

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5241101号  
(P5241101)

(45) 発行日 平成25年7月17日(2013.7.17)

(24) 登録日 平成25年4月12日(2013.4.12)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 Q 1/25	(2006.01)	C 12 Q 1/25	
C 12 Q 1/68	(2006.01)	C 12 Q 1/68	A
A 61 K 31/7088	(2006.01)	A 61 K 31/7088	
A 61 K 38/00	(2006.01)	A 61 K 37/02	

請求項の数 28 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-503413 (P2006-503413)
(86) (22) 出願日	平成16年2月10日 (2004.2.10)
(65) 公表番号	特表2006-517412 (P2006-517412A)
(43) 公表日	平成18年7月27日 (2006.7.27)
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/003632
(87) 國際公開番号	W02004/072275
(87) 國際公開日	平成16年8月26日 (2004.8.26)
審査請求日	平成18年11月30日 (2006.11.30)
(31) 優先権主張番号	60/447,747
(32) 優先日	平成15年2月11日 (2003.2.11)
(33) 優先権主張国	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	504396117 シャイアー 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 レ キシントン シャイアー ウェイ 300
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(72) 発明者	フォン フィギュラ カート ドイツ連邦共和国 ゲッtingen ハイン ホルツウェグ 30
(72) 発明者	シュミット ベルンハルト ドイツ連邦共和国 ゲッtingen デュス テーレ アイヒェンウェグ 38

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多重スルファターゼ欠損症およびその他のスルファターゼ欠損症の診断および治療

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象におけるホルミルグリシン生成酵素(FGE)発現のレベルを決定するための方法であつて、対象から得られた試料中で、配列番号：2のアミノ酸34～374、配列番号：2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、および78からなる群から選択される配列を有するペプチドまたはポリペプチドのFGE-C-ホルミルグリシン生成活性をイン・ビトロで測定することを含む方法。

## 【請求項 2】

C-ホルミルグリシン生成活性の調節に有用な作用因子を同定するための方法であつて 10

、  
(a) 配列番号：1記載のヌクレオチド配列を有する核酸分子もしくはC-ホルミルグリシン生成活性を有するその発現産物、または該核酸を発現する細胞を、作用因子候補と接触させる段階、

(b) 前記核酸分子によりコードされる発現産物の、または前記核酸を発現する細胞におけるC-ホルミルグリシン生成活性を測定する段階、および

(c) 測定されたC-ホルミルグリシン生成活性を対照と比較して、作用因子候補がC-ホルミルグリシン生成活性を調節するか否かを判定する段階

を含む、方法。

## 【請求項 3】

20

対象におけるスルファターゼ欠損症を診断するための薬剤の調製のための、(i) 配列番号：1記載のヌクレオチド配列を有する核酸分子、または(ii)(i)の核酸分子の発現産物、を含む分子に選択的に結合する作用因子の使用であって、該作用因子が核酸もしくは抗体またはそれらのフラグメントである、使用。

**【請求項4】**

前記スルファターゼ欠損症が多重スルファターゼ欠損症である、請求項3記載の使用。

**【請求項5】**

作用因子および対照を含むパッケージを含む、対象におけるスルファターゼ欠損症を診断するためのキットであって、

該作用因子は、C - ホルミルグリシン生成活性を有するペプチドもしくはポリペプチドに特異的に結合する抗体もしくはそのフラグメント、またはストリンジエントな条件下でC - ホルミルグリシン生成活性を有するペプチドもしくはポリペプチドをコードする核酸分子に選択的に結合するオリゴヌクレオチドであり、10

ここで、前記C - ホルミルグリシン生成活性を有するペプチドもしくはポリペプチドは、配列番号：2のアミノ酸34～374、配列番号：2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、および78からなる群から選択される配列を有し、

前記ストリンジエントな条件は、65 の6×SSCまたは65 の3.5×SSC、0.02% Ficoll、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン、2.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [ pH7 ]、0.5% SDS、および2mM EDTAでハイブリダイゼーションを行い、2×SSCにて室温で洗浄し、20 次に0.1×SSC/0.1×SDSにて最高68までの温度で洗浄することを含み、

前記対照は、前記ペプチド、ポリペプチドまたは核酸に対する前記作用因子の結合の測定値を比較するためものである、

キット。

**【請求項6】**

対照が測定値と比較するための既定値である、請求項5記載のキット。

**【請求項7】**

前記対照が、

(a) 配列番号：1記載のヌクレオチド配列からなる分子とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつC - ホルミルグリシン生成活性を有するポリペプチド(FGE)をコードする核酸分子、30

(b) 遺伝コードの縮重によりコドン配列が(a)の核酸分子と異なる核酸分子、および

(c) (a)または(b)の相補体

からなる群から選択される核酸の発現産物のエピトープを含む、請求項5記載のキット。

**【請求項8】**

対象におけるスルファターゼ欠損症を治療するための薬剤の調製のための

C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子の使用であって、該作用因子が、

i) (a) 配列番号：1記載のヌクレオチド配列からなる核酸分子とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であって、該ストリンジエントな条件は、65 の6×SSCまたは65 の3.5×SSC、0.02% Ficoll、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン、2.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [ pH7 ]、0.5% SDS、および2mM EDTAでハイブリダイゼーションを行い、2×SSCにて室温で洗浄し、次に0.1×SSC/0.1×SDSにて最高68までの温度で洗浄することを含む、核酸分子、40

(b) C - ホルミルグリシン生成活性を有するポリペプチド(FGE)をコードする(a)の核酸分子の相補体、

(c) 遺伝コードの縮重によりコドン配列が(a)または(b)の核酸分子と異なる核酸分子、および

(d) 配列番号：1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80～87からなる群から選択される配列を有する核酸分子50

からなる群から選択される核酸分子、または  
 i i ) i ) ( a )、( b )、( c )、または( d )の核酸分子によりコードされるペプチドまたはポリペプチド、  
 もしくは配列番号：2のアミノ酸34～374、配列番号：2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群から選択される配列を有するペプチド  
 である、使用。

## 【請求項9】

イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5またはHSulf-6をコードする核酸分子、該核酸分子の発現産物、およびスルファターゼ活性を有する該核酸分子の発現産物の断片、からなる群より選択される付加的な作用因子をさらに含む、請求項8記載の使用。 10

## 【請求項10】

前記付加的な作用因子が、i ) ( a )、( b )、( c )、または( d )の核酸分子を発現する細胞により生産される、請求項9記載の使用。

## 【請求項11】

前記i ) ( a )、( b )、( c )、または( d )の核酸分子が外因性FGE核酸分子を発現する、請求項8記載の使用。 20

## 【請求項12】

前記i ) ( a )、( b )、( c )、または( d )の核酸分子が内因性FGE核酸分子を発現する、請求項8記載の使用。

## 【請求項13】

スルファターゼ欠損症の治療に有用な作用因子候補を同定するための方法であって、細胞または組織における核酸分子のセットの発現を、作用因子候補の非存在下において、核酸分子のセットの第1の量の発現が許容される条件下で、インビトロで判定する段階であって、核酸分子のセットが、 30

( a ) 配列番号：1記載のヌクレオチド配列からなる核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であって、該ストリンジェントな条件は、65 の $6 \times S$ SCまたは65 の $3.5 \times SSC$ 、0.02% Ficoll、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン、2.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [ pH7 ]、0.5% SDS、および2mM EDTAでハイブリダイゼーションを行い、2×SSCにて室温で洗浄し、次に $0.1 \times SSC/0.1 \times SDS$ にて最高68までの温度で洗浄することを含む、核酸分子、

( b ) C -ホルミルグリシン生成活性を有するポリペプチド(FGE)をコードする( a )の核酸分子の相補体、

( c ) 遺伝コードの縮重によりコドン配列が( a )または( b )の核酸分子と異なる核酸分子、 40

( d ) 配列番号：1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80～87からなる群から選択される配列を有する核酸分子

からなる群から選択される核酸分子、および

( e ) ( a )、( b )、( c )、または( d )の相補物、

からなる群から選択される少なくとも1つの核酸分子を含む段階；

細胞または組織を作用因子候補とインビトロで接触させる段階；ならびに

核酸分子のセットの発現の試験量(test amount)を検出する段階を含み、

ここで、作用因子候補の存在下での発現の試験量が発現の第1の量に比して大きいことにより、作用因子候補がスルファターゼ欠損症の治療に有用であることが示される、方法。

**【請求項 14】**

核酸分子またはその発現産物のセットを含む固相核酸分子アレイであって、該核酸分子のセットが少なくとも2つの核酸分子を含み、ここで少なくとも1つの核酸分子が、配列番号：2のアミノ酸34～374、配列番号：2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群から選択されるポリペプチドをコードし、少なくとも1つの核酸分子が、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群から選択されるポリペプチドをコードする、固相核酸分子アレイ。10

**【請求項 15】**

細胞におけるスルファターゼ活性を高めるための薬剤の調製のための、

(a) 配列番号：1記載のヌクレオチド配列からなる核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であって、該ストリンジェントな条件は、65 の $6 \times S$  SCまたは65 の $3.5 \times SSC$ 、0.02% Ficoll、0.02% ポリビニルピロリドン、0.02% ウシ血清アルブミン、2.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH7]、0.5% SDS、および2mM EDTAでハイブリダイゼーションを行い、2×SSCにて室温で洗浄し、次に0.1×SSC/0.1×SDSにて最高68までの温度で洗浄することを含む、核酸分子、20

(b) C -ホルミルグリシン生成活性を有するポリペプチド(FGE)をコードする(a)の核酸分子の相補体、20

(c) 遺伝コードの縮重によりコドン配列が(a)または(b)の核酸分子と異なる核酸分子、20

(d) (a)、(b)、または(c)の相補体

(e) 配列番号：1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80～87からなる群から選択される配列を有する核酸分子からなる群から選択される単離された核酸分子、またはその発現産物の使用。20

**【請求項 16】**

細胞が内因性スルファターゼを発現する、請求項15記載の使用。

**【請求項 17】**

細胞が外因性スルファターゼを発現する、請求項15記載の使用。30

**【請求項 18】**

内因性または外因性スルファターゼが活性化される、請求項16または17記載の使用。30

**【請求項 19】**

スルファターゼが、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群から選択される、請求項15～18のいずれか一項記載の使用。40

**【請求項 20】**

細胞が哺乳動物細胞である、請求項15～19のいずれか一項記載の使用。

**【請求項 21】**

哺乳動物細胞がヒト細胞である、請求項20記載の使用。

**【請求項 22】**

哺乳動物細胞がCHO細胞である、請求項20記載の使用。

**【請求項 23】**

前記単離された核酸分子が、配列番号：1記載のヌクレオチド配列を有する、請求項15～22のいずれか一項記載の使用。50

**【請求項 2 4】**

前記単離された核酸分子が、配列番号：2のアミノ酸34～374を有するポリペプチドをコードする、請求項15～23のいずれか一項記載の使用。

**【請求項 2 5】**

配列番号：2記載の配列に少なくとも1つの差異（variation）を含むアミノ酸配列を含み、この少なくとも1つの差異に：Met1Arg；Met1Val；Ser155Pro；Cys218Tyr；Ala279Val；Arg327Stop；Cys336Arg；Arg345Cys；Arg349Trp；Arg349Gln；Ser359Stop；またはそれらの組み合わせが含まれる、バリアント型FGEポリペプチドをコードする、ヒトFGE遺伝子の単離されたバリアント型アレル。

**【請求項 2 6】**

10

配列番号：2記載の配列に少なくとも1つの差異を含むアミノ酸配列を含み、この少なくとも1つの差異に：Met1Arg；Met1Val；Ser155Pro；Cys218Tyr；Ala279Val；Arg327Stop；Cys336Arg；Arg345Cys；Arg349Trp；Arg349Gln；Ser359Stop；またはそれらの組み合わせが含まれる、単離されたバリアント型ヒトFGEポリペプチド。

**【請求項 2 7】**

細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比が上昇しているスルファターゼ產生細胞であって、

(i) スルファターゼ；および

(ii) 配列番号：2のアミノ酸34～374または配列番号：2を含む過剰発現しているホルミルグリシン生成酵素（FGE）

20

を含み、

ここで、細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比が、過剰発現しているホルミルグリシン生成酵素の非存在下で細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比よりも上昇しており、

前記過剰発現しているFGEが、細胞に導入された外因性FGEである、細胞。

**【請求項 2 8】**

活性型スルファターゼを生産する方法であって、スルファターゼと、配列番号2：のアミノ酸34～374または配列番号：2を含むホルミルグリシン生成酵素（FGE）と、を同時発現する細胞を、前記活性型スルファターゼが生産される条件下で培養するステップを含み、ここで、FGEが、細胞に導入された外因性FGEである、方法。

30

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****発明の分野**

本発明は、多重スルファターゼ欠損症（Multiple Sulfatase Deficiency；MSD）およびその他のスルファターゼ欠損症の診断および治療のための方法および組成物に関する。より詳細には、本発明は、スルファターゼ上での翻訳後修飾を調節する、単離された分子に関する。このような調節は適正なスルファターゼ機能のために必須である。

**【背景技術】****【0002】**

40

**発明の背景**

スルファターゼは、広範囲にわたる配列相同性（Franco, B., et al., Cell, 1995, 81: 15-25; Parenti, G., et al., Curr. Opin. Gen. Dev., 1997, 7: 386-391）、高度の構造的類似性（Bond, C.S., et al., Structure 1997, 5: 277-289; Lukatela, G., et al., Biochemistry, 1998, 37: 3654-64）および、硫酸エステルの切断のために必須な特有の翻訳後修飾（Schmidt, B., et al., Cell, 1995, 82: 271-278; Selmer, T., et al., Eur. J. Biochem., 1996, 238: 341-345）を共通に有する、高度に保存された遺伝子ファミリーのメンバーである。翻訳後修飾には、C での保存されたシステイン残基（真核生物の場合）またはセリン残基（ある種の原核生物の場合）の酸化が含まれ、これにより、側鎖のチオメチル基がアルデヒド基によって置換されたL-C - ホルミルグリシン（別名

50

、FGly ; 2-アミノ-3-オキソプロパン酸)が生じる。アルデヒドはスルファターゼの触媒部位の必須部分であり、アルデヒド水和物として作用する可能性が高い。双頭ヒドロキシル基の一方は硫酸エステルの切断過程で硫酸基を受容し、共有結合性に硫酸化された酵素中間体を形成する。もう一方のヒドロキシル基は硫酸基のその後の除去およびアルデヒド基の再生のために必要である。この修飾は、新生スルファターゼポリペプチドの移入の最中またはその直後に小胞体で起こり、修飾されるシステイン(またはセリン)残基を取り囲む短い線状配列によって導かれる。この高度に保存された配列はヘキサペプチドL/V-C(S)-X-P-S-R (SEQ ID NO : 32) であり、これはすべての真核生物スルファターゼN末端領域に存在し、残基Xにはヒドロキシル基またはチオール基が非常に高い頻度で存在する (Dirks, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1997, 94: 11963-11968)。

10

## 【0003】

ヒトでは現在までに13種のスルファターゼ遺伝子が同定されている。それらは、基質特異性および細胞内局在(リソソーム、ゴルジおよびERなど)の点でさまざまな酵素をコードする。これらの遺伝子のうち4種であるARSC、ARSD、ARSEおよびARSF(それぞれアリールスルファターゼC、D、EおよびFをコードする)は、同一の染色体領域(Xp22.3)の内部に位置する。それらは高度の配列類似性を有するとともにほぼ同一なゲノム構成を有し、このことはそれらが進化の過程で最近起こった重複イベントによって生じたことを意味する(Franco B, et al., Cell, 1995, 81: 15-25; Meroni G, et al., Hum Mol Genet, 1996, 5: 423-31)。

## 【0004】

ヒト代謝におけるスルファターゼの重要性は、個々のスルファターゼ活性の欠損に起因する少なくとも8種類のヒト単一遺伝子病が同定されていることによって強く示されている。これらの疾患のほとんどはリソソーム貯蔵障害であり、その表現型上の結果は貯蔵物質の種類および組織分布に由来する。これらの中には、グリコサミノグリカンの異化過程に対して作用するスルファターゼの欠損に起因する5種類のムコ多糖症(MPS II型、IIIA型、IID型、IVA型およびVI型)

20

(Neufeld and Muenzer, 2001, *The mucopolysaccharidoses, In The*

*Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly,

D. Valle, B. Childs, K.W. Kinzler and B. Vogelstein, eds. New York: Mc Graw-Hill, pp.

30

3421-3452)

、ならびに、中枢神経系および末梢神経系におけるスルホリピドの蓄積を特徴とし、高度かつ進行性の神経学的悪化につながる異染性ロイコジストロフィー(MLD)がある。さらに別の2種類のヒト疾患が、非リソソーム性スルファターゼの欠損によって起こる。これらには、ステロイドスルファターゼ(STS/ARSC)欠損に起因する皮膚疾患であるX連鎖性魚鱗癬、ならびに、アリールスルファターゼE(ARSE)欠損のために骨および軟骨が冒される点状軟骨異形成症が挙げられる。スルファターゼは、妊娠時のワルファリンへの子宮内曝露に起因するARSE活性の阻害によって引き起こされるワルファリン胎芽病といった薬剤誘発性ヒト奇形症候群とも関連づけられている。

40

## 【0005】

興味深いヒト単一遺伝子病の1つである多重スルファターゼ欠損症(MSD)では、すべてのスルファターゼ活性が同時に欠損している。その結果、この重度の多系統疾患(multisystemic disease)の表現型は、個々のスルファターゼ欠損症に認められる特徴を兼ね備えている。MSD患者由来の細胞は、ヒトスルファターゼをコードするcDNAのトランスクレクション後にもスルファターゼ活性が欠如しており、このことはすべてのスルファターゼの活性にとって必要な共通の機構が存在することを示唆する(Rommerskirch and von Figura, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1992, 89: 2561-2565)。スルファターゼの翻訳後修飾に欠陥があることが1例のMSD患者で見いだされており、このことはこの疾患が、システインからホルミルグリシンへの変換機構と関連づけられる1つまたは複数の遺伝子の変

50

異によって引き起こされることを示唆する (Schmidt, B., et al., Cell, 1995, 82: 271-278)。生物学および医学の面で高い関心が寄せられているにもかかわらず、この（これらの）遺伝子の同定を目指した取り組みは、MSD患者が稀であること、およびその結果として遺伝子マッピングを行うのに適した家族症例が得られないことによって阻まれている。

### 【発明の開示】

#### 【0006】

##### 発明の概要

本発明は、多重スルファターゼ欠損症 (MIM 272200) の診断および治療のため、ならびにその他のスルファターゼ欠損症の治療のための方法および組成物を提供する。より詳細には、本発明者らは、スルファターゼの機能 (L-C -ホルミルグリシン；別名、FGlyおよび/または2-アミノ-3-オキソプロパン酸の形成) のために必須である、スルファターゼ上で起こる特有の翻訳後修飾の原因となる酵素であるホルミルグリシン生成酵素 (FGE) をコードする遺伝子を同定した。予想外のことには、FGE遺伝子の変異は、対象における多重スルファターゼ欠損症 (MSD) の発症につながることが見いだされた。同じく予想外のことには、FGEが、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6を非制限的に含むスルファターゼの活性を高めうることも見いだされた。これらの発見に鑑みると、本発明の分子は、多重スルファターゼ欠損症およびその他のスルファターゼ欠損症の診断および治療に用いることができる。

10

#### 【0007】

本発明の分子を多重スルファターゼ欠損症の診断に用いるための方法を提供する。

#### 【0008】

さらに、スルファターゼ上でFGly形成を調節することを目的としてこれらの分子をインビオまたはインビトロで用いるための方法、このような修飾と関連性のある状態を治療するための方法、ならびに多重スルファターゼ欠損症およびその他のスルファターゼ欠損症の治療のための治療用製剤の調製に有用な組成物も提供される。

30

#### 【0009】

本発明はしたがって、いくつかの局面において、スルファターゼ上でFGly形成を調節するポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする単離された核酸、前記物の機能的改变物およびバリエント、前記物の有用な断片、ならびにそれらに関連した治療薬および診断薬、研究方法、組成物およびツールを含む。

#### 【0010】

本発明の1つの局面によれば、(a) SEQ ID NO:1記載のヌクレオチド配列からなる分子とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつC -ホルミルグリシン生成活性を有するホルミルグリシン生成酵素 (FGE) ポリペプチドをコードする、核酸分子、(b) 遺伝暗号の縮重性のために(a)の核酸分子とはコドン配列が異なる核酸分子、および(c) (a)または(b)の相補物、からなる群より選択される、単離された核酸分子が提供される。ある種の態様において、単離された核酸分子は、SEQ ID NO:1記載のヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様において、単離された核酸分子は、SEQ ID NO:3記載のヌクレオチド配列またはその断片からなる。

40

#### 【0011】

本発明は、もう1つの局面において、(a) SEQ ID NO:1記載のヌクレオチド配列の固有断片、および(b) (a)の相補物、からなる群より選択される単離された核酸分子を提供し、この際、(a)の固有断片は、(1) SEQ ID NO:4および/またはSEQ ID NO:4のヌクレオチド20~1141と同一な配列、ならびに(2) (1)の相補物、からなる群より選択されるいすれの配列とも同一でない連続したヌクレオチドの配列を含むことを条件とする。前

50

述の態様のいずれにおいても、相補物は完全長相補物のことを指す。

【0012】

1つの態様において、連続したヌクレオチドの配列は、(1)配列群と同一でない少なくとも2つの連続したヌクレオチド、(2)配列群と同一でない少なくとも3つの連続したヌクレオチド、(3)配列群と同一でない少なくとも4つの連続したヌクレオチド、(4)配列群と同一でない少なくとも5つの連続したヌクレオチド、(5)配列群と同一でない少なくとも6つの連続したヌクレオチド、および(6)配列群と同一でない少なくとも7つの連続したヌクレオチド、からなる群より選択される。

【0013】

もう1つの態様において、断片は、少なくとも以下のものからなる群より選択されるサイズを有する：8ヌクレオチド、10ヌクレオチド、12ヌクレオチド、14ヌクレオチド、16ヌクレオチド、18ヌクレオチド、20ヌクレオチド、22ヌクレオチド、24ヌクレオチド、26ヌクレオチド、28ヌクレオチド、30ヌクレオチド、40ヌクレオチド、50ヌクレオチド、75ヌクレオチド、100ヌクレオチド、200ヌクレオチド、1000ヌクレオチドおよびそれらの間のすべての整数長。10

【0014】

もう1つの局面によれば、本発明は、上記の核酸分子を含む、発現ベクター、およびこのような発現ベクターによる形質転換またはトランスフェクションを受けた宿主細胞を提供する。

【0015】

さらにもう1つの局面によれば、本発明は、活性化された型の内因性FGE遺伝子を発現する細胞を提供する。1つの態様において、内因性FGE遺伝子の活性化は相同組換えを介して起こる。20

【0016】

本発明のもう1つの局面によれば、単離されたポリペプチドが提供される。この単離されたポリペプチドは、本発明の前述の核酸分子によってコードされる。いくつかの態様において、単離されたポリペプチドは、SEQ ID NO:1の核酸によってコードされ、C - ホルミルグリシン生成活性を有するSEQ ID NO:2の配列を有するポリペプチドを生じる。また別の態様において、単離されたポリペプチドは、ヒトゲノム内部での固有の配列に相当するのに十分な長さであって、C - ホルミルグリシン生成活性を有するポリペプチドによって同定される、前記物の断片またはバリエントであってもよく、この際、断片は、SEQ ID NO:4を有する核酸配列によってコードされるいかなる配列とも同一でない連続したアミノ酸の配列を含むことを条件とする。もう1つの態様において、上記のポリペプチド分子の免疫原性断片が提供される。免疫原性断片はC - ホルミルグリシン生成活性を有しても有していないなくてもよい。30

【0017】

本発明のもう1つの局面によれば、本発明の前述の核酸分子によってコードされるポリペプチドと選択的に結合する、単離された結合ポリペプチドが提供される。この単離された結合性ポリペプチドは、SEQ ID NO:2の配列を含むポリペプチド、その断片、または本明細書の別の箇所に述べるC - ホルミルグリシン生成活性を有する単離されたポリペプチドのファミリーに属するポリペプチドと、選択的に結合することが好ましい。好ましい態様において、単離された結合性ポリペプチドには、抗体および抗体の断片（例えば、Fab断片、F(ab)2断片、Fd断片、およびFGEポリペプチドと選択的に結合するCDR3領域を含む抗体断片）が含まれる。ある種の態様において、抗体はヒトのものである。いくつかの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。1つの態様において、抗体はポリクローナル抗血清である。さらなる態様において、抗体はヒト化されている。さらに別の態様において、抗体はキメラ性である。40

【0018】

本発明のもう1つの局面によれば、C - ホルミルグリシン生成活性を有する単離されたポリペプチドのファミリーが提供される。前記ポリペプチドのそれぞれは、アミノ末端か50

らカルボキシル末端の順に以下を含む：(a)アミノ末端サブドメイン1；サブドメイン2；35～45アミノ酸を含むカルボキシ末端サブドメイン3；この際、サブドメイン3は、SEQ ID NO:2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群より選択されるポリペプチドのサブドメイン3に対して少なくとも約75%の相同性を有し、しかも長さがほぼ等しい。重要な態様において、サブドメイン2は120～140アミノ酸を含む。さらに重要な態様において、サブドメイン2のアミノ酸の少なくとも5%はトリプトファンである。いくつかの態様において、サブドメイン2は、SEQ ID NO:2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群より選択されるポリペプチドのサブドメイン2に対して少なくとも約50%の相同性を有する。ある種の態様において、各ポリペプチドのサブドメイン3は、SEQ ID NO:2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群より選択されるポリペプチドのサブドメイン3に対して、少なくとも約80%～約100%の相同性を有する。

#### 【0019】

本発明のさらにもう1つの局面によれば、対象におけるFGE発現のレベルを決定するための方法が提供される。本方法は、対象におけるFGE発現のレベルを決定するために、対象由来の被験試料におけるFGEの発現を測定する段階を含む。ある種の態様においては、被験試料において測定されたFGE発現を、既知レベルのFGE発現を含む対照におけるFGE発現と比較する。発現は、FGE mRNAの発現、FGEポリペプチドの発現、または本明細書の別の箇所に述べるFGE C - ホルミルグリシン生成活性として定義される。発現の測定にはさまざまな方法を用いることができる。本発明の好ましい態様には、mRNA発現を測定するためのPCRおよびノーザンプロット法、FGEポリペプチド発現を測定するためのFGEモノクローナル抗体またはFGEポリクローナル抗血清、ならびにFGE C - ホルミルグリシン生成活性を測定するための方法が含まれる。

#### 【0020】

ある種の態様においては、生検試料などの被験試料および血液などの生物性液体を被験試料として用いる。対象の被験試料におけるFGE発現を、対照におけるFGE発現と比較する。

#### 【0021】

本発明のもう1つの局面によれば、分子のC - ホルミルグリシン生成活性の調節に有用な作用因子(agent)を同定するための方法が提供される。本方法は、(a)C - ホルミルグリシン生成活性を有する分子を作用因子候補と接触させること、(b)その分子のC - ホルミルグリシン生成活性を測定すること、および(c)作用因子候補がその分子のC - ホルミルグリシン生成活性を調節するか否かを判定するために、分子の測定されたC - ホルミルグリシン生成活性を対照と比較する段階を含み、この際、その分子は、SEQ ID NO:1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80～87からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはそれらの発現産物(例えば、SEQ ID NO:2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群より選択される配列を有するペプチド)である。ある種の態様において、対照は、作用因子候補の非存在下で測定された、その分子のC - ホルミルグリシン生成活性である。

#### 【0022】

本発明のなおもう1つの局面によれば、対象における多重スルファターゼ欠損症を診断する方法が提供される。本方法は、多重スルファターゼ欠損症を有することが疑われる対象由来の生物試料を作用因子と接触させる段階であって、前記作用因子は(i)SEQ ID NO:1、3もしくは4のヌクレオチド配列を有するFGE核酸分子、(ii)(i)の核酸分子の発現産物、または(iii)(ii)の発現産物の断片、からなる群より選択される分子と特異的に結合する段階；および、結合した作用因子の量を測定し、それによって前記核酸分子の発現またはその発現産物の発現が異常であるか否かを判定する段階を含み、異常な発現によって対象における多重スルファターゼ欠損症が診断される。

## 【 0 0 2 3 】

本発明のなおもう1つの局面によれば、核酸分子またはその発現産物の異常な発現を特徴とする状態を診断するための方法が提供される。本方法は、対象由来の生物試料を作用因子と接触させる段階であって、前記作用因子は前記核酸分子、その発現産物またはその発現産物の断片と特異的に結合する段階；および、結合した作用因子の量を測定し、それによって前記核酸分子の発現またはその発現産物の発現が異常であるか否かを判定する段階であって、異常な発現によってその状態が診断される段階；を含み、この際、核酸分子はSEQ ID NO:1のヌクレオチド配列を有し、状態は多重スルファターゼ欠損症である。

## 【 0 0 2 4 】

本発明のもう1つの局面によれば、核酸分子またはその発現産物の異常な発現を特徴とする、対象における多重スルファターゼ欠損症を判定するための方法が提供される。本方法は、患者由来の試料を、対象における多重スルファターゼ欠損症の判定法(determination)として、(i) SEQ ID NO:1、3、4のヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはFEGゲノム座位に由来する配列を有する核酸分子、(ii) その核酸分子によってコードされるポリペプチド、(iii) そのポリペプチドに由来するペプチド、および(iv) そのポリペプチドまたはペプチドと選択的に結合する抗体、からなる群より選択されるパラメーターに関してモニタリングする段階を含む。いくつかの態様において、試料は、前述の態様のいずれかに記載した生物性液体または組織である。ある種の態様において、モニタリングの段階は、試料を、(a)(i) の核酸分子とストリンジエントな条件下で選択的にハイブリダイズする単離された核酸分子、(b)(ii) のポリペプチドまたは(iii) のペプチドと選択的に結合する抗体、および(c)(iv) の抗体と結合するポリペプチドまたはペプチド、からなる群より選択される検出可能な作用因子と接触させる段階を含む。抗体、ポリペプチド、ペプチドまたは核酸は、放射性標識または酵素によって標識することができる。さらなる態様において、本方法はさらに、試料をペプチドに関してアッセイする段階を含む。

## 【 0 0 2 5 】

本発明のもう1つの局面によれば、キットが提供される。本キットは、前述の単離されたFGE核酸またはそれらの発現産物のいずれかと選択的に結合する作用因子、および前記作用因子と前述の単離されたFGE核酸またはそれらの発現産物のいずれかとの結合の測定値と比較するための対照、を含むパッケージを含む。いくつかの態様において、対照は、測定値と比較するための既定値である。ある種の態様において、対照は、前述の単離されたFGE核酸のいずれかの発現産物のエピトープを含む。1つの態様において、キットはさらに、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群より選択されるポリペプチド、またはそのペプチドと選択的に結合する第2の作用因子、ならびに前記第2の作用因子と前記ポリペプチドまたはそのペプチドとの結合の測定値と比較するための対照を含む。

## 【 0 0 2 6 】

本発明のさらにもう1つの局面によれば、多重スルファターゼ欠損症を治療するための方法が提供される。本方法は、このような治療を必要とする対象に対して、C-ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子を、対象における多重スルファターゼ欠損症を治療するために有効な量で投与する段階を含む。いくつかの態様において、本方法はさらに、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5またはHSulf-6をコードする核酸分子、その核酸分子の発現産物、およびその核酸分子の発現産物の断片、からなる群より選択される作用因子を同

10

20

30

40

50

時投与する段階を含む。ある種の態様において、C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子は、本発明の単離された核酸分子（例えば、請求項18記載の核酸分子、またはSEQ ID NO : 1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80～87からなる群より選択される配列を有する核酸）である。重要な態様において、C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子は、本発明のペプチド（例えば、請求項11～15、19、20記載のペプチド、またはSEQ ID NO : 2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群より選択される配列を有するペプチド）である。C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子は、内因性および/または外因性のFGE核酸分子を発現する細胞によって産生されうる。重要な態様において、内因性FGE核酸分子は活性化されていてもよい。

10

#### 【 0 0 2 7 】

本発明の1つの局面によれば、対象におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるための方法が提供される。本方法は、本発明の単離されたFGE核酸分子（例えば、請求項1～8記載の核酸分子、またはSEQ ID NO : 1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80～87からなる群より選択される配列を有する核酸）および/またはその発現産物を、対象に対して、対象におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるための有効な量で投与する段階を含む。

#### 【 0 0 2 8 】

本発明の1つの局面によれば、多重スルファターゼ欠損症を有する対象を治療するための方法が提供される。本方法は、このような治療を必要とする対象に対して、C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子を、対象におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるために有効な量で投与する段階を含む。いくつかの態様において、C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子は、本発明のセンス核酸（例えば、請求項1～8記載の核酸分子、またはSEQ ID NO : 1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80～87からなる群より選択される配列を有する核酸）である。ある種の態様において、C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子は、本発明の単離されたポリペプチド（例えば、請求項11～15、19、20記載のポリペプチド、またはSEQ ID NO : 2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群より選択される配列を有するペプチド）である。

20

#### 【 0 0 2 9 】

本発明のなおもう1つの局面によれば、細胞におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるための方法が提供される。本方法は、細胞を、細胞におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるための有効な量にある、本発明の単離された核酸分子（例えば、請求項1～8記載の核酸分子、またはSEQ ID NO : 1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80～87からなる群より選択される配列を有する核酸）またはその発現産物と接触させる段階を含む。重要な態様において、本方法は、細胞におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるために内因性FGE遺伝子を活性化する段階を含む。

30

#### 【 0 0 3 0 】

本発明のさらにもう1つの局面によれば、薬学的組成物が提供される。本組成物は、多重スルファターゼ欠損症を治療するための薬学的有効量にある、本発明の単離された核酸分子（例えば、請求項1～8のいずれか一項記載の単離された核酸分子、SEQ ID NO : 1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80～87からなる群より選択される配列を有するFGE核酸分子）またはそれらの発現産物を含む作用因子、および薬学的に許容される担体を含む。

40

#### 【 0 0 3 1 】

本発明の1つの局面によれば、多重スルファターゼ欠損症の治療に有用な作用因子候補を同定するための方法が提供される。本方法は、細胞または組織における核酸分子のセットの発現を、作用因子候補の非存在下において、核酸分子のセットの第1の量の発現が許容される条件下で判定する段階であって、核酸分子のセットは(a) SEQ ID NO : 1記載の

50

スクレオチド配列からなる群より選択される分子とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつC - ホルミルグリシン生成活性を有するポリペプチド (FGE) をコードする、核酸分子、(b) 遺伝暗号の縮重性のために (a) または (b) の核酸分子とはコドン配列が異なる核酸分子、(c) SEQ ID NO: 1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80~87からなる群より選択される配列を有する核酸分子、ならびに (d) (a) または (b) または (c) の相補物、からなる群より選択される少なくとも1つの核酸分子を含む段階；細胞または組織を作用因子候補と接触させる段階、ならびに核酸分子のセットの発現の試験量 (test amount) を検出する段階を含み、作用因子候補の存在下での発現の試験量が発現の第1の量に比して大きいことにより、作用因子候補が多重スルファターゼ欠損症の治療に有用であることが示される。 10

#### 【0032】

本発明のさらにもう1つの局面によれば、多重スルファターゼ欠損症および/またはその他のスルファターゼ欠損症の治療に有用な医薬品を調製するための方法が提供される。

#### 【0033】

本発明のなおもう1つの局面によれば、固相核酸分子アレイが提供される。本アレイは、固体基質に対して固定された、核酸分子、それらの発現産物、またはそれら（核酸分子もしくはポリペプチド分子のいずれか）の断片のセットから本質的になり、それぞれの核酸分子はSEQ ID NO: 2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群より選択されるポリペプチドをコードする。いくつかの態様において、固相アレイはさらに、少なくとも1つの対照核酸分子を含む。ある種の態様において、核酸分子のセットは、それぞれがSEQ ID NO: 2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群より選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、またはさらには少なくとも5つの核酸分子を含む。 20

#### 【0034】

本発明のさらにもう1つの局面によれば、対象におけるスルファターゼ欠損症を治療するための方法が提供される。本方法は、このような治療を必要とする対象に対して、本発明に従って產生されたスルファターゼを、対象におけるスルファターゼ欠損症を治療するために有効な量で投与する段階を含み、しかもそのスルファターゼ欠損症は多重スルファターゼ欠損症ではない。重要な態様において、スルファターゼは、C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子と接触させた細胞によって產生される。ある種の態様において、スルファターゼ欠損症には、ムコ多糖症II (MPS II; ハンター症候群)、ムコ多糖症IIIA (MPS IIIA; サンフィリピ症候群A)、ムコ多糖症VIII (MPS VIII)、ムコ多糖症IVA (MPS IVA; モルキオ症候群A)、ムコ多糖症VI (MPS VI; マロト-ラミー症候群)、異染性ロイコジストロフィー (MLD)、X連鎖性劣性点状軟骨異形成症1、またはX連鎖性魚鱗癬 (ステロイドスルファターゼ欠損症) が非制限的に含まれる。ある種の態様において、C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子は、本発明の核酸分子またはペプチドでありうる。1つの態様において、スルファターゼ、およびC - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子は、同じ細胞内で共発現される。スルファターゼ、および/またはC - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子は、内因性または外因性のいずれの由来でもよい。内因性の由来であれば、それを活性化することができる（例えば、当技術分 40 50

野で知られた適切な位置での、強力なプロモーターおよび/または他のエレメントの挿入による)。外因性であれば、その発現を発現ベクター上のエレメントによって作動させること、またはそれを、その高度の発現を可能にすると考えられる細胞ゲノム内部の適切な場所(例えば、強力なプロモーターの下流)にターゲティングさせることができる。

#### 【 0 0 3 5 】

本発明のもう1つの局面によれば、薬学的組成物が提供される。本組成物は、スルファターゼ欠損症を治療するための薬学的有効量にある、本発明の単離された核酸分子またはその発現産物を含む作用因子、および薬学的に許容される担体を含む。

#### 【 0 0 3 6 】

本発明のさらにもう1つの局面によれば、細胞におけるスルファターゼ活性を高めるための方法が提供される。本方法は、スルファターゼを発現する細胞を、細胞におけるスルファターゼ活性を高めるために有効な量にある、本発明の単離された核酸分子(例えば、請求項1~8のいずれか一項記載の単離された核酸分子、SEQ ID NO:1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80~87からなる群より選択される配列を有するFGE核酸分子)またはその発現産物(例えば、請求項11~15、19、20記載のポリペプチド、またはSEQ ID NO:2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群より選択される配列を有するペプチド)と接触させる段階を含む。細胞は内因性および/または外因性のスルファターゼを発現しうる。重要な態様において、内因性スルファターゼは活性化されている。ある種の態様において、スルファターゼは、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5および/またはHSulf-6である。ある種の態様において、細胞は哺乳動物細胞である。

#### 【 0 0 3 7 】

本発明のもう1つの局面によれば、薬学的組成物が提供される。本組成物は、スルファターゼ欠損症を治療するための薬学的有効量にある、細胞によって產生されるスルファターゼ、および薬学的に許容される担体を含み、この際、前記細胞は、本発明の単離された核酸分子(例えば、請求項1~8記載のもの、またはSEQ ID NO:1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80~87からなる群より選択される配列を有する核酸分子)またはその発現産物(例えば、SEQ ID NO:2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群より選択されるペプチド)を含む作用因子と接触させられている。

#### 【 0 0 3 8 】

本発明のなおもう1つの局面によれば、バリアント型FGEポリペプチドをコードする、ヒトFGE遺伝子の単離されたバリアント型アレル(variant allele)が提供される。この単離されたバリアント型アレルは、SEQ ID NO:2に少なくとも1つの差異(variation)を含むアミノ酸配列を含み、この際、この少なくとも1つの差異には: Met1Arg ; Met1Val ; Leu20Phe ; Ser155Pro ; Ala177Pro ; Cys218Tyr ; Arg224Trp ; Asn259Ile ; Pro266Leu ; Ala279Val ; Arg327Stop ; Cys336Arg ; Arg345Cys ; Ala348Pro ; Arg349Gln ; Arg349Trp ; Arg349Trp ; Ser359Stop ; またはそれらの組み合わせが含まれる。

#### 【 0 0 3 9 】

本発明のさらにもう1つの局面によれば、単離されたバリアント型ヒトFGEポリペプチドが提供される。この単離されたバリアント型ヒトFGEポリペプチドは、SEQ ID NO:2に少なくとも1つの差異を含むアミノ酸配列を含み、この際、この少なくとも1つの差異には: Met1Arg ; Met1Val ; Leu20Phe ; Ser155Pro ; Ala177Pro ; Cys218Tyr ; Arg224Trp ; Asn259Ile ; Pro266Leu ; Ala279Val ; Arg327Stop ; Cys336Arg ; Arg345Cys ; Ala348Pro ; Arg349Gln ; Arg349Trp ; Arg349Trp ; Ser359Stop ; またはそれらの組み合わせが含まれる。

#### 【 0 0 4 0 】

10

20

30

40

50

前述のバリアント型ヒトFGEポリペプチドのいずれかを免疫原として有する抗体も提供される。このような抗体にはポリクローナル抗血清、モノクローナル抗体、キメラ抗体が含まれ、これらを検出可能なように標識することもできる。検出可能な標識には、放射性元素、蛍光を発する化学物質、または酵素が含まれる。

#### 【0041】

本発明のもう1つの局面によれば、細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比が上昇しているスルファターゼ產生細胞が提供される。本細胞は(i)発現が高度化しているスルファターゼ、および(ii)発現が高度化しているホルミルグリシン生成酵素を含み、この際、細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比(すなわち、スルファターゼの比活性)は、ホルミルグリシン生成酵素の非存在下で細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比よりも少なくとも5%上昇している。ある種の態様において、細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比は、ホルミルグリシン生成酵素の非存在下で細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比よりも、少なくとも10%、15%、20%、50%、100%、200%、500%、1000%上昇している。

#### 【0042】

本発明のさらにもう1つの局面によれば、対象におけるスルファターゼ欠損症を治療するための改良された方法が提供される。本方法は、このような治療を必要とする対象に対して、対象におけるスルファターゼ欠損症を治療するための有効量でスルファターゼを投与する段階を含み、この際、スルファターゼは、スルファターゼの比活性を上昇させるために有効な量のホルミルグリシン生成酵素と接触されている。1つの重要な態様において、スルファターゼは、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群より選択される。ある種の態様において、ホルミルグリシン生成酵素は、請求項1~8記載の核酸分子、またはSEQ ID NO:1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80~87からなる群より選択される配列を有する核酸である。いくつかの態様において、ホルミルグリシン生成酵素は、請求項11~15、19、20記載のペプチド、またはSEQ ID NO:2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群より選択される配列を有するペプチドである。

#### 【0043】

本発明の上記およびその他の目的については、本発明の詳細な説明と関連してさらに詳細に述べる。

#### 【0044】

##### 配列の簡単な説明

SEQ ID NO:1は、ヒトFGE cDNAのヌクレオチド配列である。

#### 【0045】

SEQ ID NO:2は、ヒトFGE cDNA(SEQ ID NO:1)の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

#### 【0046】

SEQ ID NO:3は、SEQ ID NO:2のポリペプチドをコードするヒトFGE cDNA(すなわち、SEQ ID NO:1のヌクレオチド20~1141)のヌクレオチド配列である。

#### 【0047】

SEQ ID NO:4は、GenBank Acc. No. AK075459のヌクレオチド配列である。

#### 【0048】

SEQ ID NO:5は、GenBank Acc. No. BAC11634を有する未命名のタンパク質産物である、SEQ ID NO:4の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

**【 0 0 4 9 】**

SEQ ID NO : 6は、ヒトイズロン酸2-スルファターゼcDNA ( GenBank Acc. No. M58342 ) のヌクレオチド配列である。

**【 0 0 5 0 】**

SEQ ID NO : 7は、ヒトイズロン酸2-スルファターゼcDNA ( SEQ ID NO : 6 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 0 5 1 】**

SEQ ID NO : 8は、ヒトスルファミダーゼcDNA ( GenBank Acc. No. U30894 ) のヌクレオチド配列である。

**【 0 0 5 2 】**

SEQ ID NO : 9は、ヒトスルファミダーゼcDNA ( SEQ ID NO : 8 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 0 5 3 】**

SEQ ID NO : 10は、ヒトN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼcDNA ( GenBank Acc. No. U06088 ) のヌクレオチド配列である。

**【 0 0 5 4 】**

SEQ ID NO : 11は、ヒトN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼcDNA ( SEQ ID NO : 10 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 0 5 5 】**

SEQ ID NO : 12は、ヒトN-アセチルグルコサミン6-スルファターゼcDNA ( GenBank Acc. No. Z12173 ) のヌクレオチド配列である。

**【 0 0 5 6 】**

SEQ ID NO : 13は、ヒトN-アセチルグルコサミン6-スルファターゼcDNA ( SEQ ID NO : 12 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 0 5 7 】**

SEQ ID NO : 14は、ヒトアリールスルファターゼA cDNA ( GenBank Acc. No. X52151 ) のヌクレオチド配列である。

**【 0 0 5 8 】**

SEQ ID NO : 15は、ヒトアリールスルファターゼA cDNA ( SEQ ID NO : 14 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 0 5 9 】**

SEQ ID NO : 16は、ヒトアリールスルファターゼB cDNA ( GenBank Acc. No. J05225 ) のヌクレオチド配列である。

**【 0 0 6 0 】**

SEQ ID NO : 17は、ヒトアリールスルファターゼB cDNA ( SEQ ID NO : 16 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 0 6 1 】**

SEQ ID NO : 18は、ヒトアリールスルファターゼC cDNA ( GenBank Acc. No. J04964 ) のヌクレオチド配列である。

**【 0 0 6 2 】**

SEQ ID NO : 19は、ヒトアリールスルファターゼC cDNA ( SEQ ED NO : 18 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 0 6 3 】**

SEQ ID NO : 20は、ヒトアリールスルファターゼD cDNA ( GenBank Acc. No. X83572 ) のヌクレオチド配列である。

**【 0 0 6 4 】**

SEQ ID NO : 21は、ヒトアリールスルファターゼD cDNA ( SEQ ID NO : 20 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 0 6 5 】**

SEQ ID NO : 22は、ヒトアリールスルファターゼE cDNA ( GenBank Acc. No. X83573 ) の

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列である。

【 0 0 6 6 】

SEQ ID NO : 23は、ヒトアリールスルファターゼE cDNA ( SEQ ID NO : 22 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

【 0 0 6 7 】

SEQ ID NO : 24は、ヒトアリールスルファターゼF cDNA ( GenBank Acc. No. X97868 ) のヌクレオチド配列である。

【 0 0 6 8 】

SEQ ID NO : 25は、ヒトアリールスルファターゼF cDNA ( SEQ ID NO : 24 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。 10

【 0 0 6 9 】

SEQ ID NO : 26は、ヒトアリールスルファターゼG cDNA ( GenBank Acc. No. BC012375 ) のヌクレオチド配列である。

【 0 0 7 0 】

SEQ ID NO : 27は、ヒトアリールスルファターゼG ( SEQ ID NO : 26 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

【 0 0 7 1 】

SEQ ID NO : 28は、HSulf-1 cDNA ( GenBank Acc. No. AY101175 ) のヌクレオチド配列である。 20

【 0 0 7 2 】

SEQ ID NO : 29は、HSulf-1 cDNA ( SEQ ID NO : 28 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

【 0 0 7 3 】

SEQ ID NO : 30は、HSulf-2 cDNA ( GenBank Acc. No. AY101176 ) のヌクレオチド配列である。

【 0 0 7 4 】

SEQ ID NO : 31は、HSulf-2 cDNA ( SEQ ID NO : 30 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

【 0 0 7 5 】

SEQ ID NO : 32は、スルファターゼ上に存在する高度に保存されたヘキサペプチドL/V-F G1y-X-P-S-Rである。 30

【 0 0 7 6 】

SEQ ID NO : 33は、合成FG1y生成基質である；その一次配列はヒトアリールスルファターゼAに由来する。

【 0 0 7 7 】

SEQ ID NO : 34は、乱雑化されたオリゴペプチド

PVSLPTRSCAALLTGR

である。

【 0 0 7 8 】

SEQ ID NO : 35は、Ser69オリゴペプチド

PVSLSTPSRAALLTGR

である。 40

【 0 0 7 9 】

SEQ ID NO : 36は、ヒトFGE特異的プライマー-1199ncである。

【 0 0 8 0 】

SEQ ID NO : 37は、ヒトFGE特異的順方向プライマー-1cである。

【 0 0 8 1 】

SEQ ID NO : 38は、ヒトFGE特異的逆方向プライマー-1182cである。

【 0 0 8 2 】

SEQ ID NO : 39は、EcoRI部位を含むヒト5'-FGE特異的プライマーである。 50

## 【 0 0 8 3 】

SEQ ID NO : 40は、HA特異的プライマーである。

## 【 0 0 8 4 】

SEQ ID NO : 41は、c-myc特異的プライマーである。

## 【 0 0 8 5 】

SEQ ID NO : 42は、RGS-His6特異的プライマーである。

## 【 0 0 8 6 】

SEQ ID NO : 43は、ヒトFGE調製物由来のトリプシン性オリゴペプチド

SQNTPDSSASNLLGFR

である。

10

## 【 0 0 8 7 】

SEQ ID NO : 44は、ヒトFGE調製物由来のトリプシン性オリゴペプチド

MVPIPAGVFTMGTDDPQIK

である。

## 【 0 0 8 8 】

SEQ ID NO : 45は、ヒトFGE2パラログ (GenBank GI : 24308053) のヌクレオチド配列である。

## 【 0 0 8 9 】

SEQ ID NO : 46は、ヒトFGE2パラログ (SEQ ID NO : 45) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

20

## 【 0 0 9 0 】

SEQ ID NO : 47は、マウスFGEパラログ (GenBank GI : 26344956) のヌクレオチド配列である。

## 【 0 0 9 1 】

SEQ ID NO : 48は、マウスFGEパラログ (SEQ ID NO : 47) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

## 【 0 0 9 2 】

SEQ ID NO : 49は、マウスFGEオルソログ (GenBank GI : 22122361) のヌクレオチド配列である。

## 【 0 0 9 3 】

30

SEQ ID NO : 50は、マウスFGEオルソログ (SEQ ID NO : 49) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

## 【 0 0 9 4 】

SEQ ID NO : 51は、ショウジョウバエFGEオルソログ (GenBank GI : 20130397) のヌクレオチド配列である。

## 【 0 0 9 5 】

SEQ ID NO : 52は、ショウジョウバエFGEオルソログ (SEQ ID NO : 51) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

## 【 0 0 9 6 】

SEQ ID NO : 53は、カ (mosquito) のFGEオルソログ (GenBank GI : 21289310) のヌクレオチド配列である。

40

## 【 0 0 9 7 】

SEQ ID NO : 54は、カのFGEオルソログ (SEQ ID NO : 53) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

## 【 0 0 9 8 】

SEQ ID NO : 55は、近縁種S. coelicolorのFGEオルソログ (GenBank GI : 21225812) のヌクレオチド配列である。

## 【 0 0 9 9 】

SEQ ID NO : 56は、S. coelicolorのFGEオルソログ (SEQ ID NO : 55) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

50

**【 0 1 0 0 】**

SEQ ID NO : 57は、近縁種*C. efficiens*のFGEオルソログ (GenBank GI : 25028125) のヌクレオチド配列である。

**【 0 1 0 1 】**

SEQ ID NO : 58は、*C. efficiens*のFGEオルソログ (SEQ ID NO : 57) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 1 0 2 】**

SEQ ID NO : 59は、*N. aromaticivorans*のFGEオルソログ (GenBank GI : 23108562) のヌクレオチド配列である。

**【 0 1 0 3 】**

SEQ ID NO : 60は、*N. aromaticivorans*のFGEオルソログ (SEQ ID NO : 59) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 1 0 4 】**

SEQ ID NO : 61は、*M. loti*のFGEオルソログ (GenBank GI : 13474559) のヌクレオチド配列である。

**【 0 1 0 5 】**

SEQ ID NO : 62は、*M. loti*のFGEオルソログ (SEQ ID NO : 61) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 1 0 6 】**

SEQ ID NO : 63は、*B. fungorum*のFGEオルソログ (GenBank GI : 22988809) のヌクレオチド配列である。

10

**【 0 1 0 7 】**

SEQ ID NO : 64は、*B. fungorum*のFGEオルソログ (SEQ ID NO : 63) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 1 0 8 】**

SEQ ID NO : 65は、*S. meliloti*のFGEオルソログ (GenBank GI : 16264068) のヌクレオチド配列である。

20

**【 0 1 0 9 】**

SEQ ID NO : 66は、*S. meliloti*のFGEオルソログ (SEQ ID NO : 65) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

30

**【 0 1 1 0 】**

SEQ ID NO : 67は、マイクロシラ属 (*Microscilla* sp.) のFGEオルソログ (GenBank GI : 14518334) のヌクレオチド配列である。

**【 0 1 1 1 】**

SEQ ID NO : 68は、マイクロシラ属 (*Microscilla* sp.) のFGEオルソログ (SEQ ID NO : 67) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 1 1 2 】**

SEQ ID NO : 69は、*P. putida* KT2440株のFGEオルソログ (GenBank GI : 26990068) のヌクレオチド配列である。

**【 0 1 1 3 】**

SEQ ID NO : 70は、*P. putida* KT2440株のFGEオルソログ (SEQ ID NO : 69) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

40

**【 0 1 1 4 】**

SEQ ID NO : 71は、*R. metallidurans*のFGEオルソログ (GenBank GI : 22975289) のヌクレオチド配列である。

**【 0 1 1 5 】**

SEQ ID NO : 72は、*R. metallidurans*のFGEオルソログ (SEQ ID NO : 71) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 1 1 6 】**

SEQ ID NO : 73は、*P. marinus*のFGEオルソログ (GenBank GI : 23132010) のヌクレオチ

50

ド配列である。

【 0 1 1 7 】

SEQ ID NO : 74は、*P. marinus*のFGEオルソログ（SEQ ID NO : 73）の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

【 0 1 1 8 】

SEQ ID NO : 75は、*C. crescentus* CB15株のFGEオルソログ（GenBank GI : 16125425）のヌクレオチド配列である。

【 0 1 1 9 】

SEQ ID NO : 76は、*C. crescentus* CB15株のFGEオルソログ（SEQ ID NO : 75）の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。 10

【 0 1 2 0 】

SEQ ID NO : 77は、結核菌 (*M. tuberculosis*) Ht37Rv株のFGEオルソログ（GenBank GI : 15607852）のヌクレオチド配列である。

【 0 1 2 1 】

SEQ ID NO : 78は、結核菌Ht37Rv株のFGEオルソログ（SEQ ID NO : 77）の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

【 0 1 2 2 】

SEQ ID NO : 79は、FGEオルソログおよびパラログのサブドメイン3上に存在する高度に保存されたヘプタペプチドである。

【 0 1 2 3 】

SEQ ID NO : 80は、GenBank Acc. No. : CA379852を有するFGEオルソログEST断片のヌクレオチド配列である。 20

【 0 1 2 4 】

SEQ ID NO : 81は、GenBank Acc. No. : A1721440を有するFGEオルソログEST断片のヌクレオチド配列である。

【 0 1 2 5 】

SEQ ID NO : 82は、GenBank Acc. No. : BJ505402を有するFGEオルソログEST断片のヌクレオチド配列である。

【 0 1 2 6 】

SEQ ID NO : 83は、GenBank Acc. No. : BJ054666を有するFGEオルソログEST断片のヌクレオチド配列である。 30

【 0 1 2 7 】

SEQ ID NO : 84は、GenBank Acc. No. : AL892419を有するFGEオルソログEST断片のヌクレオチド配列である。

【 0 1 2 8 】

SEQ ID NO : 85は、GenBank Acc. No. : CA064079を有するFGEオルソログEST断片のヌクレオチド配列である。

【 0 1 2 9 】

SEQ ID NO : 86は、GenBank Acc. No. : BF189614を有するFGEオルソログEST断片のヌクレオチド配列である。 40

【 0 1 3 0 】

SEQ ID NO : 87は、GenBank Acc. No. : AV609121を有するFGEオルソログEST断片のヌクレオチド配列である。

【 0 1 3 1 】

SEQ ID NO : 88は、HSulf-3 cDNAのヌクレオチド配列である。

【 0 1 3 2 】

SEQ ID NO : 89は、HSulf-3 cDNA ( SEQ ID NO : 88 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

【 0 1 3 3 】

SEQ ID NO : 90は、HSulf-4 cDNAのヌクレオチド配列である。 50

**【 0 1 3 4 】**

SEQ ID NO : 91は、HSulf-4 cDNA ( SEQ ID NO : 90 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 1 3 5 】**

SEQ ID NO : 92は、HSulf-5 cDNAのヌクレオチド配列である。

**【 0 1 3 6 】**

SEQ ID NO : 93は、HSulf-5 cDNA ( SEQ ID NO : 92 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 1 3 7 】**

SEQ ID NO : 94は、HSulf-6 cDNAのヌクレオチド配列である。

10

**【 0 1 3 8 】**

SEQ ID NO : 95は、HSulf-6 cDNA ( SEQ ID NO : 94 ) の翻訳産物の予想されるアミノ酸配列である。

**【 0 1 3 9 】****発明の詳細な説明**

本発明は、スルファターゼの機能：すなわちLC -ホルミルグリシン（別名、FGlyおよび/または2-アミノ-3-オキソプロパン酸）の形成のために必須である、スルファターゼ上で起こる特有の翻訳後修飾の原因となる酵素であるホルミルグリシン生成酵素（FGE）の発見を含む。予想外のことには、FGE遺伝子の変異は、対象における多重スルファターゼ欠損症（MSD）の発症につながることが見いだされた。同じく予想外のことには、FGEが、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6、ならびに米国仮特許出願・公開番号第20030073118号、第20030147875号、第20030148920号、第20030162279号および第20030166283号（これらの内容は本明細書に明示的に組み入れられる）に記載されたスルファターゼを非制限的に含むスルファターゼの活性を高めうることも見いだされた。これらの発見に鑑みると、本発明の分子は、多重スルファターゼ欠損症およびその他のスルファターゼ欠損症の診断および治療に用いることができる。

20

**【 0 1 4 0 】**

多重スルファターゼ欠損症の診断に用いるための方法を提供する。

**【 0 1 4 1 】**

さらに、スルファターゼ上でFGly形成を調節することを目的としてこれらの分子をインピボまたはインピトロで用いるための方法、このような修飾と関連性のある状態を治療するための方法、ならびに多重スルファターゼ欠損症およびその他のスルファターゼ欠損症の治療のための治療用製剤の調製において有用な組成物も提供される。

**【 0 1 4 2 】**

本発明はしたがって、いくつかの局面において、スルファターゼ上でFGly形成を調節するポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする単離された核酸、前記物の機能的改变物およびバリエント、前記物の有用な断片、ならびにそれらに関連した治療薬および診断薬、研究方法、組成物およびツールを含む。

30

**【 0 1 4 3 】**

「C -ホルミルグリシン生成活性」とは、基質上にFGlyを形成させる、またはその形成を増強する、分子の能力のことのことを指す。基質は、本明細書中の別の箇所に述べたようなスルファターゼであってもよく、または合成オリゴペプチドであってもよい（例えば、SEQ ID NO : 33および実施例を参照）。基質は、SEQ ID NO : 32の保存されたヘキサペプチド [ L/V-C(S)-X-P-S-R ] を含むことが好ましい。FGly形成をアッセイするための方法は、当技術分野（例えば、Dierks, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1997, 94: 11963-11968を参照）および本明細書中の別の箇所（例えば、実施例を参照）において

40

50

て記載されている。本明細書で用いる「分子」には、「核酸」および「ポリペプチド」の両方が含まれる。FGE分子は、インビトロおよびインビトロの両方で、FGlyを形成させること、または形成を増強/増加させることができる。

#### 【0144】

C -ホルミルグリシン生成活性を「増強（または増加）させること」とは、本明細書で用いる場合、一般に、FGEおよび/またはそのコードされるポリペプチドの発現亢進のことを指す。発現亢進とは、本発明の核酸のいずれか（本明細書中の別の箇所に述べたようなFGE核酸）の複製、転写および/または翻訳を増加させること（すなわち、検出可能な程度まで）を指すが、その理由は、これらの任意のもののアップレギュレーションが、その遺伝子（核酸）によってコードされるポリペプチドの濃縮/量の増加をもたらすためである。  
10 また、C -ホルミルグリシン生成活性を増強（または増加）させることは、例えば、対照と比較してFGE分子のt<sub>1/2</sub>（半減期）の延長または安定化をもたらす、FGEの分解（例えば、ユビキチン化の増加を介する）、ダウンレギュレーションなどのことも指す。ダウンレギュレーションまたは発現低下とは、遺伝子および/またはそれによってコードされるポリペプチドの発現低下のことを指す。遺伝子発現のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションは、対照と比較した、遺伝子（例えば、FGE）のmRNAのレベル、またはその遺伝子によってコードされるポリペプチドのタンパク質発現のレベルの上昇または低下を、当技術分野で知られた任意の適した手段、例えば、それぞれ核酸ハイブリダイゼーションまたは抗体検出法などを用いて検出することによって直接判定することができる。  
20 また、FGE遺伝子発現のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを、C -ホルミルグリシン生成活性の変化を検出することによって間接的に判定することもできる。

#### 【0145】

「発現」とは、本明細書で用いる場合、核酸および/またはポリペプチドの発現、ならびにポリペプチド分子の活性（例えば、分子のC -ホルミルグリシン生成活性）のことを指す。

#### 【0146】

本発明の1つの局面は、FGEをコードするcDNAのクローニングを含む。本発明によるFGEは、SEQ ID NO:1の核酸分子を含む単離された核酸分子であり、C -ホルミルグリシン生成活性を有するポリペプチドをコードする。ヒトFGE cDNAの配列はSEQ ID NO:1として提示されており、このcDNAによってコードされるタンパク質産物の予想されるアミノ酸配列はSEQ ID NO:2として提示されている。  
30

#### 【0147】

本明細書で用いる場合、対象は哺乳動物または非ヒト哺乳動物である。すべての態様において、ヒトFGEおよびヒト対象が好ましい。

#### 【0148】

本発明はしたがって、1つの局面において、単離されたFGEポリペプチド、このポリペプチドをコードするcDNA、前記物の機能的改变物およびバリエント、前記物の有用な断片、ならびにそれらに関連した診断薬および治療薬を含む。

#### 【0149】

核酸に関して本明細書で用いる場合、「単離された」という用語は：(i) 例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、インビトロで増幅された；(ii) クローニングにより組換え的に作製された；(iii) 切断およびゲル分離などによって精製された；または(iv) 例えば化学合成によって合成されたことを意味する。単離された核酸とは、当技術分野で周知の組換えDNA技術によって容易に操作されるもののことである。したがって、5'および3'制限部位が既知である、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマー配列が開示されている、ベクター中に含まれるヌクレオチド配列は、単離されていると判断されるが、その天然の宿主内にその天然の状態で存在する核酸配列はそうでない。単離された核酸は、実質的に精製されていてもよいが、そうである必要はない。例えば、クローニングベクターまたは発現ベクターの内部に単離されている核酸は、それが存在する細胞内の  
40  
50

物質のごくわずかな割合を占めるに過ぎないと思われるため、純粋ではない。しかし、このような核酸は、それが当業者に知られた標準的な技法によって容易に操作されるため、本明細書でこの用語を用いる場合、単離されている。

#### 【0150】

ポリペプチドに関して本明細書で用いる場合、「単離された」という用語は、それが、本発明の目的のいずれかに対して操作または利用しうるような十分に純粋な形態で、その天然の環境から分離されていることを意味する。したがって、単離されたとは、(i)抗体の產生および/または単離のため、(ii)アッセイにおける試薬として、(iii)シーカエンシングのため、(iv)治療薬として、などに用いられるように十分に純粋であることを意味する。

10

#### 【0151】

本発明によれば、C - ホルミルグリシン生成活性を有するFGEポリペプチドをコードする単離された核酸分子には以下のものが含まれる：(a) SEQ ID NO : 1の核酸からなる分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつC - ホルミルグリシン生成活性を有するFGEポリペプチドをコードする、核酸分子、(b) C - ホルミルグリシン生成活性を有する各々のFGEポリペプチドをコードする、(a)の欠失物、付加物および置換物、(c) 遺伝暗号の縮重性のために(a)または(b)の核酸分子とはコドン配列が異なる核酸分子、ならびに(d) (a)、(b)または(c)の相補物。「相補物」には、本明細書で用いる場合、(a)、(b)または(c)の「完全長相補鎖または100%相補鎖」が含まれる。

#### 【0152】

20

C - ホルミルグリシン生成活性と同じく有する、本発明のFGE核酸のホモログおよびアレルも本発明に含まれる。ホモログには、本明細書で述べる場合、本明細書中の別の箇所に特定されている分子（例えば、SEQ ID NO : 4、5、45～78および80～87）、すなわちオルソログおよびパラログが含まれる。それ以外のホモログは、本発明の教示に従って、さらには従来の技法により、同定することができる。本明細書に記載のFGEホモログはすべて、共通のC - ホルミルグリシン生成活性を有するため、本発明のすべての局面において、それらをヒトFGE分子と互換的に用いることができる。

#### 【0153】

したがって、本発明の1つの局面は、FGEポリペプチドをコードし、かつSEQ ID NO : 1のコード領域からなる核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするような核酸配列である。1つの重要な態様において、「ストリンジェントな条件下」という用語は、本明細書で用いる場合、当技術分野でよく知られたパラメーターのことを指す。核酸を用いる場合、ハイブリダイゼーション条件は、低イオン強度、およびDNAハイブリッド複合体の融解温度( $T_m$ )をわずかに下回る温度（典型的には、ハイブリッドの $T_m$ よりも約3低い）という条件下において、一般にストリンジェントであると言われる。ストリンジェンシーが高いほど、プローブ配列と標的との間の相関がより特異的になる。核酸のハイブリダイゼーションに用いられるストリンジェントな条件は当技術分野で周知であり、この種の方法をまとめた参考文献、例えば、「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning : A Laboratory Manual)」、J. Sainbrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989、または「分子生物学における最新プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」、F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに記載されている。「ストリンジェントな条件」の一例は、65の、 $6 \times$  SSC中でのハイブリダイゼーションである。ストリンジェントな条件のもう1つの例は、65の、 $3.5 \times$  SSC、0.02% Ficoll、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン、2.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH7]、0.5% SDS、2mM EDTAからなるハイブリダイゼーション緩衝液中でのハイブリダイゼーションである (SSCは0.15M塩化ナトリウム/0.15Mクエン酸ナトリウム、pH7である；SDSはドデシル硫酸ナトリウムである；EDTAはエチレンジアミン四酢酸である)。ハイブリダイゼーションの後に、DNAを移行させた膜を $2 \times$  SSCにて室温で洗浄し、その後に0.1× SSC/0.1× SDSにて最高68までの温度で洗浄する。さらにもう1つの例では、水性ハイブリダイ

30

40

50

ゼーション溶液を用いる代わりに、ホルムアミドハイブリダイゼーション溶液を用いる。すなわち、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件を、例えば、50%ホルムアミド 溶液および42<sup>10</sup> を用いることによって得ることができる。用いることができ、同程度のストリンジエンシーが得られると考えられる、他の条件、試薬などもある。当業者はこのような条件をよく知っていると考えられるため、本明細書ではそれらを提示しない。しかし、当業者が、本発明のFGE核酸のホモログおよびアレルの明確な同定が可能となるような様式で条件を操作しうることは理解されているであろう。当業者はまた、このような分子の発現のために細胞およびライブラリーをスクリーニングした上で、それらをルーチン的に単離し、その後に該当する核酸分子の単離およびシークエンシングを行うための方法も周知している。

#### 【 0 1 5 4 】

一般に、ホモログおよびアレルは、SEQ ID NO : 1およびSEQ ID NO : 2に対して、典型的には、それぞれ少なくとも40%のヌクレオチド同一性および/または少なくとも50%のアミノ酸同一性を有すると考えられ、場合によっては、少なくとも50%のヌクレオチド同一性および/または少なくとも65%のアミノ酸同一性を有すると考えられ、さらに別の場合には、少なくとも60%のヌクレオチド同一性および/または少なくとも75%のアミノ酸同一性を有すると考えられる。さらに別の場合には、ホモログおよびアレルは、SEQ ID NO : 1およびSEQ ID NO : 2に対して、典型的にはそれぞれ、少なくとも90%、95%もしくはさらには99%のヌクレオチド同一性、および/または少なくとも95%、98%またはさらには99%のアミノ酸同一性を有すると考えられる。相同性は、NCBI ( Bethesda, Maryland ) によって開発された、さまざまな公開ソフトウェアツールによって算出することができる。ツールの例には、Altschul SF, et al., のヒューリスティックアルゴリズム ( J Mol Biol, 1990, 215: 403-410 ) が含まれ、これはBLASTとしても知られる。ペアワイズアラインメントおよびClustalWアラインメント ( BLOSUM30行列の設定 ) ならびにKyte-Doolittle のヒドロパシー分析を、公開されているもの ( EMIBL, Heidelberg, Germany ) および商用のもの ( 例えば、Oxford Molecular Group/genetics Computer Group, Madison, WI のMacVector配列解析ソフトウェア ) を用いて行うこともできる。前述の核酸のWatson-Crick相補物も本発明に含まれる。

#### 【 0 1 5 5 】

FGEのホモログおよびアレルといったFGE関連遺伝子のスクリーニングにおいては、前述の条件を放射性プローブとともに用いて、サザンプロット法を行うことができる。DNAを最終的に移行させた膜を洗浄した後に、放射性シグナルを検出するために、膜をX線フィルムまたはホスホイメージープレート ( phosphoimager plate ) に向けて配置することができる。

#### 【 0 1 5 6 】

完全長ヒトFGE cDNAクローンに関する本明細書中の開示が与えられれば、ヒトFGE遺伝子に対応するマウスcDNAクローンといったその他の哺乳動物配列を、標準的なコロニーハイブリダイゼーション法を用いて、cDNAライブラリーから単離することができる。

#### 【 0 1 5 7 】

本発明はまた、天然の物質に存在するものに代わるコドンを含む縮重核酸も含む。例えば、セリン残基は、コドンTCA、AGT、TCC、TCG、TCTおよびAGCによってコードされる。したがって、セリンをコードするヌクレオチドトリプレットの任意のものを、インビトロまたはインビボで、伸長中のFGEポリペプチドにセリン残基が組み入れられるようにタンパク質合成装置を導くために用いすることは、当業者には明らかであると考えられる。同様に、他のアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列トリプレットには、以下のものが非制限的に含まれる：CCA、CCC、CCGおよびCCT ( プロリンのコドン ) ; CGA、CGC、CGG、CGT 、 AGAおよびAGG ( アルギニンのコドン ) ; ACA、ACC、ACGおよびACT ( トレオニンのコドン ) ; AACおよびAAT ( アスパラギンのコドン ) ; ならびにATA、ATCおよびATT ( イソロイシンのコドン ) 。その他のアミノ酸残基も、同様に多数のヌクレオチド配列によってコードされうる。したがって、本発明は、コドン配列遺伝暗号の縮重のために、生物的に単離さ

10

20

30

40

50

れた核酸とはコドン配列が異なる縮重核酸も含む。

【0158】

本発明はまた、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:3の単離された固有断片、またはそれらの相補物も提供する。固有断片とは、より大規模な核酸の「特徴的目印(signature)」であるもののことである。例えば、固有断片は、その厳密な配列が、以上に定義したFGE核酸(およびヒトアレル)以外には、ヒトゲノム内部の分子に見いだされないことを保証するのに十分な長さである。当業者は、ルーチンの範囲を超えない手順を用いて、断片がヒトゲノム内部に固有であるか否かを判定することができる。しかし、SEQ ID NO:4、および/または本出願の提出日の時点ですでに公開されているその他の配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列から完全に構成される断片は、固有断片から除外される。

10

【0159】

前述のGenBank寄託物に記載された配列から完全に構成される断片は、本発明の配列に固有のヌクレオチドのいずれをも含まないものである。したがって、本発明による固有断片は、GenBank寄託物またはそれらの断片におけるものの正確な配列以外のヌクレオチド配列を含まなければならない。違いがGenBank配列に対する付加、欠失もしくは置換であってもよく、またはそれがGenBank配列とは全く別個の配列であってもよい。

【0160】

固有断片は、このような核酸を同定するためのサザンプロットアッセイおよびノーザンプロットアッセイにおけるプローブとして用いることができ、またはPCRを用いるものなどの増幅アッセイに用いることもできる。当業者には知られているように、サザンプロット法およびノーザンプロット法などのある種の用途には、200、250、300ヌクレオチドまたはそれ以上といった長いプローブが好ましいが、PCRなどの用途にはより短い断片が好ましいと考えられる。また、固有断片を、実施例の項に示されているように、抗体の產生もしくはポリペプチド断片の結合の判定のため、またはイムノアッセイの構成要素の作製のために、融合タンパク質を作製する目的で用いることもできる。同じく、固有断片を、例えば抗体の調製、イムノアッセイまたは治療応用において有用な、FGEポリペプチドの非融合断片を作製するために用いることもできる。固有断片をさらに、FGE核酸およびポリペプチドのそれぞれの発現を抑制するためのアンチセンス分子として用いることもできる。

20

【0161】

当業者に認識されているように、固有断片のサイズは、その遺伝暗号の保存性に依存すると考えられる。すなわち、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:3のいくつかの領域および相補物は、固有であるために比較的長いセグメントを要すると考えられるが、一方、また別のものは、短いセグメント、典型的には12~32ヌクレオチド長(例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31および32塩基)しか要しないか、または開示された配列の最大で全長に至るより多くを必要とすると考えられる。上述したように、本開示は、各配列に関する第1ヌクレオチド、第2ヌクレオチドなど(末端の手前の8ヌクレオチドまでの)で始まって、ヌクレオチド番号8、9、10など以後の任意の箇所(最後のヌクレオチドまでの)で終わる、各配列のそれぞれおよびすべての断片を含むことを意図している(ただし、配列が上記のように固有であることを条件とする)。長さが20ヌクレオチドまたはそれ以上である、ヌクレオチド1に始まってヌクレオチド1180で終わるSEQ ID NO:1、またはヌクレオチド1で始まってヌクレオチド1122で終わるSEQ ID NO:3、またはそれらの相補物の領域の事実上あらゆるセグメントが固有であると考えられる。当業者は、固有断片が目的の配列を断片のヒトゲノム中の他の配列と選択的に区別する能力に一般に基づく、この種の配列を選択するための方法に非常に習熟しており、これは一般的には既知のデータベース上にあるものに対するもので十分であるが、インピットロの確認用ハイブリダイゼーションおよびシーケンシング分析を行うこともできる。

40

【0162】

上述したように、本発明は、FGEポリペプチドをコードする核酸分子と選択的に結合し

50

て、FGE活性を低下させる、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

#### 【0163】

本明細書で用いる場合、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」または「アンチセンス」という用語は、特定の遺伝子を含むDNAまたはその遺伝子のmRNA転写物と生理的条件下でハイブリダイズし、それによってその遺伝子の転写および/またはそのmRNAの翻訳を阻害する、オリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチド、修飾オリゴリボヌクレオチドまたは修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドについて述べている。アンチセンス分子は、標的遺伝子または転写物とのハイブリダイゼーションによって標的遺伝子の転写または翻訳を妨げるように設計される。当業者は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの厳密な長さおよびその標的に対する相補性の程度は、標的の配列およびその配列を構成する特定の塩基を含め、選択した個々の標的に依存すると考えられることを認識しているであろう。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、生理的条件下で標的と選択的に結合するように、すなわち生理的条件下で標的細胞中の任意の他の配列よりも標的配列に対して実質的により高度にハイブリダイズするように、構築および配列化することが好ましい。SEQ ID NO:1に基づき、または対立遺伝子的もしくは相同なゲノム配列および/またはcDNA配列に基づき、当業者は、本発明に従って用いるために、さまざまな適したアンチセンス分子の任意のものを容易に選択して合成することができる。阻害のための十分な選択性および効力を有するためには、このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的に対して相補的である少なくとも10個、より好ましくは少なくとも15個の連続した塩基を含むべきであるが、場合によっては、7塩基長という短さの修飾オリゴヌクレオチドがアンチセンスオリゴヌクレオチドとして首尾良く用いられている (Wagner et al., Nat. Med., 1995, 1(11): 1116-1118; Nat. Biotech., 1996, 14: 840-844)。最も好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは20~30塩基の相補配列を含む。遺伝子またはmRNA転写物の任意の領域に対してアンチセンス性であるオリゴヌクレオチドを選択してよいが、好ましい態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、翻訳開始部位、転写開始部位またはプロモーター部位といったN末端部位または5'上流部位に対応する。さらに、3'非翻訳領域をアンチセンスオリゴヌクレオチドによる標的とすることができる。mRNAスプライシング部位に対するターゲティングも当技術分野で用いられているが、選択的mRNAスプライシングが起こるならば好ましさが落ちる可能性がある。さらに、アンチセンスは、mRNA二次構造が想定されない部位 (例えば、Sainio et al., Cell Mol. Neurobiol. 14(5): 439-457, 1994を参照) およびタンパク質が結合しないと想定される部位を標的とすることが好ましい。なお、SEQ ID No:1はcDNA配列を開示しているものの、当業者はこの配列に対応するゲノムDNAを容易に導き出すことができる。したがって、本発明はまた、SEQ ID NO:1に対応するゲノムDNAに対して相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドも提供する。同様に、対立遺伝子的または相同なFGE cDNAおよびゲノムDNAに対するアンチセンスも、必要以上の実験手順を用いずに実現することができる。

#### 【0164】

一連の本態様において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、「天然の」デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはそれらの任意の組み合わせから構成されていてもよい。すなわち、一方の天然ヌクレオチドの5'末端およびもう一方の天然ヌクレオチドの3'末端を、ホスホジエステルヌクレオシド間結合を介して、天然の系と同じように共有結合させることができる。これらのオリゴヌクレオチドは、当技術分野で認知されている方法によって調製することができ、これは手作業で、または自動合成装置によって行うことができる。それらをベクターによって組換え的に作製することもできる。

#### 【0165】

しかし、好ましい態様において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドには「修飾」オリゴヌクレオチドも含まれうる。すなわち、オリゴヌクレオチドを、それらが標的とハイブリダイズするのを妨げずに、それらの安定性もしくは標的指向性を高める、または別の様式でそれらの治療的有効性を高めるような、さまざまなやり方で修飾することができる。

10

20

30

40

50

## 【0166】

本明細書で用いる場合、「修飾オリゴヌクレオチド」という用語は、(1)そのヌクレオチドの少なくとも2つが、合成的なヌクレオシド間結合(すなわち、一方のヌクレオチドの5'末端ともう一方のヌクレオチドの3'末端とのホスホジエステル結合以外の結合)を介して共有結合している、および/または(2)核酸に通常付随しない化学基がオリゴヌクレオチドに対して共有結合している、というオリゴヌクレオチドについて述べている。好みしい合成的なヌクレオシド間結合には、ホスホロチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロジチオエート、リン酸エステル、アルキルホスホチオエート、ホスホルアミダイト、カルバメート、カーボネート、リン酸トリエステル、アセトアミダイト、カルボキシメチルエステルおよびペプチドがある。

10

## 【0167】

「修飾オリゴヌクレオチド」という用語には、共有結合性に修飾された塩基および/または糖を有するオリゴヌクレオチドも含まれる。例えば、修飾オリゴヌクレオチドには、3'位のヒドロキシル基および5'位のリン酸基以外の低分子量有機基と共有結合した糖骨格を有するオリゴヌクレオチドが含まれる。このため、修飾オリゴヌクレオチドには2'-O-アルキル化リボース基が含まれる。さらに、修飾オリゴヌクレオチドは、リボースの代わりにアラビノースなどの糖を含んでもよい。本発明はしたがって、FGEポリペプチドをコードする核酸に対して相補的であって生理的条件下でハイブリダイズ可能である修飾アンチセンス分子を、薬学的に許容される担体とともに含む医薬製剤も想定している。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、薬学的組成物の一部として投与してもよい。このような薬学的組成物には、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、当技術分野で知られた任意の標準的な生理的および/または薬学的に許容される担体と組み合わせたものが含まれる。組成物は、無菌であり、かつ、患者に対する投与に適した重量または容積の単位中にアンチセンスオリゴヌクレオチドの治療的有効量を含むべきである。「薬学的に許容される」とは、有効成分の生物活性の有効性を妨げない非毒性材料のことを指す。「生理的に許容される」とは、細胞、細胞培養物、組織または生物体といった生体系との適合性がある非毒性材料のことを指す。担体の特性は投与の経路に依存すると考えられる。生理的および薬学的に許容される担体には、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤、および当技術分野で周知のその他の材料が含まれる。

20

## 【0168】

30

本発明はまた、細胞におけるC-ホルミルグリシン生成活性を高めるための方法も含む。重要な態様において、これはベクター(「発現ベクター」および/または「ターゲティングベクター」)の使用によって実現される。

## 【0169】

「ベクター」は、本明細書で用いる場合、異なる環境間での輸送のため、または宿主細胞における発現のために、制限および連結によってその内部に所望の配列を挿入しうるさまざまな核酸のうち任意のものでよい。ベクターは一般にDNAから構成されるが、RNAベクターも入手可能である。ベクターには、プラスミド、ファージミドおよびウイルスゲノムが非制限的に含まれる。クローニングベクターとは宿主細胞内での複製が可能なもののことであり、これはさらに、新たな組換えベクターが宿主細胞内で複製する能力を保つように、ベクターを決定可能な様式で切断し、そこに所望のDNA配列を連結することが可能なもの、1つまたは複数のエンドヌクレアーゼ制限部位によって特徴づけられる。プラスミドの場合には、所望の配列の複製は宿主菌におけるプラスミドのコピー数の増加に伴って何度も起こることもあり、または宿主が有糸分裂によって複製する前に宿主当たり1回しか起こらないこともある。ファージの場合には、複製が溶解期には能動的に起こり、または溶原化期には受動的に起こると考えられる。「発現ベクター」とは、調節配列と機能的に結合させ、RNA転写物として発現されるように、制限および連結によってその内部に所望のDNA配列(例えば、SEQ ID NO:3のFGE cDNA)を挿入しうるもののことである。ベクターはさらに、ベクターによる形質転換またはトランスフェクションを受けた細胞または受けていない細胞の同定に用いるのに適した、1つまたは複数のマーカー配列を含んでもよい。

40

50

マークーには、例えば、抗生素質または他の化合物に対する耐性または感受性のいずれかを上昇または低下させるタンパク質をコードする遺伝子、当技術分野で知られた標準的なアッセイによって活性を検出しうる酵素（例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）をコードする遺伝子、および形質転換またはトランスフェクションを受けた細胞、宿主、コロニーまたはブラークの表現型に視覚的な影響を及ぼす遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質）が含まれる。

#### 【0170】

「ターゲティングベクター」とは、例えば、調節配列を、内因性遺伝子の内部（例えば、エクソンおよび/またはイントロンの内部）、内因性遺伝子プロモーター配列の内部または内因性遺伝子のプロモーター配列の上流に挿入するために用いられる、標的指向性のある構築物/配列を一般に含むもののことである。もう1つの例において、ターゲティングベクターは、目的の遺伝子（例えば、SEQ ID NO:1のcDNAによってコードされるもの）、および、その遺伝子をゲノム中の好ましい場所（例えば、転写活性のある場所、例えば関連のない遺伝子の内因性プロモーターの下流）にターゲティングさせるために必要なその他の配列を含みうる。ターゲティング構築物およびベクターの構築は、米国特許第5,641,670号および第6,270,989号に詳細に記載されており、これらは参照として本明細書に明示的に組み入れられる。

#### 【0171】

異種DNAまたはRNAによる形質転換が可能であって、培養下で増殖および維持することが可能な、事実上あらゆる細胞（原核細胞または真核細胞）を、本発明の実施に用いることができる。その例には、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞、およびヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ、靈長動物などの哺乳動物細胞が含まれる。それらは初代細胞株または二次細胞株（培養下での平均集団倍加回数が有限であり、不死化していない）でもよく、不死化細胞株（見かけ上、培養下での寿命が無限である）でもよい。初代細胞および二次細胞には、例えば、線維芽細胞、ケラチノサイト、上皮細胞（例えば、乳腺上皮細胞、腸上皮細胞）、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液の構成要素（例えば、リンパ球、骨髓細胞）、筋細胞、およびこれらの体細胞種の前駆細胞（胚性幹細胞を含む）が含まれる。細胞を遺伝子治療に用いる場合には、初代細胞を、操作した細胞が投与される個体から入手することが好ましい。しかし、初代細胞を、同じ種のドナー（レシピエント以外）から入手することもできる。本発明のDNA構築物および方法に用いうる不死化ヒト細胞株の例には、以下のものが非制限的に含まれる：HT-1080細胞（ATCC CCL 121）、HeLa細胞およびHeLa細胞の派生物（ATCC CCL 2、2.1および2.2）、MCF-7乳癌細胞（ATCC BTH 22）、K-562白血病細胞（ATCC CCL 243）、KB癌細胞（ATCC CCL 17）、2780AD卵巣癌細胞（Van der Buck, A. M. et al., Cancer Res, 48: 5927-5932 (1988)、Raji細胞（ATCC CCL 86）、WiDr結腸腺癌細胞（ATCC CCL 218）、SW620結腸腺癌細胞（ATCC CCL 227）、Jurkat細胞（ATCC TIB 152）、Namalwa細胞（ATCC CRL1432）、HL-60細胞（ATCC CCL 240）、Daudi細胞（ATCC CCL 213）、RPMI 8226細胞（ATCC CCL 155）、U937細胞（ATCC CRL 1593）、Bowes黒色腫細胞（ATCC CRL 9607）、WI-38VA13亜系統2R4細胞（ATCC CLL 75.1）およびMOLT-4細胞（ATCC CRL 1582）、CHO細胞およびCOS細胞、ならびにヒト細胞と別の種の細胞との融合によって作製されたヘテロハイブリドーマ細胞。WI-38（ATCC CCL 75）およびMRC-5（ATCC CCL 171）などの二次ヒト線維芽細胞株を用いることもできる。本発明の方法の実施に用いうる細胞のタイプに関するそれ以上の詳細は、米国特許第5,641,670号および第6,270,989号に記載されている。細胞の代わりに無細胞転写系を用いることもできる。

#### 【0172】

本発明の細胞は、当技術分野で知られているような、FGEタンパク質またはその機能的断片の発現をもたらす条件下で維持される。記載した方法を用いて発現されたタンパク質を、細胞可溶化物または細胞上清から精製してもよい。本方法に従って作製されたタンパク質は、薬学的に有用な製剤として調製し、当技術分野で知られているような従来の薬学的経路（例えば、経口的、静脈内、筋肉内、鼻腔内、気管内または皮下）により、ヒトま

10

20

30

40

50

たは非ヒト動物に対して送達することができる。本明細書中の別の箇所に述べるように、組換え細胞は不死化された初代細胞または二次細胞であってよく、これは好ましくはヒトのものである。生産された非ヒトFGEが治療的に有用であるようなタンパク質生産の目的にとって非ヒト細胞が有利である場合には、他の種由来の細胞が望ましいと考えられる。

#### 【0173】

本明細書で用いる場合、コード配列および調節配列は、それらが、コード配列の発現または転写が調節配列の影響または制御の下に置かれるように共有結合している場合には、「機能的に」結合していると言われる。コード配列が機能的タンパク質へと翻訳されることが望ましい場合には、2つのDNA配列は、5'調節配列におけるプロモーターの誘導がコード配列の転写をもたらすならば、および、2つのDNA配列化の結合の性質が(1)フレームシフト変異の導入を引き起こさない、(2)プロモーター領域がコード配列の転写を指令する能力を妨げない、かつ(3)対応するRNA転写物がタンパク質へと翻訳される能力を妨げないならば、機能的に結合していると言われる。したがって、プロモーター領域は、プロモーター領域が、結果的に生じる転写物が所望のタンパク質またはポリペプチドへと翻訳されるようにDNA配列の転写を生じさせることができると考えられる。

10

#### 【0174】

遺伝子発現のために必要とされる調節配列の厳密な性質は、種または細胞種によって異なると考えられるが、一般的には、必要に応じて、それぞれ転写および翻訳の開始にかかる5'非転写配列および5'非翻訳配列（例えば、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列など）を含むであろう。詳細には、このような5'非転写調節配列は、機能的に結合した遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含むと考えられる。調節配列はまた、エンハンサー配列または上流活性化配列も必要に応じて含むと考えられる。本発明のベクターは、選択的には、5'リーダー配列またはシグナル配列を含んでもよい。適切なベクターの選択および設計は、当業者の能力および裁量の範囲に含まれる。

20

#### 【0175】

発現のために必要な要素のすべてを含む発現ベクターが販売されており、当業者に知られている。例えば、Sambrook et al., 「分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning : A Laboratory Manual）」、Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照されたい。細胞は、FGEポリペプチドをコードする異種DNA（RNA）またはその断片もしくはバリエントを細胞に導入することにより、遺伝的に操作される。そのような異種DNA（RNA）は、宿主細胞における異種DNAの発現を可能にする転写エレメントの機能的制御下に置かれる。

30

#### 【0176】

哺乳動物細胞におけるmRNA発現のために好ましい系は、G418耐性を付与する遺伝子などの選択マーカー（安定的なトランスフェクションを受けた細胞系の選択を容易にする）およびヒトサイトメガロウイルス（CMV）エンハンサー-プロモーター配列を含む、pRc/CMV（Invitrogen, Carlsbad, CAより入手可能）などのものである。加えて、靈長動物およびイヌの細胞系における発現のために適したものにpCEP4ベクター（Invitrogen, Carlsbad, CA）があり、これはプラスミドのマルチコピー型染色体外エレメントとしての維持を容易にするエブスタインバーウイルス（EBV）の複製起点を含む。また別の発現ベクターにはpEF-BOSプラスミドがあり、これはインビトロでの転写を効率的に誘発するポリペプチド伸長因子1 のプロモーターを含む。このプラスミドは、Mishizuma and Nagata (Nuc. Acids Res. 18: 5322, 1990) によって記載されており、トランスフェクション実験におけるその使用は、例えば、Demoulin (Mol. Cell. Biol. 16: 4710-4716, 1996) によって開示されている。さらにもう1つの好ましい発現ベクターには、E1タンパク質およびE3タンパク質を欠損している、Stratford-Perricaudetによって記載されたアデノウイルスがある (J. Clin. Invest. 90: 626-630, 1992)。P1Aに対する免疫処置のためのマウスへの皮内注射における、アデノウイルスのAdeno.P1A組換え体としての使用は、Warnier et

40

50

al., によって開示されている (Int. J. Cancer, 67: 303-310, 1996)。

**【0177】**

本発明はまた、当業者が所望の発現ベクターまたはベクターを調製することを可能にする、いわゆる発現キットも包含する。このような発現キットは、以前に考察したコード配列のそれぞれの少なくとも別個な部分を含む。前述した配列（これらは必要である）が含まれる限り、必要に応じて、他の構成要素を加えてよい。

**【0178】**

また、本発明が、上記のFGE cDNA配列を含む発現ベクターを、原核細胞（例えば、大腸菌）または真核細胞（例えば、CHO細胞、COS細胞、酵母発現システム、および昆虫細胞における組換えバキュロウイルス発現）である宿主細胞および細胞株をトランスフェクトする目的に用いることを包含することも認識されていると考えられる。特に有用なものは、ヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ、靈長動物などの哺乳動物細胞である。それらは非常にさまざまな種類の組織からのものであってよく、これには本明細書中の別の箇所に述べたような初代細胞および不死化細胞株が含まれる。具体的な例には、HT-1080細胞、CHO細胞、樹状細胞、U293細胞、末梢血白血球、骨髄幹細胞、胚性幹細胞および昆虫細胞が含まれる。本発明はまた、細胞および動物におけるFGE遺伝子「ノックアウト体」の構築も可能にし、FGE活性のある特定の面を検討するための材料を提供する。

**【0179】**

本発明はまた、前述のFGE核酸によってコードされ、SEQ ID NO:2のポリペプチドおよびその固有断片を含む、単離されたポリペプチド（タンパク質全体および部分的タンパク質を含む）も提供する。このようなポリペプチドは、例えば、単独でまたは融合タンパク質の部分として、抗体の產生のため、イムノアッセイの成分として、等に有用である。ポリペプチドは組織または細胞ホモジネートを含む生物試料から単離することができるほか、発現系に適した発現ベクターを構築し、その発現ベクターを発現系に導入して、組換えるに発現されたタンパク質を単離することにより、種々の原核生物および真核生物発現系において組換えるに発現させることもできる。また、抗原性ペプチド（免疫認識のために細胞の表面にMHC分子によって提示されるものなど）を含む、短いポリペプチドを、十分に確立されたペプチド合成法を用いて化学的に合成することもできる。

**【0180】**

FGEポリペプチドの固有断片は、一般に、核酸に関連して上述した固有断片の特徴および特性を有する。

**【0181】**

FGEポリペプチドの固有断片は、一般に、核酸に関連して上述した固有断片の特徴および特性を有する。当業者には認識されているように、固有断片のサイズは、断片が保存されたタンパク質ドメインの一部分を構成するか否かといった要因に依存すると考えられる。このため、SEQ ID NO:2のいくつかの領域は、固有であるために比較的長いセグメントを要すると考えられるが、一方、また別のものは、短いセグメント、典型的には5~12アミノ酸（例えば、5、6、7、8、9、10、11および12アミノ酸長）、または、完全長である287アミノ酸長までの各整数を含む、より多くを必要とすると考えられる。

**【0182】**

ポリペプチドの固有断片は、ポリペプチドの特徴的な機能的能力を保っている断片であることが好ましい。ポリペプチドの固有断片において保たれる機能的能力には、抗体との相互作用、他のポリペプチドまたはそれらの断片との相互作用、他の分子との相互作用などが含まれる。重要な活性の一つは、ポリペプチドを同定するための特徴的目印として作用する能力である。当業者は、固有断片が目的の配列を非ファミリーメンバーと選択的に区別する能力に基づいて、固有のアミノ酸配列を選択するための方法に非常に習熟している。一般的には、断片の配列を既知のデータベース上にあるものと比較することで十分である。

**【0183】**

本発明は、上記のFGEポリペプチドのバリエントを含む。本明細書で用いる場合、FGEポ

10

20

30

40

50

リペプチドの「バリアント」とは、FGEポリペプチドの一次アミノ酸配列に対する1つまたは複数の改変を含むポリペプチドのことである。FGEポリペプチドのバリアントを作り出す改変は一般に、FGEポリペプチドをコードする核酸に対して行われ、これには、1) FGEポリペプチドの活性を低下もしくは消失させるため；2) 発現系におけるタンパク質の安定性もしくはタンパク質-リガンド結合の安定性といったFGEポリペプチドの性質を強化するため；3) 抗原性エピトープの付加もしくは検出可能部分の付加などのように、FGEポリペプチドに新規な活性もしくは性質を付与するため；または4) FGEポリペプチド受容体もしくはその他の分子に対して同等またはより良い結合性を得るための、欠失、点変異、切断、アミノ酸置換およびアミノ酸または非アミノ酸部分の付加が含まれる。または、切断、リンカー分子の付加、ビオチンなどの検出可能部分の付加、脂肪酸の付加などにより、改変をポリペプチドに直接加えることもできる。改変物には、FGEアミノ酸配列の全体または部分を含む融合タンパク質も含まれる。当業者は、タンパク質配列の変化がタンパク質コンフォメーションに及ぼす影響を予測するための方法を周知していると考えられ、このため、既知の方法に従ってバリアント型FGEポリペプチドを「設計する」ことができる。このような方法の一例は、Dahiyat and MayoによってScience 278 : 8287, 1997に記載されており、これによればタンパク質をデノボ合成することができる。本方法は、既知のタンパク質に対して、ポリペプチド配列の一部分のみを変化させるために適用することができる。Dahiyat and Mayoのコンピュータ計算法を適用することにより、FGEポリペプチドの個々のバリアントを提示し、そのバリアントが所望のコンフォメーションを保っているか否かを判定するために検討することができる。10  
20

#### 【0184】

バリアントには、その生理的活性には関係しないポリペプチドの特徴を変化させるために特に改変されたFGEポリペプチドが含まれる。例えば、望ましくないジスルフィド結合を防ぐために、システイン残基を置換または除去することができる。同様に、発現系におけるプロテアーゼによるタンパク質分解をなくすことによってFGEポリペプチドの発現を増強するために、ある種のアミノ酸を変更することもできる（例えば、KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母発現系における二塩基アミノ酸残基）。

#### 【0185】

FGEポリペプチドをコードする核酸の変異は、コード配列のアミノ酸リーディングフレームを保たせることができると同時に、バリアント型ポリペプチドの発現にとって有害な恐れのある、ヘアピンまたはループなどの二次構造とハイブリダイズする可能性の高い領域を核酸中に作り出さないことが好ましい。30

#### 【0186】

変異は、アミノ酸置換を選択することにより、またはポリペプチドをコードする核酸中の選択された部位のランダム変異誘発により作製することができる。続いて、バリアント型ポリペプチドを発現させ、どの変異がバリアント型ポリペプチドに所望の性質を付与するかを判定するために、1つまたは複数の活性に関して検査する。ポリペプチドのアミノ酸配列は変化させないが、特定の宿主における翻訳のために好ましいコドンが得られるような、またはmRNAの構造を変化させるような、さらなる変異を、例えば安定性および/もしくは発現を高めるために、バリアント（または非バリアント型FGEポリペプチド）に加えることができる。例えば大腸菌、哺乳動物細胞などにおける核酸の翻訳のために好ましいコドンは、当業者に周知である。ポリペプチドの発現を高めるために、さらに他の変異をFGE遺伝子またはcDNAクローンの非コード配列に加えることもできる。40

#### 【0187】

当業者は、前述のポリペプチドの機能的に等価なバリアント、すわなちFGEポリペプチドの機能的能力を保っているバリアントを得るために、FGEポリペプチドに保存的アミノ酸置換を加えることができることを理解していると考えられる。本明細書で用いる場合、「保存的アミノ酸置換」とは、ポリペプチドの三次構造および/または活性を著しくは変化させないアミノ酸置換のことを指す。バリアントは、ポリペプチド配列を改変するための当業者に知られた方法に従って調製することができ、これには、この種の方法をまとめ50

た参考文献、例えば、「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning : A Laboratory Manual)」、J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989、または「分子生物学における最新プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」、F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに記載されたものが含まれる。FGEポリペプチドの機能的に等価なバリアントの例には、SEQ D NO : 2の保存的アミノ酸置換物が含まれる。アミノ酸の保存的置換には、以下のグループ内部のアミノ酸間の置換が含まれる：(a) M、I、L、V；(b) F、Y、W；(c) K、R、H；(d) A、G；(e) S、T；(f) Q、N；および(g) E、D。

## 【0188】

10

したがって、FGEポリペプチドの機能的に等価なバリアント、すなわち天然のFGEポリペプチドの機能を保っているFGEポリペプチドのバリアントは、本発明によって想定されている。FGEポリペプチドの機能的に等価なバリアントを得るためにFGEポリペプチドのアミノ酸配列における保存的アミノ酸置換は、一般に、FGEポリペプチドをコードする核酸 (SEQ ID NO : 1, 3) の改変によって行われる。このような置換は、当業者に知られたさまざまな方法によって行うことができる。例えば、アミノ酸置換を、PCRにより導かれる変異、Kunkelの方法による部位指定変異誘発法 (Kunkel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 82: 488-492, 1985) またはFGEポリペプチドをコードする遺伝子の化学合成によって行うことができる。FGEポリペプチドの機能的に等価な断片の活性は、改変型FGEポリペプチドをコードする遺伝子を細菌発現ベクターまたは哺乳動物発現ベクター中にクローニングし、そのベクターを適した宿主細胞に導入して、改変型FGEポリペプチドを発現させ、本明細書に開示したようなFGEポリペプチドの機能的能力（例えば、Cホルミルグリシン生成活性など）に関して検査することによって調べることができる。

## 【0189】

20

本明細書に記載した本発明にはさまざまな用途があり、そのいくつかを本明細書の別の箇所に述べられている。第1に、本発明はFGEポリペプチドの単離を可能にする。当業者に周知のさまざまな方法を、単離されたFGE分子を入手するために利用することができる。ポリペプチドを、天然にポリペプチドを産生する細胞から、クロマトグラフィー手段または免疫学的認識によって精製してもよい。または、ポリペプチドの産生を引き起こすために発現ベクターを細胞に導入してもよい。また別の方法では、コードされるポリペプチドの産生を引き起こすために、mRNA転写物をマイクロインジェクションまたは別の様式で細胞に導入してもよい。網状赤血球溶解液系などの無細胞抽出物におけるFGE mRNAの翻訳を、FGEポリペプチドの生産のために用いてもよい。当業者はまた、FGEポリペプチドを単離するための既知の方法に従ってもよい。これらには、イムノクロマトグラフィー、HPLC、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよびイムノアフィニティークロマトグラフィーが非制限的に含まれる。

30

## 【0190】

本発明はまた、ある種の態様において、FGEポリペプチド由来の「ドミナントネガティブ」ポリペプチドも提供する。ドミナントネガティブポリペプチドは、タンパク質の不活性型バリアントであり、細胞機構と相互作用することによって、活性型タンパク質を細胞機構との相互作用から排除し、または活性型タンパク質と競合し、それによって活性型タンパク質の影響を低下させる。例えば、リガンドと結合するがリガンドとの結合に応じてシグナルを伝達することはしないドミナントネガティブ受容体は、リガンド発現の生物学的影響を低下させることができる。同じく、標的タンパク質とは正常に相互作用するが標的タンパク質をリン酸化しない、ドミナントネガティブ性で触媒活性のないキナーゼは、細胞シグナルに応答した標的タンパク質のリン酸化を低下させることができる。同様に、遺伝子の制御領域内のプロモーター部位と結合するが遺伝子転写を増加させないドミナントネガティブ転写因子は、転写を増加させずにプロモーター結合部位を占有することにより、正常な転写因子の影響を低下させることができる。

## 【0191】

40

50

細胞内のドミナントネガティブポリペプチドの発現の最終的な結果は、活性型タンパク質の機能の低下である。当業者は、タンパク質のドミナントネガティブバリアントの可能性を評価し、標準的な変異誘発法を用いて、1つまたは複数のドミナントネガティブバリアント型ポリペプチドを作製することができる。例えば、米国特許第5,580,723号およびSambrook et al., 「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning : A Laboratory Manual)」、Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照されたい。当業者は続いて、変異誘発ポリペプチドの集団を、選択した活性の低下および/またはこの種の活性の保持に関して検査することができる。タンパク質のドミナントネガティブバリアントの作製および検査のための他の同様な方法は、当業者に明らかであると考えられる。

10

## 【0192】

FGE cDNAの単離により、当業者が、FGEの異常な発現を特徴とする障害を診断することも可能になる。これらの方法は、FGE遺伝子および/またはそれに由来するFGEポリペプチドの発現を判定する段階を含む。前者の状況では、このような判定は、ポリメラーゼ連鎖反応、または以下に例示するような標識ハイブリダイゼーションプローブを用いてアッセイする段階を含む、任意の標準的な核酸判定アッセイによって行うことができる。後者の状況では、このような判定は、例えば分泌されたFGEタンパク質と結合する抗体を用いる、任意の標準的な免疫学的アッセイによって行うことができる。本発明に従って診断しうる好ましい障害の一つは多重スルファターゼ欠損症である。

## 【0193】

20

本発明はまた、FGEポリペプチドと選択的に結合する能力を有する、単離されたペプチド結合因子も含み、これは例えば、抗体または抗体の断片（「結合性ポリペプチド」）でありうる。抗体には、従来の方法に従って調製されたポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。ある種の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 4の核酸によってコードされるポリペプチドと結合する結合因子（例えば、抗体）を含まない。

## 【0194】

30

重要なこととして、当技術分野で周知のように、抗体とそのエピトープとの結合に関与するのは、抗体分子のごくわずかな部分であるパラトープのみである（概論については、Clark, W.R. (1986) 「今日の免疫学の実験的基盤 (The Experimental Foundations of Modern Immunology)」、Wiley & Sons, Inc., New York ; Roitt, I. (1991) 「エッセンシャル免疫学 (Essential Immunology)」、7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxfordを参照のこと）。例えば、pFc'領域およびFc領域は、補体カスケードのエフェクターであるが、抗原結合には関与しない。pFc'領域を酵素的に切断除去した抗体、またはpFc'領域を伴わずに作製された抗体は、F(ab')<sub>2</sub>断片と呼ばれ、完全な抗体の両方の抗原結合部位を保持している。同様に、Fc領域が酵素的に切断除去された抗体、Fc領域を伴わずに作製された抗体は、Fab断片と呼ばれ、完全な抗体分子の抗原結合部位の一方を保っている。さらに詳細には、Fab断片は、抗体軽鎖とFdと呼ばれる抗体重鎖の一部分が共有結合したものからなる。Fd断片は抗体特異性の主要な決定因子であり（单一のFd断片を、抗体特異性を変化させずに最大10種類の軽鎖と結合させることができる）、Fd断片は単独でエピトープ結合能力を保持している。

40

## 【0195】

抗体の抗原結合部分の内部には、当技術分野で周知のように、抗原のエピトープと直接相互作用する相補性決定領域 (CDR) およびパラトープの三次構造を維持するフレームワーク領域 (FR) が存在する（概論については、Clark, 1986 ; Roitt, 1991を参照されたい）。重鎖Fd断片およびIgG免疫グロブリンの軽鎖のいずれにも、4つのフレームワーク領域 (FR1 ~ FR4) が存在し、それぞれは3つの相補性決定領域 (CDR1 ~ CDR3) によって隔てられている。CDR、特にCDR3領域、より詳細には重鎖CDR3が、抗体特異性を主に担っている。

## 【0196】

哺乳動物抗体の非CDR領域を、元の抗体のエピトープ特異性を保ちながら、同種または

50

異種特異的抗体の同様の領域によって置き換えられることは現在では十分に確立されている。これは、非ヒトCDRをヒトFR領域および/またはFc/pFc'領域と共有結合させて機能的抗体を作製する「ヒト化」抗体の開発および利用において最も明らかに示されている。例えば、米国特許第4,816,567号、第5,225,539号、第5,585,089号、第5,693,762号および第5,859,205号を参照されたい。このようにして、例えば、PCT国際公報WO 92/04381号は、マウスFR領域の少なくとも一部分がヒト由来のFR領域によって置換されたヒト化マウスRSV抗体の作製および利用を開示している。抗原結合能力を有する完全な抗体の断片を含む、この種の抗体は、しばしば「キメラ」抗体と呼ばれる。

#### 【0197】

したがって、当業者には明らかなように、本発明はまた、F(ab')2断片、Fab断片、Fv断片およびFd断片；Fc領域および/またはFR領域および/またはCDR1領域および/またはCDR2領域および/または軽鎖CDR3領域が相同なヒト配列または非ヒト配列によって置換されたキメラ抗体；FR領域および/またはCDR1領域および/またはCDR2領域および/または軽鎖CDR3領域が相同なヒト配列または非ヒト配列によって置換されたキメラF(ab')2断片抗体；FR領域および/またはCDR1領域および/またはCDR2領域および/または軽鎖CDR3領域が相同なヒト配列または非ヒト配列によって置換されたキメラFab断片抗体；ならびに、FR領域および/またはCDR1領域および/またはCDR2領域が相同なヒト配列または非ヒト配列によって置換されたキメラFd断片抗体も提供する。本発明はまた、いわゆる一本鎖抗体も含む。

#### 【0198】

したがって、本発明は、FGEポリペプチドと特異的に結合するさまざまなサイズおよびタイプのポリペプチド、ならびにFGEポリペプチドとそれらの結合パートナーとの複合体を含む。これらのポリペプチドが抗体技術以外の源に由来してもよい。例えば、このようなポリペプチド結合因子を、溶液中に、固定化された形態で、細菌鞭毛ペプチドディスプレイライブラリーとして、またはファージディスプレイライブラリーとして容易に調製しうる、縮重ペプチドライブラリーとして得ることができる。コンビナトリアルライブラリーを、1つまたは複数のアミノ酸を含むペプチドから合成することもできる。ライブラリーはさらに、ペプチドおよび非ペプチド性合成部分から合成することができる。

#### 【0199】

ファージディスプレイは、本発明による有用な結合性ペプチドの同定に特に有効な可能性がある。手短に述べると、ファージライブラリー（例えば、m13、fdまたは ファージ）を調製し、4～約80アミノ酸残基の挿入物を従来の手順を用いて提示させる。挿入物は例えば、完全な縮重アレイでも偏りのあるアレイでもよい。続いて、FGEポリペプチドまたはFGEと結合パートナーとの複合体と結合する挿入物を保有するファージを選択する。このプロセスを、FGEポリペプチドまたは複合体と結合するファージの複数回の再選択によって繰り返すことができる。複数回の繰り返しにより、特定の配列を有するファージの濃縮がもたらされる。DNA配列解析を行うことで、発現されたポリペプチドの配列を同定することができる。FGEポリペプチドまたは複合体と結合する最小の線状部分を決定する。この最小線状部分に加えてその上流または下流にある1つまたは複数の別の縮重性残基を含む挿入物を含む、偏りのあるライブラリーを用いる手順を繰り返すことができる。FGEポリペプチドと結合するポリペプチドを同定するために、酵母ツーハイブリッドスクリーニング法を用いることもできる。このように、本発明のFGEポリペプチド、またはその断片、またはFGEと結合パートナーとの複合体を、本発明のFGEポリペプチドのペプチド結合パートナーを同定および選択する目的で、ファージディスプレイライブラリーを含むペプチドライブラリーのスクリーニングに用いることができる。このような分子は、記述したように、スクリーニングアッセイのため、精製プロトコールのため、FGEの機能を直接妨げるため、および当業者には明らかと考えられる他の目的のために用いることができる。

#### 【0200】

FGEポリペプチドまたはその断片を、それらの天然の結合パートナーを単離するために用いることもできる。結合パートナーの単離は、周知の方法に従って行うことができる。

10

20

30

40

50

例えば、単離されたFGEポリペプチドを基質と結合させ、続いて、FGE結合パートナーを含むと疑われる溶液を基質に対して適用するとよい。FGEポリペプチドの結合パートナーが溶液中に存在するならば、それは基質に結合させたFGEポリペプチドと結合すると考えられる。続いて、結合パートナーを単離するとよい。FGEの結合パートナーである他のタンパク質も、必要以上の実験を行わずに同様の方法によって単離しうる。好ましい結合パートナーの一つはスルファターゼである。

#### 【0201】

本発明はまた、対象におけるFGE発現のレベルを測定するための方法も提供する。これはまず、対象から被験試料を入手することによって実施しうる。被験試料は組織または生物性液体でありうる。組織には、脳、心臓、血清、乳房、結腸、膀胱、子宮、前立腺、胃、精巣、卵巣、脾臓、下垂体、副腎、甲状腺、唾液腺、乳腺、腎臓、肝臓、腸、脾臓、胸腺、血管、骨髄、気管および肺が含まれる。ある種の態様において、被験試料は心臓および血管組織に由来し、生物性液体には血液、唾液および尿が含まれる。この種の試料の入手には侵襲的手法および非侵襲的手法のいずれを用いることもでき、これらは当技術分野で十分に記載されている。分子レベルでは、PCR法およびノーザンプロット法の両方を、  
10 本明細書に記載した本発明の産物および当業者に周知のプロトコール（これらはこのような方法をまとめた参考文献に記載されている）を用いてFGE mRNAのレベルを判定するため  
に用いることができる。タンパク質レベルでは、FGE発現を、ポリクローナル性またはモノクローナル性の抗FGE血清と標準的な免疫学的アッセイの組み合わせによって判定する  
20 ことができる。好ましい方法は、被験試料のFGE発現の測定レベルを対照と比較するものと考えられる。対照は、既知の量の核酸プローブ、FGEエピトープ（FGE発現産物など）、またはFGE発現が対照レベルまたは「正常」レベルである対象の同様の被験試料が含まれ  
うる。

#### 【0202】

FGEポリペプチドは組換え的に作製することが好ましいが、この種のポリペプチドを生物性抽出物から単離することもできる。組換え的に作製されるFGEポリペプチドには、FGEタンパク質と別のポリペプチド、例えば、タンパク質-タンパク質結合、配列特異的核酸結合（GAL4など）を付与もしくは強化しうる、アッセイ条件下でのFGEポリペプチドの安定性を高める、または緑色蛍光タンパク質などの検出可能部分を付与することができるポリペプチドとの融合物を含むキメラタンパク質が含まれる。FGEポリペプチドまたは断片と融合させたポリペプチドは、例えば免疫学的認識または蛍光標識によって、融合タンパク質を容易に検出するための手段ともなりうる。  
30

#### 【0203】

本発明はまた、トランスジェニック非ヒト動物の作製にも有用である。本明細書で用いる場合、「トランスジェニック非ヒト動物」には、生殖系列細胞および/または体細胞に1つまたは複数の外因性核酸分子が組み入れられている非ヒト動物が含まれる。したがって、トランスジェニック動物には、相同組換えによるホモ接合性またはヘテロ接合性の遺伝子破壊を有する「ノックアウト」動物、エピソーム性または染色体性に組み入れられた発現ベクターを有する動物などが含まれる。ノックアウト動物は、当技術分野で周知であるように、胚性幹細胞を用いる相同組換えによって作製することができる。組換えは、例えば、cre/loxシステムまたは当業者に知られた他のリコンビナーゼ系を用いることによって容易になることがある。ある種の態様においては、リコンビナーゼ系はそれ自体が条件的に、例えばある種の組織または細胞種において、ある種の胚または後胚発生段階で発現され、これは発現を上昇または低下させる化合物の添加などによって誘導される。一般に、このような系において用いられる条件的発現ベクターは、所望の遺伝子発現パターン（例えば、時間的または空間的に）を付与する種々のプロモーターを用いている。FGEの発現を調節的または条件的な様式で上昇させるために、条件的プロモーターをFGE核酸分子と機能的に結合させることもできる。FGE活性または発現に対するトランス作用性の負の調節因子を、上記の条件的プロモーターと機能的に結合させることもできる。このようなトランス作用性調節因子には、アンチセンスFGE核酸分子、ドミナントネガティブFGE分子  
40  
50

をコードする核酸分子、FGE核酸に対して特異的なリボザイム分子などが含まれる。これらのトランスジェニック非ヒト動物は、FGE発現の上昇または低下を特徴とする状態に対する診断薬または治療薬の生化学的または生理学的な影響を調べるための実験に有用である。その他の用途は当業者に明らかであると考えられる。

#### 【0204】

本発明はまた、遺伝子治療も想定している。エクスピボ遺伝子治療を実施するための手順は米国特許5,399,346号およびその特許の包袋記録に含められた提出物に記載されており、これらはすべて、公開されている文書である。一般にこれは、欠陥のある遺伝子コピーを含む対象の細胞に遺伝子の機能的コピーをインビトロで導入し、遺伝的に操作された細胞を対象に戻すことを含む。遺伝子の機能的コピーは、遺伝子操作細胞における遺伝子の発現を可能にする調節エレメントの機能的制御下におかれる。さまざまなトランスフェクション法および形質導入法が、ならびに適した発現ベクターが当業者に周知であり、そのいくつかはPCT出願WO95/00654号に記載されている。アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスおよび標的指向性リポソームなどのベクターを用いるインビボ遺伝子治療も、本発明によれば想定している。10

#### 【0205】

本発明はさらに、FGEまたはFGE断片に依存的な細胞機能のレベルで作用する作用因子または作用因子のリード化合物を同定する、効率的な方法も提供する。特に、このような機能には、他のポリペプチドまたは断片との相互作用が含まれる。一般に、これらのスクリーニング方法は、FGE活性(C - ホルミルグリシン生成活性など)を妨げる化合物に関してアッセイする段階を含むが、スクリーニング方法を用いて、FGE C - ホルミルグリシン生成活性を高める化合物をアッセイすることもできる。このような方法は、化合物の自動化されたハイスループットスクリーニングに適合させることができる。目標となる指標には、FGEによって調節される、C - ホルミルグリシン生成活性などの細胞プロセスが含まれる。20

#### 【0206】

標識下インビトロタンパク質-リガンド結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、イムノアッセイ、ツーハイブリッドまたはスリーハイブリッドスクリーニングなどの細胞系アッセイ、発現アッセイなどを含む、候補となる(薬理学的)作用因子に関するさまざまなアッセイが得られている。トランスフェクトされた核酸は、例えば、コンビナトリアルペプチドライブラーまたはcDNAライブラーをコードすることができる。この種のアッセイのために便利な試薬、例えばGAL4融合タンパク質は当技術分野で知られている。細胞系アッセイの一例は、細胞に対して、FGEポリペプチドをGAL4 DNA結合ドメインと融合させたものをコードする核酸、および遺伝子発現調節領域(1つまたは複数のGAL4結合部位など)と機能的に結合したレポーター遺伝子をコードする核酸をトランスフェクトする段階を含む。レポーター遺伝子の転写の活性化は、FGEおよびレポーター融合ポリペプチドが結合してレポーター遺伝子の転写が可能になった場合に起こる。続いて、FGEポリペプチドにより媒介される細胞機能を調節する作用因子を、レポーター遺伝子の発現の変化によって検出する。レポーター遺伝子の発現の変化を判定するための方法は当技術分野で知られている。30

#### 【0207】

本方法において用いられるFGE断片は、トランスフェクトされた核酸によって產生されない場合、単離されたポリペプチドとしてアッセイ混合物に添加される。FGEポリペプチドは組換え的に作製することが好ましいが、このようなポリペプチドを生物性抽出物から単離することもできる。組換え的に作製されるFGEポリペプチドには、FGEタンパク質と別のポリペプチド、例えば、タンパク質-タンパク質結合、配列特異的核酸結合(GAL4など)を付与もしくは強化しうる、アッセイ条件下でのFGEポリペプチドの安定性を高める、または緑色蛍光タンパク質もしくはFlagエピトープなどの検出可能部分を付与することができるポリペプチドとの融合物を含むキメラタンパク質が含まれる。40

#### 【0208】

50

アッセイ混合物は、FGEと相互作用しうる天然の細胞内FGE結合性標的から構成される。天然のFGE結合性標的を用いうる場合には、それを、FGE結合性標的の部分（例えば、ペプチド 例えば、SEQ ID NO:33のペプチド または核酸断片）または類似体（すなわち、アッセイの目的とする天然の結合性標的のFGE結合特性を模倣する作用因子）として用いることが、その部分または類似体がFGE断片に対してアッセイで測定可能な結合親和性および結合活性を付与する限り、多くの場合には好ましい。

#### 【0209】

アッセイ混合物は作用因子候補も含む。一般的には、種々の濃度に対する異なる応答を得るために、複数のアッセイ混合物を種々の作用因子濃度で並行的に処理する。一般的には、これらの濃度のうち1つは、作用因子がゼロ濃度である、または作用因子がアッセイ検出限界未満の濃度である、陰性対照としての役割を果たす。作用因子候補はさまざまな化学的クラスを包含するが、一般的にはそれらは有機化合物である。好ましくは、作用因子候補は低分子量の有機化合物であり、すなわち、分子量が50よりは大きいが約2500よりは小さい、好ましくは約1000よりは小さい、より好ましくは約500よりも小さい。作用因子候補は、ポリペプチドおよび/または核酸との構造的な相互作用のために必要な化学官能基を含み、これには一般に少なくとも1つのアミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基またはカルボキシ基、好ましくは化学官能基のうち少なくとも2つ、より好ましくは化学官能基のうち少なくとも3つが含まれる。作用因子候補には、環状炭素または複素環構造および/または芳香族または多環芳香族構造が、以上に特定した官能基の1つまたは複数によって置換されたものが含まれうる。作用因子候補はまた、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロール、イソプレノイド、プリン、ピリミジン、上記のものの誘導体または構造的類似体、またはそれらの組み合わせなどを含む生体分子でもありうる。作用因子が核酸である場合には、作用因子は通常はDNA分子またはRNA分子であるが、本明細書中に規定した修飾核酸も想定している。

10

#### 【0210】

作用因子候補は、合成化合物または天然化合物のライブラリーを含む、多岐にわたる源から得られる。例えば、多岐にわたる有機化合物および生体分子のランダム的および定方向的 (directed) な合成のために、無作為化されたオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含む、数多くの手段を用いることができる。または、細菌、真菌、植物および動物抽出物の形態にある天然化合物のライブラリーが入手可能であり、または容易に作製しうる。さらに、天然の、または合成的に作製されたライブラリーおよび化合物を、従来の化学的、物理的および生化学的手段によって容易に修飾することもできる。さらに、既知の（薬理学的）作用因子に対して、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化などの定方向性またはランダムな化学修飾を行って、構造的類似体を作製することもできる。

20

#### 【0211】

さまざまな他の試薬を混合物中に含めることもできる。これらには、最適なタンパク質-タンパク質結合および/またはタンパク質-核酸結合を促すために用いられる、塩、緩衝剤、中性タンパク質（例えば、アルブミン）、界面活性剤などの試薬が含まれる。このような試薬を、反応成分の非特異的またはバックグラウンド的な相互作用を低下させるために用いてもよい。アッセイの効率を改善するプロテアーゼ、阻害薬、ヌクレアーゼ阻害薬、抗菌薬などの他の試薬を用いることもできる。

30

#### 【0212】

前述のアッセイ材料の混合物を、FGEポリペプチドが、細胞の結合標的、その一部分またはその類似体と特異的に結合するような条件下で、ただし作用因子候補の存在下においてインキュベートする。成分の添加の順序、インキュベーション温度、インキュベーション時間、およびアッセイのその他のパラメーターは容易に決定しうる。このような実験は、アッセイの基本的な組成ではなく、アッセイパラメーターを最適化することを単に含むのみである。インキュベーション温度は一般的には4 ~ 40 である。インキュベーション時間は、迅速なハイスループットスクリーニングを容易にするためには最小限に抑える

40

50

ことが好ましく、これは一般的には0.1~10時間である。

#### 【0213】

インキュベーション後に、FGEポリペプチドと1つまたは複数の結合標的との間の特異的結合の有無を、使用者が利用しうる任意の簡便な方法によって検出する。無細胞性結合アッセイの場合には、結合した成分を非結合成分から分離する分離の段階がしばしば用いられる。分離の段階はさまざまなやり方で行うことができる。簡便には、成分のうち少なくとも1つを、結合しなかった成分を容易に分離しうるような固体基質上に固定化する。固体基質はさまざまな材料でできたものでよく、しかもさまざまな形状、例えば、マイクロタイタープレート、マイクロビーズ、ディップスティック、樹脂粒子などであってよい。基質は信号対雑音比が最大になるように選択することが好ましく、これは主としてバックグラウンドの結合が最小限になるように、さらには分離の容易性および費用の点から選択される。10

#### 【0214】

分離は例えば、ビーズまたはディップスティックを貯留槽から取り出し、マイクロタイタープレートウェルなどの貯留槽を空にするか希釈し、ビーズ、粒子、クロマトグラフィーカラムまたはフィルターを洗浄液または溶媒によってすすぎ洗いすることによって行われる。分離の段階は、多数回のすすぎ洗いまたは洗浄を含むことが好ましい。例えば、固体基質がマイクロタイタープレートである場合には、塩、緩衝剤、界面活性剤、非特異的タンパク質といった特異的結合にかかわらないインキュベーション混合物の成分を一般に含む洗浄液で、ウェルを数回洗浄することが考えられる。固体基質が磁性ビーズである場合には、ビーズを洗浄液で1回または複数回洗浄し、磁石を用いて単離することが考えられる。20

#### 【0215】

検出は、ツーハイブリッドまたはスリーハイブリッドスクリーニングなどの細胞系アッセイのための任意の簡便な手法によって行うことができる。標的分子と相互作用するFGEポリペプチドのレポーター遺伝子転写アッセイによって生じた転写物は一般に、直接的または間接的に検出可能な産物、例えば、-ガラクトシダーゼ活性、ルシフェラーゼ活性などをコードすると考えられる。無細胞性結合アッセイの場合、成分の1つは通常、検出可能な標識を含む、またはそれと結合している。直接的な検出（例えば、放射能、発光、光学濃度または電子密度など）または間接的な検出（例えば、FLAGエピトープなどのエピトープタグ、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素タグ、等）が得られる、非常にさまざまな標識を用いることができる。標識はFGE結合パートナーと結合させてもよく、または結合パートナーの構造に組み込んでよい。30

#### 【0216】

標識の検出にはさまざまな方法を用いることができ、これは標識の性質およびその他のアッセイ成分によって決まる。例えば、標識を固体基質に結合した状態で検出することも、固体基質から分離した後に検出することもできる。標識は光学濃度または電子密度、放射線、非放射性エネルギー移動などによって直接的に検出してもよく、抗体結合物、ストレプトアビシン-ビオチン結合物などによって間接的に検出してもよい。標識を検出するための方法は当技術分野で周知である。40

#### 【0217】

本発明は、FGE特異的結合因子、このような因子を同定および作製する方法、ならびに診断、治療法および医薬品開発におけるそれらの利用を提供する。例えば、FGE特異的な薬物は種々の診断的および治療的な用途に有用であり、多重スルファターゼ欠損症などにおけるように疾患または疾患の予後がFGE結合特性の変化と関連性がある場合には特にそうである。新規なFGE特異的結合因子には、FGE特異的抗体、細胞表面受容体、ならびにツーハイブリッドスクリーニングなどのアッセイによって同定されたその他の神経細胞内および細胞外結合因子、ならびに化学物質ライブラリーなどのスクリーニングで同定された非天然型の細胞内および細胞外結合因子が含まれる。

#### 【0218】

一般に、FGEと特異的分子との結合の特異性は、結合平衡定数によって決定される。FGEポリペプチドと選択的に結合しうる標的は、好ましくは結合平衡定数が少なくとも約107M<sup>-1</sup>、より好ましくは少なくとも約108M<sup>-1</sup>であり、最も好ましくは少なくとも約109M<sup>-1</sup>である。非常にさまざまな細胞系アッセイおよび無細胞アッセイを、FGE特異的結合を示すために用いることができる。細胞系アッセイには、FGEにより媒介される転写を抑制または増加させるアッセイである、ワンハイブリッド、ツーハイブリッドおよびスリーハイブリッドスクリーニングが含まれる。無細胞アッセイには、FGE-タンパク質結合アッセイ、イムノアッセイなどが含まれる。FGEポリペプチドと結合する作用因子のスクリーニングのために有用なその他のアッセイには、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)および電気泳動移動度シフト分析(EMSA)が含まれる。

10

#### 【0219】

本発明のもう1つの局面によれば、本発明の分子のC<sub>-</sub>ホルミルグリシン生成活性の調節に有用な作用因子(agent)を同定するための方法が提供される。本方法は、(a)C<sub>-</sub>ホルミルグリシン生成活性を有する分子を作用因子候補と接触させる段階、(b)その分子のC<sub>-</sub>ホルミルグリシン生成活性を測定する段階、および(c)作用因子候補がその分子のC<sub>-</sub>ホルミルグリシン生成活性を調節するか否かを判定するために、分子の測定されたC<sub>-</sub>ホルミルグリシン生成活性を対照と比較する段階を含み、この際、その分子は本発明のFGE核酸分子またはその発現産物である。「接触させる」とは、C<sub>-</sub>ホルミルグリシン生成活性を有する分子を作用因子候補と直接的および間接的に接触させることを含む。「間接的に」接触させることは、作用因子候補がその作用を、第3の作用因子(例えば、メッセンジャー分子、受容体など)を介して、分子のC<sub>-</sub>ホルミルグリシン生成活性に及ぼすことを意味する。ある種の態様において、対照は、作用因子候補の非存在下で測定された分子のC<sub>-</sub>ホルミルグリシン生成活性である。アッセイ方法および作用因子候補は、FGEに関連した前述の態様において上述した通りである。

20

#### 【0220】

本発明のなおもう1つの局面によれば、核酸分子、その発現産物、またはその発現産物の断片の異常な発現を特徴とする状態を診断するための方法が提供される。本方法は、対象から単離した生物試料を核酸分子と特異的に結合する作用因子と接触させる段階、および、その障害の決定法として作用因子と核酸分子または発現産物との相互作用を判定する段階を含み、この際、その核酸分子は本発明によるFGE分子である。その障害は多重スルファターゼ欠損症である。FGE分子の異常な発現を引き起こすFGE遺伝子における変異は、SEQ ID NO:2に対して以下のアミノ酸変化をもたらす: Met1Arg; Met1Val; Leu20Phe; Ser155Pro; Ala177Pro; Cys218Tyr; Arg224Trp; Asn259Ile; Pro266Leu; Ala279Val; Arg327Stop; Cys336Arg; Arg345Cys; Ala348Pro; Arg349Gln; Arg349Trp; Arg349Trp; Ser359Stop; またはそれらの組み合わせ。

30

#### 【0221】

分子が核酸分子である場合には、このような判定は、ポリメラーゼ連鎖反応、または以下に例示するような標識ハイブリダイゼーションプローブを用いてアッセイする段階を含む、任意の標準的な核酸判定アッセイによって行うことができる。分子が核酸分子の発現産物である場合には、このような判定は、例えば、ポリペプチド発現産物のいずれかと結合する抗体を用いる、任意の標準的な免疫学的アッセイによって行うことができる。

40

#### 【0222】

「異常な発現」とは、対照(すなわち、健常または「正常」な対象における同じ分子の発現)との比較による、FGE分子(核酸および/またはポリペプチド)の発現低下(低発現)または発現亢進(過剰発現)のことを指す。「健常対象」とは、本明細書で用いる場合、標準的な医学的基準に従って、多重スルファターゼ欠損症を有していない、またはそれを発症するリスクのない対象のことを指す。健常対象はまた、それ以外の様式でも疾患の症状を呈さない。言い換えれば、このような対象は、医療の専門家によって調べられた場合に、健康であって多重スルファターゼ欠損症の症状を有しないものとして特徴づけられると考えられる。これらには、いくつかの組織における酸性ムコ多糖の量の増加、軽度の

50

ムコ多糖沈着、急速な神経学的悪化、尿中のムコ多糖およびスルファチドの過剰な存在、脳脊髄液タンパク質の増加、ならびに末梢神經におけるミエリンの異染性変性といった、異染性ロイコジストロフィーおよびムコ多糖症の特徴が含まれる。

#### 【 0 2 2 3 】

本発明はまた、本発明の核酸または本発明の発現産物のレベルを測定するために用いられると考えられる、新規なキットも提供する。

#### 【 0 2 2 4 】

1つの態様において、キットは、前述の単離されたFGE核酸のいずれかまたはその発現産物と選択的に結合する作用因子、および、前記作用因子と前述の単離されたFGE核酸またはそれらの発現産物のいずれかとの結合の測定値と比較するための対照、を含むパッケージを含む。いくつかの態様において、対照は、測定値と比較するための既定値である。ある種の態様において、対照は、前述の単離されたFGE核酸のいずれかの発現産物のエピトープを含む。1つの態様において、キットはさらに、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群より選択されるポリペプチドまたはそのペプチドと選択的に結合する第2の作用因子、ならびに前記第2の作用因子と前記ポリペプチドまたはそのペプチドとの結合の測定値と比較するための対照を含む。10

#### 【 0 2 2 5 】

核酸検出の場合には、本発明の核酸分子を增幅するためのプライマーの対を含めることができる。好ましいキットは、既知量の核酸プローブなどの対照、エピトープ（イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群より選択されるポリペプチドまたはそのペプチドと選択的に結合する第2の作用因子、ならびに前記第2の作用因子と前記ポリペプチドまたはそのペプチドとの結合の測定値と比較するための対照を含む。20

核酸検出の場合には、本発明の核酸分子を增幅するためのプライマーの対を含めることができる。好ましいキットは、既知量の核酸プローブなどの対照、エピトープ（イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群より選択されるポリペプチドまたはそのペプチドと選択的に結合する第2の作用因子、ならびに前記第2の作用因子と前記ポリペプチドまたはそのペプチドとの結合の測定値と比較するための対照を含む。30

試薬は容器内にパッケージ化すること、および/またはウェル表面に規定量をコーティングすることができ、キットは標識された免疫試薬（標識された抗IgG抗体など）のような標準的な材料を含んでもよい。1つのキットは、FGEタンパク質をコーティングしたポリスチレン製マイクロタイプレートをパッケージ化したもの、および標識された抗ヒトIgG抗体を含む容器である。プレートのウェルを、例えば生物性液体と接触させ、洗浄した上で抗IgG抗体と接触させる。続いて標識を検出する。本発明の特徴を具現化したキットが、数字11によって全体的に指定され、図25に示されている。キット11は、以下の主な構成要素から構成される：パッケージ15、本発明の作用因子17、対照作用因子19および指示書21。パッケージ15は、本発明の作用因子17を含むバイアル（または多数のバイアル）、対照作用因子19を含むバイアル（または多数のバイアル）および指示書21を保持するためのボックス様構造である。当業者は、個別の必要性に適するようにパッケージ15を容易に改変することができる。40

#### 【 0 2 2 6 】

本発明はまた、対象における多重スルファターゼ欠損症を治療するための方法も含む。本方法は、このような治療を必要とする対象に対して、C -ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子を、対象におけるCホルミルグリシン生成活性を高めるのに有効な量で投与する段階を含む。いくつかの態様において、本方法はさらに、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリーリー

1020304050

ルスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6をコードする核酸分子、その核酸分子の発現産物、および/またはその核酸分子の発現産物の断片からなる群より選択される配列を有する作用因子を同時投与する段階を含む。

**【0227】**

核酸またはポリペプチドの「発現を調節する作用因子」は、本明細書で用いる場合、当技術分野で知られており、センス核酸およびアンチセンス核酸、ドミナントネガティブ核酸、ポリペプチドに対する抗体などを指す。分子の発現を調節する（および本明細書に記載するように、その活性を調節する）任意の作用因子が、本発明によれば有用である。ある種の態様において、C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子は、本発明の単離された核酸分子（例えば、SEQ ID NO : 3の核酸）である。重要な態様において、C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子は、本発明のペプチド（例えば、SEQ ID NO : 2のペプチド）である。いくつかの態様において、C - ホルミルグリシン生成活性を調節する作用因子は、本発明のセンス核酸である。

**【0228】**

本発明の1つの局面によれば、対象におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるための方法が提供される。本方法は、本発明の単離されたFGE核酸分子、および/またはその発現産物を、対象に対して、対象におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるための有効な量で投与する段階を含む。

**【0229】**

本発明のなおもう1つの局面によれば、細胞におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるための方法が提供される。本方法は、細胞を、細胞におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるための有効な量にある、本発明の単離された核酸分子（例えば、SEQ ID NO : 1の核酸）またはその発現産物（例えば、SEQ ID NO : 2のペプチド）と接触させる段階を含む。重要な態様において、本方法は、細胞におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるために内因性FGE遺伝子を活性化する段階を含む。

**【0230】**

前述の態様のいずれにおいても、核酸は、HT-1080細胞などの真核細胞の内部での核酸分子の発現を導く遺伝子発現配列と機能的に結合させることができる。「遺伝子発現配列」とは、それと機能的に結合した核酸の効率的な転写および翻訳を可能にする、プロモーター配列またはプロモーター-エンハンサーの組み合わせなどの任意の調節性ヌクレオチド配列のことである。遺伝子発現配列は、例えば、構成性プロモーターまたは誘導性プロモーターなどの哺乳動物プロモーターまたはウイルスプロモーターであってよい。構成性哺乳動物プロモーターには、以下の遺伝子のプロモータが非制限的に含まれる：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスクフェラーゼ（HPTR）、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、-アクチンプロモーターおよびその他の構成性プロモーター。真核細胞で構成的に機能するウイルスプロモーターの例には、例えば、シミアンウイルス、パピローマウイルス、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ラウス肉腫ウイルス、サイトメガロウイルスからのプロモーター、モロニー白血病ウイルスおよび他のレトロウイルスの長い末端反復配列（LTR）、ならびに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターが含まれる。その他の構成性プロモーターも当業者に周知である。また、本発明の遺伝子発現配列として有用なプロモーターには誘導性プロモーターも含まれる。誘導性プロモーターは誘導物質の存在下で活性化される。例えば、メタロチオネインプロモーターは、ある種の金属イオンの存在下で転写および翻訳を高めるように活性化される。他の誘導性プロモーターも当業者に周知である。

**【0231】**

一般に、遺伝子発現配列は、必要に応じて、それぞれ転写および翻訳の開始にかかわる5'非転写配列および5'非翻訳配列（例えば、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列など）を含むであろう。詳細には、このような5'非転写調節配列は、機能的に結合した遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含むと考えられる。

10

20

30

40

50

遺伝子発現配列はまた、選択的には、エンハンサー配列または上流活性化配列も必要に応じて含むと考えられる。

#### 【0232】

本発明の任意のFGE核酸分子は、特定の細胞系列の細胞、例えばニューロンにおける核酸分子の発現を可能にする遺伝子発現配列と機能的に結合していることが好ましい。ニューロンなどの細胞における核酸分子の発現を可能にする配列は、このような細胞種において選択的に活性があり、それによってこれらの細胞における核酸分子の発現を引き起こすものである。例えば、シナプシン-1プロモーターは、ニューロンにおいて本発明の前述の核酸分子の任意のものを発現させるために用いることができる；例えばフォンビルプラント因子遺伝子プロモーターは、血管内皮細胞において核酸分子を発現させるために用いる。当業者は、本発明の任意の好ましい細胞において核酸分子を発現させうる代替的なプロモーターを容易に同定することができる。10

#### 【0233】

核酸配列および遺伝子発現配列は、それらが、核酸コード配列（例えば、FGEの場合には、SEQ ID NO : 3）の転写および/または翻訳が、遺伝子発現配列の影響下または制御下に置かれるように共有結合している場合には、「機能的に」結合していると言われる。核酸配列が機能的タンパク質へと翻訳されることが望ましい場合には、2つのDNA配列は、5'調節配列におけるプロモーターの誘導が核酸配列の転写をもたらすならば、および、2つのDNA配列間の結合の性質が（1）フレームシフト変異の導入を引き起こさない、（2）プロモーター領域が核酸配列の転写を指令する能力を妨げない、かつ（3）対応するRNA転写物がタンパク質へと翻訳される能力を妨げないならば、機能的に結合していると言われる。したがって、遺伝子発現配列は、その遺伝子発現配列が、結果的に生じる転写物が所望のタンパク質またはポリペプチドへと翻訳されるようにDNA配列の転写を生じさせることができると考えられる。20

#### 【0234】

本発明の分子は、本発明の好ましい細胞種に対して、単独でまたはベクターに付随させて送達することができる（ベクターに関する上記の考察も参照されたい）。最も広義において（および本明細書の別の箇所での発現およびターゲティングベクターの説明と一致して）、「ベクター」とは、（1）標的細胞に対する分子の送達、および/または（2）標的細胞による分子の取り込み、を容易にする任意の媒体のことである。送達ベクターは、ベクターの非存在下で起こる分解の程度よりも低い程度の分解で、分子を標的細胞に輸送する。選択的には、ターゲティングリガンドのコグネイト受容体を表面に発現する細胞に対してベクターを選択的に送達するために、「ターゲティングリガンド」をベクターに結合させることができる。このようにして、ベクター（核酸またはタンパク質を含む）を、ニューロンに対して選択的に送達することができる。ターゲティングのための方法には、Priestに対する米国特許5,391,723号に記載されたものなどの結合物が含まれる。よく知られたターゲティング媒体のもう1つの例は、リポソームである。リポソームはGibco BRLから販売されている。標的指向性リポソームの作製に関してはさまざまな方法が公表されている。30

#### 【0235】

一般に、本発明において有用なベクターには、以下のものが非制限的に含まれる：本発明の核酸配列の挿入または組み入れ、および本発明の核酸配列と結合させうる核酸断片（例えば、エンハンサー、プロモーター）の付加によって操作された、プラスミド、ファージミド、ウイルス、ウイルスまたは細菌源に由来するその他の媒体。ウイルスベクターは好ましい種類のベクターであり、これには以下のウイルスに由来する核酸配列が非制限的に含まれる：アデノウイルス；アデノ隨伴ウイルス；レトロウイルス、例えばモロニーマウス白血病ウイルス；ハーヴェイマウス肉腫ウイルス；マウス乳腺腫瘍ウイルス；ラウス肉腫ウイルス；SV40型ウイルス；ポリオーマウイルス；エブスタイン-バーウィルス；パパピローマウイルス；ヘルペスウイルス；ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；およびRNAウイルス、例えばレトロウイルス。命名されてはいないが当技術分野で知られている他40

のベクターを用いることもできる。

#### 【0236】

ある種の用途に対して特に好ましいウイルスに、二本鎖DNAウイルスの1つであるアデノ随伴ウイルスがある。アデノ随伴ウイルスは、広範囲にわたる細胞種および種を感染させることができ、複製能が欠損するように操作することができる。これには、熱安定性および脂質溶媒安定性、造血細胞を含む多様な系列の細胞における形質導入頻度の高さ、および重複感染阻止がみられないため多数回の一連の形質導入が可能であることといったさらなる利点がある。アデノ随伴ウイルスは、ヒト細胞DNAに部位特異的な様式で組み込まれ、それによって挿入性変異誘発の可能性および挿入遺伝子発現のばらつきを最小限に抑えることが報告されている。さらに、野生型アデノ随伴ウイルス感染は、選択圧が存在しなくとも組織培養下で100継代以上にわたって追跡されており、このことは、アデノ随伴ウイルスゲノムの組み込みが比較的安定なイベントであることを意味する。また、アデノ随伴ウイルスは染色体外様式でも機能することができる。10

#### 【0237】

一般に、その他の好ましいウイルスベクターは、必須でない遺伝子が目的の遺伝子によって置き換えられた細胞変性作用のない真核生物ウイルスをベースとしている。細胞変性作用のないウイルスにはレトロウイルスが含まれ、そのライフサイクルは、ゲノムウイルスRNAのDNAへの逆転写に引き続いてプロウイルスが宿主細胞DNAに組み込まれる。アデノウイルスおよびレトロウイルスはヒト遺伝子治療の試験に対して承認されている。一般に、レトロウイルスは複製能欠損性であり（すなわち、所望のタンパク質の合成を導くことはできるが感染性粒子を製造することはできない）。このような遺伝的に改変されたレトロウイルス発現ベクターは、遺伝子インビボでの遺伝子の高効率形質導入に対して汎用性がある。複製能欠損レトロウイルスを作製するための標準的なプロトコール（外因性遺伝物質のプラスミドへの組み入れ、プラスミドによるパッケージング細胞株のトランسفエクション、パッケージング細胞株による組換えレトロウイルスの產生、組織培養液からのウイルス粒子の収集、およびウイルス粒子による標的細胞の感染を含む）は、Kriegler, M., 「遺伝子導入および発現、実験マニュアル (Gene Transfer and Expression, Laboratory Manual)」、W.H. Freeman C.O., New York (1990) および Murry, E.J. Ed. 「分子生物学における方法 (Methods in Molecular Biology)」、vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991) に提示されている。2030

#### 【0238】

もう1つの好ましいレトロウイルスベクターは、Nabel, E.G, et al., Science, 1990, 249: 1285-1288に記載されているような、モロニーマウス白血病ウイルス由来のベクターである。これらのベクターは、中膜を含む、動脈壁の三層のすべてに対する遺伝子の送達に有効であったことが報告されている。他の好ましいベクターは、Flugelman, et al., Circulation, 1992, 85: 1110-1117に開示されている。本発明の分子を送達するために有用なそのほかのベクターは、Mulligan, et. alによる米国特許第5,674,722号に記載されている。

#### 【0239】

前述のベクターに加えて、ニューロン、肝細胞、線維芽細胞および/または血管内皮細胞などの細胞に対して本発明の分子を送達するために、ならびにそれらによる取り込みを容易にするために、その他の送達方法を用いることもできる。40

#### 【0240】

本発明のこのような好ましい送達方法の1つは、コロイド分散系である。コロイド分散系には、水中油型エマルション、ミセル、複合ミセルおよびリポソームを含む脂質ベースの系が含まれる。本発明の好ましいコロイド系はリポソームである。リポソームはインビボまたはインビトロでの送達ベクターとして有用な人工的膜小胞である。サイズが0.2~4.0 μmである大型単ラメラ小胞 (LUV) は大型の高分子を封入しうることが示されている。RNA、DNAおよび完全なビリオンを内部の水相中に封入し、生物活性のある形態で細胞に対して送達することができる (Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 1981, 6: 77)。50

リポソームが効率的な遺伝子導入ベクターであるためには、以下の特性の1つまたは複数が存在すべきである：(1)目的の遺伝子を、生物活性を保ちながら高い効率で封入すること；(2)非標的細胞と比較して、標的細胞に対して選好的および実質的に結合すること；(3)小胞の水性含有物を標的細胞の細胞質に高い効率で送達すること；および(4)遺伝情報の正確かつ効果的な発現。

#### 【0241】

リポソームは、リポソームをモノクローナル抗体、糖、糖脂質またはタンパク質などの特異的リガンドと結合させることにより、心筋または血管細胞壁などの特定の組織に標的として向かわせることができる。血管壁に対するリポソームのターゲティングのために有用な可能性のあるリガンドには、日本血球凝集ウイルスのウイルス外被タンパク質が非制限的に含まれる。さらに、ベクターを、核酸を宿主細胞の核に導くと考えられる核ターゲティングペプチドと結合させることもできる。10

#### 【0242】

リポソームは、Gibco BRLから、例えば、LIPOFECTIN（商標）およびLIPOFECTACE（商標）として販売されており、これらは塩化N-[1-(2,3ジオレイルオキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム(DOTMA)および臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDA B)などの陽イオン性脂質からできている。リポソームを作製するための方法は当技術分野で周知であり、多くの刊行物に記載されている。また、Gregoriadis, G. Trends in Biotechnology, V.3, p.235-241 (1985)によるリポソームに関する総説もある。核酸を含む高分子の細胞内送達のための新規リポソームも、PCT国際出願PCT/US96/07572号（公報番号W0 96/40060号、標題「高分子の細胞内送達（Intracellular Delivery of Macromolecules）」）に開示されている。20

#### 【0243】

1つの特定の態様において、好ましい媒体は、哺乳動物レシピエントへの移植に適した生体適合性のある微粒子またはインプラントである。本方法に従って有用な生体内崩壊性インプラントの例は、PCT国際出願PCT/US/03307号（公報番号WO 95/24929号、標題「ポリマー性遺伝子送達システム（Polymeric Gene Delivery system）」、1994年3月15日に提出された米国特許出願番号213,668号に対する優先権を請求している）に記載されている。PCT/US/0307号は、適切なプロモーターの制御下にある外因性遺伝子を含めるための、生体適合性のある、好ましくは生体分解性のあるマイクロカプセルを記載している。このポリマーマトリックスは、患者における外因性遺伝子の持続的放出を実現するために用いられる。本発明によれば、本明細書に記載の核酸を、PCT/US/03307号に開示された、生体適合性のある、好ましくは生体分解性のあるポリマーマトリックス中に封入または分散させる。ポリマーマトリックスは、ミクロスフェア（核酸が固体マイクロカプセルの全体にわたって分散されている）またはマイクロカプセル（核酸がポリマー性外殻の内部に蓄えられている）などの微粒子の形態にあることが好ましい。本発明の核酸を含めるためのマイクロカプセルのその他の形態には、フィルム、コーティング、ゲル、インプラントおよびステントが含まれる。ポリマーマトリックスのサイズおよび組成は、基質デバイスが移植される組織中で好都合な放出動態が得られるように選択される。ポリマーマトリックスデバイスのサイズはさらに、用いようとする送達方法（これは組織中への注射、または鼻腔内および/もしくは肺領域内へのエアロゾルによる懸濁液の投与が典型的である）に応じて選択される。デバイスが血管表面に投与された場合の導入の有効性をさらに高めるために、ポリマーマトリックス組成物を、好都合な分解速度を有するように、かつ生体接着性のある材料でできているように選択することもできる。マトリックス組成物を、分解せず、長期間にわたって拡散による放出を行うように選択することもできる。3040

#### 【0244】

生体非分解性および生体分解性ポリマーマトリックスはいずれも、本発明の核酸を対象に送達するために用いることができる。生体分解性マトリックスの方が好ましい。このようなポリマーは、天然ポリマーでも合成ポリマーでもよい。合成ポリマーの方が好ましい。ポリマーは、放出が得られることが望ましい期間に基づいて選択され、これは一般的に50

は数時間から1年またはそれ以上までの程度である。一般的には、数時間から3ヶ月ないし12ヶ月までの範囲の期間にわたる放出が最も望ましい。ポリマーは選択的には、その水中重量の最大約90%が吸収されるヒドロゲルの形態にあり、さらに選択的には、多価イオンまたはその他のポリマーと架橋されている。

#### 【0245】

一般に、本発明の核酸は、生体内崩壊性インプラントを用いて拡散によって送達され、またはより好ましくは、ポリマーマトリックスの分解によって送達される。生体分解性送達システムを形成するために用いられる合成ポリマーの例には、以下のものが含まれる：ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハロゲン化物、ポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびこれらの共重合体、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、アクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステルの重合体、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、ヒドロキシプロピル、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシリエチルセルロース、セルローストリニアセテート、セルローススルフェートナトリウム塩、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート)、ポリエチレン、ポリブロピレン、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリビニルアセテート、ポリ塩化ビニル、ポリスチレンおよびポリビニルピロリドン。

#### 【0246】

生体非分解性ポリマーの例には、エチレンビニルアセテート、ポリアクリル酸(ポリメタクリル酸)、ポリアミド、これらの共重合体および混合物が含まれる。

#### 【0247】

生体分解性ポリマーの例には、乳酸およびグリコール酸の重合体、重合無水物(polyanhydride)、ポリ(オルト)エステル、ポリウレタン、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)およびラクチド-カプロラクトン共重合体などの合成ポリマー、ならびにアルジネートおよびその他の多糖類(デキストランおよびセルロースを含む)、これらの化学誘導体(化学基、例えばアルキル、アルキレンの置換物、付加物、ヒドロキシリ化物、酸化物、および当業者によってルーチン的に作られているその他の修飾物)、アルブミンおよびその他の親水性タンパク質、ゼインおよびその他のプロアミンおよび疎水性タンパク質、これらの共重合体および混合物などの天然のポリマーが含まれる。一般に、これらの材料は、インビオでの酵素的加水分解または水への曝露のいずれかにより、表面崩壊または内部崩壊によって分解する。

#### 【0248】

特に関心が持たれる生体接着性ポリマーには、H.S. Sawhney, C.P. Pathak and L.A. HubellによってMacromolecules, 1993, 26, 581-587(その教示内容は本明細書に組み入れられる)に記載された生体内崩壊性ヒドロゲル、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、重合無水物、ポリアクリル酸、アルジネート、キトサン、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)およびポリ(オクタデシルアクリレート)が含まれる。したがって、本発明は

、医薬品として用いるための本発明の上記の分子の組成物、その医薬品を調製するための方法、およびインピボでの医薬品の持続的放出のための方法を提供する。

#### 【0249】

凝縮剤 (compaction agent) を、本発明のベクターと併用することもできる。「凝縮剤」とは、本明細書で用いる場合、核酸の負の電荷を中和し、それによって核酸の細粒への凝縮を可能にするヒストンなどの作用因子のことを指す。核酸の凝縮により、標的細胞による核酸の取り込みが容易になる。凝縮剤は単独で用いること、すなわち、本発明の単離された核酸を細胞によってより効率的に取り込まれる形態で送達するために用いることができるが、上記のベクターの1つまたは複数と併用することがより好ましい。

#### 【0250】

標的細胞による本発明の核酸の取り込みを容易にするために用いられる組成物のその他の例には、リン酸カルシウムおよび細胞内輸送のその他の化学メディエーター、マイクロインジェクション用組成物、およびエレクトロポレーションが含まれる。

#### 【0251】

本発明は、細胞におけるスルファターゼ活性を高めるための方法を含む。このような方法は、スルファターゼを発現する細胞を、細胞におけるスルファターゼ活性を高めるための有効な量にある、本発明の単離された核酸分子（例えば、請求項1～8のいずれか一項記載の単離された核酸分子、SEQ ID NO: 1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80～87からなる群より選択される配列を有するFGE核酸分子）またはその発現産物（例えば、請求項11～15、19、20記載のポリペプチド、またはSEQ ID NO: 2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群より選択される配列を有するペプチド）と接触させる段階を含む。スルファターゼ活性を「高めること」とは、本明細書で用いる場合、スルファターゼの特異的基質に対する親和性および/またはその変換が高まることを指し、これは一般的にはスルファターゼ分子上でのFGly形成の増加の結果である。1つの態様において、細胞は、野生型細胞よりも高いレベルでスルファターゼを発現する。「細胞におけるスルファターゼ活性を高めること」はまた、細胞によって分泌されるスルファターゼの活性を高めることも指す。細胞は内因性および/または外因性スルファターゼを発現しうる。FGE分子の前記接触はまた、細胞の内因性FGE遺伝子を活性化することも指す。重要な態様において、内因性スルファターゼは活性化されている。ある種の態様において、スルファターゼは、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5、および/またはHSulf-6である。ある種の態様において、細胞は哺乳動物細胞である。

#### 【0252】

本発明のもう1つの局面によれば、薬学的組成物が提供される。薬学的組成物が提供される。本組成物は、スルファターゼ欠損症を治療するための薬学的有効量にある、細胞によって產生されるスルファターゼ、および薬学的に許容される担体を含み、この際、前記細胞は、本発明の単離された核酸分子（例えば、請求項1～8記載のもの、またはSEQ ID NO: 1、3、4、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77および80～87からなる群より選択される配列を有する核酸分子）またはその発現産物（例えば、SEQ ID NO: 2、5、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76および78からなる群より選択されるペプチド）を含む作用因子と接触させられている。重要な態様において、スルファターゼは正常/対照細胞よりも高いレベルで発現される。

#### 【0253】

本発明はまた、細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比が上昇しているスルファターゼ產生細胞も含む。本細胞は(i)対照と比べて活

10

20

30

40

50

性が高度化しているスルファターゼ、および(ii)対照と比べて活性が高度化しているホルミルグリシン生成酵素を含み、この際、細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比は、ホルミルグリシン生成酵素の非存在下で細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比よりも少なくとも5%上昇している。スルファターゼの過剰発現は内因性スルファターゼの活性を低下させる可能性があることが当技術分野では知られている(Anson et al., Biochem. J., 1993, 294: 657-662)。さらに、組換えスルファターゼのうち活性があるものは一部分に過ぎない。本発明者らは、予想外のことにつき、スルファターゼの発現/活性が高度化している細胞におけるFGEの発現/活性の上昇が、より活性の高いスルファターゼの產生をもたらすことを見いだした。スルファターゼ分子上のFGlyの存在はスルファターゼ活性と関連性があるため、本明細書中の別の箇所に述べるように、MALDI-TOF質量分析法を用いてスルファターゼ細胞産物上のFGlyの存在を判定することにより、「活性型スルファターゼ」を定量化することができる。続いて、スルファターゼ全体に対する比を容易に決定することができる。

#### 【0254】

本発明はまた、スルファターゼ欠損症の診断および治療のための方法も提供する。このような障害には、ムコ多糖症II(MPS II; ハンター症候群)、ムコ多糖症IIIA(MPS IIIA; サンフィリピ症候群A)、ムコ多糖症VIII(MPS VIII)、ムコ多糖症IVA(MPS IVA; モルキオ症候群A)、ムコ多糖症VI(MPS VI; マロトーラミー症候群)、異染性ロイコジストロフィー(MLD)、X連鎖性劣性点状軟骨異形成症1、またはX連鎖性魚鱗癬(ステロイドスルファターゼ欠損症)が非制限的に含まれる。

#### 【0255】

本発明の方法は、前述した状態の任意のものの即時(acute)治療および予防的治療の両方に有用である。本明細書で用いる場合、即時治療とは、特定の状態を有する対象の治療のことを指す。予防的治療とは、その状態になるリスクはあるが、現時点ではその状態の症状を有しないか経験していない対象の治療のことを指す。

#### 【0256】

その最も広義において、「治療」または「治療すること」という用語は、即時治療および予防的治療の両方を指す。治療を必要とする対象が、ある状態を経験している(または特定の状態を有するまたは有しつつある)場合には、その状態を治療することとは、その状態、またはその状態によって生じる1つもしくは複数の症状を、改善、軽減または消失させることを指す。いくつかの好ましい態様において、状態を治療することとは、その状態に付随する特定の症状または症状の特定のサブセットを改善、軽減または消失させることを指す。治療を必要とする対象が、ある状態になるリスクを有する場合には、対象を治療することとは、対象がその状態になるリスクを低下させることを指す。

#### 【0257】

本発明の治療薬の投与の様式および投与量は、治療しようとする状態の具体的な段階、治療しようとする対象の年齢および身体的状態、治療期間、同時併用療法の性質(あれば)、具体的な投与経路、ならびに医療専門家の知識および専門技術の範囲にある同様の要因によって異なると考えられる。

#### 【0258】

本明細書に記載したように、本発明の作用因子は、前述のスルファターゼ欠損症の任意のものを治療するための有効量で投与される。一般に、有効量とは、対象の所望の組織における有益な変化を引き起こす何らかの量のことである。有効量は、症状の、または全体としての状態の、軽減、改善もしくは消失といった、特定の状態の好都合な表現型変化を引き起こすのに十分な量であることが好ましい。

#### 【0259】

一般に有効量とは、単独で、またはさらなる投薬とともに、所望の応答を生じさせるような医薬製剤の量のことである。これには状態の進行を一時的に緩徐化させることのみも含まれるが、より好ましくは、これには状態の進行を永続的に停止させること、または状

10

20

30

40

50

態の発現を遅らせること、または状態が起こることを予防することが含まれる。これはルーチン的な方法によってモニタリングが可能である。一般に、有効化合物の投与量は、1日当たり約0.01mg/kg～1日当たり1000mg/kgであると考えられる。50μg～500mg/kgの範囲の投与量が適切であると考えられ、これが経口的に、1日当たり1回または複数回投与されることが好ましい。

#### 【0260】

このような量は、当然ながら、治療しようとする具体的な状態、状態の重症度、年齢、身体的状態、体格および体重を含む個々の患者のパラメーター、治療期間、同時併用療法の性質（あれば）、具体的な投与経路、ならびに医療専門家の知識および専門技術の範囲にある同様の要因に依存すると考えられる。静脈内投与などのある種の投与形態では投与量が少なくなると考えられる。対象における応答が、適用された初期用量では不十分である場合には、患者の忍容性が許容する範囲で、より高い用量（または、より限局的な異なる送達経路による、実効上でより高い用量）を用いてもよい。化合物の適切な全身レベルを達成するためには、1日当たりでの多回投与が想定される。一般的には、最大量、すなわち確かな医学的判断に従った最も高い安全量を用いることが好ましい。しかし、当業者には、患者が医学的理由、心理的理由または事実上あらゆる他の理由から、より低い用量または耐容量を要求する可能性があることが理解されていると考えられる。

10

#### 【0261】

本発明の作用因子を、選択的には、医薬製剤を作るために薬学的に許容される担体と配合してもよい。「薬学的に許容される担体」とは、本明細書で用いる場合、ヒトへの投与に適した、適合性のある1つまたは複数の固体性または液体性の充填剤、希釈剤または封入物質のことを意味する。「担体」という用語は、適用を容易にするために有効成分と配合される、天然性または合成性の有機成分または無機成分のことを表す。薬学的組成物の成分を、所望の薬学的有効性を大きく低下させると考えられる相互作用が起こらないような様式で、本発明の分子と互いに混合することもできる。いくつかの局面において、医薬製剤は、本発明の作用因子を、障害を治療するために有効な量として含む。

20

#### 【0262】

医薬製剤が、以下のものを含む、適した緩衝剤を含んでもよい：酢酸（塩とともにある）；クエン酸（塩とともにある）；ホウ酸（塩とともにある）；またはリン酸（塩とともにある）。また、薬学的組成物は、選択的には、ベンザルコニウムクロライド；クロロブタノール；パラベン類またはチメロサールなどの適した保存料を含んでもよい。

30

#### 【0263】

さまざまな投与経路を利用することができる。選択される具体的な様式は、当然ながら、選択される具体的な薬剤、治療しようとする状態の重症度、および治療効果のために必要な投与量に依存すると考えられる。本発明の方法は、一般的に言って、医学的に許容される任意の投与様式、すなわち臨床的に許容されない有害作用を引き起こさずに有効化合物の有効レベルが得られるような任意の様式を用いて実施しうる。このような投与様式には、経口的、直腸内、局所的、鼻腔内、皮内、経皮的または非経口的な経路が含まれる。「非経口的」という用語には、皮下、静脈内、大網内、筋肉内または注入が含まれる。静脈内または筋肉内経路は長期的な治療法および予防には特に適してはいない。一例として、片頭痛を有する対象の急性期治療のための薬学的組成物は、錠剤、カプセル剤、粉剤、坐薬、注射剤および鼻噴霧薬を含む、さまざまな様式で、さまざまな投与様式のために製剤化することができる。

40

#### 【0264】

医薬製剤は、単位投薬式剤形（unit dosage form）として便利な形で提供することができ、薬学の技術分野で周知である方法の任意のものによって調製しうる。いずれの方法も、有効作用因子を、1つまたは複数の補助的な成分から構成される担体と一緒に合わせる段階を含む。一般に、組成物は、有効化合物を、液体担体、微細化された固体担体またはその両方と均一かつ密接に合わせた上で、必要に応じて生成物を成形することによって調製される。

50

**【 0 2 6 5 】**

経口投与用に適した組成物は、それぞれが規定量の有効化合物を含む、カプセル剤、錠剤、ロゼンジ剤などの離散的な単位として提供することができる。その他の組成物には、水性液体または非水性液体中にある懸濁剤、例えばシロップ剤、エリキシル剤または乳剤が含まれる。

**【 0 2 6 6 】**

非経口的投与用に適した組成物は、本発明の作用因子の無菌水性製剤を含むことが好都合であり、これはレシピエントの血液に対して等張であることが好ましい。この水性製剤は、適した分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を用いる既知の方法に従って製剤化することができる。無菌性の注射用製剤は、非経口的に許容される無毒性の希釈剤または溶媒中にある無菌性の注射液または懸濁剤、例えば1,3-ブタンジオール中にある溶液であってもよい。用いられる許容される媒体および溶媒には、水、リンゲル液および等張塩化ナトリウム溶液がある。さらに、無菌性の不揮発性油は、従来より溶媒または懸濁媒体として用いられている。この目的には、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む、任意の低刺激性不揮発性油を用いることができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸を注射剤の調製に用いることもできる。経口的、皮下、静脈内、筋肉内などの投与用に適した製剤は、「レミントン薬学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」、Mack Publishing Co., Easton, PAに記載されている。

**【 0 2 6 7 】**

本発明の1つの局面によれば、細胞におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるための方法が提供される。本方法は、細胞を、細胞におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるための有効な量にある、本発明の単離された核酸分子（例えば、SEQ ID NO:1の核酸）またはその発現産物（例えば、SEQ ID NO:2のペプチド）と接触させる段階を含む。重要な態様において、本方法は、細胞におけるC - ホルミルグリシン生成活性を高めるために内因性FGE遺伝子を活性化する段階を含む。いくつかの態様において、接触は、本発明の分子が細胞内に入ることを可能にする条件下で行われる。

**【 0 2 6 8 】**

本発明による、細胞内に分子が「入ることを可能にする」という用語は、分子の性質に応じて、以下の意味を有する。単離された核酸の場合には、これは核酸が細胞膜を通って細胞核内に入ることの記述を意味しており、それに統いて「核酸導入遺伝子」は、細胞機構を利用して、核酸によってコードされる機能的ポリペプチドを産生させることができる。「核酸導入遺伝子」とは、随伴するベクターの有無にかかわらず、本発明の核酸のすべてを記述することを意味している。ポリペプチドの場合には、これはポリペプチドが細胞膜を通って細胞の細胞質に入ること、および必要に応じて、ポリペプチドを機能的に（例えば、活性型へと）変換する細胞質機構を利用するなどを記述することを意味している。

**【 0 2 6 9 】**

本発明の核酸を細胞に導入するためにはさまざまな技法を用いることができ、これは核酸をインビトロで導入するかインビボの宿主内で導入するかに依存する。このような技法には、核酸-CaPO<sub>4</sub>沈降物のトランスフェクション、DEABと会合させた核酸のトランスフェクション、目的の核酸を含むレトロウイルスによるトランスフェクション、リポソームを介したトランスフェクションなどが含まれる。ある種の用途に関しては、核酸を特定の細胞に対してターゲティングさせることが好ましい。このような場合には、本発明の核酸を細胞内に送達するために用いられる媒体（例えば、レトロウイルスまたは他のウイルス；リポソーム）に対してターゲティング分子を結合させることができる。例えば、標的細胞上の表面膜タンパク質に対して特異的な抗体、または標的細胞上の受容体に対するリガンドなどの分子を、核酸送達用媒体と結合させること、またはその内部に組み入れができる。例えば、本発明の核酸を送達するためにリポソームを用いる場合には、エンドサイトーシスに関する表面膜タンパク質と結合するタンパク質を、ターゲティングのため、および/または取り込みを容易にするために、リポソームに組み入れてもよい。このようなタンパク質には、特定の細胞種に対する向性のあるキャプシドタンパク質またはそ

10

20

30

40

50

の断片、細胞周期において内部取り込みを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在部を標的とするタンパク質、および細胞内半減期を延長させるタンパク質などが含まれる。当業者に知られているように、ポリマー性送達システムを細胞への核酸の送達のために用いることも成功している。このようなシステムは、核酸の経口的送達すら可能にする。

#### 【0270】

その他の送達システムには、時間放出型、遅延放出または持続的放出型の送達システムが含まれる。このようなシステムにより、本発明の作用因子の反復投与を省くことが可能となり、対象および医師の利便性を高めることができる。多くの種類の放出送達システムが利用可能であり、当業者に知られている。これらには、ポリ(ラクチド-グリコリド)、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸および重合無水物などのポリマーを基にしたシステムが含まれる。  
薬剤を含む前述のポリマーのマイクロカプセルは、例えば、米国特許第5,075,109号に記載されている。送達システムには非ポリマー性システムも含まれ、これには以下のものがある：ステロール(レステロール、コレステロールエステルなど)および脂肪酸または中性脂肪(モノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリドなど)を含む脂質；ヒドロゲル放出システム；シラスティック(sylastic)システム；ペプチドを基にしたシステム；ワックスコーティン；従来の結合剤および添加剤を用いた圧縮錠剤；部分的に融合したインプラント；その他。具体的な例には、以下のものが非制限的に含まれる：(a)本発明の作用因子が、米国特許第4,452,775号、第4,675,189号および第5,736,152号に記載されたもののようなマトリックス内部の形態に含まれている崩壊性システム、ならびに(b)有効成分が、米国特許第3,854,480号、第5,133,974号および第5,407,686号に記載されたものなどのポリマーから制御された速度で透過する拡散システム。さらに、ポンプを用いるハードウェア送達システムを用いることもできる(そのいくつかは移植用に適合化されている)。

#### 【0271】

長期的な持続放出性インプラントの使用が望ましいこともある。長期的放出とは、本明細書で用いる場合、インプラントが、治療レベルの有効成分を少なくとも30日間、好ましくは60日間にわたって送達するように構築および配置されていることを意味する。長期的な持続放出性インプラントは当業者に周知であり、これには上記の放出システムのいくつかが含まれる。具体的な例には、米国特許第4,748,024号およびカナダ特許第1330939号に記載された長期的持続放出性インプラントが非制限的に含まれる。

#### 【0272】

本発明はまた、有効量で投与された場合に本発明の分子と協同的、相加的または相乗的に作用して(i)C-ホルミルグリシン生成活性を調節する、かつ(ii)本発明の分子のC-ホルミルグリシン生成活性が関与している状態のいずれか(例えば、MSDを含むスルファターゼ欠損症)を治療する、本発明のFGE分子以外の作用因子の投与を含み、いくつかの態様においてはその同時投与を含む。本発明の分子以外の作用因子には、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5またはHSulf-6(それらの核酸およびポリペプチド、および/または断片)および/またはそれらの組み合わせが含まれる。

#### 【0273】

「同時投与すること」とは、本明細書で用いる場合、2種またはそれ以上の本発明の化合物(例えば、FGE核酸および/またはポリペプチド、ならびに、例えば、スルファターゼ欠損症の治療に有益なことが知られている作用因子(例えば、MPSIIの治療におけるイズロン酸2-スルファターゼ))を、单一の組成物中にある混合物として同時に投与すること、または化合物が相加的効果、さらには相乗的効果を発揮するように十分に近接した時間内で逐次的に投与することを指す。

10

20

30

40

50

## 【0274】

本発明はまた、固相核酸分子アレイも含む。本アレイは、固体基質に対して固定された、核酸分子、それらの発現産物、またはそれら（核酸分子またはポリペプチド分子のいずれか）の断片のセットから本質的になり、それぞれの核酸分子は、FGE、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群より選択される。いくつかの態様において、固相アレイはさらに、少なくとも1つの対照核酸分子を含む。ある種の態様において、核酸分子のセットは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、またはさらには少なくとも5つの核酸分子を含み、それぞれはFGE、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群より選択される。好ましい態様において、核酸分子のセットは、最大で100種類の異なる核酸分子を含む。重要な態様において、核酸分子のセットは、最大で10種類の異なる核酸分子を含む。

## 【0275】

本発明によれば、マイクロアレイ技術の標準的なハイブリダイゼーション法を、核酸発現のパターンの評価および核酸発現の同定のために利用する。マイクロアレイ技術は、DNAチップ技術、遺伝子チップ技術および固相核酸アレイ技術を含む別の名称でも知られ、当業者に周知であり、同定された核酸プローブ（例えば、本明細書中の別の箇所に記載された分子、例えば、FGE、イズロン酸2-スルファターゼ、スルファミダーゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ、アリールスルファターゼA、アリールスルファターゼB、アリールスルファターゼC、アリールスルファターゼD、アリールスルファターゼE、アリールスルファターゼF、アリールスルファターゼG、HSulf-1、HSulf-2、HSulf-3、HSulf-4、HSulf-5およびHSulf-6からなる群より選択される。好ましい態様において、核酸分子のセットは、最大で100種類の異なる核酸分子を含む。重要な態様において、核酸分子のセットは、最大で10種類の異なる核酸分子を含む。）、

## 【0276】

本発明によれば、マイクロアレイ基質には、ガラス、シリカ、アルミニノケイ酸、ホウケイ酸、アルミナおよび酸化ニッケルなどの金属酸化物、種々の粘土、ニトロセルロースまたはナイロンが非制限的に含まれる。すべての態様において、ガラス基質が好ましい。本発明によれば、プローブは、DNA、ゲノムDNA、cDNAおよびオリゴヌクレオチドを非制限的に含む群から選択され、これは天然性でも合成性でもよい。オリゴヌクレオチドプローブは20-mer～25-merオリゴヌクレオチドであることが好ましく、DNA/cDNAプローブは500～5000塩基長であることが好ましいが、他の長さを用いることもできる。適切なプローブ長は、当業者により、当技術分野で知られた手順に従って決定されうる。1つの態様において、好ましいプローブは、SEQ ID NO：1、3、4、6、8、10、および/または12として示された核酸分子の2つまたはそれ以上のセットである。当業者に知られたゲル濾過または沈降などの標準的な方法を用いて、混入物を除去するためにプローブを精製してもよい。

10

20

30

40

50

## 【0277】

1つの態様においては、マイクロアレイ基質に対して、基質上でのプローブの合成を強化するために化合物をコーティングしてもよい。このような化合物には、オリゴエチレングリコールが非制限的に含まれる。もう1つの態様においては、基質上のカップリング因子またはカップリング基を用いて、第1のヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを基質に対して共有結合させる。これらの因子または基には、アミノ基、ヒドロキシ基、臭素基およびカルボキシ基が非制限的に含まれる。これらの反応性基は、一価位置が鎖結合によって占有され、残りが反応性基と結合するように、アルキレンまたはフェニレン二価遊離基などのヒドロカルビル遊離基を介して基質と結合させることが好ましい。これらのヒドロカルビル基は、最大で約10個の炭素原子、好ましくは最大で約6個の炭素原子を含むことができる。主鎖内に2~4個の炭素原子を含むアルキレン遊離基が通常好ましい。このプロセスの上記およびそのほかの詳細は、例えば、米国特許第4,458,066号に開示されている（これはその全体が参考として組み入れられる）。

10

## 【0278】

1つの態様において、プローブは、光指定による化学合成、光化学的脱保護、またはヌクレオチド前駆体の基質への送達後のプローブ作製といった方法を用いて、基質上に規定のグリッドパターンで直接合成される。

## 【0279】

もう1つの態様において、基質に、プローブの基質に対する結合性を高める化合物をコーティングすることもできる。このような化合物には、ポリリジン、アミノシラン、アミノ反応性シラン（Chipping Forecast, 1999）またはクロム（Gwynne and Page, 2000）が非制限的に含まれる。この態様では、プローブを基質に対して密着印刷様式で、またはインクジェット式または圧電式送達などの非密着印刷様式で塗布するためのコンピュータ制御式ロボットを利用して、あらかじめ合成したプローブを基質に対して正確な規定容積およびグリッドパターンで塗布する。UV照射を非制限的に含む方法を用いて、プローブを基質と共有結合させてもよい。もう1つの態様においては、プローブを熱により基質と結合させる。

20

## 【0280】

標的是、DNA、ゲノムDNA、cDNA、RNA、mRNAを非制限的に含む群から選択される核酸であり、これらは天然性でも合成性でもよい。すべての態様において、スルファターゼ欠損症を発症することまたは有することが疑われる対象由来の核酸分子が好ましい。本発明のある種の態様においては、1つまたは複数の対照核酸分子を基質と結合させる。対照核酸分子は、核酸の質および結合特性；試薬の質および有効性；ハイブリダイゼーションの成果；ならびに分析閾値およびその成果を非制限的に含む要因の決定を可能にするものが好ましい。対照核酸には、ハウスキーピング遺伝子などの遺伝子またはそれらの断片の発現産物が非制限的に含まれる。

30

## 【0281】

スルファターゼ欠損症の疾患マーカーのセットを選択するためには、例えば、遺伝子発現のマイクロアレイ分析によって生じた発現データを解析し、患者の種々のカテゴリー（患者の各カテゴリーは異なるスルファターゼ欠損症の障害である）におけるどの遺伝子が有意差を伴って発現されるかを判定することが好ましい。遺伝子発現の有意性はPermaxコンピュータソフトウェアを用いて判定することができるが、発現の有意差を区別しうる任意の標準的な統計学パッケージを用いてよい。Permaxは、データの大規模アレイに対して並べ替え2標本t検定を遂行する。高次元ベクトルの観測に関しては、Permaxソフトウェアはそれぞれの属性に対してt統計値を算出し、属性全体の最大および最小の並べ替え分布を用いて有意性を評価する。その主な用途は、二群間（例えば、対照健常対象および特定のスルファターゼ欠損症を有する対象）で最も差のある属性（遺伝子）を決定し、t統計値およびそれらの有意水準を用いて「最大の差」を計測することである。

40

## 【0282】

スルファターゼ欠損症の発現に関するある核酸分子の発現を、例えば、SEQ ID NO:1お

50

および/または3によってコードされるポリペプチドの発現を判定することにより、SEQ ID N 0:2の発現を判定するためのタンパク質測定法を用いて判定することもできる。タンパク質を特異的および定量的に測定する好ましい方法には、表面増強レーザー脱離イオン化法( SELDI ; 例えば、Ciphergen Protein Chip System)などの質量分析に基づく方法、質量分析に基づかない方法、および二次元ゲル電気泳動などの免疫組織化学に基づく方法が含まれる。

#### 【 0 2 8 3 】

SELDI法は、当業者に知られた手順により、微視的な量のタンパク質を蒸発させて個々のタンパク質の「フィンガープリント」を作成し、それによって単一試料中の多くのタンパク質の存在量の同時測定を可能にするために用いることができる。SELDIに基づくアッセイを利用して、多重スルファターゼ欠損症ならびにこの種の状態の諸段階を特徴づけることが好ましい。このようなアッセイには好ましくは以下の例が非制限的に含まれる。RNAマイクロアレイによって発見された遺伝子産物は、SELDIタンパク質ディスクに対する特異的(抗体を介した)捕捉(例えば、選択的SELDI)によって選択的に測定することができる。タンパク質スクリーニング(例えば、二次元ゲル)によって発見された遺伝子産物は、SEQ ID NO:1、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26および/または28からの目的の特定マーカーを描出するように最適化された「全タンパク質SELDI」によって分離することができる。SEQ ID NO:1、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26および/または28からの多数のマーカーのSELDI測定による特定のスルファターゼ欠損症の予測モデルを、SELDI戦略のために利用することもできる。10  
20

#### 【 0 2 8 4 】

スルファターゼ欠損症と関連のある核酸の発現を判定するための前述の任意のマイクロアレイ方法の使用は、当業者に知られたルーチン的な方法を用いて行うことができ、タンパク質測定法によって判定された発現を、スルファターゼ欠損症の患者に対する治療戦略を選択するために、予後判定法として用いられる規定レベルのマーカーと相關づけることもできる。

#### 【 0 2 8 5 】

本発明はまた、細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比(すなわち、比活性)が上昇しているスルファターゼ產生細胞も含む。本細胞は(i)発現が高度化しているスルファターゼ、および(ii)発現が高度化しているホルミルグリシン生成酵素を含み、この際、細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比(すなわち、スルファターゼの比活性)は、ホルミルグリシン生成酵素の非存在下で細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比よりも少なくとも5%上昇している。30

#### 【 0 2 8 6 】

「発現が高度化しているスルファターゼ」とは、本明細書で用いる場合、一般的には、スルファターゼおよび/またはそのコードされるポリペプチドの発現が対照と比較して亢進していることを指す。発現亢進とは、スルファターゼ核酸のいずれか(本明細書中の別の箇所に述べたようなスルファターゼ核酸)の複製、転写および/または翻訳を増加させること(すなわち、検出可能な程度まで)を指すが、その理由は、これらのプロセスのいずれかのアップレギュレーションが、その遺伝子(核酸)によってコードされるポリペプチドの濃縮/量の増加をもたらすためである。これは、スルファターゼcDNAおよび/またはスルファターゼ座位を含むゲノムDNAによる細胞のトランسفェクション、内因性スルファターゼ遺伝子のゲノム座位の上流に、例えば強力なプロモーターエレメントを相同組換えを用いて配置することによって内因性スルファターゼ遺伝子を活性化すること(例えば、米国特許第5,733,761号、第6,270,989号および第6,565,844号に詳細に記載された遺伝子活性化技術を参照されたい。これらはすべて参考として本明細書に明示的に組み入れられる)などのよう、当技術分野で知られたさまざまな方法(本明細書中の別の箇所にも述べている)を用いて実現することができる。一般的な対照は、ベクタープラスミドをトランسفクトした同一の細胞であると考えられる。また、スルファターゼ活性を増強40  
50

(または増加)させることは、例えば、スルファターゼの分解(例えば、ユビキチン化の増加を介する)、ダウンレギュレーションを防止または阻害し、その結果、例えば、対照と比較してFGE分子の $t_{1/2}$ (半減期)の延長または安定化をもたらすことも指す。ダウンレギュレーションまたは発現低下とは、遺伝子および/またはそれによってコードされるポリペプチドの発現低下のことを指す。遺伝子発現のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションは、対照と比較した、遺伝子(例えば、FGE)のmRNAのレベル、またはその遺伝子によってコードされるポリペプチドのタンパク質発現のレベルの上昇または低下を、当技術分野で知られた任意の適した手段、例えば、それぞれ核酸ハイブリダイゼーションまたは抗体検出法などを用いて検出することによって直接判定することができる。また、FGE遺伝子発現のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを、C  
10 -ホルミルグリシン生成活性の変化を検出することによって間接的に判定することもできる。

#### 【0287】

同様に、「発現が高度化しているホルミルグリシン生成酵素」とは、本明細書で用いる場合、一般的には、本発明のFGE核酸および/またはそのコードされるポリペプチドの発現が対照と比較して亢進していることを指す。発現亢進とは、本発明のFGE核酸(本明細書中の別の箇所に述べたようなもの)の複製、転写および/または翻訳を増加させること(すなわち、検出可能な程度まで)を指すが、その理由は、これらのプロセスのいずれかのアップレギュレーションが、その遺伝子(核酸)によってコードされるポリペプチドの濃縮/量の増加をもたらすためである。これは、上記(スルファターゼに関する)および本明細書中の別の箇所に述べた方法を用いて実現することができる。  
20

#### 【0288】

ある種の態様において、細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比は、ホルミルグリシン生成酵素の非存在下で細胞によって產生されるスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比よりも、少なくとも10%、15%、20%、50%、100%、200%、500%、1000%上昇している。

#### 【0289】

本発明はさらに、対象におけるスルファターゼ欠損症を治療するための改良された方法を含む。本方法は、このような治療を必要とする対象に対して、対象におけるスルファターゼ欠損症を治療するための有効量でスルファターゼを投与する段階を含み、この際、スルファターゼは、スルファターゼの比活性を上昇させるために有効な量のホルミルグリシン生成酵素と接触されている。本明細書中の別の箇所に述べたように、「比活性」とは、產生されたスルファターゼ全体に対する活性型スルファターゼの比のことを指す。「接触された」とは、本明細書で用いる場合、本明細書中の別の箇所に述べたようにスルファターゼを翻訳後修飾するFGEのことを指す。FGEおよびスルファターゼをコードする核酸を1つの細胞内で共発現させれば、または単離されたFGEポリペプチドを単離されたスルファターゼポリペプチドとインビトロで接触させさえすれば、FGEをスルファターゼと接触させてそれを修飾させることができること、当業者には明らかであると考えられる。対象におけるスルファターゼ欠損症を治療するために、単離されたFGEポリペプチドを単離されたスルファターゼポリペプチドとともに対象に対して同時投与することがたとえ可能でも、スルファターゼを対象に投与する前に、FGEとスルファターゼとの接触をインビトロで行っておくことが好ましい。この改良された治療方法は、スルファターゼの比活性がより高いため、投与する必要のあるスルファターゼの量および/または頻度がより少なくて済むという理由で、対象にとって有益である。  
30  
40

#### 【0290】

本発明は、以下の実施例を参照することによってさらに詳細に理解されると考えられる。しかし、これらの実施例は、本発明の態様を単に例示することのみを意図しており、本発明の範囲を限定するものとみなされるべきではない。

#### 【0291】

#### 実施例

10

20

30

40

50

実施例1:

多重スルファターゼ欠損症はヒトC - ホルミルグリシン生成酵素 (FGE) をコードする遺伝子における変異によって引き起こされる

実験手順材料および方法

## FGEに関するインビトロアッセイ

FGEの活性の観測に関しては、N-アセチル化およびC-アミド化を行った23merペプチド P23 (MTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRS) (SEQ ID NO:33)

を基質として用いた。11位のシスティン残基のFGlyへの変換はMALDI-TOF質量分析法により観測した。30%アセトニトリルおよび0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) 中にP23の6 μM原液を調製した。標準的条件下では、6molのP23を最大10 μlの酵素とともに、67mM NaCl、15 μM CaCl<sub>2</sub>、2mM DTTおよび0.33mg/mlウシ血清アルブミンを含む50mM Tris/HCl、pH 9.0中にて（最終容積30 μlとして）37 °Cでインキュベートした。酵素反応を停止させるためには、10%TFAを1.5 μl添加した。続いてP23をZipTip C18 (Millipore) に結合させ、0.1%TFAで洗浄し、3 μlの50%アセトニトリル、0.1%TFAにより溶出させた。溶出液0.5 μlを0.5 μlのマトリックス溶液 (5mg/ml a-シアノ-4-ヒドロキシ-ケイ皮酸 (Bruker Daltonics, Billerica, MA)、50%アセトニトリル、0.1%TFA中) と、ステンレス鋼ターゲット上で混合した。MALDI-TOF質量分析は、Reflex III (Bruker Daltonics) により、リフレクトロンモードおよび脱離/イオン化閾値をわずかに上回るレーザーエネルギーを用いて行った。スペクトルはすべて、ターゲット上の数個のスポットからの200 ~ 300ショットの平均である。質量軸は分子質量が1000 ~ 3000 Daの範囲のペプチドを外部標準として用いて補正した。P23のモノアイソトピックMH<sup>+</sup>は2526.28であり、FGly含有生成物のそれは2508.29である。活性（生成物のpmol数/h）は、生成物のピーク高をP23および生成物のピーク高の合計によって除算することに基づいて算出した。

## 【0292】

## ウシ精巣からのFGEの精製

ウシ精巣を地域の屠畜場から入手し、氷上に最長20h置いた。実質から結合組織を除去し、ワーリングブレンダーを用いて3回の電動処理 (motor pottering) によりホモジネート化した。入手したホモジネートの細胞分画による粗ミクロソーム (RM) の調製は、記載された内容 (Meyer et al., J. Biol. Chem., 2000, 275: 14550-14557) に以下の変更を加えた上で行った。4 °Cでの各20分間の分画遠心処理を、500g (JA10遠心器)、3000g (JA 10) および10000g (JA20) の3回行った。最終上清からRM膜を沈降させ (125000g、Ti45遠心器、45分間、4 °C)、電動処理によってホモジネート化した上で、ショ糖クッショングループラスム (reticuloplasm) すなわちRMの管腔内容物は、記載の通りに (Fey et al., J. Biol. Chem., 2001, 276: 47021-47028)、低濃度のdeoxy Big Chapでの分画抽出によって入手した。FGEの精製に関しては、95mlのレチクロプラスムを20mM Tris/HCl、pH 8.0、2.5mM DTTに対して4 °Cで20h透析した上で、125000g、1hの遠心沈降処理を行った。透明化したレチクロプラスムの32mlアリコートをMonoQ HR10/10カラム (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) に室温でローディングし、洗浄した上で、0 ~ 0.75M NaCl (Tris緩衝液80ml中) の直線的勾配により2ml/minで溶出させた。50 ~ 165mM NaClで溶出したFGE活性を含む画分を3回の処理でプールし (42ml)、0.5M KCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM MnCl<sub>2</sub>、1mM CaCl<sub>2</sub> および2.5mM DTTを含む50mM Hepes緩衝液、pH 7.4により洗浄したコンカナバリンA-Sepharose (Amersham Biosciences) 2mlと混合した。4 °Cで16hインキュベートした後に、コンカナバリンA-Sepharoseをカラムに集め、同じHepes緩衝液6mlにより洗浄した。結合した物質を、カラムを0.5M a-メチルマンノシド (50mM Hepes、pH 7.4、2.5mM DTF中) 6mlとともに室温で1hインキュベートすることによって溶出させた。同じ溶出液4mlを用いて

10

20

30

40

50

溶出を再度行った。コンカナバリンA-Sepharoseからの溶出液を併せたもの(10ml)を、0.5M Tris/HCl、pH 8.0に調整し、乱雑化ペプチド

**(PVSLPTRSCAALLTGR) (SEQ ID NO:34)**

10mgにより誘導体化したAffigel 10(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 2mlと混合して、バッファーA(50mM Hepes、pH 8.0、0.15M酢酸カリウム、0.125Mショ糖、1mM MgCl<sub>2</sub>および2.5mM DTTを含む)により洗浄した。4で3hインキュベートした後に、このアフィニティーマトリックス(affinity matrix)をカラムに集めた。4mlのバッファーAによる流出液および洗浄画分を収集し、まとめた上で、Ser69ペプチド

**(PVSLSTPSRAALLTGR) (SEQ ID NO:35)**

10mgによる置換処理を行った2mlのAffigel 10と混合し、バッファーAで洗浄した。4で一晩インキュベートした後に、アフィニティーマトリックスをカラムに集め、バッファーB(2M NaClおよび20種のタンパク質生成性アミノ酸各50mg/mlの混合物を含むバッファーA)6mlにより3回洗浄した。結合した物質を、25mMのSer69ペプチドを含む6mlのバッファーBとともにAffigelを90minずつ2回インキュベートすることによってアフィニティーマトリックスから溶出させた。溶出液のアリコートに対して1mg/mlウシ血清アルブミンによる置換処理を行い、バッファーAに対して透析させた上で活性に関して分析した。活性の残りの部分(11.8ml)は、Vivaspin 500濃縮装置(Vivascience AG, Hannover, Germany)で濃縮し、95でLaemmli SDSサンプルバッファー中に溶解させた。出発材料およびクロマトグラフィー段階後に入手した調製物のポリペプチド組成を、SDSPAGE(15%アクリルアミド、0.16%ビスアクリルアミド)により観測し、SYPRO Ruby(Bio-Rad Laboratories)で染色した。

**【0293】**

**質量分析法によるFGEの同定**

ペプチド質量フィンガープリント分析に関しては、精製ポリペプチドをゲル中でトリプシン消化し(Shevchenko et al., Anal. Chem., 1996, 68: 850-855)、C18ZipTipで脱塩処理を行った上で、ジヒドロ安息香酸をマトリックスとして、トリプシン由来の2種類の自己溶解性ペプチド(m/z 842.51および2211.10)を内部標準として用いるMALDI-TOF質量分析法により分析した。タンデム質量分析に関しては、選択したペプチドをMALDI-TOFポストソース分解質量分析法により分析した。それらに対応する二重荷電イオンを単離し、オフライン式nano-ESIイオントラップ質量分析法(EsquireLC, Bruker Daltonics)により断片化した。これらの質量分析データを、NCBI nrタンパク質データベースおよびNCBI ESTヌクレオチドデータベースにおけるタンパク質同定のためにMascot検索アルゴリズムにより用いた。

**【0294】**

**バイオインフォマティクス**

シグナルペプチドおよび切断部位は、EMBOSS(Rice et al., Trends in Genetics, 2000, 16: 276-277)に組み込まれているvon Heijneの方法(von Heijne, Nucleic Acids Res., 1986, 14: 4683-90)により記載した。N-グリコシル化部位はBrunakのアルゴリズム(Gupta and Brunak, Pac. Symp. Biocomput., 2002, 310-22)を用いて予想した。機能的ドメインは、PFAM-Hidden-Markov-Model(バージョン7.8)(Sonhammer et al., Nucleic Acids Res., 1998, 26: 320-322)を検索することにより検出した。FGEホモロジーの検索のためには、National Center for Biotechnology Informationのデータベース(Wheeler et al., Nucleic Acids Res., 2002, 20: 13-16)に対して、BLAST(Altschul et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25: 3389-3402)を用いてクエリー処理を行った。配列類似性は、EMBOSSによる標準的なツールを用いて算出した。ゲノム座位の構成およびシンテニーはNCBIのヒトゲノムおよびマウスゲノムのリソース、ならびに同じくNCBI(Bethesda、MD)のHuman-Mouse Homology Mapを用いて決定した。

**【0295】**

**ヒトFGE cDNAのクローニング**

RNEASY(商標) Miniキット(Qiagen, Inc., Valencia, CA)を用いてヒト線維芽細胞か

10

20

30

40

50

ら調製した全RNAを、OMNISCRIP RT(商標)キット(Qiagen, Inc., Valencia, CA)、およびオリゴ(dT)プライマーまたはFGE特異的プライマー

1199nc (CCAATGTAGGTCAGACACG) (SEQ ID NO:36)

のいずれかを用いて逆転写させた。第一鎖cDNAを、順方向プライマー

1c (ACATGGCCCCGCGGGAC) (SEQ ID NO:37)

、および逆方向プライマーとして

1199nc または 1182nc (CGACTGCTCCTGGACTGG) (SEQ ID NO:38)

のいずれかを用いるPCRを用いて増幅した。これらのPCR産物をpCR4-TOPO(商標)ベクター(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)中に直接クローニングした。種々の個体から独立したRT反応およびPCR反応によって入手した多数のクローニングPCR産物のシークエンシングにより、FGE cDNAのコード配列を決定した(SEQ ID NO:1および3)。

#### 【0296】

変異検出、ゲノムシークエンシング、部位指定変異誘発およびノーザンプロット分析

本研究に用いた標準的なプロトコールは、本質的には、Lubke et al. (Nat. Gen., 2001, 28: 73-76) および Hansske et al. (J. Clin. Invest., 2002, 109: 725-733) に記載されたものと同じである。ノーザンプロットを、全コード領域をカバーするcDNAプローブ、およびRNAローディングに関する対照としてのアクチンcDNAプローブとハイブリダイズさせた。

#### 【0297】

細胞株および細胞培養

MSD患者1~6由来の線維芽細胞を、それぞれ、

E. Christenson

(Rigshospitalet Copenhagen), M. Beck (Universitätskinderklinik Mainz), A. Kohlschütter (Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg), E. Zammarchi (Meyer Hospital, University of Florence), K. Harzer (Institut für Hirnforschung, Universität Tübingen), and A. Fensom (Guy's Hospital, London)

から入手した。ヒト皮膚線維芽細胞であるHT-1080細胞、BHK21細胞およびCHO細胞は、10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ変法イーグル培地にて5%CO<sub>2</sub>下、37℃で維持した。

#### 【0298】

トランスフェクション、間接免疫蛍光法、ウエスタンプロット分析およびFGE活性の検出

Pfuポリメラーゼ(Stratagene, La Jolla, CA)および以下のプライマー:

GGAATTCTGGACAAACATGGCTGCG (EcoRI) (SEQ ID NO:39), CCCAAGCTTATGC

GTAGTCAGGCACATCATACGGATAGTCATGGTGGGCAGGC(HA)(SEQ ID NO:40),

CCCAAGCTTACAGGTCTTCTCAGAAATCAGCTTTGTTCGTCCATGGTGGGCAG

GC (c-Myc) (SEQ ID NO:41), CCCAAGCTTAGTGATGGTATGGTATGCGATC

CTCTGTCCATGGTGGGCAGGC (RGS-His<sub>6</sub>) (SEQ ID NO:42)

を用いるadd-on PCRを用いることにより、FGE cDNAに対して、5' EcoRI部位、および3' HAタグ配列、c-Mycタグ配列またはRGS-His6タグ配列のいずれか(その後方に終止コドンおよびHindIII部位)を付与した。その結果得られたPCR産物をEcoRI/HindIII断片としてpMP-SVEH(Artelt et al., Gene, 1988, 68: 213-219)中にクローニングした。得られたプラスミドを、EFFECTENE(商標)(Qiagen)をトランスフェクション試薬として用いて、カバーガラス上で増殖させたHT-1080細胞、BHK21細胞およびCHO細胞に対して一過性にトランスクエクトした。トランスフェクションの48h後に細胞を、HA(Berkeley Antibody Company, Richmond, CA)、c-Myc(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)またはRGS-His(Qiagen)に対するモノクローナルIgG1抗体を一次抗体として用いて、以前

10

20

30

40

50

の記載の通りに間接免疫蛍光法により分析した (Lubke et al., Nat. Gen., 2001, 28: 73-76; Hansske et al., J. Clin. Invest., 2002, 109: 725-733)。小胞体マーカータンパク質タンパク質であるジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、サブタイプの異なるモノクローナル抗体 (IgG2A, Stressgen Biotech., Victoria BC, Canada) を用いて検出した。これらの一次抗体を、それぞれCY2またはCY3を結合させたアイソタイプ特異的ヤギ二次抗体 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) を用いて検出した。免疫蛍光画像はLeica TCS Sp2 AOBSレーザー走査顕微鏡を用いて得た。ウエスタンプロット分析に関しては、同じモノクローナル抗体、および二次抗体としてのHRP結合抗マウス IgGを用いた。FGE活性の決定に関しては、トリプシン処理した細胞を、プロテイナーゼ阻害薬の混合物 (208 μM 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩、0.16 μM アプロチニン、4.2 μM ロイペプチド、7.2 μM ベスタチン、3 μM ペプスタチンA、2.8 μM E-64) を含むリン酸緩衝食塩水で洗浄し、2.5mM DTT、プロテイナーゼ阻害薬および1% Triton X-100を含む10 mM Tris、pH 8.0中に溶解した後、125,000gでの1hの遠心処理により透明化した。上清を、上記の条件を用いるMonoQ PC 1.6/5カラムでのクロマトグラフィーにかけた。50 ~ 200 mM NaClで溶出した画分をプールし、凍結乾燥させ、元のプール容積の10分の1に再構成した後に、FGE活性をペプチドP23を用いて決定した。

## 【0299】

## レトロウイルス形質導入

目的のcDNAを、モロニーマウス白血病ウイルスを基にしたベクターであるpLPCXおよびpLNCL2 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) 中にクローニングした。同種指向性FNX-Eco細胞 (ATCC, Manassas, VA) のトランスフェクション、ならびに両種指向性RETROPAK (商標) PT67細胞 (BD Biosciences Clontech) およびヒト線維芽細胞の形質導入は、記載の通りに行なった

(Lübke et al., Nat. Gen., 2001, 28:73-76; Thiel et al., Biochem. J., 2002, 376, 195-201)

。いくつかの実験に関しては、スルファターゼ活性の決定の前に、pLPCX形質導入PT67細胞をピューロマイシンにより選択した。

## 【0300】

## スルファターゼアッセイ

ASA、STSおよびGalNAc6Sの活性は、

Rommerskirch

and von Figura, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1992, 89:2561-2565; Glössl and Kresse, Clin. Chim. Acta, 1978, 88:111-119

に記載されたようにして決定した。

## 【0301】

結果

## FGE活性に関する迅速ペプチドベースアッセイ

本発明者らは、ミクロソーム抽出物中のFGE活性を、インビトロ合成した[35S]ASA断片を基質として用いて決定するためのアッセイを開発した。この断片を、リボソームと会合した新生鎖複合体としてのアッセイ混合物に添加した。生成物の定量には、トリプシン消化、RP-HPLCによるペプチドの分離、ならびにヒドラゾンに対する化学的誘導体化、RP-HPLC分離および液体シンチレーション計数の組み合わせによる、トリプシンペプチドを含む[35S]標識FGlyの同定および定量が含まれていた (Fey et al., J. Biol. Chem., 2001, 276: 47021-47028)。精製中の酵素活性のモニタリングのためには、この複雑な手順を変更する必要があった。ASA残基65-80に対応し、FGly形成のために必要な配列モチーフを含む合成16merペプチドは、インビトロアッセイでFGE活性を阻害した。このことから、ASA65-80などのペプチドがFGEに対する基質として作用することが示唆された。本発明者らは、ASA残基60-80に対応し、さらにN-アセチル化メチオニンおよびC-アミド化セリン残基が

それぞれN末端およびC末端を保護するために加えられている23merペプチドP23 ( SEQ ID N 0 : 33 ) を合成した。マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型 ( MALDI-TOF ) 質量分析法により、システインおよびFGly含有型P23の同定および定量が可能であった。P 23の11位にFGly残基が存在することは、MALDI-TOFポストソース分解質量分析法 ( Peng et al., J. Mass Spec., 2003, 38: 80-86を参照 ) によって確認された。P23とウシ臍臓またはウシ精巣のミクロソーム由来の抽出物とのインキュベーションにより、ペプチドの最大95 % がFGly含有誘導体に変換された ( 図1 ) 。標準的条件下では、消費された基質が50 % 未満であってインキュベーション期間が24hを超えない限り、反応は酵素およびインキュベーション時間に比例した。P23に関するkmは13nMであった。還元型および酸化型のグルタチオン、Ca<sup>2+</sup>ならびにpHの影響は、リボソーム会合新生鎖複合体を基質として用いたアッセイで認められたものと同程度であった ( Fey et al., J. Biol. Chem., 2001, 276: 47021-47028 ) 。

### 【 0 3 0 2 】

#### FGEの精製

FGEの精製のためには、ウシ精巣ミクロソームの可溶性画分 ( レチクロプラスム ) を出発材料として用いた。FGEの比活性は、ウシ臍臓ミクロソーム由来のレチクロプラスムの10 ~ 20倍の高さであった ( Fey et al., J. Biol. Chem., 2001, 276: 47021-47028 ) 。FGEの精製は、4種類のクロマトグラフィー段階の組み合わせによって行った。最初の2つの段階は、MonoQ陰イオン交換体およびコンカナバリンA-Sepharose上でのクロマトグラフィーとした。pH 8でFGE活性はMonoQと結合し、これを50 ~ 165mM NaClで溶出させたところ回収率は60 ~ 90 % であった。この画分をコンカナバリンA-Sepharoseと混合するとFGEが結合した。出発時活性の30 ~ 40 % を0.5M α-メチルマンノシドによって溶出させることができた。後半の2つの精製段階は、16merペプチドにより誘導体化したアフィニティーマトリックス上でのクロマトグラフィーとした。第1のアフィニティーマトリックスは、FGly形成のために必須な残基Cys69、Pro71およびArg73を乱雑化したASA65-80ペプチドのバリアント ( 乱雑化ペプチド )

#### PVSLPTRSCAALLTGR -SEQ ID NO:34

) により置換したAffigel 10とした。このペプチドはインビトロアッセイ系に10mM濃度で添加した場合にはFGE活性を阻害せず、Affigel 10に固定化した場合にはFGE活性を保持しなかった。乱雑化ペプチドのアフィニティーマトリックス上でのクロマトグラフィーにより、小胞体のシャペロンを含め、ペプチド結合タンパク質は除外された。第2のアフィニティーマトリックスは、Cys69がセリンにより置換されたASA65-80ペプチドのバリアント ( Ser69ペプチド )

#### PVSLSTPSRAALLTGR-SEQ ID NO:35

) により置換したAffigel 10とした。このSer69ペプチドのアフィニティーマトリックスはFGEと効率的に結合した。FGE活性は2M KSCNまたは25mM 5er69ペプチドによって回収率20 ~ 40 % で溶出させることができた。活性決定の前にはKSCNまたはSer69ペプチドを透析によって除去しなければならなかった。活性型FGEの溶出にはCys69のセリンによる置換が必須であった。野生型ASA65-80ペプチドにより置換したAffigel 10はFGEを効率的に結合させた。しかし、カオトロピック塩 ( KSCN、MgCl<sub>2</sub> ) 、ペプチド ( ASA65-80またはSer69ペプチド ) または低pHもしくは高pHの緩衝液を用いた溶出液中には、ほぼ全く活性が回収されなかつた。図2には、出発材料、および4種類のクロマトグラフィー段階による典型的な精製後の活性画分のポリペプチドパターンを示している。最終画分中には、出発時のFGE活性の5 % および出発時のタンパク質の0.0006 % が回収された ( 8333倍の精製 ) 。

### 【 0 3 0 3 】

精製された39.5kDaおよび41.5kDaのポリペプチドは単一の遺伝子によってコードされる

精製したFGE調製物中の39.5kDaおよび41.5kDaのポリペプチドをペプチド質量フィンガープリント分析にかけた。MALDI-TOF質量分析法によって得られた、2種類のポリペプチドのトリプシンペプチドの質量スペクトルは大きく重複しており、このことはこの2種類の

タンパク質が同一遺伝子から生じたことを示唆する。両方のポリペプチドのトリプシンペプチド中には、量の多い2種類のペプチドである

MH<sup>+</sup> 1580.73, SQNTPDSSASNLLGFR (SEQ ID

NO:43), および MH<sup>+</sup> 2049.91, MVPIPAGVFTMGTDDPQIK -SEQ ID NO:44

に2つのメチオニン酸化が加わったもの)が見いだされ、これらはGenBank Acc. No. AK07 5459のcDNAによってコードされるタンパク質 (SEQ ID NO: 4)と合致した。この2種類のペプチドのアミノ酸配列を、MALDI-TOFポストソース分解スペクトルにより、およびオフライン式ナノエレクトロスプレーイオン化 (ESI) イオントラップ質量分析法を用いるMS/MS分析によって確かめた。FGEのC末端部分をカバーするヒトcDNAのウシオルソログのEST配列、および両方のペプチドの配列のマッチングにより、ウシFGEに関するさらなる配列情報が得られた。

#### 【 0 3 0 4 】

##### FGEの進化上の保存およびドメイン構造

ヒトFGEの遺伝子は (SEQ ID NO: 1および/または3) のcDNAによってコードされ、染色体3p26に位置する。これは約105kbの範囲に及び、そのコード配列は9個のエクソンにわたって分布している。ヒトFGE遺伝子の3つのオルソログが、マウス (87%の同一性)、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) (48%の同一性) およびハマダラカ (*Anopheles gambiae*) (47%の同一性)で見いだされた。オルソロガスEST配列は、ウシ、20 ブタ、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)、ニシツメガエル (*Silurana tropicalis*)、ゼブラフィッシュ、サケおよびその他の魚類を含むさらに8つの種で見いだされた(詳細については実施例2を参照されたい)。ヒト遺伝子とマウス遺伝子との間でエクソン-インtron構造は保存されており、染色体6E2上のマウス遺伝子はヒト染色体3p26と相同な領域に位置する。S.セレビシエ (*S. cerevisiae*) およびC.エレガヌス (*C. elegans*) のゲノムにはFGEホモログが存在しない。原核生物ではヒトFGEの12種類のホモログが見いだされた。ヒトFGEのcDNAは、374残基のタンパク質をコードすると予想される(図3およびSEQ ID NO: 2)。このタンパク質は33残基の切断可能なシグナル配列を含み(これはFGEが小胞体内に移行することを示す)、Asn141に単一のN-グリコシル化部位を含む。FGEとコンカナバリンAが結合することは、このN-グリコシル化部位が用いられることが示唆する。FGEの残基87~367は、PFAMタンパク質モチーフデータベース中に機能不明のドメイン (PFAM: DUF323)として挙げられている。ヒトFGEと、データベース中に同定されたその真核生物オルソログとの配列比較解析により、このドメインが3つの異なるサブドメインから構成されることが示されている。

#### 【 0 3 0 5 】

N末端サブドメイン(ヒトFGEにおける残基91~154)は、既知の4種類の真核生物FGEオルソログの内部で46%の配列同一性および79%の類似性を有する。ヒトFGEでは、このドメインはAsn141にN-グリコシル化部位を有し、これは他のオルソログで保存されている。FGEの中央部(ヒトFGEにおける残基179~308)は、トリプトファンリッチなサブドメイン(129残基中に12個のトリプトファン)によって代表される。このサブドメインの内部での真核生物オルソログの同一性は57%であり、類似性は82%である。C末端サブドメイン(ヒトFGEにおける残基327~366)は、FGEファミリー内で最も高度に保存されている配列である。ヒトC末端サブドメインと真核生物オルソログ(3つの完全長配列および8つのEST)との配列同一性は85%であり、類似性は97%である。サブドメイン3の40残基の内部では4つのシステイン残基が完全に保存されている。これらのシステインのうち3つは原核生物FGEオルソログでも保存されている。FGEファミリーの12種類の原核生物メンバー(詳細については実施例2を参照のこと)は、真核生物FGEと共にサブドメイン構造を有する。3つのサブドメイン間の境界は、種々の長さの非保存的配列がサブドメインを互いに隔てているため、原核FGEファミリーではより明確である。ヒトおよびマウスのゲノムはFGEの2種類の近縁ホモログをコードする(ヒトではSEQ ID NO: 43および44、GenBank Acc. No.

10

20

30

40

50

NM\_015411、マウスではSEQ ID NO : 45および46、GenBank Acc. No. AK076022)。この2つのパラログの同一性は86%である。それらの遺伝子は相同的な染色体領域に位置する(ヒトでは7q11、マウスでは5G1)。いずれのパラログもFGEオルソログと共にサブドメイン構造を有し、ヒトFGEとの同一性は35%であり、類似性は47%である。この2つのホモログの同一性が100%である、第3のサブドメインでは、システインを含むサブドメイン3のウニペカマー配列が欠失している。

### 【0306】

#### 発現、細胞内局在および分子形態

2.1kbの単一の転写物が、検出可能なby皮膚線維芽細胞からの全RNA、ならびに心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および胰臓からのポリA<sup>+</sup> RNAのノーザンプロット分析によって検出可能である。-アクチンRNAに比べて存在量には一桁のばらつきがあり、胰臓および腎臓で最も多く、脳で最も少ない。ヒトFGE、またはHAタグ、MycタグもしくはHis6タグによってC末端が延長されたFGE誘導体のcDNAを安定的または一過性に発現する種々の真核細胞株を、FGE活性およびFGEの細胞内局在に関してアッセイした。タグ標識FGEおよび非標識FGE一過性発現により、FGE活性は1.6～3.9倍に上昇した。PT67細胞におけるFGEの安定的発現はFGEの活性を約100倍に上昇させた。BHK 21細胞、CRO細胞およびHT1080細胞において間接免疫蛍光法によりタグ標識型FGEを検出したところ、種々のタグ標識型FGEと、小胞体の内腔タンパク質であるプロテインジスルフィドイソメラーゼとの共存が示された。タグ標識型FGEをコードするcDNAを一過性にトランスフェクトしたBHK 21細胞からの抽出物のウエスタンプロット分析により、見かけ上のサイズが42～44kDaである単一の免疫反応性バンドが示された。

### 【0307】

#### MSDにおいてFGE遺伝子は変異を有する

MSDは、スルファターゼにおけるFGly残基の生成に欠損があることによって引き起こされる(Schmidt, B., et al., Cell, 1995, 82: 271-278)。このため、FGE遺伝子はMSDの候補遺伝子である。本発明者らは、7例のMSD患者のFGEをコードするcDNAの増幅およびシーケンシングを行って10種類の変異を同定し、これをゲノムDNAのシーケンシングによって確かめた(表1)。

### 【0308】

#### (表1) MSD患者における変異

変異	タンパク質に対する影響	備考	患者
1076C>A	S359X	C末端16残基の短縮	1*
IVS3+5-8 del	残基149-173の欠失	エクソン3のインフレーム消失	1, 2
979C>T	R327X	サブドメイン3の消失	2
1045C>T	R349W	サブドメイン3における保存的残基の置換	3, 7
1046G>A	R349Q	サブドメイン3における保存的残基の置換	4
1006T>C	C336R	サブドメイン3における保存的残基の置換	4
836C>T	A279V	サブドメイン2における保存的残基の置換	5
243delC	フレームシフトおよび短縮	3つのサブドメインすべての消失	5
661delG	フレームシフトおよび短縮	サブドメイン3を含むFGEのC末端側3分の1の消失	6**
IVS6-1G>A	残基281-318の欠失	エクソン7のインフレーム消失	5

\*患者1は、Schmidt, B., et al., Cell, 1995, 82: 271-278、およびRommerskirch and v

10

20

30

40

50

on Figura, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1992, 89: 2561-2565におけるMSD患者Mo.である。

\*\*患者6は、Burk et al., J. Pediatr., 1984, 104: 574-578により報告されたMSD患者である。

他の患者は未発表の症例である。

### 【0309】

第1の患者は、セリン359のコドンを終止コドンに変換する1076C > A置換 (S359X) についてヘテロ接合性であり、この変異はエクソン3によってコードされ、タンパク質の第1ドメインおよび第2ドメインを隔てている25残基149-173の除去を引き起こす。ゲノムシーケンシングにより、イントロン3のスプライスドナー部位を破壊する第3イントロンのヌクレオチド+5-8の欠失 (IVS3+5-8 del) が判明した。第2の患者は、エクソン3の消失を引き起こす変異 (IVS3+5-8 del) およびアルギニン327のコドンを終止コドンに変換する979C > T置換 (R327X) についてヘテロ接合性であった。979C > Tアレルによってコードされる短縮型FGEはサブドメイン3の大部分を失っている。第3の患者は、サブドメイン3中の保存的なアルギニン349をトリプトファンに置き換える1045C > T置換 (R349W) についてホモ接合性であった。第4の患者は、PGEドメイン内の保存的な残基を置換する2つのミスセンス変異：アルギニン349をグルタミンに置き換える1046 > T置換 (R349Q) およびシスティン336をアルギニンに置き換える1006T > C置換 (C336R) についてヘテロ接合性であった。第5の患者は、保存的なアラニン279をバリンに置き換える836C > T置換 (A279V) についてヘテロ接合性であった。第2の変異は、プロリン81以後の配列を変化させて残基139の後の翻訳停止を引き起こす单一ヌクレオチド欠失 (243delC) である。第6の患者は、残基220以後のアミノ酸配列を変化させ、残基266の後に終止コドンを導入する单一ヌクレオチドの欠失 (661delG) についてヘテロ接合性であった。第2の変異は、残基281-318をコードするエクソン7のインフレーム欠失を引き起こす、イントロン6のスプライスアクセプター部位の変異 (IVS6-1G > A) である。第7の患者には、第3患者におけるものと同じ1045C > T置換が見いだされた。さらに、本発明者らは、対照およびMSD患者からの18種のFGEアレルのコード領域に2種類の多型を見いだした。22%はセリン63をアスパラギンに置き換える188G > A置換 (S63N) を保有し、28%はサイレント性1116C > T置換を保有していた。

### 【0310】

野生型および変異型FGE cDNAによるMSD線維芽細胞への形質導入

FGEの欠損症がMSDにおいて合成されるスルファターゼの不活性の原因であることを確かめるために、本発明者らはレトロウイルス遺伝子導入を利用して、FGE cDNAをMSD線維芽細胞で発現させた。対照として、cDNA挿入物を含まないレトロウイルスベクターによる形質導入も行った。この代謝的欠陥の補完に関するモニタリングのために、選択の前または後に形質導入線維芽細胞におけるASA、ステロイドスルファターゼ (STS) およびN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ (GalNAc6S) の活性を測定した。野生型FGEの形質導入は、この3種のスルファターゼの触媒活性を2種類のMSD細胞株（表2）で部分的に回復させ、第3のMSD細胞株ではSTSを回復させた。ASAおよびGalNAc6Sに関しては、線維芽細胞の選択後の回復が正常活性の20~50%と部分的に過ぎなかつたことに注意すべきである。STSに関しては活性は選択後の対照線維芽細胞の程度まで回復したことがわかった。選択により、ASAおよびSTSの活性は50~80%上昇したが、これは線維芽細胞の15~50%が形質導入を受けるという以前の観察所見に一致する (Lubke et al., Nat. Gen., 2001, 28: 73-76)。レトロウイルスベクターのみを形質導入したMSD線維芽細胞におけるスルファターゼ活性（表2）は、非形質導入MSD線維芽細胞と同程度であった（提示せず）。IVS3+5-8delI変異を有するFGE cDNAの形質導入はスルファターゼ活性を回復させることができなかつた（表2）。

### 【0311】

(表2) 野生型または変異型FGE cDNAの形質導入によるMSD線維芽細胞の補完

線維芽細胞	FGE挿入物	スルファターゼ		
		ASA <sup>1</sup>	STS <sup>1</sup>	GalNAc6S <sup>1</sup>
MSD 3°	-	1.9 ± 0.2	<3	56.7 ± 32
	FGE <sup>+</sup>	7.9	13.5	n. d.
	FGE <sup>++</sup>	12.2 ± 0.2	75.2	283 ± 42
	FGE-IVS3+5-8del <sup>+</sup>	1.8	<3	n. d.
	FGE-IVS3+5-8del <sup>++</sup>	2.1	<3	98.5
MSD 4°	-	1.1 ± 0.3	<3	n. d.
	FGE <sup>+</sup>	4.7	17.0	n. d.
対照線維芽細胞		58 ± 11	66 ± 31	828 ± 426

<sup>1</sup>これらの値はASA( mU/mg細胞タンパク質)、STS( μU/mg細胞タンパク質)、GalNAc6S( μU/mg細胞タンパク質)と3-ヘキソサミニダーゼ(U/mg細胞タンパク質)との比を示している。対照線維芽細胞に関しては、6~11種の細胞株の平均および偏差を示している。指示された場合、並行して形質導入を行った2つの培養物の範囲をMSD線維芽細胞に関して示している。

MSD線維芽細胞の番号は表1中の患者のそれに対応する。

+ 選択前の活性決定

20

++ 選択後の活性決定

n.d. : 測定せず

【 0 3 1 2 】

#### 考察

FGEは小胞体の高度に保存された糖タンパク質である

ウシ精巣からのFGEの精製により、同じ遺伝子から生じる39.5kDaおよび41.5kDaの2つのポリペプチドが得られた。3種類の異なるタグ標識を施した型のFGEが3種類の真核細胞株で単一形態として発現されたことから、ウシ精巣から精製したFGE調製物中に観察された2つの形態のうち一方は、精製中に限定的タンパク分解によって生じた可能性が示唆された。ASA65-80ペプチド中のCys69がセリンによって置換されることが、アフィニティーコロマトグラフィーによるFGEの精製のためには不可欠であった。FGEは、小胞の膜を通過しての移行を媒介する切断可能なシグナル配列を有する。成熟型タンパク質の大部分(340残基中の275残基)は特有のドメインを規定し、この3つのサブドメインのホモログは機能が判明しているタンパク質には存在しないため、これは3つのサブドメインから構成される可能性が高い(実施例2参照)。新たに合成されたスルファターゼポリペプチド中の線状FGly修飾モチーフの認識(Dierks et al., EMBO J., 1999, 18: 2084-2091)が、1つのFGEサブドメインの機能である可能性がある。触媒ドメインはいくつかの様式でFGly形成を触媒する可能性がある。FGEはシステインのチオール基から電子を引き出し、それを受容体に伝達することが提唱されている。その結果生じたチオアルデヒドは自然に加水分解されてFGlyおよびH2Sになると考えられる(Schmidt, B., et al., Cell, 1995, 82: 271-278)。または、FGEが、FADH2などの電子供与体の助けを借りてO2の一方の原子システインに導入し、もう一方をH2Oに導入する混合機能型オキシダーゼ(モノオキシダーゼ)として作用する可能性もある。その結果生じるシステインのチオアルデヒド水和物誘導体はFGlyおよびH2Sと自然に反応すると考えられる。部分精製したFGE調製物を用いた予備的な実験により、FGly形成が分子酸素に絶対的に依存することが示された。このことは、FGEが混合機能型オキシダーゼとして作用することを示唆すると考えられる。サブドメイン3が特に高度に保存されており、そこに完全に保存された3つのシステイン残基が存在することからみて、このサブドメインは触媒部位である可能性の高い候補である。FGlyモチーフの認識および電子受容体または電子供与体の結合を媒介する構造的要素がFGEのドメイン構造と相關するか否かを調べることは興味深いと考えられる。

30

40

50

## 【0313】

組換えFGEは小胞体内に局在し、これはその作用部位として提唱されている部位と一致する。FGly残基は、新たに合成されたスルファターゼにおいて、小胞体への移行中またはその直後に生成される (Dierks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1997, 94: 11963-11968; Dierks et al., FEBS Lett., 1998, 423: 61-65)。FGEそれ自体はKDEL型のER滞留シグナルを含まない。このため、小胞体内への滞留は他のERタンパク質との相互作用によって媒介されると思われる。移行/N-グリコシル化機構の構成要素は、このような相互作用パートナーの注目される候補である。

## 【0314】

FGEにおける変異はMSDの原因となる

10

本発明者らは、FGEをコードする遺伝子における変異がMSDの原因となることを示した。FGEは他の成分とも相互作用する可能性があり、後者をコードする遺伝子の欠陥も同じくMSDの原因になると考えられる。7例のMSD患者において、本発明者らは実際にFGE遺伝子における10種類の変異を見いだした。いずれの変異も、サブドメイン3(3種類の変異)またはサブドメイン2(1種類の変異)における高度に保存された残基の置換、種々の長さのC末端短縮(4種類の変異)または大規模なインフレーム欠失(2種類の変異)により、FGEタンパク質に重大な影響を及ぼした。2種類のMSD細胞株およびMSD変異の1つに関しては、野生型FGE cDNAの形質導入(変異型FGE cDNAではなく)により、スルファターゼ活性が部分的に回復することが示された。このことは、FGE遺伝子が変異の部位であり、この変異に疾患の原因となる性質があることを明確に示している。MSDは臨床的にも生化学的にも不均一である。出生時に発現して水頭症を発症する稀な新生児型、乳児異染性ロイコジストロフィーと最初のうちは似ているがその後に魚鱗癬およびムコ多糖症に似た特徴を生じる一般的な型、ならびに、ムコ多糖症の臨床的特徴を主とする、より頻度の低い軽症型が識別されている。生化学的には、これはスルファターゼの残存活性が検出されることが特徴であり、ほとんどの場合、これは培養皮膚線維芽細胞では対照の10%未満である(Burc h et al., Clin. Genet., 1986, 30: 409-15; Basner et al., Pediatr. Res., 1979, 13: 1316-1318)。しかし、いくつかのMSD細胞株では、特定のスルファターゼの活性が正常範囲に達している(Yutaka et al., Clin. Genet., 1981, 20: 296-303)。さらに、残存活性は細胞培養条件および未知の要因に依存することが報告されている。生化学的には、MSDは2つの群に分類される。第I群では、スルファターゼの残存活性は、ASBのそれを含めて15%未満である。第II群では、スルファターゼの残存活性はより高度であり、特にASBのそれは対照の50~100%に達する場合もある。今回報告した患者は、生化学的表現型に関して、第II群に分類された患者5(ASB活性が対照範囲にある)を除き、全例が第I群に分類された。臨床基準に基づくと、患者1および6は新生児型症例であり、患者2~4および7は一般的な型であり、患者5はムコ多糖症様の型のMSDである。

20

## 【0315】

この表現型の不均一性は、MSD患者における変異の違いがFGEの残存活性の違いに関係している可能性を示唆する。FGE IVS3+5-8delを安定的に発現するPT67細胞に関する予備的なデータからは、エクソン3のインフレーム欠失がFGE活性を完全に消失させることができている。MSDにおける変異、変異型FGEの生化学的特徴、および最近開発された高感度の質量分析法(Peng et al., J. Mass Spec., 2003, 38: 80-86)を用いたスルファターゼにおけるFGlyの残存量の特徴づけにより、MSDにおける遺伝子型-表現型相関に関するさらに詳細な理解が得られると考えられる。

30

## 【0316】

実施例2:

ヒトFGE遺伝子は、原核生物から真核生物まで保存されている、スルファターゼを修飾する新たな遺伝子ファミリーを規定する

## バイオインフォマティクス

シグナルペプチドおよび切断部位は、EMBOSS(Rice et al., Trends in Genetics, 2000, 16: 276-277)に組み込まれているvon Heijneの方法(von Heijne, Nucleic Acids Re

40

50

s., 1986, 14: 4683-90)、およびNielsen et al.の方法(Protein Engineering, 1997, 10: 1-6)により記載した。N-グリコシル化部位はBrunakのアルゴリズム(Gupta and Brunak, Pac. Symp. Biocomput., 2002, 310-22)を用いて予想した。

### 【0317】

機能的ドメインは、PFAM-Hidden-Markov-Model(バージョン7.8)(Sonhammer et al., Nucleic Acids Res., 1998, 26: 320-322)を検索することにより検出した。PFAM DUF323シードからの配列は、TrEMBL(Bairoch, A. and Apweiler, R., Nucleic Acids Res., 2000, 28: 45-48)から入手した。マルチブルアラインメントおよび系統樹の構築は、Clustal W(Thompson, J., et al., Nucleic Acids Res., 1994, 22: 4673-4680)を用いて行った。系統樹の計算に関しては、ギャップ位置を除外し、多数の置換について補正した。有意な結果を得るために系統樹のブートストラッピングを行った。系統樹の描出にはNJplot(Perriere, G. and Gouy, M., Biochimie, 1996, 78: 364-369)を用いた。アラインメントは、EMBOSSによるpre-typplotコマンドを用いてプロットした。  
10

### 【0318】

FGEホモログの検索のためには、National Center for Biotechnology InformationのデータベースNR、NTおよびEST(Wheeler et al., Nucleic Acids Res., 2002, 20: 13-16)に対して、BLAST(Altschul et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25: 3389-3402)を用いてクエリー処理を行った。タンパク質配列に関しては、NRデータベースの現行バージョンに対して反復収束Psi-Blastを期待値カットオフ値 $10^{-40}$ およびデフォルトのパラメーターで用いて検索を行った。収束には5回の反復で達した。スクレオチド配列に関しては、Psi-TBlastnを用いて検索を行った:これにはNRおよびヒトFGEのタンパク質配列を入力として用い、hFGEのスコアマトリックスを反復収束Psi-Blastを用いて作成した。このマトリックスを、スクレオチドデータベースNTおよびESTのクエリー処理のためにblastallに対する入力として用いた。いずれの段階に関しても、期待値カットオフ値には $10^{-20}$ を用いた。  
20

### 【0319】

タンパク質二次構造の予測は、Psipred(Jones, D., J Mol Biol., 1999, 292: 1950-202; McGuffin, L., et al., Bioinformatics, 2000, 16: 404-405)を用いて行った。

### 【0320】

サブドメインの類似性スコアは、EMBOSSによるconsアルゴリズムをデフォルトのパラメーターで用いてのアラインメントから算出した。メタアラインメントは、FGEファミリーサブグループのコンセンサス配列を整列化することによって作成した。ゲノム座位の構成およびシンテニーは、NCBI(Bethesda, MD)のNCBIヒトゲノムおよびマウスゲノムリソース、ならびにSoftberry(Mount Kisco, NY)のHuman-Mouse-Rat Syntenyを用いて決定した。細菌ゲノム配列はNCBI-FTP-サーバからダウンロードした。ゲノムloci of細菌FGE遺伝子のゲノム座位の概観を得るために、NCBIの微生物ゲノム注釈(annotation)を用いた。  
30

### 【0321】

#### 結果および考察

ヒトFGEおよび関連タンパク質の基本的特徴およびモチーフ

ヒトFGE遺伝子(SEQ ID NO:1, 3)は、374残基を有すると予想されるFGEタンパク質(SEQ ID NO:2)をコードする。残基22~33に切断性シグナル(Heijneスコア15.29)があり、残基17~29のヒドロパシースコア(Kyte, J. and Doolittle, R., J Mol Biol., 1982, 157: 105-132)が1.7~3.3であることは、33個のN末端残基がER移行後に切断されることを意味する。しかし、Nielsen et al.のアルゴリズム(Protein Engineering, 1997, 10: 1-6)を用いたところ、シグナル配列の切断は残基34の後で起こることが予想された。このタンパク質はAsn 141にN-グリコシル化部位と考えられる部位を1つ有する。  
40

### 【0322】

タンパク質モチーフデータベースPFAM(Sonhammer et al., Nucleic Acids Res., 1998, 26: 320-322)に対するFGEタンパク質配列を用いた検索により、ヒトFGEの残基87~36

7を、 $7:9 \times 10^{-114}$ という高度に有意な期待値で、タンパク質ドメインDUF323として分類しうることが判明した（「機能不明のドメイン」、PF03781）。DUF323を規定するPFAMシードは25種のタンパク質配列からなり、その大半はシークエンシングデータに由来する仮想的タンパク質である。ヒトFGEとDUF323との関連性を分析するために、FGEとDUF323シードの配列とのマルチプルアラインメントを行った。これに基づき、系統樹を構築してブートストラッピングを行った。仮想的配列のうち4つ（TrEMBL-ID Q9CK12、Q9I761、094632およびQ9Y405）はシードの他のメンバーと非常に大きな相違があり、ブートストラッピングを適切に行う妨げとなつたため、それらはセットから除外しなければならなかつた。図2は、ヒトFGEと残りの21種のDUF323シードタンパク質との間の関係を示したブートストラッピング後の系統樹を示している。この系統樹を用いることで、シードのメンバーを、ヒトFGEと近縁関係にあるホモログおよびより関連性の低い遺伝子という2つのカテゴリーに細分することができる。  
10

### 【0323】

一番上の7つのタンパク質は、ヒトFGEに対する系統学的距離（phylogenetic distance）が0.41～0.73である。これらは単一のドメインであるDUF323のみを含む。この群における相同性は全アミノ酸配列の範囲にわたり、その大部分はDUF323ドメインからなる。DUF323ドメインはこのホモログ群では高度に保存されているが、シードの他の15種のタンパク質のヒトFGEとの関連性はそれよりも低い（系統学的距離が1.14～1.93）。それらのDUF323ドメインは、第1群の高度に保存されたDUF323ドメインとはかなり大きな違いがある（「FGEのサブドメインおよびFGE遺伝子における変異」の項を参照されたい）。これらの15タンパク質のほとんどは仮想的であり、そのうち6つはさらに検討が進んでいる。それらのうち、トラコーマクラミジア（*C. trachomatis*）由来のセリン/トレオニンキナーゼ（TrEMBL:084147）は、DUF323に加えて他のドメイン、すなわちATP結合ドメインおよびキナーゼドメインを含む。R.スフェロイデス（*R. sphaeroides*）由来の配列（TrEMBL:Q9ALV8）およびシュードモナス（*Pseudomonas*）属由来の配列（TrEMBL:052577）はタンパク質NirVをコードし、その遺伝子は銅含有亜硝酸レダクターゼnirKとともに転写される（Jain, R. and Shapleigh, J., *Microbiology*, 2001, 147: 2505-2515）。CarC（TrEMBL:Q9XB56）は、E.カロトボラ（*E. carotovora*）からの-Lアクタム系抗生物質の合成に関するオキシダーゼである（McGowan, S., et al., *Mol Microbiol.*, 1996, 22: 415-426; Khaleel Ili N, T. C. およびBusby RW, *Biochemistry*, 2000, 39: 8666-8673）。XyIR（TrEMBL:031397）およびBH0900（TrEMBL:Q9KEF2）は、バシラス科およびクロストリジウム科におけるペントース利用の調節に関するエンハンサー結合タンパク質である（Rodionov, D., et al., *FEMS Microbiol Lett.*, 2001, 205: 305-314）。FGEとDUF323との比較により、FGEファミリーを機能の異なる別種のDUF323含有ホモログと識別する相同性閾値が確立された。後者には、セリン/トレオニンキナーゼおよびXylI（転写エンハンサーの一つ）ならびにFGE（FGly生成酵素の一つ）およびCarC（オキシダーゼの一つ）が含まれる。本明細書の別の箇所で考察しているように、FGEはそのシステイン修飾機能をオキシダーゼとして発揮する可能性があり、このことはFGEおよびDUF323シードの非FGE性メンバーは共通のオキシダーゼ機能を有する可能性を示唆する。  
20  
30  
40

### 【0324】

#### FGEのホモログ

DUF323シードの中にヒトFGEの近縁ホモログが存在したことから、本発明者らはNCBIのNucleic Acid Res.データベース中のヒトFGEのホモログを検索することにした（Wheeler et al., *Nucleic Acids Res.*, 2002, 20: 13-16）。検索の閾値は、DUF323シードに存在する6種のホモログおよびその他の近縁ホモログが、他のシードメンバーを検出することなく得られるようを選択した。この検索により、真核生物における3種のFGEオルソログ、原核生物における12種のオルソログ、ならびにヒトおよびマウスにおける2種のパラログが同定された（表3）。

### 【0325】

（表3）真核生物および原核生物におけるFGE遺伝子ファミリー  
50

SEQ ID NO: NA, AA [GI]	種	長さ [AA]	サブグループ
1/3, 2	ヒト	374	E1
49, 50 [22122361]	マウス	372f	E1
51, 52 [20130397]	キイロショウジョウバエ	336	E1
53, 54 [21289310]	ハマダラカ	290	E1
47, 48 [26344956]	マウス	308	E2
45, 46 [24308053]	ヒト	301	E2
55, 56 [21225812]	ストレプトミセス・セリカラ ( <i>Streptomyces coelicolor</i> ) A3(2)	314	P1
57, 58 [25028125]	コリネバクテリウム・エフィシェンス ( <i>Corynebacterium efficiens</i> ) YS-314	334	P1
59, 60 [23108562]	ノボスフィンゴビウム・アロマチシボランス ( <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> )	338	P2
61, 62 [13474559]	ミヤコグサ根粒菌 ( <i>Mesorhizobium loti</i> )	372	P2
63, 64 [22988809]	バーコルデリア・フンゴルム ( <i>Burkholderia fungorum</i> )	416	P2
65, 66 [16264068]	アルファルファ根粒菌 ( <i>Sinorhizobium meliloti</i> )	303	P2
67, 68 [14518334]	マイクロシラ属 ( <i>Microscilla sp.</i> )	354	P2
69, 70 [26990068]	シュードモナス・プチダ ( <i>Pseudomonas putida</i> ) KT2440	291	P2
71, 72 [22975289]	ラルストニア・メタリデュランス ( <i>Ralstonia metallidurans</i> )	259	P2
73, 74 [23132010]	プロクロロコッカス・マリヌス ( <i>Prochlorococcus marinus</i> )	291	P2
75, 76 [16125425]	カウロバクター・クレセンツス ( <i>Caulobacter crescentus</i> ) CB15	338	P2
77, 78 [15607852]	結核菌 Ht37Rv	299	P2

GI GenBankタンパク質識別名

NA 核酸

AA アミノ酸

E1 真核生物オルソログ

E2 真核生物パラログ

P1 近縁性のある原核生物オルソログ

P2 その他の原核生物オルソログ

f-GenBankでの予測に誤りがあったタンパク質配列

【0326】

マウス配列 GI 22122361は、GenBankでは284aaのタンパク質をコードすることが予想されたが、cDNA配列 NM 145937は372残基のタンパク質をコードする。この予測の誤りは、マウスFGE遺伝子の第1エクソンを省いたことに理由がある。NRデータベース中に見いだされたすべての配列は高等真核生物または原核生物に由来する。FGE-ホモログは古細菌にも植物にも検出されなかった。さらに閾値を下げた検索でも、C.エレガヌスおよびS.セレビシエの完全シークエンシングがなされたゲノム、ならびに関連したORFデータベース中にはホモログは見いだされなかった。NTおよびESTスクレオチドデータベースの真核生物配列における検索では、NRデータベースにリスト化されていない、タンパク質レベルで高度

10

20

30

40

50

の保存性を示す3'末端cDNA配列断片を有するさらに8種のFGEオルソロガスESTが同定された。これらの配列はmRNAの完全なコード部分を含んでおらず、いずれも高等真核生物に由来する（表4）。

### 【0327】

（表4）真核生物におけるFGEオルソログEST断片

SEQ ID NO: NA [GB]	種
80 [CA379852]	ニジマス (Oncorhynchus mykiss)
81 [AI721440]	ゼブラフィッシュ (Danio rerio)
82 [BJ505402]	メダカ (Oryzias latipes)
83 [BJ054666]	アフリカツメガエル
84 [AL892419]	ニシツメガエル
85 [CA064079]	タイセイヨウサケ (Salmo salar)
86 [BF189614]	イノシシ (Sus scrofa)
87 [AV609121]	ウシ (Bos taurus)

10

20

30

GB GenBankアクセスション番号；NA 核酸

### 【0328】

NRデータベースからのコード配列のマルチプルアラインメントおよび系統樹の構築 (ClustalWを使用)により、ホモログの以下の4つのサブグループを規定することが可能となった：真核生物オルソログ（ヒト、マウス、カおよびショウジョウバエFGE、真核生物パラログ（ヒトおよびマウスFGEパラログ）、FGEと近縁性のある原核生物オルソログ（ストレプトミセスおよびコリネバクテリウム）、ならびにその他の原核生物オルソログ（コロバクター、シードモナス、マイコバクテリウム、プロクロロコッカス、メソリゾビウム、シノリゾビウム、ノボスフィンゴビウム、ラルストニア、バーコルデリアおよびマイクロシラ）。真核生物オルソログは、ヒトFGEに対して、87%（マウス）、48%（ショウジョウバエ）および47%（ハマダラカ）の全体的同一性を示す。FGEオルソログは原核生物および高等真核生物に認められるものの、系統学的にS.セレビシエとキイロショウジョウバエとの間に位置する下等真核生物の完全シークエンシングがなされたゲノム中にはそれらは認められなかった。さらに、FGEホモログは、大腸菌およびフグの完全シークエンシングがなされたゲノム中にも存在しない。

### 【0329】

本明細書中の別の箇所で考察したように、ヒトおよびマウスで見いだされたFGEパラログはわずかなFGly生成活性を有していて、それがMSD患者におけるスルファターゼの残存活性の原因となっている可能性がある。

40

### 【0330】

#### FGEのサブドメイン

FGE遺伝子ファミリーは、高度に保存された3つの部分/ドメインを有する（本明細書中の別の箇所に述べた通り）。前者を隔てている非保存的な2つの配列に加えて、それらはN末端およびC末端に非保存的な延長部を有する。保存された3つの部分は、さまざまな長さの非保存的な部分が間にあることから、DUF323ドメインのサブドメインに相当すると考えられる。サブドメイン1および2を隔てる部分の長さは22~29残基であり、サブドメイン2および3を隔てるものは7~38アミノ酸である。N末端およびC末端の非保存的な部分の長さにはさらに大きなばらつきがある（N末端：0~90AA、C末端：0~28AA）。ラルストニア・

50

メタリデュランス (*Raistonia metallidurans*) 由来のFGE遺伝子の配列は第1のサブドメインを欠いているため、おそらく不完全であると考えられる。

### 【0331】

DUF323のサブドメインの規定に関する妥当性を検証するために、本発明者らはヒトFGEタンパク質の二次構造予測をPsipredを用いて行った。疎水性ERシグナル（残基1~33）はヘリックス構造を含むことが予想され、このことからvon-Heijneアルゴリズムのシグナル予測性が確かめられた。N末端の非保存的な領域（aa 34~89）およびサブドメイン2と3との間のスペーサー領域（aa 308~327）はらコイル区域を含む。サブドメイン1および2を隔てる領域はコイルを含む。aa 65/66にある -ヘリックスの予測信頼性は低く、これはおそらく予測アーチファクトと考えられる。サブドメイン境界はコイル間に位置し、 -ヘリックスおよび -ストランドのいずれも分断しない。第1サブドメインは数個の -ストランドおよび1つの -ヘリックスから構成され、第2サブドメインは2つの -ストランドおよび4つの -ヘリックスを含む。第3サブドメインは、サブドメインの最初および最後でシートに隣接している1つの -ヘリックス領域を有する。以上をまとめると、この二次構造は、サブドメイン境界がコイル内部に位置し、サブドメインが構造的エレメント -ヘリックスおよび -ストランド含むという点で、提唱されているサブドメイン構造と一致する。

### 【0332】

サブドメインはいずれも、データベースにリスト化された配列中に、単離されたモジュールとして存在するわけではないことに注意すべきである。FGEファミリーの4つのサブグループのそれぞれの内部では、サブドメインは高度に保存されており、第3サブドメインが最も高い相同意を示す（表5）。このサブドメインはまた、サブグループ間でも最も強い相同意を示す。

### 【0333】

（表5）FGEファミリー サブドメインの相同意（%類似性）

サブファミリー	メンバー	サブドメイン		
		1	2	3
E1	4	79	82	100
E2	2	90	94	100
P1	2	70	79	95
P2	10	59	79	80

E1 真核生物オルソログ；E2 真核生物パラログ

P1 近縁性のある原核生物オルソログ；P2 その他の原核生物オルソログ

### 【0334】

FGEファミリーの第1のサブドメインは、サブグループ間で最も弱い相同意を示す。真核生物オルソログでは、それはN-グリコシル化部位を有する：これはヒトでは残基Asn 141に、マウスではAsn 139に、ショウジョウバエではAsn 120にある。アノフェレスでは、キイロショウジョウバエAsn 120と相同な残基130にアスパラギンは存在しない。しかし、2つのヌクレオチドの変化により、アノフェレスではAsn 130にN-グリコシル化部位が生じる可能性がある。このため、残基130を包含する配列の再シークエンシングを行う必要がある。第2サブドメインはトリプトファンリッチであり、ヒトFGEでは129残基中に12個のTrpがある。これらのトリプトファンのうち10個がFGEファミリー内で保存されている。

### 【0335】

サブドメイン3の高度の保存性：真核生物オルソログ間でのサブドメイン3の類似性は100%、同一性は90%である。このタンパク質の機能にとっての第3サブドメインの重要性は、MSD患者における疾患の原因となる変異の多発地点であるという観察所見によって強く示されている。実施例1に記した6例のMSD患者で同定された9種の変異のうち7種は、サブ

10

20

30

40

50

ドメイン3の40残基をコードする配列中に位置する。これらの残基はシステイン4個を含み、そのうち3個は原核生物および真核生物のオルソログ間で保存されている。2つの真核生物パラログは、FGEファミリーの他のメンバーとの相同性が最も低く、例えば、それらはサブドメイン3の保存的な3つのシステインのうち2つを含まない。オルソログおよびパラログのサブドメイン3配列の間で保存されている特徴は、最初のRVXXGG(A)Sモチーフ (SEQ ID NO : 79)、3つのアルギニンを含むヘプタマー (サブドメインコンセンサス配列の残基19 ~ 25) および末端GFRモチーフである。FGEの近縁ホモログでない15種のシード配列のDUF323ドメインの比較により、著しい配列の違いが示されている：これらの15種のシード配列は第1および第2サブドメインでは保存性が低いが、全体的なサブドメイン構造は同じく認められる。FGEファミリー内で最も高度に保存されているサブドメイン3はより短く、原核生物FGEファミリーメンバー (類似性が約60%) に比して真核生物サブドメイン3に対する相同性が有意に低い (類似性が約20%)。すなわち、これらはサブドメイン3の保存的なシステイン残基をすべて欠いている。保存されている特徴は、最初のRVXXGG(A)Sモチーフ (SEQ ID NO : 79) および末端GFRモチーフのみである。

### 【 0 3 3 6 】

#### ヒトおよびマウスのFGE遺伝子ゲノム構成

ヒトFGE遺伝子は染色体3p26に位置する。これは翻訳配列に関して105kbおよび9つのエクソンを包含する。マウスFGE遺伝子は長さ80Kbであり、染色体6E2に位置する。マウスFGE遺伝子の9つのエクソンはヒトのエクソンとほぼ同じサイズである (図3)。ヒト遺伝子とマウス遺伝子との間の主な違いは、エクソン9中の3'-UTRの保存性の低さおよびエクソン9の長さであり、マウス遺伝子の方が461bp長い。マウス染色体6のセグメント6E2はヒト染色体セグメント3p26に対する相同性が高い。ヒトおよびマウスのFGE座位はともにテロメア側で、LMCD1、KIAA0212、ITPR1、AXCAMおよびIL5RAをコードする遺伝子と隣接している。動原体の側には、いずれのFGE座位もCAV3およびOXTRの座位が隣接している。

### 【 0 3 3 7 】

#### 原核生物FGE遺伝子のゲノム構成

原核生物において、スルファターゼは、活性中心でFGlyに変換される残基に応じてシステイン型スルファターゼまたはセリン型スルファターゼのいずれかに分類される (Miech, C., et al., J Biol Chem., 1998, 273: 4835-4837; Dierks, T., et al., J Biol Chem., 1998, 273: 25560-25564)。肺炎杆菌、大腸菌およびペスト菌では、セリン型スルファターゼは、鉄-イオウクラスター-モチーフを含む細胞質タンパク質をコードし、セリン残基からのFGlyの生成に不可欠な、AtsBとのオペロンの部分である (Marquordt, C., et al., J Biol Chem., 2003, 278: 2212-2218; Szameit, C., et al., J Biol Chem., 1999, 274: 15375-15381)。

### 【 0 3 3 8 】

このため、原核生物FGE遺伝子が、FGEの基質であるシステイン型スルファターゼに近接して位置するか否かを検討することは興味深い。表3に示した原核生物FGE遺伝子のうち、7種は完全シークエンシングがなされたゲノムであり、FGE座位の近隣分析が可能である。実際、この7種のゲノムのうち4種 (C. efficiens : PD 25028125、P. putida : PD 26990068、C. crescentus : PD 16125425およびM. tuberculosis : PD 15607852) では、システイン型スルファターゼが、FGEおよびスルファターゼの同時転写に適合するようにFGEに直接隣接して見いだされた。それらのうち2つ (C. efficiensおよびP. putida) では、FGEおよびスルファターゼが重複したORFも有しており、このことはそれらの同時発現を強く示している。さらに、4種の原核生物におけるFGEおよびスルファターゼ遺伝子のゲノム中の近接は、細菌FGEが機能的オルソログであるという仮説のさらなる証拠となる。

### 【 0 3 3 9 】

残る3種類の生物はシステイン型スルファターゼを含むが (S. coelicolor : PD 24413927、M. loti : PD 13476324、S. meliloti : PID 16262963、16263377、15964702)、これらの生物ではFGEの近隣の遺伝子は標準的なスルファターゼの特徴的目印を含まず (Dierks, T., et al., J Biol Chem., 1998, 273: 25560-25564)、それらの機能を示すようなド

10

20

30

40

50

メインも含まない。このため、これらの生物において、FGEおよびシステイン型スルファターゼの発現はトランス的に調節されている可能性が高い。

#### 【0340】

##### 結論

その欠陥が常染色体劣性伝達性リソソーム貯蔵疾患である多重スルファターゼ欠損症の原因となるヒトFGEの同定により、原核生物および真核生物からのFGEオルソログ、ならびにマウスおよびヒトにおけるFGEパラログを含む、新たな遺伝子ファミリーの定義が可能になる。FGEは、大腸菌、S.セレビシエ、C.エレガヌスおよびフグの完全シーケンシングがなされたゲノム中には認められない。さらに、原核生物と高等真核生物との間には系統学的なギャップがあり、系統学的に原核生物とキイロショウジョウバエとの間に位置する種にはFGEが存在しない。しかし、これらの下等真核生物のいくつか、例えばC.エレガヌスはシステイン型スルファターゼ遺伝子を有する。このことは、システイン型スルファターゼに対して作用する第2のFGly生成系が存在することを意味する。この仮定は、FGEを持たない大腸菌がシステイン型スルファターゼ中にFGlyを生成しうるという観察所見によつて裏づけられている (Dierks, T., et al., J Biol Chem., 1998, 273: 25560-25564)。

。

#### 【0341】

##### 実施例3：

FGE発現はスルファターゼを過剰発現する細胞株におけるスルファターゼ活性を有意に上昇させる

20

本発明者らは、スルファターゼを発現/過剰発現する細胞に対するFGEの影響を検討したいと考えた。これを目的として、ヒトスルファターゼであるイズロン酸2-スルファターゼ (I2S) またはN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ (GALNS) を発現するHT-1080細胞に対して、FGE発現構築物pXMG.1.3 (表7および図4) または対照プラスミドpXMG.1.2 (FGEが機能的FGEを産生できないアンチセンスの向きにある、表7) のいずれかを2件ずつトランスフェクトした。エレクトロポレーション24時間後の培地交換から24、48および72時間後に培地試料を収集した。培地の試料を、活性アッセイによりそれぞれのスルファターゼ活性に関して、さらにイズロン酸2-スルファターゼまたはN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼのいずれかに対して特異的なELISAにより評価した全スルファターゼタンパク質レベルに関して検査した。

30

#### 【0342】

(表6) トランスフェクションの基質として用いたスルファターゼを発現するトランスフェクト細胞株

細胞株	プラスミド	発現したスルファターゼ
36F	pXFM4A.1	N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ
30C6	pXI2S6	イズロン酸2-スルファターゼ

#### 【0343】

(表7) イズロン酸2-スルファターゼおよびN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼを発現するHT-1080細胞のトランスフェクションのために用いたFGEおよび対照プラスミド

40

プラスミド	主なDNA配列エレメントの構成*
pXMG.1.3 (FGE 発現)	>1.6 kb CMV エンハンサー / プロモーター > 1.1 kb FGE cDNA > hGH3' 非翻訳配列 < amp < DHFR カセット < Cdneo カセット(ネオマイシン(FGE 発現)ホスホトランスフェラーゼ)
pXMG.1.2(対照、逆向きFGE)	>1.6 kb CMV エンハンサー / プロモーター < 1.1 kb FGE cDNA < hGH3' 非翻訳配列 < amp < DHFR カセット < Cdneo カセット(ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ)

\* > は5'から3'への向きを表す

10

### 【0344】

#### 実験手順

##### 材料および方法

イズロン酸2-スルファターゼおよびN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼを產生するHT-1080細胞のトランスフェクション

それぞれのエレクトロポレーションのために、HT-1080細胞を収集して $9 \sim 12 \times 10^6$  個を得た。2種類のプラスミド(被験物(FGE)および対照)を2件ずつトランスフェクトした；この場合、対照プラスミドには、CMVプロモーターに対して逆向きにクローニングしたFGE cDNAを含めた。細胞を約1000RPMで5分間遠心した。細胞を $1 \times PBS$ 中に $16 \times 10^6$  個/mLとして懸濁させた。エレクトロポレーション用キュベットの底部にプラスミドDNA 100 μgを添加し、細胞浮遊液750 μLを( $12 \times 10^6$  個)をキュベット内のDNA溶液に添加した。細胞およびDNAを、プラスチック製トランスファーpipetteで、泡が生じないように注意しながら穏やかに混合した。細胞に対するエレクトロポレーション処理は450V、250 μF(BioRad Gene Pulser)を行った。時定数を記録した。

20

### 【0345】

エレクトロポレーションを行った細胞を10~30分間静置した。続いてDMEM/10%子ウシ血清1.25mLを各キュベットに添加し、混合した上で、すべての細胞を20mLのDMBM/10を含む新たなT75フラスコに移した。24時間後にフラスコに再び20mLのDMEM/10を補給し、死細胞を除去した。トランスフェクションから48~72時間後に培地試料を収集し、2つずつのT75フラスコから細胞を採取した。

30

### 【0346】

#### 培地の調製

1L DMEM/10(23mLの2mM Lグルタミン、115mLの子ウシ血清を含む)

### 【0347】

細胞のトランスフェクションはメトトレキサート(MTX)を含まない培地中で行った。24時間後に細胞に適量のMTX(36F = 1.0 μM MTX、30C6 = 0.1M MTX)を含む培地を補給した。培地を収集し、再補給から24、48および72時間後に細胞を採取した。

### 【0348】

#### 活性アッセイ

##### イズロン酸2-スルファターゼ(I2S)

40

NAP5脱塩カラム(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)を透析バッファー(5mM酢酸ナトリウム、5mM tris、pH 7.0)により平衡化した。I2Sを含む試料をカラムに適用し、支持体に入り込ませた。試料を1mLの透析バッファーにより溶出させた。脱塩された試料を、反応バッファー(5mM酢酸ナトリウム、0.5mg/L BSA、0.1% Triton X-100、pH 4.5)中にI2Sが約100ng/mLとなるようにさらに希釈した。各I2S試料10 μLを96ウェルFluorimetricプレート(Perkin Elmer, Norwalk, CT)の最上段に添加し、37℃で15分間プレインキュベートした。基質は、4-メチル-ウンベリフェリ硫酸(Fluka, Buchs, Switzerland)を基質バッファー(5mM酢酸ナトリウム、0.5mg/mL BSA、pH 4.5)中に最終濃度1.5mg/mLで溶解させることによって調製した。I2S試料を含む各ウェルに基質100 μLを添加し、プレートを暗所にて37℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後

50

に190 μLの停止バッファー（332.5mMグリシン、207.5mM炭酸ナトリウム、pH 10.7）を、試料を含む各ウェルに添加した。4-メチルウンベリフェロン（4-MUF, Sigma, St. Louis, MO）の標準原液を、生成物標準物質として試薬級の水により最終濃度1 μMとして調製した。150 μLの1M 4-MUF標準原液および150 μLの停止バッファーを、プレート内の最上段ウェルの1つに添加した。150 μLの停止バッファーを、96ウェルプレートの残りのすべてのウェルに添加した。二倍系列希釈をプレートの各列の最上段から最下段まで作製した。プレートの読み取りは、Fusion Universal Microプレート Analyzer（Packard, Meriden, CT）により、励起フィルター波長330nmおよび発光フィルター波長440nmで行った。4-MUF標準原液の μモル数と蛍光との関係を示した標準曲線を作成し、未知の試料については蛍光をこの曲線から外挿した。結果はUnit/mLとして報告されており、この際、活性1単位は37  
10 で1分間に生成された4-MUFの1 μモルに等しかった。

#### 【0349】

##### N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ (GALNS)

GALNS活性アッセイには、蛍光基質4-メチルウンベリフェリル-3-D-ガラクトピラノシド-6-スルフェート（Toronto Research Chemicals Inc., カタログ番号M33448）を利用する。本アッセイは2つの段階で構成される。第1の段階では、反応バッファー（0.1M酢酸ナトリウム、0.1M塩化ナトリウム、pH 4.3）中に調製した1.3mM基質75 μLを、培地/タンパク質試料またはその対応する希釈物10 μLとともに37 で4時間インキュベートした。反応は、GALNS活性を阻害する2Mリン酸二水素ナトリウムを5 μL添加することによって停止させた。コウジ菌由来の -ガラクトシダーゼ約500U（Sigma, カタログ番号G5160）を添加した後に、基質の蛍光部分を放出させるために反応混合物を37 でさらに1時間インキュベートした。第2の反応は停止溶液（1%グリシン、1%炭酸ナトリウム、pH 10.7）910 μLの添加によって停止させた。その結果得られた混合物の蛍光を、4-メチルウンベリフェロン（ナトリウム塩、Sigma, カタログ番号M1508）を参照標準物質として用いて測定波長359nmおよび参考波長445nmで測定した。活性1単位は、1時間当たりに放出される4-メチルウンベリフェロンのnmole数に相当する。  
20

#### 【0350】

##### イムノアッセイ (ELISA)

##### イズロン酸2-スルファターゼ (I2S)

96ウェル平底プレートに、50nM炭酸ナトリウム、pH 9.6で10 μg/mLに希釈したマウスモノクローナル抗I2S抗体を37 で1時間かけてコーティングした。マウスモノクローナル抗I2S抗体は、Maine Biotechnology Services, Inc. (Portland, ME)との契約により、精製した組換え產生完全長ヒトI2Sポリペプチドに対して、標準的なハイブリドーマ作製技術を用いて開発させた。プレートを0.1% Tween-20を含む1×PBSで3回洗浄し、2% BSAを含む37 の洗浄バッファー中に1時間おいてブロックした。2% BSAを含む洗浄バッファーを試料および標準物質の希釈に用いた。I2S標準物質は希釈して100ng/mL～1.56ng/mLで用いた。ブロッキングバッファーを除去した後に、試料および標準物質をプレートに適用し、37 で1時間インキュベートした。検出抗体である西洋ワサビペルオキシダーゼ結合マウス抗I2S抗体は、2% BSAを含む洗浄バッファー中に0.15 μg/mLに希釈した。プレートを3回洗浄し、検出抗体をプレートに添加して、それを37 で30分間インキュベートした。  
30 プレートを現像するために、TMB基質（Bio-Rad, Hercules, CA）を調製した。プレートを3回洗浄し、基質100 μLを各ウェルに添加して、それを37 で15分間インキュベートした。反応を2N硫酸（100 μL/ウェル）を用いて停止させ、プレートをマイクロタイタープレートリーダーにより、655nmを参考波長として用いて450nmで読み取った。  
40

#### 【0351】

##### N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ (GALNS)

2種類のマウスモノクローナル抗GALNS抗体をGALNS ELISAの基盤とした。マウスモノクローナル抗GALNS抗体はまた、Maine Biotechnology Services, Inc. (Portland, ME)との契約により、精製した組換え產生完全長ヒトGALNSポリペプチドに対して標準的なハイブリドーマ作製技術を用いても開発させた。GALNSの捕捉のための第1の抗体は、コーティ  
50

ングバッファー（50mM炭酸ナトリウム、pH 9.6）中のF96 MaxiSorp Nunc-Immuno Plate（Nalge Nunc、カタログ番号442404）のコーティングに用いた。37℃で1時間インキュベートして洗浄バッファーで洗浄した後に、プレートをプロッキングバッファー（PBS、0.05% Tween-20、2% BSA）により37℃で1時間かけてブロックした。続いて、実験試料および対照試料をGALNS標準物質とともにプレートにローディングし、37℃でさらに1時間インキュベートした。洗浄バッファーによる洗浄後に、HRPと結合させた第2の検出抗体をプロッキングバッファーに適用し、37℃で30分間インキュベートした。プレートを再び洗浄した後に、Bio-Rad TMB基質試薬を添加し、15分間インキュベートした。続いて反応を停止させるために2N硫酸を添加し、プレートリーダーを450nm波長で用いてその結果を分光学的に評価した。

10

### 【0352】

#### 考察

スルファターゼ活性に対するFGEの影響

#### GALNS

対照レベルに比して総GALNS活性の約50倍の上昇が観察された（図5）。このレベルの活性上昇は3つの培地サンプリング時点のすべてで観察された。さらに、GALNS活性は時間経過に対して直線的に蓄積し、24～48時間の間に4倍に上昇し、48～72時間の間に2倍に上昇した。

### 【0353】

#### I2S

20

絶対値での大きさは落ちるもの、総I2S活性に関しても同様の影響が観察され、対照レベルに比して総I2S活性の約5倍の上昇が観察された。このレベルの活性上昇は実験期間を通じて持続した。GALNSで認められた結果と同様に、I2S活性は時間経過に対して直線的に培地中に蓄積した（24～48時間の間に2.3倍、48～72時間の間に1.8倍）。

### 【0354】

スルファターゼ比活性に対するFGEの影響

#### GALNS

36F細胞におけるFGEの発現は、GALNSの見かけ上の比活性（ELISAにより評価した酵素全体に対する酵素活性の比）を対照レベルに比して40～60倍に上昇させた（図6）。比活性の上昇は試験中の3つの時点にわたって持続し、トランスフェクション後の蓄積で3日間にわたり上昇するように思われた。

30

### 【0355】

#### I2S

同様の影響はI2Sでも認められ、対照値（0.5～0.7U/mg）に比して比活性の6～7倍の上昇（3～5U/mg）が観察された。

### 【0356】

GALNS（図7）およびI2Sのいずれに関しても、ELISA値はFGEのトランスフェクションによる有意な影響を受けなかった。このことはFGEの発現がスルファターゼ産生にかかわる翻訳経路および分泌経路を妨げないことを示している。

### 【0357】

40

以上をまとめると、双方のスルファターゼに関するこれらの結果はすべて、FGE発現が、GALNSおよびI2Sを過剰発現する細胞株におけるスルファターゼ比活性を劇的に高めることを示している。

### 【0358】

FGE（SUNF1）およびその他のスルファターゼ遺伝子の共発現

正常細胞におけるそのほかのスルファターゼ活性に対するFGE（SUNF1）の影響を調べるために、本発明者らは、ARSA（SEQ ID NO：14）、ARSC（SEQ ID NO：18）およびARSE（SEQ ID NO：22）のcDNAを、FGE（SUNF1）cDNAのコトランスフェクションの存在下または非存在下で、種々の細胞株において過剰発現させ、スルファターゼ活性を測定した。Cos-7細胞におけるスルファターゼcDNAの過剰発現はスルファターゼ活性の中程度の上昇をもたらす。

50

らしたが、スルファターゼ遺伝子およびFGE (SUMF1) 遺伝子の両方を共発現させた場合には顕著な相乗的上昇(20~50倍)が観察された。程度は落ちるものとの、同様の影響は別の3種類の細胞株HepG2、LE293およびU2OSでも観察された。多重類のスルファターゼcDNA的同时過剰発現は、単一のスルファターゼの過剰発現に比較して個々の各スルファターゼ活性の上昇幅の減少をもたらし、このことは修飾機構に関して異なるスルファターゼ同士の競合が存在することを示す。

#### 【0359】

進化過程におけるFGE (SUMF1) 遺伝子の機能的保存について検討するために、本発明者らはARSA、ARSCおよびARSEのcDNAを、MSD cDNAのコトランスクレプションの存在下または非存在下で、種々の細胞株において過剰発現させ、スルファターゼ活性を測定した。マウスおよびショウジョウバエのFGE (SUMF1) 遺伝子は3種類のヒトスルファターゼのすべてに対する活性があり、ショウジョウバエFGE (SUMF1) の効率が最も低かった。これらのデータは進化過程におけるFGE (SUMF1) の高度の機能的保存を示しており、これは細胞機能および生存に対する大きな生物学的意義があることを意味する。程度ははるかに落ちるものとの、FGE2 (SUMF2) 遺伝子を用いることによっても一致して同様の影響が観察され、このことからこの遺伝子によってコードされるタンパク質もスルファターゼ修飾活性を有することが示唆された。これらのデータは、FGE (SUMF1) によってコードされるタンパク質がスルファターゼ活性の律速因子であることを示しており、この所見は酵素補充療法に用いるための活性型スルファターゼの大規模生産にとって重要な意味を持つ。

#### 【0360】

##### 実施例4:

マイクロセルを介した染色体導入法を用いた機能的補完による、MSDで変異している遺伝子の同定

マイクロセルを介した染色体導入法を用いる、機能的補完による別の実験において、本発明者らは、MSDで変異している遺伝子がFGEであることを確かめた。本発明者らの知見は、遠い関係にある諸生物におけるタンパク質のファミリー全体に影響を及ぼす新規な生物機構に対してさらなる洞察を与えるものである。稀な遺伝病の分子的基盤を明らかにしたことと加えて、本発明者らのデータはさらに、スルファターゼの活性に対するFGE遺伝子産物の強力な増強作用も裏づけている。後者の知見には、スルファターゼ欠損症によって引き起こされる少なくとも8種のヒト疾患の治療に対する直接的な臨床的意義がある。

#### 【0361】

MSDに関する遺伝子は染色体3p26にマッピングされる

MSDで変異している遺伝子の染色体位置を特定するために、本発明者らはマイクロセル介した染色体導入法を用いる機能的補完により、欠陥のあるスルファターゼ酵素をレスキューすることを試みた。優性選択マーカーHyTKによる標識がなされた個々の正常ヒト染色体を有する一群のヒト/マウスハイブリッド細胞株を、ドナーヒト染色体の源として用い、MSD患者由来の不死化細胞株と融合させた。22対のヒト常染色体すべてを個別に患者細胞株に導入し、ハイブリッドをハイグロマイシンにより選択した。22通りの導入実験のそれぞれにおいて、約25個の生存コロニーを摘出した。これらを別々に増殖させ、以後の酵素検査のために採取した。アリールスルファターゼA (ARSA) (SEQ ID NO: 15)、アリールスルファターゼB (ARSB) (SEQ ID NO: 17) およびアリールスルファターゼC (ARSC) (SEQ ID NO: 19) の活性を、約440個のクローン ( $20 \times 22$ ) のそれについて検査した。この分析により、染色体3の導入に由来するいくつかのクローンのスルファターゼ活性が他のすべてのクローンよりも有意に高いことが明らかに示された。染色体3の導入による個々の各クローンの活性を分析したところ、著しいばらつきが観察された。各クローンがドナー細胞株由来の完全なヒト染色体3を有するか否かを検証するために、本発明者らは、染色体の全長にわたって均一に分布し、ドナー細胞株と患者細胞株との間で異なるアレルを有することに基づいてあらかじめ選択された23種の染色体3多型遺伝子マーカーの一群を用いた。これにより、ドナー染色体の存在について検討すること、および偶発的な染色体切断に起因する特定領域の喪失を同定することが可能になった。高い酵素活性を有

10

20

30

40

50

する各クローンはドナー細胞株由来の染色体3の全体を保っていたが、活性の低いクローンは、ドナー細胞株由来の染色体3アレルの欠如に基づき、この染色体全体を喪失しているように思われた。後者のクローンはおそらく選択マーカー遺伝子を含むドナー染色体のわずかな領域を保っており、このためにハイグロマイシン含有培地における生存が可能になったと考えられる。これらのデータは、正常なヒト染色体3が、MSD患者細胞株で観察された欠陥を補完しうることを示している。

#### 【0362】

補完活性の原因となる遺伝子を含む具体的な染色体領域を決定するために、本発明者らは、染色体の種々の部分を喪失していることが判明しているNeo標識染色体3ハイブリッド体を用いた。さらに、本発明者らは、HyTK標識ヒト染色体3の照射マイクロセルを介した染色体導入法も行った。115種の染色体3照射ハイブリッド体をスルファターゼ活性に関して検査し、染色体の全長にわたる31種の多型マイクロサテライトマーカーの一群を用いて遺伝子型を判定した。高い酵素活性を示すクローンはすべて、染色体3p26を保っているようと思われた。この領域からの別のマーカーを用いたより分解能の高い分析により、補完遺伝子の推定位置はマーカーD3S3630とD3S2397との間にマッピングされた。

10

#### 【0363】

##### MSDで変異している遺伝子の同定

本発明者らは、3p26ゲノム領域からの遺伝子を、MSD患者における変異に関して調べた。各エクソンをスプライス部位を含めてPCR増幅し、直接シーケンシングによって分析した。変異分析は、血縁関係にない12例の罹患個体に対して行った；5例は以前に記載されたMSD患者であり、7例はまだ発表されていない症例である。本発明者らのMSDコホートから、いくつかの変異が、機能不明の遺伝子に対応する発現配列タグ（EST）AK075459（SEQ ID NO：4、5）に同定され、これがMSDに関与する遺伝子であることが強く示唆された。いずれの変異も100例の対照個体には存在しないことが判明し、配列多型の存在の可能性は否定された。逆転写を行った患者RNA、特にゲノムDNA分析によってスプライス部位の内部または近傍にスプライシングに影響を及ぼす可能性のある変異の存在が判明した症例のものに対して、さらに確認のための変異分析を行った。フレームシフト変異、ナンセンス変異、スプライシング変異およびミスセンス変異も同定され、このことは本疾患が、劣性疾患に関して予想されるような機能喪失機序によって起こることを示唆する。これは、ほぼすべてのミスセンス変異が、進化を通じて高度に保存されたアミノ酸（下記参照）に影響を及ぼすという観察所見とも一致する。

20

#### 【0364】

##### （表8）同定されたそのほかのMSD変異

30

症例	参考文献	表現型	エクソン	ヌクレオチドの変化	アミノ酸の変化
1. BA426	Conary et al, 1988	中等度	3	463T>C	S155P
			3	463T>C	S155P
2. BA428	Burch et al, 1986	重度かつ新生児性	5	661delG	フレームシフト
3. BA431	Zenger et al, 1989	中等度	1	2T>G	M1R
			2	276delC	フレームシフト
4. BA799	Burk et al, 1981	軽度～中等度	3	463T>C	S155P
			3	463T>C	S155P
5. BA806	未発表	重度かつ新生児性	9	1045T>C	R349W
6. BA807	Schmidt et al, 1995	不明	3	c519+4delGTAA ex 3 の飛び越え (skipping)	
			9	1076C>A	S359X
7. BA809	Couchot et al, 1974	軽度～中等度	1	1A>G	M1V
			9	1042G>C	A348P
8. BA810	未発表	重度	8	1006T>C	C336R
			9	1046G>A	R349Q
9. BA811	未発表	重度かつ新生児性	3	c519+4delGTAA ex 3 の飛び越え 979C>T	
			8	R327X	
10. BA815	未発表	中等度	5	c.603-6delC	ex 6 の飛び越え
			6	836C>T	A279V
11. BA919	未発表	軽度～中等度	9	1033C>T	R345C
			9	1033C>T	R345C
12. BA920	未発表	中等度	5	653G>A	C218Y
			9	1033C>T	R345C

## 【0365】

変異は検討したそれぞれのMSD患者で同定され、このため、遺伝子座の不均一性の可能性は除外された。同定された変異のタイプと報告された表現型の重症度との間に明らかな相関は認められず、このことから臨床的差異は対立遺伝子の不均一性には起因しないことが示唆された。3つのケースで、異なる患者（表6中の症例1および4、症例6および9、ならびに症例11および12）が同一の変異を有することが見いだされた。これらの患者のうち2例（症例11および12）はシチリア島の同じ町の出身であり、このことはファウンダー効果の存在を示唆するが、これはハプロタイプ分析によって実際に確かめられた。驚いたことに、ほとんどの患者は複数の異なる対立遺伝子変異を有する複合型ヘテロ接合体であり、ホモ接合体はわずかに過ぎないことが判明した。このことは、血族婚でないことが親によって報告されていることに合致するが、MSDのような極めて稀な劣性疾患に関しては幾分予想外の所見であった。

## 【0366】

## FGE遺伝子およびタンパク質

ヒトFGE（本明細書ではSUMF1とも互換的に用いられる）cDNA（SEQ ID NO：1）のコンセンサスcDNA配列を、いくつかの発現配列タグ（EST）クローニングから、および一部は、対応するゲノム配列からアセンブルした。この遺伝子は9つのエクソンを含み、約105kbの範囲に及ぶ（実施例1参照）。配列比較により、本発明者らがFGE2（本明細書ではSUMF2とも互換的に用いられる）と命名したFGE遺伝子のパラログ（SEQ ID NO：45、46）がヒト染色体7に位置することも同定された。

## 【0367】

10

20

30

40

50

### スルファターゼ欠損症の機能的補完

FGE (SUMF1) 遺伝子に変異があることを本発明者が同定した2例のMSD患者（表8中の症例1および12）からの線維芽細胞（細胞株BA426およびBA920）に対して、野生型および2種類の変異型のFGE (SUMF1) cDNA (R327Xおよびex3) を含むHSVウイルスを感染させた。ARS-A、ARS-BおよびARSCの活性を感染72hr後に調べた。野生型FGE (SUMF1) cDNAの発現はこの3種類すべての活性の機能的補完をもたらしたが、変異型FGE (SUMF1) cDNAではこれは生じなかつた（表9）。これらのデータは、FGE (SUMF1) がMSD遺伝子であるという確定的な証拠を与えるとともに、患者で見いだされた変異の機能的関与も証明している。これらの疾患関連変異はスルファターゼ欠損症をもたらし、このことはFGE (SUMF1) がスルファターゼ活性の必須因子であることを示している。

10

### 【0368】

（表9）スルファターゼ欠損症の機能的補完

レシピエント MSD 細胞株	構築物	ARSA <sup>(1)</sup>	ARSB <sup>(1)</sup>	ARSC <sup>(1)</sup>	
BA426	HSV アンプリコン	24.0	22.5	0.15	20
	SUMF1-Δex3	42.0	23.8	0.29	
	SUMF1-R327X	33.6	24.2	0.16	
	SUMF1	119.5 (4.9 x)	37.8 (1.7 x)	0.62(4.1 x)	
BA920	HSV アンプリコン	16.6	11.3	0.15	30
	SUMF1-Δex3	17.2	14.4	0.07	
	SUMF1-R327X	36.0	13.5	0.13	
	SUMF1	66.5 (4.0 x)	21.6 (1.9 x)	0.42(2.8 x)	
対照の範囲		123.7-394.6	50.6-60.7	1.80-1.58	

（1）酵素活性はすべて、遊離した4-メチルウンベリフェロンのnmole数/タンパク質1mg・3hrとして表している。MSD細胞株BA426およびBA920に対して、HSVアンプリコンを単独で、または変異型もしくは野生型のSUMF1 cDNAを有する構築物とともに感染させた。野生型SUMF1遺伝子を感染させた線維芽細胞における個々のアリールスルファターゼ活性の上昇をベクターのみを感染させた細胞のものと比較して、括弧内に示している。感染していない对照線維芽細胞で測定した活性も示している。

30

### 【0369】

#### MSDの分子的基盤

この疾患遺伝子は患者細胞株における酵素欠損症を補完しうるはずであるという仮説に基づき、本発明者らは、MSD患者由来の不死化細胞株に対して、マイクロセルを介した染色体導入法を行った。この手法は、予想される機能を細胞株で評価しうる（例えば、酵素活性を測定することにより、または形態的特徴を検出することにより）と考えられる遺伝子の同定に首尾良く用いられている。酵素活性の確率的変動の問題に対処するために、本発明者らは、補完アッセイで3種類の異なるスルファターゼ（ARSA、ARS-BおよびARSC）の活性を測定した。染色体導入の結果、補完遺伝子は染色体3にマッピングされることが明らかに示された。染色体3に関する照射ハイブリッド体を作製することにより、領域内マッピングが得られた。個々のハイブリッドクローニングの特徴を、ドナー細胞株とレシピエント細胞株との間でアレルの違いを示す31種のマイクロサテライトマーカーの型判定によってゲノムレベルで、さらにスルファターゼ活性を検査することによって機能的レベルで評価した。130種のこうしたハイブリッド体の分析により、補完領域は染色体3p26に対してマッピングされた。

40

### 【0370】

50

重要な意味を持つゲノム領域がひとつたび同定されると、FGE (SUMF1) 遺伝子も患者DNAの変異分析によって同定された。変異は検討したすべての患者で見いだされ、これによってMSDには単一の遺伝子が関与することが示された。見いだされた変異にはさまざまなタイプがあり、その大半（例えば、スプライス部位、開始部位、ナンセンス、フレームシフト）は、劣性疾患に関して予想されるように、コードされるタンパク質の機能喪失を引き起こすことが推定される。ほとんどのミスセンス変異は、進化の過程で高度に保存されてきたアミノ酸に対応するコドンに影響し、このこともこれらの変異が機能喪失を引き起こすことを示唆する。変異のタイプと表現型の重症度との間には相関が得られず、このことは後者がこれとは関係のない要因に起因することを示している。稀な遺伝病に関しては予想外のことには、多くの患者は2種類の変異を有する複合型ヘテロ接合体であることが判明した。しかし、シチリア島の小さな町から得られた1つの変異に関してはファウンダー効果が認められた。

10

#### 【0371】

##### FGE (SUMF1) 遺伝子の機能

2種類の患者細胞株において、ウイルスベクター中に挿入された外因性FGE (SUMF1) cDNAの発現により4種類の異なるスルファターゼの酵素欠損症がレスキューされたことによって、「補完因子」としてのFGE (SUMF1) 遺伝子の実体が明確に示された。いずれの場合にも、エンプティベクターをトランスフェクトした対照患者細胞株と比較して、検討したすべてのスルファターゼ活性に関して、部分的ではあるものの一貫した回復が認められた。平均すると、酵素活性の上昇は1.7～4.9倍の範囲であり、正常細胞株で観察されたレベルの約半分に達した。酵素活性は、各実験に用いたウイルス粒子の数、およびマーカータンパク質 (GFP) 分析によって調べた感染効率と相関する。同じ実験に、患者で発見された変異のうち2つであるR327Xおよび ex3を有するFGE (SUMF1) cDNAを含むベクターを用いたところ、酵素活性の有意な上昇は認められず、このことからこれらの変異の機能的関与が示された。

20

#### 【0372】

本明細書中の別の箇所に述べたように、Schmidt et al.は、スルファターゼが、ほとんどのスルファターゼの活性部位であることが判明している高度に保存されたシステインのC-ホルミルグリシンへの翻訳後修飾を受けることを最初に発見した。彼らはまた、MSDではこの修飾に欠陥があることを示した (Schmidt, B., et al., Cell, 1995, 82: 271-278)。本発明者らの変異データおよび機能データは、FGE (SUMF1) がこの修飾の原因となるという有力な証拠を与えるものである。

30

#### 【0373】

FGE (SUMF1) 遺伝子は、分析した、細菌からヒトまでに至る遠い関係にあるすべての種にわたって極めて高度の配列保存性を示す。本発明者らは、ヒトFGE (SUMF1) 遺伝子のショウジョウバエホモログが、過剰発現されたヒトスルファターゼを活性化しうるという証拠を示しており、このことは遠い関係にある複数の種のFGE (SUMF1) 遺伝子に認められる高いレベルの配列類似性が顕著な機能的保存性と相關することを実証している。目立った一つの例外は、FGE (SUMF1) 遺伝子もスルファターゼをコードする遺伝子も持たないようと思われる酵母であり、このことはスルファターゼの機能がこの生物には必要でないことを示すとともに、FGE (SUMF1) 遺伝子およびスルファターゼ遺伝子の進化に関して互恵的な影響が存在する可能性を示唆する。

40

#### 【0374】

興味深いことに、ヒトを含め、分析したすべての脊椎動物のゲノム中には、2種類の相同遺伝子、FGE (SUMF1) およびFGE2 (SUMF2) が存在している。系統樹から見てとれるように、FGE2 (SUMF2) 遺伝子はFGE (SUMF1) 遺伝子とは独立に進化したように思われる。本発明者のアッセイでは、FGE2 (SUMF2) 遺伝子もスルファターゼを活性化しうるが、FGE (SUMF1) 遺伝子と比べてその効率ははるかに低い。これはMSD患者に認められる残存スルファターゼ活性の原因であると思われ、完全なスルファターゼ欠損症は致死的である可能性を示唆している。現時点では、本発明者らは、FGE2 (SUMF2) 遺伝子がさらに別の未知

50

の機能を有する可能性を否定することはできない。

**【0375】**

**スルファターゼ欠損症に起因する疾患の治療法に対する影響**

FGE (SUMF1) cDNAを、ARSA、ARSCまたはARSEのcDNAのいずれかとともに過剰発現する細胞では、単一のスルファターゼのみを過剰発現する細胞と比較して、スルファターゼ活性の最大50倍もの大きな上昇が観察された。すべての細胞株で有意な相乗効果が認められ、このことはFGE (SUMF1) がスルファターゼ活性の律速因子であることを示している。しかし、異なるスルファターゼ間には差異が認められ、これはおそらく、FGE (SUMF1) によってコードされるタンパク質と種々のスルファターゼとの親和性が異なるためと考えられる。内因性ホルミルグリシン生成酵素のレベルが異なると思われる異なる細胞株間でも差異が観察された。これらの観察所見と一致して、本発明者らは、MSD遺伝子の発現が組織間で異なり、腎臓および肝臓で有意に高レベルであることを見いだした。このことは、FGE (SUMF1) 遺伝子発現レベルが低い組織では外因性に到達したスルファターゼタンパク質を有効に修飾する能力が低い可能性があるため、重要な意味を持つ（下記参照）。これらのデータを総合すると、FGE (SUMF1) 遺伝子の機能は、各々のスルファターゼが、それぞれの構造的スルファターゼ遺伝子のmRNAレベルを担当する個別の機構およびすべてのスルファターゼに共通する共通機構の両方によって制御されるという二重調節システムを実現するように進化してきたことが示唆される。さらに、FGE2 (SUMF2) はスルファターゼ修飾に対して部分的な冗長性を与える。

**【0376】**

これらのデータは、酵素補充療法に利用するための活性型スルファターゼの大量生産にとって重大な意味を持つ。スルファターゼ欠損症の動物モデル、例えばムコ多糖症VIのネコモデルに対する酵素補充試験が報告されており、いくつかの症状の予防および治癒に有効なことが実証されている。ヒトでの治療試験は現在、スルファターゼ欠損症に起因する2種類の先天的疾患であるMPSII（ハンター症候群）およびMPSVI（マロト-ラミー症候群）に対して実施中であり、間もなく多数の患者へと拡大されると考えられる。

**【0377】**

実施例5：

**モルキオ病MPS IVAに対する、FGE活性化GALNSを用いた酵素補充療法**

モルキオ病患者の骨格系病態の主な原因は、リソソームスルファターゼGALNSの欠損に起因する、骨端円板（骨端線）軟骨細胞における硫酸ケラタン（KS）の蓄積である。インビオ調査試験の主な目的は、静脈内（IV）投与したFGE活性化GALNSが、正常マウスにおける骨端線の軟骨細胞およびその他の適した細胞種に浸透するか否かを明らかにすることであった。骨格異常は全体的にみられないものの、反復投与したFGE活性化GALNSのインビオでの生化学的活性を示す目的で、GALNS欠損マウスモデル（モルキオノックイン MKI、S. Tomatsu, St. Louis University, MO）も用いた。マウスモデルに骨格系病態がみられないことは、齧歯動物では骨格KSが大きく減少しているか存在しないことを反映している（Venn G, & Mason RM., Biochem J., 1985, 228: 443-450）。しかし、これらのマウスは、種々の臓器および組織において、GAGの検出可能な蓄積およびその他の細胞異常を示した。このため、これらの試験の全体的な目的は、FGEにより活性化されたGALNSが骨端線に浸透するか否か（生体内分布試験）、および機能的GALNS酵素活性が罹患組織における蓄積GAGの除去に向けられるか否か（薬物動態試験）を示すことであった。

**【0378】**

これらの試験の結果から、IV注射したFGE活性化GALNSが、他の組織と比較して相対的に低レベルではあるものの、骨端線の軟骨細胞内に取り込まれたことが示された。さらに、MKIマウスにおける16週間にわたるFGE活性化GALNSの注射により、蓄積したGAGが有効に消失し、リソソームバイオマーカーの染色は検討したすべての軟部組織で低下した。以上を総合すると、これらの実験は、GALNSが骨端線軟骨細胞に送達されること、および多数の組織におけるGAG除去に関する生化学活性を示すことに成功した。

**【0379】**

10

20

30

40

50

### 生体内分布試験

4週齢ICR(正常)マウスに5mg/kg FGE活性化GALNSの単回IV注射を行った。注射の2時間後に肝臓、大腿(骨)、心臓、腎臓および脾臓を採取し、組織学的検査用に調製した。モノクローナル抗ヒトGALNS抗体を、注射したGALNSの種々の組織中での存在を示すために用いた。媒体対照との比較により、検討したすべての組織でGALNSが検出された。さらに、西洋ワサビペルオキシダーゼレポーター系を用いたところ、GALNSは、骨を例外として、検討したすべての組織で容易に観察された。骨端線におけるGALNS取り込みを示すためには、より感度の高いフルオレセイン-イソチオシアネート(FITC)レポーター系を用いる必要があり、このことはGALNSは骨端線に浸透するものの、骨端線軟骨細胞による利用能は軟部組織の細胞よりも低いことを意味する。より高感度の蛍光検出法が必要ではあるものの、媒体対照との比較により、骨の骨端線軟骨細胞へのGALNS送達は検討したすべての骨端線切片で観察された。

#### 【0380】

### MKIマウスにおける薬物動態試験

4週齢のMKIマウスまたは野生型マウスに対して、20週齢になるまでIV注射(各群n=8)を毎週行った。毎週のそれぞれの注射は、2mg/kgのFGE活性化GALNSまたは媒体対照(野生型マウスに対してはこれは注射しなかった)のいずれからなった。20週齢になった時点ですべてのマウスを組織学的検査のために屠殺し、以下の方法を用いて染色した：細胞形態に関してはヘマトキシリンおよびエオジン、GAGの検出用にはアルシアンブルー。

#### 【0381】

検討したすべての軟部組織(肝臓、心臓、腎臓および脾臓)でのアルシアンブルー染色の低下または消失により、蓄積したGAGの除去が示された。これはGALNSを注射したマウスのみで観察された。MKIマウスにおける骨端線は、正常な骨格形態によって示されるように正常に機能したが、より軽微な細胞異常が観察された(明らかな病的作用を伴わない軟骨細胞の空胞化を含む)。骨端線の肥大帯域および増殖帯域における空胞化した軟骨細胞はGALNS投与による影響を受けなかった。これは、GALNS注射マウスで空胞化の減少が認められた、骨端線の石灰化帯域における軟骨細胞とは対照的であった。MKIマウスの骨端線における軟骨細胞の空胞化および非KS性GAGと推定されるものの蓄積は、マウスの骨端線にはKSが存在しないことが知られているため、一般的に言って思いがけない予想外のことであった。これらの特別な観察所見は、このノックインマウスには高レベルの変異型GALNSが存在するという事実を反映している可能性が高い(残存性の変異型GALNSが存在せず、骨端線軟骨細胞の空胞化およびGAG蓄積もみられないノックアウトマウスとは対照的である Tomatsu S. et al., Human Molecular Genetics, 2003, 12: 3349-3358)。骨端線における空胞化現象は、変異型GALNSを発現する細胞サブセットに対する二次的影響を示す可能性もある。しかし、16週間にわたる酵素注射からは、多組織へのFGE活性化GALNSの送達およびインビボ酵素活性の有力な証拠が示されている。

#### 【0382】

### 図面の詳細な説明

図1: ウシ精巣ミクロソームからの可溶性抽出物の非存在下(A)または存在下(B)におけるインキュベーション後のP23のMALDI-TOF質量スペクトル

6pmolのP23を、1μlのミクロソーム抽出物の存在下または非存在下において、標準的な条件下で37℃で10minインキュベートした。試料は実験手順の項に記載したようにMALDI-TOF質量分析用に調製した。P23(2526.28)およびそのFGly誘導体(2508.29)のモノアイソトピック質量MH<sup>+</sup>を示している。

#### 【0383】

図2: ヒトFGEおよびPFAM-DUF323シードの21種のタンパク質のアラインメントによって得られた系統樹

枝に付した数字は系統学的距離を示す。タンパク質はTrEMBL ID番号および種の名称によって命名した。hFGE ヒトFGE。右上方: 系統学的距離の縮尺。星印は遺伝子がさらに調査されていることを示す。最上方の7つの遺伝子はFGE遺伝子ファミリーの一部である。

10

20

30

40

50

## 【0384】

図3：ヒトおよびマウスのFGE遺伝子座の構成

エクソンはボックスおよび淡色のボックス（マウス座位）として縮尺を保って示されている。右下方にあるバーは縮尺を示す。エクソン間の線はインtronを示す（縮尺通りではない）。インtronの線の上にある数字は、インtronのサイズをキロベース単位で示している。

## 【0385】

図4：FGE発現プラスミドpXMG.1.3のマップを示した概略図

## 【0386】

図5：FGE発現プラスミドを一過性にトランスフェクトした36F細胞におけるN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ活性を示した棒グラフ

10

細胞に対して、FGE cDNAを逆向きに有する対照プラスミドpXMG.1.2、またはまたはFGE発現プラスミドpXMG.1.3を、メトレキサート（MTX）を含まない培地中でトランスフェクトした。24時間後に細胞に1.0 μM MTXを含む培地を再補給した。培地を収集し、再補給から24、48および72時間後に細胞を採取した。N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ活性は活性アッセイにより決定した。示した各値は、2回ずつの別個のトランスフェクションの平均と、エラーバーによって示した標準偏差である。

## 【0387】

図6：FGE発現プラスミドを一過性にトランスフェクトした36F細胞におけるN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ比活性を示した棒グラフ

20

細胞に対して、FGE cDNAを逆向きに有する対照プラスミドpXMG.1.2、またはまたはFGE発現プラスミドpXMG.1.3を、メトレキサート（MTX）を含まない培地中でトランスフェクトした。24時間後に細胞に1.0 μM MTXを含む培地を再補給した。培地を収集し、再補給から24、48および72時間後に細胞を採取した。N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ比活性は活性アッセイおよびELISAによって決定し、ELISA反応性N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ1mg当たりのN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ活性の比として表している。示した各値は2回ずつの別個のトランスフェクションの平均である。

## 【0388】

図7：FGE発現プラスミドを一過性にトランスフェクトした36F細胞におけるN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ産生を示した棒グラフ

30

細胞に対して、FGE cDNAを逆向きに有する対照プラスミドpXMG.1.2、またはまたはFGE発現プラスミドpXMG.1.3を、メトレキサート（MTX）を含まない培地中でトランスフェクトした。24時間後に細胞に1.0 μM MTXを含む培地を再補給した。培地を収集し、再補給から24、48および72時間後に細胞を採取した。N-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ総タンパク質量はELISAにより決定した。示した各値は、2回ずつの別個のトランスフェクションの平均と、エラーバーによって示した標準偏差である。

## 【0389】

図8：FGE発現プラスミドを一過性にトランスフェクトした30C6細胞におけるイズロン酸2-スルファターゼ活性を示したグラフ

細胞に対して、FGE cDNAを逆向きに有する対照プラスミドpXMG.1.2、またはまたはFGE発現プラスミドpXMG.1.3を、メトレキサート（MTX）を含まない培地中でトランスフェクトした。24時間後に細胞に1.0 μM MTXを含む培地を再補給した。培地を収集し、再補給から24、48および72時間後に細胞を採取した。イズロン酸2-スルファターゼ活性は活性アッセイにより決定した。示した各値は2回ずつの別個のトランスフェクションの平均である。

40

## 【0390】

図9：本発明の特徴を具現化したキットを示している。

## 【0391】

本明細書中に開示したすべての参考文献は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。特許請求の範囲は以下に提示され、その後に配列表が続いている。

50

## 【図面の簡単な説明】

【0392】

【図1】ウシ精巣ミクロソームからの可溶性抽出物の非存在下(A)または存在下(B)におけるインキュベーション後のP23を図式化したMALDI-TOF質量スペクトル。

【図2】ヒトFGEおよびPFAM-DUF323シードの21種のタンパク質のアラインメントによって得られた系統樹。

【図3】ヒトおよびマウスのFGE遺伝子座の構成。エクソンはボックスおよび淡色のボックス(マウス座位)として縮尺を保って示されている。イントロンの線の上にある数字は、イントロンのサイズをキロベース単位で示している。

【図4】FGE発現プラスミドpXMG. 1.3のマップを示した概略図。

10

【図5】FGE発現プラスミドを一過性にトランスフェクトした36F細胞におけるN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ活性を示した棒グラフ。

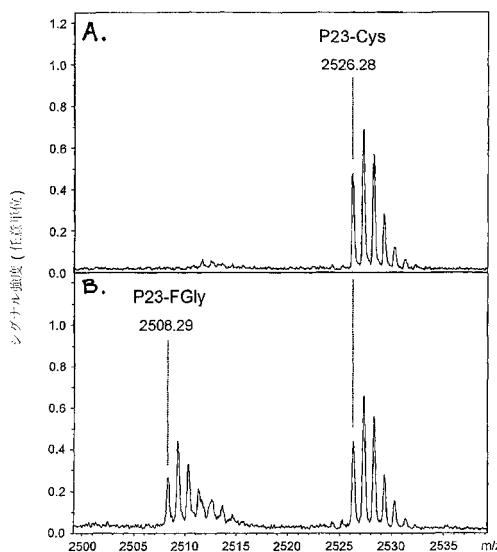
【図6】FGE発現プラスミドを一過性にトランスフェクトした36F細胞におけるN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ比活性を示した棒グラフ。

【図7】FGE発現プラスミドを一過性にトランスフェクトした36F細胞におけるN-アセチルガラクトサミン6-スルファターゼ産生を示した棒グラフ。

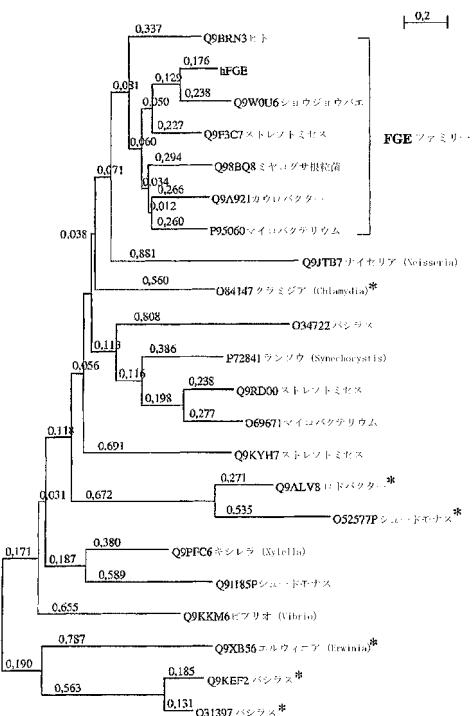
【図8】FGE発現プラスミドを一過性にトランスフェクトした30C6細胞におけるイズロン酸2-スルファターゼ活性を示したグラフ。

【図9】本発明の特徴を具現化したキットを示している。

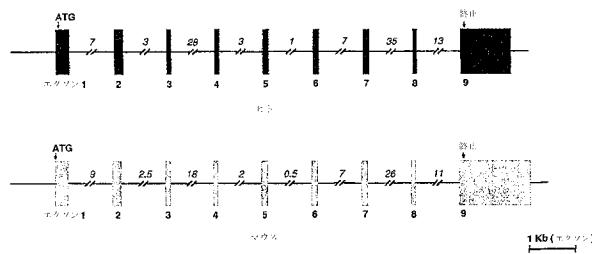
【図1】



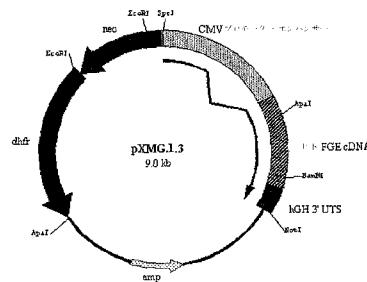
【図2】



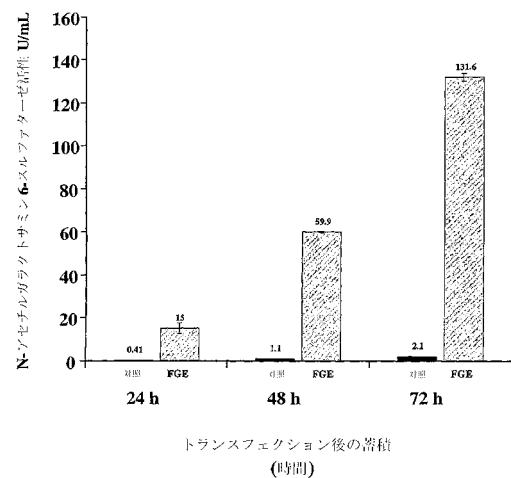
【図3】



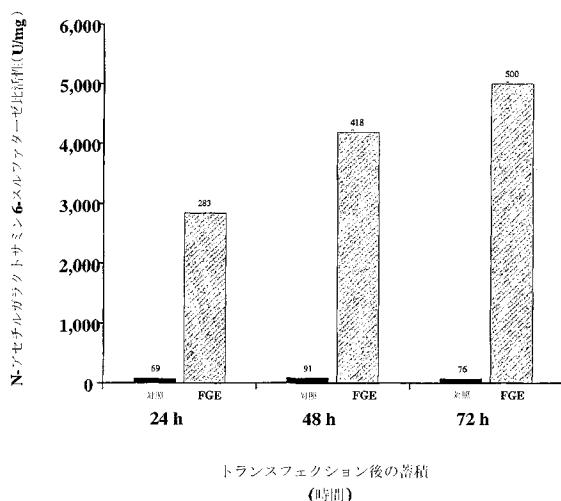
【図4】



【図5】

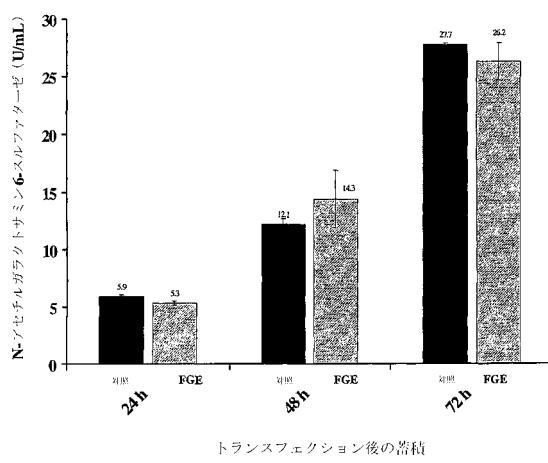
N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ活性 (U/mL)  
トランスフェクション後の蓄積 (時間)

【図6】

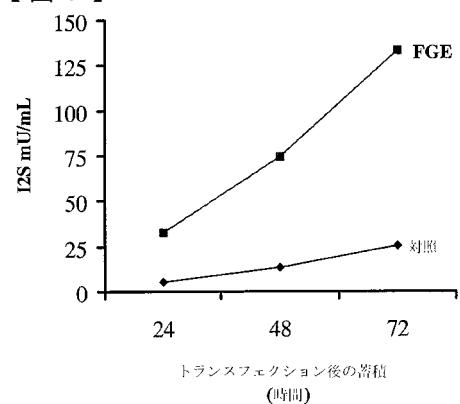


トランスフェクション後の蓄積 (時間)

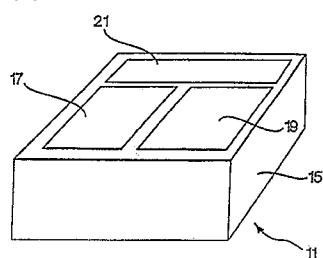
【図7】

N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ活性 (U/mL)  
トランスフェクション後の蓄積 (時間)

【図8】



【図9】



## 【配列表】

0005241101000001.app  
0005241101000002.xml

## フロントページの続き

F I		
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53
C 1 2 N 9/00	(2006.01)	G 0 1 N 33/53
C 1 2 N 9/16	(2006.01)	C 1 2 N 9/00
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 9/16
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 M 1/00	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2
C 0 7 K 16/40	(2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 F
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	C 0 7 K 16/40
A 6 1 P 25/02	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 15/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/02
A 6 1 P 19/08	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
		A 6 1 P 15/08
		A 6 1 P 19/08

(72)発明者 ダークス トーマス

ドイツ連邦共和国 ゲッチンゲン スタンプフェ アイヒェ 89

(72)発明者 ハートレイン マイケル ダブリュー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボックスボロ リード ファーム ロード 167

(72)発明者 バラビオ アンドレア

イタリア共和国 ナポリ ヴィア フランチェスコ ペトラルカ 93 / 13

(72)発明者 コズマ マリア ピア

イタリア共和国 ナポリ ラルゴ エッケ ホモ 2

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 國際公開第00/050443(WO,A1)

特開2012-090630(JP,A)

國際公開第01/060991(WO,A1)

國際公開第02/059327(WO,A1)

特表平10-500939(JP,A)

國際公開第01/077137(WO,A1)

國際公開第01/070804(WO,A1)

國際公開第01/018022(WO,A1)

特開2002-017376(JP,A)

Cell, Vol.82, No.2(1995)p.271-278

Chem.Biol., Vol.5, No.8(1998)p.R181-R186

EMBO J., Vol.18, No.8(1999)p.2084-2091

J.Biol.Chem., Vol.276, No.50(2001)p.47021-47028

Cell, Vol.113, No.4(2003.May)p.435-444

Cell, Vol.113, No.4(2003.May)p.445-456

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

CA / BIOSIS / WPI DS (STN)  
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq  
SwissProt / PIR / GeneSeq  
PubMed