

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6744856号  
(P6744856)

(45) 発行日 令和2年8月19日(2020.8.19)

(24) 登録日 令和2年8月4日(2020.8.4)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/13	(2006.01)
C 07 K 16/18	(2006.01)
C 07 K 16/46	(2006.01)
C 07 K 16/28	(2006.01)
C 12 P 21/08	(2006.01)
	C 12 N 15/13
	C 07 K 16/18
	C 07 K 16/46
	C 07 K 16/28
	C 12 P 21/08

請求項の数 65 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-504288 (P2017-504288)
(86) (22) 出願日	平成27年4月8日(2015.4.8)
(65) 公表番号	特表2017-514515 (P2017-514515A)
(43) 公表日	平成29年6月8日(2017.6.8)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2015/052524
(87) 國際公開番号	W02015/155694
(87) 國際公開日	平成27年10月15日(2015.10.15)
審査請求日	平成30年3月20日(2018.3.20)
(31) 優先権主張番号	61/977,039
(32) 優先日	平成26年4月8日(2014.4.8)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/977,042
(32) 優先日	平成26年4月8日(2014.4.8)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	515069277 プロセナ・バイオサイエンシズ・リミテッド アイルランド国 ダブリン 1, ノース・ウォール・キー 25-28
(73) 特許権者	591003013 エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT T スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラッセ124
(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】  $\alpha$ -シヌクレインを認識する抗体を含む血液脳関門シャトル

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

血液脳関門シャトルであって、

(a) 配列番号10、11、および12のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1-3と、配列番号25、26、および27のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1-3とを含む抗体を含む脳エフェクターエンティティー；および

(b) 血液脳関門受容体に結合する一価の結合エンティティー；

を含み、前記脳エフェクターエンティティーが前記一価の結合エンティティーと連結されている、血液脳関門シャトル。

## 【請求項 2】

脳エフェクターエンティティー抗体が、配列番号1の残基120-122からなり、かつ配列番号1の残基118-119を除くエピトープでヒト-シヌクレインに結合する、請求項1に記載の血液脳関門シャトル。

## 【請求項 3】

脳エフェクターエンティティー抗体が、配列番号1の残基120-124からなるエピトープでヒト-シヌクレインに結合する、請求項1に記載の血液脳関門シャトル。

## 【請求項 4】

脳エフェクターエンティティー抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項1-3のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

## 【請求項 5】

10

20

脳エフェクターエンティティー抗体がヒト化抗体である、請求項 1 - 4 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 6】

脳エフェクターエンティティー抗体のアイソタイプがヒト IgG1 である、請求項 1 - 5 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 7】

脳エフェクターエンティティー抗体が、定常領域に少なくとも 1 つ変異を有する、請求項 1 - 6 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 8】

変異が、定常領域による補体結合または活性化を減少させる、請求項 7 に記載の血液脳関門シャトル。 10

【請求項 9】

脳エフェクターエンティティー抗体が、Fab フラグメント、F(ab')2 フラグメント、または scFv である、請求項 1 - 8 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。 20

【請求項 10】

血液脳関門シャトルであって、  
(a) H4 (配列番号 17) に少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有し、配列番号 10、11、および 12 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖 CDR1 - 3 を含む成熟重鎖可変領域および L3 (配列番号 31) に少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を有し、配列番号 25、26、および 27 のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖 CDR1 - 3 を含む成熟軽鎖可変領域を含む抗体を含む、脳エフェクターエンティティーであって、前記抗体がヒト - シヌクレインに特異的に結合する、脳エフェクターエンティティー；および 20

(b) 血液脳関門受容体に結合する一価の結合エンティティー；  
を含み、前記脳エフェクターエンティティーが前記一価の結合エンティティーと連結されている、血液脳関門シャトル。

【請求項 11】

脳エフェクターエンティティー抗体の位置 H11、H27、H30、H48、および H73 の少なくとも 1 つが、L、Y、T、I、および K によりそれぞれ占められ、および脳エフェクターエンティティー抗体の位置 L12 および L14 の少なくとも 1 つが、S により占められている、請求項 10 に記載の血液脳関門シャトル。 30

【請求項 12】

脳エフェクターエンティティー抗体の位置 H11、H27、H30、H48、および H73 が、それぞれ L、Y、T、I、および K により占められ、脳エフェクターエンティティー抗体の位置 L12 および L14 が、S により占められている、請求項 11 に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 13】

脳エフェクターエンティティー抗体の位置 H67、H69、および H94 の少なくとも 1 つが、A、L、および S によりそれぞれ占められている、請求項 11 - 12 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。 40

【請求項 14】

脳エフェクターエンティティー抗体の位置 H67、H69、および H94 が、A、L、および S によりそれぞれ占められている、請求項 13 に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 15】

脳エフェクターエンティティー抗体の位置 H94 が S によって占められている、請求項 13 の血液脳関門シャトル。

【請求項 16】

脳エフェクターエンティティー抗体の位置 L2、L49、および L87 の少なくとも 1 つが、V、N、および F によりそれぞれ占められている、請求項 11 - 12 のいずれか一 50

項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 17】

脳エフェクターエンティティー抗体の位置 L2、L49、およびL87がV、N、およびFによりそれぞれ占められている、請求項16に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 18】

脳エフェクターエンティティー抗体が、H4（配列番号17）に少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する成熟重鎖可変領域と、L3（配列番号31）に少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する成熟軽鎖可変領域とを含む、請求項10-17のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 19】

脳エフェクターエンティティー抗体の成熟重鎖可変領域が、H4と名付けられたアミノ酸配列（配列番号17）を有し、脳エフェクターエンティティー抗体の成熟軽鎖可変領域がL3と名付けられたアミノ酸配列（配列番号31）を有する、請求項10に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 20】

脳エフェクターエンティティー抗体の成熟重鎖可変領域がH5と名付けられたアミノ酸配列（配列番号18）を有し、脳エフェクターエンティティー抗体の成熟軽鎖可変領域がL3と名付けられたアミノ酸配列（配列番号31）を有する、請求項10に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 21】

一価の結合エンティティーが、血液脳関門受容体リガンド、抗体フラグメント、または他のポリペプチドを含む、請求項1-20のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 22】

一価の結合エンティティーが、scFv、Fv、scFab、sFab、またはVHHである抗体フラグメントを含む、請求項21に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 23】

抗体フラグメントが、sFabである、請求項22に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 24】

血液脳関門受容体が、トランスフェリン受容体、インスリン受容体、インスリン様成長因子受容体、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質8、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1、またはヘパリン結合性上皮細胞成長因子様成長因子である、請求項1-23のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 25】

血液脳関門受容体がトランスフェリン受容体である、請求項24に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 26】

一価の結合エンティティーが、トランスフェリン受容体に特異的に結合するsFabを含む、請求項1-25のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 27】

sFabが、配列番号43、配列番号44、および/または配列番号45内のエピトープに結合する、請求項26に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 28】

脳エフェクターエンティティーが、第一のリンカーにより一価の結合エンティティーに連結されている、請求項1-27のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 29】

第一のリンカーがペプチドリンカーである、請求項28に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 30】

ペプチドリンカーが、少なくとも20のアミノ酸長を有する、請求項29に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 31】

10

20

30

40

50

ペプチドリンカーが 25 ~ 50 のアミノ酸長を有する、請求項 30 に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 32】

ペプチドリンカーが、配列番号 41 のアミノ酸配列を有する、請求項 30 に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 33】

一価の結合エンティティーが、第一のリンカーにより、脳エフェクターエンティティー抗体の重鎖の C 末端に連結されている、請求項 28 - 32 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 34】

一価の結合エンティティーが CH2 - CH3 Ig エンティティーおよび血液脳関門受容体に特異的に結合する sFab を含み、前記 sFab が前記 CH2 - CH3 Ig エンティティーの C 末端に連結されている、請求項 1 - 33 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 35】

(a) 一価の結合エンティティーが、CH2 - CH3 Ig エンティティーおよび血液脳関門受容体に特異的に結合する sFab を含み；

(b) 第一のリンカーにより CH2 - CH3 Ig ドメインの N 末端が脳エフェクターエンティティーに連結され；かつ

(c) 第二のリンカーにより CH2 - CH3 Ig ドメインの C 末端が sFab に連結されている、

請求項 1 - 34 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 36】

CH2 - CH3 Ig エンティティーが、CH2 - CH3 IgG エンティティーである、請求項 34 または 35 に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 37】

脳エフェクターエンティティー抗体が重鎖の Fc 領域を含み、一価の結合エンティティーが前記重鎖の Fc 領域の C 末端と連結されている、請求項 1 - 8 または 10 - 25 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 38】

脳エフェクターエンティティー抗体が 2 つの重鎖を含み、一価の結合エンティティーが前記重鎖の一方の Fc 領域の C 末端とのみ連結されている、請求項 37 に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 39】

脳エフェクターエンティティー抗体が、第一および第二の二量体形成モジュールを含むヘテロ二量体化重鎖を含み、前記第一および第二の二量体形成モジュールの一方のみが一価の結合エンティティーに連結されている、請求項 37 に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 40】

第一の二量体形成モジュールがノブを含み、第二の二量体形成モジュールが前記ノブを受けるホールを含む、請求項 39 に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 41】

(a) 脳エフェクターエンティティー抗体が Fc 領域を含む IgG 重鎖を含み；

(b) 一価の結合エンティティーが sFab を含み；

(c) 脳エフェクターエンティティー抗体重鎖の Fc 領域の C 末端が sFab の可変軽鎖ドメインの N 末端に連結されており；かつ

(d) sFab の C - 軽鎖ドメインの C 末端が、sFab の可変重鎖ドメインの N 末端に連結されている、

請求項 37 - 40 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 42】

血液脳関門シャトルであって：

10

20

30

40

50

(a) 配列番号 5 9 を含むアミノ酸配列を有する軽鎖と、配列番号 5 3 および 6 9 をそれぞれ含む、または配列番号 5 5 および 7 0 をそれぞれ含むアミノ酸配列を有する第一および第二の二量体形成モジュールを伴うヘテロ二量体化重鎖とを伴う抗体を含む、脳エフェクターエンティティー；

(b) 第一のリンカー；および

(c) 配列番号 6 4 を含むアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号 6 3 を含むアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む 8 D 3 - s c F a b を含む一価の結合エンティティーであって、前記 8 D 3 - s c F a b の重鎖および軽鎖が第二のリンカーにより連結されている、一価の結合エンティティー；

を含み、前記脳エフェクターエンティティー抗体の第一および第二の二量体形成モジュールの一方のみが、第一のリンカーにより一価の結合エンティティーと連結されている、血液脳関門シャトル。 10

【請求項 4 3】

8 D 3 - s c F a b が、それぞれ配列番号 6 2 および 6 1 を含むアミノ酸配列を有する重鎖および軽鎖を含む、請求項 4 2 に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 4 4】

第一のリンカーが、脳エフェクターエンティティー抗体の重鎖の C 末端を、一価の結合エンティティーの N 末端と連結する、請求項 4 2 または 4 3 に記載の血液脳関門シャトル。 20

【請求項 4 5】

第一のリンカーが配列番号 4 1、4 2、または 7 3 を含むアミノ酸配列を有する、請求項 4 2 - 4 4 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトル。

【請求項 4 6】

請求項 1 - 4 5 のいずれか一項で規定される血液脳関門シャトル、および医薬上許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 4 7】

請求項 4 5 に記載の血液脳関門シャトルをコードする核酸。

【請求項 4 8】

配列番号 5 3、5 7、および 5 9 を含むアミノ酸配列をコードする核酸。

【請求項 4 9】

配列番号 5 5、5 8、および 5 9 を含むアミノ酸配列をコードする核酸。 30

【請求項 5 0】

請求項 4 7 - 4 9 のいずれか一項に記載の核酸を含む、組換え発現ベクター。

【請求項 5 1】

配列番号 5 3、5 7、および 5 9 をそれぞれ含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む、3 つの組換え発現ベクターを含む、遺伝子導入混合物。

【請求項 5 2】

配列番号 5 5、5 8、および 5 9 をそれぞれ含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む、3 つの組換え発現ベクターを含む、遺伝子導入混合物。

【請求項 5 3】

請求項 5 0 に記載の組換え発現ベクター、または請求項 5 1 - 5 2 のいずれか一項に記載の遺伝子導入混合物により形質転換された宿主細胞。 40

【請求項 5 4】

患者のシヌクレイン病を治療または予防するための、請求項 1 - 4 5 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトルを含む医薬組成物。

【請求項 5 5】

シヌクレイン病がレビー小体病である、請求項 5 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 6】

患者が、REM 睡眠行動障害 (RBD) を有する、請求項 5 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 7】

50

20

30

40

50

シヌクレイン病を有するか、もしくはそのリスクがある患者の - シヌクレインの凝集を抑制するか、または - シヌクレイン凝集体を減らすための、請求項 1 - 4 5 のいずれか一項に記載の血液脳関門シャトルを含む医薬組成物。

**【請求項 5 8】**

シヌクレイン病がパーキンソン病である、請求項 5 4 - 5 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 5 9】**

シヌクレイン病が、多系統萎縮症 ( MSA ) またはレビー小体型認知症 ( DLB ) である、請求項 5 4 、 5 6 、または 5 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 6 0】**

患者の認知機能の低下を防ぐ、請求項 5 4 - 5 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 6 1】**

神経突起の、および / または軸索の、 - シヌクレイン凝集体を減らす、請求項 5 4 - 5 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 6 2】**

患者の神経突起のジストロフィーを減らす、請求項 5 4 - 5 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 6 3】**

シナプスの、および / または樹状突起の密度を保つ、請求項 5 4 - 5 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 6 4】**

- ( a ) 配列番号 5 9 を含むアミノ酸配列をそれぞれ有する、一対の軽鎖；
  - ( b ) 配列番号 5 3 を含むアミノ酸配列を有する第一の重鎖；および
  - ( c ) 配列番号 5 7 を含むアミノ酸配列を有する第二の重鎖；
- を含み、第一の重鎖と第二の重鎖がヘテロ二量体を形成する抗体。

**【請求項 6 5】**

- ( a ) 配列番号 5 9 を含むアミノ酸配列をそれぞれ有する、一対の軽鎖；
  - ( b ) 配列番号 5 5 を含むアミノ酸配列を有する第一の重鎖；および
  - ( c ) 配列番号 5 8 を含むアミノ酸配列を有する第二の重鎖；
- を含み、第一の重鎖と第二の重鎖がヘテロ二量体を形成する抗体。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

関連出願の相互参照

本願は、2014年4月8日に出願された米国特許出願第 6 1 / 9 7 7 , 0 3 9 号、2014年4月8日に出願された米国特許出願第 6 1 / 9 7 7 , 0 4 2 号、および2014年7月11日に出願された米国特許出願第 6 2 / 0 2 3 , 3 7 3 号の利益を主張するものであり、その各々は、あらゆる目的のために、その全体が参照により組み込まれる。

**【0 0 0 2】**

配列表

459015SEQLIST.txt ファイルに記載した配列表は、123キロバイトのサイズであり、2015年4月1日に作成したものであり、参照により本明細書に組み込まれる。

**【背景技術】**

**【0 0 0 3】**

背景

シヌクレイン病は、ドーパミン作動系および他の神経系の変性、運動障害、認知障害、および、例えばレビー小体 ( LB ) またはレビー神経突起などの、ニューロン内またはグリア細胞内の特異的蓄積の形成を特徴とする、慢性の、ほとんどが加齢性の、神経変性疾患の一部における、神経病理学的な所見である。 (McKeith et al., Neurology 47:1113-1

10

20

30

40

50

124 (1996))。シヌクレイン病には、パーキンソン病（突発性パーキンソン病を含む）、びまん性レビー小体病（D L B D）（レビー小体型認知症（D L B）としても知られる）、レビー小体型アルツハイマー病（L B V）、アルツハイマー病およびパーキンソン病の併発などのレビー小体病、および純粋自律神経失調症、ならびに多系統萎縮症（M S A；例えば、オリーブ橋小脳萎縮症、線条体黒質変性症およびシャイ・ドレーガー症候群）が含まれる。いくつかの非運動性の徴候および症状が、疾病の前駆期（すなわち、症状が出来る前の、無症状の、前臨床の、または前運動の期間）でのシヌクレイン病の前兆と考えられる。これらの初期の徴候には、例えば、レム睡眠行動障害（R B D）、嗅覚消失および便秘が含まれる(Mahowald et al., Neurology 75:488-489 (2010))。レビー小体病は、老齢人口における運動障害および認知衰退の共通原因であり続けている(Galasko et al., Arch. Neurol. 51:888-895(1994))。

## 【0004】

- シヌクレインは、 - シヌクレイン、 - シヌクレインおよびシノレチンを含む大きなタンパク質ファミリーの一部である。 - シヌクレインは通常の状態で発現され、そのうちいくらかはシナプス前終末に局在し、小胞のシナプス膜への融合を制御して、神経機能、可塑性、学習および記憶において役割を果たすと信じられている。本タンパク質は病態時に、不溶性の原纖維を形成して凝集する場合があり、脳にこれらの凝集体が組織学的に存在することによる障害は、それゆえにシヌクレイン病と呼ばれる。いくつかの研究により、 - シヌクレインとパーキンソン病の病因における中心的役割とが関連づけられている。例えば、 - シヌクレインはレビー小体（L B）において蓄積する(Spillantini et al., Nature 388:839-840 (1997); Takeda et al., J. Pathol. 152:367-372 (1998); Wakabayashi et al., Neurosci. Lett. 239:45-48 (1997))。 - シヌクレイン遺伝子の変異は、パーキンソニズムのまれな家族性の形態と同時分離（co-segregate）する(Kruger et al., Nature Gen. 18:106-108 (1998); Polymeropoulos, et al., Science 276:2045-2047 (1997))。トランスジェニックマウス(Masliah et al., Science 287:1265-1269 (2000))およびショウジョウバエ(Feany et al., Nature 404:394-398 (2000))での - シヌクレインの過剰発現は、レビー小体病のいくつかの病理学的局面を模倣している。さらに、 - シヌクレインの可溶性オリゴマーは、神経毒性があり得ると示唆されている(Conway et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:571-576 (2000); Volles et al., J. Biochem. 42:7871-7878 (2003))。ヒト、マウス、およびハエと同程度多様性に富んだ種および動物における、同様の形態学的および神経学的变化を示す - シヌクレインの蓄積は、本分子がレビー小体病の発症に寄与することを示唆している。

## 【0005】

- シヌクレインの抗体、またはこれらの抗体を誘導する - シヌクレインのフラグメントが、レビー小体病などのシヌクレイン病に対する免疫治療法として提案されている。しかしながら、抗体の脳への透過が、血液脳関門（B B B）により制限され得る。

## 【発明の概要】

## 【0006】

本発明は、血液脳関門シャトルであって、(a)少なくとも実質的に5 C 1 抗体由来のC D R を有する抗体を含む脳エフェクターエンティティー、ここで、5 C 1 は配列番号9を含むアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号24を含むアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を特徴とするマウス抗体である；および(b)血液脳関門受容体に結合する一価の結合エンティティーと連結されている、血液脳関門シャトルを提供する。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体は配列番号10、11、および12のアミノ酸配列をそれぞれ有する3つの重鎖C D R および配列番号25、26、および27のアミノ酸配列をそれぞれ有する3つの軽鎖C D R を含む。

## 【0007】

本発明はさらに、血液脳関門シャトルであって、(a)ヒト - シヌクレインに結合する抗体を含む脳エフェクターエンティティー、ここで、全長ヒト - シヌクレインの残基

10

20

30

40

50

118 - 126 のアラニンスキャニング変異導入法は、残基 120、121、および 122 のそれぞれが残基 123 および 124 のそれぞれよりも結合に寄与し、残基 123 および 124 のそれぞれが残基 118、119、125 および 126 のそれぞれよりも結合に寄与していることを示す；および (b) 血液脳関門受容体に結合する一価の結合エンティティー；を含み、前記脳エフェクターエンティティーが前記一価の結合エンティティーと連結されている、血液脳関門シャトルを提供する。

#### 【0008】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体が、本質的に配列番号 1 の残基 120 - 122 からなり、配列番号 1 の残基 118 - 119 を除くエピトープで、ヒト - シヌクレインに結合する。上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体が、配列番号 1 の残基 120 - 124 からなるエピトープで、ヒト - シヌクレインに結合する。  
10

#### 【0009】

本発明はさらに、血液脳関門シャトルであって、(a) モノクローナル抗体 5C1 の、Kabat により規定される 3 つの軽鎖 CDR および Kabat により規定される 3 つの重鎖 CDR を含む抗体を含む脳エフェクターエンティティー、ここで、5C1 は配列番号 9 を含むアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号 24 を含むアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を特徴とするマウス抗体である；および (b) 血液脳関門受容体に結合する一価の結合エンティティー；を含み、前記脳エフェクターエンティティーが前記一価の結合エンティティーと連結されている、血液脳関門シャトルを提供する。  
20

#### 【0010】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体はキメラ抗体、ベニヤ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体はヒト化抗体である。上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体はキメラ抗体である。上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体はベニヤ抗体である。上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体は、アイソタイプがヒト IgG1 抗体である。

#### 【0011】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体は、定常領域に少なくとも 1 つの変異を有する。場合により、本変異は定常領域による補体結合または活性化を減少させる。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体は、EUナンバリングの位置 241、264、265、270、296、297、322、329、および 331 の 1 つ以上において、定常領域に変異を有する。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体は位置 318、320、および 322 にアラニンを有する。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体は、EUナンバリングの位置 234、235、237、および 329 の 1 つ以上に、変異を有する。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体は、位置 234、235 および 237 の 1 つ以上に、アラニンを有する。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体は、位置 234 および 235 にアラニンを有し、位置 329 にグリシンを有する。  
30  
40

#### 【0012】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体がヒト IgG2 または IgG4 のアイソタイプを有する。

#### 【0013】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体が Fab フラグメント、F(ab')2 フラグメント、または scFv である。

#### 【0014】

本発明はさらに、血液脳関門シャトルであって：(a) H4 (配列番号 17) に少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を有する成熟重鎖可変領域および L3 (配列番号 31) に少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有する成熟軽鎖可変領域を含む抗体を含む、  
50

脳エフェクターエンティティーであって、前記抗体がヒト - シヌクレインに特異的に結合する、脳エフェクターエンティティー；および（b）血液脳関門受容体に結合する一価の結合エンティティー；を含み、前記脳エフェクターエンティティーが前記一価の結合エンティティーと連結されている、血液脳関門シャトルを提供する。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体は配列番号9の3つのKabat CDRおよび配列番号24の3つのKabat CDRを含む。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の位置H11、H27、H30、H48、およびH73のうち少なくとも1つを、L、Y、T、I、およびKがそれぞれ占め、脳エフェクターエンティティー抗体の位置L12およびL14のうち少なくとも1つを、Sが占める。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の位置H11、H27、H30、H48、およびH73をL、Y、T、I、およびKがそれぞれ占め、脳エフェクターエンティティー抗体の位置L12およびL14を、Sが占める。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の位置H67、H69、およびH94の少なくとも1つを、A、L、およびSがそれぞれ占める。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の位置H67、H69、およびH94を、それA、L、およびSが占める。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の位置H94をSが占める。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の位置L2、L49、およびL87の少なくとも1つを、V、N、およびFがそれぞれ占める。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の位置L2、L49、およびL87を、V、N、およびFがそれぞれ占める。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体は、H4（配列番号17）に少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する成熟重鎖可変領域およびL3（配列番号31）に少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する成熟軽鎖可変領域を含む。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の成熟重鎖可変領域および成熟軽鎖可変領域のCDRにおける、H4（配列番号17）およびL3（配列番号31）のCDRとの差異はいずれも、それぞれ、位置H60 - H65に存在する。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の成熟重鎖可変領域は、H4と名付けられたアミノ酸配列（配列番号17）を有し、脳エフェクターエンティティー抗体の成熟軽鎖可変領域は、L3と名付けられたアミノ酸配列（配列番号31）を有する。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の成熟重鎖可変領域は、H5（配列番号18）と名付けられたアミノ酸配列を有し、脳エフェクターエンティティー抗体の成熟軽鎖可変領域は、L3と名付けられたアミノ酸配列（配列番号31）を有する。

#### 【0015】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体の成熟重鎖可変領域は、重鎖定常領域と融合し、脳エフェクターエンティティー抗体の成熟軽鎖可変領域は、軽鎖定常領域と融合する。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の重鎖定常領域は、天然のヒト重鎖定常領域と比較してFc受容体への結合が減少した、天然のヒト重鎖定常領域の変異体である。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の成熟重鎖可変領域は配列番号66の配列を有する重鎖定常領域と融合し、および/または脳エフェクターエンティティー抗体の成熟軽鎖可変領域は、配列番号52の配列を有する軽鎖定常領域と融合する。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体の成熟重鎖可変領域は、配列番号66または75の配列を有する重鎖定常領域と融合しており、および/または脳エフェクターエンティティー抗体の成熟軽鎖可変領域は配列番号52の配列を有する軽鎖定常領域と融合している。

#### 【0016】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体は、Fabフラグメント、F(ab')2フラグメント、またはscFvである。

#### 【0017】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、一価の結合エンティティーが、血液脳関門受容体リガンド、抗体フラグメント、または他のポリペプチドを含む。場合により、一価の結合エンティティーは、scFv、Fv、scFab、sFab、またはVHHである抗体フラグメントを含む。場合により、一価の結合エンティティーはsFabを含

む。

#### 【0018】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、血液脳関門受容体は、トランスフェリン受容体、インスリン受容体、インスリン様成長因子受容体、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質8、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1、またはヘパリン結合性上皮細胞成長因子様成長因子である。場合により、血液脳関門受容体は、トランスフェリン受容体である。

#### 【0019】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、一価の結合エンティティーがトランセフェリン受容体に特異的に結合するsFabを含む。場合により、sFabは、配列番号43、配列番号44および/または配列番号45内のエピトープに結合する。  
10

#### 【0020】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティーが第一のリンカーにより一価の結合エンティティーと連結されている。場合により、第一のリンカーはペプチドリンカーである。場合により、ペプチドリンカーは少なくとも20のアミノ酸長を有する。場合により、ペプチドリンカーは25～50のアミノ酸長を有する。場合により、ペプチドリンカーは配列番号41のアミノ酸配列を有する。場合により、ペプチドリンカーは、配列番号42のアミノ酸配列を有する。場合により、ペプチドリンカーは、配列番号73のアミノ酸配列を有する。場合により、一価の結合エンティティーは、第一のリンカーにより、脳エフェクターエンティティー抗体の重鎖のC末端と連結されている。  
20

#### 【0021】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、一価の結合エンティティーは、CH2-CH3 Igエンティティーおよび、血液脳関門受容体に特異的に結合するsFabを含み、前記sFabは、前記CH2-CH3 IgエンティティーのC末端に連結されている。場合により、前記CH2-CH3 IgエンティティーはCH2-CH3 IgGエンティティーである。

#### 【0022】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、一価の結合エンティティーはCH2-CH3 Igエンティティーおよび血液脳関門受容体に特異的に結合するsFabを含み、第一のリンカーによりCH2-CH3 IgドメインのN末端が脳エフェクターエンティティーに連結され、かつ第二のリンカーによりCH2-CH3 IgドメインのC末端がsFabに連結されている。場合により、前記CH2-CH3 IgエンティティーはCH2-CH3 IgGエンティティーである。  
30

#### 【0023】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体が重鎖のFc領域を含み、一価の結合エンティティーが前記重鎖のFc領域のC末端に連結されている。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体は2つの重鎖を含み、一価の結合エンティティーが、前記重鎖の一方のFc領域のC末端のみに連結されている。場合により、脳エフェクターエンティティー抗体は、第一および第二の二量体形成モジュールを含むヘテロ二量体化重鎖を含み、前記第一および第二の二量体形成モジュールの一方のみが、一価の結合エンティティーに連結されている。場合により、第一の二量体形成モジュールは、ノブ(nob)を含み、第二の二量体形成モジュールは、前記ノブを受けるホール(hole)を含む。  
40

#### 【0024】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターエンティティー抗体はFc領域を含むIgG重鎖を含み、一価の結合エンティティーはsFabを含み、脳エフェクターエンティティー抗体重鎖のFc領域のC末端はsFabの可変軽鎖ドメインのN末端と連結され、sFabのC-軽鎖ドメインのC末端はsFabの可変重鎖ドメインのN末端と連結されている。  
50

## 【0025】

本発明は、さらに、血液脳関門シャトルであって：(a)配列番号59を含むアミノ酸配列を有する軽鎖と、配列番号53および69をそれぞれ含む、または配列番号55および70をそれぞれ含むアミノ酸配列を有する第一および第二の二量体形成モジュールを伴うヘテロ二量体化重鎖とを伴う抗体を含む、脳エフェクターエンティティー；(b)第一のリンカー；および(c)配列番号64を含むアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号63を含むアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む8D3-scFabを含む一価の結合エンティティーであって、前記8D3-scFabの重鎖および軽鎖が第二のリンカーにより連結されている、一価の結合エンティティー；を含み、前記脳エフェクターエンティティー抗体の第一および第二の二量体形成モジュールの一方のみが、第一のリンカーにより一価の結合エンティティーと連結されている、血液脳関門シャトルを提供する。場合により、8D3-scFabは、配列番号62および61をそれぞれ含むアミノ酸配列を有する、重鎖および軽鎖を含む。場合により、第一のリンカーは、脳エフェクターエンティティー抗体の重鎖のC末端を、一価の結合エンティティーのN末端と連結する。場合により、第一のリンカーは、配列番号41、42、または73を含むアミノ酸配列を有する。場合により、第二のリンカーは、配列番号41、42、または73を含むアミノ酸配列を有する。場合により、8D3-scFabは、配列番号60を含むアミノ酸配列を有する。

## 【0026】

上述した血液脳関門シャトルのうちいくつかでは、脳エフェクターアイディーが第一の重鎖および第二の重鎖を含み、第一の重鎖が配列番号46を含むアミノ酸配列を有する重鎖定常領域と融合する成熟重鎖可変領域を含み、かつ第二の重鎖が配列番号67を含むアミノ酸配列を有する重鎖定常領域と融合する成熟重鎖可変領域を含む。場合により、一価の結合エンティティーは第二の重鎖のC末端に連結されている。場合により、一価の結合エンティティーは、配列番号64を含むアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号63を含むアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、8D3-scFabを含む。場合により、一価の結合エンティティーは、配列番号62および61をそれぞれ含むアミノ酸配列を有する、重鎖および軽鎖を含む8D3-scFabを含む。場合により、脳エフェクターエンティティーおよび一価のエンティティーは第一のリンカーにより連結され、8D3重鎖および軽鎖は、第二のリンカーにより連結されている。場合により、第一のリンカーは配列番号73を含むアミノ酸配列を有し、第二のリンカーは配列番号41を含むアミノ酸配列を有する。

## 【0027】

本発明はさらに、上述の血液脳関門シャトルのいずれか、および医薬上許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

## 【0028】

本発明は、さらに、上述の血液脳関門シャトルのいずれかをコードする核酸を提供する。場合により、核酸は配列番号53、57、および/または59を含むアミノ酸配列をコードする。場合により、核酸は、配列番号55、58、および/または59を含むアミノ酸配列をコードする。

## 【0029】

本発明は、さらに、上述の核酸のいずれかを含む、組換え発現ベクターを提供する。場合により、組換え発現ベクターは、配列番号53、配列番号57、または配列番号59を含むアミノ配列をコードする核酸を含む。場合により、組換え発現ベクターは、配列番号55、配列番号58、または配列番号59を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む。

## 【0030】

本発明は、さらに、配列番号55、58、および59をそれぞれ含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む、3つの組換え発現ベクターを含む、遺伝子導入混合物を提供する。本発明は、さらに、配列番号55、58、および59をそれぞれ含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む遺伝子導入混合物を提供する。場合により、3つの組換え発現ベクター

は、等モル量で存在する。

【0031】

本発明は、さらに、上述の組換え発現ベクターのいずれか、または上述の遺伝子導入混合物のいずれかで形質転換した宿主細胞を提供する。

【0032】

本発明は、さらに、血液脳関門シャトルを製造する方法であって：(a) 細胞が血液脳関門シャトルを分泌するように、上述の核酸のいずれかで形質転換した細胞を培養すること；および(b) 分泌した血液脳関門シャトルを精製することを含む方法を、提供する。

【0033】

本発明は、さらに、血液脳関門シャトルを製造する細胞株を製造する方法であって：(a) 上述の組換え発現ベクターのいずれかを細胞に導入すること、ここで前記組換え発現ベクターはさらに選択マーカーを含む；(b) コピー数の増加したベクターを有する細胞を選択する条件下で細胞を増殖させること；(c) 選択した細胞から単一細胞を単離すること；および(d) 血液脳関門シャトルの産出量に基づき、単一細胞からクローニングした細胞を保存することを含む方法を提供する。場合により、本方法は、選択的条件下で細胞を増殖させ、少なくとも100mg/L/10<sup>6</sup>細胞/24時間で天然に発現し分泌する細胞株をスクリーニングすることをさらに含む。

【0034】

本発明は、さらに、患者のシヌクレイン病を治療または予防する方法であって、患者に、上述の血液脳関門シャトルのいずれかの効果的な投与計画を施すことを含む方法を、提供する。場合により、シヌクレイン病はレビー小体病である。場合により、患者はREM睡眠行動障害(RBD)である。場合により、シヌクレイン病はパーキンソン病である。場合により、シヌクレイン病は多系統萎縮症(MSA)またはレビー小体型認知症(DLB)である。場合により、本方法は患者の認知機能の低下を抑制する。場合により、本方法は、神経突起の、および/または軸索の-シヌクレイン凝集体を減少させる。場合により、本方法は、患者の神経突起のジストロフィーを減少させる。場合により、本方法はシナプスの、および/または樹状突起の密度を保つ。場合により、本方法は、患者のシナプトフィジンおよび/またはMAP2を保つ。

【0035】

本発明は、シヌクレイン病を有するか、またはそのリスクがある患者の-シヌクレインの凝集を抑制するか、または-シヌクレイン凝集体を減らす方法であって、患者に上述の血液脳関門シャトルのいずれかの有効量を投与することを含む方法を、提供する。場合により、-シヌクレイン凝集体はレビー小体を含み、シヌクレイン病はレビー小体病である。場合により、シヌクレイン病はパーキンソン病である。場合により、シヌクレイン病は、多系統萎縮症(MSA)またはレビー小体型認知症(DLB)である。場合により、本方法は患者の認知機能の低下を抑制する。場合により、本方法は、神経突起の、および/または軸索の-シヌクレイン凝集体を減少させる。場合により、本方法は、患者の神経突起のジストロフィーを減少させる。場合により、本方法はシナプスの、および/または樹状突起の密度を保つ。場合により、本方法は、患者のシナプトフィジンおよび/またはMAP2を保つ。

【0036】

本発明は、さらに、シヌクレイン病を有するか、またはそのリスクがある患者の、-シヌクレイン凝集体を検出する方法であって：(a) 患者に上述のいずれかの血液脳関門シャトルの有効量を投与すること、ここで、脳エフェクターエンティティー抗体はレビー小体に結合する；および(b) 患者の、結合脳エフェクターエンティティー抗体を検出すること、を含む方法を、提供する。場合により、-シヌクレイン凝集体はレビー小体を含み、シヌクレイン病はレビー小体病である。

【0037】

本発明は、さらに、脳エフェクターエンティティーが血液脳関門を通過して輸送される方法であって、一価の結合エンティティーが、脳エフェクターエンティティーが血液脳関

10

20

30

40

50

門を通過して輸送されるように、上述の血液脳関門シャトルのいずれかを、血液脳関門に曝すことを含む方法を、提供する。

**【0038】**

本発明は、さらに：(a)配列番号59を含むアミノ酸配列をそれぞれ有する、一対の軽鎖；(b)配列番号53を含むアミノ酸配列を有する第一の重鎖；および(c)配列番号57を含むアミノ酸配列を有する第二の重鎖；を含む抗体であって、第一および第二の重鎖がヘテロ二量体を形成する抗体を提供する。

**【0039】**

本発明は、さらに：(a)配列番号59を含むアミノ酸配列をそれぞれ有する、一対の軽鎖；(b)配列番号55を含むアミノ酸配列を有する第一の重鎖；および(c)配列番号58を含むアミノ酸配列を有する第二の重鎖；を含む抗体であって、第一および第二の重鎖がヘテロ二量体を形成する抗体を提供する。

**【図面の簡単な説明】**

**【0040】**

【図1】マウス5C1重鎖成熟可変領域のアミノ酸配列を示す。Kabatの規定に従うCDR領域は、下線または太字で示している。

**【0041】**

【図2】マウス5C1軽鎖成熟可変領域のアミノ酸配列を示す。Kabatの規定に従うCDR領域は、下線または太字で示している。

**【0042】**

【図3】モリス水迷路試験の、プローブ部分における、ヒト-シヌクレイントランスジェニックマウスの記憶能力についての、5C1による受動免疫療法の結果を示している。

**【0043】**

【図4】ラウンドビームテストにおける速度とエラーについての、5C1による、ヒト-シヌクレイントランスジェニックマウスにおける、受動免疫療法の結果を示している。

**【0044】**

【図5】様々なヒト化5C1抗体の親和性を試験したELISAアッセイの結果を示す。

**【0045】**

【図6】9E4抗体が結合する-シヌクレインのエピトープを決定するために用いられたアラニンスキャニング変異導入実験の結果を示す。図の上部は、9E4抗体(左図)またはコントロール抗体1H7(右図)で染色された、完全長-シヌクレイン(野生型または、図のように、残基118-126の個々の点変異)のウエスタンプロットを示している。図の下部は、9E4抗体が結合する-シヌクレインのエピトープを示している。

**【0046】**

【図7】5C1抗体が結合する-シヌクレインのエピトープを決定するために用いられたアラニンスキャニング変異導入実験の結果を示す。図の上部は、5C1抗体(左図)またはコントロール抗体1H7(右図)で染色された、完全長-シヌクレイン(野生型または、図のように、残基118-126の個々の点変異)のウエスタンプロットを示している。図の下部は、5C1抗体が結合する-シヌクレインのエピトープを示している。

**【0047】**

【図8】5D12抗体が結合する-シヌクレインのエピトープを決定するために用いられたアラニンスキャニング変異導入実験の結果を示す。図の上部は、5D12抗体(左図)またはコントロール抗体1H7(右図)で染色された、完全長-シヌクレイン(野生型または、図のように、残基118-126の個々の点変異)のウエスタンプロットを示している。図の下部は、5D12抗体が結合する-シヌクレインのエピトープを示している。

**【0048】**

【図9】E4、5C1および5D12抗体の結合部位に近接した-シヌクレインのアミノ酸の球棒モデルを図示している。

**【0049】**

10

20

30

40

50

【図10】「ノブ」 $5\text{C}1\text{H}4 - \text{Hu IgG}1 - \text{s c Fab}$ (8D3)重鎖融合タンパク質を図示している。

【0050】

【図11】「ホール」 $5\text{C}1\text{H}4 - \text{Hu IgG}1$ 重鎖融合タンパク質を図示している。

【0051】

【図12】 $5\text{C}1\text{L}3 - \text{Hu IgKappa}$ 軽鎖融合タンパク質を図示している。

【0052】

【図13】脳エフェクターエンティティーが $5\text{C}1$ 抗体を含み、一価の結合エンティティーが $8\text{D}3 - \text{s Fab}$ を含む、血液脳関門シャトルのバージョンを図示している。

【0053】

配列の簡単な説明

配列番号1は、野生型ヒト - シヌクレインである。

【0054】

配列番号2は、Jensen et al. (1995)により報告された、 - シヌクレインの非アミロイド成分(NAC)ドメインである。

【0055】

配列番号3は、Ueda et al. (1993)により報告された、 - シヌクレインの非アミロイド成分(NAC)ドメインである。

【0056】

配列番号4は、 $5\text{C}1$ ペプチド免疫原であるヒト - シヌクレインのアミノ酸残基118 - 129である。

【0057】

配列番号5は、シグナルペプチドをコードする配列を伴うマウス $5\text{C}1$ 重鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【0058】

配列番号6は、シグナルペプチドを伴うマウス $5\text{C}1$ 重鎖可変領域である。

【0059】

配列番号7は、シグナルペプチドをコードする配列を伴うマウス $5\text{C}1$ 軽鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【0060】

配列番号8は、シグナルペプチドを伴うマウス $5\text{C}1$ 軽鎖可変領域である。

【0061】

配列番号9は、マウス $5\text{C}1$ 成熟重鎖可変領域である。

【0062】

配列番号10は、Kabatにより規定される $5\text{C}1$ 重鎖CDR1の配列である。

【0063】

配列番号11は、Kabatにより規定される $5\text{C}1$ 重鎖CDR2の配列である。

【0064】

配列番号12は、Kabatにより規定される $5\text{C}1$ 重鎖CDR3の配列である。

【0065】

配列番号13は、ヒトVH受容体FR(アクセッション番号AY42876.1)である。

【0066】

配列番号14は、ヒト化 $5\text{C}1\text{H}1$ の配列である。

【0067】

配列番号15は、ヒト化 $5\text{C}1\text{H}2$ の配列である。

【0068】

配列番号16は、ヒト化 $5\text{C}1\text{H}3$ の配列である。

【0069】

配列番号17は、ヒト化 $5\text{C}1\text{H}4$ の配列である。

10

20

30

40

50

**【 0 0 7 0 】**

配列番号 1 8 は、ヒト化 5 C 1 H 5 の配列である。

**【 0 0 7 1 】**

配列番号 1 9 は、シグナルペプチドをコードする配列を伴うヒト化 5 C 1 H 1 をコードする核酸配列である。

**【 0 0 7 2 】**

配列番号 2 0 は、シグナルペプチドをコードする配列を伴うヒト化 5 C 1 H 2 をコードする核酸配列である。

**【 0 0 7 3 】**

配列番号 2 1 は、シグナルペプチドをコードする配列を伴うヒト化 5 C 1 H 3 をコードする核酸配列である。 10

**【 0 0 7 4 】**

配列番号 2 2 は、シグナルペプチドをコードする配列を伴うヒト化 5 C 1 H 4 をコードする核酸配列である。

**【 0 0 7 5 】**

配列番号 2 3 は、シグナルペプチドをコードする配列を伴うヒト化 5 C 1 H 5 をコードする核酸配列である。

**【 0 0 7 6 】**

配列番号 2 4 は、マウス 5 C 1 成熟軽鎖可変領域配列である。

**【 0 0 7 7 】**

配列番号 2 5 は、K a b a t により規定される 5 C 1 軽鎖 C D R 1 の配列である。 20

**【 0 0 7 8 】**

配列番号 2 6 は、K a b a t により規定される 5 C 1 軽鎖 C D R 2 の配列である。

**【 0 0 7 9 】**

配列番号 2 7 は、K a b a t により規定される 5 C 1 軽鎖 C D R 3 の配列である。

**【 0 0 8 0 】**

配列番号 2 8 は、ヒト V L 受容体 F R ( アクセッション番号 C A B 5 1 2 9 3 . 1 ) である。

**【 0 0 8 1 】**

配列番号 2 9 は、ヒト化 5 C 1 L 1 の配列である。 30

**【 0 0 8 2 】**

配列番号 3 0 は、ヒト化 5 C 1 L 2 の配列である。

**【 0 0 8 3 】**

配列番号 3 1 は、ヒト化 5 C 1 L 3 の配列である。

**【 0 0 8 4 】**

配列番号 3 2 は、ヒト化 5 C 1 L 4 の配列である。

**【 0 0 8 5 】**

配列番号 3 3 は、シグナルペプチドをコードする配列を伴うヒト化 5 C 1 L 1 をコードする核酸配列である。

**【 0 0 8 6 】**

配列番号 3 4 は、シグナルペプチドをコードする配列を伴うヒト化 5 C 1 L 2 をコードする核酸配列である。 40

**【 0 0 8 7 】**

配列番号 3 5 は、シグナルペプチドをコードする配列を伴うヒト化 5 C 1 L 3 をコードする核酸配列である。

**【 0 0 8 8 】**

配列番号 3 6 は、シグナルペプチドをコードする配列を伴うヒト化 5 C 1 L 4 をコードする核酸配列である。

**【 0 0 8 9 】**

配列番号 3 7 は、例示的なヒト I g G 1 定常領域をコードする核酸配列である。 50

## 【0090】

配列番号38は、例示的なヒト Ig G1 定常領域をコードするアミノ酸配列である。

## 【0091】

配列番号39は、N末端アルギニンを欠く、例示的なヒト 軽鎖定常領域をコードする核酸配列である。

## 【0092】

配列番号40は、N末端アルギニンを欠く、例示的なヒト 軽鎖定常領域のアミノ酸配列である。

## 【0093】

配列番号41は、式(G<sub>4</sub>S)<sub>6</sub>G<sub>2</sub>を有するペプチドリンカーのアミノ酸配列である 10  
。

## 【0094】

配列番号42は、式(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>を有するペプチドリンカーのアミノ酸配列である。

## 【0095】

配列番号43は、8D3エピトープマッピングペプチド373のアミノ酸配列である。

## 【0096】

配列番号44は、8D3エピトープマッピングペプチド374のアミノ酸配列である。

## 【0097】

配列番号45は、8D3エピトープマッピングペプチド375のアミノ酸配列である。

## 【0098】

配列番号46は、H U - I G G 1 - H C - H O L E のアミノ酸配列である。 20

## 【0099】

配列番号47は、H U - I G G 1 - H C - K N O B のアミノ酸配列である。

## 【0100】

配列番号48は、H U - I G G 1 - H C - H O L E \_ L A L A P G のアミノ酸配列である。

## 【0101】

配列番号49は、H U - I G G 1 - H C - K N O B \_ L A L A P G のアミノ酸配列である。

## 【0102】

配列番号50は、H U - I G G 1 - H C - K N O B \_ 8 D 3 - s c F a b のアミノ酸配列である。 30

## 【0103】

配列番号51は、H U - I G G 1 - H C - K N O B \_ L A L A P G \_ 8 D 3 - s c F a b のアミノ酸配列である。

## 【0104】

配列番号52は、(N末端アルギニンを伴う)H U - I G K A P P A - L C のアミノ酸配列である。

## 【0105】

配列番号53は、5C1 - H 4 \_ H U - I G G 1 - H C - H O L E のアミノ酸配列である。 40

## 【0106】

配列番号54は、5C1 - H 4 \_ H U - I G G 1 - H C - K N O B のアミノ酸配列である。

## 【0107】

配列番号55は、5C1 - H 4 \_ H U - I G G 1 - H C - H O L E \_ L A L A P G のアミノ酸配列である。

## 【0108】

配列番号56は、5C1 - H 4 \_ H U - I G G 1 - H C - K N O B \_ L A L A P G のアミノ酸配列である。 50

## 【0109】

配列番号57は、5C1-H4-HU-IGG1-HC-KNOB\_8D3-scFa  
bのアミノ酸配列である。

## 【0110】

配列番号58は、5C1-H4-HU-IGG1-HC-KNOB\_LALAPG\_8  
D3-scFabのアミノ酸配列である。

## 【0111】

配列番号59は、5C1-L3-HU-IGKAPPALCのアミノ酸配列である。

## 【0112】

配列番号60は、8D3-scFabのアミノ酸配列である。 10

## 【0113】

配列番号61は、8D3VL-HU-IGKAPPALCのアミノ酸配列である。

## 【0114】

配列番号62は、8D3VH-HU-CH1のアミノ酸配列である。

## 【0115】

配列番号63は、8D3VLのアミノ酸配列である。

## 【0116】

配列番号64は、8D3VHのアミノ酸配列である。

## 【0117】

配列番号65は、HU-CH1のアミノ酸配列である。 20

## 【0118】

配列番号66は、IgG1\_G1m3アロタイプの例示的なヒトIgG1定常領域のア  
ミノ酸配列である。

## 【0119】

配列番号67は、C末端のグリシンおよびリシン残基を除去したHU-IGG1-HC  
-KNOBのアミノ酸配列である。

## 【0120】

配列番号68は、C末端のグリシンおよびリシン残基を除去したHU-IGG1-HC  
-KNOB\_LALAPGのアミノ酸配列である。

## 【0121】

配列番号69は、C末端のグリシンおよびリシン残基を除去した5C1-H4-HU-  
IGG1-HC-KNOBのアミノ酸配列である。 30

## 【0122】

配列番号70は、C末端のグリシンおよびリシン残基を除去した5C1-H4-HU-  
IGG1-HC-KNOB\_LALAPGのアミノ酸配列である。

## 【0123】

配列番号71は、(N末端アルギニンを有する)HU-IGKAPPALCをコード  
する核酸配列である。

## 【0124】

配列番号72は、IgG1\_G1m3アロタイプの例示的なヒトIgG1定常領域をコ  
ードする核酸配列である。 40

## 【0125】

式G<sub>3</sub>S(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>を有するペプチドリンカーのアミノ酸配列である。

## 【0126】

配列番号74は、ヒト-シヌクレインの残基118-126のアミノ酸である。

## 【0127】

配列番号75は、IgG1\_G1m3アロタイプの例示的なヒトIgG1定常領域のア  
ミノ酸配列である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0128】

**定義**

基本的な抗体の構造単位は、サブユニットのテトラマーである。各テトラマーは、2つの同一のポリペプチド鎖のペアを含み、各ペアは1つの「軽」鎖（約25 kDa）および1つの「重」鎖（約50 - 70 kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分には、主に抗原認識を担う約110 ~ 110以上のアミノ酸の可変領域が含まれる。最初に発現された際、本可変領域は一般的に切断可能なシグナルペプチドと繋がっている。シグナルペプチドのない可変領域は、時々、成熟可変領域と呼ばれる。従って、例えば、軽鎖成熟可変領域は、軽鎖シグナルペプチドのない軽鎖可変領域を意味する。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定している。定常領域は、CH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域のいずれかまたは全てを含み得る。

10

**【0129】**

軽鎖は、(kappa)または(lambda)のいずれかに分類される。重鎖は、(gamma)、μ(mu)、(alpha)、(delta)、または(epsilon)として分類され、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEとして抗体のアイソトープを規定している。軽鎖および重鎖において、可変領域および定常領域は、約12以上のアミノ酸の「J」領域により連結され、重鎖はまた、約10以上のアミノ酸の「D」領域を含む(generally, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7)を参照されたい) (参照により、その全体が、あらゆる目的のために組み込まれる)。

**【0130】**

20

各重鎖／軽鎖の対の成熟可変領域が、抗体結合部位を形成する。二機能性抗体または二重特異性抗体を除いて、2つの結合部位は同一である。これらの鎖は全て、3つの、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる超可変領域によって比較的保存されたフレームワーク領域(FR)が連結されるという、同一の全体構造を提示する。各対の2つの鎖のCDRは、フレームワーク領域により整列し、特異的エピトープへの結合が可能になっている。N末端からC末端にかけて、軽鎖および重鎖は共に、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4の領域を含む。各領域へのアミノ酸の割当は、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)、またはChothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989) の規定に従っている。Kabatはまた、広く用いられる番号付け規則(Kabatナンバリング)を提供し、異なる重鎖間の、または異なる軽鎖間の、対応する残基には、同じ番号が割り当てられる(例えば、H83は成熟重鎖可変領域の、Kabatナンバリングの位置83を意味し：同様に、位置L36は、成熟軽鎖可変領域のKabatナンバリングの位置36を意味する)。Kabatナンバリングは、他に明記しない限り、抗体の可変領域における位置を言及するのに、あらゆる場合に用いられる。

30

**【0131】**

「抗体」という用語には、完全な抗体およびその結合フラグメントが含まれる。一般的に、フラグメントは、標的への特異的結合に対して、フラグメントが由来する完全な抗体と競合する。フラグメントには、分離した重鎖、分離した軽鎖、Fab、Fab'、F(ab')2、F(ab)c、Fv、单鎖抗体、および单ードメイン抗体が含まれる。单一(可変)ドメイン抗体には、従来の抗体の、VLパートナーから分離したVH領域(またはその逆)(Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546)、並びに、VH領域がVL領域と会合していないラクダ科(Camelidae)または軟骨魚類(例えば、テンジクザメ)などの種由来のVH領域(時にVHHとして知られる)が含まれる(例えば、WO 9404678参照)。天然のパートナーから一本鎖が分離した单ードメイン抗体は、時々Dabsとして知られ、ラクダ科(Camelidae)または軟骨魚類由来の单ードメイン抗体は時々、ナノボディとして知られる。定常領域または定常領域の一部は、单ードメイン抗体に存在してもよく、または存在しなくてもよい。例えば、ラクダ科由来の天然の单ー可変領域抗体には、VHH可変領域、並びにCH2およびCH3定常領域が含まれる。单ードメイン抗体、例えば

40

50

ナノボディは、従来の抗体と類似の手法により、ヒト化され得る。Dabs抗体はたいてい、ヒト起源の抗体から取得される。フラグメントは、組換えDNA技術、または完全免疫グロブリンの酵素的若しくは化学的分離により、生産される。

#### 【0132】

「抗体」という用語にはまた、二重特異性抗体および／またはヒト化抗体が含まれる。二重特異性抗体または二機能性抗体は、2つの異なる重鎖／軽鎖ペアおよび2つの異なる結合部位を有する、人工のハイブリッド抗体である（例えば、Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelnik et al., J. Immunol. 148:1547-53 (1992)を参照されたい）。いくつかの二重特異性抗体において、2つの異なる重鎖／軽鎖ペアには、ヒト化5C1重鎖／軽鎖ペアと、5C1が結合するエピトープとは異なる  
- シヌクレイン上のエピトープに特異的な重鎖／軽鎖ペアとが含まれる。  
10

#### 【0133】

いくつかの二重特異性抗体において、1つの重鎖軽鎖ペアは、以下にさらに開示されるヒト化5C1抗体であり、重鎖軽鎖ペアは、血液脳関門上に発現する受容体、例えばインスリン受容体、インスリン様成長因子（IGF）受容体、レプチニン受容体、またはリポタンパク質受容体、またはトランスフェリン受容体に、結合する抗体由来である(Friden et al., PNAS 88:4771-4775, 1991; Friden et al., Science 259:373-377, 1993)。これらの二重特異性抗体は、受容体媒介経細胞輸送により、血液脳関門を通過して輸送され得る。二重特異性抗体の脳への取り込みは、二重特異性抗体を、血液脳関門受容体への親和性を減少させるように設計することにより、さらに増強され得る。当該受容体への親和性の減少は、脳へのより広範囲への分布をもたらした（例えば、Atwal. et al. Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yu et al. Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2011を参照されたい）  
20  
。

#### 【0134】

例示的な二重特異性抗体はまた、（1）軽鎖および重鎖がそれぞれ、短いペプチド結合によりタンデムになった2つの可変ドメインを含む、二重可変ドメイン抗体（DVD-Ig）(Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Immunoglobulin (DVD-Ig<sup>TM</sup>) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) 2つの一本鎖二重特異性抗体の融合物であって、その結果それぞれの標的抗原に対して2つの結合部位を有する四価の二重特異性抗体となっている、Tandab; (3) scFvと二重特異性抗体との組み合わせであって、その結果多価分子となっている、flexibody; (4) Fabに適用されたときに、異なるFabフラグメントに繋がった2つの同一のFabフラグメントからなる三価の二重特異性の結合タンパク質を生成する、プロテインキナーゼAの「二量体化およびドッキングドメイン」に基づく、いわゆる「ドックアンドロック（dock and lock）」分子; (5) 例えば、ヒトFc領域の両末端に融合した2つのscFvを含む、いわゆるスコーピオン分子（Scorpion molecule）、でもあり得る。二重特異性抗体の調製に有用なプラットホームの例には、BiTE (Micromet)、DART (MacroGenics)、FcabおよびMab2 (F-star)、Fc操作IgG1 (Xencor) またはDuoBody (Fabアーム交換に基づく、Genmab) が含まれる。  
30  
40

#### 【0135】

「抗原」は、抗体が特異的に結合するエンティティーである。

#### 【0136】

「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原上の部位を指す。タンパク質抗原では、エピトープは、近接アミノ酸、または1つ以上のタンパク質の三次フォールディングにより並置された非近接のアミノ酸から、形成され得る。近接のアミノ酸から形成されるエピトープは、一般的に、変性溶媒にさらされた状態で保持され、一方、三次フォールディングにより形成されるエピトープは、一般的に、変性溶媒の処理により失われる。エピトープには、一般的に、特有の空間的コンフォメーションにおいて、少なくとも2つ、3つ、およびたいていはそれ以上、少なくとも5つまたは8-10アミノ酸が含まれる。エ  
50

ピトープの空間的コンフォメーションを決定する方法には、例えば、X線結晶構造解析および二次元核磁器共鳴が含まれる。例えば、Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)のEpitope Mapping Protocolsを参照されたい。エピトープには、C末端残基またはN末端残基が含まれ得る。エピトープにはまた、ポリペプチドの遊離アミノ基、またはポリペプチドの遊離カルボキシル基が含まれ得るが、含まれる必要はない。このように、エピトープには、C末端残基またはN末端残基が含まれ得るが、必ずしも遊離カルボキシル基または遊離アミノ基のそれぞれが、含まれない。抗体の結合特異性は、時にアミノ酸の範囲で規定される。抗体が、配列番号1のアミノ酸118-126内のエピトープに結合すると言われる場合、例えば、意味するところは、そのエピトープが、範囲の外側の限界を規定するアミノ酸を含め列挙されたアミノ酸の範囲内であるということである。範囲内の全てのアミノ酸が、エピトープの一部を構成することを意味するのではない。従って、例えば、配列番号1のアミノ酸118-126内のエピトープが、配列番号1の他の区分の、アミノ酸118-124、119-125、120-126、120-124、または120-122で構成されてもよい。

#### 【0137】

同一の、または重複するエピトープを認識する抗体は、ある抗体が別の抗体の標的抗原に対する結合と競合する能力を示す、単純な免疫アッセイで、同定され得る。抗体のエピトープは、接触する残基を決定するための、抗原に結合する抗体のX線結晶構造解析により規定され得る（エピトープは接触する残基により規定される）。あるいは、ある抗体の結合を減らすか、または取り除く、抗原における全てのアミノ酸変異が、他の抗体の結合を減らすか、または取り除く場合、2つの抗体は、同じエピトープを有する。

#### 【0138】

抗体間の競合は、供試の抗体が共通抗原に対する参考抗体の特異的結合を抑制するアッセイにより決定される。例えば、Junghans et al. (1990)、Cancer Res. 50:1495を参照されたい。競合的結合アッセイで測定したとき、過剰の試験抗体（例えば、少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍または100倍）が、参考抗体の結合を少なくとも50%、75%、90%、95%、98%、または99%抑制する場合、試験抗体は参考抗体と競合する。競合アッセイにより同定された抗体（競合抗体）には、参考抗体と同じエピトープに結合する抗体、および参考抗体が結合するエピトープに対し、立体障害を生じるのに十分近位の近接したエピトープに結合する抗体が含まれる。

#### 【0139】

抗体は、一般的に、少なくとも $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、または $10^{10}$ M-1の親和性定数で、指定された標的に結合する。この結合は、検出可能な程度に高く、少なくとも1つの無関係な標的に対して生じる非特異的結合から区別可能な、特異的結合である。特異的結合は、特定の官能基間の結合または特定の空間的適合（例えば、鍵と鍵穴タイプ）の形成の結果であり得、一方、非特異的結合は、たいていファンデルワールス力の結果である。特異的結合は、しかしながら、モノクローナル抗体が唯一の標的に結合することを必ずしも意味するのではない。

#### 【0140】

抗体の配列を比較する際、配列同一性パーセントは、Kabatナンバリング規則により最大限配列された抗体配列で決定される。アライメント後、対象の抗体領域（例えば、重鎖または軽鎖の全体成熟可変領域）を、参考抗体の同じ領域と比較した場合、対象抗体および参考抗体の領域間の配列同一性パーセントは、対象抗体および参考抗体の両方の領域における同じアミノ酸が占める位置の数を、ギャップを計算に入れずに、2つの領域の整列した位置の全ての数で割って、パーセントに変換するための100を乗じた数である。

#### 【0141】

保存的、または非保存的としてアミノ酸置換を分類する目的で、アミノ酸を次のようにグループ化する：グループI（疎水性側鎖）：met、ala、val、leu、ile；グループII（中性親水性側鎖）：cys、ser、thr；グループIII（酸性側

10

20

30

40

50

鎖) : a s p、 g l u ; グループ I V ( 塩基性側鎖 ) : a s n、 g l n、 h i s、 l y s、 a r g ; グループ V ( 鎖配向に影響を与える残基 ) : g l y、 p r o ; およびグループ V I ( 芳香族性側鎖 ) : t r p、 t y r、 p h e。保存的置換には、同じクラス内のアミノ酸間の置換が含まれる。非保存的置換は、これらのクラスの 1 つのメンバーを、別のクラスのメンバーと交換することにより構成される。

#### 【 0 1 4 2 】

モノクローナル抗体は、一般的に、単離した形態で提供される。このことは、抗体が一般的に、その生産または精製から生じる妨害タンパク質および他の夾雑物に対して、少なくとも 50% w / w の純度であることを意味するが、薬剤を、過剰量の、薬学的に許容される担体またはその使用を促進することを意図した他の担体と組み合わせる可能性を除外しない。時々、モノクローナル抗体は、これらのモノクローナル抗体の、または他のタンパク質および夾雑物の、凝集体またはフラグメントに対し、少なくとも 60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% w / w の純度である。いくつかのこれらのモノクローナル抗体は、凝集体またはフラグメントを含んでもよいが、他のタンパク質および夾雫物に対し、少なくとも 99% w / w の純度である。

#### 【 0 1 4 3 】

1つ以上の列挙される要素を「含む」組成物または方法は、具体的に列挙されていない他の要素を含んでも良い。例えば、抗体を「含む」組成物は、抗体を単独で含んでもよく、または他の成分と組み合わせて含んでもよい。

#### 【 0 1 4 4 】

値の範囲の指定には、当該範囲内の全ての整数または当該範囲を規定する全ての整数、および当該範囲内の整数により規定される全ての小範囲が含まれる。

#### 【 0 1 4 5 】

特に文脈から明らかでない限り、「約」という用語は、記載された値の測定値の誤差範囲内の値(平均値の標準誤差(S E M))を包含する。

#### 【 0 1 4 6 】

統計学的有意性は、p 0 . 0 5 を意味する。

#### 【 0 1 4 7 】

「患者」には、予防的または治療的処置のいずれかを受ける、ヒトまたは他の哺乳動物の対象が含まれる。

#### 【 0 1 4 8 】

リスク因子を有する個体がリスク因子を有さない個体と比較してある疾患を発症するリスクが統計学的に顕著に高いとされるリスク因子(例えば、遺伝的、生化学的、家族歴、さらされる状況(situational exposure))を対象が少なくとも 1 つ有する場合、その個体は当該疾患のリスクが上昇している。

#### 【 0 1 4 9 】

「症状」という用語は、例えば歩行の変化などの、患者が気付いた、疾患の主観的証拠を指す。「徴候」という用語は、医師により観察された疾患の客観的証拠を指す。

#### 【 0 1 5 0 】

「認知機能」という用語は、例えば、注意、記憶、言語の作成並びに理解、問題解決、および環境並びにセルフケアに関心を持つことの、いずれかまたは全ての精神機能を指す。

#### 【 0 1 5 1 】

「認知機能の増強」または「認知機能の改善」とは、ベースライン(例えば、診断または処置の開始時)と比較した改善を指す。「認知機能の低下」とは、このベースラインと比較した機能の低下を指す。

#### 【 0 1 5 2 】

ラットまたはマウスなどの動物モデルシステムにおいて、認知機能は、対象が空間情報を使用する迷路(モリス水迷路、バーンズ円形迷路、高架式放射状迷路、T迷路など)、恐怖条件付け、能動的回避、照明オープンフィールド、暗所活動度計、高架式十字迷路、

10

20

30

40

50

2コンパートメント探索試験、または、強制水泳試験などを使用する方法によって、測定してよい。

#### 【0153】

ヒトにおいて、認知機能は、いくつかの標準試験のうちの1つ以上によって、測定できる。認知機能の試験またはアッセイの例は記載されており (Ruoppila and Suutama, Scan. J. Soc. Med. Suppl. 53, 44-65, 1997)、それには、標準心理試験（例えば、Wechsler Memory Scale, the Wechsler Adult Intelligence Scale, Raven's Standard Progressive Matrices, Schaie-Thurstone Adult Mental Abilities Test）、神経心理検査（例えば、Luria-Nebraska）、メタ認知自己評価（例えば、Metamemory Questionnaire）、視覚空間アッセイ試験（例えば、Poppelreuter's Figures, Clock Recognition, Honeycomb Drawing and Cancellation）、認知アッセイ試験（例えば、Folstein's Mini Mental State Test）、および、反応時間検査が含まれる。他の認知能力の標準試験には、アルツハイマー病評価尺度 - 認知サブスケール (ADAS - cog)；臨床的全般的印象の変化尺度 (CIBIC - plus scale)；アルツハイマー病共同研究の日常生活動作の評価 (ADCS - ADL)；ミニメンタルステート検査 (MMSE)；神経精神症状評価法 (NPI)；臨床的認知症重症度判定尺度 (CDR)；ケンブリッジ神経心理学自動検査バッテリー (CANTAB)、または、Sandoz 臨床評価 - 老人病 (SCAG)、ストループ検査、トレイルメイキング、ウェクスラー数字復唱検査 (Wechsler Digit Span)、および Cog State コンピュータ化認識試験が含まれる。さらに、認知機能は、陽電子放出断層撮影 (PET)、機能的磁気共鳴画像法 (fMRI)、単光子放射型コンピュータ断層撮影法 (SPECT)、または、脳機能の測定を可能にする他のあらゆるイメージング技術などの、イメージング技術を用いて測定してもよい。10

#### 【0154】

「遺伝子導入混合物」は、任意の方法により細胞外の核酸を宿主細胞に導入する上で必要な薬剤の、任意の組み合わせである。これらの方法には、例えば、リン酸カルシウム-DNA 共沈殿、DEAE-デキストラン媒介遺伝子導入、ポリブレン媒介遺伝子導入、エレクトロポレーション、微量注入法、微粒子銃法 (microparticle bombardment)、リボソーム融合、リポフェクション、プロトプラスト融合、レトロウイルス感染、ウイルス形質導入、および遺伝子銃が含まれる。20

#### 【0155】

単数形の、「a」、「an」および「the」の記述には、文脈が他に明確に示さない限り、複数形の参照が含まれる。例えば、「化合物」または「少なくとも1つの化合物」には、複数の化合物が含まれ得、それらの混合物が含まれる。30

#### 【0156】

##### 詳細な説明

###### I . 概要

本発明は、モノクローナル抗体 5C1 または関連抗体、例えば - シヌクレイン上の同じエピトープに結合する抗体を、 BBB を形成する細胞上の受容体（血液脳関門受容体、または BBB 受容体）に結合する一価の結合エンティティーに連結させることにより形成される、血液脳関門 (BBB) シャトルを提供する。本発明の実施はメカニズムの理解に左右されないが、一価の結合エンティティーの血液脳関門受容体への結合は、抗体の血液脳関門の通過を促進する。抗体は、例えば、 - シヌクレインの蓄積に関連する障害（例えば、シヌクレイン病）を治療するのに有用である。これらの障害には、レビー小体病、例えばパーキンソン病、びまん性レビー小体病 (DLBD)、レビー小体型アルツハイマー病 (LBV)、アルツハイマー病およびパーキンソン病の併発、および純粋自律神経失調症、ならびに多系統萎縮症 (MSA) が含まれる。抗体はまた、シヌクレイン病の診断に有用である。40

#### 【0157】

##### II . 標的分子

天然のヒト野生型 - シヌクレインは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する 140 アミ

50

ノ酸のペプチドである (Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11282-6, 1993; GenBank アクセッション番号: P37840)。当該タンパク質は、3つの認識ドメイン、アミノ酸 1 - 61 をカバーする K T K E 反復ドメイン、アミノ酸約 60 - 95 から始まる N A C (非アミロイド成分) ドメイン、およびアミノ酸約 98 - 140 から始まる C 末端酸性ドメインを有する。Jensen et al. (1995) は、N A C が配列番号 2 のアミノ酸配列を有すると報告した (Jensen et al., Biochem. J. 310.1: 91-94; GenBank アクセッション番号 S56746)。しかしながら、Ueda et al. (1993) は、N A C が配列番号 3 のアミノ酸配列を有すると報告した (Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11282-6)。

#### 【0158】

特に文脈から明らかでない限り、-シヌクレインまたはそのフラグメントへの言及には、上に示した天然のヒト野生型アミノ酸配列、およびそのヒト対立遺伝子変異型が含まれ、特にレビー小体およびパーキンソン病の家族性遺伝型に関連するヒト対立遺伝子変異型が含まれる（例えば、E 46K、A 30P および A 53T であり、最初の文字は配列番号 1 におけるアミノ酸であり、数字は配列番号 1 におけるコドンの位置であり、二番目の文字は対立遺伝子多型におけるアミノ酸である）。これらの変異体は、場合により、独立して、または任意の組み合わせで存在する。-シヌクレイン凝集を増強する、誘導された変異 E 83Q、A 90V、A 76T はまた、独立して、または互いに組み合わせて、および / またはヒト対立遺伝子多型 E 46K、A 30P および A 53T と組み合わせて、存在し得る。

#### 【0159】

##### I I I . レビー小体疾患および他のシヌクレイン病

レビー小体疾患 (LBD)、特にパーキンソン病は、ドーパミン作動系の変性、運動変化、認知障害、およびレビー小体 (LB) の形成を特徴とする (McKeith et al., Neurology (1996) 47:1113-24)。レビー小体は、神経細胞に見られる球状タンパク質沈着物である。脳におけるこれらの存在は、アセチルコリンおよびドーパミンを含む化学伝達物質の作用を遮断して、脳の正常な機能を妨害する。レビー小体病には、パーキンソン病（特発性パーキンソン病を含む）、びまん性レビー小体病 (DLBD)（レビー小体型認知症 (DLB) としてもまた知られる）、レビー小体型アルツハイマー病 (LBV)、およびアルツハイマー病およびパーキンソン病の併発が含まれる。DLBD は、アルツハイマー病およびパーキンソン病の双方と症状が同じである。DLBD は、主に、シヌクレイン病が最初に観察される脳の領域においてパーキンソン病と異なる。DLBD では、レビー小体は最初に皮質に形成される。パーキンソン病では、レビー小体は、中脳および脳幹、例えば黒質に生じる。両障害において、病状は、時空間的に規定された方法で、脳の他の領域まで慢性的に進行する。他のレビー小体病には、純粋自律神経失調症、レビー小体嚙下障害、偶発性 LBD、および遺伝性 LBD（例えば、-シヌクレイン遺伝子、PARK3 および PARK4 の変異）が含まれる。多系統萎縮症 (MSA；例えば、オリーブ橋小脳萎縮症、線条体黒質変性症およびシャイ・ドレーガー症候群) は、オリゴデンロサイトが、-シヌクレインの細胞内沈着と同時に神経筋伝達の機能障害により影響されているシヌクレイン病である。

#### 【0160】

##### I V . 抗体

###### A . 結合特異性および機能特性

5C1 は、本明細書に記載される脳シャトルに組み込まれるための例示的な抗体である。その重鎖および軽鎖成熟可変領域は、配列番号 9 および配列番号 24 に、それぞれ示されている。組み込まれ得る他の抗体には、5C1 と同じエピトープに結合する抗体が含まれる。これらの抗体は、同様の機能特性、例えば -シヌクレインの神経細胞の凝集体の減少、認知機能の改善、および / またはシナップスの密度および / または樹状突起の密度の維持などを、有し得る。5C1 抗体および関連抗体を記述する先の出願には、2013年10月8日に出願された PCT 国際出願第 PCT/US2013/63945、および 2012 年 10 月 8 日に出願された米国特許出願第 61/711,204、2012 年 10

10

20

30

40

50

月26日に出願された米国特許出願第61/719,281、2013年6月27日に出願された米国特許出願第61/840,432、2013年8月30日に出願された米国特許出願第61/872,366および2013年10月8日に出願された米国特許出願第14/049,169が含まれ、これらは全て、あらゆる目的のために、その全体が参考により組み込まれる。

#### 【0161】

この結合特異性を有する他の抗体は、マウスまたは他の動物(例えば、モルモット、靈長類、ウサギ、またはラット)を、 - シヌクレインまたはそのフラグメント(例えば、アミノ酸残基118 - 126、またはその一部を含むフラグメント)で免疫化することにより生産され得る。Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988) を参照されたい。この免疫原は、天然の供給源から取得されるか、ペプチド合成により取得されるか、または組換え発現により取得され得る。免疫原は、場合により、担体タンパク質と融合されて、あるいは他の方法で複合体化されて、投与され得る。免疫原は、場合により、アジュバントと一緒に投与され得る。フロイント完全アジュバントに続けて不完全アジュバントが、実験動物の免疫化に使用され得る。ウサギまたはモルモットは、一般的に、ポリクローナル抗体を作成するために使用される。マウスは一般的に、モノクローナル抗体を作成するために使用される。得られた抗体は、 - シヌクレインへの結合で、場合により、5C1との競合で、選別され得る。抗体はまた、以下における効果で、選別され得る：(1) 例えばモリス水迷路(MWM)試験または水平ビームテストなどの行動学的アッセイ、および / または脳組織における、 - シヌクレイン、 - シヌクレイン凝集、シナプトフィジン、MAP2、および / または PSD95 を検出するための免疫学的アッセイを受けた、 - シヌクレイン形質導入げっ歯類モデルにおける効果で選別され；(2) 例えばモリス水迷路(MWM)試験または水平ビームテストなどの行動学的アッセイ、および / または脳組織における - シヌクレイン、 - シヌクレイン凝集、シナプトフィジン、MAP2、および / または PSD95 を検出するための免疫学的アッセイを用いて、 - シヌクレイン蓄積を特徴とする疾患のための、げっ歯類または他の非ヒト動物モデルにおける効果で選別され；および / または(3) 適切な行動学的アッセイを用いて、 - シヌクレイン蓄積に関連する症状を有するヒトにおける効果で選別され得る。前述の手法のいずれかの代わりに、またはそれに加えて、抗体は、変異性の変化のコレクションに対して、5C1と同じ、または同様の結合プロファイルを示す抗体を同定するために、 - シヌクレインの変異導入された形態に対して、選別することができる。変異は、一度に1つの残基の、または - シヌクレイン全体にわたる、若しくはエピトープが存在すると知られている - シヌクレインの部分(例えば残基118 - 126)にわたる、より広い間隔が空いた、アラニン(あるいは、アラニンがすでに存在する場合は、セリン)による体系的な置換であり得る。

#### 【0162】

図6-8および実施例6は、残基118 - 126内に結合する他の2つの抗体、すなわち9E4および5D12と比較して、5C1のエピトープを特徴付けている。アラニン変異導入により、 - シヌクレインの残基118 - 126において、1つずつ、個々のアミノ酸に変異導入する影響を試験している。残基118 - 126内の様々なアミノ酸の変異により引き起こされる、結合親和性(言い換えると、結合への寄与)の相対的な変化のプロファイルは、エピトープを特徴付ける。5C1にとって、残基120 - 122のいずれかの変異導入は、最大の結合の減少を示す。残基123または124の変異導入は、結合の顕著な減少をもたらすが、位置120 - 122のいずれかの変異には及ばない。残基118、119、125または残基126の変異導入は、結合親和性の減少をほとんど示さず、本質的には変化しない。簡単にするために、変異導入の効果をおよそ3つのカテゴリーに細分することができる：残基120 - 122の結合が本質的に完全に減少するカテゴリー(ネガティブコントロールと区別できない)、残基118、119、125および126の結合が本質的には減少しないカテゴリー(ポジティブコントロールと区別できない)、残基123および124の結合親和性が中程度に減少するカテゴリー。それゆえに、

10

20

30

40

50

5 C 1 のエピトープは、配列番号 1 の残基 1 2 0 - 1 2 4 からなる、または本質的になる直線状エピトープとして、おおよそ特徴づけることができ、残基 1 2 0 - 1 2 2 が結合に最大に寄与する。本段落の記述のいずれかで特徴づけられる 5 C 1 エピトープを有する抗体が、提供される。いくつかの抗体は、残基 1 2 0 - 1 2 2 から本質的になり、かつ残基 1 1 9 - 1 2 0 を含まないエピトープにより特徴付けられ、このことは、残基 1 2 0 - 1 2 2 がそれぞれ、他のいずれの残基よりも結合に寄与していること、および残基 1 1 9 および 1 2 0 が結合への（例えば実施例のアラニンスキャニング法により）検出可能な寄与を示さないことを意味している。残基 1 2 3 および 1 2 4 は、これらの抗体における結合に小さく寄与してもよいし、しなくてよい。

## 【 0 1 6 3 】

10

選択したマウス抗体の結合特異性を有する抗体（例えば、5 C 1）はまた、ファージディスプレイ法の変形を用いて生産され得る。Winter, WO 92/20791を参照されたい。本方法は、特に、ヒト抗体の生産に適している。本方法において、選択したマウス抗体の重鎖または軽鎖可変領域のいずれかが、出発物質として用いられる。例えば、軽鎖可変領域が出発物質として選択された場合、ファージライブラリーは、同じ軽鎖可変領域（すなわち、マウス出発物質）と異なる重鎖可変領域を提示するメンバーで構成される。例えば、重鎖可変領域は、再構成された重鎖可変領域のライブラリーから取得され得る。 - シヌクレインに強い特異的結合（例えば、少なくとも  $10^{-8} \text{ M}^{-1}$  または  $10^{-9} \text{ M}^{-1}$ ）を示すファージが選択される。その後、当該ファージ由来の重鎖可変領域は、さらなるファージライブラリーを構成するための出発物質としての役割を果たす。このライブラリーにおいて、各ファージは同じ重鎖可変領域（最初のディスプレイライブラリーから同定された領域）および異なる軽鎖可変領域を提示する。例えば、軽鎖可変領域は、最構成されたヒト可変軽鎖領域のライブラリーから取得され得る。この場合も、 - シヌクレインに強い特異的結合を示すファージが選択される。結果として得られた抗体はたいてい、マウス出発物質と同じまたは同様のエピトープ特異性を有する。

## 【 0 1 6 4 】

20

他の抗体は、例示される抗体、例えば 5 C 1 の重鎖および軽鎖をコードする c D N A の変異導入により取得され得る。従って、成熟重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸配列において 5 C 1 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一であり、かつその機能特性を維持するモノクローナル抗体、および / または 少数の機能的に重要でないアミノ酸の置換（例えば、保守的な置換）、欠失、または挿入により各抗体から異なる抗体もまた、本発明に含まれる。

## 【 0 1 6 5 】

30

全体的にまたは実質的に 5 C 1 に由来する C D R のうち、いくつかまたは全て（例えば、3、4、5 および 6 つ）を有する抗体は、本明細書に記載される脳シャトルに組み込まれ得る。これらの抗体は、5 C 1 の重鎖可変領域に全体的にまたは実質的に由来する C D R を少なくとも 2 つ、およびたいていは 3 つ全て有する重鎖可変領域、および / または 5 C 1 の軽鎖可変領域に全体的にまたは実質的に由来する C D R を少なくとも 2 つ、およびたいていは 3 つ全て有する軽鎖可変領域を含み得る。当該抗体は、重鎖および軽鎖を共に含み得る。C D R が、4、3、2 または 1 つ以下の置換、挿入または欠失を含む場合、C D R は対応する 5 C 1 C D R に実質的に由来するが、C D R H 2 (K a b a t により規定された) は、6、5、4、3、2、または 1 つ以下の置換、挿入または欠失を有し得る。これらの抗体は、成熟重鎖および / または軽鎖可変領域のアミノ酸配列において 5 C 1 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % の同一性を有し、かつその機能特性を維持し得、かつ / または、少数の機能的に重要でないアミノ酸の置換（例えば、保守的な置換）、欠失、または挿入により 5 C 1 から異なり得る。

## 【 0 1 6 6 】

40

いくつかの抗体は、5 C 1 と同様の機能的活性、例えば、神経突起および / または軸索の - シヌクレイン凝集体の減少、神経突起のジストロフィーの減少、認知機能の改善、

50

認知低下の回復、治療または抑制、および／またはシナプスの密度および／または樹状突起の密度の維持または増加を示す。

【0167】

B. キメラ抗体およびベニヤ抗体

非ヒト抗体、特に5C1のキメラおよびベニヤの形態は、本明細書に記載される脳シャトルに組み込まれ得る。

【0168】

キメラ抗体は、非ヒト抗体（例えば、マウス）の軽鎖および重鎖の成熟可変領域がヒト軽鎖および重鎖定常領域と組み合わされた抗体である。一般的に、軽鎖および重鎖定常領域はヒト由来であるが、定常領域は必要に応じて（例えば、適切な動物モデルにおいて非ヒト抗体の試験を促進させるために）異なる非ヒト種に由来し得る。これらの抗体は実質的にまたは全体的にマウス抗体の結合特異性を保持し、およびヒト定常領域が寄与するヒト配列の約3分の2であり得る。10

【0169】

ベニヤ抗体は、非ヒト抗体のCDRのうちのいくつかおよびたいてい全て、および非ヒト可変領域フレームワーク残基のうちのいくつかを保持するが、B細胞またはT細胞のエピトープに寄与し得る他の可変領域フレームワーク残基、例えば曝露残基（exposed residues）（Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991）を、ヒト抗体配列の対応する位置の残基と置換している、ヒト化抗体の1つのタイプである。結果として得られるのは、CDRが全体的にまたは実質的に、非ヒト抗体に由来しており、非ヒト抗体の可変領域フレームワークが置換により、よりヒト様に作成されている抗体である。20

【0170】

C. ヒト化抗体

ヒト化5C1抗体は、ヒト-シヌクレインに特異的に結合する。いくつかのヒト化抗体の親和性（すなわちKa）は、例えば、マウス5C1抗体の親和性の5または2の倍数の範囲内であり得る。いくつかのヒト化抗体は、実験誤差の範囲内で、マウス5C1と同じ親和性を有する。いくつかのヒト化抗体は、マウス5C1よりも大きな親和性を有する。いくつかのヒト化抗体は、同じエピトープに結合する、および／またはヒト-シヌクレインへの結合について、マウス5C1と競合する。

【0171】

ヒト化抗体は、非ヒト「ドナー」抗体（例えば、マウス5C1）由来のCDRが、ヒト「アクセプター」抗体配列に移植された、遺伝子操作された抗体である（例えば、Queen, US 5,530,101および5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; Foote, US 6,881,557参照）。アクセプター抗体配列は、例えば、成熟ヒト抗体配列、これらの配列の複合体、ヒト抗体配列のコンセンサス配列、または生殖系列領域配列（germline region sequence）であり得る。従って、ヒト化5C1抗体は、全体的にまたは実質的にマウス5C1抗体に由来するCDRのいくつかまたは全て、および、存在する場合、全体的にまたは実質的にヒト抗体配列に由来する可変領域フレームワーク配列並びに定常領域を有する。同様に、ヒト化重鎖は、全体的にまたは実質的にドナー抗体重鎖に由来する少なくとも2つのCDRおよびたいてい3つ全てのCDR、並びに、実質的にヒト重鎖可変領域フレームワークおよび定常領域配列に由来する、重鎖可変領域フレームワーク配列および重鎖定常領域（存在する場合）を有する。同様に、ヒト化軽鎖は、全体的にまたは実質的に、ドナー抗体軽鎖に由来する、少なくとも2つのCDRおよびたいてい3つ全てのCDR、並びに、実質的にヒト軽鎖可変領域フレームワークおよび定常領域配列に由来する、軽鎖可変領域フレームワーク配列および軽鎖定常領域（存在する場合）を有する。ナノボディおよびdAbs以外、ヒト化抗体はヒト化重鎖およびヒト化軽鎖を含む。（Kabatによって規定される）対応する残基の少なくとも85%、90%、95%または100%がそれぞれのCDR間で同一であるとき、ヒト化抗体のCDRは、実質的に、非ヒト抗体の対応するCDRに由来する。抗体鎖の可変領域フレームワーク配列または抗体鎖の定常領域は、Kabatによって規定される対応する304050

残基の少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%が同一のとき、実質的に、それぞれヒト可変領域フレームワーク配列またはヒト定常領域に由来する。

#### 【0172】

ヒト化抗体はしばしば、マウス抗体由来の、6つ全てのCDR（好ましくはKabatにより規定された）を組み込んでいるが、ヒト化抗体はまた、マウス抗体由来の全てのCDRより少ないCDR（少なくとも3、4、または5つ）で作成され得る（例えば、Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000）。 10

#### 【0173】

いくつかの抗体において、特異性決定残基（SDR）と名付けられている(Kashmiri et al., Methods (2005) 36(1):25-34)、CDRの一部のみ、すなわち結合に必要なCDR残基のサブセットが、ヒト化抗体において結合を維持するのに必要である。抗原と接觸していないCDR残基およびSDRにないCDR残基は、以前の研究（例えば、CDRH2の、残基H60-H65の1つ以上、または全てが、時々必要でない）に基づき、コチア超可変ループ(Chothia, J. Mol. Biol. 196:901 (1987))の外側にあるKabat CDRの領域から、分子モデル化により、および／または経験的に、またはGonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004に記載されるように、同定することができる。これらのヒト化抗体において、1つ以上のドナー-CDR残基が存在しない位置、またはドナー-CDR全体が除かれた位置において、その位置を占めるアミノ酸は、アクセプター-抗体配列の対応する位置（Kabatナンバリングによる）を示すアミノ酸であり得る。含んでいるCDRにおいて、アクセプターをドナー-アミノ酸へこのように置換する数は、競合する考慮点のバランスを反映する。このような置換は、ヒト化抗体のマウスアミノ酸の数を減らし、結果として潜在的な免疫原性を低下させるのに、潜在的に有利である。しかしながら、置換はまた、親和性の変化を引き起こし得、親和性の顕著な低下は、好ましくは避けられる。CDR内の置換の位置、および、置換されるアミノ酸はまた、経験的に選択できる。 20

#### 【0174】

ヒトアクセプター-抗体配列は、場合により、ヒトアクセプター-配列可変領域フレームワークおよび対応するドナー-抗体鎖の可変領域フレームワークの間の高い配列同一性（例えば、65%）を提供するために、多くの既知のヒト抗体配列から選択され得る。 30

#### 【0175】

ヒト可変領域フレームワーク残基に由来するアミノ酸には、CDRコンフォメーションおよび／または抗原への結合に影響を及ぼすそれらの可能性に基づいて、置換のために選択し得るものがある。そのような影響の可能性は、モデル化すること、特定位置のアミノ酸の特性を試験すること、特定アミノ酸の置換または変異の影響を実験的に観察すること、によって調べられる。

#### 【0176】

例えば、マウス成熟可変領域フレームワーク残基と選択したヒト成熟可変領域フレームワーク残基とでアミノ酸が異なるとき、ヒトフレームワークアミノ酸は、そのアミノ酸が 40

、

- (1) 非共有結合で抗原に直接結合する、
- (2) CDR領域に隣接する、

(3) 他の態様でCDR領域と相互作用する（例えば、CDR領域の約6以内に位置する）、（例えば、相同な既知の免疫グロブリン鎖の解析された構造上の軽鎖または重鎖をモデル化することにより同定される）

- (4) 重鎖と軽鎖との相互作用を媒介する残基である、

と合理的に期待できるときには、マウス抗体由来の等価なフレームワークアミノ酸で置換することができる。

#### 【0177】

50

20

30

40

50

Queen, US 5,530,101により規定されたクラス(1)-(3)由来のフレームワーク残基は、時には代わりに、カノニカル(canonical)およびバーニヤ(vernier)残基と呼ばれる。CDRループのコンフォメーションを規定するのを助けるフレームワーク残基は、時にはカノニカル(canonical)残基と呼ばれる(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Thornton & Martin J. Mol. Biol., 263:800-815 (1996))。抗原結合ループコンフォメーションをサポートし、抗体が抗原に適合するよう微調整する役割をするフレームワーク残基は、時にはバーニヤ残基と呼ばれる(Foote & Winter, J. Mol. Biol. 224:487-499 (1992))。

#### 【0178】

置換の候補となる他のフレームワーク残基は、潜在的グリコシル化部位を作成する残基である。さらに他の置換の候補は、その位置でヒト免疫グロブリンにとって異常であるアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。これらのアミノ酸は、マウスドナー抗体由来の等価な位置の、またはより一般的なヒト免疫グロブリンの等価な位置の、アミノ酸で置換可能である。

#### 【0179】

マウス5C1抗体のヒト化形態が、本明細書に記載の脳シャトルに組み込まれ得る。マウス抗体は、配列番号9および配列番号24をそれぞれ含むアミノ酸配列を有する、成熟重鎖および軽鎖可変領域を含む。本発明は、5つの例示されるヒト化成熟可変領域を提供する:H1、配列番号14; H2、配列番号15; H3、配列番号16; H4、配列番号17; およびH5、配列番号18。本発明はさらに、4つの例示されるヒト化成熟軽鎖可変領域を提供する:L1、配列番号29; L2、配列番号30; L3、配列番号31; およびL4、配列番号32。抗体は、提供されるこれらの成熟重鎖および軽鎖可変領域の任意の並び替え、すなわちH1L2、H1L3、H1L4、H2L1、H2L2、H2L3、H2L4、H3L1、H3L2、H3L3、H3L4、H4L1、H4L2、H4L3、H4L4、H5L1、H5L2、H5L3、またはH5L4を含む。8つの重鎖逆突然変異と5つの軽鎖逆突然変異とを含むH4L3変異体は、マウスおよびキメラ5C1抗体の2倍の親和性の範囲内である、-シヌクレインへの親和性(Biacore装置で測定される)を有する。下記の表3を参照されたい。ELISAで測定されるように、H4L3変異体は、実質的にキメラ抗体と同じ(実験誤差の範囲内)、かつマウス5C1抗体よりも優れた、-シヌクレインに対する親和性を有する。図5を参照されたい。さらに、6つの重鎖逆突然変異および5つの軽鎖逆突然変異を含むH5L3変異体は、マウスおよびキメラ5C1抗体の4倍の親和性の範囲内である、ヒト-シヌクレインへの親和性(Biacore装置で測定される)を提供する。下記の表3を参照されたい。9つの重鎖逆突然変異および2つの軽鎖逆突然変異を含むH3L4変異体はまた、実質的にキメラ5C1抗体と実験誤差範囲内で同じ、ヒト-シヌクレインへの親和性(ELISAにより測定される)を提供し、それぞれ、9つの重鎖逆突然変異並びに5つおよび6つの軽鎖逆突然変異を含む、H3L3およびH3L1変異体は、マウス5C1抗体よりも優れた、-シヌクレインへの親和性を提供する(ELISAにより測定される)。

#### 【0180】

本発明は、ヒト化成熟重鎖可変領域がH4(配列番号17)に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を示し、およびヒト化成熟軽鎖可変領域がL3(配列番号31)に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を示す、H4L3ヒト化5C1抗体の変異体を提供する。いくつかのこののような抗体において、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または13個全てのH4L3の逆突然変異が、保持されている。本発明はまた、ヒト化成熟重鎖可変領域が、H5(配列番号18)に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を示し、ヒト化成熟軽鎖可変領域が、L3(配列番号31)に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を示す、H5L3ヒト化5C1抗体の変異体を提供する。いくつかのこのような抗体において、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11個全

10

20

30

40

50

ての H 5 L 3 の逆突然変異が保持されている。ヒト化成熟重鎖可変領域が、H 3 (配列番号 16) に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を示し、ヒト化成熟軽鎖可変領域が、L 4 (配列番号 32) に、少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を示す、H 3 L 4 ヒト化 5 C 1 抗体の変異体が、本明細書に記載の脳シャトルに組み込まれ得る。いくつかのこのようないくつかの抗体において、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 11 個全ての H 3 L 4 の逆突然変異が保持されている。いくつかの抗体において、V h 領域の H 11、H 27、H 30、H 48、および H 73 の位置のうち少なくとも 1 つが、それ L、Y、T、I、および K で占められている。いくつかの抗体において、V h 領域の H 11、H 27、H 30、H 48、および H 73 の位置が、それぞれ L、Y、T、I、および K で占められている。いくつかの抗体において、V h 領域の H 67、H 69、H 91、および H 94 の位置のうち少なくとも 1 つが、それぞれ A、L、F、および S で占められている。  
 10 いくつかの抗体において、例えば H 4 の場合、V h 領域の H 67、H 69、および H 94 の位置が、A、L、および S でそれぞれ占められている。いくつかの抗体において、例えば H 5 の場合、H 94 の位置が S で占められている。いくつかの抗体において、例えば H 3 の場合、V h 領域の H 67、H 69、H 91 および H 94 の位置が、それぞれ A、L、F、および S により占められている。いくつかの抗体において、V k 領域の L 12 および L 14 の位置の少なくとも 1 つが、S で占められている。いくつかの抗体において、例えば L 3 および L 4 の場合、V k 領域の L 12 および L 14 の位置が、S で占められている。いくつかの抗体において、V k 領域の L 2、L 45、L 49 および L 87 の位置のうち少なくとも 1 つが、それぞれ V、K、N、および F で占められている。いくつかの抗体において、例えば L 3 の場合、V k 領域の L 2、L 49、および L 87 の位置が、それぞれ V、N、および F で占められている。いくつかの抗体において、例えば L 1 の場合、V k 領域の L 2、L 45、L 49、および L 87 の位置が、それぞれ V、K、N、および F で占められている。これらのヒト化抗体の C D R 領域は、マウスドナー抗体の C D R 領域と同じである、H 4 L 3 または H 5 L 3 の C D R 領域に、同一または実質的に同一であり得る。C D R 領域は、任意の従来の定義（例えば、コチア（Chothia））により規定され得るが、好ましくは Kabat により規定される。

#### 【0181】

ヒト化 5 C 1 変異体のさらなる変異の可能性の 1 つは、可変領域フレームワークのさらなる逆突然変異である。ヒト化 m A b において C D R と隣接していない多くのフレームワーク残基は、ドナーマウス m A b、または他のマウス若しくはヒト抗体の、対応する位置のアミノ酸置換を受け入れることができ、多くの潜在的な C D R 隣接残基でさえまた、置換を受け入れることができ、または、C D R 内のアミノ酸でさえ、例えば可変領域フレームワークを提供するために用いられるヒトアクセプター配列の対応する位置で見出される残基で改変されてもよい。さらに、代替のヒトアクセプター配列を、例えば重鎖および／または軽鎖に用いることができる。異なるアクセプター配列を用いる場合、上記で推奨された 1 つ以上の逆突然変異は、対応するドナー残基とアクセプター残基が逆突然変異することなくすでに同一であるために、行われなくてもよい場合がある。例えば、位置 H 11 をすでに L が占め、H 48 をすでに I が占め、および／または H 73 をすでに K が占める重鎖アクセプター配列を用いるとき、対応する逆突然変異は必要ない。同様に、位置 L 12 および／または L 14 を S が占める軽鎖アクセプター配列を用いるとき、対応する逆突然変異は必要ない。

#### 【0182】

成熟軽鎖および重鎖可変領域が、ヒト化 5 C 1 の成熟軽鎖および重鎖可変領域、H 1 L 1、H 1 L 2、H 1 L 3、H 1 L 4、H 2 L 1、H 2 L 2、H 2 L 3、H 2 L 4、H 3 L 1、H 3 L 2、H 3 L 3、H 4 L 1、H 4 L 2、H 4 L 4、H 5 L 1、H 5 L 2、または H 5 L 4 に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を示すヒト化抗体は、本明細書に記載の脳シャトルに組み込まれ得る。これらのヒト化抗体の C D R 領域は、マウスドナー抗体の C D R 領域に、同一または実質的に同一であ  
 30  
 40  
 50

り得る。CDR領域は、任意の従来の定義（例えば、コチア（Chothia））により規定され得るが、好ましくはKabatにより規定される。

### 【0183】

#### 定常領域の選択

キメラ、ヒト化、ベニヤ、またはヒト抗体の重鎖および軽鎖可変領域は、Fc受容体と相互作用するのに十分な定常領域のうち少なくとも一部と連結することができる。定常領域は一般的に、ヒト定常領域であるが、必要に応じて非ヒト定常領域が選択され得る。

### 【0184】

定常領域の選択は、抗体依存性補体媒介細胞傷害、および／または抗体依存性細胞媒介細胞傷害が、必要であるかどうかによって部分的には決まる。例えば、ヒトアイソタイプ IgG1およびIgG3は、補体媒介細胞傷害を有するが、ヒトアイソタイプIgG2およびIgG4は補体媒介細胞傷害が不十分であるか、または有さない。ヒトIgG1およびIgG3はまた、ヒトIgG2およびIgG4よりも強い細胞媒介エフェクター機能を誘導する。抗体に含めるのに好適なヒトIgG1定常領域は、配列番号38の配列を有し得る。軽鎖定常領域は、またはであり得る。抗体に含めるのに好適なヒト軽鎖定常領域は、配列番号52を有し得る。配列番号52のN末端アルギニンは削除することができ、その場合、軽鎖定常領域は配列番号40のアミノ酸配列を有する。抗体は、2つの軽鎖および重鎖を含むテトラマーとして、分離した重鎖として、分離した軽鎖として、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>またはFvフラグメントとして、または重鎖および軽鎖可変領域がスペーサーを介して連結している単鎖抗体として、発現され得る。

10

### 【0185】

ヒト定常領域は、異なる個体間で、アロタイプ変異および同型アロタイプ変異を示す。つまり、定常領域は、異なる個体において、1つ以上の多型位置にて相違し得る。同型アロタイプは、同型アロタイプを認識する血清が1つ以上の他のアイソタイプの非多型領域に結合する点で、アロタイプと異なる。したがって、例えば、他の重鎖定常領域は、IgG1 G1m3アロタイプであり、配列番号66のアミノ酸配列を有する。IgG1 G1m3アロタイプの別の重鎖定常領域は、配列番号75のアミノ酸配列を有する。ヒト定常領域と言えば、任意の天然のアロタイプの定常領域、または天然のアロタイプの多型位置を占める任意の残基の並べ替え、または下記に記載したようにエフェクター機能の減少または増大のための最大3、5、または10個の置換を含む。

20

### 【0186】

軽鎖および／または重鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端の、1つまたは複数のアミノ酸、例えば重鎖のC末端リシンは、分子の一部または全部において、欠損するか、または誘導体化されていてよい。エフェクター機能、例えば補体媒介細胞傷害またはADCを、減少もしくは増大させるために(例えば、Winter et al., US Patent No. 5,624,821; Tso et al., US Patent No. 5,834,597;およびLazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006を参照)、またはヒトにおける半減期を長くするために(例えば、Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004を参照)、定常領域で置換を行うことができる。例示的な置換には、抗体の半減期を増すための、位置250のG1nおよび／または位置428(この段落において、定常領域にEUNANPARLINGを使用する)のLeuが含まれる。位置234、235、236および／または237残基のいずれかまたは全ての置換は、Fc受容体、特にFcRI受容体に対する親和性を減少させる(例えば、USS6,624,821を参照)。エフェクター機能を減少させるために、ヒトIgG1の位置234、235および237に、アラニン置換を用いることができる。場合により、ヒトIgG2の位置234、236および237はアラニンで置換され、位置235はグルタミンで置換される(例えば、USS5,624,821を参照)。いくつかの抗体において、ヒトIgG1のEUNANPARLINGの位置241、264、265、270、296、297、322、329、および331の1つ以上における変異が用いられる。いくつかの抗体において、ヒトIgG1のEUNANPARLINGの318、320、および322の1つ以上における変異が用いられる。いくつかの抗体において、位置234および／また

30

40

50

は 235 はアラニンに置換され、および / または位置 329 はグリシンに置換されている。いくつかの抗体において、例えば配列番号 75 において、位置 234 および 235 がアラニンに置換されている。いくつかの抗体において、アイソタイプはヒト IgG2 または IgG4 である。

#### 【 0187 】

##### E . ヒト抗体

- シヌクレインに対するヒト抗体は、以下に記載の様々な技術により提供される。いくつかのヒト抗体は、5C1 と同じまたは重複するエピトープ特異性を有するように、競合的結合実験または他の方法で選択される。ヒト抗体はまた、- シヌクレインの 1 つのフラグメント（例えば、アミノ酸残基 118 - 126）のみを免疫原として用いることにより、および / または - シヌクレインの欠失変異体コレクションに対する抗体を選別することにより、特定のエピトープ特異性について選別できる。ヒト抗体を作成する技術の 1 つは、トリオーマ法 (triooma methodology) である (Oestberg et al., Hybridoma 2:36 1-367 (1983); Oestberg, U.S.Pat.No.4,634,664; および Engleman et al., U.S.Pat.No.4,634,666)。他の技術には、ヒト免疫グロブリン遺伝子、例えば XenoMouse (登録商標)、Livamab Mouse または Veloceimmune mouse を発現するトランスジェニックマウスの免疫化が含まれる（例えば、Lonberg et al., WO93/1222、U.S.Pat.No.5,877,397、U.S.Pat.No.5,874,299、U.S.Pat.No.5,814,318、U.S.Pat.No.5,789,650、U.S.Pat.No.5,770,429、U.S.Pat.No.5,661,016、U.S.Pat.No.5,633,425、U.S.Pat.No.5,625,126、U.S.Pat.No.5,569,825、U.S.Pat.No.5,545,806、Nature 148, 1547-1553 (1994)、Nature Biotechnology 14, 826 (1996)、Kucherlapati、および WO 91/10741 を参照）。別の技術は、ファージディスプレイである（例えば、Dower et al., WO 91/17271 および McCafferty et al., WO 92/01047、U.S.Pat.No.5,877,218、U.S.Pat.No.5,871,907、U.S.Pat.No.5,858,657、U.S.Pat.No.5,837,242、U.S.Pat.No.5,733,743 および U.S.Pat.No.5,565,332 を参照）。これらの方 10 法において、外表面に様々な抗体を提示するファージライブラリーが作成される。抗体はたいてい、Fv または Fab フラグメントとして提示される。所望の特異性を有する抗体を提示するファージは、- シヌクレインペプチドまたはそのフラグメントに対する親和性の増大により、選択される。別の技術は、Reddy et al., Nat. Biotechnol. 2010 Sept 28(9):965-9 (Epub 2010 Aug 29)、および US 20110053803、20100099103、20100291066、20100035763、および 20100151471 において概説される一般的なプロトコールに従い、ヒト B 細胞由来の DNA を配列決定することである。簡潔に言うと、抗 - シヌクレイン抗体を有すると考えられるヒト、例えば、- シヌクレイン、そのフラグメント、- シヌクレインまたはそのフラグメントを含む長鎖ポリペプチド、または抗イディオタイプ抗体で免疫化したヒトから、B 細胞を取得できる。その後、B 細胞由来の抗体の mRNA は、cDNA に逆転写され、例えば 454 配列決定技術を用いて配列決定される。各抗体由来の鎖の配列を獲得した後、鎖を一対にし（例えば、バイオインフォマティクスを用いて）、クローン化し、発現し、また所望の特性について選別することができる。

#### 【 0188 】

##### F . 組換え抗体の発現

抗体発現細胞株（例えば、ハイブリドーマ）を用いて、キメラおよびヒト化抗体を作成するための多くの方法が知られている。例えば、抗体の免疫グロブリン可変領域は、よく知られた方法を用いて、クローン化および配列決定することができる。ある方法では、重鎖可変 VH 領域が、ハイブリドーマ細胞から調製した mRNA を用いた RT - PCR によりクローン化される。転写開始コドンを包含する VH 領域リーダーペプチドに対する、5' プライマーおよび g2b 定常領域特異的 3' プライマーとして、コンセンサスプライマーが用いられる。例示的なプライマーが、Schenk et al. による U.S. patent publication US 2005/0009150 に、記載されている（以下、「Schenk」）。複数の、個別に作成されたクローン由来の配列は、增幅の間に変化が導入されていないかを確かめるために、比較され得る。VH 領域の配列はまた、5' RACE RT - PCR 法および 3' g2b 特異的プライマーにより取得した VH フラグメントの配列決定によって、決定または確認す 20 30 40 50

ることができる。

#### 【0189】

軽鎖可変VL領域は、類似の方法でクローン化できる。ある手法において、転写開始コドンを包含するVL領域とハイブリダイズするように設計された5'プライマーと、V-J連結領域の下流のCK領域に特異的な3'プライマーとを用いて、コンセンサスプライマーセットは、VL領域の增幅のために設計される。第二の手法において、VLをコードするcDNAをクローン化するために、5'RACE RT - PCR法が用いられる。例示的なプライマーは、上述のSchenkに記載されている。クローン化された配列は、その後、ヒト（または他の非ヒト種）定常領域をコードする配列と組み合わせられる。ヒト定常領域をコードする例示的な配列には、配列番号38および66により示されるヒト IgG1定常領域をそれぞれコードする配列番号37および72、並びに、配列番号40および52により示されるヒト 軽鎖定常領域をそれぞれコードする配列番号39および71を含む。  
10

#### 【0190】

ある手法において、重鎖および軽鎖可変領域は、VDJまたはVJジャンクションそれぞれの下流にスプライスドナー配列をコードするように再設計され、また哺乳動物発現ベクター、例えば重鎖はpCMV-h1、軽鎖はpCMV-Mc1にクローン化される。これらのベクターは、挿入された可変領域カセットの下流に、エキソンフラグメントとしてヒト1およびCK定常領域をコードしている。配列検証に統いて、キメラ抗体を作成するために、重鎖および軽鎖発現ベクターをCHO細胞に同時導入することができる。遺伝子導入後48時間に、ならし培地を回収し、抗体作成のためにウエスタンプロット解析で評価するか、または抗原結合のためにELISAで評価する。キメラ抗体は、上述のようにヒト化されている。  
20

#### 【0191】

キメラ、ベニヤ、ヒト化、およびヒト抗体は、一般的に、組換え発現により作成される。組み換え核酸構築物は、一般的に、抗体鎖のコード配列に作動可能に連結された発現調節配列を含み、天然の発現調節エレメントまたは異種発現調節エレメント、例えばプロモーターを含む。発現調節配列は、真核または原核の宿主細胞に対して形質転換または遺伝子導入可能なベクターのプロモーターシステムであり得る。ベクターが、一度適切な宿主に組み込まれると、ヌクレオチド配列の高発現、並びに交差反応抗体の回収および精製に好適な条件下で、宿主は保持される。  
30

#### 【0192】

これらの発現ベクターは、一般的に、エピソームまたは宿主染色体DNAの不可欠な部分のいずれかとして、宿主生物において複製可能である。通常、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換した細胞の検出を可能にするために、選択マーカー、例えばアンビシリントリプシン耐性またはハイグロマイシン耐性を含有する。

#### 【0193】

大腸菌(E.coli)は、本明細書で開示されるポリペプチドをコードするDNA配列をクローン化するのに有用である。微生物、例えば酵母はまた、発現に有用である。サッカロマイセス(Saccharomyces)は、発現調節配列、複製起点、終結配列、および所望される配列を有する好適なベクターを持つ、酵母宿主である。典型的なプロモーターには、3'-ホスホグリセリン酸キナーゼおよび他の糖分解酵素が含まれる。酵母誘導性プロモーターには、特に、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソシトクロムC、マルトースおよびガラクトースの利用に関連する酵素由来のプロモーターが含まれる。  
40

#### 【0194】

哺乳動物細胞は、免疫グロブリンまたはそのフラグメントをコードするヌクレオチド区分を発現するための宿主細胞である。Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987)を参照されたい。完全な異種タンパク質を分泌することが可能な、多くの好適な宿主細胞株が開発されており、CHO細胞株、種々のCOS細胞株、HeLa細胞、L細胞、ヒト胎児由来腎臓細胞(HEK293細胞)、および骨髄腫細胞株が含まれる。細  
50

胞は、非ヒトであり得る。これらの細胞の発現ベクターには、発現調節配列、例えば複製起点、プロモーター、エンハンサー (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986))、および必要な処理情報部位、例えば、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列が含まれ得る。発現調節配列には、内在性遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルスなどに由来するプロモーターが含まれ得る。Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992) を参照されたい。

#### 【0195】

あるいは、抗体コード配列は、トランスジェニック動物のゲノムに導入され、続いてトランスジェニック動物の乳中で発現されるために、導入遺伝子に組み込まれ得る(例えば、U.S.Pat.No.5,741,957、U.S.Pat.No.5,304,489、U.S.Pat.No. 5,849,992を参照)。好適な導入遺伝子には、乳腺特異的遺伝子、例えばカゼインまたはラクトグロブリン由来のプロモーターおよびエンハンサーと作動可能に連結された軽鎖および/または重鎖のコード配列が含まれる。

#### 【0196】

目的のDNA区分を含有するベクターは、細胞宿主の型に応じた方法により、宿主細胞に導入することができる。例えば、カルシウムクロライド遺伝子導入は通常、原核細胞に対して利用され、一方、リン酸カルシウム処置、エレクトロポレーション、リポフェクション、遺伝子銃、またはウイルスをベースにした遺伝子導入は、他の細胞宿主に対して用いることができる。哺乳動物細胞を形質転換するために用いられる他の方法には、ポリブレンの使用、プロトプラスト融合、リボソーム、エレクトロポレーション、および微量注入法が含まれる。トランスジェニック動物の作成のために、導入遺伝子は受精した卵母細胞に微量注入することができ、または、胚性幹細胞のゲノムおよび除核した卵母細胞に導入された細胞の核に組み込むことができる。

#### 【0197】

抗体の重鎖および軽鎖をコードする誘導ベクターを細胞培養に導入した後、細胞プールを、無血清培地における生産性向上および製品品質についてスクリーニングすることができる。次いで、最高生産性の細胞プールをFACS系単一細胞クローニングに付して、モノクローナル株を產生することができる。7.5 g/L 培地を超える生産力値に相当する、細胞当たり1日当たり50 pgまたは100 pgを超える比生産性が、用いられ得る。単一細胞クローンによって作成される抗体は、濁度、ろ過特性、PAGE、IEF、UVスキャン、HPLC、糖-オリゴ糖マッピング、質量分析、および、ELISAまたはBiacoreなどの結合アッセイについて、試験することもできる。その後、選択されたクローンは、後の使用のために、多数のバイアルに入れて蓄え、冷凍貯蔵することができる。

#### 【0198】

一旦発現すると、抗体は、プロテインA捕捉、HPLC精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、標準的な手順に従って精製することができる(一般に、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982) を参照)。

#### 【0199】

抗体の商業的生産の方法には、コドン最適化、プロモーターの選択、転写要素の選択、ターミネーターの選択、無血清单一細胞クローニング、細胞バンキング、複製数増幅のための選択マーカーの使用、CHOターミネーター、またはタンパク力値の向上が含まれる(例えば、US 5,786,464、US 6,114,148、US 6,063,598、US 7,569,339、W02004/050884、W02008/012142、W02008/012142、W02005/019442、W02008/107388、およびW02009/027471、およびUS 5,888,809を参照)。

#### 【0200】

#### G. 抗体スクリーニングアッセイ

抗体は、結合アッセイ、機能性選別、-シヌクレイン沈着物に関連する疾患の動物モデルにおける選別、および臨床試験を含む、いくつかの選別を受けることができる。結合

10

20

30

40

50

アッセイでは、特異的結合を試験し、場合により - シヌクレイン（またはそのフラグメント、例えばアミノ酸残基 118 - 126）への親和性およびエピトープ特異性を試験する。これらの選別は、時々、5C1などの例示的抗体と競合させて行われる。場合により、抗体または - シヌクレイン標的は、これらのアッセイにおいて、固定化されている。機能性アッセイは、天然に - シヌクレインを発現する細胞、または - シヌクレイン若しくはそのフラグメントをコードするDNAで遺伝子導入された細胞を含む細胞モデルにおいて行うことができる。好適な細胞には、神経細胞が含まれる。 - シヌクレインレベルの減少（例えば、細胞抽出物または上清の、ウェスタンブロッティングまたは免疫沈降）、凝集 - シヌクレインレベルの減少（例えば、免疫組織化学法および / または共焦点法）、および / または - シヌクレインに起因し得る毒性の減少に関して、細胞を選別することができる。10

#### 【0201】

動物モデル選別は、 - シヌクレイン沈着物に関連するヒト疾患、例えばレビー小体病をシミュレートする動物モデルにおいて、徴候または症状を、治療的または予防的に処置する抗体の能力を試験する。モニターし得る好適な徴候または症状には、運動バランス、協調、および認知障害が含まれる。障害の程度は、適切なコントロール、例えばコントロール抗体（例えば、アイソトープ適合コントロール抗体）を受け取ったコントロール動物、プラセボ、または全く処置していない動物における、運動バランス、協調、または認知障害との比較により、決定され得る。レビー小体病のトランスジェニック動物または他の動物は、ヒト - シヌクレイン導入遺伝子を発現し得る。動物モデルにおける試験を促進するために、動物モデルに適切な定常領域を有する抗体が、使われ得る。対応するマウス抗体またはキメラ抗体が適切な動物モデルで有効であり、ヒト化抗体が同様の結合親和性（例えば、1.5倍、2倍、または3倍、実験誤差内）を有する場合に、抗体のヒト化バージョンは有効であろうと結論づけることができる。20

#### 【0202】

臨床試験は、 - シヌクレイン沈着物に関連する疾患を有するヒトにおいて、安全性および有効性を試験する。

#### 【0203】

H . 核酸  
本発明は、さらに、上述の重鎖および軽鎖のいずれかをコードする核酸を提供する。一般的に、これらの核酸は、成熟重鎖および成熟軽鎖に融合したシグナルペプチドもコードする。シグナルペプチドの好適な例には、配列番号6のアミノ酸残基1 - 19（配列番号5のヌクレオチド1 - 57によりコードされる）および配列番号8のアミノ酸残基1 - 19（配列番号7のヌクレオチド1 - 57にコードされる）が含まれる。核酸上のコード配列は、そのコード配列の発現を確実にするために、例えばプロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終結シグナルなどの、調節配列と作動可能に連結することができる。重鎖および軽鎖をコードする核酸は、単離型で存在することができ、または、1つ以上のベクターにクローニングすることができる。核酸は、例えば、固相合成または重複オリゴヌクレオチドのPCRによって、合成することができる。重鎖および軽鎖をコードする核酸は、例えば発現ベクター内で、1つの近接核酸として一緒にすることができる、または、別個にして、例えば、各々それ自体の発現ベクターにクローニングすることができる。3040

#### 【0204】

#### V . 血液脳関門シャトル

本明細書で開示される抗 - シヌクレイン抗体は、血液脳関門受容体に結合可能な一価の結合エンティティーに連結することができ、その結果血液脳関門シャトルを形成する。連結は、直接またはリンカーを介してあり得る。連結は、例えば、一方の鎖、通常抗 - シヌクレイン抗体の重鎖、任意のリンカー、および一価の結合エンティティーを含む近接融合タンパク質を形成するものであり、この重鎖が抗 - シヌクレイン抗体の軽鎖と複合体化しうる。化学的結合もまた、抗 - シヌクレイン抗体と一価の結合エンティティー50

との間に使用可能である。血液脳関門シャトルは、Bohrmann et al., WO 2014/033074に記載され、参照により、その全体が、あらゆる目的のために組み込まれる。

#### 【0205】

脳エフェクターエンティティーは、血液脳関門シャトルにより、血液脳関門を通過して脳に輸送される分子または化合物である。脳エフェクターエンティティーは、一般的に、脳に送達されることが望まれる特徴的な治療活性を有する。本明細書で開示される抗 - シヌクレイン抗体が血液脳関門シャトルの一部である場合、それらを脳エフェクターエンティティー抗体と呼ぶ。脳エフェクターエンティティー抗体は、単独で、または他の化合物と組み合わせて、脳エフェクターエンティティーを構成する。

#### 【0206】

血液脳関門シャトルにおいて、抗 - シヌクレイン抗体を一価の結合エンティティーに連結させることは、血液脳関門を通過する抗体の輸送を促進することができる。全身投与された血液脳関門シャトルの取り込みおよび血液脳関門シャトルの他の活性を評価するためのアッセイが、WO 2014/033074に開示されている。中枢神経系の実質 (parenchyma space) 内の濃度また、測定可能である。例えば、微小透析または毛細管単離法 (capillary depletion method) は、ELISA または標識した血液脳関門シャトルの放射能測定と組み合わせることができる。

10

#### 【0207】

##### A. 血液脳関門受容体

血液脳関門 (BBB) は、末梢循環と脳と脊髄の間の、生理学的障壁である。BBBは、脳毛細血管内皮原形質膜内の密着結合により形成されており、ウレア (60ダルトン) などの非常に小さい分子を含む分子の脳への輸送を制限する頑強な障壁を作っている。血液脳関門 (BBB) は、合わせて、脳内の BBB、脊髄内の血液 - 脊髄関門、および網膜内の血液 - 網膜関門のことを指し、これらは中枢神経系内の近接する毛細血管関門である。BBB はまた、毛細血管内皮細胞でなく上衣細胞から成る、血液 - CSF 関門 (脈絡叢) を包含する。

20

#### 【0208】

血液脳関門受容体 (R / BBB) は、BBB を通過して分子を輸送することができるか、あるいは外因的に投与された分子を輸送するのに用いることができる、脳内皮細胞に発現した細胞外膜連結受容体タンパク質である。血液脳関門受容体の例には、以下が含まれる：トランスフェリン受容体 (TfR) (例えば、UniProt アクセッション番号 P02786)、インスリン受容体 (例えば、UniProt アクセッション番号 P06213)、インスリン様成長因子受容体 (IGF-R) (例えば、UniProt アクセッション番号 P08069)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク 1 (LRP1) を含む低密度リポタンパク質受容体(例えば、UniProt アクセッション番号 Q07954)および低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 8 (LRP8) (例えば、UniProt アクセッション番号 Q14114)、およびヘパリン結合性上皮細胞成長因子様成長因子 (HB-EGF) (例えば、UniProt アクセッション番号 Q99075)。

30

#### 【0209】

トランスフェリン受容体は、分子量約 180,000 ダルトンの膜貫通型糖タンパク質であり、脊椎動物の鉄の取り込みに関与する 2 つのジスルフィド結合したサブユニット (それぞれ見かけ上約 90,000 ダルトンの分子量) から構成される。例えば、トランスフェリン受容体は、Schneider et al., Nature 311:675-678 (1984) に記載されるアミノ酸配列を含むヒト TfR であり得る。

40

#### 【0210】

##### B. 一価の結合エンティティー

一価の結合エンティティーは、特異的に、かつ一価の結合様式で、血液脳関門受容体に結合することができる分子 (すなわち、受容体に 1 : 1 で結合する分子) である。血液脳関門受容体抗原は、一価の結合エンティティーの、作成または選別のために、用いられ得る。これらの抗原は、例えば、所望のエピトープを含有する、血液脳関門受容体またはそ

50

の一部（例えば、細胞外ドメイン）の可溶性の形態であり得る。あるいは、細胞表面に血液脳関門受容体を発現する細胞が、一価の結合エンティティーを産生または選別するために、用いられ得る。

#### 【0211】

一価の結合エンティティーの血液脳関門受容体への結合を決定するために、様々な技術が利用可能である。これらのアッセイの1つは、組換え血液脳関門受容体でプレートをコーティングし、そのプレートを一価の結合エンティティーを含むサンプルを培養した後に、一価の結合エンティティーの血液脳関門受容体への結合を測定する、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）である。

#### 【0212】

一価の結合エンティティーは、血液脳関門受容体リガンドなどの、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドであり得る。一価の結合エンティティーは、Fab、Fab'、Fv、またはVHHフラグメントなどの抗体フラグメントであり得、または単鎖FabまたはscFvなどの単鎖抗体分子であり得る。単鎖Fab(scFab)フォーマットは、Hust et al., BMC Biotechnol. 7:14 (March 8, 2007)に記載されている。scFabには、リンカーを介してVLおよびCL領域を含む軽鎖と繋がる、重鎖のVHおよびCH1領域（すなわち、Fabフラグメントに含まれる重鎖の一部であって、Fdフラグメントとしても知られている）が含まれる。ある場合には、リンカーは、VH領域のN末端を、CL領域のC末端に連結させる（図10参照）。完全な抗体において、重鎖CH1領域と軽鎖定常領域の間にジスルフィドを形成する1つ以上のシステインが、取り除かれ得る。唯一のscFabを含む一価の結合エンティティーは、単一Fab(scFab)を有していると言われる。一価の結合エンティティーは、ファージディスプレイまたは免疫化などの技術を用いて設計された足場タンパク質であり得る。血液脳関門シャトルは、一価の結合エンティティーの単一ユニットの存在により特徴づけられ得る（すなわち、血液・脳シャトルには、一価の結合エンティティーのユニットが1つだけ含まれる）。

#### 【0213】

一価の結合エンティティーにはまた、CH2 - CH3 Igドメインおよび血液脳関門受容体を対象とするscFabが含まれ得る。scFabは、リンカーにより、CH2 - CH3 IgドメインのC末端に連結され得る。CH2 - CH3 Igエンティティーは、免疫グロブリンCH2またはCH3ドメイン由来のタンパク質エンティティーである。CH2 - CH3 Igエンティティーには、二量体を形成する2つのCH2 - CH3ポリペプチドが含まれ得る。免疫グロブリンは、IgG、IgA、IgD、IgEまたはIgMであり得る。CH2 - CH3 Igエンティティーには、天然のCH2 - CH3ドメイン配列および/または変異体のCH2 - CH3ドメイン配列が含まれ得る。CH2 - CH3 Igエンティティーは、IgG免疫グロブリンに由来し得、この場合、CH2 - CH3 IgGエンティティーと呼ばれる。例えば、CH2 - CH3 Igエンティティーは、重鎖のCys226またはPro230からカルボキシル末端に伸びる、ヒト重鎖CH2 - CH3 IgGドメインであり得る。Fc領域のC末端リシン(Lys447)は、存在することもしないこともできる。特記されない限り、CH2 - CH3ドメイン領域または定常領域のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に記載される、EUインデックスとも呼ばれるEUナンバリングシステムに従う。

#### 【0214】

いくつかの一価の結合エンティティーは、トランスフェリン受容体を対象とする。例えば、一価の結合エンティティーには、トランスフェリン受容体を対象とする1つのscFab（すなわち、scFab）が含まれ得る。ある場合には、scFabは、配列番号43、配列番号44、および/または配列番号45内のアミノ酸配列を含む、トランスフェリン受容体のエピトープを認識する。トランスフェリン受容体を対象とするいくつかの一価の結合エンティティーは、Boado et al., BiotechnologyおよびBioengineering 102:1251-1

10

20

30

40

50

258 (2009) およびWO 2014/033074に記載される、マウス 8 D 3 抗トランスフェリン抗体に由来する。例えば、一価の結合エンティティーには、実施例 7 のように（図 13 もまた参照）、8 D 3 抗体の s c F a b が含まれ得る。

#### 【 0 2 1 5 】

一価の結合様式とは、一価の結合エンティティーと血液脳関門受容体の間の相互作用が、単一エピトープを介して起こる、血液脳関門受容体への特異的結合のことを指す。一価の結合様式の単一エピトープ相互作用部位は、血液脳関門受容体のいずれの二量体化または多量体化も妨げ得る。一価の結合様式を測定する様々なアッセイが利用でき、スキヤツチャードアッセイおよび表面プラズモン共鳴技術（例えば、B i a c o r e を用いて）、およびWO 2014/033074に記載のインビボ研究が含まれる。エピトープマッピングおよびX線構造決定はまた、一価の結合エンティティーの、血液脳関門受容体に対する単一抗原結合活性を試験するために、用いられ得る。10

#### 【 0 2 1 6 】

脳エフェクターエンティティー抗体が重鎖を含む場合の、一価の結合様式を達成する方法の 1 つは、一価の結合エンティティーを 1 つの重鎖のみ（例えば、重鎖の F c 領域）に連結することである。これは、Ridgway et al., Protein Engineering 9(7): 617-621 (1996) およびCarter et al., Immunotechnology 2(1):73-73(1) (1996) に記載された、「ノブ・イントゥ・ホール」抗体設計戦略の使用を通じて、成し遂げられ得る。例えば、C H 3 鎮は、C H 3 ドメイン間の接点の小さなアミノ酸側鎖を、大きなアミノ酸側鎖に置換することによって「ノブ」を作成することで、また大きな側鎖を小さな側鎖に置換することによって「ホール」を作成することで、本方法によりヘテロ二量体を形成するために、改変することができる。20

#### 【 0 2 1 7 】

いくつかの血液脳関門シャトルにおいて、脳エフェクターエンティティー抗体の第一の重鎖には第一の二量体形成モジュールが含まれ、脳エフェクターエンティティー抗体の第二の重鎖には第二の二量体形成モジュールが含まれ、これにより、2 つの重鎖のヘテロ二量体形成が可能となる。例えば、第一の二量体形成モジュールには、「ノブ」が含まれ得、第二の二量体形成モジュールには、「ノブ・イントゥ・ホール」戦略に従いノブを受けるための「ホール」が含まれ得る。ノブまたは隆起は、抗体鎖の表面から突き出た少なくとも 1 つの側鎖を有する抗体鎖のアミノ酸と空間的に隣接したアミノ酸または小さなクラスターを指す、技術用語である。このようなノブは、好ましい接触をさせ、鎖間の相互作用を安定化させるために、別の抗体鎖との接点で、ホールまたは腔（cavity）、すなわち湾入（indentation）またはポケットに、突き出るか、または挿入してもよい；その時、ホールはノブを受けたと言われる。30

#### 【 0 2 1 8 】

「ノブ・イントゥ・ホール」戦略は、一価の結合エンティティーを第一の二量体形成モジュールに結合させ、第二の二量体形成モジュールに結合させないことにより、一価の結合を達成するために、このように、用いられ得る。例えば、第一の二量体形成モジュールは、次の要素を次の順番で含む、融合タンパク質であり得る：（1）5 C 1 H 4 の重鎖可変領域；（2）ヒト I g G 1 定常領域；（3）リンカー；（4）マウス 8 D 3 トランスフェリン抗体の軽鎖可変領域；（5）ヒト I g 軽鎖定常領域；（6）リンカー；（7）マウス 8 D 3 抗トランスフェリン抗体の重鎖可変領域；および（8）ヒト I g G 1 C H 1 重鎖ドメイン。第二の二量体形成モジュールは、次の要素を次の順番で含む、融合タンパク質であり得る：（1）5 C 1 H 4 の重鎖可変領域および（2）ヒト I g G 1 定常領域。実施例 7 および図 10 - 12 参照。第一および第二の二量体形成モジュールがヘテロ二量体化する場合、単一の一価の結合エンティティーのみが、存在するだろう。40

#### 【 0 2 1 9 】

#### C . 血液脳関門シャトルのエンティティーの結合

血液脳関門シャトルの異なるエンティティーの結合は、直接共有結合により達成され得る。例えば、このような結合は、本明細書で開示される抗 - シヌクレイン抗体と一価の50

結合エンティティーとを連結することが可能である。直接結合は、単一のタンパク質として発現されるように、一価の結合エンティティーと脳エフェクターエンティティーをコードする2つの遺伝子の遺伝的融合物を介して、タンパク質融合物を構築することによって達成され得る。直接結合はまた、一価の結合エンティティーの反応性の基と、脳エフェクターエンティティーの対応する基またはアクセプターとの間に共有結合を形成することによって、達成され得る。直接結合はまた、適切な条件下で結合するように他の分子への共有結合を形成する、反応性の基を含むように、結合している2つの分子の1つを修飾（例えば遺伝的に修飾）することにより、達成され得る。例えば、所望の反応性の基（例えばシステイン残基）を有する分子（例えば、アミノ酸）は、一価の結合エンティティーに組み込まれ得、その後、ジスルフィド結合が脳エフェクターエンティティー抗体と形成され得る。核酸をタンパク質へ共有結合させる方法もまた、知られている（すなわち、光架橋、例えば、Zatsepin et al., Russ. Chem. Rev. 74:77-95 (2005) 参照）。 10

#### 【0220】

共有結合はまた、様々なリンカーを用いて行われてもよい。これらのリンカーは、血液脳関門シャトルの様々なエンティティーに共有結合的に繋がり得る。いくつかのリンカーは、脳エフェクターエンティティーを一価の結合エンティティーに繋げる。一価の結合エンティティーは、リンカーにより脳エフェクターエンティティーのC末端に連結され得る。例えば、一価の結合エンティティーは、リンカーにより脳エフェクターエンティティー抗体の重鎖のFc領域のC末端に連結され得る。いくつかの場合、一価の結合エンティティーに繋がっている脳エフェクターエンティティー抗体の重鎖Fc領域は、全長Fc領域と比較して切り詰めることができる。 20

#### 【0221】

リンカーはまた、血液脳関門シャトルの他のエンティティーを繋げることができる。例えば、いくつかの血液脳関門シャトルにおいて、一価の結合エンティティーは、CH2 - CH3 Igエンティティーおよび血液脳関門受容体を対象とするsFabを含み得る。これらの血液脳関門シャトルにおいて、リンカーはsFabを、CH3 - CH2 IgエンティティーのC末端に繋げることができる。例えば、これらの血液脳関門シャトルは、脳エフェクターエンティティーをCH2 - CH3 IgエンティティーのN末端に繋げる第一のリンカーと、sFabをCH2 - CH3 IgドメインのC末端に繋げる第二のリンカーとを有し得る。第一のおよび第二のリンカーは、同じであり得るか、または異なり得る。 30

#### 【0222】

2つ以上のリンカーを有する血液脳関門シャトルの別の例において、一価の結合エンティティーはscFabを含み得る。いくつかのこれらの血液脳関門シャトルにおいて、脳エフェクターエンティティー抗体のIgG重鎖のFc領域は、そのC末端でscFabに連結されている。例えば、これらの血液脳関門シャトルは、次の成分を、次の順番でつながって、含むことができる：(1)脳エフェクターエンティティー抗体のIgG重鎖；(2)IgG重鎖のFc領域のC末端をscFabの可変軽鎖ドメインのN末端に結合させるリンカー；(3)scFabの可変軽鎖ドメインおよびC-軽鎖ドメイン；(4)scFabのC-軽鎖ドメインのC末端を、scFabの可変重鎖ドメインのN末端に結合させるリンカー；および(5)scFabの可変重鎖ドメインおよびIgG CH1重鎖ドメイン。第一および第二のリンカーは、同じであり得るか、または異なり得る。 40

#### 【0223】

リンカーは、単鎖ペプチドリンカーであり得る。いくつかのこれらのリンカーは、ペプチド結合で連結された1~20個のアミノ酸を含み得る。アミノ酸は、20個の、天然起源のアミノ酸から選択され得る。ある場合には、1つ以上のアミノ酸が、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミンおよびリシンから選択され得る。他のこれらのリンカーには、少なくとも20個のアミノ酸または少なくとも25個のアミノ酸が含まれ得る。例えば、リンカーは、32~50個のアミノ酸長を有し得る。いくつかのリンカーリーは、式(G<sub>x</sub>S)<sub>n</sub>G<sub>m</sub>を有し、G=グリシンおよびS=セリンである。いくつかのリ 50

ンカーにとって、 $x = 3$  ;  $n = 8$ 、9または10；および $m = 0$ 、1、2または3である。他のリンカーにとって、 $x = 4$  ;  $n = 6$ 、7または8；および $m = 0$ 、1、2または3である。さらに他のリンカーにとって、 $x = 4$  ;  $n = 6$ または7；および $m = 0$ 、1、2または3である。さらに他のリンカーにとって、 $x = 4$ 、 $n = 7$ 、および $m = 2$ である。3つの代表的なリンカーは、式  $(G_4S)_4$  (配列番号 42)、 $(G_4S)_6G_2$  (配列番号 41)、および  $G_3S(G_4S)_3$  (配列番号 73) を有する。

#### 【0224】

血液脳関門シャトルの異なるエンティティー（例えば、本明細書で開示される抗 - シヌクレイン抗体および一価の結合エンティティー）の連結はまた、様々な化学リンカーを用いた結合によってあり得る。例えば、一価の結合エンティティーおよび脳エフェクターエンティティーは、様々な二機能性のタンパク質カップリング剤、例えばN - サクシニミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP)、サクシニミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボン酸塩 (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二機能性の誘導体（例えばジメチルアジビミデート H C1）、活性エステル（例えばジサクシニミジルスペリン酸塩）、アルデヒド（例えばグルタルアルデヒド）、ビス - アジド化合物（例えばビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン）、ビス - ジアゾニウム誘導体（例えばビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えばトルエン 2, 6 - ジイソシアネート）、およびビス - 活性フッ素化合物（例えば 1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン）を用いて、結合され得る。リンカーは、切断可能なリンカーであることができ、脳エフェクターエンティティーの放出と脳への輸送を促進する。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、感光性のリンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカーが用いられ得る（例えば、Chari et al., Cancer Res. 52: 127-131 (1992); U.S.Patent No. 5,208,020 参照）。

#### 【0225】

血液脳関門シャトルの様々なエンティティーはまた、標識と連結され得る。これらの標識は、検出またはイメージングに用いられるマーカーであり得る。これらの標識の例には、放射標識、フルオロフォア、発色団、および親和性タグが含まれる。これらの標識は、医用画像のための放射標識（例えば、テクネチウム 99m (Tc 99m) またはヨウ素 - 123 (I 123)）、または核磁気共鳴 (NMR) 画像法または磁気共鳴画像法 (MR I) のためのスピノン標識、例えばヨウ素 - 123、ヨウ素 - 131、インジウム - 111、フッ素 - 19、炭素 - 13、窒素 - 15、酸素 - 17、ガドリニウム、マンガン、または鉄であり得る。

#### 【0226】

##### D. 核酸

本発明は、さらに、上述の血液脳関門シャトルのいずれかをコードする核酸を提供する。核酸上のコード配列は、そのコード配列の発現を確実にするために、例えばプロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終結シグナルなどの、調節配列と作動可能に連結することができる。核酸は、単離した形態で存在することができ、または1つ以上のベクターにクローン化することができる。例えば、配列番号 53、57、および 59 をコードする核酸は、1つ、2つ、3つまたはそれを超えるベクターにクローン化することができる。同様に、配列番号 55、58、および 59 をコードする核酸は、1つ、2つ、3つまたはそれを超えるベクターにクローン化することができる。核酸は、例えば、固相合成または重複オリゴヌクレオチドの PCR によって、合成することができる。脳エフェクターエンティティー抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸は、例えば発現ベクター内で、1つの近接した核酸として連結することができ、または、別個にして、例えば、各々それ自体の発現ベクターにクローン化することができる。脳エフェクターエンティティー抗体の2つの異なるバージョンの重鎖（例えば、第一の二量体形成モジュールおよび第二の二量体形成モジュール、または「ノブ・イントゥ・ホール」戦略に従った「ノブ」バージョンおよび「ホール」バージョン）をコードする核酸は、1つの発現ベクターにク

10

20

30

40

50

ローン化すること、または別々の発現ベクターにクローン化することができる。一価の結合エンティティーをコードする核酸は、1つの発現ベクターまたは複数の発現ベクターにクローン化することができる。脳エフェクターエンティティーの全てまたはいくつか、および一価の結合エンティティーの全てまたはいくつかをコードする核酸は、1つの発現ベクターまたは別々の発現ベクターに、クローン化することができる。

#### 【0227】

##### E . 血液脳関門シャトルの発現

血液脳関門シャトルは、組み換え発現によって產生することができる。組み換え核酸構造物は、一般的に、天然会合または異種発現調節エレメント、例えばプロモーターを含む、血液脳関門シャトルの成分のコード配列に作動可能に連結された発現調節配列を含む。  
発現調節配列は、真核または原核宿主細胞を形質転換または遺伝子導入することが可能なベクターにおけるプロモーター系であり得る。ベクターが適切な宿主に導入されると、宿主はヌクレオチド配列の高レベル発現、ならびに血液脳関門シャトルの回収および精製に適する条件下に保たれる。

10

#### 【0228】

これらの発現ベクターは、一般的に、エピソームまたは宿主染色体DNAの不可欠な部分として、宿主生物において複製可能である。通常、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にするために、選択マーカー、例えばアンピシリン耐性またはハイグロマイシン耐性を含有する。

#### 【0229】

20

血液脳関門シャトル核酸配列の発現に有用な好適な宿主細胞が、IV.Fの部分に記載されており、大腸菌(E.coli)、酵母などの微生物、哺乳動物細胞が含まれる。目的のDNA区分を含有するベクターは、IV.Fの部分に記載された方法を用いて宿主細胞に導入することができる。

#### 【0230】

30

血液脳関門シャトルの成分をコードするベクターを細胞培養に導入した後、細胞プールを、無血清培地における生産性向上および製品品質についてスクリーニングすることができる。次いで、最高生産性の細胞プールをFACS系単一細胞クローニングに付して、モノクローナル株を產生することができる。7.5g/L培地を超える生産力値に相当する、細胞当たり1日当たり50pgまたは100pgを超える比生産性が、用いられ得る。単一細胞クローニングによって產生される血液脳関門シャトルは、濁度、ろ過特性、PAGE、IEF、UVスキャン、HPLC、糖-オリゴ糖マッピング、質量分析、および、ELISAまたはBiacoreなどの結合アッセイについて、試験することもできる。その後、選択されたクローニングは、後の使用のために、多数のバイアルに入れて蓄え、冷凍貯蔵することができる。

#### 【0231】

一旦発現すると、血液脳関門シャトルは、プロテインA捕捉、HPLC精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、標準的な手順に従って精製することができる(一般に、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982) を参照)。

#### 【0232】

40

##### VII . 治療への適用

本発明は、レビー小体病(LBD)またはMSAなどのシヌクレイン病を患っている患者またはその危険性のある患者における、その疾患の治療または効果的な予防の方法を提供する。治療に適する患者には、シヌクレイン病の疾患の危険性があるが症状を示していない個体のほか、シヌクレイン病の症状、または、例えば、EEG低速化、精神神経兆候(抑鬱、痴呆、幻覚、不安、無関心、快感消失)、自律神経系の変化(起立性低血圧、膀胱障害、便秘、便失禁、流涎、嚥下困難、性機能不全、脳血流の変化)、感覚の変化(嗅覚、痛覚、色覚異常感覚)、睡眠障害(レム睡眠行動障害(RBD)、レストレスレッグス症候群/周期性四肢運動、睡眠過剰、不眠)、ならびに、さまざまな他の兆候および症状(疲労、複視、視朦朧、脂漏、体重減少/増加)などの、シヌクレイン病の初期の危険な

50

兆候を現在示している患者が含まれる。したがって、本方法は、LBDの遺伝的危険性のあることが判っている個体に、予防的に施すことができる。そのような個体には、この疾患の経験者の親類、および、遺伝的または生化学的マーカーの分析で危険性が決定された個体が含まれる。パーキンソン病に対する危険性の遺伝的マーカーには、-シヌクレイン遺伝子の変異、特に -シヌクレインの二重複もしくは三重複および -シヌクレインタンパク質の位置 30 および 53 における点変異、または、LRRK2、GBA、Parkin、UCHL1、および CYP2D6 遺伝子における変異が含まれる。現在パーキンソン病を患っている個体は、安静時振戦、筋硬直、運動緩慢および姿勢不安定を含むその臨床症状から、認定することが可能である。

## 【0233】

10

無症状の患者において、治療はどの年齢（例えば、10、20、または30歳）でも開始することができる。しかし、通常、患者が40、50、60または70歳に達するまで、治療を開始する必要はない。治療は、一般的に、ある期間にわたって複数の投与を必要とする。治療は、抗体、または、治療剤（例えば、アルファシヌクレインペプチドの切断型）に対する活性化T細胞もしくはB細胞の反応を長期にわたってアッセイすることによって、監視することが可能である。反応が低下する場合、ブースター投与が指示される。

## 【0234】

20

本発明は、患者に有益な治療反応（例えば、神経突起および/または軸索 -シヌクレイン凝集体の減少、神経突起ジストロフィーの減少、認知機能の改善、および/または認知低下の逆転、治療もしくは防止）を生じる条件下で、血液脳関門シャトル組成物を投与することによって、患者におけるレビー小体病またはMSAなどのシヌクレイン病を治療または有效地に予防する方法を提供する。いくつかの方法において、新皮質および/または基底核の神経網における神経突起ジストロフィーの面積は、対照と比較して、10%、20%、30%、40%以上、低減することが可能である。

## 【0235】

認識障害、認識機能の進行性の低下、脳形態の変化および脳血管機能の変化は、レビー小体病を患っているまたはレビー小体病の危険性のある患者において、通常見られる。本発明は、そのような患者における認知機能の低下を抑制する方法を提供する。

## 【0236】

30

本発明はまた、シナプス密度および/または樹状突起密度を保存または増加させる方法も提供する。シナプス密度または樹状突起密度の変化の指標は、シナプス形成のマーカー（シナプトフィジン）および/または樹状突起のマーカー（MAP2）によって測定することができる。いくつかの方法において、シナプス密度または樹状突起密度の変化の指標は、健康な対象におけるシナプス密度または樹状突起密度のレベルまで回復することができる。いくつかの方法において、患者のシナプス密度または樹状突起密度のレベルは、対照と比べて5%、10%、15%、20%、25%、30%以上、上昇し得る。

## 【0237】

## VII. 医薬組成物および処置の方法

予防用途においては、本明細書で開示される血液脳関門シャトルまたはその医薬組成物は、疾患に感染し易いまたは疾患の危険性のある患者に、その疾患の危険性を低減し、重症度を軽減し、または、少なくとも1つの徴候または症状の発現を遅らせるのに有効な投与計画（投与の用量、頻度および経路）で投与される。いくつかの予防用途において、投与計画は、-シヌクレインおよび切断フラグメントの脳内の蓄積を、抑制し、もしくは遅らせ、および/または、その有毒作用を抑制し、もしくは遅らせ、および/または、行動の欠陥の進行を妨げおよび/もしくは遅らせるのに有効である。治療用途において、血液脳関門シャトルは、レビー小体病またはMSAなどのシヌクレイン病の疑いのあるまたはシヌクレイン病を既に患っている患者に、その疾患の兆候もしくは症状の少なくとも1つを改善し、または、少なくともさらなる悪化を抑制するのに有効な投与計画（投与の用量、頻度および経路）で投与される。いくつかの治療用途において、投与計画は、毒性および/もしくは行動の欠陥に関連する -シヌクレインおよび切断フラグメントのレベル

40

50

を低減し、または、少なくともさらなる増加を抑制するのに有効である。

【0238】

投与計画は、処置を受けた個々の患者が、本明細書に記載の方法で処置されない同等の患者の対照集団における平均の転帰よりも、好ましい転帰を遂げる場合に、または、比較臨床試験（例えば、第I I相、第I I / I I I相、または第I I I相試験）において、対照患者に対して処置患者で、 $p < 0.05$ もしくは $0.01$ またはさらに $0.001$ のレベルで、より好ましい転帰が示される場合に、治療上または予防上、有効であると認められる。

【0239】

有効な用量は、使用される血液脳関門シャトルの種類、投与の方法、対象部位、シヌクレイン病の種類を含む患者の生理状態、患者がシヌクレイン病を含む神経変性疾患の特定の遺伝的リスク因子（例えば、A p o E、G B A、L R R K 2、M A P T、およびS N C Aに存在する遺伝的リスク因子など）の保有者であるかどうか、患者がヒトであるか動物であるか、投与される他の薬物、および処置が予防であるか治療であるか、を含む多くの因子に応じて変動する。

10

【0240】

血液脳関門シャトルの例示的な用量範囲は、患者の体重の、約 $0.001 \sim 15 \text{ mg} / \text{kg}$ であり、より一般的には $0.05 \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ または $0.1 \sim 3 \text{ mg} / \text{kg}$ または $0.15 \sim 2 \text{ mg} / \text{kg}$ または $0.15 \sim 1.5 \text{ mg} / \text{kg}$ である。血液脳関門シャトルは、そのような用量を、毎日、隔日、毎週、隔週、毎月、毎四半期、または、経験的分析によって定める他のあらゆるスケジュールに従って、投与することができる。例示的処置は、例えば少なくとも6ヶ月の、長期間にわたる複数の用量での投与を必要とする。追加の例示的処置計画は、2週に1回、1ヶ月に1回、または3～6ヶ月に1回の投与を必要とする。いくつかの場合、最初に高用量の投与が、その後一回以上の低用量の投与がされてもよい。投与計画には、様々な時点での1回のまたは複数回の投与、急速投与、およびパルス注入が含まれ得る。

20

【0241】

血液脳関門シャトルは、末梢経路で（すなわち、投与された血液脳関門シャトルが、血液脳関門を通過して脳内の意図する部位に達する経路で）、投与することが可能である。投与経路には、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、鼻腔内、病巣内、肺内または筋肉内が含まれる。血液脳関門シャトルについてのいくつかの投与経路は、静脈内および皮下である。この種の注射は、腕または脚の筋肉になされるのがもっとも一般的である。いくつかの方法において、血液脳関門シャトルは、沈着物が蓄積している特定の組織に直接注射され、例えば頭蓋内注射である。

30

【0242】

非経口投与のための医薬組成物は、無菌で実質的に等張であり、すなわち約 $250 \sim 350 \text{ mOsm} / \text{kg H}_2\text{O}$ の浸透圧を意味し、G M P条件下で製造することができる。医薬組成物は、単位用量形態（つまり、単回投与のための用量）で提供することができる。医薬組成物は、1つ以上の生理的におよび医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤または助剤を用いて製剤化することが可能である（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) 参照）。これらの担体、希釈剤、賦形剤、および助剤は、使用される用量および濃度において、レシピエントに対し無毒性であり得る。製剤は選択される投与経路に依存する。注射については、血液脳関門シャトルは水溶液で、例えばハンクス液、リンゲル液、生理食塩水、または酢酸緩衝液などの生理的に許容される緩衝液中で（注射部位の不快感低減のため）、製剤化することができる。溶液は、懸濁剤、安定剤および/または分散剤などの製剤化剤を含有することができる。これに代えて、血液脳関門シャトルは、抗体は、滅菌した発熱性物質非含有水などの好適な媒体で使用前に調製するために、凍結乾燥の形態とすることもできる。徐放性製剤もまた、調製することができる（例えば、WO 2014/033074参照）。活性成分をマイクロカプセルに封入することもまた、可能である（例えば、WO 2014/033074参照）。

40

50

**【 0 2 4 3 】**

本投与計画は、処置する疾患の治療または予防において有効な他の薬剤と組み合わせて、施すことが可能である。これらの他の薬剤は、本投与計画に悪影響を与えないように、相補的な活性を有することができる。例えば、パーキンソン病の場合、 - シヌクレインに対する免疫療養剤WO/2008/103472、レボドパ、ドーパミン作動剤、COMT阻害剤、M A O - B 阻害剤、アマンタジン、または、抗コリン作動剤を、本投与計画と組み合わせて使用することができる。このような併用療法には、併用投与（2つ以上の治療剤が同一のまたは別々の製剤に含まれている）および単独投与（すなわち、血液脳関門シャトルの投与が、追加の治療剤および／またはアジュバントの投与の前に、同時に、および／または後に行われ得る）が含まれる。血液脳関門シャトルはまた、放射線療法などの介入治療、行動療法、または疾患を治療または予防するために適切な他の治療と組み合わせて、用いることができる。10

**【 0 2 4 4 】****V I I I . 他の適用**

上述の血液脳関門シャトルは、臨床診断もしくは治療に関連して、または研究において、 - シヌクレインを検出可能なエンティティーを脳へ運ぶために、使用することができる。血液脳関門シャトルはまた、 - シヌクレインを持つ細胞、および、様々な刺激に対するそれらの応答の検出における実験室研究用の研究試薬として、使用することができる。そのような使用では、脳エフェクターエンティティー抗体は、蛍光分子、スピナラベル分子、酵素またはラジオアイソトープで標識することが可能であり、血液脳関門シャトルは、 - シヌクレインのアッセイを行うために必要なすべての試薬を備えるキットの形態で、提供することができる。20

**【 0 2 4 5 】**

血液脳関門シャトルは、患者において、LBなどの - シヌクレイン凝集体を検出可能なエンティティーを脳へ運ぶために、使用することができる。そのような方法は、パーキンソン病、脳における - シヌクレイン凝集体の存在に関連する他の疾患、またはそれに対する罹患しやすさを診断し、または診断を確認するのに、有用である。例えば、前記方法は、認知症の症状を呈している患者に使用することが可能である。患者がLBを有している場合、その患者は、おそらく、パーキンソン病などのレビー小体病を患っている。前期方法はまた、無症状の患者に使用することもできる。レビー小体または - シヌクレインの他の異常沈着物の存在は、症状性疾患に対する将来の罹患し易さを示す。前記方法はまた、レビー小体病などのシヌクレイン病であると診断されたことのある患者における、疾患の進行および／または治療に対する応答を監視するために有用である。30

**【 0 2 4 6 】**

前記方法は、本明細書で開示される抗 - シヌクレイン抗体を含む血液脳関門シャトルを投与し、次いで抗体が結合した後に抗体を検出することによって、実施することができる。望まれる場合、消失応答は、Fabなどの、完全長定常領域を欠く抗体フラグメントを使用することによって、避けることが可能である。いくつかの方法において、同じ抗体が、治療薬および診断試薬の双方として機能する。

**【 0 2 4 7 】**

診断（例えば、インビボ造影）のためには、血液脳関門シャトルは、静脈注射によって患者の身体に、または、脳内投与によって、もしくは、頭蓋骨を貫通する孔を開けることによって、直接脳に投与することができる。試薬の用量は、治療法と同じ範囲内とすべきである。一般的に、脳エフェクターエンティティー抗体は標識されるが、いくつかの方法においては、抗体は標識されず、抗体に結合する二次標識剤が使用される。標識の選択は、検出の手段に依存する。例えば、光学的検出には蛍光標識が適している。外科的介入なしでの断層検出には常磁性標識の使用が適する。PETまたはSPECTを使用して放射性標識を検出することも可能である。40

**【 0 2 4 8 】**

診断は、標識された場所の数、大きさおよび／または強度を、それぞれの基準値と比較

50

することによって行われる。基準値は、罹患していない個体の集団における平均のレベルを代表し得る。基準値は、同じ患者において決定した先のレベルを代表することもできる。例えば、基準値は、治療前の患者において決定することができ、その後の測定値はその基準値と比較することができる。基準に対する値の低下は、治療に対する陽性の応答を示唆する。

#### 【0249】

抗 - シヌクレイン抗体を含む血液脳関門シャトルは、抗イディオタイプ抗体を生成するためには使用することが可能である（例えば、Greenspan & Bona, FASEB J. 7(5) :437-444 (1989) および Nissinoff, J. Immunol. 147:2429-2438 (1991) 参照）。このような抗イディオタイプ抗体は、その抗体で処置された個体における臨床ヒト抗ヒト抗体（H A H A）応答の研究のほか、薬物動態研究、薬力学研究、生体内分布研究に利用することができる。例えば、抗イディオタイプ抗体は、脳エフェクターエンティティー 5 C 1 抗体の可変領域に特異的に結合し、したがって、薬物動態研究において脳エフェクターエンティティー 5 C 1 抗体を検出するのに使用することができ、処置を受けた個体におけるヒト抗ヒト抗体（H A H A）応答を定量化するのに役立つ。10

#### 【0250】

##### I X . キット

本明細書で開示される血液脳関門シャトルを含むキットと使用説明書もまた、提供される。これらのキットは、例えば、上述の診断方法を実施するために用いることができる。キットにはまた、標識が含まれ得る。キットはまた、一般的に、キットを使用するための指示を提供するラベリング（Labeling）を含有する。ラベリングにはまた、測定した標識のレベルと、 - シヌクレインに対する抗体のレベルとを相關させる図表または他の対応する投与計画が含まれてよい。ラベリングは一般的に、製造、輸送、販売または使用のいずれの時点のキットにも添付している、あるいは他の方法で付随している、記載された、または記録されたいずれの物質をも指す。例えば、ラベリングという用語は、広告用リーフレットおよびパンフレット、梱包材、使用説明書、オーディオカセットまたはビデオカセット、コンピューターディスク、ならびにキットに直接刻み込まれた文書を包含する。20

#### 【0251】

インビオ造影を実施するための診断キットもまた、提供される。これらのキットは、一般的に、本明細書に記載の - シヌクレインのエピトープと結合する抗体を含む血液脳関門シャトルを含有する。抗体は、標識することができ、二次標識剤がキットに含まれる。キットは、インビオ造影アッセイを実施するための説明書を含むことができる。30

#### 【0252】

##### X . 製品

レビー小体病（例えば、パーキンソン病）または M S A などのシヌクレイン病を治療および / または予防するために有用な物質を含有する製品もまた、提供される。製品には、容器、および容器に掲載されている、または結びついているラベルまたはパッケージが含まれ得る。これらの容器の例には、ボトル、バイアル、シリング、および静脈注射用溶液バッグが含まれる。これらの容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な物質から形成されてよい。容器は、当該疾患を治療、予防、および / または診断するために、単独で、または他の組成物と組み合わせて、組成物を保持する。組成物中の少なくとも 1 つの活性薬剤は、本明細書で開示される血液脳関門シャトルである。ラベルまたは添付文書は、組成物が当該疾患を治療するために用いられるることを示している。いくつかの製品には、血液脳関門シャトルを含む組成物を含有する第一の容器と、さらなる細胞傷害性薬物または治療剤を含む組成物を含有する第二の容器とが含まれてもよい。製品にはまた、組成物を、当該疾患を治療するために用いることができることを示す添付文書が、含まれ得る。製品にはまた、対象の当該疾患を治療するための指示が記載された添付文書が含まれ得る。これらの添付文書では、血液脳関門シャトルが血液脳関門を横切った取り込みを改善していることが、示されてもよい。製品はまた、薬学的に許容される緩衝液を含有する 1 つ以上の他の容器を含むことができる。含まれ得る他の物質は、商業的観点および使用者の觀40

点から望まれる物質、例えば他の緩衝液、希釈剤、フィルター、ニードル、およびシリングである。

#### 【0253】

上記または下記で引用するすべての特許出願、ウェブサイト、他の出版物、アクセッション番号などは、個々の各項目が、あらゆる目的のために参照によって全体が取り込まれると、具体的かつ個別に示されているのと同様に、あらゆる目的のために参照によって全体が取り込まれる。配列の異なるバージョンが異なる時点でアクセッション番号に関連付けられている場合、本出願の有効出願日のアクセッション番号に関連付けられたバージョンを意味する。有効出願日は、実際の出願日、または、該当する場合、アクセッション番号に言及する優先出願の出願日の、早い方を意味する。同様に、出版、ウェブサイトなどの異なるバージョンが異なる時点で公開されている場合、そうでないと示されない限り、本出願の有効出願日における最新公開のバージョンを意味する。本発明の、あらゆる特徴、ステップ、要素、態様、または局面は、具体的にそうでないと示されない限り、他のいずれとも組み合わせて使用することが可能である。本発明を、明瞭化および理解のために、図面および例を用いてある程度詳しく説明したが、添付の特許請求の範囲内で、ある程度の変更および修正を実施してもよいことが明らかであろう。10

#### 【実施例】

#### 【0254】

##### 実施例1：マウス5C1の単離

マウス5C1抗体は、ヒツジ抗マウス抗体に連結されたペプチド免疫原V D P D N E A Y E G G C（配列番号4）を含むペプチド複合体を注射したマウスで産生された。C末端G G Cペプチドに融合した-シヌクレインの残基118-126を含むこのペプチドは、C末端システイン残基に結合するマレイミドリンカーを介して、ヒツジ抗マウス抗体に連結されていた。20

#### 【0255】

##### 実施例2：-シヌクレイン抗体による受動免疫

レビー小体病の動物モデルにおける-シヌクレイン抗体の影響を試験する目的で、様々な-シヌクレイン抗体を用いてマウスを受動免疫した。3-4月齢の野生型、-シヌクレインノックアウト、および-シヌクレイントランスジェニック（61系統）の雌マウスを用いた（n=14/グループ）。試験した抗体には、以下が含まれた：30

9E4（IgG1、エピトープ：-シヌクレインのアミノ酸118-126）；

5C1（IgG1、免疫原：-シヌクレインのアミノ酸118-126、シス-リンク）；

5D12（IgG2、免疫原：-シヌクレインのアミノ酸118-126、n-リンク）；

1H7（IgG1、エピトープ：-シヌクレインのアミノ酸91-99）；および  
27-1（IgG1コントロール抗体）。

#### 【0256】

マウスは、5カ月に渡って、10mg/kgの抗体の投与を受け、合計21回の注射を受けた。さらに、ヒト-シヌクレイン（wt）を発現するレンチウイルス（LV）を、海馬へのヒト-シヌクレイン（wt）の片側導入によって、動物に注射した。40

#### 【0257】

検出抗体（readout antibody）には、Chemiconからの-シヌクレイン抗体（エピトープ、完全長-シヌクレイン）、Milliporeからの-シヌクレイン抗体（エピトープ、完全長-シヌクレイン）、およびELADW105（エピトープ：-シヌクレインのアミノ酸121-124、ある場合には、残基122-124で切断された-シヌクレイン）が含まれる。

#### 【0258】

終点：抗体力値を、実験終了前に監視した。行動は、モリス水迷路試験（MWM）および水平ラウンドビームテストを用いて評価した。ラウンドビームテストは、異なる直径の50

2つのビームを用いて、運動バランス、協調、および歩調を評価する。ビームA（練習ビーム）がより大径であり、それゆえ横切るのがより容易である。ビームD（試験ビーム）がより小径であり、それゆえ横切るのがより困難である。水迷路能力は、第10週および実験終了前に実施した。実験終了時に、マウスを屠殺し、-シヌクレイン凝集、シナプトフィジン、およびMAP2の神経病理学測定値を得た。さらに、-シヌクレイン、PSD95、およびシナプトフィジンの生化学測定値を得た。シナプスマーカー、ニューロンマーカーおよびグリアマーカーを用いて、選択多重標識および共焦点標識を行った。

#### 【0259】

結果：結果は、5D12以外のすべての抗体が、-シヌクレイン蓄積を有意に低下させ、MWM能力における陽性の成果に加えて、シナプスおよび樹状突起密度を保存することを示した。9E4抗体は、行動試験のみならず、インピトロおよびインピボの研究において有効であった。特に、本結果は、-シヌクレイン抗体が神経突起／軸索の-シヌクレイン凝集体を低減しうることを示唆している。

#### 【0260】

行動結果：5C1および9E4抗体は-シヌクレイントランスジェニックマウスにおいて、より少ない程度であるが1H7のように水迷路能力を改善した。図3を参照されたい。対照的に、5D12抗体は、-シヌクレイントランスジェニックマウスの水迷路能力を改善しなかった。水平ラウンドビームテストに関して、9E4抗体および1H7抗体は、速さおよびエラー数の両方で測定した能力を改善したが、5D12抗体および5C1抗体は改善しなかった。図4を参照されたい。図4のデータは、10cm当たりのスリップ数として（すなわち「エラー」）、および移動した距離を、その距離を移動した時間で割った割合（すなわち、10cm/secの単位で測定した「速度」）として、表している。

#### 【0261】

神経病理学結果：5C1抗体、9E4抗体および1H7抗体が、ELADW-105陽性神経突起ジストロフィーを低減したのに対し、5D12抗体は低減しなかった。-シヌクレイントランスジェニックマウスにおいて、9E4抗体は、コントロールマウス（すなわち、27-1 IgG1コントロール抗体を受けたマウス）と比較して、神経網の面積を、新皮質で43%、基底核で40%減少させた。9E4抗体はまた、新皮質および基底核において、シナプトフィジンおよびMAP2の染色を保存した。

#### 【0262】

##### 実施例3：5C1の可変ドメインの配列決定

mRNAを、QIAGEN（登録商標）OLIGOTEX（登録商標）mRNA kitを用いて、5C1ハイブリドーマ細胞ペレットから抽出して精製した。精製したmRNAを、次いで、オリゴチミジンアンチセンスプライマーおよびINVITROGEN（登録商標）SUPERSCRIPT（登録商標）IIキットを用いて、cDNAに転写した。5C1重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸配列を、PCRにより、縮重VHおよびVLセンスプライマーおよび遺伝子特異的（CH/CL）アンチセンスプライマーを用いて、cDNAから増幅した。シグナルペプチド、可変ドメイン、および定常ドメインの配列を（アンチセンスプライマーまで）含むように設計されたPCR産物を、ゲル精製し、プラント（blunt）ベクターまたはTAベクターにクローン化し、その後配列決定した。配列は、メチオニンで始まり、可変領域から定常領域に伸びる翻訳領域を有する、少なくとも3つの独立したクローンの解析から推定した。

#### 【0263】

5C1重鎖可変領域をコードする核酸は、配列番号5の配列を有する。位置1-19にシグナルペプチドを含む、対応するタンパク質配列（図1）は、配列番号6の配列を有する。

#### 【0264】

5C1軽鎖可変領域をコードする核酸は、配列番号7の配列を有する。位置1-19にシグナルペプチドを含む、対応するタンパク質配列（図2）は、配列番号8の配列を有す

10

20

30

40

50

る。

#### 【0265】

成熟重鎖可変領域（配列番号9）のアミノ酸配列は、表1（下記）に示しており、成熟軽鎖可変領域（配列番号24）の対応するアミノ酸配列は、表2（下記）に示している。Kabatナンバリングを、全体を通して使用している。

#### 【0266】

実施例4：マウス5C1のヒト化

5C1Vh領域のCDRの解析により、5残基のCDR-H1（配列番号10）、7残基のCDR-H2（配列番号11）、および6残基のCDR-H3（配列番号12）を明らかにしている。5C1Vk領域のCDRの同様の解析により、16残基のCDR-L1（配列番号25）、7残基のCDR-L2（配列番号26）、および9残基のCDR-L3（配列番号27）を明らかにしている。  
10

#### 【0267】

5C1VkおよびVH領域の間の接点残基の解析により、残基のほとんどが、通常見られる残基であることを、明らかにしている。

#### 【0268】

NCBの非重複タンパク質配列データベースの調査により、5C1マウスCDRを移植する好適なヒトフレームワークの選択が可能となった。V<sub>k</sub>については、NCBIアクセションコードCAB51293.1（GI:5578786；配列番号28）のヒト軽鎖が選ばれた。V<sub>h</sub>については、ヒトIg重鎖AAY42876.1（GI:66096557；配列番号13）が選ばれた。  
20

#### 【0269】

選択されたヒトフレームワークに基づく逆突然変異を伴う、例示的なヒト化V<sub>h</sub>およびヒト化V<sub>k</sub>のデザインを表1および表2にそれぞれ示している。

#### 【0270】

例示的なヒト化V<sub>h</sub>デザイン

5C1Vh領域の5つの異なるヒト化バージョンを、H1、H2、H3、H4、およびH5と設計した。逆突然変異の選択において、残基H11、H27、H30、H48、H67、H69、H73、H91、およびH94に最終的に注目した。これら残基がコチア定義に従いCDR-H1の一部を形成したために（H27およびH30）、または、ヒトフレームワーク配列の対応する残基が低頻度残基であるために（位置H11のV、位置H48のM、および位置H73のE）、各ヒト化V<sub>h</sub>領域デザインにおいて、残基H11、H27、H30、H48、およびH73は、それぞれL、Y、T、I、およびKに逆突然変異させた。バージョンH1（配列番号14）については、さらなる残基H67およびH69を、CDRパッキングを保つために、（それぞれAおよびLに）逆突然変異させた。バージョンH2（配列番号15）においては、さらなる逆突然変異は導入されなかった（すなわち、バージョンH1の位置H67およびH69の逆突然変異は除かれた）。バージョンH3（配列番号16）において、さらなる残基H67、H69、H91、およびH94を、（それぞれA、L、F、およびSに）逆突然変異させた。H67、H69、およびH94の逆突然変異はCDRパッキングを保つためであったが、H91、V<sub>h</sub>/V<sub>k</sub>の接点残基は、その接点への影響を調べるために、逆突然変異させた。バージョンH4（配列番号17）において、さらなる残基H67、H69、およびH94を、（それぞれA、L、およびSに）逆突然変異させた。このように、バージョンH4は、H91の逆突然変異が除かれている点で、H3と異なる。バージョン5（配列番号18）において、さらなる残基H94を、CDRパッキングを保つために、（Sに）逆突然変異させた。  
30  
40

【表 1 - 1】

表 1  
ヒト化 5 C 1 V H 領域

K a b a t #	L i n e a r #	F R または C D R	マウス 5 C 1 (配列番号 9)	H u V H 受容体 F R (配列番号 1 3) Acc#AAY42876.1	5 C 1 H 1 (配列番号 1 4)	5 C 1 H 2 (配列番号 1 5)	5 C 1 H 3 (配列番号 1 6)	5 C 1 H 4 (配列番号 1 7)	5 C 1 H 5 (配列番号 1 8)
1	1	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	A	K	K	K	K	K	K

【表 1 - 2】

図 1  
ヒト化 5 C 1 VH 領域

Kabat #	Linear #	FRまたはCDR	マウス 5 C 1 (配列番号 9)	H u VH 受容体 FR (配列番号 13) Acc#AY42876.1	5 C 1 H 1 (配列番号 14)	5 C 1 H 2 (配列番号 15)	5 C 1 H 3 (配列番号 16)	5 C 1 H 4 (配列番号 17)	5 C 1 H 5 (配列番号 18)
13	13	Frl	K	K	K	K	K	K	K
14	14	Frl	P	P	P	P	P	P	P
15	15	Frl	G	G	G	G	G	G	G
16	16	Frl	T	S	S	S	S	S	S
17	17	Frl	S	S	S	S	S	S	S
18	18	Frl	V	V	V	V	V	V	V
19	19	Frl	Q	K	K	K	K	K	K
20	20	Frl	M	V	V	V	V	V	V
21	21	Frl	S	S	S	S	S	S	S
22	22	Frl	C	C	C	C	C	C	C
23	23	Frl	K	K	K	K	K	K	K
24	24	Frl	A	A	A	A	A	A	A
25	25	Frl	S	S	S	S	S	S	S
26	26	Frl	G	G	G	G	G	G	G
27	27	Frl	Y	G	Y	Y	Y	Y	Y
28	28	Frl	T	T	T	T	T	T	T
29	29	Frl	F	F	F	F	F	F	F
30	30	Frl	T	N	T	T	T	T	T
31	31	CDR-H1	N	N	N	N	N	N	N
32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	W	A	W	W	W	W	W
34	34	CDR-H1	M	I	M	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	N	N	N	N	N	N	N
35A		CDR-H1	-	-	-	-	-	-	-
35B		CDR-H1	-	-	-	-	-	-	-

10

20

30

40

【表 1 - 3】

図 1  
ヒト化 5C1 VH領域

Kabat #	Linear #	FRまたはCDR マウス 5C1 (配列番号 9)	H u V H受容体 FR (配列番号 1.3) Acc#AY42876.1	5 C 1 H 1 (配列番号 1.4)	5 C 1 H 2 (配列番号 1.5)	5 C 1 H 3 (配列番号 1.6)	5 C 1 H 4 (配列番号 1.7)	5 C 1 H 5 (配列番号 1.8)
36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	I	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	R	R	R	R
39	39	Fr2	A	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	G	G	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	I	I	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	A	G	A	A	A	A
51	51	CDR-H2	T	I	T	T	T	T
52	52	CDR-H2	N	I	N	N	N	N
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-	-
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-	-
53	54	CDR-H2	N	I	N	N	N	N
54	55	CDR-H2	N	F	N	N	N	N
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G	G

10

20

30

【表 1 - 4】

特 1  
C 1 VH 電域  
下代 5 C 1

Kabat #	Linear #	FRまたはCDR	マウス5C1 (配列番号9)	H u V H 受容体FR (配列番号13) Access#AY42876.1	5 C 1 H 1 (配列番号14)	5 C 1 H 2 (配列番号15)	5 C 1 H 3 (配列番号16)	5 C 1 H 4 (配列番号17)	5 C 1 H 5 (配列番号18)
56	57	CDR-H2	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	D	T	D	D	D	D	D
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	N	A	N	N	N	N	N
61	62	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
62	63	CDR-H2	R	K	R	R	R	R	R
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	K	Q	K	K	K	K	K
65	66	CDR-H2	D	G	D	D	D	D	D
66	67	Fr3	K	R	R	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	A	V	A	A	V
68	69	Fr3	I	T	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	L	I	L	I	L	L	I
70	71	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	K	E	K	K	K	K	K
74	75	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	T	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	N	N	N	N	N	N
77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A	A	A

10

20

30

40

【表 1 - 5】

讲 1  
ヒト化 5 C 1 VH 領域

Kabat #	Linear #	FRまたはCDR	マウス 5 C 1 (配列番号 9)	H u VH受容体 FR (配列番号 1 3) Acc#AY42876.1	5 C 1 H 1 (配列番号 1 4)	5 C 1 H 2 (配列番号 1 5)	5 C 1 H 3 (配列番号 1 6)	5 C 1 H 4 (配列番号 1 7)	5 C 1 H 5 (配列番号 1 8)
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	M	M	M	M	M	M	M
81	82	Fr3	H	E	E	E	E	E	E
82	83	Fr3	L	L	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	R	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	S	T	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	F	Y	Y	Y	F	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
94	98	Fr3	S	R	R	R	S	S	S
95	99	CDR-H3	G	E	G	G	G	G	G
96	100	CDR-H3	G	G	G	G	G	G	G
97	101	CDR-H3	H	N	H	H	H	H	H
98		CDR-H3	-	L	-	-	-	-	-
99		CDR-H3	-	N	-	-	-	-	-
100		CDR-H3	-	W	-	-	-	-	-

10

20

30

【表 1 - 6】

C1 H1 C2 H2 C3 H3 C4 H4 C5 H5 C6 H6 C7 H7 C8 H8 C9 H9												
Kabat #	Linear #	FRまたはCDR	マウス5C1 (配列番号9)	Hu VH受容体FR (配列番号13) Acc#AY42876.1	L	L	L	L	L	L	L	L
100A	102	CDR-H3	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100B		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100C		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100D		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100E		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100F		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100G		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100H		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100I		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100J		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100K		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	103	CDR-H3	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A
102	104	CDR-H3	Y	P	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

10

20

30

【表 1 - 7】

表 1  
ヒト化 5 C 1 VH 領域

Kabat #	Linear #	FRまたはCDR	マウス 5 C 1 (配列番号 9)	Hu VH 受容体 FR (配列番号 13) Accession#AY42876.1	5 C 1 H 1 (配列番号 14)	5 C 1 H 2 (配列番号 15)	5 C 1 H 3 (配列番号 16)	5 C 1 H 4 (配列番号 17)	5 C 1 H 5 (配列番号 18)
103	105	Fr4	W	W	W	W	W	W	W
104	106	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
105	107	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	108	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
107	109	Fr4	T	T	T	T	T	T	T
108	110	Fr4	V	L	L	L	L	L	L
109	111	Fr4	V	V	V	V	V	V	V
110	112	Fr4	T	T	T	T	T	T	T
111	113	Fr4	V	V	V	V	V	V	V
112	114	Fr4	S	S	S	S	S	S	S
113	115	Fr4	A	S	S	S	S	S	S

## 【0271】

ヒト化 5 C 1 H 1、H 2、H 3、H 4、および H 5 をコードする例示的な核酸配列は、配列番号 19、20、21、22、および 23 において、それぞれ提供される。

## 【0272】

## 例示的なヒト化 V k デザイン

5 C 1 V k 領域の 4 つの異なるヒト化バージョンを、L 1、L 2、L 3、および L 4 と設計した。逆突然変異の選択において、残基 L 2、L 12、L 14、L 45、L 49、および L 87 に最終的に注目した。ヒトフレームワーク配列の対応する残基が低頻度残基であるために（それぞれ P および T）、各ヒト化 V k 領域デザインにおいて、残基 L 12 および L 14 を S に逆突然変異させた。バージョン L 1（配列番号 29）について、さらなる残基 L 2、L 45、L 49 および L 87 を、（それぞれ V、K、N、および F に）逆突然変異させた。L 2 は、カノニカル / C D R 相互作用残基である；L 45 はマウスからヒトフレームワーク配列への極性 / 電荷スイッチを起こし（K から Q へ）、従ってフォールディングに影響を与える；L 49 はバーニヤ残基である；L 87 はV h / V k 接点残基である。バージョン L 2（配列番号 30）において、さらなる残基 L 45 を K に逆突然変異させた。従って、L 1 と比べて、残基 L 2、L 49 および L 87 の逆突然変異は除かれた。バージョン L 3（配列番号 31）において、さらなる残基 L 2、L 49、および L 87 を（それぞれ V、N、および F に）逆突然変異させた。従って、L 1 と比べて、残基 L 45 の逆突然変異は除かれた。バージョン L 4（配列番号 32）において、さらなる残基は突然変異させなかった（すなわち、残基 L 12 および L 14 のみ突然変異させた）。

10

20

30

40

【表 2 - 1】

表2  
ヒト化5C1Vk領域

K a b a t #	L i n e a r #	F RまたはCDR	マウス5C1VL (配列番号24)	H u V k受容体Fr (配列番号28) Acc# CAB51293.1	5 C 1 L 1 (配列番号29)	5 C 1 L 2 (配列番号30)	5 C 1 L 3 (配列番号31)	5 C 1 L 4 (配列番号32)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	V	I	V	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	I	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	Y	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	P	S	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	T	S	S	S	S
15	15	Fr1	P	P	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	D	E	E	E	E	E
18	18	Fr1	Q	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q	Q

10

20

30

【表 2 - 2】

讲 2  
ヒト化 5 C 1 V k 領域

Kabat #	Linear #	FRまたはCDR	マウス 5 C 1 VL (配列番号 24)	Hu V k 受容体 Fr (配列番号 28) Acc# CAB51293.1	5 C 1 L 1 (配列番号 29)	5 C 1 L 2 (配列番号 30)	5 C 1 L 3 (配列番号 31)	5 C 1 L 4 (配列番号 32)
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	F	L	F	F	F	F
27D	31	CDR-L1	H	H	H	H	H	H
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1	-	-	-	-	-	-
28	33	CDR-L1	K	N	K	K	K	K
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	N	Y	N	N	N	N
31	36	CDR-L1	T	N	T	T	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	H	D	H	H	H	H
35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
37	42	Fr2	L	L	L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	K	K	K	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	K	Q	K	K	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	N	Y	N	Y	N	Y
50	55	CDR-L2	R	L	R	R	R	R
51	56	CDR-L2	V	G	V	V	V	V
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S

10

20

30

【表 2 - 3】

特許  
下化5C1 VK領域

Kabat #	Linear #	FRまたはCDR	マックス5C1 VL (配列番号24)	Huvk受容体Fr (配列番号28) Acc# CAB51293.1	5C1 L1 (配列番号29)	5C1 L2 (配列番号30)	5C1 L3 (配列番号31)	5C1 L4 (配列番号32)
53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N	N
54	59	CDR-L2	R	R	R	R	R	R
55	60	CDR-L2	F	A	F	F	F	F
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	K	K	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	G	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D

10

20

30

## 【表 2 - 4】

表2  
ヒト化5C1 V<sub>k</sub>領域

Kabat #	Linear #	FRまたはCDR	マウス5C1 VL (配列番号24)	Hu V <sub>k</sub> 受容体Fr (配列番号28) Acc# CAB51293.1	5C1 L <sub>1</sub> (配列番号29)	5C1 L <sub>2</sub> (配列番号30)	5C1 L <sub>3</sub> (配列番号31)	5C1 L <sub>4</sub> (配列番号32)
83	88	Fr3	L	V	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	F	Y	F	Y	F	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	S	M	S	S	S	S
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	S	A	S	S	S	S
92	97	CDR-L3	A	L	A	A	A	A
93	98	CDR-L3	H	Q	H	H	H	H
94	99	CDR-L3	V	T	V	V	V	V
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95B		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95C		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95D		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95E		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	W	P	W	W	W	W
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	G	G	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	V	V	V	V	V
105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	I	I	I	I	I
106A		Fr4	-	-	-	-	-	-
107	112	Fr4	R	K	K	K	K	K

## 【0273】

ヒト化5C1 L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>、およびL<sub>4</sub>をコードする例示的な核酸配列は、配列番号33、34、35、および36において、それぞれ提供される。

## 【0274】

実施例5：ヒト化5C1抗体の - シヌクレインに対する親和性

5C1ヒト化重鎖タンパク質およびヒト化軽鎖タンパク質の様々な組み合わせの、 - シヌクレインに対する親和性を、ELISAで解析した。図5に示したように、ヒト化5C1抗体のH1L1バージョンは、当該アッセイ条件下で、 - シヌクレインに親和性を示さなかった。対照的に、キメラ5C1抗体は、 - シヌクレインに対して、マウス5C1抗体よりも高い親和性を有した。ヒト化バージョンH3L4、H4L3、およびキメラH+L3は、同程度の能力であり、キメラ5C1抗体とほとんど同様の能力であった。さ

10

20

30

40

50

らに、ヒト化バージョン H 3 L 3 および H 3 L 1 は、H 3 L 4、H 4 L 3、およびキメラ H + L 3 よりもわずかに低い親和性であったが、同程度の能力であった。図 5 の x 軸は、それぞれの抗体の n g / mL を表し、y 軸は吸光度を表している。

#### 【 0 2 7 5 】

様々なヒト化 5 C 1 抗体バージョンはまた、より詳細に結合親和性を決定するために、Biacoreにより解析した。抗ヒト IgG CM5 Biacore chip を、GE Healthcareにより供給されたプロトコールに従い、準備した。各ヒト化 5 C 1 抗体バージョンは、次式を用いて  $R_{max}$  が 50 を超えないレベルまで、それぞれ捕捉した：

$$R_{max} = (\text{捕捉抗体の RU}) * (\text{シヌクレインの MW}) / (\text{捕捉抗体の MW}) * 2$$

10

分母の 2 の係数は、抗体の結合部位の数である。 - シヌクレインは、予想 KD の約 10 倍を上回る値から約 10 分の 1 を下回る値に渡る濃度で、チップ上に流した。データを収集し、ドリフトと少量の非特異的結合を考慮するために、2つの参照値を減算した。データを、1 : 1 モデルおよびグローバルフィットを使用した Biacore 評価ソフトウェアを用いて、解析した。

#### 【 0 2 7 6 】

Biacore 解析の結果を、表 3 (下記) に要約している。本データは、 - シヌクレインへの親和性の減少のほとんどが、いくつかの抗体バージョンにおける解離速度の増加によるものであることを示している。H 4 L 3 は、高い親和性を有することが確認された。

20

【表3】

表3

Biacoreで測定した、5C1変異抗体の親和性

5C1 変異体	#フレームワークマウス アミノ酸		$K_D$	$K_{on}$	$K_{off}$
	HC	LC			
m5C1	82	80	68.7 nM	7.5x10 <sup>4</sup> /s	5.1x10 <sup>3</sup> /s
Ch5C1	82	80	86.0 nM	6.1x10 <sup>4</sup> /s	5.3x10 <sup>3</sup> /s
h5C1_H3L4	65、9つの逆突然変異を含む(V11L, G27Y, N30T, M48I, V67A, I69L, E73K, Y91F, R94S)	69、2つの逆突然変異を含む(P12S, T14S)	1237.0 nM	4.4x10 <sup>4</sup> /s	54.5x10 <sup>3</sup> /s
h5C1_H4L3	64、8つの逆突然変異を含む(V11L, G27Y, N30T, M48I, V67A, I69L, E73K, R94S)	72、5つの逆突然変異を含む(I2V, P12S, T14S, Y49N, Y87F)	119.8 nM	4.4x10 <sup>4</sup> /s	5.1x10 <sup>3</sup> /s
h5C1_H4L4	69、2つの逆突然変異を含む(P12S, T14S)	600.9 nM	5.3x10 <sup>4</sup> /s	32.4x10 <sup>3</sup> /s	
h5C1_H5L3	62、6つの逆突然変異を含む(V11L, G27Y, N30T, M48I, E73K, R94S)	72、5つの逆突然変異を含む(I2V, P12S, T14S, Y49N, Y87F)	283.1 nM	3.9x10 <sup>4</sup> /s	11.1x10 <sup>3</sup> /s
h5C1_H5L4	69、2つの逆突然変異を含む(P12S, T14S)	1062.0 nM	3.7x10 <sup>4</sup> /s	40.3x10 <sup>3</sup> /s	

## 【0277】

## 実施例6：アラニンスキャニング変異導入法

これら抗体の重複ペプチドへの結合によると、抗体5C1、9E4および5D12が結合するエピトープは、-シヌクレインの残基118-126内に、ほぼ位置している。本実施例は、-シヌクレインの位置118から126の間の各残基についての、アラニンスキャニング変異導入法による、より詳細なマッピングを述べる。アラニンは、嵩張らず、化学的不活性で、それにもかかわらず他の多くのアミノ酸が保持する二次構造選好を真似るメチル官能基を有するために、用いられる。図6、7、および8の上部は、それぞれ、抗体9E4、5C1および5D12で染色されたウエスタンプロットの結果を示している。プロットには、完全長-シヌクレインおよびアラニンスキャニング変異導入法により残基118-126になされた-シヌクレインの点変異が含まれ、0.5 μg/mlの抗体で染色した。位置122および125の変異は、本質的に9E4の結合を消失させるが、他の位置の変異は、何らかの効果がある場合も、ほとんど結合を消失させない。従って、9E4は主に残基122および125に接触する。位置120-122の変異は

10

20

30

40

50

、本質的に 5 C 1 の結合を消失させ、位置 1 2 3 および 1 2 4 の変異は、実質的に結合を減少させるが消失はさせない。従って、5 C 1 は主に残基 1 2 0 - 1 2 2 に接触し、より少ない程度で残基 1 2 3 - 1 2 4 に接触する。位置 1 2 0 - 1 2 2 の変異は、本質的に 5 D 1 2 の結合を消失させ、位置 1 1 8 、 1 1 9 、 1 2 3 および 1 2 4 の変異は実質的に結合を減少させたが消失はさせなかった。従って、5 D 1 2 は主に位置 1 2 0 - 1 2 2 に結合し、より少ない程度で位置 1 1 8 、 1 1 9 、 1 2 3 、および 1 2 4 に結合する。図 6 - 8 の各図の下部では、配列番号 7 4 内の残基の大きさが、各抗体の - シヌクレインに対する結合への残基の寄与と相關している。例えば、図 8 の残基 1 2 0 の「P」は、この残基の変異が、本質的に 5 D 1 2 の - シヌクレインへの結合を消失させたために、大きく、1 1 8 の「V」残基は、この残基の変異が 5 D 1 2 の - シヌクレインへの結合を減少させたが消失はさせなかつたために、小さく、残基 1 2 6 の「E」は、この残基の変異が 5 D 1 2 の - シヌクレインへの結合にほとんど影響がなかつたために、さらに小さい。図 6 - 8 のそれぞれにおいて、1 H 7 抗体はコントロールとして使用されている。1 H 7 は - シヌクレインの残基 9 1 - 9 8 に結合するため、残基 1 1 6 - 1 2 6 の変異の存在にかかわらず、 - シヌクレインに結合すると予想される。  
10

## 【 0 2 7 8 】

5 C 1 および 5 D 1 2 と比較した、9 E 4 の異なる結合特異性は、個々の生産方法を部分的に反映しているだろう。9 E 4 は完全長 - シヌクレインの免疫化により生産され、その結果、抗体は立体構造的なエピトープに結合した。5 C 1 および 5 D 1 2 は 1 0 アミノ酸のペプチドの免疫化により生産され、その結果、直線上のエピトープに結合した。  
20

## 【 0 2 7 9 】

図 9 は、9 E 4 、 5 C 1 および 5 D 1 2 抗体の結合部位に近接する、 - シヌクレインのアミノ酸の球棒モデルである。9 E 4 が結合するエピトープの 2 つの不連続な残基、残基 1 2 2 および 1 2 5 が、完全長 - シヌクレインタンパク質の立体構造において、ポケットを形成する。

## 【 0 2 8 0 】

## 実施例 7 : 発現プラスミドの作成

次の抗体 - s F a b 融合ポリペプチドをコードする発現プラスミドを構築する：

ノブ 5 C 1 - H 4 - s c F a b ( 8 D 3 ) 重鎖融合タンパク質 ( 5 C 1 - H 4 \_ H U - I G G 1 - H C - K N O B ) の組成 ( 図 1 0 参照 ) ( 配列番号 5 7 であるが、配列番号 5 8 もまた使用可能である ) :  
30

- ・ 5 C 1 - H 4 重鎖可変領域 ( 配列番号 1 7 ) ;
- ・ さらなるジスルフィド架橋を形成するための、C H 3 ノブ変異 T 3 6 6 W および S 3 5 4 C 変異を含有する、ヒト I g G 1 重鎖定常領域 ( 配列番号 6 7 であるが、配列番号 6 8 もまた使用可能である ) ;
- ・ グリシン - セリンリンカー ( 配列番号 7 3 であるが、配列番号 4 1 および 4 2 もまた使用可能である ) ;
- ・ マウス 8 D 3 抗トランスフェリン抗体の可変軽鎖ドメイン変異体 ( L 5 9 6 V および L 5 9 8 I ) (Boado et al., Biotechnology and Bioengineering 102:1251-1258 (2009))  
40 ( 配列番号 6 3 ) ;
- ・ ヒト C - 軽鎖 ( 配列番号 5 2 ) ;
- ・ リシン - セリンリンカー ( 配列番号 4 1 であるが、配列番号 4 2 および 7 3 もまた使用可能である ) ;
- ・ マウス 8 D 3 抗トランスフェリン抗体の可変重鎖ドメイン ( 配列番号 6 4 ) ; および
- ・ ヒト I g G 1 C H 1 重鎖ドメイン ( 配列番号 6 5 ) 。

ホール 5 C 1 - H 4 重鎖融合タンパク質 ( 5 C 1 - H 4 \_ H U - I G G 1 - H C - H O L E ) の組成 ( 図 1 1 参照 ) ( 配列番号 5 3 であるが、配列番号 5 5 もまた使用可能である ) :  
50

- ・ 5 C 1 - H 4 重鎖可変領域（配列番号 17）；および
- ・さらなるジスルフィド架橋を形成するための、C H 3 ホール変異 T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V、並びに、Y 3 4 9 C 変異を含有する、ヒト Ig G 1 重鎖定常領域（配列番号 46 であるが、配列番号 48 もまた使用可能である）。

ホール 5 C 1 - L 3 軽鎖タンパク質（5 C 1 - L 3 \_ H U - I G K A P P A - L C）の組成（図 12 参照）（配列番号 59）：

- ・ 5 C 1 - L 3 軽鎖可変領域（配列番号 31）；および
- ・ヒト C - 軽鎖（配列番号 52）。

【0281】

10

上述の「ノブ」および「ホール」変異は、図 10 および 11 において四角で囲まれてあり、さらなるジスルフィド架橋を形成するためのシステインへの変異は、図 10 および 11 において丸で囲まれている。

【0282】

これらの発現プラスミドを用いて作成された血液脳関門シャトルは、図 13 に図示している。図 13 において、H C は重鎖を示し、L C は軽鎖を示している。

【0283】

実施例 8：5 C 1 - c F a b 構築物の精製

この抗体鎖は、HEK 293 細胞（ヒト胎児腎臓細胞株 293 由来）の一過性遺伝子導入と、F 17 培地（Invitrogen Corp.）での培養により、作成される。遺伝子導入のために、「293 - F e c t i n」遺伝子導入試薬（Invitrogen）を用いる。抗体鎖は、それぞれ「ノブ」5 C 1 - s c F a b (8 D 3) 重鎖、「ホール」5 C 1 - s c F a b (8 D 3) 重鎖、および対応する 5 C 1 軽鎖をコードする、3 つの異なるプラスミドから発現される。3 つのプラスミドは、遺伝子導入において、等モルのプラスミドの割合で、用いられる。遺伝子導入は、製造業者の説明書に規定されるように、実施する。細胞培養上清を含有する抗体融合タンパク質は、遺伝子導入後 7 日目に回収する。上清は、精製まで凍結保存する。

20

【0284】

タンパク質を、ろ過した培養上清から精製する。上清を、タンパク質 A セファロースカラム（GE Healthcare）に負荷し、pH 7.4 の PBS で洗浄する。抗体の溶出は、100 mM クエン酸緩衝液により pH 3.0 で行い、次いで直ちにサンプルを pH 6.5 に中和する。濃縮後、凝集タンパク質および他の副産物を、分子ふるいクロマトグラフィー（Superdex 200；GE Healthcare）により、20 mM ヒスチジン、140 mM NaCl、pH 6.0 において、分離する。不完全に構築された分子および他の副産物を定量するために、分析型 SEC (TSK G3000SWXL) およびチップベースキャピラリー電気泳動システム (CE-SDS, LabChipGX, Caliper) で解析する。副産物のない、単量体の抗体画分をプールする。MILIPORE Amicon Ultra（分画分子量 30）遠心濃縮器を用いた濃縮後、タンパク質を -80° で保管する。最終産物の解析評価は、UV タンパク質測定、CE - SDS、分子ふるいクロマトグラフィー、質量分析によって行い、またエンドトキシン測定によっても行う。

30

40

【図1】

SCI-VH																			
Kabat	ナンバリング	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
m5C1VH		Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	A	K	P	G	T	S	V
Kabat	ナンバリング	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
m5C1VH		S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y	H	M	N	W	I	K
Kabat	ナンバリング	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
m5C1VH		P	G	Q	G	L	E	W	I	G	A	T	N	P	N	N	G	Y	T
Kabat	ナンバリング	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
m5C1VH		N	Q	R	F	K	D	K	A	I	L	T	A	D	K	S	S	N	T
Kabat	ナンバリング	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
m5C1VH		M	H	L	-	-	-	W	G	Q	G	T	V	V	F	C	A	S	G
Kabat	ナンバリング	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114
m5C1VH		H	L	A	-	-	X	W	G	Q	G	T	V	V	T	V	S	A	-

FIG. 1

【図3】

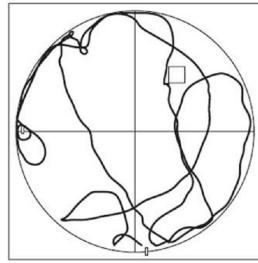
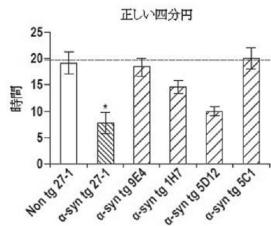


FIG. 3



【図2】

SCI-VL																				
Kabat	ナンバリング	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
m5C1VL		D	V	V	M	T	Q	I	F	L	Y	L	S	V	S	P	G	D	Q	
Kabat	ナンバリング	21	22	23	24	25	26	27	27A	27B	27C	27D	27E	27F	28	29	30	31	32	
m5C1VL		I	S	C	R	S	S	O	S	L	F	H	S	-	K	G	N	Y	L	
Kabat	ナンバリング	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
m5C1VL		W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	N	R	V	S	
Kabat	ナンバリング	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	
m5C1VL		F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	G	S	G	T	D	F	T	L	
Kabat	ナンバリング	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	
m5C1VL		I	S	G	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	F	C	S	O	S	A	
Kabat	ナンバリング	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107						V

FIG. 2

【図4】

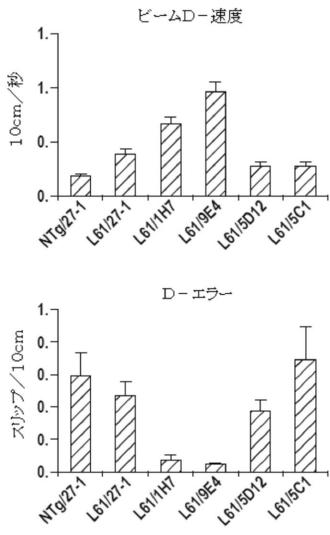


FIG. 4

【図5】

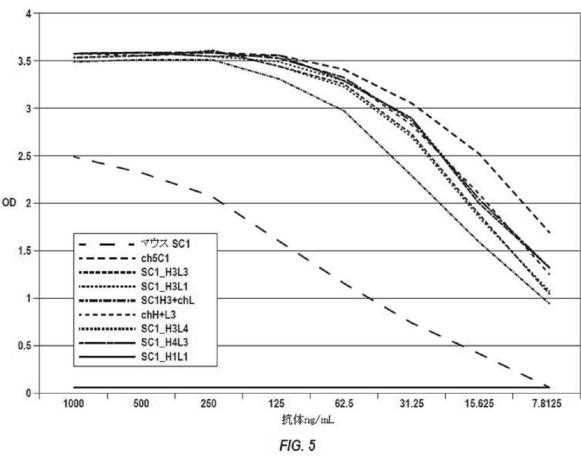
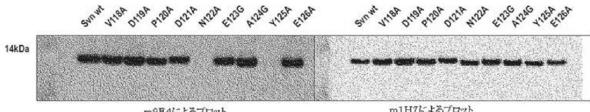


FIG. 5

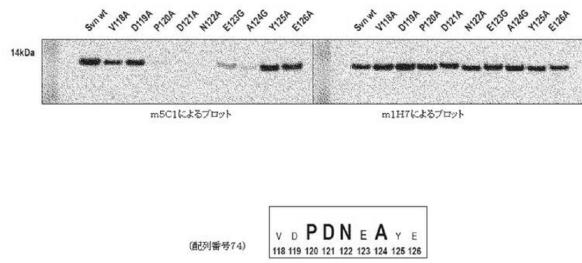
【図6】



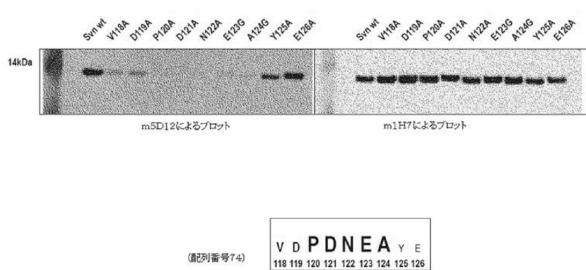
V	D	P	D	N	E	A	Y	E
118	119	120	121	122	123	124	125	126

FIG. 6

( 义 7 )



〔四八〕



〔 义 9 〕

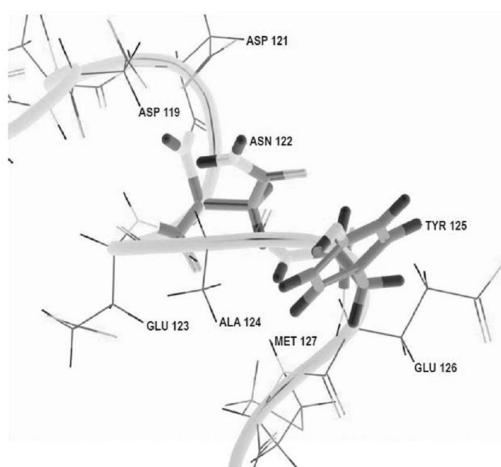
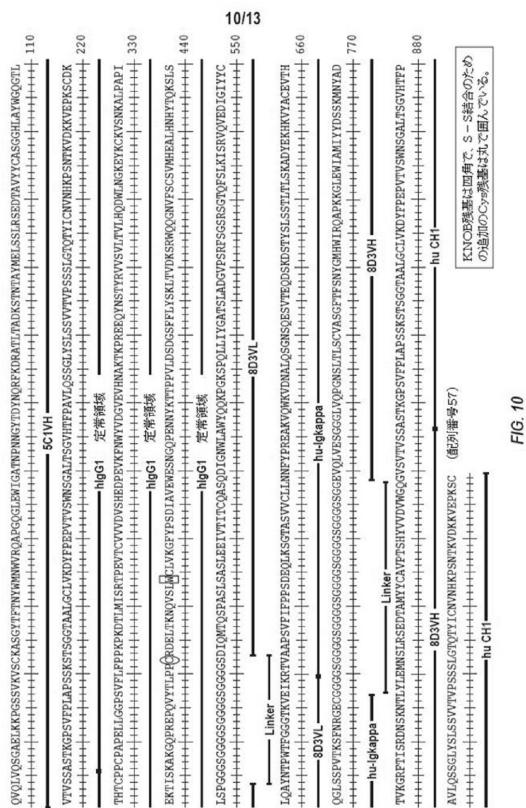


FIG. 9

【 义 1 0 】



〔 囮 1 1 〕

MEISSLASSEUTAVYIASGHLAYWQCTQVLTWSASTKPSVPELAPSKSSTSGTAAAGLCKVPPFVVNSIGA  
 16  
 LATSUWHTPAVLSQSSGAISSSISVTVTPSSSLGFTQYICNWKHPSNTKVKDVKPVSCKUHTHCPDPABLGAPSVFL  
 24  
 5C VH —————— hG1 —————— 常規領域  
 14  
 12  
 10  
 8  
 6  
 4  
 2  
 1  
 0

HOLE模基は四角で、S-S結合のCys残基は丸で囲んで置かれた。

FIG. 11

【図12】

FIG. 12

【 図 1 3 】

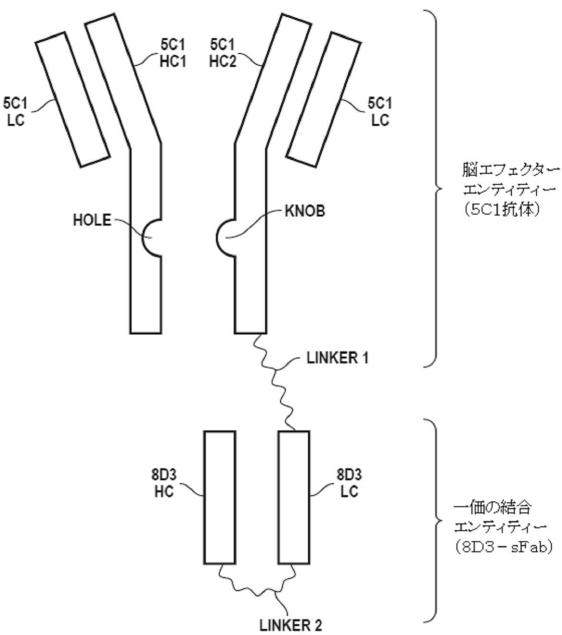


FIG. 13

【配列表】

0006744856000001.app

## フロントページの続き

			F	I
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	38/00
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
				N

(31)優先権主張番号 62/023,373

(32)優先日 平成26年7月11日(2014.7.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72)発明者 ロビン・バーバー

アメリカ合衆国9 4 5 9 8 カリフォルニア州ウォルナット・クリーク、ノーマンディ・レイン2 5  
0 番

(72)発明者 ケイト・ドーラ・ゲイムス - シール

アメリカ合衆国9 4 0 0 2 カリフォルニア州ベルモント、アラメダ・デ・ラス・ブルガス5 0 3 番

(72)発明者 ターロチャン・エス・ニイジャー

アメリカ合衆国9 4 5 6 3 カリフォルニア州オリンダ、アイアンバーク・コート7 1 2 番

(72)発明者 ワグナー・ザーゴ

アメリカ合衆国9 4 4 0 1 カリフォルニア州サン・マテオ、クリークサイド・レイン2 2 番

(72)発明者 オラフ・ムンディグル

ドイツ8 2 3 6 2 ヴァイルハイム、タッシーロリング1 6 番

(72)発明者 イエンス・ニーヴェナー

ドイツ8 1 4 7 6 ミュニック、ロイテナー・シュトラーセ2 1 アー番

(72)発明者 ゲオルグ・ティーフェンタラー

ドイツ8 2 4 0 4 ジンデルスドルフ、オーベルリーダーン4 番

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 4 / 0 3 3 0 7 4 (WO , A 1 )

国際公開第2 0 1 4 / 0 5 8 9 2 4 (WO , A 1 )

PLOS ONE , 2 0 1 1 年 4 月 2 9 日 , Vol.6 , No.4 , Pages. E19338-1/17

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 1 3

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

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / W P I D S / B I O S I S ( S T N )