの糖鎖を有することを特徴とする請求項１から１７いずれか１項記載の方法。
【請求項１９】
前記ｈｍＧＣＢが、６個のマンノース残基を有する少なくとも１つの糖鎖を有することを特徴とする請求項１から１７いずれか１項記載の方法。

【請求項２０】
前記ｈｍＧＣＢが８個のマンノース残基を有する少なくとも１つの糖鎖を有することを特徴とする請求項１から１７いずれか１項記載の方法。
【請求項２１】
前記ｈｍＧＣＢが９個のマンノース残基を有する少なくとも１つの糖鎖を有することを特徴とする請求項１から１７いずれか１項記載の方法。
【請求項２２】
前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が、ｈｍＧＣＢの少なくとも２つの糖鎖上で防止されていることを特徴とする請求項１から１７いずれか１項記載の方法。
【請求項２３】
前記調製物のｈｍＧＣＢの少なくとも６０％が、前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている１以上の糖鎖を有することを特徴とする請求項２２記載の方法。
【請求項２４】
前記調製物のｈｍＧＣＢの少なくとも７０％が、前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている１以上の糖鎖を有することを特徴とする請求項２３記載の方法。
【請求項２５】
前記調製物のｈｍＧＣＢの少なくとも８０％が、前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている１以上の糖鎖を有することを特徴とする請求項２４記載の方法。
【請求項２６】
前記５糖コアに遠位の３つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されていることを特徴とする請求項１から１７いずれか１項記載の方法。
【請求項２７】
前記細胞の少なくとも３０％が、少なくとも８個のマンノース残基を有する１またはそれ以上の糖鎖を有するｈｍＧＣＢを産生することを特徴とする請求項１から１７いずれか１項記載の方法。
【請求項２８】
前記細胞の少なくとも４０％が、少なくとも８個のマンノース残基を有する１またはそれ以上の糖鎖を有するｈｍＧＣＢを産生することを特徴とする請求項２７記載の方法。
【請求項２９】
前記細胞の少なくとも６０％が、少なくとも８個のマンノース残基を有する１またはそれ以上の糖鎖を有するｈｍＧＣＢを産生することを特徴とする請求項２８記載の方法。
【請求項３０】
前記ｈｍＧＣＢ調製物の糖鎖の少なくとも６０％が、６個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とする請求項１から１７いずれか１項記載の方法。
【請求項３１】
前記ｈｍＧＣＢ調製物の糖鎖の少なくとも８０％が、６個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とする請求項３０記載の方法。
【請求項３２】
前記ｈｍＧＣＢ調製物の糖鎖の少なくとも３０％が、８個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とする請求項１から１７いずれか１項記載の方法。
【請求項３３】
前記ｈｍＧＣＢ調製物の糖鎖の少なくとも６０％が、８個またはそれ以上のマンノース残基を有することを特徴とする請求項３２記載の方法。
【請求項３４】
前記調製物中のＧＣＢが、８０％：２０％の５個以上のマンノース残基を有する糖鎖の４個以下のマンノース残基をもつ糖鎖に対する比を有することを特徴とする請求項１から

３３いずれか１項記載の方法。
【請求項３５】
前記調製物中のＧＣＢが、８５％：１５％の５個以上のマンノース残基を有する糖鎖の４個以下のマンノース残基をもつ糖鎖に対する比を有することを特徴とする請求項１から３３いずれか１項記載の方法。
【請求項３６】
前記調製物中のＧＣＢが、９０％：１０％の５個以上のマンノース残基を有する糖鎖の４個以下のマンノース残基をもつ糖鎖に対する比を有することを特徴とする請求項１から３３いずれか１項記載の方法。
【請求項３７】
前記調製物中のＧＣＢが、９５％：５％の５個以上のマンノース残基を有する糖鎖の４個以下のマンノース残基をもつ糖鎖に対する比を有することを特徴とする請求項１から３３いずれか１項記載の方法。
【請求項３８】
前記細胞が少なくとも１つのクラス２プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする請求項１から３７いずれか１項記載の方法。
【請求項３９】
前記細胞がクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子を含むことを特徴とする請求項１から３７いずれか１項記載の方法。
【請求項４０】
前記細胞が初代細胞であることを特徴とする請求項１から３９いずれか１項記載の方法。
【請求項４１】
前記細胞が２次細胞であることを特徴とする請求項１から３９いずれか１項記載の方法。
【請求項４２】
前記細胞がほ乳類の細胞であることを特徴とする請求項１から３９いずれか１項記載の方法。
【請求項４３】
前記細胞がヒトの細胞であることを特徴とする請求項４２記載の方法。
【請求項４４】
前記細胞が線維芽細胞または筋原細胞であることを特徴とする請求項４３記載の方法。
【請求項４５】
前記細胞が不死化細胞であることを特徴とする請求項４３記載の方法。
【請求項４６】
前記細胞がＨＴ－１０８０細胞であることを特徴とする請求項４５記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
発明の背景
ゴーシェ病は、リソソーム酵素、グルコセレブロシダーゼ（ＧＣＢ）の欠損により特徴づけられる、常染色体性劣性遺伝リソソーム貯蔵障害である。ＧＣＢは白血球および赤血球の膜中でスフィンゴ糖脂質が分解した後生成される糖脂質、グルコセレブロシドを加水分解する。この酵素の欠損により、ゴーシェ病の患者の肝臓、脾臓および骨髄に存在する食細胞のリソソーム中にグルコセレブロシドが多量に蓄積する。これらの分子の蓄積により脾腫、肝腫、骨障害、血小板減少および貧血を始めとする一連の臨床的な症状が発現する（Ｂｅｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ. Ｇａｕｃｈｅｒ ｄｉｓｅａｓｅ; Ｉｎ: Ｔｈｅ Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｅｓ ｏｆ Ｉｎｈｅｒｉｔｅｄ Ｄｉｓｅａｓｅ（ＭｃＧｒａｗ-Ｈｉｌｌ, Ｉｎｃ, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, １９９５） ｐｐ. ２６２５-２６３９）。
【０００２】

この病気の患者の治療には、骨痛の緩和のための鎮痛薬の投与、血液および血小板の輸血ならびに場合によっては脾摘除術が行われる。骨侵食を起こしている患者に対しては時には関節置換も必要となる。

【０００３】

ＧＣＢによる酵素補充療法は、ゴーシェ病の治療として用いられてきた。ゴーシェ病の患者の現在の治療法では、ＧＣＢ発現構成体でトランスフェクションしたヒト胎盤またはチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞から得られた、炭水化物リモデルＧＣＢ、それぞれアルグルセラーゼまたはイミグルセラーゼとして知られる、が投与される。この処置は極めて高価なものであるが、１つには網内系細胞起源の細胞上のマンノース受容体を酵素の標的とするために、複合グリカンのトリマンノシルコアを露出させるためＧＣＢから糖を除去するコストが高いためである。ヒト胎盤組織（アルグルセラーゼの場合）が払底していること、複雑な精製プロトコル、比較的多量の炭水化物リモデルＧＣＢが必要であることなどがこの治療のコスト高の原因である。

【０００４】

発明の概要

本発明は１つにはタンパク質、たとえばリソソーム貯蔵酵素、の前駆体オリゴ糖鎖の５糖コアから遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去を防止することによって、高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）などの高マンノースタンパク質が得られることを発見したことに基づくものである。これらの高マンノースタンパク質はマンノース受容体を発現する細胞をこのタンパク質の標的とするために使用することができる。このような細胞にはマクロファージ、クッパー細胞および組織球をはじめとする網内系細胞起源の細胞が含まれる。これらの高マンノースタンパク質は例えばさまざまなリソソーム蓄積症を治療するために、リソソームを標的にした受容体依存性エンドサイトーシスによるデリバリを行うのに用いることができる。

【０００５】

特にｈｍＧＣＢはマンノース受容体を効率的に標的とすることがわかっている。マンノース受容体はマクロファージおよびその他の細胞例えば樹状細胞、心筋細胞、およびグリア細胞に存在し、受容体依存性エンドサイトーシスの手段となる。ゴーシェ病患者にＧＣＢが存在しないと、マクロファージ、クッパー細胞および組織球をはじめとする網内系細胞起源の細胞に主としてグルコセレブロシドの蓄積が生じる。これらの細胞はその表面にマンノース受容体を発現するため、ｈｍＧＣＢを用いて受容体依存性エンドサイトーシスによるリソソームへの矯正酵素のデリバリを効果的に行い、それによってゴーシェ病を治療することができる。驚くべきことに、マクロファージによるｈｍＧＣＢの取り込みは細胞から分泌されるＧＣＢ取り込み量に比較し大きいことがわかった。

【０００６】

したがって、本発明の１つの態様においては高マンノースグルコセレブロシド（ｈｍＧＣＢ）調製物を生成する方法を特徴とする。この方法は、

ＧＣＢを発現することのできる細胞を提供し、

ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の５糖コアから遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去を防止する条件の下で前駆体オリゴ糖を有するＧＣＢを生成させ、それによってｈｍＧＣＢ調製物を生成することを含む。

【０００７】

好ましい実施態様において、前記ＧＣＢはヒトＧＣＢである。好ましい実施態様において前記細胞はヒト細胞である。

【０００８】

好ましい実施態様において、前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基の除去、５糖コアに遠位のα１，３マンノース残基、および／または前記５糖コアに遠位のα１，６マンノース残基の除去が防止されている。前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基の除去が防止されていることが好ましい。

【０００９】

好ましい実施態様において、本発明の方法は、前記細胞を、ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の前記５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基、例えば前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基、５糖コアに遠位のα１，３マンノース残基、および／または前記５糖コアに遠位のα１，６マンノース残基の除去を防止する物質と接触させることを含むことができる。前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基の除去を防止することが好ましい。

【００１０】

好ましい実施態様において、本発明の方法は、前記細胞を、ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去を防止する物質と接触させることを含むことができ、ここでこの物質はマンノシダーゼ阻害剤である。マンノシダーゼ阻害剤はクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤、クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤または両方である。クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はキフネンシン、デオキシマンノジリマイシン、または類似の阻害剤の１つまたはそれ以上であってよい。好ましくは、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はキフネンシンである。有用なクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はスワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシ－１，４－ジデオキシ－１，４－イミノ－Ｄ－マンニトール（６－デオキシ－ＤＩＭ）および６－デオキシ－６－フルオロ－－１，４－ジデオキシ－１，４－イミノ－Ｄ－マンニトール（６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ）の１つあるいはそれ以上であってよい。好ましくは、クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はスワインソニンである。

【００１１】

好ましい実施態様において、マンノシダーゼ阻害剤は約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在する。

【００１２】

好ましい実施態様において、本発明の方法は、細胞を、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤とクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤に接触させることを含む。好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤は約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤は約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はそれぞれ約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤の合計濃度は約０．０２５から４０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から２０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌの間であり、好ましくは約０．１から４．０μｇ／ｍｌの間である。

【００１３】

好ましい実施態様において前記細胞は少なくとも１つのゴルジプロセシングマンノシダーゼに対し突然変異、たとえばノックアウトを有する。この突然変異は遺伝子の発現を減少する、タンパク質または活性レベルを減少する、またはマンノシダーゼの分布またはその他翻訳後修飾、例えば糖鎖の処理、を変えるものであってよい。この突然変異はゴルジプロセシングマンノシダーゼ活性のレベルを減少するもの、例えば遺伝子発現レベルを引き下げるもの、ヌルミューテーション、欠失、フレームシフトまたは挿入であってよい。好ましい実施態様においてこの突然変異は例えばマンノシダーゼ遺伝子のノックアウトである。突然変異は（タンパク質の）構造（および活性）に影響を与えることができ、例えば感温突然変異や短縮であってよい。好ましい実施態様において、前記細胞はクラス１プロセシングマンノシダーゼ、クラス２プロセシングマンノシダーゼ、クラス１プロセシン

グマンノシダーゼとクラス２プロセシングマンノシダーゼに対して突然変異、例えばノックアウトを有する。好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＡ、ゴルジマンノシダーゼＩＢ、ゴルジマンノシダーゼＩＣ、またはそれらを組み合わせたものである。好ましい実施態様において、クラス２プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＩである。

【００１４】

好ましい実施態様において、細胞はクラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子およびクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子を含む。好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＡ、ゴルジマンノシダーゼＩＢ、ゴルジマンノシダーゼＩＣ、およびこれらを組み合わせたものである。好ましい実施態様においてクラス２プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＩである。

【００１５】

好ましい実施態様において、前記細胞は例えばｍＲＮＡなどの細胞マンノシダーゼ核酸配列に結合し、またはそれを不活性化し、タンパク質の発現を抑制することのできる、アンチセンス分子またはリボザイムなどの核酸配列を含む。好ましい実施態様において、この核酸配列はクラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子、クラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子、クラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子とクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子の両方である。好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＡ、ゴルジマンノシダーゼＩＢ、ゴルジマンノシダーゼＩＣ、およびこれらを組み合わせたものである。好ましい実施態様においてクラス２プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＩである。

【００１６】

好ましい実施態様において前記細胞はマンノシダーゼと結合し阻害する分子、例えば外来性分子を含む。この分子は例えば一本鎖抗体、細胞間タンパク質または競合あるいは非競合阻害剤であってもよい。

【００１７】

好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢ分子は少なくとも４個のマンノース残基を有する糖鎖を含む。例えばｈｍＧＣＢ分子は５個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍＧＣＢ分子は６個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍＧＣＢ分子は７個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍＧＣＢ分子は８個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍＧＣＢ分子は９個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を有する。好ましくは、ｈｍＧＣＢ分子は５個、８個または９個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を有する。

【００１８】

好ましい実施態様において、生成されるｈｍＧＣＢ（１つまたはそれ以上のｈｍＧＣＢ分子またはその調製物全体のいずれか）は、マンノース残基のＧｌｃＮＡｃ残基に対する比が、ＧｌｃＮＡｃ残基２に対して、マンノース残基が３より大きく、好ましくはマンノース対ＧｌｃＮＡｃの比が４：２，５：２，６：２，７：２，８：２，９：２であり、より好ましくはマンノース対ＧｌｃＮＡｃの比が５：２，８：２または９：２である。

【００１９】

好ましい実施態様において、５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去は、ｈｍＧＣＢ分子の１、２、３または４本の糖鎖において防止されている。

【００２０】

好ましい実施態様において、調製物中の少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％の、またはすべてのｈｍＧＣＢ分子が少なくとも１本の、好ましくは、２本、３本、または４本の糖鎖を持ち、その糖鎖において５糖コアから遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防

止されている。

【００２１】

好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢ調製物は比較的不均質な調製物である。好ましくは、ｈｍＧＣＢ調製物中の糖鎖の８０％、７０％、６０％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％または１％が５糖コアに加えて同数のマンノース残基を有する。例えば５糖コアに加えて同数のマンノース残基を有する糖鎖の異なる数のマンノース残基を有する糖鎖に対する割合は、約６０％：４０％、５０％：５０％、４０％：６０％、３０％：７０％、２５％：７５％、２０％：８０％、１５％：８５％、１０％：９０％、および５％以下：９５％以上であってよい。

【００２２】

好ましい実施態様において、ゴルジマンノシダーゼＩＡおよび／またはＩＢおよび／またはＩＣの活性は阻害されており、ｈｍＧＣＢ調製物中の糖鎖の少なくとも約６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％および１００％が５個以上、例えば５個、６個、７個、８個、および／または９個のマンノース残基を有する。好ましい実施態様において、ゴルジマンノシダーゼＩＩの活性は抑制されており、５個以上のマンノース残基を有する糖鎖の４個以下のマンノース残基をもつ糖鎖に対する比は約６０％：４０％、７０％：３０％、７５％：２５％、８０％：２０％、８５％：１５％、９０％：１０％、９５％：５％、９９％：１％、または１００％：０％である。

【００２３】

好ましい実施態様において、ゴルジマンノシダーゼＩＩの活性は阻害されており、ｈｍＧＣＢ調製物中の糖鎖の少なくとも約６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％または１００％が５個以上、例えば５個、６個、７個、８個、および／または９個のマンノース残基を有する。好ましい実施態様において、ゴルジマンノシダーゼＩＩの活性は抑制されており、５個以上のマンノース残基を有する糖鎖の４個以下のマンノース残基をもつ糖鎖に対する比は約６０％：４０％、７０％：３０％、７５％：２５％、８０％：２０％、８５％：１５％、９０％：１０％、９５％：５％、９９％：１％、または１００％：０％である。

【００２４】

好ましい実施態様において、前記細胞はＧＣＢコード化領域を含む外来性核酸配列を含む。好ましい実施態様において、細胞はこの外来性ＧＣＢコード化領域の発現を調節する作用を有する調節配列、内在性または外来性の調節配列をさらに含む。

【００２５】

好ましい実施態様において、前記細胞は内在性ＧＣＢコード化配列の発現を調節する外来性調節配列を含み、例えばこの調節配列は内在性ＧＣＢコード化配列の発現を調節するように前記細胞のゲノム中に組み込まれる。

【００２６】

好ましい実施態様において、この調節配列はプロモーター、エンハンサー、上流活性化配列（ＵＡＳ）、骨格結合領域または転写因子結合部位の１つ以上を含む。好ましい実施態様において、この調節配列には、メタロチオネイン－Ｉ遺伝子、例えばマウスメタロチオネインーＩ遺伝子、からの調節配列、ＳＶ－４０遺伝子からの調節配列、サイトメガロウイルス遺伝子からの調節配列、コラーゲン遺伝子からの調節配列、アクチン遺伝子からの調節配列、免疫グロブリン遺伝子からの調節配列、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ遺伝子からの調節配列、またはＥＦ－１α遺伝子からの調節配列が含まれる。

【００２７】

好ましい実施態様において、前記細胞は真核細胞である。好ましい実施態様においてこの細胞は真菌、植物または動物、たとえば脊椎動物を起源とするものである。好ましい実施態様において、この細胞はほ乳類の細胞、例えばほ乳類の初代または２次細胞、たとえば線維芽細胞、造血幹細胞、筋原細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液の固形成分を含む細胞、筋肉細胞およびこれら体細胞の前駆体、および形質転換または不死化細胞系である。好ましくはこの細胞はヒトの細胞である。本発明の方法

で有用な不死化ヒト細胞系の例をあげると、これに限定するわけではないが、Ｂｏｗｅｓの黒色腫細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＲＬ９６０７）、Ｄａｕｄｉ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２１３）、ヒーラ細胞およびヒーラ細胞の誘導体（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２、ＣＣＬ２．１およびＣＣＬ２．２）、ヒーラ－６０細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２４０）、ＨＴ－１０８０細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１２１）、Ｊｕｒｋａｔ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＴＩＢ１５２）、ＫＢカルチノーマ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１７）、Ｋ－５６２白血病細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２４３）、ＭＣＦ－７乳ガン細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＢＴＨ２２）、ＭＯＬＴ－４細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．１５８２）、Ｎａｍａｌｗａ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＲＬ１４３２）、ラージ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ８６）、ＲＰＭＩ８２２６細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１５５）、Ｕ－９３７細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．１５９３）、ＷＩ－２８ＶＡ１３サブライン２Ｒ４細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＬＬ１５５）、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１１９）および２７８０ＡＤ卵巣カルチノーマ細胞（Ｖａｎ　Ｄｅｒ　Ｂｌｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　４８：５９２７－５９３２，１９８８）、およびヒト細胞と別の種の細胞とを融合して得た異種ハイブリドーマ細胞があげられる。もうひとつの実施態様において、不死化細胞系はヒト細胞株以外の細胞株、たとえばＣＨＯ細胞株やコス細胞株であってもよい。また別の実施態様において、細胞はクローン細胞株またはクローン細胞系からのものであってもよい。

【００２８】

好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢ発現可能な細胞数が提供され、少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、またはすべての細胞が特定数のマンノース残基を有する、少なくとも１本の、好ましくは２本、３本、または４本の糖鎖を有するｈｍＧＣＢ分子を生成する。

【００２９】

好ましい実施態様において、この細胞は少なくとも１つのマンノシダーゼ阻害剤を含む培地中で培養される。好ましい実施態様において、本発明の方法はさらにこの細胞が培養されている培地からｈｍＧＣＢを得ることを含む。

【００３０】

もう１つの態様において、本発明はｈｍＧＣＢの調製物を製造する方法を特徴とする。この方法は

ＧＣＢを発現することのできる細胞を提供し、

ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去が防止されるように、クラス１プロセシングマンノシダーゼ活性およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ活性を阻害する条件の下で、前駆体オリゴ糖を有するＧＣＢを生成させ、それによってｈｍＧＣＢ調製物を製造する、ことを含む。

【００３１】

好ましい実施態様において、このＧＣＢはヒトＧＣＢである。好ましい実施態様においてこの細胞はヒト細胞である。

【００３２】

好ましい実施態様において、前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基、５糖コアに遠位のα１，３マンノース残基、および／または前記５糖コアに遠位のα１，６マンノース残基の除去が防止されている。前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基の除去が防止されていることが好ましい。

【００３３】

好ましい実施態様において、本発明の方法は、細胞を、クラス１プロセシングマンノシダーゼ活性を阻害する物質およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ活性を阻害する物質に接触させ、それによってＧＣＢの前駆体オリゴ糖の前記５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去を防止することを含むことができる。好ましい実施態様にお

いては、５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基の除去が防止される。

【００３４】

好ましい実施態様において、本発明の方法は、細胞を、クラス１プロセシングマンノシダーゼ活性を阻害する物質およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ活性を阻害する物質に接触させることを含み、ここでこの物質はクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤とクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤である。好ましい実施態様において、このクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はキフネンシン、デオキシマンノジリマイシン、または類似の阻害剤の１つまたはそれ以上であってよい。好ましくは、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はキフネンシンである。好ましい実施態様において、クラス２のプロセシングマンノシダーゼ阻害剤はスワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシ－ＤＩＭ、および６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭの１つあるいはそれ以上であってよい。好ましくは、クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はスワインソニンである。

【００３５】

好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤は約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤は約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はそれぞれ約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤の合計濃度は約０．０２５から４０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から２０μｇ／ｍｌ、０．０５から１μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から４．０μｇ／ｍｌの間である。

【００３６】

好ましい実施態様において細胞はクラス１マンノシダーゼとクラス２マンノシダーゼに対し突然変異、たとえばノックアウトを有する。この突然変異は遺伝子の発現を減少する、タンパク質または活性レベルを減少する、またはマンノシダーゼの分布またはその他翻訳後修飾、例えば糖鎖の処理、を変えるものであってよい。この突然変異はクラス１プロセシングマンノシダーゼおよび／またはクラス２プロセシングマンノシダーゼの活性レベルを減少するもの、例えば遺伝子の発現、ヌルミューテーション、欠失、フレームシフトまたは挿入であってよい。好ましい実施態様においてこの突然変異はマンノシダーゼ遺伝子のノックアウトである。この突然変異は（タンパク質の）構造（および活性）に影響を与えることができ、例えば感温突然変異であってよい。好ましい実施態様においてクラス１プロセシングマンノシダーゼは、ゴルジマンノシダーゼＩＡ、ゴルジマンノシダーゼＩＢ、ゴルジマンノシダーゼＩＣ、またはそれらを組み合わせたものである。好ましい実施態様において、クラス２プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＩである。

【００３７】

好ましい実施態様において、前記細胞はクラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子とクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子を含む。好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＡ、ゴルジマンノシダーゼＩＢ、ゴルジマンノシダーゼＩＣ、およびこれらを組み合わせたものである。好ましい実施態様においてクラス２プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＩである。

【００３８】

好ましい実施態様において、細胞はマンノシダーゼに結合しそれを不活性化する、外来性分子などの分子を含む。この分子は例えば一本鎖抗体、細胞間タンパク質または競合性

あるいは非競合性阻害剤であってもよい。

【００３９】

好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼ活性とクラス２マンノシダーゼ活性は、異なる作用機序で阻害されてもよい。例えば、クラス１プロセシングマンノシダーゼ活性は、細胞を、クラス１プロセシングマンノシダーゼを阻害する物質、例えばクラス１マンノシダーゼ阻害剤と接触させて阻害し、クラス２プロセシングマンノシダーゼは、クラス２マンノシダーゼのノックアウトである細胞および／またはクラス２マンノシダーゼアンチセンス分子を含む細胞により阻害することができる。もう１つの好ましい実施例において、クラス２プロセシングマンノシダーゼ活性は、細胞を、クラス２プロセシングマンノシダーゼを阻害する基質、例えばクラス２マンノシダーゼ阻害剤、と接触させることによって阻害し、クラス１プロセシングマンノシダーゼは、クラス１マンノシダーゼのノックアウトである細胞、および／またはクラス１マンノシダーゼアンチセンス分子を含む細胞を用いて阻害することができる。

【００４０】

好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢ分子は少なくとも４個のマンノース残基を有する糖鎖を含む。例えばｈｍＧＣＢ分子は５個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍＧＣＢ分子は６個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍＧＣＢ分子は７個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍＧＣＢ分子は８個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍＧＣＢ分子は９個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を有する。好ましくは、ｈｍＧＣＢ分子は５個、８個または９個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を有する。

【００４１】

好ましい実施態様において、生成されるｈｍＧＣＢ（１つまたはそれ以上のｈｍＧＣＢ分子または調製物全体のいずれか）は、マンノース残基のＧｌｃＮＡｃ残基に対する比が、ＧｌｃＮＡｃ残基２に対しマンノース残基が３より大きく、好ましくはマンノース対ＧｌｃＮＡｃの比が４：２，５：２，６：２，７：２，８：２，９：２であり、より好ましくはマンノース対ＧｌｃＮＡｃの比が５：２，８：２または９：２である。

【００４２】

好ましい実施態様において、５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が、ｈｍＧＣＢ分子の１，２、３または４本の糖鎖において防止されている。

【００４３】

好ましい実施態様において、調製物の少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％の、またはすべてのｈｍＧＣＢ分子が少なくとも１本の、好ましくは、２本、３本、または４本の糖鎖を持ち、その糖鎖において５糖コアから遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている。

【００４４】

好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢ調製物は比較的不均質な調製物である。好ましくは、５糖コアに加えて同数のマンノース残基を有する糖鎖はｈｍＧＣＢ調製物中の８０％、７０％、６０％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％または１％未満である。例えば５糖コアに加え同数のマンノース残基を有する糖鎖の異なる数のマンノース残基を有する糖鎖に対する比は、約６０％：４０％、５０％：５０％、４０％：６０％、３０％：７０％、２５％：７５％、２０％：８０％、１５％：８５％、１０％：９０％、および５％以下：９５％以上であってよい。

【００４５】

好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼ、例えばゴルジマンノシダーゼＩＡおよび／またはＩＢおよび／またはＩＣの活性、およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ、例えばゴルジマンノシダーゼＩＩの活性は阻害されており、ｈｍＧＣＢ調製物中の糖鎖の少なくとも約６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、

９５％、９８％、９９％および１００％が５個以上、例えば５個、６個、７個、８個、および／または９個のマンノース残基を有する。好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼ、例えばゴルジマンノシダーゼＩＡおよび／またはＩＢおよび／またはＩＣの活性、およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ、例えばゴルジマンノシダーゼＩＩの活性は抑制されており、５個以上のマンノース残基を有する糖鎖の４個以下のマンノース残基をもつ糖鎖に対する比は約６０％：４０％、７０％：３０％、７５％：２５％、８０％：２０％、８５％：１５％、９０％：１０％、９５％：５％、９９％：１％、または１００％：０％である。

【００４６】

好ましい実施態様において、細胞はＧＣＢコード化領域を含む外来性核酸配列を含む。好ましい実施態様において、細胞はこの外来性ＧＣＢコード化領域の発現を調節する作用を有する調節配列、内在性または外来性の調節配列をさらに含む。

【００４７】

好ましい実施態様において、細胞は内在性ＧＣＢコード化配列の発現を調節する作用を有する外来性調節配列を含む、例えばこの調節配列は内在性ＧＣＢコード化配列の発現を調節するように細胞のゲノム中に組み込まれる。

【００４８】

好ましい実施態様において、この調節配列はプロモーター、エンハンサー、上流活性化配列（ＵＡＳ）、骨格結合領域または転写因子結合部位の１つ以上を含む。好ましい実施態様において、この調節配列には、メタロチオネイン－Ｉ遺伝子、例えばマウスメタロチオネインーＩ遺伝子、からの調節配列、ＳＶ－４０遺伝子からの調節配列、サイトメガロウイルス遺伝子からの調節配列、コラーゲン遺伝子からの調節配列、アクチン遺伝子からの調節配列、免疫グロブリン遺伝子からの調節配列、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ遺伝子からの調節配列、またはＥＦ－１α遺伝子からの調節配列が含まれる。

【００４９】

好ましい実施態様において、前記細胞は真核細胞である。好ましい実施態様においてこの細胞は真菌、植物または動物、たとえば脊椎動物を起源とするものである。好ましい実施態様において、この細胞はほ乳類の細胞、例えばほ乳類の初代または２次細胞、たとえば線維芽細胞、造血幹細胞、筋原細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液の固形成分を含む細胞、筋肉細胞およびこれら体細胞の前駆体、および形質転換または不死化細胞系である。好ましくはこの細胞はヒトの細胞である。本発明の方法で有用な不死化ヒト細胞株の例をあげると、これに限定するわけではないが、Ｂｏｗｅｓの黒色腫細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＲＬ９６０７）、Ｄａｕｄｉ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２１３）、ヒーラ細胞およびヒーラ細胞の誘導体（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２、ＣＣＬ２．１およびＣＣＬ２．２）、ヒーラ－６０細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２４０）、ＨＴ－１０８０細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１２１）、Ｊｕｒｋａｔ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＴＩＢ１５２）、ＫＢカルチノーマ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１７）、Ｋ－５６２白血病細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２４３）、ＭＣＦ－７乳ガン細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＢＴＨ２２）、ＭＯＬＴ－４細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．１５８２）、Ｎａｍａｌｗａ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＲＬ１４３２）、ラージ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ８６）、ＲＰＭＩ８２２６細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１５５）、Ｕ－９３７細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．１５９３）、ＷＩ－２８ＶＡ１３サブライン２Ｒ４細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＬＬ１５５）、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１１９）および２７８０ＡＤ卵巣カルチノーマ細胞（Ｖａｎ Ｄｅｒ Ｂｌｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ． ４８：５９２７－５９３２，１９８８）、およびヒト細胞と別の種の細胞とを融合して得た異種ハイブリドーマ細胞があげられる。もうひとつの実施態様において、この不死化細胞系はヒト細胞株以外の細胞株、たとえばＣＨＯ細胞株やコス細胞株であってもよい。また別の実施態様において、この細胞はクローン細胞株またはクローン細胞系

からのものであってもよい。

【００５０】

好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢ発現可能な細胞数が提供され、少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、またはすべての細胞が特定数のマンノース残基を有する少なくとも１本の、好ましくは２本、３本、または４本の糖鎖を有するｈｍＧＣＢ分子を生成する。

【００５１】

好ましい実施態様において、この細胞は少なくとも１つのクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤と少なくとも１つのクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤を含む培地中で培養される。好ましい実施態様において、本発明の方法はさらにこの細胞が培養されている培地からｈｍＧＣＢを得ることを含む。

【００５２】

もう１つの態様において、本発明はｈｍＧＣＢの調製物を製造する方法を特徴とする。この方法は

内在性ＧＣＢコード化領域の発現を調節する外来性調節配列を含む核酸配列を導入した細胞を提供し、

ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去が防止される条件の下で、前駆体オリゴ糖を有するＧＣＢを生成させ、それによってｈｍＧＣＢ調製物を製造する、ことを含む。

【００５３】

好ましい実施態様において、このＧＣＢはヒトＧＣＢである。

【００５４】

好ましい実施態様において、前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基、５糖コアに遠位のα１，３マンノース残基、および／または前記５糖コアに遠位のα１，６マンノース残基の除去が防止されている。前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基の除去が防止されていることが好ましい。

【００５５】

好ましい実施態様において、本発明の方法は、細胞を、ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の前記５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基、例えば前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基、５糖コアに遠位のα１，３マンノース残基、および／または前記５糖コアに遠位のα１，６マンノース残基の除去を防止する物質と接触させることを含む。５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基の除去を防止することが好ましい。

【００５６】

好ましい実施態様において、本発明の方法は、細胞を、ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の前記５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去を防止する物質と接触させることを含み、ここでこの物質はマンノシダーゼ阻害剤である。このマンノシダーゼ阻害剤はクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤、クラス２マンノシダーゼ阻害剤、あるいはその両方であってよい。クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はキフネンシン、デオキシマンノジリマイシン、または類似の阻害剤の１つまたはそれ以上であってよい。好ましくは、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はキフネンシンである。有用なクラス２のプロセシングマンノシダーゼ阻害剤はスワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシ－ＤＩＭ、および６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭの１つあるいはそれ以上であってよい。好ましくは、クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はスワインソニンである。

【００５７】

好ましい実施態様において、マンノシダーゼ阻害剤は約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５からμｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在する。

【００５８】

好ましい実施態様において、本発明の方法はさらに、細胞を、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤と接触させることを含む。好ましい実施態様において、このクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤は約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤は約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はそれぞれ約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤およびクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤の合計濃度は約０．０２５から４０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から２０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から４．０μｇ／ｍｌの間である。

【００５９】

好ましい実施態様において細胞は少なくとも１つのマンノシダーゼに対し突然変異、たとえばノックアウトを有する。この突然変異は遺伝子の発現を減少する、タンパク質または活性レベルを減少する、またはマンノシダーゼの分布またはその他翻訳後修飾、例えば糖鎖の処理、を変えるものであってよい。この突然変異はゴルジプロセシングマンノシダーゼ活性のレベルを減少するもの、例えば遺伝子の発現、ヌルミューテーション、欠失、フレームシフトまたは挿入であってよい。好ましい実施態様においてこの突然変異は例えばマンノシダーゼ遺伝子のノックアウトである。この突然変異は（タンパク質の）構造（および活性）に影響を与えることができ、例えば感温突然変異または切断であってよい。好ましい実施態様において細胞は、クラス１プロセシングマンノシダーゼ、クラス２プロセシングマンノシダーゼに対して例えばノックアウトなどの突然変異を有し、クラス１プロセシングマンノシダーゼとクラス２プロセシングマンノシダーゼに対して例えばノックアウトなどの突然変異体を有する。好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼは、ゴルジマンノシダーゼＩＡ、ゴルジマンノシダーゼＩＢ、ゴルジマンノシダーゼＩＣ、またはそれらを組み合わせたものである。好ましい実施態様において、クラス２プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＩである。

【００６０】

好ましい実施態様において、前記細胞は例えばｍＲＮＡなどの細胞マンノシダーゼ核酸配列に結合し、またはそれを不活性化し、タンパク質の発現を抑制することのできる、アンチセンス分子またはリボザイムなどの核酸配列を含む。好ましい実施態様において、この核酸配列はクラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子、クラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子、クラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子とクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子の両方である。好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＡ、ゴルジマンノシダーゼＩＢ、ゴルジマンノシダーゼＩＣ、およびこれらを組み合わせたものである。好ましい実施態様においてクラス２プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＩである。

【００６１】

好ましい実施態様において、細胞はマンノシダーゼに結合しそれを阻害する、外来性分子などの分子を含む。この分子は例えば一本鎖抗体、細胞間タンパク質または競合性あるいは非競合性阻害剤であってもよい。

【００６２】

好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢ分子は少なくとも４個のマンノース残基を有する糖鎖を含む。例えばｈｍＧＣＢ分子は５個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍＧＣＢ分子は６個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍＧＣＢ分子は７個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍ

ＧＣＢ分子は８個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を持ち、ｈｍＧＣＢ分子は９個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を有する。好ましくは、ｈｍＧＣＢ分子は５個、８個または９個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を有する。

【００６３】

好ましい実施態様において、生成されるｈｍＧＣＢ（１つまたはそれ以上のｈｍＧＣＢ分子または調製物全体のいずれか）は、マンノース残基のＧｌｃＮＡｃ残基に対する比が、ＧｌｃＮＡｃ残基２に対しマンノース残基が３より大きく、好ましくはマンノース対ＧｌｃＮＡｃの比が４：２、５：２、６：２、７：２、８：２，９：２であり、より好ましくはマンノース対ＧｌｃＮＡｃの比が５：２、８：２または９：２である。

【００６４】

好ましい実施態様において、５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が、ｈｍＧＣＢ分子の１、２、３または４本の糖鎖において防止されている。

【００６５】

好ましい実施態様において、調製物の少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％の、またはすべてのｈｍＧＣＢ分子が少なくとも１本の、好ましくは、２本、３本、または４本の糖鎖を持ち、その糖鎖において５糖コアから遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている。

【００６６】

好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢ調製物は比較的不均質な調製物である。好ましくは、５糖コアに加えて同数のマンノース残基を有する糖鎖はｈｍＧＣＢ調製物中８０％、７０％、６０％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％または１％未満である。例えば５糖コアに加え、同数のマンノース残基を有する糖鎖の異なる数のマンノース残基を有する糖鎖に対する比は、約６０％：４０％、５０％：５０％、４０％：６０％、３０％：７０％、２５％：７５％、２０％：８０％、１５％：８５％、１０％：９０％、および５％以下：９５％以上であってよい。

【００６７】

好ましい実施態様において、ゴルジマンノシダーゼＩＡおよび／またはＩＢおよび／またはＩＣの活性は阻害されており、ｈｍＧＣＢ調製物中の糖鎖の少なくとも約６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％または１００％が５個以上、例えば５個、６個、７個、８個、および／または９個のマンノース残基を有する。好ましい実施態様において、ゴルジマンノシダーゼＩの活性は抑制されており、５個以上のマンノース残基を有する糖鎖の４個以下のマンノース残基をもつ糖鎖に対する比は約６０％：４０％、７０％：３０％、７５％：２５％、８０％：２０％、８５％：１５％、９０％：１０％、９５％：５％、９９％：１％、または１００％：０％である。

【００６８】

好ましい実施態様において、ゴルジマンノシダーゼＩＩの活性は阻害されており、ｈｍＧＣＢ調製物中の糖鎖の少なくとも約６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％または１００％が５個以上、例えば５個、６個、７個、８個、および／または９個のマンノース残基を有する。好ましい実施態様において、ゴルジマンノシダーゼＩＩの活性は抑制されており、５個以上のマンノース残基を有する糖鎖の４個以下のマンノース残基をもつ糖鎖に対する比は約６０％：４０％、７０％：３０％、７５％：２５％、８０％：２０％、８５％：１５％、９０％：１０％、９５％：５％、９９％：１％、または１００％：０％である。

【００６９】

好ましい実施態様において、この調節配列はプロモーター、エンハンサー、上流活性化配列（ＵＡＳ）、骨格結合領域または転写因子結合部位の１つ以上を含む。好ましい実施態様において、この調節配列には、メタロチオネイン－Ｉ遺伝子、例えばマウスメタロチオネインーＩ遺伝子、からの調節配列、ＳＶ－４０遺伝子からの調節配列、サイトメガロ

ウイルス遺伝子からの調節配列、コラーゲン遺伝子からの調節配列、アクチン遺伝子からの調節配列、免疫グロブリン遺伝子からの調節配列、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ遺伝子からの調節配列、またはＥＦ－１α遺伝子からの調節配列が含まれる。

【００７０】

好ましい実施態様において、この細胞は真核細胞である。好ましい実施態様においてこの細胞は真菌、植物または動物、たとえば脊椎動物を起源とするものである。好ましい実施態様において、この細胞はほ乳類の細胞、例えばほ乳類の初代または２次細胞、たとえば線維芽細胞、造血幹細胞、筋原細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液の固形成分を含む細胞、筋肉細胞およびこれら体細胞の前駆体、および形質転換または不死化細胞系である。好ましくはこの細胞はヒトの細胞である。本発明の方法で有用な不死化ヒト細胞株の例をあげると、これに限定するわけではないが、Ｂｏｗｅｓの黒色腫細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＲＬ９６０７）、Ｄａｕｄｉ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２１３）、ヒーラ細胞およびヒーラ細胞の誘導体（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２、ＣＣＬ２．１およびＣＣＬ２．２）、ヒーラ－６０細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２４０）、ＨＴ－１０８０細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１２１）、Ｊｕｒｋａｔ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＴＩＢ１５２）、ＫＢカルチノーマ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１７）、Ｋ－５６２白血病細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２４３）、ＭＣＦ－７乳ガン細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＢＴＨ２２）、ＭＯＬＴ－４細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．１５８２）、Ｎａｍａｌｗａ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＲＬ１４３２）、ラージ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ８６）、ＲＰＭＩ８２２６細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１５５）、Ｕ－９３７細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．１５９３）、ＷＩ－２８ＶＡ１３サブライン２Ｒ４細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＬＬ１５５）、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１１９）および２７８０ＡＤ卵巣カルチノーマ細胞（Ｖａｎ　Ｄｅｒ　Ｂｌｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　４８：５９２７－５９３２，１９８８）、およびヒト細胞と別の種の細胞とを融合して得た異種ハイブリドーマ細胞があげられる。もうひとつの実施態様において、この不死化細胞系はヒト細胞株以外の細胞株、たとえばＣＨＯ細胞株やコス細胞株であってもよい。また別の実施態様において、この細胞はクローン細胞株またはクローン細胞系からのものであってもよい。

【００７１】

好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢ発現可能な細胞数が提供され、少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、またはすべての細胞が特定の数のマンノース残基を有する少なくとも１本の、好ましくは２本、３本、または４本の糖鎖を有するｈｍＧＣＢ分子を生成する。

【００７２】

好ましい実施態様において、この細胞は少なくとも１つのマンノシダーゼ阻害剤を含む培地中で培養される。好ましい実施態様において、本発明の方法はさらにこの細胞が培養されている培地からｈｍＧＣＢを得ることを含む。

【００７３】

もう１つの態様において、本発明はここで記載した方法のいずれかによって生成されたｈｍＧＣＢ分子、例えばここで記載したｈｍＧＣＢ分子、例えばここに記載のいずれかの方法によって生成されたヒトｈｍＧＣＢ、を特徴とする。好ましくは、このｈｍＧＣＢ分子は前駆体オリゴ糖鎖の少なくとも４個のマンノース残基を有する、少なくとも１本の糖鎖、好ましくは２本、３本または４本の糖鎖を含む。

【００７４】

もう１つの態様において本発明は前駆体オリゴ糖鎖の少なくとも４個のマンノース残基を有する１本の糖鎖、好ましくは２本、３本または４本の糖鎖を含むｈｍＧＣＢ分子の一部を含むｈｍＧＣＢ調製物を特徴とする。好ましくはこのｈｍＧＣＢ調製物はここに記載の方法のいずれかにより生成される。

【００７５】
好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢはヒトｈｍＧＣＢである。
【００７６】
好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢ分子は５個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖、６個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖、７個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖、８個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖、９個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を有することができる。
【００７７】
好ましい実施態様において、生成されるｈｍＧＣＢ（１つまたはそれ以上のｈｍＧＣＢ分子または調製物全体のいずれか）は、マンノース残基のＧｌｃＮＡｃ残基に対する比が、ＧｌｃＮＡｃ残基２に対しマンノース残基が３より大きく、好ましくはマンノース対ＧｌｃＮＡｃの比が４：２，５：２，６：２，７：２，８：２，９：２であり、より好ましくはマンノース対ＧｌｃＮＡｃの比が５：２，８：２または９：２である少なくとも１本の糖鎖を有する。
【００７８】
好ましい実施態様において、調製物の少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％の、またはすべてのｈｍＧＣＢ分子が少なくとも１本の、好ましくは、２本、３本、または４本の糖鎖を持ち、その糖鎖において５糖コアから遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている。
【００７９】
もう１つの態様において、本発明は少なくとも１つのマンノシダーゼ活性が阻害されており、内在性ＧＣＢコード化領域の発現を調節するように導入された外来性調節配列を含む細胞を特徴とし、ここでこの細胞はＧＣＢを生成するにあたり、ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去が防止されている。
【００８０】
好ましい実施態様において、この細胞はｈｍＧＣＢ調製物、例えばヒトｈｍＧＣＢ調製物を生成し、ここで、前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基、５糖コアに遠位のα１，３マンノース残基、および／または前記５糖コアに遠位のα１，６マンノース残基の除去が防止されている。５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基の除去が防止されていることが好ましい。
【００８１】
好ましい実施態様においては、細胞を、マンノシダーゼを阻害する物質と接触させることにより、細胞中の少なくとも１つのマンノシダーゼ活性が阻害されている。好ましい実施態様において、この物質はマンノシダーゼ阻害剤である。このマンノシダーゼ阻害剤はクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤、クラス２マンノシダーゼ阻害剤、あるいはその両方であってよい。好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はキフネンシン、デオキシマンノジリマイシン、の１つまたはそれ以上であってよい。好ましくは、クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はキフネンシンである。好ましい実施態様において、クラス２のプロセシングマンノシダーゼ阻害剤はスワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシ－ＤＩＭ、および６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭの１つあるいはそれ以上であってよい。好ましくは、クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤はスワインソニンである。
【００８２】
好ましい実施態様において、細胞は少なくとも１つのゴルジプロセシングマンノシダーゼに対し突然変異、たとえばノックアウトを有する。この突然変異は遺伝子の発現を減少する、タンパク質または活性レベルを減少する、またはマンノシダーゼの分布またはその他翻訳後修飾、例えば糖鎖の処理、を変えるものであってよい。この突然変異はゴルジプロセシングマンノシダーゼ活性のレベルを減少するもの、例えば遺伝子の発現、ヌルミューテーション、欠失、フレームシフトまたは挿入であってよい。好ましい実施態様におい

てこの突然変異はマンノシダーゼ遺伝子のノックアウトである。この突然変異は（タンパク質の）構造（および活性）に影響を与えることができ、例えば感温突然変異であってよい。好ましい実施態様において細胞は、クラス１プロセシングマンノシダーゼ、クラス２プロセシングマンノシダーゼ、およびクラス１プロセシングマンノシダーゼとクラス２プロセシングマンノシダーゼに対して例えばノックアウトなどの突然変異を有する。好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼは、ゴルジマンノシダーゼＩＡ、ゴルジマンノシダーゼＩＢ、ゴルジマンノシダーゼＩＣ、またはそれらを組み合わせたものである。好ましい実施態様において、クラス２プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＩである。

【００８３】

好ましい実施態様において、細胞はｍＲＮＡなどの細胞マンノシダーゼ核酸に結合しまたはそれを不活性化し、タンパク質の発現を抑制することのできる、アンチセンス分子またはリボザイムなどの核酸配列を含む。好ましい実施態様において、この核酸配列はクラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子、クラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子、クラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子とクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子の両方である。好ましい実施態様において、クラス１プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＡ、ゴルジマンノシダーゼＩＢ、ゴルジマンノシダーゼＩＣ、およびこれらを組み合わせたものである。好ましい実施態様においてクラス２プロセシングマンノシダーゼはゴルジマンノシダーゼＩＩである。

【００８４】

好ましい実施態様において、細胞はマンノシダーゼに結合しそれを不活性化する、外来性分子などの分子を含む。この分子は例えば一本鎖抗体、細胞間タンパク質または競合性あるいは非競合性阻害剤であってもよい。

【００８５】

好ましい実施態様において、細胞により生成されるｈｍＧＣＢ分子は、マンノース残基のＧｌｃＮＡｃ残基に対する比が、ＧｌｃＮＡｃ残基２に対しマンノース残基が３より大きく、好ましくは、マンノース対ＧｌｃＮＡｃの比が４：２，５：２，６：２，７：２，８：２，９：２であり、より好ましくは、マンノース対ＧｌｃＮＡｃの比が５：２，８：２または９：２である。

【００８６】

好ましい実施態様において、この細胞ではｈｍＧＣＢ分子の１，２、３または４本の糖鎖において５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が不可能である。

【００８７】

好ましい実施態様において、この細胞から生産された少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％の、またはすべてのｈｍＧＣＢ分子が少なくとも１本の、好ましくは、２本、３本、または４本の糖鎖を持ち、その糖鎖において５糖コアから遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている。

【００８８】

好ましい実施態様において、この調節配列にはプロモーター、エンハンサー、上流活性化配列（ＵＡＳ）、骨格結合領域または転写因子結合部位の１つ以上が含まれる。好ましい実施態様において、この調節配列には、メタロチオネイン－Ｉ遺伝子、例えばマウスメタロチオネインーＩ遺伝子、からの調節配列、ＳＶ－４０遺伝子からの調節配列、サイトメガロウイルス遺伝子からの調節配列、コラーゲン遺伝子からの調節配列、アクチン遺伝子からの調節配列、免疫グロブリン遺伝子からの調節配列、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ遺伝子からの調節配列、またはＥＦ－１α遺伝子からの調節配列が含まれる。

【００８９】

好ましい実施態様において、この細胞は真核細胞である。好ましい実施態様においてこ

の細胞は真菌、植物または動物、たとえば脊椎動物を起源とするものである。好ましい実施態様において、この細胞はほ乳類の細胞、例えばほ乳類の初代または２次細胞、たとえば線維芽細胞、造血幹細胞、筋原細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液の固形成分を含む細胞、筋肉細胞およびこれら体細胞の前駆体、および形質転換または不死化細胞系である。好ましくは、この細胞はヒトの細胞である。本発明の方法で有用な不死化ヒト細胞株の例をあげると、これに限定するわけではないが、Ｂｏｗｅｓの黒色腫細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＲＬ９６０７）、Ｄａｕｄｉ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２１３）、ヒーラ細胞およびヒーラ細胞の誘導体（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２、ＣＣＬ２．１およびＣＣＬ２．２）、ヒーラ－６０細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２４０）、ＨＴ－１０８０細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１２１）、Ｊｕｒｋａｔ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＴＩＢ１５２）、ＫＢカルチノーマ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１７）、Ｋ－５６２白血病細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ２４３）、ＭＣＦ－７乳ガン細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＢＴＨ２２）、ＭＯＬＴ－４細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．１５８２）、Ｎａｍａｌｗａ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＲＬ１４３２）、ラージ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ８６）、ＲＰＭＩ８２２６細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１５５）、Ｕ－９３７細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．１５９３）、ＷＩ－２８ＶＡ１３サブライン２Ｒ４細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＬＬ１５５）、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞（ＡＴＣＣ受け入れ番号Ｎｏ．ＣＣＬ１１９）および２７８０ＡＤ卵巣カルチノーマ細胞（Ｖａｎ　Ｄｅｒ　Ｂｌｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　４８：５９２７－５９３２，１９８８）、およびヒト細胞と別の種の細胞とを融合して得た異種ハイブリドーマ細胞があげられる。もうひとつの実施態様において、この不死化細胞系はヒト細胞株以外の細胞株、たとえばＣＨＯ細胞株やコス細胞株であってもよい。また別の実施態様において、この細胞はクローン細胞株またはクローン細胞系からのものであってもよい。

【００９０】

もう１つの態様において本発明はゴーシェ病の治療に適した量の、前駆体オリゴ糖鎖の少なくとも４個のマンノース残基を有する、少なくとも１本の糖鎖、好ましくは２本、３本または４本の糖鎖を含むｈｍＧＣＢ分子、例えばヒトｈｍＧＣＢを含む医薬組成物を特徴とする。

【００９１】

好ましい実施態様において、この医薬組成物はさらに医薬上許容される担体または希釈剤を含む。

【００９２】

もう１つの態様において本発明はゴーシェ病の患者を治療する方法を特徴とする。この方法はゴーシェ病の患者に前駆体オリゴ糖の少なくとも４つのマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖、好ましくは、２個、３個または４個の糖鎖を有する、ｈｍＧＣＢ調製物、例えばヒトｈｍＧＣＢ調製物、をゴーシェ病の治療に適した量、投与することを含む。

【００９３】

もう１つの態様において、本発明は、ｈｍＧＣＢを試料から精製する方法を特徴とする。この方法は採取したｈｍＧＣＢ生成物を提供すること、このｈｍＧＣＢ生成物を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）および／または疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に付し、それによって精製されたｈｍＧＣＢを得ることを含む。

【００９４】

好ましい実施態様において、ＭＥＰ　Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）がＨＣＩＣに対して用いられる。もう１つの好ましい実施態様において、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）がＨＩＣに用いられる。

【００９５】

もう１つの好ましい実施態様において、本発明はさらにｈｍＧＣＢ生成物をイオン交換

クロマトグラフィーに付すことを含む。イオン交換クロマトグラフィーに先立ち、ｈｍＧＣＢ生成物をＨＣＩＣおよび／またはＨＩＣに付してもよく、またＨＣＩＣおよび／またはＨＩＣに先立ちｈｍＧＣＢ生成物をイオン交換クロマトグラフィーに付してもよい。好ましくは、ｈｍＧＣＢ生成物は１回以上のイオン交換クロマトグラフィーステップに付される。このイオン交換クロマトグラフィーは陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーまたは両方であってよい。

【００９６】

好ましい実施態様において、陰イオン交換クロマトグラフィーは、Ｑ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｑ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）、ＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＤＥＡＥ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われる。好ましい実施態様において、陽イオンクロマトグラフィーは、ＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｓｏｕｒｃｅ ３０Ｓ（登録商標）、ＣＭ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＣＭ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｓ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われる。

【００９７】

好ましい実施態様において、本発明はさらにｈｍＧＣＢ生成物をサイズ排除クロマトグラフィーに付すことを含む。好ましくは、このサイズ排除クロマトグラフィーはＳｕｐｅｒｄｅｘ ２００（登録商標）、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－２００ ＨＲ（登録商標）およびＢｉｏ－Ｇｅｌ Ａ １．５ｍ（登録商標）の１つまたはそれ以上を用いて行われる。

【００９８】

もう１つの態様において、本発明はｈｍＧＣＢを精製する方法を特徴とする。この方法は採取したｈｍＧＣＢ生成物を提供すること、このｈｍＧＣＢ生成物を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）および／または疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に付すこと、このｈｍＧＣＢ生成物を陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーのうちの１つ以上に付し、それによって精製されたｈｍＧＣＢを得ることを含む。

【００９９】

好ましい実施態様において、ＭＥＰ Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）がＨＣＩＣに対して用いられる。もう１つの好ましい実施態様において、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）がＨＩＣに用いられる。

【０１００】

好ましい実施態様において、本発明は陰イオン交換クロマトグラフィーを用いることを含む。好ましくは、陰イオン交換クロマトグラフィーは、Ｑ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｑ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）、ＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＤＥＡＥ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われる。

【０１０１】

好ましい実施態様において、本発明は陽イオン交換クロマトグラフィーを用いることを含む。好ましくは、陽イオンクロマトグラフィーは、ＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｓｏｕｒｃｅ ３０Ｓ（登録商標）、ＣＭ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＣＭ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｓ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われる。

【０１０２】

好ましい実施態様において、本発明はサイズ排除クロマトグラフィーを用いることを含む。好ましくは、このサイズ排除クロマトグラフィーはＳｕｐｅｒｄｅｘ ２００（登録

商標）、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－２００　ＨＲ（登録商標）およびＢｉｏ－Ｇｅｌ　Ａ　１．５ｍ（登録商標）の１つまたはそれ以上を用いて行われる。

【０１０３】

好ましい実施態様において、ｈｍＧＣＢ生成物は（順不同で）、陰イオン交換クロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーに付される。好ましくは、ｈｍＧＣＢはこれら３つすべてのクロマトグラフィーステップに、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーそしてサイズ排除クロマトグラフィーの順序で付される。

【０１０４】

もう１つの態様において、本発明はｈｍＧＣＢの精製方法を特徴とする。この方法は採取したｈｍＧＣＢ生成物を提供すること、このｈｍＧＣＢ生成物を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）および／または疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に付すこと、このＨＣＩＣおよび／またはＨＩＣ精製ｈｍＧＣＢ生成物を陰イオン交換クロマトグラフィーに付すこと、陰イオン交換クロマトグラフィー精製ｈｍＧＣＢ生成物を陽イオン交換クロマトグラフィーに付すこと、そして陽イオン交換クロマトグラフィー精製ｈｍＧＣＢ生成物をサイズ排除クロマトグラフィーに付し、それによって精製されたｈｍＧＣＢを得ることを含む。

【０１０５】

好ましい実施態様において、ＭＥＰ　Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）がＨＣＩＣに対して用いられる。もう１つの好ましい実施態様において、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）がＨＩＣに用いられる。

【０１０６】

好ましい実施態様において、陰イオン交換クロマトグラフィーは、Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｈｉｇｈ　Ｑ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）、ＤＥＡＥ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）、およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　ＤＥＡＥ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われる。

【０１０７】

好ましい実施態様において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｓｏｕｒｃｅ　３０Ｓ（登録商標）、ＣＭ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　ＣＭ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　Ｈｉｇｈ　Ｓ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われる。

【０１０８】

好ましい実施態様において、サイズ排除クロマトグラフィーはＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００（登録商標）、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－２００　ＨＲ（登録商標）およびＢｉｏ－Ｇｅｌ　Ａ　１．５ｍ（登録商標）の１つまたはそれ以上を用いて行われる。

【０１０９】

「高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）」とは、ここでは前駆体オリゴ糖からの４個以上のマンノース残基を有する、少なくとも１本の糖鎖を有するグルコセレブロシダーゼを言う。このｈｍＧＣＢは前駆体オリゴ糖鎖からのマンノース残基を５個、６個、７個、８個または９個有することが好ましい。最も好ましくは、このｈｍＧＣＢは前駆体オリゴ糖鎖からのマンノース残基を５個、８個または９個有する。

【０１１０】

「ｈｍＧＣＢ調製物」とは２つ以上のｈｍＧＣＢ分子を指す。

【０１１１】

「初代細胞」には脊椎動物組織源（プレーテイング、すなわち皿またはフラスコなどの組織培養基板に固定される前の）から単離された細胞の懸濁液中に存在する細胞、組織か

ら得られた外植片中に存在する細胞、先の２種類の細胞を初めて培養したもの、そしてこれらの培養細胞から得られた細胞懸濁液が含まれる。２次細胞または細胞株とはその後培養されているすべての段階の細胞をさす。すなわち、最初に培養された初代細胞が培養基質から除去され、再度培養（継代培養）されると、これはその後の継代中のすべての細胞を含め、ここでは２次細胞と呼ばれる。２次細胞は１回以上継代されている２次細胞からなる細胞株である。細胞株は１）１回以上継代され、２）培養により有限数の平均個体数倍加を示し、３）接触阻害、足場依存性の増殖性を示し（足場依存性は懸濁培養液で増殖する細胞に対しては適用されない）、そして４）不死化されていない、２次細胞からなる。「クローン細胞株」は単一の創始細胞から誘導される細胞株と定義される。「異種細胞株」とは２つ以上の創始細胞から誘導される細胞株と定義される。

【０１１２】

「不死化細胞」とはその決定的な特徴として、ここでは培養中見かけ上無限の寿命を示す細胞系（「株」という名称は初代および２次細胞に使用されるのでここでは「系」とする）を指す。

【０１１３】

「トランスフェクション細胞」とは、外来性合成核酸配列、例えばタンパク質をコード化する配列、が導入されている細胞を指す。細胞中に入ると、この合成核酸配列は受容細胞染色体ＤＮＡ内に取り込まれ、エピソームとして存在することができる。この合成核酸配列を細胞内に導入するには標準的なトランスフェクション法を用いることができ、例えばリポソームにより仲介されるトランスフェクション、ポリブレン、ＤＥＡＥデキストラン－仲介トランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、あるいはマイクロインジェクションなどである。「トランスフェクション」にはＤＮＡまたはＲＮＡのウイルスによる細胞へのデリバリは含まれない。

【０１１４】

「感染細胞」または「導入細胞」とは、外来性合成核酸配列、例えばタンパク質のコード化を行う配列、がウイルスによって導入されたことを指す。遺伝子の移入に有用であると知られているウイルスはアデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ポリオウイルス、レトロウイルス、シンドビスウイルス、レンチウイルスおよびカナリア痘ウイルスなどのワクシニアウイルスである。

【０１１５】

本発明の他の特徴と利点は下記の詳細な説明と特許請求の範囲から明らかとなろう。

【０１１６】

発明の詳細な説明

本発明は１つにはグルコセレブロシダーゼ（ＧＣＢ）の前駆体オリゴ糖鎖の５糖コアから遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去を妨げることによって、マンノース受容体を効率よく標的とする高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を得ることができることを発見したことに基づくものである。前駆体オリゴ糖鎖の５糖コアからのマンノース残基の除去は、１つまたはそれ以上のマンノース酵素、例えば１つまたはそれ以上のクラス１プロセシングマンノシダーゼ、および／またはクラス２のマンノシダーゼ、の活性を阻害または減少させることによって阻止することができる。１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去を妨げるまたは阻害することにより、前駆体オリゴ糖鎖からの４個以上のマンノース残基を有する、少なくとも１本の糖鎖を有するｈｍＧＣＢが得られる。

【０１１７】

ゴーシェ病はＧＣＢの欠損により引き起こされる。ＧＣＢはスフィンゴ糖脂質グルコセレブロシドの分解に必要である。ＧＣＢの欠損により、主として食作用細胞、例えばマクロファージ中にグルコセレブロシドが蓄積し、ひいては肝臓、脾臓および骨髄に蓄積する。

【０１１８】

マクロファージはマンノース受容体を有する。これらの受容体はこれらの細胞による受

容体依存性エンドサイトーシスにおいて役割を果たす。ｈｍＧＣＢはマクロファージ上のマンノース受容体を効率よく標的とし、ＧＣＢのこれらの細胞中への取り込み（ｈｍＧＣＢの形での）を向上させる。ＧＣＢ（ｈｍＧＣＢの形での）をグルコセレブロシドが蓄積している細胞へと向かわせることにより、ｈｍＧＣＢはマクロファージ中のグルコセレブロシドを加水分解するために使用され、それによってこの糖脂質のその後のゴーシェ病の患者の肝臓、脾臓および骨髄中での蓄積が減少する。

【０１１９】

グルコセレブロシダーゼ

このグルコセレブロシダーゼコード化遺伝子に関してはさまざまな種からの核酸配列情報が入手可能である（Ｈｏｒｏｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ４（１）：８７－９６；Ｂｅｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ １２（４）：７９５－８００）。

【０１２０】

成熟したヒトＧＣＢには５つの潜在性Ｎ－結合グリコシル化部位がＡｓｎ－１９、Ａｓｎ－５９、Ａｓｎ－１４６、Ａｓｎ－２７０、およびＡｓｎ－４６２に存在する。ヒトの組織から得たＧＣＢの場合、グリコシル化はこの５つの部位のうち４つで生じる（Ｅｒｉｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０：１４３１９－１４３２４）。部位指向突然変異誘発を用いた研究により、Ａｓｎ－４６２の部位は決して用いられないことがわかった。（Ｂｅｒｇ－Ｆｕｓｓｍａｎ ｅｔ．ａｌ（１９９３）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１４８６１－１４８６６）。ヒト胎盤ＧＣＢからリリースされたグリカン鎖の約２０％は、７個以下のマンノース残基を含む高マンノース型のものであることが示されたが、大半のグリカン鎖はシアリル化ビアンテナまたはトリアンテナ構造との複合型であった（Ｔａｋａｓａｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５９：１０１１２－１０１１７）。

【０１２１】

ＧＣＢ Ｎ－グリコシル化において最初に起こることは、小胞体の内腔中でオリゴ糖－ＰＰ－ドリコールから発生期のペプチドへの$Glc_3Man_9GlcNAc_2$の同時翻訳的移入である。ドナーオリゴ糖上に３つのグルコース残基が存在することにより、オリゴ糖トランスフェラーゼによるアクセプターアスパラギンへの効率的な移入が行われる。Ｎ－グリコシル化に続き、ＥＲ グルコシダーゼＩおよびＩＩによる折り畳みプロセス中にグルコース残基は速やかにＧＣＢから除去される。２つの異なるＥＲマンノシダーゼはそれぞれ$Man_9GlcNAc_2$から１個のマンノース残基を加水分解し、２つの異なる$Man_8GlcNAc_2$異性体（図１参照）を形成する。アクセス可能なグリカンは、ゴルジ中でさらに処理され、ゴルジマンノシダーゼＩにより最大４個のα１，２－結合マンノース残基が除去されて、$Man_5GlcNAc_2$になる。基質特異性と組織発現がわずかに異なるが$Man_9GlcNAc_2$グリカンから４個のマンノース残基をトリミングし、$Man_5GlcNAc_2$とすることのできる、関連するゴルジマンノシダーゼＩイソ型（ＩＡ，ＩＢおよびＩＣ）をコード化する、少なくとも３個の異なるヒト遺伝子がある（Ｔｒｅｍｂｌａｙ ｅｔ ａｌ．（Ｊｕｌｙ ２７、２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．［印刷前に電子的に発表された］。これらは染色体６ｑ２２，１ｐ１３，および１ｐ３５－３６上に位置し、そのｃＤＮＡ配列はＧｅｎＢａｎｋからＸ７４８３７、ＡＦ０２７１５６、およびＡＦ２６１６５５としてそれぞれ入手することができる。

【０１２２】

グリカンが複合グリカンとなる生合成経路の最終ステージではＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼの作用により、$Man_5GlcNAc_2$から$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$への最初の変換が必要であり、その後ゴルジマンノシダーゼＩＩがさらに２つのマンノース残基の除去を触媒し、$GlcNAcMan_3GlcNAc_2$を生じる。これは複合型の鎖を形成するためのトランスゴルジおよびトランスゴルジネットワーク中に位置するグリコシルトランスフェラーゼによるグリカン伸長の基質である。

【０１２３】

初期のＮ－グリコシル化ステップ中でＧＣＢへと移入された高マンノース鎖がゴルジ中で複合型の鎖に処理されなければ、高マンノース鎖を有するＧＣＢ（ｈｍＧＣＢ）が網内皮細胞上のマンノース受容体を効率的に標的とするであろう。

【０１２４】

細胞

トランスフェクションまたは感染すべき初代および２次細胞はさまざまな組織から得ることができ、培養物中で維持し増殖することのできる細胞型を含んでいる。例えばトランスフェクションまたは感染すべき初代および２次細胞には線維芽細胞、角化細胞、上皮細胞（例えばほ乳類の上皮細胞、腸上皮細胞）、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液の固形成分を含む細胞（例えばリンパ球、骨髄細胞）、筋肉細胞およびこれら体細胞の前駆体、および形質転換または不死化細胞系である。初代細胞はトランスフェクションまたは感染した初代または２次細胞が投与された（例えば自己細胞）個体から得ることが好ましい。しかし、初代細胞は同一種の（すなわち同種細胞）のドナー（受容体を除く）から得ることもでき、また別の種（すなわち異種細胞）（例えばマウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、トリ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サル、ヒヒ）のドナーから得てもよい。

【０１２５】

脊椎動物、とりわけほ乳類を起源とする、初代あるいは２次細胞は、外来性ＤＮＡ配列、例えば治療タンパク質をコード化する外来性ＤＮＡ配列、でトランスフェクションまたは感染させ、コード化された治療タンパク質を長期にわたり、生体内外で安定的に再現性よく生産させることができる。さらにこのトランスフェクションした、または感染した初代および２次細胞は生理的関連レベルで生体内でコード化生成物を発現することができ、移植後細胞を回収し、再培養により増殖させその移植前の性質を呈示させることができる。細胞は修飾により細胞表面組織適合性複合体や外来の炭水化物部分を減少させ、免疫抗原性を減少させ、例えば万能ドナー細胞とすることができる。

【０１２６】

別法として、脊椎動物、とりわけほ乳類起源の初代あるいは２次細胞は、調節配列を含む外来性ＤＮＡ配列によりトランスフェクションまたは感染させることができる。このような調節配列の例としては、プロモーター、エンハンサー、ＵＡＳ、骨格結合領域または転写因子結合部位の１つまたはそれ以上が含まれる。標的事象により、標的となった内在性遺伝子がその管理下に置かれ（例えばプロモーターまたはエンハンサーのどちらか一方、あるいはその両方をこの内在性遺伝子または調節領域の上流に挿入することにより）ＤＮＡ配列の調節配列の挿入が行われる。また標的事象が同時に遺伝子の組織と特異的調節配列の削除などにより、内在性調節配列を削除することもオプションとして可能である。この標的事象により既存の調節配列の置換が行える、例えば組織特異的エンハンサーは内在性要素よりもより広範囲なまたは異なる細胞型に特異性を有する、あるいは相当する非トランスフェクションまたは非感染細胞とは異なる調節または誘導のパターンを示すエンハンサーに置き換えることができる。このように、内在性調節配列が削除され、新規の配列が加えられる。別法として、例えば内在性調節要素内で外来性配列を標的とすることになどにより、内在性調節配列を除去あるいは置換せずに、標的事象によって破壊、または無能にすることもできる。同種組み換えによる調節配列の導入により、通常は発現しない治療的タンパクを発現する初代または２次細胞が得られる。さらに、調節配列の標的導入は治療的タンパク質を製造あるいは含むが通常よりその量が少なく（生理的に正常な下限よりも少量）あるいは欠損形であるような細胞に対して用いることができ、また治療的タンパク質を生理的に正常なレベルで作り出すが、その含量あるいは生成を増加、強化する必要のある細胞に対しても使用することができる。内在性コード化配列の活性化法は米国特許第５，６４１，６７０号、第５，７３３，７６１号および第５，９６８，５０２号に記載されており、その内容はここに参照として援用している。

【０１２７】

トランスフェクションまたは感染させた初代あるいは２次細胞はまた選択可能な表現型

を付与し、その同定と分離を容易にする、選択可能なマーカーをコード化するＤＮＡ配列を含むこともできる。ＤＮＡ配列を安定に発現するトランスフェクションされた初代または２次細胞の製造方法、このようなトランスフェクション細胞の異種細胞株やクローン細胞株、そしてクローンおよび異種細胞株の製造方法は知られており、例えば米国特許第５，６４１，６７０号、米国特許第５，７３３，７６１号および米国特許第５，９６８，５０２号に記載されており、その内容はここに参照として援用している。

【０１２８】

トランスフェクションした初代または２次細胞はエレクトロポレーションにより製造することができる。エレクトロポレーションは適当な電圧と静電容量（および相当する時間定数）で行われ、ＤＮＡ構成体が初代あるいは２次細胞へと導入される。エレクトロポレーションは幅広い範囲の電圧（例えば５０から２０００ボルト）と、相当する静電容量で実行することができる。約０．１から５００μｇの全ＤＮＡが一般に用いられる。

【０１２９】

別法として、リン酸カルシウム沈殿法、マイクロインジェクション、修正リン酸カルシウム沈殿法およびポリブレン沈殿法、リポソーム融合法、および受容体依存性遺伝子デリバリ法もまた細胞のトランスフェクションに用いることができる。

【０１３０】

グルコセレブロシダーゼのプロセシング

マンノース残基の除去を防止するためのプロセシングがなされていない細胞中のオリゴ糖アセンブリは通常下記に解説するように進行する。

【０１３１】

ＧＣＢのオリゴ糖鎖はＮ－グリコシド結合によりポリペプチド主鎖へと結合する。Ｎ－結合グリカンはアミド結合を持ち、これにより、オリゴ糖の還元性末端Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）残基のアノマー炭素（Ｃ－１）とポリペプチドのアスパラギン（Ａｓｎ）残基の窒素とが結合する。

【０１３２】

Ｎ－結合オリゴ糖アセンブリの開始はＧＣＢタンパク質のＡｓｎ残基上では直接始まらずむしろ脂肪に結合した１４糖前駆体オリゴ糖のプリアセンブリが関与し、これがｍＲＮＡからの翻訳中に、または翻訳後直ちにＥＲ中のタンパク質に移入される。「前駆体オリゴ糖」とはここでは糖鎖の生合成において、初期のステップに関与するオリゴ糖鎖を指す。「前駆体オリゴ糖」は、少なくとも糖$Man_9GlcNAc_2$を含むオリゴ糖構造であってよく、例えば前駆体オリゴ糖は図１に示す構造、$Glc_3Man_9GlcNAc_2$を有する。この前駆体オリゴ糖は、ピロリン酸塩架橋を通じてポリイソプレノイド担体脂質、ドリコールに結合している間に合成される。このアセンブリは少なくとも６つの明らかな膜結合グリコシルトランスフェラーゼを含む。これらの酵素のいくつかはヌクレオチド糖から単糖を移入し、その他のものはドリコール結合単糖を糖供与体として利用する。脂質結合前駆体のアセンブリが完了した後、もう１つの膜結合酵素がそれを立体化学的にアクセス可能なＡｓｎ残基へと転移させる。これは配列－Ａｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ－／Ｔｈｒ－の一部として生じる。

【０１３３】

新たに合成されたＧＣＢのグリコシル化Ａｓｎ残基は一時的に、ここで「未処理糖鎖」と呼ぶ、$Glc_3Man_9GlcNAc_2$を有する。

【０１３４】

Ｎ－結合オリゴ糖のプロセシングは多数の膜結合酵素が順番に作用することによって完成するが、これは前駆体オリゴ糖$Glc_3Man_9GlcNAc_2$のタンパク質への転移後、直ちに開始される。「プロセシング」、「トリミング」および「修飾」という用語はここでは同義に用いている。

【０１３５】

Ｎ－結合オリゴ糖のプロセシングは３つの段階に分けることができる；３つのグルコース残基の除去、さまざまな数のマンノース残基の除去、そして様々な糖残基の得られた処

理コアへの添加である。

【０１３６】

最初の処理段階でのグルコース残基の除去は３つのグルコース残基のすべてを除去してＮ－結合$Man_9GlcNAc_2$を生成するものである。この構造はここではＭａｎα１－２Ｍａｎα１－２Ｍａｎα１－３［Ｍａｎα１－２Ｍａｎα１－３（Ｍａｎα１－２Ｍａｎα１－６）Ｍａｎα１－６］Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃ（図１，構造９’を参照のこと）と示す。処理は通常マンノース残基の除去を行う第２ステージへと続いて行われる。

【０１３７】

このMan_9GlcAc_2部分の４つのマンノース残基は、α１，２結合で結合している。これらの最大４つのα１，２結合マンノース残基はマンノシダーゼＩＡ，ＩＢおよびＩＣにより除去されＮ－結合$Man_{5-8}GlcNAc_2$を生成する。

【０１３８】

タンパク質結合Man_5GlcAc_2がついでＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃからβ１，２－結合ＧｌｃＮＡｃ残基をコアα１、３－結合マンノース残基へと転移し、ＧｌｃＮＡｃ$MAn_5ClcNAc_2$を形成するＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼのための基質として作用する。マンノシダーゼＩＩにより２個のマンノース残基が除去され、「５糖コア」である、$Man_3GlcNAc_2$をその中に含むタンパク質結合オリゴ糖が生成されて、この処理工程のトリミング段階が完成する。$GlcNAcMan_3GlcNAc_2$という構造はついでβ１，２－結合ＧｌｃＮＡｃ残基をα１，６－結合マンノース残基へと転移することができるＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩＩの基質となる。

【０１３９】

トリミング段階の後、単糖が一連の膜結合ゴルジグリコシルトランスフェラーゼ（これらはそれぞれアクセプターオリゴ糖、ドナー糖および糖の間に形成される結合の種類に対して極めて特異的である）によって順番に加えられ、オリゴ糖鎖が成長する。これらには明確なＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼ（β１，２；β１，４またはβ１，６結合を形成する）、ガラクトシルトランスフェラーゼ（β１，４；β１，３；およびα１，３結合を形成する）、シアリルトランスフェラーゼ（１つはα２，３を、もう１つはα２，６結合を形成する）、フコシルトランスフェラーゼ（α１，２、α１，３、α１，４またはα１，６結合を形成する）が含まれているほか、さまざまな通常にはない結合を行うその他の酵素も多数含まれる。これらグリコシルトランスフェラーゼの協働作用により「複合」オリゴ糖とまとめて名付けられる多岐にわたる構造が得られる。これらには不変のコア５糖、$Man_3GlcNAc_2$、に結合している２個、３個または４個の外向きの枝（「アンテナ」）が含まれていてもよい。これらの構造体はその外向きの枝の数に応じて、ビアンテナ（枝２本）、トリアンテナ（枝３本）またはテトラアンテナ（枝４本）と呼ぶ。これらの複合グリカンの大きさは様々である。

【０１４０】

高マンノースグルコセレブレシダーゼのプロセシング

ｈｍＧＣＢはＧＣＢの細胞糖質の修飾（すなわちプロセシング）を低下または阻止することより製造される。ＧＣＢの前駆体オリゴ糖鎖の５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去を防止する条件のもとでＧＣＢの製造を行うことにより糖質の修飾が阻止できる。例えば、前駆体オリゴ糖からのマンノース残基の除去中の１つまたはそれ以上の「トリミング」段階を阻止することができる。

【０１４１】

細胞マンノシダーゼは大きく２つのクラスに分けられる。クラス１プロセシング酵素にはＥＲマンノシダーゼＩ、ゴルジマンノシダーゼＩＡ，ＩＢおよびＩＣが含まれ、これはα１，２－結合マンノース残基を加水分解し、活性にCa^{2+}イオンを必要とする。クラス２プロセシング酵素にはＥＲマンノシダーゼＩＩ、ゴルジマンノシダーゼＩＩ、細胞質ゾルαマンノシダーゼ、およびリゾソーマルα‐マンノシダーゼが含まれ、これはより広範な基質に対し特異性を持ち、活性にCa^{2+}を必要としない。

【０１４２】
前駆体オリゴ糖からのマンノース残基のトリミングには少なくとも下記のマンノシダーゼ酵素が関与する。すなわちゴルジマンノシダーゼＩＡ，ＩＢおよびＩＣとゴルジマンノシダーゼＩＩである。細胞中でのＮ結合オリゴ糖アセンブリの間に１つまたはそれ以上のこれらのマンノシダーゼを阻害することにより、少なくとも５糖コアに加えて１つまたはそれ以上のマンノース残基を有する糖鎖を少なくとも１本有するＧＣＢを生成することができる。例えばＥＲマンノシダーゼＩとゴルジマンノシダーゼＩの両方を阻害すると、少なくとも１本の糖鎖（好ましくはすべての鎖）が、前駆体オリゴ糖からの少なくとも８つのマンノース残基を有するようなｈｍＧＣＢを生成することができる。ゴルジマンノシダーゼＩＩの阻害により、少なくとも１本の糖鎖（好ましくはすべての鎖）が、前駆体オリゴ糖からの少なくとも５つのマンノース残基を有するようなｈｍＧＣＢを生成することができる。

【０１４３】
マンノシダーゼによるトリミングは、例えばこの細胞を、ＧＣＢの前駆体オリゴ糖からの１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去を防止する物質と接触させることによって、また少なくとも１つのマンノシダーゼを生成しない、あるいは欠乏レベルで生成するような細胞中で、または突然変異および／または不活性マンノシダーゼを生産する細胞中でＧＣＢを生成することによって阻害することができる。例えばこの細胞は少なくとも１つのマンノシダーゼに対するノックアウトであってもよく、少なくとも１つのアンチセンスマンノシダーゼ分子を発現するものであっても、または少なくとも１つのマンノシダーゼに対して優性陰性であってもよい。

【０１４４】
マンノース残基の除去を防止する物質
ＧＣＢの前駆体オリゴ糖から１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去を防止する物質を、ｈｍＧＣＢ調製物を製造するのに用いることができる。例えばＧＣＢを発現する細胞を、ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基および／またはＧＣＢの前駆体オリゴ糖のα１，３マンノース残基および／またはＧＣＢの前駆体オリゴ糖のα１，６マンノース残基の除去を防止する物質と接触させることができる。好ましくはこの物質はマンノシダーゼ阻害剤であり、例えばクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤またはクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤である。

【０１４５】
細胞マンノシダーゼはタンパク質配列の相同性から大きく２つのクラスに分けることができる（Ｍｏｒｅｍｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ ４：１１３－１２５）。これら２つのクラスは機構的に異なっている。クラス１酵素はＥＲマンノシダーゼＩおよびゴルジマンノシダーゼＩイソ型を含み、約６３－７３ｋＤＡの質量を持ち、α１，２－結合マンノース残基を加水分解し、活性にCa^{2+}を必要とする。クラス１プロセシングマンノシダーゼは、例えば基質模擬体、例えばマンノースのピラノース類似体、で処理することによりブロックすることができる。例えばクラス１プロセシングマンノシダーゼは１つまたはそれ以上の下記の酵素阻害剤により処理することでブロックすることができる。すなわちキフネンシン、デオキシマンノジリマイシンまたはそれらを組み合わせたものである。クラス２の酵素は、ＥＲマンノシダーゼＩ、ゴルジマンノシダーゼＩＩ、ｃｙｓｔｏｌｉｃα－マンノシダーゼ、およびリソソームα－マンノシダーゼ、を含み、約１０７－１３６ｋＤＡと、より大きな質量を持ち、活性にCa^{2+}を必要とせずより広範囲の基質に特異性を有する。クラス２のプロセシングマンノシダーゼは例えばマンノシルカチオンのフラノース遷移状態類似体で処理することによってブロックできる（Ｄａｎｉｅｌｓ ｅｔ ａｌ．（１９９４） ＧｌｙｃｏＢｉｏｌ．４：５５１－５６６）。例えばクラス２のプロセシングマンノシダーゼは下記の１つまたはそれ以上の阻害剤を用いて処理することによりブロックできる。すなわちスワインソニン、６－デオキシ－ＤＩＭ、６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ、マンノスタチンＡまたはそれらを組み合わせたものである。

【０１４６】
キフネンシンは小胞体マンノシダーゼＩおよび／またはゴルジマンノシダーゼＩＡおよび／またはＩＢおよび／またはＩＣの阻害剤として使用でき、デオキシマンノジリマイシンは小胞体マンノシダーゼＩ、小胞体マンノシダーゼＩＩおよび／またはゴルジマンノシダーゼＩＡおよび／またはＩＢおよび／またはＩＣの阻害剤として使用でき、スワインソニンはゴルジマンノシダーゼＩＩの阻害剤として使用でき、マンノスタチンＡはゴルジマンノシダーゼＩＩの阻害剤として使用することができる。
【０１４７】
マンノシダーゼ阻害剤を使用することにより、オリゴ糖アセンブリ中のマンノース残基トリミングのある段階移行、ＧＣＢの糖鎖のプロセシングが阻害できる。例えば細胞を、キフネンシンと接触することによって前駆体オリゴ糖のどれか１個、２個、３個、または４個の残基のトリミングを阻害することができる。
【０１４８】
α－マンノシダーゼの処理は下記の酵素阻害剤うちの１つまたはそれ以上を用いて細胞を処理することによってブロックできる。
【０１４９】
・キフネンシン、小胞体ＩおよびゴルジマンノシダーゼＩ酵素の阻害剤（Ｗｅｎｇ ａｎｄ Ｓｐｉｒｏ（１９９３）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ ２６８：２５６５６－２５６６３；Ｅｌｂｅｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ２６５：１５５９９－１５６０５）
・スワインソニン、ゴルジマンノシダーゼＩＩ酵素の阻害剤（Ｔｕｌｓｉａｎｉ ｅｔ ａｌ．（１９８２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ ２５７：７９３６－７９３９）
・デオキシマンノジリマイシン、小胞体マンノシダーゼＩおよびＩＩ、およびゴルジマンノシダーゼＩの阻害剤（Ｗｅｎｇ ａｎｄ Ｓｐｉｒｏ（１９９３）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ ２６８：２５６５６－２５６６３；Ｔｒｅｍｂｌａｙ ａｎｄ Ｈｅｒｓｃｏｖｉｃｓ（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．Ｊｕｌ２７；[出版前に電子的に公開]
・ＤＩＭ（１，４－ジデオキシ－１，４－イミノ－Ｄ－マンニトール）、ゴルジマンノシダーゼＩＩの阻害剤（Ｐａｌａｍａｒｚｙｋ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２４３：３５－４５）
・６－デオキシ－ＤＩＭおよび６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ、ゴルジマンノシダーゼＩＩの阻害剤（Ｗｉｎｃｈｅｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９３）ＢｉｏｃｈｅｍＪ．２９０：７４３－７４９）
・マンノスタチンＡ、ゴルジマンノシダーゼＩＩの阻害剤（Ｔｒｏｐｅａ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２９：１００６２－１００６９）
さまざまなマンノシダーゼ阻害剤を特定の細胞型への貫通性、ならびにマンノシダーゼ阻害剤の阻害能に応じて選択することができる。例えば、スワインソニンは急速に時間および濃度に依存したやり方で培養線維芽細胞により内部移行される。スワインソニンはまたクラス２マンノシダーゼ、たとえばゴルジマンノシダーゼの潜在的な阻害剤である。このようにスワインソニンはｈｍＧＣＢを培養線維芽細胞中で生産するのに使用でき、例えば前駆体オリゴ糖鎖の少なくとも４から５個のマンノース残基を有する、少なくとも１本の糖鎖を有するｈｍＧＣＢを生産するのに使用することができる。さらに、キフネンシンは簡単に培養繊維芽細胞により取り込まれ、クラス１マンノシダーゼ、例えば小胞体マンノシダーゼＩおよびゴルジマンノシダーゼＩの潜在的阻害剤である。このように、キフネンシンは培養繊維芽細胞中でｈｍＧＣＢを生産するのに使用でき、例えば、前駆体オリゴ糖鎖の少なくとも４個、５個、６個、７個、８個または９個のマンノース残基を有する、少なくとも１本の糖鎖を有するｈｍＧＣＢを製造するのに使用することができる。
【０１５０】
好ましくは、マンノシダーゼ阻害剤は０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍ

ｌの濃度で存在する。例えばクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤は約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤は約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、クラス１およびクラス２のプロセシングマンノシダーゼ阻害剤はそれぞれ約０．０２５から２０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、０．０５から５μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在し、あるいはクラス１プロセシングおよびクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤の合計濃度は約０．０２５から４０．０μｇ／ｍｌ、０．０５から２０μｇ／ｍｌ、０．０５から１０μｇ／ｍｌ、好ましくは約０．１から５．０μｇ／ｍｌの間である。

【０１５１】

細胞は例えば、少なくとも１つのマンノシダーゼ阻害剤を含む培地で培養することによってマンノシダーゼ阻害剤と接触させることができる。

【０１５２】

マンノシダーゼ突然変異細胞

マンノシダーゼノックアウト細胞

マンノシダーゼ遺伝子発現の永久的または調節された不活性化はマンノシダーゼ部位を標的とするトランスフェクションプラスミドＤＮＡ構成体または合成オリゴヌクレオチドによって行うことができる。プラスミド構成体またはオリゴヌクレオチドはいくつかの形に設計することができる。これらは１）選択可能なマーカー遺伝子または他の配列をマンノシダーゼ遺伝子のエクソン中に挿入する、２）非コード化配列の調節領域中に外来性配列を挿入する、３）調節および／またはコード化配列の削除または置換、および４）部位特異性変異誘発によりタンパク質コード化配列を変化させる、ことを含む。

【０１５３】

選択可能なマーカー遺伝子をコード化配列中に挿入する場合、内在性マンノシダーゼエクソンと、例えば選択可能なマーカー遺伝子を含むように処理されたマンノシダーゼエクソンとのフレーム内融合を生じさせることができる。この方法では、成功した標的化に続き、内在性マンノシダーゼ遺伝子が融合ｍＲＮＡ（マンノシダーゼ配列プラス選択できるマーカー配列）を発現する。さらに融合ｍＲＮＡは機能性マンノシダーゼ翻訳生成物を製造することができないであろう。

【０１５４】

ＤＮＡ配列を調節領域に挿入する場合、マンノシダーゼ遺伝子の転写は内在性のプロモーター領域、または５‘非翻訳領域（５’ＵＴＲ）中の翻訳に必要であるその他の領域を破壊することによって沈黙化することができる。このような領域には例えば翻訳制御領域およびイントロンのスプライスドナーがあげられる。第二に、新しい調節配列はマンノシダーゼ遺伝子の上流に挿入することができ、それによりマンノシダーゼ遺伝子は細胞外因子の制御下に置かれる。このように、反応を抑制し、最適なｈｍＧＣＢ生産に必要なマンノシダーゼ遺伝子発現を失わせることが可能であろう。さらに選択可能なマーカーおよびプロモーターを含む配列は内在性配列の発現を破壊するのに使用することができる。最後に内在性マンノシダーゼ遺伝子のすべてまたは一部をターゲット基質の適当な設計により削除することもまた可能である。

【０１５５】

ヒトゴルジマンノシダーゼＩＡ，ＩＢまたはＩＣ遺伝子の少なくとも１つの染色体コピーのノックアウトを含む細胞を生成するために、遺伝子の少なくとも５‘部分（調節配列、５’ＵＴＲ、コード化配列を含む）を含むゲノムＤＮＡを分離する。例えば、ＧｅｎＢａｎｋ配列、受け入れ番号Ｎｏ．ＮＭ００５９０７（ヒト）は、ゴルジマンノシダーゼＩＡのプローブを製造するのに用いることができ、受け入れ番号Ｎｏ．ＡＡＦ９７０５８は、複製連鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、ゴルジマンノシダーゼＩＢまたはＩＣのプローブを生成するのに用いることができる。ＰＣＲ用のオリゴヌクレオチドはＧｅｎＢａｎｋ配列

に基づいて指定することができる。得られるプローブは交雑により、単一のコピーゴルジマンノシダーゼＩＡ，ＩＢまたはＩＣ遺伝子にすることができる。このプローブはついで市販されている組み換えファージライブラリをスクリーンするのに用いることができ（例えばヒトゲノムＤＮＡから得られたライブラリ）、マンノシダーゼＩ構造遺伝子のすべてまたは一部を含むクローンを単離する。ひとたびマンノシダーゼ調節および／またはコード化配列を含む組み換えクローンが分離されると、マンノシダーゼ遺伝子発現を不活性化するように設計された特定のターゲットプラスミドを構成することができる。マンノシダーゼ活性の不活性化は外来性ＤＮＡを調節またはコード化配列へと挿入し、翻訳読みとり枠を破壊することから得られる。酵素の不活性化はまたｍＲＮＡ転写、またはｍＲＮＡプロセシングの破壊、または内在性マンノシダーゼ調節またはコード化配列の削除の結果得ることもできる。

【０１５６】

その他のクラス１およびクラス２プロセシングマンノシダーゼの核酸配列もまた、例えばＧｅｎＢａｎｋで得ることができる。ゴルジマンノシダーゼＩＡ，ＩＢあるいはＩＣについて上記に解説した方法を用いて、その他のクラス１および／またはクラス２プロセシングマンノシダーゼのためのノックアウト細胞を製造することもできる。

【０１５７】

マンノシダーゼノックアウト細胞は例えば遺伝子治療に用いることができる。ノックアウト細胞を細胞が生体内でｈｍＧＣＢを生成するように例えばゴーシェ病の患者に投与することができる。

【０１５８】

アンチセンスマンノシダーゼ核酸配列

マンノシダーゼをコード化するヌクレオチドコードに対しアンチセンスである核酸分子、例えばクラス１プロセシングまたはクラス２プロセシングマンノシダーゼをマンノシダーゼの発現を阻害する、不活性化剤として用いることができる。例えばゴルジマンノシダーゼＩＡ、ゴルジマンノシダーゼＩＢ、ゴルジマンノシダーゼＩＣおよび／またはゴルジマンノシダーゼＩＩ発現はアンチセンス核酸分子によって阻害される。「アンチセンス」核酸にはマンノシダーゼをコード化する「センス」核酸に対し相補的である、例えば二本鎖ｃＤＮＡ分子のコード化鎖に相補的な、またはｍＲＮＡ配列に相補的な核酸配列が含まれる。したがってアンチセンス核酸はセンス核酸と水素結合を形成することができる。アンチセンス核酸は全マンノシダーゼコード化鎖に対して相補的であっても、またはその一部のみに相補的であってもよい。例えばマンノシダーゼをコード化するヌクレオチド配列のコード化鎖の「コード化領域」に対してアンチセンスである核酸分子を使用することができる。

【０１５９】

さまざまなマンノシダーゼをコード化するコード化鎖配列は、例えばＢａｕｓｅ（１９９３）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２１７（２）：５３５－５４０；Ｇｏｎｚａｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７４（３０）：２１３７５－２１３８６；Ｍｉｓａｇｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９２（２５）：１１７６６－１１７７０；Ｔｒｅｍｂｌａｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　８（６）：５８５－５９５、Ｔｒｅｍｂｌａｙ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．Ｊｕｌ　１２７：［印刷に先立ち電子的に発表］、に開示されており、ワトソンとクリックの塩基対の規則に従ってアンチセンス核酸配列を設計することができる。アンチセンス核酸分子はマンノシダーゼｍＲＮＡの全コード化領域に相補的である配列を含むことができるが、より好ましくはマンノシダーゼｍＲＮＡのコード化または非コード化領域の部分のみに相補的であるオリゴヌクレオチドである。例えばこのアンチセンスオリゴヌクレオチドはマンノシダーゼｍＲＮＡの翻訳開始部位を取り巻く領域に対し相補的な配列を含むことができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは例えば約５，１０，１５，２０，２５，３０、３５、４０、４５，５０またはそれ以上のヌクレオチドの長さでよい。アンチセンス核酸は当業者に知られた手順

を用いて化学合成および酵素連結反応を用いて構成することができる。例えばアンチセンス核酸（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド）は天然に産出するヌクレオチドまたは分子の生物学的安定性を高めるべく設計され、様々に修飾された、あるいはアンチセンスとセンス核酸間の二重鎖の物理的安定性を高めるべく設計され、様々に修飾されたヌクレオチド、例えばホスホロチオエート誘導体とアクリジン置換ヌクレオチド、を用いて化学的に合成することができる。アンチセンス核酸を生成するのに使用することのできる修飾ヌクレオチドの例としては、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルケオシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルケオシン、５‘－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ｙブトキソシン、プソイドウラシル、ケオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗ、および２，６－ジアミノプリンがあげられる。別法として、アンチセンス核酸はアンチセンス配位（すなわち挿入核酸から転写されたＲＮＡがここで問題となっている標的核酸に対しアンチセンス配位を有する）にて核酸がサブクローンされている発現ベクトルを用いて生物学的に製造することもできる。

【０１６０】

ｈｍＧＣＢの精製

「精製された」ｈｍＧＣＢとはここではＧＣＢを発現する細胞から生成した際実質的に細胞物質を除去したｈｍＧＣＢものを指す。「実質的に細胞物質を除去した」という表現には、ｈｍＧＣＢを生成する細胞の細胞成分からこのタンパク質が分離されているｈｍＧＣＢの調製物が含まれる。１つの実施態様において、「実質的に細胞物質を除去した」とは約３０％（乾燥重量）未満の非ＧＣＢタンパク質（これを「タンパク質不純物」または「汚染タンパク質」とよぶ）、より好ましくは約２０％未満の非ＧＣＢタンパク質、さらにより好ましくは約１０％未満の非ＧＣＢタンパク質、最も好ましくは、約５％未満の非ＧＣＢタンパク質を含むｈｍＧＣＢ調製物を指す。ｈｍＧＣＢが培地から得られる（すなわち採取される）場合、これは培地の成分を実質的に含まないことが好ましく、すなわち培地の成分が、タンパク質調製物の乾燥重量の約２０％未満、より好ましくは約１０％未満、最も好ましくは約５％未満であることが好ましい。

【０１６１】

様々な方法を用いてｈｍＧＣＢを培地から採取することができる。「採取されたｈｍＧＣＢ」とはここでは培地から得られるｈｍＧＣＢ、または細胞から得られるｈｍＧＣＢを指す。例えば、精製手順に先立ち採取されたｈｍＧＣＢを準備するためには下記のいずれかの方法を使用することができる。これらの方法としては、１）新鮮な採取物を濾過する；２）新鮮な採取物を濾過し、例えば約－２０℃から－８０℃で濾過した生成物を処理する準備ができるまで凍結し（準備のできた時にこれを融解し、場合によっては濾過する）；３）新鮮な採取物を濾過し、濾過した生成物を濃縮（例えば８倍から１０倍）し、それから場合によっては再び濾過する；４）新鮮な採取物を濾過し、濾過した生成物を濃縮し（例えば約８倍から１０倍）、場合によっては再び濾過し、ついで約－２０℃から－８０℃で濾過した生成物を処理する準備ができるまで凍結し（準備のできた時にこれを融解し、場合によっては濾過する）がある。これらの方法のバリエーションも用いることができる。例えば採取した生成物または採取した生成物を濃縮したものを凍結する際、異なる採

取物を融解後プールし濾過してもよい。さらに採取したあるいは濃縮した採取物について、採取物を低温、例えば約２℃から８℃で短期間、例えば約１日から３日、好ましくは１日、精製に先立ちプールしておくこともできる。低温に保った採取物は、精製に先立ちプールしてもよい。

【０１６２】

採取物の濃縮を行う際は、分子量５０００から５０，０００のカットオフ、好ましくは分子量１０、０００から３０，０００のカットオフ、で限外濾過を行うことができる。フィルターによる清澄化には通常１．２μｍ／０．５μｍプレフィルターを用い、ついで０．２μｍの最終フィルターを用いる。

【０１６３】

ｈｍＧＣＢは下記の精製技法によって精製される。例えば疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）を用いてｈｍＧＣＢ調製物を精製することができる。別法として、疎水性干渉クロマトグラフィー（ＨＩＣ）を用いてｈｍＧＣＢを精製することもできる。ＨＣＩＣおよびＨＩＣについては共に下記に記載する。

【０１６４】

ＨＣＩＣまたはＨＩＣはそれだけで用いてもよくまた１つまたはそれ以上のイオン交換ステップと組み合わせて使用してもよい。ＨＣＩＣまたはＨＩＣステップ（ＨＣＩＣまたはＨＩＣステップの前であっても後であって）と組み合わせて用いることのできるイオン交換ステップには陰イオン交換および／または陽イオン交換クロマトグラフィーがある。タンパク質の精製に使用する一般に知られている市販の陰イオン交換担体は第四アンモニウム官能基を有する。本プロセスにおいて用いるのに好ましい基材はアガロースまたはセルロースベースの基材、例えば微結晶性セルロースまたは架橋アガロースである。また特に好ましいものとしてジエチルアミノエチル、トリエチルアミノメチルまたはトリメチルアミノメチル官能基を有する基材があげられる。時に好ましい陰イオン交換基材は、トリメチルアミノメチル架橋アガロースであり、これは例えばＱ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（商標、Ｐｈａｒｍａｃｉａ製）として市販されている。タンパク質の精製に使用することができる、一般に知られている市販の陽イオン交換基材は、カルボン酸やスルホン酸などの酸性官能基を有する。陽イオン機能を有する基材にはさまざまな形のセルロースおよびポリスチレンベースの基材が含まれる。例えば当該分野で知られている弱陽イオン交換体にはこれに限るわけではないが、Ｃａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）およびＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ－Ｃｅｌｌｕｌｏｓｅ（登録商標）がある。強陽イオン交換体として知られているのは、これに限るわけではないが、スルホン化ポリスチレン（ＡＧ５０Ｗ（登録商標）Ｂｉｏ－Ｒｅｘ７０（登録商標））、スルホン化セルロース（Ｓｐ－Ｓｅｐｈａｄｅｘ）（登録商標）およびスルホン化Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（Ｓ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ）（登録商標）がある。特に好ましい陽イオン交換基材はＳ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（商標,Ｐｈａｒｍａｃｉａ製）である。

【０１６５】

これらの基材を用いるクロマトグラフィーステップは、カラムクロマトグラフィーか、別法としてはバッチ吸着技法で行うことがもっとも好ましく、２５℃から４０℃の温度で随意に行うことができる。好ましくは、塩を洗浄用バッファーまたは溶出バッファーに加えてバッファーのイオン力を増加する。このためには従来使用されている塩のいずれを用いてもよく、当業者は容易に決定することができるが、最も頻繁に、また都合良く用いられている塩としてはＮａＣｌがあげられる。

【０１６６】

従来のゲル濾過ステップをＨＣＩＣまたはＨＩＣクロマトグラフィープロセスステップと組み合わせて使用することができる。これらの基材の代表的な例としてはアクリルアミドで架橋したポリデキストランがあげられる。たとえばアリルデキストランとＮ，Ｎ‘－メチレンビスアクリルアミドとを共有結合で架橋することによって調製した複合親水性ゲル、や架橋セルロースまたはアガロースゲルがあげられる。市販されている架橋デキスト

ラン－アクリルアミドとしてはＳｅｐｈａｃｒｙｌ（登録商標）がＰｈａｒｍａｃｉａから発売されている。市販されている架橋デキストラン－アガロース樹脂としてはＳｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）がＰｈａｒｍａｃｉａから市販されている。好ましいＳｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）ゲルはＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００（登録商標）である。架橋セルロースゲルの例としては、市販されている架橋多孔性セルロースゲル、例えばＧＬＣ３００（登録商標）またはＧＬＣ１０００（登録商標）がＡｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．から市販されている。ＴｏｓｏＨａａｓから発売されているＴＳＫ－Ｇｅｌ　ＳＷ（登録商標）などのシリカベースの樹脂もまた使用できる。ＴＳＫ－Ｇｅｌ　ＰＷ（登録商標）、ＴＳＫ　Ａｌｐｈａ　Ｓｅｒｉｅｓ（登録商標）、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ　ＨＷ　ｐａｃｋｉｎｇｓ（エチレングリコールとメチルアクリレートポリマーの共重合体）などのポリマーベースの樹脂もまたＴｏｓｏＨａａｓから発売されている。

【０１６７】

好ましくは、ＨＣＩＣまたはＨＩＣは１つまたはそれ以上のこれらのイオン交換ステップと組み合わせることができる。ＨＣＩＣまたはＨＩＣとさまざまなイオン交換またはゲル濾過ステップの組み合わせが用いられる場合、これらはどのような順序で行うこともできる。例えば下記に記載するように、ＭＥＰ　Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）クロマトグラフィーを用いたＨＣＩＣ、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）クロマトグラフィーを用いたＨＩＣ、それからＱ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）および最後にＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００（登録商標）を含む４ステップの手順を行うことができる。これらの手順のうちのいくつかは下記に詳細に示す。

【０１６８】

ＭＥＰハイパーセルクロマトグラフィー

ＭＥＰ（メルカプトエチルピリジン）Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）（ＢｉｏＳｅｐｒａ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）をＨＣＩＣに使用することができる。これはＮＥＰが結合した多孔性（８０－１００ミクロン）の再生セルロースビーズからなる樹脂である。この官能基（ＭＥＰ）は疎水性の尾とイオン化可能な頭基を持ち、中性のｐＨでは帯電しておらず、生理的イオン強度で疎水的相互作用に基づきある種のタンパク質リガンドと結合することができる。溶出はｐＨを４ないし５に減少させることによって行うが、この時ＭＥＰはプラスに帯電しており、タンパク質は電気的反発力によりカラムから溶出する。例えば、調製した採取物または採取物の濃縮物を直接、１８０ｍＭの塩化ナトリウムと２ｍＭのＤＴＴを含む、ｐＨ６．８の２５ｍＭリン酸ナトリウムで平衡させたＭＥＰカラムへ注ぐ。オプションとして、その後２８０ｎｍ（Ａ２８０）での吸光度が安定化するまでカラムを２５ｍＭカプリル酸ナトリウムを含む平衡バッファーで洗浄することもできる。ｈｍＧＣＢは、カラムから５０ｍＭの酢酸ナトリウム、２ｍＭのＤＴＴ、ｐＨ４．７，で溶出することができ、２８０ｎｍでモニターされるピークを採取する。

【０１６９】

ＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｍｅｔｈｙｌクロマトグラフィー

ＭＥＰ　Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）の別法としてＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）があり、これは疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）樹脂である。この樹脂はメチル官能基が結合した多孔性の共重合グリコールメタクリレートおよびジエチレングリコールジメタクリレートビーズ組成物からなる。例えばＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）（ＢｉｏＲａｄ）クロマトグラフィーは下記のように行うことができる。採取物、または採取して濃縮したもののｐＨを５．６に調節し、最終濃度が０．７０Ｍとなるように硫酸アンモニウムを加える。用意した採取物を０．７０Ｍの硫酸アンモニウム、１０ｍＭのＭＥＳ、ｐＨ５．６で平衡させたＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）カラムに入れる。装填後、カラムをＡ２８０がベースラインにもどるまで平衡させたバッファーで洗浄する。ｈｍＧＣＢは１０ｍＭのＭＥＳ、ｐＨ５．６で溶出することができる。溶出したｈｍＧＣＢは限外濾過に付しおよび／またはＱ　Ｓｐｈａｒｏｓｅクロマトグラフィー、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅクロマトグラフィーおよび／ま

たはＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００クロマトグラフィーなどのイオン交換ステップに付す準備として、ダイアフィルトレーションに付す。

【０１７０】

Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅクロマトグラフィー

Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ）は比較的強い陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂である。官能性置換基は第四アミン基であり、これは２から１２の使用ｐＨ範囲中ではプラスの電荷を有する。この使用ｐＨで正味負の電荷を有するタンパク質は比較的低イオン強度でこの樹脂に結合しやすく、より高いイオン強度またはより低いｐＨにおいて溶出できる。ｈｍＧＣＢはおよそｐＨ６において低イオン強度のＱ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅには結合しないが、不純物は結合するのでサンプルを精製することができる。例えば下記のプロトコルを用いてサンプル中のｈｍＧＣＢをＱ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）クロマトグラフィーにより精製することができる。適当な条件の下でｈｍＧＣＢをこのカラムに流すと、生成物は流出／洗浄画分中に存在する。リン酸ナトリウム（２５０ｍＭ、ｐＨ６）を上記に記載したように調製したＭＥＰ溶出プールに最終濃度が２５ｍＭとなるように加え、このプールのｐＨを、水酸化ナトリウム（および必要であればＨＣｌにより）ｐＨ６に調節する。水で希釈する、または２５ｍＭのリン酸ナトリウム、２ｍＭ　ＤＴＴ、ｐＨ約６を用いた限外濾過またはダイアフィルトレーションによって導電性を２．５±０．１ｍＳ／ｃｍに調節する。この材料はついで濾過し、２５ｍＭのリン酸ナトリウム、２ｍＭのＤＴＴ、ｐＨ６．０中で平衡させたＱ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）のカラムに付す。装填後、カラムを平衡バッファーでＡ２８０がベースラインに達するまで洗浄する。流出／洗浄画分はついでもう１つのカラム、例えばＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）カラムで処理し、その後すぐに、例えば２４時間以内、に凍結し、その後の処理を行うまで約－２０℃から－８０℃の間の温度で保存する。

【０１７１】

例えば、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　Ｈｉｇｈ　Ｑ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）（ＢｉｏＲａｄ）などの他の強陰イオン交換樹脂もまたＱ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅの代わりに使用できる。ＤＥＡＥ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）またはＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　ＤＥＡＥ（登録商標）（ＢｉｏＲａｄ）などの弱陰イオン交換樹脂もまた使用することができる。カラムはバッファー、例えば２５ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６、で平衡させる。サンプルのｐＨをｐＨ６に調節し、希釈またはダイアフィルトレーションにより伝導度を比較的低イオン強度へと調節する。これにより不純物がカラムに結合しｈｍＧＣＢは流出する。サンプルを加え、カラムを平衡バッファーで洗浄する。不純物は依然としてカラムに結合しており、塩、例えば塩化ナトリウムまたは塩化カリウムなどの添加、またはより低いｐＨのバッファーの添加、または塩を加えｐＨを下げる両者を行うことによって溶出できる。

【０１７２】

ｈｍＧＣＢは装填中に装填液中の塩濃度を減少させることによって、またはカラムをより高いｐＨで操作することによって、または塩を減少させてｐＨを引き上げることの組み合わせによって、陰イオン交換カラムに結合することができる。

【０１７３】

ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅクロマトグラフィー

ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ）は比較的強い陽イオン交換クロマトグラフィーである。官能性置換基は電荷を有するスルホン酸基であり、これは２から１２の使用ｐＨ範囲で負に帯電している。使用ｐＨにおいて正味の正の電荷を有するタンパク質は比較的低いイオン強度においてこの樹脂に結合しやすく、より高いイオン強度またはより高いｐＨにおいて溶出することができる。ｈｍＧＣＢは約ｐＨ６で中くらいのイオン強度（例えば６．５ｍＳ／ｃｍ）においてＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅと結合し、より高いイオン強度（例えば１０．７ｍ

Ｓ／ｃｍ）において溶出することができる。不純物タンパク質はｈｍＧＣＢ溶出条件の下でＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅに結合したままであるので、サンプル中のｈｍＧＣＢを精製することができる。例えば下記のプロトコルを用いてｈｍＧＣＢをＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）クロマトグラフィーにより精製することができる。塩化ナトリウム（２．０Ｍ原液）をＳｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）に加え６．３ｍＳ／の伝導度となるまで流出／洗浄を行う。ｐＨをチェックし必要であればｐＨ６．０に再度調節する。その後伝導度が６．５ｍＳ／ｃｍとなるまで塩化ナトリウム原液の添加を続ける。この物質は濾過し、２５ｍＭリン酸ナトリウム、４４ｍＭ塩化ナトリウム、ｐＨ６．０で平衡させたＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）のカラムに加える。装填後、ベースラインに達するまでカラムを平衡バッファーで洗浄し、２５ｍＭリン酸ナトリウム、８４ｍＭ塩化ナトリウム、ｐＨ６．０で溶出する。ｈｍＧＣＢは溶出画分に存在する。

【０１７４】

もう１つの陽イオン交換樹脂、例えばＳｏｕｒｃｅ　３０Ｓ（登録商標）（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）、ＣＭ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（登録商標）（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　ＣＭ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）（ＢｉｏＲａｄ）またはＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　Ｈｉｇｈ　Ｓ　Ｓｕｐｐｐｏｒｔ（登録商標）（ＢｉｏＲａｄ）、もまたＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅの代わりに用いることができる。ｈｍＧＣＢは約ｐＨ６で低から中イオン強度、例えば４から７ｍＳ／ｃｍでカラムに結合することができる。バッファー例えば１０ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ６．０、１０ｍＭ　ＭＥＳ、ｐＨ６．０、２５ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．０またはその他ｐＨ６．０で適切なバッファー能力を有するバッファーをカラムを平衡するために使用できる。サンプルのイオン強度は希釈またはダイアフィルトレーションでカラムへの結合ができるレベルに調節する。サンプルをカラムに流し、装填後カラムを洗浄して未結合物質を除去する。塩、たとえば塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを、ｈｍＧＣＢをカラムから溶出するのに使用することができる。別法として、より高いｐＨのバッファーにより、またはより高い塩濃度とより高いｐＨを有するバッファーによりｈｍＧＣＢをカラムから溶出することができる。

【０１７５】

ｈｍＧＣＢはまた装填中に平衡バッファー中の塩の濃度およびサンプル装填液中の塩の濃度を増加させることによって、カラムをより高いｐＨで操作することによって、あるいは塩の濃度とｐＨとを高めることによって陽イオン交換カラムから流出させることができる。

【０１７６】

Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００クロマトグラフィー

Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００　ｐｒｅｐ　ｇｒａｄｅ（登録商標）（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ）はｈｍＧＣＢのサイズ排除クロマトグラフィーに用いることができる。ここで分子はサイズ、分子量、ストークス半径または流体力学的容積により分離される。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００はアガロースに共有結合的に架橋したデキストランからなり、球形タンパク質の場合、１０，０００から６０，０００の分子量分画範囲を有する。例えば、下記のプロトコルを用いてＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００（登録商標）クロマトグラフィーによりｈｍＧＣＢを精製することができる。ＳＰ溶出液プールを分子量１０，０００カットオフ膜により限外濾過により濃縮する。濃縮したプールを濾過し、ついで５０ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ６．０により平衡させたＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００　ｐｒｅｐ　ｇｒａｄｅ（登録商標）カラムに付す。初期の画分のＡ２８０のカラム溶出液を集め、例えば８から１６％のＳＤＳポリアクリルアミドゲルを流して画分のプーリングを決定する。銀に着色したゲルによる目視によってプーリングを決定してもよい。

【０１７７】

Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－２００　ＨＲ（登録商標）、Ｂｉｏ－Ｇｅｌ　Ａ　１．５ｍ（登録商標）またはＴｏｓｏＨａａｓ　ＴＳＫ　Ｇｅｌ樹脂などの他のサイズ排除クロマ

トグラフィー樹脂をｈｍＧＣＢを精製するのに使用することもできる。ｈｍＧＣＢのサイズ排除クロマトグラフィー樹脂に使用するバッファーとしては５０ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ６．０がある。０．１５Ｍの塩化ナトリウムを含む２５ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．０などの他のバッファーもまた使用することができる。バッファーのｐＨはｐＨ５とｐＨ７の間であり、カラムとのイオン的相互作用を最小にするべく十分なイオン強度を持たなくてはならない。

【０１７８】

所望の精製物を得るために、上記に解説した精製プロトコルにおいてｐＨ、バッファーおよび／または塩の濃度のバリエーションが通常の技法により可能である。

【０１７９】

マクロファージの取り込みとｈｍＧＣＢの細胞標的化を測定するためのアッセイ

マクロファージによるｈｍＧＣＢの取り込み効率は例えばマクロファージ中のタンパク質レベルおよび／または酵素活性を測定することによって求めることができる。例えば下記の実施例およびＤｉｍｅｎｔｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ　Ｂｉｏｌ．　４２：４８５－４９０に記載されているように、マクロファージ細胞株を用いたインビトロ分析を行ってｈｍＧＣＢの絶対摂取率並びにマンノース受容体特異的摂取率を決定することができる。

【０１８０】

さらに、例えばＦｒｉｅｄｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｂｌｏｏｄ　９３：２８０７－２８１６中に記載されているように、肝細胞によるｈｍＧＣＢおよびＧＣＢの摂取率のインビボでの比較を行うことができる。簡単に述べるとマウスモデルにｈｍＧＣＢまたはＧＣＢを注射し、その後速やかに屠殺する。この動物の肝臓を用いて肝細胞、例えば実質細胞、クッパー細胞、内皮細胞、および肝実質細胞、の懸濁液を調製する。この細胞はついで分離し、その形態により分類し、さまざまな肝細胞タイプにおけるタンパク質レベルおよび／またはｈｍＧＣＢおよびＧＣＢの酵素活性を測定する。別法として、免疫組織化学的検出を用いて処置した動物の組織中の特定の細胞または細胞株へｈｍＧＣＢを限局化することもできる。

【０１８１】

医薬組成物

高マンノースグルコセレブロシド（ｈｍＧＣＢ）は例えばヒトなどの患者に投与するのに適した医薬組成物中に含有させることができる。この組成物はゴーシェ病の患者を治療するのに十分な用量のｈｍＧＣＢを含むことができる。ここで言う「医薬上許容される担体」とは、いかなるそしてあらゆる溶媒、賦形剤、分散媒体、コーティング、殺菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸着遅延剤などを始めとする、医薬投与に適合したものを含む。薬剤的に活性な物質のために、このような媒体および剤を用いることは当該分野において公知である。この活性化合物と従来の媒体または剤とが不適合である場合を除き、このような媒体を本発明の組成物中に使用することができる。補助活性化合物もまたこの組成物中に含むことができる。

【０１８２】

本発明の医薬組成物は、その意図されている投与経路に適するように製剤化される。投与経路としては非経口、すなわち静脈内、皮内および皮下投与があげられる。好ましい投与経路は静脈内である。非経口投与用の溶液または懸濁液には下記の成分が含有されている；注射用の水などの滅菌希釈剤、食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの殺菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート化剤；酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩などのバッファーおよび塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの浸透張力調整剤である。ｐＨは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整することができる。非経口製剤はアンプル、使い捨て注射器、またはガラスまたはプラスチック製の多数回用量バイアルに封入されている。

【０１８３】
注射用に適した医薬組成物には滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液、および滅菌注射溶液または分散剤をその場で調剤するための滅菌粉末、例えば、凍結乾燥製剤がある。静脈内投与に適した担体としては、生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ（登録商標）（ニュージャージー州、パーシッパニーにあるＢＡＳＦ製）またはリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）がある。これらすべてにおいて、組成物は滅菌されており、簡単に注射できる程度の流動性がなければならない。さらに製造条件および貯蔵条件のもとで安定であり、細菌やカビなどの微生物の汚染作用から保護されていなければならない。担体は例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）など、および適当なこれらの混合物を含む溶媒または分散媒体であってよい。分散体の場合は必要な粒子径の維持のために、例えばレシチンなどのコーティングを用いることにより、また界面活性剤を用いることにより、適当な流動性が維持されている。微生物の作用は、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどのさまざまな抗菌剤および抗真菌剤の使用により防ぐことができる。多くの場合、この組成物のなかに例えば砂糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール類、および塩化ナトリウムなどの等張化剤を加えることが好ましい。例えば、アルミニウムモノステアレート、ヒト血清アルブミンおよびゼラチンなどの吸着遅延剤を含有させることによって注射用組成物の安定性をさらに持続させることができる。

【０１８４】
滅菌注射液は必要量のｈｍＧＣＢを適当な溶媒中に必要に応じて、上記にリストアップした成分の１つまたはそれ以上の組み合せたものと一緒に加え、除菌濾過して調製することができる。一般に分散物は活性化合物を塩基性の分散媒ならびに上記のリストから選ばれる必要な他の成分を含む滅菌賦形剤に混合して調製する。滅菌注射液調製用の粉末の場合は、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥（たとえばｌｙｏｐｈｉｌｉｚａｔｉｏｎ）、であり、これにより活性成分と先に滅菌濾過したその溶液からのその他の所望の成分との粉末が得られる。

【０１８５】
１つの実施態様において、活性化合物はインプラントおよびマイクロカプセルデリバリシステムを始めとする制御放出製剤などの体からの急速な排泄からこの化合物を守る担体と共に調製されている。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの生体分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤を調製する方法は当業者には明らかであろう。これらの物質はまたＡｌｚａ　ＣｏｒｐｏｒａｔｉｏｎおよびＮｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ　ｉｎｃ．から市販されている。リポゾーム懸濁液（ウイルス抗原へのモノクローナル抗体で感染させた細胞を標的とするリポゾームを含む）もまた医薬上許容される担体として使用することができる。これらは例えば米国特許第４，５２２，８１１号に記載のもののような、当業者に知られている方法に従って調製することができる。

【０１８６】
ゴーシェ病の治療
ｈｍＧＣＢは、例えばここに記載されたｈｍＧＣＢ分子または調製物のいずれでもよいが、ゴーシェ病の患者の治療に使用することができる。別法として、ここに記載したマンノシダーゼノックアウト細胞のいずれもゴーシェ病の患者に導入し、ｈｍＧＣＢをこの患者に供給することができる。様々な投与経路と様々な部位を使用することができる。個体中に移植するとこのノックアウト細胞はｈｍＧＣＢを生産することができる。

【０１８７】
好ましくは、使用されているノックアウト細胞は一般に患者特異的に遺伝子工学によって作られた細胞であろう。しかし、同種または異なる種の他の個体から細胞を得ることもまた可能である。このような細胞の使用には免疫抑制剤の投与、組織適合抗原の変更またはバリアー装置の使用などが移植細胞の拒絶を防ぐために必要かもしれない。

【０１８８】
ゴーシェ病は、リソソーム酵素、グルコセレブロシダーゼ（ＧＣＢ）の欠損により特徴づけられる、常染色体性劣性遺伝リソソーム貯蔵障害である。ＧＣＢはスフィンゴ糖脂質が白血球および赤血球の膜中で分解した後、生成されている糖脂質、グルコセレブロシドを加水分解する。ＧＣＢの加水分解が不十分であると、マクロファージ（ゴーシェ細胞）中にグルコセレブロシドが蓄積し、貧血、血小板減少、器官肥大症、および骨に関わる主要な問題を引き起こす。
【０１８９】
ゴーシェ病には、ゴーシェ病タイプ１、タイプ２、およびタイプ３を始めとするいくつかのタイプがあるが、これはＧＣＢ遺伝子中の様々な突然変異から生じる。「治療的に有効量」のｈｍＧＣＢ、すなわちゴーシェ病を治療するのに十分な用量のｈｍＧＣＢ、をゴーシェ病の患者に与えることができる。「治療する」とはここではゴーシェ病の１つまたはそれ以上の症状を軽減するまたは抑制することを指す。ゴーシェ病タイプＩの症状には骨痛、骨損傷、オステオペニア、骨壊死、無血管性骨壊死、および特発性骨折などの骨の合併症；貧血；肝脾腫大症；脾結節および肝機能不全；血小板減少症；および／または発育遅延および思春期発達遅延があげられる。ゴーシェ病タイプＩＩの症状にはゴーシェ病タイプＩの症状に加えて、項強直、感情鈍麻、カタトニー、斜視、深部反射亢進、および喉頭痙攣があげられる。ゴーシェ病タイプＩＩＩの症状はゴーシェ病タイプＩＩに類似のものであるが、症状はより穏やかで、また発症時期も遅い。
【０１９０】
治療的に有効量のｈｍＧＣＢは個人個人に応じて決定することができるが、病気の重篤度との関連での投与時期、患者のサイズ、使用薬剤の種類、使用デリバリシステムの種類をある程度考慮し、また薬剤投与計画が１回投与なのか、多数回投与なのか、また制御放出投与であるのかにも基づいて決定する。ゴーシェ病を治療するのに十分なｈｍＧＣＢの用量はヒト組織から得た、またはヒト胎児から得たＧＣＢまたはインビトロで細胞によって生産されたＧＣＢの用量より少ないことが好ましく、さらにコアマンノース残基を露出するようにトリミングされていることが好ましい。
【０１９１】
その他のリソソーム蓄積症の治療
一般に、ここに解説する本発明はその表面にマンノース受容体を発現する細胞を標的とするタンパク質を製造するのに使用することができる。したがってここに記載する本発明は治療用タンパク質がマンノース受容体発現細胞を標的とすることが望ましい、いかなる疾患の治療に用いることもできる。例えばここに解説する本発明は、またその他のリソソーム蓄積酵素および、細胞、例えば細網内皮細胞由来の細胞が未消化の物質を蓄積するようなその他のリソソーム蓄積症に用いることもできる。細網内皮細胞にはマクロファージ、肝臓中のクッパー細胞、脾臓中の組織球が含まれる。このようなリソソーム蓄積症としては、これに限定するわけではないが、ファーバー病およびＮｅｉｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病があげられる。
【０１９２】
ファーバー病は酸性セラミダーゼの欠乏により特徴づけられる常染色体性劣性遺伝リソソーム蓄積病である。セラミダーゼはセラミドの分解を担う酵素である。もしセラミド分解が不十分であると、セラミドは蓄積し肉芽腫形成および組織球応答を引き起こす（Ｍｏｓｅｒ、Ｈ．Ｗ．Ｃｅｒａｍｉｄａｓｅ ｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ：Ｆａｂｅｒ ｌｉｐｏｇｒａｎｕｌｏｍａｔｏｓｉｓ；Ｔｈｅ Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｉｎｈｅｒｉｔｅｄ Ｄｉｓｅａｓｅ（Ｃ．Ｒ．Ｓｃｒｉｖｅｒ、Ａ．Ｌ．Ｂｅａｕｄｅｔ、Ｗ．Ｓ．Ｓｌｙ ａｎｄ Ｄ． Ｖａｌｌｅ、Ｅｄｓ．）、７版、ｐｐ．２５８９－２５９９，ＭａｃＧｒｏｗ－Ｈｉｌｌ Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９５））。
【０１９３】
ファーバー病には、ファーバータイプ１、タイプ２、タイプ３、タイプ４、そしてタイ

プ５を始めとする、関わっている主たる組織の部位とその症状の重篤さにおいて異なるいくつかの型がある。高マンノース酸性セラミダーゼはファーバー病の患者に、この病気の少なくとも１つの症状をやわらげ、軽減するために投与することができる。ファーバー病タイプ１の症状としては関節の腫張（特に指節間、中手骨、くるぶし、手根、膝関節および肘関節である）、侵された関節に関して触知可能な結節、および過圧点、失声に発展することもある嗄叫声、摂食および呼吸困難、乏しい体重増加、そして間欠熱があげられる。これらの症状は通常生後２週間から４ヶ月の間に生じる。ファーバータイプ２およびタイプ３の症状にはリウマトイド結節、関節変形、そして喉頭病変があげられる。これらの患者はファーバータイプ１の患者よりも長命である。ファーバー病タイプ５の症状には、１歳から２歳半の頃に始まる精神運動衰退が含まれる。

【０１９４】

Ｎｅｉｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病のタイプＡおよびタイプＢは、酸性スフィンゴミエリナーゼの欠乏により特徴づけられる常染色体性劣性遺伝リソソーマル蓄積障害である。酸性スフィンゴミエリナーゼはスフィンゴミエリンの分解を担う酵素である。もしスフィンゴミエリナーゼが欠乏すると、スフィンゴミエリンおよびその他の脂質が単球－マクロファージ系に蓄積する（Ｓｃｈｕｍａｎ、Ｅ．Ｈ．ａｎｄ　Ｄｅｓｎｉｃｋ、Ｒ．Ｊ．Ｎｅｉｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ　Ｄｉｓｅａｓｅ　Ｔｙｐｅ　Ａ　ａｎｄ　Ｂ：ａｃｉｄ　ｓｐｈｉｎｇｏｍｙｅｌｉｎａｓｅ　ｄｅｆｉｃｉｅｎｃｉｅｓ：Ｔｈｅ　Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂａｓｉｓ　ｏｆ　Ｉｎｈｅｒｉｔｅｄ　Ｄｉｓｅａｓｅ（Ｃ．Ｒ．Ｓｃｒｉｖｅｒ，Ａ．Ｌ．Ｂｅａｕｄｅｔ，Ｗ．Ｓ．Ｓｌｙ　ａｎｄ　Ｄ．　Ｖａｌｌｅ、Ｅｄｓ．）、７版、ｐｐ．２５８９－２５９９、Ｍｃｇｒａｗ－Ｈｉｌｌ　Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９９５））。

【０１９５】

Ｎｅｉｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病にはタイプＡおよびタイプＢを始めとするいくつかの型がある。高マンノース酸性スフィンゴミエリナーゼは、例えばこの病気の治療のため、すなわち少なくとも１つの症状を軽減、緩和するため、Ｎｅｉｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病の患者に投与することができる。Ｎｅｉｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病タイプＡの症状としては脾臓および肝臓の腫脹、リンパ節症、小赤血球性貧血、血小板数減少、低血圧症、筋無力症、精神運動遅滞があげられる。Ｎｅｉｍａｎｎ－ＰｉｃｋタイプＢの症状としては脾臓および／または肝臓の腫脹、肝脾腫大症、ｐｕｌｍｏｎａｒｙ　ｃｏｍｐｒｏｍｉｓｅがあげられる。

【０１９６】

このように高マンノース酸性セラミダーゼまたは高マンノース酸性スフィンゴミエリナーゼなどの高マンノースリソソーム貯蔵障害酵素はこれらのタンパク質がマンノース受容体発現細胞を標的とするためにここに記載の方法により製造することができる。

【０１９７】

実施例

Ｇｅｎｅ－Ａｃｔｉｖａｔｅｄ（登録商標）ＧＧＢ（ＧＡ－ＧＣＢ）を発現するＨＴ－１０８０細胞による実験において、この細胞は０．１から２μｇ／ｍＬの範囲の濃度のキフネンシンまたはスワインソニンで処理した。

【０１９８】

キフネンシンまたはスワインソニンのＧＡ－ＧＣＢ糖形に及ぼす効果

ＧＡ－ＧＣＢを産生するＨＴ－１０８０細胞を、２枚の６－ウェルプレートにおいて、キフネンシンまたはスワインソニンを濃度０（薬剤なし）、０．１、０．２５、０．５、１および２μｇ／ｍＬ、に調節したＰｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ中で培養した。培地を回収し、細胞を再び２４時間毎に３日間培養した。３日目のサンプルを等電点電気泳動（ＩＥＦ）分析に付した。キフネンシンとスワインソニンのＧＡ－ＧＣＢの分子電荷に及ぼす影響をＩＥＦ分析により示す。この薬物はどちらも見かけの等電点（ｐＩ）において濃度依存の増加が観察された、キフネンシンでは、試験した最高濃度（２μｇ／ｍＬ）で、ｐＩにおいてスワインソニンより大きなシフトが見られた。

【０１９９】
キフネンシンまたはスワインソニンのＧＡ－ＧＣＢ生産に及ぼす影響
１０本のローラーボトル（表面積はそれぞれ１７００ｃｍ^2）中のＧｒｏｗｔｈ Ｍｅｄｉｕｍ（１０％子ウシ血清を入れたＤＭＥＭ）にＧＡ－ＧＣＢ産生ＨＴ－１０８０細胞を接種した。２週間増殖した後、培地を吸引し、２００ｍＬの新鮮なＰｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ／Ｆ１２、子ウシ血清０％）を３セットのローラーボトルに加えた。２セット（４本）のローラーボトルを１μｇ／ｍＬのキフネンシンまたはスワインソニンのいずれかで処理した。３番目のグループ（２本）のローラーボトルには薬品の処理を行わなかった。約２４時間の後、各ローラーボトルから培地を回収し、プールし、サンプルをＧＡ－ＧＣＢ酵素活性分析のために取り出した。この手順を７日間繰り返した。７日間の連日の回収を通じてすべてのローラーボトルで安定なＧＡ－ＧＣＢの産生が観察された（表１）。しかし酵素の絶対値は薬品処理グループに応じて変化し、７日間の回収に渡り下記の平均ＧＡ－ＧＣＢ産生レベルが観察された：３８．３±３．５ｍｇ／Ｌ（コントロール、薬品処理なし）、２４．５±４．０ｍｇ／Ｌ（スワインソニン、１μｇ／ｍＬ）、および２１．３±２．８ｍｇ／ｌ（キフネンシン、１μｇ／ｍＬ）。両薬品はしたがって安定な産生ではあるが、産生レベルの低下をもたらし、この低下はキフネンシンで最も大きかった（コントロールに比較し４４％の減少）。

【０２００】
【表１】

表１　マンノシダーゼ阻害剤で処理した細胞中でのローラーボトルにおける
グルコセレブロシダーゼの産生

処理	グルコセレブロシダーゼａ）活性（ｂ）ｍｇ／リットル）							
	収穫物１	収穫物２	収穫物３	収穫物４	収穫物５	収穫物６	収穫物７	平均±標準偏差
薬品未添加	35.8	36.6	44.9	40.5	34.6	38.3	37.2	38.3 ±3.5
スワインソニン (1μg/ml)	28.6	17.4	28.5	27.0	22.9	25.0	22.3	24.5 ±4.0
キフネンシン (1μg/ml)	26.0	22.9	17.7	21.2	18.4	21.0	22.0	21.3 ±2.8

ａ）分析は下記の通り行った：テスト物品を酵素基質（４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド）と混合し３７℃で１時間培養する。
反応をＮａＯＨ／グリシンバッファーを加えて停止させる。
蛍光分光計を使用して蛍光の量を測定する。
ｂ）比活性：２５００ユニット／ｍｇ。１ユニットは１μモルの基質を３７℃１時間で変換する量と定義する。

マクロファージ内へのＧＡ－ＧＣＢの取り込みに及ぼすキフネンシンまたはスワインソニンの影響
ＨＴ－１０８０細胞中で産生されたＧＡ－ＧＣＢをインビトロ分析で用いてマウスマクロファージ細胞系中での取り込み効率を測定した。この実験の特定の目的はマウスのＪ７７４Ｅ細胞中のＧＡ－ＧＣＢの絶対的およびマンノース受容体特異的な摂取量を求めることであった。分析の一日前に５０，０００細胞／ｃｍ^{2}のＪ７７４Ｅ細胞をＧｒｏｗｔｈ Ｍｅｄｉｕｍを入れた１２ウェルプレートに蒔いた。分析用に、５０ｎＭビタミンＤ３（１，２－５、ジヒドロキシビタミンＤ３）を含む０．５ｍＬのＰｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ／Ｆ１２）（仔ウシ血清０％）を細胞に添加した。２μｇ／ｍＬのマンナン（マンノース受容体の競合体）を含む、または含まないテストウェルに非精製ＧＡ－ＧＣＢ（表１の採取物４）を最終濃度が１０μｇ／ｍＬとなるように加えた。３

つの異なる形のＧＡ－ＧＣＢを用いた：キフネンシン（１μｇ／ｍＬ）で処理した細胞由来のＧＡ－ＧＣＢ、スワインソニン（１μｇ／ｍＬで処理した細胞由来のＧＡ－ＧＣＢ、そして未処理細胞由来のＧＡ－ＧＣＢ（１μｇ／ｍＬ）である。対照ウェルにはＧＡ－ＧＣＢを加えなかった。ウェルを３７℃で４時間培養し、緩衝食塩水で十分に洗浄し、掻き取ってＧＡ－ＧＣＢ酵素反応緩衝液に入れ、２回の凍結融解サイクルを経て遠心分離で清澄化した。上清の酵素活性と全タンパクを定量した。ＧＡ－ＧＣＢのマウスＪ７４４Ｅ細胞中へのインターナリゼーションは、細胞溶解物の１ｍｇあたりの単位数で表２に示す。これらの結果からキフネンシン処理細胞由来のＧＡ－ＧＣＢの摂取量はバックグラウンドの１４倍であり、マンナンにより７３％阻害可能であり、スワインソニン処理細胞由来のＧＡ－ＧＣＢの摂取量はバックグラウンドの７倍であり、マンナンにより６７％阻害可能であることがわかった。さらに未処理細胞由来のＧＡ－ＧＣＢの摂取量はバックグラウンドの約３倍であり、マンナンにより５３％阻害可能であることがわかった。このように、キフネンシンまたはスワインソニンのどちらかによる、細胞間マンノシダーゼの阻害はマンノース受容体を経て効率よく細胞中に移送されうるＧＡ－ＧＣＢが生じ、キフネンシンの取り込みはスワインソニンの約２倍であった。ＧＡ－ＧＣＢのマンノース受容体を通じた細胞標的化における向上は、したがってキフネンシンまたはスワインソニンの存在下でＧＡ－ＧＣＢの生産を行うことにより最適化できる。

【０２０１】

【表２】

表２　グルコセレブロシダーゼのＪ７７４Ｅ細胞中へのインターナリゼーション

マンノシダーゼ阻害剤により処理された細胞から生成したグルコセレブロシダーゼ

[b]サンプル	[a]グルコセレブロシダーゼ活性（単位/細胞溶解物mg）		阻害率（%）
	絶対量	バックグラウンド修正	
バックグラウンド（GA-GCB 未添加）	655	0	-
未処理細胞からのGA-GCB	2816	2161	-
＋マンナン	1678	1023	53
キフネンシン処理細胞からのGA-GCB	9185	8530	-
＋マンナン	2977	2322	73
スワインソニン処理細胞からのGA-GCB	4787	4132	-
＋マンナン	2036	1381	67

ａ）分析は下記の通り行った：サンプルを酵素基質（４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド）と混合し３７℃で１時間培養する。
反応をＮａＯＨ／グリシンバッファーを加えて停止させる。蛍光分光計を使用して蛍光の量を測定する。凍結融解細胞溶解物中でビシンコニン酸（ＢＣＡ）により全タンパク質量を定量した。活性は単位／全タンパク質ｍｇで報告した。
１単位とは１μモルの基質を３７℃１時間で変換する量である。

ｂ）薬品処理した細胞には、マンナン（２μｇ／ｍＬ）の存在下または不在下でキフネンシンあるいはスワインソニンを１μｇ／ｍＬ加えた。

ｈｍＧＣＢの生成および特性付け

ｈｍＧＣＢは２μｇ／ｍｌの濃度でのキフネンシンの存在下で培養したヒトの線維芽細

胞の培地から精製した。ｈｍＧＣＢ上に存在する４つのＮ－結合グリカンをペプチドＮ－グリコシダーゼＦにより解放し、Ｓｅｐ－ｐａｋ　Ｃ１８カートリッジを用いて精製した。５％酢酸画分中に溶出するオリゴ糖を水酸化ナトリウムとヨードメチルを用いてパーメチル化し、メタノール：水（８０：２０）中に溶解し、パーメチル化グリカン混合物の一部をマトリックス補助レーザー脱着イオン化飛行時間形質量分析法（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ）により分析した。サンプルを２，５－ジヒドロキシ安息香酸をマトリックスとして用いたＤｅｌａｙｅｄ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎと結合したＶｏｙａｇｅｒ　ＳＴＲ　Ｂｉｏｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｓｔａｔｉｏｎレーザー脱着質量分析計で分析した。擬似分子イオンのパターンがｍ／ｚ１５００－２５００の範囲に見られ、$Man_5GlcNAc_2$から$Man_9GlcNAc_2$に渡る高マンノースグリカンが存在することが示された。

【０２０２】

【表３】

表３　キフネンシン処理細胞由来のｈｍＧＣＢから得たＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析より得られたデータのまとめ

M/Z	ピークの割当	全グリカン中のおよその%
1580	$Man_5GlcNAc_2$	1.3
1730 1752 1784	$Man_6GlcNAc_2$	11.2
1934 1957 1988	$Man_7GlcNAc_2$	23.3
2139 2161 2192	$Man_8GlcNAc_2$	32.0
2343 2365 2397	$Man_9GlcNAc_2$	31.2
2969	ビアンテナ性複合体	1.0

最も大量に存在する高マンノースグリカンは$Man_9GlcNAc_2$と$Man_8GlcNAc_2$であり、$Man_7GlcNAc_2$、$Man_6GlcNAc_2$およびMan_5GlcAc_2となるにつれ存在量が減ってくる。２つのシアル酸残基を有するフコシル化ビアンテナ性複合体グリカンがわずかに観察された。それぞれのピーク高さを測定することによって、グリカンの比較存在量の近似値を得た。表３を参照されたい。高マンノースグリカンの平均鎖長のより正確な評価は無傷の糖タンパク質をＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳで分析することにより得られた。グリカン鎖が均一であるため、鋭いピークがｍ／ｚが６２，４８３．１のところに得られた。アミノ酸配列から計算されている成熟ペプチドの質量は５５，５７７．６であり、先の４つのＮ－結合グリカン鎖がこのｈｍＧＣＢ全質量に６９０５．５だけ貢献していることが示されている。この数値から平均グリカン長は８．１５マンノース残基であることが計算できる。

【０２０３】

ここに引用するすべての特許ならびに参照文献はその全体をここに援用する。

【０２０４】

その他の実施態様は、特許請求の範囲内のものである。

【０２０５】

以下、本発明のさらに別の実施態様を項分け記載する。

【０２０６】

（実施態様１）　グルコセレブロシダーゼ（ＧＣＢ）を発現することのできる細胞を提供し、
ＧＣＢの前駆体オリゴ糖の５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去を防止する条件の下で前駆体オリゴ糖を有するＧＣＢの生産を行い、ｈｍＧＣＢ調製物を製造することを含む、高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法。

【０２０７】
（実施態様２）　前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする実施態様１記載の方法。

【０２０８】
（実施態様３）　前記５糖コアに遠位の１つのα１，３マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする実施態様１記載の方法。

【０２０９】
（実施態様４）　前記５糖コアに遠位の１つのα１，６マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする実施態様１記載の方法。

【０２１０】
（実施態様５）　前記方法がＧＣＢの前記前駆体の５糖コアに遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去を防止する物質と前記細胞とを接触させることを含むことを特徴とする実施態様１記載の方法。

【０２１１】
（実施態様６）　前記物質がマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様５記載の方法。

【０２１２】
（実施態様７）　前記マンノシダーゼ阻害剤がクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様６記載の方法。

【０２１３】
（実施態様８）　前記マンノシダーゼ阻害剤がクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様６記載の方法。

【０２１４】
（実施態様９）　前記クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、キフネンシン、デオキシマンノジリマイシンおよびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様７記載の方法。

【０２１５】
（実施態様１０）　前記クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤がキフネンシンであることを特徴とする実施態様７記載の方法。

【０２１６】
（実施態様１１）　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシＤＩＭ、６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ、およびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様８記載の方法。

【０２１７】
（実施態様１２）　前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤がスワインソニンであることを特徴とする実施態様８記載の方法。

【０２１８】
（実施態様１３）　前記マンノシダーゼ阻害剤が約０．０５から２０．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする実施態様６記載の方法。

【０２１９】
（実施態様１４）　前記マンノシダーゼ阻害剤が約０．１から２．０μｇ／ｍｌの濃度で存在することを特徴とする実施態様１３記載の方法。

【０２２０】
（実施態様１５）　前記細胞を、クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤と接触

させることをさらに含むことを特徴とする実施態様７記載の方法。
【０２２１】
（実施態様１６） 前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニン、マンノスタチンおよびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様１５記載の方法。
【０２２２】
（実施態様１７） 前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニンであることを特徴とする実施態様１５記載の方法。
【０２２３】
（実施態様１８） 前記細胞が少なくとも１つのマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様１記載の方法。
【０２２４】
（実施態様１９） 前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様１８記載の方法。
【０２２５】
（実施態様２０） 前記細胞がクラス２プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様１８記載の方法。
【０２２６】
（実施態様２１） 前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼおよびクラス２プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様１８記載の方法。
【０２２７】
（実施態様２２） 前記細胞がアンチセンスマンノシダーゼ分子を含むことを特徴とする実施態様１記載の方法。
【０２２８】
（実施態様２３） 前記アンチセンス分子が、クラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子、クラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子、クラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子およびクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子の両方、とからなる群から選択されることを特徴とする実施態様２２記載の方法。
【０２２９】
（実施態様２４） 前記ｈｍＧＣＢが少なくとも４個のマンノース残基を有する糖鎖を１本含むことを特徴とする実施態様１記載の方法。
【０２３０】
（実施態様２５） 前記ｈｍＧＣＢが５個のマンノース残基を有する糖鎖を少なくとも１本含むことを特徴とする実施態様２４記載の方法。
【０２３１】
（実施態様２６） 前記ｈｍＧＣＢが８個のマンノース残基を有する糖鎖を少なくとも１本含むことを特徴とする実施態様２４記載の方法。
【０２３２】
（実施態様２７） 前記ｈｍＧＣＢが９個のマンノース残基を有する糖鎖を少なくとも１本含むことを特徴とする実施態様２４記載の方法。
【０２３３】
（実施態様２８） 生成された前記ｈｍＧＣＢにおいてマンノース残基のＧｌｃＮＡｃ残基に対する比がＧｌｃＮＡｃ残基２に対しマンノース残基が３以上であることを特徴とする実施態様１記載の方法。
【０２３４】
（実施態様２９） 前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去がｈｍＧＣＢの少なくとも２本の糖鎖上で防止されていることを特徴とする実施態様１記載の方法。

【０２３５】
（実施態様３０） 前記調製物のｈｍＧＣＢの少なくとも６０％が、前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている１本以上の糖鎖を有することを特徴とする実施態様１記載の方法。
【０２３６】
（実施態様３１） 前記細胞が、ＧＣＢコード化領域を含む外来性核酸配列を含むことを特徴とする実施態様１記載の方法。
【０２３７】
（実施態様３２） 前記細胞が、ＧＣＢコード化領域の発現を調節するように作用する外来性調節配列をさらに含むことを特徴とする実施態様３１記載の方法。
【０２３８】
（実施態様３３） 前記細胞が、内在性ＧＣＢコード化配列の発現を調節するように作用する外来性調節配列を含むことを特徴とする実施態様１記載の方法。
【０２３９】
（実施態様３４） 前記細胞が初代細胞であることを特徴とする実施態様１記載の方法。
【０２４０】
（実施態様３５） 前記細胞が２次細胞であることを特徴とする実施態様１記載の方法。
【０２４１】
（実施態様３６） 前記細胞がほ乳類の細胞であることを特徴とする実施態様１記載の方法。
【０２４２】
（実施態様３７） 前記細胞がヒトの細胞であることを特徴とする実施態様３６記載の方法。
【０２４３】
（実施態様３８） 前記細胞が線維芽細胞または筋原細胞であることを特徴とする実施態様３７記載の方法。
【０２４４】
（実施態様３９） 前記細胞が不死化細胞であることを特徴とする実施態様３７記載の方法。
【０２４５】
（実施態様４０） 前記細胞がＨＴ－１０８０細胞であることを特徴とする実施態様３９記載の方法。
【０２４６】
（実施態様４１） ＧＣＢ発現可能な細胞集団が提供され、これら細胞の少なくとも１０％が特定数のマンノース残基を有する４本の糖鎖を有するＧＣＢを生産することを特徴とする実施態様１記載の方法。
【０２４７】
（実施態様４２） 前記細胞が少なくとも１つのマンノシダーゼ阻害剤を含む培地中で培養されていることを特徴とする実施態様５記載の方法。
【０２４８】
（実施態様４３） 前記マンノシダーゼ阻害剤がクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様４２記載の方法。
【０２４９】
（実施態様４４） 前記クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤がキフネンシン、デオキシマンノジリマイシンおよびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様４３記載の方法。
【０２５０】
（実施態様４５） 前記マンノシダーゼ阻害剤がクラス２プロセシングマンノシダー

ゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様４２記載の方法。
【０２５１】
（実施態様４６） 前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシ－ＤＩＭ、６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ、およびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様４５記載の方法。
【０２５２】
（実施態様４７） 前記培地がさらにクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤を含むことを特徴とする実施態様４３記載の方法。
【０２５３】
（実施態様４８） 前記ｈｍＧＣＢが前記細胞が培養されている培地から得られることを特徴とする実施態様４２記載の方法。
【０２５４】
（実施態様４９） 高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法であって、
グルコセレブロシダーゼ（ＧＣＢ）を発現することのできる細胞を提供することと、
ＧＣＢの前記前駆体オリゴ糖の５糖コアから遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去が防がれるように、クラス１プロセシングマンノシダーゼ活性とクラス２プロセシングマンノシダーゼ活性を阻害する条件の下で前駆体オリゴ糖を有するＧＣＢの生産を行い、それによってｈｍＧＣＢ調製物を製造することと、
を含む高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法。
【０２５５】
（実施態様５０） 前記細胞を、クラス１プロセシングマンノシダーゼを阻害する物質およびクラス２プロセシングマンノシダーゼを阻害する物質と接触させることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２５６】
（実施態様５１） 前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のα１，２マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２５７】
（実施態様５２） 前記５糖コアに遠位の１つのα１，３マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２５８】
（実施態様５３） 前記５糖コアに遠位の１つのα１，６マンノース残基を除去することが防止されていることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２５９】
（実施態様５４） 前記物質がクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２６０】
（実施態様５５） 前記物質がクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤であることを特徴とする実施態様４９記載の方法
（実施態様５６） 前記クラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、キフネンシン、デオキシマンノジリマイシンおよびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様５４記載の方法。
【０２６１】
（実施態様５７） 前記クラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤が、スワインソニン、マンノスタチン、６－デオキシＤＩＭ、６－デオキシ－６－フルオロ－ＤＩＭ、およびその組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする実施態様５５記載の方法。
【０２６２】
（実施態様５８） 前記マンノシダーゼ阻害剤が約０．０５から２０．０μｇ／ｍｌ

の濃度で存在することを特徴とする実施態様５６または５７記載の方法。
【０２６３】
（実施態様５９） 前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２６４】
（実施態様６０） 前記細胞がクラス２プロセシングマンノシダーゼのノックアウトであることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２６５】
（実施態様６１） 前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼおよびクラス２プロセシングマンノシダーゼ両方のノックアウトであることを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２６６】
（実施態様６２） 前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子を含むことを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２６７】
（実施態様６３） 前記細胞がクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子を含むことを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２６８】
（実施態様６４） 前記細胞がクラス１プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子とクラス２プロセシングマンノシダーゼアンチセンス分子とを含むことを特徴とする実施態様６３記載の方法。
【０２６９】
（実施態様６５） 前記細胞がＧＣＢコード化領域を含む外来性核酸配列を含むことを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２７０】
（実施態様６６） 前記細胞がＧＣＢコード化領域の発現を調節するように作用する外来性調節配列をさらに含むことを特徴とする実施態様６５記載の方法。
【０２７１】
（実施態様６７） 前記細胞が内在性ＧＣＢコード化配列の発現を調節するように作用する外来性調節配列を含むことを特徴とする実施態様４９記載の方法。
【０２７２】
（実施態様６８） 前記細胞が少なくとも１つのクラス１プロセシングマンノシダーゼ阻害剤および少なくとも１つのクラス２プロセシングマンノシダーゼ阻害剤を含む培地中で培養されていることを特徴とする実施態様５０記載の方法。
【０２７３】
（実施態様６９） 前記細胞が培養されている培地から前記ｈｍＧＣＢを得ることをさらに含むことを特徴とする実施態様６８記載の方法。
【０２７４】
（実施態様７０） 高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法であって、
外来性調節配列を含む核酸配列を、この調節配列が内在性ＧＣＢコード化領域の発現を調節するように導入した細胞を提供することと、
ＧＣＢの前記前駆体オリゴ糖の５糖コアから遠位の少なくとも１つのマンノース残基の除去を防止する条件下で前駆体オリゴ糖を有するＧＣＢの生産を行い、それによってｈｍＧＣＢ調製物を製造することと、
を含む高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）を生成する方法。
【０２７５】
（実施態様７１） 前駆体オリゴ糖鎖の少なくとも４個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を含む高マンノースグルコセレブロシダーゼ（ｈｍＧＣＢ）調製物。
【０２７６】

（実施態様７２）　前記ｈｍＧＣＢが５個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ調製物。

【０２７７】

（実施態様７３）　前記ｈｍＧＣＢが８個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ調製物。

【０２７８】

（実施態様７４）　ｈｍＧＣＢが９個のマンノース残基を有する少なくとも１本の糖鎖を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ調製物。

【０２７９】

（実施態様７５）　生成された前記ｈｍＧＣＢが、マンノース残基のＧｌｃＮＡｃ残基に対する比がＧｌｃＮＡｃ残基２に対しマンノース残基が３以上である、少なくとも１本の糖鎖を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ調製物。

【０２８０】

（実施態様７６）　ｈｍＧＣＢの少なくとも２本の糖鎖が前駆体オリゴ糖鎖の少なくとも４個のマンノース残基を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ調製物。

【０２８１】

（実施態様７７）　前記調製物のｈｍＧＣＢの少なくとも８５％が前記５糖コアに遠位の１つまたはそれ以上のマンノース残基の除去が防止されている４本の糖鎖を有することを特徴とする実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ調製物。

【０２８２】

（実施態様７８）　実施態様７１記載のｈｍＧＣＢ調製物をゴーシェ病の治療に適した量含む、医薬組成物。

【０２８３】

（実施態様７９）　医薬上許容される担体または希釈剤をさらに含むことを特徴とする実施態様７８記載の組成物。

【０２８４】

（実施態様８０）　実施態様７８記載の組成物を前記患者に投与し、それによってゴーシェ病を治療することを含む、ゴーシェ病の患者を治療する方法。

【０２８５】

（実施態様８１）　サンプルからｈｍＧＣＢを精製する方法であって、

採取したｈｍＧＣＢ生成物を提供することと、

ｈｍＧＣＢ生成物を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）または疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に付し、それによって精製したｈｍＧＣＢを得ること、

とを含む、サンプルからｈｍＧＣＢを精製する方法。

【０２８６】

（実施態様８２）　ＭＥＰ　Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）がＨＣＩＣに用いられることを特徴とする実施態様８１記載の方法。

【０２８７】

（実施態様８３）　ＭａｃｒｏＰｒｅｐ　Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）がＨＩＣに用いられることを特徴とする実施態様８１記載の方法。

【０２８８】

（実施態様８４）　前記ｈｍＧＣＢ生成物をイオン交換クロマトグラフィーに付すことをさらに含むことを特徴とする実施態様８１記載の方法。

【０２８９】

（実施態様８５）　イオン交換クロマトグラフィーに先立ち、前記ｈｍＧＣＢ生成物がＨＣＩＣまたはＨＩＣに付されることを特徴とする実施態様８４記載の方法。

【０２９０】

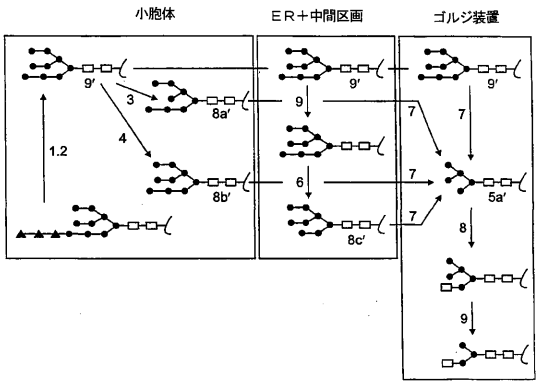
（実施態様８６）　ＨＣＩＣまたはＨＩＣに先立ちｈｍＧＣＢ生成物がイオン交換ク

ロマトグラフィーに付されることを特徴とする実施態様８４記載の方法。
【０２９１】
（実施態様８７） 前記ｈｍＧＣＢ生成物が１つまたはそれ以上のイオン交換クロマトグラフィーステップに付されることを特徴とする実施態様８４記載の方法。
【０２９２】
（実施態様８８） 前記イオン交換クロマトグラフィーが陰イオン交換クロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーからなる群から選択されることを特徴とする実施態様８４記載の方法。
【０２９３】
（実施態様８９） 陰イオン交換クロマトグラフィーがＱ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｑ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）、ＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＤＥＡＥ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様８８記載の方法。
【０２９４】
（実施態様９０） 陽イオン交換クロマトグラフィーがＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｓｏｕｒｃｅ ３０Ｓ（登録商標）、ＣＭ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＣＭ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｓ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様８８記載の方法。
【０２９５】
（実施態様９１） 前記ｈｍＧＣＢ生成物をサイズ排除クロマトグラフィーに付すことをさらに含むことを特徴とする実施態様８４記載の方法。
【０２９６】
（実施態様９２） 前記サイズ排除クロマトグラフィーがＳｕｐｅｒｄｅｘ ２００（登録商標）、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－２００ ＨＲ（登録商標）およびＢｉｏ－Ｇｅｌ Ａ １．５ｍ（登録商標）の１つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９１記載の方法。
【０２９７】
（実施態様９３） ｈｍＧＣＢの精製方法であって、
採取したｈｍＧＣＢ生成物を提供することと、
該ｈｍＧＣＢ生成物を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）または疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に付すことと、
該ｈｍＧＣＢ生成物を陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーの１つまたはそれ以上に付し、それによって精製されたｈｍＧＣＢを得ることと、
を含むｈｍＧＣＢの精製方法。
【０２９８】
（実施態様９４） ＭＥＰ Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）をＨＣＩＣに用いることを特徴とする実施態様９３記載の方法。
【０２９９】
（実施態様９５） ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）をＨＩＣに用いることを特徴とする実施態様９３記載の方法。
【０３００】
（実施態様９６） 陰イオン交換クロマトグラフィーがＱ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｑ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）、ＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＤＥＡＥ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９３記載の方法。

【０３０１】
（実施態様９７） 陽イオン交換クロマトグラフィーが、ＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｓｏｕｒｃｅ ３０Ｓ（登録商標）、ＣＭ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＣＭ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｓ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９３記載の方法。
【０３０２】
（実施態様９８） 前記サイズ排除クロマトグラフィーが、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００（登録商標）、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－２００ ＨＲ（登録商標）およびＢｉｏ－Ｇｅｌ Ａ １．５ｍ（登録商標）の１つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９３記載の方法。
【０３０３】
（実施態様９９） ｈｍＧＣＢの精製方法であって、
採取したｈｍＧＣＢ生成物を提供することと、
該ｈｍＧＣＢ生成物を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）または疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に付すことと、
該ＨＣＩＣまたはＨＩＣ精製ｈｍＧＣＢ生成物を陰イオン交換クロマトグラフィーに付すことと、
該陰イオン交換クロマトグラフィー精製ｈｍＧＣＢ生成物を陽イオン交換クロマトグラフィーに付すことと、
該陽イオン交換クロマトグラフィー精製ｈｍＧＣＢ生成物をサイズ排除クロマトグラフィーに付し、それによって精製されたｈｍＧＣＢを得ることと、
を含むｈｍＧＣＢの精製方法。
【０３０４】
（実施態様１００） ＭＥＰ Ｈｙｐｅｒｃｅｌ（登録商標）をＨＣＩＣに用いることを特徴とする実施態様９９記載の方法。
【０３０５】
（実施態様１０１） ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｍｅｔｈｙｌ（登録商標）をＨＩＣに用いることを特徴とする実施態様９９記載の方法。
【０３０６】
（実施態様１０２） 陰イオン交換クロマトグラフィーが、Ｑ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、ＭａｃｒｏＰｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｑ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）、ＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＤＥＡＥ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９９記載の方法。
【０３０７】
（実施態様１０３） 陽イオン交換クロマトグラフィーが、ＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｓｏｕｒｃｅ ３０Ｓ（登録商標）、ＣＭ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（登録商標）、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＣＭ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）およびＭａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ Ｈｉｇｈ Ｓ Ｓｕｐｐｏｒｔ（登録商標）のうちの１つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９９記載の方法。
【０３０８】
（実施態様１０４） 前記サイズ排除クロマトグラフィーが、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００（登録商標）、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－２００ ＨＲ（登録商標）およびＢｉｏ－Ｇｅｌ Ａ １．５ｍ（登録商標）の１つまたはそれ以上を用いて行われることを特徴とする実施態様９９記載の方法。
【図面の簡単な説明】
【図１】 Ｎ－結合グリカンが小胞体、中間区画ならびにゴルジ装置中でトリミングを起

こす時のトリミングを示す図である。酵素には下記の通り番号をつけた。（１）α－グルコシダーゼＩ、（２）α－グルコシダーゼＩＩ、（３）ＥＲマンノシダーゼＩ、（４）ＥＲマンノシダーゼＩＩ、（５）ＥＲグルコシルトランスフェラーゼ、（６）エンドマンノシダーゼ、（７）ゴルジマンノシダーゼＩＡ，ＩＢおよびＩＣ、（８）ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ、（９）ゴルジマンノシダーゼＩＩ。▲はグルコース、□はＧｌｃＮＡｃ、●はマンノースである。酵素（３）および（７）はキフネンシン阻害され、酵素（９）はスワインソニンで阻害される。

【図１】



フロントページの続き

(72)発明者 プラッシュサント，ミシュラ
アメリカ合衆国 テキサス州 ７５２０４ ダラス コール アヴェニュー ４１１６ アパートメント ３０２
(72)発明者 ボロースキー，マリアン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１５２ ウィンスロップ バートレット パークウェイ ４７
(72)発明者 フランシスーダニエル，ピーター
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０１７６０ ネイティック ノース アヴェニュー １００

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 特表平０３－５０３７２１（ＪＰ，Ａ）
DNA，１９８８年，vol.7 no.2，pp.99-106
BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS，１９８６年，vol.141 no.2，pp.452-458
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY，１９９０年，vol.265 no.26，pp.15599-15605
Biochimica et Biophysica Acta，１９８１年，vol.673，pp.425-434
Proc. Natl. Acad. Sci. USA，１９９０年，vol.87，pp.1913-1916

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
IPC
C12N 15/00-15/90
DB名
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
WPI