(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102559633 A
(43)申请公布日 2012.07.11

(21)申请号 201210019823.X
(22)申请日 2001.08.17
(30)优先权数据
09/641,471 2000.08.18 US
(62)分案原申请数据
01802801.2 2001.08.17
(71)申请人 夏尔人类遗传性治疗公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 C·A·吉诺施塔 M·普拉施森特
M·布洛斯基 P·弗朗西斯-丹尼尔
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 罗菊华
(51)Int.Cl.
C12N 9/16(2006.01)
A61K 38/46(2006.01)
A61P 3/00(2006.01)

权利要求书 5 页 说明书 30 页 附图 1 页

(54)发明名称

高甘露糖蛋白质和产生高甘露糖蛋白质的方法

(57)摘要

本发明表征了一种生产高甘露糖葡糖脑苷脂酶(hmGCB)的方法,包括:提供一种能表达葡糖脑苷脂酶(GCB)的细胞;在防止去除远离GCB前体寡糖的五糖核心的至少一个甘露糖残基的条件下生产含有前体寡糖的GCB,从而生产一种hmGCB制剂。优选地,防止去除远离五糖核心的至少一个甘露糖残基的条件是抑制1类加工甘露糖苷酶和/或2类加工甘露糖苷酶。本发明也表征了一种hmGCB制剂和使用hmGCB制剂的方法。

CN 102559633 A

1. 一种生产高甘露糖葡糖脑苷脂酶 (hmGCB) 的方法，包括：

提供一种能表达葡糖脑苷脂酶 (GCB) 的细胞；和

在防止去除远离 GCB 前体寡糖的五糖核心的至少一个甘露糖残基的条件下生产含有前体寡糖的 GCB，从而生产一种 hmGCB 制剂。

2. 权利要求 1 的方法，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基。

3. 权利要求 1 的方法，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,3 甘露糖残基。

4. 权利要求 1 的方法，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,6 甘露糖残基。

5. 权利要求 1 的方法，其中该方法包括使细胞接触一种物质，该物质可防止去除远离 GCB 前体寡糖五糖核心的至少一个甘露糖残基。

6. 权利要求 5 的方法，其中该物质是一种甘露糖苷酶抑制剂。

7. 权利要求 6 的方法，其中该甘露糖苷酶抑制剂是一种 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂。

8. 权利要求 6 的方法，其中该甘露糖苷酶抑制剂是一种 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂。

9. 权利要求 7 的方法，其中 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂选自：kifunensine、deoxymannojirimycin 和其组合。

10. 权利要求 7 的方法，其中 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂是 kifunensine。

11. 权利要求 8 的方法，其中 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂选自：苦马豆素、mannostatin、6- 脱氧 -DIM、6- 脱氧 -6- 氟 -DIM 和其组合。

12. 权利要求 8 的方法，其中 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂是苦马豆素。

13. 权利要求 6 的方法，其中甘露糖苷酶抑制剂以约 0.05-20.0 μ g/ml 的浓度存在。

14. 权利要求 13 的方法，其中甘露糖苷酶抑制剂以约 0.1-2.0 μ g/ml 的浓度存在。

15. 权利要求 7 的方法，其还包括使细胞接触一种 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂。

16. 权利要求 15 的方法，其中 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂选自：苦马豆素、mannostatin 和其组合。

17. 权利要求 15 的方法，其中 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂是苦马豆素。

18. 权利要求 1 的方法，其中细胞是至少一种甘露糖苷酶的敲除体。

19. 权利要求 18 的方法，其中细胞是 1 类加工甘露糖苷酶的敲除体。

20. 权利要求 18 的方法，其中细胞是 2 类加工甘露糖苷酶的敲除体。

21. 权利要求 18 的方法，其中细胞是 1 类加工甘露糖苷酶和 2 类加工甘露糖苷酶的敲除体。

22. 权利要求 1 的方法，其中细胞含有一种反义甘露糖苷酶分子。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述反义分子选自：1 类加工甘露糖苷酶反义分子、2 类加工甘露糖苷酶反义分子、1 类加工甘露糖苷酶反义分子和 2 类加工甘露糖苷酶反义分子两者。

24. 权利要求 1 的方法，其中 hmGCB 具有一条至少含 4 个甘露糖残基的糖链。

25. 权利要求 24 的方法，其中 hmGCB 具有一条至少含 5 个甘露糖残基的糖链。

26. 权利要求 24 的方法，其中 hmGCB 具有一条至少含 8 个甘露糖残基的糖链。

27. 权利要求 24 的方法，其中 hmGCB 具有一条至少含 9 个甘露糖残基的糖链。

28. 权利要求 1 的方法，其中产生的 hmGCB 的甘露糖残基与 GlcNAc 残基之比大于 3 个甘露糖残基比 2 个 GlcNAc 残基。

29. 权利要求 1 的方法，其中在 hmGCB 的至少 2 条糖链上防止去除一个或多个远离五糖核心的甘露糖残基。

30. 权利要求 1 的方法，其中制品中至少 60％的 hmGCB 含有一条或多条糖链，其中防止去除一个或多个远离五糖核心的甘露糖残基。

31. 权利要求 1 的方法，其中细胞含有一种包含 GCB 编码区的外源核酸序列。

32. 权利要求 31 的方法，其中细胞还包含一种作用为调节 GCB 编码区表达的外源调节序列。

33. 权利要求 1 的方法，其中细胞含有一种作用为调节内源 GCB 编码序列表达的外源调节序列。

34. 权利要求 1 的方法，其中细胞是一种初级细胞。

35. 权利要求 1 的方法，其中细胞是一种次级细胞。

36. 权利要求 1 的方法，其中细胞是一种哺乳动物细胞。

37. 权利要求 36 的方法，其中细胞是一种人细胞。

38. 权利要求 37 的方法，其中细胞是一种成纤维细胞或成肌细胞。

39. 权利要求 37 的方法，其中细胞是一种无限增殖化细胞。

40. 权利要求 39 的方法，其中细胞是一种 HT-1080 细胞。

41. 权利要求 1 的方法，其中提供能表达 GCB 的细胞群体，至少 10％的细胞产生具有 4 条含特定数量甘露糖残基的糖链的 GCB。

42. 权利要求 5 的方法，其中细胞在至少含有一种甘露糖苷酶抑制剂的培养基中培养。

43. 权利要求 42 的方法，其中甘露糖苷酶抑制剂是 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂。

44. 权利要求 43 的方法，其中 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂选自：kifunensine、deoxymannojirimycin 和其组合。

45. 权利要求 42 的方法，其中甘露糖苷酶抑制剂是 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂。

46. 权利要求 45 的方法，其中 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂选自：苦马豆素、mannostatin、6- 脱氧 -DIM、6- 脱氧 -6- 氟 -DIM 和其组合。

47. 权利要求 43 的方法，其中培养基中还含有一种 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂。

48. 权利要求 42 的方法，其中 hmGCB 从培养细胞的培养基中获得。

49. 一种生产高甘露糖葡糖脑苷脂酶 (hmGCB) 的方法，包括：

提供一种能表达葡糖脑苷脂酶 (GCB) 的细胞；和

在抑制 1 类加工甘露糖苷酶活性和 2 类加工甘露糖苷酶活性使得防止去除远离 GCB 前体寡糖五糖核心的至少一个甘露糖残基的条件下产生含有前体寡糖的 GCB，从而产生一种 hmGCB 制剂。

50. 权利要求 49 的方法，其中使细胞接触一种可抑制 1 类加工甘露糖苷酶的物质和一种可抑制 2 类加工甘露糖苷酶的物质。

51. 权利要求 49 的方法，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基。

52. 权利要求 49 的方法，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,3 甘露糖残基。

53. 权利要求 49 的方法，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,6 甘露糖残基。

54. 权利要求 49 的方法，其中所述物质是一种 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂。

55. 权利要求 49 的方法，其中所述物质是一种 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂。

56. 权利要求 54 的方法，其中 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂选自：kifunensine、deoxymannojirimycin 和其组合。

57. 权利要求 55 的方法，其中 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂选自：苦马豆素、mannostatin、6- 脱氧 -DIM、6- 脱氧 -6- 氟 -DIM 和其组合。

58. 权利要求 56 或 57 的方法，其中甘露糖苷酶抑制剂以约 0.05-20.0 μ g/ml 的浓度存在。

59. 权利要求 49 的方法，其中细胞是 1 类加工甘露糖苷酶的敲除体。

60. 权利要求 49 的方法，其中细胞是 2 类加工甘露糖苷酶的敲除体。

61. 权利要求 49 的方法，其中细胞是 1 类加工甘露糖苷酶和 2 类加工甘露糖苷酶的敲除体。

62. 权利要求 49 的方法，其中细胞含有 1 类加工甘露糖苷酶反义分子。

63. 权利要求 49 的方法，其中细胞含有 2 类加工甘露糖苷酶反义分子。

64. 权利要求 63 的方法，其中细胞含有 1 类加工甘露糖苷酶反义分子和 2 类加工甘露糖苷酶反义分子。

65. 权利要求 49 的方法，其中细胞含有一种包含 GCB 编码区的外源核酸序列。

66. 权利要求 65 的方法，其中细胞还含有一种用来调节 GCB 编码区的表达的外源调节序列。

67. 权利要求 49 的方法，其中细胞含有一种用来调节内源 GCB 编码序列的表达的外源调节序列。

68. 权利要求 50 的方法，其中细胞在含有至少一种 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂和至少一种 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂的培养基中培养。

69. 权利要求 68 的方法，还包括从培养细胞的培养基中获得 hmGCB。

70. 一种生产高甘露糖葡糖脑苷脂酶 (hmGCB) 的方法，包括：

提供一种已导入含外源调节序列的核酸序列的细胞，使得该调节序列调节内源 GCB 编码区的表达；和

在防止去除远离 GCB 前体寡糖的五糖核心的至少一个甘露糖残基的条件下产生具有前体寡糖的 GCB，从而产生一种 hmGCB 制剂。

71. 一种高甘露糖葡糖脑苷脂酶 (hmGCB) 制剂，其含有至少一条含前体寡糖链的至少 4 个甘露糖残基的糖链。

72. 权利要求 71 的 hmGCB 制剂，其中该 hmGCB 含有至少一条含 5 个甘露糖残基的糖链。

73. 权利要求 71 的 hmGCB 制剂，其中该 hmGCB 含有至少一条含 8 个甘露糖残基的糖链。

74. 权利要求 71 的 hmGCB 制剂，其中该 hmGCB 含有至少一条含 9 个甘露糖残基的糖链。

75. 权利要求 71 的 hmGCB 制剂，其中产生的 hmGCB 含有至少一条糖链，其甘露糖残基与 GlcNAc 残基之比大于 3 个甘露糖残基比 2 个 GlcNAc 残基。

76. 权利要求 71 的 hmGCB 制剂，其中该 hmGCB 的至少 2 条糖链含有前体寡糖链的至少 4 个甘露糖残基。

77. 权利要求 71 的 hmGCB 制剂，其中制剂中至少 85％的 hmGCB 含有 4 条糖链，其中防止去除一个或多个远离五糖核心的甘露糖残基。

78. 一种药用组合物，其含有：

权利要求 71 的 hmGCB 制剂，其量适于治疗戈谢病。

79. 权利要求 78 的组合物，其进一步含有一种药学可接受的载体或稀释剂。

80. 一种治疗戈谢病患者的方法，包括：

对患者施用权利要求 78 的组合物，由此治疗戈谢病。

81. 一种从样品中纯化 hmGCB 的方法，包括：

提供收获的 hmGCB 产物；和

对 hmGCB 产物进行疏水电荷诱导层析 (HCIC) 或疏水作用层析 (HIC)，

由此获得纯化的 hmGCB。

82. 权利要求 81 的方法，其中用 MEP Hypercel ®进行 HCIC。

83. 权利要求 81 的方法，其中用 MacroPrep Methyl ®进行 HIC。

84. 权利要求 81 的方法，其还包括对 hmGCB 产物进行离子交换层析。

85. 权利要求 84 的方法，其中在离子交换层析之前对 hmGCB 产物进行 HCIC 或 HIC。

86. 权利要求 84 的方法，其中在 HICI 或 HIC 之前对 hmGCB 产物进行离子交换层析。

87. 权利要求 84 的方法，其中对 hmGCB 产物进行一次以上的离子交换层析步骤。

88. 权利要求 84 的方法，其中离子交换层析选自阴离子交换层析和阳离子交换层析。

89. 权利要求 88 的方法，其中用下列之一种或多种进行阴离子交换层析：Q Sepharose Fast Flow®、MacroPrep High Q Support®、DEAE Sepharose Fast Flow®和 Macro-Prep DEAE®。

90. 权利要求 88 的方法，其中用下列之一或多种进行阳离子交换层析：SP Sepharose Fast Flow®、Source 30S®、CM Sepharose FastFlow®、Macro-Prep CM Support®和 Macro-Prep High S Support®。

91. 权利要求 84 的方法，其进一步包括对 hmGCB 产物进行大小排阻层析。

92. 权利要求 91 的方法，其中用下列之一或多种进行大小排阻层析：Superdex 200®、Sephacryl S-200HR®和 Bio-Gel A 1.5m®。

93. 一种纯化 hmGCB 的方法，包括：

提供收获的 hmGCB 产物；

对 hmGCB 产物进行疏水电荷诱导层析 (HCIC) 或疏水作用层析 (HIC)；和

对 hmGCB 产物进行阴离子交换层析、阳离子交换层析和大小排阻层析之一种或多种，

由此获得纯化的 hmGCB。

94. 权利要求 93 的方法，其中用 MEP Hypercel ®进行 HCIC。

95. 权利要求 93 的方法，其中用 MacroPrep Methyl ®进行 HIC。

96. 权利要求 93 的方法，其中用下列之一种或多种进行阴离子交换层析：Q Sepharose Fast Flow®、MacroPrep High Q Support®、DEAE Sepharose Fast Flow®和 Macro-Prep DEAE®。

97. 权利要求 93 的方法，其中用下列之一种或多种进行阳离子交换层析：SP Sepharose Fast Flow®、Source 30S®、CM Sepharose FastFlow®、Macro-Prep CM Support®和 Macro-Prep High S Support®。

98. 权利要求 93 的方法，其中用下列之一种或多种进行大小排阻层析：Superdex 200®、Sephacryl S-200HR®和 Bio-Gel A 1.5m®。

99. 一种纯化 hmGCB 的方法，包括：

提供收获的 hmGCB 产物；

对 hmGCB 产物进行疏水电荷诱导层析 (HCIC) 或疏水作用层析 (HIC)；

对 HCIC 或 HIC 纯化的 hmGCB 产物进行阴离子交换层析；

对阴离子交换纯化的 hmGCB 进行阳离子交换层析；和

对阳离子交换纯化的 hmGCB 进行大小排阻层析，

由此获得纯化的 hmGCB。

100. 权利要求 99 的方法，其中用 MEP Hypercel ®进行 HCIC。

101. 权利要求 99 的方法，其中用 MacroPrep Methyl ®进行 HIC。

102. 权利要求 99 的方法，其中用下列之一种或多种进行阴离子交换层析：Q Sepharose Fast Flow ®、MacroPrep High Q Support ®、DEAE Sepharose Fast Flow ®和 Macro-Prep DEAE ®。

103. 权利要求 99 的方法，其中用下列之一种或多种进行阳离子交换层析：SP Sepharose Fast Flow ®、Source 30S ®、CM Sepharose Fast Flow ®、Macro-Prep CM Support ®和 Macro-Prep High S Support ®。

104. 权利要求 99 的方法，其中用下列之一种或多种进行大小排阻层析：Superdex 200 ®、Sephacryl S-200HR ®和 Bio-Gel A 1.5m ®。

高甘露糖蛋白质和产生高甘露糖蛋白质的方法

[0001] 发明背景

[0002] 戈谢病 (Gaucher 病) 是一种常染色体隐性溶酶体贮积病，其特征在于溶酶体酶葡糖脑苷脂酶 (GCB) 缺乏。GCB 水解在白细胞和红细胞膜中的鞘糖脂降解后形成的糖脂葡糖脑苷脂。该酶的缺乏导致葡糖脑苷脂在位于戈谢病患者的肝脏、脾脏和骨髓中的吞噬细胞溶酶体中大量积累。这些分子的积累引起多种临床表现，包括脾肿大、肝肿大、骨骼疾病、血小板减少和贫血 (Beutler 等人，戈谢病 ;《遗传性疾病的代谢和分子基础》(McGraw-Hill, Inc.，纽约，1995)，第 2625-2639 页)。

[0003] 该病患者的治疗包括施用止痛剂以缓解骨痛、血液和血小板输注，以及某些情况下的脾切除术。对于骨腐烂的患者关节置换术有时也是必要的。

[0004] 用 GCB 进行酶置换治疗已经作为戈谢病的一种疗法。当前对戈谢病患者的治疗包括施用碳水化合物重建 (remodel) 的 GCB，它来源于人胎盘或用 GCB 表达构件转染的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞，分别被称为阿糖苷酶 (alglucerase) 或 imiglucerase。这种治疗极其昂贵，部分是由于为了将该酶导向网状内皮来源细胞上的甘露糖受体，从 GCB 中除去糖以暴露复合聚糖的三甘露糖基核心的成本。人胎盘组织的缺乏 (在阿糖苷酶情况中)、复杂纯化方案和需要的相对大量的碳水化合物重建的 GCB 全都计入治疗成本。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明部分基于以下发现，防止去除远离蛋白质 (如一种溶酶体贮积酶) 前体寡糖链五糖核心的一个或多个甘露糖残基，能获得高甘露糖蛋白质，如高甘露糖葡糖脑苷脂酶 (hmGCB)。这些高甘露糖蛋白质能用来将蛋白质导向表达甘露糖受体的细胞。这些细胞包括网状内皮来源的细胞，包括巨噬细胞、枯否细胞和组织细胞。因此，这些高甘露糖蛋白质能用来例如将受体介导的胞吞输送定向溶酶体，以治疗多种溶酶体贮积病。

[0007] 特别是，已经发现 hmGCB 可有效地定向甘露糖受体。甘露糖受体存在于巨噬细胞和其它细胞 (如树突细胞、心肌细胞和神经胶质细胞) 上，有助于受体介导的胞吞。戈谢病患者中 GCB 的缺乏导致葡糖脑苷脂主要在网状内皮来源的细胞 (包括巨噬细胞、枯否细胞和组织细胞) 中积累。由于这些细胞在其表面表达甘露糖受体，能用 hmGCB 通过受体介导的胞吞作用将校正酶的输送有效地定向溶酶体，从而治疗戈谢病。令人惊讶的是，发现巨噬细胞对 hmGCB 的摄取比细胞分泌的 GCB 的摄取增多。

[0008] 因此，一方面，本发明表征一种生产高甘露糖葡糖脑苷脂酶 (hmGCB) 制剂的方法。该方法包括 :

[0009] 提供一种能表达 GCB 的细胞 ;和

[0010] 在防止去除远离 GCB 前体寡糖的五糖核心的至少一个甘露糖残基的条件下生产含有前体寡糖的 GCB，从而生产一种 hmGCB 制剂。

[0011] 在一个优选实施方案中，GCB 是人 GCB。在一个优选实施方案中，细胞是人细胞。

[0012] 在一个优选实施方案中，防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基 ;远离五糖核心的 α 1,3 甘露糖残基 ;和 / 或防止去除远离五糖核心的 α 1,6 甘露糖残基。优选地，防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基。

[0013] 在一个优选实施方案中，该方法包括使细胞接触一种物质，该物质可防止去除远离 GCB 前体寡糖五糖核心的至少一个甘露糖残基，例如防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基，远离五糖核心的 α 1,3 甘露糖残基和 / 或远离五糖核心的 α 1,6 甘露糖残基。优选地，防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基。

[0014] 在一个优选实施方案中，该方法包括使细胞接触一种物质，该物质可防止去除远离 GCB 前体寡糖五糖核心的至少一个甘露糖残基，其中该物质是一种甘露糖苷酶抑制剂。该甘露糖苷酶抑制剂可以是 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂、2 类加工甘露糖苷酶抑制剂或此两者。1 类加工甘露糖苷酶抑制剂可以是 kifunensine、deoxymannojirimycin 或类似抑制剂中的一种或多种。优选地，1 类加工甘露糖苷酶抑制剂是 kifunensine。有用的 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂可包括苦马豆素、mannostatin、6- 脱氧 -1,4- 双脱氧 -1,4- 亚氨基 -D- 甘露糖醇 (6- 脱氧 -DIM) 和 6- 脱氧 -6- 氟 -1,4- 亚氨基 -D- 甘露糖醇 (6- 脱氧 -6- 氟 -DIM) 中的一种或多种。优选地，2 类加工甘露糖苷酶抑制剂是苦马豆素。

[0015] 在一个优选实施方案中，甘露糖苷酶抑制剂以约 0.025-20.0 μ g/ml、0.05-10 μ g/ml、0.05-5 μ g/ml、优选地约 0.1-2.0 μ g/ml 的浓度存在。

[0016] 在一个优选实施方案中，该方法还包括使细胞接触 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂和 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶抑制剂以约 0.025-20.0 μ g/ml、0.05-10 μ g/ml、0.05-5 μ g/ml、优选地约 0.1-2.0 μ g/ml 的浓度存在；2 类加工甘露糖苷酶抑制剂以约 0.025-20.0 μ g/ml、0.05-10 μ g/ml、0.05-5 μ g/ml、优选地约 0.1-2.0 μ g/ml 的浓度存在；1 类加工和 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂的每一种以约 0.025-20.0 μ g/ml、0.05-10 μ g/ml、0.05-5 μ g/ml、优选地约 0.1-2.0 μ g/ml 的浓度存在；1 类加工和 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂的总浓度约为 0.025-40.0 μ g/ml、0.05-20 μ g/ml、0.05-10 μ g/ml，优选地约 0.1-4.0 μ g/ml。

[0017] 在一个优选实施方案中，细胞具有至少一种高尔基体加工甘露糖苷酶的突变，如敲除。该突变可以是降低基因表达、降低蛋白质或活性水平，或改变甘露糖苷酶分布，或其它翻译后修饰如糖链加工的突变。该突变可以降低高尔基体加工甘露糖苷酶活性水平，例如降低基因表达，如无效突变，如缺失、移码或插入。在一个优选实施方案中，该突变是敲除，例如甘露糖苷酶基因中的敲除。该突变能影响结构（和蛋白质活性），例如可以是一种温度敏感突变或截短。在一个优选实施方案中，细胞具有 1 类加工甘露糖苷酶、2 类加工甘露糖苷酶、1 类加工甘露糖苷酶和 2 类加工甘露糖苷酶的突变，例如敲除。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶是：高尔基体甘露糖苷酶 IA；高尔基体甘露糖苷酶 IB；高尔基体甘露糖苷酶 IC；或其组合。在一个优选实施方案中，2 类加工甘露糖苷酶是高尔基体甘露糖苷酶 II。

[0018] 在一个优选实施方案中，细胞包含一种核酸序列，如反义分子或核酶，它能结合或灭活一种细胞甘露糖苷酶核酸序列，如 mRNA，并抑制该蛋白质的表达。在一个优选实施方案中，该核酸序列是：1 类加工甘露糖苷酶反义分子；2 类加工甘露糖苷酶反义分子；1 类加工甘露糖苷酶反义分子和 2 类加工甘露糖苷酶反义分子两者。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶是：高尔基体甘露糖苷酶 IA；高尔基体甘露糖苷酶 IB；高尔基体甘露糖苷酶 IC；及其组合。在一个优选实施方案中，2 类加工甘露糖苷酶是高尔基体甘露糖苷酶 II。

[0019] 在一个优选实施方案中，细胞包含一种可结合并抑制甘露糖苷酶的分子，如一种

外源分子。该分子可以是，例如一种单链抗体、胞内蛋白或竞争性或非竞争性抑制剂。

[0020] 在一个优选实施方案中，hmGCB 分子包含一条至少含 4 个甘露糖残基的糖链。例如，hmGCB 分子具有至少一条含 5 个甘露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 6 个甘露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 7 个甘露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 8 个甘露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 9 个甘露糖残基的糖链。优选地，hmGCB 分子具有至少一条含 5 个、8 个或 9 个甘露糖残基的糖链。

[0021] 在一个优选实施方案中，产生的 hmGCB（一种或多种 hmGCB 分子或整个制剂）中甘露糖残基与 GlcNAc 残基之比大于 3 个甘露糖残基比 2 个 GlcNAc 残基，优选地，甘露糖与 GlcNAc 之比为 4 ： 2、5 ： 2、6 ： 2、7 ： 2、8 ： 2、9 ： 2，更优选地，甘露糖与 GlcNAc 之比为 5 ： 2、8 ： 2 或 9 ： 2。

[0022] 在一个优选实施方案中，在 hmGCB 分子的 1、2、3 或 4 条糖链上防止去除远离五糖核心的一个或多个甘露糖残基。

[0023] 在一个优选实施方案中，制剂中至少 30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或全部的 hmGCB 分子含有至少 1 条、优选地 2 条、3 条或 4 条糖链，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个甘露糖残基。

[0024] 在一个优选实施方案中，hmGCB 制剂是一种相对异源的制剂。优选地，除了五糖核心外，hmGCB 中不到 80％、70％、60％、50％、45％、40％、35％、30％、25％、20％、15％、10％、5％或 1％的糖链含有相同数量的甘露糖残基。例如，除五糖核心之外含有相同数量甘露糖残基的糖链与含有不同数量甘露糖残基的糖链之比约为 :60％ ： 40％ ;50％ ： 50％ ;40％ ： 60％ ;30％ ： 70％ ;25％ ： 75％ ;20％ ： 80％ ;15％ ： 85％ ;10％ ： 90％ ;5％或更低 ： 95％或更高。

[0025] 在一个优选实施方案中，高尔基体甘露糖苷酶 IA 和 / 或 IB 和 / 或 IC 的活性被抑制，hmGCB 制剂中至少约 60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或 100％的糖链含有 5 个或 5 个以上甘露糖残基，例如 5、6、7、8 和 / 或 9 个甘露糖残基。在一个优选实施方案中，高尔基体甘露糖苷酶 I 的活性被抑制，含有 5 个或更多甘露糖残基的糖链与含有 4 个或更少甘露糖残基的糖链之比约为 :60％ ： 40％;70％ ： 30％;75％ ： 25％;80％ ： 20％;85％ ： 15％ ;90％ ： 10％ ;95％ ： 5％ ;99％ ： 1％ ;或 100％ ： 0％。

[0026] 在一个优选实施方案中，高尔基体甘露糖苷酶 II 的活性被抑制，hmGCB 制剂中至少约 60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或 100％的糖链含有 5 个或 5 个以上甘露糖残基，例如 5、6、7、8 和 / 或 9 个甘露糖残基。在一个优选实施方案中，高尔基体甘露糖苷酶 II 的活性被抑制，含有 5 个或更多甘露糖残基的糖链与含有 4 个或更少甘露糖残基的糖链之比约为 :60％ ： 40％ ;70％ ： 30％ ;75％ ： 25％ ;80％ ： 20％ ;85％ ： 15％ ;90％ ： 10％ ;95％ ： 5％ ;99％ ： 1％ ;或 100％ ： 0％。

[0027] 在一个优选实施方案中，该细胞包含一种含有 GCB 编码区的外源核酸序列。在一个优选实施方案中，细胞还包含一种调节序列，一种内源或外源调节序列，其作用是调节外源 GCB 编码区的表达。

[0028] 在一个优选实施方案中，该细胞包含一种外源调节序列，其作用是调节内源 GCB 编码序列的表达，例如，调节序列整合到细胞基因组中，使其调节内源 GCB 编码序列的表达。

[0029] 在一个优选实施方案中，调节序列包括下列之一种或多种：启动子、增强子、上游激活序列 (UAS)、支架结构附着区或转录因子结合位点。在一个优选实施方案中，调节序列包括：来自金属硫蛋白 -I 基因（例如小鼠金属硫蛋白 -I 基因）的调节序列、来自 SV-40 基因的调节序列、来自巨细胞病毒基因的调节序列、来自胶原蛋白基因的调节序列、来自肌动蛋白基因的调节序列、来自免疫球蛋白基因的调节序列、来自 HMG-CoA 还原酶基因的调节序列，或来自 EF-1α 基因的调节序列。

[0030] 在一个优选实施方案中，该细胞是一种真核细胞。在一个优选实施方案中，细胞是真菌、植物或动物来源的，例如脊椎动物来源的。在一个优选实施方案中，该细胞是一种哺乳动物细胞，例如初级或次级哺乳动物细胞，例如成纤维细胞、造血干细胞、成肌细胞、角化细胞、上皮细胞、内皮细胞、神经胶质细胞、神经细胞、含有血液有形成分的细胞、肌细胞和这些体细胞的前体；转化的或无限增殖化细胞系。优选地，该细胞是人细胞。在本方法中有用的无限增殖化人细胞系的例子包括但不限于：Bowes 黑素瘤细胞 (ATCC 保藏号 CRL 9607)、Daudi 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 213)、HeLa 细胞和 HeLa 细胞衍生物 (ATCC 保藏号 CCL2 CCL2.1 和 CCL 2.2)、HL-60 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 240)、HT-1080 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 121)、Jurkat 细胞 (ATCC 保藏号 TIB 152)、KB 癌细胞 (ATCC 保藏号 CCL 17)、K-562 白血病细胞 (ATCC 保藏号 CCL 243)、MCF-7 乳腺癌细胞 (ATCC 保藏号 BTH 22)、MOLT-4 细胞 (ATCC 保藏号 1582)、Namalwa 细胞 (ATCC 保藏号 CRL 1432)、Raji 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 86)、RPMI 8226 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 155)、U-937 细胞 (ATCC 保藏号 1593)、WI-28VA13 亚系 2R4 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 155)、CCRF-CEM 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 119) 和 2780AD 卵巢癌细胞 (Van Der Blick 等人，Cancer Res. 48：5927-5932，1988)，以及人细胞与其它种的细胞融合产生的杂交瘤细胞。在另一个实施方案中，无限增殖化细胞系可以是人细胞系之外的细胞系，如 CHO 细胞系、COS 细胞系。在另一个实施方案中，细胞可以来自克隆细胞株或克隆细胞系。

[0031] 在一个优选实施方案中，提供能表达 hmGCB 的细胞群体，至少 30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或全部细胞产生至少含有 1 条糖链、优选地 2、3 或 4 条糖链的 hmGCB 分子，它们含有特定数量的甘露糖残基。

[0032] 在一个优选实施方案中，细胞在含有至少一种甘露糖苷酶抑制剂的培养基中培养。在一个优选实施方案中，该方法还包括从培养细胞的培养基中获得 hmGCB。

[0033] 另一方面，本发明表征了一种生产 hmGCB 制剂的方法。该方法包括：

[0034] 提供一种能表达 GCB 的细胞；和

[0035] 在抑制 I 类加工甘露糖苷酶活性和 2 类加工甘露糖苷酶活性以防止去除远离 GCB 前体寡糖五糖核心的至少一个甘露糖残基的条件下生产含有前体寡糖的 GCB，从而生产 hmGCB 制剂。

[0036] 在一个优选实施方案中，GCB 是人 GCB。在一个优选实施方案中，细胞是人细胞。

[0037] 在一个优选实施方案中，防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基；防止去除远离五糖核心的 α 1,3 甘露糖残基；和 / 或防止去除远离五糖核心的 α 1,6 甘露糖残基。优选地，防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基。

[0038] 在一个优选实施方案中，该方法可包括：使细胞接触一种抑制 1 类加工甘露糖苷酶活性的物质和一种抑制 2 类加工甘露糖苷酶活性的物质，从而防止去除远离 GCB 前体寡

糖五糖核心的至少一个甘露糖残基。在一个优选实施方案中，这些物质防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基。

[0039] 在一个优选实施方案中，该方法包括使细胞接触一种抑制 1 类加工甘露糖苷酶活性的物质和一种抑制 2 类加工甘露糖苷酶活性的物质，其中这些物质是 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂和 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶抑制剂可以是 kifunensine、deoxymannojirimycin 或类似抑制剂中的一种或多种。优选地，1 类加工甘露糖苷酶抑制剂是 kifunensine。在一个优选实施方案中，2 类加工甘露糖苷酶抑制剂可以是苦马豆素、mannostatin、6- 脱氧 -DIM 和 6- 脱氧 -6- 氟 -DIM 中的一种或多种。优选地，2 类加工甘露糖苷酶抑制剂是苦马豆素。

[0040] 在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶抑制剂以约 0.025-20.0μg/ml、0.05-10μg/ml、0.05-5μg/ml、优选地约 0.1-2.0μg/ml 的浓度存在；2 类加工甘露糖苷酶抑制剂以约 0.025-20.0μg/ml、0.05-10μg/ml、0.05-5μg/ml、优选地约 0.1-2.0μg/ml 的浓度存在；1 类加工和 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂的每一种以约 0.025-20.0μg/ml、0.05-10μg/ml、0.05-5μg/ml、优选地约 0.1-2.0μg/ml 的浓度存在；1 类加工和 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂的总浓度约为 0.025-40.0μg/ml、0.05-20μg/ml、0.05-10μg/ml、优选地约 0.1-4.0μg/ml。

[0041] 在一个优选实施方案中，细胞具有 1 类甘露糖苷酶和 2 类甘露糖苷酶的突变，如敲除。该突变可以是降低基因表达、降低蛋白质或活性水平或改变甘露糖苷酶分布或甘露糖苷酶的其它翻译后修饰如糖链加工的突变。该突变可以降低 1 类加工甘露糖苷酶和 / 或 2 类加工甘露糖苷酶活性水平，例如降低基因表达，如无效突变，如缺失、移码或插入。在一个优选实施方案中，该突变是甘露糖苷酶基因中的敲除。该突变能影响结构（和蛋白质活性），例如可以是一种温度敏感突变体。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶是：高尔基体甘露糖苷酶 IA；高尔基体甘露糖苷酶 IB；高尔基体甘露糖苷酶 IC；或其组合。在一个优选实施方案中，2 类加工甘露糖苷酶是：高尔基体甘露糖苷酶 II。

[0042] 在一个优选实施方案中，细胞包含 1 类加工甘露糖苷酶反义分子和 2 类加工甘露糖苷酶反义分子。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶是：高尔基体甘露糖苷酶 IA；高尔基体甘露糖苷酶 IB；高尔基体甘露糖苷酶 IC；其组合。在一个优选实施方案中，2 类加工甘露糖苷酶是高尔基体甘露糖苷酶 II。

[0043] 在一个优选实施方案中，该细胞包含一种可结合并抑制甘露糖苷酶的分子，如一种外源分子。该分子可以是，例如一种单链抗体、胞内蛋白或竞争性或非竞争性抑制剂。

[0044] 在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶活性和 2 类加工甘露糖苷酶活性能被不同机制抑制。例如，细胞接触抑制 1 类加工甘露糖苷酶的物质（如 I 类甘露糖苷酶抑制剂）能抑制 1 类加工甘露糖苷酶的活性，使用一种 2 类甘露糖苷酶敲除和 / 或包含 2 类甘露糖苷酶反义分子的细胞能抑制 2 类加工甘露糖苷酶。在另一个优选实施方案中，细胞接触抑制 2 类甘露糖苷酶的物质（如 2 类甘露糖苷酶抑制剂）能抑制 2 类加工甘露糖苷酶的活性，使用一种 1 类甘露糖苷酶敲除和 / 或包含 1 类甘露糖苷酶反义分子的细胞能抑制 1 类加工甘露糖苷酶。

[0045] 在一个优选实施方案中，hmGCB 分子包含一条至少含 4 个甘露糖残基的糖链。例如，hmGCB 分子具有至少一条含 5 个甘露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 6 个甘

露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 7 个甘露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 8 个甘露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 9 个甘露糖残基的糖链。优选地，hmGCB 分子具有至少一条含 5 个、8 个或 9 个甘露糖残基的糖链。

[0046] 在一个优选实施方案中，产生的 hmGCB（一种或多种 hmGCB 分子或整个制剂）中甘露糖残基与 GlcNAc 残基之比大于 3 个甘露糖残基比 2 个 GlcNAc 残基，优选地，甘露糖与 GlcNAc 之比为 4 ： 2、5 ： 2、6 ： 2、7 ： 2、8 ： 2、9 ： 2，更优选地，甘露糖与 GlcNAc 之比为 8 ： 2 或 9 ： 2。

[0047] 在一个优选实施方案中，在 hmGCB 分子的 1、2、3 或 4 条糖链上防止去除远离五糖核心的一个或多个甘露糖残基。

[0048] 在一个优选实施方案中，制剂中至少 30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或全部的 hmGCB 分子含有至少 1 条、优选地 2 条、3 条或 4 条糖链，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个甘露糖残基。

[0049] 在一个优选实施方案中，hmGCB 制剂是一种相对异源的制剂。优选地，除了五糖核心外，hmGCB 制剂中不到 80％、70％、60％、50％、45％、40％、35％、30％、25％、20％、15％、10％、5％或 1％的糖链含有相同数量的甘露糖残基。例如，除五糖核心之外含有相同数量甘露糖残基的糖链与含有不同数量甘露糖残基的糖链之比约为 :60％ ： 40％ ;50％ ： 50％ ;40％ ： 60％ ;30％ ： 70％ ;25％ ： 75％ ;20％ ： 80％ ;15％ ： 85％ ;10％ ： 90％ ;5％或更低 ： 95％或更高。

[0050] 在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶如高尔基体甘露糖苷酶 IA 和 / 或高尔基体甘露糖苷酶 IB 和 / 或高尔基体甘露糖苷酶 IC 的活性，2 类加工甘露糖苷酶如高尔基体甘露糖苷酶 II 的活性被抑制，hmGCB 制剂中至少约 60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或 100％的糖链含有 5 个或 5 个以上的甘露糖残基，例如 5、6、7、8 和 / 或 9 个甘露糖残基。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶如高尔基体甘露糖苷酶 IA 和 / 或高尔基体甘露糖苷酶 IB 和 / 或高尔基体甘露糖苷酶 IC 的活性，2 类加工甘露糖苷酶如高尔基体甘露糖苷酶 II 的活性被抑制，含有 5 个或更多甘露糖残基的糖链与含有 4 个或更少甘露糖残基的糖链之比分别约为 :60％ ： 40％ ;70％ ： 30％ ;75％ ： 25％ ;80％ ： 20％ ;85％ ： 15％ ;90％ ： 10％ ;95％ ： 5％ ;99％ ： 1％ ;或 100％ ： 0％。

[0051] 在一个优选实施方案中，细胞包含一种含有 GCB 编码区的外源核酸序列。在一个优选实施方案中，细胞还包含一种调节序列，一种内源或外源调节序列，其作用是调节外源 GCB 编码区的表达。

[0052] 在一个优选实施方案中，细胞包含一种外源调节序列，其作用是调节内源 GCB 编码序列的表达，例如，调节序列整合到细胞基因组中，使其调节内源 GCB 编码序列的表达。

[0053] 在一个优选实施方案中，调节序列包括下列之一种或多种 :启动子、增强子、上游激活序列 (UAS)、支架结构附着区或转录因子结合位点。在一个优选实施方案中，调节序列包括 :来自金属硫蛋白 -I 基因（例如小鼠金属硫蛋白 -I 基因）的调节序列、来自 SV-40 基因的调节序列、来自巨细胞病毒基因的调节序列、来自胶原蛋白基因的调节序列、来自肌动蛋白基因的调节序列、来自免疫球蛋白基因的调节序列、来自 HMG-CoA 还原酶基因的调节序列，或来自 EF-1α 基因的调节序列。

[0054] 在一个优选实施方案中，细胞是一种真核细胞。在一个优选实施方案中，细胞是

真菌、植物或动物来源的，例如脊椎动物来源的。在一个优选实施方案中，细胞是一种哺乳动物细胞，例如初级或次级哺乳动物细胞，例如成纤维细胞、造血干细胞、成肌细胞、角化细胞、上皮细胞、内皮细胞、神经胶质细胞、神经细胞、含有血液有形成分的细胞、肌细胞和这些体细胞的前体；转化的或无限增殖化细胞系。优选地，该细胞是人细胞。在本方法中有用的无限增殖化人细胞系的例子包括但不限于：Bowes 黑素瘤细胞 (ATCC 保藏号 CRL 9607)、Daudi 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 213)、HeLa 细胞和 HeLa 细胞衍生物 (ATCC 保藏号 CCL2、CCL2.1 和 CCL 2.2)、HL-60 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 240)、HT-1080 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 121)、Jurkat 细胞 (ATCC 保藏号 TIB 152)、KB 癌细胞 (ATCC 保藏号 CCL 17)、K-562 白血病细胞 (ATCC 保藏号 CCL 243)、MCF-7 乳腺癌细胞 (ATCC 保藏号 BTH 22)、MOLT-4 细胞 (ATCC 保藏号 1582)、Namalwa 细胞 (ATCC 保藏号 CRL 1432)、Raji 细胞 (ATCC 保藏号 CCL86)、RPMI 8226 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 155)、U-937 细胞 (ATCC 保藏号 1593)、WI-28VA13 亚系 2R4 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 155)、CCRF-CEM 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 119) 和 2780AD 卵巢癌细胞 (Van Der Blick 等人，Cancer Res. 48：5927-5932，1988)，以及人细胞与其它种的细胞融合产生的杂交瘤细胞。在另一个实施方案中，无限增殖化细胞系可以是人细胞系之外的细胞系，如 CHO 细胞系、COS 细胞系。在另一个实施方案中，细胞可以来自克隆细胞株或克隆细胞系。

[0055] 在一个优选实施方案中，提供能表达 hmGCB 的细胞群体，至少 30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或全部细胞产生含有至少一条糖链、优选地 2、3 或 4 条糖链的 hmGCB 分子，它们含有特定数量的甘露糖残基。

[0056] 在一个优选实施方案中，细胞在含有至少一种 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂和至少一种 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂的培养基中培养。在一个优选实施方案中，该方法还包括从培养细胞的培养基中获得 hmGCB。

[0057] 另一方面，本发明表征了一种生产 hmGCB 制剂的方法。该方法包括：

[0058] 提供一种细胞，该细胞中导入了一种含有外源调节序列的核酸序列，使得该调节序列可调节内源 GCB 编码区的表达；和

[0059] 在防止去除远离 GCB 前体寡糖五糖核心的至少一个甘露糖残基的条件下生产含有前体寡糖的 GCB，从而生产 hmGCB 制剂。

[0060] 在一个优选实施方案中，GCB 是人 GCB。

[0061] 在一个优选实施方案中，防止去除远离五糖核心的一个或多个 α1,2 甘露糖残基；防止去除远离五糖核心的 α1,3 甘露糖残基；和 / 或防止去除远离五糖核心的 α1,6 甘露糖残基。优选地，防止去除远离五糖核心的一个或多个 α1,2 甘露糖残基。

[0062] 在一个优选实施方案中，该方法包括使细胞接触一种物质，该物质可防止去除远离 GCB 前体寡糖五糖核心的至少一个甘露糖残基，例如防止去除远离五糖核心的一个或多个 α1,2 甘露糖残基，远离五糖核心的 α1,3 甘露糖残基和 / 或远离五糖核心的 α1,6 甘露糖残基。优选地，防止去除远离五糖核心的一个或多个 α1,2 甘露糖残基。

[0063] 在一个优选实施方案中，该方法包括使细胞接触一种物质，该物质可防止去除远离 GCB 前体寡糖五糖核心的至少一个甘露糖残基，而且该物质是一种甘露糖苷酶抑制剂。该甘露糖苷酶抑制剂可以是 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂、2 类加工甘露糖苷酶抑制剂或此两者。1 类加工甘露糖苷酶抑制剂可以是 kifunensine、deoxymannojirimycin 或类似抑制

剂中的一种或多种。优选地，1 类加工甘露糖苷酶抑制剂是 kifunensine。有用的 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂可包括苦马豆素、mannostatin、6- 脱氧 -DIM、6- 脱氧 -6- 氟 -DIM 中的一种或多种。优选地，2 类加工甘露糖苷酶抑制剂是苦马豆素。

[0064] 在一个优选实施方案中，甘露糖苷酶抑制剂以约 0.025-20.0μg/ml、0.05-10μg/ml、0.05-5μg/ml、优选地约 0.1-2.0μg/ml 的浓度存在。

[0065] 在一个优选实施方案中，该方法还包括使细胞接触一种 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂和一种 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶抑制剂以约 0.025-20.0μg/ml、0.05-10μg/ml、0.05-5μg/ml、优选地约 0.1-2.0μg/ml 的浓度存在；2 类加工甘露糖苷酶抑制剂以约 0.025-20.0μg/ml、0.05-10μg/ml、0.05-5μg/ml、优选地约 0.1-2.0μg/ml 的浓度存在；1 类加工和 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂的每一种以约 0.025-20.0μg/ml、0.05-10μg/ml、0.05-5μg/ml、优选地约 0.1-2.0μg/ml 的浓度存在；1 类加工和 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂的总浓度约为 0.025-40.0μg/ml、0.05-20μg/ml、0.05-10μg/ml、优选地约 0.1-4.0μg/ml。

[0066] 在一个优选实施方案中，细胞具有至少一种甘露糖苷酶的突变，如敲除。该突变可以是降低基因表达、降低蛋白质或活性水平或改变甘露糖苷酶分布或其它翻译后修饰如糖链加工的突变。该突变可以降低高尔基加工甘露糖苷酶活性水平，例如降低基因表达，如无效突变，如缺失、移码或插入。在一个优选实施方案中，该突变是敲除，例如甘露糖苷酶基因中的敲除。该突变能影响结构（和蛋白质活性），例如可以是一种温度敏感突变或截短。在一个优选实施方案中，该细胞具有 1 类加工甘露糖苷酶、2 类加工甘露糖苷酶的突变，例如敲除，1 类加工甘露糖苷酶和 2 类加工甘露糖苷酶的突变，例如敲除。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶是高尔基体甘露糖苷酶 IA；高尔基体甘露糖苷酶 IB；高尔基体甘露糖苷酶 IC；或其组合。在一个优选实施方案中，2 类加工甘露糖苷酶是高尔基体甘露糖苷酶 II。

[0067] 在一个优选实施方案中，该细胞包含一种核酸序列，如反义分子或核酶，它们能结合或灭活一种细胞甘露糖苷酶核酸序列，如 mRNA，并抑制该蛋白质的表达。在一个优选实施方案中，该核酸序列是：1 类加工甘露糖苷酶反义分子；2 类加工甘露糖苷酶反义分子；1 类加工甘露糖苷酶反义分子和 2 类加工甘露糖苷酶反义分子两者。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶是：高尔基体甘露糖苷酶 IA；高尔基体甘露糖苷酶 IB；高尔基体甘露糖苷酶 IC；其组合。在一个优选实施方案中，2 类加工甘露糖苷酶是高尔基体甘露糖苷酶 II。

[0068] 在一个优选实施方案中，该细胞包含一种可结合并抑制甘露糖苷酶的分子，如一种外源分子。该分子可以是，例如一种单链抗体、胞内蛋白或竞争性或非竞争性抑制剂。

[0069] 在一个优选实施方案中，hmGCB 分子包含一条至少含 4 个甘露糖残基的糖链。例如，hmGCB 分子具有至少一条含 5 个甘露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 6 个甘露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 7 个甘露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 8 个甘露糖残基的糖链，hmGCB 分子具有至少一条含 9 个甘露糖残基的糖链。优选地，hmGCB 分子具有至少一条含 5 个、8 个或 9 个甘露糖残基的糖链。

[0070] 在一个优选实施方案中，产生的 hmGCB（一种或多种 hmGCB 分子或整个制剂）中甘露糖残基与 GlcNAc 残基之比大于 3 个甘露糖残基比 2 个 GlcNAc 残基，优选地，甘露糖与 GlcNAc 之比为 4 ： 2、5 ： 2、6 ： 2、7 ： 2、8 ： 2、9 ： 2，更优选地，甘露糖与 GlcNAc 之比

为 5 ： 2、8 ： 2 或 9 ： 2。

[0071] 在一个优选实施方案中，在 hmGCB 分子的 1、2、3 或 4 条糖链上防止去除远离五糖核心的一个或多个甘露糖残基。

[0072] 在一个优选实施方案中，制剂中至少 30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或全部的 hmGCB 分子含有至少 1 条、优选地 2 条、3 条或 4 条糖链，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个甘露糖残基。

[0073] 在一个优选实施方案中，hmGCB 制剂是一种相对异源的制剂。优选地，除了五糖核心外，hmGCB 中不到 80％、70％、60％、50％、45％、40％、35％、30％、25％、20％、15％、10％、5％或 1％的糖链含有相同数量的甘露糖残基。例如，除五糖核心之外含有相同数量甘露糖残基的糖链与含有不同数量甘露糖残基的糖链之比约为 :60％ ： 40％ ;50％ ： 50％ ; 40％ ： 60％ ;30％ ： 70％ ;25％ ： 75％ ;20％ ： 80％ ;15％ ： 85％ ;10％ ： 90％ ;5％或更低 ： 95％或更高。

[0074] 在一个优选实施方案中，高尔基体甘露糖苷酶 IA 和 / 或 IB 和 / 或 IC 的活性被抑制，hmGCB 制剂中至少约 60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或 100％的糖链含有 5 个或 5 个以上甘露糖残基，例如 5、6、7、8 和 / 或 9 个甘露糖残基。在一个优选实施方案中，高尔基体甘露糖苷酶 I 的活性被抑制，含有 5 个或更多甘露糖残基的糖链与含有 4 个或更少甘露糖残基的糖链之比约为 :60％ ： 40％;70％ ： 30％;75％ ： 25％;80％ ： 20％; 85％ ： 15％ ;90％ ： 10％ ;95％ ： 5％ ;99％ ： 1％ ;或 100％ ： 0％。

[0075] 在一个优选实施方案中，高尔基体甘露糖苷酶 II 的活性被抑制，hmGCB 制剂中至少约 60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或 100％的糖链含有 5 个或 5 个以上甘露糖残基。在一个优选实施方案中，高尔基体甘露糖苷酶 II 的活性被抑制，含有 5 个或更多甘露糖残基的糖链与含有 4 个或更少甘露糖残基的糖链之比约为 :60％ ： 40％ ; 70％ ： 30％;75％ ： 25％;80％ ： 20％;85％ ： 15％;90％ ： 10％;95％ ： 5％;99％ ： 1％; 或 100％ ： 0％。

[0076] 在一个优选实施方案中，该调节序列包括下列之一种或多种 :启动子、增强子、上游激活序列 (UAS)、支架结构附着区或转录因子结合位点。在一个优选实施方案中，该调节序列包括 :来自金属硫蛋白 -I 基因 (例如小鼠金属硫蛋白 -I 基因) 的调节序列、来自 SV-40 基因的调节序列、来自巨细胞病毒基因的调节序列、来自胶原蛋白基因的调节序列、来自肌动蛋白基因的调节序列、来自免疫球蛋白基因的调节序列、来自 HMG-CoA 还原酶基因的调节序列，或来自 EF-1α 基因的调节序列。

[0077] 在一个优选实施方案中，该细胞是一种真核细胞。在一个优选实施方案中，该细胞是真菌、植物或动物来源的，例如脊椎动物来源的。在一个优选实施方案中，该细胞是一种哺乳动物细胞，例如初级或次级哺乳动物细胞，例如成纤维细胞、造血干细胞、成肌细胞、角化细胞、上皮细胞、内皮细胞、神经胶质细胞、神经细胞、含有血液有形成分的细胞、肌细胞和这些体细胞的前体 ;转化的或无限增殖化细胞系。优选地，该细胞是人细胞。在本方法中有用的无限增殖化人细胞系的例子包括但不限于 :Bowes 黑素瘤细胞 (ATCC 保藏号 CRL 9607)、Daudi 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 213)、HeLa 细胞和 HeLa 细胞衍生物 (ATCC 保藏号 CCL2 CCL2.1 和 CCL 2.2)、HL-60 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 240)、HT-1080 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 121)、Jurkat 细胞 (ATCC 保藏号 TIB 152)、KB 癌细胞 (ATCC 保藏号 CCL 17)、K-562 白血病

细胞 (ATCC 保藏号 CCL 243)、MCF-7 乳腺癌细胞 (ATCC 保藏号 BTH 22)、MOLT-4 细胞 (ATCC 保藏号 1582)、Namalwa 细胞 (ATCC 保藏号 CRL 1432)、Raji 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 86)、RPMI 8226 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 155)、U-937 细胞 (ATCC 保藏号 1593)、WI-28VA13 亚系 2R4 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 155)、CCRF-CEM 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 119) 和 2780AD 卵巢癌细胞 (Van Der Blick 等人，Cancer Res. 48 :5927-5932，1988)，以及人细胞与其它种的细胞融合产生的杂交瘤细胞。在另一个实施方案中，无限增殖化细胞系可以是人细胞系之外的细胞系，如 CHO 细胞系、COS 细胞系。在另一个实施方案中，细胞可以来自克隆细胞株或克隆细胞系。

[0078] 在一个优选实施方案中，提供能表达 hmGCB 的细胞群体，至少 30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或全部细胞产生含有至少 1 条糖链、优选地 2、3 或 4 条糖链的 hmGCB 分子，它们含有特定数量的甘露糖残基。

[0079] 在一个优选实施方案中，细胞在含有至少一种甘露糖苷酶抑制剂的培养基中培养。在一个优选实施方案中，该方法还包括从培养细胞的培养基中获得 hmGCB。

[0080] 另一方面，本发明表征了通过此处所述任一种方法生产的一种 hmGCB 分子，例如此处所述的 hmGCB 分子，如人 hmGCB。优选地，hmGCB 分子包含至少 1 条糖链，优选地 2、3 或 4 条糖链，它们含有前体寡糖链的至少 4 个甘露糖残基。

[0081] 另一方面，本发明表征了一种包含 hmGCB 分子的一部分的 hmGCB 制剂，该分子包含至少 1 条糖链，优选地 2、3 或 4 条糖链，它们含有前体寡糖链的至少 4 个甘露糖残基。优选地，hmGCB 制剂通过此处所述的任一种方法生产。

[0082] 在一个优选实施方案中，hmGCB 是人 hmGCB。

[0083] 在一个优选实施方案中，hmGCB 分子可含有 :至少一条含 5 个甘露糖残基的糖链 ;至少一条含 6 个甘露糖残基的糖链 ;至少一条含 7 个甘露糖残基的糖链 ;至少一条含 8 个甘露糖残基的糖链 ;至少一条含 9 个甘露糖残基的糖链。

[0084] 在一个优选实施方案中，产生的 hmGCB（一种或多种 hmGCB 分子或整个制剂）含有至少一种糖链，其中甘露糖残基与 GlcNAc 残基之比大于 3 个甘露糖残基比 2 个 GlcNAc 残基，优选地，甘露糖与 GlcNAc 之比为 4 ： 2、5 ： 2、6 ： 2、7 ： 2、8 ： 2、9 ： 2，更优选地，甘露糖与 GlcNAc 之比为 5 ： 2、8 ： 2 或 9 ： 2。

[0085] 在一个优选实施方案中，制剂中至少 30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或全部的 hmGCB 分子含有至少 1 条、优选地 2 条、3 条或 4 条糖链，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个甘露糖残基。

[0086] 另一方面，本发明表征了一种细胞，其至少一种甘露糖苷酶活性被抑制，并且包含一种含外源调节序列的核酸序列，该调节序列调节被导入后使得能调节内源 GCB 编码区的表达，其中该细胞产生防止去除远离 GCB 前体寡糖五糖核心的至少一个甘露糖残基的 GCB。

[0087] 在一个优选实施方案中，该细胞产生一种 hmGCB 制剂，例如，人 hmGCB 制剂，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基 ;防止去除远离五糖核心的 α 1,3 甘露糖残基 ;和 / 或防止去除远离五糖核心的 α 1,6 甘露糖残基。优选地，防止去除远离五糖核心的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基。

[0088] 在一个优选实施方案中，细胞接触一种抑制甘露糖苷酶的物质可抑制细胞中至少一种甘露糖苷酶活性。在一个优选实施方案中，该物质是一种甘露糖苷酶抑制剂。该

甘露糖苷酶抑制剂可以是 1 类加工甘露糖苷酶抑制剂、2 类加工甘露糖苷酶抑制剂或此两者。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶抑制剂可以是 kifunensine 和 deoxymannojirimycin 之一或两者。优选地，1 类加工甘露糖苷酶抑制剂是 kifunensine。在一个优选实施方案中，2 类加工甘露糖苷酶抑制剂可以是苦马豆素、mannostatin、6- 脱氧 -DIM 和 6- 脱氧 -6- 氟 -DIM 中的一种或多种。优选地，2 类加工甘露糖苷酶抑制剂是苦马豆素。

[0089] 在一个优选实施方案中，细胞具有至少一种高尔基加工甘露糖苷酶的突变，如敲除。该突变可以是降低基因表达、降低蛋白质或活性水平或改变甘露糖苷酶分布或其它翻译后修饰如糖链加工的突变。该突变可以降低高尔基加工甘露糖苷酶活性水平，例如降低基因表达，如无效突变，如缺失、移码或插入。在一个优选实施方案中，该突变是甘露糖苷酶基因中的敲除。该突变能影响结构（和蛋白质活性），例如可以是一种温度敏感突变。在一个优选实施方案中，该细胞是 1 类加工甘露糖苷酶、2 类加工甘露糖苷酶、1 类加工甘露糖苷酶和 2 类加工甘露糖苷酶的突变体，例如敲除突变体。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶是高尔基体甘露糖苷酶 IA ；高尔基体甘露糖苷酶 IB ；高尔基体甘露糖苷酶 IC ；其组合。在一个优选实施方案中，2 类加工甘露糖苷酶是高尔基体甘露糖苷酶 II。

[0090] 在一个优选实施方案中，细胞还包含一种核酸序列，如反义分子或核酶，它们能结合或灭活一种细胞甘露糖苷酶核酸序列，如 mRNA，并抑制该蛋白质的表达。在一个优选实施方案中，该核酸序列是 ：1 类加工甘露糖苷酶反义分子 ；2 类加工甘露糖苷酶反义分子 ；1 类加工甘露糖苷酶反义分子和 2 类加工甘露糖苷酶反义分子两者。在一个优选实施方案中，1 类加工甘露糖苷酶是 ：高尔基体甘露糖苷酶 IA ；高尔基体甘露糖苷酶 IB ；高尔基体甘露糖苷酶 IC ；其组合。在一个优选实施方案中，2 类加工甘露糖苷酶是高尔基体甘露糖苷酶 II。

[0091] 在一个优选实施方案中，该细胞包含一种可结合并抑制甘露糖苷酶的分子，如一种外源分子。该分子可以是，例如一种单链抗体、胞内蛋白或竞争性或非竞争性抑制剂。

[0092] 在一个优选实施方案中，该细胞产生的 hmGCB 分子中甘露糖残基与 GlcNAc 残基之比大于 3 个甘露糖残基比 2 个 GlcNAc 残基，优选地，甘露糖与 GlcNAc 之比为 4 ： 2、5 ： 2、6 ： 2、7 ： 2、8 ： 2、9 ： 2，更优选地，甘露糖与 GlcNAc 之比为 5 ： 2、8 ： 2 或 9 ： 2。

[0093] 在一个优选实施方案中，该细胞不能在 hmGCB 的 1、2、3 或 4 条糖链上去除远离五糖核心的一个或多个甘露糖残基。

[0094] 在一个优选实施方案中，细胞产生的至少 30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％、99％或全部的 hmGCB 分子含有至少 1 条、优选地 2 条、3 条或 4 条糖链，其中防止去除远离五糖核心的一个或多个甘露糖残基。

[0095] 在一个优选实施方案中，调节序列包括下列之一种或多种 ：启动子、增强子、上游激活序列 (UAS)、支架结构附着区或转录因子结合位点。在一个优选实施方案中，调节序列包括 ：来自金属硫蛋白 -I 基因（例如小鼠金属硫蛋白 -I 基因）的调节序列、来自 SV-40 基因的调节序列、来自巨细胞病毒基因的调节序列、来自胶原蛋白基因的调节序列、来自肌动蛋白基因的调节序列、来自免疫球蛋白基因的调节序列、来自 HMG-CoA 还原酶基因的调节序列，或来自 EF-1α 基因的调节序列。

[0096] 在一个优选实施方案中，细胞是一种真核细胞。在一个优选实施方案中，细胞是真菌、植物或动物来源的，例如脊椎动物来源的。在一个优选实施方案中，细胞是一种哺乳

动物细胞，例如初级或次级哺乳动物细胞，例如成纤维细胞、造血干细胞、成肌细胞、角化细胞、上皮细胞、内皮细胞、神经胶质细胞、神经细胞、含有血液有形成分的细胞、肌细胞和这些体细胞的前体；转化的或无限增殖化细胞系。优选地，该细胞是人细胞。在本方法中有用的无限增殖化人细胞系的例子包括但不限于：Bowes 黑素瘤细胞 (ATCC 保藏号 CRL 9607)、Daudi 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 213)、HeLa 细胞和 HeLa 细胞衍生物 (ATCC 保藏号 CCL2 CCL2.1 和 CCL 2.2)、HL-60 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 240)、HT-1080 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 121)、Jurkat 细胞 (ATCC 保藏号 TIB 152)、KB 癌细胞 (ATCC 保藏号 CCL 17)、K-562 白血病细胞 (ATCC 保藏号 CCL 243)、MCF-7 乳腺癌细胞 (ATCC 保藏号 BTH 22)、MOLT-4 细胞 (ATCC 保藏号 1582)、Namalwa 细胞 (ATCC 保藏号 CRL 1432)、Raji 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 86)、RPMI 8226 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 155)、U-937 细胞 (ATCC 保藏号 1593)、WI-28VA13 亚系 2R4 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 155)、CCRF-CEM 细胞 (ATCC 保藏号 CCL 119) 和 2780AD 卵巢癌细胞 (Van Der Blick 等人，Cancer Res. 48：5927-5932，1988)，以及人细胞与其它种的细胞融合产生的杂交瘤细胞。在另一个实施方案中，无限增殖化细胞系可以是人细胞系之外的细胞系，如 CHO 细胞系、COS 细胞系。在另一个实施方案中，细胞可以来自克隆细胞株或克隆细胞系。

[0097] 另一方面，本发明表征了一种包含 hmGCB 分子 (如人 hmGCB) 的药用组合物，它包含至少一条糖链，优选地 2、3 或 4 条糖链，这些糖链含有前体寡糖链的至少 4 个甘露糖残基，其量适于治疗戈谢病。

[0098] 在一个优选实施方案中，该药用组合物还包含一种药学可接受的载体或稀释剂。

[0099] 本发明的另一方面表征了一种治疗戈谢病患者的方法。该方法包括对戈谢病患者施用一种 hmGCB 制剂，如人 hmGCB 制剂，它包含至少一条糖链，优选地 2、3 或 4 条糖链，这些糖链含有前体寡糖链的至少 4 个甘露糖残基，其量适于治疗戈谢病。

[0100] 另一方面，本发明表征了一种从样品中纯化 hmGCB 的方法。该方法包括：提供一种收获的 hmGCB 产物；对该 hmGCB 产物进行疏水电荷诱导层析 (HCIC) 和 / 或疏水作用层析 (HIC)，从而获得纯化的 hmGCB。

[0101] 在一个优选实施方案中，用 MEP Hypercel ®进行 HCIC。在另一个优选实施方案中，用 MacroPrep Methyl ®进行 HIC。

[0102] 在另一个优选实施方案中，该方法还包括对 hmGCB 产物进行离子交换层析。可在离子交换层析之前对 hmGCB 产物进行 HCIC 和 / 或 HIC，或者在 HCIC 和 / 或 HIC 之前对 hmGCB 产物进行离子交换层析。优选地，对 hmGCB 产物进行一次以上的离子交换层析步骤。离子交换层析可以是阴离子交换层析、阳离子交换层析或此两者。

[0103] 在一个优选实施方案中，使用下列之一种或多种进行阴离子交换层析：Q Sepharose Fast Flow ®、MacroPrep High Q Support ®、DEAESepharose Fast Flow ® 和 Macro-Prep DEAE ®。在一个优选实施方案中，用下列之一或多种进行阳离子交换层析：SP Sepharose Fast Flow ®、Source 30S ®、CM Sepharose Fast Flow ®、Macro-Prep CM Support ® 和 Macro-Prep High S Support ®。

[0104] 在一个优选实施方案中，该方法还包括对 hmGCB 产物进行大小排阻层析。优选地，用下列之一或多种进行大小排阻层析：Superdex200 ®、Sephacryl S-200HR ® 和 Bio-Gel A 1.5m ®。

[0105] 另一方面，本发明表征了一种纯化 hmGCB 的方法。该方法包括：提供收获的 hmGCB 产物；对 hmGCB 产物进行疏水电荷诱导层析 (HCIC) 和 / 或疏水作用层析 (HIC)；对 hmGCB 产物进行阴离子交换层析、阳离子交换层析和大小排阻层析中的一种或多种，从而获得纯化的 hmGCB。

[0106] 在一个优选实施方案中，用 MEP Hypercel ®进行 HCIC。在另一个优选实施方案中，用 MacroPrep Methyl ®进行 HIC。

[0107] 在一个优选实施方案中，该方法包括使用阴离子交换层析。优选地，用下列之一种或多种进行阴离子交换层析：Q Sepharose Fast Flow ®、MacroPrep High Q Support ®、DEAE Sepharose Fast Flow ®和 Macro-Prep DEAE ®。

[0108] 在一个优选实施方案中，该方法包括使用阳离子交换层析。优选地，用下列之一种或多种进行阳离子交换层析：SP Sepharose Fast Flow ®、Source 30S ®、CM Sepharose Fast Flow ®、Macro-Prep CM Support ®和 Macro-Prep High S Support ®。

[0109] 在一个优选实施方案中，该方法包括使用大小排阻层析。优选地，用下列之一种或多种进行大小排阻层析：Superdex 200 ®、SephacrylS-200HR ®和 Bio-Gel A 1.5m ®。

[0110] 在一个优选实施方案中，对 hmGCB 进行（以任何顺序）：阴离子交换层析和阳离子交换层析；阴离子交换层析和大小排阻层析；阳离子交换层析和大小排阻层析；阴离子交换层析、阳离子交换层析和大小排阻层析。优选地，以下列顺序对 hmGCB 进行所有这三种层析步骤：阴离子交换层析、阳离子交换层析和大小排阻层析。

[0111] 另一方面，本发明表征了一种纯化 hmGCB 的方法。该方法包括：提供收获的 hmGCB 产物；对 hmGCB 产物进行疏水电荷诱导层析 (HCIC) 和 / 或疏水作用层析 (HIC)；对 HCIC 和 / 或 HIC 纯化的 hmGCB 产物进行阴离子交换层析；对阴离子交换纯化的 hmGCB 进行阳离子交换层析；以及，对阳离子交换纯化的 hmGCB 进行大小排阻层析，从而获得纯化的 hmGCB。

[0112] 在一个优选实施方案中，用 MEP Hypercel ®进行 HCIC。在另一个优选实施方案中，用 MacroPrep Methyl ®进行 HIC。

[0113] 在一个优选实施方案中，用下列之一种或多种进行阴离子交换层析：Q Sepharose Fast Flow ®、MacroPrep High Q Support ®、DEAESepharose Fast Flow ®和 Macro-Prep DEAE ®。

[0114] 在一个优选实施方案中，用下列之一种或多种进行阳离子交换层析：SP Sepharose Fast Flow ®、Source 30S ®、CM Sepharose Fast Flow ®、Macro-Prep CM Support ®和 Macro-Prep High S Support ®。

[0115] 在一个优选实施方案中，用下列之一种或多种进行大小排阻层析：Superdex 200 ®、Sephacryl S-200HR ®和 Bio-Gel A 1.5m ®。

[0116] 术语“高甘露糖葡糖脑苷脂酶 (hmGCB)”在此使用时是指含有至少一条糖链的葡糖脑苷脂酶，该糖链含有 4 个或 4 个以上的来自前体寡糖的甘露糖残基。优选地，hmGCB 含有 5、6、7、8 或 9 个来自前体寡糖链的甘露糖残基。最优选地，hmGCB 含有 5、8 或 9 个来自前体寡糖链的甘露糖残基。

[0117] 术语“hmGCB 制剂”是指两种或多种 hmGCB 分子。

[0118] 术语“初级细胞”包括存在于自脊椎动物组织来源分离的细胞悬液中的细胞（在平板接种之前，即附着于组织培养底物如平皿或瓶上的）、在来自组织的外植体中存在的细

胞、第一次平板接种的前述两种细胞型、由这些平板接种的细胞衍生的细胞悬液。术语次级细胞或细胞株是指培养中所有后来步骤的细胞。即，首先从培养底物中取出平板接种的初级细胞，再次平板接种（传代），在此称为次级细胞，如随后传代的所有细胞。次级细胞是由传代一次或多次的次级细胞组成的细胞株。细胞株由下列次级细胞组成，它们：1）被传代一次或多次；2）在培养中显示有限数量的平均群体倍增；3）显示接触抑制、锚定依赖生长的特性（锚定依赖性不适用于悬浮培养繁殖的细胞）；4）不是无限增殖的。“克隆细胞株”被定义为由单个创始细胞（founder cell）衍生的细胞株。“异源细胞株”被定义为由两种或多种生成细胞衍生的细胞株。

[0119] 在此使用时，“无限增殖化细胞”是主要特征在于在培养中显示明显不受限制的寿命的细胞系（不同于命名为初级和次级细胞具有的“株”的细胞株）。

[0120] 术语“转染的细胞”是指导入外源合成核酸序列（如编码一种蛋白质的序列）的细胞。一旦进入细胞，合成核酸序列即能整合到受体细胞染色体 DNA 中或能以附加型存在。能用标准转染方法向细胞中导入合成核酸序列，例如脂质体、聚凝胺（polybrene）、DEAE 介导的转染、葡聚糖介导的转染、电穿孔、磷酸钙沉淀或显微注射。术语“转染”不包括通过病毒向细胞中运送 DNA 或 RNA。

[0121] 术语“感染的细胞”或“转导的细胞”是指通过病毒导入外源合成核酸序列（如编码一种蛋白质的序列）的细胞。公知可用于基因转移的病毒包括腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、流行性腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、反转录酶病毒、辛德毕斯病毒、慢病毒和痘苗病毒如金丝雀痘病毒。

[0122] 通过下列详述和权利要求书，本发明的其它特征和优点将是显然的。

[0123] 附图简述

[0124] 图 1 是一张示意图，显示 N 连接的聚糖当在内质网、中室和高尔基体中存在时的修剪。这些酶如下编号：(1) α－葡糖苷酶 I；(2) α－葡糖苷酶 II；(3)ER 甘露糖苷酶 I；(4)ER 甘露糖苷酶 II；(5)ER 葡糖基转移酶；(6) 内甘露糖苷酶；(7) 高尔基体甘露糖苷酶 IA、IB 和 IC；(8)GlcNAc 转移酶 I；(9) 高尔基体甘露糖苷酶 II。，葡萄糖；，GlcNAc；，甘露糖。酶 (3) 和 (7) 被 kifunensine 抑制；酶 (9) 被苦马豆素抑制。

[0125] 发明详述

[0126] 本发明部分地基于以下发现：抑制去除远离葡糖脑苷脂酶 (GCB) 前体寡糖链五糖核心的一个或多个甘露糖残基产生可有效导向甘露糖受体的高甘露糖葡糖脑苷脂酶 (hmGCB)。抑制或降低一种或多种甘露糖苷酶（如一种或多种 1 类加工甘露糖苷酶和 / 或 2 类加工甘露糖苷酶）的活性能防止从前体寡糖链的五糖核心中去除甘露糖残基。通过防止或抑制一个或多个甘露糖残基的去除，能获得含有至少一条含 4 个或 4 个以上来自前体寡糖链的甘露糖残基的糖链的 hmGCB。

[0127] 戈谢病是由于 GCB 缺陷引起的。GCB 是鞘糖脂葡糖脑苷脂降解所必需的。在 GCB 缺乏时，葡糖脑苷脂主要在吞噬细胞（例如巨噬细胞）中积累，最终在肝脏、脾脏和骨髓中积累。

[0128] 巨噬细胞具有甘露糖受体。这些受体在这些细胞的受体介导的胞吞作用中起作用。hmGCB 可有效地定向巨噬细胞上的甘露糖受体，提高这些细胞对 GCB 的摄取（以 hmGCB 形式）。通过将 GCB（以 hmGCB 形式）引导到葡糖脑苷脂积累的细胞中，hmGCB 能用来水解

巨噬细胞中的葡糖脑苷脂，从而降低该糖脂在戈谢病患者的肝脏、脾脏和骨髓中的积累。

[0129] 葡糖脑苷脂酶

[0130] 来自不同种的编码葡糖脑苷脂酶的基因的核苷酸序列信息可以获得。（参见 Horowitz 等人 (1989)Genomics 4(1) :87-96 ;Beutler 等人 (1992)Genomics 12(4) : 795-800)。

[0131] 成熟的人 GCB 在 Asn-19、Asn-59、Asn-146、Asn-270 和 Asn-462 处有 5 个潜在的 N- 连接糖基化位点。在人组织衍生的 GCB 中，在 5 个位点中的 4 个处发生糖基化 (Erickson 等人 (1985)J. Biol. Chem. 260 :14319-14324)。利用定点诱变的研究证明，位点 Asn-462 不再被占据 (Berg-Fussman 等人 (1993)J. Biol. Chem. 268 :14861-14866)。从人胎盘 GCB 中释放的接近 20％的聚糖链显示为含有可达 7 个甘露糖残基的高甘露糖类型，而大多数聚糖链是具有唾液酸二天线和三天线结构的复合型 (Takasaki 等人 (1984)J. Biol. Chem. 259 : 10112-10117)。

[0132] GCB N- 糖基化的第一个事件是内质网 (ER) 腔中 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ 从寡糖 -PP- 多萜醇向新生肽的协同翻译转移。供体寡糖上存在 3 个葡萄糖残基允许由寡糖基转移酶向受体天冬酰胺有效转移。N- 糖基化后，在折叠过程中 ER 葡糖苷酶 I 和 II 从 GCB 中快速除去葡萄糖残基。两种不同的 ER 甘露糖苷酶均能从 $Man_9GlcNAc_2$ 上水解下一个甘露糖残基，形成 $Man_8GlcNAc_2$ 的两种不同的异构体（见图 1)。可接近的聚糖然后在高尔基体中进一步加工为 $Man_5GlcNAc_2$，是通过高尔基体甘露糖苷酶 I 除去可达 4 个 α 1,2- 连接的甘露糖残基。至少有 3 种不同的编码相关高尔基体甘露糖苷酶 I 同工型 (IA、IB 和 IC) 的人类基因，它们有略微不同的底物特异性和组织表达，但全都能从 $Man_9GlcNAc_2$ 聚糖上剪下 4 个甘露糖残基，形成 $Man_5GlcNAc_2$(Tremblay 等人 (2000 年 7 月 27 日)J. Biol. Chem. [待印刷])。它们位于染色体 6q22、1p13 和 1p35-36 上，其 cDNA 序列可从 GenBank 获得，分别为 X74837、AF027156 和 AF261655。

[0133] 加工的最后一个阶段是使聚糖进入复杂聚糖的生物合成途径，需要开始时通过 GlcNAc 转移酶 I 的作用使 $Man_5GlcNAc_2$ 转化为 $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$，之后高尔基体甘露糖苷酶 II 能催化去除另外两个甘露糖残基，产生 $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$。它是位于跨高尔基体和跨高尔基体网络中的糖基转移酶引起聚糖延伸形成复合型链的底物。

[0134] 如果在最初的 N- 糖基化步骤中转移给 GCB 的高甘露糖链在高尔基体中能免于被加工为复合链，则含有高甘露糖链的 GCB(hmGCB) 可有效地定向网状内皮组织细胞上的甘露糖受体。

[0135] 细胞

[0136] 将要转染或感染的初级和次级细胞能从多种组织中获得，包括能培养保存和繁殖的细胞型。例如，能被转染或感染的初级和次级细胞包括成纤维细胞、角化细胞、上皮细胞（例如哺乳动物上皮细胞、肠上皮细胞）、内皮细胞、神经胶质细胞、神经细胞、血液的有形成分（例如淋巴细胞、骨髓细胞）、肌细胞和这些体细胞型的前体。初级细胞优选地从施用了转染或感染的初级或次级细胞的个体中获得（即自体细胞）。然而，初级细胞可从相同种（即，同种异体细胞）或其它种（即，异种细胞）（例如，小鼠、大鼠、兔、猫、狗、猪、母牛、鸟、绵羊、山羊、马、猴、狒狒）的供体（不是受体）中获得。

[0137] 脊椎动物（特别是哺乳动物）来源的初级或次级细胞能用外源 DNA 序列（例如编

码治疗蛋白的外源 DNA 序列）转染或感染，在并长期在体外和体内稳定且可再生的产生编码的治疗蛋白。另外，转染或感染的初级和次级细胞能以生理相关水平在体内表达编码产物，细胞能在植入后恢复，并在重新培养后生长并显示其植入前的特性。能修饰细胞，以减少细胞表面组织相容性复合物或外源糖部分，以降低免疫原性，例如普通供体细胞。

[0138] 此外，脊椎动物（特别是哺乳动物）的初级或次级细胞能用含有调节序列的外源 DNA 序列转染或感染。这些调节序列的例子包括启动子、增强子、UAS、支架附着区或转录结合位点之一种或多种。导向事件能导致 DNA 序列中插入调节序列，将导向的内源基因置于其控制下（例如，通过将启动子或增强子或此两者插入内源基因或调节区上游）。任选地，导向事件能同时导致基因的内源调节序列的缺失，如组织特异性负调节序列的缺失。导向事件能替换存在的调节序列；例如，组织特异性增强子能被替换为比内源元件有更宽或不同细胞型特异性，或显示与相应未转染或未感染细胞不同的调节或诱导模式的增强子。就此而言，删除内源序列并加入新序列。此外，内源调节序列也可不被去除或替换，但被导向事件破坏或失能，例如通过将外源序列导向内源调节元件内。通过同源重组导入调节序列能产生表达通常不被表达的治疗蛋白的初级或次级细胞。另外，导入调节序列能用于以低于正常的量（以低于生理正常较低水平的量）或以缺陷形式产生或含有治疗蛋白的细胞，和以生理正常水平产生治疗蛋白的细胞，但其含量或产量将增加。美国专利号 5,641,670、美国专利号 5,733,761 和美国专利号 5,968,502 描述了激活内源编码序列的方法，其内容在此引用作为参考。

[0139] 转染的或感染的初级或次级细胞也可含有编码赋予选择性表型的选择性标记的 DNA 序列，便于其鉴定和分离。生产稳定表达该 DNA 序列的转染初级或次级细胞的方法，这些转染细胞的克隆细胞株和异源细胞株，生产克隆和异源细胞株的方法众所周知，例如在美国专利号 5,641,670、美国专利号 5,733,761 和美国专利号 5,968,502 中描述，其内容在此引用作为参考。

[0140] 转染的初级或次级细胞能通过电穿孔制备。电穿孔以适当电压和电容（和相应的时间常数）进行，导致 DNA 构件进入初级或次级细胞。电穿孔能在宽范围的电压（例如 50-2000 伏）和相应电容下进行。一般使用约 0.1-500μg 的总 DNA。

[0141] 此外，能利用公知的方法转染细胞，如磷酸钙沉淀、显微注射、改良磷酸钙沉淀和聚凝胺沉淀、脂质体融合和受体介导的基因送递。

[0142] 葡糖脑苷脂酶的加工

[0143] 为防止去除甘露糖残基而未被处理的细胞中的寡糖装配通常如下所述进行：

[0144] GCB 的寡糖链通过 N- 糖苷键与多肽骨架连接。N- 连接的聚糖含有一个酰胺键，它连接寡糖的还原端 N- 乙酰氨基葡糖 (GlcNAc) 残基的异头碳 (C-1) 与多肽的天冬酰胺 (Asn) 残基的一个氮。

[0145] N- 连接的寡糖装配的起始不在 GCB 蛋白的 Asn 残基上直接发生，而是包括脂连接的 14 糖前体寡糖的预装配，然后在由 mRNA 翻译期间或之后不久转移给 ER 中的蛋白质。“前体寡糖”在此使用时是指参与糖链生物合成的初始步骤的寡糖链。“前体寡糖”可以是至少包含下列糖的寡糖结构：$Man_9GlcNAc_2$，例如，前体寡糖可具有下列结构：$Glc_3Man_9GlcNAc_2$，如图 1 所示。当通过焦磷酸桥与聚类异戊二烯载体脂（一种多萜醇）连接时，前体寡糖合成。这种装配涉及至少 6 种不同的膜结合糖基转移酶。这些酶中的一些从核苷酸糖转移单糖，

而其它的利用多萜醇 - 连接的单糖作为糖供体。在完成脂连接的前体的装配后，另一种膜结合酶将其转移给空间上可接近的 Asn 残基，它是序列 -Asn-X-Ser/Thr- 的部分。

[0146] 新合成的 GCB 的糖基化 Asn 残基短时携带 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$，在此也被称为“未加工的糖链”。

[0147] N- 连接的寡糖的加工通过大量膜结合酶的顺序作用完成，在将前体寡糖 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ 转移给蛋白质之后立即开始。术语“加工”、“修剪”和“修饰”在此可互换使用。

[0148] N- 连接的寡糖加工能分为三个阶段 :3 个葡萄糖残基的去除，可变数量的甘露糖残基的去除，和多个糖残基向产生的修剪核心的加入。

[0149] 加工第一阶段中葡萄糖残基的去除包括所有三个葡萄糖残基的去除，产生 N- 连接的 $Man_9GlcNAc_2$。该结构在此也被称为 :Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3[Man α 1-2Man α 1-3(Man α 1-2Man α 1-6)Man α 1-6]Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc（参见图 1，结构 9’）。加工通常持续到去除甘露糖残基的第二阶段。

[0150] $Man_9GlcNAc_2$ 部分的 4 个甘露糖残基通过 α -1,2 连接结合。甘露糖苷酶 IA、IB 和 IC 能除去可达 4 个这样的 α 1,2- 连接的甘露糖残基，产生 N- 连接的 $Man_{5-8}GlcNAc_2$。

[0151] 蛋白质 - 连接的 $Man_5GlcNAc_2$ 然后能作为 GlcNAc 转移酶 I 的底物，该酶将 β 1,2- 连接的 GlcNAc 残基从 UDP-GlcNAc 转移给核心 α 1,3- 连接的甘露糖残基，形成 $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$。甘露糖苷酶 II 然后能完成该加工途径的修剪阶段，是通过除去 2 个甘露糖残基产生蛋白质连接的寡糖，其中含有 $Man_3GlcNAc_2$，“五糖核心”。结构 $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$ 是 GlcNAc 转移酶 II 的底物，该酶能将 β 1,2- 连接的 GlcNAc 残基转移给 α 1,6- 连接的甘露糖残基。

[0152] 在修剪阶段后，由一系列膜结合的高尔基体糖基转移酶向延长的寡糖链上连续加入单糖，这些酶对于受体寡糖、供体糖和糖间形成的键型而言都是高度特异的。它们包括不同的 GlcNAc 转移酶（产生 β 1,2、β 1,4 或 β 1,6 键）；半乳糖基转移酶（产生 β 1,4、β 1,3 和 α 1,3 键）；唾液酸转移酶（产生 α 2,3 键的一种酶，和产生 α 2,6 键的另一种酶）；岩藻糖基转移酶（产生 α 1,2、α 1,3、α 1,4 或 α 1,6 键）；和产生多种异常键的不断增加的其它酶。这些糖基转移酶的协同作用产生通称为“复合”寡糖的不同结构家族。它们可含有与不变的核心五糖 $Man_3GlcNAc_2$ 连接的 2、3 或 4 个外分支（“天线”）。这些结构根据其外分支的数量是指 :二天线（两个分支）、三天线（三个分支）或四天线（四个分支）。这些复合聚糖的大小可能变化。

[0153] 高甘露糖葡糖脑苷脂酶的加工

[0154] 通过减少或防止 GCB 的细胞糖修饰（即加工）能产生 hmGCB。在防止去除远离 GCB 前体寡糖链五糖核心的至少一个甘露糖残基的条件下产生 GCB，能防止糖修饰。例如，能防止从前体寡糖中除去甘露糖残基期间的一个或多个“修剪”阶段。

[0155] 细胞甘露糖苷酶归为两大类 :1 类加工酶，包括 ER 甘露糖苷酶 I、高尔基体甘露糖苷酶 IA、IB 和 IC，能水解 α 1,2- 连接的甘露糖残基，其活性需要 Ca^{2+} ;2 类加工酶，包括 ER 甘露糖苷酶 II、高尔基体甘露糖苷酶 II、胞质 α 甘露糖苷酶和溶酶体 α 甘露糖苷酶，它们具有较宽的底物特异性，其活性不需要 Ca^{2+}。

[0156] 从前体寡糖上修剪甘露糖残基至少涉及下列甘露糖苷酶 :高尔基体甘露糖苷酶

IA、IB 和 IC，和高尔基体甘露糖苷酶 II。通过在细胞的 N- 连接的寡糖装配过程中抑制一种或多种这类酶，能产生至少含有一条糖链的 GCB，该糖链除了五糖核心外含有一个或多个甘露糖残基。例如，ER 甘露糖苷酶 I 和高尔基体 ER 甘露糖苷酶 I 的抑制能产生至少含有一条糖链（优选地所有链）的 hmGCB，该糖链含有来自前体寡糖的至少 8 个甘露糖残基；高尔基体甘露糖苷酶 II 的抑制能产生至少含有一条糖链（优选地所有链）的 hmGCB，该糖链含有来自前体寡糖的至少 5 个甘露糖残基。

[0157] 例如，使细胞接触一种防止从 GCB 前体寡糖上除去一个或多个甘露糖残基的物质，或在不能产生或以缺陷水平产生至少一种甘露糖苷酶的细胞中或在产生突变和 / 或失活甘露糖苷酶的细胞中产生 GCB，能抑制甘露糖苷酶引起的修剪。例如，细胞可以是至少一种甘露糖苷酶的敲除体，能表达至少一种反义甘露糖苷酶分子，或者对于至少一种甘露糖苷酶可能是显性阴性的。

[0158] 防止去除甘露糖残基的物质

[0159] 防止从 GCB 的前体寡糖上除去一个或多个甘露糖残基的物质能用来生产 hmGCB 制剂。例如，表达 GCB 的细胞能接触一种物质，该物质可防止去除 GCB 的前体寡糖的一个或多个 α 1,2 甘露糖残基，和 / 或去除 GCB 的前体寡糖的 α 1,3 甘露糖残基，和 / 或去除 GCB 的前体寡糖的 α 1,6 甘露糖残基。优选地，该物质是一种甘露糖苷酶抑制剂，例如，1 类加工甘露糖苷酶抑制剂或 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂。

[0160] 细胞甘露糖苷酶根据蛋白质序列同源性归于两大类 (Moremen 等人 (1994) Glycobiology 4 :113-125)。这两类在机理上不同。1 类酶包括 ER 甘露糖苷酶 I 和高尔基体甘露糖苷酶 I 同工型，分子量约为 63-73kDa，可水解 α 1,2- 连接的甘露糖残基，其活性需要 Ca^{2+}。例如，用底物模拟物如甘露糖的吡喃糖类似物处理能阻断 1 类加工甘露糖苷酶。例如，用下列一种或多种酶抑制剂处理能阻断 1 类加工甘露糖苷酶 :kifunensine、deoxymannojirimycin 或其组合。2 类酶包括 ER 甘露糖苷酶 I、高尔基体甘露糖苷酶 II、胞质 α - 甘露糖苷酶和溶酶体 α - 甘露糖苷酶，具有约为 107-136kDa 的较大分子量，其活性不需要 Ca^{2+}，具有较宽的底物特异性。例如，用甘露糖基阳离子的呋喃糖过滤态类似物处理能阻断 2 类加工甘露糖苷酶 (Daniels 等人 (1994)GlycoBiol.4 :551-566)。例如，用下列一种或多种抑制剂处理能阻断 2 类加工甘露糖苷酶 :苦马豆素、6- 脱氧 -DIM、6- 脱氧 -6- 氟 -DIM、mannostatin A 或其组合。

[0161] Kifunensine 能用作内质网甘露糖苷酶 I 和 / 或高尔基体甘露糖苷酶 IA 和 / 或 IB 和 / 或 IC 的抑制剂 ;deoxymannojirimycin 能用作 ER 甘露糖苷酶 I、ER 甘露糖苷酶 II 和 / 或高尔基体甘露糖苷酶 IA 和 / 或 IB 和 / 或 IC 的抑制剂 ;苦马豆素能用作高尔基体甘露糖苷酶 II 的抑制剂 ;mannostatin A 能用作高尔基体甘露糖苷酶 II 的抑制剂。

[0162] 使用甘露糖苷酶抑制剂能抑制寡糖装配期间甘露糖残基修剪特定阶段后 GCB 糖链的加工。例如，细胞与 Kifunensine 接触能抑制前体寡糖的任何或 1、2、3 或 4 个甘露糖残基的修剪。

[0163] 用下列一种或多种酶抑制剂处理细胞能阻断加工 α - 甘露糖苷酶 :

[0164] ● Kifunensine，内质网 I 和高尔基体甘露糖苷酶 I 的一种抑制剂 (Weng 和 Spiro(1993)J.Biol.Chem.268 :25656-25663 ;Elbein 等人 (1990)J.Biol.Chem.265 : 15599-15605)。

[0165] ● 苦马豆素，高尔基体甘露糖苷酶 II 的一种抑制剂 (Tulsiani 等人 (1982) J. Biol. Chem. 257 :7936-7939)。

[0166] ● deoxymannojirimycin，内质网甘露糖苷酶 I 和 II 和高尔基体甘露糖苷酶 I 的一种抑制剂 (Weng 和 Spiro(1993) J. Biol. Chem. 268 :25656-25663 ;Tremblay 和 Herscovics(2000) J. Biol. Chem. Jul 27 ;[待印刷])。

[0167] ● DIM(1,4- 双脱氧 -1,4- 亚氨基 -D- 甘露糖醇)，高尔基体甘露糖苷酶 II 的一种抑制剂 (Palamarzyk 等人 (1985) Arch. Biochem. Biophys :243 :35-45)。

[0168] ● 6- 脱氧 -DIM 和 6- 脱氧 -6- 氟 -DIM，高尔基体甘露糖苷酶 II 的抑制剂 (Winchester 等人 (1993) Biochem J. 290 :743-749)。

[0169] ● mannostatin A，高尔基体甘露糖苷酶 II 的一种抑制剂 (Tropea 等人 (1990) Biochemistry 29 :10062-10069)。

[0170] 可根据渗入特定细胞型的能力以及甘露糖苷酶抑制剂的抑制能力选择不同的甘露糖苷酶抑制剂。例如，培养的成纤维细胞能以时间和浓度依赖的方式快速内化苦马豆素。苦马豆素也是 2 类甘露糖苷酶 (如高尔基体甘露糖苷酶 II) 的一种强抑制剂。因此，苦马豆素能用来在培养的成纤维细胞中产生 hmGCB，例如含有至少一条含前体寡糖的至少 4 个或 5 个甘露糖残基的糖链的 hmGCB。另外，kifunensine 可容易地被培养的成纤维细胞摄取，是 1 类甘露糖苷酶 (如 ER 甘露糖苷酶 I 和高尔基体甘露糖苷酶 I) 的强抑制剂。因此，kifunensine 能用来在培养的成纤维细胞中产生 hmGCB，例如含有至少一条含前体寡糖的至少 4、5、6、7、8 或 9 个甘露糖残基的糖链的 hmGCB。

[0171] 优选地，甘露糖苷酶抑制剂以 0.025-20.0 μ g/ml、0.05-10 μ g/ml、0.05-5 μ g/ml、优选地约 01-2.0 μ g/ml 的浓度存在。例如，1 类加工甘露糖苷酶抑制剂能以约 0.025-20.0 μ g/ml、0.05-10 μ g/ml、0.05-5 μ g/ml、优选地约 0.1-2.0 μ g/ml 的浓度存在 ；2 类加工甘露糖苷酶抑制剂能以约 0.025-20.0 μ g/ml、0.05-10 μ g/ml、0.05-5 μ g/ml、优选地约 0.1-2.0 μ g/ml 的浓度存在 ;1 类和 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂的每一种均能以约 0.025-20.0 μ g/ml、0.05-10 μ g/ml、0.05-5 μ g/ml、优选地约 0.1-2.0 μ g/ml 的浓度存在 ；或者 1 类和 2 类加工甘露糖苷酶抑制剂的总浓度可以是约 0.025-40.0 μ g/ml、0.05-20 μ g/ml、0.05-10 μ g/ml、优选地约 0.1-5.0 μ g/ml。

[0172] 细胞能接触一种甘露糖苷酶抑制剂，例如在含有至少一种甘露糖苷酶抑制剂的培养基中培养细胞。

[0173] 甘露糖苷酶突变细胞

[0174] 甘露糖苷酶敲除细胞

[0175] 甘露糖苷酶基因表达的永久或调节灭活能通过用转染的质粒 DNA 构件或合成寡核苷酸导向甘露糖苷酶基因座位实现。质粒构件或寡核苷酸可设计为几种形式。包括下列 :1) 在甘露糖苷酶基因外显子内插入选择性标记基因或其它序列 ;2) 在非编码序列的调节区内插入外源序列 ;3) 调节和 / 或编码序列的缺失或置换 ；和，4) 通过位点特异性诱变改变蛋白质编码序列。

[0176] 在向编码序列中插入选择性标记基因的情况中，实现内源甘露糖苷酶外显子与改构后含有如一种选择性标记基因的甘露糖苷酶外显子的框内融合是可能的。这样在成功导向后，内源甘露糖苷酶基因表达一种融合 mRNA(甘露糖苷酶序列加选择性标记序列)。而

且，融合 mRNA 将不能产生功能性甘露糖苷酶翻译产物。

[0177] 在向调节区中插入 DNA 序列的情况中，通过破坏内源启动区或转录所需的 5’非翻译区 (5’UTR) 中的其它任何区域能使甘露糖苷酶基因的转录沉默。这些区域包括，例如翻译控制区和内含子的剪接供体。其次，一种新调节序列能插入甘露糖苷酶基因上游，这将使甘露糖苷酶基因受胞外因子的控制。因此为了最佳 hmGCB 产生如希望地下调或抑制甘露糖苷酶基因表达是可能的。而且，能用一种包含选择性标记和启动子的序列破坏内源序列的表达。最后，通过适当设计导向底物能删除所有或部分内源甘露糖苷酶基因。

[0178] 为了产生含有至少一个染色体拷贝的人高尔基体甘露糖苷酶 IA、IB 或 IC 基因的敲除的细胞，分离至少含有基因 5’部分（包括调节序列、5’UTR、编码序列）的基因组 DNA。例如，利用聚合酶链反应 (PCR)，能用保藏号为 NM005907（人）的 GenBank 序列产生针对高尔基体甘露糖苷酶 IA 的探针，或者用保藏号 AAF97058 产生针对高尔基体甘露糖苷酶 IB 或 IC 的探针。用于 PCR 的寡核苷酸能根据 GenBank 序列设计。得到的探针能与单拷贝的高尔基体甘露糖苷酶 IA、IB 或 IC 基因杂交。然后能用该探针筛查可商品获得的重组噬菌体文库（例如由人基因组 DNA 制成的文库），以分离含有全部或部分甘露糖苷酶 I 结构基因的克隆。一旦分离含有甘露糖苷酶调节和 / 或编码序列的重组克隆，即可构建用来灭活甘露糖苷酶基因表达的特异导向质粒。甘露糖苷酶活性的灭活是由于向调节或编码序列中插入外源 DNA，而破坏了翻译阅读框。该酶的灭活也可能是 mRNA 转录或 mRNA 加工破坏的结果，或者是由于内源甘露糖苷酶调节或编码序列的缺失。

[0179] 其它 1 类和 2 类加工甘露糖苷酶的核酸序列也可获得，例如从 GenBank 获得。利用以上对于高尔基体甘露糖苷酶 IA、IB 或 IC 所述的方法，能产生其它 1 类和 / 或 2 类加工甘露糖苷酶的敲除细胞。

[0180] 甘露糖苷酶敲除细胞例如能用于基因治疗。能对患者（如戈谢病患者）施用敲除细胞，使细胞在体内产生 hmGCB。

[0181] 反义甘露糖苷酶核酸序列

[0182] 相对于编码甘露糖苷酶（如 1 类加工或 2 类加工甘露糖苷酶）的核苷酸反义的核酸分子能作为抑制甘露糖苷酶表达的灭活剂。例如，高尔基体甘露糖苷酶 IA、高尔基体甘露糖苷酶 IB、高尔基体甘露糖苷酶 IC 和 / 或高尔基体甘露糖苷酶 II 表达能被反义核酸分子抑制。“反义”核酸包括与编码甘露糖苷酶的“有义”核酸互补，例如与双链 cDNA 分子的编码链互补或与 mRNA 序列互补的核苷酸序列。因此，反义核酸能与有义核酸形成氢键。反义核酸能与完整甘露糖苷酶编码链或只是与其一部分互补。例如，能使用相对于编码甘露糖苷酶的核苷酸序列的编码链“编码区”反义的反义核酸分子。

[0183] 由于在例如 Bause(1993)Eur.J.Biochem.217(2) :535-540 ;Gonzalez 等人 (1990)J.Biol.Chem.274(30) :21375-21386 ;Misago 等人 (1995)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92(25) :11766-11770 ;Tremblay 等人 (1998)Glycobiology 8(6) :585-595 ;Tremblay 等人 (2000)J.Biol.Chem.Jul 27 :[电子出版物，待印刷] 中公开了编码多种甘露糖苷酶的编码链序列，可根据 Watson 和 Crick 碱基配对原则设计反义核酸。反义核酸分子能包含与甘露糖苷酶 mRNA 的完整编码区互补的序列，但更优选地是只与甘露糖苷酶 mRNA 的编码区或非编码区的一部分互补的寡核苷酸。例如，反义寡核苷酸能包含与甘露糖苷酶 mRNA 翻译起始位点周围的区域互补的序列。反义寡核苷酸的长度可以是，例如约 5、10、15、20、25、30、35、

40、45、50 或更多个核苷酸。反义核酸能用本领域周知的方法用化学合成法和酶连接反应构建。例如，能用自然存在的核苷酸或为了提高分子生物学稳定性或提高反义和有义核酸之间形成的双螺旋的物理稳定性而不同修饰的核苷酸化学合成反义核酸（例如反义寡核苷酸），例如，能使用硫代磷酸衍生物和吖啶取代的核苷酸。能用来产生反义核酸的修饰核苷酸的例子包括：5- 氟尿嘧啶、5- 溴尿嘧啶、5- 氯尿嘧啶、5- 碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4- 乙酰胞嘧啶、5-（羧基羟甲基）尿嘧啶、5- 羧甲基氨甲基 -2- 硫尿苷、5- 羧甲基氨甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β -D-galactosylqueosine、肌苷、N6- 异戊烯基腺嘌呤、1- 甲基鸟嘌呤、1- 甲基肌苷、2,2- 二甲基鸟嘌呤、2- 甲基腺嘌呤、2- 甲基鸟嘌呤、3- 甲基胞嘧啶、5- 甲基胞嘧啶、N6- 腺嘌呤、7- 甲基鸟嘌呤、5- 甲基氨甲基尿嘧啶、5- 甲氧基氨甲基 -2- 硫尿嘧啶、β -D-mannosylqueosine、5'- 甲氧基羧甲基尿嘧啶、5- 甲氧基尿嘧啶、2- 甲硫基 -N6- 异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶 -5- 氧乙酸 (v)、ybutoxosine、假尿嘧啶、queosine、2- 硫胞嘧啶、5- 甲基 -2- 硫尿嘧啶、2- 硫尿嘧啶、4- 硫尿嘧啶、5- 甲基尿嘧啶、尿嘧啶 -5- 氧乙酸甲酯、尿嘧啶 -5- 氧乙酸 (v)、5- 甲基 -2- 硫尿嘧啶、3-(3- 氨基 -3-N-2- 羧丙基）尿嘧啶、(acp3)w 和 2,6- 二氨基嘌呤。此外，也能用以反义方向（即，由插入核酸转录的 RNA 相对于目的靶核酸是反义方向的）亚克隆了一种核酸的表达载体生物学产生反义核酸。

[0184] hmGCB 的纯化

[0185] 术语“纯化的”hmGCB 在此使用时是指当由表达 GCB 的细胞产生时基本上不含细胞物质的 hmGCB。词语“基本上不含细胞物质”包括蛋白质与产生细胞的成分分开的 hmGCB 制剂。在一个实施方案中，词语“基本上不含细胞物质”包括含有不到约 30％（干重）非 GCB 蛋白（也称为“蛋白质杂质”或“污染蛋白”）、更优选地不到约 20％的非 GCB 蛋白、更优选地不到约 10％的非 GCB 蛋白、最优选地不到约 5％的非 GCB 蛋白的 hmGCB 制剂。当从培养基中获得（即收获）hmGCB 时，也优选地基本上不含培养基成分，即，培养基成分不到蛋白质制品干重的约 20％、更优选地不到约 10％、最优选地不到约 5％。

[0186] 能用多种方法从培养基中收获 hmGCB。术语“收获的 hmGCB”在此使用时是指从培养基或从细胞中获得的 hmGCB。例如，能用下列备选方法之一在纯化步骤之前制备收获的 hmGCB。可包括：1) 过滤新鲜收获物；2) 过滤新鲜收获物，并在约 -20℃到 -80℃下冷冻过滤的产物直到准备加工（此时可融解，任选地过滤）；3) 过滤新鲜收获物，浓缩过滤产物（例如，约 8-10 倍），然后任选地再次过滤；4) 过滤新鲜收获物，浓缩过滤产物（例如，约 8-10 倍），任选地再次过滤，然后在约 -20℃到 -80℃下冷冻过滤的产物直到准备加工（此时可融解，任选地过滤）。也可进行这些备选方法的变更方法。例如，当冷冻收获产物或浓缩的收获产物时，不同收获物能在融解和过滤后合并。另外，对于收获的或浓缩的收获产物，能将产物在纯化之前保持在冷却温度下例如约 2℃到 8℃下较短时间，例如约 1-3 天，优选地 1 天。在纯化之前能合并保持在冷却温度下的收获产物。

[0187] 当进行收获物的浓缩时，能使用分子量截止值为 5000-50000、优选地 10000-30000 的超滤膜。过滤澄清一般使用 1.2μm/0.5μm 预过滤器，随后用 0.2μm 终过滤器。

[0188] HmGCB 能用下列纯化技术纯化。例如，能用疏水电荷诱导层析 (HCIC) 纯化 hmGCB 制剂。此外，也能用疏水作用层析 (HIC) 纯化 hmGCB 制剂。HCIC 和 HIC 均在下面描述。

[0189] HCIC 和 HIC 能单独使用或与一个或多个离子交换步骤结合使用。能与 HCIC 或 HIC

步骤结合使用的离子交换步骤（在HCIC或HIC之前或之后）包括使用阴离子交换和/或阳离子交换层析。在蛋白质纯化中使用的公知可购得的阴离子交换载体具有季铵功能基团。本方法中使用的优选基质是基于琼脂糖或纤维素的基质，如微晶纤维素或交联琼脂糖。含有二乙基氨乙基、三乙基氨甲基或三甲基氨甲基功能基团的基质也是特别优选的。一种特别优选的阴离子交换基质是可以购得的三甲基氨甲基交联琼脂糖，如，Q-Sepharose Fast Flow® (Pharmacia)。可在蛋白质纯化中使用的公知可购得的阳离子交换载体具有酸性功能基，包括羧基和磺酸。含有阳离子功能基的基质包括多种形式的基于纤维素和聚苯乙烯的基质。例如，本领域公知的弱阳离子交换剂包括但不限于：羧甲基-Sepharose®和羧甲基-纤维素®。本领域公知的强阳离子交换剂包括但不限于：磺化聚苯乙烯(AG 50W®，Bio-Rex 70®)、磺化纤维素(SP-Sephadex®)和磺化Sepharoses(S-Sepharoses®)。一种特别优选的阳离子交换基质是S-Sepharoses Fast Flow® (Pharmacia)。

[0190] 涉及这些基质的层析步骤最优选地作为柱层析步骤或以另一种分批吸附技术进行，任选地能在25℃至40℃的温度下进行。优选地，向洗涤或洗脱缓冲液中加入一种盐以提高缓冲液的离子强度。如果能被本领域技术人员容易地测定，常规使用的任何盐均可用于这一目的，NaCl是最常用的盐之一。

[0191] 一种常规凝胶过滤步骤也能与HCIC或HIC层析步骤组合使用。这些基质的代表性实例是与丙烯酰胺交联的葡聚糖，如烯丙基葡聚糖与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺和交联纤维素或琼脂糖凝胶共价交联制备的复合亲水凝胶。可购得的交联葡聚糖-丙烯酰胺的商品名为Sephacryl®，可从Pharmacia获得。可购得的交联葡聚糖-琼脂糖树脂的商品名为Superdex®，可从Pharmacia获得。一种优选的Superdex®凝胶是Superdex 200®。交联纤维素凝胶的例子是可购得的交联多孔纤维素凝胶，例如可从Amicon Inc.获得的GLC 300®或GLC 1000®。能使用基于硅石的树脂如可从TosoHaas获得的TSK-Gel SW®。基于聚合物的树脂如TSK-Gel PW®、TSK Alpha Series®、Toyopearl HW packings®（乙二醇与丙烯酸甲酯聚合物的共聚作用）也可从TosoHaas获得。

[0192] 优选地，HCIC或HIC能与这些离子交换步骤中的一种或多种组合。当使用HCIC或HIC与不同离子交换或凝胶过滤步骤的组合时，它们能以任何顺序进行。例如，如下所述，能进行一种四步方法，包括利用MEP Hypercel®层析的HCIC或利用MacroPrep Methyl®层析的HIC，然后是Q Sepharose Fast Flow®、SP Sepharose Fast Flow®和最后的Superdex 200®。以下更详细地叙述了几种这样的方法。

[0193] MEP Hypercel层析

[0194] MEP(巯基乙基吡啶)Hypercel® (BioSepra，Life Technologies)能用于HCIC。它是一种由与再生的多孔纤维素珠(80-100微米)连接的NEP组成的树脂。由疏水尾和可电离首基组成的功能基团(MEP)在中性pH下不带电荷，在生理离子强度下基于疏水相互作用能结合特定的蛋白质配基。通过将pH由4提高为5进行洗脱，此时MEP带正电，由于静电排斥蛋白质从柱上洗脱。例如，制备的收获物或收获浓缩物能直接加到用含180mM氯化钠和2mM DTT的25mM磷酸钠，pH6.8平衡的MEP柱上。任选地，用含25mM辛酸钠的平衡缓冲液洗涤该柱，直到280nm的吸光度(A280)稳定。能用50mM乙酸钠、2mM DTT，pH4.7从柱上洗脱hmGCB，收集在280nm下监测到的峰。

[0195] MacroPrep Methyl层析

[0196] MEP Hypercel ®的一种备选物是 MacroPrep Methyl ®,它是一种疏水作用层析(HIC)树脂。该树脂由与多孔共聚乙二醇异丁烯酸和二甲基丙烯酸二甘醇酯的珠组合物连接的甲基功能基团组成。例如,MacroPrep Methyl ® (BioRad) 层析能如下进行。将收获物或收获浓缩物的 pH 调节为 5.6,加入硫酸铵至终浓度为 0.70M。制备的收获物加到用 0.70M 硫酸铵、10mMMES, pH5.6 平衡的 MacroPrep Methyl ®柱上。加样后,用平衡缓冲液洗涤该柱,直到 A280 回到基线。用 10mMMES,pH5.6 洗脱 hmGCB。超滤和 / 或渗滤洗脱的 hmGCB,准备进行离子交换步骤,如 Q Sepharose 层析、SP Sepharose 层析和 / 或 Superdex200 层析。

[0197] Q Sepharose 层析

[0198] Q Sepharose Fast Flow ® (Amersham Pharmacia) 是一种相对较强的阴离子交换层析树脂。功能取代基是一种季胺基,它在 pH 2-12 的工作 pH 范围内带正电。在工作 pH 下带净负电荷的蛋白质在相对较低的离子强度下倾向于结合树脂,在较高离子强度或较低 pH 下能被洗脱。在接近 pH6 和低离子强度下, hmGCB 不能结合 Q Sepharose,

[0199] 但杂质可以结合,由此纯化样品。例如,能用下列方案经 Q Sepharose Fast Flow ®层析纯化样品中的 hmGCB。在适当的条件下,hmGCB 流经该柱,于是产物出现于流通 / 洗涤级分中。向如上所述制备的 MEP 洗脱合并液中加入磷酸钠 (250mM,pH6) 至终浓度为 25mM,用 NaOH(必要时用 HCl) 将合并液的 pH 调节为 pH6。通过用水稀释或用接近 pH6 的 25mM 磷酸钠、2mM DTT 超滤和 / 或渗滤,将传导率调节为 2.5±0.1mS/cm。然后过滤该物质,加到用 25mM 磷酸钠、2mM DTT, pH6 平衡的 Q Sepharose Fast Flow ®柱上。加样后,用平衡缓冲液洗涤该柱,直到 A280 达到基线。之后不久,例如在 24 小时内,流通 / 洗涤级分可通过另一个柱子 (如 SP Sepharose Fast Flow ®柱),或者在进一步处理之前在约 -20℃到 -80℃下冻存。

[0200] 能使用其它强阴离子交换树脂,如 Macro-Prep High Q Support ® (BioRad),代替 Q Sepharose。也能使用较弱的阴离子交换树脂如 DEAE Sepharose Fast Flow ® (Pharmacia) 或 Macro-Prep DEAE ® (BioRad)。该柱用缓冲液 (如 25mM 磷酸钠, pH6) 平衡。调节样品的 pH 为 pH6,通过稀释或渗滤为相对较低的离子强度调节传导率,这使杂质结合于柱上,而 hmGCB 流过。加样,用平衡缓冲液洗柱。杂质仍结合于柱上,能用盐如氯化钠或氯化钾,或用较低 pH 的缓冲液,或增多的盐和较低 pH 的组合洗脱。

[0201] 也能使 hmGCB 在加样期间与阴离子交换柱结合,方法包括降低加样中的盐浓度,或在较高 pH 下使用该柱,或减少盐和较高 pH 的组合。

[0202] SP Sepharose 层析

[0203] SP Sepharose Fast Flow ® (Amersham Pharmacia) 是一种相对较强的阳离子交换层析树脂。功能取代基是带电的磺酸基,它在 pH 2-12 的工作 pH 范围内带负电荷。在工作 pH 下带净正电荷的蛋白质在相对较低的离子强度下倾向于结合树脂,在较高离子强度或较高 pH 下能被洗脱。在接近 pH6 和中离子强度 (例如 6.5mS/cm) 下, hmGCB 能结合 SP Sepharose,在较高离子强度 (例如 10.7mS/cm) 下能被洗脱。在 hmGCB 洗脱条件下杂质蛋白仍结合于 SP Sepharose,由此纯化样品中的 hmGCB。例如,能用下列方案经 SP Sepharose Fast Flow ®层析纯化 hmGCB。向 Q Sepharose ®流通 / 洗涤液中加入氯化钠 (2.0M 贮存液) 直到传导率为 6.3mS/cm。检查 pH,必要时重新调节为 pH6.0。然后,继续加入氯化钠贮存液直到传导率为 6.5mS/cm。过滤该物质,加到用 25mM 磷酸钠、44mM 氯化钠, pH6.0 平衡

的SP Sepharose Fast Flow®柱上。加样后，用平衡缓冲液洗柱，直到达到基线，并用25mM磷酸钠、84mM氯化钠，pH6.0洗脱。HmGCB存在于洗脱级分中。

[0204] 另一种阳离子交换树脂，例如Source 30S®(Pharmacia)、CM Sepharose Fast Flow®(Pharmacia)、Macro-Prep CM Support®(BioRad)或Macro-Prep High S Support®(BioRad)能作为SP Sepharose的备选物。在接近pH6和低到中度离子强度下，如4-7mS/cm，hmGCB能与该柱结合。用一种缓冲液（如10mM柠檬酸钠，pH6.0，10mM MES，pH6.0，25mM磷酸钠，pH6.0）或在pH6.0时有足够缓冲能力的其它缓冲液平衡该柱。通过稀释或渗滤调节样品的离子强度，直到适合与该柱结合的水平。样品加于柱上，加样后洗柱以除去未结合的物质。用一种盐（如氯化钠或氯化钾）从柱上洗脱hmGCB。此外，也能用较高pH或较高盐浓度与较高pH结合的缓冲液从柱上洗脱hmGCB。

[0205] 也可使hmGCB在加样过程中流经阳离子交换柱，方法包括提高平衡缓冲液和加样样品中的盐浓度，在较高pH下使用该柱，或增多的盐和较高pH的组合。

[0206] Superdex 200层析

[0207] Superdex 200 prep grade®(Amersham Pharmacia)用于hmGCB的大小排阻层析，由此根据大小、分子量、撞击(strokes)半径或流体体积分离分子。Superdex 200由与琼脂糖共价交联的葡聚糖组成，对于球状蛋白质有10000-60000分子量的分级分离范围。例如，能用下列方案经Superdex 200®层析纯化hmGCB。SP洗脱合并液用10000mw截止值的膜超滤浓缩。过滤浓缩的合并液，然后加于用50mM柠檬酸钠，pH6.0平衡的Superdex 200prep grade®柱上。收集最初级分中柱流出液的A280，例如，运行8-16％SDS聚丙烯酰胺凝胶，确定级分的合并。可根据银染色凝胶的目视检查判断合并。

[0208] 也能用其它大小排阻层析树脂如Sephacryl S-200HR®、Bio-GelA 1.5m®或TosoHaas TSK Gel树脂纯化hmGCB。用于hmGCB大小排阻层析的缓冲液是50mM柠檬酸钠，pH6.0。也能使用其它缓冲液，如含有0.15M氯化钠的25mM磷酸钠，pH6.0。缓冲液的pH可以为pH5-7，应当有足够的离子强度使得与柱的离子相互作用最小。

[0209] 上述任何纯化方案中pH、缓冲液和/或盐浓度的改变能用常规方法进行，以获得希望的纯化产物。

[0210] 测定巨噬细胞摄取和hmGCB的细胞导向的试验

[0211] 例如通过测定巨噬细胞中的蛋白质水平和/或酶活性可测定巨噬细胞对hmGCB的摄取率。例如，如以下实施例和Diment等人(1987)J.Leukocyte Biol.42:485-490所述，能用利用巨噬细胞系的一种体外试验测定hmGCB的完全摄取和甘露糖受体特异的摄取。

[0212] 另外，肝细胞对hmGCB和GCB的摄取的体内对比能如Friedman等人(1999)Blood 93:2807-2816所述确定。简言之，能对一种小鼠模型注射hmGCB或GCB，然后在不久后杀死。用动物肝脏制备肝细胞（如实质细胞、枯否细胞、内皮细胞和肝细胞）悬液。然后分离细胞，根据形态学鉴定，测定不同肝细胞型中hmGCB和GCB的蛋白质水平和/或酶活性。此外，也可用免疫组化检测将hmGCB定位于所治疗动物的组织中的特定细胞或细胞型。

[0213] 药用组合物

[0214] 高甘露糖葡糖脑苷脂酶(hmGCB)能掺入适于对患者（如病人）施用的药用组合物中。该组合物可包含足够剂量的hmGCB来治疗戈谢病患者。在此使用时，词语“药学可接受的载体”是指包括适于药用的任何和所有溶剂、赋形剂、分散剂、包衣、抗细菌剂和抗真

菌剂、等渗和吸收延迟剂等。这些基质和药剂用于药学活性物质的使用在本领域中众所周知。只要不是任一常规基质或药剂不适于活性化合物，这种基质即能在本发明的组合物中使用。补充的活性化合物也能掺入组合物中。

[0215] 配制本发明的药用组合物使其适于预期的施用途径。施用途径的例子包括肠胃外，例如静脉内、皮内和皮下施用。优选地，施用途径是静脉内。用于肠胃外施用的溶剂或悬液可包含下列成分：无菌稀释剂，如注射用水、盐溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抗细菌剂，如苯甲醇或甲基对羟基苯甲酸脂；抗氧化剂，如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，如乙二胺四乙酸；缓冲液，如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张力的试剂如氯化钠或右旋葡萄糖。pH 能用酸或碱（如盐酸或氢氧化钠）调节。肠胃外制剂能包封于由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量瓶中。

[0216] 适于注射使用的药用组合物包括无菌水溶液（水溶时）或分散和无菌粉末，例如冻干的制剂，用于临时制备无菌注射液或分散。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水、制菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,NJ) 或磷酸盐缓冲液 (PBS)。在所有情况下，组合物必须是无菌的，并且应当是流体以便具有易注射性。它在生产和贮存条件下必须稳定，并且必须可在保存中防止微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质，包括如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等），及其适当的混合物。例如，使用包被如卵磷脂，在分散时保持需要的颗粒大小，使用表面活性剂，能保持适当的流动性。预防微生物的作用能用多种抗细菌剂和抗真菌剂实现，例如，对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下，组合物中优选地包含等渗剂，例如糖、多元醇，如甘露糖醇、山梨糖醇、氯化钠。在组合物中含有延迟吸收的试剂，如一硬脂酸铝、人血清白蛋白和明胶，能使可注射组合物的稳定性延长。

[0217] 无菌注射液能如下制备：在含有上述一种或组合的成分的适当溶剂中掺入需要量的 hmGCB，必要时，随后过滤除菌。一般通过向含有基本分散剂和需要的上述其它成分的无菌载体中掺入活性化合物进行分散。对于用于制备无菌注射液的无菌粉末，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，例如冻干，这产生活性成分加预先无菌过滤溶液的希望的其它任何成分的粉末。

[0218] 在一个优选实施方案中，活性化合物用可保护化合物免于从体内快速消除的载体制备，例如控释制剂，包括植入物和微胶囊输送系统。能使用可生物降解的、生物相容的聚合物，如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。这些制剂的制备方法为本领域技术人员所知。材料也能从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc. 购得。脂质体悬液（包括针对用病毒抗原的单克隆抗体感染的细胞的脂质体）也能用作药学可接受的载体。它们能按照本领域技术人员周知的方法制备，如美国专利号 4,522,811 所述。

[0219] 戈谢病的治疗

[0220] HmGCB，例如任何 hmGCB 分子或此处所述的制剂，能用来治疗戈谢病患者。此外，也能将此外所述的任何甘露糖苷酶敲除细胞导入戈谢病患者中，以对患者输送 hmGCB。能使用不同施用途径和不同部位。在植入个体中后，敲除细胞能产生 hmGCB。

[0221] 优选地，使用的敲除细胞一般是患者特异的遗传工程细胞。但是，从同种不同个体或从不同种获得细胞也是可能的。使用这些细胞可能需要施用免疫抑制剂，改变组织相容

性抗原，或使用可预防植入细胞排斥的屏障装置。

[0222] 戈谢病是一种常染色体隐性溶酶体贮积病，其特征在于溶酶体酶葡糖脑苷脂酶(GCB)缺陷。GCB水解在白细胞和红细胞膜中的鞘糖脂降解后形成的糖脂葡糖脑苷脂。如果GCB水解不充分，则葡糖脑苷脂能在巨噬细胞（戈谢细胞）中积累，导致贫血、血小板减少、器官肥大和严重的骨骼问题。

[0223] 戈谢病有几种类型，包括1型、2型和3型戈谢病，可由于GCB基因的不同突变而引起。能对戈谢病患者施以“治疗有效量的”hmGCB，即足以治疗戈谢病的hmGCB的剂量。术语“治疗”在此使用时是指减少或抑制戈谢病的一种或多种症状。I型戈谢病的症状包括：骨骼并发症，如骨痛、骨损伤、骨质减少、骨坏死、无血管性坏死和病理性骨折；贫血；肝脾肿大；脾节结和肝功能障碍；血小板减少；和/或生长和青春期发育延迟。II型戈谢病的症状包括I型戈谢病的症状，以及颈强直、冷漠、紧张、斜视、深反射和喉痉挛增强。III型戈谢病的症状除了发作较轻和较晚外类似于II型戈谢病。

[0224] 治疗有效量的hmGCB可根据个体确定，至少部分地基于患者体重、使用的药剂、使用的施用系统的类型、相对于疾病严重程度的施用时间，以及是使用单剂量、多剂量还是控释剂量方案。优选地，足以治疗戈谢病的hmGCB的剂量低于人组织产生的或人胎盘产生的GCB的量，或细胞体外产生、然后修饰暴露核心甘露糖残基的GCB。

[0225] 其它溶酶体贮积病的治疗

[0226] 此处所述的本发明一般能用来生产可导向在表面表达甘露糖受体的任何细胞的蛋白质。因此，此处所述的本发明能用来治疗希望向甘露糖受体表达细胞导向一种治疗蛋白质的任何疾病。例如，此处所述的本发明也能用于其它溶酶体贮积酶和其它溶酶体贮积病，其中细胞（如网状内皮来源的细胞）积累来消化的底物。网状内皮细胞包括肝脏中的巨噬细胞、枯否细胞和脾中的组织细胞。这些溶酶体贮积病包括但不限于法韦尔病和Neimann-Pick病。

[0227] 法韦尔病是一种常染色体隐性溶酶体贮积病，其特征在于酸性神经酰胺酶缺陷。神经酰胺酶是引起神经酰胺降解的酶。如果神经酰胺降解不充分，则神经酰胺积累，导致肉芽肿形减和组织细胞反应(Moser，H.W. 神经酰胺酶缺陷：法韦尔脂肪肉芽肿症；于：《遗传病的代谢与分子基础》(C.R.Scriver，A.L.Beaudet，W.S.Sly和D.Valle编写)，第7版，2589-2599页，McGraw-Hill Inc.，纽约(1995))。

[0228] 法韦尔病有几种类型，包括I型、2型、3型、4型和5型法韦尔病，它们在严重程度和主要组织参与部位上不同。也有6型和7型法韦尔病。能对法韦尔病患者施以高甘露糖酸性神经酰胺酶，以治疗（即缓解或减少）该疾病的至少一种症状。1型法韦尔病的症状包括：关节（特别是指骨间、掌、踝、腕、膝和肘关节）肿胀，与患处关节有关的和压点上可触及的结节，可发展为失声的嘶叫，进食和呼吸困难，体重增加较差和间歇性发热。这些症状一般在2周和4个月大之间发生。2型和3型法韦尔病的症状包括：皮下结节、关节变形和累及喉。这些患者比1型法韦尔病患者存活期长。5型法韦尔病的症状包括从1到2.5岁时开始的精神运动性退化。

[0229] A型和B型Neimann-Pick病是常染色体隐性溶酶体贮积病，其特征在于酸性鞘磷脂酶缺陷。酸性鞘磷脂酶是一种引起鞘磷脂降解的酶。如果鞘磷脂酶缺陷，鞘磷脂和其它脂类能在单核细胞-巨噬细胞系统中积累(Schuman，E.H. 和Desnick，R.J.A型和B

型 Neimann-Pick 病 :酸性鞘磷脂酶缺陷 ;于 :《遗传病的代谢与分子基础》(C.R.Scriver, A.L.Beaudet, W.S.Sly 和 D.Valle 编写),第 7 版,2589-2599 页, McGraw-Hill Inc.,纽约 (1995))。

[0230] Neimann-Pick 病有几种类型,包括 A 型和 B 型。能对 Neimann-Pick 病患者施以高甘露糖酸性鞘磷脂酶,以治疗 (即缓解或减少) 该病的至少一种症状。A 型 Neimann-Pick 病的症状包括 :脾和肝增大、淋巴结病、小细胞性贫血、血小板计数减少、张力减退、肌无力、精神运动性阻抑。B 型 Neimann-Pick 病的症状包括 :肝和 / 或脾增大、肝脾肿大 (heptosplenomegaly) ;肺损伤。

[0231] 因此,高甘露糖溶酶体贮积酶如高甘露糖酸性神经酰胺酶或高甘露糖酸性鞘磷脂酶能用此处所述的方法产生,以便将这些蛋白质导向甘露糖受体表达细胞。

实施例

[0232] 在使用表达 Gene-Activated™ GCB(GA-GCB) 的 HT-1080 细胞的实验中,细胞用浓度为 0.1-2μg/mL 的 kifunensine 或苦马豆素处理。

[0233] kifunensine 或苦马豆素对 GA-GCB 糖型 (glycoform) 的作用

[0234] 将产生 GA-GCB 的 HT-1080 细胞一式两份接种于 6 孔板上,并将生产培养基调节为以下的 kifunensine 或苦马豆素浓度 :0(无药物)、0.1、0.25、0.5、1 和 2μg/mL。收获培养基,每 24 小时重新补充细胞共三天。对第三天的样品进行等电聚焦 (IEF) 分析。通过 IEF 分析显示 lifunensine 和苦马豆素对 GA-GCB 的分子电荷的影响。对于这两种药物,都观察到表观等电点 (pI) 的浓度依赖的提高,在最高测试浓度 (2μg/ml) 时, kifunensine 比苦马豆素引起更大的 pI 迁移。

[0235] kifunensine 或苦马豆素对 GA-GCB 产生的影响

[0236] 10 个摇瓶 (每个表面积 1700cm^2) 的生长培养基 (含 10%小牛血清的 DMEM) 中接种产生 GA-GCB 的 HT-1080 细胞。在生长两周后,吸出培养基,向三组摇瓶中加入新鲜生产培养基 (DMEM/F12,0%小牛血清)。两组 4 只摇瓶用 1μg/mL kifunensine 或苦马豆素处理。第三组两只摇瓶不接受药物处理。大约 24 小时后,从每个摇瓶中收获培养基,合并,对样品进行 GA-GCB 酶活性分析。这一步骤重复 7 天。对于所有摇瓶,在 7 种日收获物中都观察到 GA-GCB 的稳定产生 (表 1)。然而,酶的绝对水平因药物处理组而不同,在 7 种收获物中观察到以下平均 GA-GCB 产生水平 :38.3±3.5mg/L(对照,未药物处理)、24.5±4.0mg/L(苦马豆素,1μg/ml) 和 21.3±2.8mg/L(kifunensine,1μg/ml)。因此,这两种药物都导致稳定的、但是较低的产生水平, kifunensine 见到最大降低 (与对照相比降低 44%)。

[0237] 表 1. 甘露糖苷酶抑制剂处理的细胞中葡糖脑苷脂酶的摇瓶生产

[0238]

处理	葡糖脑苷脂酶[a]活性([b]mg/升)							
	收获物 1	收获物 2	收获物 3	收获物 4	收获物 5	收获物 6	收获物 7	平均值± 标准差
不加入药物	35.8	36.6	44.9	40.5	34.6	38.3	37.2	38.3±3.5
苦马豆素(1μg/ml)	28.6	17.4	28.5	27.0	22.9	25.0	22.3	24.5±4.0
Kifunensine (1μg/ml)	26.0	22.9	17.7	21.2	18.4	21.0	22.0	21.3±2.8

[0239] [a] 测定如下进行：待测物质与酶底物（4- 甲基伞形基 - β -D- 吡喃葡糖苷）混合，在 37℃下温育 1 小时。加入 NaOH/ 甘氨酸缓冲液终止反应。用荧光分光光度计定量荧光。

[0240] [b] 比活性：2500 单位 /mg。一单位定义为在 37℃下 1 小时内转化 1μ 摩尔底物。

[0241] kifunensine 或苦马豆素对巨噬细胞摄取 GA-GCB 的影响

[0242] 在体外试验中用 HT-1080 细胞产生的 GA-GCB 测定小鼠巨噬细胞细胞系的摄取效率。该实验的具体目标是测定小鼠 J774E 细胞中 GA-GCB 的绝对和甘露糖受体特异的摄取。测定前一天，将 J774E 细胞以 50000 细胞 /cm^2 平板接种于 12 孔板的生长培养基中。为了测定，向细胞加入 0.5mL 含 50nM 维生素 D3(1,2-5, 二羟基维生素 D3) 的生产培养基 (DMEM/F12,0％小牛血清）。在 2μg/mL 甘露聚糖（甘露糖受体的一种竞争剂）的存在或不存在下，向测试孔中加入未纯化的 GA-GCB（来自收获物 4，表 1），至终浓度为 10μg/mL。使用三种不同形式的 GA-GCB：来自 kifunensine(1μg/mL) 处理的细胞的 GA-GCB，来自苦马豆素 (1μg/mL) 处理的细胞的 GA-GCB，来自未处理的细胞的 GA-GCB(1μg/mL)。对照细胞不接受 GA-GCB。孔在 37℃下温育 4 小时，然后用缓冲盐水充分洗涤，刮到 GA-GCB 酶反应缓冲液中，经过 2 次冻 / 融循环，离心澄清。然后定量测定上清液的酶活性和总蛋白。GA-GCB 向小鼠 J774E 细胞中的内化在表 2 中显示，以单位 /mg 细胞裂解物报告。结果证明，来自 kifunensine 处理的细胞的 GA-GCB 的摄取比背景高 14 倍，可被甘露聚糖抑制 73％，而来自苦马豆素处理的细胞的 GA-GCB 比背景高 7 倍，可被甘露聚糖抑制 67％。另外，也证明来自未处理的细胞的 GA-GCB 比背景约高 3 倍，可被甘露聚糖抑制 53％。因此，kifunensine 或苦马豆素对胞内甘露糖苷酶的抑制产生能通过甘露糖受体有效转运到细胞中的 GA-GCB，kifunensine 引起比苦马豆素约高 2 倍的摄取。因此通过在 kifunensine 或苦马豆素存在下生产 GA-GCB，能优化 GA-GCB 通过甘露糖受体向细胞导向的提高。

[0243] 表 2. 葡糖脑苷脂酶向 J774E 细胞中的内化。甘露糖苷酶抑制剂处理的细胞产生的葡糖脑苷脂酶。

[0244]

[b]样品	[a]葡糖脑苷脂酶活性 (单位/mg 细胞裂解物)		抑制 (%)
	绝对值	背景修正值	
背景(不加入 GA-GCB)	655	0	-
来自未处理细胞的 GA-GCB+甘露聚糖	2816	2161	-
	1678	1023	53
来自 kifunensine 处理的细胞的 GA-GCB+甘露聚糖	9185	8530	-
	2977	2322	73
来自苦马豆素处理的细胞的 GA-GCB+甘露聚糖	4787	4132	-
	2036	1381	67

[0245] [a] 测定如下进行：样品与酶底物(4-甲基伞形基-β-D-吡喃葡糖苷)混合，在37℃下温育1小时。加入NaOH/甘氨酸缓冲液终止反应。用荧光分光光度计定量荧光。冻/融细胞裂解物中的总蛋白用二金鸡宁酸(BCA)测定。活性报告为单位/mg总蛋白。一单位定义为在37℃下1小时内转化1μ摩尔底物。

[0246] [b] 药物处理的细胞在甘露聚糖(2μg/mL)存在或不存在下接受1μg/mL kifunensine或苦马豆素。

[0247] hmGCB的纯化和表征

[0248] 从在浓度为2μg/ml的kifunensine存在下生长的人成纤维细胞的培养基中纯化hmGCB。hmGCB上存在的4个N连接的聚糖用肽N-糖苷酶F释放，用Sep-pak C18柱纯化。在5%乙酸级分中洗脱的寡糖用氢氧化钠和甲基碘化物预甲基化，溶解于甲醇：水(80：20)中，预甲基化的聚糖混合物部分用基质辅助的激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF-MS)分析。用Voyager STR Biospectrometry Research Station激光解吸质谱仪结合使用2,5-二羟基苯甲酸基质的延迟提取分析样品。在m/z 1500-2500范围内见到假分子离子模式，表明存在$Man_5GlcNAc_2$到$Man_9GlcNAc_2$的高甘露糖聚糖。

[0249] 表3. MALDI-TOF-MS分析kifunensine处理细胞的hmGCB的N-聚糖获得的数据概表

[0250]

M/Z	峰成分	总聚糖的近似%
1580	$Man_5GlcNAc_2$	1.3
1730 1752 1784	$Man_6GlcNAc_2$	11.2
1934 1957 1988	$Man_7GlcNAc_2$	23.3
2139 2161 2192	$Man_8GlcNAc_2$	32.0
2343 2365 2397	$Man_9GlcNAc_2$	31.2
2969	二天线复合物	1.0

[0251] 存在的最丰富的高甘露糖聚糖是 $Man_9GlcNAc_2$ 和 $Man_8GlcNAc_2$，$Man_7GlcNAc_2$、$Man_6GlcNAc_2$ 和 $Man_5GlcNAc_2$ 的丰度降低。发现有痕量的含两个唾液酸残基的岩藻糖二天线复合聚糖。通过测量峰高获得每种聚糖的相对丰度的近似指标。见表 3。对高甘露糖聚糖平均链长的更精确的估计通过 MALDI-TOF-MS 分析完整糖蛋白获得。由于聚糖链的同质性在 m/z 62483.1 处获得顶点。由氨基酸序列计算的成熟肽的质量为 55577.6，表明 4 个 N-连接的聚糖链为 hmGCB 的总质量贡献了 6905.5。根据这一数字，能计算平均聚糖长度为 8.15 个甘露糖残基。

[0252] 此处引用的所有专利和参考文献均完整引用作为参考。

[0253] 其它实施方案在下列权利要求书中。

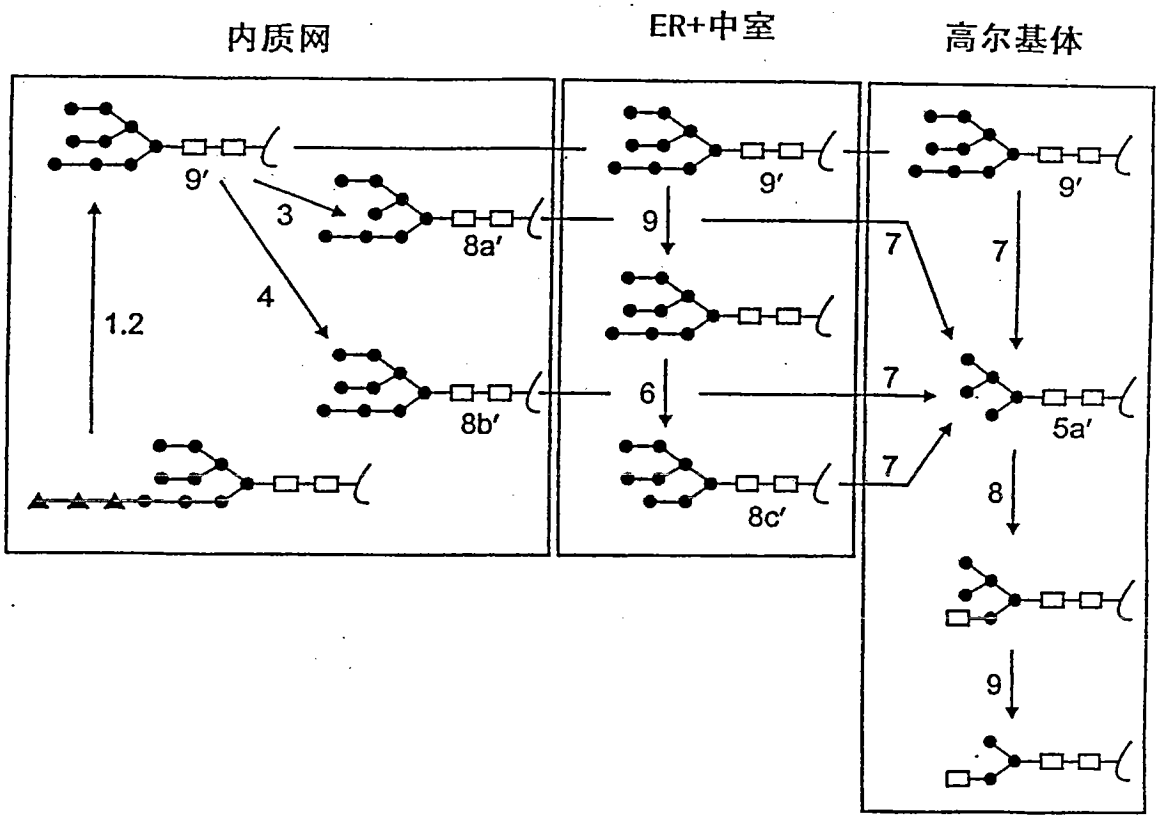


图 1