

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-530465  
(P2020-530465A)

(43) 公表日 令和2年10月22日(2020.10.22)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 45/00</b> (2006.01)	A 61 K 45/00	4 B 06 4
<b>C07K 16/46</b> (2006.01)	C 07 K 16/46	4 C 07 6
<b>C07K 16/28</b> (2006.01)	C 07 K 16/28	4 C 08 4
<b>C12N 15/13</b> (2006.01)	C 12 N 15/13	4 C 08 5
<b>C12N 15/62</b> (2006.01)	C 12 N 15/62	Z 4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-507090 (P2020-507090)	(71) 出願人	518086619 デナリ セラピューティクス インコーポ レイテッド D e n a l i T h e r a p e u t i c s l n c . アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80, サウス サンフランシスコ, オ イスター ポイント ブールバード 16 1
(86) (22) 出願日	平成30年8月10日 (2018.8.10)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	令和2年3月10日 (2020.3.10)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 國際出願番号	PCT/US2018/046337	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 國際公開番号	W02019/033046		最終頁に続く
(87) 國際公開日	平成31年2月14日 (2019.2.14)		
(31) 優先権主張番号	62/543,658		
(32) 優先日	平成29年8月10日 (2017.8.10)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/583,314		
(32) 優先日	平成29年11月8日 (2017.11.8)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54) 【発明の名称】 トランスフェリン受容体結合タンパク質を使用するための、親和性に基づく方法

## (57) 【要約】

本明細書では、血液脳関門を通過して作用物質を輸送するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、前記作用物質は、神経変性疾患を治療するための治療標的に結合する。本明細書に記載されるように、前記作用物質は、トランスフェリン受容体に結合するタンパク質に連結されている。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

治療標的に結合する作用物質を、哺乳動物の血液脳関門（B B B）を通過して輸送するための方法であつて、

約400nM～約2μMの親和性でトランスフェリン受容体（T f R）に結合するタンパク質に前記B B Bを曝露することを含み、前記タンパク質が、前記作用物質に連結されており、かつ、連結された前記作用物質を、前記B B Bを通過して輸送する、前記方法。

**【請求項 2】**

前記作用物質への脳曝露時間が延長される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記治療標的が神経変性疾患に関与している、請求項1または2に記載の方法。

10

**【請求項 4】**

約400nM～約2μMの親和性でT f Rに結合するタンパク質を哺乳動物に投与することを含み、前記タンパク質が、神経変性疾患に関与している治療標的に結合する作用物質に連結されており、それにより前記作用物質への前記哺乳動物の脳の曝露時間が延長される、前記神経変性疾患を治療するための方法。

**【請求項 5】**

前記タンパク質が、より強い親和性で前記T f Rに結合する参照タンパク質に連結された作用物質と比較して前記作用物質への脳曝露時間を延長する、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

20

**【請求項 6】**

脳曝露が、時間に対する前記作用物質の脳中濃度のプロットの曲線下面積（A U C）を測定することによって判定される、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記タンパク質が、より強い親和性で前記T f Rに結合する参照タンパク質に連結された作用物質と比較して、前記哺乳動物における治療有効濃度での前記作用物質への脳曝露時間を延長する、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記参照タンパク質が、約50nMの親和性またはこれよりも強い親和性で前記T f Rに結合する、請求項5～7のいずれか1項に記載の方法。

30

**【請求項 9】**

前記T f Rが靈長類T f Rである、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記靈長類T f RがヒトT f Rである、請求項9に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記タンパク質が前記T f Rアピカルドメインに結合する、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記タンパク質が、約420nM～約1.5μMの親和性で前記T f Rに結合する、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

40

**【請求項 13】**

前記タンパク質が、約600nM～約1.5μMの親和性で前記T f Rに結合する、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記作用物質の治療有効濃度が、前記哺乳動物における神経変性疾患の1つ以上の症状を治療する濃度である、請求項7～13のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記神経変性疾患が、アルツハイマー病（A D）、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項3～14のいずれか1項に記載の方法。

50

**【請求項 16】**

前記作用物質が抗体可変領域を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記作用物質が抗体フラグメントを含む、請求項 16 に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記作用物質が F a b または s c F V を含む、請求項 17 に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記タンパク質が、T f R に結合することができる非天然結合部位を含む改変 F c ポリペプチドである、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記タンパク質が、T f R に特異的に結合する抗体可変領域を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 21】**

前記タンパク質が抗体フラグメントを含む、請求項 20 に記載の方法。

**【請求項 22】**

前記タンパク質が F a b または s c F V を含む、請求項 21 に記載の方法。

**【請求項 23】**

前記治療標的が、 - セクレターゼ 1 ( B A C E 1 ) タンパク質、タウタンパク質、骨髓細胞で発現する誘発受容体 2 ( t r i g g e r i n g r e c e p t o r e x p r e s s e d o n m y e l o i d c e l l s 2 : T R E M 2 ) タンパク質、及び - シヌクレインタンパク質からなる群から選択される、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 24】**

前記治療標的が B A C E 1 であり、かつ、前記タンパク質に連結された場合の前記作用物質が、前記参照タンパク質に連結された場合と比較して、前記哺乳動物の脳内に存在するアミロイド タンパク質 ( A ) の量をより長時間にわたって減少させる、請求項 5 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 25】**

前記作用物質に連結された前記タンパク質が、薬学的に許容される担体の一部として投与される、請求項 4 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、2018年2月15日出願の国際特許出願番号 P C T / U S 2 0 1 8 / 0 1 8 3 7 1 、2017年11月8日出願の米国特許仮出願第 6 2 / 5 8 3 , 3 1 4 号、及び 2017年8月10日出願の米国特許仮出願第 6 2 / 5 4 3 , 6 5 8 号に基づく優先権を主張するものであり、当該出願の開示内容をあらゆる目的でそれらの全容にわたって本明細書に参照により援用するものである。

**【発明の概要】****【0002】****【図面の簡単な説明】****【0003】**

【図 1】野生型マウスにおける C H 3 C ポリペプチドの薬物動態学 ( P K ) 分析を示す。すべてのポリペプチド - F a b 融合体は、より速いクリアランスを示した C H 3 C . 3 . 2 - 5 を除き、野生型 F c - F a b 融合体 ( すなわち、抗 R S V 抗体である A b 1 2 2 、及び抗 B A C E 1 抗体である A b 1 5 3 ) と同等のクリアランスを示した。

【図 2】マウスの脳組織における薬物動態学 / 薬力学 ( P K / P D ) データを示す。キメラ h u T f R ヘテロ接合体マウス ( n = 4 / 群 ) に 4 2 m g / k g の A b 1 5 3 または一価 C H 3 C . 3 5 . N 1 6 3 ( 「 C H 3 C . 3 5 . N 1 6 3 \_ m o n o 」 として示される ) を投与した。

10

20

30

40

50

)のいずれかを静脈内投与し、野生型マウス(  $n = 3$  )に 50 mg / kg のコントロールヒト Ig G 1 (「 hu Ig G 1 」として示される)を静脈内投与した。棒グラフは平均  $\pm$  SEM を表す。

【図 3 A】抗 BACE1\_Ab153、CH3C35.21 : Ab153、CH3C35.20 : Ab153、または CH3C35 : Ab153 ポリペプチド融合体の単回の 50 mg / kg の全身注射後の hTfR アビカル  $^{+/-}$  ノックイン (KI) マウスの血漿中の hu Ig G 1 濃度を示す (平均  $\pm$  SEM、 $n = 5$  / 群)。

【図 3 B】抗 BACE1\_Ab153、CH3C35.21 : Ab153、CH3C35.20 : Ab153、または CH3C35 : Ab153 ポリペプチド融合体の単回の 50 mg / kg の全身注射後の hTfR アビカル  $^{+/-}$  ノックイン (KI) マウスの脳ライセート中の hu Ig G 1 濃度を示す (平均  $\pm$  SEM、 $n = 5$  / 群)。 10

【図 3 C】抗 BACE1\_Ab153、CH3C35.21 : Ab153、CH3C35.20 : Ab153、または CH3C35 : Ab153 ポリペプチド融合体の単回の 50 mg / kg の全身注射後の hTfR アビカル  $^{+/-}$  KI マウスの脳ライセート中の内因性マウス A の濃度を示す (平均  $\pm$  SEM、 $n = 5$  / 群)。

【図 3 D】抗 BACE1\_Ab153、CH3C35.21 : Ab153、CH3C35.20 : Ab153、または CH3C35 : Ab153 ポリペプチド融合体の単回の 50 mg / kg の全身注射後の hTfR アビカル  $^{+/-}$  KI マウスの脳ライセート中のアクチンに対して正規化した脳 T f R タンパク質のウェスタンプロットによる定量化を示す (平均  $\pm$  SEM、 $n = 5$  / 群)。 20

【図 4 A】抗 BACE1\_Ab153、CH3C.35.23 : Ab153、または CH3C.35.23.3 : Ab153 ポリペプチド融合体の単回の 50 mg / kg の全身注射後の hTfR アビカル  $^{+/-}$  KI マウスの血漿中の hu Ig G 1 濃度を示す (平均  $\pm$  SEM、 $n = 5$  / 群)。

【図 4 B】抗 BACE1\_Ab153、CH3C.35.23 : Ab153、または CH3C.35.23.3 : Ab153 ポリペプチド融合体の単回の 50 mg / kg の全身注射後の hTfR アビカル  $^{+/-}$  KI マウスの脳ライセート中の hu Ig G 1 濃度を示す (平均  $\pm$  SEM、 $n = 5$  / 群)。

【図 4 C】抗 BACE1\_Ab153、CH3C.35.23 : Ab153、または CH3C.35.23.3 : Ab153 ポリペプチド融合体の単回の 50 mg / kg の全身注射後の hTfR アビカル  $^{+/-}$  KI マウスの脳ライセート中の内因性マウス A の濃度を示す (平均  $\pm$  SEM、 $n = 5$  / 群)。 30

【図 4 D】抗 BACE1\_Ab153、CH3C.35.23 : Ab153、または CH3C.35.23.3 : Ab153 ポリペプチド融合体の単回の 50 mg / kg の全身注射後の hTfR アビカル  $^{+/-}$  KI マウスの脳ライセート中のアクチンに対して正規化した脳 T f R タンパク質のウェスタンプロットによる定量化を示す (平均  $\pm$  SEM、 $n = 4$  / 群)。

【図 5】hTfR アビカル  $^{+/-}$  KI マウスにおける操作された T f R 結合ポリペプチドの hTfR 親和性と、経時的な脳曝露との間の関係を示す。ドットは、hTfR アビカル  $^{+/-}$  KI マウスにおける 50 mg / kg の単回投与後の異なる AT V 親和性バリアントの累積経時的脳曝露 (AUC) を示す。ポリペプチドの脳濃度 (hu Ig G 1 により測定される) を、投与後の様々な日 (1 ~ 10 日の範囲) で計算した。データは、各実験で各群  $n = 4 \sim 5$  匹のマウスを用いた 3 つの独立した試験の要約を示している。 40

【図 6】hTfR アビカル  $^{+/-}$  KI マウスにおける操作された T f R 結合ポリペプチドの hTfR 親和性と、最大脳中濃度との間の関係を示す。ドットは、50 mg / kg の単回投与後の投与 1 日後に測定した異なるポリペプチド親和性バリアントの最大脳中濃度を示す。データは、各試験で各群  $n = 4 \sim 5$  匹のマウスを用いた 3 つの独立した実験の要約を示している。

【図 7】hTfR アビカル  $^{+/-}$  KI マウスにおける操作された T f R 結合ポリペプチドの hTfR 親和性と、ポリペプチドの血漿中濃度に対する脳中濃度の比との間の関係を示す。 50

す。ドットは、 $50 \text{ mg} / \text{kg}$  の単回投与後の投与 1 日後に測定した異なるポリペプチド親和性バリアントの血漿中濃度に対する最大脳中濃度の比を示す。データは、各実験で各群  $n = 4 \sim 5$  匹のマウスを用いた 3 つの独立した試験の要約を示している。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0004】

###### 詳細な説明

###### I . 序論

本発明は、疾患の治療のために、TfR 結合ポリペプチド及びタンパク質に連結された治療用物質を、血液脳関門 (BBB) を通過して輸送することに関する。本発明は、BBB を通過して治療用物質を輸送するうえで望ましい TfR 結合親和性が、治療用物質の標的と、及び疾患の治療における有効性をもたらす作用機序とに依存するという発見に一部に基づくものである。詳細には、比較的低い TfR 親和性を有するポリペプチド及びタンパク質では、 $C_{max}$  は低くなるがクリアランスは遅くなり、そのため、曝露時間が長くなることが見出された。

10

##### 【0005】

抗 BACE1 物質及び抗タウ物質（例えば、アルツハイマー病の治療用）及び抗シヌクレイン物質（例えば、パーキンソン病の治療用）ならびに他のものなどの阻害抗体をはじめとする阻害物質を含む、いくつかの療法では、投与ウインドウにわたって治療用物質への長期的又は持続的な脳曝露を実現することは、半減期が短くかつ／またはターンオーバーが速い（例えば、タウ、シヌクレイン）標的を含む標的を完全に嵌入するために望ましく、かつ A（やはり短い半減期を有する）の產生を低減させるために BACE1 活性の阻害を持続させることが望ましい。治療用物質への長期的又は持続的な脳曝露を実現するのに、 $400 \sim 2,000 \text{ nM}$  の範囲の TfR 親和性を有するポリペプチド及びタンパク質を使用することが特に有用である。

20

##### 【0006】

###### I I . 定義

本明細書で使用する場合、単数形「1つの (a)」、「1つの (an)」、及び「その (the)」には、内容によってそうでない旨が明確に示されない限り、複数の指示対象が含まれる。したがって、例えば、「ポリペプチド」と言った場合、2つ以上のそのような分子を含み得る、といった具合である。

30

##### 【0007】

本明細書で使用する場合、「約」及び「およそ」なる用語は、数値または範囲において特定される量を修飾して用いられる場合、その数値、及び例えば  $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、または  $\pm 5\%$  といった、当業者には周知のその値からの妥当な偏差が、記載される値の想定される意味の範囲内にあることを示す。

##### 【0008】

本発明に関連して使用する場合の「トランスフェリン受容体」または「TfR」とは、トランスフェリン受容体タンパク質 1 のことを指す。ヒトトランスフェリン受容体 1 のポリペプチド配列は、配列番号 6 に記載されている。他の種由来のトランスフェリン受容体タンパク質 1 の配列も知られている（例えば、チンパンジー、アクセッショング番号 X P \_ 0 0 3 3 1 0 2 3 8 . 1 ; アカゲザル、N P \_ 0 0 1 2 4 4 2 3 2 . 1 ; イヌ、N P \_ 0 0 1 0 0 3 1 1 1 . 1 ; ウシ、N P \_ 0 0 1 1 9 3 5 0 6 . 1 ; マウス、N P \_ 0 3 5 7 6 8 . 1 ; ラット、N P \_ 0 7 3 2 0 3 . 1 ; 及びニワトリ、N P \_ 9 9 0 5 8 7 . 1 ）。「トランスフェリン受容体」なる用語には、トランスフェリン受容体タンパク質 1 の染色体座の遺伝子によってコードされる例示的な参照配列、例えばヒト配列の対立遺伝子バリアントも含まれる。完全長のトランスフェリン受容体タンパク質は、短い N 末端細胞内領域、膜貫通領域、及び大きな細胞外ドメインを含んでいる。細胞外ドメインは、プロテアーゼ様ドメイン、螺旋状ドメイン、及びアピカルドメインの 3 つのドメインによって特徴付けられる。ヒトトランスフェリン受容体 1 のアピカルドメイン配列は配列番号 4 に記載されている。

40

50

## 【0009】

本明細書で使用する場合、「Fcポリペプチド」なる用語は、構造ドメインとしてIgフォールドを特徴とする、天然に存在する免疫グロブリンの重鎖ポリペプチドのC末端領域を指す。Fcポリペプチドは、少なくともCH2ドメイン及び/またはCH3ドメインを含む定常領域配列を含み、ヒンジ領域の少なくとも一部を含むことができる。一般に、Fcポリペプチドは可変領域を含まない。

## 【0010】

「改変Fcポリペプチド」とは、野生型の免疫グロブリン重鎖Fcポリペプチド配列と比較して少なくとも1つの変異、例えば置換、欠失、または挿入を有するが、天然のFcポリペプチドの全体のIgフォールドまたは構造を保持している、Fcポリペプチドを指す。

10

## 【0011】

本明細書で使用する場合の「CH3ドメイン」及び「CH2ドメイン」なる用語は、免疫グロブリンの定常領域ドメインポリペプチドのことを指す。IgG抗体に関連して、CH3ドメインポリペプチドとは、EU番号付けスキームに従って番号付けした場合に約341位～約447位のアミノ酸のセグメントのことを指し、CH2ドメインポリペプチドとは、EU番号付けスキームに従って番号付けした場合に約231位～約340位のアミノ酸のセグメントのことを指す。CH2及びCH3ドメインポリペプチドは、IMGT(ImmunoGenetics)番号付けスキームによって番号付けすることもでき、その場合、IMGT Scientific chartの番号付け(IMGTウェブサイト)に従えば、CH2ドメインの番号付けは1～110であり、CH3ドメインの番号付けは1～107である。CH2及びCH3ドメインは、免疫グロブリンのFc領域の一部である。IgG抗体に関連して、Fc領域とは、EU番号付けスキームに従って番号付けした場合に、約231位～約447位までのアミノ酸のセグメントのことを指す。本明細書で使用する場合、「Fc領域」なる用語は、抗体のヒンジ領域の少なくとも一部も含み得る。例示的なヒンジ領域配列は、配列番号5に記載されている。

20

## 【0012】

「可変領域」なる用語は、生殖細胞系列の可変(V)遺伝子、多様性(D)遺伝子、または連結(J)遺伝子から誘導され(定常(C $\mu$ 及びC $\gamma$ )遺伝子セグメントからは誘導されない)、抗体に抗原と結合するためのその特異性を与える抗体重鎖または軽鎖内のドメインのことを指す。一般的に抗体可変領域は、3個の超可変「相補性決定領域」を間に挟んだ4個の保存された「フレームワーク」領域で構成されている。

30

## 【0013】

CH3及びCH2ドメインに関して「野生型」、「天然」、及び「天然に存在する」なる用語は、本明細書では、天然に存在する配列を有するドメインのことを指して用いられる。

## 【0014】

本発明に関連して、突然変異体ポリペプチドまたは突然変異体ポリヌクレオチドについて「突然変異体」なる用語は、「バリアント」と互換的に用いられる。所定の野生型(例えば、CH3またはCH2ドメイン)参照配列に関するバリアントは、天然に存在する対立遺伝子バリアントを含むことができる。「天然に存在しない」(例えばCH3またはCH2)ドメインとは、自然界で細胞内に存在せず、かつ、天然ドメイン(例えば、CH3ドメインまたはCH2ドメイン)のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの遺伝子変容によって、例えば遺伝子操作技術または突然変異導入法を用いて生成される、バリアントドメインまたは突然変異体ドメインのことを指す。「バリアント」は、野生型に対して少なくとも1つのアミノ酸変異を含むあらゆるドメインを含む。突然変異は、置換、挿入、及び欠失を含み得る。

40

## 【0015】

本明細書で使用する場合の「結合親和性」なる用語は、2個の分子間、例えばポリペプチドの1個の結合部位とポリペプチドが結合する標的、例えばTRとの間の非共有結合

50

相互作用の強さのことを指す。したがって、例えば、この用語は、特に示されるかまたは文脈から明らかでない限り、ポリペプチドとその標的との間の 1 : 1 の相互作用のことを指す場合がある。結合親和性は、解離速度定数 ( $k_d$ 、時間<sup>-1</sup>) を結合速度定数 ( $k_a$ 、時間<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>) で割ったものなどを指す平衡解離定数 ( $K_D$ ) を測定することにより定量化することができる。 $K_D$  は、例えば、Biacore (商標) システムなどの表面プラズモン共鳴 (SPR) 法 (例えば、下記実施例 3 に述べる方法を用いる); KinExA (登録商標) などのカイネティック排除アッセイ; 及びバイオレイヤー干渉法 (例えば、FortéBio (登録商標) Octet (登録商標) プラットフォームを使用) を使用して、複合体形成及び解離の速度論を測定することによって求めることができる。本明細書で使用する場合、「結合親和性」には、ポリペプチドとその標的と間の 1 : 1 の相互作用を反映したもののように正式な結合親和性だけでなく、強い結合を反映しうる  $K_D$  が計算された見かけ上の親和性も含まれる。

10

## 【0016】

本明細書で使用する場合、本明細書に記載される操作された T f R 結合ポリペプチド、T f R 結合ペプチド、または T f R 結合抗体について言及する際、標的に、例えば T f R に「特異的に結合する」または「選択的に結合する」なる用語は、操作された T f R 結合ポリペプチド、T f R 結合ペプチド、または T f R 結合抗体が、構造的に異なる標的に結合するよりも、より強いアフィニティー、より強いアビディティー、及び / またはより長い持続時間で標的に結合する結合反応のことを指す。典型的な実施形態では、操作された T f R 結合ポリペプチド、T f R 結合ペプチド、または T f R 結合抗体は、同じ親和性アッセイ条件下でアッセイした場合に無関係の標的と比較して特定の標的、例えば T f R に対して少なくとも 5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、25 倍、50 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍、またはそれよりも高い親和性を有する。本明細書で使用する場合の特定の標的 (例えば、T f R) 「特異的結合」、「に特異的に結合する」、または「に対して特異的である」なる用語は、例えば、結合する標的に対する平衡解離定数  $K_D$  が例えば、 $10^{-4}$  M 以下、例えば、 $10^{-5}$  M、 $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M、または  $10^{-12}$  M である分子によって示されうる。いくつかの実施形態では、操作された T f R 結合ポリペプチド、T f R 結合ペプチド、または T f R 結合抗体は、種間で保存されている (例えば、種間で構造的に保存されている)、例えば、非ヒト靈長類とヒトとの間で保存されている (例えば、非ヒト靈長類とヒトとの間で構造的に保存されている) T f R のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、操作された T f R 結合ポリペプチド、T f R 結合ペプチド、または T f R 結合抗体は、ヒト T f R にだけ結合することができる。

20

## 【0017】

「アミノ酸」なる用語は、天然に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体のことを指す。

30

## 【0018】

天然に存在するアミノ酸とは、遺伝子コードによってコードされるもの、及び、例えばヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタミン酸、及び O - ホスホセリンなどの後で修飾されたアミノ酸である。「アミノ酸類似体」とは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、及び R 基に結合した 炭素を有する、化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。かかる類似体は、修飾された R 基 (例えばノルロイシン) または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持している。「アミノ酸模倣体」とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化合物のことを指す。

40

## 【0019】

天然に存在する - アミノ酸としては、これらに限定されるものではないが、アラニン (Ala)、システイン (Cys)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、フェニルアラニン (Phe)、グリシン (Gly)、ヒスチジン (His)、イソロ

50

イシン( I l e )、アルギニン( A r g )、リシン( L y s )、ロイシン( L e u )、メチオニン( M e t )、アスパラギン( A s n )、プロリン( P r o )、グルタミン( G l n )、セリン( S e r )、スレオニン( T h r )、バリン( V a l )、トリプトファン( T r p )、チロシン( T y r )、及びこれらの組み合わせが挙げられる。天然に存在する  
-アミノ酸の立体異性体としては、これらに限定されるものではないが、D - アラニン( D - A l a )、D - システイン( D - C y s )、D - アスパラギン酸( D - A s p )、D - グルタミン酸( D - G l u )、D - フェニルアラニン( D - P h e )、D - ヒスチジン( D - H i s )、D - イソロイシン( D - I l e )、D - アルギニン( D - A r g )、D - リシン( D - L y s )、D - ロイシン( D - L e u )、D - メチオニン( D - M e t )、D - アスパラギン( D - A s n )、D - プロリン( D - P r o )、D - グルタミン( D - G l n )、D - セリン( D - S e r )、D - スレオニン( D - T h r )、D - バリン( D - V a l )、D - トリプトファン( D - T r p )、D - チロシン( D - T y r )、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

## 【0020】

本明細書では、アミノ酸は、それらの一般的に知られる3文字記号によるか、またはIUPAC - IUB生化学命名法委員会により推奨される1文字記号で呼称される。

## 【0021】

「ポリペプチド」及び「ペプチド」なる用語は、本明細書では一本鎖中のアミノ酸残基のポリマーを呼称するうえで互換的に使用される。かかる用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学模倣体であるようなアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマー及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用される。アミノ酸ポリマーは、全体がL - アミノ酸から構成されてもよいか、全体がD - アミノ酸から構成されてもよいか、またはLアミノ酸とDアミノ酸との混合物から構成されてもよい。

## 【0022】

本明細書で使用する場合の「タンパク質」とは、ポリペプチド、または一本鎖ポリペプチドの二量体(すなわち2個)もしくは多量体(すなわち3個以上)のことを指す。タンパク質の一本鎖ポリペプチド同士は、例えばジスルフィド結合のような共有結合、または非共有結合性相互作用によって結合することができる。

## 【0023】

「保存的置換」、「保存的変異」、または「保存的に改変されたバリエント」なる用語は、あるアミノ酸の、類似の特性を有するものとして分類され得る別のアミノ酸による置換をもたらす変化のことを指す。このようにして定義される保存的アミノ酸のグループのカテゴリーの例としては、G l u (グルタミン酸またはE)、A s p (アスパラギン酸またはD)、A s n (アスパラギンまたはN)、G l n (グルタミンまたはQ)、L y s (リシンまたはK)、A r g (アルギニンまたはR)、及びH i s (ヒスチジンまたはH)を含む「荷電/極性基」；P h e (フェニルアラニンまたはF)、T y r (チロシンまたはY)、T r p (トリプトファンまたはW)、及び(ヒスチジンまたはH)を含む「芳香族基」；ならびに、G l y (グリシンまたはG)、A l a (アラニンまたはA)、V a l (バリンまたはV)、L e u (ロイシンまたはL)、I l e (イソロイシンまたはI)、M e t (メチオニンまたはM)、S e r (セリンまたはS)、T h r (スレオニンまたはT)、及びC y s (システインまたはC)を含む「脂肪族基」を挙げることができる。各グループ内にサブグループを特定することもできる。例えば、荷電または極性アミノ酸のグループは、L y s 、A r g 、及びH i s からなる「正に荷電したサブグループ」、G l u 及びA s p からなる「負に荷電したサブグループ」、ならびにA s n 及びG l n からなる「極性サブグループ」を含むサブグループに更に分割することができる。別の例では、芳香族または環状基を、P r o 、H i s 、及びT r p からなる「窒素環サブグループ」、ならびにP h e 及びT y r からなる「フェニルサブグループ」を含むサブグループに更に分割することができる。更に別の例では、脂肪族基を、例えば、V a l 、L e u 、G l y 、及びA l a からなる「脂肪族非極性サブグループ」、ならびにM e t 、S e r 、T h r

10

20

30

40

50

、及び C y s からなる「脂肪族弱極性サブグループ」などのサブグループに更に分割することができる。保存的変異のカテゴリーの例としては、上記のサブグループ内のアミノ酸のアミノ酸置換、例えば、これらに限定されるものではないが、正電荷を維持できるように L y s を A r g に、またはその逆；負電荷を維持できるように G l u を A s p に、またはその逆；遊離 - O H を維持できるように S e r を T h r に、またはその逆；遊離 - N H<sub>2</sub> を維持できるように G l n を A s n に、またはその逆が挙げられる。いくつかの実施形態では、例えば活性部位において疎水性アミノ酸を天然に存在する疎水性アミノ酸に置換することで疎水性が保たれる。

#### 【0024】

2個以上のポリペプチド配列に関連した「同一」または「同一性」%なる用語は、配列比較アルゴリズムを用いて、またはマニュアルアラインメント及び目視による検査により測定した場合に比較ウインドウ、または指定された領域にわたって最大の一一致となるよう比較及びアラインした場合に特定の領域にわたって同じであるか、または例えば、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95%もしくはそれ以上一致しているアミノ酸残基の特定の割合(%)を有する2個以上の配列またはサブ配列のことを指す。

#### 【0025】

ポリペプチドの配列比較では、一般的に1つのアミノ酸配列が、候補配列を比較する参考配列の役割を果たす。例えば、視覚的アラインメントまたは既知のアルゴリズムを用いた公開されているソフトウェアを使用するなど、当業者に利用可能な様々な方法を用いてアラインメントを行って最大のアラインメントを得ることができる。かかるプログラムとしては、BLAST プログラム、ALIGN、ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.)、または Megalign (DNASTAR) が挙げられる。最大のアラインメントを得るためにアラインメントで用いられるパラメータは、当業者によって決めることができる。本出願の目的におけるポリペプチド配列比較では、デフォルトのパラメータを用いて2個のタンパク質配列をアラインするための BLASTP アルゴリズムの標準タンパク質 BLAST を用いる。

#### 【0026】

あるポリペプチド配列中の所定のアミノ酸残基の特定に関連して使用される場合、「～に対応する」、「～を基準として決められる」、または「～を基準として番号付けされる」なる用語は、所定のアミノ酸配列を特定の参考配列と最大限アラインして比較した場合にその参考配列の残基の位置を指す。したがって、例えば、改変された F c ポリペプチド中のアミノ酸残基は、その残基が、配列番号 1 と最適にアラインされた場合に配列番号 1 中のそのアミノ酸とアラインする際に配列番号 1 のアミノ酸に「対応する」。参考配列とアラインされるポリペプチドは、参考配列と同じ長さである必要はない。

#### 【0027】

本明細書で互換的に使用される「対象」、「個人」、及び「患者」なる用語は、これに限定されるものではないが、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、ラット、マウス、及びモルモット）、ウサギ、ウシ、ブタ、ウマ、及び他の哺乳動物種を含む哺乳動物のことを指す。一実施形態では、患者はヒトである。

#### 【0028】

「治療」、「治療する」、及びこれに類する用語は、本明細書では、所望の薬理学的及び/または生理学的作用を得ることを一般的に意味して用いられる。「治療する」または「治療」は、軽減、寛解、患者の生存率の改善、生存期間もしくは生存率の増大、症状の消失または傷害、疾患、もしくは状態を患者にとってより耐容できるものとすること、変性もしくは低下の速度の遅延、または患者の物理的もしくは精神的な健康の改善などのあらゆる客観的もしくは主観的なパラメータを含む、傷害、疾患、または状態の治療もしくは改善における奏功のあらゆる兆候のことを指す場合がある。症状の治療または改善は、客観的または主観的なパラメータに基づいたものであってよい。治療の効果は、治療を受

10

20

30

40

50

けていない個人または個人の集団と、または治療前もしくは治療期間の異なる時点において同じ患者と比較することができる。

#### 【0029】

「薬学的に許容される賦形剤」とは、これらに限定されないが、バッファー、担体、または防腐剤などの、ヒトまたは動物における使用に生物学的または薬理学的に適合した非活性医薬成分のことを指す。

#### 【0030】

本明細書で使用する場合、作用物質の「治療量」、「治療有効量」、または「治療有効濃度」とは、対象における疾患の徵候または症状を治療する作用物質の量または濃度である。

10

#### 【0031】

「投与する」なる用語は、作用物質、化合物、または組成物を生物学的作用が望ましい部位に送達する方法のことを指す。これらの方法は、これらに限定されるものではないが、局所投与、非経口投与、静脈内投与、皮内投与、筋肉内投与、髄腔内投与、結腸投与、直腸投与、または腹腔内投与が挙げられる。一実施形態では、本明細書に記載される組成物は静脈内投与される。

#### 【0032】

##### I I I . 治療方法

###### A . 神経変性疾患の治療のための方法

一態様では、本発明は、治療標的（例えば、神経変性疾患に関与している治療標的）に結合する（例えば、特異的に結合する）作用物質（例えば、治療用物質）を、哺乳動物の血液脳関門（B B B）を通過して輸送するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、約400nM～約2μMの親和性でトランスフェリン受容体（T f R）に結合する（例えば、特異的に結合する）ポリペプチドまたはタンパク質にB B Bを曝露することを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は作用物質に連結されており、かつ、連結された作用物質を、B B Bを通過して輸送する。いくつかの実施形態では、作用物質への脳曝露時間が延長される（例えば、参照物質と比較して）。

20

#### 【0033】

別の態様では、本発明は、神経変性疾患を治療するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、約400nM～約2μMの親和性でT f Rに結合する（例えば、特異的に結合する）ポリペプチドまたはタンパク質を哺乳動物に投与することを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、神経変性疾患に関与している治療標的に結合する（例えば、特異的に結合する）作用物質（例えば、治療用物質）に連結されており、それにより作用物質への哺乳動物の脳の曝露時間が延長される。適している神経変性疾患の非限定的な例としては、アルツハイマー病（A D）、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

30

#### 【0034】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、約400nM、500nM、600nM、700nM、800nM、900nM、1μM、1.1μM、1.2μM、1.3μM、1.4μM、1.5μM、1.6μM、1.7μM、1.8μM、1.9μM、または2μMの親和性でT f Rに結合（例えば、特異的に結合）する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、約420nM～約1.5μMまたは600nM～1.5μMの親和性でT f Rに結合する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、約420nMの親和性でT f Rに結合する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、約620nMの親和性でT f Rに結合する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、約750nMの親和性でT f Rに結合する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、約820nMの親和性でT f Rに結合する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、約1,100nMの親和性でT f Rに結合する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、約1,440nMの親和性でT f Rに結合する。

40

50

## 【0035】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはペプチド（例えば、作用物質に連結されたもの）は、より強い親和性で T f R に結合する（例えば、特異的に結合する）参照ポリペプチドまたはタンパク質に連結された作用物質と比較して、哺乳動物において治療有効濃度（例えば、神経変性疾患の 1 つ以上の徴候または症状を治療するうえで充分な濃度）の作用物質への脳曝露時間を延長する。

## 【0036】

いくつかの実施形態では、脳曝露時間（例えば、作用物質への）は、参照と比較して、少なくとも約 1.1 倍、少なくとも約 1.2 倍、少なくとも約 1.3 倍、少なくとも約 1.4 倍、少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 1.75 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2.5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 5 倍、またはそれ以上延長される。10

## 【0037】

いくつかの実施形態では、脳曝露は、脳曝露（例えば、脳内の作用物質の濃度）を時間の関数として、曲線下面積（AUC）を計算することによって定量化される。増加した AUC は、脳曝露が増大または延長されたことを示しうる。いくつかの実施形態では、治療有効濃度の作用物質への脳曝露の持続時間が延長される。

## 【0038】

いくつかの実施形態では、参照ポリペプチドまたはペプチドは、約 400 nM、約 350 nM、約 300 nM、約 250 nM、約 200 nM、約 150 nM、約 100 nM、もしくは約 50 nM の親和性、またはそれよりも強い親和性で T f R に結合する（例えば、特異的に結合する）。いくつかの実施形態では、参照ポリペプチドまたはタンパク質は、約 50 nM の親和性またはそれよりも強い親和性で T f R に結合する。20

## 【0039】

非限定的な例として、治療標的は、 - セクレターゼ 1 (BACE1) タンパク質、タウタンパク質、骨髄細胞で発現する誘発受容体 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2 : TREM2) タンパク質、または - シヌクレインタンパク質とすることができます。いくつかの実施形態では、治療標的は BACE1 であり、かつ、このタンパク質に連結された場合の作用物質（例えば、治療用物質）は、参照タンパク質に連結された場合と比較して、哺乳動物の脳内に存在するアミロイド タンパク質 (A) の量をより長時間にわたって減少させる。30

## 【0040】

いくつかの実施形態では、哺乳動物は霊長類（例えば、ヒト）である。いくつかの実施形態では、ヒトは、神経疾患（例えば、神経変性疾患）の治療を要する患者である。いくつかの実施形態では、患者は神経疾患の 1 つ以上の徴候または症状を有する。

## 【0041】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、霊長類 T f R に結合する（例えば、特異的に結合する）。いくつかの実施形態では、霊長類 T f R はヒト T f R である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、T f R アピカルドメインに結合する。

## 【0042】

いくつかの実施形態では、作用物質（例えば、治療用物質）は、操作された T f R 結合ポリペプチドに連結される。いくつかの実施形態では、操作された T f R 結合ポリペプチドは、ポリペプチドがトランスフェリン受容体に特異的に結合することを可能とする改変を有する CH3 または CH2 ドメインを含む。適切な操作された T f R 結合ポリペプチドの非限定的な例を、下記セクション IV に記載する。いくつかの実施形態では、作用物質は、表 1 または表 2 に記載される操作された T f R 結合ポリペプチドに連結される。いくつかの実施形態では、作用物質は、CH3C.35.23、CH3C.35.23.1.1、CH3C.35.23.3、及び CH3C.35.23.4 からなる群から選択される操作された T f R 結合ポリペプチドに連結される。40

## 【0043】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、作用物質（例えば、治療用物質）は、TfR結合ペプチドに連結される。いくつかの実施形態では、TfR結合ポリペプチドは、アミノ酸約5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個の長さを有する短鎖ペプチドである。適切なペプチド（すなわち、望ましい範囲内の親和性でTfRに結合するもの）を作製、スクリーニング、及び同定するための方法は、当該技術分野では周知のものである。例えば、負の選択と正の選択の交互のラウンドを用いるファージディスプレイ手法を用いて適切なペプチドを同定することができる。この手法は、例えば、その全容をあらゆる目的で本明細書によって援用するLee et al., Eur. J. Biochem. (2001) 268: 2004-2012に記載されている。

10

## 【0044】

いくつかの実施形態では、作用物質（例えば、治療用物質）は、TfR結合抗体に連結される。適切なTfR結合ポリペプチドの非限定的な例は、約480nmの親和性を有する、中国特許出願公報番号CN101245107Aに開示されるH67抗体である。

## 【0045】

いくつかの実施形態では、タンパク質は、TfRに特異的に結合する抗体可変領域を含む。いくつかの例では、タンパク質は抗体フラグメントを含む。いくつかの例では、タンパク質はFabまたはscFvを含む。

## 【0046】

いくつかの実施形態では、作用物質（例えば、治療用物質）は、抗体可変領域を含む。いくつかの実施形態では、作用物質は抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、作用物質はFabまたはscFvを含む。

20

## 【0047】

いくつかの実施形態では、作用物質（例えば、治療用物質）はFabを含み、ポリペプチドはFc形式であり（ヒンジまたは部分的ヒンジ領域を含みうる）、したがって、トランスフェリン受容体結合Fc-Fab融合体を生成する。いくつかの実施形態では、Fc-Fab融合体（例えば、改変CH2またはCH3ドメインポリペプチドを含む）は二量体のサブユニットである。いくつかの実施形態では、二量体はヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、二量体はホモ二量体である。いくつかの実施形態では、二量体は、トランスフェリン受容体に結合する1個のポリペプチドを含む（すなわち、トランスフェリン受容体との結合について一価である）。いくつかの実施形態では、二量体は、トランスフェリン受容体に結合する第2のポリペプチドを含む。第2のポリペプチドは、Fc-Fab融合体中に存在する同じ改変CH3ドメインポリペプチド（または改変CH2ドメインポリペプチド）を含むことにより二価の結合ホモ二量体を与えてよいか、または第2の改変CH3ドメインポリペプチド（または改変CH2ドメインポリペプチド）が第2のトランスフェリン受容体結合部位を与えてよい。いくつかの実施形態では、二量体は、改変CH3ドメインポリペプチドまたは改変CH2ドメインポリペプチドを含む第1のサブユニットと、どちらもトランスフェリン受容体に結合しないCH2及びCH3ドメインを含む第2のサブユニットとを含む。

30

## 【0048】

いくつかの実施形態では、作用物質（例えば、Fabフラグメント）は、ポリペプチドまたはタンパク質に連結されており、かつタウタンパク質（例えば、ヒトタウタンパク質）またはそのフラグメントに結合する。いくつかの実施形態では、作用物質は、リン酸化タウタンパク質、非リン酸化タウタンパク質、タウタンパク質のスプライスアイソフォーム、N末端が切断されたタウタンパク質、C末端が切断されたタウタンパク質、及び/またはそれらのフラグメントに結合することができる。

40

## 【0049】

いくつかの実施形態では、作用物質（例えば、Fabフラグメント）は、ポリペプチドまたはタンパク質に連結されており、かつ-セクレターゼ1(BACE1)タンパク質（例えば、ヒトBACE1タンパク質）またはそのフラグメントに結合する。いくつかの

50

実施形態では、作用物質は、B A C E 1 タンパク質の1つ以上のスプライスアイソフォームまたはそのフラグメントに結合することができる。

#### 【0050】

いくつかの実施形態では、作用物質（例えば、F a b フラグメント）は、ポリペプチドまたはタンパク質に連結されており、かつ骨髄細胞で発現する誘発受容体2（T R E M 2）タンパク質（例えば、ヒトT R E M 2 タンパク質）またはそのフラグメントに結合する。

#### 【0051】

いくつかの実施形態では、作用物質（例えば、F a b フラグメント）は、ポリペプチドまたはタンパク質に連結されており、かつ - シヌクレインタンパク質（例えば、ヒト - シヌクレインタンパク質）またはそのフラグメントに結合する。いくつかの実施形態では、作用物質は、モノマー性 - シヌクレイン、オリゴマー性 - シヌクレイン、 - シヌクレインフィブリル、可溶性 - シヌクレイン、及び / またはこれらのフラグメントに結合することができる。

10

#### 【0052】

#### B . 更なる実施形態及びリンカー

ポリペプチド（例えば、下記で更に説明する改変C H 3 またはC H 2 ドメインポリペプチド）は、F c 領域の別のドメインと連結することができる。いくつかの実施形態では、改変C H 3 ドメインポリペプチドをC H 2 ドメインと連結することができるが、これは、天然に存在するC H 2 ドメイン、または通常はC H 2 ドメインのC末端にあるバリアントC H 2 ドメインであってよい。いくつかの実施形態では、改変C H 2 ドメインポリペプチドをC H 3 ドメインと連結することができるが、これは、天然に存在するC H 3 ドメイン、または通常はC H 3 ドメインのN末端にあるバリアントC H 3 ドメインであってよい。いくつかの実施形態では、C H 3 ドメインに連結された改変C H 2 ドメインを含むポリペプチド、またはC H 2 ドメインに連結された改変C H 3 ドメインを含むポリペプチドは、抗体の部分的または完全なヒンジ領域を更に含むことにより、改変C H 3 ドメインポリペプチドまたは改変C H 2 ドメインポリペプチドが、部分的または完全なヒンジ領域を有するF c 領域の一部となるような形式をもたらす。ヒンジ領域は、いずれの免疫グロブリンサブクラスまたはアイソタイプからのものであってもよい。例示的な免疫グロブリンのヒンジの1つとして、I g G ヒンジ領域、例えば、I g G 1 ヒンジ領域、例えば、ヒトI g G 1 ヒンジアミノ酸配列

20

EPKSCDKTHTCPPCP(配列番号5)

30

がある。

#### 【0053】

尚も他の実施形態では、操作されたT f R 結合ポリペプチド、T f R 結合ペプチド、またはT f R 結合抗体は、タンパク質の精製に有用なペプチドまたはタンパク質、例えば、ポリヒスチジン、エピトープタグ、例えばF L A G 、c - M y c 、ヘマグルチニンタグなど、グルタチオンSトランスフェラーゼ（G S T ）、チオレドキシン、p r o t e i n A 、p r o t e i n G 、またはマルトース結合タンパク質（M B P ）と融合させることができる。場合により、操作されたT f R 結合ポリペプチド、T f R 結合ペプチド、またはT f R 結合抗体と融合されたペプチドまたはタンパク質は、第X a 因子またはトロンビンの切断部位のようなプロテアーゼ切断部位を含むことができる。

40

#### 【0054】

本発明の方法では、作用物質（例えば、治療用物質）は、ポリペプチドまたはタンパク質（例えば、操作されたT f R 結合ポリペプチド、T f R 結合ペプチド、またはT f R 結合抗体）に連結される。リンカーは、ポリペプチドまたはタンパク質に作用物質を連結するのに適したいずれのリンカーであってもよい。いくつかの実施形態では、連結は酵素によって切断可能なものである。特定の実施形態では、連結は中枢神経系に存在する酵素によって切断可能なものである。

#### 【0055】

50

いくつかの実施形態では、リンカーはペプチドリンカーである。ペプチドリンカーは、作用物質（例えば治療用物質）とポリペプチドまたはタンパク質との互いに対する回転を可能とし、かつ／またはプロテアーゼによる消化に対して耐性を有するように構成することができる。いくつかの実施形態では、リンカーは、例えば、Gly、Asn、Ser、Thr、Alaなどのアミノ酸を含む柔軟なリンカーであってよい。かかるリンカーは、周知のパラメータを用いて設計することができる。例えば、リンカーは、Gly-Serリピートのような繰り返し配列を有することができる。

#### 【0056】

異なる実施形態において、作用物質（例えば、治療用物質）のポリペプチドまたはタンパク質（例えば、操作されたTfR結合ポリペプチド、TfR結合ペプチド、またはTfR結合抗体）への連結は、周知の化学架橋試薬及びプロトコールを用いて実現することができる。例えば、当業者には周知の、ポリペプチドまたはタンパク質を対象となる作用物質と架橋するうえで有用な多くの化学架橋剤が存在する。例えば、架橋剤は、分子を段階的に連結するために使用することができるヘテロ二官能性架橋剤である。ヘテロ二官能性架橋剤は、タンパク質を結合するためのより特異的な連結方法の設計を可能とし、それにより、ホモタンパク質ポリマーのような不要な副反応の発生を低減するものである。

#### 【0057】

前記作用物質（例えば、治療用物質）は、トランスフェリン受容体に対するポリペプチドまたはタンパク質の結合を作用物質が妨げない限り、ポリペプチドまたはタンパク質のN末端またはC末端領域に連結することができ、ポリペプチドまたはタンパク質（例えば、操作されたTfR結合ポリペプチド、TfR結合ペプチド、またはTfR結合抗体）の任意の領域に結合させることができる。

#### 【0058】

##### C. 結合親和性、脳中濃度、及び脳曝露の測定

いくつかの実施形態では、TfR結合ポリペプチドの親和性は一価の形式で測定することができる。他の実施形態では、親和性は、例えば、ポリペプチド-Fab融合タンパク質を含む二量体として、二価の形式で測定することができる。

#### 【0059】

結合親和性、結合速度論、及び交差反応性を分析するための方法は当該技術分野では周知のものである。これら的方法としては、これらに限定されるものではないが、固相結合アッセイ（例えば、ELISAアッセイ）、免疫沈降法、表面プラズモン共鳴（例えば、Biacore（商標）（GE Healthcare, Piscataway, NJ））、速度論的排除アッセイ（kinetic exclusion assay）（例えば、KineXa（登録商標））、フローサイトメトリー、蛍光活性化セルソーティング（FACS）、バイオレイヤー干渉法（例えば、Octet（登録商標）（Fortebio, Inc., Menlo Park, CA））、及びウェスタンプロット分析が挙げられる。いくつかの実施形態では、結合親和性及び／または交差反応性を調べるためにELISAが用いられる。いくつかの実施形態では、結合親和性、結合速度論、及び／または交差反応性を調べるために表面プラズモン共鳴（SPR）が用いられる。いくつかの実施形態では、結合親和性、結合速度論、及び／または交差反応性を調べるために速度論的排除アッセイが用いられる。いくつかの実施形態では、結合親和性、結合速度論、及び／または交差反応性を調べるためにバイオレイヤー干渉法が用いられる。

#### 【0060】

結合親和性（例えば、TfRに対する）を決定するための方法の非限定的な1つの例を下記実施例3で述べるが、この実施例ではBiacore（商標）器具を使用した表面プラズモン共鳴によって親和性を測定している。この方法では、対象とする操作されたTfR結合ポリペプチド、TfR結合ペプチド、またはTfR結合抗体をセンサーチップ上に捕捉し、TfRの連続希釈液をセンサーチップ上に特定の流速（例えば、30 μL／分）及び温度（例えば、室温）で注入する。指定の会合時間及び解離時間（例えば、それぞれ45秒及び180秒）を用いて分析した後、センサーチップを再生する。コントロール（

10

20

30

40

50

例えば、無関係な Ig G を同様の濃度で用いる) から測定された反応を減じることによって結合反応を補正し、ソフトウェアを使用して平衡反応を濃度に対してフィッティングすることによって安定状態の親和性を求めることができる。

#### 【0061】

脳内及び / または血漿中の作用物質( 例えば、操作された T f R 結合ポリペプチドに、 T f R 結合ペプチドに、または T f R 結合抗体に連結されたもの ) の濃度は、例えば、ヒトトランスフェリン受容体 ( h T f R ) ノックインマウスモデルを用いて測定することができる。かかるモデルを用いることで、例えば、最大脳中濃度 ( C<sub>m a x</sub> ) 及び / または脳曝露を測定及び / または比較して、例えば C<sub>m a x</sub> が増大するかどうか、及び / または脳曝露時間が延長されるかどうかを判定することができる。ヒトアピカル T f R ( h T f R アピカル + / + ) マウスノックインモデルの作出については、下記実施例 2 で述べる。適切なモデルを作出するため、 C R I S P R / C a s 9 系を使用してマウス T f r c 遺伝子( 例えば、インビボの発現が内因性プロモーターの制御下にある ) 内でヒト T f r c アピカルドメインを発現するマウスを作製することができる。詳細には、 C a s 9 、シングルガイド RNA 、及びドナー DNA ( 例えば、マウスで発現させるためにコドン最適化されたヒトアピカルドメインのコーディング配列 ) をマウス胚に( 例えば、前核注入により ) 導入することができる。次に、胚を偽妊娠雌に移植することができる。胚を移植した雌の子孫からのファウンダー雄を野生型の雌と交配して F 1 ヘテロ接合体マウスを作出することができる。次に、 F 1 世代のヘテロ接合体マウスの交配によってホモ接合体マウスを作出することができる。

10

20

30

#### 【0062】

作用物質( 例えば、操作された T f R 結合ポリペプチドに、 T f R 結合ペプチドに、または T f R 結合抗体に連結されたもの ) の脳及び / または血漿中濃度または曝露の評価のために、連結された作用物質をマウスモデル( 例えば、 h T f R アピカル + / + ) に投与することができる。適切な時間の後にマウスから血漿試料を得た後、血管系を適切な溶液で灌流することができる。灌流後、脳( またはその一部 ) を抽出し、ホモジナイズしてから溶解することができる。血漿及び / または脳ライセート中の作用物質濃度を当業者には周知の常法を用いて測定することができる。ノックインマウスモデルに所定範囲の用量を投与することにより、標準曲線を作成することができる。ノックインマウスモデルに、異なる操作された T f R 結合ポリペプチド、 T f R 結合ペプチド、または T f R 結合抗体( 例えば、異なる T f R 親和性を有するもの ) に連結された作用物質、または参照ポリペプチドもしくはタンパク質( 例えば、対象とするポリペプチドまたはタンパク質よりも強い T f R に対する親和性を有するもの ) に連結された作用物質を投与することにより、作用物質への脳曝露及び / または脳内の作用物質の C<sub>m a x</sub> 値に対する操作された T f R 結合ポリペプチド、 T f R 結合ペプチド、または T f R 結合抗体の効果に関する比較を行うことができる。

30

#### 【0063】

##### D . 医薬組成物

本発明で使用するための製剤を調製するためのガイダンスは、当業者には周知の医薬品及び製剤用の任意の数のハンドブックにみることができる。

40

#### 【0064】

いくつかの実施形態では、作用物質( 例えば、治療用物質 ) に連結されたポリペプチドまたはタンパク質を薬学的に許容される担体または賦形剤の一部として投与する。薬学的に許容される担体には、生理学的適合性を有し、活性剤の活性を好ましくは妨げない、または他の形で阻害しないあらゆる溶媒、分散媒、またはコーティングが含まれる。様々な薬学的に許容される賦形剤が周知である。

40

#### 【0065】

いくつかの実施形態では、担体は、静脈内、髄腔内、脳室内、筋肉内、経口、腹腔内、経皮、局所、または皮下投与に適したものである。薬学的に許容される担体は、例えば組成物を安定させるかまたはポリペプチドの吸収を増大もしくは減少させる作用を有する 1

50

つ以上の生理学的に許容される化合物を含むことができる。生理学的に許容される化合物としては、例えば、グルコース、スクロース、またはデキストランなどの炭水化物、アスコルビン酸またはグルタチオンなどの酸化防止剤、キレート剤、低分子量タンパク質、活性剤のクリアランスもしくは加水分解を低減する組成物、または賦形剤もしくは他の安定化剤及び／または緩衝剤を挙げることができる。他の薬学的に許容される担体及びそれらの製剤も当該技術分野で利用可能である。

#### 【0066】

本明細書に記載される医薬組成物は、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠製造、乳化、カプセル化、封入、または凍結乾燥プロセスにより、当業者には周知の方法で製造することができる。以下の方法及び賦形剤はあくまで例示的なものであり、いかなる意味でも限定的なものではない。10

#### 【0067】

経口投与のために、作用物質（例えば、治療用物質）に連結されたポリペプチドまたはタンパク質を、当該技術分野では周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって製剤化することができる。かかる担体は、化合物を、治療される患者によって経口摂取される、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、エマルション、親油性及び親水性懸濁液、液剤、ゲル、シロップ剤、スラリー剤、及び懸濁液などとして製剤化することを可能とする。経口用の医薬製剤は、ポリペプチドを、固体賦形剤と混合し、得られた混合物を場合に応じて粉碎し、必要に応じて適切な助剤を加えた後、顆粒の混合物を処理して錠剤または糖衣コアを得ることによって得ることができる。適切な賦形剤としては、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類などの充填剤；例えばトウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、及び／またはポリビニルピロリドンなどのセルロース調製物が挙げられる。必要に応じて、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸、もしくはアルギン酸ナトリウムなどのその塩などの崩壊剤を加えることができる。20

#### 【0068】

作用物質（例えば、治療用物質）に連結されたポリペプチドまたはタンパク質は、注射により、例えばボーラス注射または連続注入により非経口投与のように製剤化することができる。注射用には、ポリペプチドを植物油または同様の油類、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸またはプロピレングリコールのエステルなどの水性または非水性溶媒中に、必要に応じて、可溶化剤、等張化剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤、及び防腐剤などの従来の添加剤と共に、溶解、懸濁、または乳化することによってポリペプチドを製剤として配合することができる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、水溶液、好ましくはハンクス液、リングル液、または生理学的食塩水のような生理学的適合性を有するバッファー中に配合することができる。注射用の製剤は、単位剤形、例えば、防腐剤が添加されたアンプル中、または複数用量容器中で与えることができる。組成物は、油性または水性溶媒中の懸濁液、溶液、またはエマルションの形態を取ることができ、懸濁化剤、安定化剤、及び／または分散剤などの配合剤を含むことができる。30

#### 【0069】

一般的に、インビオ投与に使用される医薬組成物は無菌である。滅菌処理は、例えば、熱滅菌、蒸気滅菌、滅菌濾過、または放射線照射などの当該技術分野では周知の方法によって行うことができる。40

#### 【0070】

##### I.V. 操作されたトランスフェリン受容体結合ポリペプチド

このセクションでは、トランスフェリン受容体に結合し、かつ血液脳関門（BBB）を通過して輸送されることが可能である、操作されたポリペプチドの非限定的な例について述べる。

#### 【0071】

いくつかの実施形態では、操作されたポリペプチドは、ポリペプチドがトランスフェリ50

ン受容体に特異的に結合することを可能とするような改変を有するCH3またはCH2ドメインを含む。かかる改変は、CH3またはCH2ドメインの表面に存在するアミノ酸の特定のセットに導入される。いくつかの実施形態では、改変CH3またはCH2ドメインを含むポリペプチドは、トランスフェリン受容体のアピカルドメイン内のエピトープに特異的に結合する。

#### 【0072】

当業者には、例えばIgM、IgA、IgE、IgDなどの他の免疫グロブリンアイソタイプのCH2及びCH3ドメインを、これらのドメイン内で上記に述べたセット(i)～(vi)に対応するアミノ酸を特定することにより同様に改変することができるが理解される。改変は、例えば、非ヒト靈長類、サル、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、ニワトリなどの他の種に由来する免疫グロブリンからの対応するドメインに行なうことができる。10

#### 【0073】

##### CH3トランスフェリン受容体結合ポリペプチド

いくつかの実施形態では、改変されるドメインはIgGのCH3ドメインのようなヒトIgのCH3ドメインである。CH3ドメインは、いずれのIgGのサブタイプ、すなわち、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4から得られるものであってもよい。IgG抗体に関連して、CH3ドメインとは、EU番号付けスキームに従って番号付けした場合に、約341位～約447位までのアミノ酸のセグメントのことを指す。トランスフェリン受容体結合のためのアミノ酸位置の対応するセットを特定する目的でのCH3ドメイン内の位置は、特に指定されない限り、配列番号3を基準として決められるか、または配列番号1のアミノ酸114～220を基準として決められる。置換もまた、配列番号1を基準として決められ、すなわち、あるアミノ酸は、配列番号1の対応する位置のアミノ酸に対して置換であるとみなされる。配列番号1は、部分的なヒンジ領域の配列であるPCPをアミノ酸1～3として含んでいる。配列番号1を基準としたCH3ドメイン内の位置の番号付けは、これらの最初の3個のアミノ酸を含む。20

#### 【0074】

上記に述べたように、改変することができるCH3ドメインの残基のセットは、本明細書では配列番号1を基準として番号付けされる。例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のCH3ドメインなどの任意のCH3ドメインは、配列番号1の記載される位置の残基に対応する残基の1つ以上のセットにおいて、改変、例えばアミノ酸置換を有することができる。配列番号1の任意の特定の位置に対応するIgG2、IgG3、及びIgG4の配列のそれぞれの位置は容易に決めるができる。30

#### 【0075】

一実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変CH3ドメインポリペプチドは、トランスフェリン受容体のアピカルドメインと、完全長のヒトトランスフェリン受容体配列(配列番号6)の208位を含むエピトープにおいて結合するが、この位置は、配列番号4に記載されるヒトトランスフェリン受容体アピカルドメイン配列の11位に対応している。配列番号4は、ヒトトランスフェリン受容体1のユニプロテイン(uniprotein)配列P02786(配列番号6)のアミノ酸198～378に対応している。いくつかの実施形態では、改変CH3ドメインポリペプチドは、トランスフェリン受容体のアピカルドメインと、完全長のヒトトランスフェリン受容体配列(配列番号6)の158、188、199、207、208、209、210、211、212、213、214、215、及び/または294位を含むエピトープにおいて結合する。改変CH3ドメインポリペプチドは、受容体に対するトランスフェリンの結合をブロックまたは他の形で阻害することなくトランスフェリン受容体に結合し得る。いくつかの実施形態では、トランスフェリンのTfRに対する結合は、実質的に阻害されない。いくつかの実施形態では、トランスフェリンのTfRに対する結合は、約50%未満(例えば、約45%未満、約40%未満、約35%未満、約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、または約5%未満)阻害される。いくつかの実施形態では、40

トランスフェリンの T f R に対する結合は、約 20 % 未満（例えば、約 19 % 未満、約 18 % 未満、約 17 % 未満、約 16 % 未満、約 15 % 未満、約 14 % 未満、約 13 % 未満、約 12 % 未満、約 11 % 未満、約 10 % 未満、約 9 % 未満、約 8 % 未満、約 7 % 未満、約 6 % 未満、約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満、または約 1 % 未満）阻害される。このような結合特異性を示す例示的な C H 3 ドメインポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 114 ~ 220 を基準として決めた場合に 153、157、159、160、161、162、163、186、188、189、及び 194 位にアミノ酸置換を有するポリペプチドを含む。

#### 【0076】

C H 3 トランスフェリン受容体結合セット (i) : 153、157、159、160、161、162、163、186、188、189、及び 194 10

いくつかの実施形態では、改変 C H 3 ドメインポリペプチドは、153 位、157 位、159 位、160 位、161 位、162 位、163 位、186 位、188 位、189 位、及び 194 位を含むアミノ酸位置の 1 セット（セット i）において 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、または 11 個の置換を含む。これらの位置に導入することができる例示的な置換を表 1 及び表 2 に示す。

#### 【0077】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変 C H 3 ドメインポリペプチドは、以下のような配列番号 1 に対する置換を有する少なくとも 1 つの位置を含む。すなわち、153 位の G l u、L e u、S e r、V a l、T r p、T y r、または G l n、157 位の L e u、T y r、P h e、T r p、M e t、P r o、または V a l、159 位の L e u、T h r、H i s、P r o、A s n、V a l、または P h e、160 位の V a l、P r o、I l e、または酸性アミノ酸、161 位の T r p、162 位の脂肪族アミノ酸、G l y、S e r、T h r、または A s n、163 位の G l y、H i s、G l n、L e u、L y s、V a l、P h e、S e r、A l a、A s p、G l u、A s n、A r g、または T h r、186 位の酸性アミノ酸、A l a、S e r、L e u、T h r、P r o、I l e、または H i s、188 位の G l u、S e r、A s p、G l y、T h r、P r o、G l n、または A r g、189 位の T h r、A r g、A s n、または酸性アミノ酸、及び / または、194 位の芳香族アミノ酸、H i s、または L y s。いくつかの実施形態では、改変 C H 3 ドメインポリペプチドは、上記のセット中の位置の 1 つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ、疎水性に基づくグループ、側鎖の環構造に基づくグループ（例えば、芳香族アミノ酸）、またはサイズに基づくグループ、及び / または極性かまたは非極性かによるグループの中のアミノ酸を含む。したがって、例えば、I l e が 157 位、159 位、及び / または 186 位に存在してよい。いくつかの実施形態では、160 位、186 位、及び 189 位のうちの 1 つ、2 つ、またはそれにおける酸性アミノ酸は G l u である。他の実施形態では、160 位、186 位、及び 189 位のうちの 1 つ、2 つ、またはそれにおける酸性アミノ酸は A s p である。 20 30

#### 【0078】

いくつかの実施形態では、改変 C H 3 ドメインポリペプチドは、164 位及び 165 位を含む位置に 1 個または 2 個の置換を更に含む。いくつかの実施形態では、164 位に S e r、T h r、G l n、または P h e が存在してよい。いくつかの実施形態では、165 位に G l n、P h e、または H i s が存在してよい。 40

#### 【0079】

更なる実施形態では、改変 C H 3 ドメインは以下、すなわち、187 位が L y s、A r g、G l y、または P r o、197 位が S e r、T h r、G l u、または L y s、及び 199 位が S e r、T r p、または G l y、から選択される 1 つ、2 つ、または 3 つの位置を更に含む。

#### 【0080】

C H 3 トランスフェリン受容体結合セット (i i) : 118、119、120、122、 50

210、211、212、及び213

いくつかの実施形態では、改変CH3ドメインポリペプチドは、118位、119位、120位、122位、210位、211位、212位、及び213位からなるアミノ酸位置の1セット(セットi i)において少なくとも3個または少なくとも4個、一般的には5個、6個、7個、または8個の置換を含む。いくつかの実施形態では、改変CH3ドメインポリペプチドは、210位にGlyを、211位にPheを、かつ/または213位にAspを含む。いくつかの実施形態では、213位にGluが存在してよい。特定の実施形態では、改変CH3ドメインポリペプチドは、以下の位置に少なくとも1つの置換を含む。すなわち、118位にPheまたはIle、119位にAsp、Glu、Gly、Ala、またはLys、120位にTyr、Met、Leu、Ile、またはAsp、122位にThrまたはAla、210位にGly、211位にPhe、212位にHis、Tyr、Ser、またはPhe、または213位にAsp。いくつかの実施形態では、118位、119位、120位、122位、210位、211位、212位、及び213位のうちの2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つすべてがこのパラグラフで指定される置換を有する。いくつかの実施形態では、改変CH3ドメインポリペプチドは、上記のセット中の位置の1つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ、疎水性に基づくグループ、側鎖の環構造に基づくグループ(例えば、芳香族アミノ酸)、またはサイズに基づくグループ、及び/または極性かまたは非極性かによるグループの中のアミノ酸を含んでもよい。

10

20

#### 【0081】

いくつかの実施形態では、改変CH3ドメインポリペプチドは、同一性%が118位、119位、120位、122位、210位、211位、212位、及び213位のセットを含まないことを条件として、配列番号1のアミノ酸114～220と少なくとも70%の同一性、少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、または少なくとも95%の同一性を有する。

#### 【0082】

#### CH2トランスフェリン受容体結合ポリペプチド

いくつかの実施形態では、改変されるドメインはIgGのCH2ドメインのようなヒトIgのCH2ドメインである。CH2ドメインは、いずれのIgGのサブタイプ、すなわち、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4から得られるものであってもよい。IgG抗体に関連して、CH2ドメインとは、EU番号付けスキームに従って番号付けした場合に、約231位～約340位までのアミノ酸のセグメントのことを指す。トランスフェリン受容体結合のためのアミノ酸位置の対応するセットを特定する目的でのCH2ドメイン内の位置は、配列番号2を基準として決められるか、または配列番号1のアミノ酸4～113を基準として決められる。置換もまた、配列番号1を基準として決められ、すなわち、あるアミノ酸は、配列番号1の対応する位置のアミノ酸に対して置換であるとみなされる。配列番号1は、部分的なヒンジ領域の配列であるPCPをアミノ酸1～3として含んでいる。これら3個の残基はFc領域の一部ではないが、配列番号1を基準としたCH2ドメイン内の位置の番号付けは、これらの最初の3個のアミノ酸を含む。

30

#### 【0083】

上記に述べたように、改変することができるCH2ドメインの残基のセットは、本明細書では配列番号1を基準として番号付けされる。例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のCH2ドメインなどの任意のCH2ドメインは、配列番号1の記載される位置の残基に対応する残基の1つ以上のセットにおいて、改変、例えばアミノ酸置換を有することができる。配列番号1の任意の特定の位置に対応するIgG2、IgG3、及びIgG4の配列のそれぞれの位置は容易に決定することができる。

40

#### 【0084】

一実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変CH2ドメインポリペプチドは、トランスフェリン受容体のアピカルドメイン内のエピトープに結合する。ヒトトランスフェリン受容体アピカルドメイン配列は、配列番号4に記載されており、これ

50

はヒトトランスフェリン受容体 1 のユニプロテイン配列 P 0 2 7 8 6 のアミノ酸 1 9 8 ~ 3 7 8 に対応している。改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、受容体に対するトランスフェリンの結合をブロックまたは他の形で阻害することなくトランスフェリン受容体に結合しうる。いくつかの実施形態では、トランスフェリンの T f R に対する結合は、実質的に阻害されない。いくつかの実施形態では、トランスフェリンの T f R に対する結合は、約 5 0 % 未満（例えば、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、または約 5 % 未満）阻害される。いくつかの実施形態では、トランスフェリンの T f R に対する結合は、約 2 0 % 未満（例えば、約 1 9 % 未満、約 1 8 % 未満、約 1 7 % 未満、約 1 6 % 未満、約 1 5 % 未満、約 1 4 % 未満、約 1 3 % 未満、約 1 2 % 未満、約 1 1 % 未満、約 1 0 % 未満、約 9 % 未満、約 8 % 未満、約 7 % 未満、約 6 % 未満、約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満、または約 1 % 未満）阻害される。  
10

#### 【 0 0 8 5 】

C H 2 トランスフェリン受容体結合セット ( i i i ) : 4 7 、 4 9 、 5 6 、 5 8 、 5 9 、  
6 0 、 6 1 、 6 2 、 及び 6 3

いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、4 7 位、4 9 位、5 6 位、5 8 位、5 9 位、6 0 位、6 1 位、6 2 位、及び 6 3 位を含むアミノ酸位置の 1 セット（セット i i i ）において少なくとも 3 個または少なくとも 4 個、一般的には 5 個、6 個、7 個、8 個、または 9 個の置換を含む。いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、6 0 位に G l u を、かつ / または 6 1 位に T r p を含む。いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、以下の位置の少なくとも 1 つの置換、すなわち、4 7 位に G l u 、 G l y 、 G l n 、 S e r 、 A l a 、 A s n 、 T y r 、 20 または T r p 、4 9 位に I l e 、 V a l 、 A s p 、 G l u 、 T h r 、 A l a 、 または T y r 、5 6 位に A s p 、 P r o 、 M e t 、 L e u 、 A l a 、 A s n 、 または P h e 、5 8 位に A r g 、 S e r 、 A l a 、 または G l y 、5 9 位に T y r 、 T r p 、 A r g 、 または V a l 、6 0 位に G l u 、6 1 位に T r p または T y r 、6 2 位に G l n 、 T y r 、 H i s 、 I l e 、 P h e 、 V a l 、 または A s p 、 または、6 3 位に L e u 、 T r p 、 A r g 、 A s n 、 T y r 、 または V a l を含む。いくつかの実施形態では、4 7 位、4 9 位、5 6 位、5 8 位、5 9 位、6 0 位、6 1 位、6 2 位、及び 6 3 位のうちの 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、または 9 つすべてがこのパラグラフで指定される置換を有する。いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、上記のセット中の位置の 1 つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ、疎水性に基づくグループ、側鎖の環構造に基づくグループ（例えば、芳香族アミノ酸）、またはサイズに基づくグループ、及び / または極性かまたは非極性かによるグループの中のアミノ酸を含んでもよい。  
30

#### 【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、同一性 % が 4 7 位、4 9 位、5 6 位、5 8 位、5 9 位、6 0 位、6 1 位、6 2 位、及び 6 3 位のセットを含まないことを条件として、配列番号 1 のアミノ酸 4 ~ 1 1 3 と少なくとも 7 0 % の同一性、少なくとも 7 5 % の同一性、少なくとも 8 0 % の同一性、少なくとも 8 5 % の同一性、少なくとも 9 0 % の同一性、または少なくとも 9 5 % の同一性を有する。  
40

#### 【 0 0 8 7 】

C H 2 トランスフェリン受容体結合セット ( i v ) : 3 9 、 4 0 、 4 1 、 4 2 、 4 3 、 4 4 、 6 8 、 7 0 、 7 1 、 及び 7 2

いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、3 9 位、4 0 位、4 1 位、4 2 位、4 3 位、4 4 位、6 8 位、7 0 位、7 1 位、及び 7 2 位を含むアミノ酸位置の 1 セット（セット i v ）において少なくとも 3 個または少なくとも 4 個、一般的には 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、または 1 0 個の置換を含む。いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、4 3 位に P r o を、6 8 位に G l u を、かつ / または 7 0 位に T y r を含む。いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、  
50

以下の位置の少なくとも 1 つの置換、すなわち、39 位の Pro、Phe、Ala、Met、または Asp、40 位の Glu、Pro、Arg、Lys、Ala、Ile、Leu、Glu、Asp、または Tyr、41 位の Thr、Ser、Gly、Met、Val、Phe、Trp、または Leu、42 位の Pro、Val、Ala、Thr、または Asp、43 位の Pro、Val、または Phe、44 位の Trp、Gln、Thr、または Glu、68 位の Glu、Val、Thr、Leu、または Trp、70 位の Tyr、His、Val、または Asp、71 位の Thr、His、Gln、Arg、Asn、または Val、及び、72 位の Tyr、Asn、Asp、Ser、または Pro を含む。いくつかの実施形態では、39 位、40 位、41 位、42 位、43 位、44 位、68 位、70 位、71 位、及び 72 位のうちの 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、または 10 個すべてがこのパラグラフで指定される置換を有する。いくつかの実施形態では、改変 CH2 ドメインポリペプチドは、上記のセット中の位置の 1 つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ、疎水性に基づくグループ、側鎖の環構造に基づくグループ（例えば、芳香族アミノ酸）、またはサイズに基づくグループ、及び／または極性かまたは非極性かによるグループの中のアミノ酸を含んでもよい。  
10

#### 【0088】

いくつかの実施形態では、改変 CH2 ドメインポリペプチドは、同一性 % が 39 位、40 位、41 位、42 位、43 位、44 位、68 位、70 位、71 位、及び 72 位のセットを含まないことを条件として、配列番号 1 のアミノ酸 4～113 と少なくとも 70 % の同一性、少なくとも 75 % の同一性、少なくとも 80 % の同一性、少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、または少なくとも 95 % の同一性を有する。  
20

#### 【0089】

CH2 トランスフェリン受容体結合セット (v) : 41、42、43、44、45、65、66、67、69、及び 73

いくつかの実施形態では、改変 CH2 ドメインポリペプチドは、41 位、42 位、43 位、44 位、45 位、65 位、66 位、67 位、69 位、及び 73 位を含むアミノ酸位置の 1 セット（セット v）において少なくとも 3 個または少なくとも 4 個、一般的には 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、または 10 個の置換を含む。いくつかの実施形態では、改変 CH2 ドメインポリペプチドは、以下の位置の少なくとも 1 つの置換、すなわち、41 位の Val または Asp、42 位の Pro、Met、または Asp、43 位の Pro または Trp、44 位の Arg、Trp、Glu、または Thr、45 位の Met、Tyr、または Trp、65 位の Leu または Trp、66 位の Thr、Val、Ile、または Lys、67 位の Ser、Lys、Ala、または Leu、69 位の His、Leu、または Pro、または、73 位の Val または Trp を含む。いくつかの実施形態では、41 位、42 位、43 位、44 位、45 位、65 位、66 位、67 位、69 位、及び 73 位のうちの 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、または 10 個すべてがこのパラグラフで指定される置換を有する。いくつかの実施形態では、改変 CH2 ドメインポリペプチドは、上記のセット中の位置の 1 つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ、疎水性に基づくグループ、側鎖の環構造に基づくグループ（例えば、芳香族アミノ酸）、またはサイズに基づくグループ、及び／または極性かまたは非極性かによるグループの中のアミノ酸を含んでもよい。  
30

#### 【0090】

いくつかの実施形態では、改変 CH2 ドメインポリペプチドは、同一性 % が 41 位、42 位、43 位、44 位、45 位、65 位、66 位、67 位、69 位、及び 73 位のセットを含まないことを条件として、配列番号 1 のアミノ酸 4～113 と少なくとも 70 % の同一性、少なくとも 75 % の同一性、少なくとも 80 % の同一性、少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、または少なくとも 95 % の同一性を有する。  
40

#### 【0091】

CH2 トランスフェリン受容体結合セット (vi) : 45、47、49、95、97、9

10

20

30

40

50

## 9、102、103、及び104

いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、45位、47位、49位、95位、97位、99位、102位、103位、及び104位を含むアミノ酸位置の1セット(セットv i)において少なくとも3個または少なくとも4個、一般的には5個、6個、7個、8個、または9個の置換を含む。いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインは、103位にTrpを含む。いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、以下の位置の少なくとも1つの置換、すなわち、45位のTrp、Val、Ile、またはAla；47位のTrpまたはGly；49位のTyr、Arg、またはGlu；95位のSer、Arg、またはGln；97位のVal、Ser、またはPhe；99位のIle、Ser、またはTrp；102位のTrp、Thr、Ser、Arg、またはAsp；103位のTrp；及び、104位のSer、Lys、Arg、またはValを含む。いくつかの実施形態では、45位、47位、49位、95位、97位、99位、102位、103位、及び104位のうちの2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、または9つすべてがこのパラグラフで指定される置換を有する。いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、上記のセット中の位置の1つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ、疎水性に基づくグループ、側鎖の環構造に基づくグループ(例えば、芳香族アミノ酸)、またはサイズに基づくグループ、及び/または極性かまたは非極性かによるグループの中のアミノ酸を含んでもよい。

10

20

## 【0092】

いくつかの実施形態では、改変 C H 2 ドメインポリペプチドは、同一性%が45位、47位、49位、95位、97位、99位、102位、103位、及び104位のセットを含まないことを条件として、配列番号1のアミノ酸4～113と少なくとも70%の同一性、少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、または少なくとも95%の同一性を有する。

30

## 【0093】

## V. Fc領域内の更なる変異

本発明の方法で使用される作用物質に連結されたポリペプチド(例えば、トランスフェリン受容体に結合するように改変され、かつ BBB を通る輸送を開始することができる)はまた、例えば、血清安定性を高めるため、エフェクター機能を調節するため、グリコシル化に影響を及ぼすため、ヒトにおける免疫原性を低下させるため、及び/または、ポリペプチドのノブ・アンド・ホール型のヘテロ二量化を可能とするためなど、更なる変異を含んでもよい。

40

## 【0094】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、対応する野生型Fc領域(例えば、ヒト Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、またはIg G 4のFc領域)と少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%のアミノ酸配列の同一性を有する。

50

## 【0095】

ポリペプチドは、例えば、グリコシル化に影響を及ぼすため、血清半減期を長くするため、またはC H 3 ドメインについては、改変 C H 3 ドメインを含むポリペプチドのノブ・アンド・ホール型のヘテロ二量化を可能とするためなど、アミノ酸の指定されたセットの外側に導入される他の変異を有してもよい。一般的に、この方法では、第1のポリペプチドの界面に突起(「ノブ」)を、第2のポリペプチドの界面に対応した穴(「ホール」)を導入することで、突起が穴の中に位置してヘテロ二量体の形成を促し、ホモ二量体の形

50

成を妨げることができると伴う。突起は、第1のポリペプチドの界面の小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）に置換することによって形成される。突起と同じ、または同様の大きさの相補的な穴が、大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの（例えば、アラニンまたはスレオニン）に置換することによって第2のポリペプチドの界面に形成される。このような異なる変異は、トランスフェリン受容体に対する改変 C H 3 または C H 2 ドメインの結合に負の影響を及ぼさないポリペプチド内の位置に導入される。

#### 【0096】

二量体化のためのノブ・アンド・ホール型のアプローチの例示的な一実施形態では、二量体化しようとする第1の F c ポリペプチドサブユニットの、配列番号1の139位に対応する位置が、天然のスレオニンの代わりにトリプトファンを有し、二量体の第2の F c ポリペプチドサブユニットが、配列番号1の180位に対応する位置に天然のチロシンの代わりにバリンを有する。F c ポリペプチドの第2のサブユニットは、配列番号1の139位に対応する位置の天然のスレオニンがセリンに置換され、配列番号1の141位に対応する位置の天然のロイシンがアラニンに置換される置換を更に含んでもよい。

10

#### 【0097】

ポリペプチドは、ヘテロ二量体化のための他の改変、例えば、自然に帯電している C H 3 - C H 3 界面内の接触残基の静電的操作、または疎水性パッチ改変を含むように操作することもできる。

20

#### 【0098】

いくつかの実施形態では、血清半減期を延長するための改変を導入することができる。例えば、いくつかの実施形態では、F c 領域は、配列番号1の25位に対応する位置に T y r を、配列番号1の27位に対応する位置に T h r を、配列番号1の29位に対応する位置に G l u を含む C H 2 ドメインを含む。

20

#### 【0099】

いくつかの実施形態では、変異、例えば置換を、配列番号1を基準として決めた場合の17～30位、52～57位、80～90位、156～163位、及び201～208位のうちの1つ以上に導入する。いくつかの実施形態では、配列番号1を基準として決めた場合の24位、25位、27位、28位、29位、80位、81位、82位、84位、85位、87位、158位、159位、160位、162位、201位、206位、207位、または209位に1つ以上の変異を導入する。いくつかの実施形態では、配列番号1を基準として決めた場合の25位、27位、及び29位のうちの1つ、2つ、または3つに変異を導入する。いくつかの実施形態では、変異は、配列番号1を基準として番号付けした場合のM 25 Y、S 27 T、及びT 29 Eである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、変異M 25 Y、S 27 T、及びT 29 Eを更に含む。いくつかの実施形態では、配列番号1を基準として決めた場合の201位及び207位の1つまたは2つに変異を導入する。いくつかの実施形態では、変異は、配列番号1を基準として番号付けした場合のM 201 L 及びN 207 Sである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、M 201 L を伴うかまたは伴わずに変異N 207 Sを更に含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、配列番号1を基準として番号付けした場合のT 80 位、E 153 位、及びN 207 位の1つ、2つ、または3つすべてに置換を含む。いくつかの実施形態では、変異はT 80 Q 及びN 207 Aである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、変異T 80 A、E 153 A、及びN 207 Aを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、配列番号1を基準として番号付けした場合のT 23 位及びM 201 位に置換を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、変異T 23 Q 及びM 201 Lを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、配列番号1を基準として番号付けした場合のM 201 位及びN 207 位に置換を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、置換M 201 L 及びN 207 Sを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチド

30

40

50

は、N 2 0 7 S または N 2 0 7 A の置換を含む。

#### 【0100】

##### Fcエフェクター機能

いくつかの実施形態では、Fc領域（例えば、改変CH2またはCH3ドメインを含む）はエフェクター機能を有する（すなわち、Fc領域は、エフェクター機能を媒介するエフェクター細胞で発現するFc受容体に結合する際にある特定の生物学的機能を誘導する能力を有する）。エフェクター細胞としては、これらに限定されるものではないが、単核球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、マスト細胞、血小板、B細胞、大顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、及び細胞傷害性T細胞が挙げられる。

10

#### 【0101】

抗体エフェクター機能の例としては、これらに限定されるものではないが、C1q結合及び補体依存性細胞傷害活性（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞介在性細胞障害活性（ADCC）、抗体依存性細胞介在性食作用（ADCP）、細胞表面受容体のダウンレギュレーション（例えば、B細胞受容体）、及びB細胞活性化が挙げられる。エフェクター機能は抗体クラスによって異なり得る。例えば、天然のヒトIgG1及びIgG3抗体は、免疫系細胞上に存在する適切なFc受容体に結合する際にADCC及びCDC活性を誘発することができ、天然のヒトIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4は、免疫細胞上に存在する適切なFc受容体に結合する際にADCP機能を誘発することができる。

20

#### 【0102】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、エフェクター機能を低下させる更なる改変を含むことができる。あるいは、いくつかの実施形態では、ポリペプチド（例えば、改変CH2またはCH3ドメインを含む）は、エフェクター機能を高める更なる改変を含むことができる。

#### 【0103】

エフェクター機能を調節する例示的なFcポリペプチド変異としては、これらに限定されるものではないが、CH2ドメイン内の置換、例えば、配列番号1の7及び8位に対応する位置における置換が挙げられる。いくつかの実施形態では、改変CH2ドメイン内の置換は、配列番号1の7及び8位のA1aを含む。いくつかの実施形態では、改変CH2ドメイン内の置換は、配列番号1の7及び8位のA1a、ならびに102位のG1yを含む。

30

#### 【0104】

エフェクター機能を調節する更なるFcポリペプチド変異としては、これらに限定されるものではないが、238、265、269、270、297、327及び329位における1つ以上の置換を含む（EU番号付けスキームでは、配列番号1を基準として番号付けした場合に11、38、42、43、70、100、及び102位に相当する）。例示的な置換（EU番号付けスキームで番号付けした場合）には以下のものが含まれる。すなわち、329位は、プロリンがグリシンもしくはアルギニンに置換されたまたはFcのプロリン329とFc RIIIIのトリプトファン残基Trp87及びTrp110との間に形成されるFc/Fc受容体界面を壊すだけの充分な大きさを有するアミノ酸残基に置換された変異を有することができる。更なる例示的な置換は、S228P、E233P、L235E、N297A、N297D、及びP331Sを含む。複数の置換が存在してもよく、例えば、ヒトIgG1のFc領域のL234A及びL235A、ヒトIgG1のFc領域のL234A、L235A、及びP329G、ヒトIgG4のFc領域のS228P及びL235E、ヒトIgG1のFc領域のL234A及びG237A、ヒトIgG2のFc領域のV234A及びG237A、ヒトIgG4のFc領域のL235A、G237A、及びE318A、ならびにヒトIgG4のFc領域のS228P及びL236Eが挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ADCCを調節する1つ以上のアミノ酸置換、

40

50

例えば、E U 番号付けスキームに従う、F c 領域の 2 9 8、3 3 3、及び / または 3 3 4 位の置換を有することができる。

#### 【 0 1 0 5 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、A D C C を増大または減少させる 1 つ以上のアミノ酸置換を有してもよいか、またはC 1 q 結合及び / またはC D C を変化させる変異を有してもよい。

#### 【 0 1 0 6 】

更なる変異を含む例示的なポリペプチド

ポリペプチドは、ノブ変異（例えば、配列番号 1 を基準として番号付けした場合の T 1 3 9 W）、ホール変異（例えば、配列番号 1 を基準として番号付けした場合の T 1 3 9 S、L 1 4 1 A、及び Y 1 8 0 V）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、配列番号 1 を基準として番号付けした場合の L 7 A、L 8 A、及び / または P 1 0 2 G（例えば、L 7 A 及び L 8 A））、及び / または血清安定性を高める変異（例えば、( i ) 配列番号 1 を基準として番号付けした場合の M 2 5 Y、S 2 7 T、及び T 2 9 E、または ( i i ) 配列番号 1 を基準として番号付けした場合の、M 2 0 1 L を伴うかまたは伴わない N 2 0 7 S）を含む更なる変異を含むことができる。

10

#### 【 実施例 】

#### 【 0 1 0 7 】

#### V I . 実施例

本発明を、特定の実施例によってより詳細に説明する。以下の実施例はあくまで例示の目的で示されるものにすぎず、本発明をいかなる形でも限定しようとするものではない。当業者には、実質的に同じ結果が得られるように変更または改変することができる様々な重要でないパラメータが容易に認識されよう。用いられる数値（例えば、量、温度など）に関して精度を確実とするべく努力に努めてはいるが、ある程度の実験的誤差及び偏差は存在し得る。本発明の実施では、特に断らない限りは、当該技術分野の技術の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組換えDNA技術、及び薬理学の従来の方法を用いている。かかる技術は文献に充分な説明がなされている。更に、当業者には、特定のライブラリーに適用される操作のための方法は、本明細書に記載される他のライブラリーにも適用できることが明らかに示される。

20

#### 【 0 1 0 8 】

#### 実施例 1 C H 3 C バリアントの薬物動態学的 / 薬力学的特性分析

本実施例では、マウスの血漿中及び脳組織中での C H 3 C バリアントポリペプチドの薬物動態学的 / 薬力学的 ( P K / P D ) 特性分析について述べる。詳細には、抗 B A C E 1 物質は、脳内でより低い C<sub>m a x</sub> 値を示したが、T f R に対する親和性が弱いポリペプチドに連結された場合に、T f R に対する親和性がより強いポリペプチドと比較して時間の経過とともににより高い脳中濃度を示しつつ時間の経過とともににより高い A の阻害を示したことが、本実施例によって示される（例えば、図 3 B、3 C、4 B、及び 4 C を参照）。

30

#### 【 0 1 0 9 】

#### 野生型マウス血漿中の C H 3 C バリアントの薬物動態

40

ポリペプチド - F a b 融合体はヒト T f R にのみ結合しマウス T f R には結合しないことから、T f R 介在性クリアランスを有さないモデルにおけるインビボ安定性を示すために野生型マウスでいくつかの C H 3 C バリアントの薬物動態学 ( P K ) が試験された。実験計画を下記表 3 に示す。6 ~ 8 週齢の C 5 7 B 1 6 マウスに静脈内投与し、表 3 に示される時点において頸下瀉血により生存中瀉血が行われた。血液を E D T A 血漿チューブに採取し、1 4 , 0 0 0 r p m で 5 分間遠心した後、血漿を後の分析用に単離した。

#### 【 0 1 1 0 】

#### ( 表 3 ) P K 実験計画

グループ	ポリペプチド	時点	N	用量(IV)
1A/1B	Ab122	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	12.3 mg/kg
2A/2B	Ab153	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	11.4 mg/kg
3A/3B	CH3C.35.163 mono (Ab153 融合体)	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	11.4 mg/kg
4A/4B	CH3C.3.2-19 (Ab153 融合体)	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	11.0 mg/kg
5A/5B	CH3C.3.2-5 (Ab153 融合体)	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	10.5 mg/kg
6A/6B	CH3C.3.2-1 (Ab153 融合体)	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	10.0 mg/kg

## 【 0 1 1 1 】

マウスにおいて A b 1 2 2 は正常な P K を有する抗 R S V コントロールとして使用した。マウスにおいて A b 1 5 3 は正常な P K を有する抗 B A C E 1 コントロールとして使用した。この実験では、A b 1 5 3 の F a b アームを各ポリペプチドに融合した。

## 【 0 1 1 2 】

マウス血漿中のポリペプチド濃度を、ジェネリックのヒト I g G アッセイ ( M S D (登録商標) ヒト I g G キット # K 1 5 0 J L D - 4 ) を製造者の指示に従って使用して定量した。要約すると、予めコーティングしたプレートを M S D (登録商標) B l o c k e r A で 3 0 分間ブロッキングした。血漿試料を、 H a m i l t o n (登録商標) N I M B U S リキッドハンドリング装置を使用して 1 : 2 , 5 0 0 で希釈し、ブロッキングしたプレートに 2 つ組で加えた。投与溶液も同じプレート上で分析して適正な用量を確認した。標準曲線として 0 . 7 8 ~ 2 0 0 n g / m L の I g G を、 4 パラメータロジスティック回帰を用いてフィッティングした。図 1 及び表 4 は、これらのデータの分析結果を示す。大幅に速いクリアランス及び短い半減期を有していた C H 3 C . 3 . 2 - 5 を除き、 C H 3 C ポリペプチドバリアントのすべてが、標準 A b 1 2 2 と同等のクリアランス及び半減期値を有していた。興味深い点として、このバリアントは C H 3 C . 3 . 2 - 1 9 ( N 1 6 3 D ) の点変異体であり、後者は正常な P K プロファイルを有していた。

## 【 0 1 1 3 】

(表 4) C H 3 C ポリペプチド - F a b 融合体の P K パラメータ

ポリペプチド	クリアランス (mg/日/kg)	半減期 (日)
Ab122	6.12	9.12
Ab153	9.11	4.74
CH3C.35.N163 mono (Ab153融合体)	8.44	5.35
CH3C.3.2-19 (Ab153融合体)	10.3	5.42
CH3C.3.2-5 (Ab153融合体)	21.0	1.90
CH3C.3.2-1 (Ab153融合体)	9.25	4.65

## 【 0 1 1 4 】

野生型マウス脳組織における一価 C H 3 C . 3 5 . N 1 6 3 の P K / P D の評価

マウス T f r c 遺伝子内でヒト T f r c アピカルドメインを発現するトランスジェニックマウスを、 C R I S P R / C a s 9 技術を用いて作製した。得られたキメラ T f R を内因性プロモーターの制御下にて、インビボで発現させた。

## 【 0 1 1 5 】

キメラ h T f R アピカル + / + ヘテロ接合体マウス ( n = 4 / 群 ) に 4 2 m g / k g の

10

20

30

40

50

A b 1 5 3 または一価 C H 3 C . 3 5 . N 1 6 3 のいずれかを静脈内投与し、野生型マウス (n = 3) に 5 0 m g / k g のコントロールヒト I g G 1 を静脈内投与した。マウスにおいて A b 1 5 3 は正常な P K を有するコントロールとして使用した。すべてのマウスを投与 2 4 時間後に P B S で灌流した。灌流に先立ち、血液を E D T A 血漿チューブ中に心穿刺により採取し、1 4 , 0 0 0 r p m で 5 分間遠心した。次いで、後の P K 及び P D 分析用に血漿を単離した。灌流後の脳を摘出し、脳半球を分離して組織重量の 1 0 倍の P B S 中、1 % N P - 4 0 ( P K 用 ) または 5 M G u H C l ( P D 用 ) 中でホモジナイズした。

#### 【 0 1 1 6 】

図 2 は、脳の P K 実験の結果を示す。取り込みは、一価 C H 3 C . 3 5 . N 1 6 3 のグループで、A b 1 5 3 及びコントロールヒト I g G 1 グループよりも大きかった。 10

#### 【 0 1 1 7 】

h T f R アピカル + / + マウスにおけるポリペプチド - F a b 融合体の脳及び血漿の P K P D : C H 3 C . 3 5 . 2 1 、 C H 3 C . 3 5 . 2 0 、 C H 3 C . 3 5 、 C H 3 C . 3 5 . 2 3 、 C H 3 C . 3 5 . 2 3 . 3

P K 及び脳での取り込みに対する T f R 結合親和性の影響を評価するため、B i a c o r e によって測定されるアピカルヒト T f R に対する結合親和性の異なる抗 B A C E 1 A b 1 5 3 及び操作された T f R 結合ポリペプチド融合体 ( C H 3 C . 3 5 . 2 1 : A b 1 5 3 、 C H 3 C . 3 5 . 2 0 : A b 1 5 3 、 C H 3 C . 3 5 : A b 1 5 3 融合体 ) を作製した。ヒト T f R に対する C H 3 C . 3 5 . 2 1 : A b 1 5 3 、 C H 3 C . 3 5 . 2 0 : A b 1 5 3 、 C H 3 C . 3 5 : A b 1 5 3 融合体の結合親和性はそれぞれ、1 0 0 n M 、1 7 0 n M 、及び 6 2 0 n M である。h T f R アピカル + / + マウスノックインマウスに、5 0 m g / k g の A b 1 5 3 または各ポリペプチド - F a b 融合体を全身投与し、血漿 P K 及び脳 P K P D を投与の 1 、 3 、及び 7 日後に評価した。脳及び血漿 P K P D 分析を上記のセクションで述べたようにして行った。末梢組織での T f R の発現により、C H 3 C . 3 5 . 2 1 : A b 1 5 3 、 C H 3 C . 3 5 . 2 0 : A b 1 5 3 、及び C H 3 C . 3 5 : A b 1 5 3 融合体は、A b 1 5 3 単独と比較して血漿中のより速やかなクリアランスを示したが、これは、標的介在性のクリアランスと一致し、インビボでの T f R 結合を示すものである ( 図 3 A ) 。印象的な点として、C H 3 C . 3 5 . 2 1 : A b 1 5 3 、 C H 3 C . 3 5 . 2 0 : A b 1 5 3 、及び C H 3 C . 3 5 : A b 1 5 3 融合体の脳中濃度は、A b 1 5 3 と比較して有意に増大し、同じ時点における A b 1 5 3 がわずかに約 3 n M であったのと比較して投与後 1 日目に 3 0 n m よりも高い最大脳中濃度が得られた ( 図 3 B ) 。C H 3 C . 3 5 . 2 1 : A b 1 5 3 、 C H 3 C . 3 5 . 2 0 : A b 1 5 3 、及び C H 3 C . 3 5 : A b 1 5 3 融合体の脳曝露の増大は、A b 1 5 3 を投与したマウスにおける A レベルと比較して、マウスの脳で約 5 5 ~ 6 0 % 低い内因性のマウス A レベルをもたらした ( 図 3 C ) 。C H 3 C . 3 5 . 2 1 : A b 1 5 3 、 C H 3 C . 3 5 . 2 0 : A b 1 5 3 、及び C H 3 C . 3 5 : A b 1 5 3 融合体の濃度が脳で高い状態に保たれた一方でより低い脳 A レベルは維持され、7 日目までに曝露が低減された場合の A b 1 5 3 で処置したマウスと同様のレベルに戻った。経時的な脳曝露の低下は、C H 3 C . 3 5 . 2 1 : A b 1 5 3 、 C H 3 C . 3 5 . 2 0 : A b 1 5 3 、及び C H 3 C . 3 5 : A b 1 5 3 融合体の末梢曝露の低下と相關しており、インビボでの明確な P K / P D の関係を示した ( 図 3 A と 3 C とを比較 ) 。更に、全体の脳の T f R レベルは、この単回の高用量の投与後に A b 1 5 3 処理マウスとポリペプチド - F a b 融合体処理マウスとで同等であり、脳における T f R 発現に対して、ポリペプチド - F a b 融合体の脳曝露の増大が有意な影響を及ぼさないことを示している ( 図 3 D ) 。 40

#### 【 0 1 1 8 】

操作された T f R 結合ポリペプチド - F a b 融合体のより広い親和性範囲での P K と脳での取り込みとの関係を更に評価するため、h T f R との結合についてより広い親和性範囲を有する更なる融合体を作製した。ヒト T f R に対する C H 3 C . 3 5 . 2 3 : A b 1 5 3 及び C H 3 C . 3 5 . 2 3 . 3 : A b 1 5 3 融合体の結合親和性は、それぞれ 4 2 0 50

nM 及び 1440 nM である。hTfR アピカル<sup>+/+</sup>ノックインマウスに上記に述べたように投与を行った。血漿の PK 及び脳の PKPD を投与の 1、4、7、及び 10 日後に評価した。ポリペプチド - Fab 融合体の末梢での PK は hTfR 親和性に依存しており、より親和性の高い CH3C.35.23 : Ab153 融合体は、大幅に低い親和性を有する CH3C.35.23.3 : Ab153 融合体と比較してより速やかなクリアランスを示した(図 4A)。CH3C.35.23 : Ab153 及び CH3C.35.23.3 : Ab153 融合体はいずれも、Ab153 単独と比較して有意に高い脳曝露を有し、CH3C.35.23 : Ab153 は投与後 1 日目に脳内で約 36 nM に達した(図 4B)。血漿中濃度が同様であったにもかかわらず、CH3C.35.23.3 : Ab153 融合体のこの最大の脳での取り込みは、CH3.35.23 : Ab153 融合体の脳での取り込みよりも低く、これは恐らくは後者の融合体の hTfR に対する親和性が約 3.5 倍低いことによるものと考えられる。興味深い点として、親和性のより低い融合体が 10 日目までにより持続した末梢曝露を与えたことから、その脳曝露も親和性のより高い CH3C.35.23 : Ab153 融合体よりも高かった。このことは、親和性のより低い操作された TfR 結合ポリペプチド - Fab 融合体では脳 C<sub>max</sub> はより低いが PK は経時的に持続するというトレードオフを示している。抗 BACE1 単独と比較して、A40 の有意に低い濃度が、抗 BACE1 ポリペプチド融合体を投与したマウスの脳で観察された(図 4C)。この A40 低下の持続時間は、脳における hu IgG1 曝露の経時的なレベルと一致していた(図 4B)。印象的な点として、CH3C.35 : Ab153 融合体を投与したマウスは、単回投与の 7 ~ 10 日後まで持続的な脳の A40 の低下を示した。全体的な脳の TfR レベルは、CH3C.35 : Ab153 融合体に対して Ab153 を投与したマウス間で投与後 1 日目に同等であった(図 4D)。これらのデータは共に、操作された TfR 結合ポリペプチド融合体が抗 BACE1 の脳曝露を増大させることにより単回投与後に脳の A40 を有意に低下させ得ることを示すものである。

#### 【0119】

#### 実施例 2 TfR 結合ポリペプチド親和性の選択

本実施例では、トランスフェリン受容体(TfR)に対する TfR 結合ポリペプチドの親和性と、もたらされる、TfR 結合ポリペプチドに連結された治療用物質への脳曝露との間の関係について述べる。

#### 【0120】

図 5 は、治療用物質への脳曝露(時間に対する脳濃度の曲線下面積(AUC)により評価される)は、治療用物質を TfR に対する親和性が比較的低いポリペプチドに連結した場合に最大であったことを示している。詳細には、脳曝露は、治療用物質を TfR に対する親和性が約 250 nM よりも弱いポリペプチドに連結した場合に大幅に延びた。

#### 【0121】

図 6 に示されるように、脳内のより低い最高血中濃度(C<sub>max</sub>)が、治療用物質を TfR に対する親和性が比較的弱いポリペプチドに連結した場合に観察された。詳細には、脳の C<sub>max</sub> 値は、TfR 結合ポリペプチドが約 250 nM よりも低い親和性を有する場合に有意に低かった。

#### 【0122】

図 7 は、TfR に対して一連の親和性を有するポリペプチドに連結された場合の治療用物質の血漿中濃度に対する脳中 C<sub>max</sub> の比を示す。

#### 【0123】

#### 方法

#### hTfR アピカル<sup>+/+</sup>KI の作製

ノックイン / ノックアウトマウスの作製のための方法は文献に公開されており、当業者には周知のものである。要約すると、CRISPR/Cas9 技術を用いてマウス Tfrc 遺伝子内でヒト Tfrc アピカルドメインを発現する hTfR アピカル<sup>+/+</sup>KI マウスを作製し、得られたキメラ TfR を内因性プロモーターの制御下にてインビボで発現させた。本明細書においてその全容を参照により援用される国際出願番号 PCT/US20

10

20

30

40

50

18 / 018302に記載されるように、C57BL6マウスを使用して単一細胞胚に前核マイクロインジェクションした後、偽妊娠雌に胚移植することにより、ヒトアピカルTfRマウス系統のノックインを作製した。詳細には、Cas9、シングルガイドRNA、及びドナーDNAを胚に導入した。ドナーDNAは、マウスで発現させるためにコドン最適化されたヒトアピカルドメインコーディング配列を含んだ。アピカルドメインコーディング配列には、左側及び右側のホモロジーアームを隣接させた。ドナー配列は、アピカルドメインが4番目のマウスエクソンの後に挿入され、3末端に9番目のエクソンが直接隣接するように設計した。胚を移植した雌の子孫からのファウンダー雄を野生型の雌と交配してF1へテロ接合体マウスを作出した。次に、F1世代のヘテロ接合体マウスの交配によってホモ接合体マウスを作出した。

10

## 【0124】

## マウスPKPD

PK/PDの評価のために、hTfRアピカル<sup>+/+</sup>K1マウスに50mg/kgで尾静脈注射により1回全身投与した。灌流に先立ち、血液をEDTA血漿チューブに心穿刺により採取し、14,000rpmで5分間遠心した。次いで、後のPK/PD分析用に血漿を単離した。灌流後の脳を摘出し、脳半球を分離して組織重量の10倍のPBS中、1%NP-40(PK用)または5MGuHCl(PD用)中でホモジナイズした。

## 【0125】

マウス血漿及び脳ライセート中の抗体濃度を、ジェネリックのヒトIgGアッセイ(MSDヒトIgGキット#K150JLD)を製造者の指示にしたがって使用して定量した。要約すると、プレコートしたプレートをMSD Blocker Aで30分間プロッキングした。血漿試料を、Hamilton Nimbusリキッドハンドリング装置を使用して1:10,000で希釈し、プロッキングしたプレートに2つ組で加えた。脳試料を1%NP-40溶解バッファー中にホモジナイズし、ライセートをPK分析用に1:10に希釈した。投与溶液も同じプレート上で分析して適正な用量を確認した。標準曲線として0.78~200ng/mLのIgGを、4パラメータロジスティック回帰を用いてフィッティングした。

20

## 【0126】

## 実施例3 Biacore(商標)を用いたCH3Cバリアントの結合の特性分析

組換えTfRアピカルドメインのクローンバリアントの親和性をBiacore(商標)T200装置を使用して表面プラズモン共鳴により測定した。Biacore(商標)シリーズS CM5のセンサーチップを抗ヒトFabとともに固定化した(GE Health careより販売されるヒトFab捕捉キット)。5μg/mLのポリペプチド-Fab融合体を各フローセル上に1分間捕捉させ、ヒトまたはカニクイザルアピカルドメインの連続3倍希釈液を流速30μL/分で室温において注入した。各試料を45秒間の結合及び3分間の解離により分析した。それぞれの注入後、10mMグリシン-HCl(pH2.1)を用いてチップを再生した。結合応答を、無関連のIgGを同様の密度で捕捉させたフローセルからのRUを引くことによって補正した。Biacore(商標)T200 Evaluation Software v3.1.を用いて平衡状態の応答を濃度に対してフィッティングすることによって、安定状態の親和性を得た。

30

## 【0127】

組換えTfR細胞外ドメイン(ECД)のクローンバリアントの親和性を求めるため、Biacore(商標)シリーズS CM5センサーチップをストレプトアビシンとともに固定化した。ビオチン化したヒトまたはカニクイザルTfRのECДを各フローセル上に1分間捕捉させ、各クローンバリアントの連続3倍希釈液を流速30μL/分で室温において注入した。各試料を45秒間の結合及び3分間の解離により分析した。結合応答を、同様の密度でTfR ECДを有さないフローセルからのRUを引くことによって補正した。Biacore(商標)T200 Evaluation Software v3.1.を用いて平衡状態の応答を濃度に対してフィッティングすることによって、安定状態の親和性を得た。

40

50

## 【 0 1 2 8 】

結合親和性を表5に要約する。親和性は安定状態のフィッティングにより得た。

## 【 0 1 2 9 】

(表5) 更なるCH3Cバリアントの結合親和性

クローン	ヒトTfR (μM)	カニクイザルTfR (μM)	ヒトアピカル TfR (μM)	カニクイザルアピカル TfR (μM)
CH3C.35.19.mono	0.4	5.9	0.37	5.6
CH3C.35.20.mono	0.25	6.7	0.17	8
CH3C.35.21.mono	0.1	2.1	0.12	2.2
CH3C.35.24.mono	0.29	3.3	0.23	3
CH3C.35.21.11.mono	0.24	4	0.13	2.2
CH3C.35.21.16.mono	0.18	1.8	0.12	1.9
CH3C.35.21.17.mono	0.3	2.9	0.13	2.6
CH3C.35.mono	0.61	>10	0.61	>10
CH3C.35.N153.mono	0.42	>10	0.95	>10
CH3C.35.bi	0.22	>2	試験せず	試験せず
CH3C.35.N153.bi	0.37	3.3	試験せず	試験せず
CH3C.3.2-19.bi	5.2	5.6	試験せず	試験せず
CH3C.35.19.bi	0.074	1.5	試験せず	試験せず
CH3C.35.20.bi	0.054	1.7	試験せず	試験せず
CH3C.35.21.bi	0.049	0.7	試験せず	試験せず
CH3C.35.24.bi	0.061	0.65	試験せず	試験せず

10

20

30

40

## 【 0 1 3 0 】

更なるCH3CバリアントのCH3C.35.20.1.1、CH3C.35.23.2.1、CH3C.35.23.1.1、CH3C.35.S413、CH3C.35.23.3.1、CH3C.35.N390.1、及びCH3C.35.23.6.1を作製し、ヒトTfRに対するそれらの結合親和性を上記に述べたものと同じプロトコールにしたがって測定した。CH3C.35.20.1.1、CH3C.35.23.2.1、CH3C.35.23.1.1、CH3C.35.S413、CH3C.35.23.3.1、CH3C.35.N390.1、及びCH3C.35.23.6.1の結合親和性は、それぞれ620nM、690nM、750nM、1700nM、1900nM、2000nM、及び2100nMである。

## 【 0 1 3 1 】

本明細書に述べられる実施例及び実施形態はあくまで例示的な目的のものに過ぎず、これらを考慮することでさまざまな改変または変更が当業者に示唆され、かかる改変及び変更は本出願の趣旨及び範囲、ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれるものであることが理解されよう。本明細書に引用される配列アクセッション番号の配列をここに参照によって援用する。

## 【 0 1 3 2 】

(表1) CH3Cレジスターの位置及び変異

配列名	配列グループ	157	158	159	160	161	162	163	164	...	186	187	188	189	190	191	192	193	194
野生型	n/a	N	G	Q	P	E	N	N	Y	...	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
CH3C.1		L	G	L	V	W	V	G	Y	...	A	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.2		Y	G	T	V	W	S	H	Y	...	S	K	S	E	W	Q	Q	G	Y
CH3C.3		Y	G	T	E	W	S	Q	Y	...	E	K	S	D	W	Q	Q	G	H
CH3C.4		V	G	T	P	W	A	L	Y	...	L	K	S	E	W	Q	Q	G	W
CH3C.17	2	Y	G	T	V	W	S	K	Y	...	S	K	S	E	W	Q	Q	G	F
CH3C.18	1	L	G	H	V	W	A	V	Y	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.21	1	L	G	L	V	W	V	G	Y	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.25	1	M	G	H	V	W	V	G	Y	...	D	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.34	1	L	G	L	V	W	V	F	S	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.35	2	Y	G	T	E	W	S	S	Y	...	T	K	S	E	W	Q	Q	G	F
CH3C.44	2	Y	G	T	E	W	S	N	Y	...	S	K	S	E	W	Q	Q	G	F
CH3C.51	1/2	L	G	H	V	W	V	G	Y	...	S	K	S	E	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.1-3	1	L	G	H	V	W	V	A	T	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.1-9	1	L	G	P	V	W	V	H	T	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-5	1	L	G	H	V	W	V	D	Q	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-19	1	L	G	H	V	W	V	N	Q	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-1	1	L	G	H	V	W	V	N	F	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.4-1		W	G	F	V	W	S	T	Y		P	K	S	N	W	Q	Q	G	F
CH3C.3.4-19		W	G	H	V	W	S	T	Y		P	K	S	N	W	Q	Q	G	Y
CH3C.3.2-3		L	G	H	V	W	V	E	Q		P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-14		L	G	H	V	W	V	G	V		P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-24		L	G	H	V	W	V	H	T		P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.4-26		W	G	T	V	W	G	T	Y		P	K	S	N	W	Q	Q	G	Y
CH3C.3.2-17		L	G	H	V	W	V	G	T		P	K	S	T	W	Q	Q	G	W

【 0 1 3 3 】

(表2) CH3C.35.21に関するレジスター内の許容される多様性の探索及びホットスポット位置

10

20

30

	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196
野生型	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F
CH3C.35.20.1	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.20.2	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.20.3	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.20.4	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.	.	S	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.20.5	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	A	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.20.6	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	V	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.a.1	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.a.2	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.a.3	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.a.4	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.	.	S	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.a.5	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	A	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.a.6	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	V	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.23.1	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	S	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.23.2	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.23.3	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.23.4	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.	.	S	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.23.5	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	A	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.23.6	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	V	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.24.1	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	S	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.24.2	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.24.3	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.24.4	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.	.	S	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.24.5	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	A	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.24.6	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	V	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.17.1	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.17.2	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.17.3	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.17.4	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.	.	S	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.17.5	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	A	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.17.6	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	V	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.20	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.22	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.	.	T	.	E	.	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.23	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.24	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.21.17	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.N390	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.	.	T	.	E	.	.	.	.	.	F	.	.	
CH3C.35.20.1.1							F		T	E	W	S	S				S		E	E					F			
CH3C.35.23.2.1							Y		T	E	W	A					S		E						F			
CH3C.35.23.1.1							F		T	E	W	S					S		E	E					F			
CH3C.35.S413							Y		T	E	W	S	S				S		E						F			
CH3C.35.23.3.1							Y		T	E	W	V					S		E	E					F			
CH3C.35.N390.1							Y		T	E	W	S					S		E						F			
CH3C.35.23.6.1							F		T	E	W	V					S		E	E					F			

【 0 1 3 4 】

非公式の配列一覧表

10

20

30

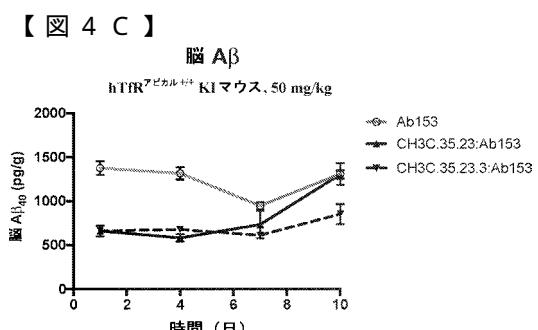
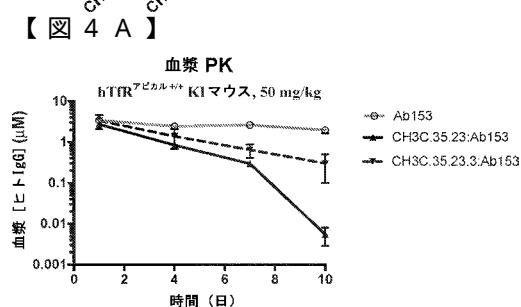
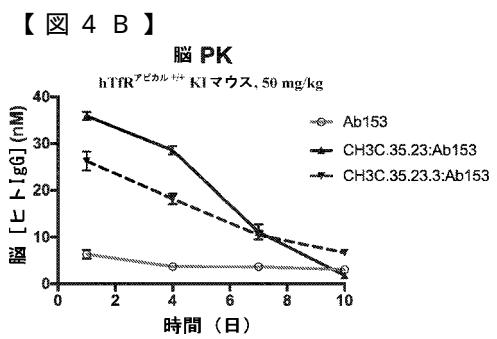
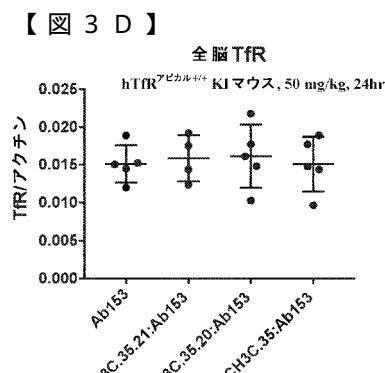
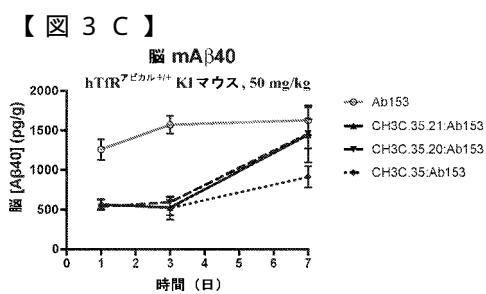
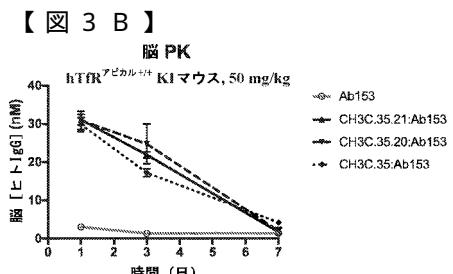
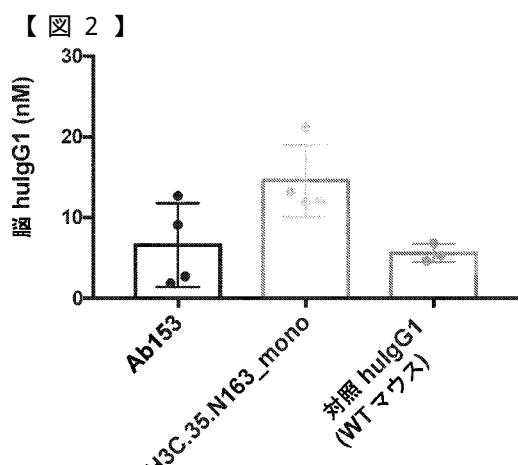
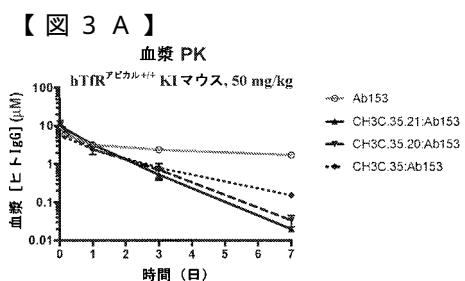
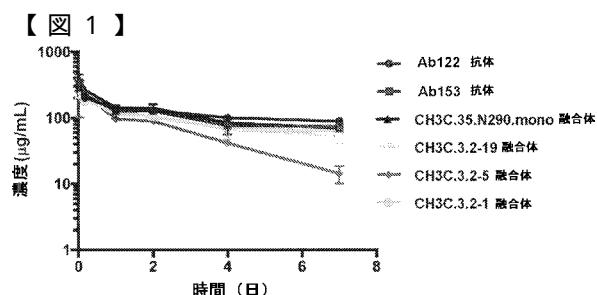
40

配列番号	配列	説明
1	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	野生型ヒトFc配列 アミノ酸1~3(PCP)は ヒンジ領域に由来する。
2	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIKAK	CH2ドメイン配列。 ヒンジ領域由来のN末端 の3個のアミノ酸(PCP) を含む。
3	GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	CH3ドメイン配列
4	NSVIIVDKNGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKD FEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPI VNAELSFFGHAAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISR AAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVS	ヒトTfRアピカルドメイン
5	EPKSCDKTHTCPPCP	ヒトIgG1ヒンジアミノ酸 配列
6	MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAVDEE ENADNNNTKANVTKPKRCGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGYCKGV EPKTECERLAGTESPVREEPGEDPAARRLYWDDLKRKLSEKLDST DFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRD QHFVKIQVKDSAQNNSVIIVDKNGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTG KLVHANFGTKKDLEDYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAI GVLIVMDQTKFPIVNAELSFSGHAAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSR SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKN VKLTVSNLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPAAK SGVGTALLLKAQMFSMDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGVAT EWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQ NVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCF CEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTH DVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMLGLSLQWLYSARGD FFRATSRLTTDFGNAEKDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKE SPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRKQNNNGAFNETLFRNQLALATW TIQGAANALSGDVWDIDNEF	ヒトトランスフェリン 受容体タンパク質1 (TFR1)

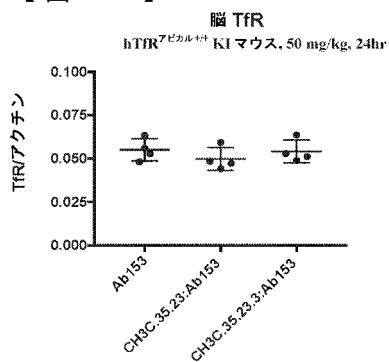
10

20

30

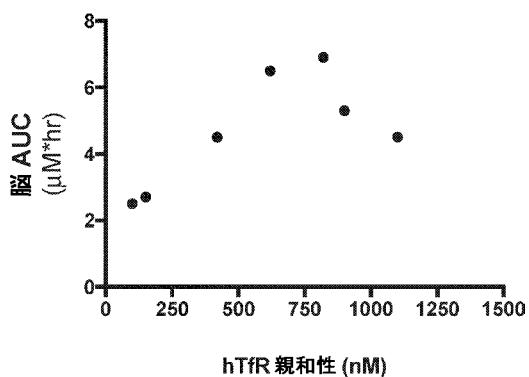


【図4D】



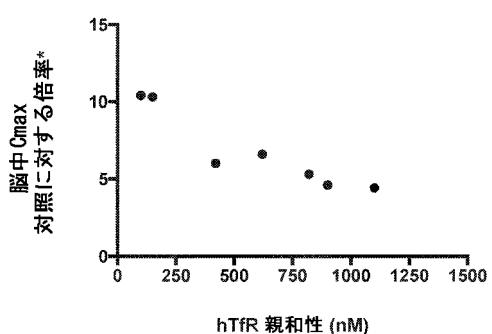
【図5】

脳AUC 対 hTfR Kd



【図6】

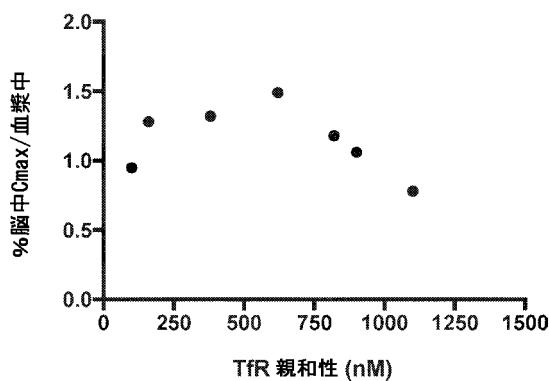
Cmax倍率 対 hTfR親和性



\*同一試験での抗BACE1のCmaxに対する倍率

【図7】

脳中Cmax/血漿中の比 対 hTfR親和性



【手続補正書】

【提出日】令和2年4月9日(2020.4.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2020530465000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. <b>PCT/US 2018/046337</b>	
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (see extra sheet)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
<b>C07K 16/18, 16/28, 16/40, 16/46, A61P 25/28, A61K 39/395</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PAJ, Esp@cenet, DWPI, EAPATIS, PATENTSCOPE, Information Retrieval System of FIPS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X  A	WO 2012/075037 A1 (GENENTECH INC et al.) 07.06.2012, claims  Y. JOY YU et al. Therapeutic bispecific antibodies cross the blood-brain barrier in nonhuman primates. Science Translational Medicine, 2014, v.6, Issue 261, pp.1-10	1-4  1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:  "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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  06 November 2018 (06.11.2018)	Date of mailing of the international search report  15 November 2018 (15.11.2018)	
Name and mailing address of the ISA/RU: Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59, GSP-3, Russia, 125993 Facsimile No: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37	Authorized officer  S. Ilchenko Telephone No. (499) 240-25-91	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US 2018/046337

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 5-25  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

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

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b> Classification of subject matter	International application No.  PCT/US 2018/046337
<p><i>C07K 16/18</i> (2006.01) <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>C07K 16/40</i> (2006.01) <i>C07K 16/46</i> (2006.01) <i>A61P 25/28</i> (2006.01)</p>	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
	C 1 2 P 21/08	

(31) 優先権主張番号 PCT/US2018/018371

(32) 優先日 平成30年2月15日(2018.2.15)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81) 指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT)

(74) 代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 デニス マーク エス.

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード 1 6 1 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72) 発明者 ゲット ジェニファー

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード 1 6 1 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 シルバーマン アダム ピー。  
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード 161 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 ウエルズ ロバート シー。  
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード 161 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 ズチエロ ジョイ ユ  
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード 161 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 カリオリス ミハリス  
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード 161 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01  
4C076 AA12 AA95 BB11 CC01 CC09 CC41 EE41 EE59 FF31  
4C084 AA17 MA17 MA66 NA05 NA12 NA13 ZA01 ZA02 ZA15 ZA16  
ZA23  
4C085 AA13 AA14 BB41 BB42 BB44 CC23 DD62 EE05 GG01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA21 FA74