(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2023-500359
(P2023-500359A)
(43)公表日　令和5年1月5日(2023.1.5)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）	
Ａ６１Ｋ	*39/395(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	ＭＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ａ６１Ｋ	*9/127(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/127		４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*9/50 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/50		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ	*47/46 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/46		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*47/50 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/50		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全63頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-526371(P2022-526371)
(86)(22)出願日　令和2年11月4日(2020.11.4)
(85)翻訳文提出日　令和4年7月4日(2022.7.4)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/058968
(87)国際公開番号　WO2021/092080
(87)国際公開日　令和3年5月14日(2021.5.14)
(31)優先権主張番号　62/930,178
(32)優先日　令和1年11月4日(2019.11.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　522177994
アルナ バイオ， インコーポレーテッド
アメリカ合衆国 ジョージア州 ３０６０２， アセンズ， リバー ロード ４２５
(74)代理人　100158920
弁理士　上野 英樹
(72)発明者　スタイス， スティーブン， エル．
アメリカ合衆国 ジョージア州 ３０６０６， アセンズ， リバー ボトム ロード ３８０
(72)発明者　スウェテンバーグ， レイモンド
アメリカ合衆国 ジョージア州 ３０６０６， アセンズ， レイク ウェルブルック ドライブ １２４０
(72)発明者　カーティ， リアナ ケイ．
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞外小胞、及び抗体の送達のためのその使用

(57)【要約】
本明細書で開示されるのは、神経細胞、例えば神経前駆細胞又は神経幹細胞由来の細胞外小胞（ＥＶ）の表面に結合したポリペプチド（例えば、抗体又はその抗原結合部分）を対象に投与することにより、ポリペプチド、例えば抗体又はその抗原結合部分を対象の中枢神経系に送達する方法である。抗体又はその抗原結合部分などのポリペプチドに結合した神経ＥＶを含むコンジュゲート、及びその使用方法もまた提供される。また、本明細書では、神経細胞由来の細胞外小胞（ＥＶ）の内腔に装入されたポリペプチド（例えば、抗体又はその抗原結合部分）を対象に投与することによって、ポリペプチド、例えば抗体又はその抗原結合部分を送達する方法も開示される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗体又はその抗原結合部分を対象の中枢神経系（ＣＮＳ）へと送達する方法であって、該方法は、抗体又はその抗原結合部分と、神経細胞由来の細胞外小胞とを含むコンジュゲートを前記対象に投与するステップを含み、前記抗体又はその抗原結合部分は、クリックリンカーによって前記細胞外小胞の表面に結合される、方法。
【請求項２】
前記コンジュゲートは静脈内投与される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記コンジュゲートは鼻腔内投与される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記コンジュゲートは頭蓋内投与される、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記コンジュゲートは髄腔内投与される、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記神経細胞は神経前駆細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記神経前駆細胞はヒト多能性細胞由来である、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記ヒト多能性細胞はヒト胚性幹細胞である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記ヒト多能性細胞は人工多能性幹細胞である、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記抗体又はその抗原結合部分はＩｇＧである、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記抗体又はその抗原結合部分は、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、タンデムｓｃＦｖ、ダイアボディ、ミニボディ、及びシングルドメイン抗体からなる群から選択される抗体断片である、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記抗体又はその抗原結合部分は、ヒト化抗体又はその抗原結合部分である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記抗体又はその抗原結合部分は、完全ヒト抗体又はその抗原結合部分である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記クリックリンカーは、アジドクリック反応物とアルキンクリック反応物との間の反応から形成される、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
前記クリックリンカーは、アジドとジベンゾシクロオクチーン（ＤＢＣＯ）との間の反応から形成される、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記クリックリンカーは、テトラジンとトランスシクロオクテンとの間の反応から形成される、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記クリックリンカーは、テトラジンとノルボルネンとの間の反応から形成される、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記抗体は前記対象の脳に送達される、請求項１～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】

前記抗体は前記対象の脊髄に送達される、請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０】

前記ＥＶは、外因性核酸及び／又は外因性タンパク質を更に含む、請求項１～１９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２１】

前記ＥＶは、外因性ｓｉＲＮＡ及び／又はアンチセンス核酸を含む、請求項１８に記載の方法。

【請求項２２】

前記ＥＶは低分子を更に含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２３】

抗体－ＥＶ（Ａｂ－ＥＶ）コンジュゲートを含む組成物であって、前記コンジュゲートは、抗体又はその抗原結合部分と、神経細胞由来の細胞外小胞（ＥＶ）とを含み、前記抗体又はその抗原結合部分は、クリックリンカーによって前記ＥＶの表面に結合される、組成物。

【請求項２４】

前記神経細胞は神経前駆細胞である、請求項２３に記載の組成物。

【請求項２５】

前記神経前駆細胞はヒト多能性細胞由来である、請求項２４に記載の組成物。

【請求項２６】

前記ヒト多能性細胞は、ヒト胚細胞又は人工多能性細胞である、請求項２５に記載の組成物。

【請求項２７】

前記クリックリンカーは、アジドとジベンゾシクロオクチンとの間、テトラジンとトランスシクロオクテンとの間、テトラジンとノルボルネンとの間、アジドとアルキンとの間、アジド（歪み促進型）とアルキンとの間、アジド（歪み促進型）とニトロンとの間、アルケンとアジドとの間、アルケンとテトラジンとの間、及び／又はアルケンとテトラゾールとの間のうちのいずれか１つ以上の反応から形成される、請求項２３に記載の組成物。

【請求項２８】

前記抗体又はその抗原結合部分はＩｇＧである、請求項２３～２７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２９】

前記抗体又はその抗原結合部分は、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、タンデムｓｃＦｖ、ダイアボディ、ミニボディ、及びシングルドメイン抗体からなる群から選択される抗体断片である、請求項２３～２８のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３０】

前記抗体又はその抗原結合部分は、ヒト化抗体又はその抗原結合部分である、請求項２３～２９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３１】

前記抗体又はその抗原結合部分は、ソラネズマブ、アデュカヌマブ、ニボルマブ、ベバシズマブ、オクレリズマブ、ナタリズマブ、ジヌツキシマブ、ガンテネルマブ、レカネマブ、又はウブリツキシマブのうちのいずれか１つ以上である、請求項２３～３０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３２】

抗体又はその抗原結合部分を細胞外小胞（ＥＶ）の内腔に装入する方法であって、該方法は、ｉ）前記ＥＶをサポニンで処理して、前記ＥＶの膜を透過性にするステップと、ｉｉ）処理された前記ＥＶを超音波処理するステップと、ｉｉｉ）前記抗体又はその抗原結合部分を前記ＥＶに付加することによって、抗体又はその抗原結合部分を前記ＥＶの前記内腔に装入するステップとを含む、方法。

【請求項３３】

前記ＥＶは約０．０５％～０．３％のサポニンで処理される、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記抗体又はその抗原結合部分の装入時に、前記抗体の少なくとも１０％を前記ＥＶに装入するための十分な期間に亘って、前記ＥＶをインキュベートするステップを含む、請求項３２又は３３に記載の方法。
【請求項３５】
抗体又はその抗原結合部分を対象の中枢神経系（ＣＮＳ）へと送達する方法であって、該方法は、前記抗体又はその抗原結合部分を細胞外小胞（ＥＶ）の内腔に含む前記ＥＶを前記対象に投与するステップを含み、前記ＥＶは神経細胞由来である、方法。
【請求項３６】
前記神経細胞は神経前駆細胞である、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記神経前駆細胞はヒト多能性細胞由来である、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記ヒト多能性細胞はヒト胚性幹細胞である、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記ヒト多能性細胞は人工多能性幹細胞である、請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
前記抗体又はその抗原結合部分はＩｇＧである、請求項３５～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１】
前記抗体又はその抗原結合部分は、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、タンデムｓｃＦｖ、ダイアボディ、ミニボディ、及びシングルドメイン抗体からなる群から選択される抗体断片である、請求項３５～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
前記抗体又はその抗原結合部分は、ヒト化抗体又はその抗原結合部分である、請求項３５～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
前記抗体又はその抗原結合部分は、完全ヒト抗体又はその抗原結合部分である、請求項３５～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
前記抗体は前記対象の脳に送達される、請求項３５～４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
前記抗体は前記対象の脊髄に送達される、請求項３５～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記ＥＶは、外因性核酸及び／又は外因性タンパク質を更に含む、請求項３５～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記ＥＶは、外因性ｓｉＲＮＡ及び／又はアンチセンス核酸を含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記ＥＶは小分子を更に含む、請求項３５～４７のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【関連出願】
【０００１】
本出願は、２０１９年１１月４日出願の米国仮特許出願第６２／９３０，１７８号に対する優先権を主張するものである。上記の優先権を生じる出願の全内容は、参照により本

出願に援用される。
【技術分野】
【０００２】
本出願はＡＳＣＩＩフォーマットで電子提出された配列リストを含み、その配列リストは、その全体が参照により本出願に援用される。２０２０年１０月２９日に作成されたそのＡＳＣＩＩのコピーは、ファイル名がＡ１０６５２５＿１０４０ＷＯ＿ＳＬ．ｔｘｔであり、サイズが８６，４０２バイトである。
【背景技術】
【０００３】
アルツハイマー病の治療剤であるソラネズマブ及びアデュカヌマブを含む抗体系薬剤の近年の失敗により、ＣＮＳにおける効果的なバイオアベイラビリティのために投与経路としてＩＶを使用することを含む、ＣＮＳにおける治療用抗体を用いた治療の将来に関して、多くの疑問が提起されている。マウスでは、抗体濃度は、ＩＶで投与した場合に注入用量の約０．１％で脳において測定可能であり、極めて少量ではあるものの７２時間後まで検出可能である（非特許文献１）。同様に、ＩＶによって送達される抗体は、ヒト臨床試験において血清中に見られる濃度の０．１％のＣＳＦレベルが報告されており、これはＩｇＧがヒトの血液脳関門（ＢＢＢ）を容易には通過しないことを示している（非特許文献２）。
【０００４】
ＢＢＢトランスサイトーシスタンパク質に結合する一方の可変領域を含有し、他方の可変領域が関心対象である特定の標的に結合する、二重特異性抗体が生成されている。特にトランスフェリン受容体は、ＢＢＢを通過する強力な輸送因子であることが示されているものの、ヒトでの試験におけるその使用は、安全面での懸念によって妨げられている（非特許文献３）。近年、ＢＢＢを通過するＣＤ９８ｈｃ（非特許文献４）及びＦＣ５（非特許文献５）を含む、他の潜在的な二重特異性の標的が調査されているが、臨床的には依然として証明されていない。アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、ＢＢＢを通過する能力（非特許文献６）及び脳内の分泌抗体をコードできる外因性遺伝子を送達する能力（非特許文献７）の両方について、有望であることもまた示されている。しかしながらＡＡＶは、特に再投与時での高いクリアランス率、及びこれらの抗体の生成にあまりに高いエネルギを費やすニューロン又は他のＣＮＳ細胞の潜在的な衰退につながりやすい。従って、抗体などの治療用タンパク質を中枢神経系に送達する更なる方法に対する必要性が、当該技術分野において存在する。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００５】
【非特許文献１】Banks et al., Peptides, 2002. 23(12): p. 2223-6
【非特許文献２】Rubenstein et al., Blood. 2003. 101(2): p. 466-8
【非特許文献３】Couch et al., Sci Transl Med, 2013. 5(183): p. 183ra57, 1-12
【非特許文献４】Zuchero et al., Neuron, 2016. 89(1): p. 70-82
【非特許文献５】Muruganandam et al., 2002. 16(2): p. 240-242
【非特許文献６】Deverman et al., Nat Biotechnol, 2016. 34(2): p. 204-9
【非特許文献７】Ryan et al., 2010. 18(8): p. 1471-1481
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００６】
対象の脳及び中枢神経系への抗体などの治療用タンパク質の送達を向上させるために、本明細書では、神経の細胞外小胞（ＥＶ）を治療用タンパク質の担体として使用する方法が提供される。一態様では、本明細書では、抗体又はその抗原結合部分を対象の中枢神経系へと送達する方法が提供され、その方法は、抗体又はその抗原結合部分と、神経細胞由来の細胞外小胞とを含むコンジュゲートを対象に投与するステップを含み、その抗体又は

その抗原結合部分は、クリックリンカーによって上記細胞外小胞及び関連するタンパク質の表面に結合される。

【０００７】

一態様では、本明細書では、ポリペプチドを対象の中枢神経系へと送達する方法が提供され、その方法は、ポリペプチドと、神経細胞由来の細胞外小胞とを含むコンジュゲートを対象に投与するステップを含み、そのポリペプチドは、上記細胞外小胞及び関連するタンパク質の表面に、クリックリンカーによって結合される。例示の実施形態では、ポリペプチドは外因性ポリペプチドである。他の例示の実施形態では、ポリペプチドは治療用ポリペプチドである。

【０００８】

いくつかの実施形態では、上記コンジュゲートは静脈内投与される。

【０００９】

いくつかの実施形態では、上記コンジュゲートは鼻腔内投与される。

【００１０】

いくつかの実施形態では、上記コンジュゲートは対象の脳へと送達される。いくつかの実施形態では、上記コンジュゲートは、対象の血液脳関門を越えて送達される。

【００１１】

いくつかの実施形態では、神経細胞は神経前駆細胞である。いくつかのこのような実施形態では、神経前駆細胞はヒト多能性細胞由来である。特定の実施形態では、そのヒト多能性細胞はヒト胚性幹細胞である。他の実施形態では、そのヒト多能性細胞は人工多能性幹細胞である。

【００１２】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、ＩｇＧである。

【００１３】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、タンデムｓｃＦｖ、ダイアボディ、ミニボディ、及びシングルドメイン抗体からなる群から選択される抗体断片である。

【００１４】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、ヒト化抗体又はその抗原結合部分である。

【００１５】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、完全ヒト抗体又はその抗原結合部分である。

【００１６】

いくつかの実施形態では、クリックリンカーは、アジドクリック反応物とアルキンクリック反応物との間の反応から形成される。

【００１７】

いくつかの実施形態では、クリックリンカーは、アジドとジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）との間の反応から形成される。

【００１８】

いくつかの実施形態では、クリックリンカーは、テトラジンとトランスシクロオクテンとの間の反応から形成される。

【００１９】

いくつかの実施形態では、クリックリンカーは、テトラジンとノルボルネンとの間の反応から形成される。

【００２０】

いくつかの実施形態では、抗体は対象の脳に送達される。

【００２１】

いくつかの実施形態では、抗体は対象の中枢神経系に送達される。

【００２２】

いくつかの実施形態では、上記ＥＶは、外因性核酸及び／又は外因性タンパク質を更に含む。特定の実施形態では、上記ＥＶは、ｓｉＲＮＡ及び／又はアンチセンス核酸を含む。

【００２３】

いくつかの態様では、本明細書では、抗体－ＥＶ（Ａｂ－ＥＶ）コンジュゲートを含む組成物が提供され、そのコンジュゲートは、抗体又はその抗原結合部分と、神経細胞由来の細胞外小胞（ＥＶ）とを含み、抗体又はその抗原結合部分は、クリックリンカーによってＥＶの表面に結合される。

【００２４】

いくつかの実施形態では、神経細胞は神経前駆細胞である。いくつかのこのような実施形態では、神経前駆細胞はヒト多能性細胞由来である。特定の実施形態では、ヒト多能性細胞はヒト胚性幹細胞である。他の実施形態では、ヒト多能性細胞は人工多能性幹細胞である。

【００２５】

いくつかの実施形態では、クリックリンカーは、アジドとジベンゾシクロオクチンとの間、テトラジンとトランスシクロオクテンとの間、テトラジンとノルボルネンとの間、アジドとアルキンとの間、アジド（歪み促進型）とアルキンとの間、アジド（歪み促進型）とニトロンとの間、アルケンとアジドとの間、アルケンとテトラジンとの間、及び／又はアルケンとテトラゾールとの間のうちのいずれか１つ以上の反応から形成される。

【００２６】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分はＩｇＧである。

【００２７】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、タンデムｓｃＦｖ、ダイアボディ、ミニボディ、及びシングルドメイン抗体からなる群から選択される抗体断片である。

【００２８】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、ヒト化抗体又はその抗原結合部分である。

【００２９】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、ソラネズマブ、アデュカヌマブ、ニボルマブ、ベバシズマブ、オクレリズマブ、ナタリズマブ、ジヌツキシマブ、ガンテネルマブ、レカネマブ、又はウブリツキシマブのうちのいずれか１つ以上である。

【００３０】

いくつかの態様では、本明細書では、抗体又はその抗原結合部分を細胞外小胞（ＥＶ）の内腔に装入する方法が提供され、その方法は、ｉ）ＥＶをサポニンで処理して、ＥＶの膜を透過性にするステップと、ｉｉ）処理されたＥＶを超音波処理するステップと、ｉｉｉ）抗体又はその抗原結合部分をＥＶに付加することによって、抗体又はその抗原結合部分をＥＶの内腔に装入するステップとを含む。

【００３１】

いくつかの実施形態では、ＥＶは約０．０５％～０．３％のサポニンで処理される。

【００３２】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分を細胞外小胞（ＥＶ）の内腔に装入する上記方法は、抗体又はその抗原結合部分の装入時に、抗体の少なくとも１０％をＥＶに装入するための十分な期間に亘って、ＥＶをインキュベートするステップを含む。

【００３３】

いくつかの態様では、本明細書では、抗体又はその抗原結合部分を対象の中枢神経系（ＣＮＳ）へと送達する方法が提供され、その方法は、抗体又はその抗原結合部分を細胞外小胞（ＥＶ）の上記内腔に含むＥＶを対象に投与するステップを含み、ＥＶは神経細胞由来である。

【００３４】

いくつかの実施形態では、神経細胞は神経前駆細胞である。いくつかのこのような実施形態では、神経前駆細胞はヒト多能性細胞由来である。特定の実施形態では、ヒト多能性細胞はヒト胚性幹細胞である。他の実施形態では、ヒト多能性細胞は人工多能性幹細胞である。

【００３５】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、ＩｇＧである。

【００３６】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、タンデムｓｃＦｖ、ダイアボディ、ミニボディ、及びシングルドメイン抗体からなる群から選択される抗体断片である。

【００３７】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、ヒト化抗体又はその抗原結合部分である。

【００３８】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、完全ヒト抗体又はその抗原結合部分である。

【００３９】

いくつかの実施形態では、抗体は対象の脳に送達される。

【００４０】

いくつかの実施形態では、抗体は対象の脊髄に送達される。

【００４１】

いくつかの実施形態では、ＥＶは、外因性核酸及び／又は外因性タンパク質を更に含む。いくつかの実施形態では、ＥＶは、外因性ｓｉＲＮＡ及び／又はアンチセンス核酸を含む。いくつかの実施形態では、ＥＶは小分子を更に含む。

【図面の簡単な説明】

【００４２】

【図１】銅を使用しないクリックケミストリー反応を用いて抗体（Ａｂ）を細胞外小胞（ＥＶ）に結合させる例示の方法を示す概略図である。アジド基を非反応性の抗体に添加した。これとは別個に、アミン基を攻撃するＳＤＰカップリングによって、細胞外小胞（ＥＶ）をＤＩＢＯ基で修飾した。次に、銅を使用しないクリックケミストリー反応により、混合時に抗体をＥＶに結合させた。

【図２Ａ－２Ｂ】未結合の抗体（図２Ａ）又は神経前駆細胞由来の細胞外小胞に結合された抗体（図２Ｂ）を投与されたマウスから得られた、マウスの脳の切片の画像を提供する。核（青色）及び抗体（白色）シグナルが示されている。

【図３Ａ－Ｂ】様々な装入条件を用いた、神経前駆細胞由来の細胞外小胞（ＡＢ１２６）の内腔への抗体（図３Ａ）又はルシフェラーゼタンパク質（図３Ｂ）の装入効率を示す。

【発明を実施するための形態】

【００４３】

Ａ．定義

本発明がより容易に理解され得るように、初めに特定の用語を定義する。更に、あるパラメータの値又は値の範囲が記載されている場合は常に、記載されている値の中間にある値及び中間にある範囲も本発明の一部となることに留意されたい。

【００４４】

用語「約」又は「およそ」は通常、与えられている値又は範囲の５％以内、又はより好ましくは１％以内を意味する。

【００４５】

本明細書では、用語「抗体」は最も広い意味で使用され、これらに限定するものではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、ナノボディ、モノボディ、抗体ミメティック、及び所望の抗原結合活性を示す抗体断片を含む、標的抗原に結合する様々な構造を包含する。

【００４６】
いくつかの実施形態では、抗体は、ジスルフィド結合で相互接続された４つのポリペプチド鎖、即ち２つの重（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖を含む免疫グロブリン分子、並びにその多量体（例えばＩｇＭ）を含む。各重鎖（ＨＣ）は、重鎖可変領域（又はドメイン）（本明細書ではＨＣＶＲ又はＶＨと略す）及び重鎖定常領域（又はドメイン）を含む。重鎖定常領域は、３つのドメイン、即ちＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３を含む。各軽鎖（ＬＣ）は、軽鎖可変領域（本明細書ではＬＣＶＲ又はＶＬと略す）及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は１つのドメイン（ＣＬ１）を含む。ＶＨ領域及びＶＬ領域は、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変性の領域へと更に細分化されることができ、これらには、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる、より保存された領域が点在する。ＶＨ及びＶＬはそれぞれ、３つのＣＤＲ及び４つのＦＲで構成され、これらはアミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４で配置される。免疫グロブリン分子は、いずれかの種類（例えばＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、又はサブクラスであり得る。

【００４７】
本明細書で使用される場合、用語「ＣＤＲ」又は「相補性決定領域」は、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見られる、非隣接抗原結合部位を指す。これらの特定の領域については、Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609－6616 (1977)及びKabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991)によって、Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901－917 (1987)によって、並びにMacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732－745 (1996)によって説明されており、ここで定義には、互いに比較した場合のアミノ酸残基の重複又はサブセットが含まれる。

【００４８】
用語「Ｆｃドメイン」は、インタクト抗体のパパイン消化によって生成されることができる、免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を定義するために使用される。Ｆｃドメインは、天然配列Ｆｃドメイン又は多様体Ｆｃドメインであってもよい。免疫グロブリンのＦｃドメインは、一般に２つの定常ドメイン、即ちＣＨ２ドメイン及びＣＨ３ドメインを含み、また任意でＣＨ４ドメインを含むことができる。Ｆｃ部分でのアミノ酸残基を置換して抗体エフェクタ機能を改変することは、当該技術分野において公知である（Winter, et al.、米国特許第５，６４８，２６０号、米国特許第５，６２４，８２１号）。抗体のＦｃドメインは、例えば抗体及び抗体－抗原複合体のサイトカイン誘導、ＡＤＣＣ、食作用、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、及び半減期／クリアランス率などの、複数の重要なエフェクタ機能を仲介する。特定の実施形態では、Ｆｃドメイン含有結合タンパク質のＦｃドメイン内において少なくとも１つのアミノ酸残基が改変（例えば削除、挿入、又は置換）されることにより、その結合タンパク質のエフェクタ機能が改変される。

【００４９】
本明細書で使用される場合、「インタクト」又は「全長」抗体は、４つのポリペプチド鎖、即ち２つの重（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖を含む抗体を指す。一実施形態では、インタクト抗体はインタクトＩｇＧ抗体である。

【００５０】
本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指す。即ち、その集団を構成する個々の抗体は、可能性のある多様体抗体、例えば自然に発生する変異を含有する又はモノクローナル抗体の生成中調製物の生成中に発生する可能性のある多様体抗体（このような多様体は一般に微量だけ存在する）を除いて、配列が同一であり、同一のエピトープに結合する。異なる複数の決定基（エピトープ）に対する異なる複数の抗体を典型的には含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、１つの抗原での単一の決定基に向けられる。よって、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体の集団か

ら得られるという抗体の特徴を示すものであり、何らかの特定の方法による抗体の生産を必要とするものとして解釈されない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、これらに限定するものではないが、ハイブリドーマ法、組み換えＤＮＡ法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含む、多様な技法によって作製されることができ、モノクローナル抗体の作製のためのこれらの方法及び他の例示の方法が、本明細書で説明される。

【００５１】

本明細書で使用される場合、用語「ヒト抗体」は、フレームワーク領域及びＣＤＲ領域の両方がヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列由来である可変領域を有する抗体を指す。更に、抗体が定常領域を含有する場合、その定常領域もヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列由来である。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えばインビトロでのランダムな若しくは部位特異的な変異誘発によって、又はインビボでの体細胞変異によって導入される変異）を含んでもよい。しかしながら、本明細書で使用される場合、用語「ヒト抗体」は、マウスなどの別の哺乳類種の生殖細胞系列に由来するＣＤＲ配列がヒトフレームワーク配列にグラフトされている抗体を含むことは意図されていない。

【００５２】

用語「ヒト化抗体」は、マウスなどの１つの非ヒト哺乳類種での、生殖細胞系列由来のＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列にグラフトされている抗体を指すことが意図される。更なるフレームワーク領域の修飾を、ヒトフレームワーク配列及び／又は非ヒトＣＤＲ配列内で実施してもよい。例えば非ヒト抗体である抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化がなされた抗体を指す。

【００５３】

用語「キメラ抗体」は、可変領域配列がある種に由来し、かつ定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば可変領域配列がマウス抗体に由来し、かつ定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を指すことが意図される。

【００５４】

抗体の「抗体断片」、「抗原結合断片」、又は「抗原結合部分」は、インタクト抗体の一部分を含み、かつそのインタクト抗体が結合する抗体に結合する、インタクト抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定するものではないが、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）２、ダイアボディ、直鎖抗体、単鎖抗体分子（例えばｓｃＦｖ）、及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。

【００５５】

「多重特異性抗原結合ポリペプチド」又は「多重特異性抗体」は、２つ以上の抗原又はエピトープを標的とするものである。「二重特異性（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ）」、「二重特異性（ｄｕａｌ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ）」、又は「二重機能性（ｂｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ）」抗原結合ポリペプチド又は抗体は、２つの異なる抗原結合部位を備えるハイブリッド分子である。二重特異性抗原結合ポリペプチド及び抗体は、多重特異性抗原結合ポリペプチド又は多重特異性抗体の例であり、これらに限定するものではないが、ハイブリドーマの融合、又はＦａｂ’断片若しくは半抗体の連結を含む、多様な方法で生産されることができる。例えばSongsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79: 315－321、Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547－1553, Brinkmann and Kontermann. 2017. MABS. 9(2):182－212を参照。二重特異性抗原結合ポリペプチド又は抗体の２つの結合部位は、例えば、２つの異なるエピトープに結合することになり、それらは同一のタンパク質標的にあっても、異なるタンパク質標的にあってもよい。

【００５６】

用語「抗体ミメティック」又は「抗体模倣物」は、抗体とは構造的に関連していないものの、抗原に特異的に結合できる分子を指す。抗体ミメティックの例としては、限定する

ものではないが、アドネクチン（即ちフィブロネクチン系結合分子）、アフリン、アフィマー、アフィチン、アルファボディ、アフィボディ、ＤＡＲＰｉｎ、アンチカリン、アビマー、フィノマー、Ｋｕｎｉｔｚドメインペプチド、モノボディ、ｎａｎｏＣＬＡＭＰ、ナノボディ、ユニボディ、バーサボディ、アプタマー、及びペプチド分子が挙げられ、これらは全て従来の抗体結合を模倣するものの、異なる機序から生成されて異なる機序によって機能する、結合構造を用いている。用語「自家ＥＶ」は、ＥＶの投与対象である１人の対象又は患者由来の細胞から得られる、ＥＶの集団を説明するために使用される。

【００５７】

本明細書で使用される場合、用語「中枢神経系」又は「ＣＮＳ」は、硬膜内の全ての構造を指す。このような構造としては、限定するものではないが、脳及び脊髄の細胞及び組織が挙げられる。ＣＮＳは、脳室及び脊髄中心管を満たす脳脊髄液も含む。

【００５８】

本明細書で使用される場合、用語「有効量」又は「治療有効量」は、障害又はその１つ以上の症状の重篤度及び／又は期間を低減又は改善する、障害の進行を防止する、障害の退行を引き起こす、障害に関連する１つ以上の症状の再発、発症、兆候、又は進行を防止する、あるいは別の療法の予防又は治療効果を強化又は向上させるために十分な薬剤の量、例えばエクソソームであるＥＶを含む組成物の量を指す。

【００５９】

用語「胚性幹細胞」は、好ましくはヒトを含む霊長類の、胚盤胞期の胚から単離された多能性細胞を指す。

【００６０】

本明細書では、用語「細胞外小胞」及び「ＥＶ」は、脂質二重層、例えば原形質膜の一部分によって取り囲まれた、約１０ｎｍ～１０μｍの小胞を指すために使用される。ＥＶは、細胞からの流体、巨大分子、溶質、及び代謝物を含有することができる。用語「ＥＶ」はまた、神経ＥＶなどの細胞由来のＥＶ中に見られる生物活性分子を含有するように操作された脂質小胞を含む。これらの用語は、エクソソーム及びエクトソームの両方を包含する。ＥＶは、複数の単離技法、例えば遠心分離法、ろ過法、及び超遠心分離法の組み合わせを用いて、適切な生物学的出所から得ることができる。エクソソームは、多胞体（ＭＶＢ）のエキソサイトーシスにおいて放出される。エクトソームは、原形質膜において集合して原形質膜から放出される小胞である。一部の例では、ＥＶのサイズは約２０ｎｍ～１０μｍ、２０ｎｍ～１μｍ、２０ｎｍ～５００ｎｍ、２０ｎｍ～２００ｎｍ、３０ｎｍ～１００ｎｍ、３０ｎｍ～１６０ｎｍ、又は８０～１６０ｎｍである。いくつかの実施形態では、ＥＶは、サイズが約２０～１５０ｎｍのエクソソームである。ＥＶは、これらに限定するものではないが、全血、血清、血漿、母乳、脳脊髄液、羊水、腹水、又は骨髄を含む、哺乳類由来のいずれかの適した生物学的試料から単離され得る。いくつかの実施形態では、ＥＶは、培養された哺乳類細胞（例えば未熟な樹状細胞（野生型又は不死化）、人工及び非人工多能性幹細胞、線維芽細胞、血小板、免疫細胞、網赤血球、腫瘍細胞、間葉系幹細胞、衛星細胞、造血幹細胞、膵臓幹細胞、白色及びベージュ前脂肪細胞など）から単離されることができる。例示の実施形態では、ＥＶは、神経細胞（例えば神経前駆細胞、神経幹細胞、グリア細胞、星状細胞、ニューロンなど）から単離されることができる。

【００６１】

用語「ヒト多能性幹細胞」（「ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）」及びヒト人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）はそのサブセットである）は、受精後のいずれかの時点の前胚性、胚性、胎児組織又は成体幹細胞（ヒト人工多能性幹細胞の場合）に由来し、適切な条件下において、特に神経幹細胞及び前駆細胞、神経堤細胞、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）、並びに関連する増殖性及び非増殖性神経細胞を含む、複数の異なる細胞種の子孫を産生することができるという特徴を有する。その用語は、様々な種類の幹細胞の確立された系統と、本明細書に記載されているような多能性を有する、一次組織から得られた細胞との両方を含む。

【００６２】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な」は、化合物の生物学的活性又は特性を無効化しない、毒性が比較的低い、担体、賦形剤又は希釈剤などの材料を指す。即ちその材料は、望ましくない生物学的影響を引き起こすことなく、又はその材料が含有される組成物のいずれの成分とも有害な相互作用を起こすことなく、個体に投与されることができる。いくつかの例では、「薬学的に許容可能な」担体又は賦形剤は、合理的な利益／リスク比で、過度な毒性、刺激、アレルギー反応、免疫原性、又は合併症を伴わずに、ヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに適した化合物を指す。

【００６３】

本明細書で使用される場合、「リンカー」は、共有結合、又は抗体をＥＶに共有結合させて抗体－ＥＶコンジュゲートを形成する原子の鎖を含む、２価の化学部分を意味する。ペプチド又は巨大分子のいずれかの既知の結合方法を、本開示の状況において使用することができる。一般に、抗体とＥＶとの共有結合には、リンカーが２つの反応性官能基を有すること、即ち反応性の点で２価性であることが必要である。２つ以上の機能性部分又は生物学的活性部分を結合させるために有用な２価リンカー反応物が公知であり、そのような結合方法は、例えば、Hermanson, G. T. (1996) Bioconjugate Techniques、Academic Press: New York, p234－242に記載されている。その文献の開示は、共有結合に適したリンカーに関連し、参照により本出願に援用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、「クリックリンカー」を利用する。これは、２つの相補的なクリック官能基の間の反応から生成される。

【００６４】

用語「リンカー」が、結合形態の結合部を説明する際に使用される場合、リンカーと細胞外細胞膜結合部分との間、及び／又はリンカーと部位特異的修飾ポリペプチドとの間の結合の形成により、反応性末端のうちの一方又は両方はなくなっている（化学部分に変換されている）か、又は不完全となっている（例えばカルボン酸のカルボニルのみとなっている）。従って、本明細書で使用されるリンカーとしては、限定するものではないが、リンカーでの反応性官能基と抗体での求核性基又は他の反応性置換基との間のカップリング反応によって形成される化学部分を含有するリンカー、及びリンカーでの反応性官能基とＥＶでの求核性基との間のカップリング反応によって形成される化学部分を含有するリンカーが挙げられる。

【００６５】

これらのカップリング反応によって形成される化学部分の例は、求核反応物／求電子反応物のペア（例えばチオール／ハロアルキルのペア、アミン／カルボニルのペア、又はチオール／α，β不飽和カルボニルのペアなど）、ジエン／ジエノフィルのペア（例えば特にアジド／アルキンのペア、又はジエン／α，β不飽和カルボニルのペア）などを含む、化学反応性官能基間の反応によってもたらされる。化学部分を形成するための反応性官能基間のカップリング反応としては、限定するものではないが、チオールのアルキル化、ヒドロキシルのアルキル化、アミンのアルキル化、アミン又はヒドロキシルアミンの縮合、ヒドラジン形成、アミド化、エステル化、ジスルフィド形成、環状付加（例えば特に［４＋２］ディールス・アルダー環状付加、［３＋２］ヒュスゲン環状付加）、求核反応物の芳香族置換、求電子反応物の芳香族置換、及び当該技術分野で公知の又は本明細書に記載の他の反応様式が挙げられる。適したリンカーは、抗体、ＥＶ、又はこれら両方の求核性官能基との反応のために、求電子性官能基を含有してもよい。

【００６６】

用語「神経細胞」は、ニューロンで構成された繊維の紐状の束である１つ又は複数の神経に関連する細胞である。神経細胞は典型的には、神経前駆細胞（ＮＰＣ）に由来する。いくつかの実施形態では、神経細胞は、神経前駆細胞又は多能性幹細胞からインビトロで得ることができる。例示の実施形態では、本明細書で言及される神経細胞は、ヒト神経細胞である。いくつかの実施形態では、神経細胞は、ニューロン、グリア細胞、星状細胞、希突起膠細胞、ミクログリア細胞、シュワン細胞、又は神経膠細胞であることができる。他の実施形態では、神経細胞は神経前駆細胞又は神経幹細胞であることができる。用語「

神経前駆細胞」及び「神経幹細胞」は、複数の神経細胞及びグリア細胞種のうちの制限されたレパートリーに分化する能力を有する多能性細胞を指す。いくつかの実施形態では、神経前駆細胞は、多能性幹細胞から、例えば人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）又は胚性幹細胞（ＥＳ細胞）から、インビトロで得ることができる。例示の実施形態では、本明細書で言及される神経前駆細胞はヒト神経前駆細胞である。いくつかの実施形態では、神経前駆細胞は形質転換されていないものであることができる。いくつかの実施形態では、神経前駆細胞は増殖性である。いくつかの実施形態では、神経前駆細胞は、分化することなく表現型を維持する。

【００６７】

用語「神経ＥＶ」は、神経細胞、例えば神経前駆細胞に由来する、細胞由来のＥＶを指すために使用される。この用語はまた、細胞由来のＥＶ中に見られる十分な数の生物活性分子を含有することによって、実質的に同一の生物学的活性を有するように操作された小胞を指す。

【００６８】

本明細書に記載の「神経血管修復」は、脳への神経血管損傷の後に起こる回復を指す。神経血管損傷は、脳、脳幹、並びに脊椎、脳底動脈、及び頸動脈を含む上部脊髄への供給を行う、主要な血管への損傷を指す。これらの血管は頭蓋外及び頭蓋内の両方に位置し、損傷は、これらの位置のうちの一方又は両方で発生し得る。１つの例では、神経血管修復は、神経新生及び血管新生の増加、並びに／又は出血を取り除いて治癒のための環境を作り出すグリア細胞の動員があるときに発生する。星状細胞、周皮細胞、マトリックスプロテアーゼ、及び血管平滑筋細胞も、神経血管修復において重要な役割を果たす。

【００６９】

本明細書で使用される場合、用語「試料」は、対象から採取された標本（例えば細胞（例えば神経細胞）、組織、血液、血液成分（例えば血清又は血漿）、尿、唾液、羊水、脳脊髄液、膵液、絨毛膜絨毛試料、及び骨髄）を指す。

【００７０】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、投与又は治療の標的であるいずれかの生物を指す。「対象」は、生物、例えば哺乳類（例えばヒト、非ヒト哺乳類、非ヒト霊長類、霊長類、実験動物、マウス、ラット、ハムスター、ネコ、又はイヌ）であることができる。一実施形態では、対象はヒト対象である。用語「患者」は、臨床医、例えば内科医の治療下にあるヒト対象を指す。対象はオスであってもメスであってもよい。

【００７１】

用語「治療する」及び「治療」は、疾患、病的状態、若しくは障害の軽減、改善、安定化（即ち悪化させないこと）、予防、又は治癒を目的とした、対象の医学的管理を指す。この用語は、能動的治療（疾患、病的状態、又は障害の軽減を目的とした治療）、原因治療（関連する疾患、病的状態、又は障害の原因に向けられた治療）、緩和治療（症状の緩和のために設計された治療）、予防治療（関連する疾患、病的状態、又は障害の発症を最小限に抑える、又は部分的に若しくは完全に阻害することを目的とした治療）、及び支持治療（別の療法を補足するために使用される治療）を含む。治療は、検出可能か検出不可能かにかかわらず、疾患又は状態の程度の減少、疾患又は状態の拡大の防止、疾患又は状態の進行の遅延又は低速化、疾患又は状態の改善又は緩和、及び寛解（部分的な又は完全な）を含む。疾患又は状態を「改善する」又は「緩和する」とは、治療を行わない場合の程度又は時間経過と比較した場合に、疾患、障害、若しくは状態の程度及び／若しくは望ましくない臨床症状が減少する、並びに／又は進行の時間経過が遅く若しくは長くなることを意味する。治療は、症状又は疾患の完全な改善を必要とせず、症状及び／又はその根底にあるリスク因子を低減する実施形態を包含する。「治療」は、治療を受けていない場合に予想される生存と比較して、生存が延長されることも意味することができる。治療を必要とする者としては、状態又は障害を既に有する者、及び状態若しくは障害を起こしやすい者、又は状態若しくは障害を予防すべき者が挙げられる。用語「予防する」は、事象の可能性を１００％排除することを要求するものではない。むしろこの用語は、事象の発

生の可能性が、化合物又は方法の存在時に低下したことを示す。

【００７２】

本発明により、当該技術分野の技能の範囲内である従来の細胞培養方法、化学合成方法、並びに他の生物学的及び薬学的技法を用いてもよい。このような技法は公知であり、そうでない場合でも文献で十分に説明されている。細胞の増殖のための標準的な技法、細胞の分離のための標準的な技法、並びに関連する場合には、ＤＮＡリガーゼ、ＤＮＡポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどが関与する酵素反応のためのクローニング、ＤＮＡの単離、増幅及び精製のための標準的な技法、並びに様々な分離技法は、当業者によって知られておりかつ一般に使用されているものである。多数の標準的な技法が、Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York、Maniatis et al., 1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York、Wu (Ed.) 1993 Meth. Enzymol. 218, Part I、Wu (Ed.) 1979 Meth. Enzymol. 68、Wu et al., (Eds.) 1983 Meth. Enzymol. 100 and 101、Grossman and Moldave (Eds.) 1980 Meth. Enzymol. 65、Miller (Ed.) 1972 Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York、Old and Primrose, 1981 Principles of Gene Manipulation, University of California Press, Berkeley、Schleif and Wensink, 1982 Practical Methods in Molecular Biology、Glover (Ed.) 1985 DNA Cloning Vol. I and II, IRL Press, Oxford, UK、Hames and Higgins (Eds.) 1985 Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK;及びSetlow and Hollaender 1979 Genetic Engineering: Principles and Methods, Vols. １－４, Plenum Press, New Yorkに記載されている。略語及び命名法が使用されている場合、これらは当該技術分野において標準的なものとみなされ、本明細書で引用されているものなどの専門誌において一般に使用されている。

【００７３】

ある値の範囲が提供されている場合、文脈からそうでないことが明らかでない（多数の炭素原子を含む基の場合など。この場合には、その範囲内にある各炭素原子数が提供される）限り、その範囲の上限と下限との間の、下限の単位の１／１０までの各中間値、及び言及されている範囲内の他のいずれかの言及されている値又は中間値が、本発明に含まれることが理解される。これらのより小さな範囲に独立して含まれ得る、これらのより小さな範囲の上限及び下限もまた、言及されている範囲内の特に除外された限界を条件として、本発明に含まれる。言及されている範囲がこれらの限界値のうちの一方又は両方を含む場合、含まれているこれらの限界値のいずれか又は両方を除外した範囲も、本発明に含まれる。

【００７４】

異なる定義がされていない限り、本明細書において使用される全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する分野の当業者が一般に理解する意味と同一の意味を有する。本明細書に記載されているものと同様又は同等であるいずれの方法及び材料も本発明の実施又は試験に使用されることができるが、ここでは好ましい方法及び材料について説明する。

【００７５】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される、単数形「ａ」「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、文脈からそうでないことが明確でない限り、複数についての言及を含む。

【００７６】

Ｂ．細胞外小胞（ＥＶ）、及び治療用タンパク質の送達

本発明は、抗体などの治療用ポリペプチドを、例えば神経細胞由来のエクソソーム及び／又は微小胞などの神経の細胞外小胞（ＥＶ）の表面に結合させた上記ポリペプチドを投与することによって、例えば対象の血液脳関門を越えて、対象の中枢神経系へ送達する方法に向けられる。更に提供されるのは、これらに限定するものではないが、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、認知症、神経系の癌、例えば神経膠芽腫又は中

枢神経系に転移した癌を含む、神経障害及び損傷の治療に関連する様々な用途において、ポリペプチド－ＥＶコンジュゲート、例えば抗体（Ａｂ）－ＥＶコンジュゲートを使用する方法である。更に、抗体又はその抗原結合断片にカップリングされた神経ＥＶを含むコンジュゲート、及びその使用方法が、本明細書において提供される。

【００７７】

本発明はまた、抗体などの治療用ポリペプチドを、例えば神経細胞由来のエクソソーム及び／又は微小胞などの神経の細胞外小胞（ＥＶ）の内腔に装入された上記ポリペプチドを投与することによって、例えば対象の血液脳関門を越えて、対象の中枢神経系へ送達する方法にも関する。更に提供されるのは、これらに限定するものではないが、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、認知症、神経系の癌、例えば神経膠芽腫又は中枢神経系に転移した癌を含む、神経障害及び損傷の治療に関連する様々な用途において、内腔装入済みのＥＶを使用する方法である。

【００７８】

細胞外小胞は、脂質二重層、例えば細胞原形質膜の一部分によって取り囲まれた、小さな構造の混成群を含む。ＥＶのサイズは直径約１０ｎｍ～１０μｍとすることができ、最も一般的には約２５～５００ｎｍであることができる。ＥＶは大まかに２つの種類、即ちエクソソーム及びエクトソームに分けることができる。エクソソームは、多胞体（ＭＶＢ）の成熟期でのエンドソーム膜の内向きの出芽を通じて、細胞によって形成され得る。そして、ＭＶＢと細胞表面との融合によって、エクソソームは細胞外空間に放出されることができる。エクソソームは典型的には直径２５～５００ｎｍであり、いくつかの実施形態では約２５～２５０ｎｍ、約５０～１５０ｎｍ、又は約５０～２００ｎｍであり得る。微小胞としても知られるエクトソームは、原形質膜の出芽を通じて細胞によって形成され得る。エクトソームのサイズは約１０ｎｍから１０μｍまで様々であり得、いくつかの実施形態では約１０～１０００ｎｍ、又は約５０～５００ｎｍであり得る。

【００７９】

本発明のコンジュゲート及び方法での使用に適したＥＶは、いずれの適した出所に由来するものであってもよい。例えばＥＶは、神経幹細胞、神経前駆細胞、又はニューロン、グリア細胞、若しくは星状細胞などの分化した神経細胞などの、神経細胞に由来するものであってもよい。本明細書に記載の方法での使用に適したＥＶは、合成によって生産されることもできる。例示の実施形態では、本明細書に記載の抗体コンジュゲートで使用されるＥＶは、神経前駆細胞又は神経幹細胞由来である。

【００８０】

ＥＶは細胞間コミュニケーションに関与し、細胞膜との融合によって、あるいはこれらに限定するものではないが、カベオリン非依存性機序及びカベオリン依存性機序、クラスリン非依存性機序及びクラスリン依存性機序、マクロ飲作用、並びに／又は食作用を含む、細胞への取り込みを通じて、ＥＶから細胞への物質の移動を可能にする。ＥＶは、免疫調節、血管新生、腫瘍増殖に関連する内皮細胞の移動、又は虚血再灌流障害における損傷の低減を含む、多数の生理学的プロセスに関与することが報告されている。これらの機能の多くは、小胞内又は小胞表面に含まれるタンパク質、核酸、又は脂質によって仲介される。

【００８１】

ＥＶは内腔にカーゴを有することができ、脂質二重層に埋め込んだり、脂質二重層に付着させたりすることができる。このカーゴは、タンパク質、脂質、及び／又は核酸、例えばｍＲＮＡ若しくはｍｉＲＮＡを含むことができる。ＥＶが細胞によって産生される場合、カーゴの組成は細胞種に強く依存する。例えば、星状細胞、神経前駆細胞、及び間葉系幹細胞に由来するＥＶはそれぞれ、タンパク質カーゴの異なる補体を含有することが示されている（例えば米国特許出願公開第２０１８／０３２７７１４号を参照。その文献の全内容は参照により本出願に援用される）。これらの異なる細胞種由来のＥＶはまた、ｍＲＮＡ及び／又はｍｉＲＮＡを含む、異なる特性の核酸分子を含有する。ＥＶが細胞から得られる実施形態では、ＥＶは、このＥＶが由来する細胞によって産生されるＥＶの内容物

を反映する内因性カーゴを含有する。いくつかの実施形態では、細胞から得られたＥＶは外因性カーゴも含有することができる。外因性カーゴはタンパク質、核酸、小分子、又は脂質を含み、細胞外空間への小胞の放出に続いて小胞を操作することによってＥＶに導入される。他の実施形態では、細胞から得られたＥＶは外因性カーゴを含有することができ、これはこのＥＶが由来する細胞内に組み換え核酸が存在することにより、ＥＶ内へとパッケージングされる。例えば、組み換えタンパク質を含有するＥＶは、このタンパク質をコードする組み換え核酸を含有する細胞から得ることができる。ＥＶが合成によって生産される実施形態では、小胞内に含めるために適したカーゴが選択されることができる。例えば一実施形態では、合成ＥＶは、例えば神経前駆細胞、ニューロン、グリア細胞、又は星状細胞である神経細胞に由来するＥＶ内に存在する１つ以上のタンパク質、脂質、又は核酸を含有することができる。

【００８２】

細胞由来のＥＶ、例えばエクソソームは、その細胞起源を反映した多様な生物学的分子を含む。一実施形態では、本発明は、例えば神経前駆細胞である神経細胞由来のＥＶの集団を提供する。このような神経ＥＶは、神経細胞由来の、サイトカイン及び増殖因子並びにコーディング及び非コーディングＲＮＡ分子などの様々なタンパク質環境を含有する。神経ＥＶに含有されるカーゴは、神経保護の提供；炎症の低減；Ｔ細胞、マクロファージ、及びミクログリアに作用することによる免疫調節；酸化ストレスの低減；血管の完全性の向上；代謝活性への影響；並びに神経新生、細胞移動、再髄鞘形成及び分化の増大による神経再生効果の誘発によって、神経及び血管機能に影響を及ぼすことができる。理論によって束縛されるものではないが、神経細胞（例えば神経前駆細胞、神経幹細胞）由来のＥＶの表面に発現される天然タンパク質の組み合わせは、他の出所由来のＥＶに比べて、小胞によるＣＮＳの局在化及び血液脳関門の横断を、より高い程度まで可能にすると考えられている。ＣＮＳを標的化する及び／又は血液脳関門を横断する能力は、本明細書で示されているように、抗体でＥＶを表面標識することによって妨げられない。更に、神経細胞（例えば神経前駆細胞、神経幹細胞）由来のＥＶを含むＥＶ－抗体コンジュゲートは、機能的にインタクトな抗体及びその抗原結合断片を、脳及び中枢神経系内の標的への送達のために、血液脳関門を越えて輸送することができる。

【００８３】

いくつかの実施形態では、神経細胞由来のＥＶ、例えばエクソソームは、これらに限定するものではないがＣＤ６３、ＣＤ８１、及びＣＤ１３３を含む、膜タンパク質を含有することができる。従って一実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲート及び方法における使用に適したＥＶ、例えばエクソソームは、細胞表面タンパク質ＣＤ６３、ＣＤ８１、及びＣＤ１３３のうちの１個以上（即ち１個以上、２個以上、又は３個全て）を含む。更に、ＥＶ、例えばエクソソームは、ｈｓａ－ｍｉＲ－１３５ａ－２、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２４－１、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２４－２、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２４－３、ｈｓａ－ｍｉＲ－４８９、ｈｓａ－ｍｉＲ－９－３、ｈｓａ－ｍｉＲ－９－２、ｈｓａ－ｍｉＲ－９－１、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１９ｂ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１９ａ－２、ｈｓａ－ｍｉＲ－３６３、及び／又はｈｓａ－ｍｉＲ－２０ｂのｍｉＲＮＡうちの１個以上（即ち１個以上、２個以上、３個以上、４個以上、５個以上、６個以上、７個以上、８個以上、９個以上、１０個以上、１１個以上、又は１２個全て）を含むことができる。一実施形態では、単離されたＥＶの集団は、上述のｍｉＲＮＡのうちの１つ以上に関して濃縮されている。濃縮は、絶対量として、又は非神経細胞、例えば間葉系幹細胞由来の未修飾のエクソソームと比較した場合などの相対量として、測定されることができる。

【００８４】

（ｉ）ＥＶの生産

本明細書で開示されるコンジュゲート及び方法における使用に適したＥＶは、様々な細胞種によって産生されることができ、又は合成によって生産されることができる。一実施形態では、ＥＶは、神経前駆細胞、ニューロン、星状細胞、希突起膠細胞、ミクログリア、シュワン細胞、又は神経膠細胞などの神経細胞に由来するものであることができる。い

くつかの実施形態では、ＥＶは、形質転換された細胞株によって産生されることができる。他の実施形態では、ＥＶは、形質転換されていない細胞株によって産生されることができる。いくつかの実施形態では、ＥＶは、外因性ポリペプチド及び／又は核酸を発現する、操作された細胞株、例えば組み換え細胞株によって産生されることができる。他の実施形態では、ポリペプチド－ＥＶコンジュゲートは、他の出所からのＥＶ、例えば、これらに限定するものではないが、血小板、網赤血球、免疫細胞、腸上皮細胞、腫瘍細胞、ＨＥＬＡ細胞、間葉系幹細胞、ヒト胚性腎細胞（ＨＥＫ細胞）、及びあらゆる種類の初代細胞を含む、細胞種から生成されたＥＶを用いて、産生されることができる。他の実施形態では、ＥＶは、例えば乳、初乳などの体液から単離されることができる。

【００８５】

一実施形態では、ＥＶはエクソソームを含むことができ、又は本質的にエクソソームからなるものであることができる。エクソソームは上述の細胞種のいずれに由来するものであってもよい。例えば、本明細書で開示されるコンジュゲート及び方法における使用に適したエクソソームは、神経エクソソームであることができる。神経エクソソームは、これらに限定するものではないが、神経前駆細胞、ニューロン、星状細胞、希突起膠細胞、ミクログリア、シュワン細胞、又は神経膠細胞を含む、神経細胞に由来するものであることができる。別の実施形態では、エクソソームは合成によって生産される。

【００８６】

別の実施形態では、ＥＶは、微小胞としても知られるエクトソームを含むことができ、又は本質的にエクトソームからなるものであることができる。微小胞は上述の細胞種のいずれに由来するものであってもよい。例えば、本明細書で開示されるコンジュゲート及び方法における使用に適した微小胞は、神経微小胞であることができる。神経微小胞は、これらに限定するものではないが、神経前駆細胞、ニューロン、星状細胞、希突起膠細胞、ミクログリア、シュワン細胞、又は神経膠細胞を含む、神経細胞に由来するものであることができる。別の実施形態では、微小胞は合成によって生産される。

【００８７】

いくつかの例では、本開示のＥＶは、細胞がＥＶを産生するための十分な時間に亘って、神経細胞などの細胞を培養することによって得ることができる。ＥＶを産生するために使用される細胞は、いくつかの実施形態では、多能性幹細胞から、例えばヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）又は人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）から得ることができる。

【００８８】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞から分化した神経細胞、例えば神経前駆細胞から、ＥＶが単離される。多能性幹細胞は、ステージ特異的胚性抗原（ＳＳＥＡ）３及び４のうちの１つ以上と、Ｔｒａ－１－６０及びＴｒａ－１－８１の抗体を用いて検出可能なマーカーとを発現し得る（Thomson et al., Science 282:1145, 1998）。インビトロでの多能性幹細胞の分化は、（存在する場合は）ＳＳＥＡ－４、Ｔｒａ－１－６０、及びＴｒａ－１－８１の発現の喪失、並びにＳＳＥＡ－１の発現の増加をもたらす。未分化の多能性幹細胞は典型的には、アルカリホスファターゼ活性を有し、これは４％パラホルムアルデヒドで細胞を固定してから、製造元（Vector Laboratories、カリフォルニア州バーリンゲーム）の説明に従ってＶｅｃｔｏｒ　Ｒｅｄを基質として用いて発達させることによって検出されることができる。また、未分化の多能性幹細胞は典型的には、抗体又はＲＴ－ＰＣＲで検出されるように、Ｏｃｔ－４及びＴＥＲＴを発現する。一実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲートにおいて使用についてＥＶは、ヒトＥＳ細胞由来の神経前駆細胞によって産生されることができる。別の実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲートにおいて使用するためのＥＶは、ヒトｉＰＳ細胞由来の神経前駆細胞によって産生されることができる。

【００８９】

使用され得る多能性幹細胞の種類としては、受精後に形成される組織に由来する多能性幹細胞の確立された系統を含み、その組織としては、典型的には妊娠およそ１０～１２週であるが必ずしもそうではない、妊娠中のいずれかの時点において採取される、前胚性組

織（例えば胚盤胞など）、胚性組織、又は胎児組織が挙げられる。限定でない例としては、ヒト胚性幹細胞又はヒト胚性生殖細胞の確立された倫理的な系統、例えばヒト胚性幹細胞株ＷＡ０１、ＷＡ０７、及びＷＡ０９（ＷｉＣｅｌｌ）などである。このような細胞の初期確立又は安定化期における本開示の組成物の使用も考えられ、この場合には、出所となる細胞は、出所となる組織から直接採取された一次多能性細胞である。また、フィーダー細胞の不在下で既に培養された多能性幹細胞集団から採取された細胞も好適である。また、例えばＢＧ０１ｖ（ViaCyte、カリフォルニア州サンディエゴ）などの変異ヒト胚性幹細胞株、並びにＷＡ０１、ＷＡ０７、ＷＡ０９（WiCell、ウィスコンシン州マディソン）、及びＢＧ０１、ＢＧ０２（ViaCyte、カリフォルニア州サンディエゴ）などの正常ヒト胚性幹細胞株も好適である。

【００９０】

ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）は、例えばThomson et al.（米国特許第５，８４３，７８０号；Science 282:1145, 1998、Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7844, 1995）によって説明されているような、当該技術分野において説明されている方法によって、調製されることができる。あるいはこれらを商業的に入手してもよい。

【００９１】

ｉＰＳＣは、成体の体細胞を脱分化させて多能性状態に戻すことによって作製される。ｉＰＳＣは、これらに限定するものではないが、４つの遺伝子（ｃ－ｍｙｃ、Ｋｌｆ４、ＳＯＸ２、ＯＣＴ４）の人工的発現、又はそれに類似のものを含む、いずれかの適した方法によって生成されることができる。

【００９２】

ヒト神経前駆（ｈＮＰ）細胞をヒト胚性幹細胞（ＥＳＣ）から産生するための方法は、例えば米国特許第７，５３１，３５４号に記載されており、その文献は参照によりその全体が本出願に援用される。ヒト神経前駆細胞（ｈＮＰ）は、ネスチン、Ｍｕｓａｓｈｉ－１、ＳＯＸ１、ＳＯＸ２、及びＳＯＸ３を含む、最も早期の多能性神経幹細胞に関連するマーカーを発現することが知られている。１つの例では、ｈＮＰはＳＯＸ１を発現する（ＳＯＸ１＋）。別の例では、ｈＮＰはＳＯＸ２を発現する（ＳＯＸ２＋）。他のいくつかの例では、ｈＮＰはＳＯＸ３を発現する（ＳＯＸ３＋）。いくつかの具体的な例では、ｈＮＰはネスチン、Ｍｕｓａｓｈｉ－１、ＳＯＸ１、ＳＯＸ２、及びＳＯＸ３のうちの少なくとも１つを発現する。他の例では、ｈＮＰはネスチン、Ｍｕｓａｓｈｉ－１、ＳＯＸ１、ＳＯＸ２、及びＳＯＸ３のうちの２つ以上を発現する。更に別の例では、ｈＮＰはネスチン、Ｍｕｓａｓｈｉ－１、ＳＯＸ１、ＳＯＸ２、及びＳＯＸ３のうちの３つ以上を発現する。いくつかの例では、ｈＮＰはネスチン、Ｍｕｓａｓｈｉ－１、ＳＯＸ１、ＳＯＸ２、及びＳＯＸ３のうちの少なくとも１つを発現するが、ＯＣＴ４は発現しない。他のいくつかの例では、ｈＮＰはネスチン、Ｍｕｓａｓｈｉ－１、ＳＯＸ１、ＳＯＸ２、及びＳＯＸ３のうちの少なくとも２つを発現するが、ＯＣＴ４は発現しない。更に別の例では、ｈＮＰはネスチン、Ｍｕｓａｓｈｉ－１、ＳＯＸ１、ＳＯＸ２、及びＳＯＸ３のうちの少なくとも３つを発現するが、ＯＣＴ４は発現しない。ある具体的な例では、ｈＮＰはＳＯＸ１、ＳＯＸ２、及びＳＯＸ３を発現するが、ＯＣＴ４は発現しない。神経前駆細胞は、フィーダー細胞を用いて又は用いずに培養されることができる。いくつかの例では、米国特許第７，５３１，３５４号で提示されている方法に従って産生された神経前駆細胞は、フィーダー細胞を含まず、また胚様体も含まない。

【００９３】

本開示のＥＶは、いくつかの例では、直接的又は間接的に多能性幹細胞に由来するグリア細胞などの分化した神経細胞を、ＥＶを産生するための条件下でＥＶを産生するための十分な時間に亘って細胞培養培地で培養し、ＥＶを培養培地から単離することによって得ることができる。グリア細胞の種類としては、希突起膠細胞、星状細胞、上衣細胞、シュワン細胞、ミクログリア、及び衛星細胞が挙げられる。１つの例では、分化した神経細胞（例えばグリア細胞）は星状細胞を含む。使用できる分化した神経細胞としては、ｈＮ２

（商標）神経細胞（ArunA Biomedical Inc.）、ＮｅｕｒｏＮｅｔ（商標）ニューロン、及びＡｓｔｒｏＰｒｏ（商標）星状細胞（ArunA Biomedical Inc.）が挙げられる。

【００９４】

ＥＶは、細胞培養培地又は組織培養上清から単離されることができる。細胞から産生されたＥＶは、いずれかの適した方法で培養培地から回収されることができる。典型的には、単離されたＥＶの集団は、遠心分離、サイズ排除カラム、マイクロ流体デバイス、ポリマー沈殿、ろ過、又はこれらの方法の組み合わせによって、細胞培養物又は組織上清から調製されることができる。例えばＥＶは、米国特許出願公開第２０１４０３５６３８２号に記載されるようにしてして調製されることができ、その文献はその全体が参照により本出願に援用される。例えばＥＶは、分画遠心分離、即ち比較的大きな粒子をペレット化するための低速（＜２，０００ｇ）での遠心分離、及びこれに続くＥＶをペレット化するための高速（＞１００，０００ｇ）での遠心分離、適切なフィルタ（例えば０．２２μｍフィルタ）を用いたサイズろ過、勾配超遠心分離（例えばショ糖勾配を用いた）、又はこれらの方法の組み合わせによって調製されることができる。

【００９５】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるＥＶ産生ＮＰ細胞及び／又は神経細胞は、細胞及びそのＥＶ産生能力に応じて、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、若しくは１４日間に亘って、あるいは約１、２、３、４、５、６、７、８週間、又は約１、２、３、４、５、若しくは６ヶ月もの長期間に亘って、培養される。ＥＶ産生細胞は、当業者によって容易に決定される条件下で、適した培地で培養して増殖させることができる。細胞培養条件は細胞種によって変化し得る。これ以降に提示される例は、適した培地及び条件を例示するものである。例えばエクソソーム欠失ウシ胎児血清（例えば１０％）を含み、任意でグルタミン又はグルタミン含有混合物及び抗生物質を補充した、ＣＭＲＬ　１０６６培地（Invitrogen製）を使用してもよい。細胞は、いくつかの実施形態では表面に付着させて増殖させることができ、例えば細胞は、表面（フィーダー細胞を含有しない）での単層又は複層として増殖させることができ、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、９５、又は１００％コンフルエントとなるまで増殖させることができる。他の実施形態では、細胞は、細胞凝集体として、又は浮遊培養中のマイクロビーズ上で、増殖させることができる。

【００９６】

細胞増殖培地は当該技術分野において公知であり、少なくとも最小必須培地に加えて、増殖因子、アスコルビン酸、グルコース、非必須アミノ酸、塩（微量元素を含む）、グルタミン、インスリン（指示されており除外されていない場合）、アクチビンＡ、トランスフェリン、β－メルカプトエタノール、及び当該技術分野において公知である本明細書の他の箇所で説明されている他の化学物質などの１つ以上の任意の成分を含む。好ましい培地は、神経細胞を支援する、低タンパク質の無血清増殖培地である。使用される増殖因子は、線維芽細胞増殖因子２（ＦＧＦ２）とすることができ、これは単独であるか、又は好ましくは白血病抑制因子（ＬＩＦ）と組み合わされる。増殖培地で増殖させるＮＰ又は神経細胞に応じて、ＬＩＦを含むことが好ましいが、これは必要でない場合もある。更なる培地としては基底細胞培地が挙げられ、これは血清、例えば約０．１％～２０％（好ましくは約２～１０％）のウシ胎児血清を含有してもよく、又は合成培地については、ウシ胎児血清及びＫＳＲを含まず、任意でウシ血清アルブミン（約１～５％、好ましくは約２％）を含む。いくつかの例では、培地は合成されており、無血清であり、タンパク質含有量が低い。他の例では、培地はＡｒｕｎＡ製の培地及びサプリメントであり、これらは神経培養物が、フィーダー細胞を必要とすることなく複数の継代に亘って安定した核型を維持でき、初期段階の創薬を含む多様な研究用途にとって優れた選択肢となる。増殖培地の成分は、増殖させる神経細胞の種類に依存し、それらは全て当該技術分野において公知である。１つの例では、ＡＢ２（商標）Ｎｅｕｒａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉａ　Ｋｉｔが使用され、これはＡＢ２（商標）Ｂａｓａｌ　Ｎｅｕｒａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ

及びＡＮＳ（商標）Ｎｅｕｒａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔを含有する。ある具体的な例では、上記例の培地及びサプリメントを、神経細胞の培養の要件を満たす汎用性のために特別に操作する。ＡＢ２（商標）Ｂａｓａｌ　Ｎｅｕｒａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ及びＡＮＳ（商標）Ｎｅｕｒａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔは、ｈＮＰ１（商標）系統の分化を様々な神経表現型へと向けるための特別な培地のためのベースとして使用することができる。培地及びサプリメントの各ロットは、細胞増殖、無菌性、ｐＨ、浸透圧、及びエンドトキシンに関する試験を行うことにより、使用について事前検定されている。

【００９７】

培地に任意で添加してもよい他の化学物質としては、培地で増殖させる細胞種に応じて、多数の成分の中でも特に、ニコチンアミド；ＴＧＦ－β１、２、及び３を含むＴＧＦ－βファミリーのメンバー；アクチビンＡ；Ｎｏｄａｌ；骨形態形成タンパク質（ＢＭＰ２～７）；血清アルブミン；線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）ファミリーのメンバー；血小板由来増殖因子－ＡＡ及び－ＢＢ；血小板に富む血漿；インスリン増殖因子（ＩＧＦ－Ｉ、ＩＩ、ＬＲ－ＩＧＦ）；増殖分化因子（ＧＤＦ－５、－６、－８、－１０、１１）；グルカゴン様ペプチド－Ｉ及びＩＩ（ＧＬＰ－Ｉ及びＩＩ）；ＧＬＰ－１及びＧＬＰ－２ミメトボディ；エクセンディン－４；副甲状腺ホルモン；インスリン；プロゲステロン；アプロチニン；ヒドロコルチゾン；エタノールアミン；上皮増殖因子（ＥＧＦ）；ガストリンＩ及びＩＩ；例えばトリエチレンペンタミンなどの銅キレート剤；フォルスコリン；Ｎａ－ブチレート；ベータセルリン；ＩＴＳ；Ｎｏｇｇｉｎ；神経突起増殖因子；Ｎｏｄａｌ；バルプロ酸；トリコスタチンＡ；酪酸ナトリウム；肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）；スフィンゴシン－１；ＶＥＧＦ；ＭＧ１３２（ＥＭＤ、カリフォルニア州）；Ｎ２及びＢ２７サプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カリフォルニア州）；例えばシクロパミン（ＥＭＤ、ＣＡ）などのステロイドアルカロイド；ケラチノサイト増殖因子（ＫＧＦ）；Ｄｉｃｋｋｏｐｆタンパク質ファミリー；ウシ下垂体抽出物；膵島新生関連タンパク質（ＩＮＧＡＰ）；インディアンヘッジホッグ；ソニックヘッジホッグ；プロテアソーム阻害剤；ノッチ経路阻害剤；ソニックヘッジホッグ阻害剤；ヘレグリン；又はこれらの組み合わせのうちのいずれか１つ以上が挙げられる。これらの成分が含まれる場合、これらの成分はそれぞれ有効量で含まれる。

【００９８】

いくつかの例では、適した培地は、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、Ｇｉｂｃｏ　＃１１９６５－０９２；ノックアウトダルベッコ改変イーグル培地（ＫＯＤＭＥＭ）、Ｇｉｂｃｏ　＃１０８２９－０１８；ハムＦ１２／５０％ＤＭＥＭ基礎培地；２００ｍＭ　Ｌ－グルタミン、Ｇｉｂｃｏ　＃１５０３９－０２７；非必須アミノ酸溶液、Ｇｉｂｃｏ　１１１４０－０５０；β－メルカプトエタノール、Ｓｉｇｍａ　＃Ｍ７５２２；ヒト組み換え塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、Ｇｉｂｃｏ　＃１３２５６－０２９などの成分から作製されてもよい。他の適した反応物としては、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ（Gibco）、ＢｒａｉｎＰｈｙｓ（Stem Cell Technologies）、及び／又はＮｅｕｒｏＤｉｆｆ（Stem Cell Technologies）が挙げられる。

【００９９】

細胞培地は市販されており、Invitrogen Corp.（GIBCO）、Cell Applications, Inc.、Biological Industries、Beth HaEmek（イスラエル）、及びCalbiochemから入手可能なものなどの合成された異種由来成分を含まない成分を含め、市販の成分で補足されることができる。当業者は、本発明による標的細胞のうちのいずれか１つ以上を産生するために、細胞培地を容易に改変することができる。

【０１００】

本開示のＥＶ産生細胞は、その細胞を様々な方法で支援するフィーダー細胞の層上で培養されてもよい。細胞をフィーダー細胞の層上で培養するための方法は、当該技術分野において公知である。細胞は、細胞支持体若しくはマトリックス上で、接着性の単層として又は懸濁液中の細胞凝集体として増殖させることができる。いくつかの例では、ＥＶを産

生するために使用される細胞に応じて、細胞支持体の使用が好ましい場合がある。細胞支持体が使用される場合、これは好ましくは、少なくとも１つの基質タンパク質を含む。基質タンパク質としては、例えば細胞外マトリックス中に見られるタンパク質である細胞外マトリックスタンパク質、例えばラミニン、テネイシン、トロンボスポンジン、及びこれらの混合物が挙げられ、これらは増殖の促進を示し、上皮増殖因子（ＥＧＦ）に対する相同性を有するドメインを含有し、増殖促進活性を示す。使用され得る他の基質タンパク質としては、例えばコラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ポリリジン、ポリオルニチン、及びこれらの混合物が挙げられる。更に、ゲル、及びこれらの胚性幹細胞分化タンパク質のうちの１つ以上を有効濃度で含有する他のゲルのメチルセルロースなどの他の材料も、使用されることができる。例示の分化タンパク質又はこれらの分化タンパク質を含む材料としては、例えば組み換えラミニン、ＢＤ　Ｃｅｌｌ－Ｔａｋ（商標）細胞・組織接着剤、ＢＤ（商標）ＦＩＢＲＯＧＥＮヒト組み換えコラーゲンＩ、ＢＤ（商標）ＦＩＢＲＯＧＥＮヒト組み換えコラーゲンＩＩＩ、ＢＤ　Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）基底膜マトリックス、ＢＤ　Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）高濃度（ＨＣ）基底膜マトリックス、ＢＤ（商標）ＰｕｒａＭａｔｒｉｘ（商標）ペプチドヒドロゲル、コラーゲンＩ、高濃度（ＨＣ）コラーゲンＩ、コラーゲンＩＩ（ウシ）、コラーゲンＩＩＩ、コラーゲンＩＶ、コラーゲンＶ、及びコラーゲンＶＩが特に挙げられる。

【０１０１】

あるいはこれらの細胞は、フィーダー細胞を含まない培養システム、又はフィーダー細胞を基本的に含まないが、それでもＥＶを産生するための細胞の増殖を支援する培養システムで培養されることができる。フィーダー不使用の培養における細胞の増殖は、別の細胞種で事前に培養を行うことによって調質された培地を用いて支援されることができる。あるいは、分化を伴わないフィーダー不使用の培養におけるＥＶ産生細胞の増殖は、化学的に合成された培地を用いて支援されることができる。これらの方法は当該技術分野において公知である。本発明の特定の実施形態では、フィーダー細胞を含有しない培地で細胞を増殖させる。

【０１０２】

ＥＶは、様々な時間間隔で（ＥＶの産生速度に応じて、例えば約１、２、４、６、８日、又は３、６、９、１２日、又はこれより長い間隔で）採取されることができる。ＥＶの例示の収量は、本明細書中の他の箇所に記載されているように、増殖性及び非増殖性神経細胞の培養の約２４時間～７日の期間中に、細胞１００万個当り少なくとも約１ｎｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約１０ｎｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約５０ｎｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約１００ｎｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約５００ｎｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約７５０ｎｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約８００ｎｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約９００ｎｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約１．０μｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約１．５μｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約２．０μｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約２．５μｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも例えば約３．０μｇのＥＶ、細胞１００万個当り少なくとも約５．０μｇのＥＶ、及び細胞１００万個当り少なくとも約１０．０μｇのＥＶであり得る。

【０１０３】

多くの例では、ＥＶは、超遠心分離若しくは分画遠心分離又はこれらのいずれかの組み合わせによって採取及び回収され、ペレット化されたＥＶが回収されて、回収後のペレット化されたＥＶは任意で、適した媒体で洗浄される。例えば、ＥＶの調製物は、細胞培養物又は組織上清から、遠心分離、ろ過、又はこれらの方法の組み合わせによって調製されることができる。いくつかの実施形態では、ＥＶは、分画遠心分離、即ち比較的大きな粒子をペレット化するための低速（＜２，０００ｇ）での遠心分離、及びこれに続くＥＶをペレット化するための高速（＞１００，０００ｇ）での遠心分離、適切なフィルタ（例えば０．２２μｍフィルタ）を用いたサイズろ過、勾配超遠心分離（例えばショ糖勾配を用いた）、又はこれらの方法の組み合わせによって調製されることができる。ＥＶは、分

画遠心分離、マイクロ及び限外ろ過、ポリマー沈殿、マイクロ流体分離、免疫捕捉、及びサイズ排除クロマトグラフィによって精製され得る。ＥＶの単離及び精製のための上述の方法及び／又は関連する方法は、Thery, et al., Current Protocols in Cell Biology, (2006) 3.221－3.22.29, copyright 2006 by John Wiley & Sons, Inc.、Sokolova, et al., Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011, 87, 146－150、Wiklander, et al., Journal of Extracellular Vesicles, 2015, 4, 26316, pp. 1－13、及びBoing, et al., Journal of Extracellular Vesicles, 2014, 3, 23430, pp. 1－11によって説明されている。電界無線周波数及び音響などの他の単離方法を開発することもできる。

【０１０４】

合成エクソソームなどの合成小胞を製造する方法は、当該技術分野において公知である。このような方法を、本明細書において提供される組成物及び方法における使用に適した合成小胞を生産するために使用することができる。なお、ＥＶの内容物、即ち脂質二重層を除去又は排除して内容物を得たＥＶもまた、人工ＥＶを作るために使用されてもよい。

【０１０５】

（ｉｉ）ポリペプチド－ＥＶコンジュゲート

一態様では、本発明は、神経細胞（例えば神経前駆細胞又は神経幹細胞）由来の細胞外小胞を含むポリペプチド－ＥＶコンジュゲートを含む組成物を提供し、ここではポリペプチドは、クリックケミストリーを用いて小胞の表面に結合される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、抗体又はその抗原結合部分である（本明細書では「抗体－ＥＶ（Ａｂ－ＥＶ）コンジュゲート」と呼ぶ）。ポリペプチド－ＥＶコンジュゲート（例えばＡｂ－ＥＶコンジュゲート）は、神経細胞（例えば神経前駆細胞又は神経幹細胞）由来の細胞外小胞を含むことができ、細胞外小胞はその表面でポリペプチド（例えば抗体又はその抗原結合部分）と結合される。ポリペプチド（例えば抗体）は、クリックケミストリーを用いて小胞の表面に結合されることができる。このような実施形態では、ポリペプチド（例えば抗体）は、２つの相補的なクリックケミストリー官能基の間の反応から生成されるリンカーによって、小胞にカップリングされることができる。ポリペプチド－ＥＶコンジュゲートの更なる特徴を以下で提供する。

【０１０６】

本明細書で提供されるポリペプチド－ＥＶ（例えばＡｂ－ＥＶ）コンジュゲートを調製するために、抗体又はその抗原結合部分を、多様な結合方法を用いてＥＶに結合させることができる。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、ＥＶにカップリングされるポリペプチドは、抗体又はその抗原結合部分である。抗体は、例えばモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、ナノボディ、モノボディ、及び所望の抗原結合活性を示す抗体断片であることができる。抗体又はその抗原結合部分は、全長（インタクト）抗体、二重特異性抗体、二重可変ドメイン抗体、多鎖若しくは単鎖抗体、及び／又はその抗原結合断片の形態を取ることができる。その抗原結合断片は、これらに限定するものではないが、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、（Ｆａｂ’）２、Ｆｖ、ｓｃＦｖ（単鎖Ｆｖ）、サロボディ（ｓｕｒｒｏｂｏｄｙ）（代替軽鎖構築物を含む）、シングルドメイン抗体、ラクダ化抗体などを含む。抗体又はその抗原結合部分は、例えばＩｇＡ（例えばＩｇＡ１若しくはＩｇＡ２）、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ（例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３若しくはＩｇＧ４）、又はＩｇＭを含むいずれかのアイソタイプとすることもでき、あるいはそれに由来するものとすることもできる。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、ヒト化抗体又はその抗原結合部分である。他の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、完全ヒト抗体又はその抗原結合部分である。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、抗体ミメティックが、本明細書で提供されるＥＶに結合される。抗体ミメティックの例としては、限定するものではないが、アドネクチン（即ちフィ

ブロネクチン系結合分子）、アフリン、アフィマー、アフィチン、アルファボディ、アフィボディ、ＤＡＲＰｉｎ、アンチカリン、アビマー、フィノマー、Ｋｕｎｉｔｚドメインペプチド、モノボディ、ｎａｎｏＣＬＡＭＰ、ナノボディ、ユニボディ、バーサボディ、アプタマー、及びペプチド分子が挙げられ、これらは全て、従来の抗体結合を模倣するものの異なる機序から生成されて異なる機序によって機能する結合構造を用いている。

【０１０９】

ポリペプチド（例えば抗体又はその抗原結合部分）は、「クリックケミストリー」を用いて、ＥＶの表面に結合されることができる（例えばKolb, H. C.、Finn, M. G.、Sharpless, K. B. Angewandte Chemie, International Edition 2001, 40, 2004－2021、Kolb, H. C.、Sharpless, K. B. Drug Discovery Today 2003, 8, 1128－1137を参照。これらの文献の開示は、その全体が参照により本出願に援用される）。いずれかの適したクリック反応を用いて、ポリペプチドをＥＶ表面に連結することができる。クリックケミストリー反応は、通常は迅速で、モジュール式で、効率的で、多くの場合有毒な廃棄物を生成せず、溶媒として水を用いて実施されることができ、更に立体特異的に設定されることができるため、有利である。

【０１１０】

本明細書に記載の用語「クリック官能基」は、水溶液中の穏やかな条件下で、対応するクリック反応物と迅速かつ選択的に反応（例えば環状付加反応を介した、「クリック」）することができる反応物を指すために、用語「クリックケミストリー反応物」又は「クリック反応物」と相互交換可能なものとして使用される。穏やかな条件は、低い反応物濃度での、中性のｐＨ、水溶液、及び環境温度を含むことができる。クリック官能基の例としては、アジド、アルケン、アルキン、ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）、トランスシクロオクテン、ニトロン、ニトリルイミン、酸化ニトリル、イソニトリル、テトラゾール、及びテトラジン基が挙げられる。例示のクリック反応としては、限定するものではないが、Ｃｕ－アジド－アルキン、歪み促進型アジド－アルキン、シュタウディンガーライゲーション、テトラジンライゲーション、光誘導型テトラゾール－アルケン、チオール－エン、ＮＨＳエステル、エポキシド、イソシアネート、及びアルデヒド－アミノオキシが挙げられる。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分をＥＶにカップリングするリンカーは、２つの相補的なクリック官能基の間の反応から生成される（「クリックリンカー」）。

【０１１１】

一実施形態では、本明細書のポリペプチド－ＥＶコンジュゲートのポリペプチド（例えば抗体若しくはその抗原結合部分）又はＥＶは、クリック官能不飽和基であるクリック官能基を含むことができる。その例は、アルケン及びアルキンなどの親双極子、並びに関連するヘテロ原子官能基を含む分子、例えばカルボニル及びニトリルである。クリック官能不飽和基のために反応物として使用できる他のクリック官能基は、テトラジン及びテトラゾールなどのジエンである。

【０１１２】

別の実施形態では、本明細書のポリペプチド－ＥＶコンジュゲートのポリペプチド（例えば抗体若しくはその抗原結合部分）又はＥＶは、クリック官能双極性基を含むことができる。クリック官能双極性基は、１つ以上のヘテロ原子を含み、荷電双極子を表す少なくとも１つのメソメリー構造を有する化合物であると理解される。クリック官能双極性基の例は、直鎖１，３－双極性基、例えばアジド、酸化ニトリル、ジアゾアルカン、ニトリルイミン、及びニトロンである。

【０１１３】

特定の実施形態では、ＥＶ－Ａｂコンジュゲートは、第１のクリック官能基を含む抗体又はその抗原結合部分を、第２のクリック官能基を含むＥＶと反応させることによって調製される。その第１及び第２のクリック官能基は、クリックケミストリー反応を起こすことが知られている。抗体又はその抗原結合部分とＥＶとの結合を可能にするために使用され得る相補的な官能基のペアの限定でない例を、表１に示す。

【０１１４】

表１　Ａｂ－ＥＶコンジュゲートの形成のための相補的なクリック官能基のペアの例

結合反応	ＥＶ官能基	抗体官能基
銅（Ｉ）触媒アジド－アルキン環状付加	アジド	アルキン
	アルキン	アジド
歪み促進型アジド－アルキン環状付加	アジド（歪み促進型）	アルキン
	アルキン	アジド（歪み促進型）
歪み促進型アルキン－ニトロン環状付加	アルキン（歪み促進型）	ニトロン
	ニトロン	アルキン（歪み促進型）
アルケン及びアジド[３＋２]環状付加	アルケン	アジド
	アジド	アルケン
アルケン及びテトラジン逆電子需要ディールス・アルダー	アルケン	テトラジン
	テトラジン	アルケン
アルケン及びテトラゾールフォトクリック	アルケン	テトラゾール
	テトラゾール	アルケン

【０１１５】

当業者に公知である他の例示のクリック反応物のペアとしては、限定するものではないが、アジド及びジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ；ＤＩＢＯとしても公知）、テトラジン及びトランスシクロオクテン、並びにテトラジン及びノルボルネンが挙げられる。

【０１１６】

１つの例示の実施形態では、アジドで標識されたＥＶを、ＤＢＣＯで標識された抗体又はその抗原結合部分にカップリングすることができる。別の実施形態では、ＤＢＣＯで標識されたＥＶを、アジドで標識された抗体又はその抗原結合部分にカップリングすることができる。このような実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、アジドとＤＢＣＯの反応によって形成されたクリックリンカーを介して、ＥＶに結合される。

【０１１７】

別の例示の実施形態では、テトラジンで標識されたＥＶを、トランスシクロオクテンで標識された抗体又はその抗原結合部分にカップリングすることができる。別の実施形態では、トランスシクロオクテンで標識されたＥＶを、テトラジンで標識された抗体又はその抗原結合部分にカップリングすることができる。このような実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、テトラジンとトランスシクロオクテンの反応によって形成されたクリックリンカーを介して、ＥＶに結合される。

【０１１８】

別の例示の実施形態では、テトラジンで標識されたＥＶを、ノルボルネンで標識された抗体又はその抗原結合部分にカップリングすることができる。別の実施形態では、ノルボルネンで標識されたＥＶを、テトラジンで標識された抗体又はその抗原結合部分にカップリングすることができる。このような実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、テトラジンとノルボルネンの反応によって形成されたクリックリンカーを介して、ＥＶに結合される。

【０１１９】

本明細書において提供される、抗体をＥＶに結合させるために使用できる例示の反応としては、トリアゾールが形成される、アジドとアルキンとの銅触媒反応（ヒュスゲン１，３－双極性環状付加）；ジエンとジエノフィルの反応（ディールス・アルダー）；歪み促進型アジド－アルキン環状付加；歪み促進型アルキン－ニトロン環状付加；歪みアルケンとアジド、テトラジン若しくはテトラゾールの反応；アルケンとアジドとの［３＋２］環状付加；アルケンとテトラジンとの逆電子需要ディールス・アルダー；又はアルケンとテ

トラゾールとの光反応が挙げられる。いくつかの実施形態では、反応は水性環境で実施されることができる。特定の実施形態では、反応は、銅触媒又はルテニウム触媒反応（例えばアジドとアルキンとの、例えばアジド－アルキン環状付加反応における反応を開始させるための）である。あるいは反応は、銅を使用しない反応（例えば歪み促進型アジド－アルキン環状付加反応、歪み促進型アルキン－ニトロン環状付加）であってもよい。

【０１２０】

クリック官能基をタンパク質及びＥＶに組み込む方法は、例えば、Smyth et al. "Surface functionalization of exosomes using click chemistry." Bioconjugate chemistry 25.10 (2014): 1777－1784、Wang et al. "Integrating protein engineering and bioorthogonal click conjugation for extracellular vesicle modulation and intracellular delivery." PLoS One 10.11 (2015): e0141860、及びLee et al. "Facile metabolic glycan labeling strategy for exosome tracking." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)－General Subjects 1862.5 (2018): 1091－1100に記載されており、その各文献はその全体が参照により本出願に援用される。

【０１２１】

ＥＶに結合される抗体などのタンパク質の個数は、ＥＶのクリック結合の程度を変更することによって変化させることができる。用語「クリック結合の程度」は、「置換の程度」又は「ＤＳ」と相互交換可能なものとして使用されることができ、ＥＶ当りのクリック反応物の平均個数を指す。クリック置換の程度は、クリック結合反応におけるＥＶの濃度に対するクリック反応物のモル当量の数を変化させることによって、変化させることができる。例えばクリック結合反応は、約１～約５０００モル当量のクリック反応物、例えば約１、約５、約１０、約２０、約５０、約１００、約１５０、約２００、約２５０、約３００、約３５０、約４００、約４５０、約５００、約５５０、約６００、約６５０、約７００、約７５０、約８００、約８５０、約９００、約９５０、約１０００、約１２００、約１５００、約１８００、約２０００、約２２００、約２５００、約２８００、約３０００、約３２００、約３５００、約４０００、約４２００、約４５００、又は約５０００モル当量のクリック反応物を含んでもよい。挙げられた値の中間の範囲もまた、本発明の一部となることが意図されている。例えばクリック結合反応は、約１～約５０、約１０～約１００、約１５０～約２５０、約２００～約５００、約４００～約８００、約７００～約１０００、約１２００～約１６００、約１５００～約２０００、約１８００～約３５００、又は約３２００～約５０００モル当量のクリック反応物を含んでもよい。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、クリック反応物に結合されるＥＶは、約０．０１％～約１００％、例えば約０．０１％～約０．５％、約０．１％～約５％、約１％～約１０％、約５％～約１５％、約１０％～約２０％、約１５％～約２５％、約２０％～約３５％、約３０％～約４０％、約３５％～約５０％、約４０％～約６０％、約５０％～約７５％、約７０％～約９０％、又は約８５％～約１００％のクリック置換の程度を有する。例えば、クリック反応物に結合される本発明のＥＶは、約０．０１％、約０．０５％、約０．１％、約０．５％、約１％、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％又は約１００％であり得る。

【０１２３】

本明細書において提供される方法を用いて、いずれかの抗体又はその抗原結合部分を、神経細胞由来のＥＶに結合させることができる。いくつかの実施形態では、抗体はキメラ抗体又はその抗原結合部分である。他の実施形態では、抗体はヒト化抗体又はその抗原結合部分である。他の実施形態では、抗体は完全ヒト抗体又はその抗原結合部分である。例示の実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、脳又は中枢神経系で発現される標的タンパク質に特異的に結合する。例えばいくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、アミロイドβポリペプチド（Ａβ）、例えばアルツハイマー病に関連するヒトアミ

ロイドβポリペプチドに特異的に結合することができる。

【０１２４】

１つの例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、抗アミロイドβ抗体であるソラネズマブ、又はその抗原結合部分を含むことができる。ソラネズマブは、ＡβのＭｉｄドメインを標的とするヒト化ＩｇＧ１モノクローナル抗体である。ソラネズマブ（１０Ｄ５及びｍ２６６としても公知）は、例えば米国特許第７３２０７９０号、米国特許第７１９５７６１号、米国特許第８１０５５９７号、米国特許第８５９１８９４号、及び米国特許第８６２３３６５号に記載されており、その各文献はその全体が参照により本出願に援用される。

【０１２５】

一実施形態では、本明細書に記載の抗体－ＥＶコンジュゲートは、ソラネズマブの可変の重鎖及び／又は軽鎖領域を含む抗アミロイドβ抗体又はその抗原結合部分を含む。一実施形態では、抗アミロイドβ抗体は、ソラネズマブのＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、並びに／又はソラネズマブのＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１２６】

ソラネズマブの重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を表２に記載する。ソラネズマブのＣＤＲ領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）は太字で強調されている。ソラネズマブの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域には下線が付されている。

【０１２７】

表２：ソラネズマブのアミノ酸配列

配列番号	配列の説明	アミノ酸配列
1	ソラネズマブ重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSRY**SMSWVRQAPG KGLELVAQI**NSVGNS**TYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS**GDY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
2	ソラネズマブ重鎖可変領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSRY**SMSWVRQAPG KGLELVAQI**NSVGNS**TYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS**GDY**WGQGTLVTVSSA
3	ソラネズマブVH CDR1	GFTFSRY
4	ソラネズマブVH CDR2	NSVG
5	ソラネズマブVH CDR3	GDY
6	ソラネズマブ軽鎖	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLIYSDGNAYLH**WFLQ KPGQSPRLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYC**SQSTHVPWT**FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
7	ソラネズマブ軽鎖可変領域	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLIYSDGNAYLH**WFLQ KPGQSPRLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYC**SQSTHVPWT**FGQGTKVEIKR
8	ソラネズマブVL CDR1	QSLIYSDGNAYLH
9	ソラネズマブVL CDR2	KVSNRF
10	ソラネズマブVL CDR3	QSTHVPWT

【０１２８】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、表２に記載の１つ、２つ、若しくは３つの重鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列、及び／あるいは表２に記載の１つ、２つ、若しくは３つの軽鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号３のＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号４のＶＨ　ＣＤＲ２、及び配列番号５のＶＨ　ＣＤＲ３、並びに／又は配列番号８のＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号９のＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号１０のＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０１２９】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号２に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、及び／又は配列番号７に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖を有する。
【０１３０】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号１に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖、及び／又は配列番号６に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖を有する。
【０１３１】
別の例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、抗アミロイドβ抗体であるアデュカヌマブ、又はその抗原結合部分を含むことができる。アデュカヌマブは、Ａβの凝集形態の配座エピトープを認識する完全ヒトＩｇＧ１モノクローナル抗体である。アデュカヌマブ（ＢＩＩＢ０３７及びＢＡＲＴとしても公知）は、例えば米国特許出願公開第２０１５０３１５２６７号、米国特許出願公開第２０１８０３３３４８７号、国際公開特許第２０１７２１１８２７号、及び国際公開特許第２０１９０４０６１２号に記載されており、その各文献はその全体が参照により本出願に援用される。
【０１３２】
一実施形態では、本明細書に記載の抗体－ＥＶコンジュゲートは、アデュカヌマブの可変の重鎖及び／又は軽鎖領域を含む抗アミロイドβ抗体又はその抗原結合部分を含む。一実施形態では、抗アミロイドβ抗体は、アデュカヌマブのＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、並びに／又はアデュカヌマブのＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１３３】
アデュカヌマブの重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を表３に記載する。アデュカヌマブのＣＤＲ領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）は太字で強調されている。アデュカヌマブの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域には下線が付されている。
【０１３４】
表３：アデュカヌマブのアミノ酸配列

配列番号	配列の説明	アミノ酸配列
１１	アデュカヌマブ重鎖	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFAFSSY**GMHWVRQAPG KGLEWVAVI**WFDGTK**KYYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN TLRAEDTAVYYCAR**DRGIGARRGPYYMDV**WGKGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
１２	アデュカヌマブ重鎖可変領域	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFAFSSY**GMHWVRQAPG KGLEWVAVI**WFDGTK**KYYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN TLRAEDTAVYYCAR**DRGIGARRGPYYMDV**WGKGTTVTVSSA
１３	アデュカヌマブ VH CDR1	GFAFSSY
１４	アデュカヌマブ VH CDR2	WFDGTK
１５	アデュカヌマブ VH CDR3	DRGIGARRGPYYMDV
１６	アデュカヌマブ軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGKAP KLLIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ** **SYSTPLT**FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
１７	アデュカヌマブ軽鎖可変領域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGKAP KLLIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ** **SYSTPLT**FGGGTKVEIKR
１８	アデュカヌマブ VL CDR1	QSISSYLN
１９	アデュカヌマブ VL CDR2	AASSLQS
２０	アデュカヌマブ VL CDR3	QQSYSTPLT

【０１３５】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、表３に記載の１つ、２つ、若しくは３つの重鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列、及び／あるいは表３に記載の１つ、２つ、若しくは３つの軽鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号１３のＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号１４のＶＨ　ＣＤＲ２、及び配列番号１５のＶＨ　ＣＤＲ３、並びに／又は配列番号１８のＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号１９のＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号２０のＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０１３６】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号１２に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、及び／又は配列番号１７に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を有する。
【０１３７】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号１１に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖、及び／又は配列番号１６に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖を有する。
【０１３８】
別の実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、本明細書において提供される抗アミロイドβ抗体に対して少なくとも９５％の同一性、例えば本明細書において提供される抗アミロイドβ抗体に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の同一性を備えたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を備える。特定の実施形態では、抗体は、抗アミロイドβ抗体又はその多様体のＨＣ可変ドメインを含む修飾重鎖（ＨＣ）可変領域を含み、その多様体は、（ｉ）１、２、３、４若しくは５個のアミノ酸の置換、付加、若しくは欠失という点で抗アミロイドβ抗体とは異なり、（ｉｉ）最高５、４、３、２、又は１個のアミノ酸の置換、付加、若しくは欠失という点で抗アミロイドβ抗体とは異なり、（ｉｉｉ）１～５、１～３、１～２、２～５、若しくは３～５個のアミノ酸の置換、付加、若しくは欠失という点で抗アミロイドβ抗体とは異なり、及び／又は（ｉｖ）抗アミロイドβ抗体に対して少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％同一のアミノ酸配列を含み、（ｉ）～（ｉｖ）のいずれにおいても、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換であっても非保存的アミノ酸置換であってもよく、上記修飾重鎖可変領域は、抗体のアミロイドβ結合特異性を保持しながら、抗アミロイドβ抗体の重鎖可変領域に対して強化された生物学的活性を有することができる。
【０１３９】
別の例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、ヒトプログラム細胞死１（ＰＤ１）タンパク質に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合部分を備えることができる。ＰＤ１に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分を備えた抗体－ＥＶコンジュゲートは、ＰＤ１が関与する疾患又は障害の治療、例えば多形性神経膠芽腫を含むがこれに限定されない癌の治療に使用されることができる。１つの例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、抗ＰＤ１抗体であるニボルマブ、又はその抗原結合部分を含むことができる。ニボルマブは、ＰＤ１を標的とするヒトＩｇＧ４モノクローナル抗体である。ニボルマブは、例えば米国特許第８００８４４９号、米国特許第８１６８１７９号、及び米国特許第９３８７２４７号に記載されており、その各文献はその全体が参照により本出願に援用される。
【０１４０】
一実施形態では、本明細書に記載の抗体－ＥＶコンジュゲートは、ニボルマブの可変の重鎖及び／又は軽鎖領域を含む抗ＰＤ１抗体又はその抗原結合部分を含む。一実施形態では、抗ＰＤ１抗体は、ニボルマブのＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、並びに／又はニボルマブのＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。ニボルマブの重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を表４に記載する。
【０１４１】
表４：ニボルマブのアミノ酸配列

配列番号	配列の説明	アミノ酸配列
２１	ニボルマブ重鎖	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMN SLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK
２２	ニボルマブ重鎖可変領域	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMN SLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSA
２３	ニボルマブ VH CDR1	GITFSNS
２４	ニボルマブ VH CDR2	WYDGSK
２５	ニボルマブ VH CDR3	NDDY
２６	ニボルマブ軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
２７	ニボルマブ軽鎖可変領域	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQGTKVEIKR
２８	ニボルマブ VL CDR1	QSVSSYLA
２９	ニボルマブ VL CDR2	DASNRAT
３０	ニボルマブ VL CDR3	QQSSNWPRT

【０１４２】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、表４に記載の１つ、２つ、若しくは３つの重鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列、及び／あるいは表４に記載の１つ、２つ、若しくは３つの軽鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２３のＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号２４のＶＨ　ＣＤＲ２、及び配列番号２５のＶＨ　ＣＤＲ３、並びに／又は配列番号２８のＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号２９のＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号３０のＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０１４３】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号２２に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、及び／又は配列番号２７に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を備える。
【０１４４】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号２１に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖、及び／又は配列番号２６に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖を備える。
【０１４５】
別の例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、癌に関連するヒト血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）タンパク質に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合部分を備えることができる。ＶＥＧＦに特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分を備えた抗体－ＥＶコンジュゲートは、ＶＥＧＦが関与する疾患又は障害の治療、例えば多形性神経膠芽腫を含むがこれに限定されない癌の治療に使用されることができる。１つの例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、抗ＶＥＧＦ抗体であるベバシズマブ、又はその抗原結合部分を含むことができる。ベバシズマブは、ＶＥＧＦを標的とする組み換えヒト化モノクローナル抗体である。ベバシズマブは、例えば米国特許第６６３２９２６号、米国特許第７１６９９０１号、及び米国特許第７５７５８９３号に記載されており、その各文献はその全体が参照により本出願に援用される。
【０１４６】
一実施形態では、本明細書に記載の抗体－ＥＶコンジュゲートは、ベバシズマブの可変の重鎖及び／又は軽鎖領域を含む抗ＶＥＧＦ抗体又はその抗原結合部分を含む。一実施形態では、抗ＶＥＧＦ抗体は、ベバシズマブのＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、並びに／又はベバシズマブのＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。ベバシズマブの重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を表５に記載する。
【０１４７】
表５：ベバシズマブのアミノ酸配列

配列番号	配列の説明	アミノ酸配列
３１	ベバシズマブ重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPG KGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHT
３２	ベバシズマブ重鎖可変領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPG KGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSSA
３３	ベバシズマブ VH CDR1	GYTFTNY
３４	ベバシズマブ VH CDR2	NTYTGE
３５	ベバシズマブ VH CDR3	YPHYYGSSHWYFDV
３６	ベバシズマブ軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKA PKVLIYF TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVP WTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
３７	ベバシズマブ軽鎖可変領域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKA PKVLIYF TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVP WTFGQ GTKVEIKR
３８	ベバシズマブ VL CDR1	QDISNYLN
３９	ベバシズマブ VL CDR2	FTSSLHS
４０	ベバシズマブ VL CDR3	QQYSTVPWT

【０１４８】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、表５に記載の１つ、２つ、若しくは３つの重鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列、及び／あるいは表５に記載の１つ、２つ、若しくは３つの軽鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号３３のＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号３４のＶＨ　ＣＤＲ２、及び配列番号３５のＶＨ　ＣＤＲ３、並びに／又は配列番号３８のＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号３９のＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号４０のＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０１４９】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号３２に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、及び／又は配列番号３７に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を備える。
【０１５０】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号３１に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖、及び／又は配列番号３６に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖を備える。
【０１５１】
別の例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、ヒトＢリンパ球抗原ＣＤ２０（ＣＤ２０）タンパク質に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合部分を備えることができる。ＣＤ２０に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分を備えた抗体－ＥＶコンジュゲートは、ＣＤ２０が関与する疾患又は障害の治療、例えば再発性ＭＳ、原発性進行性ＭＳ、及び二次性進行性ＭＳなどの多発性硬化症（ＭＳ）の治療に使用されることができる。１つの例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、抗ＣＤ２０抗体であるオクレリズマブ、又はその抗原結合部分を含むことができる。オクレリズマブは、ＣＤ２０を標的とするヒト化ＩｇＧ１モノクローナル抗体である。オクレリズマブは、例えば米国特許第５，５００，３６２号、米国特許第５，６７７，１８０号、及び米国特許第７，７９９，９００号に記載されており、その各文献はその全体が参照により本出願に援用される。
【０１５２】
一実施形態では、本明細書に記載の抗体－ＥＶコンジュゲートは、オクレリズマブの可変の重鎖及び／又は軽鎖領域を含む抗ＣＤ２０抗体又はその抗原結合部分を含む。一実施形態では、抗ＣＤ２０抗体は、オクレリズマブのＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、並びに／又はオクレリズマブのＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。オクレリズマブの重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を表６に記載する。
【０１５３】
表６：オクレリズマブのアミノ酸配列

配列番号	配列の説明	アミノ酸配列
４１	オクレリズマブ重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPG KGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
４２	オクレリズマブ重鎖可変領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPG KGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWYFDVWGQGTLVTVSSA
４３	オクレリズマブ VH CDR1	GYTFTSY
４４	オクレリズマブ VH CDR2	YPGNGD
４５	オクレリズマブ VH CDR3	VVYYSNSYWYFDV
４６	オクレリズマブ軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAP KPLIYAP SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPP TFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKV QWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLS SPVTKSFNRGEC
４７	オクレリズマブ軽鎖可変領域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAP KPLIYAP SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPP TFGQG TKVEIKR
４８	オクレリズマブ VL CDR1	SSVSYMH
４９	オクレリズマブ VL CDR2	APSNLAS
５０	オクレリズマブ VL CDR3	QQWSFNPPT

【０１５４】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、表６に記載の１つ、２つ、若しくは３つの重鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列、及び／あるいは表６に記載の１つ、２つ、若しくは３つの軽鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号４３のＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号４４のＶＨ　ＣＤＲ２、及び配列番号４５のＶＨ　ＣＤＲ３、並びに／又は配列番号４８のＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号４９のＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号５０のＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０１５５】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号４２に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、及び／又は配列番号４７に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を備える。
【０１５６】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号４１に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖、及び／又は配列番号４６に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖を備える。
【０１５７】
別の例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、ヒトα－４インテグリンタンパク質に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合部分を備えることができる。α－４インテグリンに特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分を備えた抗体－ＥＶコンジュゲートは、α－４インテグリンが関与する疾患又は障害の治療、例えば再発寛解型多発性硬化症を例とする多発性硬化症の治療に使用されることができる。１つの例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、抗α－４インテグリン抗体であるナタリズマブ、又はその抗原結合部分を含むことができる。ナタリズマブは、α－４インテグリンを標的とするヒト化モノクローナル抗体である。ナタリズマブは、例えば米国特許第７，１５７，０８６号、米国特許第６，６０２，５０３号、及び米国特許第８，１２４，３５０号に記載されており、その各文献はその全体が参照により本出願に援用される。
【０１５８】
一実施形態では、本明細書に記載の抗体－ＥＶコンジュゲートは、ナタリズマブの可変の重鎖及び／又は軽鎖領域を含む抗α－４インテグリン抗体又はその抗原結合部分を含む。一実施形態では、抗α－４インテグリン抗体は、ナタリズマブのＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、並びに／又はナタリズマブのＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。ナタリズマブの重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を表７に記載する。
【０１５９】
表７：ナタリズマブのアミノ酸配列

配列番号	配列の説明	アミノ酸配列
５１	ナタリズマブ重鎖可変領域	VKLQQSGAELVKPGASVKLFCTASGFNIKDTYMHWVKQRPQQGLEWIGRIDPASGDTKYDPKFQVKATITADTSSNTAWLQLSSLTSEDTAVYYCADGMWVSTGYALDFWGQGTTVTVSS
５２	ナタリズマブVH CDR1	GFNIKDT
５３	ナタリズマブVH CDR2	DPASGD
５４	ナタリズマブVH CDR3	GMWVSTGYALDF
５５	ナタリズマブ軽鎖可変領域	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYY ASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGG GTKLEI
５６	ナタリズマブVL CDR1	QSVTNDVA
５７	ナタリズマブVL CDR2	YASNRYT
５８	ナタリズマブVL CDR3	QQDYSSPYT

【０１６０】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、表７に記載の１つ、２つ、若しくは３つの重鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列、及び／あるいは表７に記載の１つ、２つ、若しくは３つの軽鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号５２のＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号５３のＶＨ　ＣＤＲ２、及び配列番号５４のＶＨ　ＣＤＲ３、並びに／又は配列番号５６のＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号５７のＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号５８のＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０１６１】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号５１に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、及び／又は配列番号５５に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を備える。

【０１６２】

別の例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、ヒトＧＤ２ガングリオシド（ＧＤ２）タンパク質に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合部分を備えることができる。ＧＤ２に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分を備えた抗体－ＥＶコンジュゲートは、ＧＤ２が関与する疾患又は障害の治療、例えば神経芽腫の治療に使用されることができる。１つの例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、抗ＧＤ２抗体であるジヌツキシマブ、又はその抗

原結合部分を含むことができる。ジヌツキシマブは、ＧＤ２を標的とするキメラヒト／マウスモノクローナル抗体である。ジヌツキシマブは、例えば米国特許第９，７７７，０６８号、米国特許第１０，２９４，３０５号、及び米国特許第９，８４０，５６６号に記載されており、その各文献はその全体が参照により本出願に援用される。

【０１６３】

一実施形態では、本明細書に記載の抗体－ＥＶコンジュゲートは、ジヌツキシマブの可変の重鎖及び／又は軽鎖領域を含む抗ＧＤ２抗体又はその抗原結合部分を含む。一実施形態では、抗ＧＤ２抗体は、ジヌツキシマブのＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、並びに／又はジヌツキシマブのＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。ジヌツキシマブの重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を表８に記載する。

【０１６４】

表８：ジヌツキシマブのアミノ酸配列

配列番号	配列の説明	アミノ酸配列
５９	ジヌツキシマブ重鎖	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWVRQNIGKSLEWIGA IDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
６０	ジヌツキシマブ重鎖可変領域	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWVRQNIGKSLEWIGA IDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSVTVSSA
６１	ジヌツキシマブ VH CDR1	GSSFTGY
６２	ジヌツキシマブ VH CDR2	DPYYGG
６３	ジヌツキシマブ VH CDR3	GMEY
６４	ジヌツキシマブ軽鎖	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPK LLIHKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVP PLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
６５	ジヌツキシマブ軽鎖可変領域	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPK LLIHKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVP PLTFGAGTKLELKR
６６	ジヌツキシマブ VL CDR1	QSLVHRNGNTYLH
６７	ジヌツキシマブ VL CDR2	KVSNRFS
６８	ジヌツキシマブ VL CDR3	SQSTHVPPLT

【０１６５】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、表８に記載の１つ、２つ、若しくは３つの重鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列、及び／あるいは表８に記載の１つ、２つ、若しくは３つの軽鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号６１のＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号６２のＶＨ　ＣＤＲ２、及び配列番号６３のＶＨ　ＣＤＲ３、並びに／又は配列番号６６のＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号６７のＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号６８のＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０１６６】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号６０に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、及び／又は配列番号６５に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を備える。
【０１６７】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号５９に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖、及び／又は配列番号６４に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖を備える。
【０１６８】
別の例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、アルツハイマー病に関連するヒトアミロイドβタンパク質に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合部分を備えることができる。アミロイドβに特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分を備えた抗体－ＥＶコンジュゲートは、アミロイドβが関与する疾患又は障害の治療、例えばアルツハイマー病の治療に使用されることができる。１つの例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、抗アミロイドβ抗体であるガンテネルマブ、又はその抗原結合部分を含むことができる。ガンテネルマブは、アミロイドβを標的とするヒトＩｇＧ１モノクローナル抗体である。ガンテネルマブは、例えば米国特許第７，７９４，７１９号、米国特許第８，２１６，５７７号、及び米国特許第８，３２９，８８６号に記載されており、その各文献はその全体が参照により本出願に援用される。
【０１６９】
一実施形態では、本明細書に記載の抗体－ＥＶコンジュゲートは、ガンテネルマブの可変の重鎖及び／又は軽鎖領域を含む抗アミロイドβ抗体又はその抗原結合部分を含む。一実施形態では、抗アミロイドβ抗体は、ガンテネルマブのＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、並びに／又はガンテネルマブのＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。ガンテネルマブの重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を表９に記載する。
【０１７０】
表９：ガンテネルマブのアミノ酸配列

配列番号	配列の説明	アミノ酸配列
６９	ガンテネルマブ重鎖	QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAINASGTRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
７０	ガンテネルマブ重鎖可変領域	QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAINASGTRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGTLVTVSSA
７１	ガンテネルマブ VH CDR1	GFTFSSY
７２	ガンテネルマブ VH CDR2	NASGTR
７３	ガンテネルマブ VH CDR3	GKGNTHKPYGYVRYFDV
７４	ガンテネルマブ軽鎖	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA PRLLIY GASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCLQIYNM PITFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
７５	ガンテネルマブ軽鎖可変領域	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA PRLLIY GASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCLQIYNM PITFG QGTKVEIKR
７６	ガンテネルマブ VL CDR1	QSVSSSYLA
７７	ガンテネルマブ VL CDR2	GASSRAT

配列番号	配列の説明	アミノ酸配列
７８	ガンテネルマブ VL CDR3	LQIYNMPIT

【０１７１】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、表９に記載の１つ、２つ、若しくは３

つの重鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列、及び／あるいは表９に記載の１つ、２つ、若しくは３つの軽鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号７１のＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号７２のＶＨ　ＣＤＲ２、及び配列番号７３のＶＨ　ＣＤＲ３、並びに／又は配列番号７６のＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号７７のＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号７８のＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０１７２】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号７０に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、及び／又は配列番号７５に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を備える。

【０１７３】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号６９に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖、及び／又は配列番号７４に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖を備える。

【０１７４】

別の例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、抗アミロイドβ抗体であるレカネマブ、又はその抗原結合部分を含むことができる。レカネマブは、アミロイドβを標的とするヒト化マウスモノクローナル抗体である。レカネマブは、例えば米国特許第８，１０６，１６４号、米国特許第８，９９９，９３６号、及び米国特許第９，５７３，９９４号に記載されており、その各文献はその全体が参照により本出願に援用される。

【０１７５】

一実施形態では、本明細書に記載の抗体－ＥＶコンジュゲートは、レカネマブの可変の重鎖及び／又は軽鎖領域を含む抗アミロイドβ抗体又はその抗原結合部分を含む。一実施形態では、抗アミロイドβ抗体は、レカネマブのＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、並びに／又はレカネマブのＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。レカネマブの重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を表１０に記載する。

【０１７６】

表１０：レカネマブのアミノ酸配列

配列番号	配列の説明	アミノ酸配列
７９	レカネマブ重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSFGMHWVRQAPGK GLEWVAYISSGSSTIYYGDTVKGRFTISRDNAKNSLFLQMSSLR AEDTAVYYCAREG GYYYGRSYYTMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
８０	レカネマブ重鎖可変領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSFGMHWVRQAPGK GLEWVAYISSGSSTIYYGDTVKGRFTISRDNAKNSLFLQMSSLR AEDTAVYYCAREG GYYYGRSYYTMDYWGQGTTVTVSSA
８１	レカネマブ軽鎖	DVVMTQSPLSLPVTPGAPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQK PGQSPK LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGIYYCFQ GSHVPPTFGPGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
８２	レカネマブ軽鎖可変領域	DVVMTQSPLSLPVTPGAPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQK PGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDV GIYYCFQGSHVPPTFGPGTKLEIKR

【０１７７】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号８０に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、及び／又は配列番号８２に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を備える。

【０１７８】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号７９に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖、及び／又は配列番号８１に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖を備える。

【０１７９】

別の例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、ヒトＢリンパ球抗原ＣＤ２０（ＣＤ２０）タンパク質に特異的に結合する、抗体又はその

抗原結合部分を備えることができる。上述の通り、ＣＤ２０に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分を備えた抗体－ＥＶコンジュゲートは、ＣＤ２０が関与する疾患又は障害の治療、例えば再発性多発性硬化症を例とする多発性硬化症の治療に使用されることができる。１つの例示の実施形態では、本明細書において提供される抗体－ＥＶコンジュゲートは、抗ＣＤ２０抗体であるウブリツキシマブ、又はその抗原結合部分を含むことができる。ウブリツキシマブは、ＣＤ２０を標的とするキメラヒト／マウスモノクローナル抗体である。ウブリツキシマブは、例えば米国特許第９，２３４，０４５号、米国特許第９，６９４，０７１号、及び米国特許第９，８７３，７４５号に記載されており、その各文献はその全体が参照により本出願に援用される。

【０１８０】

一実施形態では、本明細書に記載の抗体－ＥＶコンジュゲートは、ウブリツキシマブの可変の重鎖及び／又は軽鎖領域を含む抗ＣＤ２０抗体又はその抗原結合部分を含む。一実施形態では、抗ＣＤ２０抗体は、ウブリツキシマブのＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、並びに／又はウブリツキシマブのＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。ウブリツキシマブの重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を表１１に記載する。

【０１８１】

表１１：ウブリツキシマブのアミノ酸配列

配列番号	配列の説明	アミノ酸配列
８３	ウブリツキシマブ重鎖	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTP RQGLEWIGGIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVGKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCARYDYNYAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
８４	ウブリツキシマブ重鎖可変領域	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTP RQGLEWIGGIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVGKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCARYDYNYAMDYWGQGTSVTVSSA
８５	ウブリツキシマブVH CDR1	GYTFTSY
８６	ウブリツキシマブVH CDR2	YPGNGD
８７	ウブリツキシマブVH CDR3	YDYNYAMDY
８８	ウブリツキシマブ軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSP KPWIYAT SNLASGVPARFSGSGSGTSYSFTISRVEAEDAATYYCQQWTFNP PTFGGG TRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
８９	ウブリツキシマブ軽鎖可変領域	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSP KPWIYAT SNLASGVPARFSGSGSGTSYSFTISRVEAEDAATYYCQQWTFNP PTFGGG TRLEIKR
９０	ウブリツキシマブVL CDR1	SSVSYMH
９１	ウブリツキシマブVL CDR2	ATSNLAS
９２	ウブリツキシマブVL CDR3	QQWTFNPPT

【０１８２】

一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、表１１に記載の１つ、２つ、若しくは３つの重鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列、及び／あるいは表１１に記載の１つ、２つ、若しくは３つの軽鎖ＣＤＲ領域、又はこれに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を備えた配列を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号８５のＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号８６のＶＨ　ＣＤＲ２、及び配列番号８７のＶＨ　ＣＤＲ３、並びに／又は配列番号９０のＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号９１のＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号９２のＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０１８３】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号８４に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、及び／又は配列番号８９に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を備える。
【０１８４】
一実施形態では、抗体－ＥＶコンジュゲートは、配列番号８３に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた重鎖、及び／又は配列番号８８に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％の同一性を備えた軽鎖を備える。
【０１８５】
一実施形態では、本明細書に記載の抗体－ＥＶコンジュゲートは、ヒト免疫グロブリンを含む。免疫グロブリンは、ヒト抗体を含有するヒト血漿から作製される無菌溶液である。免疫グロブリン製品は、ＧＡＭＵＮＥＸ　Ｃ（商標）、ＧＡＭＭＡＫＥＤ（商標）、ＨＩＺＥＮＴＲＡ（商標）、ＰＲＩＶＩＧＥＮ（商標）、及びＧＡＭＭＡＧＡＲＤ（商標）の商品名で販売されている。免疫グロブリンを含む抗体－ＥＶコンジュゲートは、これらに限定するものではないが、慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー（ＣＩＤＰ）及び多巣性運動ニューロパチーを含む、障害の治療に使用されることができる。
【０１８６】
いくつかの実施形態では、本明細書において提供される抗体標識ＥＶは更に、これらに限定するものではないが、小分子、核酸（例えば短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短鎖ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、及び二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ））、タンパク質、並びに／又はペプチドを含む、分子を含むことができる。
【０１８７】
いくつかの例では、ＥＶを細胞から単離し、次にＥＶに所望の分子を装入した後に、対象にＥＶを投与する。他の例では、ＥＶを産生する細胞と、１つ以上の治療剤とを同時にインキュベートすることによって、上記所望の分子をＥＶに装入することができる。他のいくつかの例では、所望の核酸、タンパク質、又はペプチドは、ＥＶの産生に使用される細胞中でのその所望の分子の過剰発現によってＥＶに装入されることができ、従って産生中に上記所望の分子がＥＶに装入される。また別の例では、エクソソームへの上記所望の分子の輸送を促進する担体分子（例えばタンパク質）の過剰発現によって、上記所望の分子をＥＶに装入することができる。例えば、ウシ白血病ウイルスタンパク質からの担体ペプチドを、関心のポリペプチドとの融合タンパク質として発現させることにより、エクソソームへの関心のポリペプチドの装入を促進することができる。この方法は、例えば米国特許第９，５４６，３７１号に記載されており、その文献の全内容は参照により本出願に援用される。他の実施形態では、担体分子は、ＥＶの産生に使用される細胞内で阻害性核酸と共に発現され、これによりＥＶに阻害性核酸を装入することができる。
【０１８８】
上述の例では、所望の分子は外因性又は内因性であってもよい。外因性分子は、インビトロ、インビボ、又はエクスビボで外部の出所から、例えばＥＶにとって天然のものではない外部の出所から、ＥＶに付加される分子を指す。内因性分子は、インビトロ、インビボ、又はエクスビボでＥＶ内に天然で存在する又はＥＶに関係する分子を指す。外因性分子は、例えば過剰発現、産生後の装入などによって外部の出所からＥＶに付加される時に、ＥＶ内に天然で存在する分子（核酸、タンパク質など）と同じ種類の分子を含むことができる。
【０１８９】
抗体又はその抗原結合部分を用いたＥＶの表面標識の前又は後に、ＥＶに所望のカーゴ

分子を装入することができる。本明細書に記載の所望の分子は、インキュベーション、超音波処理、電気穿孔、又は膜透過処理剤（例えばポリオール、界面活性剤、糖）などのトランスフェクション試薬の使用を含む、多数の異なる技法によってＥＶに導入されることができる。電気穿孔の条件は、所望の分子の電荷及びサイズに応じて変化し得る。典型的な電圧は、２０Ｖ／ｃｍ～１，０００Ｖ／ｃｍ、例えば２０Ｖ／ｃｍ～１００Ｖ／ｃｍであり、静電容量は典型的には２５μＦ～２５０μＦ、例えば２５μＦ～１２５μＦである。１５０ｍＶ～２５０ｍＶの電圧、特に２００ｍＶの電圧が、ＥＶへの抗体の装入には好ましい。あるいは、トランスフェクション試薬を用いて、ＥＶに所望の分子（例えば外因性タンパク質及び／又はペプチド）を装入してもよい。ＥＶのサイズが小さいものの、従来のトランスフェクション剤を、所望の分子（例えば外因性タンパク質及び／又はペプチド）でのＥＶのトランスフェクションに使用することができる。１つの例では、ＥＶが細胞から産生される際に治療用タンパク質又はペプチドがＥＶに取り込まれるように、関心の治療用タンパク質又はペプチドを発現する核酸構築物を用いて宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトすることによって、ＥＶに装入してもよい。別の例では、阻害性核酸構築物がＥＶに取り込まれるように、担体／アダプタ分子を伴う又は伴わない阻害性核酸構築物を用いて宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトすることによって、ＥＶに阻害性核酸構築物を装入することもできる。

【０１９０】

（ｉｉｉ）ＥＶ内腔に抗体が装入されたＥＶ

一態様では、本発明は、ＥＶの内腔にポリペプチド（例えば抗体又はその抗原結合断片）が装入されたＥＶを含む組成物を提供する。この目的に適したＥＶは、抗体又はその抗原結合部分の装入のための、神経細胞（例えば神経前駆細胞又は神経幹細胞）由来の細胞外小胞を含むことができる。本明細書に記載のいずれかの抗体を、上述のように例えばクリックケミストリーによるＥＶ表面への装入に加えて又はその代わりに、ＥＶ内腔への装入に使用することができる。

【０１９１】

様々な方法を用いて、ポリペプチド（例えば抗体又はその抗原結合部分）をＥＶの内腔に装入することができる。

【０１９２】

いくつかの実施形態では、膜透過処理に適した界面活性剤、例えばサポニンを用いて、抗体を小胞に装入する。いくつかの実施形態では、超音波処理によって抗体を小胞に装入する。いくつかの実施形態では、電気穿孔によって抗体を小胞に装入する。いくつかの実施形態では、振盪（例えば１００ｒｐｍ～１５００ｒｐｍ）を伴うインキュベーション（例えば室温での）によって、抗体を小胞に装入する。いくつかの実施形態では、上述の方法の組み合わせ（例えばサポニン透過処理及び超音波処理、電気穿孔及び超音波処理、サポニン透過処理及び電気穿孔など）を用いて、抗体を小胞に装入する。タンパク質、例えば抗体は、透過処理、超音波処理、及び／又は電気穿孔の前、途中、又は後に小胞に付加されることができる。いくつかの実施形態では、小胞は、内腔に装入されるタンパク質、例えば抗体の存在下で、界面活性剤、超音波処理、及び／又は電気穿孔を用いて透過処理される。他の実施形態では、小胞を、界面活性剤、超音波処理、及び／又は電気穿孔を用いて透過処理した後に、装入されるタンパク質、例えば抗体と共にインキュベートする。いくつかの実施形態では、装入されるタンパク質（例えば抗体）は、約２５～約２０００μｇ／ｍＬの濃度で小胞に付加される。いくつかの実施形態では、装入されるタンパク質（例えば抗体）は、約５０～約１５００μｇ／ｍＬの濃度で小胞に付加される。いくつかの実施形態では、装入されるタンパク質（例えば抗体）は、約１００～約１０００μｇ／ｍＬの濃度で小胞に付加される。いくつかの実施形態では、装入されるタンパク質（例えば抗体）は、約２５μｇ／ｍＬ、約５０μｇ／ｍＬ、約１００μｇ／ｍＬ、約２００μｇ／ｍＬ、約３００μｇ／ｍＬ、約４００μｇ／ｍＬ、約５００μｇ／ｍＬ、約６００μｇ／ｍＬ、約７００μｇ／ｍＬ、約８００μｇ／ｍＬ、約９００μｇ／ｍＬ、約１，０００μｇ／ｍＬ、約１，５００μｇ／ｍＬ、又は約２０００μｇ／ｍＬの濃度で小胞に付加さ

れる。

【０１９３】

いくつかの実施形態では、膜の透過処理に適した界面活性剤を用いて、抗体を小胞の内腔に装入する。このような界面活性剤としては、例えばサポニン、Ｔｗｅｅｎ－２０、及び細胞外小胞の透過処理に好適であることが当該技術分野において公知である他の薬剤が挙げられる。いくつかの実施形態では、約０．０１％、約０．０３％、約０．０５％、約０．０７％、約０．０９％、約０．１％、約０．１２％、約０．１４％、約０．１６％、約０．１８％、約０．２％、約０．２２％、約０．２４％、約０．２６％、約０．２８％、又は約０．３％（ｗ／ｖ）の界面活性剤（例えばサポニン）を用いて、ＥＶ膜を透過処理する。いくつかの実施形態では、サポニンを用いたＥＶ膜の透過処理によって、抗体を小胞の内腔に装入する。例えば、抗体の付加の前に、例えば０．０１％～５％（ｗ／ｖ）のサポニンと共にＥＶの調製物をインキュベートすることによって、上記膜を透過処理することができる。いくつかの実施形態では、抗体の付加の前に、例えば約０．０１％、約０．０３％、約０．０５％、約０．０７％、約０．０９％、約０．１％、約０．１２％、約０．１４％、約０．１６％、約０．１８％、約０．２％、約０．２２％、約０．２４％、約０．２６％、約０．２８％、約０．３％、約０．４％、約０．５％、約０．６％、約０．７％、約０．８％、約０．９％、約１．０％、約１．２％、約１．４％、約１．６％、約１．８％、約２．０％、約２．２％、約２．４％、約２．８％、約３．０％、約３．２％、約３．４％、約３．６％、約３．８％、約４．０％、約４．２％、約４．４％、約４．６％、約４．８％、又は約５．０％（ｗ／ｖ）のサポニンと共にＥＶの調製物をインキュベートすることによって、上記膜を透過処理することができる。いくつかの実施形態では、抗体の付加の前に、ＥＶをサポニンと共に１～２０分間インキュベートすることができる。いくつかの実施形態では、抗体の付加の前に、ＥＶをサポニンと共に１～１０分間インキュベートすることができる。いくつかの実施形態では、抗体の付加の前に、ＥＶをサポニンと共に１～５分間インキュベートすることができる。その後に抗体を透過処理されたＥＶに付加し、任意で軽く混合又は振盪（例えば１００ｒｐｍ、２００ｒｐｍ、３００ｒｐｍ、４００ｒｐｍ、５００ｒｐｍ、６００ｒｐｍ、７００ｒｐｍ、８００ｒｐｍ、９００ｒｐｍ、１０００ｒｐｍ、１１００ｒｐｍ、１２００ｒｐｍ、１３００ｒｐｍ、１４００ｒｐｍ、１５００ｒｐｍ）しながら、１～３０分（例えば１～２０分、１～１５分、１～１０分、又は１～５分）の持続時間に亘ってインキュベートすることができる。

【０１９４】

いくつかの実施形態では、超音波処理によって抗体を小胞の内腔に装入する。超音波処理は、本明細書で表１２に例示されているような様々な振幅、パルス時間、及びサイクルの組み合わせで実施されることができることを、当業者は理解するだろう。例えば超音波処理の振幅は、１０％から１００％までのいずれかの振幅（例えば１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％）に設定されることができ、これを様々なパルス時間（例えば４秒オン／２秒オフ、４秒オン／４秒オフ、４秒オン／８秒オフ、２秒オン／２秒オフ、２秒オン／４秒オフ、２秒オン／８秒オフ、８秒オン／２秒オフ、８秒オン／４秒オフ、８秒オン／８秒オフ）、及びサイクル数（例えば２サイクル～３６サイクル、例えば２サイクル、４サイクル、６サイクル、８サイクル、１０サイクル、１２サイクル、１４サイクル、１６サイクル、１８サイクル、２０サイクル、２２サイクル、２４サイクル、２６サイクル、２８サイクル、３０サイクル、３２サイクル、３４サイクル、又は３６サイクル）と組み合わせることができる。いくつかの実施形態では、超音波処理の振幅は、一定の持続時間（例えば１分、２分、３分、４分、５分、６分、７分、８分、９分、１０分、又はそれ以上）において、１０％から１００％までのいずれかの振幅（例えば１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％）に設定されることができる。いくつかの実施形態では、例えば電圧（例えば１００Ｖ、１５０Ｖ、２００Ｖ、２５０Ｖ、３００Ｖ、３５０Ｖ、４００Ｖ、４５０Ｖ、５００Ｖ、５５０Ｖ、６００Ｖ、６５０Ｖ、７００Ｖ、７５０Ｖ、８００Ｖ、８５０Ｖ、９００Ｖ、９５０Ｖ、１ｋＶ、又はそれ以上）並びにパルスの

持続時間及び数（例えば１パルス、２パルス、３パルス、４パルス、５パルス、６パルス、７パルス、８パルス、９パルス、１０パルス、１１パルス、１２パルス、１３パルス、１４パルス、１５パルス、１６パルス、１７パルス、１８パルス、１９パルス、２０パルス、又はそれ以上）を変化させることによる公知の方法を用いた電気穿孔によって、抗体が小胞の内腔に装入される。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、振盪（例えば１００ｒｐｍ、２００ｒｐｍ、３００ｒｐｍ、４００ｒｐｍ、５００ｒｐｍ、６００ｒｐｍ、７００ｒｐｍ、８００ｒｐｍ、９００ｒｐｍ、１０００ｒｐｍ、１１００ｒｐｍ、１２００ｒｐｍ、１３００ｒｐｍ、１４００ｒｐｍ、１５００ｒｐｍ）を伴う又は伴わない、インキュベーション（例えば３０分、１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１７時間、１８時間、１９時間、２０時間、２１時間、２２時間、２３時間、２４時間、又はそれ以上に亘る）によって、抗体は小胞の内腔に装入される。インキュベーションは、いずれかの適した温度で実施されることができる。いくつかの実施形態では、インキュベーションは約４～約３７℃で実施されることができる。いくつかの実施形態では、インキュベーションは、室温で、氷上で、約４℃で、又は約３７℃で実施されることができる。

【０１９６】

いくつかの実施形態では、本明細書でも例示されているように、小胞の内腔への抗体の導入に関して本明細書に記載されている方法のいずれかの組み合わせを用いて、ポリペプチド（例えば抗体）を小胞に装入する。いくつかの実施形態では、ポリペプチド（例えば抗体）は小胞の膜の透過処理中に含められる（小胞に付加される）。いくつかの実施形態では、ポリペプチド（例えば抗体）は小胞の膜の透過処理後に含められる（小胞に付加される）。

【０１９７】

特定の実施形態では、ＥＶへの抗体の付加前の１０～１００％の振幅での５～３０分の持続時間に亘る超音波処理を伴う、ＥＶのサポニン透過処理（例えば０．０１～５％のサポニンを用いて）によって、抗体をＥＶに装入する。特定の実施形態では、ＥＶへの抗体の付加前の２０％の振幅での１０分の持続時間に亘る超音波処理を伴う、ＥＶのサポニン透過処理（０．２％サポニン）によって、抗体をＥＶに装入する。特定の実施形態では、ＥＶへの抗体の付加前の４０％の振幅での１０分の持続時間に亘る超音波処理を伴う、ＥＶのサポニン透過処理（０．２％サポニン）によって、抗体をＥＶに装入する。特定の実施形態では、ＥＶへの抗体の付加前の２０％の振幅での５分の持続時間に亘る超音波処理を伴う、ＥＶのサポニン透過処理（０．２％サポニン）によって、抗体をＥＶに装入する。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、０．０１～５％のサポニンでの透過処理と振盪との組み合わせによって、抗体をＥＶに装入する。いくつかの実施形態では、０．２％サポニンでの透過処理と振盪（例えば５００ｒｐｍ）との組み合わせによって、抗体をＥＶに装入する。いくつかの実施形態では、室温でのインキュベーションと振盪（例えば１０００ｒｐｍ）との組み合わせによって、抗体をＥＶに装入する。いくつかの実施形態では、電気穿孔によって抗体をＥＶに装入する。いくつかの実施形態では、２０％の振幅、１２サイクル、４秒オン及び８秒オフの超音波処理によって、抗体を小胞に装入する。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、６０％の振幅、４秒オン／８秒オフの持続時間での６サイクルに亘る超音波処理によって、抗体をＥＶに装入する。いくつかの実施形態では、６０％の振幅、２秒オン／４秒オフの持続時間及びそれに続く氷上での２分間のインキュベーションでの６サイクルに亘る超音波処理によって、抗体をＥＶに装入する。

【０２００】

いくつかの実施形態では、ある範囲のポリペプチド（例えば抗体）濃度、例えば１００

μｇ／ｍｌ、約２００μｇ／ｍｌ、約３００μｇ／ｍｌ、約４００μｇ／ｍｌ、約５００μｇ／ｍｌ、約６００μｇ／ｍｌ、約７００μｇ／ｍｌ、約８００μｇ／ｍｌ、約９００μｇ／ｍｌ、又は約１，０００μｇ／ｍｌを、ＥＶの内腔に装入することができる。

【０２０１】

抗体をＥＶの内腔に装入した後に、限外ろ過、超遠心分離や、サイズ排除、イオン交換、及びバイオアフィニティクロマトグラフィを含む高速液体クロマトグラフィ（ＨＰＬＣ）などの当該技術分野において公知である様々な方法を用いて、内腔への装入が行われたＥＶを、遊離している抗体及び未装入のＥＶから分離することができる。

【０２０２】

Ｃ．製剤、送達、及び投与

本明細書で提供される、ポリペプチド装入済みＥＶ、例えば抗体装入済みＥＶ（抗体－ＥＶコンジュゲートと、内腔に抗体が装入されたＥＶとを含む）は、対象への送達のための医薬組成物（例えば神経細胞由来のＡｂ－ＥＶコンジュゲートを含む医薬組成物）内で製剤されることができる。医薬組成物は、治療有効量のポリペプチド装入済みＥＶ（例えば抗体装入済み神経ＥＶ）と、薬学的に許容可能な担体とを含むことができる。例えば、治療有効量のポリペプチド装入済みＥＶ（例えばＡｂ－ＥＶコンジュゲート及び／又は内腔装入済みのＥＶ）は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水中で提供されることができる。他の適した賦形剤、ビヒクル、及び担体が当該技術分野において公知である。それらは、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (1990)に記載されている。従来から用いられており、活性剤に対して不活性であるいずれかの投与、ビヒクル、又は担体を、本開示のポリペプチド装入済みＥＶを含む医薬組成物の調製及び投与のために利用し得ることは、当業者に理解される。このような方法、ビヒクル及び担体の例は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 4th ed. (1970)に記載されているようなものであり、その文献の開示は参照により本出願に援用される。

【０２０３】

本開示のポリペプチド装入済みＥＶ（例えば抗体装入済み神経ＥＶ）を含有する製剤は、例えば溶液、懸濁液、乳液、徐放性製剤、ローション、エアロゾルなどの液体、固体、又は半固体の形態を取ることができ、任意で、正確な投与量を簡単に投与するのに適した単位剤形の形態を取ることができる。医薬組成物は、通常は従来の医薬担体及び／又は賦形剤を含み、更に他の薬剤、担体、アジュバント、添加剤などを含んでもよい。Ａｂ－ＥＶコンジュゲートと１つ以上の賦形剤との重量百分率の比は、約２０：１～約１：６０、又は約１５：１～約１：４５、又は約１０：１～約１：４０、又は約９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１若しくは１：１～約１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１５、１：２０、１：２５、１：３０若しくは１：３５とすることができ、好ましくは約２０：１、１９：１、１８：１、１７：１、１６：１、１５：１、１４：１、１３：１、１２：１、１１：１、１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、又は５：１である。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、約１μｇ～約１ｇ以上のＥＶの合計量、例えば約１μｇ～約１００μｇ、約１００μｇ～約２００μｇ、約２００μｇ～約３００μｇ、約３００μｇ～約４００μｇ、約５００μｇ～約６００μｇ、約７００μｇ～約８００μｇ、約９００μｇ～約１ｍｇ、約１００μｇ～約５００μｇ、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約５ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約５００ｍｇ、約２５ｍｇ～約５００ｍｇ、約５０ｍｇ～約３５０ｍｇ、約７５ｍｇ～約４５０ｍｇ、約５０ｍｇ～約４５０ｍｇ、約７５ｍｇ～約３２５ｍｇ、約１００ｍｇ～約６５０ｍｇ、又は約５００ｍｇ～約１ｇのＥＶの合計量を含み、更に任意で、１つ以上の適した医薬担体、添加剤及び／又は賦形剤を含有してもよい。

【０２０４】

様々な例において、本明細書に記載の医薬組成物（例えば抗体装入済み神経ＥＶなどのポリペプチド装入済みＥＶを含む医薬組成物）は、当業者に公知のいずれかの投与経路を介した細胞への及び／又は対象への送達のために製剤されることができる。投与方法は一般に知られているか、又は当業者には明らかである。例えばRemington’s Pharmace

utical Sciences(17th Ed., Mack Pub. Co. 1985)を参照。

【０２０５】

本明細書において提供されるポリペプチド装入済みＥＶ（例えば抗体装入済み神経ＥＶ）を含む組成物は、これらに限定するものではないが、注射、注入、吸入、鼻腔内、眼内、局所送達、カニューレ間送達、又は摂食を含む、いずれかの適した経路で対象へと送達されることができる。注射としては、限定するものではないが、静脈内、頭蓋内、髄腔内、筋肉内、動脈内、髄腔内、脳室内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、脳脊髄内、及び胸骨内への注射及び注入が挙げられる。いくつかの例では、投与は脳脊髄内注射を含む。他のいくつかの例では、投与はエアロゾルの吸入（例えば噴霧による）を含む。他の例では、全身（例えば経口、直腸、経鼻、舌下、口腔内、若しくは非経口）、腸内（例えば系全体への効果。ただしＣＮＳを通じて送達される）、又は局所（例えば皮膚への局所的塗布、硝子体内注射）投与がされる。いくつかの例では、ポリペプチド装入済みＥＶ（例えば抗体装入済み神経ＥＶ）の投与は、抗体が装入されたＥＶを、中枢神経系へと、特定の実施形態では血液脳関門を越えて、送達することができる。いくつかの実施形態では、投与は疾患及び／又は機能不全を有する組織（例えば脳）の部位において行われる。他の実施形態では、投与の部位は、疾患及び／又は機能不全を有する組織から離れている（例えば静脈内又は鼻腔内送達の場合）。一実施形態では、ポリペプチド装入済みＥＶを含む組成物は、対象に非経口投与される。一実施形態では、ポリペプチド装入済みＥＶを含む組成物は、対象に静脈内投与される。別の実施形態では、ポリペプチド装入済みＥＶを含む組成物は、対象に鼻腔内投与される。一実施形態では、ポリペプチド装入済みＥＶを含む組成物は、対象に頭蓋内投与される。一実施形態では、ポリペプチド装入済みＥＶを含む組成物は、対象に髄腔内投与される。

【０２０６】

非経口投与（例えば静脈内、筋肉内、髄腔内、脳脊髄液内、又は鼻腔内）のための注射用組成物は、滅菌生理食塩水などの適したＩＶ溶液中に、ポリペプチド装入済みＥＶ（例えば抗体装入済み神経ＥＶ）と、任意で更なる成分とを含有することができる。他の実施形態では、その組成物は、水性乳液中の懸濁液として製剤される。

【０２０７】

液体医薬組成物は、ポリペプチド装入済みＥＶ（例えば抗体装入済み神経ＥＶ）の集合体と、任意で医薬用アジュバントとを、例えば食塩水、水性デキストロース、グリセロール、又はエタノールなどの担体中に溶解又は分散させて、溶液又は懸濁液を形成することによって調製されることができる。

【０２０８】

静脈内製剤は、本明細書に記載のポリペプチド装入済みＥＶ（例えば抗体装入済み神経ＥＶ）と、等張媒体と、ポリペプチド装入済みＥＶの凝集を防止する１つ以上の物質とを含むことができる。例示の静脈内／髄腔内／脳脊髄液内製剤は、食塩水（例えば生理食塩水（ＮＳ）、約０．９１％ｗ／ｖのＮａＣｌ、約３００ｍＯｓｍ／Ｌ）及び／又は０．１８％食塩水中のデキストロース４％と、任意で１％、２％、又は３％のヒト血清アルブミンとを含有してもよい。更に、ポリペプチド装入済みＥＶを破壊して内容物を取得し、この内容物を本発明による組成物中で使用してもよい。

【０２０９】

経口液体調製物での使用のために、組成物を溶液、懸濁液、乳液、又はシロップとして調製することもでき、これは液体形態で、又は水若しくは生理食塩水中での水和に適した乾燥形態で供給される。経口投与についての賦形剤としては、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、でんぷん、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石、セルロース、グルコース、ゼラチン、ショ糖、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。必要に応じて、組成物は湿潤剤、乳化剤、又は緩衝剤などの少量の非毒性補助物質を含んでもよい。

【０２１０】

鼻腔内、気管内又は肺内投与の場合、組成物は、鼻、気管、及び／又は肺内へとスプレーすることができる液体又はエアロゾル製剤として提供されることができる。

【０２１１】

組成物が経口投与用の固体調製物の形態で使用される場合、この調製物は、錠剤、顆粒、粉末、カプセルなどにされることができる。錠剤製剤では、組成物は通常は添加剤、例えば糖類又はセルロースの調製物などの賦形剤、でんぷんペースト又はメチルセルロースなどの結合剤、充填剤、崩壊剤、及び医薬調製物の製造に一般的に使用される他の添加剤と共に製剤される。

【０２１２】

本明細書において提供される医薬組成物（例えばポリペプチド装入済みＥＶを含む医薬組成物）は、対象に１回の投与をすることができ、あるいは複数回の投与をある期間に亘って実施してもよい。例えば２回、３回、４回、５回、又はそれ以上の投与が、１回の治療中に、又はある設定された期間で、対象になされもよい。いくつかの例では、６回、８回、１０回、１２回、１５回、又は２０回以上の投与が、治療レジメンとして、１回の治療中に又はある設定された期間で、対象になされもよい。他の例では、例えば神経学的障害に関連する症状が持続する限り、投与が必要に応じてなされてもよい。いくつかの実施形態では、対象の余生について反復投与が必要とされる。例示の投薬スケジュールとしては、１日１回、２日に１回、３日に１回、１週間に１回、２週間に１回、１か月に１回、２か月に１回、３か月に１回、６か月に１回、１２か月に１回、又はそれ以上の期間に１回の、ポリペプチド装入済みＥＶを含む医薬組成物の投与が挙げられる。

【０２１３】

いくつかの態様では、本発明は、１つ以上の追加の治療剤を更に含む、ポリペプチド装入済みＥＶ（例えば抗体装入済み神経ＥＶ）を含む医薬組成物を提供する。

【０２１４】

いくつかの実施形態では、ＥＶは、１つ以上の阻害性核酸を含むことができる。例えばいくつかの実施形態では、ＥＶは、短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短鎖ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、及び二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）から選択される、１つ以上の阻害性核酸を含むことができる。

【０２１５】

いくつかの実施形態では、ＥＶは、１つ以上の神経栄養剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、ＥＶは、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、上皮増殖因子受容体（ＥＧＦ）、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、ＦＧＦ－６、グリア由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（ＧＣＳＦ）、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、ＩＦＮ－γ、インスリン様増殖因子結合タンパク質（ＩＧＦＢＰ－２）、ＩＧＦＢＰ－６、ＩＬ－１ｒａ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、単球走化性タンパク質（ＭＣＰ－１）、単核食細胞コロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、神経栄養因子（ＮＴ３）、メタロプロテイナーゼの組織阻害剤（ＴＩＭＰ－１）、ＴＩＭＰ－２、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－β）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、ＶＥＧＦ－Ｄ、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子受容体（ｕＰＡＲ）、骨形態形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ＩＬ１－ａ、ＩＬ－３、レプチン、幹細胞因子（ＳＣＦ）、間質細胞由来因子－１（ＳＤＦ－１）、血小板由来増殖因子－ＢＢ（ＰＤＧＦＢＢ）、トランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦβ－１）、及びＴＧＦβ－３から選択される、１つ以上の化学物質を含むことができる。

【０２１６】

本明細書に記載のポリペプチド装入済みＥＶを含む医薬組成物は、単剤療法（単独の薬剤）として、又は併用療法（対象は、ポリペプチド装入済みＥＶを含む医薬組成物を、１つ以上の追加の薬剤と組み合わせて投与される）で、対象に投与されてもよい。ポリペプチド装入済みＥＶを含む医薬組成物、及び１つ以上の追加の薬剤は、同時に、順次又は一時的に、対象に投与されることができる。

【０２１７】
一実施形態では、本開示は、神経学的障害、例えばアルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、神経系の癌（例えば神経膠芽腫若しくは神経芽腫）、視神経脊髄炎、多発性硬化症、片頭痛、慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー（ＣＩＤＰ）、又は多巣性運動ニューロパチーに罹患した対象の治療での使用のために、本明細書に記載のポリペプチド装入済みＥＶを含む医薬組成物（例えば、例えば抗体装入済み神経ＥＶを含む医薬組成物）を提供する。別の実施形態では、本開示は、神経学的障害、例えばアルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、神経系の癌（例えば神経膠芽腫若しくは神経芽腫）、視神経脊髄炎、多発性硬化症、片頭痛、慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー（ＣＩＤＰ）、又は多巣性運動ニューロパチーに罹患した対象の治療用の医薬品の製造における使用のために、本明細書に記載のポリペプチド装入済みＥＶ（例えば、抗体－ＥＶコンジュゲート及び内腔に抗体が装入されたＥＶを含む、抗体装入済みＥＶ）を含む医薬組成物を提供する。

【０２１８】
いくつかの例では、医薬製剤は、流体媒体１ｍｌ当り約５０ｎｇ以上のポリペプチド装入済みＥＶを含んでもよい。例示の医薬製剤は、流体媒体１ｍｌ当り約１００ｎｇ、２００ｎｇ、３００ｎｇ、４００ｎｇ、５００ｎｇ、６００ｎｇ、７００ｎｇ、８００ｎｇ、９００ｎｇ、１．０μｇ、１．５μｇ、２．０μｇ、２．５μｇ、３．０μｇ、５．０μｇ、１０．０μｇ、１５．０μｇ、２０．０μｇ、１００μｇ、又はそれ以上のポリペプチド装入済みＥＶを含むことができる。

【０２１９】
他の実施形態では、医薬製剤は、媒体１ｍｌ当り約０．１μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約０．２μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約０．３μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約０．４μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約０．５μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約０．６μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約０．７μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約０．８μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約０．９μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約１．０μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約１．５μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約２．０μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約２．５μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り少なくとも例えば約３．０μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り例えば少なくとも約５．０μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約１０．０μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、静脈内投与用媒体１ｍｌ当り１５．０μｇのポリペプチド装入済みＥＶ、又は静脈内投与用媒体１ｍｌ当り約２０．０μｇ以上のポリペプチド装入済みＥＶを含んでもよい。

【０２２０】
いくつかの例では、組成物の投与は、単回投与において、１ｋｇ当り1×10^{8}以上のポリペプチド装入済みＥＶを含む。他の例では、ポリペプチド装入済みＥＶ組成物の投与は、１ｋｇ当り1×10^{8}、1×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～1×10^{11}、1×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}又はそれ以上のポリペプチド装入済みＥＶの投与量を含む。いくつかの例では、単回投与が対象に複数回行われる。他の特定の例では、対象への複数回の投与は、静脈内、脳脊髄内、静脈内への注入及び注射のうちの２つ以上を含む。

【０２２１】
いくつかの例では、医薬組成物は、少なくとも１ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも５ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも１０ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも２０ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも２５ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも５０ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも６０

ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも７５ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも１００ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも１５０ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも２００ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも２５０ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、少なくとも３００ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、約３５０ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、約４００ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、約５００ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、約７５０ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶ、約１ｇ（１，０００ｍｇ）以上のポリペプチド装入済みＥＶを、単独で、又は治療有効量の少なくとも１つの追加の薬剤と組み合わせて含む、剤形である。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約１０ｍｇ～約７５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約６５０ｍｇ、又は約３０ｍｇ～約５００ｍｇ、又は約３５ｍｇ～約４５０ｍｇ、最も多くの場合には約５０～約５００ｍｇのポリペプチド装入済みＥＶを含む。

【０２２２】

ポリペプチド装入済みＥＶ、例えば抗体装入済みＥＶ（抗体－ＥＶコンジュゲート及び内腔に抗体が装入されたＥＶを含む）を含む医薬組成物の治療有効量は、治療される状態（例えば神経学的障害、例えばアルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、又は神経系の癌、例えば神経膠芽腫）の１つ以上の症状を治療又は改善するために十分な量であり、同時に重大な副作用を引き起こすおそれのある量を超えない量である。治療上有効な投与量は、治療される状態の特性、治療される特定の個体などの多数の因子に依存し得る。

【０２２３】

Ｄ．治療の方法

いくつかの態様では、本発明は、ポリペプチド装入済みＥＶ（例えば、抗体－ＥＶコンジュゲート及び内腔に抗体が装入されたＥＶを含む、抗体装入済みＥＶ）を含む組成物を用いて、対象を治療する方法を提供する。本明細書に記載のポリペプチド装入済みＥＶを含む組成物又は医薬組成物はいずれも、本明細書で提供されるいずれの方法での使用にも適している。例示の実施形態では、ポリペプチド装入済みＥＶのＥＶは、神経細胞由来、例えば神経前駆細胞、ニューロン、又は星状細胞由来である。他の例示の実施形態では、ポリペプチド装入済みＥＶのＥＶは、合成によって生産され、神経ＥＶの特徴である１つ以上のマーカー、例えばＭＳＣ由来のＥＶ中に存在しない、神経ＥＶ中に存在する１つ以上のタンパク質又は核酸を含有する。

【０２２４】

いくつかの態様では、本発明は、対象における神経学的障害、例えばアルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、神経系の癌（例えば神経膠芽腫若しくは神経芽腫）、視神経脊髄炎、多発性硬化症、片頭痛、慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー（ＣＩＤＰ）、又は多巣性運動ニューロパチーを、治療する（例えば治癒させる、抑制する、その関連症状を改善する、その進行を遅延させる若しくは防止する、その発症を遅延させる若しくは防止する、又は繰り返し若しくは再発を防止する）方法を提供し、その方法は、本明細書に記載のポリペプチド装入済みＥＶを含む組成物を、対象における疾患又は障害を治療するための十分な量で対象に投与するステップを含む。疾患又は障害を治療するための十分な量は、本明細書において提供されているような、好ましくは有効量、例えば治療有効量である。

【０２２５】

治療の結果としての症状の変化は、いずれかの適した対照と比較して測定されることができる。例えば、症状の変化は、治療開始前の同一の患者が経験した症状の頻度、重篤度、若しくは持続時間、又は回数に対して測定されることができる。他の実施形態では、症状の変化は、治療を受けていない、即ちＡｂ－ＥＶを含む組成物を投与されていない、同様の症状を有する異なる対象又は対象のグループに生じた症状の頻度、重篤度、持続時間、又は回数に対して測定されることができる。いくつかの実施形態では、軽減の程度は、適した対照と比較して決定した場合に、少なくとも５％、即ち少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％又

はそれ以上である。
【０２２６】
いくつかの実施形態では、ポリペプチド装入済みＥＶを含む組成物は、単回投与として対象に投与される。いくつかの実施形態では、Ａｂ－ＥＶを含む組成物は、複数回投与で投与される。例えばいくつかの実施形態では、組成物を毎日、２日に１回、３日に１回、４日に１回、５日に１回、６日に１回、７日に１回、２週間に１回、３週間に１回、４週間に１回、８週間に１回、又は１２週間に１回投与することができる。
【０２２７】
本明細書に記載の本発明の方法の他の適した修正及び改変は容易になされ、本明細書で開示される本発明の範囲又は実施形態から逸脱することなく、適した均等発明を用いてなされ得ることは、当業者には容易に分かるであろう。本発明を詳細に説明してきたが、本発明は以下の実施例を参照するでより明確に理解される。実施例は、単なる例示を目的とするものであり、限定を意図したものではない。
【実施例】
【０２２８】
以下の実施例は単なる例示であり、本明細書において提供される開示の範囲を限定することは全く意図されていない。
【０２２９】
実施例１：抗体で表面標識された神経前駆細胞の細胞外小胞の調製
この実施例は、クリックケミストリーを用いた、神経前駆細胞由来の細胞外小胞（ＥＶ）への抗体（Ａｂ）の結合を説明する。
【０２３０】
ＥＶの精製済みの集団を、米国特許出願公開第２０１８／０３２７７１４号（その全内容が参照により本出願に援用される）で提供される方法に従って、神経前駆細胞から得た。簡潔に述べると、米国特許出願公開第２０１８／０３２７７１４号に記載されるようにしてヒト神経前駆細胞を培養した。培地交換の２４時間後に、神経前駆細胞のコンフルエントな培養物から細胞培地を回収し、－２０℃で冷凍した。培地を４℃で一晩解凍し、細胞外小胞（ＥＶ）の精製の前に、０．２２μｍフィルタユニットを通して培地をろ過した。タンジェンシャルフローろ過を用いて、ろ過された細胞培養培地から細胞外小胞を精製した。
【０２３１】
ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ　Ｐｌｕｓ　６４７で標識されたヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体は、マウスモデルにおいて反応性及び免疫原性が欠乏していることが予想されたため、概念実証の実験のために選択された。ＳＩＴＥＣＬＩＣＫ（商標）抗体アジド修飾法（ThermoFisherカタログ番号Ｓ２００２６を参照）を用いて、アジド基を含むように抗体（Ａｂ）を修飾した。製造元の推奨に従った。
【０２３２】
これとは別に、ＥＶの表面でのアミン基を標的とするＳＤＰエステル基を介してｓＤＩＢＯを呈するように、ＥＶを修飾した。ｓＤＩＢＯ（ＣＬＩＣＫ－ＩＴ（商標）ＳＤＰエステルｓＤＩＢＯアルキン、カタログ番号Ｃ２００２５）を、ＥＶ１個に対してｓＤＩＢＯの分子５．９５ｅ^{5}個の比率で、室温で２時間に亘ってＥＶと反応させた。この数は、後のステップで付加されるＡｂ分子の個数の約１０倍となるように選択された。
【０２３３】
遊離した未結合の抗体の用量漸増試験により、肝臓において高いシグナルを定性的に検出するためには、１００μＬの用量で約８×１０^{13}個のＡｂの注射が必要であることが示されたため、それをＥＶに架橋するための用量として選択した。ＥＶ１個に対してＡｂを５．９５ｅ^{4}個の比率で、アジド－ＡｂをｓＤＩＢＯ－ＥＶと混合した。混合された時に、その後に銅を使用しないクリックケミストリー反応により、抗体をＥＶと結合させた（図１）。
【０２３４】

実施例２：ＥＶ－Ａｂコンジュゲートのインビボ投与

この実施例は、マウスにおける細胞外小胞－抗体（ＥＶ－Ａｂ）コンジュゲートのインビボ投与を説明する。ＥＶ－Ａｂ混合物、Ａｂのみ、及びＰＢＳ（ｎ＝１／条件）を、一晩のインキュベーションの後で、動物に静脈内注射した。約２時間後に動物を安楽死させて、脳を保存した。組織を固定し、凍結切片を作製し、場合によってはＴｒｕｅＢｌａｃｋリポフスチン自家蛍光クエンチャー（Ｂｉｏｔｉｕｍ）で処理してバックグラウンドを抑制した。切片を抗ヤギ二次抗体で染色した後に撮像した。

【０２３５】

染色済み及び未染色の切片を、Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ　７１０共焦点顕微鏡で撮像した。シグナルからバックグラウンドを区別するために、画像を複数の波長で撮影したが、これは場合によって、Ｚｅｉｓｓ　Ｚｅｎ　２０１２　Ｂｌｕｅソフトウェアを用いてラムダ画像を線形アンミキシングで撮影することを含む。まず、ＰＢＳ処理済みの動物の脳切片からランダムに選択されたフレームを撮像し、シグナル対ノイズ比の感触をつかんだ。未処理の脳切片を撮像して分析した後に、Ａｂ－ＥＶ混合物で処理された動物を、自動タイル分割Ｚスタックで、半球のスライスとして撮像した。低倍率で複数の波長において切片全体を撮像した後に、ズーム及びスキャンのためにＩｍａｇｅＪソフトウェアを用いて、切片を手動で検査した。Ａｂ処理済みの動物の１つの半球も同様にスキャン及び分析した。分析後、Ａｂ－ＥＶ半球（図２Ｂ）は、ＰＢＳ処理済みの脳のスライス又はＡｂのみで処理された脳のスライス（図２Ａ）とは異なるシグナルのパターンを有していた。Ａｂのみで処理されたマウス及びＰＢＳ処理済みのマウスはいずれも、強度の点状蛍光を示し、これは領域毎に見た目が異なり、これは自家蛍光を示す。点状蛍光のない領域では、ＴｒｕｅＢｌａｃｋリポフスチン自家蛍光クエンチャー（Biotium）によってシグナルが完全に抑制された。Ａｂ－ＥＶの半球は、ＰＢＳ処理済みの脳のスライス及びＡｂのみで処理された脳のスライスと同様の領域において、同様の自家蛍光を示した。しかしながら、Ａｂのみで処理された脳及びＰＢＳ処理済みの脳で抑制された領域において、Ａｂ－ＥＶは、高強度のシグナルの蓄積パターンを示し、これは高強度での細胞の形状でのシグナルの蓄積を示し（図２Ｂ）、脳組織へのＡｂ－ＥＶコンジュゲートの送達を実証している。

【０２３６】

実施例３：細胞外小胞の内腔への装入

この実施例は、ＥＶの膜の透過処理による、神経前駆細胞由来の細胞外小胞の内腔へのポリペプチド（例えば抗体又はルシフェラーゼタンパク質）の装入を説明する。

【０２３７】

サポニン透過処理（０．２％ｗ／ｗ）、インキュベーション、電気穿孔、又は超音波処理によって、抗体を神経前駆細胞由来のＥＶに装入した。サポニン透過処理は界面活性剤に基づく装入を提供し、振盪（５００ｒｐｍ）と組み合わされた。インキュベーションは、振盪（１０００ｒｐｍ）を伴って室温で実施された。電気穿孔は、Ｎｅｏｎトランスフェクションシステムを５００Ｖ、１ｍｓ幅、及び１２パルスで使用して実施された。最後に超音波処理は、Ｆｉｓｈｅｒｂｒａｎｄ　Ｍｏｄｅｌ　５０５ソニケーター（５００Ｗ、２０ｋＨｚ）を２０％振幅、４秒オン／８秒オフの１２サイクルで用いて行われた。これらの様々な装入手順を試験した後に、エクソソーム（ＥＶ）１個当り抗体分子２５，０００個以上で、エクソソームの内腔への抗体の装入がなされた。図３Ａ。

【０２３８】

サポニン透過処理、インキュベーション、又は超音波処理によって、ルシフェラーゼタンパク質（６２ｋＤａ）を神経前駆細胞由来のＥＶに装入した。サポニン透過処理は界面活性剤に基づく装入を提供し、タンパク質の添加前の超音波処理と組み合わされた。インキュベーションは、振盪（１０００ｒｐｍ）を伴って室温で実施された。最後に超音波処理は、Ｆｉｓｈｅｒｂｒａｎｄ　Ｍｏｄｅｌ　５０５ソニケーター（５００Ｗ、２０ｋＨｚ）を用いて行われた。振幅、パルス時間、及びサイクル数を変化させた複数の組み合わせを試験した（以下の表１２に記載）。直接のプローブ超音波処理はルシフェラーゼタンパク質の機能を破壊するため、全ての超音波処理プロトコルはカップホーンアクセサリを

用いて実施された。５０回以上の装入手順を試験した後で、１５％以上のタンパク質の装入効率が達成された。図３Ｂには、表１２に記載されている各条件について、装入効率が記載されている。

【０２３９】

表１２：ＥＶの内腔に装入されたポリペプチドを試験する条件

条件#	装入条件の説明
1	サポニン (0.2%)、超音波処理、20%振幅、10 分
2	サポニン (0.2%)、超音波処理、40%振幅、10 分
3	20% Amp、12 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
4	40% Amp、12 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
5	60% Amp、12 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
6	20% Amp、36 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
7	40% Amp、36 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
8	60% Amp、36 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
9	室温で１８時間のインキュベーション、振盪
10	20% Amp、24 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
11	40% Amp、24 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
12	60% Amp、24 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
13	20% Amp、12 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
14	40% Amp、12 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
15	60% Amp、12 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
16	20% Amp、24 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
17	40% Amp、24 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
18	60% Amp、24 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
19	20% Amp、36 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
20	40% Amp、36 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
21	60% Amp、36 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
22	20% Amp、12 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
23	40% Amp、12 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
24	60% Amp、12 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
25	20% Amp、24 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
26	40% Amp、24 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
27	60% Amp、24 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
28	20% Amp、36 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
29	40% Amp、36 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
30	60% Amp、36 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
31	20% Amp、5 分間一定
32	20% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
33	40% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
34	60% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
35	20% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
36	40% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
37	60% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
38	20% Amp、6 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
39	40% Amp、6 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
40	60% Amp、6 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
41	サポニン (0.2%)、超音波処理、20% Amp、5 分
42	80% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ

条件#	装入条件の説明
43	80% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
44	80% Amp、6 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
45	80% Amp、12 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
46	100% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ
47	100% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ
48	100% Amp、6 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ
49	60% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ、氷上に 2 分、1 回反復
50	60% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ、氷上に 2 分、1 回反復
51	60% Amp、6 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ、氷上に 2 分、1 回反復
52	80% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ、氷上に 2 分、1 回反復
53	80% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 2 秒オフ、氷上に 2 分、1 回反復
54	80% Amp、6 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ、氷上に 2 分、1 回反復
55	100% Amp、6 サイクル、4 秒オン/ 8 秒オフ、氷上に 2 分、1 回反復
56	100% Amp、6 サイクル、2 秒オン/ 4 秒オフ、氷上に 2 分、1 回反復

Ａｍｐ＝振幅

【０２４０】

参照による援用

本出願全体を通して引用されている参考文献、特許、係属中の特許出願、及び刊行物の内容は、その全体が参照により本出願に明示的に援用される。

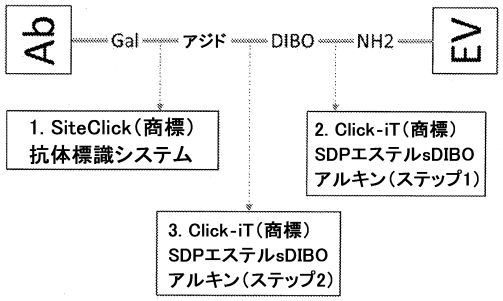
【０２４１】

均等発明

当業者であれば、本明細書に記載の発明の具体的実施形態の多数の均等発明を認識し、又はありふれた実験だけを用いて確認できるであろう。そのような均等発明は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

【図面】

【図１】



【図２】

図 2A

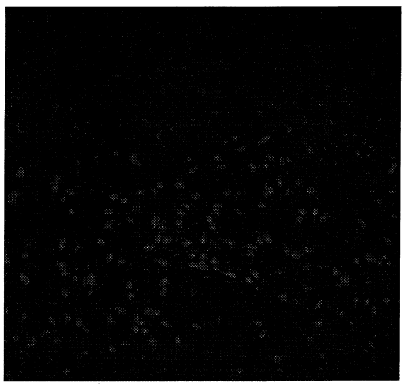
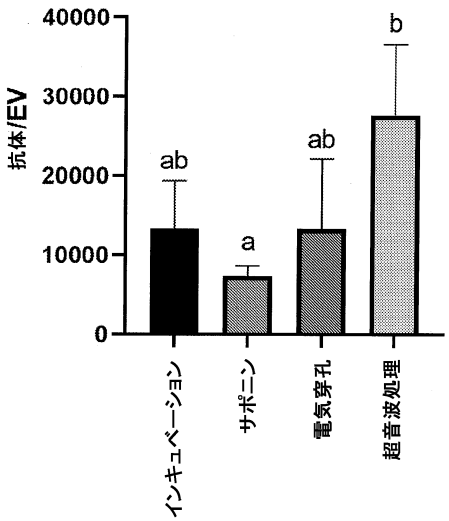


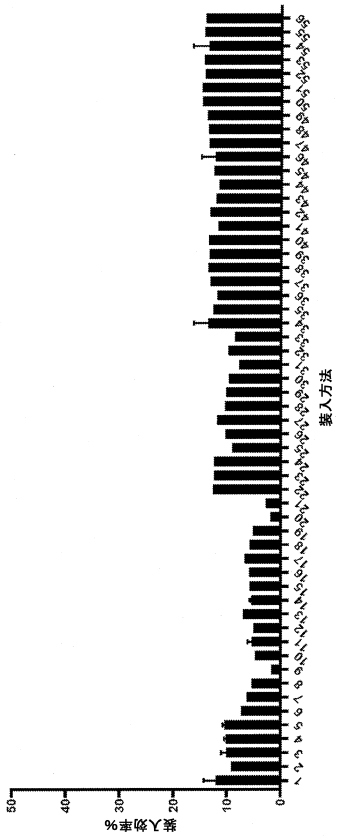
図 2B



【図３Ａ】



【図３Ｂ】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/58968

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 39/39, A61K 9/127, A61K 39/00, C12N 15/88, A61K 35/12, A61K 47/65 (2021.01)
CPC - A61K 39/39533, A61K 39/385, A61K 47/6911, A61K 9/1271, A61K 2039/575, A61K 2039/57

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---- Y	US 2018/0327714 A1 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC. et al.) 15 November 2018 (15.11.2018) Abstract; Claim 14; Claim 18; para [0049]; para [0052]; para [0058]; para [0072]; para [0113]; para [0146]; para [0174]; para [0190];	35-39 ---- 1-10, 40-41
X	WO 2017/173034 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 5 October 2017 (05.10.2017) Abstract; Claim 1; para [0117]; para [0125-0126]; para [0127] - [0129]	32-34
Y	US 2012/0177724 A1 (IRVINE et al.) 12 July 2012 (12.07.2012) Abstract; para [0074]; para [0136]; para [0138]; para [0224]	1-10, 40-41

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 March 2021	MAR 16 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/58968

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 11-22, 29-31, 42-48
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
---Please see continuation in first extra sheet----------

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-10, 32-41

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US 20/58968

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

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

Group I, claims 1-10, 35-41, directed to a method of delivering an antibody, or antigen binding portion thereof, to the central nervous system (CNS) of a subject.

Group II, claims 23-28, directed to a composition comprising an antibody-EV (Ab-EV) conjugate.

Group III, claims 32-34, directed to a method of loading an antibody, or antigen-binding portion thereof, into the lumen of an extracellular vesicle (EV).

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a method of delivering an antibody, or antigen binding portion thereof, to the central nervous system (CNS) of a subject, that is not required by Groups II-III.

Group II has the special technical feature of a composition comprising an antibody-EV (Ab-EV) conjugate, that is not required by Groups I and III.

Group III has the special technical feature of a method of loading an antibody, or antigen-binding portion thereof, into the lumen of an extracellular vesicle (EV), that is not required by Groups I-II.

Common technical features:

Groups I-III share the common technical feature of an antibody-EV (Ab-EV) conjugate. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is anticipated by US 2018/0327714 A1 to University of Georgia Research Foundation, Inc. et al., (hereinafter 'Univ Georgia').

Univ Georgia teaches an antibody-EV (Ab-EV) conjugate used for the treatment a CNS disease (Abstract - 'Disclosed herein are neural extracellular vesicles (EVs) and methods of using these EVs in the treatment of spinal cord injury, stroke, and traumatic brain injury and neurodegenerative diseases.'; para [0113] - 'EVs may be loaded with small molecules, antisense oligonucleotides, siRNAs, peptides, proteins or antibodies that target, peptides or peptide translation products which are involved in neurodegenerative processes.'; Claim 14 - 'The composition of claim 11, wherein the EVs comprise one or more protein biomarkers of Table 7.'; para [0058] - 'exogenous protein and/or peptide and other cargo can be introduced into the EVs by a number of different techniques including electroporation or the use of a transfection reagent. A voltage in the range of 150 mV to 250 mV, particularly a voltage of 200 mV is preferred for loading EVs with an antibody.'; Claim 18 - 'A method of treating a subject with a with a spinal cord injury, stroke, traumatic brain injury or a neurodegenerative disease comprising administering to the subject an effective amount of a composition of claim 1.').

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-III inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, continuation of Item 4 above: claims 11-22, 29-31, 42-48 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61P	*25/00 (2006.01)*	A61P	25/00		
C12N	*5/0793(2010.01)*	C12N	5/0793		
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		
C12N	*5/0735(2010.01)*	C12N	5/0735		
C07K	*16/18 (2006.01)*	C07K	16/18		
C07K	*16/28 (2006.01)*	C07K	16/28		
C07K	*16/22 (2006.01)*	C07K	16/22		
C12N	*15/113 (2010.01)*	C12N	15/113	Z	
C12N	*15/88 (2006.01)*	C12N	15/88	Z	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

アメリカ合衆国 ジョージア州 ３０６０６， アセンズ， ウェストパーク ドライブ ２６５

Ｆターム（参考） 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC20 BA01 BD39 BD50 CA44
4C076 AA19 AA64 AA95 BB11 BB13 BB25 CC01 CC50 EE57H EE59
4C085 AA13 AA14 CC03 DD52 EE01 GG02 GG10
4H045 AA11 AA30 BA50 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26