

明 細 書

発明の名称： α -N-アセチルグルコサミニダーゼの変異体

技術分野

[0001] 本発明は、ヒト α -N-アセチルグルコサミニダーゼ (hNAGLU) の変異体に関し、詳しくは、hNAGLUのアミノ酸配列に変異を加えることにより、hNAGLUをコードする遺伝子を導入した宿主細胞におけるhNAGLUの発現量を、野生型hNAGLUをコードする遺伝子を導入した場合と比較して高めることのできる、新規なhNAGLU変異体に関する。

背景技術

[0002] リソソーム病の一種であるムコ多糖症IIIB型 (MPS-IIIB) は、サンフィリポ症候群B型としても知られ、リソソーム内においてグリコサミノグリカン (GAG) の一種であるヘパラン硫酸 (HS) の分解に必要となる酵素 α -N-アセチルグルコサミニダーゼ (NAGLU) の遺伝子異常に伴う、酵素活性低下又は欠損により発症する遺伝病である。重症例の場合、脳を含めた様々な臓器へのHSの蓄積により認知機能低下、行動障害などの深刻な神経障害や組織障害を2歳から6歳頃に発現し、多動等の行動上の問題及び精神発達遅滞が認められる。そして中枢神経変性症状の急速な進行に伴う重度の精神遅滞、及び運動疾患が認められ、7～8歳までに言語能力は消失する。10歳代になると、睡眠障害、肝脾腫、痙攣発作が見られ、運動不能で寝たきりとなり、多くは20歳代頃に呼吸器感染症等で死亡する。

[0003] サンフィリポ症候群B型患者において不足もしくは欠損している酵素を補充するために、酵素補充療法が行われている。酵素 α -N-アセチルグルコサミニダーゼ (NAGLU) は、ヘパラン硫酸の非還元末端 α -N-アセチルグルコサミン残基を加水分解する反応を触媒する作用を持ち、患者に投与されることで患者体内のリソソームにおいて蓄積したHSを分解することができる。

[0004] 野生型ヒトNAGLU (hNAGLU) をコードする遺伝子は、1995年において単離されている (特許文献1)。酵素補充療法に用いられるhNAGLUは、これを

コードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターで形質転換させた細胞を用いて生産される、組換えhNAGLUである。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2000-500972号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、hNAGLUのアミノ酸配列に変異を加えることにより、hNAGLUをコードする遺伝子を導入した宿主細胞におけるhNAGLUの発現量を、野生型hNAGLUをコードする遺伝子を導入した場合に比べて高めることのできる、新規なhNAGLU変異体を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 上記目的に向けた研究において、本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、本明細書において詳述する、hNAGLUのアミノ酸配列を改変することにより得られるhNAGLU変異体をコードする遺伝子を導入した宿主細胞が、野生型hNAGLUをコードする遺伝子を導入した宿主細胞に比較してより多くのhNAGLUを発現することを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は以下を含むものである。

1. 下記の(1)～(7)からなる群から選択されるヒト α -N-アセチルグルコサミニダーゼ(hNAGLU)の変異体：

(1) 配列番号1で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中36位のリシンがグルタミン酸に、かつ37位のプロリンがセリンに、それぞれ置換された配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するもの；

(2) 配列番号1で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するもの；

(3) 配列番号1で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位のグル

タミンがアルギニンに置換された配列番号 9 で示されるアミノ酸配列を有するもの；

(4) 配列番号 1 で示される野生型の hNAGLU のアミノ酸配列中 228 位のグルタミン酸がリシンに置換された配列番号 11 で示されるアミノ酸配列を有するもの；

(5) 配列番号 1 で示される野生型の hNAGLU のアミノ酸配列中 320 位のトレオニンがプロリンに、かつ 321 位のグルタミン酸がアスパラギン酸に、それぞれ置換された配列番号 15 で示されるアミノ酸配列を有するもの；

(6) 配列番号 1 で示される野生型の hNAGLU のアミノ酸配列中 505 位のセリンがアラニンに、かつ 506 位のイソロイシンがバリンに、それぞれ置換された配列番号 17 で示されるアミノ酸配列を有するもの；及び

(7) 配列番号 1 で示される野生型の hNAGLU のアミノ酸配列中 526 位のセリンがアスパラギンに、かつ 528 位のアラニンがトレオニンに、それぞれ置換された配列番号 19 で示されるアミノ酸配列を有するもの。

2. 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を有する上記 1 の hNAGLU 変異体に、該アミノ酸配列の 36 位のグルタミン酸及び 37 位のセリンを保存しつつ、変異が加えられた hNAGLU 変異体であって、以下の (1' - a) ~ (1' - h) からなる群から選択されるもの：

(1' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10 個であり、1 ~ 5 個であり、又は 1 ~ 3 個であり、例えば、1 個又は 2 個であるもの；

(1' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10 個であり、1 ~ 5 個であり、又は 1 ~ 3 個であり、例えば、1 個又は 2 個であるもの；

(1' - c) 上記 1' - a の置換と 1' - b の欠失を組み合わせたもの；

(1' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列の N 末端側若しくは C 末端側に、1 個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加

されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1' - e) 上記1' - aの置換と1' - dの付加を組み合わせたもの；

(1' - f) 上記1' - bの欠失と1' - dの付加を組み合わせたもの；

(1' - g) 上記1' - aの置換と、1' - bの欠失と及び1' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(1' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

3. 配列番号5で示されるアミノ酸配列を有する上記1のhNAGLU変異体(1)に、該アミノ酸配列の45位のセリンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、以下の(2' - a)～(2' - h)からなる群から選択されるもの：

(2' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(2' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(2' - c) 上記2' - aの置換と2' - bの欠失を組み合わせたもの；

(2' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(2' - e) 上記2' - aの置換と2' - dの付加を組み合わせたもの；

(2' - f) 上記2' - bの欠失と2' - dの付加を組み合わせたもの；

(2' - g) 上記2' - aの置換と、2' - bの欠失と及び2' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(2' - h) 該アミノ酸配列と80%以上, 85%以上, 90%以上, 95%以上の同一性, 98%以上, 又は99%の同一性を示すもの。

4. 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有する上記1のhNAGLU変異体に, 該アミノ酸配列の209位のアルギニンを保存しつつ, 変異が加えられたhNAGLU変異体であって, 以下の(3' - a) ~ (3' - h) からなる群から選択されるもの:

(3' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり, 置換されたアミノ酸残基の個数が, 1~10個であり, 1~5個であり, 又は1~3個であり, 例えば, 1個又は2個であるもの;

(3' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり, 欠失されたアミノ酸残基の個数が, 1~10個であり, 1~5個であり, 又は1~3個であり, 例えば, 1個又は2個であるもの;

(3' - c) 上記3' - aの置換と3' - bの欠失を組み合わせたもの;

(3' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に, 1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり, 付加されたアミノ酸残基の個数が, 1~10個であり, 1~5個であり, 又は1~3個であり, 例えば, 1個又は2個であるもの;

(3' - e) 上記3' - aの置換と3' - dの付加を組み合わせたもの;

(3' - f) 上記3' - bの欠失と3' - dの付加を組み合わせたもの;

(3' - g) 上記3' - aの置換と, 3' - bの欠失と及び3' - dの付加を組み合わせたもの; 及び

(3' - h) 該アミノ酸配列と80%以上, 85%以上, 90%以上, 95%以上の同一性, 98%以上, 又は99%の同一性を示すもの。

5. 配列番号11で示されるアミノ酸配列を有する上記1のhNAGLU変異体に, 該アミノ酸配列の228位のリジンを保存しつつ, 変異が加えられたhNAGLU変異体であって, 以下の(4' - a) ~ (4' - h) からなる群から選択されるもの:

(4' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(4' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(4' - c) 上記4' - aの置換と4' - bの欠失を組み合わせたもの；

(4' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(4' - e) 上記4' - aの置換と4' - dの付加を組み合わせたもの；

(4' - f) 上記4' - bの欠失と4' - dの付加を組み合わせたもの；

(4' - g) 上記4' - aの置換と、4' - bの欠失と及び4' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(4' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

6. 配列番号15で示されるアミノ酸配列を有する上記1のhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の320位のプロリン及び321位のアスパラギン酸を保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、以下の(5' - a)～(5' - h)からなる群から選択されるもの：

(5' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(5' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であ

り、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(5' - c) 上記5' - aの置換と5' - bの欠失を組み合わせたもの；

(5' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(5' - e) 上記5' - aの置換と5' - dの付加を組み合わせたもの；

(5' - f) 上記5' - bの欠失と5' - dの付加を組み合わせたもの；

(5' - g) 上記5' - aの置換と、5' - bの欠失と及び5' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(5' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

7. 配列番号17で示されるアミノ酸配列を有する上記1のhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の505位のアラニン及び506位のバリンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、以下の(6' - a)～(6' - h)からなる群から選択されるもの：

(6' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(6' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(6' - c) 上記6' - aの置換と6' - bの欠失を組み合わせたもの；

(6' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(6' - e) 上記6' - aの置換と6' - dの付加を組み合わせたもの；
(6' - f) 上記6' - bの欠失と6' - dの付加を組み合わせたもの；
(6' - g) 上記6' - aの置換と、6' - bの欠失と及び6' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(6' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

8. 配列番号19で示されるアミノ酸配列を有する上記1のhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の526位のアスパラギン及び528位のトレオニンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、以下の(7' - a) ~ (7' - h) からなる群から選択されるもの：

(7' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1~10個であり、1~5個であり、又は1~3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(7' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1~10個であり、1~5個であり、又は1~3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(7' - c) 上記7' - aの置換と7' - bの欠失を組み合わせたもの；

(7' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1~10個であり、1~5個であり、又は1~3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(7' - e) 上記7' - aの置換と7' - dの付加を組み合わせたもの；

(7' - f) 上記7' - bの欠失と7' - dの付加を組み合わせたもの；

(7' - g) 上記7' - aの置換と、7' - bの欠失と及び7' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(7' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

9. 以下の(8)～(15)からなる群から選択されるものである上記4のhNAGLU変異体:

(8) 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の209位のアルギニンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、36位のリシンがグルタミン酸に、37位のプロリンがセリンに、それぞれ置換された配列番号25で示されるアミノ酸配列を有するもの;

(9) 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の209位のアルギニンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号27で示されるアミノ酸配列を有するもの;

(10) 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の209位のアルギニンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、320位のトレオニンがプロリンに、321位のグルタミン酸がアスパラギン酸に、それぞれ置換された配列番号29で示されるアミノ酸配列を有するもの;

(11) 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の209位のアルギニンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、36位のリシンがグルタミン酸に、37位のプロリンがセリンに、それぞれ置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号31で示されるアミノ酸配列を有するもの;

(12) 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の209位のアルギニンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、54位のバリンがイソロイシンに、620位のアルギニンがリシンに、それぞれ置換された配列番号33で示されるアミノ酸配列を有するもの;

(13) 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の209位のアルギニンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、54位のバリンがイソロイシンに置換され、かつ、44位のロイ

シンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号35で示されるアミノ酸配列を有するもの；

(14) 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の209位のアルギニンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、620位のアルギニンがリシンに置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号37で示されるアミノ酸配列を有するもの；及び

(15) 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の209位のアルギニンを保存しつつ、54位のバリンがイソロイシンに、620位のアルギニンがリシンに、それぞれ置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号39で示されるアミノ酸配列を有するもの。

10. 配列番号25で示されるアミノ酸配列を有する上記9に記載のhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の209位のアルギニン、36位のグルタミン酸、及び37位のセリンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、以下の(8'-a)～(8'-h)からなる群から選択されるもの：

(8'-a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(8'-b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(8'-c) 上記8'-aの置換と8'-bと欠失を組み合わせたもの；

(8'-d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(8' - e) 上記8' - aの置換と8' - dの付加を組み合わせたもの；
(8' - f) 上記8' - bの欠失と8' - dの付加を組み合わせたもの；
(8' - g) 上記8' - aの置換と、8' - bの欠失と及び8' - dの付加を組み合わせたもの；

(8' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

11. 配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する上記9に記載のhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の210位のアルギニン、及び45位のセリンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、以下の(9' - a) ~ (9' - h) からなる群から選択されるもの：

(9' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1~10個であり、1~5個であり、又は1~3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(9' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1~10個であり、1~5個であり、又は1~3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(9' - c) 上記9' - aの置換と9' - bの欠失を組み合わせたもの；

(9' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1~10個であり、1~5個であり、又は1~3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(9' - e) 上記9' - aの置換と9' - dの付加を組み合わせたもの；

(9' - f) 上記9' - bの欠失と9' - dの付加を組み合わせたもの；

(9' - g) 上記9' - aの置換と、9' - bの欠失と及び9' - dの付加を組み合わせたもの；

(9' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

12. 配列番号29で示されるアミノ酸配列を有する上記9に記載のhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の209位のアルギニン、320位のプロリン、及び321位のアスパラギン酸を保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、以下の(10' - a) ~ (10' - h) からなる群から選択されるもの：

(10' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(10' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(10' - c) 上記10' - aの置換と10' - bの欠失を組み合わせたもの；

(10' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(10' - e) 上記10' - aの置換と10' - dの付加を組み合わせたもの；

(10' - f) 上記10' - bの欠失と10' - dの付加を組み合わせたもの；

(10' - g) 上記10' - aの置換と、10' - bの欠失と及び10' - dの付加を組み合わせたもの；

(10' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

13. 配列番号31で示されるアミノ酸配列を有する上記9に記載のhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の210位のアルギニン、36位のグルタミン酸、37位のセリン、及び45位のセリンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体

であって、以下の(1 1' - a) ~ (1 1' - h) からなる群から選択されるもの：

(1 1' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1 1' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1 1' - c) 上記1 1' - aの置換と1 1' - bの欠失を組み合わせたもの；

(1 1' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1 1' - e) 上記1 1' - aの置換と1 1' - dの付加を組み合わせたもの；

(1 1' - f) 上記1 1' - bの欠失と1 1' - dの付加を組み合わせたもの；

(1 1' - g) 上記1 1' - aの置換と、1 1' - bの欠失と及び1 1' - dの付加を組み合わせたもの；

(1 1' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

14. 配列番号33で示されるアミノ酸配列を有する上記9に記載のhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の209位のアルギニン、54位のイソロイシン、及び620位のリシンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、以下の(1 2' - a) ~ (1 2' - h) からなる群から選択されるもの：

(1 2' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残

基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(12' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(12' - c) 上記12' - aの置換と12' - bの欠失を組み合わせたもの；

(12' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(12' - e) 上記12' - aの置換と12' - dの付加を組み合わせたもの；

(12' - f) 上記12' - bの欠失と12' - dの付加を組み合わせたもの；

(12' - g) 上記12' - aの置換と、12' - bの欠失と及び12' - dの付加を組み合わせたもの；

(12' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

15. 配列番号35で示されるアミノ酸配列を有する上記9に記載のhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の210位のアルギニン、55位のイソロイシン、及び45位のセリンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、以下の(13' - a)～(13' - h)からなる群から選択されるもの：

(13' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(13' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(13' - c) 上記13' - aの置換と13' - bの欠失を組み合わせたもの；

(13' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(13' - e) 上記13' - aの置換と13' - dの付加を組み合わせたもの；

(13' - f) 上記13' - bの欠失と13' - dの付加を組み合わせたもの；

(13' - g) 上記13' - aの置換と、13' - bの欠失と及び13' - dの付加を組み合わせたもの；

(13' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

16. 配列番号37で示されるアミノ酸配列を有する上記9に記載のhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の210位のアルギニン、621位のリシン、及び45位のセリンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、以下の(14' - a)～(14' - h)からなる群から選択されるもの：

(14' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(14' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(14' - c) 上記14' - aの置換と14' - bの欠失を組み合わせたもの；

(14' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(14' - e) 上記14' - aの置換と14' - dの付加を組み合わせたもの；

(14' - f) 上記14' - bの欠失と14' - dの付加を組み合わせたもの；

(14' - g) 上記14' - aの置換と、14' - bの欠失と及び14' - dの付加を組み合わせたもの；

(14' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

17. 配列番号39で示されるアミノ酸配列を有する上記9に記載のhNAGLU変異体に、該アミノ酸配列の210位のアルギニン、55位のイソロイシン、621位のリシン、及び45位のセリンを保存しつつ、変異が加えられたhNAGLU変異体であって、以下の(15' - a)～(15' - h)からなる群から選択されるもの：

(15' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換されたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(15' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失されたものであり、欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(15' - c) 上記15' - aの置換と15' - bの欠失を組み合わせたもの；

(15' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(15' - e) 上記15' - aの置換と15' - dの付加を組み合わせたもの；

(15' - f) 上記15' - bの欠失と15' - dの付加を組み合わせたもの；

(15' - g) 上記15' - aの置換と、15' - bの欠失と及び15' - dの付加を組み合わせたもの；

(15' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

18. 上記1～17の何れかのhNAGLU変異体をコードする遺伝子を含んでなるDNA。

19. 上記18のDNAを含んでなる発現ベクター。

20. 上記19の発現ベクターで形質転換された哺乳動物細胞。

21. 上記20の哺乳動物細胞を無血清培地で培養するステップを含む、hNAGLU変異体の製造方法。

22. 上記1～17の何れかに記載のhNAGLU変異体と、抗体との融合蛋白質であって、該抗体が脳血管内皮細胞上の受容体と結合することにより、該融合蛋白質が血液脳関門(BBB)を通過することのできるものである、融合蛋白質。

23. 該脳血管内皮細胞上の受容体が、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、レプチン受容体、リポタンパク質受容体、及びIGF受容体からなる群から選択されるものである、上記22に記載の融合蛋白質。

24. 該脳血管内皮細胞上の受容体が、トランスフェリン受容体である、上記22に記載の融合蛋白質。

25. 該抗体が、Fab抗体、F(ab')₂抗体、F(ab')₂抗体、単一

ドメイン抗体，一本鎖抗体，又はFc抗体の何れかである，上記22～24の何れかに記載の融合蛋白質。

26．該hNAGLU変異体が，該抗体の軽鎖のC末端側若しくはN末端側の何れかに結合しているものである，上記22～25の何れか一項に記載の融合蛋白質。

27．該hNAGLU変異体が，該抗体の重鎖のC末端側若しくはN末端側の何れかに結合しているものである，上記22～25の何れか一項に記載の融合蛋白質。

28．該hNAGLU変異体が，該抗体の軽鎖のC末端側若しくはN末端側の何れか，又は重鎖のC末端側若しくはN末端側の何れかに，リンカー配列を介して結合しているものである，上記22～27の何れか一項に記載の融合蛋白質。

29．該リンカー配列が，1～50個のアミノ酸残基からなるものである，上記28に記載の融合蛋白質。

30．該リンカー配列が，1個のグリシン，1個のセリン，アミノ酸配列Gly-Ser，アミノ酸配列Ser-Ser，アミノ酸配列Gly-Gly-Ser，配列番号3のアミノ酸配列，配列番号4のアミノ酸配列，配列番号5のアミノ酸配列，及びこれらのアミノ酸配列が1～10個連続してなるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含んでなるものである，上記29に記載の融合蛋白質。

31．上記22～30の何れかに記載の融合蛋白質をコードする遺伝子を含んでなるDNA。

32．上記31に記載のDNAを含んでなる発現ベクター。

33．上記32に記載の発現ベクターで形質転換された哺乳動物細胞。

34．上記33に記載の哺乳動物細胞を無血清培地で培養するステップを含む，hNAGLU変異体と抗体との融合蛋白質の製造方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば，ムコ多糖症IIIB型の患者の治療のため，酵素補充療法と

して投与されることの可能なhNAGLUを、遺伝子組換え技術を用いて効率よく製造することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の確認実験の結果を示す図（実施例6）。棒グラフの縦軸は蛍光強度を示す。（a）は野生型hNAGLU又はhNAGLU変異体に相当するバンドのSDS-pageにおけるパターンを、（b）は野生型hNAGLU又はhNAGLU変異体に相当するバンドのウェスタンブロッティングにおけるパターンを、それぞれ示す。（1）はK36E/P37S hNAGLU変異体、（2）はL44_G45insS hNAGLU変異体、（3）はR129Q hNAGLU変異体、（4）はQ209R hNAGLU変異体、（5）はE228K hNAGLU変異体、（6）はT240V hNAGLU変異体、（7）はT320P/E321D hNAGLU変異体、（8）はS505A/I506V hNAGLU変異体、（9）はS526N/A528T hNAGLU変異体、（10）はD613Q hNAGLU変異体、（11）はH204K hNAGLU変異体、及び（12）は野生型hNAGLU、の発現量のデータをそれぞれ示す。

[図2]バルク細胞によるhNAGLU変異体発現量の確認実験の結果を示す図（実施例10）。棒グラフの縦軸は、それぞれのhNAGLU変異体について、 1×10^6 個の細胞が発現したhNAGLUの酵素活性量（nmol/h/ 10^6 細胞）を示す。（1）はK36E/P37S hNAGLU変異体、（2）はL44_G45insS hNAGLU変異体、（3）はR129Q hNAGLU変異体、（4）はQ209R hNAGLU変異体、（5）はE228K hNAGLU変異体、（6）はT240V hNAGLU変異体、（7）はT320P/E321D hNAGLU変異体、（8）はS505A/I506V hNAGLU変異体、（9）はS526N/A528T hNAGLU変異体、（10）はD613Q hNAGLU変異体、（11）はH204K hNAGLU変異体、及び（12）は野生型hNAGLU、の発現量のデータをそれぞれ示す。（1）～（4）のそれぞれについて測定は4回繰り返し実施し、図にはそれぞれの測定値が示されている。

[図3]一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の確認実験の結果を示す図（実施例16）。棒グラフの縦軸は蛍光強度を示す。（a）は野生型hNAGLU又はhNAGLU変異体に相当するバンドのSDS-pageにおけるパターンを、（b）野生型hNAGLU又はhNAGLU変異体に相当するバンドのウェスタンブロッティングにおけるパターンを、それぞれ示す。（1）は野生型hNAGLU、（2）はQ209R hNAGLU変異体

，(3)はK36E/P37S/Q209R hNAGLU変異体，(4)はL44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体，(5)はQ209R/T320P/E321D hNAGLU変異体，(6)はK36E/P37S/L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体，の発現量のデータをそれぞれ示す。

[図4]一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の確認実験の結果を示す図（実施例16）。棒グラフの縦軸は蛍光強度を示す。(a)は野生型hNAGLU又はhNAGLU変異体に相当するバンドのSDS-pageにおけるパターンを示す。(1)は野生型hNAGLU，(2)はQ209R hNAGLU変異体，(3)はL44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体，(4)はV54I/Q209R/R620K hNAGLU変異体，(5)はL44_G45insS/V54I/Q209R hNAGLU変異体，(6)はL44_G45insS/Q209R/R620K hNAGLU変異体，(7)はL44_G45insS/V54I/Q209R/R620K hNAGLU変異体，(8)は陰性コントロールの発現量のデータをそれぞれ示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本明細書において，単に「ヒト α -N-アセチルグルコサミニダーゼ」又は「hNAGLU」というときは，配列番号1で示される720個のアミノ酸残基からなる通常の野生型のhNAGLUに加え，ヘパラン硫酸を分解することのできる酵素活性を有する等の通常の野生型hNAGLUとしての機能を有するものである限り，配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し，1個又は複数個のアミノ酸残基が，置換，欠失，及び／又は付加（本明細書において，アミノ酸残基の「付加」は，配列の末端又は内部に残基を追加することを意味する。）されたものに相当するhNAGLUの変異体も特に区別することなく包含する。野生型のhNAGLUは，例えば，配列番号2で示される塩基配列を有する遺伝子にコードされる。アミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換する場合，置換するアミノ酸残基の個数は，1～10個であり，1～5個であり，又は1～3個であり，例えば，1個又は2個である。アミノ酸残基を欠失させる場合，欠失させるアミノ酸残基の個数は，1～10個であり，1～5個であり，又は1～3個であり，例えば，1個又は2個である。また，アミノ酸残基を欠失させる場合，N末端のアミノ酸残基を欠失させてもよく，その場合の欠失させるアミノ酸残基の個数は，1～10個であり，1～5個であり，又は1～3個で

あり、例えば、1個又は2個である。また、これらアミノ酸残基の置換と欠失を組み合わせてもよい。

[0011] 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、アミノ酸残基を付加する場合、アミノ酸残基はhNAGLUのアミノ酸配列中に又は当該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加される。このとき付加されるアミノ酸残基の個数は、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個である。また、アミノ酸残基の付加と置換を組み合わせてもよく、アミノ酸残基の付加と欠失を組み合わせてもよく、アミノ酸残基の付加、置換及び欠失を組み合わせてもよい。通常の野生型のhNAGLUは743個のアミノ酸残基からなる前駆体として生合成され、配列番号67で示されるN末端から23個のアミノ酸残基からなるリーダーペプチドが取り除かれてhNAGLUとなる。hNAGLUのN末端側にアミノ酸が付加される場合、当該アミノ酸はリーダーペプチドに由来するものであってもよい。その場合にN末端に付加されるアミノ酸は、アミノ酸が1個の場合はGlyであり、アミノ酸が2個の場合はAla- Glyであり、アミノ酸が2個の場合はAla-Ala- Glyである。

[0012] これらアミノ酸の置換及び欠失、及び付加の3種類の変異のうち、少なくとも2種類の変異を組み合わせ導入したhNAGLUの変異体としては、以下に示す(i)～(iv)があるがこれらに限られるものではない：

(i) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、0～10個のアミノ酸残基の欠失と、0～10個のアミノ酸残基の他のアミノ酸残基への置換と、更に0～10個のアミノ酸残基の付加とを行ってなるアミノ酸配列を有するもの；

(ii) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、0～5個のアミノ酸残基の欠失と、0～5個のアミノ酸残基の他のアミノ酸残基への置換と、更に0～5個のアミノ酸残基の付加とを行ってなるアミノ酸配列を有するもの；

(iii) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、0～3個のアミノ酸残基の欠失と、0～3個のアミノ酸残基の他のアミノ酸残基への置換と、更

に0～3個のアミノ酸残基の付加とを行ってなるアミノ酸配列を有するもの
；

(iv) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、0～2個のアミノ酸残基の欠失と、0～2個のアミノ酸残基の他のアミノ酸残基への置換と、更に0～2個のアミノ酸残基の付加とを行ってなるアミノ酸配列を有するもの。

[0013] 上記の野生型又は変異型のhNAGLUであって、これを構成するアミノ酸が糖鎖により修飾されたものもhNAGLUである。また、上記の野生型又は変異型のhNAGLUであって、これを構成するアミノ酸がリン酸により修飾されたものもhNAGLUである。また、糖鎖及びリン酸以外のものにより修飾されたものもhNAGLUである。また、上記の野生型又は変異型のhNAGLUであって、これを構成するアミノ酸の側鎖が、置換反応等により変換したものもhNAGLUである。かかる変換としては、システイン残基のホルミルグリシンへの変換があるが、これに限られるものではない。

[0014] つまり、糖鎖により修飾されたhNAGLUは、当該修飾される前のアミノ酸配列を有するhNAGLUに含まれるものとする。また、リン酸により修飾されたhNAGLUは、リン酸により修飾される前の元のアミノ酸配列を有するhNAGLUに含まれるものとする。また、糖鎖及びリン酸以外のものにより修飾されたものも、当該修飾される前の元のアミノ酸配列を有するhNAGLUに含まれるものとする。また、hNAGLUを構成するアミノ酸の側鎖が、置換反応等により変換したものも、当該変換される前の元のアミノ酸配列を有するhNAGLUに含まれるものとする。かかる変換としては、システイン残基のホルミルグリシンへの変換があるが、これに限られるものではない。

[0015] 本発明において、「ヒト α -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異体」(hNAGLU変異体)の語は、通常の野生型hNAGLUのアミノ酸配列(配列番号1で示されるアミノ酸配列)に対し、1個又は複数個のアミノ酸残基が、置換、欠失、及び／又は付加(本明細書において、アミノ酸残基の「付加」は、配列の末端又は内部に残基を追加することを意味する。)されたものであり、且つ、ヘパラン硫酸を分解することのできる酵素活性を有する等の通常の野生型h

NAGLUとしての機能を有するものである。本発明において好ましいhNAGLU変異体は、配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、1個又は複数個のアミノ酸残基が、他のアミノ酸残基へ置換され、欠失し、或いは付加されたアミノ酸配列であるものを含む。当該アミノ酸配列中のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換する場合、置換するアミノ酸残基の個数は、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又2個である。アミノ酸残基を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸残基の個数は、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又2個である。また、hNAGLU変異体は、これらアミノ酸残基の置換と欠失を組み合わせたものであってもよい。

[0016] 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、アミノ酸残基を付加する場合、アミノ酸残基はhNAGLUのアミノ酸配列中に又は当該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加される。このとき付加されるアミノ酸残基の個数は、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個である。また、アミノ酸残基の付加と置換を組み合わせてもよく、アミノ酸残基の付加と欠失を組み合わせてもよく、アミノ酸残基の付加、置換及び欠失を組み合わせてもよい。即ち、hNAGLU変異体は、配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、アミノ酸の置換及び欠失、及び付加の3種類の変異のうち、少なくとも2種類の変異を組み合わせて導入したものである。

[0017] これらアミノ酸の置換及び欠失、及び付加の3種類の変異のうち、少なくとも2種類の変異を組み合わせて導入したhNAGLUの変異体としては、以下に示す(i)～(iv)があるがこれらに限られるものではない：

(i) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、0～10個のアミノ酸残基の欠失と、0～10個のアミノ酸残基の他のアミノ酸残基への置換と、更に0～10個のアミノ酸残基の付加とを行ってなるアミノ酸配列を有するもの(但し野生型のhNAGLUは除く)；

(ii) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、0～5個のアミノ酸残

基の欠失と、0～5個のアミノ酸残基の他のアミノ酸残基への置換と、更に0～5個のアミノ酸残基の付加とを行ってなるアミノ酸配列を有するもの（但し野生型のhNAGLUは除く）；

（i i i）配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、0～3個のアミノ酸残基の欠失と、0～3個のアミノ酸残基の他のアミノ酸残基への置換と、更に0～3個のアミノ酸残基の付加とを行ってなるアミノ酸配列を有するもの（但し野生型のhNAGLUは除く）；

（i v）配列番号1で示されるアミノ酸配列に対し、0～2個のアミノ酸残基の欠失と、0～2個のアミノ酸残基の他のアミノ酸残基への置換と、更に0～2個のアミノ酸残基の付加とを行ってなるアミノ酸配列を有するもの（但し野生型のhNAGLUは除く）。

[0018] 種々のhNAGLU変異体における通常の野生型hNAGLUと比較したときの各変異の位置及びその形式（欠失、置換、及び付加）は、両hNAGLUのアミノ酸配列のアラインメントにより、容易に確認することができる。

[0019] hNAGLU変異体のアミノ酸配列は、配列番号1で示される通常の野生型hNAGLUのアミノ酸配列と、好ましくは80%以上の同一性を示し、85%以上の同一性を示し、90%以上の同一性を示し、又は、95%以上の同一性を示し、例えば、98%以上、又は99%の同一性を示すものである。

[0020] 野生型hNAGLUのアミノ酸配列とhNAGLU変異体のアミノ酸配列との同一性は、周知の相同性計算アルゴリズムを用いて容易に算出することができる。例えば、そのようなアルゴリズムとして、BLAST(Altschul SF. J Mol Biol. 215. 403-10, (1990)), Pearson及びLipmanの類似性検索法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85. 2444 (1988)), Smith及びWatermanの局所相同性アルゴリズム(Adv. Appl. Math. 2. 482-9(1981))等がある。

[0021] 野生型hNAGLU又はhNAGLU変異体のアミノ酸配列中のアミノ酸の他のアミノ酸への置換は、例えば、アミノ酸のそれらの側鎖および化学的性質で関連性のあるアミノ酸ファミリー内で起こるものである。このようなアミノ酸ファミリー内での

置換は、元の蛋白質の機能に大きな変化をもたらさない（即ち、保存的アミノ酸置換である）ことが予測される。かかるアミノ酸ファミリーとしては、例えば以下の（１）～（１２）で示されるものがある：

- （１）酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸、
- （２）塩基性アミノ酸であるヒスチジン、リシン、及びアルギニン
- （３）芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン、
- （４）水酸基を有するアミノ酸（ヒドロキシアミノ酸）であるセリンとトレオニン、
- （５）疎水性アミノ酸であるメチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン、
- （６）中性の親水性アミノ酸であるシステイン、セリン、トレオニン、アスパラギン、及びグルタミン、
- （７）ペプチド鎖の配向に影響するアミノ酸であるグリシンとプロリン、
- （８）アミド型アミノ酸（極性アミノ酸）であるアスパラギンとグルタミン、
- （９）脂肪族アミノ酸である、アラニン、ロイシン、イソロイシン、及びバリン、
- （１０）側鎖の小さいアミノ酸であるアラニン、グリシン、セリン、及びトレオニン、
- （１１）側鎖の特に小さいアミノ酸であるアラニンとグリシン、
- （１２）分岐鎖を有するアミノ酸であるバリン、ロイシン、及びイソロイシン。

[0022] 本発明の一実施形態において、高発現型hNAGLU変異体というときは、組換え蛋白質として宿主細胞で発現させたときに、同一条件で野生型のhNAGLUを組換え蛋白質として宿主細胞で発現させたときと比較して、少なくとも１．１倍以上、１．５倍以上、２倍以上、４倍以上、５倍以上、又は６倍以上、例えば、１．５～４倍、２～５倍、２～８倍等の発現量が得られることを特

徴とするhNAGLU変異体である。ここで同一条件下とは、発現ベクター、宿主細胞、培養条件等が同一であることをいう。

[0023] かかる高発現型hNAGLU変異体の好ましい実施形態として、以下の（１）～（７）が挙げられる：

（１）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中36位のリシンがグルタミン酸に、かつ37位のプロリンがセリンに、それぞれ置換された配列番号３で示されるアミノ酸配列を有するもの、

（２）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号５で示されるアミノ酸配列を有するもの、

（３）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位のグルタミンがアルギニンに置換された配列番号９で示されるアミノ酸配列を有するもの、

（４）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中228位のグルタミン酸がリシンに置換された配列番号１１で示されるアミノ酸配列を有するもの、

（５）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中320位のトレオニンがプロリンに、かつ321位のグルタミン酸がアスパラギン酸に、それぞれ置換された配列番号１５で示されるアミノ酸配列を有するもの、

（６）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中505位のセリンがアラニンに、かつ506位のイソロイシンがバリンに、それぞれ置換された配列番号１７で示されるアミノ酸配列を有するもの、

（７）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中526位のセリンがアスパラギンに、かつ528位のアラニンがトレオニンに、それぞれ置換された配列番号１９で示されるアミノ酸配列を有するもの。

[0024] 更に、かかる高発現型hNAGLU変異体の好ましい実施形態として、以下の（１'）～（７'）が挙げられる。

（１'）配列番号３で示されるアミノ酸配列の36位のグルタミン酸及び37位

のセリンに変異を加えることなく：

(1' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1' - c) 上記1' - aの置換と1' - bの欠失を組み合わせたもの；

(1' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1' - e) 上記1' - aの置換と1' - dの付加を組み合わせたもの；

(1' - f) 上記1' - bの欠失と1' - dの付加を組み合わせたもの；

(1' - g) 上記1' - aの置換と、1' - bの欠失と及び1' - dの付加を組み合わせたもの；

(1' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0025] (2') 配列番号5で示されるアミノ酸配列の45位のセリンに変異を加えることなく：

(2' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(2' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(2' - c) 上記2' - aの置換と2' - bの欠失を組み合わせたもの；

(2' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(2' - e) 上記2' - aの置換と2' - dの付加を組み合わせたもの；

(2' - f) 上記2' - bの欠失と2' - dの付加を組み合わせたもの；

(2' - g) 上記2' - aの置換と、2' - bの欠失と及び2' - dの付加を組み合わせたもの；

(2' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0026] (3') 配列番号9で示されるアミノ酸配列の209位のアルギニンに変異を加えることなく；

(3' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(3' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(3' - c) 上記3' - aの置換と3' - bの欠失を組み合わせたもの；

(3' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(3' - e) 上記3' - aの置換と3' - dの付加を組み合わせたもの；

(3' - f) 上記3' - bの欠失と3' - dの付加を組み合わせたもの；

(3' - g) 上記3' - aの置換と、3' - bの欠失と及び3' - dの付

加を組み合わせたもの；

(3' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0027] (4') 配列番号11で示されるアミノ酸配列の228位のリシンに変異を加えることなく；

(4' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(4' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(4' - c) 上記4' - aの置換と4' - bの欠失を組み合わせたもの；

(4' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(4' - e) 上記4' - aの置換と4' - dの付加を組み合わせたもの；

(4' - f) 上記4' - bの欠失と4' - dの付加を組み合わせたもの；

(4' - g) 上記4' - aの置換と、4' - bの欠失と及び4' - dの付加を組み合わせたもの；

(4' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0028] (5') 配列番号15で示されるアミノ酸配列の320位のプロリン及び321位のアスパラギン酸に変異を加えることなく；

(5' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個である

もの；

(5' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(5' - c) 上記5' - aの置換と5' - bの欠失を組み合わせたもの；

(5' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(5' - e) 上記5' - aの置換と5' - dの付加を組み合わせたもの；

(5' - f) 上記5' - bの欠失と5' - dの付加を組み合わせたもの；

(5' - g) 上記5' - aの置換と、5' - bの欠失と及び5' - dの付加を組み合わせたもの；。

(5' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0029] (6') 配列番号17で示されるアミノ酸配列の505位のアラニン及び506位のバリンに変異を加えることなく；

(6' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(6' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(6' - c) 上記6' - aの置換と6' - bの欠失を組み合わせたもの；

(6' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1

～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(6' - e) 上記6' - aの置換と6' - dの付加を組み合わせたもの；

(6' - f) 上記6' - bの欠失と6' - dの付加を組み合わせたもの；

(6' - g) 上記6' - aの置換と、6' - bの欠失と及び6' - dの付加を組み合わせたもの；

(6' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0030] (7') 配列番号19で示されるアミノ酸配列の526位のアスパラギン及び528位のトレオニンに変異を加えることなく；

(7' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(7' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(7' - c) 上記7' - aの置換と7' - bの欠失を組み合わせたもの；

(7' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(7' - e) 上記7' - aの置換と7' - dの付加を組み合わせたもの；

(7' - f) 上記7' - bの欠失と7' - dの付加を組み合わせたもの；

(7' - g) 上記7' - aの置換と、7' - bの欠失と及び7' - dの付加を組み合わせたもの；

(7' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0031] 上記(1)の配列番号1で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位

のグルタミンがアルギニンに置換された配列番号 9 で示されるアミノ酸配列を有する高発現型hNAGLU変異体に、更に変異を導入した高発現型hNAGLU変異体の具体的な実施形態として、以下の (8) ~ (15) が挙げられる：

(8) 配列番号 1 で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位のグルタミンがアルギニンに、36位のリシンがグルタミン酸に、37位のプロリンがセリンに、それぞれ置換された配列番号 25 で示されるアミノ酸配列を有するもの、

(9) 配列番号 1 で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位のグルタミンがアルギニンに置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号 27 で示されるアミノ酸配列を有するもの、

(10) 配列番号 1 で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位のグルタミンがアルギニンに、320位のトレオニンがプロリンに、321位のグルタミン酸がアスパラギン酸に、それぞれ置換された配列番号 29 で示されるアミノ酸配列を有するもの、

(11) 配列番号 1 で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位のグルタミンがアルギニンに、36位のリシンがグルタミン酸に、37位のプロリンがセリンに、それぞれ置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号 31 で示されるアミノ酸配列を有するもの、

(12) 配列番号 1 で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位のグルタミンがアルギニンに、54位のバリンがイソロイシンに、620位のアルギニンがリシンに、それぞれ置換された配列番号 33 で示されるアミノ酸配列を有するもの、

(13) 配列番号 1 で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位のグルタミンがアルギニンに、54位のバリンがイソロイシンに、それぞれ置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号 35 で示されるアミノ酸配列を有するもの、

(14) 配列番号1で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位のグルタミンがアルギニンに、620位のアルギニンがリシンに、それぞれ置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号37で示されるアミノ酸配列を有するもの、

(15) 配列番号1で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位のグルタミンがアルギニンに、54位のバリンがイソロイシンに、620位のアルギニンがリシンに、それぞれ置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号39で示されるアミノ酸配列を有するもの。

[0032] 更に、かかる高発現型hNAGLU変異体の好ましい実施形態として、以下の(8')～(15')が挙げられる。

[0033] (8') 配列番号25で示されるアミノ酸配列の209位のアルギニン、36位のグルタミン酸、及び37位のセリンに変異を加えることなく：

(8' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(8' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(8' - c) 上記8' - aの置換と8' - bの欠失を組み合わせたもの；

(8' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(8' - e) 上記8' - aの置換と8' - dの付加を組み合わせたもの；

(8' - f) 上記8' - bの欠失と8' - dの付加を組み合わせたもの；

(8' - g) 上記8' - aの置換と、8' - bの欠失と及び8' - dの付

加を組み合わせたもの；

(8' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0034] (9') 配列番号27で示されるアミノ酸配列の210位のアルギニン、及び45位のセリンに変異を加えることなく；

(9' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(9' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(9' - c) 上記9' - aの置換と9' - bの欠失を組み合わせたもの；

(9' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(9' - e) 上記9' - aの置換と9' - dの付加を組み合わせたもの；

(9' - f) 上記9' - bの欠失と9' - dの付加を組み合わせたもの；

(9' - g) 上記9' - aの置換と、9' - bの欠失と及び9' - dの付加を組み合わせたもの；

(9' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0035] (10') 配列番号29で示されるアミノ酸配列の209位のアルギニン、320位のプロリン、及び321位のアスパラギン酸に変異を加えることなく；

(10' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であ

るもの；

(10' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(10' - c) 上記10' - aの置換と10' - bの欠失を組み合わせたもの；

(10' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(10' - e) 上記10' - aの置換と10' - dの付加を組み合わせたもの；

(10' - f) 上記10' - bの欠失と10' - dの付加を組み合わせたもの；

(10' - g) 上記10' - aの置換と、10' - bの欠失と及び10' - dの付加を組み合わせたもの；

(10' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0036] (11') 配列番号31で示されるアミノ酸配列の210位のアルギニン、36位のグルタミン酸、37位のセリン、及び45位のセリンに変異を加えることなく；

(11' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(11' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1 1' - c) 上記 1 1' - a の置換と 1 1' - b の欠失を組み合わせたもの；

(1 1' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列の N 末端側若しくは C 末端側に、1 個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ～ 10 個であり、1 ～ 5 個であり、又は 1 ～ 3 個であり、例えば、1 個又は 2 個であるもの；

(1 1' - e) 上記 1 1' - a の置換と 1 1' - d の付加を組み合わせたもの；

(1 1' - f) 上記 1 1' - b の欠失と 1 1' - d の付加を組み合わせたもの；

(1 1' - g) 上記 1 1' - a の置換と、1 1' - b の欠失と及び 1 1' - d の付加を組み合わせたもの；

(1 1' - h) 該アミノ酸配列と 80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上の同一性、98% 以上、又は 99% の同一性を示すもの。

[0037] (1 2') 配列番号 33 で示されるアミノ酸配列の 209 位のアルギニン、54 位のイソロイシン、及び 620 位のリシンに変異を加えることなく；

(1 2' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ～ 10 個であり、1 ～ 5 個であり、又は 1 ～ 3 個であり、例えば、1 個又は 2 個であるもの；

(1 2' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1 ～ 10 個であり、1 ～ 5 個であり、又は 1 ～ 3 個であり、例えば、1 個又は 2 個であるもの；

(1 2' - c) 上記 1 2' - a の置換と 1 2' - b の欠失を組み合わせたもの；

(1 2' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列の N 末端側若しくは C 末端側に、1 個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ～ 10 個であり、1 ～ 5 個であり、又は

1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1 2' - e) 上記1 2' - aの置換と1 2' - dの付加を組み合わせたもの；

(1 2' - f) 上記1 2' - bの欠失と1 2' - dの付加を組み合わせたもの；

(1 2' - g) 上記1 2' - aの置換と、1 2' - bの欠失と及び1 2' - dの付加を組み合わせたもの；

(1 2' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0038] (1 3') 配列番号35で示されるアミノ酸配列の210位のアルギニン、55位のイソロイシン、及び45位のセリンに変異を加えることなく；

(1 3' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1 3' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1 3' - c) 上記1 3' - aの置換と1 3' - bの欠失を組み合わせたもの；

(1 3' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1 3' - e) 上記1 3' - aの置換と1 3' - dの付加を組み合わせたもの；

(1 3' - f) 上記1 3' - bの欠失と1 3' - dの付加を組み合わせたもの；

(13' - g) 上記13' - aの置換と、13' - bの欠失と及び13' - dの付加を組み合わせたもの；

(13' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0039] (14') 配列番号37で示されるアミノ酸配列の210位のアルギニン、621位のリシン、及び45位のセリンに変異を加えることなく：

(14' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり、置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(14' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり、欠失させたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(14' - c) 上記14' - aの置換と14' - bの欠失を組み合わせたもの；

(14' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(14' - e) 上記14' - aの置換と14' - dの付加を組み合わせたもの；

(14' - f) 上記14' - bの欠失と14' - dの付加を組み合わせたもの；

(14' - g) 上記14' - aの置換と、14' - bの欠失と及び14' - dの付加を組み合わせたもの；

(14' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[0040] (15') 配列番号39で示されるアミノ酸配列の210位のアルギニン、55

位のイソロイシン，621位のリシン，及び45位のセリンに変異を加えることなく：

(15' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換させたものであり，置換されたアミノ酸残基の個数が，1～10個であり，1～5個であり，又は1～3個であり，例えば，1個又は2個であるもの；

(15' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基を欠失させたものであり，欠失させたアミノ酸残基の個数が，1～10個であり，1～5個であり，又は1～3個であり，例えば，1個又は2個であるもの；

(15' - c) 上記15' - aの置換と15' - bの欠失を組み合わせたもの；

(15' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に，1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり，付加されたアミノ酸残基の個数が，1～10個であり，1～5個であり，又は1～3個であり，例えば，1個又は2個であるもの；

(15' - e) 上記15' - aの置換と15' - dの付加を組み合わせたもの；

(15' - f) 上記15' - bの欠失と15' - dの付加を組み合わせたもの；

(15' - g) 上記15' - aの置換と，15' - bの欠失と及び15' - dの付加を組み合わせたもの；

(15' - h) 該アミノ酸配列と80%以上，85%以上，90%以上，95%以上の同一性，98%以上，又は99%の同一性を示すもの。

[0041] 本発明の一実施形態におけるhNAGLU変異体は，組換え蛋白質として宿主細胞で発現させたときに，同一条件下で野生型のhNAGLUを組換え蛋白質として宿主細胞で発現させたときと比較して，発現量が多いことを特徴とするものである。本明細書において，このタイプのhNAGLU変異体を，高発現型hNAGLU変異体という。高発現型hNAGLU変異体は，組換え蛋白質として製造したとき

に、野生型のhNAGLUと比較して生産効率を上昇させることができるので、生産コストを低減することができる。なお、ここで同一条件下とは、発現ベクター、宿主細胞、培養条件等が同一であることをいう。

[0042] 組換え蛋白質として宿主細胞で発現させたときに、野生型のhNAGLUと比較して発現量が上昇するhNAGLU変異体をコードする遺伝子は、例えば、以下の手法で取得できる。変異を導入したhNAGLUと野生型のhNAGLUをコードする遺伝子をそれぞれ同一の種類の発現ベクターに組み込み、これを用いて同一の種類の宿主細胞を形質転換させて、それぞれの発現ベクターが導入された細胞を取得する。次いで、これらの細胞を同一条件下で培養し、培養上清に得られるhNAGLUを定量する。野生型のhNAGLUをコードする遺伝子が導入された細胞の定量値と比較して、大きい定量値を示した細胞に導入された遺伝子が、目的の高発現型hNAGLU変異体をコードする遺伝子として特定される。なお、ここでの定量値として、hNAGLUの蛋白質としての定量値の他に、hNAGLUの酵素活性値を用いることもできる。例えば、定量値として、培養上清に含まれるhNAGLUの酵素活性の総量を用いることもできる。

[0043] 野生型のhNAGLUへの変異の導入は、野生型のhNAGLUをコードする遺伝子にランダムに変異を導入する手法を用いて行うことができる。例えば、野生型のhNAGLUをコードする遺伝子をベクターに組み込み、これを用いて形質転換させた宿主細胞に変異源（放射線、変異原性物質等）を作用させることにより、野生型のhNAGLUをコードする遺伝子に変異を導入することができる。

[0044] 野生型のhNAGLUへの変異の導入は、野生型のhNAGLUをコードする遺伝子の予め定めた箇所に変異を導入する手法を用いて行うこともできる。例えば、予め定めた箇所に変異を有する遺伝子を化学合成することにより、かかる遺伝子変異を導入することができる。

[0045] 高発現型hNAGLU変異体は、当該変異体をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを用いて形質転換させた宿主細胞を培養することにより、組換え蛋白質として製造することができる。

[0046] このとき用いられる宿主細胞は、そのような発現ベクターを導入すること

により高発現型hNAGLU変異体を発現させることができるものである限り特に制限はなく、哺乳動物細胞、酵母、植物細胞、昆虫細胞等の真核生物細胞、大腸菌、枯草菌等の原核細胞の何れであってもよいが、哺乳動物細胞が特に好適である。

- [0047] 哺乳動物細胞を宿主細胞として使用する場合、該哺乳動物細胞の種類について特に限定はないが、ヒト、マウス、チャイニーズハムスター由来の細胞が好ましく、特にチャイニーズハムスター卵巣細胞由来のCHO細胞、又はマウス骨髓腫に由来するNS/O細胞が好ましい。またこのとき高発現型hNAGLU変異体をコードするDNA断片を組み込んで発現させるために用いる発現ベクターは、哺乳動物細胞内に導入したとき該遺伝子の発現をもたらすものであれば特に限定なく用いることができる。発現ベクターに組み込まれた該遺伝子は、哺乳動物細胞内で遺伝子の転写の頻度を調節することができるDNA配列（遺伝子発現制御部位）の下流に配置される。本発明において用いることのできる遺伝子発現制御部位としては、例えば、サイトメガロウイルス由来のプロモーター、SV40初期プロモーター、ヒト伸長因子-1 α （EF-1 α ）プロモーター、ヒトユビキチンCプロモーター等が挙げられる。
- [0048] 目的の蛋白質をコードする遺伝子の下流側に内部リボソーム結合部位（IRES: internal ribosome entry site）を介して、選択マーカーとしてグルタミン合成酵素（GS）を配置した発現ベクターが知られている（国際特許公報WO2012/063799, WO2013/161958）。これら文献に記載された発現ベクターは、高発現型hNAGLU変異体の製造に特に好適に使用することができる。
- [0049] 例えば、目的の蛋白質を発現させるための発現ベクターであって、第1の遺伝子発現制御部位、並びに、その下流に該蛋白質をコードする遺伝子、更に下流に内部リボソーム結合部位、及び更に下流にグルタミン合成酵素をコードする遺伝子を含み、且つ、上記第1の遺伝子発現制御部位の又はこれとは別の第2の遺伝子発現制御部位の下流にジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子

又は薬剤耐性遺伝子を更に含んでなる発現ベクターは、高発現型hNAGLU変異体の製造に好適に使用できる。この発現ベクターにおいて、第1の遺伝子発現制御部位又は第2の遺伝子発現制御部位としては、サイトメガロウイルス由来のプロモーター、SV40初期プロモーター、ヒト伸長因子-1 α プロモーター（hEF-1 α プロモーター）、ヒトユビキチンCプロモーターが好適に用いられるが、hEF-1 α プロモーターが特に好適である。

[0050] また、内部リボソーム結合部位としては、ピコルナウイルス科のウイルス、口蹄疫ウイルス、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、コロナウイルス、ウシ腸内ウイルス、サイラーのネズミ脳脊髄炎ウイルス、コクサッキーB型ウイルスからなる群より選択されるウイルスのゲノム、又はヒト免疫グロブリン重鎖結合蛋白質遺伝子、ショウジョウバエアンテナペディア遺伝子、ショウジョウバエウルトラビトラックス遺伝子からなる群から選択される遺伝子の5'非翻訳領域に由来するものが好適に用いられるが、マウス脳心筋炎ウイルスゲノムの5'非翻訳領域に由来する内部リボソーム結合部位が特に好適である。マウス脳心筋炎ウイルスゲノムの5'非翻訳領域に由来する内部リボソーム結合部位を用いる場合、野生型のもの以外に、野生型の内部リボソーム結合部位に含まれる複数の開始コドンのうちの一部が破壊されたものも好適に使用できる。また、この発現ベクターにおいて、好適に用いられる薬剤耐性遺伝子は、好ましくはピューロマイシン又はネオマイシン耐性遺伝子であり、より好ましくはピューロマイシン耐性遺伝子である。

[0051] また、例えば、目的の蛋白質を発現させるための発現ベクターであって、ヒト伸長因子-1 α プロモーター、その下流に該蛋白質をコードする遺伝子、更に下流にマウス脳心筋炎ウイルスゲノムの5'非翻訳領域に由来する内部リボソーム結合部位、及び更に下流にグルタミン合成酵素をコードする遺伝子を含み、且つ別の遺伝子発現制御部位及びその下流にジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を更に含む発現ベクターであって、該内部リボソーム結合部位が、野生型の内部リボソーム結合部位に含まれる複数の開始コドンのうちの一部が破壊されたものである発現ベクターは、高発現型hNAGLU変異体の製

造に好適に使用できる。このような発現ベクターとして、WO 2013/161958に記載された発現ベクターが挙げられる。

[0052] また、例えば、目的の蛋白質を発現させるための発現ベクターであって、ヒト伸長因子-1 α プロモーター、その下流に該蛋白質をコードする遺伝子、更に下流にマウス脳心筋炎ウイルスゲノムの5' 非翻訳領域に由来する内部リボソーム結合部位、及び更に下流にグルタミン合成酵素をコードする遺伝子を含み、且つ別の遺伝子発現制御部位及びその下流に薬剤耐性遺伝子を更に含む発現ベクターであって、該内部リボソーム結合部位が、野生型の内部リボソーム結合部位に含まれる複数の開始コドンのうちの一部が破壊されたものである発現ベクターは、高発現型hNAGLU変異体の製造に好適に使用できる。このような発現ベクターとして、WO 2012/063799に記載されたpE-mIRES-GS-puro及びWO 2013/161958に記載されたpE-mIRES-GS-mNeoが挙げられる。

[0053] 野生型のマウス脳心筋炎ウイルスゲノムの5' 非翻訳領域に由来する内部リボソーム結合部位の3' 末端には、3つの開始コドン(ATG)が存在している。上記のpE-mIRES-GS-puro及びpE-mIRES-GS-mNeoは、開始コドンのうちの一部が破壊されたIRESを有する発現ベクターである。

[0054] hNAGLU変異体(高発現型hNAGLU変異体を含む)は、これをコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入した宿主細胞を培養することにより、細胞中又は培地中に発現させることができる。哺乳動物細胞が宿主細胞である場合のhNAGLU変異体の発現方法について、以下に詳述する。

[0055] 哺乳動物細胞の培養のための培地としては、哺乳動物細胞を培養して増殖させることのできるものであれば、特に限定なく用いることができるが、好ましくは無血清培地が用いられる。本発明において、組換え蛋白質生産用培地として用いられる無血清培地としては、例えば、アミノ酸を3~700 mg/L、ビタミン類を0.001~50 mg/L、単糖類を0.3~10 g/L、無機塩を0.1~10000 mg/L、微量元素を0.001~0.1 mg/L、ヌクレオシドを0.1~50 mg/L、脂肪酸を0.001~

10 mg/L, ビオチンを0.01~1 mg/L, ヒドロコルチゾンを0.1~20 µg/L, インシュリンを0.1~20 mg/L, ビタミンB12を0.1~10 mg/L, プトレッシンを0.01~1 mg/L, ピルビン酸ナトリウムを10~500 mg/L, 及び水溶性鉄化合物を含有する培地が好適に用いられる。所望により, チミジン, ヒポキサンチン, 慣用のpH指示薬及び抗生物質等を培地に添加してもよい。

[0056] 組換え蛋白質生産用培地として用いられる無血清培地として, DMEM/F12培地(DMEMとF12の混合培地)を基本培地として用いてもよく, これら各培地は当業者に周知である。更にまた, 無血清培地として, 炭酸水素ナトリウム, L-グルタミン, D-グルコース, インスリン, ナトリウムセレナイト, ジアミノブタン, ヒドロコルチゾン, 硫酸鉄(II), アスパラギン, アスパラギン酸, セリン及びポリビニルアルコールを含むものである, DMEM(HG)HAM改良型(R5)培地を使用してもよい。更に市販の無血清培地, 例えば, CD OptiCHO™培地, CHO-S-SFM11培地又はCD CHO培地(Thermo Fisher Scientific社, 旧ライフテクノロジー社), IScho-V™培地(Irvine Scientific社), EX-CELL™302培地又はEX-CELL™325-PF培地(SAFC Biosciences社)等を基本培地として使用することもできる。

[0057] 高発現型hNAGLU変異体は, これをコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入した哺乳動物細胞を上記の無血清培地で培養して組換え蛋白質として発現させたときに, 同一条件で野生型のhNAGLUを組換え蛋白質として発現させたときと比較して, 少なくとも1.1倍以上, 1.5倍以上, 2倍以上, 4倍以上, 5倍以上, 又は6倍以上, 例えば, 1.5~4倍, 2~5倍, 2~8倍等の発現量が得られることを特徴とする。このとき用いられる哺乳動物細胞は, CHO細胞, NS/O細胞等であるが, 特にCHO細胞である。

[0058] hNAGLU変異体をコードする宿主細胞を培養することにより, 細胞内又は培地中に発現した組換えhNAGLU変異体は, カラムクロマトグラフィー等の方法

により不純物から分離し、精製することができる。精製されたhNAGLU変異体は、医薬として使用することができる。特に、hNAGLU変異体は、サンフィリポ症候群B型として知られるムコ多糖症IIIB型（MPS－IIIB）を対象疾患とする医薬として使用することができる。

[0059] hNAGLU変異体を有効成分として含有してなる医薬は、注射剤として静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下又は脳室内に投与することができる。それらの注射剤は、凍結乾燥製剤又は水性液剤として供給することができる。水性液剤とする場合、バイアルに充填した形態としてもよく、注射器に予め充填したものであるプレフィルド型の製剤として供給することもできる。凍結乾燥製剤の場合、使用前に水性媒質に溶解し復元して使用する。

[0060] 本発明の一実施形態におけるhNAGLU変異体は、抗体との結合とすることができる。例えば、本発明の一実施形態におけるhNAGLU変異体は、脳血管内皮細胞上の受容体と特異的に結合することのできる抗体との結合体とすることができる。脳血管内皮細胞上の受容体と特異的に結合することのできる抗体との結合体とすることにより、hNAGLU変異体をして血液脳関門（BBB）を通過させ、中枢神経系（CNS）において機能を発揮させるようにすることができる。そのような脳血管内皮細胞上の受容体としては、例えば、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、レプチン受容体、リポタンパク質受容体、及びIGF受容体等が挙げられるが、これらに限られない。また、当該受容体は好ましくはヒト由来の受容体である。

[0061] 本発明において、「抗体」の語は、主としてヒト抗体、マウス抗体、ヒト化抗体、ラクダ科動物（アルパカを含む）由来の抗体、ヒト抗体と他の哺乳動物の抗体とのキメラ抗体、及びマウス抗体と他の哺乳動物の抗体とのキメラ抗体のことをいうが、特定の抗原に特異的に結合する性質を有するものである限り、これらに限定されるものではなく、また、抗体の動物種にも特に制限はない。

[0062] 本発明において、「ヒト抗体」の語は、その蛋白質全体がヒト由来の遺伝子にコードされている抗体をいう。但し、遺伝子の発現効率を上昇させる等

の目的で、元のヒトの遺伝子に、元のアミノ酸配列に変化を与えることなく変異を加えた遺伝子にコードされる抗体も、「ヒト抗体」に含まれる。また、ヒト抗体をコードする2つ以上の遺伝子を組み合わせて、あるヒト抗体の一部を他のヒト抗体の一部に置き換えて作製した抗体も、「ヒト抗体」である。ヒト抗体は、軽鎖の3箇所の相補性決定領域(CDR)と重鎖の3箇所の相補性決定領域(CDR)を有する。軽鎖の3箇所のCDRは、N末端側にあるものから順にCDR1、CDR2及びCDR3という。重鎖の3箇所のCDRも、N末端側にあるものから順にCDR1、CDR2及びCDR3という。あるヒト抗体のCDRを、その他のヒト抗体のCDRに置き換えることにより、ヒト抗体の抗原特異性、親和性等を改変した抗体も、ヒト抗体に含まれる。

[0063] 本発明において、元のヒト抗体の遺伝子を改変することにより、元の抗体のアミノ酸配列に置換、欠失、付加等の変異を加えた抗体も、「ヒト抗体」に含まれる。元の抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換する場合、置換するアミノ酸の個数は、好ましくは1～20個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個である。元の抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～20個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個である。また、これらアミノ酸の置換と欠失を組み合わせた変異を加えた抗体も、ヒト抗体である。アミノ酸を付加する場合、元の抗体のアミノ酸配列中若しくはN末端又はC末端に、好ましくは1～20個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個のアミノ酸を付加する。これらアミノ酸の付加、置換及び欠失を組み合わせた変異を加えた抗体も、ヒト抗体である。変異を加えた抗体のアミノ酸配列は、元の抗体のアミノ酸配列と、好ましくは80%以上の同一性を示し、より好ましくは90%以上の同一性を示し、更に好ましくは95%以上の同一性を示し、更に好ましくは98%以上の同一性を示す。ヒト抗体に上記の変異を加える場合、当該変異は抗体の可変領域に加えることができる。抗体の可変領域に上記の変異を加える場合、当該変異は可

変領域のCDRとフレームワーク領域の何れに加えてもよいが、特にフレームワーク領域に加えられる。即ち、本発明において「ヒト由来の遺伝子」というときは、ヒト由来の元の遺伝子に加えて、これに改変を加えることにより得られる遺伝子も含まれる。

[0064] 本発明において、「ヒト化抗体」の語は、可変領域の一部（例えば、特にCDRの全部又は一部）のアミノ酸配列がヒト以外の哺乳動物由来であり、それ以外の領域がヒト由来である抗体のことをいう。例えば、ヒト化抗体として、ヒト抗体を構成する軽鎖の3箇所の相補性決定領域（CDR）と重鎖の3箇所の相補性決定領域（CDR）を、他の哺乳動物のCDRに置き換えることによって作製された抗体が挙げられる。ヒト抗体の適切な位置に移植されるCDRの由来となる他の哺乳動物の生物種は、ヒト以外の哺乳動物である限り特に限定はないが、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、又はヒト以外の霊長類であり、より好ましくはマウス及びラットであり、更に好ましくはマウスである。また、元のヒト化抗体のアミノ酸配列に上記のヒト抗体に加えることのできる変異と同様の変異を加えた抗体も、「ヒト化抗体」に含まれる。

[0065] 本発明において、「キメラ抗体」の語は、2つ以上の異なる種に由来する、2つ以上の異なる抗体の断片が連結されてなる抗体のことをいう。

[0066] ヒト抗体と他の哺乳動物の抗体とのキメラ抗体とは、ヒト抗体の一部がヒト以外の哺乳動物の抗体の一部によって置き換えられた抗体である。抗体は、以下に説明するFc領域、Fab領域及びヒンジ部とからなる。このようなキメラ抗体の具体例として、Fc領域がヒト抗体に由来する一方でFab領域が他の哺乳動物の抗体に由来するキメラ抗体が挙げられる。ヒンジ部は、ヒト抗体又は他の哺乳動物の抗体のいずれかに由来する。逆に、Fc領域が他の哺乳動物に由来する一方でFab領域がヒト抗体に由来するキメラ抗体が挙げられる。ヒンジ部は、ヒト抗体又は他の哺乳動物の抗体のいずれかに由来する。

[0067] また、抗体は、可変領域と定常領域とからなるということもできる。キメ

ラ抗体の他の具体例として、重鎖の定常領域（ C_H ）と軽鎖の定常領域（ C_L ）がヒト抗体に由来する一方で、重鎖的可変領域（ V_H ）及び軽鎖的可変領域（ V_L ）が他の哺乳動物の抗体に由来するもの、逆に、重鎖の定常領域（ C_H ）と軽鎖の定常領域（ C_L ）が他の哺乳動物の抗体に由来する一方で、重鎖的可変領域（ V_H ）及び軽鎖的可変領域（ V_L ）がヒト抗体に由来するものも挙げられる。ここで、他の哺乳動物の生物種は、ヒト以外の哺乳動物である限り特に限定はないが、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、又はヒト以外の霊長類であり、例えばマウスである。

[0068] 本発明の一実施形態における抗体は、2本の免疫グロブリン軽鎖（又は単に「軽鎖」）と2本の免疫グロブリン重鎖（又は単に「重鎖」）の計4本のポリペプチド鎖からなる基本構造を有する。但し、本発明において、「抗体」というときは、この基本構造を有するものに加え、

- (1) 1本の軽鎖と1本の重鎖の計2本のポリペプチド鎖からなるもの、
 - (2) 本来の意味での抗体の基本構造からFc領域が欠失したものであるFab領域からなるもの及びFab領域とヒンジ部の全部若しくは一部とからなるもの（Fab, F(ab')₂及びF(ab')₂を含む）、
 - (3) 軽鎖のC末端側にリンカー配列を、そして更にそのC末端側に重鎖を結合させてなるものである一本鎖抗体、
 - (4) 重鎖のC末端側にリンカー配列を、そして更にそのC末端側に軽鎖を結合させてなるものである一本鎖抗体、
 - (5) 本来の意味での抗体の基本構造からFc領域が欠失したものであるFc領域からなるものであって、且つ当該Fc領域のアミノ酸配列が特定の抗原に特異的に結合する性質を有するように改変されたもの（Fc抗体）
- ,
- (6) 後述する単ドメイン抗体も、本発明における「抗体」に含まれる。

[0069] 本発明の一実施形態における抗体は、ラクダ科動物（アルパカを含む）由来の抗体である。ラクダ科動物の抗体には、ジスルフィド結合により連結さ

れた2本の重鎖からなるものがある。この2本の重鎖からなる抗体を重鎖抗体という。VHHは、重鎖抗体を構成する重鎖の可変領域を含む1本の重鎖からなる抗体、又は重鎖抗体を構成する定常領域（CH）を欠く1本の重鎖からなる抗体である。VHHも本発明の実施形態における抗体の一つである。その他、ジスルフィド結合により連結された2本の軽鎖からなる抗体も本発明の実施形態における抗体の一つである。この2本の軽鎖からなる抗体を軽鎖抗体という。ラクダ科動物由来の抗体（VHHを含む）をヒトに投与したときの抗原性を低減させるために、ラクダ科動物の抗体のアミノ酸配列に変異を加えたものも、本発明の一実施形態における抗体である。ラクダ科動物の抗体のアミノ酸に変異を加える場合、本明細書に記載の抗体に加えることのできる変異と同様の変異を加えることができる。

[0070] 本発明の一実施形態における抗体は、サメ由来の抗体である。サメの抗体は、ジスルフィド結合により連結された2本の重鎖からなる。この2本の重鎖からなる抗体を重鎖抗体という。VNARは、重鎖抗体を構成する重鎖の可変領域を含む1本の重鎖からなる抗体、又は重鎖抗体を構成する定常領域（CH）を欠く1本の重鎖からなる抗体である。VNARも本発明の実施形態における抗体の一つである。サメ由来の抗体（VNARを含む）をヒトに投与したときの抗原性を低減させるために、サメの抗体のアミノ酸配列に変異を加えたものも、本発明の一実施形態における抗体である。サメの抗体のアミノ酸に変異を加える場合、本明細書に記載の抗体に加えることのできる変異と同様の変異を加えることができる。サメの抗体をヒト化したものも本発明の実施形態における抗体の一つである。

[0071] 2本の軽鎖と2本の重鎖の計4本のポリペプチド鎖からなる基本構造を有する抗体は、軽鎖の可変領域（VL）に3箇所の相補性決定領域（CDR）と重鎖の可変領域（VH）に3箇所の相補性決定領域（CDR）を有する。軽鎖の3箇所のCDRは、N末端側にあるものから順にCDR1、CDR2及びCDR3という。重鎖の3箇所のCDRも、N末端側にあるものから順にCDR1、CDR2及びCDR3という。ただし、これらCDRの一部又は全

部が不完全であるか、または存在しないものであっても、特定の抗原に特異的に結合する性質を有するものである限り、抗体に含まれる。軽鎖及び重鎖の可変領域（ V_L 及び V_H ）のCDR以外の領域は、フレームワーク領域（FR）という。FRは、N末端側にあるものから順にFR1、FR2、FR3及びFR4という。通常、CDRとFRはN末端側から順に、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で存在する。

[0072] 本発明の一実施形態において、元の抗体のアミノ酸配列に置換、欠失、付加等の変異を加えた抗体も、抗体に含まれる。元の抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換する場合、置換するアミノ酸の個数は、好ましくは1～20個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個である。元の抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～20個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個である。また、これらアミノ酸の置換と欠失を組み合わせた変異を加えたものも、抗体である。アミノ酸を付加する場合、元の抗体のアミノ酸配列中若しくはN末端又はC末端に、好ましくは1～20個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個のアミノ酸を付加する。これらアミノ酸の付加、置換及び欠失を組み合わせた変異を加えたものも、抗体である。変異を加えた抗体のアミノ酸配列は、元の抗体のアミノ酸配列と、好ましくは80%以上の同一性を示し、より好ましくは85%以上の同一性を示し、更に好ましくは、90%以上、95%以上、又は98%以上の同一性を示す。

[0073] 本発明の一実施形態において、元の抗体の可変領域のアミノ酸配列に置換、欠失、付加等の変異を加えた抗体も、抗体に含まれる。元の抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換する場合、置換するアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個である。元の抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個である。また、これらアミノ酸の置換と欠失を

組み合わせた変異を加えたものも、抗体である。アミノ酸を付加する場合、元の抗体のアミノ酸配列中若しくはN末端又はC末端に、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個のアミノ酸を付加する。これらアミノ酸の付加、置換及び欠失を組み合わせた変異を加えたものも、抗体である。変異を加えた抗体のアミノ酸配列は、元の抗体のアミノ酸配列と、好ましくは80%以上の同一性を示し、より好ましくは85%以上の同一性を示し、更に好ましくは、90%以上、95%以上、又は98%以上の同一性を示す。抗体の可変領域に変異を加える場合、当該変異は可変領域のCDRとフレームワーク領域の何れに加えてもよいが、特にフレームワーク領域に加えられる。

[0074] 本発明の一実施形態において、元の抗体の可変領域のフレームワーク領域にアミノ酸配列に置換、欠失、付加等の変異を加えた抗体も、抗体に含まれる。元の抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換する場合、置換するアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個である。元の抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個である。また、これらアミノ酸の置換と欠失を組み合わせた変異を加えたものも、抗体である。アミノ酸を付加する場合、元の抗体のアミノ酸配列中若しくはN末端又はC末端に、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個のアミノ酸を付加する。これらアミノ酸の付加、置換及び欠失を組み合わせた変異を加えたものも、抗体である。変異を加えた抗体のアミノ酸配列は、元の抗体のアミノ酸配列と、好ましくは80%以上の同一性を示し、より好ましくは85%以上の同一性を示し、更に好ましくは、90%以上、95%以上、又は98%以上の同一性を示す。

[0075] 本発明の一実施形態において、元の抗体の可変領域のCDR領域にアミノ酸配列に置換、欠失、付加等の変異を加えた抗体も、抗体に含まれる。元の抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換する場合、置換する

アミノ酸の個数は、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個、更に好ましくは1又は2個である。元の抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個、更に好ましくは1又は2個である。また、これらアミノ酸の置換と欠失を組み合わせた変異を加えたものも、抗体である。アミノ酸を付加する場合、元の抗体のアミノ酸配列中若しくはN末端又はC末端に、好ましくは1～5個、よりに好ましくは1～3個、更に好ましくは1又は2個のアミノ酸を付加する。これらアミノ酸の付加、置換及び欠失を組み合わせた変異を加えたものも、抗体である。変異を加えた抗体のアミノ酸配列は、元の抗体のアミノ酸配列と、好ましくは80%以上の同一性を示し、より好ましくは85%以上の同一性を示し、更に好ましくは、90%以上、95%以上、又は98%以上の同一性を示す。

[0076] 元の抗体のアミノ酸配列と変異を加えた抗体のアミノ酸配列との同一性は、周知の相同性計算アルゴリズムを用いて容易に算出することができる。例えば、そのようなアルゴリズムとして、BLAST (Altschul SF, J Mol Biol. 215. 403-10, (1990)), Pearson及びLipmanの類似性検索法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85. 2444 (1988)), Smith及びWatermanの局所相同性アルゴリズム(Adv. Appl. Math. 2. 482-9(1981))等がある。

[0077] 本発明の一実施形態において、Fabとは、可変領域とC_L領域（軽鎖の定常領域）を含む1本の軽鎖と、可変領域とC_H1領域（重鎖の定常領域の部分1）を含む1本の重鎖が、それぞれに存在するシステイン残基同士でジスルフィド結合により結合した分子のことをいう。Fabにおいて、重鎖は、可変領域とC_H1領域（重鎖の定常領域の部分1）に加えて、更にヒンジ部の一部を含んでもよいが、この場合のヒンジ部は、ヒンジ部に存在して抗体の重鎖どうしを結合するシステイン残基を欠くものである。Fabにおいて、軽鎖と重鎖とは、軽鎖の定常領域（C_L領域）に存在するシステイン残基と、重鎖の定常領域（C_H1領域）又はヒンジ部に存在するシステイン残基との間で形成されるジスルフィド結合により結合する。Fabを形成する重鎖のこと

をF a b重鎖という。F a bは、ヒンジ部に存在して抗体の重鎖どうしを結合するシステイン残基を欠いているので、1本の軽鎖と1本の重鎖とからなる。F a bを構成する軽鎖は、可変領域とC_L領域を含む。F a bを構成する重鎖は、可変領域とC_H1領域からなるものであってもよく、可変領域、C_H1領域に加えてヒンジ部の一部を含むものであってもよい。但しこの場合、ヒンジ部で2本の重鎖の間でジスルフィド結合が形成されないように、ヒンジ部は重鎖間を結合するシステイン残基を含まないように選択される。F (a b')においては、その重鎖は可変領域とC_H1領域に加えて、重鎖どうしを結合するシステイン残基を含むヒンジ部の全部又は一部を含む。F (a b')₂は2つのF (a b')が互いのヒンジ部に存在するシステイン残基どうしでジスルフィド結合により結合した分子のことをいう。F (a b')又はF (a b')₂を形成する重鎖のことをF a b'重鎖という。また、複数の抗体が直接又はリンカーを介して結合してなる二量体、三量体等の重合体も、抗体である。更に、これらに限らず、抗体分子の一部を含み、且つ、抗原に特異的に結合する性質を有するものは何れも、本発明でいう「抗体」に含まれる。即ち、本発明において軽鎖というときは、軽鎖に由来し、その可変領域の全て又は一部のアミノ酸配列を有するものが含まれる。また、重鎖というときは、重鎖に由来し、その可変領域の全て又は一部のアミノ酸配列を有するものが含まれる。従って、可変領域の全て又は一部のアミノ酸配列を有する限り、例えば、F c領域が欠失したものも、重鎖である。

[0078] また、ここでF c又はF c領域とは、抗体分子中の、C_H2領域（重鎖の定常領域の部分2）、及びC_H3領域（重鎖の定常領域の部分3）からなる断片を含む領域のことをいう。

[0079] 更には、本発明の一実施形態における抗体は、

(7) 上記(2)で示したF a b、F (a b')又はF (a b')₂を構成する軽鎖と重鎖を、リンカー配列を介して結合させて、それぞれ一本鎖抗体としたs c F a b、s c F (a b')、及びs c F (a b')₂も含まれる。ここで、s c F a b、s c F (a b')、及びs c F (a b')₂にあっては

、軽鎖のC末端側にリンカー配列を、そして更にそのC末端側に重鎖を結合させてなるものでもよく、また、重鎖のC末端側にリンカー配列を、そして更にそのC末端側に軽鎖を結合させてなるものでもよい。更には、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域をリンカー配列を介して結合させて一本鎖抗体としたs c F vも、本発明における抗体に含まれる。s c F vにあっては、軽鎖の可変領域のC末端側にリンカー配列を、そして更にそのC末端側に重鎖の可変領域を結合させてなるものでもよく、また、重鎖の可変領域のC末端側にリンカー配列を、そして更にそのC末端側に軽鎖の可変領域を結合させてなるものでもよい。

[0080] 更には、本明細書でいう「抗体」には、完全長抗体、上記(1)～(7)に示されるものに加えて、(1)～(7)を含むより広い概念である、完全長抗体の一部が欠損したものである抗原結合性断片(抗体フラグメント)のいずれの形態も含まれる。抗原結合性断片には、重鎖抗体、軽鎖抗体、V H H、V N A R、及びこれらの一部が欠損したものも含まれる。

[0081] 「抗原結合性断片」の語は、抗原との特異的結合活性の少なくとも一部を保持している抗体の断片のことをいう。結合性断片の例としては、F a b、F a b'、F (a b')₂、可変領域(F v)、重鎖可変領域(V_H)と軽鎖可変領域(V_L)とを適当なリンカーで連結させた一本鎖抗体(s c F v)、重鎖可変領域(V_H)と軽鎖可変領域(V_L)を含むポリペプチドの二量体であるダイアボディ、s c F vの重鎖(H鎖)に定常領域の一部(C_H3)が結合したものの二量体であるミニボディ、その他の低分子化抗体等を包含する。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。

[0082] 本発明の一実施形態において、「一本鎖抗体」というときは、軽鎖の可変領域の全て又は一部を含むアミノ酸配列のC末端側にリンカー配列が結合し、更にそのC末端側に重鎖の可変領域の全て又は一部を含むアミノ酸配列が結合してなり、特定の抗原に特異的に結合することのできる蛋白質をいう。また、重鎖の可変領域の全て又は一部を含むアミノ酸配列のC末端側にリンカー配列が結合し、更にそのC末端側に軽鎖の可変領域の全て又は一部を含

むアミノ酸配列が結合してなり、特定の抗原に特異的に結合することのできる蛋白質も、本発明における「一本鎖抗体」である。重鎖のC末端側にリンカー配列を介して軽鎖が結合した一本鎖抗体にあっては、通常、重鎖は、Fc領域が欠失している。軽鎖の可変領域は、抗体の抗原特異性に関与する相補性決定領域(CDR)を3つ有している。同様に、重鎖の可変領域も、CDRを3つ有している。これらのCDRは、抗体の抗原特異性を決定する主たる領域である。従って、一本鎖抗体には、重鎖の3つのCDRが全てと、軽鎖の3つのCDRの全てとが含まれることが好ましい。但し、抗体の抗原特異的な親和性が維持される限り、CDRの1個又は複数個を欠失させた一本鎖抗体とすることもできる。

[0083] 一本鎖抗体において、抗体の軽鎖と重鎖の間に配置されるリンカー配列は、好ましくは2～50個、より好ましくは8～50個、更に好ましくは10～30個、更により好ましくは12～18個又は15～25個、例えば15個若しくは25個のアミノ酸残基から構成されるペプチド鎖である。そのようなリンカー配列は、これにより両鎖が連結されてなる抗hTfR抗体がhTfRに対する親和性を保持する限り、そのアミノ酸配列に限定はないが、好ましくは、グリシンのみ又はグリシンとセリンから構成されるものであり、例えば、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(配列番号3)、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(配列番号4)、アミノ酸配列Ser-Gly-Gly-Gly-Gly(配列番号5)、又はこれらのアミノ酸配列が2～10回、あるいは2～5回繰り返された配列を含むものである。例えば、重鎖の可変領域の全領域からなるアミノ酸配列のC末端側に、リンカー配列を介して軽鎖の可変領域を結合させる場合、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(配列番号3)の3個が連続したものに相当する計15個のアミノ酸を含むリンカー配列が好適である。

[0084] 本発明の一実施形態において、単ドメイン抗体とは、単一の可変領域で抗原に特異的に結合する性質を有する抗体のことをいう。単ドメイン抗体

には、可変領域が重鎖の可変領域のみからなる抗体（重鎖単ドメイン抗体）、可変領域が軽鎖の可変領域のみからなる抗体（軽鎖単ドメイン抗体）が含まれる。VHH、VNARは単ドメイン抗体の一種である。

[0085] 本発明の一実施形態において、「ヒトトランスフェリン受容体」の語は、配列番号57に示されるアミノ酸配列を有する膜蛋白質をいう。本発明の抗体は、その一実施態様において、配列番号57で示されるアミノ酸配列中N末端側から89番目のシステイン残基からC末端のフェニルアラニンまでの部分（トランスフェリン受容体の細胞外領域）に対して特異的に結合するものであるが、これに限定されない。

[0086] 所望の蛋白質に対する抗体の作製方法としては、当該蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入した細胞を用いて、組換え蛋白質を作製し、この組換え蛋白質を用いてマウス等の動物を免疫して得る方法が一般的である。免疫後の動物から組換え蛋白質に対する抗体産生細胞を取り出し、これとミエローマ細胞とを融合させることにより、組換え蛋白質に対する抗体の産生能を有するハイブリドーマ細胞を作製することができる。

[0087] また、マウス等の動物より得た免疫系細胞を体外免疫法により所望の蛋白質で免疫することによっても、当該蛋白質に対する抗体を産生する細胞を取得できる。体外免疫法を用いる場合、その免疫系細胞が由来する動物種に特に限定はないが、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ウマ、及びヒトを含む霊長類であり、より好ましくは、マウス、ラット及びヒトであり、更に好ましくはマウス及びヒトである。マウスの免疫系細胞としては、例えば、マウスの脾臓から調製した脾細胞を用いることができる。ヒトの免疫系細胞としては、ヒトの末梢血、骨髓、脾臓等から調製した細胞を用いることができる。ヒトの免疫系細胞を体外免疫法により免疫した場合、組換え蛋白質に対するヒト抗体を得ることができる。

[0088] 体外免疫法により免疫系細胞を免疫した後、細胞をミエローマ細胞と融合させることにより、抗体産生能を有するハイブリドーマ細胞を作製することができる。また、免疫後の細胞からmRNAを抽出してcDNAを合成し、

このcDNAを鋳型としてPCR反応により免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖をコードする遺伝子を含むDNA断片を増幅し、これらを用いて人工的に抗体遺伝子を再構築することもできる。

[0089] 上記方法により得られたままのハイブリドーマ細胞には、目的外の蛋白質を抗原として認識する抗体を産生する細胞も含まれる。また、所望の蛋白質に対する抗体を産生するハイブリドーマ細胞の全てが、当該蛋白質に対して高親和性を有する等の所望の特性を示す抗体を産生するとも限らない。

[0090] 同様に、人工的に再構築した抗体遺伝子には、目的外の蛋白質を抗原として認識する抗体をコードする遺伝子も含まれる。また、所望の蛋白質に対する抗体をコードする遺伝子の全てが、当該蛋白質に対して高親和性を有する等の所望の特性を示す抗体をコードするものとも限らない。

[0091] 従って、上記で得られたままのハイブリドーマ細胞から、所望の特性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選択するステップが必要となる。また、人工的に再構築した抗体遺伝子にあっては、当該抗体遺伝子から、所望の特性を有する抗体をコードする遺伝子を選択するステップが必要となる。例えば、所望の蛋白質に対して高親和性を示す抗体（高親和性抗体）を産生するハイブリドーマ細胞、又は高親和性抗体をコードする遺伝子を選択する方法として、以下に詳述する方法が有効である。

[0092] 例えば、所望の蛋白質に対して高親和性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選択する場合、当該蛋白質をプレートに添加してこれに保持させた後、ハイブリドーマ細胞の培養上清を添加し、次いで当該蛋白質と結合していない抗体をプレートから除去し、プレートに保持された抗体の量を測定する方法が用いられる。この方法によれば、プレートに添加したハイブリドーマ細胞の培養上清に含まれる抗体の当該蛋白質に対する親和性が高いほど、プレートに保持される抗体の量が多くなる。従って、プレートに保持された抗体の量を測定し、より多くの抗体が保持されたプレートに対応するハイブリドーマ細胞を、当該蛋白質に対して相対的に高い親和性を有する抗体を産生する細胞株として選択することができる。この様にして選択された細胞株が

ら、mRNAを抽出してcDNAを合成し、このcDNAを鋳型として、当該蛋白質に対する抗体をコードする遺伝子を含むDNA断片をPCR法を用いて増幅することにより、高親和性抗体をコードする遺伝子を単離することもできる。

[0093] 上記の人工的に再構築した抗体遺伝子から、高親和性を有する目的の蛋白質に対する抗体をコードする遺伝子を選択する場合は、一旦、人工的に再構築した抗体遺伝子を発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを宿主細胞に導入する。このとき、宿主細胞として用いる細胞としては、人工的に再構築した抗体遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入することにより抗体遺伝子を発現させることのできる細胞であれば原核細胞、真核細胞を問わず特に限定はないが、ヒト、マウス、チャイニーズハムスター等の哺乳動物由来の細胞が好ましく、特にチャイニーズハムスター卵巢由来のCHO細胞、又はマウス骨髓腫に由来するNS/O細胞が好ましい。また、抗体遺伝子をコードする遺伝子を組み込んで発現させるために用いる発現ベクターは、哺乳動物細胞内に導入させたときに、該遺伝子を発現させるものであれば特に限定なく用いることができる。発現ベクターに組み込まれた該遺伝子は、哺乳動物細胞内で遺伝子の転写の頻度を調節することができるDNA配列（遺伝子発現制御部位）の下流に配置される。本発明において用いることのできる遺伝子発現制御部位としては、例えば、サイトメガロウイルス由来のプロモーター、SV40初期プロモーター、ヒト伸長因子-1アルファ（EF-1 α ）プロモーター、ヒトユビキチンCプロモーター等が挙げられる。

[0094] このような発現ベクターが導入された哺乳動物細胞は、発現ベクターに組み込まれた上述の人工的に再構築した抗体を発現するようになる。このようにして得た、人工的に再構築した抗体を発現する細胞から、所望の蛋白質に対する抗体に対して高親和性を有する抗体を産生する細胞を選択する場合、当該蛋白質をプレートに添加してこれに保持させた後、当該蛋白質に細胞の培養上清を接触させ、次いで、当該蛋白質と結合していない抗体をプレートから除去し、プレートに保持された抗体の量を測定する方法が用いられる。

この方法によれば、細胞の培養上清に含まれる抗体の当該蛋白質に対する親和性が高いほど、プレートに保持された抗体の量が多くなる。従って、プレートに保持された抗体の量を測定し、より多くの抗体が保持されたプレートに対応する細胞を、当該蛋白質に対して相対的に高い親和性を有する抗体を産生する細胞株として選択することができ、ひいては、当該蛋白質に対して高親和性を有する抗体をコードする遺伝子を選択できる。このようにして選択された細胞株から、当該蛋白質に対する抗体をコードする遺伝子を含むDNA断片を、PCR法を用いて増幅することにより、高親和性抗体をコードする遺伝子を単離することもできる。

[0095] 本発明におけるhNAGLU変異体と、抗体との結合体を製造する方法としては、非ペプチドリンカー又はペプチドリンカーを介して結合させる方法がある。非ペプチドリンカーとしては、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、多糖類、デキストラン、ポリビニルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、及びヒアルロン酸、又はこれらの誘導体、若しくはこれらを組み合わせたものを用いることができる。ペプチドリンカーは、ペプチド結合した1～50個のアミノ酸から構成されるペプチド鎖若しくはその誘導体であって、そのN末端とC末端が、それぞれhNAGLU変異体は抗体のいずれかと共有結合を形成することにより、hNAGLU変異体と抗体とを結合させるものである。

[0096] 抗体とhNAGLU変異体とは、抗体の重鎖又は軽鎖のC末端側又はN末端側に、リンカー配列を介して又は直接に、それぞれhNAGLU変異体のN末端又はC末端をペプチド結合により結合させることもできる。このように抗体とhNAGLU変異体とを結合させてなる結合体は、抗体の重鎖又は軽鎖をコードするcDNAの3'末端側又は5'末端側に、直接又はリンカー配列をコードするDNA断片を挟んで、hNAGLU変異体をコードするcDNAがインフレームで配置されたDNA断片を、哺乳動物細胞用の発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを導入した哺乳動物細胞を培養することにより、融合蛋白質とし

て得ることができる。この哺乳動物細胞には、hNAGLU変異体をコードするDNA断片を重鎖と結合させる場合にあっては、抗体の軽鎖をコードするcDNA断片を組み込んだ哺乳動物細胞用の発現ベクターも、同じ宿主細胞に導入されることができ、また、hNAGLU変異体をコードするDNA断片を軽鎖と結合させる場合にあっては、抗体の重鎖をコードするcDNA断片を組み込んだ哺乳動物細胞用の発現ベクターも、同じ宿主細胞に導入されることができる。抗体が一本鎖抗体である場合、抗体とhNAGLU変異体とを結合させた融合蛋白質は、hNAGLU変異体をコードするcDNAの5'末端側又は3'末端側に、直接、又はリンカー配列をコードするDNA断片を挟んで、一本鎖抗体をコードするcDNAを連結したDNA断片を、(哺乳動物細胞、酵母等の真核生物又は大腸菌等の原核生物細胞用の)発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを導入したこれらの細胞中で発現させることにより、得ることができる。抗体とhNAGLU変異体の融合蛋白質は、上記手法により組換え蛋白質として製造することができる。

[0097] 発現ベクターを導入した哺乳動物細胞の培養のための培地としては、哺乳動物細胞を培養して増殖させることのできるものであれば、特に限定なく用いることができるが、好ましくは無血清培地が用いられる。本発明において、組換え蛋白質生産用培地として用いられる無血清培地としては、例えば、アミノ酸を3~700mg/L、ビタミン類を0.001~50mg/L、単糖類を0.3~10g/L、無機塩を0.1~10000mg/L、微量元素を0.001~0.1mg/L、ヌクレオシドを0.1~50mg/L、脂肪酸を0.001~10mg/L、ビオチンを0.01~1mg/L、ヒドロコルチゾンを0.1~20μg/L、インシュリンを0.1~20mg/L、ビタミンB12を0.1~10mg/L、プトレッシンを0.01~1mg/L、ピルビン酸ナトリウムを10~500mg/L、及び水溶性鉄化合物を含有する培地が好適に用いられる。所望により、チミジン、ヒポキサンチン、慣用のpH指示薬及び抗生物質等を培地に添加してもよい。

[0098] 抗体とhNAGLU変異体の融合蛋白質の生産用培地として用いられる無血清培

地として、DMEM/F12培地（DMEMとF12の混合培地）を基本培地として用いてもよく、これら各培地は当業者に周知である。更にまた、無血清培地として、炭酸水素ナトリウム、L-グルタミン、D-グルコース、インスリン、ナトリウムセレナイト、ジアミノブタン、ヒドロコルチゾン、硫酸鉄（II）、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン及びポリビニルアルコールを含むものである、DMEM（HG）HAM改良型（R5）培地を使用してもよい。更には市販の無血清培地、例えば、CD OptiCHO™培地、CHO-S-SFM II培地又はCD CHO培地（Thermo Fisher Scientific社、旧ライフテクノロジーズ社）、IS CHO-V™培地（Irvine Scientific社）、EX-CELL™302培地又はEX-CELL™325-PF培地（SAFC Biosciences社）等を基本培地として使用することもできる。

[0099] 抗体とhNAGLU変異体の融合蛋白質の好ましい実施形態として、以下の（１）～（７）が挙げられる。すなわち：

（１）抗体の重鎖のC末端に直接又はリンカーを介してhNAGLU変異体が結合した結合体と、抗体の軽鎖とを含むもの；

（２）抗体の重鎖のN末端に直接又はリンカーを介してhNAGLU変異体が結合した結合体と、抗体の軽鎖とを含むもの；

（３）抗体の軽鎖のC末端に直接又はリンカーを介してhNAGLU変異体が結合した結合体と、抗体の重鎖とを含むもの；

（４）抗体の軽い鎖のN末端に直接又はリンカーを介してhNAGLU変異体が結合した結合体と、抗体の重鎖とを含むもの。

[0100] 抗体とhNAGLU変異体とを、リンカー配列を介して結合させる場合、抗体とhNAGLU変異体との間に配置されるリンカー配列は、好ましくは１～60個又は１～50個、より好ましくは１～17個、更に好ましくは１～10個、更に好ましくは１～5個のアミノ酸から構成されるペプチド鎖であるが、リンカー配列を構成するアミノ酸の個数は、１個、２個、３個、１～17個、１～10個、10～40個、20～34個、23～31個、25～29個、

27個等と適宜調整できる。そのようなリンカー配列は、これにより連結された抗体が脳血管内皮細胞上の受容体との親和性を保持し、且つ当該リンカー配列により連結されたhNAGLU変異体が、生理的条件下で当該hNAGLU変異体の生理活性を発揮できる限り、そのアミノ酸配列に限定はないが、好ましくは、グリシンとセリンから構成されるものである。例えば、グリシン又はセリンのいずれか1個のアミノ酸からなるもの、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号58）、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号59）、アミノ酸配列Ser-Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号60）、又はこれらのアミノ酸配列が1～10個、あるいは2～5個連続してなる配列を含むものが挙げられる。1～50個のアミノ酸からなる配列、2～17個、2～10個、10～40個、20～34個、23～31個、25～29個、又は27個のアミノ酸からなる配列等を有するものである。例えば、アミノ酸配列Gly-Serを含むものはリンカー配列として好適に用いることができる。また、アミノ酸配列Gly-Serに続いてアミノ酸配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号58）が5個連続してなる計27個のアミノ酸配列を含むものはリンカー配列として好適に用いることができる。更には、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号58）が5個連続してなる計25個のアミノ酸配列を含むものはリンカー配列として好適に用いることができる。

[0101] なお、本発明において、1つのペプチド鎖に複数のリンカー配列が含まれる場合、便宜上、各リンカー配列はN末端側から順に、第1のリンカー配列、第2のリンカー配列というように命名する。

[0102] 本発明のhNAGLU変異体と結合させるべき抗体の具体的な例として、以下の抗ヒトトランスフェリン受容体抗体（抗hTfR抗体）が挙げられる。すなわち、

（1）抗hTfR抗体であって、該抗体の軽鎖が、配列番号61のアミノ酸配列を含んでなり、重鎖が、配列番号62のアミノ酸配列を含んでなる抗体、及び

(2) 抗hTfR抗体であって、かつFab抗体であって、該抗体の軽鎖が、配列番号61のアミノ酸配列を含んでなり、重鎖が、配列番号63のアミノ酸配列を含んでなる抗体、

である。ただし、これらに限られず、上記アミノ酸配列に対しては適宜、置換、欠失、付加等の変異を加えることができる。なお、上記(1)及び(2)の抗hTfR抗体はヒト化抗hTfR抗体である。

[0103] 上記の抗ヒトトランスフェリン受容体抗体の軽鎖のアミノ酸配列のアミノ酸を他のアミノ酸へ置換させる場合、置換させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個であり、より好ましくは1～5個であり、更に好ましくは1～3個、更により好ましくは1又は2個である。軽鎖のアミノ酸配列中のアミノ酸を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個であり、より好ましくは1～5個であり、更に好ましくは1～3個であり、更により好ましくは1又は2個である。また、これらアミノ酸の置換と欠失を組み合わせた変異を加えることもできる。

[0104] 上記の抗ヒトトランスフェリン受容体抗体の軽鎖のアミノ酸配列にアミノ酸を付加する場合、軽鎖のアミノ酸配列中若しくはN末端側又はC末端側に、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個、更により好ましくは1又は2個のアミノ酸が付加される。これらアミノ酸の付加、置換及び欠失を組み合わせた変異を加えることもできる。変異を加えた軽鎖のアミノ酸配列は、元の軽鎖のアミノ酸配列と、好ましくは80%以上の同一性を有し、より好ましくは90%以上の同一性を示し、更に好ましくは、95%以上の同一性を示す。

[0105] 上記の抗ヒトトランスフェリン受容体抗体の重鎖のアミノ酸配列のアミノ酸を他のアミノ酸へ置換させる場合、置換させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個であり、より好ましくは1～5個であり、更に好ましくは1～3個、更により好ましくは1又は2個である。重鎖のアミノ酸配列中のアミノ酸を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個であり、より好ましくは1～5個であり、更に好ましくは1～3個であ

り、更により好ましくは1又は2個である。また、これらアミノ酸の置換と欠失を組み合わせた変異を加えることもできる。

- [0106] 上記の抗ヒトトランスフェリン受容体抗体の重鎖のアミノ酸配列にアミノ酸を付加する場合、重鎖のアミノ酸配列中若しくはN末端側又はC末端側に、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個、更により好ましくは1又は2個のアミノ酸が付加される。これらアミノ酸の付加、置換及び欠失を組み合わせた変異を加えることもできる。変異を加えた重鎖のアミノ酸配列は、元の重鎖のアミノ酸配列と、好ましくは80%以上の同一性を有し、より好ましくは90%以上の同一性を示し、更に好ましくは、95%以上の同一性を示す。
- [0107] 本発明のhNAGLU変異体は、脳血管内皮細胞上の受容体に対する抗体と結合させることにより、血液脳関門を通過させて脳内で機能を発揮させることができるので、NAGLUの欠損を原因とする中枢神経系の疾患状態の治療のための血中投与用薬剤の製造のために使用することができる。また、抗体と結合させたhNAGLU変異体は、NAGLUの欠損を原因とする中枢神経系の疾患状態の治療上有効量を、該当する患者に血中投与（点滴静注等の静脈注射を含む）することを含む、治療方法において使用することができる。血中投与された抗体と結合させたhNAGLU変異体は、脳内に到達する他、NAGLUを発現する他の臓器・器官にも到達することができる。また、当該薬剤は、当該疾患状態の発症を予防するために用いることもできる。
- [0108] 本発明のhNAGLU変異体は、脳血管内皮細胞上の受容体に対する抗体と結合させることにより、血中に投与して中枢神経系（CNS）において薬効を発揮させるべき薬剤として使用することができる。かかる薬剤は、一般に点滴静脈注射等による静脈注射、皮下注射、筋肉注射により患者に投与されるが、投与経路には特に限定はない。
- [0109] 本発明の一実施形態におけるhNAGLU変異体は、抗体に限らず、その他の蛋白質との結合体とすることもできる。その他の蛋白質に特に限定はないが、当該蛋白質は、例えばヒト由来の蛋白質である。hNAGLU変異体と当該その他

の蛋白質の結合体は、上述のhNAGLU変異体と抗体との結合体を製造する方法により得ることができる。また、hNAGLU変異体と当該その他の蛋白質の融合蛋白質は、上述の抗体との融合蛋白質を製造する方法により組換え蛋白質として得ることができる。本発明の一実施形態には、hNAGLU変異体とその他の蛋白質との融合蛋白質をコードする遺伝子、当該遺伝子を組み込んだ発現ベクター、及び当該発現ベクターを導入した宿主細胞が含まれる。

- [0110] 本発明の一実施形態におけるhNAGLU変異体は、抗hTfR抗体に限らず、ヒトhTfRに結合することのできる物質との結合体とすることもできる。当該物質に特に限定はないが、当該蛋白質は、例えば、ヒトトランスフェリンである。ヒトトランスフェリンは野生型のものに限らず、hTfRとの親和性を有する限り、その部分断片、変異体であってもよい。このような結合体は、血液脳関門を通過して脳内で機能を発揮することができる。hNAGLU変異体とヒトトランスフェリンの融合蛋白質は、上述の抗体との融合蛋白質を製造する方法により組換え蛋白質として得ることができる。本発明の一実施形態には、hNAGLU変異体とヒトトランスフェリンとの融合蛋白質をコードする遺伝子、当該遺伝子を組み込んだ発現ベクター、及び当該発現ベクターを導入した宿主細胞が含まれる。

実施例

- [0111] 以下、実施例を参照して本発明を更に詳細に説明するが、本発明が実施例に限定されることは意図しない。

- [0112] 〔実施例1〕hNAGLU変異体の発現ベクターの構築

野生型hNAGLU遺伝子を含む配列番号41で示される塩基配列を有するDNA断片を合成した。これを鋳型として、フォワードプライマーとして配列番号42で示される塩基配列を有するMluI付加5'プライマーを、リバープライマーとして表1で示すプライマーを用いて、表1に示すNo. 1～7及び11のPCRを行った。表1に各リバープライマーの塩基配列に対応する配列番号を示す。

- [0113]

[表1]

表1 PCRに用いたプライマー1

PCR反応 No.	リバースプライマー名	配列番号 (塩基配列)
1	K36E/P37S変異導入3' プライマー	4 4
2	L44_G45insS変異導入3' プライマー	4 5
3	R129Q変異導入3' プライマー	4 6
4	Q209R変異導入3' プライマー	4 7
5	E228K変異導入3' プライマー	4 8
6	T240V変異導入3' プライマー	4 9
7	T320P/E321D変異導入3' プライマー	5 0
11	H204K変異導入3' プライマー	5 4

[0114] 次いで、配列番号4 1で示される塩基配列を有するDNA断片を鋳型として、フォワードプライマーとして表1に示すNo. 1～7及び11のPCRで得られたPCR産物を、リバースプライマーとして配列番号4 3で示される塩基配列を有するHisタグ-NotI付加3' プライマーを用いてPCRを行い、表2に示すhNAGLU変異体をコードする遺伝子を含むPCR産物を得た。表2に各hNAGLU変異体のアミノ酸配列に対応する配列番号、それらをコードする塩基配列に対応する配列番号、及び各hNAGLU変異体の番号（変異体番号）を示す。

[0115] [表2]

表2 PCR産物の名称1

PCR反応 No.	コードされるhNAGLU変異体の名称	配列番号 (アミノ酸配列)	配列番号 (塩基配列)	変異体番号
1	K36E/P37S hNAGLU変異体	3	4	1
2	L44_G45insS hNAGLU変異体	5	6	2
3	R129Q hNAGLU変異体	7	8	1 6
4	Q209R hNAGLU変異体	9	1 0	3
5	E228K hNAGLU変異体	1 1	1 2	4
6	T240V hNAGLU変異体	1 3	1 4	1 7
7	T320P/E321D hNAGLU変異体	1 5	1 6	5
11	H204K hNAGLU変異体	2 3	2 4	1 9

[0116] 野生型hNAGLU遺伝子を含む配列番号4 1で示される塩基配列を有するDNA断片を鋳型として、フォワードプライマーとして表3に示すプライマー、リバースプライマーとして配列番号4 3で示される塩基配列を有するHisタグ-Not

I付加3' プライマーを用いて表3に示すNo. 8～10のPCRを行った。表3に各フォワードプライマーの塩基配列に対応する配列番号を示す。

[0117] [表3]

表3 PCRに用いたプライマー2

PCR反応 No.	フォワードプライマー名	配列番号 (塩基配列)
8	S505A/1506V変異導入5' プライマー	5 1
9	S526N/A528T変異導入5' プライマー	5 2
10	D613Q変異導入5' プライマー	5 3

[0118] 次いで、配列番号4 1で示される塩基配列を有するDNA断片を鋳型として、フォワードプライマーとして配列番号4 2で示される塩基配列を有するMluI付加5' プライマーを、リバースプライマーとして表3に示すNo. 8～10のPCRで得られたPCR産物を用いてPCRを行い、表4に示すhNAGLU変異体をコードする遺伝子を含むPCR産物を得た。表4に各hNAGLU変異体のアミノ酸配列に対応する配列番号、それらをコードする塩基配列に対応する配列番号、及び各hNAGLU変異体の番号（変異体番号）を示す。

[0119] [表4]

表4 PCR産物の名称2

PCR反応 No.	コードされるhNAGLU変異体の名称	配列番号 (アミノ酸配列)	配列番号 (塩基配列)	変異体番号
8	S505A/1506V hNAGLU変異体	1 7	1 8	6
9	S526N/A528T hNAGLU変異体	1 9	2 0	7
10	D613Q hNAGLU変異体	2 1	2 2	1 8

[0120] 次いで、No. 1～11のPCRで得られたPCR産物、及び野生型hNAGLUをコードする配列番号4 1で示される塩基配列を有するDNA断片を、MluI及びNotI（タカラバイオ社）で制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動にて分離した。EtBr染色を行った後、UV照射下で目的のDNA断片を含むバンドを切り出し、QIAEX II Gel Extraction Kit（QIAGEN社）を用いてゲルからDNAを抽出した。同様に、pCI-neoベクター（プロメガ社）、pEI-puroベクターもMluI及びNotIで制限酵素処理し、ゲル抽出、精製を行った。制限酵素で処理した各ベクターに、制限酵素で処理した各PCR産物をそれぞれ混合し、Ligation Mix（タカラバ

イオ社)を用いて16℃で30～60分間ライゲーション反応を行った。野生型hNAGLU遺伝子を含む配列番号41で示される塩基配列を含むDNA断片についても、同様にライゲーション反応を行った。

[0121] なお、pEI-puroベクターは以下の手順で作製した。pEF/myc/nucベクター(インビトロジェン社)を、制限酵素(KpnI及びNcoI)で消化し、EF-1aプロモーター及びその第一イントロンを含むDNA断片を切り出し、このDNA断片をT4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理した。別に、pCI-neo(インビトロジェン社)を、制限酵素(BglII及びEcoRI)で消化して、CMVのエンハンサー／プロモーター及びイントロンを含む領域を切除した後に、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理した。これに、上記のEF-1aプロモーター及びその第一イントロンを含む領域(平滑末端化処理後のもの)を挿入した。これをpE-neoベクターを名付けた。pCAGIpuroベクター(Miyahara M. et.al., J. Biol. Chem. 275, 613-618 (2000))を、制限酵素(NotI及びBamHI)で消化し、マウス脳筋炎ウイルス(EMCV)に由来する内部リボソーム結合部位(IRES)、ピュロマイシン耐性遺伝子(Puro^r)及びウシ成長ホルモン(bGH)に由来するポリアデニル化シグナル(polyA)を含むDNA断片を切り出した。別に、pE-neoベクターを、制限酵素(NotI及びBamHI)で消化して、ネオマイシン耐性遺伝子(Neo^r)を含む約2 kbpの領域を切除した。これに、上記のIRES、PuroR及びbGH由来のpolyAを含むDNA断片を挿入した。これをpEI-puroベクターと名付けた。

[0122] 次に、各ライゲーション反応液を用いて大腸菌(ECOSTM X Competent E. coli DH5 α , ニッポンジーン社)をそれぞれ形質転換した。得られた形質転換体が目的のプラスミドDNAを保持しているか確認するため、シングルコロニーをLB液体培地(LB Broth, Sigma-Aldrich社)で一晩培養し、FastGene Plasmid Mini Kit(日本ジェネティクス社)を用いてプラスミドDNAを少量精製した。精製したプラスミドDNAをMluI及びNotIで制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動にて分離することで、目的のインサートDNAが挿入されていることを確認した。また、各hNAGLU遺伝子に目的の改変が導入されていることを

，サンガーシーケンス解析により確認した。目的のhNAGLU変異体又は野生型hNAGLUが組み込まれていることを確認した各プラスミドを常法により精製した。

[0123] 〔実施例2〕hNAGLU変異体の一過性発現

hNAGLU変異体の一過性発現は、実施例1で得た精製したpCI-neoベクターに各hNAGLU変異体をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて行った。コントロールとしてpCI-neoベクターに野生型NAGLUをコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを用いた。

[0124] ExpiCHO Expression System (Thermo Fisher Scientific社)のHigh titer プロトコルに従い、hNAGLU変異体をコードする遺伝子を組み込んだプラスミド、及び野生型hNAGLUをコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて、ExpiCHO細胞を形質転換させた。形質転換後、細胞を8日間培養し、各hNAGLU変異体及び野生型hNAGLUを培養上清中に発現させた。培養後、培養液を遠心分離して培養上清を回収した。

[0125] 〔実施例3〕一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の確認 (SDS page電気泳動)

実施例2で得られた培養上清10 μ Lを、8 μ Lの2×Sample Buffer (バイオラッド社)及び2 μ Lの2-Mercaptoethanolと混合し、100℃で3分間保温することで還元条件下で熱変性させた。熱変性後の試料を、0.1% SDSを含む50 mM Tris緩衝液/380 mM グリシン緩衝液(pH8.3)内に設置した5-20%ポリアクリルアミドゲルのウェルに5 μ Lずつ付し、25 mA定電流にて電気泳動した。電気泳動後のゲルをOriole Fluorescent Gel Stain (バイオラッド社)に浸し、室温で90分間振とうした。ゲルを純水で洗浄した後、ルミノイメージアナライザー (Amersham Imager 600RGB, サイティバ社)で蛋白質のバンドを検出した。

[0126] 〔実施例4〕一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の確認 (ウエスタンブロッティング法)

実施例3に記載した方法と同様に電気泳動を行い、ニトロセルロース膜と電気泳動後のゲルを、20%メタノールを含む25 mM Tris緩衝液/192 mM グリシ

ン緩衝液に浸したブロットングペーパーで挟み、ブロットング装置で1.0 A, 25 Vで10分間通電することで、蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。転写後のニトロセルロース膜を5%スキムミルクを含むPBSTに浸して1時間振とうした後、0.4 $\mu\text{g/mL}$ に希釈したMouse anti-His tag mAb（医学生物学研究所）溶液に浸して1時間振とうした。PBSTで膜を洗浄後、0.4 $\mu\text{g/mL}$ に希釈したAnti-mouse IgG (H+L), HRP Conjugate（プロメガ社）溶液に浸して30分間振とうし、再度PBSTで洗浄した。膜の転写面にHRP検出試薬（バイオラッド社）を滴下して5分間反応させ、各hNAGLU変異体及び野生型hNAGLUに相当するバンドをルミノイメージアナライザーで検出した。

[0127] 〔実施例5〕一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の確認（酵素活性測定）

試料溶液として、実施例2で得られた培養上清を0.1% BSAを含む100 mM クエン酸緩衝液(pH4.2)で10倍希釈したものを調製した。標準溶液として、4-MU (4-Methylumbelliferone, シグマアルドリッチ社)を0.1% BSAを含む100 mM クエン酸緩衝液(pH4.2)で400~35.12 μM に段階希釈したものを調製した。基質溶液として、NAGLUの人工基質である4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- α -D-glucosaminide（シグマアルドリッチ社）を0.1% BSAを含む100 mM クエン酸緩衝液(pH4.2)で1 mmol/Lに希釈したものを調製した。マイクロプレートに試料溶液又は標準溶液を各ウェルに25 μL ずつ添加し、更に基質溶液を25 μL /well添加してプレートシェイカーで攪拌し混合した。プレートを37°Cで1時間保温した後、200 mmol/L グリシン-NaOH緩衝液(pH10.7)を各ウェルに150 μL ずつ添加して反応を停止させた。蛍光プレートリーダー（Gemini XPS, モレキュラーデバイス社）で遊離した4-MU (4-Methylumbelliferone)の蛍光強度を測定した（励起波長355 nm, 蛍光波長460 nm）。標準溶液の測定結果に基づき検量線を作成し、これに各試料溶液の測定値を内挿して、酵素活性量を求めた。

[0128] 〔実施例6〕一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の確認（結果）

図1に、実施例2~4で測定した一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の測定結果を示す。表5は、図1において棒グラフで示される酵素活性測定結

果に基づく各hNAGLU変異体の発現量を、野生型の発現量を1としたときの相対値として示したものである。

[0129] [表5]

表5 一過性発現による各hNAGLU変異体の発現
(野生型hNAGLUの発現量を1とした相対量)

hNAGLU変異体の名称	変異体番号	発現量
野生型hNAGLU	—	1
K36E/P37S hNAGLU変異体	1	2.5
L44_G45insS hNAGLU変異体	2	3.2
R129Q hNAGLU変異体	1 6	0.5
Q209R hNAGLU変異体	3	4.4
E228K hNAGLU変異体	4	1.5
T240V hNAGLU変異体	1 7	0.6
T320P/E321D hNAGLU変異体	5	2.0
S505A/I506V hNAGLU変異体	6	1.5
S526N/A528T hNAGLU変異体	7	1.2
D613Q hNAGLU変異体	1 8	0.6
H204K hNAGLU変異体	1 9	0.4

[0130] K36E/P37S hNAGLU変異体, L44_G45insS hNAGLU変異体, Q209R hNAGLU変異体, E228K hNAGLU変異体, T320P/E321 D hNAGLU変異体, S505A/I506V hNAGLU変異体, S526N/A528 T hNAGLU変異体の7種の変異体(変異体番号1～7)は, 野生型と比較して高い一過性発現を示した。特に, Q209R hNAGLU変異体(変異体番号3)は野生型hNAGLUと比較して4.4倍の発現量を示した。一方, R129Q hNAGLU変異体(変異体番号1 6), S526N/A528T hNAGLU変異体(変異体番号1 7), D613Q hNAGLU変異体(変異体番号1 8), 及びH204K hNAGLU変異体(変異体番号1 9)は, 野生型と比較して低い一過性発現を示した。

[0131] また, 酵素活性量と, 図1(a)に示されるSDS page電気泳動上で確認されるhNAGLU変異体の発現量には正の相関が認められた。更に, 酵素活性量と, 図1(b)に示されるウエスタンブロッティング法で確認されるhNAGLU変異体の発現量にも正の相関が認められた。

[0132] [実施例7] hNAGLU変異体発現バルク細胞の作製

遺伝子導入装置(スーパーエレクトロポレーターNEPA21, ネッパジーン社

）を用いて、CHO-K1細胞の無血清馴化株に、実施例1で得られた各hNAGLU変異体又は野生型hNAGLUをコードする遺伝子を組み込んだ発現プラスミドをそれぞれ導入し、10 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin (Thermo Fisher Scientific社) を含むCD OptiCHO培地 (Thermo Fisher Scientific社) にて選択培養を行った。3～4日おきに培地交換を繰り返しながら順次培養液量を拡大し、培養中の細胞の生存率が90%を超えた時点で細胞を回収し、これをhNAGLU変異体発現バルク細胞及び野生型hNAGLU発現バルク細胞とした。

[0133] 〔実施例8〕hNAGLU変異体発現バルク細胞の培養

10 $\mu\text{g/mL}$ Puromycinを含むCD OptiCHO培地に、実施例7で得られた各hNAGLU変異体発現バルク細胞及び野生型hNAGLU発現バルク細胞を、それぞれ 2×10^5 cells/mLの細胞密度で播種し、37°C、5% CO₂存在下で静置培養した。培養開始から9日後、培養上清を遠心分離して培養上清を回収した。

[0134] 〔実施例9〕バルク細胞によるhNAGLU変異体発現量の確認（酵素活性測定）

試料溶液として、実施例8で得られた培養上清を0.1% BSAを含むクエン酸緩衝液(pH4.2)で10倍希釈したものを調製した。基質溶液として、hNAGLUの人工基質である4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- α -D-glucosaminideをクエン酸緩衝液(pH4.2)で1 mmol/Lに希釈したものを調製した。マイクロプレートに試料溶液又は標準溶液を各ウェルに25 μL ずつ添加し、更に基質溶液を25 μL /well添加してプレートシェイカーで攪拌し混合した。プレートを37°Cで1時間保温した後、200 mmol/L グリシン-NaOH緩衝液(pH10.7)を各ウェルに150 μL ずつ添加して反応を停止させた。蛍光プレートリーダーで遊離した4-MU (4-Methylumbelliferone) の蛍光強度を測定した（励起波長355 nm、蛍光波長460 nm）。標準溶液の測定結果に基づき検量線を作成し、これに各試料溶液の測定値を内挿して、酵素活性量を求めた。酵素活性量は、各々のhNAGLU変異体について、培養中に 1×10^6 個の細胞から発現したhNAGLUの酵素活性量 (nmol/h/ 1×10^6 個細胞) として求めた。

[0135] 〔実施例10〕バルク細胞によるhNAGLU変異体発現量の確認（結果）

図2に、実施例9で測定したバルク細胞によるhNAGLU変異体発現量の測定

結果を示す。表6は、図2において棒グラフで示される酵素活性測定結果に基づく各hNAGLU変異体の発現量を、野生型の発現量を1としたときの相対値として示したものである。なお、バルク細胞の培養は4回繰り返し、それぞれについて酵素活性測定を実施した。

[0136] [表6]

表6 バルク細胞による各hNAGLU変異体の発現量
(野生型hNAGLUの発現量を1とした相対量)

hNAGLU変異体の名称	変異体番号	発現量平均値 (平均値)
野生型hNAGLU	—	1
K36E/P37S hNAGLU変異体	1	1.5
L44_G45insS hNAGLU変異体	2	1.6
R129Q hNAGLU変異体	1 6	0.9
Q209R hNAGLU変異体	3	2.2
E228K hNAGLU変異体	4	1.1
T240V hNAGLU変異体	1 7	0.5
T320P/E321D hNAGLU変異体	5	1.4
S505A/I506V hNAGLU変異体	6	1.3
S526N/A528T hNAGLU変異体	7	1.2
D613Q hNAGLU変異体	1 8	0.9
H204K hNAGLU変異体	1 9	0.3

[0137] 一過性発現の場合と同様に、バルク細胞においてもK36E/P37S hNAGLU変異体、L44_G45insS hNAGLU変異体、Q209R hNAGLU変異体、E228K hNAGLU変異体、T320P/E321D hNAGLU変異体、S505A/I506V hNAGLU変異体、S526N/A528T hNAGLU変異体の7種の変異体(変異体番号1～7)は、野生型と比較して発現量が多かった。特に、Q209R hNAGLU変異体(変異体番号3)は野生型hNAGLUと比較して2.2倍の発現量を示した。また、一過性発現の場合と同様に、R129Q hNAGLU変異体(変異体番号1 6)、S526N/A528T hNAGLU変異体(変異体番号1 7)、D613Q hNAGLU変異体(変異体番号1 8)、及びH204K hNAGLU変異体(変異体番号1 9)は、野生型と比較して発現量が少なかった。

[0138] [実施例1 1] Q209R hNAGLU変異体への変異導入及び発現ベクターの構築
実施例1～10の実験結果により、hNAGLU変異体の中で、Q209R hNAGLU変異体が最も高い発現量を示すことがわかった。そこで、更なる高発現hNAGLU

変異体を得るために、Q209R hNAGLU変異体に更に変異を導入した。実施例 1 で得られたQ209R hNAGLU変異体をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを鋳型として、フォワードプライマーとして配列番号 4 2 で示される塩基配列を有するMluI付加5' プライマーを、リバープライマーとして表 7 に示すプライマーを用いて、表 7 に示すNo. 12~15のPCRを行った。表 7 に各リバープライマーの塩基配列に対応する配列番号を示す。

[0139] [表7]

表7 PCRに用いたプライマー3

PCR反応 No.	リバープライマー名	配列番号 (塩基配列)
12	K36E/P37S変異導入3' プライマー	4 4
13	L44_G45insS変異導入3' プライマー	4 5
14	T320P/E321D変異導入3' プライマー	5 0
15	V54I変異導入3' プライマー	5 5

[0140] また、実施例 1 で得られたQ209R hNAGLU変異体をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを鋳型として、フォワードプライマーとして表 8 で示すプライマー、リバープライマーとして配列番号 4 3 で示される塩基配列を有するHisタグ-NotI付加3' プライマーを用いて表 8 に示すNo. 16のPCRを行った。表 8 にフォワードプライマーの塩基配列に対応する配列番号を示す。

[0141] [表8]

表8 PCRに用いたプライマー4

PCR反応 No.	フォワードプライマー名	配列番号 (塩基配列)
16	R620K変異導入5' プライマー	5 6

[0142] 次に、実施例 1 で得られたQ209R hNAGLU変異体をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを鋳型として、表 9 に示すフォワードプライマーとリバープライマーとを用いて、表 9 に示すNo. 17~26のPCRを行った。

[0143]

[表9]

表9 PCRに用いたプライマー5

PCR反応 No.	フォワードプライマー名	リバースプライマー名
17	PCR反応No. 12 プロダクト	Hisタグ-Not I付加3' プライマー
18	PCR反応No. 13 プロダクト	Hisタグ-Not I付加3' プライマー
19	PCR反応No. 14 プロダクト	Hisタグ-Not I付加3' プライマー
20	PCR反応No. 12 プロダクト	L44_G45insS変異導入3' プライマー
21	PCR反応No. 15 プロダクト	PCR反応No. 16 プロダクト
22	PCR反応No. 13 プロダクト	V54I変異導入3' プライマー
23	PCR反応No. 13 プロダクト	PCR反応No. 16 プロダクト
24	PCR反応No. 22 プロダクト	PCR反応No. 16 プロダクト
25	PCR反応No. 20 プロダクト	Hisタグ-Not I付加3' プライマー
26	PCR反応No. 22 プロダクト	Hisタグ-Not I付加3' プライマー

[0144] 上記のNo. 17～19, 21, 及び23～26のPCRにより, Q209R hNAGLU変異体に, 更に1～3個の変異を導入した表10に示すhNAGLU変異体をコードするDNA断片を増幅した。表10に各hNAGLU変異体のアミノ酸配列に対応する配列番号, それらをコードする塩基配列に対応する配列番号, 及び各hNAGLU変異体の番号(変異体番号)を示す。

[0145] [表10]

表10 PCR産物の名称3

PCR反応 No.	コードされるhNAGLU変異体の名称	配列番号 (アミノ酸配列)	配列番号 (塩基配列)	変異体番号
17	K36E/P37S/Q209R hNAGLU変異体	25	26	8
18	L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体	27	28	9
19	Q209R/T320P/E321D hNAGLU変異体	29	30	10
25	K36E/P37S/L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体	31	32	11
21	V54I/Q209R/R620K hNAGLU変異体	33	34	12
26	L44_G45insS/V54I/Q209R hNAGLU変異体	35	36	13
23	L44_G45insS/Q209R/R620K hNAGLU変異体	37	38	14
24	L44_G45insS/V54I/Q209R/R620K hNAGLU変異体	39	40	15

[0146] 次いで, No. 17～19, 21, 及び23～26のPCRで得られた各PCR産物を, MluI 及びNotI (タカラバイオ社)で制限酵素処理し, アガロースゲル電気泳動にて分離した。EtBr染色を行った後, UV照射下で目的のDNA断片を含むバンドを切り出し, QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社)を用いてゲルからDNA

を抽出した。同様に、pCI-neoベクター（プロメガ社）、pEI-puroベクターもMluI及びNotIで制限酵素処理し、ゲル抽出、精製を行った。制限酵素で処理した各ベクターに、制限酵素で処理した各PCR産物をそれぞれ混合し、Ligation Mix（タカラバイオ社）を用いて16℃で30～60分間ライゲーション反応を行った。

[0147] 次いで、各ライゲーション反応液を用いて大腸菌（ECOS™ X Competent E. coli DH5 α 、ニッポンジーン社）をそれぞれ形質転換した。得られた形質転換体が目的のプラスミドDNAを保持しているか確認するため、シングルコロニーをLB液体培地（LB Broth, Sigma-Aldrich社）で一晩培養し、FastGene Plasmid Mini Kit（日本ジェネティクス社）を用いてプラスミドDNAを少量精製した。精製したプラスミドDNAをMluI及びNotIで制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動にて分離することで、目的のインサートDNAが挿入されていることを確認した。また、各hNAGLU遺伝子に目的の改変が導入されていることを、サンガーシーケンス解析により確認した。目的のhNAGLU変異体が組込まれていることを確認した各プラスミドを常法により精製した。

[0148] 〔実施例 1 2〕 hNAGLU変異体の一過性発現

hNAGLU変異体の一過性発現は、実施例 1 1 で精製したpCI-neoベクターにhNAGLU変異体を組み込んだプラスミドを用いて行った。コントロールとしてpCI-neoベクターに野生型hNAGLUを組み込んだプラスミドを用いた。

[0149] ExpiCHO Expression System (Thermo Fisher Scientific社) のHigh titer プロトコールに従い、hNAGLU変異体をコードする遺伝子を組み込んだプラスミド、及び野生型hNAGLUをコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて、ExpiCHO細胞を形質転換させた。形質転換後、細胞を8日間培養し、各hNAGLU変異体及び野生型hNAGLUを培養上清中に発現させた。培養後、培養液を遠心分離して培養上清を回収した。また、陰性コントロールとして、形質転換をしていない細胞の培養上清を同様にして回収した。

[0150] 〔実施例 1 3〕 一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の確認（SDS page電気泳動）

実施例 1 2 で得られた培養上清10 μ Lを、8 μ Lの2×Sample Buffer及び2 μ Lの2-Mercaptoethanolと混合し、100℃で3分間保温することで還元条件下で熱変性させた。熱変性後の試料を、0.1% SDSを含む50 mM Tris緩衝液/380 mM グリシン緩衝液(pH8.3)内に設置した5-20%ポリアクリルアミドゲルのウェルに5 μ Lずつアプライし、25 mA定電流にて電気泳動した。電気泳動後のゲルをOriole Fluorescent Gel Stain (バイオラッド社)に浸し、室温で90分間振とうした。ゲルを純水で洗浄した後、ルミノイメージアナライザーで蛋白質のバンドを検出した。

[0151] 〔実施例 1 4〕一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の確認（ウエスタンブロットティング法）

実施例 1 3 に記載した方法と同様に電気泳動を行い、ニトロセルロース膜と電気泳動後のゲルを、20%メタノールを含む25 mM Tris緩衝液/192 mM グリシン緩衝液に浸したブロットティングペーパーで挟み、ブロットティング装置で1.0 A, 25 Vで10分間通電することで蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。転写後のニトロセルロース膜を5%スキムミルクを含むPBSTに浸して1時間振とう後、0.4 μ g/mLに希釈したMouse anti-His tag mAb溶液に浸して1時間振とうした。PBSTで膜を洗浄後、0.4 μ g/mLに希釈したAnti-mouse IgG (H+L), HRP Conjugate溶液に浸して30分間振とうし、再度PBSTで洗浄した。膜の転写面にHRP検出試薬を滴下して5分間反応させ、ルミノイメージアナライザーで検出した。

[0152] 〔実施例 1 5〕一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の確認（酵素活性測定）

試料溶液として、実施例 1 2 で得られた培養上清を0.1% BSAを含むクエン酸緩衝液(pH4.2)で10倍希釈したものを調製した。基質溶液として、hNAGLUの人工基質である4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- α -D-glucosaminideをクエン酸緩衝液(pH4.2)で1 mmol/Lに希釈したものを調製した。マイクロプレートに試料溶液又は標準溶液を25 μ L/well添加し、更に各ウェルに25 μ Lの基質溶液を添加してプレートシェイカーで攪拌し混合した。プレートを37℃で1時

間保温した後、200 mmol/L グリシン-NaOH緩衝液 (pH10.7) を150 μ L/well 添加して反応を停止させた。蛍光プレートリーダーで遊離した4-MU (4-Methylumbelliferone) の蛍光強度を測定した (励起波長355 nm, 蛍光波長460 nm)。標準溶液の測定結果に基づき検量線を作成し、これに各試料溶液の測定値を内挿して、酵素活性量を求めた。

[0153] [実施例 1 6] 一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の確認 (結果)

図 3 及び図 4 に、実施例 1 2 ~ 1 5 で測定した一過性発現によるhNAGLU変異体発現量の測定結果を示す。表 1 1 は、図 3 及び図 4 において棒グラフで示される酵素活性測定結果に基づく各hNAGLU変異体の発現量を、野生型の発現量を 1 としたときの相対値として示したものである。

[0154] [表11]

表 1 1 一過性発現による各hNAGLU変異体の発現量
(野生型NAGLUの発現量を1とした相対量)

hNAGLU変異体の名称	変異体番号	発現量
野生型hNAGLU	—	1
Q209R hNAGLU変異体	3	3.3
K36E/P37S/Q209R hNAGLU変異体	8	3.7
L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体	9	5.4
Q209R/T320P/E321D hNAGLU変異体	10	4.0
K36E/P37S/L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体	11	5.4
V54I/Q209R/R620K hNAGLU変異体	12	5.9
L44_G45insS/V54I/Q209R hNAGLU変異体	13	5.1
L44_G45insS/Q209R/R620K hNAGLU変異体	14	4.2
L44_G45insS/V54I/Q209R/R620K hNAGLU変異体	15	5.6

(注) Q209R hNAGLU変異体とK36E/P37S/L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体の発現量は図 3 と図 4 に示される発現量の平均値。

[0155] Q209R hNAGLU変異体に更に変異を加えた、K36E/P37S/Q209R hNAGLU変異体、L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体、Q209R/T320P/E321D hNAGLU変異体、K36E/P37S/L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体、V54I/Q209R/R620K hNAGLU変異体、L44_G45insS/V54I/Q209R hNAGLU変異体、L44_G45insS/Q209R/R620K hNAGLU変異体、及びL44_G45insS/V54I/Q209R/R620K hNAGLU変異体 (変異体 8 ~ 1 5) は、何れもQ209R hNAGLU変異体と比較して高い一過性発現を示した。特に

， V54I/Q209R/R620K hNAGLU変異体は， Q209R hNAGLU変異体と比較して， 約1.8倍（野生型の5.9倍）の一過性発現を示した。また， 酵素活性量と， 図3（b）及び図4（a）に示されるSDS page電気泳動上で確認されるhNAGLU変異体の発現量には正の相関が認められた。更に， 酵素活性量と， 図4（b）に示されるウエスタンブロッティング法で確認されるhNAGLU変異体の発現量にも正の相関が認められた。

[0156] 〔実施例17〕

以上の結果は， 組換え体hNAGLUを製造する場合に， 組換え体野生型hNAGLUに代えて組換え体Q209R hNAGLU変異体として製造することにより， 2～5倍の生産量を得ることができることを示す。また， Q209R hNAGLU変異体に更に変異を加えて， 組換え体K36E/P37S/Q209R hNAGLU変異体， 組換え体L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体， 組換え体Q209R/T320P/E321D hNAGLU変異体， 組換え体K36E/P37S/L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体， 組換え体V54I/Q209R/R620K hNAGLU変異体， 組換え体L44_G45insS/V54I/Q209R hNAGLU変異体， 組換え体L44_G45insS/Q209R/R620K hNAGLU変異体， 及び組換え体L44_G45insS/V54I/Q209R/R620K hNAGLU変異体として製造することにより， 更に組換え体hNAGLUの生産量を増加させることができることを示す。

[0157] 〔実施例18〕 抗ヒトトランスフェリン受容体抗体（抗hTfR抗体）とhNAGLU変異体の融合蛋白質の発現用細胞の構築

抗ヒトトランスフェリン受容体抗体（抗hTfR抗体）とhNAGLU変異体の融合蛋白質は， 以下に詳述する方法により製造することができる。

[0158] 発現ベクターであるpE-neoベクターとpE-hygrベクターを特許文献（W02018/124121）に記載された方法により構築する。pE-neoベクターとpE-hygrベクターをそれぞれMluIとNotIにより消化する。

[0159] 配列番号63のアミノ酸配列を含んでなる抗hTfR抗体のFab重鎖のC末端に， 配列番号3で示されるアミノ酸配列が3個連続してなる計15個のアミノ酸からなるリンカー配列を介して， L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体（変異体番号9）が結合する配列番号64で示される蛋白質をコードするDNA

断片を合成する。このDNA断片の5'側には、5'端から順にMluI配列と、分泌シグナルとして機能するリーダーペプチドをコードする配列とを、3'側にはNotI配列を配置する。このDNA断片をMluIとNotIで消化し、pE-neoベクターのMluIとNotIの間に組み込み、pE-neo(HC-mhNAGLU)を構築する。

[0160] また、L44_G45insS/Q209R hNAGLU変異体（変異体番号9）のC末端に、配列番号3で示されるアミノ酸配列が3個連続してなる計15個のアミノ酸からなるリンカー配列を介して、配列番号63のアミノ酸配列を含んでなる抗hTfR抗体のFab重鎖が結合する配列番号65で示される蛋白質をコードするDNA断片を合成する。このDNA断片の5'側には、5'端から順にMluI配列と、分泌シグナルとして機能するリーダーペプチドをコードする配列とを、3'側にはNotI配列を配置する。このDNA断片をMluIとNotIで消化し、pE-neoベクターのMluIとNotIの間に組み込み、pE-neo(mhNAGLU-HC)を構築する。

[0161] 配列番号61のアミノ酸配列を含んでなる抗hTfRの軽鎖をコードするDNA断片（配列番号66）をコードするDNA断片を合成する。このDNA断片をMluIとNotIで消化し、pE-hygrベクターのMluIとNotIの間に組み込み、pE-hygr(LC)を構築する。

[0162] CHO細胞（CHO-K1：American Type Culture Collectionから入手）を、下記の方法により、GenePulser（Bio-Rad社）を用いて、pE-neo(HC-mhNAGLU)及びpE-neo(HC-mhNAGLU)、又はpE-neo(HC-mhNAGLU)及びpE-neo(mhNAGLU-HC)でそれぞれ形質転換する。細胞の形質転換は概ね以下の方法で行う。5×10⁵個のCHO-K1細胞をCD OptiCHO™培地（ライフテクノロジー社）を添加した3.5 cm培養ディッシュに播種し、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養する。培地をOpti-MEM™ I培地（ライフテクノロジー社）に交換し、細胞を5×10⁶細胞/mLの密度となるように懸濁する。細胞懸濁液100 μLを採取し、これにOpti-MEM™ I培地で100 μg/mLに希釈したpE-neo(HC-mhNAGLU)及びpE-neo(HC-mhNAGLU)プラスミドDNA溶液を5 μLずつ添加する。GenePulser（Bio-Rad社）を用いて、エレクトロポレーションを実施し、細胞にプラスミドを導

入する。細胞を、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養し、次いで0.5 mg/mLのハイグロマイシン及び0.8 mg/mLのG418を添加したCD OptiCHO™培地で選択培養する。

[0163] 次いで、限界希釈法により、1ウェルあたり1個以下の細胞が播種されるように、96ウェルプレート上に選択培養で選択された細胞を播種し、各細胞が単クローンコロニーを形成するように約10日間培養する。単クローンコロニーが形成されたウェルの培養上清を採取し、培養上清中のヒト化抗体含量をELISA法にて調べ、ヒト化抗体高発現細胞株を選択する。

[0164] このときのELISA法は概ね以下の方法で実施する。96ウェルマイクロタイタープレート（Nunc社）の各ウェルに、ヤギ抗ヒトIgGポリクローナル抗体溶液を0.05M 炭酸水素塩緩衝液（pH 9.6）で4 µg/mLに希釈したものを100 µLずつ加え、室温で少なくとも1時間静置して抗体をプレートに吸着させた。次いで、PBS-Tで各ウェルを3回洗浄後、Starting Block（PBS）Blocking Buffer（Thermo Fisher Scientific社）を各ウェルに200 µLずつ加えてプレートを室温で30分静置する。各ウェルをPBS-Tで3回洗浄した後、PBSに0.5% BSA及び0.05% Tween20を添加したもの（PBS-BT）で適当な濃度に希釈した培養上清又はヒトIgG標準品を、各ウェルに100 µLずつ加え、プレートを室温で少なくとも1時間静置する。プレートをPBS-Tで3回洗浄した後、PBS-BTで希釈したHRP標識抗ヒトIgGポリクローナル抗体溶液を、各ウェルに100 µLずつ加え、プレートを室温で少なくとも1時間静置する。PBS-Tで各ウェルを3回洗浄後、リン酸-クエン酸緩衝液（pH 5.0）を含む0.4 mg/mL オーフエニレンジアミンを100 µLずつ各ウェルに加え、室温で8～20分間静置する。次いで、1 mol/L 硫酸を100 µLずつ各ウェルに加えて反応を停止させ、96ウェルプレートリーダーを用いて、各ウェルの490 nmにおける吸光度を測定する。高い測定値を示したウェルに対応する細胞を、高発現細胞株として融合蛋白質の製造に用いることができる。

[0165] [実施例19] 抗hTfR抗体とhNAGLU変異体の融合蛋白質の製造

抗hTfR抗体とhNAGLU変異体の融合蛋白質は、以下の方法で製造するこ

とができる。実施例 18 に記載の高発現細胞株を、細胞濃度が約 2×10^5 個/mL となるように、CD OptiCHO™ 培地で希釈し、1 L の三角フラスコに 200 mL の細胞懸濁液を加え、37℃ で、5% CO₂ と 95% 空気からなる湿潤環境で約 70 rpm の攪拌速度で 6~7 日間培養する。培養上清を遠心操作により回収し、0.22 μm フィルター (Millipore 社) でろ過して、培養上清を回収する。その培養上清に、カラム体積の 5 倍容の 150 mL NaCl を含む 20 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) を添加し、カラム体積の 3 倍容の 150 mM NaCl を含む 20 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) で予め平衡化しておいた Protein A カラム (カラム体積: 1 mL, Bio-Rad 社) に負荷する。次いで、カラム体積の 5 倍容の同緩衝液を供給してカラムを洗浄した後、150 mM NaCl を含むカラム体積の 4 倍容の 50 mM グリシン緩衝液 (pH 2.8) で、吸着した融合蛋白質を溶出させる。この融合蛋白質を含む溶出液の pH を 1 M Tris 緩衝液 (pH 8.0) を添加して pH 7.0 に調整する。こうして得られて溶液を融合蛋白質の精製品として、4℃ 又は凍結して保存する。

産業上の利用可能性

- [0166] 本発明によれば、ムコ多糖症 IIIB 型の患者の治療のため、酵素補充療法として投与されることの可能な hNAGLU 変異体であって、野生型 hNAGLU と比較して、組換え体蛋白質としてより効率良く生産することの hNAGLU 変異体を提供することができる。

配列表フリーテキスト

- [0167] 配列番号 1 : 野生型 hNAGLU のアミノ酸配列
配列番号 2 : 野生型 hNAGLU をコードする DNA 断片の塩基配列, 合成配列
配列番号 3 : hNAGLU 変異体番号 1 のアミノ酸配列
配列番号 4 : hNAGLU 変異体番号 1 をコードする DNA 断片の塩基配列, 合成配列
配列番号 5 : hNAGLU 変異体番号 2 のアミノ酸配列
配列番号 6 : hNAGLU 変異体番号 2 をコードする DNA 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 7 : hNAGLU変異体番号 16 のアミノ酸配列

配列番号 8 : hNAGLU変異体番号 16 をコードする D N A 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 9 : hNAGLU変異体番号 3 のアミノ酸配列

配列番号 10 : hNAGLU変異体番号 3 をコードする D N A 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 11 : hNAGLU変異体番号 4 のアミノ酸配列

配列番号 12 : hNAGLU変異体番号 4 をコードする D N A 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 13 : hNAGLU変異体番号 17 のアミノ酸配列

配列番号 14 : hNAGLU変異体番号 17 をコードする D N A 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 15 : hNAGLU変異体番号 5 のアミノ酸配列

配列番号 16 : hNAGLU変異体番号 5 をコードする D N A 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 17 : hNAGLU変異体番号 6 のアミノ酸配列

配列番号 18 : hNAGLU変異体番号 6 をコードする D N A 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 19 : hNAGLU変異体番号 7 のアミノ酸配列

配列番号 20 : hNAGLU変異体番号 7 をコードする D N A 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 21 : hNAGLU変異体番号 18 のアミノ酸配列

配列番号 22 : hNAGLU変異体番号 18 をコードする D N A 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 23 : hNAGLU変異体番号 19 のアミノ酸配列

配列番号 24 : hNAGLU変異体番号 19 をコードする D N A 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 25 : hNAGLU変異体番号 8 のアミノ酸配列

配列番号 26 : hNAGLU変異体番号 8 をコードする DNA 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 27 : hNAGLU変異体番号 9 のアミノ酸配列

配列番号 28 : hNAGLU変異体番号 9 をコードする DNA 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 29 : hNAGLU変異体番号 10 のアミノ酸配列

配列番号 30 : hNAGLU変異体番号 10 をコードする DNA 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 31 : hNAGLU変異体番号 11 のアミノ酸配列

配列番号 32 : hNAGLU変異体番号 11 をコードする DNA 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 33 : hNAGLU変異体番号 12 のアミノ酸配列

配列番号 34 : hNAGLU変異体番号 12 をコードする DNA 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 35 : hNAGLU変異体番号 13 のアミノ酸配列

配列番号 36 : hNAGLU変異体番号 13 をコードする DNA 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 37 : hNAGLU変異体番号 14 のアミノ酸配列

配列番号 38 : hNAGLU変異体番号 14 をコードする DNA 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 39 : hNAGLU変異体番号 15 のアミノ酸配列

配列番号 40 : hNAGLU変異体番号 15 をコードする DNA 断片の塩基配列, 合成配列

配列番号 41 : hNAGLUをコードする遺伝子を含む塩基配列, 合成配列

配列番号 42 : MluI付加5' プライマー, 合成配列

配列番号 43 : Hisタグ-NotI付加3' プライマー, 合成配列

配列番号 44 : K36E/P37S変異導入3' プライマー, 合成配列

配列番号 45 : L44_G45insS変異導入3' プライマー, 合成配列

- 配列番号 46 : R129Q変異導入3' プライマー, 合成配列
- 配列番号 47 : Q209R変異導入3' プライマー, 合成配列
- 配列番号 48 : E228K変異導入3' プライマー, 合成配列
- 配列番号 49 : T240V変異導入3' プライマー, 合成配列
- 配列番号 50 : T320P/E321 D変異導入3' プライマー, 合成配列
- 配列番号 51 : S505A/I506V変異導入5' プライマー, 合成配列
- 配列番号 52 : S526N/A528 T変異導入5' プライマー, 合成配列
- 配列番号 53 : D613Q変異導入5' プライマー, 合成配列
- 配列番号 54 : H204K変異導入3' プライマー, 合成配列
- 配列番号 55 : V54I変異導入3' プライマー, 合成配列
- 配列番号 56 : R620K変異導入5' プライマー, 合成配列
- 配列番号 57 : ヒトトランスフェリン受容体のアミノ酸配列
- 配列番号 58 : リンカーのアミノ酸配列の一例 1
- 配列番号 59 : リンカーのアミノ酸配列の一例 2
- 配列番号 60 : リンカーのアミノ酸配列の一例 3
- 配列番号 61 : 抗 h T f R 抗体の軽鎖のアミノ酸配列
- 配列番号 62 : 抗 h T f R 抗体の重鎖のアミノ酸配列
- 配列番号 63 : 抗 h T f R 抗体の Fab 重鎖のアミノ酸配列
- 配列番号 64 : hNAGLU 変異体番号 9 と抗 h T f R 抗体の Fab 重鎖の融合蛋白質
のアミノ酸配列 1
- 配列番号 65 : hNAGLU 変異体番号 9 と抗 h T f R 抗体の Fab 重鎖の融合蛋白質
のアミノ酸配列 2
- 配列番号 66 : 抗 h T f R 抗体の軽鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列, 合
成配列
- 配列番号 67 : 野生型 hNAGLU 前駆体のシグナルペプチドのアミノ酸配列

請求の範囲

- [請求項1] 下記の（１）～（７）からなる群から選択されるヒト α -N-アセチルグルコサミニダーゼ（hNAGLU）の変異体：
- （１）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中36位のリシンがグルタミン酸に、かつ37位のプロリンがセリンに、それぞれ置換された配列番号３で示されるアミノ酸配列を含むもの；
- （２）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号５で示されるアミノ酸配列を含むもの；
- （３）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中209位のグルタミンがアルギニンに置換された配列番号９で示されるアミノ酸配列を含むもの；
- （４）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中228位のグルタミン酸がリシンに置換された配列番号１１で示されるアミノ酸配列を含むもの；
- （５）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中320位のトレオニンがプロリンに、かつ321位のグルタミン酸がアスパラギン酸に、それぞれ置換された配列番号１５で示されるアミノ酸配列を含むもの；
- （６）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中505位のセリンがアラニンに、かつ506位のイソロイシンがバリンに、それぞれ置換された配列番号１７で示されるアミノ酸配列を含むもの；及び
- （７）配列番号１で示される野生型のhNAGLUのアミノ酸配列中526位のセリンがアスパラギンに、かつ528位のアラニンがトレオニンに、それぞれ置換された配列番号１９で示されるアミノ酸配列を含むもの。
- [請求項2] 請求項１に記載の配列番号３で示されるアミノ酸配列を含むhNAGLU

変異体に対し、該アミノ酸配列の36位のグルタミン酸及び37位のセリン以外において、以下の(1' - a) ~ (1' - h) からなる群から選択される変異を含むhNAGLU変異体：

(1' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1' - c) 上記1' - aの置換と1' - bの欠失を組み合わせたもの；

(1' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(1' - e) 上記1' - aの置換と1' - dの付加を組み合わせたもの；

(1' - f) 上記1' - bの欠失と1' - dの付加を組み合わせたもの；

(1' - g) 上記1' - aの置換と、1' - bの欠失と及び1' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(1' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[請求項3]

請求項1に記載の配列番号5で示されるアミノ酸配列を含むhNAGLU

の変異体に対し、該アミノ酸配列の45位のセリン以外において、以下の(2' - a) ~ (2' - h) からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(2' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(2' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(2' - c) 上記2' - aの置換と2' - bの欠失を組み合わせたもの；

(2' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(2' - e) 上記2' - aの置換と2' - dの付加を組み合わせたもの；

(2' - f) 上記2' - bの欠失と2' - dの付加を組み合わせたもの；

(2' - g) 上記2' - aの置換と、2' - bの欠失と及び2' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(2' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[請求項4]

請求項1に記載の配列番号9で示されるアミノ酸配列を含むhNAGLU

変異体に対し、該アミノ酸配列の209位のアルギニン以外において、以下の(3' - a) ~ (3' - h) からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(3' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(3' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(3' - c) 上記3' - aの置換と3' - bの欠失を組み合わせたもの；

(3' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(3' - e) 上記3' - aの置換と3' - dの付加を組み合わせたもの；

(3' - f) 上記3' - bの欠失と3' - dの付加を組み合わせたもの；

(3' - g) 上記3' - aの置換と、3' - bの欠失と及び3' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(3' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[請求項5]

請求項1に記載の配列番号11で示されるアミノ酸配列を含むhNAG

LU変異体に対し、該アミノ酸配列の228位のリジン以外において、以下の(4' - a) ~ (4' - h) からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(4' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(4' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(4' - c) 上記4' - aの置換と4' - bの欠失を組み合わせたもの；

(4' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(4' - e) 上記4' - aの置換と4' - dの付加を組み合わせたもの；

(4' - f) 上記4' - bの欠失と4' - dの付加を組み合わせたもの；

(4' - g) 上記4' - aの置換と、4' - bの欠失と及び4' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(4' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[請求項6]

請求項1に記載の配列番号15で示されるアミノ酸配列を含むhNAG

LU変異体に対し、該アミノ酸配列の320位のプロリン及び321位のアスパラギン酸以外において、以下の(5' - a) ~ (5' - h) からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(5' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(5' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(5' - c) 上記5' - aの置換と5' - bの欠失を組み合わせたもの；

(5' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(5' - e) 上記5' - aの置換と5' - dの付加を組み合わせたもの；

(5' - f) 上記5' - bの欠失と5' - dの付加を組み合わせたもの；

(5' - g) 上記5' - aの置換と、5' - bの欠失と及び5' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(5' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[請求項7]

請求項1に記載の配列番号17で示されるアミノ酸配列を含むhNAG

LU変異体に対し、該アミノ酸配列の505位のアラニン及び506位のバリン以外において、以下の(6' - a) ~ (6' - h) からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(6' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(6' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(6' - c) 上記6' - aの置換と6' - bの欠失を組み合わせたもの；

(6' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(6' - e) 上記6' - aの置換と6' - dの付加を組み合わせたもの；

(6' - f) 上記6' - bの欠失と6' - dの付加を組み合わせたもの；

(6' - g) 上記6' - aの置換と、6' - bの欠失と及び6' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(6' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[請求項8]

請求項1に記載の配列番号19で示されるアミノ酸配列を含むhNAG

LU変異体に対し、該アミノ酸配列の526位のアスパラギン及び528位のトレオニン以外において、以下の(7' - a) ~ (7' - h) からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(7' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(7' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(7' - c) 上記7' - aの置換と7' - bの欠失を組み合わせたもの；

(7' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(7' - e) 上記7' - aの置換と7' - dの付加を組み合わせたもの；

(7' - f) 上記7' - bの欠失と7' - dの付加を組み合わせたもの；

(7' - g) 上記7' - aの置換と、7' - bの欠失と及び7' - dの付加を組み合わせたもの；及び

(7' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[請求項9]

請求項4に記載の配列番号9で示されるアミノ酸配列を含むhNAGLU

変異体に対し、以下の（８）～（１５）からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

（８）36位のリシンがグルタミン酸に、37位のプロリンがセリンに、それぞれ置換された配列番号２５で示されるアミノ酸配列を含むものの；

（９）44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号２７で示されるアミノ酸配列を含むもの；

（１０）320位のトレオニンがプロリンに、321位のグルタミン酸がアスパラギン酸に、それぞれ置換された配列番号２９で示されるアミノ酸配列を含むもの；

（１１）36位のリシンがグルタミン酸に、37位のプロリンがセリンに、それぞれ置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号３１で示されるアミノ酸配列を含むものの；

（１２）54位のバリンがイソロイシンに、620位のアルギニンがリシンに、それぞれ置換された配列番号３３で示されるアミノ酸配列を含むもの；

（１３）54位のバリンがイソロイシンに置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号３５で示されるアミノ酸配列を含むもの；

（１４）620位のアルギニンがリシンに置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号３７で示されるアミノ酸配列を含むもの；及び

（１５）54位のバリンがイソロイシンに、620位のアルギニンがリシンに、それぞれ置換され、かつ、44位のロイシンと45位のグリシンの間にセリンが付加された配列番号３９で示されるアミノ酸配列を含むもの。

[請求項10]

請求項９に記載の配列番号２５で示されるアミノ酸配列を含むhNAG

LU変異体に対し、該アミノ酸配列の209位のアルギニン、36位のグルタミン酸、及び37位のセリン以外において、以下の(8' - a) ~ (8' - h) からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(8' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(8' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(8' - c) 上記8' - aの置換と8' - bと欠失を組み合わせたもの；

(8' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(8' - e) 上記8' - aの置換と8' - dの付加を組み合わせたもの；

(8' - f) 上記8' - bの欠失と8' - dの付加を組み合わせたもの；

(8' - g) 上記8' - aの置換と、8' - bの欠失と及び8' - dの付加を組み合わせたもの；

(8' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[請求項11]

請求項9に記載の配列番号27で示されるアミノ酸配列を含むhNAG

LU変異体に対し、該アミノ酸配列の210位のアルギニン、及び45位のセリン以外において、以下の(9' - a) ~ (9' - h) からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(9' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(9' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(9' - c) 上記9' - aの置換と9' - bの欠失を組み合わせたもの；

(9' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(9' - e) 上記9' - aの置換と9' - dの付加を組み合わせたもの；

(9' - f) 上記9' - bの欠失と9' - dの付加を組み合わせたもの；

(9' - g) 上記9' - aの置換と、9' - bの欠失と及び9' - dの付加を組み合わせたもの；

(9' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[請求項12]

請求項9に記載の配列番号29で示されるアミノ酸配列を含むhNAG

LU変異体に対し、該アミノ酸配列の209位のアルギニン、320位のプロリン、及び321位のアスパラギン酸以外において、以下の(10' - a) ~ (10' - h) からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(10' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(10' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(10' - c) 上記10' - aの置換と10' - bの欠失を組み合わせたもの；

(10' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1 ~ 10個であり、1 ~ 5個であり、又は1 ~ 3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(10' - e) 上記10' - aの置換と10' - dの付加を組み合わせたもの；

(10' - f) 上記10' - bの欠失と10' - dの付加を組み合わせたもの；

(10' - g) 上記10' - aの置換と、10' - bの欠失と及び10' - dの付加を組み合わせたもの；

(10' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[請求項13] 請求項9に記載の配列番号31で示されるアミノ酸配列を含むhNAGLU変異体に対し、該アミノ酸配列の210位のアルギニン、36位のグルタミン酸、37位のセリン、及び45位のセリン以外において、以下の(11'-a)～(11'-h)からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(11'-a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(11'-b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(11'-c) 上記11'-aの置換と11'-bの欠失を組み合わせたもの；

(11'-d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(11'-e) 上記11'-aの置換と11'-dの付加を組み合わせたもの；

(11'-f) 上記11'-bの欠失と11'-dの付加を組み合わせたもの；

(11'-g) 上記11'-aの置換と、11'-bの欠失と及び11'-dの付加を組み合わせたもの；

(11'-h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示す

もの。

[請求項14] 請求項9に記載の配列番号33で示されるアミノ酸配列を含むhNAGLU変異体に対し、該アミノ酸配列の209位のアルギニン、54位のイソロイシン、及び620位のリシン以外において、以下の(12'-a)～(12'-h)からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(12'-a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(12'-b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(12'-c) 上記12'-aの置換と12'-bの欠失を組み合わせたもの；

(12'-d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(12'-e) 上記12'-aの置換と12'-dの付加を組み合わせたもの；

(12'-f) 上記12'-bの欠失と12'-dの付加を組み合わせたもの；

(12'-g) 上記12'-aの置換と、12'-bの欠失と及び12'-dの付加を組み合わせたもの；

(12'-h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%

以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

[請求項15] 請求項9に記載の配列番号35で示されるアミノ酸配列を含むhNAG

LU変異体に対し、該アミノ酸配列の210位のアルギニン、55位のイソロイシン、及び45位のセリン以外において、以下の(13'-a)～(13'-h)からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体：

(13'-a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり、該置換されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(13'-b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり、該欠失されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(13'-c) 上記13'-aの置換と13'-bの欠失を組み合わせたもの；

(13'-d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に、1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり、該付加されたアミノ酸残基の個数が、1～10個であり、1～5個であり、又は1～3個であり、例えば、1個又は2個であるもの；

(13'-e) 上記13'-aの置換と13'-dの付加を組み合わせたもの；

(13'-f) 上記13'-bの欠失と13'-dの付加を組み合わせたもの；

(13'-g) 上記13'-aの置換と、13'-bの欠失と及び13'-dの付加を組み合わせたもの；

(13' - h) 該アミノ酸配列と80%以上, 85%以上, 90%以上, 95%以上の同一性, 98%以上, 又は99%の同一性を示すもの。

[請求項16]

請求項9に記載の配列番号37で示されるアミノ酸配列を含むhNAGLU変異体に対し, 該アミノ酸配列の210位のアルギニン, 621位のリシン, 及び45位のセリン以外において, 以下の(14' - a) ~ (14' - h) からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体:

(14' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり, 該置換されたアミノ酸残基の個数が, 1~10個であり, 1~5個であり, 又は1~3個であり, 例えば, 1個又は2個であるもの;

(14' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり, 該欠失されたアミノ酸残基の個数が, 1~10個であり, 1~5個であり, 又は1~3個であり, 例えば, 1個又は2個であるもの;

(14' - c) 上記14' - aの置換と14' - bの欠失を組み合わせたもの;

(14' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に, 1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり, 該付加されたアミノ酸残基の個数が, 1~10個であり, 1~5個であり, 又は1~3個であり, 例えば, 1個又は2個であるもの;

(14' - e) 上記14' - aの置換と14' - dの付加を組み合わせたもの;

(14' - f) 上記14' - bの欠失と14' - dの付加を組み合わせたもの;

(14' - g) 上記14' - aの置換と, 14' - bの欠失と及び14' - dの付加を組み合わせたもの;

(14' - h) 該アミノ酸配列と80%以上, 85%以上, 90%以上, 95%以上の同一性, 98%以上, 又は99%の同一性を示すもの。

[請求項17] 請求項9に記載の配列番号39で示されるアミノ酸配列を含むhNAGLU変異体に対し, 該アミノ酸配列の210位のアルギニン, 55位のイソロイシン, 621位のリシン, 及び45位のセリン以外において, 以下の(15' - a) ~ (15' - h) からなる群から選択される変異を有するhNAGLU変異体:

(15' - a) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたものであり, 該置換されたアミノ酸残基の個数が, 1~10個であり, 1~5個であり, 又は1~3個であり, 例えば, 1個又は2個であるもの;

(15' - b) 該アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基が欠失されたものであり, 該欠失されたアミノ酸残基の個数が, 1~10個であり, 1~5個であり, 又は1~3個であり, 例えば, 1個又は2個であるもの;

(15' - c) 上記15' - aの置換と15' - bの欠失を組み合わせたもの;

(15' - d) 該アミノ酸配列中に又は該アミノ酸配列のN末端側若しくはC末端側に, 1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものであり, 該付加されたアミノ酸残基の個数が, 1~10個であり, 1~5個であり, 又は1~3個であり, 例えば, 1個又は2個であるもの;

(15' - e) 上記15' - aの置換と15' - dの付加を組み合わせたもの;

(15' - f) 上記15' - bの欠失と15' - dの付加を組み合わせたもの;

(15' - g) 上記15' - aの置換と, 15' - bの欠失と及び

15' - d の付加を組み合わせたもの；

(15' - h) 該アミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の同一性、98%以上、又は99%の同一性を示すもの。

- [請求項18] 請求項1～17の何れかに記載のhNAGLU変異体をコードする遺伝子を含んでなるDNA。
- [請求項19] 請求項18に記載のDNAを含んでなる発現ベクター。
- [請求項20] 請求項19に記載の発現ベクターで形質転換された哺乳動物細胞。
- [請求項21] 請求項20に記載の哺乳動物細胞を無血清培地で培養するステップを含む、hNAGLU変異体の製造方法。
- [請求項22] 請求項1～17の何れかに記載のhNAGLU変異体と、抗体との融合蛋白質であって、該抗体が脳血管内皮細胞上の受容体と結合することにより、該融合蛋白質が血液脳関門(BBB)を通過することのできるものである、融合蛋白質。
- [請求項23] 該脳血管内皮細胞上の受容体が、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、レプチン受容体、リポタンパク質受容体、及びIGF受容体からなる群から選択されるものである、請求項22に記載の融合蛋白質。
- [請求項24] 該脳血管内皮細胞上の受容体が、トランスフェリン受容体である、請求項22に記載の融合蛋白質。
- [請求項25] 該抗体が、Fab抗体、F(ab')₂抗体、F(ab')₂抗体、単ドメイン抗体、一本鎖抗体、又はFc抗体の何れかである、請求項22～24の何れかに記載の融合蛋白質。
- [請求項26] 該hNAGLU変異体が、該抗体の軽鎖のC末端側若しくはN末端側の何れかに結合しているものである、請求項22～25の何れか一項に記載の融合蛋白質。
- [請求項27] 該hNAGLU変異体が、該抗体の重鎖のC末端側若しくはN末端側の何れかに結合しているものである、請求項22～25の何れか一項に記載

載の融合蛋白質。

- [請求項28] 該hNAGLU変異体が、該抗体の軽鎖のC末端側若しくはN末端側の何れか、又は重鎖のC末端側若しくはN末端側の何れかに、リンカー配列を介して結合しているものである、請求項22～27の何れか一項に記載の融合蛋白質。
- [請求項29] 該リンカー配列が、1～50個のアミノ酸残基からなるものである、請求項28に記載の融合蛋白質。
- [請求項30] 該リンカー配列が、1個のグリシン、1個のセリン、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、配列番号3のアミノ酸配列、配列番号4のアミノ酸配列、配列番号5のアミノ酸配列、及びこれらのアミノ酸配列が1～10個連続してなるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含んでなるものである、請求項29に記載の融合蛋白質。
- [請求項31] 請求項22～30の何れかに記載の融合蛋白質をコードする遺伝子を含んでなるDNA。
- [請求項32] 請求項31に記載のDNAを含んでなる発現ベクター。
- [請求項33] 請求項32に記載の発現ベクターで形質転換された哺乳動物細胞。
- [請求項34] 請求項33に記載の哺乳動物細胞を無血清培地で培養するステップを含む、hNAGLU変異体と抗体との融合蛋白質の製造方法。