

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年7月2日(02.07.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/098989 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/084198
 - (22) 国際出願日: 2014年12月24日(24.12.2014)
 - (25) 国際出願の言語: 日本語
 - (26) 国際公開の言語: 日本語
 - (30) 優先権データ:
特願 2013-266880 2013年12月25日(25.12.2013) JP
 - (71) 出願人: JCRファーマ株式会社(JCR PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6590021 兵庫県芦屋市春日町三番十九号 Hyogo (JP).
 - (72) 発明者: 藺田 啓之(SONODA, Hiroyuki); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷2-2-10 JCRファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 森本 秀人(MORIMOTO, Hideto); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷2-2-10 JCRファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 越村 友理(KOSHIMURA, Yuri); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷2-2-10 JCRファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 木下 正文(KINOSHITA, Masafumi); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷2-2-10 JCRファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 高木 春奈(TAKAGI, Haruna); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷2-2-10 JCRファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 由井 佳子(YOSHII, Yoshiko); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷2-2-10 JCRファーマ株式会社内 Hyogo (JP).
 - (74) 代理人: 早坂 巧, 外(HAYASAKA, Takumi et al.); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満2丁目9番14号北ビル3号館5階 早坂・神谷国際特許事務所 Osaka (JP).
 - (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
 — 国際調査報告 (条約第21条(3))
 — 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2015/098989 A1

(54) Title: NOVEL ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODY THAT PASSES THROUGH BLOOD-BRAIN BARRIER

(54) 発明の名称: 血液脳関門を通過する新規抗トランスフェリン受容体抗体

(57) Abstract: Provided are a novel anti-transferrin receptor antibody that can pass through the blood-brain barrier, a fusion protein of the antibody and a protein that is administered into the blood and facilitates function in the central nervous system, and a production method for both. The fusion protein contains: an anti-human-transferrin receptor antibody that recognizes any amino acid sequence selected from a group comprising of SEQ ID 1, 2, and 3; and an amino acid sequence of another protein that is bonded to the amino acid sequence and the C-terminus side of the antibody.

(57) 要約: 血液脳関門を通過し得る新規抗トランスフェリン受容体抗体、及び血中に投与して中枢神経系において機能させるべき蛋白質と当該抗体との融合蛋白質、及びそれらの製造法が開示されている。当該融合蛋白質は、配列番号1、2及び3からなる群から選択される何れかのアミノ酸配列を認識する抗ヒトトランスフェリン受容体抗体と、そのアミノ酸配列とそのC末端側に結合した他の蛋白質のアミノ酸配列とを含んでなる。

明 細 書

発明の名称：

血液脳関門を通過する新規抗トランスフェリン受容体抗体

技術分野

[0001] 本発明は、中枢神経系（CNS）において機能させるべき蛋白質の血液脳関門輸送に関し、詳しくは、特定の抗トランスフェリン受容体抗体、それらの抗体の何れかと中枢神経系において機能させるべき蛋白質とを融合させるなる融合蛋白質、及び、中枢神経系において機能させるべきタンパク質を特定の抗トランスフェリン受容体抗体との融合蛋白質の形で投与することによる、当該蛋白質を中枢神経系に送達して機能させる方法に関する。

背景技術

[0002] 脳室周囲器官（松果体、脳下垂体、最後野等）を含む幾つかの領域を除く脳の大半の組織に血液を供給する毛細血管は、筋肉等その他の組織に存在する毛細血管と異なり、これを形成している内皮細胞が強固な細胞間接合によって結合し合っている。そのため、血液から脳への物質の受動移動が妨げられ、例外はあるものの、脂溶性の高い物質、又は分子量が小さく（200～500ダルトン以下）且つ生理pH付近において電氣的に中性な物質以外、毛細血管から脳へ移行しにくい。このような、脳内毛細血管の内皮細胞を介した、血液と脳の組織液との間の物質交換を制限する機構は、血液脳関門（Blood Brain Barrier又はBBB）と呼ばれている。また、血液脳関門は、脳のみならず、血液と脳及び脊髄を含む中枢神経系の組織液との間の物質交換を制限している。

[0003] 血液脳関門の存在により、中枢神経系の細胞の大半は、血中のホルモン、リンホカイン濃度の変動等の影響を受けることなく、その生化学的な恒常性が保たれる。

[0004] しかしながら、血液脳関門の存在は、薬剤開発のうえで問題を提起する。例えば、神経成長因子（NGF）は、中枢神経系においてコリン作動性ニュー

ーロンに作用し、アポトーシスによる細胞死を防止して細胞の生存維持に機能していると考えられ、アルツハイマー病の痴ほう症治療薬として期待されたが、神経成長因子は、分子量が10kDを超えることから、血液脳関門を通過せず脳内に存在する患部に到達しないので、アルツハイマー病の治療剤として機能を発揮しないとされた。また、 α -レイズロニダーゼの欠損に起因する遺伝性代謝疾患である、ムコ多糖症Ⅰ型（ハーラー症候群）に対しては、組換え α -レイズロニダーゼを静脈内補充する酵素補充療法が、その治療法として行われているが、ハーラー症候群において顕著な中枢神経系（CNS）の異常に対しては、酵素が血液脳関門を通過できないことから有効でない。

[0005] そのような中枢神経系において作用させるべき蛋白質等の高分子物質に血液脳関門を通過させるための方法が、種々開発されている。例えば、神経成長因子の場合、これをリポソームに内包させ、リポソームと脳内毛細血管の内皮細胞の細胞膜との融合により、血液脳関門を通過させる方法が試みられているが、実用化に至っていない（非特許文献1）。 α -レイズロニダーゼの場合、1回当たりに投与される酵素の量を増加させて酵素の血中濃度を高めることにより、血液脳関門における酵素の受動輸送を高める試みが行われ、ハーラー症候群の動物モデルを用いて、この手法により中枢神経系（CNS）の異常が緩解することが示されている（非特許文献2）。

[0006] また、高分子物質を髄腔内又は脳内に直接投与する試みも行われている。例えば、ハーラー症候群（ムコ多糖症Ⅰ型）の患者の髄腔内にヒト α -レイズロニダーゼを投与する方法（特許文献1）、ニーマン-ピック病の患者の脳室内にヒト酸スフィンゴミエリナーゼを投与する方法（特許文献2）、ハンター症候群のモデル動物の脳室内にイズロン酸2-スルファターゼ（I2S）を投与する方法（特許文献3）が報告されている。このような手法によれば、確実に中枢神経系に薬剤を作用させることができると考えられる一方、侵襲性が高い。

[0007] 血液脳関門を通して高分子物質を脳内に到達させる方法として、脳内毛細

血管の内皮細胞上に存在する膜蛋白質と親和性を持つように高分子物質を修飾し膜蛋白質と複合体を形成させてエンドサイトーシスにより血液脳関門を通過させる方法が種々報告されている。脳内毛細血管の内皮細胞上に存在する膜蛋白質としては、例えば、インスリン、トランスフェリン、インスリン様成長因子（IGF-I, IGF-II）、LDL、及びレプチンに対する受容体が挙げられる。

[0008] 例えば、神経成長因子（NGF）をインスリンとの融合蛋白質の形で合成し、この融合蛋白質をインスリン受容体との結合を介して血液脳関門を通過させる技術が報告されている（特許公報4～6）。また、神経成長因子（NGF）を抗インスリン受容体抗体との融合蛋白質の形で合成し、この融合蛋白質をインスリン受容体との結合を介して血液脳関門を通過させる技術が報告されている（特許文献4及び7）。また、神経成長因子（NGF）をトランスフェリンとの融合蛋白質の形で合成し、この融合蛋白質をトランスフェリン受容体（TfR）との結合を介して血液脳関門を通過させる技術が報告されている（特許文献8）。また、神経成長因子（NGF）を抗トランスフェリン受容体抗体（抗TfR抗体）との融合蛋白質の形で合成し、この融合蛋白質をトランスフェリン受容体との結合を介して血液脳関門を通過させる技術が報告されている（特許文献4及び9）。

[0009] 抗トランスフェリン受容体抗体を用いた技術について更にみると、薬剤を抗TfR抗体と結合させて血液脳関門を通過させる技術において、抗TfR抗体の重鎖C末端側にリンカーを介して軽鎖を結合させた一本鎖抗体を使用できることが報告されている（非特許文献3）。また、hTfRとの解離定数が30nM～1μMの抗hTfR抗体が、薬剤をして血液脳関門を通過させる技術において好適に利用できることが報告されている（特許文献10）。また、I2S等のリソソーム酵素を抗hTfR抗体と結合させた融合蛋白質とすることにより、リソソーム酵素をして血液脳関門を通過させることができることが報告されている（特許文献11）。抗hTfR抗体とリポソームを組合わせて、抗hTfR抗体を表面に有するリポソームに薬剤を内包させることにより、薬剤をして血液脳関門を通

過させる技術についても報告がある（特許文献12，13）。

[0010] 上記抗体との融合蛋白質を医薬として利用することを考えた場合、投与開始後に、その抗体に対する免疫反応等の過剰反応が生じて薬剤の投与が困難となる場合も考えられる。従って、そのような場合に備えて、既知の抗体とは別の抗体との融合蛋白質を準備しておくことは、過剰反応による治療の中止という問題を回避する上で極めて意義が高い。

先行技術文献

特許文献

- [0011] 特許文献1：特表2007-504166号公報
特許文献2：特表2009-525963号公報
特許文献3：特開2012-62312号公報
特許文献4：米国特許5154924号公報
特許文献5：特開2011-144178号公報
特許文献6：米国特許2004/0101904号公報
特許文献7：特表2006-511516号公報
特許文献8：特開H06-228199号公報
特許文献9：特許第5977307号公報
特許文献10：WO2012/075037
特許文献11：特表2013-507131号公報
特許文献12：WO1991/04014
特許文献13：WO2013/059617

非特許文献

- [0012] 非特許文献1：Xie Y. et al., J Control Release. 105. 106-19(2005)
非特許文献2：Ou L. et al., Mol Genet Metab. (2013)
非特許文献3：Li JY. Protein Engineering. 12. 787-96(1999)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 上記背景の下で、本発明の目的は、血液脳関門を通過し得る新規抗トランスフェリン受容体抗体、及び血中に投与して中枢神経系において機能させるべき蛋白質と当該抗体との融合蛋白質、及びそれらの製造法若しくは使用法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0014] 上記目的に向けた研究において、本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、抗ヒトトランスフェリン受容体抗体であって、当該抗体と融合させることによりリソソーム酵素をして血液脳関門を通過させることができる、新規抗体を見出し本発明を完成した。すなわち、本発明は以下を提供する。

1. 配列番号1, 2及び3からなる群から選択される何れかのアミノ酸配列を認識する抗ヒトトランスフェリン受容体抗体。

2. 該配列番号1, 2及び3からなる群から選択されるアミノ酸配列中の少なくとも10個の連続するアミノ酸残基よりなる部分を認識する、上記1の抗ヒトトランスフェリン受容体抗体。

3. 上記1又は2の何れかの抗ヒトトランスフェリン受容体抗体であって、

軽鎖の可変領域の全て又は一部を含むアミノ酸配列と、

そのC末端側に第1のリンカー配列として結合した15～25個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列と、

更にそのC末端側に結合した、重鎖の可変領域の全て又は一部を含むアミノ酸配列とを含んでなる1本鎖抗体である、抗ヒトトランスフェリン受容体抗体。

4. 配列番号4, 5, 6及び7からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、上記3の抗ヒトトランスフェリン受容体抗体。

5. 上記1～4の何れかの抗ヒトトランスフェリン受容体抗体と、そのC末端側に結合した他の蛋白質のアミノ酸配列とを含んでなる、融合蛋白質。

6. 上記1～4の何れかの抗ヒトトランスフェリン受容体抗体と、

そのC末端側に第2のリンカー配列として結合した3～50個のアミノ酸

残基からなるアミノ酸配列と、

更にそのC末端側に結合した他の蛋白質のアミノ酸配列とを含んでなる、融合蛋白質。

7. 該他の蛋白質がリソソーム酵素である、上記5又は6の融合蛋白質。

8. 該リソソーム酵素がヒトイズロン酸-2-スルファターゼである、上記7の融合蛋白質。

9. 上記1~4の何れかの抗ヒトトランスフェリン受容体抗体をコードするDNA。

10. 上記5~8の何れかの融合蛋白質をコードするDNA。

11. 上記10のDNAを組み込んだ哺乳動物発現用ベクター。

12. 上記11の哺乳動物発現用ベクターで形質転換させた哺乳動物細胞。

13. 該哺乳動物細胞がCHO細胞である、上記12の細胞。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、中枢神経系(CNS)において機能させようとする蛋白質、特に生理活性蛋白質を、抗ヒトトランスフェリン受容体との融合蛋白質とすることにより血液脳関門を通過させることができる形で提供でき、従って、それらの生理活性蛋白質を血中に投与して直接中枢神経系に作用させることが可能である。

図面の簡単な説明

[0016] [図1A]図1Aは、形質転換大腸菌クローンM11により産生されたhI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質をマウスに尾静脈投与したときの脳分布試験の結果を、rhI2Sでの結果と共に示す。縦軸は脳ホモジネート中のI2S濃度($\mu\text{g}/\text{湿重量}$)を示す(各群2匹の平均値)。

[図1B]図1Bは、形質転換大腸菌クローンM27により産生されたhI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質をマウスに尾静脈投与したときの脳分布試験の結果を、rhI2Sでの結果と共に示す。縦軸は脳ホモジネート中のI2S濃度($\mu\text{g}/\text{湿重量}$)を示す(各群2匹の平均値)。

[図1C]図1 Cは、形質転換大腸菌クローンB84により産生されたhI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質をマウスに尾静脈投与したときの脳分布試験の結果を、rhI2Sでの結果と共に示す。縦軸は脳ホモジネート中のI2S濃度 ($\mu\text{g}/\text{湿重量}$) を示す (各群2匹の平均値)。

[図2]図2は、ハンター症候群病態モデルマウスを用いたhI2S-sc抗TfR抗体融合蛋白質の薬効評価の結果を示す図。縦軸は、ビヒクルを投与したマウスの脳内に蓄積したグリコサミノグリカンの量を100%としたときの、rhI2Sを投与したマウス及びhI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質を投与したマウスにおける、グリコサミノグリカンの蓄積量 (%) を示す (値は各群3匹の平均値)。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明において、「1本鎖抗体」というときは、免疫グロブリン軽鎖の可変領域の全て又は一部を含む配列、そのC末端に第1のリンカー配列、更にそのC末端側に免疫グロブリン重鎖の可変領域の全て又は一部を含むアミノ酸配列を有し、特定の抗原に特異的に結合する抗体のことをいう。免疫グロブリン軽鎖の可変領域は、抗原と直接接触し抗体の特異性を決定する相補性決定領域 (CDR) を3つ有している。同様に、免疫グロブリン重鎖の可変領域も、CDRを3つ有している。これらのCDRは、抗原と直接接触し抗体の特異性を決定する領域である。従って、1本鎖抗体には、免疫グロブリン重鎖の3つのCDRが全てと、免疫グロブリン軽鎖の3つのCDRの全てとが含まれることが好ましい。

[0018] 但し、CDRのアミノ酸配列には、1本鎖抗体の抗原に対する親和性が著しく損なわれない限り、1又は数個のアミノ酸を置換、挿入、決失させる等の変異を導入してもよく、また、変異を導入することにより、1本鎖抗体と抗原の親和性を適宜調整することができる。例えば、1本鎖抗体と抗原との親和性が高く、水性液中での解離定数が著しく低い場合、これを生体内に投与したときに、1本鎖抗体が抗原と解離せず、その結果、機能上の不都合が生じる可能性がある。このような場合に、CDRに変異を導入することにより、解離定数を、元の抗体の2～5倍、5～10倍、10～100倍等と段階的に調整し、目

的に合致した最も好ましい1本鎖抗体を獲得し得る。逆に、当該変異の導入により、解離定数を、元の抗体の1/2~1/5倍、1/5~1/10倍、1/10~1/100倍等と段階的に調整することもできる。このような解離定数の調整は、1本鎖抗体をコードする遺伝子をファージミドに組み込み、これを用いてカプシド表面上に1本鎖抗体をさせたファージを作成し、変異原等を作用させることにより1本鎖抗体をコードする遺伝子上に変異を導入させながらファージを増殖させ、増殖させたファージから、所望の解離定数を有する1本鎖抗体を発現するファージを、一定条件下で抗原カラムを用いて精製することで、得ることができる。

[0019] なお、本発明において、「1本鎖抗体の抗原に対する親和性」とは、抗原を特異的に認識して結合する1本鎖抗体の性質のことをいい、「1本鎖抗体が抗原に対して親和性を有する」とは、1本鎖抗体が、生理的条件下で、好ましくは0.1nM~5 μ M、更に好ましくは1nM~1 μ Mの解離定数で、抗原に特異的に結合する性質を有することをいう。

[0020] 1本鎖抗体をコードする遺伝子は、抗原で免疫した動物から得た脾細胞又は末梢血単核球、若しくは試験管内において抗原で免疫した脾細胞又は末梢血単核球から抽出したmRNAを鋳型としてcDNAを合成し、このcDNAを鋳型として、PCRにより免疫グロブリン軽鎖をコードするDNA断片と免疫グロブリン重鎖をコードするDNA断片とをそれぞれ増幅し、次いで、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNA断片の3'末端側に、第1のリンカー配列をコードするDNA配列を挟んで、免疫グロブリン重鎖をコードするDNA断片が連結するように増幅させて構築することができる。逆に、免疫グロブリン重鎖をコードするDNA断片の3'末端側に、第1のリンカー配列をコードするDNA配列を挟んで、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNA断片が連結するように増幅させて、1本鎖抗体をコードする遺伝子を構築することもできる。このようにして構築した1本鎖抗体をコードする遺伝子は、動物細胞内で発現できるように、5'末端側に開始コドンが配置される。このとき、免疫グロブリン軽鎖と重鎖のcDNAの間に配置される第1のリンカー配列をコードするDNA配列は、好ましくは15~25

個、より好ましくは15~20個、さらに好ましくは15個のアミノ酸残基から構成されるペプチド鎖を第1のリンカー配列としてコードするものである。かかる第1のリンカー配列は、リンカー配列により連結された免疫グロブリンの軽鎖と重鎖が抗原を認識し得る立体配置をとることができる限り、そのアミノ酸配列に制限はないが、好ましくは、グリシンとセリンから構成されるものであり、例えば、配列番号8で示されるアミノ酸配列 (Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser) を有するものである。

[0021] 本発明において、「1本鎖抗ヒトトランスフェリン受容体抗体」、「1本鎖抗hTfR抗体」又は「sc抗hTfR抗体」というときは、上記の1本鎖抗体の中で、ヒトトランスフェリン受容体を抗原として、これに特異的に結合するものをいう。このような1本鎖抗hTfR抗体をコードする遺伝子は、上記の1本鎖抗体をコードする遺伝子を作成する手法において、hTfR、又はhTfRを構成するペプチド鎖の部分アミノ酸配列を有する、13~25個のアミノ酸からなるペプチド鎖を抗原として試験管内で免疫した脾臓又は末梢血単核球、若しくは、かかるペプチド鎖を抗原として免疫した動物から得た脾細胞又は末梢血単核球から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAから、作製することができる。このとき用いられるhTfRを構成するペプチド鎖としては、生理的条件下でhTfRに特異的に結合する抗hTfR抗体が得られるものである限り特に限定はないが、次のアミノ酸配列を有するペプチド鎖：

(1) Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu (配列番号1)

(2) Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly (配列番号2)、及び

(3) Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser (配列番号3)

が好適に使用できる。

[0022] 従って、本発明の1本鎖抗ヒトトランスフェリン受容体抗体の好ましい形態は、ヒトトランスフェリン受容体を構成するペプチド鎖中の一部分をなす

配列番号 1～3 で示すアミノ酸配列を認識して特異的に結合するものであり、より好ましくは配列番号 1～3 で示すアミノ酸配列中の少なくとも 10 個の連続するアミノ酸残基よりなる配列を認識するものであり、更に好ましくは、配列番号 1～3 で示すアミノ酸配列中の 13 個の連続するアミノ酸残基よりなる配列を認識するものである。

[0023] 上記手法で作成された 1 本鎖抗 hTfR 抗体をコードする遺伝子は、多様な DNA 配列を有する免疫グロブリン遺伝子から PCR により増幅された増幅産物群として得られたものである。その中から、所望の 1 本鎖抗 hTfR 抗体をコードする遺伝子を単離する必要がある。従って、所望の性質を有する 1 本鎖抗 hTfR 抗体をコードする遺伝子をスクリーニングするため、それら PCR による増幅等をして作成された 1 本鎖抗 hTfR 抗体をコードする遺伝子を、一旦、哺乳動物細胞、酵母等の真核生物又は大腸菌等の原核生物細胞用の発現ベクターに組み込み、1 本鎖抗 hTfR 抗体 cDNA ライブラリを作成する必要がある。次いで、このライブラリを用いて宿主細胞を形質転換して 1 本鎖抗 hTfR 抗体を発現させ、発現させた 1 本鎖抗 hTfR 抗体と抗原との親和性を測定して、所望の親和性を有する 1 本鎖抗 hTfR 抗体を発現する宿主細胞を単離することにより、所望の 1 本鎖抗 hTfR 抗体をコードする遺伝子を単離、特定することができる。1 本鎖抗 hTfR 抗体と hTfR の親和性は、生理的条件下での解離定数が 1nM ～ $1\mu\text{M}$ であることが好ましいが、これに限らず、1 本鎖抗 hTfR 抗体の用途によって、その親和性は適宜調整される。

[0024] 本発明において、「Sc 抗 hTfR 抗体融合蛋白質」というときは、上記の 1 本鎖抗 hTfR 抗体の C 末端側に、第 2 のリンカー配列を介して又は直接に、他の任意の蛋白質が融合したものをいう。そのような Sc 抗 hTfR 抗体融合蛋白質は、他の蛋白質をコードする cDNA の 5' 末端側に、直接、又はリンカー配列をコードする DNA 断片を挟んで、所望の hTfR に対する親和性を有する 1 本鎖抗 hTfR 抗体をコードする cDNA を連結した DNA 断片を、哺乳動物細胞、酵母等の真核生物又は大腸菌等の原核生物細胞用の発現ベクターに組み込み、これらの細胞中で発現させることにより得ることができる。このとき、1 本鎖抗 hTfR 抗体

と他の蛋白質に配置される第2のリンカー配列は、好ましくは3~50個、より好ましくは13~17個、さらに好ましくは15個のアミノ酸から構成されるペプチド鎖である。そのような第2のリンカー配列は、当該リンカー配列により連結された1本鎖抗hTfR抗体がhTfRと親和性を保持し、且つ当該リンカー配列により連結された他の蛋白質が、生理的条件下で当該蛋白質の生理活性を発揮できる限り、そのアミノ酸配列に制限はないが、好ましくは、グリシンとセリンから構成されるものであり、例えば、配列番号9で示されるアミノ酸配列 (Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser) を有するものである。

[0025] Sc抗hTfR抗体融合蛋白質は、ヒト体内に投与された場合、脳内毛細血管の内皮細胞上に発現するhTfRと結合し、エンドサイトーシス等の機構により血液脳関門を通過して脳内に取り込まれる。従って、脳内で機能させるべき蛋白質をSc抗hTfR抗体と融合させたSc抗hTfR抗体融合蛋白質をヒトの血中に投与した場合、通常なら血液脳関門を通過することができず脳内で機能させることが期待できない蛋白質でも、脳内に到達させてその機能を発揮させることができるようになる。従って、Sc抗hTfR抗体融合蛋白質は、Sc抗hTfR抗体と融合させる蛋白質を適宜選択することにより、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、筋委縮性側索硬化症、脳腫瘍、脳障害を伴うリソソーム病、糖原病等の疾患に対する治療剤として利用できる。例えば、Sc抗hTfR抗体と融合させた神経成長因子 (NGF-Sc抗hTfR抗体) は、アルツハイマー病の痴ほう症治療薬として、Sc抗hTfR抗体と融合させた α -レーズロニダーゼはハーラー症候群の脳障害治療剤として、Sc抗hTfR抗体と融合させたイズロン酸-2-スルファターゼはハンター症候群の脳障害治療剤として使用できる。

[0026] その他、Sc抗hTfR抗体と融合させて薬効を発揮できる蛋白質としては、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、グリア細胞株神経栄養因子 (GDNF)、各種ニュートロフィン、アクチビン、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、上皮細胞増殖因子 (EGF)、各種サイトカイン、インタ

ーフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、インターロイキン6、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、PD-1等が挙げられる。

実施例

[0027] 以下、実施例を参照して本発明を更に詳細に説明するが、本発明が実施例に限定されることは意図しない。

[0028] [マウス1本鎖抗hTfR抗体cDNAライブラリの作製]

マウス脾臓から得た細胞を分割し、これを、ヒトトランスフェリン受容体 (hTfR) を構成するペプチド鎖の部分アミノ酸配列を有する3種類のペプチド、すなわち、ペプチド1 (アミノ酸配列を配列番号1で示す)、ペプチド2 (アミノ酸配列を配列番号2で示す)、ペプチド3 (アミノ酸配列を配列番号3で示す) 及びこれらペプチドを組合わせたものを用いて、体外免疫法によりそれぞれ免疫した。体外免疫法は概略以下の手法で行った。15mLの遠沈管にペプチドをそれぞれ1 nmolと、アジュバントとして、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン10mg/mLを5 μ L添加し、次いで、マウス脾臓から得た細胞を 1.5×10^7 個添加して室温で15分間静置した。次いで、IL-4、IL-13、抗-CD40抗体及びLPSを、終濃度がそれぞれ10ng/mL、10ng/mL、1 μ g/mL及び40 μ g/mLとなるように添加してから40% FBS含有RPMI1640培地を3.5mL添加し、5%CO₂存在下、37°Cで2日間培養した。更に、IL-21を、終濃度が10ng/mLとなるように添加し、同条件下で更に3日間培養した。

[0029] 免疫後の細胞から全RNAを抽出し、これを鋳型として1本鎖cDNAを合成した。1本鎖cDNAからPCRにより免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のcDNAをそれぞれ増幅した。免疫グロブリン軽鎖の増幅には、下記の配列番号10~27に示す塩基配列を有するフォワードプライマー:

- (1) VL-FW1 : ttcatggcggactacaaagayatccagctgactcagcc (配列番号10)
- (2) VL-FW2 : ttcatggcggactacaaagayattgttctcwcccagtc (配列番号11)
- (3) VL-FW3 : ttcatggcggactacaaagayattgtgmtmactcagtc (配列番号12)

- (4) VL-FW4 : ttcattggcggactacaaagayattgtgytracacagtc (配列番号 1 3)
(5) VL-FW5 : ttcattggcggactacaaagayattgtratgacmcagtc (配列番号 1 4)
(6) VL-FW6 : ttcattggcggactacaaagayattmagatramccagtc (配列番号 1 5)
(7) VL-FW7 : ttcattggcggactacaaagayattcagatgaydcagtc (配列番号 1 6)
(8) VL-FW8 : ttcattggcggactacaaagayatycagatgacacagac (配列番号 1 7)
(9) VL-FW9 : ttcattggcggactacaaagayattgttctcawccagtc (配列番号 1 8)
(10) VL-FW10 : ttcattggcggactacaaagayattgwgctsacccaatc (配列番号 1 9)
)
(11) VL-FW11 : ttcattggcggactacaaagayattstratgaccartc (配列番号 2 0)
)
(12) VL-FW12 : ttcattggcggactacaaagayrttktgatgaccarac (配列番号 2 1)
)
(13) VL-FW13 : ttcattggcggactacaaagayattgtgatgacbcaagc (配列番号 2 2)
)
(14) VL-FW14 : ttcattggcggactacaaagayattgtgataacycagga (配列番号 2 3)
)
(15) VL-FW15 : ttcattggcggactacaaagayattgtgatgaccagwt (配列番号 2 4)
)
(16) VL-FW16 : ttcattggcggactacaaagayattgtgatgacacaacc (配列番号 2 5)
)
(17) VL-FW17 : ttcattggcggactacaaagayattttgctgactcagtc (配列番号 2 6)
)
(18) VL-FW18 : ttcattggcggactacaaagatgctgttgactcaggaatc (配列番号 2 7)

と、下記の配列番号 2 8 ~ 3 2 に示す塩基配列を有するリバースプライマー
:

- (19) VL-RV1 : ggagccgccgccgcagaaccaccaccaccagaaccaccaccaccacgtttgat
ttccagcttgg (配列番号 2 8)

(20) VL-RV2 : ggagccgcccgcgcccagaaccaccaccaccagaaccaccaccaccacgttttat
ttccagcttgg (配列番号 29)

(21) VL-RV3 : ggagccgcccgcgcccagaaccaccaccaccagaaccaccaccaccacgttttat
ttccaactttg (配列番号 30)

(22) VL-RV4 : ggagccgcccgcgcccagaaccaccaccaccagaaccaccaccaccacgtttcag
ctccagcttgg (配列番号 31)

(23) VL-RV5 : ggagccgcccgcgcccagaaccaccaccaccagaaccaccaccaccacctaggac
agtcagtttgg (配列番号 32)

とを用いた。

[0030] なお、塩基配列中、「r」はg又はaを、「y」はt又はcを、「m」はa又はcを
、「k」はg又はtを、「s」はg又はcを、「w」はa又はtを、「b」はg、c又はt
を、「d」はa、g又はtを、「v」はa、g又はcを、それぞれ表す。

[0031] また、免疫グロブリン重鎖の増幅には、下記の配列番号 33～51 に示す
塩基配列を有するフォワードプライマー：

(1) VH-FW1 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgAKgTRMAgCTTCAggAgTC (配
列番号 33)

(2) VH-FW2 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgAggTBCAgCTBCAgCAgTC (配
列番号 34)

(3) VH-FW3 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCCAggTgCAgCTgAAgSASTC (配
列番号 35)

(4) VH-FW4 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgAggTCCARCTgCAACARTC (配
列番号 36)

(5) VH-FW5 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCCAggTYCAgCTBCAgCARTC (配
列番号 37)

(6) VH-FW6 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCCAggTYCARCTgCAgCAgTC (配
列番号 38)

(7) VH-FW7 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCCAggTCCACgTgAAgCAgTC (配
列番号 39)

(8) VH-FW8 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgAggTgAASSTggTggAATC (配列番号 4 0)

(9) VH-FW9 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgAVgTgAWgYTggTggAgTC (配列番号 4 1)

(10) VH-FW10 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgAggTgCAgSKggTggAgTC (配列番号 4 2)

(11) VH-FW11 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgAKgTgCAMCTggTggAgTC (配列番号 4 3)

(12) VH-FW12 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgAggTgAAgCTgATggARTC (配列番号 4 4)

(13) VH-FW13 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgAggTgCARCTTgTTgAgTC (配列番号 4 5)

(14) VH-FW14 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgARgTRAAgCTTCTCgAgTC (配列番号 4 6)

(15) VH-FW15 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgAAgTgAARSTTgAggAgTC (配列番号 4 7)

(16) VH-FW16 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCCAggTTACTCTRAAAgWgTSTg (配列番号 4 8)

(17) VH-FW17 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCCAggTCCAACVCAgCARCC (配列番号 4 9)

(18) VH-FW18 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgATgTgAACTTggAAgTgTC (配列番号 5 0)

(19) VH-FW19 : ggCggCggCggCTCCggTggTggTggATCCgAggTgAAggTCATCgAgTC (配列番号 5 1)

と、下記の配列番号 5 2 ~ 5 5 に示す塩基配列を有するリバープライマー :

(20) VH-RV1 : ggCAAgCTTTACCTgCAgCgAggAAACggTgACCGTggT (配列番号 5 2)

(21) VH-RV2 : ggCAA_gCTTTACCT_gCA_gC_gAg_gAgACT_gT_gAg_gT_ggT (配列番号 5 3)

(22) VH-RV3 : ggCAA_gCTTTACCT_gCA_gC_gCA_gAgACA_gT_gACCA_gAgT (配列番号 5 4)

(23) VH-RV4 : ggCAA_gCTTTACCT_gCA_gC_gAg_gAgAC_ggT_gACT_gAg_gT (配列番号 5 5)

とを用いた。

[0032] 次いで、上記PCRにより増幅させて得た免疫グロブリンの軽鎖cDNAと重鎖cDNAとを等モル混和してPCRを行い、軽鎖cDNAの3'側に、第1のリンカー配列として配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するペプチド鎖をコードする塩基配列を介して、重鎖cDNAが結合した1本鎖抗hTfR抗体をコードするcDNAを増幅させた。次いで、増幅させて得た1本鎖抗hTfR抗体をコードするcDNAを鋳型として、配列番号56に示す塩基配列 (ggcgaattcatggcggactacaaag) を有するフォワードプライマーと配列番号57に示す塩基配列 (ggcaagctttactgcagcg) を有するリバースプライマーとを用いてPCRを行った。得られた増幅産物をEcoRI/HindIIIで切断し、この増幅産物がコードするペプチド鎖のN末端側にマルトース結合蛋白質が融合するように、大腸菌発現用プラスミドのpMAL-c2E (New England Biolabs社) のEcoRI/HindIIIに組み込み、これを、マウス1本鎖抗hTfR抗体cDNAライブラリとした。なお、このcDNAライブラリの作成は、国際公開公報WO 2009/072660及び特開2012-29685に記載の方法に準じて行った。

[0033] [ヒト1本鎖抗hTfR抗体cDNAライブラリの作製]

上記マウス1本鎖抗hTfR抗体cDNAライブラリの作製と同様の手法により、ペプチド1 (配列番号1)、ペプチド2 (配列番号2)、ペプチド3 (配列番号3) 及びこれらペプチドを組合わせたものを用いて、ヒト末梢血単核球 (ロンザ社) を体外免疫法により免疫して全RNAを抽出し、これを鋳型として、ヒト1本鎖抗hTfR抗体cDNAライブラリを作成した。

[0034] [1本鎖抗hTfR抗体cDNAライブラリのスクリーニング]

大腸菌 (JM109) を、マウス及びヒト 1 本鎖抗hTfR抗体cDNAライブラリにより形質転換させた後、アンピシリン (Amp) を含むLBプレートに播種し、37°Cで一晩培養した。翌日、プレート上に形成されたコロニーを一つずつ採取し、96穴プレートに予め分注したOvernight Express™ Instant LB Medium (Novagen社) に植菌した。これを37°Cで一晩振とう培養した後、Popculture Reagent (Novagen社) を1/10量加えて溶菌し、次いで等量のTBS-Tを添加して遠心し、上清を回収した。この上清をサンプル溶液とした。

[0035] 96穴プレートの各穴に5 µg/mLの組換えヒトTfR (rhTfR) (Sino Biological社) 又はウシガンマグロブリン (バイオラッド社) を50 µL加え、4°Cで一晩静置した。溶液を除去した後、各穴を300 µL のTBS-Tで1回洗浄した。次いで、各穴に1% BSA溶液を300 µL加えて30分室温で静置した。溶液を除去した後、各穴に上記のサンプル液を100 µLずつ加えて室温で2時間静置した。溶液を除去した後、各穴を300 µL のTBS-Tで3回洗浄し、次いで50 µL のHRP標識抗MBP抗体 (ノバジェン社) を添加し1時間室温で静置した。溶液を除去した後、各穴を300 µL のTBS-Tで3回洗浄し、次いで50 µL のPOD基質溶液 (ナカライテスク社) を添加し、10~15分室温で反応させた。100 µL の0.2N HCl溶液を添加して反応を停止し、プレートリーダーで450nmの吸光度を測定して、rhTfRと親和性の高い1本鎖抗rhTfR抗体を発現するクローン (rhTfR高親和性クローン) を特定した。マウス1本鎖抗hTfR抗体cDNAライブラリからは、rhTfR高親和性クローンとして、M11、M23及びM27の3種類のクローンが得られた。また、ヒト1本鎖抗hTfR抗体cDNAライブラリからは、rhTfR高親和性クローンとして、1種のクローン (B84) が得られた。

[0036] なお、クローンM11はペプチド2 (配列番号2) 及びペプチド3 (配列番号3)、クローンM23はペプチド2 (配列番号2) 及びペプチド3 (配列番号3)、クローンM27はペプチド2 (配列番号2) 及びペプチド3 (配列番号3)、クローンB84はペプチド1 (配列番号1) で、それぞれ免疫した細胞由来の1本鎖抗hTfR抗体ライブラリをスクリーニングして得られたものであった。従って、クローンM11、クローンM23及びクローンM27は、ペプチド2又はペプ

チド3のアミノ酸配列の全部又は一部をエピトープとして認識するマウス1本鎖抗rhTfR抗体を発現するクローンであり、クローンB84はペプチド1のアミノ酸配列の全部又は一部をエピトープとして認識するヒト1本鎖抗rhTfR抗体を発現するクローンである。

[0037] [rhTfR高親和性クローンの解析]

上記スクリーニングで得た4種のrhTfR高親和性クローンから、発現ベクターを精製し、各クローンがコードする1本鎖抗rhTfR抗体のアミノ酸配列を解析した。その結果、クローンM11は配列番号4、クローンM23は配列番号5、クローンM27は配列番号6、クローンB84は配列番号7にそれぞれ示すアミノ酸配列を有する1本鎖抗rhTfR抗体をコードすることが判った。

[0038] [ヒトイズロン酸-2-スルファターゼと1本鎖抗rhTfR抗体との融合蛋白質の作成]

上記4種のrhTfR高親和性クローンから、発現ベクターを精製し、これをEcoRI/HindIIIで消化してアガロースゲル電気泳動に供し、1本鎖抗rhTfR抗体をコードする約700bpのDNA断片を切り出し、次いで、このDNA断片をpET32aベクターのEcoRI/HindIIIに組み込んだ。こうして得られたベクターを用いて大腸菌(JM109)を形質転換させた後、アンピシリン(Amp)を含むLBプレートに播種し、37°Cで一晩培養した。翌日、プレート上に形成されたコロニーをLB培地で培養した後、クローン毎にベクターを回収した。

[0039] 回収したベクターをBglII/NotIで消化してアガロースゲル電気泳動に供し、1本鎖抗rhTfR抗体をコードする約700bpのDNA断片を切り出した。ヒト胎盤cDNAライブラリ(タカラバイオ)を鋳型として、第一反応に用いる外側プライマーセット:

(a) I2S-f: ACGCCTATTGCTGCAGGATG (配列番号58), 及び

(b) I2S-r: AAACGACCAGCTCTAACTCC (配列番号59), 並びに

第二反応に用いる内側プライマーセット:

(c) I2S-f2: ATActcgagGCCACCATGCCGCCACCCCGG (配列番号60), 及び

(d) I2S-r2: TTCTTATgcggccgcTCAAGGCATCAACAA (配列番号61)

の2つのプライマーセットを用いてネスティッドPCRを行い、ヒトイズロン酸-2-スルファターゼ (hI2S) をコードする cDNAを含むDNA断片を増幅させた。この増幅産物を、XhoIとNotIで消化し、哺乳動物発現ベクターpE-neo7のXhoIとNotIサイトに組み込み、pE-neo-I2Sを得た。なお、pE-neo7は、国際公開公報W0 2012/101998に記載の方法で作成した。

[0040] pE-neo-hI2SをBglIII/NotIで消化し、これに上記のBglIII/NotIで消化した1本鎖抗hTfR抗体をコードする約700bpのDNA断片を組み込み、hI2SのN末端側に1本鎖抗hTfR抗体が融合した融合蛋白質 (hI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質) を哺乳動物細胞内で発現することのできるベクターを構築した。こうして得られたベクターを用いて大腸菌 (JM109) を形質転換させた後、アンピシリン (Amp) を含むLBプレートに播種し、37°Cで一晩培養した。翌日、プレート上に形成されたコロニーをLB培地で培養した後、コロニー毎にベクターを回収した。CHO細胞を、回収したベクターにより、エレクトロポレーション法を用いて形質転換させた後、ネオマイシン存在下で1週間選択培養して、hI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質を発現する薬剤耐性細胞を、クローン毎に得た。

[0041] クローン毎に得た薬剤耐性細胞を、200mLのOptiCHO培地 (Invitrogen社) を含む1L三角フラスコで培養し、培養7日目に培養上清を回収した。回収した培養上清を0.22 μ m膜フィルターで粒子を除去し、平衡化バッファー (20mM HEPES, 100mM NaCl, pH7.0) で平衡化させたHiTrap Q HP Sepharose カラム (カラム容量: 5mL) に付加した。次いで、カラムを5倍容の平衡化バッファー洗浄し、平衡化バッファーと溶出バッファー (20mM HEPES, 500mM NaCl, pH6.0) の直線グラジエントでhI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質を溶出させた。hI2Sの酵素活性の高い画分を纏めて、30kDa cutoffの限外濾過膜濃縮カラムを用いて約10倍に濃縮後、-80°Cで保存した。なお、hI2Sの酵素活性の測定は、国際公開公報W0 2012/101998に記載の方法に準じて行った。

[0042] [hI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質のマウスでの脳分布試験]

雄性C57BL/6Nマウスへ、組換えhI2S及びクローン毎 (M11, M23, M27, 及びB84) に得た上記精製したhI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質を3及び6mg/kgの用

量で尾静脈内投与した (n = 2 / 群)。投与から7時間後に、マウスをイソフルランで麻酔し、マウスの静脈から生理食塩水を灌流させた後、脳を採取した。採取した脳を、Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Co. LLC.) を含むT-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific K.K.) でホモジネートし、遠心して上清を回収した。回収した上清と、ビオチン化抗hI2Sモノクローナル抗体及びSulfo化抗hI2Sモノクローナル抗体とを混和し、室温で1時間反応させて、ビオチン化抗I2Sモノクローナル抗体、hI2S-scrhTfR抗体融合タンパク及びSulfo化hI2Sモノクローナル抗体の複合体を形成させた。次いで、上記複合体を含む反応液をStreptavidin Gold Plates (Meso Scale Diagnostics, LLC.) へ添加し1時間反応させて、上記複合体を、ビオチンとストレプトアビジンとの結合を介して、プレート上へ結合させた。プレートを洗浄後、SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC.) を用いて、プレートに電流を流すことにより上記複合体中のSulfo標識体に電気化学的刺激を与え、このときSulfo標識体から発せられる蛍光強度を測定することにより、hI2S-scrhTfR融合タンパクの濃度を測定した。なお、組換えhI2Sは、国際公開公報W02012/101998に記載の方法に準じて調製したものを使用した。

[0043] [hI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質のハンター症候群病態モデルマウスを用いた薬効評価]

ハンター症候群の病態モデルマウスである、雄性イズロン酸2-スルファターゼ遺伝子ノックアウトマウスに、ビヒクル (生理食塩水)、組換えhI2S (rhI2S)、及びクローンM11のhI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質を3 mg/kgの用量で、3日に1回、計3回、尾静脈内投与した (n=3/群)。最終投与から3日後にマウスをイソフルランで麻酔して放血致死させた後、脳を採取した。採取した脳を直ちに液体窒素中で急速凍結し、その後凍結乾燥した。次いで、凍結乾燥した脳を粉碎し、粉碎した脳組織を0.5 mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中に懸濁させ、これにアクチナーゼEを添加して60°Cで16時間静置し、タンパク質を消化させた。次いで、遠心して上清を回収し、Wieslab sGAG

quantitative kit (Euro-Diagnostica AB) を用いアルシアンブルー比色定量法により、上清中に含まれるhI2Sの基質であるグリコサミノグリカンの濃度を定量した。

[0044] [結果 1 : hI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質のマウスでの脳分布試験]

rhI2Sを投与したマウスでは、脳ホモジネート中のI2S濃度は、3及び6 mg/kg投与群ともに、0.01 µg/g湿重量未満であった。一方、クローン毎に得たhI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質を投与したマウスでは、脳ホモジネート中のI2S濃度が、rhI2Sを投与したマウスと比較して、10~20倍の高値を示した(図1A~図1C, クローンM23については示さず)。また、4種のクローン中、クローンB84のhI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質を投与したマウスでの脳ホモジネート中のI2S濃度が、最も高値であった(図1B)。この結果は、4種のクローンのsc抗hTfR抗体が、これらをhI2Sと融合させたとき、hI2Sを脳に効率良く輸送する機能を有することを示すものである。

[0045] [結果 2 : hI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質のハンター症候群病態モデルマウスを用いた薬効評価]

組換えhI2Sを投与したマウスでは、ビヒクルを投与したマウスと比較して、脳内に蓄積したグリコサミノグリカンの減少はほとんど観察されなかったが、hI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質を投与したマウスでは、グリコサミノグリカンの脳内での蓄積量が、ビヒクルを投与したマウスと比較して、約83%に減少した(図2)。この結果は、クローンM11のhI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質が、ハンター症候群病態モデルマウスの脳内に蓄積したグリコサミノグリカンを分解できることを示すものである。従って、hI2S-sc抗hTfR抗体融合蛋白質は、ハンター症候群の患者に投与したときに、患者の脳内に蓄積したグリコサミノグリカンを分解することにより、ハンター症候群における中枢神経障害を緩解し得る。

産業上の利用可能性

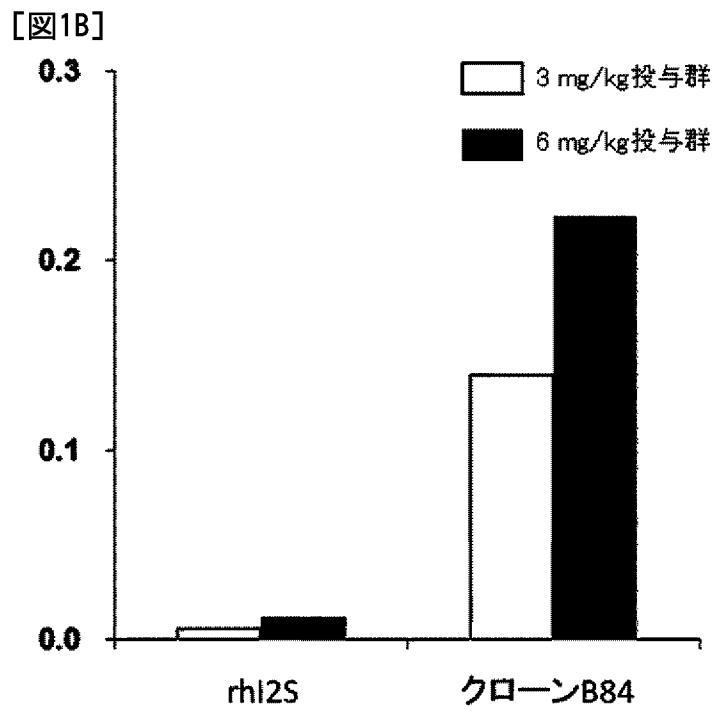
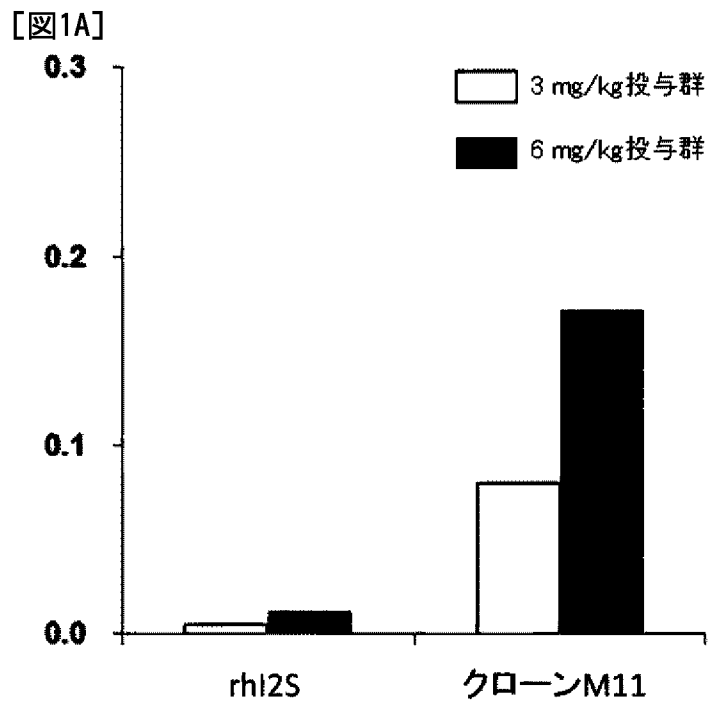
[0046] 本発明は、所望の生理活性蛋白質を、血液脳関門通過可能な1本鎖抗rhTfR抗体との融合蛋白質の形で、且つ通過後に中性神経系において機能し得る蛋

白質として提供できるため、血中に投与し中枢神経系において作用させるべき蛋白質を提供するものとして有用性が高い。

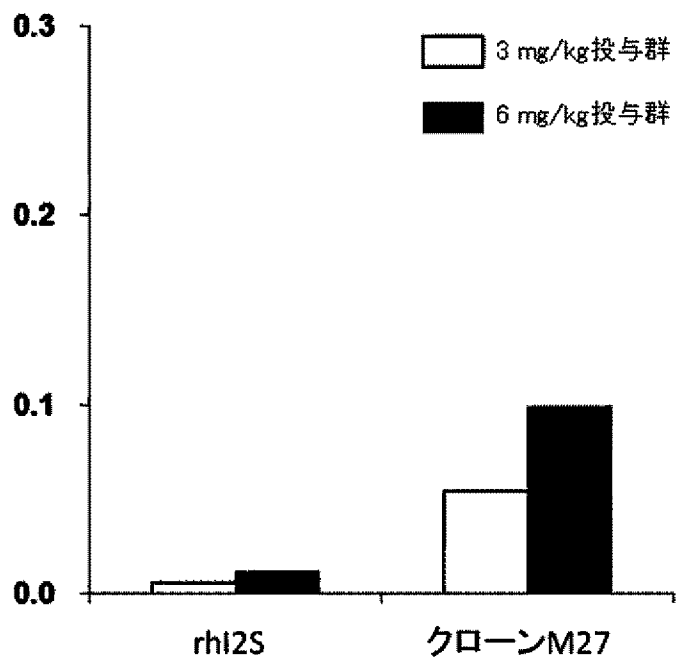
請求の範囲

- [請求項1] 配列番号 1, 2 及び 3 からなる群から選択される何れかのアミノ酸配列を認識する抗ヒトトランスフェリン受容体抗体。
- [請求項2] 該配列番号 1, 2 及び 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列中の少なくとも 10 個の連続するアミノ酸残基よりなる部分を認識する, 請求項 1 の抗ヒトトランスフェリン受容体抗体。
- [請求項3] 請求項 1 又は 2 の何れかの抗ヒトトランスフェリン受容体抗体であって,
軽鎖の可変領域の全て又は一部を含むアミノ酸配列と,
その C 末端側に第 1 のリンカー配列として結合した 15 ~ 25 個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列と,
更にその C 末端側に結合した, 重鎖の可変領域の全て又は一部を含むアミノ酸配列とを含んでなる 1 本鎖抗体である, 抗ヒトトランスフェリン受容体抗体。
- [請求項4] 配列番号 4, 5, 6 及び 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる, 請求項 3 の抗ヒトトランスフェリン受容体抗体。
- [請求項5] 請求項 1 ~ 4 の何れかの抗ヒトトランスフェリン受容体抗体と, その C 末端側に結合した他の蛋白質のアミノ酸配列とを含んでなる, 融合蛋白質。
- [請求項6] 請求項 1 ~ 4 の何れかの抗ヒトトランスフェリン受容体抗体と,
その C 末端側に第 2 のリンカー配列として結合した 3 ~ 50 個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列と,
更にその C 末端側に結合した他の蛋白質のアミノ酸配列とを含んでなる, 融合蛋白質。
- [請求項7] 該他の蛋白質がリソソーム酵素である, 請求項 5 又は 6 の融合蛋白質。
- [請求項8] 該リソソーム酵素がヒトイズロン酸-2-スルファターゼである, 請求項 7 の融合蛋白質。

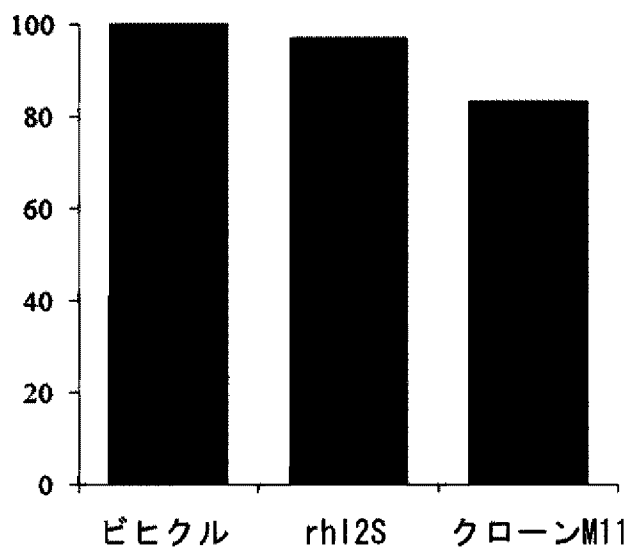
- [請求項9] 請求項 1 ～ 4 の何れかの抗ヒトトランスフェリン受容体抗体をコードする DNA。
- [請求項10] 請求項 5 ～ 8 の何れかの融合蛋白質をコードする DNA。
- [請求項11] 請求項 1 0 の DNA を組み込んだ哺乳動物発現用ベクター。
- [請求項12] 請求項 1 1 の哺乳動物発現用ベクターで形質転換させた哺乳動物細胞。
- [請求項13] 該哺乳動物細胞が CHO 細胞である，請求項 1 2 の細胞。



[図1C]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/084198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C07K16/18, C07K19/00, C12N5/071

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LI JY et al., Genetically engineered brain drug delivery vectors: cloning, expression and in vivo application of an anti-transferrin receptor single chain antibody-streptavidin fusion gene and protein, Protein Eng., 1999, Vol.12, No.9, pp.787-796, abstract, fig. 1, 6B, page 792, page 793, right column, lines 50 to 52	1-13

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

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

Date of the actual completion of the international search 23 March 2015 (23.03.15)	Date of mailing of the international search report 07 April 2015 (07.04.15)
---	--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/084198

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZEW E M et al., Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion, Immunotechnology, 1997, Vol.3, pp.127-136, abstract, fig. 2, 5, page 129, right column, chapter of '2.2. Construction of the pancRNase-anti-transferrin receptor scFv fusion protein', page 133, left column, chapter of '3.4. RNase-scFv fusions inhibit protein synthesis in three human tumor cell lines'	1-13
Y	NEWTON DL et al., Angiogenin single-chain immunofusions: influence of peptide linkers and spacers between fusion protein domains, Biochemistry, 1996, Vol.35, pp.545-553, abstract, fig. 1, 3, 7, page 546, right column, lines 4 to 24, page 548, left column, line 17 to right column, line 13, page 549, right column, lines 37 to 57	1-13
Y	ZHOU QH et al., Brain-penetrating IgG-iduronate 2-sulfatase fusion protein for the mouse, Drug Metab. Dispos., 2012, Vol.40, No.2, pp.329-335, abstract, fig. 6, page 335, left column, lines 18 to 32	1-13
Y	ZHOU QH et al., Selective plasma pharmacokinetics and brain uptake in the mouse of enzyme fusion proteins derived from species-specific receptor-targeted antibodies, J. Drug Target., 2012, Vol.20, No.8, pp.715-719, abstract, fig. 2, page 715, left column, line 2 to right column, line 2, page 718, right column, line 48 to page 719, left column, line 23	1-13
Y	JP 2013-507131 A (Armagen Technologies, Inc.), 04 March 2013 (04.03.2013), claims 50, 64; paragraphs [0002], [0082] & WO 2011/044542 A1 & US 2011/0110935 A1	1-13
A	LUO D et al., Construction and expression of bi-functional proteins of single-chain Fv with effector domains, J. Biochem., 1996, Vol.120, pp.229-232	1-13

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/09, C07K16/18, C07K19/00, C12N5/071</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2015年											
日本国実用新案登録公報	1996-2015年											
日本国登録実用新案公報	1994-2015年											
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), UniProt/GeneSeq</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>LI JY et al., Genetically engineered brain drug delivery vectors: cloning, expression and in vivo application of an anti-transferrin receptor single chain antibody-streptavidin fusion gene and protein, Protein Eng., 1999, Vol.12, No.9, pp.787-796, 要約, 図1, 図6B, 第792頁, 第793頁右欄第50-52行</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	LI JY et al., Genetically engineered brain drug delivery vectors: cloning, expression and in vivo application of an anti-transferrin receptor single chain antibody-streptavidin fusion gene and protein, Protein Eng., 1999, Vol.12, No.9, pp.787-796, 要約, 図1, 図6B, 第792頁, 第793頁右欄第50-52行	1-13				
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
Y	LI JY et al., Genetically engineered brain drug delivery vectors: cloning, expression and in vivo application of an anti-transferrin receptor single chain antibody-streptavidin fusion gene and protein, Protein Eng., 1999, Vol.12, No.9, pp.787-796, 要約, 図1, 図6B, 第792頁, 第793頁右欄第50-52行	1-13										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの											
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの											
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日 23.03.2015</p>	<p>国際調査報告の発送日 07.04.2015</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官（権限のある職員） 小金井 悟</p>	<table border="1"> <tr> <td>4B</td> <td>5804</td> </tr> </table>	4B	5804								
4B	5804											
<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>												

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ZEW E M et al., Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion, Immunotechnology, 1997, Vol. 3, pp.127-136, 要約, 図2, 図5, 第129頁右欄「2.2. Construction of the pancRNase-anti-transferrin receptor scFv fusion protein」の章, 第133頁左欄「3.4. RNase-scFv fusions inhibit protein synthesis in three human tumor cell lines」の章	1-13
Y	NEWTON DL et al., Angiogenin single-chain immunofusions: influence of peptide linkers and spacers between fusion protein domains, Biochemistry, 1996, Vol. 35, pp. 545-553, 要約, 図1、3、7, 第546頁右欄第4-24行, 第548頁左欄第17行-右欄第13行, 第549頁右欄第37-57行	1-13
Y	ZHOU QH et al., Brain-penetrating IgG-iduronate 2-sulfatase fusion protein for the mouse, Drug Metab. Dispos., 2012, Vol. 40, No. 2, pp. 329-335, 要約, 図6, 第335頁左欄第18-32行	1-13
Y	ZHOU QH et al., Selective plasma pharmacokinetics and brain uptake in the mouse of enzyme fusion proteins derived from species-specific receptor-targeted antibodies, J. Drug Target., 2012, Vol. 20, No. 8, pp. 715-719, 要約, 図2, 第715頁左欄第2行-右欄第2行, 第718頁右欄第48行-第719頁左欄第23行	1-13
Y	JP 2013-507131 A (アーメイゲン・テクノロジーズ・インコーポレイテッド) 2013.03.04 請求項50、64, 段落 [0002]、[0082] & WO 2011/044542 A1 & US 2011/0110935 A1	1-13
A	LUO D et al., Construction and expression of bi-functional proteins of single-chain Fv with effector domains, J. Biochem., 1996, Vol. 120, pp. 229-232	1-13