

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-509097

(P2015-509097A)

(43) 公表日 平成27年3月26日 (2015. 3. 26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-552303 (P2014-552303)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月10日 (2013. 1. 10)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年7月24日 (2014. 7. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/021041
 (87) 国際公開番号 W02013/106577
 (87) 国際公開日 平成25年7月18日 (2013. 7. 18)
 (31) 優先権主張番号 61/585, 039
 (32) 優先日 平成24年1月10日 (2012. 1. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592221528
 バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ センター 14
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ファーリントン, グラハム ケイ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01720, アクトン, アルゴンキンロード 1

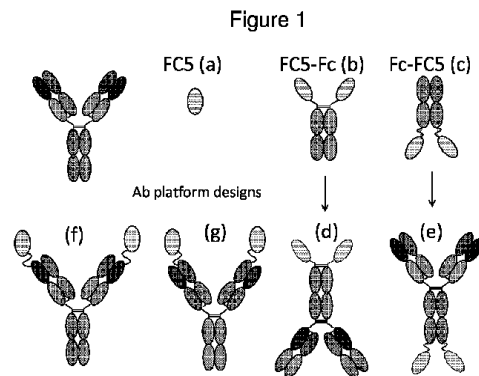
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液脳関門を越える治療分子の輸送の向上

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも部分的に、二量体型のBBB通過移動抗体（例えば、TMEM30A (CDC-50A) 結合抗体、FC5）が、一価FC5 V_{HH}と比較して、BBBを越える輸送を大きく向上させることが判明したという発見に基づく。本発明は、中でも、血液脳関門を越える、薬理的に活性な薬剤の輸送を増加させる分子、血液脳関門を越える輸送を増加させるための方法、および神経学的成分を有する障害または疾患の治療方法を提供する。

【選択図】なし



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 種の薬理的に活性な薬剤と、T M E M 3 0 A に結合する少なくとも 1 つの結合部位とを含む結合分子であって、T M E M 3 0 A に結合する前記少なくとも 1 つの結合部位は、i) 直接、または i i) 介在アミノ酸配列を介して F c 部分の N 末端に融合している結合分子。

【請求項 2】

少なくとも 2 つの結合部位を含む、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つの結合部位は、F C 5 アミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の結合分子。 10

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの結合部位は、F C 5 アミノ酸配列からなる、請求項 1 または 2 に記載の結合分子。

【請求項 5】

T M E M 3 0 A に結合する少なくとも 2 つの結合部位を含む、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 6】

T M E M 3 0 A に結合する少なくとも 3 つの結合部位を含む、請求項 1 に記載の結合分子。 20

【請求項 7】

T M E M 3 0 A に結合する少なくとも 4 つの結合部位を含む、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つの T M E M 3 0 A 結合部位は、直接 F c 部分に遺伝子学的に融合している、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの T M E M 3 0 A 結合部位は、ペプチドリンカーを含む介在アミノ酸配列を介して F c 部分に遺伝子学的に融合している、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの T M E M 3 0 A 結合部位は、ペプチドリンカーからなる介在アミノ酸配列を介して F c 部分に遺伝子学的に融合している、請求項 1 に記載の結合分子。 30

【請求項 11】

2 つの T M E M 3 0 A 結合部位が、ペプチドリンカーを含むアミノ酸配列を介して、完全 F c 領域の 2 つの異なる F c 部分の N 末端に融合している、請求項 2 に記載の結合分子。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つの T M E M 3 0 A 結合部位は、s c F c 分子の N 末端に融合している、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 種の薬理的に活性な薬剤は、F c 領域の C 末端に融合している、請求項 1 に記載の結合分子。 40

【請求項 14】

前記少なくとも 1 種の薬理的に活性な薬剤は、微小化学物質である、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 15】

前記微小化学物質は、システイン残基で前記結合分子に融合している、請求項 13 に記載の結合分子。

【請求項 16】

前記システイン残基は、改変システイン残基である、請求項 14 に記載の結合分子。 50

- 【請求項 17】
前記少なくとも 1 種の薬理的に活性な薬剤は、ポリペプチドである、請求項 1 に記載の結合分子。
- 【請求項 18】
前記少なくとも 1 種の薬理的に活性な薬剤は、抗原結合部位を含む、請求項 17 に記載の結合分子。
- 【請求項 19】
前記抗原結合部位は、非 T M E M 3 0 結合抗体から得られる、請求項 18 に記載の結合分子。
- 【請求項 20】 10
前記薬理的に活性な薬剤は、s c F v 分子、F a b 分子、および単ドメイン抗体からなる群から選択される、請求項 19 に記載の結合分子。
- 【請求項 21】
前記少なくとも 1 種の薬理的に活性な薬剤は、前記結合分子に遺伝子学的に融合している、請求項 1 に記載の結合分子。
- 【請求項 22】
前記少なくとも 1 種の薬理的に活性な薬剤は、前記結合分子に共有結合的に連結している、請求項 1 に記載の結合分子。
- 【請求項 23】 20
前記結合部位は、抗体分子の V H ドメインを含む介在アミノ酸配列を介して遺伝子学的に融合している、請求項 1 に記載の結合分子。
- 【請求項 24】
前記結合部位は、抗体分子の V L ドメインを含む介在アミノ酸配列を介して遺伝子学的に融合している、請求項 1 に記載の結合分子。
- 【請求項 25】
少なくとも 1 つの T M E M 3 0 A 結合部位は、無傷抗体分子の V H ドメインの N 末端に遺伝子学的に融合している、請求項 23 に記載の結合分子。
- 【請求項 26】 30
少なくとも 1 つの T M E M 3 0 A 結合部位は、無傷抗体分子の V L ドメインの N 末端に遺伝子学的に融合している、請求項 24 に記載の結合分子。
- 【請求項 27】
2 つの結合部位が、無傷抗体分子の V H ドメインおよび V L ドメインの N 末端に遺伝子学的に結合している、請求項 1 に記載の結合分子。
- 【請求項 28】
前記介在アミノ酸配列は、ペプチドリンカーをさらに含む、請求項 23 または 24 に記載の結合分子。
- 【請求項 29】 40
薬学的に活性な薬剤は、神経活性ペプチド、微小化学物質、および中枢神経系における標的に結合する抗体の可変領域からなる群から選択される、請求項 1 に記載の結合分子。
- 【請求項 30】
請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の結合分子を対象に投与することを含む、神経障害を治療する方法。
- 【請求項 31】
前記神経障害は、貯蔵障害である、請求項 30 に記載の方法。
- 【請求項 32】
前記神経障害は、慢性疼痛である、請求項 30 に記載の方法。
- 【請求項 33】
前記神経障害は、てんかんである、請求項 30 に記載の方法。
- 【請求項 34】 50
前記神経障害は、多発性硬化症である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 35】

前記神経障害は、タンパク質症である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 36】

前記神経障害は、脱髄障害である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 37】

神経障害の治療のための医薬の製造における、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の結合分子の使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

10

全身にわたる巨大分子の分配は、一般に、毛細血管の極めて有窓の内皮細胞内膜を介して組織内に拡散する血液中の巨大分子が媒介する拡散である。巨大分子の自由拡散は、極めて血管が発達した脳においては存在しない。脳毛細血管内皮細胞は、循環系の残りの部分において見られる有窓を持たず、極めて特化した内皮細胞の密な細胞内接点を有する。これらの密な接点は、毛細管の管腔側から反管腔側への 400 kDa を超える分子の自由拡散を防止するように機能する。さらに、毛細管は、有機アニオン輸送体 (OATS) および多剤耐性 (MDR) 系等の様々な輸送体系を含み、それらは、そのような系統がなければ内皮細胞を通して拡散し得る分子の輸送勾配を能動的に確立する。制限的閉門の組み合わせは、例えば毒素およびウイルスを含む外来物質の進入を防止すると共に、治療物質の拡散を制限する。さらに、これらの制限的血液脳閉門 (BBB) は、薬理的治療用量での潜在的に治療効果を有するタンパク質、ペプチドおよび微小分子の脳実質への受動的送達を効果的に阻止する。

20

【0002】

BBB 内皮細胞を越える治療分子の輸送を達成するための 1 つの成功戦略は、受容体媒介トランスサイトシス (RMT) を利用している。この戦略は、典型的に BBB 内皮細胞を介した分子の輸送に関与する、BBB 内皮細胞上のタンパク質に特異的に結合する抗体または分子を使用する。そのような抗体は、BBB 内皮細胞を通じてトランスサイトシスを経ながら付着したペイロードを送達する、シャトル分子として使用される。この技術の応用例は、トランスフェリン受容体およびインスリン受容体に対する抗体の使用を含む (Yu et al., 2011, Science Translational Medicine, Volume 3)。これらの 2 つの場合において、RMT 抗体は、治療タンパク質ドメインに C 末端で融合し、BBB を越えて分子を輸送することが示されている。残念ながら、一般に使用される RMT 標的であるトランスフェリンおよびインスリン受容体は、数多くの組織において高度および広範に発現する。この広範な標的発現は、短い循環半減期をもたらし、これは次いで、BBB 内皮細胞への暴露時間を制限し、それにより脳内への分子の注入を制限する。さらに、これらの抗体は、代謝的に重要な細胞機能を標的化し、それにより潜在的な安全性リスクを生じる。

30

BBB を通過する活性 BBB 輸送分子を利用する改善された標的化部分、例えば、BBB を通過移動する抗体分子から得られる結合部位が、脳内への治療薬の送達に極めて有益である。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献 1】 Yu et al., 2011, Science Translational Medicine, Volume 3

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、少なくとも部分的に、血液脳閉門 (BBB) 通過移動抗体、例えば、TME M30A (CDC-50A) 結合抗体 (例えば、単一ドメイン抗体 FC5 等) を含む融合

50

タンパク質が、一価 V_{HH} と比較して、BBBを越える輸送を大きく向上させることが判明したという発見に基づく。最初の結合およびBBB内皮輸送実験では、ラマ単ドメイン V_{HH} 抗体 (sdAb) であるFC5が、BBB内皮細胞層を介した輸送を促進し得ることが示された (例えば、米国特許第7,943,129号を参照されたい)。 V_{HH} の循環半減期は、低分子量およびFcドメインの欠損に起因して短いことが知られている (Jain, M., Kamal, N., and Batra, S. K. (2007) *Trends in biotechnology* 25 (7), 307 - 316; Batra, S. K., Jain, M., Wittel, U. A., Chauhan, S. C., and Colcher, D. (2002) *Current opinion in biotechnology* 13 (6), 603 - 608)。驚くべきことに、このコンストラクトの循環半減期は、BBB通過移動単ドメイン抗体を、ヒトFcのN末端に融合し、二価抗体様コンストラクトをもたらすことにより大きく向上した。そのような結合部位のFcコンストラクト内への組み込みは、各結合部分が細胞表面上に発現した推定標的、例えばTMM30Aに結合した二価結合の可能性を有する二価分子を形成する。二価結合は、結合力効果により、見掛けの結合親和性に大きな変化を促し得る (Reynolds, J. A. (1979) *Biochemistry* 18 (2), 264 - 269; Hubble, J. (1999) *Molecular immunology* 36 (1), 13 - 18)。本明細書において示されるように、相互作用の親和性が増加した。この親和性の増加を考慮すると、二価分子を形成するFcの付加が、BBBを越える輸送を大幅に増加するという発見は、予期されなかった。Fcドメインの付加は、分子の腎臓濾過およびFcRnへの結合による *in vivo* での抗体リサイクリングの促進を防止する質量の増大により、ベータ相薬物動態を拡張し得るが、高度に発現した標的への結合後の循環結合分子の排除により、向上した見掛けの親和性の増加は反対の効果も有していた可能性があるため、輸送の増加は予期されなかった。しかしながら、最も驚くべきことに、本明細書において示されるように、結合部位 - Fc配置 (アミノからカルボキシ末端、すなわち、FcのN末端に融合した結合部位) における融合タンパク質は、Fc - 結合部位配置 (FcのC末端に融合した結合部位) における融合タンパク質よりも高い活性を有することが判明した。これは、Fc - 結合部位融合タンパク質 (FcのC末端に融合した結合部位) が、*in vitro* で行われた最初の実験において、内皮細胞への増加した結合を示すという事実にも関わらず成立した。一価型の結合部位 - Fcコンストラクトもまた提供される。

【0005】

したがって、一態様において、本発明は、少なくとも1種の薬理的に活性な薬剤と、TMM30Aに結合する少なくとも1つの結合部位、例えばBBB通過移動結合部位を含む結合分子であって、TMM30Aに結合する少なくとも1つの結合部位は、i) 直接、またはii) 介在アミノ酸配列を介してFc部分のN末端に融合している結合分子に関する。

【0006】

一実施形態において、結合分子は、少なくとも2つの結合部位を含む。

【0007】

一実施形態において、少なくとも1つの結合部位は、FC5アミノ酸配列を含む。一実施形態において、結合分子は、TMM30Aに結合する少なくとも2つまたは少なくとも3つ (例えば、2つまたは3つ) の結合部位を含む。一実施形態において、結合分子は、TMM30Aに結合する少なくとも3つまたは少なくとも4つ (例えば、3つまたは4つ) の結合部位を含む。

【0008】

一実施形態において、少なくとも1つのBBB通過移動部位 (例えば、BBBを通過移動する抗体分子から得られる結合部位) は、直接Fc部分に遺伝子学的に融合している。

【0009】

一実施形態において、少なくとも1つのBBB通過移動部位 (例えば、BBBを通過移

10

20

30

40

50

動する抗体分子から得られる結合部位)は、ペプチドリンカーを含む介在アミノ酸配列を介してFc部分に遺伝子学的に融合している。

【0010】

一実施形態において、少なくとも1つのBBB通過移動部位(例えば、BBBを通過移動する抗体分子から得られる結合部位)は、ペプチドリンカーからなる介在アミノ酸配列を介してFc部分に遺伝子学的に融合している。

【0011】

一実施形態において、2つのBBB通過移動部位(例えば、BBBを通過移動する抗体分子から得られる結合部位)が、ペプチドリンカーを含むアミノ酸配列を介して、完全Fc領域の2つの異なるFc部分のN末端に融合している。

10

【0012】

一実施形態において、少なくとも1つのBBB通過移動部位(例えば、BBBを通過移動する抗体分子から得られる結合部位)は、scFc分子のN末端に融合している。

【0013】

一実施形態において、少なくとも1種の薬理的に活性な薬剤は、Fc領域のC末端に融合している。

【0014】

一実施形態において、少なくとも1種の薬理的に活性な薬剤は、微小化学物質である。

【0015】

一実施形態において、微小化学物質は、システイン残基で結合分子に融合している。一実施形態において、システイン残基は、改変システイン残基である。

20

【0016】

一実施形態において、少なくとも1種の薬理的に活性な薬剤は、ポリペプチドである。

【0017】

一実施形態において、少なくとも1種の薬理的に活性な薬剤は、抗原結合部位(例えば、非BBB通過移動抗体から得られる抗原結合部位)を含む。

【0018】

一実施形態において、薬理的に活性な薬剤は、scFv分子、Fab分子、および単一ドメイン抗体からなる群から選択される。

30

【0019】

一実施形態において、少なくとも1種の薬理的に活性な薬剤は、結合分子に遺伝子学的に融合している。

【0020】

一実施形態において、少なくとも1種の薬理的に活性な薬剤は、結合分子に共有結合的に連結している。

【0021】

一実施形態において、BBB通過移動部位は、抗体分子のVHドメインを含む介在アミノ酸配列を介して遺伝子学的に融合している。

40

【0022】

一実施形態において、BBB通過移動部位は、抗体分子のVLドメインを含む介在アミノ酸配列を介して遺伝子学的に融合している。

【0023】

一実施形態において、少なくとも1つのBBB通過移動部位が、無傷抗体分子のVHドメインのN末端に遺伝子学的に融合している。

【0024】

一実施形態において、少なくとも1つのBBB通過移動部位が、無傷抗体分子のVLドメインのN末端に遺伝子学的に融合している。

【0025】

50

一実施形態において、2つのBBB通過移動部位が、無傷抗体分子のVHドメインおよびVLドメインのN末端に遺伝子学的に融合している。

【0026】

一実施形態において、介在アミノ酸配列は、ペプチドリナーをさらに含む。

【0027】

一実施形態において、薬学的に活性な薬剤は、神経活性ペプチド、微小化学物質、および中枢神経系における標的に結合する抗体の可変領域からなる群から選択される。

【0028】

一実施形態において、本発明は、本発明の結合分子を対象に投与することを含む、神経障害を治療する方法に関する。

【0029】

一実施形態において、神経障害は、貯蔵障害である。一実施形態において、神経障害は、慢性疼痛である。一実施形態において、神経障害は、てんかんである。一実施形態において、神経障害は、多発性硬化症である。一実施形態において、神経障害は、タンパク質症の疾患である。一実施形態において、障害は、脱髄障害である。

【0030】

別の実施形態において、本発明は、神経障害の処置のための医薬の製造における、本発明の結合分子の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】(a)単独の、(b)ヒトIgG1 agly FcドメインにN末端(Fc5-Fc)または(c)C末端(Fc-Fc5)で融合した、Fc5単一重鎖ドメイン抗体、および薬学的に活性な部分として非BBB通過移動ドメインを組み込んだ可能な抗体様コンストラクト(d、e)の概略図である。分子(f)および(g)は、完全抗体分子へのFc5単一重鎖ドメイン抗体の付加を示し、単一重鎖ドメイン抗体は、例えば、VLもしくはVHドメイン、またはその両方に融合し得る。

【図2】4~12% Bis-Tris SDS PAGE上での各精製タンパク質2.5μgの電気泳動を示す図である。10~220kDのSDS PAGE分子量標準が、各ゲル上に標示されている。パネルAには非還元(1)および還元レーン(2)Fc5が、パネルBには非還元(1)および還元レーン(2)Fc5-Fcが、パネルCには非還元(1)および還元レーン(2)Fc-Fc5が示されている。

【図3】対照抗体12F6A(hIgG1)、CRL2434(mIgG1)およびC37H(V_HHのみ)と比較した、*in vitro* SV40ラットBBB形質転換内皮細胞株を越えるFc5Fc、FcFc5およびFc5の輸送の増加した速度を示す図である。

【図4-1】図4a~c。パネル4(a)は、Fc5-Fc()、Fc-Fc5()、またはhuFc aglyドメインのN末端に融合した無関係な対照ラクダ科V_HH(V_HH-Fc)()の、SV40ラットBBB形質転換内皮細胞株に対する結合を示す。パネル(4b)は、Fc5-Fc()およびFc-Fc5()の、初代ラットBBB内皮細胞株に対する結合を示す。パネル4cは、Fc5-Fcのラット()またはヒト()に対する結合、およびFc-Fc5の、EBNA293細胞に一時的に発現したラット()またはヒト()TMEM30Aに対する結合を示す。

【図4-2】図4a~c。パネル4(a)は、Fc5-Fc()、Fc-Fc5()、またはhuFc aglyドメインのN末端に融合した無関係な対照ラクダ科V_HH(V_HH-Fc)()の、SV40ラットBBB形質転換内皮細胞株に対する結合を示す。パネル(4b)は、Fc5-Fc()およびFc-Fc5()の、初代ラットBBB内皮細胞株に対する結合を示す。パネル4cは、Fc5-Fcのラット()またはヒト()に対する結合、およびFc-Fc5の、EBNA293細胞に一時的に発現したラット()またはヒト()TMEM30Aに対する結合を示す。

【図5-1】図5a~c。パネル5aは、Hargreaves動物モデルにおける、ダ

10

20

30

40

50

ラルギンに共有結合的に架橋したFC5 (FC5 - Dal) の疼痛を抑制する能力を示す。足逃避速度は、20秒の時間枠に基づく可能な最大効果のパーセント(%MPE)として表現される。陰性対照は、対側非炎症対照足の足逃避速度()を示し、陽性対照は、ラットがPBSのみをIV注射された場合の炎症足の急速な足逃避速度()を示す。Hargreaves動物における足逃避速度を抑制する、21mg/Kg (mpk)でのFC5 - Dalの単回IV投薬()の有効性が、7mpk()でのFC5 - Dalの3回のIV投薬と比較されている。パネル5bは、それぞれの評価対象足の%MPE反応対時間の曲線下の平均面積を示す。パネル5cは、0、1時間および2時間の時点で、ラットが3回の投薬で、7mpkの無関係V_{HH} - Dal (灰色の四角)またはFC5単独(白抜きの四角)をIV注射される追加の陰性対照実験を示す。対側対照足もまた示されている(黒丸)。足逃避速度の抑制の%MPEを、Hargreaves動物において決定した。

10

【図5-2】図5a~c。パネル5aは、Hargreaves動物モデルにおける、ラルギンに共有結合的に架橋したFC5 (FC5 - Dal) の疼痛を抑制する能力を示す。足逃避速度は、20秒の時間枠に基づく可能な最大効果のパーセント(%MPE)として表現される。陰性対照は、対側非炎症対照足の足逃避速度()を示し、陽性対照は、ラットがPBSのみをIV注射された場合の炎症足の急速な足逃避速度()を示す。Hargreaves動物における足逃避速度を抑制する、21mg/Kg (mpk)でのFC5 - Dalの単回IV投薬()の有効性が、7mpk()でのFC5 - Dalの3回のIV投薬と比較されている。パネル5bは、それぞれの評価対象足の%MPE反応対時間の曲線下の平均面積を示す。パネル5cは、0、1時間および2時間の時点で、ラットが3回の投薬で、7mpkの無関係V_{HH} - Dal (灰色の四角)またはFC5単独(白抜きの四角)をIV注射される追加の陰性対照実験を示す。対側対照足もまた示されている(黒丸)。足逃避速度の抑制の%MPEを、Hargreaves動物において決定した。

20

【図6】図6a~d。Fc - FC5 - Dalの有効性を、Hargreavesモデルにおいて評価した。パネル6aにおいては0の時点で、パネル6Bにおいては0および2時間の時点で、ラットに2mpkでIV投薬した。パネル6Cおよび6Dにおいては、0の時点で各ラットに6.5mpkでIV投薬した。

【図7-1】図7a~d。HargreavesモデルにおけるFC5 - Fc - Dalの有効性を、陰性対照Fc - Dalと比較した。0の時点で、単一濃度のFC5 - Fc - DalまたはFc - Dalを、0.5、2.5または6.0mpkでラットにIV投薬した。データは、パネル7aおよび7bにおいて、示された時点での可能な最大効果(MPE)のパーセントとして、およびパネル7cおよび7dにおいて、曲線下面積パーセントとして示されている。

30

【図7-2】図7a~d。HargreavesモデルにおけるFC5 - Fc - Dalの有効性を、陰性対照Fc - Dalと比較した。0の時点で、単一濃度のFC5 - Fc - DalまたはFc - Dalを、0.5、2.5または6.0mpkでラットにIV投薬した。データは、パネル7aおよび7bにおいて、示された時点での可能な最大効果(MPE)のパーセントとして、およびパネル7cおよび7dにおいて、曲線下面積パーセントとして示されている。

40

【発明を実施するための形態】

【0032】

例えばTMEM30A (CDC - 50A) に結合する、少なくとも1種のBBB通過移動単ドメイン抗体(例えばFC5単ドメイン)を含む融合タンパク質は、一価V_{HH}と比較して、BBBを越える輸送を大きく向上させることが判明した。特に、結合部位 - Fc配置(アミノからカルボキシ末端)は、活性の向上を示した。この大幅に増加した輸送に少なくとも部分的に基づいて、血液脳関門を越える輸送が増加した分子、血液脳関門を越える輸送を増加させるための方法、およびそのような分子を使用した治療の方法が、本明細書に記載される。

50

【0033】

本発明をさらに説明する前に、便宜のため、ある特定の用語を以下で説明する。

【0034】

I. 定義

本明細書において使用される場合、「タンパク質」または「ポリペプチド」という用語は、天然アミノ酸または非天然アミノ酸の2つ以上のポリマーを指す。

【0035】

「アミノ酸」という用語は、アラニン (Ala または A) ; アルギニン (Arg または R) ; アスパラギン (Asn または N) ; アスパラギン酸 (Asp または D) ; システイン (Cys または C) ; グルタミン (Gln または Q) ; グルタミン酸 (Glu または E) ; グリシン (Gly または G) ; ヒスチジン (His または H) ; イソロイシン (Ile または I) ; ロイシン (Leu または L) ; リシン (Lys または K) ; メチオニン (Met または M) ; フェニルアラニン (Phe または F) ; プロリン (Pro または P) ; セリン (Ser または S) ; トレオニン (Thr または T) ; トリプトファン (Trp または W) ; チロシン (Tyr または Y) ; およびバリン (Val または V) を含む。非従来のアミノ酸もまた本発明の範囲内であり、ノルロイシン、オミチン、ノルバリン、ホモセリン、および Ellman et al. Meth. Enzym. 202 : 301 - 336 (1991) に記載のもの等の他のアミノ酸残基類似体を含む。そのような非自然発生的アミノ酸残基を生成するためには、Noren et al. Science 244 : 182 (1989) および Ellman et al. (上記参照) の手順を使用することができる。簡潔に述べると、これらの手順は、非自然発生的アミノ酸残基によるサプレッサ-tRNAの化学的活性化に続く、RNAのin vitro転写および翻訳を含む。また、非従来のアミノ酸の導入は、当該技術分野において知られているペプチド化学を使用して達成され得る。本明細書において使用される場合、「極性アミノ酸」という用語は、正味ゼロの電荷を有するが、その側鎖 (例えば、M、F、W、S、Y、N、Q、C) の異なる部分においてゼロではない部分電荷を有するアミノ酸を含む。これらのアミノ酸は、疎水性相互作用および静電相互作用に参与し得る。本明細書において使用される場合、「荷電アミノ酸」という用語は、その側鎖 (例えば、R、K、H、E、D) 上にゼロではない正味電荷を有し得るアミノ酸を含む。これらのアミノ酸は、疎水性相互作用および静電相互作用に参与し得る。

10

20

30

【0036】

本明細書において使用される場合、「リンカーペプチド」という用語は、2つのポリペプチド配列を接続または結合する、例えば、2つのポリペプチドドメインを結合するアミノ酸配列を指し、そのアミノ酸配列は、天然では2つのポリペプチドドメインを自然に接続または結合しない。一実施形態において、リンカーペプチドは、合成である。本明細書において使用される場合、「合成」という用語は、自然発生的ではないアミノ酸配列を指す。

【0037】

本発明のリンカーペプチドは、ペプチド結合を介して2つのアミノ酸配列を接続する。一実施形態において、リンカーペプチドは、BBB通過移動部分を第2の部分、例えばFc部分ドメインまたは領域に接続する。一実施形態において、本発明のリンカーペプチドは、薬理的に活性な部分を、直鎖状配列における第2の部分、例えば、BBB通過移動部分またはFc部分ドメインもしくは領域である第2の部分に接続する。別の実施形態において、リンカーペプチドは、2つの薬理的に活性な部分を接続する。一実施形態において、リンカーペプチドは、1つ以上のFc部分ドメインまたは領域を、非Fc部分に接続または遺伝子学的に融合する。

40

【0038】

ポリペプチドに関して、「直鎖状配列」または「配列」は、アミノからカルボキシル末端への方向におけるポリペプチド内のアミノ酸の序列であり、配列内の互いに隣接する残基は、ポリペプチドの主要構造において連続的である。

50

【0039】

本明細書において使用される場合、「連結した」、「融合した」、または「融合」という用語は、同義的に使用される。これらの用語は、化学共役または組み換え手段を含む何らかの手段によって、2つ以上の元素または成分を互いに繋ぎ合わせることを指す。本明細書において使用される場合、「共有結合的に融合した」または「共有結合的にカップリングした」という用語は、特定の分子が互いに直接共有結合しているか、または、連結ペプチドもしくは部分等の介在部分（複数を含む）を介して、互いに間接的に共有結合的に繋がっていることを意味する。好ましい実施形態において、部分は、共有結合的に融合している。共有結合的連結の1つの種類は、ペプチド結合である。化学共役の方法（例えば、ヘテロ二官能性架橋剤を使用する）は、当該技術分野において知られている。また、融合部分は、遺伝子学的に融合していてもよい。本明細書において使用される場合、「遺伝子学的に融合した」、「遺伝子学的に連結した」、または「遺伝子融合」という用語は、2つ以上のタンパク質、ポリペプチド、またはそれらの断片の、それらのタンパク質、ポリペプチド、または断片をコードする単一ポリヌクレオチド分子の遺伝子発現による、それらの個々のペプチド骨格を介した同一直線上の共有結合的連結または付着を指す。そのような遺伝子融合は、単一の連続遺伝子配列の発現をもたらす。好ましい遺伝子融合は、フレーム内にある、すなわち、2つ以上のオープンリーディングフレーム（ORF）が融合して、元のORFの正しいリーディングフレームを維持するように、連続的なより長いORFを形成する。したがって、得られる組み換え融合タンパク質は、元のORFによりコードされるポリペプチドに対応する2つ以上のタンパク質セグメントを含有する単一ポリペプチドである（このセグメントは、天然では通常そのように繋がっていない）。この場合、単一ポリペプチドは、処理中に切断され、2つのポリペプチド鎖を含む二量体分子を生成する。

10

20

【0040】

主題のポリペプチドは、少なくとも1つの薬理的に活性な部分を含む。薬理的に活性な部分は、生物学的な文脈での作用または反応を行うことができる部分を指す。例えば、「薬理的に活性な部分」という用語は、生体系の成分（例えば、生物学的流体中、または細胞の表面上もしくは細胞マトリックス内のタンパク質）に結合する、およびその結合が生物学的効果（例えば、それが結合する活性部分および/または成分の変化（例えば、それが結合する活性部分および/もしくは成分の切断、シグナルの伝達、または細胞もしくは対象における生物学的反応の増強もしくは阻害）により測定されるような）をもたらす、その薬理的に活性な分子または部分を指す。好ましい薬学的に活性な部分は、治療部分である。

30

【0041】

例となる薬理的に活性な部分は、例えば、薬物、抗体分子またはその一部の抗原結合断片（例えば、F(ab)、scFv、VHドメイン、またはVLドメイン）（例えば、生物学的反応を付与、誘発または阻止するための）、受容体のリガンド結合部分またはリガンドの受容体結合部分、酵素等を含んでもよい。一実施形態において、薬理的に活性な部分は、タンパク質の熟成形態を含む。別の実施形態において、薬理的に活性な部分は、生物活性を保持する全長タンパク質の一部を含む。他の例となる薬理的に活性な部分は、治療上有用なアミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸（ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、炭水化物および脂質を含むがこれらに限定されない）を含む。本発明の例となる薬理的に活性な部分は、栄養因子、成長因子、酵素、抗体、神経伝達物質、神経修飾物質、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬、造影および検出剤、同位体、ならびに化学治療薬剤等を含む。本発明の薬理的に活性な部分はまた、治療薬剤が標的組織に送達されると活性化され得る薬物、プロドラッグおよび前駆体を含む。「薬理的に活性な部分」という用語は、BBB通過移動部分を含むことを意図しない。薬理的に活性な薬剤は、非BBB通過移動部分である。

40

【0042】

本発明の結合分子は、「キメラ」または「融合」タンパク質である。そのようなタンバ

50

ク質は、天然では自然に連結していない第2のアミノ酸配列に連結した第1のアミノ酸配列を含む。アミノ酸配列は、通常、融合ポリペプチド中で一緒となる別個のタンパク質中に存在してもよく、またはそれらは、通常、同じタンパク質中に存在してもよいが、融合ポリペプチド中で新たな配置に位置付けられる。キメラタンパク質は、当技術分野において周知の方法を使用して、例えば化学合成により、またはペプチド領域が所望の関係でコードされているポリヌクレオチドを形成および翻訳することにより形成され得る。

【0043】

本発明のポリペプチドは、結合分子、すなわち、BBB通過移動抗体から得られた結合ドメインまたは結合部位を含む結合分子である。BBB通過移動抗体は、それに付着した部分のBBB通過移動を促進する。例となるBBB通過移動抗体結合部位は、米国特許第7,943,129号に記載されている。一実施形態において、BBB通過移動抗体は、TMEM30Aに結合する。本明細書において使用される場合、「結合ドメイン」または「結合部位」という用語は、標的分子との特定の結合を媒介するポリペプチドの部分、領域、または部位（例えば、TMEM30A結合部位またはBBB通過移動を促進する他の部位）を指す。例となる結合ドメインは、抗原結合部位（例えば、VHおよび/もしくはVLドメイン）またはそのような結合部位を含む分子（例えば、抗体もしくは単一ドメイン抗体）を含む。

10

【0044】

本発明のポリペプチドは、BBB通過移動部分に関して一価または多価であり、例えば、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上のBBB通過移動部分を含む。

20

【0045】

本明細書に記載の薬理的に活性な部分はまた、例えば、抗体分子から得られるような結合ドメインもしくは結合部位（例えば、BBBを通過移動しない抗体からのVHおよび/もしくはVLドメイン）、そのような結合部位を含む分子（例えば、抗体もしくは単一ドメイン抗体）、リガンドの受容体結合ドメイン、受容体のリガンド結合ドメイン、または触媒ドメインを含んでもよい。「リガンド結合ドメイン」という用語は、本明細書において使用される場合、天然受容体（例えば、細胞表面受容体）、または少なくとも定性的なリガンド結合能力、および好ましくは対応する天然受容体の生物活性を保持するその領域もしくは誘導体を指す。「受容体結合ドメイン」という用語は、本明細書において使用される場合、天然リガンド、または少なくとも定性的な受容体結合能力、および好ましくは対応する天然リガンドの生物活性を保持するその領域もしくは誘導体を指す。

30

【0046】

一実施形態において、本発明のポリペプチドは、修飾抗体である。本明細書において使用される場合、「修飾抗体」という用語は、自然発生的ではないように改質された抗体の合形成態、例えば、少なくとも2つの重鎖部分を含むが、2つの完全重鎖を含まない抗体（例えば、ドメイン欠失抗体またはミニボディ）；Fc部分、ドメイン、領域またはscFc領域に繋がった2つ以上の異なる抗原に、例えばTMEM30Aおよび治療学的に関連した標的結合部位に結合するように改質された、抗体の多重特異的形態（例えば、二重特異的、三重特異的等）を含む。

40

【0047】

本明細書において使用される場合、「Fc領域」という用語は、天然免疫グロブリンのFc領域に対応するポリペプチドの部分、すなわち、その2つの重鎖のそれぞれのFcドメイン（またはFc部分）の二量体会合により形成されるような部分、として定義されるものとする。天然Fc領域は、ホモ二量体型であり、2つのポリペプチド鎖を含む。対照的に、「遺伝子学的に融合したFc領域」または「一本鎖Fc領域」（scFc領域）という用語は、本明細書において使用される場合、米国特許出願第20110243966号に記載のように、単一ポリペプチド鎖内に遺伝子学的に連結した（すなわち、単一の連続遺伝子配列内にコードされた）Fcドメイン（またはFc部分）から成る合成二量体Fc領域を指す。一実施形態において、scFc領域が使用される場合、結合分子は、BB

50

B通過移動部分に関して一価である。

【0048】

本明細書において使用される場合、「Fcドメイン」という用語は、パライン切断部位のすぐ上流側のヒンジ領域（すなわち、重鎖定常領域の第1の残基を114とすると、IgG内の残基216）において開始し、抗体のC末端で終了する単一免疫グロブリン重鎖の部分を指す。したがって、完全Fcドメインは、少なくともヒンジドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含む。本明細書において使用される場合、「Fc領域」という用語は、天然抗体のFc領域に類似した二量体化Fcドメインを指す（例えば、従来の2つのポリペプチド鎖形態で形成されるか、または一本鎖Fc領域として形成されるかを問わず）。

10

【0049】

本明細書において使用される場合、「Fcドメイン部分」または「Fc部分」という用語は、Fcドメインの、またはFcドメインから得られるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、Fc部分は、ヒンジ（例えば、上部、中間、および/または下部ヒンジ領域）ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH4ドメイン、またはそれらの変異体、一部、もしくは断片の少なくとも1つを含む。他の実施形態において、Fc部分は、完全Fcドメイン（すなわち、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン）を含む。一実施形態において、Fc部分は、CH3ドメイン（またはその一部）に融合したヒンジドメイン（またはその一部）を含む。別の実施形態において、Fc部分は、CH3ドメイン（またはその一部）に融合したCH2ドメイン（またはその一部）を含む。別の実施形態において、Fc部分は、CH3ドメインまたはその一部からなる。別の実施形態において、Fc部分は、ヒンジドメイン（またはその一部）およびCH3ドメイン（またはその一部）からなる。別の実施形態において、Fc部分は、CH2ドメイン（またはその一部）およびCH3ドメインからなる。別の実施形態において、Fc部分は、ヒンジドメイン（またはその一部）およびCH2ドメイン（またはその一部）からなる。一実施形態において、Fc部分は、CH2ドメインの少なくとも一部（例えば、CH2ドメインの全てまたは一部）を有さない。

20

【0050】

一実施形態において、本発明の結合分子は、1つのポリペプチド鎖（scFc分子）として存在するか、または野生型形態で2つのポリペプチド鎖として存在するかを問わず、完全Fc領域を含む。

30

【0051】

特異的に結合したとは、生理学的条件下で比較的安定である複合体を形成する2つの分子を指す。特異的結合は、通常低い親和性と共に中程度から高度の能力を有する非特異的結合から区別されるような、高い親和性および低い程度から中程度の能力を特徴とする。典型的に、結合は、親和性定数KAが 10^6 M^{-1} より高い、またはより好ましくは 10^8 M^{-1} より高い場合に、特異的と見なされる。必要に応じて、結合条件を変動させることにより、実質的に特異的結合に影響せずに非特異的結合が低減され得る。例えば分子の濃度、溶液のイオン強度、温度、結合に許容される時間、遮断薬（例えば、血清アルブミン、ミルクカゼイン）の濃度等の適切な結合条件は、当業者により、慣例的な技術を使用して最適化され得る。

40

【0052】

一実施形態において、本発明のFc部分は、本明細書において新生児型受容体（FcRn）結合パートナーと呼ばれる、FcRn結合に必要とされることが当該技術分野において知られているFc分子の部分の少なくとも含む。FcRn結合パートナーは、FcRn受容体により特異的に結合され得る分子またはその一部であり、結果的にFcRn結合パートナーのFcRn受容体による能動輸送を伴う。

【0053】

本発明のFcRn結合パートナーは、全IgG、IgGのFc断片、およびFcRn受容体の完全結合領域を含む他の断片を含む、FcRn受容体により特異的に結合され得る

50

分子を包含する。別の実施形態において、本発明の結合分子のFc部分ドメインまたは領域は、FcRnへの低減された結合を示す、最小限の結合を示す、または結合を示さないように修飾される。FcRn受容体に結合するIgGのFc部分の領域は、X線結晶学に基づいて説明されている(Burmeister et al., 1994, Nature 372:379)。FcのFcRnとの主要な接触エリアは、CH2およびCH3ドメインの連結部近くである。Fc-FcRnの接触は、全て単一Ig重鎖内である。FcRn結合パートナーは、全IgG、IgGのFc断片、およびFcRnの完全結合領域を含むIgGの他の断片を含む。主要な接触部位は、CH2ドメインのアミノ酸残基248、250~257、272、285、288、290~291、308~311、および314、ならびにCH3ドメインのアミノ酸残基385~387、428、および433~436を含む。免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片のアミノ酸の付番に対してなされる言及は、全てKabata et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Mdに基づく。

10

【0054】

IgGのFc領域は、部位特異的突然変異誘発等の十分認識された手順に従って修飾し、FcRnにより結合される修飾IgGまたはそのFc断片もしくは一部を得ることができる。そのような修飾は、FcRnへの結合を保存する、またはさらに向上させる、FcRn接触部位から離れた修飾および接触部位内の修飾を含む。例えば、ヒトIgG1 Fc (Fc 1)内の以下の単一アミノ酸残基が、FcRnに対するFc結合親和性の大幅な損失なしに置換され得る：P238A、S239A、K246A、K248A、D249A、M252A、T256A、E258A、T260A、D265A、S267A、H268A、E269A、D270A、E272A、L274A、N276A、Y278A、D280A、V282A、E283A、H285A、N286A、T289A、K290A、R292A、E293A、E294A、Q295A、Y296F、N297A、S298A、Y300F、R301A、V303A、V305A、T307A、L309A、Q311A、D312A、N315A、K317A、E318A、K320A、K322A、S324A、K326A、A327Q、P329A、A330Q、P331A、E333A、K334A、T335A、S337A、K338A、K340A、Q342A、R344A、E345A、Q347A、R355A、E356A、M358A、T359A、K360A、N361A、Q362A、Y373A、S375A、D376A、A378Q、E380A、E382A、S383A、N384A、Q386A、E388A、N389A、N390A、Y391F、K392A、L398A、S400A、D401A、D413A、K414A、R416A、Q418A、Q419A、N421A、V422A、S424A、E430A、N434A、T437A、Q438A、K439A、S440A、S444A、およびK447A(例えば、P238Aは、位置番号238でアラニンにより置換された野生型プロリンを表す)。

20

30

【0055】

上記変異のいくつかは、Fc部分に新たな機能性を付与し得る。例えば、一実施形態は、N297Aを組み込み、極めて保存されたN-グリコシル化部位を除去する。この変異の効果は、グリコシル化を低減し、それによりエフェクター機能および/または免疫原性を低減することである。上記変異から生じる新たな機能性のさらなる例として、FcRnに対する親和性が、いくつかの場合において野生型の親和性を超えて増加され得る。この増加した親和性は、増加した「オン」速度、減少した「オフ」速度、または増加した「オン」速度および減少した「オフ」速度の両方を反映し得る。FcRnに対する増加した親和性を付与すると考えられる変異は、T256A、T307A、E380A、およびN434Aを含む(Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591)。

40

【0056】

50

一実施形態において、FcRn結合パートナーは、配列PKNSSMISNTP（配列番号： ）を含み、HQS LGTQ（配列番号： ）、HQNLSDGK（配列番号： ）、HQNISDGK（配列番号： ）、またはVISSHLGQ（配列番号： ）から選択される配列を随意にさらに含むポリペプチドである（米国特許第5,739,277号）。

【0057】

当業者は、改質されたエフェクター機能および/またはFcRn結合を示す多くの他のFc変異またはその類似体に精通している。さらに、免疫グロブリン定常領域（例えばペグ化）またはその断片を化学的に修飾する手段（例えば、Aslam and Dent 1998, Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences Macmillan Reference, Londonを参照されたい）は、当技術分野において、例えば米国特許出願第20120003210号において周知である。

10

【0058】

一実施形態において、BBB通過移動部分が付着するFc部分、ドメインまたは領域は、当該技術分野において知られている方法を使用して、例えば、通常はグリコシル化されている残基を変異させることにより、または、グリコシル化が生じないようにポリペプチドの発現を改質することにより、非グリコシル化されている。例として、1つの特定の実施形態は、N297A変異を組み込み、極めて保存されたN-グリコシル化部位を除去する。別の実施形態において、Fc部分は、米国特許第7,863,419号に記載のように、位置299の変異、例えば、T299変異を別のアミノ酸に組み込む。アラニンに加えて、上で特定された、または当該技術分野においてFc機能を低減することが知られている位置で、他のアミノ酸が野生型アミノ酸に置換されてもよい。

20

【0059】

別の実施形態において、Armour, K.L., Clark, M.R., Hadley, A.G. & Williamson L.M. (1999), Eur J Immunol 29:2613-2624に開示されている変異が、主題の結合分子内に導入されてもよい。

【0060】

変異は、単一でFcに導入されて、天然Fcとは異なる100を超えるFc部分を生じ得る。さらに、これらの個々の変異の2つ、3つまたはそれ以上の組み合わせが一緒に導入されて、さらに数百の可能性のあるFc領域を生じ得る。さらに、本発明のコンストラクトのFc部分の1つが変異され、他方のFc部分が全く変異されなくてもよく、または、それらが両方とも変異されるが異なる変異であってもよい。

30

【0061】

また、本発明のキメラタンパク質における使用に企図されるのは、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部のペプチド模倣薬、例えば、Fc断片のペプチド模倣薬またはFcRn結合パートナーのペプチド模倣薬である。一実施形態において、ペプチド模倣薬は、ファージディスプレイを使用して、または化学ライブラリスクリーニングにより特定される（例えば、McCafferty et al. 1990, Nature 348:552, Kang et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363; EP0589877B1を参照されたい）。

40

【0062】

別の実施形態において、本発明のFc領域（例えば、scFc領域）は、当該技術分野においてFcR結合に必要であることが知られているFc分子の部分を少なくとも含む。

【0063】

一実施形態において、本発明のFc領域（例えば、scFc領域）は、当該技術分野においてタンパク質A結合に必要であることが知られているFc分子の部分を少なくとも含む。一実施形態において、本発明のFc領域（例えば、scFc領域）は、当該技術分野

50

においてタンパク質 G 結合に必要であることが知られている F c 分子の部分を少なくとも含む。一実施形態において、そのような分子は、F c R n に結合しない。

【0064】

本明細書に記載のように、当業者には、野生型 F c 部分からアミノ酸配列が変動するように、1つ以上のアミノ酸の変化（置換、付加または欠失）を含有させることにより、F c ドメインが修飾され得ることが理解される。多くのそのような変化または改質は、当技術分野において知られている。ある特定の例となる実施形態において、F c 部分は、エフェクター機能を保持し（例えば、F c R 結合）、ある特定の実施形態において、F c 部分は、エフェクター機能を有さないか、または低減されたエフェクター機能を有する。

【0065】

本発明のポリペプチドの F c ドメインまたは部分は、任意のアイソタイプ（A、E、G、または M）からのものであってもよく、異なる免疫グロブリン分子から得られてもよい。例えば、ポリペプチドの F c ドメインまたは部分は、I g G 1 分子から得られた C H 2 および / または C H 3 ドメイン、ならびに I g G 3 分子から得られたヒンジ領域を含んでもよい。別の例において、F c ドメインまたは部分は、一部は I g G 1 分子から得られた、および一部は I g G 3 分子から得られたキメラヒンジ領域を含み得る。別の例において、F c ドメインまたは部分は、一部は I g G 1 分子から得られた、および一部は I g G 4 分子から得られたキメラヒンジを含み得る。

【0066】

本発明のリンカーペプチドを含むポリペプチドは、当該技術分野において知られている技術を使用して作製され得る。一実施形態において、本発明のポリペプチドは、「組み換えにより生成」される、すなわち組み換え DNA 技術を使用して生成される。本発明のポリペプチドを作製するための例となる技術は、本明細書により詳細に記載される。

【0067】

本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、活性成分を組み合わせたことができ、組み合わせた後に活性成分を対象に投与するために使用することができる、化学組成物または化合物を意味する。本明細書において使用される場合、「生理学的に許容される」エステルまたは塩という用語は、組成物が投与される対象に有害ではない、薬学的組成物の任意の他の成分に適合する活性成分のエステルまたは塩形態を意味する。本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される担体」はまた、賦形剤；表面活性剤；分散剤；不活性希釈剤；造粒および崩壊剤；結合剤；滑沢剤；甘味剤；香味剤；着色剤；保存剤；ゼラチン等の生理学的に分解性の組成物；水性ビヒクルおよび溶媒；油性ビヒクルおよび溶媒；懸濁剤；分散または湿潤剤；乳化剤；鎮痛薬；緩衝剤；塩；増粘剤；充填剤；乳化剤；酸化防止剤；安定剤；ならびに薬学的に許容されるポリマーまたは疎水性材料の1つ以上を含むが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物中に含有され得る他の「追加的成分」は、当該技術分野において知られており、例えば、参照により本明細書に組み込まれる Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. に記載されている。

【0068】

本明細書において使用される場合、「効果的な量」は、治療反応を生成するのに十分な量である。

【0069】

本明細書において使用される場合、「タンパク質症」という用語は、誤って折り畳まれたタンパク質または凝集したタンパク質を特徴とする障害を指し、この障害は遺伝子成分を有する。

【0070】

II. BBB 通過移動抗体

一実施形態において、BBB 通過移動部分は、米国特許第 7,943,129 号に記載の通りである。例えば、一実施形態において、BBB 通過移動部分は、米国特許第 7,9

10

20

30

40

50

43, 129号に記載のような配列番号：58(FC5)、配列番号：86(FC44)、および配列番号：87(FC7)からなる群から選択される配列に記載されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、BBB通過移動部分は、FC5部分である。FC5は、ラクダ科から得られる重鎖抗体(HCA、二重鎖、二重鎖重鎖抗体、V_{HH}、または単一ドメイン抗体とも呼ばれる)である。同じラクダ科により産生されるIgG型の従来の四重鎖免疫グロブリンと比較して、これらの抗体は、従来の免疫グロブリンの軽鎖およびCH1ドメインを有さない。これらの自然発生的重鎖抗体の突出した特徴の1つは、それらの可変ドメイン(V_{HH}と示される)のVL接合位置44、45および47(Kabat付番)における、それぞれGlu、ArgおよびGlyの優勢的な存在である。従来の四重鎖抗体の重鎖の可変ドメイン(VHと示される)における同じ位置は、ほぼGly、LeuおよびTrpのみにより占有される。これらの違いは、従来の四重鎖抗体のVHドメインの相対的不溶性と比較して、ラクダ科HCA可変ドメイン(V_{HH})の高い溶解性および安定性の原因であると考えられる。ラクダ科V_{HH}ドメインのさらに2つの重要な特徴は、その比較的長いCDR3、およびCDRにおけるシステイン対の高い発生率である。システイン対はジスルフィド架橋の形成を媒介し、したがって抗体結合部位の表面トポロジーの調整に関与すると思われる。ラクダsdAb-リゾチーム錯体の結晶構造において、sdAbから突出し、CDRジスルフィド結合により部分的に安定化された固いループが結合部位から延長し、リゾチーム活性部位内に深く入り込んでいる(Desmyter et al., Nature Struct. Biol., 3, 803-811 (1996))。

10

20

【0071】

一実施形態において、BBB通過移動抗体は、TMEM30A(C6orf67、CDC50A)に結合する。TMEM30Aに結合する例となる部分は既知であり、または、当該技術分野において周知の方法を使用して作製され得る。例えば、TMEM30Aのアミノ酸配列またはその一部を含むアミノ酸配列を使用して、TMEM30Aアミノ酸配列を特異的に認識する抗体を作製すること、または結合部位のライブラリから、TMEM30Aに特異的に結合する結合部分に関してスクリーニングすることができる。そのような抗体からの、またはライブラリから得られる結合部位は、本発明の結合分子において使用することができる。TMEM30Aのアミノ酸配列を以下に示す。

【化 1】

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	
MAMNYNAKDE	VDGGPPCAPG	GTAKTRRPDN	TAFKQQLPA	WQPILTAGTV	LPIFFIIGLI	
	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
FIPIGIGIFV	TSNNIREIEI	DYTGTEPSSP	CNKCLSPDVT	PCFCTINFTL	EKSFEQNVFM	
	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
YYGLSNFYQN	HRRYVKS RDD	SQLNGDSSAL	LNPSKECEPY	RRNEDKPIAP	CGAIANSFMN	10
	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
DTLELFLIGN	DSYPIPIALK	KKGIAWWDK	NVKFRNPPGG	DNLEERFKGT	TKPVNWLKPV	
	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
YMLDSDPDNN	GFINEDFIVW	MRTAALPTFR	KLYRLIERKS	DLHPTLPAGR	YSLNVTYNYP	
	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
VHYFDGRKRM	ILSTISWGG	KNPFLGIAYI	AVGSISFLLG	VLLVINHKY	RNSSNTADIT	20

【0072】

本発明のポリペプチドは、認識されたプロトコルを使用して T M E M 3 0 A に結合する抗体から得られる、その可変領域または部分（例えば、V L および / または V H ドメイン）を含んでもよい。例えば、可変ドメインは、人間以外の動物、例えば、マウス、モルモット、霊長類、ウサギまたはラットにおいて、哺乳動物を抗原またはその断片で免疫化することにより生成された抗体から得ることができる。全ての目的において参照により組み込まれる、Harlow & Lane（上記参照、）を参照されたい。免疫グロブリンは、関連した抗原（例えば、精製された腫瘍関連抗原、またはそのような抗原を含む細胞もしくは細胞抽出物）およびアジュバントの、複数の皮下または腹腔内注射により生成される。この免疫化は、一般的に、活性化された脾細胞またはリンパ球からの抗原反応性抗体の生成を含む免疫反応を惹起する。 30

【0073】

可変領域は、免疫化された哺乳動物の血清から採取されたポリクローナル抗体から得ることができるが、脾臓、リンパ節または末梢血から個々のリンパ球を単離して、所望の可変領域が得られるモノクローナル抗体（M A b）の均質な調製物を提供することが望ましい場合が多い。ウサギまたはモルモットが、典型的には、ポリクローナル抗体の作製に使用される。マウスが、典型的には、モノクローナル抗体の作製に使用される。モノクローナル抗体は、抗原断片をマウスに注射し、「ハイブリドーマ」を調製し、抗原に特異的に結合する抗体に関してハイブリドーマをスクリーニングすることにより、断片に対して調製することができる。この周知のプロセス（Kohler et al., (1975), Nature, 256: 495）において、抗原を注射されたマウスからの比較的寿命の短い、または致死性であるリンパ球が、不死腫瘍細胞株（例えば、骨髓腫細胞株）と融合し、そのようにして、共に不死であり、B細胞により遺伝子的にコードされた抗体を生成することができるハイブリッド細胞または「ハイブリドーマ」を生成する。得られたハイブリッドは、選択、希釈、および単一抗体の形成のための特定の遺伝子を含むそれぞれの個々の系統による再増殖によって、単一の遺伝子系統に分離される。それらは、所望の 40 50

抗原に対して均質であり、またその純粋な遺伝子起源に関連して「モノクローナル」と呼ばれる抗体を生成する。

【0074】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞は、好ましくは、融合していない親骨髄腫細胞の増殖または生存を阻害する1種以上の物質を含有する好適な培養培地中で播種および増殖される。当業者には、ハイブリドーマの形成、選択および増殖のための試薬、細胞株および培地が多く供給元から市販されており、標準化されたプロトコルが十分確立されていることが理解される。一般に、ハイブリドーマ細胞が増殖される細胞培地は、所望の抗原に対するモノクローナル抗体の生成に関して分析される。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により生成されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法により、または *in vitro* アッセイにより、例えば放射免疫測定法 (RIA) または酵素免疫測定法 (ELISA) により決定される。所望の特異性、親和性および/または活性の抗体を生成するハイブリドーマ細胞が特定された後、クローンは、希釈手順を制限することによりサブクロニングされ、標準法により増殖され得る (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp 59-103 (Academic Press, 1986))。サブクロンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、親和性クロマトグラフィー (例えば、タンパク質 A、タンパク質 G、もしくはタンパク質 L 親和性クロマトグラフィー)、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、または透析等の従来精製手順により、培養培地、腹水または血清から分離され得ることが、さらに理解される。

10

20

【0075】

随意に、抗体は、抗原の他の非重複断片に結合することのない、抗原の特定の領域または所望の断片への結合に関してスクリーニングされてもよい。後者のスクリーニングは、抗原の欠失変異の集合に対する抗体の結合を決定し、どの欠失変異が抗体に結合するかを決定することにより達成され得る。結合は、例えば、ウェスタンブロットまたは ELISA により評価され得る。抗体への特異的結合を示す最小断片は、抗体のエピトープを画定する。代替として、エピトープの特異性は、試験および参照抗体が抗原への結合に関して競合する競合アッセイにより決定され得る。試験および参照抗体が競合する場合、それらは、一方の抗体の結合が他方の結合に干渉するように十分近位で、同じエピトープ (複数を含む) に結合する。

30

【0076】

所望のモノクローナル抗体をコードする DNA は、容易に単離し、定常領域ドメイン配列の単離のために上で説明された従来手順のいずれかを使用して配列決定することができ (例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより)。単離およびサブクロニングされたハイブリドーマ細胞は、そのような DNA の好ましい源として機能する。より具体的には、単離された DNA (本明細書に記載のように合成であってもよい) は、本発明のポリペプチドへの組み込みのための所望の可変領域配列をクローニングするために使用され得る。

【0077】

他の実施形態において、結合部位は、完全ヒト抗体から得られる。ヒトまたは実質的にヒトの抗体は、内因性免疫グロブリン産生が不可能な形質転換動物 (例えばマウス) において生成され得る (例えば、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 6,075,181 号、米国特許第 5,939,598 号、米国特許第 5,591,669 号および米国特許第 5,589,369 号を参照されたい)。例えば、キメラおよび生殖系列変異マウスにおける抗体重鎖結合領域のホモ接合体欠失は、内因性抗体生成の完全阻害をもたらすことが説明されている。そのような生殖系列変異マウスへのヒト免疫グロブリン遺伝子の移送は、抗原負荷の際にヒト抗体の産生をもたらす。SCID マウスを使用したヒト抗体を生成する別の好ましい手段は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 5,811,524 号に開示されている。これらのヒト抗体に関連した遺伝物質もま

40

50

た、本明細書に記載のように単離および操作され得ることが理解される。

【0078】

組み換え抗体の生成のためのさらに別の高効率的手段は、Newman, Biotechnology, 10:1455-1460 (1992)により開示されている。具体的には、この技術は、サル可変ドメインおよびヒト定常配列を含有する霊長類化抗体の生成をもたらす。この参考文献は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。さらに、この技術はまた、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、同一出願人による米国特許第5,658,570号、米国特許第5,693,780号および米国特許第5,756,096号に記載されている。

【0079】

別の実施形態において、リンパ球は、顕微操作および単離された可変遺伝子により選択され得る。例えば、末梢血単核細胞は、免疫化動物から単離され、約7日間 *in vitro* で培養され得る。培養物は、スクリーニング基準に適合する特定の抗体に関してスクリーニングされ得る。陽性ウェルからの細胞が単離され得る。個々のIg産生B細胞が、FACSにより、または補体媒介溶血ブランクアッセイにおいてそれらを特定することにより単離され得る。Ig産生B細胞は、管内に顕微操作され得、VHおよびVL遺伝子は、例えばRT-PCRを使用して増幅され得る。VHおよびVL遺伝子は、抗体発現ベクター内にクローニングされ、発現のために細胞（例えば、真核または原核細胞）内にトランスフェクトされ得る。

【0080】

代替として、可変(V)ドメインは、選ばれた動物からの可変遺伝子配列のライブラリから得ることができる。ドメイン、例えばV_Hおよび/またはV_Lドメインのランダムな組み合わせを発現するライブラリを、所望の結合特性を有する要素を特定するために、所望の抗原に関してスクリーニングすることができる。そのようなスクリーニングの方法は、当該技術分野において周知である。例えば、抗体遺伝子レパトリーは、バクテリオファージ発現ベクター内にクローニングされ得る(Huse, W. D. et al. (1989). Science, 247:1275)。さらに、その表面上に抗体を発現する細胞(Francisco et al. (1994), PNAS, 90:10444; Georgiou et al. (1997), Nat. Biotech., 15:29; Boder and Wittrup (1997) Nat. Biotechnol. 15:553; Boder et al. (2000), PNAS, 97:10701; Daugherty, P. et al. (2000) J. Immunol. Methods. 243:211)またはウイルス(例えば、Hoogenboom, H. R. (1998), Immunotechnology 4:1; Winter et al. (1994). Annu. Rev. Immunol. 12:433; Griffiths, A. D. (1998). Curr. Opin. Biotechnol. 9:102)がスクリーニングされ得る。

【0081】

また、当業者には、抗体可変ドメインをコードするDNAが、当該技術分野において知られた方法を使用して、ファージ、酵母、または細菌において発現された抗体ライブラリから得られてもよいことが理解される。例となる方法は、例えば、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、EP368684B1; 米国特許第5,969,108号; Hoogenboom et al., (2000) Immunol. Today 21:371; Nagy et al. (2002) Nat. Med. 8:801; Huie et al. (2001), PNAS, 98:2682; Lui et al. (2002), J. Mol. Biol. 315:1063に記載されている。いくつかの出版物(例えば、Marks et al. (1992), Bio/Technology 10:779-783)は、鎖シャッフリングによる高親和性ヒト抗体の生成、ならびに大規模なファージライブラリを構築するための戦略としての、組み合わせ感染および *in vivo* 組み換えを説明している。別の実施形態において、リボソームディスプレイを使用

10

20

30

40

50

して、バクテリオファージをディスプレイプラットフォームとして置き換えることができる(例えば、Hanes, et al. (1998), PNAS 95:14130; Hanes and Pluckthun. (1999), Curr. Top. Microbiol. Immunol. 243:107; He and Tauszig. (1997), Nuc. Acids Res., 25:5132; Hanes et al. (2000), Nat. Biotechnol. 18:1287; Wilson et al. (2001), PNAS, 98:3750; または Irving et al. (2001) J. Immunol. Methods 248:31を参照されたい)。

【0082】

スクリーニングのための例となるライブラリは、ヒト可変遺伝子ライブラリである。ヒト以外の源からの V_L および V_H ドメインもまた使用され得る。ライブラリは、免疫化対象からのナープ、または半合成であってもよい(Hoogenboom and Winter. (1992). J. Mol. Biol. 227:381; Griffiths et al. (1995) EMBO J. 13:3245; de Kruif et al. (1995). J. Mol. Biol. 248:97; Barbas et al. (1992), PNAS, 89:4457)。一実施形態において、免疫グロブリンドメインに変異をもたらし、より大きな不均一性を有する核酸分子のライブラリを形成することができる(Thompson et al. (1996), J. Mol. Biol. 256:77; Lamminmaki et al. (1999), J. Mol. Biol. 291:589; Caldwell and Joyce. (1992), PCR Methods Appl. 2:28; Caldwell and Joyce. (1994), PCR Methods Appl. 3:S136)。標準的スクリーニング手順を使用して、高親和性変異体を選択することができる。別の実施形態において、例えば、当該技術分野において知られている技術を使用して結晶構造から得られた情報を使用して、抗体結合力を増加させるために V_H および V_L 配列に変化をもたらすことができる。

【0083】

別の例となるライブラリは、単ドメイン抗体を含むラクダ科ライブラリである。例となる単ドメイン分子は、抗体の単離された重鎖可変ドメイン(V_H)、すなわち軽鎖可変ドメインを有さない重鎖可変ドメイン、および抗体の単離された軽鎖可変ドメイン(V_L)、すなわち重鎖可変ドメインを有さない軽鎖可変ドメインを含む。本発明の結合分子において使用される例となる単ドメイン抗体は、例えば、Hamers - Casterman, et al., Nature 363:446-448 (1993)、および Dumoulin, et al., Protein Science 11:500-515 (2002)に記載のような、ラクダ科重鎖可変ドメイン(約118から136のアミノ酸残基)を含む。他の例となる単ドメイン抗体は、Dabs (登録商標) (Domantis Ltd., Cambridge, UK)としても知られる単 V_H または V_L ドメインを含む。さらに他の単ドメイン抗体は、サメ抗体(例えば、サメIg-NAR)を含む。サメIg-NARは、1つの可変ドメイン(V -NAR)および5つのC様定常ドメイン(C-NAR)のホモ二量体を含み、長さが5から23残基で変動する細長いCDR3領域に多様性が集中している。ラクダ科の種(例えばラマ)において、 V_{HH} と呼ばれる重鎖可変領域は、抗原結合ドメイン全体を形成する。ラクダ科 V_{HH} 可変領域と、従来の抗体から得られるもの(V_H)との間の主な違いは、(a) V_{HH} における対応する領域と比較して、 V_H の軽鎖接触表面におけるより疎水性のアミノ酸、(b) V_{HH} におけるより長いCDR3、および(c) V_{HH} におけるCDR1とCDR3との間のジスルフィド結合の頻繁な発生を含む。単ドメイン結合分子を作製するための方法は、共に参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,005,079号および米国特許第6,765,087号に記載される。 V_{HH} ドメインを含む例となる単ドメイン抗体は、Nanobodies (登録商標) (Ablynx NV, Ghent, Belgium)を含む。

【0084】

さらに、本発明のポリペプチドの生成に有用な可変領域配列は、多くの異なる源から得ることができる。例えば、上述のように、様々なヒト遺伝子配列が、公的にアクセス可能な寄託物の形態で利用可能である。抗体および抗体コード遺伝子の多くの配列（例えば、臨床的に有益な特性を有することが知られている抗体）が公開されており、好適な可変領域配列（例えばV_LおよびV_H配列）は、当該技術分野において認識されている技術を使用して、これらの配列から合成することができる。

【0085】

別の実施形態において、本発明のポリペプチドの結合ドメインは、例えばラクダ科から得られるV_Hドメインからなり、これは、V_L鎖の非存在下で安定である（Hamers - Casterman et al. (1993). Nature, 363: 446; Desmyter et al. (1996). Nat. Struct. Biol. 3: 803; Decanniere et al. (1999). Structure, 7: 361; Davies et al. (1996). Protein Eng., 9: 531; Kortt et al. (1995). J. Protein Chem., 14: 167)。

10

【0086】

本発明のポリペプチドは、完全マウス、完全ヒト、キメラ、ヒト化、人間以外の霊長類、または霊長類化抗体から得られる可変ドメインまたはCDR（複数を含む）を含んでもよい。非ヒト抗体、またはその断片もしくはドメインは、当該技術分野において認識されている技術を使用して、その免疫原性を低減するように改質され得る。ヒト化抗体は、親抗体の結合特性を保持する、または実質的に保持するように修飾されているが、人間において親の非ヒト抗体より免疫原性が低い、非ヒト抗体から得られる抗体である。ヒト化標的抗体の場合、これは、(a)非ヒト可変ドメイン全体をヒト定常領域にグラフトし、キメラ標的抗体を生成すること；(b)非ヒト相補性決定領域(CDR)の1つ以上の少なくとも一部を、重要なフレームワーク残基を保持する、または保持しないヒトフレームワークおよび定常領域内にグラフトすること；(c)非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、表面残基の置き換えによりヒト様部分でそれらを「覆い隠す」ことを含む、様々な方法により達成され得る。そのような方法は、全て参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Morrisson et al., (1984), PNAS. 81: 6851-55; Morrisson et al., (1988), Adv. Immunol. 44: 65-92; Verhoeyen et al., (1988), Science 239: 1534-1536; Padlan, (1991), Molec. Immun. 28: 489-498; Padlan, (1994), Molec. Immun. 31: 169-217; ならびに米国特許第5,585,089号、米国特許第5,693,761号および米国特許第5,693,762号に開示されている。

20

30

【0087】

本発明のポリペプチドの免疫原性を低下させるために、脱免疫化もまた使用され得る。本明細書において使用される場合、「脱免疫化」は、T細胞エピトープの修飾を含む（例えば、WO9852976A1、WO0034317A2）。例えば、V_HおよびV_L配列が分析され、相補性決定領域(CDR)および配列内の他の重要な残基に対するエピトープの位置を示す、各V領域からのヒトT細胞エピトープ「マップ」が生成される。最終抗体の活性を改質する危険性が低い代替のアミノ酸置換を特定するために、T細胞エピトープマップからの個々のT細胞エピトープが分析される。アミノ酸置換の組み合わせを含む様々な代替のV_HおよびV_L配列が設計され、これらの配列が、その後、機能に関して試験される様々な本発明のポリペプチド内に組み込まれる。典型的には、12から24の間の変異抗体が生成および試験される。次いで、修飾されたVおよびヒトC領域を含む完全重鎖および軽鎖遺伝子が、発現ベクター内にクローニングされ、その後プラスミドが、全抗体の生成のために細胞株に導入される。次いで、抗体が適切な生化学的および生物学的アッセイにおいて比較され、最適な変異体が特定される。

40

【0088】

50

一実施形態において、本発明のポリペプチドに使用される可変ドメインは、1つ以上のCDRの少なくとも部分的な置き換えにより改質される。別の実施形態において、可変ドメインは、例えば、部分的なフレームワーク領域の置き換えおよび配列変更により、随意に改質されてもよい。ヒト化可変領域を作製する上で、CDRは、フレームワーク領域が得られる抗体と同じクラスまたはさらにサブクラスの抗体から得られてもよいが、CDRは、異なるクラスの抗体から、および好ましくは異なる種からの抗体から得られる。1つの可変ドメインの抗原結合能力を別の可変ドメインに移すために、CDRの全てをドナー可変領域からの完全CDRで置き換える必要はなくてもよい。むしろ、結合ドメインの活性を維持するのに必要なそれらの残基を移すことだけが必要となり得る。米国特許第5,585,089号、米国特許第5,693,761号および米国特許第5,693,762号に記載の説明を考慮して、慣例的な実験を行うことにより、または試行錯誤的な試験により、免疫原性が低下した機能性抗原結合部位を得ることは、十分当業者の能力の範囲内である。

10

【0089】

FC5は、本発明のポリペプチドに組み込むことができる例となるTMM30A結合部分である。FC5のアミノ酸配列を、以下に記載する。

【化2】

```

E V Q L Q A S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G F K I T H Y T M
G W F R Q A P G K E R E F V S R I T W G G D N T F Y S N S V K G R F
T I S R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A D Y Y C A A G S T S
T A T P L R V - - - D Y W G K G T Q V T V S S

```

20

【0090】

III. 随意のリンカーペプチド

本発明のポリペプチドは、随意に、少なくとも1つのリンカーペプチドを含む。一実施形態において、2つ以上のリンカーペプチドが、本発明のポリペプチドのポリペプチドに存在する。別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、3、4、5、6、7、8、9または10個のリンカーペプチドを含む。

【0091】

本発明のリンカーペプチドは、組み換えポリペプチドにおける所与の位置で1回生じてもよく、または、所与の位置で複数回生じてもよい（すなわち、リンカーペプチドの配列は、順次x回繰り返されてもよい）。例えば、一実施形態において、本発明のリンカーペプチドは、ポリペプチド内の所与の位置において、1回から10回の間（これらを含む）で繰り返される。別の実施形態において、リンカーペプチドは、ポリペプチド内の所与の位置において、2、3、4、5、6、7、8、9または10回生じる。

30

【0092】

本発明のリンカーペプチドは、様々な長さを有し得る。一実施形態において、本発明のリンカーペプチドは、約5から約75アミノ酸の長さである。別の実施形態において、本発明のリンカーペプチドは、約5から約50アミノ酸の長さである。別の実施形態において、本発明のリンカーペプチドは、約10から約40アミノ酸の長さである。別の実施形態において、本発明のリンカーペプチドは、約15から約35アミノ酸の長さである。別の実施形態において、本発明のリンカーペプチドは、約15から約20アミノ酸の長さである。別の実施形態において、本発明のリンカーペプチドは、約15アミノ酸以上の長さである。

40

【0093】

リンカーペプチドは、タンパク質工学において非常に頻繁に使用されているため、合成生物学における標準的な組み立て部分となっている（例えば、Anderson, J. C., et al. Journal of Biological Engineering 2010, 4:1および遺伝子コンストラクトにおいて使用される標準生物学的パーツをリストしているパーツ登録ウェブサイトを参照されたい）。

50

【0094】

リンカーペプチドの現在の当該技術分野において認識されている使用のいくつかの例は、scFv分子(Freund et al. FEBS 1993.320:97);一本鎖免疫グロブリン分子(Shu et al. 1993. PNAS. USA 90:7995);ミニボディ(Hu et al. 1996 Cancer Res. 56:3055);CH2ドメイン欠失抗体(Mueller, B.M., et al. 1990 PNAS USA. 87:5702);一本鎖二重特異性抗体(Schlereth et al. 2005 Cancer Res. 65:2882);全長IgG様二重特異性抗体(Marvin, J.S. et al. 2005 Acta Pharmacol Sin 26:649およびそれに引用されている参考文献、ならびにMichaels et al. 2009 MAbs. 1:128およびOrcutt K.D. et al. 2010 Protein Eng Des Sel. 23:221);scFv融合タンパク質(deGraaf et al. 2002 British Journal of Cancer 86:811);タンパク質-断片相補性アッセイの開発(Remy, I. et al. 2007 BioTechniques 42:137)における使用を含む。

10

【0095】

キシロースを還元するものを含む他の例となるリンカーペプチド(例えば、PCT/US11/66947に開示されるような)が、本発明の結合分子において使用され得る。

【0096】

リンカーペプチドは、それらが結合するポリペプチドのNもしくはC末端(またはその両方)に付着してもよい。

20

【0097】

IV. 例となる薬学的に活性な部分

標的となる疾患または障害または状態に依存して、例えば、本発明の結合分子、例えばTMM30Aを標的とする本発明によるBBB通過移動部位を含む結合分子を使用して、様々な薬物カーゴ、例えば、薬学的に活性な薬剤、またはそれと同等に薬学的に活性な部分が、in vivoで成功裏に送達され得る。本明細書において使用される場合、「薬学的に活性な部分」および「薬理的化合物」という用語は、疾患または障害の効果を治療または改善するのに有用な任意の部分または化合物を指す。例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS、ルー・ゲーリック病)、疼痛てんかん、蓄積症および多発性硬化症等の神経変性疾患を含む疾患または障害が標的となり得る。

30

【0098】

例となる薬学的に活性な分子は、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、グリア細胞株神経栄養因子(GDNF)、およびインスリン様成長因子(IGF)を含む。さらに、治療可能性を有することが示され、本発明の抗体により送達され得る他の化合物は、P物質、神経ペプチドY、ダラルギン、アルファシヌクレイン、血管作動性腸管ペプチド(VIP)、ガンマ-アミノ-酪酸(GABA)、ドーパミン、コレシストキニン(CCK)、エンドルフィン、エンケファリンおよびチロトロピン放出ホルモン(TRH)を含むがこれらに限定されない神経ペプチドである。さらなる例となる治療薬は、サイトカイン、鎮静剤、抗痙攣薬、ポリヌクレオチドおよび導入遺伝子(例えば、不安神経症、鬱病、統合失調症、および睡眠障害等の精神病だけでなく、てんかん、発作性障害、脳梗塞および脳血管障害、脳炎および髄膜炎、記憶および認識障害、急性または慢性疼痛(例えば難治性)、ならびに身体的外傷を含むがこれらに限定されない、そのような神経障害に使用され得る小分子干渉RNAを含む)を含み得る。

40

【0099】

一実施形態において、薬学的に活性な部分は、TMM30Aに結合しない抗原結合部位を含む。ある特定の実施形態において、本発明のポリペプチドは、生物学的効果を媒介

50

する非 T M E M 3 0 A 標的分子に特異的な少なくとも1つの結合部位を有する。一実施形態において、結合部位は、(例えば、細胞表面受容体に結合し、活性化または阻害シグナルの伝達をもたらすことにより)細胞活性化または阻害を媒介する。一実施形態において、結合部位は、細胞の死をもたらす(例えば、細胞シグナル誘発経路により、補体結合または結合分子上に存在するペイロード(例えば毒性ペイロード)への暴露により)、あるいは、対象における疾患または障害を媒介する(例えば、細胞死を媒介もしくは促進することにより、フィブリン塊の溶解を促進する、もしくは塊形成を促進することにより、または生物学的に利用可能な物質の量を調整することにより)シグナルの伝達を開始することができる。別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、低減または排除を目標とした抗原、例えば、細胞表面抗原または可溶性抗原に特異的な少なくとも1つの結合部位を有する。

10

【0100】

さらに他の実施形態において、本発明のポリペプチドは、神経疾患または障害の処置に有用な分子に結合する。例えば、ポリペプチドは、神経細胞(例えば、ニューロン、グリア細胞または)上に存在する抗原に結合し得る。ある特定の実施形態において、神経障害に関連した抗原は、上で説明された自己免疫または炎症性障害であってもよい。本明細書において使用される場合、「神経疾患または障害」は、神経系が変性している患者における障害または状態を含む(例えば、神経変性障害、および神経系が適切に発達しない、または脊髄損傷等の損傷後に再生しない障害)。本発明の方法および組成物により診断、予防または処置が可能な神経障害の例は、多発性硬化症、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、神経因性疼痛、外傷性脳損傷、ギラン-バレー症候群、および慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)を含むが、これらに限定されない。

20

【0101】

さらなる例となる薬理的に活性な部分を、以下でさらに説明する。

【0102】

i. 抗原結合部分

ある特定の実施形態において、薬学的に活性な部分は、例えば抗体または単一ドメイン抗体の少なくとも1つの抗原結合部分(結合部位)を含む。一実施形態において、抗原結合部分は、特定の細胞型または組織に組成物を標的化する。

【0103】

他の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分の結合部位は、抗原結合部分または断片を含んでもよい。「抗原結合部分」という用語は、抗原に結合する、または抗原結合(すなわち、特異的結合)に関して無傷抗体と(すなわち、それらが得られる無傷抗体と)競合する免疫グロブリン、抗体、または抗体変異体のポリペプチド断片を指す。例えば、抗原結合断片は、上で説明された抗体または抗体変異体から得ることができる。抗原結合部分は、当該技術分野において周知の組み換えまたは生化学的方法により生成され得る。例となる抗原結合断片は、VHおよび/またはVL(いずれかの可変領域のみで抗原への結合に十分である場合)、Fv、Fab、Fab'、および(Fab')₂を含む。

30

【0104】

他の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、一本鎖結合分子(例えば、一本鎖可変領域またはscFv)からの結合部位を含んでもよい。一本鎖抗体の生成のための説明されている技術(米国特許第4,694,778号; Bird, Science 242:423-442(1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988); および Ward et al., Nature 334:544-554(1989))を、一本鎖結合部分の生成に適合させることができる。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重鎖および軽鎖断片を連結させて一本鎖抗体をもたらすことにより形成される。大腸菌における機能性Fv断片の組み立てのための技術もまた使用され得る(Skerra et al., Science 242:1038-1041(1988))。

40

【0105】

50

ある特定の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、一本鎖可変領域配列 (s c F v) を含む、またはそれからなる1つ以上の結合部位または領域を含む。一本鎖可変領域配列は、1つ以上の抗原結合部位、例えば、V_Hドメインにリンカーペプチドにより連結したV_Lドメインを有する単一ポリペプチドを含む。V_Lおよび/またはV_Hドメインは、当該技術分野において知られた抗体またはその変異体から得ることができる。S c F v分子は、V_H-リンカー-V_Lの方向、またはV_L-リンカー-V_Hの方向で構築され得る。

【0106】

ある特定の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分において使用されるs c F v分子は、安定化されたs c F v分子である。一実施形態において、安定化されたs c F v分子は、V_HドメインとV_Lドメインとの間に介在するリンカーペプチドを含んでもよく、V_HおよびV_Lドメインは、V_Hにおけるアミノ酸とV_Lドメインにおけるアミノ酸との間のジスルフィド結合により連結している。他の実施形態において、安定化されたs c F v分子は、最適化された長さまたは組成を有するs c F vリンカーを含んでもよい。さらに他の実施形態において、安定化されたs c F v分子は、少なくとも1つの安定化アミノ酸置換(複数を含む)を有するV_HまたはV_Lドメインを含んでもよい。さらに別の実施形態において、安定化されたs c F v分子は、上に列挙された安定化特性の少なくとも2つを有してもよい。

10

【0107】

安定化されたs c F v分子は、改善されたタンパク質安定性を有するか、または、作用可能に連結したポリペプチドに改善されたタンパク質安定性を付与する。本発明のポリペプチドに存在し得る例となる安定化されたs c F v分子は、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2007年3月19日出願の米国特許出願第11/725,970号に記載されている。

20

【0108】

ある特定の例となる実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、Fc領域のC末端および/またはN末端にリンカーペプチドを介して作用可能に連結した少なくとも1つのs c F v分子を含む。

【0109】

一実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、所望の標的を認識する抗体からの少なくとも1つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、所望の標的を認識する抗体からの少なくとも2つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、所望の標的を認識する抗体からの少なくとも3つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、所望の標的を認識する抗体からの少なくとも4つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、所望の標的を認識する抗体からの少なくとも5つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、所望の標的を認識する抗体からの6つ全てのCDRを含む。一実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、所望の標的を認識する抗体分子の完全アミノ酸配列を含む(例えば、二重特異的四価抗体分子の場合)。

30

40

【0110】

本発明の薬学的に活性な部分における使用のために結合部位を得ることができる例となる抗体は、当該技術分野において知られている。例えば、現在FDAにより承認されている、治療における使用のための抗体を使用して、結合部位を得ることができる。一実施形態において、例となる結合部位は、抗Lingo抗体から得られる(例えば、PCT/US2008/000316を参照されたい)。

【0111】

他の態様において、本発明の薬学的に活性な部分は、修飾された抗体分子または抗体の修飾された形態から得られた抗原結合部位(もしくはその一部)を含んでもよい。例となるそのような形態は、例えば、ミニボディ、二特異性抗体、三特異性抗体、ナノボディ、

50

ラクダ科、Dabs、四価抗体、イントラシアボディ（例えば、Jendreyko et al., 2003, J. Biol. Chem. 278: 47813）、融合タンパク質（例えば、抗体サイトカイン融合タンパク質、Fc受容体の少なくとも一部に融合したタンパク質）、および二重特異性抗体を含む。他の修飾された抗体は、例えば、米国特許第4,745,055号；EP256,654；Faulkner et al., Nature 298: 286 (1982)；EP120,694；EP125,023；Morrison, J. Immunol. 123: 793 (1979)；Kohler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197 (1980)；Raso et al., Cancer Res. 41: 2073 (1981)；Morrison et al., Ann. Rev. Immunol. 2: 239 (1984)；Morrison, Science 229: 1202 (1985)；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 (1984)；EP255,694；EP266,663；およびWO88/03559に記載されている。再集合免疫グロブリン鎖もまた知られている。例えば、米国特許第4,444,878号；WO88/03565；およびEP68,763、ならびにそれらに引用されている参考文献を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0112】

別の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、二特異性抗体である抗原結合部位もしくは領域、またはそれから得られた抗原結合部位を含む。二特性抗体は、それぞれscFv分子に類似したポリペプチドを有するが、通常は、同じポリペプチド鎖上のV_LおよびV_Hドメインが相互作用することができないように、可変ドメインの両方を接続する短い（例えば10未満、好ましくは1～5の）アミノ酸残基リンカーを有する、二量体四価分子である。その代わりに、1つのポリペプチド鎖のV_LおよびV_Hドメインは、（それぞれ）第2のポリペプチド鎖上のV_HおよびV_Lドメインと相互作用する（例えば、WO02/02781を参照されたい）。一実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、少なくとも1つの遺伝子学的に融合したFc領域（すなわち、scFc領域）のN末端および/またはC末端に作用可能に連結している二特異性抗体を含む。

【0113】

ある特定の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、非BBB通過移動抗体結合部位（例えば、非TEME30A結合単ドメイン結合分子、例えば単ドメイン抗体）を含む。

【0114】

ii. 非免疫グロブリン結合分子

ある特定の他の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、非免疫グロブリン結合分子から得られる1つ以上の結合部位を含む。本明細書において使用される場合、「非免疫グロブリン結合分子」という用語は、その結合部位が、免疫グロブリン以外のポリペプチドから得られたアミノ酸配列を含む結合分子である。抗体分子から得られたものではない結合部位を含む結合分子の例は、以下でより詳細に説明される受容体結合部位およびリガンド結合部位を含む。

【0115】

非免疫グロブリンの薬学的に活性な部分は、免疫グロブリンではない免疫グロブリンスーパーファミリーの1つ（例えば、T細胞受容体または細胞接着タンパク質（例えば、CTLA-4、NCAM、テロキン））から得られるアミノ酸配列を含み得る。他の実施形態において、アミノ酸配列は、免疫グロブリンフォールドに基づかないタンパク質トポロジー（例えば、アンキリン反復タンパク質またはフィブロネクチン等）を含んでもよいが、それにもかかわらず標的に特異的に結合することができる。

【0116】

非免疫グロブリン系の薬学的に活性な部分は、人工的に多様化された結合部位を有する結合分子のライブラリからの標的結合変異体の選択または単離により同定され得る。多様化されたライブラリは、完全にランダムな手法（例えば、エラーブローンPCR、エキソ

ンシャッフリング、もしくは指向進化)を使用して生成されてもよく、または、当該技術分野において認識されている設計戦略により支援されてもよい。例えば、通常結合部位がその同種標的分子と相互作用する際に関連するアミノ酸位置は、結合部位をコードする核酸内の対応する位置における、縮重コドン、トリヌクレオチド、ランダムペプチド、またはループ全体の挿入によりランダム化され得る(例えば、米国特許出願公開第20040132028号を参照されたい)。アミノ酸位置の場所は、標的分子と複合化した結合部位の結晶構造の調査により同定され得る。ランダム化のための有望な位置は、ループ、平坦表面、螺旋、および結合部位の結合空洞を含む。ある特定の実施形態において、多様性の候補となりやすい結合部位内のアミノ酸は、その免疫グロブリンフォールドとの相同性により特定され得る。例えば、フィブロネクチンのCDR様ループ内の残基は、フィブロ

10

20

30

40

50

【0117】

一実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、フィブロネクチン結合分子からの結合部位を含む。フィブロネクチン結合分子(例えば、フィブロネクチンI、II、またはIII型ドメインを含む分子)は、CDR様ループを示し、これは、免疫グロブリンとは対照的に、鎖内ジスルフィド結合に依存しない。フィブロネクチンポリペプチドを作製するための方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO01/64942、ならびに米国特許第6,673,901号、米国特許第6,703,199号、米国特許第7,078,490号、および米国特許第7,119,171号に記載されている。1つの例となる実施形態において、フィブロネクチンポリペプチドは、AdNectin(登録商標)(Adnexus Therapeutics, Waltham, MA)である。

【0118】

別の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、Affibody(登録商標)(Abcam, Cambridge, MA)からの結合部位を含む。アフィボディは、ブドウ球菌タンパク質A(SPA)の免疫グロブリン結合ドメインから得られる(例えば、Nord et al., Nat. Biotechnol., 15:772-777(1997)を参照されたい)。アフィボディを作製するための方法は、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,740,734号および米国特許第6,602,977号、ならびにWO00/63243に記載されている。

【0119】

別の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、Anticalin(登録商標)(Pieris AG, Friesing, Germany)からの結合部位を含む。アンチカリン(リポカリンとしても知られる)は、多様な α -バレルタンパク質ファミリーの1つであり、その機能は、そのバレル/ループ領域において標的分子に結合することである。リポカリン結合部位は、バレルの鎖を接続するループ配列をランダム化することにより改変され得る(例えば、Schlehuber et al., Drug Discov. Today, 10:23-33(2005); Beste et al., PNAS, 96:1898-1903(1999)を参照されたい)。本発明の結合分子において使用されるアンチカリン結合部位は、オオモンシロチョウのピリン結合タンパク質(BBP)のアミノ酸位置28から45、58から69、86から99および114から129を含む直鎖ポリペプチド配列の配列位置に対応する4つのセグメントにおいて変異されたリポカリンファミリーのポリペプチドから開始して得ることができる。アンチカリン結合部位を作製するための他の方法は、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、WO99/16873およびWO05/019254に記載されている。

【0120】

別の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、高システインポリペプチドからの結合部位を含む。本発明の実践において使用される高システインドメインは、典型的には、螺旋、シート、またはパレル構造を形成しない。典型的には、ジスルフィド結合は、3次元構造へのドメインの折り畳みを促進する。通常、高システインドメインは、少なくとも2つのジスルフィド結合、より典型的には少なくとも3つのジスルフィド結合を有する。例となる高システインポリペプチドは、Aドメインタンパク質である。Aドメイン（「相補型反復」と呼ばれることもある）は、約30～50、または30～65のアミノ酸を含有する。いくつかの実施形態において、ドメインは、約35～45のアミノ酸、いくつかの場合において約40のアミノ酸を含む。30～50のアミノ酸内に、約6つのシステイン残基がある。6つのシステインのうち、ジスルフィド結合は、典型的には、以下のシステイン間に見られる：C1およびC3、C2およびC5、C4およびC6。Aドメインは、リガンド結合部分を構成する。ドメインのシステイン残基は、ジスルフィド結合して、コンパクトで安定した、機能的に独立した部分を形成する。これらの反復のクラスタは、リガンド結合ドメインを構成し、差別的なクラスタ化は、リガンド結合に関する特異性を付与し得る。Aドメインを含有する例となるタンパク質は、例えば、補体成分（例えば、C6、C7、C8、C9、および因子I）、セリンプロテアーゼ（例えば、エンテロペプチダーゼ、マトリプターゼ、およびコリン）、膜貫通タンパク質（例えば、ST7、LRP3、LRP5およびLRP6）、ならびにエンドサイトーシス受容体（例えば、ソルチリン関連受容体、LDL受容体、VLDLR、LRP1、LRP2、およびApoER2）を含む。所望の結合特異性のAドメインタンパク質を作製するための方法は、例えば、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、WO02/088171およびWO04/044011に開示されている。

【0121】

他の実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、反復タンパク質からの結合部位を含む。反復タンパク質は、互いに重なって隣接ドメインを形成する小さい（例えば約20から約40のアミノ酸残基の）構造単位または反復の連続的複製を含有するタンパク質である。反復タンパク質は、タンパク質における反復の数を調節することにより、特定の標的結合部位に適合するように修飾され得る。例となる反復タンパク質は、Designed Ankyrin Repeat Proteins（すなわち、DARPs（登録商標）、Molecular Partners, Zurich, Switzerland）（例えば、Binz et al., Nat. Biotechnol., 22: 575-582 (2004)を参照されたい）または高ロイシン反復タンパク質（すなわちLRRP）（例えば、Pancer et al., Nature, 430: 174-180 (2004)を参照されたい）を含む。これまで決定させているアンキリン反復単位の三次構造は全て、ヘアピンに続く2つの非平行螺旋で構成され、反復単位を次の反復単位に接続するループで終わる特徴を共通して有している。アンキリン反復単位で構築されるドメインは、反復単位を延長および湾曲した構造に重ねることにより形成される。LRRP結合部位は、ウミヤツメおよび他の無顎類の適応免疫系の一部を形成し、リンパ球成熟中の一連の高ロイシン反復遺伝子の組み換えにより形成される点で、抗体に類似している。DARPinまたはLRRP結合部位を作製するための方法は、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、WO02/20565およびWO06/083275に記載されている。

【0122】

本発明の結合分子において使用され得る他の非免疫グロブリン結合部位は、Src相同ドメイン（例えば、SH2もしくはSH3ドメイン）、PDZドメイン、ベータ-ラクタマーゼ、高親和性プロテアーゼ阻害剤、または微小ジスルフィド結合タンパク質骨格、例えばサソリ毒から得られる結合部位を含む。これらの分子から得られる結合部位を作製するための方法は、当該技術分野において開示されており、例えば、Silverman et al., Nat. Biotechnol., 23(12): 1493-4 (2005); Panni et al., J. Biol. Chem., 277: 21666-21

674 (2002), Schneider et al., Nat. Biotechnol., 17:170-175 (1999); Legendre et al., Protein Sci., 11:1506-1518 (2002); Stoop et al., Nat. Biotechnol., 21:1063-1068 (2003); および Vita et al., PNAS, 92:6404-6408 (1995) を参照されたい。さらに他の結合部位は、EGF様ドメイン、Kringledメイン、PANドメイン、Gladメイン、SRCRDメイン、Kunitz/ウシ膾トリプシン阻害剤ドメイン、Kazal型セリンプロテアーゼ阻害剤ドメイン、Trefoil (P型)ドメイン、フォン・ヴィレブランド因子C型ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、チログロブリンI型反復、LDL受容体クラスAドメイン、Sushiドメイン、Linkドメイン、トロンボスポンジンI型ドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、フォン・ヴィレブランド因子A型ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、F5/8 C型ドメイン、ヘモペキシンドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、CTLA-4ドメイン、および当業者により知られている他のそのようなドメイン、ならびにそれらの誘導体および/または変異体からなる群から選択される結合ドメインから得ることができる。追加的な非免疫グロブリンポリペプチドは、Avimers (登録商標) (Avidia, Inc., Mountain View, CA - 国際PCT公開番号WO06/055689 および米国特許出願公開第2006/0234299号を参照されたい)、Telobodies (登録商標) (Biotech Studio, Cambridge, MA) 20、Evi bodies (登録商標) (Evogenix, Sydney, Australia 米国特許第7,166,697号)、ならびにMicrobodies (登録商標) (Nascacell Technologies, Munich, Germany) を含む。

【0123】

iii. 受容体またはリガンドの結合部分

他の態様において、本発明の薬学的に活性な部分は、受容体のリガンド結合部分および/またはリガンドの受容体結合部分である。

【0124】

他の例となる実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、以下のタンパク質の1つ以上から得られる、1つ以上のリガンド結合ドメインまたは受容体結合ドメインを含んでもよい。 30

【0125】

a. サイトカインおよびサイトカイン受容体

サイトカインは、リンパ球の増殖、分化、および機能的活性化に対する多面的効果を有する。様々なサイトカイン、またはその受容体結合部分が、本発明の融合タンパク質において利用され得る。例となるサイトカインは、インターロイキン (例えばIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、およびIL-18)、コロニー刺激因子 (CSF) (例えば顆粒球CSF (G-CSF)、顆粒球-マクロファージCSF (GM-CSF) 40、および単球マクロファージCSF (M-CSF))、腫瘍壊死因子 (TNF) アルファおよびベータ、細胞毒性Tリンパ球抗原4 (CTLA-4)、ならびにインターフェロン、または (米国特許第4,925,793号および米国特許第4,929,554号) を含む。

【0126】

サイトカイン受容体は、典型的には、リガンド特異的アルファ鎖および共通ベータ鎖からなる。例となるサイトカイン受容体は、GM-CSF、IL-3 (米国特許第5,639,605号)、IL-4 (米国特許第5,599,905号)、IL-5 (米国特許第5,453,491号)、IL10受容体、IFN (EP0240975)、およびTNFファミリーの受容体 (例えば、TNF (例えば、TNFR-1 (EP417,56 50

3)、TNFR-2(EP417, 014)リンフォトキシンベータ受容体)に関するものを含む。

【0127】

b. 接着タンパク質

接着分子は、細胞が互いに相互作用することを可能にする膜結合タンパク質である。白血球ホーミング受容体および細胞接着分子、またはその受容体結合部分を含む様々な接着タンパク質を、本発明の融合タンパク質内に組み込むことができる。白血球ホーミング受容体は、炎症の間に白血球細胞表面上に発現し、細胞外基質成分への結合を媒介する - 1インテグリン(例えば、VLA-1、2、3、4、5、および6)、ならびに血管内皮上に細胞接着分子(CAM)を結合させる 2-インテグリン(例えば、LFA-1、LPAM-1、CR3、およびCR4)を含む。例となるCAMは、ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1、およびMAdCAM-1を含む。他のCAMは、E-セレクトリン、L-セレクトリン、およびP-セレクトリンを含むセレクトリンファミリーのものを含む。

10

【0128】

c. サイトカイン

感染部位に対する白血球の移動を刺激する走化性タンパク質であるケモカインもまた、本発明の融合タンパク質に組み込むことができる。例となるケモカインは、マクロファージ炎症性タンパク質(MIP-1- およびMIP-1-)、好中球走化因子、およびRANTES(正常T細胞に発現する遺伝子産物(regulated on activation normally T-cell expressed and secreted))を含む。

20

【0129】

d. ホルモン

本発明の融合タンパク質における薬理的に活性な部分としての使用のための例となる成長ホルモンは、レニン、ヒト成長ホルモン(HGH; 米国特許第5, 834, 598号)、N-メチオニルヒト成長ホルモン; ウシ成長ホルモン; 成長ホルモン放出因子; 副甲状腺ホルモン(PTH); 甲状腺刺激ホルモン(TSH); チロキシン; プロインスリンおよびインスリン(米国特許第5, 157, 021号および米国特許第6, 576, 608号); 卵胞刺激ホルモン(FSH); カルシトニン、黄体形成ホルモン(LH)、レプチン、グルカゴン; ボンベシン; ソマトロピン; ミュラー管抑制物質; リラキシンおよびプロリラキシン; ゴナドトロピン関連ペプチド; プロラクチン; 胎盤性ラクトゲン; OBタンパク質; またはミュラー管抑制物質を含む。

30

【0130】

e. 受容体およびリガンド

一実施形態において、本発明の薬学的に活性な部分は、リガンドまたは受容体の結合部位(複数を含む)(例えば、受容体の細胞外ドメイン(ECD))を、少なくとも1つの遺伝子学的に融合したFc領域(すなわち、scFc領域)と組み合わせる。ある特定の実施形態において、受容体のリガンド結合部分の結合部位またはドメインは、抗体または抗体変異体により結合される受容体から得られてもよい。他の実施形態において、受容体のリガンド結合部位は、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーの受容体(例えば、可溶性T細胞受容体、例えばmTCR(登録商標)(Medigene AG, Munich, Germany)、上で説明されたTNF受容体スーパーファミリーの受容体(例えば、免疫アドヘシンの可溶性TNF受容体)、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)受容体ファミリー(例えば、GFR3)、Gタンパク質結合受容体(GPCR)スーパーファミリーの受容体、チロシンキナーゼ(TK)受容体スーパーファミリーの受容体、リガンド依存性(LG)スーパーファミリーの受容体、ケモカイン受容体スーパーファミリー、IL-1/To11様受容体(TLR)スーパーファミリー、およびサイトカイン受容体スーパーファミリーの受容体)からなる群から選択される受容体から得られる。

40

【0131】

50

他の実施形態において、リガンドの受容体結合部分の結合部位またはドメインは、抗体または抗体変異体により結合されるリガンドから得られてもよい。例えば、リガンドは、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーの受容体、TNF受容体スーパーファミリーの受容体、Gタンパク質結合受容体(GPCR)スーパーファミリーの受容体、チロシンキナーゼ(TK)受容体スーパーファミリーの受容体、リガンド依存性(LG)スーパーファミリーの受容体、ケモカイン受容体スーパーファミリー、IL-1/To11様受容体(TLR)スーパーファミリー、およびサイトカイン受容体スーパーファミリーの受容体からなる群から選択される受容体に結合し得る。1つの例となる実施形態において、リガンドの受容体結合部分の結合部位は、TNFリガンドスーパーファミリー(例えば、CD40L)に属するリガンドから得られる。

10

【0132】

成長因子またはその受容体(またはその受容体結合部分もしくはリガンド結合部分)を、本発明の融合タンパク質に組み込むことができる。例となる成長因子は、血管内皮成長因子(VEGF)およびそのアイソタイプ(米国特許第5,194,596号);aFGFおよびbFGFを含む維芽細胞成長因子(FGF);心房性ナトリウム利尿因子(ANF);肝臓成長因子(HGF;米国特許第5,227,158号および米国特許第6,099,841号)、神経栄養因子、例えば骨由来神経栄養因子(BDNF)、グリア細胞由来栄養因子リガンド(例えば、GDNF、ニューツリン、アルテミン、およびパーセフィン)、ニューロトロフィン-3、-4、-5、もしくは-6(NT-3、NT-4、NT-5、もしくはNT-6)、または神経成長因子、例えばNGF-血小板由来成長因子(PDGF)(米国特許第4,889,919号、米国特許第4,845,075号、米国特許第5,910,574号、および米国特許第5,877,016号);形質転換成長因子(TGF)、例えばTGF-アルファおよびTGF-ベータ(WO90/14359)、形態形成タンパク質(BMP)を含む骨誘導因子;インスリン様成長因子-Iおよび-II(IGF-IおよびIGF-II;米国特許第6,403,764号および米国特許第6,506,874号);エリスロポエチン(EPO);トロンボポエチン(TPO;幹細胞因子(SCF)、トロンボポエチン(TPO、c-Mplリガンド)、ならびにWntポリペプチド(米国特許第6,159,462号)を含む。

20

【0133】

本発明の薬理的に活性な部分として使用され得る例となる成長因子受容体は、EGF受容体;VEGF受容体(例えば、Flt1またはFlk1/KDR)、PDGF受容体(WO90/14425);HGF受容体(米国特許第5,648,273号および米国特許第5,686,292号)、ならびに、NGF、BDNF、およびNT-3に結合するp75^{NTR}またはp75とも呼ばれる低親和性受容体(LNGFR)を含む神経栄養受容体、および受容体チロシンキナーゼのtrkファミリーの1つである高親和性受容体(例えば、trkA、trkB(EP455,460)、trkC(EP522,530))を含む。

30

【0134】

f. 薬物

別の実施形態において、薬理的に活性な薬剤は、疾患の治療、治癒、予防、もしくは診断において使用される、または別様に身体的もしくは精神的な健康状態を高めるために使用される原薬である。そのような薬物は、化学物質であってもよく、例となるそのような物質は、本明細書においてより詳細に説明される。

40

【0135】

本発明は、神経系に影響を与える障害の治療のための他の薬剤を送達するために適用されてもよく、また、診断目的で適用されてもよい。CNS障害の治療のための薬剤の好ましいクラスは、以下を含む。

シナプスおよび神経効果器接合部において作用する薬物;全身および局所鎮痛薬および麻酔薬、例えばオピオイド鎮痛薬および拮抗薬;睡眠薬および鎮静薬;鬱病、統合失調症等の精神障害の治療のための薬物;抗てんかん薬および抗痙攣薬;ハンチントン病、老化

50

およびアルツハイマー病；神経保護薬（例えば、興奮性アミノ酸拮抗薬および神経栄養因子）ならびに神経再生剤；脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、または神経成長因子等の栄養因子；CNS外傷または脳梗塞の治療を目的とした薬物；ならびに依存症および薬物乱用の治療のための薬物；オータコイドおよび抗炎症薬；寄生虫感染および微生物疾患用の化学療法薬剤；免疫抑制剤および抗がん薬；ホルモンおよびホルモン拮抗薬；重金属および重金属拮抗薬；非金属毒性薬剤に対する拮抗薬；がんの治療のための細胞増殖抑制剤；放射性医薬品における使用のための診断物質、および放射線治療免疫活性および免疫反応性薬剤；ならびに他の多くの薬剤、例えば、伝達物質およびそのそれぞれの受容体-作動薬および-拮抗薬、そのそれぞれの前駆体または代謝産物；抗生物質、抗痙攣薬、抗ヒスタミン剤、制吐薬、弛緩薬、興奮剤、「センス」および「アンチセンス」オリゴヌクレオチド、脳拡張剤、向精神剤、抗躁病薬、血管拡張剤および収縮剤、抗高血圧剤、片頭痛治療剤、催眠剤、血糖上昇剤または血糖降下剤、ミネラルまたは栄養剤、抗肥満薬、同化剤ならびに喘息治療剤。

【0136】

典型的な活性成分（例えば薬物）は、神経系に影響を与える、または神経系の診断試験に使用される任意の物質であってもよい。これらは、Gilman et al. (1990), "Goodman and Gilman's - - The Pharmacological Basis of Therapeutics", Pergamon Press, New Yorkにより説明されており、以下の薬剤を含む。

アセチルコリンおよび合成コリンエステル、自然発生的コリン作動性アルカロイドおよびその合成コンジナー、抗コリンエステラーゼ剤、神経節興奮薬、アトロピン、スコポラミン、および関連抗ムスカリン様作用薬、エピネフリン、ノルエピネフリンおよびドーパミン等のカテコールアミンおよび交感神経作用薬、アドレナリン作動薬、アドレナリン受容体拮抗薬、GABA、グリシン、グルタメート、アセチルコリン、ドーパミン、5-ヒドロキシトリプタミンおよびヒスタミン等の伝達物質、神経活性ペプチド；

オピオイド鎮痛薬および拮抗薬等の鎮痛薬および麻酔薬；ベンゾジアゼピン、バルビツール酸塩、抗ヒスタミン薬、フェノチアジンおよびブチルフェノンなどの前麻酔薬および麻酔薬物；オピオイド；制吐剤；アトロピン、スコポラミンまたはグリコピロレートなどの抗コリン作用薬；コカイン；クロラル誘導体；エトクロルピノール；グルテチミド；メチプロリン；メプロバメート；パラアルデヒド；ジスルフィラム；モルヒネ、フェンタニールおよびナロキソン；

中枢作用鎮咳薬；

フェノチアジン、チオキサンテンおよび他の複素環式化合物（例えば、ハルペリオドル）等の精神薬剤；デスイミプラミンおよびイミプラミンなどの三環抗鬱薬；非定型性抗鬱剤（例えば、フルオキセチンおよびトラゾドン）、イソカルボキサジド等のモノアミンオキシダーゼ阻害剤；リチウム塩；クロロジアゼポキシドおよびジアゼパム等の不安緩解剤；

ヒダントイン、抗痙攣バルビツール酸塩、イミノスチルベン（例えばカルバマゼピン）、スクシンイミド、バルプロ酸、オキサゾリジンジオンおよびベンゾジアゼピンを含む抗てんかん薬。

L-DOPA / CARBIDOPA、アポモルヒネ、アマンタジン、エルゴリン、セレゲリン、ロピノロール、メシル酸プロモクリプチンおよび抗コリン作用薬等の抗パーキンソン薬；

バクロフェン、ジアゼパムおよびダントロレン等の痙攣抑制剤；

神経保護剤、例えば興奮性アミノ酸拮抗薬、神経栄養因子および脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、または神経成長因子；ニューロトロフィン（NT）3（NT3）；NT4およびNT5；ガングリオシド；神経再生剤；

オピオイド拮抗薬および抗鬱剤を含む依存症および薬物乱用の治療のための薬物；

ヒスタミン、ブラジキニン、カリジン、およびそれらのそれぞれの作動薬および拮抗薬等のオータコイドおよび抗炎症薬；

10

20

30

40

50

寄生虫感染および微生物疾患用の化学療法薬剤；

アルキル化剤（例えばニトロソウレア）および代謝拮抗物質を含む抗がん薬；窒素マスタード、エチレンアミンおよびメチルメラミン；アルキルスルホネート；葉酸類似体；ピリミジン類似体、プリン類似体、ピンカアルカロイド；ならびに抗生物質。

【0137】

本発明はまた、制吐薬、弛緩薬、興奮剤、「センス」および「アンチセンス」オリゴヌクレオチド、脳拡張剤、向精神剤、血管拡張剤および収縮剤、抗高血圧剤、片頭痛処置剤、血糖上昇剤または血糖降下剤、ミネラルまたは栄養剤、抗肥満薬、同化剤ならびに喘息治療剤、フェニルブタゾン、インドメタシン、ナプロキセン、イブプロフェン、フルルビプロフェン、ジクロフェナク、デキサメタゾン、プレドニゾンおよびプレドニソロン等の抗炎症薬；ソロクチジルム、ピンカミン、ナフチドロフリルオキサレート、コデルゴクリンメシレート、シ克蘭デレート、パバベリン、ニコチン酸等の脳血管拡張剤、ステアリン酸エリスロマイシンおよびセファレキシン等の抗感染薬剤の送達に有用である。

副腎皮質刺激ホルモン、アデノシンデアミナーゼリボヌクレアーゼ、アルカリホスファターゼ、アンジオテンシン、抗体、アルギナーゼ、アルギニンデアミネアーゼ、アスパラギナーゼ、セルレイン、カルシトニン、ケモトリプシン、コレシストキニン、凝固因子、ダイノルフィン、エンドルフィン、エンケファリン、エンケファリン、エリスロポエチン、ガストリン放出ペプチド、グルカゴン、ヘモグロビン、視床下部放出因子、インターフェロン、カタカルシン、モチリン、神経ペプチドY、ニューロテンシン、非自然発生的オピオイド、オキシトシン、パパイン、副甲状腺ホルモン、ペプチドプロラクチン、可溶性CD-4、ソマトメジン、ソマトスタチン、ソマトスタチン、ソマトトロピン、スーパーオキシドジスムターゼ、甲状腺刺激ホルモン、組織プラスミノゲン活性化因子、トリプシン、パソプレッシン、およびそのようなペプチドの類似体、ならびに他の好適な酵素、ホルモン、タンパク質、ポリペプチド、酵素-タンパク質複合体、抗体-ハプテン複合体、ウイルスエピトープ等の送達に有用である。

【0138】

V. ポリペプチドの例となる形式

本発明の結合分子の例となる形式が、添付の図面に記載される。例えば、図1は、薬学的に活性な部分が示されていない実施形態（例えば、薬学的に活性な部分が付加され得るFC5FcおよびFcFC5骨格）、ならびに薬学的に活性な部分が抗体結合部位である実施形態を含む。例えば、一実施形態において、本発明の結合分子の骨格（すなわち、薬学的に活性な部分が付加され得るコンストラクト）は、Fc領域、ドメインまたは部分に共有結合的に連結（例えば遺伝子学的に融合）した2つのBBB通過移動部分を含む。BBB通過移動部分は、直接、またはリンカーペプチドを介して連結してもよい。好ましい実施形態において、BBB通過移動部分は、Fc領域、ドメインまたは部分のN末端に連結してもよい。一実施形態において、追加的な結合部分（例えば、scFv分子の形態の非TMM30Aの薬理的に活性な部分）が、Fc領域、ドメインまたは部分のC末端に連結してもよい。

【0139】

別の実施形態において、追加のBBB通過移動部分が、Fc領域、ドメインまたは部分のC末端に連結してもよい。BBB通過移動部分は、直接、またはリンカーペプチドを介して連結してもよい。

【0140】

別の実施形態において、本発明の結合分子は、無傷抗体分子のVHドメインにN末端で融合したBBB通過移動部分を含む。別の実施形態において、本発明の結合分子は、無傷抗体分子のVLドメインにN末端で融合したBBB通過移動部分を含む。さらに別の実施形態において、本発明の結合分子は、無傷抗体分子にC末端で融合した2つのBBB通過移動部分を含む。BBB通過移動部分は、直接、またはリンカーペプチドを介して連結してもよい。

【0141】

10

20

30

40

50

薬学的に活性な部分（または追加的な薬理的に活性な部分）は、当該技術分野において知られている方法を使用して、これらのコンストラクトのいずれかに付着してもよいことが理解される。

【0142】

一実施形態において、本発明のポリペプチドは、1つのみの薬学的に活性な部分を含む（薬学的に活性な部分に関して単量体型であるが、BBB通過移動部分に関して多量体（例えば二量体）型である分子を形成する）。別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、2つ以上の薬理的に活性な部分、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10またそれ以上の薬理的に活性な部分を含む。薬学的に活性な部分は、同じまたは異なってもよい。

10

【0143】

本発明の一実施形態において、薬学的に活性な部分は、Fcドメイン、領域または部分のN末端に、リンカーペプチドを介して作用可能に連結してもよい。別の実施形態において、薬理的に活性な部分は、リンカーペプチドを介して、Fcドメイン、領域または部分のC末端に作用可能に連結してもよい。

【0144】

他の実施形態において、2つ以上の薬学的に活性な部分が、互いに（例えばリンカーペプチドを介して）直列で連結している。一実施形態において、薬学的に活性な部分のタンデム配列が、Fc領域、ドメインまたは部分のC末端またはN末端に、リンカーペプチドを介して作用可能に連結している。

20

【0145】

薬理的に活性な化合物にタンパク質を複合化、連結およびカップリングする他の方法が、当該技術分野において周知である。例えば、Wu A M, Senter P D, Arming antibodies: prospects and challenges for immun conjugates, Nat. Biotechnol. 2005 September; 23(9): 1137-46 and Trail P A, King H D, Dubowchik G M, Monoclonal antibody drug immun conjugates for targeted treatment of cancer, Cancer Immunol Immunother. 2003 May; 52(5): 328-37; Saito G, Swanson J A, Lee K D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities, Adv Drug Deliv Rev. 2003 Feb. 10; 55(2): 199-215を参照されたい。同様に、本発明の抗体は、薬学的に活性な化合物と共に投入されるリボソーム、ナノ粒子または他の類似の担体と組み合わせて提供されてもよい。そのような組成物を調製する方法は、当該技術分野において知られている（例えば、Sugano et al., Antibody Targeting of Doxorubicin-loaded Liposomes Suppresses the Growth and Metastatic Spread of Established Human Lung Tumor Xenografts in Severe Combined Immunodeficient Mice Cancer Research 60, 6942-6949, Dec. 15, 2000およびMartin et al., Nanomaterials in Analytical Chemistry, Analytical Chemistry News & Features, May 1, 1998; pp. 322 A-327 Aを参照されたい）。

30

40

【0146】

多くのエフェクター分子は、結合ポリペプチドが連結し得る好適な官能基を有さない。一実施形態において、エフェクター分子、例えば薬物またはプロドラッグは、連結分子を

50

介してポリペプチドに付着している。一実施形態において、連結分子は、特定部位における細胞毒性の活性化を可能とする化学結合を含有する。好適な化学結合は、当該技術分野において周知であり、ジスルフィド結合、酸解離性結合、光解離性結合、ペプチダーゼ解離性結合、スルフヒドリル基とマレイミド基との間に形成されるチオエーテル結合、およびエステラーゼ解離性結合を含む。最も好ましくは、連結分子は、ジスルフィド結合またはチオエーテル結合を含む。本発明によれば、連結分子 p は、好ましくは、反応性化学基を含む。特に好ましい反応性化学基は、N - スクシンイミジルエステルおよび N - スルホスクシンイミジルエステルである。好ましい実施形態において、反応性化学基は、チオール基の間のジスルフィド結合を介してエフェクターに共有結合し得る。一実施形態において、エフェクター分子は、チオール基を含むように修飾される。当業者には、チオール基が、水素原子に結合した硫黄原子を含有し、典型的には、当該技術分野において「 - - S H 」または「 R S H 」として示され得るスルフヒドリル基とも呼ばれることが理解される。

10

20

30

40

50

【0147】

一実施形態において、連結分子が、エフェクター分子を本発明のポリペプチドに繋ぐために使用され得る。連結分子は、開裂性または非開裂性であってもよい。一実施形態において、開裂性連結分子は、連結分子がより低い酸化還元電位を有する環境、例えば細胞質または遊離スルフヒドリル基を有する分子のより高い濃度を有する他の領域内で開裂可能であるような、酸化還元開裂性連結分子である。酸化還元電位の変化により開裂可能な連結分子の例は、ジスルフィドを含有するものを含む。開裂刺激は、本発明の結合タンパク質の細胞内取り込み後に提供されてもよく、細胞質のより低い酸化還元電位が、連結分子の開裂を促進する。別の実施形態において、pHの低下が、標的細胞内へのメイタンシノイドカーゴの放出を誘引する。pHの低下は、エンドソーム輸送、腫瘍成長、炎症、および心筋虚血等の多くの生理学および病理学的プロセスに關与する。pHは、エンドソームにおいて生理学的な7.4から5~6に降下し、リソソームにおいて4~5に降下する。がん細胞のリソソームまたはエンドソームを標的化するために使用され得る酸感受性連結分子の例は、例えば、アセタール、ケタール、オルトエステル、ヒドラゾン、トリチル、cis - アコニチル、またはチオカルバモイルに見られるもの等の酸開裂性結合を有するものを含む(例えば、Willner et al., (1993), Bioconj. Chem., 4: 521 - 7; 米国特許第4,569,789号、米国特許第4,631,190号、米国特許第5,306,809号、および米国特許第5,665,358号を参照されたい)。他の例となる酸感受性連結分子は、ジペプチド配列Phe - LysおよびVal - Lysを含む(King et al., (2002), J. Med. Chem., 45: 4336 - 43)。開裂刺激は、低pHエンドソーム区画(例えばリソソーム)への細胞内取り込み輸送後に提供されてもよい。他の例となる酸開裂性連結分子は、2つ以上のメイタンシノイドの付着のための2つ以上の酸開裂性結合を含有する分子である(King et al., (1999), Bioconj. Chem., 10: 279 - 88; WO 98/19705)。

【0148】

開裂性連結分子は、特定の標的細胞に關連した生物学的に供給される開裂物質、例えばリソソームまたは腫瘍關連酵素に感受性であってもよい。酵素的に開裂され得る連結分子の例は、ペプチドおよびエステルを含むが、これらに限定されない。例となる酵素開裂性連結分子は、カテプシンBまたはプラスミン等の腫瘍關連プロテアーゼに感受性であるものを含む(Dubowchik et al., (1999), Pharm. Ther., 83: 67 - 123; Dubowchik et al., (1998), Bioorg. Med. Chem. Lett., 8: 3341 - 52; de Groot et al., (2000), J. Med. Chem., 43: 3093 - 102; de Groot et al., (1999) m 42: 5277 - 83)。カテプシンB開裂性部位は、ジペプチド配列パリン - シトルリンおよびフェニルアラニン - リシンを含む(Doronina et al., (2003), Nat. Biotech., 21(7):

778-84); Dubowchik et al., (2002), Bioconjug. Chem., 13: 855-69)。他の例となる酵素開裂性部位は、好中球、マクロファージ、および他の顆粒球により優先的に放出される酵素である、チメットオリゴペプチダーゼ (Thimet Oligopeptidase) (TOP) 等のトラウス (trousse) プロテアーゼにより認識される、4から16アミノ酸のオリゴペプチド配列 (例えば、Suc - - Ala - Leu - Ala - Leu) により形成されるものを含む。

【0149】

ある特定の具体的な態様において、本発明の結合ポリペプチドは、多重特異的であり、例えば、第1の分子または分子のエピトープに結合する少なくとも1つの結合部位、および第2の分子または第1の分子の第2のエピトープに結合する少なくとも1つの第2の結合部位を有する。本発明の多重特異的結合分子は、少なくとも2つの結合部位を含んでもよい。ある特定の実施形態において、本発明の多重特異的結合分子の少なくとも2つの結合部位は、BBB通過移動部位である。

10

【0150】

VI. 結合分子の合成

本発明のポリペプチドの形式を選択しても、ポリペプチドを生成するために様々な方法が利用可能である。そのような方法は、化学合成技術および組み換えDNA発現技術を含むが、これらに限定されない。

【0151】

一実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチド分子をコードする核酸配列を含む核酸コンストラクトに関する。コードの縮重のために、様々な核酸配列がポリペプチドのアミノ酸配列をコードすることが理解される。所望のポリヌクレオチドが、当該技術分野において知られている方法を使用して (例えば、デノボ固相DNA合成により、または標的ポリペプチドをコードした事前に調製されたポリヌクレオチドのPCR突然変異誘発により) 生成され得る。

20

【0152】

オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発は、(例えばFc変異体部分に)アミノ酸置換をコードしたコドンを導入するための置換、フレーム内挿入、または改質 (例えば改質コドン) を調製するための1つの方法である。例えば、開始ポリペプチドDNAは、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドを一本鎖DNAテンプレートにハイブリダイズすることにより改質される。ハイブリダイゼーションの後、DNAポリメラーゼを使用して、オリゴヌクレオチドプライマーを組み込むテンプレートの第2の相補鎖全体を合成する。一実施形態において、遺伝子改変、例えば、プライマーベースPCR突然変異誘発が、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを生成するために本明細書に定義されるような改質を組み込むのに十分である。

30

【0153】

組み換え生成のために、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が、適切な発現ビヒクル、すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要な要素、または、RNAウイルスベクターの場合、複製および翻訳に必要な要素を含有するベクターに挿入される。

40

【0154】

ポリペプチドをコードする核酸は、適切なリーディングフレームにおいてベクターに挿入される。次いで、発現ベクターが、ポリペプチドを発現する好適な標的細胞内にトランスフェクトされる。当該技術分野において知られているトランスフェクション技術は、リン酸カルシウム沈殿 (Wigler et al., 1978, Cell 14: 725) および電気穿孔 (Neumann et al., 1982, EMBO, J. 1: 841) を含むが、これらに限定されない。様々な宿主-発現ベクター系を使用して、真核細胞において本明細書に記載のポリペプチドを発現させることができる。一実施形態において、真核細胞は、哺乳動物細胞を含む動物細胞 (例えば、CHO、BHK、Cos、HeLa

50

細胞)である。ポリペプチドが真核細胞において発現される場合、ポリペプチドをコードするDNAはまた、ポリペプチドが分泌されるのを許容するシグナル配列をコードし得る。当業者には、タンパク質が翻訳される間、シグナル配列が細胞により開裂され、成熟ポリペプチドを形成することが理解される。一実施形態において、本発明は、本発明のリンカーペプチドを含む成熟ポリペプチドに関する。代替として、シグナル配列が含まれない場合、ポリペプチドは、細胞を溶解することにより回収され得る。

【0155】

本発明のポリペプチドはまた、げっ歯類、ヤギ、ヒツジ、ブタ、またはウシ等の形質転換動物において合成されてもよい。「形質転換動物」という用語は、外来遺伝子をそのゲノムに組み込んだ人間以外の動物を指す。この遺伝子は、生殖細胞組織中に存在するため、親から子に伝えられる。外来性遺伝子は、単一細胞胚内に導入される(Brinster et al. 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438)。形質転換動物を生成する方法は、当該技術分野において知られており、免疫グロブリン分子を生成する形質転換体を含む(Wagner et al. 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6376; McKnight et al. 1983, Cell 34:335; Brinster et al. 1983, Nature 306:332; Ritchie et al. 1984, Nature 312:517; Baldassarre et al. 2003, Theriogenology 59:831; Robl et al. 2003, Theriogenology 59:107; Malassagne et al. 2003, Xenotransplantation 10(3):267)。

10

20

【0156】

発現ベクターは、組み換えにより生成されたポリペプチドの容易な精製または特定を可能とするタグをコードし得る。その例は、ハイブリッドタンパク質が生成されるように、配列をコードする本明細書に記載のポリペプチドがlacZコード領域と共にフレーム内のベクターにライゲーションされ得る、ベクターpUR278(Rutherford et al. 1983, EMBO J. 2:1791)を含むがこれに限定されず;pGEXベクターは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)タグを有するタンパク質を発現するために使用され得る。これらのタンパク質は、通常可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズへの吸着に続く、遊離グルタチオンの存在下での溶出により、細胞から容易に精製され得る。ベクターは、精製後のタグの容易な除去のための開裂部位(例えばPrecision Protease(Pharmacia、Peapack、N.J.))を含む。

30

【0157】

本発明の目的のために、当該技術分野において認識された数多くの異なる発現ベクター系を使用することができる。

【0158】

これらの発現ベクターは、典型的には、エピソームとして、または宿主染色体DNAの不可欠な部分として、宿主生物において複製可能である。発現ベクターは、プロモーター(例えば、自然発生的または異種プロモーター)、エンハンサー、シグナル配列、スプライスシグナル、エンハンサー要素、および転写停止配列を含むがこれらに限定されない発現制御配列を含んでもよい。好ましくは、発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることができるベクター中の真核生物プロモーター系である。発現ベクターはまた、ウシ乳頭腫ウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス(RSV、MMTVまたはMOMLV)、サイトメガロウイルス(CMV)、またはSV40ウイルス等の動物ウイルスから得られるDNA要素を使用してもよい。その他は、ポリシストロン系の内部リボソーム結合部位との使用を含む。

40

【0159】

一般に、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能とする

50

ために、選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性またはネオマイシン耐性）を含有する（例えば、Itakura et al.、米国特許第4,704,362号を参照されたい）。DNAをその染色体に統合した細胞は、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することにより選択され得る。マーカーは、栄養要求性宿主への原栄養性、殺生物剤耐性（例えば抗生物質）、または銅などの重金属に対する耐性を提供し得る。選択可能マーカー遺伝子は、発現されるDNA配列に直接連結され得るか、または同時形質転換により同じ細胞内に導入され得る。

【0160】

他の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、ポリシストロン性コンストラクトを使用して発現され得る。これらの発現系において、対象となる複数の遺伝子産物、例えば多量体結合タンパク質の複数のポリペプチドが、単一のポリシストロン性コンストラクトから生成され得る。これらの系は、有利には、真核宿主細胞内に比較的高レベルの本発明のポリペプチドを提供するために、内部リボソーム侵入部位（IRES）を使用する。適合するIRES配列は、同じく本明細書に組み込まれる米国特許第6,193,980号に開示される。当業者には、そのような発現系が、本出願において開示されるポリペプチドの全範囲を効果的に生成するために使用され得ることが理解される。

10

【0161】

より一般的には、ポリペプチドをコードするベクターまたはDNA配列が調製されたら、発現ベクターは、適切な宿主細胞内に導入され得る。すなわち、宿主細胞は形質転換され得る。宿主細胞へのプラスミドの導入は、当該技術分野において周知の様々な技術により達成され得る。これらは、トランスフェクション（電気泳動および電気穿孔を含む）、原形質融合、リン酸カルシウム沈殿、エンベロープを有するDNAとの細胞融合、マイクロインジェクション、および無傷ウイルスの感染を含むが、これらに限定されない。Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988)を参照されたい。最も好ましくは、宿主へのプラスミド導入は、電気穿孔による。形質転換した細胞は、軽鎖および重鎖の生成に適した条件下で増殖され、重鎖および/または軽鎖タンパク質合成に関して分析される。例となる分析技術は、酵素免疫測定法（ELISA）、放射免疫測定法（RIA）、または蛍光活性化細胞選別分析（FACS）、免疫組織化学等を含む。

20

30

【0162】

本明細書において使用される場合、「形質転換」という用語は、遺伝子型を変化させ、結果的に受容細胞における変化をもたらす受容宿主細胞へのDNAの導入を指すように、広範な意味で使用されるものとする。

【0163】

これらと同じように、「宿主細胞」は、組み換えDNA技術を使用して構築され、少なくとも1つの異種遺伝子をコードするベクターで形質転換された細胞を指す。組み換え宿主からのポリペプチドの単離プロセスの説明において、「細胞」および「細胞培養物」という用語は、別段に明確に指定されない限り、ポリペプチドの源を指すように同義的に使用される。換言すれば、「細胞」からのポリペプチドの回収は、沈降させた全細胞から、または培地および懸濁した細胞の両方を含有する細胞培養物からを意味し得る。

40

【0164】

タンパク質発現に使用される宿主細胞株は、最も好ましくは、哺乳動物由来のものであり、当業者は、発現される所望の遺伝子産物に最も好適な具体的な宿主細胞株を優先的に決定する能力を有すると考えられる。例となる宿主細胞株は、DG44およびDUXB11（チャイニーズハムスター卵巣系、DHFマイナス）、HELA（ヒト子宮頸癌）、CVI（サル腎臓系）、COS（SV40 T抗原によるCVIの誘導体）、R1610（チャイニーズハムスター線維芽細胞）BALBC/3T3（マウス線維芽細胞）、HA

50

K (ハムスター腎臓系)、SP2/O (マウス骨髄腫)、P3x63-Ag3.653 (マウス骨髄腫)、BFA-1c1BPT (ウシ内皮細胞)、RAJI (ヒトリンパ球) ならびに293 (ヒト腎臓) を含むが、これらに限定されない。CHO細胞が特に好ましい。宿主細胞株は、典型的には、商業サービス、American Tissue Culture Collectionまたは公開された文献から入手可能である。

【0165】

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子は、細菌または酵母または植物細胞等の非哺乳動物細胞においても発現され得る。これに関して、細菌等の様々な非哺乳動物単細胞微生物、すなわち培養または発酵において増殖され得るものが形質転換され得ることが理解される。形質転換を受けやすい細菌は、エンテロバクター属、例えば大腸菌またはサルモネラの菌種；バシラス属、例えば枯草菌；肺炎球菌属；連鎖球菌属、およびインフルエンザ菌のメンバーを含む。さらに、細菌において発現される場合、ポリペプチドは、典型的には、封入体の一部となることが理解される。ポリペプチドは、単離され、精製され、次いで機能性分子に組み立てられなければならない。

10

【0166】

原核生物に加えて、真核生物微生物も使用され得る。サッカロマイセス・セレピシアエ、または一般にパン酵母は、真核微生物の中で最も一般的に使用されるが、多くの他の株が一般的に利用可能である。

サッカロマイセスにおける発現のために、例えば、プラスミドYRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)) が一般的に使用される。このプラスミドは、例えば、ATCC No. 44076またはPEP4-1等のトリプトファン中で成長する能力が欠如した酵母の変異株に対する選択マーカーを提供する、TPR1遺伝子を既に含有している (Jones, Genetics, 85:12 (1977))。次いで、酵母宿主細胞ゲノムの特性としてのtrp1病変の存在は、トリプトファンの非存在下での増殖により形質転換の検出に有効な環境を提供する。ピキア等の他の酵母もまた使用され得る。所望により、発現制御配列を有する酵母発現ベクター (例えばプロモーター)、複製源、停止配列等である。典型的なプロモーターは、3-ホスホグリセリン酸キナーゼおよび他の糖分解酵素を含む。誘導可能な酵母プロモーターは、中でも、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソシクロムC、ならびにメタノール、マルトースおよびガラクトース利用を担う酵素からのプロモーターを含む。

20

30

【0167】

代替として、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、形質転換動物のゲノムへの導入、およびその後の形質転換動物のミルクにおける発現のために、導入遺伝子に組み込むことができる (例えば、Deboer et al., 米国特許第5,741,957号、Rosen, 米国特許第5,304,489号、およびMeade et al., 米国特許第5,849,992号を参照されたい)。好適な導入遺伝子は、カゼインまたはベータラクタグロブリン等の乳腺特異的遺伝子からのプロモーターおよびエンハンサーとの作用可能な連結におけるポリペプチドのコード配列を含む。

40

【0168】

In vitro生成は、所望のポリペプチドを大量に提供するための拡張を可能とする。組織培養条件下での哺乳動物の大量細胞培養法のための技術は、当該技術分野において知られており、例えばエアリフト反応器内もしくは連続攪拌反応器内の均質懸濁培養、または、例えば中空繊維内、マイクロカプセル内、アガロースマイクロビーズもしくはセラミックカートリッジ上への固定化もしくは閉じ込め細胞培養を含む。必要および/または所望に応じて、ポリペプチドの溶液は、例えば、合成ヒンジ領域ポリペプチドの優先的生合成の後、または本明細書に記載のHICクロマトグラフィーステップの前もしくは後に、習慣的なクロマトグラフィー法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE-セルロースもしくは(免疫)親和性クロマトグラフィーでのクロマトグラフ

50

ィーにより精製され得る。下流側の精製を促進するために、親和性タグ配列（例えばHis(6)タグ）が、随意にポリペプチド配列内に付着または含有されてもよい。

【0169】

当業者は、本発明に関連した使用のために、より小さいペプチドを容易に合成することができる。合成ペプチドを調製するための標準的手順は、当該技術分野において周知である。ペプチドは、Merrifieldの固相ペプチド合成(SPPS)法(参照により本明細書に組み込まれるJ. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1964))を使用して、または、当該技術分野において周知の標準的溶液法(例えば、参照により本明細書に組み込まれるBodanzsky, M., Principles of Peptide Synthesis 2nd revised ed. (Springer-Verlag, 1988 and 1993)を参照されたい)を使用して合成され得る。代替として、当該技術分野において周知の同時複数ペプチド合成(SMPs)技術が使用され得る。Merrifieldの方法により調製されるペプチドは、Applied Biosystems 431 A-01 Peptide Synthesizer (Mountain View, Calif.)等の自動化ペプチド合成装置を使用して、または、参照により本明細書に組み込まれるHoughten, Proc. Nat. Acad. Sci., USA 82: 5131 (1985)により説明される、手作業によるペプチド合成技術を使用して合成され得る。

10

【0170】

ペプチドは、アミノ酸またはアミノ酸類似体を使用して合成することができ、その活性基は、例えば、t-ブチルジカーボネート(t-BOC)基またはフルオレニルメトキシカルボニル(FMOC)基を使用して、必要に応じて保護される。アミノ酸およびアミノ酸類似体は、商業的に購入する(Sigma Chemical Co.; Advanced Chemtec)、または当該技術分野において知られた方法を使用して合成することができる。固相法を使用して合成されたペプチドは、4-メチルベンズヒドリルアミン(MBHA)、4-(オキシメチル)-フェニルアセトアミドメチルおよび4-(ヒドロキシメチル)フェノキシメチル-コポリ(スチレン-1%ジビニルベンゼン)(Wang樹脂)(これらは全て市販されている)を含む樹脂に、または、参照により本明細書に組み込まれるDe Grado and Kaiser, J. Org. Chem. 47: 3258 (1982)により説明されるように合成され得るp-ニトロベンゾフェノンオキシムポリマー(オキシム樹脂)に付着され得る。

20

30

【0171】

VII. 結合分子の精製

本発明のポリペプチドは、発現したら、当該技術分野における標準的手順、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、親和性カラムクロマトグラフィー、HPLC精製、ゲル電気穿孔等(一般に、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)を参照されたい)に従い精製され得る。新しく合成されたペプチドはまた、逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)等の方法、またはペプチドのサイズもしくは電荷に基づく他の分離方法を使用して精製され得る。さらに、精製されたペプチドは、これらの方法、ならびにアミノ酸分析および質量分析等の他の周知の方法を使用して特性決定され得る。

40

【0172】

薬学的用途には、少なくとも約90%から95%の均質性の実質的に純粋なタンパク質が好ましく、98%から99%またはそれ以上の均質性が最も好ましい。

【0173】

VIII. 投与方法

本発明のポリペプチドの調製および対象への投与方法は、当業者に周知である、または当業者により容易に決定される。

【0174】

対象への投与のための組成物は、本発明の結合分子(遺伝子治療用途のため)をコード

50

するヌクレオチド配列を含む核酸分子およびポリペプチド分子を含む。

【0175】

導入方法は、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路を含むがこれらに限定されない。複合体は、任意の便利な経路により、例えば、注入またはポーラス注射により、上皮または皮膚粘膜内皮（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜等）を通じた吸収により投与されてもよく、また、他の薬理的に活性な薬剤と共に投与されてもよい。投与は、全身または局所的であってもよい。

【0176】

ある特定の状況において、脳室内およびくも膜下注射を含む任意の好適な経路により、本発明の薬学的組成物を中枢神経系に直接導入することが望ましくなり得；脳室内注射は、例えばオンマヤ槽等の槽に取り付けられた脳室内カテーテルにより容易化され得る。

10

【0177】

例えば吸入器または噴霧器、およびエアロゾル化剤を用いた製剤の使用により、経肺または経鼻投与もまた使用することができる。

【0178】

別の実施形態において、複合体は、制御放出系において送達され得る。一実施形態において、ポンプが使用されてもよい（Langer（上記参照）；Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987)；Buchwald et al., Surg. 88: 507 (1980)；Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989)を参照されたい）。さらに別の実施形態において、制御放出系は、治療標的、すなわち脳の近傍に配置されてもよく、したがって、全身用量の極一部を必要とし得る（例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release（上記参照）, vol. 2, pp. 115 - 138 (1984)を参照されたい）。

20

【0179】

他の制御放出系は、Langerによる考察（Science 249: 1527 - 1533 (1990)）において考察されている。

【0180】

対象は、好ましくは、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、犬等を含む動物を含むがこれらに限定されない動物であり、好ましくは哺乳動物、最も好ましくは人間である。

30

【0181】

通常、注射に好適な薬学的組成物は、緩衝剤（例えば酢酸塩、リン酸塩またはクエン酸塩緩衝剤）、界面活性剤（例えばポリソルベート）、任意選択で安定剤（例えばヒトアルブミン）等を含み得る。しかしながら、本明細書における教示に適合する他の方法において、ポリペプチドは、有害な細胞集団の部位に直接送達され、それにより疾患組織の治療剤への曝露を増加させることができる。

【0182】

非経口投与用の調製物は、無菌水溶液または非水溶液、懸濁液、およびエマルジョンを含む。非水溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油、オレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルである。水性担体は、生理食塩水および緩衝媒体を含む、水、アルコール/水溶液、エマルジョンまたは懸濁液を含む。主題の発明において、薬学的に許容される担体は、0.01 ~ 0.1 M、好ましくは0.05 Mのリン酸塩緩衝液、または0.8%生理食塩水を含むが、これらに限定されない。他の一般的な非経口ビヒクルは、リン酸ナトリウム溶液、リンゲルのデキストロース（Ringer's dextrose）、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、または揮発性油を含む。静脈内投与用ビヒクルは、流体および栄養補給液、電解質補給液、例えばリンゲルのデキストロースに基づくもの等を含む。保存剤および他の添加剤、例えば抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤、および不活性ガス等もまた存在し得る。

40

【0183】

50

より具体的には、注射用途に好適な薬学的組成物は、無菌注射溶液または分散液の即座の調製のための、無菌水溶液（水溶性の場合）または分散液および無菌粉末を含む。そのような場合、組成物は無菌でなければならず、容易な注射可能性（*syringability*）が存在する程度に流動的であるべきである。これは製造および保管条件において安定であるべきであり、好ましくは細菌や真菌等の微生物の汚染作用に対し保護される。担体は、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール等）、ならびにそれらの適した組み合わせを含有する、溶媒または分散媒であってもよい。例えばレシチン等のコーティングを使用することにより、分散の場合は必要な粒径を維持することにより、および界面活性剤の使用により、適正な流動性を維持することができる。

10

【0184】

微生物の活動の防止は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等により達成され得る。多くの場合において、組成物中に、等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に含めることによりもたらすことができる。

【0185】

いずれの場合も、無菌注射溶液は、必要な量の活性化化合物（例えば、単独または他の活性薬剤と組み合わせたポリペプチド）を、必要に応じて本明細書に列挙された成分のうち1つまたはそれらの組み合わせと共に適切な溶媒に組み込み、続いて無菌濾過することにより調製することができる。一般に、分散液は、基本的な分散媒および上に列挙されたものからの必要な他の成分を含有する無菌ビヒクルに、活性化化合物を組み込むことにより調製される。無菌注射溶液の調製用の無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥およびフリーズドライであり、これにより、活性成分と、以前に無菌濾過されたその溶液からの追加的な任意の所望の成分との粉末が得られる。当技術分野において知られた方法に従い、注射用調製物は処理され、アンプル、袋、瓶、注射器またはバイアル等の容器に充填され、無菌状態で封止される。さらに、調製物は、好ましくは、関連した組成物が、自己免疫性または腫瘍性障害に罹患した、またはその傾向がある対象の治療に有効であることを示すラベルまたは添付文書を有するキットの形態で、包装および販売されてもよい。

20

30

【0186】

状態の治療のための本発明の組成物の効果的な用量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者が人間であるかまたは動物であるか、投与される他の医薬、および処置が予防的であるかまたは治療的であるかを含む、多くの異なる要因に依存して変動する。通常、患者は人間であるが、形質転換哺乳動物を含む人間以外の哺乳動物もまた治療され得る。

【0187】

治療用量は、安全性および有効性を最適化するために、当業者に知られた慣例的方法を使用して滴定され得る。一実施形態において、本発明のポリペプチドは、患者に以前に投与されたものであるが、従来のリンカーペプチドの代わりに本発明のリンカーペプチドを含むように修飾されているポリペプチドである。そのような場合、投与されるポリペプチドの用量は、以前に安全および効果的であることが判明した用量、すなわち治療標準に一致する。

40

【0188】

本発明のポリペプチドは、複数の機会に投与され得る。単一の投薬の間隔は、週1回、月1回、または年1回であってもよい。また、間隔は、患者におけるポリペプチド、ポリペプチド標的、または抗原の血液レベルを測定することにより示されるように、不規則であってもよい。いくつかの方法において、投薬は、特定の *in vivo* 濃度に達するように調節される。代替として、ポリペプチドは、持続放出製剤として投与されてもよく、この場合、より低頻度の投与が必要である。用量および頻度は、患者におけるポリペ

50

プチドの半減期に依存して変動する。

【0189】

投与の用量および頻度は、処置が予防的であるかまたは治療的であるかに依存して変動し得る。予防用途においては、本発明のポリペプチドまたはそのカクテルを含有する組成物は、患者の耐性を向上させるために、まだ疾患状態にない患者に投与される。そのような量は、「予防上効果的な量」と定義される。長期的な期間にわたり、比較的低頻度の間隔で比較的低い用量が投与されてもよい。一部の患者は、生涯にわたり処置を受け続ける。

【0190】

治療用途においては、比較的短い間隔で比較的高用量が投与されてもよく、時折、疾患の進行が低減または停止されるまで、好ましくは患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで必要とされ得る。

10

【0191】

本発明の分子は、(例えば、併用治療計画を提供するために)薬剤(複数を含む)と併用して、または組み合わせて使用され得る。本発明の分子を組み合わせることができる例となる薬剤は、治療される特定の障害の現在の治療標準を示す薬剤を含む。そのような薬剤は、化学的または生物学的の性質を有し得る。「生物学的」または「生物学的薬剤」という用語は、治療薬としての使用を意図した、生物および/またはその産物から作製される任意の薬学的に活性な薬剤を指す。

【0192】

本発明のポリペプチドは、随意に、処置(例えば予防的または治療的)を必要とする障害または状態を処置する上で効果的な他の薬剤と組み合わせて投与されてもよい。本明細書において使用される場合、補助療法と併用または組み合わされた本発明のポリペプチドの投与は、療法および開示されるポリペプチドの、逐次的な、同時の、同じ範囲の、両立する、または同時期の投与または適用を意味する。当業者には、併用治療計画の様々な成分の投与または適用が、処置の全体的有効性を向上させるように時間調節され得ることが理解される。例えば、化学治療薬剤または生物学的薬剤は、主題の結合分子と併用した標準的な周知の処置過程で投与されてもよい。当業者(例えば医師)は、選択された補助療法および本明細書の教示に基づき、必要以上の実験を行うことなく、効果的な併用治療計画を容易に見定めることができる。

20

30

【0193】

一実施形態において、ポリペプチドは、核酸分子としての投与により、患者において生成され得る。核酸分子は、ベクター、プラスミド、リボソーム、DNA注射、電気穿孔、遺伝子銃、静脈内注射または肝動脈注入を含む、当該技術分野において知られた技術を使用して投与され得る。遺伝子治療の実施形態における使用のためのベクターは、当該技術分野において知られている。

【0194】

本発明のポリペプチドと組み合わせて使用される薬剤の量は、対象により変動し得、または、当該技術分野において知られているものに従って投与され得る。例えば、Bruce A Chabner et al., Antineoplastic Agents, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 1233-1287 (Joel G. Hardman et al., eds., 9th ed., 1996)を参照されたい。別の実施形態において、治療標準に一致するそのような薬剤の量が投与される。

40

【0195】

上述のように、本発明のポリペプチドは、哺乳動物障害の*in vivo*処置のために薬学的に効果的な量で投与され得る。これに関して、本発明の分子は、投与を容易化し、活性薬剤の安定性を促進するために製剤化され得る。好ましくは、本発明による薬学的組成物は、生理食塩水、非毒性緩衝液、保存剤等の薬学的に許容される非毒性無菌担体を含む。本出願の目的のために、治療薬剤に複合化した、または複合化していない本発明のポ

50

リペプチドの薬学的に効果的な量は、抗原への効果的な結合を達成するため、および利点を達成するため、例えば疾患もしくは障害の症状を改善するため、または物質もしくは細胞を検出するために十分な量を意味するものとする。腫瘍細胞の場合、ポリペプチドは、好ましくは、腫瘍性または免疫反応性細胞上の選択された免疫反応性抗原と相互作用することができる。当然ながら、本発明の薬学的組成物は、薬学的に効果的な量のポリペプチドを提供するために、単回または複数回投薬で投与され得る。

【0196】

本開示の範囲に即して、本発明の分子は、治療または予防効果を生成するために十分な量で、上述の処置方法に従って人間または他の動物に投与され得る。

【0197】

投与形態および剤形は、当然ながら、所与の処置用途に望ましく有効な化合物の治療量に影響する。治療上効果的な量は、疾患の発生を予防、遅延、もしくはその重症度を低減するために必要な量、または進行している疾患を停止もしくはその重症度を低減するために必要な量である。この量は、被投与者の体重および健康、形質転換されている細胞の種類、本発明の組成物の投与形態、ならびに処置されている医学的障害の種類等の因子に基づいて変動することが、当業者に容易に明らかとなる。

【0198】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の成分の1つ以上が充填された1つ以上の容器を備える、薬学的パックまたはキットを提供する。随意に、製剤または生物学的製品の製造、使用または販売を規制している政府機関により規定される形態の通知が、その容器（複数を含む）に伴ってもよく、この通知は、ヒトへの投与のための製造、使用または販売の機関による承認を反映する。

【0199】

以下の実施例により本発明をさらに説明するが、実施例は限定として解釈されるべきではない。本出願全体を通して引用される全ての参考文献、特許および特許出願公開の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0200】

FC5分子の発現、精製および特性決定：FC5を大腸菌において発現させ、細胞周辺腔から可溶性タンパク質を放出させるための浸透圧衝撃を使用して精製した。次いで、フラクトゲルSE上でのカチオン交換に続くスーパーデックス200上でのゲル濾過により、可溶性Hisタグ化FC5をニッケルカラム上で溶解物から捕捉した。ラクダ科Vhhを、SDS PAGEにより特性決定した（図2a~c）。前述の方法に従い、FC5-FC、FC-FC5およびFC5-scram-FCを、DG44 CHO細胞株において発現させた。pHを7.0に調節し、事前に平衡化された5ml HiTrap rProtein A FFカラム（GE healthcare）上でタンパク質を捕捉することにより、所望のhFc含有タンパク質をCHO細胞発酵培地（1L）から精製した。全身の内毒素依存性BBB開裂が生じないことを確実にするために、全ての精製されたタンパク質を、注射前に内毒素のレベルに関して特性決定した。結果を表Iに示す。Uto et al. 1991（Uto, I., Ishimatsu, T., Hirayama, H., Ueda, S., Tsuruta, J., and Kambara, T. (1991) Journal of immunological methods 138 (1), 87-94）に記載の方法を用い、神経活性ペプチド、ダラルギン、ガラニンまたはNPYを、スクシンイミジアル-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）二官能性化学リンカーを使用して、所望の分子（FC5、FC5-FC）に連結させた。連結させる各ペプチドは、システアミド類似体を用いてC末端上で合成され、これにより、SMCC二官能性架橋化学を使用した、遊離システインを介したタンパク質上のリシン側鎖へのペプチドのC末端架橋が可能であった。架橋後、各標識化分子を、S-200調製ゲル濾過により精製し、架橋反応中に形成されたいかなる凝集物も排除した。各FC5ドメインまたはFC5-FCドメインに連結したペプチドダ

10

20

30

40

50

ラルギン、NPYまたはガラニンの平均数を、質量分析により決定した。表Iは、FC5、FC5-FcまたはFc-FC5ドメイン当たりの連結したペプチドの平均数を示す。

【0201】

FC5含有分子の循環薬物動態：BBB内皮細胞のFC5含有抗体のそれぞれへの暴露を理解するために、分子の薬物動態をラットにおいて決定した。動物に、ヒトFcドメインに融合したFC5 Vhh N末端 (FC5-Fc) またはC末端 (Fc-FC5) を3mpkで腹腔内投薬した。血漿中のFC5-FcまたはFc-FC5の濃度を、ELISAにより様々な時点で測定した。結果を分析して、各コンストラクトのベータ相半減期を決定した (表II)。結果は、FC5-FcおよびFc-FC5の半減期が、ヒトFcに融合した場合、FC5 Vhh単独の場合よりも大幅に長いことを示したが、Fcはリサイクリングを付与することが周知であり、より大きな質量が腎臓濾過を防止する (Holt, L. J., Herring, C., Jespers, L. S., Woolven, B. P., and Tomlinson, I. M. (2003) Trends in biotechnology 21 (11), 484-490)。

10

【0202】

FC5含有分子のin vitro輸送速度：我々は、各FC5含有タンパク質のin vivo通過BBB流動速度をモデル化するために、in vitro BBB内皮細胞層を使用した。in vitroモデルは、小分子による緊張に関して検証された単層アッセイ系において、固定化成体ラット脳内皮細胞 (SV-AREC) の単層を使用した (Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R. D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J. E., Raub, T. J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Oberge, J. O., and Osterberg, T. (2005) Toxicol In Vitro 19 (3), 299-334)。in vitro流動速度測定のための方法は、(Caram-Salas, N., Boileau, E., Farrington, G. K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A., and Stanimirovic, D. Methods in molecular biology 763, ed. 2010, 383-401) に記載のものと同様であった。SV-AREC細胞層を介したFC5、FC5-FcおよびFc-FC5の流入速度を測定したが、結果は図3に示される通りである。

20

30

【0203】

TMEM30Aに対するFC5分子の結合親和性：新しく単離されたラットBBB内皮細胞、SV40形質転換ラットBBB内皮細胞 (Caram-Salas, N., Boileau, E., Farrington, G. K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A., and Stanimirovic, D. Methods in molecular biology 763, ed. 2010, 383-401)、および事前に特定された標的TMEM30Aで一時的にトランスフェクトしたHek293細胞を使用して、各分子の結合親和性を、別個の蛍光フローサイトメトリーアッセイにおいて評価した。各細胞株に対する結合曲線を図4A~Cに示し、計算された親和性値を表IIIに示す。結果は、初代ラットBBB内皮細胞に対するFC5Fcの結合が、11nMの親和性を有し、一方、SV40形質転換細胞株に対する結合は、75nMのEC50値、すなわち約7倍弱い結合をもたらすことを示している。一方で、ラットTMEM30A一時的形質転換Hek293細胞株に対する結合は、約1700nM、すなわち初代BBB内皮細胞株に対する結合よりもほぼ170倍弱い親和性をもたらす。これらのデータは、フローサイトメトリーにより測定された場合、FC5-FcがFC5 Vhh単独より高い見掛けの親和性の大幅な増加を有することを示しており、これは、FC5-FcがTMEM-30Aを発現する細胞に対して二座親和性をもって結合することを示唆している。

40

【0204】

50

動物モデルにおける有効性評価：RMTによりBBBを介して分子ペイロードを送達するための輸送体として機能する分子の能力に対して、FC5 Vhhドメイン二量体化が有する効果を評価するために、これらの分子の活性を動物モデルにおいて評価した。輸送効率には多くの要因が影響し得ることが知られており、例えば、抗トランスフェリン受容体抗体の親和性を数分の1にでも低減することが、BBB通過移動を効果的に行う分子の能力にプラスの影響を与えることが報告されている (Yu, Y. J., Zhang, Y., Kenrick, M., Hoyte, K., Luk, W., Lu, Y., Atwal, J., Elliott, J. M., Prabhu, S., Watts, R. J., and Dennis, M. S. *Science translational medicine* 3(84), 84ra44)。この概念によれば、FC5 VhhのFc二量体化後の大幅な親和性の向上が、効果的BBB輸送分子として機能するFC5 Vhhの能力に悪影響を及ぼすことが予測される。したがって、神経活性ペプチドが連結した分子(各分子は異なるFC5結合価を有する)の効力を、in vivoモデルにおいて評価した。

10

20

30

40

50

【0205】

Hargreavesモデルは、フロイトアジュバントの足への注射により誘発された熱疼痛に対する増加した感受性を測定する。熱疼痛は、脳の中脳水道周囲部分におけるミュー疼痛受容体に対する6アミノ酸ペプチドダラルギンの結合後に抑制され得る。静脈内注射されたダラルギンは、BBBを通過することができず、疼痛抑制をもたらさないが、ICV注射により、ダラルギンはミュー受容体に拡散してミュー受容体を阻止し、それにより疼痛を阻止することができる。したがって、静脈内注射されたダラルギンは、受容体媒介輸送体に連結して、BBB通過輸送および疼痛抑制を可能とするはずである。FC5含有分子により媒介されたダラルギンのBBBを介した輸送を評価するために、Hargreaves動物モデルを使用して、ダラルギンに連結したFC5 Vhhの様々な分子形態の効力を比較した。FC5-ダラルギンの陰性対照分子は、EG2-ダラルギンであり、FC5-Fc-ダラルギンの陰性対照分子は、Fc-FC5-ダラルギンであった。

【0206】

陽性および陰性被験物質の比較可能性を確実にするために、FC5-DalおよびEG2-Dalを質量分析により特性決定し、各Vhhに対する連結したダラルギンペプチドの比が同等であることを示した(表I)。

【0207】

静脈内(IV)注射の前に、各分子をまず陽性対照として脳室内(ICV)注射により試験し、全ての連結した分子が機能的に活性であり、疼痛抑制を誘発し得ることを確実にした。分子は脳脊髄液に直接注射され、中脳水道周囲ミュー疼痛受容体に拡散しそれを阻止することができるため、陰性対照および陽性試験分子は両方とも、ICV注射後に疼痛を抑制すると推測される。ICV注射により評価した全ての場合において、FC5-Dal、EG2-Dal、FC5-Fc-Dal、Fc-FC5-Dalまたはダラルギン単独は、送達されたダラルギンの量に基づき、同様の効力を提供した。次に、各ダラルギン標識化分子および対応するダラルギン標識化対照タンパク質を、IV投与後の有効性に関して評価した。まず、対照(EG2-Dal)の有効性に対するFC5-Dalの有効性を比較した。結果は、モルヒネ単独により観察され得る抑制レベルと同様の完全疼痛抑制が達成されたことを示している(図5aおよびb)。興味深いことに、最初の疼痛抑制が観察されるまでに、用量当たり1kg当たり7.5mg(mpk)のFC5-Dalの3回の投薬が必要であったことが分かる。さらに、対照群は、動物が同様に1kg当たり7.5mg(mpk)で3回投薬された後でも、疼痛抑制を示さなかった。これらのデータは、FC5が受容体媒介輸送体として機能し、BBBを介してダラルギンを脳実質内に輸送し、ダラルギンをミュー疼痛受容体に結合およびそれを阻止させることができ、一方対照EG2-ダラルギンは疼痛抑制を示さなかったことを実証および確認している。これらのデータを表IVに要約する。

【0208】

二量体化FC5形態、FC5-FcおよびFc-FC5は、BBB内皮細胞上のTME M 30Aに対して非常に異なる結合親和性を示した(表III)。Hargreaves疼痛モデルにおいて、親和性の向上が効力の改善に関連しているかを決定するために、FC5-Fc-dalおよびFc-FC5-dalの両方を、疼痛抑制に関して評価した。IV注射後、Fc-FC5-dalは、有効性を示さず(図6a~d)、一方FC5-Fc-dal(図7aおよび7c)は、疼痛抑制において極めて有効であった。さらに、陰性対照Fc-Dalは、*in vivo*において有効性を示さなかった(図7bおよび7d)。FC5-Fcは、最初の0.5mpkでの単回投薬でも最初の1時間以内に疼痛の低減において有効性を示し、最初の0.5時間後は平均50%MPEであった。FC5-dalの効力をFC5-Fc-dalの結果と比較すると、21mpkでのFC5-dalの単回投薬が、0.5mpkでのFC5-Fc-Dalとほぼ同じレベルの疼痛抑制を提供することが示された。注射されたダラルギンのモル比に基づき、FC5-Fc-Dalは、Hargreavesモデルでの疼痛を抑制する能力において、FC5-Dalよりも約80倍高い効力を示す。2.5mpkでのFC5-Fc-Dalの第2の投薬は、1匹の動物において、可能な最大疼痛抑制を提供するのに十分であった。Hargreaves疼痛モデルにおいて観察された、FC5-Fc-Dal、Fc-FC5-DalおよびFC5-Dalの向上した生物活性の観察は、表IIに要約されるように、FC5-Fcのより高い親和性およびより高い有効性に関連している。

【0209】

さらに、他の神経活性ペプチドを使用して、疼痛抑制の同様の有効性が達成され得る。例えば、上述のものと同一の化学的性質を有する、FC5またはFC5-Fcに連結したガラニン、29アミノ酸の3.2kDペプチドは、Hargreavesモデルにおいて慢性疼痛を抑制した。対照的に、Fcのみに連結したガラニンは、効果的な疼痛緩和を提供することができなかった。ICV陽性対照およびIV注射の両方の結果を、表VIに要約する。連結したガラニンがその同種受容体GalR1およびGalR2に結合し、陰性対照および試験分子の両方において疼痛を抑制する活性を検証するために、全ての分子を試験すると、ICV注射後に疼痛を抑制することが示された(表VI)。IV注射された場合、FC5またはFC5-FcのいずれかのFC5含有分子に連結したガラニンのみが、*in vivo*で疼痛を抑制することができた。Hargreaves動物モデルにおける疼痛を低減するために必要な、FC5に連結したガラニン対FC5-Fcに連結したガラニンの用量において、大きな差が見られた。6mpkの単回用量でのガラニン-FC5(表VI)は、8%MPEをもたらし、一方FC5-Fc-Galの単回用量は、45%MPEをもたらした。

【0210】

ペンチレンテトラゾール(PTZ)の腹腔内投与は、ラットにおいて発作を誘発し、てんかん発作のモデルとして使用されている(Chen, J.W.; Naylor, D.E.; Wasterlain, C.G. *Advances in the pathophysiology of status epilepticus*. *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, 2007, 186, 7-15.; Werner, F.M.; Covenas, R. *Neuropeptides involved in schizophrenia*, *Curr. Top. Neurochem.*, 2005, 4, 35-49.; Werner, F.M.; Covenas, R. *In: Focus on Neuropeptide Research*, Covenas, Mangas and Narvaez, Eds.; *Transworld Research Network: Trivandrum*, 2007; pp. 299-339; Werner, F.M.; Covenas, R. *Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in major depression*. *Int. J. Neurosci.*, 2010, 120, 455-70)。ガラニンおよび神経ペプチドY等の神経活性ペプチドは、PTZ誘発性発作からの保護を付与することが知られている(Mazarati 1998a; Mazarati, A

10

20

30

40

50

M., Hohmann, J. G., Bacon, A, Liu, H., Sankar, R., Steiner, R. A, Wynick, D., et al. Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 2000, 20(16), 6276-81). Mazarati et al. (Mazarati A, Liu H, Soomets U, Sankar R, Shin D, Katsumori H, Langel U, Wasterlain CG Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. *J Neurosci* 1998, 18:10070-10077). これらの研究は、ラット海馬からのガラニンの欠乏が、自立性てんかん重積状態の発症に関連するを示した。さらに、脳海馬領域へのガラニンの注射は、発作を抑制し得る (Mazarati A, Liu H, Soomets U, Sankar R, Shin D, Katsumori H, Langel U, Wasterlain CG Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. *J Neurosci* 1998, 18:10070-10077.; Mazarati AM, Halasz E, Telegdy G Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats. *Brain Res* 1992, 589:164-166)。しかしながら、静脈内投与された神経活性ペプチドは、BBBを通過することができず、その微小なサイズに起因して短い半減期を有する (Jain, Kamal and Batra. *Trends Biotechnol.* Vol 25. ed.: 2007: 307-16, Batra, Jain, Wittel, Chauhan and Colcher. *Curr Opin Biotechnol.* Vol 13. ed.: 2002: 603-8)。PTZモデルにおけるガラニンの有効性を、単一ドメイン抗体FC5、およびFC5-Fcの両方に連結したガラニンを試験することにより評価した。コンストラクトは両方ともBBB輸送を向上させると推測されるが、ここで、FC5-Fcコンストラクトは、その推定標的TMEEM30Aに対する強い結合に起因する増加した実際の親和性を有すること、ならびに増加したサイズおよびFc依存性リサイクリングに起因するはるかに長い半減期を有することが示された。

【0211】

PTZ誘発性発作モデルにおいて、対象薬剤が、IVまたは直接海馬注射により注射される。海馬注射は、薬剤を直接作用部位に送達し、ガラニンをその同種受容体に結合させ、発作の発生を阻止する。さらに、各分子の直接海馬注射は、各分子、Fc、FC5またはFC5-Fcに連結したガラニンが発作抑制活性を保持することを示すための陽性対照として役立つ。投与される各分子の用量は、ほぼモル当量のガラニン用量を提供するように変動させた。陽性対照試験のために、雄Wistarラット(4~6週齢)に、5 μ Lの最終体積のバルブ口酸、Gal-CyaまたはFC5-Galの1つを海馬内注射し、続いて15分後に50mpk PTZをIP注射して、発作を誘発した。

【0212】

FC5、FC5-FcまたはFcに連結したガラニンのBBBを通過する有効性を評価するために、これらの分子のそれぞれを、図7Aおよび7Bに詳細に示されるように全身的に注射した。全身試験のために、ラットに、Gal-CyaまたはFC5-Galの単回用量の1、2または3回の静脈内注射(尾静脈を介して)を行った。その後、それぞれの場合において、50mpkの用量でのIP PTZ注射を腹腔内に施し、ラットの動き

を30分間記録した。

【0213】

次いで、記録された全ての動きを検討し、以下の3つの特徴的な行動変化のそれぞれに関して、発作の発生までの時間および発作期間を公正な調査者により測定した：最初のミオクローヌス反射（FMJ；耳、頭および肩の痙攣を特徴とする）、最初の間代発作（FCJ；最小限の発作、頭および前肢の筋肉のクローヌス、全身の不随意運動、ならびに立ち直り反射を伴う跳躍運動を特徴とする）、および最初の強直性全身伸展（TGE；立ち直り能力の喪失、前肢および後肢の屈曲または伸展、ならびに全身のクローヌスを特徴とする）。

【0214】

表VII aは、各分子の海馬内注射の結果を示す。50 mpk PTZのIP注射は、各発作型、ミオクローヌス、間代性および全身強直性の急速な発生と共に、最も重症度の低いFMJから最も重度の発作形態である全身強直性への極めて急速な進行をもたらした。PTZ誘発性発作発生を部分的に抑制することが知られている小分子であるバルプロ酸（Pollack G.M., Shen D.D. J Pharmacol Methods. (1985) Apr; 13(2): 135-46)は、3つ全ての発作型を大幅に遅延させたが、発作発生を完全には防止せず、ミオクローヌスおよび間代発作の発生において約100秒の遅延が観察された。単独またはFC5に連結したガラニンの海馬内注射は、ミオクローヌス発作の大幅な遅延、ならびにより重度の間代性および全身性強直発作の完全な防止をもたらした。

【0215】

各分子の静脈内投薬により得られた結果を、表VII bに示す。PTZは、各発作型の急速な発生をもたらし、11.2 mpkでのバルプロ酸のIV投薬は、ミオクローヌスおよび間代性発作の発生を抑制する。神経活性ペプチドの短半減期および長半減期バージョンであるガラニンおよびガラニン-Fcの静脈内投与は、それぞれ、発作発生の遅延をもたらさないか、または極僅かな遅延をもたらした。PTZ投薬の1時間前に6 mpkで投薬されたFC5-ガラニンは、ミオクローヌス発作の大幅な遅延ならびに間代性および全身性間代発作の完全な抑制をもたらした。PTZ投薬の2時間前のFC5-Fc-ガラニンの単回投薬も、ミオクローヌス発作の大幅な遅延ならびに間代性および全身性間代発作の完全な抑制をもたらした。

【0216】

これらの結果から、いくつかの結論を導くことができる。FC5、FcまたはFC5-Fcに連結したガラニンは、HargreavesモデルにおいてICV投薬された場合、示されたような同等の活性を保持し（表IVおよびV）、さらに、表VII aは、FC5-ガラニンが、PTZ発作モデルにおいてラットの海馬内に注射された場合、モルベースでガラニン単独と同等の活性を示したことを示している。対照的に、単独またはhFc分子に付着した長寿命分子としてのガラニンは、血液脳関門を効果的に通過せず、PTZ誘発性発作を抑制しない。FC5-ガラニンまたはFC5-Fc-ガラニンとしてFC5に付着した場合のみ、ガラニンは、BBBを通過して、PTZ誘発性発作を効果的に遅延および抑制することができる。FC5-Fcに連結したガラニンは、モル用量比較に基づき、発作の低減においてFC5のみに連結したガラニンよりはるかに効果的であり、具体的には少なくとも16倍より有効であった。さらに、FC5-Fcガラニンは、FC5-ガラニンと比較した場合、最初のミオクローヌス発作の発生までの時間においてより大きな遅延を示した。これらの結果は、改善された半減期、ならびにFC5-Fcのその標的に対する実際の親和性の増加が、ガラニンのBBB通過送達を改善し、FC5ガラニンよりも、PTZ発作モデルにおいてより効果的な発作低減をもたらすことを示している。

10

20

30

40

【表 1】

表 I. 発現および精製された分子の特性決定。

分子 プラスミド	FC5 ⁽¹⁾ (EAG2333)	FC5-Fc ⁽²⁾ (EAG2345)	Fc-FC5 ⁽²⁾ (EAG2304)	Fc
計算された分子量(ダ ルトン)	15,375	78,725	78,924	51,896
内毒素(EU/mg)	<1	<1	<1	<1
LS分子量(ダルトン)	16,860	77,530	78,950	57,800
分析 SECにおけるピ ーク面積純度%	99.7	98.9	95.0	99.7
平均的な連結したダラ ルギンペプチド ⁽³⁾	1.5	1.5	1.5	1.0

10

(1) mycタグEQKLISEEDL、C末端(1202mw t)、C末端Hisタグ
5Hを含有する

20

(2) Fcドメインは、ヒトIgG1およびaglyである(全てのFcドメインは、h
IgG配列においてT299A点変異を含有し、Fc N-グリコシル化を排除する)

(3) FC5-Fcドメインに共有結合したダラルギンの平均数を決定するために、MS
により評価された。

【表 2】

表 I I. hFcに融合したFC5ドメインの薬物動態学的半減期決定。

30

アッセイ形式	FC5-Fc		Fc-FC5		hIgG1	
	蛍光	ELISA	蛍光	蛍光	ELISA	ELISA
ベータ相半減 期(時間)	39.4	35.7	38.6	43.5	48	

【0217】

半減期は、ラット血清からのヒトFcのELISA検出、またはAL680標識化分子
により決定し、蛍光は血清から決定した。半減期が蛍光対ELISAにより決定された分
子の間に差は観察されなかった。分子は、3mpkで腹腔内注射した。

40

【表 3】

表 I I I. 有効性と BBB 内皮細胞に対する親和性との相関を示す、H a r g r e a v e s モデルにおける FC5-D a l、FC5-Fc-D a l および Fc-FC5-D a l の結合親和性および相対的有効性の要約。

分子	親和性(nM)			
	FC5	FC5-Fc	Fc-FC5	
初代ラット BBB EC	>2000	11	1700	10
SV-ARBE C		75	ND	
ラット大動脈内皮細胞		1700		
Hargreaves モデルにおける FC5-Dal と比較した効力の倍数	1	80	<0.1	20

【表 4】

表 I V. 単独または FC5 に連結したダラルギンによる H a r g r e a v e s モデルにおける慢性疼痛抑制の要約。

分子	ICV		IV		
	用量(μg)	% MPE	用量(mg/kg)	% MPE	
PBS	5	0 ± 0.8	800 (μL)	0 ± 0.6	30
ダラルギン	2	35 ± 1	0.34 × 3 回注射	0.3 ± 0.3	
FC5	69.75	0 ± 2	7 × 3 回注射	1.9 ± 0.3	
EG2	69.75	0 ± 2	7 × 3 回注射	0 ± 1.3	
A20.1			7.84 × 3 回注射	2.2 ± 0.3	
FC5-ダラルギン	74.4	47 ± 2	7 × 3 回注射	41 ± 0.5	
EG2-ダラルギン	74.4	31 ± 1	7 × 3 回注射	2.0 ± 0	
A20.1-ダラルギン			2.49 × 3 回注射	3.1 ± 0	
FC5 + ダラルギン			(0.65 μg + 7 mg/Kg) × 3 回注射	0 ± 1.6	

【0218】

慢性疼痛抑制は、可能な最大効果のパーセンテージ (% M P E) として表現される。この値は、測定の時間枠にわたる対側対照足に対する疼痛抑制動物の曲線下の面積に基づく。I C V または I V で注射された分子の有効性は、H a r g r e a v e s モデルにおける可能な最大効果のパーセント (% M P E) として示される。A 2 0 . 1 および E G 2 は、FC5 に関連しない単ドメイン抗体であり、B B B 内皮細胞に対する見掛けの親和性を有さない。静脈内 (I V) 投薬値における m p k での用量は、注射当たりのものとして示され、続いて注射の数が示されている。

40

【表 5】

表V. Fcに連結したダラルギンまたはFC5-Fcに連結したダラルギンによるHargreavesモデルにおける慢性疼痛抑制の要約。

分子	ICV		IV	
	用量(μ g)	% MPE	用量(mg/kg)	% MPE
FC5-Fc-Dal	11.5	43 \pm 3	6	46 \pm 2
Fc Dal	9.3	55 \pm 2	6	5 \pm 2
FC5-Fc + FC5-Fc-Dal			2.5+6	32 \pm 7

10

【0219】

第2の実験において、連結していないFC5-FcのIV用量を、示された濃度で、FC5-Fc-Dalの付与の前にIV注射した。

【表 6】

表VI. Fc、FC5-FcまたはFC5に連結したガラニンによるHargreavesモデルにおける慢性疼痛抑制。

分子	ICV		IV	
	用量(μ g)	% MPE	(mg/kg)	% MPE
ガラニン	2	54 \pm 1	1	0 \pm 1
Fc-Gal	11.2	49 \pm 1	6	2 \pm 1
FC5-Gal	10.87	49 \pm 2	6	8 \pm 1
FC5-Fc-Gal	11.4	49 \pm 2	6	45 \pm 2

20

FC5-Galの複数投薬の場合、投薬は1時間間隔であった。第3の実験において、連結していないFC5-FcのIV用量を、示された濃度で、FC5-Fc-Dalの付与の前にIV注射した。

【表 7】

表VII. : ラットPTZモデルにおける、海馬注射 (a) またはIV注射 (b) を使用した発作発生までの時間の比較

a) 海馬注射。

分子	用量(ug)	発作発生までの時間 (秒)		
		ミオクロオヌス(秒)	間代	全身性强直
PTZのみ	50 mg/kg	0 ± 2	0 ± 6	0 ± 0.5
バルプロ酸	11.2	100 ± 6	100 ± 9	2 ± 1
ガラニン	1.82	104 ± 0	防止	防止
FC5-ガラニン	11.9	82 ± 4	防止	防止

b) 静脈内注射。

分子	用量(mg/kg)	発作発生までの時間 (秒)		
		ミオクロオヌス(秒)	間代	全身性强直
PTZのみ	50 mg/kg	0 ± 1	0 ± 3	0 ± 0.5
バルプロ酸	11.2	100 ± 3	100 ± 3	100 ± 0
ガラニン	1×2回注射	0.5 ± 5	0 ± 2	2 ± 4
Fc-Gal	6	2 ± 1	18 ± 2	17 ± 2
FC5-ガラニン	6×3回注射	47 ± 3	防止	防止
FC5-Fc-ガラニン	6	101 ± 28	防止	防止

【0220】

PTZによるラットのIP投薬後、以下に示される各発作型の発生までの時間を試験した：FMJ、FCJおよびTGE。発作型は、上でより詳細に説明されている。(a) PTZ投与IPは、それぞれの発作型までの対照時間を確立する。PTZのIP注射前のバルプロ酸、ガラニンまたはFC5-ガラニンの海馬注射は、各発作型までの時間に対しこれらの分子が有し得る最大効果を確立する。(b) バルプロ酸、陽性対照、ガラニン(1×3回注射投薬、1時間間隔の各投薬は、PTZ投薬の45分前に完了)またはFC5-ガラニン(1×3回投薬、1時間間隔の各投薬は、PTZ投薬の45分前に完了)、FC5-Fc-GalもしくはFc-Gal(共にPTZのIP注射の2時間前に投薬)のIV投薬は、IV投薬後にこれらの分子のそれぞれが有し得る効果を評価する。Fc-Galは、分子がFC5-F(ab)断片を有さないため、陰性対照として機能するが、FC5-Fcと同様のin vivo PKを有する。

配列1：FC5-agly(T299A)hFcの配列。(pEAG2345)
 DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHTYTMGWFRQA
 PGKEREFVSRITWGGDNTFYNSVSKGRFTISRDNKNTVY
 LQMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTV
 SSAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列2：agly(T299A)hFc-FC5の配列。(pEAG2403)
 EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT

ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSDVQL
 QASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKE
 REFVSRITWGGDNTFYNSNVKGRFTISRDNANKNTVYLQMN
 SLKPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTVSS

配列3：スクランブルFC5 - a g l y (T 2 9 9 A) h F c の配列 (p Y L 6 0 5)

EPKSSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSAYRVS V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSDVQL
 QASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKE
 REFVSRITWGGDNTFYNSNVKGRFTISRDNANKNTVYLQMN
 SLKPEDTADYYCAADAGSTGSYGSFDYWGKGTQVTVSS

10

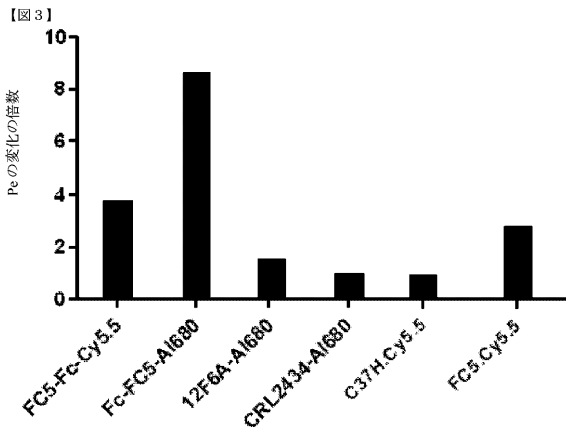
【0221】

均等物

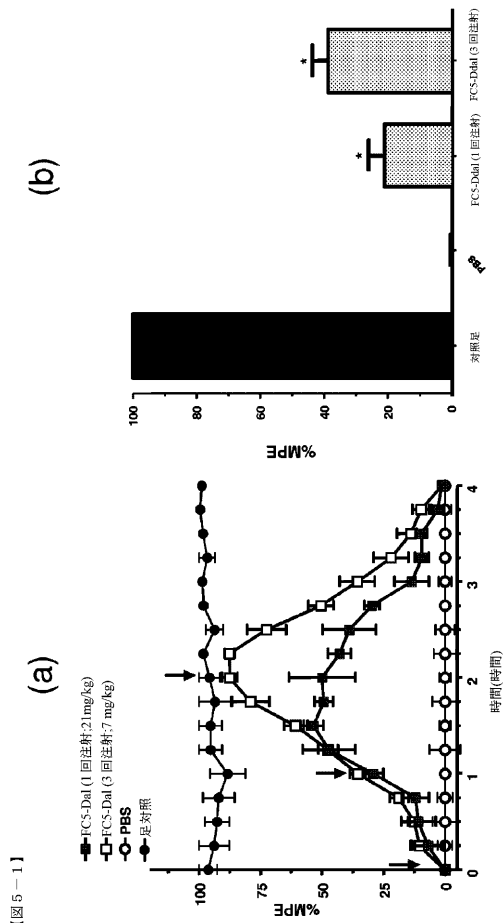
当業者は、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態の多くの均等物を理解するか、または慣例的な実験を用いるだけで確定することができる。そのような均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

20

【図3】

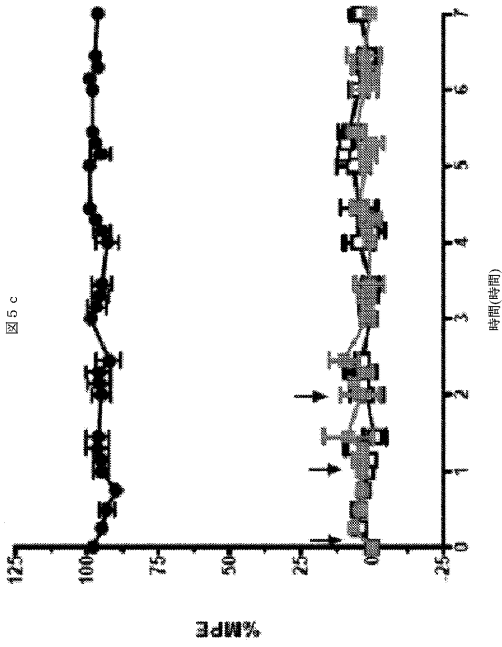


【図5-1】

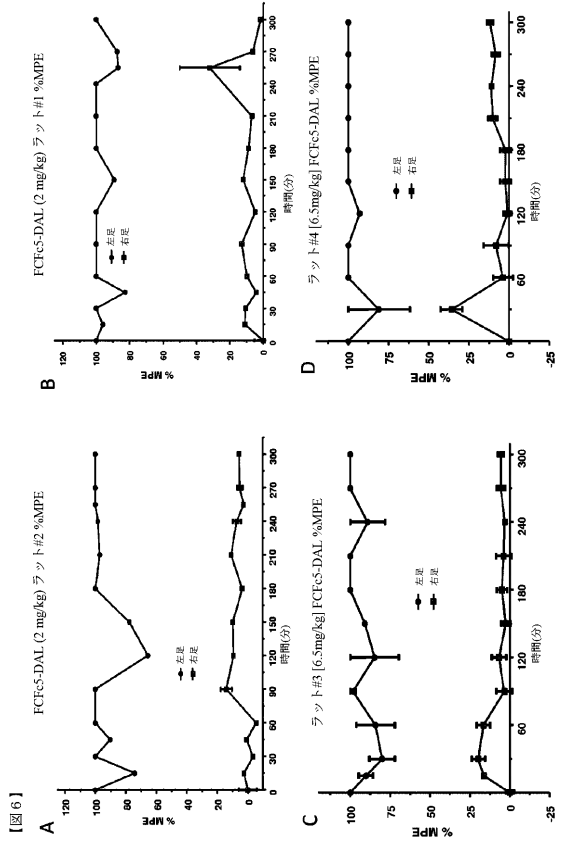


【図5-1】

【 図 5 - 2 】

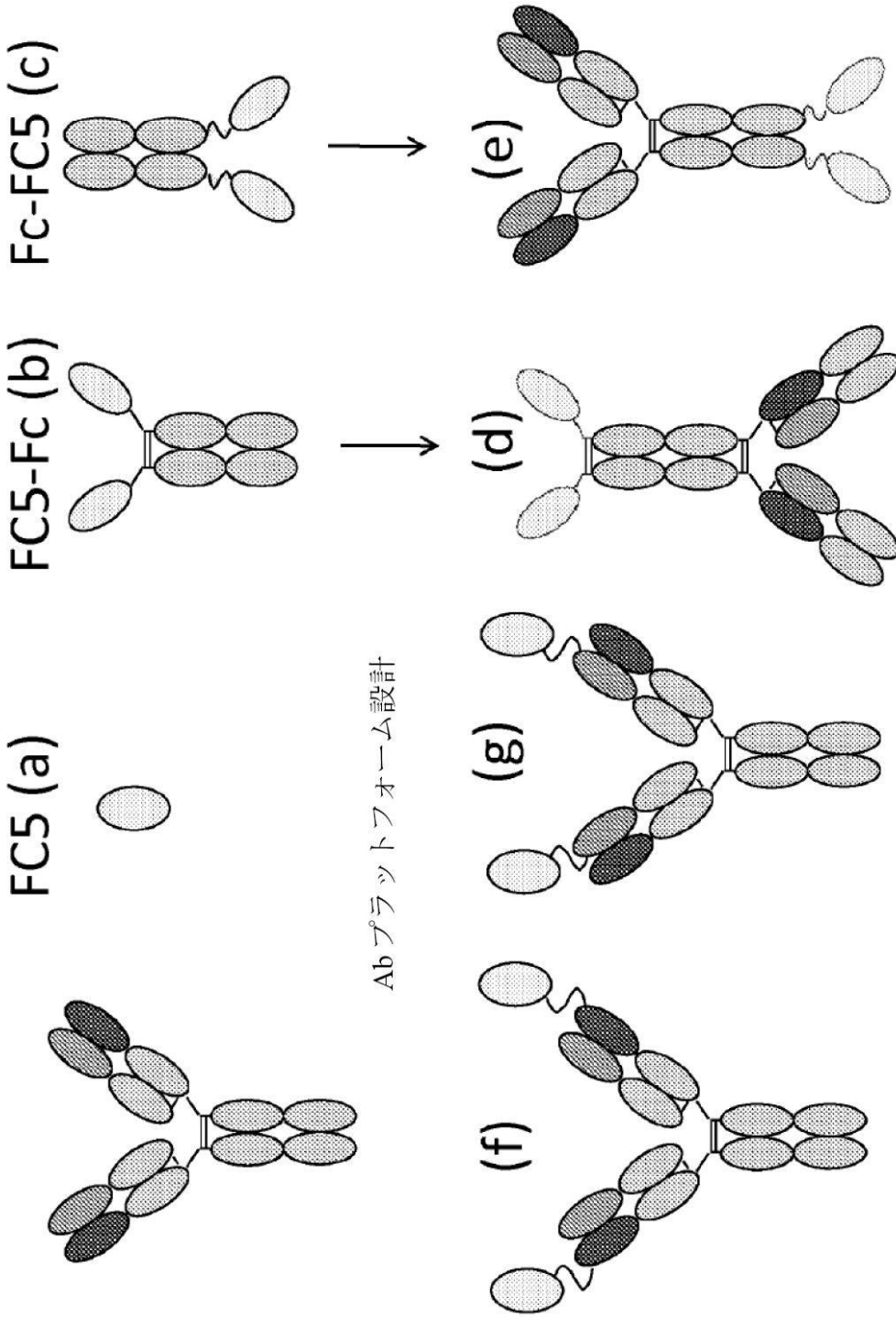


【 図 6 】

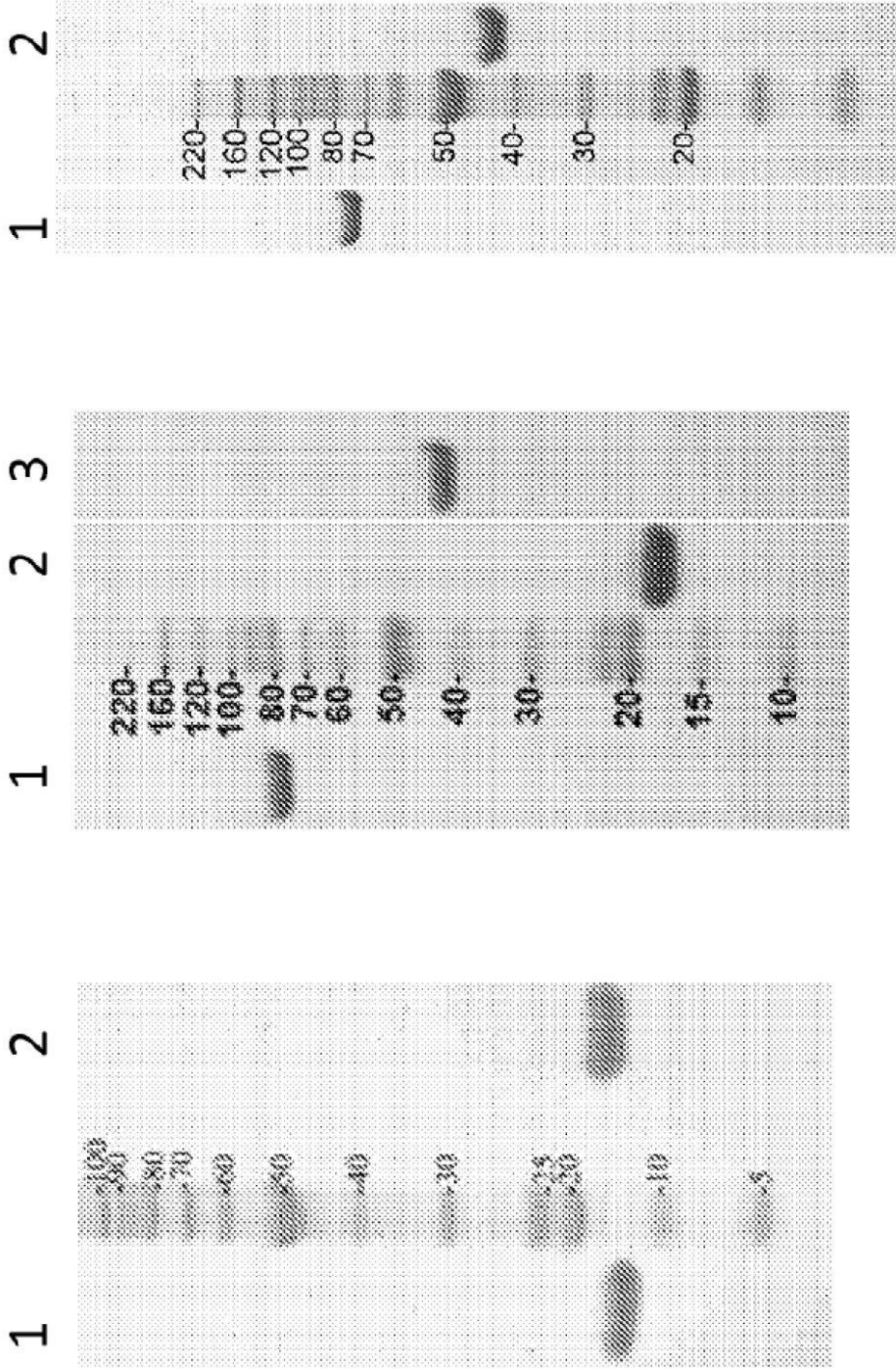


【図1】

【図1】



【図2】



【図2】

【 图 4 - 1 】

图 4 a

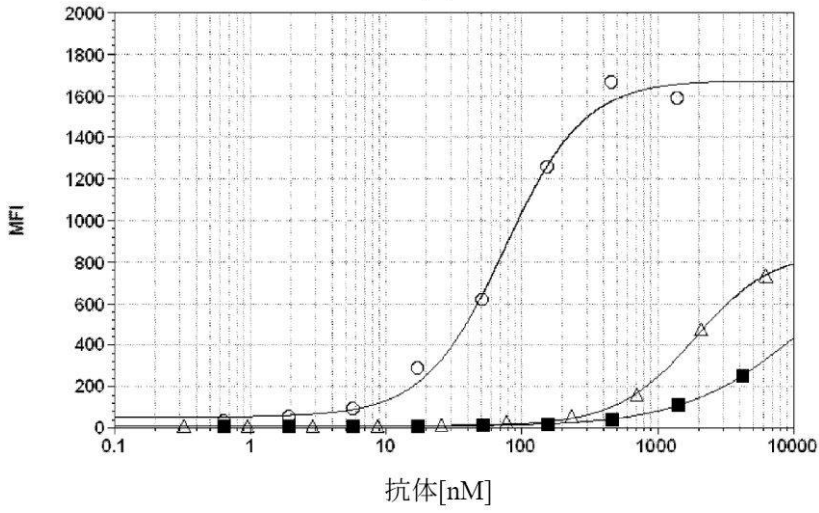
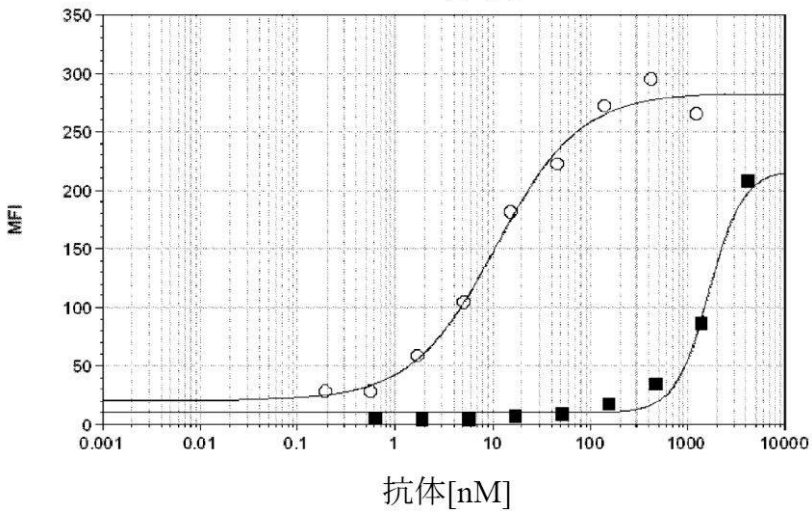
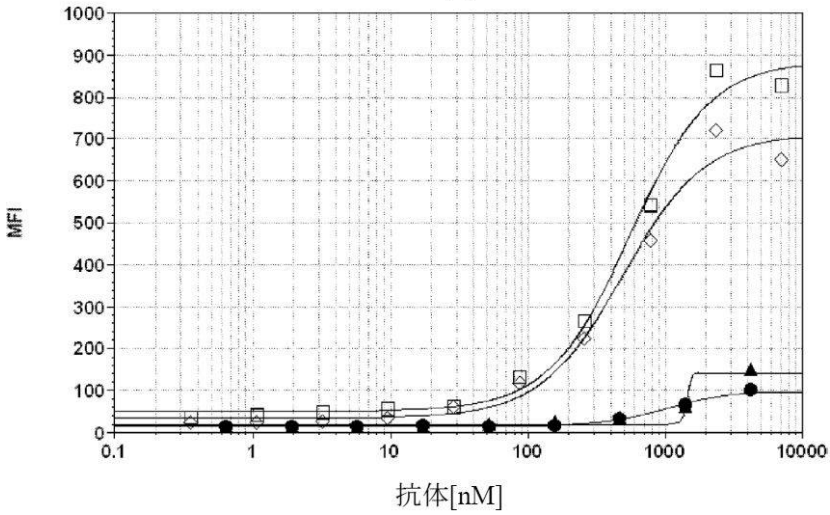


图 4 b



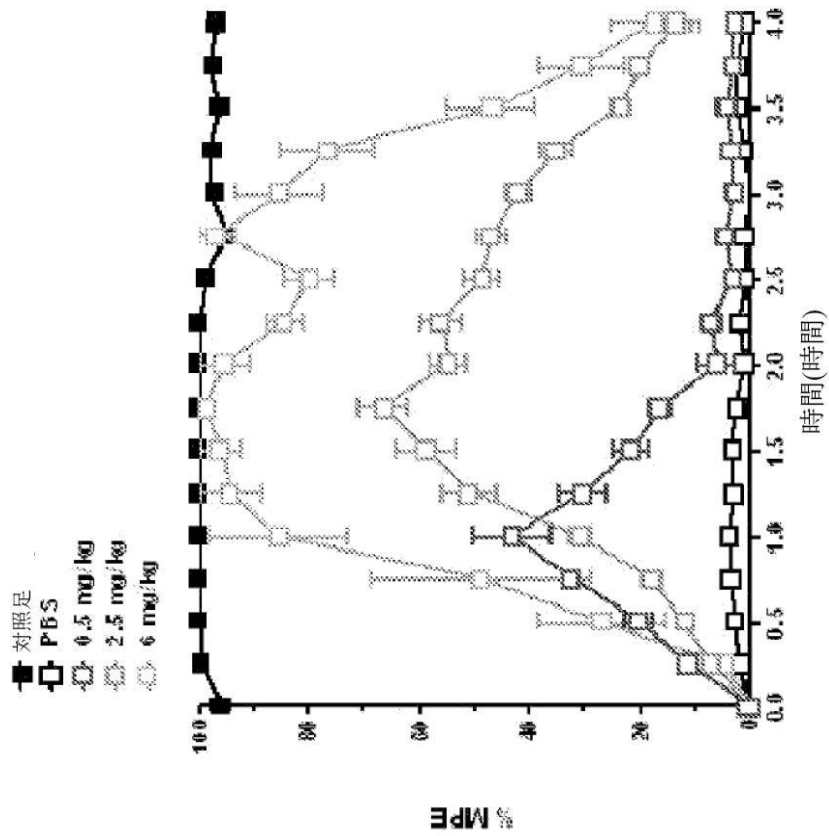
【 图 4 - 2 】

图 4 c



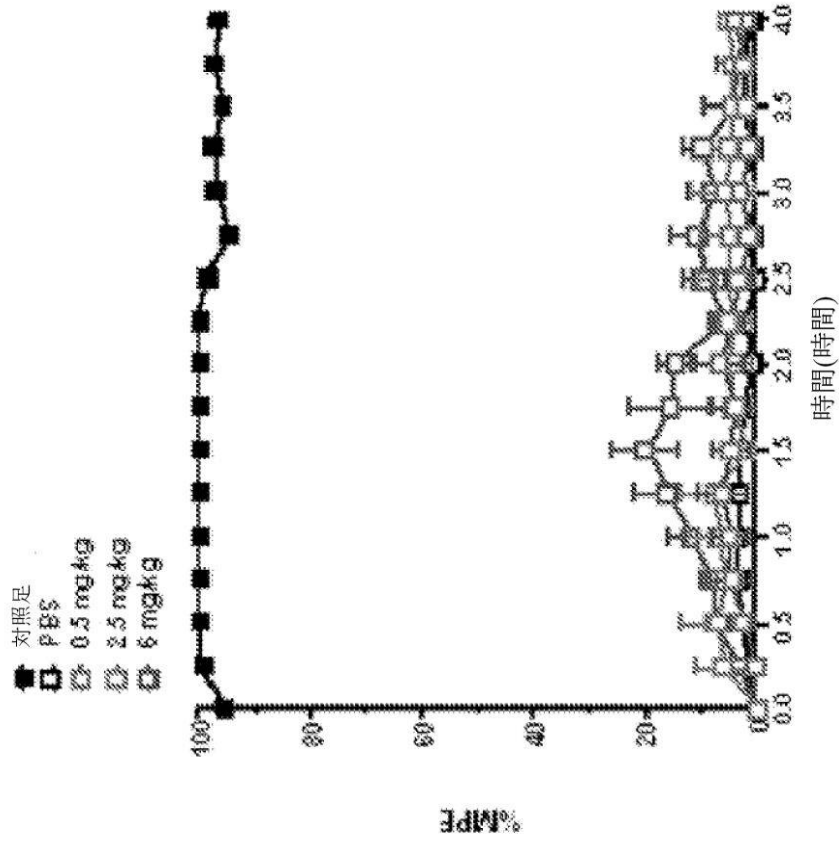
(a)

FC5-FC-Dal



(b)

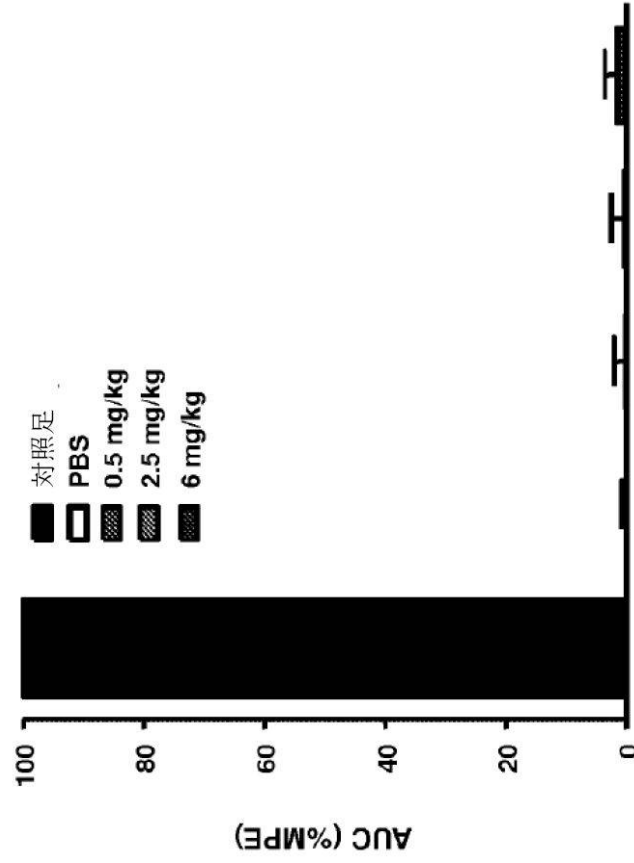
FC-Dal



【 図 7 - 2 】

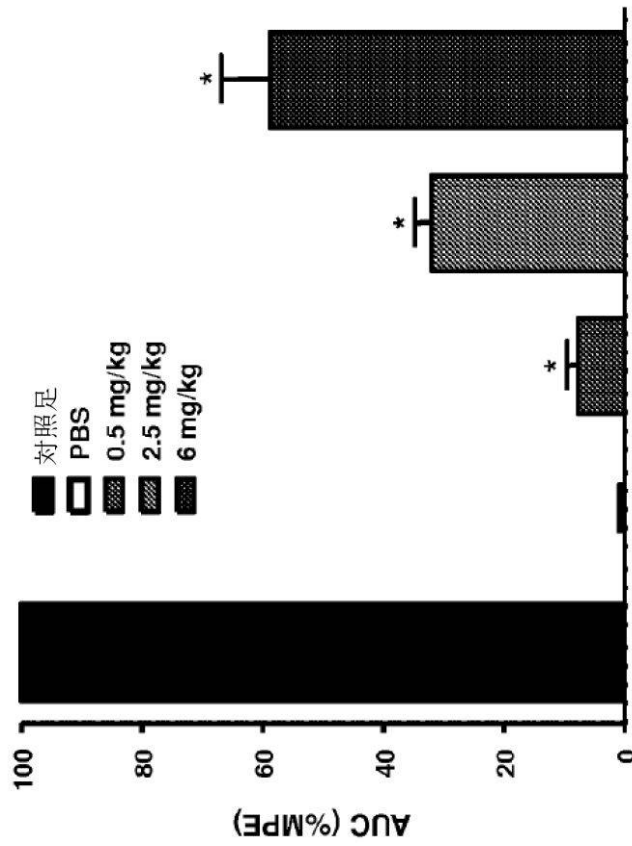
(d)

FC-Dal



(c)

FC5-FC-Dal



【 図 7 - 2 】

【 配 列 表 】

2015509097000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/021041

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C07K16/46 A61P25/00 A61K47/48 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) C07K A61K A61P		
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, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/127580 A1 (CANADA NAT RES COUNCIL [CA]; STANIMIROVIC DANICA [CA]; ABULROB ABEDLN) 20 October 2011 (2011-10-20)	1-11,14, 17,18, 21-24, 28-37
Y	claim 2 page 8, lines 18-20 page 5 page 9, lines 26-32 ----- -/--	13,15, 16,19,20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 4 September 2013		Date of mailing of the international search report 16/09/2013
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 Bumb, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/021041

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ABULROB ABEDLNASSER ET AL: "SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AS BLOOD-BRAIN BARRIER DELIVERY VECTORS", INTERNATIONAL CONGRESS SERIES, EXCERPTA MEDICA, AMSTERDAM, NL, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 212-223, XP001536285, ISSN: 0531-5131, DOI: 10.1016/J.ICS.2005.02.024 the whole document</p> <p>-----</p>	13,15,16
Y	<p>BY YOULET ET AL: "Intracerebroventricular injection of an agonist-like monoclonal antibody to adenosine A(2A) receptor has antinociceptive effects in mice.", JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY JAN 2011, vol. 230, no. 1-2, January 2011 (2011-01), pages 178-182, XP027595398, ISSN: 1872-8421 the whole document</p> <p>-----</p>	19,20
A	<p>WO 2011/107507 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; PARK JOHN E [DE]; DORNER-CIOSSEK CORNEL) 9 September 2011 (2011-09-09) table XIX</p> <p>-----</p>	1-37
A	<p>YU Y JOY ET AL: "Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target", SCIENCE / SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, WASHINGTON, DC : AAAS, US, vol. 3, no. 84 84ra44, 25 May 2011 (2011-05-25), pages 1-8, XP008148394, ISSN: 1946-6242, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3002230 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/021041

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011127580 A1	20-10-2011	CA 2796215 A1	20-10-2011
		EP 2558503 A1	20-02-2013
		US 2013034572 A1	07-02-2013
		WO 2011127580 A1	20-10-2011

WO 2011107507 A1	09-09-2011	AR 080446 A1	11-04-2012
		AU 2011222980 A1	02-08-2012
		CA 2788275 A1	09-09-2011
		CN 102781962 A	14-11-2012
		EA 201201227 A1	30-04-2013
		EP 2542579 A1	09-01-2013
		JP 2013520974 A	10-06-2013
		KR 20130010114 A	25-01-2013
		MA 34025 B1	01-02-2013
		PE 05272013 A1	09-05-2013
		SG 183369 A1	27-09-2012
		TW 201144437 A	16-12-2011
		US 2012058118 A1	08-03-2012
		US 2013017209 A1	17-01-2013
		UY 33253 A	30-09-2011
		WO 2011107507 A1	09-09-2011

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P	25/04	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 シスク, ウィリアム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 1 9, ボックスボロー, ジョセフ ロード 2 8 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA44 DA02 EA04 HA03
 4C084 AA02 AA07 AA19 BA02 BA41 BA44 CA53 MA02 NA05 NA14
 ZA011 ZA061 ZA081
 4C085 AA14 AA22 BB41 BB42 CC21 CC22 CC23 DD62
 4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA21 FA74 GA26