(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年12月5日(05.12.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/248062 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/18 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/019802

(22) 国際出願日： 2024年5月30日(30.05.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-089889 2023年5月31日(31.05.2023) JP
特願 2023-180242 2023年10月19日(19.10.2023) JP

(71) 出願人:株式会社Ｊｉｋｓａｋ Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ(**JIKSAK BIOENGINEERING, INC.**) [JP/JP]; 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町３丁目２５番１６号 ＣＹＢＥＲＮＩＣＳ ＭＥＤＩＣＡＬ ＩＮＮＯＶＡＴＩＯＮ ＢＡＳＥ－Ａ ３２２室 Kanagawa (JP).

(72) 発明者: 湯 本 法 弘 (**YUMOTO Norihiro**); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町３丁目２５番１６号 ＣＹＢＥＲＮＩＣＳ ＭＥＤＩＣＡＬ ＩＮＮＯＶＡＴＩＯＮ ＢＡＳＥ－Ａ ３２２室 株式会社Ｊｉｋｓａｋ Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (**HIRAKI & ASSOCIATES**); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目５－１ 愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2024/248062 A1

(54) **Title:** ANTI-SYNAPTOTAGMIN 2 ANTIBODY

(54) 発明の名称： 抗シナプトタグミン２抗体

(57) **Abstract:** The problem addressed by the present invention is to provide an antibody that excels at binding to the intravesicular domain of synaptotagmin 2. Provided is a synaptotagmin 2 antibody capable of efficiently targeting a desired substance toward motor neuron synapses.

(57) 要約： 本発明は、シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合する優れた抗体を提供することを課題とする。 所望の物質を運動神経細胞シナプスへと効率的に標的化することができるシナプトタグミン2抗体を提供する。

明　細　書

発明の名称 ： 抗シナプトタグミン２抗体

技術分野

[0001]　本発明は、シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合するモノクローナル抗体に関する。本発明の抗体は、運動神経細胞への生理活性物質及び／又は標識物質送達のための標的化剤、及びそれを含む医薬組成物として使用することができる。

背景技術

[0002]　神経は、中枢神経及び末梢神経から構成され、種々の情動、筋肉及び内臓等諸臓器の機能等を調節する。このような神経機能は、神経の損傷、疾患、及び老化等によって低下する場合があり、かかる場合、心身の健康が害され、社会生活を営む上で甚大な影響を受けることとなり得る。したがって、神経機能を維持及び改善することは、クオリティ・オブ・ライフ（QOL）の維持及び改善に直結するため、極めて重大な課題といえる。

[0003]　中枢神経及び末梢神経は、それぞれ神経細胞から構成され、これらの細胞はシナプスを介して相互にシグナルを交換する。シナプスは、神経細胞の軸索終末（シナプス前部）と、別の神経細胞の樹状突起又は骨格筋や臓器等の細胞（シナプス後部）との間に形成される間隙を含む接合部であり、シナプス前部から放出される化学物質がシナプス後部に存在する受容体に結合することでシグナルを伝達する。シナプス形成は、シナプス前部及び後部に発現する特異的な膜タンパク質の相互作用が引き金となって起こる。

[0004]　近年、シナプス形成を促進することにより神経機能を維持及び改善することが可能な化合物やペプチドが開発されている。特許文献１には、特定のペプチドが、皮質ニューロン初代培養細胞（PCN）において樹状突起伸長促進作用及びシナプス形成促進作用を有すること、そのようなペプチドを軽度認知障害又は初期認知症の治療に用いることが記載されている。そして、特許文献２には、アミロイド前駆体タンパク（APP）がβセクレターゼによって切断

されることにより生成するC末端フラグメントβ（CTFβ）が、シナプス形成を促進すること、CTFβを神経変性疾患の治療等に用いることが記載されている。

[0005] さらに、特許文献３には、LRRTM分子又はその分子を含む融合タンパク質をその表面に固定化させたマイクロビーズを用いた、シナプス前部を有する運動神経細胞の培養方法が記載されている。このように、薬剤の運動神経細胞の機能への影響をin vitroにおいて簡便にスクリーニング可能な技術が開発されていることにより、今後、運動神経細胞に作用可能な化合物や薬剤候補が数多く提供されることが予想される。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２０１２－０９２０４８号公報

特許文献2：特開２００８－１４３８６７号公報

特許文献3：ＷＯ２０２１／００６０７５

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明者らは、運動神経細胞のシナプス小胞に存在する膜タンパク質に結合可能な抗体を利用した、標的の運動神経細胞への薬剤の制御された輸送を可能にする方法を開発した（WO 2023/210585）。この方法によれば、上記のような化合物や薬剤を運動神経細胞に作用させることができる。しかしながら、これまでこのような利用方法が想定されていなかったことから、このような膜タンパク質に結合可能な優れた抗体は存在しなかった。

[0008] したがって、本発明は、運動神経細胞のシナプス小胞に存在する膜タンパク質に結合可能な優れたモノクローナル抗体の提供、及びそれを用いた運動神経細胞への物質の標的化手段及び標的化部位の可視化手段を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、シナプトタグミン2の小胞内ドメイン（N末端部分）に結合する優れたモノクローナル抗体を取得することに成功し、この抗体を用いることにより運動神経細胞シナプスに所望の物質を効率的に標的化可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] 本発明は、これらの知見に基づいてなされたものであり、以下を提供する。

［１］シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合可能な抗体であって、配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるHCDR1、配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるHCDR2、及び配列番号５に示されるアミノ酸配列からなるHCDR3を含む重鎖可変領域、及び配列番号６に示されるアミノ酸配列からなるLCDR1、配列番号７に示されるアミノ酸配列からなるLCDR2、及び配列番号８に示されるアミノ酸配列からなるLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、前記抗体。

［２］以下の（ａ）～（ｃ）のいずれかから選択される、［１］に記載の抗体：（ａ）前記重鎖可変領域が、配列番号１又は１７に対して90％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、前記軽鎖可変領域が、配列番号２又は１８に対して90％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる抗体；（ｂ）前記重鎖可変領域が、配列番号１又は１７において1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、前記軽鎖可変領域が配列番号２又は１８において1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなる抗体；又は（ｃ）前記重鎖可変領域が配列番号１又は１７に示されるアミノ酸配列からなり、前記軽鎖可変領域が配列番号２又は１８に示されるアミノ酸配列からなる抗体。

［３］［１］又は［２］に記載の抗体と、標識物質及び／又は生理活性物質とのコンジュゲート。

［４］［１］又は［２］に記載の抗体をコードする塩基配列を有する核酸分子。

［５］［４］に記載の核酸分子を含む細胞。

［６］［１］又は［２］に記載の抗体を含む、運動神経細胞への標的化剤。

［７］標識物質及び／又は生理活性物質をさらに含む、［６］に記載の標的化剤。

［８］前記抗体と、前記標識物質及び／又は前記生理活性物質とのコンジュゲートを含む、［７］に記載の標的化剤。

［９］前記標識物質が蛍光分子である、［７］又は［８］に記載の標的化剤。

［１０］運動神経細胞可視化剤である、前記標識物質を含む［７］～［９］のいずれかに記載の標的化剤。

［１１］前記生理活性物質が、シナプス形成促進剤、シナプス維持剤、筋肉増強剤及び神経細胞機能改変剤からなる群から選択される一以上である、［７］～［１０］のいずれかに記載の標的化剤。

［１２］エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる、［６］～［１１］のいずれかに記載の標的化剤。

［１３］［７］～［１２］のいずれかに記載の標的化剤を含む医薬組成物。

［１４］［７］～［１２］のいずれかに記載の標的化剤及び／又は［１３］に記載の医薬組成物を運動神経細胞に接触させる工程、及び前記標的化剤及び／又は前記医薬組成物を前記運動神経細胞のシナプスに送達する工程を含む、運動神経細胞への前記標識物質及び／又は前記生理活性物質の標的化方法。

［１５］［１０］に記載の運動神経細胞可視化剤である標的化剤を運動神経細胞に接触させる工程、前記標的化剤を前記運動神経細胞のシナプスに送達する工程、及び前記標識物質のシグナルを検出する工程を含む、運動神経細胞可視化方法。

［１６］［７］～［１２］のいずれかに記載の標的化剤を運動神経細胞に接触させる工程、及び前記標的化剤を前記運動神経細胞シナプスに送達する工程を含む、状態又は疾患の予防又は治療方法。

［１７］前記状態又は疾患が神経機能の低下を呈する状態若しくは疾患である、［１６］に記載の予防又は治療方法。

［１８］前記状態又は疾患が神経疾患及び神経筋疾患である、［１６］又は［１７］に記載の予防又は治療方法。

［１９］前記標的化剤が、前記抗体と前記生理活性物質とのコンジュゲートを含む、［１６］～［１８］のいずれかに記載の予防又は治療方法。

［２０］シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合可能な抗体の、前記抗体及び生理活性物質を含む医薬の製造における使用であって、前記抗体が、配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるHCDR1、配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるHCDR2、及び配列番号５に示されるアミノ酸配列からなるHCDR3を含む重鎖可変領域、及び配列番号６に示されるアミノ酸配列からなるLCDR1、配列番号７に示されるアミノ酸配列からなるLCDR2、及び配列番号８に示されるアミノ酸配列からなるLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、前記使用。

［２１］シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合可能な抗体を含む、運動神経細胞への標的化用組成物であって、前記抗体が、配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるHCDR1、配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるHCDR2、及び配列番号５に示されるアミノ酸配列からなるHCDR3を含む重鎖可変領域、及び配列番号６に示されるアミノ酸配列からなるLCDR1、配列番号７に示されるアミノ酸配列からなるLCDR2、及び配列番号８に示されるアミノ酸配列からなるLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、前記組成物。

［２２］状態又は疾患の予防又は治療方法において使用するための、シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合可能な抗体であって、配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるHCDR1、配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるHCDR2、及び配列番号５に示されるアミノ酸配列からなるHCDR3を含む重鎖可変領域、及び配列番号６に示されるアミノ酸配列からなるLCDR1、配列番号７に示されるアミノ酸配列からなるLCDR2、及び配列番号８に示されるアミノ酸配列からなるLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、前記抗体。

［２３］運動神経細胞への標識物質及び／又は生理活性物質の標的化方法に

おいて使用するための、シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合可能な抗体であって、配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるHCDR1、配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるHCDR2、及び配列番号５に示されるアミノ酸配列からなるHCDR3を含む重鎖可変領域、及び配列番号６に示されるアミノ酸配列からなるLCDR1、配列番号７に示されるアミノ酸配列からなるLCDR2、及び配列番号８に示されるアミノ酸配列からなるLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、前記抗体。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2023-089889号及び日本国特許出願番号2023-180242号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0011] 本発明により、所望の物質を運動神経細胞へと標的化することができるモノクローナル抗体が提供される。物質が生理活性物質又は治療剤である場合、運動神経細胞の異常による状態及び／又は疾患を処置することができる。また、物質が標識物質である場合、運動神経細胞を可視化することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、LRRTM2ビーズを用いたシナプス前部の誘導及び抗体の送達の実験手順を模式的に示す図である。ニューロスフィアをプレートに播種すると、ニューロスフィアから神経軸索が伸長する。続いて、そこにLRRTM2ビーズを播種することにより、伸長した神経軸索からLRRTM2ビーズ表面にシナプス前部が誘導される。このようにシナプス前部が誘導されたプレートに、正常ウサギIgG抗体（対照）又は抗シナプトタグミン2 小胞内ドメイン（N末端）抗体（抗SYT2 N末端抗体（ポリクローナル抗体又は本発明のモノクローナル抗体））を導入し、神経細胞を活動させることにより、抗SYT2 N末端抗体がシナプス前部に標的化されるか否かを調べた。

[図2]図２は、正常ウサギ抗体とモノメチルアウリスタチンE（MMAE）のコンジュゲートを導入した対照抗体群における蛍光画像を示す図である。図中で示される蛍光シグナルはβIIIチューブリン（Tuj1）に基づくシグナルである

。図Ａ中、黒破線円はニューロスフィアの位置を示す。図Ｂ及びＣは図Ａ中の白色枠の領域の拡大画像を示す図である。図Ａ中、スケールバーは1mmを示し、図Ｂ及びＣ中、スケールバーは100μmを示す。

[図3]図３は、抗シナプトタグミン2 小胞内ドメイン（N末端）ポリクローナル抗体（ポリクローナル抗SYT2 N末端抗体）とMMAEのコンジュゲートを導入したSYT2抗体群における蛍光画像を示す図である。図中で示される蛍光シグナルはTuj1に基づくシグナルである。図Ｂ及びＣは図Ａ中の白色枠の領域の拡大画像を示す図である。図Ａ中、スケールバーは1mmを示し、図Ｂ及びＣ中、スケールバーは100μmを示す。

[図4]図４は、MMAEに基づく薬理効果を定量したグラフを示す図である。図中、相対軸索量は、対照の正常ウサギ抗体とMMAEのコンジュゲートを使用した場合の結果（図中、「Cont. IgG-MMAE」）を100％として標準化した値である。図中、破線は相対軸索量が100％の位置を示し、「MMAE」はMMAEを単独で導入した単独導入群、「α-SYT2 IgG-MMAE」はポリクローナル抗SYT2 N末端抗体とMMAEのコンジュゲートを導入したSYT2抗体群の結果を示す。図中、エラーバーは標準誤差を示し、「＊」は$p<0.05$を示し、「＊＊＊」は$p<0.001$を示す。

[図5]図５は、MMAEに基づく薬理効果を定量したグラフを示す図である。図中、相対軸索量は、ポリクローナル抗SYT2 N末端抗体とMMAEのコンジュゲートを使用した場合の結果（図中、「Polyclonal Ab」）を100％として標準化した値である。図中、破線は相対軸索量が100％の位置を示し、「Monoclonal Ab」は抗シナプトタグミン2 小胞内ドメイン（N末端）モノクローナル抗体（第１の抗体）とMMAEのコンジュゲートを導入したSYT2抗体群の結果を示す。図中、エラーバーは標準誤差を示し、「＊＊」は$p<0.01$を示す。

[図6]図６は、100ng/mLの第１の抗SYT2抗体を用いた場合のシナプトタグミン2への結合親和性をELISA法にて定量したグラフを示す図である。図中、相対抗体量は、ポリクローナル抗SYT2 N末端抗体を使用した場合の結果（図中、「Polyclonal Ab」）を1.0として標準化した値である。図中、破線は相対抗

体量が1.0の位置を示し、「Monoclonal Ab」は第１の抗体を使用した場合の結果を示す。図中、エラーバーは標準偏差を示し、「＊＊＊＊」はp<0.0001を示す。

[図7]図７は、500ng/mLの第１の抗SYT2抗体を用いた場合のシナプトタグミン2への結合親和性をELISA法にて定量したグラフを示す図である。図中、相対抗体量は、ポリクローナル抗SYT2 N末端抗体を使用した場合の結果（図中、「Polyclonal Ab」）を1.0として標準化した値である。図中、破線は相対抗体量が1.0の位置を示し、「Monoclonal Ab」は第１の抗体を使用した場合の結果を示す。図中、エラーバーは標準偏差を示し、「＊＊＊＊」はp<0.0001を示す。

[図8]図８は、MMAEに基づく薬理効果を定量したグラフを示す図である。図中、相対軸索量は、ポリクローナル抗SYT2 N末端抗体とMMAEのコンジュゲートを使用した場合の結果（図中、「Polyclonal Ab」）を100％として標準化した値である。図中、破線は相対軸索量が100％の位置を示し、「Monoclonal Ab」は抗シナプトタグミン2 小胞内ドメイン（N末端）モノクローナル抗体（第２の抗体）とMMAEのコンジュゲートを導入したSYT2抗体群の結果を示す。図中、エラーバーは標準誤差を示し、「＊」はp<0.05を示す。

[図9]図９は、100ng/mLの第２の抗SYT2抗体を用いた場合のシナプトタグミン2への結合親和性をELISA法にて定量したグラフを示す図である。図中、相対抗体量は、ポリクローナル抗SYT2 N末端抗体を使用した場合の結果（図中、「Polyclonal Ab」）を1.0として標準化した値である。図中、破線は相対抗体量が1.0の位置を示し、「Monoclonal Ab」は第２の抗体を使用した場合の結果を示す。図中、エラーバーは標準偏差を示し、「＊＊」はp<0.01を示す。

[図10]図１０は、500ng/mLの第２の抗SYT2抗体を用いた場合のシナプトタグミン2への結合親和性をELISA法にて定量したグラフを示す図である。図中、相対抗体量は、ポリクローナル抗SYT2 N末端抗体を使用した場合の結果（図中、「Polyclonal Ab」）を1.0として標準化した値である。図中、破線は相

対抗体量が1.0の位置を示し、「Monoclonal Ab」は第２の抗体を使用した場合の結果を示す。図中、エラーバーは標準偏差を示し、「＊＊＊」はp<0.001を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、シナプトタグミン2の小胞内ドメイン（N末端部分）に結合可能であり、目的の物質の運動神経細胞への標的化に使用可能なモノクローナル抗体（「本発明の抗体」と称する）を提供する。

[0014] ＜シナプトタグミン2＞

本明細書において、「シナプトタグミン2」とは、シナプトタグミンファミリーに属する膜タンパク質の1つを指す。シナプトタグミンファミリーには、哺乳動物では17種類のタンパク質が属するが、そのうち、シナプトタグミン2は、末梢神経において、神経筋接合部のシナプス前部のシナプス小胞膜上に主に発現しており、カルシウムイオン依存的にシナプス小胞と細胞膜との融合を促進するタンパク質である（例えば、Rickman, Colin, et al., Journal of Biological Chemistry 279.13 (2004): 12574-12579.、 Stephanie Bauche, et al., Neurol Genet. 2020 Dec 3;6(6):e534. doi: 10.1212を参照）。シナプトタグミン2は一回膜貫通型タンパク質であり、小胞内ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインをN末端から順に含む。C末端側の細胞質ドメインはカルシウムイオン結合能を有するタンデムC2ドメインを有し、この細胞質ドメインが膜の融合に関する機能を主に担っていることが知られている。

[0015] シナプトタグミン2の小胞内ドメインは、シナプス小胞の内腔に露出している。細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇に伴ってシナプス小胞と細胞膜とが融合すると、シナプス小胞の内腔が細胞外空間とつながる結果、シナプトタグミン2の小胞内ドメインが細胞外に一時的に露出する。その後、シナプトタグミン2を含む細胞膜部分はシナプス小胞膜としてエンドサイトーシスにより細胞内に回収され、シナプス小胞として再利用される。この際にシナプトタグミン2の小胞内ドメインは、再びシナプス小胞内腔に露出する。

[0016] 具体的には、例示的なヒトシナプトタグミン2は、アミノ酸配列が配列番号９で表される419アミノ酸からなるタンパク質である。各ドメインの位置は、例えば、配列番号９においては、小胞内ドメインは1位～62位のアミノ酸配列で示される領域、膜貫通ドメインは63位～83位のアミノ酸配列で示される領域、及び細胞質ドメインは84位～419位のアミノ酸配列で示される領域である。

[0017] 例示的なマウスシナプトタグミン2は、アミノ酸配列が配列番号１０で表される422アミノ酸からなるタンパク質である。各ドメインの位置は、配列番号１０においては、小胞内ドメインは1位～60位のアミノ酸配列で示される領域、膜貫通ドメインは61位～87位のアミノ酸配列で示される領域、及び細胞質ドメインは88位～422位のアミノ酸配列で示される領域である。

[0018] 他の生物のシナプトタグミン2の配列情報は、NCBIデータベース等の公知のデータベースより容易に取得することができる。

[0019] 本明細書において、「シナプトタグミン2の小胞内ドメイン」とは、シナプトタグミン2のN末端部分に存在する小胞内ドメインの全部又は一部を指す。小胞内ドメインの全部としては、例えば、配列番号９における1位～62位のアミノ酸配列（配列番号１１）及び／又は配列番号１０における1位～60位のアミノ酸配列（配列番号１２）で示される領域が含まれる。また、小胞内ドメインの一部としては、例えば、配列番号１１及び／又は１２における任意の長さの部分配列で示される領域が含まれる。

[0020] なお、抗体の取得の際に使用する抗原ペプチドとしては、最終的に小胞内ドメインに結合可能な抗体を取得可能であれば、小胞内ドメイン又はその一部のアミノ酸配列に追加で他のアミノ酸を含むペプチドを使用することができる。そのように使用可能な抗原ペプチドとしては、例えば、配列番号１３～１５で示されるアミノ酸配列を有するペプチド等が挙げられる。

[0021] ＜本発明の抗体＞

本発明の抗体は、シナプトタグミン2の小胞内ドメイン（N末端部分）を特異的に認識して結合し得るモノクローナル抗体（「本発明の抗体」と称する

）である。本発明の抗体は、シナプトタグミン2の小胞内ドメインには結合するが、好ましくは、シナプトタグミンファミリーに属する他の膜タンパク質（例えば、シナプトタグミン1）の小胞内ドメインには結合しない。また、本発明の抗体は、ヒトシナプトタグミン2及び／又はマウスシナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合し、好ましくは、その他の動物由来のシナプトタグミン2の小胞内ドメインには結合しない。

[0022] なお、本明細書において、「結合する」及び「特異的に結合する」とは、特に限定するものではないが、抗原と抗体との結合が10^{-8}M以下、好ましくは10^{-9}M以下、より好ましくは10^{-10}M以下（5×10^{-11}M以下、3×10^{-11}M以下等）のKD値の結合親和性を有するものであることを意味し得る。本発明の抗体は、シナプトタグミン2の小胞内ドメインに対して上記の結合親和性を有する。本発明の抗体は、他のタンパク質を含む他の抗原（例えば、シナプトタグミン1等のシナプトタグミンファミリーに属する他の膜タンパク質の小胞内ドメイン等）等に対しては上記の結合親和性を有さないことが好ましい。または、結合親和性は、結合速度定数が大きいことによって判断してもよい。この場合の結合速度定数の具体的な値は特に限定しないが、例えば、10^{3}/Ms以上、10^{4}/Ms以上、10^{5}/Ms以上（2×10^{5}/Ms以上、2.5×10^{5}/Ms以上等）であればよい。あるいは、結合親和性は、解離速度定数が小さいことによって判断してもよい。この場合の解離速度定数の具体的な値は特に限定しないが、例えば、10^{-3}/s以下、10^{-4}/s以下（5×10^{-5}/s以下、2×10^{-5}/s以下、1.5×10^{-5}/s以下等）、10^{-5}/s以下（8×10^{-6}/s以下、7.5×10^{-6}/s以下等）であればよい。結合親和性、結合速度定数及び解離速度定数の測定方法としては、例えば、表面プラズモン共鳴法の他、バイオレイヤー干渉法等が挙げられ、例えば、バイオレイヤー干渉法を好適に使用することができる。

[0023] あるいはまた、本明細書において「標的物質に特異的に結合する」とは、標的物質、例えばシナプトタグミン2の小胞内ドメインに対する結合が、例えば過剰量の標的物質を使用し、一般的な結合アッセイで検出して、標的物質以外の物質に対する結合と比較して2倍以上、3倍以上、4倍以上である場合を

意味し得る。また、上記したように蛍光標識によって結合を検出する場合に、S/N比が2以上、3以上、4以上である場合を意味し得る。

[0024] 本発明の抗体は、マウス、ウサギ、ヤギ等の非ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれであっても良いが、ヒトにおける状態・疾患の治療に使用する場合、特に限定するものではないが、ヒト化抗体又はヒト抗体であることが好ましい。したがって、本発明において好適に使用することができる抗体は、ヒト抗体のフレームワーク領域（FR）と、シナプトタグミン2の小胞内ドメインに対して高い結合親和性をもたらし得る相補性決定領域（CDR）とを含む抗体であり得る。

[0025] 本発明の抗体は、IgG抗体分子、又はその抗原結合性断片及び抗原結合性誘導体であり得る。例えば、抗体は、完全抗体、Fab、Fab'、$F(ab')_2$断片、また重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）をリンカーで連結した一本鎖抗体（scFv）断片、scFv-Fc、$sc(Fv)_2$、Fv、ダイアボディー等であり得る。

[0026] scFv、scFv-Fc、及び$sc(Fv)_2$はリンカーで可変領域を連結した合成ポリペプチドである。リンカーとしては、当分野で通常使用されるものであればいずれでも良く、特に限定するものではないが、例えば5～25個、好ましくは10～20個のアミノ酸残基からなるペプチドリンカー、例えばGSリンカー等を好適に使用することができる。

[0027] 本発明の抗体にはさらに、抗原結合性に影響しない範囲で当業者に理解され得る誘導体、例えば抗体精製を容易にしたり安定性を高めたりするための修飾が施された誘導体、及び抗がん剤等の薬物と結合させた複合体も含まれる。本明細書においては、シナプトタグミン2の小胞内ドメインとの結合性を保持する断片及び誘導体を、文脈に矛盾のない限り、便宜的に「抗体」に含めることが意図される。

[0028] 本発明の抗体はまた、二量体、三量体、四量体等の多量体として合成することもできる。さらに、本発明の抗体は、シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合する第1の特異性と、他の抗原に対して結合する第2の特異性とを有する二重特異性抗体であっても良い。第2の特異性は、例えば標的細胞が発現

し得る別の抗原に対するものであっても、送達目的の生理活性物質及び／又は標識物質に対するものであっても良く、目的に応じて適宜選択することができる。第2の特異性が、標的細胞、つまり運動神経細胞が発現し得る別の抗原に対するものである場合、二重特異性抗体の使用によって、標的細胞への送達がより特異的にもたらされる。また、第2の特異性が、生理活性物質及び／又は標識物質に対するものである場合、それらの物質を、二重特異性抗体と共に投与することにより、複合体として標的部位に送達することができる。

[0029] 当業者であれば、本明細書の記載、及び当分野における技術常識に基づいて、本発明の抗体を用途に応じた適切な形態のものとして取得することができる。

[0030] 特に限定するものではないが、本発明のシナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合する抗体の例として、以下の抗体を挙げることができる。

[0031] 配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるHCDR1、配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるHCDR2、及び配列番号５に示されるアミノ酸配列からなるHCDR3を含む重鎖可変領域、及び

配列番号６に示されるアミノ酸配列からなるLCDR1、配列番号７に示されるアミノ酸配列からなるLCDR2、及び配列番号８に示されるアミノ酸配列からなるLCDR3を含む軽鎖可変領域

を含む、抗体。

[0032] この場合、本発明の他の領域のアミノ酸配列（例えば、FRのアミノ酸配列、定常領域のアミノ酸配列）は特に限定しない。抗体の結合特性は、基本的には重鎖及び軽鎖のCDRによって決定される。したがって、本発明の抗体においてアミノ酸配列が改変されてもよいが、その改変は、結合特性に与える影響が少ないという観点から、フレームワーク領域又は定常領域内にあることが好ましい。また、改変は、抗体の立体構造を大きく変更しないものであることが好ましい。

[0033] また、本発明のシナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合する抗体として

、以下の抗体が挙げられる：

（ａ）上述のHCDR1～3及びLCDR1～3を有し、重鎖可変領域が、配列番号１又は１７に対して90％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域が、配列番号２又は１８に対して90％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる抗体。

[0034] 本明細書において（アミノ酸配列の）「配列同一性」とは、比較する2つのポリペプチドのアミノ酸配列において、アミノ酸残基の一致数が最大となるように、必要に応じて一方又は双方に適宜ギャップを挿入して整列化（アラインメント）したときに、全アミノ酸残基数における一致アミノ酸残基数の割合（％）をいう。配列同一性は当分野で周知の手法及びソフトウェアを用いて算出することができる。

[0035] ここで、本発明の抗体におけるアミノ酸配列の配列同一性は90％以上であれば特に限定しない。例えば、重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号１又は１７に対して90％以上、91％以上、92％以上、93％以上、94％以上、95％以上、96％以上、97％以上、98％以上、又は99％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。また、本発明の抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、例えば、配列番号２又は１８に対して90％以上、91％以上、92％以上、93％以上、94％以上、95％以上、96％以上、97％以上、98％以上、又は99％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

[0036] また、本発明のシナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合する抗体として、以下の抗体が挙げられる：

（ｂ）上述のHCDR1～3及びLCDR1～3を有し、重鎖可変領域が、配列番号１又は１７において1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域が配列番号２又は１８において1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなる抗体。

[0037] ここで、「数個」とは、5個以下、例えば2個以上、3個以上、4個以上又は5個であり得る。したがって、本発明の抗体は、上記（ｂ）の抗体における重

鎖可変領域及び／若しくは軽鎖可変領域でそれぞれ5個以下（例えば、2～3個）のアミノ酸の改変を有し得る。ある抗体と機能的に同等な抗体の調製は、例えば部位特異的変異誘発法等の当分野で周知の手法によって行うことができる。

[0038] 本明細書において「アミノ酸の置換」とは、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸間の置換をいう。アミノ酸の置換は、特に限定するものではないが、保存的置換であり得る。保存的置換とは、電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質の類似する保存的アミノ酸群内での置換を指す。例えば、低極性側鎖を有する無電荷極性アミノ酸群（Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Cys, Tyr）、分枝鎖アミノ酸群（Leu, Val, Ile）、中性アミノ酸群（Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro）、親水性側鎖を有する中性アミノ酸群（Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys）、酸性アミノ酸群（Asp, Glu）、塩基性アミノ酸群（Arg, Lys, His）、芳香族アミノ酸群（Phe, Tyr, Trp）内での置換が挙げられる。

[0039] 重鎖可変領域にアミノ酸置換等（アミノ酸の付加、欠失及び／又は置換）を有する場合、その位置は特に限定しない。例えば、重鎖可変領域のフレームワーク領域（VHFR）1（配列番号１又は１７の第1位～第30位）、VHFR2（配列番号１又は１７の第36位～第49位）、VHFR3（配列番号１又は１７の第67位～第98位）、VHFR4（配列番号１又は１７の第108位～第118位）のいずれにおいて置換等を有してもよい。例えば、少なくともVHFR1及び／又はVHFR4に置換等を有してもよく、少なくともVHFR2及び／又はVHFR3に置換等を有さなくてもよく、1つのFRにつき最大1又は2個のアミノ酸の置換等を有してもよい。具体的には、例えば、VHFR1及び／又はVHFR4に最大1又は2個ずつのアミノ酸の置換等を有し、VHFR2及びVHFR3に置換等を有さないアミノ酸配列の重鎖可変領域を好適に使用することができる。また、例えば、重鎖可変領域は、配列番号１又は１７の第1位～第6位の範囲に1又は2以上の置換等を有するように構成されてもよく、配列番号１又は１７の第1位～第6位の範囲に置換等を有さないか、最大でも1個の置換等を有するように構成されてもよい。

[0040] 軽鎖可変領域にアミノ酸置換等を有する場合、その位置は特に限定しない。例えば、軽鎖可変領域のフレームワーク領域（VLFR）1（配列番号２又は１８の第1位～第23位）、VLFR2（配列番号２又は１８の第40位～第54位）、VLFR3（配列番号２又は１８の第62位～第93位）、VLFR4（配列番号２又は１８の第103位～第112位）のいずれにおいて置換等を有してもよい。例えば、少なくともVLFR1に置換等を有してもよく、VLFR2、VLFR3又はVLFR4の少なくともいずれか一つに置換等を有さなくてもよく、1つのFRにつき最大1又は2個のアミノ酸の置換等を有してもよい。具体的には、例えば、VLFR1に最大1、2又は3個のアミノ酸の置換等を有し、VLFR2、VLFR3及びVLFR4に置換等を有さないアミノ酸配列の軽鎖可変領域を好適に使用することができる。また、例えば、軽鎖可変領域は、配列番号２又は１８の第1位～第7位の範囲に1、2又は3以上の置換等を有するように構成されてもよく、配列番号２又は１８の第1位～第7位の範囲に置換等を有さないか、最大でも1又は2個の置換等を有するように構成されてもよい。

[0041] また、本発明のシナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合する抗体として、以下の抗体が挙げられる：

（ｃ）重鎖可変領域が配列番号１又は１７に示されるアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域が配列番号２又は１８に示されるアミノ酸配列からなる抗体。

[0042] 生体内において、ある抗原に対する抗体が生じた後、「親和性成熟（affinity maturation）」と呼ばれるプロセスにより、初代の抗体よりも抗原に対する親和性が向上した抗体が生じることが知られている。したがって、上記の具体的に開示した抗体のアミノ酸配列に基づいて、開示した抗体と同等、又は開示した抗体よりも向上した活性を有する抗体、具体的にはシナプトタグミン2の小胞内ドメインに対する結合親和性、物質の送達のための標的化剤としての機能性が向上した抗体を取得することが可能である。これらの改変は、フレームワーク領域及び定常領域内である場合に加えて、CDR領域内においても生じ得る。

[0043] 本発明の抗体を取得する方法は、特に限定しない。例えば、抗原として特定されたシナプトタグミン2の小胞内ドメインを非ヒト哺乳動物に免疫して、公知の手法によってモノクローナル抗体として取得することができる。本発明の抗体はまた、活性が実証された本発明の抗体のアミノ酸配列情報又は該抗体をコードするポリヌクレオチドの塩基配列情報に基づいて、遺伝子工学的手法を用い、あるいは化学合成手段を用いて、合成によって取得することもできる。

[0044] 遺伝子工学的手法によって抗体を作製する場合、重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入して発現させ、組換えタンパク質として抗体を取得することができる。この場合、ポリヌクレオチドはDNAであってもRNAであっても良く、また宿主細胞への導入手段は当分野で使用されているものを適宜利用することができる。ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するためのベクターとして、ウイルスベクター、プラスミドベクター、ファージベクター等を適宜使用することができる。宿主細胞としては、例えば大腸菌等の細菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等を利用することができる。ここで、重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレオチドは、別個のベクターに導入しても、同一のベクターに連結して導入しても良い。

[0045] 例えば、本発明の抗体によれば、生理活性物質とのコンジュゲートの形態で、運動神経細胞において優れた生理活性を示すことができる。本発明の抗体の使用に基づく生理活性の改善は、例えば、事前にLRRTM分子が表面に固定されたマイクロビーズと共に共培養し、軸索の伸長及びシナプス前部の形成が誘導された運動神経細胞に対してモノメチルアウリスタチンE（MMAE）と本発明のコンジュゲートを投与することにより得られた結果を指標として確認することができる。この際、例えば、ポリクローナル抗SYT2 N末端抗体（Synaptic Systems社、カタログ番号105 223の抗体等）とMMAEのコンジュゲートを使用した場合の軸索量と本発明の抗体とのコンジュゲートを使用した場合の軸索量を比較することにより、本発明の抗体による標的化効果を確認することができる。本発明の抗体を使用した場合、例えば、軸索量がポリクロー

ナル抗体を使用した場合より減少する。例えば、統計学上有意に減少すればよいが、具体的には、平均で軸索量がポリクローナル抗体を使用した場合の90%以下、80%以下、75%以下となり得る。

[0046] ＜核酸分子＞

本発明は、本発明の抗体をコードする塩基配列を有する核酸分子も提供する。本発明の核酸分子は、本発明の抗体のいずれか一以上をコードする核酸分子であればよい。そのような核酸分子の塩基配列は特に限定しない。例えば、コドン最適化した塩基配列や、5'末端側に開始コドン（ATG）が付加された塩基配列等が挙げられる。本発明の核酸分子はDNA、RNA又はそれらの組合せであってもよく、天然ヌクレオチドの他、修飾ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド等を適宜含めることができる。

[0047] 本発明の核酸分子は、本発明の抗体をコードする核酸に加えて他の任意の構成要素を含むことができる。例えば、プロモーターをさらに含み、細胞内で本発明の抗体を発現可能な遺伝子発現ベクターとしてもよい。

[0048] 本明細書において「遺伝子発現ベクター」とは、遺伝子や遺伝子断片（以下「遺伝子等」と表記する）を発現可能な状態で含み、その遺伝子等の発現を制御できる発現単位を包含するベクターをいう。遺伝子発現ベクターは、プラスミドベクター、ウイルスベクター、ファージベクターであってもよい。例えば、遺伝子組換え操作の容易なプラスミドベクター、又は免疫細胞に容易に遺伝子を導入することできるウイルスベクターとすることができる。本発明におけるベクターには、必要に応じて、標識遺伝子（選択マーカー）、エンハンサー、ターミネーター、複製起点、及びポリAシグナル等を追加で含んでもよい。

[0049] 本明細書において「発現可能な状態」とは、プロモーターの制御下にあるプロモーター下流域に、発現すべき遺伝子等を配置していることをいう。

[0050] 具体的なベクターの種類は特に限定しない。例えば、プラスミドベクターは、例えばPromega社のpCIベクター、pSIベクター、pcDNA3ベクター等の市販の哺乳動物細胞用発現ベクターや、哺乳動物細胞と大腸菌等の細菌間とで複

製可能なシャトルベクターであってもよい。

[0051] ウイルスベクターは、例えばレトロウイルスベクター（オンコレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、及び偽型ベクターを含む）、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクター、エプスタイン－バーウイルス（EBV）ベクター、及びHSVベクター等のウイルスベクターが使用可能である。感染細胞内で自己複製しないように複製能を欠くウイルスベクターを使用してもよい。

[0052] 本明細書において「プロモーター」とは、遺伝子発現ベクターを導入した細胞において、下流（3’末端側）に配置された遺伝子等の発現を制御することのできる遺伝子発現調節領域である。プロモーターは、発現制御下にある遺伝子等を発現させる場所に基づいて、ユビキタスプロモーター（全身性プロモーター）と部位特異的プロモーターに分類することができる。ユビキタスプロモーターは、全細胞、すなわち宿主個体全体で対象とする遺伝子等（対象遺伝子等）の発現を制御するプロモーターである。また、部位特異的プロモーターは、特定の細胞又は組織でのみ対象遺伝子等の発現を制御するプロモーターである。本発明の遺伝子発現ベクターに含まれるプロモーターは、ユビキタスプロモーター又は部位特異的プロモーターのいずれであってもよいが、宿主細胞において発現を誘導できることが好ましい。

[0053] また、プロモーターは、発現の時期に基づいて構成的活性型プロモーター、発現誘導型プロモーター又は時期特異的活性型プロモーターに分類される。構成的活性型プロモーターは、細胞内で対象遺伝子等を恒常的に発現させることができる。発現誘導型プロモーターは、細胞内で対象遺伝子等の発現を任意の時期に誘導することができる。また、時期特異的活性型プロモーターは、細胞内で対象遺伝子等を発生段階の特定の時期にのみ発現誘導することができる。いずれのプロモーターも、宿主細胞内で対象遺伝子の過剰な発現をもたらし得ることから過剰発現型プロモーターと解することができる。本発明の遺伝子発現ベクターに含まれるプロモーターは、治療効果の長期持

続性を可能とする構成的活性型プロモーターであることが好ましい。

[0054] 本態様の遺伝子発現ベクターにおけるプロモーターは、本発明の抗体をコードする核酸を宿主細胞内で発現誘導できるプロモーターである。具体的には、例えば、CMVプロモーター（CMV-IEプロモーター）、SV40初期プロモーター、RSVプロモーター、EF1αプロモーター、Ubプロモーター、5’LTRプロモーター等が挙げられる。レトロウイルスベクターの場合、本発明の抗体をコードする核酸を5’LTRプロモーター下流に配置して、その遺伝子発現を誘導することができる。

[0055] ＜細胞＞

さらに、本発明は、本発明の抗体を発現可能な細胞を提供する。

本発明の宿主細胞の種類は特に限定しない。例えば、細胞が由来する生物は特に限定しないが、例えば、標的化剤において後述する脊椎動物に由来する細胞を本発明の細胞として使用することができる。また、宿主細胞の細胞種は特に限定しない。例えば、外肺葉性の細胞、中胚葉性の細胞、内胚葉性の細胞、及びこれらの組合せであってもよい。例えば、上皮組織、結合組織、軟骨組織、骨組織、血液組織（リンパ組織を含む）、筋組織、神経組織、又はこれらの組合せの細胞であってもよい。また、本発明の細胞は、分化能を有さない細胞であっても、分化能を有する細胞（例えば、複能性細胞、多能性細胞等）であってもよい。分化能を有する細胞としては、具体的には、例えば、間葉系幹細胞、造血幹細胞、種々のがん細胞株、神経幹細胞、iPS細胞及びES細胞が挙げられる。

[0056] 本発明で用いる「多能性幹細胞」とは、自己複製能を有しin vitroにおいて培養することが可能で、かつ、個体を構成する細胞に分化しうる多分化能を有する細胞をいう。具体的には、胚性幹細胞（ES細胞）、胎児の始原生殖細胞由来の多能性幹細胞（GS細胞）、体細胞由来の人工多能性幹細胞（iPS細胞）等を挙げることができるが、本方法で好ましく用いられるのはヒト由来のiPS細胞又はES細胞である。

[0057] ES細胞は、受精卵から取得することが多いが、受精卵以外、例えば、脂肪

組織、胎盤、精巣細胞から取得することもでき、いずれのES細胞も本発明の対象である。受精卵以外からES細胞を作製する方法は報告されており（例えば、ＷＯ２００３／０４６１４１）、それらの報告を適宜参照して用いることができる。

[0058] iPS細胞は、体細胞に由来する人工的な幹細胞であって、特異的な再プログラム化因子を核酸又はタンパク質の形態で体細胞に導入することにより製造することができ、ES細胞とほぼ同等の特性（例えば、分化多能性及び自己複製に基づく増殖能）を示す。再プログラム化因子に含まれる遺伝子の例としては、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-MYC、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3、Glis1、又はその組合せ等が挙げられる。iPS細胞を製造する方法については、多くの報告がなされており、これらの報告を参照し、それらを適宜変更して用いることができる。本方法で用いることができるiPS細胞は、好ましくはヒト由来のiPS細胞であり、例えば、ヒトの線維芽細胞由来のiPS細胞である。

[0059] ヒトiPS細胞を末梢神経細胞へと分化誘導する方法は、多くの報告がなされており（例えば、Chambers, Stuart M., et al., Nature biotechnology 27.3 (2009): 275.）、これらの報告を参照し、適宜変更して用いることができる。あるいは、ヒトiPS細胞から分化誘導した様々な神経細胞が市販されており、例えば、FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc.又はリプロセル（株）等から購入することができる。

[0060] 本発明の細胞は、本発明の抗体を発現可能である。好ましくは、本発明の細胞は本発明の核酸分子を含む。本発明の細胞は、本発明の核酸分子を複数コピー含むことができる。

[0061] ＜標的化剤＞

本発明はまた、シナプトタグミン2の小胞内ドメイン（N末端部分）に結合可能な本発明の抗体を含む、運動神経細胞への標的化剤（「本発明の標的化剤」と称する）に関する。

[0062] 本明細書において、「標的化剤」とは、特定の物質を標的へと送達するための薬剤を指す。本明細書においては、標的化剤を用いることにより、標識物質及び／又は生理活性物質（「所望の物質」と称する）が運動神経細胞、特に運動神経細胞シナプスに輸送される。また、シナプス及びシナプス小胞への標的化においては、エンドサイトーシスによるシナプス小胞の回収に伴って細胞内、特にシナプス小胞内に取り込まれ、細胞体へと送達される。さらに、本発明の標的化剤により、輸送された物質が細胞質中で生理活性を発揮し得る。

[0063] 例えば、本発明の標的化剤がシナプス小胞に取り込まれると共に、輸送された所望の物質がシナプス小胞膜を透過し細胞質中に移行し得る。具体的には、例えば、生理活性物質が使用された場合、標的化剤中の少なくとも1つの生理活性物質が細胞質に移行し、核内の生体物質、細胞質中の所望の生体物質又は細胞質膜上の生体物質に作用することができる。生理活性物質が作用する生体物質は、細胞膜上又は細胞内に存在し得る物質であれば特に限定されず、例えば、タンパク質、核酸等の高分子化合物、脂質、糖、アミノ酸、ヌクレオチド等の低分子化合物、金属イオン等のイオン又は原子等のいずれでもよい。

[0064] 具体的には、例えば、核内の生体物質としては、DNA、RNA（mRNA、siRNA、miRNA等）、転写因子、核内受容体等が挙げられ、細胞質中の生体物質としては、上記核酸の他、細胞骨格、酵素、金属イオン等が挙げられる。細胞膜上の生体物質としては、例えば、細胞膜の脂質、細胞膜上受容体、受容体と共役している酵素及び細胞接着因子等が挙げられる。

[0065] 本明細書において、「運動神経細胞」とは、中枢からの刺激を効果器である骨格筋へと伝える神経細胞群を指す。運動神経細胞は、一般には、中枢神経細胞である一次運動神経細胞及び末梢神経細胞である二次運動神経細胞を含むが、本明細書における運動神経細胞は二次運動神経細胞である。

[0066] 本明細書において、「二次運動神経細胞」とは、細胞体を脊髄前角や脳幹に有し、骨格筋との接合部まで軸索を伸ばす運動神経細胞を指す。本明細書

における運動神経細胞としては、例えば、α運動神経細胞、β運動神経細胞、及びγ運動神経細胞等が含まれる。また、脊髄の前核に細胞体を有する脊髄神経細胞の他、動眼神経、滑車神経、外転神経、顔面神経、舌下神経等の一部の脳神経も含まれる。本明細書における運動神経細胞は、通常、アセチルコリンを神経伝達物質として分泌し、コリン作動性神経細胞に分類される。しかし、アセチルコリン以外の神経伝達物質を分泌する運動神経細胞であってもよい。本明細書における運動神経細胞が投射する筋細胞は骨格筋細胞である。

[0067] 本明細書において、「骨格筋細胞」とは、骨格を動かす横紋筋を構成する細胞又はその表現型を有する細胞を指す。本明細書における骨格筋細胞は、骨に付着する筋肉細胞及び筋紡錘等の骨格筋に含まれるその他の筋肉細胞を広く含む。骨格筋の種類は特に限定しないが、例えば、横隔膜、外側広筋、内側広筋、大腿直筋、中間広筋、上腕二頭筋、前脛骨筋、後脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋、三角筋、広背筋、胸鎖乳突筋、肋間筋、眼筋、顔面筋、舌筋、あぶみ骨筋等が挙げられる。また、本明細書における骨格筋細胞は、人工の幹細胞（iPS細胞及びES細胞等）及び／又は天然の幹細胞（間葉系幹細胞及び骨格筋幹細胞等）からin vitroで分化させた細胞等の培養骨格筋細胞も含む。

[0068] 本明細書において、細胞は、脊椎動物に由来する細胞であり得る。脊椎動物には、魚類、爬虫類、両生類、鳥類及び哺乳類が含まれる。具体的な哺乳類としては、例えば、霊長類（例えば、ヒト）が挙げられる。また細胞は、家畜（ニワトリ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ等）、愛玩動物（熱帯魚、トカゲ、イヌ、ネコ、ウサギ等）、実験動物（カエル、マウス、ラット、サル等）に由来する細胞であり得る。細胞は1種類の組織、個体、及び動物種に由来する必要はなく、複数種類の細胞の混合物であってもよい。また、細胞が由来する組織及び個体の健康状態は特に限定しない。

[0069] 本発明の標的化剤によれば、所望の物質を運動神経細胞シナプスを介して運動神経細胞（例えば、運動神経細胞の軸索終末、軸索、軸索小丘、細胞体

、樹状突起等）に標的化することができる。

[0070] 本明細書において、「シナプス」とは、神経細胞の軸索終末と、別の神経細胞の樹状突起（中枢神経系の場合）又は骨格筋、臓器等の細胞（末梢神経系の場合）との間に形成される、間隙を含む接合部を指す。

[0071] 本明細書において、シナプスは、化学的シナプス、例えば、興奮性シナプス、抑制性シナプス等であり得る。本明細書において、シナプスは、神経細胞と別の神経細胞との間に形成されるシナプス（例えば、神経細胞の軸索と別の神経細胞の樹状突起との間に形成されるシナプス）、又は神経細胞と他種細胞（筋細胞等）との間に形成されるシナプスであってもよいが、好ましくは、神経細胞のシナプス前部と骨格筋細胞上のシナプス後部により形成されるシナプス（「神経筋接合部」とも称される）である。

[0072] 本明細書において、「シナプス前部」とは、シナプスにおいて神経細胞の軸索終末に形成される膨大した部分を指し、「シナプス後部」とは、別の神経細胞の樹状突起又は骨格筋、臓器等の他の細胞におけるシナプス前部に面する部分を指す。また、「シナプス間隙」とは、シナプス前部とシナプス後部の間の空間を指す。シナプスでは、シナプス前部中に存在するシナプス小胞内に蓄積された神経伝達物質がシナプス間隙に放出され、シナプス後部に存在する受容体に結合することでシグナルが伝達される。

[0073] 本明細書において、「シナプス小胞」とは、シナプス前部の神経細胞の細胞質中に存在する分泌小胞を指す。本明細書におけるシナプス小胞には、神経伝達物質をその内部に含み、刺激に応じて細胞膜と融合して神経伝達物質をシナプス間隙に放出する小胞のみならず、神経伝達物質の放出後にエンドサイトーシス（バルクエンドサイトーシスを含む）によって神経細胞中に回収された小胞も含まれる。

[0074] 本発明の標的化剤はシナプス間隙において、細胞膜上に露出したシナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合し、エンドサイトーシスによってシナプス小胞に取り込まれ、それにより運動神経細胞の細胞体等まで送達することができる。そのため、本発明の標的化剤によれば、所望の物質（標識物質及び

／又は生理活性物質）を運動神経細胞の内部、特に運動神経細胞の細胞体へと標的化することができる。

[0075] 本発明の標的化剤は、シナプトタグミン2の小胞内ドメイン（N末端部分）に結合可能な本発明の抗体に加え、所望の物質（標識物質及び／又は生理活性物質）をさらに含み得る。

[0076] 本明細書において、「標識物質」とは、その存在を検出可能なシグナルを発する物質を指す。標識物質としては、例えば、蛍光分子、化学発光物質等の特定の条件において光を発する発光性標識物質、光音響効果プローブ等の音波を発する発音性標識物質、又は放射性標識物質等が挙げられる。蛍光分子の例としては、特に限定するものではないが、蛍光タンパク質、フルオレセイン及びその誘導体、ピレン及びその誘導体、量子ドット等の蛍光分子が挙げられる。化学発光物質としては、例えばペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリフォスファターゼ（ALP）等の酵素等が挙げられる。放射性標識物質としては、例えば^{14}C、^{3}H、^{125}I等を含む試薬が挙げられる。光音響効果とは、光吸収に伴う断熱膨張によって熱弾性波が生じる現象をいい、この熱弾性波は音響波として検出することができる。光音響効果プローブとしては、例えば、インドシアニングリーン又はその誘導体、クルクミン誘導体、又はコリン誘導体等が挙げられる。使用する抗体、標識物質及び生理活性物質の吸光特性がわかっている場合には、必ずしも光音響効果用の標識物質を使用する必要はなく、例えば、発光性標識物質を光音響効果に基づいて検出してもよい。

[0077] 本明細書において、「生理活性物質」とは、生体又は細胞に対して直接的又は間接的に生理的効果を発揮し得る物質を指す。例えば、標的の運動神経細胞に生理的効果を発揮し得る低分子化合物、ペプチドやアプタマー等の機能性中分子、並びに抗体、酵素等のタンパク質及びDNA、RNA等の核酸等の生体高分子を含む高分子化合物等が挙げられる。例えば、シナプス形成促進剤、シナプス維持剤、筋肉増強剤又は神経細胞機能改変剤等の薬剤又はプロドラッグを生理活性物質として使用することができる。

[0078] 「生理的効果」とは、タンパク質、DNA及びRNA等の生体分子における量的

及び／又は質的な変化をもたらす効果を指す。生理的効果の結果として、例えば、生体、器官、組織、細胞等の機能や性質等が変化し得る。例えば、シナプス形成の促進若しくは抑制、神経機能の低下の改善若しくは予防、又は神経細胞の過活動の改善若しくは予防等の効果が得られる。

[0079] 本発明の標的化剤が所望の物質（標識物質及び／又は生理活性物質）を含む場合、本発明の抗体と所望の物質とが共有結合により連結していない状態で（例えば、非共有結合的に連結した状態で）、又は共有結合により連結した状態で含まれる。共有結合により連結した状態で含まれる場合、シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合可能な本発明の抗体と所望の物質とはコンジュゲート（「本発明のコンジュゲート」と称する）を形成する。

[0080] 本明細書において、「コンジュゲート」とは、2以上の分子が共有結合により連結された物質を指す。特に、本発明のコンジュゲートは、本発明の抗体と所望の物質（標識物質及び／又は生理活性物質）とが連結している。

[0081] 本発明の標的化剤における抗体と所望の物質との間の共有結合及び非共有結合は、本発明の抗体と所望の物質とが連結した状態で運動神経細胞の近傍まで到達可能な結合であれば特に限定しない。

[0082] 本明細書において、「シナプス形成促進剤」とは、シナプス前部及び／又はシナプス後部の形成を促進する作用を有する薬剤を指す。シナプス形成促進には、例えば、シナプスの接合力を増強すること、例えば、（ｉ）シナプス前部及び／若しくは後部の表面積及び／若しくは体積の増加、（ｉｉ）シナプス前部に特異的に発現するタンパク質（例えば、シナプシン1又はシナプシン2等）の量、密度、集積速度、集積頻度等の増加及び／若しくは定性的な変化、（ｉｉｉ）シナプス後部に特異的に発現するタンパク質（例えば、LRRTMファミリータンパク質）の量、密度、集積速度、集積頻度等の増加及び／若しくは定性的な変化をもたらすことが含まれる。

[0083] 本明細書において、「シナプス維持剤」とは、シナプス前部及び／又はシナプス後部の退縮を抑制する又はそれを補助する作用を有する薬剤を指す。シナプス維持には、例えば、シナプスの接合力の減弱を抑制する又はそれを

補助すること、例えば、（ｉ）シナプス前部及び／若しくは後部の表面積及び／若しくは体積の減少の抑制又はその補助、（ｉｉ）シナプス前部に特異的に発現するタンパク質（例えば、シナプシン1又はシナプシン2等）の量、密度、集積速度、集積頻度等の減少及び／若しくは定性的な変化の抑制又はその補助、（ｉｉｉ）シナプス後部に特異的に発現するタンパク質（例えば、LRRTMファミリータンパク質）の量、密度、集積速度、集積頻度等の減少及び／若しくは定性的な変化の抑制又はその補助をもたらすことが含まれる。

[0084] 本明細書において、「筋肉増強剤」とは、筋肉の増強若しくは減弱の抑制をもたらす作用又はそれを促進する作用を有する薬剤を指す。筋肉の増強の種類は、筋肉の機能が強化される限り特に限定しないが、例えば、筋肉の表面積及び／若しくは体積の増加、筋束、筋線維、筋原線維、筋節、筋細胞等の筋肉を構成する各要素の数、密度等の増加及び／若しくは定性的な変化、並びに／又は筋肉を構成する細胞中の特定のタンパク質の発現量の変化をもたらす作用、筋量及び／若しくは筋力（例えば骨格筋の筋量若しくは筋力）を増加させる作用、又はこれらの作用により筋肉の減弱の抑制をもたらす作用等が挙げられる。

[0085] 具体的なシナプス形成促進剤、シナプス維持剤及び筋肉増強剤としては、限定するものではないが、例えば、本発明者らが見出した、特開２０２２－０５３５３５において開示される化合物（例えば、チアミン及びその誘導体）、特開２０２３－０２８８４８において開示される化合物（例えば、アトロピン、ブスルファン、クロモカルブ、プロカインアミド、ウデナフィル、プロピフェナゾン及びそれらの誘導体）等が挙げられる。

[0086] 本明細書において、「神経細胞機能改変剤」とは、神経細胞が発揮する機能を変化させる作用又は促進する作用を有する薬剤を指す。神経細胞の機能改変は、神経細胞の機能の程度及び／又は性質が変化する限り特に限定しないが、例えば、神経細胞の電気生理学的特性（刺激の伝導及び伝達の特性等）の変化、遺伝子発現様式の変化、並びに形態学的な特性の変化（神経突起の伸長、退縮及び分岐、並びにシナプスの形成及び退縮等）等が含まれる。

[0087] 具体的な機能改変剤としては、限定するものではないが、例えば、AP-1阻害剤（例えば、本発明者らが見出したＷＯ２０２０／１９６７２５に開示される化合物等）、FUS阻害剤、SOD1阻害剤、TDP-43阻害剤（例えば、アナカルジン酸の化合物等）、KIF1A阻害剤、その他の微小管重合阻害剤（モノメチルアウリスタチンE（MMAE）、モノメチルアウリスタチンF、アウリスタチンPE等のアウリスタチン系薬剤等を含む）等の細胞骨格改変剤等が挙げられる。

[0088] 本明細書において、「細胞骨格改変剤」とは、細胞骨格の形成、維持、分解、分岐、走行及び局在からなる群から選択される一以上を抑制及び／又は促進する薬剤を指す。本明細書における細胞骨格改変剤には、細胞骨格以外の分子に作用することにより細胞骨格の形成等を改変する薬剤も含まれる。細胞骨格には、微小管、中間径フィラメント及びアクチンフィラメントのいずれも含まれる。例えば、細胞骨格改変剤として、細胞骨格の形成、維持を抑制する薬剤、具体的には、例えば、微小管の重合阻害剤等を使用することができる。

[0089] これらの薬剤は、神経細胞に対する作用を有していればよく、運動神経細胞特異的な作用を有する必要はない。

[0090] 本発明のコンジュゲートにおいては、本発明の抗体と所望の物質（標識物質及び／又は生理活性物質）とが直接的に共有結合で連結していてもよく、それらがリンカー等を介して間接的に連結していてもよい。

[0091] 本発明の標的化剤がコンジュゲートを含まない場合、所望の物質は、本発明の抗体と結合可能な部分を有することが好ましい。具体的には、例えば、本発明の抗体に結合可能な別の抗体と共有結合により結合している所望の物質を使用することができる。この場合の「本発明の抗体に結合可能な別の抗体」の具体的な構成は、抗原が本発明の抗体であり、ポリクローナル抗体であってもよい以外は「＜本発明の抗体＞」の項における記載に準ずる。

[0092] 本発明の抗体に結合可能な部分と所望の物質との結合は、本発明の標的化剤又はコンジュゲートにおける結合に準ずる。したがって、本発明の抗体に結合可能な部分と所望の物質とは非共有結合により連結していてもよく、直

接的に共有結合で連結していてもよく、リンカー等を介して間接的に連結していてもよい。

[0093] 本発明の標的化剤が所望の物質を含む場合、所望の物質と本発明の抗体とが非共有結合的に連結しているペプチド複合体の形で、所望の物質を本発明の標的化剤に含めることができる。

[0094] 所望の物質が本発明の抗体に結合する部位は、本発明の抗体のSYT2 N末端への結合を損なわない限り特に限定しない。具体的には、例えば、高頻度可変領域（HVR）以外の部位又は定常領域に所望の物質を結合することができる。

[0095] また、本発明の標的化剤は、互いの機能を損なわない限り、所望の物質を複数含んでもよい。この場合、例えば、同じ物質を複数含んでもよく、互いに異なる物質を1つずつ又は複数含んでもよい。

[0096] 本発明において利用可能なリンカーとしては、当分野において好適に使用されるリンカーを適宜使用することができる。この場合、リンカーの構成及び鎖長は、得られるコンジュゲートの機能を損なわない範囲で適切なものを選択することができる。リンカーは、例えば、シナプスへの輸送後に切断可能なように構成されてもよい。また、リンカーは、例えば、シナプスへの輸送後に切断されないように構成されてもよい。

[0097] リンカーは、当分野で通常使用されるものであればいずれでも良く、特に限定するものではないが、例えば5～25個、好ましくは10～20個のアミノ酸残基からなるペプチドリンカー、例えばGSリンカー等を好適に使用することができる。また、例えば、酸不安定性リンカー、光不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー等の切断可能なリンカーを使用してもよい。

[0098] 本発明の標的化剤に含まれる本発明の抗体は、シナプス小胞と細胞膜の融合により一時的に細胞表面に露出したシナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合し、シナプス小胞のエンドサイトーシスに伴って、シナプトタグミン2と一緒に細胞内に送達され得る。したがって、標的化剤又はコンジュゲートは

、標的となるシナプスのシナプス小胞に所望の物質が送達されるように設計されることが好ましい。シナプス小胞に送達され得る化合物の特徴は、当技術分野において周知である。本発明の標的化剤又はコンジュゲートの粒子径は、バルクエンドサイトーシスのエンドソームの直径が90nm～160nmであることから、その平均値（又は中央値）を、例えば、160nm以下、150nm以下、140nm以下、130nm以下、120nm以下、110nm以下、100nm以下、90nm以下とすることができる。また、シナプス小胞の直径が40nm～60nmであることから、本発明のコンジュゲートの粒子径は、その平均値（又は中央値）を、例えば、60nm以下、55nm以下、50nm以下、45nm以下、40nm以下、35nm以下、30nm以下、25nm以下、23nm以下、20nm以下、18nm以下、15nm以下、14nm以下、13nm以下、12nm以下とすることができる。例えば、標的化剤が所望の物質を含まない場合は、標的化剤に所望の物質が結合した際の全体の粒子径を上述の範囲とすることができる。ただし、例えば、シナプス小胞のエンドサイトーシスを阻害する目的で、又はシナプス表面若しくはシナプス間隙に物質を送達する目的で粒子径を大きく設計してもよい。また、例えば、シナプス小胞への送達の際には既に所望の物質が分離されているように設計する場合には、分離前の粒子径を大きく設計してもよい。

[0099] 本発明のコンジュゲート又は標的化剤は、血液脳関門を通過するように構成される必要は無い。通常は、本発明のコンジュゲート又は標的化剤は、血液脳関門を通過せず、そのため、中枢神経系には作用せず、末梢に存在するシナプスにおいてのみ作用し得る。

[0100] シナプスを介した運動神経細胞への標的化作用は、例えば、生理活性物質を含む本発明のコンジュゲート又は標的化剤を脊椎動物等の対象（例えば、非ヒト哺乳動物、ヒト、その他脊椎動物）に投与し、本発明のコンジュゲート又は標的化剤による、対象の神経細胞における生理的効果を評価することにより判定することができる。生理的効果の評価は、例えば、本発明のコンジュゲート若しくは標的化剤を投与した群と投与していない群との生理的効果の程度を比較することにより、及び／又は本発明のコンジュゲート若しく

は標的化剤を投与した群と生理活性物質を単体で投与した群の生理的効果の程度を比較することにより、行うことができる。

[0101] 本発明者等は、先に、神経細胞を、LRRTM分子（LRRTM2の細胞外ドメイン等）が表面に固定されたマイクロビーズと共に共培養することにより、シナプス前部の形成を誘導することができることを見出している（ＷＯ２０２１／００６０７５）。

[0102] したがって、被験物質がシナプスを含む運動神経細胞への標的化作用を有するか否かはまた、神経細胞とマイクロビーズとの共培養により誘導されたシナプス前部に被験物質が局在するか否かを調べることにより判定することもできる。

[0103] 「LRRTM（ロイシンリッチリピート膜貫通型神経タンパク質、leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein）ファミリータンパク質」とは、LRRTMファミリーに属するタンパク質を指す。LRRTMファミリーは、シナプス後部側のシナプスオーガナイザータンパク質ファミリーの1つであり、シナプス前部の形成を誘導する活性を有する。ヒトを含む哺乳類では、LRRTMファミリータンパク質として、LRRTM1、LRRTM2、LRRTM3、及びLRRTM4の4種類が報告されている。マイクロビーズに使用されるLRRTMファミリータンパク質はそのいずれであってもよい。

[0104] ＜コンジュゲート＞

本発明は、シナプトタグミン2の小胞内ドメイン（N末端部分）に結合可能な本発明の抗体と、所望の物質（標識物質及び／又は生理活性物質）とのコンジュゲートに関する。本発明のコンジュゲートは、例えば、運動神経細胞のシナプス小胞内に取り込まれ、運動神経細胞に送達される。

[0105] ＜運動神経細胞又はそのシナプスの可視化剤＞

本発明は、運動神経細胞又はそのシナプスの可視化剤である標的化剤（「本発明の可視化剤」と称する）を提供する。

[0106] 本発明の可視化剤は、運動神経細胞又はそのシナプスを可視化する用途に使用するための、標識物質を含む標的化剤である。

[0107] 「運動神経細胞を可視化する」とは、運動神経細胞の全体又は一部分を検出可能な状態にすることを指す。運動神経細胞の一部分を可視化する場合、可視化される部分は無作為であっても、所定の部分であってもよい。例えば、所定の部分としてシナプスを可視化することができる。その場合、本発明の可視化剤をシナプス可視化剤として利用することができる。「シナプスを可視化する」とは、シナプス前部及び／又はシナプス後部を検出可能な状態にすることを指す。そのため、本発明の可視化剤には、直接目視により検出可能な標識物質の他、検出可能な任意の標識物質を使用することができる。同様に、本発明の可視化剤は、運動神経細胞の軸索終末、軸索、軸索小丘、細胞体、樹状突起等を可視化することができる。

[0108] 本発明の可視化剤は、in vivo又はin vitroにおいて使用され得る。標識物質のシグナルの検出は、運動神経細胞が生きている間に、又は運動神経細胞を固定した後に行うことができる。運動神経細胞が生きた状態での検出に適した標識物質は当技術分野において公知である。例えば、in vivoイメージングの分野において公知の蛍光物質、化学若しくは生物発光物質等の発光性物質、光音響効果プローブ等の発音性物質、放射性同位体等の放射性物質又は造影剤等が挙げられる。

[0109] 本発明の可視化剤は、任意の用途、例えば、運動神経細胞又はシナプス（神経筋接合部を含む）若しくはシナプス小胞の数、サイズ若しくは位置を可視化するため、又は外科手術若しくは診断において組織を可視化するために使用され得る。

[0110] 本発明の可視化剤は、他の試薬等、例えば、本発明の可視化剤に含まれる標識物質の検出のために必要な試薬等と共にキットの形態で提供されてもよい。

[0111] 特に、例えば、標識物質が酵素等である場合、その基質を本発明の可視化剤と共に提供することができる。

[0112] ＜組成物又は医薬組成物＞

本発明はさらに、本発明のコンジュゲート又は標的化剤を含む、組成物（

「本発明の組成物」と称する）又は医薬組成物（「本発明の医薬組成物」と称する）に関する。

[0113] 本発明の組成物又は医薬組成物は、生理活性物質を含む本発明の標的化剤を含む。本発明の組成物又は医薬組成物は、標的化剤の他に、必要に応じて、添加剤（例えば、担体（固体や液体担体等）、賦形剤、界面活性剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解補助剤、懸濁化剤、コーティング剤、着色剤、保存剤、緩衝剤、pH調整剤）等を含んでもよい。このとき、添加剤は、組成物又は医薬組成物の剤形に応じて適宜選択することができる。

[0114] 本発明の組成物又は医薬組成物は、限定するものではないが、例えば固形製剤、液体製剤、ジェル剤、エアロゾル剤等の任意の剤形に調製されたものであってよい。なお、組成物又は医薬組成物を液体製剤として用いる場合には、それを使用する直前に、例えば、生理食塩水で再構成することを意図した乾燥物として調製することもできる。

[0115] 賦形剤としては、例えば、乳糖、結晶セルロース、デンプン等が挙げられる。結合剤としては、例えば、デンプン糊、アラビアゴム糊、ヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。崩壊剤としては、例えば、デンプン、セルロース類、炭酸塩等が挙げられる。滑沢剤としては、例えば、ワックス、タルク等である。

[0116] 本発明の組成物又は医薬組成物は、シナプス形成促進剤、シナプス維持剤、筋肉増強剤又は神経細胞機能改変剤を生理活性物質として含む場合、シナプス形成を促進することにより神経機能の低下を改善又は予防することができる。したがって、本発明の組成物又は医薬組成物は、神経機能の低下、例えば、神経の損傷による神経機能の低下、老化による神経機能の低下、若しくは疾患による神経機能の低下等を改善若しくは予防するため、又は神経機能の向上のために使用することができる。

[0117] 本明細書において、「神経の損傷」とは、神経の任意の箇所での損傷を指し、体外から物理的に与えられた損傷、及び、がん、腫瘍等の体内の要因に起因する損傷を含む。

[0118] 本明細書において、「老化」とは、時間の経過と共に生物の個体に起こる種々の機能低下、形態変化、外観変化等及びその過程を指す。

[0119] 老化により生じる状態としてフレイル及びサルコペニア等が知られている。フレイルとは、加齢と共に、心身の活力（運動機能、認知機能等）が低下し、複数の慢性疾患の併存等の影響も受けつつ、生活機能に障害が生じ、心身が脆弱化した状態を意味する。心身の活力の低下としては、例えば、認知機能障害、めまい、摂食障害、嚥下障害、視力障害、うつ、貧血、難聴、せん妄、易感染性、体重減少、筋量低下等が挙げられる。慢性疾患としては、高血圧、心疾患、脳血管疾患、糖尿病、呼吸器疾患、悪性腫瘍等が挙げられる。一方、サルコペニアとは、加齢又は疾患等により骨格筋量が低下し筋力が低下した状態を意味する。老齢マウスの神経筋接合部では、シナプス解離（synaptic detachment）、シナプス後部からの部分的又は完全な軸索の離脱等の形態の変化が見られることから、加齢に伴う神経筋接合部の形態の変化がサルコペニアにおける骨格筋量の低下等に関与していると考えられている。

[0120] 本発明の組成物又は医薬組成物は、特に、フレイル又はサルコペニアを有するか、又はそれを有するリスクが高い対象において、老化による神経機能の低下を改善又は予防するために使用することができる。

[0121] 本発明において、疾患としては、例えば、神経疾患及び神経筋疾患が挙げられる。

本明細書において、「神経疾患」とは、中枢神経又は末梢神経等の神経の障害により生じた疾患を指し、例えば、以下からなる群から選択される一以上の疾患を指す：アルツハイマー病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、前頭側頭葉変性症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ハンチントン病、ジストニア、プリオン病、有棘赤血球舞踏病、副腎白質ジストロフィー、多系統萎縮症、脊髄小脳変性症、筋萎縮性側索硬化症、原発性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、脊髄性筋萎縮症、痙性対麻痺、脊髄空洞症、シャルコー・マリー・トゥース病、前頭側頭型認知症、てんかん、統合失調症、

自閉症、自閉症スペクトラム障害等。

[0122] 本明細書において、「神経筋疾患」とは、運動神経、神経筋接合部、又は筋肉細胞のいずれかの障害により生じた疾患を指し、例えば、以下からなる群から選択される一以上の疾患を指す：筋ジストロフィー、ミオパチー、先天性筋無力症候群、遺伝性周期性四肢麻痺、重症筋無力症、ランバート・イートン症候群等。

[0123] 筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、一次運動神経及び二次運動神経が選択的にかつ進行性に変性・消失する疾患であり、初期病態として神経筋接合部において骨格筋から運動神経が脱離することが知られている。したがって、骨格筋と運動神経との間のシナプスの形成を促進又は退縮の抑制をすることができるシナプス形成促進剤又はシナプス維持剤を含む本発明の組成物又は医薬組成物は、特に、筋萎縮性側索硬化症による神経機能の低下を改善又は予防するために使用することができる。

[0124] 例えば、本発明の医薬組成物は、本発明のコンジュゲート又は標的化剤を含む筋萎縮性側索硬化症治療用医薬組成物、脊髄性筋委縮症治療用医薬組成物等とすることができる。

[0125] 筋肉増強剤を含む本発明の組成物又は医薬組成物は、筋肉を増強することにより、筋力の低下を改善又は予防することができる。したがって、筋肉増強剤を含む本発明の組成物又は医薬組成物は、筋力の低下、例えば、外傷若しくは外科手術後の筋力の低下、老化による筋力の低下、疾患による筋力の低下を改善若しくは予防するため、又は筋肉機能の向上のために使用することができる。

[0126] 本明細書において、「外傷」とは、外的要因による組織又は臓器の損傷を指し、例えば、創傷、骨折、捻挫、内臓破裂、熱傷、凍傷等を含む。

[0127] 機能改変剤を含む本発明の組成物又は医薬組成物は、運動神経細胞の機能を改変することにより、神経細胞の低下又は亢進を改善又は予防することができる。したがって、機能改変剤を含む本発明の組成物又は医薬組成物は、神経細胞の過活動、例えば、疾患若しくは状態による神経細胞の過活動を改

善若しくは予防するため、又は筋肉の緊張、例えば、老化による震え、外傷若しくは疾患による筋肉の緊張を改善若しくは予防するためにも使用することができる。

[0128] 具体的には、上述の各種疾患及び状態の他、例えば、異常不随意運動（ジスキネジア）（例えば、異常頭部運動、振戦、（有痛性）痙攣、筋線維束性攣縮等）、歩行及び移動の異常（例えば、失調性歩行、歩行困難等）、その他の協調運動障害（例えば、運動失調症等）、神経系及び筋骨格系に関するその他の状態（例えば、テタニー、異常反射、姿勢異常、痙縮、筋緊張亢進、筋緊張症、深部腱反射亢進、嚥下障害等）等を改善又は予防するために使用することができる。

[0129] 本明細書において「疾患」は、対象個体における識別可能な症状や原因によって分類可能な病的状態を指し、疾病及び障害を包含する。本発明において「状態」とは、対象個体における識別可能な症状を含む病的状態のうち、疾患に該当しないものを指す。

[0130] 本発明の組成物又は医薬組成物は、本発明の標的化剤を複数含んでもよく、その他の有効成分をさらに含んでもよい。その他の有効成分は、組成物又は医薬組成物に含まれる標的化剤の機能を損なわない限り、特に限定しない。標的化剤を複数種類含む場合、シナプトタグミン2以外の膜タンパク質に結合可能な標的化剤を含んでもよい。また、例えば、シナプトタグミン2であっても、異なる部位（例えば、異なるエピトープ）に結合可能な抗体を含む標的化剤を含むことができる。これらの標的化剤に含まれる標識物質及び／又は生理活性物質は互いに異なっても同じであってもよい。

本発明の核酸分子及び／又は細胞を本発明の組成物又は医薬組成物に含めることができる。

[0131] ＜運動神経細胞又はシナプスへの標的化方法＞

本発明は、運動神経細胞又はシナプスへの標的化方法に関する。本発明によれば、シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合する本発明の抗体を運動神経細胞に接触させることにより、当該抗体を運動神経細胞内（特に運動神

経細胞のシナプス小胞内）に取り込ませ、所望の物質（標識物質及び／若しくは生理活性物質）を運動神経細胞（例えば、運動神経細胞の軸索終末、軸索、軸索小丘、細胞体、樹状突起等）に標的化することができる。このようにして、シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合する抗体が運動神経細胞又はシナプスに標的化される。当該抗体に所望の物質を直接的に又はリンカーを介して間接的に連結して本発明のコンジュゲートを製造し、これを運動神経細胞に接触させることにより、又は当該抗体と、当該抗体に結合可能な所望の物質を別々に運動神経細胞に接触させることにより、当該所望の物質を運動神経細胞内（例えば、運動神経細胞の細胞体内又はシナプス小胞内）に送達することができる。したがって、本発明によれば、運動神経細胞又はシナプスの標的化方法が提供され、本方法は、運動神経細胞等の細胞に抗体（所望の物質と連結していてもよい）を接触させることを含む。

[0132] ＜標識物質及び／又は生理活性物質の標的化方法＞

本発明は、所望の物質（標識物質及び／又は生理活性物質）の標的化方法であって、本発明のコンジュゲート又は標的化剤を運動神経細胞に接触させる工程、及び標的化剤を運動神経細胞シナプスに送達する工程を含む方法に関する。

[0133] 本発明における接触の対象は、運動神経細胞を含んでいれば特に限定されない。接触は、例えば、運動神経細胞のみを対象として行ってもよいし、運動神経細胞以外の細胞を含む組織を対象として行ってもよい。例えば、本発明の標的化剤は神経筋接合部における運動神経細胞シナプスの前部を主な標的とするため、運動神経細胞が投射する骨格筋細胞をさらに含む組織を対象としてもよい。

[0134] 本方法における運動神経細胞は、脊椎動物（非ヒト哺乳動物、ヒト、その他脊椎動物）の運動神経細胞を含み得る。本方法における運動神経細胞は、好ましくはヒト運動神経細胞を含む。以下、ヒト運動神経細胞を例として本発明を説明するが、本方法はヒト運動神経細胞に限定されるものではない。

[0135] ヒト運動神経細胞は、その由来に限らず制限なく用いることができる。例

えば、これに限定されないが、ヒトから単離した細胞の初代培養、ヒトから単離され細胞株として樹立された細胞、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導したヒト運動神経細胞を挙げることができる。ヒト運動神経細胞が由来する多能性幹細胞は、好ましくは、ヒト由来の多能性幹細胞である。

[0136] 一実施形態において、本方法は、in vitroの方法である。別の実施形態において、本方法は、ex vivoの方法である。別の実施形態において、本方法は、in vivoの方法である。本方法がin vivoの方法である場合、対象はヒトを除く哺乳動物であり得る。

[0137] 本方法がin vitroの方法である場合、本方法は、シナプス形成を誘導する工程をさらに含んでもよい。本明細書において、「シナプス形成を誘導する」とは、神経細胞の軸索においてシナプス前部の形成を引き起こすこと、及び／又は別の神経細胞の樹状突起若しくは骨格筋、臓器等の細胞においてシナプス後部の形成を引き起こすことを指す。シナプス形成の誘導は、シナプス前部を形成しようとする細胞とシナプス後部を形成しようとする細胞とを共培養することにより行うこともできる。また、シナプス形成の誘導はその他の方法、例えば、運動神経細胞とLRRTM2の細胞外ドメインで被覆されたビーズとを共培養することにより行うことができる。シナプス形成を誘導する工程は、本発明の標的化剤を運動神経細胞に接触させる工程と同時又はその前に行われ得る。

[0138] 本方法がin vitroの方法である場合、本発明の標的化剤を運動神経細胞に接触させる工程は、本発明の標的化剤を、運動神経細胞を含む試料に接触させることにより行われる。接触の方法は、試料中の運動神経細胞と標的化剤が互いに接触可能であれば特に限定しない。例えば、標的化剤を試料に直接散布、噴霧、滴下、塗布することによって、試料を標的化剤に浸漬することによって、又はその組合せによって適用することができる。また、試料が他の担体（例えば、培養培地等）中に存在する場合、標的化剤をその担体に散布、噴霧、滴下、塗布することにより適用してもよい。

[0139] 適用量は特に限定せず、運動神経細胞の数やその他の条件を勘案して適宜

設定することができる。例えば、IgG抗体の濃度で、0.01μg/mL以上、0.1μg/mL以上、0.2μg/mL以上、0.5μg/mL以上、0.7μg/mL以上、0.9μg/mL以上、1μg/mL以上、2μg/mL以上、5μg/mL以上、7μg/mL以上、9μg/mL以上、又は10μg/mL以上を適用することができる。

[0140] 本方法がin vivoの方法である場合、本発明の標的化剤を被験試料に接触させる工程は、本発明の標的化剤を対象に投与することにより行われる。

[0141] 投与方法は特に限定しないが、例えば、局所投与、経腸投与、及び非経口投与、具体的には、皮膚上投与、吸入投与、注腸投与、点眼、点耳、経鼻投与、膣内投与、経管栄養による投与、経静脈投与、経動脈投与、筋肉内投与、心臓内投与、皮下投与、骨内投与、皮内投与、くも膜下（腔）投与、腹腔内投与、膀胱内投与、経皮投与、経粘膜投与、硬膜外投与、硝子体内投与等が挙げられる。

[0142] 投与量は特に限定せず、対象の動物種やその他の条件を勘案して適宜設定することができる。例えば、IgG抗体をマウス投与する場合、体重1kgあたりの用量が0.1mg/kg以上、0.5mg/kg以上、1mg/kg以上、2mg/kg以上、4mg/kg以上、又は5mg/kg以上を適用することができる。

[0143] 本工程において使用される標的化剤は1種類である必要はない。例えば、複数種類の標的化剤を一緒に又は別々に使用することができる。具体的には、例えば、コンジュゲートを含む標的化剤と、所望の物質（標識物質及び／又は生理活性物質）を含まない標的化剤を使用することができる。また、使用する所望の物質も1種類である必要はなく、例えば、複数種類の標識物質及び／又は生理活性物質を一緒に又は別々に使用することができる。具体的には、例えば、標識物質及び生理活性物質を組み合わせて使用してもよい。

[0144] 本発明の標的化剤を運動神経細胞に接触させる工程は複数回行うことができる。本工程を複数回行う場合、それぞれにおいて使用される標的化剤及び細胞の種類、並びに適用方法及び投与方法は、毎回同じでも異なってもよい。

[0145] 運動神経細胞に本発明のコンジュゲート又は標的化剤を接触させると、本

発明の標的化剤は、シナプス小胞を介して運動神経に取り込まれる。本発明の標的化剤を運動神経細胞に接触させる際には、運動神経細胞を活動させる又はその活動を促進させることができる。運動神経細胞を活動させる又はその活動を促進させることにより、本発明のコンジュゲート又は標的化剤の運動神経細胞内への取り込み効率を向上させることができる。通常、本発明のコンジュゲート又は標的化剤がシナプス小胞に取り込まれると、そのまま逆行輸送により軸索を通じて細胞体へと送達される。

[0146] 運動神経細胞を活動させる方法は特に限定しないが、例えば、十分な時間にわたり、運動神経細胞を自発的に活動させる方法、及び人工的な刺激によって運動神経細胞を活動させる又はシナプス小胞のエンドサイトーシスを促進する方法等が挙げられる。

[0147] 自発的に活動させる方法としては、例えば、十分な時間にわたり、活動可能な環境に運動神経細胞を置くことが含まれる。運動神経細胞が活動可能な環境は、当技術分野において周知である。

[0148] 自発的に活動させる方法において運動神経細胞を活動させる時間（例えば、本発明のコンジュゲート又は標的化剤との接触時間等）は特に限定しないが、例えば、本方法がin vitroの方法である場合、1時間以上、3時間以上、6時間以上、12時間以上、18時間以上、又は24時間以上とすることができる。また、本方法がin vivoの方法である場合、例えば、1時間以上、3時間以上、6時間以上、12時間以上、18時間以上、24時間以上、36時間以上、48時間以上、60時間以上、72時間以上、100時間以上、120時間以上、150時間以上、168時間以上、200時間以上又は240時間以上とすることができる。

[0149] 人工的な刺激によって運動神経細胞を活動させる又はその活動を促進させる方法としては、例えば、十分な時間にわたり、運動神経細胞が活発に活動し得る環境に運動神経細胞を置くことが含まれる。

[0150] 本方法がin vitroの方法である場合、運動神経細胞を活動させる又はその活動を促進させる方法は、運動神経細胞に、化学的刺激及び／又は物理的刺激を与えることができる。運動神経細胞を活発に活動させるための刺激は、

当技術分野においては周知である。化学的刺激に使用される化合物としては、例えば、アミオダロン、テトラエチルアンモニウム、4-アミノピリジン、バリウム、デンドロトキシン等のカリウムイオンチャネル阻害剤、バトラコトキシン等のナトリウムチャネルアゴニスト、Bay K8644等のカルシウムチャネルアゴニスト、高濃度のカリウムイオン若しくは神経伝達物質、又はこれらの組合せ等が挙げられる。物理的刺激としては、例えば、温度変化等が挙げられる。

[0151] 化学的刺激を行う場合、化合物の添加量は特に限定しない。例えば、1μM以上、10μM以上、50μM以上、又は100μM以上の濃度で添加することができる。

[0152] 刺激の時間は特に限定せず、刺激の種類及び強度等の条件を勘案して適宜設定することができる。例えば、2分以上、3分以上、4分以上、5分以上、8分以上、9分以上、10分以上、20分以上、25分以上、30分以上、又は1時間以上にわたり刺激を与えることができる。

[0153] 本方法がin vivoの方法である場合、運動神経細胞を活動させる又はその活動を促進させる方法は、対象に活発に活動させる方法（例えば、対象に運動をさせる方法や脳活動を活発化させる方法等）や、化学物質等により運動神経細胞の活動を促進する方法等により行うことができる。運動神経の活動を促進する化合物としては、上記化学的刺激に使用される化合物が挙げられ、対象に投与することができる。上記化学的刺激に使用される化合物は、薬学的に許容される濃度又は方法で投与され得る。化合物刺激が生体毒性を発揮することがないように上記化合物を対象に投与することができるが、生体毒性が発現する場合には対象への上記化合物の投与をしなくてもよい。運動神経細胞の活動を促進した場合、通常、自然発火させる方法と比較して短時間で同程度の効果が見込まれる。

[0154] 所望の物質を含まない標的化剤を使用する場合、所望の物質と標的化剤とを一緒に又は別々に運動神経細胞に接触させることができる。その所望の物質と標的化剤とを別々に接触させる場合、所望の物質が標的化剤と結合可能

であれば、そのタイミングは特に限定しない。例えば、所望の物質の運動神経細胞との接触は、標的化剤と運動神経細胞との接触の前から、又はその後に行うことができる。

[0155] 各接触の方法は、上述の接触方法に準じて選択することができる。例えば、各接触について、同じ方法又は互いに異なる方法を使用することができる。

[0156] 本方法は、必要に応じて、標的化の成否を確認する工程をさらに含んでもよい。本方法で使用した標的化剤が生理活性物質を含む場合には、例えば、標的化剤の項において上述したように、生理的効果が見られた場合に標的化が成功したものと判断することができる。また、本方法で使用した標的化剤が標識物質を含む場合には、後述の可視化方法の標識物質のシグナルを検出する工程に準じて、シグナルが検出された場合に標的化が成功したものと判断することができる。

[0157] 本方法において使用する標的化剤として本発明の医薬組成物を使用する場合、本方法を状態若しくは疾患の予防若しくは治療方法として使用することができる。

[0158] この場合、対象において生理的効果を十分に発揮させる工程をさらに含むことができる。例えば、使用される生理活性物質が単独で効果を発揮することができる物質である場合には、生理的効果が発揮されるのに十分な時間だけ対象を栄養が十分に与えられた環境下に置くことにより効果を発揮させることができる。また、例えば、使用される生理活性物質が効果を発揮するために他の物質が必要である場合、その物質を追加で投与することができる。

[0159] この場合、本発明は、本発明の抗体及び生理活性物質を含む標的化剤を運動神経細胞に接触させる工程、及び前記標的化剤を前記運動神経細胞シナプスに送達する工程を含む、状態又は疾患の予防又は治療方法に関する。本方法によれば、医薬組成物に関して例示した各種状態又は疾患を予防又は治療することができる。本方法の接触させる工程は、好ましくは対象に標的化剤及び／又は医薬組成物を投与することを含む。

[0160] したがって、例えば、本発明の方法は、神経機能の低下、例えば、神経の損傷による神経機能の低下、老化による神経機能の低下、若しくは疾患による神経機能の低下等を改善若しくは予防するため、又は神経機能の向上のための方法である。一実施形態において、状態又は疾患は、神経機能の低下を呈する状態若しくは疾患である。一実施形態において、状態又は疾患は、神経疾患及び神経筋疾患である。一実施形態において、標的化剤は、前記抗体と前記生理活性物質とのコンジュゲートを含む。

[0161] この工程の時間は、対象の状態、生理活性物質の種類、投与量等によって適宜決定することができる。例えば、一般に生理活性物質を投与した場合に生理的効果が発揮されるまでの期間を基準に判断してもよく、生理的効果の確認を1回又は複数回行い、生理的効果が十分に発揮されるまで継続してもよい。

[0162] ＜運動神経細胞又はそのシナプスの可視化方法＞

本発明は、運動神経細胞又はシナプスの可視化方法であって、本発明の可視化剤を運動神経細胞に接触させる工程、前記可視化剤を運動神経細胞シナプスに送達する工程、及び前記標識物質のシグナルを検出する工程を含む方法に関する。

[0163] 本方法において、接触に用いる運動神経細胞は、上記の標識物質及び／又は生理活性物質の標的化方法について記載した通りのものである。

[0164] 一実施形態において、本方法は、in vitroの方法である。別の実施形態において、本方法は、ex vivoの方法である。別の実施形態において、本方法は、in vivoの方法である。本方法がin vivoの方法である場合、対象はヒトであるか、又はヒトを除く哺乳動物であり得る。

[0165] 本方法において、本発明の可視化剤を運動神経細胞に接触させる工程及び可視化剤を運動神経細胞シナプスに送達する工程は、標的化剤として可視化剤を使用すること以外は、上記の標識物質及び／又は生理活性物質の標的化方法について記載した本発明の標的化剤を運動神経細胞に接触させる工程及び標的化剤を運動神経細胞シナプスに送達する工程の通りである。

[0166] 本方法は、必要に応じて、標識物質からシグナルを発生させる工程をさらに含んでもよい。シグナルを発生させる方法は特に限定しない。シグナルを発生させる方法及びその要否は、使用する標識物質の種類等によって判断することができる。

[0167] 例えば、標識物質が蛍光分子又は放射性標識物質の場合には、可視化剤が標的の運動神経細胞シナプスに送達するのに十分な時間、つまり、可視化剤が標的の運動神経細胞シナプスに到達し、その運動神経細胞シナプスにおいて十分にシナプス小胞のエンドサイトーシスが起こるのに十分な時間待つことにより、標的においてシグナルを発生させることができる。この時間は、可視化剤を運動神経細胞シナプスに送達する工程の時間に準じて適宜選択することができる。

[0168] 例えば、標識物質が化学発光物質の場合には、可視化剤が標的の運動神経細胞シナプスに送達されるのに十分な時間待つことに加え、シグナルの発生に使用されるその基質等の物質を添加することにより行うことができる。

本工程は、後述のシグナルを検出する工程と同時又はその前に行うことができる。

[0169] 本方法は、検出用物質のシグナルを検出する工程をさらに含む。検出に使用する方法は特に限定せず、使用する標識物質の種類等の条件に応じて適宜選択することができる。

[0170] 標識物質が蛍光物質である場合、例えば、標識物質の励起波長の光を含む励起光を運動神経細胞に照射し、標識物質の蛍光波長を検出可能な検出器を用いて検出することができる。また、標識物質が化学発光物質である場合、例えば、標識物質の発光波長を検出可能な検出器を用いて検出することができる。標識物質が放射性標識物質である場合には、標識物質が発する放射線を検出可能な検出器を用いて検出することができる。

[0171] 標識物質のシグナルの検出は、運動神経細胞を含む試料における運動神経細胞（例えば、シナプス、細胞体等）の存在、位置若しくは量を検出することを含む。

[0172] 本発明の方法は、試料中の標識物質のシグナルを検出する工程に加えて、試料で検出された標識物質のシグナルを、標識物質を含む標準試料におけるシグナル、又は予め作成した基準値と比較して存在、位置又は量を判定する工程をさらに含み得る。標準試料は、特定の状態又は疾患か否かを判断するための基準となる生物試料であれば特に限定しない。具体的には、例えば、健常個体から得られたもの、試料と同じ個体から異なる回収時期に得られたもの、又は特定の状態若しくは疾患であることがわかっている個体から得られたもの等が挙げられる。標準試料は、例えば、試料と同じ生物種、個体、組織又は細胞に由来する生物試料であってもよく、他の生物種、個体、組織又は細胞に由来する生物試料であってもよい。また、基準値は、目的の状態か否かを判断するための基準となる値であれば特に限定しない。基準値は、例えば、標準試料で一般に検出されるシグナルの強度又は数等に基づいて設定することができる。

[0173] いずれの場合においても、比較の方法は特に限定しない。例えば、目視により、数値の大きさにより又は統計的手法により行うことができる。

[0174] ＜その他の発明＞

本発明は、対象に所望の物質を投与する方法を提供する。物質は、本発明の抗体と当該所望の物質とのコンジュゲートの形態である。これにより、対象の細胞、例えば運動神経細胞に前記所望の物質を送達することができる。前記所望の物質が生理活性物質である場合には、当該生理活性物質を運動神経細胞等の細胞に送達することができる。また、前記所望の物質が標識物質である場合には、当該標識物質の送達部位（例えば運動神経細胞又はそのシナプス）を観察することに用いることができる。本発明はまた、この方法に用いるための当該抗体と当該所望の物質とのコンジュゲート、又は当該コンジュゲートを含む組成物を提供する。この場合、本発明は、本発明の抗体、又は上記抗体と所望の物質（標識物質及び／若しくは生理活性物質）とのコンジュゲートを含む、運動神経細胞又はそのシナプスへの標的化用組成物に関する。

[0175] 本発明は、対象の運動神経細胞を可視化する方法であって、当該対象に本発明の抗体と標識物質とのコンジュゲートの有効量を投与することを含む方法を提供する。本発明はまた、この方法に用いるための当該抗体と当該標識物質とのコンジュゲート、又は当該コンジュゲートを含む組成物を提供する。

[0176] 本発明は、対象の運動神経細胞に生理活性物質を送達する方法であって、当該対象に本発明の抗体と当該生理活性物質とのコンジュゲートの有効量を投与することを含む方法を提供する。本発明はまた、この方法に用いるための当該抗体と当該生理活性物質とのコンジュゲート、又は当該コンジュゲートを含む組成物を提供する。

[0177] 本発明は、上記方法のいずれかにおいて使用するための、上記本発明の抗体又は上記本発明のコンジュゲートを提供する。例えば、本発明は、状態又は疾患の予防又は治療方法において使用するための、上記本発明の抗体又は上記本発明のコンジュゲートに関する。また、例えば、本発明は、運動神経細胞又はそのシナプスへの標識物質及び／又は生理活性物質の標的化方法において使用するための、上記本発明の抗体又は上記本発明のコンジュゲートに関する。

[0178] 本発明は、上記方法のいずれかに用いるための医薬の製造において使用するための、上記抗体又は上記抗体と上記物質とのコンジュゲートを提供する。

[0179] また、本発明は、上記本発明の抗体又は上記本発明のコンジュゲートの、上記抗体及び生理活性物質を含む医薬の製造における使用を提供する。

実施例

[0180] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0181] 本願と特願2023-089889とでは、実施例１～４、図１～５、表１～６、配列番号１～１６がそれぞれ同じ番号に対応する。また、本願と特願2023-180242とでは、実施例６と実施例１、実施例７と実施例２、実施例３と実施例３、

実施例８と実施例４、実施例９と実施例５がそれぞれ対応し、図１と図１、図２と図２、図３と図３、図４と図４、図８と図５、図９と図６、図１０と図７がそれぞれ対応し、表１と表１、表２と表２、表７と表３、表８と表４、表９と表５、表１０と表６がそれぞれ対応し、配列番号３～１６がそれぞれ同じ配列番号に対応し、配列番号１７と配列番号１、配列番号１８と配列番号２、配列番号１９と配列番号１７、配列番号２０と配列番号１８、配列番号２１と配列番号１９がそれぞれ対応する。

[0182] ＜実施例１：第１のモノクローナル抗体の作製＞

モノクローナル抗体は、株式会社医学生物学研究所に委託して、ファージディスプレイを用いて作製した。作製手順の概要は以下の通りである。

[0183] １．抗原ペプチドの合成

Beijing SciLight Biotechnology Ltd. Co.に委託して、免疫用抗原及びパニング用抗原として下記のペプチドを合成した。

[0184] [表1]

表１:合成された抗原ペプチド

		親タンパク質	位置	配列	配列番号
免疫用抗原ペプチド	im-hSYT2	Human SYT2	1-62	MRNIFKRNQEPIVAPATTTATMPIGPVDNSTESGGAGESQEDMFAKLKEKLFNEINKIPLPPC	13
パニング用抗原ペプチド	pan-hSYT2	Human SYT2	1-62	MRNIFKRNQEPIVAPATTTATMPIGPVDNSTESGGAGESQEDMFAKLKEKLFNEINKIPLPPK*	14
	pan-mSYT2	Mouse SYT2	1-65	MRNIFKRNQEPNVAPATTTATMPLAPVAPADNSTESTGPGESQEDMFAKLKEKFFNEINKIPLPPK*	15
	pan-hSYT1	Human SYT1	1-58	MVSESHHEALAAPPVTTVATVLPSNATEPASPGEGKEDAFSKLKEKFMNELHKIPLPPK*	16

下線:キャリアタンパク質結合用のシステイン残基

*:ビオチンに結合したリシン残基

[0185] 免疫用抗原をエルマン試薬を用いて、免疫応答を誘導するためのキャリアタンパク質に結合させた。キャリアタンパク質としてはキーホールリンペッ

トヘモシアニン（KLH）を用いた。

[0186] ２．マウスの免疫

KLH結合免疫用抗原を1.0mg/mLの抗原溶液として調製し、マウス4匹に毎週1回、計4回免疫した。免疫の完了したマウスから抗体力価確認用の血清、及びファージライブラリー作製用のリンパ節組織を回収した。

[0187] 「１．抗原ペプチドの合成」で合成された3種類のパニング用抗原ペプチドを抗原として用いたELISA法により、得られた血清の抗体力価を評価した。その結果、ヒトシナプトタグミン2のN末端ドメインに結合可能な抗体が、回収されたマウス血清中に存在することが確認された。

[0188] ３．抗体ファージライブラリーの作製

免疫したマウスから回収したリンパ節組織の細胞からTotal RNAを抽出し、逆転写してcDNAを調製した。次に、調製されたcDNAから、抗体遺伝子増幅用プライマーを使用してVH及びVL遺伝子領域を増幅した。増幅された核酸をファージミドベクターに組込み、抗体ファージミドライブラリーを作製した。作製された抗体ファージミドライブラリーを用いて大腸菌の形質転換を行い、抗体ファージライブラリー（抗体断片scFvを発現し、その表面に提示する）を作製した。

[0189] ４．パニングによる濃縮

以下の（１）～（３）に示す一連のパニング操作を3回繰り返し、標的抗原特異的な抗体の断片を発現するファージを濃縮した：

（１）抗体ファージライブラリーを除外抗原に接触させ、除外抗原に反応した抗体ファージを除去し、反応しなかった抗体ファージを回収した；

（２）回収された抗体ファージを標的抗原に接触させ、標的抗原に反応した抗体ファージを回収し、反応しなかった抗体ファージを洗浄により除去した；

（３）回収された抗体ファージを大腸菌に感染させ、培養することにより増殖させた。

各パニング操作に使用した除外抗原及び標的抗原を表２に示す。

[0190] [表2]

表 2:パニング操作に使用された抗原

	除外抗原	標的抗原
1 回目	pan-hSYT1	pan-hSYT2
2 回目	pan-hSYT1	pan-mSYT2
3 回目	HEK293T	HEK293T (hSYT2 発現)

[0191] 最後のパニング操作には、HEK293T細胞（ATCC社製；カタログ番号：#CRL-3216）とそれにヒトシナプトタグミン2の一過性発現ベクター（CMVプロモーター下で発現）を導入した細胞を使用した。

[0192] ５．抗体力価による濃縮の評価

各パニング操作において、（３）で感染された大腸菌で抗体遺伝子の発現を誘導して、「１．抗原ペプチドの合成」で合成された3種類のパニング用抗原ペプチドを抗原として用いたELISA法により、培養上清の抗体（ポリクローナルscFv）の力価を評価した。最後のパニング操作の後には、回収した96コロニーの大腸菌それぞれの培養上清を用いて抗体（ポリクローナルscFv）の力価を評価した。ヒト及びマウスのシナプトタグミン2のN末端ドメインに反応し、ヒトシナプトタグミン1のN末端ドメインには反応しないクローンとして、37クローンが選択された。

[0193] ６．scFvのアミノ酸配列の同定

選択されたクローンの抗体遺伝子の塩基配列を、アゼンタ株式会社に委託して決定し、scFvのアミノ酸配列を同定した。

[0194] ７．クローンの選抜

アミノ酸配列の配列同一性に基づくクラスター解析の結果、及びパニング操作に使用した2種類のHEK293T細胞への反応性試験の結果に基づいてIgG抗体作製用に8クローンを選抜した。

[0195] ８．ヒト化IgG抗体の作製

選抜した8つの各クローンのscFV発現ベクターからH鎖とL鎖それぞれの可変領域遺伝子領域（それぞれmVH及びmVL）をPCR法により増幅した。増幅された

VHをヒトIgG1定常領域（hCH）と共にpcDNA3.4プラスミドに挿入し（重鎖発現ベクター）、同様に、VLをヒトIgκ定常領域（hCL）と共にpcDNA3.4プラスミドに挿入した（軽鎖発現ベクター）。

[0196] 重鎖発現ベクターと共に軽鎖発現ベクターをExpi CHO™細胞にトランスフェクションし、培養上清を回収した。

[0197] 得られた培養上清からPierce™ Disposable Columns, 10 mL（カタログ番号：#29924；Thermo Scientific社）を用いて抗体を精製した。

これにより、各クローンから15mg以上の量の抗体が作製された。

[0198] 得られた抗体のうち、1クローンを本発明の第１のモノクローナル抗体とした。本発明の第１のモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を表３に示す。

[0199] [表3]

表 3:第1のモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列

	配列	配列番号
重鎖可変領域	EVQLQESGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIDPETGGTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRGNDGYNEDYWGQGTTLTVSS	1
軽鎖可変領域	DVLMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQDTHFPYTFGGGTKLEIK	2

[0200] ９．フローサイトメトリーによる抗体力価の評価

パニング操作に使用した2種類のHEK293T細胞を用いたフローサイトメトリーにより抗体力価を評価した。フローサイトメトリーにはCytoFLEX（Beckman coulter社）を用いた。

[0201] 細胞の標識は以下の通り行った。各HEK293T細胞に作製したモノクローナル抗体をそれぞれ各10μg/mL～1.0ng/mLの10倍希釈系列を添加した。二次抗体としては、Anti-Human IgG Goat pAbs PE（カタログ番号：#IM0550；Beckman coulter社）を200倍希釈で使用した。対照として、ポリクローナルウサギ抗SYT2 N末端抗体（Polyclonal rabbit purified antibody SYT2 luminal doma

in；カタログ番号105 223；Synaptic Systems社）を一次抗体として使用した。これに対する二次抗体にはAnti-Rabbit IgG(H+L)-PE（カタログ番号：#IM0855；Beckman coulter社）を200倍希釈で使用した。

[0202] 本発明の第１の抗体では、得られたモノクローナル抗体の中でも、低い抗体濃度において強い蛍光が検出された。特に、0.01μg/mLの抗体濃度における蛍光強度は、対照ポリクローナル抗体を使用した場合の2倍程度と、本発明の第１のモノクローナル抗体は低濃度でも抗原に効率的に結合可能であり、感度の高い抗体であることが示唆された。

[0203] １０．相補性決定領域（CDR）の配列の同定

本発明の第１のモノクローナル抗体のCDRのアミノ酸配列はKabatの方法に基づいて同定した。

同定された各CDRのアミノ酸配列を表４に示す。

[0204] [表4]

表４:第1のモノクローナル抗体の CDR のアミノ酸配列

		配列	配列番号
重鎖	HCDR1	DYEMH	3
	HCDR2	AIDPETGGTAYNQKFKG	4
	HCDR3	GNDGYNEDY	5
軽鎖	LCDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN	6
	LCDR2	LVSKLDS	7
	LCDR3	WQDTHFPYT	8

[0205] ＜実施例２：第１のモノクローナル抗体の評価＞

得られた第１のモノクローナル抗体の抗原への結合特性を評価した。

[0206] pan-hSYT2を抗原として用い、Octet RED96e System（SARTORIUS社）を使用して抗体の結合特性を測定した。測定には以下の条件を用いた：

バイオセンサー：Streptavidinバイオセンサー（カタログ番号：#18-5019；SARTORIUS社）；

抗体濃度：5nM／2.5nM／1.25nM／0.63nM／0.31nM／0.17nM／0.08nM／0nM；

バッファー：0.002%Tween-20及び0.01% BSAを含むPBS；

固相化前平衡化：バッファーのみで60秒インキュベート；

固相化：抗原ペプチドを含むバッファーで300秒インキュベート；

抗体添加前平衡化：バッファーのみで180秒インキュベート；

抗体結合反応：抗体を含むバッファーで600秒インキュベート；

抗体解離反応：バッファーのみで1800秒インキュベート；

いずれも30℃、1000rpmの撹拌速度でインキュベートした。

[0207] ポリクローナルウサギ抗SYT2 N末端抗体を用いた測定では、抗原は0.2μg/mLの濃度で使用した。一方、本発明の第１のモノクローナル抗体を用いた測定では、抗原は0.05μg/mLの濃度で使用した。

[0208] 測定結果を表５及び６に示す。表５は抗原を0.2μg/mLの濃度で使用した結果を示し、表６は抗原を0.05μg/mLの濃度で使用した結果を示す。

[0209] [表5]

表 5:抗原を 0.2μg/mL の濃度で使用した場合の測定結果

	親和性 (M)	結合速度定数 (1/Ms)	解離速度定数 (1/s)
対照 ポリクローナル抗体	1.85 E-10	1.40 E+5	2.60 E-5

[0210] [表6]

表 6:抗原を 0.05μg/mL の濃度で使用した場合の測定結果

	親和性 (M)	結合速度定数 (1/Ms)	解離速度定数 (1/s)
第1の モノクローナル抗体	2.67 E-11	2.63 E+5	7.01 E-6

[0211] 親和性は解離反応の進みやすさを示す解離速度定数を結合反応の進みやすさを示す結合速度定数で除算した値であり、親和性が高い程値は小さくなる。

[0212] 表５及び６に示す結果から、対照ポリクローナル抗体にて測定された結果と比較して、本発明の第１のモノクローナル抗体は解離定数が低く、全体として、抗原と解離しにくく親和性が高いことがわかった。

[0213] ＜実施例３：シナプトタグミン2抗体を用いた薬剤の送達による薬理効果の検

証＞

ポリクローナルシナプトタグミン2抗体を用いて運動神経細胞内に薬剤を送達した場合、薬剤に基づく薬理効果が観察されるかどうか調べた。

[0214] １．細胞の培養

Dead Cell Removalキット（Veritas社）を用い、同キットのプロトコルに従ってヒトiPS誘導運動神経細胞（40HU-005-2M；ixcells biotechnologies社）を解凍した。解凍後の細胞を96ウェルプレート（V底）に2×10^4細胞/ウェルの密度で播種し、運動神経細胞培養培地（Motor Neuron Maintenance Medium；ixcells biotechnologies社）中で1週間培養し、ニューロスフィアを作製した。作製されたニューロスフィアは、大きさと真円度を基準に選別し、この基準を満たしたものを以下の実験に用いた。

[0215] 96ウェルEZVIEW（登録商標）カルチャープレートLB（AGCテクノグラス株式会社）をポリ-D-リシン及びGeltrex（登録商標）Matrix（Thermo Fisher Scientific社）でコーティングした後、選別されたニューロスフィアをプレートに播種し、20日間培養した。培地としては、まず、上述の運動神経細胞培養培地を使用し、培養2日目に同培地での培地交換を行った。その後は、ニューロン培地（Neurobasal plus medium（B27 plus supplement（Thermo Fisher Scientific社）、20ng/mL BDNF、20ng/mL GDNF及びペニシリン・ストレプトマイシンを添加））を用いて、週3回培地交換を行った。いずれの培地交換も50μL/ウェルで行った。

[0216] ２．LRRTM2ビーズの調製

LRRTM2の細胞外ドメインで被覆されたマイクロビーズ（活性ビーズ）を、ＷＯ２０２１／００６０７５に開示されるようにして調製した。

[0217] 具体的には、ストレプトアビジン被覆マイクロビーズ（Streptavidin Coated Microspheres; Bangs Laboratories, Inc；ポリスチレン製、平均直径9.94μm）を洗浄緩衝液（リン酸緩衝食塩水（PBS）、0.01% ウシ血清アルブミン（BSA）、0.05% TritonX-100）で2回洗浄し、ビオチン化抗ヒトIgG（Fc特異的）抗体（Sigma-Aldrich社；マウスモノクローナル）と結合緩衝液（PBS

、0.01% BSA）中で反応させ、ストレプトアビジン被覆マイクロビーズにビオチン化抗ヒトIgG（Fc特異的）抗体を固相化した。得られたビーズを洗浄緩衝液で3回洗浄した（抗ヒトIgGFc抗体ビーズ）。

[0218] 次に抗ヒトIgGFc抗体ビーズを結合緩衝液に懸濁し、そこにヒトLRRTM2の細胞外ドメインとヒトIgGのFc部分との融合タンパク質（LRRTM2-Fc；R&D systems社）を添加し、LRRTM2-Fcを抗ヒトIgGFc抗体ビーズに固相化した。得られたビーズを洗浄緩衝液で洗浄し、結合緩衝液に懸濁した（LRRTM2ビーズ懸濁液）。

[0219] ３．シナプス前部の誘導（図１）

20日間の培養を経たプレートに0.1μg/ウェルになるようにLRRTM2ビーズを播種し、48時間、37℃で培養し、シナプス前部の形成を誘導した。

[0220] ４．コンジュゲートの作製

薬剤としては微小管重合阻害剤であるモノメチルアウリスタチンE （MMAE：MedChemExpress社）を用いた。MMAEと抗体のコンジュゲートをMagicLink™ kit（broadpharm社）を用いて作製した。コンジュゲートの作製はメーカーのプロトコルに従って行った。

[0221] 抗体としては、ポリクローナルウサギ抗SYT2 N末端抗体（Polyclonal rabbit purified antibody SYT2 luminal domain；カタログ番号105 223；Synaptic Systems社）、又は対照として、正常ウサギIgG抗体（Normal Rabbit IgG；カタログ番号AB-105-C；R&D Systems社）を用いた。

[0222] ５．コンジュゲート溶液の調製

ニューロン培地を37℃で30分間温めた後、培地に、終濃度が100μMとなるように4-アミノピリジン（Sigma Aldrich社）を添加して混和した。さらに、コンジュゲートを終濃度が1μg/mLとなるように添加して混和した。この粗製コンジュゲート溶液を200gで3分間、室温で遠心し、その上清をコンジュゲート溶液として回収した。

[0223] また、さらなる対照群として、一部のサンプルではコンジュゲートでなくMMAE単体を導入した（サンプル数：13）。この場合、コンジュゲートの代わり

に同濃度のMMAEを用いて上述の通りMMAE溶液を調製した。

[0224] ６．コンジュゲートの導入

シナプス前部を形成させたプレートにて、100μLのコンジュゲート溶液又はMMAE溶液を用いて培地交換を行い、37℃で30分培養することにより、コンジュゲートを導入した。

[0225] ７．軸索の伸長反応

導入の後に溶液を回収して洗浄し、コンジュゲート及びMMAEを含まないニューロン培地に培地交換した。その後、さらに24時間培養することにより、軸索を伸長させた。

[0226] ８．細胞の固定

培養の後、ニューロン培地を用いて洗浄した後、2%パラホルムアルデヒド（PFA）溶液で固定した。

[0227] ９．免疫細胞化学染色

添加した抗体を一次抗体として、免疫細胞化学染色による染色を行った。固定後の細胞において、界面活性剤による細胞膜の透過処理及びブロッキングをした後、追加の一次抗体としてマウス抗βIIIチューブリン（Tuj1）抗体（カタログ番号801202；Biolegend社）を用いた一次抗体反応を行った。その後、Alexa 555標識抗マウス抗体（カタログ番号A32727；Thermo Fisher Scientific社）を用いた二次抗体反応を行い、蛍光画像を取得した。ブロッキングは、ブロッキング緩衝液（PBS＋2%正常ヤギ血清＋1% BSA＋1%ウシ胎児血清＋0.02% TritonX-100）を用いて行った。サンプル数は以下の通り：MMAE単独導入群、13サンプル；対照抗体群、17サンプル；ポリクローナルSYT2抗体群、27サンプル。

[0228] 蛍光画像の取得は、LAS Xソフトウェア（Leica社）を搭載した倒立ライブセル（DMi8）顕微鏡蛍光顕微鏡（Leica社）を用いて、以下の励起波長、検出波長、露光時間及び検出閾値で行った。ガンマ補正値はいずれも1を用いた。

[0229] 励起波長及び検出波長：Alexa 555　最大励起　555nm；最大検出　580nm；実際の検出　595nm。

露光時間及び検出閾値：Alexa 555　露光時間　50ms；検出閾値　100～3500。

[0230] １０．軸索量の解析

軸索量は、取得した蛍光画像におけるTuj1シグナルの輝度の合計値（＝（ピクセルあたりの蛍光強度）×（ピクセル数））として取得した。対照の正常ウサギ抗体とMMAEのコンジュゲートを使用した場合の結果を100%として標準化した値を相対軸索量として算出した。輝度の取得はLAS Xソフトウェア（Leica社）を用いて行った。

[0231] １１．統計解析

統計解析は、GraphPad Prism9（GraphPad Software社）を使用してt検定により行った。有意水準としては$p<0.05$を用いた。

[0232] 結果を図２～４に示す。図２及び３は、対照の正常ウサギ抗体とMMAEのコンジュゲートを使用した対照抗体群（図２）、及びポリクローナル抗SYT2 N末端抗体とのコンジュゲートを使用したSYT2抗体群（図３）の軸索の様子を示す免疫細胞化学染色像である。また、図４はその結果を定量的に示したグラフである。

[0233] いずれの実験条件においても、ニューロスフィアから軸索が伸長し、シナプス前部も正常に誘導されていた（図２Ａ及び３Ａ）。

[0234] MMAEは、軸索の伸長及び維持に重要な細胞骨格である微小管の重合を阻害する。そのため、MMAEの効果が強い程、軸索の伸長及び維持が阻害され、軸索量が減少すると予想される。

[0235] 対照抗体群では、ニューロスフィアから遠い遠位部でも多くの太い軸索と、膨らみとして観察されるシナプス前部が見られた（図２Ｂ）。また、ニューロスフィアに比較的近い近位部では、軸索が互いに平行に近い状態で整列して走行している様子が観察された（図２Ｃ）。

[0236] 一方、SYT2抗体群では、ニューロスフィアから遠い遠位部には少数の細い軸索のみが見られ、シナプス前部の形成も乏しかった（図３Ｂ）。また、ニューロスフィアに比較的近い近位部では、軸索の走行が、対照抗体群ほどは

整列しておらず、軸索の走行が乱れている様子が観察された（図３Ｃ）。

[0237] 定量した結果からも観察結果が裏付けられた。対照抗体群（図４中、「Cont. IgG-MMAE」）と比較して、ポリクローナルSYT2抗体群（図４中、「α-SYT2 IgG-MMAE」）では軸索量は有意に減少し、相対軸索量は約87.15％となった。また、SYT2抗体群の結果は、MMAEを単独で導入した単独導入群（図４中、「MMAE」）と比較しても有意に減少し、軸索量は単独導入群の約82.7％であった。なお、単独導入群と対照抗体群では有意な差は見られなかった。

[0238] ＜実施例４：本発明の第１のモノクローナル抗体を用いた薬剤の送達による薬理効果の検証＞

実施例１において取得した本発明の第１のモノクローナル抗体を用いて運動神経細胞内に薬剤を送達した場合の、薬剤に基づく薬理効果に与える影響を調べた。

[0239] 実施例１で取得した本発明の第１のモノクローナル抗体を抗SYT2 N末端抗体として使用し、対照抗体の代わりにポリクローナルウサギ抗SYT2 N末端抗体を使用した以外は実施例３と同様に実験を行った。各群3サンプルずつで実験を行った。

[0240] 結果を図５に示す。図５は本発明の第１のモノクローナル抗体を使用した場合の結果を定量的に示したグラフである。

[0241] MMAEは、軸索の伸長及び維持に重要な細胞骨格である微小管の重合を阻害する。そのため、MMAEの効果が強い程、軸索の伸長及び維持が阻害され、軸索量が減少すると予想される。

[0242] ポリクローナル抗体群（図５中、「Polyclonal Ab」）と比較して、第１のモノクローナルSYT2抗体群（図５中、「Monoclonal Ab」）では軸索量は有意に減少した。

[0243] このことから、生理活性物質の送達効率が抗体の性質に依存していることが再確認されると共に、既に薬理効果を有することが示されたポリクローナル抗体と比較しても、本発明の第１のモノクローナル抗体を使用は有意に効率的に生理活性物質等を運動神経細胞へ送達可能であることが示唆された。

[0244] ＜実施例５：本発明の第１のモノクローナル抗体のELISA法による親和性の確認＞

実施例１において取得した本発明の第１のモノクローナル抗体の抗原への結合親和性を、SYT2を細胞膜上に発現する培養細胞を用いたELISA法を用いて調べた。

[0245] １．細胞の調製

SYT2発現細胞（SYT2の小胞内ドメインを細胞表面に発現する細胞）は、株式会社医学生物学研究所に委託して調製した。調製手順の概要は以下の通りである。

[0246] 培養細胞としてはHEK293T細胞（American Type Culture Collection社製）を用いた。

[0247] また、SYT2の発現ベクターとしては、pCMV6-AC-Myc-DDK-IRES-GFP-Puro Mammalian Expression Vectorプラスミド（ORIGENE社製）にヒトSYT2（配列番号９で表されるアミノ酸配列）をコードする遺伝子配列（配列番号２１）を有するDNA断片を組み込んだプラスミドベクター（配列番号１９）を用いた。

[0248] HEK293T細胞へのプラスミドベクターの導入は以下のように行った。

[0249] トランスフェクション用溶液は、1μgの濃度でプラスミドベクターを含むベクター溶液1μLとOpti-MEM™ I Reduced Serum Medium（Thermo Fisher Scientific社製）100μLを混合することにより調製した。

[0250] トランスフェクション用培地としては、2μLのLipofectamine™ 2000 Transfection Reagent（Thermo Fisher Scientific社製）を添加したOpti-MEM™I Reduced Serum Medium培地（Thermo Fisher Scientific社製）を用いた。

[0251] トランスフェクションのために、HEK293T細胞を1.0×10^5細胞/wellの細胞密度で24 wellプレート（IWAKI社製）に播種し、維持用培地（1% Penicillin-Streptomycin（Thermo Fisher Scientific社製）と10% Fetal Bovine Serum（Cytiva社製）と1% GlutaMAX™ I（Thermo Fisher Scientific社製）を添加したDMEM培地（Thermo Fisher Scientific社製））中で80～90%コンフルエントになるまで培養した。培養の後、培地を除去し、トランスフェクション

用培地1mLで培地交換を行った。培地交換の後、トランスフェクション用溶液100μLを添加して37℃、5%CO_2の存在下にて3日間インキュベートした。

[0252] インキュベートの後、培地を除去し、平衡化した発現用培地（2.5μg/μLのPuromycin（Thermo Fisher Scientific社製）を添加したDMEM培地（Thermo Fisher Scientific社製））1mLで培地交換を行った。培地交換の後、37℃、5%CO_2の存在下にて3日間培養することにより、HEK293T細胞にSYT2を発現させた。培地交換は3日毎に全量交換にて行い、発現用培地での培養開始後3日に継代を行った。

[0253] ２．継代培養

培養後に培地を除去し、PBSで洗浄した。洗浄後に0.1%トリプシン（ナカライテスク社製）を2mL添加し、1.5分～2分間、室温でインキュベートして細胞を剥離し、ピペッティングによりトリプシンを失活させ、反応を停止した。細胞を50mLチューブに回収し、ピペッティングにより細胞塊を分散させた。

[0254] 分散させた細胞懸濁液を130×g、室温で5分間遠心して上清を除去し、10mL～20mLの発現用培地を添加して細胞を懸濁した。細胞数をカウントし、24wellプレート1.0×10^5細胞/wellの細胞密度で播種した。

[0255] ３．ELISA試験

継代後3日間培養した細胞から、測定用培地（1% Penicillin-Streptomycin（Thermo Fisher Scientific社製）と10% Fetal Bovine Serum（Cytiva社製）と1% GlutaMAX™ I（Thermo Fisher Scientific社製）を添加したDMEM培地（Thermo Fisher Scientific社製））を用いて継代と同様の手順を行い、測定用培地に基づく細胞懸濁液を得た。

[0256] 得られた細胞懸濁液を2×10^4細胞/wellの細胞密度でELISA用96wellプレート（IWAKI社製）に播種し、37℃、5%CO_2の存在下にて1日間インキュベートした。

[0257] 1.5mLチューブに一次抗体の濃度が1μg/mL、500ng/mL、100ng/mLになるように一次抗体液を調製した。溶媒としては測定用培地を用い、一次抗体とし

ては、対照抗体であるポリクローナルウサギ抗SYT2 N末端抗体又は本発明の第１のモノクローナル抗体を用いた。

[0258] インキュベート後のELISA用96wellプレートから培地を除去し、100μL/wellの一次抗体液を各ウェルに添加し、37℃、5%CO_2の存在下にて1時間インキュベートした。

[0259] 一次抗体反応の後、抗体液を除去して測定用培地100μLを用いて洗浄した。その後、2%PFA溶液を添加し、室温で15分間かけて固定し、0.25%のTritonX-100含有PBSを用いた細胞膜の透過処理を行った。

[0260] 透過処理後の細胞をPBSで洗浄し、ブロッキング緩衝液（PBS＋2%正常ヤギ血清＋1% BSA＋1%ウシ胎児血清＋0.02% TritonX-100）を各ウェルに添加して、室温で1時間ブロッキングを行った。

[0261] ブロッキングの後、二次抗体液を添加し、室温で1時間インキュベートした。二次抗体液はブロッキング緩衝液を溶媒として用いて調製した。ポリクローナルウサギ抗SYT2 N末端抗体に対する二次抗体としてはGoat anti-Rabbit 488（カタログ番号#A32731；Thermo Fisher Scientific社）を用い、本発明のモノクローナル抗体に対する二次抗体としてはGoat anti-Human 488（カタログ番号#A48276；Thermo Fisher Scientific社）を用いた。また各染色用に、二次抗体液にはDAPI（カタログ番号D1306；Thermo Fisher Scientific社）を添加した。

[0262] 二次抗体反応の後、抗体液を除去して0.02%のTritonX-100含有PBSを用いて洗浄した。その後、1%PFA溶液を添加し、室温で5分間かけて後固定した。その後、固定液をPBSに置換した。

[0263] ４．蛍光シグナルの検出及び測定

蛍光シグナルの測定にはPromega GloMax（Promega Corporation社製）を用いて、以下の励起波長及び検出波長で行った。

DAPI：励起波長　365nm、蛍光波長　415nm～445nm、検出波長　475nm

Alexa 488：励起波長　475 nm、蛍光波長　500nm～550nm、検出波長　525nm

[0264] 検出されたAlexa 488シグナルの蛍光強度をDAPIの蛍光強度で除算し、抗SY

T2抗体の相対蛍光強度とした。さらに、対照抗体を使用した場合の相対蛍光強度を1.0として標準化した値を相対抗体量とした。

[0265] 結果を図６及び７に示す。図６は100ng/mLの第１の抗SYT2抗体を使用した場合の結果を示すグラフであり、図７は500ng/mLの第１の抗SYT2抗体を使用した場合の結果を示すグラフである。

[0266] 本発明の第１の抗体は、100ng/mLという低濃度で使用した場合であっても、対照抗体と比較して有意にSYT2への結合能が高かった。

[0267] この結果から、実施例２にて行った抗体の親和性の評価の結果と一致して、本発明の第１の抗体が優れた抗体であることが確認された。

[0268] ＜実施例６：第２のモノクローナル抗体の作製＞

第２のモノクローナル抗体は、株式会社医学生物学研究所に委託して、ファージディスプレイを用いて作製した。作製手順の概要は実施例１の通りである。

[0269] 得られた抗体のうち、第１の抗体とは異なる1クローンを本発明の第２のモノクローナル抗体として取得した。本発明のモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を表７に示す。

[0270] [表7]

表７:第2のモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列

	配列	配列番号
重鎖可変領域	QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIDPETGGTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRGNDGYNEDYWGQGTSLTVSS	17
軽鎖可変領域	DIVMTQSPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQDTHFPYTFGGGTKLEIK	18

[0271] ９．フローサイトメトリーによる抗体力価の評価

実施例１と同様にパニング操作に使用した2種類のHEK293T細胞を用いたフローサイトメトリーにより抗体力価を評価した。

[0272] 第２の抗体では、得られたモノクローナル抗体の中でも、低い抗体濃度に

おいて強い蛍光が検出された。特に、0.01μg/mLの抗体濃度における蛍光強度は、対照ポリクローナル抗体を使用した場合の2倍程度と、本発明の第２のモノクローナル抗体は低濃度でも抗原に効率的に結合可能であり、感度の高い抗体であることが示唆された。

[0273] １０．相補性決定領域（CDR）の配列の同定

本発明の第２のモノクローナル抗体のCDRのアミノ酸配列はKabatの方法に基づいて同定した。

同定された各CDRのアミノ酸配列を表８に示す。

[0274] [表8]

表 8:第2のモノクローナル抗体の CDR のアミノ酸配列

		配列	配列番号
重鎖	HCDR1	DYEMH	3
	HCDR2	AIDPETGGTAYNQKFKG	4
	HCDR3	GNDGYNEDY	5
軽鎖	LCDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN	6
	LCDR2	LVSKLDS	7
	LCDR3	WQDTHFPYT	8

[0275] ＜実施例７：第２のモノクローナル抗体の評価＞

得られた第２のモノクローナル抗体の抗原への結合特性を実施例２と同様に評価した。なお、対照としてはポリクローナルウサギ抗SYT2 N末端抗体を用いた。また、抗原は0.2μg/mLの濃度で使用した。

[0276] 測定結果を表９及び１０に示す。表９はポリクローナルウサギ抗SYT2 N末端抗体の結果を示し、表１０は本発明の第２のモノクローナル抗体の結果を示す。

[0277] [表9]

表 9:ポリクローナル抗体の測定結果

	解離速度定数 (1/s)
対照 ポリクローナル抗体	2.60 E-5

[0278] [表10]

表 10:第2のモノクローナル抗体の測定結果

	解離速度定数 (1/s)
第2の モノクローナル抗体	1.35 E-5

[0279] 解離速度定数は抗原－抗体複合体の解離反応の進みやすさを示す値であり、親和性が高い程値は小さくなる。

[0280] 表９及び１０に示す結果から、対照ポリクローナル抗体にて測定された結果と比較して、本発明の第２のモノクローナル抗体は解離速度定数が低く、全体として、抗原と解離しにくく親和性が高いことがわかった。

[0281] ＜実施例８：本発明の第２のモノクローナル抗体を用いた薬剤の送達による薬理効果の検証＞

実施例６において取得した本発明の第２のモノクローナル抗体を用いて運動神経細胞内に薬剤を送達した場合の、薬剤に基づく薬理効果に与える影響を調べた。

[0282] 実施例６で取得した本発明の第２のモノクローナル抗体を抗SYT2 N末端抗体として使用した以外は実施例４と同様に実験を行った。各群3サンプルずつで実験を行った。

[0283] 結果を図８に示す。図８は本発明の第２のモノクローナル抗体を使用した場合の結果を定量的に示したグラフである。

[0284] MMAEは、軸索の伸長及び維持に重要な細胞骨格である微小管の重合を阻害する。そのため、MMAEの効果が強い程、軸索の伸長及び維持が阻害され、軸索量が減少すると予想される。

[0285] ポリクローナル抗体群（図８中、「Polyclonal Ab」）と比較して、第２のモノクローナルSYT2抗体群（図８中、「Monoclonal Ab」）では軸索量は有意に減少した。

[0286] このことから、生理活性物質の送達効率が抗体の性質に依存していることが再確認されると共に、既に薬理効果を有することが示されたポリクローナ

ル抗体と比較しても、本発明の第２のモノクローナル抗体を使用は有意に効率的に生理活性物質等を運動神経細胞へ送達可能であることが示唆された。

[0287] ＜実施例９：本発明の第２のモノクローナル抗体のELISA法による親和性の確認＞

実施例６において取得した本発明の第２のモノクローナル抗体の抗原への結合親和性を、実施例５と同様に、SYT2を細胞膜上に発現する培養細胞を用いたELISA法を用いて調べた。

[0288] 結果を図９及び１０に示す。図９は100ng/mLの第２の抗SYT2抗体を使用した場合の結果を示すグラフであり、図１０は500ng/mLの第２の抗SYT2抗体を使用した場合の結果を示すグラフである。

[0289] 本発明の第２の抗体は、100ng/mLという低濃度で使用した場合であっても、対照抗体と比較して有意にSYT2への結合能が高かった。

[0290] この結果から、実施例７にて行った抗体の親和性の評価の結果と一致して、第２の抗体が優れた抗体であることが確認された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] シナプトタグミン2の小胞内ドメインに結合可能な抗体であって、

配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるHCDR1、配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるHCDR2、及び配列番号５に示されるアミノ酸配列からなるHCDR3を含む重鎖可変領域、及び

配列番号６に示されるアミノ酸配列からなるLCDR1、配列番号７に示されるアミノ酸配列からなるLCDR2、及び配列番号８に示されるアミノ酸配列からなるLCDR3を含む軽鎖可変領域

を含む、前記抗体。

[請求項2] 以下の（ａ）～（ｃ）のいずれかから選択される、請求項１に記載の抗体：

（ａ）前記重鎖可変領域が、配列番号１又は１７に対して90％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、前記軽鎖可変領域が、配列番号２又は１８に対して90％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる抗体；

（ｂ）前記重鎖可変領域が、配列番号１又は１７において1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、前記軽鎖可変領域が配列番号２又は１８において1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなる抗体；又は

（ｃ）前記重鎖可変領域が配列番号１又は１７に示されるアミノ酸配列からなり、前記軽鎖可変領域が配列番号２又は１８に示されるアミノ酸配列からなる抗体。

[請求項3] 請求項１に記載の抗体と、標識物質及び／又は生理活性物質とのコンジュゲート。

[請求項4] 請求項１に記載の抗体をコードする塩基配列を有する核酸分子。

[請求項5] 請求項４に記載の核酸分子を含む細胞。

[請求項6] 請求項１に記載の抗体を含む、運動神経細胞への標的化剤。

[請求項7] 標識物質及び／又は生理活性物質をさらに含む、請求項６に記載の標的化剤。

[請求項8] 前記抗体と、前記標識物質及び／又は前記生理活性物質とのコンジュゲートを含む、請求項７に記載の標的化剤。

[請求項9] 前記標識物質が蛍光分子である、請求項７に記載の標的化剤。

[請求項10] 運動神経細胞可視化剤である、前記標識物質を含む請求項７に記載の標的化剤。

[請求項11] 前記生理活性物質が、シナプス形成促進剤、シナプス維持剤、筋肉増強剤及び神経細胞機能改変剤からなる群から選択される一以上である、請求項７に記載の標的化剤。

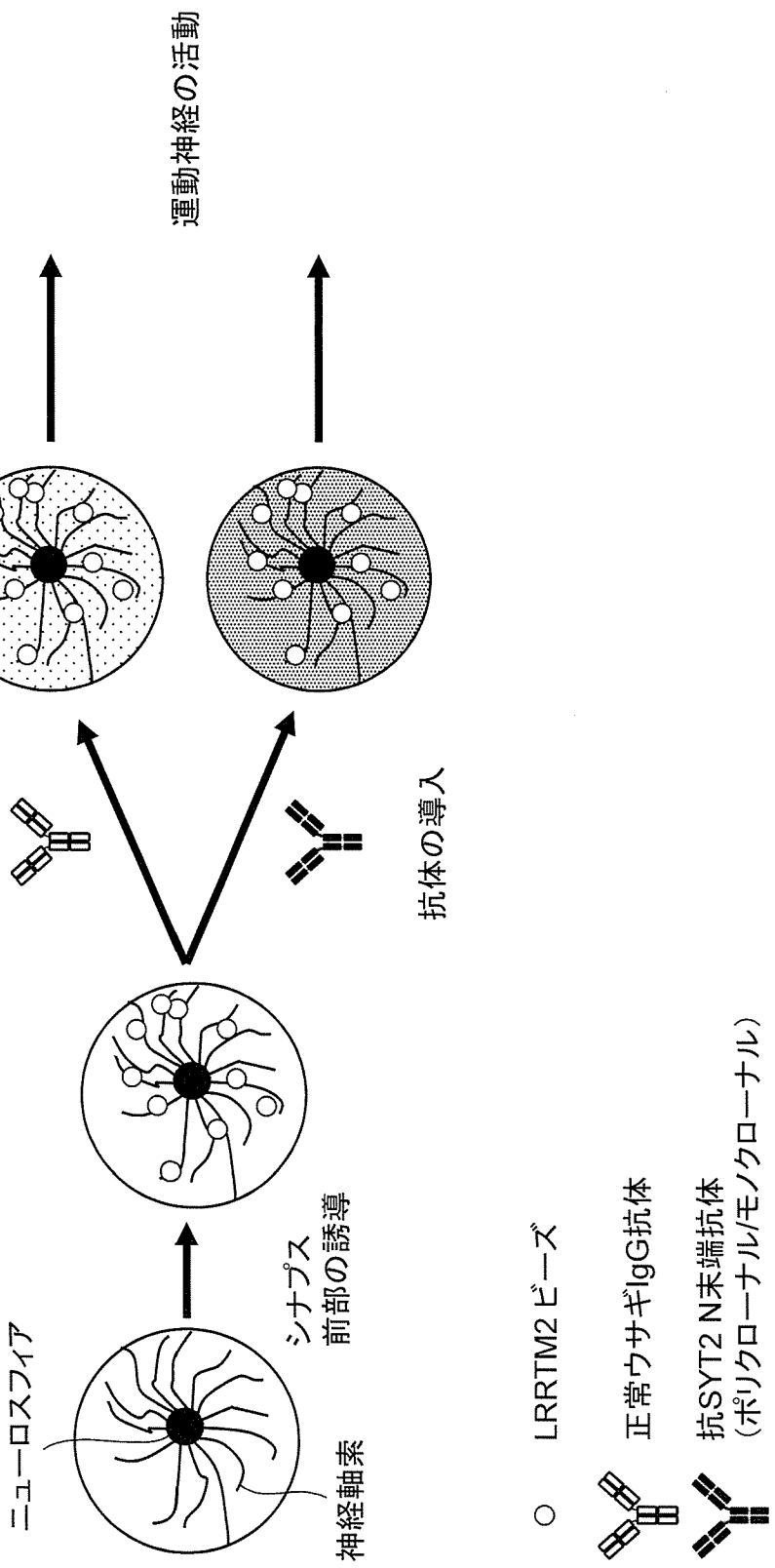
[請求項12] エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる、請求項６に記載の標的化剤。

[請求項13] 請求項７に記載の標的化剤を含む医薬組成物。

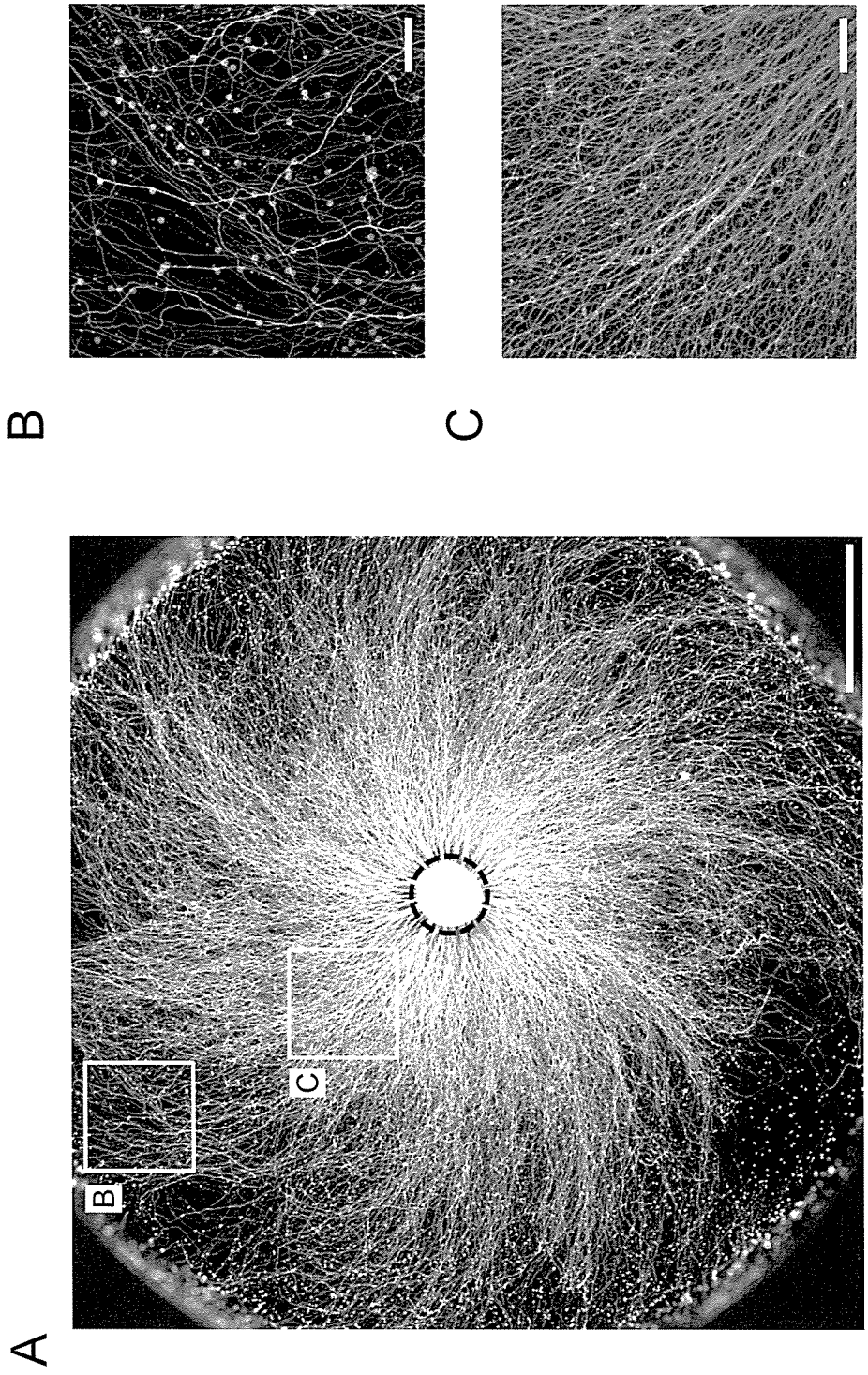
[請求項14] 請求項７に記載の標的化剤及び／又は請求項１３に記載の医薬組成物を運動神経細胞に接触させる工程、及び前記標的化剤及び／又は前記医薬組成物を前記運動神経細胞のシナプスに送達する工程を含む、運動神経細胞への前記標識物質及び／又は前記生理活性物質の標的化方法。

[請求項15] 請求項１０に記載の運動神経細胞可視化剤である標的化剤を運動神経細胞に接触させる工程、前記標的化剤を前記運動神経細胞のシナプスに送達する工程、及び前記標識物質のシグナルを検出する工程を含む、運動神経細胞可視化方法。

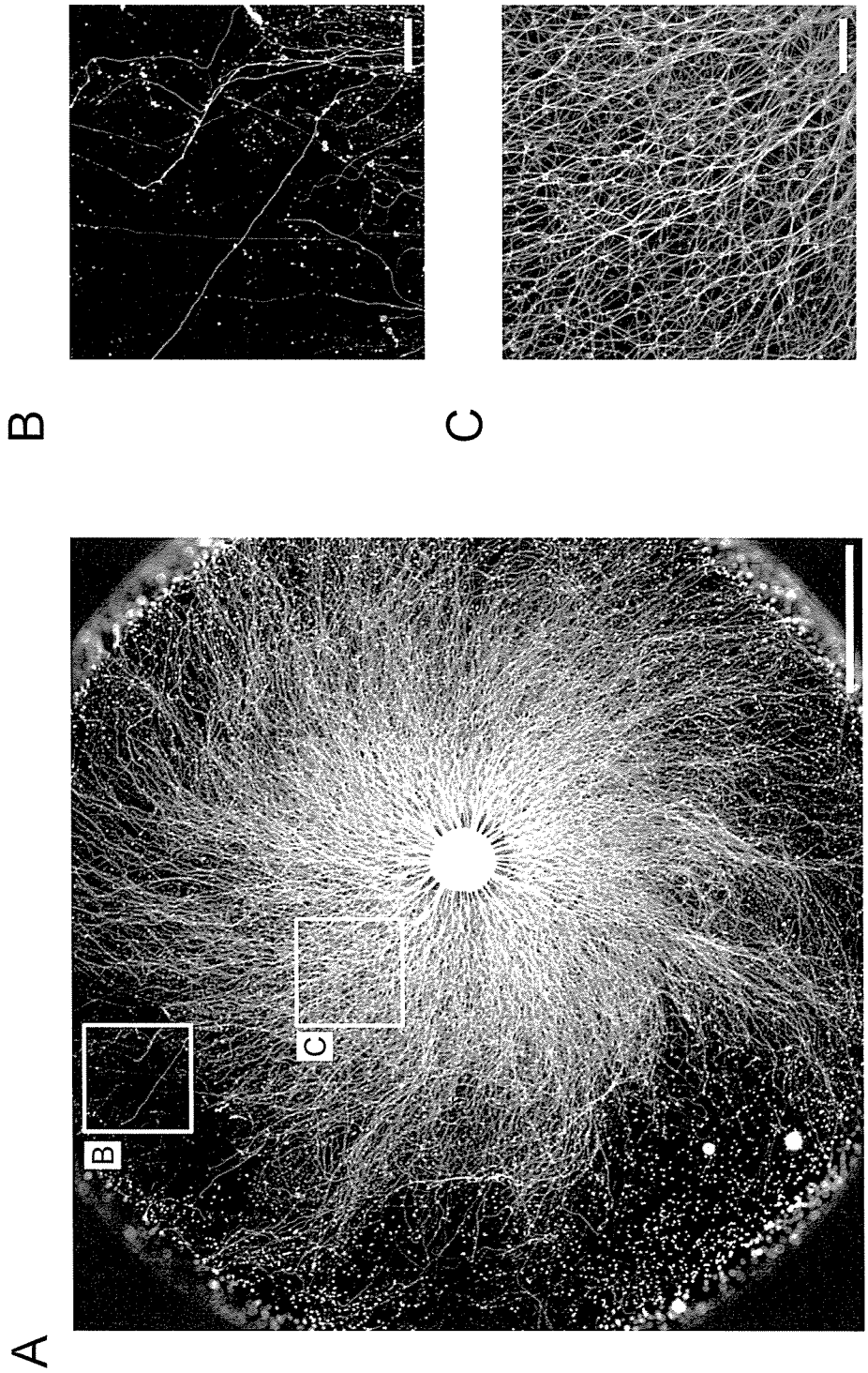
[図1]


運動神経の活動
抗体の導入
ニューロスフィア
神経軸索
シナプス
前部の誘導
LRRTM2 ビーズ
正常ウサギIgG抗体
抗SYT2 N末端抗体
(ポリクローナル/モノクローナル)

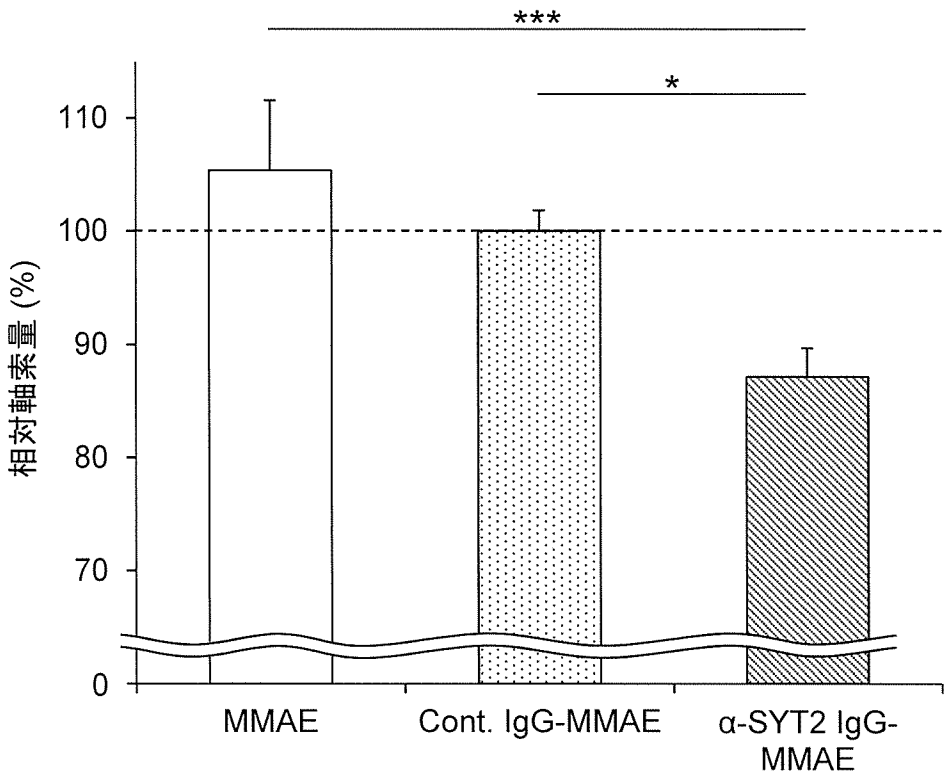
[図2]



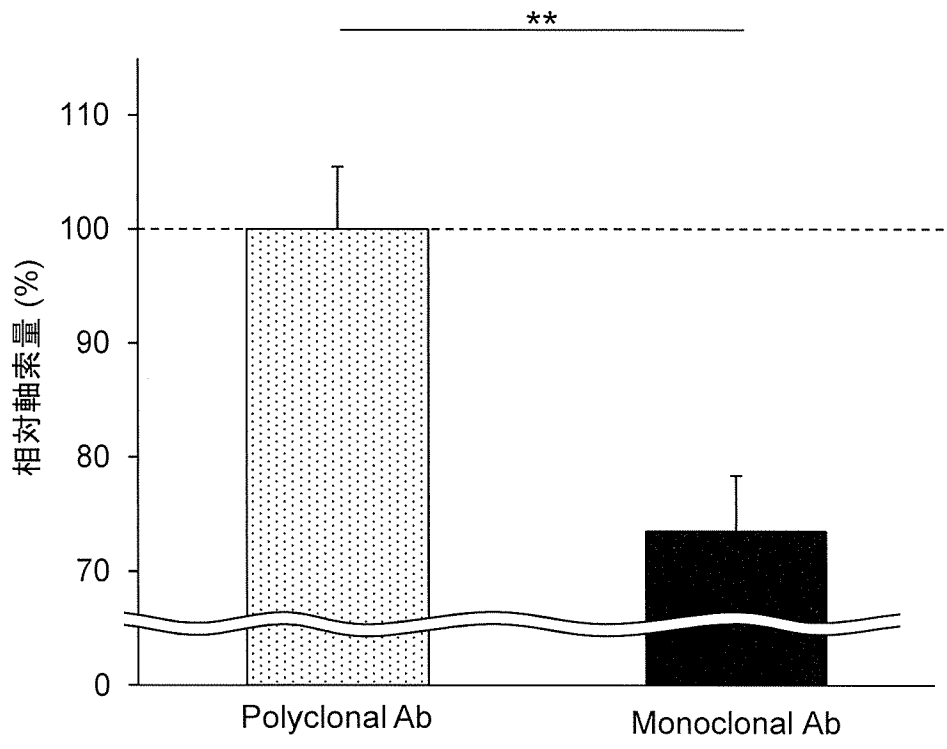
[図3]



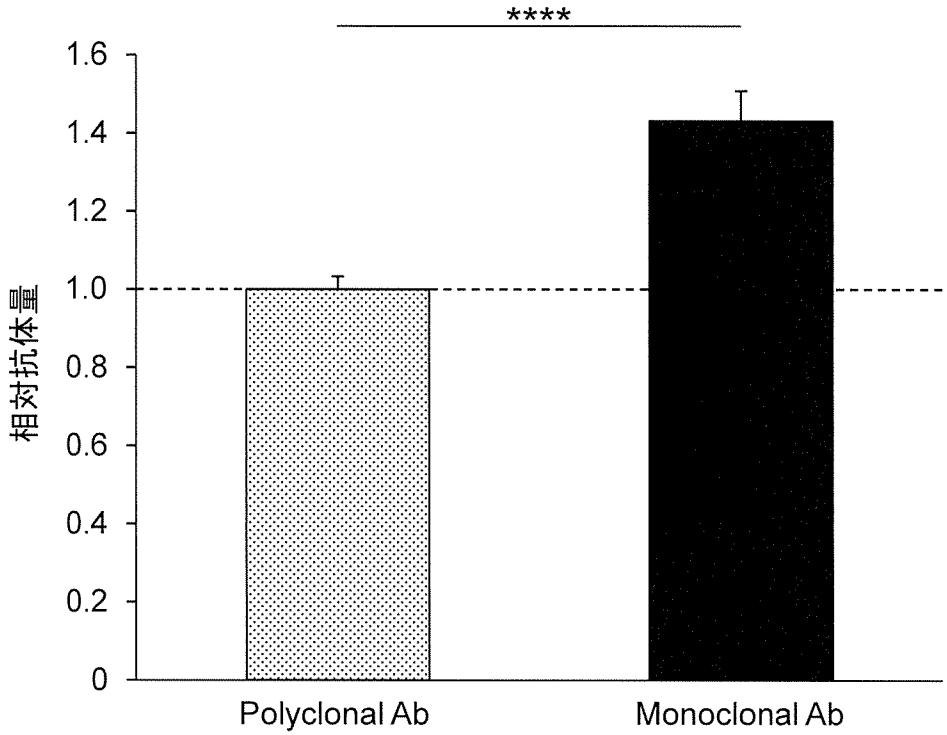
[図4]


***
*
110
100
90
80
70
0
相対軸索量 (%)
MMAE
Cont. IgG-MMAE
α-SYT2 IgG-MMAE

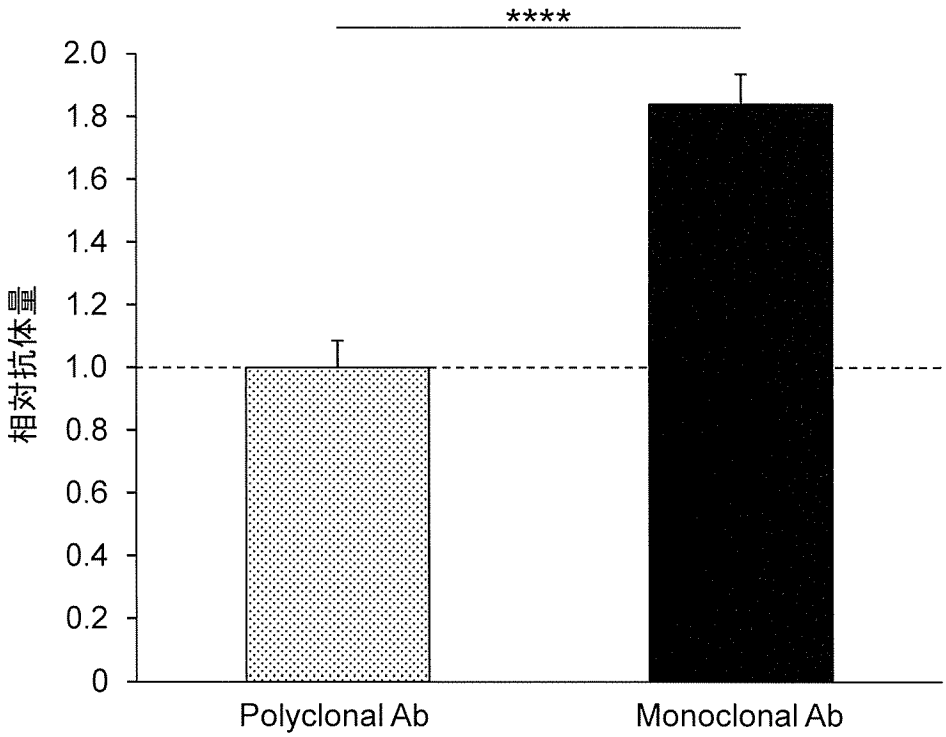
[図5]


**
110
100
90
80
70
0
相対軸索量 (%)
Polyclonal Ab
Monoclonal Ab

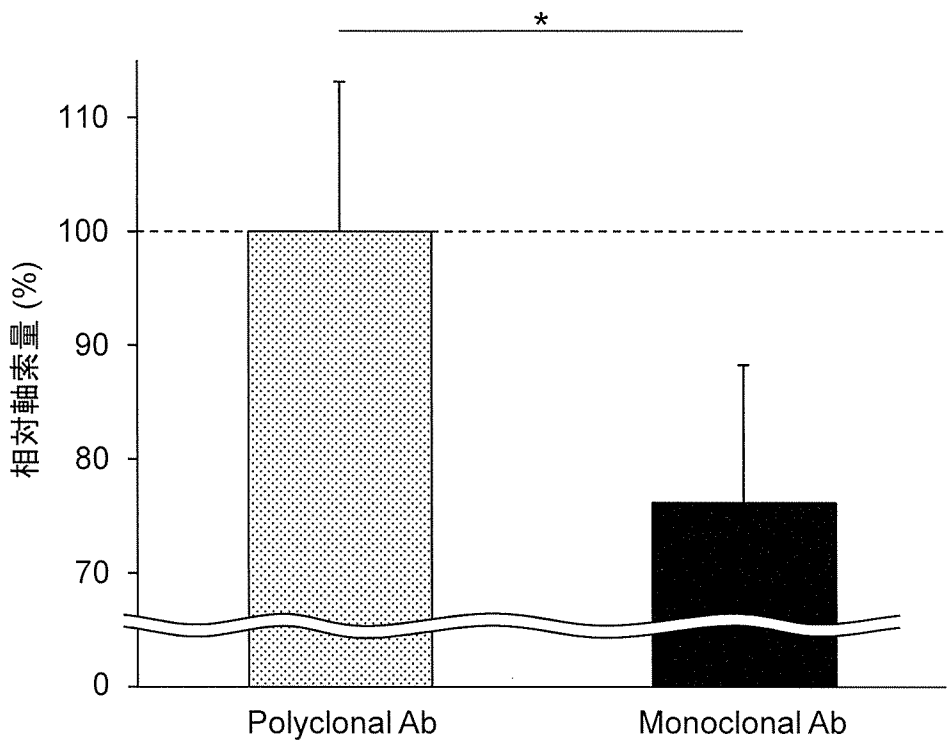
[図6]


****
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
相対抗体量
Polyclonal Ab
Monoclonal Ab

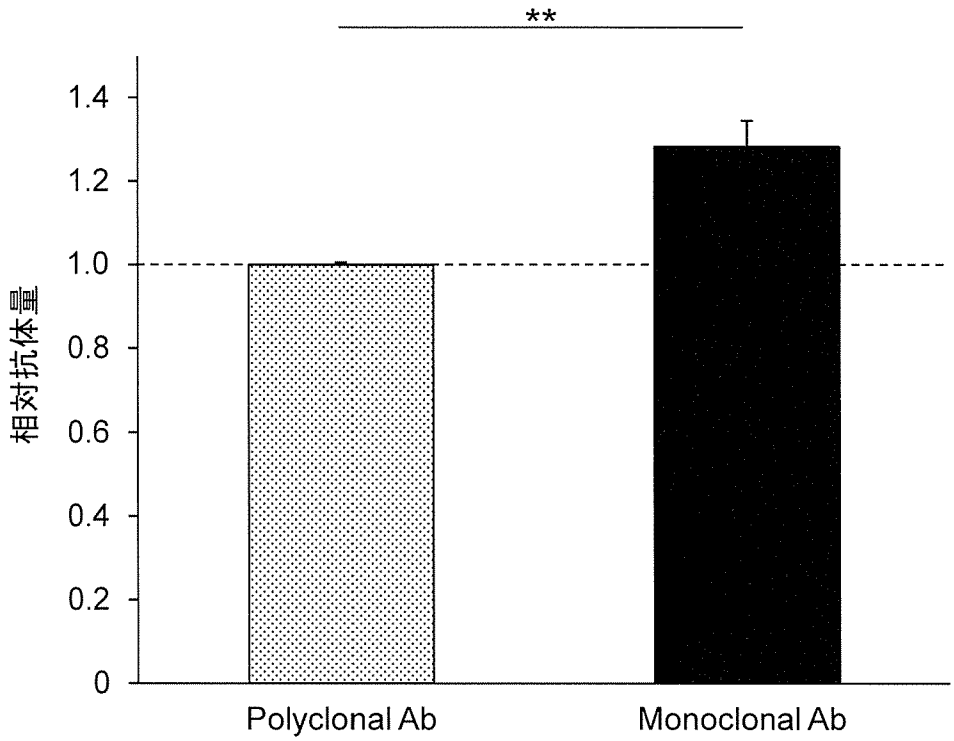
[図7]


****
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
相対抗体量
Polyclonal Ab
Monoclonal Ab

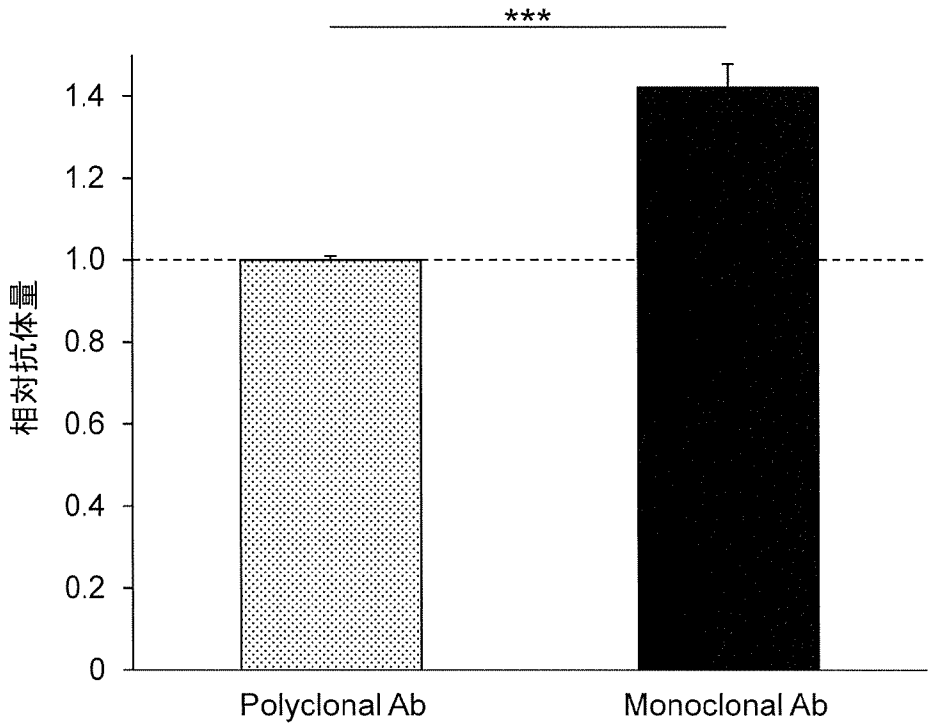
[図8]


*
110
100
90
80
70
0
相対軸索量 (%)
Polyclonal Ab
Monoclonal Ab

[図9]


**
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
相対抗体量
Polyclonal Ab
Monoclonal Ab

[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/019802

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/18(2006.01)i; ***A61K 39/395***(2006.01)i; ***A61K 47/68***(2017.01)i; ***A61P 25/02***(2006.01)i; ***C12N 1/15***(2006.01)i; ***C12N 1/19***(2006.01)i; ***C12N 1/21***(2006.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12N 15/13***(2006.01)i
FI: C07K16/18 ZNA; C12N15/13; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; A61K39/395 N; A61K47/68; A61P25/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/18; A61K39/395; A61K47/68; A61P25/02; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/13

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHOJI-KASAI, Yoko et al. Neurotransmitter Release from Synaptotagmin-Deficient Clonal Variants of PC12 Cells. Science. 1992, vol. 256, pp. 1820-1823 p. 1821, right column, lines 34-39	1, 3-15
A	p. 1821, right column, lines 34-39	2
X	DUBEY, Mohit et al. Myelination synchronizes cortical oscillations by consolidating parvalbumin-mediated phasic inhibition. eLife. 2022, vol. 11: e73827, pp. 1-24 section "Key resources table"	1, 3-15
A	section "Key resources table"	2
A	FOX, Michael A. SANES, Joshua R. Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses. J. Comp. Neurol. 2007, vol. 503, pp. 280-296 table 2.	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 August 2024	**20 August 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/019802

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/019802

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 16/18(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 25/02(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i
FI: C07K16/18 ZNA; C12N15/13; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; A61K39/395 N; A61K47/68; A61P25/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K16/18; A61K39/395; A61K47/68; A61P25/02; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/13

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	SHOJI-KASAI, Yoko et al., Neurotransmitter Release from Synaptotagmin-Deficient Clonal Variants of PC12 Cells, Science, 1992, Vol. 256, p. 1820-1823 第１８２１頁右欄第３４－３９行	1,3-15
A	第１８２１頁右欄第３４－３９行	2
X	DUBEY, Mohit et al., Myelination synchronizes cortical oscillations by consolidating parvalbumin-mediated phasic inhibition, eLife, 2022, Vol. 11: e73827, p. 1-24 「Key resources table」の項	1,3-15
A	「Key resources table」の項	2

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
05.08.2024	20.08.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
小倉　梢 4B 4504
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	FOX, Michael A. and SANES, Joshua R., Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses, J. Comp. Neurol., 2007, Vol. 503, p. 280-296 TABLE 2.	1-15

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/019802

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見: