

(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2018-505662  
(P2018-505662A)

(43) 公表日 平成30年3月1日(2018.3.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNAA	4B064
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28	4B065
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00	4C076
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4C084
<b>C12N 1/19 (2006.01)</b>	C12N 1/19	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-532749 (P2017-532749)  
 (86) (22) 出願日 平成27年12月18日 (2015.12.18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年8月8日 (2017.8.8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/080539  
 (87) 国際公開番号 W02016/097315  
 (87) 国際公開日 平成28年6月23日 (2016.6.23)  
 (31) 優先権主張番号 62/094,503  
 (32) 優先日 平成26年12月19日 (2014.12.19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505148324  
 メッドイミュン・リミテッド  
 イギリス国 シービー21 6ジーエイチ  
 ケンブリッジ, グランタ パーク, ザ  
 ミルスタイン ビルディング  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100118902  
 弁理士 山本 修  
 (74) 代理人 100106208  
 弁理士 宮前 徹  
 (74) 代理人 100120112  
 弁理士 中西 基晴  
 (74) 代理人 100135415  
 弁理士 中濱 明子

最終頁に続く

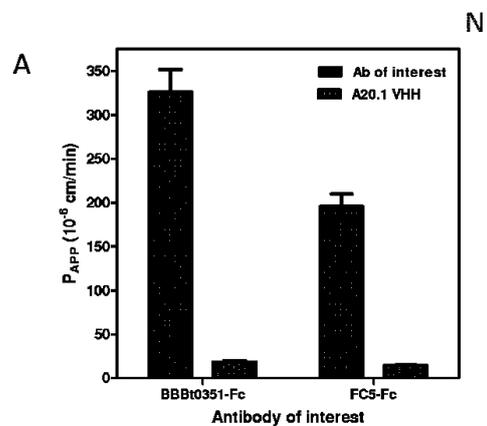
(54) 【発明の名称】 血液脳関門輸送分子およびそれらの使用

(57) 【要約】

本開示は、目的の薬剤を血液脳関門を通過して運搬することが可能な輸送体分子を提供する。輸送体分子をコードするポリヌクレオチド、輸送体分子を作製する方法、および例えば中枢神経系疾患、障害、または傷害の診断、予防、または処置のために輸送体分子を使用する方法も提供される。

【選択図】 図 1

FIGURE 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

免疫グロブリンポリペプチドを含む単離された輸送体分子であって、該ポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖相補性決定領域 - 1 (H - CDR 1)、免疫グロブリン重鎖相補性決定領域 - 2 (H - CDR 2)、免疫グロブリン重鎖相補性決定領域 - 3 (H - CDR 3)、免疫グロブリン軽鎖相補性決定領域 - 1 (L - CDR 1)、免疫グロブリン軽鎖相補性決定領域 - 2 (L - CDR 2)、および免疫グロブリン軽鎖相補性決定領域 - 3 (L - CDR 3) を含み；H - CDR 1、H - CDR 2、H - CDR 3、L - CDR 1、L - CDR 2、および L - CDR 3 がそれぞれ、

(a) 配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 12、配列番号 13、および配列番号 14； 10

(b) 配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 229、配列番号 230、および配列番号 231；

(c) 配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 229、配列番号 230、および配列番号 231；

(d) 配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 66、配列番号 67、および配列番号 68；

(e) 配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 229、配列番号 230、および配列番号 231；

(f) 配列番号 93、配列番号 94、配列番号 95、配列番号 229、配列番号 230、および配列番号 231； 20

(g) 配列番号 111、配列番号 112、配列番号 113、配列番号 229、配列番号 230、および配列番号 231；

(h) 配列番号 129、配列番号 130、配列番号 131、配列番号 138、配列番号 139、および配列番号 140；

(i) 配列番号 147、配列番号 148、配列番号 149、配列番号 156、配列番号 157、および配列番号 158；

(j) 配列番号 165、配列番号 166、配列番号 167、配列番号 174、配列番号 175、および配列番号 176；

(k) 配列番号 183、配列番号 184、配列番号 185、配列番号 192、配列番号 193、および配列番号 194；または 30

(l) 配列番号 210、配列番号 211、配列番号 212、配列番号 219、配列番号 220、および配列番号 220

を含み、該輸送体分子は、血液脳関門を通過することができる、上記輸送体分子。

## 【請求項 2】

前記 H - CDR 1、H - CDR 2、H - CDR 3、L - CDR 1、L - CDR 2、および L - CDR 3 がそれぞれ、

(b) 配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 30、配列番号 31、および配列番号 32；

(c) 配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 48、配列番号 49、および配列番号 50； 40

(e) 配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 84、配列番号 85、および配列番号 86；

(f) 配列番号 93、配列番号 94、配列番号 95、配列番号 102、配列番号 103、および配列番号 104；

(g) 配列番号 111、配列番号 112、配列番号 113、配列番号 120、配列番号 121、および配列番号 122；または

(h) 配列番号 129、配列番号 130、配列番号 131、配列番号 138、配列番号 139、および配列番号 140

を含む、請求項 1 に記載の輸送体分子。 50

## 【請求項 3】

免疫グロブリンポリペプチドを含む単離された輸送体分子であって、該ポリペプチドは

(a) 配列番号 2 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な免疫グロブリン重鎖可変領域 (VH) アミノ酸配列、および配列番号 11 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な免疫グロブリン軽鎖可変領域 (VL) アミノ酸配列；

(b) 配列番号 20 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 29 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列；

(c) 配列番号 38 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 47 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列；

(d) 配列番号 56 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 65 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列；

(e) 配列番号 74 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 83 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列；

(f) 配列番号 92 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 101 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列；

(g) 配列番号 110 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 119 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列；

(h) 配列番号 128 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 137 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列；

(i) 配列番号 146 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 155 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列；

(j) 配列番号 164 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 173 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列；

(k) 配列番号 182 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 191 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列；

(l) 配列番号 209 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 218 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列；または

(m) 配列番号 226 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VH アミノ酸配列、および配列番号 227 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一な VL アミノ酸配列

を含み、該輸送体分子は、血液脳関門を通過することができる、上記輸送体分子。

## 【請求項 4】

(a) VH は配列番号 2 を含み、VL は配列番号 11 を含み；

(b) VH は配列番号 20 を含み、VL は配列番号 228 を含み；

(c) VH は配列番号 38 を含み、VL は配列番号 228 を含み；

(d) VH は配列番号 56 を含み、VL は配列番号 65 を含み；

(e) VH は配列番号 74 を含み、VL は配列番号 228 を含み；

10

20

30

40

50

- ( f ) V H は配列番号 9 2 を含み、V L は配列番号 2 2 8 を含み；
- ( g ) V H は配列番号 1 1 0 を含み、V L は配列番号 2 2 8 を含み；
- ( h ) V H は配列番号 1 2 8 を含み、V L は配列番号 1 3 7 を含み；
- ( i ) V H は配列番号 1 4 6 を含み、V L は配列番号 1 5 5 を含み；
- ( j ) V H は配列番号 1 6 4 を含み、V L は配列番号 1 7 3 を含み；
- ( k ) V H は配列番号 1 8 2 を含み、V L は配列番号 1 9 1 を含み；
- ( l ) V H は配列番号 2 0 9 を含み、V L は配列番号 2 1 8 を含み；または
- ( m ) V H は配列番号 2 2 6 を含み、V L は配列番号 2 2 7 を含む、請求項 3 に記載の

輸送体分子。

【請求項 5】

- ( b ) V H は配列番号 2 0 を含み、V L は配列番号 2 9 を含み；
  - ( c ) V H は配列番号 3 8 を含み、V L は配列番号 4 7 を含み；
  - ( e ) V H は配列番号 7 4 を含み、V L は配列番号 8 3 を含み；
  - ( f ) V H は配列番号 9 2 を含み、V L は配列番号 1 0 1 を含み；または
  - ( g ) V H は配列番号 1 1 0 を含み、V L は配列番号 1 1 9 を含む、請求項 4 に記載の
- 輸送体分子。

【請求項 6】

免疫グロブリンポリペプチドを含む単離された輸送体分子であって、該ポリペプチドは、アミノ酸配列番号 2 0 0 を有する単ドメインの V H を含む、上記輸送体分子。

【請求項 7】

インビトロのトランスサイトーシスアッセイにおいて、F C 5 より効果的に脳微小血管内皮細胞 B M V E C を通過することができる、請求項 6 に記載の輸送体分子。

【請求項 8】

前記免疫グロブリンポリペプチドが、抗体またはそれらの B B B 透過性フラグメントを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項 9】

前記抗体またはそれらの B B B 透過性フラグメントが、2 つまたはそれより多くのサブユニットを含む、請求項 8 に記載の輸送体分子。

【請求項 10】

ジスルフィド結合を介して結合した重鎖および軽鎖を含む、請求項 9 に記載の輸送体分子。

【請求項 11】

重鎖定常領域またはそれらのフラグメントをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項 12】

前記重鎖定常領域が、F c 領域を含む、請求項 11 に記載の輸送体分子。

【請求項 13】

前記 F c 領域が、ヒンジ領域を含む、請求項 12 に記載の輸送体分子。

【請求項 14】

前記重鎖定常領域またはそれらのフラグメントが、I g G 定常領域またはそれらのフラグメントである、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項 15】

前記 I g G 定常ドメインまたはそれらのフラグメントが、野生型 I g G 定常ドメインと比較して、1 つまたはそれより多くのアミノ酸置換を含み、ここで改変された I g G は、該野生型 I g G 定常ドメインを有する I g G の半減期と比較して、F c R n に関する変更された半減期および / または変更された結合親和性を有する、請求項 14 に記載の輸送体分子。

【請求項 16】

前記改変された I g G が、前記野生型 I g G 定常ドメインを有する I g G の半減期と比較して、F c R n に関する増加した半減期および / または増加した結合親和性を有する、

10

20

30

40

50

請求項 15 に記載の輸送体分子。

【請求項 17】

前記改変された I g G が、前記野生型 I g G 定常ドメインを有する I g G の半減期と比較して、FcRn に関する減少した半減期および / または減少した結合親和性を有する、請求項 15 に記載の輸送体分子。

【請求項 18】

前記 I g G 定常ドメインまたはそれらのフラグメントが、野生型 I g G 定常ドメインと比較して、1 つまたはそれより多くのアミノ酸置換を含み、ここで改変された I g G は、該野生型 I g G 定常ドメインを有する I g G の半減期と比較して、低減したエフェクター機能および / または少なくとも 1 つのエフェクター分子への低減した結合を有する、請求項 14 に記載の輸送体分子。

10

【請求項 19】

前記 I g G 定常ドメインまたはそれらのフラグメントが、野生型 I g G 定常ドメインと比較して、変更された糖付加を有し、ここで改変された I g G は、該野生型 I g G 定常ドメインを有する I g G の半減期と比較して、低減したエフェクター機能および / または少なくとも 1 つのエフェクター分子への低減した結合を有する、請求項 14 に記載の輸送体分子。

【請求項 20】

前記重鎖定常ドメインまたはそれらのフラグメントが、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 定常ドメインまたはそれらのフラグメントである、請求項 11 ~ 19 のいずれか一項に記載の輸送体分子。

20

【請求項 21】

軽鎖定常ドメインまたはそれらのフラグメントをさらに含む、請求項 1 ~ 5 または 11 ~ 20 のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項 22】

前記軽鎖定常ドメインまたはそれらのフラグメントが、ヒトカップ定常ドメインもしくはそれらのフラグメント、またはヒトラムダ定常領域もしくはそれらのフラグメントを含む、請求項 21 に記載の輸送体分子。

【請求項 23】

前記抗体またはそれらのフラグメントが、マウス抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、多重特異性抗体、あらゆるそれらの組合せ、またはあらゆるそれらの抗原結合フラグメントである、請求項 8 ~ 22 のいずれか一項に記載の輸送体分子。

30

【請求項 24】

前記抗体またはそれらのフラグメントが、2 つの重鎖および 2 つの軽鎖を含む完全 I g G 免疫グロブリンである、請求項 8 ~ 23 のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項 25】

Fv フラグメント、Fab フラグメント、F(ab')<sub>2</sub> フラグメント、Fab' フラグメント、dsFv フラグメント、scFv フラグメント、または sc(Fv)<sub>2</sub> フラグメントである、請求項 8 ~ 23 のいずれか一項に記載の輸送体分子。

40

【請求項 26】

scFv フラグメントを含み、ここで ScFv は、リンカーを介して一緒に融合した VH および VL を含む、請求項 25 に記載の輸送体分子。

【請求項 27】

dsFv フラグメントを含み、ここで dsFv は、リンカーを介して一緒に融合した VH および VL を含む、請求項 25 に記載の輸送体分子。

【請求項 28】

アミノ末端から、VH-L-VL を含み、式中 L はリンカーである、請求項 26 に記載の輸送体分子。

【請求項 29】

50

前記リンカーが、(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub> (式中nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる群より選択される正の整数である) (配列番号232)、Ser(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>、(式中nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる群より選択される正の整数である) (配列番号233)、GGGGSGGGGGSGGGGS (配列番号234)、GGGGSGGGGGSGGGG (配列番号235)、GGGGSGGGGGSGGGGSA (配列番号236)、またはGGGGSGGGGGSGGGGSA (配列番号237)である、請求項26~28のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項30】

連結されたペイロードをさらに含み、ここで前記輸送体分子は、BBBを通過して該ペイロードを輸送することができる、請求項1~29のいずれか一項に記載の輸送体分子。

10

【請求項31】

前記ペイロードが、ペプチド結合を介して、前記免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドに融合されている、請求項30に記載の輸送体分子。

【請求項32】

前記ペイロードが、前記免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドに化学的にコンジュゲートされている、請求項30に記載の輸送体分子。

【請求項33】

前記ペイロードが、前記免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドと非共有結合を介して連結されている、請求項30に記載の輸送体分子。

20

【請求項34】

前記ペイロードが、抗微生物剤、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、脂質、生体応答調整物質、医薬物質、リンホカイン、異種抗体もしくはそれらのフラグメント、検出可能な標識、ポリエチレングリコール(PEG)分子、または薬剤の2種もしくはそれより多くの組合せを含む、請求項30~33のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項35】

前記ペイロードが、神経栄養因子、内分泌因子、増殖因子、パラクリン因子、視床下部放出因子、神経伝達物質ポリペプチド、CNS細胞によって発現される受容体に関するポリペプチドアゴニスト、およびリソソーム蓄積症に關与するポリペプチドからなる群より選択される神経刺激性のポリペプチドを含む、請求項34に記載の輸送体分子。

30

【請求項36】

前記ペイロードが、IL-1受容体アンタゴニスト(IL-1Ra)、ダラージン、インターフェロン-、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-4/5、ニューロトロフィン(NT)-3、ニュールツリン、ニューレグリン、ネトリン、毛様体神経栄養因子(CNTF)、幹細胞因子(SCF)、セマフォリン、肝細胞増殖因子(HGF)、上皮増殖因子(EGF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)-c<sub>x</sub>、TGF-B、血管内皮増殖因子(VEGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、ヘレグリン、アルテミン、パーセフィン、インターロイキン、顆粒球-コロニー刺激因子(CSF)、顆粒球マクロファージ-CSF、カルジオトロフィン-1、ヘッジホッグ、白血病抑制因子(LIF)、ミッドカイン、プレイオトロフィン、エリスロポイエチン(EPO)、骨形成タンパク質(BMP)、ネトリン、サボシン、あらゆるそれらのフラグメント、またはあらゆるそれらの組合せを含む、請求項35に記載の輸送体分子。

40

【請求項37】

前記ペイロードが、異種抗体またはそれらのフラグメントを含む、請求項34に記載の輸送体分子。

【請求項38】

前記異種抗体またはそれらのフラグメントが、ベータ-セクレターゼ1(BACE1)

50

、CD20、CD25、CD52、CD33、CTLA-4、テネイシン、アルファ-4 (a4) インテグリン、IL-12、IL-23、IL-12/IL-23のp40サブユニット、アミロイド-13(AI3)、ハンチンチン、神経成長因子(NGF)、上皮増殖因子受容体(EGFR/HER1)、ヒト上皮増殖因子受容体2(HER2/neu)、血管内皮増殖因子(VEGF)、TrkA、TNF-a、TNF-13、-シヌクレインタウ、アポリポタンパク質E4(ApoE4)、プリオンタンパク質(PrP)、ロイシンリッチリピートキナーゼ2(LRRK2)、パーキン、プレセニリン1、プレセニリン2、ガンマセクレターゼ、死受容体6(DR6)、アミロイド前駆タンパク質(APP)、p75ニューロトロフィン受容体(p75NTR)、カスパーゼ6、神経栄養因子および/または神経栄養因子受容体の1つまたはそれより多くに特異的に結合する、請求項37に記載の輸送体分子。

10

【請求項39】

ヒトIgG重鎖定常領域またはそれらのフラグメント、およびヒト軽鎖定常領域をさらに含み、ここでIL-1Raポリペプチドが該重鎖定常領域のC末端に融合されている、請求項36に記載の輸送体分子。

【請求項40】

脳微小血管内皮細胞(BMVEC)に結合することができる、請求項1~39のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項41】

前記BMVECが、ヒト、カニクイザル、マウス、ラット、またはウシBMVECである、請求項40に記載の輸送体分子。

20

【請求項42】

前記BMVECが、脳毛細血管内皮細胞(BCEC)である、請求項40または41に記載の輸送体分子。

【請求項43】

インビトロのトランスサイトーシスアッセイにおいて、BCECの単分子層を通過することができる、請求項40~42のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項44】

脳内皮細胞への結合に関して単一ドメイン抗体FC5またはBbbt0241と競合することができる、請求項40~43のいずれか一項に記載の輸送体分子。

30

【請求項45】

Bbbt0626、Bbbt0727、Bbbt0632、Bbbt0654、Bbbt0726、Bbbt0732、またはBbbt0754のVHおよびVLドメインを含む、請求項44に記載の輸送体分子。

【請求項46】

脳内皮細胞への結合に関して単一ドメイン抗体FC5またはBbbt0241と競合しない、請求項40~43のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項47】

Bbbt0643、Bbbt0674、Bbbt0755、Bbbt0351、Bbbt0579またはBbbt0671のVHおよびVLドメインを含む、請求項46に記載の輸送体分子。

40

【請求項48】

ダイノルフィンにコンジュゲートさせて、ラットモデルで末梢投与される場合、BBBを通過することにより利尿を誘導することができる、請求項1~47のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項49】

IL-1RAに融合させて、ラットの坐骨神経部分結紮アッセイで末梢投与される場合、BBBを通過することにより神経因性疼痛を低減させることができる、請求項1~47のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項50】

50

マウスモデルで末梢投与される場合、定量的全身オートラジオグラフィーによって測定される場合、小脳皮質、大脳灰白質、脊髄灰白質、脳橋、またはそれらの組合せに局在化する、請求項 1 ~ 47 のいずれか一項に記載の輸送体分子。

【請求項 5 1】

請求項 1 ~ 50 のいずれか一項に記載の輸送体分子、および担体を含む組成物。

【請求項 5 2】

請求項 1 ~ 50 のいずれか一項に記載の輸送体分子、またはそれらのフラグメントもしくはサブユニットをコードする核酸分子を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5 3】

VH、VL、またはVHおよびVLをコードする、請求項 5 2 に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、核酸分子が、配列番号 2、配列番号 11、または配列番号 2 および配列番号 11；配列番号 20、配列番号 29、または配列番号 20 および配列番号 29；配列番号 38、配列番号 47、または配列番号 38 および配列番号 47；配列番号 56、配列番号 65、または配列番号 66 および配列番号 65；配列番号 74、配列番号 83、または配列番号 74 および配列番号 83；配列番号 92、配列番号 101、または配列番号 92 および配列番号 101；配列番号 110、配列番号 119、または配列番号 110 および配列番号 119；配列番号 128、配列番号 137、または配列番号 128 および配列番号 137；配列番号 146、配列番号 155、または配列番号 146 および配列番号 155；配列番号 164、配列番号 173、または配列番号 164 および配列番号 173；配列番号 182、配列番号 191、または配列番号 182 および配列番号 191；配列番号 200；配列番号 209、配列番号 218、または配列番号 209 および配列番号 218；または配列番号 226、配列番号 227、または配列番号 226 および配列番号 227 を含む、ポリヌクレオチド。

10

20

【請求項 5 4】

ペイロードをコードする核酸をさらに含む、請求項 5 2 または 5 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5 5】

請求項 1 ~ 50 のいずれか一項に記載の輸送体分子、またはそれらのフラグメントもしくはサブユニットをコードする 2 つまたはそれより多くの核酸分子を含む組成物。

【請求項 5 6】

前記 2 つまたはそれより多くの核酸分子がそれぞれ、配列番号 2 および配列番号 11；配列番号 20 および配列番号 29；配列番号 38 および配列番号 47；配列番号 56 および配列番号 65；配列番号 74 および配列番号 83；配列番号 92 および配列番号 101；配列番号 110 および配列番号 119；配列番号 128 および配列番号 137；配列番号 146 および配列番号 155；配列番号 164 および配列番号 173；配列番号 182 および配列番号 191；配列番号 209 および配列番号 218；または配列番号 226 および配列番号 227 を含む、請求項 5 5 に記載の組成物。

30

【請求項 5 7】

ペイロードをコードする核酸分子をさらに含む、請求項 5 5 または 5 6 に記載の組成物。

40

【請求項 5 8】

前記 2 つまたはそれより多くの核酸分子が、同じベクター中に存在する、請求項 5 5 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 9】

請求項 5 2 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド、または請求項 5 5 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の 2 つまたはそれより多くの核酸分子を含むベクター。

【請求項 6 0】

前記 2 つまたはそれより多くの核酸分子が、少なくとも 2 つの別々のベクター中に存在する、請求項 5 5 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6 1】

50

前記ポリヌクレオチドまたは前記2つまたはそれより多くの核酸分子が、1つまたはそれより多くのプロモーターに作動可能に連結されている、請求項59に記載のベクターまたは請求項60に記載の組成物。

【請求項62】

前記ペイロードが、抗微生物剤、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、脂質、生体応答調整物質、医薬物質、リンホカイン、異種抗体もしくはそれらのフラグメント、検出可能な標識、ポリエチレングリコール(PEG)分子、または薬剤の2種もしくはそれより多くの組合せを含む、請求項54に記載のポリヌクレオチドまたは請求項57に記載の組成物。

【請求項63】

前記ペイロードが、IL-1受容体アンタゴニスト(IL-1Ra)、ダラージン、インターフェロン- $\gamma$ 、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-4/5、ニューロトロフィン(NT)-3、ニューロツリン、ニューレグリン、ネトリン、毛様体神経栄養因子(CNTF)、幹細胞因子(SCF)、セマフォリン、肝細胞増殖因子(HGF)、上皮増殖因子(EGF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、血管内皮増殖因子(VEGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、ヘレグリン、アルテミン、パーセフィン、インターロイキン、顆粒球-コロニー刺激因子(CSF)、顆粒球マクロファージ-CSF、カルジオトロフィン-1、ヘッジホッグ、白血病抑制因子(LIF)、ミッドカイン、プレイオトロフィン、エリスロポイエチン(EPO)、骨形成タンパク質(BMP)、ネトリン、サボシン、あらゆるそれらのフラグメント、またはあらゆるそれらの組合せを含む、請求項62に記載のポリヌクレオチドまたは組成物。

【請求項64】

請求項59に記載のベクター、または請求項60に記載の組成物を含む、単離された宿主細胞。

【請求項65】

請求項1~50のいずれか一項に記載の輸送体分子の作製方法であって、(a)請求項64に記載の宿主細胞を培養すること；および(b)前記輸送体分子またはそれらのフラグメントもしくはサブユニットを単離することを含む、上記方法。

【請求項66】

(c)前記輸送体分子またはそれらのフラグメントもしくはサブユニットをペイロードにコンジュゲートすることをさらに含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

請求項1~50のいずれか一項に記載の輸送体分子、請求項51または請求項55~58のいずれか一項に記載の組成物、請求項52~54のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項59に記載のベクター、または請求項64に記載の宿主細胞を含む、診断試薬。

【請求項68】

請求項1~50のいずれか一項に記載の輸送体分子、請求項51または請求項55~58のいずれか一項に記載の組成物、請求項52~54のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項59に記載のベクター、または請求項64に記載の宿主細胞を含むキット。

【請求項69】

中枢神経系(CNS)の疾患、障害、または傷害を処置する方法であって、処置が必要な対象に、請求項1~50のいずれか一項に記載の輸送体分子を含む組成物を末梢投与することを含み、該輸送体分子は、BBBを通過して輸送された後にCNSに曝露されると該疾患、障害、または傷害を処置することが可能な治療剤を含み、該疾患、障害、または傷害を処置するのに十分な該治療剤の量は、BBBを通過して輸送されることにより該疾患、障害、または傷害を処置する量である、上記方法。

【請求項70】

10

20

30

40

50

前記治療剤が、CNSへの侵入後に前記輸送体分子から放出される、請求項69に記載の方法。

【請求項71】

CNSの前記疾患、障害、または傷害が、多発性硬化症(MS)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄損傷、外傷性脳損傷、卒中、神経因性疼痛、神経変性、神経炎症、進行性多巣性白質脳病(PML)、脳脊髄炎(EPL)、橋中心髄鞘崩壊症(CPM)、副腎白質ジストロフィー、アレキサンダー病、ペリツェウス-メルツパッハー病(PMZ)、グロボイド細胞白質ジストロフィー(クラッペ病)、ウォラー変性、視神経炎、横断性脊髄炎、放射線照射後の傷害、化学療法 of 神経学的合併症、急性虚血性視神経症、ビタミンE欠乏症、ビタミンE単独欠乏症候群、パッセン-コルンツヴァイク症候群、マルキアファ-ヴァ-ビニヤミ病、異染性白質ジストロフィー、三叉神経痛、ベル麻痺、原発性腫瘍、二次転移、またはあらゆるこれらの組合せを含む、請求項69または70に記載の方法。

10

【請求項72】

前記治療剤が、インターロイキン-1受容体アンタゴニスト(IL-1Ra)であり、前記疾患、障害、または傷害が、神経因性疼痛である、請求項71に記載の方法。

【請求項73】

対象のCNSの薬剤への曝露を増加させる方法であって、該薬剤を、請求項1~50のいずれか一項に記載の輸送体分子にカップリングすること、およびカップリングされた薬剤を末梢投与することを含む、上記方法。

20

【請求項74】

BBBを通過して薬剤を輸送する方法であって、輸送体分子がそれらにカップリングされた薬剤をBBBを通過して輸送するように、該薬剤を、請求項1~50のいずれか一項に記載の輸送体分子にカップリングすることを含む、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

電子的に提出された配列表の参照

[0001]本出願と共に提出されたASCIIテキストファイルの形態の電子的に提出された配列表(BBB-100P1\_\_Seq;サイズ:84キロバイト;および作成日:2014年12月19日)の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

30

【背景技術】

【0002】

[0002]血液脳関門(BBB)は、脳のホメオスタシスを保護および制御して、脳のほとんどの部分への分子の自由な通過を防ぎ、そのため多くの脳疾患の処置が制限される。栄養素、増殖因子およびホルモンなどの必須の分子の輸送は、脳内皮細胞の通過を制御する一連の特異的な輸送体および受容体を介して達成される。それゆえに脳への生物製剤および他の薬物の送達は、重大な課題の一つである。加えて、脳から抗体を迅速に除去して、恐らくFcと炎症性反応を促進するエフェクターリガンドとの係合による炎症性反応を防ぐ輸送メカニズムが存在すると考えられる。

40

【0003】

[0003]この10年にわたり、輸送体分子の細胞外ドメインへの結合は、内皮細胞層を通過する受容体と抗体との複合体のトランスサイトシスを容易にするという血液脳関門を通過する抗体輸送の報告が出現してきた。

【0004】

[0004]血液脳関門は、主として脳毛細血管内皮細胞(BCEC)によって形成されるが(RubinおよびStaddon, Ann. Rev. Neurosci. 1999; 22:11~28)、他の細胞型、例えば周皮細胞、星状細胞およびニューロン性細胞もBBBの機能において重要な役割を果たす。BCECは、血液から脳への小さいおよび大きい(水溶性の)化合物の傍細胞輸送を防ぐ密着結合などの特定の特徴を有する(BrightmanおよびReese, J. Cell Biol. 1969; 40

50

(3):648~77; ReeseおよびKarnovsky、J. Cell Biol. 1967; 34(1):207~17)。B B Bは、物理的、代謝的および免疫学的なバリアとして機能する(Gaillardら、Microvasc. Res. 2003; 65(1):24~31)。

【0005】

[0005] B B Bを通過することができるF C 5と称される単ドメイン抗体(ラマ)が、学術研究所によってヒト脳内皮細胞の表面選択を使用して同定された(Muruganandamら、FASEB 2001; Abulrobら、J. Neurochemistry 2005; 95:1201~1214; P C T公報W O 0 2 / 0 5 7 4 4 5号A 1、米国特許第8,383,107号)。F C 5は、種交差反応性を有し、ラット、マウス、イヌおよびヒトの脳内の皮細胞に結合することができる。この抗体の推定上の受容体は、T M E M 3 0 aであり、これは、膜貫通タンパク質3 0 A、c d c 5 0 a、F L J 1 0 8 5 6、またはC 6 o r f 6 7とも称される。これは、正確な機能が不明なオーファン受容体である。これは、複合体が少なくとも2つのタンパク質:P型A T PアーゼのP 4サブファミリーからのアルファサブユニット、およびT M E M 3 0 a(c d c 5 0 a)を包含するC D C 5 0 - L e m p 3ファミリーからのベータサブユニットで構成されるアミノリン脂質のトランスロケーションにおいて役割を果たすと考えられる(Chenら、J. Immunol. 2011; 186:3215~3225; Munoz-Martinezら、Biochemical Pharmacology 2010; 80:793~800)。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】P C T公報W O 0 2 / 0 5 7 4 4 5号A 1

【特許文献2】米国特許第8,383,107号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】RubinおよびStaddon、Ann. Rev. Neurosci. 1999; 22:11~28

【非特許文献2】BrightmanおよびReese、J. Cell Biol. 1969; 40(3):648~77;

【非特許文献3】ReeseおよびKarnovsky、J. Cell Biol. 1967; 34(1):207~17

【非特許文献4】Gaillardら、Microvasc. Res. 2003; 65(1):24~31

【非特許文献5】Muruganandamら、FASEB 2001

【非特許文献6】Abulrobら、J. Neurochemistry 2005; 95:1201~1214

【非特許文献7】Chenら、J. Immunol. 2011; 186:3215~3225

【非特許文献8】Munoz-Martinezら、Biochemical Pharmacology 2010; 80:793~800

20

30

【発明の概要】

【0008】

[0006]本開示は、ヒトでの使用に好適な機能的な分子として再構築された単ドメインのラクダ抗体F C 5に類似した特性を有する血液脳関門輸送体分子を提供する。

[0007]一形態において、本開示は、免疫グロブリンポリペプチドを包含する単離された輸送体分子であって、該ポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖相補性決定領域-1(H-C D R 1)、免疫グロブリン重鎖相補性決定領域-2(H-C D R 2)、免疫グロブリン重鎖相補性決定領域-3(H-C D R 3)、免疫グロブリン軽鎖相補性決定領域-1(L-C D R 1)、免疫グロブリン軽鎖相補性決定領域-2(L-C D R 2)、および免疫グロブリン軽鎖相補性決定領域-3(L-C D R 3)を含み; H-C D R 1、H-C D R 2、H-C D R 3、L-C D R 1、L-C D R 2、およびL-C D R 3はそれぞれ、(a)配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号12、配列番号13、および配列番号14; (b)配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号229、配列番号230、および配列番号231; (c)配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号229、配列番号230、および配列番号231; (d)配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号66、配列番号67、および配列番号68; (e)配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号229、配列番号230、および配列番号231; (f)配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号229、配列番号2

40

50

30、および配列番号231；(g)配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号229、配列番号230、および配列番号231；(h)配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号138、配列番号139、および配列番号140；(i)配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号156、配列番号157、および配列番号158；(j)配列番号165、配列番号166、配列番号167、配列番号174、配列番号175、および配列番号176；(k)配列番号183、配列番号184、配列番号185、配列番号192、配列番号193、および配列番号194；または(l)配列番号210、配列番号211、配列番号212、配列番号219、配列番号220、および配列番号220であり、該輸送体分子は、血液脳関門を通過することができる、上記輸送体分子を提供する。

10

## 【0009】

[0008]別の形態において、本開示は、免疫グロブリンポリペプチドを包含する単離された輸送体分子であって、該ポリペプチドは、(a)配列番号2に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)アミノ酸配列、および配列番号11に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)アミノ酸配列、(b)配列番号20に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号29に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列、(c)配列番号38に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号47に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列、(d)配列番号56に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号65に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列、(e)配列番号74に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号83に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列、(f)配列番号92に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号101に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列、(g)配列番号110に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号119に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列、(h)配列番号128に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号137に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列、(i)配列番号146に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号155に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列、(j)配列番号164に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号173に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列、(k)配列番号182に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号191に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列、(l)配列番号209に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号218に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列；または(m)配列番号226に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号227に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列を含み、該輸送体分子は、血液脳関門を通過することができる、上記輸送体分子を提供する。

20

30

40

50

## 【 0 0 1 0 】

[0009]別の形態において、本開示は、免疫グロブリンポリペプチドを包含する単離された輸送体分子であって、該ポリペプチドは、アミノ酸配列番号200を有する単一ドメインのVHを含む、上記輸送体分子を提供する。特定の形態において、輸送体分子は、インビトロのトランスサイトーシスアッセイにおいて、FC5より効果的に脳微小血管内皮細胞BMVECを通過することができる。

## 【 0 0 1 1 】

[0010]本明細書で提供される輸送体分子は、重鎖定常領域またはそれらのフラグメントをさらに包含してもよく、例えば、Fc領域および/またはヒンジ領域を包含する。さらに、本明細書で提供される輸送体分子の免疫グロブリンポリペプチドは、抗体またはそれらのBBB透過性フラグメントを包含してもよい。特定の形態において、抗体またはそれらのBBB透過性フラグメントは、2つまたはそれより多くのサブユニット、例えば、ジスルフィド結合を介して結合した重鎖および軽鎖を包含してもよい。特定の形態において、重鎖定常領域またはそれらのフラグメントは、IgG定常領域またはそれらのフラグメントであってもよい。特定の形態において、抗体またはそれらのフラグメントは、マウス抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、多重特異性抗体、あらゆるそれらの組合せ、またはあらゆるそれらの抗原結合フラグメントであってもよい。特定の形態において、抗体またはそれらのフラグメントは、2つの重鎖および2つの軽鎖を包含する完全IgG免疫グロブリンであってもよい。特定の形態において、それらのBBB透過性フラグメントは、Fvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fab'フラグメント、dsFvフラグメント、scFvフラグメント、またはsc(Fv)<sub>2</sub>フラグメントであってもよい。例えば、フラグメントは、scFvフラグメントを包含してもよく、ここでScFvは、リンカーを介して一緒に融合したVHおよびVLを含み、またはフラグメントは、dsFvフラグメントを包含してもよく、ここでdsFvは、リンカーを介して一緒に融合したVHおよびVLを含む。特定の形態において、scFvまたはdsFvは、アミノ末端から、VH-L-VLを包含してもよく、式中Lはリンカーである。特定の形態において、リンカーは、(Gly4Ser)<sub>n</sub>(式中nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる群より選択される正の整数である)(配列番号232)、Ser(Gly4Ser)<sub>n</sub>(式中nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる群より選択される正の整数である)(配列番号233)、GGGGSGGGSGGGGS(配列番号234)、GGGGSGGGGS(配列番号235)、GGGGSGGGGS(配列番号236)、またはGGGGSGGGGS(配列番号237)であってもよい。

## 【 0 0 1 2 】

[0011]特定の形態において、IgG定常ドメインまたはそれらのフラグメントは、野生型IgG定常ドメインと比較して、1つまたはそれより多くのアミノ酸置換を包含してもよく、ここで改変されたIgGは、野生型IgG定常ドメインを有するIgGの半減期と比較して、FcRnに関する変更された半減期および/または変更された結合親和性を有する。一例において、改変されたIgGは、野生型IgG定常ドメインを有するIgGの半減期と比較して、FcRnに関する増加した半減期および/または増加した結合親和性を有してもよい。別の例において、改変されたIgGは、野生型IgG定常ドメインを有するIgGの半減期と比較して、FcRnに関する減少した半減期および/または減少した結合親和性を有する。特定の形態において、IgG定常ドメインまたはそれらのフラグメントは、野生型IgG定常ドメインと比較して、1つまたはそれより多くのアミノ酸置換を包含してもよく、ここで改変されたIgGは、野生型IgG定常ドメインを有するIgGの半減期と比較して、低減したエフェクター機能および/または少なくとも1つのエフェクター分子への低減した結合を有する。特定の形態において、IgG定常ドメインまたはそれらのフラグメントは、野生型IgG定常ドメインと比較して、変更された糖付加を有してもよく、ここで改変されたIgGは、野生型IgG定常ドメイ

10

20

30

40

50

ンを有する I g G の半減期と比較して、低減したエフェクター機能および/または少なくとも1つのエフェクター分子への低減した結合を有する。特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子の重鎖定常ドメインまたはそれらのフラグメントは、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、もしくは I g G 4 定常ドメインまたはそれらのフラグメントであってもよい。

【0013】

[0012]特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、軽鎖定常ドメインまたはそれらのフラグメントをさらに包含してもよい。例えば、軽鎖定常ドメインまたはそれらのフラグメントは、ヒトカッパ定常ドメインもしくはそれらのフラグメント、またはヒトラムダ定常領域もしくはそれらのフラグメントであってもよい。

10

【0014】

[0013]特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、連結されたペイロードをさらに包含してもよく、ここで輸送体分子は、B B B を通過してペイロードを輸送することができる。特定の形態において、ペイロードは、ペプチド結合を介して、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドに融合されている。特定の形態において、ペイロードは、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドに化学的にコンジュゲートされている。特定の形態において、ペイロードは、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドと非共有結合を介して連結される。

【0015】

[0014]ペイロードとしては、例えば、抗微生物剤、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、脂質、生体応答調整物質、医薬物質、リンホカイン、異種抗体もしくはそれらのフラグメント、検出可能な標識、ポリエチレングリコール ( P E G ) 分子、または薬剤の2種もしくはそれより多くの組合せを挙げることができる。例えば、ペイロードとしては、神経刺激性のポリペプチド、例えば、神経栄養因子、内分泌因子、増殖因子、パラクリン因子、視床下部放出因子、神経伝達物質ポリペプチド、C N S 細胞によって発現される受容体に関するポリペプチドアゴニスト、リソソーム蓄積症に關与するポリペプチドまたはあらゆるそれらの組合せを挙げることができる。別の例において、ペイロードとしては、I L - 1 受容体アンタゴニスト ( I L - 1 R a )、ダラージン ( dalargin )、インターフェロン - 、グリア細胞株由来神経栄養因子 ( G D N F )、腫瘍壊死因子受容体 ( T N F R )、神経成長因子 ( N G F )、脳由来神経栄養因子 ( B D N F )、ニューロトロフィン - 4 / 5、ニューロトロフィン ( N T ) - 3、ニュールツリン、ニューレグリン、ネトリン、毛様体神経栄養因子 ( C N T F )、幹細胞因子 ( S C F )、セマフォリン、肝細胞増殖因子 ( H G F )、上皮増殖因子 ( E G F )、トランスフォーミング増殖因子 ( T G F ) - c x、T G F - B、血管内皮増殖因子 ( V E G F )、血小板由来増殖因子 ( P D G F )、ヘレグリン、アルテミン、パーセフィン、インターロイキン、顆粒球 - コロニー刺激因子 ( C S F )、顆粒球マクロファージ - C S F、カルジオトロフィン - 1、ヘッジホッグ、白血病抑制因子 ( L I F )、ミッドカイン、プレイオトロフィン、エリスロポイエチン ( E P O )、骨形成タンパク質 ( B M P )、ネトリン、サボシン、あらゆるそれらのフラグメント、またはあらゆるそれらの組合せを挙げることができる。一形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、ヒト I g G 重鎖定常領域またはそれらのフラグメント、およびヒト軽鎖定常領域を含んでもよく、ここで I L - 1 R a ポリペプチドが重鎖定常領域の C 末端に融合されている。

20

30

40

【0016】

[0015]特定の形態において、ペイロードは、異種抗体またはそれらのフラグメントを包含してもよく、例えば、異種抗体またはそれらのフラグメントは、ベータ - セクレターゼ 1 ( B A C E 1 )、C D 2 0、C D 2 5、C D 5 2、C D 3 3、C T L A - 4、テネイシン、アルファ - 4 ( a 4 ) インテグリン、I L - 1 2、I L - 2 3、I L - 1 2 / I L - 2 3 の p 4 0 サブユニット、アミロイド - 1 3 ( A I 3 )、ハンチンチン、神経成長因子 ( N G F )、上皮増殖因子受容体 ( E G F R / H E R 1 )、ヒト上皮増殖因子受容体 2 ( H E R 2 / n e u )、血管内皮増殖因子 ( V E G F )、T r k A、T N F - a、T N

50

F - 13、 $\beta$ -シヌクレインタウ、アポリポタンパク質 E4 (ApoE4)、プリオンタンパク質 (PrP)、ロイシンリッチリピートキナーゼ 2 (LRPK2)、パーキン、プレセニン 1、プレセニン 2、ガンマセクレターゼ、死受容体 6 (DR6)、アミロイド前駆タンパク質 (APP)、p75 ニューロトロフィン受容体 (p75NTR)、カスパーゼ 6、神経栄養因子および/または神経栄養因子受容体の 1 つまたはそれより多くに特異的に結合する。特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、脳微小血管内皮細胞 (BMVEC)、例えば、ヒト、カニクイザル、マウス、ラット、またはウシ BMVEC に結合することができる。特定の形態において、BMVEC は、脳毛細血管内皮細胞 (BCEC) である。特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、インビトロのトランスサイトーシスアッセイにおいて、BCEC の単分子層を通過することができる。

10

## 【0017】

[0016] 特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、脳内皮細胞への結合に関して単一ドメイン抗体 FC5 または Bbbt0241 と競合することができる。このタイプの例示的な輸送体としては、Bbbt0626、Bbbt0727、Bbbt0632、Bbbt0654、Bbbt0726、Bbbt0732、または Bbbt0754 の VH および VL ドメインが挙げられる。

## 【0018】

[0017] 特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、脳内皮細胞への結合に関して単一ドメイン抗体 FC5 または Bbbt0241 と競合しない。このタイプの例示的な輸送体としては、Bbbt0643、Bbbt0674、Bbbt0755、Bbbt0351、Bbbt0579 または Bbbt0671 の VH および VL ドメインが挙げられる。

20

## 【0019】

[0018] 特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、ダイノルフィンにコンジュゲートさせて、ラットモデルで末梢投与される場合、BBB を通過することにより利尿を誘導することができる。特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、IL-1Ra に融合させて、ラットの坐骨神経部分結紮アッセイで末梢投与される場合、BBB を通過することにより神経因性疼痛を低減させることができる。特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、マウスモデルで末梢投与される場合、定量的全身オートラジオグラフィーによって測定される場合、小脳皮質、大脳灰白質、脊髄灰白質、脳橋、またはそれらの組合せに局在化する。

30

## 【0020】

[0019] 本開示はさらに、本明細書で提供される輸送体分子、および担体を包含する組成物を提供する。

[0020] 本開示はさらに、本明細書で提供される輸送体分子、またはそれらのフラグメントもしくはサブユニットをコードする核酸分子を包含する単離されたポリヌクレオチドを提供する。特定の形態において、核酸分子は、VH、VL、または VH および VL をコードしていてもよく、核酸分子は、配列番号 2、配列番号 11、または配列番号 2、および配列番号 11；配列番号 20、配列番号 29、または配列番号 20、および配列番号 29；配列番号 38、配列番号 47、または配列番号 38、および配列番号 47；配列番号 56、配列番号 65、または配列番号 66、および配列番号 65；配列番号 74、配列番号 83、または配列番号 74、および配列番号 83；配列番号 92、配列番号 101、または配列番号 92、および配列番号 101；配列番号 110、配列番号 119、または配列番号 110、および配列番号 119；配列番号 128、配列番号 137、または配列番号 128、および配列番号 137；配列番号 146、配列番号 155、または配列番号 146、および配列番号 155；配列番号 164、配列番号 173、または配列番号 164、および配列番号 173；配列番号 182、配列番号 191、または配列番号 182、および配列番号 191；配列番号 200；配列番号 209、配列番号 218、または配列番号 209、および配列番号 218；または配列番号 226、配列番号 227、または配列番

40

50

号 2 2 6、および配列番号 2 2 7 を含む。特定の形態において、本明細書で提供されるポリヌクレオチドはさらに、ペイロード、例えば上述したペイロードをコードする核酸を包含する。

【 0 0 2 1 】

[0021]本開示はさらに、本明細書で提供される輸送体分子、またはそれらのフラグメントもしくはサブユニットをコードする 2 つまたはそれより多くの核酸分子を包含する組成物を提供する。特定の形態において、2 つまたはそれより多くの核酸分子は、それぞれ、配列番号 2 および配列番号 1 1 ; 配列番号 2 0 および配列番号 2 9 ; 配列番号 3 8 および配列番号 4 7 ; 配列番号 5 6 および配列番号 6 5 ; 配列番号 7 4 および配列番号 8 3 ; 配列番号 9 2 および配列番号 1 0 1 ; 配列番号 1 1 0 および配列番号 1 1 9 ; 配列番号 1 2 8 および配列番号 1 3 7 ; 配列番号 1 4 6 および配列番号 1 5 5 ; 配列番号 1 6 4 および配列番号 1 7 3 ; 配列番号 1 8 2 および配列番号 1 9 1 ; 配列番号 2 0 9 および配列番号 2 1 8 ; または配列番号 2 2 6 および配列番号 2 2 7 を包含していてもよい。特定の形態において、組成物は、ペイロードをコードする核酸分子をさらに包含していてもよい。特定の形態において、組成物の 2 つまたはそれより多くの核酸分子は、同じベクター中に存在する。特定の形態において、2 つまたはそれより多くの核酸分子は、少なくとも 2 つの別々のベクター中に存在する。

10

【 0 0 2 2 】

[0022]本開示はさらに、本明細書で提供される単離されたポリヌクレオチド、または本明細書で提供される組成物の 2 つまたはそれより多くの核酸分子を包含するベクターを提供する。

20

【 0 0 2 3 】

[0023]特定の形態において、本明細書で提供されるポリヌクレオチド核酸分子は、1 つまたはそれより多くのプロモーターに作動可能に (operably) 連結されていてもよい。

[0024]特定の形態において、本開示は、本明細書で提供されるベクター、または 2 つまたはそれより多くの本明細書で提供されるベクターの組成物を包含する、単離された宿主細胞を提供する。本開示はさらに、本明細書で提供される輸送体分子の作製方法であって、( a ) 提供された宿主細胞を培養すること ; および ( b ) 輸送体分子またはそれらのフラグメントもしくはサブユニットを単離することを包含する、上記方法を提供する。特定の形態において、本方法はさらに、( c ) 輸送体分子またはそれらのフラグメントもしくはサブユニットをペイロードにコンジュゲートすることを包含する。

30

【 0 0 2 4 】

[0025]特定の形態において、本開示は、本明細書で提供される輸送体分子、本明細書で提供される組成物、本明細書で提供されるポリヌクレオチド、本明細書で提供されるベクター、または本明細書で提供される宿主細胞を包含する診断試薬を提供する。特定の形態において、本開示は、本明細書で提供される輸送体分子、本明細書で提供される組成物、本明細書で提供されるポリヌクレオチド、本明細書で提供されるベクター、または本明細書で提供される宿主細胞を包含するキットを提供する。

【 0 0 2 5 】

[0026]別の形態において、本開示は、中枢神経系 ( C N S ) の疾患、障害、または傷害を処置する方法であって、処置が必要な対象に、本明細書で提供される輸送体分子を包含する組成物を末梢投与することを包含し、輸送体分子は、B B B を通過して輸送された後に C N S に曝露されると疾患、障害、または傷害を処置することが可能な治療剤を含み、疾患、障害、または傷害を処置するのに十分な治療剤の量は、B B B を通過して輸送されることにより疾患、障害、または傷害を処置する量である、上記方法を提供する。特定の形態において、治療剤は、C N S への侵入後に輸送体分子から放出される。特定の形態において、C N S の疾患、障害、または傷害は、これらに制限されないが、多発性硬化症 ( M S )、筋萎縮性側索硬化症 ( A L S )、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄損傷、外傷性脳損傷、卒中、神経因性疼痛、神経変性、神経炎症、進行性多巣性白質脳病 ( P M L )、脳脊髄炎 ( E P L )、橋中心髄鞘崩壊症 ( C P M )、副腎白質

40

50

ジストロトフィー、アレキサンダー病、ペリツェウス - メルツバッハー病 (PMZ)、グロバイド細胞白質ジストロトフィー (クラッペ病)、ウォラー変性、視神経炎、横断性脊髄炎、放射線照射後の傷害、化学療法の神経学的合併症、急性虚血性視神経症、ビタミンE欠乏症、ビタミンE単独欠乏症候群、パッセン - コルンツヴァイク症候群、マルキアファ - ヴァ - ビニヤミ病、異染性白質ジストロトフィー、三叉神経痛、ベル麻痺、原発性腫瘍、二次転移、またはあらゆるそれらの組合せであってもよい。一形態において、治療剤は、インターロイキン - 1受容体アンタゴニスト (IL - 1Ra) であり、疾患、障害、または傷害は、神経因性疼痛である。

【0026】

[0027]本開示はさらに、対象の CNS の薬剤への曝露を増加させる方法であって、薬剤を、本明細書で提供される輸送体分子にカップリングすること、およびカップリングされた薬剤を末梢投与することを包含する、上記方法を提供する。本開示はさらに、BBBを通過して薬剤を輸送する方法であって、輸送体分子がそれらにカップリングされた薬剤をBBBを通過して輸送するように、薬剤を、本明細書で提供される輸送体分子にカップリングすることを包含する、上記方法を提供する。

10

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】[0028]図1は、不死化ラット脳内皮細胞株 (SV - ARBEC) (パネルA)、および初代ラット脳内皮細胞 (パネルB) による Bbbt0351 のトランスサイトーシスの程度を示す。結果は、Y軸に見かけの透過性として示される (cm/分) で示される。A: ナノ LC - SRM 質量分析によって測定された SV - ARBEC 細胞による、Bbbt0351 - Fc または FC5 - Fc と陰性対照の VHH 抗体とのトランスサイトーシスの比較 (Haqqani A. S. ら、Method. Mol. Pharmaceutics. 2013; 10, 1542 ~ 1556); B: ナノ LC - SRM 質量分析によって測定された初代ラット脳内皮細胞による、FC5 - Fc および Bbbt0351 - Fc のトランスサイトーシスの直接的な比較。FC5 および Bbbt0351 の両方を ヒト IgG1 - Fc のヒンジ領域に遺伝学的に融合させた; C: 10 mg/kg で静脈内注射した後の 24 時間にわたる FC5 - Fc および Bbbt0351 - Fc のマウス脳への曝露の比較; マウスを PBS で灌流し、脳を取り出し、中性洗浄剤の存在下でホモジナイズして、遠心分離後、可溶性分画に BBB 標的化分子を放出させた。メソスケールディスカバリーアッセイ技術 (Mesoscale Discovery assay technology、MSD) を介して脳への曝露を測定した。MSD は、アレイプレート上での結合事象を検出するのに電気化学発光検出を利用する。分析物、このケースでは FC5 - Fc または Bbbt0351 - Fc のいずれかを捕獲するのに、マウスモノクローナル抗ヒト Fc 捕獲抗体が使用され、この捕獲事象は、その後、蛍光タグを有するヒツジ抗ヒト IgG の結合 (H + L) を介して検出される。D: i.v. 投与後の最初の 24 時間の間における別個のタイムポイントでの血漿中の FC5 - Fc および Bbbt0351 - Fc と比較した、脳中の注射された FC5 - Fc および Bbbt0351 - Fc の比率の比較。

20

30

【図2】[0029]図2Aは、単鎖 Fv (scFv) Bbbt0241、FC5 のヒト化型の構造、およびそれに続く完全 IgG 分子または Fab 分子を形成するためのヒト IgG1 およびカッパ定常領域の付加の概略図を示す。図2Bは、scFv ライブラリーの構造を示す。CAT2.0 ライブラリービルド中にこれまでに述べられた軽鎖のライブラリーを含有する重鎖のアクセプターベクターに SfiI および XhoI エンドヌクレアーゼ制限部位を介して FC5 ドメイン抗体を指向的にクローニングした (Lloyd C. ら、Protein Eng Des Sel 2009; 22 (3); 159 ~ 68)。

40

【図3】[0030]図3Aは、蛍光微量アッセイ技術 (FMAT) アッセイの概略図を示す (Miraglia S. ら、J Biomol Screen 1999; 4 (4); 193 ~ 204)。目的の scFv は、マウス抗 his モノクローナル抗体と結合し、順にアレクサフルオロ (AlexaFluor) 647 で標識された抗マウスモノクローナル抗体と結合するヒスチジンタグと共に卵型として描写される。複合体は、scFv を介して脳内皮細胞に結合すると、細胞において蛍光の領域を発生させる。この細胞ベースの蛍光はゲーティングされ、蛍光単位 (FL - 1) としてプ

50

ロットされる。図 3 B は、F M A T アッセイにおける希釈率を増加させた F C 5 D A b および B b b t 0 2 4 1 の s c F v の B . E n d 3 細胞への結合を示す。結果は、蛍光単位 ( F L - 1 ) として示される。図 3 C は、競合 F M A T アッセイにおいて F C 5 D a b と結合した細胞の写真を示す。一定量の F C 5 D a b を、量を増加させた B b b t 0 2 4 1 または対照 h I g G 1 と共にインキュベートした。図 3 D は、図 3 C に提示されたデータの図式的な要約である。

【図 4】[0031] 図 4 A は、インビトロのトランスサイトーシスアッセイにおける単一ウェルの概略図を示す。図 4 B は、インビトロのトランスサイトーシスアッセイにおいて S V - A R B E C 細胞を介した、F C 5 - F c、B b b t 0 2 4 1 h I g G 1、および N I P 2 2 8 h I g G 1、すなわちハプテン ( B S A にコンジュゲートしたニトロフェノール ) に対して生じたアイソタイプ陰性対照 I g G のインビトロにおける輸送の程度を示す P<sub>A P P</sub> 値を提供する。

【図 5】[0032] 図 5 A は、 $\alpha$ -オピオイドアゴニストであるダイノルフィンにコンジュゲートした s c F v 分子の概略図である。図 5 B は、実施例で説明される利尿モデルに関する研究設計を示す。図 5 C は、ダイノルフィンにコンジュゲートしているかまたは遊離の陰性対照 N I P 2 2 8 h I g G 1 T M と比較した、ダイノルフィンにコンジュゲートしているかまたは遊離の B b b t 0 2 4 1 h I g G 1 T M が投与されたラットにおける経時的な尿排出量を示す。各グループにつき、n = 6。P 値は、ビヒクルに対して、および陰性対照に対して示される。従属因子として時間および処置を用いた二元配置 A N O V A を使用してデータを分析した。それに続く統計的有意性をボンフェローニの事後検定を使用して得た。

【図 6】[0033] 図 6 A は、一定量の F C 5 模倣剤 S c F v と濃度を増加させた B b b t 0 2 4 1 I g G とを使用した F M A T 競合の結果を示す。図 6 B は、一定量の F C 5 様非模倣剤 S c F v と濃度を増加させた B b b t 0 2 4 1 I g G とを使用した F M A T 競合の結果を示す。

【図 7 A】[0034] 図 7 A は、選択された F C 5 模倣剤および非模倣剤ダイノルフィンコンジュゲート ( I g G 様式 ) をラットに投与した際の尿排出量の結果を示す。n = 6。従属因子として時間および処置を用いた二元配置 A N O V A を使用してデータを分析した。それに続く統計的有意性をボンフェローニの事後検定を使用して得た。P 値が示される。

【図 7 B】図 7 B は、ダイノルフィンにコンジュゲートした N I P 2 2 8 - I g G ( 黒色のバー ) および B b b t 0 6 2 6 - I g G ( 灰色のバー ) をラットに投与した際の尿排出量の用量応答曲線を示す。n = 6。試験される動物の数のために、実験を 2 日かけて行った。結果は、これら両方の研究からの組み合わせられたデータとして提示される。

【図 8】[0035] 図 8 は、坐骨神経部分結紮アッセイで実行される概略的な外科手術を示すグラフィック表示である。

【図 9】[0036] 図 9 は、ラットにおける部分的な坐骨神経結紮によって誘導された痛覚過敏の逆戻りにおける F C 5 模倣剤 - I L 1 R a 融合体の作用を示す。1 グループ当たり n = 9 ~ 10。従属因子として時間および処置を用いた二元配置 A N O V A を使用してデータを分析した。それに続く統計的有意性をテューキーの事後検定を使用して得た。P 値が示される。

【図 10】[0037] 図 10 は、神経部分結紮によって誘導された痛覚過敏に対する用量を増加させた B b b t 0 6 2 6 - I L 1 R a 融合体の作用を示す。グループ 1 つ当たり n = 7 ~ 8。従属因子として時間および処置を用いた二元配置 A N O V A を使用してデータを分析した。それに続く統計的有意性をボンフェローニの事後検定を使用して得た。P 値が示される。

【図 11 A】[0038] 図 11 A は、神経部分結紮によって誘導された痛覚過敏に対する B b b t 0 6 2 6 - I L 1 R a 融合体の静脈内投与と皮下投与との作用を比較する。グループ 1 つ当たり n = 7 ~ 8。従属因子として時間および処置を用いた二元配置 A N O V A を使用してデータを分析した。それに続く統計的有意性をボンフェローニの事後検定を使用して得た。P 値が示される。

10

20

30

40

50

【図 1 1 B】図 1 1 B は、神経部分結紮によって誘導された痛覚過敏に対する B b b t 0 6 2 6 - I L 1 R a 融合体の静脈内投与と皮下投与との作用を比較する。グループ 1 つ当たり  $n = 7 \sim 8$ 。従属因子として時間および処置を用いた二元配置 A N O V A を使用してデータを分析した。それに続く統計的有意性をボンフェローニの事後検定を使用して得た。P 値が示される。

【図 1 2 A】[0039]図 1 2 A は、神経部分結紮によって誘導された痛覚過敏に対する B b b t 0 6 2 6 - I L 1 R a 融合体の単回および反復投与を比較する。グループ 1 つ当たり  $n = 8 \sim 10$ 。従属因子として時間および処置を用いた二元配置 A N O V A を使用してデータを分析した。それに続く統計的有意性をボンフェローニの事後検定を使用して得た。P 値が示される。

【図 1 2 B】[0039]図 1 2 B は、神経部分結紮によって誘導された痛覚過敏に対する B b b t 0 6 2 6 - I L 1 R a 融合体の単回および反復投与を比較する。グループ 1 つ当たり  $n = 8 \sim 10$ 。従属因子として時間および処置を用いた二元配置 A N O V A を使用してデータを分析した。それに続く統計的有意性をボンフェローニの事後検定を使用して得た。P 値が示される。

【発明を実施するための形態】

【0028】

定義

[0040]単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、文章中に明らかな別段の指示がない限り、複数形の指示対象を包含する。用語「1つの(a)」(または「1つの(an)」)、加えて用語「1つまたはそれより多くの」、および「少なくとも1つの」は、本明細書において同義的に使用することができる。

【0029】

[0041]さらに、「および/または」は、本明細書で使用される場合、その他のものを含むまたは含まない2つの特定のフィーチャまたは構成要素のそれぞれの具体的な開示として解釈されるものとする。したがって、用語「および/または」は、本明細書において「Aおよび/またはB」などの成句で使用される場合、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」(単独)、および「B」(単独)を包含することが意図される。同様に、用語「および/または」は、「A、B、および/またはC」などの成句で使用される場合、以下の実施態様：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A(単独)；B(単独)；およびC(単独)のそれぞれを包含することが意図される。

【0030】

[0042]別段の指定がない限り、本明細書で使用される全ての専門用語や科学用語は、本開示が関係する分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology、Juo, Pei-Show、第2版、2002、CRC Press；The Dictionary of Cell and Molecular Biology、第3版、1999、Academic Press；およびOxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology、改訂版、2000、Oxford University Pressは、当業者に本開示で使用される用語の多くの一般的な辞書を提供するものである。

【0031】

[0043]単位、接頭辞、および記号は、それらの国際単位系(SI)により容認された形態で表される。数値範囲は、範囲を定義する数値を含む。別段の指定がない限り、アミノ酸配列は、左から右へアミノからカルボキシの方向に記載される。本明細書に記載される見出しは、本開示の様々な形態または実施態様を限定するものではなく、限定は、全体として本明細書を参照することによりなされ得る。したがって、以下に定義される用語は、本明細書を全体として参照することによってより十分に定義される。

【0032】

[0044]実施態様が言語「含む」を用いて記載される場合はいつでも、「からなる」およ

10

20

30

40

50

び/または「本質的にからなる」という用語で記載されるそれ以外の類似の実施態様も提供される。

【0033】

[0045]アミノ酸は、IUPAC-IUB生化学命名法委員会によって推奨されたそれらの一般的に公知の3文字記号または1文字記号によって本明細書で記述される。同様にヌクレオチドも、それらの一般的に容認された1文字コードによって記述される。

【0034】

[0046]用語「抗体」または「免疫グロブリン」は、本明細書において同義的に使用されるように、抗体全体およびあらゆるそれらの抗原結合フラグメントまたは単鎖を包含する。

10

【0035】

[0047]典型的な抗体は、ジスルフィド結合によって相互連結された少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む。本明細書で説明されるような特定のラクダ抗体は、2つのH鎖を含むがL鎖は含まない。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書ではVHと略記される)および重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書ではVLと略記される)および軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C1で構成される。VHおよびVL領域は、フレームワーク領域(FW)と称されるより高度に保存された領域が散在した相補性決定領域(CDR)と称される超可変性を有する領域にさらに細かく分類できる。各VHおよびVLは、3つのCDRおよび4つのFWで構成されており、これらは、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順番:FW1、CDR1、FW2、CDR2、FW3、CDR3、FW4で配列される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的な補体系の第1成分(C1q)などの宿主組織または因子への結合を媒介することができる。

20

【0036】

[0048]用語「生殖細胞化(germlining)」は、抗体中の特異的な位置におけるアミノ酸が生殖細胞系のアミノ酸に逆突然変異することを意味する。

[0049]用語「抗体」は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、または前述のものの組合せなどの標的を、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を介して認識してそれに特異的に結合する免疫グロブリン分子を指す場合がある。用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、無傷のポリクローナル抗体、無傷のモノクローナル抗体、抗体フラグメント(例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFvフラグメント)、単鎖Fv(scFv)突然変異体、多重特異性抗体、例えば少なくとも2つの無傷の抗体から生成した二重特異性抗体またはそれらの抗原結合フラグメント、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原決定部分を含む融合タンパク質、および抗体が特定の生物活性を提示する限り抗原認識部位を含む他のあらゆる改変免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと称されるそれらの重鎖定常ドメインの同一性に基づいて、免疫グロブリンの5つの主要なクラス:IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、またはそれらのサブクラス(アイソタイプ)(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)のいずれかに属する可能性がある。免疫グロブリンの異なるクラスは、異なる周知のサブユニット構造および3次元立体配置を有する。抗体は、ネイキッドであってもよいし、または例えば毒素、放射性同位体などの他の分子にコンジュゲートしていてもよい。

30

40

【0037】

[0050]用語「抗原結合フラグメント」は、無傷の抗体の部分の指し、無傷の抗体の相補性を決定する可変領域を指す。抗体フラグメントの例としては、これらに限定されないが、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFvフラグメント、直鎖状抗体、単鎖抗体(例えば、scFv)、ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げ

50

られる。

【0038】

[0051]「モノクローナル抗体」は、単一の抗原決定基、またはエピトープの高度に特異的な認識および結合に關与する均質な抗体集団を指す。これは、典型的には異なる抗原決定基に対して向けられた異なる抗体を包含するポリクローナル抗体とは対照的である。用語「モノクローナル抗体」は、無傷のおよび全長モノクローナル抗体の両方、加えて抗体フラグメント（例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv）、単鎖（scFv）突然変異体、抗体の部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む他のあらゆる改変された免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」は、これらに限定されないが、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、およびトランスジェニック動物などにより様々な方法で作製された抗体を指す。

10

【0039】

[0052]用語「ヒト化抗体」は、最小の非ヒト（例えば、マウス）配列を含有するように操作された非ヒト（例えば、マウス）免疫グロブリンから誘導された抗体を指す。典型的には、ヒト化抗体は、相補性決定領域（CDR）からの残基が、目的の特異性、親和性、および/または能力を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、またはハムスター）のCDRからの残基で置き換えられているヒト免疫グロブリンである（Jonesら、1986、Nature、321：522～525；Riechmannら、1988、Nature、332：323～327；Verhoeyenら、1988、Science、239：1534～1536）。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FW）残基は、目的の特異性、親和性、および/または能力を有する非ヒト種からの抗体における対応する残基で置き換えられている。

20

【0040】

[0053]ヒト化抗体は、抗体の特異性、親和性、および/または能力をより正確にし、最適化するために、Fvフレームワーク領域中および/または置き換えられた非ヒト残基内のいずれかにおいて追加の残基の置換によりさらに改変されていてもよい。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDR領域の全部または実質的に全部を含有する少なくとも1つ、典型的には2つまたは3つの可変ドメインの実質的に全部を含むと予想され、それに対してFR領域の全部または実質的に全部は、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリンの定常領域またはドメイン（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含んでいてもよい。ヒト化抗体を生成するのに使用される方法の例は、米国特許第5,225,539号または5,639,641号に記載されている。

30

【0041】

[0054]抗体の「可変領域」は、単独または組合せのいずれかの、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域はそれぞれ、高度可変領域としても公知の3つの相補性決定領域（CDR）によって連結される4つのフレームワーク領域（FW）からなる。各鎖におけるCDRは、FW領域によって近接して一緒に保持されており、他方の鎖からのCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するための少なくとも2つの技術：（1）異種間の配列の変動に基づくアプローチ（すなわち、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest（第5版、1991、国立衛生研究所（National Institutes of Health）、メリーランド州ベセスダ））；および（2）抗原-抗体複合体の結晶学的な研究に基づくアプローチ（Al-lazikaniら（1997）J. Molec. Biol. 273：927～948）がある。加えて、これらの2つのアプローチの組合せが、時にはCDRを決定するために当業界において使用される。

40

【0042】

[0055]カバット（Kabat）のナンバリングシステムは、一般的に、可変ドメイン中の残基（およそ軽鎖の残基1～107および重鎖の残基1～113）（例えば、Kabatら、Sequences of Immunological Interest、第5版、公衆衛生局（Public Health Service）、国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダ（1991））を指す場合に使用される。

【0043】

50

[0056]Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、公衆衛生局、国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダ(1991)において、カバットでなされるようなアミノ酸位置のナンバリングは、抗体のコンパイルにおける重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに使用されるナンバリングシステムを指す。以下の表1を参照されたい。このナンバリングシステムを使用する場合、実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのFWまたはCDRの短縮またはそれらへの挿入に相当するより少ないまたは追加のアミノ酸を含有する可能性がある。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後に、単一のアミノ酸の挿入(カバットに従って、残基52a)、および重鎖FWの残基82の後に、挿入された残基(例えば、カバットに従って残基82a、82b、および82cなど)を包含し得る。

10

【0044】

【表1】

ループ	カバット	AbM	コチア
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32...34 (カバットのナンバリング)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32 (コチアのナンバリング)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

20

【0045】

[0057]カバットの残基ナンバリングは、所与の抗体に関して、抗体配列の相同性領域における「標準的な」カバットでナンバリングされた配列とのアライメントによって決定することができる。一方でコチア(Chothia)は、構造的なループの配置を参照する(ChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol. 196: 901~917(1987))。コチアのCDR-H1ループの末端は、カバットのナンバリングの慣例を使用してナンバリングした場合、ループの長さに応じてH32とH34とで異なる(これはなぜなら、カバットのナンバリングスキームはH35AおよびH35Bに挿入を置くためであり、35Aも35Bも存在しない場合、ループの末端は32であり、35Aのみ存在する場合、ループの末端は33であり、35Aおよび35Bの両方が存在する場合、ループの末端は34である)。AbMの高度可変領域は、カバットのCDRとコチアの構造的なループとの組合せにより示され、オックスフォードモレキュラー(Oxford Molecular)のAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用される。

30

【0046】

[0058]IMGT(ImMunoGeneTics)はまた、CDRなどの免疫グロブリン可変領域に関するナンバリングシステムも提供する。例えば、参照により本発明に組み入れられるLefranc, M.P.ら、Dev. Comp. Immunol. 27: 55~77(2003)を参照されたい。IMGTナンバリングシステムは、5,000個より多くの配列のアライメント、構造データ、および高度可変ループの特徴付けに基づいたものであり、全ての種ごとの可変およびCDR領域の簡単な比較を可能にする。IMGTナンバリングの概要に従えば、H-CDR1は、26位から35位にあり、H-CDR2は、51位から57位にあり、H-CDR3は、93位から102位にあり、L-CDR1は、27位から32位にあり、L-CDR2は、50位から52位にあり、L-CDR3は、89位から97位にある。

40

【0047】

[0059]本明細書全体にわたり使用されているように、記載されるVH CDR配列は古

50

典型的なカバットのナンバリング配置に対応しており、すなわちカバットH - CDR 1は、31～35位にあり、H - CDR 2は、50～65位にあり、H - CDR 3は、95～102位にある。L - CDR 2およびL - CDR 3もまた、古典的なカバットのナンバリング配置に対応しており、すなわちそれぞれ50～56位および89～97位である。本明細書で使用される場合、用語「L - CDR 1」または「軽鎖CDR 1」は、VLにおいてカバットの23～34位に配置された配列に対応する（対照的に、カバットのナンバリングの概要に従う古典的なL - CDR 1配置は24～34位に対応する）。

【0048】

[0060]本明細書で使用される場合、用語「Fc領域」は、第1の定常領域免疫グロブリンドメイン（例えば、CH1）を除く抗体の定常領域を含むポリペプチド、およびそれらのフラグメントを包含する。したがってFcは、IgA、IgD、およびIgGの最後の2つの定常ドメイン、ならびにIgEおよびIgMの最後の3つの定常ドメイン、ならびに任意選択でこれらのドメインへのフレキシブルなヒンジ領域のN末端を指す。IgAおよびIgMの場合、Fc領域は、J鎖を包含する場合もある。IgGの場合、Fcは、免疫グロブリンドメインCガンマ2およびCガンマ3（C<sub>2</sub>およびC<sub>3</sub>）、ならびに任意選択でCガンマ1（C<sub>1</sub>）とCガンマ2（C<sub>2</sub>）との間にヒンジ領域を含む。

10

【0049】

[0061]Fc領域の境界は変動する可能性があるが、ヒトIgGの重鎖Fc領域は通常、残基C226またはP230からそのカルボキシル末端を含むと規定され、ここでナンバリングは、Kabat（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、公衆衛生局、国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダ（1991））に記載された通りのEUインデックスに従う。Fcは、単独でこの領域を指す場合もあるし、または抗体、抗体フラグメント、またはFc融合タンパク質の環境中のこの領域を指す場合もある。

20

【0050】

[0062]抗体定常領域内の多数の異なる位置（例えば、これらに限定されないが、カバットに記載された通りEUインデックスによってナンバリングした場合、270位、272位、312位、315位、356位、および358位などのFc位置）で、多形が観察されており、したがって本発明の配列と従来技術における配列とのわずかな差が存在する可能性がある。ヒト免疫グロブリンの多形体は、よく特徴付けられている。今のところ、18Gmアロタイプ：G1m（1、2、3、17）またはG1m（a、x、f、z）、G2m（23）またはG2m（n）、G3m（5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28）またはG3m（b1、c3、b3、b0、b3、b4、s、t、g1、c5、u、v、g5）が公知である（Lefrancら、The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford、43～78頁（1990）；Lefranc, G.ら、1979, Hum. Genet.: 50, 199～211）。本発明の開示の抗体は、あらゆる免疫グロブリン遺伝子のあらゆるアロタイプ、同型アロタイプ（isotype）、またはハプロタイプを組み込むことができ、したがって本明細書で提供される配列のアロタイプ、同型アロタイプまたはハプロタイプに限定されないことが予想される。

30

【0051】

[0063]本明細書で使用される場合、用語「Fc融合タンパク質」は、全長Fcドメインを含むタンパク質（例えば、本発明の開示のコンジュゲート化合物）に加えて、Fcドメインフラグメント（例えば、完全CH2ドメイン、完全CH3ドメイン、CH2フラグメント、CH3フラグメント、またはそれらの組合せ）を含むタンパク質を包含する。Fc融合タンパク質はまた、ヒンジ領域の全部または一部を含んでいてもよい。

40

【0052】

[0064]用語「ヒト抗体」は、ヒトによって生産された抗体、または当業界において公知のあらゆる技術を使用して作製されたヒトによって生産された抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。このヒト抗体の定義は、無傷または全長抗体、それらのフラグメント、ならびに/または少なくとも1つのヒト重鎖および/もしくは軽鎖ポリペプチ

50

ドを含む抗体、例えば、マウス軽鎖およびヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体などを包含する。

【0053】

[0065]用語「キメラ抗体」は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つまたはそれより多くの種から誘導されている抗体を指す。典型的には、軽鎖と重鎖両方の可変領域が、目的の特異性、親和性、および/または能力を有する1種の哺乳動物種（例えば、マウス、ラット、ウサギなど）から誘導された抗体の可変領域に対応し、同時に、その種における免疫応答の惹起を回避するために、定常領域が別の種（通常ヒト）から誘導された抗体中の配列に相同である。

【0054】

[0066]「結合親和性」は、一般的に、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間における総計の非共有結合による相互作用の強度を指す。別段の指定がない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原との）間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般的に解離定数（ $K_D$ ）によって表すことができる。親和性は、本明細書で説明される方法などの当業界において公知の一般的な方法によって測定することができる。低い親和性の抗体は、一般的に、抗原とゆっくり結合し、容易に解離する傾向があるが、それに対して高親和性の抗体は、一般的に、抗原とより速く結合し、より長く結合したままである傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当業界において公知であり、そのうちいずれかを本発明の開示の目的のために使用することができる。

【0055】

[0067]「効力」は通常、別段の指定がない限り、 $IC_{50}$ 値としてnMまたはpMで表される。 $IC_{50}$ は、抗体分子の中央値の阻害濃度である。機能アッセイにおいて、 $IC_{50}$ は、生体反応をその最大値の50%に低減する濃度である。リガンド結合研究において、 $IC_{50}$ は、受容体結合を最大の特異的な結合レベルの50%に低減する濃度である。 $IC_{50}$ は、当業界において公知の様々な手段によって計算することができる。

【0056】

[0068]本開示の抗体またはポリペプチドに関する効力向上の参照抗体と比較した場合の倍率は、少なくとも約2倍、少なくとも約4倍、少なくとも約6倍、少なくとも約8倍、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約60倍、少なくとも約70倍、少なくとも約80倍、少なくとも約90倍、少なくとも約100倍、少なくとも約110倍、少なくとも約120倍、少なくとも約130倍、少なくとも約140倍、少なくとも約150倍、少なくとも約160倍、少なくとも約170倍、または少なくとも約180倍またはそれより高い倍率であり得る。

【0057】

[0069]「単離された」ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、天然に見出されない形態のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物である。単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物は、それらが天然に見出される形態でなくなる程度に精製されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物を包含する。一部の実施態様において、単離された抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、実質的に純粋である。

【0058】

[0070]「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」は、診断、予後予測、または療法の必要を示すあらゆる対象、特に哺乳類対象を意味する。哺乳類対象としては、ヒト、家畜、家畜、競技用動物、および動物園の動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、クマなどが挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 9 】

[0071]用語「医薬組成物」は、活性成分の生物活性を有効にすることができるような形態を有し、組成物が投与されると予想される対象にとって容認し難い程毒性である追加の要素を含有しない調製物を指す。このような組成物は、滅菌されていてもよい。

## 【 0 0 6 0 】

[0072]本明細書で開示される抗体の「有効量」は、具体的に述べられた目的を達成するのに十分な量である。「有効量」は、述べられた目的に関して、経験的に決定してもよいし、慣例的な方式で決定してもよい。

## 【 0 0 6 1 】

[0073]用語「治療有効量」は、対象または哺乳動物において疾患または障害を「処置」または「予防」するのに有効な抗体または他の薬物の量を指す。

[0074]言葉「標識」は、本明細書で使用される場合、「標識された」抗体が生成されるように抗体に直接的または間接的にコンジュゲートした検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自身検出可能であってもよいし（例えば、放射線同位体標識または蛍光標識）、または酵素標識のケースでは、検出することができる基質化合物または組成物の化学的変更を触媒してもよい。

## 【 0 0 6 2 】

[0075]「処置すること」または「処置」または「処置するため」または「改善すること」または「改善するため」などの用語は、（１）診断された病理学的な症状または障害の症状を治癒する、スローダウンさせる、減らす、および／または診断された病理学的な症状または障害の進行を止める治療的手段、ならびに（２）標的化された病理学的な症状または障害の発生を予防する、および／または遅延させる予防的または予防的措置の両方を指す。したがって、処置が必要な者としては、障害を有する者；障害を有しやすい者；および障害を予防しようとする者が挙げられる。特定の実施態様において、患者が、例えば、炎症性または自己免疫性の疾患または障害に関連する症状の全体的、部分的または一過性の改善または消失を示す場合、その対象は、本明細書で提供される方法に従ってその疾患または障害についてうまく「処置」されている。

## 【 0 0 6 3 】

[0076]「ポリヌクレオチド」、または「核酸」は、本明細書において同義的に使用されるように、あらゆる長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNAを包含する。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、改変されたヌクレオチドもしくは塩基、および／もしくはそれらの類似体、またはDNAもしくはRNAポリメラーゼによってポリマーに取り込むことができるあらゆる基質であり得る。ポリヌクレオチドは、改変されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチドおよびそれらの類似体を含んでいてもよい。前記の説明は、RNAおよびDNAなどの本明細書で述べられた全てのポリヌクレオチドに適用される。

## 【 0 0 6 4 】

[0077]用語「発現」は、本明細書で使用される場合、遺伝子が本明細書で提供される生化学的分子、例えば輸送体分子を生産するプロセスを指す。このプロセスは、細胞内における遺伝子の機能性の存在、例えば、これらに限定されないが、遺伝子ノックダウン、加えて一過性発現と安定な発現の両方などのあらゆる顕示化を包含する。そのようなものとしては、これらに限定されないが、遺伝子の１つまたはそれより多くのmRNAへの転写、およびこのようなmRNAの１つまたはそれより多くのポリペプチドへの翻訳が挙げられる。最終産物が生化学的物質である場合、発現は、その生化学的物質およびあらゆる前駆体の生成を包含する。

## 【 0 0 6 5 】

[0078]「発現産物」は、核酸、例えば遺伝子の転写によって生産されたメッセンジャーRNA、またはポリペプチドのいずれかであり得る。本明細書に記載される発現産物としてはさらに、転写後修飾、例えばポリアデニル化を有する核酸、または翻訳後修飾、例えばメチル化、糖付加、脂質付加、他のタンパク質サブユニットとの連結、タンパク質分解

10

20

30

40

50

切断、および同種のものを有するポリペプチドが挙げられる。

【0066】

[0079]用語「ベクター」または「発現ベクター」は、本明細書では、宿主細胞中に導入して目的の発現産物を発現させるための媒体として使用されるベクターを意味するものとして使用される。当業者公知のように、このようなベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルスおよびレトロウイルスからなる群より容易に選択することができる。一般的に、ベクターは、選択マーカー、特定の核酸のクローニングを容易にするための適切な制限部位、ならびに真核または原核細胞中に入るおよび/またはそこで複製する能力を含んでいてもよい。ベクターの例としては、これらに限定されないが、ウイルスベクター、裸のDNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、カチオン性縮合剤と連結されたDNAまたはRNA発現ベクター、リボソーム中に封入されたDNAまたはRNA発現ベクター、および特定の真核細胞、例えばプロデューサー細胞が挙げられる。

10

【0067】

[0080]用語「宿主細胞」は、組換えDNA技術を使用して構築され、少なくとも1つの発現産物をコードするベクターを有する細胞を指す。組換え宿主から発現産物を単離するためのプロセスの記載において、用語「細胞」および「細胞培養物」は、同義的に使用され、明かに別段の指定がない限り発現産物の源を示し、すなわち、「細胞」からの発現産物の回収は、遠沈させた全細胞からの回収、または培地と懸濁された細胞の両方を含有する細胞培養物からの回収のいずれかを意味する。

20

【0068】

[0081]用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、本明細書において同義的に使用され、あらゆる長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは、直鎖状でもよいし、または分岐状でもよく、改変されたアミノ酸を含んでいてもよいし、その間に非アミノ酸が介在していてもよい。これらの用語はまた、天然に改変された、または介入；例えば、ジスルフィド結合形成、糖付加、脂質化、アセチル化、リン酸化、または他のあらゆる操作もしくは改変、例えば標識要素とのコンジュゲーションによって改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。また、例えば、1つまたはそれより多くのアミノ酸類似体（例えば、天然にはないアミノ酸など）、加えて当業界において公知の他の改変を含有するポリペプチドもこの定義内に包含される。本開示のポリペプチドは抗体をベースとしているため、特定の実施態様において、ポリペプチドは、単鎖または連結された鎖として生じる可能性があることが理解される。

30

【0069】

[0082]2つまたはそれより多くの核酸またはポリペプチドの状況における用語「同一性」またはパーセント「同一性」は、2つまたはそれより多くの配列または部分配列が、配列同一性の一部としていかなる保存的アミノ酸置換も考慮に入れずに対応が最大になるように比較して並べられた（必要に応じてギャップを導入して）場合、同じか、または同じヌクレオチドまたはアミノ酸残基の特定のパーセンテージを有することを指す。パーセント同一性は、配列比較ソフトウェアまたはアルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定することができる。アミノ酸またはヌクレオチド配列のアライメントを得るのに使用することができる様々なアルゴリズムおよびソフトウェアが当業界において公知である。

40

【0070】

[0083]このような配列アライメントアルゴリズムの1つの非限定的な例は、Karlinら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci.、87：2264-2268、改変版として、Karlinら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci.、90：5873-5877に記載されるアルゴリズムであり、NBLASTおよびXBLASTプログラム（Altschulら、1991、Nucleic Acids Res.、25：3389～3402）に取り入れられている。特定の実施態様において、ギャップ有りBLASTは、Altschulら、1997、Nucleic Acids Res. 25：3389～3402で説明されるようにして使用することができる。配列を並べるのに使用することができる追加の公共的に利用可能なソフトウェア

50

プログラムは、BLAST-2、WU-BLAST-2 (Altschulら、1996、Methods in Enzymology、266:460~480)、ALIGN、ALIGN-2 (ジェネンテック (Genentech)、カリフォルニア州サウスサンフランシスコ) またはメガライン (Megalign) (DNA STAR) である。特定の実施態様において、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムを使用して (例えば、NWsgapdna.CMPマトリックス、および40、50、60、70、または90のギャップウェイト、および1、2、3、4、5、または6のレングスウェイトを使用して) 決定される。特定の代替の実施態様において、NeedlemanおよびWunschのアルゴリズム (J. Mol. Biol. (48):444~453(1970)) を取り込んだGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムを使用して、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性を決定することができる (例えば、BLOSUM62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、および16、14、12、10、8、6、または4のギャップウェイト、および1、2、3、4、5のレングスウェイトを使用して)。代替として、特定の実施態様において、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のパーセント同一性は、MyersおよびMyersのアルゴリズム (CABIOS、4:11~17(1989)) を使用して決定される。例えば、パーセント同一性は、ALIGNプログラム (バージョン2.0) を使用して、およびPAM120を残基表、12のギャップの伸長ペナルティーおよび4のギャップペナルティーで使用して決定することができる。当業者は、特定のアライメントソフトウェアによって、最大のアライメントにとって適切なパラメーターを決定することができる。特定の実施態様において、アライメントソフトウェアのデフォルトパラメーターが使用

10

20

#### 【0071】

[0084] 特定の実施態様において、第1のアミノ酸配列の第2の配列アミノ酸に対するパーセンテージ同一性「X」は、 $100 \times (Y/Z)$  として計算され、式中Yは、第1および第2の配列のアライメント中の同一なマッチとしてスコア付けされたアミノ酸残基の数 (目視検査または特定の配列アライメントプログラムによって並べられた場合) であり、Zは、第2の配列中の残基の総数である。第1の配列の長さが第2の配列より長い場合、第1の配列の第2の配列に対するパーセント同一性は、第2の配列の第1の配列に対するパーセント同一性より高いと予想される。

#### 【0072】

[0085] 「保存的アミノ酸置換」は、1つのアミノ酸残基が類似の側鎖を有する別のアミノ酸残基で置き換えられている置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当業界で定義されており、塩基性側鎖 (例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性極性側鎖 (例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖 (例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ分岐側鎖 (例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン) および芳香族側鎖 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) を包含する。例えば、チロシンをフェニルアラニンで置換することは、保存的置換である。特定の実施態様において、本開示のポリペプチドおよび抗体の配列における保存的置換は、そのアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたは抗体の、抗原、すなわちそのポリペプチドまたは抗体が結合するIL-21への結合を無効にしない。抗原結合をなくさないヌクレオチドおよびアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、当業界において周知である (例えば、Brummellら、Biochem. 32:1180~1187(1993); Kobayashiら、Protein Eng. 12(10):879~884(1999); およびBurksら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412~417(1997) を参照)。

30

40

#### 【0073】

[0086] 用語「コンセンサス配列」は、本明細書で軽鎖 (VL) および重鎖 (VH) 可変領域に関して使用される場合、VLまたはVH鎖内のどのアミノ酸残基が、抗原結合を損なわずに改変を受け入れることができるかに関する情報に基づき定義された、複合的な、

50

または一般名称化したV LまたはV H配列を指す。したがって、V LまたはV H鎖の「コンセンサ配列」において、特定のアミノ酸位置は、その位置における複数の可能性のあるアミノ酸残基の1つによって占められる。例えば、アルギニン(R)またはセリン(S)が特定の位置に存在する場合、コンセンサ配列内のその特定の位置は、アルギニンまたはセリン(RまたはS)のいずれかであり得る。V HおよびV L鎖のコンセンサ配列は、例えば、インビトロにおける親和性の成熟(例えば、縮重をコードするプライマーを使用して、特定のC D R中のアミノ酸位置毎に無作為化すること)、抗体C D R内のアミノ酸残基の変異誘発スキャンすること(例えば、アラニンスキャンニング変異)、または当業界において公知の他のあらゆる方法を行い、それに続き抗原への突然変異体の結合を評価して、突然変異したアミノ酸位置が抗原結合に影響を与えるかどうかを決定することによって定義することができる。一部の実施態様において、突然変異は、C D R領域に導入される。他の実施態様において、突然変異は、フレームワーク領域に導入される。いくつかの他の実施態様において、突然変異は、C D Rおよびフレームワーク領域に導入される。

10

20

30

40

50

#### 【0074】

##### 血液脳関門輸送体分子

[0087]本開示は、ペイロードと連結したままで、例えば、ペイロードに融合またはコンジュゲートしたままで脳内皮細胞を通過することができる輸送体分子を使用して、目的の物質、例えば治療剤または診断剤または「ペイロード」を血液脳関門(B B B)を通過して送達するための組成物を提供する。本明細書で使用される場合、用語「ペイロード」は、本明細書で提供される輸送体分子によってB B Bを通過する輸送を促進することができるあらゆる物質の省略表現として使用される。ペイロードは、例えば融合ポリペプチドとして輸送体分子の一部であってもよいし、またはジスルフィド結合または他の共有結合を介してポリペプチドに合体していてもよい。代替として、ペイロードは、さらに後述されるように、輸送体分子をB B Bを通過したその輸送が容易になるような状態にすることができるあらゆる方法で輸送体分子と連結していてもよい。特定の形態において、ペイロードは、B B B輸送後も輸送体分子の一部のままであり、その形態で中枢神経系(C N S)活性を保持する。代替として、ペイロードは、B B B輸送中に輸送体分子と連結しているが、B B B輸送後に輸送体分子から解離できるようになっていてもよい。ペイロード部分の例示的な非限定的な例は、本明細書の他所に提供されている。本開示はさらに、このような輸送体分子の使用を含む、C N Sの疾患または障害を処置または診断するための方法を提供する。

#### 【0075】

[0088]特定の形態において、本開示は、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドを含む単離された輸送体分子を提供する。特定の形態において、該ポリペプチドは、脳微小血管内皮細胞(B M V E C)、例えば、マウスB . E n d 3細胞への結合を検出するために蛍光微量アッセイ技術(F M A T)を使用して同定され単離された、ラクダ抗体F C 5のヒト化型である。特定の形態において、該ポリペプチドは、B M V E Cへの結合を検出するために再度F M A Tを使用して同定され単離された、F C 5からの2つの重鎖相補性決定領域(C D R)を含む、ナイーブs c F vファージライブラリーまたはs c F vファージライブラリーから単離された抗体V Hおよび抗体V Lを含む。特定の形態において、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドは、抗体またはそれらの活性なフラグメントであり、ここで「活性な」は、輸送体分子が、例えば、1つまたはそれより多くの種におけるB M V E C、例えば、マウスB M V E C、ラットB M V E C、カニクイザルB M V E C、またはヒトB M V E Cに結合する、1つまたはそれより多くの種のB M V E Cに内在化する、および/または単独で、またはペイロードと連結した状態のいずれかで血液脳関門を通過することができることを意味する。特定の形態において、輸送体分子は、B b b t 0 2 4 1、B b b t 0 3 5 1、B b b t 0 6 2 6、B b b t 0 6 3 2、B b b t 0 6 5 4、B b b t 0 7 2 6、B b b t 0 7 2 7、B b b t 0 7 3 2、B b b t 0 7 5 4、B b b t 0 6 7 4、B b b t 0 7 5 5、B b b t 0 6 4 3、B b b t 0 5 7 9またはB b b t

0671の1つまたはそれより多くを含む。

【0076】

[0089]特定の形態において、輸送体分子は、BMVECに結合しないが、それでもなおインピットのトランスサイトーシスアッセイで示されるようにBBBを通過して輸送することが可能である。特定の形態において、この輸送体分子は、は、FC5より高い効率でBBBを通過する。特定の形態において、この輸送体分子は、2つのアミノ酸置換、カバットの97位におけるT97A置換、およびカバットの100a位におけるT100aD置換を除いてFC5のアミノ酸配列に同一であり、Bbbt0351のアミノ酸配列(配列番号200)を有する。

【0077】

[0090]特定の形態において、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖相補性決定領域(CDR)を含む。例えば免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖相補性決定領域-1(H-CDR1)、免疫グロブリン重鎖相補性決定領域-2(H-CDR2)、免疫グロブリン重鎖相補性決定領域-3(H-CDR3)を包含していてもよい。特定の形態において、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドは、免疫グロブリン軽鎖CDRを追加で含んでもよいし、または代替として含んでもよい。例えば、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドは、相補性決定領域-1(L-CDR1)、免疫グロブリン軽鎖相補性決定領域-2(L-CDR2)、および免疫グロブリン軽鎖相補性決定領域-3(L-CDR3)を包含していてもよい。特定の形態において、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドは、それぞれ以下のアミノ酸配列を有するH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2、およびL-CDR3を含有していてもよい：

(a) Bbbt0241のCDRである、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号12、配列番号13、および配列番号14；

(b) Bbbt0626のCDRに類似したCDRである、配列番号21、配列番号22、配列番号23、QGDSLX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>YYX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>(式中X<sub>2</sub>=TまたはRであり；X<sub>3</sub>=S、R、またはTであり；X<sub>4</sub>=AまたはTであり；X<sub>5</sub>=NまたはSである)(配列番号229)、GX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>NRPS(式中X<sub>8</sub>=KまたはEであり、X<sub>9</sub>=NまたはDである)(配列番号230)、およびNSRD X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>G X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>V(式中X<sub>13</sub>=SまたはNであり；X<sub>14</sub>=SまたはTであり；X<sub>15</sub>=N、K、またはHであり；X<sub>16</sub>=HまたはPであり；X<sub>17</sub>=VまたはWである)(配列番号231)；

(c) Bbbt0632のCDRに類似したCDRである、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号229、配列番号230、および配列番号231；

(d) Bbbt0654のCDRである、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号66、配列番号67、および配列番号68；

(e) Bbbt0726のCDRに類似したCDRである、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号229、配列番号230、および配列番号231；

(f) Bbbt0727のCDRに類似したCDRである、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号229、配列番号230、および配列番号231；

(g) Bbbt0732のCDRに類似したCDRである、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号229、配列番号230、および配列番号231；

(h) Bbbt0754のCDRである、配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号138、配列番号139、および配列番号140；

(i) Bbbt0674のCDRである、配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号156、配列番号157、および配列番号158；

(j) Bbbt0755のCDRである、配列番号165、配列番号166、配列番号167、配列番号174、配列番号175、および配列番号176；

(k) Bbbt0643のCDRである、配列番号183、配列番号184、配列番号185、配列番号192、配列番号193、および配列番号194；または

(l) Bbbt0579のCDRである、配列番号210、配列番号211、配列番号

10

20

30

40

50

2 1 2、配列番号 2 1 9、配列番号 2 2 0、配列番号 2 2 1。

【 0 0 7 8 】

[0091]特定の代替の実施態様において、上述した1つまたはそれより多くのCDRは、例えば1、2、3、4、または5つの単一のアミノ酸の欠失、置換または挿入を有すること除いて、列挙されたCDRと同一である。特定の実施態様において、上記で提供される輸送体分子は、血液脳関門を通過することができる。特定の形態において、B b b t 0 2 4 1 バリエーションである B b b t 0 2 4 1 m の H - C D R 3 は、2つの置換、カバットの97位におけるT 9 7 A置換、およびカバットの100a位におけるT 1 0 0 a D置換を含む。

【 0 0 7 9 】

[0092]特定の形態において、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドは、それぞれ以下のアミノ酸配列を有するH - C D R 1、H - C D R 2、H - C D R 3、L - C D R 1、L - C D R 2、およびL - C D R 3を含有していてもよい：

( b ) B b b t 0 6 2 6 の C D R である、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 3 0、配列番号 3 1、および配列番号 3 2 ；

( c ) B b b t 0 6 3 2 の C D R である、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 1、配列番号 4 8、配列番号 4 9、および配列番号 5 0 ；

( e ) B b b t 0 7 2 6 の C D R である、配列番号 7 5、配列番号 7 6、配列番号 7 7、配列番号 8 4、配列番号 8 5、および配列番号 8 6 ；

( f ) B b b t 0 7 2 7 の C D R である、配列番号 9 3、配列番号 9 4、配列番号 9 5、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、および配列番号 1 0 4 ；または

( g ) B b b t 0 7 3 2 の C D R である、配列番号 1 1 1、配列番号 1 1 2、配列番号 1 1 3、配列番号 1 2 0、配列番号 1 2 1、および配列番号 1 2 2 。

【 0 0 8 0 】

[0093]特定の代替の実施態様において、上述した1つまたはそれより多くのCDRは、例えば1、2、3、4、または5つの単一のアミノ酸の欠失、置換または挿入を有すること除いて、列挙されたCDRと同一である。特定の実施態様において、上記で提供される輸送体分子は、血液脳関門を通過することができる。

【 0 0 8 1 】

[0094]特定の形態において、H - C D R 1、H - C D R 2、H - C D R 3、L - C D R 1、L - C D R 2、およびL - C D R 3は、抗体V Hおよび抗体V Lが生産されるように免疫グロブリンフレームワーク領域中に存在していてもよい。特定の形態において、フレームワーク領域は、ヒトから誘導されたフレームワーク領域であってもよい。特定の形態において、抗体V Hおよび抗体V Lは、例えばフレキシブルなペプチドリンカーを介して一緒に融合され、s c F v分子を形成する。特定の形態において、V HおよびV Lは、1つまたはそれより多くの免疫グロブリンの定常ドメイン、例えば、C H 1ドメイン、ヒンジ領域、C H 3ドメイン、C H 3ドメイン、C L - カップドメイン、および/またはC L ラムダドメインをさらに含む。特定の形態において、1つまたはそれより多くの免疫グロブリンの定常ドメインは、ヒト免疫グロブリン、例えば、ヒトI g G 1免疫グロブリンから誘導される。特定の形態において、例えば、より長いもしくはより短い半減期、増加したもしくは低減したエフェクター機能、またはペプチド融合、ジスルフィド結合もしくは化学的なコンジュゲーションのいずれかを介してペイロード分子を接続する能力を助長するために、V H、V L、および/または定常ドメインは、突然変異を含んでいてもよい。

【 0 0 8 2 】

[0095]特定の形態において、本開示は、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドを含む単離された輸送体分子であって、該ポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖可変領域(V H)領域、免疫グロブリン軽鎖可変領域(V L)領域または免疫グロブリンV H領域および免疫グロブリンV L領域を含む、上記輸送体分子を提供する。特定の形態において、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドは、以下を含む：

( a ) 配列番号 2 に少なくとも 8 0 %、8 4 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9

10

20

30

40

50

7%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号11に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号2および配列番号11は、B b b t 0 2 4 1のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；

(b) 配列番号20に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号29に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号20および配列番号29は、B b b t 0 6 2 6のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；

(c) 配列番号38に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号47に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号38および配列番号47は、B b b t 0 6 3 2のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；

(d) 配列番号56に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号65に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号56および配列番号65は、B b b t 0 6 5 4のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；

(e) 配列番号74に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号83に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号74および配列番号83は、B b b t 0 7 2 6のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；

(f) 配列番号92に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号101に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号92および配列番号101は、B b b t 0 7 2 7のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；

(g) 配列番号110に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号119に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号110および配列番号119は、B b b t 0 7 3 2のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；

(h) 配列番号128に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号137に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号128および配列番号137は、B b b t 0 7 5 4のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；

(i) 配列番号146に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号155に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号146および配列番号155は、B b b t 0 6 7 4のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；

(j) 配列番号164に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号173に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号164および配列番号173は、B b b t 0 7 5 5のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；

(k) 配列番号182に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%

10

20

30

40

50

、 97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号191に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号182および配列番号191は、B b b t 0643のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；

(1) 配列番号209に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号218に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号209および配列番号218は、B b b t 0579のVHおよびVL領域をコードする、上記配列；または

(m) 配列番号226に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVHアミノ酸配列、および配列番号227に少なくとも80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なVLアミノ酸配列であって、配列番号226および配列番号227は、B b b t 0671のVHおよびVL領域をコードする、上記配列。

#### 【0083】

特定の形態において、上記で提供される輸送体分子は、輸送体活性を有し、例えば、輸送体分子は、1つまたはそれより多くの種からのBMVEC、例えば、マウス、ラット、カニクイザル、またはヒトBMVECに結合することができるか、輸送体分子は、1つまたはそれより多くの種のBMVECに内在化することができるか、または輸送体分子は、血液脳関門を通過することができる。

#### 【0084】

[0096]特定の形態において、本開示は、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドを含む単離された輸送体分子であって、該ポリペプチドは、VH領域およびVL領域を含み、ここで、

(a) VHは配列番号2を含み、VLは配列番号11を含み；

(b) VHは配列番号20を含み、VLは、S S E L T Q D P A V S V A L X<sub>1</sub> Q T V R I T C Q G D S L X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> Y Y X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> W Y Q X<sub>6</sub> K P G Q A P V L V X<sub>7</sub> Y G X<sub>8</sub> X<sub>9</sub> N R P S G X<sub>10</sub> P D R F S G S X<sub>11</sub> S G X<sub>12</sub> T A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C N S R D X<sub>13</sub> X<sub>14</sub> G X<sub>15</sub> X<sub>16</sub> X<sub>17</sub> V F G G G T K L T V L (式中X<sub>1</sub> = RまたはGであり；X<sub>2</sub> = TまたはRであり；X<sub>3</sub> = S、R、またはTであり；X<sub>4</sub> = AまたはTであり；X<sub>5</sub> = NまたはSであり；X<sub>6</sub> = HまたはQであり；X<sub>7</sub> = MまたはIであり；X<sub>8</sub> = KまたはEであり；X<sub>9</sub> = NまたはDであり；X<sub>10</sub> = VまたはIであり；X<sub>11</sub> = SまたはRであり；X<sub>12</sub> = NまたはTであり；X<sub>13</sub> = SまたはNであり；X<sub>14</sub> = SまたはTであり；X<sub>15</sub> = N、K、またはHであり；X<sub>16</sub> = HまたはPであり；X<sub>17</sub> = VまたはWである) (配列番号228)または配列番号29を含み；

(c) VHは配列番号38を含み、VLは配列番号228または配列番号47を含み；

(d) VHは配列番号56を含み、VLは配列番号65を含み；

(e) VHは配列番号74を含み、VLは配列番号228または配列番号83を含み；

(f) VHは配列番号92を含み、VLは配列番号228または配列番号101を含み；

(g) VHは配列番号110を含み、VLは配列番号228または配列番号119を含み；

(h) VHは配列番号128を含み、VLは配列番号137を含み；

(i) VHは配列番号146を含み、VLは配列番号155を含み；

(j) VHは配列番号164を含み、VLは配列番号173を含み；または

(k) VHは配列番号182を含み、VLは配列番号191を含む、輸送体分子を提供する。

#### 【0085】

特定の形態において、上記で提供される輸送体分子は、輸送体活性を有し、例えば、輸送体分子は、1つまたはそれより多くの種からのBMVEC、例えば、マウス、ラット、

カニクイザル、またはヒト B M V E C に結合することができるか、輸送体分子は、1つまたはそれより多くの種の B M V E C に内在化することができるか、または輸送体分子は、血液脳関門を通過することができる。

【0086】

[0097]特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドを含み、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドは、抗体またはそれらの B B B 透過性フラグメントを含む。本明細書に記載される「B B B 透過性フラグメント」は、1つまたはそれより多くの種の B M V E C に特異的に結合して、インビトロまたはインビボで B M V E C を介して末梢血管系から C N S 血管系に通過することができる輸送体分子のフラグメントである。所与のフラグメントが B B B 透過性フラグメントであるかどうかは、当業界における通常の技術を有する者に公知の様々なインビトロまたはインビボのアッセイによって試験することができる。例えば、輸送体分子は、本明細書の他所で説明されるインビトロのトランスサイトーシスアッセイで、または本明細書の他所で説明される利尿アッセイなどのインビボのアッセイで試験することができる。インビボにおける B B B を通過するペイロードの送達を測定するのに使用することができる他のアッセイとしては、これらに限定されないが、慢性絞扼損傷 ( C C I ) ; 神経部分損傷モデル ( S N I ) または脊髄神経結紮 ( S N L ) が挙げられ、これらは全て、ポーフリック ( paw flick )、またはハーグリーブス方法 ( Hargreaves K & Pain; 1988; 32; 77 ~ 88 ) により測定することができる。

10

【0087】

[0098]特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、2つまたはそれより多くのサブユニット、例えば、重鎖またはそれらのフラグメントおよび軽鎖またはそれらのフラグメントを含むかまたはからなる抗体またはそれらの B B B 透過性フラグメントを含み、ここで重鎖および軽鎖は、例えば、単一の融合タンパク質 (例えば、 s c F v ) として、または1つまたはそれより多くのジスルフィド結合によって一緒に保持された2つのサブユニットとして連結される。特定の形態において、重鎖は、V H ドメインまたはV H 領域を含み、軽鎖は、V L ドメインまたはV L 領域を含む。

20

【0088】

[0099]特定の形態において、重鎖は、重鎖定常ドメイン、例えば、C H 1 ドメイン、ヒンジ、C H 2 ドメイン、および/もしくはC H 3 ドメイン、またはそれらのフラグメントをさらに含む。特定の形態において、重鎖定常ドメインは、I g G 定常ドメインまたはそれらのフラグメント、例えば、ヒト I g G 定常ドメイン、例えば、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 定常ドメインである。特定の形態において、I g G 定常ドメインまたはそれらのフラグメントは、野生型 I g G 定常ドメインと比較して、変更された糖付加および/または1つまたはそれより多くのアミノ酸置換を含み、ここで変更された I g G は、特定の特性、例えば、野生型 I g G 定常ドメインを有する I g G の半減期と比較して、増加または減少した半減期、野生型 I g G 定常ドメインと比較して、増加もしくは減少したエフェクター機能のいずれか、または例えばペプチド結合、ジスルフィド結合もしくは化学的なコンジュゲーションを介して異種部分と接続する能力を有する。特定の形態において、I g G 定常ドメインまたはそれらのフラグメントは、野生型 I g G 定常ドメインと比較して、変更された糖付加を有し、ここで変更された I g G は、特定の特性、例えば、野生型 I g G 定常ドメインを有する I g G の半減期と比較して、増加または減少した半減期、野生型 I g G 定常ドメインと比較して、増加または減少したエフェクター機能のいずれかを有する。

30

40

【0089】

[0100]様々なエフェクター機能、例えばこれらに限定されないが、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 ( A D C C )、補体依存性細胞傷害 ( C D C )、または抗体依存性の細胞の食作用 ( A D C P ) などは、免疫グロブリンの定常ドメインによって促進することができる。

【0090】

50

[0101]半減期を増加または減少させることが可能な多数の特異的なI g G定常ドメイン置換が当業界において公知である。例えば、カバットに記載された通りE Uインデックスによってナンバリングした場合の置換252Y、254T、256E、およびそれらの組合せは、半減期を増加させることが示されている(例えば、US7,083,784を参照)。また、残基250、252、254、256、257、309、311、428、433、434およびそれらの組合せにおける置換も、半減期を変更することが報告されている(例えば、米国特許第6,277,375号、7,083,784号;7,217,797号、8,088,376号;US2002/0147311;US2007/0148164;WO9823289およびWO09058492を参照)。同様に、エフェクター機能を増加または減少させることが可能なI g G定常ドメインの置換が当業界において説明されている。例えば、カバットに記載された通りE Uインデックスによってナンバリングした場合の置換239Sおよび/または332Eは、ADCC活性を増加させることが示されており(例えば、WO2004099249、US7,317,091を参照)、一方でカバットに記載された通りE Uインデックスによってナンバリングした場合の置換234F、235E、235F、235Q、235Y、239A、332Q、331S、332Qおよびそれらの組合せは、ADCCを減少させることが示されている。エフェクター機能を変更する(増加または減少させる)多数の他の置換を使用することができ、例えば、WO8807089、WO9958572、WO9951642、WO2012175751、WO2011149999、WO2011066501、WO2000042072、WO2011120134に記載された突然変異を参照されたい。

10

20

#### 【0091】

[0102]I g G定常ドメインまたはそれらのフラグメントを含む分子によって惹起されたエフェクター機能(例えば、ADCC)は、I g G定常ドメインのCH2領域に連結された炭水化物部分に強く依存する(Claudia Ferraraら、2006、Biotechnology and Bioengineering 93:851~861)。したがって、I g G定常のCH2ドメインの糖付加を、エフェクター機能が増加または減少するように改変してもよい(例えば、Umanaら、1999、Nat. Biotechnol 17:176~180;Daviesら、2001、Biotechnol Bioeng 74:288~294;Shieldsら、2002、J Biol Chem 277:26733~26740;Shinkawaら、2003、J Biol Chem 278:3466~3473;米国特許第6,602,684号;6,946,292号;7,064,191号;7,214,775号;7,393,683号;7,425,446号;7,504,256号;米国公報第2003/0157108号;2003/0003097号;2009/0010921号;POTILLEGENT(商標)技術(Biowa, Inc);GLYCOMAB(商標)糖付加工技術(ロシュ(Roche))を参照)。特定には、フコシル化が低減されたI g G定常領域は、Fc RIIIAへの増加した結合および強化されたADCC活性を有する。フコシル化が低減されているかまたはフコシル化がないI g G定常領域の生成方法が説明されている(例えば、US2005/0226867;Moriら、2004、Biotechnol Bioeng 88:901~908;Coxら、2006、Nat Biotechnol., 24:1591~7、および上述された参考文献を参照)。代替として、糖付加が欠失したI g G定常領域は、低減したエフェクター機能を有し(Walkerら、1989、Biochem. J. 259:347~353)、例えば細菌の宿主細胞使用して生成できることが示されている(例えば、Simmonsら、2002、J. Immunol. Methods、263:133~147を参照)。

30

40

#### 【0092】

[0103]特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、野生型I g G定常ドメインと比較して、変更された糖付加および/または1つまたはそれより多くのアミノ酸置換を含むI g G定常ドメインまたはそれらのフラグメントを含み、その場合、輸送体分子の少なくとも1つのエフェクター機能(例えば、ADCC)が、低減または消去される。特定の形態において、ADCC活性、CDC活性、またはADCC活性およびCDC活性の両方が低減または消去される。

#### 【0093】

[0104]特定の形態において、軽鎖は、軽鎖定常ドメインまたはそれらのフラグメント、

50

例えば、CカッパドメインまたはCラムダドメイン、例えば、ヒトカッパ定常ドメインもしくはそれらのフラグメント、またはヒトラムダ定常領域もしくはそれらのフラグメントをさらに含む。

【0094】

[0105]特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、マウス抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、多重特異性抗体、あらゆるそれらの組合せ、またはあらゆるそれらの抗原結合フラグメントを含むかまたはからなる抗体またはそれらのBBB透過性フラグメントを含む。特定の形態において、抗体またはそれらのフラグメントは、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む、完全IgG免疫グロブリン、例えばヒトIgG1免疫グロブリンである。特定の形態において、輸送体分子は、抗体フラグメント、例えば、Fvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fab'フラグメント、dsFvフラグメント、scFvフラグメント、またはsc(Fv)<sub>2</sub>フラグメントを含むかまたはからなる。

10

【0095】

[0106]特定の実施態様において、本明細書で提供される輸送体分子は、抗体のscFvフラグメントを含み、scFvは、直接的に、またはリンカー、例えばフレキシブルなリンカーを介してのいずれかで互いに融合した、VHドメインまたはVH領域およびVLドメインまたはVL領域を含む。scFv中のVHおよびVLは、VHがN末端にあり、VLがC末端にあるか、またはその逆になるように配列されていてもよい。VHおよびVLがリンカーを介して融合されている場合、scFvは、アミノ末端から、VH-L-VLを含んでいてもよく、式中Lはリンカーであり、またはVL-L-VHを含んでいてもよく、式中Lはリンカーである。

20

【0096】

[0107]scFvを調製するのに好適な様々なリンカーは、当業界において通常の技術を有する者に公知である。いくつかの非限定的な例としては、リンカー(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>、(式中nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる群より選択される正の整数である)(配列番号232)、Ser(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>、(式中nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる群より選択される正の整数である)(配列番号233)、GGGGSGGGGSGGGGS(配列番号234)、GGGGSGGGGSGGGG(配列番号235)、GGGGSGGGGSGGGGSA(配列番号236)、またはGGGGSGGGGSGGGGS(配列番号237)が挙げられる。

30

【0097】

[0108]特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、scFvを含み、scFvは、Bbbt0241、Bbbt0626、Bbbt0632、Bbbt0654、Bbbt0726、Bbbt0727、Bbbt0732、Bbbt0754、Bbbt0674、Bbbt0755、Bbbt0643、Bbbt0579、またはBbbt0671のVHおよびVLを含む。

【0098】

[0109]特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、輸送体分子がBBBを通過するペイロードの輸送を容易にすることができるように、ペイロードと連結される。特定の形態において、ペイロードは、ペプチドまたはポリペプチドであり、ペプチド結合を介して、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドに融合されている。融合は、例えば、重鎖または軽鎖のいずれかのN末端、重鎖または軽鎖のいずれかのC末端、またはあらゆるそれらの組合せになされてもよい。特定の形態において、ペイロードは、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチド上の1つまたはそれより多くの部位にジスルフィド結合を介して接続されたペプチドまたはポリペプチドである。特定の形態において、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドは、ペイロードの1つまたはそれより多くのコピーの、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドへの正確なおよび/または高密度の接続を容易にするために、より多いまたはより少ないシステイン残基を含有するように操作

40

50

されてもよい。特定の形態において、ペイロードは、例えば、遊離のシステインを介した C M K (クロロメチルケトン) カップリング；遊離のシステインを介したマレイミドカップリング；遊離のアミン基への N H S カップリング；「クリック」ケミストリー (アルキン + アジ化物)；「オキシムライゲーション」 (ヒドラジドまたはヒドロキシルアミン + アルデヒド) または「ケント (Kent) ライゲーション」 (チオエステル + 天然のシステイン) を介して、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドに化学的にコンジュゲートされている。天然のまたは操作されたシステイン残基は、マレイミドまたはハロアセチルなどのチオール反応性基を介したコンジュゲーションを可能にすることから、特に有用である。

#### 【 0 0 9 9 】

[0110] 特定の形態において、ペイロードは、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドと非共有結合を介して連結される。

[0111] C N S に輸送する必要があるあらゆるタイプのペイロードが、本明細書で提供される輸送体分子と連結されていてもよい。例えば、ペイロードは、ペプチドまたはポリペプチド、例えば、ペプチドタグ、ホルモンまたはそれらの誘導體、酵素、サイトカイン、リンホカイン、または異種抗体もしくはそれらのフラグメント；ポリヌクレオチド、例えば、マイクロ RNA、マイクロ RNA 阻害剤、アンチセンス分子、および RNA i 分子、c D N A、または遺伝子治療剤；炭水化物、ポリエチレングリコールなどのポリマー、化学療法剤などの小分子薬物、または抗微生物剤もしくは抗ウイルス剤、プロドラッグ、脂質、生体応答調整物質、検出可能な標識、または薬剤の 2 種もしくはそれより多くの組合せであってもよい。

#### 【 0 1 0 0 】

[0112] 特定の形態において、ペイロードは、インターロイキン - 1 受容体アンタゴニスト ( I L - 1 R a ) またはそれらの活性なフラグメントを含む。本明細書の他所で説明されるように、 I L - 1 R a は、C N S への侵入時に、神経因性疼痛を受けている対象に鎮痛作用を付与することができる ( Gabay E1ら、Eur J Pain. 2011年3月；15 ( 3 ) : 242 ~ 8 ) 。しかしながら、アンタゴニストは、何らかの作用が観察される前に C N S に到達しなければならない。 I L - 1 R a の B B B 輸送体へのカップリングは、髄腔内送達というよりも、 I L - 1 R a の C N S への送達を容易にする方法の一つである。したがって、本開示は、 I L - 1 R a またはそれらの活性なフラグメントに融合した、またはその他の方法で連結された、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドを含む輸送体分子を提供する。 I L - 1 R a は、あらゆる好適な手段によって本明細書で提供される輸送体分子に接続させることができ、例えば I L - 1 R a ポリペプチドは、本明細書で提供される免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドに、重鎖または軽鎖のいずれかの N 末端または C 末端で融合させることができる。例えば、本開示は、 I L - 1 R a に融合した輸送体分子であって、アミノ酸配列番号 2 2 2 を有するリンカーを介して、配列番号 3 8 の C 末端に融合した I L - 1 R a ( 配列番号 2 2 3 ) に融合した、アミノ酸配列番号 3 8 を有する V H ( B b b t 0 6 3 2 ) 、およびアミノ酸配列番号 2 2 2 を有するリンカーを介して、配列番号 2 の C 末端に融合した I L - 1 R a ( 配列番号 2 2 3 ) に融合した、アミノ酸配列番号 4 7 を有する V L またはアミノ酸配列番号 2 を有する V H ( B b b t 0 2 4 1 ) 、およびアミノ酸配列番号 1 1 を有する V L を含む、輸送体分子を提供する。本開示に基づいて、当業界において通常の技術を有する者であれば、輸送体分子が活性を保持するように、例えば、輸送体分子が、 B M V E C に特異的に結合することができるように、 B M V E C に内在化することができるように、またはインビボまたはインビトロのいずれかで B M V E C を通過して輸送することができるように、 I L - 1 R a に融合した本明細書で提供される免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドを含む無数の他の輸送体分子を予期することができる。

#### 【 0 1 0 1 】

[0113] エンケファリンは、有力な鎮痛作用を有する、C N S 中のニューロンによって放出される天然に存在するペプチドである。ダラージンなどのエンケファリン類似体が説明

10

20

30

40

50

されており、神経因性疼痛を受けている対象に鎮痛作用を付与することができるが、何らかの作用が観察される前に CNS に到達しなければならない (Rousselleら、(2003) J. Pharm. Exper. Ther. 306 : 371 ~ 376)。エンケファリンおよび類似体を BBB 輸送体にカップリングすることは、BBB を通過するエンケファリンおよび類似体の送達を容易にする方法の一つである。したがって、本開示は、エンケファリンまたはエンケファリン類似体に融合した、またはその他の方法で連結された、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドを含む輸送体分子を提供する。

#### 【0102】

[0114] 特定の形態において、ペイロードは、腫瘍壊死因子アルファ (TNF - ) 阻害剤を含む。BBB を通過して送達される TNF - 阻害剤は、神経保護作用があり、アルツハイマー病を処置するのに使用できることが示されている (Zhouら (2011) J. Pharm. Exp. Ther. 339 : 618 ~ 23 ; Tobinck および Gross (2008) J. NeuroInflam 5 : 2)。TNF - 阻害剤の BBB 輸送体へのカップリングは、BBB を通過するこのような阻害剤の送達を容易にする方法の一つである。したがって、本開示は、TNF - 阻害剤に融合した、またはその他の方法で連結された、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドを含む輸送体分子を提供する。TNF - 阻害剤は、あらゆる好適な手段によって本明細書で提供される輸送体分子に接続させることができ、例えばポリペプチドの TNF - 阻害剤は、本明細書で提供される免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドに、重鎖または軽鎖のいずれかの N 末端または C 末端で融合させることができる。多数の好適な TNF - 阻害剤が当業界において説明されており、そのようなものとしては、これらに限定されないが、TNF 受容体のリガンド結合部分 (TNFR)、例えば、エタネルセプト (ENBR E L (登録商標)) ; および TNF - と結合する抗体、例えば、アダリムマブ (HUM I R A (登録商標))、インフリキシマブ (レミケード (登録商標))、ゴリムマブ (S I M P O N I (登録商標)) が挙げられる。

#### 【0103】

[0115] 特定の形態において、ペイロードは、インターフェロン - 、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、腫瘍壊死因子受容体 (TNFR)、神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン - 4 / 5、ニューロトロフィン (NT) - 3、ニュールツリン、ニューレグリン、ネトリン、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、幹細胞因子 (SCF)、セマフォリン、肝細胞増殖因子 (HGF)、上皮増殖因子 (EGF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) - c x、TGF - B、血管内皮増殖因子 (VEGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、ヘレグリン、アルテミン、パーセフィン、インターロイキン、顆粒球 - コロニー刺激因子 (CSF)、顆粒球マクローファージ - CSF、カルジオトロフィン - 1、ヘッジホッグ、白血病抑制因子 (LIF)、ミッドカイン、プレイオトロフィン、エリスロポイエチン (EPO)、骨形成タンパク質 (BMP)、ネトリン、サボシン、またはそれらの組合せを含む。

#### 【0104】

##### 輸送体分子活性

[0116] 本明細書で提供される特定の輸送体分子は、異種ペイロード分子を単独で、またはそれと連結させてのいずれかで BBB を通過して輸送する能力を有する。活性は、多数のアッセイによって実証することができる。例えば、特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、1 つまたはそれより多くの種からの BMVEC、例えば、ヒト、カニクイザル、マウス、ラット、またはウシ BMVEC に結合することができる。結合は、当業界における通常の技術を有する者に公知の様々な方法で、例えば、本明細書の他所で説明される FMAT アッセイで実証することができる。特定の形態において、BMVEC は、脳毛細血管内皮細胞 (BCEC) である。特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、インビトロのトランスサイトーシスアッセイにおいて、BCEC の単分子層を通過することができる。さらに、特定の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、本明細書の他所で詳細に説明される競合 FMAT アッセイにおいて、BMVEC への結合に関して、単一ドメイン抗体である FC5 (例えば、PCT 公報 WO 02 /

057445を参照)またはBbbt0241と競合することができる。BMVECへの結合に関してFC5またはBbbt0241と競合する輸送体分子の例としては、Bbbt0626、Bbbt0727、Bbbt0632、Bbbt0654、Bbbt0726、Bbbt0732、またはBbbt0754のVHおよびVLDメインを含む輸送体分子が挙げられる。特定の代替の形態において、本明細書で提供される輸送体分子は、BMVECに結合するが、競合FMATアッセイにおいて、BMVECへの結合に関して、単ドメイン抗体FC5またはBbbt0241と競合しない。BMVECへの結合に関してFC5またはBbbt0241と競合しない輸送体分子の例としては、Bbbt0643、Bbbt0674、Bbbt0755、Bbbt0579またはBbbt0671のVHおよびVLDメインを含む輸送体分子が挙げられる。

10

#### 【0105】

[0117]特定の形態において、輸送体分子活性は、インビボで実証することができる。例えば、-オピオイドペプチドのダイノルフィンは、動物モデルにおいて利尿を引き起こすことができるが、それがCNSに到達した場合のみである。したがって、本明細書で提供される輸送体分子を1つまたはそれより多くのダイノルフィン分子にコンジュゲートさせて、対象に、例えばラットモデルにおいて、末梢投与、例えば静脈内投与することができ、活性は、動物における尿排出量の増加によって実証することができる。

#### 【0106】

[0118]別の例において、IL-1Raは、神経因性疼痛によって引き起こされる痛覚過敏を低減することができるが、それがCNSに到達した場合のみである。したがって、本明細書で提供される輸送体分子をIL-1Raに融合させて、神経因性疼痛モデル、例えばラットの坐骨神経部分結紮アッセイにおいて、末梢投与、例えば静脈内または皮下投与することができる。鎮痛作用は、輸送体分子がBBBを通過することによって神経因性疼痛を低減できることを実証する。

20

#### 【0107】

[0119]特定の形態において、輸送体分子活性は、CNSにおける輸送体分子の可視化によって実証することができる。例えば、トリチウムで標識された輸送体分子を、対象、例えばマウスの末梢、例えば静脈内に送達して、次いで定量的全身ラジオグラフィによりCNS中で可視化することができる。特定の形態において、輸送体分子は、CNSの特異的な領域、例えば、小脳皮質、大脳灰白質、脊髄灰白質、脳橋、またはそれらの組合せに局在化する。

30

#### 【0108】

##### ポリヌクレオチド

[0120]本開示は、本明細書で提供されるいずれかの輸送体分子をコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の形態において、単離されたポリヌクレオチド、または2つもしくはそれより多くのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド組成物であって、該ポリヌクレオチドは、単独で、または集合的に輸送体分子をコードし、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチド、加えてBBBを通過して輸送しようとするペイロードをコードしていてもよい、上記ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド組成物が提供される。特定の形態において、単離されたポリヌクレオチド、または2つまたはそれより多くの単離されたポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド組成物であって、該ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド(複数)は、Bbbt0241、Bbbt0351、Bbbt0626、Bbbt0632、Bbbt0654、Bbbt0726、Bbbt0727、Bbbt0732、Bbbt0754、Bbbt0674、Bbbt0755、Bbbt0643、Bbbt0579、またはBbbt0671の1つまたはそれより多くを含む免疫グロブリンから誘導されたポリペプチドを単独で、または集合的にコードする、1つまたはそれより多くの核酸分子を含む、上記組成物が提供される。

40

#### 【0109】

[0121]特定の形態において、単離されたポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチド輸送体分子またはそれらのフラグメン

50

トもしくはサブユニットをコードする核酸分子を含み、該輸送体分子は、V H、V L、またはV HおよびV Lを含み、該核酸分子は、配列番号2、配列番号11、または配列番号2、および配列番号11；配列番号20、配列番号29、または配列番号20、および配列番号29；配列番号38、配列番号47、または配列番号38、および配列番号47；配列番号56、配列番号65、または配列番号66、および配列番号65；配列番号74、配列番号83、または配列番号74、および配列番号83；配列番号92、配列番号101、または配列番号92、および配列番号101；配列番号110、配列番号119、または配列番号110、および配列番号119；配列番号128、配列番号137、または配列番号128、および配列番号137；配列番号146、配列番号155、または配列番号146、および配列番号155；配列番号164、配列番号173、または配列番号164、および配列番号173；配列番号182、配列番号191、または配列番号182、および配列番号191；配列番号200；配列番号209、配列番号218、または配列番号209、および配列番号218；または配列番号226、配列番号227、または配列番号226、および配列番号227をコードする、上記ポリヌクレオチドが提供される。

10

**【0110】**

[0122]特定の形態において、単離されたポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチド輸送体分子またはそれらのフラグメントもしくはサブユニットをコードする核酸分子を含み、該輸送体分子は、V H、V L、またはV HおよびV Lを含み、該核酸分子は、配列番号1、配列番号10、または配列番号1、および配列番号10；配列番号19、配列番号28、または配列番号19、および配列番号28；配列番号37、配列番号46、または配列番号37、および配列番号46；配列番号55、配列番号64、または配列番号55、および配列番号64；配列番号73、配列番号82、または配列番号73、および配列番号82；配列番号91、配列番号100、または配列番号91、および配列番号100；配列番号109、配列番号118、または配列番号109、および配列番号118；配列番号127、配列番号136、または配列番号127、および配列番号136；配列番号145、配列番号154、または配列番号145、および配列番号154；配列番号163、配列番号172、または配列番号163、および配列番号172；配列番号181、配列番号190、または配列番号181、および配列番号190；配列番号199；または配列番号208、配列番号217、または配列番号208、および配列番号217を含む、上記ポリヌクレオチドが提供される。

20

30

**【0111】**

[0123]特定の形態において、単離されたポリヌクレオチドは、異種ペイロード、例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドペイロードをコードする核酸分子をさらに含む。例示的なペイロードは、本明細書の他所で提供される。

**【0112】**

[0124]特定の形態において、2つまたはそれより多くの単離されたポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド組成物であって、該ポリヌクレオチドは、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチド輸送体分子またはそれらのフラグメントもしくはサブユニットをコードする2つまたはそれより多くの核酸分子を含み、該輸送体分子は、V HおよびV Lを含み、該核酸分子はそれぞれ、配列番号2および配列番号11；配列番号20および配列番号29；配列番号38および配列番号47；配列番号56および配列番号65；配列番号74および配列番号83；配列番号92および配列番号101；配列番号110および配列番号119；配列番号128および配列番号137；配列番号146および配列番号155；配列番号164および配列番号173；配列番号182および配列番号191；配列番号209および配列番号218；または配列番号226および配列番号227をコードする、上記ポリヌクレオチド組成物が提供される。

40

**【0113】**

[0125]特定の形態において、2つまたはそれより多くの単離されたポリヌクレオチドを

50

含むポリヌクレオチド組成物であって、該ポリヌクレオチドは、免疫グロブリンから誘導されたポリペプチド輸送体分子またはそれらのフラグメントもしくはサブユニットをコードする2つまたはそれより多くの核酸分子を含み、該輸送体分子は、VHおよびVLを含み、該核酸分子は、それぞれ、配列番号1および配列番号10；配列番号19および配列番号28；配列番号37および配列番号46；配列番号55および配列番号64；配列番号73および配列番号82；配列番号91および配列番号100；配列番号109および配列番号118；配列番号127および配列番号136；配列番号145および配列番号154；配列番号163および配列番号172；配列番号181および配列番号190；または配列番号208および配列番号217を含む、上記ポリヌクレオチド組成物が提供される。

10

**【0114】**

[0126]特定の形態において、2つまたはそれより多くの単離されたポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド組成物は、異種ペイロード、例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドペイロードをコードする核酸分子をさらに含む。例示的なペイロードは、本明細書の他所で提供される。

**【0115】**

[0127]特定の形態において、ベクター、または2つまたはそれより多くのベクターは、本明細書で提供される輸送体分子のディスプレイ、スクリーニング、単離、クローニング、および/または発現を容易にするために提供される。特定の形態において、ベクターまたはベクターは、発現ベクターである。

20

**【0116】**

[0128]特定の形態において、ポリヌクレオチド組成物の2つまたはそれより多くの核酸分子は、同じベクター中に存在していてもよい。特定の形態において、ポリヌクレオチド組成物の2つまたはそれより多くの核酸分子は、少なくとも2つの別々のベクター中に存在していてもよい。

**【0117】**

[0129]使用される発現ベクターは、本明細書で提供される輸送体分子をコードする単離されたポリヌクレオチドを発現する。組換え発現ベクターは、哺乳類、微生物、ウイルスまたは昆虫遺伝子から誘導された好適な転写または翻訳調節エレメントに作動可能に連結された輸送体分子のポリペプチド鎖をコードする合成またはcDNAから誘導されたDNAフラグメントを有する、複製可能なDNAコンストラクトである。転写単位は一般的に、(1)遺伝子発現において調節的な役割を有する遺伝学的エレメントまたはエレメント(複数)、例えば、転写プロモーターまたはエンハンサー、(2)mRNAに転写されタンパク質に翻訳される構造的またはコード配列、ならびに(3)以下で詳細に説明されるような適切な転写および翻訳開始および終結配列の接合体を含む。このような調節エレメントとしては、転写を制御するためのオペレーター配列が挙げられる。加えて、通常複製起点によって付与される宿主中で複製する能力、および形質転換株の認識を容易にするための選択遺伝子を取り込まれていてもよい。

30

**【0118】**

[0130]特定の形態において、単離されたポリヌクレオチドまたは2つまたはそれより多くの単離されたポリヌクレオチドを含む組成物であって、核酸分子は、プロモーターに作動可能に連結されているか、または2つまたはそれより多くの核酸分子は、2つまたはそれより多くのプロモーターに作動可能に連結され、該プロモーターは、同一でもよいまたは異なってもよい、上記組成物が提供される。

40

**【0119】**

[0131]DNA領域は、それらが互いに機能的に関連している場合、「作動可能に連結されている(operably associated)」。例えば、シグナルペプチド(分泌リーダー)に関するDNAは、シグナルペプチドがポリペプチドの分泌に参加する前駆体として発現される場合、ポリペプチドに関するDNAと作動可能に連結されており；プロモーターは、プロモーターが配列の転写を制御する場合、コード配列と作動可能に連結されており；また

50

はリボソーム結合部位は、リボソーム結合部位が翻訳を許容するように配置される場合、コード配列と作動可能に連結されている。酵母発現系での使用を意図した構造的なエレメントとしては、宿主細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列が挙げられる。代替として、組換えタンパク質がリーダーまたは輸送配列なしで発現される場合、タンパク質は、N末端のメチオニン残基を包含していてもよい。この残基は、任意選択で、最終産物が提供されるように、それに続き発現された組換えタンパク質から切断されてもよい。

#### 【0120】

[0132]発現制御配列および発現ベクターの選択は、宿主の選択に依存すると予想される。多種多様の発現宿主/ベクターの組合せを採用することができる。真核宿主にとって有用な発現ベクターとしては、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルスおよびサイトメガロウイルス由来の発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主にとって有用な発現ベクターとしては、公知の細菌プラスミド、例えばpCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導体などの大腸菌(*E. coli*)由来のプラスミド、より広い宿主域を有するプラスミド、例えばM13、ならびに線維状の一本鎖DNAファージが挙げられる。

10

#### 【0121】

[0133]特定の形態において、本明細書で提供されるポリヌクレオチドを含む単離された宿主細胞が提供される。特定の形態において、本明細書で提供されるポリヌクレオチド組成物の2つまたはそれより多くのポリヌクレオチドを含む、1つまたはそれより多くの単離された宿主細胞が提供される。

20

#### 【0122】

[0134]本明細書で提供される輸送体分子の発現にとって好適な宿主細胞としては、適切なプロモーターの制御下にある、原核生物細胞、酵母細胞、昆虫細胞または高等真核細胞が挙げられる。原核生物としては、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば大腸菌または杆菌が挙げられる。高等真核細胞としては、後述するような哺乳類起源の確立された細胞株が挙げられる。無細胞翻訳システムも採用することができる。抗体産生などのタンパク質生産方法に関する追加の情報は、例えば、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許公開第2008/0187954号、米国特許第6,413,746号および6,660,501号、および国際特許公開WO04009823号で見出すことができる。

30

#### 【0123】

[0135]また様々な哺乳類または昆虫細胞培養系も、輸送体分子を発現させるのに採用することができる。哺乳類細胞における組換えタンパク質は、一般的に、正確にフォールディングされ、適切に改変され、完全に機能的であるため、このようなタンパク質の発現を実行させることができる。好適な哺乳類宿主細胞株の例としては、HEK-293およびHEK-293T、Gluzman (*Cell* 23:175, 1981)によって記載されたサル腎臓細胞のCOS-7株、および他の細胞株、例えば、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、HeLaおよびBHK細胞株などが挙げられる。哺乳類発現ベクターは、複製起点などの非転写エレメント、発現させようとする遺伝子と作動可能に連結されている好適なプロモーターおよびエンハンサー、ならびに他の5'または3'フラんキング非転写配列、ならびに5'または3'非翻訳配列、例えばリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライドナーおよびアクセプター部位、ならびに転写終結配列を含んでいてもよい。昆虫細胞における異種タンパク質生産のためのバキュロウイルス系は、LuckowおよびSummers、*BioTechnology* 6:47 (1988)で総論されている。

40

#### 【0124】

[0136]本明細書で提供される宿主細胞は、本明細書で提供される輸送体分子の作製方法であって、(a)宿主細胞を培養すること、および(b)宿主細胞から発現された輸送体分子を単離することを包含する、上記方法において利用することができる。特定の形態において、ペイロード部分は、輸送体分子の一部として発現される。特定の形態において、

50

本方法は、輸送体分子を、例えば化学的なコンジュゲーションによって、ペイロード部分と連結させることをさらに含む。

【0125】

医薬および診断用組成物

[0137]別の形態において、本開示は、本明細書で提供される輸送体分子の1つまたは組合せを含有する組成物、例えば医薬組成物であって、1つまたはそれより多くの輸送体分子は、医薬的に許容される担体と共に製剤化された、BBBを通過する輸送のための1つまたはそれより多くのペイロード部分を含む、上記組成物を提供する。このような組成物は、本明細書で提供される1つまたは2つまたはそれより多くの異なる輸送体分子を包含していてもよい。

10

【0126】

[0138]医薬組成物は、併用療法で、および/または他の薬剤と組み合わせて投与することもできる。例えば、併用療法は、本明細書で提供される輸送体分子と、少なくとも1つの他の療法との併用を包含していてもよく、ここで療法は、例えば、免疫療法、化学療法、放射線処置、または薬物療法であり得る。

【0127】

[0139]本明細書で提供される医薬化合物は、1つまたはそれより多くの医薬的に許容される塩を包含していてもよい。このような塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。

【0128】

[0140]本明細書で提供される医薬組成物はまた、医薬的に許容される抗酸化剤を包含していてもよい。医薬的に許容される抗酸化剤の例としては、(1)水溶性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムおよび同種のもの；(2)油溶性抗酸化剤、例えばバルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロール、および同種のもの；ならびに(3)金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸、および同種のもものが挙げられる。

20

【0129】

[0141]本明細書で提供される医薬組成物で採用することができる好適な水性および非水性担体の例としては、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、ポリエチレングリコール、および同種のもの)、および好適なそれらの混合物、植物油、例えばオリーブ油、および注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルが挙げられる。適した流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液のケースでは特定の粒度の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。

30

【0130】

[0142]これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含有していてもよい。滅菌手順と、様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸、および同種のものとの両方によって、微生物の存在を確実に予防することができる。また等張剤、例えば糖、塩化ナトリウム、および同種のものも組成物に添加してもよい。加えて、注射可能な医薬の形態の持続吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる薬剤の包含によって実現することができる。

40

【0131】

[0143]好適で例示的な組成物および調合物、ならびにこのような組成物および調合物を調製する方法は、例えば、PCT公報WO2009/058379号、PCT公報WO2011/130324号、およびPCT公報WO2011/130328号で見出すことができる。

【0132】

50

[0144]本明細書で提供される組成物はまた、診断用組成物、例えば、イメージング用ペイロードをCNSに送達するための組成物であってもよい。したがって、輸送体分子、輸送体分子をコードするポリヌクレオチド（単数または複数）、ポリヌクレオチドを含むベクター（単数または複数）、またはベクター（単数または複数）を含む宿主細胞を含む診断用組成物が提供される。

【0133】

輸送体分子の使用法

[0145]本明細書で提供される輸送体分子は、インビトロおよびインビボにおける診断的および治療的な有用性を有する。例えば、これらの分子は、例えばインビトロまたはエクスピボで培養物中の細胞に投与することもできるし、または例えばインビボで対象に投与して、CNSの様々な疾患または障害を処置、予防または診断することもできる。

10

【0134】

[0146]したがって本開示は、CNSの疾患、障害、または傷害を処置、診断、または予防する方法であって、本方法は、処置が必要な対象に、本明細書で提供される輸送体分子を含む組成物を末梢投与することを含み、輸送体分子は、BBBを通過して輸送された後にCNSに曝露されたときに、疾患、障害、または傷害を診断する、予防する、または処置することが可能な治療的または診断的ペイロード部分を含み、疾患、障害、または傷害を診断する、予防する、または処置するのに十分な治療的または診断的ペイロード部分の量がBBBを通過して輸送されることにより疾患、障害、または傷害を処置する、上記方法を提供する。

20

【0135】

[0147]本開示は、単独で、または他の療法と組み合わせてのいずれかでの、CNSの疾患、障害、または傷害に関連する1つまたはそれより多くの症状を予防する、管理する、処置する、または改善するための、BBBを通過してペイロード部分を輸送するためのペイロード部分（例えば、治療剤または薬物）にコンジュゲートまたは融合した本明細書で提供される輸送体分子の使用を包含する。

【0136】

[0148]特定の形態において、ペイロード部分は、CNSへの侵入後に輸送体分子から放出される。特定の形態において、ペイロード部分は、その活性を弱めることなく輸送体分子に連結されたままである。

30

【0137】

[0149]様々なペイロード部分が、CNSの疾患、障害または傷害を診断する、予防する、または処置するのに採用することができ、ここで疾患、障害、または傷害は、多発性硬化症（MS）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病、脊髄損傷、外傷性脳損傷、卒中、神経因性疼痛、神経変性、神経炎症、認知症、進行性多巣性白質脳病（PML）、脳脊髄炎（EPL）、橋中心髄鞘崩壊症（CPM）、副腎白質ジストロフィー、アレキサンダー病、ペリツェウス-メルツバッター病（PMZ）、グロバイド細胞白質ジストロフィー（クラッペ病）、ウォラー変性、視神経炎、横断性脊髄炎、放射線照射後の傷害、化学療法の神経学的合併症、急性虚血性視神経症、ビタミンE欠乏症、ビタミンE単独欠乏症候群、バッセン-コルンツヴァイク症候群、マルキアファ-ヴァ-ビニャミ病、異染性白質ジストロフィー、三叉神経痛、ベル麻痺、原発性腫瘍（例えば、膠芽腫）もしくは二次転移、またはあらゆるそれらの組合せを含む。

40

【0138】

[0150]特定の形態において、治療剤は、インターロイキン-1受容体アンタゴニスト（IL-1Ra）であり、疾患、障害、または傷害は、神経因性疼痛である。

[0151]本開示はまた、疾患を診断する方法も提供する。造影剤などの部分を有する本明細書で提供される輸送体分子は、疾患を診断するのに使用される方法で実行されてもよい。

【0139】

50

[0152]本開示はさらに、特異的な標的をイメージングする方法を提供する。一実施態様において、CNSにおける特異的な標的の存在、配置、または進行をイメージングする方法において、本明細書で提供される輸送体分子は、緑色蛍光タンパク質、他の蛍光タグ(Cy3、Cy5、ローダミンなど)、ビオチン、または放射性核種などの造影剤であるペイロードに融合させるかまたはコンジュゲートさせて、これらのペイロードをBBBを通過して輸送することができる。他の実施態様において、本明細書で提供される輸送体分子の利用を介して標的をイメージングする方法は、MRI、PETスキャン、X線、蛍光検出によって、または当業界において公知の他の検出方法によって実行される。

【0140】

[0153]本開示はまた、本明細書で提供される輸送体分子を使用して疾患の進行、再発、処置、または改善をモニターする方法も提供する。一実施態様において、疾患の進行、再発、処置、または改善をモニターする方法は、本明細書で提供される輸送体分子の利用を介してCNS中の化合物/標的をイメージングする、診断する、またはそれらと接触させる方法によって達成される。

10

【0141】

キット

[0154]本明細書で提供される組成物(例えば物質をBBBを通過して送達することが可能な輸送体分子)および使用説明書を含むキットも本開示の範囲内である。キットは、少なくとも1つの追加の試薬、または1つまたはそれより多くの追加の輸送体分子をさらに含有していてもよい。キットは、典型的には、キット内容物の意図した使用を示すラベルを包含する。ラベルという用語は、キット上もしくはキットと共に供給されるか、またはそれ以外の方法でキットに付随するあらゆる文書または記録材料を包含する。

20

【0142】

均等物

[0155]当業者であれば、以下の慣例的な実験を使用して、本明細書で説明される具体的な実施態様の多くの均等物を認識するか、または確認することができると予想される。このような均等物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

【0143】

[0156]添付された特許請求の範囲の実施は、別段の指定がない限り、当業界の技術範囲内の細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を採用すると予想される。このような技術は、文献で詳細に説明されている。例えば、Sambrookら、編(1989)Molecular Cloning A Laboratory Manual(第2版; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrookら、編(1992)Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Cold Springs Harbor Laboratory、ニューヨーク); D. N. Glover編(1985)DNA Cloning、I巻およびII巻; Gait編(1984)Oligonucleotide Synthesis; Mullisら、米国特許第4,683,195号; HamesおよびHiggins編(1984)Nucleic Acid Hybridization; HamesおよびHiggins編(1984)Transcription And Translation; Freshney(1987)Culture Of Animal Cells(Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press)(1986); Perbal(1984)A Practical Guide To Molecular Cloning; 学術論文、Methods In Enzymology(Academic Press, Inc.、ニューヨーク); MillerおよびCalos編(1987)Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(Cold Spring Harbor Laboratory); Wuら編、Methods In Enzymology、154巻および155巻; MayerおよびWalker編(1987)Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Academic Press、London); WeirおよびBlackwell編(1986)Handbook Of Experimental Immunology、I~IV巻; Manipulating the Mouse Embryo、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、ニューヨーク(1986); およびAusubelら(1989)Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley and Sons、メリーランド州ボルチモア)を参照されたい。

30

40

【0144】

[0157]抗体工学の一般原則は、Borrebaeck編(1995)Antibody Engineering(第2版

50

; Oxford Univ. Press) に記載されている。タンパク質工学の一般原則は、Rickwoodら編 (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (Oxford Univ. Pressにおける IRL Press、英国オックスフォード) に記載されている。抗体および抗体 - ハプテン結合の一般原則は、Nisonoff (1984) Molecular Immunology (第2版; Sinauer Associates、マサチューセッツ州サンダーランド); および Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall、ニューヨーク州ニューヨーク) に記載されている。加えて、当業界において公知であり具体的に説明されていない免疫学の標準的な方法は、全般的に、Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons、ニューヨーク; Stitesら編 (1994) Basic and Clinical Immunology (第8版; Appleton & Lange、コネチカット州ノーウォーク) ならびに Mishell および Shiigi (編) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co.、ニューヨーク) の記載に従う。 10

【0145】

[0158] 免疫学の一般原則を記載した標準的な参考文献としては、Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons、ニューヨーク; Klein (1982) J. Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons、ニューヨーク); Kennettrら編 (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press、ニューヨーク); Campbell (1984)、Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology中の「Monoclonal Antibody Technology」、Burdenら編 (Elsevier、アムステルダム); Goldsbyら編 (2000) Kuby Immunology (第4版; H. Freeman & Co.); Roittら (2001) Immunology (第6版; London: Mosby); Abbasら (2005) Cellular and Molecular Immunology (第5版; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann および Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow および Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach および Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press) が挙げられる。 20

【0146】

[0159] 上記で引用された全ての参考文献、加えて全ての本明細書で引用された参考文献は、この参照によりそれらの全体が開示に組み入れられる。

[0160] 以下の実施例は、例証のために提供されたものであり、限定のために提供されたものではない。 30

【実施例】

【0147】

実施例 1: 改善された FC5 パリアント、B b b t 0 3 5 1 の構築および特徴付け

[0161] この実施例は、血液脳関門を通過するラクダ単ドメイン抗体である FC5 由来の改善されたラクダ B B B 輸送体分子の構築を説明する。Stanimirovicら、J. Neurochem. 95: 1201 (2005)。FC5 は、げっ歯類細胞とヒト脳内皮細胞の両方を認識する。FC5 の結合標的は、2つの膜貫通ドメインを有するグリコシル化オーファン受容体である T M E M 3 0 a であると報告されている。T M E M 3 0 a は3つのアイソフォームを有し、ほとんどの細胞型で普遍的に発現される。 40

【0148】

[0162] FC5 を、CDR3 アラニンおよび最小限の変異誘発 (parsimonious mutagenesis) に供し、多数の突然変異体を D A b 様式で作製し、発現する能力およびマウス脳内皮細胞と結合する能力に関して試験した。タンパク質を発現して、H I S 捕獲カラムでの精製後に精製タンパク質をもたらしたが、F M A T 結合アッセイにおいてマウス脳内皮細胞での結合シグナルを提供しなかったパリアントをさらに評価した。パリアント B b b t 0 3 5 1 は、FC5 の可変領域と比較して2つのアミノ酸置換、すなわちカバットの 97 位における T 9 7 A 置換、およびカバットの 100 a 位における T 1 0 0 a D 置換を含む。B b b t 0 3 5 1 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、配列番号 199 ~ 207 として示される (表 2)。B b b t 0 3 5 1 は、F c ドメインと共に発現される場合、h I g G 50

1のヒンジ領域のN末端に遺伝学的に融合される。

【0149】

[0163] B b b t 0 3 5 1 は、脳内皮細胞への結合を示さないが、インビトロおよびインビボにおいてFC5の輸送速度と比較して、増加した輸送速度を有するFC5の突然変異形態である。2種のラットのインビトロBBBモデルで、脳内皮細胞を通過するB b b t 0 3 5 1 - F c の輸送をFC5 - F c と比較した。初代ラット脳内皮細胞BBBモデルは説明されており (Watson P. M. D.ら、BMC Neuroscience 2013 : 14、59~79)、このモデルのバリアを通過するトランスサイトーシスを測定するのに使用される方法は以下の通りである：細胞培養培地を、細胞培養挿入物上で3連で培養したR B E Cの上および下の区画から除去し、リンゲルH E P E S 緩衝液 ( B S A 非含有 ) で交換した。上の区画に目的の分子を添加して、各ウェル中で望ましい最終濃度にした。培養物を37 で振盪しながらインキュベートし、30、60および90分後に下の区画中の新鮮な緩衝液を含む別のウェルに移した。下の区画からサンプルを収集し、ナノ-LC S R M 質量分析によって分析した。ラット細胞株BBBモデルを通過する分子のトランスサイトーシスを測定するための方法が説明されている (Haqqani A. S.ら、Method. Mol. Pharmaceutics. 2013 ; 10、1542~1556)。初代ラット脳内皮細胞または不死化ラット脳内皮細胞株を通過する大きい分子の輸送は、ナノ-LC S R M 質量分析技術によって検出することができる。

10

【0150】

[0164] 図1AおよびBに、インビボにおけるB b b t 0 3 5 1 - F c およびFC5 - F c の輸送の比較を示す。結果は、方程式  $(dQ_r / dT) / (A \times C_0)$  を使用して計算される見かけの透過性 ( $P_{APP}$ ) として示され、式中、 $dQ_r / dT$  は、時間に対する下の区画における分子の累積量であり、Aは、細胞培養挿入物の表面積であり、 $C_0$  は、上の区画における分子の開始濃度である。これらの結果から、F M A T 結合アッセイにおいてシグナルが示されないにもかかわらず、B b b t 0 3 5 1 - F c は、両方においてインビトロBBBモデルを通過するFC5 - F c より優れた輸送を示すことが示される。

20

【0151】

実施例2 : B b b t 0 2 4 1 の構築および特徴付け

[0165] この実施例は、B b b t 0 2 4 1、すなわちFC5から開始したヒト化BBB輸送体分子の構築を説明する。

【0152】

[0166] 以下の方法 (図2A) に従って、FC5を軽鎖の付加によってヒト化した。FC5ベースの単鎖Fvフラグメント (FC5 - s c F v) フェージライブラリーは、これまでに述べられたC A T 2 . 0 ライブラリーをベースとした (Lloyd C.ら、Protein Eng Des Sel 2009 ; 22 (3) ; 159~68)。

30

【0153】

[0167] 簡単に言えば、生殖細胞系の特異的プライマーを使用してV L 遺伝子セグメントを増幅し (Hutchings C. Antibody Engineering. Springer Laboratory Manuals. 2001 ; 93~108)、その後、改変されたp C A N T A B 6ベクターにクローニングした (McCafferty J.ら、J. Appl. Biochem. Biotechnol. 1994 ; 47 ; 157~171)。このベクターは、独立した重鎖および軽鎖のクローニングを可能にするためにX h o I およびA p a L I 部位を両端に有する [ G l y 4 S e r ] 3 リンカーを含有する。すでにクローニングした軽鎖ライブラリーを、S f i I およびX h o I 指向性クローニングを介して [ G l y 4 S e r ] 3 上流にFC5 V H H を挿入するためのアクセプターベクターとして利用して、FC5 - s c F v ライブラリーを作製した (10<sup>8</sup>種の多様性)。FC5は、E L I S A によってプロテインAと結合することが示され (V H 3 ファミリーのクローンは、プロテインAと結合することができる)、それゆえに、ライブラリーをプロテインAで選択して、完全s c F v を形成し、それでもなおプロテインAと結合できるクローンのみを濃縮した。

40

【0154】

[0168] プロテインAでの選択後、フェージ粒子をそのまま大腸菌に感染させ、個々のコロニーを採取してスクリーニングのために96ウェルプレートに入れた。

50

[0169]ヒト化FC5-scFvパリアントの最初のスクリーニングは、可溶性scFvを発現する大腸菌細胞の未精製ペリプラズム抽出物(ペリプラズム調製物)を使用した蛍光微量測定技術アッセイ(FMAT)によるスクリーニングを介してなされた(図3A)。これらのscFvを、検出抗体、すなわちscFvのC末端で6×HISタグと結合すると予想されるマウス抗HIS抗体、続いて抗HIS抗体を検出すると予想されるアレクサフルオロ647で標識した抗マウスIgGと共にそのままインキュベートした。次いでこの三次複合体を、同質溶液中でマウス(B.End3)由来の脳微小血管内皮(BMVEC)細胞株に添加し、インキュベートした。細胞表面上で受容体と結合したScFvを、陽性結合事象をもたらす細胞周辺の蛍光シグナルの濃度として読み取った。図3Bに、Bbbt0241に関するFMATアッセイの結果を示す。

10

#### 【0155】

[0170]陽性scFvを「ヒット」と称し、これらをその後、説明の通りに発現させ精製した(Dobsonら、MAbs 2009;1(6);552~562)。簡単に言えば、scFvプラスミドを大腸菌TG1細胞中で培養し、1mMイソプロピル-D-1-チオガラクトシド(IPTG)で発現を誘導して、50mMトリス-HCl、0.5mMのEDTA、500mMスクロース(TESS)のpH7.4の緩衝液を使用した浸透圧性ショックによって、scFvタンパク質をペリプラズムから単離した。次いで単離されたプラスミドを再び発現させ、ニッケルカラム上での標準的なHIS精製手順によって精製した。マウスB.End3細胞株を公知の濃度の精製scFvと共に使用したFMATアッセイで、「ヒット」の結合を確認した。さらに、B.End3細胞への結合に関してヒト化FC5 hIgGのFC5 DAbと競合する能力を競合FMATアッセイで試験した。図3Cは、一定濃度のFC5 DAbおよび増加する濃度の競合物質hIgG1、例えばBbbt0241を使用した競合FMATアッセイにおけるB.End3細胞の顕微鏡写真を示す。CEA6は、陰性対照hIgG1である。図3Dは、競合を定量的に示すグラフである。次いで確認された「ヒット」を、他の種、例えばラットおよびカニクイザル由来のBMVECへの結合に関して試験した。ヒト化FC5パリアントの元のスクリーニングから、scFv Bbbt0241をリード候補として同定した。Bbbt0241の配列は、配列番号1~18および199として提示される(表2)。

20

#### 【0156】

[0171]ラットに投与されたBbbt0241の局在化を、以下のようにして定量的全身オートラジオグラフィー(QWBA)によって分析した。Bbbt0241 hIgG1 TMをトリチウム化N-スクシンイミジルプロピオネート(NSP)で標識した。バイアルに、1.6mCiを含有するNSPの単一のアリコート分配した。室温で、穏やかな窒素ガス流下で溶媒を蒸発させた。残留物をDMSO(Hybril-Max-シグマ(Sigma))に再懸濁し、混合して、放射標識された材料の完全な溶解を確認した。バイアルに、抗体溶液の単一のアリコート(1mL)を分配した。次いで溶液を、+4°Cでおよそ16時間(一晚)そのまま静置した。次いで、MWC04000ゼブラスピ(Zebraspin)脱塩カラム(ピアース(Pierce))を使用したゲルろ過によって[3H]-抗体溶液を精製した。精製後、溶液中の精製Bbbt0241のUV応答とそれに続くサイズ排除クロマトグラフィーによる分析に基づき材料の特異的な活性を決定し、さらに放射活性の存在を決定した。[3H]-Bbbt0241を、pH7.4のリン酸緩衝塩類溶液中の静脈注射用溶液として製剤化した。

30

40

#### 【0157】

[0172]雄のスプラギーダーラットに、単回用量のトリチウム化Bbbt0241を30mg/kgで静脈内投与した。投与後24時間で3匹の動物を、血漿中の量と比較した脳組織中のBbbt0241のレベルについて分析した。投与後24時間で、動物をイソフルランを使用して麻酔し、心臓穿刺によって約1mLの血液を収集した。次いで、10IU/mLリチウムヘパリンを含有する約50mLのリン酸緩衝塩類溶液(PBS)を使用した心臓の左心室を介した放血によって動物を殺した。

50

## 【 0 1 5 8 】

[0173] 脳を取り出し、- 20 から - 30 の間に冷却したイソペンタン中で凍結した。分析の前、脳サンプルを - 70 未満で貯蔵した。血液を血清に加工し、L S C によって放射活性レベルを分析した。灌流の程度に関してラット全脳を評価し、次いで重さを量った。およそ5倍量の冷たい(およそ4 の)、Complete (登録商標) プロテアーゼ阻害剤(ロシュ・ダイアグノスティクス(Roche Diagnostics)) を含有するP B S を全脳サンプルに添加し、次いでそれらを、10 mL のポッターエルページェムモルタルタイプガラスホモジナイザーで、PTFE 乳棒を用いて、2 × 10 回の時計回りのストロークと5秒の休止時間を使用してホモジナイズした。未加工の脳ホモジネートのアリコートパックカード(Packard) 306 サンプルコンバスターで燃焼させ、放射活性レベルを測定し、これを使用してサンプル加工後の放射活性の回収率を計算した。

10

## 【 0 1 5 9 】

[0174] ホモジネートをLoBindチューブ(エッペンドルフ)に移し、4、16000 g で1時間の遠心分離によって細胞内および細胞外タンパク質を含有する可溶性フラグメントに加工した。可溶性分画の除去後、得られたペレットを、ガラスホモジナイザーで、1 × 10 回の時計回りのストロークを使用して0.5% トウイン20 を含有する5倍量の冷P B S 中のComplete (登録商標)(およそ4) 中でホモジナイズした。ホモジネートをLoBindチューブに移し、4、16000 g で1時間遠心分離した。得られたペレット画分は、膜タンパク質に結合した放射活性ならびに実質およびB B B 内皮からの膜に結合した標的受容体を含有していた。最後に、上述したように、ペレット画分に緩く結合した全ての残存する放射活性を、室温で、1% S D S を含有する5倍量のP B S 中のComplete (登録商標) で抽出し、その後LoBindチューブ中で均質化し、遠心分離した。全画分の重さを全てのサンプルにつき記録し、放射活性レベルを収集された分画の重さを量ったアリコート中で測定した。次いでこれらのサンプルを液体シンチレーション計数器(L S C) によって分析した。全ての組織加工段階中、サンプルを氷上で維持した。

20

## 【 0 1 6 0 】

[0175] 投与後5分、4時間、24時間、および72時間に、4匹の動物を全身および脳への曝露に関してスクリーニングした。投与後5分、4、24および72時間に、イソフルラン麻酔下でヘキサン/固体CO<sub>2</sub>(約-70) 中に浸漬することによって動物を殺した。殺す前に、血液サンプル(およそ0.5 mL) を末梢の尾静脈から採取し、血清に加工した。肢および尾部の除去後、胴体を左側面を最も上にしてカルボキシメチルセルロースの1%水溶液中に埋め込み、固体CO<sub>2</sub>で-70 に冷却したヘキサン中で少なくとも30分間凍結した。動物のブロックを、断片化に必要なまで-20 で貯蔵した。断片化時に各ブロックを、およそ-20 に維持したライカ(Leica) C M 3 6 0 0 クリオマクロトーム(Cryomacrotome)(ライカマイクロシステムズ社(Leica Microsystems GmbH)、ドイツ)に搭載させた。できる限り多くの組織が包含されるようにラット身体最大の異なるレベルで全身の矢状断片(30 μm) を調製した:

30

レベル1: 眼窩外の涙腺

レベル2: 眼窩内の涙腺

レベル3: ハーダー腺/副腎

レベル4: 甲状腺

レベル5: 脳および脊髄。

40

## 【 0 1 6 1 】

[0176] 断片を断片化テープ(T 4 1 0、T A A B) 上に搭載させ、標識した。全ての断片を、蛍光イメージングプレートに曝露する前におよそ1時間凍結乾燥した(L y o P r o 3 0 0 0 凍結乾燥機)。目的の組織および臓器を最もよく表す蛍光イメージングのために断片を選んだ。事前に消光させた蛍光イメージングプレートに、断片を校正標準と共に設置した。イメージングプレートを室温で14日間曝露し、環境放射線から保護するために鉛製の遮蔽ボックス中の遮光カセットに封入した。曝露後、F u j i F L A - 5 1 0

50

0 イメージアナライザー（レイテック（Raytek）、英国）を使用して、イメージングプレート（Seescan）バージョン2（ラボロジック（LabLogic）、英国）を使用して、目的の組織および臓器を定量した。

【0162】

[0177] 定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）研究から、B b b t 0 2 4 1 h I g G 1 T M が、脳および脊髄の別々の領域、すなわち小脳皮質、大脳の灰白質、脊髄の灰白質および脳橋に特異的に輸送されたことが示された。曝露研究から、静脈内（i . v . ）投与後24時間で、B b b t 0 2 4 1 の脳：血漿の比率が1～1.5%であったことが実証された。（マウスにおいて、B b b t 0 6 2 6 h I g G 1 T M でも類似の曝露レベルも実証された）。

10

【0163】

[0178] また B b b t 0 2 4 1 も、インビトロのトランスサイトーシスアッセイで、Haqqani A. S.、Caram-Salas N.、Ding W.、Brunette E.、Delaney C. E.、Baumann E.、Boileau E.、Stanimirovic D. Multiplexed Evaluation of Serum and CSF Pharmacokinetics of Brain-Targeting Single-Domain Antibodies Using a Nano-LC SRM-ILIS Method. Mol. Pharmaceutics. 2013; 10, 1542～1556で説明される方法を使用して、陰性対照 I g G ( N I P 2 2 8 I g G ) と並行して試験した（図4A）。図4Bに結果を示す。

【0164】

[0179] 実施例1において B b b t 0 3 5 1 の輸送体活性を改善すると同定された突然変異、カバットの97位における T 9 7 A 置換、およびカバットの100a位における T 1 0 0 a D 置換が B b b t 0 2 4 1 に導入されると、結果として突然変異型の B b b t 0 2 4 1 m が生じる。次いで改変された s c F v または B b b t 0 2 4 1 m の I g G 型を、実施例1で説明したインビトロのトランスサイトーシスアッセイを使用して改善された輸送体活性に関して試験する。

20

【0165】

実施例3：BBB輸送体分子に関する追加のライブラリーのスクリーニング

[0180] マウス脳内皮（B . E n d 3）細胞を使用して競合細胞表面選択を実行し、B b b t 0 2 4 1 および F C 5 と競合するか、またはそれと類似の結合特性を有する追加のファージディスプレイライブラリーから、ファージディスプレイされた s c F v を同定した。3つのナイーブライブラリーをスクリーニングした。洗浄剤、例えば2%ホルムアルデヒド、続いて P B S 中の0.2%トリトンの添加により B . E n d 3 細胞を室温で15分間破裂させ、室温で15分間インキュベートし、その後細胞を遠沈させ、P B S で洗浄し、これを F C 5 / B b b t 0 2 4 1 抗原のより大きいプールと接触できるようにすることによって、F C 5 / B b b t 0 2 4 1 標的抗原に結合する s c F v の濃縮にとってより優れた条件をもたらした。細胞を破裂させた後、細胞を上述したファージライブラリーと共に室温で1～2時間インキュベートした。その後細胞を P B S で最大10回洗浄して、細胞から全ての未結合のまたは弱く結合したファージ粒子を除去した。その後、洗浄した細胞に B b b t 0 2 4 1 h I g G を添加し、再度1～2時間インキュベートし、この I g G を細胞に結合させ、選択から結合した s c F v を競合解離させた。細胞を 2 0 0 0 r p m で遠沈し、上清を採取し、これを使用して増殖中の T G 1 細胞に感染させた。競合溶出選択を複数回繰り返して実行して、B b b t 0 2 4 1 と同じまたは類似のエピトープに結合する s c F v を濃縮した。

30

40

【0166】

[0181] 個々のクローンの結合を示すために、B . E n d 3 細胞での F M A T アッセイにおいて、実施例1で説明されるように大腸菌ペリプラズム調製物を使用してライブラリーの最初のスクリーニングを実行した。この最初のスクリーニングからのヒットを選択し、配列決定し、その後、固有の s c F v を精製タンパク質調製（H I S 調製）に供し、確認のための結合 F M A T アッセイで使用した。

【0167】

[0182] アッセイされた B b b t 0 2 4 1 、 および F C 5 から誘導された S c F v （模倣

50

剤および非模倣剤)の全てが、固有の結合プロファイルを有しており、それによりそれらは、細胞表面上で全く目立たない点状の結合部で細胞の部分集団のみ(通常約25~30%)と結合することが観察された。

【0168】

[0183] B b b t 0 2 4 1 h I g G 1 または F C 5 - F c のいずれかが競合可能な場合、結合した s c F v 複合体によって提供される蛍光シグナルが減少したことから、特定の s c F v が、細胞結合に関して B b b t 0 2 4 1 / F C 5 ( F C 5 模倣剤と称される、図 6 A ) と競合したことが示された。最初に、10種の固有の F C 5 模倣剤 s c F v が同定された。しかしながら、そのうち数種が、他の細胞、例えば初代ラットまたはイヌ大血管脳内皮細胞およびヒト D 3 脳内皮細胞との F M A T 結合アッセイで試験した場合、種交差反応性を欠いていたため、それらを不適切にする安定性の低減のためにさらなる特徴付けから除外された。残りの7種の s c F v、すなわち B b b t 0 6 2 6、B b b t 0 7 2 7、B b b t 0 6 3 2、B b b t 0 6 5 4、B b b t 0 7 2 6、B b b t 0 7 3 2、および B b b t 0 7 5 4 を F C 5 模倣剤と称し、これらをさらに特徴付けた。リード s c F v を、ヒト I g G 1 - T M - L 2 3 4 F / L 2 3 5 E / P 3 3 1 S ( O g a n e s y a n V ら、Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2008: 64 (6); 700~704) を使用して I g G 1 様式に変換し、競合 F M A T を実行して、これらの s c F v の I g G 型が、試験された全ての他の F C 5 模倣剤と、細胞表面への結合に関して競合できるかどうかを決定した。7種の F C 5 模倣剤は、それらが互いに競合することができる方式に応じて、3つの競合階級: B b b t 0 6 2 6 および B b b t 0 7 2 7 を包含する第1のグループ、B b b t 0 6 3 2 および B b b t 0 6 5 4 を包含する第2のグループ、ならびに B b b t 0 7 2 6、B b b t 0 7 3 2、および B b b t 0 7 5 4 を包含する第3のグループに分類された。

10

20

【0169】

[0184] スクリーニングされたファージペリプラズム調製物から、B b b t 0 2 4 1 に類似した結合プロファイルを有する別の15種の固有の s c F v を同定したが、それらの B . E n d 3 細胞への結合は、B b b t 0 2 4 1 h I g G 1 または F C 5 - F c によって競合的に阻害されなかった(図 6 B)。これらのうち3種が、許容できる安定性、配列および交差反応性特性を有することが見出された。これらの s c F v、B b b t 0 6 4 3、B b b t 0 6 7 4、および B b b t 0 7 5 5 を、F C 5 様非模倣剤と称した。

30

【0170】

[0185] これらのコンストラクトの V H および V L 領域の D N A 配列、加えて s c F v、V H、V L、ならびに様々な C D R およびフレームワークのアミノ酸配列は、表 2 に示される配列番号として提示される。

【0171】

【表 2】

表2:BBB輸送体分子の配列

構造	Bbbt 0241	Bbbt 0626	Bbbt 0632	Bbbt 0654	Bbbt 0726	Bbbt 0727	Bbbt 0732	Bbbt 0754	Bbbt 0674	Bbbt 0755	Bbb t 0643	Bbbt 0351	Bbbt 0579	Bbbt 0671
VH領域を コードす るDNA	1	19	37	55	73	91	109	127	145	163	181	199	208	
VH全体	2	20	38	56	74	92	110	128	146	164	182	200	209	226
VH CDR1	3	21	39	57	75	93	111	129	147	165	183	201	210	
VH CDR2	4	22	40	58	76	94	112	130	148	166	184	202	211	
VH CDR3	5	23	41	59	77	95	113	131	149	167	185	203	212	
VH FW1	6	24	42	60	78	96	114	132	150	168	186	204	213	
VH FW2	7	25	43	61	79	97	115	133	151	169	187	205	214	
VH FW3	8	26	44	62	80	98	116	134	152	170	188	206	215	
VH FW4	9	27	45	63	81	99	117	135	153	171	189	207	216	
VL領域を コードす るDNA	10	28	46	64	82	100	118	136	154	172	190		217	
VL全体	11	29	47	65	83	101	119	137	155	173	191		218	227
VL CDR1	12	30	48	66	84	102	120	138	156	174	192		219	
VL CDR2	13	31	49	67	85	103	121	139	157	175	193		220	
VL CDR3	14	32	50	68	86	104	122	140	158	176	194		221	
VL FW1	15	33	51	69	87	105	123	141	159	177	195		222	
VL FW2	16	34	52	70	88	106	124	142	160	178	196		223	
VL FW3	17	35	53	71	89	107	125	143	161	179	197		224	
VL FW4	18	36	54	72	90	108	126	144	162	180	198		225	

10

20

## 【 0 1 7 2 】

[0186]リードFC5模倣剤および非模倣剤候補を、h I g G 1 T Mおよびh I g G 1 T M + A D C様式に変換した。Fcドメイン中の3つの残基(T 2 8 9 C、A 3 3 9 CおよびS 4 4 2 C)をシステインに変換して、ペイロードの接続を可能にした(Dimasi N.ら、J. Mol. Biol. 2009 ; 393 ; 672 ~ 692。)

30

## 【 0 1 7 3 】

[0187]h I g G 1 T M様式において、クロロメチルケトン(CMK)反応性基を有するペプチドを、チオール化学を介して、h I g G 1 T MのヒンジおよびCH1 - CL1領域における鎖間および鎖内のジスルフィド結合でシステイン残基に接続した。

## 【 0 1 7 4 】

実施例4：インビトロにおけるFC5模倣剤およびFC5様非模倣剤の特徴付け

[0188]FC5模倣剤およびFC5様非模倣剤を、追加のインビトロおよびインビボのアクセスによって特徴付けた。ヒットを、サイプロオレンジ(Sypro orange)標準方法(Ericssonら、2006 Analytical Biochemistry 357、289~298頁)に従って熱安定性に関して試験し、さらに可能性のあるN結合型またはO結合型糖付加または脱アミド化部位などの配列の信頼性に関して試験した。実施例3で説明されるようなマウス脳内皮細胞株B . e n d 3への結合に関するscFvヒットの試験に加えて、以下のFMAT方法により、scFvをB . e n d 3細胞への内在化に関して試験した。これまでに述べられたような結合FMATアクセスと同様に、ただし以下のようにプロトコルを変更して内在化FMATを実行した。FMATを37℃で実行し、抗マウス検出抗体はCypher 5 Eで標識し、0.1%BSAを含有するリンゲルHEPES緩衝液で実行した。FC5模倣剤およびFC5様非模倣剤を、h I g G様式で、初代ラット脳内皮細胞(RBEC)、初代カ

40

50

ニクイザル脳内皮細胞への結合に関して、さらにヒトD3細胞への結合に関して試験した。

【0175】

[0189]表3および4に、これらのアッセイの結果を示す。

【0176】

【表3】

表3 FC5模倣剤のリード

	scFv B.end3 結合	Bbbt0241 IgG 競 結合	scFv B.End3 内在化	IgG B.end3 結合	IgG RBEC 結合	IgG CBEC 結合	IgG D3(ヒト) 結合	熱安定性 (scFv)	ライブラリー
Bbbt0626	√	√	√	√	√	√	√	√	BMVtrp
Bbbt0727	√	√	√	√	√	√	√	√	BMVtrp
Bbbt0632	√	√	√	√	√	√	√	√	CStrp
Bbbt0654	√	√	√	√	√	√	√	√	DP47
Bbbt0726	√	√	√	√	√	√	√	√	BMVtrp
Bbbt0732	√	√	√	√	√	√	√	√	DP47
Bbbt0754	√	√	√	√	√	√	√	√	DP47

10

20

【0177】

【表4】

表4 FC5非模倣剤のリード

	scFv B.end3 結合	Bbbt0241 IgG 競 結合	scFv B.End3 内在 化	IgG B.end3 結合	IgG RBEC 結合	IgG CBEC 結合	IgG D3(ヒト) 結合	熱安定性 (scFv)	ライブラリー
Bbbt0643	√	X	√	√	√	√	√	√	DP47
Bbbt0674	√	X	√	√	√	√	√	√	DP47
Bbbt0755	√	X	√	√	√	√	√	√	DP47

30

【0178】

[0190]次いで全てのリードクローン(Bbbtと称される)を、ラット、マウスおよびウシトランスサイトーシスアッセイで、説明の通りに、ビオチン化した精製scFvの輸送として試験した(Watson P. M. D.ら、BMC Neuroscience 2013:14、59~79; Coisne C.ら、Lab Invest. 2005:85、734~746; Dehouck M-P.ら、J. Neurochem. 1990:54、1798~1801)。ScFvを、scFvのC末端におけるFLAGと10xHISタグとの間において遊離のシステイン残基で特異的にビオチン化した。ELISAにより、96ウェルのNi-NTAプレートでHISタグを介して輸送されたscFvを捕獲することによりScFv輸送を検出し、ビオチンをユーロピウムで標識したストレプトアビジンで検出した。

40

【0179】

実施例5:FC5模倣剤およびFC5様非模倣剤のインビボにおける特徴付け  
ラット利尿モデル

[0191]BBBを通過して鎮痛剤を含むペイロードを輸送することにおける本開示の輸送体ポリペプチドの機能を、以下のようにラット利尿モデルを使用して実証した。

【0180】

[0192]ダイノルフィン、前駆タンパク質であるプロダイノルフィンから生じる内因性

50

オピオイドペプチドのクラスである。これらは、1モル当たりモルヒネより6~10倍高い効力を示し、主として - オピオイド受容体 (KOR) を介してそれらの作用を発揮する。ダイノルフィン、疼痛応答の調節因子であることがこれまでに示されている。ラット脊髄のクモ膜下腔にダイノルフィンペプチドを注入すると、用量依存性の無痛が引き起こされ、これはナロキソン処置によって一部消失する (Han JSら、Sci. Sin., Ser. B, Chem. Biol. Agric. Med. Earth Sci. 27 (2) : 169~77. (1984))。ダイノルフィンペプチドは、動物において末梢で制限され、BBBを通過することができない。しかしながら、BBB標的部分にカップリングされたダイノルフィンペプチドは、BBBを通過して送達され、疼痛の緩和をもたらすことができた。

#### 【0181】

[0193]そのために、Bbbt0241 (scFvおよびIgG様式の両方) を発現させ、精製し、クロロメチルケトン活性基を使用して、Bbbt0241scFvまたはhIgG上のシステイン残基にダイノルフィンペプチドをカップリングすることによって - オピオイドペプチド (ダイノルフィン) にカップリングした (図5A)。scFv - ダイノルフィンコンジュゲートをラットに注射し (i.v.)、4時間にわたり1時間おきに利尿を測定した。図5Bに研究設計を示す。ダイノルフィンがBBBを通過して輸送される場合、利尿の増加が観察される。ダイノルフィン単独の末梢投与は作用を示さない。図5Cは、ダイノルフィンにコンジュゲートしたBbbt0241をラットに投与した際に観察された尿排出量の有意な増加を示す。

#### 【0182】

[0194]FC5模倣剤および非模倣剤のscFvおよびIgG様式の両方を、ラット利尿モデルで試験した。図7Aは、Bbbt0643、Bbbt0674、Bbbt0754、およびBbbt0654のIgG型を投与した際に観察された、ビヒクルを超える尿排出量の有意な増加を示す。IgG化合物を体重1kg当たり4mlで投与した。図7B、図7Cおよび図7Dは、対照と比較した異なる用量のBbbt0626 hIgGの作用を示す (用量は、グラフ上においてmg/mlで示される)。結果から、ダイノルフィンにコンジュゲートしたBbbt0626の用量に伴い作用が増加することが示される。それに続くアッセイから、表3に記載のFC5模倣剤の全ておよび表4に記載のFC5非模倣剤の全てが、利尿モデルにおいて陽性であったことが実証された (データ示さず)。

#### 【0183】

##### マウスの坐骨神経部分結紮モデル

[0195]神経因性疼痛は、中枢神経が介在することから、疼痛の緩和をもたらすためには、薬物をCNSに到達させなければならない。神経因性疼痛モデルはすでに説明されており (Seltzer Zら、Pain 43 : 205~218 (1990))、それによれば、マウスの1本の脚の坐骨神経を部分結紮し、結果として損傷した脚において脚の圧痛の閾値を低下させる。鎮痛薬は、CNSに到達することができれば、疼痛を低減すると予想され、脚の圧力比は、より等しくなると予想される。図8に、モデルの概略図を示す。

#### 【0184】

[0196]神経因性疼痛を緩和するための方策としてのIL-1受容体拮抗作用の使用は、実証されている (Gabayら、Eur J Pain. 2011 Mar ; 15 (3) : 242~8 (2011))。IL-1Raは、天然に存在するIL-1受容体アンタゴニストである。このタンパク質はBBBを通過せず、セルツァー (Seltzer) モデルによって測定する場合、疼痛の軽減を達成するにはクモ膜下に送達しなければならない。しかしながら、BBB標的部分にカップリングされたIL-1Raは、i.v.投与後、BBBを通過して送達されて、疼痛の緩和をもたらすことができた。

#### 【0185】

[0197]この目的を達成するために、Bbbt0241、Bbbt0632、Bbbt0626、およびBbbt0726 (およびNIP228対照IgG) を、重鎖定常領域のC末端にリンカーを介して融合したIL-1Raとの融合コンストラクトとして発現させた。これらまたは類似のビルディングブロックからのこれらの融合タンパク質のいずれか

10

20

30

40

50

の構築は、十分に当業界において通常の技術を有する者の知識の範囲内である。融合コンストラクトを、標準的な方法に従ってCHO-EbNA細胞で発現させ(Daramolaら、Biotechnol Prog. 2014 30:132~41)、得られたタンパク質を、プロテインAの親和性およびゲルろ過によって精製した。インビトロでのアッセイにおいて、このコンストラクトはIL1Ra活性を保持することが示された(データ示さず)。

【0186】

[0198]0日目に動物対象は外科手術を受けて、手術後7日目および10日目に機械的な痛覚過敏に関して試験された。外科手術後13日目におけるIL-1Ra融合タンパク質または対照の投与後、投与後2時間(一部の実験)、4時間、1日、2日および4日で機械的な痛覚過敏に関して動物を再度試験した。

【0187】

[0199]無痛覚計(analgysemeter)を使用して機械的な痛覚過敏を決定した(Randall L Oら、Arch Int Pharmacodyn Ther. 111:409~19(1957))(Ugo Basile)。逃避応答が観察されるまで、それぞれ順番に各後肢の背面に力を増加させて適用した。そのポイントで力の適用を中断し、重量をグラムで記録した。データを、同側および反対側の脚ごとに、逃避の閾値としてグラムで表した。ベースラインの読み取りを確立した後、マウスを、ほぼ等しい同側/反対側の比率を有する2つのグループに分割し、外科手術を施した。マウスを3%イソフルランで麻酔した。この後、大腿の中央のレベルでの切開による鈍的剥離によって、およそ1cmの左坐骨神経を露出させた。次いで縫合材(10/0のバージンシルク:エチコン)を背面の神経の3分の1に通し、きつく縛った。接着剤を使用して切開部を閉じ、試験開始前の少なくとも7日間、マウスを回復させた。偽の手術をしたマウスも同じプロトコルを受けたが、神経を露出させた後、創傷を接着剤で閉じ、そのまま回復させた。

【0188】

[0200]マウスにおける予備的な用量応答研究から、40mg/kgまたは100mg/kgのBbbt0241およびBbbt0632-IL-1Ra融合体の静脈内(i.v.)投与は、有意な無痛モデル系を示した(データ示さず)ことが示される。図9は、100mg/kgのBbbt0632、Bbbt0626、およびBbbt0726 IL-1Ra融合体のi.v.投与で有意な無痛が観察され、作用が投与後2日より長く継続したことを示す。Bbbt0626 IL-1Ra融合タンパク質を用いて追加のインビボでの研究を行った。融合タンパク質を25mg/kg、50mg/kg、および100mg/kgでi.v.投与したところ、統計学的に有意な用量依存性の作用が実証された(図10)。さらに、i.v.投与と皮下(s.c.)投与との比較から、2種の送達経路間に作用の差がないことが示された(図11Aおよび11B)。

【0189】

[0201]最後に、反復投与の作用を研究した。この研究において、0日目に動物は外科手術を受けて、手術後7日目および10日目に機械的な痛覚過敏に関して試験された。13日目に、Bbbt0626-IL-1RaまたはNIP228-IL-1Raのいずれかを全ての動物に投与し、投与後4時間および1日で機械的な痛覚過敏に関して試験した。14日目に、Bbbt0626-IL-1RaまたはNIP228-IL-1Raのいずれかを一部の動物に再度投与し、4時間後に再度試験した。この研究は、動物の数が多いため、同数で半分に分けて行われた。次いで動物を投与後4日まで試験した。

【0190】

[0202]図12Aおよび12Bに、結果(組み合わせられた研究からの)を示す。単回投与された動物において、ピークの鎮痛作用は、初期の研究の場合と同様に、投与後4時間から1日の間であった。2回の投与を受けた動物において、無痛のレベルは増加し、さらに2回目の投与後の4時間でピークの無痛を示した。作用は、第2回目の投与後の4日間にわたり統計学的に有意なままであった。1回目の投与(17日目)から4日後に2回目の用量が投与されたさらなる研究において、それでもなお増加した作用が観察され、2回目の投与から少なくとも4日間続いた(データ示さず)。

10

20

30

40

50

【0191】

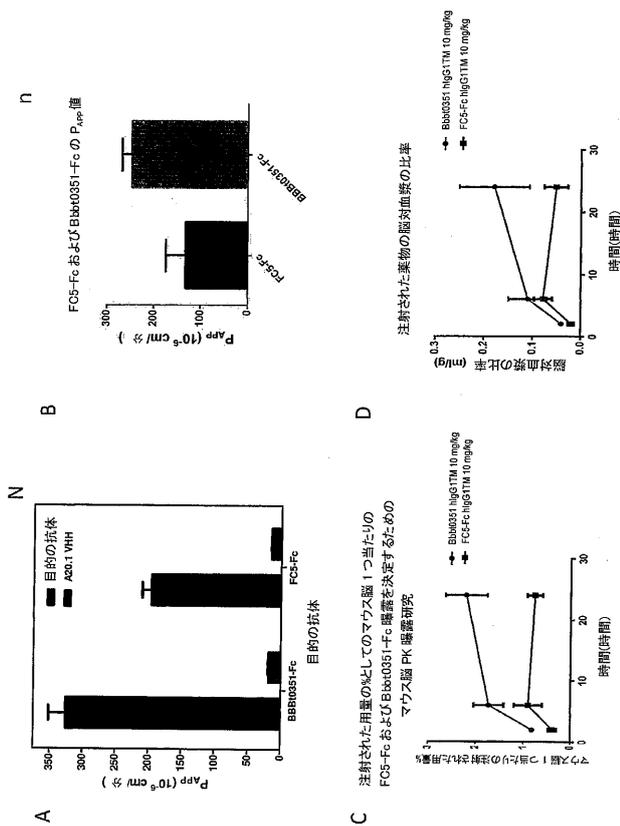
[0203] 前述した具体的な実施態様の説明は、他者が、当業界の技術範囲内の知識を適用することによって、このような具体的な実施態様を、余計な実験を行うことなく、本発明の開示の全般的な概念から逸脱することなく、様々な適用のために容易に改変したり、および/または適合させたりすることができる程度に詳細に本開示の全般的な性質を解明していると予想される。それゆえに、このような適合および改変は、本明細書で示された教示および指針に基づき、開示された実施態様の均等物の意味および範囲に含まれることが意図される。本明細書における表現または用語は、説明の目的のためであり、限定の目的のためではないことが理解されると予想され、したがって本明細書に記載の用語または表現は、当業者によって教示および指針の観点で解釈されることとする。

10

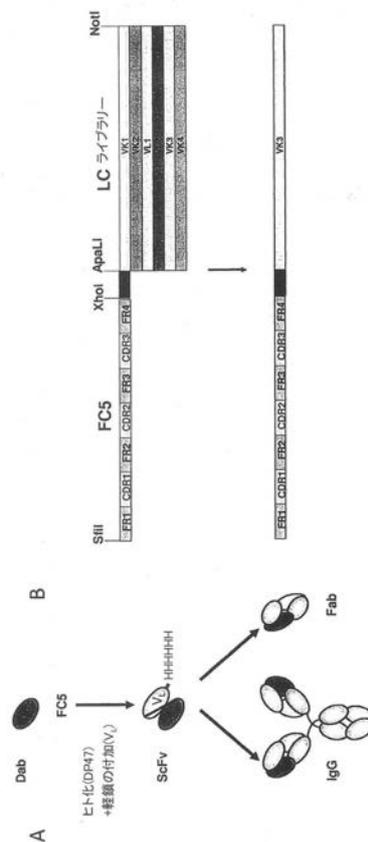
【0192】

[0204] 本発明の開示の幅および範囲は、上記で説明した例示的な実施態様のいずれによっても限定されないものとするが、以下の特許請求の範囲およびそれらの均等物によってのみ定義されるものとする。

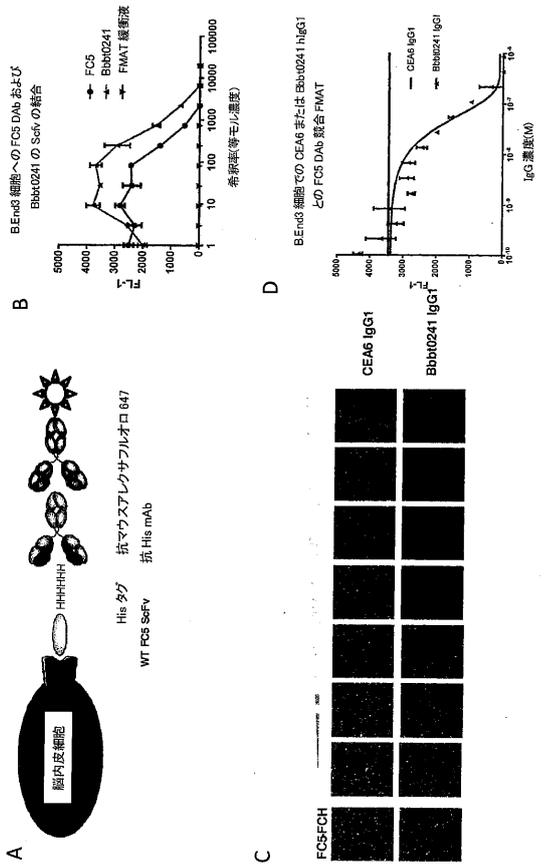
【図1】



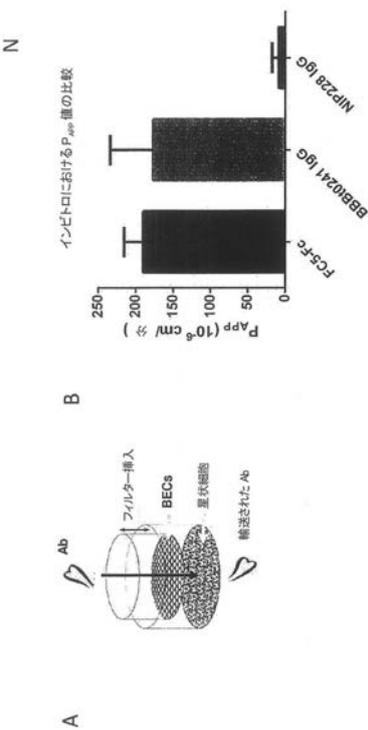
【図2】



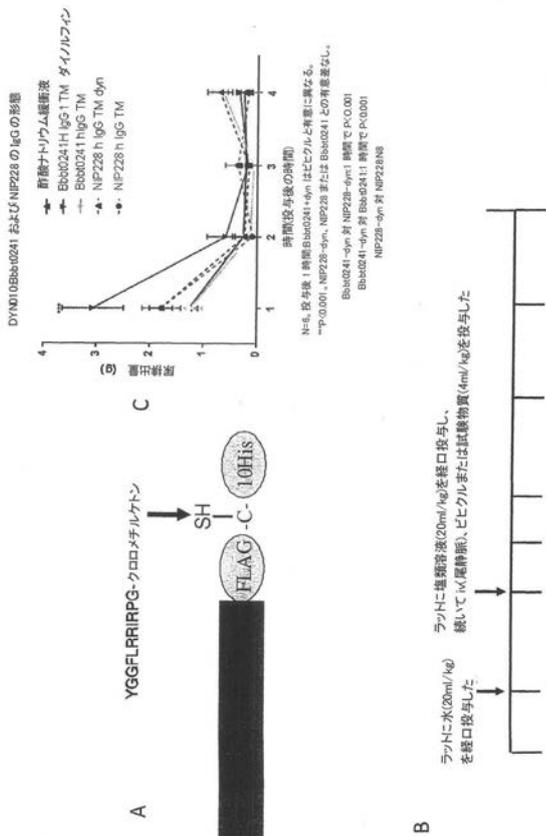
【 図 3 】



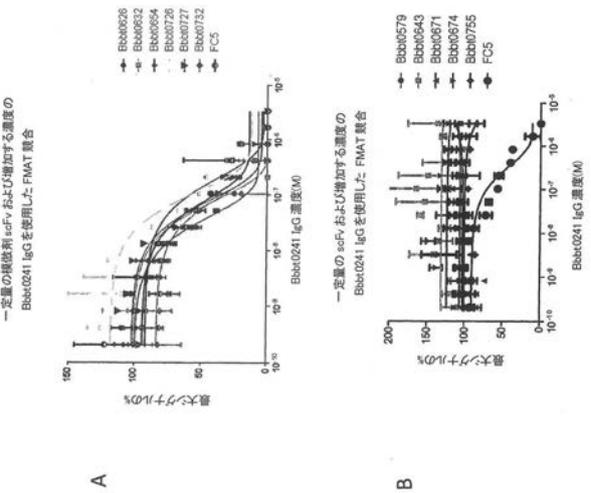
【 図 4 】



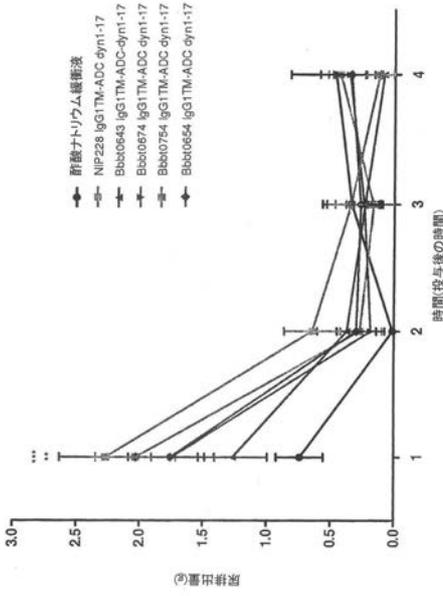
【 図 5 】



【 図 6 】

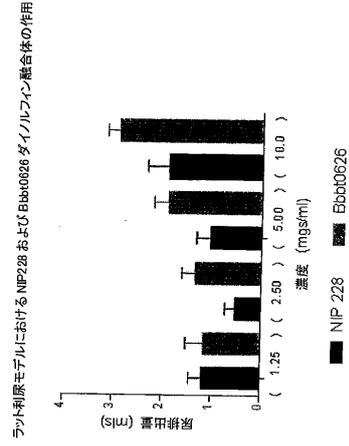


【 図 7 A 】



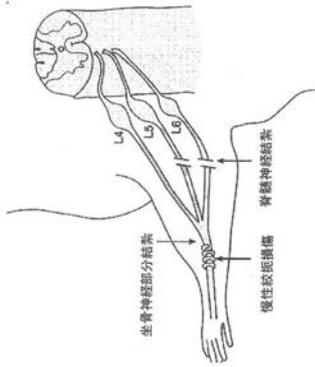
N=6. 従属因子として時間および処置を用いた二元配置 ANOVA を使用して分析されたデータ。それに続くボンフェローニの事後検定を使用して得られた統計的有意性。対ヒトセル。投与後 1 時間 Bbb0754-dyn および NIP228-dyn \*\*\*P<0.001, Bbb0674-dyn および Bbb0654-dyn \*\*P<0.05。

【 図 7 B 】



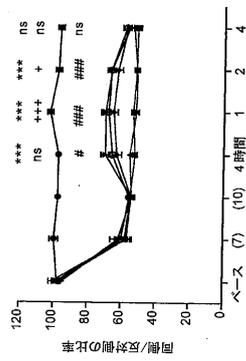
ラット初尿モデルにおける NIP228 および Bbb0626 タイロキシン融合体の作用

【 図 8 】



【 図 9 】

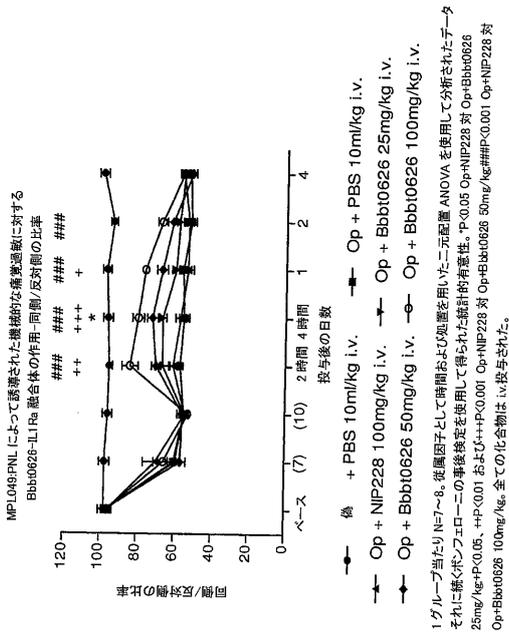
MPL083-PNL によって誘発された機能的な疼痛過敏に対する FC5 抗体剤-IL1Ra 融合体の作用-同側/反対側の比率



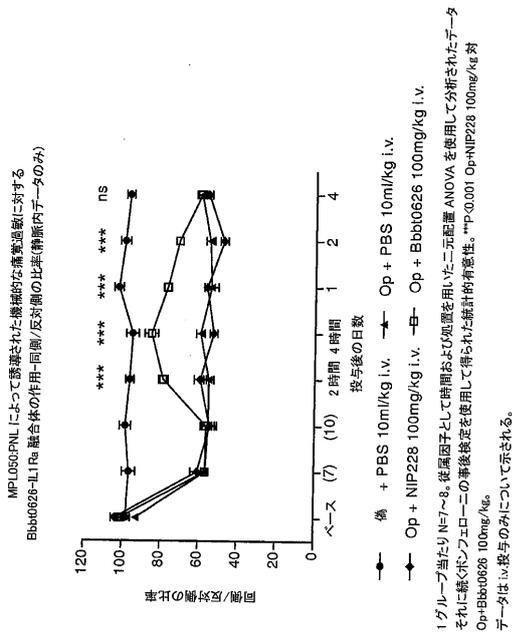
● 偽 + PBS 10ml/kg s.c. ● Op + PBS ヒトセル 10ml/kg s.c.  
 ▲ Op + NIP228 100mg/kg s.c. ▲ Op + Bbb0626-IL1Ra 100mg/kg s.c.  
 ◆ Op + Bbb0632-IL1Ra 100mg/kg s.c. ◆ Op + Bbb0726-IL1Ra 100mg/kg s.c.

1グループ当たりN=9~10。従属因子として時間および処置を用いた二元配置 ANOVA を使用して分析されたデータ。それに続くボンフェローニの事後検定を使用して得られた統計的有意性。\*\*\*P<0.001 Op-NIP228 対 Op+Bbb0626-IL1Ra; #P<0.05, ++P<0.001 Op-NIP228 対 Op+Bbb0632-IL1Ra; #P<0.05, ##P<0.001 Op+NIP228 対 Op+Bbb0726-IL1Ra。

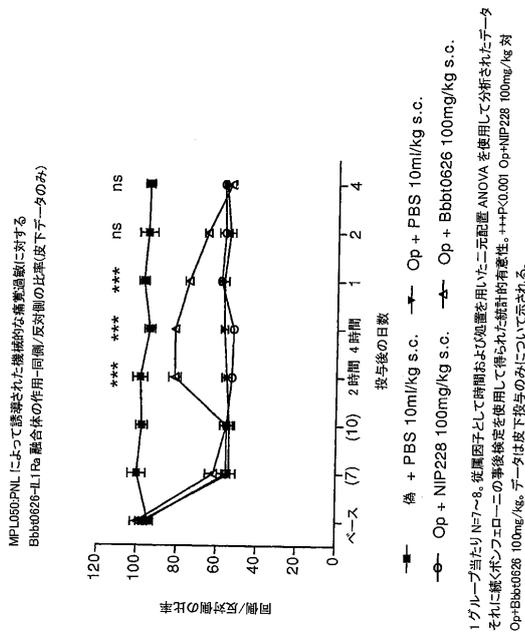
【 図 1 0 】



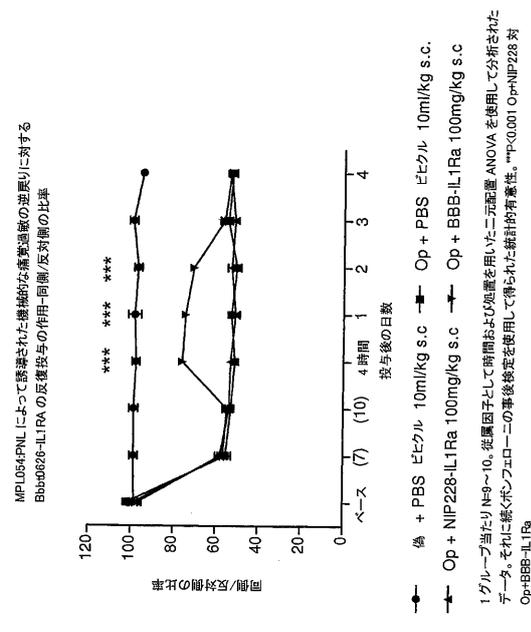
【 図 1 1 A 】



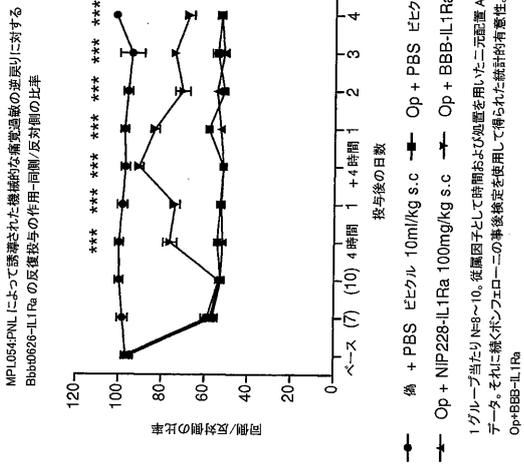
【 図 1 1 B 】



【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】



【 配列表 】

2018505662000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/080539
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/40 A61K47/48 C07K14/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
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		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/057445 A1 (CA NAT RESEARCH COUNCIL [CA]; MURUGANANDAM ARUMUGAM [CA]; TANHA JASMID) 25 July 2002 (2002-07-25) claim 21; sequence SEQ ID No. 85 -----	1-4, 6-43, 48-74
Y	WO 2007/036021 A1 (CA NAT RESEARCH COUNCIL [CA]; ABULROB ABEDLNASSER [CA]; STANIMIROVIC) 5 April 2007 (2007-04-05) examples 1-4 ----- -/--	1-4, 6-43, 48-74
<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		Date of mailing of the international search report
1 April 2016		21/06/2016
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  Marinoni J-C

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/080539

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 A ET AL: "The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells",            JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, WILEY INTERSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 95, no. 4, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 1201-1214, XP003010699, ISSN: 0022-3042, DOI: 10.1111/J.1471-4159.2005.03463.X            the whole document</p> <p>-----</p>	1-4, 6-43, 48-74
Y	<p>WO 2013/106577 A2 (BIOGEN IDEC INC [US])            18 July 2013 (2013-07-18)</p> <p>claims 1-13; figures 1-4</p> <p>-----</p>	1-4, 6-43, 48-74
Y	<p>WO 2006/099747 A1 (CA NAT RESEARCH COUNCIL [CA]; TANHA JAMSHID [CA])            28 September 2006 (2006-09-28)            page 9, line 8 - line 25</p> <p>-----</p>	1-4, 6-43, 48-74
Y	<p>WO 2010/080463 A1 (IMCLONE LLC [US]; ZHU ZHENPING [US]; HIRAGA KAORI [US]; HAIDAR JAAFAR) 15 July 2010 (2010-07-15)            claim 1</p> <p>-----</p>	1-4, 6-43, 48-74

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2015/080539**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-4, 6-43, 48-74(all partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2015/ 080539

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-4, 6-43, 48-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively:(a) SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, and SEQ ID NO: 14.

---

2. claims: 1-45, 48-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively: (b) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, and SEQ ID NO: 231.

---

3. claims: 1-45, 48-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively: (c) SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, and SEQ ID NO: 231;

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

## 4. claims: 1-45, 48-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively: (d) SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, and SEQ ID NO: 68;

---

## 5. claims: 1-45, 48-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively: (e) SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, and SEQ ID NO: 231;

---

## 6. claims: 1-45, 48-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively: (f) SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, and SEQ ID NO: 231;

---

International Application No. PCT/ EP2015/ 080539

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

## 7. claims: 1-45, 48-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively: (g) SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, and SEQ ID NO: 231;

---

## 8. claims: 1-45, 48-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively: (h) SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, and SEQ ID NO: 140;

---

## 9. claims: 1-43, 46-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively: (i) SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, and SEQ ID NO: 158;

---

International Application No. PCT/ EP2015/ 080539

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

## 10. claims: 1-43, 46-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively: (j) SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, and SEQ ID NO: 176;

---

## 11. claims: 1-43, 46-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively: (k) SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, and SEQ ID NO: 194

---

## 12. claims: 1-43, 46-74(all partially)

Transporter molecule comprising an immunoglobulin polypeptide, wherein the polypeptide comprises an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-1 (H-CDR1), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-2 (H-CDR2), an immunoglobulin heavy chain complementarity-determining region-3 (H-CDR3), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-1 (L-CDR1), an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-2 (L-CDR2), and an immunoglobulin light chain complementarity-determining region-3 (L-CDR3); wherein the H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, and L-CDR3 comprise, respectively: (l) SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 220, and SEQ ID NO: 221;

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/080539

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 02057445	A1	25-07-2002	CA 2441903 A1	25-07-2002
			EP 1328626 A1	23-07-2003
			US 2004161738 A1	19-08-2004
			US 2009162422 A1	25-06-2009
			US 2011171720 A1	14-07-2011
			US 2013150561 A1	13-06-2013
			WO 02057445 A1	25-07-2002
			-----	
WO 2007036021	A1	05-04-2007	CA 2623659 A1	05-04-2007
			CA 2623841 A1	05-04-2007
			EP 1943341 A1	16-07-2008
			JP 5269597 B2	21-08-2013
			JP 2009509503 A	12-03-2009
			US 2009047300 A1	19-02-2009
			US 2009233357 A1	17-09-2009
			US 2011097739 A1	28-04-2011
			US 2015238637 A1	27-08-2015
			WO 2007036021 A1	05-04-2007
			WO 2007036022 A1	05-04-2007
			-----	
WO 2013106577	A2	18-07-2013	AU 2013207927 A1	17-07-2014
			CA 2860579 A1	18-07-2013
			CN 104159922 A	19-11-2014
			EA 201491346 A1	28-11-2014
			EP 2802606 A2	19-11-2014
			HK 1203977 A1	06-11-2015
			JP 2015509097 A	26-03-2015
			KR 20140112497 A	23-09-2014
			US 2015210762 A1	30-07-2015
			WO 2013106577 A2	18-07-2013
			-----	
WO 2006099747	A1	28-09-2006	AT 531800 T	15-11-2011
			AU 2006227536 A1	28-09-2006
			CA 2602028 A1	28-09-2006
			CA 2868774 A1	28-09-2006
			CA 2868781 A1	28-09-2006
			CA 2868865 A1	28-09-2006
			CA 2868867 A1	28-09-2006
			CA 2873899 A1	28-09-2006
			CA 2873906 A1	28-09-2006
			CA 2873939 A1	28-09-2006
			EP 1869182 A1	26-12-2007
			EP 2316945 A1	04-05-2011
			EP 2316946 A1	04-05-2011
			EP 2316947 A1	04-05-2011
			EP 2316948 A1	04-05-2011
			EP 2322621 A2	18-05-2011
			EP 2322622 A2	18-05-2011
			EP 2322623 A2	18-05-2011
			EP 2322624 A2	18-05-2011
			EP 2330195 A2	08-06-2011
			EP 2330196 A2	08-06-2011
			EP 2333066 A1	15-06-2011
			EP 2333067 A1	15-06-2011
			EP 2333068 A1	15-06-2011
			EP 2336323 A2	22-06-2011
			EP 2336324 A2	22-06-2011
			EP 2336325 A1	22-06-2011

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/080539

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 2336326 A2	22-06-2011
		EP 2336327 A1	22-06-2011
		EP 2336328 A1	22-06-2011
		EP 2338997 A1	29-06-2011
		EP 2338998 A1	29-06-2011
		EP 2338999 A2	29-06-2011
		EP 2339000 A1	29-06-2011
		EP 2339001 A2	29-06-2011
		EP 2345723 A1	20-07-2011
		EP 2351841 A1	03-08-2011
		EP 2351842 A1	03-08-2011
		EP 2360255 A1	24-08-2011
		EP 2360256 A1	24-08-2011
		EP 2363485 A1	07-09-2011
		EP 2368990 A1	28-09-2011
		EP 2368991 A2	28-09-2011
		EP 2368992 A2	28-09-2011
		EP 2368993 A2	28-09-2011
		EP 2368994 A2	28-09-2011
		EP 2368995 A2	28-09-2011
		EP 2368996 A2	28-09-2011
		EP 2368997 A2	28-09-2011
		EP 2371960 A2	05-10-2011
		EP 2371961 A1	05-10-2011
		EP 2374886 A2	12-10-2011
		EP 2374887 A2	12-10-2011
		EP 2377935 A1	19-10-2011
		EP 2377936 A2	19-10-2011
		EP 2386638 A2	16-11-2011
		ES 2375826 T3	06-03-2012
		ES 2531537 T3	17-03-2015
		ES 2534305 T3	21-04-2015
		ES 2536995 T3	01-06-2015
		ES 2546788 T3	28-09-2015
		ES 2550836 T3	12-11-2015
		ES 2558338 T3	03-02-2016
		ES 2565782 T3	06-04-2016
		JP 5171611 B2	27-03-2013
		JP 5731956 B2	10-06-2015
		JP 5901679 B2	13-04-2016
		JP 2008536490 A	11-09-2008
		JP 2012070748 A	12-04-2012
		JP 2014144010 A	14-08-2014
		JP 2016073284 A	12-05-2016
		PT 2360255 E	08-04-2015
		US 2009220485 A1	03-09-2009
		US 2013142780 A1	06-06-2013
		US 2016052995 A1	25-02-2016
		WO 2006099747 A1	28-09-2006
-----			
WO 2010080463	A1	15-07-2010	NONE
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/02	
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/02	1 0 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	47/65	(2017.01)	A 6 1 K	47/65	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 ウェブスター, カール・インズ  
イギリス国ケンブリッジシャー シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク  
, メッドイミュン・リミテッド

(72) 発明者 トム, アルバート・ジョージ  
イギリス国ケンブリッジシャー シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク  
, メッドイミュン・リミテッド

(72) 発明者 ジャームタス, ルッツ・ユー  
イギリス国ケンブリッジシャー シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク  
, メッドイミュン・リミテッド

(72) 発明者 ハッチャー, ジョナサン・ピー  
イギリス国ケンブリッジシャー シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク  
, メッドイミュン・リミテッド

F ターム(参考) 4B064 AG01 AG27 CA19 CE12 DA01

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA44

4C076 AA11 BB11 CC01 CC04 CC11 CC27 EE41 EE59 FF11 FF68

4C084 AA02 AA03 AA19 MA17 MA66 NA13 ZA02 ZA08 ZA15 ZA21

ZA36 ZA94 ZB11 ZB26

4C085 AA21 CC22 EE03 GG01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA01 DA30 DA45

DA76 EA20 EA21 FA72 FA74 GA26