

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6219956号
(P6219956)

(45) 発行日 平成29年10月25日(2017.10.25)

(24) 登録日 平成29年10月6日(2017.10.6)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 19/00	(2006.01) C07K 19/00 Z N A
C07K 16/46	(2006.01) C07K 16/46
C12N 15/09	(2006.01) C12N 15/00 A
C12N 1/15	(2006.01) C12N 1/15
C12N 1/19	(2006.01) C12N 1/19

請求項の数 42 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-528977 (P2015-528977)
(86) (22) 出願日	平成25年8月26日(2013.8.26)
(65) 公表番号	特表2015-528452 (P2015-528452A)
(43) 公表日	平成27年9月28日(2015.9.28)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2013/067595
(87) 國際公開番号	W02014/033074
(87) 國際公開日	平成26年3月6日(2014.3.6)
審査請求日	平成27年4月27日(2015.4.27)
(31) 優先権主張番号	12182181.3
(32) 優先日	平成24年8月29日(2012.8.29)
(33) 優先権主張国	歐州特許庁(EP)

(73) 特許権者	591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラツセ124
(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(74) 代理人	100116528 弁理士 三宅 俊男
(74) 代理人	100146031 弁理士 柴田 明夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液脳関門シャトル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脳エフェクター本体、リンカー、及びトランスフェリンレセプターに結合する一つの一価結合性本体を含む血液脳関門シャトルであって、

リンカーが、トランスフェリンレセプターに結合する一価結合性本体にエフェクター本体を連結し、トランスフェリンレセプターに結合する一価結合性本体が、配列番号14、15、又は16のアミノ酸配列内に含まれる、トランスフェリンレセプター中のエピトープを認識する一つのscFabを含む、血液脳関門シャトル。

【請求項 2】

脳エフェクター本体が、神経障害薬、神経栄養因子、成長因子、酵素、細胞傷害性薬物、脳ターゲットに対する抗体、脳ターゲットに対するモノクローナル抗体、脳ターゲットに対するペプチドから成る群より選択される、請求項1記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 3】

脳ターゲットが、-セクレターゼ1、A、上皮成長因子、上皮成長因子レセプター2、タウ、リン酸化タウ、アポリポタンパク質E4、シヌクレイン、シヌクレインのオリゴマー性フラグメント、CD20、ハンチンチン、ブリオンタンパク質、ロイシンリチリピートキナーゼ2、パーキン、プレセニリン2、セクレターゼ、デスレセプター6、アミロイド前駆タンパク質、p75ニューロトロフィンレセプター、及びカスパーゼ6から成る群より選択される、請求項2記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 4】

10

20

脳エフェクター本体が、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドから成る群より選択される、請求項 1 から 3 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 5】

トランスフェリンレセプターに結合する一価結合性本体が、リンカーによって脳エフェクター本体の C 末端に連結されている、請求項 4 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 6】

脳エフェクター本体が、脳ターゲットに対する完全長抗体を含む、請求項 1 から 5 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 7】

脳エフェクター本体が、完全長 Ig G を含む、請求項 6 記載の血液脳関門シャトル。 10

【請求項 8】

脳エフェクター本体としての完全長 Ig G 抗体、リンカー、及びトランスフェリンレセプターと結合する一価結合性本体としての一つの sc Fab を含む血液脳関門シャトルであって、sc Fab が、リンカーによって Ig G 抗体の重鎖の一つの Fc 部分の C 末端に連結されている、請求項 7 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 9】

エフェクター本体が、A に対する完全長抗体である、請求項 6 から 8 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 10】

A に対する抗体が、(a) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H - CDR 1、(b) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H - CDR 2、(c) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H - CDR 3、(d) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む L - CDR 1、(e) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む L - CDR 2、及び (f) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む L - CDR 3 を含む、請求項 9 記載の血液脳関門シャトル。 20

【請求項 11】

A に対する抗体が、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V_H ドメイン及び配列番号 12 のアミノ酸配列を含む V_L ドメインを含む、請求項 10 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 12】

エフェクター本体が、リン酸化タウに対する完全長抗体であり、一価結合性本体が、トランスフェリンレセプターに対する一つの sc Fab である、請求項 6 から 8 記載の血液脳関門シャトル。 30

【請求項 13】

エフェクター本体が、シヌクレインに対する完全長抗体であり、一価結合性本体が、トランスフェリンレセプターに対する一つの sc Fab である、請求項 6 から 8 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 14】

リンカーが、ペプチドリンカーである、請求項 1 から 13 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 15】

ペプチドリンカーが、少なくとも 20 アミノ酸長を有するアミノ酸配列であるペプチドである、請求項 14 記載の血液脳関門シャトル。 40

【請求項 16】

ペプチドリンカーが、25 ~ 50 アミノ酸長を有するアミノ酸配列であるペプチドである、請求項 15 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 17】

トランスフェリンレセプターに結合する一価結合性本体が、CH₂ - CH₃ Ig 本体及びトランスフェリンレセプターに結合する一つの sc Fab を含み、sc Fab が、第 2 のリンカーによって CH₂ - CH₃ Ig 本体の C 末端に連結されている、請求項 1 から 3 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 18】

脳エフェクター本体、リンカー、CH₂ - CH₃ Ig ドメイン、第 2 のリンカー、及 50

びトランスフェリンレセプターに結合する一つの s c F a b を含む血液脳関門シャトルであって、脳エフェクター本体が、第1のリンカーによって C H 2 - C H 3 I g ドメインの N 末端に連結されており、 s c F a b が、第2のリンカーによって C H 2 - C H 3 I g ドメインの C 末端に連結されている、請求項 17 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 19】

C H 2 - C H 3 I g 本体が C H 2 - C H 3 I g G 本体である、請求項 17 又は 18 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 20】

請求項 1 から 19 記載の血液脳関門シャトルをコードする単離された核酸。

【請求項 21】

請求項 20 記載の核酸を含むホスト細胞。

10

【請求項 22】

請求項 1 から 19 記載の血液脳関門シャトル及び薬学的担体を含む薬学的製剤。

【請求項 23】

医薬として使用するための、請求項 1 から 19 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 24】

医薬の製造における請求項 1 から 19 記載の血液脳関門シャトルの使用。

【請求項 25】

医薬が、神経変性障害の処置用である、請求項 24 記載の使用。

【請求項 26】

神経変性障害が、アルツハイマー病である、請求項 25 記載の使用。

20

【請求項 27】

血液脳関門を通して脳エフェクター本体を輸送するための、請求項 1 から 19 記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 28】

C H 2 - C H 3 I g 本体、リンカー、及びトランスフェリンレセプターに対する一つの s c F a b を含む、血液脳関門を通して脳エフェクター本体を輸送するための融合タンパク質であって、 s c F a b が、リンカーによって C H 2 - C H 3 I g 本体の C 末端に連結されている融合タンパク質。

【請求項 29】

30

脳エフェクター本体が、神経障害薬、神経栄養因子、成長因子、酵素、細胞傷害性薬物、脳ターゲットに対する抗体フラグメント又はペプチドから成る群より選択され、脳ターゲットに対する抗体フラグメント又はペプチドが、 s c F v 、 F v 、 s c F a b 、 F a b 、 V H H 、 F (a b ') ₂ から成る群より選択される、請求項 28 記載の、血液脳関門を通して脳エフェクター本体を輸送するための融合タンパク質。

【請求項 30】

トランスフェリンレセプターに対する s c F a b が、配列番号 14、15、又は 16 のアミノ酸配列内に含まれる、トランスフェリンレセプター中のエピトープを認識する、請求項 28 又は 29 記載の、血液脳関門を通して脳エフェクター本体を輸送するための融合タンパク質。

40

【請求項 31】

リンカーがペプチドリンカーである、請求項 28 から 29 記載の、血液脳関門を通して脳エフェクター本体を輸送するための融合タンパク質。

【請求項 32】

C H 2 - C H 3 I g 本体が C H 2 - C H 3 I g G 本体である、請求項 28 から 31 記載の融合タンパク質。

【請求項 33】

請求項 28 から 32 記載の融合タンパク質をコードする単離された核酸。

【請求項 34】

請求項 33 記載の核酸を含むホスト細胞。

50

【請求項 3 5】

請求項 2 8 から 3 2 記載の、血液脳関門を通して脳エフェクター本体を輸送するための融合タンパク質と、リンカーによって融合タンパク質の C H 2 - C H 3 I g 本体の N 末端に連結された脳エフェクター本体とを含むコンジュゲート。

【請求項 3 6】

脳エフェクター本体が、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドから成る群より選択される、請求項 3 5 記載のコンジュゲート。

【請求項 3 7】

エフェクター本体の C 末端が、リンカーによって C H 2 - C H 3 I g 本体の N 末端に連結されている、請求項 3 6 記載のコンジュゲート。 10

【請求項 3 8】

請求項 3 5 から 3 7 記載のコンジュゲート及び薬学的担体を含む薬学的製剤。

【請求項 3 9】

医薬として使用するための、請求項 3 5 から 3 7 記載のコンジュゲート。

【請求項 4 0】

医薬の製造における、請求項 3 5 から 3 7 記載のコンジュゲートの使用。

【請求項 4 1】

医薬が、神経変性障害の処置用である、請求項 4 0 記載の使用。

【請求項 4 2】

神経変性障害が、アルツハイマー病である、請求項 4 1 記載の使用。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、血液脳関門上のレセプター (R / B B B) と結合する血液脳関門シャトル及びそれを使用する方法に関する。

【0 0 0 2】

背景

例えば低い脳透過性を有する大型バイオ治療薬又は小分子薬などの神経障害薬の脳透過は、神経血管ユニット (N V U) 中の他の細胞成分と一緒に広範囲で不透過性の血液脳関門 (B B B) によって厳密に制限されている。この障壁を克服するための多くの戦略が試験されており、一つは、脳毛細血管内皮上に発現された内因性レセプターによって仲介されるトランスサイトシス経路を利用することである。脳へのバイオ治療薬のレセプター介在性送達を可能にするために、モノクローナル抗体又はペプチドなどのリコンビナントタンパク質がこれらのレセプターに対して設計されている。しかし、脳内皮細胞 (B E C) 内の誤ソーティング及び B E C 中のあるオルガネラ (特にバイオ治療薬の分解に導くオルガネラ) 内の蓄積度を最小化する一方で脳の取り込みを最大化するための戦略は、まだ探求されていない。 30

【0 0 0 3】

モノクローナル抗体及び他のバイオ治療薬は、中枢神経系 (C N S) における病態の処置に莫大な治療潜在性を有する。しかし、脳内へのそれらの経路は、B B B によって阻止される。以前の研究から、血流中に注射された I g G の非常のわずかなパーセンテージ (約 0 . 1 %) が C N S 区画中に透過できることが明らかにされた (Felgenhauer, Klin. W schr. 52: 1158-1164 (1974))。 C N S 中の抗体が低濃度であるせいで、これにより確かに任意の薬理作用が制限される。 40

【0 0 0 4】

したがって、神経障害薬の送達システムが B B B を通過して脳内に薬物を効率的にシャトルする必要がある。

【0 0 0 5】

概要

第一の局面では、本発明は、脳エフェクター本体、リンカー、及び血液脳関門レセプタ 50

一に結合する一つの一価結合性本体を含む血液脳関門シャトルであって、リンカーが、血液脳関門レセプターに結合する一価結合性本体にエフェクター本体を連結する血液脳関門シャトルを提供する。

【0006】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、血液脳関門レセプターに結合する一価結合性本体は、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドから成る群より選択される。

【0007】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、血液脳関門レセプターに結合する一価結合性本体は、血液脳関門レセプターのリガンド、s c F v、F v、s F a b、V H H、好ましくはs F a bから成る群より選択される分子を含む。 10

【0008】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、血液脳レセプターは、トランスフェリンレセプター、インスリンレセプター、インスリン様成長因子レセプター、低比重リボタンパク質レセプター関連タンパク質8、低比重リボタンパク質レセプター関連タンパク質1、及びヘパリン結合性上皮成長因子様成長因子、好ましくはトランスフェリンレセプターから成る群より選択される。

【0009】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、血液脳関門レセプターに結合する一価結合性本体は、トランスフェリンレセプターに対する一つのs c F a b、より詳細には配列番号14、15又は16のアミノ酸配列内に含まれる、トランスフェリンレセプター中のエピトープを認識するs c F a bを含む。 20

【0010】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、脳エフェクター本体は、神経障害薬、神経栄養因子、成長因子、酵素、細胞傷害性薬物、脳ターゲットに対する抗体、脳ターゲットに対するモノクローナル抗体、脳ターゲットに対するペプチドから成る群より選択される。

【0011】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、脳ターゲットは、-セクレターゼ1、A、上皮成長因子、上皮成長因子レセプター2、タウ、リン酸化タウ、アポリポタンパク質E4、シヌクレイン、シヌクレインのオリゴマーフラグメント、C D 2 0、ハンチングチン、ブリオンタンパク質、ロイシンリッチリピートキナーゼ2、パーキン、プレセニリン2、セクレターゼ、デスレセプター6、アミロイド前駆タンパク質、p 7 5 ニュートロフィンレセプター、及びカスパーーゼ6から成る群より選択される。 30

【0012】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、脳エフェクター本体は、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドから成る群より選択される。

【0013】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、血液脳レセプターに結合する一価結合性本体は、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドから成る群より選択され、該一価結合性本体は、リンカーによって脳エフェクター本体のC末端に連結されている。

【0014】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、脳エフェクター本体は、脳ターゲットに対する完全長抗体、好ましくは完全長I g Gを含む。

【0015】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、血液脳関門シャトルは、脳エフェクター本体としての完全長I g G抗体、リンカー、及び血液脳レセプターと結合する一価結合性本体としての一つのs c F a bを含み、ここでs c F a bは、リンカーによってI g G抗体の重鎖の一つのF c部分のC末端に連結されている。

【0016】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、エフェクター本体は、Aに対する完全長抗体である。 50

【0017】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、Aに対する抗体は、(a)配列番号5のアミノ酸配列を含むH-CDR1、(b)配列番号6のアミノ酸配列を含むH-CDR2、(c)配列番号7のアミノ酸配列を含むH-CDR3、(d)配列番号8のアミノ酸配列を含むL-CDR1、(e)配列番号9のアミノ酸配列を含むL-CDR2、及び(f)配列番号10のアミノ酸配列を含むL-CDR3を含む。

【0018】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、Aに対する抗体は、配列番号11のアミノ酸配列を含むV_Hドメイン及び配列番号12のアミノ酸配列を含むV_Lドメインを含む。

【0019】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、エフェクター本体は、Aに対する完全長抗体であり、一価結合性本体は、トランスフェリンレセプターに対するscFab、より詳細には配列番号14、15又は16のアミノ酸配列内に含まれるトランスフェリンレセプター中のエピトープを認識するscFabである。

【0020】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、脳ターゲットに対する血液脳関門シャトルの抗体の第1の重鎖は、第1の二量体化モジュールを含み、脳ターゲットに対する血液脳関門シャトルの抗体の第2の重鎖は、第2の二量体化モジュールを含み、これら2種の重鎖のヘテロ二量体化が可能になる。

【0021】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、脳ターゲットに対する血液脳関門シャトルの抗体の第1の重鎖の第1の二量体化モジュールは、ノブズ-イントゥ-ホールズ戦略(knobs into holes strategy)によるノブを含み、脳ターゲットに対する血液脳関門シャトルの抗体の第2の重鎖の二量体化モジュールは、ホールを含む。

【0022】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、エフェクター本体はリン酸化タウに対する完全長抗体であり、一価結合性本体はトランスフェリンレセプターに対する一つのscFabである。

【0023】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、エフェクター本体はシヌクレインに対する完全長抗体であり、一価結合性本体はトランスフェリンレセプターに対する一つのscFabである。

【0024】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、リンカーは、ペプチドリンカー、好ましくは少なくとも25アミノ酸長、より好ましくは30~50アミノ酸長を有するアミノ酸配列であるペプチドであり、特に該リンカーは、(G₄S)₆G₂又は(G₄S)₄である。

【0025】

本発明の以下の三つの態様は、脳エフェクター本体が、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドであるが、但し、脳エフェクター本体は完全長抗体、特に完全長IgGではない血液脳関門シャトルに関する。

【0026】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、血液脳関門レセプターに結合する一価結合性本体は、CH2-CH3 Ig本体及び血液脳関門レセプターに結合する一つのscFabを含み、その際、scFabは、第2のリンカーによってCH2-CH3 Ig本体のC末端に連結されている。

【0027】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、血液脳関門シャトルは、脳エフェクター本体、リンカー、CH2-CH3 Igドメイン、第2のリンカー、及び血液脳関門レセプターに結合する一つのscFabを含み、その際、脳エフェクター本体は、第1のリンカーによってCH2-CH3 IgドメインのN末端に連結されており、scFabは、第2のリ

10

20

30

40

50

ンカーによって C H 2 - C H 3 Ig ドメインの C 末端に連結されている。

【 0 0 2 8 】

血液脳関門シャトルの特定の一態様では、 C H 2 - C H 3 Ig 本体は C H 2 - C H 3 Ig G 本体である。

【 0 0 2 9 】

そのうえ本発明は、本発明の血液脳関門シャトルをコードする単離された核酸、血液脳関門シャトルをコードする単離された核酸を含むホスト細胞、及び血液脳関門シャトルを含む薬学的製剤に関する。

【 0 0 3 0 】

本発明の血液脳関門シャトルは、医薬として使用することができ、特に、例えばアルツハイマー病などの神経障害の処置のために使用することができる。 10

【 0 0 3 1 】

本発明の血液脳関門シャトルは、血液脳関門を通して脳エフェクター本体を輸送するため使用することができる。

【 0 0 3 2 】

特定の一態様では、本発明の血液脳関門シャトルの Ig G 抗体の重鎖であって、その Fc 部の C 末端で、血液脳関門レセプターに結合する一価結合性本体としての scFab に連結されている重鎖は、以下の構造を有する：

- Ig G 重鎖、
- Ig G の重鎖の Fc 部分の C 末端を scFab の VL ドメインの N 末端に連結しているリンカー、
- scFab の可変軽鎖ドメイン (VL) 及び C - 軽鎖ドメイン、
- scFab の C - 軽鎖ドメインの C 末端を scFab の VH ドメインの N 末端に連結しているリンカー、
- scFab 抗体の可変重鎖ドメイン (VH) 及び Ig G C H 3 重鎖ドメイン。

【 0 0 3 3 】

第二の局面では、本発明は、 C H 2 - C H 3 Ig 本体、リンカー、及び血液脳関門レセプターに対する一つの scFab を含む、血液脳関門を通して脳エフェクター本体を輸送するための融合タンパク質であって、 scFab が、リンカーによって C H 2 - C H 3 Ig 本体の C 末端に連結されている融合タンパク質を提供する。 30

【 0 0 3 4 】

本発明の融合タンパク質の特定の一態様では、本発明の融合タンパク質は、さらに、 C H 2 - C H 3 Ig 本体の N 末端で脳エフェクター本体を C H 2 - C H 3 Ig 本体の N 末端に連結するためのリンカーを含む。

【 0 0 3 5 】

本発明の融合タンパク質の特定の一態様では、脳エフェクター本体は、神経障害薬、神経栄養因子、成長因子、酵素、細胞傷害性薬物、脳ターゲットに対する抗体フラグメント又はペプチドから成る群より選択され、脳ターゲットに対する抗体フラグメント又はペプチドは、 scFv 、 Fv 、 scFab 、 Fab 、 VH 、 F(ab')2 から成る群より選択される。 40

【 0 0 3 6 】

本発明の融合タンパク質の特定の一態様では、血液脳関門レセプターに対する scFab は、トランスフェリンレセプターに対する scFab 、好ましくは配列番号 14 、 15 、又は 16 のアミノ酸配列内に含まれる、トランスフェリンレセプター中のエピトープを認識する scFab である。

【 0 0 3 7 】

本発明の融合タンパク質の特定の一態様では、リンカーは、ペプチドリンカー、特に少なくとも 15 アミノ酸長、より詳細には 20 ~ 50 アミノ酸長を有するアミノ酸配列であるペプチドであり、最も詳細には該リンカーは、アミノ酸配列 (G4S)6G2 (配列番号 13) 又は (G4S)4 (配列番号 17) を有する。 50

【0038】

本発明の融合タンパク質の特定の態様では、C H 2 - C H 3 Ig 本体はC H 2 - C H 3 Ig G 本体である。

【0039】

そのうえ、本発明は、本発明の融合タンパク質をコードする単離された核酸、及び本発明の融合タンパク質をコードする核酸を含むホスト細胞を提供する。

【0040】

第三の局面では、本発明は、本発明の融合タンパク質と、リンカーによって本発明の融合タンパク質のC H 2 - C H 3 Ig 本体のN末端に連結されている脳エフェクター本体とを含むコンジュゲートを提供する。

10

【0041】

本発明のコンジュゲートの特定の一態様では、脳エフェクター本体は神経栄養因子であり、その際、C H 2 - C H 3 Ig 本体のN末端に神経栄養因子を連結しているリンカーはペプチドリンカーである。

【0042】

そのうえ、本発明は、本発明のコンジュゲート及び薬学的担体を含む薬学的製剤、医薬としてのコンジュゲートの使用、特に神経変性障害、特にアルツハイマー病の処置のためのコンジュゲートの使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0043】

20

【図1A】実施例に使用された異なる形式の血液脳関門シャトル（融合タンパク質）を示す図である。1 A : A に対するIg G (mAb31)。1 B : A に対するIg G (mAb31)のFc部に連結されたTfRに対する単一Fab (sFab)。1 C : A に対するIg G (mAb31)のFc部に連結されたTfRに対する二重Fab (dFab)。s c Fab構造は、Ig G抗体の重鎖のC末端に融合されている。

【図1B】実施例に使用された異なる形式の血液脳関門シャトル（融合タンパク質）を示す図である。1 A : A に対するIg G (mAb31)。1 B : A に対するIg G (mAb31)のFc部に連結されたTfRに対する単一Fab (sFab)。1 C : A に対するIg G (mAb31)のFc部に連結されたTfRに対する二重Fab (dFab)。s c Fab構造は、Ig G抗体の重鎖のC末端に融合されている。

30

【図1C】実施例に使用された異なる形式の血液脳関門シャトル（融合タンパク質）を示す図である。1 A : A に対するIg G (mAb31)。1 B : A に対するIg G (mAb31)のFc部に連結されたTfRに対する単一Fab (sFab)。1 C : A に対するIg G (mAb31)のFc部に連結されたTfRに対する二重Fab (dFab)。s c Fab構造は、Ig G抗体の重鎖のC末端に融合されている。

【図2】A構造に対する融合タンパク質の結合特性を示す図である。結合親和性は、Fab構築物が保存されたA結合特性を有することを示すELISA設定を用いて測定した。AフィブリルへのmAb31 - 8D3構築物の結合。8D3（白四角）は固定化Aフィブリルに結合しないものの、mAb31 - 8D3 - dFab（黒四角）、mAb31 - 8D3 - sFab（白三角）、及びmAb31（黒三角）は類似の親和性で結合する。

40

【図3】トランスフェリンレセプター（TfR）に対する構築物の結合特性を示す図である。結合親和性は、Fab構築物だけがトランスフェリンレセプター（TfR）と結合し、二価結合様式のせいで二重Fab構築物の方がわずかに高い見かけの親和性を有することを示すELISA設定を用いて測定した。mTfRへのmAb31 - 8D3構築物の結合。mAb31（黒三角）は固定化mTfRに結合しないものの、mAb31 - 8D3 - dFab（黒四角）は、8D3親抗体（白四角）に類似の親和性で結合する。一価構築物mAb31 - 8D3 - sFab（白三角）は、中等度の結合親和性を示す。

【図4A】抗Aモノクローナル抗体mAb31（図4A）、単一Fab mAb31（mAb31のC末端に融合された単一Fab）（図4B）、及び二重Fab mAb31

50

(mAb31のC末端に融合された二重Fab) (図4C)のブラーク装飾を示す図である。PS2APPマウス (n=3/構築物)に構築物を単回静脈内用量10mg/kgで注射し、それから投与後8時間脳灌流した。分析は、ブラーク結合についての免疫組織化学検査及び共焦点顕微鏡法を含んだ。データは、単一Fab-mAb31構築物だけがBBBを通過してブラークに結合できることを示している。この図に全動物からの脳の代表野1個を示す。

【図4B】抗Aモノクローナル抗体mAb31 (図4A)、単一Fab-mAb31 (mAb31のC末端に融合された単一Fab) (図4B)、及び二重Fab-mAb31 (mAb31のC末端に融合された二重Fab) (図4C)のブラーク装飾を示す図である。PS2APPマウス (n=3/構築物)に構築物を単回静脈内用量10mg/kgで注射し、それから投与後8時間脳灌流した。分析は、ブラーク結合についての免疫組織化学検査及び共焦点顕微鏡法を含んだ。データは、単一Fab-mAb31構築物だけがBBBを通過してブラークに結合できることを示している。この図に全動物からの脳の代表野1個を示す。

【図4C】抗Aモノクローナル抗体mAb31 (図4A)、単一Fab-mAb31 (mAb31のC末端に融合された単一Fab) (図4B)、及び二重Fab-mAb31 (mAb31のC末端に融合された二重Fab) (図4C)のブラーク装飾を示す図である。PS2APPマウス (n=3/構築物)に構築物を単回静脈内用量10mg/kgで注射し、それから投与後8時間脳灌流した。分析は、ブラーク結合についての免疫組織化学検査及び共焦点顕微鏡法を含んだ。データは、単一Fab-mAb31構築物だけがBBBを通過してブラークに結合できることを示している。この図に全動物からの脳の代表野1個を示す。

【図5】二重Fab-mAb31構築物の定量を示す図である。処置された動物合計3匹から異なる3領域でブラーク及び毛細血管の染色を定量した (各構築物あたり合計9野)。データは、二重Fab-mAb31構築物ではmAb31に比べて毛細血管の場合だけが増加することを示している。ブラーク (脳内)で二重Fab-mAb31のレベル増加は検出されなかった。10mg/kgを投与後8時間にmAb31 (HEK対照)に比べた二重Fab-mAb3を定量。

【図6】単一Fab-mAb31構築物の定量を示す図である。処置された動物合計3匹から異なる3領域でブラーク及び毛細血管の染色を定量した (各構築物あたり合計9野)。データは、単一Fab-mAb31構築物ではmAb31に比べてブラークで大きな増加があることを示している。蛍光シグナルの定量は、単一Fab-mAb31がmAb31構築物の50倍超を示している。単一Fab-mAb31構築物ではmAb31に比べて毛細血管にも一過性染色があり、BBBを通過したことを示している。10mg/kgを投与後8時間及び25mg/kgを投与後24時間にmAb31 (HEK対照)に比べた単一Fab-mAb31を定量。

【図7】異なる2用量の抗Aモノクローナル抗体mAb31及び非常に低用量の単一Fab-mAb31 (mAb31のC末端に融合された単一Fab)のブラーク装飾を示す図である。構築物をPS2APPマウス (n=3/構築物)に単回静脈内投与で注射し、それから投与後様々な時点での脳灌流した。分析は、ブラーク結合についての免疫組織化学検査及び共焦点顕微鏡法を含んだ。データは、単一Fab-mAb31構築物だけがBBBを通過してブラークに結合できることを示している。脳曝露は単一Fab-mAb31構築物について非常に迅速であり、ブラーク装飾は、単回投与から少なくとも1週間にわたり持続可能である。

【図8】単一Fab-mAb31又は二重Fab-mAb31で処置されたTfRの細胞表面発現の定量を示す図である。二重Fab-mAb31構築物によるトランスフェリンレセプター (TfR)の細胞表面ダウンレギュレーション。TfRを発現している脳内皮細胞を、単一Fab-mAb31構築物 (図8A)又は二重Fab-mAb31構築物 (図8B)のいずれかと共に24時間インキュベーションした。二重Fab-mAb31構築物だけが細胞表面に発現されたTfRのレベルを低下させた。

10

20

30

40

50

【図9A】単一Fab-mab31又は二重Fab-mAb31で処置されたTfRのin vivo細胞輸送を示す図である。毛細血管及びplaquesのin vivo染色を検討する初期時点。sFab-MAb31(図9A)及びdFab-MAb31(図9B)の両方が、注射の15分後に脳血管系を装飾し、それらの分布に差はない。注射の8時間後にsFab-MAb31は実質に到達し、アミロイドplaquesを装飾する(矢印、図9C)が、一方、dFab-MAb31は15分の時点まで同様に脳血管系内に留まる(図9D)。dFab-MAb31について、実質のアミロイドplaquesは検出されない。

【図9B】単一Fab-mab31又は二重Fab-mAb31で処置されたTfRのin vivo細胞輸送を示す図である。毛細血管及びplaquesのin vivo染色を検討する初期時点。sFab-MAb31(図9A)及びdFab-MAb31(図9B)の両方が、注射の15分後に脳血管系を装飾し、それらの分布に差はない。注射の8時間後にsFab-MAb31は実質に到達し、アミロイドplaquesを装飾する(矢印、図9C)が、一方、dFab-MAb31は15分の時点まで同様に脳血管系内に留まる(図9D)。dFab-MAb31について、実質のアミロイドplaquesは検出されない。

【図9C】単一Fab-mab31又は二重Fab-mAb31で処置されたTfRのin vivo細胞輸送を示す図である。毛細血管及びplaquesのin vivo染色を検討する初期時点。sFab-MAb31(図9A)及びdFab-MAb31(図9B)の両方が、注射の15分後に脳血管系を装飾し、それらの分布に差はない。注射の8時間後にsFab-MAb31は実質に到達し、アミロイドplaquesを装飾する(矢印、図9C)が、一方、dFab-MAb31は15分の時点まで同様に脳血管系内に留まる(図9D)。dFab-MAb31について、実質のアミロイドplaquesは検出されない。

【図9D】単一Fab-mab31又は二重Fab-mAb31で処置されたTfRのin vivo細胞輸送を示す図である。毛細血管及びplaquesのin vivo染色を検討する初期時点。sFab-MAb31(図9A)及びdFab-MAb31(図9B)の両方が、注射の15分後に脳血管系を装飾し、それらの分布に差はない。注射の8時間後にsFab-MAb31は実質に到達し、アミロイドplaquesを装飾する(矢印、図9C)が、一方、dFab-MAb31は15分の時点まで同様に脳血管系内に留まる(図9D)。dFab-MAb31について、実質のアミロイドplaquesは検出されない。

【図10A】単一Fab-mab31又は二重Fab-mAb31で処置されたTfRのin vivo細胞輸送を示す図である。研究に使用された全ての構築物の完全性を検査するために、MAb31(図10A)、sFab-MAb31(図10B)又はdFab-MAb31(図10C)を使用して18ヶ月マウスのAPPトランスジェニック脳の凍結切片の染色を行った。図10Dに検査の結果を示す。結果は、3種の構築物全てがトランスジェニックマウスの脳内のアミロイドplaquesを検出したことを示した。

【図10B】単一Fab-mab31又は二重Fab-mAb31で処置されたTfRのin vivo細胞輸送を示す図である。研究に使用された全ての構築物の完全性を検査するために、MAb31(図10A)、sFab-MAb31(図10B)又はdFab-MAb31(図10C)を使用して18ヶ月マウスのAPPトランスジェニック脳の凍結切片の染色を行った。図10Dに検査の結果を示す。結果は、3種の構築物全てがトランスジェニックマウスの脳内のアミロイドplaquesを検出したことを示した。

【図10C】単一Fab-mab31又は二重Fab-mAb31で処置されたTfRのin vivo細胞輸送を示す図である。研究に使用された全ての構築物の完全性を検査するために、MAb31(図10A)、sFab-MAb31(図10B)又はdFab-MAb31(図10C)を使用して18ヶ月マウスのAPPトランスジェニック脳の凍結切片の染色を行った。図10Dに検査の結果を示す。結果は、3種の構築物全てがトランスジェニックマウスの脳内のアミロイドplaquesを検出したことを示した。

【図10D】単一Fab-mab31又は二重Fab-mAb31で処置されたTfRのin vivo細胞輸送を示す図である。研究に使用された全ての構築物の完全性を検査するために、MAb31(図10A)、sFab-MAb31(図10B)又はdFab-MAb31(図10C)を使用して18ヶ月マウスのAPPトランスジェニック脳の凍

10

20

30

40

50

結切片の染色を行った。図 10 D に検査の結果を示す。結果は、3 種の構築物全てがトランシジェニックマウスの脳内のアミロイドplaquesを検出したことを示した。

【図 11】単一 F ab - m ab 3 1 で処置された T f R の in vivo 細胞輸送を示す図である。 in vivo 処置標本に関する高分解能共焦点顕微鏡法は、 s F ab - M A b 3 1 が脳毛細血管の管腔側を装飾せず、内皮細胞の管腔膜を通過して小胞様構造内及び内皮細胞サイトゾル内に含まれることを示している。図 11 の矢印は、内皮細胞核の反管腔側の s F ab - M A b 3 1 構築物含有小胞を示す。これらのデータは、 s F ab - M A b 3 1 が脳内皮細胞に進入でき、かつまた血管系を通過して脳の実質間隙 (parenchyma space) 内のアミロイドplaquesに到達できることを示唆している (図 9 A 及び C と比較) 。

【図 12】二重 F ab - m ab 3 1 で処置された T f R の in vivo 細胞輸送を示す図である。 in vivo 処置標本に関する高分解能共焦点顕微鏡法は、 d F ab - M A b 3 1 が脳毛細血管の管腔側を装飾せず、内皮細胞の管腔膜を通過して小胞様構造内及び内皮細胞サイトゾル内に含まれることを示している。図 12 の矢印は、内皮細胞核の反管腔側の d F ab - M A b 3 1 構築物含有小胞を示す。これらのデータは、 d F ab - M A b 3 1 が脳内皮細胞に進入することができるが、トラップされて血管系を通過することができず、したがって脳の実質間隙内のアミロイドplaquesに到達しないことを示唆している (図 9 B 及び D と比較) 。

【図 13 A】 i . v . 投与後の脳曝露及びplaques装飾を示す図である。図 13 A : m ab 3 1 、 d F ab 、及び s F ab 構築物を 1.0 mg/kg で PS 2 APP トランシジェニック動物に静脈内注射し、動物を灌流し、注射の 8 時間後に屠殺した。 m ab 3 1 に比べ d F ab についてplaques装飾の有意な増加は検出されなかった。 s F ab 構築物について、検出抗体からの 555 nm での蛍光強度ベースで親 m ab 3 1 の 55 倍のplaques装飾が検出された。注射の 8 時間後の m ab 3 1 (図 13 B) 、 d F ab (図 13 C) 、及び s F ab (図 13 D) に関連する代表的な免疫組織化学染色。 d F ab は微小血管だけの染色を示し、一方で s F ab はアミロイド - plaques を広範囲に装飾する。図 13 E : 2 mg/kg 及び 1.0 mg/kg のどちらの m ab 3 1 よりも低用量の s F ab 構築物 (2.66 mg/kg) の方が脳内のplaquesに迅速かつ顕著に到達することの実証。 s F ab 構築物のターゲットとの会合 (engagement) は、注射後少なくとも 1 週間持続可能である。免疫組織化学染色は、注射後 7 日に 2 mg/kg の m ab 3 1 (図 13 F) 及び 2.66 mg/kg の s F ab (図 13 G) についてplaques装飾を示す。

【図 13 B】 i . v . 投与後の脳曝露及びplaques装飾を示す図である。図 13 A : m ab 3 1 、 d F ab 、及び s F ab 構築物を 1.0 mg/kg で PS 2 APP トランシジェニック動物に静脈内注射し、動物を灌流し、注射の 8 時間後に屠殺した。 m ab 3 1 に比べ d F ab についてplaques装飾の有意な増加は検出されなかった。 s F ab 構築物について、検出抗体からの 555 nm での蛍光強度ベースで親 m ab 3 1 の 55 倍のplaques装飾が検出された。注射の 8 時間後の m ab 3 1 (図 13 B) 、 d F ab (図 13 C) 、及び s F ab (図 13 D) に関連する代表的な免疫組織化学染色。 d F ab は微小血管だけの染色を示し、一方で s F ab はアミロイド - plaques を広範囲に装飾する。図 13 E : 2 mg/kg 及び 1.0 mg/kg のどちらの m ab 3 1 よりも低用量の s F ab 構築物 (2.66 mg/kg) の方が脳内のplaquesに迅速かつ顕著に到達することの実証。 s F ab 構築物のターゲットとの会合 (engagement) は、注射後少なくとも 1 週間持続可能である。免疫組織化学染色は、注射後 7 日に 2 mg/kg の m ab 3 1 (図 13 F) 及び 2.66 mg/kg の s F ab (図 13 G) についてplaques装飾を示す。

【図 13 C】 i . v . 投与後の脳曝露及びplaques装飾を示す図である。図 13 A : m ab 3 1 、 d F ab 、及び s F ab 構築物を 1.0 mg/kg で PS 2 APP トランシジェニック動物に静脈内注射し、動物を灌流し、注射の 8 時間後に屠殺した。 m ab 3 1 に比べ d F ab についてplaques装飾の有意な増加は検出されなかった。 s F ab 構築物について、検出抗体からの 555 nm での蛍光強度ベースで親 m ab 3 1 の 55 倍のplaques装飾が検出された。注射の 8 時間後の m ab 3 1 (図 13 B) 、 d F ab (図 13 C) 、及び s F

10

20

30

40

50

a b (図13D) に関する代表的な免疫組織化学染色。d F a b は微小血管だけの染色を示し、一方でs F a b はアミロイド- プラークを広範囲に装飾する。図13E: 2 mg/kg及び10 mg/kgのどちらのm A b 3 1 よりも低用量のs F a b 構築物 (2 . 6 6 mg/kg) の方が脳内のプラークに迅速かつ顕著に到達することの実証。s F a b 構築物のターゲットとの会合 (engagement) は、注射後少なくとも1週間持続可能である。免疫組織化学染色は、注射後7日に2 mg/kgのm A b 3 1 (図13F) 及び2 . 6 6 mg/kgのs F a b (図13G) についてプラーク装飾を示す。

【図13D】i . v . 投与後の脳曝露及びプラーク装飾を示す図である。図13A: m A b 3 1 、d F a b 、及びs F a b 構築物を10 mg/kgでP S 2 A P Pトランスジェニック動物に静脈内注射し、動物を灌流し、注射の8時間後に屠殺した。m A b 3 1 に比べd F a b についてプラーク装飾の有意な増加は検出されなかった。s F a b 構築物について、検出抗体からの555 nmでの蛍光強度ベースで親m A b 3 1 の55倍のプラーク装飾が検出された。注射の8時間後のm A b 3 1 (図13B) 、d F a b (図13C) 、及びs F a b (図13D) に関する代表的な免疫組織化学染色。d F a b は微小血管だけの染色を示し、一方でs F a b はアミロイド- プラークを広範囲に装飾する。図13E: 2 mg/kg及び10 mg/kgのどちらのm A b 3 1 よりも低用量のs F a b 構築物 (2 . 6 6 mg/kg) の方が脳内のプラークに迅速かつ顕著に到達することの実証。s F a b 構築物のターゲットとの会合 (engagement) は、注射後少なくとも1週間持続可能である。免疫組織化学染色は、注射後7日に2 mg/kgのm A b 3 1 (図13F) 及び2 . 6 6 mg/kgのs F a b (図13G) についてプラーク装飾を示す。

【図13E】i . v . 投与後の脳曝露及びプラーク装飾を示す図である。図13A: m A b 3 1 、d F a b 、及びs F a b 構築物を10 mg/kgでP S 2 A P Pトランスジェニック動物に静脈内注射し、動物を灌流し、注射の8時間後に屠殺した。m A b 3 1 に比べd F a b についてプラーク装飾の有意な増加は検出されなかった。s F a b 構築物について、検出抗体からの555 nmでの蛍光強度ベースで親m A b 3 1 の55倍のプラーク装飾が検出された。注射の8時間後のm A b 3 1 (図13B) 、d F a b (図13C) 、及びs F a b (図13D) に関する代表的な免疫組織化学染色。d F a b は微小血管だけの染色を示し、一方でs F a b はアミロイド- プラークを広範囲に装飾する。図13E: 2 mg/kg及び10 mg/kgのどちらのm A b 3 1 よりも低用量のs F a b 構築物 (2 . 6 6 mg/kg) の方が脳内のプラークに迅速かつ顕著に到達することの実証。s F a b 構築物のターゲットとの会合 (engagement) は、注射後少なくとも1週間持続可能である。免疫組織化学染色は、注射後7日に2 mg/kgのm A b 3 1 (図13F) 及び2 . 6 6 mg/kgのs F a b (図13G) についてプラーク装飾を示す。

【図13F】i . v . 投与後の脳曝露及びプラーク装飾を示す図である。図13A: m A b 3 1 、d F a b 、及びs F a b 構築物を10 mg/kgでP S 2 A P Pトランスジェニック動物に静脈内注射し、動物を灌流し、注射の8時間後に屠殺した。m A b 3 1 に比べd F a b についてプラーク装飾の有意な増加は検出されなかった。s F a b 構築物について、検出抗体からの555 nmでの蛍光強度ベースで親m A b 3 1 の55倍のプラーク装飾が検出された。注射の8時間後のm A b 3 1 (図13B) 、d F a b (図13C) 、及びs F a b (図13D) に関する代表的な免疫組織化学染色。d F a b は微小血管だけの染色を示し、一方でs F a b はアミロイド- プラークを広範囲に装飾する。図13E: 2 mg/kg及び10 mg/kgのどちらのm A b 3 1 よりも低用量のs F a b 構築物 (2 . 6 6 mg/kg) の方が脳内のプラークに迅速かつ顕著に到達することの実証。s F a b 構築物のターゲットとの会合 (engagement) は、注射後少なくとも1週間持続可能である。免疫組織化学染色は、注射後7日に2 mg/kgのm A b 3 1 (図13F) 及び2 . 6 6 mg/kgのs F a b (図13G) についてプラーク装飾を示す。

【図13G】i . v . 投与後の脳曝露及びプラーク装飾を示す図である。図13A: m A b 3 1 、d F a b 、及びs F a b 構築物を10 mg/kgでP S 2 A P Pトランスジェニック動物に静脈内注射し、動物を灌流し、注射の8時間後に屠殺した。m A b 3 1 に比べd F a b についてプラーク装飾の有意な増加は検出されなかった。s F a b 構築物について、

10

20

30

40

50

検出抗体からの 555 nmでの蛍光強度ベースで親 mAb31 の 55 倍のブラーク装飾が検出された。注射の 8 時間後の mAb31 (図 13B)、dFab (図 13C)、及び sFab (図 13D) に関連する代表的な免疫組織化学染色。dFab は微小血管だけの染色を示し、一方で sFab はアミロイド - ブラークを広範囲に装飾する。図 13E : 2 mg/kg 及び 10 mg/kg のどちらの mAb31 よりも低用量の sFab 構築物 (2.66 mg/kg) の方が脳内のブラークに迅速かつ顕著に到達することの実証。sFab 構築物のターゲットとの会合 (engagement) は、注射後少なくとも 1 週間持続可能である。免疫組織化学染色は、注射後 7 日に 2 mg/kg の mAb31 (図 13F) 及び 2.66 mg/kg の sFab (図 13G) についてブラーク装飾を示す。

【図 14A】週 1 回の i.v. 注射 14 回によって処置された担ブラーク PS2APPマウスにおける長期研究での in vivo 有効性を示す図である。それぞれ低用量 mAb31、中用量 mAb31、低用量 sFab、及び中用量 sFab について、研究の終了時に残留ブラークに結合している投与後構築物のターゲットブラーク結合性を示す (図 14A ~ D)。皮質及び海馬についてブラークの免疫組織化学染色後の定量的形態計測解析を示す (図 14E)。研究の開始時のアミロイドーシスのベースラインレベルとして、4.5 月齢で屠殺された未処置動物のブラーク負荷を示す。ビヒクル処置動物で見られた進行性のブラーク形成に比べて、中用量 sFab で処置後に有意なブラーク数の減少が明らかであり、ブラーク形成の減少傾向は低用量 sFab であっても出現する。したがって、sFab 構築物は、皮質及び海馬の両方でブラーク数を有意に減少させる。ブラークサイズの分析から、ブラーク数の減少が小さなブラークサイズで最も顕著であることが明らかとなった。* p 0.05、** p 0.01、*** p 0.001。

【図 14B】週 1 回の i.v. 注射 14 回によって処置された担ブラーク PS2APPマウスにおける長期研究での in vivo 有効性を示す図である。それぞれ低用量 mAb31、中用量 mAb31、低用量 sFab、及び中用量 sFab について、研究の終了時に残留ブラークに結合している投与後構築物のターゲットブラーク結合性を示す (図 14A ~ D)。皮質及び海馬についてブラークの免疫組織化学染色後の定量的形態計測解析を示す (図 14E)。研究の開始時のアミロイドーシスのベースラインレベルとして、4.5 月齢で屠殺された未処置動物のブラーク負荷を示す。ビヒクル処置動物で見られた進行性のブラーク形成に比べて、中用量 sFab で処置後に有意なブラーク数の減少が明らかであり、ブラーク形成の減少傾向は低用量 sFab であっても出現する。したがって、sFab 構築物は、皮質及び海馬の両方でブラーク数を有意に減少させる。ブラークサイズの分析から、ブラーク数の減少が小さなブラークサイズで最も顕著であることが明らかとなった。* p 0.05、** p 0.01、*** p 0.001。

【図 14C】週 1 回の i.v. 注射 14 回によって処置された担ブラーク PS2APPマウスにおける長期研究での in vivo 有効性を示す図である。それぞれ低用量 mAb31、中用量 mAb31、低用量 sFab、及び中用量 sFab について、研究の終了時に残留ブラークに結合している投与後構築物のターゲットブラーク結合性を示す (図 14A ~ D)。皮質及び海馬についてブラークの免疫組織化学染色後の定量的形態計測解析を示す (図 14E)。研究の開始時のアミロイドーシスのベースラインレベルとして、4.5 月齢で屠殺された未処置動物のブラーク負荷を示す。ビヒクル処置動物で見られた進行性のブラーク形成に比べて、中用量 sFab で処置後に有意なブラーク数の減少が明らかであり、ブラーク形成の減少傾向は低用量 sFab であっても出現する。したがって、sFab 構築物は、皮質及び海馬の両方でブラーク数を有意に減少させる。ブラークサイズの分析から、ブラーク数の減少が小さなブラークサイズで最も顕著であることが明らかとなった。* p 0.05、** p 0.01、*** p 0.001。

【図 14D】週 1 回の i.v. 注射 14 回によって処置された担ブラーク PS2APPマウスにおける長期研究での in vivo 有効性を示す図である。それぞれ低用量 mAb31、中用量 mAb31、低用量 sFab、及び中用量 sFab について、研究の終了時に残留ブラークに結合している投与後構築物のターゲットブラーク結合性を示す (図 14A ~ D)。皮質及び海馬についてブラークの免疫組織化学染色後の定量的形態計測解析を

10

20

30

40

50

示す(図14E)。研究の開始時のアミロイドーシスのベースラインレベルとして、4.5月齢で屠殺された未処置動物のplaques負荷を示す。ビヒクル処置動物で見られた進行性のplaques形成に比べて、中用量sFabで処置後に有意なplaques数の減少が明らかであり、plaques形成の減少傾向は低用量sFabであっても出現する。したがって、sFab構築物は、皮質及び海馬の両方でplaques数を有意に減少させる。plaquesサイズの分析から、plaques数の減少が小さなplaquesサイズで最も顕著であることが明らかとなった。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 。

【図14E】週1回のi.v.注射14回によって処置された担plaquesPS2APPマウスにおける長期研究でのin vivo有効性を示す図である。それぞれ低用量mAb31、中用量mAb31、低用量sFab、及び中用量sFabについて、研究の終了時に残留plaquesに結合している投与後構築物のターゲットplaques結合性を示す(図14A~D)。皮質及び海馬についてplaquesの免疫組織化学染色後の定量的形態計測解析を示す(図14E)。研究の開始時のアミロイドーシスのベースラインレベルとして、4.5月齢で屠殺された未処置動物のplaques負荷を示す。ビヒクル処置動物で見られた進行性のplaques形成に比べて、中用量sFabで処置後に有意なplaques数の減少が明らかであり、plaques形成の減少傾向は低用量sFabであっても出現する。したがって、sFab構築物は、皮質及び海馬の両方でplaques数を有意に減少させる。plaquesサイズの分析から、plaques数の減少が小さなplaquesサイズで最も顕著であることが明らかとなった。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 。

【図15】FcのC末端に融合されたTfR scFabフラグメントと多量体を形成した抗体がADCCを誘導しないことを示す図である。BA/F3マウス赤白血病細胞のNK92介在性殺滅を、LDHの放出を定量することによって測定した。「従来型の」「N末端をFcに」配向でTfR結合性Fab部分を有する多量体性構築物だけが顕著なADCCを誘導し、一方で逆配向の脳シャトル構築物は非誘導性(silent)である。

【図16】トランスフェリンレセプターに対するscFab 8D3が、マウストランスフェリンレセプターの細胞外ドメイン中の3種の異なるペプチドに結合することを示す図である。アミノ酸3個が重複する15残基長ペプチドへの抗体8D3の結合は、固定化mTfRペプチドを保持するCelluSpotスライド上でインキュベーションされた抗体の化学ルミネセンス検出によって明らかにした。囲み内: 8D3によって結合されたペプチド373、374、及び376番(配列番号15、16、及び17)。

【0044】

発明の態様の詳細な説明

定義

「血液脳関門」又は「BBB」は、脳毛細血管内皮形質膜内のタイトジャンクションによって形成される、末梢循環と脳及び脊髄との間の生理学的関門を表し、尿素(60ダルトン)などの非常に小さな分子であっても脳内への分子の輸送を制限する密着関門を作る。脳内のBBB、脊髄内の血液-脊髄関門、及び網膜内の血液-網膜関門は、CNS内の近接毛細血管関門であり、本明細書において、まとめて血液脳関門又はBBBと呼ばれる。BBBは、また、関門が毛細血管内皮細胞よりもむしろ上皮細胞から構成される血液-CSF関門(脈絡叢)を包含する。

【0045】

ノブズ-イントウ-ホールズの二量体化モジュール及び抗体工学におけるそれらの使用は、Carter P.; Ridgway J.B.B.; Presta L.G.: Immunotechnology, Volume 2, Number 1, February 1996, pp. 73-73(1)に記載されている。

【0046】

「中枢神経系」又は「CNS」は、身体の機能をコントロールする神経組織複合体を表し、それらには、脳及び脊髄が含まれる。

【0047】

「血液脳関門レセプター」(本明細書では「R/BBB」と略記)は、BBBを通過して分子を輸送する能力があるか、又は外因性の投与された分子を輸送するために使用され

10

20

30

40

50

る、脳内皮細胞上に発現される細胞外膜結合型レセプタータンパク質である。本明細書におけるR / BBBの例には、トランスフェリンレセプター(T f R)、インスリンレセプター、インスリン様成長因子レセプター(IGF-R)、非限定的に低比重リポタンパク質レセプター関連タンパク質1(LRP1)及び低比重リポタンパク質レセプター関連タンパク質8(LRP8)を含む低比重リポタンパク質レセプター、ならびにヘパリン結合性上皮成長因子様成長因子(HB-EGF)が挙げられる。本明細書における例示的なR / BBBは、トランスフェリンレセプター(T f R)である。

【0048】

「脳エフェクター本体」は、BBBを通して脳に輸送されるべき分子を表す。エフェクター本体は、典型的には、脳に送達したい特徴的な治療活性を有する。エフェクター本体には、例えばペプチド、タンパク質、及び抗体、特に脳ターゲットに対するモノクローナル抗体又はそのフラグメントなどの神経障害薬及び細胞傷害性薬物が含まれる。

10

【0049】

「一価結合性本体」は、R / BBBと特異的に一価結合様式で結合することができる分子を表す。本発明の血液脳シャトル及び/又はコンジュゲートは、單一ユニットの一価結合性本体の存在によって特徴づけられ、すなわち本発明の血液脳シャトル及び/又はコンジュゲートは、1ユニットの一価結合性本体を含む。一価結合性本体には、非限定的に、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、及びFab、Fab'、Fvフラグメントを含む抗体フラグメント、例えば単鎖Fab、scFvなどの単鎖抗体分子が挙げられる。一価結合性本体は、例えば、ファージディスプレイ又は免疫処置のような最新技術を用いて加工された足場タンパク質でありうる。一価結合性本体は、また、ペプチドでありうる。ある態様では、一価結合性本体は、CH2 - CH3 Igドメイン及び血液脳関門レセプターに対する單一Fab(scFab)を含む。scFabは、CH2 - CH3 IgドメインのC末端にリンカーによって連結されている。ある態様では、scFabはトランスフェリンレセプターに対するものである。

20

【0050】

「一価結合様式」は、一価結合性本体とR / BBBとの間の相互作用が一つの單一エピトープを経由して起こる、R / BBBへの特異的結合を表す。一価結合様式は、單一エピトープの相互作用点が原因でR / BBBの任意の二量体化/多量体化を阻止する。一価結合様式は、R / BBBの細胞内ソーティングが変化することを阻止する。

30

【0051】

用語「エピトープ」には、抗体と特異的結合する能力のある任意のポリペプチド決定基が含まれる。ある態様では、エピトープ決定基には、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、又はスルホニルなどの、化学的に活性な表面分子基(surface grouping of molecules)が含まれ、ある態様では、特異的三次元構造特性及び/又は特異的電荷特性を有しうる。エピトープは、抗体によって結合される抗原の領域である。

【0052】

「トランスフェリンレセプター」(「T f R」)は、脊椎動物での鉄取り込みに関与する、ジスルフィド結合した2個のサブユニット(見かけの分子量はそれぞれ約90,000)から構成される膜貫通糖タンパク質(分子量約180,000)である。一態様では、本明細書におけるT f Rは、例えばSchneider et al. Nature 311 :675 - 678 (1984)におけるようなアミノ酸配列を含むヒトT f Rである。

40

【0053】

本明細書に使用する「神経障害」は、CNSに影響する、及び/又はCNSに病因を有する疾患又は障害を表す。例示的なCNS疾患又は障害には、非限定的に、ニューロバチー、アミロイドーシス、ガン、眼疾患又は障害、ウイルス又は微生物感染、炎症、虚血、神経変性疾患、発作、行動障害、及びリソーム蓄積病が挙げられる。本出願のために、血液-網膜関門によって残りの身体から普通は隔離されている眼がCNSに含まれることを理解されたい。神経障害の具体例には、非限定的に、神経変性疾患(非限定的にレビー小体病、ポリオ後症候群、シャイ-ドレイガー症候群、オリーブ橋小脳萎縮症、パーキン

50

ソン病、多系統萎縮症、線条体黒質変性症、タウオパチー（非限定的にアルツハイマー病及び核上性麻痺を含む）、プリオント病（非限定的に、ウシ海綿状脳症、スクレイピー、クロイツフェルト・ヤコブ症候群、クールー、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、慢性消耗病、及び致死性家族性不眠症を含む）、球麻痺、運動ニューロン疾患、及び神経系ヘテロ変性障害（nervous system heterodegenerative disorder）（非限定的にカナバン病、ハンチントン病、神経セロイドリポフスチン症、アレキサンダー病、トゥーレット症候群、メンケス縮れ毛症候群、コケイン症候群、ハラーフォルデン・シュバッツ症候群、ラフォラ病、レット症候群、肝レンズ核変性症、レッシュ・ナイハン症候群、及びウンフェルリヒト・ルントボルク症候群を含む）、認知症（非限定的にピック病、及び脊髄小脳失調症を含む）、ガン（例えば、体内の他の場所のガンに起因する脳転移を含む、CNS及び/又は脳のガン）が挙げられる。

【0054】

「神経障害薬」は、1種又は複数の神経障害を処置する薬物又は治療薬である。本発明の神経障害薬には、非限定的に、小分子化合物、抗体、ペプチド、タンパク質、1種又は複数のCNSターゲットの天然リガンド、1種又は複数のCNSターゲットの天然リガンドの改変版、アプタマー、干渉核酸（すなわち低分子干渉RNA（siRNA）及び低分子ヘアピン型RNA（shRNA））、リボザイム、及び小分子、又は任意の前述の活性フラグメントが挙げられる。本発明の例示的な神経障害薬は本明細書に記載されており、それらには、非限定的に、抗体、アプタマー、タンパク質、ペプチド、干渉核酸及び小分子、ならびにそれ自体であるか、あるいはCNS抗原、又は非限定的にアミロイド前駆タンパク質もしくはその部分、アミロイド-セクレターゼ、セクレターゼ、タウ-シヌクレイン、パークリン、ハンチントン、DR6、プレセニリン、Apoe、神経膠腫もしくは他のCNSガンのマーカー、及びニューロトロフィンなどのターゲット分子を特異的に認識及び/又はそれに作用する（すなわち阻害、活性化、もしくは検出する）かのいずれかの任意の前述の活性フラグメントが含まれる。神経障害薬、及び処置するためにそれらを使用することができる対応する障害の非限定的な例は、脳由来神経栄養因子（BDNF）、慢性脳損傷（神経発生）、線維芽細胞成長因子2（FGF-2）、抗上皮成長因子レセプター（EGFR）抗体及び脳ガン、グリア細胞系由来神経因子（GDNF）及びパークリンソン病、脳由来神経栄養因子（BDNF）及び筋萎縮性側索硬化症、うつ、リソソーム酵素及び脳のリソソーム蓄積病、毛様体神経栄養因子（CNTF）及び筋萎縮性側索硬化症、ニューレグリン-1及び統合失調症、抗HER2抗体（例えばトラスツズマブ）及びHER2陽性ガンからの脳転移である。

【0055】

「造影剤」は、化合物の存在及び/又は位置を直接又は間接的に検出可能にする1種又は複数の性質を有するその化合物である。そのような造影剤の例には、検出を可能にするラベル本体を組み入れているタンパク質及び小分子化合物が挙げられる。

【0056】

「CNS抗原」又は「脳ターゲット」は、抗体又は小分子でターゲティングできる、脳を含むCNS中に発現される抗原及び/又は分子である。そのような抗原及び/又は分子の例には、非限定的に-セクレターゼ1（BACE1）、アミロイド（A）、上皮成長因子レセプター（EGFR）、ヒト上皮成長因子レセプター2（HER2）、タウ、アポリポタンパク質E4（Apoe4）、-シヌクレイン、CD20、ハンチントン、プリオントンパク質（PrP）、ロイシンリッチリピートキナーゼ2（LRRK2）、パークリン、プレセニリン1、プレセニリン2、セクレターゼ、デスレセプター6（DR6）、アミロイド前駆タンパク質（APP）、p75ニューロトロフィンレセプター（p75NTTR）、及びカスパーゼ6が挙げられる。一態様では、抗原はBACE1である。

【0057】

本明細書における「ネイティブな配列」のタンパク質は、タンパク質の天然変異体を含む、自然界で見られるタンパク質のアミノ酸配列を含むタンパク質を表す。本明細書に使用する用語には、その天然起源から単離されたタンパク質又はリコンビナント產生された

10

20

30

40

50

タンパク質が含まれる。

【0058】

本明細書における用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、具体的に、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2種のインタクトな抗体から形成された多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、及び（所望の生物学的活性を示す限り）抗体フラグメントを包含する。

【0059】

本明細書における「抗体フラグメント」は、抗原と結合する能力を保持するインタクトな抗体の部分を含む。抗体フラグメントの例には、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、及び Fv フラグメント；二特異性抗体；線状抗体；例えば単鎖 Fab 、 $scFv$ などの単鎖抗体分子、ならびに抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が挙げられる。「单鎖 Fab 」形式は、例えばHust M. et al. BMC Biotechnol. 2007 Mar 8;7:14に記載されている。

10

【0060】

本明細書に使用する用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を表し、すなわち、その集団を構成する個別の抗体は、モノクローナル抗体の产生中に発生しうる可能性のある変異体（そのような変異体は一般に少量存在する）を除き、同一であり、かつ／又は同じエピトープに結合する。概して種々の決定基（エピトープ）に対する種々の抗体を含むポリクローナル抗体処方と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の单一決定基に対する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンが混入していない点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の产生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明により使用されるべきモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって製造することができ、又はリコンビナントDNA法によって製造することができる（例えば米国特許第4,816,567号参照）。「モノクローナル抗体」は、また、例えばClackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)及びMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)に記載されている技法を使用してファージ抗体ライブラリーから単離することができる。本明細書におけるモノクローナル抗体の具体例には、キメラ抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体（その抗原結合性フラグメントを含む）が挙げられる。本明細書におけるモノクローナル抗体には、具体的に、重鎖及び／又は軽鎖の部分が、特定の種から得られた又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同であるものの、一方で鎖（一つ又は複数）の残りが、別の種から得られた又は別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、ならびに所望の生物学的活性を示す限りそのような抗体のフラグメントが挙げられる（米国特許第4,816,567号；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。本明細書における関心対象のキメラ抗体には、非ヒト靈長類（例えばヒヒ、アカゲザル又はカニクイザルなどの旧世界ザル）由来の可変ドメイン抗原結合性配列及びヒト定常領域配列を含む「靈長類化」抗体が挙げられる（米国特許第5,693,780号）。

20

【0061】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ抗体である。大部分は、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有する、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト靈長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域由来残基によって置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）の残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。そのうえ、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体に見られない残基を含みうる。これらの改変は、さらに、抗体の性能を精密化するために加えられる。一般にヒト化抗体は、超可変領域の全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンの超可変領域に対応し、上

30

40

50

記のような F R 置換（一つ又は複数）を除き F R の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列の F R である、少なくとも 1 個、典型的には 2 個の可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、場合によっては、免疫グロブリン定常領域、典型的にはヒト免疫グロブリン定常領域の少なくとも部分も含む。さらなる詳細については、Jones et al, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature* 332:323-329 (1988); 及び Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992) を参照されたい。

【 0 0 6 2 】

本明細書における「ヒト抗体」は、ヒト B 細胞から入手可能な抗体のアミノ酸配列構造に対応するアミノ酸配列構造を含むヒト抗体であり、それには、ヒト抗体の抗原結合性フラグメントが含まれる。そのような抗体は、非限定的に、免疫処置したときに内因性免疫グロブリンの產生なしにヒト抗体を產生する能力があるトランスジェニック動物（例えばマウス）による產生（例えば Jakobovits et al, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al, *Nature*, 362:255-258 (1993); Brugermann et al, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); ならびに米国特許第 5,591,669 号、同第 5,589,369 号及び同第 5,545,807 号参照））；ヒト抗体又はヒト抗体フラグメントを発現しているファージディスプレイからの選択（例えば McCafferty et al, *Nature* 348:552-553 (1990); Johnson et al, *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993); Clackson et al, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991); Griffith et al, *EMBO J.* 12:725-734 (1993)；米国特許第 5,565,332 号及び同第 5,573,905 号参照）；in vitro 活性化 B 細胞による作製（米国特許第 5,567,610 号及び同第 5,229,275 号参照）；及びヒト抗体產生ハイブリドーマからの単離を含む多様な技法により同定又は製造することができる。

【 0 0 6 3 】

本明細書における「多重特異性抗体」は、少なくとも 2 種の異なるエピトープに結合特異性を有する抗体である。例示的な多重特異性抗体は、R / B B B 及び脳抗原の両方と結合しうる。多重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体フラグメント（例えば F (a b') 2 二重特異性抗体）として調製することができる。2、3 個、又はそれよりも多い（例えば 4 個の）機能性抗原結合部位を有する加工抗体も考えられている（例えば、米国特許出願公開第 2002/0004587 A1 号、Miller et al. 参照）。多重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体フラグメントとして調製することができる。

【 0 0 6 4 】

本明細書における抗体には、変化した抗原結合活性又は生物学的活性を有する「アミノ酸配列変異体」が挙げられる。そのようなアミノ酸変化の例には、抗原に対する親和性が増強した抗体（例えば「親和性成熟」抗体）、及び Fc 領域が存在するならば、変化した Fc 領域、例えば変化した（増加もしくは減少した）抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）及び／もしくは補体依存性細胞傷害作用（CDC）を有する抗体（例えば、国際公開公報第 00/42072 号、Presta, L. 及び国際公開公報第 99/51642 号、Iduosiogi e ら参照）；ならびに／又は増大もしくは減少した血清半減期（例えば国際公開公報第 00/42072 号、Presta, L. 参照）を有する抗体が挙げられる。

【 0 0 6 5 】

「親和性改変された変異体」は、親和性を変化（増加又は減少）させる、親抗体（例えば親キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体）の一つ又は複数の置換された超可変領域又はフレームワーク残基を有する。一態様では、さらなる発展のために選択された、結果として生じた変異体（1 種又は複数）は、本発明により R / B B B に対して減少した親和性を有する。そのような置換変異体を作製するための好都合な方法は、ファージディスプレイを使用する。簡潔には、いくつかの超可変領域部位（例えば 6 ~ 7 個の部位）は、各部位に可能性のあるアミノ置換を作製するように突然変異される。このように作製された抗体変異体は、纖維状ファージ粒子から、各粒子内にパッケージングされた M13 の遺伝子 I II 産物との融合体として一価的にディスプレイされる。次に、ファージディスプレイ

10

20

30

40

50

された変異体は、それらの生物学的活性（例えば結合親和性）についてスクリーニングされる。改変のための候補となる超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング突然変異誘発を行って、抗原結合に顕著に寄与する超可変領域残基を同定することができる。代替的又は追加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とそのターゲットとの間の接觸点を同定することが有益でありうる。そのような接觸残基及び隣接残基は、本明細書において作り上げられた技法による置換のための候補である。そのような変異体が作製された後に、変異体のパネルがスクリーニングに供され、変化した親和性を有する抗体をさらなる成長のために選択することができる。

【0066】

本明細書における抗体は、存在するならば Fc 領域に結合している任意の糖質が変化された「グリコシル化変異体」でありうる。例えば、抗体の Fc 領域に結合しているフコースを欠如する成熟糖質構造を有する抗体は、米国特許出願公開第 2003/0157108 号 (Presta, L.) に記載されている。US2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) も参照されたい。抗体の Fc 領域に結合している糖質を二等分する N-アセチルグルコサミン (GalNAc) を有する抗体は、国際公開公報第 2003/011878 号 (Jean-Mairetら) 及び米国特許第 6,602,684 号 (Umanaら) に参照されている。抗体の Fc 領域に結合しているオリゴ糖中に少なくとも 1 個のガラクトース残基を有する抗体は、国際公開公報第 1997/30087 号 (Patelら) に報告されている。その Fc 領域に結合している糖質が変化された抗体に関する国際公開公報第 1998/58964 号 (Raju, S.) 及び国際公開公報第 1999/22764 号 (Raju, S.) も参照されたい。グリコシル化が改変された抗体を記載している US2005/0123546 (Umanaら) も参照されたい。本明細書に使用する場合の用語「超可変領域」は、抗原結合を担う抗体アミノ酸残基を表す。超可変領域は、「相補性決定領域」又は「CDR」由来のアミノ酸残基（例えば軽鎖可変ドメイン中の残基 24～34 (L1)、50～56 (L2) 及び 89～97 (L3)）ならびに重鎖可変ドメイン中の 31～35 (H1)、50～65 (H2) 及び 95～102 (H3) ; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) ）ならびに / 又は「超可変ループ」由来の残基（例えば軽鎖可変ドメイン中の残基 26～32 (L1)、50～52 (L2) 及び 91～96 (L3)）ならびに重鎖可変ドメイン中の 26～32 (H1)、53～55 (H2) 及び 96～101 (H3) ; Chothia and Leslie J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) ）を含む。「フレームワーク」又は「FR」残基は、本明細書定義の超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0067】

「完全長抗体」は、抗原結合性可変領域に加えて軽鎖定常ドメイン (CL) 及び重鎖定常ドメイン、CH1、CH2 及び CH3 を含むものである。定常ドメインは、ネイティブな配列の定常ドメイン（例えばヒトのネイティブな配列の定常ドメイン）又はそのアミノ酸配列変異体でありうる。

【0068】

「ネイキッドな抗体」は、細胞傷害性本体、ポリマー、又は放射性ラベルなどの異種分子とコンジュゲーションしていない（本明細書定義の）抗体である。

【0069】

抗体の「エフェクター機能」は、抗体の Fc 領域（ネイティブな配列の Fc 領域又はアミノ酸配列変異型 Fc 領域）に起因しうる生物学的活性を表す。抗体のエフェクター機能の例には、C1q 結合性、補体依存性細胞傷害作用 (CDC)、Fc レセプター結合性、抗体依存性細胞傷害作用 (ADCC) などが挙げられる。一態様では、本明細書における抗体は、本質的にエフェクター機能を欠如する。

【0070】

用語「抗体依存性細胞傷害作用 (ADCC)」は、エフェクター細胞の存在下での抗体によるヒトターゲット細胞の溶解を表す。用語「補体依存性細胞傷害作用 (CDC)」は、大部分の IgG 抗体サブクラスの Fc 部分への補体因子 C1q の結合によって開始され

10

20

30

40

50

る過程を意味する。抗体へのC1qの結合は、いわゆる結合部位での定義されたタンパク質-タンパク質相互作用によって引き起こされる。そのようなFc部分の結合部位は、技術の現状において公知である。そのようなFc部分の結合部位は、例えば、アミノ酸L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331、及びP329(KabatのEUインデックスによる番号付け)によって特徴づけられる。サブクラスIgG1、IgG2、及びIgG3の抗体は、通常、C1q及びC3の結合を含む補体活性化を示し、一方で、IgG4は補体系を活性化せず、C1q及び/又はC3と結合しない。

【0071】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、完全長抗体は異なる「クラス」に割り付けることができる。5個の主要なクラスの完全長抗体、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらのいくつかは、さらに「サブクラス」(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、及びIgA2に類別することができる。異なるクラスの抗体に対応する重鎖定常ドメインは、それぞれγ、δ、ε、η、及びμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元配置は、周知である。本明細書に使用する用語「リコンビナント抗体」は、その抗体をコードする核酸を含むリコンビナントホスト細胞によって発現される抗体(例えばキメラ、ヒト化、もしくはヒト抗体、又はその抗原結合フラグメント)を表す。リコンビナント抗体を産生するための「ホスト細胞」の例には、(1)哺乳動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、COS細胞、骨髄腫細胞(YO細胞及びNSO細胞を含む)、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、HeLa細胞及びVero細胞；(2)昆虫細胞、例えば、sf9、sf21及びTn5；(3)植物細胞、例えばNicotiana属に属する植物(例えばNicotiana tabacum)；(4)酵母細胞、例えばSaccharomyces属(例えばSaccharomyces cerevisiae)又はAspergillus属(例えばAspergillus niger)に属するもの；(5)細菌細胞、例えばEscherichia coli細胞又はBacillus subtilis細胞などが挙げられる。

【0072】

本明細書に使用する「特異的に結合性」又は「に特異的に結合する」は、抗原に選択的又は優先的に結合する抗体を表す。結合親和性は、一般に、スキヤチャード解析又は表面プラズモン共鳴技法(例えばBIACORE(登録商標)を使用)などの標準アッセイを用いて決定される。

【0073】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて参照抗体からの抗原への結合を50%以上遮断する抗体を表し、逆に、参照抗体は、競合アッセイにおいて抗体からの抗原への結合を50%以上遮断する。

【0074】

本明細書に使用する用語「細胞傷害性薬物」は、細胞機能を阻害もしくは抑制する、及び/又は細胞の死滅もしくは破壊を引き起こす物質を表す。細胞傷害性薬物には、非限定的に放射性同位体(例えばAt211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212及びLuの放射性同位体)；化学療法剤又は化学療法薬(例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド(ビンクリスチン、ビンプラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシリ、ダウノルビシン又は他のインターラーコート剤)；成長阻害剤；核酸分解酵素などの酵素及びそのフラグメント；抗生物質；細菌、真菌、植物又は動物起源の小分子毒素又は酵素活性毒素などの毒素(そのフラグメント及び/又は変異体を含む)が挙げられる。

【0075】

薬剤、例えば薬学的製剤の「有効量」は、所望の治療成績又は予防成績を達成するために必要な薬用量及び時間で有効な量を表す。

【0076】

10

20

30

40

50

本明細書における用語「F c 領域」は、定常領域の少なくとも部分を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。F c 領域は、免疫グロブリンのC H 2 及びC H 3 ドメインを含む。この用語には、ネイティブな配列のF c 領域及び変異型F c 領域が含まれる。一態様では、ヒトI g G重鎖F c 領域は、C y s 2 2 6 又はP r o 2 3 0 から重鎖カルボキシル末端に及ぶ。しかし、F c 領域のC末端リシン(L y s 4 4 7)は、存在する場合もあり、存在しない場合もある。本明細書において特に明記しない限り、F c 領域又は定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載のように、E Uインデックスとも呼ばれるE U番号付けシステムに従う。「フレームワーク」又は「F R」は、超可変領域(H V R)の残基以外の可変ドメイン残基を表す。可変ドメインのF Rは、一般に、4種のF R ドメイン、すなわちF R 1、F R 2、F R 3、及びF R 4から成る。したがって、H V R及びF R配列は、一般に、V H(又はV L)中の以下の配列中に出現する：F R 1 - H 1(L 1) - F R 2 - H 2(L 2) - F R 3 - H 3(L 3) - F R 4。

【0077】

本明細書に使用する用語「C H 2 - C H 3 I g 本体」は、免疫グロブリンC H 2 又はC H 3 ドメイン由来のタンパク質本体を表す。「C H 2 - C H 3 I g 本体」は、二量体を形成している2個の「C H 2 - C H 3」ポリペプチドを含む。免疫グロブリンは、I g G、I g A、I g D、I g E 又はI g M でありうる。一態様では、I g G免疫グロブリン由来のC H 2 - C H 3 I g 本体は、本明細書において「C H 2 - C H 3 I g G 本体」と呼ばれる。この用語には、C H 2 - C H 3 ドメインのネイティブな配列及び変異型C H 2 - C H 3 ドメインが含まれる。一態様では、「C H 2 - C H 3 I g 本体」は、C y s 2 2 6 又はP r o 2 3 0 から重鎖C末端に及ぶヒト重鎖C H 2 - C H 3 I g G ドメイン由来である。しかし、F c 領域のC末端リシン(L y s 4 4 7)は、存在する場合も、しない場合もある。本明細書において特に明記しない限り、C H 2 - C H 3 ドメイン領域又は定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されているように、E Uインデックスとも呼ばれるE U付番システムに従う。

【0078】

「コンジュゲート」は、非限定的にラベル、神経障害薬又は細胞傷害性薬物を含む1種又は複数の異種分子にコンジュゲーションされた本発明の融合タンパク質である。

【0079】

本明細書に使用する「リンカー」は、本発明の血液脳関門シャトル及び/又は融合タンパク質及び/又はコンジュゲートの異なる本体を共有結合させる化学リンカー又は単鎖ペプチドリンカーを表す。リンカーは、例えば脳エフェクター本体を一価結合性本体に連結する。例えば、一価結合性本体がC H 2 - C H 3 I g 本体及び血液脳関門レセプターに対するs F a b を含むならば、リンカーは、s F a b をC H 3 - C H 2 I g 本体のC末端に連結する。一価結合性本体に脳エフェクター本体を連結しているリンカー(第1のリンカー)及びC H 2 - C H 3 I g ドメインのC末端にs F a b を連結しているリンカー(第2のリンカー)は、同一又は異なる場合がある。

【0080】

1~20個のアミノ酸がペプチド結合により繋がったものから成る単鎖ペプチドリンカーを使用することができる。ある他の態様では、アミノ酸は、20種の天然アミノ酸より選択される。ある他の態様では、1種又は複数のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン及びリシンより選択される。他の態様では、リンカーは化学リンカーである。ある態様では、該リンカーは、少なくとも25アミノ酸長、好ましくは32~50アミノ酸長のアミノ酸配列を有する単鎖ペプチドである。一態様では、該リンカーは(G x S)ⁿ [但し、G = グリシン、S = セリン(x = 3, n = 8, 9もしくは10、及びm = 0, 1, 2もしくは3)又は(x = 4及びn = 6, 7もしくは8、及び

$m = 0, 1, 2$ もしくは 3] であって、好ましくは $x = 4, n = 6$ 又は 7 及び $m = 0, 1, 2$ 又は 3 であり、より好ましくは $x = 4, n = 7$ 、及び $m = 2$ である。一態様では、該リンカーは $(G_4S)_4$ (配列番号 17) である。一態様では、該リンカーは $(G_4S)_6G_2$ (配列番号 13) である。

【0081】

コンジュゲーションは、多様な化学リンカーを使用して行うことができる。例えば、一価結合性本体又は融合タンパク質、及び脳エフェクター本体は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(S M C C)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミダートH C 1など)、活性エステル(ジスクシンイミジルスペラートなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアナート(トルエン2,6-ジイソシアナートなど)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)のような多様な二官能性タンパク質カップリング剤を使用してコンジュゲーションすることができる。リンカーは、脳への送達時にエフェクター本体の放出を促進する「切断可能なリンカー」でありうる。例えば、酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー(Chari et al, Cancer Res. 52: 127-1 31 (1992); 米国特許第5,208,020号)を使用することができる。

【0082】

共有結合的コンジュゲーションは、直接的又はリンカーを介してのいずれかでありうる。ある態様では、直接コンジュゲーションは、タンパク質融合体の構築による(すなわち、R / B B Bに対する一価結合性本体及びエフェクター本体をコードしている2種の遺伝子を遺伝子融合し、単一タンパク質として発現させることによる)。ある態様では、直接コンジュゲーションは、R / B B Bに対する一価結合性本体の二つの部分の一つにある反応基と、脳エフェクター本体上の対応する基又はアクセプターとの間の共有結合の形成による。ある態様では、直接コンジュゲーションは、適切な条件下でコンジュゲーションされるべき他の分子と共有結合を形成する反応基(非限定的な例として、スルフヒドリル基又はカルボキシル基)を含むように、コンジュゲーションされるべき2個の分子の一方を改変(すなわち遺伝子改変)することによる。非限定的な一例として、所望の反応基(すなわちシステイン残基)を有する分子(すなわちアミノ酸)を、例えばR / B B B抗体に対する一価結合性本体に導入し、神経薬と共にジスルフィド結合を形成させることができる。タンパク質への核酸の共有結合的コンジュゲーションの方法も、当技術分野において公知である(すなわち光架橋、例えばZatsepin et al. Russ. Chem. Rev. 74: 77-95 (2005)参照)。コンジュゲーションは、また、多様なリンカーを使用して行うことができる。例えば、一価結合性本体及びエフェクター本体は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(S M C C)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミダートH C 1など)、活性エステル(ジスクシンイミジルスペラートなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアナート(トルエン2,6-ジイソシアナートなど)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)などの多様な二官能性タンパク質カップリング剤を使用してコンジュゲーションすることができる。ペプチド結合によって繋がった1~20個のアミノ酸から成るペプチドリンカーも使用することができる。そのようなある態様では、アミノ酸は、20種の天然アミノ酸より選択される。他のそのようなある態様では、1種又は複数のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン及びリシンより選択される。リンカーは、脳に送達されるとエフ

10

20

30

40

50

エクター本体の放出を促進する「切断可能なリンカー」でありうる。例えば、酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー (Chari et al, Cancer Res. 52: 127-131 (1992); 米国特許第5,208,020号) を使用することができる。

【0083】

「ラベル」は、本明細書において融合タンパク質と連結された、検出又は画像法のために使用されるマーカーである。そのようなラベルの例には、放射性ラベル、フルオロフォア、クロモフォア、又は親和性タグが挙げられる。一態様では、ラベルは、医用画像法のために使用される放射性ラベル、例えば¹¹¹Indiumもしくは¹²³I、又はこれもヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、鉄などのような核磁気共鳴 (NMR) 画像法 (磁気共鳴画像法 (MRI) としても知られている) のためのスピルラベルである。「個体」又は「対象」は哺乳類である。哺乳類には、非限定的に、家畜動物 (例えばウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ)、靈長類 (例えばヒト及びサルなどの非ヒト靈長類)、ウサギ、及びげっ歯類 (例えばマウス及びラット) が挙げられる。ある態様では、個体又は対象はヒトである。

【0084】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から分離された抗体である。いくつかの態様では、抗体は、例えば電気泳動 (例えばSDS-PAGE、等電点電気泳動 (IEF)、キャピラリー電気泳動) 又はクロマトグラフィー (例えばイオン交換又は逆相HPLC) により決定するとき95%又は99%よりも大きい純度で精製される。抗体純度の判定方法の総説については、例えばFlatman et al, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007) を参考されたい。

【0085】

用語「添付文書」は、治療用処方の販売パッケージに慣例上入れられる説明書であって、そのような治療用処方の使用に関する適応、用法、用量、投与、併用療法、禁忌及び/又は警告についての情報を含む説明書を表すために使用される。

【0086】

用語「薬学的製剤」は、その中に含有される活性成分の生物学的活性を有効にさせるような剤形の処方であって、その製剤が投与される対象に容認できないほど有毒な追加的な成分を含有しない処方を表す。

【0087】

「薬学的に許容されうる担体」は、薬学的製剤中の活性成分以外の成分であって、対象に無毒の成分を表す。薬学的に許容されうる担体には、非限定的に、緩衝剤、賦形剤、安定化剤、又は保存料が挙げられる。

【0088】

本明細書に使用する「処置」 (及び「処置する」又は「処置すること」などのその文法的変形) は、処置される個体の自然経過を変えようとする臨床的介入を表し、予防のため、又は臨床病理の経過中のいずれかに行うことができる。望ましい処置効果には、非限定的に、疾患の発生又は再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接又は間接的病理学的帰結の縮小、転移の予防、疾患の進行速度の低下、病状の改善又は緩和、及び寛解又は予後改善が挙げられる。いくつかの態様では、本発明の抗体は、疾患の発生を遅延又は疾患の進行を減速するために使用される。

【0089】

組成物及び方法

本発明の方法及び製造品は、R/BBBに結合する血液脳関門シャトル及び/又は融合タンパク質を使用又は組み入れる。一価結合性本体の產生又はスクリーニングのために使用されるべきR/BBB抗原は、例えば所望のエピトープを含む可溶型又はその部分 (例えば細胞外ドメイン) でありうる。代替的又は追加的に、細胞表面に BBB-R を発現している細胞は、一価結合性本体を作製又はスクリーニングするために使用することができ

10

20

30

40

50

る。一価結合性本体を作製するために有用な他の形態の R / B B B は、当業者に明らかであろう。本明細書における R / B B B の例には、トランスフェリンレセプター (T f R) 、インスリンレセプター、インスリン様成長因子レセプター (I G F - R) 、低比重リボタンパク質レセプター関連タンパク質 1 (L R P 1) 及び L R P 8 、ならびにヘパリン結合性上皮成長因子様成長因子 (H B - E G F) が挙げられる。

【 0 0 9 0 】

本発明によると、R / B B B に対する「一価結合性」本体（例えば T f R に対する一価結合性本体）は、そのような一価結合性本体が C N S (例えは脳) の取り込みの改善を示すことを実証している本明細書におけるデータに基づき選択される。そのような結合性本体を同定するために、非限定的にスキヤッチャードアッセイ及び表面プラズモン共鳴技法（例えは BIACORE (登録商標) 使用）ならびに本明細書記載の in vivo 研究を含む、一価結合様式を測定するための多様なアッセイが利用できる。

10

【 0 0 9 1 】

したがって、本発明は、血液脳関門を通して例えは神経障害薬などの脳エフェクター本体を輸送するために有用な一価結合性本体の製造方法であって、それが R / B B B に対して一価結合様式を有することから、R / B B B に対する一価結合性部分のパネルから一価結合性本体を選択することを含む方法を提供する。一価結合様式は、レセプターの正常な細胞内ソーティングを妨害しないことによって、ある R / B B B について効率的な B B B 通過を確実にする。

【 0 0 9 2 】

20

ニューロパチー障害のために、非限定的に麻薬性 / オピオイド鎮痛薬（すなわちモルヒネ、フェンタニル、ヒドロコドン、メペリジン、メサドン、オキシモルフォン、ペントゾシン、プロポキシフェン、トラマドール、コデイン及びオキシコドン）、非ステロイド系抗炎症薬 (N S A I D) (すなわちイブプロフェン、ナプロキセン、ジクロフェナク、ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェン、フルビプロフェン、インドメタシン、ケトロラク、メフェナム酸、メロキシカム、ナブメトン、オキサプロジン、ピロキシカム、スリングダク、及びトルメチン) 、コルチコステロイド (すなわちコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、デキサメタゾン、メチルプレドニゾロン及びトリアムシノロン) 、抗片頭痛薬 (すなわちスマトリプチン (sumatriptin)) 、アルモトリプタン、フロバトリプタン、スマトリプタン、リザトリプタン、エレトリプタン、ゾルミトリプタン、ジヒドロエルゴタミン、エレトリプタン及びエルゴタミン) 、アセトアミノフェン、サリチラート (すなわちアスピリン、サリチル酸コリン、サリチル酸マグネシウム、ジフルニサル、及びサルサラート) 、抗けいれん薬 (すなわちカルバマゼピン、クロナゼパム、ガバペンチン、ラモトリジン、プレガバリン、チアガビン、及びトピラマート) 、麻酔薬 (すなわちイソフルラン、トリクロロエチレン、ハロタン、セボフルラン、ベンゾカイン、クロロブロカイン、コカイン、シクロメチカイン、ジメトカイン、プロポキシカイン、プロカイン、ノボカイン、プロパラカイン、テトラカイン、アルチカイン、ブピバカイン、カルチカイン、シンコカイン、エチドカイン、レボブピバカイン、リドカイン、メピバカイン、ビペロカイン、ブリロカイン、ロピバカイン、トリメカイン、サキシトキシン及びテトロドトキシン) 、及び c o x - 2 阻害剤 (すなわちセレコキシブ、ロフェコキシブ、及びバルデコキシブ) を含む鎮痛薬である神経薬を選択することができる。めまいを併発したニューロパチー障害のために、非限定的にメクリジン、ジフェンヒドラミン、プロメタジン及びジアゼパムを含む抗めまい薬である神経薬を選択することができる。悪心を併発したニューロパチー障害のために、非限定的にプロメタジン、クロルプロマジン、プロクロルペラジン、トリメトベンズアミド、及びメトクロプラミドを含む制吐薬である神経薬を選択することができる。神経変性疾患のために、成長ホルモン又は神経栄養因子である神経薬を選択することができ；例には、非限定的に脳由来神経栄養因子 (B D N F) 、神経成長因子 (N G F) 、ニューロトロフィン - 4 / 5 、線維芽細胞成長因子 (F G F) - 2 及び他の F G F 、ニューロトロフィン (N T) - 3 、エリスロポエチン (E P O) 、肝細胞成長因子 (H G F) 、上皮成長因子 (E G F) 、形質転換成長因子 (T G F) - 、 T G F 40

30

40

50

- 、血管内皮成長因子(VEGF)、インターロイキン-1レセプター拮抗薬(IL-1ra)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、グリア由来神経栄養因子(GDNF)、ニュールツリン、血小板由来成長因子(PDGF)、ヘレグリン、ニューレグリン、アルテミン(artemin)、パーセフィン、インターロイキン、グリア細胞系由来神経栄養因子(GFR)、顆粒球コロニー刺激因子(CSF)、顆粒球-マクロファージ-CSF、ネットリン、カーディオトロフィン-1、ヘッジホッグ、白血病抑制因子(LIF)、ミッドカイン、ブレイオトロフィン、骨形成タンパク質(BMP)、ネトリン、サポシン、セマフォリン、及び幹細胞因子(SCF)が挙げられる。ガンのために、化学療法剤である神経薬を選択することができる。化学療法剤の例には、チオテバ及びCYTOXAN(登録商標)(シクロホスファミド(cyclophosphamide))などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンなどのアルキルスルホナート；ベンゾドパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドパ(meturedopa)、及びウレドパ(uredopa)などのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphamide)及びトリメチロロメラミンを含むエチレンイミン及びメチラメラミン(methylamelamine)；アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン)；-9-テトラヒドロカンナビノール(ドロナビノール、MARINO L(登録商標))；-ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン(合成アナログであるトポテカン(HYCANTIN(登録商標)を含む)、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン(scopolectin)、及び9-アミノカンプトテシン)；ブリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；デュオカルマイシン(合成アナログKW-2189及びCB1-TM1を含む)；エリュテロビン；パンクラスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(sarcodictyin)；スponジスタチン(spongistatin)；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン(mechlorethamne)、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビキン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターなどのナイトロジエンマスター；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムスチン(ranimustine)などのニトロソウレア(nitrosurea)；エンジイン抗生物質などの抗生物質(例えばカリチアマイシン、特にカリチアマイシンI I及びカリチアマイシンI I(例えばAgnew, Chem Intl. Ed. Engl, 33: 183-186(1994)参照)；ダイネミシンAを含むダイネミシン；エスペラミシン；ならびにネオカルチノスタチンクロモフォア及び関連色素タンパク質エンジイン抗生物質クロモフォア)、アクラシノマイシン(aclacinomycin)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン(carabacin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン(chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)(ドキソルビシン)(モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシン及びデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシンCなどのマイトイマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキサート及び5-フルオロウラシル(5-FU)などの代謝拮抗剤；デノブテリン、メトトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサートなどの葉酸アナログ；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリンアナログ；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフルール、シタラビン、

ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなどのピリミジンアナログ；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤 (anti-adrenal)；フォリン酸 (frolinic acid) などの葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトラキサート (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルチン；ジアジクオン；エフロールニチン (eflornithine)；酢酸エリプチニウム (elliptinium acetate)；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン (lonidainine)；メイタンシンなどのメイタンシノイド及びアンサミトシン (ansamitocin)；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール (mopidanmol)；ニトラクリン (nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；ブロカルバジン；PSK (登録商標) (多糖複合体) (JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン；リゾキシン (rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2" - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン (特に T - 2 毒素、ベラクリン (verracin) A、ロリジン A 及びアンゲイジン)；ウレタン；ビンデシン (ELDISINE (登録商標)、F I L D E S I N (登録商標))；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール (mitolactol)；ピポブロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド (「Ara - C」)；チオテパ；タキソイド (例えば、TAXOL (登録商標) (パクリタキセル) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE (商標) (クレモフォール不含、パクリタキセルのアルブミン加工ナノパーティクル製剤) (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois)、及びTAXOTERE (登録商標) (ドキセタキセル (doxetaxel)) (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロラムブシル (chlorambucil)；ゲムシタビン (GEMZAR (登録商標))；6-チオグアニン；メルカブトブリン；メトレキサート；シスプラチン及びカルボプラチニンなどの白金アナログ；ビンプラスチン (VELBAN (登録商標))；白金；エトポシド (VP - 16)；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン (ONCOVIN (登録商標))；オキサリプラチニン；ロイコボリン (leucovovin)；ビノレルビン (vinorelbine) (NAVELBINE (登録商標))；ノバントロン (novantrone)；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノブテリン；イバンドロン酸塩；トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン (difluoromethylornithine) (DMFO)；レチノイン酸などのレチノイド；カペシタビン (XELODA (登録商標))；上記の任意の薬学的に許容されうる塩、酸又は誘導体；ならびに CHOP (シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、及びプレドニゾロンの併用療法の略語)、及び FOLFOX (オキサリプラチニン (ELOXATIN (商標)) を 5-FU 及びロイコボリンと組み合わせた処置方式の略語)などの上記の 2 種以上の組み合わせが挙げられる。

【0093】

ガンの成長を促進することができるホルモンの効果を調節、低減、遮断、又は阻害するように作用し、多くの場合に全身性又は全身処置の形態である抗ホルモン剤も、この化学療法剤の定義に含まれる。それらは、ホルモン自体でありうる。例には、例えば、タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標)) (タモキシフェン) を含む)、EVISTA (登録商標) ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン (keoxifene)、LY 117018、オナブリストン、及びFARESTON (登録商標) (トレミフェン) を含む抗エストロゲン薬及び選択的エストロゲンレセプターモデュレーター (SERM)；抗プロゲステロン薬；エストロゲンレセプターダウンレギュレーター (ERD)；卵巣を抑制又は活動停止にするように機能する薬剤、例えば、LUPRON (登録商標) 及びELIGARD (登録商標) (酢酸ロイプロリド) などの黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アゴニスト、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテレリン (tripeterelin)；フルタミド、ニルタミド及びビカルタミドなどの他の抗アンドロゲン薬；ならびに例えば 4(5)-イミダゾール、アミドグルテチミド、MEGASE (登録商標) 50

）（酢酸メゲストロール）、AROMASIN（登録商標）エキセメスタン、ホルメスタン（form estanide）、ファドロゾール、RIVISOR（登録商標）（ボロゾール）、FEMARA（登録商標）（レトロゾール）、及びARIMIDEX（登録商標）（アナストロゾール）などの、副腎におけるエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害薬が挙げられる。加えて、化学療法剤のそのような定義には、クロドロネート（例えばBONEFOS（登録商標）又はOSTAC（登録商標））、DIDROCAL（登録商標）（エチドロネート）、N E - 5 8 0 9 5 、ZOMETA（登録商標）（ゾレドロン酸／ゾレドロネート）、FOSAMAX（登録商標）（アレンドロネート）、AREDIA（登録商標）（パミドロネート）、SKELID（登録商標）（チルドロネート）、又はACTONEL（登録商標）（リセドロネート）などのビスホスホネート；及びトロキサシタビン（1，3 - ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、例えばP K C - 、R a f 、H - R a s 、及び上皮成長因子レセプター（E G F - R ）などの、異常な細胞増殖に結びつけられるシグナル伝達経路での遺伝子の発現を阻害するもの；THERATOPE（登録商標）ワクチン及び遺伝子治療ワクチンなどのワクチン、例えばALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、及びVAXID（登録商標）ワクチン；LURTOTECAN（登録商標）（トポイソメラーゼ1阻害剤）；ABARELLX（登録商標）（r m R H ）；ラパチニブジトシレート（G W 5 7 2 0 1 6 としても公知のE r b B - 2 及びE G F R 二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤）；ならびに上記の任意の薬学的に許容されうる塩、酸又は誘導体が挙げられる。
10

【0094】

20

ガンの治療又は予防のための神経薬として選択することができる別の群の化合物は、抗ガン免疫グロブリン（非限定的にトラスツズマブ、ベバシズマブ、アレムツズマブ（alem tuxumab）、セツキシマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、イブリツモマブチウキセタン、パニツムマブ及びリツキシマブを含む）である。場合により、非限定的に放射性ラベルを有するトシツモマブを含む、毒性ラベルと一緒にになった抗体を、所望の細胞（すなわちガン細胞）をターゲティングして殺滅するために使用することができる。

【0095】

30

眼疾患又は眼障害のために、抗血管新生眼科薬（すなわちベバシズマブ、ラニビズマブ及びペガブタニブ）、眼科用緑内障薬（すなわちカルバコール、エピネフリン、臭化デメカリウム、アプラクロニジン、ブリモニジン、ブリンゾラミド、レボブノロール、チモロール、ベタキソロール、ドルゾラミド、ビマトプロスト、カルテオロール、メチプラノロール、ジビベフリン、トラボプロスト及びラタノプロスト）、カルボニックアンヒドライゼ阻害薬（すなわちメタゾラミド及びアセタゾラミド）、眼科用抗ヒスタミン薬（すなわちナファゾリン、フェニレフリン及びテトラヒドロゾリン）、眼用ルブリカント（ocular lubricant）、眼科用ステロイド（すなわちフルオロメトロン、プレドニゾロン、ロテブレドノール、デキサメタゾン、ジフルプレドナート、リメキソロン、フルオシノロン、メドリゾン及びトリアムシノロン）、眼科用麻酔薬（すなわちリドカイン、プロパラカイン及びテトラカイン）、眼科用抗感染症薬（すなわちレボフロキサシン、ガチフロキサシン、シプロフロキサシン、モキシフロキサシン（moxifloxacin）、クロラムフェニコール、バシトラシン／ポリミキシンb、スルファセタミド、トブラマイシン、アジスロマイシン、ベシフロキサシン、ノルフロキサシン、スルフィソキサゾール、ゲンタマイシン、イドクスウリジン、エリスロマイシン、ナタマイシン、グラミシジン、ネオマイシン、オフロキサシン、トリフルリジン（trifluridine）、ガンシクロビル、ビダラビン）、眼科用抗炎症薬（すなわちネバフェナク、ケトロラク、フルビプロフェン、スプロフェン、シクロスボリン、トリアムシノロン、ジクロフェナク及びプロムフェナク）、及び眼科用抗ヒスタミン薬又はうっ血除去薬（すなわちケトチフェン、オロパタジン、エピナスチン、ナファゾリン、クロモリン、テトラヒドロゾリン、ペミロラスト、ベポタスチン、ナファゾリン、フェニレフリン、ネドクロミル、ロドキサミド（Iodox amide）、フェニレフリン、エメダスチン及びアゼラスチン）である神経薬を選択することができる。発作障害のために、非限定的にバルビツレート系抗けいれん薬（すなわちプリミドン、メタルビタール、
40

50

メホバルビタール、アロバルビタール、アモバルビタール、アプロバルビタール、アルフェナール (alphenal) 、バルビタール、プラロバルビタール及びフェノバルビタール) 、ベンゾジアゼピン系抗けいれん薬 (すなわちジアゼパム、クロナゼパム、及びロラゼパム) 、カルバメート系抗けいれん薬 (すなわちフェルバメート) 、カルボニックアンヒドラーーゼ阻害薬系抗けいれん薬 (すなわちアセタゾラミド、トピラマート及びゾニサミド) 、ジベンザゼピン系抗けいれん薬 (すなわちルフィナマイド、カルバマゼピン、及びオクスカルバゼピン) 、脂肪酸誘導体系抗けいれん薬 (すなわちジバルプロエクス及びバルプロ酸) 、 - アミノ酪酸アナログ (すなわちブレガバリン、ガバペンチン及びビガバトリン) 、 - アミノ酪酸再取り込み阻害薬 (すなわちチアガビン) 、 - アミノ酪酸トランスアミナーゼ阻害薬 (すなわちビガバトリン) 、ヒダントイント系抗けいれん薬 (すなわちフェニトイント、エトトイント、ホスフェニトイント及びメフェニトイント) 、その他の抗けいれん薬 (すなわちラコサミド及び硫酸マグネシウム) 、プロゲスチン (すなわちプロゲステロン) 、オキサゾリジンジオン系抗けいれん薬 (すなわちパラメタジオン及びトリメタジオン) 、ピロリジン系抗けいれん薬 (すなわちレベチラセタム) 、スクシンイミド抗けいれん薬 (すなわちエトスクシミド及びメトスクシミド) 、トリアジン系抗けいれん薬 (すなわちラモトリジン) 、及び尿素系抗けいれん薬 (すなわちフェナセミド及びフェネトライド) を含む抗けいれん薬又は抗てんかん薬である神経薬を選択することができる。
10

【0096】

リソソーム蓄積病のために、それ自体であるか、又は疾患において障害される酵素の活性を他の方法で模倣する神経薬を選択することができる。リソソーム蓄積障害の処置のための例示的なリコンビナント酵素には、非限定的に、例えば米国特許出願公開第2005/0142141号に示される酵素 (すなわち、 - L - イズロニダーゼ、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ、N - スルファターゼ、 - N - アセチルグルコサミニダーゼ、N - アセチル - ガラクトサミン - 6 - スルファターゼ、 - ガラクトシダーゼ、アリールスルファターゼB、 - グルクロニダーゼ、酸性 - グルコシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、 - ガラクトシダーゼA、ヘキソサミニダーゼA、酸性スフィンゴミエリナーゼ、 - ガラクトセレブロシダーゼ、 - ガラクトシダーゼ、アリールスルファターゼA、酸性セラミダーゼ、アスパルトアシラーゼ、パルミトイール - タンパク質チオエステラーゼ1及びトリペプチジルアミノペプチダーゼ1) が挙げられる。
20

【0097】

アミロイドーシスのために、非限定的に、 - セクレターゼ、タウ、プレセニリン、アミロイド前駆タンパク質又はその部分、アミロイドペプチド又はそのオリゴマーもしくはフィブリル、デスレセプター6 (D R 6) 、終末糖化産物レセプター (R A G E) 、パーキン、及びハンチンチンから選択されるターゲットに特異的に結合する抗体又は他の結合分子 (非限定的に小分子、ペプチド、アブタマー、又は他のタンパク質バインダーを含む) ; コリンエステラーゼ阻害薬 (すなわちガランタミン、ドネペジル、リバスチグミン及びタクリン) ; N M D A レセプター拮抗薬 (すなわちメマンチン) 、モノアミン枯渇剤 (monoamine depletor) (すなわちテトラベナジン) ; メシリル酸エルゴロイド ; 抗コリン作動性抗パーキンソン病薬 (すなわちプロシクリジン、ジフェンヒドラミン、トリヘキシフェニジル (trihexylphenidyl) 、ベンズトロピン、ビペリデン及びトリヘキシフェニジル) ; ドーパミン作動性抗パーキンソン病薬 (すなわちエンタカポン、セレギリン、ラミペキソール、プロモクリプチン、ロチゴチン、セレギリン、ロピニロール、ラサギリン、アポモルヒネ、カルビドパ、レボドパ、ペルゴリド、トルカポン及びアマンタジン) ; テトラベナジン ; 抗炎症薬 (非限定的に、非ステロイド系抗炎症薬 (すなわち、インドメタシン (indomethicin) 及び上に列挙した他の化合物を含む) ; ホルモン (すなわちエストロゲン、プロゲステロン及びロイプロリド) ; ビタミン (すなわち葉酸塩及びニコチンアミド) ; ジメボリン (dimebolin) ; ホモタウリン (すなわち3 - アミノプロパンスルホン酸 ; 3 A P S) ; セロトニンレセプター活性モデュレーター (すなわちキサリプロデン) ; インターフェロン、ならびにグルココルチコイドを含む神経薬を選択することができる。
30
40
50

【0098】

ウイルス又は微生物疾患のために、非限定的に抗ウイルス化合物（非限定的に、アダマンタン抗ウイルス薬（すなわちリマンタジン及びアマンタジン）、抗ウイルス性インターフェロン（すなわちペゲインターフェロン - 2b）、ケモカインレセプター拮抗薬（すなわちマラビロク）、インテグラーゼ鎖転移阻害薬（すなわちラルテグラビル）、ノイラミニダーゼ阻害薬（すなわちオセルタミビル及びザナミビル）、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬（すなわちエファビレンツ、エトラビリン、デラビルジン及びネビラピン）、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬（テノホビル、アバカビル、ラミブジン、ジドブジン、スタブジン、エンテカビル、エムトリシタビン、アデホビル、ザルシタビン、テルビブジン及びジダノシン）、プロテアーゼ阻害薬（すなわちダルナビル、アタザナビル、ホスアンプレナビル、チプラナビル、リトナビル、ネルフィナビル（nelfmavir）、アンプレナビル、インジナビル及びサキナビル）、プリンヌクレオシド（すなわちバラシクロビル、ファムシクロビル、アシクロビル、リバビリン、ガンシクロビル、バルガンシクロビル及びシドホビル）、及びその他の抗ウイルス薬（すなわちエンフビルチド、ホスカルネット、パリビズマブ及びホミビルセン））、抗生物質（非限定的にアミノペニシリン（すなわちアモキシシリン、アンピシリン、オキサシリン、ナフシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン（flucoxacillin）、テモシリン、アズロシリン、カルベニシリン、チカルシリーン、メズロシリーン、ピペラシリーン及びバカンピシリーン）、セファロスボリン（すなわちセファゾリン、セファレキシン、セファロチン、セファマンドール、セフトリアキソン、セフォタキシム、セフポドキシム、セフタジジム、セファドロキシル、セフラジン、ロラカルベフ、セフォテタン、セフロキシム、セフプロジル、セファクロル、及びセフォキシチン）、カルバペネム／ペネム（すなわちイミペネム、メロペネム、エルタペネム、ファロペネム及びドリペネム）、モノバクタム（すなわちアズトレオナム、チゲモナム（tigemonam）、ノカルジシン（norcardicin）A及びタブトキシニン - - ラクタム、別の - ラクタム抗生物質と組み合わせた - ラクタマーゼ阻害薬（すなわちクラブラン酸、タゾバクタム及びスルバクタム）、アミノグリコシド（すなわちアミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、ストレプトマイシン、トプラマイシン、及びパロモマイシン）、アンサマイシン（すなわちゲルダナマイシン及びハービマイシン）、カルバセフェム（すなわちロラカルベフ）、グリコペプチド（すなわちティコプラニン及びバンコマイシン）、マクロライド（すなわちアジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシスロマイシン、トロレアンドマイシン、テリスロマイシン及びスペクチノマイシン）、モノバクタム（すなわちアズトレオナム）、キノロン（すなわちシプロフロキサシン、エノキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、トロバフロキサシン、グレパフロキサシン、スバルフロキサシン及びテマフロキサシン）、スルホンアミド（すなわちマフェニド、スルホンアミドクリソイジン、スルファセタミド、スルファジアジン、スルファメチゾール、スルファニルアミド、スルファサラジン、スルフィソキサゾール、トリメトプリム、トリメトプリム及びスルファメトキサゾール）、テトラサイクリン（すなわちテトラサイクリン、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン及びオキシテトラサイクリン）、抗悪性腫瘍性又は細胞傷害性抗生物質（すなわちドキソルビシン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エピルビシン、イダルビシン、ブリカマイシン、マイトマイシン、ペントスタチン及びバルルビシン）及びその他の抗細菌化合物（すなわちバシトラシン、コリスチン及びポリミキシンB）を含む）、抗真菌薬（すなわちメトロニダゾール、ニタゾキサニド、イミダゾール、クロロキン、ヨードキノール及びパロモマイシン）、及び抗寄生虫薬（非限定的にキニーネ、クロロキン、アモジアキン、ピリメタミン、スルファドキシン、プログアニル、メフロキン、アトバコン、ブリマキン、アルテミシニン（artemesinin）、ハロファントリン（halofantrine）、ドキシサイクリン、クリンダマイシン、メベンダゾール、パモ酸ピランテル、チアベンダゾール、ジエチルカルバマジン、イベルメクチン、リファンピシン、アンホテリシンB、メラルソプロー 10 20 30 40 50

ル、エフロルニチン (efornithine) 及びアルベンダゾールを含む) が含まれる神経薬を選択することができる。虚血のために、非限定的に、血栓溶解薬 (すなわちウロキナーゼ、アルテプラーゼ、レテプラーゼ及びテネクテプラーゼ)、血小板凝集阻害薬 (すなわちアスピリン、シロスタゾール、クロピドグレル、プラスグレル及びジピリダモール)、スタチン (すなわちロバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン (fuivastatin)、ロスバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチン、セリバスタチン及びピタバスタチン)、及び血流又は血管柔軟性を高めるための、例えば血圧医薬品を含む化合物が含まれる神経薬を選択することができる。

【0099】

行動障害のために、神経薬は、非限定的に非定型抗精神病薬 (すなわちリスペリドン、オランザピン、アリピプラゾール (apripiprazole)、クエチアピン、パリペリドン、アセナピン、クロザピン、イロペリドン及びジプラシドン)、フェノチアジン抗精神病薬 (すなわちプロクロルペラジン、クロルプロマジン、フルフェナジン、ペルフェナジン、トリフルオペラジン、チオリダジン及びメソリダジン)、チオキサンテン (すなわちチオチキセン)、その他の抗精神病薬 (すなわちピモジド、リチウム、モリンドン、ハロペリドール及びロキサピン)、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (すなわちシタロプラム、エスシタロプラム、パロキセチン、フルオキセチン及びセルトラリン)、セロトニン - ノルエピネフリン再取り込み阻害薬 (すなわちデュロキセチン、ベンラファキシン、デスベンラファキシン、三環系抗うつ薬 (すなわちドキセピン、クロミプラミン、アモキサピン、ノルトリプチリン、アミトリプチリン、トリミプラミン、イミプラミン、プロトリプチリン及びデシプラミン)、四環系抗うつ薬 (すなわちミルタザピン及びマプロチリン)、フェニルピペラジン抗うつ薬 (すなわちトラゾドン及びネファゾドン)、モノアミンオキシダーゼ阻害薬 (すなわちイソカルボキサジド、フェネルジン、セレギリン及びトラニルシプロミン)、ベンゾジアゼピン (すなわちアルプラゾラム、エスタゾラム、フルラゼパム (flurazepam)、クロナゼパム、ロラゼパム及びジアゼパム)、ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害薬 (すなわちブロピオン)、CNS 刺激薬 (すなわちフェンテルミン、ジエチルプロピオン、メタンフェタミン、デキストロアンフェタミン、アンフェタミン、メチルフェニデート、デクスマチルフェニデート、リスデキサンフェタミン、モダフィニル (modafinil)、ペモリン、フェンジメトラジン (phendimetrazine)、ベンズフェタミン、フェンジメトラジン (phendimetrazine)、アルモダフィニル (armodafinil)、ジエチルプロピオン、カフェイン、アトモキセチン、ドキサプラム、及びマジンドール)、抗不安 / 鎮静 / 催眠薬 (非限定的にバルビツレート (すなわちセコバルビタール、フェノバルビタール及びメホバルビタール)、ベンゾジアゼピン (上記)、及びその他の抗不安 / 鎮静 / 催眠薬 (すなわちジフェンヒドラミン、ナトリウムオキシベート、ザレプロン、ヒドロキシジン、抱水クロラール、アオルピデム (aolpidem)、ブスピロン、ドキセピン、エスゾピクロン、ラメルテオン、メプロバメート及びエチクロルビノール) を含む)、セクレチン (例えばRatliff-Schaub et al. Autism 9: 256-265 (2005) 参照)、オピオイドペプチド (例えばCowen et al, J. Neurochem. 89:273-285 (2004) 参照)、及び神経ペプチド (例えばHethwa et al. Am. J. Physiol. 289: E301-305 (2005) 参照) を含む行動変容化合物から選択することができる。

【0100】

CNS 炎症のために、炎症自体に対処する神経薬 (すなわちイブプロフェン又はナプロキセンなどの非ステロイド系抗炎症薬)、又は炎症の根底にある原因を処置する神経薬 (すなわち抗ウイルス薬又は抗ガン薬) を選択することができる。

【0101】

別の態様では、脳エフェクター本体は、インタクトな抗体又は完全長抗体である。インタクトな抗体は、それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、異なるクラスに割り付けることができる。インタクトな抗体には五つの主要クラス、すなわち Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、及び Ig M があり、これらのいくつかを「サブクラス」(アイソタイプ)、例えば Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A、及び Ig A 2 にさ

10

20

30

40

50

らに分けることができる。異なるクラスの抗体に対応する重鎖定常ドメインは、それぞれγ、α、ε、δ、及びμと呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配置は周知である。一態様では、インタクトな抗体はエフェクター機能を欠如する。

【0102】

抗体を作製するための技法は公知であり、例が、本明細書上記の定義の部に提供される。一態様では、抗体は、キメラ、ヒト化、もしくはヒト抗体又はその抗原結合フラグメントである。

【0103】

R / BBBに対する一価結合性本体の結合を決定するために様々な技法が利用可能である。そのようなアッセイは、ヒト R / BBB (及び脳抗原)に対する結合能を確認するための酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) である。このアッセイによると、抗原 (例えばリコンビナント sR / BBB) をコーティングされたプレートが、R / BBBに対する一価結合性本体を含む試料と共にインキュベーションされ、関心が持たれる抗原に対する一価結合性本体の結合が決定される。

【0104】

一局面では、本発明の一価結合性本体は、例えばELISA、ウエスタンプロットなどの公知の方法によって、その抗原活性について検査される。

【0105】

一局面では、本発明の一価結合性本体は、X線構造決定のエピトープマッピングを用いて、R / BBBに対する単一抗原結合活性について検査される。

【0106】

全身投与された血液脳関門シャトル及び/又はコンジュゲートの取り込みならびに血液脳関門シャトル及び/又はコンジュゲートの他の生物学的活性を評価するためのアッセイは、実施例に開示するように、又は関心が持たれる血液脳関門シャトル及び/もしくはコンジュゲートについて公知のように行うことができる。CNSの実質間隙内の濃度の測定は、また、ラベルされた血液脳関門シャトル及び/又は、例えばコンジュゲートのELISA又は放射能測定と組み合わせた微量透析法又は毛細血管枯渇法 (capillary depletion method) を用いて使用することができる。

【0107】

薬学的製剤

本発明により使用される血液脳関門シャトル及び/又はコンジュゲートの治療用製剤は、場合による薬学的に許容されうる担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で保管用に調製される (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))。許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤は、採用される用量及び濃度でレシピエントに無毒であり、それらには、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存料 (オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；メチルパラベンもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど)；低分子量 (約10残基未満の) ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリシンなどのアミノ酸；単糖、二糖、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の糖質；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属複合体 (例えばZn-タンパク質複合体)；ならびに/又はTWEEN (商標)、PLURONICS (商標)もしくはポリエチレングリコール (PEG)などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

【0108】

10

20

30

40

50

本明細書における製剤は、また、必要に応じて1種よりも多い活性化合物を、場合により相互にマイナスに影響しない相補的活性を有する活性化合物を含有しうる。そのような医薬の種類及び有効量は、例えば、製剤中に存在する血液脳関門シャトル及び/又はコンジュゲートの量、ならびに対象の臨床パラメーターに依存する。例示的なそのような医薬を後述する。

【0109】

活性成分は、また、例えばコアセルベーション技法もしくは界面重合により調製されたマイクロカプセル中に、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセル及びポリメタクリル酸メチルマイクロカプセルにより、コロイド薬物送達システム（例えばリポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルション、ナノパーティクル及びナノカプセル）中に、又はマクロエマルション中に封入することができる。そのような技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0110】

徐放性製剤を調製することができる。徐放性製剤の適切な例には、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、そのマトリックスは、造形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリラート）、又はポリビニルアルコール、ポリ乳酸（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸-L-グルタミン酸-エチルコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニルコポリマー、LUPRON D EPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射用ミクロスフェア）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【0111】

in vivo投与のために使用されるべき製剤は、無菌でなければならない。これは、無菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。一態様では、製剤は等張である。

【0112】

本発明の血液脳関門シャトル及び/又はコンジュゲートは、多様なin vivo方法で利用することができる。例えば、本発明は、BBBを通して治療用化合物を輸送する方法であって、血液脳関門シャトル及び/又はコンジュゲートをBBBに曝露することにより、一価結合性本体がそれに連結された治療用化合物を、BBBを通して輸送することを含む方法を提供する。別の例では、本発明は、BBBを通して神経障害薬を輸送する方法であって、血液脳関門シャトル及び/又はコンジュゲートをBBBに曝露することにより、一価結合性本体がそれに連結された神経障害薬を、BBBを通して輸送する方法を提供する。一態様では、本明細書におけるBBBは、哺乳類（例えばヒト）における、例えば非限定的にアルツハイマー病（AD）、脳卒中、認知症、筋ジストロフィー（MD）、多発性硬化症（MS）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、囊胞性線維症、アンジェルマン症候群、リトル症候群、パーキンソン病、ピック病、パジェット病、ガン、外傷性脳損傷などを含む神経障害を有するBBBである。

【0113】

一態様では、神経障害は、ニューロパチー、アミロイドーシス、ガン（例えばCNS又は脳に波及する）、眼疾患又は眼障害、ウイルス又は微生物感染、炎症（例えばCNS又は脳の炎症）、虚血、神経変性疾患、発作、行動障害、リソソーム蓄積病などより選択される。

【0114】

ニューロパチー障害は、不適切もしくは制御不能の神経シグナル伝達又はその欠如によって特徴づけられる神経系の疾患又は異常であり、ニューロパチー障害には、非限定的に、慢性痛（侵害受容性疼痛を含む）、ガン関連痛を含む体組織への損傷によって起こる疼痛、神経因性疼痛（神経、脊髄、又は脳における異常によって起こる疼痛）、及び心因性疼痛（精神障害に完全又は大部分関係する）、頭痛、片頭痛、ニューロパチー、ならびに

10

20

30

40

50

めまい又は恶心などの、多くの場合にそのようなニューロパチー障害に随伴する症状及び症候群が挙げられる。

【0115】

アミロイドーシスは、非限定的に続発性アミロイドーシス、加齢性アミロイドーシス、アルツハイマー病（AD）、軽度認知障害（MCI）、レビー小体認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血（オランダ型）；グアム島のパーキンソン・認知症複合、脳アミロイド血管障害、ハンチントン病、進行性核上性麻痺、多発性硬化症；クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、伝染性海綿状脳症、HIV関連認知症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、封入体筋炎（IBM）、及び -アミロイド沈着に関連する眼疾患（すなわち黄斑変性、ドルーゼン関連視神経症、及び白内障）を含む、CNS中の細胞外タンパク質性沈着物に関連する一群の疾患及び障害である。

10

【0116】

CNSのガンは、1種又は複数のCNS細胞（すなわち神経細胞）の異常増殖によって特徴づけられ、それには、非限定的に、神経膠腫、多形神経膠芽腫、髄膜腫、星状細胞腫、聴神経腫、軟骨腫、乏突起神経膠腫、髄芽腫（medullomas）、神経節膠腫、シュワン腫、神経線維腫、神経芽腫、及び硬膜外、髄内又は硬膜内腫瘍が挙げられる。

【0117】

CNSのウイルス又は微生物感染には、非限定的に髄膜炎、脳炎、脊髄炎、血管炎及び膿瘍を含む、急性又は慢性でありうるCNS病態生理を招く、ウイルス（すなわちインフルエンザ、HIV、ポリオウイルス、風疹）、細菌（すなわちNeisseria sp.、Streptococcus sp.、Pseudomonas sp.、Proteus sp.、E. coli、S. aureus、Pneumococcus sp.、Meningococcus sp.、Haemophilus sp.、及びMycobacterium tuberculosis）及び真菌などの他の微生物（すなわち酵母、Cryptococcus neoformans）、寄生虫（すなわちtoxoplasma gondii）又はアメーバによる感染が非限定的に挙げられる。CNSの炎症は、CNSへの損傷によって起こる炎症であり、損傷は、身体的損傷（すなわち事故、手術、脳外傷、脊髄損傷、振盪による）又はCNSの1種もしくは複数の他の疾患もしくは障害（すなわち膿瘍、ガン、ウイルスもしくは微生物感染）に起因もしくは関係する損傷でありうる。

20

【0118】

本明細書に使用するCNSの虚血は、脳における異常血流又は血管拳動に関係する一群の障害又はその原因を表し、それには、非限定的に、局所脳虚血、全脳虚血、脳卒中（すなわち、くも膜下出血及び脳内出血）、及び動脈瘤が挙げられる。

30

【0119】

神経変性疾患は、CNSにおける神経細胞の機能喪失又は死滅に関連する一群の疾患及び障害であり、それには、非限定的に、副腎白質ジストロフィー、アレキサンダー病、アルパース病、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、バッテン病、コケイン症候群、大脳皮質基底核変性症、アミロイドーシスによって起こる又は関連する変性、フリードライヒ運動失調症、前頭側頭葉変性症、ケネディー病、多系統萎縮症、多発性硬化症、原発性側索硬化症、進行性核上性麻痺、脊髄性筋萎縮症、横断性脊髄炎、レフサム病、及び脊髄小脳失調症が挙げられる。

【0120】

40

発作性疾患及びCNS障害は、CNSにおける不適切及び/又は異常な電気伝導を伴い、それには、非限定的に、てんかん（すなわち欠神発作、無緊張発作、良性ローランドてんかん、小児期欠神、間代発作、複雑部分発作、前頭葉てんかん、熱性けいれん、点頭けいれん、若年性ミオクローヌスてんかん、若年性欠神てんかん、レノックス・ガストー症候群、ランドウ・クレフナー症候群、ドラベ症候群、大田原症候群、ウエスト症候群、ミオクローヌス発作、ミトコンドリア障害、進行性ミオクローヌスてんかん、心因発作、反射てんかん、ラスマッセン症候群、単純部分発作、二次性全般化発作、側頭葉てんかん、強直間代（toniclonic）発作、強直発作、精神運動発作、辺縁系てんかん、部分発作、全般発作、てんかん重積状態、腹部てんかん、無動発作、自律神経発作、両側汎発性ミオクローヌス、月経随伴性てんかん、失立発作、情動発作、焦点発作、笑い発作、ジャクソン

50

マーチ、ラフォラ病、運動発作、多焦点性発作、夜間発作、光過敏性発作、偽発作、感覚発作、微細発作、シルバン (sylvan) 発作、離脱性けいれん、及び視覚性反射発作) が挙げられる。

【 0 1 2 1 】

行動障害は、罹患対象の部分での異常行動によって特徴づけられる C N S の障害であり、それには、非限定的に、睡眠障害 (すなわち、不眠、睡眠時随伴症、夜驚症、概日リズム睡眠障害、及びナルコレプシー) 、気分障害 (すなわち、うつ、自殺性うつ、不安、慢性情動障害、恐怖症、パニック発作、強迫性障害、注意欠陥多動性障害 (A D H D) 、注意欠陥障害 (A D D) 、慢性疲労症候群、広場恐怖症、外傷後ストレス障害、双極性障害) 、摂食障害 (すなわち食欲低下又は過食症) 、精神病、発達性行動障害 (すなわち自閉症、レット症候群、アスペルガー症候群 (Asperger's syndrome)) 、人格障害及び精神病性障害 (すなわち統合失調症、妄想性障害など) が挙げられる。

【 0 1 2 2 】

リソソーム蓄積障害は、ときに C N S に関連するか、又は C N S 特異的症状を有する代謝障害であり、そのような障害には、非限定的に、ティ - サックス病、ゴーシェ病、ファブリー病、ムコ多糖症 (I 、 I I 、 I I I 、 I V 、 V 、 V I 及び V I I 型) 、グリコーゲン蓄積疾患、 G M 1 - ガングリオシドーシス、異染性白質ジストロフィー、ファーバー病、カナバン白質ジストロフィー、及び神経セロイドリポフスチン症 1 及び 2 型、ニーマン - ピック病、ポンペ病、及びクラッベ病が挙げられる。

【 0 1 2 3 】

一局面では、医薬として使用するための本発明の血液脳関門シャトル及び / 又はコンジュゲートが提供される。さらなる局面では、神経疾患又は障害 (例えはアルツハイマー病) の処置に使用するための本発明の血液脳関門シャトル及び / 又はコンジュゲートが提供される。ある態様では、処置の方法に使用するための本発明の血液脳関門シャトル及び / 又はコンジュゲートが提供される。ある態様では、本発明は、個体に本発明の血液脳関門シャトル及び / 又はコンジュゲートの有効量を投与することを含む、神経疾患又は障害を有する個体を処置する方法に使用するための本発明の血液脳関門シャトル及び / 又はコンジュゲートを提供する。任意の上記態様による「個体」は、場合によりヒトである。

【 0 1 2 4 】

本発明の血液脳関門シャトル及び / 又はコンジュゲートは、単独で、又は他の薬剤と組み合わせてのいずれかで治療に使用することができる。例えは、本発明の血液脳関門シャトル及び / 又はコンジュゲートは、少なくとも 1 種の追加的な治療薬と同時投与することができる。ある態様では、追加的な治療薬は、処置するために採用されている本発明の血液脳関門シャトル及び / 又はコンジュゲートと同じ又は異なる神経障害を処置するために有効な治療薬である。追加的な治療薬の例には、非限定的に : 上記の様々な神経薬、コリンエステラーゼ阻害薬 (ドネペジル、ガランタミン、ロバストギミン (rovastigmine) 、及びタクリンなど) 、 N M D A レセプター拮抗薬 (メマンチンなど) 、アミロイド ペプチド凝集阻害薬、抗酸化剤、 - セクレターゼモデュレーター、神経成長因子 (N G F) 模倣体又は N G F 遺伝子療法、 P P A R γ 作動薬、 H M S - C o A レダクターゼ阻害薬 (スタチン) 、アンパカイン、カルシウムチャネル遮断薬、 G A B A レセプター拮抗薬、グリコーゲンシンターゼキナーゼ阻害薬、静脈内免疫グロブリン、ムスカリンレセプター作動薬、ニコチン (nictotinic) レセプター モデュレーター、能動又は受動的アミロイド ペプチド免疫処置、ホスホジエステラーゼ阻害薬、セロトニンレセプター拮抗薬及び抗アミロイド ペプチド抗体が挙げられる。ある態様では、少なくとも 1 種の追加的な治療薬が、神経薬の 1 種又は複数の副作用を緩和する能力のために選択される。

【 0 1 2 5 】

そのような上述の併用療法は、組み合わせ投与 (2 種以上の治療薬が同一又は別々の製剤中に含まれる) 及び分離投与 (本発明の血液脳関門シャトル及び / 又はコンジュゲートの投与が、追加的な治療薬及び / 又はアジュバントの投与の前、同時、及び / 又は後に起こりうる) を包含する。本発明の血液脳関門シャトル及び / 又はコンジュゲートは、また

10

20

30

40

50

、当技術分野において公知で、治療又は予防されるべき神経障害に適切な、放射線療法、行動療法、又は他の治療法などであるが、それに限定されるわけではない他のインターベンション治療と組み合わせて使用することができる。本発明の血液脳関門シャトル及び／又はコンジュゲート（及び任意の追加的な治療薬）は、非経口、肺内、及び鼻腔内、及び局所処置を望むのであれば病巣内投与を含む、任意の適切な手段により投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が挙げられる。

【0126】

投薬は、投与が短期間又は長期間であるかに部分的に依存して、任意の適切な経路により、例えば静脈内又は皮下注射などの注射により行うことができる。本明細書において、非限定的に、様々な時点にわたる単回（monovalent）又は多回投与、ボーラス投与、及びパルス注入を含む様々な投薬スケジュールが考えられている。

10

【0127】

本発明の血液脳関門シャトル及び／又はコンジュゲートは、適正な医療に一致するように製剤化、投薬、及び投与される。これに関連する考慮要因には、処置される特定の障害、処置される特定の哺乳類、個別の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医師に公知の他の要因が挙げられる。本発明の血液脳関門シャトル及び／又はコンジュゲートは、問題となる障害を予防又は治療するために現在使用されている1種又は複数の薬剤と一緒に製剤化する必要はないが、場合により一緒に製剤化される。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する血液脳関門シャトル及び／又はコンジュゲートの量、障害又は処置の種類、ならびに上述の他の要因に依存する。これらは、一般に、上記と同じ投薬量で及び投与経路で使用されるか、又は本明細書記載の投薬量の約1～99%、もしくは適切であると経験的／臨床的に決定された任意の投薬量及び任意の経路により使用される。

20

【0128】

疾患の予防又は処置のために、本発明の血液脳関門シャトル及び／又はコンジュゲート（単独で、又は1種もしくは複数の他の追加的な治療薬と組み合わせて使用する場合）の適切な投薬量は、処置される疾患の種類、血液脳関門シャトル及び／又はコンジュゲートの種類、疾患の重症度及び経過、抗体が予防的目的それとも治療的目的で投与されるか、以前の治療法、患者の臨床歴ならびに血液脳関門シャトル及び／又はコンジュゲートへの応答、ならびに担当医師の裁量に依存する。血液脳関門シャトル及び／又はコンジュゲートは、患者に1回で、又は一連の処置にわたり適宜投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、約1 μ g/kg～15mg/kg（例えば0.1mg/kg～10mg/kg）の血液脳関門シャトル及び／又はコンジュゲートが、例えば、1回もしくは複数の別々の投与又は連続複数回（continuous inmultimeric）による患者への投与のための初回候補投薬量でありうる。ある典型的な1日投薬量は、上述の要因に応じて約1 μ g/kg～100mg/kg以上の範囲でありうる。状態に応じて数日以上にわたる反復投与のために、処置は、一般に疾患症状の所望の抑制が起こるまで持続する。抗体の例示的な一投薬量は、約0.05mg/kg～約10mg/kgの範囲である。したがって、約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg又は10mg/kgの一つ又は複数の用量（又はその任意の組み合わせ）が、患者に投与されうる。そのような用量は、間欠的に、（例えば患者が抗体の投与を約2～約20、又は例えば約6回受けるように）例えば1週間に1回又は3週間に1回投与することができる。初回のより高い負荷用量に続き1回又は複数のより低い用量を投与することができる。しかし、他の投薬方式も有用でありうる。この治療法の進行は、従来の技法及びアッセイにより容易にモニタリングされる。

30

【0129】

製造品

本発明の別の局面では、上記障害の治療及び／又は予防に有用な物質を含有する製造品が提供される。製造品は、容器、及び容器又は容器に関連するラベル又は添付文書を含む。適切な容器には、例えばボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどが挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの多様な材料から形成することができる。容

40

50

器は、それ自体である組成物又は状態を治療、予防及び／もしくは診断するために有効な別の組成物と組み合わされた組成物を収容し、無菌アクセスポートを有しうる（例えば、容器は、皮下注射針により刺通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルでありうる）。組成物中の少なくとも1種の活性薬剤は、本発明の血液脳シャトル及び／又はコンジュゲートである。ラベル又は添付文書は、組成物が選ばれた状態を処置するために使用されることを示す。そのうえ、製造品は、(a)組成物がその中に収容された第1の容器（その際、組成物は、本発明の血液脳閥門シャトル及び／又はコンジュゲートを含む）；及び(b)組成物がその中に収容された第2の容器（その際、組成物は、さらなる細胞傷害性薬物又は他の治療薬を含む）を含みうる。本発明のこの態様における製造品は、さらに、組成物が特定の状態を処置するために使用することができることを示す添付文書を含む。代替的又は追加的に、製造品は、さらに、注射用静菌水（BWF1）、リン酸緩衝食塩水、リングル液及びブドウ糖溶液などの薬学的に許容されうる緩衝液を含む第2（又は第3）の容器を含みうる。それは、さらに、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的及び利用者の観点から望ましい他の物質を含みうる。

【0130】

場合により製造品は、さらに、対象における神経障害を処置するための説明を有する添付文書を含み、ここで、その説明は、本明細書開示の血液脳閥門シャトル及び／又はコンジュゲートを用いた処置が、神経障害を処置することを示し、場合により血液脳閥門シャトル及び／又はコンジュゲートが、R/B/Bへの一価結合様式のせいでB/B/Bを通した取り込みが改善されたことを示す。

【0131】

実施例

実施例1：発現プラスミドの作製

基本／基準哺乳類発現プラスミドの説明

ヒト胚性腎細胞（HEK293）の一過性トランスフェクションにより所望のタンパク質を発現させた。所望の遺伝子／タンパク質（例えば抗体-Fab多量体タンパク質）の発現のために、以下の機能的エレメントを含む転写ユニットを使用した：

- イントロンAを含むヒトサイトメガロウイルス由来最初期エンハンサー及びプロモーター（P-CMV）、
- ヒト重鎖免疫グロブリン5'非翻訳領域（5'UTR）、
- マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列（SS）、
- 発現されるべき遺伝子／タンパク質（例えば完全長抗体重鎖）、及び
- ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列（BGH-pA）。

【0132】

発現されるべき所望の遺伝子を含む発現ユニット／カセット以外に、基本／基準哺乳類発現プラスミドは：

- E. coliにおいてこのプラスミドを複製させるベクターpUC18由来複製起点、及び
 - E. coliにアンピシリン耐性を付与する - ラクタマーゼ遺伝子
- を含む。

【0133】

以下の抗体-sFab融合ポリペプチド／タンパク質をコードする発現プラスミドを構築した：

四価Mab31-scFab(8D3)（図1C）（Mab31=Aを認識するヒトモノクローナル抗体。Mab31のINN=ガンテネルマブ（Gantenerumab））

重鎖（10132_pPM284_Mab31（IgG1）-（G4S）4-VL-Ck-（G4S）6-GG-VH-CH1）（配列番号1）：

Mab31-scFab(8D3)重鎖融合タンパク質の組成：

- C末端Lysを有さないMab31ヒトIgG1重鎖
- グリシンセリン-リンカー

10

20

30

40

50

- マウス 8 D 3 抗トランスフェリン抗体の可変軽鎖ドメイン (V L) 変異体 (L 5 9 6 V 及び L 5 9 8 I) (Boado, R.J. Zhang, Y. Wang, Y and Pardridge, W.M., Biotechnology and Bioengineering (2009) 102, 1251-1258)

- ヒト C - 軽鎖
- グリシンセリン - リンカー
- マウス 8 D 3 抗トランスフェリン抗体の可変重鎖ドメイン (V H) (Boado, R.J. Zhang, Y. Wang, Y and Pardridge, W.M., Biotechnology and Bio-engineering (2009) 102, 1251-1258)
- ヒト Ig G 1 CH 3 重鎖ドメイン

軽鎖 (5 1 7 0 - V L - M a b 3 1 - B s m I - L 2 - N e o - B G H p A) (配列番号 2)

M a b 3 1 軽鎖の組成

- M a b 3 1 ヒト C 軽鎖

三価 M a b 3 1 - s c F a b (8 D 3) (図 1 B)

ノブ重鎖 (1 0 1 3 4 _ p P M 2 8 7 _ M a b 3 1 (I g G 1) _ ノブ _ S S _ - (G 4 S) 4 - V L - C K - (G 4 S) 6 - G G - V H - C H 1) (配列番号 3)

ノブ M a b 3 1 - s c F a b (8 D 3) 重鎖融合タンパク質の組成

- 追加的なジスルフィド架橋の形成のための、C 末端 L y s を有さず C H 3 ノブ突然変異 T 3 6 6 W 及び S 3 5 4 C 突然変異を含む M a b 3 1 ヒト Ig G 1 重鎖
- グリシンセリン - リンカー

- マウス 8 D 3 抗トランスフェリン抗体の可変軽鎖ドメイン (V L) 変異体 (L 5 9 6 V 及び L 5 9 8 I) (Boado, R.J. Zhang, Y. Wang, Y and Pardridge, W.M., Biotechnology and Bioengineering (2009) 102, 1251-1258)

- ヒト C - 軽鎖

- グリシンセリン - リンカー

- マウス 8 D 3 抗トランスフェリン抗体の可変重鎖ドメイン (V H) (Boado, R.J. Zhang, Y. Wang, Y and Pardridge, W.M., Biotechnology and Bio-engineering (2009) 102, 1251-1258)

- ヒト Ig G 1 CH 3 重鎖ドメイン

ホール重鎖 (1 0 1 3 3 _ p P M 2 8 6 _ M a b 3 1 (I g G 1) _ ホール _ S S) (配列番号 4)

ホール M a b 3 1 重鎖融合タンパク質の組成

- 追加的なジスルフィド架橋の形成のための C H 3 ホール突然変異 T 3 6 6 S、Y 4 0 7 V 及び L 3 6 8 A 及び Y 3 4 9 C 突然変異を含む M a b 3 1 ヒト Ig G 1 重鎖

軽鎖 (5 1 7 0 - V L - M a b 3 1 - B s m I - L 2 - N e o - B G H p A) (配列番号 2)

M a b 3 1 軽鎖の組成

- M a b 3 1 ヒト C 軽鎖

【0 1 3 4】

実施例 2：単一及び二重 M a b 3 1 - F a b 構築物の精製

抗体鎖は、F 1 7 培地 (Invitrogen Corp.) 中で培養された H E K 2 9 3 細胞 (ヒト胚性腎細胞系 2 9 3 由来) の一過性トランスフェクションによって作製した。トランスフェクションのために、「293-Fectin」トランスフェクション試薬 (Invitrogen) を使用した。抗体鎖は、それぞれ四価 M a b 3 1 - s c F a b (8 D 3) 重鎖及び M a b 3 1 に対応する軽鎖、又はノブ及びホール三価 M a b 3 1 - s c F a b (8 D 3) 重鎖及び M a b 3 1 に対応する軽鎖をコードする 2 種 (四価 M a b 3 1 - s c F a b (8 D 3)) 又は 3 種 (三価 M a b 3 1 - s c F a b (8 D 3)) の異なるプラスミドから発現させた。2 又は 3 種のプラスミドは、トランスフェクションのときに等モルのプラスミド比で使用した。トランスフェクションは、製造業者の説明書に明記されたように行った。抗体融合タンパク質を含有する細胞培養上清は、トランスフェクションの 7 日後に回収した。上清は、精

10

20

30

40

50

製まで凍結保管した。

【0135】

タンパク質は、濾過後の細胞培養上清から精製した。上清をプロテインAセファロースカラム (GE Healthcare) に適用し、PBS (pH 7.4) で洗浄した。抗体の溶出は、100 mMクエン酸緩衝液 (pH 3.0) の直後に試料を pH 6.5 に中和することで達成した。濃縮後、凝集したタンパク質及び他の副産物は、サイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200; GE Healthcare) によって単量体性抗体から 20 mMヒスチジン、140 mM NaCl (pH 6.0) 中に分離した。不完全に集合した分子及び他の副産物の定量のために、各単一フラクションを分析用 SEC (TSK G3000SWXL) 及びチップベースのキャピラリー電気泳動システム (CE-SDS, LabChipGX, Caliper) で分析した。副産物を有さない単量体性抗体フラクションをプールした。MILLIPOREAmicon Ultra (30 分子量カットオフ) 遠心分離濃縮器を使用して濃縮後、タンパク質を -80 で保管した。最終産物の分析特徴づけは、UV タンパク質測定、CE-SDS、サイズ排除クロマトグラフィー、質量分析、及びまたエンドトキシン測定によって行った。

【0136】

実施例3：単一Fab及び二重Fab構築物のELISA結合データ

マウストラヌスフェリンレセプター (mTfR) への mAb31-8D3 構築物の結合は、不完全ELISAにより判定した。この目的のために、リコンビナントmTfR (細胞外ドメイン; Sino Biological) をPBS中に 1 µg/mLでMaxisorbマイクロタイターブレート (Nunc) に 4 で一晩コーティングした。1% Crottein-C / PBS (ブロッキング緩衝液; Roche) 中で RT において 1 時間ブロッキングし、0.1% Tween-20 / PBS (洗浄緩衝液) で 4 回洗浄後、mAb31-8D3 構築物をブロッキング緩衝液中に 0.01 から 150 nM の間の濃度でウェルに加え、RT で 1 時間インキュベーションした。4回の洗浄段階の後に、抗ヒト-IgG-HRP (Jackson Immunoresearch) をブロッキング緩衝液中に 1:10,000 希釈して添加することによって構築物を検出し (1 RT)、続いて 6 回洗浄し、TMB (Sigma) 中でインキュベーションした。吸光度は、1N HCl で発色を停止させた後に 450 nm で読み取った。

【0137】

図3に、mTfRへの二価mAb31-8D3-dFabの結合性が8D3 IgGの結合性に匹敵し、一方で一価構築物mAb31-8D3-sFabが低下した親和性を示すことを示す。

【0138】

mAb31 の機能性を ELISA によって確認した。簡潔には、PBS 中に 7 µg/mL の A (1-40) を Maxisorb ブレート上に 37 で 3 日間コーティングし、フィブリル状 A を生成させ、次に RT で 3 時間乾燥させた。ブレートは、PBS 中の 1% Crottein-C 及び 0.1% RSA (ブロッキング緩衝液) を用いて RT で 1 時間ブロッキングし、次に洗浄緩衝液で 1 回洗浄した。mAb31 構築物は、ブロッキング緩衝液中に濃度最大 100 nM で加え、4 で一晩インキュベーションした。4 回の洗浄ステップの後に、上記のように構築物を検出した。

【0139】

図4に、両方のmAb31-8D3構築物 (sFab及びdFab) が、固定化A フィブリルに未変更mAb31に匹敵する親和性で結合することを示す。

【0140】

実施例4：単一Fab構築物だけが BBB を通過し、ラークを装飾する脳の切片作製及び免疫組織化学染色：

脳は、PBS 滴流後に調製し、矢状断凍結切片を、Paxinos 及び Franklin の脳図解書により横方向に約 1.92 から 1.68 ミリメートルの間で切断した。Leica CM3050S クリオスタットを使用して -15 で公称厚さ 20 ミクロンの脳切片を作製し、予冷したガラススライド (Superfrost plus, Menzel, Germany) 上に置いた。各脳について、切片 3 枚を 80 ミクロン間隔で同じスライド上に置いた。

10

20

30

40

50

【0141】

切片をP B S 中で5分間再水和させ、続いて-20℃に予冷した100%アセトンで2分間浸漬した。全てのその後の段階は室温で行った。脳切片を有するスライドをUltra V block (LabVision) 中で5分間連続インキュベーションすることにより非特異的結合部位を遮断し、続いてP B Sで洗浄し、2%正常ヤギ血清を加えたP B Sに入れたパワーブロック溶液 (power block solution) (BioGenex) 中で20分間インキュベーションした。スライドは、P B S (pH 7.4) 中の2%正常ヤギ血清に入れて、二次抗体、すなわち濃度20 μg/mlのAlexa Fluor 555色素 (#A-21433, lot 54699A, Molecular Probes) コンジュゲーション型親和性精製ヤギ抗ヒトIgG (重鎖及び軽鎖特異的) と共に直接1時間インキュベーションした。P B Sで高度に洗浄後、ラークの局在は、0.5 μg/mlのB A P - 2、すなわちロシュ社内のAに対するAlexa Fluor 488色素コンジュゲーション型マウスモノクローナル抗体と共に、パワーブロック溶液 (BioGenex) 及び10%正常ヒツジ血清を有するP B S 中で1時間インキュベーションすることにより、A ラークについて二重ラベルすることで判定した。P B Sで洗浄後、50mM酢酸アンモニウム (pH 5) 中の4mM CuSO₄ 中で30分間インキュベーションすることで消光することによってリポフスチンの自己蛍光を減少させた。スライドを再蒸留水ですすいだ後に、スライドを共焦点マトリックス (Micro Tech Lab, Austria) で包埋した。

【0142】

共焦点顕微鏡法

前頭皮質 (一次運動野領域) 中にラーク含有領域を有する各P S 2 A P P - マウスの脳の各切片から3画像を取得した。1エアリーのピンホール設定のLeica TCS SP5共焦点システムを用いて画像を記録した。

【0143】

Alexa Fluor 488色素で免疫ラベルされたラークを、レーザー出力30%で光電子増倍管のゲイン及びオフセットを調整して (典型的にはそれぞれ770V及び-0%) 、同じスペクトル条件 (励起488nm及び帯域発光500~554nm) で捕捉した。

【0144】

組織切片の可触性面に結合した二次Alexa Fluor 555抗体は、励起561nmのレーザー線で、適用された検出抗体の発光波長範囲に及ぶ570~725nmの範囲のウインドウで記録した。画像取得のために、装置の設定、特にレーザー出力、スキャン速度、ゲイン及びオフセットを一定に保ち、被験ヒト抗A抗体について強度の測定値を比較できるようにした。レーザー出力を30%に設定し、PMTゲインの設定は、典型的には850V、公称オフセットは0%であった。これにより、淡染ラークと濃染ラークの両方を同じ設定で視覚化することが可能になった。取得周波数は400Hzであった。

【0145】

共焦点スキャンは、HCX PL APO 20×0.7 IMM UV水浸対物レンズを用いて单一光学層として分解能512×512ピクセルで記録し、垂直軸の光学的測定深さを双方的にコントロールして組織切片内の画像化を確実にした。前頭皮質の層2~5に位置するアミロイドラークを画像化し、蛍光強度を定量した。

【0146】

統計解析

免疫陽性領域をT I F F 画像として視覚化し、ImageJバージョン1.45 (NIH) を用いて蛍光強度及び面積 (ピクセル単位で測定) の定量のために処理した。定量のために、5のバックグラウンド強度を各画像において差し引きし、5平方ピクセル未満の陽性領域をフィルタリングして除去した。選択された等値面の合計蛍光強度は、単一の個別陽性領域の合計強度として決定し、平均ピクセル強度は、合計強度を被解析ピクセル数で除算して計算した。

【0147】

平均及び標準偏差の値は、各動物の3枚の異なる切片から取得した9枚の写真から得られた、測定された全ての等値面からMicrosoft Excel (Redmond/WA, USA) で計算した。統

10

20

30

40

50

計解析は、群比較のためのスチュードントの *t* 検定又はマン - ホイットニー *U* 検定を用いて行った。

【 0 1 4 8 】

10 mg/ml mAb31 (図 1 A の構築物)、13.3 mg/kg sFab - mAb31 (図 1 B の構築物) 及び 16.7 mg/kg dFab - mAb31 (図 1 C の構築物) をマウス尾に i.v. 注射し、8 時間後に脳を PBS で灌流した。上記のように切片を調製し、ヤギ抗ヒト IgG で染色した。mAb31 構築物について、特異的なシグナルはほとんど検出されなかった (図 4 A)。sFab - mAb31 について、ラーク及び毛細血管の両方の拡がった染色が検出されたが (図 4 B)、一方で dFab - mAb31 について毛細血管の染色だけが検出された (図 4 C)。これは、トランスフェリンレセプターへの一価結合様式 (sFab - mAb31 の方が、 BBB で脳内皮細胞を通過してずっと効率的に構築物を運ぶことを明確に示した。二価結合分子 (dFab - mAb31) の定量を図 5 に示す。データは、dFab - mAb31 構築物についてラーク装飾の増加がなく、構築物の毛細血管蓄積が原因の合計強度の増加だけがあることを示している。

【 0 1 4 9 】

実施例 5 : 脳の単一 Fab 構築物曝露の定量

実験手順を実施例 4 に記載する。図 6 に、10 mg/ml mAb31 (図 1 A の構築物) 及び 13.3 mg/kg sFab - mAb31 (図 1 B の構築物) を用いて sFab - mAb31 の脳曝露の定量を示す。sFab - mAb31 構築物を注射した 8 時間後に、すでに mAb31 に比べてかなりの取り込みがある (約 55 倍の増加)。25 mg/ml mAb31 (図 1 A の構築物) 及び 33.3 mg/kg sFab - mAb31 (図 1 B の構築物) を用いて、投与の 24 時間後に類似のデータが得られた。図 6 にも、sFab - mAb31 の一過性毛細血管染色が、経時的なターゲティング効果及び BBB 通過を明らかにすることを示す。全てのこれらのデータは、図 6 に示すように高度に有意である。

【 0 1 5 0 】

図 7 に、低用量での mAb31 (図 1 A の構築物) 及び sFab - mAb31 構築物 (図 1 B の構築物) のデータを示す。再び、sFab - mAb31 構築物だけが脳内皮細胞を通過し、脳内のラークを装飾することができる。すでに投与の 8 時間後に最大の効果に到達する。脳内の A ラークへの結合シグナルが増加する傾向があるのは、mAb31 構築物が高用量 (10 mg/kg) 及び相対的に長期間 (7 日間) の場合だけである (図 7)。全てのこれらのデータは、図 7 に示すように高度に有意である。

【 0 1 5 1 】

実施例 6 : 二重 Fab 構築物による細胞表面 TfR の特異的ダウンレギュレーション

実験の詳細 : BEND3 細胞を 6 ウェルプレート形式で培養する。集密に達した 2 ~ 3 日後に dFab - mAb31、sFab - mAb31 又は未処理対照で 24 時間処理する。次に、培地を除去 / 吸引し、細胞を氷冷 PBS (-MgCl₂) (-CaCl₂) (Gibco 14190-094) 5 ml / ウェルで 2 回洗浄する。トリプシン / EDTA (Lonza CC-5012) 1 ml / ウェルを添加し、全ての細胞が剥離するまで 37 °C で 15 分間インキュベーションする。トリプシン中和溶液 (氷冷) (Lonza CC-5002) 1 ml で反応を停止する。トリプシン / EDTA + 中和溶液 2 ml を 50 ml 容 Falcon チューブ中に収集し、氷上に置く。細胞を 4 及び 1400 rpm で 10 分間遠心分離する。ペレットを氷冷 BEND3 培地 (DMEM - 12 (Gibco 31331) + 10% FBS) 50 ml 中に再懸濁する。細胞を 4 及び 1400 rpm で 10 分間遠心分離する。ペレットを氷冷 FACS 緩衝液 (BD554656) 3 ml 中に再懸濁する。細胞数 : a) sFab チューブ (細胞 2.5 × 10⁵ 個/ml) の生存率 : 47%、b) dFab チューブ (細胞 3.18 × 10⁵ 個/ml) の生存率 : 55%、c) 対照チューブ (細胞 4.6 × 10⁵ 個/ml) の生存率 : 57%。FACS 染色 : 細胞 1 × 10⁵ 個 / エッペンドルフチューブとなるように分配し、遠心分離する (4 °C、10 分、1500 rpm)。上清を吸引する ; a) CD71 - PE (クローン R17217 - IgG2a モノクローナル) (santa cruz sc-52504) は 20 μL 抗体 / ペレット (染色体積 100 μL) を氷冷 FACS 緩衝液 (BD554656) で 100 μL に調整、b) CD31 - APC (BD55126) 50

2) (ラット抗マウス IgG2a (200 µg/ml)) は 5 µg抗体 / ペレット (染色体積 100 µL) を氷冷 FACS 緩衝液 (BD554656) で 100 µL に調整、c) 8D3-A1ex-a488 (染色体積 100 µL) は氷冷 FACS 緩衝液 (BD554656) で希釈 (1:50)、d) A1ex-a488、APC 及び PE (全て BD 製) についてのアイソタイプ対照。氷冷して暗条件で 1 時間インキュベーションする。氷冷 FACS 緩衝液で 1.5 ml に調整し、遠心分離する (4 10 分、1500 rpm)。ペレットを氷冷 FACS 緩衝液 1.5 ml で 2 回洗浄し、最終的にペレットを PBS 500 µL 中に再懸濁する。FACS 測定は、Guava フローサイトメトリー装置を使用して行った。データは、二重 (dFab) 構築物 (図 8B) が細胞表面でのトランスフェリンレセプターをダウンレギュレーションするように見えることを示している。これは、単一 (sFab) 構築物を用いたこのアッセイの設定で検出不能であり (図 8A)、一価結合様式が、脳内皮細胞上の細胞表面でのトランスフェリンレセプターの量を決定する細胞輸送及びリサイクリングに直接的な効果を有さないことを示している。
10

【0152】

実施例 7：単一及び二重 Fab 構築物の in vivo 細胞内ソーティング

APPswe / PS2 トランスジェニックマウスに以下の構築物：Mab31 (10 mg/kg)、sFab - Mab31 (13.3 mg/kg) 又は dFab - Mab31 (17.44 mg/kg) を i.v. 注射 (尾注射) した。注射された用量は分子サイズを反映し、Mab31 を参照として使用した。注射の 15 分後又は 8 時間後に、マウスを CO₂ で安樂死させ、以下のように処理した。心臓の右心房を切開することにより、血液及び灌流溶液が流出できるようにした。左心室を切開し、強制給餌プローブ #10 を大動脈内に押し込んだ。PBS 約 20 ml を注射し (約 10 ml/min、室温)、続いて PBS 中の 2% PFA 30 ml を注射した。脳を摘出し、同じ灌流液中で追加的に 7 時間 00 分インキュベーションした。ビブラトームを使用して、脳自由浮遊性切片 100 ミクロンを作製し、それを免疫蛍光染色のために使用した。切片を最初に透過性にし、PBS - 0.3% Triton X-100 - 10% 口バ血清を使用してブロッキングした。次に、PBS - 5% 口バ血清中に希釈した表示の一次抗体と共に切片を一晩インキュベーションした。Molecular Probes 製二次抗体を製造業者の推奨にしたがって使用した。Leica SP5 共焦点顕微鏡を使用して画像を取得し、画像処理及び 3D 復元のために Imaris ソフトウェアを使用した。
20

【0153】

これらのデータは、末梢投与された sFab - Mab31 及び dFab - Mab31 の脳内皮細胞による取り込みを明らかにするものである。Mab31、sFab - Mab31 及び dFab - Mab31 は、A1ex-a555 と連結されたヤギ抗ヒト抗体を使用して検出した。図 9 に示すように、注射の 15 分後に sFab - Mab31 (図 9A) 及び dFab - Mab31 (図 9B) の両方が脳血管系を装飾したが、それらの分布に差はなかった。注射の 8 時間 00 分後に、sFab - Mab31 は実質に達し、アミロイドplaques を装飾するが (図 9C 矢印)、一方で dFab - Mab31 (図 9D) は、15 分の時点に類似して脳血管系内に留まった。dFab - Mab31 を用いたときに実質中からアミロイドplaques は検出されない。
30

【0154】

図 10：本研究に使用された全ての構築物の完全性をコントロールするために、Mab31 (図 10A)、sFab - Mab31 (図 10B) 又は dFab - Mab31 (図 10C) を使用して 18 ヶ月の脳凍結切片の染色を行った。結果は、3 種の構築物の全てがトランスジェニックマウスの脳内のアミロイドplaques を検出したことを示した。
40

【0155】

図 11 ~ 12：高分解能共焦点顕微鏡法から、sFab - Mab31 (図 11) 及び dFab - Mab31 (図 12) が脳毛細血管の管腔側を装飾せず、内皮細胞の管腔膜を通過して小胞様構造内及び内皮細胞のサイトゾル内に含まれることを示している。図 11 及び図 12 の矢印は、内皮細胞核の反管腔側の sFab - Mab31 構築物又は dFab - Mab31 構築物を含む小胞を示す。まとめると、これらのデータは、sFab - Mab31 構築物を含む小胞を示す。まとめると、これらのデータは、sFab - Mab31 構築物を含む小胞を示す。
50

3 1 及び d F a b - M A b 3 1 の両方が内皮細胞に進入できるが、 s F a b - M A b 3 1 だけが血管系を通過してアミロイドplaqueに到達できることを示唆している。

【 0 1 5 6 】

本発明の方法及び組成物は、 C N S に分布する抗体の部分を劇的に改善して、したがって C N S 中でより容易に治療濃度に到達する方策を提供する。本発明の方法及び組成物は、新規であり、最適で乱されていない細胞内経路 / ソーティングを利用して B E C 内の異なるオルガネラを通過して反管腔側に到達する効率を有意に改善する。

【 0 1 5 7 】

実施例 8 : B B B を通過するために重要な一価レセプター結合様式

抗 A モノクローナル抗体 m A b 3 1 は、非常に特異的であり、強力な A plaque 結合体であり、本発明者らに脳実質内のターゲットの会合を定量するための強力な読み取りを提供する。本発明者らは、 m A b 3 1 親抗体に比べて 2 種の脳シャトル構築物の脳曝露量を検討するために P S 2 A P P ダブルトランスジェニックアミロイドーシスモデルを用いた。3 種の変異体を 1 0 mg/kg で静脈内注射し、注射の 8 時間後に plaque に存在する抗体の量を定量することによって脳曝露の程度を決定した。 d F a b 構築物のために、 m A b 3 1 に比べて plaque 装飾の有意な増加は検出されなかった (図 1 3 A) 。しかし、 s F a b 構築物について、親 m A b 3 1 抗体に比べて plaque 装飾の大きな増加があった。 s F a b 構築物について、アミロイドplaqueでのターゲット会合は、ラベル化二次抗体を用いた蛍光強度定量に基づき 50 倍よりも大きく改善した。 s F a b 構築物は大きな plaque 装飾を示したものの (図 1 3 D) 、 d F a b は、微小血管にのみ検出可能であり (図 1 3 C) 、 d F a b 構築物が脳微小血管をターゲティングし、その中に進入するが、反管腔側から逃避できることを示した。本発明者らは、低用量 2 . 6 6 mg/kg で s F a b 構築物のターゲット会合能を検討し、最大 7 日まで in vivo 曝露時間を延長した。単回注射後 8 時間以内に最大 plaque 装飾に到達し、続いて少なくとも 1 週間にわたる持続的 plaque 結合が生じた (図 1 3 E) 。

【 0 1 5 8 】

前回の研究で、親 m A b 3 1 は、注射の 7 日後に最大 plaque 結合に到達することが示された。微小血管構造における染色の定量から、 s F a b 構築物の局在化が B B B で非常に一過性であったことが示され、これは、構築物が閑門を通過する相対的に迅速な速度を例示している。注射の 7 日後の 2 mg/kg の親抗体 m A b 3 1 (図 1 3 F) 及び等モル濃度の s F a b 構築物 (図 1 3 G) について、代表的な plaque 染色画像は、 s F a b 脳シャトル構築物で plaque 結合が増加したことを明らかにしている。 s F a b 構築物は、リソソーム区画とほんの最低限の共局在を示し、それは、リソソームへの T f R の正常な構成的輸送を反映している可能性がある。本発明者らの in vitro 研究は、また、 s F a b 構築物のリサイクリング及びトランスサイトーシスを示した。まとめると、これらの結果は、 s F a b 構築物が T f R の正常な輸送を妨害しないことを示唆している。対照的に、 d F a b 構築物は、リソソーム区画と強い共局在を示すが、 in vitro でも in vivo でもトランスサイトーシス活性を示さない。

【 0 1 5 9 】

実施例 9 : B B B を通した抗体送達の増加は、強化された in vivo 効力に変換される

次の連続の実験で、本発明者らは、一価結合様式を用いた脳曝露の顕著な増加が長期処置研究で抗 A 抗体の in vivo 効力を改善するかどうかを問うた。本発明者らは、 s F a b 構築物及び対照親抗体 m A b 3 1 を 1 週間に 1 回 3 ヶ月間注射した。前回の 5 ヶ月研究で、治療用抗体 m A b 3 1 は、 2 0 mg/kg で plaque 負荷を軽減することが示された。図 1 4 に示すデータに基づき、本発明者らは、脳曝露の改善が in vivo 効力の強化に繋がるかどうかを検討するために 2 種の低用量を選択した。最終でのターゲット plaque 結合は、両方の用量で親 m A b 3 1 抗体よりも s F a b 構築物と強いターゲット会合があったことを示した (図 1 4 A ~ D) 。 A P P P S 2 二重トランスジェニックマウスでのアミロイドーシスの程度をベースラインで、ならびにビヒクル、低用量親 m A b 3 1

10

20

30

40

50

及び低用量 s F a b 構築物処置の後に定量した。これらの低用量で、親モノクローナル m A b 3 1 を用いて *in vivo* 効果は検出されず（図 14 E）、それは、前回の 5 ヶ月間長期試験に基づき予期されたことであった。対照的に、皮質及び海馬の両方におけるブラーク数の有意な減少が、低用量 2.67 mg/kg の s F a b 構築物で観察された。ずっと低い用量 0.53 mg/kg であっても（図 14 E）、s F a b 構築物は統計的有意性に到達しなかったものの、特に皮質において s F a b 構築物を有利とする傾向が見られた。ブラークサイズの二次分析から、m A b 3 1 についての作用様式に一致して、小さなブラークについてブラーク数のより顕著な減少が明らかとなった。これらのデータは、一価様式の T f R 結合によって可能にされる脳透過の増加が、アルツハイマー病病態の慢性動物モデルにおける治療用抗体の効力における有意な改善に繋がることを示している。 10

【 0 1 6 0 】

実施例 10：T f R + B a F 3 細胞に対する異なる抗体融合タンパク質の *in vitro* エフェクター機能（ADCC）

トランスフェリンレセプター発現 B a F 3 細胞（DSMZ, #CLPZ04004）（T f R +）を、異なる抗体 - 融合分子によって誘導される抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）実験のためのターゲット細胞として使用した。

【 0 1 6 1 】

簡潔には、B a F 3 細胞 1×10^4 個を丸底 96 ウェル中に蒔き、場合により抗体融合タンパク質の存在化又は不在下でヒト N K 9 2 エフェクター細胞（高親和性 C D 1 6 クローン 7 A 2 F 3；Roche GlycArt）と共にエフェクター / ターゲット比 3 : 1 で同時培養した。4 時間インキュベーション後に（37、5% CO₂）死 / 濕死細胞からの乳酸脱水素酵素（LDH）の放出によって測定される細胞傷害性を判定した。これについて、細胞を 250 × g で 5 分間遠心分離し、上清 50 μl を平底プレートに移した。LDH 反応混液 50 μl（Roche LDH reaction mix, cat. no. 11644793001; Roche Diagnostics GmbH）を添加し、反応物を 37 及び 5% CO₂ で 20 分間インキュベーションした。その後、Tecan Sunrise Reader を用いて波長 492 / 620 nm で吸光度を測定した。 20

【 0 1 6 2 】

全ての試料を三つ組で試験し、以下の対照に基づき結果を計算した：

- ターゲット細胞のみ（+ 培地）
- 最大 LDH 放出：ターゲット細胞 + 3% Triton-X
- 自然放出：ターゲット細胞 + N K 細胞（E : T = 3 : 1）

特異的 ADCC / 溶解（%）は、次項により計算した：

【 0 1 6 3 】

【数 1】

$$\% \text{ 特異的 ADCC} = \frac{\text{試料} - \text{自然放出}}{\text{最大放出} - \text{自然放出}} \times 100$$

【 0 1 6 4 】

図 15：F c の C 末端に融合された T f R - s c F a b フラグメントを有する抗体融合体は ADCC を誘導しない。B A / F 3 マウス赤白血病細胞の N K 9 2 介在性殺滅は、LDH 放出を定量することによって測定した。「従来型」「N 末端を F c に」配向の T f R 結合性 F a b 部分を有する融合構築物だけが顕著な ADCC を誘導し、一方で、逆配向の脳シャトル構築物は非誘導性である。構築物：8 D 3 - IgG（完全長 8 D 3 IgG）、O A - 8 D 3（8 D 3 IgG の単一重鎖）、m A b 3 1（図 1 A の抗体）、m A b 3 1 - 8 D 3 s F a b（図 1 B の構築物）、m A b 3 1 - 8 D 3 - d F a b（図 1 C の構築物）。 40

【 0 1 6 5 】

実施例 11：m T f R 抗体 8 D 3 のエピトープマッピング

モノクローナル抗体 8 D 3 のエピトープマッピングは、マウストラスフェリンレセプ

50

ター 1 の細胞外ドメイン (9 0 ~ 7 6 3) の配列に対応する重複する固定化ペプチドフラグメント (長さ : アミノ酸 15 個、移動 : アミノ酸 3 個) のライブラリーにより実施した。ペプチドアレイの調製のために、Intavis CelluSpots (商標) 技法を採用した。このアプローチでは、自動合成装置 (Intavis MultiPep RS) を用いて改変セルロースディスク上にペプチドを合成し、セルロースディスクを合成後に溶解する。次に、高分子セルロースに共有結合したままの個別のペプチド溶液を、コーティング済み顕微鏡用スライド上にスポットする。384 ウェル合成プレート中のアミノ改変セルロースディスクに 9 - フルオレニルメトキシカルボニル (F m o c) 化学反応を利用して CelluSpots (商標) 合成を段階的に実施した。各カップリングサイクルにおいて、対応するアミノ酸を D I C / H O B t の D M F 溶液で活性化した。カップリング段階の間に、未反応のアミノ基を無水酢酸、ジイソプロピルエチルアミン及び 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾールの混合物でキャッピングした。合成の完了時に、セルロースディスクを 96 ウェルプレートに移し、トリフルオロ酢酸 (T F A) 、ジクロロメタン、トリイソプロピルシラン (triisopropylsilane) (T I S) 及び水の混合物で処理し、側鎖脱保護に供した。切断溶液の除去後、セルロースに結合しているペプチドを T F A 、 T F M S A 、 T I S 及び水の混合物に溶かし、ジイソプロピルエーテルで沈殿させ、 D M S O 中に再懸濁した。続いて Intavis スライドスポッティングロボットを使用してこれらのペプチド溶液を Intavis CelluSpots (商標) スライド上にスポットした。

【 0 1 6 6 】

エピトープ分析のために、調製済みスライドをエタノールで、次にトリス緩衝食塩水 (T B S ; 50 mM トリス、 137 mM N a C l 、 2.7 mM K C l 、 pH 8) で洗浄し、その後、 0.1% Tween 20 加 T B S 中に 10 × Western Blocking Reagent (Roche Applied Science) 及びスクロース 2.5 g を入れた液 5 mL で 4 にて 16 時間ブロッキング段階を実施した。洗浄 (T B S + 0.1% Tween 20) 後、スライドを抗体 8 D 3 の T B S + 0.1% Tween 20 溶液 (1 μ g/mL) と共に環境温度で 2 時間インキュベーションした。洗浄後、検出のために抗マウス二次 H R P 抗体 (T B S - T 中に 1 : 20000) と共にスライドをインキュベーションし、続いて化学ルミネセンス基質ルミノールと共にインキュベーションし、 Lumil Imager (Roche Applied Science) で視覚化した。 E L I S A 陽性スポットを定量し、対応するペプチド配列の割り付けにより抗体結合エピトープを同定した。

【 0 1 6 7 】

図 16 : 8 D 3 は、マウストラヌスフェリンレセプターの細胞外ドメイン中の 3 種の異なるペプチドに結合する。アミノ酸 3 個が重複する 15 残基長ペプチドへの抗体 8 D 3 の結合は、固定化 m T f R ペプチドを担持する CelluSpot スライド上でインキュベーションされた抗体の化学ルミネセンス検出によって明らかにした。欄内 : 8 D 3 によって結合されたペプチド # 373 、 374 及び 376 。

【 0 1 6 8 】

【表 1 】

ペプチド ID	ペプチド配列	配列番号
373	I-G-Q-N-M-V-T-I-V-Q-S-N-G-N-L	配列番号 14
374	N-M-V-T-I-V-Q-S-N-G-N-L-D-P-V	配列番号 15
376	Q-S-N-G-N-L-D-P-V-E-S-P-E-G-Y	配列番号 16

表1: ペプチドマッピング実験において 8D3 によって結合された mTfR 細胞外ドメインのペプチド配列

【 0 1 6 9 】

抗体、タンパク質、ペプチド及び小分子を含む治療薬を、 B B B を通して治療学的に関連する用量で送達することができる、血液脳関門レセプター、特にトランヌスフェリンレセプター (T f R) に対する 1 群のバイオ治療用構築物を本実施例で説明する。ある種の加工バイオ治療用構築物の分布は、注射後数時間以内に脳血管間隙から実質間隙に変化した

。これは、これらの特定の構築物が、重大な量のバイオ治療薬に B E C を経由して実質にトランスサイトーシスさせる、 B E C を経由する最適な輸送経路を利用するこを示している。 C N S へのバイオ治療用構築物の取り込み及び C N S における分布の程度は、血液脳関門レセプター、特に T f R への一価結合様式に完全に依存した。 T f R が R / B B B へのバイオ治療用構築物の結合により二量体化されるようになる場合、実質間隙内に検出可能なレベルは検出されなかった。本発明の方法論を用いて加工された、単回全身用量の単一 F a b 抗 A モノクローナル構築物は、脳における有意な抗体取り込みを招いたばかりでなく、病的アミロイドplaquesへの抗 A モノクローナル結合の装飾も劇的に増加させる。しかし、 R / B B B に対する二重 F a b 結合性構築物を使用して、 C N S 内に検出可能なレベルは検出されなかった。本出願に示されたこの事実及び実験は、 R / B B B に対する一価結合様式を用いて C N S へのバイオ治療薬（抗体など）の取り込みを増加させることの背景となる主要な寄与メカニズムを明らかにしている。最初に、二重（又は多量体性）抗 R / B B B 結合様式は、管腔側の細胞表面の R / B B B を迅速にダウンレギュレーションすることによって脳の取り込みを制限し、それで効率的な B B B 通過の第一段階である血管系に取り込まれうる抗 R / B B B の合計量を減少させる。第二に、二重（又は多量体性）抗 R / B B B 結合様式は、構築物が反管腔側に到達することを抑制する B E C において細胞内で個別の誤ソーティングを誘導する。顯著には、 R / B B B への一価結合性は、脳の取り込み及び分布を改善し、血管系から C N S 内のアミロイドplaquesへの局在で完全な移行が観察される。第二に、 R / B B B についてのバイオ治療用構築物の加工一価結合様式は、管腔側への R / B B B のリサイクリングを確保して、追加的な融合ポリペプチド構築物の取り込みならびに反管腔側及び実質内への輸送を可能にする。第三に、一価結合様式のバイオ治療用構築物は、 I g G の F c 部の C 末端で加工され、それは、大部分の場合に in vivo 効力のために重要な治療用モノクローナル抗体のための独特な形式を保つ。これは、また、本出願で記載された I g G の他の部分に連結することによって達成することができる。これは、確立した前臨床及び臨床効力を有する開発済みの I g G モノクローナルを、確立した機能及び効力を損なうことなしにこの輸送システムに組み入れるので、有利である。そのうえ、レセプター介在性輸送（ R M T ）に基づく一価ターゲティング R / B B B 技法は、 C N S 疾患のための広範囲の潜在的治療法のための扉を開くものである。本発明は、 B B B を通した治療薬の輸送及び C N S 分布を大きく改善する治療活性が証明された既存の I g G 形式を保っている B B B 透過治療薬を加工する方法を提供する。

【 0170 】

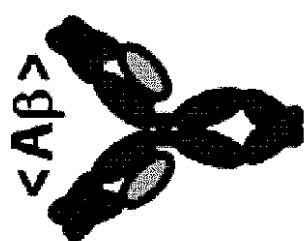
【表 2】

開示されたアミノ酸配列

アミノ酸配列名	配列番号(配列 ID 番号)	
Mab31 軽鎖 – scFab (8D3)	1	
Mab31 軽鎖	2	
Knob Mab31 重鎖 – scFab (8D3)	3	10
Hole Mab31 重鎖 – scFab (8D3)	4	
Mab 31 V _H CDR1	5	
Mab 31 V _H CDR2	6	
Mab 31 V _H CDR3	7	
Mab 31 V _L CDR1	8	20
Mab 31 V _L CDR 2	9	
Mab 31 V _L CDR3	10	
Mab 31 V _H	11	
Mab 31 V _L	12	
ペプチドリンカー (G ₄ S) ₆ G ₂	13	30
8D3 エピトープマッピングペプチド 373	14	
8D3 エピトープマッピングペプチド 374	15	
8D3 エピトープマッピングペプチド 376	16	
ペプチドリンカー (G ₄ S) ₄	17	

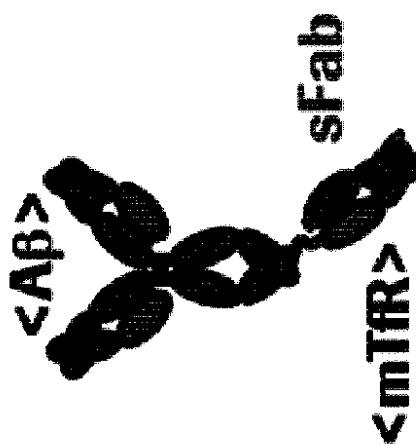
【図 1 A】

Fig. 1A



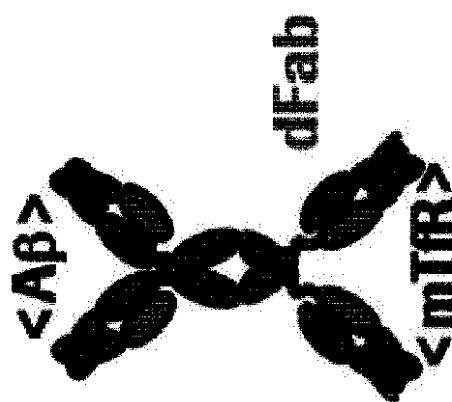
【図 1 B】

Fig. 1B

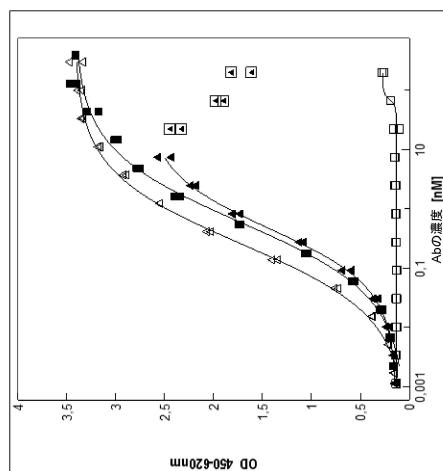


【図 1 C】

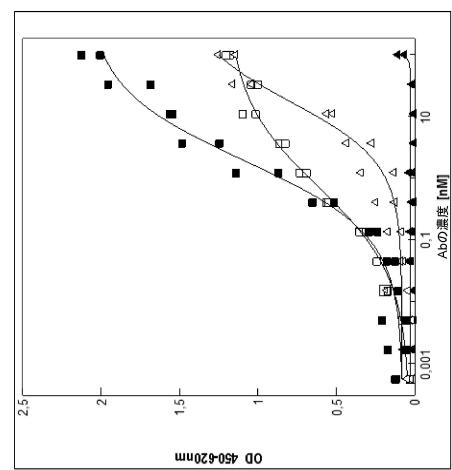
Fig. 1C



【図 2】

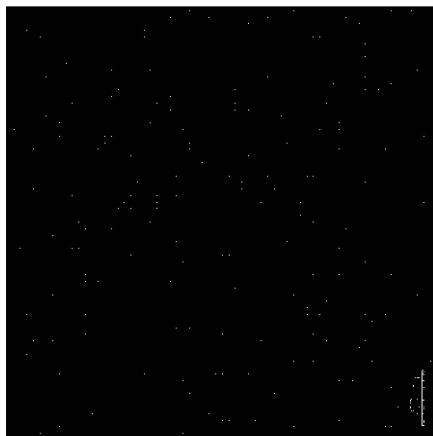


【図 3】



【図 4 A】

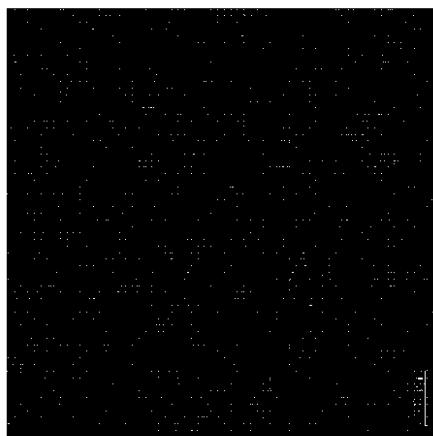
Fig. 4A



mAb31

【図 4 B】

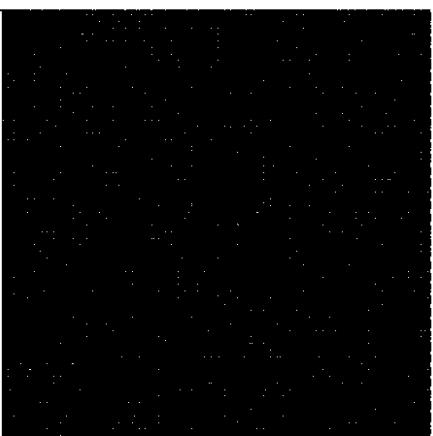
Fig. 4B



sFab-mAb31

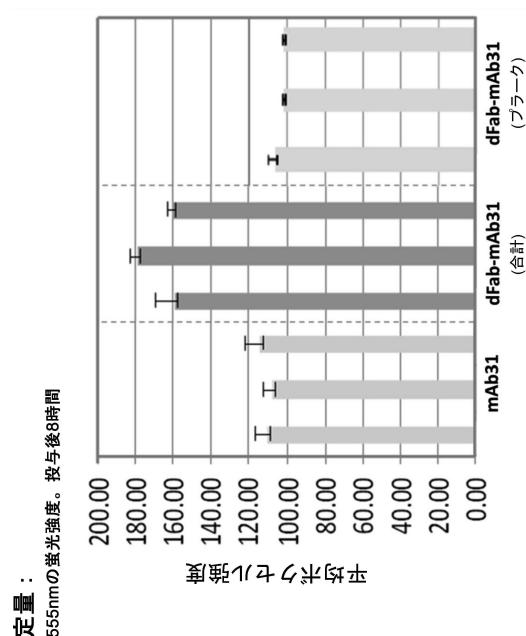
【図 4 C】

Fig. 4C

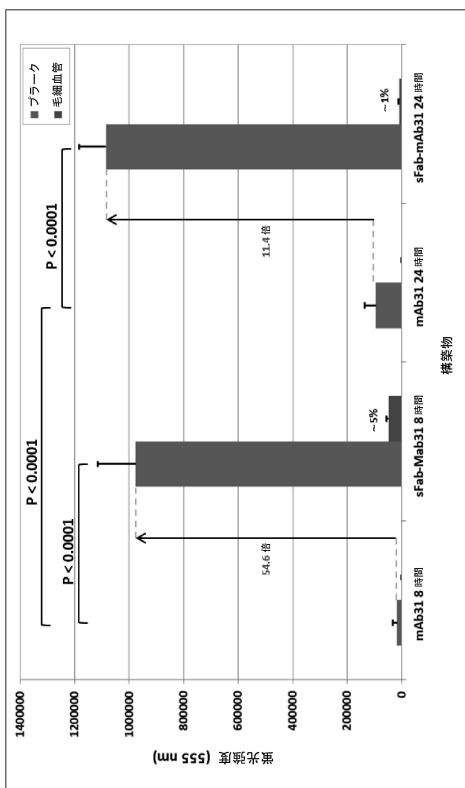


dFab-mAb31

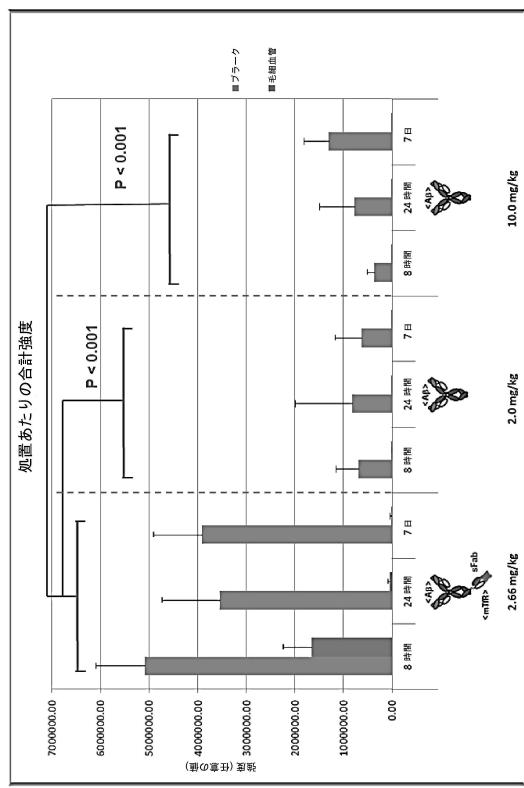
【図 5】



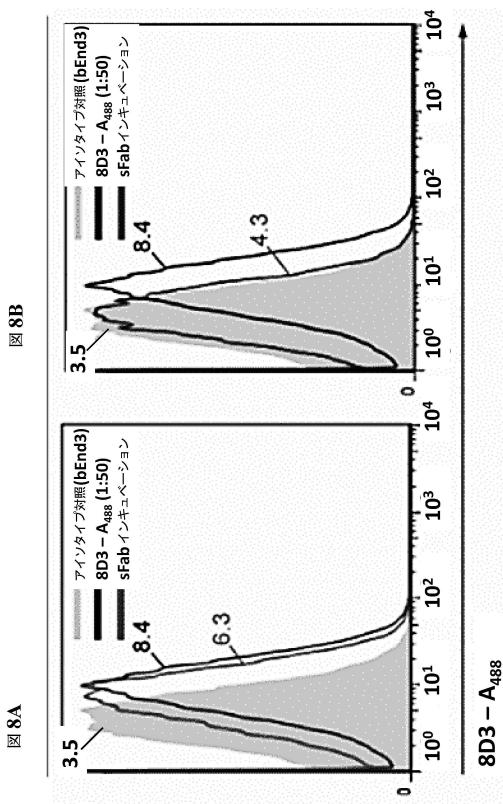
【図6】



【図7】



【図8】



【図9 A - 9 D】

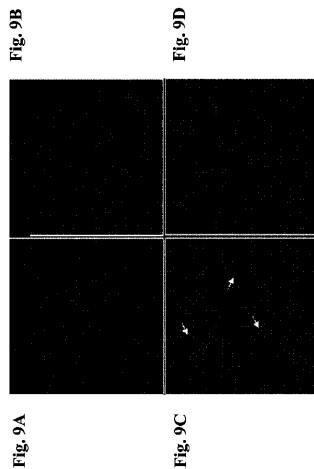
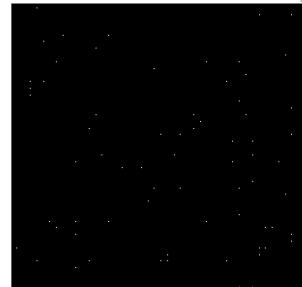


Fig. 10A



【図 10 B】



【図 10 C】



Fig. 10C

Fig. 10B

【図 10 D】

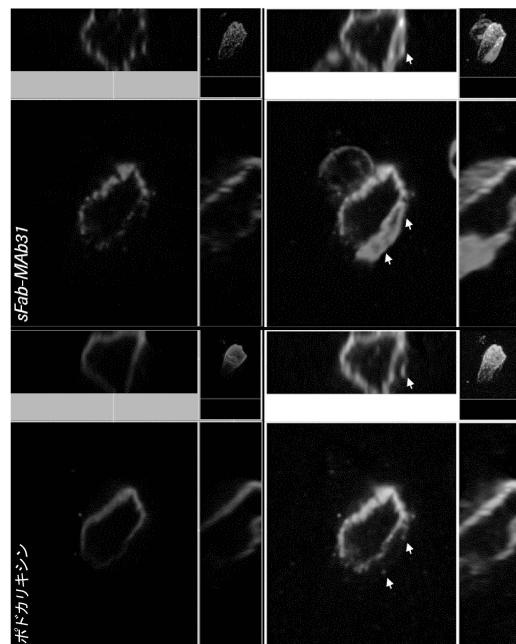


対照

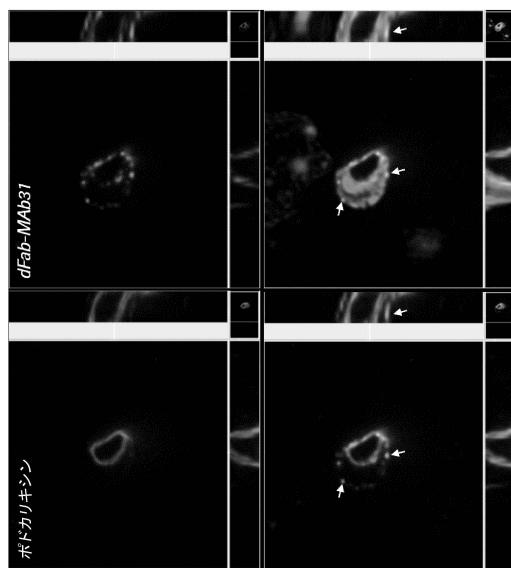
sFab-MAb31

dFab-MAb31

【図 11】



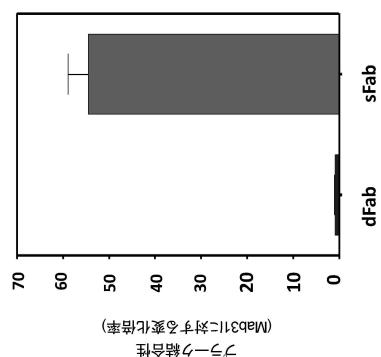
【図 12】



ポドカリキシン

dFab-MAb31

【図 13 A】



MAb31/dFab ratio
マウス結合性

【図 1 3 B】

mAb31

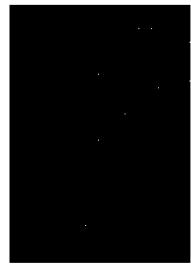


Fig. 13B

【図 1 3 C】

dFab



Fig. 13C

【図 1 3 D】

sfab

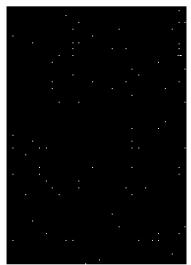
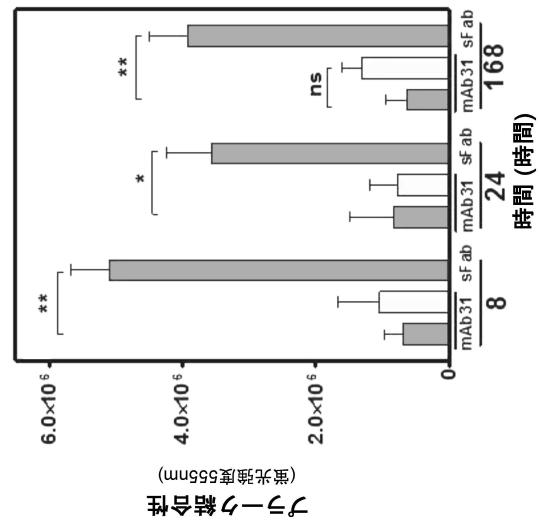


Fig. 13D

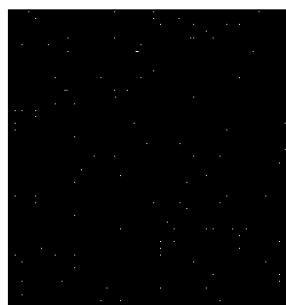
【図 1 3 E】



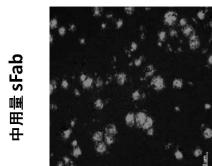
【図13F】



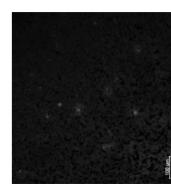
【図13G】



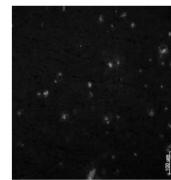
【図14D】



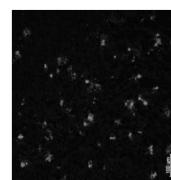
【図14A】



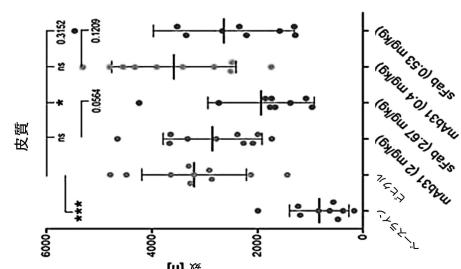
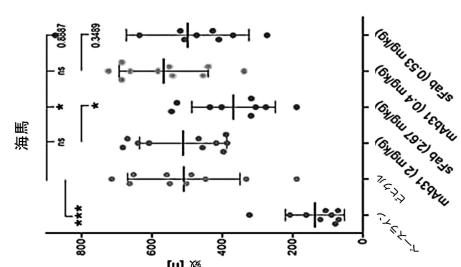
【図14B】



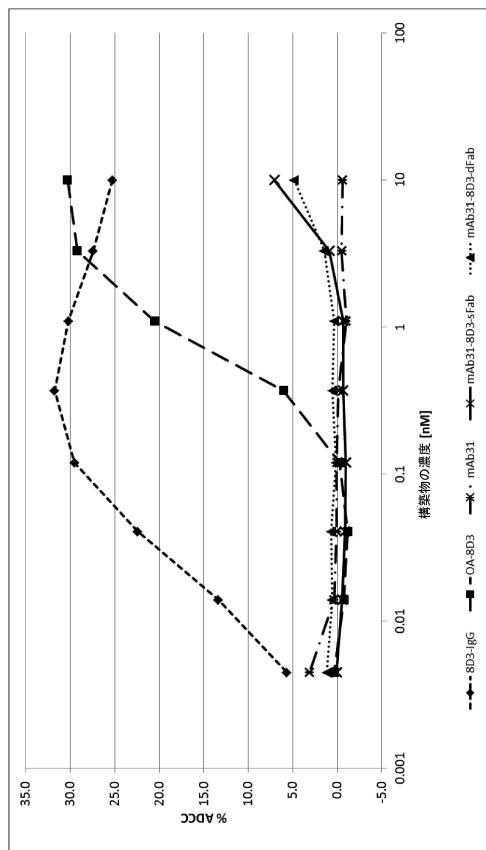
【図14C】



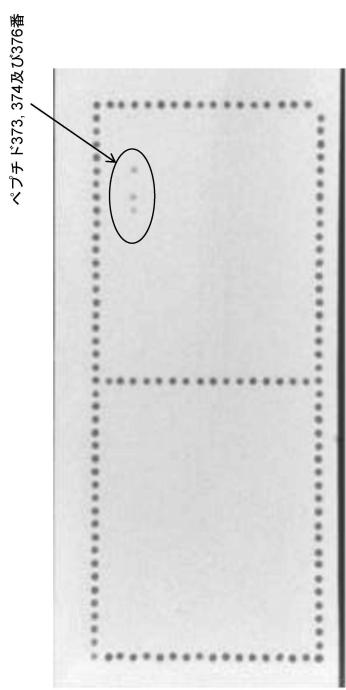
【図14E】



【図15】



【図16】



【配列表】

0006219956000001.app

フロントページの続き

(51) Int.CI.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 K	47/68	
			A 6 1 P	25/28	

(74)代理人 100145104

弁理士 藤館 祥治

(74)代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(72)発明者 ポーマン, ベルント

スイス国、ツェーハー - 4 1 2 5 リーエン、モーアハルデンシュトラーセ 1 6 6 ベー

(72)発明者 フレスクゴード, ペル - オーラ

スイス国、ツェーハー - 4 1 5 3 ライナハ・ベーエル、ライネンヴェーク 1 4 0

(72)発明者 メイヤー, ペーテル

ドイツ国、8 8 4 0 0 ビーベラッハ・アン・デア・リース、アムリスヴィルシュトラーセ 7

(72)発明者 ニーヴェーナー, イエンス

ドイツ国、8 1 4 7 6 ミュンヘン、ロイテナー・シュトラーセ 2 1 アー

(72)発明者 ティソ - ダグエット, アラン

ドイツ国、8 2 0 6 1 ノイリート、フリーダーシュトラーセ 1 1

(72)発明者 ウーリッヒ, エドゥアルト

スイス国、ツェーハー - 4 0 5 3 バーゼル、グンデルディンガーシュトラーセ 1 0 3

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 國際公開第2 0 1 2 / 0 7 5 0 3 7 (WO, A1)

米国特許出願公開第2 0 0 5 / 0 1 4 7 6 1 3 (US, A1)

米国特許出願公開第2 0 1 0 / 0 2 5 6 3 3 8 (US, A1)

米国特許出願公開第2 0 1 0 / 0 0 8 1 7 9 6 (US, A1)

国際公開第2 0 0 7 / 0 6 8 4 2 9 (WO, A1)

mAbs, (2012.03), 4, [2], p.182-197

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d