

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-546129

(P2024-546129A)

(43)公表日 令和6年12月17日(2024.12.17)

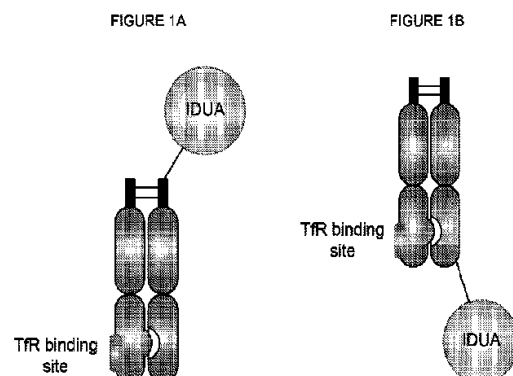
(51)国際特許分類			F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/55	(2006.01)	C 1 2 N	15/55		4 C 0 8 5
			審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全112頁) 最終頁に続く
(21)出願番号			特願2024-534711(P2024-534711)		(71)出願人	
(86)(22)出願日			令和4年12月16日(2022.12.16)		518086619	
(85)翻訳文提出日			令和6年6月11日(2024.6.11)		デナリ セラピューティクス インコーポ	
(86)国際出願番号			PCT/US2022/053196		レイテッド	
(87)国際公開番号			WO2023/114485		Denali Therapeutics	
(87)国際公開日			令和5年6月22日(2023.6.22)		Inc.	
(31)優先権主張番号			63/291,283		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0	
(32)優先日			令和3年12月17日(2021.12.17)		8 0 , サウス サンフランシスコ, オ	
(33)優先権主張国・地域又は機関			米国(US)		イスター ポイント ブールバード 1 6 1	
(81)指定国・地域			AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		(74)代理人	
			,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		100078282	
			AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		弁理士 山本 秀策	
			T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		(74)代理人	
			,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		100113413	
			最終頁に続く		弁理士 森下 夏樹	
					(74)代理人	
					100181674	
					弁理士 飯田 貴敏	
					(74)代理人	
					100181641	
					最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 アルファー-L-イゾロニダーゼ酵素を含む融合タンパク質及びその方法

(57)【要約】

本明細書で提供されるのは、血液脳関門（BBB）を通過させて輸送し得、アルファー-L-イゾロニダーゼ（IDUA）酵素-Fc融合ポリペプチドを含むタンパク質である。特定の実施形態は、MPS Iを治療するためにそのようなタンパク質を使用する方法も提供する。

【選択図】図1



10

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質であって、

a. アルファ-ラーイズロニザーゼ (I D U A) アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された第 1 の F c ポリペプチドと、

b. 配列番号 28 と少なくとも 90 % の同一性を有する配列を含み、トランスフェリン受容体 (T f R) に特異的に結合し得る第 2 の F c ポリペプチドと、を含む前記タンパク質。

【請求項 2】

前記第 2 の F c ポリペプチドが、E U 付番に従う、位置 389 に A l a を有する、請求項 1 に記載のタンパク質。 10

【請求項 3】

前記第 2 の F c ポリペプチドが、E U 付番に従う、位置 380 に G l u ; 及び位置 390 に A s n をさらに含む、請求項 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

前記第 2 の F c ポリペプチドが、E U 付番に従う、以下の位置に、すなわち：

i. 位置 384 に T y r ;

i i. 位置 386 に T h r ;

i i i. 位置 387 に G l u ;

i v. 位置 388 に T r p ;

v. 位置 413 に T h r ;

v i. 位置 415 に G l u ;

v i i. 位置 416 に G l u ; 及び

v i i i. 位置 421 に P h e、

をさらに含む、請求項 3 に記載のタンパク質。 20

【請求項 5】

対象の血液脳関門を通過させて輸送され得る、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 6】

約 100 n M ~ 約 500 n M の親和性で T f R に結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。 30

【請求項 7】

約 200 n M ~ 約 400 n M の親和性で T f R に結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 8】

前記第 2 の F c ポリペプチドが、前記 T f R のアピカルドメインに結合する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 9】

前記タンパク質の前記 T f R への前記結合が、トランスフェリンの前記 T f R への結合を実質的に阻害しない、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。 40

【請求項 10】

前記 I D U A アミノ酸配列が、配列番号 39、40、45、78、及び 99 のいずれか 1 つに対する少なくとも 80 %、85 %、90 %、または 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 11】

前記 I D U A アミノ酸配列が、配列番号 39、40、45、78、及び 99 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載のタンパク質。

【請求項 12】

前記 I D U A アミノ酸配列が、配列番号 41 ~ 44 のいずれか 1 つに対する少なくとも 80 %、85 %、90 %、または 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 50

～ 9 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 13】

前記 I D U A アミノ酸配列が、配列番号 41～44 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載のタンパク質。

【請求項 14】

前記 I D U A アミノ酸配列が、配列番号 46～49 のいずれか 1 つに対する少なくとも 80 %、85 %、90 %、または 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 15】

前記 I D U A アミノ酸配列が、配列番号 46～49 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載のタンパク質。

【請求項 16】

前記 I D U A アミノ酸配列が、配列番号 79～82 のいずれか 1 つに対する少なくとも 80 %、85 %、90 %、または 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 17】

前記 I D U A アミノ酸配列が、配列番号 79～82 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 16 に記載のタンパク質。

【請求項 18】

前記第 1 の F c ポリペプチドが、ペプチド結合によってまたはポリペプチドリンカーによって、前記 I D U A アミノ酸配列、前記 I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 19】

前記ポリペプチドリンカーが可塑性ポリペプチドリンカーである、請求項 18 に記載のタンパク質。

【請求項 20】

前記可塑性ポリペプチドリンカーがグリシンリッチリンカーである、請求項 18 に記載のタンパク質。

【請求項 21】

前記ポリペプチドリンカーが、G S（配列番号 71）、G₄S（配列番号 72）または（G₄S）₂（配列番号 73）である、請求項 19 または 20 に記載のタンパク質。

【請求項 22】

前記第 1 の F c ポリペプチドの N 末端が、前記 I D U A アミノ酸配列、前記 I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 23】

前記第 1 の F c ポリペプチドの C 末端が、前記 I D U A アミノ酸配列、前記 I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 24】

単一の I D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片を含む請求項 1～23 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 25】

前記第 2 の F c ポリペプチドが前記第 1 の F c ポリペプチドと F c 二量体を形成する請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 26】

前記第 1 の F c ポリペプチド及び前記第 2 の F c ポリペプチドがそれぞれ、ヘテロ二量体化を促進する改変を含有する、請求項 1～25 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 27】

E U 付番に従い、前記 F c ポリペプチドのうちの一方が、T 3 6 6 W 置換を有し、もう

10

20

30

40

50

一方のFcポリペプチドが、T366S、L368A、及びY407V置換を有する、請求項26に記載のタンパク質。

【請求項28】

前記第1のFcポリペプチドが前記T366S、前記L368A、及び前記Y407V置換を含有し、前記第2のFcポリペプチドが前記T366W置換を含む、請求項27に記載のタンパク質。

【請求項29】

前記第1のFcポリペプチドが、配列番号9～16及び19～22のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み；前記第2のFcポリペプチドが、配列番号25～32及び35～38のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項28に記載のタンパク質。

10

【請求項30】

前記第1のFcポリペプチド及び／または前記第2のFcポリペプチドが、ネイティブFcRn結合部位を含む、請求項1～29のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項31】

前記第1のFcポリペプチド及び前記第2のFcポリペプチドが、エフェクター機能を有しない、請求項1～30のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項32】

前記第1のFcポリペプチド及び／または前記第2のFcポリペプチドが、エフェクター機能を低下させる改変を含む、請求項1～30のいずれか1項に記載のタンパク質。

20

【請求項33】

エフェクター機能を低下させる前記改変が、EU付番に従い、位置234でのAla及び位置235でのAla；位置234でのAla、位置235でのAla及び位置329でのGly；または位置234でのAla、位置235でのAla及び位置329でのSerという置換である、請求項32に記載のタンパク質。

【請求項34】

前記第1のFcポリペプチドが、配列番号11～16及び19～22のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項33に記載のタンパク質。

30

【請求項35】

前記第1のFcポリペプチドが、配列番号11、12、19、及び20のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項34に記載のタンパク質。

【請求項36】

前記第1のFcポリペプチドが、配列番号15、16、21、及び22のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項34に記載のタンパク質。

【請求項37】

前記IDUAアミノ酸配列に連結された前記第1のFcポリペプチドが、配列番号50～69及び83～92のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項33に記載のタンパク質。

40

【請求項38】

前記IDUAアミノ酸配列に連結された前記第1のFcポリペプチドが、配列番号50～53のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項37に記載のタンパク質。

【請求項39】

前記IDUAアミノ酸配列に連結された前記第1のFcポリペプチドが、配列番号54～57のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項37に記載のタンパク質。

50

【請求項 40】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 83～86 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 37 に記載のタンパク質。

【請求項 41】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 58～61 及び 91～92 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 37 に記載のタンパク質。

【請求項 42】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 62～65 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 37 に記載のタンパク質。

10

【請求項 43】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 87～90 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 37 に記載のタンパク質。

【請求項 44】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 66～67 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 37 に記載のタンパク質。

20

【請求項 45】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 68～69 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 37 に記載のタンパク質。

【請求項 46】

前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 27～32 及び 35～38 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 33～45 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 47】

前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 27、28、35 及び 36 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 46 に記載のタンパク質。

30

【請求項 48】

前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 31、32、37 及び 38 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 46 に記載のタンパク質。

【請求項 49】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 50～65 及び 83～92 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み；前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 35～38 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 26 に記載のタンパク質。

40

【請求項 50】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 50～57 及び 83～86 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み；前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 35～36 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 49 に記載のタンパク質。

【請求項 51】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 58～65 及び 87～92 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み；前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 37～38 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 49 に記載のタ

50

ンパク質。

【請求項 5 2】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 6 6 ～ 6 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み；前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 3 5 ～ 3 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 に記載のタンパク質。

【請求項 5 3】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 6 6 ～ 6 7 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み；前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 3 5 ～ 3 6 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 5 2 に記載のタンパク質。

【請求項 5 4】

前記 I D U A アミノ酸配列に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 6 8 ～ 6 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み；前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 3 7 ～ 3 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 5 2 に記載のタンパク質。

【請求項 5 5】

前記 I D U A アミノ酸配列の脳内への取り込みが、前記第 1 の F c ポリペプチド及び前記第 2 の F c ポリペプチドの非存在下での前記 I D U A アミノ酸配列の取り込みと比較して、または前記第 2 の F c ポリペプチドに対する T f R 結合をもたらす前記改変のない前記 I D U A 酵素の取り込みと比較して、少なくとも 5 倍大きい、請求項 1 ～ 5 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 5 6】

前記第 1 の F c ポリペプチドが、血液脳関門（B B B）受容体に結合するように改変されておらず、前記第 2 の F c ポリペプチドが、T f R に特異的に結合するように改変されている、請求項 1 ～ 5 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 5 7】

前記タンパク質が、免疫グロブリン重鎖及び／もしくは軽鎖可変領域配列またはその抗原結合部分を含まない、請求項 1 ～ 5 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 5 8】

アルファー-レイズロニダーゼ（I D U A）アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された F c ポリペプチドを含むポリペプチドであって、前記 F c ポリペプチドが、配列番号 1 2 に対する少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、かつ別の F c ポリペプチドとのヘテロ二量体化を促進する 1 つ以上の改変を含む、前記ポリペプチド。

【請求項 5 9】

前記 F c ポリペプチドが、ペプチド結合によってまたはポリペプチドリンカーによって、前記 I D U A 酵素、前記 I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される、請求項 5 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 0】

N 末端から C 末端まで：前記 I D U A 酵素、前記 I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片；ポリペプチドリンカー；及び前記 F c ポリペプチド、を含む、請求項 5 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 1】

N 末端から C 末端まで：前記 F c ポリペプチド；ポリペプチドリンカー；及び前記 I D U A 酵素、前記 I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片、を含む、請求項 5 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 2】

前記 F c ポリペプチドが、E U 付番に従う T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V 置換を含む、請求項 5 8 ～ 6 1 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 6 3】

前記 F c ポリペプチドが、E U 付番に従い、位置 2 3 4 での A l a 及び位置 2 3 5 での A l a；位置 2 3 4 での A l a、位置 2 3 5 での A l a 及び位置 3 2 9 での G l y；また

10

20

30

40

50

は位置 2 3 4 での A l a、位置 2 3 5 での A l a 及び位置 3 2 9 での S e r という置換を含む、請求項 5 8 ～ 6 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 6 4】

前記ポリペプチドが、配列番号 5 0 ～ 6 9 及び 8 3 ～ 9 2 のいずれか 1 つに対する少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 6 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 5】

請求項 5 8 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド及び請求項 5 8 に記載の他の F c ポリペプチドを含むタンパク質。

【請求項 6 6】

請求項 1 ～ 5 7 及び 6 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質、または請求項 5 8 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド及び薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 6 7】

請求項 5 8 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 6 8】

請求項 6 7 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 6 9】

請求項 6 7 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 6 8 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 7 0】

請求項 5 8 に記載の前記他の F c ポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 6 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 7 1】

I D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された F c ポリペプチドを含むポリペプチドを生成する方法であって、請求項 6 7 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる前記ポリペプチドが発現する条件下で宿主細胞を培養することを含む、前記方法。

【請求項 7 2】

請求項 1 ～ 5 7 のいずれか 1 項に記載の、I D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された前記第 1 の F c ポリペプチドをコードする第 1 の核酸配列と；前記第 2 の F c ポリペプチドをコードする第 2 の核酸配列と、を含む、ポリヌクレオチドの対。

【請求項 7 3】

請求項 7 2 に記載のポリヌクレオチドの対を含む、1 つ以上のベクター。

【請求項 7 4】

請求項 7 2 に記載のポリヌクレオチドの対、または請求項 7 3 に記載の 1 つ以上のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 7 5】

I D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された第 1 の F c ポリペプチドと、第 2 の F c ポリペプチドとを含むタンパク質を生成する方法であって、請求項 7 2 に記載のポリヌクレオチドの対が発現する条件下で宿主細胞を培養することを含む、前記方法。

【請求項 7 6】

M P S I を治療する方法であって、請求項 1 ～ 5 7 及び 6 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 5 8 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを、それを必要とする患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 7 7】

M P S I の治療を必要とする患者におけるその治療に使用するための、請求項 1 ～ 5

10

20

30

40

50

7 及び 6 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 5 8 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 7 8】

M P S I の治療を必要とする患者におけるそれを治療するための医薬の調製における、請求項 1 ～ 5 7 及び 6 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 5 8 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 7 9】

M P S I を有する患者において毒性代謝産物の蓄積を減少させる方法であって、請求項 1 ～ 5 7 及び 6 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 5 8 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを、前記患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 8 0】

M P S I を有する患者における毒性代謝産物の蓄積を減少させるのに使用するための、請求項 1 ～ 5 7 及び 6 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 5 8 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 8 1】

M P S I を有する患者における毒性代謝産物の蓄積を減少させるための医薬の調製における、請求項 1 ～ 5 7 及び 6 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 5 8 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 8 2】

前記毒性代謝産物が、ヘパラン硫酸由来オリゴ糖またはデルマタン硫酸由来オリゴ糖を含む、請求項 7 9 ～ 8 1 のいずれか 1 項に記載の方法、タンパク質または使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 2 1 年 1 2 月 1 7 日出願の米国仮出願第 6 3 / 2 9 1 , 2 8 3 号に対する優先権を主張する。上に参照された出願の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ムコ多糖症 I 型 (M P S I) (またはハーラー症候群) は、I D U A 遺伝子の遺伝子変異によって引き起こされるリソソーム蓄積障害である。これらの変異により、アルファーレーイズロニダーゼ (I D U A) タンパク質の機能が低下または消失し、グリコサミノグリカンであるデルマタン硫酸及びヘパラン硫酸が蓄積し、骨格、心臓、呼吸器系、及び脳などの複数の臓器及び組織に変化が生じる。M P S I の治療は依然として大部分が保存的である；欠乏している酵素は静脈内投与してもよいが、血液脳関門 (B B B) を通過させて組換え酵素を送達することが困難であるせいで、脳にはほとんど効果がない。したがって、M P S I の症状及び I D U A 欠損を、C N S (中枢神経系) 及び末梢神経の両方で治療する、より効果的な治療法が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 3】

したがって、本明細書では、B B B を通過し、M P S I の末梢及び C N S 症状の両方を治療する能力を有する特定の酵素補充療法が提供される。特に、特定の実施形態は、(a) アルファーレーイズロニダーゼ (I D U A) アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された第 1 の F c ポリペプチド；及び (b) 第 2 の F c ポリペプチドを含むタンパク質を提供し；この第 1 及び／または第 2 の F c ポリペプチドは、血液脳関門 (B B B) 受容体、例えばトランスフェリン受容体 (T f R) に結合し得る (例えば、特異的に結合し得る) 改変 F c である。特定の実施形態では、この第 2 の F c ポリペプチドは、第 1 の F c ポリペプチドと F c 二量体を形成する。

【0004】

特定の実施形態では、この第1のFcポリペプチドは、TfRに結合し得る（例えば、特異的に結合する）改変されたFcである。特定の実施形態では、この第1のFcポリペプチドは、配列番号28または98（例えば、配列番号28）と少なくとも90%の同一性を有する配列を含む改変Fcであり、TfRに特異的に結合し得る。

【0005】

特定の実施形態では、この第1のFcポリペプチドは、1）配列番号28または98（例えば、配列番号28）と少なくとも90%の同一性を有する配列を含み；2）TfRに特異的に結合し得；かつ3）EU付番に従い位置389にAlaを有する。特定の実施形態では、この第1のFcポリペプチドは、EU付番に従い、位置380にGlu；及び位置390にAsnをさらに含む。いくつかの実施形態では、この第1のFcポリペプチドは、EU付番に従い、以下の位置に：すなわち位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheをさらに含む。

【0006】

特定の実施形態では、この第2のFcポリペプチドは、TfRに結合し得る（例えば、特異的に結合し得る）改変Fcである。特定の実施形態では、この第2のFcポリペプチドは、配列番号28または98（例えば、配列番号28）と少なくとも90%の同一性を有する配列を含む改変Fcであり、TfRに特異的に結合し得る。

【0007】

特定の実施形態では、この第2のFcポリペプチドは、1）配列番号28または98（例えば、配列番号28）と少なくとも90%の同一性を有する配列を含み；2）TfRに特異的に結合し得；かつ3）EU付番に従い位置389にAlaを有する。特定の実施形態では、この第2のFcポリペプチドは、EU付番に従い、位置380にGlu；及び位置390にAsnをさらに含む。特定の実施形態では、第2のFcポリペプチドは、EU付番に従い、以下の位置に、すなわち位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheをさらに含む。

【0008】

特定の実施形態は、以下を含むタンパク質を提供する：

- a. アルファ-ラーイズロニダーゼ（IDUA）アミノ酸配列、IDUAバリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された第1のFcポリペプチド；及び
- b. 配列番号28と少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、トランスフェリン受容体（TfR）に特異的に結合し得る第2のFcポリペプチド。

【0009】

特定の実施形態では、第2のFcポリペプチドは、EU付番に従い、位置389にAlaを有する。

【0010】

特定の実施形態では、前記第2のFcポリペプチドが、EU付番に従い、位置380にGlu；及び位置390にAsnをさらに含む。

【0011】

特定の実施形態では、第2のFcポリペプチドは、EU付番に従い、以下の位置に、すなわち：位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheをさらに含む。

【0012】

特定の実施形態では、タンパク質は、対象の血液脳関門を横切って輸送され得る。

【0013】

特定の実施形態では、タンパク質は、約100nM～約500nMの親和性でTfRに結合する。

10

20

30

40

50

【0014】

特定の実施形態では、タンパク質は、約200～約400 nMの親和性でTfRに結合する。

【0015】

特定の実施形態では、第2のFcポリペプチドは、TfRのアピカルドメインに結合する。

【0016】

特定の実施形態では、タンパク質のTfRへの結合は、トランスフェリンのTfRへの結合を実質的に阻害しない。

【0017】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列は、配列番号39、40、45、78、及び99のいずれか1つに対する少なくとも80%、85%、90%、または95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0018】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列は、配列番号39、40、45、78、及び99のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0019】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列は、配列番号41～44のいずれか1つに対する少なくとも80%、85%、90%、または95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0020】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列は、配列番号41～44のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0021】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列は、配列番号46～49のいずれか1つに対する少なくとも80%、85%、90%、または95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0022】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列は、配列番号46～49のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0023】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列は、配列番号79～82のいずれか1つに対する少なくとも80%、85%、90%、または95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0024】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列は、配列番号79～82のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0025】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチドは、ペプチド結合によってまたはポリペプチドリinkerによって、IDUAアミノ酸配列、IDUAバリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。特定の実施形態では、第1のFcポリペプチドは、ペプチド結合によって、IDUAアミノ酸配列、IDUAバリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。特定の実施形態では、第1のFcポリペプチドは、ペプチドリinkerによって、IDUAアミノ酸配列、IDUAバリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。

【0026】

特定の実施形態では、ポリペプチドリinkerは、可塑性ポリペプチドリinkerである。

【0027】

特定の実施形態では、可塑性ポリペプチドリinkerは、グリシンリッチリinkerである。

。

10

20

30

40

50

【0028】

特定の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、GS（配列番号71）、G₄S（配列番号72）または（G₄S）₂（配列番号73）である。

【0029】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチドのN末端は、IDUAアミノ酸配列、IDUAバリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。

【0030】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチドのC末端は、IDUAアミノ酸配列、IDUAバリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。

【0031】

特定の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、単一のIDUAアミノ酸配列、IDUAバリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片を含む。

【0032】

特定の実施形態では、この第2のFcポリペプチドは、第1のFcポリペプチドとFc二量体を形成する。

【0033】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチド及び第2のFcポリペプチドはそれぞれ、ヘテロ二量体化を促進する改変を含む。

【0034】

特定の実施形態では、EU付番に従い、Fcポリペプチドのうちの一方は、T366W置換を有し、他方のFcポリペプチドは、T366S、L368A、及びY407V置換を有する。

【0035】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチドは、T366S、L368A、及びY407V置換を含有し、第2のFcポリペプチドは、T366W置換を含む。

【0036】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチドは、配列番号9～16及び19～22のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み；第2のFcポリペプチドは、配列番号25～32及び35～38のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0037】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチドは、T366W置換を含み、第2のFcポリペプチドは、T366S、L368A、及びY407V置換を含む。

【0038】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチドは、配列番号17～18及び74～75のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み；第2のFcポリペプチドは、配列番号33～34及び97～98のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0039】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、ネイティブFcRn結合部位を含む。

【0040】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチド及び第2のFcポリペプチドは、エフェクター機能を有さない。

【0041】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、エフェクター機能を低下させる改変を含む。

【0042】

特定の実施形態では、エフェクター機能を低下させる改変は、EU付番に従い、位置234でのAla及び位置235でのAla；位置234でのAla、位置235でのAla

10

20

30

40

50

a 及び位置 329 での G l y ; または位置 234 での A l a 、位置 235 での A l a 及び位置 329 での S e r という置換である。

【0043】

特定の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 11 ~ 16 、及び 19 ~ 22 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0044】

特定の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 11 、12、19、及び 20 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0045】

特定の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 15 、16、21、及び 22 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0046】

特定の実施形態では、I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 50 ~ 69 及び 83 ~ 92 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0047】

特定の実施形態では、I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 50 ~ 53 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0048】

特定の実施形態では、I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 54 ~ 57 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0049】

特定の実施形態では、I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 83 ~ 86 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0050】

特定の実施形態では、I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 58 ~ 61 及び 91 ~ 92 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0051】

特定の実施形態では、I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 62 ~ 65 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0052】

特定の実施形態では、I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 87 ~ 90 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0053】

特定の実施形態では、I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 66 ~ 67 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0054】

特定の実施形態では、I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 68 ~ 69 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0055】

特定の実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号27～32及び35～38のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0056】

特定の実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号27、28、35及び36のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0057】

特定の実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号31、32、37及び38のいずれか1つに対する少なくとも95%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0058】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドは、配列番号50～65及び83～92のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；第2のFcポリペプチドは、配列番号35～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0059】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドは、配列番号50～57及び83～86のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；第2のFcポリペプチドは、配列番号35～36のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

20

【0060】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドは、配列番号58～65及び87～92のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；第2のFcポリペプチドは、配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0061】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドは、配列番号66～69のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；第2のFcポリペプチドは、配列番号35～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0062】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドは、配列番号66～67のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；第2のFcポリペプチドは、配列番号35～36のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

30

【0063】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドは、配列番号68～69のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；第2のFcポリペプチドは、配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0064】

特定の実施形態では、IDUAアミノ酸配列の脳内への取り込みは、第1のFcポリペプチド及び第2のFcポリペプチドの非存在下でのIDUAアミノ酸配列の取り込みと比較して、またはTfR結合をもたらす、第2のFcポリペプチドに対する、改変のないIDUA酵素の取り込みと比較して、少なくとも5倍大きい。

40

【0065】

特定の実施形態では、第1のFcポリペプチドは、血液脳関門（BBB）受容体に結合するように改変されておらず、第2のFcポリペプチドはTfRに特異的に結合するように改変されている。

【0066】

特定の実施形態では、タンパク質は、免疫グロブリン重鎖及び／または軽鎖可変領域配列またはその抗原結合部分を含まない。

【0067】

特定の実施形態では、アルファー-L-イズロニダーゼ（IDUA）アミノ酸配列、ID

50

U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された F c ポリペプチドを含むポリペプチドを提供し、この F c ポリペプチドは、配列番号 12 に対する少なくとも 90 % の同一性を有する配列を含み、別の F c ポリペプチドとのヘテロ二量体化を促進する 1 つ以上の改変を含む。

【0068】

特定の実施形態では、F c ポリペプチドは、ペプチド結合によってまたはポリペプチドリンカーによって、IDUA 酵素、IDUA バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。

【0069】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、N 末端から C 末端まで：IDUA 酵素、IDUA バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片；ポリペプチドリンカー；及び F c ポリペプチドを含む。

【0070】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、N 末端から C 末端まで：F c ポリペプチド；ポリペプチドリンカー；及び IDUA 酵素、IDUA バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片を含む。

【0071】

特定の実施形態では、F c ポリペプチドは、EU 付番に従う、T366S、L368A 及び Y407V 置換を含む。

【0072】

特定の実施形態では、F c ポリペプチドは、EU 付番に従う、位置 234 での Ala 及び位置 235 での Ala；位置 234 での Ala、位置 235 での Ala 及び位置 329 での Gly；または位置 234 での Ala、位置 235 での Ala 及び位置 329 での Ser という置換を含む。

【0073】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 50～69 及び 83～92 のいずれか 1 つに対する少なくとも 95 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0074】

特定の実施形態では、1) アルファ-レイズロニダーゼ (IDUA) アミノ酸配列、IDUA バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された F c ポリペプチドを含むポリペプチドであって、この F c ポリペプチドは、配列番号 12 に対する少なくとも 90 % の同一性を有する配列を含み、別の F c ポリペプチドとのヘテロ二量体化を促進する 1 つ以上の改変を含む、ポリペプチドと、2) 他の F c ポリペプチドと、を含むタンパク質を提供する。

【0075】

特定の実施形態は、本明細書に記載の融合タンパク質または本明細書に記載のポリペプチドと、薬学的に許容される担体及び／または賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。

【0076】

特定の実施形態は、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、本明細書に記載の IDUA-Fc 融合ポリペプチド）をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0077】

特定の実施形態は、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【0078】

特定の実施形態は、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載のベクターを含む宿主細胞を提供する。特定の実施形態では、その宿主細胞は、本明細書に記載の別のポリペプチド（例えば、TfR 結合改変 F c ポリペプチドなどの他の F c ポリペプチド）をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドをさらに含む。

【0079】

特定の実施形態は、IDUA アミノ酸配列、IDUA バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された F c ポリペプチドを含むポリペプチドを生成する方法であ

10

20

30

40

50

って、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドが発現する条件下で宿主細胞を培養することを含む、方法を提供する。

【0080】

特定の実施形態は、IDUAアミノ酸配列、IDUAバリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された第1のFcポリペプチドをコードする第1の核酸配列；及び本明細書に記載される、第2のFcポリペプチドをコードする第2の核酸配列、を含むポリヌクレオチドの対を提供する。

【0081】

特定の実施形態はまた、本明細書に記載のポリヌクレオチドの対を含む1つ以上のベクターを提供する。例えば、特定の実施形態は、ポリヌクレオチドの対を含む単一のベクターを提供する。他の実施形態は、2つのベクターを提供し、この第1のベクターは、この対からの第1のポリヌクレオチドを含み、第2のベクターは、この対からの第2のポリヌクレオチドを含む。

【0082】

特定の実施形態は、本明細書に記載のポリヌクレオチドの対、または本明細書に記載の1つ以上のベクターを含む宿主細胞を提供する。

特定の実施形態は、IDUAアミノ酸配列、IDUAバリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された第1のFcポリペプチド、及び第2のFcポリペプチドを含むタンパク質を生成する方法であって、本明細書に記載のポリヌクレオチドの対が発現する条件下で宿主細胞を培養することを含む、方法を提供する。

【0083】

特定の実施形態は、MPS Iを治療する方法であって、本明細書に記載のタンパク質または本明細書に記載のポリペプチドを、それを必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、治療有効量のタンパク質またはポリペプチドが投与される。

【0084】

特定の実施形態は、MPS Iの治療を必要とする患者におけるその治療に使用するための、本明細書に記載のタンパク質または本明細書に記載のポリペプチドを提供する。

【0085】

特定の実施形態は、MPS Iの治療を必要とする患者におけるそれを治療するための医薬の調製における、本明細書に記載のタンパク質または本明細書に記載のポリペプチドの使用を提供する。

【0086】

特定の実施形態は、MPS Iを有する患者における毒性代謝産物の蓄積を減少させる方法であって、本明細書に記載のタンパク質または本明細書に記載のポリペプチドをこの患者に投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、治療有効量（例えば、治療上有効な量）のタンパク質またはポリペプチドが投与される。

【0087】

特定の実施形態は、MPS Iを有する患者における毒性代謝産物の蓄積を減少させるのに使用するための、本明細書に記載のタンパク質または本明細書に記載のポリペプチドを提供する。

【0088】

特定の実施形態は、MPS Iを有する患者における毒性代謝産物の蓄積を減少させるための医薬の調製における、本明細書に記載のタンパク質または本明細書に記載のポリペプチドの使用を提供する。

【0089】

特定の実施形態では、毒性代謝産物は、ヘパラン硫酸由来のオリゴ糖またはデルマタン硫酸由来のオリゴ糖を含む。

【図面の簡単な説明】

【0090】

10

20

30

40

50

【図1】例示的なETV:IDUA融合タンパク質の図解であり、IDUA酵素は、FcポリペプチドのN末端(A)またはFcポリペプチドのC末端(B)に融合されている。

【図2】IDUA-Fc融合タンパク質及びAldurazyme(アウドラザイム)(ラロニダーゼ)の酵素活性のインビトロ評価。

【図3】ヘパラン硫酸及びデルマタン硫酸のLCMS定量を使用して、ハーラー(MPS I)患者と健常対照群の線維芽細胞におけるラロニダーゼと比較したETV:IDUA Fusion 1の細胞活性の評価。

【図4A】TfRノックインマウス(「TfR^{mu}/h^uKI」)における、ETV:IDUA Fusion 3血清PKの評価。

【図4B】TfRノックインマウス(「TfR^{mu}/h^uKI」)における、ETV:IDUA Fusion 4血清PKの評価。

【図4C】TfRノックインマウス(「TfR^{mu}/h^uKI」)における、ETV:IDUA Fusion 6血清PKの評価。

【図5A】TfRノックインマウス(「TfR^{mu}/h^uKI」)におけるETV:IDUA Fusion 3脳PKの評価。

【図5B】TfRノックインマウス(「TfR^{mu}/h^uKI」)における、ETV:IDUA Fusion 4脳PKの評価。

【図5C】TfRノックインマウス(「TfR^{mu}/h^uKI」)における、ETV:IDUA Fusion 6脳PKの評価。

【図6A】MPS Iの健康なマウスモデルと疾患マウスモデルで実施した比較研究における、CSFにおける薬力学的反応(総GAGレベル)の評価。健康なマウスモデルは、TfRノックインマウス(「TfR^{mu}/h^u」)で表され、疾患マウスモデルは、IDUA遺伝子がノックアウトされたTfRノックインマウス(「IDUA KO; TfR^{mu}/h^u」)で表される。グラフには平均±SEM及びp値が示される:一元配置分散分析、ダネットの多重比較検定; ** p ≤ 0.01、*** p ≤ 0.001、及び**** p ≤ 0.0001。

【図6B】MPS Iの健康なマウスモデルと疾患マウスモデルで実施した比較研究における、脳における薬力学的反応(総GAGレベル)の評価。健康なマウスモデルは、TfRノックインマウス(「TfR^{mu}/h^u」)で表され、疾患マウスモデルは、IDUA遺伝子がノックアウトされたTfRノックインマウス(「IDUA KO; TfR^{mu}/h^u」)で表される。グラフには平均±SEM及びp値が示される:一元配置分散分析、ダネットの多重比較検定; ** p ≤ 0.01、*** p ≤ 0.001、及び**** p ≤ 0.0001。

【図6C】MPS Iの健康なマウスモデルと疾患マウスモデルで実施した比較研究における、肝臓における薬力学的反応(総GAGレベル)の評価。健康なマウスモデルは、TfRノックインマウス(「TfR^{mu}/h^u」)で表され、疾患マウスモデルは、IDUA遺伝子がノックアウトされたTfRノックインマウス(「IDUA KO; TfR^{mu}/h^u」)で表される。グラフには平均±SEM及びp値が示される:一元配置分散分析、ダネットの多重比較検定; ** p ≤ 0.01、*** p ≤ 0.001、及び**** p ≤ 0.0001。

【図6D】MPS Iの健康なマウスモデルと疾患マウスモデルで実施した比較研究における、尿における薬力学的反応(総GAGレベル)の評価。健康なマウスモデルは、TfRノックインマウス(「TfR^{mu}/h^u」)で表され、疾患マウスモデルは、IDUA遺伝子がノックアウトされたTfRノックインマウス(「IDUA KO; TfR^{mu}/h^u」)で表される。グラフには平均±SEM及びp値が示される:一元配置分散分析、ダネットの多重比較検定; ** p ≤ 0.01、*** p ≤ 0.001、及び**** p ≤ 0.0001。

【発明を実施するための形態】

【0091】

現在、MPS Iの治療のための新しい治療薬、特に神経認知表現型を有する重篤なM

10

20

30

40

50

P S Iを治療する治療薬が必要とされている。本明細書に記載されているのは、E T V : I D U Aと呼ばれる特定の酵素補充療法であり、これには、B B Bを通過し、M P S Iの末梢及びC N S症状の両方を治療する能力がある。本明細書で使用される場合、「E T V : I D U A」という用語は、B B Bを通過させて輸送し得、I D U A酵素、I D U A酵素バリエーション、またはその触媒活性断片に結合（例えば、融合）している第1のF cポリペプチド；及び第2のF cポリペプチドを含む、タンパク質（例えば、二量体タンパク質）を指す。

【0092】

I D U A酵素－F c融合ポリペプチドを含むタンパク質分子

本明細書に記載されるように、特定の実施形態は、I D U A酵素－F c融合ポリペプチドを含むタンパク質分子を提供する。タンパク質に組み込まれたI D U A酵素は、触媒的に活性である、すなわち、酵素活性を保持する。いくつかの態様では、本明細書に記載のタンパク質は、以下を含む：（a）改変（例えば、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の改変）を含んでもよいし、または野生型F cポリペプチドであってもよい第1のF cポリペプチド；及びI D U A酵素；ならびに（b）第2のF cポリペプチドであって、改変（例えば、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の改変）を含んでもよいし、または野生型F cポリペプチドであってもよい、第2のF cポリペプチド；及び任意選択でI D U A酵素を含み、ここでこの第1及び／または第2のF cポリペプチドは、血液脳関門（B B B）受容体、例えば、トランスフェリン受容体（T f R）への結合をもたらす改変を含む。

【0093】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のタンパク質は、全長I D U A野生型配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のタンパク質は、成熟I D U A野生型配列を含む。本明細書に記載されているように、野生型I D U Aタンパク質配列にはいくつかの多型が報告されている。例えば、I D U A酵素は、E U付番に従い、位置33にHもしくはQを含み、及び／または位置622にAもしくはTを含んでもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のタンパク質は、触媒活性断片または野生型I D U A配列のバリエーションを含む。例えば、I D U A酵素は、E U付番に従い位置27にEを含んでもよいし、または、アミノ酸が存在しなくてもよい。他のI D U A酵素短縮についても本明細書で説明する。したがって、いくつかの実施形態では、I D U Aアミノ酸配列は、配列番号39～49、78～82及び99のいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、あるいは配列番号39～49、78～82及び99のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、I D U Aアミノ酸配列は、配列番号39、40、45、78、及び99のいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、あるいは配列番号39、40、45、78、及び99のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このような配列内でX₁はHである。特定の実施形態では、このような配列内でX₁はQである。特定の実施形態では、このような配列内でX₂はAである。特定の実施形態では、このような配列内でX₂はTである。特定の実施形態では、このような配列内でX₃はEである。特定の実施形態では、このような配列内でX₃は存在しない。いくつかの実施形態では、I D U Aアミノ酸配列は、配列番号41～44のいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、あるいは配列番号41～44のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、I D U Aアミノ酸配列は、配列番号46～49のいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも

96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、あるいは配列番号46～49のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、IDUAアミノ酸配列は、配列番号79～82のいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、あるいは配列番号79～82のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0094】

上で考察するとおり、いくつかの実施形態では、IDUA酵素は、IDUAタンパク質のバリエーションまたは触媒活性断片である（例えば、本明細書に記載されたIDUAアミノ酸配列を含む）。いくつかの実施形態では、IDUA酵素の触媒活性バリエーションまたは断片は、野生型IDUA酵素の活性の少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれ以上を有する。

【0095】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のタンパク質に存在するIDUA酵素、またはその触媒活性バリエーションもしくは断片は、FcポリペプチドまたはTfR結合Fcポリペプチドに接合されていない場合のその活性と比較して、その活性の少なくとも25%を保持する。いくつかの実施形態では、IDUA酵素、またはその触媒活性バリエーションもしくは断片は、FcポリペプチドまたはTfR結合Fcポリペプチドに接合されていない場合のその活性と比較して、その活性の少なくとも10%、または少なくとも15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%もしくは95%を保持する。いくつかの実施形態では、IDUA酵素、またはその触媒活性バリエーションもしくは断片は、FcポリペプチドまたはTfR結合Fcポリペプチドに接合されていない場合のその活性と比較して、その活性の少なくとも80%、85%、90%または95%を保持する。いくつかの実施形態では、Fcポリペプチドへの融合は、IDUA酵素、またはその触媒活性バリエーションもしくは断片の活性を低下させない。いくつかの実施形態では、TfR結合Fcポリペプチドへの融合は、IDUA酵素の活性を低下させない。

【0096】

Fcポリペプチド改変

本明細書に記載の融合タンパク質に組み込まれたFcポリペプチドは、ある特定の改変を含み得る。例えば、Fcポリペプチドは、血液脳関門（BBB）受容体、例えば、トランスフェリン受容体（TfR）への結合をもたらす改変を含み得る。さらに、Fcポリペプチドは、ヘテロ二量体化を促進する改変、血清安定性または血清半減期を増大させる改変、エフェクター機能を調節する改変、グリコシル化に影響を与える改変、及び／またはヒトにおける免疫原性を低下させる改変など、他の改変を含んでもよい。したがって、特定の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、2つのFcポリペプチドを含み、一方のFcは野生型Fcポリペプチド、例えば、ヒトIgG1 Fcポリペプチドであり；他方のFcは、血液脳関門（BBB）受容体、例えば、トランスフェリン受容体（TfR）に結合するように改変されており、任意選択で、1つ以上の追加の改変をさらに含む。特定の他の実施形態では、両方のFcポリペプチドはそれぞれ、独立して選択された改変（例えば、本明細書に記載の改変）を含む。例えば、特定の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、2つのFcポリペプチドを含み、ここで一方のFcは、BBB受容体に結合するように改変されていないが、本明細書に記載される1つ以上の他の改変を含み；もう一方のFcは、血液脳関門（BBB）受容体、例えば、トランスフェリン受容体（TfR）に結合するように改変されており、任意選択で、1つ以上の追加の改変をさらに含む。特定の他の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、2つのFcポリペプチドを含み、両方のFcポリペプチドとも、血液脳関門（BBB）受容体、例え

10

20

30

40

50

ば、トランスフェリン受容体（T f R）に結合するように改変されており、任意選択で、1つ以上の追加の改変をさらに含む。

【0097】

種々のF c改変において指定されるアミノ酸残基は、B B B受容体、例えば、T f Rに結合する改変F cポリペプチド中に導入されるものを含め、本明細書において、E Uインデックス付番を使用して付番される。任意のF cポリペプチド、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4のF cポリペプチドは、本明細書に記載の1つ以上の位置に、改変、例えば、アミノ酸置換を有し得る。

【0098】

本明細書に記載の融合タンパク質に存在する改変（例えば、ヘテロ二量体化及び／またはB B B受容体結合を増強させる）F cポリペプチドは、ネイティブF c領域配列またはその断片、例えば、少なくとも50アミノ酸長もしくは少なくとも100アミノ酸長、もしくはそれ以上の断片に対して、少なくとも70%の同一性、少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ネイティブF cのアミノ酸配列は、配列番号1のF c領域配列である。いくつかの実施形態では、改変F cポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸1～110もしくは配列番号1のアミノ酸111～217、またはそれらの断片、例えば、少なくとも50アミノ酸長もしくは少なくとも100アミノ酸長もしくはそれ以上の断片に対して、少なくとも70%の同一性、少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する。

【0099】

いくつかの実施形態では、改変（例えば、ヘテロ二量体化及び／またはB B B受容体結合を増強させる）F cポリペプチドは、ネイティブF c領域のアミノ酸配列に対応する、少なくとも50個のアミノ酸、または少なくとも60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個もしくは95個以上、または少なくとも100個以上のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、改変F cポリペプチドは、配列番号1のようなネイティブF c領域のアミノ酸配列に対応する、少なくとも25個の連続するアミノ酸、または少なくとも30個、35個、40個もしくは45個の連続するアミノ酸、または50個の連続するアミノ酸、または少なくとも60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個もしくは95個以上の連続するアミノ酸、または100個のもしくはそれ以上の連続するアミノ酸を含む。

【0100】

血液脳関門（B B B）受容体結合のための改変

いくつかの態様では、本明細書で提供されるのは、血液脳関門（B B B）を通過させて輸送し得る融合タンパク質である。このようなタンパク質は、B B B受容体に結合する、改変F cポリペプチドを含む。B B B受容体は、B B B内皮、ならびに他の細胞型及び組織型で発現する。いくつかの実施形態では、B B B受容体は、トランスフェリン受容体（T f R）である。

【0101】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、T f Rに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、約50 nM～約500 nMの親和性でT f Rに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、タンパク質は、約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450

、460、470、480、490または500 nMの親和性でTfRに結合する（例えば、特異的に結合する）。いくつかの実施形態では、タンパク質は、約100～約500 nMの親和性でTfRに結合する。いくつかの実施形態では、タンパク質は、約100 nM～約300 nM、または約200 nM～約450 nMの親和性でTfRに結合する。いくつかの実施形態では、タンパク質は、約250 nMの親和性でTfRに結合する。特定の実施形態では、タンパク質は、約150～約400 nM、または約200～約400 nM、または約250 nM～約350 nM、または約300～約350 nMの親和性でTfRに結合する。

【0102】

いくつかの実施形態では、TfRに特異的に結合する改変Fcポリペプチドは、CH3ドメインに置換を含む。いくつかの実施形態では、改変Fcポリペプチドは、TfR結合活性のために改変されるIgG CH3ドメインなどのヒトIg CH3ドメインを含む。CH3ドメインは、任意のIgGサブタイプ、すなわちIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4からのものであり得る。IgG抗体の文脈では、CH3ドメインとは、EU付番スキームに従って付番されたほぼ位置341～ほぼ位置447のアミノ酸のセグメントを指す。

【0103】

いくつかの実施形態では、TfRに特異的に結合する改変Fcポリペプチドは、TfRのアピカルドメインに結合し、かつトランスフェリンのTfRへの結合を遮断することもその他で阻害することなく、TfRに結合し得る。いくつかの実施形態では、トランスフェリンのTfRへの結合は、実質的に阻害されない。いくつかの実施形態では、トランスフェリンのTfRへの結合は、約50%未満（例えば、約45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、または5%未満）阻害される。いくつかの実施形態では、トランスフェリンのTfRへの結合は、約20%未満（例えば、約15%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、6%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満または1%未満）阻害される。

【0104】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質に存在する改変（例えば、BBB受容体結合）Fcポリペプチドは、EU付番スキームに従う、アミノ酸位置384、386、387、388、389、413、415、416及び421に置換を含む。

【0105】

いくつかの実施形態では、TfRに特異的に結合する改変Fcポリペプチドは、EU付番に従う、位置389にAlaを含む。いくつかの実施形態では、TfRに特異的に結合する改変Fcポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置380にGlu；位置389にAla；及び位置390にAsnを含む。いくつかの実施形態では、TfRに特異的に結合する改変Fcポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち位置380にGlu；位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置389にAla；位置390にAsn；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheを含む。

【0106】

追加の実施形態では、改変Fcポリペプチドは、EU付番スキームに従う414、424及び426を含む位置に1つ、2つまたは3つの置換をさらに含む。いくつかの実施形態では、位置414はLys、Arg、GlyもしくはProであり、位置424はSer、Thr、GluもしくはLysであり、及び／または位置426はSer、TrpもしくはGlyである。

【0107】

いくつかの実施形態では、改変Fcポリペプチドは、配列番号23のアミノ酸111～217に対する少なくとも70%の同一性、少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の

10

20

30

40

50

同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し；配列番号 23 の E U インデックス位置 380、384～390 及び／または 413～421 のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、配列番号 24 のアミノ酸 111～216 に対する少なくとも 70% の同一性、少なくとも 75% の同一性、少なくとも 80% の同一性、少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し；配列番号 23 または 24 の E U インデックス位置 380、384～390 及び／または 413～421 のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、配列番号 23 または 24 に対する少なくとも 70% の同一性、少なくとも 75% の同一性、少なくとも 80% の同一性、少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し；配列番号 23 または 24 の E U インデックス位置 380、384～390 及び／または 413～421 のアミノ酸を含む。

10

【0108】

いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、配列番号 23 または 24 に対する少なくとも 75% の同一性、少なくとも 80% の同一性、少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、位置 389 に A l a を有する。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、配列番号 23 または 24 に対する少なくとも 75% の同一性、少なくとも 80% の同一性、少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置 380 に G l u；位置 389 に A l a；及び位置 390 に A s n を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、配列番号 23 または 24 に対する少なくとも 75% の同一性、少なくとも 80% の同一性、少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し、かつ E U 付番に従い、以下の位置に、すなわち位置 380 に G l u；位置 384 に T y r；位置 386 に T h r；位置 387 に G l u；位置 388 に T r p；位置 389 に A l a；位置 390 に A s n；位置 413 に T h r；位置 415 に G l u；位置 416 に G l u；及び位置 421 に P h e を含む。

20

30

【0109】

いくつかの実施形態では、改変された F c ポリペプチドは、配列番号 23 または 24 のアミノ酸配列を含む。

【0110】

追加の F c ポリペプチド変異

いくつかの態様では、本明細書に記載の融合タンパク質は、2つの F c ポリペプチドを含み、一方または両方の F c ポリペプチドはそれぞれ、独立して選択された改変（例えば、本明細書に記載の改変）を含む。一方または両方の F c ポリペプチドに導入され得る他の変異の非限定的な例としては、例えば、F c ポリペプチドの血清安定性もしくは血清半減期を増加させる変異、F c ポリペプチドのエフェクター機能を調節する変異、F c ポリペプチドのグリコシル化に影響を与える変異、F c ポリペプチドのヒトにおける免疫原性を低下させる変異、ならびに／または F c ポリペプチドのノブ及びホールによるヘテロ二量体化をもたらす変異が挙げられる。F c ポリペプチドに含まれ得るさまざまな修飾の例は、W O 2 0 1 9 / 0 7 0 5 7 7 に記載されており、その全体があらゆる目的で本明細書に参照により組み込まれている。

40

いくつかの実施形態では、融合タンパク質に存在する F c ポリペプチドはそれぞれ独立して、対応する野生型 F c ポリペプチド（例えば、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、

50

または I g G 4 の F c ポリペプチド) に対する少なくとも約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% のアミノ酸配列同一性を有する。

【0111】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質に存在する F c ポリペプチドは、ヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体形成を妨げるノブ変異及びホール変異を有する。一般に、改変は、突起が空洞内に配置されてヘテロ二量体形成を促進し、それによってホモ二量体形成を妨げることができるように、一方のポリペプチドの界面で突起（「ノブ」）を導入し、別のポリペプチドの界面で対応する空洞（「ホール」）を導入する。突起は、第一のポリペプチドの界面の小さいアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置き換えることによって構築される。突起と同一または類似のサイズの埋め合わせとなる空洞は、第二のポリペプチドの界面で、大きなアミノ酸側鎖をより小さいもの（例えば、アラニンまたはトレオニン）と置き換えることによって作成される。いくつかの実施形態では、このような追加の変異は、BBB受容体、例えば、TfRへのポリペプチドの結合に悪影響を与えない F c ポリペプチドの位置にある。

【0112】

二量体化のためのノブ及びホールアプローチの一つの例示的な実施形態では、融合タンパク質に存在する F c ポリペプチドのうちの一方の位置 366（EU付番スキームに従って付番された）は、ネイティブトレオニンの代わりにトリプトファンを含む。二量体の他方の F c ポリペプチドは、位置 407（EU付番スキームに従って付番された）にネイティブチロシンの代わりにバリンを有する。他方の F c ポリペプチドはさらに置換を含んでもよく、この場合、位置 366（EU付番スキームに従って付番された）のネイティブトレオニンがセリンで置換され、位置 368（EU付番スキームに従って付番された）のネイティブロイシンがアラニンで置換される。したがって、本明細書に記載の融合タンパク質の F c ポリペプチドのうちの一方は、T366Wノブ変異を有し、他方の F c ポリペプチドは Y407V 変異を有しており、これは通常、T366S 及び L368A ホール変異を伴う。特定の実施形態では、第1の F c ポリペプチドは、T366S、L368A、及び Y407V 置換を含有し、第2の F c ポリペプチドは、T366W 置換を含む。特定の他の実施形態では、第1の F c ポリペプチドは、T366W 置換を含有し、第2の F c ポリペプチドは、T366S、L368A、及び Y407V 置換を含む。

【0113】

いくつかの実施形態では、血清半減期を増強するための改変を、導入してもよい。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質に存在する一方または両方の F c ポリペプチドは、EU付番スキームに従って付番した、位置 252 にチロシン、位置 254 にトレオニン及び位置 256 にグルタミン酸を含んでもよい。したがって、一方または両方の F c ポリペプチドは、M252Y、S254T、及び T256E 置換を有し得る。代替的に、一方または両方の F c ポリペプチドは、EU付番スキームに従って付番した、M428L 及び N434S 置換を有し得る。代替的に、一方または両方の F c ポリペプチドは、N434S または N434A 置換を有し得る。

【0114】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質に存在する一方または両方の F c ポリペプチドは、エフェクター機能を低下させる改変、すなわち、エフェクター機能を媒介するエフェクター細胞上に発現した F c 受容体に結合した際に、特定の生物学的機能を誘導する能力が低下している改変を含み得る。抗体のエフェクター機能の例としては、限定するものではないが、C1q 結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）、F c 受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞媒介性食作用（ADCP）、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御、及び B細胞活性化が挙げられる。エフェクター機能は、抗体のクラスによって異なる場合がある。例えば、ネイティブヒト I g G 1 及び I g G 3 抗体は、免疫系細胞に存在する適切な F c 受容体に結合すると ADCC 及び CDC 活性を誘発し得る；ネイティブヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4 は、免疫細胞に存在する適切な F c 受容体に結合すると、ADCP 機能

を誘発し得る。

【0115】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質に存在する一方または両方のFcポリペプチドを、ヘテロ二量体化のための他の改変、例えば、天然に荷電したCH₃-CH₃界面内の接触残基の静電的な操作または疎水性パッチ改変を含むように操作してもよい。

【0116】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質に存在する一方または両方のFcポリペプチドは、エフェクター機能を調節する追加の改変を含んでもよい。

【0117】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質に存在する一方または両方のFcポリペプチドは、エフェクター機能を低下させるか、または除去する改変を含んでもよい。エフェクター機能を低下させる例示的なFcポリペプチド変異としては、CH₂ドメインにおける、例えば、EU付番スキームに従う位置234及び位置235での置換が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、いくつかの実施形態では、一方または両方のFcポリペプチドは、位置234及び位置235にアラニン残基を含んでもよい。したがって、一方または両方のFcポリペプチドは、L234A及びL235A（LALA）置換を有してもよい。

エフェクター機能を調節する追加のFcポリペプチド変異としては、以下のもの、すなわち、位置329に、プロリンが、グリシン、セリンもしくはアルギニンで、またはFcのプロリン329とFcγRIIIのトリプトファン残基Trp87及びTrp110との間に形成されたFc/Fcγ受容体界面を破壊するのに十分な大きさのアミノ酸残基で置換されている変異を有し得ることが挙げられるが、これらに限定されない。さらなる例示的な置換としては、EU付番スキームに従うS228P、E233P、L235E、N297A、N297D、及びP331Sが挙げられる。複数の置換もまた存在する場合がある、例えば、EU付番スキームに従う、ヒトIgG1のFc領域のL234A及びL235A；ヒトIgG1のFc領域のL234A、L235A、及びP329G；ヒトIgG1のFc領域のL234A、L235A、及びP329S；ヒトIgG4のFc領域のS228P及びL235E；ヒトIgG1のFc領域のL234A及びG237A；ヒトIgG1のFc領域のL234A、L235A、及びG237A；ヒトIgG2のFc領域のV234A及びG237A；ヒトIgG4のFc領域のL235A、G237A、及びE318A；ならびにヒトIgG4のFc領域のS228P及びL236E。いくつかの実施形態では、一方または両方のFcポリペプチドは、ADCCを調節する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、EU付番スキームに従う位置298、333、及び／または334での置換を有し得る。

【0118】

いくつかの実施形態では、C末端Lys残基は、本明細書に記載のFcポリペプチドにおいて除去される（すなわち、EU付番スキームに従う、位置447のLys残基）。

【0119】

追加の変異を含む例示的なFcポリペプチド

本明細書に記載の非限定的な例として、本明細書に記載の融合タンパク質に存在する一方または両方のFcポリペプチドは、ノブ変異（例えば、EU付番スキームに従って付番したT366W）、ホール変異（例えば、EU付番スキームに従って付番したT366S、L368A及びY407V）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、EU付番スキームに従って付番したL234A、L235A及び／またはP329GまたはP329S（例えば、L234A及びL235A；L234A、L235A、及びP329G；またはL234A、L235A、及びP329S））、及び／または血清安定性もしくは血清半減期を増加させる変異（例えば、（i）EU付番を参照して付番されたM252Y、S254T、及びT256E、または（ii）EU付番スキームに従って付番されたM428Lを伴うかまたは伴わないN434S）、を含む追加の変異を含んでもよい。例とし

て、配列番号 9～22、25～38、74～77、及び 97～98 は、これらの追加の変異の 1 つ以上を含む改変 F c ポリペプチドの非限定的な例を提供する。

【0120】

いくつかの実施形態では、F c ポリペプチドまたは改変 F c ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、E U 付番スキームに従って付番した T 3 6 6 W）、ならびに配列番号 1、2、23 及び 24 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、配列番号 1、2、23、及び 24 のいずれか 1 つの配列を有する F c ポリペプチドまたは改変 F v ポリペプチドは、ノブ変異を有するように改変してもよい。

10

【0121】

いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、E U 付番を参照して付番した T 3 6 6 W）を含み、かつ配列番号 17 及び 18 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、配列番号 17 及び 18 のいずれか 1 つの配列を含む。

【0122】

いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、E U 付番を参照して付番した T 3 6 6 W）を含み、かつ配列番号 25 及び 26 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、E U 付番を参照して付番した T 3 6 6 W）を含み、配列番号 25 及び 26 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、位置 389 に A l a を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、E U 付番を参照して付番した T 3 6 6 W）を含み、配列番号 25 または 26 に対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置 380 に G l u ; 位置 389 に A l a ; 及び位置 390 に A s n を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、E U 付番を参照して付番した T 3 6 6 W）を含み、配列番号 25 または 26 に対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、以下の位置に、すなわち位置 380 に G l u ; 位置 384 に T y r ; 位置 386 に T h r ; 位置 387 に G l u ; 位置 388 に T r p ; 位置 389 に A l a ; 位置 390 に A s n ; 位置 413 に T h r ; 位置 415 に G l u ; 位置 416 に G l u ; 及び位置 421 に P h e を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、配列番号 25 及び 26 のいずれか 1 つの配列を含む。

20

30

40

【0123】

いくつかの実施形態では、F c ポリペプチドまたは改変 F c ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、E U 付番スキームに従って付番した T 3 6 6 W）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、E U 付番スキームに従って付番した L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び／または P 3 2 9 G または P 3 2 9 S（例えば、L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A ; L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び P 3 2 9 G ; または L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び P 3 2 9 S））、ならびに配列番号 1、2、23、及び 24 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85 % の

50

同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、配列番号 1、2、23、及び 24 のうちのいずれか 1 つの配列を有する Fc ポリペプチドまたは改変された Fc ポリペプチドは、ノブ変異、及びエフェクター機能を調節する変異を有するように改変してもよい。

【0124】

いくつかの実施形態では、改変 Fc ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、EU 付番を参照して付番した T366W）、ならびにエフェクター機能を調節する変異（例えば、EU 付番を参照して付番した L234A、L235A、及び／または P329G または P329S（例えば、L234A 及び L235A；L234A、L235A、及び P329G；または L234A、L235A、及び P329S））を含み、かつ配列番号 74～75 及び 76～77 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変 Fc ポリペプチドは、配列番号 74～75 及び 76～77 のいずれか 1 つの配列を含む。

【0125】

いくつかの実施形態では、改変 Fc ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、EU 付番を参照して付番した T366W）、ならびにエフェクター機能を調節する変異（例えば、EU 付番を参照して付番した L234A、L235A、及び／または P329G または P329S（例えば、L234A 及び L235A；L234A、L235A、及び P329G；または L234A、L235A、及び P329S））を含み、配列番号 27～32 及び 35～38 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変 Fc ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、EU 付番を参照して付番した T366W）、ならびにエフェクター機能を調節する変異（例えば、EU 付番を参照して付番した L234A、L235A、及び／または P329G または P329S（例えば、L234A 及び L235A；L234A、L235A、及び P329G；または L234A、L235A、及び P329S））を含み、配列番号 27～32 及び 35～38 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し、かつ EU 付番に従う、位置 389 に Ala を含む。いくつかの実施形態では、改変 Fc ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、EU 付番を参照して付番した T366W）、ならびにエフェクター機能を調節する変異（例えば、EU 付番を参照して付番した L234A、L235A、及び／または P329G または P329S（例えば、L234A 及び L235A；L234A、L235A、及び P329G；または L234A、L235A、及び P329S））を含み、配列番号 27～32 及び 35～38 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し、かつ EU 付番に従い、以下の位置に、すなわち位置 380 に Glu；位置 389 に Ala；及び位置 390 に Asn を含む。いくつかの実施形態では、改変 Fc ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、EU 付番を参照して付番した T366W）、ならびにエフェクター機能を調節する変異（例えば、EU 付番を参照して付番した L234A、L235A、及び／または P329G または P329S（例えば、L234A 及び L235A；L234A、L235A、及び P329G；または L234A、L235A、及び P329S））を含み、配列番号 27～32 及び 35～38 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、また

10

20

30

40

50

は少なくとも 99% の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、以下の位置に、すなわち位置 380 に G l u ; 位置 384 に T y r ; 位置 386 に T h r ; 位置 387 に G l u ; 位置 388 に T r p ; 位置 389 に A l a ; 位置 390 に A s n ; 位置 413 に T h r ; 位置 415 に G l u ; 位置 416 に G l u ; 及び位置 421 に P h e を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、配列番号 27 ~ 32 及び 35 ~ 38 のいずれか 1 つの配列を含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、F c ポリペプチドまたは改変 F c ポリペプチドは、ホール変異（例えば、E U 付番スキームに従って付番した T 366 S、L 368 A 及び Y 407 V）、ならびに配列番号 1、2、23、及び 24 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、配列番号 1、2、23、及び 24 のいずれか 1 つの配列を有する F c ポリペプチドまたは改変 F c ポリペプチドは、ホール変異を有するように改変してもよい。

【0127】

いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、ホール変異（例えば、E U 付番を参照して付番した T 366 S、L 368 A 及び Y 407 V）を含み、かつ配列番号 9 及び 10 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、配列番号 9 及び 10 のいずれか 1 つの配列を含む。

【0128】

いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、ホール変異（例えば、E U 付番を参照して付番した T 366 S、L 368 A 及び Y 407 V）を含み、かつ配列番号 33 及び 34 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、ホール変異（例えば、E U 付番を参照して付番した T 366 S、L 368 A 及び Y 407 V）を含み、配列番号 33 及び 34 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、以下の位置にすなわち、位置 389 に A l a を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、ホール変異（例えば、E U 付番を参照して付番した T 366 S、L 368 A、及び Y 407 V）を含み、配列番号 33 及び 34 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、以下の位置にすなわち、位置 380 に G l u ; 位置 389 に A l a ; 及び位置 390 に A s n を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、配列番号 33 及び 34 のいずれか 1 つの配列を含む。

【0129】

いくつかの実施形態では、Fcポリペプチドまたは改変Fcポリペプチドは、ホール変異（例えば、EU付番スキームに従って付番したT366S、L368A及びY407V）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、EU付番スキームに従って付番したL234A、L235A、及び／またはP329GまたはP329S（例えば、L234A及びL235A；L234A、L235A、及びP329G；またはL234A、L235A、及びP329S））、ならびに配列番号1、2、23、及び24のいずれか1つの配列に対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、配列番号1、2、23、及び24のうちのいずれか1つの配列を有するFcポリペプチドまたは改変Fcポリペプチドは、ホール変異、及びエフェクター機能を調節する変異を有するように改変され得る。

10

【0130】

いくつかの実施形態では、改変Fcポリペプチドは、ホール変異（例えば、EU付番を参照して付番したT366S、L368A及びY407V）、ならびにエフェクター機能を調節する変異（例えば、EU付番を参照して付番したL234A、L235A、及び／またはP329GまたはP329S（例えば、L234A及びL235A；L234A、L235A、及びP329G；またはL234A、L235A、及びP329S））を含み、かつ配列番号11～16及び19～22のいずれか1つの配列に対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変Fcポリペプチドは、配列番号11～16及び19～22のいずれか1つの配列を含む。

20

【0131】

いくつかの実施形態では、改変Fcポリペプチドは、ホール変異（例えば、EU付番を参照して付番したT366S、L368A、及びY407V）、ならびにエフェクター機能を調節する変異（例えば、EU付番を参照して付番したL234A、L235A、及び／またはP329GまたはP329S（例えば、L234A及びL235A；L234A、L235A、及びP329G；またはL234A、L235A、及びP329S））を含み、かつ配列番号97～98のいずれか1つの配列に対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変Fcポリペプチドは、ホール変異（例えば、EU付番を参照して付番したT366S、L368A、及びY407V）、ならびにエフェクター機能を調節する変異（例えば、EU付番を参照して付番したL234A、L235A、及び／またはP329GまたはP329S（例えば、L234A及びL235A；L234A、L235A、及びP329G；またはL234A、L235A、及びP329S））を含み、配列番号97～98のいずれか1つの配列に対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、位置389にAlaを含む。いくつかの実施形態では、改変Fcポリペプチドは、ホール変異（例えば、EU付番を参照して付番したT366S、L368A、及びY407V）、ならびにエフェクター機能を調節する変異（例えば、EU付番を参照して付番したL234A、L235A、及び／またはP329GまたはP329S（例えば、L234A及びL235A；L234A、L235A、及びP329G；またはL234A、L235A、及びP329S））を含み、配列番号97～98のいずれか1つの配列に対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に

30

40

50

従う、以下の位置に、すなわち位置 380 に G l u ; 位置 389 に A l a ; 及び位置 390 に A s n を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、ホール変異（例えば、E U 付番を参照して付番した T 366 S、L 368 A、及び Y 407 V）、ならびにエフェクター機能を調節する変異（例えば、E U 付番を参照して付番した L 234 A、L 235 A、及び／または P 329 G または P 329 S（例えば、L 234 A 及び L 235 A ; L 234 A、L 235 A、及び P 329 G ; または L 234 A、L 235 A、及び P 329 S））を含み、配列番号 97～98 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、以下の位置に、すなわち位置 380 に G l u ; 位置 384 に T y r ; 位置 386 に T h r ; 位置 387 に G l u ; 位置 388 に T r p ; 位置 389 に A l a ; 位置 390 に A s n ; 位置 413 に T h r ; 位置 415 に G l u ; 位置 416 に G l u ; 及び位置 421 に P h e を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、配列番号 97～98 のいずれか 1 つの配列を含む。

10

【0132】

F c R n 結合部位

特定の態様では、改変（例えば、B B B 受容体結合）F c ポリペプチド、または B B B 受容体に特異的に結合しない本明細書に記載の融合タンパク質に存在する F c ポリペプチドは、F c R n 結合部位を含み得る。いくつかの実施形態では、F c R n 結合部位は、F c ポリペプチドまたはその断片中に存在する。

20

【0133】

いくつかの実施形態では、F c R n 結合部位は、ネイティブ F c R n 結合部位を含む。いくつかの実施形態では、F c R n 結合部位は、ネイティブ F c R n 結合部位のアミノ酸配列に対するアミノ酸変化を含まない。いくつかの実施形態では、ネイティブ F c R n 結合部位は、I g G 結合部位、例えば、ヒト I g G 結合部位である。いくつかの実施形態では、F c R n 結合部位は、F c R n 結合を変化させる改変を含む。

【0134】

いくつかの実施形態では、F c R n 結合部位は、1 つ以上の変異した、例えば置換されたアミノ酸残基を有し、この変異（複数可）は、血清半減期を増加させるか、または血清半減期を実質的に減少させない（すなわち、変異した位置に野生型残基を有する同等物の改変 F c ポリペプチドと比較して、同一条件下でアッセイした場合に血清半減期を 25 % 以下減少させる）。いくつかの実施形態では、F c R n 結合部位は、E U 付番スキームに従う位置 250～256、307、380、428 及び 433～436 で置換された 1 つ以上のアミノ酸残基を有する。

30

【0135】

いくつかの実施形態では、F c R n 結合部位のまたはその近傍の 1 つ以上の残基は、改変ポリペプチドの血清半減期を延長させるために、ネイティブヒト I g G 配列に対して変異している。いくつかの実施形態では、変異は、位置 252、254 及び 256 のうちの 1 つ、2 つまたは 3 つに導入されている。いくつかの実施形態では、変異は M 252 Y、S 254 T 及び T 256 E である。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、変異 M 252 Y、S 254 T 及び T 256 E をさらに含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、E U 付番スキームに従う、位置 T 307、E 380 及び N 434 のうちの 1 つ、2 つまたは 3 つすべてに置換を含む。いくつかの実施形態では、変異は T 307 Q 及び N 434 A である。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、変異 T 307 A、E 380 A 及び N 434 A を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、E U 付番スキームに従う、位置 T 250 及び M 428 に置換を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、変異 T 250 Q 及び／または M 428 L を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、E U 付番スキームに従う、位置 M 428 及び N 434 に置換を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペプチドは、変異 M 428 L 及び N 434 S を含む。いくつかの実施形態では、改変 F c ポリペ

40

50

ブチドは、N 4 3 4 S または N 4 3 4 A 変異を含む。

【0136】

F c ポリペプチドに連結された I D U A 酵素

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、本明細書に記載されている2つのF c ポリペプチドを含み、F c ポリペプチドの一方または両方は、部分的または完全なヒンジ領域をさらに含み得る。ヒンジ領域は、任意の免疫グロブリンサブクラスまたはアイソタイプ由来のものであり得る。例示的な免疫グロブリンヒンジは、I g G 1 ヒンジ領域などのI g G ヒンジ領域、例えば、ヒトI g G 1 ヒンジのアミノ酸配列E P K S C D K T H T C P P C P（配列番号5）またはその一部（例えば、D K T H T C P P C P、配列番号6）である。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、F c ポリペプチドのN末端領域に存在する。

10

【0137】

特定の実施形態では、第1のF c ポリペプチドのN末端は、I D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。特定の実施形態では、第1のF c ポリペプチドのC末端は、I D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。

【0138】

特定の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、単一のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片を含む。

【0139】

特定の他の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、第2のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片を含む。例えば、特定の実施形態では、第2のF c ポリペプチドは、I D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。特定の実施形態では、第2のF c ポリペプチドのN末端は、第2のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。特定の実施形態では、第2のF c ポリペプチドのC末端は、第2のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。

20

【0140】

特定の実施形態では、第1のF c ポリペプチドのN末端は、第1のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結され；第2のF c ポリペプチドのN末端は、第2のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。

30

【0141】

特定の実施形態では、第1のF c ポリペプチドのC末端は、第1のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結され；第2のF c ポリペプチドのC末端は、第2のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。

【0142】

特定の実施形態では、第1のF c ポリペプチドのN末端は、第1のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結され；第2のF c ポリペプチドのC末端は、第2のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。

40

【0143】

特定の実施形態では、第1のF c ポリペプチドのC末端は、第1のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結され；第2のF c ポリペプチドのN末端は、第2のI D U A アミノ酸配列、I D U A バリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結される。

【0144】

いくつかの実施形態では、F c ポリペプチドは、リンカー、例えば、ペプチドリンカー

50

によってIDUA酵素に接合されている。いくつかの実施形態では、Fcポリペプチドは、ペプチド結合によって、または、ペプチドリンカーによってIDUA酵素に接合されており、例えば、Fcポリペプチドは融合ポリペプチドである。ペプチドリンカーは、接合しているFcポリペプチドに対してIDUA酵素の回転が可能となるように、及び／またはプロテアーゼによる消化に対して耐性であるように構成されてもよい。ペプチドリンカーは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸またはそれらの組み合わせを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、例えば、Gly、Asn、Ser、Thr、Alaなどのようなアミノ酸を含有する可塑性リンカー（例えば、グリシンリッチリンカー）であってもよい。そのようなリンカーは、公知のパラメータを使用して設計され、任意の長さのものであってもよく、かつ任意の長さの任意の反復単位（例えば、Gly残基及びSer残基の反復単位）を任意の数含んでもよい。例えば、リンカーは、2つ、3つ、4つ、5つもしくはそれ以上のGly₄-Ser（配列番号72）反復などの反復、または単一のGly₄-Ser（配列番号72）を有してもよい。他の態様では、リンカーは、Gly-Ser（配列番号71）であってもよい。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、プロテアーゼ切断部位、例えば、中枢神経系に存在する酵素によって切断可能なプロテアーゼ切断部位を含んでもよい。

10

【0145】

いくつかの実施形態では、IDUA酵素は、例えば、Gly-Serリンカー（配列番号71）、Gly₄-Serリンカー（配列番号72）または（Gly₄-Ser）₂リンカー（配列番号73）によって、FcポリペプチドのN末端に接合されている。いくつかの実施形態では、Fcポリペプチドは、リンカーに接合されているかまたはIDUA酵素に直接接合されているヒンジ配列または部分的ヒンジ配列をN末端に含み得る。

20

【0146】

いくつかの実施形態では、IDUA酵素は、例えば、Gly-Serリンカー（配列番号71）、Gly₄-Serリンカー（配列番号72）または（Gly₄-Ser）₂リンカー（配列番号73）によって、FcポリペプチドのC末端に接合されている。いくつかの実施形態では、FcポリペプチドのC末端は、IDUA酵素に直接接合されている。

【0147】

いくつかの実施形態では、IDUA酵素は、化学的架橋剤によってFcポリペプチドに接合されている。そのようなコンジュゲートは、周知の化学的架橋試薬及びプロトコルを使用して生成され得る。例えば、当業者に公知であり、ポリペプチドを目的の作用物質と架橋させるのに有用である、多数の化学的架橋剤がある。例えば、この架橋剤は、段階的に分子を連結させるために使用し得るヘテロ二官能性架橋剤である。ヘテロ二官能性架橋剤によって、タンパク質をコンジュゲートさせるためのより特異的なカップリング方法が設計できるようになり、これにより、ホモタンパク質ポリマーなどの望ましくない副反応の発生を低減させる。多種多様なヘテロ二官能性架橋剤が当技術分野において公知であり、それらとしては、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）またはその水溶性類似体であるN-ヒドロキシスルホスクシンイミド（スルホ-NHS）、スクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）；N-スクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノベンゾエート（SIAB）、スクシンイミジル4-（p-マレイミドフェニル）ブチレート（SMPB）、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドヒドロクロリド（EDC）；4-スクシンイミジルオキシカルボニル-a-メチル-a-（2-ピリジルジチオ）-トルエン（SMPPT）、N-スクシンイミジル3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）、及びスクシンイミジル6-[3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート]ヘキサノエート（LCSPPD）が挙げられる。N-ヒドロキシスクシンイミド部分を有するこれらの架橋剤を、一般により高い水溶性を有するN-ヒドロキシスルホスクシンイミド類似体として得ることができる。さらに、連結鎖内にジスルフィド架橋を有する架橋剤は、インビボでのリンカー切断の量を低減させるために、代わりにアルキル誘導体として合成され得る。ヘテ

30

40

50

ロニ官能性架橋剤に加えて、ホモニ官能性架橋剤及び光反応性架橋剤を含む多数の他の架橋剤が存在する。ジスクシンイミジルスベレート (disuccinimidyl succrate) (DSS)、ビスマレイミドヘキサン (BMH) 及びジメチルピメルイミデート・2HCl (DMP) は、有用なホモニ官能性架橋剤の例であり、ならびにビス-[B-(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド (BASED) 及びN-スクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート (SNPAH) は、有用な光反応性架橋剤の例である。

【0148】

IDUA酵素-Fc融合ポリペプチドを含む例示的なタンパク質分子

いくつかの態様において、本明細書に記載の融合タンパク質は、IDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはその触媒活性断片に連結された第1のFcポリペプチド、及び第2のFcポリペプチドを含み、この第1及び／または第2のFcポリペプチドは、血液脳関門 (BBB) 受容体、例えば、トランスフェリン受容体 (TfR) に結合 (例えば、特異的に結合) し得る改変Fcである。特定の実施形態では、この第2のFcポリペプチドは、第1のFcポリペプチドとFc二量体を形成する。いくつかの実施形態では、この第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖及び／もしくは軽鎖可変領域配列またはその抗原結合部分を含まない。いくつかの態様では、融合タンパク質は、第2のIDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはその触媒活性断片 (例えば、第2のFcポリペプチドに結合していてもよい) をさらに含む。

【0149】

いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは改変Fcポリペプチドであり、及び／または第2のFcポリペプチドは改変Fcポリペプチドである (例えば、本明細書に記載の1つ以上の改変を含む)。例えば、いくつかの実施形態では、改変Fcポリペプチドは、他方のFcポリペプチドとのヘテロ二量体化を促進する1つ以上の改変を含む。いくつかの実施形態では、改変Fcポリペプチドは、エフェクター機能を低下させる1つ以上の改変を含む。いくつかの実施形態では、改変Fcポリペプチドは、血清半減期を延長する1つ以上の改変を含む。いくつかの実施形態では、改変Fcポリペプチドは、BBB受容体、例えば、トランスフェリン受容体 (TfR) への結合を付与する1つ以上の改変を含む。例えば、特定の実施形態では、TfRに結合可能なFcポリペプチドは、EU付番に従い、位置389にAlaを含む。いくつかの実施形態では、TfR受容体に結合し得るFcポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置380にGlu；位置389にAla；及び位置390にAsnを含む。いくつかの実施形態では、TfR受容体に結合し得るFcポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち位置380にGlu；位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置389にAla；位置390にAsn；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheを含む。いくつかの実施形態では、このようなFcポリペプチドは、TfRに特異的に結合する。

【0150】

いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、改変Fcポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、改変Fcポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第1及び第2のFcポリペプチドはそれぞれ改変Fcポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは改変ポリペプチドであるが、TfRに特異的に結合しない；そして第2のFcポリペプチドは、TfRに特異的に結合し得る改変ポリペプチドであり、任意選択で、本明細書に記載される1つ以上のさらなる改変をさらに含む。他の実施形態では、第1のFcポリペプチドは改変ポリペプチドであり、これは、TfRに特異的に結合し得、かつ任意選択で、本明細書に記載の1つ以上のさらなる改変をさらに含む；この第2のFcポリペプチドは、TfRに特異的に結合しない改変ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、TfRに特異的に結合し得る改変ポリペプチドであり、任意選択で、本明細書に記載の1つ以上のさらなる改変をさらに含む；この第2のFcポリペプチドは、TfRに特異的に

結合し得る改変ポリペプチドであり、かつ任意選択で、本明細書に記載の1つ以上のさらなる改変をさらに含む。

【0151】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、IDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはその触媒的に活性な断片に連結されたT366S、L368A、及びY407V（ホール）置換を含む第1のFcポリペプチドを含む第1のポリペプチド鎖と；T366W（ノブ）置換を含む第2のFcポリペプチドを含む第2のポリペプチド鎖とを含み、ここでこの第1及び／または第2のFcポリペプチドは、TfRに結合し得る、改変ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、L234A及びL235A（LALA）置換をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、L234A、L235A、及びP329G（LALAPG）置換をさらに含むか、またはL234A、L235A、及びP329S（LALAPS）置換をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、M252Y、S254T、及びT256E（YTE）置換をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、1）L234A及びL235A（LALA）置換；L234A、L235A、及びP329G（LALAPG）置換；またはL234A、L235A、及びP329S（LALAPS）置換；ならびに2）M252Y、S254T、及びT256E（YTE）置換をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、位置234、235、252、254、256及び366にヒトIgG1野生型残基を含む。

10

20

【0152】

いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、TfRに結合し得る改変ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、IDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはその触媒活性断片に連結された第1のFcポリペプチドは、TfRに結合するように改変されてはいない。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、ノブ変異、LALA／LALAPG／LALAPS変異、及び／またはYTE変異を含み、配列番号25～32のいずれか1つに対する少なくとも85％の同一性、少なくとも90％の同一性、少なくとも95％の同一性、少なくとも96％の同一性、少なくとも97％の同一性、少なくとも98％の同一性、または少なくとも99％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、ノブ変異、LALA／LALAPG／LALAPS変異、及び／またはYTE変異を含み、配列番号25～32のいずれか1つに対する少なくとも85％の同一性、少なくとも90％の同一性、少なくとも95％の同一性、少なくとも96％の同一性、少なくとも97％の同一性、少なくとも98％の同一性、または少なくとも99％の同一性を有し、かつEU付番に従う、位置389にAlaを含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号25～32のいずれか1つの配列に対する少なくとも85％の同一性、少なくとも90％の同一性、少なくとも95％の同一性、少なくとも96％の同一性、少なくとも97％の同一性、少なくとも98％の同一性、または少なくとも99％の同一性を有し、かつEU付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置380にGlu；位置389にAla；及び位置390にAsnを含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号25～32のいずれか1つの配列に対する少なくとも85％の同一性、少なくとも90％の同一性、少なくとも95％の同一性、少なくとも96％の同一性、少なくとも97％の同一性、少なくとも98％の同一性、または少なくとも99％の同一性を有し、かつEU付番に従う、以下の位置に、すなわち位置380にGlu；位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置389にAla；位置390にAsn；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheを含むか、あるいは配列番号25～32のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、ホール変異、LALA／LALAPG／LALAPS変

30

40

50

異、及び／または Y T E 変異を含み、かつ配列番号 9～16 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有するか、あるいは配列番号 9～16 のいずれか 1 つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の F c ポリペプチドは、配列番号 25～32 のいずれか 1 つを含み、第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 9～16 のいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態では、第 1 の F c ポリペプチド及び／または第 2 の F c ポリペプチドの N 末端は、I g G 1 ヒンジ領域の一部（例えば、D K T H T C P P C P、配列番号 6）を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の F c ポリペプチドは、配列番号 35～38 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の F c ポリペプチドは、配列番号 35～38 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、位置 389 に A l a を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の F c ポリペプチドは、配列番号 35～38 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置 380 に G l u；位置 389 に A l a；及び位置 390 に A s n を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の F c ポリペプチドは、配列番号 35～38 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、以下の位置に、すなわち位置 380 に G l u；位置 384 に T y r；位置 386 に T h r；位置 387 に G l u；位置 388 に T r p；位置 389 に A l a；位置 390 に A s n；位置 413 に T h r；位置 415 に G l u；位置 416 に G l u；及び位置 421 に P h e を含むか、あるいは配列番号 35～38 のいずれか 1 つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 19～22 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有するか、あるいは配列番号 19～22 のいずれか 1 つの配列を含む。

10

20

30

40

50

【0153】

いくつかの実施形態では、第 2 の F c ポリペプチドは T f R に結合するように改変されてはいない。いくつかの実施形態では、I D U A 酵素、I D U A 酵素バリエーション、またはその触媒活性断片に連結された第 1 の F c ポリペプチドは、T f R に結合し得る改変ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第 2 の F c ポリペプチドは、ノブ変異、L A L A / L A L A P G / L A L A P S 変異、及び／または Y T E 変異を含み、かつ配列番号 17～18 及び 74～75 のいずれか 1 つの配列に対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有するか、あるいは配列番号 17～18 及び 74～75 のいずれか 1 つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、ホール変異、L A L A / L A L A P G / L A L A P S 変異、及び／または Y T E 変異を含み、かつ配列番号 33～34、及び 97～98 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有する。いくつかの実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、ホール変異、L A L A / L A L A P G / L A L A P S 変異、及び／または Y T E 変異を含み、配列番号 33～34、及び 97～98 のい

いずれか1つに対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、位置389にAlaを含む。いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドは、ホール変異、LALA/LALAPG/LALAPS変異、及び/またはYTE変異を含み、配列番号33~34、及び97~98のいずれか1つの配列に対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置380にGlu；位置389にAla；及び位置390にAsnを含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、ホール変異、LALA/LALAPG/LALAPS変異、及び/またはYTE変異を含み、配列番号33~34、及び97~98のいずれか1つに対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、以下の位置に、すなわち位置380にGlu；位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置389にAla；位置390にAsn；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheを含むか、あるいは配列番号33~34、及び97~98のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号17~18及び74~75のいずれか1つを含み、この第1のFcポリペプチドは、配列番号33~34、及び97~98のいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び/または第2のFcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（例えば、DKTHTCPPCP、配列番号6）を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号76~77のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するか、あるいは配列番号76~77のいずれか1つの配列を含む。

10

20

30

40

50

【0154】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、IDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはその触媒活性断片に連結されたT366W（ノブ）置換を含む第1のFcポリペプチドを含む第1のポリペプチド鎖と；T366S、L368A、及びY407V（ホール）置換を含む第2のFcポリペプチドを含む第2のポリペプチド鎖とを含み、ここでこの第1及び/または第2のFcポリペプチドは、TfRに結合し得る、改変ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び/または第2のFcポリペプチドは、L234A及びL235A（LALA）置換をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び/または第2のFcポリペプチドは、L234A、L235A、及びP329G（LALAPG）置換をさらに含むか、またはL234A、L235A、及びP329S（LALAPS）置換をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び/または第2のFcポリペプチドは、M252Y、S254T及びT256E（YTE）置換をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び/または第2のFcポリペプチドは、1）L234A及びL235A（LALA）置換；L234A、L235A、及びP329G（LALAPG）置換；またはL234A、L235A、及びP329S（LALAPS）置換；ならびに2）M252Y、S254T、及びT256E（YTE）置換をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び/または第2のFcポリペプチドは、位置234、235、252、254、256及び366にヒトIgG1野生型残基を含む。

【0155】

いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、TfRに結合し得る改変ポリペ

プチドである。いくつかの実施形態では、IDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはその触媒活性断片に連結された第1のFcポリペプチドは、TfRに結合するように改変されてはいない。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、ホール変異、LALA/LALAPG/LALAPS変異、及び/またはYTE変異を含み、配列番号33~34、及び97~98のいずれか1つに対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、ホール変異、LALA/LALAPG/LALAPS変異、及び/またはYTE変異を含み、配列番号33~34、及び97~98のいずれか1つに対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、位置389にAlaを含む。前述の実施形態のいくつかでは、第2のFcポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置380にGlu及び位置390にAsnをさらに含む。前述の実施形態のいくつかでは、第2のFcポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち位置380にGlu；位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置389にAla；位置390にAsn；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheを含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号33~34、及び97~98のうちのいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、ノブ変異、LALA/LALAPG/LALAPS変異、及び/またはYTE変異を含み、かつ配列番号17~18及び74~75のいずれか1つの配列に対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するか、あるいは配列番号17~18及び74~75のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号33~34及び97~98のいずれか1つを含み、第1のFcポリペプチドは、配列番号17~18及び74~75のいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチド及び/または第2のFcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（例えば、DKTHTCPPCP、配列番号6）を含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、配列番号76~77のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するか、あるいは配列番号76~77のいずれか1つの配列を含む。

10

20

30

40

50

【0156】

いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドはTfRに結合するように改変されてはいない。いくつかの実施形態では、IDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはその触媒活性断片に連結された第1のFcポリペプチドは、TfRに結合し得る改変ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、ホール変異、LALA/LALAPG/LALAPS変異、及び/またはYTE変異を含み、かつ配列番号9~16のいずれか1つに対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するか、あるいは配列番号9~16のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、ノブ変異、LALA/LALAPG/LALAPS変異、及び/またはYTE変異を含み、かつ配列番号25~32のいずれか1つに対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、ノブ変異、LAL

A / L A L A P G / L A L A P S 変異、及び / または Y T E 変異を含み、配列番号 25 ~ 32 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有し、かつ E U 付番に従う、位置 389 に A l a を含む。前述の実施形態のいくつかでは、F c ポリペプチドは、E U 付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置 380 に G l u 及び位置 390 に A s n をさらに含む。前述の実施形態のいくつかでは、第 1 の F c ポリペプチドは、E U 付番に従う、以下の位置に、すなわち位置 380 に G l u ; 位置 384 に T y r ; 位置 386 に T h r ; 位置 387 に G l u ; 位置 388 に T r p ; 位置 389 に A l a ; 位置 390 に A s n ; 位置 413 に T h r ; 位置 415 に G l u ; 位置 416 に G l u ; 及び位置 421 に P h e を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 25 ~ 32 のいずれか 1 つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の F c ポリペプチドは、配列番号 9 ~ 16 のいずれか 1 つを含み、第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 25 ~ 32 のいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態では、第 1 の F c ポリペプチド及び / または第 2 の F c ポリペプチドの N 末端は、I g G 1 ヒンジ領域の一部（例えば、D K T H T C P P C P、配列番号 6）を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の F c ポリペプチドは、配列番号 19 ~ 22 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有するか、あるいは配列番号 19 ~ 22 のいずれか 1 つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 35 ~ 38 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有するか、あるいは配列番号 35 ~ 38 のいずれか 1 つの配列を含む。

10

20

【0157】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質に存在する I D U A 酵素は、配列番号 9 ~ 16 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有する第 1 の F c ポリペプチドを含む第 1 のポリペプチド鎖に連結されているか、あるいは配列番号 9 ~ 16 のいずれか 1 つの配列を（例えば、融合ポリペプチドとして）含む。いくつかの実施形態では、I D U A 酵素は、可塑性リンカーなどのリンカー、及び / またはヒンジ領域もしくはその一部（例えば、D K T H T C P P C P、配列番号 6）によって第 1 の F c ポリペプチドに連結されている。いくつかの実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドの N 末端は、I g G 1 ヒンジ領域の一部（例えば、D K T H T C P P C P ; 配列番号 6）を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 19 ~ 22 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有するか、あるいは配列番号 19 ~ 22 のいずれか 1 つの配列を含む。いくつかの実施形態では、I D U A 酵素は、配列番号 39 ~ 49、78 ~ 82、及び 99 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有する I D U A 配列を含むか；あるいは配列番号 39 ~ 49、78 ~ 82、及び 99 のいずれか 1 つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドに連結された I D U A 配列は、配列番号 50 ~ 69、及び 83 ~ 92 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、または少なくとも 99 % の同一性を有するか、あるいは配列番号 50 ~ 69、及び 83 ~ 92 のいずれか 1 つの配列を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 25 ~ 32 のいずれか 1 つに対する少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも

30

40

50

95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する第2のFcポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号25~32のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する第2のFcポリペプチドを含み、かつEU付番に従う、位置389にAlaを含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号25~32のいずれか1つの配列に対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置380にGlu；位置389にAla；及び位置390にAsnを含む。いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドは、配列番号25~32のいずれか1つの配列に対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、以下の位置に、すなわち位置380にGlu；位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置389にAla；位置390にAsn；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheを含むか、あるいは配列番号25~32のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（例えば、DKHTTCPPCP；配列番号6）を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号35~38のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号35~38のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、位置389にAlaを含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号35~38のいずれか1つの配列に対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置380にGlu；位置389にAla；及び位置390にAsnを含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号35~38のいずれか1つの配列に対する少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、以下の位置に、すなわち位置380にGlu；位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置389にAla；位置390にAsn；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheを含むか、あるいは配列番号35~38のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のIDUA酵素は、可塑性リンカーなどのリンカー、及び／またはヒンジ領域もしくはその一部（例えば、DKHTTCPPCP、配列番号6）によって第2のFcポリペプチドに連結されている。いくつかの実施形態では、第2のIDUA酵素は、配列番号39~49、78~82、及び99のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するIDUA配列を含むか、あるいは配列番号39~49、78~82、及び99のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドに連結された第2のIDUA配列は、配列番号101~103のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも9

10

20

30

40

50

0%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するか、あるいは配列番号101～103のいずれか1つの配列を含む。

【0158】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号50～65及び83～92のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号35～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0159】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号50～57及び83～86のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号35～36のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

10

【0160】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号50～53のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号35～36のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0161】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号50～51のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号35～36のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

20

【0162】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号51のアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号36のアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0163】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号54～57のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号35～36のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0164】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号83～86のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号35～36のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

30

【0165】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号83～84のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号35～36のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0166】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号84のアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号36のアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

40

【0167】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号58～65及び87～92のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0168】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号58～61のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

50

【0169】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号58～59のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0170】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号59のアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号38のアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0171】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号60～61のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

10

【0172】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号61のアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号38のアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0173】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号62～65のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

20

【0174】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号64～65のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0175】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号65のアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号38のアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0176】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号87～90のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

30

【0177】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号89～90のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0178】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号90のアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号38のアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

40

【0179】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号91～92のいずれか1つのアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0180】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号92のアミノ酸配列を含むIDUAアミノ酸配列に連結された第1のFcポリペプチドと；配列番号38のアミノ酸配列を含む第2のFcポリペプチドと、を含む。

【0181】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号50～51のいずれか1つのア

50

ミノ酸配列を含む I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドと；配列番号 1 0 1 または 1 0 2 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む第 2 の I D U A アミノ酸配列に連結された第 2 の F c ポリペプチドと、を含む。

【0182】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む第 1 の I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドと；配列番号 1 0 2 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む第 2 の I D U A アミノ酸配列に連結された第 2 の F c ポリペプチドと、を含む。

【0183】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 6 6 ～ 6 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドと；配列番号 3 5 ～ 3 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む第 2 の F c ポリペプチドと、を含む。

【0184】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 6 6 ～ 6 7 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドと；配列番号 3 5 ～ 3 6 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む第 2 の F c ポリペプチドと、を含む。

【0185】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドと；配列番号 3 5 ～ 3 6 のアミノ酸配列を含む第 2 の F c ポリペプチドと、を含む。

【0186】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドと；配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む第 2 の F c ポリペプチドと、を含む。

【0187】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 6 8 ～ 6 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドと；配列番号 3 7 ～ 3 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む第 2 の F c ポリペプチドと、を含む。

【0188】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドと；配列番号 3 7 ～ 3 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の F c ポリペプチドと、を含む。

【0189】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドと；配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の F c ポリペプチドと、を含む。

【0190】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む第 1 の I D U A アミノ酸配列に連結された第 1 の F c ポリペプチドと；配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列を含む第 2 の I D U A アミノ酸配列に連結された第 2 の F c ポリペプチドと、を含む。

【0191】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質に存在する I D U A 酵素は、配列番号 1 7 ～ 1 8 及び 7 4 ～ 7 5 のいずれか 1 つに対する少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % の同一性、少なくとも 9 6 % の同一性、少なくとも 9 7 % の同一性、少なくとも 9 8 % の同一性、または少なくとも 9 9 % の同一性を有する第 1 の F c ポリペプチドを含む第 1 のポリペプチド鎖に連結されているか、あるいは配列番号 1 7 ～ 1 8 及び 7 4 ～ 7 5 のいずれか 1 つの配列を（例えば、融合ポリペプチドとして）含む。いくつかの実施形態では、第 1 の I D U A 酵素は、可塑性リンカーなどのリンカー、及び／またはヒンジ領域もしくはその一部（例えば、D K T H T C P P C P、配列番号 6

10

20

30

40

50

）によって第1のFcポリペプチドに連結されている。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（例えば、DKTHTCPPCP；配列番号6）を含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、配列番号76～77のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するか、あるいは配列番号76～77のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、IDUA酵素は、配列番号39～49、78～82、及び99のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するIDUA配列を含むか、あるいは配列番号39～49、78～82、及び99のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、Fcポリペプチドに連結されたIDUA配列は、配列番号100及び104のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するか、あるいは配列番号100及び104のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号33～34及び97～98のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する第2のFcポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号33～34及び97～98のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する第2のFcポリペプチドを含み、かつEU付番に従う、位置389にAlaを含む。前述の実施形態のいくつかでは、第2のポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置380にGlu及び位置390にAsnをさらに含む。前述の実施形態のいくつかでは、第2のFcポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち位置380にGlu；位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置389にAla；位置390にAsn；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheを含む。前述の実施形態のいくつかでは、第2のFcポリペプチドは、配列番号33～34及び97～98のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（例えば、DKTHTCPPCP；配列番号6）を含む。いくつかの実施形態では、第2のIDUA酵素は、可塑性リンカーなどのリンカー、及び／またはヒンジ領域もしくはその一部（例えば、DKTHTCPPCP、配列番号6）によって第2のFcポリペプチドに連結されている。

10

20

30

40

50

【0192】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質に存在するIDUA酵素は、配列番号25～32のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する第1のFcポリペプチドを含む第1のポリペプチド鎖に連結されている（例えば、融合ポリペプチドとして）。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、配列番号25～32のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、位置389にAlaを含む。前述の実施形態のいくつかでは、第1のポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置380にGlu及び位置390にAsnをさらに含む。前述の実施形態のいくつかでは、第1のFcポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち位置380にGlu；位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置3

88にTrp；位置389にAla；位置390にAsn；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheを含む。前述の実施形態のいくつかでは、第1のFcポリペプチドは、配列番号25～32のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、IDUA酵素は、可塑性リンカーなどのリンカー、及び／またはヒンジ領域もしくはその一部（例えば、DKTHTCPPCP、配列番号6）によって第1のFcポリペプチドに連結されている。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（例えば、DKTHTCPPCP；配列番号6）を含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、配列番号35～38のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、配列番号35～38のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有し、かつEU付番に従う、位置389にAlaを含む。前述の実施形態のいくつかでは、第1のポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置380にGlu及び位置390にAsnをさらに含む。前述の実施形態のいくつかでは、第1のFcポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち位置380にGlu；位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置389にAla；位置390にAsn；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheを含む。前述の実施形態のいくつかでは、第1のFcポリペプチドは、配列番号35～38のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、IDUA酵素は、配列番号39～49、78～82、及び99のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するIDUA配列を含むか、あるいは配列番号39～49、78～82、及び99のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドに連結されたIDUA配列は、配列番号101～103のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するか、あるいは配列番号101～103のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号9～16のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するか、あるいは配列番号9～16のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（例えば、DKTHTCPPCP；配列番号6）を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号19～22のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するか、あるいは配列番号19～22のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のIDUA酵素は、可塑性リンカーなどのリンカー、及び／またはヒンジ領域もしくはその一部（例えば、DKTHTCPPCP、配列番号6）によって第2のFcポリペプチドに連結されている。いくつかの実施形態では、第2のIDUA酵素は、配列番号39～49、78～82、及び99のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するIDUA配列を含むか、あるいは配列番号39～49、78～82、及び99のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドに連結された第2のIDUA配列は、配列番号50～69及び83～92のいずれか1つに対する少なくとも85%、少なくとも9

10

20

30

40

50

0 %、少なくとも95 %の同一性、少なくとも96 %の同一性、少なくとも97 %の同一性、少なくとも98 %の同一性、または少なくとも99 %の同一性を有するか、あるいは配列番号50～69及び83～92のいずれか1つの配列を含む。

【0193】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質に存在するIDUA酵素は、配列番号33～34及び97～98のいずれか1つに対する少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %の同一性、少なくとも96 %の同一性、少なくとも97 %の同一性、少なくとも98 %の同一性、または少なくとも99 %の同一性を有する第1のFcポリペプチドを含む第1のポリペプチド鎖に連結されている（例えば、融合ポリペプチドとして）。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドは、配列番号33～34及び97～98のいずれか1つに対する少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %の同一性、少なくとも96 %の同一性、少なくとも97 %の同一性、少なくとも98 %の同一性、または少なくとも99 %の同一性を有し、かつEU付番に従う、位置389にAlaを含む。前述の実施形態のいくつかでは、第1のポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち、位置380にGlu及び位置390にAsnをさらに含む。前述の実施形態のいくつかでは、第1のFcポリペプチドは、EU付番に従う、以下の位置に、すなわち位置380にGlu；位置384にTyr；位置386にThr；位置387にGlu；位置388にTrp；位置389にAla；位置390にAsn；位置413にThr；位置415にGlu；位置416にGlu；及び位置421にPheを含む。前述の実施形態のいくつかでは、第1のFcポリペプチドは、配列番号33～34及び97～98のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、IDUA酵素は、可塑性リンカーなどのリンカー、及び／またはヒンジ領域もしくはその一部（例えば、DKHTTCPPCP、配列番号6）によって第1のFcポリペプチドに連結されている。いくつかの実施形態では、第1のFcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（例えば、DKHTTCPPCP；配列番号6）を含む。いくつかの実施形態では、IDUA酵素は、配列番号39～49、78～82、及び99のいずれか1つに対する少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %の同一性、少なくとも96 %の同一性、少なくとも97 %の同一性、少なくとも98 %の同一性、または少なくとも99 %の同一性を有するIDUA配列を含むか、あるいは配列番号39～49、78～82、及び99のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号17～18及び74～75のいずれか1つに対する少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %の同一性、少なくとも96 %の同一性、少なくとも97 %の同一性、少なくとも98 %の同一性、または少なくとも99 %の同一性を有する第2のFcポリペプチドを含むか、あるいは配列番号17～18及び74～75のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（例えば、DKHTTCPPCP；配列番号6）を含む。いくつかの実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号76～77のいずれか1つに対する少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %の同一性、少なくとも96 %の同一性、少なくとも97 %の同一性、少なくとも98 %の同一性、または少なくとも99 %の同一性を有するか、あるいは配列番号76～77のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のIDUA酵素は、可塑性リンカーなどのリンカー、及び／またはヒンジ領域もしくはその一部（例えば、DKHTTCPPCP、配列番号6）によって第2のFcポリペプチドに連結されている。いくつかの実施形態では、第2のIDUA酵素は、配列番号39～49、78～82、及び99のいずれか1つに対する少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %の同一性、少なくとも96 %の同一性、少なくとも97 %の同一性、少なくとも98 %の同一性、または少なくとも99 %の同一性を有するIDUA配列を含むか、あるいは配列番号39～49、78～82、及び99のいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、Fcポリペプチドに連結された第2のIDUA配列は、配列番号100及び104のいずれか1つに対する少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %の同一性、少なくとも96 %の同一性、少なくと

10

20

30

40

50

も 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、または少なくとも 99% の同一性を有するか、あるいは配列番号 100 及び 104 のいずれか 1 つの配列を含む。

【0194】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、1) IDUA アミノ酸配列に結合した第 1 の Fc ポリペプチド、及び 2) 第 2 の Fc ポリペプチドを含み；ここで各ポリペプチドは前述の実施形態で述べたアミノ酸配列からなる。

【0195】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、1) IDUA アミノ酸配列に連結された第 1 の Fc ポリペプチド；及び 2) 第 2 の IDUA アミノ酸配列に連結された第 2 の Fc ポリペプチドを含み、各ポリペプチドは、前述の実施形態で述べたアミノ酸配列からなる。

10

【0196】

本明細書に記載の融合タンパク質及び他の組成物は、広範囲にわたる結合親和性を有し得る。例えば、いくつかの実施形態では、タンパク質は、トランスフェリン受容体 (TfR) に対する親和性を有し、その範囲は、約 50 mM ~ 約 500 nM、または約 100 nM ~ 約 500 nM である。いくつかの実施形態では、TfR に対する親和性は、約 50 nM ~ 約 300 nM の範囲である。いくつかの実施形態では、TfR に対する親和性は、約 100 nM ~ 約 350 nM の範囲である。いくつかの実施形態では、TfR に対する親和性は、約 150 nM ~ 約 400 nM の範囲である。いくつかの実施形態では、TfR に対する親和性は、約 200 nM ~ 約 400 nM の範囲である。いくつかの実施形態では、TfR に対する親和性は、約 200 nM ~ 約 450 nM の範囲である。いくつかの実施形態では、TfR に対する親和性は、一価の親和性である。

20

【0197】

タンパク質活性の評価

IDUA 酵素を含む本明細書に記載の融合タンパク質の活性は、実施例セクションに記載のものなど、人工基質を使用してインビトロで活性を測定するアッセイを含む、種々のアッセイを使用して評価され得る。

【0198】

いくつかの実施形態では、組織試料を評価する。組織試料は、上記のアッセイを使用して評価し得るが、ただし、微小胞を確実に破裂させるために、超音波処理ステップの前に、複数回の、例えば 2 回、3 回、4 回または 5 回以上の凍結融解サイクルが通常含まれる。

30

【0199】

本明細書に記載のアッセイによって評価し得る試料としては、脳、肝臓、腎臓、肺、脾臓、血漿、血清、脳脊髄液 (CSF) 及び尿が挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の酵素-Fc 融合タンパク質 (例えば、IDUA-Fc 融合タンパク質) を受けた患者由来の CSF 試料を評価し得る。

【0200】

核酸、ベクター、及び宿主細胞

本明細書に記載の融合タンパク質に含まれるポリペプチド鎖は、通常、組換え法を使用して調製される。したがって、いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載されている Fc ポリペプチドを含むポリペプチド鎖のいずれかをコードする核酸配列を含む単離された核酸、ならびにポリペプチドをコードする核酸を複製するため、及び／またはポリペプチドを発現するために使用される核酸が導入された宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、真核生物、例えば、ヒト細胞である。

40

【0201】

別の態様では、本明細書に記載のポリペプチド鎖の 1 つ以上をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、このポリヌクレオチドは、本明細書に記載のポリペプチド配列のうちの 1 つをコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載のポリペプチド配列のうちの 2 つをコード

50

する。ポリヌクレオチドは、一本鎖であっても、または二本鎖であってもよい。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、DNAである。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、cDNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、RNAである。

【0202】

いくつかの実施形態はまた、各核酸配列が本明細書に記載のポリペプチドをコードする核酸配列の対を提供する。例えば、特定の実施形態は、核酸配列の対を提供し、この対の第1の核酸配列は、第1のIDUAアミノ酸配列、IDUAバリエーションアミノ酸配列、またはその触媒活性断片に連結された第1のFcポリペプチドをコードし；及びこの対の第2の核酸配列は、第2のFcポリペプチドをコードし、ここでこの第1及び／または第2のFcポリペプチドは、血液脳関門（BBB）受容体、例えば、トランスフェリン受容体（TfR）に結合し得る（例えば、特異的に結合し得る）改変Fcである。

10

【0203】

いくつかの実施形態では、このポリヌクレオチドが、核酸構築物内に含まれるか、またはポリヌクレオチドの対が1つ以上の核酸構築物内に含まれる。いくつかの実施形態では、構築物は、複製可能なベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミド、ウイルスベクター、ファージミド、酵母染色体ベクター、及び非エピソーム哺乳動物ベクターから選択される。

【0204】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、発現構築物中の1つ以上の制御性ヌクレオチド配列に作動可能に連結される。ある一連の実施形態では、核酸発現構築物は、表面発現ライブラリーとしての使用に適合する。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、酵母における表面発現に適合する。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、ファージにおける表面発現に適合する。別の一連の実施形態では、核酸発現構築物は、ミリグラム量またはグラム量でポリペプチドを単離することが可能な系におけるポリペプチドの発現に適合する。いくつかの実施形態では、この系は、哺乳動物細胞発現系である。いくつかの実施形態では、この系は、酵母細胞発現系である。

20

【0205】

組換えポリペプチド生成のための発現ビヒクルとしては、プラスミド及び他のベクターが挙げられる。例えば、好適なベクターとしては、以下のタイプのプラスミド、すなわち、E. coliなどの原核細胞における発現のためのpBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミド、及びpUC由来プラスミドが挙げられる。pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pkoneo、及びpHyg由来のベクターは、真核細胞のトランスフェクションに好適な哺乳動物発現ベクターの例である。あるいは、ウシパピローマウイルス（BPV-1）またはエプスタイン・バーウイルス（pHEBo、pREP由来及びp205）などのウイルスの誘導体を、真核細胞におけるポリペプチドの一過性発現に使用し得る。いくつかの実施形態では、バキュロウイルス発現系の使用により組換えポリペプチドを発現させることが望ましい場合がある。そのようなバキュロウイルス発現系の例としては、pVL由来ベクター（pVL1392、pVL1393及びpVL941など）、pAcUW由来ベクター（pAcUW1など）、ならびにpBlueBac由来ベクターが挙げられる。追加の発現系としては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、及び他のウイルスの発現系が挙げられる。

30

40

【0206】

ベクターは、任意の好適な宿主細胞に形質転換し得る。いくつかの実施形態では、宿主細胞、例えば、細菌または酵母細胞は、表面発現ライブラリーとしての使用に適合し得る。ある種の細胞では、ベクターは宿主細胞中で発現し、比較的大量のポリペプチドを発現する。そのような宿主細胞としては、哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び原核細胞が挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）

50

細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、NSO細胞、Y0細胞、HEK293細胞、COS細胞、Vero細胞、またはHeLa細胞などの哺乳動物細胞である。

【0207】

本明細書に記載の1つ以上のFcポリペプチド鎖をコードする発現ベクター（複数可）でトランスフェクトされた宿主細胞を、適切な条件下で培養して、1つ以上のポリペプチドの発現を生じ得る。ポリペプチドは、ポリペプチドを含有する細胞と培地の混合物から分泌して、単離してもよい。あるいは、ポリペプチドを細胞質中にまたは膜画分中に保持して、細胞を回収して溶解し、所望の方法を使用してポリペプチドを単離してもよい。

【0208】

治療方法

本明細書に記載の融合タンパク質は、MPS Iを治療するために治療上使用し得る。

【0209】

したがって、特定の実施形態は、MPS Iを有する対象における毒性代謝産物（例えば、ヘパラン硫酸由来のオリゴ糖またはデルマタン硫酸由来のオリゴ糖）の蓄積を減少させる方法であって、本明細書に記載のタンパク質を対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0210】

特定の実施形態は、MPS Iを有する対象における毒性代謝産物（例えば、ヘパラン硫酸由来のオリゴ糖またはデルマタン硫酸由来のオリゴ糖）の蓄積を減少させるのに使用するための、本明細書に記載のタンパク質を提供する。

【0211】

特定の実施形態は、MPS Iを有する対象における毒性代謝産物（例えば、ヘパラン硫酸由来のオリゴ糖またはデルマタン硫酸由来のオリゴ糖）の蓄積を減少させるための医薬の調製における、本明細書に記載のタンパク質の使用を提供する。

【0212】

特定の実施形態は、MPS Iを治療する方法であって、本明細書に記載のタンパク質をそれを必要とする対象に投与することを含む、方法も提供する。

【0213】

特定の実施形態は、MPS Iの治療を必要とする対象におけるその治療に使用するための、本明細書に記載のタンパク質を提供する。

【0214】

特定の実施形態は、MPS Iの治療を必要とする対象におけるそれを治療するための医薬の調製における、本明細書に記載のタンパク質の使用を提供する。

【0215】

いくつかの実施形態では、タンパク質（例えば、IDUA酵素に連結された）の投与によって、本明細書に記載の融合タンパク質に連結されていない場合のIDUAの取り込みと比較して、または参照タンパク質（例えば、TfR結合をもたらす第2のFcポリペプチドに対する改変を有さない、本明細書に記載の融合タンパク質）に連結されたIDUAの取り込みと比較して、脳内のIDUAのC_{max}が改善される（例えば、増加する）。

【0216】

いくつかの実施形態では、脳内のIDUAのC_{max}は、本明細書に記載の融合タンパク質に連結されていない場合のIDUAの取り込みと比較して、または参照タンパク質（例えば、TfR結合をもたらす第2のFcポリペプチドに対する改変を有さない、本明細書に記載の融合タンパク質）に連結されたIDUAの取り込みと比較して、少なくとも約1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.2倍、2.4倍、2.6倍、2.8倍、3倍、4倍、5倍、6倍、またはそれ以上改善される（例えば、増加される）。

【0217】

本明細書に記載の融合タンパク質は、治療有効量または治療有効用量で対象に投与される。

10

20

30

40

50

【0218】

種々の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、非経口的に投与される。いくつかの実施形態では、タンパク質は静脈内投与される。

【0219】

いくつかの非経口的な実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、腹腔内投与、皮内投与または筋肉内投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、硬膜外投与などによりくも膜下腔内に、または側脳室内に投与される。

【0220】

医薬組成物及びキット

他の態様では、本明細書に記載の融合タンパク質を含む医薬組成物及びキットが提供される。 10

【0221】

医薬組成物

本開示に使用するための製剤を調製するための指針は、当業者に公知の医薬品及び製剤についての多くのハンドブックに見出すことができる。

【0222】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載されている融合タンパク質を含み、かつ1つ以上の薬学的に許容される担体及び／または賦形剤をさらに含む。薬学的に許容される担体としては、任意の溶媒、分散媒、またはコーティングが挙げられ、これらは、活性薬剤と生理学的に適合し、活性薬剤の活性を妨害しないか、または別様に阻害 20

【0223】

本明細書に記載の医薬組成物の用量及び所望の薬物濃度は、想定される特定の使用に応じて変動し得る。

【0224】

キット

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質を含む、M P S I の治療に使用するためのキットを提供する。

【0225】

いくつかの実施形態では、キットは、1つ以上の追加の治療剤をさらに含む。例えば、いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の融合タンパク質を含み、M P S I の神経学的症状の治療に使用するための1つ以上の追加の治療剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の方法を実施するための指示（すなわち、プロトコル）（例えば、血液脳関門を通過させてI D U A 酵素を含む融合タンパク質を投与するためのキットを使用するための使用説明）を含む説明資料をさらに含む。説明資料は通常、書面または印刷資料を含むが、それらに限定されない。このような使用説明書を保存し、それらをエンドユーザーに伝えることが可能な任意の媒体が、本開示によって企図される。このような媒体としては、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えば、C D - R O M）等が挙げられるがこれらに限定されない。このような媒体は、このような説明資料を提供するインターネットサイトのアドレスを含んでもよい。 30 40

【0226】

特定の定義

本明細書で使用する場合、内容が明らかに別段に示されている場合を除き、「ある、1つの（a：不定冠詞）」、「ある、1つの（an：不定冠詞）」及び「この、その（the：定冠詞）」という単数形には、複数の言及物が含まれる。したがって、例えば、「ポリペプチド（a p o l y p e p t i d e）」という言及には、2つ以上のそのような分子などを含み得る。

【0227】

本明細書で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、数値または範囲で指 50

定された量を修正するために使用される場合、その数値及び当業者に公知の値からの妥当な偏差、例えば、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ または $\pm 5\%$ が、記載された値の意図する意味の範囲内であることを示す。

【0228】

本明細書で互換的に使用される場合、「対象」、「個体」及び「患者」という用語は、限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、ラット、マウス、及びモルモット）、ウサギ、雌ウシ、ブタ、ウマ、及び他の哺乳動物種を含む哺乳動物を指す。一実施形態では、患者はヒトである。いくつかの実施形態では、ヒトは、MPS Iの治療を必要とする患者である。いくつかの実施形態では、患者は、MPS Iの1つ以上の徴候または症状を有する。

10

【0229】

「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、ヒトまたは動物での使用に対して生物学的に、または薬理学的に適合する非活性医薬成分、例えば、限定されないが、緩衝液、担体、または保存料を指す。

【0230】

「投与する」という用語は、薬剤（例えば、本明細書に記載のETV：IDUA療法などのMPS I治療剤）、化合物、または組成物（例えば、医薬組成物）を生物学的作用の所望の部位に送達する方法を指す。これらの方法としては、非経口送達、静脈内送達、皮内送達、筋肉内送達、髄腔内送達、または腹腔内送達が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、静脈内投与される。

20

【0231】

本明細書で使用される場合、「治療」（及び「治療する」または「治療すること」等のその文法上の変形形態）は、治療されている個体の自然過程を変えるための臨床介入を指し、予防のために、または臨床病理過程の間に行ってもよい。治療の望ましい効果としては、限定するものではないが、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的病理学的帰結の縮小、疾患進行速度の減少、病状の回復または緩解、及び寛解または予後の改善が挙げられる。

【0232】

「有効量」という語句は、(i) 特定の疾患、状態もしくは障害を治療もしくは予防する、(ii) 特定の疾患、状態もしくは障害のうちの1つ以上の症状を減弱させる、改善する、もしくは排除する、または(iii) 本明細書に記載の特定の疾患、状態もしくは障害のうちの1つ以上の症状の発症を予防もしくは遅延させる、本明細書に記載の化合物の量を意味する。

30

【0233】

本明細書に開示される物質／分子の「治療有効量」は、個体の病状、年齢、性別、及び体重、ならびに個体において所望の応答を誘発する物質／分子の能力などの要因に従って変動し得る。治療有効量は、物質／分子の毒性または有害な効果を、治療上有益な効果が上回る量を包含する。「予防有効量」は、必要な投与量及び投与期間にて、所望の予防的結果を達成するのに有効な量を指す。典型的であって必ずしもそうではないが、疾患の早期段階前または早期段階で予防用量が対象において用いられるため、予防有効量は、治療有効量よりも少ないであろう。

40

【0234】

本明細書で使用される「アルファーレイズロニダーゼ」、「イズロニダーゼアルファール」、「レイズロニダーゼ」、「イズロニダーゼ」、または「IDUA」とは、デルマタン硫酸及びヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカンのリソソーム分解に関与する酵素であるアルファーレイズロニダーゼ（EC 3. 2. 1. 76）を指す。IDUA遺伝子の変異は、MSP Iと関連しており、ヘパラン硫酸及びデルマタン硫酸の分解障害から生じる。任意選択でFcポリペプチドを含むタンパク質の成分として本明細書で使用される「IDUA」または「IDUA酵素」という用語は、触媒活性であり、機能的バリエーション、例としては、対立遺伝子バリエーション及びスプライスバリエーション、ならびにその触媒

50

活性断片を包含する。ヒトIDUAの配列は、UniProtエントリP35475で利用可能であり、4p16.3のヒトIDUA遺伝子によってコードされている。全長配列は、配列番号39として提供され、位置33にHもしくはQ、及び／または位置622にAもしくはTを有してもよく、この位置はEU付番に従う。本明細書で使用される「成熟」IDUA配列は、天然に存在する完全長ポリペプチド鎖のシグナル配列を欠くポリペプチド鎖の形態を指す。成熟ヒトIDUAポリペプチドのアミノ酸配列の実施形態は、完全長ヒト配列のアミノ酸27～653に対応する配列番号40として提供される。本明細書で使用される「短縮された、短縮型、切断された(truncated)」IDUA配列とは、天然に存在する全長ポリペプチド鎖の触媒活性断片を指す(例えば、配列番号45～49、78～82、及び99(ここで、X₃は存在しない))。ヒトIDUAの構造は、十分に特徴付けられている。チンパンジー(例えば、Pan paniscus(ピグミーチンパンジー)(ボノボ)のUniProtエントリA0A2R9ALZ1)を含む、ヒト以外の霊長類のIDUA配列も記載されている。マウスIDUA配列は、UniProtエントリP48441で入手可能である。IDUAバリエーションは、例えば、同一条件下でアッセイした場合、対応する野生型IDUAまたはその断片の活性の少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%を有する。触媒活性IDUA断片は、例えば、同一条件下でアッセイした場合、対応する完全長IDUAまたはそのバリエーションの活性の少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%を有する。市販されているIDUAの組換え型は、Aldurazyme(アウドラザイム)またはラロニダーゼと呼ばれ、どちらの用語も同じ組換え型を指す。

10

20

30

40

50

【0235】

本明細書で使用される「トランスフェリン受容体」または「TfR」とは、トランスフェリン受容体タンパク質1を指す。ヒトトランスフェリン受容体1ポリペプチド配列は、配列番号7に示される。他の種に由来するトランスフェリン受容体タンパク質1の配列も公知である(例えば、チンパンジー、アクセッション番号XP_003310238.1;アカゲザル、NP_001244232.1;イヌ、NP_001003111.1;畜牛、NP_001193506.1;マウス、NP_035768.1;ラット、NP_073203.1;及びニワトリ、NP_990587.1)。「トランスフェリン受容体」という用語は、トランスフェリン受容体タンパク質1染色体遺伝子座にある遺伝子によってコードされる、例示的な参照配列、例えば、ヒト配列の対立遺伝子バリエーションも包含する。全長のトランスフェリン受容体タンパク質には、短いN末端細胞内領域、膜貫通領域、及び大きな細胞外ドメインが含まれる。細胞外ドメインは、3つのドメイン、すなわち、プロテアーゼ様ドメイン、ヘリカルドメイン、及びアピカルドメインを特徴とする。ヒトトランスフェリン受容体1のアピカルドメイン配列は、配列番号8に規定される。

【0236】

本明細書で使用される「融合タンパク質」または「[IDUA酵素]-Fc融合タンパク質」とは、IDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはその触媒活性断片に連結された(例えば、融合した)第1のFcポリペプチド(すなわち、「[IDUA]-Fc融合ポリペプチド」と);(例えば、第1のFcポリペプチドとFc二量体を形成する)第2のFcポリペプチドと、を含む二量体タンパク質を指す。第2のFcポリペプチドはまた、IDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはその触媒活性断片に連結(例えば、融合)されてもよい。第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、ペプチド結合またはポリペプチドリンカーによって、IDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはそれらの触媒活性断片に連結され得る。第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、他のFcポリペプチドとのヘテロ二量体化を促進する、1つ以上の改変を含有する改変Fcポリペプチドであり得る。第1のFcポリペプチド

及び／または第2のFcポリペプチドは、トランスフェリン受容体への結合を付与する1つ以上の改変を含有する改変Fcポリペプチドであり得る。第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、エフェクター機能を低下させる1つ以上の改変を含有する改変Fcポリペプチドであり得る。特定の実施形態では、第1のFcポリペプチド及び第2のFcポリペプチドは、エフェクター機能を有さない。第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、血清半減期を延長する1つ以上の改変を含む改変Fcポリペプチドであり得る。特定の実施形態では、第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖及び／もしくは軽鎖可変領域配列またはその抗原結合部分を含まない。特定の実施形態では、第1のFcポリペプチド及び第2のFcポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖及び／もしくは軽鎖可変領域配列またはその抗原結合部分を含まない。

10

【0237】

本明細書で使用される「融合ポリペプチド」または「[IDUA酵素]-Fc融合ポリペプチド」とは、IDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはその触媒活性断片に連結（例えば、融合）したFcポリペプチドを指す。Fcポリペプチドは、ペプチド結合またはポリペプチドリンカーによって、IDUA酵素、IDUA酵素バリエーション、またはそれらの触媒活性断片に連結され得る。Fcポリペプチドは、別のFcポリペプチドとのそのヘテロ二量体化を促進する1つ以上の改変を含有する改変Fcポリペプチドであり得る。Fcポリペプチドは、トランスフェリン受容体への結合を付与する1つ以上の改変を含有する改変Fcポリペプチドであり得る。Fcポリペプチドは、エフェクター機能を低下させる1つ以上の改変を含有する改変Fcポリペプチドであり得る。Fcポリペプチドは、血清半減期を延長する1つ以上の改変を含有する改変Fcポリペプチドであり得る。

20

【0238】

本明細書で使用される場合、「Fcポリペプチド」という用語は、構造ドメインとしてのIgフォールドを特徴とする天然に存在する免疫グロブリン重鎖ポリペプチドのC末端領域を指す。Fcポリペプチドは、少なくともCH2ドメイン及び／またはCH3ドメインを含む定常領域配列を含有し、少なくともヒンジ領域の一部を含有し得る。一般に、Fcポリペプチドは可変領域を含有しない。

【0239】

「改変Fcポリペプチド」とは、野生型免疫グロブリン重鎖Fcポリペプチド配列と比較して、少なくとも1つの変異、例えば、置換、欠失、または挿入を有するが、ネイティブFcポリペプチドの全般的なIgフォールドまたは構造を保持するFcポリペプチドを指す。

30

【0240】

「FcRn」という用語は、胎児性Fc受容体を指す。FcポリペプチドのFcRnへの結合は、Fcポリペプチドのクリアランスを低下させ、血清半減期を延長する。ヒトFcRnタンパク質は、主要組織適合性(MHC)クラスIタンパク質に類似した約50kDaのサイズのタンパク質と、約15kDaのサイズのβ2-ミクログロブリンから構成されるヘテロ二量体である。

【0241】

本明細書で使用される場合、「FcRn結合部位」とは、FcRnに結合するFcポリペプチドの領域を指す。ヒトIgGでは、EUインデックスを使用して付番したFcRn結合部位には、T250、L251、M252、I253、S254、R255、T256、T307、E380、M428、H433、N434、H435及びY436が含まれる。これらの位置は、配列番号1の位置20~26、77、150、198及び203~206に対応する。

40

【0242】

本明細書で使用される場合、「ネイティブFcRn結合部位」とは、FcRnに結合するFcポリペプチドの領域であってFcRnに結合する天然に存在するFcポリペプチドの領域と同じアミノ酸配列を有するFcポリペプチドの領域を指す。

50

【0243】

本明細書で使用される場合、「CH3ドメイン」及び「CH2ドメイン」という用語は、免疫グロブリン定常領域ドメインポリペプチドを指す。本出願の目的で、CH3ドメインポリペプチドとは、EUに従って付番した位置ほぼ341から位置ほぼ447のアミノ酸のセグメントを指し、CH2ドメインポリペプチドとは、EU付番スキームに従って付番した位置ほぼ231から位置ほぼ340のアミノ酸セグメントを指し、ヒンジ領域配列を含まない。CH2及びCH3ドメインのポリペプチドはまた、IMGT (Immunogenetics) 付番スキームによっても付番される場合があり、この場合、IMGT Scientific chartの付番 (IMGTウェブサイト) によれば、CH2ドメインの付番は1~110であり、CH3ドメインの付番は1~107である。CH2ドメイン及びCH3ドメインは、免疫グロブリンのFc領域の一部である。Fc領域とは、EU付番スキームに従って付番した位置ほぼ231から位置ほぼ447のアミノ酸のセグメントを指すが、本明細書で使用される場合、抗体のヒンジ領域の少なくとも一部を含むことができる。例示的なヒンジ領域の配列は、ヒトIgG1ヒンジ配列EPKSCDKTHTCPPCP (配列番号5) である。

10

【0244】

「天然に存在する」、「ネイティブ」または「野生型」とは、人工的に生成されたものとは異なるものとして自然界に見出され得る物体を説明するために使用される。例えば、生物 (ウイルスを含む) に存在するヌクレオチド配列であって、自然界の供給源から単離し得、実験室で意図的に改変されていないものは、天然に存在する。さらに、「野生型」とは、正常な遺伝子、または既知の変異のない自然界に見出される生物を指す。

20

【0245】

例えば、CH3またはCH2ドメインに関する「野生型」、「ネイティブ」及び「天然に存在する」という用語は、天然において存在する配列を有するドメインを指すために本明細書で使用される。

【0246】

本明細書で使用される場合、変異ポリペプチドまたは変異ポリヌクレオチドに関する「変異体」という用語は、「バリエント」と互換的に使用される。所与の野生型CH3またはCH2ドメインの参照配列に関するバリエントは、天然に存在する対立遺伝子バリエントを含むことができる。「非天然」に生じるCH3またはCH2ドメインとは、細胞に天然には存在せず、ネイティブCH3ドメインもしくはCH2ドメインポリヌクレオチドまたはポリペプチドの、例えば、遺伝子操作技術または変異導入技術を使用した遺伝子改変によって生成されるバリエントまたは変異体ドメインを指す。「バリエント」としては、野生型に対して少なくとも1つのアミノ酸変異を含む任意のドメインが挙げられる。変異には、置換、挿入、及び欠失を含んでもよい。

30

【0247】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸、及び合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸に類似した様式で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体を指す。

【0248】

天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるもの、ならびにそれらのアミノ酸が後で改変されたもの、例えば、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタメート、及びO-ホスホセリンである。「アミノ酸類似体」とは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基に結合したα炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。このような類似体は、改変R基 (例えば、ノルロイシン) または改変ペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。「アミノ酸模倣体」とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸に類似した様式で機能する化合物を指す。

40

【0249】

50

天然に存在する α -アミノ酸としては、アラニン (A l a)、システイン (C y s)、アスパラギン酸 (A s p)、グルタミン酸 (G l u)、フェニルアラニン (P h e)、グリシン (G l y)、ヒスチジン (H i s)、イソロイシン (I l e)、アルギニン (A r g)、リジン (L y s)、ロイシン (L e u)、メチオニン (M e t)、アスパラギン (A s n)、プロリン (P r o)、グルタミン (G l n)、セリン (S e r)、トレオニン (T h r)、バリン (V a l)、トリプトファン (T r p)、チロシン (T y r)、及びそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。天然に存在する α -アミノ酸の立体異性体としては、D-アラニン (D-A l a)、D-システイン (D-C y s)、D-アスパラギン酸 (D-A s p)、D-グルタミン酸 (D-G l u)、D-フェニルアラニン (D-P h e)、D-ヒスチジン (D-H i s)、D-イソロイシン (D-I l e)、D-アルギニン (D-A r g)、D-リジン (D-L y s)、D-ロイシン (D-L e u)、D-メチオニン (D-M e t)、D-アスパラギン (D-A s n)、D-プロリン (D-P r o)、D-グルタミン (D-G l n)、D-セリン (D-S e r)、D-トレオニン (D-T h r)、D-バリン (D-V a l)、D-トリプトファン (D-T r p)、D-チロシン (D-T y r)、及びこれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0250】

アミノ酸は、本明細書では、一般に知られている3文字記号またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionが推奨する1文字記号のいずれかで言及され得る。

20

【0251】

「ポリペプチド」及び「ペプチド」という用語は、本明細書では互換的に使用され、一本鎖におけるアミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマー及び非天然に生じるアミノ酸ポリマーに適用される。アミノ酸ポリマーは、完全にL-アミノ酸、完全にD-アミノ酸、またはLアミノ酸及びDアミノ酸の混合物を含み得る。

【0252】

本明細書で使用される、「タンパク質」という用語は、ポリペプチドまたは一本鎖ポリペプチドの二量体（すなわち、2つ）もしくは多量体（すなわち、3つ以上）のいずれかを指す。タンパク質の一本鎖ポリペプチドは、共有結合、例えば、ジスルフィド結合によって、または非共有相互作用によって接合され得る。

30

【0253】

「保存的置換」、「保存的変異」、または「保存的に改変されたバリエーション」という用語は、類似の特徴を有すると分類され得る別のアミノ酸でのアミノ酸の置換を生じる改変を指す。このようにして定義される保存的アミノ酸群の分類の例としては、G l u（グルタミン酸またはE）、A s p（アスパラギン酸またはD）、A s n（アスパラギンまたはN）、G l n（グルタミンまたはQ）、L y s（リジンまたはK）、A r g（アルギニンまたはR）、及びH i s（ヒスチジンまたはH）を含めた「荷電／極性群」、P h e（フェニルアラニンまたはF）、T y r（チロシンまたはY）、T r p（トリプトファンまたはW）、及び（ヒスチジンまたはH）を含めた「芳香族群」、ならびにG l y（グリシンまたはG）、A l a（アラニンまたはA）、V a l（バリンまたはV）、L e u（ロイシンまたはL）、I l e（イソロイシンまたはI）、M e t（メチオニンまたはM）、S e r（セリンまたはS）、T h r（トレオニンまたはT）、及びC y s（システインまたはC）を含めた「脂肪族群」を挙げることができる。各グループ内で、サブグループを特定することもできる。例えば、荷電または極性アミノ酸のグループは、L y s、A r g及びH i sで構成される「正に荷電したサブグループ」、G l u及びA s pで構成される「負に荷電したサブグループ」、ならびにA s n及びG l nで構成される「極性サブグループ」を含むサブグループに細分し得る。別の例では、芳香族または環状群は、P r o、H i s、及びT r pを含む「窒素環下位群」、ならびにP h e及びT y rを含む「フェニル下

40

50

位群」を含めた下位群に分割され得る。別のさらなる例では、脂肪族群は、下位群、例えば、Val、Leu、Gly、及びAlaを含む「脂肪族非極性下位群」ならびにMet、Ser、Thr、及びCysを含む「脂肪族微極性下位群」に分割され得る。保存的変異のカテゴリの例としては、上記サブグループ内のアミノ酸のアミノ酸置換が挙げられ、これには例えば、以下が挙げられる：LysをArgに、またはその逆で正電荷を維持できるようにする；GluをAspに、またはその逆で負電荷を維持できるようにする；SerをThrに、またはその逆で遊離-OHを維持できるようにする；及びGlnをAsnに、またはその逆で遊離-NH₂を維持できるようにする。いくつかの実施形態では、疎水性アミノ酸は、天然に存在する疎水性アミノ酸と、例えば、活性部位で置換され、疎水性を保存する。

10

【0254】

2つ以上のポリペプチド配列との関連における「同一の」またはパーセント「同一性」という用語は、配列比較アルゴリズムを使用して、または手動アラインメント及び目視検査により測定した場合に、比較ウィンドウまたは指定された領域にわたり最大限一致するように比較及びアラインメントされるとき、特定の領域にわたって、同じであるかまたは特定のパーセンテージ、例えば、少なくとも60%の同一性、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%もしくはそれ以上同一であるアミノ酸残基を有する、2つ以上の配列または部分配列を指す。いくつかの実施形態では、参照配列に対して指定されたパーセント同一性を有する配列は、1つ以上の保存的置換によって参照配列とは異なる。

20

【0255】

ポリペプチドの配列比較の場合、通常は1つのアミノ酸配列が参照配列として機能し、これを候補配列と比較する。アラインメントは、当業者に利用可能な様々な方法、例えば、視覚によるアラインメントを用いて、または既知のアルゴリズムを用いた公開されているソフトウェアを用いて行い、最大のアラインメントを達成し得る。このようなプログラムとしては、BLASTプログラム、ALIGN、ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.)、またはMegalign (DNASTAR)が挙げられる。最大のアラインメントを達成するためにアラインメントに使用されるパラメータは、当業者によって決定され得る。本出願の目的で、ポリペプチド配列の配列比較に関しては、2種のタンパク質配列をデフォルトのパラメータで整理させるためのBLASTPアルゴリズム標準タンパク質BLASTが使用される。

30

【0256】

ポリペプチド配列における所与のアミノ酸残基の特定との関連で使用される場合の「～に対応する」、「～を参照して決定される」、または「～を参照して付番される」という表現は、所与のアミノ酸配列が最大限にアラインメントされ、参照配列と比較される場合の特定の参照配列の残基の位置を指す。したがって、例えば、改変Fcポリペプチド中のアミノ酸残基は、当該残基を配列番号1に対して最適にアラインメントしたときに配列番号1のアミノ酸と一致する場合、配列番号1のアミノ酸に「対応する」。参照配列に対してアラインメントされるポリペプチドは、参照配列と同じ長さである必要はない。

【0257】

「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、互換的に、任意の長さのヌクレオチド鎖を指し、DNA及びRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、改変ヌクレオチドもしくは塩基、及び／またはそれらの類似体、あるいは、DNAまたはRNAポリメラーゼによって鎖の中に組み込むことができる任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、改変ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。本明細書で企図されるポリヌクレオチドの例としては、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖RNA、ならびに一本鎖ならびに二本鎖DNA及びRNAの混合物を有するハイブリッド分子が挙げられる。

40

【0258】

本明細書で使用する場合、「結合親和性」とは、2つの分子間、例えば、ポリペプチド

50

上の単一の結合部位と、それが結合する標的、例えばトランスフェリン受容体との間の非共有結合相互作用の強さを指す。したがって、例えば、別段示されない限り、または文脈から明らかでない限り、この用語はポリペプチドとその標的との間の1:1の相互作用を指す場合がある。結合親和性は、平衡解離定数 (K_D) を測定することにより定量化し得、これは、結合速度定数 (k_a 、時間 $^{-1}$ M $^{-1}$) で除した解離速度定数 (k_d 、時間 $^{-1}$) を指す。 K_D は、複合体形成及び解離の動態の測定、例えば、表面プラズモン共鳴 (SPR) 方法、例えばBiacore (商標) システム; KinExA (登録商標) などの結合平衡除外法 (kinetic exclusion) アッセイ; 及びBioLayer干渉法 (例えば、ForteBio (登録商標) Octet (登録商標) プラットフォームを使用する) を使用することによって決定され得る。本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、ポリペプチドとその標的との間の1:1の相互作用を反映するものなどの公式の結合親和性のみならず、強力な結合を反映し得る K_D が算出される見かけの親和性も含む。

10

【0259】

本明細書で使用される場合、標的、例えばTfRに「特異的に結合する」または「選択的に結合する」という用語は、本明細書に記載の操作されたTfR結合ポリペプチド、TfR結合ペプチド、またはTfR結合融合タンパク質を指す場合、それにより、操作されたTfR結合ポリペプチド、TfR結合ペプチド、またはTfR結合融合タンパク質が、構造的に異なる標的に結合するよりも、より高い親和性、より高いアビディティ、及び/またはより長い持続時間で標的に結合する、結合反応を指す。典型的な実施形態では、操作されたTfR結合ポリペプチド、TfR結合ペプチド、またはTfR結合融合タンパク質は、同じアフィニティーアッセイ条件下でアッセイした場合、無関係の標的と比較して、特異的標的、例えば、TfRに対して少なくとも5倍、10倍、50倍、100倍、1,000倍、10,000倍、またはそれ以上大きい親和性を有する。本明細書で使用する場合、特定の標的 (例えば、TfR) 「への特異的な結合」、「に特異的に結合する」または「に特異的である」という用語は、例えば、結合する標的に対して、例えば、 10^{-4} M以下 (例えば、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} Mまたは 10^{-12} M) の平衡解離定数 K_D を有する分子によって示され得る。いくつかの実施形態では、操作されたTfR結合ポリペプチド、TfR結合ペプチド、またはTfR結合融合タンパク質は、種間で保存された (例えば、種間で構造的に保存された)、例えば、非ヒト霊長類とヒト種との間で保存された (例えば、非ヒト霊長類とヒト種との間で構造的に保存された) TfR上のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、操作されたTfR結合ポリペプチド、TfR結合ペプチド、またはTfR結合融合タンパク質は、ヒトTfRに排他的に結合し得る。

20

30

【0260】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、生殖系列可変 (V) 遺伝子、多様性 (D) 遺伝子、または結合 (J) 遺伝子に由来し (かつ定常 (C_μ 及び C_δ) 遺伝子セグメントには由来しない)、抗体に抗原と結合する特異性を与える、抗体重鎖または軽鎖中のドメインを指す。通常、抗体の可変領域は、3つの超可変「相補性決定領域」が散在する4つの保存された「フレームワーク」領域を含む。

40

【0261】

「抗原結合部分」及び「抗原結合断片」という用語は、本明細書において互換的に使用され、その可変領域を介して抗原に特異的に結合する能力を保持した1つ以上の抗体の断片を指す。抗原結合断片の例としては、Fab断片 (VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる一価断片)、F(ab')₂断片 (ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片から構成される二価断片)、一本鎖Fv (scFv)、ジスルフィド結合Fv (dsFv)、相補性決定領域 (CDR)、VL (軽鎖可変領域)、ならびにVH (重鎖可変領域) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0262】

以下の実施例は非限定的であることを意図している。

50

【実施例】

【0263】

実施例1：アルファ-1-イズロニダーゼ（IDUA）を含む融合タンパク質の構築。

設計及びクローニング

(i) ヒトIDUA酵素がFc領域を含むヒトIgG1断片に融合した第1の融合ポリペプチド（「IDUA-Fc融合ポリペプチド」）と、(ii) トランスフェリン受容体（TfR）結合を付与するFc領域（「改変Fcポリペプチド」）に変異を含む改変ヒトIgG1断片と、を含むIDUA-Fc融合タンパク質を設計した。(i) ヒトIDUA酵素配列が、Fc領域を含むヒトIgG1断片に融合した第1の融合ポリペプチド（「IDUA-Fc融合ポリペプチド」）と、(ii) ヒトIDUA酵素配列が、TfR結合を付与するFc領域に変異を含む改変ヒトIgG1断片に融合した第2の融合ポリペプチド（「TfRに結合するIDUA-Fc融合ポリペプチド」）と、を含む融合タンパク質も設計した。IDUA配列がヒトIgG1 Fc領域のN末端及びC末端に融合した、IDUA-Fc融合ポリペプチドを作成した。すべての構築物において、シグナルペプチドMGWSCIIILFLVATATGAYA（配列番号70）を融合の上流に挿入して分泌を促進した。使用したヒトIgG1 Fc領域の断片は、UniProtKB ID P01857の配列のアミノ酸D104-K330（EU付番、位置221~447、ヒンジの10アミノ酸（位置221~230）を含む）に対応する。(i) IDUA-Fc融合ポリペプチドと(ii) 改変Fcポリペプチドを別々にコードする発現ベクターを生成し、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に共トランスフェクトして、IDUA酵素（「モノザイム」）を含むヘテロ二量体融合タンパク質を生成した。(i) IDUA-Fc融合ポリペプチドと(ii) TfRに結合するIDUA-Fc融合ポリペプチドを別々にコードする発現ベクターも生成し、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に共トランスフェクトして、IDUA酵素（「バイザイム」）を含むヘテロ二量体融合タンパク質を生成した。一部の構築物では、IgG1断片には追加の変異が含まれており、これにより2つのFc領域のヘテロ二量体化が容易になる。

【0264】

ホール変異及びLALA変異を有するIgG1 Fcポリペプチド配列のN末端に融合した成熟ヒトIDUA配列を含むIDUA-Fc融合ポリペプチドは、配列番号50または51の配列を有する。IDUA酵素は、GGGGSリンカー（配列番号72）によってFcポリペプチドに接合し、FcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（DKTHTCPPCP；配列番号6）を含んでいた。

【0265】

ホール変異及びLALAPS変異を有するIgG1 Fcポリペプチド配列のN末端に融合した成熟ヒトIDUA配列を含むIDUA-Fc融合ポリペプチドは、配列番号58または59の配列を有する。IDUA酵素は、GGGGSリンカー（配列番号72）によってFcポリペプチドに接合し、FcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（DKTHTCPPCP；配列番号6）を含んでいた。

【0266】

ホール変異及びLALAPS変異を有するIgG1 Fcポリペプチド配列のN末端に融合した成熟ヒトIDUA配列を含むIDUA-Fc融合ポリペプチドは、配列番号60または61の配列を有する。IDUA酵素は、GGGGSリンカー（配列番号72）によってFcポリペプチドに接合し、FcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（DKTHTCPPCP；配列番号6）を含んでいた。

【0267】

ホール変異及びLALAPS変異を有するIgG1 Fcポリペプチド配列のN末端に融合した成熟、短縮型ヒトIDUA配列を含むIDUA-Fc融合ポリペプチドは、配列番号64または65の配列を有する。IDUA酵素は、GGGGSリンカー（配列番号72）によってFcポリペプチドに接合し、FcポリペプチドのN末端は、IgG1ヒンジ領域の一部（DKTHTCPPCP；配列番号6）を含んでいた。

【0268】

ホール変異及びL A L A P S変異を有するI g G 1 F cポリペプチド配列のN末端に融合した成熟ヒトI D U A配列を含むI D U A－F c融合ポリペプチドは、配列番号91または92の配列を有する。I D U A酵素はG G G G Sリンカー（配列番号72）によってF cポリペプチドに接合し、F cポリペプチドのN末端はI g G 1ヒンジ領域の一部（D K T H T C P P C P；配列番号6）を含んでいた。

【0269】

ノブ変異及びL A L A変異を有するI g G 1 F cポリペプチド配列のN末端に融合した成熟ヒトI D U A配列を含むI D U A－F c融合ポリペプチドは、配列番号104または100の配列を有する。I D U A酵素はG G G G Sリンカー（配列番号72）によってF cポリペプチドに接合し、F cポリペプチドのN末端は、I g G 1ヒンジ領域の一部（D K T H T C P P C P；配列番号6）を含んでいた。

10

【0270】

ノブ変異及びL A L A変異を有するT f R結合改変I g G 1 F cポリペプチド配列のN末端に融合した成熟ヒトI D U A配列を含む、I D U A－F c融合ポリペプチドは、配列番号101または102の配列を有する。I D U A酵素はG G G G Sリンカー（配列番号72）によってF cポリペプチドに接合し、F cポリペプチドのN末端は、I g G 1ヒンジ領域の一部（D K T H T C P P C P；配列番号6）を含んでいた。

【0271】

ノブ変異及びL A L A変異を有するT f R結合改変I g G 1 F cポリペプチド配列のC末端に融合した成熟ヒトI D U A配列を含む、F c－I D U A融合ポリペプチドは、配列番号103の配列を有する。I D U A酵素はG G G G Sリンカー（配列番号72）によってF cポリペプチドに接合し、F cポリペプチドのN末端は、I g G 1ヒンジ領域の一部（D K T H T C P P C P；配列番号6）を含んでいた。

20

【0272】

ホール変異及びL A L A P S変異を有するI g G 1 F cポリペプチド配列のC末端に融合した成熟ヒトI D U A配列を含むF c－I D U A融合ポリペプチドは、配列番号68の配列を有する。I D U A酵素は、G G G G Sリンカー（配列番号72）によってF cポリペプチドに接合し、F cポリペプチドのN末端は、I g G 1ヒンジ領域の一部（D K T H T C P P C P；配列番号6）を含んでいた。

30

【0273】

ホール変異及びL A L A P S変異を有するI g G 1 F cポリペプチド配列のC末端に融合した成熟ヒトI D U A配列を含むF c－I D U A融合ポリペプチドは、配列番号69の配列を有する。I D U A酵素は、G G G G Sリンカー（配列番号72）によってF cポリペプチドに接合し、F cポリペプチドのN末端は、I g G 1ヒンジ領域の一部（D K T H T C P P C P；配列番号6）を含んでいた。

【0274】

ノブ変異及びL A L A変異を有するT f R結合改変F cポリペプチドは、配列番号35または36の配列を有する。改変F cポリペプチドのN末端は、I g G 1ヒンジ領域の一部（D K T H T C P P C P；配列番号6）を含んでいた。

40

【0275】

ノブ変異及びL A L A P S変異を有するT f R結合改変F cポリペプチドは、配列番号37または38の配列を有する。改変F cポリペプチドのN末端は、I g G 1ヒンジ領域の一部（D K T H T C P P C P；配列番号6）を含んでいた。

【0276】

最初の「N末端モノザイム」I D U A－F c融合タンパク質（「E T V：I D U A F u s i o n 1」）を生成したが、これは、配列番号35の配列を有するT f R結合改変F cポリペプチドと、配列番号50の配列を有するI D U A－F c融合ポリペプチドとを含む。I D U A－F c融合タンパク質をまた、細胞培養生成中にさらにプロセッシングして、T f R結合改変F cポリペプチドが、配列番号36の配列を有するか、及び／またはI

50

D U A - F c 融合ポリペプチドが、配列番号 5 1 の配列を有するようにしてもよい。したがって、本明細書で使用される場合、E T V : I D U A F u s i o n 1 という用語は、非プロセッシング配列（すなわち、配列番号 3 5 及び 5 0）を有するタンパク質分子；1 つ以上のプロセッシング配列（すなわち、配列番号 3 6 及び 5 1 から選択される）を含むタンパク質分子；またはプロセッシング及び非プロセッシングタンパク質分子を含む混合物を指すために使用し得る。

【0277】

第 2 の「N 末端モノザイム」I D U A - F c 融合タンパク質（「E T V : I D U A F u s i o n 2」）を生成したが、これは、配列番号 3 7 の配列を有する T f R 結合改変 F c ポリペプチドと、配列番号 5 8 の配列を有する I D U A - F c 融合ポリペプチドとを含む。I D U A - F c 融合タンパク質はまた、細胞培養生成中にさらにプロセッシングして、T f R 結合改変 F c ポリペプチドが配列番号 3 8 の配列を有し、及び／または I D U A - F c 融合ポリペプチドが配列番号 5 9 の配列を有するようにしてもよい。したがって、本明細書で使用される場合、E T V : I D U A F u s i o n 2 という用語は、非プロセッシング配列（すなわち、配列番号 3 7 及び 5 8）を有するタンパク質分子；1 つ以上のプロセッシング配列（すなわち、配列番号 3 8 及び 5 9 から選択される）を含むタンパク質分子；またはプロセッシング及び非プロセッシングタンパク質分子を含む混合物を指すために使用され得る。

10

【0278】

第 3 の「N 末端モノザイム」I D U A - F c 融合タンパク質（「E T V : I D U A F u s i o n 3」）を生成したが、これは、配列番号 3 7 の配列を有する T f R 結合改変 F c ポリペプチドと、配列番号 6 0 の配列を有する I D U A - F c 融合ポリペプチドとを含む。I D U A - F c 融合タンパク質をまた、細胞培養生成中にさらにプロセッシングして、T f R 結合改変 F c ポリペプチドが配列番号 3 8 の配列を有し、及び／または I D U A - F c 融合ポリペプチドが配列番号 6 1 の配列を有するようにしてもよい。したがって、本明細書で使用される場合、E T V : I D U A F u s i o n 3 という用語は、非プロセッシング配列（すなわち、配列番号 3 7 及び 6 0）を有するタンパク質分子；1 つ以上のプロセッシング配列（すなわち、配列番号 3 8 及び 6 1 から選択される）を含むタンパク質分子；またはプロセッシング及び非プロセッシングタンパク質分子を含む混合物を指すために使用され得る。

20

30

【0279】

第 4 の「N 末端モノザイム」I D U A - F c 融合タンパク質（「E T V : I D U A F u s i o n 4」）を生成したが、これは、配列番号 3 7 の配列を有する T f R 結合改変 F c ポリペプチドと、配列番号 6 4 の配列を有する I D U A - F c 融合ポリペプチドとを含む。I D U A - F c 融合タンパク質をまた、細胞培養生成中にさらにプロセッシングして、T f R 結合改変 F c ポリペプチドが配列番号 3 8 の配列を有し、及び／または I D U A - F c 融合ポリペプチドが配列番号 6 5 の配列を有するようにしてもよい。したがって、本明細書で使用される場合、E T V : I D U A F u s i o n 4 という用語は、非プロセッシング配列（すなわち、配列番号 3 7 及び 6 4）を有するタンパク質分子；1 つ以上のプロセッシング配列（すなわち、配列番号 3 8 及び 6 5 から選択される）を含むタンパク質分子；またはプロセッシング及び非プロセッシングタンパク質分子を含む混合物を指すために使用され得る。

40

【0280】

第 5 の「N 末端モノザイム」I D U A - F c 融合タンパク質（「E T V : I D U A F u s i o n 5」）を生成したが、これは、配列番号 3 7 の配列を有する T f R 結合改変 F c ポリペプチドと、配列番号 9 1 の配列を有する I D U A - F c 融合ポリペプチドとを含む。I D U A - F c 融合タンパク質をまた、細胞培養生成中にさらにプロセッシングして、T f R 結合改変 F c 融合ポリペプチドが配列番号 3 8 の配列を有し、及び／または I D U A - F c 融合ポリペプチドが配列番号 9 2 の配列を有するようにしてもよい。したがって、本明細書で使用される場合、E T V : I D U A F u s i o n 5 という用語は、非

50

プロセッシング配列（すなわち、配列番号 37 及び 91）を有するタンパク質分子；1つ以上のプロセッシング配列（すなわち、配列番号 38 及び 92 から選択される）を含むタンパク質分子；またはプロセッシング及び非プロセッシングタンパク質分子を含む混合物を指すために使用され得る。

【0281】

「C末端モノザイム」IDUA-Fc 融合タンパク質（「ETV:IDUA Fusion 6」）を生成したが、これは、配列番号 37 の配列を有する TfR 結合改変 Fc ポリペプチドと、配列番号 68 の配列を有する IDUA-Fc 融合ポリペプチドとを含む。IDUA-Fc 融合タンパク質はまた、細胞培養生産中にさらに処理して、TfR 結合改変 Fc ポリペプチドが配列番号 38 の配列を有するようにしてもよい。したがって、本明細書で使用される場合、ETV:IDUA Fusion 6 という用語は、配列番号 37 及び 68 を含むタンパク質分子、配列番号 38 及び 68 を含むタンパク質分子、または配列番号 37 及び 68 を含むタンパク質分子と、配列番号 38 及び 68 を含むタンパク質分子との混合物を指すために使用され得る。

表 1 は、追加の例示的な IDUA-Fc 融合タンパク質及び組換えタンパク質の配列を示している。

【表 1】

表 1. ETV:IDUA 融合タンパク質

融合タンパク質	改変 Fc ポリペプチド (任意選択で IDUA に 連結)	IDUA-Fc または Fc- IDUA 融合ポリペプチ ド
ETV:IDUA Fusion 1	配列番号 35 または 36	配列番号 50 または 51
ETV:IDUA Fusion 2	配列番号 37 または 38	配列番号 58 または 59
ETV:IDUA Fusion 3	配列番号 37 または 38	配列番号 60 または 61
ETV:IDUA Fusion 4	配列番号 37 または 38	配列番号 64 または 65
ETV:IDUA Fusion 5	配列番号 37 または 38	配列番号 91 または 92
ETV:IDUA Fusion 6	配列番号 37 または 38	配列番号 68
ETV:IDUA Fusion 7	配列番号 37 または 38	配列番号 89 または 90
ETV:IDUA Fusion 8	配列番号 35 または 36	配列番号 83 または 84
ETV:IDUA Fusion 9	配列番号 35 または 36	配列番号 67
ETV:IDUA Fusion 10	配列番号 101 または 102	配列番号 50 または 51
ETV:IDUA Fusion 11	配列番号 103	配列番号 67

【0282】

ETV:IDUA（例えば、上記の任意の融合タンパク質）を含む組成物は、非プロセッシング配列を有するタンパク質分子を含む組成物を指すか；1つ以上のプロセッシング配列を含むタンパク質分子を含む組成物を指すか；またはプロセッシングタンパク質分子と非プロセッシングタンパク質分子とを含む混合物を指すために使用され得る。

【0283】

TfR 結合を付与する変異を欠く IDUA-Fc 融合タンパク質を、同様に設計及び構築した。

【0284】

第 1 の非 TfR 結合「N末端モノザイム」IDUA-Fc 融合タンパク質（「IDUA

「Fc Fusion 12」) を生成したが、これは、配列番号 76 の配列を有する Fc ポリペプチドと、配列番号 83 の配列を有する IDUA-Fc 融合ポリペプチドとを含む。IDUA-Fc 融合タンパク質をまた、細胞培養生成中にさらにプロセッシングして、Fc ポリペプチドが配列番号 77 を有し、及び／または IDUA-Fc 融合ポリペプチドが配列番号 84 の配列を有するようにしてもよい。したがって、本明細書で使用される場合、IDUA-Fc 融合タンパク質という用語は、非プロセッシング配列（すなわち、配列番号 76 及び 83）を有するタンパク質分子；1つ以上のプロセッシング配列（すなわち、配列番号 77 及び 84 から選択される）を含むタンパク質分子を指すか；またはプロセッシング及び非プロセッシングタンパク質分子を含む混合物を指すために使用され得る。

【0285】

第2の非TfR結合「N末端モノザイム」IDUA-Fc 融合タンパク質（「IDUA-Fc Fusion 13」）を生成したが、これは、配列番号 76 の配列を有する Fc ポリペプチドと、配列番号 50 の配列を有する第2の IDUA-Fc 融合ポリペプチドとを含む。IDUA-Fc 融合タンパク質をまた、細胞培養生成中にさらにプロセッシングして、Fc ポリペプチドが配列番号 77 の配列を有し、及び／または IDUA-Fc 融合ポリペプチドが配列番号 51 の配列を有するようにしてもよい。したがって、本明細書で使用される場合、IDUA-Fc 融合タンパク質という用語は、非プロセッシング配列（すなわち、配列番号 76 及び 50）を有するタンパク質分子を指すか；1つ以上のプロセッシング配列（すなわち、配列番号 77 及び 51 から選択される）を含むタンパク質分子を指すか；またはプロセッシング及び非プロセッシングタンパク質分子を含む混合物を指すために使用され得る。

【0286】

非TfR結合「N末端バイザイム」IDUA-Fc 融合タンパク質（「IDUA-Fc Fusion 14」）を生成したが、これは、配列番号 104 の配列を有する第1の IDUA-Fc ポリペプチドと、配列番号 50 の配列を有する第2の IDUA-Fc 融合ポリペプチドとを含む。IDUA-Fc 融合タンパク質はまた、細胞培養生成中にさらにプロセッシングして、第1の IDUA-Fc ポリペプチドが配列番号 100 の配列を有し、及び／または第2の IDUA-Fc 融合ポリペプチドが配列番号 51 の配列を有するようにしてもよい。したがって、本明細書で使用される場合、IDUA-Fc Fusion 14 という用語は、非プロセッシング配列（すなわち、配列番号 104 及び 50）を有するタンパク質分子を指すか；1つ以上のプロセッシング配列（すなわち、配列番号 100 及び 51 から選択される）を含むタンパク質分子；またはプロセッシング及び非プロセッシングタンパク質分子を含む混合物を指すために使用され得る。表2は、TfRに結合しない例示的な IDUA-Fc 融合タンパク質及び組換えタンパク質の配列を示している。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. IDUA-Fc 融合タンパク質及び組換えタンパク質

融合タンパク質	Fc ポリペプチド (任意選択で IDUA に連結)	IDUA-Fc または Fc-IDUA 融合ポ リペプチド	IDUA ポリペ プチド
IDUA-Fc Fusion 12	配列番号 76 また は 77	配列番号 83 また は 84	---
IDUA-Fc Fusion 13	配列番号 76 また は 77	配列番号 50 また は 51	---
IDUA-Fc Fusion 14	配列番号 104 また は 100	配列番号 50 また は 51	---
IDUA 組換えタン パク質 15	---	---	配列番号 93
IDUA 組換えタン パク質 16	---	---	配列番号 94
IDUA 組換えタン パク質 17	---	---	配列番号 95

【0287】

ETV: IDUA (例えば、上記の任意の融合タンパク質)を含む組成物とは、非プロセシング配列を有するタンパク質分子を含む組成物を指すか; 1つ以上のプロセシング配列を含むタンパク質分子を含む組成物を指すか; またはプロセシングタンパク質分子と非プロセシングタンパク質分子とを含む混合物を指すために使用され得る。

【0288】

組換えタンパク質の発現及び精製

組換え IDUA-Fc 融合タンパク質を発現させるために、Exp i CHO 細胞 (Thermo Fisher Scientific) に、製造元の使用説明書 (Thermo Fisher Scientific) に従って Exp i fectamine (商標) CHO トランスフェクションキットを使用して、関連する DNA 構築物をトランスフェクトした。細胞は、オービタルシェーカー (Infor s HT Multitron) 内で 37℃、5% CO₂ 及び 125 rpm で、製造元のプロトコルに記載されているように、フィードを補充した Exp i CHO (商標) 発現培地で増殖させた。要するに、対数増殖している Exp i CHO 細胞に、培養体積 1 mL あたり 0.8 µg の全 DNA プラスミドを、6 × 10⁶ 細胞 / mL の密度でトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞を 37℃ に戻した。トランスフェクションの 18 ~ 22 時間後、トランスフェクトされた培養物に栄養フィードを補充し、生産実行中は細胞培養温度を 32℃ に下げた。トランスフェクトされた細胞培養上清を、トランスフェクションの 120 時間後に、4000 rpm で 15 分間遠心分離することにより回収した。清澄化した上清を濾過し (0.22 µm のメンブレン)、4℃ で保存した。

【0289】

TfR 結合を付与する操作された Fc 領域を含む (または含まない) IDUA-Fc 融合タンパク質を、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを使用して細胞培養上清から精製した。上清を、HiTrap MabSelect Prisma Protein A アフィニティークラム (GE Healthcare Life Science

ces (Akta Pure Systemを使用する)) にロードした。次に、そのカラムを、10カラム体積(CV)のPBSで洗浄した。結合したタンパク質は、50mMクエン酸緩衝液pH3.6を使用して溶出した。溶出直後に、1MのTris (pH8) (1:8希釈)を使用して画分を中和した。プロテインAプールは、陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)を使用してさらに精製した。HiTrap (登録商標) SP High Performanceカラム(Cytiva、SKU 17-1152-01)への結合を容易にするために、タンパク質Aプールを酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)で10倍に希釈した。カラムは、20mMの酢酸ナトリウム、0.5MのNaCl、pH5.5の線形塩勾配を使用して30CVで溶出した。画分はHPLC-SECでさらに分析した。純度が95%を超える画分をプールし、1XPBS、pH7.4で透析した。IDUA-Fc融合の最終バルクの均一性は、還元及び非還元キャリパー(マイクロキャピラリー電気泳動-SDS)及びHPLC-SECなどの多数の技術によって評価された。

10

【0290】

C末端ヘキサヒスチジンタグ(配列番号93~95)を有する組換えIDUAは、上記のようにExp CHO細胞で発現された。ヘキサヒスタジンタグ付きIDUA酵素を精製するために、トランスフェクトした上清を、100mMのNaClを含む20mMのHEPES pH7.4の15Lに対して一晩透析した。透析された上清を、HiTrapカラム(GE Healthcare Life Sciences (Akta Pure Systemを使用する))に結合した。結合後、そのカラムを20CVのPBSで洗浄した。結合したタンパク質は、500mMのイミダゾールを含むPBSを使用して溶出した。IDUA酵素を含むプールされた画分を、50mMのTris pH7.5で1:10に希釈し、Q Sepharose High Performance (GE Healthcare)を使用してさらに精製した。結合後、そのカラムを10CVの50mMのTris pH7.5で洗浄した。結合したタンパク質は、50mMのTris pH7.5及び0.5MのNaClへの直線勾配を使用して溶出して、1CVの画分に収集した。画分の純度は非還元SDS-PAGEによって評価された。

20

【0291】

実施例2: IDUA-Fc融合タンパク質の特徴付け。

実施例1に記載のとおり構築及び調製したETV: IDUA融合タンパク質を、TfR結合、酵素活性、及び細胞効力について評価した。

30

【0292】

操作されたTfR結合部位を有するIDUA-Fc融合タンパク質は、ヒトTfRに結合する

操作されたTfR結合を有するIDUA-Fc融合タンパク質が、ヒトTfRと相互作用する改変Fcドメインの能力に影響を与えるか否かを判定するために、ヒトTfRに対するETV: IDUA Fusion 3、4、及び6(実施例1)の親和性を、Biacore 8K装置(Cytiva)を用いて表面プラズモン共鳴(SPR)によって測定した。5µg/mLのIDUA-Fc融合タンパク質を、プロテインAコーティングされたBiacore (商標) シリーズS CM5センサーチップで1分間捕捉し、ヒトアピカルドメインTfRの連続3倍希釈液を30µL/分の流速で注入した。各試料は、ヒトTfR濃度を増加させながら60秒間の注入を5回連続して行い、その後、注入サイクルの最後に60秒間解離させて分析した。各注入後、10mMグリシン-HCl (pH1.5)を使用して、チップを再生した。結合応答は、同様の密度Aで無関係なIgGを捕捉するフローセルからRUを減算することによって補正された。Biacore (商標) Insight Evaluation Softwareを使用した速度論解析には、 k_{on} と k_{off} を同時にフィッティングする1:1 Langmuirモデルを使用した。ETV: IDUA Fusion 3、4、及び6のヒトTfRに対する一価結合親和性は、約200nM~400nMの範囲であった。

40

【0293】

50

操作された T f R 結合部位を有する I D U A - F c 融合タンパク質は、インビトロで活性である

操作された T f R 結合 I D U A - F c 融合タンパク質のインビトロ活性を評価して、I D U A がヒト I g G 断片に融合したとき、その酵素活性を維持することを実証した。組換え I D U A のインビトロ活性は、人工基質を使用した 1 ステップの蛍光酵素アッセイを使用して測定した。70.96 mM の 4-メチルウンベリフェリル- α -L-イソプロニド (遊離酸) (Cayman Chemical #19543) のアリコート、アッセイ緩衝液 (50 mM の酢酸ナトリウム、0.5 M の NaCl、0.025 % の Triton (登録商標) X-100、pH 4.5) で希釈し、最終濃度を 2.5 mM にした。I D U A - F c 融合タンパク質は、50 mM の濃度から開始して段階的に希釈した。次に、5 μ L の基質を、384 ウェルの黒色平底マイクロプレート (NUNC #262260) 中で、連続希釈した I D U A - F c 融合タンパク質 5 μ L と混合した。反応は 22°C で 60 分間インキュベートして、10 μ L の停止緩衝液 (0.5 M 炭酸ナトリウム緩衝液、pH 10.3) で停止した。次に、反応溶液の蛍光を測定した (励起波長 365 nm、及び発光波長 450 nm)。4-メチルウンベリフェロンの標準曲線を非線形回帰によってフィッティングさせて、生成物の量を計算し、全基質切断の 10 % 未満であることを確認した。比活性 (pmol 生成物 / 分 / pmol I D U A) は、生成物の量を反応時間及び I D U A のモル量で除すことによって算出した。

10

【0294】

インビトロ酵素活性アッセイでは、I D U A - F c 融合タンパク質が活性であり、ETV : I D U A Fusion 3、4、及び 6 間で類似していることが実証された (図 2)。すべての ETV : I D U A 融合タンパク質は、Aldurazyme (アウドラザイム) (ラロニダーゼ) の活性の約 75 % ~ 約 90 % の範囲の比活性を示した。

20

【0295】

改変された T f R 結合部位を持つ I D U A - F c 融合タンパク質は、インビトロでの基質蓄積を修正する

I D U A - F c 融合タンパク質の細胞活性は、基質補正を評価するためにヘパラン硫酸及びデルマタン硫酸の LCMS 定量を使用して、ハーラー (MPS I) 患者及び健常対照の線維芽細胞でも検査した。簡単に説明すると、ハーラー線維芽細胞と健康な線維芽細胞を、10 % の FBS を補充した DMEM 培地で 24 ウェル培養プレートに、ウェルあたり 75,000 細胞の密度でプレートした。細胞は、コンフルエンスに達するまで、約 96 時間この形式で培養した。次に、ETV : I D U A Fusion 1 を、開始濃度 62.5 nM から 12 ポイント、5 倍連続希釈用量曲線で各ウェルに添加した。タンパク質を添加してから 72 時間後、低張ショックによって細胞を溶解した。溶解物を、96 ウェルアッセイプレートに移し、緩衝液の組成を 111 mM の酢酸アンモニウム及び 11 mM の酢酸カルシウムを含むように調整し、超音波処理して溶解を完了した。溶解液のタンパク質濃度を BCA アッセイによって決定し、すべての溶解液を等しいタンパク質濃度に調整した。溶解物に 2 mM の DTT を補充し、ヘパリナーゼ I (1.25 mIU / 反応)、ヘパリナーゼ II (1.25 mIU / 反応)、ヘパリナーゼ III (1.25 mIU / 反応)、及びコンドロイチナーゼ B (6.25 mIU / 反応) を含む酵素混合物を用いて、GAG を 30°C で 3 時間消化した。消化反応は、10 mM の EDTA でクエンチさせ、各反応に 20 ng の 4 U A - 2 S - G l c N C O E t - 6 S 内部標準を添加し、続いて 95°C で 10 分間変性させた。遠心濾過により試料から不溶性物質を除去し、清澄化した試料をガラス製 LC-MS バイアル内でアセトニトリルと 1 : 1 で混合した。ヘパラン硫酸及びデルマタン硫酸 GAG 由来の二糖類種を、ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 mm、2.1 $\times$ 150 mM のカラムを備えた Xevo TQ-S Micro 装置で LC-MS / MS によって定量した。

30

40

【0296】

MPS I 患者の線維芽細胞は、I D U A 活性を欠いており、2 つのグリコサミノグリカン (GAG) 種であるヘパラン硫酸及びデルマタン硫酸の蓄積につながる。ETV : I

50

D U A F u s i o n 1 は、M P S I 患者由来細胞においてラロニダーゼと同様の効力を示し、ヘパラン硫酸の蓄積を減らすための低いピコモル細胞 E C ₅₀ (約 7 ~ 1 0 p M) を示した (図 3)。

【 0 2 9 7 】

T f R 結合部位を改変した I D U A - F c 融合タンパク質は、T f R K I マウスの脳への取り込み増大を示す

T f R ノックイン (以下「T f R^{mu}/h^uK I」または「T f R^{mu}/h^u」と表記) マウスにおける I D U A - F c 融合タンパク質の末梢 (血清) 及び脳 P K を評価した。T f R^{ms}/h^uK I マウスは、国際特許出願番号 W O 2 0 1 8 / 1 5 2 2 8 5 に記載のとおり、C R I S P R / C a s 9 技術を使用して、マウス T f r c 遺伝子内のヒト T f r c アピカルドメインを発現するように作製された。得られるキメラ T f R は、内因性プロモーターの制御下でインビボで発現させた。簡単に説明すると、6 ~ 8 週齢の雄性 T f R^{mu}/h^uK I マウス (コホートあたり n = 1 2) に E T V : I D U A 融合タンパク質 4 0 m g / k g を投与し、血清及び脳組織中の I D U A 酵素及び E T V : I D U A 完全分子の濃度を測定した。総 I D U A 酵素レベルは、サンドイッチ E L I S A ベースのアッセイを使用して、血清については投与後 t = 0 . 2 5、0 . 5、1、4、8、1 0、2 4、及び 4 8 時間で測定され、脳 P K については投与後 t = 1、8、2 4、4 8 時間で測定された。分析に使用した I D U A - F c 融合タンパク質は上記の通りであり、実施例 1 に従って調製した。総 I D U A 酵素レベルの測定のために、ポリクローナルヒツジ抗ヒト I D U A 抗体 (B i o - T e c h n e A F 4 1 1 9) を、M U L T I - A R R A Y (登録商標) 9 6 ウェルプレート (M e s o S c a l e D i a g n o s t i c s L 1 5 X A - 3) に一晩コーティングした。そのプレートを P B S (T h e r m o F i s h e r 3 7 5 2 8)、B S 中の B l o c k e r (商標) C a s e i n でブロックし、その後希釈した血清または脳溶解物とインキュベートした。次に、ルテニウム結合ポリクローナルヒツジ抗ヒト I D U A 抗体 (B i o - T e c h n e A F 4 1 1 9) を、検出用に加えた。界面活性剤を含む 1 × R e a d 緩衝液 T (M e s o S c a l e D i a g n o s t i c s R 9 2 T C - 1) を各ウェルに加え、プレートして、M S D リーダーにロードした。標準曲線は個々の構築物に基づいており、4 パラメータのロジスティック曲線を使用して適合させた。結果は、図 4 A ~ 4 C 及び図 5 A ~ 5 C ならびに表 3 に示されている。

【 0 2 9 8 】

E T V : I D U A F u s i o n 3、4、及び 6 は循環中で良好な安定性を示した。すべての分子で高い脳 C m a x 値 (約 1 5 n M 以上) が観察され、すべての分子の脳への取り込みは末梢曝露と一致していた。

【表 3】

表 3. E T V : I D U A 融合タンパク質の薬物動態パラメータ (T f R^{mu}/h^uK I マウス)

分子	CL(mL/時間/kg)	血清半減期 (時間)	血清 Cmax(nM)	脳 Cmax(nM)
ETV:IDUA Fusion 3	37.0	5.8	4242	22.16
ETV:IDUA Fusion 4	45.3	6.0	3526	17.87
ETV:IDUA Fusion 6	30.1	5.3	4308	14.83

【 0 2 9 9 】

実施例 3 : E T V : I D U A F u s i o n s の生成物品質属性。

さまざまな E T V : I D U A 融合タンパク質を製品品質の観点から評価した。この研究では、E T V : I D U A F u s i o n 3、4、及び 6 (実施例 1) を評価した。すべ

ての構造は、実施例 1 で説明したように準備された。溶出画分中の ETV:IDUA 融合タンパク質の均一性は、還元及び非還元キャリパー（マイクロキャピラリー電気泳動－SDS）及び HPLC－SEC などのさまざまな技術によって評価した。ヒト TfR に対する親和性を、実施例 2 に記載されるように測定した。

【0300】

結果

実施例 2 で説明したように、ETV:IDUA Fusion 3 及び 6 に対する測定されたヒト TfR 親和性は同等であった（ K_D は、約 200～400 nM の範囲）。

ETV:IDUA Fusion 3、4、及び 6 の発現力価は、約 100 mg/L を超えた。

10

【0301】

ETV:IDUA Fusion 3、4、及び 6 のタンパク質 A クロマトグラフィー精製後の回収率を評価した。全ての構造のプロテイン A 後のプールの分析によって、少なくとも約 90% のインタクトな ETV 構造（ノブ及びホルの対を含む改変 Fc 二量体の維持）を伴う、少なくとも 85% の純度が示された（HPLC－SEC で測定）。すべての構造のプロテイン A 後のプールは、さらに洗練させるために陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）にかけた。全ての構造の CEX 後プールは、>95% のインタクトな ETV 構造を伴い、>99% の純度レベル（HPLC－SEC で測定）を達成した。

【0302】

ETV:IDUA 融合タンパク質の製品品質特性の概要を表 4 に示す。

20

【表 4】

表 4. ETV:IDUA 融合タンパク質の製品品質特性

属性	ETV:IDUA Fusion 3	ETV:IDUA Fusion 4	ETV:IDUA Fusion 6
発現力価(mg/L)	182	160	105
収率%(プロテイン A 後)	約 45-50	約 45-50	70
純度%(プロテイン A 後)	93	93	85
純度%(CEX 後)	99	99	99
比活性 (pmol 生成物/分/pmol IDUA) [ラロニダーゼに対する%]	315[89%]	293[83%]	280[79%]
TfR 親和性(K_D)	340nM	355nM	200nM

30

【0303】

実施例 4: MPS I の疾患モデルにおける ETV:IDUA 融合タンパク質とラロニダーゼの比較研究。

代表的な ETV:IDUA 融合タンパク質（ETV:IDUA Fusion 3）を、MPS I のマウスモデルにおける標準治療の酵素補充療法であるラロニダーゼと比較した。

40

【0304】

結果

ETV:IDUA 及びラロニダーゼを、単回静脈内（IV）投与後に IDUA KO; TfR^{mu/hu} KI マウスの脳、CSF、及び肝臓における総 GAG レベルを、そのタンパク質がどの程度低下させるかについて比較した。ETV:IDUA Fusion

50

3を、ラロニダーゼと等モル量（0.85mg/kg）、等モル量の約10倍の量（8.8mg/kg）、及び高用量レベル（40mg/kg）でマウスに投与し、ラロニダーゼは治療のための臨床的に関連する用量（0.58mg/kg）と一致する用量で投与した。総GAGは、主要なヘパラン硫酸（HS）（DOA0、DOS0）及びデルマタン硫酸（DS）（DOa4）由来の二糖類の合計として決定した。図6A～6D及び表5に示すように、単回投与から7日後、ETV:IDUAタンパク質は、脳脊髄液（CSF）と脳組織の両方で総GAGレベルを低下し得、この低下はラロニダーゼで達成された効果よりも優れていた。総GAGレベルの減少は、ラロニダーゼの用量と等モルの用量を含め、ETV:IDUAの3種類の投与量すべてで確認された（CSF:79%減少対36%減少；脳:38%減少対N/S減少）。肝臓では、投与されたすべての用量において、ラロニダーゼとETV:IDUAタンパク質のとの間の総GAG減少は同様であった。尿中では、ETV:IDUAは、等モル用量でラロニダーゼ（0.85mg/kg）と同等に総GAGレベルを低下させた。しかし、ETV:IDUAの高用量（例えば、8.8mg/kg及び40mg/kg）では、尿中の総GAGレベルの低下はラロニダーゼよりも良好であった。

10

【表5】

表5. 溶媒処理したIDUA KO; Tfr^{mu/hu}KIマウスと比較した、単回IV投与後の総GAGレベルの減少率。

20

治療	投与量 [mg/kg]	CSF 総 GAG 減少	脳内総 GAG 減少	肝臓総 GAG 減少	尿中総 GAG 減少
ラロニダーゼ	0.58	36%	N/S	96%	63%
ETV:IDUA Fusion 3	0.85	79%	38%	95%	64%
ETV:IDUA Fusion 3	8.8	92%	79%	96%	86%
ETV:IDUA Fusion 3	40	95%	86%	95%	94%

30

【0305】

図6A～6Dのデータは、おおよその平均量+/-平均の標準誤差を表している。その結果、ETV:IDUAがCSF、脳、及び尿中の基質蓄積を確実に減少させ、この減少が標準治療であるERT治療に比べて改善を示したことが示されている。

【0306】

実験方法

ETV:IDUA Fusion 3は、実施例1で説明したように発現及び精製された。ラロニダーゼは、市販品（NDC 58468-0070-1、ロット番号OY0432）から入手した。

【0307】

この研究で使用したMPS Iマウスモデルは、IDUAをコードする遺伝子がノックアウトされているが、マウスTfrにノックアウトされたヒトTfrアピカルドメインも有するマウスモデルである（本明細書では「IDUA KO; Tfr^{mu/hu}KI」または「IDUA KO; Tfr^{mu/hu}」マウスと呼ぶ）。IDUA KOマウスは、The Jackson Laboratories（JAX ストック番号004068）から入手した。簡単に説明すると、Tfr^{mu/hu}KI雄性マウス（実施例2参照；本明細書では「Tfr^{mu/hu}」と称される）を、IDUA変異についてヘテロ接合性である雌性マスと交配させて、Tfr^{mu/hu}KIホモ接合バックグラウンドのホモ接合性のIDUA KOマウスを作製した。この研究で使用されたマウスは混合の性別であり、12時間の明暗サイクルの下で、食物（#25502、照射；LabDiet）及

40

50

び水を自由に摂取させて飼育した。

【0308】

この研究では、IDUA KO; Tfrmu/huKIマウスに、ETV: IDUA Fusion 3またはラロニダーゼを静脈内注射で単回投与し、薬力学的反応を評価した。特に、タンパク質の末梢投与がIDUA KO; Tfrmu/huKIマウスの脳、CSF、肝臓、及び尿中の総GAGレベルに及ぼす影響を調べた。約2ヶ月齢のIDUA KO; Tfrmu/huKIに、生理食塩水、ETV: IDUA融合タンパク質(0.85、8.8、または40mg/kg体重)、またはラロニダーゼ(0.58mg/kg体重)を静脈内(i.v.)注射した(n=4~5/群)。生理食塩水をi.v.注射した約2ヶ月齢の同腹子Tfrmu/huKIマウス(非MPS Iマウス)を、対照として使用した。尿試料を、単回投与後6日目と7日目に採取して、分析のためにプールした。単回投与後7日目に、すべての動物を殺し、脳、CSF、及び肝臓組織を採取した。収集されたすべての組織及び体液をドライアイスで急速冷凍し、分析まで-80℃で保存した。

10

【0309】

ヘパラン硫酸及びデルマタン硫酸種は、以下に説明するLC-MS/MSベースの方法を使用して、インピボで測定した。Qiagen TissueLyzer IIを30Hzで3分間、2回使用して、組織アリコート(50mg)を水(500~750µL)中で均質化した。ホモジネートを、96ウェルディーププレートに移し、96チップ超音波処理装置(Q Sonica)を使用して20×1秒のパルスで超音波処理した。超音波処理したホモジネートを、17,000×gで20分間、4℃で遠心させ、細胞破片をペレット化した。得られた溶解物を清澄な96ウェルディーププレートに移し、BCAを実行して総タンパク質を定量した。試料中のヘパラン硫酸(HS)及びデルマタン硫酸(DS)は、LC-MS/MS分析の前に、対応する二糖類に消化された。タンパク質溶解物(脳及び肝臓組織由来)及びCSF及び尿を、ヘパリナーゼI、II、III及び内部標準D4UA-2S-GlcNCOEt-6S(HD009, Iduron Ltd, Manchester, UK)と、酢酸アンモニウム、酢酸カルシウム、及びDTTからなる消化緩衝液中で混合し、PCRプレート中で30℃で3時間振とう(700rpm)した。尿については、安定標識クレアチニン(内部標準、N-メチル-D3、98%)も混合物に加えた。3時間のインキュベーション後、各試料に0.0025MのEDTAを加えて反応を停止し、その混合物を95℃で10分間煮沸して酵素を不活性化した。脳、肝臓、CSF、及び尿由来の消化試料を遠心分離し、上清をセルロースアセテートフィルタープレート(Millipore, MSUN03010)に移して再度遠心分離した。脳、CSF及び尿試料のために、得られた溶出液を、96ウェルのガラスバイアルプレート中で等量のアセトニトリルと混合し、以下のように質量分析によって分析した。肝臓の場合、得られた溶出液を2倍量のアセトニトリルと混合した。

20

30

【0310】

体液及び組織中のHS及びDS由来の二糖類の定量は、液体クロマトグラフィー(Exion LC, Sciex, Framingham, MA, USA; Agilent 1290 Infinity II HPLC, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)とエレクトロスプレー質量分析法(Sciex Triple Quad 7500, Sciex, Framingham, MA, USA; Sciex Triple Quad 6500+, Sciex, Framingham, MA, USA)を組み合わせ実施した。両方の液体クロマトグラフィーでの各分析では、ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7mm、2.1×150mmカラム(Waters Corporation, Milford, MA, USA)に、流速0.6mL/分を、カラム温度55℃で用いて試料を注入した。移動相Aは、10mMギ酸アンモニウム及び0.1%ギ酸を含む水で構成され、移動相Bは、0.1%ギ酸を含むアセトニトリルで構成されていた。勾配を、以下のようにプログラムした: 80%Bで0.0~6.0分、80%B~20%Bで6.0~6.01分、2

40

50

0 % B ~ 2 0 % B で 6 . 0 1 ~ 8 . 0 分、2 0 % B ~ 8 0 % B で 8 . 0 ~ 8 . 1 分、及び 8 0 % B で 8 . 1 ~ 1 0 分保持。Sciex Triple Quad 7500 のために、エレクトロスプレーイオン化を、以下の設定を適用して負イオン化モードで実行した：カーテングス 4 0 ; イオンスプレー電圧 - 4 5 0 0 ; 温度 4 5 0 °C ; イオン源ガス 1 が 5 0 ; 及びイオン源ガス 2 が 6 0 。Sciex OS 2 . 1 . 6 . 5 9 7 8 1 を、多重反応モニタリングモード (MRM) を使用して、以下の設定を用いて、データ取得を実行した：滞留期間 1 0 0 m s e c ; 衝突エネルギー - 3 0 ; 入口電位 - 1 0 ; 衝突セル出口電位 - 1 0 。Sciex Triple Quad 6500+ の場合、エレクトロスプレーイオン化は、以下の設定を適用して、負イオン化モードで実行した：カーテングス 2 0 、イオンスプレー電圧 - 4 5 0 0 、温度 4 5 0 °C ; イオン源ガス 1 が 5 0 、及びイオン源ガス 2 が 6 0 。Analyst 1 . 7 . 1 を、MRM を使用して、以下の設定を用いて、データ取得を実行した：滞留期間 1 0 0 m s e c ; 衝突エネルギー - 3 0 ; デクラスタリング電位 - 8 0 ; 入口電位 - 1 0 ; 衝突セル出口電位 - 1 0 。個々の二糖種は、市販の参照標準 (Iduron Ltd) を使用して、保持時間及び MRM トランジションに基づいて同定した。Sciex Triple Quad 7500 及び Sciex Triple Quad 6500+ では、次の二糖遷移をモニタリングした：D O A 0 (H S) 、 m/z 3 7 8 > 8 7 ; D O S 0 (H S) 、 m/z 4 1 6 > 1 3 8 、及び D O a 4 (m/z 4 5 8 > 3 0 0) ; D 4 U A - 2 S - G l c N C O E t - 6 S (内部標準) m/z 4 7 2 > 9 7 。二糖類の量は、BCA アッセイで測定された総タンパク質レベル、または試料あたりに使用された体液の量に対して正規化された。

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

非公式配列表

配列 番号	配列	説明
1	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	野生型ヒト Fc 配列 位置 231～447 の EU インデッ クス付番
2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	野生型ヒト Fc 配列 位置 231～446 の EU インデッ クス付番
3	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	CH2 ドメイン配 列 位置 231～340 の EU インデッ クス付番
4	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3 ドメイン配 列 位置 341～447 の EU インデッ クス付番
5	EPKSCDKTHTCPPCP	ヒト IgG1 ヒン ジアミノ酸配列
6	DKTHTCPPCP	ヒト IgG1 ヒン ジ配列の一部

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

7	MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVMKLAV DEEENADNNTKANVTGPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRRK LSEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQFR EFKLSKVWRDQHFKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPG GYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAG KITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSSFFGHAHLGT GDPYTPGFPSFNHTQFPSSRSSLNIPVQTISRAAAELFGNME GDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKLNIFGVK GFVEPDHYVVVGQAQRDAWGPGAAGSGVGTALLKLAQMFS MVLKDGFPQRSIIASFWSAGDFGSGATEWLEGYLSLHLKAF TYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLY QDSNWSKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLG TTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDY ERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATS RLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPF RHFVWGSGSHTLPALLENLKLKQNNGAFNETLFRNQLALAT WTIQGAANALSGDVWDIDNEF	ヒトトランス フェリン受容 体タンパク質 1(TFR1)
8	NSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTK KDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMD QTKFPIVNAELSSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSRSSL NIPVQTISRAAAELFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKN VKLTVS	ヒト Tfr アピ カルドメイン
9	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異を 有する Fc 配列
10	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	ホール変異を 有する Fc 配列
11	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	ホール変異及 び LALA 変異 を有する Fc 配 列

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

12	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	ホール変異及 び LALA 変異 を有する Fc 配列
13	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	ホール変異及 び LALAPG 変異を有する Fc 配列
14	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	ホール変異及 び LALAPG 変異を有する Fc 配列
15	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	ホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列
16	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	ホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列
17	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	ノブ変異を有 する Fc 配列

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

18	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	ノブ変異を有する Fc 配列
19	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異及び LALA 変異を有する Fc 配列、ならびにヒト IgG1 ヒンジ配列の一部
20	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	ホール変異及び LALA 変異を有する Fc 配列、ならびにヒト IgG1 ヒンジ配列の一部
21	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異及び LALAPS 変異を有する Fc 配列、ならびにヒト IgG1 ヒンジ配列の一部
22	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	ホール変異及び LALAPS 変異を有する Fc 配列、ならびにヒト IgG1 ヒンジ配列の一部
23	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.23.2

10

20

30

40

50

【表 6 - 5】

24	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	クローン CH3C.35.23.2
25	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	ノブ変異を有 するクローン CH3C.35.23.2
26	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	ノブ変異を有 するクローン CH3C.35.23.2
27	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	ノブ変異及び LALA 変異を 有するクロー ン CH3C.35.23.2
28	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG	ノブ変異及び LALA 変異を 有するクロー ン CH3C.35.23.2
29	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	ノブ変異及び LALAPG 変異 を有するクロ ーン CH3C.35.23.2

10

20

30

40

50

【表 6 - 6】

30	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG	ノブ変異及び LALAPG 変異 を有するクロ ーン CH3C.35.23.2
31	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	ノブ変異及び LALAPS 変異を 有するクロ ーン CH3C.35.23.2
32	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG	ノブ変異及び LALAPS 変異を 有するクロ ーン CH3C.35.23.2
33	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS SPGK	ホール変異を有 するクロ ーン CH3C.35.23.2
34	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS SPG	ホール変異を有 するクロ ーン CH3C.35.23.2
35	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLS SPGK	ノブ変異及び LALA 変異を有 するクロ ーン CH3C.35.23.2 な らびにヒト IgG1 ヒンジ配 列の一部

10

20

30

40

50

【表 6 - 7】

36	DKTHTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEW ANYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	ノブ変異及び LALA 変異を有す るクローン CH3C.35.23.2 なら びにヒト IgG1 ヒ ンジ配列の一部
37	DKTHTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEW ANYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異及び LALAPS 変異を有 するクローン CH3C.35.23.2 なら びにヒト IgG1 ヒ ンジ配列の一部
38	DKTHTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEW ANYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	ノブ変異及び LALAPS 変異を有 するクローン CH3C.35.23.2 なら びにヒト IgG1 ヒ ンジ配列の一部
39	MRPLRPRAALLALLASLLAAPPVAPAEAPHLVX ₁ VDAARALW PLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPH RGIKQVRTHWLLELVTTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLREN QLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFWDLVSSLARRYIGR YGLAHVSKWNFETWNEPDHDFDNVSMTMQGFLNYYDACS EGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFT GEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADT PIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQHQNLLL ANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPFAQRTLTARFQVNNTRPP HVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSNHTV GVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVTLR LRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFPTAEQF RRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCAR PEKPPGQVTRLRALPLTQGGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQF SQDGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTGAVSGSYRVRX ₂ LDYW ARPGPFSDPVYPYLEVPVPRGPPSPGNP	全長ヒトアルファ -L-イブロンダー ゼポリペプチド配 列であって、ここ で、X ₁ は、Hま たはQであり、 かつ X ₂ は、Aま たはTである。

10

20

30

40

50

【表 6 - 8】

40	EAPHLVX ₁ VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLARTFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVSPDTGAVSGSYRVX ₂ LDYWARPG PFSDPVYPYLEVPVPRGPPSPGNP	成熟ヒトアルファ-L-イズロニダーゼポリペプチド、ここで、X ₁ は、HまたはQであり、かつX ₂ は、AまたはTである。
41	EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLARTFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVSPDTGAVSGSYRVRTLDYWARPG PFSDPVYPYLEVPVPRGPPSPGNP	EU 付番による Q33 及び T622(下線付き)を有する成熟ヒトアルファ-L-イズロニダーゼポリペプチド配列

10

20

30

40

50

【表 6 - 9】

42	EAPHLV <u>Q</u> VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLRTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVR <u>A</u> LDYWARPG PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGPNP	EU 付番による Q33 及び T622(下線付き) を有する成熟ヒ トアルファ-L- イズロニダーゼ ポリペプチド配 列
43	EAPHLV <u>H</u> VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLRTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVR <u>T</u> LDYWARPG PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGPNP	EU 付番による H33 及び T622(下線付き) を有する成熟ヒ トアルファ-L- イズロニダーゼ ポリペプチド配 列

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 0】

44	EAPHLV <u>H</u> VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPFAQRTLRTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVRA <u>L</u> LDYWARPG PFSDPVYPYLEVPVPRGPPSPGNP	EU 付番による H33 及び A622(下線付き) を有する成熟ヒ トアルファ-L- イゾロニダーゼ ポリペプチド配 列
45	EAPHLVX ₁ VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPFAQRTLRTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVX ₂ LDYWARPG PFSDPVYPYLEVPV	短縮型ヒトアル ファ-L-イゾロ ニダーゼポリペ プチド配列の実 施形態であり、 X ₁ は、Hまたは Qであり、かつ X ₂ は、Aまたは Tである。

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 1】

46	EAPHLV <u>Q</u> VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPPFAQRTLTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFPTAEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVRT <u>L</u> LDYWARPG PFSDPVPYLEVPV	EU 付番による Q33 及び T622(下線付き) を有する短縮型 ヒトアルファ- L-イズロニダー ゼポリペプチド 配列の実施形態
47	EAPHLV <u>Q</u> VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPPFAQRTLTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFPTAEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVRA <u>L</u> LDYWARPG PFSDPVPYLEVPV	EU 付番による Q33 及び A622(下線付き) を有する短縮型 ヒトアルファ- L-イズロニダー ゼポリペプチド 配列の実施形態

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 2】

48	EAPHLV <u>H</u> VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPFAQRTLTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVRT <u>L</u> LDYWARPG PFSDPVPPYLEVPV	EU 付番による H33 及び T622(下線付き) を有する短縮型 ヒトアルファ- L-イズロニダー ゼポリペプチド 配列の実施形態
49	EAPHLV <u>H</u> VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPFAQRTLTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVRA <u>L</u> LDYWARPG PFSDPVPPYLEVPV	EU 付番による H33 及び A622(下線付き) を有する短縮型 ヒトアルファ- L-イズロニダー ゼポリペプチド 配列の実施形態

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 3】

50	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTA RFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTA MGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLLGRP VFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVFVSPDTGAVSGSYRVRTLDYWARPG</u> <u>PFSDPVYPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC</u> <u>AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT</u> <u>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G₄S リンカー (配列番号 72)が ホール変異及び LALA 変異を有 する Fc 配列の N 末端に融合して いる、Q33 及び T622 (下線付 き)を有する成 熟ヒト IDUA 配 列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド	10
51	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTA RFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTA MGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLLGRP VFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVFVSPDTGAVSGSYRVRTLDYWARPG</u> <u>PFSDPVYPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC</u> <u>AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT</u> <u>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G₄S リンカー (配列番号 72)が ホール変異及び LALA 変異を有 する Fc 配列の N 末端に融合して いる、Q33 及び T622 (下線付 き)を有する成 熟ヒト IDUA 配 列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド	20

40

【表 6 - 1 4】

52	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVNSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	G ₄ S リンカー(配 列番号 72)がホ ール変異及び LALA 変異を有 する Fc 配列の N 末端に融合し ている、Q33 及 び A622 (下線 付き)を有する 成熟ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド
53	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVNSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	G ₄ S リンカー(配 列番号 72)がホ ール変異及び LALA 変異を有 する Fc 配列の N 末端に融合し ている、Q33 及 び A622 (下線 付き)を有する 成熟ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 5】

54	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLLGRPVFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGA VSGSYRVRTL D YWARPG</u> <u>PFSDPVYPYLEVPVGGGGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI</u> <u>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFVLVSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G₄S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALA 変異 を有する Fc 配 列の N 末端に 融合している、 Q33 及び T622 (下線付き) を 有する短縮型ヒ ト IDUA 配列を 有する IDUA- Fc 融合ポリペ プチド	10
55	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLLGRPVFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGA VSGSYRVRTL D YWARPG</u> <u>PFSDPVYPYLEVPVGGGGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI</u> <u>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFVLVSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G₄S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALA 変異 を有する Fc 配 列の N 末端に 融合している、 Q33 及び T622 (下線付き) を 有する短縮型ヒ ト IDUA 配列を 有する IDUA- Fc 融合ポリペ プチド	20
			30
			40
			50

【表 6 - 1 6】

56	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSAHGFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFPDGTGAVSGSYRVRLDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI</u> <u>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFLLVSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G ₄ S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALA 変異を 有する Fc 配列 の N 末端に融 合している、 Q33 及び A622 (下線付き) を 有する短縮型ヒ ト IDUA 配列を 有する IDUA-Fc 融合ポリペプチ ド
57	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSAHGFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFPDGTGAVSGSYRVRLDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI</u> <u>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFLLVSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G ₄ S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALA 変異を 有する Fc 配列 の N 末端に融 合している、 Q33 及び A622 (下線付き) を 有する短縮型ヒ ト IDUA 配列を 有する IDUA-Fc 融合ポリペプチ ド

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 7】

58	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRRLGRPVFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRTLDDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC</u> <u>AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLT</u> <u>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G4S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALA 変異を 有する Fc 配列 の N 末端に融 合している、 Q33 及び T622 (下線付き) を 有する成熟ヒト IDUA 配列を有 する IDUA-Fc 融合ポリペプチ ド
59	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRRLGRPVFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRTLDDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC</u> <u>AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLT</u> <u>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G4S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列の N 末端 に融合してい る、Q33 及び T622 (下線付 き) を有する成 熟ヒト IDUA 配 列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 8】

60	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC</u> <u>AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLT</u> <u>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G4S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列の N 末端 に融合してい る、Q33 及び A622 (下線付 き) を有する成 熟ヒト IDUA 配 列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド
61	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC</u> <u>AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLT</u> <u>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G4S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列の N 末端 に融合してい る、Q33 及び A622 (下線付 き) を有する成 熟ヒト IDUA 配 列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 9】

62	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTA MGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRP VFPTAEQ</u> <u>FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLL VHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVFSPDTGAVSGSYRVRTL D YWARPG</u> <u>PFSDPVYPYLEVPVGGGGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPI</u> <u>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G4S リンカー (配列番号 72)が ホール変異及び LALAPS 変異を 有する Fc 配列の N 末端に融合し ている、Q33 及 び T622 (下線付 き)を有する短 縮型ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド	10
63	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTA MGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRP VFPTAEQ</u> <u>FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLL VHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVFSPDTGAVSGSYRVRTL D YWARPG</u> <u>PFSDPVYPYLEVPVGGGGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPI</u> <u>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G4S リンカー (配列番号 72)が ホール変異及び LALAPS 変異を 有する Fc 配列の N 末端に融合し ている、Q33 及 び T622 (下線付 き)を有する短 縮型ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド	20
			30
			40
			50

【表 6 - 2 0】

64	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAEO</u> <u>FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPI</u> <u>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G4S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列の N 末端 に融合してい る、Q33 及び A622 (下線付 き) を有する短 縮型ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド	10
65	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAEO</u> <u>FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPI</u> <u>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G4S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列の N 末端 に融合してい る、Q33 及び A622 (下線付 き) を有する短 縮型ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド	30

40

50

【表 6 - 2 1】

66	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGSEAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFC <u>PPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLE</u> <u>LVTTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASG</u> <u>HFTDFEDKQQVFEWKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETW</u> <u>NEPDHHDFFDNVSM TMQGFLNYDDACSEGLRAASPALRLGGPG</u> <u>DSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGA</u> <u>RSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQP</u> <u>WRADVITYAAMVVKVIAQHQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFL</u> <u>SYHPPHFAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVL TAMGLLALL</u> <u>DEEQLWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAA</u> <u>VLIYASDDTRAHPNRSVAVTLRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGL</u> <u>CSPDGEWRRLGRPVFPTAEQFRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGR</u> <u>LTLRPALRLPSLLL VHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLV</u> <u>WSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTD</u> <u>GAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPVYPYLEVPVPRGPPSPGNP</u>	G4S リンカー(配 列番号 72)がホ ール変異及び LALA 変異を有 する Fc 配列の C 末端に融合し ている、Q33 及 び A622(下線付 き)を有する成 熟ヒト IDUA 配 列を有する Fc- IDUA 融合ポリ ペプチド
67	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGSEAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFC <u>PPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLE</u> <u>LVTTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASG</u> <u>HFTDFEDKQQVFEWKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETW</u> <u>NEPDHHDFFDNVSM TMQGFLNYDDACSEGLRAASPALRLGGPG</u> <u>DSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGA</u> <u>RSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQP</u> <u>WRADVITYAAMVVKVIAQHQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFL</u> <u>SYHPPHFAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVL TAMGLLALL</u> <u>DEEQLWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAA</u> <u>VLIYASDDTRAHPNRSVAVTLRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGL</u> <u>CSPDGEWRRLGRPVFPTAEQFRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGR</u> <u>LTLRPALRLPSLLL VHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLV</u> <u>WSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTD</u> <u>GAVSGSYRVRTLDYWARPGPFSDPVYPYLEVPVPRGPPSPGNP</u>	G4S リンカー(配 列番号 72)がホ ール変異及び LALA 変異を有 する Fc 配列の C 末端に融合し ている、Q33 及 び T622(下線付 き)を有する成 熟ヒト IDUA 配 列を含む Fc- IDUA 融合ポリ ペプチド

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 2】

68	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGSEAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFC <u>PPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLL</u> <u>LVTTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASG</u> HFTDFEDKQQVFEWKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETW NEPDHHDFFDNVSMTMQGFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPG DSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGA RSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQP WRADVITYAAMVVKVIAQHQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFL SYHHPFAQRTLTA RFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTA MGLLALL DEEQLWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAA VLIYASDDTRAHPNRSVAVTLRLRGVPPGGLVYVTRYLDNGL CSPDGEWRRLLGRP VFPTAEQFRMRMAEDPVAAAPRPLPAGGR LTLRPALRLPSLLLHVHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLV WSDEHVGSKCLWTYEQFSQDGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTD GAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPVPYPYLEVPVPRGPPSPGNP	G₄S リンカー (配列番号 72)が ホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列の C 末端 に融合してい る、Q33 及び A622(下線付き) を有する成熟 ヒト IDUA 配列 を含む Fc- IDUA 融合ポリ ペプチド
69	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGSEAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFC <u>PPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLL</u> <u>LVTTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASG</u> HFTDFEDKQQVFEWKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETW NEPDHHDFFDNVSMTMQGFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPG DSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGA RSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQP WRADVITYAAMVVKVIAQHQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFL SYHHPFAQRTLTA RFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTA MGLLALL DEEQLWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAA VLIYASDDTRAHPNRSVAVTLRLRGVPPGGLVYVTRYLDNGL CSPDGEWRRLLGRP VFPTAEQFRMRMAEDPVAAAPRPLPAGGR LTLRPALRLPSLLLHVHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLV WSDEHVGSKCLWTYEQFSQDGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTD GAVSGSYRVRTLDYWARPGPFSDPVPYPYLEVPVPRGPPSPGNP	G₄S リンカー (配列番号 72)が ホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列の C 末端 に融合してい る、Q33 及び T622(下線付き) を有する成熟 ヒト IDUA 配列 を含む Fc- IDUA 融合ポリ ペプチド

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 3】

70	MGWSCILFLVATATGAYA	分泌シグナルペプチド
71	GS	GS リンカー
72	GGGGS	グリシンリッチリンカー
73	GGGGS	グリシンリッチリンカー
74	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	ノブ変異及び LALA 変異を有する Fc 配列
75	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	ノブ変異及び LALA 変異を有する Fc 配列
76	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	ノブ変異及び LALA 変異を有する Fc 配列、 ならびにヒト IgG1 ヒンジ配列の一部
77	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG	ノブ変異及び LALA 変異を有する Fc 配列、 ならびにヒト IgG1 ヒンジ配列の一部

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 4】

78	EAPHLVX ₁ VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVX ₂ LDYWARPG PFSDPVPPYLEVPVPRG	短縮型ヒトアル ファ-L-イズロ ニダーゼポリペ プチド配列の実 施形態であり、 X ₁ は、Hまたは Qであり、かつ X ₂ は、Aまたは Tである。
79	EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVRTLDYWARPG PFSDPVPPYLEVPVPRG	EU 付番による Q33 及び T622(下線付き) を有する短縮型 ヒトアルファ- L-イズロニダー ゼポリペプチド 配列の実施形態

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 5】

80	EAPHLV <u>Q</u> VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPFAQRTLTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRRLGRPVPFTAQEQ FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVR <u>A</u> LDYWARP PFSDPVPYLEVPVPRG	EU 付番による Q33 及び A622(下 線付き)を有する 短縮型ヒトアル ファ-L-イズロニ ダーゼポリペプ チド配列の実施 形態
81	EAPHLV <u>H</u> VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPFAQRTLTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRRLGRPVPFTAQEQ FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVFSPTDGAVSGSYRVR <u>T</u> LDYWARP PFSDPVPYLEVPVPRG	EU 付番による H33 及び T622(下 線付き)を有する 短縮型ヒトアル ファ-L-イズロニ ダーゼポリペプ チド配列の実施 形態

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 6】

82	EAPHLV <u>H</u> VDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFPTAEQ FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRA <u>L</u> LDYWARPG PFSDPVVPYLEVPVPRG	EU 付番による H33 及び A622(下線付き) を有する短縮型 ヒトアルファ- L-イズロニダー ゼポリペプチド 配列の実施形態
83	EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFPTAEQ</u> <u>FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRTL</u> <u>LDYWARPG</u> <u>PFSDPVVPYLEVPVPRGGGGGSDKTHTCPPCAPEAAAGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u> <u>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G4S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALA 変異 を有する Fc 配 列の N 末端に 融合している、 Q33 及び T622 (下線付き) を 有する短縮型ヒ ト IDUA 配列を 有する IDUA- Fc 融合ポリペ プチド

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 7】

84	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLLGRPVEPTAEQ</u> <u>FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLFVSPDTGAVSGSYRVRTLTDYWARPG</u> <u>PFSDPVPPYLEVPVPRGGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u> <u>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLVSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G₄S リンカー (配列番号 72) がホール変異 及び LALA 変 異を有する Fc 配列の N 末端 に融合してい る、Q33 及び T622 (下線付 き) を有する 短縮型ヒト IDUA 配列を有 する IDUA-Fc 融合ポリペプ チド
85	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLLGRPVEPTAEQ</u> <u>FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLFVSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPPYLEVPVPRGGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u> <u>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLVSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G₄S リンカー (配列番号 72) がホール変異 及び LALA 変 異を有する Fc 配列の N 末端 に融合してい る、Q33 及び A622 (下線付 き) を有する 短縮型ヒト IDUA 配列を有 する IDUA-Fc 融合ポリペプ チド

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 8】

86	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLARTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAEO</u> <u>FRMRAAEDPVAAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLFVSPDTGAVSGSYRVRLDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGGGGGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u> <u>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G₄S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALA 変異を 有する Fc 配列 の N 末端に融 合している、 Q33 及び A622 (下線付き) を 有する短縮型ヒ ト IDUA 配列を 有する IDUA-Fc 融合ポリペプチ ド
87	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLARTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAEO</u> <u>FRMRAAEDPVAAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLFVSPDTGAVSGSYRVRLDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGGGGGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u> <u>SAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G₄S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列の N 末端 に融合してい る、Q33 及び T622 (下線付 き) を有する短 縮型ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 9】

88	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRRLGRPVPFTAQ</u> <u>FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRTLTYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGGGGGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u> <u>SAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G4S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列の N 末端 に融合してい る、Q33 及び T622 (下線付 き) を有する短 縮型ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド
89	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRRLGRPVPFTAQ</u> <u>FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGGGGGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u> <u>SAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G4S リンカー (配列番号 72) がホール変異及 び LALAPS 変 異を有する Fc 配列の N 末端 に融合してい る、Q33 及び A622 (下線付 き) を有する短 縮型ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 0】

90	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTA MGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPPGPLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRR LGRP VFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLL VHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u> <u>SAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G₄S リンカー (配列番号 72)が ホール変異及び LALAPS 変異を 有する Fc 配列の N 末端に融合し ている、Q33 及 び A622 (下線付 き) を有する短 縮型ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド	10
91	<u>EAPHLVHVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTA MGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPPGPLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRR LGRP VFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLL VHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC</u> <u>AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLVSKLT</u> <u>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G₄S リンカー (配列番号 72)が ホール変異及び LALAPS 変異を 有する Fc 配列の N 末端に融合し ている、H33 及 び A622 (下線付 き) を有する成 熟ヒト IDUA 配 列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド	30

40

50

【表 6 - 3 1】

92	<u>EAPHLVHVDAARALWPLRRFWRSTGFCPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPFAQRTLRTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRRLGRPVPFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLFFVSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNAKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC</u> <u>AVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT</u> <u>VDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G₄S リンカー (配列番号 72)がホール変 異及び LALAPS 変異 を有する Fc 配 列の N 末端に 融合してい る、H33 及び A622 (下線付 き)を有する 成熟ヒト IDUA 配列を 有する IDUA- Fc 融合ポリペ プチド
93	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPFAQRTLRTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRRLGRPVPFPTAEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLFFVSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGSHHHHHH</u>	6x His タグに 融合されてい る、Q33 及び A622(下線付 き)を有する成 熟ヒトアルフ ァ-L-イゾロニ ダーゼポリペ プチド配列

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 2】

94	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVTYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGPLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLLGRPVPFTAEO</u> <u>FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRTLIDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGSHHHHHH</u>	6x His タグに融合されている、Q33 及び T622(下線付き)を有する成熟ヒトアルファ-L-イズロニダーゼポリペプチド配列
95	<u>X₃APHLVHVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVTYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGPLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLLGRPVPFTAEO</u> <u>FRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGSHHHHHH</u>	H33 及び A622 を有する成熟ヒトアルファ-L-イズロニダーゼポリペプチド配列であって、ここで X ₃ は、E であるか、または存在しない(下線付き)(6x His タグに融合されている)
96	HHHHHH	6x-His タグ
97	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVLSLCAVKGFPYSDIAVEWESYGTEWANYKTTTPVLDSDG SFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	ホール変異及び LALA 変異を有するクローン CH3C.35.23.2

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 3】

98	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTSCAVKGFPYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTTPVLDSDG SFFLVSKLTVTKKEWQQGFVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSP G	ホール変異及び LALA 変異を有 するクローン CH3C.35.23.2
99	X ₃ APHLVX ₁ VDAARALWPLRRFWRSTGFCPLPHSQADQYVLS WDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSY NFTHLGDYLDLLRENQLLPGFELMGSAHGFTDFEDKQQVFEW KDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSM TQQGFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGL LRHCHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQ QIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVK VIAQHQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTAR FQVNNTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGT VLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNR SVAVTLRRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRP VFPTAEQFRMRRAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLL VHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLW TYEIQFSQDGKAYTPVSRKPSTFNLVFSPTDGA VSGSYRVRX ₂ LDY WARPGPFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNP	成熟ヒトアルフ ァ-L-イズロニ ダーゼポリペ チドであって、 ここで、X ₁ は、HまたはQ であり；X ₂ は、AまたはT であり；かつ X ₃ は、Eである か、または存在 しない。
100	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNE</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSAHGFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSM</u> <u>TQQGFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQ</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNR</u> <u>SVAVTLRRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRP</u> <u>VFPTAEQFRMRRAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLL</u> <u>VHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLW</u> <u>TYEIQFSQDGKAYTPVSRKPSTFNLVFSPTDGA VSGSYRVRTLDY</u> <u>WARPGPFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW</u> <u>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL</u> <u>TVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G ₄ S リンカー (配列番号 72) がノブ変異及び LALA 変異を有 する Fc 配列の N 末端に融合し ている、Q33 及 び T622 (下線 付き) を有する 成熟ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 4】

101	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLARTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRTLTDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW</u> <u>CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL</u> <u>TVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	G4S リンカー (配列番号 72) がノブ変異及び LALA 変異を有 するクローン CH3C.35.23.2 の N 末端に融合し ている、Q33 及 び T622 (下線 付き) を有する 成熟ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド
102	<u>EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW</u> <u>DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNF</u> <u>THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGASGHFTDFEDKQQVFEWKD</u> <u>LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVSMTMQ</u> <u>GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH</u> <u>CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO</u> <u>LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ</u> <u>HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLARTARFQVN</u> <u>NTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN</u> <u>HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT</u> <u>LRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVPFTAQEQ</u> <u>FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRALRLPSLLLHVHVCARP</u> <u>EKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQ</u> <u>DGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRTLTDYWARPG</u> <u>PFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNPGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW</u> <u>CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL</u> <u>TVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	G4S リンカー (配列番号 72) がノブ変異及び LALA 変異を有 するクローン CH3C.35.23.2 の N 末端に融合し ている、Q33 及 び T622 (下線 付き) を有する 成熟ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 5】

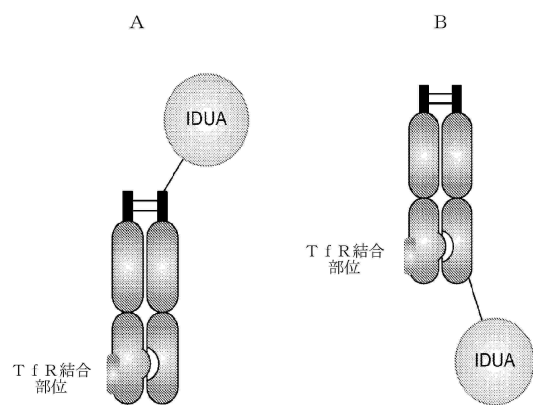
103	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYK TTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGSEAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGF CPPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLL ELVTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASG HFTDFEDKQQVFEWKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETW NEPDHHDFFDNVSMQMGFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPG DSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGA RSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQP WRADVITYAAMVVKVIAQHQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFL SYHPPFAQRTLRTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTAAGLLALL DEEQLWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAA VLIYASDDTRAHPNRSVAVTLRLRGVPPGGLVYVTRYLDNGL CSPDGEWRRLGRPVFPTAEQFRMRMAEDPVAAAPRPLPAGGR LTLRALRLPSLLLHVHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLV WSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKPSTFNLFVSPDT GAVSGSYRVRTLTDYWARPGPFSDPVYPYLEVPVPRGPPSPGNP	G₄S リンカー(配 列番号 72) がノ ブ変異及び LALA 変異を有 するクローン CH3C.35.23.2 の C 末端に融合し ている、Q33 及 び T622(下線付 き)を有する成 熟ヒト IDUA 配 列を含む Fc- IDUA 融合ポリ ペプチド	10
104	EAPHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSW DQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLLELVTRGSTGRGLSYNF THLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGHFTDFEDKQQVFEWKD LVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSMQ GFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRO LFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMVVKVIAQ HQNLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPPFAQRTLRTARFQVN NTRPPHVQLLRKPVLTAAGLLALLDEEQLWAEVSQAGTVLDSN HTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRGVPPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFPTAEQ FRMRMAEDPVAAAPRPLPAGGRLLTLRALRLPSLLLHVHVCAR PEKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQ DGKAYTPVSRKPSTFNLFVSPDTGAVSGSYRVRTLTDYWARPG PFSDPVYPYLEVPVPRGPPSPGNP GGGSDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	G₄S リンカー (配列番号 72) がノブ変異及び LALA 変異を有 する Fc 配列の N 末端に融合し ている、Q33 及 び T622 (下線 付き) を有する 成熟ヒト IDUA 配列を有する IDUA-Fc 融合ポ リペプチド	20

40

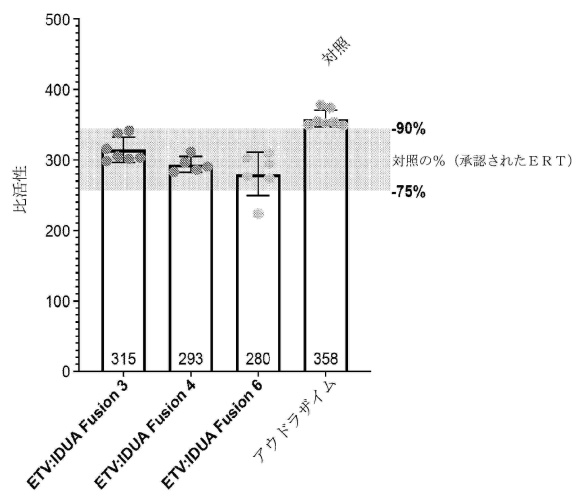
【0311】

すべての刊行物、特許、及び特許文書は、参照により個別に組み込まれるかのように、参照により本明細書に組み込まれる。本開示は、種々の具体的かつ好ましい実施形態及び技術を参照して記載してきた。しかしながら、本発明の主旨及び範囲内に留まりながら、多くの変形及び改変を行うことができることを理解されたい。

【図面】
【図 1】

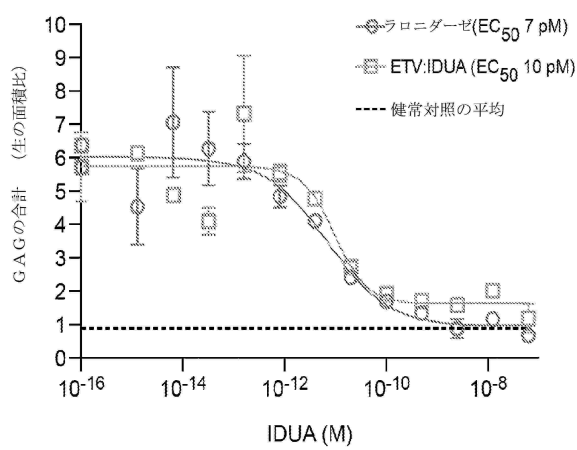


【図 2】

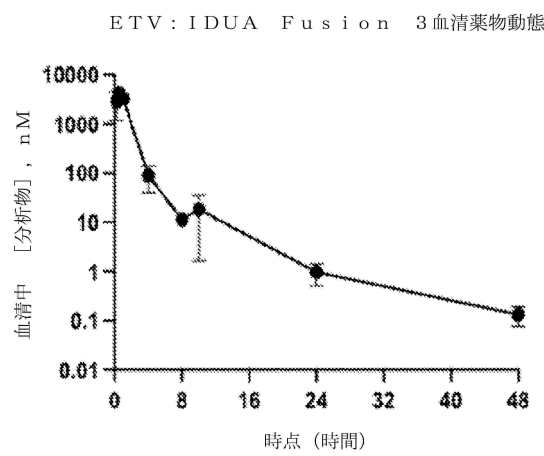


10

【図 3】



【図 4 A】



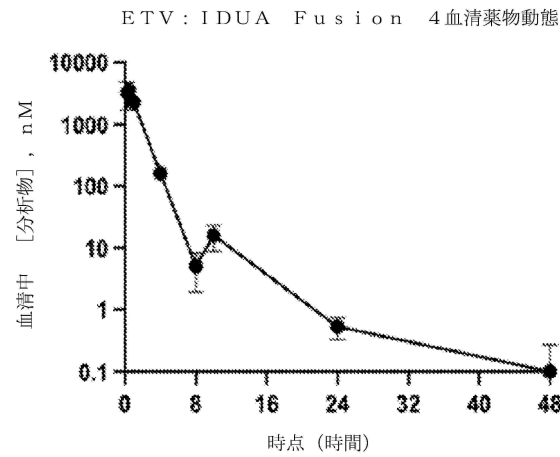
20

30

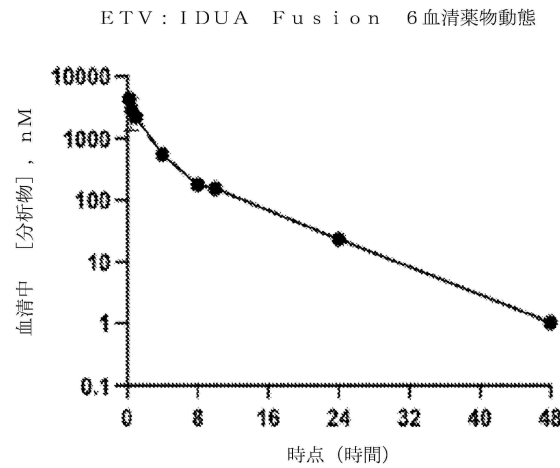
40

50

【図 4 B】

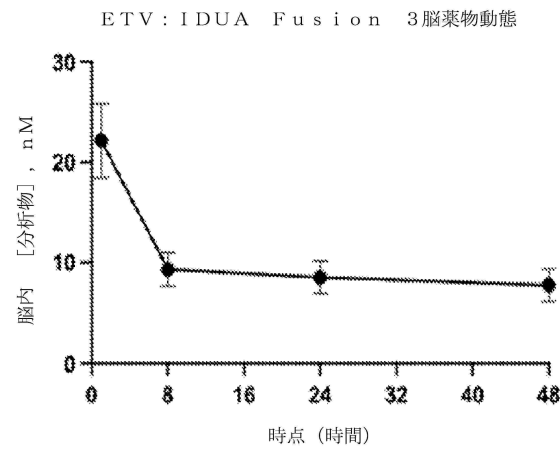


【図 4 C】

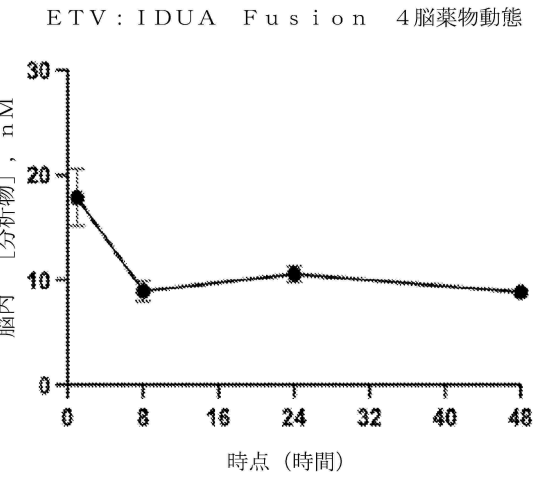


10

【図 5 A】



【図 5 B】



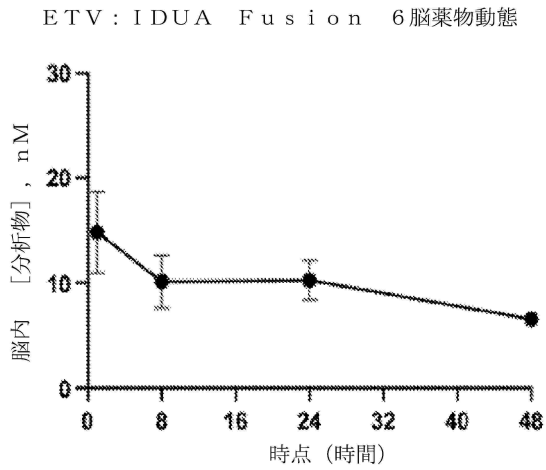
20

30

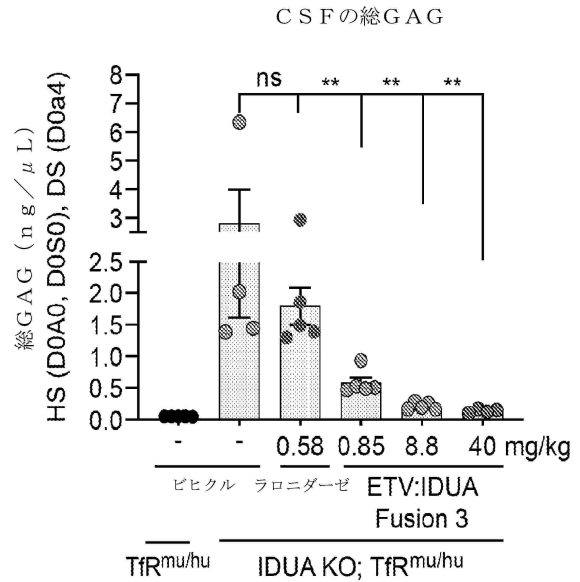
40

50

【図 5 C】

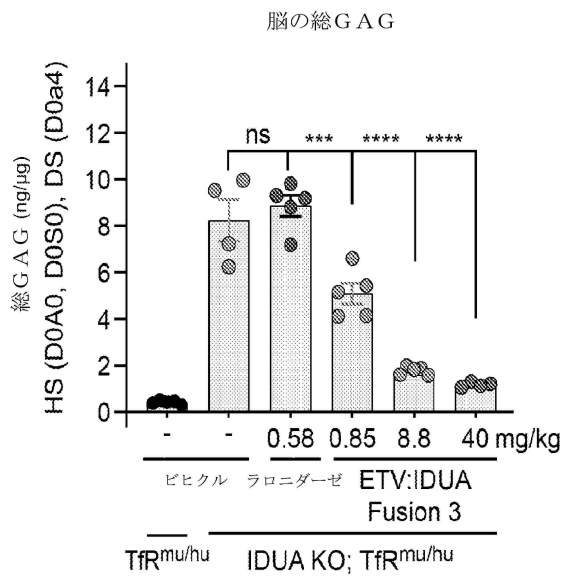


【図 6 A】

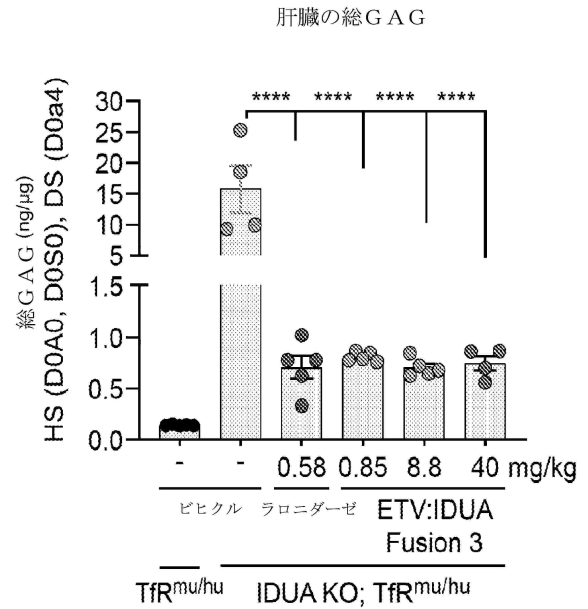


10

【図 6 B】



【図 6 C】



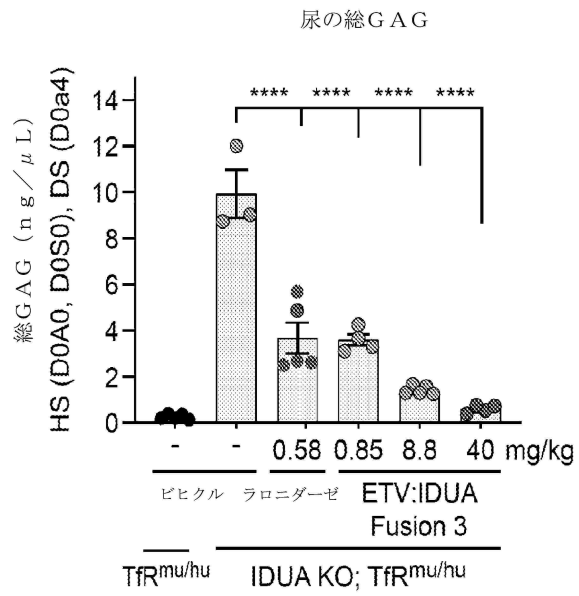
20

30

40

50

【図 6 D】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/053196

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/24 A61K38/47 A61P3/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2018/171012 A1 (SONODA HIROYUKI [JP] ET AL.) 21 June 2018 (2018-06-21) SEQ ID NO: 268, 269; [0604], [0802], [1068]; ex 29; cl 1-69 -----	1-82
Y	WO 2021/158986 A1 (DENALI THERAPEUTICS INC [US]; ARGUELLO ANNIE [US] ET AL.) 12 August 2021 (2021-08-12) pg 93-95; ex 1-4; cl 1-140; SEQ ID NO: 109 -----	1-82
Y	WO 2019/246071 A1 (DENALI THERAPEUTICS INC [US]) 26 December 2019 (2019-12-26) cl 1-159; SEQ ID NO: 282 ----- -/--	1-82

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 April 2023

Date of mailing of the international search report

04/05/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Behrens, Joyce

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/053196

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/070577 A1 (DENALI THERAPEUTICS INC [US]) 11 April 2019 (2019-04-11) cited in the application cl 1-142; [0004]-[0022]; Fig. 1; SEQ ID NO: 229	1-82
A	WO 2016/077356 A2 (SYNAGEVA BIOPHARMA CORP [US]) 19 May 2016 (2016-05-19) pg 4-5; cl 1-26	1-82

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/053196

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/053196

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2018171012 A1	21-06-2018	AU 2016283343 A1	01-02-2018
		AU 2022206724 A1	18-08-2022
		BR 112017027965 A2	28-08-2018
		CA 2990785 A1	29-12-2016
		CL 2017003351 A1	04-05-2018
		CL 2018003680 A1	12-04-2019
		CN 107849555 A	27-03-2018
		CN 114409783 A	29-04-2022
		CO 2018000235 A2	28-03-2018
		EA 201890130 A1	31-05-2018
		EP 3315606 A1	02-05-2018
		HK 1245328 A1	24-08-2018
		HK 1247962 A1	05-10-2018
		IL 256497 A	28-02-2018
		IL 267960 A	26-09-2019
		JP 6328851 B2	23-05-2018
		JP 6797148 B2	09-12-2020
		JP 2018134095 A	30-08-2018
		JP 2021036893 A	11-03-2021
		JP 2022163193 A	25-10-2022
		JP WO2016208695 A1	26-04-2018
		KR 20180020277 A	27-02-2018
		MY 187033 A	27-08-2021
		PH 12017502428 A1	02-07-2018
		SG 11201710734U A	30-01-2018
		TW 201704261 A	01-02-2017
		TW 202146445 A	16-12-2021
		US 2018171012 A1	21-06-2018
		US 2022064288 A1	03-03-2022
		WO 2016208695 A1	29-12-2016
WO 2021158986 A1	12-08-2021	CN 115698037 A	03-02-2023
		EP 4100419 A1	14-12-2022
		US 2023092681 A1	23-03-2023
		WO 2021158986 A1	12-08-2021
WO 2019246071 A1	26-12-2019	AU 2019288212 A1	03-12-2020
		BR 112020025306 A2	09-03-2021
		CA 3101202 A1	26-12-2019
		CL 2020003255 A1	28-05-2021
		CN 112424233 A	26-02-2021
		EC SP20081591 A	29-01-2021
		EP 3807322 A1	21-04-2021
		IL 279510 A	31-01-2021
		JP 2021527656 A	14-10-2021
		KR 20210027377 A	10-03-2021
		PE 20210323 A1	18-02-2021
		PH 12020552189 A1	28-06-2021
		SG 11202011743S A	28-01-2021
		TW 202016152 A	01-05-2020
		US 2021284702 A1	16-09-2021
		WO 2019246071 A1	26-12-2019
WO 2019070577 A1	11-04-2019	AU 2018345303 A1	09-04-2020
		BR 112020005271 A2	15-09-2020
		CA 3076369 A1	11-04-2019
		CL 2020000810 A1	14-08-2020
		CN 111278859 A	12-06-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/053196

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CO 2020003128 A2	19-06-2020
		CR 20200129 A	22-08-2020
		EP 3692070 A1	12-08-2020
		EP 3904389 A1	03-11-2021
		IL 273439 A	31-05-2020
		JP 2021500857 A	14-01-2021
		KR 20200058510 A	27-05-2020
		MA 50746 A	12-08-2020
		PE 20210347 A1	25-02-2021
		PH 12020550510 A1	19-04-2021
		SG 11202002730X A	29-04-2020
		TW 201925236 A	01-07-2019
		US 2019249155 A1	15-08-2019
		US 2020277584 A1	03-09-2020
		US 2021198640 A1	01-07-2021
		WO 2019070577 A1	11-04-2019

WO 2016077356 A2	19-05-2016	EP 3218000 A2	20-09-2017
		JP 2017534640 A	24-11-2017
		US 2018185495 A1	05-07-2018
		WO 2016077356 A2	19-05-2016

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 H 0 4 5
C 1 2 N 9/24 (2006.01)	C 1 2 N 9/24	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 38/47 (2006.01)	A 6 1 K 38/47	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,
MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 アドゥスミリ, ゴウリスダ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

(72)発明者 デビス, オリバー プレイアー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

(72)発明者 カリオリス, ミハリス エス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

(72)発明者 マホーン, カタル エス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

(72)発明者 ティヤギ, シュリシュティ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

(72)発明者 山ノ口 蘭輔

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01

4B065 AA91X AB01 AC14 BA02 CA25 CA31 CA44 CA46

4C076 AA95 CC21 CC41 EE59

4C084 AA02 BA44 DC22 NA14 ZA011 ZC192 ZC211

4C085 AA14 BB11

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 DA89 EA20

FA74 GA26