(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6691144号
(P6691144)
(45)発行日　令和2年4月28日(2020.4.28)　(24)登録日　令和2年4月13日(2020.4.13)

(51)Int.Cl.		F I	
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28
A61P 25/00	(2006.01)	A61P	25/00
A61P 25/02	(2006.01)	A61P	25/02
A61P 25/28	(2006.01)	A61P	25/28
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00

請求項の数 18　(全 96 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-566854 (P2017-566854)
(86)(22)出願日　平成28年6月22日 (2016.6.22)
(65)公表番号　特表2018-520143 (P2018-520143A)
(43)公表日　平成30年7月26日 (2018.7.26)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/064460
(87)国際公開番号　WO2016/207240
(87)国際公開日　平成28年12月29日 (2016.12.29)
審査請求日　平成30年6月18日 (2018.6.18)
(31)優先権主張番号　15173508.1
(32)優先日　平成27年6月24日 (2015.6.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号　15176084.0
(32)優先日　平成27年7月9日 (2015.7.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁 (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　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
(72)発明者　デングル，シュテファン
ドイツ国、８０３３３　ミュンヘン、シュライスハイマー・シュトラーセ　４４アー
(72)発明者　ジョルジュ，ギー
ドイツ国、８２３９２　ハーバッハ、アム・ベルクグラーベン　１１
最終頁に続く

(54)【発明の名称】目的に合わせた親和性を有する抗トランスフェリンレセプター抗体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトトランスフェリンレセプター及びカニクイザルトランスフェリンレセプターに特異的に結合するヒト化抗体であって、
重鎖可変ドメインにおいて、配列番号：６６、６８、及び７２のＨＶＲと、
軽鎖可変ドメインにおいて、配列番号：７５、７６、及び７８のＨＶＲとを含む、
ヒト化抗体であって、
配列番号：２４の重鎖可変ドメインと、配列番号：３７の軽鎖可変ドメインとを含む、ヒト化抗体。
【請求項２】
ヒト化抗体が、エフェクター機能サイレントである、請求項１記載のヒト化抗体。
【請求項３】
ヒト化抗体が、ヒトトランスフェリンレセプターに対する少なくとも１つの結合特異性と、治療ターゲットに対する少なくとも１つの結合特異性とを有する多重特異性抗体である、請求項１又は２記載のヒト化抗体。
【請求項４】
ヒト化抗体が、ヒトトランスフェリンレセプターに結合する第１抗原結合部位と、脳抗原に結合する第２抗原結合部位とを含む、請求項３記載のヒト化抗体。
【請求項５】
脳抗原が、Ａベータ、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）、アルファ－シヌクレイン、ＣＤ２０、アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）、及びグルコセレブロシダーゼからなる群より選択される、請求項４記載のヒト化抗体。

【請求項６】

多重特異性抗体が、

ｉ）ヒトトランスフェリンレセプター及びＡベータの両方、又は

ｉｉ）ヒトトランスフェリンレセプター及びＣＤ２０の両方、又は

ｉｉｉ）ヒトトランスフェリンレセプター及びアルファ－シヌクレインの両方、又は

ｉｖ）ヒトトランスフェリンレセプター及びリン酸化タウの両方、又は

ｖ）ヒトトランスフェリンレセプター及びグルコセレブロシダーゼの両方

に結合する、請求項３～５のいずれか一項記載のヒト化抗体。

【請求項７】

ヒト化抗体が、

ｉ）配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインを含む第１結合部位と、

ｉｉ）第２結合部位であって、

ａ）配列番号：８１の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８２の軽鎖可変ドメイン、又は

ｂ）配列番号：８３の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８４の軽鎖可変ドメイン、又は

ｃ）配列番号：８５の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８６の軽鎖可変ドメイン、又は

ｄ）配列番号：８７の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８８の軽鎖可変ドメイン、又は

ｅ）配列番号：９１の重鎖可変ドメイン及び配列番号：９２の軽鎖可変ドメイン、又は

ｆ）配列番号：８９の重鎖可変ドメイン及び配列番号：９０の軽鎖可変ドメイン、又は

ｇ）配列番号：９３の重鎖可変ドメイン及び配列番号：９４の軽鎖可変ドメイン、又は

ｈ）配列番号：７９の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８０の軽鎖可変ドメイン

から選択される第２結合部位と、を含む二重特異性抗体である、請求項１～６のいずれか一項記載のヒト化抗体。

【請求項８】

ヒト化抗体が、

ａ）ヒトサブクラスＩｇＧ１の全長抗体、又は

ｂ）ヒトサブクラスＩｇＧ４の全長抗体、又は

ｃ）変異Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇを有するヒトサブクラスＩｇＧ１の全長抗体、

ｄ）変異Ｓ２２８Ｐ及びＬ２３５Ｅを有するヒトサブクラスＩｇＧ４の全長抗体、

ｅ）両重鎖における変異Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、ならびに、一方の重鎖における変異Ｔ３６６Ｗ及びＳ３５４Ｃ、ならびに、それぞれの他方の重鎖における変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを有するヒトサブクラスＩｇＧ１の全長抗体、又は

ｆ）両重鎖における変異Ｓ２２８Ｐ及びＬ２３５Ｅ、ならびに、一方の重鎖における変異Ｔ３６６Ｗ及びＳ３５４Ｃ、ならびに、それぞれの他方の重鎖における変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを有するヒトサブクラスＩｇＧ４の全長抗体

である、請求項１～７のいずれか一項記載のヒト化抗体。

【請求項９】

ヒト化抗体が、
ｉ）ヒトＩｇＧ１サブクラスのホモ二量体Ｆｃ領域、又は
ｉｉ）ヒトＩｇＧ４サブクラスのホモ二量体Ｆｃ領域、又は
ｉｉｉ）ヘテロ二量体Ｆｃ領域であって、
ａ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖを含み、もしくは
ｂ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＹ３４９Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＳ３５４Ｃを含み、もしくは
ｃ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＳ３５４Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを含む、ヘテロ二量体Ｆｃ領域、又は
ｉｖ）ヒトＩｇＧ４サブクラスのヘテロ二量体Ｆｃ領域であって、両Ｆｃ領域ポリペプチドが、変異Ｐ３２９Ｇ、Ｌ２３４Ａ、及びＬ２３５Ａを含み、かつ
ａ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖを含み、もしくは
ｂ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＹ３４９Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＳ３５４Ｃを含み、もしくは
ｃ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＳ３５４Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを含む、ヘテロ二量体Ｆｃ領域、又は
ｖ）ヒトＩｇＧ４サブクラスのヘテロ二量体Ｆｃ領域であって、両Ｆｃ領域ポリペプチドが、変異Ｐ３２９Ｇ、Ｓ２２８Ｐ、及びＬ２３５Ｅを含み、かつ
ａ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖを含み、もしくは
ｂ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＹ３４９Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＳ３５４Ｃを含み、もしくは
ｃ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＳ３５４Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを含む、ヘテロ二量体Ｆｃ領域
を含む、請求項１～７のいずれか一項記載のヒト化抗体。

【請求項１０】
請求項１～９のいずれか一項記載のヒト化抗体と、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬製剤。

【請求項１１】
医薬として使用するための、請求項１～９のいずれか一項記載のヒト化抗体。

【請求項１２】
神経障害を処置するための医薬の製造における、請求項１～９のいずれか一項記載のヒト化抗体の使用。

【請求項１３】
神経障害が、末梢神経障害、神経変性疾患、ガン、眼疾患、発作性障害、リソソーム蓄積症、アミロイドーシス、ウイルス又は微生物疾患、虚血、行動障害、及びＣＮＳ炎症からなる群より選択される、請求項１２記載の使用。

【請求項１４】
１つ以上の化合物を、ＢＢＢを通過させて輸送するための医薬の製造における、請求項１～９のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項１５】
神経障害の処置に使用するための、請求項１～９のいずれか一項記載のヒト化抗体。

【請求項１６】
神経障害が、末梢神経障害、神経変性疾患、ガン、眼疾患、発作性障害、リソソーム蓄積症、アミロイドーシス、ウイルス又は微生物疾患、虚血、行動障害、及びＣＮＳ炎症からなる群より選択される、請求項１５記載のヒト化抗体。
【請求項１７】
医薬の製造における、請求項１～９のいずれか一項記載のヒト化抗体の使用。
【請求項１８】
医薬が、末梢神経障害、神経変性疾患、ガン、眼疾患、発作性障害、リソソーム蓄積症、アミロイドーシス、ウイルス又は微生物疾患、虚血、行動障害、及びＣＮＳ炎症からなる群より選択される神経障害の処置のためのものである、請求項１７記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
［発明の分野］
本発明は、ヒトトランスフェリンレセプターに対して設計されたオフレートを有する抗トランスフェリンレセプター抗体及び血液脳関門シャトルモジュールとしてのその使用に関する。
【０００２】
［背景］
脳への低浸透性を有する神経障害剤、例えば、大型のバイオ医薬又は小分子剤等の脳への浸透は、神経血管系単位（ＮＶＵ）における他の細胞コンポーネントと共に、広範で、不浸透性の血液脳関門（ＢＢＢ）により、厳密に制限されている。この障害を克服するための多くの戦略が試されてきた。その１つが、脳毛細管内皮に発現している内在性レセプター（血液脳関門レセプター）により媒介される経細胞輸送経路を利用するものである。脳へのバイオ医薬のレセプター媒介性送達を可能にするリコンビナントタンパク質、例えば、モノクローナル抗体又はペプチドが、これらのレセプターに対して設計されてきた。しかしながら、脳への取込みを最大化する戦略は、脳内皮細胞（ＢＥＣ）への誤った局在化を最小化するが、ＢＥＣにおける特定の細胞小器官（特に、バイオ医薬の分解をもたらす小器官）への蓄積の程度は、不明なままである。
【０００３】
モノクローナル抗体及び他のバイオ医薬は、中枢神経系（ＣＮＳ）における病理の処置に大きな治療的可能性を有する。しかしながら、脳へのその経路は、ＢＢＢにより妨げられる。以前の研究では、血流に注入された内の非常に小さな割合（約０．１％）のＩｇＧしか、ＣＮＳ区画内に浸透することができないことが例証されている（Felgenhauer, Klin. Wschr. 52 (1974) 1158-1164）。このことは、ＣＮＳ内の抗体が低濃度であるため、どのような薬理学的作用も間違いなく制限するであろう。
【０００４】
ＣＮＳ内に分布する抗体の割合をＢＢＢレセプター（すなわち、トランスフェリンレセプター、インスリンレセプター等）を利用することにより改善することができることが、以前に見出された（例えば、国際公開公報第９５／０２４２１号を参照のこと）。
【０００５】
したがって、ＢＢＢを通過させて、脳内に効率的に薬剤を輸送する神経障害剤の送達システムについての必要性が存在する。
【０００６】
国際公開公報第２０１４／０３３０７４号には、血液脳関門シャトルが報告されている。
【０００７】
国際公開公報第２０１４／１８９９７３号には、抗トランスフェリンレセプター抗体及び使用方法が報告されている。ＢＢＢレセプターを伝統的な特異的高親和性抗体によりターゲッティングすることにより、ＢＢＢ輸送における限定された増大がもたらされること

が更に報告されている。ＣＮＳ内への抗体の取込みの大きさ及びＣＮＳにおける分布は、研究された抗ＢＢＢ抗体の中で、ＢＢＢレセプターに対するその結合親和性に逆相関することが、後に見出された。例えば、治療用量レベルで投与されたトランスフェリンレセプター（ＴｆＲ）に対する低親和性抗体により、高親和性抗ＴｆＲ抗体に対して、抗ＴｆＲ抗体のＢＢＢ輸送及びＣＮＳ保持がかなり改善され、ＣＮＳにおける治療濃度をより容易に保持することが可能である（Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43）。このようなＢＢＢ輸送の証明が、ＴｆＲとアミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）開裂酵素であるβ－セクレターゼ（ＢＡＣＥ１）との両方に結合する二重特異性抗体を使用して達成された。低親和性抗体を使用して操作された二重特異性抗ＴｆＲ／ＢＡＣＥ１抗体の１回の全身投与によって、脳への顕著な抗体取込みがもたらされるだけでなく、単特異的抗ＢＡＣＥ１単独と比較して、脳Ａβ１－４０のレベルを劇的に低下した。このことから、ＢＢＢ浸透が、抗ＢＡＣＥ１の能力により影響を受けることが示唆している（Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43；Yu et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra44）。

【０００８】

さらに、治療用途を意図したモノクローナル抗体（ｍＡｂ）の徹底的な非臨床安全性評価は、非常に重要である。抗体の操作態様の複雑性及び抗体生成のためのリコンビナント生成細胞系の多様性により誘引される可変性が増大するためである。さらに、伝統的な小分子薬剤と比較して、ｍＡｂのその複雑な構造、固有の生物学的機能、及びより長い半減期が、慢性疾患の処置についてのｍＡｂの長い臨床使用による懸念に加えて、安全性の考慮に加わる（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Kim, S.J., et al., Mol. Cells 20 (2005) 17-29）。

【０００９】

ｍＡｂについての非臨床研究の全体としての目的は、対象となるｍＡｂの毒性学的特性を定義し、製品開発のための情報を提供することである。非臨床評価の主な目的は、毒性についてのターゲット臓器の特定およびその毒性が処置により可逆的であるかどうかを判定すること、（２）ヒト第Ｉ相臨床試験に安全な開始用量及びその後の用量増大スキームの特定、（３）臨床試験において安全性パラメータをモニターする情報の提供、及び（４）製品ラベルに要求を支持する安全性データを提供することである。これらの目的を達成するために、抗体の薬理学的特性を定義し、理解するのに役立つ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏの両方における非臨床研究が行われている（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Cavagnaro, J.A., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.)「Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals」; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65）。

【００１０】

ｍＡｂの非臨床安全性評価の成功のために、最も関連する動物種が、毒性試験に選択される必要がある（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126）。関連する種は、抗体が薬理学的に活性であり、ターゲット抗原が存在し、又は、発現されている必要があり、組織交叉反応性プロファイルがヒトに類似している必要がある種である（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126；Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205；Hall, W.C., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240）。免疫化学及び機能アッセイ法を使用して、所望のエピトープを発現し、ヒト組織に類似する組織交叉反応性プロファイルを説明している関連する動物種を特定することができる（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Hall, W.C., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240）。種交叉反応性研究は、このプロセスにおいて有用であり、市販の多種組織マイクロアレイを使用する、各種の種からの組織の免疫組織化学的調査を含む（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Hall, W.C

., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240）。あるいは、蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）によるこれらの動物からの細胞に対する抗体結合性の評価は、典型的には、細胞切片の免疫組織学的分析より高感度である(Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205）。ターゲット抗原のＤＮＡ及びアミノ酸配列が、種間で比較される必要があり、種間のホモロジーが判定される必要がある（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205）。

【００１１】

加えて、抗原の生体分布、機能、及び構造は、ターゲット抗原の抗体結合により生じる毒性の評価を可能するために、関連する動物種とヒトとの間で比較可能である必要がある。同毒性は、ｏｎターゲット毒性と呼ばれる（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; 19,20）。さらに、動物種及びヒトにおいて、ターゲット抗原組織分布における強力な類似性から、動物において特定されたターゲット臓器の毒性が、ヒトにおいて可能性ある毒性を予測するであろうことが考えられる。動物種とヒトとの間の抗原組織分布における類似性の欠如は、毒性研究のための動物種の使用を全体としては妨げるものではないが、これらの差異は、ヒトのリスク評価に考慮されるべきである。抗原密度又は親和性についても同様に、動物モデルとヒトとの間の絶対的な同等性は求められない。毒性試験に選択された種の関連性についての正当化は、規制の順守に含まれる必要がある。１種のみが安全性評価に使用される場合、更なる関連種の不存在を説明する実験概要が保証される（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11）。

【００１２】

治療的使用が意図されたモノクローナル抗体が、種交叉反応性をいずれも有さない場合、代理抗体又はそのモデルについて異なる種が使用される必要がある。このため、代理抗体は、制限された種交叉反応性を有するヒト化モノクローナル抗体により可能となる、限定された安全性試験に対する可能性のある解決策である。しかしながら、現在、可能性のある代理抗体が臨床薬についての安全性問題を判定するのにおけるその使用前に判定される必要がある、評価基準が定義されていない（Regulatory Toxicology and Pharmacology Volume 40, Issue 3, December 2004, Pages 219-226）。

【００１３】

このため、特定のｍＡｂについての動物モデルを特定するために、上記考慮がなされる必要があるが、それにも関わらず、対象となるｍＡｂが、試験種のターゲット抗原に対する交叉反応性を有することが必要である。他にも、最も適切な試験種であっても使用することができない場合がある。したがって、ヒト及び非臨床試験を意図した種におけるそのターゲットについて、種内交叉反応性を有しないが、種間交叉反応性を有する、ｍＡｂについての必要性が存在する。

【００１４】

欧州特許第２７０８５６０号には、トランスフェリンレセプターを特異的に認識する抗体が報告されている。フランス国特許第２９５３８４１号には、トランスフェリンレセプターを対象とする抗体及び鉄依存性腫瘍の免疫療法のためのその使用が報告されている。米国特許出願公開公報第２００９／１６２３５９号には、二価の二重特異性抗体が報告されている。

【００１５】

［概要］

本明細書に報告されている抗トランスフェリンレセプター抗体は、血液脳関門を通過させて、脳内に脳エフェクター実体を輸送する、血液脳関門シャトルモジュールとして使用することができることが見出されている。特定の実施態様では、血液脳関門シャトルモジュールは、トランスフェリンレセプターに特異的に結合する、一価の結合実体である。本

明細書に報告されている抗トランスフェリンレセプター抗体は、血液脳関門シャトルモジュールとして使用された場合、例えば、神経障害、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、及びアルツハイマー病とパーキンソン病との併存疾患の診断又は処置に有用である。

【００１６】

本明細書において、ヒトトランスフェリンレセプター（ｈｕＴｆＲ）及びカニクイザルトランスフェリンレセプター（ｃｙＴｆＲ）に特異的に結合する、抗トランスフェリンレセプター抗体が報告される。特定の実施態様では、抗トランスフェリンレセプター抗体は、

・ヒトトランスフェリンレセプター（ｈｕＴｆＲ）及びカニクイザルトランスフェリンレセプター（ｃｙＴｆＲ）に結合し、

・カニクイザルトランスフェリンレセプターに対する抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１のオフレート以下の（すなわち、多くても）、ヒトトランスフェリンレセプターに対するオフレートを有し、ここで、該オフレートは、表面プラズモン共鳴により決定され、ここで、抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１は、配列番号：６４の重鎖可変ドメインと配列番号：６５の軽鎖可変ドメインとを有し、

・０．１１/s～０．００５１/sであり、これらを含むヒトトランスフェリンレセプターに対するオフレートで結合する。

【００１７】

本明細書に報告されている一態様は、ヒトトランスフェリンレセプター及びカニクイザルトランスフェリンレセプターに特異的に結合し、

ｉ）配列番号：０１の重鎖可変ドメインから得られたヒト化重鎖可変ドメインと、

ｉｉ）配列番号：２６の軽鎖可変ドメインから得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含み、

ここで、カニクイザルトランスフェリンレセプターに対する抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１のオフレート以下の（すなわち、多くても）、ヒトトランスフェリンレセプターに対するオフレートを有し、

ここで、該オフレートは、表面プラズモン共鳴により決定され、

ここで、抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１は、配列番号：６４の重鎖可変ドメインと配列番号：６５の軽鎖可変ドメインとを有する、

抗トランスフェリンレセプター抗体である。

【００１８】

一実施態様において、ヒトトランスフェリンレセプターに対するオフレートは、０．１１/s～０．００５１/sであり、これらを含む。

【００１９】

一実施態様において、本抗体は、軽鎖可変ドメインにおいて、８０位にプロリンアミノ酸残基（Ｐ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を有する。

【００２０】

一実施態様において、本抗体は、軽鎖可変ドメインにおいて、９１位にアスパラギンアミノ酸残基（Ｎ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を有する。

【００２１】

一実施態様において、本抗体は、軽鎖可変ドメインにおいて、９３位にアラニンアミノ酸残基（Ａ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を有する。

【００２２】

一実施態様において、本抗体は、重鎖可変ドメインにおいて、１００ｇ位にセリンアミノ酸残基（Ｓ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を有する。

【００２３】

一実施態様において、本抗体は、重鎖可変ドメインにおいて、１００ｇ位にグルタミンアミノ酸残基（Ｑ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を有する。

【００２４】

一実施態様において、本抗体は、重鎖可変ドメインにおいて、６５位にセリンアミノ酸残基（Ｓ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を有する。

【００２５】

一実施態様において、本抗体は、重鎖可変ドメインにおいて、１０５位にグルタミンアミノ酸残基（Ｑ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を有する。

【００２６】

一実施態様において、本抗体は、軽鎖可変ドメインにおいて、８０位にプロリンアミノ酸残基（Ｐ）、軽鎖可変ドメインにおいて、９１位にアスパラギンアミノ酸残基（Ｎ）、軽鎖可変ドメインにおいて、９３位にアラニンアミノ酸残基（Ａ）、重鎖可変ドメインにおいて、１００ｇ位にセリンアミノ酸残基（Ｓ）、重鎖可変ドメインにおいて、６５位にセリンアミノ酸残基（Ｓ）、及び、重鎖可変ドメインにおいて、１０５位にグルタミンアミノ酸残基（Ｑ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を有する。

【００２７】

一実施態様において、本抗体は、軽鎖可変ドメインにおいて、８０位にプロリンアミノ酸残基（Ｐ）、軽鎖可変ドメインにおいて、９１位にアスパラギンアミノ酸残基（Ｎ）、軽鎖可変ドメインにおいて、９３位にアラニンアミノ酸残基（Ａ）、重鎖可変ドメインにおいて、１００ｇ位にグルタミンアミノ酸残基（Ｑ）、重鎖可変ドメインにおいて、６５位にセリンアミノ酸残基（Ｓ）、及び、重鎖可変ドメインにおいて、１０５位にグルタミンアミノ酸残基（Ｑ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を有する。

【００２８】

本明細書に報告されている一態様は、（ａ）配列番号：６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号：６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号：７１、７２、又は７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号：７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号：７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２；及び（ｆ）配列番号：７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、抗トランスフェリンレセプター抗体である。

【００２９】

好ましい一実施態様では、抗トランスフェリンレセプター抗体は、（ａ）配列番号：６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号：６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号：７２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号：７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号：７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２；及び（ｆ）配列番号：７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【００３０】

本明細書に報告されている一態様は、ヒトトランスフェリンレセプター（ｈｕＴｆＲ）に特異的に結合する、抗トランスフェリンレセプター抗体であり、

ｉ）配列番号：２４のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列と、

ｉｉ）配列番号：３７のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）配列とを含み、

ここで、該抗体は、配列番号：２４の重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列と配列番号：３７の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）配列とを含む抗体と約同じオフレートを有する、抗トランスフェリンレセプター抗体である。

【００３１】

一実施態様において、ヒトトランスフェリンレセプターに対するオフレートは、０．１1/s～０．００51/sであり、これらを含む。

【００３２】

本明細書に報告されている好ましい一態様は、ヒトトランスフェリンレセプター（ｈｕＴｆＲ）に特異的に結合し、

ｉ）配列番号：２４のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列と、

ｉｉ）配列番号：３７のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む、抗

トランスフェリンレセプター抗体である。

【００３３】

全ての態様の一実施態様では、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対して少なくとも１つの結合特異性と、治療ターゲットに対する少なくとも１つの特異性とを有する、多重特異性抗体である。一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに結合する第１抗原結合部位と、脳抗原に結合する第２抗原結合部位とを含む。更なる実施態様では、脳抗原は、ヒトＡベータ、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）、ヒトアルファ－シヌクレイン、チロシン又はセリン残基においてリン酸化されているヒトｔａｕ、ヒトＣＤ２０、アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）、及びヒトグルコセレブロシダーゼからなる群より選択される。好ましい一実施態様では、多重特異性抗体は、

ｉ）トランスフェリンレセプター及びＡベータの両方、又は

ｉｉ）トランスフェリンレセプター及びＣＤ２０の両方、又は

ｉｉｉ）トランスフェリンレセプター及びアルファ－シヌクレインの両方、又は

ｉｖ）トランスフェリンレセプター及びリン酸化タウの両方、又は

ｖ）トランスフェリンレセプター及びＨＥＲ２の両方、又は

ｖｉ）トランスフェリンレセプター及びグルコセレブロシダーゼの両方

に結合する。

【００３４】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトＡベータに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８１の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８２の軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【００３５】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトＣＤ２０に対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：７９の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８０の軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。一実施態様において、該重鎖可変領域は、Ｋａｂａｔの１１位におけるアミノ酸残基の任意のアミノ酸、ただし、ロイシンによる置換えを含む。一実施態様において、この置換は、Ｋａｂａｔの１１位におけるアミノ酸残基の非極性アミノ酸による置換えを含む。好ましい一実施態様では、この置換は、配列番号：７９の重鎖可変ドメインにおけるＫａｂａｔの１１位でのアミノ酸残基の、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、及びフェニルアラニンからなる群より選択されるアミノ酸残基による置換えを含む。

【００３６】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファ－シヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８３の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８４の軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【００３７】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファ－シヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８５から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：８６から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【００３８】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可

変ドメインと、ヒトアルファーシヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８７から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：８８から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【００３９】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファーシヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８９から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：９０から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【００４０】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファーシヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：９１から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：９２から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【００４１】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファーシヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：９３から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：９４から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【００４２】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ｉ）配列番号：９７のアミノ酸配列を有するグルコセレボシダーゼ、又は、ｉｉ）少なくとも７０％の配列同一性を有する配列番号：９７の機能性変異体、又は、ｉｉｉ）１つ以上のアミノ酸変異、欠失、もしくは挿入を有する配列番号：９７の機能性変異体、又は、ｉｖ）Ｎ末端もしくはＣ末端において又は欠失されたアミノ酸配列内に少なくとも１つのアミノ酸残基を有する配列番号：９７のトランケート機能性変異体、又は、Ｖ）　ｉｉｉ）とｉｖ）との組み合わせに対する結合部位とを含む、二重特異性抗体である。

【００４３】

全ての態様の一実施態様では、本抗体は、

ｉ）場合により、変異Ｐ３２９Ｇ、Ｌ２３４Ａ、及びＬ２３５Ａを有するヒトＩｇＧ１サブクラスのホモ二量体Ｆｃ領域、又は

ｉｉ）場合により、変異Ｐ３２９Ｇ、Ｓ２２８Ｐ、及びＬ２３５Ｅを有するヒトＩｇＧ４サブクラスのホモ二量体Ｆｃ領域、又は

ｉｉｉ）ヘテロ二量体Ｆｃ領域であって、

ａ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖを含み、もしくは

ｂ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＹ３４９Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＳ３５４Ｃを含み、もしくは

ｃ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＳ３５４Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを含む、ヘテロ二量体Ｆｃ領域、又は

ｉｖ）ヒトＩｇＧ４サブクラスのヘテロ二量体Ｆｃ領域であって、両Ｆｃ領域ポリペプチドが、変異Ｐ３２９Ｇ、Ｌ２３４Ａ、及びＬ２３５Ａを含み、かつ

ａ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖを含み、もしくは

ｂ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＹ３４９Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＳ３５４Ｃを含み、もしくは

ｃ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＳ３５４Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを含む、ヘテロ二量体Ｆｃ領域、又は

ｖ）ヒトＩｇＧ４サブクラスのヘテロ二量体Ｆｃ領域であって、両Ｆｃ領域ポリペプチドが、変異Ｐ３２９Ｇ、Ｓ２２８Ｐ、及びＬ２３５Ｅを含み、かつ

ａ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖを含み、もしくは

ｂ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＹ３４９Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＳ３５４Ｃを含み、もしくは

ｃ）一方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｗ及びＳ３５４Ｃを含み、他方のＦｃ領域ポリペプチドが、変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを含む、ヘテロ二量体Ｆｃ領域

を含む。

【００４４】

全ての態様の一実施態様では、本抗体は、ＣｒｏｓｓＭａｂである。

【００４５】

本明細書に報告されている一態様は、

ｉ）配列番号：５２、５３、５４、５５、５６、５７、及び５８からなる群より選択される重鎖可変ドメイン、ならびに、配列番号：６０、６１、６２、及び６３からなる群より選択される軽鎖可変ドメイン、又は

ｉｉ）配列番号：２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、及び２５からなる群より選択される重鎖可変ドメイン、ならびに、配列番号：２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、及び４７からなる群より選択される軽鎖可変ドメイン

を含む、抗トランスフェリンレセプター抗体である。

【００４６】

本明細書に報告されている一態様は、本明細書に報告されている抗体と、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬製剤である。

【００４７】

本明細書に報告されている一態様は、医薬として使用するための、本明細書に報告されている抗体である。

【００４８】

本明細書に報告されている一態様は、神経障害を処置するための医薬の製造における、本明細書に報告されている抗体の使用である。

【００４９】

一実施態様において、神経障害は、末梢神経障害、神経変性疾患、ガン、眼疾患、発作性障害、リソソーム蓄積症、アミロイドーシス、ウイルス又は微生物疾患、虚血、行動障害、ＣＮＳ炎症、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、脳転移を伴うＣＤ２０陽性ガン、及び脳転移を伴うＨｅｒ２陽性ガンからなる群より選択される。

【００５０】

本明細書に報告されている一態様は、１つ以上の化合物を、血液脳関門（ＢＢＢ）を通過させて輸送するための医薬の製造における、本明細書に報告されている抗体の使用である。

【図面の簡単な説明】

【００５１】

【図１】経細胞輸送アッセイ法のスキーム。
【図２】BIAcoreを使用して２５℃で測定された種々の抗トランスフェリンレセプター抗体のオフレート。１：１２８．１；２：抗ｐＴａｕ抗体ｍＡｂ８６に融合した１２８．１；３：５６７；４：９３２；５：抗ｐＴａｕ抗体ｍＡｂ８６に融合した５６７；６：１０２６；７：１０２７；四角：カニクイザルトランスフェリンレセプターに対する結合；丸：ヒトトランスフェリンレセプターに対する結合；ｙ軸：オフレート［1/s］。
【図３】BIAcoreを使用して３７℃で測定された種々の抗トランスフェリンレセプター抗体のオフレート。１：１２８．１；２：９３２；３：１０２６；４：１０２７；四角：カニクイザルトランスフェリンレセプターに対する結合；丸：ヒトトランスフェリンレセプターに対する結合；ｙ軸：オフレート［1/s］。
【００５２】
［本発明の実施態様の詳細な説明］
本明細書において、実施例８の経細胞輸送アッセイ法において、高い経細胞輸送を示す、ウサギ抗体２９９のヒト化変異体が報告される。同抗体は、ヒト及びカニクイザルトランスフェリンレセプターに対する交叉反応性を有する、すなわち、トランスフェリンレセプターの両オルソログに対して特異的に結合し、良好な細胞染色を示し、ヒトトランスフェリンレセプターに対して、カニクイザルトランスフェリンレセプターに対するマウス抗体１２８．１と同様の半減期（オフレートにより反映）を有する。
【００５３】
本明細書に報告されている一態様は、ヒトトランスフェリンレセプターに特異的に結合するヒト化抗体であって、
重鎖可変ドメインにおいて、配列番号：６６、６８、及び７２のＨＶＲと、
軽鎖可変ドメインにおいて、配列番号：７５、７６、及び７８のＨＶＲとを含む、
ヒト化抗体である。
【００５４】
一実施態様において、本ヒト化抗体は、配列番号：２４の重鎖可変ドメインと、配列番号：３７の軽鎖可変ドメインとを含む。
【００５５】
一実施態様において、本ヒト化抗体は、エフェクター機能サイレントである。
【００５６】
一実施態様において、本ヒト化抗体は、ヒトトランスフェリンレセプター及びカニクイザルトランスフェリンレセプターに特異的に結合する。
【００５７】
一実施態様において、本ヒト化抗体は、
ａ）ヒトサブクラスＩｇＧ１の全長抗体、又は
ｂ）ヒトサブクラスＩｇＧ４の全長抗体、又は
ｃ）変異Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇを有するヒトサブクラスＩｇＧ１の全長抗体、
ｄ）変異Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、及び場合により、Ｐ３２９Ｇを有するヒトサブクラスＩｇＧ４の全長抗体、
ｅ）両重鎖における変異Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、ならびに、一方の重鎖における変異Ｔ３６６Ｗ及びＳ３５４Ｃ、ならびに、それぞれの他方の重鎖における変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを有するヒトサブクラスＩｇＧ１の全長抗体、又は
ｆ）両重鎖における変異Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、及び場合により、Ｐ３２９Ｇ、ならびに、一方の重鎖における変異Ｔ３６６Ｗ及びＳ３５４Ｃ、ならびに、それぞれの他方の重鎖における変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを有するヒトサブクラスＩｇＧ４の全長抗体
である。
【００５８】

本明細書に報告されている一態様は、
ｉ）配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインを含む第１結合部位と、
ｉｉ）第２結合部位であって、
ａ）配列番号：８１の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８２の軽鎖可変ドメイン、又は
ｂ）配列番号：８３の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８４の軽鎖可変ドメイン、又は
ｃ）配列番号：８５の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８６の軽鎖可変ドメイン、又は
ｄ）配列番号：８７の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８８の軽鎖可変ドメイン、又は
ｅ）配列番号：９１の重鎖可変ドメイン及び配列番号：９２の軽鎖可変ドメイン、又は
ｆ）配列番号：８９の重鎖可変ドメイン及び配列番号：９０の軽鎖可変ドメイン、又は
ｇ）配列番号：９３の重鎖可変ドメイン及び配列番号：９４の軽鎖可変ドメイン、又は
ｈ）配列番号：７９の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８０の軽鎖可変ドメイン
から選択される第２結合部位と、
を含む二重特異性抗体である。

【００５９】

本明細書に報告されている一態様は、本明細書に報告されている抗体と、場合により、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬製剤である。

【００６０】

本明細書に報告されている一態様は、医薬として使用するための、本明細書に報告されている抗体である。

【００６１】

本明細書に報告されている一態様は、神経障害の処置に使用するための、本明細書に報告されている抗体である。

【００６２】

本明細書に報告されている一態様は、医薬の製造における、本明細書に報告されている抗体の使用である。

【００６３】

本明細書に報告されている一態様は、神経障害を処置するために、本明細書に報告されている抗体を投与することを含む、処置方法である。

【００６４】

本明細書における目的で、「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義されているヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク由来の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）フレームワーク又は重鎖可変ドメイン（ＶＨ）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「由来の」アクセプターヒトフレームワークは、それと同じアミノ酸配列を含んでもよいし、又は、同フレームワークは、アミノ酸配列の変化を含有してもよい。一部の実施態様では、アミノ酸変化の数は、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、又は２以下である。一部の実施態様では、ＶＬアクセプターヒトフレームワークは、ＶＬヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に対して同一の配列である。

【００６５】

「親和性」は、分子（例えば、抗体）の１つの結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間における非共有的相互作用の総計強度を意味する。特に断りない限り、本

明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合対メンバー（例えば、抗体と抗原）間における１：１の相互作用を反映する、固有の結合親和性を意味する。分子Ｘのそのパートナー Ｙに対する親和性は、一般的には、解離定数（Ｋｄ）により表現することができる。親和性は、本明細書に記載されているものを含めて、当技術分野において公知の一般的な方法により測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な実例となり、かつ、例示的な実施態様は、以下に記載されている。

【００６６】

「親和性成熟」抗体は、このような変異を有さない親抗体と比較して、１つ以上の超可変領域（ＨＶＲ）において、１つ以上の変異を有する抗体を意味する。このような変異は、抗原に対する抗体の親和性における改善をもたらす。

【００６７】

本明細書において、「抗体」という用語は、最も広い意味に使用され、種々の抗体構造を包含する。同抗体構造は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び、所望の抗原結合活性を示す限りにおいて抗体フラグメントを含むが、これらに限定されない。

【００６８】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含む、インタクトな抗体以外の分子を意味する。抗体フラグメントの例は、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$；ディアボディ；直線抗体；一本鎖抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）；及び抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体を含むが、これらに限定されない。

【００６９】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定のソース又は種に由来し、一方、重鎖及び／又は軽鎖の残り部分が、異なるソース又は種に由来する、抗体を意味する。

【００７０】

抗体の「クラス」は、その重鎖により保有されている定常ドメイン又は定常領域の種類を意味する。５つの主なクラスの抗体：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭが存在し、これらのいくつかは、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$Ａ_1$、及びＩｇ$Ａ_2$に更に分割することができる。種々のクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、α、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。

【００７１】

「エフェクター機能」は、抗体のＦｃ領域に起因する、それらの生物学的活性を意味する。同Ｆｃ領域は、抗体クラスにより変化する。抗体のエフェクター機能の例は、Ｃ１ｑ結合性及び補体依存性細胞毒性（ＣＤＣ）；Ｆｃレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ＡＤＣＣ）；食作用；細胞表面レセプター（例えば、Ｂ細胞レセプター）のダウンレギュレーション；及びＢ細胞活性化を含む。

【００７２】

薬剤、例えば、医薬製剤の「有効量」は、所望の治療的又は予防的結果を達成するのに必要な用量及び期間において、有用な量を意味する。

【００７３】

本明細書において、「Ｆｃ領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を定義するのに使用される。この用語は、ネイティブな配列のＦｃ領域及び変異型のＦｃ領域を含む。一実施態様において、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、Ｃｙｓ２２６から又はＰｒｏ２３０から、重鎖のカルボキシル末端に広がっている。ただし、Ｆｃ領域のＣ末端リシン（Ｌｙｓ４４７）は、存在してもよいし、又は、存在しなくてもよい。本明細書において特に断りない限り、Ｆｃ領域又は定常領域中のアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Be

thesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242に記載されており、ＥＵインデックスとも呼ばれる、ＥＵナンバリングシステムに従う。

【００７４】

「フレームワーク」又は「ＦＲ」は、超可変領域（ＨＶＲ）残基以外の可変ドメイン残基を意味する。可変ドメインのＦＲは、一般的には、４つのＦＲドメイン：ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４からなる。したがって、ＨＶＲ及びＦＲ配列は、一般的には、ＶＨ（又はＶＬ）における下記配列：ＦＲ１－Ｈ１（Ｌ１）－ＦＲ２－Ｈ２（Ｌ２）－ＦＲ３－Ｈ３（Ｌ３）－ＦＲ４で表される。

【００７５】

「全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、ネイティブな抗体構造と実質的に同じ構造を有するか、又は、本明細書に定義されているＦｃ領域を含有する重鎖を有する抗体を意味するのに、本明細書において互換的に使用される。

【００７６】

「ホスト細胞」、「ホスト細胞系統」、及び「ホスト細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外因性の核酸が導入されている細胞を意味し、このような細胞の子孫を含む。ホスト細胞は、「トランスフォーマント」及び「トランスフォーメーションされた細胞」を含む。トランスフォーメーションされた細胞は、初代のトランスフォーメーションされた細胞と、継代回数に関わらずそれ由来の子孫とを含む。子孫は、核酸含量において、親細胞と完全に同一でなくてもよく、突然変異を含有してもよい。元のトランスフォーメーションされた細胞についてスクリーニング又は選択されたのと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異子孫は、本明細書に含まれる。

【００７７】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨフレームワーク配列の選択において、最も一般的に出現するアミノ酸残基を表現するフレームワークである。一般的には、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨ配列の選択は、サブグループの可変ドメイン配列からである。一般的には、配列のサブグループは、Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3におけるサブグループである。一実施態様において、ＶＬについて、サブグループは、前記Kabat et al.,におけるサブグループカッパＩである。一実施態様において、ＶＨについて、サブグループは、前記Kabat et al.,におけるサブグループＩＩＩである。

【００７８】

「ヒト化」抗体は、非ヒトＨＶＲ由来のアミノ酸残基と、ヒトＦＲ由来のアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を意味する。特定の実施態様では、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、及び典型的には２つの可変ドメインの実質的に全部を含むであろう。その中で、ＨＶＲ（例えば、ＣＤＲ）の全部又は実質的に全部が、非ヒト抗体のそれらに対応し、ＦＲの全部又は実質的に全部が、ヒト抗体のそれらに対応する。ヒト化抗体は、場合により、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含むことができる。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化型」は、ヒト化を受けた抗体を意味する。

【００７９】

本明細書で使用する場合、「超可変領域」又は「ＨＶＲ」という用語は、配列において超可変性であり（「相補性決定領域」又は「ＣＤＲ」）、構造的に規定されたループ（「超可変ループ」）を形成し、及び／又は、抗原接触残基（「抗原コンタクト」）を含有する、抗体の可変ドメインの各領域を意味する。一般的には、抗体は、６つのＨＶＲ；ＶＨに３つ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）及びＶＬに３つ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）を含む。

【００８０】

本明細書において、ＨＶＲは、

（ａ）アミノ酸残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）、９１～９６（Ｌ３）、２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）、及び９６～１０１（Ｈ３）において生じる超可変ループ（Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917）と、

（ｂ）アミノ酸残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）、８９～９７（Ｌ３）、３１～３５ｂ（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）、及び９５～１０２（Ｈ３）において生じるＣＤＲ（Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242）と、

（ｃ）アミノ酸残基２７ｃ～３６（Ｌ１）、４６～５５（Ｌ２）、８９～９６（Ｌ３）、３０～３５ｂ（Ｈ１）、４７～５８（Ｈ２）、及び９３～１０１（Ｈ３）において生じる抗原コンタクト（MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)）と、

（ｄ）ＨＶＲアミノ酸残基４６～５６（Ｌ２）、４７～５６（Ｌ２）、４８～５６（Ｌ２）、４９～５６（Ｌ２）、２６～３５（Ｈ１）、２６～３５ｂ（Ｈ１）、４９～６５（Ｈ２）、９３～１０２（Ｈ３）、及び９４～１０２（Ｈ３）を含む、（ａ）、（ｂ）、及び／又は（ｃ）の組み合わせとを含む。

【００８１】

特に断りない限り、可変ドメイン中のＨＶＲ残基及び他の残基（例えば、ＦＲ残基）は、本明細書において、前記Kobat et al.,に従ってナンバリングされる。

【００８２】

「個体」又は「対象」は、哺乳類である。哺乳類は、飼育動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト及び非ヒト霊長類、例えば、サル）、ウサギ、ならびにげっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含むが、これらに限定されない。特定の実施態様では、個体又は対象は、ヒトである。

【００８３】

「単離された抗体」は、その本来の環境の成分から分離されているものである。一部の実施態様では、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、イオン交換もしくは逆相ＨＰＬＣ）により決定された場合、９５％又は９９％より高い純度に精製される。抗体純度を評価するための方法のレビューについては、例えば、Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87を参照のこと。

【００８４】

「単離された核酸」は、その本来の環境の成分から分離されている核酸分子を意味する。単離された核酸は、核酸分子を通常含有する細胞中に含有されるが、この核酸分子が、染色体外又はその本来の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する核酸分子を含む。

【００８５】

本明細書で使用する場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を意味する。すなわち、この集団に含まれる個々の抗体は、例えば、自然発生的に生じる変異を含有し、又は、モノクローナル抗体調製物の産生中に生じる可能性ある変異型抗体を除いて、同一であり、及び／又は、同じエピトープに結合する。このような変異体は、一般的には、少量しか存在しない。種々の決定因子（エピトープ）に対する種々の抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の１つの決定因子を対象にする。このため、「モノクローナル」という修飾語は、抗体の実質的に均質な集団から得られた抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるものではない。例えば、本発明に基づいて使用されるモノクローナル抗体は、各種の技術により調製することができる。同技術は、ハイブリドーマ法、リコンビナントＤＮＡ法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリンローカスの全部又は一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むが、これらに限定されない。モノクローナル抗体を調製するためのこのような方法及び他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

【００８６】

「ネイティブな抗体」は、変化する構造を有する、天然の免疫グロブリン分子を意味する。例えば、ネイティブなＩｇＧ抗体は、約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、ジスルフィド結合している、２つの同一の軽鎖と２つの同一の重鎖とか

ら構成される。Ｎ末端からＣ末端にかけて、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＨ）、続けて、３つの定常ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３）を有する。同様に、Ｎ末端からＣ末端にかけて、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＬ）、続けて、定常軽鎖（ＣＬ）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる２種類の内の１つに割り当てることができる。

【００８７】

「添付文書」という用語は、治療剤製品の商業的な梱包に習慣的に含まれる説明書を意味するのに使用され、適用症、用途、用量、投与、組み合わせ治療、禁忌、及び／又はこのような治療剤製品の使用に関する警告についての情報を含有する。

【００８８】

参照ポリペプチド配列に対する「パーセント（％）アミノ酸配列同一性」は、配列同一性の一部として保存的置換を何ら考慮せずに、配列をアライメントし、必要に応じてギャップを導入して、最大のパーセント同一性を達成した後の、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の割合として定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的でのアライメントは、当技術分野における技術の範囲内にある種々の方法で、例えば、一般的に利用可能なコンピュータソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign（DNASTAR）ソフトウェアを使用して達成することができる。当業者であれば、配列をアライメントするための適切なパラメータを決定することができる。同パラメータは、比較される配列の全長にわたる最大アライメントを達成するのに必要とされる任意のアルゴリズムを含む。ただし、本明細書の目的で、％アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムであるALING-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.,により作製され、ソースコードは、U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559にユーザ文書としてファイルされており、同ソースコードは、著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７として登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから一般的に利用可能であり、又は、ソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むＵＮＩＸオペレイティングシステムでの使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムにより設定されており、変更しない。

【００８９】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較に利用される状況において、所定のアミノ酸配列Ｂへの、同配列Ｂと共に、又は、同配列Ｂに対する、所定のアミノ酸配列Ａの％　アミノ酸配列同一性（％　アミノ酸配列同一性は、所定のアミノ酸配列Ｂへの、同配列Ｂと共に、又は、同配列Ｂに対する、特定の％　アミノ酸配列同一性を有する又は含む所定のアミノ酸配列Ａとして代替的に表現することができる）は、下記のように算出される。

　　１００×分数Ｘ／Ｙ

【００９０】

式中、Ｘは、配列アライメントプログラムALIGN-2により、Ａ及びＢのそのプラグラムアライメントにおいて、同一マッチとしてスコアされたアミノ酸残基数であり、Ｙは、Ｂ中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Ａの長さは、アミノ酸配列Ｂの長さと等しくなく、Ｂに対するＡの％　アミノ酸配列同一性は、Ａに対するＢの％　アミノ酸配列同一性と等しくないであろうことを理解されたい。特に断りない限り、本明細書において使用される全ての％　アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して、直前の段落に記載されているように得られる。

【００９１】

「医薬製剤」という用語は、有効であるようにそれに含有される活性成分の生物学的活性を可能にするような形態にあり、この製剤が投与されるであろう対象に許容できない毒性を有する更なる成分を含有しない調製物を意味する。

【００９２】

「薬学的に許容し得る担体」は、活性成分以外の医薬製剤中の成分を意味し、対象に対して毒性を有さない。薬学的に許容し得る担体は、バッファー、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含むが、これらに限定されない。

【００９３】

本明細書で使用する場合、「処置」（及びその文法上のバリエーション、例えば、「処置する」又は「処置すること」）は、処置される個体の本来の経過を変化させる試みにおける臨床的介在を意味し、予防のため又は臨床病理の経過中のいずれかにおいて行うことができる。処置の望ましい効果は、疾患の発生又は再発を予防すること、兆候の緩和、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的結果の減弱、転移の予防、疾患の進展速度の低下、疾患状態の改善又は寛解、及び緩和又は改善された予後を含むが、これらに限定されない。一部の実施態様では、本発明の抗体は、疾患の進行を遅延させ、又は、疾患の進展を遅らせるのに使用される。

【００９４】

「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗原に抗体を結合させるのに関与する抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを意味する。ネイティブな抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、ＶＨ及びＶＬ）は、一般的には、４つの保存フレームワーク領域（ＦＲ）と３つの超可変領域（ＨＶＲ）とを含む各ドメインを有する類似構造を有する（例えば、Kindt, T.J. et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), page 91を参照のこと）。１つのＶＨ又はＶＬドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であることができる。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、相補なＶＬ又はＶＨドメインそれぞれのライブラリをスクリーニングするための抗原に結合する抗体からのＶＨ又はＶＬドメインを使用して単離することができる。例えば、Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628を参照のこと。可変領域（軽鎖及び重鎖の可変領域）におけるアミノ酸残基のナンバリングは、Ｋａｂａｔに従って行われるであろう（Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3）。

【００９５】

本明細書で使用する場合、「ベクター」という用語は、それに連結している別の核酸を伝播することができる核酸分子を意味する。この用語は、自己複製核酸構築物としてのベクターと、それが導入されるホスト細胞のゲノム内に組み込まれるベクターとを含む。特定のベクターは、それらが操作可能に連結している核酸の発現に向けさせることができる。このようなベクターは、本明細書において、「発現ベクター」と呼ばれる。

【００９６】

「血液脳関門（ＢＢＢ）」という用語は、周辺環境と脳及び脊髄との間の生理学的な関門を意味し、脳の毛細血管内皮形質膜内のタイトジャンクションにより形成され、尿素（６０ダルトン）等の非常に小さな分子であっても、脳への分子の輸送を制限するタイトな関門を生じさせる。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内の連続する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、血液ＣＳＦ関門（脈絡叢）も包含する。この場合、同関門は、毛細血管内皮細胞よりむしろ上衣細胞に含まれる。

【００９７】

「中枢神経系（ＣＮＳ）」という用語は、身体機能をコントロールする神経組織の複雑系を意味し、脳及び脊髄を含む。

【００９８】

「血液脳関門レセプター（ＢＢＢＲ）」という用語は、ＢＢＢを通過させて分子を輸送可能であるか、又は、外来的に投与された分子を輸送するのに使用される、脳の内皮細胞上に発現している細胞外膜結合レセプタータンパク質を意味する。ＢＢＢＲの例は、トランスフェリンレセプター（ＴｆＲ）、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）、低密度リポタンパク質レセプター関連タンパク質１（ＬＲＰ１）

及び低密度リポタンパク質レセプター関連タンパク質８（ＬＲＰ８）を含むがこれらに限定されない低密度リポタンパク質レセプター、ならびにヘパリン結合上皮成長因子様成長因子（ＨＢ－ＥＧＦ）を含むが、これらに限定されない。例示的なＢＢＢＲは、トランスフェリンレセプター（ＴｆＲ）である。

【００９９】

「脳エフェクター実体」という用語は、ＢＢＢを通過させて脳に輸送される分子を意味する。同エフェクター実体は、典型的には、脳に輸送されるのが望ましい特徴的な治療活性を有する。エフェクター実体は、神経障害剤及び細胞毒、例えば、脳ターゲットに対するポリペプチド及び抗体、特に、モノクローナル抗体又はそのフラグメント等を含む。

【０１００】

「一価の結合実体」という用語は、ＢＢＢＲに対して一価の結合方式で、特異的に結合可能な分子を意味する。本明細書に報告されている血液脳シャトルモジュール及び／又はコンジュゲートは、一単位の一価の結合実体の存在により特徴付けられる。すなわち、本発明の血液脳シャトルモジュール及び／又はコンジュゲートは、一単位の一価の結合実体を正確に含む。一価の結合実体は、ポリペプチド、全長抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆｖフラグメントを含む抗体フラグメント、一本鎖抗体分子、例えば、一本鎖Ｆａｂ、ｓｃＦｖを含むが、これらに限定されない。一価の結合実体は、例えば、ファージディスプレイ又は免疫化等の当技術分野における技術水準を使用して操作された足場タンパク質であることができる。一価の結合実体は、ポリペプチドであることもできる。特定の実施態様では、一価の結合実体は、血液脳関門レセプターに対する、ＣＨ２－ＣＨ３　Ｉｇドメイン及び一本鎖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り連結している。特定の実施態様では、ｓｃＦａｂは、トランスフェリンレセプターを対象にする。

【０１０１】

「一価の結合方式」という用語は、一価の結合実体とＢＢＢＲとの間の相互作用が、１つの単独のエピトープにより行われる、ＢＢＢＲに対する特異的な結合を意味する。一価の結合方式は、単独のエピトープ相互作用点のために、ＢＢＢＲの任意の二量体化／多量体化を防止する。一価の結合方式は、ＢＢＢＲの細胞内局在が変化するのを防止する。

【０１０２】

「エピトープ」という用語は、抗体への特異的な結合を可能にする、任意のポリペプチド決定因子を意味する。特定の実施態様では、エピトープ決定因子は、分子の化学的に活性な表面分類、例えば、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、又はスルホニルを含み、特定の実施態様では、特定の三次元構造特性及び／又は特定の電荷特性を有することができる。エピトープは、抗体により結合される抗原の領域である。

【０１０３】

「トランスフェリンレセプター」（ＴｆＲ）は、２つのジスルフィド結合しているサブユニット（それぞれ、約９０，０００Daの見かけの分子量）から構成されており、脊椎動物における鉄の取込みに関与する、（約１８０，０００Daの分子量を有する）膜貫通糖タンパク質である。一実施態様において、本明細書におけるＴｆＲは、Schneider et al.（Nature 311 (1984) 675 - 678）に報告されているアミノ酸配列を含むヒトＴｆＲである。

【０１０４】

「イメージング剤」の用語は、直接又は間接的に、その存在及び／又は位置の検出を可能にする、１つ以上の特性を有する化合物を意味する。このようなイメージング剤の例は、検出を可能にするラベルされた実体を包含するタンパク質及び小分子化合物を含む。

【０１０５】

「ＣＮＳ抗原」及び「脳ターゲット」という用語は、脳を含むＣＮＳにおいて発現している抗原及び／又は分子を意味し、抗体又は小分子でターゲッティングすることができる。このような抗原及び／又は分子の例は、ベーターセクレターゼ１（ＢＡＣＥ１）、アミロイドベータ（Ａベータ）、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）、Ｔａｕ、アポリポタンパク質Ｅ４（ＡｐｏＥ４）、アルファ－シヌクレイン、ＣＤ２０、ハンチンチン、プリオンタンパク質（ＰｒＰ）、ロイシンリッチリピートキナーゼ２（ＬＲＲＫ２）、パーキン、プレセニリン１、プレセニリン２、ガンマセクレターゼ、デスレセプター６（ＤＲ６）、アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）、ｐ７５ニューロトロフィンレセプター（ｐ７５ＮＴＲ）、グルコセレブロシダーゼ、及びカスパーゼ６を含むが、これらに限定されない。

【０１０６】

「特異的に結合する」という用語は、抗原に選択的又は優先的に結合する抗体を意味する。結合親和性は、一般的には、標準的なアッセイ法、例えば、Scatchard分析又は表面プラズモン共鳴技術（例えば、BIACORE（登録商標）を使用）を使用して決定される。

【０１０７】

本明細書で使用する場合、「ＣＨ２－ＣＨ３　Ｉｇ実体」という用語は、免疫グロブリンＣＨ２又はＣＨ３ドメイン由来のタンパク質実体を意味する。「ＣＨ２－ＣＨ３　Ｉｇ実体」は、二量体を形成する２つの「ＣＨ２－ＣＨ３」ポリペプチドを含む。免疫グロブリンは、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、又はＩｇＭであることができる。一実施態様において、ＩｇＧの免疫グロブリン由来のＣＨ２－ＣＨ３　Ｉｇ実体は、本明細書において、「ＣＨ２－ＣＨ３　ＩｇＧ実体」と呼ばれる。この用語は、ＣＨ２－ＣＨ３ドメインのネイティブな配列と、変異型ＣＨ２－ＣＨ３ドメインとを含む。一実施態様において、「ＣＨ２－ＣＨ３　Ｉｇ実体」は、Ｃｙｓ２２６又はＰｒｏ２３０から、重鎖のカルボキシル末端にかけて広がる、ヒト重鎖ＣＨ２－ＣＨ３　ＩｇＧドメインから得られる。ただし、Ｆｃ領域のＣ末端リシン（Ｌｙｓ４４７）は、存在してもよいし、又は、存在しなくてもよい。本明細書において特に断りない限り、ＣＨ２－ＣＨ３ドメイン領域又は定常領域中のアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されており、ＥＵインデックスとも呼ばれる、ＥＵナンバリングシステムに従う。

【０１０８】

「コンジュゲート」は、ラベル、神経障害剤、又は細胞毒物を含むが、これらに限定されない、１つ以上の異種分子にコンジュゲートしている、本発明の融合タンパク質である。

【０１０９】

「リンカー」という用語は、本明細書に報告されている血液脳関門シャトルモジュール及び／又は融合ポリペプチド及び／又はコンジュゲートの種々の実体を共有結合する化学的リンカー又は一本鎖ペプチドリンカーを意味する。リンカーは、例えば、脳エフェクター実体を一価の結合実体に結合する。例えば、一価の結合実体が、血液脳関門レセプターに対する、ＣＨ２－ＣＨ３　Ｉｇ実体及びｓｃＦａｂを含む場合、リンカーは、ｓｃＦａｂをＣＨ３－ＣＨ２　Ｉｇ実体のＣ末端にコンジュゲートする。脳エフェクター実体を一価の結合実体にコンジュゲートさせるリンカー（第１リンカー）及びｓｃＦａｂをＣＨ２－ＣＨ３　ＩｇドメインのＣ末端に結合させるリンカー（第２リンカー）は、同じであることができ、又は、異なることができる。

【０１１０】

ペプチド結合により結合する１～２０個のアミノ酸残基から構成される一本鎖ペプチドリンカーを使用することができる。特定の実施態様では、このアミノ酸は、２０個の天然のアミノ酸から選択される。特定の他の実施態様では、このアミノ酸の１つ以上は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、及びリシンから選択される。他の実施態様では、リンカーは、化学的リンカーである。特定の実施態様では、リンカーは、少なくとも２５個のアミノ酸残基の長さを有する、好ましい一実施態様では、３２～５０個のアミノ酸残基の長さを有する、アミノ酸配列の一本鎖ペプチドリンカーである。一実施態様において、ペプチドリンカーは、（ＧｘＳ）ｎリンカーである。ここで、Ｇ＝グリシンであり、Ｓ＝セリンであり、（ｘ＝３、ｎ＝８、９、又は１０）又は（ｘ＝４及び

ｎ＝６、７、又は８）であり、一実施態様において、ｘ＝４、ｎ＝６又は７であり、好ましい一実施態様では、ｘ＝４、ｎ＝７である。一実施態様において、リンカーは、（Ｇ４Ｓ）４（配列番号：９５）である。一実施態様において、リンカーは、（Ｇ４Ｓ）６Ｇ２（配列番号：９６）である。

【０１１１】

コンジュゲーションは、各種の化学的リンカーを使用して行うことができる。例えば、一価の結合実体又は融合ポリペプチド及び脳エフェクター実体は、各種の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロパノアート（ＳＰＤＰ）、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（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミダートＨＣｌ）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベラート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビスアジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアナート（例えば、トルエン　２，６－ジイソシアナート）、及びビス活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロンベンゼン）を使用してコンジュゲートすることができる。リンカーは、脳への送達に基づいて、エフェクター実体の放出を容易にする「開裂性リンカー」であることができる。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、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 (1992) 127-131；米国特許第５，２０８，０２０号）を使用することができる。

【０１１２】

共有コンジュゲーションは、直接又はリンカーを介してのいずれかであることができる。特定の実施態様では、直接コンジュゲーションは、ポリペプチド融合物の構築による（すなわち、ＢＢＢＲに対する一価の結合実体及びエフェクター実体をコードし、１つのポリペプチド（鎖）として発現される、２つの遺伝子の遺伝的融合による）。特定の実施態様では、直接コンジュゲーションは、ＢＢＢＲに対する一価の結合実体の２つの部分の内の一方における反応性基と脳エフェクター実体における対応する基又はアクセプターとの間における共有結合の形成による。特定の実施態様では、直接コンジュゲーションは、適切な条件下において、コンジュゲートする他の分子に対する共有結合を形成する反応性基（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トする２つの分子の内の一方の改変（すなわち、遺伝的改変）による。１つの非限定的な例として、所望の反応性基（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）は、例えば、ＢＢＢＲ抗体に対する一価の結合実体内に導入することができ、ジスルフィド結合は、神経剤と形成することができる。核酸をタンパク質に共有コンジュゲーションする方法も、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 (2005) 77-95を参照のこと）。コンジュゲーションは、各種のリンカーを使用しても行うことができる。例えば、一価の結合実体及びエフェクター実体は、各種の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、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（ＳＰＤＰ）、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（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミダートＨＣｌ）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベラート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビスアジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアナート（例えば、トルエン　２，６－ジイソシアナート）、及びビス活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロンベンゼン）を使用してコンジュゲートすることができる。ペプチド結合により結合する１～２０個のアミノ酸残基から構成されるペプチドリンカーも使用することができる。特定のこのような実施態様では、アミノ酸残基は、２０個の天然のアミノ酸から選択され

る。特定の他のこのような実施態様では、アミノ酸残基の１つ以上は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、及びリシンから選択される。リンカーは、脳への送達に基づいて、エフェクター実体の放出を容易にする「開裂性リンカー」であることができる。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、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 (1992) 127-131；米国特許第５，２０８，０２０号）を使用することができる。

【０１１３】

ＩＩ．組成物及び方法

平衡解離定数（K_D）は、分子間相互作用を説明するのに、一般的に使用される。平衡解離定数は、２つの分子の互いに対する相互作用強度（例えば、親和性）の測定値として使用される。このため、K_D値は、生体分子間の相互作用の強度についての測定値である。

【０１１４】

なお、K_D値は、分子間相互作用の動力学を説明しない、すなわち、K_D値から、２つの分子が互いにどの程度素早く結合するのか（会合速度定数又は「オンレート」）を推測することができない一方で、これらの分子がどの程度素早く解離するのか（解離速度定数又は「オフレート」）を推測することができない。そのようなK_D値によってのみ生体分子間の相互作用を特徴付けることは、K_D値がその比であるため、同一のK_D値が極端に異なる（桁違いの）オン及びオフレートにより構成される場合があるという事実を無視することになる。

【０１１５】

ただし、ｏｎ及びオフレートは、分子の結合挙動を特徴付けるのに重要である。オフレートは、オフ例えば、抗体のその抗原に対する結合期間を特徴付けるので、特に重要である。長いオフレートは、形成された複合体の遅い解離に相関する。一方、短いオフレートは、素早い解離に相関する。

【０１１６】

長い持続性（すなわち、頻繁な投与をほとんど必要としない）又はテーラーメイド（例えば、周囲の条件に応じて）の相互作用を有するために、オフレートは、実験的に決定されなければならない。これは、オフレートをほとんど予測することができないため、更に重要である。加えて、オフレートと結合親和性との間の相関は、上記概説されたように乏しい。例えば、K_D値がオンレートとオフレートとの比であるという事実のために、弱いバインダーであっても、そのターゲットに長く結合したままである場合がある一方で、密接なバインダーは、急速に解離する場合がある。

【０１１７】

抗体生成プロジェクトの典型的なボトルネックは、抗体結合強度に基づいたパンニング後に得られた多くの候補の順位付けである。理想的には、このような方法は、抗原の前もってのラベルリングなしに、粗製の細菌ライゼートにより行うであろう。Ylera, F., et al.（Anal. Biochem. 441 (2013) 208-213）において、一価Ｆａｂフラグメントを含有する粗製のEscherichia coliライゼートにおける高親和性の抗薬剤抗体を選択するために、オフレートをスクリーニングするための方法が報告された。それらは、順位付けパラメータとして選択されたオフレートを有する。中でも、オフレートが、濃度依存性であるためである。それらは、全長ＩｇＧとして観察されるであろうため、オフレートの順位付け及び親和性測定中の結合活性作用を避けるために、一価フォーマットを選択している。Ylera et al.によって、最良のｋオフレートを有するクローンがｋオフ順位付け工程により特定されたが、選択評価基準としてＥＬＩＳＡシグナル強度のみを使用して特定されなかったであろうことが見出された。

【０１１８】

Murray, J.B., et al.（J. Med. Chem. 57 (2014) 2845-2850）において、非精製反応生成物から化学空間をもたらすのに、動力学的にサンプルをヒットさせる効率的な方法として、表面プラズモン共鳴によるオフレートスクリーニング（ＯＲＳ）が報告された。解

離速度定数ｋｄ（オフレート）が、化合物の活性を向上させる最も顕著な可能性を有するリガンドータンパク質結合の成分であることが概説されている。著者らは、薬剤創出プログラム全体を通して動力学的に親和性を測定することは、定常状態の親和性平衡測定より有益である、と概説している。例えば、１０倍遅いオンレート及びオフレートを有する化合物は、親和性の平衡測定により評価された場合、異なるとは認識されないであろう。さらに、著者らは、BIAcore T200機器により測定されたデータが粗製サンプルと純粋なサンプルとの間のｋｄにおける、１９％の平均差を示し、同様に、より旧式のBIAcore T100機器により測定されたデータが１５％の差を有したことを見出した。著者らは、機器間及び時間間で比較した場合、ｋｄが平均３０％のみまで変動することを観察している。これにより、キャリーオーバー汚染、長期保存、及び機器差が観察されたｋｄに少しの影響を有することが証明されている。実際に、ｋｄにおけるこれらの小さな偏差は、多施設研究において観察された差を密接に反映している。この場合、観察された変動は、システムに応じて、１４％～４０％であると報告されている（Murray, J.B., et al., J. Med. Chem. 57 (2014) 2845-2850；Katsamba, P.S., et al., Anal. Biochem. 352 (2006) 208-221）。

【０１１９】

国際公開公報第２０１４／１８９９７３号には、抗トランスフェリンレセプター抗体及び使用方法が報告されている。ＢＢＢレセプターを伝統的な特異的高親和性抗体によりターゲッティングすることにより、一般的に、ＢＢＢ輸送における限定された増大がもたらされることが更に報告されている。ＣＮＳ内への抗体の取込みの大きさ及びＣＮＳにおける分布は、研究された抗ＢＢＢ抗体の中で、ＢＢＢレセプターに対するその結合親和性に逆相関することが、後に見出された。例えば、治療用量レベルで投与されたトランスフェリンレセプター（ＴｆＲ）に対する低親和性抗体により、高親和性抗ＴｆＲ抗体に対して、抗ＴｆＲ抗体のＢＢＢ輸送及びＣＮＳ保持がかなり改善され、ＣＮＳにおける治療濃度をより容易に保持することが可能である（Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43）。このようなＢＢＢ輸送の証明が、ＴｆＲとアミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）開裂酵素であるβ－セクレターゼ（ＢＡＣＥ１）との両方に結合する二重特異性抗体を使用して達成された。低親和性抗体を使用して操作された二重特異性抗ＴｆＲ／ＢＡＣＥ１抗体の１回の全身投与によって、脳への顕著な抗体取込みがもたらされるだけでなく、単特異的抗ＢＡＣＥ１単独と比較して、脳Ａβ１－４０のレベルを劇的に低下する。このことから、ＢＢＢ浸透が、抗ＢＡＣＥ１の能力により影響を受けることが示唆している（Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43；Yu et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra44）。

【０１２０】

利用可能なデータ及び実験から、より低い親和性の抗体アプローチを使用してＣＮＳ内への抗体の取込みを増大させる背景にある、幾つかの原因となるメカニズムが強調される。

【０１２１】

第一に、高親和性抗ＢＢＢレセプター（ＢＢＢ－Ｒ）抗体（例えば、前記Atwal et al.及びYu et al.,からの抗ＴｆＲ抗体）は、脳の脈管構造におけるＢＢＢ－Ｒを素早く飽和させることにより脳への取込みを制限するため、脳内に取り込まれる抗体の総量が減少し、脈管構造へのその分布も制限される。際立って、ＢＢＢ－Ｒに対する親和性を低下させることにより、脈管構造からＣＮＳ内に分布されたニューロン及び関連するニューロピルへの位置において観察された堅牢なシフトを伴って、脳への取込み及び分布が改善される。親和性は、特定の上限レベルを下回り、特定の下限レベルを上回る必要があることが見出されている。

【０１２２】

第二に、ＢＢＢ－Ｒに対する抗体のより低い親和性は、膜のＣＮＳ側から、ＢＢＢ－Ｒを介してＢＢＢの血管側に戻る抗体の能力を損なわせるのに提案されている。ＢＢＢ－Ｒに対する抗体の親和性全体は低く、ＢＢＢのＣＮＳ側での抗体の局所的な濃度は、ＣＮＳ

区画内の抗体の急速な分散により飽和しないためである。

【０１２３】

第三に、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、ＴｆＲ系について観察されたように、ＢＢＢ－Ｒに対してほとんど親和性を有さない抗体は、ＢＢＢ－Ｒに対するより高い親和性を有する抗体と同程度に効率的に、この系から排出されないため、そのより高い親和性の対照物より高い循環濃度のままである。これは、より低い親和性の抗体の循環抗体レベルが治療レベルでより高い親和性の抗体より長い期間持続されるため、有利である。その結果として、脳への抗体の取込みが、より長い期間改善される。さらに、血漿及び脳の両方の曝露におけるこの改善は、臨床における投与頻度を少なくすることができ、患者のコンプライアンス及び都合に有力な利益を有するだけでなく、抗体及び／又はそれに結合した治療化合物の任意の可能性のある副作用又はオフターゲット作用を減少させるであろう。

【０１２４】

これらの以前の研究は、マウス抗体を利用していた。同マウス抗体は、マウスＴｆＲに特異的に結合したが、霊長類又はヒトＴｆＲを特異的に認識しなかった。したがって、本明細書において、ヒトにおける治療的又は診断的使用の前に、抗体による霊長類における安全性及び有効性研究を容易にするために、霊長類、特に、カニクイザル及びヒトＴｆＲの両方を特異的に認識する、抗体及びその機能性部分が提供される。

【０１２５】

治療用途を意図したモノクローナル抗体（ｍＡｂ）の徹底的な非臨床安全性評価は、非常に重要である。抗体の操作態様の複雑性及び抗体生成のためのリコンビナント生成細胞系の多様性により誘引される可変性が増大するためである。さらに、伝統的な小分子薬剤と比較して、ｍＡｂのその複雑な構造、固有の生物学的機能、及びより長い半減期が、慢性疾患の処置についてのｍＡｂの長い臨床使用による懸念に加えて、安全性の考慮に加わる（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Kim, S.J., et al., Mol. Cells 20 (2005) 17-29）。

【０１２６】

ｍＡｂについての非臨床研究の全体としての目的は、対象となるｍＡｂの毒性学的特性を定義し、製品開発のための情報を提供することである。非臨床評価の主な目的は、毒性についてのターゲット臓器の特定およびその毒性が処置により可逆的であるかどうかを判定すること、（２）ヒト第Ｉ相臨床試験に安全な開始用量及びその後の用量増大スキームの特定、（３）臨床試験において安全性パラメータをモニターする情報の提供、及び（４）製品ラベルに要求を支持する安全性データを提供することである。これらの目的を達成するために、抗体の薬理学的特性を定義し、理解するのに役立つ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏの両方における非臨床研究が行われている（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Cavagnaro, J.A., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.)「Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals」; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65）。

【０１２７】

ｍＡｂの非臨床安全性評価の成功のために、最も関連する動物種が、毒性試験に選択される必要がある（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126）。関連する種は、抗体が薬理学的に活性であり、ターゲット抗原が存在し、又は、発現されている必要があり、組織交叉反応性プロファイルがヒトに類似している必要がある種である（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126；Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205；Hall, W.C., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240）。免疫化学及び機能アッセイ法を使用して、所望のエピトープを発現し、ヒト組織に類似する組織交叉反応性プロファイルを説明している関連する動物種を特定することができる（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Hall, W.C., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of bioph

armaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240）。種交叉反応性研究は、このプロセスにおいて有用であり、市販の多種組織マイクロアレイを使用する、各種の種からの組織の免疫組織化学的調査を含む（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Hall, W.C., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240）。あるいは、蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）によるこれらの動物からの細胞に対する抗体結合性の評価は、典型的には、細胞切片の免疫組織学的分析より高感度である（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205）。ターゲット抗原のＤＮＡ及びアミノ酸配列が、種間で比較される必要があり、種間のホモロジーが判定される必要がある（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11；Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205）。

【０１２８】

加えて、抗原の生体分布、機能、及び構造は、ターゲット抗原の抗体結合により生じる毒性の評価を可能するために、関連する動物種とヒトとの間で比較可能である必要がある。同毒性は、ｏｎターゲット毒性と呼ばれる（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; 19,20）。さらに、動物種及びヒトにおいて、ターゲット抗原組織分布における強力な類似性から、動物において特定されたターゲット臓器の毒性が、ヒトにおいて可能性ある毒性を予測するであろうことが考えられる。動物種とヒトとの間の抗原組織分布における類似性の欠如は、毒性研究のための動物種の使用を全体としては妨げるものではないが、これらの差異は、ヒトのリスク評価に考慮されるべきである。抗原密度又は親和性についても同様に、動物モデルとヒトとの間の絶対的な同等性は求められない。毒性試験に選択された種の関連性についての正当化は、規制の順守に含まれる必要がある。１種のみが安全性評価に使用される場合、更なる関連種の不存在を説明する実験概要が保証される（Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11）。

【０１２９】

治療的使用が意図されたモノクローナル抗体が、種交叉反応性をいずれも有さない場合、代理抗体又はそのモデルについて異なる種が使用される必要がある。このため、代理抗体は、制限された種交叉反応性を有するヒト化モノクローナル抗体により可能となる、限定された安全性試験に対する可能性のある解決策である。しかしながら、現在、可能性のある代理抗体が臨床薬についての安全性問題を判定するために使用するのに先立って判定されるべきであるという評価基準は定義されていない（Regulatory Toxicology and Pharmacology Volume 40, Issue 3, December 2004, Pages 219-226）。

【０１３０】

このため、特定のｍＡｂについての動物モデルを特定するために、上記考慮がなされる必要があるが、それにも関わらず、対象となるｍＡｂが、試験種のターゲット抗原に対する交叉反応性を有することが必要である。他にも、最も適切な試験種であっても使用することができない場合がある。したがって、ヒト及び非臨床試験を意図した種におけるそのターゲットについて、種内交叉反応性を有しないが、種間交叉反応性を有する、ｍＡｂについての必要性が存在する。

【０１３１】

Ａ．例示的な抗トランスフェリン抗体

本明細書において、適切なＢＢＢ輸送を確保するために、特定の範囲内にあるヒトトランスフェリンレセプターに対する結合性に対するオフレートを有する、抗トランスフェリンレセプター抗体が報告される。この範囲は、カニクイザルトランスフェリンレセプターについての表面プラズモン共鳴により測定されるマウス抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１（配列番号：６４及び６５で与えられる可変ドメインアミノ酸配列）のオフレートによる一端、及び、そのオフレートの５％（すなわち、２０倍遅い解離）による他端において定義される。一実施態様において、ヒトトランスフェリンレセプターに対する

オフレートは、０．１１/s～０．００５１/sであり、これらを含む。

【０１３２】

本明細書に報告されているクローン２９９のヒト化抗体は、標準的なヒト化技術を適用することにより利用できなかった。意図した範囲内で、０．１１/s及び０．００５１/sを含むトランスフェリンレセプター結合オフレートを有するヒト化抗体を得るために、アミノ酸配列に非標準的な変異を導入する必要があった。このことは、本明細書に報告されている抗体がヒト血液脳関門を通過させ、治療ペイロードを脳内に輸送するために開発されるため、特に重要である。

【０１３３】

適切で、開発可能なヒト化抗体を得るために、親ウサギ抗体の軽鎖における２つのシステインアミノ酸残基が、プロリン及びアスパラギンアミノ酸残基それぞれにより置き換えられなければならないことが見出された。所定のオフレート範囲内にあるのに加えて、ウサギＣＤＲＬ３の中央に存在するセリン残基は、アラニン残基に置き換えられなければならなかった。

【０１３４】

重鎖の６５、１００ｇ、及び１０５位（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング）における３つのアミノ酸残基を変化させるのが有利であることが、更に見出された。

【０１３５】

本明細書で使用される全てのナンバリングは、Ｋａｂａｔの可変ドメインナンバリングスキームに基づいている。

【０１３６】

ウサギ抗トランスフェリン抗体クローン２９９は、抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１の特性に匹敵する特性を示した。これは、下記表から分かる。

【０１３７】

【表１】

起源	経細胞輸送ローディング［pg］	経細胞輸送　％基底側	総基底側［pg］	総頂端側［pg］	輸送合計［pg］
ｍＡｂ１２８．１	2226	34	757	1229	1986
クローン２９９	2773	36	998	1346	2344
起源	ローディング　％ｍＡｂ１２８．１	総基底側　％ｍＡｂ１２８．１	総頂端側　％ｍＡｂ１２８．１	輸送合計　％ｍＡｂ１２８．１	ＥＣ５０［ｎｇ／ｍＬ］　ＦＡＣＳ　ｈＴｆＲ－ＣＨＯ
ｍＡｂ１２８．１	100	100	100	100	96
クローン２９９	125	132	110	118	275
起源	最大ｇｅｏ．平均ｈＴｆＲ－ＣＨＯ	ＥＣ５０［ｎｇ／ｍＬ］　ＦＡＣＳ　ｃｙＴｆＲ	最大ｇｅｏ．カニクイザルｈＴｆＲ－ＣＨＯ	比ＥＣ５０　カニクイザル／ヒト	比最大　カニクイザル／ヒト
ｍＡｂ１２８．１	78200	314	52100	3.3	0.6
クローン２９９	55600	241	52000	0.9	1.0
起源	BIAcore ｏｆｆレート ｈｕＴｆＲ［1/s］	BIAcore ｔ１／２　ｈｕＴｆＲ［分］	BIAcore ｏｆｆレート　ｃｙＴｆＲ［1/s］	BIAcore ｔ１／２ ｃｙｎｏ ＴｆＲ［分］	比ｔ１／２ヒト／カニクイザル
ｍＡｂ１２８．１	6.06E-04	19	5.47E-02	0.2	90.2
クローン２９９	6.16E-04	19	2.77E-04	42	0.4

【０１３８】

下記表において、クローン２９９のウサギ重鎖可ドメインのヒト化変異体との組み合わせにおける、クローン２９９のウサギ軽鎖可変ドメインのヒト化変異体のオフレートが示される。結合パートナーは、ヒトトランスフェリンレセプターとした（２５℃で測定）。

【０１３９】

【表２】

VH→ VL↓	0 (rb)	1	2	5	6	7	8	9	11	12
0 (rb)	4.34 E-04	9.08 E-04	8.06 E-04	7.72 E-04	6.63 E-04	5.15 E-04	4.06 E-04	9.01 E-04	9.05 E-04	9.21 E-04
1	5.69 E-03	1.00 E-03	1.00 E-03	1.00 E-03	1.00 E-03	7.52 E-03	3.19 E-03	6.94 E-03	1.00 E-03	1.00 E-03
2	1.25 E-03	2.86 E-03	2.75 E-03	2.41 E-03	1.87 E-03	1.31 E-03	1.01 E-03	3.99 E-03	3.85 E-03	6.35 E-03
3	1.32 E-03	4.31 E-03	3.84 E-03	3.16 E-03	2.82 E-03	1.45 E-03	1.00 E-03	4.17 E-03	5.65 E-03	5.86 E-03
4	1.36 E-03	2.56 E-03	2.63 E-03	2.38 E-03	1.87 E-03	1.25 E-03	7.88 E-04	2.70 E-03	3.88 E-03	3.11 E-03
5	1.94 E-03	2.71 E-03	2.62 E-03	2.53 E-03	1.66 E-03	1.35 E-03	1.07 E-03	3.50 E-03	4.56 E-03	5.82 E-03
6	1.90 E-03	5.38 E-03	5.55 E-03	4.64 E-03	3.06 E-03	1.97 E-03	1.40 E-03	6.83 E-03	6.71 E-03	7.05 E-03
7	4.63 E-03	7.33 E-03	7.50 E-03	6.97 E-03	5.63 E-03	3.66 E-03	2.31 E-03	7.61 E-03	7.81 E-03	7.71 E-03
8	1.39 E-03	4.85 E-03	3.94 E-03	3.78 E-03	3.01 E-03	1.72 E-03	1.16 E-03	5.23 E-03	5.52 E-03	5.31 E-03
9-NYA	1.41 E-03	2.46 E-03	2.21 E-03	2.03 E-03	1.41 E-03	1.21 E-03	1.01 E-03	2.52 E-03	2.42 E-03	2.19 E-03
10	1.88 E-03	6.77 E-03	6.49 E-03	6.53 E-03	4.55 E-03	2.64 E-03	1.73 E-03	7.19 E-03	7.16 E-03	7.79 E-03
12	5.41 E-03	7.05 E-03	8.14 E-03	1.00 E-03	7.78 E-03	7.75 E-03	6.72 E-03	1.00 E-03	7.87 E-03	1.00 E-03
14	1.78 E-03	2.99 E-03	2.44 E-03	2.33 E-03	2.20 E-03	1.53 E-03	1.04 E-03	3.32 E-03	3.51 E-03	5.46 E-03
15	6.63 E-03	6.69 E-03	6.38 E-03	6.37 E-03	4.21 E-03	2.73 E-03	1.81 E-03	7.39 E-03	7.09 E-03	7.76 E-03
17	1.49 E-03	7.56 E-03	7.12 E-03	7.45 E-03	7.17 E-03	1.87 E-03	1.12 E-03	4.25 E-03	7.55 E-03	7.27 E-03

VH→ VL↓	13	15	16	17	18	19	20	21	22	23-DANG
0 (rb)	4.82 E-04	7.63 E-04	6.53 E-04	4.13 E-04	1.09 E-03	1.00 E-03	1.11 E-03	5.65 E-04	5.06 E-04	3.38 E-04
1	1.00 E-03	7.72 E-03	7.71 E-03	4.33 E-03	1.00 E-03	1.00 E-03	1.00 E-03	7.71 E-03	5.78 E-03	2.80 E-03
2	2.46 E-03	2.16 E-03	1.97 E-03	1.05 E-03	4.89 E-03	7.69 E-03	5.25 E-03	1.38 E-03	1.26 E-03	7.15 E-04
3	2.77 E-03	2.07 E-03	1.73 E-03	8.43 E-04	6.65 E-03	1.00 E-03	7.15 E-03	1.94 E-03	1.43 E-03	7.83 E-04

4	1.30 E-03	1.34 E-03	1.27 E-03	7.23 E-04	3.35 E-03	1.00 E-03	4.36 E-03	1.46 E-03	1.18 E-03	7.61 E-04
5	2.18 E-03	2.14 E-03	2.23 E-03	1.23 E-03	3.49 E-03	1.00 E-03	3.52 E-03	1.37 E-03	1.41 E-03	8.80 E-04
6	3.65 E-03	3.50 E-03	3.39 E-03	1.71 E-03	6.74 E-03	1.00 E-03	6.06 E-03	2.07 E-03	2.14 E-03	1.16 E-03
7	6.68 E-03	5.43 E-03	5.25 E-03	2.33 E-03	7.66 E-03	1.00 E-03	7.14 E-03	2.38 E-03	3.37 E-03	1.55 E-03
8	2.47 E-03	2.09 E-03	1.97 E-03	1.11 E-03	6.77 E-03	6.71 E-03	6.58 E-03	1.74 E-03	1.65 E-03	9.41 E-04
9-NYA	1.39 E-03	1.42 E-03	1.36 E-03	9.34 E-04	2.21 E-03	6.17 E-03	1.89 E-03	1.13 E-03	1.26 E-03	7.69 E-04
10	5.89 E-03	3.99 E-03	4.24 E-03	1.88 E-03	7.46 E-03	1.00 E-03	7.05 E-03	2.11 E-03	2.09 E-03	1.20 E-03
12	7.85 E-03	7.64 E-03	7.54 E-03	2.84 E-03	1.00 E-03	1.00 E-03	1.00 E-03	7.54 E-03	6.44 E-03	1.87 E-03
14	2.22 E-03	1.94 E-03	1.75 E-03	1.05 E-03	3.00 E-03	7.96 E-03	2.39 E-03	1.03 E-03	1.12 E-03	7.33 E-04
15	7.11 E-03	6.03 E-03	4.77 E-03	1.56 E-03	7.58 E-03	1.00 E-03	7.85 E-03	1.92 E-03	1.79 E-03	9.86 E-04
17	3.39 E-03	1.69 E-03	1.66 E-03	9.88 E-04	5.30 E-03	1.00 E-03	4.57 E-03	9.97 E-04	9.38 E-04	6.94 E-04

【０１４０】

より密接なヒトトランスフェリンレセプターに対する結合に関して、カニクイザルトランスフェリンレセプターに対する抗体１２８．１の結合特性を反映する結合部位を開発するために、ＶＨ２３とＶＬ９との組み合わせが、更なる操作のための開始点として選択された。

【０１４１】

下記表において、ヒトトランスフェリンレセプターに対する、ＶＨ２３及びＶＬ９の種々の例示的な変異体、ならびに、種々の他の可変ドメインのヒト化変異体のオフレートが、比較して示される（実施例１４で測定、２５℃）。

【０１４２】

【表３】

	VK9-NYA	VK9-SYA	VK9-GYS	VK9-CYS	VH567-P…NYA	VK12-HYS	VK17-TYS	VK15-AYS	VK2-SYS	VK6-SYS
VH23-DANG	8.83E-03		3.96E-03		4.62E-03	1.53E-02	2.29E-03	6.97E-03	5.22E-03	1.32E-02
VH23-DASG	3.95E-02	4.84E-04	3.73E-03	2.33E-03						
VH23-DAQG	1.49E-02	7.55E-04	3.75E-03	1.51E-03						
VH9-DANG	1.82E-03			6.52E-03					4.02E-02	
VH9-DAQG	1.25E-03									
VH7-DANG										3.08E-02

参照：１２８．１＝７．７８Ｅ－０２（カニクイザルトランスフェリンレセプターについて測定）．

【０１４３】

下記表において、ＶＨ２３及びＶＬ９の種々の例示的な変異体の動力学データが、比較して示される（実施例１３で測定）。

【０１４４】

【表４】

BIAcore アッセイ@２５℃	TfR	kd [s^{-1}]	ka [$s^{-1}M^{-1}$]	kD [M]
mAb 128.1	カニクイザル	7.33E-02	5.41E+05	1.36E-07
VH23-DASG/VL09-NYA	ヒト	3.95E-02	8.83E+04	4.47E-07
VH23-DAQG/VL09-NYA	ヒト	1.37E-02	1.21E+05	1.13E-07
VH23-DANG/VL09-NYA	ヒト	8.83E-03	1.55E+05	5.72E-08

【０１４５】

下記表において、クローン４９４のマウス重鎖可変ドメインのヒト化変異体との組み合わせにおける、クローン４９４のマウス軽鎖可変ドメインのヒト化変異体のオフレートが示される。結合パートナーは、ヒトトランスフェリンレセプターとした。

【０１４６】

【表５】

VH→ VL↓	0 (mu)	1	2	3	4
0 (mu)	1.36E-04	1.37E-04	1.56E-04	1.48E-04	1.77E-04
1	3.70E-04	4.10E-04	4.54E-04	4.76E-04	4.48E-04
2	3.64E-04	3.99E-04	4.26E-04	4.15E-04	4.38E-04
3	3.39E-04	3.86E-04	4.30E-04	4.34E-04	4.52E-04
4	5.42E-04	6.57E-04	7.03E-04	6.83E-04	7.05E-04
5	5.44E-04	6.84E-04	7.17E-04	7.17E-04	7.28E-04
6	3.81E-04	4.86E-04	5.27E-04	5.50E-04	5.52E-04
7	2.32E-04	2.74E-04	2.99E-04	3.06E-04	3.26E-04

【０１４７】
より詳細には、一態様において、本発明は、部分的に、本明細書に報告されている抗トランスフェリンレセプター抗体が、血液脳関門を通過させて、脳内に脳エフェクター実体を輸送する、血液脳関門シャトルモジュールとして使用することができるという知見に基づいている。特定の実施態様では、血液脳関門シャトルモジュールは、トランスフェリンレセプターに特異的に結合する、一価の結合実体である。本明細書に報告されている抗トランスフェリンレセプター抗体は、血液脳関門シャトルモジュールとして使用された場合、例えば、神経障害、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、及びアルツハイマー病とパーキンソン病との併存疾患の診断又は処置に有用である。
【０１４８】
配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインを含む抗体は、結合オフレートに関して、カニクイザルトランスフェリンレセプターに対するマウス抗体１２８．１の結合特性を、ヒトトランスフェリンレセプターに対して反映させる。
【０１４９】
したがって、本明細書に報告されている一態様は、ヒトトランスフェリンレセプター（ｈｕＴｆＲ）及びカニクイザルトランスフェリンレセプター（ｃｙＴｆＲ）に結合する、単離された抗体である。ここで、本抗体は、０．１1/s～０．００51/sの、ヒトトランスフェリンレセプターに対する表面プラズモン共鳴により測定されたオフレートを有する。
【０１５０】
本明細書に報告されている別の態様は、ヒトトランスフェリンレセプター（ｈｕＴｆＲ）及びカニクイザルトランスフェリンレセプター（ｃｙＴｆＲ）に結合する、抗体又は抗体フラグメントの使用である。ここで、本抗体は、血液脳関門を通過させて、治療実体を輸送するために、０．１1/s～０．００51/sの、ヒトトランスフェリンレセプター対する表面プラズモン共鳴により測定されたオフレートを有する。
【０１５１】
一実施態様において、オフレートは、５００、２５０、１２５、６２．５、３１．２５、１５．６２５、及び０nMで測定される。
【０１５２】

一実施態様において、オフレートは、ビオチン表面を備える表面プラズモン共鳴チップと、２５０mM 塩化ナトリウムを添加した１×ＰＢＳのランニングバッファーとを使用し、流速１０μL/分で測定される。

【０１５３】

一実施態様において、会合は、１８０秒間モニターされ、解離は、６００秒間モニターされる。

【０１５４】

一実施態様において、オフレートは、BIAcore T200において測定される。

【０１５５】

一実施態様において、オフレートは、０．０８１/s～０．００８１/sである。

【０１５６】

全ての態様の一実施態様では、オフレートは、２５℃で測定される。

【０１５７】

全ての態様の一実施態様では、オフレートは、２５℃で測定されたオフレートである。

【０１５８】

本明細書に報告されている一態様は、ヒトトランスフェリンレセプター（ｈｕＴｆＲ）及びカニクイザルトランスフェリンレセプター（ｃｙＴｆＲ）に特異的に結合し、ｉ）配列番号：０１の重鎖可変ドメインから得られたヒト化重鎖可変ドメインと、ｉｉ）配列番号：２６の軽鎖可変ドメインから得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含み、ここで、軽鎖可変ドメインが、８０位にプロリンアミノ酸残基（Ｐ）、９１位にアスパラギンアミノ酸残基（Ｎ）、及び９３位にアラニンアミノ酸残基（Ａ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を有する、抗トランスフェリンレセプター抗体である。

【０１５９】

一実施態様において、本抗体は、重鎖可変ドメインにおいて、１００ｇ位にセリンアミノ酸残基（Ｓ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を更に有する。

【０１６０】

一実施態様において、本抗体は、重鎖可変ドメインにおいて、６５位にセリンアミノ酸残基（Ｓ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を更に有する。

【０１６１】

一実施態様において、本抗体は、重鎖可変ドメインにおいて、１０５位にグルタミンアミノ酸残基（Ｑ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング)を更に有する。

【０１６２】

本明細書に報告されている一態様は、ヒトトランスフェリンレセプター（ｈｕＴｆＲ）及びカニクイザルトランスフェリンレセプター（ｃｙＴｆＲ）に特異的に結合し、ｉ）配列番号：０１の重鎖可変ドメインから得られたヒト化重鎖可変ドメインと、ｉｉ）配列番号：２６の軽鎖可変ドメインから得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、抗トランスフェリンレセプター抗体である。ここで、該抗体は、カニクイザルトランスフェリンレセプターに対する抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１のオフレート（単位1/s）以下の（すなわち、多くても）、ヒトトランスフェリンレセプターに対するオフレート（単位1/s）を有する。ここで、該オフレートは、表面プラズモン共鳴により測定され、ここで、抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１は、配列番号：６４の重鎖可変ドメインと配列番号：６５の軽鎖可変ドメインとを有する。

【０１６３】

一実施態様において、本抗体は、ｉ）カニクイザルトランスフェリンレセプターに対する抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１のオフレート（単位1/s）以下（すなわち、多くても）で、ｉｉ）カニクイザルトランスフェリンレセプターに対する抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１のオフレート（単位1/s）の５％以下の（すなわち、多くても）、ヒトトランスフェリンレセプターに対するオフレート（単位1/s）を有する。

【０１６４】

本明細書に報告されている一態様は、ヒトトランスフェリンレセプター（ｈｕＴｆＲ）及びカニクイザルトランスフェリンレセプター（ｃｙＴｆＲ）に特異的に結合する、抗トランスフェリンレセプター抗体である。特定の実施態様では、抗トランスフェリンレセプター抗体は、

・ヒトトランスフェリンレセプター（ｈｕＴｆＲ）及びカニクイザルトランスフェリンレセプター（ｃｙＴｆＲ）に結合し、

・カニクイザルトランスフェリンレセプターに対する抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１のオフレート以下の（すなわち、多くても）、ヒトトランスフェリンレセプターに対するオフレート（単位1/s）を有し、ここで、該オフレートは、表面プラズモン共鳴により測定され、抗トランスフェリンレセプター抗体１２８．１は、配列番号：６４の重鎖可変ドメインと配列番号：６５の軽鎖可変ドメインとを有し、

・０．１１/s～０．００５１/sであり、これらを含むヒトトランスフェリンレセプターに対するオフレートで結合する。

【０１６５】

一態様において、本明細書では、（ａ）配列番号：６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号：６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号：７１、７２、又は７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号：７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号：７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２；及び（ｆ）配列番号：７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１、２、３、４、５、又は６つのＨＶＲを含む、抗トランスフェリンレセプター抗体が提供される。

【０１６６】

一態様において、本発明は、（ａ）配列番号：６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号：６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２；及び（ｃ）配列番号：７１又は７２又は７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、又は３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、抗体を提供する。一態様において、本発明は、（ａ）配列番号：６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号：６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２；及び（ｃ）配列番号：７２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、又は３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、抗体を提供する。一態様において、本発明は、（ａ）配列番号：６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号：６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２；及び（ｃ）配列番号：７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、又は３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、抗体を提供する。一実施態様において、本抗体は、配列番号：７１又は７２又は７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。別の実施態様では、本抗体は、配列番号：７１又は７２又は７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３と、配列番号：７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３とを含む。更なる実施態様では、本抗体は、配列番号：７１又は７２又は７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号：７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３、及び配列番号：６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２を含む。更なる実施態様では、本抗体は、（ａ）配列番号：６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号：６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２；及び（ｃ）配列番号：７２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。

【０１６７】

別の態様では、本発明は、（ａ）配列番号：７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号：７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２；及び（ｃ）配列番号：７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、又は３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、抗体を提供する。一実施態様において、本抗体は、（ａ）配列番号：７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号：７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２；及び（ｃ）配列番号：７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０１６８】
別の態様では、本発明の抗体は、（ａ）（ｉ）配列番号：６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：７１又は７２又は７３から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、又は３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号：７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号：７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号：７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、又は３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＬドメインとを含む。
【０１６９】
別の態様では、本発明は、（ａ）配列番号：６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号：６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号：７２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号：７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号：７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２；及び（ｆ）配列番号：７８から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、抗体を提供する。
【０１７０】
上記実施態様のいずれかにおいて、抗トランスフェリンレセプター抗体はヒト化されている。一実施態様において、抗トランスフェリンレセプター抗体は、上記実施態様のいずれかにおけるＨＶＲを含み、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークを更に含む。
【０１７１】
別の態様では、抗トランスフェリンレセプター抗体は、配列番号：２４のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含み、抗体が配列番号：２４の重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含むのと約同じオフレートを有する。特定の実施態様では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列に対して置換（例えば、保存的置換）、挿入、又は欠失を含有するが、その配列を含む抗トランスフェリンレセプター抗体は、同じオフレートでトランスフェリンレセプターに結合する能力を保持している。特定の実施態様では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号：２４中において、置換され、挿入され、及び／又は、欠失されている。特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、ＨＶＲの外側の領域に（すなわち、ＦＲに）生じる。場合により、抗トランスフェリンレセプター抗体は、配列番号：２４のＶＨ配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様では、ＶＨは、（ａ）配列番号：６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号：６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号：７２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、１、２、又は３つのＨＶＲを含む。
【０１７２】
別の態様では、抗トランスフェリンレセプター抗体であって、該抗体が、配列番号：３７のアミノ酸配列に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）配列を含み、抗体が配列番号：３７の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）配列を含むのと約同じオフレートを有する、抗トランスフェリンレセプター抗体が提供される。特定の実施態様では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列に対して置換（例えば、保存的置換）、挿入、又は欠失を含有するが、その配列を含む抗トランスフェリンレセプター抗体は、同じオフレートでトランスフェリンレセプターに結合する能力を保持している。特定の実施態様では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号：３７中において、置換され、挿入され、及び／又は、欠失されている。特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、ＨＶＲの外側の領域に（すなわち、ＦＲに）生じる。場合により、抗ト

ランスフェリンレセプター抗体は、配列番号：３７におけるＶＬ配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様では、ＶＬは、（ａ）配列番号：７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号：７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２；及び（ｃ）配列番号：７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、１、２又は３つのＨＶＲを含む。

【０１７３】

別の態様では、抗トランスフェリンレセプター抗体であって、該抗体が、上記提供された実施態様のいずれかにおけるＶＨと、上記提供された実施態様のいずれかにおけるＶＬとを含む、抗トランスフェリンレセプター抗体が提供される。一実施態様において、本抗体は、配列番号：２４及び配列番号：３７におけるＶＨ及びＶＬ配列それぞれを含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【０１７４】

本発明の更なる態様では、上記実施態様のいずれかの抗トランスフェリンレセプター抗体は、キメラ、ヒト化、又はヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一実施態様において、抗トランスフェリンレセプター抗体は、抗体フラグメント、例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、ｓｃＦｖ、ディアボディ、又はＦ（ａｂ’）２フラグメントである。別の実施態様では、本抗体は、全長抗体、例えば、インタクトなＩｇＧ１抗体又は、本明細書で定義されている他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

【０１７５】

全ての態様の一実施態様では、本抗体は、治療化合物に結合している。

【０１７６】

全ての態様の一実施態様では、本抗体は、イメージング剤又はラベルに結合している。

【０１７７】

別の実施態様では、本抗体は、多重特異性抗体であり、治療化合物が、場合により、該多重特異性抗体の一部を形成している。このような一実施態様では、本多重特異性抗体は、ＴｆＲに結合する第１抗原結合部位と、脳抗原に結合する第２抗原結合部位とを含む。このような一態様では、脳抗原は、ベーターセクレターゼ１（ＢＡＣＥ１）、Ａベータ、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）、ｔａｕ、アポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）、アルファーシヌクレイン、ＣＤ２０、ハンチンチン、プリオンタンパク質（ＰｒＰ）、ロイシンリッチリピートキナーゼ２（ＬＲＲＫ２）、パーキン、プレセニリン１、プレセニリン２、ガンマセクレターゼ、デスレセプター６（ＤＲ６）、アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）、ｐ７５ニューロトロフィンレセプター（ｐ７５ＮＴＲ）、グルコセレブロシダーゼ、及びカスパーゼ６からなる群より選択される。別の実施態様では、本多重特異性抗体は、ＴｆＲとＢＡＣＥ１との両方に結合する。別の実施態様では、本多重特異性抗体は、ＴｆＲとＡベータとの両方に結合する。別の実施態様では、本多重特異性抗体は、ＴｆＲとアルファシヌクレインとの両方に結合する。別の実施態様では、本多重特異性抗体は、ＴｆＲとＣＤ２０との両方に結合する。別の実施態様では、本多重特異性抗体は、ＴｆＲとグルコセレブロシダーゼとの両方に結合する。別の実施態様では、治療化合物は、神経障害剤である。

【０１７８】

上記実施態様の一態様では、本発明は、前述の抗体のいずれかと、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬製剤を提供する。

【０１７９】

上記実施態様の一態様では、本発明は、医薬として使用するための、前述の抗体のいずれかを提供する。

【０１８０】

上記実施態様の別の態様では、本発明は、神経障害を処置するための医薬の製造における、前述の抗体のいずれかの使用を提供する。一実施態様において、神経障害は、末梢神経障害、神経変性疾患、ガン、眼疾患、発作性障害、リソソーム蓄積症、アミロイドーシス、ウイルス又は微生物疾患、虚血、行動障害、及びＣＮＳ炎症からなる群より選択され

る。
【０１８１】
上記実施態様の別の態様では、本発明は、神経障害の処置に使用するための、前述の抗体のいずれかを提供する。一実施態様において、神経障害は、末梢神経障害、神経変性疾患、ガン、眼疾患、発作性障害、リソソーム蓄積症、アミロイドーシス、ウイルス又は微生物疾患、虚血、行動障害、及びＣＮＳ炎症からなる群より選択される。
【０１８２】
上記実施態様の別の態様では、本発明は、１つ以上の化合物を、ＢＢＢを通過させて輸送するのに使用するための、前述の抗体のいずれかを提供する。
【０１８３】
上記実施態様の別の態様では、１つ以上の化合物を、ＢＢＢを通過させて輸送するための医薬の製造における、前述の抗体のいずれかの使用が提供される。
【０１８４】
上記実施態様の一態様では、対象におけるＢＢＢを通過させて、化合物を輸送する方法であって、抗体がそれに結合した化合物を、ＢＢＢを通過させて輸送するように、前述の抗体のいずれかをＢＢＢに対して暴露させることを含む、方法が提供される。一実施態様において、ＢＢＢは、ヒト対象におけるものである。一実施態様において、化合物に結合した抗体は、治療用量で投与される。一実施態様において、治療用量は、ＴｆＲを飽和させる。別の実施態様では、抗体投与は、抗体投与の急性臨床兆候を最小化するように較正された用量及び／又は投与頻度においてである。
【０１８５】
上記実施態様の別の態様では、対象のＣＮＳの化合物への暴露を増大させる方法であって、抗体がそれに結合した化合物を、ＢＢＢを通過させて輸送するように、前述の抗体のいずれかをＢＢＢに対して暴露させることを含む、方法が提供される。一実施態様において、ＢＢＢは、ヒト対象におけるものである。一実施態様において、化合物に結合した抗体は、治療用量で投与される。一実施態様において、治療用量は、ＴｆＲを飽和させる。別の実施態様では、抗体投与は、抗体投与の急性臨床兆候を最小化するように較正された用量及び／又は投与頻度においてである。
【０１８６】
上記実施態様の一態様では、対象に投与された化合物のＣＮＳでの保持を増大させる方法であって、化合物のＣＮＳでの保持が増大するように、前述の抗体のいずれかをＢＢＢに対して暴露させることを含む、方法が提供される。一実施態様において、化合物に結合した抗体は、治療用量で投与される。一実施態様において、治療用量は、ＴｆＲを飽和させる。別の実施態様では、抗体投与は、抗体投与の急性臨床兆候を最小化するように較正された用量及び／又は投与頻度においてである。
【０１８７】
上記実施態様の一態様では、哺乳類における神経障害を処置する方法であって、該哺乳類を、前述の抗体のいずれかで処置することを含む、方法が提供される。一実施態様において、神経障害は、末梢神経障害、神経変性疾患、ガン、眼疾患、発作性障害、リソソーム蓄積症、アミロイドーシス、ウイルス又は微生物疾患、虚血、行動障害、及びＣＮＳ炎症からなる群より選択される。一実施態様において、神経障害は、ヒト対象におけるものである。一実施態様において、化合物に結合した抗体は、治療用量で投与される。一実施態様において、治療用量は、ＴｆＲを飽和させる。別の実施態様では、抗体投与は、抗体投与の急性臨床兆候を最小化するように較正された用量及び／又は投与頻度においてである。
【０１８８】
一実施態様において、本抗体は、抗体Ｆｃ領域のエフェクター機能、抗体の補体活性化機能、及びＴｆＲに対する抗体の親和性から選択される、１つ以上の特性において改変されている。
【０１８９】

一実施態様において、該特性は、抗体Ｆｃ領域のエフェクター機能である。
【０１９０】
一実施態様において、該特性は、抗体の補体活性化機能である。
【０１９１】
一実施態様において、該特性は、ＴｆＲに対する抗体の親和性である。
【０１９２】
一実施態様において、エフェクター機能又は補体活性化機能は、同じアイソタイプの野生型抗体に対して、低下し、又は、除去されている。一実施態様において、エフェクター機能は、抗体のグリコシル化の減少、抗体アイソタイプのエフェクター機能が天然に低下し、又は、除去されているアイソタイプへの改変、及びＦｃ領域の改変から選択される方法により、低下し、又は、除去されている。
【０１９３】
一実施態様において、エフェクター機能は、抗体のグリコシル化の減少により、低下し、又は、除去されている。一実施態様において、抗体のグリコシル化は、野生型グリコシル化が可能でない環境における抗体の生成、抗体に既に存在している炭水化物基の除去、及び、野生型グリコシル化が生じないような抗体の改変から選択される方法により減少される。
【０１９４】
一実施態様において、抗体のグリコシル化は、野生型グリコシル化が可能でない環境における抗体の生成、（例えば、非哺乳類細胞生成系における生成、又は、抗体が合成的に生成される場合）によって減少される。一実施態様において、本抗体は、非哺乳類細胞生成系において生成される。別の実施態様では、本抗体は、合成的に生成される。
【０１９５】
一実施態様において、抗体のグリコシル化は、野生型グリコシル化が生じないような抗体の改変により減少される。この場合、例えば、抗体のＦｃ領域が２９７位に変異を含むことにより、その位置における野生型のアスパラギン残基がその位置でのグリコシル化を妨げる別のアミノ酸に置き換えられている。
【０１９６】
一実施態様において、エフェクター機能は、Ｆｃ領域の少なくとも１つの改変により低下し、又は、除去される。一実施態様において、エフェクター機能又は補体活性化機能は、Ｆｃ領域の全部もしくは一部の欠失により、又は、エフェクター機能もしくは補体活性化機能のためのＦｃ領域もしくは非Ｆｃ領域コンピテントを含まないように抗体を操作することにより低下し、又は、除去される。一実施態様において、Ｆｃ領域の少なくとも１つの改変は、下記位置：２３８、２３９、２４８、２４９、２５２、２５４、２６５、２６８、２６９、２７０、２７２、２７８、２８９、２９２、２９３、２９４、２９５、２９６、２９７、２９８、３０１、３０３、３２２、３２４、３２７、３２９、３３３、３０　３３５、３３８、３４０、３７３、３７６、３８２、３８８、３８９、４１４、４１６、４１９、４３４、４３５、４３７、４３８、及び４３９から選択される１つ以上の、Ｆｃレセプターへの結合を損なわせるＦｃ領域の点突然変異；下記位置：２７０、３２２、３２９、及び３２１から選択されるＣ１ｑへの結合を損なわせるＦｃ領域の点突然変異；Ｆｃ領域の一部又は全部の除去、ならびに、ＣＨ１ドメインの１３２位における点突然変異から選択される。一実施態様において、該改変は、下記位置：２７０、３２２、３２９、及び３２１から選択されるＣ１ｑへの結合を損なわせるＦｃ領域の点突然変異である。別の実施態様では、該改変は、Ｆｃ領域の一部又は全部の除去である。別の実施態様では、補体トリガー機能は、Ｆｃ領域の全部もしくは一部の欠失により、又は、補体経路に関わるＦｃ領域を含まないように抗体を操作することにより低下し、又は、除去される。一実施態様において、本抗体は、Ｆａｂ又は一本鎖抗体から選択される。別の実施態様では、抗体の非Ｆｃ領域は、抗体による補体経路の活性化を減少させ、又は、除去するように改変される。一実施態様において、該改変は、Ｃ３への結合を損なわせる、ＣＨ１領域の点突然変異である。一実施態様において、該点突然変異は、１３２位においてである（

例えば、Vidarte et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 38217-38223を参照のこと）。

【０１９７】

上記実施態様の別の態様では、ＴｆＲに対する抗体の親和性は、ＴｆＲに対するより低い親和性を有しない同じアイソタイプの野生型抗体に関して測定された場合、低下している。このような一態様では、本抗体は、約１pM～約１００μMのＴｆＲに対するK_D又はIC_{50}を有する。

【０１９８】

一実施態様において、本明細書に報告されている抗体は、エフェクター機能サイレントである。一実施態様において、本抗体は、エフェクター機能を有しない。一実施態様において、本抗体は、ヒトＩｇＧ１サブクラスのものであり、両重鎖において、変異Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ（ＫａｂａｔのＥＵインデックスに従ったナンバリング）を有する。

【０１９９】

一実施態様において、本抗体は、

ａ）ヒトサブクラスＩｇＧ１の全長抗体、又は

ｂ）ヒトサブクラスＩｇＧ４の全長抗体、又は

ｃ）変異Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇを有するヒトサブクラスＩｇＧ１の全長抗体、

ｄ）変異Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、及び場合により、Ｐ３２９Ｇを有するヒトサブクラスＩｇＧ４の全長抗体、

ｅ）両重鎖における変異Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、ならびに、一方の重鎖における変異Ｔ３６６W及びＳ３５４Ｃ、ならびに、それぞれの他方の重鎖における変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを有するヒトサブクラスＩｇＧ１の全長抗体、又は

ｆ）両重鎖における変異Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、及び場合により、Ｐ３２９Ｇ、ならびに、一方の重鎖における変異Ｔ３６６W及びＳ３５４Ｃ、ならびに、それぞれの他方の重鎖における変異Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、及びＹ３４９Ｃを有するヒトサブクラスＩｇＧ４の全長抗体

である。

【０２００】

上記実施態様の一態様では、本発明は、前述の抗体のいずれかと、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬製剤を提供する。

【０２０１】

上記実施態様の一態様では、本発明は、医薬として使用するための、前述の抗体のいずれかを提供する。

【０２０２】

上記実施態様の別の態様では、本発明は、神経障害を処置するための医薬の製造における、前述の抗体のいずれかの使用を提供する。一実施態様において、神経障害は、末梢神経障害、神経変性疾患、ガン、眼疾患、発作性障害、リソソーム蓄積症、アミロイドーシス、ウイルス又は微生物疾患、虚血、行動障害、及びＣＮＳ炎症からなる群より選択される。

【０２０３】

上記実施態様の別の態様では、本発明は、神経障害の処置に使用するための、前述の抗体のいずれかを提供する。一実施態様において、神経障害は、末梢神経障害、神経変性疾患、ガン、眼疾患、発作性障害、リソソーム蓄積症、アミロイドーシス、ウイルス又は微生物疾患、虚血、行動障害、及びＣＮＳ炎症からなる群より選択される。

【０２０４】

上記実施態様の別の態様では、本発明は、１つ以上の化合物を、ＢＢＢを通過させて輸送するのに使用するための、前述の抗体のいずれかを提供する。

【０２０５】

上記実施態様の別の態様では、１つ以上の化合物を、ＢＢＢを通過させて輸送するための医薬の製造における、前述の抗体のいずれかの使用が提供される。

【０２０６】

上記実施態様の一態様では、対象におけるＢＢＢを通過させて、化合物を輸送する方法であって、抗体がそれに結合した化合物を、ＢＢＢを通過させて輸送するように、前述の抗体のいずれかをＢＢＢに対して暴露させることを含む、方法が提供される。一実施態様において、ＢＢＢは、ヒト対象におけるものである。一実施態様において、化合物に結合した抗体は、治療用量で投与される。一実施態様において、治療用量は、ＴｆＲを飽和させる。別の実施態様では、抗体投与は、抗体投与の急性臨床兆候を最小化するように較正された用量及び／又は投与頻度においてである。

【０２０７】

上記実施態様の別の態様では、対象のＣＮＳの化合物への暴露を増大させる方法であって、抗体がそれに結合した化合物を、ＢＢＢを通過させて輸送するように、前述の抗体のいずれかをＢＢＢに対して暴露させることを含む、方法が提供される。一実施態様において、ＢＢＢは、ヒト対象におけるものである。一実施態様において、化合物に結合した抗体は、治療用量で投与される。一実施態様において、治療用量は、ＴｆＲを飽和させる。別の実施態様では、抗体投与は、抗体投与の急性臨床兆候を最小化するように較正された用量及び／又は投与頻度においてである。

【０２０８】

上記実施態様の一態様では、対象に投与された化合物のＣＮＳでの保持を増大させる方法であって、化合物のＣＮＳでの保持が増大するように、前述の抗体のいずれかをＢＢＢに対して暴露させることを含む、方法が提供される。一実施態様において、ＢＢＢは、ヒト対象におけるものである。一実施態様において、化合物に結合した抗体は、治療用量で投与される。一実施態様において、治療用量は、ＴｆＲを飽和させる。別の実施態様では、抗体投与は、抗体投与の急性臨床兆候を最小化するように較正された用量及び／又は投与頻度においてである。

【０２０９】

上記実施態様の一態様では、哺乳類における神経障害を処置する方法であって、該哺乳類を、前述の抗体のいずれかで処置することを含む、方法が提供される。一実施態様において、神経障害は、末梢神経障害、神経変性疾患、ガン、眼疾患、発作性障害、リソソーム蓄積症、アミロイドーシス、ウイルス又は微生物疾患、虚血、行動障害、及びＣＮＳ炎症からなる群より選択される。別のこのような態様では、神経障害は、ヒト対象におけるものである。一実施態様において、化合物に結合した抗体は、治療用量で投与される。一実施態様において、治療用量は、ＴｆＲを飽和させる。別の実施態様では、抗体投与は、抗体投与の急性臨床兆候を最小化するように較正された用量及び／又は投与頻度においてである。

【０２１０】

別の実施態様では、対象に投与された化合物のクリアランスを低下させる方法であって、該化合物が、ＴｆＲに対して低い親和性で結合する抗体に結合しており、これにより、該化合物のクリアランスが低下している、方法が提供される。

【０２１１】

別の実施態様では、対象におけるＣＮＳにおいて有効な化合物の薬物動態及び／又は薬力学を最適化する方法であって、該化合物が、ＴｆＲに対して低い親和性で結合する抗体に結合しており、該抗体が、該化合物への結合後のＴｆＲに対するその親和性がＣＮＳにおける該化合物の薬物動態及び／又は薬力学を最適化する、該化合物にコンジュゲートした抗体のＢＢＢを通過する一定量の輸送をもたらすように選択される、方法が提供される。

【０２１２】

更なる態様では、上記態様及び実施態様のいずれかに基づく抗トランスフェリンレセプター抗体は、単独又は組み合わせにおいて、以下のセクション１～５に記載されている特

徴のいずれかを包含することができる。

【０２１３】

１．抗体親和性

一実施態様では、Ｋｄを、放射線ラベルされた抗原結合アッセイ法（ＲＩＡ）により測定する。一実施態様では、ＲＩＡを、対象となる抗体のＦａｂ版とその抗原とにより行う。例えば、抗原に対するＦａｂの溶液結合親和性を、用量設定系列のラベルしていない抗原の存在下において、Ｆａｂを最少濃度の（^{125}Ｉ）ラベル抗原により平衡化し、ついで、結合した抗原を抗Ｆａｂ抗体コートプレートで捕捉することにより測定する（例えば、Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881を参照のこと）。アッセイ法のための条件を確立するために、MICROTITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）を、５０mM 炭酸ナトリウム（ｐＨ９．６）中の５μg/mL 捕捉性抗Ｆａｂ抗体（Cappel Labs）により一晩コートし、その後、ＰＢＳ中の２％（w/v） ウシ血清アルブミンにより、室温（約２３℃）で２～５時間ブロッキングする。非吸着性プレート（Nunc #269620）において、１００pM又は２６pM ［^{125}Ｉ］抗原を、対象となるＦａｂの連続希釈と混合する（例えば、Presta, L.G. et al., Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599における、抗ＶＥＧＦ抗体であるＦａｂ－１２の評価と一致）。ついで、対象となるＦａｂを、一晩インキュベーションする。ただし、このインキュベーションは、平衡が達成されるのを確保するために、より長い期間（例えば、約６５時間）継続してもよい。その後、混合物を、室温でのインキュベーション（例えば、１時間）のために捕捉プレートに移す。ついで、溶液を除去し、プレートを、ＰＢＳ中の０．１％ ポリソルベート２０（TWEEN-20（登録商標））で、８回洗浄する。このプレートを乾燥させた時点で、１５０μL／ウェル シンチラント（MICROSCINT-20（商標）；Packard)を加え、プレートを、TOPCOUNT（商標）ガンマカウンタ（Packard）において、１０分間カウントする。最大結合の２０％以下を提供する各Ｆａｂ濃度を、競合的結合アッセイ法に使用するために選択する。

【０２１４】

別の実施態様によれば、Ｋｄを、BIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイ法を使用して測定する。例えば、BIACORE（登録商標）-2000又はBIACORE（登録商標）-3000（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を使用するアッセイ法を、固定化抗原ＣＭ５チップにより、約１０応答単位（RU）において２５℃で行う。一実施態様において、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ（CM5, BIACORE, Inc.）を、Ｎ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）及びＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）により、供給元の説明書に従って活性化させる。抗原を、１０mM 酢酸ナトリウム ｐＨ４．８で５μg/mL（約０．２μM）に希釈し、その後、５μL/分の流速で注入し、約１０応答単位（RU）の連結したタンパク質を達成する。抗原の注入後、1M エタノールアミンを注入して、反応しなかった基をブロックする。反応速度測定について、２倍の連続希釈のＦａｂ（０．７８nM～５００nM）を、０．０５％ ポリソルベート２０（TWEEN-20（商標））界面活性剤を含むＰＢＳ（ＰＢＳＴ）中に、約２５μL/分の流速で２５℃において注入する。シンプルな一対一のラングミュア結合モデル（BIACORE（登録商標） Evaluation Software version 3.2）を使用し、会合及び解離のセンサーグラムを同時に当て嵌めることにより、会合速度（k_{on}）及び解離速度（k_{off}）を算出する。平行解離定数（Ｋｄ）を、k_{off}/k_{on}比として算出する（例えば、Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881を参照のこと）。ｏｎ速度が、上記表面プラズモン共鳴アッセイ法により$10^{6}M^{-1}s^{-1}$を超える場合、同ｏｎ速度を、攪拌キュベットを備える分光計、例えば、ストップフローを備えた分光計（Aviv Instruments）又は8000-series SLM-AMINCO（商標）分光計（ThermoSpectronic）において測定する場合は、増大する濃度の抗原の存在下において、ＰＢＳ ｐＨ７．２中の２０nM 抗－抗原抗体（Ｆａｂ型）の２５℃での蛍光放出強度（励起＝２９５nm；放出＝３４０nm、バンドパス１６nm）における増大又は減少を測定する蛍光クエンチ技術を使用することにより決定することができる。

【０２１５】

２．抗体フラグメント

特定の実施態様では、本明細書に提供されている抗体は、抗体フラグメントである。抗体フラグメントは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、及びｓｃＦｖフラグメント、ならびに以下に記載されている他のフラグメントを含むが、これらに限定されない。特定の抗体フラグメントのレビューについて、Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134を参照のこと。ｓｃＦｖフラグメントのレビューについて、例えば、Plueckthun, A., In; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315を参照のこと。国際公開公報第９３／１６１８５号；米国特許第５，５７１，８９４号、及び同第５，５８７，４５８号も参照のこと。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含み、延長したｉｎ　ｖｉｖｏ半減期を有するＦａｂ及びＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントの検討については、米国特許第５，８６９，０４６号を参照のこと。

【０２１６】

ディアボディは、二価又は二重特異性であることができる、２つの抗原結合部位を有する抗体フラグメントである。例えば、欧州特許第０４０４０９７号；国際公開公報第１９９３／０１１６１号；Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134；及びHollinger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448を参照のこと。トリボディ及びテトラボディも、Hudson, P.J. et al., Nat. Med.9 (20039 129-134)に記載されている。

【０２１７】

単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部もしくは一部又は軽鎖可変ドメインの全部もしくは一部を含む抗体フラグメントである。特定の実施態様では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である（Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば、米国特許第６，２４８，５１６号を参照のこと）。

【０２１８】

抗体フラグメントは、種々の技術により調製することができる。同技術は、本明細書に記載されている、インタクトな抗体のタンパク質分解的消化及びリコンビナントホスト細胞（例えば、E. coli又はファージ）による生成を含むが、これらに限定されない。

【０２１９】

３．キメラ及びヒト化抗体

特定の実施態様では、本明細書に提供されている抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第４，８１６，５６７号；及びMorrison, S.L. et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855に記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は非ヒト霊長類、例えば、サル由来の可変領域）と、ヒト定常領域とを含む。更なる例において、キメラ抗体は、「クラススイッチ」抗体である。同抗体において、クラス又はサブクラスは、親抗体のクラス又はサブクラスから変化している。キメラ抗体は、その抗原結合フラグメントを含む。

【０２２０】

特定の実施態様では、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する抗原性を減少させるが、親非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持するようにヒト化される。一般的には、ヒト化抗体は、１つ以上の可変ドメインを含み、同ドメインにおいて、ＨＶＲ、例えば、ＣＤＲ（又はその一部）は、非ヒト抗体由来であり、ＦＲ（又はその一部）は、ヒト抗体配列由来である。ヒト化抗体は、場合により、ヒト定常領域の少なくとも一部も含むであろう。一部の実施態様では、ヒト化抗体中の一部のＦＲ残基は、例えば、抗体特異性又は親和性を回復又は改善するために、非ヒト抗体（例えば、ＨＶＲ残基が得られる抗体）由来の対応する残基により置換されている。

【０２２１】

ヒト化抗体及びそれを調製する方法は、例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633においてレビューされており、例えば、（特異性決定

領域（ＳＤＲ）グラフト化について記載されている）Riechmann, I. et al., Nature 332 (1988) 323-329；Queen, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033；米国特許第５，８２１，３３７号、同第７，５２７，７９１号、同第６，９８２，３２１号、及び同第７，０８７，４０９号；Kashmiri, S.V. et al., Methods 36 (2005) 25-34；（「表面再生」について記載されている）Padlan, E.A., Mol. Immunol.28 (1991) 489-498；（「ＦＲシャッフリング」について記載されている）Dall'Acqua, W.F. et al., Methods 36 (2005) 43-60；ならびに（ＦＲシャッフリングに対する「ガイドセレクション」アプローチについて記載されている）Osbourn, J. et al., Methods 36 (2005) 61-68及びKlimka, A. et al., Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260に更に記載されている。

【０２２２】

ヒト化に使用することができるヒトフレームワーク領域は、「ベストフィット」法を使用して選択されるフレームワーク領域（例えば、Sims, M.J. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308）；軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列由来のフレームワーク領域（例えば、Carter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289；及びPresta, L.G. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632を参照のこと）；ヒト成熟（体細胞的に成熟）フレームワーク領域又はヒト生殖系フレームワーク領域（例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633を参照のこと）；及びＦＲライブラリのスクリーニングから得られるフレームワーク領域（例えば、Baca, M. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684及びRosok, M.J. et al., J. Biol. Chem. 271 (19969 22611-22618)を参照のこと）を含むが、これらに限定されない。

【０２２３】

４．多重特異性抗体

特定の実施態様では、本明細書に提供されている抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも２種類の部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。特定の実施態様では、結合特異性の１つは、トランスフェリンレセプターに対するものであり、他のものは、任意の他の抗原に対するものである。二重特異性抗体は、トランスフェリンレセプターを発現している細胞に対して、細胞毒を局在化させるのにも使用することができる。二重特異性抗体は、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。

【０２２４】

多重特異性抗体を調製するための技術は、異なる特異性を有する２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対のリコンビナント共発現（Milstein, C. and Cuello, A.C., Nature 305 (1983)537-540、国際公開公報第９３／０８８２９号、及びTraunecker, A. et al., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659を参照のこと）及び「ノブ－ｉｎ－ホール」操作（例えば、米国特許第５，７３１，１６８号）を含むが、これらに限定されない。多重特異性抗体は、抗体Ｆｃヘテロ二量体分子を調製するための静電ステアリング効果を操作すること（国際公開公報第２００９／０８９００４号）；２つ以上の抗体又はフラグメントを架橋させること（例えば、米国特許第４，６７６，９８０号及びBrennan, M. et al., Science229 (1985) 81-83）；二重特異性抗体を生成するためのロイシンジッパーを使用すること（例えば、Kostelny, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553を参照のこと）；二重特異性抗体フラグメントを調製するための「ディアボディ」技術を使用すること（例えば、Holliger, P. et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448を参照のこと）；及び一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）二量体を使用すること（例えば、Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374を参照のこと）；及び例えば、Tutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991)60-69に記載されているように、三重特異性抗体を調製することによっても調製することができる。

【０２２５】

「オクトパス抗体」を含む、３つ以上の機能性の抗原結合部位を有する操作された抗体

も、本明細書に含まれる（例えば、米国特許出願公開公報第２００６／００２５５７６号を参照のこと）。

【０２２６】

本明細書における抗体又はフラグメントは、トランスフェリンレセプターと、別の種々の抗原に結合する抗原結合部位を含む、「二重作用Ｆａｂ」又は「ＤＡＦ」も含む（例えば、米国特許出願公開公報第２００８／００６９８２０号を参照のこと）。

【０２２７】

本明細書における抗体又はフラグメントは、国際公開公報第２００９／０８０２５１号、同第２００９／０８０２５２号、同第２００９／０８０２５３号、同第２００９／０８０２５４号、同第２０１０／１１２１９３号、同第２０１０／１１５５８９号、同第２０１０／１３６１７２号、同第２０１０／１４５７９２号、及び同第２０１０／１４５７９３号に記載されている多重特異性抗体も含む。

【０２２８】

本明細書に報告されている全ての態様の一実施態様では、抗トランスフェリンレセプター抗体は、二重特異性抗体である。

【０２２９】

本明細書に報告されている一態様は、

ａ）第１抗原に特異的に結合する抗体の第１軽鎖及び第１重鎖と、

ｂ）第２抗原に特異的に結合する抗体の第２軽鎖及び第２重鎖であって、第２軽鎖及び第２重鎖の可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられている第２軽鎖及び第２重鎖とを含み、

ここで、第１抗原又は第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、二価の二重特異性抗体である。

【０２３０】

ａ）に基づく抗体は、ｂ）に基づいて報告されている改変を含有せず、ａ）に基づく重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。

【０２３１】

ｂ）に基づく抗体において、軽鎖内では、可変軽鎖ドメインＶＬは、前記抗体の可変重鎖ドメインＶＨにより置き換えられており、重鎖内では、可変重鎖ドメインＶＨは、前記抗体の可変軽鎖ドメインＶＬにより置き換えられている。

【０２３２】

一実施態様において、

ｉ）　ａ）に基づく第１軽鎖の定常ドメインＣＬにおいて、１２４位のアミノ酸（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング）は、正に電荷したアミノ酸により置換されており、ここで、ａ）に基づく第１重鎖の定常ドメインＣＨ１において、１４７位のアミノ酸又は２１３位のアミノ酸（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）は、負に電荷したアミノ酸により置換されているか、

あるいは、

ｉｉ）　ｂ）に基づく第２軽鎖の定常ドメインＣＬにおいて、１２４位のアミノ酸（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング）は、正に電荷したアミノ酸により置換されており、ここで、ｂ）に基づく第２重鎖の定常ドメインＣＨ１において、１４７位のアミノ酸又は２１３位のアミノ酸（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）は、負に電荷したアミノ酸により置換されている。

【０２３３】

好ましい一実施態様では、

ｉ）　ａ）に基づく第１軽鎖の定常ドメインＣＬにおいて、１２４位のアミノ酸は、リシン（Ｋ）、アルギニン（Ｒ）、又はヒスチジン（Ｈ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング）により独立して（好ましい一実施態様では、リシン（Ｋ）又はアルギニン（Ｒ）により独立して）置換されており、ここで、ａ）に基づく第１重鎖の定常ドメインＣＨ１において、１４７位のアミノ酸又は２１３位のアミノ酸は、グルタミン酸（Ｅ）又はアスパラ

ギン酸（Ｄ）（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）により独立して置換されているか、
あるいは、
ｉｉ）　ｂ）に基づく第２軽鎖の定常ドメインＣＬにおいて、１２４位のアミノ酸は、リシン（Ｋ）、アルギニン（Ｒ）、又はヒスチジン（Ｈ）（Ｋａｂａｔに従ったナンバリング）により独立して（好ましい一実施態様では、リシン（Ｋ）又はアルギニン（Ｒ）により独立して）置換されており、ここで、ｂ）に基づく第２重鎖の定常ドメインＣＨ１において、１４７位のアミノ酸又は２１３位のアミノ酸は、グルタミン酸（Ｅ）又はアスパラギン酸（Ｄ）（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）により独立して置換されている。

【０２３４】
一実施態様では、第２重鎖の定常ドメインＣＬにおいて、１２４及び１２３位のアミノ酸は、Ｋにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０２３５】
一実施態様では、第２軽鎖の定常ドメインＣＨ１において、１４７及び２１３位のアミノ酸は、Ｅにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０２３６】
好ましい一実施態様では、第１軽鎖の定常ドメインＣＬにおいて、１２４及び１２３位のアミノ酸は、Ｋにより置換されており、第１重鎖の定常ドメインＣＨ１において、１４７及び２１３位のアミノ酸は、Ｅにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０２３７】
一実施態様では、第２重鎖の定常ドメインＣＬにおいて、１２４及び１２３位のアミノ酸は、Ｋにより置換されており、ここで、第２軽鎖の定常ドメインＣＨ１において、１４７及び２１３位のアミノ酸は、Ｅにより置換されており、第１軽鎖の可変ドメインＶＬにおいて、３８位のアミノ酸は、Ｋにより置換されており、第１重鎖の可変ドメインＶＨにおいて、３９位のアミノ酸は、Ｅにより置換されており、第２重鎖の可変ドメインＶＬにおいて、３８位のアミノ酸は、Ｋにより置換されており、第２軽鎖の可変ドメインＶＨにおいて、３９位のアミノ酸は、Ｅにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０２３８】
本明細書に報告されている一態様は、
ａ）第１抗原に特異的に結合する抗体の第１軽鎖及び第１重鎖と、
ｂ）第２抗原に特異的に結合する抗体の第２軽鎖及び第２重鎖であって、第２軽鎖及び第２重鎖の可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられており、ここで、第２軽鎖及び第２重鎖の定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられている第２軽鎖及び第２重鎖とを含み、
ここで、第１抗原又は第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、二価の二重特異性抗体である。

【０２３９】
ａ）に基づく抗体は、ｂ）に基づいて報告されている改変を含有せず、ａ）に基づく重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。

【０２４０】
ｂ）に基づく抗体において、軽鎖内では、可変軽鎖ドメインＶＬは、前記抗体の可変重鎖ドメインＶＨにより置き換えられており、定常軽鎖ドメインＣＬは、前記抗体の定常重鎖ドメインＣＨ１により置き換えられており、重鎖内では、可変重鎖ドメインＶＨは、前記抗体の可変軽鎖ドメインＶＬにより置き換えられており、定常重鎖ドメインＣＨ１は、前記抗体の定常軽鎖ドメインＣＬにより置き換えられている。

【０２４１】
本明細書に報告されている一態様は、
ａ）第１抗原に特異的に結合する抗体の第１軽鎖及び第１重鎖と、
ｂ）第２抗原に特異的に結合する抗体の第２軽鎖及び第２重鎖であって、第２軽鎖及び第２重鎖の定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられている第２軽鎖及び第２重鎖とを含み、
ここで、第１抗原又は第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、二価の二重特異性抗体である。
【０２４２】
ａ）に基づく抗体は、ｂ）に基づいて報告されている改変を含有せず、ａ）に基づく重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。
【０２４３】
ｂ）に基づく抗体において、軽鎖内では、定常軽鎖ドメインＣＬは、前記抗体の定常重鎖ドメインＣＨ１により置き換えられており、重鎖内では、定常重鎖ドメインＣＨ１は、前記抗体の定常軽鎖ドメインＣＬにより置き換えられている。
【０２４４】
本明細書に報告されている一態様は、
ａ）第１抗原に特異的に結合し、２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖からなる全長抗体と、
ｂ）１～４個の更なる抗原に特異的に結合する（すなわち、第２及び／又は第３及び／又は第４及び／又は第５抗原、好ましくは、１つの更なる抗原、すなわち、第２抗原に特異的に結合する）１、２、３、又は４本の一本鎖Ｆａｂフラグメントとを含み、
ここで、前記ｂ）に基づく一本鎖Ｆａｂフラグメントが、前記ａ）に基づく全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体における重鎖又は軽鎖のＣ末端又はＮ末端において融合しており、
ここで、第１抗原又は更なる抗原の１つが、ヒトトランスフェリンレセプターである、多重特異性抗体である。
【０２４５】
一実施態様において、第２抗原に結合する１つ又は２つの同一の一本鎖Ｆａｂフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体における重鎖又は軽鎖のＣ末端において融合している。
【０２４６】
一実施態様において、第２抗原に結合する１つ又は２つの同一の一本鎖Ｆａｂフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体における重鎖のＣ末端において融合している。
【０２４７】
一実施態様において、第２抗原に結合する１つ又は２つの同一の一本鎖Ｆａｂフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体における軽鎖のＣ末端において融合している。
【０２４８】
一実施態様において、第２抗原に結合する２つの同一の一本鎖Ｆａｂフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体における重鎖又は軽鎖それぞれのＣ末端において融合している。
【０２４９】
一実施態様において、第２抗原に結合する２つの同一の一本鎖Ｆａｂフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体における各重鎖のＣ末端において融合している。
【０２５０】
一実施態様において、第２抗原に結合する２つの同一の一本鎖Ｆａｂフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体における各軽鎖のＣ末端にお

いて融合している。
【０２５１】
本明細書に報告されている一態様は、
ａ）第１抗原に特異的に結合し、２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖からなる全長抗体と、
ｂ）　ｂａ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）又は
ｂｂ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び抗体定常ドメイン１（ＣＨ１）から成る第１ポリペプチドであって、前記第１ポリペプチドが、そのＶＨドメインのＮ末端により、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体における２つの重鎖の一方のＣ末端に融合している第１ポリペプチドと、
ｃ）　ｃａ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）又は
ｃｂ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）及び抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）からなる第２ポリペプチドであって、前記第２ポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端により、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体における２つの重鎖の他方のＣ末端に融合している第２ポリペプチドとを含み、
ここで、第１ポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と第２ポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とが共に、第２抗原に特異的に結合する抗原結合部位を形成しており、
ここで、第１抗原又は第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、三価の二重特異性抗体である。
【０２５２】
一実施態様において、ｂ）に基づくポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、ｃ）に基づくポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とは、下記位置間のジスルフィド結合の導入による鎖内ジスルフィド架橋を介して連結され、安定化している。
ｉ）重鎖可変ドメインの４４位に対する軽鎖可変ドメインの１００位、又は
ｉｉ）重鎖可変ドメインの１０５位に対する軽鎖可変ドメインの４３位、又は
ｉｉｉ）重鎖可変ドメインの１０１位に対する軽鎖可変ドメインの１００位（通常、Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）
【０２５３】
安定化のための非天然のジスルフィド架橋を導入する技術は、例えば、国際公開公報第９４／０２９３５０号、Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-59；Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393；又はSchmidt, M., et al., Oncogene (1999) 18 1711-1721に記載されている。一実施態様において、ｂ）及びｃ）に基づくポリペプチドの可変ドメイン間の任意のジスルフィド結合は、重鎖可変ドメインの４４位と軽鎖可変ドメインの１００位との間である。一実施態様において、ｂ）及びｃ）に基づくポリペプチドの可変ドメイン間の任意のジスルフィド結合は、重鎖可変ドメインの１０５位と軽鎖可変ドメインの４３位との間である（通常、Ｋａｂａｔに従ったナンバリング）。一実施態様において、一本鎖Ｆａｂフラグメントにおける可変ドメインＶＨとＶＬとの間の前記任意のジスルフィド安定化を含まない、三価の二重特異性抗体が好ましい。
【０２５４】
本明細書に報告されている一態様は、
ａ）第１抗原に特異的に結合する全長抗体の第１軽鎖及び第１重鎖と、
ｂ）第２抗原に特異的に結合する全長抗体の第２（改変）軽鎖及び第２（改変）重鎖であって、可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられており、及び／又は、ここで、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられている第２（改変）軽鎖及び第２（改変）重鎖と、
ｃ）１つ又は２つの更なる抗原（すなわち、第３及び／又は第４抗原）に特異的に結合し、ペプチドリンカーを介して、ａ）及び／又はｂ）における軽鎖又は重鎖のＣ末端又はＮ末端に融合している１～４つの抗原結合ペプチドとを含み、

ここで、第１抗原もしくは第２抗原又は更なる抗原の１つが、ヒトトランスフェリンレセプターである、三重特異性又は四重特異性抗体である。

【０２５５】

ａ）に基づく抗体は、ｂ）に基づいて報告されている改変を含有せず、ａ）に基づく重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。

【０２５６】

一実施態様において、三重特異性又は四重特異性抗体は、ｃ）に基づいて、１つ又は２つの更なる抗原に特異的に結合する、１つ又は２つの抗原結合ペプチドを含む。

【０２５７】

一実施態様において、抗原結合ペプチドは、ｓｃＦｖフラグメント及びｓｃＦａｂフラグメントからなる群より選択される。

【０２５８】

一実施態様において、抗原結合ペプチドは、ｓｃＦｖフラグメントである。

【０２５９】

一実施態様において、抗原結合ペプチドは、ｓｃＦａｂフラグメントである。

【０２６０】

一実施態様において、抗原結合ペプチドは、ａ）及び／又はｂ）における重鎖のＣ末端に融合している。

【０２６１】

一実施態様において、三重特異性又は四重特異性抗体は、ｃ）に基づいて、１つの更なる抗原に特異的に結合する、１つ又は２つの抗原結合ペプチドを含む。

【０２６２】

一実施態様において、三重特異性又は四重特異性抗体は、ｃ）に基づいて、第３抗原に特異的に結合する、２つの同一の抗原結合ペプチドを含む。好ましい一実施態様では、このような２つの同一の抗原結合ペプチドは両方とも、同じペプチドリンカーを介して、ａ）及びｂ）における重鎖のＣ末端に融合している。好ましい一実施態様では、２つの同一抗原結合ペプチドは、ｓｃＦｖフラグメント又はｓｃＦａｂフラグメントのいずれかである。

【０２６３】

一実施態様において、三重特異性又は四重特異性抗体は、ｃ）に基づいて、第３及び第４抗原に特異的に結合する、２つの抗原結合ペプチドを含む。一実施態様において、前記２つの抗原結合ペプチドは両方とも、同じペプチドコネクタを介して、ａ）及びｂ）における重鎖のＣ末端に融合している。好ましい一実施態様では、前記２つの抗原結合ペプチドは、ｓｃＦｖフラグメント又はｓｃＦａｂフラグメントのいずれかである。

【０２６４】

本明細書に報告されている一態様は、

ａ）第１抗原に特異的に結合する（２つのＦａｂフラグメントを含む）抗体の２つの軽鎖及び２つの重鎖と、

ｂ）第２抗原に特異的に結合する抗体の２つの更なるＦａｂフラグメントであって、前記更なるＦａｂフラグメントが両方とも、ペプチドリンカーを介して、ａ）における重鎖のＣ末端又はＮ末端のいずれかに融合しているＦａｂフラグメントとを含み、

ここで、Ｆａｂフラグメントにおいて、下記改変が行われており、

ｉ）　ａ）の両Ｆａｂフラグメント又はｂ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられており、及び／又は、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられており、

あるいは、

ｉｉ）　ａ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられており、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられており、

ならびに、

ｂ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換え

られており、又は、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられており、
あるいは、
ｉｉｉ）　ａ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられており、又は、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられており、
ならびに、
ｂ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられており、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられており、
あるいは、
ｉｖ）　ａ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられており、ｂ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられており、
あるいは、
ｖ）　ａ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられており、ｂ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられており、
ここで、第１抗原又は第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、二重特異性の四価抗体である。

【０２６５】
一実施態様において、前記更なるＦａｂフラグメントは両方とも、ペプチドリンカーを介して、ａ）における重鎖のＣ末端又はａ）における重鎖のＮ末端のいずれかに融合している。

【０２６６】
一実施態様において、前記更なるＦａｂフラグメントは両方とも、ペプチドリンカーを介して、ａ）における重鎖のＣ末端のいずれかに融合している。

【０２６７】
一実施態様において、前記更なるＦａｂフラグメントは両方とも、ペプチドコネクタを介して、ａ）における重鎖のＮ末端に融合している。

【０２６８】
一実施態様では、Ｆａｂフラグメントにおいて、下記改変が行われている。
ｉ）　ａ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、又は、ｂ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられており、及び／又は、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられている。

【０２６９】
一実施態様では、Ｆａｂフラグメントにおいて、下記改変が行われている。
ｉ）　ａ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられており、及び／又は、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられている。

【０２７０】
一実施態様では、Ｆａｂフラグメントにおいて、下記改変が行われている。
ｉ）　ａ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられている。

【０２７１】
一実施態様では、Ｆａｂフラグメントにおいて、下記改変が行われている。
ｉ）　ｂ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、可変ドメインＶＬ及びＶＨが、互いに置き換えられており、及び／又は、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに置き換えられている。

【０２７２】
一実施態様では、Ｆａｂフラグメントにおいて、下記改変が行われている。
ｉ）　ｂ）の両Ｆａｂフラグメントにおいて、定常ドメインＣＬ及びＣＨ１が、互いに

置き換えられている。

【０２７３】

本明細書に報告されている一態様は、

ａ）第１抗原に特異的に結合し、第１ＶＨ－ＣＨ１ドメイン対を含む第１抗体の（改変）重鎖であって、前記重鎖のＣ末端に、前記第１抗体の第２ＶＨ－ＣＨ１ドメイン対のＮ末端が、ペプチドリンカーを介して融合している第１抗体の（改変）重鎖と、

ｂ）　ａ）における前記第１抗体の２つの軽鎖と、

ｃ）第２抗原に特異的に結合し、第１ＶＨ－ＣＬドメイン対を含む第２抗体の（改変）重鎖であって、前記重鎖のＣ末端に、前記第２抗体の第２ＶＨ－ＣＬドメイン対のＮ末端が、ペプチドリンカーを介して融合している第２抗体の（改変）重鎖と、

ｄ）　ｃ）における前記第２抗体の２つの（改変）軽鎖であって、それぞれが、ＣＬ－ＣＨ１ドメイン対を含む（改変）軽鎖とを含み、

ここで、第１抗原又は第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、二重特異性の四価抗体である。

【０２７４】

本明細書に報告されている一態様は、

ａ）第１抗原に特異的に結合する第１全長抗体の重鎖及び軽鎖と、

ｂ）第２抗原に特異的に結合する第２全長抗体の重鎖及び軽鎖であって、重鎖のＮ末端が、軽鎖のＣ末端にペプチドリンカーを介して結合している第２全長抗体の重鎖及び軽鎖とを含み、

ここで、第１抗原又は第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、二重特異性抗体である。

【０２７５】

ａ）に基づく抗体は、ｂ）に基づいて報告されている改変を含有せず、重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。

【０２７６】

本明細書に報告されている一態様は、

ａ）第１抗原に特異的に結合し、２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖からなる全長抗体と、

ｂ）第２抗原に特異的に結合し、VH^2ドメイン及びVL^2ドメインを含むＦｖフラグメントであって、両ドメインが、ジスルフィド架橋を介して、互いに結合しているＦｖフラグメントとを含み、

ここで、VH^2ドメイン又はVL^2ドメインのいずれかのみが、ペプチドリンカーを介して、第１抗原に特異的に結合する全長抗体の重鎖又は軽鎖に融合しており、

ここで、第１抗原又は第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、二重特異性抗体である。

【０２７７】

二重特異性抗体において、ａ）に基づく重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。

【０２７８】

一実施態様において、VH^2ドメイン又はVL^2ドメインの他方は、ペプチドリンカーを介して、第１抗原に特異的に結合する全長抗体の重鎖又は軽鎖に融合していない。

【０２７９】

本明細書に報告されている全ての態様では、第１軽鎖は、ＶＬドメイン及びＣＬドメインを含み、第１重鎖は、ＶＨドメイン、ＣＨ１ドメイン、ヒンジ領域、ＣＨ２ドメイン、及びＣＨ３ドメインを含む。

【０２８０】

本明細書に報告されている一態様は、

ａ）第１抗原に特異的に結合する２つのＦａｂフラグメントと、

ｂ）ＣＨ１及びＣＬドメインが互いに交換されている、第２抗原に特異的に結合する１つのＣｒｏｓｓＦａｂフラグメントと、

ｃ）第１Ｆｃ領域重鎖及び第２Ｆｃ領域重鎖を含む１つのＦｃ領域とを含み、
ここで、２つのＦａｂフラグメントにおけるＣＨ１ドメインのＣ末端が、重鎖Ｆｃ領域ポリペプチドのＮ末端に結合しており、
ここで、ＣｒｏｓｓＦａｂフラグメントにおけるＣＬドメインのＣ末端が、Ｆａｂフラグメントの一方におけるＶＨドメインのＮ末端に結合しており、
ここで、第１抗原及び第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、
二重特異性で三価の抗体である。

【０２８１】

本明細書に報告されている一態様は、
ａ）第１抗原に特異的に結合する２つのＦａｂフラグメントと、
ｂ）ＣＨ１及びＣＬドメインが互いに交換されている、第２抗原に特異的に結合する１つのＣｒｏｓｓＦａｂフラグメントと、
ｃ）第１Ｆｃ領域重鎖及び第２Ｆｃ領域重鎖を含む１つのＦｃ領域とを含み、
ここで、第１ＦａｂフラグメントにおけるＣＨ１ドメインのＣ末端が、一方の重鎖Ｆｃ領域ポリペプチドのＮ末端に結合しており、ＣｒｏｓｓＦａｂフラグメントにおけるＣＬドメインのＣ末端が、他方の重鎖Ｆｃ領域ポリペプチドのＮ末端に結合しており、
ここで、第２ＦａｂフラグメントにおけるＣＨ１ドメインのＣ末端が、第１ＦａｂフラグメントにおけるＶＨドメインのＮ末端、又は、ＣｒｏｓｓＦａｂフラグメントにおけるＶＨドメインのＮ末端に結合しており、
ここで、第１抗原及び第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、二重特異性で三価の抗体である。

【０２８２】

本明細書に報告されている一態様は、
ａ）第１抗原に特異的に結合し、２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖からなる全長抗体と、
ｂ）第２抗原に特異的に結合し、重鎖フラグメント及び軽鎖フラグメントを含むＶＨ^{2}ドメイン及びＶＬ^{2}ドメインを含むＦａｂフラグメントであって、軽鎖フラグメントにおいて、可変軽鎖ドメインＶＬ^{2}が、前記抗体の可変重鎖ドメインＶＨ^{2}により置き換えられており、重鎖フラグメントにおいて、可変重鎖ドメインＶＨ^{2}が、前記抗体の可変軽鎖ドメインＶＬ^{2}により置き換えられている、Ｆａｂフラグメントとを含み、
ここで、重鎖Ｆａｂフラグメントが、全長抗体の一方の重鎖におけるＣＨ１ドメインと全長抗体の各Ｆｃ領域との間に挿入されており、軽鎖Ｆａｂ領域のＮ末端が、全長抗体の軽鎖におけるＣ末端にコンジュゲートしており、同軽鎖が、重鎖Ｆａｂフラグメントが挿入されている全長抗体の重鎖と対合しており、
ここで、第１抗原及び第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、二重特異性抗体である。

【０２８３】

本明細書に報告されている一態様は、
ａ）第１抗原に特異的に結合し、２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖からなる全長抗体と、
ｂ）第２抗原に特異的に結合し、重鎖フラグメント及び軽鎖フラグメントを含むＶＨ^{2}ドメイン及びＶＬ^{2}ドメインを含むＦａｂフラグメントであって、軽鎖フラグメントにおいて、可変軽鎖ドメインＶＬ^{2}が、前記抗体の可変重鎖ドメインＶＨ^{2}により置き換えられており、重鎖フラグメントにおいて、可変重鎖ドメインＶＨ^{2}が、前記抗体の可変軽鎖ドメインＶＬ^{2}により置き換えられている、Ｆａｂフラグメントとを含み、
ここで、Ｆａｂフラグメントにおける重鎖フラグメントのＣ末端が、全長抗体の一方の重鎖におけるＮ末端にコンジュゲートしており、Ｆａｂフラグメントにおける軽鎖フラグメントのＣ末端が、全長抗体の軽鎖におけるＮ末端にコンジュゲートしており、同軽鎖が、Ｆａｂフラグメントの重鎖フラグメントがコンジュゲートしている全長抗体の重鎖と対合しており、

ここで、第１抗原及び第２抗原が、ヒトトランスフェリンレセプターである、二重特異性抗体である。

【０２８４】

全ての態様の一実施態様では、本明細書に報告されている抗体は、多重特異性抗体であり、同多重特異性抗体は、少なくとも２つの重鎖ポリペプチドのヘテロ多量体化を必要とし、ここで、同抗体は、ヒトトランスフェリンレセプター及び第２非ヒトトランスフェリンレセプター抗原に特異的に結合する。

【０２８５】

ヘテロ二量体化を支援するために、ＣＨ３改変のための複数のアプローチは、例えば、国際公開公報第９６／２７０１１号、同第９８／０５０４３１号、欧州特許第１８７０４５９号、国際公開公報第２００７／１１０２０５号、同第２００７／１４７９０１号、同第２００９／０８９００４号、同第２０１０／１２９３０４号、同第２０１１／９０７５４号、同第２０１１／１４３５４５等、同第２０１２／０５８７６８号、同第２０１３／１５７９５４号、同第２０１３／０９６２９１号に記載されている。これらの文献は、参照により本明細書に組み入れられる。典型的には、当技術分野に公知のアプローチにおいて、第１重鎖のＣＨ３ドメイン及び第２重鎖のＣＨ３ドメインは両方とも、１つの操作されたＣＨ３ドメインを含む重鎖が、同じ構造の別の重鎖と、もはやホモ二量体化できない（例えば、ＣＨ３操作第１重鎖は、別のＣＨ３操作第１重鎖と、もはやホモ二量体化できず、ＣＨ３操作第２重鎖は、別のＣＨ３操作第２重鎖と、もはやホモ二量体化できない）ように、補完的な方法において操作されている。これにより、１つの操作されたＣＨ３ドメインを含む重鎖は、ＣＨ３ドメインを含む別の重鎖とヘテロ二量体化される。同別の重鎖は、補完的な方法で操作される。本発明のこの実施態様について、第１重鎖のＣＨ３ドメイン及び第２重鎖のＣＨ３ドメインは、アミノ酸置換による補完的な方法で操作される。これにより、第１重鎖及び第２重鎖は、ヘテロ二量体化される。一方、第１重鎖及び第２重鎖は、（例えば、立体的な理由のために）もはやホモ二量体化できない。

【０２８６】

当技術分野において公知の重鎖ヘテロ二量体化を支援するための種々のアプローチが、上記で引用され、上記に含まれており、本発明に基づく多重特異性抗体に使用される種々の代替手段として企図される。同多重特異性抗体は、本発明について上記されている特定のアミノ酸置換との組み合わせで、第１抗原に特異的に結合する第１抗体由来の「非架橋Ｆａｂ領域」と、第２抗原に特異的に結合する第２抗体由来の「架橋Ｆａｂ領域」とを含む。

【０２８７】

本明細書に報告されている多重特異性抗体のＣＨ３ドメインは、「ノブ－ｉｎｔｏ－ホール」技術により変異させることができる。同技術は、例えば、国際公開公報第９６／０２７０１１号、Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621；及びMerchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681に、複数の例を伴って、詳細に記載されている。この方法において、２つのＣＨ３ドメインの相互作用表面は、これらの２つのＣＨ３ドメインを含有する両重鎖のヘテロ二量体化を向上させるように変異される。（２つの重鎖の）２つのＣＨ３ドメインはそれぞれ、「ノブ」であることができ、一方、他のものは、「ホール」である。ジスルフィド架橋の導入は、ヘテロ二量体を更に安定化させ（Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681；Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35）、収率を向上させる。

【０２８８】

好ましい一実施態様では、本明細書に報告されている多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のＣＨ３ドメイン中のＴ３６６Ｗの突然変異と、「ホール鎖」のＣＨ３ドメイン中のＴ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖの突然変異とを含む（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。例えば、「ノブ鎖」のＣＨ３ドメイン内へのＹ３４９Ｃの突然変異と、「ホール鎖」のＣＨ３ドメイン内へのＥ３５６Ｃの突然変異又はＳ３５４Ｃの突然変異を導入することにより、ＣＨ３ドメイン間の更なる鎖間ジスルフィド架橋も使用するこ

とができる（Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681）。このため、別の好ましい実施態様では、本明細書に報告されている多重特異性抗体は、２つのＣＨ３ドメインの一方におけるＹ３４９Ｃ及びＴ３６６Ｗの突然変異と、２つのＣＨ３ドメインの他方におけるＥ３５６Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖの突然変異とを含む。または、本明細書に報告されている多重特異性抗体は、２つのＣＨ３ドメインの一方におけるＹ３４９Ｃ及びＴ３６６Ｗの突然変異と、２つのＣＨ３ドメインの他方におけるＳ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖの突然変異とを含む（一方のＣＨ３ドメイン中の更なるＹ３４９Ｃの突然変異と他方のＣＨ３ドメイン中の更なるＥ３５６Ｃ又はＳ３５４Ｃの突然変異とが、鎖間ジスルフィド架橋を形成する）（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０２８９】

欧州特許出願公開公報第１８７０４５９Ａ１号に記載されている他のノブ－ｉｎ－ホール技術も、代替的に又は追加的に使用することができる。一実施態様において、本明細書に報告されている多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のＣＨ３ドメイン中のＲ４０９Ｄ及びＫ３７０Ｅの突然変異と、「ホール鎖」のＣＨ３ドメイン中のＤ３９９Ｋ及びＥ３５７Ｋの突然変異とを含む（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０２９０】

一実施態様において、本明細書に報告されている多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のＣＨ３ドメイン中のＴ３６６Ｗの突然変異と、「ホール鎖」のＣＨ３ドメイン中のＴ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖの突然変異とを含み、更に、「ノブ鎖」のＣＨ３ドメイン中のＲ４０９Ｄ及びＫ３７０Ｅの突然変異と、「ホール鎖」のＣＨ３ドメイン中のＤ３９９Ｋ及びＥ３５７Ｋの突然変異とを含む（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０２９１】

一実施態様において、本明細書に報告されている多重特異性抗体は、２つのＣＨ３ドメインの一方におけるＹ３４９Ｃ及びＴ３６６Ｗの突然変異と、２つのＣＨ３ドメインの他方におけるＳ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖの突然変異とを含む。または、本明細書に報告されている多重特異性抗体は、２つのＣＨ３ドメインの一方におけるＹ３４９Ｃ及びＴ３６６Ｗの突然変異と、２つのＣＨ３ドメインの他方におけるＳ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖの突然変異とを含み、更に、「ノブ鎖」のＣＨ３ドメイン中のＲ４０９Ｄ及びＫ３７０Ｅの突然変異と、「ホール鎖」のＣＨ３ドメイン中のＤ３９９Ｋ及びＥ３５７Ｋの突然変異とを含む（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０２９２】

「ノブ－ｉｎｔｏ－ホール技術」とは別に、多重特異性抗体における重鎖のＣＨ３ドメインをヘテロ二量体化させるために改変するための他の技術は、当技術分野において公知である。これらの技術は、特に、国際公開公報第９６／２７０１１号、同第９８／０５０４３１号、欧州特許第１８７０４５９号、国際公開公報第２００７／１１０２０５号、同第２００７／１４７９０１号、同第２００９／０８９００４号、同第２０１０／１２９３０４号、同第２０１１／９０７５４号、同第２０１１／１４３５４５号、同第２０１２／０５８７６８号、同第２０１３／１５７９５４号、及び同第２０１３／０９６２９１号に記載されているものが、本明細書において、本明細書に報告されている多重特異性抗体との組み合わせでの「ノブ－ｉｎｔｏ－ホール技術」に対する代替手段として企図される。

【０２９３】

本明細書に報告されている多重特異性抗体の一実施態様では、欧州特許第１８７０４５９号に記載されているアプローチが、多重特異性抗体の第１重鎖及び第２重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。このアプローチは、第１及び第２重鎖両方間のＣＨ３／ＣＨ３ドメイン界面における特定のアミノ酸位置に、反対の電荷を有する電荷したアミノ酸の導入に基づいている。

【０２９４】

したがって、この実施態様は、抗体の三次構造において、第１重鎖のＣＨ３ドメイン及び第２重鎖のＣＨ３ドメインが、各抗体ＣＨ３ドメイン間に位置している界面を形成しており、ここで、第１重鎖のＣＨ３ドメイン及び第２重鎖のＣＨ３ドメインそれぞれの各アミノ酸配列が、抗体の三次構造における前記界面内に位置している１組のアミノ酸を含み、ここで、一方の重鎖のＣＨ３ドメイン中の界面に位置している１組のアミノ酸から、第１アミノ酸が、正に電荷したアミノ酸により置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメイン中の界面に位置している１組のアミノ酸から、第２アミノ酸が、負に電荷したアミノ酸により置換されている、本明細書に報告されている多重特異性抗体に関する。この実施態様の多重特異性抗体は、本明細書において、「ＣＨ３（＋／－）操作多重特異性抗体」とも呼ばれる（ここで、「＋／－」の略称は、各ＣＨ３ドメインに導入された、反対に電荷したアミノ酸を意味する）。

【０２９５】

本明細書に報告されている前記ＣＨ３（＋／－）操作多重特異性抗体の一実施態様では、正に電荷したアミノ酸は、Ｋ、Ｒ、及びＨから選択され、負に電荷したアミノ酸は、Ｅ又はＤから選択される。

【０２９６】

本明細書に報告されている前記ＣＨ３（＋／－）操作多重特異性抗体の一実施態様では、正に電荷したアミノ酸は、Ｋ及びＲから選択され、負に電荷したアミノ酸は、Ｅ又はＤから選択される。

【０２９７】

本明細書に報告されている前記ＣＨ３（＋／－）操作多重特異性抗体の一実施態様では、正に電荷したアミノ酸はＫであり、負に電荷したアミノ酸はＥである。

【０２９８】

本明細書に報告されている前記ＣＨ３（＋／－）操作多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、４０９位のアミノ酸Ｒは、Ｄにより置換されており、位のアミノ酸Ｋは、Ｅにより置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３９９位のアミノ酸Ｄは、Ｋにより置換されており、３５７位のアミノ酸Ｅは、Ｋにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０２９９】

本明細書に報告されている多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第２０１３／１５７９５３号に記載されているアプローチが、多重特異性抗体における第１重鎖及び第２重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。本明細書に報告されている前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３６６位のアミノ酸Ｔは、Ｋにより置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３５１位のアミノ酸Ｌは、Ｄにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。本明細書に報告されている前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３６６位のアミノ酸Ｔは、Ｋにより置換されており、３５１位のアミノ酸Ｌは、Ｋにより置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３５１位のアミノ酸Ｌは、Ｄにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０３００】

本明細書に報告されている前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３６６位のアミノ酸Ｔは、Ｋにより置換されており、３５１位のアミノ酸Ｌは、Ｋにより置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３５１位のアミノ酸Ｌは、Ｄにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。更に、少なくとも１つの下記置換が、他方の重鎖のＣＨ３ドメイン中に含まれる。３４９位のアミノ酸Ｙは、Ｅにより置換されており、３４９位のアミノ酸Ｙは、Ｄにより置換されており、３６８位のアミノ酸Ｌは、Ｅにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。一実施態様において、３６８位のアミノ酸Ｌは、Ｅにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）

。
【０３０１】
本明細書に報告されている多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第２０１２／０５８７６８号に記載されているアプローチが、多重特異性抗体における第１重鎖及び第２重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。本明細書に報告されている前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３５１位のアミノ酸Ｌは、Ｙにより置換されており、４０７位のアミノ酸Ｙは、Ａにより置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３６６位のアミノ酸Ｔは、Ａにより置換されており、４０９位のアミノ酸Ｋは、Ｆにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。別の実施態様では、前述の置換に加えて、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、４１１位（元はＴ）、３９９位（元はＤ）、４００位（元はＳ）、４０５位（元はＦ）、３９０位（元はＮ）、及び３９２位（元はＫ）のアミノ酸の少なくとも１つが置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。好ましい置換は、
－　Ｎ、Ｒ、Ｑ、Ｋ、Ｄ、Ｅ、及びＷから選択されるアミノ酸による、４１１位のアミノ酸Ｔの置換（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）、
－　Ｒ、Ｗ、Ｙ、及びＫから選択されるアミノ酸による、３９９位のアミノ酸Ｄの置換（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）、
－　Ｅ、Ｄ、Ｒ、及びＫから選択されるアミノ酸による、４００位のアミノ酸Ｓの置換（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）、
－　Ｉ、Ｍ、Ｔ、Ｓ、Ｖ、及びＷから選択されるアミノ酸による、４０５位のアミノ酸Ｆの置換（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）、
－　Ｒ、Ｋ、及びＤから選択されるアミノ酸による、３９０位のアミノ酸Ｎの置換（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）、ならびに
－　Ｖ、Ｍ、Ｒ、Ｌ、Ｆ、及びＥから選択されるアミノ酸による、３９２位のアミノ酸Ｋの置換（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）
である。
【０３０２】
（国際公開公報第２０１２／０５８７６８号に基づいて操作された）本明細書に報告されている前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３５１位のアミノ酸Ｌは、Ｙにより置換されており、４０７位のアミノ酸Ｙは、Ａにより置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３６６位のアミノ酸Ｔは、Ｖにより置換されており、４０９位のアミノ酸Ｋは、Ｆにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。本明細書に報告されている前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、４０７位のアミノ酸Ｙは、Ａにより置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３６６位のアミノ酸Ｔは、Ａにより置換されており、４０９位のアミノ酸Ｋは、Ｆにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。前記最後に前述した実施態様では、前記他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３９２位のアミノ酸Ｋは、Ｅにより置換されており、４１１位のアミノ酸Ｔは、Ｅにより置換されており、３９９位のアミノ酸Ｄは、Ｒにより置換されており、４００位のアミノ酸Ｓは、Ｒにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。
【０３０３】
本明細書に報告されている多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第２０１１／１４３５４５号に記載されているアプローチが、多重特異性抗体における第１重鎖及び第２重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。本明細書に報告されている前記多重特異性抗体の一実施態様では、両重鎖のＣＨ３ドメイン中のアミノ酸改変は、３６８位及び／又は４０９位に導入される（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。
【０３０４】

本明細書に報告されている多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第２０１１／０９０７６２号に記載されているアプローチが、多重特異性抗体における第１重鎖及び第２重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。国際公開公報第２０１１／０９０７６２号は、「ノブ－ｉｎｔｏ－ホール」技術に基づくアミノ酸改変に関する。本明細書に報告されている前記ＣＨ３（ＫｉＨ）操作多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３６６位のアミノ酸Ｔは、Ｗにより置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、４０７位のアミノ酸Ｙは、Ａにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。本明細書に報告されている前記ＣＨ３（ＫｉＨ）操作多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３６６位のアミノ酸Ｔは、Ｙにより置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、４０７位のアミノ酸Ｙは、Ｔにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０３０５】

ＩｇＧ２アイソタイプである、本明細書に報告されている多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第２０１１／０９０７６２号に記載されているアプローチが、多重特異性抗体における第１重鎖及び第２重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。

【０３０６】

本明細書に報告されている多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第２００９／０８９００４号に記載されているアプローチが、多重特異性抗体における第１重鎖及び第２重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。本明細書に報告されている前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３９２位のアミノ酸Ｋ又はＮは、負に電荷したアミノ酸により（好ましい一実施態様では、Ｅ又はＤにより、好ましい一実施態様では、Ｄにより）置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、３９９位のアミノ酸Ｄ、３５６位のアミノ酸ＥもしくはＤ、又は３５７位のアミノ酸Ｅは、正に電荷したアミノ酸（好ましい一実施態様では、Ｋ又はＲ、好ましい一実施態様では、Ｋにより、好ましい一実施態様では、３９９位又は３５６位のアミノ酸は、Ｋにより置換されている）により置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。更なる一実施態様では、前述の置換に加えて、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、４０９位のアミノ酸Ｋ又はＲは、負に電荷したアミノ酸により（好ましい一実施態様では、Ｅ又はＤにより、好ましい一実施態様では、Ｄにより）置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。更なる一実施態様では、前述の置換に加えて、又は、同置換に代えて、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、４３９位のアミノ酸Ｋ及び／又は３７０位のアミノ酸Ｋは、負に電荷したアミノ酸により（好ましい一実施態様では、Ｅ又はＤにより、好ましい一実施態様では、Ｄにより）互いに独立して置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０３０７】

本明細書に報告されている多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第２００７／１４７９０１号に記載されているアプローチが、多重特異性抗体における第１重鎖及び第２重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。本明細書に報告されている前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、２５３位のアミノ酸Ｋは、Ｅにより置換されており、２８２位のアミノ酸Ｄは、Ｋにより置換されており、３２２位のアミノ酸Ｋは、Ｄにより置換されており、他方の重鎖のＣＨ３ドメインにおいて、２３９位のアミノ酸Ｄは、Ｋにより置換されており、２４０位のアミノ酸Ｅは、Ｋにより置換されており、２９２位のアミノ酸Ｋは、Ｄにより置換されている（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０３０８】

本明細書に報告されている多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第２００７／１１０２０５号に記載されているアプローチが、多重特異性抗体における第１重鎖及び第２重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。

【０３０９】

全ての態様の一実施態様及び本明細書に報告されている実施態様では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体又は三重特異性抗体である。本発明の好ましい一実施態様では、多重特性抗体は、二重特異性抗体である。

【０３１０】

本明細書に報告されている全ての態様の一実施態様では、抗体は、二価又は三価の抗体である。一実施態様において、抗体は、二価の抗体である。

【０３１１】

本明細書に報告されている全ての態様の一実施態様では、多重特異性抗体は、ＩｇＧ型抗体の定常ドメイン構造を有する。本明細書に報告されている全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、ヒトのサブクラスＩｇＧ１又は突然変異Ｌ２３４Ａ及びＬ２３５Ａを有するヒトのサブクラスＩｇＧ１のものであることを特徴とする。本明細書に報告されている全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、ヒトのサブクラスＩｇＧ２のものであることを特徴とする。本明細書に報告されている全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、ヒトのサブクラスＩｇＧ３のものであることを特徴とする。本明細書に報告されている全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、ヒトのサブクラスＩｇＧ４又は更なる突然変異Ｓ２２８Ｐを有するヒトのサブクラスＩｇＧ４のものであることを特徴とする。本明細書に報告されている全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、ヒトのサブクラスＩｇＧ１又はヒトのサブクラスＩｇＧ４のものであることを特徴とする。本明細書に報告されている全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、突然変異Ｌ２３４Ａ及びＬ２３５Ａを有するヒトのサブクラスＩｇＧ１のものであることを特徴とする（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。本明細書に報告されている全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、突然変異Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇを有するヒトのサブクラスＩｇＧ１のものであることを特徴とする（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。本明細書に報告されている全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、突然変異Ｓ２２８Ｐ及びＬ２３５Ｅを有するヒトのサブクラスＩｇＧ４のものであることを特徴とする（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。本明細書に報告されている全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、突然変異Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３２９Ｇを有するヒトのサブクラスＩｇＧ４のものであることを特徴とする（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）。

【０３１２】

本明細書に報告されている全ての態様の一実施態様では、本明細書において特定されているＣＨ３ドメインを含む重鎖を含む抗体は、更なるＣ末端グリシン－リシンジペプチド（Ｇ４４６及びＫ４４７、Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）を含む。本明細書に報告されている全ての態様の一実施態様では、本明細書において特定されているＣＨ３ドメインを含む重鎖を含む抗体は、更なるＣ末端グリシン残基（Ｇ４４６、Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスに従ったナンバリング）を含む。

【０３１３】

５．抗体変異体

特定の実施態様では、本明細書に提供されている抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善するのが望ましい場合ある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列内に適切な改変を導入することにより、又は、ペプチド合成により調製することができる。このような改変は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／又は、同配列内への挿入、及び／又は、同配列内の残基の置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが、最終的な構築物に達するのに行うことができる。ただし、最終的な構築物は、所望の特徴、例えば、抗原結合性を有するという条件である。

【０３１４】
ａ）置換、挿入、及び欠失の変異体
特定の実施態様では、１つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換変異誘発の対象となる部位は、ＨＶＲ及びＦＲを含む。保存的置換は、「保存的置換」の見出しで表１に示されている。より実質的な変化は、「例示的な置換」の見出しで表１に提供され、アミノ酸側鎖の分類を参照して、更に以下に記載されているように提供される。アミノ酸置換は、対象となる抗体内に導入することができ、生成物は、所望の活性、例えば、保持／活性化された抗原結合性、低下した免疫原性、又は改善したＡＤＣＣもしくはＣＤＣについてスクリーニングすることができる。
【表６】

表１

元の残基	例示的な置換	保存的置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【０３１５】
アミノ酸は、共通する側鎖の特性に従ってグループ化することができる。
（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；
（２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；
（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；

（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；
（５）鎖配向に影響を及ぼす残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；
（６）芳香族性：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ

【０３１６】

非保存的置換は、これらのクラスの１つのメンバーを、別のクラスに交換することを必要とするであろう。

【０３１７】

ある種の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体）の１つ以上の超可変領域残基の置換を含む。一般的には、更なる研究に選択される得られた変異体は、親抗体に対する特定の生物学的特性（例えば、向上した親和性、低下した免疫原性）における改変（例えば、改善）を有し、及び／又は、親抗体の実質的に保持された特定の生物学的特性を有するであろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、同抗体は、例えば、ファージディスプレイ系親和性成熟技術、例えば、本明細書に記載されているものを使用して、都合良く生成することができる。簡潔に、１つ以上のＨＶＲ残基が成熟され、変異型抗体は、ファージ上に提示され、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【０３１８】

変異（例えば、置換）は、例えば、抗体親和性を改善するために、ＨＶＲ中にすることができる。このような変異は、ＨＶＲ「ホットスポット」、すなわち、体細胞変異法中に高頻度で突然変異を受けるコドンによりコードされる残基（例えば、Chowdhury, P.S., Methods Mol. Biol. 207 (2008) 179-196を参照のこと）、及び／又は、抗原と接触する残基にすることができる。得られた変異ＶＨ又はＶＬは、結合親和性について試験される。二次ライブラリを構築及び二次ライブラリから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom, H.R. et al. in Methods in Molecular Biology 178 (2002) 1-37に記載されている。親和性成熟の一部の実施態様では、多様性が、各種の方法（例えば、エラープローンＰＣＲ、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド指定突然変異）のいずれかにより、成熟について選択される可変遺伝子内に導入される。ついで、二次ライブラリが調製される。ついで、このライブラリが、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を特定するのにスクリーニングされる。多様性を導入する別の方法は、ＨＶＲ指定アプローチを含む。そのアプローチにおいて、複数のＨＶＲ残基（例えば、一度に４～６個の残基）がランダム化される。抗原結合性に関与するＨＶＲ残基は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発を使用して、又は、モデリングして、特異的に特定することができる。特に、ＣＤＲ－Ｈ３及びＣＤＲ－Ｌ３が、多くの場合、ターゲッティングされる。

【０３１９】

特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、このような変異が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、１つ以上のＨＶＲ内に起こすことができる。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的変異（例えば、本明細書に提供されている保存的置換）が、ＨＶＲ中にすることができる。このような変異は、例えば、ＨＶＲ中の抗原接触残基の外側でもよい。上記提供されている変異型ＶＨ及びＶＬ配列の特定の実施態様では、各ＨＶＲは、変異していないか、又は、２つ以上、２つもしくは３つのアミノ酸置換を含有するかのいずれかである。

【０３２０】

変異誘発のためにターゲティングすることができる抗体の残基又は領域を特定するのに有用な方法は、Cunningham, B.C. and Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085に記載されている、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、ターゲット残基の残基又は基（例えば、電荷した残基、例えば、Ａｒｇ、Ａｓｐ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、及びＧｌｕ）が特定され、中性又は負に電荷したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）により置き換えられて、抗体と抗原との相互作用が影響を受けたかどうかを決定する。更なる置換は、最初の置換に対する機能的感受性を証明するアミノ酸位置に導入することができる。代替的に又は追加的に、抗原－抗体複合体の結晶構造は、抗体と抗原

との間の接触点を特定する。このような接触残基及び隣接する残基は、置換のための候補としてターゲッティングすることができ、又は、除去することができる。変異体は、それらが所望の特性を含有するかどうかを決定するのにスクリーニングすることができる。

【０３２１】

アミノ酸配列挿入は、長さが１つの残基から１００個以上の残基を含有するポリペプチドの範囲で、アミノ末端融合及び／又はカルボキシル末端融合、ならびに、１つ又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例は、Ｎ末端メチオニル残基を有する抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を長くする、（例えば、ＡＤＥＰＴのための）酵素又はポリペプチドへの抗体のＮ末端又はＣ末端に対する融合物を含む。

【０３２２】

ｂ）グリコシル化変異体

特定の実施態様では、本明細書に提供されている抗体は、抗体がグリコシル化されている度合いを向上又は低下させるように変異させる。抗体に対するグリコシル化部位の付加又は欠失は、アミノ酸配列を変異させることにより、都合良く達成することができる。これにより、１つ以上のグリコシル化部位が形成又は除去される。

【０３２３】

抗体がＦｃ領域を含む場合、それに付着した炭水化物は変更することができる。哺乳類細胞により産生されるネイティブな抗体は、典型的には、二分岐したオリゴ糖を含む。同オリゴ糖は、一般的には、Ｆｃ領域におけるＣＨ２ドメインのＡｓｎ２９７にＮ－結合により付着する（例えば、Wright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32を参照のこと）。オリゴ糖は、二分岐したオリゴ糖構造の「幹」において、ＧｌｃＮＡｃに付着した、種々の炭水化物、例えば、マンノース、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）、ガラクトース、及びシアル酸ならびにフコースを含むことができる。一部の実施態様では、本発明の抗体中のオリゴ糖の改変は、特定の改善した特性を有する抗体変異体を形成するためにすることができる。

【０３２４】

一実施態様において、Ｆｃ領域に（直接又は間接的に）付着したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体変異体が提供される。例えば、このような抗体中のフコース量は、１％～８０％、１％～６５％、５％～６５％、又は２０％～４０％であることができる。フコース量は、例えば、国際公開公報第２００８／０７７５４６号に記載されているＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析法により測定された、Ａｓｎ２９７に付着した全ての糖構造（例えば、複雑なハイブリッドの高マンノース構造）の合計に対して、Ａｓｎ２９７における糖鎖内のフコースの平均量を算出することにより決定される。Ａｓｎ２９７は、Ｆｃ領域中の２９７位付近に位置するアスパラギン残基を意味する（Ｆｃ領域残基のＥＵナンバリング）。ただし、抗体中の小さな配列変異のために、Ａｓｎ２９７は、２９７位の上流又は下流約±３個のアミノ酸、すなわち、２９４～３００位に位置する場合もある。このようなフコシル化変異体は、改善したＡＤＣＣ機能を有することができる。例えば、米国特許出願公開公報第２００３／０１５７１０８号；同第２００４／００９３６２１号を参照のこと。「脱フコシル化」又は「フコース欠損」抗体変異体に関する公報の例は、米国特許出願公開公報第２００３／０１５７１０８号；国際公開公報第２０００／６１７３９号；同第２００１／２９２４６号；米国特許出願公開公報第２００３／０１１５６１４号；同第２００２／０１６４３２８号；同第２００４／００９３６２１号；同第２００４／０１３２１４０号；同第２００４／０１１０７０４号；同第２００４／０１１０２８２号；同第２００４／０１０９８６５号；国際公開公報第２００３／０８５１１９号；同第２００３／０８４５７０号；同第２００５／０３５５８６号；同第２００５／０３５７７８号；同第２００５／０５３７４２号；同第２００２／０３１１４０号；Okazaki, A. et al., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249；Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622を含む。脱フコシル化抗体を産生可能な細胞系統の例は、タンパク質フコシル化を欠いたＬｅｃ１３　ＣＨＯ細胞（Ripka, J. et al., Arch. Biochem. Biophys

. 249 (1986) 533-545；米国特許出願公開公報第２００３／０１５７１０８号；及び国際公開公報第２００４／０５６３１２号、特に実施例１１）及びノックアウト細胞系統、例えば、アルファ－１，６－フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、ＦＵＴ８、ノックアウトＣＨＯ細胞（例えば、Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622；Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688；及び国際公開公報第２００３／０８５１０７号を参照のこと）を含む。

【０３２５】

二分割オリゴ糖を有する抗体変異体が更に提供される。例えば、同変異体において、抗体のＦｃ領域に付着した二分岐オリゴ糖は、ＧｌｃＮＡｃにより二分割されている。このような抗体変異体は、減少したフコシル化及び／又は改善したＡＤＣＣ機能を有することができる。このような抗体変異体の例は、例えば、国際公開公報第２００３／０１１８７８号；米国特許第６，６０２，６８４号；及び米国特許出願公開公報第２００５／０１２３５４６号に記載されている。Ｆｃ領域に付着したオリゴ糖中に少なくとも１つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。このような抗体変異体は、改善したＣＤＣ機能を有することができる。このような抗体変異体は、例えば、国際公開公報第１９９７／３００８７号；同第１９９８／５８９６４号；及び同第１９９９／２２７６４号に記載されている。

【０３２６】

ｃ）Ｆｃ領域変異体

特定の実施態様では、１つ以上のアミノ酸改変は、本明細書に提供されている抗体のＦｃ領域内に導入することができ、これにより、Ｆｃ領域変異体を生成することができる。Ｆｃ領域変異体は、１つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸改変（例えば、置換）を含む、ヒトＦｃ領域配列（例えば、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４のＦｃ領域）を含むことができる。

【０３２７】

特定の実施態様では、本発明は、エフェクター機能の一部を有するが全ては有さない抗体変異体を企図する。同変異体は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける抗体の半減期が重要である用途の望ましい候補となる。更なる特定のエフェクター機能（例えば、相補性及びＡＤＣＣ）は必須でないか、又は、有害である。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及び／又はｉｎ　ｖｉｖｏにおける細胞毒アッセイ法は、ＣＤＣ及び／又はＡＤＣＣ活性の減少／欠損を確認するのに行うことができる。例えば、Ｆｃレセプター（ＦｃＲ）結合アッセイ法は、抗体がＦｃγＲ結合性を欠いている（このため、おそらくＡＤＣＣ活性を欠いている）が、ＦｃＲｎ結合能を保持していることを確保するのに行うことができる。ＡＤＣＣを媒介する主な細胞であるＮＫ細胞は、Ｆｃ（ＲＩＩＩのみ）を発現しているが、単球は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、及びＦｃγＲＩＩＩを発現している。造血細胞におけるＦｃＲ発現は、Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492における第４６４頁の表３中に概説されている。対象となる分子のＡＤＣＣ活性を評価するｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイ法の非限定的な例は、米国特許第５，５００，３６２号（例えば、Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063；及びHellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502を参照のこと）；米国特許第５，８２１，３３７号（Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361を参照のこと）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を利用することができる（例えば、フローサイトメトリー用のACTI（商標）非放射性細胞毒アッセイ法（CellTechnology, Inc. Mountain View, CA）及びCytoTox 96（登録商標）非放射性細胞毒アッセイ法（Promega, Madison, WI）を参照のこと）。このようなアッセイ法に有用なエフェクター細胞は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を含む。代替的に又は追加的に、対象となる分子のＡＤＣＣ活性は、例えば、Clynes, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656に開示されているもの等の動物モデルにおいて、ｉｎ　ｖｉｖｏで評価することができる。Ｃｑ１結合アッセイ法も、抗体がＣ１ｑに結合できないため、ＣＤＣ活性を欠いているのを確認するのに行うことができる。例えば、国際

公開公報第２００６／０２９８７９号及び同第２００５／１００４０２号におけるＣ１ｑ及びＣ３ｃ結合ＥＬＩＳＡを参照のこと。補体活性化を評価するために、ＣＤＣアッセイ法を行うことができる（例えば、Gazzano-Santoro, H. et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171；Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1052；及びCragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743を参照のこと）。ＦｃＲｎ結合性及びｉｎ　ｖｉｖｏクリアランス／半減期決定も、当技術分野において公知の方法を使用して行うことができる（例えば、Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769を参照のこと）。

【０３２８】

低下したエフェクター機能を有する抗体は、Ｆｃ領域の残基２３８、２６５、２６９、２７０、２９７、３２７、及び３２９の１つ以上の置換を有するものを含む（米国特許第６，７３７，０５６号）。このようなＦｃ変異体は、残基２６５及び２９７のアラニンへの置換を有する、いわゆる「ＤＡＮＡ」Ｆｃ変異体を含む、アミノ酸位置２６５、２６９、２７０、２９７、及び３２７の２つ以上の置換を有するＦｃ変異体を含む（米国特許第７，３３２，５８１号）。

【０３２９】

改善又は減少したＦｃＲに対する結合性を有する特定の抗体変異体が記載されている（例えば、米国特許第６，７３７，０５６号；国際公開公報第２００４／０５６３１２号、及びShields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604を参照のこと）。

【０３３０】

特定の実施態様では、抗体変異体は、ＡＤＣＣを改善する１つ以上のアミノ酸置換、例えば、Ｆｃ領域の２９８、３３３、及び／又は３３４位における置換を有するＦｃ領域を含む（ＥＵナンバリングでの残基）。

【０３３１】

一部の実施態様では、例えば、米国特許第６，１９４，５５１号、国際公開公報第９９／５１６４２号、及びIdusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184に記載されているように、変異は、変化した（すなわち、改善又は減少のいずれかの）Ｃ１ｑ結合性及び／又は補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）をもたらすＦｃ領域中になされる。

【０３３２】

延長した半減期及び、胎児への母方のＩｇＧ輸送を担う（Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593及びKim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434）新生児型Ｆｃレセプター（ＦｃＲｎ）に対する改善した結合性を有する抗体は、米国特許出願公開公報第２００５／００１４９３４号に記載されている。それらの抗体は、Ｆｃ領域のＦｃＲｎへの結合性を改善する、１つ以上の置換をその中に有するＦｃ領域を含む。このようなＦｃ変異体は、Ｆｃ領域残基：２３８、２５６、２６５、２７２、２８６、３０３、３０５、３０７、３１１、３１２、３１７、３４０、３５６、３６０、３６２、３７６、３７８、３８０、３８２、４１３、４２４、又は４３４の１つ以上における置換、例えば、Ｆｃ領域残基４３４の置換を有するものを含む（米国特許第７，３７１，８２６号）。

【０３３３】

Ｆｃ領域変異体の他の例に関して、Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740；米国特許第５，６４８，２６０号；同第５，６２４，８２１号；及び国際公開公報第９４／２９３５１号も参照のこと。

【０３３４】

ｄ）システイン操作抗体変異体

特定の実施態様では、システイン操作抗体、例えば、「チオＭＡｂ」を形成するのが望ましい場合がある。同抗体において、抗体の１つ以上の残基は、システイン残基により置換されている。特定の実施態様では、置換された残基は、抗体のアクセッシブル部位において起こる。システインによりそれらの残基を置換することにより、反応性チオール基は、抗体のアクセッシブル部位に位置することで、抗体を他の部分、例えば、薬剤部分又は

リンカー薬剤部分にコンジュゲートして、本明細書に更に記載されているように、免疫コンジュゲートを形成するのに使用することができる。特定の実施態様では、任意の１つ以上の下記残基：軽鎖のＶ２０５（Ｋａｂａｔナンバリング）；重鎖のＡ１１８（ＥＵナンバリング）；及び重鎖Ｆｃ領域のＳ４００（ＥＵナンバリング）は、システインにより置換することができる。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第７，５２１，５４１号に記載されているように生成することができる。

【０３３５】

ｅ）抗体誘導体

特定の実施態様では、本明細書に提供されている抗体は、当技術分野において公知であり、容易に利用できる、更なる非タンパク質性部分を含有するように更に改変することができる。抗体の誘導体化に適した部分は、水溶性ポリマーを含むが、これに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／マレイン酸無水物コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれか）、及びデキストラン又はポリ（ｎ－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、及びこれらの混合物を含むが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のために、製造中での利点を有することができる。このポリマーは、任意の分子量のものであることができ、分岐鎖又は非分岐鎖であることができる。抗体に付着するポリマー数は変化させることができ、２つ以上のポリマーが付着する場合、それらは、同じか又は異なる分子であることができる。一般的には、誘導体化に使用されるポリマーの数及び／又は種類は、改善されるべき抗体の特定の特性又は機能を含むがこれらに限定されない考慮に基づいて、抗体誘導体が規定条件下での治療に使用されるであろうかどうか等を決定することができる。

【０３３６】

別の実施態様では、抗体と、放射への曝露により選択的に加熱することができる非タンパク質性部分とのコンジュゲートが提供される。一実施態様において、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである（Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605）。放射は、任意の波長のものでよく、通常の細胞に有害でない波長を含むが、これに限定されず、非タンパク質性部分を、抗体－非タンパク質性部分近くの細胞が殺傷される温度に加熱する。

【０３３７】

Ｂ．血液脳関門シャトルモジュール

全ての態様の一実施態様では、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する少なくとも１つの結合特異性と、治療ターゲットに対する少なくとも１つの結合特異性とを有する、多重特異性抗体である。一実施態様において、本抗体は、ヒトトランスフェリンレセプターに結合する第１抗原結合部位と、脳抗原に結合する第２抗原結合部位とを含む。更なる実施態様では、脳抗原は、Ａベータ、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）、アルファ－シヌクレイン、ＣＤ２０、グルコセレブロシダーゼ、又はアミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）からなる群より選択される。好ましい一実施態様では、本多重特異性抗体は、

ｉ）トランスフェリンレセプター及びＡベータの両方、又は

ｉｉ）トランスフェリンレセプター及びＣＤ２０の両方、又は

ｉｉｉ）トランスフェリンレセプター及びアルファ－シヌクレインの両方、又は

ｉｖ）トランスフェリンレセプター及びリン酸化タウの両方、又は

ｖ）トランスフェリンレセプター及びＨＥＲ２の両方、又は

ｖｉ）トランスフェリンレセプター及びグルコセレブロシダーゼの両方

に結合する。

【０３３８】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、Ａベータに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８１の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８２の軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３３９】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトＣＤ２０に対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：７９の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８０の軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。一実施態様において、該重鎖可変領域は、Ｋａｂａｔの１１位におけるアミノ酸残基の任意のアミノ酸、ただし、ロイシンによる置換えを含む。一実施態様において、この置換は、Ｋａｂａｔの１１位におけるアミノ酸残基の非極性アミノ酸による置換えを含む。好ましい一実施態様では、この置換は、配列番号：７９の重鎖可変ドメインにおけるＫａｂａｔの１１位のアミノ酸残基の、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、及びフェニルアラニンからなる群より選択されるアミノ酸残基による置換えを含む。

【０３４０】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファーシヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８３の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８４の軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３４１】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファーシヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８５から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：８６から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３４２】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファーシヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８７から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：８８から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３４３】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファーシヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８９から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：９０から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３４４】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファーシヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：９１から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：９２から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３４５】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成

する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファ－シヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：９３から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：９４から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３４６】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：２４の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３７の軽鎖可変ドメインと、ヒトグルコセレブロシダーゼに対する結合部位とを含む、二重特異性抗体である。

【０３４７】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：７の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３４の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファ－シヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８３の重鎖可変ドメイン及び配列番号：８４の軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３４８】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：７の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３４の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファ－シヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８５から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：８６から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３４９】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：７の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３４の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファ－シヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８７から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：８８から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３５０】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：７の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３４の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファ－シヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：８９から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：９０から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３５１】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：７の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３４の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファ－シヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：９１から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：９２から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３５２】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：７の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３４の軽鎖可変ドメインと、ヒトアルファ－シヌクレインに対する結合部位のための、少なくとも一対の配列番号：９３から得られたヒト化重鎖可変ドメイン及び配列番号：９４から得られたヒト化軽鎖可変ドメインとを含む、二重特異性抗体である。

【０３５３】

一実施態様において、本抗体は、トランスフェリンレセプターに対する結合部位を形成する、少なくとも一対の配列番号：７の重鎖可変ドメイン及び配列番号：３４の軽鎖可変ドメインと、ヒトグルコセレブロシダーゼに対する結合部位とを含む、二重特異性抗体である。

【０３５４】
血液脳関門レセプターに特異的に結合する一価の結合実体は、その結合性及び経細胞輸送特性：
－　一価の結合実体としてのＢＢＢＲ発現細胞の効率的な細胞結合
－　一価の結合実体としての効率的なｉｎ　ｖｉｔｒｏ経細胞輸送
－　ヒト－カニクイザル交叉反応性（例えば、BIAcore及びＦＡＣＳ実験において）
に関して特徴付けることができる。
【０３５５】
経細胞輸送スクリーニングを、ｈＣＭＥＣ／Ｄ３系アッセイ法において行うことができる。このアッセイ法を、パルスチェイス方式で行うことができる。ｈＣＭＥＣ／Ｄ３脳内皮細胞を、一価の結合実体と共に１時間インキュベーションし、その後洗浄し、下記パラメータを、洗浄後０時間及び４時間で測定する。
ｉ）ローディング期中に細胞内に取り込まれた一価の結合実体の量
ｉｉ）ローディング及び洗浄後４時間での一価の結合実体の基底側量
ｉｉｉ）ローディング及び洗浄後４時間での一価の結合実体の頂端側量
ｉｖ）ローディング及び洗浄後０時間及び４時間での（細胞溶解による）細胞中の一価の結合実体の量
ｖ）ローディング及び洗浄後０時間及び４時間での一価の結合実体の総量
【０３５６】
本明細書に報告されている血液脳関門シャトルモジュール中の一価の結合実体として適切であるために、抗トランスフェリンレセプター抗体は（例えば、一価の結合実体として）、ｉ）ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞により取り込まれ（エンドサイトーシス）、ｉｉ）ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞の外側に輸送され（エキソサイトーシス）、ｉｉｉ）ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞内で安定（分解のためにエンドソームに輸送されないか、又は、低い輸送）していなければならない。
【０３５７】
このため、一実施態様では、一価の結合実体は、ｉ）１時間のローディング期中のｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞への（実質的な）取込み、ｉｉ）洗浄後４時間内でのローディング期間及び洗浄工程後の頂端側及び／又は基底側区画内への放出、及びｉｉｉ）低い（細胞内）分解速度により、ｈＣＭＥＣ／Ｄ３系アッセイ法において特徴付けられる。
【０３５８】
一実施態様では、ローディングは、約２．６７μg/mL 一価の結合実体の濃度において１時間である。
【０３５９】
本明細書に報告されている血液脳関門シャトルモジュールの一価の結合実体として適切であるために、一価の結合実体は、上記されているｈＣＭＥＣ／Ｄ３系アッセイ法において、下記閾値：
ｉ）４００pg以上のローディング期中に細胞内に取り込まれた一価の結合実体の量、
ｉｉ）１００pg以上のローディング及び洗浄後４時間での一価の結合実体の基底側量、及び
ｉｉｉ）１５０pg以上のローディング及び洗浄後４時間での一価の結合実体の頂端側量
を示さなければならないことが、見出されている。
【０３６０】
マウス抗ヒトトランスフェリンレセプター抗体１２８．１（可変領域配列については、国際公開公報第９３／１０８１９号ならびに配列番号：６４及び６５を参照のこと）を、参照として採用することができる。この場合には、本明細書に報告されている血液脳関門シャトルモジュールの一価の結合実体として適切であるために、一価の結合実体は、上記されているｈＣＭＥＣ／Ｄ３系アッセイ法において、下記閾値：
ｉ）抗体１２８．１のローディングの６０％以上の、ローディング期中に細胞内に取り込まれた一価の結合実体の量、

ｉｉ）抗体１２８．１の基底側量の６０％以上の、ローディング及び洗浄後４時間での一価の結合実体の基底側量、及び
ｉｉｉ）抗体１２８．１の頂端側量の６０％以上の、ローディング及び洗浄後４時間での一価の結合実体の頂端側量
を示さなければならない。

【０３６１】

ｈＣＭＥＣ／Ｄ３系アッセイ法を、下記のように行うことができる（これは、本明細書に報告されている全ての態様の一実施態様である）。

【０３６２】

ｈＣＭＥＣ／Ｄ３のための培地及びサプリメント（国際公開公報第２００６／０５６８７９号及びWeksler, B.B., et al., FASEB J. 19 (2005) 1872-1874を参照のこと）を、Lonzaから得ることができる。ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞（２６～２９回継代）を、２．５％ＦＢＳ、添加した成長因子の１／４を含有し、添加したヒドロコルチゾン、ゲンタマイシン、及びアスコルビン酸で完全に補われたＥＢＭ２培地中で、コラーゲンコートしたカバーガラス（顕微鏡）又はフラスコにおいてコンフルエントに培養する／培養することができる。

【０３６３】

全ての経細胞輸送アッセイ法について、高密度孔（1×10^{8}個／cm^2）のＰＥＴ膜フィルタインサート（孔径０．４μm、直径１２㎜）を、１２ウェル細胞培養プレートにおいて使用し／使用することができる。培地容量を、頂端側及び基底側チャンバについて、それぞれ４００μL及び１６００μLとなるように計算する。フィルタインサートの頂端側チャンバを、ラットの尾のコラーゲンＩ（７．５μg/cm^2）、続けて、フィブロネクチン（５μg/mL）でコートし／コートすることができる。各インキュベーションを、ＲＴで１時間継続する。ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞を、ＥＢＭ２培地中で１０～１２日間、コンフルエントな単層（約2×10^{5}個/cm^2）に増殖させ／増殖させることができる。空のフィルタを、１％ ＢＳＡを含有するＰＢＳ中で、１時間又は一晩（ｏ／ｎ）ブロキングし／ブロッキングすることができ、ついでその後、アッセイ法前に、ＥＢＭ２中で少なくとも１時間較正する。

【０３６４】

アッセイ（アッセイ法のスキームについては、図１を参照のこと）を、本明細書に記載されているのとは別の方法で再構成された血清フリーＥＢＭ２培地中で行った。アッセイの当日に、細胞を、６０分間血清不足にして、該当する血液脳関門レセプターの天然のリガンドを枯渇させる。細胞を含む又は含まない（ただし、完全な培地中で一晩ブロッキング）フィルタインサートを、該当するモノクローナル抗体（一価の結合実体）と頂端側で、３７℃において１時間インキュベーションした。単層を、頂端側（４００μL）及び基底側（１６００μL）においてそれぞれ、血清フリー培地中での室温（ＲＴ）で、３回３～５分間洗浄した。予め温めた培地を、頂端側チャンバに加え、フィルタを、予め温めた培地 １６００μLを含有する、新たな１２ウェルプレート（１％ ＢＳＡを含有するＰＢＳで一晩ブロッキング）に移した。この時点で、細胞を含むか又は含まないフィルタを、特異的な抗体（一価の結合実体）の取込みを決定するために、ＲＩＰＡバッファー ５００μL中で溶解させた。残ったフィルタを、３７℃又は４℃でインキュベーションした。サンプルを、種々の時点で収集して、抗体（一価の結合実体）の頂端側及び／又は基底側での放出を決定した。サンプル中の抗体含量を、高感度のＩｇＧ ＥＬＩＳＡを使用して定量することができる（実施例９を参照のこと）。各時点について、データを２つの空のフィルタ及び３つのフィルタ細胞培養物から生成するものとする。

【０３６５】

Ｃ．リコンビナント法及び組成物

抗体は、例えば、米国特許第４，８１６，５６７号に記載されているリコンビナント法及び組成物を使用して産生することができる。一実施態様において、本明細書に記載されている抗トランスフェリンレセプター抗体をコードする単離された核酸が提供される。こ

のような核酸は、抗体のＶＬを含むアミノ酸配列及び／又はＶＨを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖及び／又は重鎖）をコードすることができる。更なる実施態様では、このような核酸を含む１つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。更なる実施態様では、このような核酸を含むホスト細胞が提供される。１つのこのような実施態様では、ホスト細胞は、（１）抗体のＶＬを含むアミノ酸配列及び抗体のＶＨを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は、（２）抗体のＶＬを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第１ベクター及び抗体のＶＨを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第２ベクターを含む（例えば、（１）又は（２）によりトランスフォーメーションされている）。一実施態様において、ホスト細胞は、真核生物、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞又はリンパ球細胞（例えば、Ｙ０、ＮＳ０、Ｓｐ２０細胞）である。一実施態様において、抗トランスフェリンレセプター抗体を調製する方法が提供される。ここで、同方法は、抗体の発現に適した条件下において、上記で提供されている抗体をコードする核酸を含むホスト細胞を培養することと、場合により、ホスト細胞（又はホスト細胞培養培地）から、抗体を回収することとを含む。

【０３６６】

抗トランスフェリンレセプター抗体のリコンビナント産生のために、例えば、上記されている抗体をコードする核酸が単離され、ホスト細胞中での更なるクローニング及び／又は発現のために、１つ以上のベクター内に挿入される。このような核酸は、容易に単離することができ、（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる）従来の手法を使用してシークエンシングすることができる。

【０３６７】

抗体コードベクターのクローニング又は発現に適したホスト細胞は、本明細書に記載されている原核生物又は真核生物の細胞を含む。例えば、特に、グリコシル化及びＦｃエフェクター機能を必要としない場合、抗体は、細菌中で産生することができる。細菌中での抗体フラグメント及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第５，６４８，２３７号、同第５，７８９，１９９号、及び同第５，８４０，５２３号を参照のこと（E. coli中での抗体フラグメントの発現が記載されている、Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254も参照のこと）。発現後、抗体は、細菌細胞のペーストから、可溶性画分中に単離することができ、更に精製することができる。

【０３６８】

原核生物に加えて、真核生物の微生物、例えば、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的又は完全にヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす糸状菌及び酵母株を含む、真菌又は酵母が、抗体コードベクター用のクローニング又は発現ホストに適している。Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; and Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215を参照のこと。

【０３６９】

グリコシル化抗体の発現に適したホスト細胞は、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）からも得られる。無脊椎動物の例は、植物及び昆虫細胞を含む。数多くのバキュロウイルス株が特定されており、特にSpodoptera frugiperda細胞のトランスフェクション用の昆虫細胞に関して使用することができる。

【０３７０】

植物細胞培養物も、ホストとして利用することができる。例えば、（トランスジェニック植物中で抗体を産生するためのPLANTIBODIES（商標）技術が記載されている）米国特許第５，９５９，１７７号、同第６，０４０，４９８号、同第６，４２０，５４８号、同第７，１２５，９７８号、及び同第６，４１７，４２９号を参照のこと。

【０３７１】

脊椎動物細胞も、ホストとして使用することができる。例えば、懸濁液中で増殖させるのに適合した哺乳類の細胞系統が有用であることができる。有用な哺乳類ホスト細胞系統

の他の例は、ＳＶ４０によりトランスフォーメーションされるサル腎臓ＣＶ１系統（ＣＯＳ－７）；ヒト胚性腎臓系統（例えば、Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74に記載されている２９３又は２９３細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ）；マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252に記載されているＴＭ４細胞）；サル腎臓細胞（ＣＶ１）；アフリカグリーンモンキー腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６）；ヒト子宮頸ガン細胞（ＨＥＬＡ）；イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ）；バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ　３Ａ）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８）；ヒト肝臓細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２）；マウス乳房腫瘍（ＭＭＴ　０６０５６２）；例えば、Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68に記載されているＴＲＩ細胞；ＭＲＣ５細胞；及びＦＳ４細胞である。他の有用な哺乳類ホスト細胞系統は、ＤＨＦＲ－　ＣＨＯ細胞を含む、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞（Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220）ならびにメラノーマ細胞系統、例えば、Ｙ０、ＮＳ０、及びＳｐ２／０を含む。抗体産生に適した特定の哺乳類ホスト細胞系統のレビューについては、例えば、Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268を参照のこと。

【０３７２】

Ｄ．アッセイ法

本明細書に提供されている抗トランスフェリンレセプター抗体は、当技術分野において公知の種々のアッセイ法により、その物理的／化学的特性及び／又は生物学的活性を特定し、スクリーニングし、又は、特徴付けることができる。

【０３７３】

１．結合アッセイ法

一態様において、本発明の抗体を、その抗原結合活性について、例えば、公知の方法、例えば、ＥＬＩＳＡ、アルファＬＩＳＡ、ウェスタンブロット、抗体、又は逆相アレイ等により試験する。

【０３７４】

例示的なＥＬＩＳＡ又はアルファＬＩＳＡアッセイ法において、溶液（細胞上清、細胞又は組織ライゼート、体液等）中でのトランスフェリンレセプターは、捕捉抗体により結合される。同捕捉抗体は、トランスフェリンレセプター又は特定のコンフォーメーションにおけるトランスフェリンレセプター上の第１エピトープに特異的に結合する。検出実体に連結した検出抗体は、トランスフェリンレセプターの第２エピトープ又はコンフォーメーションに特異的に結合する。この読出しは、検出実体（化学発光、蛍光、エネルギー移動誘導発光等）に基づいている。

【０３７５】

抗体アレイの場合には、抗体を、ガラス又はニトロセルロースチップ上にスポットする。このスライドをブロッキングし、トランスフェリンレセプター含有溶液と共にインキュベーションし、結合していない抗体を除去するために洗浄する。結合した抗体を、蛍光ラベルした対応する二次抗体により検出する。蛍光シグナルを、蛍光スライドスキャナにより測定する。同様に、逆相アレイのために、リコンビナントトランスフェリンレセプター、細胞上清、細胞又は組織ライゼート、体液等を、ガラス又はニトロセルロースチップ上にスポットする。このスライドをブロッキングし、個々のアレイを、トランスフェリンレセプター上の特定のエピトープに対する抗体とインキュベーションする。結合していない抗体を洗浄し、結合した抗体を、蛍光ラベルした対応する二次抗体により検出する。蛍光シグナルを、蛍光スライドスキャナにより測定する（Dernick, G., et al., J. Lipid Res. 52 (2011) 2323-2331）。

【０３７６】

Ｅ．診断及び検出のための方法及び組成物

特定の実施態様では、本明細書に提供されている抗トランスフェリンレセプター抗体はいずれも、生体サンプル中のヒトトランスフェリンレセプターの存在を検出するのに有用

である。本明細書で使用する場合、「検出すること」という用語は、定量的又は定性的検出を包含する。特定の実施態様では、生体サンプルは、細胞又は組織、例えば、脳組織を含む。

【０３７７】

一実施態様において、診断又は検出方法に使用するための抗トランスフェリンレセプター抗体が提供される。更なる態様では、生体サンプル中のトランスフェリンレセプターの存在を検出する方法が提供される。特定の実施態様では、同方法は、生体サンプルを本明細書に記載されている抗トランスフェリンレセプター抗体と、トランスフェリンレセプター抗体のトランスフェリンレセプターへの結合が可能な条件下において接触させることと、抗トランスフェリンレセプター抗体とトランスフェリンレセプターとの間で複合体が形成されたかどうかを検出することとを含む。このような方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ又はｉｎ　ｖｉｖｏ法であることができる。一実施態様において、例えば、トランスフェリンレセプターが患者を選択するためのバイオマーカーである場合、抗トランスフェリンレセプター抗体は、抗トランスフェリンレセプター抗体による治療に適格な対象を選択するのに使用される。

【０３７８】

本発明の抗体を使用して診断することができる例示的な障害は、Ｉ型脳鉄蓄積（ＮＢＩＡ１）、純粋自立神経失調症、ダウン症候群、ゲーリック病、及び幾つかのレビー小体病、例えば、びまん性レビー小体病（ＤＬＢＤ）、アルツハイマー病レビー小体亜型（ＬＢＶＡＤ）、特定の形態のゴーシェ病、及びパーキンソン病痴呆（ＰＤＤ）を伴う神経変性を含む。

【０３７９】

特定の実施態様では、ラベルされた抗トランスフェリンレセプター抗体が提供される。ラベルは、直接検出されるラベル又は部分（例えば、蛍光、発色団、高電子密度、化学発光、及び放射性ラベル）ならびに、酵素又はリガンド等の部分を含むが、これらに限定されない。酵素又はリガンド等の部分は、例えば、酵素反応又は分子相互作用により、間接的に検出される。例示的なラベルは、放射線同位体^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、及び^{131}Ｉ、蛍光体、例えば、希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、過酸化水素を利用して、染料前駆体を酸化する酵素、例えば、ＨＲＰ、ラクトペルオキシダーゼ、又はマイクロペルオキシダーゼと組み合わせた、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第４，７３７，４５６号）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソザイム、糖質オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース－６－ホスファートデヒドロゲナーゼ、複素環オキシダーゼ、例えば、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、ビオチン／アビジン、スピンラベル、バクテリオファージラベル、安定フリーラジカル等を含むが、これらに限定されない。

【０３８０】

Ｆ．医薬製剤

本明細書に記載されている抗トランスフェリンレセプター抗体の医薬製剤は、所望の度合いの純度を有するこのような抗体を、１つ以上の任意の薬学的に許容し得る担体と混合することにより、凍結乾燥製剤又は水溶液の状態で調製される（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)）。薬学的に許容し得る担体は、一般的には、利用される用量及び濃度において、レシピエントに対して非毒性であり、バッファー、例えば、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルもしくはプロピルパラベン；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）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリ（ビニルピロリドン）；アミノ酸、例えば、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；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；キレート剤、例えば、ＥＤＴＡ；糖、例えば、ショ糖、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール；塩形成カウンターイオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）；ならびに／又は非イオン性界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含むが、これらに限定されない。本明細書において、例示的な薬学的に許容し得る担体は、間質薬分散剤、例えば、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（ｓＨＡＳＥＧＰ）、例えば、ヒト可溶性ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、ｒｈｕＰＨ２０（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）を更に含む。ｒｈｕＰＨ２０を含む特定の例示的なｓＨＡＳＥＧＰ及び使用方法は、米国特許出願公開公報第２００５／０２６０１８６号及び同第２００６／０１０４９６８号に記載されている。一態様において、ｓＨＡＳＥＧＰは、１つ以上の更なるグリコサミノグリカナーゼ、例えば、コンドロイチナーゼと組み合わせられる。

【０３８１】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第６，２６７，９５８号に記載されている。水性抗体製剤は、米国特許第６，１７１，５８６号及び国際公開公報第２００６／０４４９０８号に記載されているものを含む。後者の製剤は、ヒスチジン－アセテートバッファーを含む。

【０３８２】

本明細書における製剤は、処置される特定の適応症に必要な場合、２つ以上の活性成分、好ましくは、互いに有害に影響しない補完的な活性を有するものも含有することができる。このような活性成分は、意図した目的に効果的な量での組み合わせにおいて適切に存在する。

【０３８３】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術により、又は、界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、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－（メチルメタクリラート）マイクロカプセルそれぞれに、コロイド状薬剤送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）に、又はマクロエマルジョンに封入することができる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)に開示されている。

【０３８４】

持続放出型製剤が調製される場合がある。持続放出型製剤の適切な例は、抗体を含有する固体の疎水性ポリマーの半透過性マトリックスを含む。同マトリックスは、造形品、例えば、フィルム又はマイクロカプセルの状態である。

【０３８５】

ｉｎ　ｖｉｖｏ投与に使用される製剤は、一般的には、無菌である。無菌は、例えば、ろ過滅菌膜によるろ過により容易に達成することができる。

【０３８６】

Ｇ．治療方法及び組成物

本明細書に提供されている抗ＴｆＲ抗体のいずれかは、治療方法に使用することができる。一態様において、医薬として使用するための抗ＴｆＲ抗体が提供される。例えば、本発明は、血液脳関門を通過させて、治療化合物を輸送する方法であって、抗体がそれに結合した治療化合物を、ＢＢＢを通過させて輸送するように、治療化合物に結合した抗ＴｆＲ抗体（例えば、ＴｆＲ及び脳抗原の両方に結合する多重特異性抗体）をＢＢＢに暴露させることを含む、方法を提供する。別の例では、本発明は、血液脳関門を通過させて、神経障害剤を輸送する方法であって、抗体がそれに結合した神経障害剤を、ＢＢＢを通過さ

せて輸送するように、脳障害剤に結合した本発明の抗ＴｆＲ抗体（例えば、ＴｆＲ及び脳抗原の両方に結合する多重特異性抗体）をＢＢＢに暴露させることを含む、方法を提供する。一実施態様において、ＢＢＢは、哺乳類（例えば、ヒト）、例えば、神経障害を有するものにおけるものである。同神経障害は、アルツハイマー病（ＡＤ）、脳卒中、痴呆、筋ジストロフィー（ＭＤ）、多発性硬化症（ＭＳ）、筋委縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、嚢胞性線維症、アンゲルマン症候群、リドル症候群、パーキンソン病、ピック病、パジェット病、ガン、外傷性脳傷害等を含むが、これらに限定されない。一実施態様において、神経障害は、末梢神経、アミロイドーシス、ガン（例えば、ＣＮＳ又は脳に関与する）、眼疾患もしくは障害、ウイルスもしくは細菌感染、（例えば、ＣＮＳ又は脳の）炎症、虚血、神経変性疾患、発作、行動障害、リソソーム蓄積症等から選択される。本発明の抗体は、１つ以上の会合した活性成分／結合した治療化合物を、ＢＢＢを通過させて、このような障害がその分子、細胞、又はウイルス／細菌的基礎となるＣＮＳ／脳内に輸送するその能力のために、このような神経障害の処置に特に適している。末梢神経障害は、不適切又は制御されていない神経シグナル伝達又は同シグナル伝達の欠損により特徴付けられる、神経系の疾患又は異常であり、慢性疼痛（侵害受容性疼痛を含む）、ガン関連疼痛を含む身体組織に対する傷害により生じる疼痛、神経障害疼痛（神経、脊髄、又は脳における異常により生じる疼痛）、及び（精神障害に完全に又はほとんど関連する）精神性疼痛、頭痛、偏頭痛、末梢神経、ならびに、このような末梢神経障害に付随する兆候及び症候群、例えば、めまい又は吐き気を含むが、これらに限定されない。

【０３８７】

末梢神経障害について、鎮痛剤である神経剤を選択することができる。同鎮痛剤は、麻薬／オピオイド鎮痛剤（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、メタドン、オキシモルホン、ペンタゾシン、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剤（ＮＳＡＩＤ）（すなわち、イブプロフェン、ナプロキセン、ジクロフェナク、ジフルニサール、エトドラック、フェノプロフェン、フルビプロフェン、インドメタシン、ケトロラック、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）、抗偏頭痛剤（すなわち、スマトリプチン、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、サリチル酸塩（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、ジフルニサール、及びサルサラート）、抗痙攣剤（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）、麻酔剤（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、クロロプロカイン、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、ピペロカイン、プリロカイン、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ｃｏｘ－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）を含むが、これらに限定されない。めまいを伴う末梢神経障害について、抗めまい剤である神経剤を選択することができる。同抗めまい剤は、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が、これらに限定されない。吐き気を伴う末梢神経障害について、制吐剤である神経剤を選択することができる。同制吐剤は、プロメタジン、クロルプロマジン、プロクロルペラジン、トリメトベンザミド、及びメトクロプラミドを含むが、これらに限定されない。

【０３８８】

アミロイドーシスは、ＣＮＳにおける細胞外タンパク質性堆積に関連する、一群の疾患及び障害であり、続発性アミロイドーシス、加齢アミロイドーシス、アルツハイマー病（

ＡＤ）、軽度認知機能障害（ＭＣＩ）、レビー小体病、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血（ダッチ型）；グアムパーキンソン痴呆症候群、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、伝達性海面状脳症、ＨＩＶ関連痴呆、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、封入体筋炎（ＩＢＭ）、及び、ベータアミロイド堆積に関連する眼疾患（すなわち、黄斑変性、ドルーセン関連視神経症、及び白内障）を含むが、これらに限定されない。

【０３８９】

アミロイドーシスについて、ベータセクレターゼ、ｔａｕ、プレセニリン、アミロイド前駆体タンパク質又はその一部、アミロイドベータペプチドもしくはオリゴマー又はそれらの原繊維、デスレセプター６（ＤＲ６）、終末糖化産物レセプター（ＲＡＧＥ）、パーキン、及びハンチンチン；コリンエステラーゼ阻害剤（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）；ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト（すなわち、メマンチン）、モノアミン枯渇剤（すなわち、テトラベナジン）；エルゴロイドメシラート；抗コリン性抗パーキンソン剤（すなわち、プロシクリジン、ジフェンヒドラミン、トリヘキシルフェニジル、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剤（すなわち、エンタカポン、セレギリン、プラミペキソール、ブロモクリプチン、ロチゴチン、セリギリン、ロピニロール、ラサギリン、アポモルフィン、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；抗炎症剤（非ステロイド系抗炎症剤（すなわち、インドメタシン及び上記列記された他の化合物）を含むが、これらに限定されない）；ホルモン（すなわち、エストロゲン、プロゲステロン、及びリュープロリド）；ビタミン（すなわち、葉酸及びニコチンアミド）；ジメボリン；ホモタウリン（すなわち、３－アミノプロパンスルホン酸；３ＡＰＳ）；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、及び糖質コルチコイドから選択される、ターゲットに特異的に結合する抗体又は他の結合分子（小分子、ペプチド、アプタマー、又は他のタンパク質バインダーを含むが、これらに限定されない）を含むが、これらに限定されない、神経剤を選択することができる。

【０３９０】

ＣＮＳのガンは、１つ以上のＣＮＳ細胞（すなわち、神経細胞）の異常な増殖により特徴付けられ、神経膠種、多形性神経膠芽腫、髄膜腫、星状細胞腫、聴神経腫、軟骨腫、乏突起神経膠腫、髄芽細胞腫、神経節膠腫、シュワン腫、神経線維腫、神経芽細胞腫、及び、硬膜外、髄内、硬膜内腫瘍、又は、末梢腫瘍、例えば、ＣＤ２０もしくはＨＥＲ２陽性ガンのＣＮＳ転移を含むが、これらに限定されない。

【０３９１】

ガンについて、化学療法剤である神経剤を選択することができる。

【０３９２】

化学療法剤の例は、アルキル化剤、例えば、チオテパ及びCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミド；アルキルスルホナート、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、及びピポスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、及びウレドパ；エチレンイミン及びメチロールメラミン（methylamelamines）（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アミド、トリエチレンチオホスホラアミド、及びトリメチロールメラミン（trimethylolomelamime）を含む）;アセトゲニン（特に、ブラタシン及びブラタシノン）；デルタ－９－テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））ベーターラパコン；ラパコール；コルチシン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成類似物であるトポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、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、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；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類似物を含む）；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（合成類似物であるＫ

Ｗ－２１８９及びＣＢ１－ＴＭ１を含む）；エレウテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、チョロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノブエンビキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード;ニトロソ尿素（nitrosureas）、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、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;抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシンガンマＩＩ及びカリケアマイシンオメガＩＩ（例えば、Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33 (1994) 183-186を参照のこと）；ジネマイシンＡを含むジネマイシン；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団及び関連する発色タンパク質、エンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、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（carabicin）、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、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、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンＣ、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;代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサート及び５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）;葉酸類似物、例えば、デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサート;プリン類似物、例えば、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;ピリミジン類似物、例えば、アンシタビン、アザシチジン、６－２５アザウリジン、カルモフール、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;アンドロゲン、例えば、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;抗副腎剤、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン;葉酸補給剤、例えば、フォリン酸;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）;デホファミン（defofamine）;デメコルチン;ジアジコン;エフロルニチン（elfornithine）;酢酸エリプチニウム;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;ロニダニン（lonidanine）;メイタンシノイド、例えば、メイタンシン及びアンサマイトシン；ミトグアゾン;ミトキサントロン;モピダモール;ニトラエリン（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;プロカルバジン;PSK（登録商標）多糖類複合体（JHS Natural Products, Eugene, OR）;ラゾキサン;リゾキシン；シゾフィラン;スピロゲルマニウム;テヌアゾン酸;トリアジコン;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トキシン、ベラクリンＡ、ロリジンＡ、及びアングイジン）；ウレタン;ビンデシン（ELDISINE（登録商標）、FILDESIN（登録商標））；ダカルバジン;マンノムスチン;ミトブロニトール;ミトラクトール;５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.）、ABRAXANETM発色団フリー、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤（American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois）及びTAXOTERE（登録商標）ドセタキセル（Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロラムブシル;ゲムシタビン（GEMZAR（登録商標））;６－チオグアニン;メルカプトプリン;メトトレキサート；白金類似物、例えば、シスプラチン及びカルボプラチン;ビンブラスチン（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））;オキサリプラチン；ロイコボ

ビン；ビノレルビン（NAVELBINE（登録商標））;ノバントロン;エダトレキサート;ダウノマイシン;アミノプテリン;イバンドロナート；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）;レチノイド、例えば、レチノイン酸;カペシタビン（XELODA（登録商標））;上記いずれかの薬学的に許容し得る塩、酸、又は誘導体、ならびに、上記の２つ以上の組み合わせ、例えば、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組み合わせ治療についての略語）及びＦＯＬＦＯＸ（５－ＦＵ及びロイコボビンと組み合わせられたオキザリプラチン（ELOXATINTM）による処置計画についての略語）を含む。

【０３９３】

化学療法剤のこの定義には、ガンの増殖を促進することができるホルモンの作用を制御し、減少させ、遮断し、又は阻害するように作用し、多くの場合、全身性又は全身の処置の形式である抗ホルモン剤も含まれる。抗ホルモン剤は、ホルモン自体であることができる。例は、抗エストロゲン及び選択的エストロゲンレセプターモデュレーター（ＳＥＲＭ）（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、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン、及びFARESTON（登録商標）トレミフェンを含む）；抗プロゲステロン；エストロゲンレセプターダウンレギュレーター（ＥＲＤ）；卵巣をサプレッションし、又は、停止させるように作用する薬剤、例えば、黄体形成ホルモン放出ホルモン（ＬＨＲＨ）アゴニスト、例えば、LUPRON（登録商標）及びELIGARD（登録商標）酢酸リュープロリド、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン、及びトリプテレリン；他の抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド、及びビカルタミド；ならびに、酵素であるアロマターゼ（アロマターゼは副腎においてエストロゲン生成を制御する）を阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE（登録商標）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（formestanie）、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）アナストロゾール等を含む。加えて、化学療法剤のこのような定義は、ビスホスホナート、例えば、クロドロナート（例えば、BONEFOS（登録商標）又はOSTAC（登録商標））、DIDROCAL（登録商標）エチドロナート、ＮＥ－５８０９５、ZOMETA（登録商標）ゾレドロン酸／ゾレドロナート、FOSAMAX（登録商標）アレンドロナート、AREDIA（登録商標）パミドロナート、5 SKELID（登録商標）チルドロナート、又はACTONEL（登録商標）リセドロナート、ならびに、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類似物）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関わるシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、ＰＫＣ－アルファ、Ｒａｆ、Ｈ－Ｒａｓ、及び上皮成長因子レセプター（ＥＧＦ－Ｒ）等；ワクチン、例えば、THERATOPE（登録商標）ワクチン及び遺伝子治療ワクチン、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；ABARELIX（登録商標）ｒｍＲＨ；ラパチニブジトシラート（ＧＷ５７２０１６としても公知のＥｒｂＢ－２及びＥＧＦＲ二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤）、ならびに、上記いずれかの薬学的に許容し得る塩、酸、又は誘導体を含む。

【０３９４】

ガンの治療又は予防のための神経剤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（トラスツズマブ、ペルツズマブ、ベバシズマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、ゲムツズマ、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が、これらに限定されない）である。一部の例では、毒性ラベルと一体となっている抗体又はコンジュゲートは、所望の細胞（すなわち、ガン細胞）をターゲットし、殺傷するのに使用することができる。同抗体は、１３１Ｉ放射線ラベルを含むトシツモマブ又はトラスツズマブエンタンシンを含むが、これらに限定されない。

【０３９５】

眼疾患又は障害は、本明細書における目的において、ＢＢＢにより隔離されるＣＮＳ臓器を考慮に入れる、眼の疾患又は障害である。眼疾患又は障害は、強膜、角膜、虹彩、及び毛様体の障害（すなわち、強膜炎、角膜炎、角膜潰瘍、角膜上皮剥離、雪盲、ａｒｃｅｙｅ、タイゲソン点状表層角膜炎、角膜血管新生、フックスジストロフィー、円錐角膜、乾性角膜炎、虹彩炎、及びブドウ膜炎）、水晶体の障害（すなわち、白内障）、脈絡膜及び網膜の障害（すなわち、網膜剥離、網膜分離症、高血圧性網膜症、糖尿病性網膜症、網膜症、未熟児の網膜症、加齢黄斑変性、黄斑変性（乾燥型又は滲出型）、網膜前膜、色素性網膜炎、及び黄斑浮腫）、緑内障、飛蚊症、視神経及び視覚路の障害（すなわち、レーバー遺伝性視神経症及び視神経乳頭ドルーセン）、眼筋／両眼運動視力調節／屈折の障害（すなわち、斜視、眼麻痺、進行性外眼筋麻痺、内斜視、外斜視、遠視、近視、非点収差、不同視、老視、及び眼筋麻痺）、視覚障害及び盲目（すなわち、弱視、レーバー先天黒内障、暗点、色盲、全色盲、夜盲症、盲目、河川盲目症、及び小眼球症／眼欠損症）、充血眼、アーガイル・ロバートソン瞳孔、角膜真菌症、眼球乾燥症、及びａｎｄａｎｉｒｉｄｉａを含むが、これらに限定されない。

【０３９６】

眼疾患又は障害について、抗血管新生眼科用剤（すなわち、ベバシズマブ、ラニビズマブ、及びペガプタニブ）、眼科用緑内障剤（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、ジピベフリン、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ーゼ阻害剤（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剤（すなわち、ナファゾリン、フェニルエフェリン、及びテトラヒドロゾリン）、目薬、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、ロテプレドノール、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（すなわち、リドカイン、プロパラカイン、及びテトラカイン）、眼科用抗感染症剤（すなわち、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、シプロフルキサシン、モキシフロキサシン、クロラムフェニコール、バシトラシン／ポリミキシンＢ、スルファセトアミド、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、イドキシウリジン、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、トリフルウリジン、ガンシクロビル、ビダラビン）、眼科用抗炎症剤（すなわち、ネパフェナク、ケトロラック、フルビプロフェン、スプロフェン、シクロスポリン、トリアムシノロン、ジクロフェナク、及びブロムフェナク）、及び、眼科用抗ヒスタミン剤又は充血緩和剤（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、フェニルエフリン、ネドクロミル、ロドキサミド、フェニルエフリン、エメダスチン、及びアゼラスチン）である、神経剤を選択することができる。

【０３９７】

ＣＮＳのウイルス又は微生物感染は、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種、Streptococcus種、Pseudomonas種、Proteus種、E. coli、S. aureus、Pneumococcus種、Meningococcus種、Haemophilus種、及びMycobacterium tuberculosis)、及び他の微生物、例えば、真菌(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を含むが、これらに限定されず、急性又は慢性である場合がある髄膜炎、脳炎、脊髄炎、血管炎、及び膿瘍を含むが、これらに限定されないＣＮＳ病態生理をもたらす。

【０３９８】

ウイルス又は微生物疾患について、抗ウイルス化合物（アマンタジン抗ウイルス剤（すなわち、リマンタジン及びアマンタジン）、抗ウイルスインターフェロン（すなわち、ｐｅｇ－インターフェロンアルファ－２ｂ）、ケモカインレセプターアンタゴニスト（すなわち、マラビロク）、インテグラーゼ鎖転移阻害剤（すなわち、ラルテグラビル）、ノイ

ラミニダーゼ阻害剤（すなわち、オセルタミビル及びザナミビル）、非ヌクレオシドリバーストランスクリプターゼ阻害剤（すなわち、エファビレンズ、エトラビリン、デラビルジン、及びネビラピン）、ヌクレオシドリバーストランスクリプターゼ阻害剤（テノフォビル、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、エントリシタビン、アデフォビル、ザルシタビン、テルビブジン、及びジダノシン）、プロテアーゼ阻害剤（すなわち、ダルナビル、アタザナビル、フォサンプレナビル、チプラナビル、リトナビル、ネルフィナビル、アンプレナビル、インジナビル、及びサクイナビル）、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、及びシドフォビル）、及び種々の抗ウイルス剤（すなわち、エンフビルチド、フォスカルネット、パリビズマブ、及びフォミビルセン）、抗生物質（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、フルコキサシリン、テモシリン、アズロシリン、カルベニシリン、チカルシリン、メゾロシリン、ピペラシリン、及びバカンピシリン）、セファロスポリン（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、ノルカルジシンＡ、及びタブトキシニン－ベーター－ラクタム）、別のベータラクタム抗生物質との組み合わせにおけるベータラクタマーゼ阻害剤（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、トブラマイシン、及びパロモマイシン）、アンサマイシン（すなわち、ゲルダナマシン及びヘルビマイシン）、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、テイ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、ノルフルキサシン、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、スパルフロキサシン、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）、抗新生物剤又は細胞毒抗生物質（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、プリカマイシン、マイトマイシン、ペントスタチン、及びバルルビシン）、ならびに、種々の抗菌化合物（すなわち、バシトラシン、コリスチン、及びポリミキシンＢ）、抗真菌剤（すなわち、メトロニダゾール、ニタゾキサニド、チニダゾール、クロロキン、インドキノール、及びパロモマイシン）、ならびに抗寄生虫剤（キニン、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、プリマキン、アルテミシニン（artemesinin）、ハロファントリン、ドキシサイクリン、クリンダマイシン、メベンダゾール、ピランテルパモアート、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、リファンピン、アムホテリシンＢ、メラルソプロール、エフォルニチン、及びアルベンダゾール）を含むが、これらに限定されない）を含むが、これらに限定されない神経剤を選択することができる。

【０３９９】

ＣＮＳの炎症は、物理的傷害(すなわち、事故、手術、脳外傷、脊髄傷害、脳振盪によ

る)又はＣＮＳの１つ以上の他の疾患もしくは障害によるか又は関連する傷害(すなわち、膿瘍、ガン、ウイルス又は微生物感染)である場合がある、ＣＮＳへの傷害により引き起こされる炎症を含むが、これらに限定されない。

【０４００】

ＣＮＳの炎症について、炎症自体に対処する神経剤（すなわち、非ステロイド系抗炎症剤、例えば、イブプロフェン又はナプロキセン）、又は、炎症の基礎となる原因を処置するもの（すなわち、抗ウイルス剤又は抗ガン剤）を選択することができる。

【０４０１】

本明細書で使用する場合、ＣＮＳの虚血は、脳における異常な血流もしくは血管挙動、又はその原因に関する一群の障害を意味し、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出血)、及び動脈瘤を含むが、これらに限定されない。

【０４０２】

虚血について、血栓溶解剤（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）、血小板凝集阻害剤（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、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、例えば、血圧薬を含む、血流又は血管柔軟性を改善する化合物を含むが、これらに限定されない、神経剤を選択することができる。

【０４０３】

神経変性疾患は、ＣＮＳにおける神経細胞の機能欠如又は死に関連する一群の疾患又は障害であり、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、コケーン症候群、大脳皮質基底核変性症、アミロイドーシスにより引き起こされるか又はそれに関連する変性、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を含むが、これらに限定されない。

【０４０４】

神経変性疾患について、成長ホルモン又は神経栄養因子である神経剤を選択することができる。例は、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、神経成長因子（ＮＧＦ）、ニューロトロフィン－４／５、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）－２及び他のＦＧＦ、ニューロトロフィン（ＮＴ）－３、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、肝細胞成長因子（ＨＧＦ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、トランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）－アルファ、ＴＧＦ－ベータ、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）、インターロイキン－１レセプターアンタゴニスト（ＩＬ－１ｒａ）、毛様体神経栄養因子（ＣＮＴＦ）、グリア細胞由来神経栄養因子（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、パーセフィン、インターロイキン、グリア細胞系統由来神経栄養因子（ＧＦＲ）、顆粒球コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージ－ＣＳＦ、ネトリン、カルディオトロフィン－１、ヘッジホッグ、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、ミドカイン、プレイオトロフィン、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）を含むが、これらに限定されない。

【０４０５】

ＣＮＳの発作性疾患及び障害は、ＣＮＳにおける不適切及び／又は異常な電気伝導に関連し、てんかん（すなわち、欠伸発作、脱力発作、良性ローランドてんかん、小児期欠伸てんかん、間代性発作、複雑部分発作、前頭葉てんかん、熱性痙攣、点頭てんかん、若年性ミオクローヌスてんかん、若年性欠伸てんかん、レンノックスガストー症候群、ランドウークレフナー症候群、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、心因性発作、反射てんかん、ラスムッセン症候群、単純部分発作、二次性全般発作、側頭葉てんかん、強直間代発作、強直性発作、精神運動発作、辺縁系てんかん、部分発症発作、全般発症発作、てんかん

重積状態、腹部てんかん、無動発作、自律神経発作、広範両側性ミオクローヌス、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、ジャクソンマーチ、ラフォラ病、運動発作、多巣性発作、夜間発作、感光性発作、偽発作、感覚発作、微細発作、シルバン発作、離脱発作、及び視覚反射発作）を含むが、これらに限定されない。発作性障害について、抗痙攣剤又は抗てんかん剤である神経剤を選択することができる。同抗痙攣剤又は抗てんかん剤は、バルビツラート系抗痙攣剤（すなわち、プリミドン、メタルビタール、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、バルビタール、ブラロバルビタール、及びフェノバルビタール）、ベンゾジアゼピン系抗痙攣剤（すなわち、ジアゼパム、クロナゼパム、及びロラゼパム）、カルバマート系抗痙攣剤（すなわち、フェルバマート）、カルボニックアンヒドラーゼ阻害剤系抗痙攣剤（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痙攣剤（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）、脂肪酸誘導体系抗痙攣剤（すなわち、ジバルプロエクス及びバルプロ酸）、ガンマアミノ酪酸類似物（すなわち、プレガバリン、ガバペンチン、及びビガバトリン）、ガンマアミノ酪酸再取込み阻害剤（すなわち、チアガビン）、ガンマアミノ酪酸トランスアミナーゼ阻害剤（すなわち、ビガバトリン）、ヒダントイン系抗痙攣剤（すなわち、フェニトイン、エトトイン、ホスフェニトイン、及びメフェニトイン）、種々の抗痙攣剤（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痙攣剤（すなわち、パラメタジオン及びトリメタジオン）、ピロリジン系抗痙攣剤（すなわち、レベチラセタム）、スクシンイミド系抗痙攣剤（すなわち、エトスクシミド及びメトスクシミド）、トリアジン系抗痙攣剤（すなわち、ラモトリジン）、及び尿素系抗痙攣剤（すなわち、フェナセミド及びフェネトライド）を含むが、これらに限定されない。

【０４０６】

行動障害は、患っている対象側の異常な挙動により特徴付けられるＣＮＳの障害であり、睡眠障害（すなわち、不眠症、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、うつ病、自殺性うつ病、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（ＡＤＨＤ）、注意欠陥障害（ＡＤＤ）、慢性疲労症候群、広場恐怖症、心的外傷後ストレス障害、双極性障害）、摂食障害（すなわち、食欲不振又は過食症）、慢性幻覚精神病、発達行動障害（すなわち、自閉症、レット症候群、アスベルガー症候群）、人格障害及び精神病性障害（すなわち、統合失調症、妄想性障害等）を含むが、これらに限定されない。

【０４０７】

行動障害について、神経剤は、挙動改変化合物から選択することができる。同挙動改変化合物は、非定型抗精神病剤（すなわち、リスペリドン、オランザピン、アプリピプラゾール、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）、フェノチアジン系抗精神病剤（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）、種々の抗精神病剤（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込み阻害剤（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込み阻害剤（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、三環系抗うつ剤（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）、四環系抗うつ剤（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系抗うつ剤（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剤（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、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－ドーパミン再取込み阻害剤（すな

わち、ブプロピオン）、ＣＮＳ刺激剤（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、メチルフェニダート、デクスメチルフェニダート、リスデキサンフェタミン、モダフィニル、ペモリン、フェンジメトラジン、ベンズフェタミン、フェンジメトラジン、アルモダフィニル、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）、抗不安剤／鎮静剤／睡眠剤（バルビツラート（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（上記のとおり）、及び種々の抗不安剤／鎮静剤／睡眠剤（すなわち、ジフェンヒドラミン、ナトリウムオキシバート、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、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、及びエトクロルビノール）を含むが、これらに限定されない）、セクレチン（例えば、Ratliff－Schaub et al. Autism 9 (2005) 256-265を参照のこと）、オピオイドペプチド（例えば、Cowen et al. J. Neurochem. 89 (2004)273-285を参照のこと）、ならびに神経ペプチド（例えば、Hethwa et al. Am. J. Physiol. 289 (2005) E301-305を参照されたい）を含むが、これらに限定されない。

【０４０８】

リソソーム蓄積症は、一部の場合において、ＣＮＳと関連し、ＣＮＳ特有の兆候を有する、代謝障害である。このような障害は、テイーサックス病、ゴーシェ病、ファブリー病、ムコ多糖症（Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型、Ｖ型、ＶＩ型、及びＶＩＩ型）、糖原病、ＧＭ１－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沈着症１型及び２型、ニーマン－ピック病、ポンペ病、及びクラッベ病を含むが、これらに限定されない。

【０４０９】

リソソーム蓄積症について、該疾患において損なわれる酵素自体又は酵素の活性を何らかの方法で模倣する神経剤を選択することができる。リソソーム蓄積症の処置のための例示的なリコンビナント酵素は、例えば、米国特許出願公開公報第２００５／０１４２１４１号において説明されたもの（すなわち、アルファ－Ｌ２０イズロニダーゼ、イズロナート－２－スルファターゼ、Ｎ－スルファターゼ、アルファ－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、ベーター－ガラクトシダーゼ、アリールスルファターゼＢ、ベーター－グルクロニダーゼ、酸アルファグルコシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、アルファ－ガラクトシダーゼＡ、ヘキソサミニダーゼＡ、酸スフィンゴミエリナーゼ、ベーター－ガラクトセレブロシダーゼ、ベーター－ガラクトシダーゼ、アリールスルファターゼＡ、酸セラミダーゼ、アスパルトアシラーゼ、パルミトイル－プロテインチオエステラーゼ１、及びトリペプチジルアミノペプチダーゼ１）を含むが、これらに限定されない。

【０４１０】

一態様において、本発明の抗体は、兆候の開始前に神経障害を検出し、及び／又は、疾患もしくは障害の重症度もしくは経過を評価するのに使用される。一態様において、本抗体は、神経障害の検出及び／又は画像化を可能にする。同検出及び／又は画像化は、Ｘ線撮影法、断層撮影法、又は磁気共鳴撮影法（ＭＲＩ）による画像化を含む。

【０４１１】

一態様において、医薬として使用するための、本発明の低親和性抗ＴｆＲ抗体が提供される。更なる態様では、赤血球（すなわち、網状赤血球）を枯渇させることなく、神経疾患又は障害（例えば、アルツハイマー病）を処置するのに使用するための、低親和性抗ＴｆＲ抗体が提供される。特定の実施態様では、本明細書で記載された処置方法に使用するための、改変された低親和性抗ＴｆＲ抗体が提供される。特定の実施態様では、本発明は、有効量の（場合により、神経障害剤に結合した）抗ＴｆＲ抗体を個体に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、その安全性を改善するように改変された低親和性抗ＴｆＲ抗体を提供する。このような一実施態様では、本方法は、有効量の少なくとも１つの更なる治療剤を、個体に投与することを、更に含む。更なる実施態様では、本発明は、神経疾患又は障害（例えば、アルツハイマー病）のリ

スクにあるか、又は、これらを患っている患者におけるアミロイドプラーク形成を減少させ、又は、阻害するのに使用するための、その安全性を改善するように改変された抗ＴｆＲ抗体を提供する。上記実施態様のいずれかの「個体」は、ヒトである場合がある。特定の態様では、本発明の方法に使用するための本発明の抗ＴｆＲ抗体は、それに結合した神経障害剤の取込みを改善する。

【０４１２】

更なる態様では、本発明は、医薬の製造又は調製における、本発明の低親和性抗ＴｆＲ抗体の使用を提供する。一実施態様において、該医薬は、神経疾患又は障害の処置のためのものである。更なる実施態様では、該医薬は、神経疾患又は障害を有する個体に、有効量の医薬を投与することを含む、神経疾患又は障害を処置する方法に使用するためのものである。このような一実施態様では、本方法は、有効量の少なくとも１つの更なる治療剤を、個体に投与することを、更に含む。

【０４１３】

更なる態様では、本発明は、アルツハイマー病を処置するための方法を提供する。一実施態様において、本方法は、アルツハイマー病を有する個体に、有効量の、ＢＡＣＥ１とＴｆＲとの両方又はＡベータとＴｆＲとの両方に結合する本発明の多重特異性抗体を投与することを含む。このような一実施態様では、本方法は、有効量の少なくとも１つの更なる治療剤を、個体に投与することを、更に含む。上記実施態様のいずれかの「個体」は、ヒトであることができる。

【０４１４】

本発明の抗ＴｆＲ抗体は、治療において、単独で、又は、他の薬剤との組み合わせで使用することができる。例えば、本発明の抗ＴｆＲ抗体は、少なくとも１つの更なる治療剤と同時投与することができる。特定の実施態様では、更なる治療剤は、抗ＴｆＲ抗体が処置するのに利用されるのと同じか又は異なる神経障害に有効な治療剤である。例示的な更なる治療剤は、上記された種々の神経剤、コリンエステラーゼ阻害剤（例えば、ドネペジル、ガランタミン、ロバスチグミン、及びタクリン）、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト（例えば、メマンチン）、アミロイドベータペプチド凝集阻害剤、抗酸化剤、γ－セクレターゼモデュレーター、神経成長因子（ＮＧＦ）模倣物又はＮＧＦ遺伝子療法、ＰＰＡＲγアゴニスト、ＨＭＳ－ＣｏＡレダクターゼ阻害剤（スタチン）、アンパキン、カルシウムチャネル遮断薬、ＧＡＢＡレセプターアンタゴニスト、グリコーゲンシンターゼキナーゼ阻害剤、神経内免疫グロブリン、ムスカリン作動性レセプターアゴニスト、ニコチン作動性レセプターモデュレーター、能動的又は受動的アミロイドベータペプチド免疫化、ホスホジエステラーゼ阻害剤、セロトニンレセプターアンタゴニスト、及び抗アミロイドベータペプチド抗体を含むが、これらに限定されない。特定の実施態様では、少なくとも１つの更なる治療剤は、神経剤の１つ以上の副作用を軽減するその能力について選択される。

【０４１５】

特定の他のこのような実施態様では、少なくとも１つの更なる治療剤が、抗ＴｆＲ抗体の投与時に、補体経路の活性化を阻害し、又は、予防するその能力について選択される。このような治療剤の例は、補体経路に結合するか、又は、同経路を活性化させる抗ＴｆＲ抗体の能力と干渉しない薬剤、及び、補体経路内での１つ以上の分子相互作用を阻害する薬剤を含むが、これらに限定されない。同薬剤は、一般的には、Mollnes and Kirschfink（Molec. Immunol. 43 (2006) 107-121）に記載されている。同文献の内容は、参照により本明細書に明確に組み入れられる。

【０４１６】

上記及び本明細書に記載されたこのような組み合わせの治療は、組み合わせられた投与（この場合、２つ以上の治療剤が同じ又は別箇の製剤に含まれる）及び別箇の投与を包含する。この場合、本発明の抗体の投与を、更なる治療剤及び／又は補助剤の投与前、同投与と同時に、及び／又は、同投与後に行うことができる。一実施態様において、抗ＴｆＲ抗体の投与及び更なる治療剤の投与は互いに、約１か月以内又は約１、２、もしくは３週

間以内、又は、約１、２、３、４、５、もしくは６日以内に行う。本発明の抗体は、他の介在治療との組み合わせにおいても使用することができる。同介在治療は、例えば、放射線療法、行動療法、又は当技術分野において公知であり、治療されもしくは予防される神経障害に適切な他の治療法であるが、これらに限定されない。

【０４１７】

本発明の抗ＴｆＲ抗体（及び任意の更なる治療剤）は、任意の適切な手段により投与することができる。同手段は、非経口、肺内、及び鼻内、及び局所処置の必要に応じて、病巣内投与を含む。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与を含む。投与は、一部、投与が短期間であるか、又は、慢性的であるかに応じて、任意の適切な経路により、例えば、静脈内又は皮下注入等の注入によることができる。種々の投与計画は、種々の時点にわたる単回又は複数回の投与、ボーラス投与を含むが、これらに限定されない。パルス注入が、本明細書において企図される。

【０４１８】

本発明の抗体は、良質の医療のための原則（good medical practice）に合致する方法で、配合され、製剤化され、投与されるであろう。この文脈において考慮すべき要因は、処置される特定の障害、処置される特定のほ乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医療実務家に公知の他の要因を含む。

【０４１９】

抗体は、対象となる障害を予防しもしくは治療し、又は、抗体投与の１つ以上の副作用を予防し、軽減し、改善するのに現在使用されている１つ以上の薬剤と共に、任意選択的に配合されるが、同配合は必ずしも必要ではない。このような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害又は処置の種類、及び上記で検討された他の要因により決まる。これらは、一般的には、同じ用量で、本明細書で記載された投与経路により使用される。また、本明細書で記載された用量の約１～９９％で、又は、経験的に／臨床的に適切であると決定される任意の用量及び任意の経路で使用される。

【０４２０】

疾患の予防又は治療のために、適切な用量の本発明の抗体（単独又は１つ以上の他の更なる治療剤との組み合わせ時に）は、処置される疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体が予防又は治療目的で投与されるかどうか、以前の治療、患者の既往歴、及び抗体に対する応答、ならびに担当医の裁量により決まるであろう。抗体は、１回又は一連の処置にわたって、患者に適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、約１μg/kg～１５mg/kg（例えば、０．１mg/kg～１０mg/kg） 抗体が、例えば、１つ以上の別箇の投与によるか又は連続的な注入によるかに関わらず、患者に投与するための最初の候補用量であることができる。１つの典型的な日量は、上記された要因に応じて、約１μg/kg～１００mg/kg以上の範囲であることができる。数日以上にわたる繰返しでの投与のために、症状に応じて、処置は、一般的には、疾患兆候の所望のサプレッションが生じるまで、持続されるであろう。抗体の１つの例示的な用量は、約０．０５mg/kg～約４０mg/kgの範囲であろう。このため、約０．５mg/kg、２．０mg/kg、４．０mg/kg、５．０mg/kg、７．５mg/kg、１０mg/kg、１５mg/kg、２０mg/kg、２５mg/kg、３０mg/kg、３５mg/kg、又は４０mg/kgの内の１つ以上の用量（又は、それらの任意の組み合わせ）を、患者に投与することができる。このような用量は、例えば、毎週又は三週間毎に断続的に投与することができる（例えば、これにより、患者は、約２～約２０回、又は、例えば、約６回の抗体の投与を受ける）。最初のより大きいローディング用量、続けて、１つ以上のより小さい用量が投与されてもよい。ただし、他の投与計画も有用であることができる。抗ＴｆＲ抗体の投与による網状赤血球集団への影響を低下させる１つの方法は、全体としてより少ない量の循環性抗体が網状赤血球と相互作用する血流に存在するように、投与の量又はタイミングを変更することである。１つの非限定的な例において、より低い用量の抗ＴｆＲ抗体を、より高い用量が投与されるであろうより、高い頻度で投与することができる。使用される用量は、ＣＮＳに送達されるのに必要な抗体量（それ自体が抗体のＣＮＳ抗原

特異的部分の親和性に関連する）、ＴｆＲに対するその抗体の親和性、及び赤血球（すなわち、網状赤血球）を保護するかどうかの間で釣り合わせることができる。増殖及び発達を刺激し、又は、補体経路を阻害する化合物が、抗体と同時に、又は、連続的に投与される。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイ法により、本明細書に記載され、当技術分野において公知なように、容易にモニターされる。

【０４２１】

上記製剤又は治療法のいずれかが、抗ＴｆＲ抗体に代えて、又は、同抗体に加えて、本発明の免疫コンジュゲートを使用して行うことができることが理解される。

【０４２２】

ＩＩＩ．製品

本発明の別の態様では、上記された障害の治療、予防、及び／又は診断に有用な材料を含有する製品が提供される。本製品は、容器と、容器上又は該容器に関連するラベル又は添付文書を含む。適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、ＩＶ溶液バッグ等を含む。容器は、各種の材料、例えば、ガラス又はプラスチックから形成することができる。容器は、組成物自体、又は、症状を治療し、予防し、及び／又は診断するのに有効な別の組成物との組み合わせで、組成物を保持し、無菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針により突き刺し可能なストッパーを有するバイアルでもよい）。組成物中の少なくとも１つの活性剤は、本発明の抗体である。ラベル又は添付文書は、組成物が選択された症状を処置するのに使用されることを示す。さらに、本製品は、（ａ）本製品に含有される組成物を含む第１容器であって、同組成物が本発明の抗体を含む第１容器と、（ｂ）本製品に含有される組成物を含む第２容器であって、同組成物が更なる細胞毒又はその他の方法での治療剤を含む第２容器とを含む。本発明のこの実施態様における製品は、組成物が特定の症状を処置するのに使用することができることを示す添付文書を更に含んでもよい。代替的に又は追加的に、本製品は、薬学的に許容し得るバッファー、例えば、注射用静菌水（ＢＷＦＩ）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、及びデキストロース溶液を含む第２（又は第３）容器を更に含む。他のバッファー、希釈剤、フィルタ、針、及びシリンジを含む、商業的及びユーザ視点から望ましい他の材料を更に含んでもよい。

【０４２３】

上記製品のいずれかが、抗トランスフェリンレセプター抗体に代えて、又は、同抗体に加えて、本発明の免疫コンジュゲートを含むことができることが理解される。

【実施例】

【０４２４】

ＩＶ．実施例

下記は、本発明の方法及び組成物の例示である。種々の他の実施態様を実施でき、上記提供される一般記載を提供すると理解される。

【０４２５】

材料及び方法

リコンビナントＤＮＡ技術

標準的な方法を使用して、Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されているように、ＤＮＡを操作した。分子生物学的試薬を、製造メーカーの説明書に従って使用した。

【０４２６】

遺伝子及びオリゴヌクレオチド合成

所望の遺伝子セグメントを、Geneart GmbH（Regensburg, Germany）での化学合成により調製した。合成した遺伝子フラグメントを、増殖／増幅用のE. coliプラスミド内にクローニングした。サブクローニングされた遺伝子フラグメントのＤＮＡ配列を、ＤＮＡシークエンシングにより確かめた。あるいは、短い合成ＤＮＡフラグメントを、化学的に合成したオリゴヌクレオチドをアニーリングさせることにより、又は、ＰＣＲによりアッセ

ンブリした。各オリゴヌクレオチドを、metabion GmbH（Planegg-Martinsried, Germany）により調製した。

【０４２７】

試薬

特に断りない限り、全ての市販の化学薬品、抗体、及びキットを、製造メーカーのプロトコールに従って提供されたまま使用した。

【０４２８】

実施例１

ウサギ及びマウスの免疫化

マウスの免疫化

ＮＭＲＩマウスを、ヒト又はカニクイザルの全長ＴｆＲをコードするプラスミド発現ベクターを使用して、１００μｇ ベクターＤＮＡの皮内適用により遺伝学的に免疫化し、続けて、エレクトロポレーションした（０．１ms中に１０００V/cmの２方形波、間隔０．１２５ｓ、続けて、１０ms中に２８７．５V/cmの４方形波、間隔０．１２５ｓ）。０、１４、２８、４２、５６、７０、及び８４日目に、６又は７回のいずれかの連続的な免疫化を、マウスに受けさせた。４回目及び６回目の免疫化を、カニクイザルＴｆＲをコードするベクターにより行った。ヒトＴｆＲをコードするベクターを、他の全ての免疫化に使用した。血液を、３６、７８、及び９２日目に採取し、血清を調製した。同血清を、ＥＬＩＳＡによる力価測定に使用した（以下を参照のこと）。最も高い力価を有する動物を、９６日目に、10^6個のヒトＴＦ－１細胞又は５０μｇ リコンビナントのヘリカルドメイン（Ｌｅｕ１２２で始まり、Ａｓｎ６０８で終わり、ヒトＦｃ領域に対するＮ末端融合物としてＨＥＫ２９３Ｆ細胞中で発現しており、プロテインＡ親和性クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーにより精製される、ヒトＴｆＲの細胞外ドメイン）を欠いたヒト可溶性ＴｆＲのいずれかの静脈内注入によりブースティングするのに選択した。モノクローナル抗体を、安定してトランスフェクションされたＣＨＯ－Ｋ１細胞の表面上に発現している、ヒト及びカニクイザルのトランスフェリンレセプターに結合するその能力に基づいて、ハイブリドーマ技術により単離した（実施例３を参照のこと）。

【０４２９】

ウサギの免疫化

ニュージーランドホワイトウサギ又はヒト化抗体レパートリを発現しているトランスジェニックウサギを、ヒト又はカニクイザルの全長ＴｆＲをコードするプラスミド発現ベクターを使用して、４００μｇ ベクターＤＮＡの皮内適用により遺伝学的に免疫化し、続けて、エレクトロポレーションした（１０ms中に７５０V/cmの５方形波、間隔１ｓ）。０、１４、２８、５６、８４、及び１１２日目に、６回の連続的な免疫化を、ウサギに受けさせた。４回目及び６回目の免疫化を、カニクイザルＴｆＲをコードするベクターにより行った。ヒトＴｆＲをコードするベクターを、他の全ての免疫化に使用した。血液（推定合計血液量の１０％）を、３５、６３、９１、及び１１９日目に採取し、血清を調製した。同血清を、ＥＬＩＳＡによる力価測定に使用した（以下を参照のこと）。末梢単核球を単離し、Ｂ細胞クローニング法における抗原特異的Ｂ細胞のソースとして使用した（実施例２を参照のこと）。

【０４３０】

血清力価の測定（ＥＬＩＳＡ）

ヒトリコンビナント可溶性ＴｆＲ（R&D Systems Cat. No. 2474-TR）を、９６ウェルのNUNC Maxisorbプレートに、ＰＢＳ中の３μg/mL、１００μL/ウェルで固定し、続けて、同プレートを、ＰＢＳ中の２％ ＣｒｏｔｅｉｎＣ、２００μL/ウェルでブロッキングし、ＰＢＳ中０．５％ ＣｒｏｔｅｉｎＣ、１００μL/ウェルで、二重での抗血清の連続希釈を加え、（１）全てのマウス血清について、ＨＲＰコンジュゲートヤギ抗マウス抗体（Jackson Immunoresearch/Dianova 115-036-071；１／１６０００）、（２）全てのウサギ血清について、ＨＲＰコンジュゲートロバ抗ウサギＩｇＧ抗体（Jackson Immunoresearch/Dianova 711-036-152；１／１６０００）、（３）トランスジェニックウサギの血清のみ

について、ウサギ抗ヒトＩｇＧ抗体（Pierce/Thermo Scientific 31423；１／５０００）、（４）トランスジェニックウサギからの血清のみについて、ビオチン化ヤギ抗ヒトカッパ抗体（Southern Biotech/Biozol 2063-08、１／５０００）及びストレプトアビジン－ＨＲＰにより検出し、ＰＢＳ中の０．５％ ＣｒｏｔｅｉｎＣ、１００μL/ウェルで希釈した。全ての工程について、プレートを、３７℃で１時間インキュベーションした。全ての工程間において、プレートを、ＰＢＳ中の０．０５％ Ｔｗｅｅｎ２０で３回洗浄した。シグナルを、BM Blue POD Substrate soluble（Roche）を１００μL/ウェルで加えることにより発生させ、１Ｍ ＨＣｌを１００μL/ウェルで加えることにより停止させた。吸光度を、参照としての６９０nmに対して、４５０nmで読み出した。力価を、最大半量シグナルをもたらす抗血清の希釈として定義した。

【０４３１】

実施例２

ウサギからのＢ細胞クローニング

ウサギ末梢血単核球（ＰＢＭＣ）の単離

要約すると、血液サンプルを、６匹の動物（２匹の野生型（ｗｔ）ウサギ及び４匹のトランスジェニック（ｔｇ）ウサギ）から採取した。これらのウサギを、２通りの免疫化キャンペーン：２匹のｗｔウサギ及び２匹のｔｇウサギを含む第１キャンペーン及び２匹のｔｇウサギを含む第２キャンペーンから得た（実施例「ウサギの免疫化」も参照のこと）。ＥＤＴＡ含有全血を、lympholyte mammal（Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canada）を使用し、製造メーカーの仕様書に従って、密度遠心分離前に１×ＰＢＳ（PAA, Pasching, Austria）で２倍希釈した。ＰＢＭＣを、１×ＰＢＳで２回洗浄した。

【０４３２】

ＥＬ－４　Ｂ５培地

ＲＰＭＩ１６４０（Pan Biotech, Aidenbach, Germany）に、１０％ ＦＣＳ（Hyclone, Logan, UT, USA）、２mM グルタミン、１％ ペニシリン／ストレプトマイシン溶液（PAA, Pasching, Austria）、２mM ピルビン酸ナトリウム、１０mM ＨＥＰＥＳ（PAN Biotech, Aidenbach, Germany）、及び０．０５mM β－メルカプトエタノール（Gibco, Paisley, Scotland）を添加した。

【０４３３】

細胞の枯渇

第１免疫化キャンペーン：ＣＨＯ細胞のコンフルエントな単層で覆った、無菌の６ウェルプレート（細胞培養グレード）を、非特異的付着によるマクロファージ／単球及び非特異的に結合するリンパ球を枯渇させるのに使用した。

【０４３４】

第２免疫化キャンペーン：ＣＨＯ細胞で覆ったウェルを使用する枯渇工程を省略した。ハムスタートランスフェリンレセプター抗体に交差反応性である抗体産生Ｂ細胞が枯渇するであろうことを排除できなかったためである。したがって、ブランクである無菌の６ウェルプレート（細胞培養グレード）を、ハムスター交差反応性（及び、おそらくマウス交差反応性）の表面抗体を産生する可能性のあるＢリンパ球が、ワークフローにおける次の工程に達するのが可能なように、非特異的付着によるマクロファージ及び単球を枯渇させるのに使用した。

【０４３５】

各免疫化キャンペーンについて、各ウェルを、最大４mL 培地と、免疫化したウサギからの6×10^{6}個以下のＰＢＭＣとで満たし、インキュベーター中において３７℃で１時間結合させた。上清中の細胞（末梢血リンパ球（ＰＢＬ））を、抗原パニング工程に使用した。

【０４３６】

ヒトトランスフェリンレセプターでのＢ細胞濃縮

ヒトトランスフェリンレセプター陽性ＣＨＯ細胞の単層で覆った６ウェルの組織培養プレートに、４mL 培地当たりに6×10^{6}個以下のＰＢＬを播種し、インキュベーター中

において３７℃で１時間結合させた。付着しなかった細胞を、１×ＰＢＳで１～２回、ウェルを注意深く洗浄することにより除去した。残りの付着した細胞を、トリプシンにより、インキュベーター中において３７℃で１０分間引き剥がした。トリプシン処理を、ＥＬ－４　Ｂ５培地により停止させた。細胞を、免疫蛍光染色まで、氷上で維持した。

【０４３７】

免疫蛍光染色及びフローサイトメトリー

抗ＩｇＧ　ＦＩＴＣ（AbD Serotec, Dusseldorf, Germany）を、単一細胞ソーティングに使用した。表面染色のために、枯渇及び濃縮工程からの細胞を、ＰＢＳ中の抗ＩｇＧ　ＦＩＴＣ抗体と共にインキュベーションし、暗所において４℃で４５分間インキュベーションした。染色後、ＰＢＭＣを、氷冷ＰＢＳで２回洗浄した。最終的に、ＰＢＭＣを、氷冷ＰＢＳ中に再懸濁させ、ＦＡＣＳ分析に直ちに供した。ヨウ化プロピジウム（BD Pharmingen, San Diego, CA, USA）を、ＦＡＣＳ分析前に５μg/mLの濃度で加えて、死んだ細胞と生きている細胞との間を識別した。

【０４３８】

コンピュータを備えたBecton Dickinson FACSAria及びFACSDivaソフトウェア（BD Biosciences, USA）を、単一細胞ソーティングに使用した。

【０４３９】

Ｂ細胞培養

ウサギＢ細胞の培養を、Zubler et al. (1985)に記載されている方法と同様の方法により準備した。簡潔に、単一ソーティングされたウサギＢ細胞を、２００μL/ウェル Pansorbin Cells（１：１０００００）（Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland）、５％ ウサギ胸腺細胞上清（charge TSN-M13 (10242), MicroCoat, Bernried, Germany）、及びガンマ線照射マウスＥＬ－４－Ｂ５胸腺細胞（２．５×１０^{4}個／ウェル）を含有するＥＬ－４　Ｂ５培地を含む９６ウェルプレート中で、インキュベーター中において、５％ CO_2の雰囲気下での３７℃において７日間培養した。Ｂ細胞培養上清を、スクリーニングのために除去し、残った細胞を、直ちに収集し、ＲＬＴバッファー（Qiagen, Hilden, Germany）　１００μL中において、－８０℃で凍結させた。

【０４４０】

実施例３

細胞ＥＬＩＳＡによるヒト及びカニクイザルＴｆＲ結合抗体の特定

ウサギＢ細胞又はマウスハイブリドーマの上清を、ヒト及びカニクイザルＴｆＲを認識する抗体についてスクリーニングするために、安定してトランスフェクションされているＣＨＯ－Ｋ１細胞を使用する細胞ＥＬＩＳＡを利用した。安定したトランスフォーマントを、ヒト又はカニクイザルＴｆＲと、ネオマイシン－ホスホトランスフェラーゼのための発現カセットを含有する発現プラスミドによりＣＨＯ－Ｋ１細胞をトランスフェクションすることにより得た。トランスフェクション後、細胞を、５００μg/mL Ｇ４１８（Life Technologies）を含有する増殖培地中で希釈した。クローンを増殖させた後、細胞を剥がし、ＭＥＭ－７５（Abcam）又は１３Ｅ４（Life Technologies）及び、ヒトもしくはカニクイザルＴｆＲのためのＰＥラベル二次抗体で染色した。高度に蛍光した細胞を、９６ウェルプレートのウェル内で、単一細胞としてソーティングした（FACS Aria）。７日の増殖後、再度、クローンを、ＴｆＲ発現について確認した。最も発現しているクローンを、細胞ＥＬＩＳＡ実験に選択した。

【０４４１】

簡潔に、３８４ウェルプレートのウェル当たりに、１５，０００個の細胞を播種し、３７℃、５％ CO_2において１８時間インキュベーションした。上清を、自動洗浄器（BIOTEK）を使用して除去した。抗体含有上清　３０μL、続けて、増殖培地　２４μLを、各ウェルに加えた。２時間のインキュベーション後に、ウェルを空にし、ＰＢＳ中の０．０５％ グルタルアルデヒド　３０μLを、ＲＴにおいて４５分間加えた。ＰＢＳ／０．０２５％ Ｔｗｅｅｎ２０（ＰＢＳＴ）による３回の洗浄後、ブロッキングバッファー中に１：５０００で希釈した、抗ウサギＨＲＰ又は抗マウスＨＲＰ（Southern Biotech）　３０μL

を加えた。プレートを、ＲＴで１時間インキュベーションした。ウェルを、ＰＢＳＴで６回洗浄し、シグナルを、ウェル当たりに、ＴＭＢ ３０μLを使用して生成し、吸光度を、４５０nmにおいて測定した。

【０４４２】

実施例４

抗ＴｆＲ抗体のクローニング及び発現

リコンビナントＤＮＡ技術

Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されているように、標準的な方法を使用して、ＤＮＡを操作した。分子生物学的試薬を、製造メーカーの説明書に従って使用した。

【０４４３】

遺伝子及びオリゴヌクレオチド合成

所望の遺伝子セグメントを、Geneart GmbH（Regensburg、Germany）における化学合成により調製した。合成した遺伝子フラグメントを、増殖／増幅用のE. coliプラスミド中にクローニングした。サブクローニングした遺伝子フラグメントのＤＮＡ配列を、ＤＮＡシークエンシングにより確かめた。あるいは、短い合成ＤＮＡフラグメントを、化学的に合成したオリゴヌクレオチドをアニーリングさせることにより、又は、ＰＣＲによりアッセンブリした。各オリゴヌクレオチドを、metabion GmbH（Planegg-Martinsried, Germany）により調製した。

【０４４４】

ＶドメインのＰＣＲ増幅

トータルＲＮＡを、NucleoSpin 8/96 RNAキット（Macherey&Nagel; 740709.4, 740698）を使用し、製造メーカーのプロトコールに従って、（ＲＬＴバッファー－Qiagen - Cat. No 79216に再懸濁させた）Ｂ細胞ライゼートから調製した。ＲＮＡを、ＲＮＡｓｅフリー水 ６０μLにより溶出した。ＲＮＡ ６μLを使用し、製造メーカーの説明書に従って、Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix（Invitrogen 18080-400）及びオリゴ－ｄＴ－プライマーを使用するリバーストランスクリプターゼ反応によりｃＤＮＡを生成した。全ての工程を、Hamilton ML Starシステムにおいて行った。ｃＤＮＡ ４μLを使用して、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の可変領域（ＶＨ及びＶＬ）を、最終容量 ５０μLにおいて、野生型ウサギＢ細胞の重鎖についてのプライマーであるrbHC.up及びrbHC.do、軽鎖についてのプライマーであるrbLC.up及びrbLC.doと、トランスジェニックウサギＢ細胞の軽鎖についてのBcPCR_FHLC_leader.fw及びBcPCR_huCkappa.revを使用する、AccuPrime SuperMix（Invitrogen 12344-040）により増幅させた（以下の表を参照のこと）。全てのフォワードプライマーは、（ＶＨ及びＶＬそれぞれの）シグナルペプチドに特異的であった。一方、リバースプライマーは、（ＶＨ及びＶＬそれぞれの）定常領域に特異的であった。RbVH＋RbVLについてのＰＣＲ条件は、下記の通りとした。９４℃で５分の高温開始；９４℃で２０秒 ３５サイクル、７０℃で２０秒、６８℃で４５秒、及び６８℃で７分での最後の伸長。HuVLについてのＰＣＲ条件は、下記の通りとした。９４℃５分の高温開始；９４℃で２０秒 ４０サイクル、５２℃で２０秒、６８℃で４５秒、及び６８℃で７分での最後の伸長。

【表７】

rbHC.up （配列番号：１０３）	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC
rbHCf.do （配列番号：１０４）	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
rbLC.up （配列番号：１０５）	AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC
rbLC.do （配列番号：１０６）	CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC
BcPCR_FHLC_leader.fw （配列番号：１０７）	ATGGACATGAGGGTCCCCGC
BcPCR_huCkappa.rev （配列番号：１０８）	GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

【０４４５】

ＰＣＲ溶液　５０μLの内の８μLを、48 E-ゲル　２％（Invitrogen G8008-02）にロードした。陽性のＰＣＲ反応を、NucleoSpin Extract IIキット（Macherey&Nagel; 740609250）を使用し、製造メーカーのプロトコールに従って洗浄し、溶出バッファー　５０μL中に溶出した。全ての洗浄工程を、Hamilton ML Starletシステムで行った。

【０４４６】

ウサギモノクローナル二価抗体のリコンビナント発現

ウサギモノクローナル二価抗体のリコンビナント発現のために、ＶＨ又はＶＬをコードするＰＣＲ産物を、オーバーハングクローニング法（RS Haun et al., BioTechniques (1992) 13, 515-518；MZ Li et al., Nature Methods (2007) 4, 251-256）により、発現ベクター内にｃＤＮＡとしてクローニングした。発現ベクターは、イントロンＡを含む５’ＣＭＶプロモータと、３’ＢＧＨポリアデニル化配列とからなる発現カセットを含有した。同発現カセットに加えて、プラスミドは、E. coli中でのプラスミド増幅のための、ｐＵＣ１８由来の複製起点と、アンピシリン抵抗性を付与するベーターラクタマーゼ遺伝子とを含有した。基礎プラスミドの３つの変異体を使用した。１つのプラスミドは、ＶＨ領域を受け入れるように設計されたウサギＩｇＧ定常領域を含有する。一方、２つの更なるプラスミドは、ＶＬ領域を受け入れるウサギ又はヒトカッパＬＣ定常領域を含有する。

【０４４７】

カッパ又はガンマ定常領域とＶＬ／ＶＨインサートとをコードする直線化発現プラスミドを、オーバーラッププライマーを使用するＰＣＲにより増幅させた。

【０４４８】

精製したＰＣＲ産物を、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼと共にインキュベーションして、一本鎖オーバーハングを生成した。この反応を、ｄＣＴＰの添加により停止させた。

【０４４９】

次の工程において、プラスミド及びインサートを組み合わせ、ｒｅｃＡと共にインキュベーションして、部位特異的組換えを誘引した。組換えたプラスミドを、E. coli内にトランスフォーメーションした。翌日、増殖したコロニーを選択し、プラスミド調製、切断解析、及びＤＮＡシークエンシングにより、正しく組み換えられたプラスミドについて試験した。

【０４５０】

抗体発現について、単離したＨＣ及びＬＣプラスミドを、ＨＥＫ２９３細胞内に一過性トランスフェクションした。上清を、１週間後収集した。

【０４５１】

ウサギモノクローナル一価抗体の発現用のベクター生成

モノクローナル一価抗体として選択した候補のリコンビナント発現のために、全てのＶＨ鎖のウサギ定常領域を、ＣＨ３セグメント中にノブ突然変異を封入するヒト定常領域に変換した。ウサギ野生型Ｂ細胞由来のＶＬ鎖のために、ウサギＣカッパ定常領域を、ヒトに変換した。選択した候補のｃＤＮＡ ４μLを使用して、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の可変領域を、最終容量 ５０μLにおいて、シグナルペプチドに特異的なフォワードプライマーと、（３’端における）（ＶＨ及びＶＬそれぞれの）ヒト定常領域に相同なオーバーラップ配列（２０bp）を有するＣＤＲ３－Ｊ領域に特異的なリバースプライマーとを使用する、AccuPrime SuperMix（Invitrogen 12344-040）により増幅させた。ＶＨ及びＶＬ鎖の増幅のためのＰＣＲ条件は、下記の通りとした。９４℃で５分の高温開始；９４℃で２０秒 ３５サイクル、６８℃で２０秒、６８℃で４５秒、及び６８℃で７分での最後の伸長。

【０４５２】

ＶＨ又はＶＬをコードするＰＣＲ産物を、オーバーハングクローニング法（RS Haun et al., BioTechniques (1992) 13, 515-518；MZ Li et al., Nature Methods (2007) 4, 251-256）により、発現ベクター内にｃＤＮＡとしてクローニングした。発現ベクターは、イントロンＡを含む５’ＣＭＶプロモータと、３’ＢＧＨポリアデニル化配列とからなる発現カセットを含有した。同発現カセットに加えて、プラスミドは、E. coli中でのプラスミド増幅のための、ｐＵＣ１８由来の複製起点と、アンピシリン抵抗性を付与するベーターラクタマーゼ遺伝子とを含有した。基礎プラスミドの２つの変異体を使用した。１つのプラスミドは、新たに増幅したＶＨ鎖を受け入れるように設計されたヒトＩｇＧ定常領域を含有する。第２プラスミドは、ＶＬ鎖を受け入れるヒトカッパＬＣ定常領域を含有する。

【０４５３】

カッパ又はガンマ定常領域とＶＬ／ＶＨインサートとをコードする直線化発現プラスミドを、オーバーラッププライマーを使用するＰＣＲにより増幅させた。

【０４５４】

精製したＰＣＲ産物を、Ｔ４ ＤＮＡポリメラーゼと共にインキュベーションして、一本鎖オーバーハングを生成した。この反応を、ｄＣＴＰの添加により停止させた。

【０４５５】

次の工程において、プラスミド及びインサートを組み合わせ、ｒｅｃＡと共にインキュベーションして、部位特異的組換えを誘引した。組換えたプラスミドを、E. coli内にトランスフォーメーションした。翌日、増殖したコロニーを選択し、プラスミド調製、切断解析、及びＤＮＡシークエンシングにより、正しく組み換えられたプラスミドについて試験した。

【０４５６】

実施例５

一価の抗ＴｆＲ抗体の一過性発現

抗体を、Ｆ１７培地（Invitrogen Corp.）中で培養した、一過性にトランスフェクションしたＨＥＫ２９３細胞（ヒト胚性腎臓細胞系統２９３由来）中で、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて生成した。トランスフェクションのために、「293-Free」トランスフェクション試薬（Novagen）を使用した。上記されている抗体及び抗体ベースの改変分子を、個々の発現プラスミドから発現させた。トランスフェクションを、製造メーカーの説明書において特定されたように行った。リコンビナントタンパク質含有細胞の培養上清を、トランスフェクション後３～７日で収集した。上清を、精製まで低温（例えば、－８０℃）において保存した。

【０４５７】

例えば、ＨＥＫ２９３細胞中でのヒト免疫グロブリンのリコンビナント発現に関する一般的な情報は、Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203に提供されている。

【０４５８】
実施例６
高スループットでの片腕トランスフェリンレセプター抗体の精製
９６ディープウェルプレート中の片腕抗体を含有する洗浄上清 ５０mLを、MabSelectSuReカラム ２００μLにロードした。ｐＨ７．４でのＰＢＳによる洗浄工程後に、タンパク質を、Tecan/Atollシステムを使用して、２．５mM ＨＣｌで溶出して、溶出液 ０．５mLを得た。溶出液を、2M トリス ｐＨ８により中和した。精製したタンパク質を、Nanodrop分光計を使用して定量し、変性及び還元条件下におけるＣＥ－ＳＤＳ及び分析的ＳＥＣにより分析した。高純度（９５％超）のタンパク質を得るために、大部分の抗体は、サイズ排除クロマトグラフィーにおいて更に精製して、半抗体（ｈａｌｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ）、ノブ－ノブ抗体、及びより高度の凝集体から分離しなければならない。次に、サンプル ５００μLを、１４０mM ＮａＣｌ ｐＨ６．０を含有する２０mM ヒスチジン中で、Dionex UltiMate 3000を使用するSuperdex200 10/300GLに注入した。この方法は、１日当たりに２５～３０個のサンプルを画分することができるため、片腕フォーマットでの大量のスクリーニングヒットを洗練することができる。画分をプールし、上記されたように再度分析した。
【０４５９】
実施例７
経細胞輸送アッセイ法のためのｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞培養
ｈＣＭＥＣ／Ｄ３のための培地及びサプリメント（Weksler, B. B. et al., FASEB J. 19 (2005), 1872-1874）を、Lonzaから得た。ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞（２６～２９回の継代）を、２．５％ ＦＢＳ、添加した成長因子の１／４を含有し、添加したヒドロコルチゾン、ゲンタマイシン、及びアスコルビン酸で完全に補完されたＥＢＭ２培地中で、コラーゲンコートしたカバーガラス（顕微鏡）又はフラスコにおいて、コンフルエントに培養した。
【０４６０】
全ての経細胞輸送アッセイ法について、高密度の孔（1×10^{8}個の孔/cm^2）のＰＥＴ膜フィルタインサート（０．４μm、直径１２mm）を、１２ウェルの細胞培養プレートにおいて使用した。最適な培地容量を、頂端側及び基底側チャンバそれぞれについて、４００μL及び１６００μLと算出した。フィルタインサートの頂端側チャンバを、ラットの尾のコラーゲンＩ（７．５μg/cm^2）、続けて、フィブロネクチン（５μg/cm^2）でコートした。各インキュベーションを、ＲＴで１時間継続した。ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞を、ＥＭＢ２培地中で、コンフルエントな単層（約2×10^{5}個／cm^2）に、１０～１２日間増殖させた。
【０４６１】
実施例８
一価抗体の経細胞輸送アッセイ法
アッセイ法全体を、実施例１に記載されているのと別の方法で再構成した血清フリーＥＢＭ２培地中で行った。細胞を含むフィルタインサートを、一価抗体（濃度：２．６７μg/mL）と共に、頂端側において、３７℃で１時間インキュベーションした。続けて、頂端側及び基底側全体の培地を収集した。これらの値から、傍細胞フラックスを算出した。単層を、血清フリー培地中で、頂端側（４００μL）及び基底側（１６００μL）において、ＲＴで３回×３～５分間それぞれ洗浄した。全ての洗浄液を収集して、結合していない抗体の除去効率をモニターした。予め温めた培地を、頂端側チャンバに加え、フィルタを、（１％ ＢＳＡを含有するＰＢＳで一晩ブロッキングした）予め温めた培地 １６００μLを含有する、新たな１２ウェルプレートに移した。この時点で、特異的抗体取込みを決定するために、フィルタ上の細胞を、ＲＩＰＡバッファー ５００μL中で溶解させた。残ったフィルタを、３７℃でインキュベーションし、サンプルを、種々の時点で収集して、抗体の頂端側及び／又は基底側での放出を決定した。サンプル中の抗体含量を、非常に高感度のＩｇＧ ＥＬＩＳＡを使用して定量した（実施例３を参照のこと）。各時点において

、データを、３つのフィルタ細胞培養物から生成した。

【０４６２】

実施例９

経細胞輸送アッセイ法後の高感度ＩｇＧ　ＥＬＩＳＡ

手順全体を、洗浄工程用の自動洗浄機を使用してＲＴで行った。３８４ウェルプレートを、ＰＢＳ中の１μg/mL Ｆｃγ－特異的な抗ヒト／マウスＩｇＧにより、３０μL/ウェルで２時間コートし、続けて、ヒト及びマウスＩｇＧアッセイ法それぞれのために、１％ ＢＳＡ又は１％ ＣｒｏｔｅｉｎＣを含有するブロッキングバッファーであるＰＢＳ中で、１時間インキュベーションした。経細胞輸送アッセイ法からの段階希釈したサンプルと、経細胞輸送アッセイ法に使用される標準的な濃度の抗体とを、プレートに加え、２時間インキュベーションした。４回の洗浄後、ブロッキングバッファー中の５０ng/mL 抗ヒト／マウス－Ｆ（ａｂ）２－ビオチンを、３０μL/ウェルで加え、更に2時間インキュベーションした。６回洗浄した後、５０ng/mL（ｈｕＩｇＧアッセイ法）又は１００ng/mL（ｍＩｇＧアッセイ法） ポリ－ＨＲＰ４０－ストレプトアビジン（Fitzgerald；１％ ＢＳＡ及び０．０５％ Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳ中）を、３０μL/ウェルで加え、３０分間インキュベーションした。４回の洗浄後、免疫複合体を、ＢＭ化学発光基質（Roche）を３０μL/ウェルで加えることにより検出した。発光シグナルを、発光プレートリーダを使用して測定し、濃度を、適合する検量線を使用して算出した。アッセイ法の感度を、１０pg/mL～１０ng/mLの範囲とした。

【０４６３】

実施例１０

ｈＴｆＲ変異体をトランスフェクションされた、ＣＨＯ細胞の細胞ＥＬＩＳＡによるエピトープマッピング

ヒトトランスフェリンレセプター（ｈＴｆＲ）上のエピトープ領域を決定可能にするために、ヒトとマウスとのＴｆＲ間のかなりの相同性（７７％同一性）にも関わらず、両オルソログ間の良好な交差反応性を示す、細胞外部分に対する抗体が公知でないという論理的根拠に従って、突然変異を、表面露出アミノ酸のクラスターが整列させたマウスＴｆＲ配列（以下の表を参照のこと）中とは異なるアミノ酸を有する位置において、ｈＴｆＲ配列内に導入した。対応する突然変異を有するプラスミドのクローニングは上記されている。ヒトＴｆＲバインダーのそれらのエピトープへの結合性をマッピングするために、ＣＨＯ－Ｋ１細胞を、記載されているプラスミドにより、一過性にトランスフェクションした。抗体結合性を、細胞ＥＬＩＳＡで測定した。簡潔に、通常の増殖培地（ＲＰＭＩ／１０％ ＦＣＳ）中での実験の前日に、９６ウェルプレートのウェル当たりに、10^4個の細胞を播種した。別の日に、培地を、OPTI-MEM血清低減培地（Gibco）に変更し、OPTI-MEM １２００μL、１２μg プラスミドＤＮＡ、及びXtremeGENEトランスフェクション試薬（Roche） １２μLの混合物 １０μLを、プレインキュベーションの３０分後に、ウェルに加えた。細胞を、３７℃／７．５％ CO_2で２日間インキュベーションした。ついで、培地を除去し、ＴｆＲ抗体を、１nM～１００nMの濃度で増殖培地中に加え、続けて、４℃で２時間インキュベーションした。その後、抗体溶液を、ＰＢＳ中の０．０５％ グルタルアルデヒドにより置き換えた。細胞を、ＲＴで１５分間固定し、ついで、ＰＢＳで２回洗浄し、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＦｃ二次抗体（BioRad；ＥＬＩＳＡブロッキング試薬（Roche）中に１：２０００）と共に、ＲＴで１．５時間インキュベーションした。シグナルを、ＰＢＳで３回洗浄した後、ウェル当たりにＴＭＢ ５０μLを使用して生成し、吸光度を、４５０nmで測定した。

【表８】

プラスミド＃	hTfR中の突然変異
10188	-
18909	Thr518Asp/Gln520Lys/Phe521Ser/Gln524Arg
18910	Arg325Gln
18911	Ser355Ala/Asp356Arg/Lys358Asn/Thr359Ile
18912	Asp204Gln/Lys205Ser/Arg208Asn
18913	Lys574Gly/Glu575Ala/Ile577Thr/Glu578Gln
18914	Ala196Ile/Gln197Gly/Asn198Gln/Ser199Asn/Val200Met/Ile201Val/Ile202Thr/Val203Ile/Asp204Val/Lys205Gln/Asn206Ser/Gly207Asn/Arg208Gly/Leu209Asn/Val210Leu/Tyr211Asp/Leu212Pro
18974	Asp245Glu/Tyr247Ser/Thr248Tyr/Pro249Ser

【０４６４】

実施例１１

ヒトＴｆＲ－抗体相互作用についての表面プラズモン共鳴系結合アッセイ法

結合性実験を、抗ヒトＦａｂ抗体（GE Healthcare, cat.no 28-9583-25）で予め処理したＣ１センサーチップ（GE Healthcare, cat.no. BR1005-35）を備える、BIAcore B 4000（GE Healthcare）において、標準的なアミノカップリング化学法を使用して、供給元のマニュアに従って行った。

【０４６５】

反応速度測定のために、サンプル抗体を、リン酸緩衝生理食塩水ｐＨ７．４、０．０５％ Ｔｗｅｅｎ２０中で、２５℃において、接触時間６０秒及び流速１０μL/分を適用して固定した。リコンビナントＨｉｓ６タグ付きヒトトランスフェリンレセプター（R&D systems, cat.no 2474-TR-050）を、濃度を増大させて加え、シグナルを経時的にモニターした。流速３０μL/分での１５０秒の会合時間及び６００秒の解離時間の平均期間を記録した。データを、１：１結合モデル（ラングミュア等温線）を使用して当て嵌めた。

【０４６６】

実施例１２

マウス及びウサギ抗トランスフェリンレセプター抗体のＶＨ及びＶＬドメインのヒト化

非ヒト抗トランスフェリンレセプター抗体を、下記のようにヒト化した。カッパ軽鎖を有するＩｇＧ１クラスの非ヒト抗トランスフェリンレセプター抗体のＶＨ及びＶＬドメインを含むコード配列及びアミノ酸配列の特徴決定に基づいて、対応するヒト化抗トランスフェリンレセプター抗体を、クローン２９９についてのヒト生殖系フレームワークＶＨ４＿３及びＶＫ１＿１０の組み合わせに基づくバックワード／フォワード変異をＣＤＲグラフト化することにより生成した。

【０４６７】

実施例１３

ヒト／カニクイザルＴｆＲレセプター親和性を決定するための方法

この実施例において、解離挙動の比較についての、ヒトトランスフェリンレセプター親和性を決定するための方法を概説する。

【０４６８】

全ての分析について、GE HealthcareからのBiotin CAPtureキット（Instruction 28-9242-34 AB）を使用した。まず、チップを、BIAcore T200機器に接続することにより再水和した。その後、このチップを、ランニングバッファーで一晩待機させた。表面調製について、Biotin CAPture試薬を、ランニングバッファー（１×ＰＢＳ、０．２５M ＮａＣｌを添加）中において、１：１００で希釈した。この溶液を、フローセル１～４に、流速２μL/分で３６０秒間注入した。次に、センサ表面を、Biotin CAPtureキットに備え付けの再生溶液の１分間注入３回で準備した。これを、接続手順の間もしくは初回の間又は保存後

に行う必要がある。１００nM ヒト又はカニクイザルそれぞれのモノビオチン化トランスフェリンレセプター溶液を、フローセル２に、流速１０μL/分で３０秒間注入する必要がある。親和性決定について、６つの濃度（５００、２５０、１２５、６２．５、３１．２５、１５．６２５、及び０nM）での注入を適用した。これらを、「ｈｕ－ＴｆＲフローセル（例えば、上記概説において調製されたフローセル２）」に、流速１０μL/分での注入時間１８０秒（会合）で注入した。６００秒の解離期後、表面を、製造メーカーの説明書に従って、BiotinCAPtureキットに備え付けの再生溶液により再生した。次のサイクルを行った。

【０４６９】

反応速度データを、BIAcore T200評価ソフトウェアを使用して評価した。特に、種々のヒトトランスフェリンレセプターバインダーの解離速度定数を、１：１ラングミュア結合モデルの適用後に考慮した。

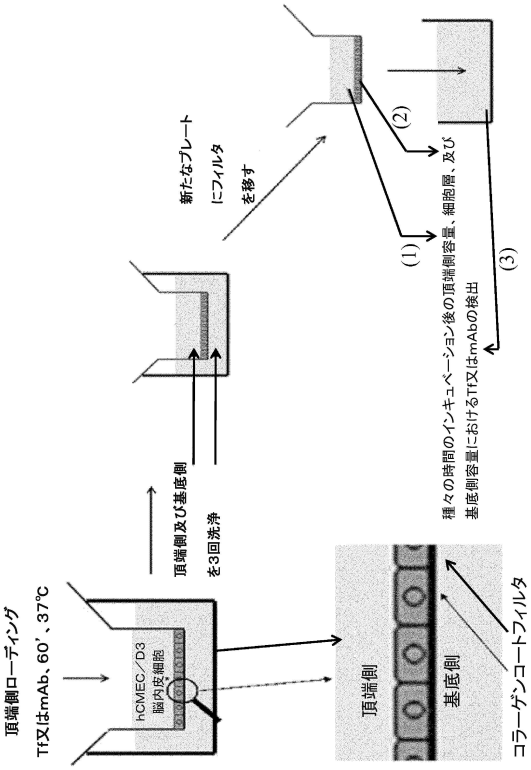
【０４７０】

実施例１４

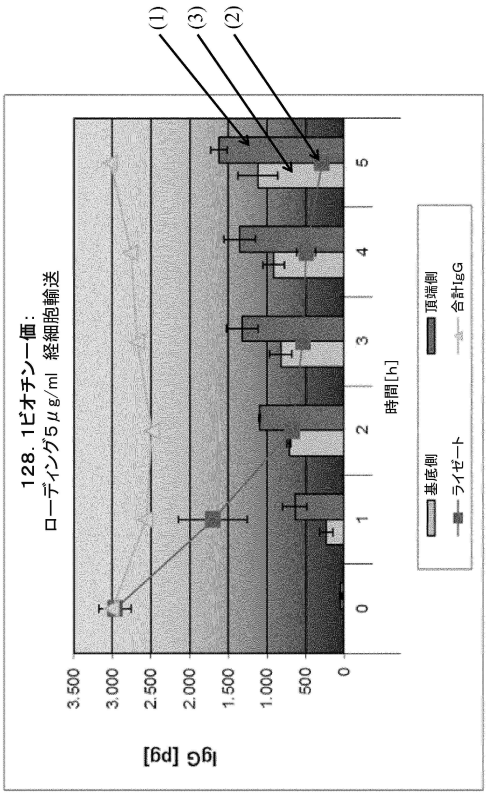
ヒト／カニクイザルトランスフェリンレセプター解離のＢ４０００相対順位付け

ＣＡＰセンサーチップ（Biotin CAPtureキットに備え付け、シリーズＳ　#28-9202-34 GE）を、製造メーカーの説明書に従って、BIAcore B4000システムに搭載し、正規化し、流体力学法においてアドレスした。初回のサイクルにおいて、ＣＡＰ試薬（該キットに備え付け）を、スポット１、２、４、及び５に対して、流速１０μL/分で３００秒間アドレスした。ヒトトランスフェリンレセプターの捕捉を、スポット１（ヒトトランスフェリンレセプター－ビオチン化）及びスポット５（カニクイザルトランスフェリンレセプター－ビオチン化）において、流速１０μL/分及び接触時間３０秒で行った。レセプターを、ランニングバッファー（１×ＰＢＳ　#28995084, GE Healthcare、０．２５M ＮａＣｌを添加）で、濃度５０nMに希釈した。抗体を、全てのフローセルに、濃度系列１００nM、５０nM、２５nM、及び０nMにおいて、流速３０μL/分で１８０秒間注入した。解離時間を、３００秒に設定した。ＣＡＰチップからの複合体全体の再生を、Biotin CAPtureキットに備え付けの再生溶液を利用して行った（流速１０μL/分で１２０秒）。活性なタンパク質濃度を調整するために、２回目のサイクルを、スポット５において、ビオチン化プロテインＡ（#P2165-2MG, Sigma）を利用して、流速１０μL/分及び接触時間３０秒で行った。スポット１を、この対照サイクルでは、空のままとした。抗体及び再生を、サイクル１と同様に取り扱った。関連する反応速度データを、BIAcore B4000評価ソフトウェアを使用して算出した。ヒトトランスフェリンレセプターからの解離を、１：１解離フィットを適用して決定した。

【図１－１】


頂端側ローディング
Tf又はmAb、60’、37℃
hCMEC／D3
脳内皮細胞
頂端側及び基底側
を3回洗浄
新たなプレート
にフィルタ
を移す
頂端側
基底側
コラーゲンコートフィルタ
(1)
(2)
(3)
種々の時間のインキュベーション後の頂端側容量、細胞層、及び
基底側容量におけるTf又はmAbの検出

【図１－２】


128．1ビオチン一価：
ローディング5μg/ml 経細胞輸送
IgG [pg]
時間[h]
基底側
頂端側
ライゼート
合計IgG
(1)
(3)
(2)

【図２】

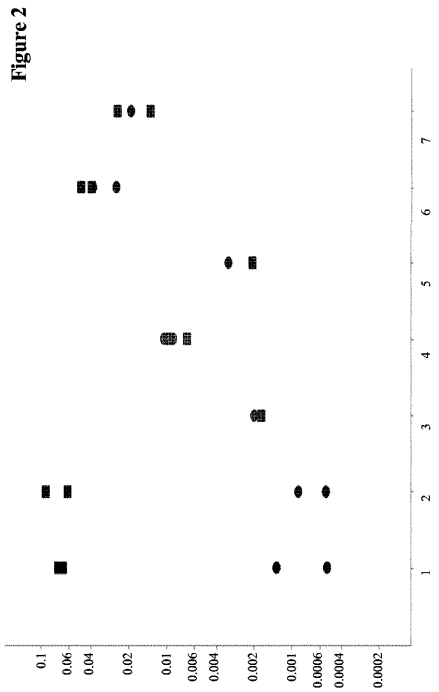


Figure 2

【図３】

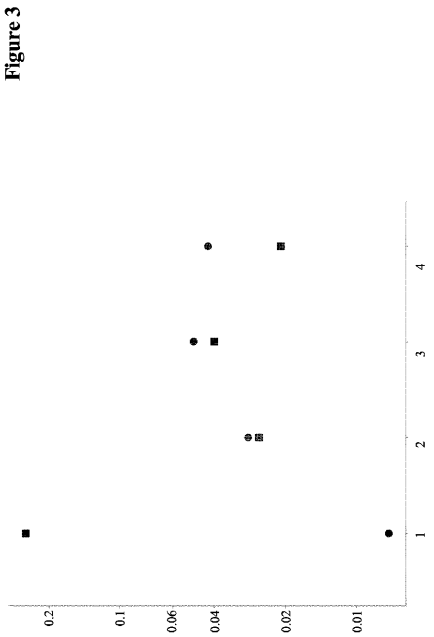


Figure 3

【配列表】
0006691144000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
A61P 27/02		***(2006.01)***	A61P	27/02	
A61P 25/08		***(2006.01)***	A61P	25/08	
A61P 31/12		***(2006.01)***	A61P	31/12	
A61P 31/00		***(2006.01)***	A61P	31/00	
A61P 9/10		***(2006.01)***	A61P	9/10	
A61P 29/00		***(2006.01)***	A61P	29/00	
A61P 25/14		***(2006.01)***	A61P	25/14	
A61P 3/00		***(2006.01)***	A61P	3/00	
A61K 39/395		***(2006.01)***	A61K	39/395	D
A61K 47/68		***(2017.01)***	A61K	39/395	N
A61P 43/00		***(2006.01)***	A61K	47/68	
C12N 15/13		*(2006.01)*	A61P	43/00	111
			C12N	15/13	ZNA

前置審査

(72)発明者　ゲプフェルト，ウルリヒ
ドイツ国、８２３７７　ペンツベルク、ラインドル　１０ベー
(72)発明者　ニーヴェーナー，イェンス
ドイツ国、８１４７６　ミュンヘン、ロイテナー・シュトラーセ　２１アー
(72)発明者　シュロットハウアー，ティルマン
ドイツ国、８２３７７　ペンツベルク、ゾンマーシュトラーセ　３アー

審査官　松田　芳子

(56)参考文献　特表２０１４－５００８８６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１３／１７７０６２（WO，Ａ１）
国際公開第９３／０１０８１９（WO，Ａ１）
国際公開第２０１４／１８９９７３（WO，Ａ１）
欧州特許出願公開第０２７０８５６０（ＥＰ，Ａ１）
仏国特許出願公開第０２９５３８４１（ＦＲ，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　１６／２８
Ａ６１Ｋ　３９／３９５
Ａ６１Ｋ　４７／６８
Ａ６１Ｐ　３／００
Ａ６１Ｐ　９／１０
Ａ６１Ｐ　２５／００
Ａ６１Ｐ　２５／０２
Ａ６１Ｐ　２５／０８
Ａ６１Ｐ　２５／１４
Ａ６１Ｐ　２５／２８
Ａ６１Ｐ　２７／０２
Ａ６１Ｐ　２９／００
Ａ６１Ｐ　３１／００
Ａ６１Ｐ　３１／１２

A61P 35/00
A61P 43/00
C12N 15/13
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
UniProt/GeneSeq