(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-521084
(P2025-521084A)
(43)公表日　令和7年7月8日(2025.7.8)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00	ZNA	4B064	
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K	16/18		4B065	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		4C084	
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	4C085	
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4H045	

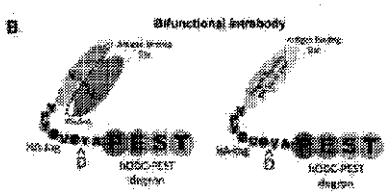
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全147頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-566249(P2024-566249)
(86)(22)出願日　令和5年5月10日(2023.5.10)
(85)翻訳文提出日　令和7年1月8日(2025.1.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/021652
(87)国際公開番号　WO2023/220118
(87)国際公開日　令和5年11月16日(2023.11.16)
(31)優先権主張番号　63/340,148
(32)優先日　令和4年5月10日(2022.5.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,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
最終頁に続く

(71)出願人　513000551
リジェネレイティブ リサーチ ファウンデーション
アメリカ合衆国 １２１４４ ニューヨーク州 レンセリア ディスカバリー ドライヴ １
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田 和彦
(74)代理人　100109070
弁理士　須田 洋之
(74)代理人　100119013
弁理士　山崎 一夫
(74)代理人　100111796
弁理士　服部 博信
(74)代理人　100123766
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　神経変性疾患における制御されたタンパク質分解のための組成物及び方法

(57)【要約】
任意的なシグナルペプチド配列、細胞透過性ペプチド、抗原結合ドメイン（例えば、抗シヌクレイン、抗タウ、抗ハンチンチン）、及びプログラム可能なプロテアソームターゲティングＰＥＳＴモチーフを含む多機能性ポリペプチド、並びにタンパク質凝集疾患、例えば、神経変性疾患の処置においてこれらのポリペプチドを使用する方法が、本明細書で開示される。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｎ末端からＣ末端へと、
Ｉ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；
（ｂ）細胞透過性ペプチド；
（ｃ）α－シヌクレインに結合する抗原結合ドメイン；及び
（ｄ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；
又は
ＩＩ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；
（ｂ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；
（ｃ）α－シヌクレインに結合する抗原結合ドメイン；及び
（ｄ）細胞透過性ペプチド
を含む組換えポリペプチド。
【請求項２】
プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列番号１に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、又は少なくとも９５％同一であり、且つ少なくとも１種のアミノ酸置換を有する配列を含み、
前記少なくとも１種のアミノ酸置換を有する前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてα－シヌクレインの分解を増加又は減少させる、請求項１に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３】
少なくとも１種のアミノ酸置換が、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、又はイソロイシンから選択される、請求項２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４】
プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列NPDF$X_1X_2X_3VX_4X_5QX_6AX_7X_8LX_9VX_{10}X_{11}AWX_{12}X_{13}GMX_{14}RHRAACASASINV（配列番号１０９）
（式中、
X_1は（Ｐ／Ａ）であり、X_2は（Ｐ／Ａ）であり、X_3は（Ｅ／Ａ）であり、X_4は（Ｅ／Ａ）であり、X_5は（Ｅ／Ａ）であり、X_6は（Ｄ／Ａ）であり、X_7は（Ｓ／Ａ）であり、X_8は（Ｔ／Ａ）であり、X_9は（Ｐ／Ａ）であり、X_{10}は（Ｓ／Ａ）であり、X_{11}は（Ｃ／Ａ）であり、X_{12}は（Ｅ／Ａ）であり、X_{13}は（Ｓ／Ａ）であり、X_{14}は（Ｋ／Ａ）である）
を含み、
前記配列が、NPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV（配列番号３）ではなく、
前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてα－シヌクレインの分解を増加させる、請求項２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５】
プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、
X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ａ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ｄ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ｓ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号７におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又は
X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ｐ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ａ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X

X_{13}は（Ｓ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号８におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又は
X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ｐ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ｄ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ａ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号１０におけるアミノ酸１６４～１９１）である
配列を含む、請求項４に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６】
前記プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列番号９に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸１６４～１９１を含み、前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてα－シヌクレインの分解を減少させる、請求項２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７】
前記抗原結合ドメインがイントラボディである、請求項１～６のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項８】
イントラボディが、α－シヌクレインに結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）又は単一ドメイン抗体である、請求項７に記載の組換えポリペプチド。
【請求項９】
単一ドメイン抗体が、α－シヌクレイン特異的ＶＬドメイン（ＶＬ　α－シヌクレイン）、α－シヌクレイン特異的ＶＨドメイン（ＶＨ　α－シヌクレイン）又はα－シヌクレイン特異的ＶＨＨドメインを含む、請求項８に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１０】
単一ドメイン抗体が、配列番号１６～配列番号１７のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を有するＶＨＨ抗体、又は配列番号１８に記載されるアミノ酸配列を有するＶＨドメインを含む、請求項９に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１１】
前記ドメインが、ＶＬ［α－シヌクレイン］－ＶＨ［α－シヌクレイン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている、請求項９又は１０に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１２】
前記ドメインが、ＶＨ［α－シヌクレイン］－ＶＬ［α－シヌクレイン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている、請求項９又は１０に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１３】
前記抗原結合ドメインが、抗体又はその機能性断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単一ドメイン抗体、及びｓｃＦｖから選択される、請求項１～６のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１４】
前記α－シヌクレイン特異的ＶＬドメイン（ＶＬ　α－シヌクレイン）及び前記α－シヌクレイン特異的ＶＨドメイン（ＶＨ　α－シヌクレイン）が、ポリペプチドリンカーによって結合されている、請求項９～１２のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１５】
前記リンカーが、配列番号１４に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項１４に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１６】
前記抗原結合ドメインが、モノクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体に由来する、請求項１～６のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１７】
前記シグナルペプチドが、配列番号１４９、及び配列番号２３６～配列番号４７３に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なく

とも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１８】
前記細胞透過性ペプチドが、配列番号１５０～配列番号１５２及び配列番号１７０～配列番号２３５のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１９】
前記細胞透過性ペプチドが、前記細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、前記組換えポリペプチドの、細胞への細胞内送達を増強する、請求項１～６のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２０】
前記細胞透過性ペプチドが、前記細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、前記組換えポリペプチドの細胞内送達を、（ａ）約１０％～約３０％、（ｂ）約３０％～約５０％、（ｃ）約５０％～約７０％又は（ｄ）約７０％～約９０％の量、増強する、請求項１～１９のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２１】
配列番号１５４～配列番号１５８、配列番号１６１、配列番号１６３、及び配列番号１６４のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、α－シヌクレインに結合する組換えポリペプチド。
【請求項２２】
処置を必要とする患者においてタンパク質凝集疾患を処置する方法であって、前記患者に、治療上有効な量の請求項１～２１のいずれか１項に記載の組換えポリペプチドを投与することを含む、前記方法。
【請求項２３】
前記タンパク質凝集疾患が、パーキンソン病（ＰＤ）、多系統萎縮症（ＭＳＡ）、レビー小体型認知症、アルツハイマー病（ＡＤ）、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、脊髄損傷（ＳＣＩ）、外傷性脳損傷（ＴＢＩ）、及び他のシヌクレイノパチーからなる群から選択される、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記組換えポリペプチドが、ＰＤを有する患者の中脳ドーパミン作動性ニューロンに送達されるか、又は中脳ドーパミン作動性ニューロンにおいて発現される、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記組換えポリペプチドが、ＭＳＡを有する患者のオリゴデンドロサイトに送達されるか、又はオリゴデンドロサイトにおいて発現される、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
前記組換えポリペプチドが、レビー小体病などのシヌクレイノパチーを有する患者のグルタミン酸作動性ニューロンに送達されるか、又はグルタミン酸作動性ニューロンにおいて発現される、請求項２３に記載の方法。
【請求項２７】
前記組換えポリペプチドを、遺伝子療法によって前記患者に提供することを更に含む、請求項２２～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８】
α－シヌクレインの分解速度が、指定された神経細胞サブタイプにおいて変更される、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記神経細胞サブタイプが、ドーパミン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニュー

ロン、ＧＡＢＡ作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト及びミクログリアを含むがこれらに限定されないニューロンから選択される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記神経細胞サブタイプが、シナプシンＩなどのニューロン特異的プロモーター、及びＶＧＬＵＴＩ若しくはチロシンヒドロキシラーゼにおけるプロモーターなどの細胞型特異的プロモーター又はミエリン塩基性タンパク質若しくはＧＦＡＰなどのグリア特異的プロモーターから選択される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３１】
Ｎ末端からＣ末端へと、
Ｉ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；
（ｂ）細胞透過性ペプチド；
（ｃ）タウに結合する抗原結合ドメイン；及び
（ｄ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；
又は
ＩＩ．（ａ）任意的にシグナルペプチドドメイン；
（ｂ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；
（ｃ）タウに結合する抗原結合ドメイン；及び
（ｄ）細胞透過性ペプチド
を含む組換えポリペプチド。
【請求項３２】
前記プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列番号１に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、又は少なくとも９５％同一であり、且つ少なくとも１種のアミノ酸置換を有する配列を含み、
前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてタウの分解を増加又は減少させる、請求項３１に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３３】
前記少なくとも１種のアミノ酸置換が、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、又はイソロイシンから選択される、請求項３２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３４】
プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列NPDF$X_1X_2X_3VX_4X_5QX_6AX_7X_8LX_9VX_{10}X_{11}AWX_{12}X_{13}GMX_{14}RHRAACASASINV$（配列番号１０９）
（式中、
X_1は（Ｐ／Ａ）であり、X_2は（Ｐ／Ａ）であり、X_3は（Ｅ／Ａ）であり、X_4は（Ｅ／Ａ）であり、X_5は（Ｅ／Ａ）であり、X_6は（Ｄ／Ａ）であり、X_7は（Ｓ／Ａ）であり、X_8は（Ｔ／Ａ）であり、X_9は（Ｐ／Ａ）であり、X_{10}は（Ｓ／Ａ）であり、X_{11}は（Ｃ／Ａ）であり、X_{12}は（Ｅ／Ａ）であり、X_{13}は（Ｓ／Ａ）であり、X_{14}は（Ｋ／Ａ）である）
を含み、
前記配列が、NPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV（配列番号３）ではなく、
前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてタウの分解を増加させる、請求項３２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３５】
前記プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、
X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ａ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、

X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ｄ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ｓ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号７におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又は

X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ｐ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ａ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ｓ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号８におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又は

X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ｐ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ｄ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ａ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号１０におけるアミノ酸１６４～１９１）である

配列を含む、請求項３４に記載の組換えポリペプチド。

【請求項３６】

プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列番号９に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸１６４～１９１を含み、前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてタウの分解を減少させる、請求項３２に記載の組換えポリペプチド。

【請求項３７】

前記抗原結合ドメインがイントラボディである、請求項３１に記載の組換えポリペプチド。

【請求項３８】

前記イントラボディが、タウに結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）又は単一ドメイン抗体である、請求項３７に記載の組換えポリペプチド。

【請求項３９】

前記単一ドメイン抗体が、タウ特異的ＶＬドメイン（ＶＬタウ）、タウ特異的ＶＨドメイン（ＶＨタウ）又はタウ特異的ＶＨＨドメインを含む、請求項３８に記載の組換えポリペプチド。

【請求項４０】

配列番号１６２に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項３６に記載の組換えポリペプチド。

【請求項４１】

前記単一ドメイン抗体が、配列番号６５～配列番号８１のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、又は配列番号８２～配列番号９８のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む、請求項３９に記載の組換えポリペプチド。

【請求項４２】

前記ドメインが、ＶＬ［タウ］－ＶＨ［タウ］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている、請求項３９又は４０に記載の組換えポリペプチド。

【請求項４３】

前記ドメインが、ＶＨ［タウ］－ＶＬ［タウ］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている、請求項３９又は４０に記載の組換えポリペプチド。

【請求項４４】

前記抗原結合ドメインが、抗体又はその機能性断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単一ドメイン抗体、及びｓｃＦｖから選択される、請求項５０に記載の組換えポリペプチド。

【請求項４５】

前記タウ特異的ＶＬドメイン（ＶＬタウ）及び前記タウ特異的ＶＨドメイン（ＶＨタウ）が、ポリペプチドリンカーによって結合されている、請求項３９～４３のいずれか１項

に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４６】
前記リンカーが、配列番号１４に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項４５に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４７】
前記抗原結合ドメインが、モノクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体に由来する、請求項３１に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４８】
前記シグナルペプチドが、配列番号１４９、及び配列番号２３６～配列番号４７３に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項３１～４７のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４９】
前記細胞透過性ペプチドが、配列番号１５０～配列番号１５２及び配列番号１７０～配列番号２３５のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項３１～４７のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５０】
前記細胞透過性ペプチドが、前記細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、前記組換えポリペプチドの、細胞への細胞内送達を増強する、請求項３１～４７のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５１】
前記細胞透過性ペプチドが、前記細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、前記組換えポリペプチドの細胞内送達を、（ａ）約１０％～約３０％、（ｂ）約３０％～約５０％、（ｃ）約５０％～約７０％又は（ｄ）約７０％～約９０％の量、増強する、請求項３１～４７のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５２】
配列番号１６２に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、タウに結合する組換えポリペプチド。
【請求項５３】
処置を必要とする患者においてタンパク質凝集疾患を処置する方法であって、前記患者に、治療上有効な量の請求項３１～５２のいずれか１項に記載の組換えポリペプチドを投与することを含む方法。
【請求項５４】
前記タンパク質凝集疾患が、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、１７番染色体上にパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（ＦＴＤＰ－１７）、前頭側頭葉変性症（ＦＴＬＤ－ＴＡＵ）、大脳皮質基底核変性症（ＣＢＤ）、原発性年連関連タウオパチー、ピック病、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、レビー小体型認知症、血管性認知症、結節性硬化症、脊髄損傷（ＳＣＩ）、外傷性脳損傷（ＴＢＩ）、又は他のタウオパチーから選択される、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
前記組換えポリペプチドが、ＰＤを有する患者の中脳ドーパミン作動性ニューロンに送達されるか、又は中脳ドーパミン作動性ニューロンにおいて発現される、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記組換えポリペプチドが、ＭＳＡを有する患者でのオリゴデンドロサイトに送達されるか、又はオリゴデンドロサイトにおいて発現される、請求項５４に記載の方法。
【請求項５７】
前記組換えポリペプチドが、タウオパチーを有する患者のグルタミン酸作動性ニューロ

ンに送達されるか、又はグルタミン酸作動性ニューロンにおいて発現される、請求項５４に記載の方法。
【請求項５８】
前記組換えポリペプチドを、遺伝子療法によって前記患者に提供することを更に含む、請求項５３～５７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５９】
Ｎ末端からＣ末端へと、
Ｉ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；
（ｂ）細胞透過性ペプチド；
（ｃ）ハンチンチンに結合する抗原結合ドメイン；及び
（ｄ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；
又は
ＩＩ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；
（ｂ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；
（ｃ）ハンチンチンに結合する抗原結合ドメイン；及び
（ｄ）細胞透過性ペプチド
を含む組換えポリペプチド。
【請求項６０】
前記プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列番号１に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、又は少なくとも９５％同一であり、且つ少なくとも１種のアミノ酸置換を有する配列を含み、
前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてハンチンチンの分解を増加又は減少させる、請求項５９に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６１】
前記少なくとも１種のアミノ酸置換が、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、又はイソロイシンから選択される、請求項６０に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６２】
前記プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列$NPDFX_1X_2X_3VX_4X_5QX_6AX_7X_8LX_9VX_{10}X_{11}AWX_{12}X_{13}GMX_{14}RHRAACASASINV$（配列番号１０９）
（式中、
X_1は（Ｐ／Ａ）であり、X_2は（Ｐ／Ａ）であり、X_3は（Ｅ／Ａ）であり、X_4は（Ｅ／Ａ）であり、X_5は（Ｅ／Ａ）であり、X_6は（Ｄ／Ａ）であり、X_7は（Ｓ／Ａ）であり、X_8は（Ｔ／Ａ）であり、X_9は（Ｐ／Ａ）であり、X_{10}は（Ｓ／Ａ）であり、X_{11}は（Ｃ／Ａ）であり、X_{12}は（Ｅ／Ａ）であり、X_{13}は（Ｓ／Ａ）であり、X_{14}は（Ｋ／Ａ）である）
を含み、
前記配列が、NPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV（配列番号３）ではなく、
前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてタンパク質の分解を増加させる、請求項６０に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６３】
前記プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、
X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ａ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ｄ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ｓ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号７におけるアミノ酸１６４～１９１

）であるか、又は
　X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ｐ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ａ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ｓ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号８におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又は
　X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ｐ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ｄ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ａ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号１０におけるアミノ酸１６４～１９１）である
配列を含む、請求項６２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６４】
　前記プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列番号９に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸１６４～１９１を含み、前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてハンチンチンの分解を減少させる、請求項６０に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６５】
　前記抗原結合ドメインがイントラボディである、請求項５９に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６６】
　前記イントラボディが、ハンチンチンに結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）又は単一ドメイン抗体である、請求項６５に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６７】
　前記単一ドメイン抗体が、ハンチンチン特異的ＶＬドメイン（ＶＬハンチンチン）、ハンチンチン特異的ＶＨドメイン（ＶＨハンチンチン）又はハンチンチン特異的ＶＨＨドメインを含む、請求項６６に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６８】
　前記ｓｃＦＶが、配列番号１０６として特許請求の範囲で記載されるＶＨドメイン、及び配列番号１０７として特許請求の範囲で記載されるＶＬドメインを含む、請求項６７に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６９】
　前記ドメインが、ＶＬ［ハンチンチン］－ＶＨ［ハンチンチン］－ＰＥＳＴモチーフ又はＶＨ［ハンチンチン］－ＶＬ［ハンチンチン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている、請求項６６又は６７に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７０】
　前記ハンチンチン特異的ＶＬドメインが、配列番号１０８として特許請求の範囲で記載されるアミノ酸配列を含む、請求項６７に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７１】
　配列番号１６０に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項５９に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７２】
　前記抗原結合ドメインが、抗体又はその機能性断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単一ドメイン抗体、及びｓｃＦｖから選択される、請求項５９に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７３】
　前記ハンチンチン特異的ＶＬドメイン（ＶＬハンチンチン）及び前記ハンチンチン特異的ＶＨドメイン（ＶＨハンチンチン）が、ポリペプチドリンカーによって結合されている、請求項６７に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７４】
　前記リンカーが、配列番号１４に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項７３に記載の

組換えポリペプチド。
【請求項７５】
前記抗原結合ドメインが、モノクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体に由来する、請求項５９に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７６】
前記シグナルペプチドが、配列番号１４９、及び配列番号２３６～配列番号４７３に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項５９～７５のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７７】
前記細胞透過性ペプチドが、配列番号１５０～配列番号１５２及び配列番号１７０～配列番号２３５のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項５９～７５のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７８】
前記細胞透過性ペプチドが、前記細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、前記組換えポリペプチドの、細胞への細胞内送達を増強する、請求項５９～７７のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７９】
前記細胞透過性ペプチドが、前記細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、前記組換えポリペプチドの細胞内送達を、（ａ）約１０％～約３０％、（ｂ）約３０％～約５０％、（ｃ）約５０％～約７０％又は（ｄ）約７０％～約９０％の量、増強する、請求項５９～７７のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項８０】
配列番号１６０に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、ハンチンチンに結合する組換えポリペプチド。
【請求項８１】
処置を必要とする患者においてタンパク質凝集疾患を処置する方法であって、前記患者に、治療上有効な量の請求項５９～８０のいずれか１項に記載の組換えポリペプチドを投与することを含む方法。
【請求項８２】
前記タンパク質凝集疾患が、ハンチントン病、又はパーキンソン病（ＰＤ）、多系統萎縮症（ＭＳＡ）、及びレビー小体型認知症、アルツハイマー病（ＡＤ）、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、脊髄損傷（ＳＣＩ）、及び外傷性脳損傷（ＴＢＩ）を含む他のタンパク質凝集神経変性疾患から選択される、請求項８１に記載の方法。
【請求項８３】
前記タンパク質凝集疾患がハンチントン病である、請求項８２に記載の方法。
【請求項８４】
前記組換えポリペプチドが、ＰＤを有する患者の中脳ドーパミン作動性ニューロンに送達されるか、又は中脳ドーパミン作動性ニューロンにおいて発現される、請求項８２に記載の方法。
【請求項８５】
前記組換えポリペプチドが、ＭＳＡを有する患者でのオリゴデンドロサイトに送達されるか、又はオリゴデンドロサイトにおいて発現される、請求項８２に記載の方法。
【請求項８６】
前記組換えポリペプチドが、ハンチントン病を有する患者のグルタミン酸作動性ニューロンに送達されるか、又はグルタミン酸作動性ニューロンにおいて発現される、請求項８３に記載の方法。

【請求項８７】
前記組換えポリペプチドを、遺伝子療法によって前記患者に提供することを更に含む、請求項８１～８６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８８】
請求項１～２１、３１～５２、及び５９～８０のいずれか１項に記載の組換えポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
【請求項８９】
請求項８８に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項９０】
請求項８８に記載のポリヌクレオチドをトランスフェクトされた単離宿主細胞。
【請求項９１】
請求項８９に記載のベクターをトランスフェクトされた単離宿主細胞。
【請求項９２】
請求項８８に記載のポリヌクレオチドを含むヒト遺伝子療法ベクターを含む医薬組成物。
【請求項９３】
薬学的に許容される担体を更に含む、請求項９２に記載の医薬組成物。
【請求項９４】
組換えポリペプチドの調製のための方法であって、請求項８８に記載のポリヌクレオチドをトランスフェクトされ、前記ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞を培養することと、
前記ポリペプチドを前記細胞から単離することと
を含む方法。
【請求項９５】
Ｎ末端からＣ末端へと、
Ｉ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；
（ｂ）細胞透過性ペプチド；
（ｃ）タンパク質に結合する抗原結合ドメイン；及び
（ｄ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；
又は
ＩＩ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；
（ｂ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；
（ｃ）タンパク質に結合する抗原結合ドメイン；及び
（ｄ）細胞透過性ペプチド
を含む組換えポリペプチド。
【請求項９６】
前記プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列番号１に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、又は少なくとも９５％同一であり、且つ少なくとも１種のアミノ酸置換を有する配列を含み、
前記少なくとも１種のアミノ酸置換を有する前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べて前記タンパク質の分解を増加又は減少させる、請求項９５に記載の組換えポリペプチド。
【請求項９７】
少なくとも１種のアミノ酸置換が、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、又はイソロイシンから選択される、請求項９６に記載の組換えポリペプチド。
【請求項９８】
プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列NPDF

$X_1X_2X_3VX_4X_5QX_6AX_7X_8LX_9VX_{10}X_{11}AWX_{12}X_{13}GMX_{14}RHRAACASASINV$（配列番号１０９）
（式中、
X_1は（Ｐ／Ａ）であり、X_2は（Ｐ／Ａ）であり、X_3は（Ｅ／Ａ）であり、X_4は（Ｅ／Ａ）であり、X_5は（Ｅ／Ａ）であり、X_6は（Ｄ／Ａ）であり、X_7は（Ｓ／Ａ）であり、X_8は（Ｔ／Ａ）であり、X_9は（Ｐ／Ａ）であり、X_{10}は（Ｓ／Ａ）であり、X_{11}は（Ｃ／Ａ）であり、X_{12}は（Ｅ／Ａ）であり、X_{13}は（Ｓ／Ａ）であり、X_{14}は（Ｋ／Ａ）である）
を含み、
前記配列が、NPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV（配列番号３）ではなく、
前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べて前記タンパク質の分解を増加させる、請求項９６に記載の組換えポリペプチド。
【請求項９９】
プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、
X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ａ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ｄ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ｓ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号７におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又は
X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ｐ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ａ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ｓ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号８におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又は
X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ｐ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ｄ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ａ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号１０におけるアミノ酸１６４～１９１）である
配列を含む、請求項９８に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１００】
前記プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインが、配列番号９に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸１６４～１９１を含み、前記ポリペプチドが、空のベクター（ＥＶ）対照に比べて前記タンパク質の分解を減少させる、請求項９６に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１０１】
前記抗原結合ドメインがイントラボディである、請求項９５～１００のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１０２】
前記イントラボディが、前記タンパク質に結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）又は単一ドメイン抗体である、請求項１０１に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１０３】
前記単一ドメイン抗体が、前記タンパク質に特異的なＶＬドメイン、前記タンパク質に特異的なＶＨドメイン、又は前記タンパク質に特異的なＶＨＨドメインを含む、請求項１０２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１０４】
前記抗原結合ドメインが、抗体又はその機能性断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単一ドメイン抗体、及びｓｃＦｖから選択される、請求項９５～１００のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項１０５】
前記タンパク質に特異的な前記ＶＬドメイン及び前記タンパク質に特異的なＶＨドメインが、ポリペプチドリンカーによって結合されている、請求項１０３に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１０６】
前記リンカーが、配列番号１４に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項１０５に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１０７】
前記抗原結合ドメインが、モノクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体に由来する、請求項９５～１００のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１０８】
前記シグナルペプチドが、配列番号１４９、及び配列番号２３６～配列番号４７３に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項９５～１００のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１０９】
前記細胞透過性ペプチドが、配列番号１５０～配列番号１５２及び配列番号１７０～配列番号２３５のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項９５～１００のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１１０】
前記細胞透過性ペプチドが、前記細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、前記組換えポリペプチドの、細胞への細胞内送達を増強する、請求項９５～１００のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１１１】
前記細胞透過性ペプチドが、前記細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、前記組換えポリペプチドの細胞内送達を、（ａ）約１０％～約３０％、（ｂ）約３０％～約５０％、（ｃ）約５０％～約７０％、又は（ｄ）約７０％～約９０％の量、増強する、請求項９５～１１０のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１１２】
前記タンパク質がα－シヌクレインである、請求項９５～１１１のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１１３】
前記単一ドメイン抗体が、配列番号１６～配列番号１７のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を有するＶＨＨ抗体、又は配列番号１８に記載されるアミノ酸配列を有するＶＨドメインを含む、請求項１１２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１１４】
前記ドメインが、ＶＬ［α－シヌクレイン］－ＶＨ［α－シヌクレイン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている、請求項１１２又は１１３に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１１５】
前記ドメインが、ＶＨ［α－シヌクレイン］－ＶＬ［α－シヌクレイン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている、請求項１１２又は１１３に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１１６】
前記タンパク質がタウである、請求項９５～１１１のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１１７】
前記単一ドメイン抗体が、配列番号６５～配列番号８１のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、又は配列番号８２～配列番号９８のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む、請求項１１６に記載の組換えポリペプチ

ド。
【請求項１１８】
前記ドメインが、ＶＬ［タウ］－ＶＨ［タウ］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている、請求項１１６又は１１７に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１１９】
前記ドメインが、ＶＨ［タウ］－ＶＬ［タウ］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている、請求項１１６又は１１７に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１２０】
前記タンパク質がハンチンチンである、請求項９５～１１１のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１２１】
前記ｓｃＦｖが、配列番号１０６として特許請求の範囲で記載されるＶＨドメイン、及び配列番号１０７として特許請求の範囲で記載されるＶＬドメインを含む、請求項１２０に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１２２】
前記ドメインが、ＶＬ［ハンチンチン］－ＶＨ［ハンチンチン］－ＰＥＳＴモチーフ又はＶＨ［ハンチンチン］－ＶＬ［ハンチンチン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている、請求項１２０又は１２１に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１２３】
前記ハンチンチン特異的ＶＬドメインが、配列番号１０８として特許請求の範囲で記載されるアミノ酸配列を含む、請求項１２０に記載の組換えポリペプチド。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２２年５月１０日に出願された米国仮特許出願第６３／３４０，１４８号の利益を主張するものであり、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本開示は、抗原結合ドメイン（例えば、抗α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチン）を含む第１のドメイン及びプログラム可能なプロテアソームターゲティングＰＥＳＴモチーフを含む第２のドメインを含む多機能性ポリペプチド、並びにタンパク質凝集疾患の処置においてこれらのポリペプチドを使用する方法に関する。これらのポリペプチドは、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病など）を処置するのに使用することができる。
【背景技術】
【０００３】
シヌクレイノパチー及びタウオパチーなどの神経変性疾患は、タンパク質凝集体の蓄積と関連付けられる。これらには、α－シヌクレイノパチー（例えば、パーキンソン病、レビー小体、多系統萎縮症（ＭＳＡ）など）、及びタウオパチー（例えば、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、１７番染色体上にパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（ＦＴＤＰ－１７）、前頭側頭葉変性症（ＦＴＬＤ－ＴＡＵ）、大脳皮質基底核変性症（ＣＢＤ）、アルツハイマー病、原発性年齢関連タウオパチー、ピック病、ボクサー認知症を含む慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、リティコ・ボディグ病、神経節膠腫、神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳後パーキンソニズム、亜急性硬化性全脳炎（ＳＳＰＥ）、ハラーフォルデン・シュパッツ病、鉛脳症、結節性硬化症、リポフスチン症など）が包含される。神経変性疾患はまた、タンパク質凝集体の蓄積と関連付けられるグルタミン反復にも起因し得る。例えば、ハンチントン病は、タンパク質産物におけるポリグルタミンリピートと解釈される、ハンチンチン遺伝子（ＨＴＴ）における伸長された不安定なトリヌクレオチドリピート（ＣＡＧ）によって引き起こされる

疾患である。現在、タウオパチー及びシヌクレイノパチー、並びにハンチントン病などの状態を有する患者に有益性をもたらすようにタンパク質凝集体の蓄積を低下させるための十分に確立された処置は存在せず、かかる処置は非常に望ましい。

外傷性脳損傷（ＴＢＩ）又は脊髄損傷（ＳＣＩ）などの神経外傷は、α－シヌクレインを含むタンパク質凝集体の蓄積及び異常なタウ堆積と関連付けられ、それらは神経変性を引き起こし得る。現在、ＴＢＩ又はＳＣＩに対する十分に確立された神経保護処置は存在せず、したがって、ＴＢＩ又はＳＣＩ誘導性の神経変性を遅らせ得るか、その影響を低減し得るか、又はそれを防止し得る処置もまた、非常に望ましい。

【発明の概要】

【０００４】

本開示は、抗原（例えば、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチン）の分解を標的化し、それにより、これらの抗原のタンパク質レベルを変化させる多機能性ポリペプチドの特性決定、送達、及び使用に関する。本開示は、部分的には、細胞透過性ペプチドが、抗原（例えば、α－シヌクレイン、タウ又はハンチンチン）のエピトープに結合するイントラボディ、及びプログラム可能なプロテアソームターゲティングＰＥＳＴモチーフを含む二機能性ポリペプチドの細胞内送達を増強することができるという発見に基づいている。更に、ヒトＰＥＳＴデグロンに対する或る特定の改変は、標的抗原（例えば、シヌクレイン、タウ、ハンチンチン）分解のレベルを変化させることができる。所与の標的抗原の分解を増加させることができるか、又は所与の抗原が完全に排除されないが、病原性条件で低減される程度にまで分解のレベルを変化させる様々な改変（例えば、ＰＥＳＴデグロンにおける特定のアミノ酸の置換）が存在する。かかる多機能性ポリペプチドは、疾患を引き起こすタンパク質凝集体の蓄積を防止して、それにより、かかるタンパク質凝集と関連付けられる神経変性状態を処置するのに使用することができる。

【０００５】

一部の場合では、本開示の多機能性ポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖シグナルペプチド配列（ＳＳ）を含む第１のドメイン、細胞透過性ペプチドを含む第２のドメイン、抗原（例えば、抗α－シヌクレイン又はハンチンチン）結合ドメインを含む第３のドメイン、及びプログラム可能なプロテアソームターゲティングＰＥＳＴモチーフを含む第４のドメイン、並びにタンパク質凝集神経変性疾患の処置においてこれらのポリペプチドを使用するための方法を含む。

【０００６】

第１の態様では、本開示は、Ｎ末端からＣ末端へと、Ｉ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；（ｂ）細胞透過性ペプチド；（ｃ）α－シヌクレインに結合する抗原結合ドメイン；及び（ｄ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；又はＩＩ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；（ｂ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；（ｃ）α－シヌクレインに結合する抗原結合ドメイン；及び（ｄ）細胞透過性ペプチドを含む組換えポリペプチドを特徴とする。

一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列番号１に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、又は少なくとも９５％同一であり、且つ少なくとも１種のアミノ酸置換を有する配列を含み、ここで少なくとも１種のアミノ酸置換を有するポリペプチドは、空のベクター（エンプティベクター）（ＥＶ）対照に比べてα－シヌクレインの分解を増加又は減少させる。

【０００７】

一部の実施形態では、少なくとも１種のアミノ酸置換は、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、又はイソロイシンから選択される。一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列$NPDFX_1X_2X_3VX_4X_5QX_6AX_7X_8LX_9VX_{10}X_{11}AWX_{12}X_{13}GMX_{14}RHRAACASASINV$（配列番号１０９）（式中、$X_1$は（Ｐ／Ａ）であり、$X_2$は（Ｐ／Ａ）であり、$X_3$は（Ｅ／Ａ）であり、$X_4$

は（Ｅ／Ａ）であり、X_5は（Ｅ／Ａ）であり、X_6は（Ｄ／Ａ）であり、X_7は（Ｓ／Ａ）であり、X_8は（Ｔ／Ａ）であり、X_9は（Ｐ／Ａ）であり、X_{10}は（Ｓ／Ａ）であり、X_{11}は（Ｃ／Ａ）であり、X_{12}は（Ｅ／Ａ）であり、X_{13}は（Ｓ／Ａ）であり、X_{14}は（Ｋ／Ａ）である）を含み、ここで配列は、NPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV（配列番号３）ではなく、ポリペプチドは、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてα－シヌクレインの分解を増加させる。

【０００８】

一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、X_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ａ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ｄ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ｓ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号７におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又はX_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ｐ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ａ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ｓ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号８におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又はX_1は（Ｐ）であり、X_2は（Ｐ）であり、X_3は（Ｅ）であり、X_4は（Ｅ）であり、X_5は（Ｅ）であり、X_6は（Ｄ）であり、X_7は（Ｓ）であり、X_8は（Ｔ）であり、X_9は（Ｐ）であり、X_{10}は（Ｓ）であり、X_{11}は（Ｃ）であり、X_{12}は（Ｅ）であり、X_{13}は（Ａ）であり、X_{14}は（Ｋ）である（配列番号１０におけるアミノ酸１６４～１９１）である配列を含む。

一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列番号９に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸１６４～１９１を含み、ここでポリペプチドは、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてα－シヌクレインの分解を減少させる。

【０００９】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインはイントラボディである。一部の実施形態では、イントラボディは、α－シヌクレインに結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）又は単一ドメイン抗体である。一部の実施形態では、単一ドメイン抗体は、α－シヌクレイン特異的ＶＬドメイン（ＶＬ　α－シヌクレイン）、α－シヌクレイン特異的ＶＨドメイン（ＶＨ　α－シヌクレイン）又はα－シヌクレイン特異的ＶＨＨドメインを含む。

一部の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号１６～配列番号１７のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を有するＶＨＨ抗体、又は配列番号１８に記載されるアミノ酸配列を有するＶＨドメインを含む。

一部の実施形態では、ドメインは、ＶＬ［α－シヌクレイン］－ＶＨ［α－シヌクレイン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている。一部の実施形態では、ドメインは、ＶＨ［α－シヌクレイン］－ＶＬ［α－シヌクレイン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている。

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体又はその機能性断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単一ドメイン抗体、及びｓｃＦｖから選択される。

一部の実施形態では、α－シヌクレイン特異的ＶＬドメイン（ＶＬ　α－シヌクレイン）及びα－シヌクレイン特異的ＶＨドメイン（ＶＨ　α－シヌクレイン）は、ポリペプチドリンカーによって結合されている。一部の実施形態では、リンカーは配列番号１４に記載されるアミノ酸配列を含む。

【００１０】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体に由来する。

一部の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号１４９、及び配列番号２３６～配列番号４７３に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列

を含む。
一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５０～配列番号１５２及び配列番号１７０～配列番号２３５のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。
一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、組換えポリペプチドの、細胞への細胞内送達を増強する。
一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、組換えポリペプチドの細胞内送達を、（ａ）約１０％～約３０％、（ｂ）約３０％～約５０％、（ｃ）約５０％～約７０％又は（ｄ）約７０％～約９０％の量、増強する。
【００１１】
第２の態様では、本開示は、配列番号１５４～配列番号１５８、配列番号１６１、配列番号１６３、及び配列番号１６４のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、α－シヌクレインに結合する組換えポリペプチドを特徴とする。
【００１２】
一部の実施形態では、本開示は、処置を必要とする患者においてタンパク質凝集疾患を処置する方法であって、患者に、治療上有効な量の第１の態様の組換えポリペプチドを投与することを含む方法を特徴とする。
一部の実施形態では、タンパク質凝集疾患は、パーキンソン病（ＰＤ）、多系統萎縮症（ＭＳＡ）、レビー小体型認知症、アルツハイマー病（ＡＤ）、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、脊髄損傷（ＳＣＩ）、外傷性脳損傷（ＴＢＩ）、及び他のシヌクレイノパチーからなる群から選択される。
【００１３】
一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、ＰＤを有する患者の中脳ドーパミン作動性ニューロンに送達されるか、又は中脳ドーパミン作動性ニューロンにおいて発現される。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、ＭＳＡを有する患者のオリゴデンドロサイトに送達されるか、又はオリゴデンドロサイトにおいて発現される。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、レビー小体病などのシヌクレイノパチーを有する患者のグルタミン酸作動性ニューロンに送達されるか、又はグルタミン酸作動性ニューロンにおいて発現される。一部の実施形態では、当該方法は、組換えポリペプチドを、遺伝子療法によって患者に提供することを更に含む。一部の実施形態では、α－シヌクレインの分解速度は、指定された神経細胞サブタイプにおいて変更される。一部の実施形態では、神経細胞サブタイプは、ドーパミン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロン、ＧＡＢＡ作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト及びミクログリアを含むがこれらに限定されないニューロンから選択される。一部の実施形態では、神経細胞サブタイプは、シナプシンＩなどのニューロン特異的プロモーター、及びＶＧＬＵＴＩ若しくはチロシンヒドロキシラーゼにおけるプロモーターなどの細胞型特異的プロモーター又はミエリン塩基性タンパク質若しくはＧＦＡＰなどのグリア特異的プロモーターから選択される。
【００１４】
第３の態様では、本開示は、Ｎ末端からＣ末端へ、Ｉ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；（ｂ）細胞透過性ペプチド；（ｃ）タウに結合する抗原結合ドメイン；及び（ｄ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；又はＩＩ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；（ｂ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；（ｃ）タウに結合する抗原結合ドメイン；及び（ｄ）細胞透過性ペプチドを含む組換えポリペプチドを特徴とする。

【００１５】
一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列番号１に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、又は少なくとも９５％同一であり、且つ少なくとも１種のアミノ酸置換を有する配列を含み、ここでポリペプチドは、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてタウの分解を増加又は減少させる。一部の実施形態では、少なくとも１種のアミノ酸置換は、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、又はイソロイシンから選択される。一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列NPDFX$_1$X$_2$X$_3$VX$_4$X$_5$QX$_6$AX$_7$X$_8$LX$_9$VX$_{10}$X$_{11}$AWX$_{12}$X$_{13}$GMX$_{14}$RHRAACASASINV（配列番号１０９）（式中、X$_1$は（Ｐ／Ａ）であり、X$_2$は（Ｐ／Ａ）であり、X$_3$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_4$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_5$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_6$は（Ｄ／Ａ）であり、X$_7$は（Ｓ／Ａ）であり、X$_8$は（Ｔ／Ａ）であり、X$_9$は（Ｐ／Ａ）であり、X$_{10}$は（Ｓ／Ａ）であり、X$_{11}$は（Ｃ／Ａ）であり、X$_{12}$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_{13}$は（Ｓ／Ａ）であり、X$_{14}$は（Ｋ／Ａ）である）を含み、ここで前記配列は、NPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV（配列番号３）ではなく、ポリペプチドは、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてタウの分解を増加させる。
【００１６】
一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、X$_1$は（Ｐ）であり、X$_2$は（Ａ）であり、X$_3$は（Ｅ）であり、X$_4$は（Ｅ）であり、X$_5$は（Ｅ）であり、X$_6$は（Ｄ）であり、X$_7$は（Ｓ）であり、X$_8$は（Ｔ）であり、X$_9$は（Ｐ）であり、X$_{10}$は（Ｓ）であり、X$_{11}$は（Ｃ）であり、X$_{12}$は（Ｅ）であり、X$_{13}$は（Ｓ）であり、X$_{14}$は（Ｋ）である（配列番号７におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又はX$_1$は（Ｐ）であり、X$_2$は（Ｐ）であり、X$_3$は（Ｅ）であり、X$_4$は（Ｅ）であり、X$_5$は（Ｅ）であり、X$_6$は（Ａ）であり、X$_7$は（Ｓ）であり、X$_8$は（Ｔ）であり、X$_9$は（Ｐ）であり、X$_{10}$は（Ｓ）であり、X$_{11}$は（Ｃ）であり、X$_{12}$は（Ｅ）であり、X$_{13}$は（Ｓ）であり、X$_{14}$は（Ｋ）である（配列番号８におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又はX$_1$は（Ｐ）であり、X$_2$は（Ｐ）であり、X$_3$は（Ｅ）であり、X$_4$は（Ｅ）であり、X$_5$は（Ｅ）であり、X$_6$は（Ｄ）であり、X$_7$は（Ｓ）であり、X$_8$は（Ｔ）であり、X$_9$は（Ｐ）であり、X$_{10}$は（Ｓ）であり、X$_{11}$は（Ｃ）であり、X$_{12}$は（Ｅ）であり、X$_{13}$は（Ａ）であり、X$_{14}$は（Ｋ）である（配列番号１０におけるアミノ酸１６４～１９１）である配列を含む。
【００１７】
一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列番号９に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸１６４～１９１を含み、ここでポリペプチドは、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてタウの分解を減少させる。一部の実施形態では、抗原結合ドメインはイントラボディである。一部の実施形態では、イントラボディは、タウに結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）又は単一ドメイン抗体である。一部の実施形態では、単一ドメイン抗体は、タウ特異的ＶＬドメイン（ＶＬタウ）、タウ特異的ＶＨドメイン（ＶＨタウ）又はタウ特異的ＶＨＨドメインを含む。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号１６２に記載されるアミノ酸配列を含む。
【００１８】
一部の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号６５～配列番号８１のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、又は配列番号８２～配列番号９８のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む。一部の実施形態では、ドメインは、ＶＬ［タウ］－ＶＨ［タウ］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている。一部の実施形態では、ドメインは、ＶＨ［タウ］－ＶＬ［タウ］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている。
一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体又はその機能性断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単一ドメイン抗体、及びｓｃＦｖから選択される。一部の実施形態では、タウ特異的ＶＬドメイン（ＶＬタウ）及びタウ特異的ＶＨドメイン（ＶＨタウ）が、ポリペプチド

リンカーによって結合されている。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号１４に記載されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体に由来する。

【００１９】

一部の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号１４９、及び配列番号２３６～配列番号４７３に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５０～配列番号１５２及び配列番号１７０～配列番号２３５のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００２０】

一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、組換えポリペプチドの、細胞への細胞内送達を増強する。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、組換えポリペプチドの細胞内送達を、（ａ）約１０％～約３０％、（ｂ）約３０％～約５０％、（ｃ）約５０％～約７０％又は（ｄ）約７０％～約９０％の量、増強する。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号１６２に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００２１】

一部の実施形態では、本開示は、処置を必要とする患者においてタンパク質凝集疾患を処置する方法であって、患者に、治療上有効な量の第３の態様の組換えポリペプチドを投与することを含む方法を特徴とする。

一部の実施形態では、タンパク質凝集疾患は、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、１７番染色体上にパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（ＦＴＤＰ－１７）、前頭側頭葉変性症（ＦＴＬＤ－ＴＡＵ）、大脳皮質基底核変性症（ＣＢＤ）、原発性年連関連タウオパチー、ピック病、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、レビー小体型認知症、血管性認知症、結節性硬化症、脊髄損傷（ＳＣＩ）、外傷性脳損傷（ＴＢＩ）、又は他のタウオパチーから選択される。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、ＰＤを有する患者の中脳ドーパミン作動性ニューロンに送達されるか、又は中脳ドーパミン作動性ニューロンにおいて発現される。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、ＭＳＡを有する患者でのオリゴデンドロサイトに送達されるか、又はオリゴデンドロサイトにおいて発現される。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、タウオパチーを有する患者のグルタミン酸作動性ニューロンに送達されるか、又はグルタミン酸作動性ニューロンにおいて発現される。一部の実施形態では、当該方法は、組換えポリペプチドを、遺伝子療法によって患者に提供することを更に含む。

【００２２】

第４の態様では、本開示は、Ｎ末端からＣ末端へと、Ｉ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；（ｂ）細胞透過性ペプチド；（ｃ）ハンチンチンに結合する抗原結合ドメイン；及び（ｄ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；又はＩＩ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；（ｂ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；（ｃ）ハンチンチンに結合する抗原結合ドメイン；及び（ｄ）細胞透過性ペプチドを含む組換えポリペプチドを特徴とする。

【００２３】

一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列番号１に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、又は少なくとも９５％同一であり、且つ少なくとも１種のアミノ酸置換

を有する配列を含み、ここでポリペプチドは、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてハンチンチンの分解を増加又は減少させる。一部の実施形態では、少なくとも１種のアミノ酸置換は、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、又はイソロイシンから選択される。一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列NPDFX$_1$X$_2$X$_3$VX$_4$X$_5$QX$_6$AX$_7$X$_8$LX$_9$VX$_{10}$X$_{11}$AWX$_{12}$X$_{13}$GMX$_{14}$RHRAACASASINV（配列番号１０９）（式中、

X$_1$は（Ｐ／Ａ）であり、X$_2$は（Ｐ／Ａ）であり、X$_3$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_4$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_5$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_6$は（Ｄ／Ａ）であり、X$_7$は（Ｓ／Ａ）であり、X$_8$は（Ｔ／Ａ）であり、X$_9$は（Ｐ／Ａ）であり、X$_{10}$は（Ｓ／Ａ）であり、X$_{11}$は（Ｃ／Ａ）であり、X$_{12}$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_{13}$は（Ｓ／Ａ）であり、X$_{14}$は（Ｋ／Ａ）である）を含み、ここで前記配列は、NPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV（配列番号３）ではなく、ポリペプチドは、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてタンパク質の分解を増加させる。

【００２４】

一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、X$_1$は（Ｐ）であり、X$_2$は（Ａ）であり、X$_3$は（Ｅ）であり、X$_4$は（Ｅ）であり、X$_5$は（Ｅ）であり、X$_6$は（Ｄ）であり、X$_7$は（Ｓ）であり、X$_8$は（Ｔ）であり、X$_9$は（Ｐ）であり、X$_{10}$は（Ｓ）であり、X$_{11}$は（Ｃ）であり、X$_{12}$は（Ｅ）であり、X$_{13}$は（Ｓ）であり、X$_{14}$は（Ｋ）である（配列番号７におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又はX$_1$は（Ｐ）であり、X$_2$は（Ｐ）であり、X$_3$は（Ｅ）であり、X$_4$は（Ｅ）であり、X$_5$は（Ｅ）であり、X$_6$は（Ａ）であり、X$_7$は（Ｓ）であり、X$_8$は（Ｔ）であり、X$_9$は（Ｐ）であり、X$_{10}$は（Ｓ）であり、X$_{11}$は（Ｃ）であり、X$_{12}$は（Ｅ）であり、X$_{13}$は（Ｓ）であり、X$_{14}$は（Ｋ）である（配列番号８におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又はX$_1$は（Ｐ）であり、X$_2$は（Ｐ）であり、X$_3$は（Ｅ）であり、X$_4$は（Ｅ）であり、X$_5$は（Ｅ）であり、X$_6$は（Ｄ）であり、X$_7$は（Ｓ）であり、X$_8$は（Ｔ）であり、X$_9$は（Ｐ）であり、X$_{10}$は（Ｓ）であり、X$_{11}$は（Ｃ）であり、X$_{12}$は（Ｅ）であり、X$_{13}$は（Ａ）であり、X$_{14}$は（Ｋ）である（配列番号１０におけるアミノ酸１６４～１９１）である配列を含む。一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列番号９に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸１６４～１９１を含み、ここでポリペプチドは、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてハンチンチンの分解を減少させる。

【００２５】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインはイントラボディである。一部の実施形態では、イントラボディは、ハンチンチンに結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）又は単一ドメイン抗体である。一部の実施形態では、単一ドメイン抗体は、ハンチンチン特異的ＶＬドメイン（ＶＬハンチンチン）、ハンチンチン特異的ＶＨドメイン（ＶＨハンチンチン）又はハンチンチン特異的ＶＨＨドメインを含む。一部の実施形態では、ｓｃＦＶは、配列番号１０６として本明細書で記載されるＶＨドメイン、及び配列番号１０７として本明細書で記載されるＶＬドメインを含む。一部の実施形態では、ドメインは、ＶＬ［ハンチンチン］－ＶＨ［ハンチンチン］－ＰＥＳＴモチーフ又はＶＨ［ハンチンチン］－ＶＬ［ハンチンチン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている。一部の実施形態では、ハンチンチン特異的ＶＬドメインは、配列番号１０８として本明細書で記載されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号１６０に記載されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体又はその機能性断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単一ドメイン抗体、及びｓｃＦｖから選択される。

【００２６】

一部の実施形態では、ハンチンチン特異的ＶＬドメイン（ＶＬハンチンチン）及びハンチンチン特異的ＶＨドメイン（ＶＨハンチンチン）は、ポリペプチドリンカーによって結合されている。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号１４に記載されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体、合成抗体、

ヒト抗体、又はヒト化抗体に由来する。一部の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号１４９、及び配列番号２３６～配列番号４７３に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００２７】

一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５０～配列番号１５２及び配列番号１７０～配列番号２３５のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、組換えポリペプチドの、細胞への細胞内送達を増強する。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、組換えポリペプチドの細胞内送達を、（ａ）約１０％～約３０％、（ｂ）約３０％～約５０％、（ｃ）約５０％～約７０％又は（ｄ）約７０％～約９０％の量、増強する。

第５の態様では、本開示は、配列番号１６０に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む、ハンチンチンに結合する組換えポリペプチドを特徴とする。

【００２８】

一部の実施形態では、本開示は、処置を必要とする患者においてタンパク質凝集疾患を処置する方法であって、患者に、治療上有効な量の第４又は第５の態様の組換えポリペプチドを投与することを含む方法を特徴とする。

一部の実施形態では、タンパク質凝集疾患は、ハンチントン病、又はパーキンソン病（ＰＤ）、多系統萎縮症（ＭＳＡ）、及びレビー小体型認知症、アルツハイマー病（ＡＤ）、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、脊髄損傷（ＳＣＩ）、及び外傷性脳損傷（ＴＢＩ）を含む他のタンパク質凝集神経変性疾患から選択される。一部の実施形態では、タンパク質凝集疾患はハンチントン病である。

【００２９】

一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、ＰＤを有する患者の中脳ドーパミン作動性ニューロンに送達されるか、又は中脳ドーパミン作動性ニューロンにおいて発現される。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、ＭＳＡを有する患者でのオリゴデンドロサイトに送達されるか、又はオリゴデンドロサイトにおいて発現される。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、ハンチントン病を有する患者のグルタミン酸作動性ニューロンに送達されるか、又はグルタミン酸作動性ニューロンにおいて発現される。一部の実施形態では、当該方法は、組換えポリペプチドを、遺伝子療法によって患者に提供することを更に含む。

【００３０】

一部の実施形態では、本開示は、上記態様のいずれかの組換えポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを特徴とする。一部の実施形態では、本開示は、本開示のポリヌクレオチドを含むベクターを特徴とする。一部の実施形態では、本開示は、本開示のポリヌクレオチドをトランスフェクトされた単離宿主細胞を特徴とする。一部の実施形態では、本開示は、本開示のベクターをトランスフェクトされた単離宿主細胞を特徴とする。一部の実施形態では、本開示は、本開示のポリヌクレオチドを含むヒト遺伝子療法ベクターを含む医薬組成物を特徴とする。一部の実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体を更に含む。一部の実施形態では、本開示は、組換えポリペプチドの調製のための方法であって、本開示のポリヌクレオチドをトランスフェクトされ、ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞を培養することと、ポリペプチドを細胞から単離することとを含む方法を特徴とする。

【００３１】

別の態様では、本開示は、Ｎ末端からＣ末端へと、Ｉ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；（ｂ）細胞透過性ペプチド；（ｃ）タンパク質に結合する抗原結合ドメイン；及び（ｄ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；又はＩＩ．（ａ）任意的なシグナルペプチドドメイン；（ｂ）プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト若しくはマウスＰＥＳＴドメイン；（ｃ）タンパク質に結合する抗原結合ドメイン；及び（ｄ）細胞透過性ペプチドを含む組換えポリペプチドを特徴とする。一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列番号１に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、又は少なくとも９５％同一であり、且つ少なくとも１種のアミノ酸置換を有する配列を含み、ここで少なくとも１種のアミノ酸置換を有するポリペプチドは、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてタンパク質の分解を増加又は減少させる。一部の実施形態では、少なくとも１種のアミノ酸置換は、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、又はイソロイシンから選択される。一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列NPDFX$_1$X$_2$X$_3$VX$_4$X$_5$QX$_6$AX$_7$X$_8$LX$_9$VX$_{10}$X$_{11}$AWX$_{12}$X$_{13}$GMX$_{14}$RHRAACASASINV（配列番号１０９）（式中、X$_1$は（Ｐ／Ａ）であり、X$_2$は（Ｐ／Ａ）であり、X$_3$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_4$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_5$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_6$は（Ｄ／Ａ）であり、X$_7$は（Ｓ／Ａ）であり、X$_8$は（Ｔ／Ａ）であり、X$_9$は（Ｐ／Ａ）であり、X$_{10}$は（Ｓ／Ａ）であり、X$_{11}$は（Ｃ／Ａ）であり、X$_{12}$は（Ｅ／Ａ）であり、X$_{13}$は（Ｓ／Ａ）であり、X$_{14}$は（Ｋ／Ａ）である）を含み、ここで前記配列は、NPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV（配列番号３）ではなく、ポリペプチドは、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてタンパク質の分解を増加させる。

【００３２】

一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、X$_1$は（Ｐ）であり、X$_2$は（Ａ）であり、X$_3$は（Ｅ）であり、X$_4$は（Ｅ）であり、X$_5$は（Ｅ）であり、X$_6$は（Ｄ）であり、X$_7$は（Ｓ）であり、X$_8$は（Ｔ）であり、X$_9$は（Ｐ）であり、X$_{10}$は（Ｓ）であり、X$_{11}$は（Ｃ）であり、X$_{12}$は（Ｅ）であり、X$_{13}$は（Ｓ）であり、X$_{14}$は（Ｋ）である（配列番号７におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又はX$_1$は（Ｐ）であり、X$_2$は（Ｐ）であり、X$_3$は（Ｅ）であり、X$_4$は（Ｅ）であり、X$_5$は（Ｅ）であり、X$_6$は（Ａ）であり、X$_7$は（Ｓ）であり、X$_8$は（Ｔ）であり、X$_9$は（Ｐ）であり、X$_{10}$は（Ｓ）であり、X$_{11}$は（Ｃ）であり、X$_{12}$は（Ｅ）であり、X$_{13}$は（Ｓ）であり、X$_{14}$は（Ｋ）である（配列番号８におけるアミノ酸１６４～１９１）であるか、又はX$_1$は（Ｐ）であり、X$_2$は（Ｐ）であり、X$_3$は（Ｅ）であり、X$_4$は（Ｅ）であり、X$_5$は（Ｅ）であり、X$_6$は（Ｄ）であり、X$_7$は（Ｓ）であり、X$_8$は（Ｔ）であり、X$_9$は（Ｐ）であり、X$_{10}$は（Ｓ）であり、X$_{11}$は（Ｃ）であり、X$_{12}$は（Ｅ）であり、X$_{13}$は（Ａ）であり、X$_{14}$は（Ｋ）である（配列番号１０におけるアミノ酸１６４～１９１）である配列を含む。

【００３３】

一部の実施形態では、プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトＰＥＳＴドメインは、配列番号９に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸１６４～１９１を含み、ここでポリペプチドは、空のベクター（ＥＶ）対照に比べてタンパク質の分解を減少させる。一部の実施形態では、抗原結合ドメインはイントラボディである。一部の実施形態では、イントラボディは、タンパク質に結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）又は単一ドメイン抗体である。一部の実施形態では、単一ドメイン抗体は、タンパク質に特異的なＶＬドメイン、タンパク質に特異的なＶＨドメイン、又はタンパク質に特異的なＶＨＨドメインを含む。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体又はその機能性断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単一ドメイン抗体、及びｓｃＦｖから選択される。一部の実施形態では、タンパク質に特異的なＶＬドメイン及びタンパク質に特異的なＶＨドメインは、ポリペプチドリンカーによって結合されている。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号１４に記載されるアミノ酸配列を含む。

【００３４】
一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体に由来する。一部の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号１４９、及び配列番号２３６～配列番号４７３に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５０～配列番号１５２及び配列番号１７０～配列番号２３５のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、組換えポリペプチドの、細胞への細胞内送達を増強する。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、細胞透過性ペプチドを含有しない同等の組換えポリペプチドに比べて、組換えポリペプチドの細胞内送達を、（ａ）約１０％～約３０％、（ｂ）約３０％～約５０％、（ｃ）約５０％～約７０％、又は（ｄ）約７０％～約９０％の量、増強する。

【００３５】
一部の実施形態では、タンパク質はα－シヌクレインである。一部の実施形態では単一ドメイン抗体は、配列番号１６～配列番号１７のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を有するＶＨＨ抗体、又は配列番号１８に記載されるアミノ酸配列を有するＶＨドメインを含む。一部の実施形態では、ドメインは、ＶＬ［α－シヌクレイン］－ＶＨ［α－シヌクレイン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている。一部の実施形態では、ドメインは、ＶＨ［α－シヌクレイン］－ＶＬ［α－シヌクレイン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている。

【００３６】
一部の実施形態では、タンパク質はタウである。一部の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号６５～配列番号８１のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、又は配列番号８２～配列番号９８のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む。一部の実施形態では、ドメインは、ＶＬ［タウ］－ＶＨ［タウ］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている。一部の実施形態では、ドメインは、ＶＨ［タウ］－ＶＬ［タウ］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている。

一部の実施形態では、タンパク質はハンチンチンである。一部の実施形態では、ｓｃＦｖは、配列番号１０６として本明細書で記載されるＶＨドメイン、及び配列番号１０７として本明細書で記載されるＶＬドメインを含む。一部の実施形態では、ドメインは、ＶＬ［ハンチンチン］－ＶＨ［ハンチンチン］－ＰＥＳＴモチーフ又はＶＨ［ハンチンチン］－ＶＬ［ハンチンチン］－ＰＥＳＴモチーフの順序で配置されている。一部の実施形態では、ハンチンチン特異的ＶＬドメインは、配列番号１０８として本明細書で記載されるアミノ酸配列を含む。

【００３７】
別記されない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語は全て、本発明が属する当業者が一般的に理解するものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似又は同等の方法及び材料は、本発明の実施又は試験において使用することができるが、例示的な方法及び材料が以下で記載されている。本明細書で言及される刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は全て、参照によりそれらの全体が組み込まれる。矛盾が生じる場合は、定義を含む本出願が優先される。材料、方法、及び例は単なる例示であり、限定的であると意図されない。

【００３８】
いかなる疑念も回避するために、「一部の実施形態では」、「或る特定の実施形態では」、「或る特定の場合では」、「一部の場合では」、「更なる実施形態では」、「１つの実施形態では」及び「更なる実施形態では」などの表現は、そこに記載される実施形態のいずれかが、それらの実施形態の特徴それぞれを組み合わせることを考慮して読み取られ

るべきであり、またそれらの実施形態の特徴の組合せが１つの実施形態で詳述されるかのように同じ様式で本開示が扱われなくてはならないように使用及び意図されることが強調される。同じことが、併記の特許請求の範囲の実施形態及び特徴のあらゆる組合せに当てはまり、実施例に例示され、それらはまた、説明において開示された相当する実施形態からの特徴と組み合わせられると意図され、ここで、一貫性及び簡潔性のみのために、実施形態は従属関係によって特徴付けられる一方で、実際には、（複数の）従属関係に起因して解釈され得る各実施形態及び特徴の組合せは、文字通りに開示され、種々の選択肢の中の選択とはみなされないと認識されなくてはならない。この状況では、実施例に開示された実施形態及び特徴が、そこで例示されたものと同じ機能を有する均等物に一般化されると意図されることが当業者に理解されよう。

本開示の他の特徴及び利点は、下記の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかである。

【図面の簡単な説明】

【００３９】

【図１Ａ－Ｃ】従来のＩｇＧ抗体由来の二機能性ｓｃＦｖイントラボディの開発戦略及びそれがトランスフェクションによって標的細胞にどのように送達されるかの概略図を示す図である。（Ａ）従来の抗体（左）、ラクダ科（Ｃａｍｅｌｉｄ）抗体（中央）、単一ドメイン抗体（右）の図。ｓｃＦｖイントラボディは、従来の抗体の可変重（ＶＨ）ドメイン及び可変軽（ＶＬ）ドメインをコードする最も短い可変領域断片（Ｆｖ）遺伝子を可撓性ペプチドリンカーで連結することによって構築される。ラクダ科抗体は、単一可変ドメインとともに２つの重鎖で構成される（ＶＨＨ）。単一ドメイン抗体は、ＶＨドメイン、ＶＬドメイン、又はＶＨＨドメインのいずれかで構成される。（Ｂ）二機能性イントラボディは、ヒトオルニチンデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）ＰＥＳＴデグロン（ＰＥＳＴ配列は、プロリン（Ｐ）、グルタミン酸（Ｅ）、セリン（Ｓ）、及びスレオニン（Ｔ）が豊富な配列である）に融合された抗原結合ドメイン、即ち、ｓｃＦｖ又はＶＨ、ＶＬ、若しくはＶＨＨのいずれかで構成される単一ドメイン抗体で構成される。一部の実施形態では、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）などのエピトープタグは、二機能性イントラボディの細胞内発現を同定するのに使用され得る。（Ｃ）細胞における二機能性イントラボディの実験計画。二機能性イントラボディ媒介性標的分解は、プロテアソームを通じて起こる。ＰＥＳＴデグロンはプロテアソームの１９Ｓ蓋部に結合し、そこでＰＥＳＴデグロンは２６Ｓプロテアソームによるイントラボディ及びその結合カーゴの分解を促進する。（１）二機能性イントラボディは、ベクターベース又はタンパク質ベースの送達によって細胞に送達される。（２）次に、細胞は、（３）リボソームでタンパク質に翻訳されるイントラボディをコードするｍＲＮＡを作製する。（４）二機能性イントラボディは、その標的タンパク質の凝集を防ぐ。（５）二機能性イントラボディ及びその標的タンパク質は、プロテアソームによって分解される。図１Ａ～図１Ｃは、それぞれ、出現順に配列番号１３３、配列番号１４、配列番号１５、及び配列番号１５を開示している。

【図２】ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴが、ＳＴ１４Ａニューロン細胞においてヒトα－シヌクレインの定常状態レベルを低下させることを実証する図である。α－シヌクレイン－ＧＦＰは、ＶＨ１４－マウスＰＥＳＴ（ＶＨ１４－ｍＰＥＳＴ）又はＶＨ１４－ヒトＰＥＳＴ（ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ）のいずれかと同時トランスフェクトされた。トランスフェクションの７２時間後、細胞のライブイメージングを行った。ウェスタンブロットは、空のベクター（ＥＶ）対照と比較して、ＶＨ１４－ｍＰＥＳＴ及びＶＨ１４－ｈＰＥＳＴトランスフェクト細胞におけるα－シヌクレイン－ＧＦＰモノマー並びに高分子量種の低減を示す。α－シヌクレイン－ＧＦＰは、全ての形態のシヌクレインを認識する汎シヌクレイン抗体を使用して検出した（１：５００；Ａｂｃａｍ　＃６１７６）。アクチンは、ローディング対照としてプローブした。グラフは、ウェスタンブロットシグナルのデンシトメトリック分析を示す。各バーは、空のベクター対照のパーセンテージとして表される汎シヌクレイン／アクチンローディング対照を表す。汎シヌクレインは、複数の形態のシヌクレインを認識するウサギポリクローナル抗体（ａｂ６１７６）を指す。

【図３】ヒトｉＰＳＣ由来３Ｄ皮質オルガノイドにおける内因性シヌクレイン発現の検証、及びＳＮＣＡ遺伝子トリプリケーション（３Ｘ　ＳＮＣＡ）を有する変異体オルガノイドにおける発現の増加を示す図である。３Ｘ－ＳＮＣＡ及びＷＴ　ｉＰＳＣを、３Ｄ前脳オルガノイドに分化させた。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで６０日（ＤＩＶ）後、オルガノイドをウェスタンブロッティング用に回収した。総タンパク質２０μｇ（左の４レーン）又は１０μｇ（右の２レーン５及び６）を、ゲル電気泳動によって分離し、ＰＶＤＦ膜に転写した。内因性シヌクレインは、ＭＪＦＲ１　抗α－シヌクレイン抗体を使用して検出した（１：１０００；Ａｂｃａｍ　＃ａｂ１３８５０１）。ＧＡＰＤＨは、ローディング対照として使用した（１：１０，０００；Ａｂｃａｍ、＃ａｂ１８１６０２）。

【図４Ａ－Ｂ】ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴがヒト皮質ニューロンにおいて内因性α－シヌクレインを有意に低減させたことを示す図である。（Ａ）Ｔｅｔ－Ｏｎ誘導性抗シヌクレインレンチウイルス構築物の設計。抗シヌクレインｍＰＥＳＴ及びｈＰＥＳＴイントラボディをｐＴｅｔ－Ｏ－Ｎｇｎ２－ｐｕｒｏ（Ａｄｄｇｅｎプラスミド　＃５２０４７）にサブクローニングした。Ｎｇｎ２挿入物を、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ及びＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ－スクランブル対照で置き換えた。５’クローニング部位はＥｃｏＲＩであり、３’クローニング部位はＸｂａＩであった。（Ｂ）ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴは、３Ｘ　ＳＮＣＡ前脳オルガノイドにおいて内因性ヒトα－シヌクレインのレベルを低減させた。免疫蛍光は、空のベクター（ＥＶ）処置オルガノイド（対照）及びスクランブル（Ｓｃｒ）ＰＥＳＴに融合されたＶＨ１４で処置したオルガノイドと比較して、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴを保有するレンチウイルスで形質導入された（ｎ＝３）オルガノイドにおいてα－シヌクレイン（ＭＪＦＲ１；Ａｂｃａｍ、下部パネル）レベルの低減を示す。オルガノイドにおけるα－シヌクレインシグナルのデンシトメトリック定量化により、ＶＨ１４処置コホートの両方において標的タンパク質の統計的に有意な低減が確認される（全て****＝ｐ＜０．０００１）。

【図５】ｈＰＥＳＴを有するボツリヌス毒素（Ｂ８）を標的化する二機能性イントラボディが、ヤツメウナギＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰ（ＤＹ－ｓｙｎ～ＧＦＰ）の定常状態タンパク質レベルを変化させないことを示す図である。ＳＴ１４Ａニューロン細胞にＤＹ－ｓｙｎ～ＧＦＰ及びＢ８－ｈＰＥＳＴ又は空のベクター対照のいずれかを同時トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後、細胞のライブセルイメージングを行い、続いてウェスタンブロッティング用に回収した。右の２つのパネル：ＤＹ－ｓｙｎ～ＧＦＰに関するライブセルイメージング（スケールバー２００μｍ）。左パネル：代表的なウェスタンブロッティングは上述の通りである。Ｂ８構築物はＤＹ－ｓｙｎ～ＧＦＰを分解せず、シヌクレインを標的化する構築物の特異性を実証している。

【図６】ヒトα－シヌクレインタンパク質の図。ＶＨ１４、ＶＨＨ－４Ｃ、ＶＨＨ－４Ｃ－Ｎ７７Ｄ、及びＤＢ１の提唱されるイントラボディ結合部位の位置は、凝集しやすく、ミスフォールディングに重要であることが示されているα－シヌクレインの非アミロイド構成要素（ＮＡＣ）疎水性ドメインに対している。

【図７】ヤツメウナギシヌクレインの発現を示す図である。ＤＹ－ｓｙｎ～ＧＦＰ、ＦＤ－ｓｙｎ～ＧＦＰ、及びＳｙｎ３～ＧＦＰを別々にＳＴ１４Ａニューロン細胞にトランスフフェクトした。トランスフェクションの４８時間後、細胞のライブセルイメージングを行った。挿入図：ＤＹ－シヌクレインの斑点が見える（矢頭）。

【図８Ａ－Ｂ】ＶＨＨ－４Ｃ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴが、ＥＶ対照に比べてシヌクレインの定常状態レベルを有意に（ｐ＜０．０５）低減させたことを示す図である。ＳＴ１４Ａニューロン細胞に、（Ａ）ヤツメウナギＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰ又は（Ｂ）ヒトα－シヌクレイン～ＧＦＰ及びＶＨＨ－４Ｃ－ＰＥＳＴ（４Ｃ－ＰＥＳＴ）、ＶＨＨ－４Ｃ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ（Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ）又は空のベクター対照（ＥＶ－ＣＯＮ）のいずれかを同時トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後、細胞のライブイメージングを行い、続いてウェスタンブロッティング用に回収した。スケールバー＝５０μｍ。総タンパク質１０μｇをゲル電気泳動によって分離し、ＰＶＤＦ膜に転写した。（Ａ）ＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰは、汎シヌクレイン抗体を使用して検出した（１：５０

０；Ａｂｃａｍ　＃６１７６）。（Ｂ）α－シヌクレインは、精製マウス抗ヒトα－シヌクレインを使用して検出した（１：１０００；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　＃６１０７８７）。ＧＡＰＤＨは、ローディング対照として使用した（１：１０，０００；Ａｂｃａｍ、＃ａｂ１８１６０２）。使用した二次抗体は、ヤギ抗ウサギＨＲＰコンジュゲートＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）であった（１：２０００；Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。タンパク質バンドは、Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ（商標）Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｐｌｕｓウェスタンブロッティング基質（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ（登録商標））を使用して検出した。シヌクレインデンシトメトリーは、３回の独立した実験からｉｍａｇｅＪソフトウェアを使用して行った。グラフは、シヌクレインウェスタンブロットバンド強度の相対的なデンシトメトリック定量化を示す。デンシトメトリーバーは、ＧＡＰＤＨローディング対照に対するシヌクレイン平均光学密度値を表す。データはＥＶ－ＣＯＮを対して提示される。Ｂｒｏｗｎ－Ｆｏｒｓｙｔｈｅ　ＡＮＯＶＡ、続いて多重比較のためのダネットの事後検定；*はｐ＜０．０５を示す。

【図９】ヒトＰＥＳＴを有するＶＨＨ－４Ｃ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ（Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ）が、ＤＹ－ｓｙｎ－ＧＦＰ発現を有意に（ｐ＜０．０５）に低減させることを示す図である。ＳＴ１４Ａニューロン細胞に、ＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰ及びＶＨＨ－４Ｃ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ、ｈＰＥＳＴ－Ｓｃｒ、又は空のベクター対照（ＥＶ－ＣＯＮ）のいずれかを同時トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後、細胞のライブイメージングを行い、ウェスタンブロッティング用に回収した。（Ａ）ライブセルイメージング（スケールバー２００μｍ）。（Ｂ）ＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰの代表的なウェスタンブロット。（Ｃ）デンシトメトリーバーは、ＧＡＰＤＨローディング対照に対するＤＹ－ｓｙｎ～ＧＦＰ平均光学密度値を表す。データは、平均値±ＳＥＭを表す（１群当たりｎ＝３）。一元配置分散分析、続いてテューキーの多重比較事後検定を実施した。*は、ＥＶ－Ｃｏｎ処置と比較してｐ＜０．０５を示す。デンシトメトリーバーは、ＧＡＰＤＨローディング対照に対するＤＹ－ｓｙｎ～ＧＦＰ平均光学密度値を表す。

【図１０Ａ－Ｂ】α－シヌクレインを標的化するＶＨＨ－４Ｃ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ（Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ）は、β－シヌクレイン～ＧＦＰ（Ａ）又はγ－シヌクレイン～ＧＦＰ（Ｂ）のレベルを有意に低減させないことを示す図である。ＳＴ１４Ａニューロン細胞に、（Ａ）β－シヌクレイン～ＧＦＰ又は（Ｂ）γ－シヌクレイン～ＧＦＰのいずれか及び空のベクター対照（ＣＯＮ）、Ｂ８－ＰＥＳＴ（ボツリヌス（ｂｏｔｕｌｉｎｉｍ）毒素を標的化する）、Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ、又はＮ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ－Ｓｃｒのいずれかを同時トランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、細胞をウェスタンブロッティング用に回収した。総タンパク質１０μｇをゲル電気泳動によって分離し、ＰＶＤＦ膜に転写した。β－シヌクレイン～ＧＦＰ及びγ－シヌクレイン～ＧＦＰは、ＧＦＰ抗体を使用して検出した（１：１０００；Ａｂｃａｍ　＃６５５６）。ＧＡＰＤＨは、ローディング対照として使用した（１：１０，０００；Ａｂｃａｍ、＃ａｂ１８１６０２）。使用した二次抗体は、ヤギ抗ウサギＨＲＰコンジュゲートＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）であった（１：２０００；Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。タンパク質バンドは、Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ（商標）Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｐｌｕｓウェスタンブロッティング基質（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して検出した。デンシトメトリーバーは、ＧＡＰＤＨローディング対照に対するＧＦＰ平均光学密度値を表す。データは、平均値±ＳＥＭ（１群当たりｎ＝３）を表す。一元配置分散分析、続いてテューキーの多重比較事後検定を実施した。*はｐ＜０．０５を示す。

【図１１Ａ－Ｂ】ｈＰＥＳＴ構築物配列を変動させることによるヒトα－シヌクレインの制御分解を示す図である。ＳＴ１４Ａ細胞に、ヒトα－シヌクレイン－ＧＦＰ及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ、及びＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ変種（Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａ）、複合型変異変種（Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ）、又は不活性デグロン対照（Ｃ４４１Ａ）のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクトされた７２時間後、細胞をウェスタンブロッティング用に収集した：（Ａ）ウェスタンブロット。（Ｂ）デンシトメトリーによるウェスタンブロットの定量化。相対的なタンパク質発現

は、総α－シヌクレイン対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ－ＣＯＮに対して正規化した。ヒトＰＥＳＴデグロン変種Ｄ４３３Ａ及びＳ４４５Ａは、不活性対照（ＣＯＮ）又は空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較して、タンパク質分解レベルの変化をもたらす。複合型変異変種Ｐ４２６／Ｐ４２７Ａは、全ての群と比較してシヌクレイン発現の変化をもたらした。Ｃ４４１Ａは、ｈＰＥＳＴを不活性にする変異である。

【図１２Ａ－Ｃ】ｈＰＥＳＴ構築物配列を変動させることによるヒトα－シヌクレインの制御分解を示す図である。ＳＴ１４Ａ細胞に、ヒトα－シヌクレイン－ＧＦＰ及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ、及びＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ変種（Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａ、Ｃ４４１Ａ）、複合型変異変種（Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ）、不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照（ＳＣＲ）又はＢ８－ＰＥＳＴ（ボツリヌス毒素を標的化する）抗原対照のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクトされた７２時間後、α－シヌクレイン－ＧＦＰ蛍光について、細胞のライブイメージングを行い、続いてウェスタンブロッティング用に収集した：（Ａ）ライブセルイメージング（スケールバー５０μｍ）。（Ｂ）ウェスタンブロット。（Ｃ）デンシトメトリーによるウェスタンブロットの定量化。データは、平均値±ＳＥＭを表す。一元配置分散分析、続いてテューキーの多重比較事後検定を実施した。ＥＶ－ＣＯＮ処置と比較して、*はｐ＜０．０５を、***はｐ＜０．００１を示す。相対的なタンパク質発現は、総α－シヌクレイン対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ－ＣＯＮに対して正規化した。ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ及びＶＨ１４－ＰＥＳＴデグロン変種Ｄ４３３Ａは、空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較して有意な（ｐ＜０．０５）タンパク質分解レベルをもたらした。複合型変異変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａは、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴと比較してシヌクレイン発現の変化、及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較して有意な（ｐ＜０．００１）タンパク質分解レベルをもたらした。

【図１３】ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ及びｈＰＥＳＴデグロン変種が、ＥＶ　ＣＯＮ及びＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ－ＳＣＲ（ＳＣＲ）対照と比較して、ヒト中脳ニューロン培養物において内因性α－シヌクレインを低減させることを示す図である。３Ｘ－ＳＮＣＡ　ｉＰＳＣを、３Ｄ中脳オルガノイドに分化させた。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで３０日（ＤＩＶ）後、オルガノイドを、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａ、又は不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照を保有するレンチウイルスで形質導入し、空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較した。処置の３０日後、オルガノイドを免疫蛍光染色用に加工処理した。内因性シヌクレインは、ＭＪＦＲ１抗α－シヌクレイン抗体を使用して検出した（１：１０００；Ａｂｃａｍ　＃ａｂ１３８５０１）。イントラボディ発現は、抗ＨＡ抗体を使用して決定した（１：１０００；Ａｂｃａｍ　＃ａｂ１１７５１５）。抗α－シヌクレインの封入はニューロン及びグリアで起こり得るため、成熟アストロサイト用のマーカーである抗Ｓ１００βを使用して、アストロサイトを同定した（１：１００；Ａｂｃａｍ　＃ａｂ５２６４２）。免疫蛍光法は、空のベクター（ＥＶ）処置オルガノイド（対照）及びスクランブル（Ｓｃｒ）ＰＥＳＴに融合されたＶＨ１４で処置したオルガノイドと比較して、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ及びｈＰＥＳＴデグロン変種を保有するレンチウイルスで形質導入された（ｎ＝３）オルガノイドにおいてα－シヌクレイン（ＭＪＦＲ１；Ａｂｃａｍ、Ｇｒｅｅｎ）レベルの低減を示す。

【図１４】ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ及びｈＰＥＳＴデグロン変種が、アポトーシス中に発生するＤＮＡ断片化を低減させることを示す図である。ＷＴ及び３Ｘ－ＳＮＣＡ　ｉＰＳＣを、３Ｄ中脳オルガノイドに分化させた。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで３０日（ＤＩＶ）後、オルガノイドを、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａ、又は不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照を保有するレンチウイルスで形質導入し、空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較した。処置の３０日後、オルガノイドを、ＴＵＮＥＬアッセイとも呼ばれる末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼｄＵＴＰニックエンド標識染色を使用した免疫蛍光染色用に加

工処理した（ＤｅａｄＥｎｄ　Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ　ＴＵＮＥＬ系；Ｐｒｏｍｅｇａ　＃Ｇ３２５０）。３Ｘ　ＳＮＣＡ中脳オルガノイドは、ＷＴ中脳オルガノイドと比較して、ＴＵＮＥＬ反応性（明るい点）の増加を示した。ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ及びＶＨ１４－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａで処置したＷＴ又は３Ｘ　ＳＮＣＡ中脳オルガノイドでは、最小のＴＵＮＥＬ反応性が見られる。

【図１５Ａ－Ｂ】ヒトＰＥＳＴデグロン融合を介して、分解のためにα－シヌクレインをプロテアソームへと標的化するヒトオルニチンデカルボキシラーゼＰＥＳＴ（ｈＰＥＳＴ）デグロン変種を示す図である。ｈＰＥＳＴデグロン（灰色で強調）内の或る特定の単一（Ａ）及び複合型（Ｂ）変異は、イントラボディ及びその結合抗原の標的分解を変化させると予測される。これは、太字で強調されているもの、即ち、Ｄ４３３Ａ、Ｃ４４１Ａ、Ｓ４４５Ａ、Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａについて実証されている。ＰＥＳＴデグロンは、上段で網掛けされている（ＯＤＣアミノ酸４２３～４５０）。図１５Ａ～図１５Ｂは、それぞれ、出現順に配列番号３及び配列番号１１０～配列番号１３２を開示している。

【図１６】抗α－シヌクレインＶＨＨ及びＶＨ配列：それぞれ配列番号１６、配列番号１７、及び配列番号１８に相当するＶＨＨ－４Ｃ－Ｎ７７Ｄ（上）、ＶＨＨ－ＤＢ１（中央）、及びＶＨ１４（下）を示す図である。ＣＤＲ＝相補性決定領域。

【図１７】マウス及びヒトのオルニチンデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）ＰＥＳＴデグロン（アミノ酸４２２～４６１）の比較を示す図である。ＰＥＳＴ領域は太字で示している。保存領域は灰色で網掛けされている。非保存領域はマーキングを有さない。ｍＯＤＣデグロンのＣ末端４０アミノ酸は、ｈＯＤＣと７７．５％（３１／４０）相同性を共有し、Ｃ末端３７アミノ酸は、８３．７％（３１／３７）相同性を共有している。コンセンサスＰＥＳＴ配列は、下線／斜体で示される。図１７は、それぞれ、出現順に配列番号２及び配列番号３を開示している。

【図１８Ａ－Ｃ】ｍＰＥＳＴ及びｈＰＥＳＴデグロンを用いた場合のタウ低減の比較を示す図である。ＳＴ１４Ａ細胞に、ＧＦＰ－タウ及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｖ－ｍＰＥＳＴ、Ｖ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ－ｍＰＥＳＴ、Ｎ－ｈＰＥＳＴ、Ｆ－ｍＰＥＳＴ、及びＦ－ｈＰＥＳＴのいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、試料を以下のために収集した：（Ａ）ライブセルイメージング。（Ｂ）ウェスタンブロット。（Ｃ）相対的なタンパク質発現は、総タウ対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ対照に対して正規化した。

【図１９Ａ－Ｂ】ｈＰＥＳＴ構築物配列を変動させることによるタウの制御分解を示す図である。ＳＴ１４Ａ細胞に、ＧＦＰ－タウ及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｖ－ｈＰＥＳＴ又はＮ－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａ、又はＣ４４１Ａのいずれかをトランスフェクトした。（Ａ）ウェスタンブロット。（Ｂ）相対的なタンパク質発現は、総タウ対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ対照に対して正規化した。ヒトＰＥＳＴデグロン変種（Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、及びＳ４４５Ａ）は、不活性ｈＰＥＳＴデグロン（Ｃ４４１Ａ）又は空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較してタンパク質分解レベルの変化をもたらした。

【図２０Ａ－Ｃ】Ｖ－ｈＰＥＳＴデグロン変種でｈＰＥＳＴ構築物配列を変動させることによるタウの制御分解を示す図である。ＳＴ１４Ａ細胞に、ＧＦＰ－タウ及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｖ－ｈＰＥＳＴ、Ｖ－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４３５Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｃ４４１Ａ、Ｅ４４４Ａ、Ｓ４４５Ａ、又は不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照（ＳＣＲ）のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、試料を以下のために収集した：（Ａ）ライブセルイメージング。スケールバー＝５０μｍ。（Ｂ）ウェスタンブロット。（Ｃ）相対的なタンパク質発現は、総タウ対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ対照に対して正規化した。ヒトＰＥＳＴデグロン変種は、空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較してタンパク質分解レベルの変化をもたらした。Ｖ－ＰＥＳＴ変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４

３５Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｃ４４１Ａ、及びＥ４４４Ａは、対照に比べてＧＦＰ－タウを７５～１００％に低減させた。Ｖ－ＰＥＳＴ及びＶ－ＰＥＳＴ変種Ｓ４４５Ａは、ＧＦＰ－タウを対照の５０～７５％に減少させた。

【図２１Ａ－Ｃ】Ｎ－ｈＰＥＳＴデグロン変種でｈＰＥＳＴ構築物配列を変動させることによるタウの制御分解を示す図である。ＳＴ１４Ａ細胞に、ＧＦＰ－タウ及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｎ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４３５Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｃ４４１Ａ、Ｅ４４４Ａ、Ｓ４４５Ａ、又は不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照（ＳＣＲ）のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、試料を以下のために収集した：（Ａ）ライブセルイメージング。スケールバー＝５０μｍ。（Ｂ）ウェスタンブロット。（Ｃ）相対的なタンパク質発現は、総タウ対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ対照に対して正規化した。ヒトＰＥＳＴデグロン変種は、空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較してタンパク質分解レベルの変化をもたらした。Ｎ－ＰＥＳＴは、ＧＦＰ－タウを対照に比べて５０～７５％低減させ、Ｎ－ＰＥＳＴ変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｅ４４４Ａ、及びＫ４４８Ａ／Ｒ４４９Ａ／Ｈ４５０Ａは、対照に比べてＧＦＰ－タウを２５～５０％減少させた。Ｎ－ＰＥＳＴ変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｓ４３５Ａ、Ｓ４４０Ａ、及びＳ４４５Ａは、対照に比べてＧＦＰ－タウを０～２５％減少させた。Ｂ８－ＰＥＳＴ、Ｎ－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ、並びにＮ－ＰＥＳＴ変種Ｄ４３３Ａ及びＣ４４１Ａは、ＥＶ　ＣＯＮと比較してＧＦＰ－タウのレベルを増加させた。

【図２２Ａ－Ｃ】Ｆ－ｈＰＥＳＴデグロン変種でｈＰＥＳＴ構築物配列を変動させることによるタウの制御分解を示す図である。ＳＴ１４Ａ細胞に、ＧＦＰ－タウ及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｆ－ｈＰＥＳＴ、Ｆ－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ２４６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４３５Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｃ４４１Ａ、Ｅ４４４Ａ、Ｓ４４５Ａ、Ｋ４４８Ａ／Ｒ４４９Ａ／Ｈ４５０Ａ、又は不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照（ＳＣＲ）のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、試料を以下のために収集した：（Ａ）ライブセルメージング。スケールバー＝５０μｍ。（Ｂ）ウェスタンブロット。（Ｃ）相対的なタンパク質発現は、総タウ対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ対照に対して正規化した。ヒトＰＥＳＴデグロン変種は、空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較してタンパク質分解レベルの変化をもたらした。Ｆ－ＰＥＳＴ及びＦ－ＰＥＳＴ変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｅ４４４Ａ、Ｓ４４５Ａ、Ｋ４４８Ａ／Ｒ４４９Ａ／Ｈ４５０Ａは、対照に比べてＧＦＰ－タウを５０～７５％低減させた。Ｆ－ＰＥＳＴ変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａは、対照に比べてＧＦＰ－タウを２５～５０％低減させた。Ｆ－ＰＥＳＴ－ＳＣＲは、ＥＶ　ＣＯＮと比較して類似のレベルのＧＦＰ－タウを発現した。

【図２３Ａ－Ｅ】同質遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較して、ＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ変異を有する人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）由来皮質ニューロンにおける細胞死の上昇を示す図である。（Ａ）２０日目の前脳明示。前脳同一性マーカーＰＡＸ６（背側前脳前駆細胞）、ＳＯＸ２（神経外胚葉マーカー）、及び一般的なニューロンマーカーＴＵＪＩ（ニューロン特異的クラスＩＩＩ　β－チューブリン）に関して陽性と染色された神経前駆細胞。（Ｂ）前脳明示。ＦＯＸＧ１（前脳マーカー）、ＴＵＪＩは、ＳＯＸ１０（神経堤）に関して陰性であった。スケールバー＝５０μｍ。（Ｃ）エチジウムホモ二量体（ＥｔｈＤ）による細胞生存率の染色。生細胞、Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２陽性細胞（淡灰色の丸）。死細胞ＥｔｈＤ（明るい斑点、幾つかを矢印で示している）。スケールバー＝１００μｍ（Ｄ）Ｖ３３７Ｍ変異体ニューロン培養物は、同質遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較して、細胞死を有意に上昇させた（**Ｐ＝０．００２５；***Ｐ＝０．０００７）。皮質培養物（ｉｎ　ｖｉｔｒｏで１１０日目）をロテノン（０．７５μＭ）又はＤＭＳＯビヒクル対照のいずれかで処置した。処置の２４時間後、細胞死を、エチジウムホモ二量体染色によって検出した。細胞死は、ＣｅｌｌＰｒｏｆｉｌｅｒ（商標）で定量化した。スケールバー

＝１００μｍ。データは、平均値±ＳＥＭを表す（１群当たりｎ＝３）。一元配置分散分析、続いてテューキーの多重比較事後検定を実施した。Ｖ３３７Ｖ（ＷＴ）と比較して、*はｐ＜０．０５、**はｐ＜０．０１を示す。（Ｅ）乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）レベルは、同質遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較して、Ｖ３３７Ｍ培養物から単離された馴化培地中で有意に上昇している（*Ｐ＝０．０２４０）。

【図２４】同質遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較した、ＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ変異を有する人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）由来皮質ニューロンにおけるプロテアソーム障害を示す図である。変異体（Ｖ３３７Ｍ）及び同質遺伝子対照（Ｖ３３７Ｖ）の皮質培養物を、培養の９０日後にユビキチン^{G76V}ＧＦＰ（Ｕｂ^{G76V}ＧＦＰ）レポーターで形質導入し、ライブセルにおいてプロテアソーム機能をモニタリングした。本発明者等が同質遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較してＭＡＰＴ　Ｖ３７７Ｍ変異体培養物中で細胞死を観察した時点の培養の１１０日目に、細胞のライブイメージングを行った。スケールバー＝１００μｍ。健常なＶ３３７Ｖ対照培養物では、Ｕｂ^{G76V}ＧＦＰ（上部中央パネル及びマージパネルにおいて矢印の欠如で表される）レポーターは迅速に分解されるが、ＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ変異体皮質ニューロンでは、ＵＢ^{G76V}ＧＦＰレポーター（矢印）の蓄積が見られ、これはユビキチンプロテアソーム系が損なわれていることが示唆している。

【図２５】二機能性抗タウ－ＰＥＳＴイントラボディが、同質遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較してＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ変異を有する人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）由来皮質ニューロンにおいてプロテアソーム障害を緩和することができることを示す図である。変異体（Ｖ３３７Ｍ）及び同質遺伝子対照（Ｖ３３７Ｖ）の皮質培養物を、ユビキチン^{G76V}ＧＦＰ（Ｕｂ^{G76V}ＧＦＰ）レポーター及び空のベクター対照（ＥＶ）、Ｖ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ－ｈＰＥＳＴ、又はＦ－ｈＰＥＳＴのいずれかで培養の９０日後に形質導入し、二機能性抗タウ－ｈＰＥＳＴイントラボディによるユビキチン非依存性タンパク質分解を介したタウの標的分解が変異体Ｖ３３７Ｍタウによって引き起こされるプロテアソーム障害に対抗することができるかどうかを決定した。処置の２０日後、細胞のライブイメージングを行った。スケールバー＝１００μｍ。Ｖ３３７Ｍ変異体培養物中では、Ｕｂ^{G76V}ＧＦＰ（矢印）レポーターの蓄積が見られ、プロテアソーム障害を示している。健常なＶ３３７Ｖ対照及び抗タウ－ｈＰＥＳＴイントラボディで処置したＶ３３７Ｍ変異体培養物では、Ｕｂ^{G76V}ＧＦＰ（２番目及び４番目のパネルの矢頭）レポーターは、迅速に分解される。

【図２６】抗タウ－ｈＰＥＳＴイントラボディ、Ｖ－ｈＰＥＳＴ及びＮ－ｈＰＥＳＴが、ＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ変異を有するヒトｉＰＳＣ由来皮質ニューロンにおいて細胞死を低減させたことを示す図である。Ｖ３３７Ｍ皮質培養物を、９０日目に空のベクター対照（ＥＶ－ＣＯＮ）、Ｖ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ－ｈＰＥＳＴ、又は無関係な抗原であるボツリヌス毒素に対するＢ８－ｈＰＥＳＴ対照イントラボディのいずれかで形質導入した。１１０日目に、エチジウムホモ二量体（ＥｔＨＤ）アッセイを使用して、死細胞及び／又は瀕死の細胞を検出した。続いて、細胞死をＣｅｌｌＰｒｏｆｉｌｅｒ（商標）で定量化した。データは、平均値±ＳＥＭを表す。二元配置分散分析、続いてテューキーの多重比較事後検定を実施した。Ｖ３３７Ｍ変異体ニューロン培養物は、同遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較して細胞死を有意に上昇させた（***、ｐ＝０．０００４）。細胞死レベルは、Ｖ－ｈＰＥＳＴによって有意に低減した（*、ｐ＝０．０２７１）。Ｎ－ｈＰＥＳＴは、同遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較して、Ｖ３３７Ｍ培養物中で有意性に匹敵していた（ｐ＝０．０５１７）。

【図２７】プログラム可能な標的抗原タンパク質分解（Ｐ－ＴＡＰ）技術を用いて、神経保護を達成するためのタウ分解の最低有効レベルを、ヒトｉＰＳＣ由来皮質ニューロンにおいて決定することができることを示す図である。変異体ＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ皮質培養物を、空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｎ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ－ｈＰＥＳＴ変種Ｓ４４５Ａ、又は不活性スクランブルｈＰＥＳＴデグロン（ＳＣＲ）を有するＮ－ｈＰＥＳＴのいずれかで６０日目に形質導入した。９０日目に、エチジウムホモ二量体（ＥｔＨＤ）アッセイを使用して、死細胞及び／又は瀕死細胞を検出した。細胞死をＣｅｌｌＰｒｏｆｉｌｅｒ（商標）で定量化した。データは、平均値±ＳＥＭを表す。一元配置分散分析、続

いてテューキーの多重比較事後検定を実施した。細胞死レベルは、タウの強力な低減物質（５０～７５％）であるＮ－ｈＰＥＳＴによって有意に（*、ｐ＜０．０５）低減した。タウの低い低減物質（０～２５％）であるＮ－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｓ４４５Ａは、ＥＶ　ＣＯＮと比較してＶ３３７Ｍ皮質培養物において細胞死を有意に低減させた（*、ｐ＜０．０５）。

【図２８】特定のエクソン及びイントロンにおける変異を伴うＭＡＰＴ（タウ）遺伝子のマップを示す図である。

【図２９Ａ－Ｂ】ヒトＰＥＳＴデグロン融合を介して、分解のためにタウをプロテアソームへと標的化するヒトオルニチンデカルボキシラーゼＰＥＳＴ（ｈＰＥＳＴ）デグロン変種を示す図である。ｈＰＥＳＴデグロン内の或る特定の単一（Ａ）及び複合型（Ｂ）変異（灰色で強調）は、イントラボディ及びその結合抗原の標的分解を変化させると予測される。これは、太字で強調されているもの、即ち、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４３５Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｃ４４１Ａ、Ｅ４４４Ａ、Ｓ４４５Ａ、Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｅ４２８Ａ－Ｅ４３０Ａ－Ｅ４３１Ａ、Ｋ４４８Ａ、Ｒ４４９Ａ、及びＨ４５０Ａによって実証されている。ＰＥＳＴデグロンは上段で網掛けされている（ＯＤＣアミノ酸４２３～４５０）。図２９Ａ～図２９Ｂは、それぞれ、出現順に配列番号３及び配列番号１１０～配列番号１３２を開示している。

【図３０】抗タウｓｃＦｖ配列を示す図である。上は、それぞれ配列番号６５～配列番号８１に相当するＶＨ配列を示し、下は、それぞれ配列番号８２～配列番号９８に相当するＶＬ配列を示す。

【図３１Ａ－Ｂ】ヒトＰＥＳＴデグロンを有する二機能性抗変異体ＨＴＴ（ｍＨＴＴ）イントラボディ、Ｃ４及びＶＬ１２．３が、ＳＴ１４Ａニューロン細胞において、ｍＨＴＴ凝集に対抗し、ｍＨＴＴ断片の除去を促進することを実証する図である。ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰは、空のベクター対照（対照）、Ｃ４－ＰＥＳＴ、ＶＬ１２．３－ＰＥＳＴ、又はタンパク質分解を促進しない不活性スクランブルＰＥＳＴデグロンを有するＣ４及びＶＬ１２．３（Ｃ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ）、若しくは（ＶＬ１２．３－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ）のいずれかと同時トランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、細胞のライブイメージングを行い、ウェスタンブロッティング用に回収した。ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰは、モノクローナル抗体ＥＭ４８（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｃａｔ＃ＭＡＢ５３７４）を使用して検出した。アクチンは、ローディング対照としてプローブした。イントラボディは、抗ＨＡを用いてそれらのＨＡタグについてプローブすることによって検出した。（Ａ）Ｃ４－ＰＥＳＴ及びＶＬ１２．３－ＰＥＳＴは、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰ凝集体（矢印）を含有する対照細胞と比較して、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰを分解する。Ｃ４－ＰＥＳＴ及びＶＬ１２．３－ＰＥＳＴは、対照と比較してｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰの凝集を防止する。（Ｂ）。ウェスタンブロットは、空のベクター対照並びにＣ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ及びＶＬ１２．３－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ対照と比較して、Ｃ４－ＰＥＳＴ及びＶＬ１２．３－ＰＥＳＴトランスフェクト細胞において可溶性ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰモノマー及びより高分子量種の低減を示している。凝集したｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰは、スタッキングゲル中で捕捉される。グラフは、ウェスタンブロットシグナルのデンシトメトリック分析を示している。各バーは、空のベクター対照のパーセンテージとして表したｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰ／アクチンローディング対照を表す。

【図３２Ａ－Ｂ】ｍＨＴＴエクソン１タンパク質断片がユビキチンプロテアソーム系を損なうことを示す図である。ＳＴ１４Ａ細胞に、ユビキチン^{G76V}ＧＦＰ（ユビキチン^{G76V}ＧＦＰ）レポーター及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、ｍＨＴＴｅｘ１－２５Ｑ－ＲＦＰ（４６Ｑ－ＲＦＰ）、ｍＨＴＴｅｘ１－４６Ｑ－ＲＦＰ（４６Ｑ－ＲＦＰ）、又はｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＲＦＰ（７２Ｑ－ＲＦＰ）のいずれかを同時トランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、ｍＨＴＴ凝集（矢印）及びＵＢ^{G76V}ＧＦＰの蓄積（アスタリスク）について細胞のライブイメージングを行う。スケールバー５０μｍ。（Ａ）健常なＥＶ　ＣＯＮ細胞では、ユビキチン^{G76V}ＧＦＰは、プロテアソームに

よって急速に分解される。非病原性ポリグルタミンリピート長２５Ｑ－ＲＦＰをトランスフェクトされた細胞では、報告されたＵＢ^{G76V}ＧＦＰは効率的に分解される。病原性ポリグルタミンリピート長４６Ｑ－ＲＦＰ及び７２－ＲＦＰで処置した細胞では、ユビキチンプロテアソーム系が損なわれていることを示唆するＵＢ^{G76V}ＧＦＰの蓄積が見られる。更に、ユビキチン（アスタリスク）は、ｍＨＴＴ　４６Ｑ及び７２Ｑの凝集体（矢印）、マージ画像（矢頭）に取り込まれている。（Ｂ）マージ画像の拡大セクション。

【図３３】Ｃ４－ＰＥＳＴ分解が、ｍＨＴＴエクソン１タンパク質断片によって引き起こされるプロテアソーム障害に対抗することを示す図である。ＳＴ１４Ａ細胞に、ユビキチン^{G76V}ＧＦＰ（ユビキチン^{G76V}ＧＦＰ）レポーター、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＲＦＰ（７２Ｑ－ＲＦＰ）、及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、ヒトＰＥＳＴデグロンを有するＣ４（Ｃ４－ＰＥＳＴ）、又は不活性スクランブルヒトＰＥＳＴデグロンを有するＣ４（Ｃ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ）のいずれかを同時トランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、ｍＨＴＴ凝集（矢印）及びＵＢ^{G76V}ＧＦＰの蓄積（アスタリスク）について細胞のライブイメージングを行った。スケールバー５０μｍ。ＥＶ　ＣＯＮ細胞では、プロテアソームは、Ｑ７２－ＲＦＰ凝集によって損なわれている。ＵＢ^{G76V}ＧＦＰレポーター（アスタリスク）は、これらの細胞において蓄積しており、７２Ｑ－ＲＦＰ凝集体（矢印）、マージ画像（矢頭）に取り込まれている。Ｃ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲで処置した細胞では、７２Ｑ－ＲＦＰが細胞内に拡散しているため、７２Ｑ－ＲＦＰの凝集が防止される。ユビキチン^{G76V}ＧＦＰレポーターは、プロテアソームによって急速に分解した。Ｃ４－ＰＥＳＴで処置した細胞では、７２Ｑ－ＲＦＰが細胞内に拡散しているため、７２Ｑ－ＲＦＰの凝集は同様に防止される。ＰＥＳＴデグロンは、７２Ｑ－ＲＦＰ（矢印）発現がほとんど検出不可能であるため、ｍＨＴＴの効率的な分解をもたらしている。ＵＢ^{G76V}ＧＦＰレポーターは、プロテアソームによって急速に分解した。

【図３４Ａ－Ｂ】ヒトＰＥＳＴデグロン構築物配列を変動させることによるｍＨＴＴの制御分解を示す図である。ＳＴ１４Ａニューロン細胞に、ヒトｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰ及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｃ４、Ｃ４－ＰＥＳＴ、及びＣ４－ＰＥＳＴ変種（Ｔ４３６Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｅ４４４Ａ）、複合型変異変種（Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ）、又は不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照（ＳＣＲ）のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクトされた７２時間後、細胞をウェスタンブロッティング用に収集した：ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰは、モノクローナル抗体ＥＭ４８（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｃａｔ　＃ＭＡＢ５３７４）を使用して検出した。イントラボディは、抗ＨＡを用いてそれらのＨＡタグについてプローブすることによって検出し、ＧＡＰＤＨは、ローディング対照としてプローブした。（Ａ）ライブセルイメージング。Ｃ４－ＰＥＳＴデグロン変種は、Ｃ４－ＰＥＳＴと比較してｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰの量を様々なレベルに低減させる。Ｃ４及びＣ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲは、ＥＶのＣＯＮ細胞における凝集されたｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰ（アスタリスク）と比較して、拡散性ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰ（矢印）の存在によって実証されるように、ｍＨＴＴの凝集を防止する。（Ｂ）ウェスタンブロット。グラフは、デンシトメトリーによるウェスタンブロットの定量を示す。相対的なタンパク質発現は、可溶性ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰ（ＥＭ４８）対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ－ＣＯＮに対して正規化した。ヒトＰＥＳＴデグロン変種Ｔ４３６Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｅ４４４Ａ、及び複合型変異変種Ｅ４２８／４３０／４３１Ａは、ＥＶ　ＣＯＮと比較してタンパク質分解レベルの変化をもたらす。Ｃ４－ＰＥＳＴ及びＣ４－ＰＥＳＴ変種Ｔ４３６Ａは、対照に比べてｍＨＴＴを７５～１００％に低減させた。Ｃ４－ＰＥＳＴ変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０／Ｅ４３１Ａ及びＥ４４４Ａは、ｍＨＴＴを対照の５０～７５％に低減させた。Ｃ４－ＰＥＳＴ変種Ｓ４４０Ａは、ｍＨＴＴを対照の２５～０％に低減させた一方で、Ｃ４、Ｃ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ、及びＣ４－ＰＥＳＴ変種Ｐ４３８Ａは全て、対照に比べてｍＨＴＴを増加させた。

【図３５Ａ－Ｂ】ヒトＰＥＳＴデグロン融合を介して、分解のためにｍＨＴＴをプロテアソームへと標的化するヒトオルニチンデカルボキシラーゼＰＥＳＴ（ｈＰＥＳＴ）デグロ

ン変種を示す図である。ｈＰＥＳＴデグロン内の或る特定の単一（Ａ）及び複合型（Ｂ）変異（灰色で強調）は、イントラボディ及びその結合抗原の標的分解を変化させると予測される。これは、太字で強調されているもの、即ち、Ｔ４３６Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｅ４４４Ａ、及びＥ４２８Ａ－Ｅ４３０Ａ－Ｅ４３１Ａに関して実証される。ＰＥＳＴデグロンは、上段で網掛けされている（ＯＤＣアミノ酸４２３～４５０）。図３５Ａ～図３５Ｂは、それぞれ、出現順に配列番号３及び配列番号１１０～配列番号１３２を開示している。

【図３６】それぞれ配列番号１０６、配列番号１０７、及び配列番号１０８に相当する、抗α－ハンチンチンｓｃＦｖ　Ｃ４及びＶＬ１２．３配列：Ｃ４可変重ＶＨ配列（上）、Ｃ４可変軽ＶＬ配列（中央）、及びＶＬ１２．３（下）を示す図である。ＣＤＲ＝相補性決定領域。

【図３７Ａ－Ｃ】二機能性抗タウイントラボディが、ヒトｉＰＳＣ由来オルガノイドにおいて内因性タウタンパク質レベルを有意に（ｐ＜０．０５）低減させることを示す図である。（Ａ）誘導性レンチウイルス構築物設計。（Ｂ）ｉｎ　ｖｉｔｒｏで１日及び１８０（ＤＩＶ）後のオルガノイドサイズ。（Ｃ）４５ＤＩＶでの二機能性抗タウ－ＰＥＳＴ（Ｖ－ＰＥＳＴ、Ｎ－ＰＥＳＴ、又はＦ－ＰＥＳＴ）イントラボディ又はエンプティウイルス対照で形質導入されたＭＡＰＴ遺伝子での個々のオルガノイドＷＴからの細胞抽出物の定量的ウェスタンブロット分析（１群当たりｎ＝３）。続いて、オルガノイドを２１日の持続期間、２μｇ／ｍＬのドキシサイクリンで一日おきに処置し、導入遺伝子発現を誘導した。Ｖ－ＰＥＳＴ、Ｎ－ＰＥＳＴ、及びＦ－ＰＥＳＴは、未処置の対照（ＣＯＮ）及び空のベクター（ＥＶ）対照と比較して内因性タウタンパク質レベルを有意に（ｐ＜０．０５）低減させた。

【図３８Ａ－Ｃ】細胞内抗体送達を増強するように設計された細胞透過性二機能性イントラボディの概略図を示す図である。（Ａ）細胞透過性二機能性イントラボディの設計。１）免疫グロブリン重鎖シグナルペプチド配列（ＳＳ）をＮ末端に付加して、複合体を分泌経路に誘導する。図３８Ａは、ペネトラチン（ＰＥＮ）と称されるショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｐｈｉｌｉａ）アンテナペディアホメオドメインに由来する細胞透過性ペプチドをイントラボディのＮ末端に付加して、細胞膜を横切るトランスロケーションを容易にすることを示す。３）ｓｃＦｖ又は単一ドメインＶＨ、ＶＬ、若しくはＶＨＨのいずれかからなる組換え抗体ドメイン。４）イントラボディ発現及び細胞分布を同定するためのＨＡエピトープタグ。５）ユビキチン非依存性タンパク質分解を促進するためのＰＥＳＴデグロン。図３８Ｂは、細胞透過性二機能性イントラボディが、ベクターベースの送達によって分泌中の細胞に送達され、続いてレシピエント細胞に移動し、そこで二機能性イントラボディ媒介標的分解が、プロテアソームを通じて起こることを示す。ＳＳは、分泌プロセス中に細胞によって自然に除去される。図３８Ｃは、細胞透過性二機能性イントラボディが、細胞又は培養培地から精製され、続いてレシピエント細胞に送達され得ることを示す。

【図３９Ａ－Ｄ】細胞透過性二機能性抗α－シヌクレインＶＨＨ－ｈＰＥＳＴイントラボディが、α－シヌクレインを低下させることを実証する図である。図３９Ａは、細胞透過性イントラボディドナーＳＴ１４Ａ細胞が、ＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ（＋）、ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ（－）、又は空のベクター（対照（ＥＶ）のいずれかをトランスフェクトされたことを示す。（＋）処置細胞では、細胞透過性イントラボディは馴化培地に分泌される一方で、（－）処置群では、細胞イントラボディは、細胞内部に留まる。０日目に、イントラボディアクセプターＳＴ１４Ａ細胞に、α－Ｓｙｎ～ｅＧＦＰをトランスフェクトした。トランスフェクションの４時間後、細胞を、各々のイントラボディドナー群からの馴化培地で処置した。次に、Ｓｙｎ～ｅＧＦＰ細胞を馴化培地で更に３日間処置した。３日目に、細胞のライブイメージングを行い、ウェスタンブロッティング用に加工処理した。図３９Ｂは、ライブセルイメージングの代表的な画像を示す（スケールバー５０μｍ）。図３９Ｃは、α－シヌクレイン～ＧＦＰの代表的なウェスタンブロットを示す。図３９Ｄは、ＥＶ対照に対するα－シヌクレイン～ＧＦＰ平均光学密度値を表すデンシトメトリーバーを用いたグラフを示す。

【図４０Ａ－Ｃ】細胞透過性二機能性抗α－シヌクレインＶＨＨ－ｈＰＥＳＴイントラボディが、内因性α－シヌクレインを低下させることを示す図である。図４０Ａは実験設計を表す。健常な対照由来の２ヶ月齢の人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）由来皮質ニューロンである細胞透過性イントラボディドナー細胞を、ＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ、ＳＳ－ＰＥＮ－ＤＢ１－ＰＥＳＴ、又は抗原対照（ボツリヌス神経毒軽鎖Ａ）であるＳＳ－ＰＥＮ－Ｂ８－ＰＥＳＴのいずれかを保有するレンチウイルスで形質導入した。形質導入の７２時間後、レシピエント３Ｘ　ＳＮＣＡトリプリケーション皮質培養物を馴化培地で更に７日間処置した後、ウェスタンブロッティング用に加工処理した。図４０Ｂは、α－シヌクレイン（Ｓｙｎ）、ＨＡタグ付きイントラボディ、及びＧＡＰＤＨローディング対照の代表的なウェスタンブロットを示す。総タンパク質１０μｇをゲル電気泳動によって分離し、ニトロセルロース膜に転写した。内因性シヌクレインは、ＭＪＦＲ１抗α－シヌクレイン抗体を使用して検出した（１：１０００；Ａｂｃａｍ　＃ａｂ１３８５０１）。ＨＡ－ＨＲＰは、ＨＡタグ付きイントラボディを検出するのに使用した（１：１０００；Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ　＃２６１８３－ＨＲＰ）。ＧＡＰＤＨは、ローディング対照として使用した（１：１０，０００；Ａｂｃａｍ、＃ａｂ１８１６０２）。図４０Ｃは、ＳＳ－ＰＥＮ－Ｂ８－ＰＥＳＴ対照に対するα－シヌクレイン平均光学密度値を表すデンシトメトリーバーを用いたグラフを示す。

【図４１Ａ－Ｃ】様々な細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）を有する細胞透過性二機能性抗α－シヌクレインＶＨＨ－ｈＰＥＳＴイントラボディが、内因性α－シヌクレインを低下させることを示す図である。図４１Ａは実験設計を表す。健常な対照由来の２ヶ月齢の人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）由来皮質ニューロンである細胞透過性イントラボディドナー細胞を、ＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ、ＳＳ－ＴＡＴ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ、又はＣＰＰドメインを欠如するＳＳ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ対照のいずれかを保有するレンチウイルスで形質導入した。形質導入の７２時間後、レシピエント３Ｘ　ＳＮＣＡトリプリケーション皮質培養物を馴化培地で更に７日間処置した後、ウェスタンブロッティング用に加工処理した。図４１Ｂは、α－シヌクレイン（Ｓｙｎ）、ＨＡタグ付きイントラボディ、及びＧＡＰＤＨローディング対照の代表的なウェスタンブロットを示す。総タンパク質１０μｇをゲル電気泳動によって分離し、ニトロセルロース膜に転写した。内因性シヌクレインは、ＭＪＦＲ１抗α－シヌクレイン抗体を使用して検出した（１：１０００；Ａｂｃａｍ　＃ａｂ１３８５０１）。ＨＡ－ＨＲＰは、ＨＡタグ付きイントラボディを検出するのに使用した（１：１０００；Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ　＃２６１８３－ＨＲＰ）。ＧＡＰＤＨは、ローディング対照として使用した（１：１０，０００；Ａｂｃａｍ、＃ａｂ１８１６０２）。イントラボディ（ＨＡ）は、ＳＳ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰ対照３Ｘ　ＳＮＣＡレシピエント処置試料に存在しないことに留意されたい。図４１Ｃは、ＳＳ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ対照に対するα－シヌクレイン平均光学密度値を表すデンシトメトリーバーを用いたグラフを示す。

【図４２Ａ－Ｄ】細胞透過性二機能性抗変異体ＨＴＴ　ｓｃＦｖ　Ｃ４－ｈＰＥＳＴイントラボディが、毒性ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰ断片の凝集を低減させることを示す図である。図４２Ａは実験設計を表す。細胞透過性イントラボディドナーＳＴ１４Ａ細胞に、ＳＳ－ＰＥＮ－Ｃ４－ＰＥＳＴ、又はＣ４－ＰＥＳＴ対照のいずれかをトランスフェクトした。ドナー処置細胞では、細胞透過性イントラボディは、馴化培地に分泌される一方で、Ｃ４－ＰＥＳＴ対照群では、イントラボディは、細胞内部に留まる。１日目に、イントラボディアクセプターＳＴ１４Ａ細胞に、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰをトランスフェクトした。トランスフェクションの４時間後、細胞を、各々のイントラボディドナー群からの馴化培地で処置した。次に、レシピエント細胞を馴化培地で更に３日間処置した。各培地交換の４時間後、レシピエント細胞のライブイメージングを行い、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰ凝集を評価した。図４２Ｂは、５２時間目のライブセルイメージングを示す（スケールバー２０μｍ）。図４２Ｃは、７６時間目のライブセルイメージングを示す（スケールバー２０μｍ）。矢印は、拡散性ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰの存在を示す。図４２Ｄは、５２時間及び７６時間目のｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅ

ＧＦＰ凝集の定量化を示す。データは、平均値±ＳＥＭを表す（１群当たりｎ＝３）。一元配置分散分析、続いてテューキーの多重比較事後検定を実施した；*はｐ＜０．０５を示し、**はｐ＜０．０５を示す。

【図４３Ａ】非ウイルス性でタンパク質ベースの細胞透過性二機能性抗タウイントラボディ（ＰＥＮ－Ｎ－ｈＰＥＳＴ）が、分化ニューロンにおいて内因性ヒトタウを有意に（ｐ＜０．０１）低減させることを示す図である。図４３Ａは、細胞透過性二機能性抗タウイントラボディ（ＰＥＮ－Ｎ－ＨＡ－ｈＰＥＳＴ）及び対照イントラボディ（Ｎ－ＨＡ－ｈＰＥＳＴ）の実験設計を表す。

【図４３Ｂ】非ウイルス性でタンパク質ベースの細胞透過性二機能性抗タウイントラボディ（ＰＥＮ－Ｎ－ｈＰＥＳＴ）が、分化ニューロンにおいて内因性ヒトタウを有意に（ｐ＜０．０１）低減させることを示す図である。図４３Ｂは、精製された細胞透過性二機能性抗タウイントラボディタンパク質送達の図解を示す。分化ＳＨＳＹ５Ｙニューロンを、５μＭ　ＰＥＮ－Ｎ－ＨＡ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ－ＨＡ－ｈＰＥＳＴ（非細胞透過性対照）、又はビヒクル対照（ＰＢＳ）で処置した。処置の４８時間後、細胞を固定し、イントラボディ発現（ＨＡ、左パネル）及び総タウ（ｈタウ、中央パネル）について染色した。

【図４３Ｃ】非ウイルス性でタンパク質ベースの細胞透過性二機能性抗タウイントラボディ（ＰＥＮ－Ｎ－ｈＰＥＳＴ）が、分化ニューロンにおいて内因性ヒトタウを有意に（ｐ＜０．０１）低減させることを示す図である。図４３Ｃは、代表的な染色を示す（スケールバー２０μｍ）。

【図４３Ｄ】非ウイルス性でタンパク質ベースの細胞透過性二機能性抗タウイントラボディ（ＰＥＮ－Ｎ－ｈＰＥＳＴ）が、分化ニューロンにおいて内因性ヒトタウを有意に（ｐ＜０．０１）低減させることを示す図である。図４３Ｄは、細胞透過性抗タウイントラボディ（ＰＥＮ－Ｎ－ｈＰＥＳＴ）が、対照と比較してタウタンパク質を有意に低減させたことを示す；デンシトメトリーバーはタウＭＦＩを表す。*ｐ＜０．０５、**ｐ＜０．０１。

【発明を実施するための形態】

【００４０】

概説

本開示は、細胞透過性ペプチドが、抗原（例えば、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチン）のエピトープに結合するイントラボディ、及びプログラム可能なプロテアソームターゲティングＰＥＳＴモチーフを含む二機能性ポリペプチドの細胞内送達を増強することができるという発見に基づいている。二機能性ポリペプチドは、シヌクレイノパチー及びタウパチー、ハンチントン病、並びに脊髄損傷（ＳＣＩ）及び外傷性脳損傷（ＴＢＩ）などのタンパク質凝集疾患の処置及び防止に有用である。本開示において使用するための二機能性ポリペプチドは、２０２０年１１月１１日に出願された米国仮出願第６３／１１２，３８１号、２０２０年１１月１１日に出願された米国仮出願第６３／１１２，３８３号、及び２０２０年１１月１１日に出願された米国仮出願第６３／１１２，３８５号に記載されており、それらの内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００４１】

α－シヌクレインタンパク質

α－シヌクレインは神経系の機能に重要な分子である。α－シヌクレインは、多くの神経変性疾患、並びに外傷性損傷において毒性レベルまで蓄積し、したがって、このタンパク質の細胞内レベルを低減させることは有益な治療アプローチである。α－シヌクレインは必須タンパク質であるため、それを全て除去することは細胞にとって有害である。したがって、治療目標が、細胞内α－シヌクレインの量を、細胞にとって毒性でないが、タンパク質を完全に排除しないレベルに低減させるα－シヌクレインの分解レベルを達成することである方法が本明細書で提供される。より正確に言えば、α－シヌクレインのレベルは望ましいレベルに低減される。

【００４２】

シヌクレイノパチーでは、α－シヌクレインは、病原性のミスフォールディング、異常

な蓄積、及び経細胞間伝播の細胞内カスケードを受ける。このプロセスは、脊椎動物モデルで観察されるように、シヌクレイン凝集及び神経毒性を誘発し、このプロセスを新規治療標的として示唆している。しかしながら、これらの事象はいずれも、主要な細胞内α－シヌクレインミスフォールディング事象の非存在下では進行しない。したがって、この病理学的カスケードを防止するためにα－シヌクレインを標的化することが重要である。これは、細胞の正常なタンパク質除去プロセスを使用してシヌクレインの蓄積を排除する可能性を有する二機能性イントラボディを開発することによって対処された。分解のためにシヌクレインをプロテアソームへと標的化する抗α－シヌクレイン体イントラボディを同定した。潜在的な免疫原性応答を回避するために、プロテアソームターゲティングシグナルは、マウスＰＥＳＴデグロンの、オルニチンデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）由来のヒトＰＥＳＴ（ｈＰＥＳＴ）デグロンによる置換によってヒトでの使用に関して最適化された。本明細書でＶＨ１４－ｈＰＥＳＴと称される１種の特定のイントラボディは、ヒト人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）由来ニューロンにおける内因性α－シヌクレインの効率的な分解をもたらした。更に、新規抗シヌクレイン二機能性イントラボディＮ７７Ｄ及びＤＢ１は、ヒト及びヤツメウナギの両方のシヌクレインを効率的に分解することができる。

【００４３】

タウタンパク質

タウは、神経系の機能に重要な分子である。タウは、多くの神経変性疾患、並びに外傷性損傷において毒性レベルまで蓄積し、したがって、タンパク質の細胞内レベルを低減させることは有益な治療アプローチである。タウは神経系で重要な機能を有するため、それを全て除去することは有害である。したがって、治療目標が、細胞内のタウの量を、細胞にとって毒性でないが、タンパク質を完全に排除しないレベルに低減させるタウの分解レベルを達成することである方法が本明細書で提供される。より正確に言えば、タウのレベルは、望ましいレベルに低減される。

本明細書に記載されるように、タウを標的化するイントラボディは、タンパク質に特異性を提供し、ＰＥＳＴデグロンは、標的をプロテアソームに提供する。タンパク質配列の特異的な変更によるＰＥＳＴデグロンの改変は、分解のレベルを調節する能力を提供する。

【００４４】

タウは、中枢神経系及び末梢神経系において発現される微小管関連リン酸化タンパク質である。タウは、微小管の安定化、神経突起の伸長、ニューロン移動、シグナル伝達、及びオルガネラ輸送などの多くの生物学的プロセスにおいて役割を果たす。正常条件下では、タウ発現は、ニューロンの軸索内で豊富である。ニューロン内のタウのミスフォールディング及び凝集は、様々なタウオパチーにおける病理学的特徴を規定している。タウオパチーの発生率は、緊急且つ未達成の医療ニーズを表している。

【００４５】

タウオパチーでは、タウタンパク質は、微小管に結合するその能力を損失する場合があり、その結果として、タウは、ニューロンの細胞体－樹状突起コンパートメントに誤って局在化される。このプロセス中に、タウは過剰リン酸化され、神経原線維タングル及びスレッド（ＮＦＴ）を含むストレートフィラメント及びペアードヘリカルフィラメント（ＰＨＦ）の不溶性凝集体へとミスフォールディングする。タウ過剰リン酸化は、ＮＦＴ形成に先立って起こると推定される。更に、異常なタウは、適切にフォールディングされたアイソフォームを、ミスフォールディングされた複合体へと動員することができ、異常な形態は、或る細胞から分泌されて他の細胞に取り込まれる可能性があり、それが、ミスフォールディングされたタウ複合体のカスケードを誘発し、中枢神経系を通じて病気が広がる可能性がある。

ミスフォールディング及び／又は凝集に利用可能なタウの細胞内レベルの低減のための免疫療法は、タウオパチーの処置に対する潜在的な治療アプローチを表す。しかしながら、タウに結合する完全長抗体は、タウタンパク質凝集体が存在する脳細胞への透過が限られている。

【００４６】
ハンチンチンタンパク質
ハンチンチンは、神経系の機能に重要な分子である。ハンチンチンは、多くの神経変性疾患、とりわけハンチントン病において毒性レベルまで蓄積し、したがって、タンパク質の細胞内レベルを低減させることは有益な治療アプローチである。ハンチンチンは神経系で重要な機能を有するため、それを全て除去することは有害である。したがって、本明細書は、治療目標が、細胞内のハンチンチンの量を、細胞にとって毒性でないが、タンパク質を完全に排除しないレベルに低減させるハンチンチンの分解レベルを達成する方法を提供する。より正確に言えば、ハンチンチンのレベルは、望ましいレベルに低減される。
【００４７】
ハンチンチンは、多くの身体の組織に存在するタンパク質であり、ハンチントン病の原因遺伝子／タンパク質（ＨＴＴ）である。ハンチントン病を引き起こす遺伝性変異は、ＣＡＧトリヌクレオチドリピートの伸長として知られている。この変異により、ＨＴＴ遺伝子におけるＣＡＧセグメントのサイズが増加する。ハンチントン病を患う人々は、３６回～１２０回を超えるＣＡＧリピートを有する。３６回～３９回のＣＡＧリピート（配列番号１３５）を有する人々は、ハンチントン病の兆候及び症状を発症する場合と発症しない場合がある一方で、４０回又はそれよりも多いリピートを有する人々は、ほぼ常にその障害を発症する。
ハンチンチンタンパク質の正確な機能は不明であるが、ハンチンチンタンパク質は、脳における神経細胞（ニューロン）において重要な役割を果たしていると考えられており、出生前の正常な発達に不可欠である。ハンチンチンは、多くの身体の組織で見出され、脳において最も高いレベルの活性で見出されている。細胞内では、このタンパク質は、化学的シグナル伝達、物質の輸送、タンパク質及び他の構造への付着（結合）、並びに細胞の自己破壊（アポトーシス）からの保護に関与し得る。幾つかの研究により、ハンチンチンが損傷したＤＮＡの修復において役割を果たすことを示唆されている。
【００４８】
ＨＴＴ遺伝子の１種の領域は、ＣＡＧトリヌクレオチドリピートとして知られる特定のＤＮＡセグメントを含有する。このセグメントは、連続して複数回出現する一連の３種のＤＮＡ構成要素（シトシン、アデニン、及びグアニン）で構成されている。通常、ＣＡＧセグメントは、遺伝子内で１０回～３５回繰り返されている（配列番号１３６）。
ＣＡＧセグメントの伸長は、ハンチンチンタンパク質の異常に長いバージョンの産生につながる。伸長されたタンパク質は、より小さな毒性のある断片へと切断され、それらがともに結合してニューロンに蓄積し、これらの細胞の正常な機能を崩壊させる。また、ハンチンチンタンパク質のＤＮＡ修復機能の損失は、特に老化中に分子の損傷が増加するため、ニューロンにおけるＤＮＡ損傷の蓄積をもたらし得ることも示唆されている。動きを調和させ、思考及び感情を制御するのに役立つ脳の領域（線条体及び大脳皮質）は特に影響を受ける。脳のこれらの領域におけるニューロンの機能不全及び最終的な死は、ハンチントン病の兆候及び症状の基礎を成している。
【００４９】
変化したＨＴＴ遺伝子がある世代から次の世代へと受け継がれると、ＣＡＧトリヌクレオチドリピートのサイズは、多くの場合増加する。通常、より多数のリピートが、兆候及び症状の早期発症と関連付けられている。この現象は、表現促進（ａｎｔｉｃｉｐａｔｉｏｎ）と呼ばれる。成人発症型のハンチントン病（中年期に出現するもの）を患う人々は通常、ＨＴＴ遺伝子において４０回～５０回のＣＡＧリピート（配列番号１３７）を有する一方で、あまり一般的ではない若年型の障害（小児期又は青年期に出現するもの）を患う人々は、６０回を超えるＣＡＧリピートを有する傾向にある。
ＨＴＴ遺伝子において２７回～３５回のＣＡＧリピート（配列番号１３８）を有する個体はハンチントン病を発症しないが、その個体は、障害を発症する子供を持つリスクがある。遺伝子が親から子へと受け継がれると、ＣＡＧトリヌクレオチドリピートのサイズはハンチントン病と関連付けられる範囲（３６回のリピート又はその超過）まで長くなる可

能性がある。
【００５０】
α－シヌクレイン、タウ、及びハンチンチンを標的化するイントラボディ
一部の実施形態では、本開示の組換えポリペプチドは、幾つかのドメインを有するイントラボディである。一部の実施形態では、本明細書に記載されるようなα－シヌクレインの分解の増加を達成するのに有用なイントラボディは、本明細書に記載されるような構造を有し得る（概略図については図１Ａ及び図１Ｂを参照）。α－シヌクレインを標的化するイントラボディは、タンパク質に特異性を提供し、ＰＥＳＴデグロンは、標的をプロテアソームに提供する。タンパク質配列の特異的な変更によるＰＥＳＴデグロンの改変は、分解のレベルを調節する能力を提供する。一部の実施形態では、イントラボディは、Ｎ末端に付加されて、複合体を分泌経路に誘導する免疫グロブリン重鎖シグナルペプチド配列（ＳＳ）及びイントラボディのＮ末端に付加されて、細胞膜を横切るトランスロケーションを容易にするペネトラチン（ＰＥＮ）と称されるショウジョウバエアンテナペディアホメオドメインに由来する細胞透過性ペプチドを有する細胞透過性イントラボディである。一部の実施形態では、イントラボディは、免疫グロブリン重鎖シグナルペプチド配列としての第１のドメイン、細胞透過性ペプチド（例えば、ＰＥＮ）としての第２のドメイン、本開示の抗原（例えば、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチン）のエピトープに結合する抗体又はその機能性断片の抗原結合ドメインを有する第３のドメイン、及びプログラム可能なプロテアソームターゲティングＰＥＳＴモチーフを有する第４のドメインを有し得る。
【００５１】
一部の実施形態では、本開示の組換えポリペプチドは、１位にある翻訳開始コドン（ＡＴＧ）を表すメチオニン（Ｍ）アミノ酸を含有する。メチオニンは、タンパク質が発現されるのに必要とされている。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端まで下記の通りに構造化される：（開始コドン）リーダー配列；細胞透過性ペプチド；α－シヌクレインに結合する抗原結合ドメイン；プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト又はマウスＰＥＳＴドメイン。他の実施形態では、組換えポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端まで下記の通りに構造化される：（開始コドン）細胞透過性ペプチド；α－シヌクレインに結合する抗原結合ドメイン；プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト又はマウスＰＥＳＴドメイン。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端まで構造化される：（開始コドン）リーダー配列；プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト又はマウスＰＥＳＴドメインを；α－シヌクレインに結合する抗原結合ドメイン；及び細胞透過性ペプチド。他の実施形態では、組換えポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端まで構造化される：（開始コドン）；プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒト又はマウスＰＥＳＴドメイン；α－シヌクレインに結合する抗原結合ドメイン；及び細胞透過性ペプチド。
【００５２】
一部の実施形態では、α－シヌクレインの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号５～配列番号１８、配列番号１４９～配列番号１５２、配列番号１５４～配列番号１５８、配列番号１６１、配列番号１６３、及び配列番号１６４のいずれか１つに記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一である配列を含む。一部の実施形態では、α－シヌクレインの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号５～配列番号１８、配列番号１４９～配列番号１５２、配列番号１５４～配列番号１５８、配列番号１６１、配列番号１６３、及び配列番号１６４のいずれか１つに記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一である配列からなる。
【００５３】

一部の実施形態では、α－タウの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号２３～配列番号９８のいずれか１つに記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一である配列を含む。一部の実施形態では、α－タウの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号２３～配列番号９８、配列番号１４９～配列番号１５２、及び配列番号１６２のいずれか１つに記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一である配列からなる。

【００５４】

一部の実施形態では、ハンチンチンの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号１００～配列番号１０８、配列番号１６５、配列番号１４９～配列番号１５２、及び配列番号１６０のいずれか１つに記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一である配列を含む。一部の実施形態では、ハンチンチンの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号１００～配列番号１０８、配列番号１６５、配列番号１４９～配列番号１５２、及び配列番号１６０のいずれか１つに記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一である配列からなる。

【００５５】

一部の実施形態では、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号１４９に記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一である免疫グロブリン重鎖シグナルペプチド配列（ＳＳ）を含む。一部の実施形態では、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号１５０に記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一であるショウジョウバエアンテナペディアホメオドメイン（ペネトラチン又はＰＥＮ）に由来する細胞透過性ペプチドを含む。一部の実施形態では、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号１５１に記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一であるＨＩＶ－１転写トランス活性化因子（ＴＡ）タンパク質（ＨＩＶ－１　ＴＡＴ）に由来する細胞透過性ペプチドを含む。一部の実施形態では、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号１５２に記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一であるファージディスプレイライブラリーに由来する合成細胞透過ペプチドを含む。

【００５６】

一部の実施形態では、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号１４に記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一である配列を有する可撓性リンカーを含む。一部の実施形態では、α－シヌクレインの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号１３９～配列番号１４８のいずれか１つ

に記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一である配列を有する可撓性リンカーを含む。

【００５７】

一部の実施形態では、エピトープタグは、イントラボディの発現を同定するのに使用され得る。エピトープタグの例は、当該技術分野において既知であり、ＦＬＡＧ、６×Ｈｉｓ（配列番号１３４）、ＨＡタグ、ｃ－ｍｙｃ、ＧＳＴ、プロテインＡ、ＣＤ、Ｓｔｒｅｐ－タグ、マルトース結合ペプチド（ＭＢＰ）、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）、Ｓ－タグ、Ａｖｉｔａｇ、ＣＢＰ、ＴＡＰ、ＳＦ－ＴＡＰを含み得るが、これらに限定されない。１つの実施形態では、本明細書に記載されるようなイントラボディは、実験条件下でのイントラボディの発現の同定用のＨＡタグを有してもよい。一部の実施形態では、ＨＡタグは、イントラボディの機能に影響を及ぼさない。一部の実施形態では、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンの分解を増加させるのに有用なイントラボディは、配列番号１５に記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一である配列を有するＨＡタグを含む。

【００５８】

一部の実施形態では、上述のようなイントラボディは、α－シヌクレイン特異的ＶＨドメイン（ＶＨ－シヌクレイン）、又はα－シヌクレイン特異的ＶＨＨ抗体（即ち、ナノボディ）、或いは配列番号１に記載されるか、又は配列番号４～配列番号１３、配列番号１６～配列番号１８、配列番号１５４～配列番号１５８、配列番号１６１、配列番号１６３、配列番号１６４、若しくは配列番号１６６のいずれか１つに記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるであるアミノ酸配列を有するそれらの抗原結合断片を含む単鎖抗体を含む。

【００５９】

抗体又はその機能性断片の抗原結合ドメインは、高い特異性及び／又は高い親和性で未改変又は改変α－シヌクレイン、及び／又は凝集α－シヌクレインに結合することができる。ヒトα－シヌクレインタンパク質のアミノ酸配列（Ｇｅｎｂａｎｋ（登録商標）アクセッション番号ＣＲ５４１６５３）は、配列番号４として提供される。一部の実施形態では、カルボキシ又はアミノ末端のいずれかにある特定数のアミノ酸は、本明細書に記載されるようなイントラボディによって標的化され得る。例えば、イントラボディは、例えばアミノ酸の特定の領域又は群を含むがこれらに限定されないα－シヌクレインタンパク質の領域又は一部を標的化し得る。一部の実施形態では、α－シヌクレインのアミノ酸５３～９５は、本明細書に記載されるようなイントラボディによって標的化され、タンパク質のリン酸化の低減をもたらす。

【００６０】

一部の実施形態では、上述のようなイントラボディは、タウ特異的ＶＨドメイン（ＶＨ－タウ）、或いは配列番号６５～配列番号８１に記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を有するその抗原結合断片を含むｓｃＦｖを含む。一部の実施形態では、ＶＨドメイン（ＶＨ－タウ）は、図１６（上）に記載されるＣＤＲを含んでもよい。

一部の実施形態では、上述のようなイントラボディは、タウ特異的ＶＬドメイン（ＶＬ－タウ）、或いは配列番号８２～配列番号９８に記載されるようなアミノ酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を有するその抗原結合断片を含むｓｃＦｖを含む。一部の実施形態では、ＶＬドメイン（ＶＬ－タウ）は、図１６（下）に記載されるＣＤＲを含んでもよい。

イントラボディ若しくは抗体又はその機能性断片の抗原結合ドメインは、高い特異性及

び／又は高い親和性でリン酸化タウ、過剰リン酸化タウ、及び／又は凝集タウに結合することができる。ヒトタウタンパク質のアミノ酸配列（Ｇｅｎｂａｎｋ（登録商標）アクセッション番号ＮＰ＿００５９０１）は、配列番号２２として提供される。

【００６１】

抗体又はその機能性断片の抗原結合ドメインは、高い特異性及び／又は高い親和性でハンチンチン及び／又は凝集ハンチンチンに結合することができる。ヒトハンチンチンタンパク質のアミノ酸配列（Ｇｅｎｂａｎｋ（登録商標）アクセッション番号ＮＭ＿００２１１１）は、配列番号９９として提供される。一部の実施形態では、上述のようなイントラボディは、ハンチンチン特異的ＶＨドメイン（Ｃ４　ＶＨ）、或いは配列番号１０６に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を有するその抗原結合断片を含むｓｃＦｖを含む。一部の実施形態では、上述のようなイントラボディは、ハンチンチン特異的ＶＬドメイン（Ｃ４　ＶＬ）、或いは配列番号１０７に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を有するその抗原結合断片を含むｓｃＦｖを含む。一部の実施形態では、上述のようなイントラボディは、配列番号１０８に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、上述のようなイントラボディは、配列番号１６５に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含むｓｃＦｖを含む。

【００６２】

一部の実施形態では、カルボキシ又はアミノ末端のいずれかにある特定数のアミノ酸は、本明細書に記載されるようなイントラボディによって標的化され得る。例えば、本明細書で開示されるイントラボディは、例えば目的の特定のエクソン又はイントロンを含むがこれらに限定されないハンチンチンタンパク質の領域又は一部を標的化し得る。一部の実施形態では、ハンチンチン遺伝子のアミノ末端にある１７個の（１７）アミノ酸は、本明細書に記載されるイントラボディによって標的化され得る。一部の実施形態では、ハンチントン病の原因となるＣＡＧトリヌクレオチドリピート、並びにプロリンリッチ領域（ＰＲＲ）を含むエクソン１は、本明細書に記載されるイントラボディによって標的化される。

【００６３】

イントラボディ若しくは抗体又はその機能性断片の抗原結合ドメインとして、単鎖（ｓｃＦｖ）、単鎖（Ｆｖ）２（ｓｃ（Ｆｖ）２）、単一ドメイン抗体（ｄＡｂ；ＶＨ；ＶＬ）、及びダイアボディが挙げられ得るが、これらに限定されない。ｓｃＦＶ抗体及び単一ドメイン抗体は、完全長抗体の結合特異性を保持するが、それらは単一遺伝子として発現させることができる。ｓｃＦＶ及び単一ドメインＶＨ又はＶＬ抗体は、細胞外及び細胞内（イントラボディ）の両方に適用され得る。一部の実施形態では、イントラボディは、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、可変重領域（ＶＨ）、超可変領域、可変軽領域（ＶＬ）、ＶＨＨ抗体（即ち、ナノボディ）、単鎖抗原結合ドメインなどであり得る。一部の実施形態では、イントラボディ（例えば、α－シヌクレイン、又はタウイントラボディ）は、本明細書でナノボディと称される単鎖抗原結合ドメインを含む。

【００６４】

ｓｃＦｖは、抗体のＶＨ及びＶＬをリンカーで連結させることによって得られた単鎖ポリペプチド抗体である。連結されるべきＶＨ及びＶＬの順序は特に限定されず、それらはあらゆる順序で配置され得る。配置の例として、［ＶＨ］－リンカー－［ＶＬ］；又は［ＶＬ］－リンカー－［ＶＨ］が挙げられる。ｓｃＦｖにおける重鎖可変領域（ＶＨ）及び

軽鎖可変領域（ＶＬ）は、本開示のあらゆる抗体（例えば、抗α－シヌクレイン抗体、抗タウ抗体、又は抗ハンチンチン抗体）、又は本明細書に記載されるそれらの抗原結合断片に由来し得る。

【００６５】

ｓｃ（Ｆｖ）$_2$は、２つのＶＨ及び２つのＶＬを含有し、それらはリンカーによって連結され、単鎖を形成する。ｓｃ（Ｆｖ）$_2$は、例えば、ｓｃＦｖをリンカーで結合することによって調製され得る。ｓｃ（Ｆｖ）$_2$は、単鎖ポリペプチドのＮ末端から始まってＶＨ、ＶＬ、ＶＨ、及びＶＬの順序で配置された２つのＶＨ及び２つのＶＬを含み得る（［ＶＨ］－リンカー－［ＶＬ］－リンカー－［ＶＨ］－リンカー－［ＶＬ］）が、２つのＶＨ及び２つのＶＬの順序は上記の配置に限定されず、それらはあらゆる順序で配置され得る。配置の例として、下記が挙げられる。

［ＶＬ］－リンカー－［ＶＨ］－リンカー－［ＶＨ］－リンカー－［ＶＬ］
［ＶＨ］－リンカー－［ＶＬ］－リンカー－［ＶＬ］－リンカー－［ＶＨ］
［ＶＨ］－リンカー－［ＶＨ］－リンカー－［ＶＬ］－リンカー－［ＶＬ］
［ＶＬ］－リンカー－［ＶＬ］－リンカー－［ＶＨ］－リンカー－［ＶＨ］
［ＶＬ］－リンカー－［ＶＨ］－リンカー－［ＶＬ］－リンカー－［ＶＨ］

【００６６】

一部の実施形態では、４つの抗体可変領域が連結される場合、３つのリンカーが必要となり、使用されるリンカーは、同一でもあってもよく、又は異なってもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載されるようなリンカーは、ＶＨをＶＬに結合するグリシン－セリンリンカーであってもよい。一部の実施形態では、リンカー長は、細胞の細胞内コンパートメントにおいてＶＨとＶＬとの間の適切なフォールディングを可能にするように最適化され得る。本開示に従って使用され得る例示的なリンカーは、配列番号１４として本明細書に記載されている。ｓｃＦｖ又はｓｃ（ＦＶ）$_2$のＶＨ領域及びＶＬ領域を連結するリンカーは特に限定されない。一部の実施形態では、リンカーはペプチドリンカーである。約３～約２５個の残基（例えば、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、又は２５個）を含むあらゆる任意的な単鎖ペプチドがリンカーとして使用され得る。

【００６７】

他の実施形態では、リンカーは、１０～２０、１０～３０、１０～４０、１０～５０、１０～６０、１０～７０、１０～８０、１０～９０、１０～１００、１０～１４４、又は１０～１５０アミノ酸長である。或る特定の場合では、リンカーは、グリシン及び／又はセリン残基のみを含有する。かかるペプチドリンカーの例として、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ；Ｇｌｙ Ｓｅｒ；Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｓｅｒ；Ｓｅｒ Ｇｌｙ Ｇｌｙ；Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｓｅｒ（配列番号１３９）；Ｓｅｒ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ（配列番号１４０）；Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｓｅｒ（配列番号１４１）；Ｓｅｒ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ（配列番号１４２）；Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｓｅｒ（配列番号１４３）；Ｓｅｒ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ（配列番号１４４）；Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｓｅｒ（配列番号１４５）；Ｓｅｒ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ（配列番号１４６）；（Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｓｅｒ）ｎ（配列番号１４７）ｎ（式中、ｎは１つ又は複数の整数である）及び（Ｓｅｒ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ Ｇｌｙ）ｎ（配列番号１４８）$_n$（式中、ｎは１つ又は複数の整数である）が挙げられる。一部の場合では、リンカーは、配列番号１３９のアミノ酸配列の複数のコピー（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個）を有するが、但し、リンカーの各コピー中のセリン残基は、別のアミノ酸で置き換えられる。

【００６８】

抗体又はその機能性断片の抗原結合ドメインにおけるＶＨ又はＶＬのアミノ酸配列は、置換、欠失、付加、及び／又は挿入などの改変を含んでもよい。例えば、ＶＨ又はＶＬのアミノ酸配列内で行われた置換、欠失、付加、及び／又は挿入などの改変は、ＣＤＲの１

種又は複数に存在し得る。或る特定の実施形態では、改変は、抗体又はその機能性断片の抗α－シヌクレイン抗原結合ドメインのＶＨ及び／又はＶＬドメインの１種又は複数のＣＤＲ及び／又はフレームワーク領域における１種、２種、又は３種のアミノ酸置換を含む。かかる置換は、抗体又はその機能性断片の抗原（例えば、α－シヌクレイン、タウ、ハンチンチン）結合ドメインの結合、機能活性を改善し、及び／又は免疫原性を低減させるように行われる。或る特定の実施形態では、置換は、保存的アミノ酸置換である。一部の実施形態では、抗体又はその機能性断片の抗原（例えば、α－シヌクレイン、タウ、ハンチンチン）結合ドメインのＣＤＲの１種、２種、又は３種のアミノ酸は、ＶＨ及びＶＬが会合されると抗原（例えば、α－シヌクレイン、タウ、ハンチンチン）結合及び／又は機能活性が存在する限りは、欠失又は付加されてもよい。一部の実施形態では、ＣＤＲは、図１５Ａ～図１５Ｂにおいて、及び配列番号１６～配列番号１８内に提供されたＣＤＲであってもよい。

【００６９】

プロテアソームターゲティングＰＥＳＴモチーフは、プロリル（Ｐ）、グルタミル（Ｅ）、アスパルチル（Ｄ）、セリル（Ｓ）及びスレオニル（Ｔ）残基が豊富な領域（ＰＥＳＴ領域）を含有するペプチド配列であり、プロテアソーム分解の加速のために標的化される。この配列は、短い細胞内の半減期を有するタンパク質と関連付けられる。マウスオルニチンデカルボキシラーゼ（ＭＯＤＣ）は、哺乳動物の中で最も短い半減期のタンパク質の１種である。プロテアソームによるＭＯＤＣの構成的分解は、そのカルボキシ末端におけるＰＥＳＴ配列（アミノ酸４２２～４６１）によって制御される。

【００７０】

例示的なマウス由来ＰＥＳＴモチーフ配列は、例えば、配列番号２（SHGFPPEVEEQDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINV）に記載されるような、オルニチンデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）アミノ酸４２２～４６１に相当するアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

例示的なヒト由来ＰＥＳＴモチーフ配列（ｈＰＥＳＴ）は、例えば、配列番号３（NPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV）に記載されるような、ヒトオルニチンデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）アミノ酸４２２～４６１に相当するアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

マウスＰＥＳＴ（ｍＰＥＳＴ；配列番号２）及びヒトＰＥＳＴ（ｈＰＥＳＴ；配列番号３）配列の比較が表１において提供され、マウスｍＰＥＳＴとヒトｈＰＥＳＴとの間で８２．５％配列相同性を実証している。

【００７１】

【表１】

表1.マウスPEST及びヒトPEST配列の比較

mPEST (ODC)	SHGFPPEVEEQDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINV (配列番号2)
hPEST (ODC)	NPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV (配列番号3)

一部の実施形態では、ＰＥＳＴデグロンは、その全体が本明細書に組み込まれる国際特許公開ＷＯ２０１８０４９２１９号（ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５０７６４号）に開示された配列のいずれか１つである。

【００７２】

２つのポリペプチド（又はポリヌクレオチド）配列間の「％同一」という用語は、２つの配列の最適なアラインメントのために導入されなくてはならない付加又は欠失（即ち、ギャップ）を考慮に入れて、比較ウィンドウでの配列によって共有される同一の適合位置の数を指す。適合位置は、同一のヌクレオチド又はアミノ酸が標的配列及び参照配列の両方において提示されるあらゆる位置である。標的配列において提示されたギャップは、ギャップがヌクレオチド又はアミノ酸ではないため計数されない。同様に、参照配列において提示されたギャップは、標的配列のヌクレオチド又はアミノ酸が計数され、参照配列由来のヌクレオチド又はアミノ酸が計数されないため計数されない。配列同一性のパーセンテージは、同一のアミノ酸残基又は核酸塩基が両方の配列において現れる位置の数を決定して、適合位置の数を得て、適合位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数で除算し、その結果に１００を乗じて配列同一性のパーセンテージを得ることによって算出される。配列の比較、及び２つの配列間のパーセント配列同一性の決定は、オンライン使用、及びダウンロードの両方に容易に利用可能なソフトウェアを使用して遂行され得る。適切なソフトウェアプログラムが、様々なソースから、タンパク質及びヌクレオチドの両方の配列のアラインメント用に入手可能である。パーセント配列同一性を決定するのに適したプログラムの１種は、米国政府のＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ＢＬＡＳＴウェブサイト（blast.ncbi.nlm.nih.gov）から入手可能なプログラムのＢＬＡＳＴスートの一部であるｂｌ２ｓｅｑである。Ｂｌ２ｓｅｑは、ＢＬＡＳＴＮ又はＢＬＡＳＴＰアルゴリズムのいずれかを使用して、２つの配列間の比較を実施する。ＢＬＡＳＴＮは、核酸配列の比較に使用されるのに対して、ＢＬＡＳＴＰは、アミノ酸配列の比較に使用される。別記されない限り、デフォルトとして語長（Ｗ）３、期待値（Ｅ）１０、及びＢＬＯＳＵＭ６２スコアリング行列を使用するＢＬＡＳＴＰプログラム（アミノ酸配列用）（Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989を参照）がパーセント同一性を決定するのに使用されるべきである。

【００７３】

他の適切なプログラムは、例えば、バイオインフォマティクスプログラムのＥＭＢＯＳＳスート一部であり、ebi.ac.uk/Tools/psaにてＥｕｒｏｐｅａｎ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＥＢＩ）からも入手可能なＮｅｅｄｌｅ、Ｓｔｒｅｔｃｈｅｒ、Ｗａｔｅｒ、又はＭａｔｃｈｅｒである。或る特定の実施形態では、第１のアミノ酸配列対第２の配列アミノ酸のパーセンテージ同一性「Ｘ」は、ｌ００×（Ｙ／Ｚ）として算出され、式中、Ｙは、第１及び第２の配列のアラインメントにおいて同一の適合としてスコアリングされたアミノ酸残基の数であり（目視検査又は特定の配列アラインメントプログラムによってアラインされた場合の）、Ｚは、第２の配列における残基の総数である。第１の配列の長さが第２の配列よりも長い場合、第１の配列対第２の配列のパーセント同一性は、第２の配列対第１の配列のパーセント同一性よりも高い。パーセント配列同一性の算出のための配列アラインメントの作成が、専ら一次配列データによって駆動されるバイナリ配列間比較に限定されないことは、当業者に理解されよう。配列アラインメントは、複数の配列アラインメントから導出され得る。複数の配列アラインメントを作成するのに適したプログラムの１種は、clustal.orgから入手可能なＣｌｕｓｔａｌ Ｏｍｅｇａである。別の適切なプログラムは、drive5.com/muscleから入手可能なＭＵＳＣＬＥである。或いは、ＣｌｕｓｔａｌＷ２及びＭＵＳＣＬＥは、例えばＥＢＩから入手可能である。

【００７４】

「連結」又は「融合」という用語は、ペプチド結合（例えば、遺伝的融合）、化学的コンジュゲーション、又は当該技術分野において既知の他の手段を介した結合を指す。例えば、分子又は部分が連結され得る方法の１種は、分子又は部分を、ペプチド結合を介して連結するペプチドリンカーを用いる。

【００７５】

「と会合された」という用語は、第１のアミノ酸鎖と第２のアミノ酸鎖との間に形成さ

れる共有結合又は非共有結合を指す。１つの実施形態では、「と会合された」という用語は、共有結合、非ペプチド結合又は非共有結合を意味する。別の実施形態では、「と会合された」という用語は、化学的に架橋されていない共有結合、非ペプチド結合又は非共有結合を指す。別の実施形態では、「と会合された」という用語は、ペプチド結合を除く共有結合を意味する。一部の実施形態では、この会合は、コロン、即ち（：）によって示される。

【００７６】

細胞透過性ペプチド

一部の実施形態では、本明細書に記載される組換えポリペプチドは、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）を含む。細胞透過性ペプチドは、例えば、Wolfe JM, et al. ACS Cent Sci. 2018 Apr 25;4(4):512-520に記載されている。本開示の細胞透過性ペプチドは、表１に記載される細胞透過性ペプチドを含むがこれらに限定されないあらゆるペプチドであり得る。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５０～配列番号１５２及び配列番号２００～配列番号２３５のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００７７】

一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５０～配列番号１５２のいずれか１つに記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５０～配列番号１５２のいずれか１つに記載されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５０に記載されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５１に記載されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５２に記載されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５０に記載されるアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５１に記載されるアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１５２に記載されるアミノ酸配列からなる。

【００７８】

一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、本来的にカチオン性である。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、本来的に両親媒性である。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、プロリンリッチである。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、本来的に疎水性である。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドが、本開示のポリペプチドの第１の構成要素である場合、表１における配列のいずれかにも、Ｎ末端にあるメチオニン（Ｍ）残基が先行する。

【００７９】

【表２】

表1: 細胞透過性ペプチド配列

CPP名称	CPP種類	アミノ酸配列	配列番号
アルギニン-12	カチオン性	RRRRRRRRRRR	170
TAT	カチオン性	KKRRQRRR	151
アルギニン-10	カチオン性	RRRRRRRRRR	171
DPV6	カチオン性	GRPRESGKKRKRKRLKP	172
HRSV	カチオン性	RRIPNRRPRR	173
HTLV-II Rex	カチオン性	TRRQRTRRARRNR	174
DPV15	カチオン性	LRRERQSRLRRERQSR	175
アルギニン-9	カチオン性	RRRRRRRRR	176
PDX-1	カチオン性	RHIKIWFQN RRM KWKK	177
アルギニン-8	カチオン性	RRRRRRRR	178
BMV Gag	カチオン性	KMTRAQRRAAARRNRWTAR	179
knotted-1	カチオン性	KQINNWFINQRKRHWK	180
酵母GCN4	カチオン性	KRARNTEAARRSRARKLQRMKQ	181
engrailed-2	カチオン性	SQIKIWFQN KRAKIKK	182
DPV15b	カチオン性	GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR	183
酵母PrP6	カチオン性	TRRNKRNRIQEQLNRK	184
DPV7	カチオン性	GKRKKKGKLGKKRDP	185
HoxA-13	カチオン性	RQVTIWFQNRRVKEKK	186
(PPR)5	カチオン性	PPRPPRPPRPPRPPR	187
DPV10	カチオン性	SRRARRSPRHLGSG	188
P22 N	カチオン性	NAKTRRHERRRKLAIER	189
DPV1047	カチオン性	VKRGLKLRHVRPRVTRMDV	190
cp21N(12-29)	カチオン性	TAKTRYKARRAELIAERR	191
AN(1-22)	カチオン性	MDAQTRRRERRAEKQAQWKAAN	192
MPG	両親媒性	GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	193
S413-PVrev	両親媒性	ALWKTLLKKVLKAPKKKRKV	194
L-2	両親媒性	HARIKPTFRRLKWKYKGKFW	195
メリチン	両親媒性	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	196
SynB1	両親媒性	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	197
W/R	両親媒性	RRWWRRWRR	198
AIP6	両親媒性	RLRWR	199
(PPR)4	両親媒性	PPRPPRPPRPPR	200
SVM4	両親媒性	LYKKGPAKKGRPPLRGWFH	201
SVM3	両親媒性	KGTYKKKLMRIPLKGT	202
(PPR)3	両親媒性	PPRPPRPPR	203
ブフォリン2	両親媒性	TRSSRAGLQWPVGRVHRLLRK	204

SAP	両親媒性	VRLPPPVRLPPPVRLPPP	205
Pep-1	両親媒性	KETWWETWWTEWSQ PKKRKV	206
EB-1	両親媒性	LIRLWSHLIHIWFQNRRLKWKKK	207
MAP	両親媒性	KLALKALKALKAALKLA	208
pVEC	両親媒性	LLIILRRRIRKQAHAHSK	209
K-FGF + NLS	両親媒性	AAVLLPVLLAAPVQRKRQKLP	210
VT5	両親媒性	DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD	211
トランスポータン10	両親媒性	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	212
SAP(E)	両親媒性	VELPPPVELPPPVELPPP	213
CADY	両親媒性	GLWRALWRLLRSLWRLLWRA	214
PreS2-TLM	両親媒性	PLSSIFSRIGDP	215
Bac7	プロリンリッチ	RRIRPRPPRLPRPRPRPLPFPRPG	216
ピルロコリシン	プロリンリッチ	VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN	217
IVV-14	疎水性	KLWMRWYSPTTRRYG	218
435b	疎水性	GPFHFYQFLFPPV	152
Pept1	疎水性	PLILLRLLRGQF	219
439a	疎水性	GSPWGLQHHPPRT	220
Bip	疎水性	IPALK	221
Bip	疎水性	VPALR	222
HN-1	疎水性	TSPLNIHNGQKL	223
Bip	疎水性	VPTLK	224
Bip	疎水性	VSALK	225
ペネトラチン	カチオン性	RQIKIWFQNRRMKWKK	150
CAYH		CAYHRLRRC	226
SVM2		RASKRDGSWVKKLHRILE	227
SVM1		FKIYDKKVRTRVVKH	228
YTA2		YTAIAWVKAFIRKLRK	229
YTA4		IAWVKAFIRKLRKGPLG	230
PPC1		KQPRIKRKK	231
PPC2		LKKRRKLPKKKPIRNEQ	232
PPC3		KKYRGRKRHPR	233
PPC4		APKRKKLKKRF	234
PPC5		GRKAARAPGRRKQ	235

【００８０】

リーダー配列

一部の実施形態では、本明細書に記載される組換えポリペプチドは、リーダー配列を含む。リーダー配列は、シグナルペプチド配列又はドメインであってもよい。シグナルペプチドは、例えば、Haryadi R, et al. PLoS One. 2015 Feb 23;10(2):e0116878に記載されている。本開示のシグナルペプチドは、表２に記載されるシグナルペプチドを含むがこれらに限定されないペプチドであり得る。一部の実施形態では、シグナルペプチドは、Ｉｇ重鎖シグナルペプチドである。一部の実施形態では、シグナルペプチドは、カッパ軽鎖シグナルペプチドである。

【００８１】

一部の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号１４９及び配列番号２４０～配列番号４７３に記載される配列のいずれか１つに対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号１４９及び配列番号２４０～配列番号４７３に記載される配列のいずれか１つに対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列からなる。

【００８２】

一部の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号１４９に記載される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号１４９に記載されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号１４９に記載されるアミノ酸配列からなる。

【００８３】

【表３】

表YY: シグナルペプチド配列

重鎖	アミノ酸配列	GenBank アクセッション番号	アイソタイプ	配列番号
H2	MEFGLRWVFLVAILKDVQC	CAA75030	IgG1	240
H2	MEFGLSWVFLVAILKGVQC	BAC04996	IgG2	241
H2	MEFGLSWVFLVAILKGVQC	BAC85172	IgG1	242
H2	MELGLSWVFLVAILKGVQC	BAC87456	IgA1	243
H2	MELGLRWVFLVAFLEGVQC	BAB55072	IgA1	244
H2	MELGLRWVFLVTFFWGVQC	BAC85355	IgA1	245
H2	MELGLRWVLLVAILEGVHC	BAC87542	IgD	246
H2	MELGLRWVFLVALLEGVHC	BAC86968	IgG1	247
H2	MELGLRWVFLIATLAGARC	BAC05016	IgG1	248
H2	MELGLRWVFLVAILEGVQC	AAS01769	IgM	249
H2	MELGLRWVFLVAILEGVQC	CAE45931	IgG2	250
H2	MELGLYWVFLVAILEGVQC	BAC87558	IgA1	251
H2	MDLGLYWVFLVAILEGVEC	BAC86537	IgG3	252
H2	MELGLCWVFLVAILEGVPC	CAE45921	IgA2	253
H2	MELGLCWVFLVAILEGVQC	BAG62903	IgG3	254
H2	MELGLNWVLLVAILEGVQC	AAH62335	IgG2	255
H2	MELGLSWVFLVAILEGVHC	BAC85740	IgA2	256
H2	MELGLSWVFLVAILEGVQC	CAE45898	IgA2	257
H2	MELGLSWVFLVAILEGVQC	BAC85395	IgG2	258
H2	MELGLSWVFLVAILEGVQC	AAH64496	IgG1	259
H2	MELGLSWVFLVAILEGVQC	AAH41037	IgG1	260
H2	MELGLSWVFLVVILEGVQC	AAH53984	IgG1	261
H3	MESGLTWLFLVAILKGVHC	BAC85363	IgA1	262
H3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS	AAH16369	IgA1	263
H3	MKHLWFFLLLVAPPRWVLS	BAC85432	IgA1	264
H3	MKHLWFFLLLVATPRWVLS	AAH73767	IgM	265
H3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC85359	IgA1	266
H3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS	AAH73765	IgA2	267
H3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC86044	IgA2	268
H3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS	AAH02963	IgM	269
H3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC87432	IgG2	270
H3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC85436	IgG1	271
H3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS	AAH73773	IgG1	272
H3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS	AAH73766	IgG1	273
H3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS	AAH75842	IgG1	274
H3	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC85387	IgG1	275
H3	MRHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC87510	IgD	276
H3	MKHLWFFFLLVAAPRSVLS	BAC85198	IgA1	277
H3	MSVSFLIFLPVLGLPWGVLS	AAS01770	IgM	278
H3	MGHPWFFLLLVTAPRWVLS	BAC05021	IgG1	279

H4	MDWTWRILFLVAAATGAHS	AAH87841	IgA1	280
H4	MDWTWRILFLVAAATDAYS	AAH09851	IgM	281
H4	MDWTWRILFLVAAATSAHS	BAG62882	IgG3	282
H4	MDWTWRILFLVAAATSAHS	AAH37361	IgG1	283
H4	MDWTWRILFLVAAATEAHS	BAC85175	IgG1	284
H4	MDWTWRILFLVTAATGAHS	CAE45841	IgG3	285
H4	MDWTWRILFLVAAATGAHS	CAE45917	IgA1	286
H4	MDWTWRILFLVAAATGAHS	BAC85440	IgE	287
H4	MDWTWRILFLVAAATGAHS	AAI11020	IgG4	288
H4	MDWTWRILFLVAAATGAHS	AAH80557	IgG1	289
H4	MDWTWRILFLVAAATGAHS	AAH75840	IgG1	290
H4	MDWTWRILFLVAAATGAHS	BAC85235	IgG1	291
H4	MDWTWRLLFLVAAVTSAHS	AAL36987	IgA1	292
H4	MDWTWSILFLVAAATGAHS	BAG62928	IgG1	293
H4	MDWTWSILFLVTAATGAHS	BAG62876	IgG1	294
H4	MDWTWSILFLVAGASGAHS	AAH73789	IgG1	295
H4	MDWTWSILFLVAAATGARP	AAH51328	IgG1	296
H4	MGWTWSILFLVAATTGAPS	CAE45780	IgA1	297
H4	MDWTWSILFLVAAATGAQS	AAH05951	IgA1	298
H4	MDWAWRILFLVAAATGVHS	BAC86585	IgA1	299
H4	MDCTWRILLLVAVATGTHA	AAH89421	IgG3	300
H4	MDCTWRILLLVAAATGTHA	AAH90939	IgG1	301
H4	MDWTWRILFLAAAATGVQS	AAH65733	IgA2	302
H4	MDWTWTILFLVAGATGVKS	BAC86514	IgG1	303
H4	MDWTWSILFLVAAATGVHS	CAE45779	IgA2	304
H5	MDWTWRFLFVVAAVTGVQS	BAB71633	IgA1	305
H5	MDWTWRFLFVVAAVTGVQS	AAH67091	IgG1	306
H5	MDWTWILFLVAAATRVHS	AAB59424	IgE	307
H5	MDWTWRFLLVVAAATGVPS	AAH75846	IgG1	308
H5	MDWTWRFLIVVAAATGVQS	BAC85173	IgG1	309
H5	MDWTWRFLFVVAAATSVQS	AAH25314	IgG1	310
H5	MDWTWRFLFVVAAATGVQS	CAA34971	IgM	311
H5	MDWTWRFLFVVAAATGVQS	BAC86457	IgG3	312
H5	MDWTWRFLFVVAAATGVQS	BAC05013	IgG1	313
H5	MDWTWRFLFVVAAATGVQS	BAC85429	IgG1	314
H5	MDWTWRFLFVVAAATGVQS	AAH62336	IgG1	315
H5	MDWTWRFLFVVAAATGVQS	AAA02914	IgG1	316
H5	MDWTWRFLFVVAAATGVQS	AAH69016	IgG1	317
H5	MDWTWRFLFVVAAATGVQS	BAC05017	IgG1	318
H5	MDWTWRFLFVVAAATGVQS	BAC87418	IgG1	319
H5	MDWTWRFLFVVAAATGVQS	AAO17821	IgG1	320

H5	MDWTWRFLFVVAAATGVQS	AAH16381	IgG1	321
H5	MDWTWRFLFVVAAGTGVQS	AAH26038	IgG1	322
H5	MDWTWRFLFVVAASTGVQS	BAC05020	IgG1	323
H5	MDWTWRVLFVVAASTGVQS	BAC85529	IgG1	324
H5	MDRTWRLLFVVAAATGVQS	BAC85401	IgG1	325
H5	MDWTWRFLFVVAAAAGVQS	BAC85697	IgG1	326
H5	MGWTWRFLFVVAAAAGVQS	BAC05018	IgG1	327
H5	MDWTWTFLFVVAAATGVQS	BAC85199	IgG1	328
H5	MDWTWRVFCLLAVAPGVQS	BAC86094	IgA1	329
H5	MDWTWRVFCLLAVAPGADS	CAE45829	IgA2	330
H5	MDWTWRVFCLLAVAPGANS	BAC05012	IgG1	331
H5	MDWTWRVFCLLAVAPGAHS	AAH19337	IgG1	332
H5	MDWTWRVFCLLAVISGGQS	BAC05014	IgG1	333
H5	MDWTWRFLFVVAVAIGVQS	BAC85483	IgG2	334
H8	MDLMCKKMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC85190	IgA1	335
H8	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC87192	IgA1	336
H8	MGLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	AAH63384	IgD	337
H8	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC85361	IgA1	338
H8	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	AAH19235	IgM	339
H8	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	AAH17356	IgM	340
H8	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	AAH11857	IgM	341
H8	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAG62978	IgG3	342
H8	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWGLS	BAC87548	IgD	343
H8	MDVMCKKMKHLWFFLLLVAAPRWVLA	BAB71560	IgG1	344
H8	MDLKCKKMKRLWLFLLLVAAPRWVLS	BAC85394	IgG1	345
H8	MDLLCKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	AAH25985	IgG4	346
H8	MDLLCKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAG64279	IgG1	347
H8	MDLLCKKMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC85174	IgG1	348
H8	MDLMCKKMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC85371	IgA1	349
H8	MELMCKKMKHLWFFLLLVAAPRWVLS	CAE45900	IgG4	350
H8	MDLMCKKMKHLWFFLLLVAAPGWVLS	BAC86532	IgA2	351
H8	MCKTMKQLWFFLLLVAAPRWVLS	BAC85393	IgG2	352
H8	MAKTNLFLFLIFSLLLSLSSAAQPAMA	AAV67804	IgG1	353
H1	MDTLCSTLLLLTIPSWVLS	AAH92449	IgA1	354
H1	MDTLCSTLLLLTIPSWVLS	AAO17822	IgG3	355
H1	MDTLCSTLLLLTIPSWVLS	BAG62883	IgG1	356
H1	MGSTAILALLLAVLQGVCA	AAH14258	IgG1	357
H1	MGSTAILALLLAVLQGVCA	AAH89417	IgG1	358
H1	MGSTAILALLLAVLQGVCA	AAH78670	IgG1	359
H1	MELSLSWFFLLTIIQGVQC	BAC85641	IgA1	360

H1	MELGLSWIFLLAILKGVQC	BAC87503	IgA1	361
H1	MELGLSWIFLLAILKGVQC	AAH21276	IgD	362
H1	MELGLSWIFLLAILKGVQC	AAH06402	IgG1	363
H1	MDLGLSWIFLLTILKGVQC	BAC85171	IgG1	364
H1	MELGLTWIFLLAILKGVQC	CAE45781	IgG1	365
H1	MELGLSWIFLVAILKGVQC	BAC87538	IgD	366
H1	MDLGLSWLFLVALLKGVQC	BAC05203	IgG1	367
H1	MEFGLSCVFLVAIFKGVHC	AAH73782	IgG1	368
H1	MEFGLSCLFLVAILKGVRC	AAH78671	IgG1	369
H6	MEFGLSWLFLVAILKGVQG	BAC87485	IgG1	149
H6	MEFGLSWIFLVVIIKGVQC	BAC86210	IgA1	370
H6	MEFGLSWIFLVVILKGVQC	BAC85388	IgG1	371
H6	MEFGLSWIFLATILKGVQC	BAC85350	IgG1	372
H6	MEFGLSWIFLAAILKGVQC	BAF82062	IgG1	373
H6	MEFGLSWIFLAAILKGVQG	AAH65820	IgG1	374
H6	MKFGLSWIFLPAILKGVQC	AAH14667	IgG1	375
H6	MEFGLSWLFLVAILKGVQC	AAH15760	IgM	376
H6	MEFGLSWLFLVAILKGVQC	BAG62929	IgG3	377
H6	MEFGLSWLFLVAILKGVQC	BAC04926	IgG1	378
H6	MEFGLSWLFLVAILKGVQC	AAO17823	IgG1	379
H6	MEFGLSWLLLVAILKGVQC	AAH69020	IgG1	380
H6	MEFGLSWLFLVTILKGVQC	BAC85232	IgG1	381
H6	MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQV	AAH73758	IgM	382
H6	MEFGLSWVFLVAIIKGVQC	BAC85444	IgG1	383
H6	MEFGLSWVFLVAVIKGVQC	BAG62938	IgG3	384
H6	MEFGLTWVFLVAVIKGVHC	BAC85373	IgG1	385
H7	MQFGLSWVFLVALLRGVQC	BAC11114	IgA1	386
H7	MDFGLAWVFLVALLRGVQC	BAC87529	IgD	387
H7	MEFGLNWVLLVALLRGVQC	BAC05022	IgG1	388
H7	MEFGLSWVFLVALLRGVQC	BAC87554	IgD	389
H7	MEFGLSWVFLVALLRGVQC	CAE45778	IgA1	390
H7	MEFGLSWVFLVALLRGVEC	BAC87380	IgG1	391
H7	MEFGLSWVFLVALLRGVQC	AAH20240	IgM	392
H7	MEFGLSWVFLVALLRGVQC	CAH18705	IgG2	393
H7	MEFGLSWVFLVALLRGVQC	BAD08204	IgG1	394
H7	MEFGLSWVFLVALLRGVQC	AAW82028	IgG1	395
H7	MEFGLSWVFLVALLRGVQC	BAC04208	IgG1	396
H7	MEFGLSWVFLVALFRGVQC	BAC87457	IgG4	397
H7	MESGLSWVFLVALLRGVQC	BAC86513	IgA1	398
H7	MELGLSWVFLVSLLAGVQC	BAC85366	IgA1	399
H7	MELGLSWIFLVALLRGVQC	CAE45773	IgG1	400

H7	MEFGLSWVLLVVFLQGVQC	AAH33178	IgG3	401
H7	MEFGLSWVFLVGILKGVQC	BAC85349	IgA1	402
H7	MEFGLSWVYLVAILKGVQC	BAC04226	IgG1	403
H7	MEFGLSWVFLVAILKGVQC	AAH32249	IgA1	404
H7	MEFGLSWVFLVAILKGVQC	AAH90938	IgG1	405
H7	MEFGLSWVFLVAILKGVQC	BAC86964	IgG1	406
H7	MEFGLSWVFLVAILKGVQC	AAH73771	IgA1	407
H7	MEFWLSWVFLVAILKGVQC	AAH72419	IgG1	408
H7	MEFGLSWVFLVAILKGVQC	AAT49050	IgG1	409
H7	MEFGLSWVFLVAILKGVQC	AAH92518	IgG1	410
H7	MEFGLSWVFLVAILKGVQC	BAC86225	IgG1	411
軽鎖	アミノ酸配列	GenBank アクセッション番号	アイソ タイプ	配列 番号
L1	MVLQTQVFISLLLWISGSYG	BAC85234	カッパ	412
L1	MRLPAQLLGLLMLWVSGSSG	AAH73779	カッパ	413
L1	MRLPAQLLGLLMLWVSGSSG	AAH93097	カッパ	414
L1	MRLPAQLLGLLMLWVSGSSG	BAC04905	カッパ	415
L1	METPAQLLFLLLLWLPVSDTTG	AAB86466	カッパ	416
L1	METPAQLLFLLLLWLPGTTG	AAH16380	カッパ	417
L1	METPAQLLFLLLLWLPDITG	AAH73793	カッパ	418
L1	MEAPAQLLFLLLLWLPDSTG	AAH73792	カッパ	419
L1	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG	AAH66343	カッパ	420
L1	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG	AAH30813	カッパ	421
L1	MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC	AAH05332	カッパ	422
L1	MDMRVPAQLLGLLLLWLPDTRC	AAH70336	カッパ	423
L1	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC	AAH70334	カッパ	424
L1	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC	AAA58925	カッパ	425
L1	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC	CAA59987	カッパ	426
L1	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC	CAA45494	カッパ	427
L1	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC	AAH92455	カッパ	428
L1	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC	BAC05011	カッパ	429
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01725	カッパ	430
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01726	カッパ	431
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01736	カッパ	432
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	AAZ78137	カッパ	433
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01738	カッパ	434
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01677	カッパ	435
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01671	カッパ	436
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01670	カッパ	437
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01689	カッパ	438
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01755	カッパ	439
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01673	カッパ	440

L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01697	カッパ	441
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01768	カッパ	442
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01746	カッパ	443
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01741	カッパ	444
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01757	カッパ	445
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01721	カッパ	446
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01750	カッパ	447
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01756	カッパ	448
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01675	カッパ	449
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01681	カッパ	450
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01706	カッパ	451
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01767	カッパ	452
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01696	カッパ	453
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01705	カッパ	454
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01674	カッパ	455
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01759	カッパ	456
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01740	カッパ	457
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01733	カッパ	458
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01693	カッパ	459
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01751	カッパ	460
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01700	カッパ	461
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01719	カッパ	462
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01682	カッパ	463
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01720	カッパ	464
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01730	カッパ	465
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01701	カッパ	466
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01710	カッパ	467
L2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	BAC01715	カッパ	468
L2	MKYLLPTAAAGLLLHAAQPAMA	BAC01712	カッパ	469
L2	MKKNIAFLLASMFVSIATNAYA	CAC51420	カッパ	470
L2	MKQSTIALALLPLLFTPVTKA	CAH65831	カッパ	471
L2	MKKTAIAIAVALAGFATVAQAA	CAA65061	カッパ	472
L2	MKKTAIAIAVALAGFATVAQAA	AAQ16319	カッパ	473

【００８４】

本明細書に記載されるように、「同等の組換えポリペプチド」は、細胞透過性ペプチド構成要素を有さない本開示のポリペプチド（イントラボディ）である。同等の組換えペプチドは、検査ポリペプチドと同じ抗原へと標的化される。例えば、検査ポリペプチドがシヌクレインを標的化するＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｋ－ＨＡ－ｈＰＥＳＴである場合、同等のポリペプチドは、Ｎ７７Ｋ－ＨＡ－ｈＰＥＳＴであり、これもまたシヌクレインを標的化するが、ペネトラチン（ＰＥＮ）領域及び／又はＳＳ－ＰＥＮ領域は有さない。

【００８５】

ポリペプチドを産生する方法

本明細書に記載される二機能性ポリペプチド（又は抗体若しくはその機能性断片の抗原結合ドメイン）は、細菌細胞又は真核細胞において産生され得る。ポリペプチドを産生す

るために、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが構築され、発現ベクターに導入され、続いて適切な宿主細胞において発現される。標準的な分子生物学技法を使用して、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞にトランスフェクトし、形質転換体について選択し、宿主細胞を培養し、抗体を回収する。

【００８６】

ポリペプチドが細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））において発現されるべきである場合、発現ベクターは、細菌細胞におけるベクターの増幅を可能にする特性を有するべきである。更に、ＪＭ１０９、ＤＨ５ａ、ＨＢ１０１、又はＸＬｌ－Ｂｌｕｅなどの大腸菌が宿主として使用される場合、ベクターは、大腸菌において効率的な発現を可能にし得るプロモーター、例えば、ｌａｃＺプロモーター、ａｒａＢプロモーター、又はＴ７プロモーターを有さなければならない。かかるベクターの例として、例えば、Ｍ１３シリーズのベクター、ｐＵＣシリーズのベクター、ｐＢＲ３２２、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ、ｐＣＲ－Ｓｃｒｉｐｔ、ｐＧＥＸ－５Ｘ－１（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）、「ＱｌＡｅｘｐｒｅｓｓ系」（ＱＩＡＧＥＮ）、ｐＥＧＦＰ、及びｐＥＴ（この発現ベクターが使用される場合、宿主は、一部の実施形態では、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを発現するＢＬ２１である）が挙げられる。

発現ベクターは、抗体分泌用のシグナル配列を含有してもよい。大腸菌のペリプラズムへの産生のために、ｐｅｌＢシグナル配列が抗体分泌用のシグナル配列として使用され得る。細菌の発現について、塩化カルシウム法又はエレクトロポレーション法を使用して、発現ベクターを細菌細胞に導入してもよい。

【００８７】

１つの実施形態では、ポリペプチドは、哺乳動物細胞において産生される。ポリペプチドを発現するための例示的な哺乳動物宿主細胞として、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞）（ＤＨＦＲ選択可能マーカーとともに使用されるｄｈｆｒ　ＣＨＯ細胞を含む）、ヒト胎児腎２９３細胞（例えば、２９３、２９３Ｅ、２９３Ｔ）、ＣＯＳ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、リンパ球細胞株、例えば、ＮＳ０骨髄腫細胞及びＳＰ２細胞、並びにトランスジェニック動物、例えばトランスジェニック哺乳動物由来の細胞が挙げられる。

ポリペプチドが、ＣＨＯ、ＣＯＳ、２９３、２９３Ｔ、及びＮＩＨ３Ｔ３細胞などの哺乳動物細胞において発現されるべきである場合、発現ベクターは、これらの細胞における発現に必要なプロモーター、例えば、ＳＶ４０プロモーター、ＭＭＬＶ－ＬＴＲプロモーター、ＥＦｌａプロモーター、又はＣＭＶプロモーターを含む。免疫グロブリン又はそのドメインをコードする核酸配列に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）及び選択可能マーカー遺伝子などの更なる配列を保有し得る。選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする。例えば、通常、選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、Ｇ４１８、ハイグロマイシン、又はメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する。選択可能マーカーを有するベクターの例として、ｐＭＡＭ、ｐＤＲ２、ｐＢＫ－ＲＳＶ、ｐＢＫ－ＣＭＶ、ｐＯＰＲＳＶ、及びｐＯＰ１３が挙げられる。

【００８８】

１つの場合では、レンチウイルス系は、組換えポリペプチドを発現する。当該系は、ＣＢｈと呼ばれるＣＢＡプロモーターのバージョンを有し、それは細胞における長期的な導入遺伝子発現を提供する。当該系はまた、別々のＣＭＶプロモーター由来のレポータータンパク質（ｍＣｈｅｒｒｙ）を有する。この系は、形質導入効率のモニタリングを容易にする。

【００８９】

本明細書に記載されるポリペプチドは、宿主細胞の内部又は外部（例えば、培地）から単離され、実質的に純粋且つ均質な抗体として精製され得る。ポリペプチド精製に一般に使用される単離及び精製方法がポリペプチドの単離及び精製に使用されてもよく、いかなる特定の方法にも限定されない。ポリペプチドは、例えば、カラムクロマトグラフィ、濾過、限外濾過、塩析、溶媒沈降、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、ＳＤＳ－ポリアクリルアミ

ドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、及び再結晶を適切に選択し、それらを組み合わせることによって単離及び精製され得る。クロマトグラフィとして、例えば、アフィニティークロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、疎水性クロマトグラフィ、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィ、及び吸着クロマトグラフィが挙げられる。クロマトグラフィは、ＨＰＬＣ及びＦＰＬＣなどの液相クロマトグラフィを使用して実行することができる。アフィニティークロマトグラフィに使用されるカラムとして、プロテインＡカラム及びプロテインＧカラムが挙げられる。プロテインＡカラムを使用したカラムの例として、Ｈｙｐｅｒ Ｄ、ＰＯＲＯＳ、及びＳｅｐｈａｒｏｓｅ ＦＦ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）が挙げられる。また、これらの精製方法を使用して高度に精製されたポリペプチドも開示される。

一部の実施形態では、本開示のポリペプチド（即ち、細胞透過性イントラボディ）は、細菌、昆虫及び哺乳動物の細胞培養系から精製され得る。また、細胞透過性イントラボディは、ポリペプチドが細胞培養系から精製されない場合は、シグナルペプチドも含有する。

【００９０】

抗体又はその抗原結合機能性断片の抗原結合ドメインの特性決定

本明細書に記載されるポリペプチドの抗原結合特性（例えば、α－シヌクレイン結合、タウ結合、又はハンチンチン結合）は、あらゆる標準的な方法、例えば、下記の方法：ＯＣＴＥＴ（登録商標）、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）、ＢＩＡＣＯＲＥ（商標）分析、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ＥＩＡ（酵素イムノアッセイ）、ＲＩＡ（ラジオイムノアッセイ）、及び蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）のいずれか１種又は複数によって測定され得る。

【００９１】

目的のタンパク質（抗シヌクレイン、抗タウ、若しくは抗ハンチンチン抗体結合ドメイン又はそれらの機能性断片）及び標的（例えば、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチン）の結合相互作用は、ＯＣＴＥＴ（登録商標）系を使用して分析することができる。この方法では、ＦｏｒｔｅＢｉｏ社製の機器の幾つかのバリエーション（例えば、ＯＣＴＥＴ（登録商標）ＱＫｅ及びＱＫ）の１種を使用して、タンパク質相互作用、結合特異性、及びエピトープマッピングを決定する。ＯＣＴＥＴ（登録商標）系は、カスタムチップを辿ってセンサーまで戻る偏光の変化を測定することによってリアルタイム結合をモニタリングする簡素な方法を提供する。

目的のタンパク質（抗シヌクレイン、抗タウ、若しくは抗ハンチンチン抗体結合ドメイン又はそれらの機能性断片）及び標的（例えば、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチン）の結合相互作用は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）を使用して分析することができる。ＳＰＲ又は生体分子相互作用分析（ＢＩＡ）は、相互作用体のいずれも標識せずに、生体特異的な相互作用をリアルタイムで検出する。ＢＩＡチップの結合表面での質量の変化（結合事象を示す）は、表面付近の光の屈折率の変化をもたらす（表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）の光学現象）。屈折度の変化は検出可能なシグナルを発生し、それは生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として測定される。ＳＰＲを使用する方法は、当該技術分野において既知であり、記載されている。ＳＰＲからの情報を使用して、平衡解離定数（Ｋｄ）、並びに生体分子の標的への結合に関するK_{on}及びK_{off}を含む動態パラメーターの正確且つ定量的な測定を提供することができる。

【００９２】

また、エピトープは、ＢＩＡＣＯＲＥクロマトグラフィ技法を使用して、種々の抗α－シヌクレイン抗体結合ドメイン又はその機能性断片の、ヒトα－シヌクレイン、タウ、又はシヌクレインへの結合について互いと競合する能力を評価することによって直接マッピングすることができる。

酵素イムノアッセイを用いる場合、抗体を含有する試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清又は精製抗体は、抗原でコーティングされたプレートに添加される。アルカリホスファターゼなどの酵素で標識された二次抗体が添加され、プレートはインキュベートされ、

洗浄後、ｐ－ニトロフェニルホスフェートなどの酵素基質が添加され、吸光度が測定されて抗原結合活性を評価する。

抗体を評価するための更なる一般的なガイダンス、例えばウェスタンブロット及び免疫沈降アッセイは、Antibodies:A Laboratory Manual, ed. by Harlow and Lane, Cold Spring Harbor press(1988)に見出すことができる。

【００９３】

処置方法

治療上有効な量の、本明細書に記載されるような抗α－シヌクレイン二機能性イントラボディをコードする遺伝子による遺伝子療法の、処置又は防止を必要とする患者への投与を含む、パーキンソン病、多系統萎縮症、脊髄損傷（ＳＣＩ）若しくは外傷性脳損傷（ＴＢＩ）などのα－シヌクレインの凝集をもたらす疾患又は外傷によって引き起こされるタンパク質凝集の処置又は防止方法が提供される。

【００９４】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載されるような対象又は患者において、本明細書に記載されるように脊髄損傷若しくは外傷性脳損傷に起因するタンパク質凝集を処置又は防止し得る。本明細書に記載されるような抗α－シヌクレインイントラボディをコードする遺伝子による遺伝子療法を含む組成物の投与は、本明細書に記載されるような臨床設定におけるものであり得るか、又は臨床医若しくは開業医によって適切と考えられる代替設定におけるものであり得る。

【００９５】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるような抗α－シヌクレインイントラボディをコードする遺伝子による遺伝子療法を含むかかる組成物は、患者における脳損傷若しくは脊髄損傷の処置のための他の療法又は処置と組み合わせてもよい。他の薬物処置は、臨床医に適切と考えられる場合に使用されてもよい。

【００９６】

本明細書に記載される二機能性ポリペプチドは、単独で、又は他の療法と組み合わせて、パーキンソン病（ＰＤ）、多系統萎縮症（ＭＳＡ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、１７番染色体上にパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（ＦＴＤＰ－１７）を含む前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、ピック病、大脳皮質基底核変性症（ＣＢＤ）、進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、リティコ・ボディグ病、神経節膠腫及び神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節性硬化症、及びハラーフォルデン・シュパッツ病などであるがこれらに限定されないシヌクレイノパチーの防止を含む処置、並びに外傷性脳損傷（ＴＢＩ）又は脊髄損傷（ＳＣＩ）などの外傷性損傷の処置において使用され得る。かかる方法は、処置を必要とする対象（例えば、シヌクレイノパチーを患っているか、又はそれを有するリスクのある対象）に、治療上有効な量の、α－シヌクレインのエピトープに結合する抗体又はその断片の抗原結合ドメインを含む第１のドメイン、及びプログラム可能なプロテアソームターゲティングＰＥＳＴモチーフを含む第２のドメインを含む二機能性ポリペプチドを投与することを含む。当業者によって理解されるように、本明細書に記載されるような二機能性ポリペプチドは、例えば、二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子による遺伝子療法などの、例えばシヌクレイノパチーの処置のために対象に必要又は有用な形態で投与される。

【００９７】

また、アルツハイマー病（ＡＤ）、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、１７番染色体上にパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（ＦＴＤＰ－１７）、ピック病、大脳皮質基底核変性症（ＣＢＤ）、進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、リティコ・ボディグ病、神経節膠腫及び神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節性硬化症及びハラーフォルデン・シュパッツ病などであるがこれらに限定されないタウの凝集をもたらす外傷の疾患によって引き起こされるタンパク質凝集の処置又は防止方法が提供される。かかる方法は、処置又は防止を必要とする対象（例えば、タウオパチーを患っているか、又はそれを有するリスクのある対象）に、治療上有効な量の、タウ

のエピトープに結合する抗体又はその断片の抗原結合ドメインを含む第１のドメイン、及びプログラム可能なプロテアソームターゲティングＰＥＳＴモチーフを含む第２のドメインを含む二機能性イントラボディポリペプチドを投与することを含む。当業者によって理解されるように、本明細書に記載されるような二機能性ポリペプチドは、二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子による遺伝子療法などの、例えばタウオパチーの処置のために対象に必要又は有用な形態で投与される。

【００９８】

本明細書に記載される二機能性ポリペプチドは、ハンチントン病などのハンチンチンと関連付けられる疾患の防止を含む処置において使用することができる。かかる方法は、処置を必要とする対象（例えば、ハンチントン病を患っているか、又はそれを有するリスクのある対象）に、治療上有効な量の、ハンチンチンのエピトープに結合する抗体又はその断片の抗原結合ドメインを含む第１のドメイン、及びプログラム可能なプロテアソームターゲティングＰＥＳＴモチーフを含む第２のドメインを含む二機能性ポリペプチドを投与することを含む。当業者によって理解されるように、本明細書に記載されるような二機能性ポリペプチドは、二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子による遺伝子療法などの、ハンチントン病の処置のために対象に必要又は有用な形態で投与される。

【００９９】

遺伝子療法及びそれらの使用は当該技術分野において既知であり、一部の実施形態では、ＤＮＡ若しくはＲＮＡ構築物、例えば安定化されたＲＮＡ構築物などの核酸の、又は二機能性ポリペプチドの、細胞の細胞質においてその生物学的機能を可能にする形態での投与を包含し得る。一部の実施形態では、核酸は、本明細書に記載されるような二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子による遺伝子療法ベクターなどのベクターにおいて投与されてもよい。他の実施形態では、二機能性ポリペプチドに有用な遺伝子療法は、例えば細胞特異的受容体又は遺伝子プロモーターの使用を通じて、特定の細胞型への取り込み若しくは送達にとって最適化された製剤又は組成物において投与されてもよい。例えば、一部の実施形態では、遺伝子プロモーターは、一部の疾患の特定処置のために本明細書に記載されるような二機能性ポリペプチドを、オリゴデンドロサイトへと標的化するのに有用であり得る。一部の実施形態では、特定遺伝子プロモーターの使用は、ニューロン、アストロサイト、及び／又はオリゴデンドロサイトなどの或る特定の細胞型に制限された本明細書に記載されるような二機能性ポリペプチドの標的発現を可能にし得る。他の実施形態では、ドーパミン作動性ニューロン又はグルタミン酸作動性ニューロンなどの細胞型の或る特定の亜集団内での発現は、それぞれチロシンヒドロキシラーゼプロモーター又はＶＧＬＵＴ１プロモーターの使用により遂行され得る。一部の実施形態では、興奮性ニューロンなどの細胞型の或る特定の亜集団内での発現は、例えば、ＶＧＬＵＴ１プロモーターの使用により遂行され得る。

【０１００】

また、治療上有効な量の、本明細書に記載されるような抗タウイントラボディをコードする遺伝子による遺伝子療法の、処置又は防止を必要とする患者への投与を含む、脊髄損傷（ＳＣＩ）若しくは外傷性脳損傷（ＴＢＩ）、又はタウオパチーなどの疾患によって引き起こされるタンパク質凝集の処置又は防止方法が提供される。

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載されるような対象又は患者において、本明細書に記載されるように脊髄損傷若しくは外傷性脳損傷、又は本タウオパチーに起因するタンパク質凝集を処置又は防止し得る。本明細書に記載されるような抗タウイントラボディをコードする遺伝子による遺伝子療法を含む組成物の投与は、本明細書に記載されるような臨床設定におけるものであり得るか、又は臨床医若しくは開業医によって適切と考えられる代替設定におけるものであり得る。かかる抗タウイントラボディの投与に関する更なる実施形態は、本明細書の他の場所で記載されている。

一部の実施形態では、本明細書に記載されるような抗タウイントラボディをコードする遺伝子による遺伝子療法を含むかかる組成物は、患者におけるタウオパチー又はＴＢＩ若しくは脊髄損傷（ＳＣＩ）の処置のための他の療法又は処置と組み合わせてもよい。

【０１０１】
「対象」という用語は、動物若しくはヒト、又は動物若しくはヒトに由来する１種又は複数の細胞を指す。好ましくは、対象はヒトある。また、対象は、非ヒト霊長類を含み得る。
一部の態様では、治療上有効な量の、本明細書に記載されるような抗ハンチンチンイントラボディの、処置又は防止を必要とする患者への投与を含む、ハンチントン病又はＴＢＩ若しくはＳＣＩなどの疾患によって引き起こされるタンパク質凝集の処置又は防止方法が本明細書で提供される。
【０１０２】
本明細書で開示される方法は、本明細書に記載されるような対象又は患者において、本明細書に記載されるように脊髄損傷若しくは外傷性脳損傷、又はハンチントン病に起因するタンパク質凝集を処置又は防止し得る。本明細書に記載されるような抗ハンチンチンイントラボディを含む組成物の投与は、本明細書に記載されるような臨床設定におけるものであり得るか、又は臨床医若しくは開業医によって適切と考えられる代替設定におけるものであり得る。かかる抗ハンチンチンイントラボディの投与に関する更なる実施形態は、本明細書の他の場所で記載されている。
一部の実施形態では、本明細書に記載されるような抗ハンチンチンイントラボディを含むかかる組成物は、患者におけるハンチントン病又は関連する神経変性若しくは神経外傷性状態の処置のための他の療法又は処置と組み合わせてもよい。他の薬物処置は、臨床医によって適切であると考えられる場合に使用され得る。
本明細書で別記されない限り、本明細書に記載される方法は、本明細書で例示される手順、又は当該技術分野において既知の日常的に実施される方法に従って実施され得る。下記セクションは、本明細書に記載される方法を実施するための更なるガイダンスを提供する。
【０１０３】
医薬組成物
本明細書に記載されるように、本明細書に記載されるような二機能性ポリペプチドは、例えば、本明細書に記載される障害を処置するための、対象への投与に適した二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤などの医薬組成物として製剤化され得る。通常、医薬組成物は、薬学的に許容される担体を含む。医薬製剤は、当該技術分野において十分に確立されており、既知である。
本明細書に記載される医薬組成物は、種々の形態で存在し得る。これらとしては、例えば、液体溶液（例えば、注射可能溶液及び注入用溶液）、分散液又は懸濁液、錠剤、丸剤、粉末、リポソーム及び坐剤などの液体、半固体及び固体の投薬形態が挙げられる。形態は、意図される投与様式及び治療用途に依存し得る。通常、本明細書に記載される薬剤用の組成物は、注射可能溶液又は注入用溶液の形態で存在する。
【０１０４】
１つの実施形態では、本明細書に記載される二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤は、クエン酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム七水和物、一塩基性リン酸ナトリウム、Ｔｗｅｅｎ－８０、及び安定剤などの賦形剤材料を用いて製剤化される。例えば、当該遺伝子療法は、適切な濃度の緩衝溶液中で提供することでき、２～８℃で保管することができる。一部の他の実施形態では、組成物のｐＨは、約５．５～約７．５（例えば、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、又は７．５）である。
【０１０５】
医薬組成物はまた、製剤化された場合に二機能性ポリペプチドの凝集を低減させる薬剤を含んでもよい。凝集低減剤の例として、メチオニン、アルギニン、リジン、アスパラギン酸、グリシン、及びグルタミン酸から選択される１種又は複数のアミノ酸が挙げられる。医薬組成物はまた、糖（例えば、スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビト

ール、又はキシリトール）及び／又は等張性改質剤（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール、又はソルビトール）及び／又は界面活性剤（例えば、ポリソルベート－２０又はポリソルベート－８０）を含み得る。

かかる組成物は、非経口様式（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、又は筋内注射）によって投与することができる。１つの一実施形態では、二機能性ポリペプチド組成物は、皮下投与される。１つの実施形態では、二機能能性ポリペプチド組成物は、静脈内投与される。「非経口投与」及び「非経口投与される」という語句は本明細書で使用する場合、経腸投与及び局所投与以外の、通常は注射による投与様式を意味し、静脈内、筋内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内の注射並びに注入を包含するが、限定されない。

【０１０６】

組成物は、高濃度で安定な保管に適した溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、又は他の秩序構造として製剤化され得る。滅菌注射可能溶液は、必要に応じて、適切な溶媒中の必要な量の本明細書に記載される薬剤を、上記に列挙された構成要素の１種又は組合せとともに取り込むこと、続いて濾過滅菌によって調製することができる。概して、分散液は、本明細書に記載される薬剤を、塩基性分散媒質及び上記に列挙したものからの必要な他の構成要素を含有する滅菌ビヒクルに取り込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液の調製用の滅菌粉末の場合、調製方法は、本明細書に記載される薬剤の粉末に加えて、その予め滅菌濾過された溶液からのあらゆる更なる所望の構成要素を生じる真空乾燥及び凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散の場合には必要な粒子サイズの維持によって、また界面活性剤の使用によって維持され得る。注射可能な組成物の長期吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸塩及びゼラチンを組成物に含ませることによってもたらされ得る。

【０１０７】

或る特定の実施形態では、本明細書に記載されるような二機能性ポリペプチドをコードする組成物又は遺伝子療法剤は、埋込物を含む制御放出製剤、及びマイクロカプセル化された送達系などの化合物を急速放出から保護する担体を用いて調製されてもよい。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸などの生分解性の生体適合性ポリマーが使用され得る。かかる製剤の多くの調製方法は、特許を取得されているか、又は一般に既知である。

一部の実施形態では、二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤を含む組成物は、滅菌蒸留水又はリン酸緩衝生理食塩水中で製剤化される。医薬製剤のｐＨは、約５．５～約７．５（例えば、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、又は７．５）であり得る。

【０１０８】

ポリペプチドの投与

本明細書に記載されるようなポリペプチド（例えば、二機能性ポリペプチド）をコードする遺伝子療法剤を含む組成物は、様々な方法によって、対象、例えば、組成物を必要とする対象、例えば、ヒト又は動物対象に投与することができる。多くの用途について、投与経路は、静脈内注射若しくは注入（ＩＶ）、皮下注射（ＳＣ）、腹腔内注射（ＩＰ）、又は筋内注射のうちの１種である。非経口投与の他の様式もまた使用され得る。かかる様式の例として、動脈内、髄腔内、嚢内、眼内、心臓内、皮内、経気管、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、及び硬膜外及び胸骨内注射が挙げられる。

二機能性ポリペプチドの投与の経路及び／又は様式はまた、例えば、対象をモニタリングすることによって個々の症例に合わせて調整することができる。

二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤を含む組成物は、固定用量として、又はｍｇ／ｋｇ用量で投与することができる。用量はまた、二機能性ポリペプチドに対する抗体の産生を低減又は回避するように選択することができる。投与レジメンは、所望の応答、例えば、治療応答又は複合的な治療効果を提供するように調節される。概して、二機

能性ポリペプチド（及び任意に、第２の薬剤）の用量は、生物学的に利用可能な量の薬剤を対象に提供するように使用することができる。

【０１０９】

投薬単位形態又は「固定用量」は、本明細書で使用する場合、処置されるべき対象に関する単位投薬として適した物理的に分離した単位を指し、単位はそれぞれ、必要とされる医薬担体と会合させて、また任意的に他の薬剤と合わせて、所望の治療効果を生じるように算出された、既定量の二機能性ポリペプチドを含有する。単回又は複数回投薬が投与されてもよい。或いは、又は更に、二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤を含む組成物は、持続注入を介して投与されてもよい。

二機能性ポリペプチド用量をコードする遺伝子療法剤を含む組成物は、１回用量又は複数回で、例えば、少なくとも２回用量、３回用量、５回用量、１０回用量、又はそれよりも多く、例えば、１日１回若しくは２回、又は週に約１～４回、又は例えば毎週、隔週（２週間ごとに）、３週間ごとに、毎月、例えば、約１～１２週間、例えば２～８週間、例えば約３～７週間、及び例えば約４、５、又は６週間を包含するのに十分な期間（処置の経過）にわたる定期的な間隔で投与され得る。対象を効果的に処置するのに必要とされる投与量及びタイミングに影響を与え得る要因として、例えば、疾患若しくは障害の病期又は重症度、製剤、送達経路、これまでの処置、対象の一般的な健康状態及び／又は年齢、並びに存在する他の疾患が挙げられる。更に、治療上有効な量の化合物による対象の処置は、単回の処置を含み得るか、又は一連の処置を含み得る。

【０１１０】

対象が本明細書に記載される障害を発症するリスクがある場合、二機能性ポリペプチドは、障害の完全な発症前に、例えば予防策として投与され得る。かかる予防的処置の持続期間は、組成物の単回投薬であり得るか、又は処置が継続し得る（例えば、複数回投薬）。例えば、障害のリスクがある対象、又は障害の素因を有する対象は、障害が発生又は激発するのを防ぐように、本明細書に記載されるような組成物で数日間、数週間、数ヶ月間、更には数年間処置され得る。

二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤を含む組成物は、組成物を必要とする患者（例えば、シヌクレイノパチー、タウオパチー又はハンチントン病などのタンパク質凝集疾患を有しているか、又は有するリスクがある患者）に、単独で或いはシヌクレイノパチー、タウオパチー又はハンチントン病を処置するのに有用な他の治療用タンパク質（例えば、抗体、イントラボディ、ポリペプチド）と組み合わせて（即ち、同時投与又は逐次投与によって）投与され得る。一実施形態では、更なる治療用タンパク質は、本明細書に記載される医薬組成物中に含まれる。対象を処置するのに使用され得る治療用タンパク質の例として、β－アミロイド、α－シヌクレイン、ハンチンチン、ＴＤＰ－４３、及び／又はＳＯＤ－１を標的化する治療用タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１１】

組成物は、組成物を必要とする患者（例えば、シヌクレイノパチー、タウオパチー、若しくはハンチントン病などのタンパク質凝集疾患を有するか、又は有するリスクがある患者）に、シヌクレイノパチー又はタウオパチーなどのタンパク質凝集疾患を処置するのに有用な他の神経保護剤と組み合わせて（即ち、同時投与又は逐次投与によって）投与され得る。一実施形態では、更なる薬剤が、本明細書に記載される医薬組成物に含まれる。神経保護剤の例として、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、グルタミン酸作動性受容体アンタゴニスト、キナーゼ阻害剤、ＨＤＡＣ阻害剤、抗炎症剤、ジバルプロエクスナトリウム、ドーパミン若しくはドーパミン受容体アゴニスト、又はそれらのあらゆる組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１２】

一部の態様では、本明細書に記載される二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤を含む組成物は、細胞内α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンに結合するように二機能性ポリペプチドを細胞内で発現するよう設計された方法で使用することができる。

かかる方法は、細胞に、当業者に使用されるあらゆる形態、例えば、タンパク質、翻訳されるＲＮＡ分子、又は転写及び翻訳されるＤＮＡベクターで存在し得る二機能性ポリペプチドを送達することを含む。

二機能性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子が使用される場合、ポリヌクレオチドは、それが細胞に取り込まれて、二機能性ポリペプチド分子の転写を誘導するように、ｉｎ　ｖｉｖｏで導入され得る様々な宿主ベクター系となるように組換え操作され得る。かかるベクターは、それが発現されて所望のポリペプチドを産生することができる限り、エピソームのままであるか、又は染色体的に組み込まれ得る。かかるベクターは、当該技術分野において周知の且つ標準的な組換えＤＮＡ技術方法によって構築され得る。目的のドメインイントラボディをコードするベクターは、哺乳動物細胞における複製及び発現に使用されるプラスミド、ウイルス、又は当該技術分野において既知の他のものであり得る。

【０１１３】

本明細書に記載される二機能性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの送達用の多種多様なウイルス及び非ウイルスベクターは、当該技術分野において既知であり、産物の作製及び本明細書に記載される方法の実施において用いられ得る。ベクターとして、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス又はアデノ随伴ウイルスの種類に由来するものなどのウイルス発現ベクターを含むがこれらに限定されない真核細胞発現ベクターが挙げられる。

【０１１４】

適切なウイルスベクターの数例として、レトロウイルスベースのベクター（例えば、レンチウイルス）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、ヘルペスベクター、及びワクシニアベクターが挙げられる。一部の実施形態では、ベクターの構造は、例えば発現制御要素（例えば、プロモーター又はエンハンサー配列）を含む組換えポリペプチドの発現の最適化のために、又はその所望の細胞レベルを達成するために必要に応じて改変されてもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載されるようなプログラム可能なＰＥＳＴデグロン配列の発現は、細胞において高速の遺伝子転写を生じる強力なプロモーターを使用して遂行され得る。様々なベクター系が当業者に既知であり、本明細書に記載される組成物を、細胞に移入させるのに、例えば組成物を発現させることが可能なリポソーム、微粒子、マイクロカプセル、組換え細胞における封入、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス又は他のベクターの一部としての核酸の構築、ＤＮＡの注入、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションなどに使用することができる。

【０１１５】

治療用のデバイス及びキット

本明細書に記載される二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤を含む医薬組成物は、医療デバイスとともに投与することができる。デバイスは、未熟な対象によって、又は現場の救急隊員によって緊急事態に使用され、また医療施設及び他の医療機器から取り外すことができるように携帯性、室温保管、及び使いやすさなどの特徴を備えて設計することができる。デバイスは、例えば、二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤を含む医薬調製物を保管するための１種又は複数のハウジングを含んでもよく、抗体の１回又は複数回の単位用量を送達するように設定することができる。デバイスは更に、第２の薬剤、例えば、神経保護剤を、二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤も含む単一医薬組成物として、又は２種の別々の医薬組成物として投与するように設定することができる。

【０１１６】

二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤は、キットにおいて提供され得る。１つの実施形態では、キットは、（ａ）本明細書に記載されるような二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤を含む組成物を含有する容器、及び任意に（ｂ）情報資料を含む。情報資料は、本明細書に記載される方法及び／又は治療上の有益性のための薬剤の使

用に関する、説明的、指導的、マーケティング用又は他の資料であり得る。
或る実施形態では、キットはまた、本明細書に記載される障害を処置するための第２の薬剤を含む。例えば、キットは、二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤を含む組成物を含有する第１の容器と、第２の薬剤を含む第２の容器とを含む。
キットの情報資料は、その形式において限定されない。１つの実施形態では、情報資料は、化合物の生産、化合物の分子量、濃度、有効期限、バッチ又は生産地情報などに関する情報を含み得る。１つの実施形態では、情報資料は、二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤を、例えば、適切な用量、投薬形態、又は投与様式（例えば、本明細書に記載される用量、投与形態、又は投与様式）で投与して、本明細書に記載されるシヌクレイノパチー、タウオパチー、若しくはハンチントン病などのタンパク質凝集疾患を有しているか、又はそのリスクがある対象を処置する方法に関する。情報は、印刷された本文、コンピューターで読み取り可能な資料、ビデオ録画、又はオーディオ録音、又は例えばインターネット上のサブスタンティブな資料へのリンク若しくはアドレスを提供する情報を含む様々な形式で提供され得る。

【０１１７】

二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤に加えて、キット中の組成物は、溶媒又は緩衝液、安定剤、又は防腐剤などの他の成分を含み得る。二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤は、実質的に純粋な及び／又は滅菌のあらゆる形態、例えば、液体、乾燥若しくは凍結乾燥形態で提供され得る。薬剤が液体溶液中で提供される場合、液体溶液は水溶液である。薬剤が凍結乾燥産物として提供される場合、凍結乾燥粉末は概して、適切な溶媒の添加によって復元される。溶媒、例えば、滅菌水又は緩衝液（例えば、ＰＢＳ）が、キットに提供されてもよい。

【０１１８】

キットは、組成物又は薬剤を含有する組成物用の１種又は複数の容器を含むことができる。一部の実施形態では、キットは、組成物及び情報資料用の別々の容器、仕切り又はコンパートメントを含有する。例えば、組成物は、ビン、バイアル、又はシリンジ中に含有することができ、情報資料は、プラスチックスリーブ又はパケット中に含有することができる。他の実施形態では、キットの別々の要素は、単一の分割されていない容器内に含有される。例えば、組成物は、ラベルの形態で情報資料が貼り付けられたビン、バイアル又はシリンジ中に含有される。一部の実施形態では、キットは、複数（例えば、一組）の個々の容器を含み、それぞれが、薬剤の１種又は複数の単位投薬形態（例えば、本明細書に記載される投薬形態）を含有する。容器は、組合せ単位投薬、例えば、二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤及び第２の薬剤の両方を、所望の比で含む単位を含み得る。例えば、キットは、複数のシリンジ、アンプル、ホイルパケット、ブリスターパック、又は医療デバイスを含み、例えば、それぞれが単一の組合せ単位用量を含有する。キットの容器は、気密性であり、防水性であり（例えば、水分又は蒸発の変化に対して不浸透性である）、及び／又は遮光性であり得る。
キットは、組成物の投与に適したデバイス、例えば、シリンジ又は他の適切な送達デバイスを含んでもよい。デバイスは、薬剤の一方若しくは両方が予めローディングされて提供され得るか、又は空であるがローディングに適し得る。

【０１１９】

定義
値の範囲が提供される場合、文脈が明確に他の状況を指示しない限り、その範囲の上限と下限との間の下限の単位の１０分の１までの各介在する値、及びその記載された範囲におけるあらゆる他の記載された値又は介在する値が、本明細書に提供されることが理解されよう。これらのより小範囲の上限及び下限は、より小範囲に独立して含まれる場合があり、また、記載された範囲におけるあらゆる具体的に除外される限界を受けて、本明細書で提供される。記載された範囲が限界の一方又は両方を包含する場合、包含される限界のいずれか又は両方を除外する範囲も提供される。

【０１２０】

別記されない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語は全て、関連技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似又は同等のあらゆる方法及び材料もまた、本明細書の実施形態の実施又は試験において使用することができるが、好ましい方法及び材料がここで記載されている。本明細書で言及された刊行物は全て、刊行物が関連して引用される方法及び／又は材料を開示及び記載するのに参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で論述される刊行物は、本出願の出願日に先立つそれらの開示のみのために提供される。本明細書において、本開示が、先の開示によりかかる刊行物に先行する権利を有さないことの承認と解釈されるべきものは何もない。更に、提供される発行日は実際の発行日とは異なる場合があり、それらは独立して確認される必要があり得る。

別記されない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語は全て、関連技術分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。具体的な用語を特に、以下で定義する。

【０１２１】

本明細書及び併記の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、特定の実施形態について記載する文脈において（特に、併記の特許請求の範囲の或る特定の文脈において）使用される類似の言及とともに、具体的に別記されない限り、単数形及び複数形の両方を網羅すると解釈され得る。したがって、例えば、「活性剤」は、単一の活性剤だけでなく、２種又はそれよりも多い異なる活性剤の組合せも指し、「投薬形態」は、投薬形態の組合せ、並びに単一の投薬形態などを指す。一部の実施形態では、「又は」という用語は、特許請求の範囲を含む本明細書で使用する場合、代替物のみを指すよう明示されているか、又は代替物が相互排他的である場合を除いて、「及び／又は」を意味するのに使用される。

【０１２２】

一部の実施形態では、本明細書に記載される或る特定の実施形態を記載及び特許請求するのに使用される成分の量、分子量などの特性、反応条件などを表す数値は、一部の場合において「約」という用語によって修飾されていると理解されるべきである。一部の実施形態では、「約」という用語は、値が、その値を決定するのに用いられているデバイス又は方法に関する平均値の標準偏差を含むことを示すのに使用される。一部の実施形態では、書面による説明及び併記の特許請求の範囲に記載される数値パラメーターは、特定の実施形態によって得られることが求められる所望の特性に応じて多様であり得る近似値である。一部の実施形態では、数値パラメーターは、報告された有効桁の数に鑑みて、また通常の切り上げ技法を適用することによって解釈されるべきである。本明細書に記載される一部の実施形態の広い範囲を明記する数値範囲及びパラメーターが近似値であるにもかかわらず、具体例で明記された数値は、実行可能な限り正確に報告される。本明細書に記載される一部の実施形態で提示される数値は、それら各々の実験測定で見出される標準偏差から必然的に生じる或る特定の誤差を含有し得る。本明細書における値の範囲の列挙は、単に、範囲内に収まるそれぞれ別々の値を個々に言及する省略方法として役立つと意図されるに過ぎない。本明細書で別記されない限り、それぞれ個々の値は、それが本明細書で個々に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、「約」は、指定値＋／－１０％を指す。

【０１２３】

「含む」、「有する」、及び「包含する」という用語は、制約のない連結動詞である。「含む（単数形）」、「含んでいる」、「有する（単数形）」、「有している」、「包含する（単数形）」、及び「包含している」などのこれらの動詞の１種又は複数のあらゆる形式又は時制もまた制約がない。例えば、１種又は複数のステップを「含む」か、「有する」か、又は「包含する」あらゆる方法は、それらの１種又は複数のステップのみを保有することに限定されず、他の列挙されていないステップを網羅することもできる。同様に、１種又は複数の特徴を「含む」か、「有する」か、又は「包含する」あらゆる組成物又はデバイスは、それらの１種又は複数の特徴のみを保有することに限定されず、他の列挙

されていない特徴を網羅することができる。

【０１２４】

本明細書で使用する場合、「タンパク質」は、ペプチド結合によって結合されたアミノ酸残基からなる分子を指す。本開示の状況では、タンパク質は、タンパク質凝集疾患に関与するもの、例えば、α－シヌクレイン、タウ、及びハンチンチンである。本明細書に記載されるように、タンパク質は、本明細書に記載されるようなイントラボディの標的であり、それは、ヒトプログラム可能なＰＥＳＴ配列の添加に起因して所望のレベルまで分解される。

本明細書で定義されるように、タンパク質の、プロテアソームへの「送達の速度」という用語は、目的のタンパク質が、対照（例えば、空のベクター対照）に比べてＰＥＳＴドメインを含有する本開示の組換えポリペプチドの存在下で経時的に細胞において分解される速度を指す。

【０１２５】

本開示全体にわたって、１文字又は３文字コードに従ってアミノ酸に言及されることが理解されよう。１文字及び３文字アミノ酸コードは、下記の通りに提供される：Ａ＝Ａｌａ＝アラニン；Ｃ＝Ｃｙｓ＝システイン；Ｄ＝Ａｓｐ＝アスパラギン酸；Ｅ＝Ｇｌｕ＝グルタミン酸；Ｆ＝Ｐｈｅ＝フェニルアラニン；Ｇ＝Ｇｌｙ＝グリシン；Ｈ＝Ｈｉｓ＝ヒスチジン；Ｉ＝Ｉｌｅ＝イソロイシン；Ｋ＝Ｌｙｓ＝リジン；Ｌ＝Ｌｅｕ＝ロイシン；Ｍ＝Ｍｅｔ＝メチオニン；Ｎ＝Ａｓｎ＝アスパラギン；Ｐ＝Ｐｒｏ＝プロリン；Ｑ＝Ｇｌｎ＝グルタミン；Ｒ＝Ａｒｇ＝アルギニン；Ｓ＝Ｓｅｒ＝セリン；Ｔ＝Ｔｈｒ＝スレオニン；Ｖ＝Ｖａｌ＝バリン；Ｗ＝Ｔｒｐ＝トリプトファン；Ｘ＝Ｘａａ＝未知［非標準－Ｕｎｋ］；及びＹ＝Ｔｙｒ＝チロシン。

【０１２６】

本明細書で使用する場合、「α－シヌクレイン」は、ヒトα－シヌクレインを指し、多数の神経学的疾患に関与するタンパク質である。本明細書に記載されるように、α－シヌクレインは、本明細書に記載されるようなイントラボディの標的であり、それは、ヒトプログラム可能なＰＥＳＴ配列の添加に起因して所望のレベルまで分解される。一部の実施形態では、「シヌクレイン」という用語は概して、シヌクレインファミリーのタンパク質、例えば、α－シヌクレイン、β－シヌクレイン、又はγ－シヌクレインを指し得る。例えば、抗シヌクレイン抗体は、シヌクレインファミリーのあらゆる成員に結合し得る一方で、抗α－シヌクレイン抗体は、α－シヌクレインにのみ結合する。

【０１２７】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、天然供給源又は組換え源に由来する無傷免疫グロブリン、並びに無傷免疫グロブリンの免疫反応性部分（即ち、「抗原結合ドメイン」又は「抗原結合部分」）を包含する。本明細書に記載される抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、細胞内抗体（「イントラボディ」）、抗体断片（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、及びＦ（ａｂ’$_2$））、並びに単鎖抗体（ｓｃＦｖ）、単一ドメインＶＨ又はＶＬ抗体、キメラ抗体、ヒト抗体及びヒト化抗体を含む様々な形態で存在し得る。

抗体断片（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、及びＦ（ａｂ’$_2$））、例えば、抗α－シヌクレイン結合抗体の抗体断片は、無傷抗体（例えば、抗α－シヌクレイン抗体、抗タウ抗体、又は抗ハンチンチン抗体）のタンパク質分解性消化によって調製され得る。例えば、抗体断片は、全抗体をパパイン、ペプシン、又はプラスミンなどの酵素で処置することによって得ることができる。抗体断片の調製に適した他の酵素が、当該技術分野において既知である。

全抗体のパパイン消化は、Ｆ（ａｂ）$_2$又はＦａｂ断片を産生し、全抗体のペプシン消化は、Ｆ（ａｂ’）$_2$又はＦａｂ’を生じ、全抗体のプラスミン消化は、Ｆａｂ断片を生じる。

【０１２８】

或いは、抗体断片、例えば、抗α－シヌクレイン結合抗体の抗体断片は、組換え的に産

生され得る。例えば、目的の抗体断片をコードする核酸が構築され、発現ベクターに導入され、適切な宿主細胞に発現させることができる。例えば、抗体断片は、大腸菌において発現され、大腸菌から分泌させることができ、したがって、大量のこれらの断片の容易な産生を可能にする。別のアプローチによれば、抗体断片は、組換え宿主細胞培養液から直接単離することができる。

本明細書で使用する場合、「エピトープ」という用語は、抗体によって特異的に認識される特定アミノ酸配列、修飾アミノ酸配列、又はタンパク質の二次若しくは三次構造を指す。「特異的に認識している」、「特異的に認識する（単数形）」という用語、及びあらゆる文法上の変形は、抗体又はその抗原結合分子が、エピトープ、例えば、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンエピトープの少なくとも２種、少なくとも３種、又は少なくとも４種のアミノ酸と特異的に相互作用し、及び／又はそれらに結合することが可能であることを意味する。かかる結合は、「鍵と鍵穴原理」の特異性によって例示され得る。したがって、α－シヌクレイン、タウ、若しくはハンチンチン抗体、又はその抗原結合分子の抗原結合ドメインのアミノ酸配列における特定モチーフ、及びエピトープは、それらの一次、二次、又は三次構造の結果として、並びにその構造の二次修飾の結果として互いに結合する。

【０１２９】

本明細書で使用する場合、「イントラボディ」は、細胞内で活性な抗体断片、又は抗原結合ドメインを指す。細胞内抗体断片は、例えば、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）又は単一ドメイン抗体（ナノボディとしても既知；単一の単量体可変抗体ドメインからなる抗体断片）であり得る。イントラボディは、細胞内標的抗原への直接的な結合によって中和剤として作用し、それにより細胞内でタンパク質のフォールディング、タンパク質－タンパク質、タンパク質－ＤＮＡ、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、及びタンパク質修飾を変化させる。一部の実施形態では、イントラボディはまた、アルパカ、ラマ、ラクダ、及びグアナコにおいて作製される天然に存在する重鎖のみの抗体由来の小さな重鎖のみの抗体断片（ＶＨＨ）であるラクダ科ナノボディを包含する。

【０１３０】

本明細書で使用する場合、「抗原」又は「免疫原」という用語は、対象において免疫応答を誘発することが可能な物質、通常タンパク質を指すのに交換可能に使用される。例えば、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンタンパク質は、抗原であり得る。当該用語はまた、対象に投与されると（直接的に、又は対象に、タンパク質をコードするヌクレオチド配列若しくはベクターを投与することによって）、そのタンパク質に対して誘導される液性及び／又は細胞型の免疫応答を誘起することが可能であるという意味で免疫学的に活性なタンパク質を指す。

本明細書で使用する場合、「同時投与」は、１種又は複数の薬物と別の薬物との同時の投与を指す。他の実施形態では、両方の薬物が同時に投与される。本明細書の他の箇所に記載されているように、同時投与はまた、一方の薬物、又は両方の薬物のあらゆる特定の期間の投与を指し得る。例えば、本明細書に記載されるように、薬物は、別の薬物の投与の数時間又は数日前に投与されてもよく、依然として同時投与されたと考えられる。一部の実施形態では、同時投与は、両方の薬物が同時に患者の身体中に存在するような一方の薬物のあらゆる時間の投与を指し得る。一部の実施形態では、患者が意図された臨床的又は薬理学的有益性を受けた十分な時間、それら両方が患者内で存在する限り、一方の薬物は、他方の前又は後に投与されてもよい。

【０１３１】

機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的アミノ酸置換は、当該技術分野において周知である。下記の６種の群はそれぞれ、互いにとって保存的置換であるアミノ酸を含有する：１）アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、スレオニン（Ｔ）；２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）；アルギニン（Ｒ）、リジン（Ｋ）；５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、バリン（Ｖ）；及び６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）。タ

ンパク質内の全ての残基位置が、他の状況では「保存的」置換を許容するわけではない。例えば、アミノ酸残基がタンパク質の機能に必須である場合、他の状況では保存的置換でさえ、その活性を崩壊する可能性があり、例えば、抗体の、標的エピトープへの特異的結合は、標的エピトープにおける保存的変異によって崩壊され得る。

【０１３２】

本明細書に記載されるように、タンパク質をプロテアソームへと標的化して、タンパク質の分解の増加を達成するための、本明細書に記載されるような配列番号１に対するＰＥＳＴデグロン中に存在し得る置換変異は、プロリン（Ｐ）残基のアラニン（Ａ）残基への変異、例えばＰ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ（即ち、２つの連続したＰ残基の、２つの連続したＡ残基への変異）、アスパラギン酸（Ｄ）残基のＡ残基への変異、例えばＤ４３３Ａ、セリン（Ｓ）残基のＡ残基への変異、例えばＳ４４５Ａ、及び／又はリジン（Ｋ）残基のＡ残基への変異、例えばＫ４４８Ａであり得る。

他の実施形態では、タンパク質をプロテアソームへと標的化して、タンパク質の分解の低減を達成するための、本明細書に記載されるような配列番号１に対するＰＥＳＴデグロン中に存在し得る変異は、Ｐ残基のＡ残基への変異、例えばＰ４３８Ａ、グルタミン酸（Ｅ）残基のＡ残基への変異、例えばＥ４４４Ａ、Ｓ残基のＡ残基への変異、例えばＳ４４０Ａ、及び／又はスレオニン（Ｔ）残基のＡ残基への変異、例えばＴ４３６Ａであり得る。一部の実施形態では、変異は、図１５Ａ～図１５Ｂに示されるもののうちの１種である。

【０１３３】

一部の実施形態では、保存的アミノ酸置換、例えば、ある酸性又は塩基性アミノ酸を別のアミノ酸に置換することは多くの場合、本明細書に記載されるような組換えポリペプチドの生物学的活性に影響を及ぼすことなく行われ得る。この性質の配列におけるわずかな変動が、本明細書に開示されるペプチドのいずれにおいても行われ得るが、但し、これらの変化はタンパク質の所望の活性を実質的に（例えば、１５％又はそれよりも多く）変化させない。

【０１３４】

本明細書で使用する場合、「デグロン」は、タンパク質分解速度の調節において重要なタンパク質の一部を指す。既知のデグロンは、タンパク質においてあらゆる場所に位置する短アミノ酸配列、構造モチーフ、及び露出されたアミノ酸（例えば、リジン又はアルギニン）を包含する。一部の実施形態では、一部のタンパク質は、複数のデグロンを含有する。本明細書で使用する場合、ＰＥＳＴデグロンは、分解のために特定のタンパク質をプロテアソームへと標的化するのに有用な配列を指す。本明細書に記載されるように、有用なＰＥＳＴデグロンは、マウス又はヒト由来であってもよく、配列番号１として本明細書に記載されるコンセンサス配列を有してもよい。

【０１３５】

本明細書で使用する場合、「ダイアボディ」は、小さなペプチドリンカーによって結合された重鎖可変（ＶＨ）及び軽鎖可変（ＶＬ）領域からなる単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片の非共有結合二量体を指す。一部の実施形態では、ダイアボディは、リンカーを用いて結ばれたか、又は結合された２つのイントラボディ、例えばＶｈ－－リンカー－－Ｖｈである。他の実施形態では、ダイアボディは、２つのｓｃＦｖ断片が互いに共有結合された単鎖（Ｆｖ）２である。

【０１３６】

二機能性ポリペプチドをコードする遺伝子療法剤を含む本明細書に記載される医薬組成物は、「治療上有効な量」の、本明細書に記載されるような二機能性ポリペプチドを含み得る。「治療上有効な量」、「薬理学的に有効な用量」、「薬理学的に有効な量」、又は単に「有効な量」という用語は、交換可能に使用されてもよく、意図された薬理学的、治療的又は予防的結果をもたらすのに有効な薬剤の量、例えば、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンなどのタンパク質の所望のレベルを達成するのに必要な量を指す。薬理学的に有効な量は、障害の１種又は複数の症状の改善をもたらすか、或いは障害の進行を

防止するか、或いは障害の退行を引き起こすか、或いは障害を防止する。かかる有効な量は、投与された薬剤の効果、又は１種よりも多い薬剤が使用される場合の薬剤の複合効果に基づいて決定することができる。薬剤の治療上有効な量はまた、個体の疾患の病期、状態、年齢、性別、及び体重などの要因、及び化合物が個体において所望の応答を誘発する能力、例えば、少なくとも１種の障害パラメーターの改善又は障害の少なくとも１種の症状の改善に従って変動し得る。治療上有効な量はまた、組成物のあらゆる毒性又は有害な影響を治療上有益な効果が上回るものでもある。一般に、この量は、明らかに分解のためにタンパク質標的をプロテアソームへと標的化するのに十分である。対象に投与される場合、一般に、所望のレベルのタンパク質分解（即ち、所望のレベルのタンパク質が、プロテアソームへと標的化され／送られていること）を達成することが示されている標的組織濃度を達成する（例えば、ニューロンにおいて）を達成する投与量が使用される。数例では、「有効な量」は、タンパク質凝集障害又は疾患のいずれかの１種又は複数の症状及び／又は根本的な原因を処置するもの（予防を含む）である。一例では、有効な量は、治療上有効な量である。一例では、有効な量は、特定の疾患又は状態の１種又は複数の兆候又は症状が発症するのを防ぐ量である。

【０１３７】

本明細書で使用する場合、「エピトープ」は抗原決定基を指す。エピトープは、それらが特異的な免疫応答を誘発するように抗原性である分子上の特定の化学基又はペプチド配列であり、例えば、エピトープは、Ｂ細胞及び／又はＴ細胞が応答する抗原の領域である。エピトープは、タンパク質の三次フォールディングによって並置された連続アミノ酸又は非連続アミノ酸の両方から形成され得る。

本明細書で使用する場合、「外因性配列」は、宿主細胞の外側に由来する核酸配列を指す。外因性配列は、ＤＮＡ配列、ＲＮＡ配列、又はそれらの組合せであってもよい。当業者に理解されるように、当該技術分野において利用可能なあらゆるタイプの核酸が使用され得る。かかる核酸配列は、それが送達される細胞の種と異なる種、例えばマウス、又は同じ種から得ることができる。一部の実施形態では、外因性核酸配列は、対象又は患者への投与に適した、本明細書に記載されるような分解のために所望のタンパク質をプロテアソームへと標的化するためのＰＥＳＴデグロン配列をコードし得る。かかる組換えポリペプチドは、タンパク質凝集疾患若しくは特定の細胞、組織、臓器などにおけるタンパク質蓄積を処置又は防止するために対象又は患者に投与され得る。

【０１３８】

本明細書で使用する場合、「遺伝子送達」は、遺伝子移入のための細胞への外因性ポリヌクレオチドの導入を指し、ターゲティング、結合、取り込み、輸送、局在化、レプリコン組み込み及び発現を包含し得る。一部の実施形態では、遺伝子送達は、遺伝子のコードされた産物、即ち、ポリペプチド又はタンパク質、例えば本明細書に記載される二機能性ポリペプチドの導入を指し得る。

本明細書で使用する場合、「遺伝子移入」は、ターゲティング、結合、取り込み、輸送、局在化及びレプリコン組み込みを包含し得るが、遺伝子の続く発現とは異なり、遺伝子の続く発現を示唆しない細胞への外因性ポリヌクレオチドの導入を指す。

本明細書で使用する場合、「遺伝子発現」又は「発現」は、遺伝子転写、翻訳、及び翻訳後修飾のプロセスを指す。

【０１３９】

「薬学的に許容される」とは、生物学的に又は他の状況で望ましくないわけではない材料を意味し、即ち、材料は、いかなる望ましくない生物学的影響も引き起こさずに、又はそれが含有される組成物の他の成分のいずれかと有害な様式で相互作用せずに、患者に投与される医薬組成物に取り込まれ得る。「薬学的に許容される」という用語が医薬担体又は賦形剤を指すのに使用される場合、担体又は賦形剤が毒物学的試験及び製造試験の所要の基準を満たしていること、又は担体又は賦形剤が、米国食品医薬品局が作成した不活性成分ガイドに含まれていることが示唆される。「薬理学的に活性な」（又は単に「活性」）誘導体又は類似体で見られるような「薬理学的に活性な」（又は単に「活性」）は、親

化合物と同じタイプの薬理学的活性を有し、程度がほぼ同等である誘導体又は類似体を指す。「薬学的に許容される塩」という用語は、例えば、塩酸若しくはリン酸などの無機酸、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸と形成される酸付加塩を包含する。遊離カルボキシル基で形成される塩はまた、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、又は水酸化第二鉄などの無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基から得ることができる。

【０１４０】

本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合性であるあらゆる全ての溶媒、分散媒質、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤を包含する。組成物は、薬学的に許容される塩、例えば、酸付加塩又は塩基付加塩を包含し得る。

【０１４１】

本明細書で使用する場合、「プログラム可能なＰＥＳＴ」又は「プログラム可能なＰＥＳＴデグロン」又は「プログラム可能なプロテアソームターゲティングＰＥＳＴモチーフ」におけるような「プログラム可能な」は、同じＰＥＳＴデグロンの未改変又は未変化バージョンに比べて、ＰＥＳＴデグロンに融合された抗原結合ドメインの標的であるタンパク質（α－シヌクレイン、タウ、ハンチンチンなど）の分解を増加又は減少させ得る或る特定の変異（即ち、本明細書の他の場所に記載されているアミノ酸置換）導入するような様式で改変又は変化させることが可能なＰＥＳＴデグロンを指す。一部の実施形態では、ＰＥＳＴモチーフは、ベースラインレベルから、例えば、ベースラインからの低レベル（例えば、５％）の低減からベースラインからの高レベル（例えば、１００％）への細胞におけるタンパク質（例えば、α－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチン）の分解レベルを増加させる種々の変異を有し得る。この増加された分解は、空のベクター対照などの対照と比較して確認され得る。

【０１４２】

本明細書で使用する場合、「分解の増加」は、本明細書に記載されるようなＰＥＳＴ配列のタンパク質への付加による、タンパク質の分解のためのプロテアソームに対するか、若しくはプロテアソームへの輸送又は送達のためのタンパク質のターゲティングの増加又は増強を指す。同様に、「分解の減少」又は「分解の低減」は、本明細書に記載されるようなＰＥＳＴ配列のタンパク質への付加による、タンパク質の分解のためのプロテアソームに対するか、若しくはプロテアソームへの輸送又は送達のためのタンパク質のターゲティングの低減又は減少を指す。タンパク質、例えばα－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンの分解の増加又は減少を達成するのに有用であり得るＰＥＳＴコンセンサス配列の変異は、本明細書に記載されている。タンパク質、例えばハンチンチンの分解は、本明細書に記載されている。

【０１４３】

本明細書に記載されるようなタンパク質分解のレベルを比較する場合、標的タンパク質の分解の増加又は減少は、空のベクター、野生型ｈＰＥＳＴ、ｈＰＥＳＴスクランブル、又は抗原対照（Ｂ８－ｈＰＥＳＴ）と比較され得る。本明細書で使用する場合、「スクランブル対照ＰＥＳＴ」又は「Ｓｃｒ」は、プログラム可能なＰＥＳＴと同じ数のアミノ酸を有するが、タンパク質をプロテアソームへと標的化しない無作為化されたポリペプチドを指す。この実験的分解制御により、特定のＰＥＳＴデグロンが標的タンパク質、例えばα－シヌクレイン、タウ、ハンチンチンをどれだけ効率的に分解しているかの定量化が可能となる。例えば、本明細書に記載されるＰＥＳＴデグロンは、スクランブル対照ＰＥＳＴと比較してタンパク質の分解を或る特定のパーセンテージで増加し得るか、又は、本明細書に記載されるＰＥＳＴデグロンは、スクランブル対照ＰＥＳＴと比較してタンパク質の分解を或る特定のパーセンテージで減少し得る。一部の実施形態では、特定のＰＥＳＴデグロンは、本明細書では「ＥＶ－ＣＯＮ」又は「ＥＶ」と称される空のベクター対照と比較され得る。空のベクター対照は本明細書で使用する場合、ＰＥＳＴデグロンをコード

する構築物、又はＰＥＳＴデグロンに融合されたイントラボディによる細胞のトランスフェクションに使用されるベクターが、ＰＥＳＴデグロン又はイントラボディをコードする配列を欠如しているタンパク質分解のレベルを比較又は定量化するための実験対照を指す。一部の実施形態では、特定のＰＥＳＴデグロンは、同じＰＥＳＴデグロンの未改変又は未変化バージョン（即ち、野生型ＰＥＳＴ配列）と比較されてもよい。

【０１４４】

本明細書で使用する場合、「低減すること」は、脊髄損傷（ＳＣＩ）後に細胞毒性を低減することなどの低下又は軽減すること、又は本明細書に記載されるようなタンパク質、例えばα－シヌクレイン、タウ、又はハンチンチンの量又は濃度を低減することを指す。一部の実施形態では、本明細書に記載されるような二機能性ポリペプチドの投与は、かかる二機能性ポリペプチドを投与されていない患者と比較した、患者におけるタンパク質凝集又は関連症状の「低減」又は軽減をもたらし得る。「低減すること」はまた、本明細書に記載されるような処置の結果として、単独で、又は別の薬物と同時投与される疾患症状の低減を指し得る。

【０１４５】

本明細書で使用する場合、「対象」又は「個体」又は「患者」は、療法が望ましいあらゆる患者を指し、一般に療法のレシピエントを指す。「対象」又は「患者」は、哺乳動物として分類されるあらゆる動物、例えば、ヒト及び非ヒト以外哺乳動物を指す。非ヒト動物の例として、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどが挙げられる。別記されない限り、「患者」又は「対象」という用語は、本明細書で交換可能に使用される。一部の実施形態では、治療適用に適した対象は、霊長類、例えば、ヒト及び非ヒト霊長類であり得る。

本明細書で使用する場合、「タウ」は、ヒトタウを指し、多数の神経学的疾患に関与するタンパク質である。本明細書に記載されるように、タウは、本明細書に記載されるようなイントラボディの標的であり、それは、ヒトプログラム可能なＰＥＳＴ配列の添加に起因して所望のレベルまで分解される。

【０１４６】

本明細書で使用する場合、宿主細胞若しくは対象へのポリヌクレオチド又はベクターの投与は、あらゆる日常的に実施される方法を介した細胞又は対象への導入を指す。これは、当該技術分野において周知であるような「形質導入」、「トランスフェクション」、「形質転換」、又は「形質導入すること」を包含する。これらの用語は全て、外因性ポリヌクレオチドの、宿主細胞への導入のための標準的なプロセスを指し、細胞におけるポリヌクレオチド、例えば導入遺伝子の発現をもたらし、外因性ポリヌクレオチドの、宿主細胞への導入のためのプラスミド及び／又は組換えウイルスの使用を包含する。細胞におけるポリヌクレオチドの形質導入、トランスフェクション、又は形質転換は、例えば、ＥＬＩＳＡ、フローサイトメトリー及びウェスタンブロットによるタンパク質発現（定常状態レベルを含む）、アッセイ、例えばノーザンブロット、サザンブロット、レポーター機能（Ｌｕｃ）アッセイ、及び／又はゲルシフト移動度アッセイによるＤＮＡ及びＲＮＡの測定を含むがこれらに限定されない、当業者に周知の方法によって決定され得る。外因性ポリヌクレオチドの導入に使用される方法として、細菌及び／又はウイルス感染又はトランスフェクション、リポフェクション、形質転換、及びエレクトロポレーションなどの周知の技法、並びに安定化されたＲＮＡ分子の導入などの他の非ウイルス性遺伝子送達技法が挙げられる。導入されたポリヌクレオチドは、宿主細胞において安定又は一過的に維持され得る。

【０１４７】

本明細書に記載される「転写調節配列」又は「ＴＲＳ」は概して、少なくとも１種の転写プロモーターを含み、また、転写の１種又は複数のエンハンサー及び／又はターミネーターを含んでもよい。「動作可能に連結された」とは、２種又はそれよりも多い構成要素の配置を指し、ここで、そのように記載された構成要素は、それらが協調的に機能することを可能にする関係にある。例として、転写調節配列又はプロモーターは、ＴＲＳ又はプ

ロモーターがコード配列の転写を促進する場合、コード配列に動作可能に連結される。動作可能に連結されるＴＲＳは、一般にコード配列とシスで結合されるが、必ずしもそれに直接隣接しているわけではない。

【０１４８】

「処置すること」及び「処置」又は「緩和すること」という用語は本明細書で使用する場合、症状の重症度及び／又は頻度の低減又は軽減、症状及び／又は根本的な原因の排除、及び損傷の改善又は修復を指す。或る特定の態様では、「処置すること」及び「処置」という用語は本明細書で使用する場合、症状の発生の防止を指す。他の態様では、「処置すること」及び「処置」という用語は本明細書で使用する場合、脊髄損傷（ＳＣＩ）などの疾患又は状態と関連付けられる症状の根本的な原因の防止を指す。「患者へ投与すること」という語句は、当該技術分野で認められた導入手段を介して、組成物又は投薬形態を患者に導入するプロセスを指す。「処置すること」又は「緩和すること」はまた、疾患（例えば、ＳＣＩ）の症状、合併症、又は生化学的徴候の発症を防止又は遅延させ、症状を緩和するか、或いは疾患、状態、若しくは障害の更なる発達を停止又は阻害するための、化合物又は薬剤の対象への投与を包含する。治療が必要な対象は、すでに疾患又は状態を患う対象、並びに疾患又は状態を発症するリスクのあるヒトを包含する。処置は、予防的（疾患若しくは状態の発症を防止又は遅延させるため、或いはその臨床的又は無症状の症状の所見を防止するため）若しくは治療的抑制、又は疾患若しくは状態の所見後の症状の緩和であり得る。

【０１４９】

「ベクター」は、細胞に導入することができる担体を有するか、又は有さない核酸である。１種又は複数のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を誘導することが可能なベクターは、「発現ベクター」と称される。適切なベクターの例として、例えば、ウイルスベクター、プラスミドベクター、リポソーム、及び他の遺伝子送達ビヒクルが挙げられる。

【０１５０】

本明細書に記載される方法は全て、本明細書で別記されない限り、又は他の状況で文脈によって明らかに矛盾しない限り、あらゆる適切な順序で実施することができる。本明細書中の或る特定の実施形態に関して提供されるあらゆる全ての例、又は例示的な文言（例えば、「など」）の使用は、本実施形態を単に、よりはっきりと明らかにするよう意図されており、他の状況で特許請求される実施形態の範囲に限定を課すものではない。明細書におけるいかなる文言も、本実施形態の実施に必須なあらゆる特許請求されていない要素を示すと解釈されるべきではない。

【０１５１】

本明細書に開示される代替的な要素又は実施形態の群化は、限定として解釈されるべきではない。各群の成員は、個々に、或いは本明細書で見出される群又は他の要素の成員とあらゆる組合せで言及され、特許請求され得る。群の１つ又は複数の成員は、利便性若しくは特許性の理由で群において含まれ得るか、又は群から削除され得る。

本実施形態を詳細に説明してきたが、併記の特許請求の範囲で規定される範囲を逸脱することなく、修正、変形、及び同等の実施形態が可能であることが明らかである。更に、本明細書に記載される実施例は全て、非限定的な例として提供されることが理解されるべきである。

【０１５２】

【表４】

表3: 配列表

配列番号	説明	配列
1	PESTデグロンのコンセンサス配列	PDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRH
2	mPEST (ODC–$_{PEST422-461}$)の配列	SHGFPPEVEEQDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINV
3	hPEST (ODC–$_{PEST422-461}$)の配列	NPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
166	変種hPEST (ODC–$_{PEST422-461}$)の配列	NPDFAAEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
4	α-シヌクレインタンパク質; GenBank アクセッション番号CR541653又はCAG46454.1	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAGKTKEG VLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTG VTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEG ILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA
5	DB1、ラクダ科単一ドメイン抗体、ヤツメウナギ及びヒトα-シヌクレインに結合することが可能	MAEVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTSWEDTMG WFRQAPGKEREFVSAISFDANDLSDTSVYYADSVKGRF TISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAVASFEILLY GESLHIYWGQGTQVTVSS
配列番号 6-11 – 抗シヌクレインイントラボディの配列-抗原シヌクレインアミノ酸残基53-95. セット#1: VH14 (ヒト単一ドメイン) 抗原シヌクレインアミノ酸53-95		
6	VH14-hPESTの配列	MSSQVQLQQSGPGRVKPSQTLSLACVISGDTVSSKTVSWNWIRQ SPSRGLEWLGRTYFWPKWYTEYGASVKGRITIHPDTSKNQFSLQL SSVTPEDTAVYYCARSKTKRPPYYYAGMDVWGQGTTVTVSSAST KGPSGILGSGGGGSGILAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLP VSCAWESGMKRHRAACASASINV
7	VH14-hPEST-P426A/P427A	MSSQVQLQQSGPGRVKPSQTLSLACVISGDTVSSKTVSWNWIRQSP SRGLEWLGRTYFWPKWYTEYGASVKGRITIHPDTSKNQFSLQLSSV TPEDTAVYYCARSKTKRPPYYYAGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPS GILGSGGGGSGILAAAYPYDVPDYANPDFAAEVEEQDASTLPVSCA WESGMKRHRAACASASINV

8	VH14-hPEST-D433A	MSSQVQLQQSGPGRVKPSQTLSLACVISGDTVSSKTVSWNWIRQSP SRGLEWLGRTYFWPKWYTEYGASVKGRITIHPDTSKNQFSLQLSSV TPEDTAVYYCARSKTKRPPYYYAGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPS GILGSGGGGSGILAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQAASTLPVSCAW ESGMKRHRAACASASINV
9	VH14-hPEST-C441A	MSSQVQLQQSGPGRVKPSQTLSLACVISGDTVSSKTVSWNWIRQSP SRGLEWLGRTYFWPKWYTEYGASVKGRITIHPDTSKNQFSLQLSSV TPEDTAVYYCARSKTKRPPYYYAGMDVWGQGTTVTVSSASTKGP SGILGSGGGGSGILAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSAA WESGMKRHRAACASASINV
10	VH14-hPEST-S445A	MSSQVQLQQSGPGRVKPSQTLSLACVISGDTVSSKTVSWNWIRQSP SRGLEWLGRTYFWPKWYTEYGASVKGRITIHPDTSKNQFSLQLSSV TPEDTAVYYCARSKTKRPPYYYAGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPS GILGSGGGGSGILAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCA WEAGMKRHRAACASASINV
11	VH14-hPEST-スクランブル	MSSQVQLQQSGPGRVKPSQTLSLACVISGDTVSSKTVSWNWIRQSP SRGLEWLGRTYFWPKWYTEYGASVKGRITIHPDTSKNQFSLQLSSV TPEDTAVYYCARSKTKRPPYYYAGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPS GILGSGGGGSGILAAAYPYDVPDYAACCGEHPIRPPVEDFEESRASS TASAWLANMVQNKPVSDA
12	DB1-hPEST（ラクダ科単一ドメイン）抗原シヌクレインアミノ酸53-95、セット#2.	MAEVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTSWEDTMGWFRQAPG KEREFVSAISFDANDLSDTSVYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQM NSLRAEDTATYYCAVASFEILLYGESLHIYWGQGTQVTVSSAAAYP YDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
13	N77D-4C-hPEST（ラクダ科単一ドメイン)抗原シヌクレインアミノ酸53-95、セット#3	MSRQVQLVESGGGGLVQPGGSLRLSCVTPGGIFSDYAMGWYRQAP GKQRELVADITVSDTTRYSDPVKGRFTISRDNAKDMVYLQMNSLKP EDAAIYTCNAQKWEDRYGSSERYDYWGQGTQVTVSSAHHSEDPAA AYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACA SASINV
14	細胞の細胞内コンパートメントにおいてVHをVLに結合して、VHとVLとの間に適切なフォールディングを可能にするグリシン-セリンリンカー	GGGGSGGGGSGGGGS

15	実験条件下でのイントラボディの発現の同定用のHAタグ	YPYDVPDYA
16	抗α-シヌクレインVHH-4C-N77D (図16の上段)	VQLVESGGGGLVQPGGSLRLSCVTPGGIFSDYAMGWYRQAPGKQ RELVADITVSDTTRYSDPVKGRFTISRDNAKDMVYLQMNSLKPED AAIYTCNAQKWEDRYGSSERYDYWGQGTQVTVSS
17	抗α-シヌクレインVHH-DB1 (図16の中段)	EVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTSWEDTMGWFRQAPGKE REFVSAISFDANDLSDTSVYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNS LRAEDTATYYCAVASFEILLYGESLHIYWGQGTQVTVSS
18	抗α-シヌクレインVH14 (図16の下段)	QVQLQQSGPGRVKPSQTLSLACVISGDTVSSKTVSWNWIRQSPSRG LEWLGRTYFWPKWYTEYGASVKGRITIHPDTSKNQFSLQLSSVTPE DTAVYYCARSKTKRPPYYYAGMDVWGQGTTVTVSS

19	pcDNA3.1(−) 空のベクター	GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGTA CAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTG CTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAG CTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGC TTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGAT ATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAA TTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTA CATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACC CCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGT AAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGC AGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC CAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACC AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCAT TGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA GCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTA TCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGC GTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGCTGGA TATCTGCAGAATTCCACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGG TACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTT CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCT TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATG AGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGG GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACA ATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGG CGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCT GTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCG TGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTT TCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAG CTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTAC GGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTA GTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGG AGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAA CACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTT TGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAA AATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTG TGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT GCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTC CCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGC AACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCC

10 20 30 40 50

		GCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTT TATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCA GAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAA GCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGAC AGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC AGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTG GGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCT GTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTC CGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTG GCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGT CACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGG GCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATC CATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGC TACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGC ACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGA CGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCT CAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGG CGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTC TGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCA GGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGG CGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCC CGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTT CTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCC AACCTGCCATCACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAA AGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATC CTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAAC TTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATC ACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGT GGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCG TCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTT CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGA GCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGC TAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCG GGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCG GGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTC ACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCA GCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT AACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGG AACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC CCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGG CGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGA AGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGA TACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCC

		AAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGC GCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCT AACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTG CTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCC GGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAG CAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC TTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAA GGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATC CTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAT GAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA CCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGA CTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCT GGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCT CCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGC AGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAAT TGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTG CGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCG TCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGG CGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC TTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATG CCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAG TCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCG GCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA GTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGG ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA CCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGG TGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATAT TATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATA TTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACA TTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

10

20

30

40

50

20	pAAV-MCS	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG CAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG GTTCCTGCGGCCGCACGCGTGGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAA TTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTA CATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACC CCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGT CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGT AAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGC AGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC CAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGCACCA AAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATT GACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAG CAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCT CCGCGGATTCGAATCCCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGA TTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATA GGCCCACAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTA TCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATA ATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAAC AGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATA AATATTTCTGCATATAAATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATAT TGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTA TGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTT TTGCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCTCCCACAGCTCCTG GGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAA TTGGGATTCGAACATCGATTGAATTCCCCGGGGATCCTCTAGAGT CGACCTGCAGAAGCTTGCCTCGAGCAGCGCTGCTCGAGAGATCTA CGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCT GGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATT AAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTAT GGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGAC AACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGC AGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCA AGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGC ATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACG GGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCA GGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGC GTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTTCTGATTTTGTAGGTAAC

		CACGTGCGGACCGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTG GCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA CCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTAT TTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATACGTCAA AGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGG GTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCC TAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGT TCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAG GGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTG ATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGG TTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAC TCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATT CTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAA AAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAA TATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCT CTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCG CTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACA GACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTT CACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATAC GCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGA CGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTT GTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC AATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA TGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGG CATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAG TAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCG AACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCG AAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTG GCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTC GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAG TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTAC TTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC ACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGG AGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGC CTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAAC TACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGG CGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTG GCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTC GCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTA TCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAC GAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATT

		GGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATT TAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTT TTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCC ACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAG ATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAAC CACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAA CTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAA ATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGA ACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGG ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAA CGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACA CCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGC TTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGG TCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCT GGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGC GTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAA ACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC CTTTTGCTCACATGT

10

20

30

40

50

21	pTetO FUW 空のベクター	CGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAG TTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATA TATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGG CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTA TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTT TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT GGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTT TGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGG GAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCG TAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG GTGGGAGGTCTATATAAGCAGCGCGTTTTGCCTGTACTGGGTCTC TCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAG GGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTC AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGAT CCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCG CCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTC TCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGA GGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGG CTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGG GAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGG AAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGA GCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGA AGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGAC AGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCT CTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGC TTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGC ACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGA GGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAA TTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGG TGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTG GGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGA CGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGC AGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGT TGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCC TGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTT GGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGA ATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACA CGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCT TAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGA ATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGA ATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCA

		TAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTG TACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTAT CGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCG AAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCA TTCGATTAGTGAACGGATCGGCACTGCGTGCGCCAATTCTGCAGA CAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATT GGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACA GACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAA AATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTA TCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCG AGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGT TTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTA CCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCA CTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTC CCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCT ATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCGGTACCCGGGTCG AGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTT AGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGA CCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCCCGA ATTACAGGCTAGCTATCAGGATCCTACGAGGCGCGCCAGATAGAA TTCTCTTGGGCCTCAAGGGCCATGAGTTAACCAGTTCTAGATGTG ACTCATGTCAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAACCTCTGG ATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTG CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATC ATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATA AATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCA GGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCA CTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTT TCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCT GCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACA ATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGC TCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCT ACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCC TGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTC AGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACC GTCGACCTCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCA ATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAG AGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAA GACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAA AAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGAC AAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCC CTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGATCAGATATCCAC TGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCAAGAGA

		AGGTAGAAGAAGCCAATGAAGGAGAGAACACCCGCTTGTTACACC CTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTATTAG AGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACATGGCCCGAG AGCTGCATCCGGACTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCT GAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGC CTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTC TGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGT CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCA GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCC TCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTC CTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG TGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGG GAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGC TCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGG TATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTG GTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCG CCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCC GGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTC CGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAG GGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTT CGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTG TTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTT GATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAAT GAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATG TGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCA GAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTG GAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGC ATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCA TCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATG GCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTG CCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCC TAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCG GATCTGATCAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATAT CGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAA GTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGCGACGTCGCCGG AGCGGTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTT CGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCT GTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCT GGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTG GTCGGAGGTCGTGTCCACGAACTTCCGGGACGCCTCCGGGCCGGC CATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCT GCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCA

		GGACTGACACGTGCTACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTA TGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGAT GATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCC CAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG CATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAG TTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTAT ACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCT GTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACAT ACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCA GTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG CGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTC GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGT ATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG GGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGC CAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT CCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG GTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCC TGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTAC CGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC TCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCG CTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCG CTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAG ACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAG CAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTG GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGC TCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG ATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTG CAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCC TTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTC ACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCAC CTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAG TATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAG TGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGT TGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTT ACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTC ACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGC CGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTC TATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAA TAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTC ACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACG ATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT TAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGC

10

20

30

40

50

		AGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTAC TGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTC AACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTC TTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAC TTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACT CTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCAC TCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGT TTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGG AATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTT TCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG ATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCC GCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGG AGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCT GATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTG GAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGG CAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGG CGTTTTGCGCTGCTTCG
22	タウタンパク質アミノ酸1-441(GenBankアクセッション番号NP_005901)	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKE SPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAA AQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGT GSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPK TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKK VAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQP GGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDL SKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSP RHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL

配列番号23-34 -タウアミノ酸151-441の領域内で現在同定されている抗タウ-scFv-V (セット #1)エピトープの配列		
23	scFv-V-hPEST	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRAED TALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKDYLAWYQK KPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVAVY YCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLP VSCAWESGMKRHRAACASASINV
24	scFv-V-hPEST-C441A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRAE DTALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKDYLAW YQKKPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAED VAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQD ASTLPVSAAWESGMKRHRAACASASINV
25	scFv-V-hPEST-D433A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKD YLAWYQKKPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIN RLQAEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDF PPEVEEQAASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
26	scFv-V-hPEST-E428A-E430A-E431A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKDYL AWYQKKPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQ AEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPAV AAQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
27	scFv-V-hPEST-E444A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKDYL AWYQKKPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQ AEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEV EEQDASTLPVSCAWASGMKRHRAACASASINV

28	scFv-V-hPEST-K448A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKDYL AWYQKKPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQ AEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEV EEQDASTLPVSCAWESGMARHRAACASASINV
29	scFv-V-hPEST-P426A/P427A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKD YLAWYQKKPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIN RLQAEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDF AAEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
30	scFv-V-hPEST-P438A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKDYL AWYQKKPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQ AEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEV EEQDASTLAVSCAWESGMKRHRAACASASINV
31	scFv-V-hPEST-S435A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKDYL AWYQKKPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQ AEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEV EEQDAATLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
32	scFv-V-hPEST-S440A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKDYL AWYQKKPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQ AEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEV EEQDASTLPVACAWESGMKRHRAACASASINV

33	scFv-V-hPEST-S445A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRAED TALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKDYLAWYQ KKPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVAV YYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTL PVSCAWEAGMKRHRAACASASINV
34	scFv-V-hPEST-スクランブル	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRAED TALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSDIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKDYLAWYQ KKPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVAV YYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYAACCGEHPIRPPVEDFE ESRASSTASAWLANMVQNKPVSDA
配列番号35-46 - タウアミノ酸151-441の領域内で現在同定されている抗タウ-scFv- N (セット#2)エピトープの配列		
35	scFv-N-hPEST	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRAEDTA LYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYLAWYQQKP GQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVAVYYC QHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVS CAWESGMKRHRAACASASINV
36	scFv-N-hPEST-C441A	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRAED TALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYLAWY QQKPGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDV AVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDA STLPVSAAWESGMKRHRAACASASINV
37	scFv-N-hPEST-D433A	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRAED TALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYLAWY QQKPGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDV AVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQAA STLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV

38	scFv-N-hPEST-431A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRA EDTALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYLA WYQQKPGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQA EDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPAV AAQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
39	scFv-N-hPEST-E444A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYL AWYQQKPGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQ AEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEV EEQDASTLPVSCAWASGMKRHRAACASASINV
40	scFv-N-hPEST-K448A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKD YLAWYQQKPGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIN RLQAEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDF PPEVEEQDASTLPVSCAWESGMARHRAACASASINV
41	scFv-N-hPEST-P426A/P427A	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRA EDTALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYL AWYQQKPGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQ AEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFAAE VEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
42	scFv-N-hPEST-P438A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKD YLAWYQQKPGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINR LQAEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPP EVEEQDASTLAVSCAWESGMKRHRAACASASINV

43	scFv-N-hPEST-S435A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLR AEDTALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYL AWYQQKPGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQ AEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEV EEQDAATLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
44	scFv-N-hPEST-S440A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRA EDTALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYLA WYQQKPGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQ AEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPE VEEQDASTLPVACAWESGMKRHRAACASASINV
45	scFv-N-hPEST-S445A	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRA EDTALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDY LAWYQQKPGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRL QAEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPE VEEQDASTLPVSCAWEAGMKRHRAACASASINV
46	scFv-N-hPEST-スクランブル	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRA EDTALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYLA WYQQKPGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQA EDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYPYDVPDYAACCGEHPIR PPVEDFEESRASSTASAWLANMVQNKPVSDA

配列番号47-58 - タウアミノ酸151-276及び368-391の領域内で現在同定されている抗タウ-scFv- F (セット#3)エピトープの配列		
47	scFv-F-hPEST	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKG LEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQ DSNPYPLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVS CAWESGMKRHRAACASASINV
48	scFv-F-hPEST-C441A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGK GLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CLQDSNPYPLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDAS TLPVSAAWESGMKRHRAACASASINV
49	scFv-F-hPEST-D433A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGK GLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CLQDSNPYPLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQAAST LPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
50	scFv-F-hPEST-E428A-E430A-E431A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGK GLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC LQDSNPYPLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPAVAAQDASTL PVSCAWESGMKRHRAACASASINV
51	scFv-F-hPEST-E444A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKG LEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDS NPYPLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCA WASGMKRHRAACASASINV

52	scFv-F-hPEST-K448A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKG LEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQ DSNPYPLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPV SCAWESGMARHRAACASASINV
53	scFv-F-hPEST-P426A/P427A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGL EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDSNPY PLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFAAEVEEQDASTLPVSCAWES GMKRHRAACASASINV
54	scFv-F-hPEST-P438A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGL EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDSNPY PLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLAVSCAWES GMKRHRAACASASINV
55	scFv-F-hPEST-S435A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKG LEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDSN PYPLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDAATLPVSCAW ESGMKRHRAACASASINV
56	scFv-F-hPEST-S440A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKG LEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL QDSNPYPLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLP VACAWESGMKRHRAACASASINV

57	scFv-F-hPEST-S445A	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKG LEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDS NPYPLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCA WEAGMKRHRAACASASINV
58	scFv-F-hPEST-スクランブル	MQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGL EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDSNP YPLLTFGGGTKAAAYPYDVPDYAACCGEHPIRPPVEDFEESRASSTA SAWLANMVQNKPVSDA
配列番号59-64 - タウアミノ酸151-276及び368-391の領域内で現在同定されている抗タウ-scFv- A（セット#4)エピトープの配列		
59	scFv-A-hPEST	MQVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDFAGAIAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI VLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASHGINNYLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPLT FGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMK RHRAACASASINV
60	scFv-A-hPEST-P426A/P427A	MQVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDFAGAIAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASHGINNYLAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSF PLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFAAEVEEQDASTLPVSCAWES GMKRHRAACASASINV
61	scFv-A-hPEST-D433A	MQVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDFAGAIAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASHGINNYLAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANS FPLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQAASTLPVSCAWE SGMKRHRAACASASINV

62	scFv-A-hPEST-C441A	MQVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDFAGAIAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASHGINNYLAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSF PLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSAAWES GMKRHRAACASASINV
63	scFv-A-hPEST-S445A	MQVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDFAGAIAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SEIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASHGINNYLAWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAN SFPLTFGGGTKAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAW EAGMKRHRAACASASINV
64	scFv-A-hPEST-スクランブル	MQVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDFAGAIAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SEIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASHGINNYLAWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAN SFPLTFGGGTKAAAYPYDVPDYAACCGEHPIRPPVEDFEESRASST ASAWLANMVQNKPVSDA
配列番号65-81 -抗タウ-scFv (VH)の配列		
65	抗タウscFv (VH) A	QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDFAGAIAYWGQGTLVTVSS
66	抗タウscFv (VH) B	QVQLQQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDLVGAKGNWGQGTLVTVSS
67	抗タウscFv (VH) C	QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDFAGAIAYWGQGTLVTVSS
68	抗タウscFv (VH) D	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRA EDTALYFCAKDGPAVGNPQGYFDFWGRGTLVTVSS

69	抗タウscFv（VH）E	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVASMSYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDLRGALDYWGQGTLVTVSS
70	抗タウscFv（VH）F	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKG LEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARDGIAARSGYYGMDVWGQGTLVTVSS
71	抗タウscFv（VH）G	QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDFAGAIAYWGQGTLVTVSS
72	抗タウscFv（VH）K	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGL RAEDTALYFCAKDGPAVGNPQGYFDFWGRGTLVTVSS
73	抗タウscFv（VH）M	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDLPDSNGYWGQGTLVTVSS
74	抗タウscFv（VH）N	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGL RAEDTALYFCAKDGPAVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSS
75	抗タウscFv（VH）O	QVQLVQSGGGVVHPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVASMSYDGNNKYYADSVKGRFTTPRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDLRGALDYWGQGTLVTVSS
76	抗タウscFv（VH）Q	QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDFAGAIAYWGQGTLVTVSS
77	抗タウscFv（VH）S	QVQLQQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWARQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKDLVGAKGNWAQGTLVTVSS
78	抗タウscFv（VH）T	QVQLQQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKDLVGAKGNWGQGTLVTVSS

79	抗タウscFv (VH) V	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGL RAEDTALYFCAKDGPEVGNPGGYFDFWGRGTLVTVSS
80	抗タウscFv (VH) X	QVQLQQSGEGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAP GKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDLVGAKGNWGQGTLVTVSS
81	抗タウscFv (VH) Y	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVASMSYDGDNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDLRGALDYWGQGTLVTVSS
配列番号82-98 -抗タウ-scFv (VL)の配列		
82	抗タウscFv (VL) A	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASHGINNYLAWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTK
83	抗タウscFv (VL) B	EIVLTQSPSTLSASVGERVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPK VLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYS TYLWTFGQGTK
84	抗タウscFv (VL) C	EIVLTQSPSILSASVGDRVTITCRASHGINNYLAWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA NSFPWTFGQGTK
85	抗タウscFv (VL) D	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYLAWYQQ KPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVA VYYCQHYYSYPLTFGQGTK
86	抗タウscFv (VL) E	EIVLTQSPSTLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGLLPEDFASYFCQQASV FPVTFGGGTK
87	抗タウscFv (VL) F	EIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDSNPYP LLTFGGGTK
88	抗タウscFv (VL) G	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASHGINNYLAWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANS FPLTFARTK

89	抗タウscFv（VL）K	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYLAWYQQK PGQSPRLLISWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVAVY YCQHYYSYPLTFGQGTK
90	抗タウscFv（VL）M	DVVMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASENINRWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRCSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCHQ YTTYLWTFGQGTK
91	抗タウscFv（VL）N	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKDYLAWYQQK PGQSPRLLIPWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVAV YYCQHYYSYPLTFGQGTK
92	抗タウscFv（VL）O	EIVLTQSPSTLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKL LIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGLLPEDFASYFCQQASV FPVTFARTK
93	抗タウscFv（VL）Q	EICVTQSPSFLSASVGDRVTITCRASHGINNYLAWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTK
94	抗タウscFv（VL）S	EIVLTQSPSTLSASVGERVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPK VLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYS TYLWTFGQGTK
95	抗タウscFv（VL）T	EIVLTQSPSTLSASVGERVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPK VLIYKASSLESGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYS TYLWTFGQGTK
96	抗タウscFv（VL）V	DIVMTKSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSKNKDYLAWYQK KPGQSPRLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVA VYYCQHYYSYPLTFGQGTK
97	抗タウscFv（VL）X	EIVLTQSPSTLSASVGERVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKV LIYKASSLESGVPSFRSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYST YLWTFGQGTK
98	抗タウscFv（VL）Y	EIVLTQSPSTLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAP KLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGLLPEDFASYFCLQA SVFPVTFGGGTK

99	ハンチンチンタンパク質(GenBankアクセッション番号NM_002111又はNP_002102	MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPP PPPPPPQLPQPPPQAQPLLPQPQPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRP KKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGIAMELFL LCSDDAESDVRMVADECLNKVIKALMDSNLPRLQLELYKEIKKNG APRSLRAALWRFAELAHLVRPQKCRPYLVNLLPCLTRTSKRPEES VQETLAAAVPKIMASFGNFANDNEIKVLLKAFIANLKSSSPTIRR TAAGSAVSICQHSRRTQYFYSWLLNVLLGLLVPVEDEHSTLLILG VLLTLRYLVPLLQQQVKDTSLKGSFGVTRKEMEVSPSAEQLVQVY ELTLHHTQHQDHNVVTGALELLQQLFRTPPPELLQTLTAVGGIGQ LTAAKEESGGRSRSGSIVELIAGGGSSCSPVLSRKQKGKVLLGEE EALEDDSESRSDVSSSALTASVKDEISGELAASSGVSTPGSAGHD IITEQPRSQHTLQADSVDLASCDLTSSATDGDEEDILSHSSSQVS AVPSDPAMDLNDGTQASSPISDSSQTTTEGPDSAVTPSDSSEIVL DGTDNQYLGLQIGQPQDEDEEATGILPDEASEAFRNSSMALQQAH LLKNMSHCRQPSDSSVDKFVLRDEATEPGDQENKPCRIKGDIGQS TDDDSAPLVHCVRLLSASFLLTGGKNVLVPDRDVRVSVKALALSC VGAAVALHPESFFSKLYKVPLDTTEYPEEQYVSDILNYIDHGDPQ VRGATAILCGTLICSILSRSRFHVGDWMGTIRTLTGNTFSLADCI PLLRKTLKDESSVTCKLACTAVRNCVMSLCSSSYSELGLQLIIDV LTLRNSSYWLVRTELLETLAEIDFRLVSFLEAKAENLHRGAHHYT GLLKLQERVLNNVVIHLLGDEDPRVRHVAAASLIRLVPKLFYKCD QGQADPVVAVARDQSSVYLKLLMHETQPPSHFSVSTITRIYRGYN LLPSITDVTMENNLSRVIAAVSHELITSTTRALTFGCCEALCLLS TAFPVCIWSLGWHCGVPPLSASDESRKSCTVGMATMILTLLSSAW FPLDLSAHQDALILAGNLLAASAPKSLRSSWASEEEANPAATKQE EVWPALGDRALVPMVEQLFSHLLKVINICAHVLDDVAPGPAIKAA LPSLTNPPSLSPIRRKGKEKEPGEQASVPLSPKKGSEASAASRQS DTSGPVTTSKSSSLGSFYHLPSYLKLHDVLKATHANYKVTLDLQN STEKFGGFLRSALDVLSQILELATLQDIGKCVEEILGYLKSCFSR EPMMATVCVQQLLKTLFGTNLASQFDGLSSNPSKSQGRAQRLGSS SVRPGLYHYCFMAPYTHFTQALADASLRNMVQAEQENDTSGWFDV LQKVSTQLKTNLTSVTKNRADKNAIHNHIRLFEPLVIKALKQYTT TTCVQLQKQVLDLLAQLVQLRVNYCLLDSDQVFIGFVLKQFEYIE VGQFRESEAIIPNIFFFLVLLSYERYHSKQIIGIPKIIQLCDGIM ASGRKAVTHAIPALQPIVHDLFVLRGTNKADAGKELETQKEVVVS MLLRLIQYHQVLEMFILVLQQCHKENEDKWKRLSRQIADIILPML AKQQMHIDSHEALGVLNTLFEILAPSSLRPVDMLLRSMFVTPNTM ASVSTVQLWISGILAILRVLISQSTEDIVLSRIQELSFSPYLISC TVINRLRDGDSTSTLEEHSEGKQIKNLPEETFSRFLLQLVGILLE DIVTKQLKVEMSEQQHTFYCQELGTLLMCLIHIFKSGMFRRITAA ATRLFRSDGCGGSFYTLDSLNLRARSMITTHPALVLLWCQILLLV NHTDYRWWAEVQQTPKRHSLSSTKLLSPQMSGEEEDSDLAAKLGM

		CNREIVRRGALILFCDYVCQNLHDSEHLTWLIVNHIQDLISLSHE PPVQDFISAVHRNSAASGLFIQAIQSRCENLSTPTMLKKTLQCLE GIHLSQSGAVLTLYVDRLLCTPFRVLARMVDILACRRVEMLLAAN LQSSMAQLPMEELNRIQEYLQSSGLAQRHQRLYSLLDRFRLSTMQ DSLSPSPPVSSHPLDGDGHVSLETVSPDKDWYVHLVKSQCWTRSD SALLEGAELVNRIPAEDMNAFMMNSEFNLSLLAPCLSLGMSEISG GQKSALFEAAREVTLARVSGTVQQLPAVHHVFQPELPAEPAAYWS KLNDLFGDAALYQSLPTLARALAQYLVVVSKLPSHLHLPPEKEKD IVKFVVATLEALSWHLIHEQIPLSLDLQAGLDCCCLALQLPGLWS VVSSTEFVTHACSLIYCVHFILEAVAVQPGEQLLSPERRTNTPKA ISEEEEEVDPNTQNPKYITAACEMVAEMVESLQSVLALGHKRNSG VPAFLTPLLRNIIISLARLPLVNSYTRVPPLVWKLGWSPKPGGDF GTAFPEIPVEFLQEKEVFKEFIYRINTLGWTSRTQFEETWATLLG VLVTQPLVMEQEESPPEEDTERTQINVLAVQAITSLVLSAMTVPV AGNPAVSCLEQQPRNKPLKALDTRFGRKLSIIRGIVEQEIQAMVS KRENIATHHLYQAWDPVPSLSPATTGALISHEKLLLQINPERELG SMSYKLGQVSIHSVWLGNSITPLREEEWDEEEEEEADAPAPSSPP TSPVNSRKHRAGVDIHSCSQFLLELYSRWILPSSSARRTPAILIS EVVRSLLVVSDLFTERNQFELMYVTLTELRRVHPSEDEILAQYLV PATCKAAAVLGMDKAVAEPVSRLLESTLRSSHLPSRVGALHGVLY VLECDLLDDTAKQLIPVISDYLLSNLKGIAHCVNIHSQQHVLVMC ATAFYLIENYPLDVGPEFSASIIQMCGVMLSGSEESTPSIIYHCA LRGLERLLLSEQLSRLDAESLVKLSVDRVNVHSPHRAMAALGLML TCMYTGKEKVSPGRTSDPNPAAPDSESVIVAMERVSVLFDRIRKG FPCEARVVARILPQFLDDFFPPQDIMNKVIGEFLSNQQPYPQFMA TVVYKVFQTLHSTGQSSMVRDWVMLSLSNFTQRAPVAMATWSLSC FFVSASTSPWVAAILPHVISRMGKLEQVDVNLFCLVATDFYRHQI EEELDRRAFQSVLEVVAAPGSPYHRLLTCLRNVHKVTTC
100	scFv-C4-hPEST	MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRYFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSAL TQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGAYNYVSWYQQYPGKAPKLLIYD VSNRPSGISNRFSGSKSGDTASLTISGLQAEDEADYYCSSFANSGPLF GGGTKVTVLGAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWE SGMKRHRAACASASINV
101	scFv-C4-hPEST -S440A	MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDRYFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGAYNYVSWYQQYPGKA PKLLIYDVSNRPSGISNRFSGSKSGDTASLTISGLQAEDEADYYCSS FANSGPLFGGGTKVTVLGAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDAS TLPVACAWESGMKRHRAACASASINV

102	scFv-C4-hPEST-E428A-E430A-E431A	MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAP GKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDRYFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGAYNYVSWYQQYP GKAPKLLIYDVSNRPSGISNRFSGSKSGDTASLTISGLQAEDEADY YCSSFANSGPLFGGGTKVTVLGAAAYPYDVPDYANPDFPPAVA AQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
103	scFv-C4-hPEST-E444A	MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDRYFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGAYNYVSWYQQYPGKA PKLLIYDVSNRPSGISNRFSGSKSGDTASLTISGLQAEDEADYYCS SFANSGPLFGGGTKVTVLGAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDAS TLPVSCAWASGMKRHRAACASASINV
104	scFv-C4-hPEST-P438A	MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDRYFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQS ALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGAYNYVSWYQQYPGKAPKLL IYDVSNRPSGISNRFSGSKSGDTASLTISGLQAEDEADYYCSSFANS GPLFGGGTKVTVLGAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLAVS CAWESGMKRHRAACASASINV
105	scFv-C4-hPEST-T436A	MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDRYFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGAYNYVSWYQQYPGK APKLLIYDVSNRPSGISNRFSGSKSGDTASLTISGLQAEDEADYY CSSFANSGPLFGGGTKVTVLGAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEE QDASALPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
配列番号106-107 -抗ハンチンチンscFv配列		
106	C4 VH	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAP GKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVK.GRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDRYFDLWGRGTLV
107	C4 VL	QSALTQPAS.VSGSPGQSITISCTGTSSDIGAYNYVSWYQQYPGK APKLLIYDVSNRPSGIS.NRFSGSKSGDTASLTISGLQAEDEADYY CSSFANSGPLFGGGTKVTVL

108	抗ハンチンチンVL12.3	QPVLTQSPSVSAAPRQRVTISVSGSNSNIGSNTVNWIQQLPGRAP ELLMYDDLLAPGVSDRFSGSRSGTSASLTISGLQSEDEADYYAAT WDDSLNGWVFGGGTKVTVL
165	抗ハンチンチンscFv: C4	MSRAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRYFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALT QPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGAYNYVSWYQQYPGKAPKLLIYDVS NRPSGISNRFSGSKSGDTASLTISGLQAEDEADYYCSSFANSGPLFGGGT KVTVLG
種々の配列		
109	プログラム可能なプロテアソームターゲティングヒトPESTドメイン配列	NPDFX$_1$ X$_2$X$_3$VX$_4$X$_5$QX$_6$AX$_7$X$_8$ LX$_9$VX$_{10}$X$_{11}$AWX$_{12}$X$_{13}$GMX$_{14}$RHRAACASASINV
110-132	PESTデグロン変種配列	図15、図29、及び図35を参照
133	(Gly4Ser)4リンカー	図1を参照
134	6x Hisタグ	
135-138	CAGリピート	
139	リンカー	Gly Gly Gly Ser
140	リンカー	Ser Gly Gly Gly
141	リンカー	Gly Gly Gly Gly Ser
142	リンカー	Ser Gly Gly Gly Gly
143	リンカー	Gly Gly Gly Gly Gly Ser
144	リンカー	Ser Gly Gly Gly Gly Gly
145	リンカー	Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
146	リンカー	Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
147	リンカー	(Gly Gly Gly Gly Ser)n、式中nは1つ又は複数の整数である
148	リンカー	(Ser Gly Gly Gly Gly)n、式中nは1つ又は複数の整数である
149	免疫グロブリン重鎖シグナルペプチド配列(SS)	MEFGLSWLFLVAILKGVQG

150	ペネトラチン(PEN)、細胞透過性ペプチド、ショウジョウバエ(Drosphilia)アンテナペディアホメオドメインに由来	RQIKIWFQNRRMKWKK
151	TAT、細胞透過性ペプチド、HIV-1転写トランス活性化因子(TA)タンパク質(HIV-1 TAT)に由来	YGRKKRRQRRR
152	435b、ファージディスプレイライブラリーに由来する合成CPP	GPFHFYQFLFPPV
153	抗ボツリヌス神経毒軽鎖A (BoNT/A LC) VHH: B8	MCAASGSIFSIYAMGWYRQAPGKQRELVAAISSYGSTNYADSVKGR FTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNADIATMTAVGGFDYWG QGTQVTVSS
154	N77K-HA-hPEST	MSRQVQLVESGGGGLVQPGGSLRLSCVTPGGIFSDYAMGWYR QAPGKQRELVADITVSDTTRYSDPVKGRFTISRDNAKDMVYLQ MNSLKPEDAAIYTCNAQKWEDRYGSSERYDYWGQGTQVTVSSA HHSEDPAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGM KRHRAACASASINV
155	SS-PEN-N77K-HA-hPEST	MEFGLSWLFLVAILKGVQGRQIKIWFQNRRMKWKKSRQVQLVESG GGGLVQPGGSLRLSCVTPGGIFSDYAMGWYRQAPGKQRELVADITV SDTTRYSDPVKGRFTISRDNAKDMVYLQMNSLKPEDAAIYTCNAQK WEDRYGSSERYDYWGQGTQVTVSSAHHSEDPAAAYPYDVPDYNPD FPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
156	SS-TAT-N77K-HA-hPEST	MEFGLSWLFLVAILKGVQGYGRKKRRQRRRSRQVQLVESGGGGLVQ PGGSLRLSCVTPGGIFSDYAMGWYRQAPGKQRELVADITVSDTTRYSD PVKGRFTISRDNAKDMVYLQMNSLKPEDAAIYTCNQKWEDRYGSSER YDYWGQGTQVTVSSAHHSEDPAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDAS TLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV

157	SS-435B-N77K-HA-hPEST	MEFGLSWLFLVAILKGVQGGPFHFYQFLFPPVSRQVQLVESGGGGLV QPGGSLRLSCVTPGGIFSDYAMGWYRQAPGKQRELVADITVSDTTRYS DPVKGRFTISRDNAKDMVYLQMNSLKPEDAAIYTCNAQKWEDRYGS SERYDYWGQGTQVTVSSAHHSEDPAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEE QDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
158	SS-N77K-HA-hPEST（对照）	MEFGLSWLFLVAILKGVQGSRQVQLVESGGGGLVQPGGSLRLSCVTP GGIFSDYAMGWYRQAPGKQRELVADITVSDTTRYSDPVKGRFTISRD NAKDMVYLQMNSLKPEDAAIYTCNAQKWEDRYGSSERYDYWGQGT QVTVSSAHHSEDPAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAW ESGMKRHRAACASASINV
159	抗BoNT/A SS-PEN-B8-HA-hPEST	MEFGLSWLFLVAILKGVQGRQIKIWFQNRRMKWKKSRQAHVQLQQ SGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSIYAMGWYRQAPGKQRELVAAISSYG STNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNADIATMT AVGGFDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPV SCAWESGMKRHRAACASASINV
160	SS-PEN-C4-HA-hPEST	MEFGLSWLFLVAILKGVQGRQIKIWFQNRRMKWKKSRAQVQLQESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRYFD LWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSSDIGAYNYVSWYQQYPGKAPKLLIYDVSNRPSGISNRFSGSKSGDTA SLTISGLQAEDEADYYCSSFANSGPLFGGGTKVTVLGAAAYPYDVPDY ANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
161	SS-PEN-DB1-HA-hPEST	MEFGLSWLFLVAILKGVQGRQIKIWFQNRRMKWKKSRAEVQLQAS GGGFVQPGGSLRLSCAASGFTSWEDTMGWFRQAPGKEREFVSAISFDA NDLSDTSVYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAV ASFEILLYGESLHIYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQ DASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
162	SS-PEN-N-HA hPEST	MEFGLSWLFLVAILKGVQGRQIKIWFQNRRMKWKKSRQVQLVESGG GLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAAISGSGDN TYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRAEDTALYFCAKDGPAVGN PGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSLLYSSNNKDYLAWYQQKPGQSPRLLIPWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYP YDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
163	SS-PEN-VH14-HA-hPEST	MEFGLSWLFLVAILKGVQGRQIKIWFQNRRMKWKKSRSSQVQLQ QSGPGRVKPSQTLSLACVISGDTVSSKTVSWNWIRQSPSRGLEWLGRT YFWPKWYTEYGASVKGRITIHPDTSKNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCAR SKTKRPPYYYAGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSGILGSGGGGSGILAA AYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV

164	SS-PEN-VH14-HA-hPEST-V1	MEFGLSWLFLVAILKGVQGRQIKIWFQNRRMKWKKSRSSQVQLQ QSGPGRVKPSQTLSLACVISGDTVSSKTVSWNWIRQSPSRGLEWLGRTY FWPKWYTEYGASVKGRITIHPDTSKNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCARSK TKRPPYYYAGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSGILGSGGGGSGILAAAY PYDVPDYANPDFAAEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
500	PEN-N77K-HA-hPEST	MRQIKIWFQNRRMKWKKSRQVQLVESG GGGLVQPGGSLRLSCVTPGGIFSDYAMGWYRQAPGKQRELVADITV SDTTRYSDPVKGRFTISRDNAKDMVYLQMNSLKPEDAAIYTCNAQK WEDRYGSSERYDYWGQGTQVTVSSAHHSEDPAAAYPYDVPDYNPD FPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
501	TAT-N77K-HA-hPEST	MYGRKKRRQRRRSRQVQLVESGGGGLVQ PGGSLRLSCVTPGGIFSDYAMGWYRQAPGKQRELVADITVSDTTRYSD PVKGRFTISRDNAKDMVYLQMNSLKPEDAAIYTCNQKWEDRYGSSER YDYWGQGTQVTVSSAHHSEDPAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDAS TLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
502	435B-N77K-HA-hPEST	MGPFHFYQFLFPPVSRQVQLVESGGGGLV QPGGSLRLSCVTPGGIFSDYAMGWYRQAPGKQRELVADITVSDTTRYS DPVKGRFTISRDNAKDMVYLQMNSLKPEDAAIYTCNAQKWEDRYGS SERYDYWGQGTQVTVSSAHHSEDPAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEE QDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
503	抗BoNT/A PEN-B8-HA-hPEST	MRQIKIWFQNRRMKWKKSRQAHVQLQQ SGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSIYAMGWYRQAPGKQRELVAAISSYG STNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNADIATMT AVGGFDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPV SCAWESGMKRHRAACASASINV
504	PEN-C4-HA-hPEST	MRQIKIWFQNRRMKWKKSRAQVQLQESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRYFD LWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSSDIGAYNYVSWYQQYPGKAPKLLIYDVSNRPSGISNRFSGSKSGDTA SLTISGLQAEDEADYYCSSFANSGPLFGGGTKVTVLGAAAYPYDVPDY ANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
505	PEN-DB1-HA-hPEST	MRQIKIWFQNRRMKWKKSRAEVQLQAS GGGFVQPGGSLRLSCAASGFTSWEDTMGWFRQAPGKEREFVSAISFDA NDLSDTSVYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAV ASFEILLYGESLHIYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYANPDFPPEVEEQ DASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV

506	PEN-N-HA hPEST	MRQIKIWFQNRRMKWKKSRQVQLVESGG GLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAAISGSGDN TYYADSVKGRFTISRDNSENTVHLQMAGLRAEDTALYFCAKDGPAVGN PGGYFDFWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSLLYSSNNKDYLAWYQQKPGQSPRLLIPWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTINRLQAEDVAVYYCQHYYSYPLTFGQGTKAAAYP YDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
507	PEN-VH14-HA-hPEST	MRQIKIWFQNRRMKWKKSRSSQVQLQ QSGPGRVKPSQTLSLACVISGDTVSSKTVSWNWIRQSPSRGLEWLGRT YFWPKWYTEYGASVKGRITIHPDTSKNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCAR SKTKRPPYYYAGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSGILGSGGGGSGILAA AYPYDVPDYANPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV
508	PEN-VH14-HA-hPEST-V1	MRQIKIWFQNRRMKWKKSRSSQVQLQ QSGPGRVKPSQTLSLACVISGDTVSSKTVSWNWIRQSPSRGLEWLGRTY FWPKWYTEYGASVKGRITIHPDTSKNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCARSK TKRPPYYYAGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSGILGSGGGGSGILAAAY PYDVPDYANPDFAAEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRHRAACASASINV

【実施例】

【０１５３】

本明細書に記載される実施形態の例が、下記の実施例において提供される。下記の実施例は、単なる説明として、また当業者を助力するために提示される。実施例は、いかなる場合でも他の状況で本実施形態の範囲を限定すると意図されない。

【０１５４】

（実施例１）

－分解のためにシヌクレインをプロテアソームへと最も効率的に標的化する抗α－シヌクレインイントラボディの同定、研究概要。

本明細書に記載されるように、タンパク質のミスフォールディングを防止すると同時に、マウスオルニチンデカルボキシラーゼ由来のＰＥＳＴデグロン（ｍＰＥＳＴ）への融合を介して、分解のためにそれらの結合カーゴをプロテアソームへと標的化する二機能性プロテアソームターゲティングイントラボディが開発された。本明細書に記載されるように、α－シヌクレイン低減のレベルは、ヒトＰＥＳＴデグロンで制御され得る。これは複数の系で作動することが実証されている。いかなる理論にも拘束されることなく、細胞の正常なタンパク質除去プロセスを使用したα－シヌクレインタンパク質の標的分解は、フォールディングに利用可能なα－シヌクレインの量を低減させ、したがって、シヌクレイノパチー（ｓｙｎｕｃｌｅｉｎｏｐａｔｈｉｅｓ）の生理学的影響を低減させ得る。

細胞の正常なタンパク質除去プロセスを使用したシヌクレインタンパク質の標的分解は、ミスフォールディングに利用可能なシヌクレインの量を低減させ、シヌクレイン関連神経変性疾患に起因して、又はＳＣＩ後に細胞毒性を低減させる。

【０１５５】

（実施例２）

－二機能性抗シヌクレイン－ＰＥＳＴイントラボディのヒト化。

ＰＥＳＴデグロンを、ヒトの使用のために最適化した。この目標を達成するために、マウスＰＥＳＴデグロン（ｍＰＥＳＴ）をヒトＰＥＳＴ（ｈＰＥＳＴ）デグロンで置換した。オルニチンデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）遺伝子由来のマウス及びヒトＰＥＳＴデグロンの比較を表３に示す。ｈＰＥＳＴデグロンは、ＧＦＰ転写レポーターに移入され、それらの半減期をＧＦＰ－ｍＰＥＳＴレポーターと類似した程度に低減することができる。ｈ

ＰＥＳＴデグロンの、抗シヌクレインイントラボディへの融合は、ｍＰＥＳＴデグロンと同程度効率的に、分解のためにシヌクレインをプロテアソームへと誘導する。したがって、ｈＰＥＳＴデグロンを、ヒトオルニチンデカルボキシラーゼから抗α－シヌクレインイントラボディＶＨ１４にクローニングした。ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴは、マウスＳＴ１４Ａ神経前駆細胞において、シヌクレイン－ＧＦＰ蛍光をＶＨ１４－ｍＰＥＳＴと類似したレベルに低減させた（図２）。α－シヌクレイン－ＧＦＰをＶＨ１４－ｍＰＥＳＴ又はＶＨ１４－ｈＰＥＳＴのいずれかと同時トランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、細胞のライブ画像処理を行った。

【０１５６】

ウェスタンブロット分析により、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴがヒトα－シヌクレイン－ＧＦＰの定常状態のタンパク質レベルをＶＨ１４－ｍＰＥＳＴと同程度に低減したように、ライブセルイメージングの結果が確認された。図２に示されるように、ＶＨ１４－ｍＰＥＳＴ及びＶＨ１４－ｈＰＥＳＴトランスフェクト細胞におけるα－シヌクレイン－ＧＦＰモノマーは、空のベクター対照と比較して低減された。ＶＨ１４－ｍＰＥＳＴ及びＶＨ１４－ｈＰＥＳＴはまた、空のベクター対照試料において観察されたα－シヌクレイン－ＧＦＰの高分子種の存在も低減させた。アクチンは、ローディング対照としてプローブされた。グラフは、ウェスタンブロットシグナルのデンシトメトリック分析を示す。各バーは、空のベクター対照のパーセンテージとして表される汎シヌクレイン／アクチンローディング対照を表す。

【０１５７】

パーキンソン病患者由来の患者由来人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）は、シヌクレインアルファ（ＳＮＣＡ）遺伝子（α－シヌクレインをコードするＳＮＣＡトリプリケーション（ＲＵＣＤＲ；ＮＤ５００４０））におけるコピー数変異の増加を伴って樹立した。この変異を有する患者は、常染色体優性パーキンソン病を発症する。続いて、Ｓｅｒｇｉｕ Ｐａｓｃａ社によって開発され、当該技術分野において既知のヒトｉＰＳＣ ３次元（３Ｄ）脳オルガノイドプロトコールに関して最適化を行った。このプロトコールを利用する培養物は、主にニューロンからなるが、マクログリアも含むヒト神経細胞の直径およそ１～３ｍｍの球である脳オルガノイドを生じる。このプロトコールは、その高い再現性並びに皮質層Ｖ中に存在するＣＴＩＰ２陽性ニューロンを含む全ての主要な大脳皮質細胞型を産生し、それらの軸索を、視床（皮質視床ニューロン）、線条体（皮質線条体ニューロン）、橋（皮質橋ニューロン）、視蓋（皮質視蓋ニューロン）、及び脊髄（皮質脊髄運動ニューロン、ＣＳＭＮ）などの脳深部構造へ送る能力のため選択された。内因性シヌクレインの過剰発現は、ウェスタンブロッティングによって野生型（ＷＴ）の健常対照と比較してＳＮＣＡ遺伝子トリプリケーション（３Ｘ ＳＮＣＡ）を有するヒトｉＰＳＣ由来３Ｄオルガノイド６０日齢皮質ニューロンにおいて検証された（図３）。図に示されるように、３Ｘ－ＳＮＣＡ及びＷＴのｉＰＳＣは、３Ｄ前脳オルガノイドに分化させた。ｉｎ ｖｉｔｒｏで６０日（ＤＩＶ）後、オルガノイドをウェスタンブロッティング用に回収した。総タンパク質２０μｇ（左の４レーン）又は１０μｇ（レーン５及び６）をゲル電気泳動によって分離し、ＰＶＤＦ膜に転写した。内因性シヌクレインは、ＭＪＦＲ１抗シヌクレイン抗体（１：１０００；Ａｂｃａｍ ＃ａｂ１３８５０１）を使用して検出した。ＧＡＰＤＨは、ローディング対照（１：１０，０００；Ａｂｃａｍ、＃ａｂ１８１６０２）として使用した。

【０１５８】

ヒトニューロンにおけるα－シヌクレインの標的分解を評価するために、ＷＴ及び３Ｘ－ＳＮＣＡ ３Ｄ皮質オルガノイドを、ヒトＰＥＳＴデグロンを有する抗α－シヌクレインＶＨ１４（ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ）、又はスクランブルＰＥＳＴデグロン対照を有するＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ（ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ－Ｓｃｒ）のいずれかを発現する誘導性レンチウイルスで形質導入した。図４Ａは、Ｔｅｔ－Ｏｎ誘導性抗シヌクレインレンチウイルス構築物の設計を示す。簡潔に述べると、抗シヌクレインｍＰＥＳＴ及びｈＰＥＳＴイントラボディを、ｐＴｅｔ－Ｏ－Ｎｇｎ２－ｐｕｒｏ（Ａｄｄｇｅｎｅプラスミド ＃５

２０４７）にサブクローニングした。Ｎｇｎ２挿入物を、ＶＨ１４－ｍＰＥＳＴ、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ、ＶＨ１４－ｍＰＥＳＴ－スクランブル対照、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ－スクランブル対照、ＶＨＨ－Ｂ８－ｍＰＥＳＴ、及びＶＨＨ－Ｂ８－ｈＰＥＳＴで置き換えた。５’クローニング部位はＥｃｏＲＩであり、３’クローニング部位はＸｂａＩであった。処置の３０日後、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴは、エンプティウイルス対照及びＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ－Ｓｃｒ対照と比較して内因性α－シヌクレインレベルを有意に低減させた（図４Ｂ）。簡潔に述べると、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴは、３Ｘ　ＳＮＣＡ前脳オルガノイドにおいて内因性ヒトα－シヌクレインのレベルを低減させた。免疫蛍光法は、空のベクター（ＥＶ）処置オルガノイド及びスクランブル（Ｓｃｒ）ＰＥＳＴに融合されたＶＨ１４で処置されたオルガノイドと比較してＶＨ１４－ｈＰＥＳＴを保有するレンチウイルスで形質導入した（ｎ＝３）オルガノイドにおいてα－シヌクレイン（ＭＪＦＲ１；Ａｂｃａｍ、Ｇｒｅｅｎ）レベルの低減を示す。オルガノイドにおけるα－シヌクレインシグナルのデンシトメトリック定量化により、ＶＨ１４処置コホートの両方において標的タンパク質の統計学的に有意な低減が確認される。（全て****ｐ＜０．０００１）。これらの実験は、その誘導様式に起因して遺伝的及び代謝的な異常を含有し得る不死化腫瘍由来の細胞株に依存するこれまでのイントラボディ薬物スクリーニングモデルに対する大幅な改善である。更に、かかる株での実験は、その連続的な増殖に起因して、通常、短い時間枠（２～４日）に限定される。ヒトｉＰＳＣ由来の培養物は、ヒト神経細胞及び疾患表現型をより忠実にシミュレートすることによって、これらの限定を克服する。

【０１５９】

（実施例３）

－ｉｎ　ｖｉｖｏ研究のための対照イントラボディの開発。

ＰＥＳＴタグ付きイントラボディのタンパク質過剰発現及びプロテアソーム分解の両方の影響を制御するために、対照単一ドメインイントラボディを、検査系のいずれにおいても発現されない抗原に対して生成した。ＶＨＨ－Ｂ８は、ボツリヌス神経毒に結合する十分に特性決定されたラクダ科ナノボディであり、検査系において優れた細胞内溶解性を示している。

【０１６０】

予想通り、ｈＰＥＳＴを有するボツリヌス毒素（Ｂ８）を標的化する二機能性イントラボディ（Ｂ８－ｈＰＥＳＴ）は、ヤツメウナギＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰ（ＤＹ－ｓｙｎ～ＧＦＰ）の定常状態タンパク質レベルの除去を変更しない（図５）。簡潔に述べると、ＳＴ１４Ａニューロン細胞に、ＤＹ－ｓｙｎ～ＧＦＰ及びＢ８－ｈＰＥＳＴ又は空のベクター対照のいずれかを同時トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後、細胞のライブセルイメージングを行い、続いて、ウェスタンブロッティング用に回収した。ＤＹ－ｓｙｎ～ＧＦＰに関するライブセルイメージング（スケールバー２００μｍ）。代表的なウェスタンブロッティングは、上述の通りである。内因性ヒトα－シヌクレイン及びｈＰＥＳＴデグロンに関するイントラボディの、プロテアソームに対する標的会合を決定するために、Ｎ７７Ｄ－ｍＰＥＳＴ、Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ７７Ｄ－ｍＰＥＳＴ－スクランブル対照、及びＮ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ－スクランブル対照イントラボディを、ピューロマイシン耐性を有するテトラサイクリン誘導性レンチウイルスベクターにクローニングして、安定した遺伝子選択を可能にした（表３）。

【表５】

表 3. 試験用に生成したイントラボディ構築物

				ベクター骨格		
	イントラボディ	タイプ	抗原	pcDNA3.1(-)	pAAV-MCS	pTetO-Fuw (I.U./mL)
1	VH14-mPEST	単一ドメイン、VH	ヒトα-シヌクレイン シヌクレイン	1000 ng/μL	1000 ng/μL	1.14 x 10^8
2	VH14-mPEST-スクランブル			1000 ng/μL	1000 ng/μL	1.10 x 10^8
3	VH14-hPEST			1000 ng/μL	1000 ng/μL	1.34 x 10^8
4	VH14-hPEST-スクランブル			1000 ng/μL	1000 ng/μL	4.14 x 10^8
5	VH14-hPEST-P426/427A			1000 ng/μL	1000 ng/μL	1.34 x 10^8
6	VH14-hPEST-D433A			1000 ng/μL	1000 ng/μL	1.34 x 10^8
7	VH14-hPEST-S445A			1000 ng/μL	1000 ng/μL	3.97 x 10^8
8	VH14-hPEST-C441A (不活性バリアント)			1000 ng/μL	1000 ng/μL	1.34 x 10^8
9	N77D-mPEST	ラクダ科単一ドメイン、VHH	ヒトα-シヌクレイン ヤツメウナギ DY-シヌクレイン	1000 ng/μL	1000 ng/μL	--
10	N77D-mPEST-スクランブル			1000 ng/μL	1000 ng/μL	--
11	N77D-hPEST			1000 ng/μL	1000 ng/μL	9.02 x 10^7
12	N77D-hPEST-スクランブル			1000 ng/μL	1000 ng/μL	6.07 x 10^7
13	DB1-pmCherry		ヒトα-シヌクレイン ヤツメウナギ DY-シヌクレイン	1000 ng/μL	--	--
14	DB1-hPEST			1000 ng/μL	--	--
15	B8-mPEST		ボツリヌス神経毒(抗原対照)	1000 ng/μL	1000 ng/μL	1.08 x 10^9
16	B8-hPEST			1000 ng/μL	1000 ng/μL	2.22 x 10^8

【０１６１】

（実施例４）

－ヒト及びモデル生物のシヌクレインを標的化する候補イントラボディの同定。

ヤツメウナギは、ヒトシヌクレインに対して有意な相同性を有する３種のシヌクレインアイソフォーム（ＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰ、ＦＤ－シヌクレイン～ＧＦＰ、及びｓｙｎ３～ＧＦＰ）を発現する。ＲＳニューロンにおいて最も豊富に発現されるシヌクレインアイソフォームは、γ－シヌクレインであるＤＹ－シヌクレインであり、それはヒトα－シヌクレインの最初の９０アミノ酸に対しておよそ７０％同一であり、およそ９０％類似している。ヒトα－シヌクレイン及びヤツメウナギのシヌクレインは、それらのＮ末端ド

メインにおいて高度に保存されており（図６におけるヒトα－シヌクレインタンパク質の図を参照）、公開された研究により、それらが類似した生化学的特性（例えば、脂質膜結合）及びニューロンにおける機能的効果（例えば、シナプス小胞輸送）を有することが確認された。ＳＣＩ後のヒトα－シヌクレイン毒性を低減するための最適な治療標的を同定するために、α－シヌクレインの主要領域のそれぞれに誘導される一連の二機能性抗α－シヌクレインイントラボディを生成し、プロテアソームターゲティングモチーフに融合させた（図６）。凝集傾向にあるα－シヌクレインの非アミロイド構成要素（ＮＡＣ）疎水性ドメインに対するＶＨ１４、ＶＨＨ－４Ｃ、ＶＨＨ－４Ｃ－Ｎ７７Ｄ、及びＤＢ１の提唱されるイントラボディ結合部位の位置は、ミスフォールディングに重要であることが示されている。

【０１６２】

ヤツメウナギＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰ、ＦＤ－シヌクレイン～ＧＦＰ、及びｓｙｎ３－シヌクレイン～ＧＦＰを、哺乳動物ｐｃＤＮＡ３．１発現プラスミドにクローニングした。これらのプラスミドの配列検証後、ＳＴ１４Ａニューロン細胞株におけるそれらの発現を検証した（図７）。図は、ヤツメウナギシヌクレインの発現を示す。ＤＹ－ｓｙｎ～ＧＦＰ、ＦＤ－ｓｙｎ～ＧＦＰ、及びＳｙｎ３～ＧＦＰを別々にＳＴ１４Ａニューロン細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後、細胞のライブセルイメージングを行った。細胞のサブセットでは、ＤＹ－シヌクレインは、α－シヌクレイン凝集を示す斑点を形成する（図７挿入図）。ＤＹ－シヌクレインは、ヤツメウナギシヌクレインの主要な変種であるため、予備研究では初期の焦点は最初にこれに当てられた。ヒトα－シヌクレインｄ５ＰＥＳＴ、ＶＨ１４ＰＥＳＴ、ＮＡＣ３２ＰＥＳＴ、ｓｙｎ２ＰＥＳＴ、及びｓｙｎ８７ＰＥＳＴに対する樹立されたイントラボディをヤツメウナギＤＹ－シヌクレインに対してスクリーニングしたが、ヤツメウナギＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰの大幅なターンオーバーは培養系では観察されなかった。７５％配列相同性を共有する異なる種由来の抗原タンパク質に対する抗体は概して、交差反応すると予測される。ＤＹ－シヌクレイン分解の欠如は、ヒトα－シヌクレインとヤツメウナギＤＹシヌクレインとの間の配列相同性の差に起因する可能性が高い。というのは、それらが互いと６７％配列相同性を共有するに過ぎないためである。

【０１６３】

（実施例５）

－新規抗シヌクレインナノボディの開発。

ヒトα－シヌクレイン及びヤツメウナギのＤＹ－シヌクレインに交差反応することができるイントラボディを同定するために、ＶＨＨナノボディを、Ｈｙｂｒｉｂｏｄｙサービスによって産生した。ラクダ科単一ドメインナノボディをＤＹシヌクレインに対してスクリーニングした。ラクダ科動物は、軽鎖を欠如した特有の種類の免疫グロブリンを産生し、したがって、重鎖抗体（ＨＣＡｂ）と称される。ラクダ科ＨＣＡｂは、多くの抗原に関して従来の抗体と類似の結合親和性を示す。しかしながら、従来の抗体とは異なり、ＨＣＡｂは単一可変重鎖（ＶＨＨ）を使用して、エピトープに結合し、可変重鎖及び軽鎖の両方で構成される単鎖抗体Ｆｖ断片を特徴とするヒンジ構造の必要性を排除する。ラクダ科ＶＨＨナノボディは、それらが広範な抗原結合レパートリーを有し、またそれらの小さなサイズ、高い溶解性、熱安定性、リフォールディング能力、ｉｎ　ｖｉｖｏでの良好な組織透過、及び特有のエピトープに結合する能力などの、治療研究用途で非常に好適な特性を示すために選択された。このアプローチにより、ＤＢ１と名付けられた抗体が同定された（配列番号５）：

ＭＡＥＶＱＬＱＡＳＧＧＧＦＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＳＷＥＤＴＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＳＡＩＳＦＤ
ＡＮＤＬＳＤＴＳＶＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＴＹＹＣＡＶＡＳＦＥＩＬＬＹ
ＧＥＳＬＨＩＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳ

【０１６４】

（実施例６）

－イントラボディスクリーニング。

２種の更なる抗シヌクレイン－ＶＨＨ単一ドメインイントラボディ、ＶＨＨ－４Ｃ及びＶＨＨ－４Ｃ－Ｎ７７Ｄ（本明細書ではＮ７７Ｄと称される）をスクリーニングした。これらのイントラボディは、上記で使用されたように免疫化されたファージミドシヌクレインアルパカＶＨＨ免疫ライブラリー（Ａｄｄｇｅｎｅ　＃１０００００００７１）に由来していたが、会合しているタンパク質のＴａｔベースの認識による機能的リガンド結合同定を介して単離した。Ｎ７７Ｄは、計算上の親和性成熟によって開発され、その親とアミノ酸１つ分異なる（Ｎ７７Ｄ）。Ｎ７７Ｄは、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）実験によって検証された会合速度の増加を通じて、ＶＨＨ－４Ｃのマイクロモル濃度親和性と比較して、α－シヌクレインに対してナノモル濃度親和性の増強を示した。Ｎ７７Ｄ－ｍＰＥＳＴは、ヤツメウナギＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰ（図８Ａ）及びヒトα－シヌクレイン～ＧＦＰ（図８Ｂ）の定常状態レベルをおよそ４０％低減させた。

【０１６５】

このシヌクレイン過剰発現系において、ＶＨＨ－４Ｃ－ＰＥＳＴは、空のベクター対照に比べて、ＤＹ－シヌクレインの可溶性モノマーレベルを増加させた（図８Ａ）。ＶＨＨ－４Ｃ－ＰＥＳＴはまた、空のベクター対照に比べてα－シヌクレインのレベルを増加させた（図８Ｂ）。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、レベルの増強は、シヌクレインをプロテアソームに引き込む能力の減少に起因し得る。無細胞実験に基づいて、またいかなる理論にも拘束されることを望まないが、ＶＨＨ－４Ｃは、ＤＹ－シヌクレインに結合し得るが、ＤＹ－シヌクレインをプロテアソームに再誘導するのに十分な親和性を有さない。この結合反応は、タンパク質の正常なターンオーバーを潜在的に低減させ得る。しかしながら、毒性を示すであろう明白な細胞死の兆候は観察されず、図７に示されるように凝集シヌクレインを反映するＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰ斑点の兆候は観察されなかった。Ｎ７７Ｄのシヌクレインに対する親和性の増強は、ＶＨＨ－４Ｃと比較して細胞内の機能活性の増加に関与し得る。

【０１６６】

Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴがＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰ（図８Ａ）及びα－シヌクレイン～ＧＦＰ（図８Ｂ）の分解を有意に増加させることを検証した後、ヒトオルニチンデカルボキシラーゼ由来のＰＥＳＴデグロン（ｈＰＥＳＴ）を、ＶＨＨ－Ｎ７７Ｄにクローニングし、Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴが、ＳＴ１４Ａラット中型有棘ニューロン前駆細胞における分解のためにヤツメウナギＤＹ－シヌクレイン～ＧＦＰをプロテアソームへ再誘導することができることを決定した（図９）。

【０１６７】

Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴの特異性対オフターゲット結合について検討した。β－シヌクレイン及びγ－シヌクレインを、ＧＦＰ－ｐｃＤＮＡ３．１（－）プラスミドにクローニングし、β－シヌクレイン～ＧＦＰ及びγ－シヌクレイン～ＧＦＰ融合タンパク質を生成した。次に、ＳＴ１４Ａ細胞に、β－シヌクレイン～ＧＦＰ又はγ－シヌクレイン～ＧＦＰのいずれか及び空のベクター対照、Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ－Ｓｃｒ対照、又はＢ８－ｈＰＥＳＴ対照のいずれかを同時トランスフェクトした。Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴは、β－シヌクレイン～ＧＦＰ（図１０Ａ）の分解もγ－シヌクレイン～ＧＦＰ（図１０Ｂ）の分解も有意に変化させなかった。

【０１６８】

（実施例７）

－ヒトＰＥＳＴを使用した細胞内タンパク質の制御分解。

本方法は、ヒトＯＤＣを使用し、特定場所に変異を創出させることによって分解のレベルを制御する（図１５Ａ～図１５Ｂ）。本発明者等は、指定部位でＰＥＳＴ配列を変化させることによって、ヒトα－シヌクレインの種々のレベルの分解が達成されることを示した。Ｃ４４１Ａは、ＰＥＳＴ配列を不活性にし、空のベクター対照と比較して、観察されるα－シヌクレインの明らかな増加を引き起こす。空のベクター対照に対する分解の有意な増加は、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ改変Ｓ４４５Ａ及びＤ４３３Ａを用いた場合に観察された（図１１）。Ｓ４４５Ａ及びＤ４３３Ａと比較して分解の有意な増加が、ＶＨ１４－ｈ

ＰＥＳＴ改変Ｐ４２６Ａ及びＰ４２７Ａ（複合型変異）を用いた場合に観察された（図１１）。これは、種々のレベルの分解が種々のＰＥＳＴ改変を用いた場合に達成可能であることを示している。

【０１６９】

図１５Ａ～図１５Ｂに示されるように、タンパク質の分解の増加を達成するためにタンパク質をプロテアソームへと標的化するための配列番号１に対するＰＥＳＴデグロン中に存在し得る変異は、１つ又は複数のプロリン（Ｐ）残基のアラニン（Ａ）残基への変異、例えばＰ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ（即ち、２つの連続したＰ残基の２つの連続したＡ残基への変異）、１つ又は複数のアスパラギン酸（Ｄ）残基の、残基への変異、例えばＤ４３３Ａ、１つ又は複数のセリン（Ｓ）残基のＡ残基への変異、例えばＳ４４５Ａ、及び／又は１つ又は複数のリジン（Ｋ）残基のＡ残基への変異、例えばＫ４４８Ａなどであり得る。一部の実施形態では、更なる変異が、タンパク質、例えばα－シヌクレインの分解を増強するためにヒトＯＤＣ　ＰＥＳＴデグロンの１つ又は複数のアミノ酸残基において行われてもよい。

他の実施形態では、タンパク質の分解の低減を達成するためにタンパク質をプロテアソームへと標的化するための本明細書に記載されるような配列番号１に対するＰＥＳＴデグロン中に存在し得る変異は、Ｐ残基のＡ残基への変異、例えばＰ４３８Ａ、グルタミン酸（Ｅ）残基のＡ残基への変異、例えばＥ４４４Ａ、Ｓ残基のＡ残基への変異、例えばＳ４４０Ａ、及び／又はスレオニン（Ｔ）残基のＡ残基への変異、例えばＴ４３６Ａであってもよい。

【０１７０】

（実施例８）

－ヒトオルニチンデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）ＰＥＳＴ（ｈＰＥＳＴ）デグロン変種。

ヒトプロリン（Ｐ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン酸（Ｄ）、セリン（Ｓ）及びスレオニン（Ｔ）（ＰＥＳＴ）デグロン融合を介して、分解のためにα－シヌクレインをプロテアソームへと標的化するイントラボディのパネルを開発した。図１５Ａ～図１５Ｂは、この研究で同定されたＰＥＳＴデグロン変種を示す。ｈＰＥＳＴデグロン内の或る特定の変異（灰色で強調）は、イントラボディ及びその結合抗原の標的分解を変化させる。ＰＥＳＴデグロンは、上段で灰色に網掛けされている（ＯＤＣアミノ酸４２３～４５０）。

【０１７１】

（実施例９）

－α－シヌクレインタンパク質の分解を増加又は減少させる変異に関する有効性試験。

α－シヌクレインの分解を増加させるための変異の有効性の試験は、タンパク質結合、トランスロケーションなどのあらゆる方法を使用して行われる。例えば、Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａ、及び／又はＫ４４８Ａなどを含むがこれらに限定されない変異は、本明細書に記載されるようなヒトＰＥＳＴデグロン配列（配列番号１）に導入される。可視化のために、ＧＦＰマーカー又は他の適切なスクリーニング可能なマーカーを使用して、タンパク質のプロテアソームへのトランスロケーションを可視化することが可能である。適切な対照は、比較のために、またタンパク質のプロテアソームへの輸送を増加させる際の変異の成功を決定するのに使用される。残基４４１でのシステイン（Ｃ）からＡへの変異（Ｃ４４１Ａ又はＣ２０Ａ）は、この変異が治療効果を有さないため対照として使用することができる。

【０１７２】

更に、同じ方法を使用して、アラニン（Ａ）の代わりにグリシン（Ｇ）を使用する変異のサブセットを作製及び検査する。

【０１７３】

（実施例１０）

－ｉＰＳＣ由来皮質ニューロンにおけるα－シヌクレイン及びｈＰＥＳＴデグロンに対するイントラボディの、プロテアソームへの標的会合の検証。

本明細書に記載されるようなＰＥＳＴデグロンは、図１３に示されるように、ｉＰＳＣ由来の皮質及び中脳オルガノイド系において使用される。α－シヌクレインをコードするＳＮＣＡ遺伝子におけるコピー数変異の増加を有するパーキンソン病患者由来の患者由来人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）（ＳＮＣＡトリプリケーション（ＲＵＣＤＲ；ＮＤ５００４０））及び健常なドナー由来のｉＰＳＣを対照として使用する。この変異を有する患者は、常染色体優性パーキンソン病を発症する。この最適化スクリーニングに使用される検査系は、野生型ｉＰＳＣ由来皮質前脳及び中脳オルガノイドの、二機能性抗α－シヌクレイン－ｈＰＥＳＴイントラボディによるレンチウイルス形質導入である。本明細書に記載される候補イントラボディは、テトラサイクリン誘導性ｐＴｅｔＯ－ピューロマイシン耐性レンチウイルスベクターにサブクローニングされ、続いて３０日目に皮質又は中脳オルガノイドに形質導入される。内因性二機能性α－シヌクレイン分解は、免疫蛍光染色によって、及び抗シヌクレインモノクローナル抗体ＭＪＦＲ１（１：１，０００）を用いた定量的ウェスタンブロッティングによって検証される。ＨＡタグ付きイントラボディは、モノクローナル抗ＨＡ（１：５，０００、Ｃｏｖａｎｃｅ）でプローブされる。試料は、モノクローナル（抗アクチン；１：１０００、Ｓｉｇｍａ又は抗ＧＡＰＤＨ；１：１０，０００　Ａｂｃａｍ）抗体を有するアクチン又はＧＡＰＤＨハウスキーピングタンパク質のいずれかに対して正規化する。デンシトメトリーは、Ｉｍａｇｅ　Ｊソフトウェアで定量化する。処置群１つ当たりｎが３の試料を分析する。

【０１７４】

（実施例１１）

－ラットＳＴ１４Ａ神経前駆細胞におけるヒトＰＥＳＴデグロンを有する二機能性抗シヌクレイン（ｓｙｎｃｕｌｅｉｎ）イントラボディを使用した細胞内シヌクレインタンパク質の制御分解。

タウの分解を所望レベルへ変化させるｈＰＥＳＴデグロン変種を同定するために、ＳＴ１４Ａニューロン細胞にα－シヌクレイン～ＧＦＰ及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｃ４４１Ａ、Ｓ４４５Ａ、不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照（ＳＣＲ）、又は抗原対照（Ｂ８－ｈＰＥＳＴ）のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、試料を以下のために収集した：（Ａ）ライブセル画像解析。（Ｂ）ウェスタンブロット。（Ｃ）相対的なタンパク質発現は、α－シヌクレイン対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ対照に対して正規化した。ヒトＰＥＳＴデグロン変種は、空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較してタンパク質分解レベルの変化をもたらした（図１２）。複合型変異変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａは、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴと比較してシヌクレイン発現の変化を、また空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較して有意な（ｐ＜０．００１）タンパク質分解レベルをもたらした。ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ及びＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ変種Ｄ４３３Ａは、ＥＶ　ＣＯＮと比較してシヌクレインを有意に低減させた（Ｐ＜０．０１）。

【０１７５】

（実施例１２）

－ｉＰＳＣ由来中脳ニューロンにおけるヒトＰＥＳＴデグロンを有する抗シヌクレインイントラボディ抗体を使用した細胞内タンパク質の制御分解。

本方法は、ヒトＯＤＣを使用し、特定場所に変異を創出させることによって分解のレベルを制御する（図１５Ａ～図１５Ｂ）。本発明者等は、指定部位でＰＥＳＴ配列を変化させることによって、ヒトα－シヌクレインの種々のレベルの分解が達成されることを示した。本明細書に記載されるようなＰＥＳＴデグロンは、図１３に示されるように、ｉＰＳＣ由来中脳オルガノイド系において使用した。α－シヌクレインをコードするＳＮＣＡ遺伝子におけるコピー数変異の増加を有するパーキンソン病患者由来の患者由来人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）（ＳＮＣＡトリプリケーション（ＲＵＣＤＲ；ＮＤ５００４０））及び健常なドナー由来のｉＰＳＣを対照として使用した。この変異を有する患者は、常染色体優性パーキンソン病を発症する。この最適化スクリーニングに使用される検査系は、野

生型ｉＰＳＣ由来中脳オルガノイドの、二機能性抗α－シヌクレイン－ｈＰＥＳＴイントラボディによるレンチウイルス形質導入であった。本明細書に記載される候補イントラボディは、テトラサイクリン誘導性ｐＴｅｔＯ－ピューロマイシン耐性レンチウイルスベクターにサブクローニングされ、続いて３０日目に中脳オルガノイドに形質導入された。内因性二機能性α－シヌクレイン媒介性分解は、６０日目に免疫蛍光染色によって検証された。処置群１つ当たりｎが３の試料を分析した。ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴを用いた場合に、空のベクター対照及びＶＨ１４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ（不活性ＰＥＳＴデグロン対照）に対する分解の有意な増加が観察された。ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ変種Ｓ４４５Ａ、Ｄ４３３Ａ、並びにＰ４２６Ａ及びＰ４２７Ａ（複合型変異）は、ＶＨ１４－ＰＥＳＴと比較して分解の増加を示した（図１３）。これは、種々のレベルの分解が疾患関連細胞型における長期にわたる発現後に種々のＰＥＳＴ改変を用いた場合に達成可能であることを示している。

【０１７６】

実施例１１及び実施例１２について、トランスフェクション－ニューロン特性を示すラット前駆細胞（ＳＴ１４Ａ）を、トランスフェクションに利用した。ＳＴ１４Ａ細胞は、標準的なプロトコールを使用して培養した。細胞をトランスフェクションのために１２ウェルプレートに培養した。ウェル１つ当たりｐｒｋ５－ＧＦＰ－α－シヌクレイン０．７５μｇ及び１ウェル１つ当たりｐｃＤＮＡ３．１（－）発現イントラボディ発現ベクターにおいて発現される抗α－シヌクレイン－ｈＰＥＳＴ又は抗－α－シヌクレイン－ｈＰＥＳＴ変種２．２５μｇを使用して、同時トランスフェクションを実施した。細胞に一過的にトランスフェクトするために、ＰＥＩ　ＤＮＡトランスフェクション試薬を利用した。トランスフェクションの７２時間後、全ての培養物のイメージングを行い、その後、培養物をウェスタンブロット分析用に回収した。

【０１７７】

ウェスタンブロッティング－トランスフェクションの７２時間後、ＧＦＰ発現についてＳＴ１４Ａ細胞のイメージングを行った。イメージング後、試料をトリプシン処理によって６ウェルプレートから収集した。細胞試料を、１×ＰＢＳで洗浄した後、ＲＩＰＡ緩衝液に加えて１×プロテアーゼ阻害剤カクテル（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１％ＮＰ４０、０．２５％デオキシコール酸ナトリウム、２％ＳＤＳ）を使用して細胞溶解を行った。続いて、試料を１０分間超音波処理した。ＤＣタンパク質アッセイを試料に対して実施し、タンパク質濃度データを作成した。タンパク質アッセイから、試料濃度は、２×変性試料緩衝液（１２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、４％ＳＤＳ、２０％グリセロール、１０％２－メルカプトエタノール、０．０２％ブロモフェノールブルー、ｐＨ６．８）中の１ｎｇ／ｍＬに対して正規化し、タンパク質の変性を確実にするために加熱した。各溶解物試料１０μｇを、４～２０％のＣｒｉｔｅｒｉｏｎプレキャストゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　＃４５６－１０９５）を使用したドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）により分離した。タンパク質は、トランスブロット半乾燥（ＳＤ）エレクトロブロッター（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して２４～２７Ｖで３０分間、ＰＤＶＦ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）にブロットした。ＰＤＶＦ膜は、総α－シヌクレイン（ＭＪＦＲＩ又はｓｙｎＩ；１：１，０００）及びＧＡＰＤＨ（ローディング対照として、Ａｂｃａｍ；１：５，０００）についてプローブした。

【０１７８】

（実施例１３）

－二機能性ＶＨ１４－ＰＥＳＴは、３Ｘ　ＳＮＣＡ変異を有するｉＰＳＣ由来中脳培養物において生存率を増強する。

抗シヌクレイン二機能性イントラボディの安全性及び有効性を検査するために、３ＸＳＮＣＡ遺伝子トリプリケーションを有する患者由来ｉＰＳＣ及び健常な対照（ＷＴ）由来のｉＰＳＣを、パーキンソン病に罹患した脳の領域である３Ｄ中脳オルガノイドに分化させた。３０日目に、オルガノイドを空のベクター対照（ＥＶ）、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ、ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａ

、又はスクランブルＰＥＳＴデグロン対照（ＳＣＲ）のいずれかで形質導入した。６０日目に、ＴＵＮＥＬアッセイとも呼ばれる末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼｄＵＴＰニック末端標識染色（ＤｅａｄＥｎｄ　Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ　ＴＵＮＥＬ系；Ｐｒｏｍｅｇａ　＃Ｇ３２５０）を使用して、細胞死を評価した。予想通り、変異体３Ｘ　ＳＮＣＡ中脳オルガノイドは、ＷＴ中脳オルガノイドと比較してＴＵＮＥＬ反応性の増加を示した（図１４）。ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴ及びＶＨ１４－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａで処置されたＷＴ又は３Ｘ　ＳＮＣＡ中脳オルガノイドでは、最小のＴＵＮＥＬ反応性が見られた（図１４）。不死化細胞（図１１及び図１２）及び中脳オルガノイド（図１３）において最も低いレベルのシヌクレイン低減を示すＶＨ１４－ｈＰＥＳＴは、長期にわたる処置後に細胞生存率の保存において最も強力なシヌクレイン低減ＶＨ１４－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａと同程度有効であった。したがって、治療効果を提供するための最小レベルのシヌクレイン低減は、この技術を用いて使用することができる。

【０１７９】

（実施例１４）

－分解のためにタウをプロテアソームへと最も効率的に標的化する抗タウイントラボディの同定、研究概要。

タウは、アルツハイマー病（ＡＤ）及び前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）などのタウオパチーなどの多くの神経変性疾患、並びに外傷性脳損傷（ＴＢＩ）及び脊髄損傷（ＳＣＩ）に関与するタンパク質である。タウオパチーは、タウタンパク質が凝集体へと蓄積すると起こり、ニューロン及びグリア細胞の機能不全並びに死の結果として神経学的症状をもたらす。したがって、異常タウタンパク質の標的分解は重要な治療標的である。イントラボディは、それらの標的上の様々なタンパク質コンホメーション及びエピトープに結合するよう設計及び選択することができる。更に、それらを更に操作して、標的タンパク質を核、小胞体、及びプロテアソームなどの種々の細胞コンパートメントにリロケートさせることができる（図１）。

【０１８０】

本明細書に記載されるように、タンパク質のミスフォールディングを防止すると同時に、ヒトオルニチンデカルボキシラーゼ由来のＰＥＳＴデグロン（ｈＰＥＳＴ）への融合を介して、分解のためにそれらの結合カーゴをプロテアソームへと標的化する二機能性プロテアソームターゲティングイントラボディを開発した。本明細書に記載されるように、タウ低減のレベルは、ヒトＰＥＳＴデグロンで制御することができる。これは複数の系で機能することが本明細書で実証されている。いかなる理論にも拘束されることなく、細胞の正常なタンパク質除去プロセスを使用したタウタンパク質の標的分解は、フォールディングに利用可能なタウの量を低減させ、したがって、タウオパチーの生理学的影響を低減し得る。

【０１８１】

（実施例１５）

－二機能性抗タウＰＥＳＴイントラボディのヒト化。

ＰＥＳＴデグロンは、マウスＰＥＳＴデグロン（ｍＰＥＳＴ）をヒトＰＥＳＴ（ｈＰＥＳＴ）デグロンで置換することによって、ヒトの使用のために最適化し得る。オルニチンデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）遺伝子由来のマウス及びヒトＰＥＳＴデグロンの比較を図１７に示す。ｈＰＥＳＴデグロンは、ＧＦＰ転写レポーターに移入され、それらの半減期をＧＦＰ－ｍＰＥＳＴレポーターと同様のレベルに低減させることができる。ｈＰＥＳＴデグロンの抗タウイントラボディへの融合は、ｍＰＥＳＴデグロンと同程度効率的に、分解のためにタウをプロテアソームへと誘導し得る。したがって、ｈＰＥＳＴデグロンを、ヒトオルニチンデカルボキシラーゼから抗タウイントラボディ上へクローニングする。

【０１８２】

不死化腫瘍由来細胞株を利用したこれまでの実験は、価値のある情報を生み出してきたが、それらはその誘導に起因して大きな限定を提示する。患者由来人工多能性幹細胞（ｉ

ＰＳＣ）は、ＣＮＳにおいて観察されるヒト疾患の表現型をより忠実にシミュレートすることによってこれらの限定を克服することができる。タウオパチーを有する患者由来のｉＰＳＣ株は、タウをコードする遺伝子において変異を伴って樹立される。次に、最適化は、Ｓｅｒｇｉｕ　Ｐａｓｃａ社によって開発され、当該技術分野において既知であるヒトｉＰＳＣ　３次元（３Ｄ）脳オルガノイドプロトコールを使用して行われる。このプロトコールを利用した培養物は、主にニューロンからなるが、マクログリアも含むヒト神経細胞の直径およそ１～３ｍｍの球である脳オルガノイドを生じる。このプロトコールは、その高い再現性並びに皮質層Ｖ中に存在するＣＴＩＰ２陽性ニューロンを含む全ての主要な大脳皮質細胞型を産生し、それらの軸索を、視床（皮質視床ニューロン）、線条体（皮質線条体ニューロン）、橋（皮質橋ニューロン）、視蓋（皮質視蓋ニューロン）、及び脊髄（皮質脊髄運動ニューロン、ＣＳＭＮ）などの脳深部構造へ送る能力のため選択された。本明細書に記載されるような変異を有する内因性タウの発現は、ウェスタンブロッティングによって野生型（ＷＴ）の健常な対照と比較して変異を有する３次元（３Ｄ）６０日齢皮質ニューロンにおいて検証される。

【０１８３】

図２８は、特定のエクソン及びイントロンにおける変異とともにＭＡＰＴ（タウ）遺伝子の概略図を示す。これらの変異として、下記の変異が挙げられるが、これらに限定されない：

エクソン１：Ｒ５Ｈ及びＲ５Ｌ；

エクソン２：Ｇ５５Ｒ；

エクソン３：Ｖ７５Ａ及びＡ９１Ｖ；

エクソン４：Ｑ１２４Ｅ；

エクソン７：Ａ１５２Ｔ、Ｄ１７７Ｖ、及びＡ１７８Ｔ；

エクソン９：Ｇ２０１Ｓ、Ｒ２２１Ｑ、Ａ２３９Ｔ、Ｋ２５７Ｔ、Ｉ２６０Ｖ、Ｔ２６３Ｐ、Ｌ２６６Ｖ、Ｇ２７２Ｖ、及びＧ２７３Ｒ；

イントロン９：Ｉ９－１０　Ｇ＞Ｔ、Ｉ９＋３３　Ｇ＞Ａ、及びＩ９－１５　Ｔ＞Ｃ；

エクソン１０：Ｎ２７９Ｋ、ΔＫ２８０、Ｌ２８４Ｌ、Ｌ２８４Ｒ、Ｓ２８５Ｒ、Ｎ２８６Ｎ、Ｖ２８７Ｉ、Ｎ２９６Ｄ、Ｎ２９６Ｈ、Ｎ２９６Ｎ、ΔＮ２９６、Ｋ２９８Ｅ、Ｐ３０１Ｌ、Ｐ３０１Ｓ、Ｐ３０１Ｔ、Ｇ３０３Ｖ、Ｇ３０４Ｓ、Ｓ３０５Ｉ、Ｓ３０５Ｎ、及びＳ３０５Ｓ；

イントロン１０：Ｉ１０＋３　Ｇ＞Ａ、Ｉ１０＋４　Ａ＞Ｃ、Ｉ１０＋１１　Ｔ＜Ｃ、Ｉ１０＋１２　Ｃ＞Ｔ、Ｉ１０＋１３　Ａ＞Ｇ、Ｉ１０＋１４　Ｃ＞Ｔ、Ｉ１０＋１６　Ｃ＞Ｔ、Ｉ１０＋１９　Ｃ＞Ｇ、Ｉ１０＋２５　Ｃ＞Ｔ、及びＩ１０＋２９　Ｇ＞Ａ；

エクソン１１：Ｌ３１５Ｌ、Ｌ３１５Ｒ、Ｋ３１７Ｍ、Ｋ３１７Ｎ、Ｓ３２０Ｆ、及びＰ３３２Ｓ；

エクソン１２：Ｇ３３５Ｓ、Ｇ３３５Ｖ、Ｑ３３６Ｒ、Ｖ３３７Ｍ、Ｅ３４２Ｖ、Ｄ３４８Ｇ、Ｑ３５１Ｒ、Ｓ３５２Ｌ、Ｓ３５６Ｔ、Ｖ３６３Ａ、Ｖ３６３Ｉ、Ｐ３６４Ｓ、Ｇ３６６Ｒ、及びＫ３６９Ｉ；

エクソン１３：Ｇ３８９Ｒ、Ｒ４０６Ｗ、Ｎ４１０Ｈ、Ｄ４１８Ｎ、Ｑ４２４Ｋ、及びＴ４２７Ｍ。

【０１８４】

ｉＰＳＣは、Ａ１５２Ｔ、Ｎ２７９Ｋ、Ｐ３０１Ｌ、Ｓ３０５Ｎ、ＩＶＳ１０＋１６、Ｇ３３５Ｓ、Ｇ３３５Ｖ、Ｖ３３７Ｍ、Ｇ３８９Ｒ、及びＲ４０６Ｗを含む上記で列挙した多数の変異に対してこれまでに調製されている（Ｋａｒｃｈ　ＰＭＩＤ：３１６３１０２０）。

【０１８５】

（実施例１６）

－ヒトＰＥＳＴ変種を使用した細胞内タンパク質の制御分解。

本明細書に記載されるように、タウ低減のレベルは、指定部位でＰＥＳＴ配列を変化させることによって、ヒトＰＥＳＴデグロンで制御することができる。図１８に示されるよ

うに、ｈＰＥＳＴデグロンは、不死化マウスＳＴ１４Ａ神経前駆細胞において、ｍＰＥＳＴデグロンよりもタウを大幅に低減させた（９２％対８４％低減）。簡潔に述べると、ＳＴ１４Ａ細胞に、ＧＦＰ－タウ及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｖ－ｍＰＥＳＴ、又はＶ－ｈＰＥＳＴのいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、試料を以下のために収集した：（Ａ）ライブセルイメージング。（Ｂ）ウェスタンブロット。（Ｃ）相対的なタンパク質発現は、総タウ対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ対照に対して正規化した。

【０１８６】

細胞内のタウタンパク質低減レベルを最適化するために、本発明者等は、タウアミノ酸１５１～４４１に対して選択される一連の抗タウ－ｈＰＥＳＴイントラボディ、Ｖ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ－ｈＰＥＳＴ、Ｆ－ｈＰＥＳＴ、及びＡ－ｈＰＥＳＴを生成した。続いて、本発明者等は、ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｅ４２８Ａ－Ｅ４３０Ａ－Ｅ４３１Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４３５Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｅ４４４Ａ、Ｋ４４８Ａ、Ｓ４４５Ａ、Ｃ４４１Ａ及びｈＰＥＳＴ－スクランブル抗タウ－ｈＰＥＳＴイントラボディ（Ｖ、Ｎ、及びＦ）を生成した。更に、本発明者等は、Ａ－ｈＰＥＳＴ用のｈＰＥＳＴ変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａ、Ｃ４４１Ａ、及びｈＰＥＳＴ－スクランブルを作製した。次に、イントラボディをｐｃＤＮＡ３．１（－）発現ベクターにサブクローニングした。図１９は、Ｖ－ｈＰＥＳＴ及びＮ－ｈＰＥＳＴイントラボディのｈＰＥＳＴ構築物配列を変動させることによるタウの制御分解を示す。ＳＴ１４Ａ細胞に、Ｖ－ｈＰＥＳＴ若しくはＮ－ｈＰＥＳＴのいずれか、又はそれら各々のｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａ、及びＣ４４１Ａを同時トランスフェクトした。対照構築物として、空のベクター（ＥＶ）及びマウスＰＥＳＴデグロンにおけるプロテアソーム認識に重要であるとこれまでに同定された残基であるＣ４４１をＡに変異させることによって本発明者等が作製し、ヒトデグロンを不活性にすることが示されている不活性ヒトＰＥＳＴデグロンが挙げられる。次に、Ｖ－ｈＰＥＳＴ及びＮ－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａ、及び複合型変種であるＰ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａを比較した。ＧＦＰ－タウとの同時トランスフェクションの７２時間後、複合型Ｖ－ｈＰＥＳＴ－Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ及びＮ－ｈＰＥＳＴ－Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ変種は、ＥＶ－ＣＯＮと比較してタウをおよそ２５％低減させた。Ｖ－ｈＰＥＳＴ－Ｄ４３３Ａ、Ｎ－ｈＰＥＳＴ－Ｄ４３３Ａ、Ｎ－ｈＰＥＳＴ－Ｓ４４５Ａ及びＮ－ｈＰＥＳＴ－Ｓ４４５Ａ－ｈＰＥＳＴ変種は、ＥＶ－ＣＯＮと比較して総タウのおよそ４０％低減をもたらした。これは、種々のレベルの分解が複数のイントラボディにわたる種々のＰＥＳＴ改変を用いた場合に達成可能であることを示している。

【０１８７】

タンパク質の分解の低減を達成するためにタンパク質をプロテアソームへと標的化するための本明細書に記載されるような配列番号１に対するＰＥＳＴデグロン中に存在し得る変異は、１つ又は複数のプロリン（Ｐ）残基のアラニン（Ａ）残基への変異、例えばＰ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ（即ち、２つの連続したＰ残基の２つの連続したＡ残基への変異）、１つ又は複数のアスパラギン酸（Ｄ）残基のＡ残基への変異、例えばＤ４３３Ａ、１つ又は複数のセリン（Ｓ）残基のＡ残基への変異、例えばＳ４４５Ａなどであり得る。

【０１８８】

他の実施形態では、タンパク質の分解の低減を達成するためにタンパク質をプロテアソームへと標的化するための本明細書に記載されるような配列番号１に対するＰＥＳＴデグロン中に存在し得る変異は、Ｐ残基のＡ残基への変異、例えばＰ４３８Ａ、グルタミン酸（Ｅ）残基のＡ残基への変異、例えばＥ４４４Ａ、Ｓ残基のＡ残基への変異、例えばＳ４４０Ａ、及び／又はスレオニン（Ｔ）残基のＡ残基への変異、例えばＴ４３６Ａであり得る。

【０１８９】

トランスフェクション－ニューロン特性を示すラット前駆細胞（ＳＴ１４Ａ）をトランスフェクションに利用した。ＳＴ１４Ａ細胞は、標準的なプロトコールを使用して培養し

た。
細胞をトランスフェクション用に６ウェルプレートに培養した。同時トランスフェクションは、ウェル１つ当たりｐｒｋ５－ＧＦＰ－タウ及びウェル１つ当たりｐｃＤＮＡ３．１（－）発現イントラボディ発現ベクターにおいて発現される抗タウ－ｈＰＥＳＴ又は抗タウ－ｈＰＥＳＴ変種を使用して実施した。ＰＥＩ　ＤＮＡトランスフェクション試薬を利用して、細胞に一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、全ての培養物のイメージングを行い、その後、培養物をウェスタンブロット分析用に回収した。

【０１９０】

ウェスタンブロッティング－トランスフェクションの７２時間後、ＧＦＰ発現についてＳＴ１４Ａ細胞のイメージングを行った。イメージング後、試料をトリプシン処理によって６ウェルプレートから収集した。細胞試料を、１×ＰＢＳで洗浄した後、ＲＩＰＡ緩衝液に加えて１×プロテアーゼ阻害剤カクテル（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１％ＮＰ４０、０．２５％デオキシコール酸ナトリウム、２％ＳＤＳ）を使用して細胞溶解を行った。続いて、試料を１０分間超音波処理した。ＤＣタンパク質アッセイを試料に対して実施し、タンパク質濃度データを作成した。タンパク質アッセイから、試料濃度は、２×変性試料緩衝液（１２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、４％ＳＤＳ、２０％グリセロール、１０％２－メルカプトエタノール、０．０２％ブロモフェノールブルー、ｐＨ６．８）中の１ｎｇ／ｍＬに対して正規化し、タンパク質の変性を確実にするために加熱した。各溶解物試料１０μｇを、４～２０％のＣｒｉｔｅｒｉｏｎプレキャストゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　＃４５６－１０９５）を使用したドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）により分離した。タンパク質は、トランスブロット半乾燥（ＳＤ）エレクトロブロッター（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して２４～２７Ｖで３０分間、ＰＤＶＦ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）にブロットした。ＰＤＶＦ膜は、総タウ（ＤＡ９；１：１，０００）及びＧＡＰＤＨ（ローディング対照として、Ａｂｃａｍ；１：５，０００）についてプローブした。続いて、免疫蛍光染色からのタウ分解の読み取りを、汎特異的抗タウモノクローナル抗体（１：１，０００）を用いたウェスタンブロッティングによって検証し、ＨＡタグ付きイントラボディをモノクローナル抗ＨＡ（１：５，０００、Ｃｏｖａｎｃｅ）でプローブした。試料は、モノクローナル（抗アクチン；１：１０００、Ｓｉｇｍａ又は抗ＧＡＰＤＨ；１：１０，０００　Ａｂｃａｍ）抗体を有するアクチン又はＧＡＰＤＨハウスキーピングタンパク質のいずれかに対して正規化した。デンシトメトリーは、Ｉｍａｇｅ　Ｊソフトウェアで定量化する。

【０１９１】

（実施例１７）

－ヒトオルニチンデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）ＰＥＳＴ（ｈＰＥＳＴ）デグロン変種。

ヒトプロリン（Ｐ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン酸（Ｄ）、セリン（Ｓ）及びスレオニン（Ｔ）（ＰＥＳＴ）デグロン融合を介して、分解のためにタウをプロテアソームへと標的化するイントラボディのパネルを開発した。図２９Ａ～図２９Ｂは、この研究で同定されたＰＥＳＴデグロン変種を示す。ＰＥＳＴデグロンは、上段で網掛けされている（ＯＤＣアミノ酸４２３～４５０）。ｈＰＥＳＴデグロン内の重要な単一（Ａ）及び複合型（Ｂ）変異（黄色で強調表示）は、イントラボディ及びその結合抗原の標的分解を変化させると予測される。これは、図２９Ａ～図２９Ｂにおいて緑色で強調されたものによって実証されている。

【０１９２】

（実施例１８）

－タウタンパク質の分解を増加又は減少させる変異に関する有効性試験。

タウの分解を増加させるための本明細書に記載されるような変異の有効性の試験は、タンパク質結合、トランスロケーションなどのためのあらゆる方法を使用して行われる。例えば、Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａなどを含むがこれらに限定されない変異は、本明細書に記載されるようなヒトＰＥＳＴデグロン配列（配列番号１）に導

入される。可視化のために、ＧＦＰマーカー又は他の適切なスクリーニング可能なマーカーを使用して、タンパク質のプロテアソームへのトランスロケーションを可視化することが可能である。適切な対照は、比較のために、またタンパク質のプロテアソームへの輸送を増加させる際の変異の成功を決定するのに使用される。残基４４１でのシステイン（Ｃ）からＡへの変異（Ｃ４４１Ａ）は、この変異が治療効果を有さないため対照と使用することができる。更に、同じ方法を使用して、アラニン（Ａ）の代わりにグリシン（Ｇ）を使用する変異のサブセットを作製及び検査する。

【０１９３】

（実施例１９）

－ｉＰＳＣ由来皮質ニューロンにおける二機能性抗タウ－ＰＥＳＴイントラボディの、内因性ヒトタウへの標的会合の検証。

オルガノイド分化－ＦＴＤ患者由来人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）は、二機能性抗タウ－ｈＰＥＳＴ及びｈＰＥＳＴ変種の検証に使用される。Ｓｅｒｇｉｕ Ｐａｓｃａ社によって開発され、当該技術分野において既知であるヒトｉＰＳＣ ３次元（３Ｄ）脳オルガノイドプロトコール。このプロトコールを利用した培養物は、主にニューロンからなるが、マクログリアも含むヒト神経細胞の直径およそ１ｍｍの球である脳オルガノイドを生じる（図３７）。このプロトコールは、その高い再現性並びに皮質層Ｖ中に存在するＣＴＩＰ２陽性ニューロンを含む全ての主要な大脳皮質細胞型を産生し、それらの軸索を、視床（皮質視床ニューロン）、線条体（皮質線条体ニューロン）、橋（皮質橋ニューロン）、視蓋（皮質視蓋ニューロン）、及び脊髄（皮質脊髄運動ニューロン、ＣＳＭＮ）などの脳深部構造へ送る能力のため選択された。

【０１９４】

二機能性抗タウ－ＰＥＳＴイントラボディの、ｉＰＳＣによって産生された内因性ヒトタウへの標的会合を評価するために、健常なドナー（ＷＴ）由来の３Ｄ皮質オルガノイドを、マウスＰＥＳＴデグロン（タウ－ｍＰＥＳＴ）イントラボディＶ－ｍＰＥＳＴ、Ｎ－ｍＰＥＳＴ、及びＦ－ｍＰＥＳＴとともに抗タウを発現する誘導性レンチウイルスで形質導入した。処置の２１日後、タウレベルを、ウェスタンブロッティングによってエンプティウイルス対照及び未処置の対照と比較した（以下の方法を参照）。図３７に示されるように、Ｖ－ＰＥＳＴ、Ｎ－ＰＥＳＴ、及びＦ－ＰＥＳＴは、未処置の対照（ＣＯＮ）及び空のベクター（ＥＶ）対照と比較して、内因性タウタンパク質レベルを有意に（ｐ＜０．０５）低減させた。更に、この結果は、二機能性抗タウ－ＰＥＳＴイントラボディが疾患関連細胞において機能することを実証している。これらの実験は、その誘導様式に起因して遺伝的及び代謝的な異常性を含有し得る不死化腫瘍由来細胞株に依存するこれまでのイントラボディ薬物スクリーニングモデルに対する大幅な改善である。更に、かかる株での実験は、その連続的な増殖のためにより短い時間枠（２～４日）に限定される傾向にある。ヒト疾患の表現型をより正確にシミュレートすることによって、ヒトｉＰＳ細胞由来培養物はこれらの限定を克服し、長期間にわたる治療薬の検査プラットフォームとして役立つ。

【０１９５】

ウェスタンブロッティング－レンチウイルス形質導入の２１日後、オルガノイド試料を、１×ＰＢＳで洗浄した後、ＲＩＰＡ緩衝液に加えて１×プロテアーゼ阻害剤カクテル（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ７．５、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、１％ ＮＰ４０、０．２５％デオキシコール酸ナトリウム、２％ＳＤＳ）を使用して細胞溶解を行った。試料を１０分間超音波処理した。ＤＣタンパク質アッセイを試料に対して実施し、タンパク質濃度データを作成した。タンパク質アッセイから、試料濃度は、２×変性試料緩衝液（１２５ｍＭ Ｔｒｉｓ、４％ＳＤＳ、２０％グリセロール、１０％２－メルカプトエタノール、０．０２％ブロモフェノールブルー、ｐＨ６．８）中の１ｎｇ／ｍＬに対して正規化し、タンパク質の変性を確実にするために加熱した。各溶解物試料１０μｇを、４～２０％のＣｒｉｔｅｒｉｏｎプレキャストゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ ＃４５６－１０９５）を使用したドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）により分離し

た。タンパク質は、トランスブロット半乾燥（ＳＤ）エレクトロブロッター（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して２４～２７Ｖで３０分間、ＰＤＶＦ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）にブロットした。ＰＤＶＦ膜は、総タウ（ＤＡ９；１：１，０００）及びＧＡＰＤＨ（ローディング対照として、Ａｂｃａｍ；１：５，０００）についてプローブした。免疫蛍光染色からのタウ分解の読み取りを、全てのタウアイソフォームを認識する抗タウモノクローナル抗体ＤＡ９（１：１，０００）を用いたウェスタンブロッティングにより検証し、ＨＡタグ付きイントラボディをモノクローナル抗ＨＡ（１：５，０００、Ｃｏｖａｎｃｅ）でプローブした。試料は、モノクローナル（抗ＧＡＰＤＨ；１：１０，０００　Ａｂｃａｍ）抗体を有するＧＡＰＤＨハウスキーピングタンパク質に対して正規化した。デンシトメトリーは、これまでに記載されるようにＩｍａｇｅ　Ｊソフトウェアで定量化する。

【０１９６】

（実施例２０）

－ＳＴ１４Ａ神経前駆細胞におけるヒトＰＥＳＴデグロンを有する二機能性抗タウイントラボディＶを使用したタウの制御分解。

タウの分解を所望レベルへ変化させるｈＰＥＳＴデグロン変種を同定するために、ＳＴ１４Ａニューロン細胞にＧＦＰ－タウ－（０Ｎ４Ｒ）及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｖ－ｈＰＥＳＴ、Ｖ－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４３５Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｃ４４１Ａ、Ｅ４４４Ａ、Ｓ４４５Ａ、又は不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照（ＳＣＲ）のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、試料を以下のために収集した：（Ａ）ライブセルイメージング。（Ｂ）ウェスタンブロット。（Ｃ）相対的なタンパク質発現は、総タウ対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ対照に対して正規化した。ヒトＰＥＳＴデグロン変種は、空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較してタンパク質分解レベルの変化をもたらした（図２０）。Ｖ－ＰＥＳＴ変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４３５Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｃ４４１Ａ及びＥ４４４Ａは、ＧＦＰ－タウを対照に比べて７５～１００％に低減させた。Ｖ－ＰＥＳＴ及びＶ－ＰＥＳＴ変種Ｓ４４５Ａは、ＧＦＰ－タウを対照の５０～７５％に低減させた。

【０１９７】

（実施例２１）

－ＳＴ１４Ａ神経前駆細胞におけるヒトＰＥＳＴデグロンを有する二機能性抗タウイントラボディＮを使用したタウの制御分解。

タウの分解を所望レベルへ変化させるｈＰＥＳＴデグロン変種を同定するために、ＳＴ１４Ａニューロン細胞にＧＦＰ－タウ－（０Ｎ４Ｒ）及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｎ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４３５Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｃ４４１Ａ、Ｅ４４４Ａ、Ｓ４４５Ａ、又は不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照（ＳＣＲ）のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、試料を以下のために収集した：（Ａ）ライブセルイメージング。（Ｂ）ウェスタンブロット。（Ｃ）相対的なタンパク質発現は、総タウ対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ対照に対して正規化した。ヒトＰＥＳＴデグロン変種は、空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較してタンパク質分解レベルの変化をもたらした（図２１）。Ｎ－ＰＥＳＴは、ＧＦＰ－タウを対照に比べて５０～７５％低減させ、Ｎ－ＰＥＳＴ変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｅ４４４Ａ、及びＫ４４８Ａ／Ｒ４４９Ａ／Ｈ４５０Ａは、ＧＦＰ－タウを対照に比べて２５～５０％低減させた。Ｎ－ＰＥＳＴ変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｓ４３５Ａ、Ｓ４４０Ａ、及びＳ４４５Ａは、ＧＦＰ－タウを対照に比べて０～２５％低減させた。Ｂ８－ＰＥＳＴ、Ｎ－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ、並びにＮ－ＰＥＳＴ変種Ｄ４３３Ａ及びＣ４４１Ａは、ＥＶ　ＣＯＮと比較してＧＦＰ－タウのレベルを増加させた。

【０１９８】

（実施例２２）
－ＳＴ１４Ａ神経前駆細胞におけるヒトＰＥＳＴデグロンを有する二機能性抗タウイントラボディＦを使用したタウの制御分解。
タウの分解を所望レベルへ変化させるｈＰＥＳＴデグロン変種を同定するために、ＳＴ１４Ａニューロン細胞にＧＦＰ－タウ－（０Ｎ４Ｒ）及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｆ－ｈＰＥＳＴ、Ｆ－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｐ２４６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４３５Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｃ４４１Ａ、Ｅ４４４Ａ、Ｓ４４５Ａ、Ｋ４４８Ａ／Ｒ４４９Ａ／Ｈ４５０Ａ、又は不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照（ＳＣＲ）のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、試料を以下のために収集した：（Ａ）ライブセルイメージング。スケールバー＝５０μｍ。（Ｂ）ウェスタンブロット。（Ｃ）相対的なタンパク質発現は、総タウ対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ対照に対して正規化した。ヒトＰＥＳＴデグロン変種は、空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）と比較してタンパク質分解レベルの変化をもたらした（図２２）。Ｆ－ＰＥＳＴ及びＦ－ＰＥＳＴ変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｅ４４４Ａ、Ｓ４４５Ａ、及びＫ４４８Ａ／Ｒ４４９Ａ／Ｈ４５０Ａは、ＧＦＰ－タウを対照に比べて５０～７５％低減させた。Ｆ－ＰＥＳＴ変種Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａは、ＧＦＰ－タウを対照に比べて２５～５０％低減させた。Ｆ－ＰＥＳＴ－ＳＣＲは、ＥＶ　ＣＯＮと比較して類似のレベルのＧＦＰ－タウを発現した。

【０１９９】

（実施例２３）
－疾患を引き起こすＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ変異及びそれらの相当する遺伝子補正対照Ｖ３３７Ｖを保有するドナー由来のヒトｉＰＳＣ株に由来する一連のニューロン細胞を使用した厳密な細胞死アッセイの確立。
この細胞死アッセイは、ＦＴＤのモデリング及びタウオパチー用の治療分子のスクリーニングの両方に有用である。Ｖ３３７Ｍ及び対照Ｖ３３７Ｖ　ｉＰＳＣを、２０日目に前脳アイデンティティのシグネチャーの特徴を示す神経前駆細胞（ＮＰＣ）へと生成させた（図２３）。Ｔｅｍｐｌｅ　ｌａｂ社によって開発されたプロトコールを使用して、これらのＮＰＣを、４５日までに全ての主要な皮質細胞サブタイプの高度に濃縮された皮質ニューロンに分化させた。次に、対照ニューロンに対するＶ３３７Ｍ変異体の生存を実施した。これまでに、研究によりＡ１５２Ｔ　ＭＡＰＴ変異ニューロンがロテノンなどのストレッサーに対してより感受性が高く、細胞死の上昇を示すことが示されている（Silva, Cheng et al. (2016) Stem Cell Reports 7(3): 325-340）。とりわけ、ストレッサーに対するこの受攻性は、培養物がおよそ１００日経った後にのみ現れた。したがって、本発明者等は、ロテノン処置あり及びなしでＶ３３７Ｖ対照皮質ニューロンに対する１１０日のＶ３３７Ｍ皮質ニューロンにおける細胞死のレベルを比較した。細胞死は、エチジウムホモ二量体アッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して定量化し、このアッセイでは、瀕死細胞は、損傷したＤＮＡへの核色素の取り込みによって示される。同質遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照に比べて１１０日のＶ３３７Ｍ変異体ニューロンにおいて細胞死の有意な増加が見られた（図２３）。膜完全性を損失した死細胞の存在は、乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）などの細胞質から培養培地へ漏出するマーカーを測定することによって検出することができる（Riss, Niles et al. (2004) Assay Guidance Manual. S. Markossian, G. S. Sittampalam, A. Grossman et al. Bethesda (MD)）。細胞死は、ＬＤＨ－Ｇｌｏ（商標）細胞毒性アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）キットによって、Ｖ３３７Ｍ変異体培養物において有意に増加した（図２３）。Ｅｈｒｌｉｃｈ等は最近、ＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ変異を有する患者由来ｉＰＳＣ株が、タウ断片化及びリン酸化の増強、神経突起伸長の減少、及び酸化ストレスに対する感受性の増強を伴うニューロンを作製することを示した（Ehrlich, Hallmann et al. (2015) Stem Cell Reports 5(1): 83-96）。驚くべきことに、示したように、本発明者等は、ミトコンドリア電子伝達系（ＥＴＣ）複合体Ｉを阻害する環境毒素であるロテノンで細胞にストレスを与えた場合

に、細胞死の有意な増加を観察しなかった。研究間の主な差は、本発明者等が、Ｅｈｒｌｉｃｈによって産生された中脳ニューロンと比較して前脳ニューロンを生成したことであった。これは、Ｖ３３７Ｍ変異を有する患者のサブセットが、高密度のＮＦＴ、プレタングル、及び神経絨毛糸を有する重度の前頭葉萎縮症を有する（Spina, Schonhaut et al. 2017）一方で、同じ患者における黒質（中脳領域に位置する）は軽度の萎縮症及びＮＦＴ病態を示した（Spina, Schonhaut et al. (2017) Neurology 88(8): 758-766）ため重要である。これらの結果を臨床データと合わせると、更なるストレッサーなしでＶ３３７Ｍ変異単独に対して前脳ニューロンにおいて選択的な受攻性が見られることを示唆する。

【０２００】

（実施例２４）

－プロテアソームは、同質遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較して、ＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ変異を有するｉＰＳＣ由来皮質ニューロンにおいて機能が損なわれている。

プロテアソーム機能をモニタリングするために、変異体（Ｖ３３７Ｍ）及び同質遺伝子対照（Ｖ３３７Ｖ）皮質培養物を、ユビキチン^{G76V}ＧＦＰ（Ｕｂ^{G76V}ＧＦＰ）レポーターで形質導入した。このレポーターは、多様な障害におけるユビキチン／プロテアソーム依存性タンパク質分解の役割のモニタリングに、及び化合物の、ユビキチン／プロテアソーム系に対する影響を検査する有効性試験に広く使用される。Ｖ３３７Ｖ及びＶ３３７Ｍ皮質培養物は、９０日目に形質導入された。細胞死が同質遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較してＭＡＰＴ　Ｖ３７７Ｍ変異体培養物において増加する時点である培養の１１０日目に（図２３）細胞のライブイメージングを行って、Ｕｂ^{G76V}ＧＦＰレポーターの発現レベルを測定した。健常なＶ３３７Ｖ対照培養物において、Ｕｂ^{G76V}ＧＦＰ（矢印）レポーターは急速に分解されるが、ＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ変異体皮質ニューロンでは、ユビキチンプロテアソーム系の機能が損なわれている（図２４）ことを示唆し、図２３において観察される細胞死に潜在的に寄与するＵＢ^{G76V}ＧＦＰレポーターの蓄積が見られる。

【０２０１】

（実施例２５）

－二機能性抗タウ－ＰＥＳＴイントラボディは、同質遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較してＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ変異を有する人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）由来皮質ニューロンにおいてプロテアソーム障害を緩和する。

抗タウ－ＰＥＳＴイントラボディが変異体Ｖ３３７Ｍタウによって引き起こされるプロテアソーム障害に対抗することができるかどうかを決定するために、変異体（Ｖ３３７Ｍ）及び同遺伝子対照（Ｖ３３７Ｖ）皮質培養物を、（図２４）に記載されるようなユビキチン^{G76V}ＧＦＰ（Ｕｂ^{G76V}ＧＦＰ）レポーター及び空のベクター対照（ＥＶ）、Ｖ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ－ｈＰＥＳＴ、又はＦ－ｈＰＥＳＴのいずれかで形質導入した。処置の２０日後、細胞のライブイメージングを行って、Ｕｂ^{G76V}ＧＦＰレポーターの蛍光発現レベルを測定した。抗タウ－ｈＰＥＳＴイントラボディで処置されたＶ３３７Ｍ変異体培養物において、Ｕｂ^{G76V}ＧＦＰレポーターは急速に分解される（図２５）。これは、ユビキチン非依存性タンパク質分解を受ける二機能性抗タウ－ＰＥＳＴイントラボディが、Ｖ３３７Ｍタウ毒性に起因するプロテアソーム障害に対抗することができることを実証している。

【０２０２】

（実施例２６）

－抗タウ－ｈＰＥＳＴイントラボディ、Ｖ－ｈＰＥＳＴ及びＮ－ｈＰＥＳＴは、ＭＡＰＴ Ｖ３３７Ｍ変異を有するヒトｉＰＳＣ由来皮質ニューロンにおいて細胞死を低減させた。

Ｖ３３７Ｍ変異体皮質培養物が細胞死の上昇（図２３）及びプロテアソーム障害（図２４）を示し、それらは抗タウ－ＰＥＳＴイントラボディによって対抗することができる（図２５）ことを示した後、細胞死を、二機能抗タウ－ＰＥＳＴイントラボディによる処置後に評価した。Ｖ３３７Ｍ皮質培養物は、９０日目に空のベクター対照（ＥＶ－ＣＯＮ）、Ｖ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ－ｈＰＥＳＴ、又は無関係な抗原であるボツリヌス毒素に対するＢ

８－ｈＰＥＳＴ対照イントラボディのいずれかで形質導入した。１１０日目に、エチジウムホモ二量体（ＥｔＨＤ）アッセイを使用して、死細胞及び／又は瀕死細胞を検出した。予想通り、細胞死レベルは、Ｖ－ｈＰＥＳＴ及びＮ－ｈＰＥＳＴイントラボディによって対照レベルに低減した（図２６）。細胞死は、Ｖ－ｈＰＥＳＴによって有意に低減された（*、ｐ＝０．０２７１）一方で、Ｎ－ｈＰＥＳＴは、同質遺伝子Ｖ３３７Ｖ対照と比較してＶ３３７Ｍ培養物における有意性に匹敵していた（ｐ＝０．０５１７）。

【０２０３】

（実施例２７）

－プログラム可能な標的抗原タンパク質分解（Ｐ－ＴＡＰ）技術を用いて、抗タウ－ＰＥＳＴイントラボディを使用して、神経保護を達成するためのタウ分解の最も低い有効レベルは、疾患関連ヒトｉＰＳＣ由来皮質ニューロンにおいて決定され得る。

ヒト細胞において神経保護を達成するのに必要なタウ低減のレベルを決定するために、変異体ＭＡＰＴ　Ｖ３３７Ｍ皮質培養物を、タウの強力な低減物質である（５０～７５％；図２１）Ｎ－ｈＰＥＳＴ又はタウの低い低減物質である（０～２５％；図２１）Ｎ－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｓ４４５Ａで形質導入し、空のベクター対照又はスクランブル不活性ＰＥＳＴデグロンを有するＮ－ｈＰＥＳＴのいずれかと比較した。この実験では、培養物を６０日目に形質導入した後、（図２３及び図２６）に記載されるように、９０日目にエチジウムホモ二量体（ＥｔＨＤ）アッセイを使用して、細胞死を評価した。図２６と一致して、細胞死レベルは、ＥＶ　ＣＯＮと比較してタウの強力な低減物質である（５０～７５％）Ｎ－ｈＰＥＳＴによって有意に（*、ｐ＜０．０５）低減された（図２７）。タウの低い低減物質である（０～２５％）Ｎ－ｈＰＥＳＴデグロン変種Ｓ４４５Ａは、ＥＶＣＯＮと比較してＶ３３７Ｍ皮質培養物において細胞死を有意に（*、ｐ＜０．０５）低減された（図２７）。この新規発見により、ほんのおよそ２５％のタウ低減を伴う下記の長期にわたる発現が、神経保護を達成するのに十分であることが実証される。

【０２０４】

（実施例２８）

－ハンチンチンの分解を制御する二機能性抗ハンチンチン－ヒト－ＰＥＳＴ変種の同定。

ハンチンチンは、ハンチントン病の原因となるタンパク質である。ＨＴＴ遺伝子のエクソン１におけるＣＡＧリピートの伸長は、Ｎ末端に異常なポリグルタミン（ポリＱ）伸張を有するタンパク質を生じる。このポリＱ伸張は、αヘリックス、ランダムコイル、及び伸長されたループを含む多数のコンホメーションを採択している。ハンチントン病は、変異体ハンチンチンタンパク質が凝集すると発症し、ニューロン細胞死の結果として神経学的症状をもたらす。したがって、異常なハンチンチンタンパク質の標的分解は、重要な治療標的である。イントラボディは、それらの標的上の様々なタンパク質コンホメーション及びエピトープに結合するよう設計及び選択することができる。更に、イントラボディを更に操作して、標的タンパク質を核、小胞体、及びプロテアソームなどの種々の細胞コンパートメントにリロケートさせることができる（図１）。

本明細書に記載されるように、本発明者等は、タンパク質のミスフォールディングを防止すると同時に、ヒトオルニチンデカルボキシラーゼ由来のＰＥＳＴデグロン（ｈＰＥＳＴ）への融合を介して、分解のためにそれらの結合カーゴをプロテアソームへと標的化する二機能性プロテアソームターゲティングイントラボディを開発した。この研究の包括的な仮説は、細胞の正常なタンパク質除去プロセスを使用したハンチンチンタンパク質の標的分解が、フォールディングに利用可能なハンチンチンの量を低減させ、したがって、ハンチントン病又はハンチンチンの変異及び／又は凝集と関連付けられる他の疾患の生理学的影響を低減することである。

【０２０５】

（実施例２９）

－ヒトＰＥＳＴを使用した細胞内タンパク質の制御分解。

本明細書に記載されるように、ハンチンチン低減のレベルは、ヒトＰＥＳＴデグロンで制御することができる。これは複数の系で機能することが本明細書で実証されている。い

かなる理論にも拘束されることなく、細胞の正常なタンパク質除去プロセスを使用したハンチンチンタンパク質の標的分解は、フォールディングに利用可能なハンチンチンの量を低減させ、したがって、ハンチントン病の生理学的影響を低減させ得る。

例えば、デグロンの改変により、培養中の細胞（例えば、ＳＴ１４Ａラット神経前駆細胞）におけるハンチンチン分解のレベルの制御が可能となることが示される。

置かれた仮定は、（１）抗原－イントラボディ会合は所与のものであり、（２）抗原－イントラボディ－デグロン複合体の分解が非結合イントラボディ－デグロンの分解に比例することである。ハンチンチンタンパク質は本明細書で標的化されており、それは天然に存在するタンパク質であり、イントラボディは、ヒトＯＤＣ由来のＰＥＳＴデグロンを有する。

【０２０６】

図３５Ａ～図３５Ｂに示されるように、タンパク質の分解の変化を達成するためにタンパク質をプロテアソームへと標的化するための本明細書に記載されるような配列番号１に対するＰＥＳＴデグロン中に存在し得る変異は、プロリン（Ｐ）残基のアラニン（Ａ）残基への変異、例えばＰ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ（即ち、２つの連続したＰ残基の２つの連続したＡ残基への複合型変異）、アスパラギン酸（Ｄ）残基のＡ残基への単一変異、例えばＤ４３３Ａ、セリン（Ｓ）残基のＡ残基への単一変異、例えばＳ４４５Ａ、及び／又はリジン（Ｋ）残基のＡ残基への変異、例えばＫ４４８Ａであり得る。

【０２０７】

ハンチンチンの分解を増加させるため本明細書に記載されるような変異の有効性の試験は、タンパク質結合、トランスロケーションなどのためのあらゆる方法を使用して行われる。例えば、Ｐ４２６Ａ／Ｐ４２７Ａ、Ｄ４３３Ａ、Ｓ４４５Ａ、及び／又はＫ４４８Ａなどを含むがこれらに限定されない変異は、本明細書に記載されるようなヒトＰＥＳＴデグロン配列（配列番号１）に導入される。可視化のために、ＧＦＰマーカー又は他の適切なスクリーニング可能なマーカーを使用して、タンパク質のプロテアソームへのトランスロケーションを可視化することが可能である。適切な対照は、比較のために、またタンパク質のプロテアソームへの輸送を増加させる際の変異の成功を決定するのに使用される。残基４４１でのシステイン（Ｃ）からＡへの変異（Ｃ４４１Ａ）は、この変異が治療効果を有さないため対照として使用することができる。

【０２０８】

クローニング－抗ハンチンチン－ＰＥＳＴ及びそれら各々のＰＥＳＴ変種（配列番号１００～配列番号１０５）は、ｐＡＡＶ－ＭＣＳにサブクローニングされている。イントラボディの発現を同定するために、ヘマグルチニン（ＨＡ）エピトープタグ（アミノ酸配列YPYDVPDYA）をイントラボディのＣ末端に融合させる。イントラボディ及びそのカーゴをプロテアソームに誘導するために、ヒトＯＤＣ由来のアミノ酸４２２～４６１（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＨ００２９１７．２）に相当する標準的なＰＥＳＴモチーフをＨＡタグのＣ末端に付加する。ｓｃＦｖ イントラボディは、５’－ＶＨ－（Ｇ４Ｓ）３－V_L－ＨＡ－ＰＥＳＴ－３’として配置される。イントラボディは、下記のクローニング戦略：ＸｂａＩ－イントラボディ－ＮｏｔＩ－ＨＡ－ＰＥＳＴデグロン－ＨｉｎｄＩＩＩに従って、標準的なクローニング技法を用いてｐＡＡＶ－ＭＣＳにサブクローニングされる。発現プラスミドは全て、Ｓａｎｇｅｒ ＤＮＡシーケンシング（Ｇｅｎｅｗｉｚ、ＮＪ）によって検証され、Ｎｕｃｌｅｏｂｉｎｄ Ｘｔｒａ Ｍｉｄｉ Ｅｎｄｏｔｏｘｉｎ ｆｒｅｅ（Ｔａｋａｒａ ＃７４０４２０．５）調製キットを用いて製造業者のプロトコールに従って調製される。

【０２０９】

トランスフェクション－ニューロン特性を示すラット前駆細胞（ＳＴ１４Ａ）をトランスフェクションに利用する。ＳＴ１４Ａ細胞を、標準的なプロトコールを使用して培養する。細胞はトランスフェクション用に６ウェルプレートに培養する。同時トランスフェクションは、ウェル１つ当たりｍＨＴＴｅｘ１－７２－ｅＧＦＰ－ｐｃＤＮＡ３．１ ０．７５μｇ及びウェル１つ当たりｐＡＡＶ発現ベクターで発現される抗ハンチンチン－ｈＰ

ＥＳＴ又は抗ハンチンチン－ｈＰＥＳＴ変種２．２５μｇを使用して実施する。ＰＥＩ　ＤＮＡトランスフェクション試薬を利用して、細胞に一過的にトランスフェクトする。トランスフェクションの７２時間後、全ての培養物のイメージングを行い、その後、培養物をウェスタンブロット分析用に回収する。

【０２１０】

ウェスタンブロッティング－トランスフェクションの７２時間後、ＧＦＰ発現についてＳＴ１４Ａ細胞のイメージングを行う。イメージング後、試料をトリプシン処理によって６ウェルプレートから収集する。細胞試料を、１×ＰＢＳで洗浄した後、ＲＩＰＡ緩衝液に加えて１×プロテアーゼ阻害剤カクテル（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１％ＮＰ４０、０．２５％デオキシコール酸ナトリウム、２％ＳＤＳ）を使用して細胞溶解を行う。試料を１０分間超音波処理する。ＤＣタンパク質アッセイを試料に対して実施し、タンパク質濃度データを作成する。タンパク質アッセイから、試料濃度は、２×変性試料緩衝液（１２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、４％ＳＤＳ、２０％グリセロール、１０％２－メルカプトエタノール、０．０２％ブロモフェノールブルー、ｐＨ６．８）中の１ｎｇ／ｍＬに対して正規化し、タンパク質の変性を確実にするために加熱する。各溶解物試料１０μｇを、４～２０％のＣｒｉｔｅｒｉｏｎプレキャストゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　＃４５６－１０９５）を使用したドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）により分離する。タンパク質は、トランスブロット半乾燥（ＳＤ）エレクトロブロッター（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して２４～２７Ｖで３０分間、ＰＤＶＦ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）にブロットする。ＰＤＶＦ膜は、変異体ハンチンチン（ＥＭ４８；１：１，０００）及びＧＡＰＤＨ（ローディング対照として、Ａｂｃａｍ；１：５，０００）についてプローブする。デンシトメトリーは、Ｉｍａｇｅ　Ｊソフトウェアで定量化する。

【０２１１】

（実施例３０）

－二機能性抗ＨＴＴ－ＰＥＳＴイントラボディのヒト化。

ＰＥＳＴデグロンを、ヒトの使用のために最適化した。この目標を達成するために、マウスＰＥＳＴデグロン（ｍＰＥＳＴ）をヒトＰＥＳＴ（ｈＰＥＳＴ）デグロンで置換した。オルニチンデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）遺伝子由来のマウス及びヒトＰＥＳＴデグロンの比較を表３に示す。ｈＰＥＳＴデグロンの、抗ＨＴＴイントラボディへの融合は、ｍＰＥＳＴデグロンと同程度効率的に、分解のために変異体ＨＴＴエクソン１タンパク質断片をプロテアソームに誘導する。したがって、ｈＰＥＳＴデグロンは、ヒトオルニチンデカルボキシラーゼから抗ＨＴＴ　Ｃ４　ｓｃＦｖイントラボディ及びＶＬ１２．３単一ドメインイントラボディにクローニングされた。ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰを、空のベクター対照（対照）、Ｃ４－ＰＥＳＴ、ＶＬ１２．３－ＰＥＳＴ、又はタンパク質分解を促進しない不活性スクランブルＰＥＳＴデグロンを有するＣ４及びＶＬ１２．３（Ｃ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ）、又は（ＶＬ１２．３－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ）のいずれかと同時トランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、細胞のイメージングを行い、ウェスタンブロット用に回収した。図３１に示されるように、ライブセルイメージングにより、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰは、ＥＶ　ＣＯＮ細胞において凝集体（斑点）を容易に形成することが明らかになった。Ｃ４－ｈＰＥＳＴ及びＶＬ１２．３－ｈＰＥＳＴ処置細胞では、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰに関する蛍光シグナルはほとんど検出不可能であった。Ｃ４－ＰＥＳＴ及びＶＬ１２．３－ＰＥＳＴは、対照と比較してｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰの凝集を防止する。ウェスタンブロット分析により、ライブセルイメージングの結果が確認された。モノクローナル抗体ＥＭ４８（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｃａｔ　＃ＭＡＢ５３７４）で検出された可溶性及び不溶性（高分子量種）ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰは、空のベクター対照並びにＣ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ及びＶＬ１２．３－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ対照と比較して、Ｃ４－ＰＥＳＴ及びＶＬ１２．３－ＰＥＳＴ処置細胞において低減された（図３１）。

【０２１２】

（実施例３１）
－４６Ｑ又は７２Ｑリピートのいずれかを有する変異体ＨＴＴエクソン１タンパク質断片は、ユビキチンプロテアソーム系の機能を損なう。
ユビキチン－プロテアソームは、毒性変異体ＨＴＴタンパク質断片によって機能が損なわれているかどうかを決定するために、ＳＴ１４Ａ細胞に、ユビキチン^{G76V}ＧＦＰ（ユビキチン^{G76V}ＧＦＰ）レポーター及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、ｍＨＴＴｅｘ１－２５Ｑ－ＲＦＰ（４６Ｑ－ＲＦＰ）、ｍＨＴＴｅｘ１－４６Ｑ－ＲＦＰ（４６Ｑ－ＲＦＰ）、又はｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＲＦＰ（７２Ｑ－ＲＦＰ）のいずれかを同時トランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、ｍＨＴＴ凝集及びＵＢ^{G76V}ＧＦＰの蓄積について細胞のライブイメージングを行った（図３２）。健常な細胞では、ユビキチン^{G76V}ＧＦＰは、プロテアソームによって急速に分解され、プロテアソームは機能が損なわれていると、ユビキチン^{G76V}ＧＦＰレポーターが蓄積する。予想通り、健常なＥＶ　ＣＯＮ細胞では、ユビキチン^{G76V}ＧＦＰは、プロテアソームによって急速に分解される。非病原性ポリグルタミンリピート長２５Ｑ－ＲＦＰをトランスフェクトした細胞では、報告されるＵＢ^{G76V}ＧＦＰは同様に効率的に分解された。しかしながら、病原性ポリグルタミンリピート長である４６Ｑ－ＲＦＰ及び７２Ｑ－ＲＦＰで処置された細胞では、ＵＢ^{G76V}ＧＦＰレポーターは蓄積し、ｍＨＴＴ凝集体にも取り込まれた。まとめると、このことは、ユビキチンプロテアソーム系がｍＨＴＴ凝集によって機能が損なわれていることを示唆している。

【０２１３】

（実施例３２）
－二機能性イントラボディＣ４－ＰＥＳＴは、ｍＨＴＴエクソン１タンパク質断片によって引き起こされるプロテアソーム障害に対抗する。
ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＲＦＰ凝集の阻害及びプロテアソームによるその除去がＣ４－ｈＰＥＳＴを介したユビキチン非依存性タンパク質分解によるものかどうかを決定するために、ＳＴ１４Ａ細胞に、ユビキチン^{G76V}ＧＦＰ（ユビキチン^{G76V}ＧＦＰ）レポーター、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＲＦＰ（７２Ｑ－ＲＦＰ）、及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、ヒトＰＥＳＴデグロンを有するＣ４（Ｃ４－ＰＥＳＴ）、又は不活性スクランブルヒトＰＥＳＴデグロンを有するＣ４（Ｃ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ）のいずれかを同時トランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、ｍＨＴＴ凝集及びＵＢ^{G76V}ＧＦＰの蓄積について細胞のライブイメージングを行った。図３３に示されるように、プロテアソームは、Ｑ７２－ＲＦＰ凝集によって機能が損なわれた。また図３２に示されるように、ＵＢ^{G76V}ＧＦＰレポーターはこれらの細胞に蓄積し、７２Ｑ－ＲＦＰ凝集体に取り込まれたが、７２Ｑ－ＲＦＰ凝集のみを阻害するＣ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲで処置された細胞では、ＵＢ^{G76V}ＧＦＰレポーターはプロテアソームによって急速に分解された。更に、Ｑ７２－ＲＦＰ凝集を阻害し、ユビキチン非依存性タンパク質分解を介してＱ７２－ＲＦＰをプロテアソームに誘導するＣ４－ＰＥＳＴで処置された細胞Ｑ７２－ＲＦＰでは、Ｑ７２－ＲＦＰ及びＵＢ^{G76V}ＧＦＰレポーターはともに、細胞によって効果的に除去される（図３３）。

【０２１４】

（実施例３３）
－ラットＳＴ１４Ａ神経前駆細胞におけるヒトＰＥＳＴデグロンを有する二機能性抗ＨＴＴイントラボディＣ４を使用した毒性細胞内ｍＨＴＴ断片の制御分解。
ｍＨＴＴの分解を所望のレベルに変化させるｈＰＥＳＴデグロン変種を同定するために、ＳＴ１４Ａニューロン細胞に、ヒトｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰ及び空のベクター対照（ＥＶ　ＣＯＮ）、Ｃ４、Ｃ４－ＰＥＳＴ、及びＣ４－ＰＥＳＴ変種（Ｔ４３６Ａ、Ｐ４３８Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｅ４４４Ａ）、複合型変異変種（Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０Ａ／Ｅ４３１Ａ）、又は不活性スクランブルＰＥＳＴデグロン対照（ＳＣＲ）のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後、細胞のライブイメージングを行い、ウェスタンブロッティング用に回収した。図３４に示されるように、ライブセルイメ

ージングにより、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰは、ＥＶ　ＣＯＮ細胞において容易に凝集体（斑点）を形成することが明らかになった。図３１と一致して、Ｃ４及びＣ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲは、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰ凝集を防止した。Ｃ４－ＰＥＳＴ及びＣ４－ＰＥＳＴ変種Ｔ４３６Ａ処置細胞では、可溶性ｍＨＴＴの存在は、ほとんど検出不可能であった。Ｃ４－ＰＥＳＴ変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０／Ｅ４３１Ａ、Ｅ４４４Ａ、及びＳ４４０Ａで処置された細胞は、Ｃ４－ＰＥＳＴと比較して可溶性ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰのレベルの増加を示した。ウェスタンブロッティングを使用して、ライブセルイメージングの結果を確認した（図３１）。ウェスタンブロッティングについて：ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰは、モノクローナル抗体ＥＭ４８（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｃａｔ　＃ＭＡＢ５３７４）を使用して検出した。イントラボディは、抗ＨＡタグを用いてそれらのＨＡタグについてプローブすることによって検出し、ＧＡＰＤＨは、ローディング対照としてプローブした。相対的なタンパク質発現は、可溶性ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ＧＦＰ（ＥＭ４８）対内部標準対照（ＧＡＰＤＨ）の比によって決定した。次に、試料をＥＶ－ＣＯＮに対して正規化した。ヒトＰＥＳＴデグロン変種Ｔ４３６Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｅ４４４Ａ、及び複合型変異変種Ｅ４２８／４３０／４３１Ａは、ＥＶ　ＣＯＮと比較してタンパク質分解レベルの変化をもたらす。Ｃ４－ＰＥＳＴ及びＣ４－ＰＥＳＴ変種Ｔ４３６Ａは、ｍＨＴＴを対照に比べて７５～１００％に低減させた。Ｃ４－ＰＥＳＴ変種Ｅ４２８Ａ／Ｅ４３０／Ｅ４３１Ａ及びＥ４４４Ａは、ｍＨＴＴを対照の５０～７５％に低減させた。Ｃ４－ＰＥＳＴ変種Ｓ４４０Ａは、ｍＨＴＴを対照の２５～０％に低減させ、Ｃ４、Ｃ４－ＰＥＳＴ－ＳＣＲ、及びＣ４－ＰＥＳＴ変種Ｐ４３８Ａは全て、対照に比べてｍＨＴＴのパーセンテージを増加させた。これらの結果は、種々のレベルのｍＨＴＴ分解が種々のＰＥＳＴ改変を用いた場合に達成可能であることを示している。

【０２１５】

（実施例３４）

－ラットＳＴ１４Ａ神経前駆細胞における細胞透過性二機能性抗α－シヌクレインＶＨＨ－ｈＰＥＳＴイントラボディを使用した細胞内シヌクレインタンパク質の分解。

神経特性を示すラットＳＴ１４Ａ前駆細胞を使用して、細胞透過性イントラボディ又は対照を含有する馴化培地を生成した。ＳＴ１４Ａ細胞の別々のセットに、α－Ｓｙｎ～ｅＧＦＰをトランスフェクトして、細胞透過性抗α－シヌクレイン二機能性イントラボディ（ＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ）を含有する馴化培地が、対照と比較してレシピエント細胞に進入し、細胞内α－Ｓｙｎ～ｅＧＦＰを分解することができるかどうかを決定した。トランスフェクションについて、標準的なプロトコールに従って、細胞を６ウェルプレートに播種及び培養した。０日目、細胞透過性イントラボディを含有する馴化培地の生成：細胞透過性イントラボディＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ（＋）、ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ（－）対照、又は空のベクター対照のいずれかによるＳＴ１４Ａ細胞の一過性トランスフェクションを、ＰＥＩ　ＤＮＡトランスフェクション試薬を用いてウェル１つ当たり発現ベクター１つにつきＤＮＡ３．０μｇを使用して実施した。１日目。α－Ｓｙｎ～ｅＧＦＰを発現するレシピエントＳＴ１４Ａ細胞の生成。ＳＴ１４Ａ細胞に、ｐｃＤＮＡ３．１において発現されたα－Ｓｙｎ～ｅＧＦＰ　３．０μｇをトランスフェクトした。トランスフェクションの４時間後、細胞を各々のイントラボディドナー群由来の馴化培地で処置した。ＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ（＋）処置細胞では、細胞透過性イントラボディは、馴化培地に分泌されるのに対して、ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ（－）対照群では、イントラボディは細胞の内部に留まる。次に、Ｓｙｎ～ｅＧＦＰ細胞を馴化培地で更に３日間処置した。４日目に、細胞のライブイメージングを行い（図３９Ｂ）、続いてウェスタンブロッティング用に加工処理した（図３９Ｃ）。グラフは、シヌクレインウェスタンブロットバンド強度の相対的なデンシトメトリック定量化を示す（図３９Ｄ）。α－Ｓｙｎ～ｅＧＦＰタンパク質の発現は、ＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ（＋）処置細胞では、ＥＶ対照と比較して約２０％低減した。

【０２１６】

ウェスタンブロッティング－馴化培地処置の７２時間後、ＳＴ１４Ａ細胞をＳｙｎ～ｅ

ＧＦＰ発現についてイメージングを行った。イメージング後、試料をトリプシン処理によって６ウェルプレートから収集した。細胞試料を、１×ＰＢＳで洗浄した後、ＲＩＰＡ緩衝液に加えて１×プロテアーゼ阻害剤カクテル（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１％ＮＰ４０、０．２５％デオキシコール酸ナトリウム、２％ＳＤＳ）を使用して細胞溶解を行った。続いて、試料を１０分間超音波処理した。ＤＣタンパク質アッセイを試料に対して実施し、タンパク質濃度データを作成した。タンパク質アッセイから、試料濃度は、２×変性試料緩衝液（１２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、４％ＳＤＳ、２０％グリセロール、１０％２－メルカプトエタノール、０．０２％ブロモフェノールブルー、ｐＨ６．８）中の１ｎｇ／ｍＬに対して正規化し、タンパク質の変性を確実にするために加熱した。溶解物試料（１０μｇ）を、４～２０％のＣｒｉｔｅｒｉｏｎプレキャストゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　＃４５６－１０９５）を使用したドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）により分離した。タンパク質は、トランスブロット半乾燥（ＳＤ）エレクトロブロッター（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して２４～２７Ｖで３０分間、ＰＤＶＦ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）にブロットした。ＰＤＶＦ膜は、総α－シヌクレイン（ＭＪＦＲＩ又はｓｙｎ１；１：１，０００）及びＧＡＰＤＨ（ローディング対照として、Ａｂｃａｍ；１：５，０００）についてプローブした。シヌクレインデンシトメトリーは、Ｉｍａｇｅ　Ｊソフトウェアで定量化した。

【０２１７】

（実施例３５）

－細胞透過性二機能性抗α－シヌクレインＶＨＨ－ｈＰＥＳＴイントラボディは、３Ｘ　ＳＮＣＡ変異を有するｉＰＳＣ由来ニューロン培養物において内因性α－シヌクレインを低下させる。

α－シヌクレインをコードするＳＮＣＡ遺伝子においてコピー数変異の増加を有するパーキンソン病患者由来の患者由来人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）（ＳＮＣＡトリプリケーション（ＲＵＣＤＲ；ＮＤ５００４０））及び健常なドナー由来の及びｉＰＳＣを対照として使用した。この変異を有する患者は、常染色体優性パーキンソン病を発症する。この最適化スクリーニングに使用される検査系は、野生型ｉＰＳＣ由来皮質前脳培養物の、細胞透過性二機能性抗α－シヌクレインＶＨＨ－ｈＰＥＳＴイントラボディによるレンチウイルス形質導入であった。本明細書に記載される細胞透過性イントラボディ及び対照を、ピューロマイシン耐性レンチウイルスベクターにクローニングし、続いて６０日齢の皮質培養物に形質導入した。内因性二機能性α－シヌクレイン媒介性分解は、抗シヌクレインモノクローナル抗体ＭＪＦＲ１（１：１，０００；Ａｂｃａｍ）を用いた定量的ウェスタンブロッティングによって検証された。ＨＡタグ付きイントラボディは、モノクローナル抗ＨＡ（１：５，０００、Ｃｏｖａｎｃｅ）でプローブされた。試料は、モノクローナル（１：１０，０００；Ａｂｃａｍ）抗体を有するＧＡＰＤＨハウスキーピングタンパク質に対して正規化した。デンシトメトリーは、Ｉｍａｇｅ　Ｊソフトウェアで定量化した。

【０２１８】

細胞透過性イントラボディを含有する馴化培地を生成するために、健常な対照由来の２ヶ月齢の人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）由来皮質ニューロンを、ＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ＰＥＳＴ、ＳＳ－ＰＥＮ－ＤＢ１－ＰＥＳＴ、又は抗原対照（ボツリヌス神経毒軽鎖Ａ）であるＳＳ－ＰＥＮ－Ｂ８－ＰＥＳＴのいずれかを発現するレンチウイルスで形質導入した。形質導入の７２時間後、レシピエント３Ｘ　ＳＮＣＡトリプリケーション皮質培養物を、更に７日間馴化培地で処置し、続いてウェスタンブロッティング用に加工処理した（図４０Ｂ）。内因性シヌクレインレベルは、抗原対照（ＳＳ－ＰＥＮ－Ｂ８－ｈＰ）と比較した場合、細胞透過性イントラボディＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰ及びＳＳ－ＰＥＮ－ＤＢ１－ｈＰを含有する馴化培地で処置された３Ｘ　ＳＮＣＡレシピエント細胞において、それぞれおよそ４０％及びおよそ３０％低減した（図４０Ｃ）。

【０２１９】

（実施例３６）

－様々な細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）を有する細胞透過性二機能性抗α－シヌクレイン

ＶＨＨ－ｈＰＥＳＴイントラボディは、内因性α－シヌクレインを低下させる。
二機能性Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ（Ｎ７７Ｄ－ｈＰ）抗シヌクレインイントラボディによる３種のＣＰＰ配列（ペネトラチン、ＴＡＴ、及び４３５ｂ）の送達能力を、３Ｘ　ＳＮＣＡ遺伝子トリプリケーションを有するｉＰＳＣに由来するヒト皮質ニューロンにおいて検査した。細胞透過性イントラボディを有する馴化培地を生成するために、健常な対照由来の２ヶ月齢のｉＰＳＣ由来皮質ニューロンを、ＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ、ＳＳ－ＴＡＴ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴのいずれか、又はＣＰＰドメインを欠如するＳＳ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰＥＳＴ対照のいずれかを保有するレンチウイルスで形質導入した。形質導入の７２時間後、レシピエント３Ｘ　ＳＮＣＡトリプリケーション皮質培養物を、各々のドナー由来の馴化培地で更に７日間処置し、次にウェスタンブロッティング用に加工処理した（図４１Ａ）。内因性α－シヌクレイン（Ｓｙｎ）及びＨＡタグ付きイントラボディ発現は、ウェスタンブロッティングによって評価した。総タンパク質１０μｇを、ゲル電気泳動によって分離し、ニトロセルロース膜に転写した。内因性α－シヌクレインは、ＭＪＦＲ１抗α－シヌクレイン抗体（１：１，０００；Ａｂｃａｍ　＃ａｂ１３８５０１）を使用して検出した。ＨＡ－ＨＲＰは、ＨＡタグ付きイントラボディ（１：１，０００；Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ　＃２６１８３－ＨＲＰ）を検出するのに使用した。ＧＡＰＤＨは、ローディング対照として使用した（１：１０，０００；Ａｂｃａｍ、＃ａｂ１８１６０２）。ＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰ、ＳＳ－ＴＡＴ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰ、及びＳＳ－４３５ｂ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰは、ＳＳ－Ｎ７７Ｋ－ｈＰ対照と比較して、内因性α－シヌクレインをおよそ４０％、２０％、及び４０％低減させた（図４１Ｂ～図４１Ｃ）。ＨＡタグ付き細胞透過性イントラボディＳＳ－ＰＥＮ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰ、ＳＳ－ＴＡＴ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰ、及びＳＳ－４３５ｂ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰは、ＳＳ－Ｎ７７Ｄ－ｈＰ対照処置試料と比較して、３Ｘ　ＳＮＣＡレシピエント溶解物中に存在する（図４１Ｂ）。

【０２２０】

（実施例３７）

－細胞透過性二機能性抗変異体ＨＴＴ　ｓｃＦｖ　Ｃ４－ｈＰＥＳＴイントラボディは、毒性ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰ断片の凝集を低減させる。

細胞透過性抗ＨＴＴ二機能性イントラボディは、図３８に示されるように設計した。免疫グロブリン重鎖シグナルペプチド配列（ＳＳ；ＭＥＦＧＬＳＷＬＦＬＶＡＩＬＫＧＶＱＧ；配列番号１４９）をＮ末端に付加して、イントラボディ複合体を分泌経路に誘導した。分泌された二機能性イントラボディの細胞膜を横切るトランスロケーションを促進するために、細胞透過性ペプチドＰＥＮ（ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ；配列番号１５０）をｓｃＦｖ　Ｃ４－ｈＰＥＳＴのＮ末端に付加した。細胞透過性二機能性抗変異体ＨＴＴ　ｓｃＦｖ　Ｃ４－ｈＰＥＳＴイントラボディが毒性ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰ断片の凝集を低減させることができるかどうかを決定するために、ＳＴ１４Ａイントラボディドナー細胞に、ＳＳ－ＰＥＮ－Ｃ４－ＰＥＳＴ、又はＣ４－ＰＥＳＴ対照のいずれかをトランスフェクトした。ドナー処置細胞では、細胞透過性イントラボディは、馴化培地に分泌されるのに対して、Ｃ４－ＰＥＳＴ対照群では、イントラボディは細胞の内部に留まる。１日目に、イントラボディアクセプターＳＴ１４Ａ細胞に、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰをトランスフェクトした。トランスフェクションの４時間後、細胞を各々のイントラボディドナー群由来の馴化培地で処置した。次に、レシピエント細胞を馴化培地で更に３日間処置した。各培地交換の４時間後、レシピエント細胞のライブイメージングを行い、ｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰ凝集を評価した。処置の５２時間後のライブセルイメージングは、Ｃ４－ｈＰＥＳＴ対照由来の馴化培地と比較してＳＳ－ＰＥＮ－Ｃ４－ｈＰＥＳＴを含有する馴化培地で処置された細胞においてｍＨＴＴｅｘ１－７２Ｑ－ｅＧＦＰ凝集の低減を明らかにした（図４２Ｂ）。矢印は、ＳＳ－ＰＥＮ－Ｃ４－ｈＰＥＳＴ処置細胞における拡散性ｍＨＴＴｅｘ１－７２ＱＧＦＰの存在を示す。ＳＳ－ＰＥＮ－Ｃ４－ｈＰＥＳＴ処置細胞は、７６時間後にｍＨＴＴｅｘ１－７２ＱＧＦＰ凝集の有意な（Ｐ＜０．０１）低減を示した（図４２Ｃ～図４２Ｄ）。

【０２２１】

（実施例３８）
－細胞透過性二機能性抗タウイントラボディ（ＰＥＮ－Ｎ－ｈＰＥＳＴ）は、分化ニューロンにおいて内因性ヒトタウを有意に（ｐ＜０．０１）低減させる。
タンパク質ベースの細胞透過性二機能性イントラボディが、それらの細胞内標的を低減させることができることを実証するために、細胞透過性イントラボディ及び対照抗体（図４３Ｃ）を、目的の抗体をコードするｐＥＴ－６Ｘ－Ｈｉｓプラスミドで形質転換されたＲｏｓｅｔｔａ－ｇａｍｉ（商標）２（ＤＥ３）大腸菌（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃａｔ＃７１３５１）から精製した。精製は、Ｎｉ－ＮＴＡ樹脂を負荷したスピンカラムを使用して実施し、Ｈｉｓタグ付きタンパク質を引き落とした。精製タンパク質をＰＢＳに対して透析した。イントラボディの非ウイルス性のタンパク質ベースの送達を評価するために、ヒトニューロン細胞培養物をＳＨ－ＳＹ５Ｙ神経芽腫細胞から生成し、それは分化の１７日後に３Ｒ及び４Ｒのタウアイソフォームを生成した（Shipley et al., 2016）。細胞は、Ｂ－２７、Ａｎｔｉ－Ａｎｔｉ、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭａｘ、５０ｎｇ／ｍＬのＢＤＮＦ、２０ｍＭ　ＫＣｌ、２ｍＭ　ｄｂ－ｃ－ＡＭＰ、及び１０μＭレチノイン酸を補充したＮｅｕｒｏｂａｓａｌ培地中でウェル１つ当たり８．４×10^4個の細胞の密度で、Ｍａｔｒｉｇｅｌでコーティングした９６ウェルプレートに播種した。本発明者等は、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ培地中で細胞透過性ペプチド（ペネトラチン、ＰＥＮ）配列（それぞれＰＥＮ－Ｎ－ＨＡ－ｈＰＥＳＴ及びＮ－ＨＡ－ｈＰＥＳＴ）を用いて、又は用いずに精製された抗体を段階希釈して、５μＭ～８ｎＭの範囲の濃度、及び濃度１つ当たり最終容量１００μＬを産生した（図４３Ｂ）。培地を細胞から吸引し、抗体段階希釈物１００μＬで置き換えた。処置された細胞を３７℃及び５％ＣＯ２のインキュベーターに２日間戻し、続いて室温で１０分間、４％パラホルムアルデヒド中で固定した。内因性タウタンパク質レベルを評価するために、固定細胞をイムノアッセイした。細胞を０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ－１００で透過処理し、ＰＢＳ中の３％ウシ血清アルブミン、１０％正常ヤギ血清、及び０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ－１００でブロックした。細胞を、４℃で一晩マウス抗ＨＡ　ＩｇＧ１モノクローナル抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　＃２６１８３）及びウサギ抗ヒトタウポリクローナル抗体（Ｄａｋｏ　＃Ａ００２４）を使用してＨＡタグ付き精製抗体について染色した後、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（商標）４８８コンジュゲートヤギ抗マウス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　＃Ａ３２７２３）及びＣｙ３コンジュゲートヤギ抗ウサギ（Ｊａｃｋｓｏｎ　＃１１１－５４５－１４４）二次抗体とともに室温で１時間インキュベーションした。二次抗体インキュベーション後、細胞核をＤＡＰＩ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　＃Ｄ１３０６）で室温にて５分間対比染色した。細胞は、各チャネルについて下記の露光条件を使用して３２０倍の倍率でイメージングした：位相差、２８０ｍ秒；４８８、１１００ｍ秒；ＣＹ３、３０００ｍ秒；ＤＡＰＩ、３５８ｍ秒。図４３Ｃは、５μＭのＰＥＮ－Ｎ－ｈＰＥＳＴ、Ｎ－ｈＰＥＳＴ（非細胞透過剤対照）、又はビヒクル対照（ＰＢＳ）による処置の４８時間後の代表的な染色を示す。（スケールバー２０μｍ）。細胞透過剤抗タウイントラボディ（ＰＥＮ－Ｎ－ｈＰＥＳＴ）は、それぞれ、非細胞透過剤対照（Ｎ－ｈＰＥＳＴ）及びビヒクル対照と比較して、ヒトＳＨＳＹ－５Ｙ分化ニューロンにおいて内因性タウタンパク質を有意に（*ｐ＜０．０５、**ｐ＜０．０１）低減させた（図４３Ｄ）。

【０２２２】
他の実施形態
本発明は、その詳細な説明と併せて説明してきたが、前述の説明は、併記の特許請求の範囲によって規定される発明の範囲を例示するためのものであり、限定するとは意図されない。他の態様、利点、及び修正は、併記の特許請求の範囲内にある。

【図面】

【図１Ａ－Ｃ】

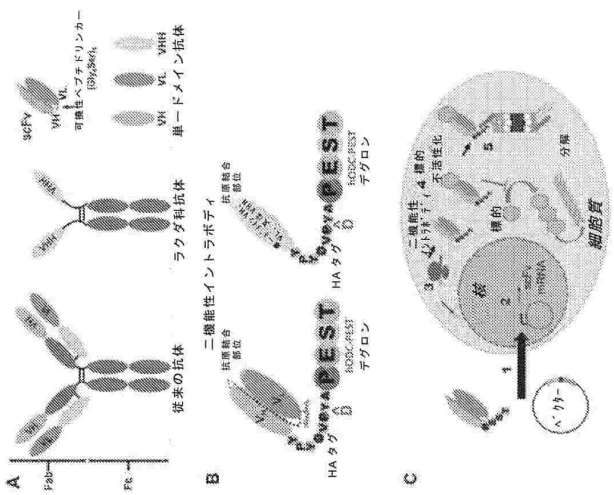


FIG. 1

【図２】

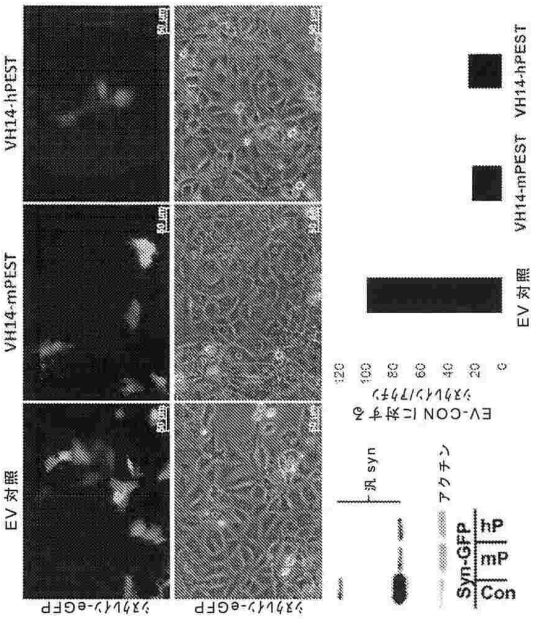


FIG. 2

【図３】

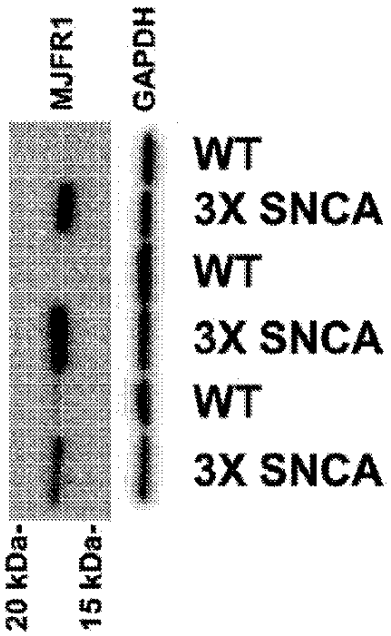


FIG. 3

【図４Ａ－Ｂ】

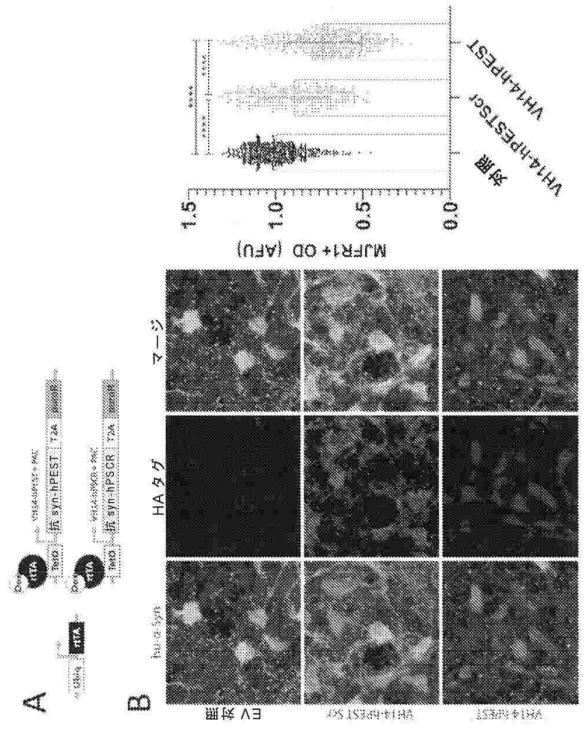


FIG. 4

【図５】

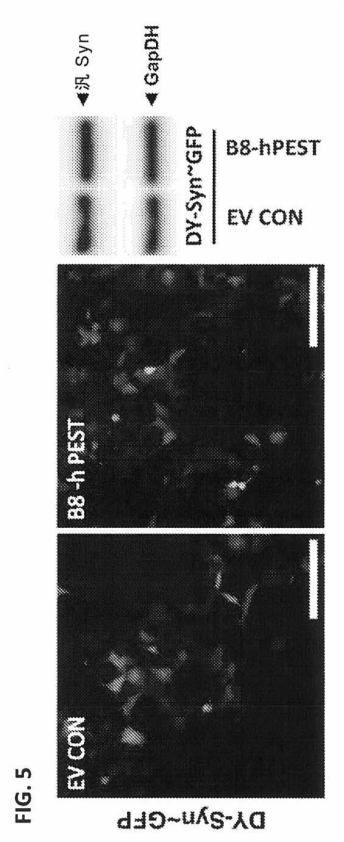


FIG. 5

【図６】

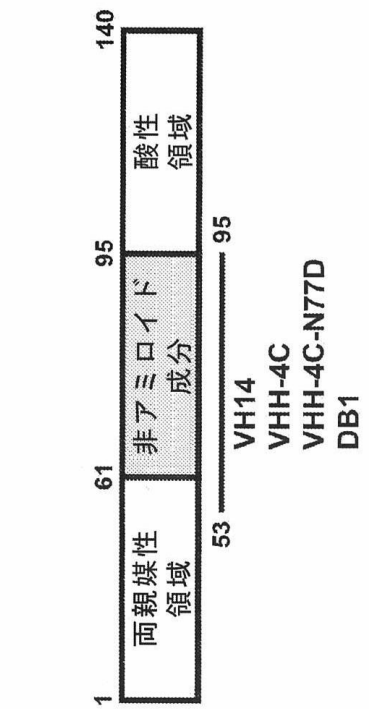


FIG. 6

【図７】

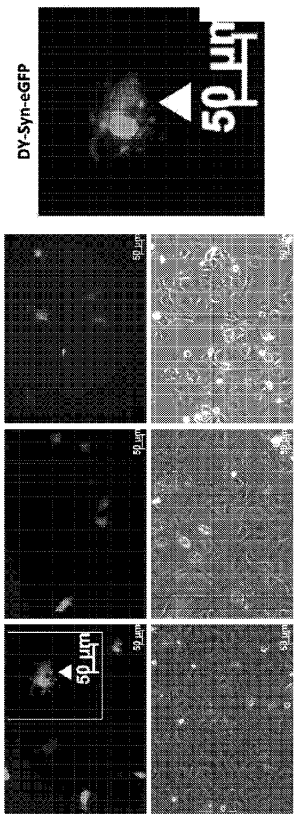


FIG. 7

【図８Ａ－Ｂ】

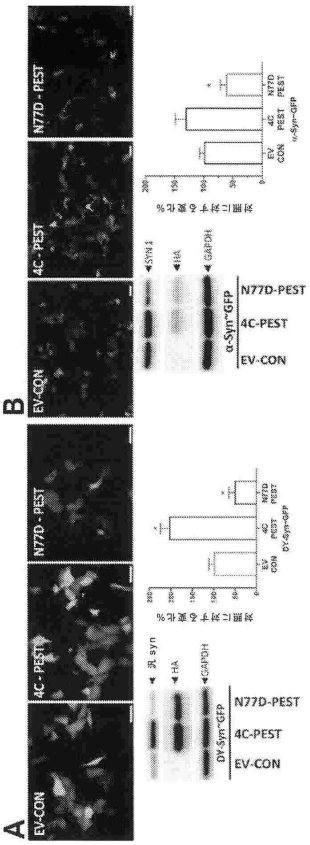


FIG. 8

【図９】

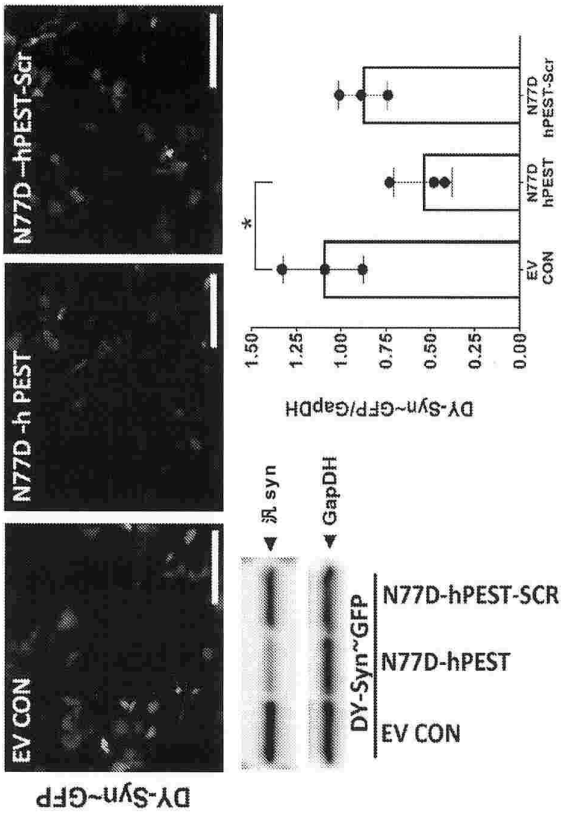


FIG. 9

【図１０Ａ－Ｂ】

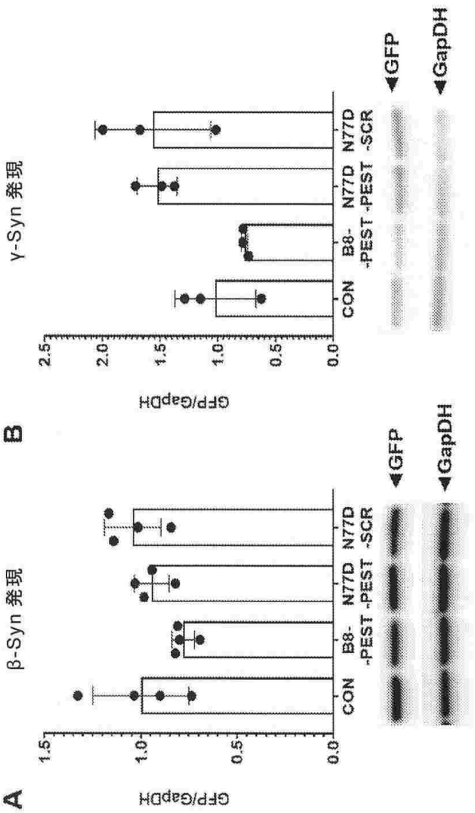


FIG. 10

【図１１Ａ－Ｂ】

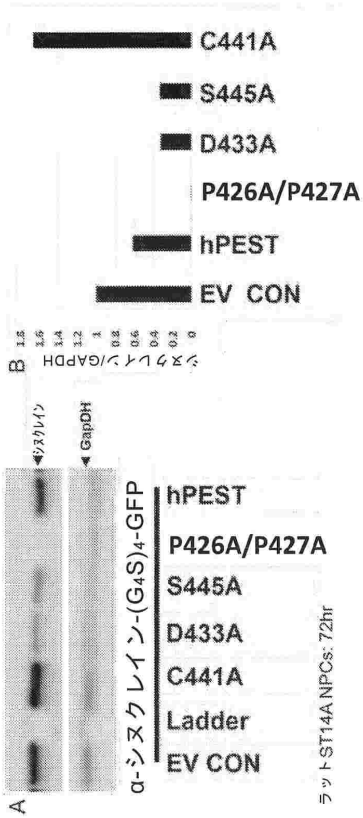


FIG. 11

【図１２Ａ－Ｃ】

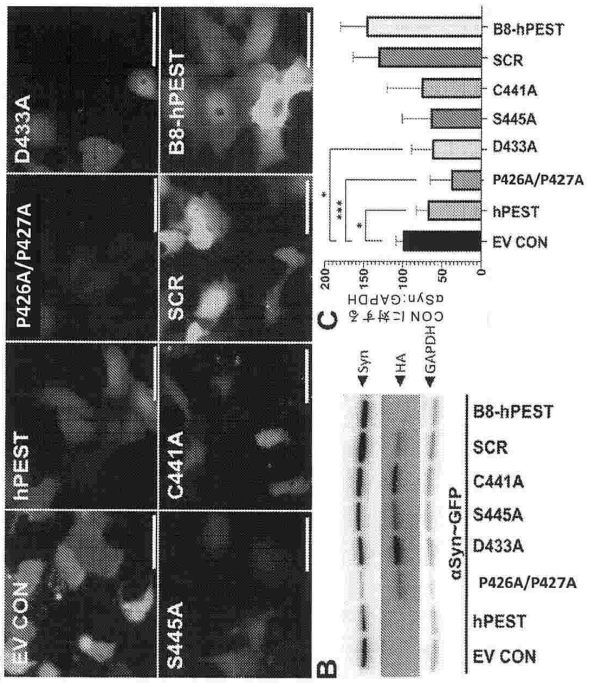


FIG. 12

【図１３】

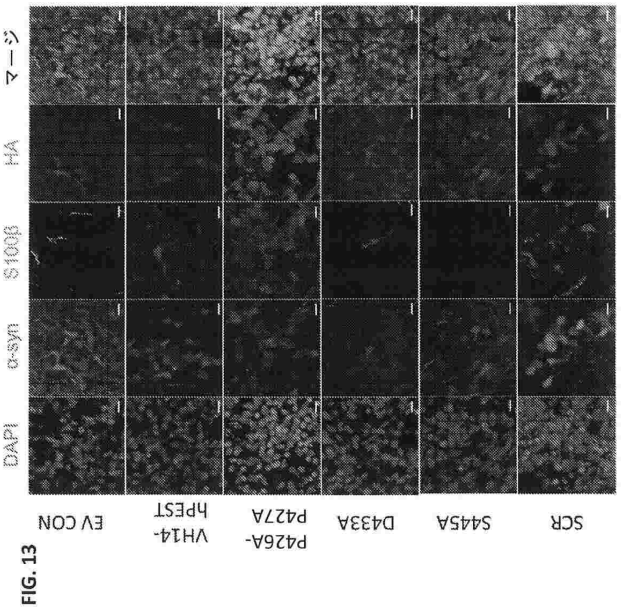


FIG. 13

【図１４】

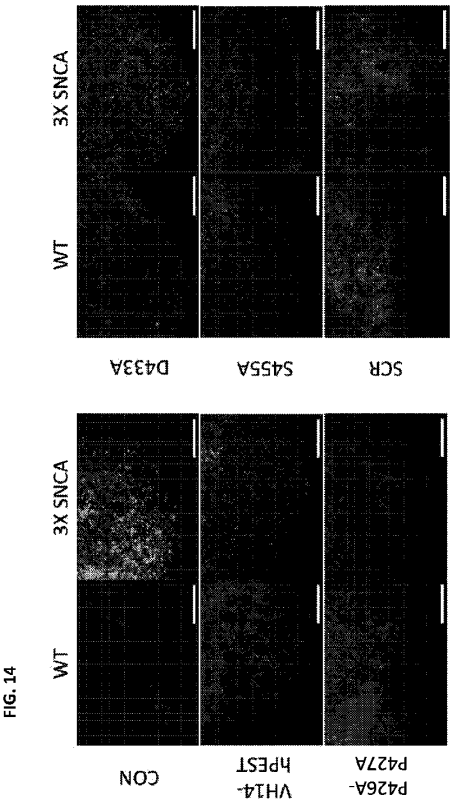


FIG. 14

【図１５Ａ－Ｂ】

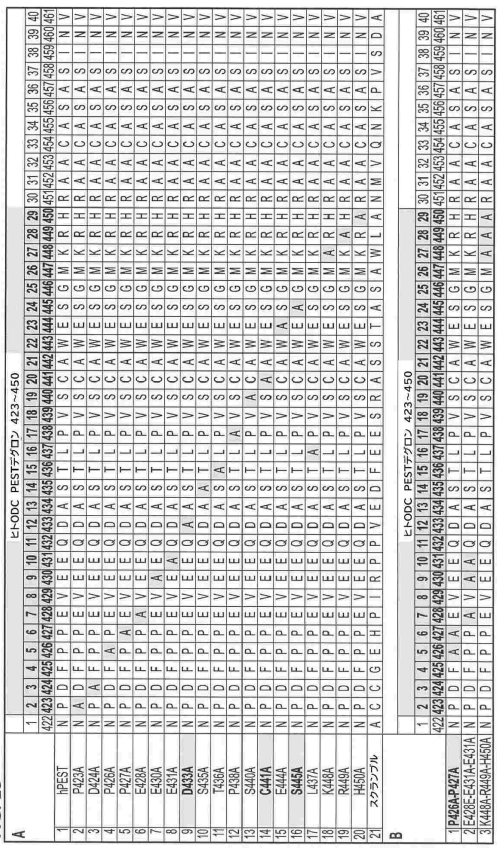


FIG. 15

【図１６】

FIG. 16

【図１７】

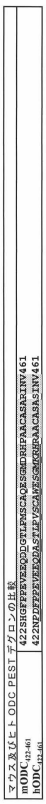


FIG. 17

【図１８Ａ－Ｃ】

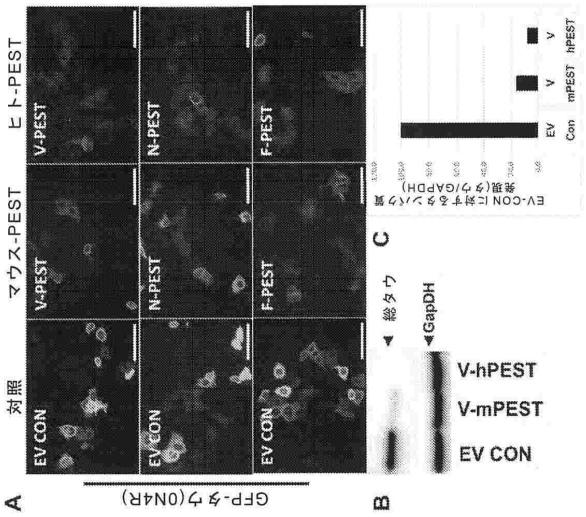


FIG. 18

【図１９Ａ－Ｂ】

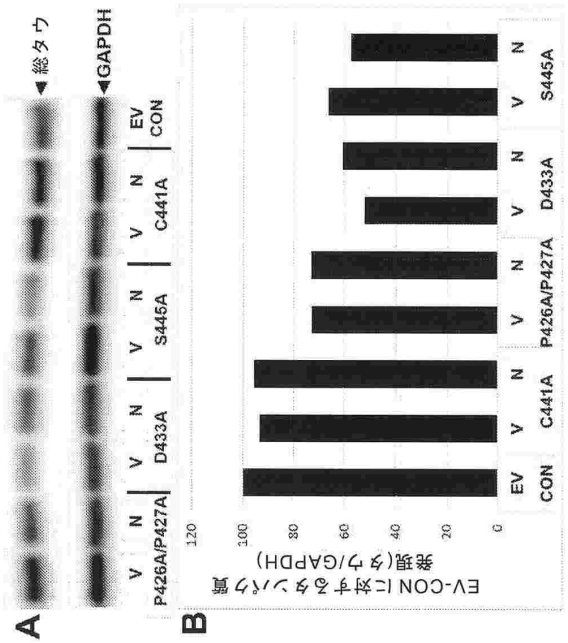


FIG. 19

【図２０Ａ－Ｃ】

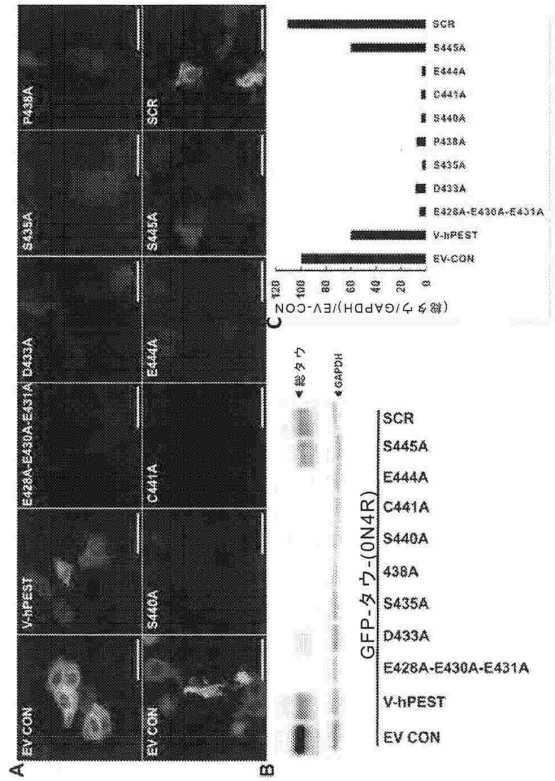


FIG. 20

【図２１Ａ－Ｃ】

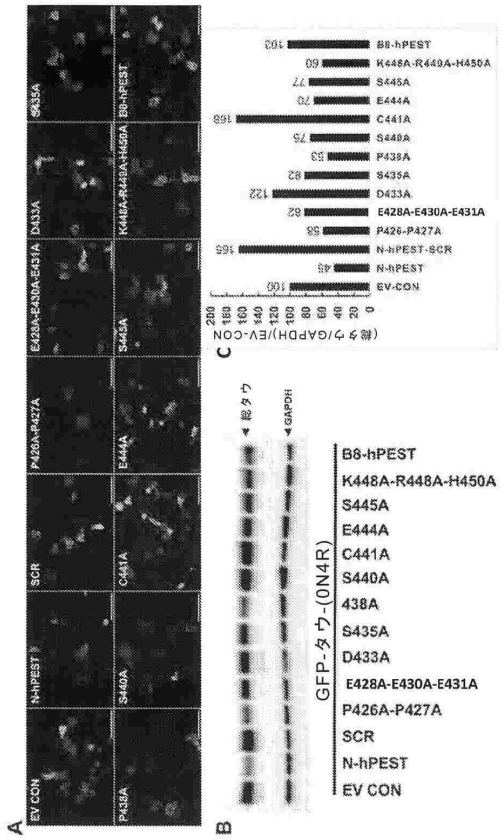


FIG. 21

【図２２Ａ－Ｃ】

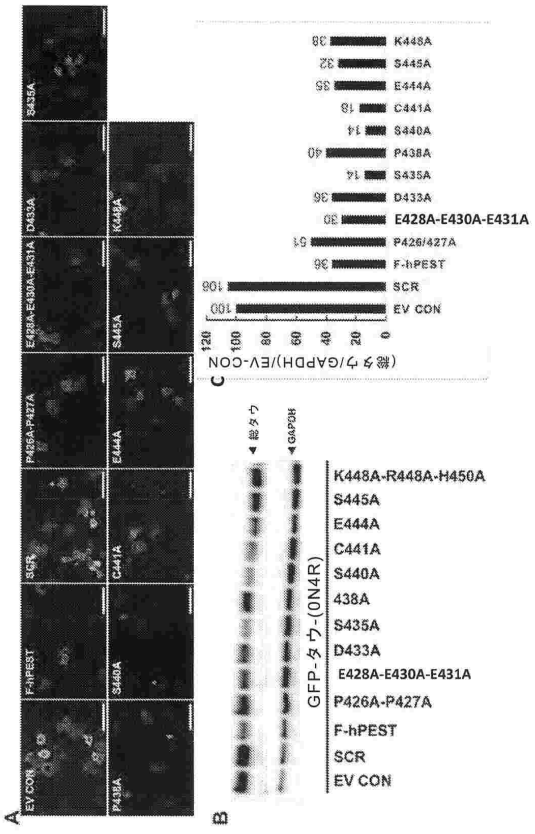


FIG. 22

【図２３Ａ－Ｅ】

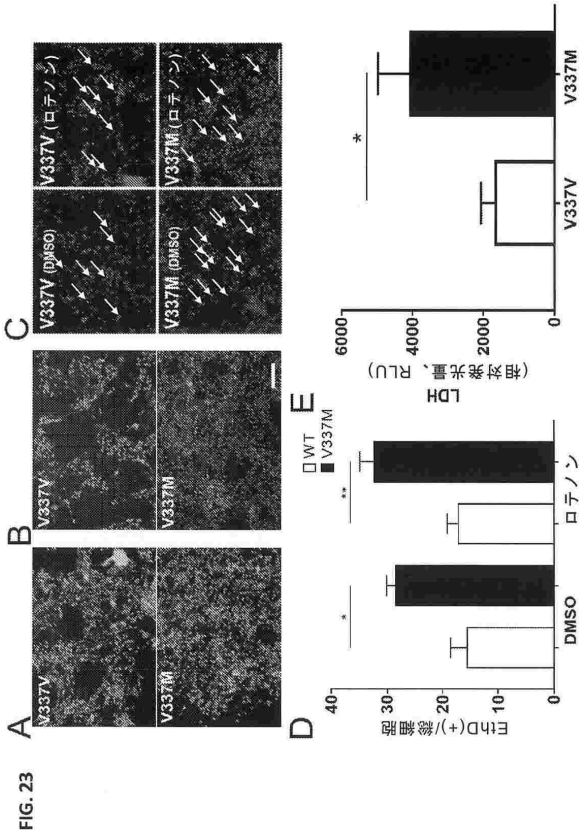


FIG. 23

【図２４】

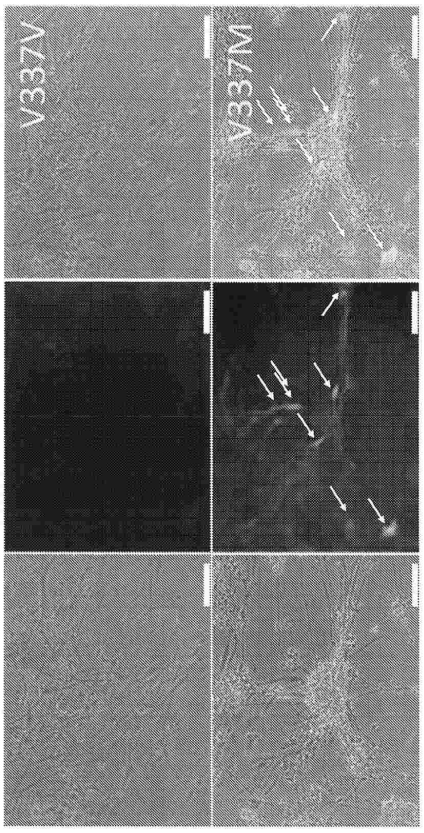


FIG. 24

【図２５】

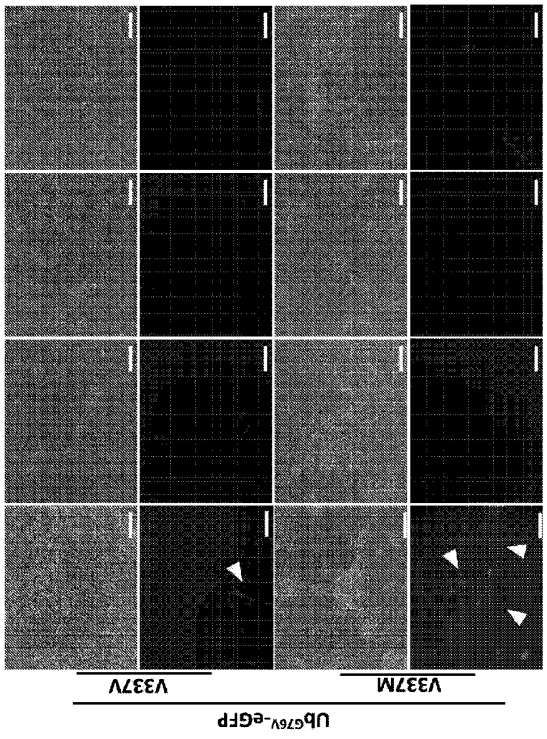


FIG. 25

【図２６】

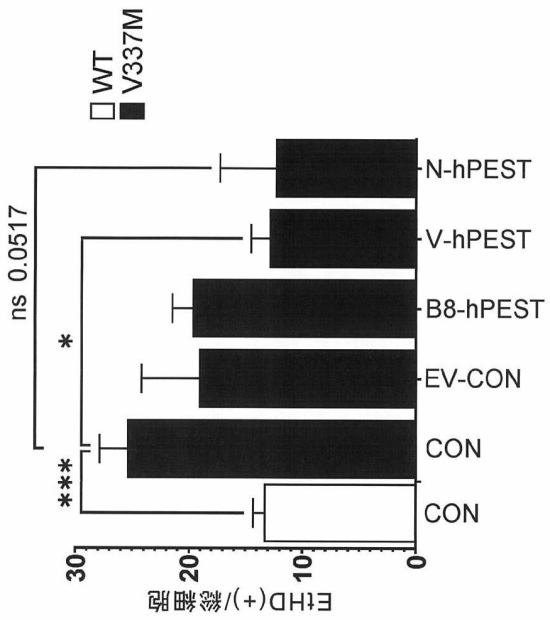


FIG. 26

【図２７】

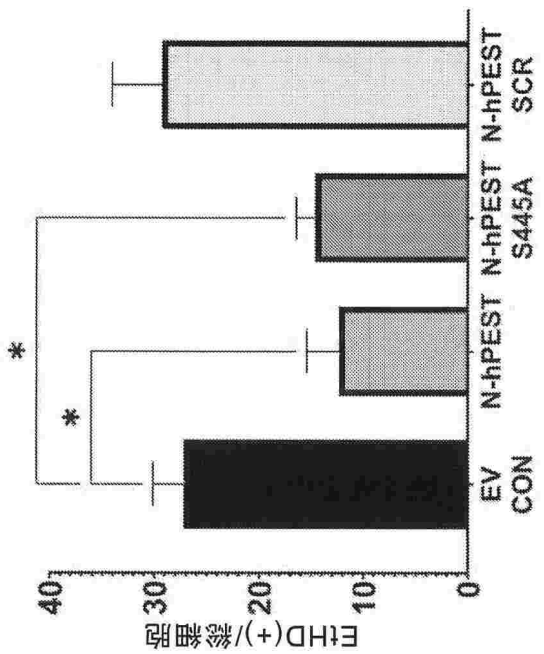


FIG. 27

【図２８】

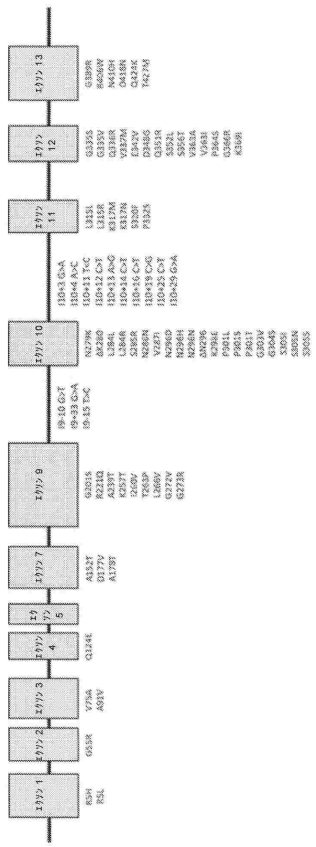


FIG. 28

【図２９Ａ－Ｂ】

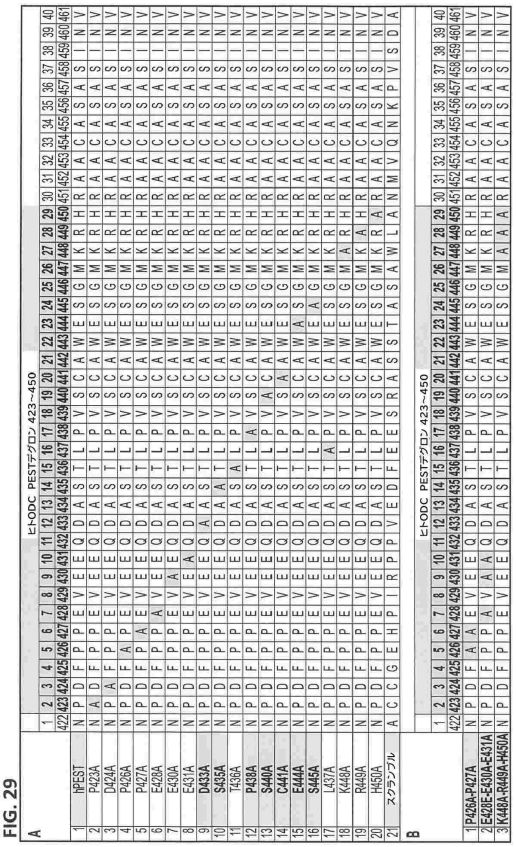


FIG. 29

【図３０】

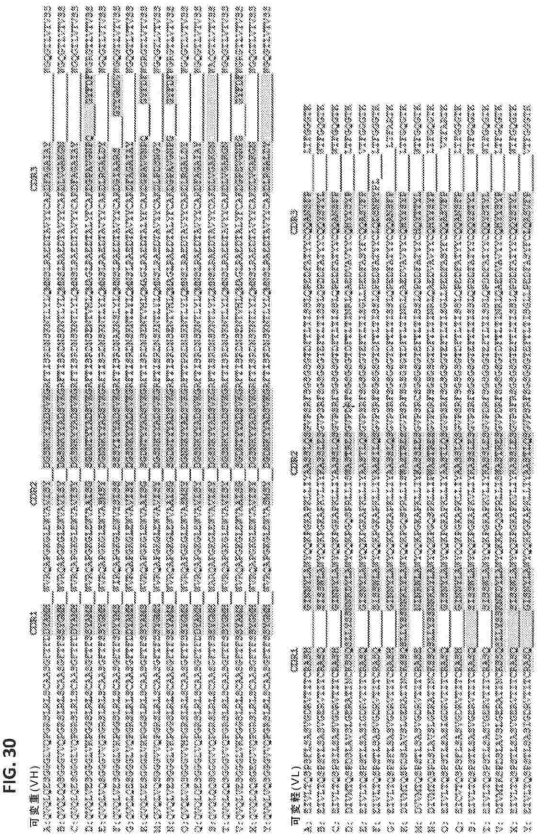


FIG. 30

【図３１Ａ－Ｂ】

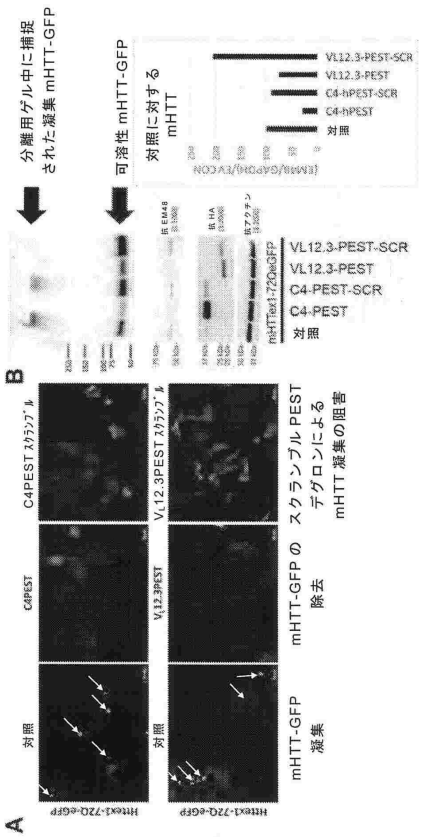


FIG. 31

【図３２Ａ－Ｂ】

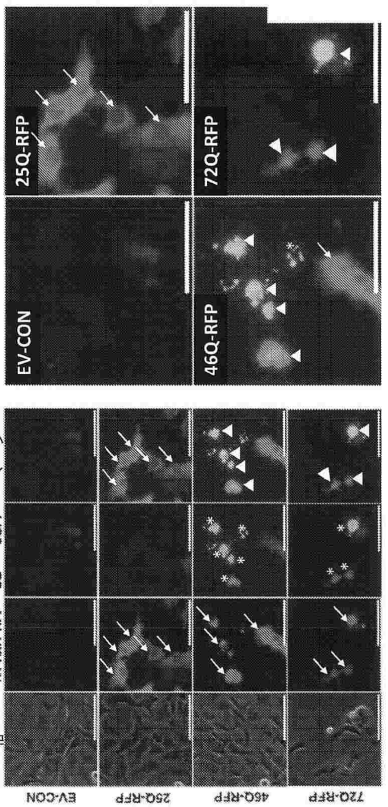


FIG. 32

【図３３】

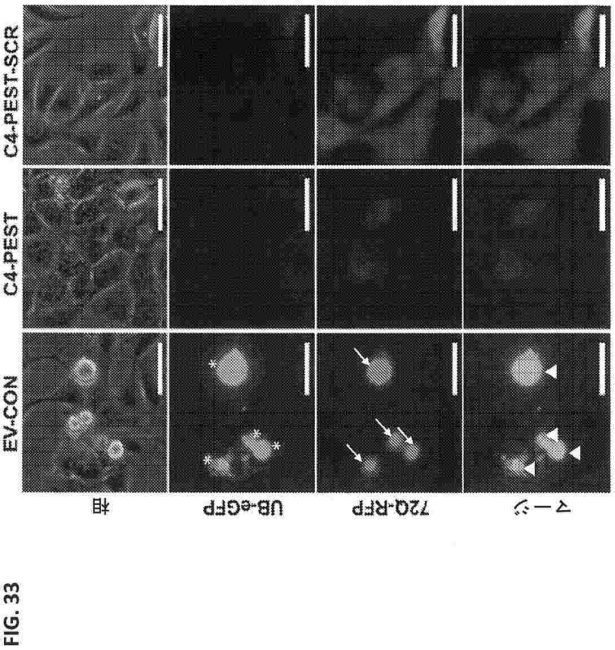
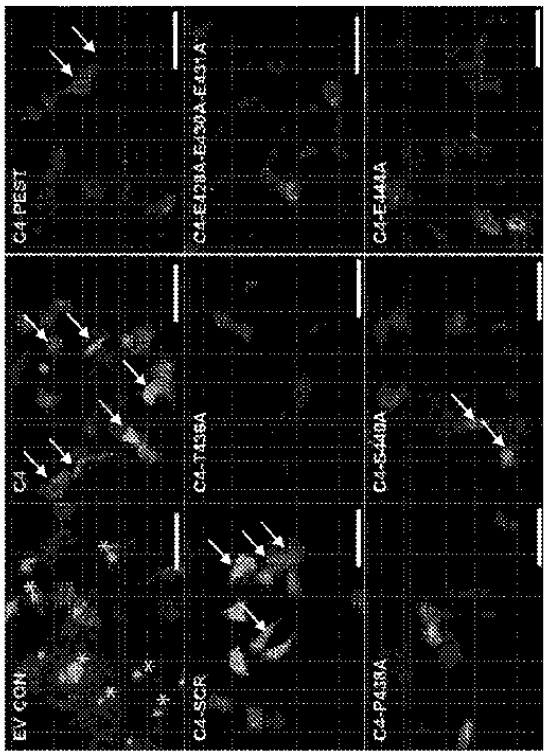
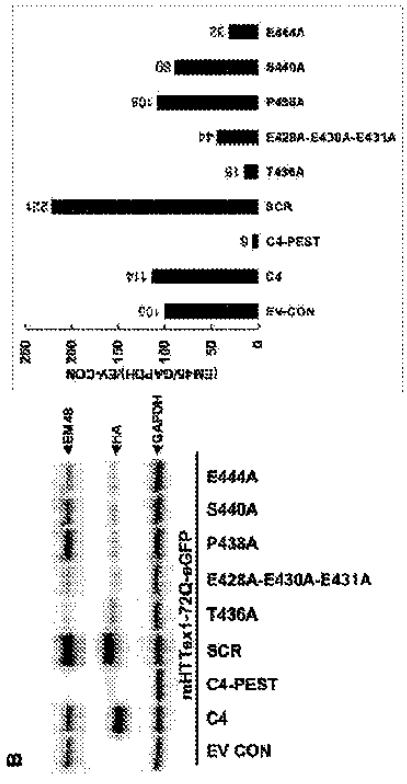


FIG. 33

【図３４Ａ】



【図３４Ｂ】



【図３５Ａ－Ｂ】

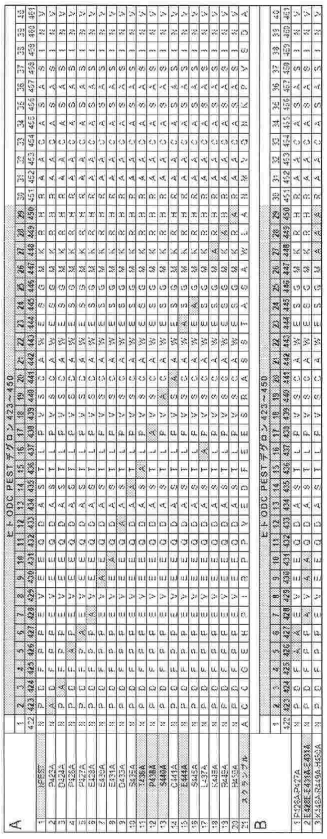


FIG. 35

【図３６】

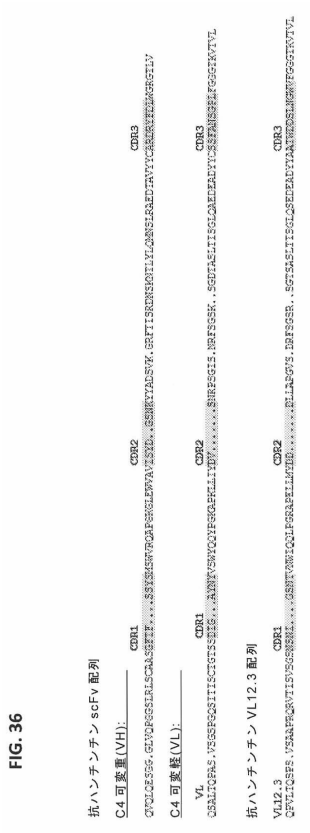


FIG. 36

【図３７Ａ－Ｃ】

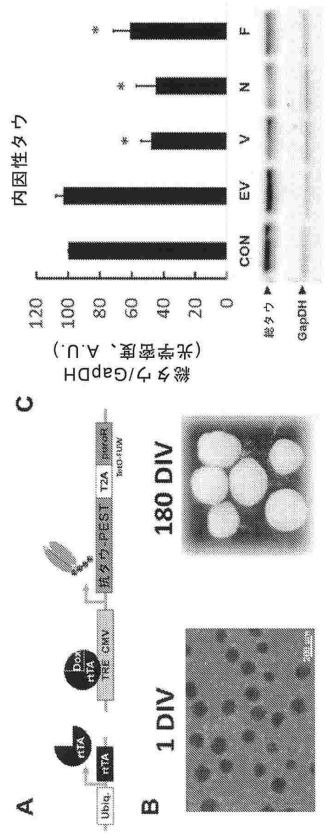


FIG. 37

【図３８Ａ－Ｃ】

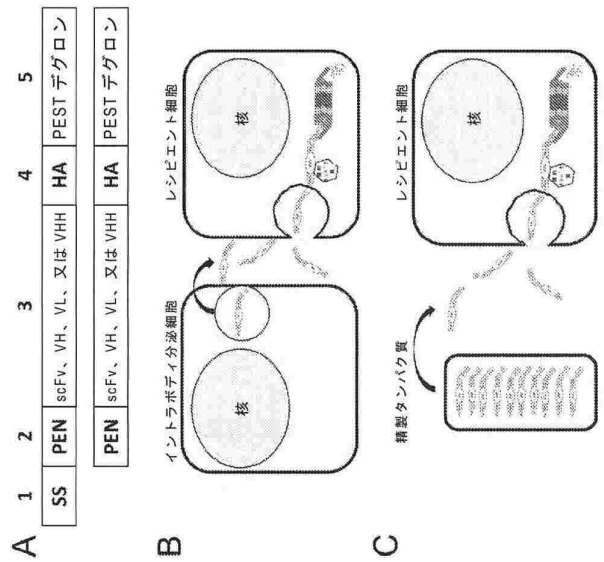


FIG. 38

【図３９Ａ－Ｄ】

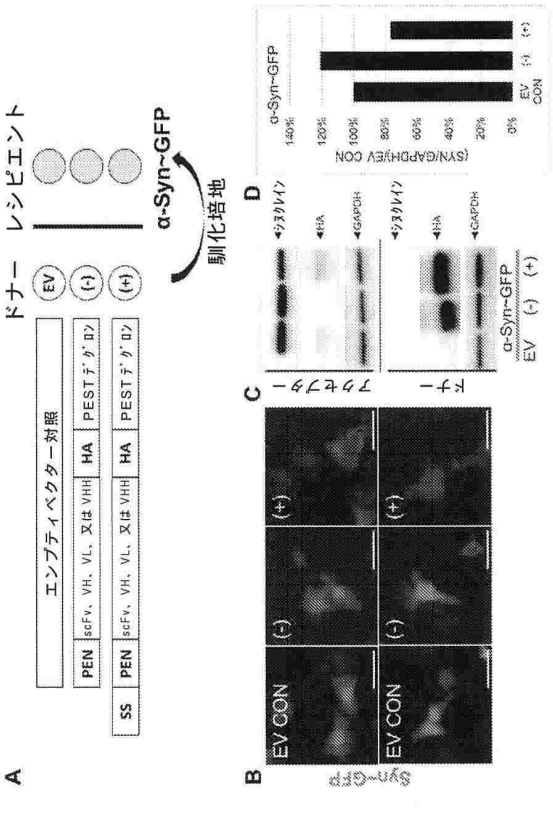


FIG. 39

【図４０Ａ－Ｃ】

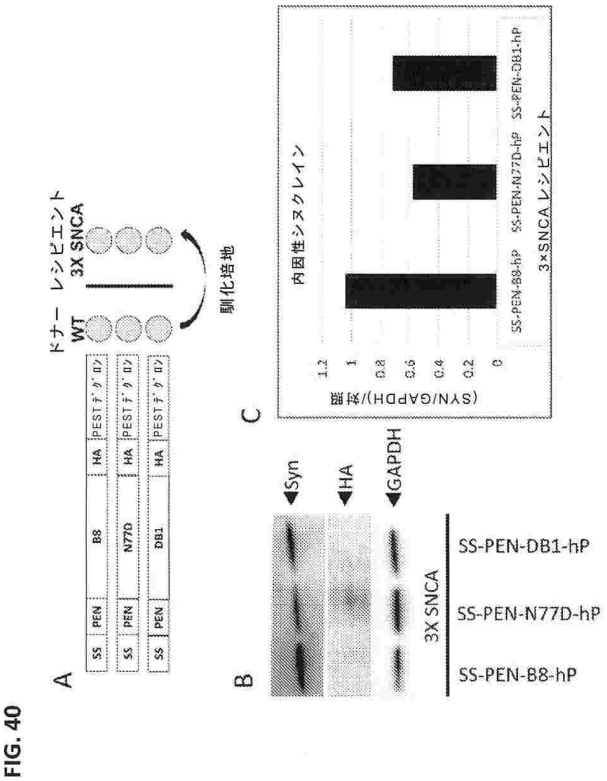


FIG. 40

【図４１Ａ－Ｃ】

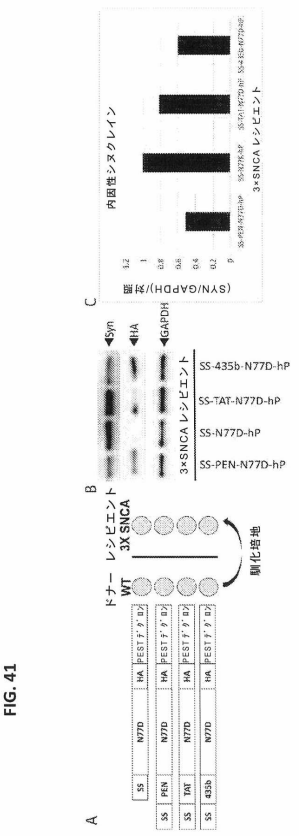


FIG. 41

【図４２Ａ－Ｄ】

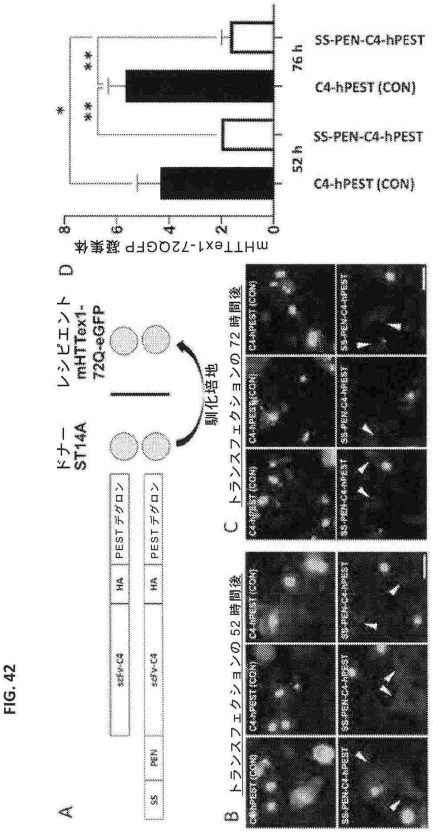
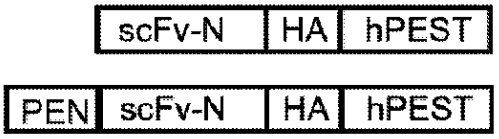


FIG. 42

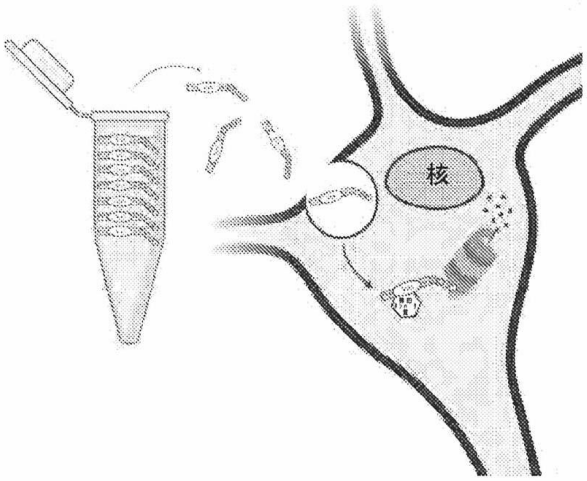
【図４３Ａ】

FIG. 43A



【図４３Ｂ】

FIG. 43B



【図４３Ｃ】

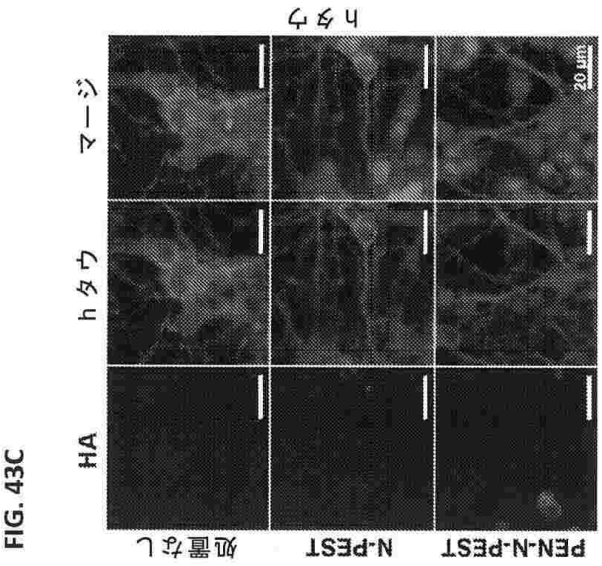


FIG. 43C

【図４３Ｄ】

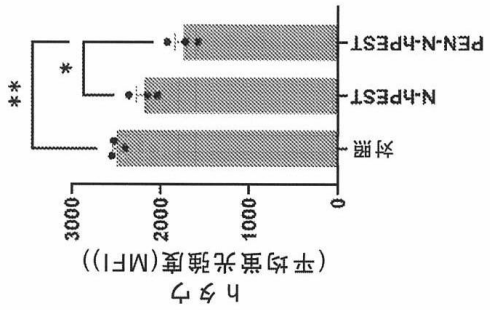


FIG. 43D

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/21652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 15/00; A61K 38/17; A61K 39/395; A61P 25/28; C07K 14/47; C07K 16/18 (2023.01)
ADD.

CPC - INV. C12N 15/00; A61K 38/1703; A61K 39/3955; A61P 25/28; C07K 16/18

ADD. A61K 2039/505; C07K 14/47; C07K 2317/569; C07K 2317/80; C07K 2319/95

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)
See Search History document

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

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	US 11,072,639 B2 (REGENERATIVE RESEARCH FOUNDATION) 27 July 2021; Columns 2, 4-7	1-3, 7/1-3, 8/7/1-3, 9/8/7/1-3, 10/9/8/7/1-3, 13/1-3, 16/1-3, 17/1-3, 18/1-3, 19/1-3, 95-97, 101/95-97, 102/101/95-97, 103/102/101/95-97, 104/95-97, 105/103/102/101/95-97, 106/105/103/102/101/95-97, 107/95-97, 108/95-97, 109/95-97, 110/95-97 — 4-5, 7/4-5, 8/7/4-5, 9/8/7/4-5, 10/9/8/7/4-5, 13/4-5, 16/4-5, 17/4-5, 18/4-5, 19/4-5, 98-99, 101/98-99, 102/101/98-99, 103/102/101/98-99, 104/98-99, 105/103/102/101/98-99, 106/105/103/102/101/98-99, 107/98-99,

☒ 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
11 October 2023 (11.10.2023)	DEC 08 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/21652

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
		108/98-99, 109/98-99, 110/98-99
Y — A	SPENCER, B. ET AL.. "a-synuclein conformational antibodies fused to penetratin are effective in models of Lewy body disease" 588-606. ANNALS of Clinical and Translational Neurology. 2016; Abstract; Page 603; DOI: 10.1002/acn3.321	1-3, 7/1-3, 8/7/1-3, 9/8/7/1-3, 10/9/8/7/1-3, 13/1-3, 16/1-3, 17/1-3, 18/1-3, 19/1-3, 95-97, 101/95-97, 102/101/95-97, 103/102/101/95-97, 104/95-97, 105/103/102/101/95-97, 106/105/103/102/101/95-97, 107/95-97, 108/95-97, 109/95-97, 110/95-97 — 4-5, 7/4-5, 8/7/4-5, 9/8/7/4-5, 10/9/8/7/4-5, 13/4-5, 16/4-5, 17/4-5, 18/4-5, 19/4-5, 98-99, 101/98-99, 102/101/98-99, 103/102/101/98-99, 104/98-99, 105/103/102/101/98-99, 106/105/103/102/101/98-99, 107/98-99, 108/98-99, 109/98-99, 110/98-99
Y — A	US 10,066,019 B2 (AGENCY FOR SCIENCE TECHNOLOGY AND RESEARCH) 04 September 2018; Claim 1	17/1-3, 108/95-97 — 17/4-5, 108/98-99
Y — A	US 2020/0270307 A1 (FELDAN BIO INC.) 27 August 2020	18/1-3, 109/95-97 — 18/4-5, 109/98-99
Y — A	HOFFMANN, K. ET AL.. "A platform for discovery of functional cell-penetrating peptides for efficient multi-cargo intracellular delivery" Scientific Reports. August 2018; Abstract; Figure 2; Page 5; DOI: 10.1038/s41598-018-30790-2	19/1-3, 110/95-97 — 19/4-5, 110/98-99
A	JOSHI, S. ET AL.. "Fusion to a highly charged proteasomal retargeting sequence increases soluble cytoplasmic expression and efficacy of diverse anti-synuclein intrabodies" 686-693. December 2012; Abstract; Pages 688, 692; Figure 1; DOI: 10.4161/mabs.21696	4-5, 7/4-5, 8/7/4-5, 9/8/7/4-5, 10/9/8/7/4-5, 13/4-5, 16/4-5, 17/4-5, 18/4-5, 19/4-5, 21, 98-99, 101/98-99, 102/101/98-99, 103/102/101/98-99, 104/98-99, 105/103/102/101/98-99, 106/105/103/102/101/98-99, 107/98-99, 108/98-99, 109/98-99, 110/98-99
A	US 11,273,137 B2 (BOARD OF TRUSTEES OF MICHIGAN STATE UNIVERSITY) 15 March 2022; Column 2	4-5, 7/4-5, 8/7/4-5, 9/8/7/4-5, 10/9/8/7/4-5, 13/4-5, 16/4-5, 17/4-5, 18/4-5, 19/4-5
A	US 7,595,379 B2 (GUDAS JEAN) 29 September 2009; Column 9	21
A	US 2013/0156781 A1 (DIMITROV DIMITER) 20 June 2013; Paragraph [0034]	21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/21652

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/21652

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.: 11-12, 14-15, 20, 22-30, 45-46, 48-51, 53-58, 76-79, 81-94, 111-123
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:
-***-Please See Supplemental Page-***-

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.:
-***-Please See Supplemental Page-***-

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/21652

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-10, 13, 16-19, 21, 31-44, 47, 52, 59-75, 80, 95-110, and alpha-synuclein (protein bound by antigen-binding domain), alanine (amino acid substitution type), amino acids 164-191 in SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 130 (PEST domain sequence), single domain antibody (intrabody type), VH alpha-synuclein (single domain antibody type), SEQ ID NO: 18 (VH antibody domain sequence), SEQ ID NO: 49 (signal peptide sequence), SEQ ID NO: 150 (cell penetrating peptide sequence), SEQ ID NO: 164 (recombinant polypeptide sequence) are directed towards recombinant polypeptides.

The recombinant polypeptides of Claims 1-2, 3-5 (each in-part), 7/1-5, 8/7/1-5, 9/8/7/1-5, 10/9/8/7/1-5 (in-part), 13/1-5, 16/1-5, 17/1-5 (in-part), 18/1-5 (in-part), 19/1-5, 21 (in-part), 95-96, 97-99 (each in-part), 101/95-99, 102/101/95-99, 103/102/101/95-99, 104/95-99, 105/103/102/101/95-99, 106/105/103/102/101/95-99, 107/95-99, 108/95-99 (in-part), 109/95-99 (in-part), 110/95-99 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass alpha-synuclein (first exemplary protein bound by antigen-binding domain), alanine (first exemplary amino acid substitution type), amino acids 164-191 in SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 130 (first exemplary PEST domain sequence), single domain antibody (exemplary intrabody type selected based on PEST domain sequence selection), VH alpha-synuclein (exemplary single domain antibody type selected based on intrabody type selection), SEQ ID NO: 18 (exemplary VH antibody domain sequence selected based on intrabody type selection), SEQ ID NO: 49 (first exemplary signal peptide sequence), SEQ ID NO: 150 (first exemplary cell penetrating peptide sequence), SEQ ID NO: 164 (exemplary recombinant polypeptide sequence selected based on PEST domain selection). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species or the most suitable species based on the selected first species of each of the genera found in claims 3-5, 10, 17-18, 21, 97-99, 108-109 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional protein(s), amino acid substitution type(s), PEST domain sequence(s), intrabody type(s), single domain antibody type(s), signal peptide sequence(s), cell penetrating peptide sequence(s), recombinant polypeptide sequence(s) to be searched. Additional protein(s), amino acid substitution type(s), PEST domain sequence(s), intrabody type(s), single domain antibody type(s), signal peptide sequence(s), cell penetrating peptide sequence(s), recombinant polypeptide sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected protein(s), amino acid substitution type(s), PEST domain sequence(s), intrabody type(s), single domain antibody type(s), signal peptide sequence(s), cell penetrating peptide sequence(s), recombinant polypeptide sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. Exemplary elections would be tau (protein bound by antigen-binding domain), alanine (amino acid substitution type), amino acids 164-191 in SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 130 (PEST domain sequence), single domain antibody (intrabody type), SEQ ID NO: 162 (recombinant polypeptide sequence).

Groups I+ share the technical features including: a recombinant polypeptide comprising from N-terminal to C-terminal: (a) an optional signal peptide domain; (b) a cell penetrating peptide; (c) an antigen-binding domain that binds a protein; and (d) a programmable proteasome-targeting human or mouse PEST domain; or II. (a) an optional signal peptide domain; (b) a programmable proteasome-targeting human or mouse PEST domain; (c) an antigen-binding domain that binds a protein; and (d) a cell penetrating peptide. These shared technical features are previously disclosed by US 2019/0202879 A1 to Regenerative Research Foundation (hereinafter "Regenerative") in view of the publication entitled "alpha-synuclein conformational antibodies fused to penetratin are effective in models of Lewy body disease" by Spencer, et al. (hereinafter "Spencer").

Regenerative discloses a recombinant polypeptide comprising from N-terminal to C-terminal: (a) an optional signal peptide domain; (c) an antigen-binding domain that binds a protein; and (d) a programmable proteasome-targeting human or mouse PEST domain; or II. (a) an optional signal peptide domain; (b) a programmable proteasome-targeting human or mouse PEST domain; (c) an antigen-binding domain that binds a protein (recombinantly produced polypeptides comprising a first domain comprising an anti-tau antigen binding domain and a second domain comprising a PEST motif, and a signal sequence, wherein any of the two domains would intrinsically be at the N- and C-terminals; abstract; paragraphs [0101], [0102]).

Regenerative does not disclose a recombinant polypeptide comprising a cell penetrating peptide.

Spencer discloses a recombinant polypeptide comprising an antigen-binding domain that binds a protein and a cell-penetrating peptide (scFv against alpha-synuclein was fused to the cell-penetrating peptide penetratin; abstract).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the recombinant polypeptide, as previously disclosed by Regenerative, for the integration of a recombinant polypeptide comprising an antigen-binding domain that binds a protein and a cell-penetrating peptide, as taught by Spencer, as this combination would provide the capability of constructing a recombinant polypeptide comprising a signal domain, a PEST domain, an antibody domain that binds pathological protein, and a CPP domain, arranged N- to C-terminal, which can be used as a therapeutic for neurodegenerative diseases caused by pathological proteins, such as alpha synuclein or tau.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions are found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Regenerative and Spencer references, unity of invention is lacking.

-***-Continued From Box III: Item IV-***-

Groups I+, Claims 1-10, 13, 16-19, 21, 31-44, 47, 52, 59-75, 80, 95-110, and alpha-synuclein (protein bound by antigen-binding domain), alanine (amino acid substitution type), amino acids 164-191 in SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 130 (PEST domain sequence), single domain antibody (intrabody type), VH alpha-synuclein (single domain antibody type), SEQ ID NO: 18 (VH antibody domain sequence), SEQ ID NO: 49 (signal peptide sequence), SEQ ID NO: 150 (cell penetrating peptide sequence), SEQ ID NO: 164 (recombinant polypeptide sequence).

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12P 21/02 (2006.01)		C12P	21/02	C
C12P 21/08 (2006.01)		C12P	21/08	
A61P 25/16 (2006.01)		A61P	25/16	
A61P 25/00 (2006.01)		A61P	25/00	
A61P 25/28 (2006.01)		A61P	25/28	
A61K 39/395(2006.01)		A61K	39/395	D
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	39/395	N
		A61K	48/00	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,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,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,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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ
２．ＴＲＩＴＯＮ

弁理士　松田 七重
(74)代理人　100111501
弁理士　滝澤 敏雄
(72)発明者　バトラー デヴィッド
アメリカ合衆国 １２１４４ ニューヨーク州 レンセリア ディスカバリー ドライヴ ワン リジェネレイティブ リサーチ ファウンデーション内

Ｆターム（参考）
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA93X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA13 MA66 NA14 ZA021 ZA022 ZA151 ZA152 ZA161 ZA162
4C085 AA13 AA14 BB31 CC22 CC23 DD62 EE01 GG02 GG03 GG04 GG06
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA21 FA84