

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-548632

(P2023-548632A)

(43)公表日 令和5年11月17日(2023.11.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47		4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全56頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-535666(P2023-535666)	(71)出願人	516127178
(86)(22)出願日	令和3年10月26日(2021.10.26)		ソラ・バイオサイエンシズ・エルエルシ
(85)翻訳文提出日	令和5年6月12日(2023.6.12)		ー
(86)国際出願番号	PCT/US2021/056539		アメリカ合衆国マサチューセッツ州01
(87)国際公開番号	WO2022/093736		760, ネイティック, ストラスモア・
(87)国際公開日	令和4年5月5日(2022.5.5)		ロード 27, ラボナンパー 3
(31)優先権主張番号	63/105,472	(74)代理人	100118902
(32)優先日	令和2年10月26日(2020.10.26)		弁理士 山本 修
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
(81)指定国・地域	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,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	100196508
	最終頁に続く		弁理士 松尾 淳一
		(74)代理人	100196243
			弁理士 運 敬太
		(72)発明者	菱谷 彰徳
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルツハイマー病の処置のための組成物および方法

(57)【要約】

タウ媒介性タンパク質凝集および関連したプロテオパターを特異的に低下させるために、細胞の生得的なシャペロン機構、具体的にはHsp70媒介性システムを動員する新規なクラスの融合タンパク質が開示される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

Jタンパク質のJドメインおよびタウ結合性ドメインを含む単離された融合タンパク質。

## 【請求項 2】

Jタンパク質のJドメインが真核生物起源である、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 3】

Jタンパク質のJドメインがヒト起源である、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 4】

Jタンパク質のJドメインが細胞質に局在する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 5】

Jタンパク質のJドメインが、配列番号 1 ~ 48 からなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 6】

Jドメインが、配列番号 5、6、10、24、および 31 からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 7】

Jドメインが配列番号 5 の配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 8】

Jドメインが配列番号 6 の配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 9】

Jドメインが配列番号 10 の配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 10】

Jドメインが配列番号 24 の配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 11】

Jドメインが配列番号 31 の配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 12】

タウ結合性ドメインが、ELISAアッセイを用いて測定された場合、 $1\ \mu\text{M}$ 以下、例えば、 $300\ \text{nM}$ 以下、 $100\ \text{nM}$ 以下、 $30\ \text{nM}$ 以下、 $10\ \text{nM}$ 以下の、タウに対する $K_D$ を有する、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 13】

タウ結合性ドメインが、配列番号 49 ~ 54 からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 14】

タウ結合性ドメインが、配列番号 49 の配列を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 15】

タウ結合性ドメインが配列番号 50 の配列を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 16】

タウ結合性ドメインが配列番号 51 の配列を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 17】

10

20

30

40

50

複数のタウ結合性ドメインを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 18】

2つのタウ結合性ドメインからなる、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 19】

3つのタウ結合性ドメインからなる、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 20】

以下の構築物：

- a . DNA J - X - T、
- b . DNA J - X - T - X - T、
- c . DNA J - X - T - X - T - X - T、
- d . T - X - DNA J、
- e . T - X - T - X - DNA J、
- f . T - X - T - X - T - X - DNA J、
- g . T - X - DNA J - X - T、
- h . T - X - DNA J - X - T - X - T、
- i . T - X - DNA J - X - T - X - T - X - T、
- j . T - X - T - X - DNA J - X - T、
- k . T - X - T - X - DNA J - X - T - X - T、
- l . T - X - T - X - DNA J - X - T - X - T - X - T、
- m . T - X - T - X - T - X - DNA J - X - T、
- n . T - X - T - X - T - X - DNA J - X - T - X - T、および
- o . T - X - T - X - T - X - DNA J - X - T - X - T - X - T

のうちの1つを含み、

ここで、

Tはタウ結合性ドメインであり、

DNA JはJタンパク質のJドメインであり、

Xは任意選択のリンカーである、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の融合タンパク質

【請求項 21】

配列番号5のJドメイン配列および配列番号49のタウ結合性ドメイン配列を含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 22】

配列番号5のJドメイン配列、および配列番号49のタウ結合性ドメイン配列の2個のコピーを含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 23】

配列番号83 ~ 88 および95 ~ 101 からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 ~ 22 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 24】

配列番号83の配列を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 25】

配列番号87の配列を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 26】

配列番号88の配列を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 27】

配列番号97の配列を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 28】

標的化試薬をさらに含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

10

20

30

40

50

- 【請求項 29】  
 エピトープをさらに含む、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
- 【請求項 30】  
 エピトープが、配列番号 66 ~ 72 からなる群から選択されるポリペプチドである、請求項 29 に記載の融合タンパク質。
- 【請求項 31】  
 細胞透過剤をさらに含む、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
- 【請求項 32】  
 細胞透過剤が、配列番号 73 ~ 76 からなる群から選択されるペプチド配列を含む、請求項 31 に記載の融合タンパク質。 10
- 【請求項 33】  
 シグナル配列をさらに含む、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
- 【請求項 34】  
 シグナル配列が、配列番号 77 ~ 79 からなる群から選択されるペプチド配列を含む、請求項 33 に記載の融合タンパク質。
- 【請求項 35】  
 細胞においてタウタンパク質の凝集を低下させる能力がある、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
- 【請求項 36】  
 タウ媒介性細胞毒性を低下させる能力がある、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。 20
- 【請求項 37】  
 請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸配列。
- 【請求項 38】  
 前記核酸が DNA である、請求項 37 に記載の核酸配列。
- 【請求項 39】  
 前記核酸が RNA である、請求項 37 に記載の核酸配列。
- 【請求項 40】  
 前記核酸が少なくとも 1 個の修飾核酸を含む、請求項 37 ~ 39 のいずれか一項に記載の核酸配列。 30
- 【請求項 41】  
 請求項 37 ~ 40 のいずれか一項に記載の核酸配列を含むベクター。
- 【請求項 42】  
 アデノ随伴ウイルス (AAV)、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、ボックスウイルス (ワクシニアまたは粘液腫)、パラミクソウイルス (麻疹、RSV、またはニューキャッスル病ウイルス)、バキュロウイルス、レオウイルス、アルファウイルス、およびフラビウイルスからなる群から選択される、請求項 41 に記載のベクター。
- 【請求項 43】  
 カプシドおよび請求項 41 または請求項 42 に記載のベクターを含むウイルス粒子。 40
- 【請求項 44】  
 カプシドが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAV10、AAV11、AAV12、偽型 AAV、アカゲザル由来 AAV、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJan AAV カプシド変異体、AAV ハイブリッドセロタイプ、臓器向性 AAV、心臓向性 AAV、および心臓向性 AAVM41 変異体からなる群から選択される、請求項 43 に記載のウイルス粒子。
- 【請求項 45】  
 請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を発現する細胞、請求項 37 ~ 40 のいずれか一項に記載の核 50

酸、請求項 4 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 4 3 ~ 4 4 のいずれか一項に記載のウイルス粒子からなる群から選択される作用物質、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む薬学的組成物。

【請求項 4 6】

細胞においてタウタンパク質の毒性を低下させる方法であって、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を発現する細胞、請求項 3 7 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 4 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 4 3 ~ 4 4 のいずれか一項に記載のウイルス粒子、および請求項 4 5 に記載の薬学的組成物と前記細胞を接触させるステップを含む、方法。

10

【請求項 4 7】

細胞が対象内にある、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

対象がヒトである、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

細胞が中枢神経系に位置する、請求項 4 6 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

対象が、タウ疾患を有すると同定されている、請求項 4 6 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

タウ疾患が、アルツハイマー病 ( A D )、パーキンソン病 ( P D )、原発性加齢関連タウオパチー ( P A R T )、慢性外傷性脳症 ( C T E )、進行性核上性麻痺 ( P S P )、大脳皮質基底核変性症 ( C B D )、17 番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症 ( F T D P - 17 )、リテイコ - ボディグ病、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳炎後パーキンソニズム、亜急性硬化性全脳炎 ( S S P E )、鉛脳症、結節性硬化症、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症、ならびにリポフスチン沈着症からなる群から選択される、請求項 5 0 に記載の方法。

20

【請求項 5 2】

タウ疾患がアルツハイマー病である、請求項 5 0 または請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

対照細胞と比較した場合、細胞において凝集タウタンパク質の量の低下がある、請求項 4 6 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 5 4】

タウ疾患の処置、防止、またはその進行の遅延を必要とする対象においてタウ疾患を処置する、防止する、またはその進行を遅延させる方法であって、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を発現する細胞、請求項 3 7 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 4 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 4 3 ~ 4 4 のいずれか一項に記載のウイルス粒子、および請求項 4 5 に記載の薬学的組成物からなる群から選択される 1 つまたは複数の作用物質の有効量を投与するステップを含む、方法。

40

【請求項 5 5】

タウ疾患が、アルツハイマー病 ( A D )、パーキンソン病 ( P D )、原発性加齢関連タウオパチー ( P A R T )、慢性外傷性脳症 ( C T E )、進行性核上性麻痺 ( P S P )、大脳皮質基底核変性症 ( C B D )、17 番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症 ( F T D P - 17 )、リテイコ - ボディグ病、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳炎後パーキンソニズム、亜急性硬化性全脳炎 ( S S P E )、鉛脳症、結節性硬化症、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症、ならびにリポフスチン沈着症からなる群から選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

タウ疾患がアルツハイマー病である、請求項 5 5 に記載の方法。

50

## 【請求項 57】

対象におけるタウ疾患の防止またはその進行の遅延における、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を発現する細胞、請求項 37 ~ 40 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 41 ~ 42 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 43 ~ 44 のいずれか一項に記載のウイルス粒子、および請求項 45 に記載の薬学的組成物の 1 つまたは複数の使用。

## 【請求項 58】

対象におけるパーキンソン病の処置または防止のための医薬の調製における、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を発現する細胞、請求項 37 ~ 40 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 41 ~ 42 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 43 ~ 44 のいずれか一項に記載のウイルス粒子、および請求項 45 に記載の薬学的組成物の 1 つまたは複数の使用。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、2020年10月26日に提出された米国仮特許出願第63/105,472号の35 U.S.C. § 119(e)による優先権を主張する。前述の出願の全内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられている。

## 【背景技術】

20

## 【0002】

細胞内で発現した全てのタンパク質は、適切に機能するためにそれらの意図された構造へ正しくフォールドされる必要がある。増え続ける疾患および障害が、タンパク質の不適切なフォールディングならびに/またはタンパク質およびリポタンパク質、加えて感染性タンパク質性物質の不適切な沈着および凝集と関連づけられることが示されている。コンフォメーション病またはプロテオパチーとしても知られている、ミスフォールディングにより引き起こされる疾患の例には、アルツハイマー病(AD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、および前頭側頭葉型認知症(FTLD)が挙げられる。変異タンパク質は、細胞において凝集し、典型的な細胞毒性細胞封入体をもたらす。

## 【0003】

30

様々な神経変性疾患は、アミロイド線維で構成される細胞内または細胞外のタンパク質凝集物の蓄積により病理学的に特徴づけられる(Formanら、(2004) Nat Med 10:1055~1063)。

## 【0004】

ADは、8人に1人の高齢のアメリカ人に影響を及ぼしている最も一般的な神経変性障害である。米国単独で540万人超の患者で、85歳以上の人々のおよそ32%がこの疾患を患っている。集中的な研究にもかかわらず、ADのための治療法はなく、対症療法のみが利用可能である。

## 【0005】

ADは、海馬および新皮質脳を含む特定の脳領域におけるシナプス喪失およびニューロン死に起因する記憶障害ならびに全体的な認知機能不全によって特徴づけられる(Norfray & Provenza, (2004) AJR Am J Roentgenol 182:3~13; Ittner & Gotz (2011) Nat Rev Neurosci 12:65~72)。神経変性がADの記憶および認知機能障害と関連していることは現在明らかであるが、罹患領域の神経変性に内在する分子機構は、依然として大部分が説明されていないままである。神経損傷は、細胞外老人斑におけるアミロイド(A)の沈着(Selkoe, (2001) Neuron 32:177~180; Fanら、(2007) J Neuroinflammation 4:22)、および過剰リン酸化タウタンパク質からなるニューロン内の神経原線維変化(NFT)(Ittner & Gotz (2011) Nat Rev Neurosci 12

40

50

: 65 ~ 72 ; Francisら、(1999) J Neurol Neurosurg Psychiatry 66 : 137 ~ 147 ; Craigら、(2011) Neurosci Biobehav Rev 35 : 1397 ~ 1409 ) に関連する。しかしながら、AD病態に対するこれらのタンパク質沈着の寄与は大部分が知られていない。

【0006】

A およびタウは両方ともシナプスで通常の役割を有し得るが、これらのタンパク質の病的種はシナプスの変性に寄与し得る (Spires - Jones & Hyman、(2014) Neuron 82 : 756 ~ 771)。

【0007】

組織学的研究に加えて、いくつかの遺伝子座に対する早発性家族性AD (FAD) についての遺伝子の連鎖の発見は、疾患の病態形成に寄与する遺伝因子を同定する見込みを提供する。早発性FADは、3つの遺伝子 (APP、PSEN1、およびPSEN2) の遺伝性の遺伝子変異、および1つの重要な遺伝的リスク因子APOE 4対立遺伝子 (Spires - Jones & Hyman、(2014) Neuron 82 : 756 ~ 771) により引き起こされる。さらなる遺伝的リスクの遺伝子座が、全ゲノム関連解析 (GWAS) および超並列再シーケンシング (MPS) の成果において同定されている (Van Cauwenberghesら、(2016) Genet Med 18 : 421 ~ 430)。

10

【0008】

これらの遺伝学的研究は、タウとFADとの間の相関を明らかにしていないが、しかしながら、連鎖解析は、タウと他の神経変性疾患との間の相関を示唆しており、その多くは、タウ遺伝子が位置する染色体上の17q21 ~ 22領域にマッピングされた (Wilhelmsenら、(1994) Am J Hum Genet 55 : 1159 ~ 1165 ; Wijkerら、(1996) Hum Mol Genet 5 : 151 ~ 154 ; Birdら、(1997) Neurology 48 : 949 ~ 954 ; Lendonら、(1998) Neurology 50 : 1546 ~ 1555)。その後、タウ遺伝子の変異は、遺伝性の優性の17番染色体におけるパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症 (FTDP - 17) から同定された (Fosterら、(1997) Ann Neurol 41 : 706 ~ 715 ; Huttonら、(1998) Nature 393 : 702 ~ 705 ; Poorkajら、(1998) Ann Neurol 43 : 815 ~ 825 ; Spillantiniら、(1998) Proc Natl Acad Sci USA 95 : 7737 ~ 7741)。

20

30

【0009】

タウは、微小管に結合し、微小管アセンブリを促進する、微小管関連タンパク質である。タウの微小管への結合は、微小管の重合を促進する (Clevelandら、(1977) J Mol Biol 116 : 227 ~ 247 ; Weingartenら、(1975) Proc Natl Acad Sci USA 72 : 1858 ~ 1862)。タウ配列の解析は、タウが、あまり保存されていない13 ~ 14アミノ酸によって分離された保存された18アミノ酸の長い結合エレメントを有するタンパク質のC末端の4反復領域に位置する4つの微小管結合モチーフを有することを明らかにした (Leeら、(2001) Neurosci 24 : 1121 ~ 1159)。成人のヒトの脳において、325 ~ 441アミノ酸長の範囲の6つのタウアイソフォームが、選択的スプライシングにより産生される (Goedertら、(1988) Proc Natl Acad Sci USA 85 : 4051 ~ 4055)。

40

【0010】

タウは、中枢神経系 (CNS) において豊富に発現され、軸索に主に位置するが、タウは、末梢神経系 (PNS) の軸索においてより低いレベルで発現される。CNSのアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトにおいて低レベルの発現のみが観察されている (Clevelandら、(1977) J Mol Biol 116 : 227 ~ 247 ; Binderら、(1985) J Cell Biol 101 : 1371 ~ 1378 ; L

50

o Prestiら、(1995) Proc Natl Acad Sci USA 92 : 10369 ~ 10373)。

【0011】

タウは、正常な状態下で、本質的に無秩序で非常に可溶性のタンパク質であるが (Jeganathanら、(2008) Biochemistry 47 : 10526 ~ 10539)、過剰リン酸化などの異常な修飾により不溶性になる (Kopeikinaら、(2012) Transl Neurosci 3 : 223 ~ 233)。過剰リン酸化タウタンパク質は、対らせん状細線維 (PHF) および直鎖状細線維の濃縮体の自己アセンブリをもたらす得、これらは、AD、前頭側頭型認知症 (FTD) および他のタウオパチーの病態形成に關与する。タウタンパク質の対らせん状細線維 (PHF) および過剰リン酸化は、AD、ならびにFTDP - 17 および進行性核上性麻痺を含むいくつかの他の神経変性タウオパチーにおいて最も認識されている分子的特徴のうちの2つである (Leeら、(2001) Neurosci 24 : 1121 ~ 1159)。

10

【0012】

タウオパチーは、線維状過剰リン酸化タウタンパク質から構成される不溶性のニューロン内凝集物の形成である共通の病理学的特徴を共有する一群の神経変性障害である (Leeら、(2001) Neurosci 24 : 1121 ~ 1159 ; Delacourte、(2001) Adv Exp Med Biol 487 : 5 ~ 19)。

【0013】

それらの多様な臨床所見にもかかわらず、これらの神経変性障害は共通の病理学的特徴 : 線維状過剰リン酸化タウタンパク質から構成される不溶性のニューロン内凝集物の形成 (Leeら、(2001) Neurosci 24 : 1121 ~ 1159 ; Delacourte、(2001) Adv Exp Med Biol 487 : 5 ~ 19) を共有しており、タウ機能不全をこれらの神経変性疾患における寄与因子として関係づける (Leeら、(2001) Neurosci 24 : 1121 ~ 1159)。タウ遺伝子のいくつかの変異は、過剰リン酸化タウタンパク質で作られた細線維の形成をもたらす (Crowther & Goedert、(2000) J Struct Biol 130 : 271 ~ 279)。

20

【0014】

熱ショック70 kDaタンパク質 (本明細書では「Hsp70s」と呼ぶ) は、様々な種の細胞においてシャペロンタンパク質の遍在性クラスを構成する (Tavariaraら、(1996) Cell Stress Chaperones 1 : 23 ~ 28)。Hsp70は、機能するために、Jドメインタンパク質およびヌクレオチド交換因子 (NEF) などのコシャペロンタンパク質と呼ばれるアシスタントタンパク質を必要とする (Hartlら、(2009) Nat Struct Mol Biol 16 : 574 ~ 581)。タンパク質をフォールドするためのHsp70シャペロン機構の最新モデルにおいて、Hsp70は、ATP結合状態とADP結合状態との間を循環し、Jドメインタンパク質は、フォールディングまたはリフォールディングを必要とする別のタンパク質 (「クライアントタンパク質」と呼ばれる) と結合して、Hsp70のATP結合型 (Hsp70 - ATP) と相互作用する (Young (2010) Biochem Cell Biol 88、291 ~ 300 ; Mayer、(2010) Mol Cell 39、321 ~ 331)。Jドメインタンパク質 - クライアントタンパク質複合体のHsp70 - ATPとの結合は、ATP加水分解を刺激し、それは、Hsp70タンパク質において立体構造変化を引き起こし、ヘリックスの蓋を閉じ、それにより、クライアントタンパク質とHsp70 - ADPとの間の相互作用を安定化し、加えて、Jドメインタンパク質の放出を誘発し、その後、そのJドメインタンパク質は、別のクライアントタンパク質と自由に結合できる。

30

40

【0015】

したがって、このモデルにより、Jドメインタンパク質は、架橋として働き、かつ様々なクライアントタンパク質の捕獲およびそのHsp70機構への提出を促進して、適切な

50

フォールディングまたはリフォールディングを促すことにより、Hsp70 機構内で重要な部分を果たす (Kampinga & Craig (2010) Nat Rev Mol Cell Biol 11:579~592)。Jドメインファミリーは、原核生物 (DnaJタンパク質) から真核生物 (Hsp40タンパク質ファミリー) にわたる種において広く保存されている。Jドメイン (約60~80aa) は、4つのヘリックス: I、II、III、およびIVで構成されている。ヘリックスIIおよびIIIは、「HPDモチーフ」を含有する可動性ループを介して接続されており、そのHPDモチーフは、Jドメインにわたって高度に保存されており、HPD配列内の変異がJドメイン機能を無効にするので、活性にとって重要な意味をもつと考えられる (Tsai & Douglas, (1996) J Biol Chem 271, 9347~9354)。

10

## 【0016】

ADなどのプロテオパチーについて上記で提供された背景を考えると、ミスフォールドされたタンパク質のレベルを低下させることが、これらの壊滅的な障害の症状を処置する、防止する、または別様に改善するための手段として役に立ち得ること、およびタンパク質ミスフォールディングを修復する細胞の生得的な能力の動員が、追求すべき当然の選択であろうことは明らかなように思われる。

## 【発明の概要】

## 【0017】

本発明者らは、タウ媒介性タンパク質凝集を特異的に低下させるために、細胞の生得的なHsp70媒介性シャペロン機構を動員する新規なクラスの融合タンパク質を開発している。タンパク質分泌および発現を増強するために、Hsp70と相互作用するコシャペロンである、Hsp40タンパク質 (Jタンパク質とも呼ばれる) の断片を含む融合タンパク質を用いる、本発明者らによる以前の研究においてとは違って、本研究は、変異タウタンパク質の凝集により引き起こされる、タンパク質凝集および細胞毒性を低下させることを目的として、Jドメイン含有融合タンパク質を用いる。この関連において、本発明者らは、機能に必要とされるJドメインのエLEMENTが、タンパク質発現および分泌を増強することにおけるJドメインの使用とは全く異なるという驚くべき発見をし、本融合タンパク質の作用様式について別個の機構を実証した。本明細書に記載された融合タンパク質は、Jドメイン、およびタウに対する親和性を有するドメインを含む。融合タンパク質内のタウ結合性タンパク質の存在は、結果として、変異タウタンパク質の凝集の特異的な低下を生じる。

20

30

## 【0018】

E1. したがって、第1の態様において、Jタンパク質のJドメインおよびタウ結合性ドメインを含む単離された融合タンパク質が本明細書で開示される。

E2. Jタンパク質のJドメインが真核生物起源である、E1に記載の融合タンパク質。

E3. Jタンパク質のJドメインがヒト起源である、E1~E2のいずれかに記載の融合タンパク質。

E4. Jタンパク質のJドメインが細胞質に局在する、E1~E3のいずれかに記載の融合タンパク質。

40

E5. Jタンパク質のJドメインが、配列番号1~48からなる群から選択される、E1~E4のいずれかに記載の融合タンパク質。

E6. Jドメインが、配列番号5、6、10、24、および31からなる群から選択される配列を含む、E1~E5のいずれかに記載の融合タンパク質。

E7. Jドメインが配列番号5の配列を含む、E1~E6のいずれかに記載の融合タンパク質。

E8. Jドメインが配列番号6の配列を含む、E1~E6のいずれかに記載の融合タンパク質。

E9. Jドメインが配列番号10の配列を含む、E1~E6のいずれかに記載の融合タンパク質。

50

E 1 0 . Jドメインが配列番号24の配列を含む、E 1 ~ E 6のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 1 1 . Jドメインが配列番号31の配列を含む、E 1 ~ E 6のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 1 2 . タウ結合性ドメインが、ELISAアッセイを用いて測定された場合、1  $\mu$  M以下、例えば、300 nM以下、100 nM以下、30 nM以下、10 nM以下の、タウに対する $K_D$ を有する、E 1 ~ E 11のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 1 3 . タウ結合性ドメインが、配列番号49 ~ 54からなる群から選択される配列を含む、E 1 ~ E 12のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 1 4 . タウ結合性ドメインが、配列番号49の配列を含む、E 1 ~ E 13のいずれかに記載の融合タンパク質。 10

E 1 5 . タウ結合性ドメインが配列番号50の配列を含む、E 1 ~ E 13のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 1 6 . タウ結合性ドメインが配列番号51の配列を含む、E 1 ~ E 13のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 1 7 . タウ結合性ドメインが配列番号52の配列を含む、E 1 ~ E 13のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 1 8 . タウ結合性ドメインが配列番号53の配列を含む、E 1 ~ E 13のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 1 9 . タウ結合性ドメインが配列番号54の配列を含む、E 1 ~ E 13のいずれかに記載の融合タンパク質。 20

E 2 0 . 複数のタウ結合性ドメインを含む、E 1 ~ E 19のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 2 1 . 2つのタウ結合性ドメインからなる、E 1 ~ E 20のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 2 2 . 3つのタウ結合性ドメインからなる、E 1 ~ E 21のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 2 3 . 以下の構築物：

a . DNA J - X - T、 30

b . DNA J - X - T - X - T、

c . DNA J - X - T - X - T - X - T、

d . T - X - DNA J、

e . T - X - T - X - DNA J、

f . T - X - T - X - T - X - DNA J、

g . T - X - DNA J - X - T、

h . T - X - DNA J - X - T - X - T、

i . T - X - DNA J - X - T - X - T - X - T、

j . T - X - T - X - DNA J - X - T、

k . T - X - T - X - DNA J - X - T - X - T、

l . T - X - T - X - DNA J - X - T - X - T - X - T、 40

m . T - X - T - X - T - X - DNA J - X - T、

n . T - X - T - X - T - X - DNA J - X - T - X - T、および

o . T - X - T - X - T - X - DNA J - X - T - X - T - X - T、

のうちの1つを含み、

ここで、

Tはタウ結合性ドメインであり、

DNA JはJタンパク質のJドメインであり、

Xは任意選択のリンカーである、E 1 ~ E 22のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 2 4 . 配列番号5のJドメイン配列および配列番号49のタウ結合性ドメイン配列を含む、E 1 ~ E 23のいずれかに記載の融合タンパク質。 50

- E 2 5 . 配列番号 5 の J ドメイン配列、および配列番号 5 0 のタウ結合性ドメイン配列を含む、E 1 ~ E 2 3 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 2 6 . 配列番号 5 の J ドメイン配列および配列番号 5 1 のタウ結合性ドメイン配列を含む、E 1 ~ E 2 3 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 2 7 . 配列番号 5 の J ドメイン配列および配列番号 5 2 のタウ結合性ドメイン配列を含む、E 1 ~ E 2 3 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 2 8 . 配列番号 5 の J ドメイン配列および配列番号 5 3 のタウ結合性ドメイン配列を含む、E 1 ~ E 2 3 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 2 9 . 配列番号 5 の J ドメイン配列および配列番号 5 4 のタウ結合性ドメイン配列を含む、E 1 ~ E 2 3 のいずれかに記載の融合タンパク質。 10
- E 3 0 . 配列番号 8 3 ~ 8 8 および 9 5 ~ 1 0 1 からなる群から選択される配列を含む、E 1 ~ E 2 9 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 3 1 . 配列番号 8 3 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 3 2 . 配列番号 8 4 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 3 3 . 配列番号 8 5 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 3 4 . 配列番号 8 6 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。 20
- E 3 5 . 配列番号 8 7 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 3 6 . 配列番号 8 8 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 3 7 . 配列番号 9 5 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 3 8 . 配列番号 9 6 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 3 9 . 配列番号 9 7 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。 30
- E 4 0 . 配列番号 9 8 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 4 1 . 配列番号 9 9 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 4 2 . 配列番号 1 0 0 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 4 3 . 配列番号 1 0 1 の配列を含む、E 1 ~ E 3 0 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 4 4 . 標的化試薬をさらに含む、E 1 ~ E 4 3 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 4 5 . エピトープをさらに含む、E 1 ~ E 4 4 のいずれかに記載の融合タンパク質。 40
- E 4 6 . エピトープが、配列番号 6 6 ~ 7 2 からなる群から選択されるポリペプチドである、E 4 5 に記載の融合タンパク質。
- E 4 7 . 細胞透過剤をさらに含む、E 1 ~ E 4 6 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 4 8 . 細胞透過剤が、配列番号 7 3 ~ 7 6 からなる群から選択されるペプチド配列を含む、E 4 7 に記載の融合タンパク質。
- E 4 9 . シグナル配列をさらに含む、E 1 ~ E 4 8 のいずれかに記載の融合タンパク質。
- E 5 0 . シグナル配列が、配列番号 7 7 ~ 7 9 からなる群から選択されるペプチド配列を含む、E 4 9 に記載の融合タンパク質。
- E 5 1 . 細胞においてタウタンパク質の凝集を低下させる能力がある、E 1 ~ E 5 0 50

のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 5 2 . タウ媒介性細胞毒性を低下させる能力がある、E 1 ~ E 5 1 のいずれかに記載の融合タンパク質。

E 5 3 . E 1 ~ E 5 2 のいずれかに記載の融合タンパク質をコードする核酸配列。

E 5 4 . 前記核酸がDNAである、E 5 3 に記載の核酸配列。

E 5 5 . 前記核酸がRNAである、E 5 4 に記載の核酸配列。

E 5 6 . 前記核酸が、少なくとも1個の修飾核酸を含む、E 5 3 ~ E 5 5 のいずれかに記載の核酸配列。

E 5 7 . E 5 3 ~ E 5 6 のいずれかに記載の核酸配列を含むベクター。

E 5 8 . アデノ随伴ウイルス(AAV)、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス(ワクシニアまたは粘液腫)、パラミクソウイルス(麻疹、RSV、またはニューキャッスル病ウイルス)、パキユロウイルス、レオウイルス、アルファウイルス、およびフラビウイルスからなる群から選択される、E 5 7 に記載のベクター。 10

E 5 9 . カプシドおよびE 5 7 またはE 5 8 に記載のベクターを含む、ウイルス粒子。

E 6 0 . カプシドが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV rh10、AAV11、AAV12、偽型AAV、アカゲザル由来AAV、AAV rh8、AAV rh10、およびAAV-DJan AAVカプシド変異体、AAVハイブリッドセロタイプ、臓器向性AAV、心臓向性AAV、および心臓向性AAVM41変異体からなる群から選択される、E 5 9 に記載のウイルス粒子。 20

E 6 1 . E 1 ~ E 5 2 のいずれかに記載の融合タンパク質、E 1 ~ E 5 2 に記載の融合タンパク質を発現する細胞、E 5 3 ~ E 5 6 のいずれかに記載の核酸、E 5 7 ~ E 5 8 のいずれかに記載のベクター、E 5 9 ~ E 6 0 のいずれかに記載のウイルス粒子からなる群から選択される作用物質、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む薬学的組成物。

E 6 2 . 細胞においてタウタンパク質の毒性を低下させる方法であって、E 1 ~ E 5 2 のいずれかに記載の融合タンパク質、E 1 ~ E 5 2 の融合タンパク質を発現する細胞、E 5 3 ~ E 5 6 のいずれかに記載の核酸、E 5 7 ~ E 5 8 のいずれかに記載のベクター、E 5 9 ~ E 6 0 のいずれかに記載のウイルス粒子、およびE 6 1 に記載の薬学的組成物と前記細胞を接触させるステップを含む、方法。 30

E 6 3 . 細胞が対象内にある、E 6 2 に記載の方法。

E 6 4 . 対象がヒトである、E 6 2 ~ E 6 3 のいずれかに記載の方法。

E 6 5 . 細胞が中枢神経系の細胞である、E 6 2 ~ E 6 4 のいずれか1つに記載の方法。

E 6 6 . 対象が、タウオパチーを有すると同定されている、E 6 2 ~ E 6 5 のいずれか1つに記載の方法。

E 6 7 . タウ疾患が、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、原発性加齢関連タウオパチー(PART)、慢性外傷性脳症(CTE)、進行性核上性麻痺(PSP)、大脳皮質基底核変性症(CBD)、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症(FTDP-17)、リティコ-ボディグ病、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳炎後パーキンソニズム、亜急性硬化性全脳炎(SSPE)、鉛脳症、結節性硬化症、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症、ならびにリポフスチン沈着症からなる群から選択される、E 6 6 に記載の方法。 40

E 6 8 . タウオパチーがアルツハイマー病(AD)である、E 6 6 またはE 6 7 に記載の方法。

E 6 9 . 対照細胞と比較した場合、細胞において凝集タウタンパク質の量の低下がある、E 6 2 ~ E 6 8 のいずれか1つに記載の方法。

E 7 0 . タウ疾患の処置、防止、またはその進行の遅延を必要とする対象において、タウ疾患を処置する、防止する、またはその進行を遅延させる方法であって、E 1 ~ E 5 5 0

2のいずれか1つに記載の融合タンパク質、E1～E52の融合タンパク質を発現する細胞、E53～E56のいずれかに記載の核酸、E57～E58のいずれかに記載のベクター、E59～E60のいずれかに記載のウイルス粒子、およびE61に記載の薬学的組成物からなる群から選択される1つまたは複数の作用物質の有効量を投与するステップを含む、方法。

E71. タウ疾患が、アルツハイマー病(A D)、パーキンソン病(P D)、原発性加齢関連タウオパチー(P A R T)、慢性外傷性脳症(C T E)、進行性核上性麻痺(P S P)、大脳皮質基底核変性症(C B D)、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症(F T D P - 17)、リテイコ・ボディグ病、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳炎後パーキンソニズム、亜急性硬化性全脳炎(S S P E)、鉛脳症、結節性硬化症、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症、ならびにリポフスチン沈着症からなる群から選択される、E70に記載の方法。

10

E72. タウオパチーがアルツハイマー病(A D)である、E70またはE71に記載の方法。

E73. 対象におけるタウ疾患の防止またはその進行の遅延における、E1～52のいずれかに記載の融合タンパク質、E1～52の融合タンパク質を発現する細胞、E53～56のいずれかに記載の核酸、E57～E58のいずれかに記載のベクター、E59～E60のいずれかに記載のウイルス粒子、およびE61に記載の薬学的組成物の1つまたは複数の使用。

E74. 対象におけるタウオパチーの処置、防止またはその進行の遅延に有用な医薬の調製における、E1～52のいずれかに記載の融合タンパク質、E1～52の融合タンパク質を発現する細胞、E53～56のいずれかに記載の核酸、E57～E58のいずれかに記載のベクター、E59～E60のいずれかに記載のウイルス粒子、およびE61に記載の薬学的組成物の1つまたは複数の使用。

20

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A】代表的なヒトJドメイン配列のC l u s t a l O m e g a配列アラインメントを示す図である。高度に保存されたH P Dドメインは、強調表示された四角形内に示されている。

【図1B】代表的なヒトJドメイン配列のC l u s t a l O m e g a配列アラインメントを示す図である。

30

【図2】Jドメインおよびタウ結合性ドメインを含むいくつかの実例的な融合タンパク質構築物を示す図である。

【図3】V5エピトープをそれぞれ含み、様々な融合タンパク質構築物J B 1 - T B P構築物1、(レーン3および8)；J B 1 - S c F v (タウ)構築物4(レーン4および9)；J B 1 - S c F v (M W 7)構築物5、(レーン5および10)；およびJ B 1 - H a p p 1構築物6、(レーン6および11)も同時発現する、野生型タウ0 N 4 R(レーン2～6)または変異(P 2 4 3 S)タウ(レーン7～11)の発現のいずれかを示す細胞抽出物のウェスタンブロット分析を示す図である。上方パネルは、抗V5抗体で探索されたタウタンパク質のレベルを示すが、下方パネルは、抗p T a u ( S e r 3 9 6)抗体で探索されたリン酸化タウのレベルを示す。

40

【図4】単独かまたはF l a gエピトープを含有するJ B 1 - S c F v (タウ)を同時発現する(レーン3、5、8および10)、野生型タウ0 N 4 R(レーン2、3、7および8)または変異(P 2 4 3 S)タウ(レーン4、5、9、10)の発現のいずれかを示す細胞抽出物のイムノブロット分析を示す図である。上方パネルは、タウ2 N 4 RにおけるT h r 2 3 1でのリン酸化タウ(レーン1～5)またはS e r 3 9 6でのリン酸化タウ(レーン6～10)を認識する抗体で探索した。下方パネルは、Jドメイン融合タンパク質を検出するために抗F l a g抗体で探索した(この場合において、J B 1 - S c F v (タウ)構築物、または構築物4)。

【図5】単独か(レーン1および6)または構築物4 [ J B 1 - S c F v (タウ) (レーン

50

ン4および8)、構築物8 [ Jドメインの保存されたHPDモチーフ内のP33Q変異を除いてJB1-ScFv (タウ) と同一である対照構築物 (レーン5および9) ] およびScFv (タウ) のみ [ Jドメインなしの構築物4 (レーン3および7) ] を同時発現する、野生型タウ0N4R (レーン2~5) または変異 (P243S) タウ (レーン6~9) の発現のいずれかを示す細胞抽出物のイムノプロット分析を示す図である。

【図6】単独 (レーン2および7) か、構築物6 (JB1-Happ1、レーン3および8)、構築物1 (JB1-TBP1、レーン4および9)、構築物14 (JB1-TBP2、レーン5および10) または構築物11 (JB1-QBP1、レーン6および11) を同時発現する、野生型 (レーン2~6) または変異 (P243S) タウ (レーン7~11) の発現を示す細胞抽出物のイムノプロット分析を示す図である。

10

【図7】野生型 (レーン1~3) または切断型Tau3R (レーン4~6)、および構築物1 (JB1~TBP1、レーン2および5) または構築物7 (保存されたJドメインのHPDモチーフ内にP33Q変異を含有するJB1~TBP1 (レーン3および6) を同時発現する野生型タウまたは切断型Tau3Rの発現を示す細胞抽出物のイムノプロット分析を示す図である。

【図8】LDHアッセイを用いて測定された、タウ媒介性細胞毒性に対する構築物1 (JB1-TBP1) の発現の効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

定義

20

本明細書および特許請求の範囲に用いられる場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が明らかに他に指図しない限り、複数の指示物を含む。例えば、用語「1つの細胞」は、その混合物を含む、複数の細胞を含む。

【0021】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すのに本明細書で交換可能に用いられる。ポリマーは直鎖状または分岐状であり得、それは修飾アミノ酸を含んでもよく、それは非アミノ酸により中断されてもよい。それらの用語はまた、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識コンポーネントとのコンジュゲーションなどの任意の他の修飾により、修飾されているアミノ酸ポリマーを包含する。

30

【0022】

本明細書で用いられる場合、用語「アミノ酸」は、天然および/または非天然もしくは合成のアミノ酸のいずれかを指し、それには、D型またはL型の両方の光学異性体、ならびにアミノ酸類似体およびペプチド模倣体が挙げられるが、それらに限定されない。標準一文字または三文字コードが、アミノ酸を名付けるために用いられる。

【0023】

「宿主細胞」は、対象ベクターについてのレシピエントであり得、またはレシピエントであった個々の細胞または細胞培養物を含む。宿主細胞は、単一の宿主細胞の子孫を含む。その子孫は、自然の、偶発的な、または計画的な変異によって、最初の親細胞と必ずしも完全に同一 (形態において、または全DNA相補体のゲノムにおいて) というわけではない。宿主細胞は、インビボでこの発明のベクターでトランスフェクトされた細胞を含む。

40

【0024】

本明細書で開示された様々なポリペプチドを記載するために用いられる場合の「単離された」は、その天然の環境のコンポーネントから識別および分離されており、ならびに/または回収されているポリペプチドを意味する。その天然の環境の夾雑コンポーネントは、典型的には、本ポリペプチドについての診断的または治療的使用に干渉する材料であり、それには、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質が挙げられ得る。当業者には明らかであるように、天然に存在しないポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片は、その天然に存在する対応物から

50

それを区別するために「単離」を必要としない。加えて、「濃縮された」、「分離された」、または「希釈された」ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片は、体積あたりの分子の濃度または数が、その天然に存在する対応物のそれより一般的に大きい点で、その天然に存在する対応物から区別可能である。一般的に、組換え手段により生成され、かつ宿主細胞において発現したポリペプチドは、「単離」されていると見なされる。

#### 【0025】

「単離された」ポリヌクレオチド、またはポリペプチドをコードする核酸、または他のポリペプチドをコードする核酸は、それが、そのポリペプチドをコードする核酸の天然源において通常付随している少なくとも1つの夾雑核酸分子から識別および分離されている核酸分子である。単離された、ポリペプチドをコードする核酸分子は、それが天然で見出される形または設定以外をとる。したがって、単離された、ポリペプチドをコードする核酸分子は、それが天然の細胞において存在する場合のその特定のポリペプチドをコードする核酸分子から区別される。しかしながら、単離された、ポリペプチドをコードする核酸分子には、そのポリペプチドを通常発現する細胞に含有される、ポリペプチドをコードする核酸分子が挙げられ、ここで、例えば、その核酸分子は、天然細胞の位置とは異なる、染色体または染色体外の位置にある。

#### 【0026】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」、「ヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」は交換可能に用いられる。それらは、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはその類似体のいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形を指す。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を有し得、既知または未知の任意の機能を実施し得る。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的例である：遺伝子または遺伝子断片のコードまたは非コード領域、連鎖解析から定義される遺伝子座、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含み得る。存在する場合、そのポリマーのアセンブリの前または後に、ヌクレオチド構造への修飾が与えられ得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチドコンポーネントによって中断され得る。ポリヌクレオチドは、標識コンポーネントとのコンジュゲーションなど、ポリマー化後にさらに修飾され得る。

#### 【0027】

本明細書で定義される場合、用語「タウ障害」、「タウ疾患」、「タウオパチー」または「タウ媒介性疾患」は、細胞内タウ凝集物、特に、タウ変異タンパク質の凝集物の形成に関連した障害を指す。タウ疾患の例には、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、原発性加齢関連タウオパチー (PART)、慢性外傷性脳症 (CTE)、進行性核上性麻痺 (PSP)、大脳皮質基底核変性症 (CBD)、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症 (FTDP-17)、リティコ-ボディグ病、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳炎後パーキンソニズム、亜急性硬化性全脳炎 (SSPE)、鉛脳症、結節性硬化症、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症、ならびにリポフスチン沈着症が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0028】

「ベクター」は、好ましくは適切な宿主において自己複製する、核酸分子であり、それは、挿入された核酸分子を宿主細胞の中へおよび/または宿主細胞間で転移させる。その用語は、主にDNAまたはRNAの細胞への挿入のために機能するベクター、主にDNAまたはRNAの複製のために機能する複製ベクター、ならびにDNAまたはRNAの転写および/または翻訳のために機能する発現ベクターを含む。また、上記の機能の1つより多くを提供するベクターも含まれる。「発現ベクター」は、適切な宿主細胞の中へ導入された場合、転写され、かつポリペプチドへ翻訳され得るポリヌクレオチドである。「発現

10

20

30

40

50

系」は、通常、所望の発現産物を生じるように機能することができる発現ベクターで構成された適切な宿主細胞を含意する。

【0029】

用語「作動可能に連結された」は、記載されたコンポーネントの並置であって、そこで、それらのコンポーネントが、それらの意図された様式でそれらが機能することを可能にする関係にある、並置を指す。コード配列と「作動可能に連結された」制御配列は、コード配列の発現が、制御配列と適合した条件下で達成されるように、ライゲーションされている。「作動可能に連結された」配列には、目的の遺伝子と近接する発現制御配列と、目的の遺伝子を制御するようにトランスでまたはある距離を置いて作用する発現制御配列の両方が挙げられ得る。用語「発現制御配列」は、それらがライゲーションされるコード配列の発現およびプロセシングに作用するのに必要であるポリヌクレオチド配列を指す。発現制御配列には、適切な転写開始、終結、プロモーター、およびエンハンサー配列；スプライシングなどの効率的なRNAプロセシングシグナルおよびポリアデニル化シグナル；細胞質mRNAを安定化させる配列；翻訳効率を増強する配列（例えば、コザックコンセンサス配列）；タンパク質安定性を増強する配列；ならびに、必要に応じて、タンパク質分泌を増強する配列が挙げられる。そのような制御配列の性質は、宿主生物体によって異なる；原核生物において、そのような制御配列には、一般的に、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列が挙げられる；真核生物において、そのような制御配列には、プロモーターおよび転写終結配列が挙げられる。用語「制御配列」は、その存在が発現およびプロセシングに必須であるコンポーネントを含むことが意図され、その存在が有利である追加のコンポーネント、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列も含むことができる。他に言及がない限り、本発明の融合タンパク質をコードする核酸分子を発現ベクターへ挿入することの本明細書での記載または言及は、その挿入される核酸もまた、その挿入される核酸分子を含有する発現ベクターが適合性宿主細胞または生物体の適合性細胞へ導入される場合、コードされた融合タンパク質の発現に必要とされる、機能性プロモーターならびに他の転写および翻訳制御エレメントとベクター内で作動可能に連結されていることを意味する。

10

20

【0030】

ポリヌクレオチドに適用される場合の「組換え型の」は、そのポリヌクレオチドが、宿主細胞において潜在的に発現し得る構築物を生じる、インビトロクローニング、制限および/またはライゲーションのステップ、ならびに他の手順の様々な組合せの産物であることを意味する。

30

【0031】

用語「遺伝子」および「遺伝子断片」は、本明細書で交換可能に用いられる。それらは、転写および翻訳された後、特定のタンパク質をコードする能力がある少なくとも1つのオープンリーディングフレームを含有するポリヌクレオチドを指す。遺伝子または遺伝子断片は、そのポリヌクレオチドが少なくとも1つのオープンリーディングフレームを含有する限り、ゲノムDNAまたはcDNAであり得、それは、コード領域全体またはそのセグメントを網羅し得る。「融合遺伝子」は、一緒に連結されている少なくとも2つの異種性ポリヌクレオチドで構成される遺伝子である。

40

【0032】

用語「疾患」および「障害」は、当技術分野において容認可能な医療水準および行為により同定された病的状態を示すように、交換可能に用いられる。

本明細書で用いられる場合、用語「有効量」は、疾患またはその1つもしくは複数の症状の重症度および/または期間を低下させまたは改善する；有害なまたは病的な状態の進展を防止する；病的状態の退行を引き起こす；病的状態に関連した1つまたは複数の症状の再発、発達、発生、または進行を防止する；障害を検出する；あるいは、治療（例えば、別の予防または治療剤の投与）の予防的または治療的効果を増強しまたは向上させるのに十分である治療の量を指す。

【0033】

50

本明細書で用いられる場合、用語「Jドメイン」は、Hsp70およびその同族の内因性ATPアーゼ触媒活性を加速する能力を保持する断片を指す。様々なJタンパク質のJドメインが決定されており（例えば、Kampingaら（2010）Nat. Rev., 11: 579~592; Hennesseyら（2005）Protein Science, 14: 1697~1709参照（それぞれは、全体として参照により組み入れられている）、以下のいくつかのホールマークによって特徴づけられる：4つのヘリックス（I、II、III、IV）、および通常、ヘリックスIIとIIIの間に高度に保存された、ヒスチジン、プロリン、およびアスパラギン酸のトリペプチド配列モチーフ（「HPDモチーフ」と呼ばれる）を有することにより特徴づけられる。典型的には、Jタンパク質のJドメインは、50アミノ酸長から70アミノ酸長の間であり、Hsp70-ATPシャペロンタンパク質とのJドメインの相互作用（結合）の部位は、ヘリックスII内から伸びる領域であると考えられており、HPDモチーフは、Hsp70 ATPアーゼ活性の刺激に必要である。本明細書で用いられる場合、用語「Jドメイン」は、Hsp70の内因性ATPアーゼ活性を加速する能力を保持する、天然のJドメイン配列およびその機能性バリエーションを含むことを意図され、その能力は、当技術分野においてよく知られた方法を用いて測定することができる（例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、Horneら（2010）J. Biol. Chem., 285, 21679~21688参照）。ヒトJドメインの非限定的リストは、表1に提供されている。

10

#### 【0034】

20

##### 詳細な説明

本発明者らは、Jタンパク質のJドメインおよびタウ結合性ドメインを含む融合タンパク質構築物と、ある特定の細胞を接触させることが、過剰リン酸化タウタンパク質を低下させる予想外の効果を生じることを見出している。過剰リン酸化タウタンパク質は、いくつかの壊滅的な疾患を引き起こすと考えられており、その疾患には、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、原発性加齢関連タウオパチー（PART）、慢性外傷性脳症（CTE）、進行性核上性麻痺（PSP）、大脳皮質基底核変性症（CBD）、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（FTDP-17）、リテイコ-ボディグ病、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳炎後パーキンソニズム、亜急性硬化性全脳炎（SSPE）、鉛脳症、結節性硬化症、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症、ならびにリポフスチン沈着症が挙げられるが、それらに限定されない。したがって、タウ関連障害を処置するための、例えばそれを必要とする対象においての、有用な組成物および方法が本明細書に提供される。

30

#### 【0035】

シャペロンに基づいた治療に関連した問題を克服するために、本発明者らは、高い特異性を有する人工シャペロンタンパク質をデザインすることが可能であるかどうかを調べた。本発明者らは、Hsp70結合/活性化のためのエフェクタードメイン（Jドメイン配列）、およびタウタンパク質に対する特異性を与えるドメインを含む一連の融合タンパク質構築物をデザインした。生じた融合タンパク質は、Hsp70およびその同族の内因性ATPアーゼ触媒活性を加速するように作用し、その結果として、タンパク質フォールディングの増加、凝集の低下、および/またはクリアランスの加速を生じる。

40

#### 【0036】

##### I. 融合タンパク質構築物

##### a. 本発明における有用なJドメイン

様々なJタンパク質のJドメインが決定されている。例えば、Kampingaら、Nat. Rev., 11: 579~592（2010）; Hennesseyら、Protein Science, 14: 1697~1709（2005）参照。本発明の融合タンパク質を調製することにおいて有用なJドメインは、主にHsp70 ATPアーゼ活性を加速するJドメインの特徴を定義する鍵を握る。したがって、本発明において有用な単離されたJドメインは、4つのヘリックス（I、II、III、IV）、および通常、

50

ヘリックス I I と I I I の間に高度に保存された、ヒスチジン、プロリン、およびアスパラギン酸のトリペプチド配列（「HPDモチーフ」と呼ばれる）を有することにより特徴づけられる、ポリペプチドドメインを含む。典型的には、Jタンパク質のJドメインは、50アミノ酸長から70アミノ酸長の間であり、Hsp70-ATPシャペロンタンパク質とのJドメインの相互作用（結合）の部位は、ヘリックス I I 内から伸びる領域であると考えられており、HPDモチーフは、原始的な活性の基礎をなす。代表的なJドメインには、DnaJB1、DnaJB2、DnaJB6、DnaJC6のJドメイン、SV40のラージT抗原のJドメイン、および哺乳動物のシステインストリングタンパク質（CSP-）のJドメインが挙げられるが、それらに限定されない。本発明の融合タンパク質に用いられ得るこれらを始めとするJドメインについてのアミノ酸配列は、表1に提供されている。保存HPDモチーフは、太字で強調されている。

10

【0037】

20

30

40

50

## 【表 1 - 1】

表1. 代表的なヒトJドメイン配列

タンパク質名	配列番号	遺伝子のNCBI参照	タンパク質のNCBI参照	Jドメインアミノ酸配列
DNAJA1	1	NM_001539	NP_001530	TYYDVLGVKPNATQEELKKAYRKL ALKY <b>HPD</b> KNPNEGEKFKQISQAYE VLSDAKKRELYDKGG
DNAJA2	2	NM_005880	NP_005871	KLYDILGVPPGASENELKKAYRKL AKEY <b>HPD</b> KNPAGDKFKEISFAYE VLSNPEKRELYDRYG
DNAJA3	3	NM_001135110	NP_001128582	DYYQILGVPRNASQKEIKKAYYQL AKKY <b>HPD</b> TNKDDPKAKEKFSQLAE AYEVLSDSEVKKRQYDAYG
DNAJA4	4	<u>NM_001130182</u>	NP_001123654	ETQYYDILGVKPSASPEEIKKAYR KLALKY <b>HPD</b> KNPDEGEKFKLISQA YEVLSDPKKRDVYDQGGEQ
DNAJB1	5			GKDYYQTLGLARGASDEEIKKAYR RQALRY <b>HPD</b> KNKEPGAEEKFKEIA EAYDVLSDPRKREIFDRYGEE
DNAJB2	6	<u>NM_001039550</u>	<u>NP_001034639</u>	ASYYEILDVPRSASADDIKKAYRR KALQW <b>HPD</b> KNPDNKEFAEKKFKEV AEAYEVLSDKHKREIYDRYGRE
DNAJB3	7	<u>NM_001001394</u>	<u>NP_001001394</u>	MVDYYEVLVDVPRQASSEAIKKAYR KLALKW <b>HPD</b> KNPENKEEAERRFKQ VAEAYEVLSDAKKRDIYDRYG
DNAJB4	8	<u>NM_001317099</u>	<u>NP_001304028</u>	GKDYYCILGIEKGASDEDIKKAYR KQALKF <b>HPD</b> KNKSPQAEKFKVEA EAYEVLSDPKKREIYDQFGEE
DNAJB5	9	<u>NM_001135004</u>	<u>NP_001128476</u>	DYYKILGIPSGANEDEIKKAYRKM ALKY <b>HPD</b> KNKEPNAEEKFKEIAEA YDVLSDPKKRGLYDQYG
DNAJB6	10	<u>NM_005494</u>	<u>NP_005485</u>	VDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRK LALKW <b>HPD</b> KNPENKEEAERKFKQV AEAYEVLSDAKKRDIYDKYG
DNAJB7	11	<u>NM_145174</u>	<u>NP_660157</u>	DYYEVLGLQRYASPEDIKKAYHKV ALKW <b>HPD</b> KNPENKEEAERKFKVEA EAYEVLSDNDEKRDIYDKYG
DNAJB8	12	<u>NM_153330</u>	<u>NP_699161</u>	NYEVLGVQASASPEDIKKAYRKL ALRW <b>HPD</b> KNPDNKEEAEEKFKLVS EAYEVLSDSKKRSLYDRAG
DNAJB9	13	<u>NM_012328</u>	<u>NP_036460</u>	SYDILGVPKSASERQIKKAFHKL AMKY <b>HPD</b> KNKSPDAEAKFREIAEA YETLSDANRRKEYDTLG
DNAJB11	14	<u>NM_016306</u>	<u>NP_057390</u>	DFYKILGVPRSASIKDIKKAYRKL ALQL <b>HPD</b> RNPDDPQAQEKFDLGA AYEVLSDSEKRRQYDTYG
DNAJB12	15	<u>NM_001002762</u>	<u>NP_001002762</u>	YEILGVSRGASDEDLKKAYRRLLAL KF <b>HPD</b> KNHAPGATEAFKAIGTAYA VLSNPEKRRQYDQFGDD

10

20

30

40

【 0 0 3 8 】

50

【表 1 - 2】

DNAJB13	16	<u>NM 153614</u>	<u>NP 705842</u>	DYYSVLGITRNSEDAQIKQAYRRL ALKHHPLKSNPSSAEIFRQIAEA YDVLSDPMPKRGYDKFG
DNAJB14	17	<u>NM 001031723</u>	<u>NP 001026893</u>	NYEVLGVTKDAGDEDLKKAYRKL ALKFHPDKNHAPGATDAFKKIGNA YAVLSNPEKRKQYDLTG
DNAJC1	18	<u>NM 022365</u>	<u>NP 071760</u>	NFYQFLGVQQDASSADIRKAYRKL SLTLHPDKNKDENAETQFRQLVAI YEVLKDDERRQRYDDIL
DNAJC2	19	<u>NM 001129887</u>	<u>NP 001123359</u>	DHYAVLGLGHVRYKATQRQIKAAH KAMVLKHHDPDKRKAAGEPIKEGDN DYFTCITKAYEMLSDPVKRRAFNS VD
DNAJC3	20	<u>NM 006260</u>	<u>NP 006251</u>	DYYKILGVKRNAAKQEI IKAYRKL ALQWHPDNFQNEEEKKKAEEKFID IAAAKEVLSDPKRRKFDGGE
DNAJC4	21	<u>NM 001307980</u>	<u>NP 001294909</u>	TYEYLLGVHPGASTEVEVKRAFFSK SKELHPDRDPGNPSLHRSRVELSE AYRVLSREQRSRSYDDQL
DNAJC5	22	<u>NM 025219</u>	<u>NP 079495</u>	GESLYHVLGLDKNATSDDIKKSYR KLALKYHPDKNPDNPEAADKFKEI NNAHAILTDATKRNIYDKYGS
DNAJCSB	23	<u>NM_033105</u>	<u>NP_149096</u>	ALYEILGLHKGASNEEIKKTYRKL ALKHHPDKNPDDPAATEKFKKEINN AHAILTDISKRSIYDKYG
DNAJC6	24	<u>NM 001256864</u>	<u>NP 001243793</u>	TKWKPVGMADLVTPEQVKKVYRKA VLVWHPDKATGQPYEQYAKMIFME LNDAWSEFENQGOQKPLY
DNAJC7	25	<u>NM 001144766</u>	<u>NP 001138238</u>	DYYKILGVDKNASEDEIKKAYRKR ALMHHPDRHSGASAEVQKEEEKKF KEVGEAFTILSDPKKKTRYDSGQ
DNAJC8	26	<u>NM 014280</u>	<u>NP 055095</u>	NPFEVLQIDPEVTDEEIKKRFRQL SILVHPDKNQDDADRAQKAFEAVD KAYKLLLDQEQQKRALDVIQ
DNAJC9	27	<u>NM 015190</u>	<u>NP 056005</u>	DLYRVLGVRREASDGEVRRGYHKV SLQVHPDRVGEKDKEATRFRQIL GKVYSVLSDREQRAVYDEQG
DNAJC10	28	<u>NM 001271581</u>	<u>NP 001258510</u>	DFYSLLGVSKTASSREIRQAFKLL ALKLHPDKNPNPNNAHGDFLKINR AYEVLKDEDLRKKYDKYG
DNAJC11	29	<u>NM 018198</u>	<u>NP 060668</u>	DYYSILNVRREASSEELKAAAYRRL CMLYHPDKHRDPELKSQAERLNL VHQAYEVLSDPQTRAIYDIYG
DNAJC12	30	<u>NM 021800</u>	<u>NP 068572</u>	DYYTLLGCDELSSVEQILAEFKVR ALECHHPDKHPENPKAVETFQKLQK AKEILTNEESRARYDHWR
DNAJC13	31	<u>NM 015268</u>	<u>NP 056083</u>	DAYEVLNLPQGGPHDESKIRKAY FRLAQKYHPDKNPEGRDMFEKVNK AYEFLCTKSAKIVDGPDP

10

20

30

40

【 0 0 3 9 】

【表 1 - 3】

DNAJC14	32	<u>NM 032364</u>	<u>NP 115740</u>	NPFHVLGVEATASDVELKKAYRQL AVMV <b>HPD</b> KNNHPRAEEAFKVLRAA WDIVSNAEKRRKEYEMKR	
DNAJC15	33	<u>NM 013238</u>	<u>NP 037370</u>	EAGLILGVSPSAGKAKIRTAHRRV MILN <b>HPD</b> KGGSPYVAAKINEAKDL LETTTKH	
DNAJC16	34			DPYRVLGVSRTASQADIKKAYKKL AREW <b>HPD</b> KNKDPGAEDKFIQISKA YEILSNEEKRSNYDQYG	
DNAJC17	35	<u>NM 018163</u>	<u>NP 060633</u>	DLYALLGIEEKAADKEVKKAYRQK ALS <b>CHPD</b> KNPDPNRAAELFHQLSQ ALEVLTDAARAAYDKVR	10
DNAJC18	36	<u>NM 152686</u>	<u>NP 689899</u>	NYYEILGVSRDASDEELKKAYRKL ALK <b>FHPD</b> KNCAPGATDAFKAIGNA FAVLSNPDKRLRYDEYG	
DNAJC19	37	<u>NM 001190233</u>	<u>NP 001177162</u>	EAALILGVSPPTANKGKIRDAHRI MLLN <b>HPD</b> KGGSPYIAAKINEAKDL LEGOAKK	
DNAJC20	38	<u>NM 172002</u>	<u>NP 741999</u>	DYFSLMDCNRSFRVDTAKLQHRYQ QLQRLV <b>HPD</b> FFSQRSQTEKDFSEK HSTLVNDAYKTL LAPLSRGLYLLK	
DNAJC21	39	<u>NM 001012339</u>	<u>NP 001012339</u>	CHYEALGVRRDASEEELKKAYRKL ALKW <b>HPD</b> KNLDNAEAAEQFKLIQ AAYDVLSDPQERAWYDNHR	20
DNAJC22	40	<u>NM 001304944</u>	<u>NP 001291873</u>	LAYQVLGLSEGATNEEIHRSYQEL VKVW <b>HPD</b> HNLQDTEEAQRHFLEIQ AAYEVLSPQRPKPGSRR	
DNAJC23	41	<u>NM 007214</u>	<u>NP 009145</u>	NPYEVNLNDPGATVAEIKKQYRLL SLKY <b>HPD</b> KGGDEVFMFRIAKAYAA LTDEESRKNWEEFG	
DNAJC24	42	<u>NM 181706</u>	<u>NP 859057</u>	DWYSILGADPSANISDLKQKYQKL ILMY <b>HPD</b> KQSTDVDPAGTVEECVQK FIEDQAWKILGNEETKREYDLQR	
DNAJC25	43	<u>NM 001015882</u>	<u>NP 001015882</u>	DCYEVLGVSRSAGKAEIARAYRQL ARRY <b>HPD</b> RYRPPQPGDEGPGRTPQS AEEAFLLVATAYETLKDEETRKDY DYML	30
DNAJC26	44	<u>NM 001318134</u>	<u>NP 001305063</u>	SRWTPVGMADLVAPEQVKKHYRRA VLAV <b>HPD</b> KAAGQPYEQHAKMIFME LNDAWSEFENQGSRPLF	
DNAJC27	45			DSWDMLGVKPGASRDEVNKAYRKL AVLL <b>HPD</b> KCVAPGSEDAFKAVVNA RTALLKNIK	
DNAJC28	46	<u>NM 001040192</u>	<u>NP 001035282</u>	EYYRLNVEEGCSADEVRESFHKL AKQY <b>HPD</b> SGSNTADSATFIRIEKA YRKVLSHVIEQTNASQS	
DNAJC29	47	<u>NM 014363</u>	<u>NP 055178</u>	IILKEVTSVVEQAWKLPESERKKII RRLYLKW <b>HPD</b> KNPENHDIANEVFK HLQNEINRLEKQAFLDQNADRASR RTFSTSASRFQSDKYS	40

【0040】

【表 1 - 4】

DNAJC30	48	<u>NM 032317</u>	<u>NP 115693</u>	ALYDLLGVPSTATQAQIKAAYYRQ CFLY <b>HPD</b> RNSGSAEAAERFTRISQ AYVVLGSATLRRKYDRGL
---------	----	------------------	------------------	---

【0041】

b. タウ結合性ドメイン

融合タンパク質はまた、少なくとも1つのタウ結合性ドメインを含む。タウ結合性ドメ

インは、融合タンパク質を形成するようにドメインと連結された一本鎖ポリペプチドまたは多量体ポリペプチドであり得る。

【0042】

タウ結合性ドメインが、細胞内において病的レベルで存在する時のタウタンパク質を結合することができるような十分な親和性を有することは理想である。したがって、一実施形態において、融合タンパク質は、96ウェルマイクロタイタープレート上でのELISAにより試験された場合、例えば、2 $\mu$ M以下、1 $\mu$ M以下、500nM以下、300nM以下、100nM以下、30nM以下の、タウに対する $K_D$ を有するタウ結合性ドメインを含む。別の実施形態において、融合タンパク質は、96ウェルマイクロタイタープレート上でのELISAにより試験された場合、例えば、2 $\mu$ M以下、1 $\mu$ M以下、500nM以下、300nM以下、100nM以下、30nM以下の、タウの凝集型に対する $K_D$ を有するタウ結合性ドメインを含む。なお別の実施形態において、タウ結合性ドメインは、タウの凝集型に対する選択性を有し、例えば、タウ結合性ドメインは、タウの可溶性形態に対する親和性と比較した場合、少なくとも2倍高い、少なくとも3倍高い、少なくとも4倍高い、少なくとも5倍高い、少なくとも10倍高い、少なくとも30倍高い、少なくとも100倍高い、タウの凝集型に対する親和性を有する。

10

【0043】

タウ結合性ドメインは、以前に同定され、かつ特徴づけられている（例えば、米国特許第7,605,133号、WO2019/161386、Abeら、(2007) BMC Bioinformatics、8:451（それぞれ、参照により本明細書に組み入れられている）参照）。したがって、別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号49~52からなる群から選択されるタウ結合性ドメイン（例えば、表2参照）を含む。一つの特定の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号49のタウ結合性ドメインを含む。

20

【0044】

別の実施形態において、融合タンパク質はまた、ドメインと化学的にコンジュゲートされているタウ結合性ドメインの使用を企図する。タウ結合性ドメインは、ドメインと直接的にコンジュゲートされ得る。あるいは、それは、リンカーによりドメインとコンジュゲートされ得る。例えば、当業者に知られて、かつタウ結合性ドメインをドメインと、または標的化ドメインを、タウ結合性ドメインおよびドメインを含む融合タンパク質と架橋するのに有用である多数の化学的架橋剤がある。例えば、いくつかの架橋剤は、分子を段階的な様式で連結するために用いることができるヘテロ二官能性架橋剤である。ヘテロ二官能性架橋剤は、タンパク質をコンジュゲートするためのより特異的なカップリング方法をデザインする能力を提供し、それにより、ホモタンパク質ポリマーなどの望ましくない副反応の発生を低下させる。様々なヘテロ二官能性架橋剤が当技術分野において知られており、それには、スクシンイジミル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)；N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)、スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(SMPB)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド(EDC)；4-スクシンイミジルオキシカルボニル-a-メチル-a-(2-ピリジルジチオ)-トルエン(SMPT)、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート]ヘキサノエート(LC-SPDP)が挙げられる。N-ヒドロキシスクシンイミド部分を有する架橋剤は、一般的により高い水溶性を有するN-ヒドロキシルホスクリンイミド類似体として得ることができる。加えて、連結鎖内にジスルフィド架橋を有する架橋剤は、インピボでのリンカー切断の量を低下させるためにアルキル誘導体として、代わりに合成することができる。ヘテロ二官能性架橋剤に加えて、ホモ二官能性架橋剤および光反応性架橋剤を含む、いくつかの他の架橋剤が存在する。ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、ビスマレイミドヘキサン(BMH)、およびジメチルピメ

30

40

50

リミデート・2 H C 1 は、この開示に用いられる有用なホモ二官能性架橋剤の例であり、ビス - [ B - ( 4 - アジドサリチルアミド ) エチル ] ジスルフィド ( B A S E D ) および N - スクシンイミジル - 6 ( 4 ' - アジド - 2 ' - ニトロフェニルアミノ ) ヘキサノエート ( S A N P A H ) は、有用な光反応性架橋剤の例である。タンパク質カップリング技術の最近の概説について、参照により本明細書に組み入れられた、Meansら、( 1990 ) Bioconj. Chem. 1 : 2 ~ 12 を参照されたい。

【 0 0 4 5 】

【 表 2 】

表2: タウ結合性ドメインの例

名前	配列番号	長さ	配列
TBP1	49	6	VQIVYK
scFv(タウ)	50	234	EVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTASGFNIKDTSMHWVRQ RPEQGLEWIGRIAPANGNTKYDPKFQGKATITTDTSST AYLQLSSLTSEDYAVYYCSGSGNYDWGQGTTLTVSGGGG SGGGSGGGGSDIQMNQSPSSLSASLGDTITISCHASQN INVWLSWYQQKPGNIPKLLIYEASTLYTGVPSTRFSGSGS GTGFTLTISLQPEDYATYYCQQGQSYPTWTFGGGTKLEI
scFv(MW7)	51	243	QVKLQESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQ SPEKGLSGVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSK SSVYLQMNSLRAEDTGIYYCIYAGFAYWGQGTTVTVSSG GGGSGGGGSGGGSDIELTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKS SQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGV PDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYSTPWT FGGGTKLEI
Happ1	52	118	MQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQ QLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRPEDEADYYCAAWDDSLCVALVFGGGTNGGGGVDGTA G
TBP2	53	6	VQIINK
TBP3	54	13	YQQYQDATADEQG

【 0 0 4 6 】

c . 任意選択のリンカー

本明細書に記載された融合タンパク質は、任意選択で、1つまたは複数のリンカーを含有することができる。リンカーは、ペプチド性または非ペプチド性であり得る。リンカーの目的は、とりわけ、タンパク質内の機能性ドメインの間（例えば、Jドメインとタウ結合性ドメインの間、タウ結合性ドメインのタンデム配置の間、Jドメインとタウ結合性ドメインと任意選択の標的化試薬のいずれかの間、またはJドメインとタウ結合性ドメインと任意選択の検出ドメインまたはエピトープのいずれかの間）に、そのドメインのそれぞれの最適な機能のために、適切な距離を与えることである。明らかに、リンカーは、好ましくは、本発明の融合タンパク質のJドメイン、標的タンパク質結合性ドメインのそれぞれの機能に干渉しない。リンカーは、本発明の融合タンパク質に存在する場合には、標的タンパク質（タウタンパク質）によって引き起こされる細胞毒性を減弱するように選択され、直接的付着が所望の効果を達成するならば、それは省略され得る。本発明の融合タンパク質に存在するリンカーは、本明細書に記載されているようなタンパク質ドメインまたは融合タンパク質全体をコードする核酸セグメントをインフレームで挿入されている発現ベクターのクローニング部位あたりの核酸のセグメント上に存在するヌクレオチド配列によってコードされる1個または複数のアミノ酸を含み得る。一実施形態において、ペプチ

10

20

30

40

50

ドリンカーは、1アミノ酸長から20アミノ酸長の間である。別の実施形態において、ペプチドリンカーは、2アミノ酸長から15アミノ酸長の間である。なお別の実施形態において、ペプチドリンカーは、2アミノ酸長から10アミノ酸長の間である。

【0047】

本発明による融合タンパク質を作製するために1つまたは複数のポリペプチドリンカーを選択することは、当業者の知識と技能の範囲内である。例えば、Araiら、Protein Eng.、14(8):529~532(2001); Crastoら、Protein Eng.、13(5):309~314(2000); Georgeら、Protein Eng.、15(11):871~879(2003); Robinsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95:5929~5934(1998)参照(それぞれ、全体として参照により本明細書に組み入れられている)。本発明による融合タンパク質を調製することにおいて用いられ得る2個以上のアミノ酸のリンカーの例には、下記の表3に提供されたものが挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0048】

【表3】

表3: リンカー配列

配列番号	長さ	配列
55	2	SR
56	4	GTGS
57	5	GLESR
58	4	GGSG
59	4	GGGS
60	5	DIAAA
61	9	DIAAALESR
62	15	GGGSGGGSGGGGS
63	11	AEAAAKEAAK
64	15	SGGSGGGSGGGGS
65	25	DIGGGSGGGSGGGSGGGGSAAA

20

30

【0049】

d. 標的化試薬

本明細書に開示された融合タンパク質はさらに、標的化部分を含み得る。本明細書で用いられる場合、用語「標的化部分」および「標的化試薬」は、交換可能に用いられ、細胞においてまたは対象の身体において、融合タンパク質の結合、輸送、蓄積、滞留時間、生物学的利用率を増強し、またはその生物活性もしくは治療効果を改変する、融合タンパク質に会合した物質を指す。標的化部分は、組織、細胞、および/または細胞内のレベルで機能性を有し得る。標的化部分は、例えば融合タンパク質の対象への投与により、融合タンパク質の特定の細胞、組織、または器官への局在を方向づけることができる。一実施形態において、標的化部分は、融合タンパク質のN末端に位置する。別の実施形態において、標的化部分は、融合タンパク質のC末端に位置する。なお別の実施形態において、標的化部分は、融合タンパク質のN末端とC末端との間に位置する。別の実施形態において、標的化部分は、化学的コンジュゲーションを介して融合タンパク質と付着する。

40

【0050】

標的化部分には、とりわけ、有機もしくは無機分子、ペプチド、ペプチド模倣体、タンパク質、抗体もしくはその断片、成長因子、酵素、レクチン、抗原もしくは免疫原、ウイルスもしくはそのコンポーネント、ウイルスベクター、受容体、受容体リガンド、毒素、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドもしくはアプタマー、ヌクレオチド、炭水化物、糖、脂質、糖脂質、核タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、ステロイド、ホルモン、化学誘引物質、サイトカイン、ケモカイン、薬物、または小分子が挙げられ得るが、

50

それらに限定されない。

【 0 0 5 1 】

本発明の例示的实施形態において、標的化部分は、標的細胞または組織、例えば、CNSの神経細胞、および/またはPNSにおいて、プラットフォーム、またはその関連したリガンドおよび/もしくは活性物質の結合、輸送、蓄積、滞留時間、生物学的利用率を増強し、または生物活性もしくは治療効果を改変する。したがって、標的化部分は、CNSに関連した細胞受容体に対する特異性を有し得、または血液脳関門(BBB)を經由してのCNSへの送達の増強に別様に関連する。結果的に、上記のようなりガンドは、リガンドと標的化部分の両方であり得る。

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態において、標的化部分は、例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第10,111,965号に記載されているような、細胞透過性ペプチドであり得る。別の実施形態において、標的化部分は、例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、米国特許出願第16/131,591号に記載されているような、抗体またはその抗原結合性断片もしくは一本鎖誘導体であり得る。

【 0 0 5 3 】

標的化部分は、標的化された細胞送達のためのプラットフォームに、そのコアと直接的または間接的に結合することにより、連結され得る。例えば、コアがナノ粒子を含む実施形態において、標的化部分のナノ粒子とのコンジュゲーションは、ナノ粒子にPEGを繋ぎ止めるために用いられる類似した官能基を利用することができる。したがって、標的化部分は、標的化部分の官能化を通してナノ粒子と直接的に結合することができる。あるいは、標的化部分は、上記で論じられているように、標的化部分の官能化PEGとのコンジュゲーションを通して、ナノ粒子と間接的に結合することができる。標的化部分は、共有結合性、非共有結合性、または静電気性相互作用によってコアと接着することができる。一実施形態において、標的化部分はペプチドである。特定の実施形態において、標的化部分は、融合タンパク質のN末端と共有結合性に付着するペプチドである。

【 0 0 5 4 】

e. エピトープ

ある特定の実施形態において、本発明の融合タンパク質は、融合タンパク質に追加の性質を与えることができる任意選択のエピトープまたはタグを含有する。本明細書で用いられる場合、用語「エピトープ」および「タグ」は、典型的には融合タンパク質のN末端またはC末端と付着する、典型的には300アミノ酸長以下の、アミノ酸配列を指すのに交換可能に用いられる。一実施形態において、本発明の融合タンパク質はさらに、精製を促進するために用いられるエピトープを含む。下記の表4に提供された、精製に有用なそのようなエピトープの例には、ヒトIgG1Fc配列(配列番号66)、FLAGエピトープ(DYKDDDDK、配列番号67)、His6エピトープ(配列番号68)、c-myc(配列番号69)、HA(配列番号70)、V5エピトープ(配列番号71)、またはグルタチオン-s-トランスフェラーゼ(配列番号72)が挙げられる。別の実施形態において、本発明の融合タンパク質はさらに、対象、例えばヒトへ投与された時、融合タンパク質の半減期を増加させるために用いられるエピトープを含む。半減期を増加させるために有用なそのようなエピトープの例には、ヒトFc配列が挙げられる。したがって、一つの特定の実施形態において、融合タンパク質は、Jドメインおよびタウ結合性ドメインに加えて、ヒトFcエピトープを含む。エピトープは、融合タンパク質のC末端に位置する。

【 0 0 5 5 】

10

20

30

40

50

## 【表 4】

表4: エピトープの代表的な例

配列番号	エピトープ	長さ	配列
66	ヒトIgG1 Fc ドメイン	232	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEV ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
67	FLAG <sup>®</sup> トープ	8	DYKDDDDK
68	His6	6	HHHHHH
69	c-myc	10	EQKLISEEDL
70	HA	9	YPYDVPDYA
71	V5エピトープ	14	GKPIPNPLLGLDST
72	グルチオン-S- トランスフェラーゼ	220	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEELHYERDEGDKWR NKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGG CPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRVIAYSKDFETLKVDFLSKLPE MLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDP MCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQAT FGGGDHPPKSD

10

20

## 【0056】

## f. 細胞透過性ペプチド

なお他の実施形態において、本明細書に記載された融合タンパク質はさらに、細胞透過性ペプチドを含み得る。細胞透過性ペプチドは、コンジュゲートされたカーゴを、それが小分子であろうと、ペプチドであろうと、タンパク質であろうと、核酸であろうと、細胞へ運ぶことが知られている。本発明の融合タンパク質における細胞透過性ペプチドの非限定的例には、ポリカチオン性ペプチド、例えば、HIV TATペプチド49-57、ポリアルギニン、およびペネトラチンpAntan(43-58)、両親媒性ペプチド、例

30

例えば、pep-1、疎水性ペプチド、例えば、C405Y、およびその他同種類のものが挙げられる。下記の表5参照。

## 【0057】

## 【表 5】

表5: 細胞透過性ペプチドの例

配列番号	配列
73	RKKRRQRRR
74	RQIKWFAQNRRMKWKK
75	KETWWETWWTEWSQPKKRKV
76	CSIPPEVKFNKPFVYLI

40

## 【0058】

したがって、一実施形態において、本融合タンパク質は、細胞透過性ペプチドおよび融合タンパク質を含み、前記細胞透過性ペプチドが、配列番号73~76からなる群から選択され、前記融合タンパク質が配列番号83~88および95~101からなる群から選択される。別の実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号73の細胞透過性ペプチド、ならびに配列番号83~88および95~101からなる群から選択される融合タ

50

ンパク質を含む。別の実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号74の細胞透過性ペプチド、ならびに配列番号83～88および95～101からなる群から選択される融合タンパク質を含む。なお別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号75の細胞透過性ペプチド、ならびに配列番号83～88および95～101からなる群から選択される融合タンパク質を含む。さらに別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号76の細胞透過性ペプチド、ならびに配列番号83～88および95～101からなる群から選択される融合タンパク質を含む。細胞透過性ペプチドを含む本融合タンパク質構築物を発現する細胞は、対象、例えばヒト対象（例えば、タウ障害を有し、または患うリスクがある患者）へ投与され得る。本融合タンパク質は、細胞から分泌され、タウ含有タンパク質凝集および/または関連した細胞毒性を低下させるのを助ける。

10

## 【0059】

## g. Jドメインおよびタウ結合性ドメインの配置

本明細書に記載された融合タンパク質は、多数の様式で配置され得る。一実施形態において、タウ結合性ドメインは、JドメインのC末端側へ付着している。別の実施形態において、タウ結合性ドメインは、JドメインのN末端側へ付着している。タウ結合性ドメインおよびJドメインは、いずれの立体配置においても、任意で、上記のようなリンカーを介して、分離され得る。

## 【0060】

いくつかの実施形態において、Jドメインは、複数のタウ結合性ドメイン、例えば、2つのタウ結合性ドメイン、3つのタウ結合性ドメイン、4つのタウ結合性ドメイン、またはそれ以上と付着し得る。複数のタウ結合性ドメインは、JドメインのN末端側へ付着し得る。なお別の実施形態において、複数のタウ結合性ドメインは、JドメインのN末端側およびC末端側に付着し得る。複数のタウ結合性ドメインのそれぞれは、同じタウ結合性ドメインであり得る。別の実施形態において、融合タンパク質における複数のタウ結合性ドメインのそれぞれは、異なるタウ結合性ドメイン（すなわち、異なる配列）であり得る。

20

## 【0061】

いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、以下の群：

- a. DNAJ - X - T、
  - b. DNAJ - X - T - X - T、
  - c. DNAJ - X - T - X - T - X - T、
  - d. T - X - DNAJ、
  - e. T - X - T - X - DNAJ、
  - f. T - X - T - X - T - X - DNAJ、
  - g. T - X - DNAJ - X - T、
  - h. T - X - DNAJ - X - T - X - T、
  - i. T - X - DNAJ - X - T - X - T - X - T、
  - j. T - X - T - X - DNAJ - X - T、
  - k. T - X - T - X - DNAJ - X - T - X - T、
  - l. T - X - T - X - DNAJ - X - T - X - T - X - T、
  - m. T - X - T - X - T - X - DNAJ - X - T、
  - n. T - X - T - X - T - X - DNAJ - X - T - X - T、および
  - o. T - X - T - X - T - X - DNAJ - X - T - X - T - X - T、
- から選択される構造を含み得、  
ここで、  
Tはタウ結合性ドメインであり、  
DNAJはJタンパク質のJドメインであり、  
Xは任意選択のリンカーである。

30

40

## 【0062】

一実施形態において、融合タンパク質は、配列番号5、6、10、24、および31か

50

らなる群から選択されるJドメインを含む。一つの特定の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号5のJドメインを含む。

【0063】

別の実施形態において、タウ結合性ドメインは、配列番号49～54からなる群から選択される。一つの特定の実施形態において、タウ結合性ドメインは、配列番号49である。

【0064】

なお別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号5のJドメインおよび配列番号49のタウ結合性ドメインを含む。別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号5のJドメイン、および配列番号53のタウ結合性ドメインの少なくとも2個のコピーを含む。別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号5のJドメインおよび配列番号50のタウ結合性ドメインを含む。別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号5のJドメインおよび配列番号51のタウ結合性ドメインを含む。さらに別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号5のJドメインおよび配列番号52のタウ結合性ドメインを含む。別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号5のJドメインおよび配列番号53のタウ結合性ドメインを含む。さらに別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号5のJドメインおよび配列番号54のタウ結合性ドメインを含む。

【0065】

Jドメインおよびタウ結合性ドメインを含む融合タンパク質構築物の非限定的例は、図2に模式的に描かれ、下記の表6にも示されている。別の実施形態において、特定の融合タンパク質構築物は、配列番号83～88、および95～101からなる群から選択される。

【表6 - 1】

表6: 融合タンパク質構築物および対照構築物

構築物番号	配列番号	構築物名	長さ	配列
1	83	JB1-TBP1	106	MGKDYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEGLKGS DIGGGSGGGSGGGSGGGSSAA AVQIVYK
2	84	TBP1-JB1-TBP1	147	MGKPIPNPLLGLDSTGTGSVQIVYKGGSGGGS GGSGGSGMGKDYQTLGLARGASDEEIKRAYR RQALRYHPDKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DP

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

				RKREIFDRYGEEGLKGSDIGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSAAAVQIVYK
3	85	JB1- 2XTBP1	128	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSA AVQIVYKGGGSGGGGSGGGGSGGVSQIVYK
4	86	JB1- scFv(タウ)	334	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSA AEVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTASGFNIKDT SMHWVRQRPEQGLEWIGRIAPANGNTKYDPKFQ GKATITTDTSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCSG SGNYDWGQGTTLTVSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MNQSPSSLSASLGD TITISCHASQNINWLSWY QQKPGNIPKLLIYEASTLYTGVP SRFSGSGSGT GFTLTISLQPED IATYYCQQGQSY PWTFGGGT KLEI
5	87	JB1- scFv(MW7)	343	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSA AQVKLQESGGGLVQPGSMKLS CAASGFTFSDA WMDWVRQSPEKGLSGVAEIRSKANNHATYYAES VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYC IYAGFAYWGQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGG DIELTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNS NQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPD RFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQHY TPWTFGGGTKLEI
6	88	JB1-Happ1	218	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSA AMQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNI NYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRPEDEADYCAAWDDSLC VALVFGGGTNGGGGVDGTAG
7	89	JB1(P33Q)- TBP	106	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHQ DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSA AVQIVYK
8	90	JB1(P33Q)- scFv(タウ)	334	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHQ DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSA AEVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTASGFNIKDT SMHWVRQRPEQGLEWIGRIAPANGNTKYDPKFQ GKATITTDTSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCSG SGNYDWGQGTTLTVSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MNQSPSSLSASLGD TITISCHASQNINWLSWY QQKPGNIPKLLIYEASTLYTGVP SRFSGSGSGT GFTLTISLQPED IATYYCQQGQSY PWTFGGGT KLEI

10

20

30

40

【表 6 - 3】

9	91	JB1(P33Q)-scFv(MW7)	343	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHQ DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS DIGGGSGGGSGGGSGGGSSAA AQVKLQESGGGLVQPGGSMKLSAASGFTFSDA WMDWVRQSPKGLSGVAEIRSKANNHATYYAES VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYC IYAGFAYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGS DIELTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSS NQKNYLAWYQQKPGQSEPKLLVYFASTRESGVPD RFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYS TPWTFGGGKTLEI	10
10	92	JB1(P33Q)-Happ1	218	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHQ DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS DIGGGSGGGSGGGSGGGSSAA AMQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGS NYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRPEDEADYYCAAWDDSLC VALVFGGGTNGGGVDTAG	20
11	93	JB1-QBP1	91	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS GGGSSNWKWWPGIFD	30
12	94	JB1(P33Q)-QBP1	91	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHQ DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS GGGSSNWKWWPGIFD	40
14	95	JB1-TBP2	106	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS DIGGGSGGGSGGGSGGGSSAA AVQIINK	
15	96	JB1-TBP3	113	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS DIGGGSGGGSGGGSGGGSSAA AYQQYQDATADEQG	
16	97	JB1-TBP1 (リカーなし)	86	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS GGGSVQIVYK	
17	98	JB1-TBP2 (リカーなし)	86	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS GGGSVQIINK	
18	99	JB1-TBP3 (リカーなし)	93	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS GGGSYQQYQDATADEQG	
19	100	JB1-scFv (ゆ)(リカーなし)	314	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS GGGSEVQLQQSGAELVQPGASVK LSCTASGFNIKDTSMHWVRQRPEQGLEWIGRIA PANGNTKYDPKFQKATITTDTSNTAYLQLSS LTSEDTAVYYCSGSGNYDWGQGTTLTVSGGGGS GGGGSGGGSDIQMNQSPSSLSASLGDITITISC HASQNINVWLSWYQQKPGNIPKLLIYEASTLYT GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDATYYCQ QQQSYPWTFGGGKTLEI	

【表 6 - 4】

20	101	JB1-Happ1 (リカーなし)	198	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHP DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDR YGEEGLKGS GGGSMQSVLTQPPSASGTPGQRV TISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYR NNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRPEDE ADYYCAAWDDSLCVALVFGGGTNGGGVDTAG
----	-----	----------------------	-----	---

## II . 融合タンパク質構築物をコードする核酸

提供される本発明の別の態様は、( a ) 前述の実施形態のいずれかに記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、または ( b ) ( a ) のポリヌクレオチドの相補体から選択されるポリヌクレオチド配列を含む、単離された核酸である。本発明は、ドメインおよびタウ結合性ドメインを含む融合タンパク質をコードする、単離された核酸、ならびに融合タンパク質をコードするそのような核酸分子と相補的な配列、加えて、その相同バリエーションを提供する。別の態様において、本発明は、本明細書に開示された融合タンパク質をコードする核酸、融合タンパク質をコードする核酸と相補的な配列、加えて、その相同バリエーションを作製するための方法を包含する。本発明のこの態様による核酸は、プレメッセンジャーRNA ( pre - mRNA )、メッセンジャーRNA ( mRNA )、RNA、ゲノムDNA ( gDNA )、PCR増幅されたDNA、相補DNA ( cDNA )、合成DNA、または組換えDNAであり得る。

10

### 【 0 0 6 7 】

さらに別の態様において、( a ) 融合タンパク質をコードするヌクレオチドを合成しおよび/またはアSEMBLするステップ、( b ) コード遺伝子を、宿主細胞に適切な発現ベクターへ組み入れるステップ、( c ) 適切な宿主細胞を発現ベクターで形質転換するステップ、ならびに ( d ) 融合タンパク質が形質転換宿主細胞において発現することを引き起こしまたは可能にする条件下で宿主細胞を培養し、それにより、生物活性融合タンパク質を産生し、産生された生物活性融合タンパク質が、当技術分野において知られた標準タンパク質精製方法によって、単離された融合タンパク質として回収される、ステップを含む、融合タンパク質を産生する方法が開示される。分子生物学における標準組換え技術が、本発明のポリヌクレオチドおよび発現ベクターを作製するために用いられる。

20

### 【 0 0 6 8 】

本発明によれば、本明細書に開示された融合タンパク質をコードする核酸配列 ( またはその相補体 ) は、適切な宿主細胞において融合タンパク質の発現を指示する組換えDNA分子を作製するために用いられる。いくつかのクローニングストラテジーは、本発明を実施するのに適しており、その多くは、本発明の融合タンパク質またはその相補体をコードする遺伝子を含む構築物を作製するために用いられる。いくつかの実施形態において、クローニングストラテジーは、本発明の融合タンパク質またはその相補体をコードする遺伝子を産生するために用いられる。

30

### 【 0 0 6 9 】

ある特定の実施形態において、1つまたは複数の融合タンパク質をコードする核酸は、RNA分子であり、プレメッセンジャーRNA ( pre - mRNA )、メッセンジャーRNA ( mRNA )、RNA、ゲノムDNA ( gDNA )、PCR増幅されたDNA、相補DNA ( cDNA )、合成DNA、または組換えDNAであり得る。

### 【 0 0 7 0 】

様々な実施形態において、核酸は、所望のポリペプチドを一過性に発現するために細胞へ導入されるmRNAである。本明細書で用いられる場合、「一過性の」は、数時間、数日間、または数週間の期間の間の、組み込まれていない導入遺伝子の発現を指し、発現の期間は、ゲノムへ組み込まれ、または細胞における安定なプラスミドレプリコン内に含有される場合のポリヌクレオチドの発現についての期間より短い。

40

### 【 0 0 7 1 】

特定の実施形態において、ポリペプチドをコードするmRNAは、インビトロで転写されたmRNAである。本明細書で用いられる場合、「インビトロで転写されたRNA」とは、インビトロで合成されているRNA、好ましくはmRNAを指す。一般的に、インビトロで転写されたRNAは、インビトロ転写ベクターから生成される。インビトロ転写ベクターは、インビトロで転写されたRNAを生成するために用いられる鋳型を含む。

### 【 0 0 7 2 】

特定の実施形態において、mRNAはさらに、5'キャップもしくは修飾5'キャップおよび/または3'ポリ(A)配列を含み得る。本明細書で用いられる場合、5'キャップ( 50

RNAキャップ、RNA 7-メチルグアノシンキャップ、またはRNA m7Gキャップとも呼ばれる)は、転写の開始後すぐに真核生物メッセンジャーRNAの「最前部(front)」または5'末端に付加されている修飾グアニンヌクレオチドである。5'キャップは、最初に転写されたヌクレオチドに連結され、かつリボソームによって認識され、かつRNAアーゼから保護される末端基を含む。キャッピング部分は、mRNAの機能性、例えば、その安定性または翻訳の効率を調節するために修飾され得る。特定の実施形態において、mRNAは、約50個から約5000個の間のアデニンのポリ(A)テール配列を含む。一実施形態において、mRNAは、約100塩基から約1000塩基の間、約200塩基から約500塩基の間、または約300塩基から約400塩基の間のポリ(A)配列を含む。一実施形態において、mRNAは、約65塩基、約100塩基、約200塩基、約300塩基、約400塩基、約500塩基、約600塩基、約700塩基、約800塩基、約900塩基、または約1000塩基もしくはそれ以上のポリ(A)配列を含む。ポリ(A)配列は、mRNAの機能性、例えば、局在化、安定性、または翻訳の効率を調節するために化学的または酵素的に修飾され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0073】

本明細書で用いられる場合、用語「ポリヌクレオチドバリエーション」および「バリエーション」およびその他同種類のものは、参照ポリヌクレオチド配列と実質的な配列類似性を示すポリヌクレオチド、または以下で定義されるストリンジェントな条件下で参照配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドを指す。これらの用語は、参照ポリヌクレオチドと比較して、1個または複数のヌクレオチドが、付加し、または欠失し、または異なるヌクレオチドに置き換えられているポリヌクレオチドを含む。この点において、変異、付加、欠失、および置換を含むある特定の変更を、参照ポリヌクレオチドに行うことができ、それにより変更されたポリヌクレオチドが、参照ポリヌクレオチドの生物学的機能または活性を保持することは、当技術分野においてよく理解されている。

#### 【0074】

##### III. 融合タンパク質をコードする核酸を含むベクター

本発明による核酸を含むベクターもまた提供される。そのようなベクターは、好ましくは、ホスファターゼをコードする核酸配列の転写/翻訳に必要なエレメント(例えば、プロモーターおよび/またはターミネーター配列)などの追加の核酸配列を含む。前記ベクターはまた、前記ベクターで形質転換された宿主細胞を選択または維持するために選択マーカー(例えば、抗生物質)をコードする核酸配列を含み得る。用語「ベクター」は、別の核酸分子を移入させまたは輸送する能力がある核酸分子を指す。移入した核酸は、一般的に、ベクター核酸分子と連結され、例えば、その中へ挿入される。ベクターは、細胞において自己複製を指示する配列を含み得、または宿主細胞DNAへの組込みを可能にするのに十分な配列を含み得る。特定の実施形態において、非ウイルスベクターは、本明細書で企図された1つまたは複数のポリヌクレオチドを罹患細胞(例えば、神経細胞)へ送達するために用いられる。一実施形態において、ベクターは、ドメインおよびタウ結合性ドメインを含む融合タンパク質をコードする、インビトロで合成されまたは合成的に調製されたmRNAを含有する。非ウイルスベクターの実例には、mRNA、プラスミド(例えば、DNAプラスミドまたはRNAプラスミド)、トランスポゾン、コスミド、および細菌人工染色体が挙げられるが、それらに限定されない。本明細書で用いられる場合、用語「核酸カセット」または「発現カセット」は、RNAおよびその後、ポリペプチドを発現することができるベクター内の遺伝的配列を指す。一実施形態において、核酸カセットは、目的の遺伝子、例えば、目的のポリヌクレオチドを含有する。別の実施形態において、核酸カセットは、1つまたは複数の発現制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリ(A)配列、および目的の遺伝子、例えば目的のポリヌクレオチドを含有する。ベクターは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個、またはそれ以上の核酸カセットを含み得る。核酸カセットは、カセット内の核酸がRNAへ転写され、必要に応じて、タンパク質もしくはポリペプチドへ翻訳され、形質転換細胞における活性に必要とされる適切な翻訳後修飾を起こし、適切な細胞内コンパートメント

へと標的化することまたは細胞外のコンパートメントへの分泌により、生物活性のために適切なコンパートメントへと転位することができるように、ベクター内に位置的にかつ順序的に方向づけられる。好ましくは、カセットは、ベクターへの即時挿入に適応した3'および5'末端を有し、例えば、それは、各末端に制限エンドヌクレアーゼ部位を有する。カセットは、単一ユニットとして、プラスミドまたはウイルスベクターへ除去および挿入され得る。

【0075】

ベクターの実例には、プラスミド、自己複製配列、および転位因子、例えば、pigg y Bac、Sleeping Beauty、Mos1、Tcl/mariner、Tol2、mini-Tol2、Tc3、MuA、Himar I、Frog Prince、およびそれらの誘導体が挙げられるが、それらに限定されない。ベクターの追加の実例には、非限定的に、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、またはP1由来人工染色体(PAC)などの人工染色体、ラムダファージまたはM13ファージなどのバクテリオファージ、および動物ウイルスが挙げられる。ベクターとして有用なウイルスの実例には、非限定的に、レトロウイルス(例えば、レンチウイルス)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス(例えば、単純ヘルペスウイルス(vims))、ポックスウイルス、パキウウイルス、パピロマウイルス、およびパポウイルス(例えば、SV40)が挙げられる。発現ベクターの実例には、哺乳動物細胞における発現のためのpCIneoベクター(Promega)；哺乳動物細胞におけるレンチウイルス媒介性遺伝子移入および発現のためのpLenti4/V5-DEST(商標)、pLenti6/V5-DEST(商標)、およびpLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen)が挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態において、本明細書に開示されたポリペプチドのコード配列は、哺乳動物細胞におけるポリペプチドの発現のためにそのような発現ベクターへライゲーションされ得る。

【0076】

特定の実施形態において、ベクターは、エピソームベクター、または染色体外に維持されるベクターである。本明細書で用いられる場合、用語「エピソームの」は、宿主の染色体DNAへの組み込みなしに、かつ分裂する宿主細胞から徐々に失われることなしに複製することができる、つまり、前記ベクターが染色体外にまたはエピソーム的に複製する、ベクターを指す。

【0077】

特定の実施形態における使用に適した実例的な遍在性発現制御配列には、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、ウイルスのサルウイルス40(SV40)プロモーター(例えば初期または後期)、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)LTRプロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)LTR、単純ヘルペスウイルス(HSV)(チミジンキナーゼ)プロモーター、ワクシニアウイルス由来のH5、P7.5、およびP11プロモーター、伸長因子1-アルファ(Efla)プロモーター、初期増殖応答1(EGR1)、フェリチンH(FerH)、フェリチンL(FerL)、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、真核生物の翻訳開始因子4A1(EIF4A1)、熱ショック70kDaタンパク質5(HSPA5)、熱ショックタンパク質90kDaベータ、メンバー1(HSP90B1)、熱ショックタンパク質70kDa(HSP70)、b-キネシン(b-KIN)、ヒトROSA26遺伝子座(Irisonsら、Nature Biotechnology 25、1477~1482(2007))、ユビキチンCプロモーター(UBC)、ホスホグリセリン酸キナーゼ1(PGK)プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリb-アクチン(CAG)プロモーター、b-アクチンプロモーターおよび骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負制御領域が欠失し、d1587revプライマー結合部位に置換された(MND)U3プロモーター(Haasら、Journal of Virology 2003; 77(17):9439~9450)の遺伝子プロモーターが挙げられるが、それらに限

10

20

30

40

50

定されない。

【0078】

ベクターは、様々な部位特異的リコンビナーゼのいずれかについての1つまたは複数の組換え部位を含み得る。部位特異的リコンビナーゼについての標的部位が、ベクター、例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターの組込みに必要とされる任意の部位に加えてであることは、理解されるべきである。本明細書で用いられる場合、用語「組換え配列」、「組換え部位」、または「部位特異的組換え部位」(SSR)は、リコンビナーゼが認識しかつ結合する特定の核酸配列を指す。

【0079】

例えば、Creリコンビナーゼについての1つの組換え部位は、8塩基対コア配列に隣接する2つの13塩基対逆方向反復(リコンビナーゼ結合部位として働く)を含む34塩基対配列である、loxPである(Sauer, B., Current Opinion in Biotechnology 5:521~527(1994)の図1参照)。FLPリコンビナーゼについての適切な認識部位には、FRT(McLeodら、1996)、FI、F2、F3(SchlakeおよびBode、1994)、FyFs(SchlakeおよびBode、1994)、FRT(LE)(Senecoffら、1988)、およびFRT(RE)(Senecoffら、1988)が挙げられるが、それらに限定されない。

【0080】

認識配列の他の例は、attB、attP、attL、およびattR配列であり、それらは、リコンビナーゼ酵素1インテグラーゼ、例えば、phi-c31によって認識される。pC31 SSRは、ヘテロタイプな部位、attB(34bp長)とattP(39bp長)の間のみ組換えを媒介する(Grothら、2000)。細菌ゲノムおよびファージゲノム、それぞれにおけるファージインテグラーゼについての付着部位に関して名付けられたattBおよびattPはどちらも、おそらく031ホモダイマーにより結合される、不完全な逆方向反復を含有する(Grothら、2000)。生成部位、attLおよびattRは、事実上、さらなるtpQA1媒介性組換えに対して不活性であり(Beltekiら、2003)、反応を不可逆性にさせている。挿入を触媒することについて、attB保有DNAは、attP部位がゲノムattB部位へ挿入するより容易に、ゲノムattP部位へ挿入することが見出されている(Thyagaraja 30 nら、2001; Beltekiら、2003)。したがって、典型的なストラテジーは、相同組換えにより、attP保有「ドッキング部位」を、限定された遺伝子座へ位置づけ、その後、そのattP保有「ドッキング部位」が、挿入としてのattB保有の入ってくる配列とパートナーを組まされる。

【0081】

本明細書で用いられる場合、「配列内リボソーム進入部位」または「IRES」は、シストロン(タンパク質コード領域)のATGなどの開始コドンへの直接的な配列内リボソーム進入を促進し、それにより、遺伝子のキャップ非依存性翻訳をもたらすエレメントを指す。例えば、Jacksonら、1990 Trends Biochem Sci 15(12):477~83、ならびにJacksonおよびKaminski 1995 RNA 1(10):985~1000参照。特定の実施形態において、ベクターは、1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の目的のポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、複数のポリペプチドのそれぞれの効率的な翻訳を達成するために、ポリヌクレオチド配列は、1つもしくは複数のIRES配列、または自己切断性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列によって分離され得る。一実施形態において、本明細書で企図されるポリヌクレオチドに用いられるIRESは、EMCV IRESである。

【0082】

本明細書で用いられる場合、用語「コザック配列」は、リボソームの小サブユニットとのmRNAの最初の結合を大いに促進し、翻訳を増加させる、短いヌクレオチド配列を指

10

20

30

40

50

す (Kozak, 1986, Cell 44 (2) : 283 ~ 92、および Kozak, 1987, Nucleic Acids Res. 15 (20) : 8125 - 48)。特定の実施形態において、ベクターは、コンセンサスコザック配列を有するポリヌクレオチド、ならびに Jドメインおよびタウ結合性ドメインを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。異種性核酸転写物の効率的な終結およびポリアデニル化を方向づけるエレメントは、異種性遺伝子発現を増加させる。転写終結シグナルは、一般的に、ポリアデニル化シグナルの下流に見出される。特定の実施形態において、ベクターは、発現されるべきポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの 3' 側にポリアデニル化配列を含む。

#### 【0083】

##### IV. 送達

特定の実施形態において、Jドメインおよびタウ結合性ドメインを含む融合タンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドは、非ウイルスまたはウイルスのベクターにより細胞へ導入される。特定の実施形態において企図されたポリヌクレオチドの非ウイルス性送達の実例的方法には、エレクトロポレーション、ソノポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、ピロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ナノ粒子、ポリカチオンまたは脂質核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ビリオン、DEAE-デキストラン媒介性移入、遺伝子銃、および熱ショックが挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0084】

企図された特定の実施形態における使用に適したポリヌクレオチド送達系の実例には、Amaxa Biosystems、Maxcyte, Inc.、BTX Molecular Delivery Systems、および Copernicus Therapeutics Inc. により提供される送達系が挙げられるが、それらに限定されない。リポフェクション試薬は、商業的に販売されている (例えば、Transfectam (商標) および Lipofectin (商標))。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適しているカチオン性および中性脂質は、文献に記載されている。例えば、Liuら、(2003) Gene Therapy 10 : 180 ~ 187 ; および Balazsら、(20W) Journal of Drug Delivery 2011 : 1 ~ 12 参照。抗体により標的化された、細菌由来の、非生存のナノセルに基づいた送達もまた、特定の実施形態において企図される。

#### 【0085】

特定の実施形態において企図されたポリヌクレオチドを含むウイルスベクターは、インビボで、個々の患者への投与により、典型的には、下に記載されているように、全身投与 (例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、または頭蓋内の注入) により、くも膜下腔内注射、脳室内注射、または局所適用により、送達され得る。あるいは、ベクターは、個々の患者 (例えば、動員末梢血、リンパ球、髄液、組織生検など) から外植された細胞または万能ドナーの造血幹細胞などのエクスピボでの細胞へ送達され、その後、その細胞を患者へ再植え込みされ得る。

#### 【0086】

一実施形態において、本明細書に開示された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むウイルスベクターは、インビボでの細胞の形質導入のために生物体へ直接的に投与される。

#### 【0087】

適切にパッケージングされかつ製剤化されたウイルスベクターは、CNSへくも膜下腔内送達を介して送達され得る。例えば、アデノ随伴ウイルスベクターは、全体として参照により本明細書に組み入れられている、米国特許出願第15/771,481号に記載された方法を用いて送達され得る。

#### 【0088】

あるいは、裸のDNAが投与され得る。投与は、分子を血液または組織細胞との最終的

10

20

30

40

50

な接触へ導入するために通常用いられる経路のいずれかによってであり、その経路には、注射、注入、局所適用、およびエレクトロポレーションが挙げられるが、それらに限定されない。そのような核酸を投与する適切な方法が利用でき、当業者によく知られており、特定の組成物を投与するために1つより多い経路を用いることができるが、特定の経路が、別の経路より速効性が高くかつより効果的な反応を提供することができる。

【0089】

本明細書で企図された特定の実施形態における使用に適したウイルスベクター系の実例には、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、およびワクシニアウイルスのベクターが挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0090】

様々な実施形態において、ドメインおよびタウ結合性ドメインを含む融合タンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドは、細胞、例えば、神経細胞へ、1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を細胞に形質導入することにより、導入される。AAVは、小さい(約26nm)複製欠損の、主にエピソーム性の、無エンベロープのウイルスである。AAVは、分裂細胞と非分裂細胞の両方に感染することができ、そのゲノムを宿主細胞のゲノムへ組み入れ得る。組換えAAV(rAAV)は、典型的には、最小限で、導入遺伝子、ならびにその制御配列、ならびに5'および3' AAV末端逆位配列(ITR)で構成される。ITR配列は、約145bp長である。特定の実施形態において、rAAVは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、またはAAV10から単離されたITRおよびカプシド配列を含む。

20

【0091】

いくつかの実施形態において、ITR配列が1つのAAV血清型から単離され、かつカプシド配列が異なるAAV血清型から単離されているキメラrAAVが用いられる。例えば、AAV2に由来したITR配列およびAAV6に由来したカプシド配列を有するrAAVは、AAV2/AAV6と呼ばれる。特定の実施形態において、rAAVベクターは、AAV2に由来したITR、およびAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、またはAAV10のいずれか1つに由来したカプシドタンパク質を含み得る。好ましい実施形態において、rAAVは、AAV2に由来したITR配列およびAAV6に由来したカプシド配列を含む。好ましい実施形態において、rAAVは、AAV2に由来したITR配列およびAAV2に由来したカプシド配列を含む。

30

【0092】

いくつかの実施形態において、操作および選択方法は、目的の細胞を形質導入する可能性をより高くするために、AAVカプシドへ適用することができる。

【0093】

rAAVベクターの構築、その産生および精製は、例えば、米国特許第9,169,494号;第9,169,492号;第9,012,224号;第8,889,641号;第8,809,058号;および第8,784,799号に開示されており、それらの特許のそれぞれは、全体として参照により本明細書に組み入れられている。様々な実施形態において、本明細書に開示された融合タンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドは、神経細胞または神経幹細胞へ、1つまたは複数のポリヌクレオチドを含むレトロウイルス、例えばレンチウイルスを細胞に形質導入することにより、導入される。本明細書で用いられる場合、用語「レトロウイルス」は、そのゲノムRNAを直鎖状二本鎖DNAコピーへ転写し、その後、そのゲノムDNAを宿主ゲノムへ共有結合性に組み込む、RNAウイルスを指す。特定の実施形態における使用に適した実例的なレトロウイルスには、モロニー Maus 白血病ウイルス(M-MuLV)、モロニー Maus 肉腫ウイルス(MoMSV)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス(HaMuSV)、Maus 乳癌ウイルス(MuMTV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、ネコ白血病ウイルス(FLV)、

40

50

スプーマウイルス、フレンドマウス白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、およびラウス肉腫ウイルス (RSV)、ならびにレンチウイルスが挙げられるが、それらに限定されない。本明細書で用いられる場合、用語「レンチウイルス」は、複雑なレンチウイルスの一群 (または一属) を指す。実例的なレンチウイルスには、HIV (ヒト免疫不全ウイルス; HIV 1型およびHIV 2型を含む); ビスナ・マエディウイルス (VSV); ヤギ関節炎脳炎ウイルス (CAEV); ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV); ネコ免疫不全ウイルス (FIV); ウシ免疫不全ウイルス (BIV); およびサル免疫不全ウイルス (SIV) が挙げられるが、それらに限定されない。一実施形態において、HIVに基づいたベクターバックボーン (すなわち、HIVシス作用性配列エレメント) が好ましい。

10

#### 【0094】

レンチウイルスベクターは、好ましくは、LTRを改変することの結果としてのいくつかの安全性の増強を含有する。「自己不活性化」(SIN)ベクターは、複製欠損ベクター、例えば、U3領域として知られた、右側(3')のLTRエンハンサー-プロモーター領域が、ウイルス複製の最初のラウンドを超えてのウイルス転写を防止するように (例えば、欠失または置換により) 改変されている、ベクターを指す。追加の安全性増強は、5' LTRのU3領域を、ウイルス粒子の産生中にウイルスゲノムの転写を駆動させる異種性プロモーターと置き換えることにより提供される。用いられ得る異種性プロモーターの例には、例えば、ウイルスのサルウイルス40 (SV40) (例えば、初期または後期)、サイトメガロウイルス (CMV) (例えば、最初期)、モロニーマウス白血病ウイルス (MoMLV)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、および単純ヘルペスウイルス (Vims) (HSV) (チミジンキナーゼ) のプロモーターが挙げられる。ある特定の実施形態において、レンチウイルスベクターは、公知の方法に従って作製される。例えば、Kutnerら、BMC Biotechnol. 2009; 9:10 Doi:10.1186/1472-6750-9-10; Kutnerら、Nat. Protoc. 2009; 4(4):495~505 Doi:10.1038/nprot.2009.22参照。

20

#### 【0095】

本明細書で企図されたある特定の実施形態によれば、ウイルスベクターバックボーン配列の大部分または全部は、レンチウイルス、例えばHIV-1に由来している。しかしながら、レトロウイルスおよび/もしくはレンチウイルス配列の多くの異なる源が用いられ得、またはレンチウイルス配列のある部分における組み合わせられた多数の置換および変更が、トランスファーベクターが本明細書に記載された機能を実施する能力を損なうことなく、受け入れられ得ることは理解されるべきである。さらに、様々なレンチウイルスベクターが当技術分野において知られており、Naldiniら (1996a、1996b、および1998); Zuffereyら、(1997); Dullら、1998、米国特許第6,013,516号; および第5,994,136号を参照されたい (それらの多くは、本明細書で企図されたウイルスベクターまたはトランスファープラスミドを作製するように適応し得る)。

30

#### 【0096】

様々な実施形態において、本明細書に開示された融合タンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドは、標的細胞へ、1つまたは複数のポリヌクレオチドを含むアデノウイルスを細胞へ形質導入することにより導入される。アデノウイルス (Ad) に基づいたベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率の能力があり、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターを用いて、高い力価および高いレベルの発現が得られている。このベクターは、相対的に単純な系において大量に産生され得る。たいていのアデノウイルスベクターは、導入遺伝子がAd E1a、E1b、および/またはE3遺伝子を置き換えるように操作され、その後、その複製欠損ベクターが、欠失した遺伝子機能をトランスに供給するヒト293細胞において増殖される。Adベクターは、肝臓、腎臓、および筋肉内で見出される細胞などの非分裂性の分化細胞を含む複数の型の組織を

40

50

インビボで形質導入することができる。通常のAdベクターは、大きな運搬能を有する。

複製欠損である、現在のアデノウイルスベクターの生成および伝播は、293と名付けられた固有のヘルパー細胞株を利用し得、その細胞株は、ヒト胚性腎臓細胞からAd5 DNA断片により形質転換され、E1タンパク質を構成的に発現する(Grahamら、1977)。E3領域は、アデノウイルスゲノムからなくても済むため(Jones & Shenk、1978)、293細胞の助けを借りる現在のアデノウイルスベクターは、E1、E3、または両方のいずれかの領域において外来DNAを有する(Graham & Prevec、1991)。アデノウイルスベクターは、真核生物遺伝子発現(Levereroら、1991; Gomez-Foixら、1992)およびワクチン開発(Runhaus & Horwitz、1992; Graham & Prevec、1992)に用いられている。異なる組織へ組換えアデノウイルスを投与することにおける研究には、気管滴下(Rosenfeldら、1991; Rosenfeldら、1992)、筋肉注射(Ragotら、1993)、末梢静脈内注射(Herz & Gerard、1993)、および脳への定位接種(Le Gal La Salleら、1993)が挙げられる。臨床試験におけるAdベクターの使用の例は、筋肉内注射を用いた抗腫瘍免疫化のためのポリヌクレオチド治療を含んだ(Stermanら、Hum. Gene Ther. 7: 1083~9 (1998))。

#### 【0097】

様々な実施形態において、本発明の融合タンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドは、対象の標的細胞へ、1つまたは複数のポリヌクレオチドをコードする単純ヘルペスウイルス、例えば、HSV-1、HSV-2を細胞に形質導入することにより導入される。

#### 【0098】

成熟HSVビリオンは、152kbである直鎖状二本鎖DNA分子からなるウイルスゲノムを含む、エンベロープ型正二十面体カプシドからなる。一実施形態において、HSVに基づいたウイルスベクターは、1つまたは複数の必須または非必須のHSV遺伝子が欠損している。一実施形態において、HSVに基づいたウイルスベクターは、複製欠損である。たいていの複製欠損HSVベクターは、複製を防止するために1つまたは複数の最初期、初期、または後期HSV遺伝子を除去する欠失を含有する。例えば、HSVベクターは、ICP4、ICP22、ICP27、ICP47、またはそれらの組合せからなる群から選択される最初期遺伝子が欠損し得る。HSVベクターの利点は、結果として長期DNA発現を生じ得る、潜伏期を進入できるその能力、および最大25kbまでの外因性DNA挿入断片を収容できるその大きなウイルスDNAゲノムである。HSVに基づいたベクターは、例えば、米国特許第5,837,532号、第5,846,782号、および第5,804,413号、ならびに国際特許出願WO91/02788、WO96/04394、WO98/15637、およびWO99/06583に記載されている(それらのそれぞれは、全体として参照により本明細書に組み入れられている)。

#### 【0099】

##### V. 融合タンパク質を発現する細胞

さらに別の態様において、本発明は、本明細書に記載された融合タンパク質を発現する細胞を提供する。細胞は、上記で記載されているような融合タンパク質をコードするベクターをトランスフェクトされ得る。一実施形態において、細胞は原核細胞である。別の実施形態において、細胞は真核細胞である。なお別の実施形態において、細胞は哺乳動物細胞である。特定の実施形態において、細胞はヒト細胞である。別の実施形態において、細胞は、タウ媒介性障害を患っておりまたは患うリスクがある患者に由来するヒト細胞であり、そのタウ媒介性障害には、ALS、FTD、およびアルツハイマー病が挙げられるが、それらに限定されない。細胞は神経細胞または筋肉細胞であり得る。

#### 【0100】

融合タンパク質を発現する細胞は、融合タンパク質を産生することにおいて有用であり得る。この実施形態において、細胞は、融合タンパク質を過剰発現するためのベクターを

トランスフェクトされる。融合タンパク質は、任意選択で、エピトープ、例えば、（それぞれ、プロテインAカラムまたは抗FLAG抗体カラムを用いる）精製を促進する、本明細書に記載されているようなヒトFcドメインまたはFLAGエピトープを含有し得る。エピトープは、融合タンパク質の残りの部分と、リンカー、または精製中もしくは後にエピトープが融合タンパク質から除去され得るようにプロテアーゼ基質配列を介して、接続され得る。

#### 【0101】

融合タンパク質を発現する細胞はまた、治療関連において有用であり得る。一実施形態において、細胞は、治療を必要とする患者（例えば、タウ媒介性障害を患っておりまたは患うリスクがある患者）から収集される。一実施形態において、細胞は神経細胞である。その後、収集された細胞は、融合タンパク質を発現するポリヌクレオチドをコードするベクターをトランスフェクトされる。その後、トランスフェクト細胞は、トランスフェクト細胞について濃縮または選択するように処理され得る。トランスフェクト細胞はまた、細胞の異なる型、例えば、神経細胞へ分化するように処置され得る。処理後、トランスフェクト細胞は、患者へ投与され得る。一実施形態において、細胞は、くも膜下腔内注射、頭蓋内注射、または脳室内注射によるCNSへの定方向的注射（directed injection）により、投与される。

#### 【0102】

代替の実施形態において、融合タンパク質の分泌型を発現する細胞が用いられ得る。例えば、融合タンパク質構築物は、N末端に分泌シグナル配列を有するようにデザインされ得る。代表的なシグナル配列は下記の表7に示されている。

#### 【0103】

##### 【表7】

表7: 代表的なシグナル配列

配列番号	配列
77	MGVKVLFALICIAVAEA
78	MAPVQLLGLLVFLPAMRC
79	MAVLGLLFCLVTFPSCVLS

#### 【0104】

したがって、一実施形態において、本融合タンパク質は、シグナル配列および融合タンパク質を含み、前記シグナル配列が、配列番号77～79からなる群から選択され、前記融合タンパク質が配列番号83～88および95～101からなる群から選択される。別の実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号77のシグナル配列、ならびに配列番号83～88および95～101からなる群から選択される融合タンパク質を含む。別の実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号78のシグナル配列、ならびに配列番号83～88および95～101からなる群から選択される融合タンパク質を含む。別の実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号79のシグナル配列、ならびに配列番号83～88および95～101からなる群から選択される融合タンパク質を含む。シグナル配列を含む融合タンパク質構築物を発現する細胞は、対象、例えばヒト対象（例えば、タウ障害を有し、または患うリスクがある患者）へ投与され得る。本融合タンパク質は、細胞から分泌され、タウタンパク質凝集および/または関連細胞毒性を低下させるのを助ける。

#### 【0105】

上記に記載されているように、ある特定の実施形態において、本融合タンパク質はさらに、細胞透過性ペプチドを含み得る。シグナル配列および細胞透過性ペプチドを含む融合タンパク質を発現する細胞は、シグナル配列を欠く融合タンパク質を分泌する能力がある

。細胞透過性ペプチドも含む分泌性融合タンパク質は、その後、すぐ近くの細胞に進入する能力があり、それらの細胞において、タウタンパク質により媒介される凝集および/または細胞毒性を低下させる潜在能力を有する。シグナル配列および細胞透過性ペプチドの両方を含有する融合タンパク質は、シグナル配列を介して分泌され、細胞透過性ペプチド配列を介して細胞に侵入する能力がある。

【0106】

VI. 使用の方法

別の態様において、本発明は、タウ障害において、および/またはタウ凝集により媒介されるタウ障害もしくは状態において、有益な効果を実現するための方法を提供する。タウ障害は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、前頭側頭型認知症 (FTD)、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、海馬硬化症、およびレビー小体型認知症からなる群から選択される。

10

【0107】

いくつかの実施形態において、本発明は、タウ疾患、障害、または状態を有する、ヒトなどの対象を処置するための方法であって、治療的または予防的有効量の融合タンパク質、そのような融合タンパク質をコードする核酸、または本明細書に記載されたそのような融合タンパク質をコードするウイルスベクターを対象へ投与するステップを含み、前記投与が、結果として、タウ疾患、障害、または状態に関連した1つまたは複数の生化学的もしくは生理学的パラメータまたは臨床エンドポイントの向上を生じる、方法を提供する。

【0108】

他の実施形態において、本発明は、細胞におけるタウの凝集を低下させる方法を提供する。細胞は、培養細胞または単離された細胞であり得る。細胞はまた、対象、例えば、ヒト対象に由来し得る。一実施形態において、細胞は、ヒト対象の CNS 内にある。別の実施形態において、ヒト対象は、タウ障害を患っておりまたは患うリスクがあり、そのタウ障害には、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、前頭側頭型認知症 (FTD)、およびアルツハイマー病が挙げられるが、それらに限定されない。一つの特定の実施形態において、タウ障害はアルツハイマー病である。

20

【0109】

病原性タウタンパク質は、いくつかの方法で検出され得る。一例において、過剰リン酸化タウタンパク質は、例えば、リン酸化タウまたはコンフォメーション特異的タウを標的化する抗体を使用することにより、非病原性 (すなわち、機能性) タウから区別され得る。対照と比較した場合の、病原性タウタンパク質におけるより大きい低下は、より高い効力を示す。病原性タウタンパク質の低下はまた、細胞において、例えば、タウタンパク質を検出する標識試薬での免疫蛍光顕微鏡法を用いて、直接的に検出することができる (例えば、Dingら、(2015) *Oncotarget*, 6: 24178 ~ 24191; Chouら、(2015) *Hum. Mol. Genet.* 24: 5154 ~ 5173、および実施例1を参照)。ある特定の実施形態において、対照と比較した場合のタウポリペプチドレベルのより大きい低下は、より高い効力を示す。

30

【0110】

したがって、一実施形態において、方法は、未処理または対照細胞と比較して、少なくとも10%、例えば、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、病原性タウタンパク質を低下させる融合タンパク質または前記融合タンパク質をコードする核酸、ベクター、もしくはウイルス粒子の有効量と、細胞を接触させるステップを含む。

40

【0111】

下記の実施例1に示されているように、Jドメインおよびタウ結合性ドメインを含む融合タンパク質の発現が、タウレポーター構築物の全体的なレベルを低下させることが見出されている。したがって、別の実施形態において、方法は、未処理または対照細胞と比較

50

して、少なくとも10%、例えば、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、タウタンパク質のレベルを低下させるのに有効な、融合タンパク質、前記融合タンパク質を発現する細胞、または前記融合タンパク質をコードする核酸、ベクター、もしくはウイルス粒子の量と、細胞を接触させるステップを含む。

#### 【0112】

##### V I I . 薬学的組成物

本明細書で企図された組成物は、本明細書で企図されているような、ドメインおよびタウ結合性ドメインを含む1つまたは複数の融合タンパク質、そのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、それを含むベクター、遺伝子修飾された細胞などを含み得る。組成物は、薬学的組成物が挙げられるが、それに限定されない。「薬学的組成物」は、単独かまたは1つもしくは複数の他の治療モダリティと組み合わせての細胞または対象への投与のための薬学的に許容されるまたは生理学的に許容される溶液として製剤化された組成物を指す。必要に応じて、組成物は、なお他の作用物質、例えば、サイトカイン、成長因子、ホルモン、小分子、化学療法剤、プロドラッグ、薬物、抗体、または他の様々な薬学的活性物質も組み合わせて、投与され得ることも理解されるであろう。追加の作用物質が、意図された治療を送達する本組成物の能力に悪影響を及ぼさないならば、本組成物にまた含まれ得る他のコンポーネントに、事実上、制限はない。

#### 【0113】

句「薬学的に許容される」は、合理的な利益/リスク比に釣り合っており、過剰な毒性、刺激作用、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、ヒトおよび動物の組織と接触して用いるのに、健全な医学的判断の範囲内において、適している、化合物、材料、組成物、および/または剤形を指すように、本明細書で用いられる。

#### 【0114】

本明細書で用いられる場合、「薬学的に許容される担体」、「希釈剤」、または「賦形剤」には、ヒトまたは家畜における使用について容認できるとして、米国食品医薬品局によって認可されている、非限定的に、任意のアジュバント、担体、賦形剤、流動促進剤、甘味剤、希釈剤、保存剤、色素/着色剤、香味料、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、安定剤、等張剤、溶剤、界面活性剤、または乳化剤が挙げられる。例示的な薬学的に許容される担体には、ラクトース、グルコース、およびスクロースなどの糖；コーン(corn)スターチおよびジャガイモデンプンなどのデンプン；セルロース、ならびにカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロースなどのその誘導体；トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；カカオバター、ワックス、動物および植物脂肪、パラフィン、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、酸化亜鉛；ピーナッツ油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、コーン(corn)油、およびダイズ油などの油；プロピレングリコールなどのグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；寒天；水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；パイロジェンフリーの水；等張食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；リン酸緩衝溶液；ならびに薬学的製剤中に用いられる任意の他の適合性物質が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0115】

##### V I I I . 投薬量

本明細書に記載された組成物(例えば、融合タンパク質構築物、核酸、または遺伝子治療ウイルス粒子を含む組成物)の投薬量は、本化合物の薬学的性質；投与の様式；レシピエントの年齢、健康、および体重；症状の性質および程度；処置の頻度、およびもしあれば、同時処置の型；ならびに処置されることになっている対象における本化合物のクリアランス速度などの多くの因子に依存して変動し得る。本明細書に記載された組成物は、臨床応答に依存して、必要に応じて調整され得る、適切な投薬量で、最初、投与され得る

。いくつかの態様において、組成物の投薬量は、予防的または治療的有効量である。

【0116】

IX. キット

(a) 本明細書に記載された、細胞または対象においてタウタンパク質の凝集を低下させる、融合タンパク質構築物、そのような融合タンパク質をコードする核酸、またはそのような核酸を包含するウイルス粒子を含む薬学的組成物、および(b) 本明細書に記載された方法のいずれかを実施するための使用説明書を含む添付文書を含むキットが企図される。いくつかの態様において、キットは、(a) 本明細書に記載された細胞または対象においてタウタンパク質の凝集を低下させる、本明細書に記載された組成物を含む薬学的組成物、(b) 追加の治療剤、および(c) 本明細書に記載された方法のいずれかを実施するための使用説明書を含む添付文書を含む。

10

【実施例】

【0117】

Jドメインが、凝集タンパク質の適切なフォールディングを促進するように特定の操作され得るかどうかを試験するために、本発明者らは、タウタンパク質を標的化するようにデザインされたいくつかの融合タンパク質構築物をデザインし、試験した。

【0118】

実施例1

融合タンパク質デザイン

A. 方法

一般的な技術および材料

本発明の実施は、他に指示がない限り、当業者に公知である、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクス、および組換えDNAの通常の技術を用いる。Sambrook, J.ら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2001; 「Current protocols in molecular biology」、F. M. Ausubelら編、1987; シリーズ「Methods in Enzymology」、Academic Press、San Diego, Calif.; 「PCR 2: a practical approach」、M. J. MacPherson、B. D. Hames、およびG. R. Taylor編、Oxford University Press、1995; 「Antibodies, a laboratory manual」Harlow, E. およびLane, D. 編、Cold Spring Harbor Laboratory、1988; 「Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics」、第11版、McGraw-Hill、2005; ならびにFreshney, R. I.、「Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique」、第4版、John Wiley & Sons、Somerset, NJ、2000(それらの内容は、全体として参照により本明細書に組み入れられている)参照。HEK-293細胞(ヒト胚性腎臓細胞)は、American Type Culture Collection(Manassas, VA)から購入された。抗FLAG抗体は、Thermo Fisher Scientificから購入された。精製、検出および/または特徴づけを容易にするために、この実施例1に用いられる融合タンパク質構築物のいくつかは、配列番号83~101に提供された配列に加えて、配列番号67のFLAGエピトープを、そのタンパク質のC末端かまたはN末端のいずれかに、短いリンカー配列に加えて、含有する。

20

30

40

【0119】

HEK293細胞におけるタンパク質の発現および検出

様々なタンパク質構築物をコードする発現ベクタープラスミドを、HEK293細胞へ、Lipofectamine 3000トランスフェクション試薬(Thermo F

50

isher Scientific)を用いて、トランスフェクトした。細胞可溶化物を、発現したタンパク質について、イムノブロットアッセイを用いて分析した。培地の試料を、分析前に、遠心分離して、デブリを除去した。細胞を、2 mM PMSFおよびプロテアーゼカクテル(完全プロテアーゼ阻害剤カクテル; Sigma)を含有する溶解バッファー(10 mM Tris-HCl、pH 8.0、150 mM NaCl、10 mM EDTA、2% SDS)中に溶解した。短時間の超音波処理後、試料を、発現したタンパク質について、イムノブロットアッセイを用いて分析した。イムノブロット分析について、試料を、SDS試料バッファー中で煮沸し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動に流した。その後、分離されたタンパク質バンドを、PVDF膜へ転写した。

#### 【0120】

10

発現したタンパク質を、化学発光シグナルを用いて検出した。簡単に述べれば、プロットを、特定のエピトープ(例えば、抗タウ抗体)を結合する能力がある一次抗体とインキュベートした。結合していない一次抗体を洗い流した後、酵素連結型二次抗体(例えば、HRP連結型抗IgG抗体)を、プロットと結合した一次抗体分子と結合させた。すすいだ後、化学発光試薬を加え、プロットにおいて結果として生じた化学発光シグナルを、X線フィルム上に捕獲した。以下の抗体:

- ・抗タウ抗体(Millipore Sigma, Burlington, MA)、
  - ・抗V5抗体(Thermo Fisher Scientific)、
  - ・抗Flag抗体(Thermo Fisher Scientific)、
  - ・抗pTau(Ser396)抗体(BioLegend, San Diego, CA)、
  - ・抗pTau(Thr231)(BioLegend, San Diego, CA)
- を用いた。

20

#### 【0121】

##### レポーター構築物

本発明者らはまず、タウを標的化する融合タンパク質が、培養細胞においてその凝集を改善するかどうかを調べた。この目的を達成するために、本発明者らは、そのN末端でV5エピトープと融合している、野生型タウ(ON4R)、ならびに過剰リン酸化および凝集を引き起こすことが公知の変異型(P243S置換を含有する)を発現する2つの構築物を作製した(下記の表8参照)。HEK293細胞を、培養し、野生型(配列番号80)または変異(配列番号81)タウをコードするプラスミドを、トランスフェクトした。

30

#### 【0122】

40

50

## 【表 8】

表8: タウレポーター構築物

構築物名	配列番号	長さ	配列
V5- タウ(0N4R)	80	404	MGKPIP N P L L G L D S T G T G S E F M A E P R Q E F E V M E D H A G T Y G L G D R K D Q G G Y T M H Q D Q E G D T D A G L K A E E A G I G D T P S L E D E A A G H V T Q A R M V S K S K D G T G S D D K K A K G A D G K T K I A T P R G A A P P G Q K G Q A N A T R I P A K T P P A P K T P P S S G E P P K S G D R S G Y S S P G S P G T P G S R S R T P S L P T P P T R E P K K V A V V R T P P K S P S S A K S R L Q T A P V P M P D L K N V K S K I G S T E N L K H Q P G G G K V Q I I N K K L D L S N V Q S K C G S K D N I K H V P G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V Q S K I G S L D N I T H V P G G G N K K I E T H K L T F R E N A K A K T D H G A E I V Y K S P V V S G D T S P R H L S N V S S T G S I D M V D S P Q L A T L A D E V S A S L A K Q G L
V5- タウ(0N4R: P243S)	81	404	MGKPIP N P L L G L D S T G T G S E F M A E P R Q E F E V M E D H A G T Y G L G D R K D Q G G Y T M H Q D Q E G D T D A G L K A E E A G I G D T P S L E D E A A G H V T Q A R M V S K S K D G T G S D D K K A K G A D G K T K I A T P R G A A P P G Q K G Q A N A T R I P A K T P P A P K T P P S S G E P P K S G D R S G Y S S P G S P G T P G S R S R T P S L P T P P T R E P K K V A V V R T P P K S P S S A K S R L Q T A P V P M P D L K N V K S K I G S T E N L K H Q P G G G K V Q I I N K K L D L S N V Q S K C G S K D N I K H V S G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V Q S K I G S L D N I T H V P G G G N K K I E T H K L T F R E N A K A K T D H G A E I V Y K S P V V S G D T S P R H L S N V S S T G S I D M V D S P Q L A T L A D E V S A S L A K Q G L
Tau3R	82	241	M I A T P R G A A P P G Q K G Q A N A T R I P A K T P P A P K T P P S S G E P P K S G D R S G Y S S P G S P G T P G S R S R T P S L P T P P T R E P K K V A V V R T P P K S P S S A K S R L Q T A P V P M P D L K N V K S K I G S T E N L K H Q P G G G K V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V Q S K I G S L D N I T H V P G G G N K K I E T H K L T F R E N A K A K T D H G A E I V Y K S P V V S G D T S P R H L S N V S S T G S I D M V D

10

20

30

## 【0123】

## 融合タンパク質構築物

表6に提供され、下記の表9に要約された、ヒトDnaJB1（配列番号5）由来のJドメインを含むいくつかの融合タンパク質構築物をデザインした。これらの実験におけるトランスフェクトされる構築物は、検出を容易にするように、それらのC末端にFlagエピトープ融合物を含有した。これらの融合タンパク質構築物に対する対照は、高度に保存されたHPDモチーフ内にP33Q変異を有するJドメインを含有する構築物を含む。加えて、任意のタウ結合性ドメインなしでヒトDnaJB1 Jドメイン（配列番号5）のみを含む構築物（構築物13）（Flagエピトープも含む）、ポリグルタミン結合ペプチドQBP1とそのいずれかの側で融合したDnaJB1 Jドメインを含有する融合タンパク質構築物（構築物11）ならびにJドメイン内にP33Q変異を有するその対応する対照（構築物12）を含むさらなる対照構築物をデザインした。

40

## 【0124】

50

## 【表 9 - 1】

表9. 融合タンパク質構築物および対照

構築物番号	構築物名	配列番号	注記
1	JB1-TBP	83	その C 末端で TBP(配列番号 49)に融合したヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
2	TBP1-JB1-TBP1	84	いずれかの側で 2 つの TBP(配列番号 49)ペプチド間に挟まれたヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
3	JB1-2xTBP	85	その C 末端でタンデム TBP(配列番号 49)ペプチドに融合したヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
4	JB1-scFv(タウ)	86	その C 末端で scFv(タウ)(配列番号 50)に融合したヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
5	JB1-scFv(MW7)	87	その C 末端で scFv(MW7)(配列番号 51)に融合したヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
6	JB1-Happ1	88	その C 末端で Happ1(配列番号 52)に融合したヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
7	JB1(P33Q)-TBP	89	その C 末端で TBP(配列番号 49)に融合した P33Q 変異を含有するヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
8	JB1(P33Q)-scFv(タウ)	90	その C 末端で scFv(タウ)(配列番号 50)に融合した P33Q 変異を含有するヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
9	JB1(P33Q)-scFv(MW7)	91	その C 末端で scFv(MW7)(配列番号 51)に融合した P33Q 変異を含有するヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
10	JB1(P33Q)-Happ1	92	その C 末端で Happ1(配列番号 52)に融合した P33Q 変異を含有するヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
11	QBP1-JB1-QBP1	93	その C 末端で QBP1、ポリグルタミン結合ペプチドに融合したヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
12	QBP1-JB1(P33Q)-QBP1	94	その C 末端で QBP1、ポリグルタミン結合ペプチドに融合した P33Q 変異を含有するヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
13	JB1 のみ	5	タウ結合性ドメインなしで JB1 を含む対照構築物
14	JB1-TBP2	95	その C 末端で TBP2(配列番号 53)に融合したヒト DnaJB1 由来の J ドメイン
15	JB1-TBP3	96	その C 末端で TBP3(配列番号 54)に融合したヒト DnaJB1 由来の J ドメイン

10

20

30

40

## 【 0 1 2 5 】

50

【表 9 - 2】

16	JB1-TBP(リンカーなし)	97	DnaJB1 と TBP との間にリンカー配列を欠くが、構築物 1 に類似する
17	JB1-TBP2(リンカーなし)	98	DnaJB1 と TBP2 との間にリンカー配列を欠くが、構築物 14 に類似する
18	JB1-TBP3(リンカーなし)	99	DnaJB1 と TBP との間にリンカー配列を欠くが、構築物 15 に類似する
19	JB1-scFv(タウ) (リンカーなし)	100	DnaJB1 と TBP との間にリンカー配列を欠くが、構築物 4 に類似する
20	JB1-Happ1 (リンカーなし)	101	DnaJB1 と TBP との間にリンカー配列を欠くが、構築物 6 に類似する

10

## 【0126】

これらの構築物のいくつかを、野生型または変異タウを発現する構築物と一緒に、HEK293細胞に同時トランスフェクトした。構築物1、構築物4、構築物5および構築物6の発現を、イムノプロット分析により検出した(データ未呈示)。

## 【0127】

Jドメインがタウ凝集を低下させるために用いることができるかどうかを決定するために、最初の実験を、野生型または変異タウと、タウ結合ペプチドTBP(構築物1)、ScFv(タウ)(構築物4)、ScFv(MW7)(構築物5)およびHapp1(構築物6)とコンジュゲートされた、Hsp40 Jドメインタンパク質(ヒトDnaJB1由来)に由来したJドメイン配列を含む融合タンパク質との同時発現により行った。図3に示されているように、HEK293細胞における野生型(図3、上方パネル、レーン2~6)または変異(P243S)タウ(レーン7~11)のいずれかの発現は、抗V5抗体によって検出されるように、タウの出現をもたらす。本発明者らは、融合タンパク質構築物のうちの1つの同時発現がリン酸化タウのレベルを変更する効果を有するかどうかをさらに試験した。したがって、Tau2N4RにおけるThr231またはSer396での過剰リン酸化がタウオパチーに関連するので(Bramblettら、(1993)Neuron 10:1089~99; Alonsoら、(2004)J Biol Chem 279:34873~81; Linら、(2007)J Neurochem 103:802~13; Alonsoら、(2010)J Biol Chem 285:30851-30860)、本発明者らは、これらの部位でリン酸化されたタウの量を調べた。Ser396(2N4R)でリン酸化されたタウを認識する抗体で探索した場合(図3、下方パネル)、野生型またはP243Sタウ単独の発現(それぞれ、レーン2および7)は、およそ63kDaのpTau(Ser396)を検出する。対照的に、検出可能なpTau(Ser396)のレベルは、構築物1、4、5、および6を同時発現する細胞の抽出物において劇的に低下した(それぞれ、野生型タウを発現する細胞について、レーン3、4、および5、ならびにP243Sタウを発現する細胞について、レーン9、10、および11)。

20

30

40

## 【0128】

図4の上方パネルは、野生型(0N4R)または変異タウのいずれかを発現する細胞において、構築物4の同時発現が、pTau(2N4RにおけるThr231)およびpTau(2N4RにおけるSer396)の劇的な低下をもたらすことを示す。下方パネルは、抗Flag抗体を用いる構築物4の検出を示す。

## 【0129】

最後に、本発明者らは、pTau(Ser396)の低下におけるJB1-ScFv(タウ)の特異性を試験した。したがって、本発明者らは、図5に示されているように、検

50

出可能な p T a u ( S e r 3 9 6 ) の量を低下させるそれらの能力におけるいくつかの構築物の能力を試験した。

・構築物 8、これは、Jドメイン内の高度に保存された H P D モチーフ内の P 3 3 Q 変異を除いて、構築物 4 と同一である ( レーン 5 および 9 )

・ S c F v ( タウ ) のみの対照 ( Jドメイン配列なしの構築物 4 ; レーン 3 および 7 )

#### 【 0 1 3 0 】

図 5 に示されているように、野生型タウ ( レーン 2 ~ 5 ) または変異 ( P 2 4 3 S ) タウ ( レーン 6 ~ 9 ) の発現は、検出可能なタウ ( 上方パネル ) および p T a u ( S e r 3 9 6 ) ( 中央パネル ) の出現をもたらす。p T a u ( S e r 3 9 6 ) のレベルは、構築物 4 ( レーン 4 および 8 ) を同時発現する細胞において劇的に低下するが、構築物 8 ( レーン 5 および 9 ) または S c F v ( タウ ) のみ ( レーン 3 および 7 ) を発現する細胞においてはそうではない。したがって、本発明者らは、p T a u ( S e r 3 9 6 ) の低下が、機能性 Jドメイン活性を必要とする構築物 4 などの融合タンパク質によって媒介されると結論する。

10

#### 【 0 1 3 1 】

図 6 に示されているように、野生型タウ ( レーン 2 ~ 6 ) または変異 ( P 2 4 3 S ) タウ ( レーン 7 ~ 1 1 ) の発現は、検出可能なタウ ( 上方パネル ) および p T a u ( S e r 3 9 6 ) ( 下方パネル ) の出現をもたらす。p T a u ( S e r 3 9 6 ) のレベルは、構築物 6 ( レーン 3 および 8 )、構築物 1 ( レーン 4 および 9 )、および構築物 1 4 ( レーン 5 および 1 0 ) を同時発現する細胞において劇的に低下し、T B P 2 ( 配列番号 5 3 ) などの結合配列が融合構築物において有用であることを示唆する。

20

#### 【 0 1 3 2 】

本発明者らは、融合タンパク質構築物のうちの 1 つの同時発現がタウの切断型 ( T a u 3 R、配列番号 8 0 ) のレベルを変更する効果を有するかどうかをさらに試験した。タウ結合ペプチド T B P を含む Jドメイン融合タンパク質 ( 構築物 1 ) は、H E K 2 9 3 細胞において、全長タウまたはタウの切断型 ( T a u 3 R ) で発現した。タウを認識する抗体で探索した場合、全長タウは約 6 0 k D a で検出されたが、T a u 3 R は約 3 0 k D a で検出された ( 図 7 )。構築物 1 は、効果を無効にする Jドメイン ( 構築物 7 ) の変異により、T a u 3 R のタンパク質レベルを有意に低下させた。

#### 【 0 1 3 3 】

図 8 は、U 8 7 - M G 神経膠腫細胞における構築物 1 の発現の効果を示す。U 8 7 - M G 神経膠腫細胞に、構築物 1 または構築物 7 ありまたはなしで、全長タウを発現するレンチウイルスを感染させた。培養培地を、2 日目に新鮮な培地と置き換えた。培養培地を、感染 7 日後に、U 8 7 - M G 細胞から収集した。培養培地における乳酸デヒドロゲナーゼ ( L D H ) 活性を、L D H - C y t o x ( 商標 ) アッセイキット ( B i o L e g e n d ) により測定した。値は平均 ± S D を表す。これらの結果は、Jドメイン融合タンパク質が、タンパク質のミスフォールディングおよび / または凝集だけでなく、タンパク質のミスフォールディングおよび / または凝集に関連する細胞毒性も低下させる能力があることを実証する。

30

#### 【 0 1 3 4 】

##### 実施例 2

融合タンパク質構築物をコードする A A V ベクター

例示的な遺伝子治療ベクターは、サイトメガロウイルス ( C M V ) 初期エンハンサーエレメントおよびニワトリベータ - アクチンプロモーターを含有する C A G プロモーターの制御下での、表 6 の融合タンパク質構築物、具体的には構築物 1、4、5、および 6、加えて対照構築物 1 3 ( D n a J B 1 Jドメインのみ)、G F P ( 陰性対照 ) をコードするコドン最適化 c D N A を有する A A V r h 1 0 ベクターにより構築される。J B 1 - T B P をコードする c D N A は、コザック配列の下流、およびウシ成長ホルモンポリアダニル化 ( B G H p A ) シグナルの上流に配置される。カセット全体は、A A V - 2 の 2 つの非コード末端逆位配列によって隣接されている。

40

50

## 【0135】

組換えAAVベクターは、上記のものと類似したバキュロウイルス発現系を用いて調製される(Urabeら、2002;Unzuら、2011(Kotin、2011に概説されている))。簡単に述べれば、複製およびパッケージングのためのREPをコードする1つ、AAVrh10のカプシドについてのCAP-5をコードする1つ、および発現カセットを有する1つである、3つの組換えバキュロウイルスが、SF9昆虫細胞に感染するために用いられる。精製は、AVB Sepharose高速アフィニティ媒体(GE Healthcare Life Sciences、Piscataway、NJ)を用いて実施される。ベクターは、導入遺伝子についてのプライマー-プローブの組合せでのQPCRを用いて滴定され、力価は、1mlあたりのゲノムコピー数(GC/ml)として表される。ベクターの力価は、およそ $8 \times 10^{13} \sim 2 \times 10^{14}$  GC/mlの間である。

## 【0136】

## 実施例3

## マウスモデルにおける効力の試験

多数のアルツハイマー病の動物モデルが存在する(例えば、Kitazawaら(2012)Curr. Pharm. Des., 18:1131~1147参照)。この実施例において、タウオパチーのヒトタウ(htau)マウスモデルを用いる(Duffら、(2000)Neurobiol Dis., 7:87~98)。8cマウスとして公知のhtauマウスは、ヒトPAC、H1ハプロタイプに由来するヒトタウを発現するが、マウススタウは、エクソン1の標的化破壊によりノックアウトされている(Duffら、前記)。マウスをC57BL/6バックグラウンドで繁殖させる。

## 【0137】

以前の研究は、2.5~6.5か月齢のマウスを処置して実施されている。融合タンパク質および対応する対照をコードするベクターを含有する異なるAAVウイルス粒子が、トランスジェニック動物に投与される。一実施形態において、ウイルス粒子は、尾静脈注射により投与される。別の実施形態において、ウイルス粒子は、筋肉内注射により投与される。なお別の実施形態において、粒子は、例えば、Stanekら、(2014)Hum. Gene Ther., 25:461~474に記載されているような、頭蓋内注射により投与される。およそ36頭のマウスを、雄および雌マウスが混合した3つの群に分け、これに、構築物4、ベクター対照、Jドメインの保存されたHPDモチーフ内にP33Q変異を有する構築物8をコードするcDNAを有するAAVrh10を投与する。

## 【0138】

投与後、疾患の進行を、モニターし、対照を注射されたマウスと比較する。この研究の一次エンドポイントは、ベクター対照処置マウスと比較して、構築物処置マウスの脳における不溶性タウ凝集物の統計学的に有意な低下である。二次エンドポイントは、不溶性タウ凝集物の用量依存的な低下、リン酸化タウの低下、および可溶性タウの低下である。

## 【0139】

## 他の態様

この明細書で言及された全ての刊行物、特許、および特許出願は、あたかも各個々の刊行物、特許、または特許出願が具体的かつ個々に示されて、全体として参照により組み入れられているかのように同じ程度で、全体として参照により本明細書に組み入れられている。本出願における用語が、参照により本明細書に組み入れられた文書においてと異なって定義されていることが見出された場合、本明細書に提供された定義がその用語についての定義としての役割を果たすものとする。

## 【0140】

本発明は、その特定の態様に関連して記載されているが、本発明はさらに改変することができ、一般的に本発明の原理に従い、かつ当技術分野内での公知または慣習的な実施範囲内に入り、上記で示された本質的な特徴に適用することができよう。本開示からの逸脱を含む、本発明の任意のパリエーション、使用、または適応を網羅することを、この出

願は意図され、主張された範囲内に従うことは理解されるであろう。

【 図面 】

【 図 1 A 】

CLUSTAL O(1.2.4) 複数配列のアラインメント

```

DnAJC20 ---DYFSLMDCNRS-FRVDTAKLQHRVYQQLQRLVHPDFFSQRS-----QTEKDFSEKHST 51
DnAJC15 ---EAGLILGVSV---PSAGKAKIRTAHRRVMIIMHPKGGSP-----YVAA 40
DnAJC19 ---EAALILGVSV---PTANKGKIRDAHRRIMLIMHPKGGSP-----YIAA 40
DnAJC13 ---DAYEVLNLPQGGPHDESKIRKAYFRLAQYHPCNPEGR-----DMFE 44
DnAJC22 ---DHYAVLGLGHVRYKATQRKIAAHKAMVLKHPKCKRKAAG-----EPIKEGDNDYFT 52
DnAJC29 ---LAYQVLGLS---EGATNEIHRSYQELVKVWHPCHLNDQT-----EQAQRHFL 45
DnAJC9 ---DLYRVLGVR---REASDGEVRRGYHKVSLQVHPDRVGEV-----DKEDATRRFQ 46
DnAJC25 ---DCYEVLVGS---RSAGKAEIARAYRQLARRVHPDRYRPPQGGEGPRTPOSABEAF 54
DnAJC10 ---DFYSLGVSV---KTASSREIRQAQFKLALKIHPCNPNP-----NAHGDFL 44
DnAJC1 ---NFYQFLGVQ---QDASSADIRKAYRKLKSLTIHPCKNKDE-----NAETQFR 43
DnAJC11 ---DYYSILNVR---REASSEELKAYRKLKSLTIHPCKNRDPE-----LKSQAERLFN 47
DnAJC3 ---DYYKILGVK---RNAKQEIIRKAYRKLALQVHPNPNNE-----EKKKAEKFI 47
DnAJC7 ---DYYKILGVQ---RNAKQEIIRKAYRKLALQVHPNPNNE-----EKKKAEKFI 49
DnAJB13 ---DYYKILGVQ---RNAKQEIIRKAYRKLALQVHPNPNNE-----EKKKAEKFI 43
DnAJB3 ---DYYKILGVQ---RNAKQEIIRKAYRKLALQVHPNPNNE-----EKKKAEKFI 44
DnAJB11 ---DYYKILGVQ---RNAKQEIIRKAYRKLALQVHPNPNNE-----EKKKAEKFI 44
DnAJC16 ---DYYKILGVQ---RNAKQEIIRKAYRKLALQVHPNPNNE-----EKKKAEKFI 43
DnAJB9 ---SYDYLGVQ---KASASERQIKKAFHKLAMKHPCKNKSP-----DAEAKFR 43
DnAJB1 ---GKDYIQTGLA---RGASDEIRKAYRKLALQVHPCKNKEP-----GAEKFK 45
DnAJB4 ---GKDYIQTGLA---RGASDEIRKAYRKLALQVHPCKNKEP-----GAEKFK 45
DnAJB5 ---DYYKILGVQ---SGANDEIRKAYRKLALQVHPCKNKEP-----GAEKFK 43
DnAJB7 ---ASYEILGVQ---RSASADDIKKAYRKLALQVHPCKNPNK-----EFAEKFK 46
DnAJB8 ---NYEVLGVQ---ASASPEDIKKAYRKLALQVHPCKNPNK-----EFAEKFK 45
DnAJB7 ---DYYEVLGVQ---RYASPEDIKKAYRKLALQVHPCKNPNK-----EFAEKFK 45
DnAJB3 ---MVDYEVLDVQ---RQASSEAIKAYRKLALQVHPCKNPNK-----EFAEKFK 47
DnAJB6 ---VDYEVLDVQ---RHASPEDIKKAYRKLALQVHPCKNPNK-----EFAEKFK 46
DnAJC6 ---TKWPFVGMV---DLVTPQVQVYRKAVALVHPCKATGQP-----YEQYAKMIF 47
DnAJC26 ---SRWTFVGMV---DLVAPQVQVYRKAVALVHPCKATGQP-----YEQYAKMIF 47
DnAJC28 ---EYRRLNVE---EGCSADEVRESFHKLAKYHPCKSGSNTA-----DSATFI 43
DnAJC29 ILKEVTSVVEQA---WKLPESEKRIIRRLYLKWHHPCKNPNH-----DIANEVFK 48
DnAJC24 ---DMSYILGAD---PSANISDLQYQKRLILMYHPCKQSTDV---PAGTVEECVQKFI 50
DnAJC12 ---DYYTILGCD---ELSSVEQILAEFKVRALECHHPCKHPENP-----KAVETQ 44
DnAJC4 ---TYEELGVH---PGASTEVRKAFKSKKELHPDRDPGNP-----SLASRFV 44
DnAJC8 ---NPFVILQID---PEVTDEIRKAYRKLALQVHPCKNODDA-----DRAQKAF 45
DnAJC30 ---ALYDLGVQ---STATQAQIKKAYRQCFQLYHPCKNSGSA-----EAEART 44
DnAJC23 ---NPFVILQID---PGATVAEIKKAYRKLALQVHPCKNODDA-----MFM 40
DnAJC27 ---DSWMLGVK---PGASRDEWNAKAYRKLALQVHPCKCVAPG-----SEDAFK 43
DnAJC14 ---NPFVILQID---ATASDVELKAYRKLALQVHPCKNHHFR-----ABEAFK 43
DnAJC17 ---DLYALGIE---EKAADKVKKAYRKLALQVHPCKNPNP-----RAELFH 44
DnAJC5 ---GESLYHVLGLD---KNATSDDIKAYRKLALQVHPCKNPNP-----EAADFK 46
DnAJC5B ---ALYELGLH---KGSANBEIKKAYRKLALQVHPCKNPNP-----EAADFK 44
DnAJC21 ---CHYEALGVR---RDASSEELKAYRKLALQVHPCKNLDNA-----AEADEFK 45
DnAJC18 ---NYEILGVQ---RDASSEELKAYRKLALQVHPCKNLDNA-----AEADEFK 43
DnAJB14 ---YEILGVQ---RGASDEDLKAYRKLALQVHPCKNHPAG-----ATDAFK 41
DnAJB12 ---NYEVLGVQ---RDAGDEDLKAYRKLALQVHPCKNHPAG-----ATDAFK 43
DnAJA2 ---KLYDLGVQ---PGASNEELKAYRKLALQVHPCKNPNP-----GDKFK 41
DnAJA1 ---TYDVLGVK---PNATQELKAYRKLALQVHPCKNPNP-----GEKFK 41
DnAJA4 ---ETQYDILGVK---PSASPEEIKKAYRKLALQVHPCKNPNP-----GEKFK 43

```

【 図 1 B 】

```

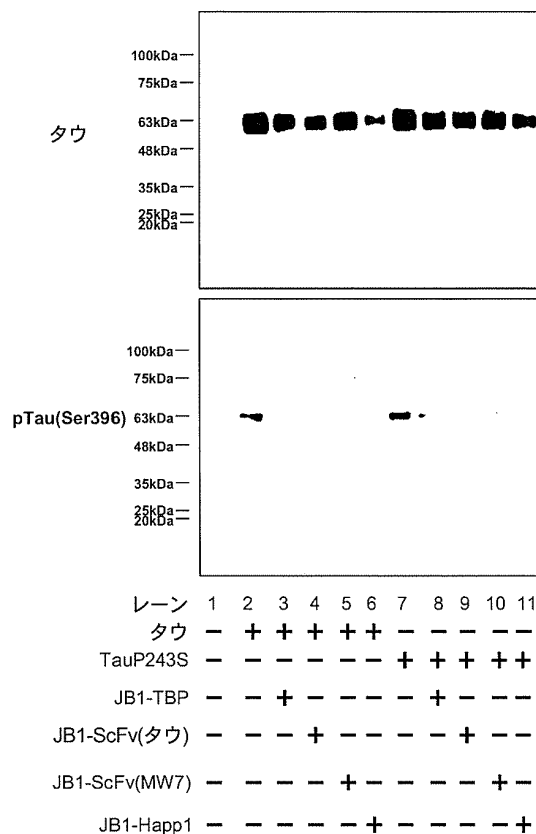
DnAJC20 LVNDAYKTLTLLAPL-----SRGLYLLK----- 72
DnAJC15 KINEAKDLLETT-----KH----- 55
DnAJC19 KINEAKDLLEGGQA-----KK----- 55
DnAJC13 KVNKAYEFLCTKS-----AKIVDGPDP----- 66
DnAJC2 CITKAYEMLSDPV-----KRAFNSVD----- 74
DnAJC22 EIQAAYEVLSPQR-----KPGSRR----- 65
DnAJC9 ILGVKVVSLSDRE-----QRVAVDEQG----- 68
DnAJC25 LVATAYETLKDEE-----TRKDYDYL----- 76
DnAJC10 KINRAYEVLKDED-----LRKKYDKYG----- 66
DnAJC1 QLVAIYEVLDKDE-----RRQRYDIL----- 65
DnAJC11 LVHQAYEVLSDPQ-----TRAIFYDIY----- 69
DnAJC3 DIAAAKEVLSDEP-----MRKKFDDE----- 69
DnAJC7 EVGEAFTILSDPK-----KKTYSDSG----- 71
DnAJB13 QIAEAYVLSDDPM-----KRGTYDKFG----- 65
DnAJB3 QLAEAYVLSDEV-----KRRQYDYG----- 66
DnAJB11 DLGAAEYVLSDE-----KRRQYDYG----- 66
DnAJC16 QISKAYEILSNEE-----KRSNYDTQG----- 65
DnAJB9 EIAEAYETLSDAN-----RRKEYDTLG----- 65
DnAJB1 EIAEAYDVLSDPR-----KREIFDRYGBE----- 69
DnAJB4 EVAEAYEVLSDPK-----KREIFDRYGBE----- 69
DnAJB5 EIAEAYDVLSDPK-----KREIFDRYGBE----- 65
DnAJB2 EVAEAYEVLSDKH-----KREIFDRYGBE----- 70
DnAJB8 LVSEAYEVLSDSK-----KRSYDRAG----- 67
DnAJB7 EVAEAYEVLSDNE-----KRDYDYG----- 67
DnAJB3 QVAEAYEVLSDAK-----KRDYDYG----- 69
DnAJB6 QVAEAYEVLSDAK-----KRDYDYG----- 68
DnAJC6 ELNDWSEFENQG-----KRPY----- 65
DnAJC26 ELNDWSEFENQG-----KRPY----- 65
DnAJC28 RIEKAYRVLSHVIEQTNASQS----- 65
DnAJC29 HLQNEINRLEKQAFIDQADRASRRFTTSASRPSQSKYS 88
DnAJC24 ELDQAWKILGNEE-----TKREYDLQR----- 72
DnAJC12 KIQKAKEILNNEE-----SRARYDHR----- 66
DnAJC4 ELSEAYVLSRQ-----SRRSYDQL----- 66
DnAJC8 AVDKAKILLDQE-----QKKRALDVIQ----- 68
DnAJC30 RISQAYVLSGAT-----LRRKYDRGL----- 66
DnAJC23 RIAKAYALDDE-----SRKNWEEFG----- 62
DnAJC27 AVVNARTALKNI-----K----- 57
DnAJC14 VLRAMWDVSNAB-----KREYEMKR----- 65
DnAJC17 QLSQALEVLDAA-----ARAAYDKVR----- 66
DnAJC5 BINNAHALTDAT-----KRNIDYKYSGL----- 70
DnAJC5B BINNAHALTDIS-----KRSYDYG----- 66
DnAJC21 LIQAAYVLSDPQ-----ERAWYDHR----- 67
DnAJC18 AIGNAFVLSNPD-----KRLRYDEYV----- 65
DnAJB12 AIGTAYAVLSNPE-----KRRQYDYG----- 65
DnAJB14 KIGNAYAVLSNPE-----KRRQYDYG----- 65
DnAJA2 EISFAYEVLSDNE-----KRELYDRY----- 63
DnAJA1 QISQAYEVLSDAK-----KRELYDRY----- 63
DnAJA4 LISQAYEVLSDPK-----KRDYDYG----- 67

```

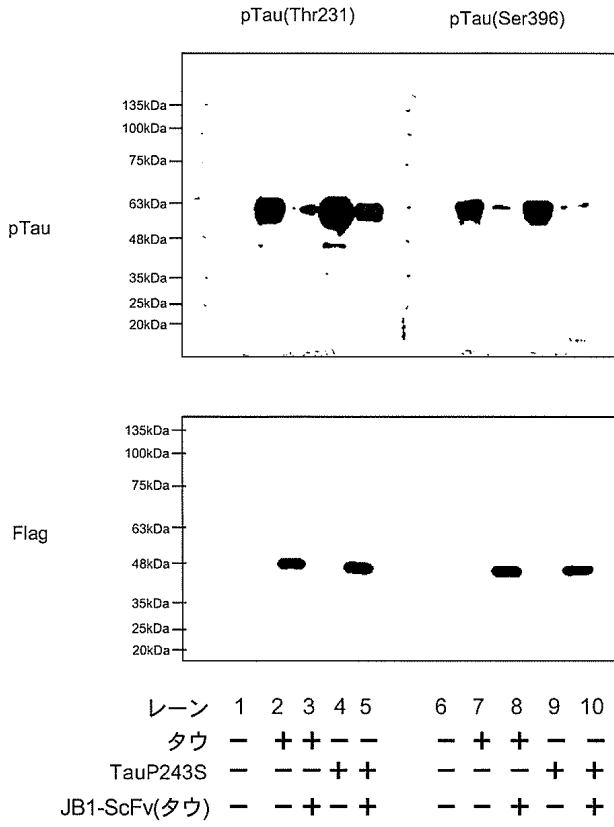
【 図 2 】

構築物番号	構築物名	配列番号	Jドメイン	タウ結合性ドメイン	図
1	JB1-TBP1	83	DnAJB1	TBP1	
2	TBP1-JB1-TBP1	84	DnAJB1	TBP1	
3	JB1-2xTBP1	85	DnAJB1	TBP1	
4	JB1-scFv(タウ)	86	DnAJB1	scFv(タウ)	
5	JB1-scFv(MW7)	87	DnAJB1	scFv(MW7)	
6	JB1-Happ1	88	DnAJB1	Happ1	
7	JB1(P33Q)-TBP1	89	DnAJB1*	TBP1	
8	JB1(P33Q)-scFv(タウ)	90	DnAJB1*	scFv(タウ)	
9	JB1(P33Q)-scFv(MW7)	91	DnAJB1*	scFv(MW7)	
10	JB1(P33Q)-Happ1	92	DnAJB1*	Happ1	
11	JB1-QBP1	93	DnAJB1	QBP1*	
12	JB1(P33Q)-QBP1	94	DnAJB1*	QBP1*	
13	JB1のみ	5	DnAJB1	なし	
14	JB1-TBP2	95	DnAJB1	TBP2	
15	JB1-TBP3	96	DnAJB1	TBP3	
16	JB1-TBP1(リカーナシ)	97	DnAJB1	TBP1	
17	JB1-TBP2(リカーナシ)	98	DnAJB1	TBP2	
18	JB1-TBP3(リカーナシ)	99	DnAJB1	TBP3	
19	JB1-scFv(タウ)(リカーナシ)	100	DnAJB1	scFv(タウ)	
20	JB1-Happ1(リカーナシ)	101	DnAJB1	Happ1	

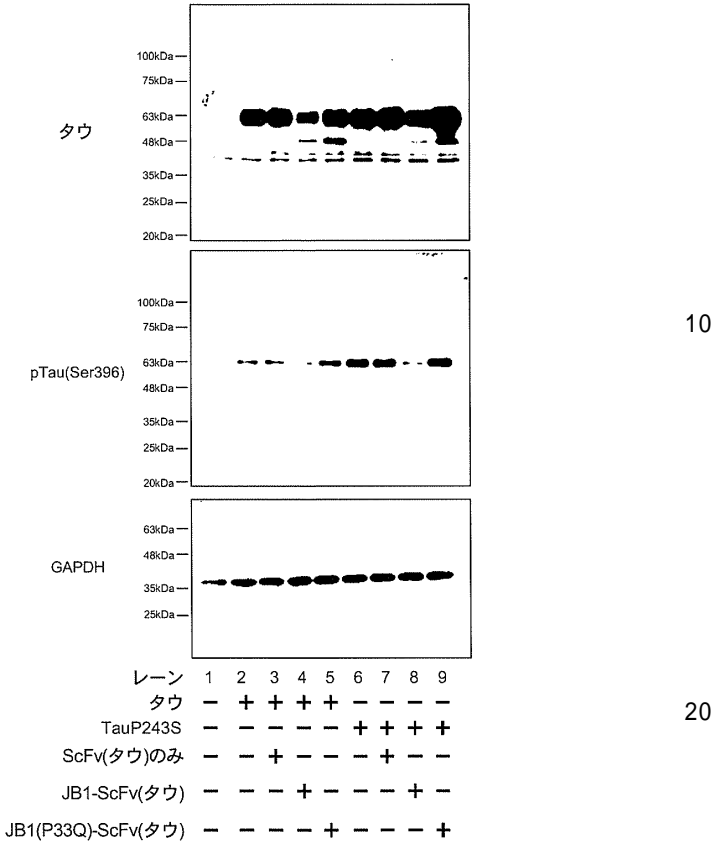
【 図 3 】



【 図 4 】



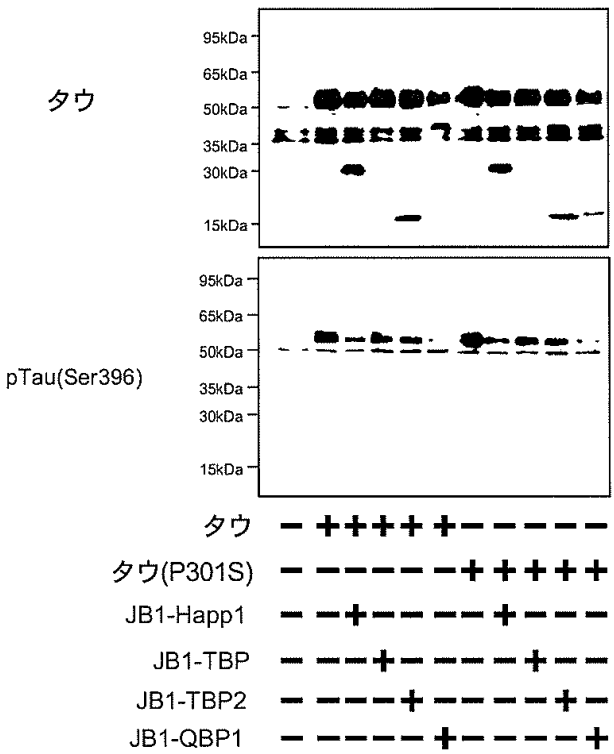
【 図 5 】



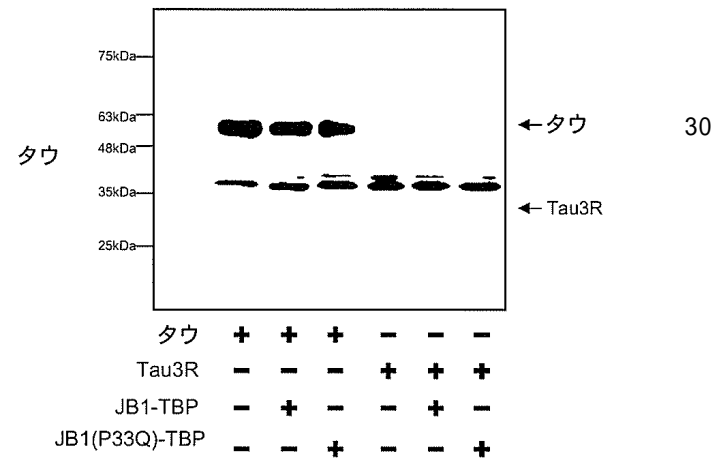
10

20

【 図 6 】



【 図 7 】

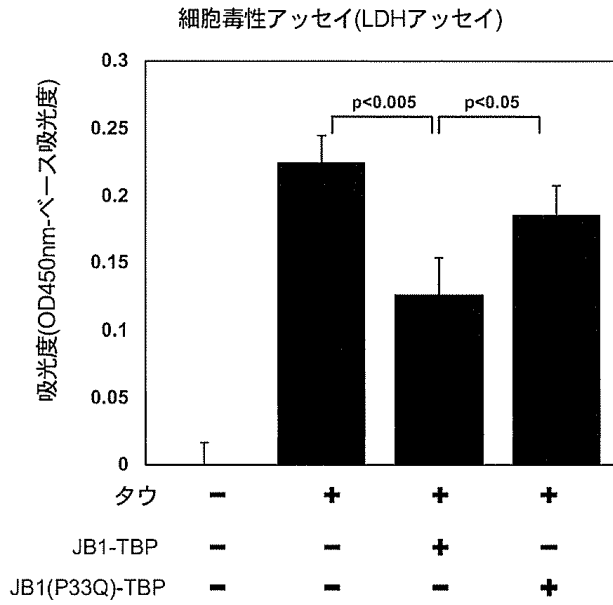


30

40

50

【 図 8 】



10

【 配列表 】

2023548632000001.app

20

30

40

50

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/056539

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K14/47 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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, 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.
X	HISHIYA AKINORI ET AL: "Artificial DnaJ Protein for protein production and conformational diseases", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, no. 1, 17 August 2017 (2017-08-17), XP055841518, DOI: 10.1038/s41598-017-09067-7 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/articles/s41598-017-09067-7>	1-58
Y	the whole document ----- -/--	1-58
<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 <b>26 January 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>08/02/2022</b>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>Keller, Yves</b>

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/056539

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SIMON DUJARDIN ET AL: "Different tau species lead to heterogeneous tau pathology propagation and misfolding", ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 6, no. 1, 29 November 2018 (2018-11-29), pages 1-12, XP021263186, DOI: 10.1186/S40478-018-0637-7 the whole document -----	1-58
X,P	WO 2021/207636 A2 (SOLA BIOSCIENCES LLC [US]) 14 October 2021 (2021-10-14) the whole document -----	1-58

10

20

30

40

1

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US2021/056539

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a.  forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

**PCT/US2021/056539**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
<b>WO 2021207636</b>	<b>A2</b>	<b>14-10-2021</b>	<b>NONE</b>
-----			

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
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 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	

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

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 4 7 8 , ベルモント , リズリー・ロード 1 4

(72)発明者 コヤ , ケイゾウ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 4 6 7 , チェスナット・ヒル , ヒース・ストリート 8 0 5

F ターム (参考) 4B065 AA95X AA95Y AB01 BA01 CA44  
4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA41 MA02 NA05 NA14 ZA02 ZA15  
ZA16 ZC41  
4C087 AA01 AA02 BB63 BC83 MA02 NA05 NA14 ZA02 ZA15 ZA16  
ZC41  
4H045 AA10 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74