

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-512464

(P2017-512464A)

(43) 公表日 平成29年5月25日 (2017.5.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 C 0 7 6
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D 4 H 0 4 5
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-555727 (P2016-555727)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月4日 (2014.12.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年11月4日 (2016.11.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2014/000861
 (87) 国際公開番号 W02015/131257
 (87) 国際公開日 平成27年9月11日 (2015.9.11)
 (31) 優先権主張番号 61/948,818
 (32) 優先日 平成26年3月6日 (2014.3.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 595006223
 ナショナル リサーチ カウンシル オブ
 カナダ
 カナダ国, オンタリオ ケー1エー Oア
 ール6, オタワ, モントリオール ロード
 1 2 0 0
 (74) 代理人 100107456
 弁理士 池田 成人
 (74) 代理人 100162352
 弁理士 酒巻 順一郎
 (74) 代理人 100123995
 弁理士 野田 雅一
 (74) 代理人 100148596
 弁理士 山口 和弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン様成長因子1 受容体特異的抗体及びそれらの使用

(57) 【要約】

血液脳関門 (BBB) は、500ダルトンを超える分子が血液から脳に輸送されるのを妨げる。受容体媒介性トランスサイトーシス (RMT) は、BBBを形成する脳内皮細胞上の受容体に結合する特定の分子が、BBBを通過して輸送されるのを促進する。インスリン様成長因子1受容体 (IGF1R) 結合抗体又はその断片が、RMTによりBBBを通過するものとして同定されている。この抗体又は断片は、BBBを通過させてカーゴ分子を送達するために使用され、ここでカーゴ分子は治療剤又は検出可能な試剤である。この抗体は、933アミノ酸のIGF1Rポリペプチドでラマを免疫することによって調製されるラクダ科動物VHHである。このラクダ科動物VHHのヒト化形態も作製される。

【選択図】 図9C

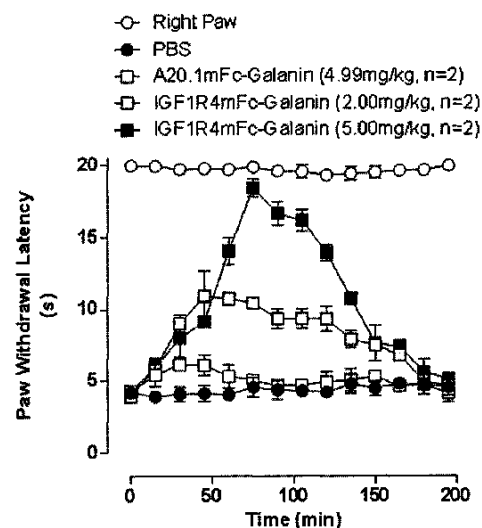


FIG 9C

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インスリン様成長因子 1 受容体 (IGF1R) エピトープに特異的に結合する単離又は精製抗体又はその断片であって、前記抗体又はその断片が血液脳関門を通過し、前記エピトープが、配列番号 5 の抗体により特異的に結合される、抗体又はその断片。

【請求項 2】

GGTVSPTA の相補性決定領域 (CDR) 1 配列 (配列番号 1)、

ITWSRGTT の CDR 2 配列 (配列番号 2)、及び

AASTFLRLILPEESAYTY の CDR 3 配列 (配列番号 3)

を含み、インスリン様成長因子 1 受容体 (IGF1R) に特異的である単離又は精製抗体又はその断片。

10

【請求項 3】

配列

X₁ V X₂ L X₃ E S G G G L V Q X₄ G G S L R L S C X₅ X₆ S G G T V S P T A M
G W X₇ R Q A P G K X₈ X₉ E X₁₀ V X₁₁ H I T W S R G T T R X₁₂ A S S V K
X₁₃ R F T I S R D X₁₄ X₁₅ K N T X₁₆ Y L Q M N S L X₁₇ X₁₈ E D T A V
Y Y C A A S T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T X₁₉ V T V S S (配列番号 4)
(式中、X₁ は E 又は Q であり、X₂ は K 又は Q であり、X₃ は V 又は E であり、X₄
は A 又は P であり、X₅ は A 又は E であり、X₆ は V 又は A であり、X₇ は V 又は F であ
り、X₈ は G 又は E であり、X₉ は L 又は R であり、X₁₀ は F 又は W であり、X₁₁ は
G 又は S であり、X₁₂ は V 又は Y であり、X₁₃ は D 又は G であり、X₁₄ は N 又は S
であり、X₁₅ は A 又は S であり、X₁₆ は L 又は V であり、X₁₇ は K 又は R であり、
X₁₈ は A 又は S であり、X₁₉ は L 又は Q である)、

20

又はそれと実質的に同一の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 4】

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S L R L S C E V S G G T V S P T A M G W F R Q
A P G K E R E F V G H I T W S R G T T R V A S S V K D R F T I S R D S A K N T V
Y L Q M N S L K S E D T A V Y Y C A A S T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T Q
V T V S S (配列番号 5) ;

30

Q V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G G T V S P T A M G W V R Q A
P G K G L E W V G H I T W S R G T T R Y A S S V K G R F T I S R D N S K N T V Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A A S T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T L V
T V S S (配列番号 6) ;

Q V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G G T V S P T A M G W F R Q A
P G K G L E F V G H I T W S R G T T R Y A S S V K G R F T I S R D N S K N T V Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A A S T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T L V
T V S S (配列番号 7) ;

Q V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G G T V S P T A M G W F R Q A
P G K G L E F V G H I T W S R G T T R Y A S S V K G R F T I S R D S S K N T V Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A A S T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T L V
T V S S (配列番号 8) ;

40

Q V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G G T V S P T A M G W F R Q A
P G K E R E F V G H I T W S R G T T R Y A S S V K G R F T I S R D S S K N T V Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A A S T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T L V
T V S S (配列番号 9) ; 及び

又はそれと実質的に同一の配列からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 5】

前記抗体が単一ドメイン抗体 (sdAb) である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載

50

の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 6】

前記 s d A b がラクダ科動物由来である、請求項 5 に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 7】

多価ディスプレイ形式である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 8】

F c 断片に連結されている、請求項 7 に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 9】

前記 F c 断片が、マウス F c 2 b 又はヒト F c 1 である、請求項 8 に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 10】

配列番号 10、38、又は 11 の配列を含む、請求項 9 に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 11】

血液脳関門を通過する、請求項 2 ～ 10 のいずれか一項に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 12】

請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の単離又は精製抗体又はその断片をコードする核酸分子。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 14】

表面に固定化されている、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 15】

カーゴ分子に連結されている、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 16】

前記カーゴ分子が、約 1 k D ～ 約 200 k D a の範囲の分子量を有する、請求項 15 に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 17】

前記カーゴ分子が、検出可能な試剤、治療剤、薬物、ペプチド、成長因子、サイトカイン、受容体トラップ、化合物、炭水化物部分、酵素、抗体若しくはその断片、DNA ベース分子、ウイルスベクター、若しくは細胞毒性剤；検出可能な試剤、治療剤、薬物、ペプチド、酵素、抗体若しくはその断片、DNA ベース分子、ウイルスベクター、若しくは細胞毒性剤が充填された 1 つ若しくは複数のリボソーム若しくはナノ担体；又は 1 つ若しくは複数のナノ粒子、ナノワイヤ、ナノチューブ、若しくは量子ドットである、請求項 15 又は 16 に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 18】

1 つ又は複数の、請求項 1 ～ 11 及び 14 ～ 17 のいずれか一項に記載の単離又は精製抗体又はその断片及び薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤を含む組成物。

【請求項 19】

a) 組織試料を、検出可能な試剤に連結された 1 つ又は複数の、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の単離又は精製抗体又はその断片と接触させるステップ、及び

b) 前記組織試料において、IGF1R に結合した前記抗体又はその断片に連結された前記検出可能な試剤を検出するステップを含む、IGF1R を検出するインビトロ方法。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

前記試料が、ヒト又は動物対象からの血清試料、血管組織試料、腫瘍組織試料、又は脳組織試料である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記検出するステップ（ステップ b））が、光学イメージング、免疫組織化学、分子画像診断、E L I S A、イメージング質量分析、又は他の好適な方法を使用して実施される、請求項 19 又は 20 に記載の方法。

【請求項 22】

対象における I G F 1 R 発現を検出するインビボ方法であって、

a) 検出可能な試剤に連結された 1 つ又は複数の、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の単離又は精製抗体又はその断片を、対象に投与するステップ、及び

b) I G F 1 R に結合した前記抗体又はその断片に連結された前記検出可能な試剤を検出するステップを含むインビボ方法。

【請求項 23】

前記検出するステップ（ステップ b））が、P E T、S P E C T、蛍光イメージング、又は任意の他の好適な方法を使用して実施される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

血液脳関門（B B B）を通過させてカーゴ分子を輸送する方法であって、

a) カーゴ分子に連結された 1 つ又は複数の、請求項 11 に記載の単離又は精製抗体又はその断片を、対象に投与するステップ、

を含み、
前記 1 つ又は複数の抗体又はその断片が、B B B を通過させて前記カーゴ分子をフェリーする、方法。

【請求項 25】

前記カーゴ分子が、約 1 k D ～ 約 2 0 0 k D a の範囲の分子量を有する、請求項 24 に記載の単離又は精製抗体又はその断片。

【請求項 26】

目的の前記分子が、検出可能な試剤、治療剤、薬物、ペプチド、成長因子、サイトカイン、受容体トラップ、化合物、炭水化物部分、酵素、抗体若しくはその断片、D N A ベース分子、ウイルスベクター、若しくは細胞毒性剤；検出可能な試剤、治療剤、薬物、ペプチド、酵素、抗体若しくはその断片、D N A ベース分子、ウイルスベクター、若しくは細胞毒性剤が充填された 1 つ若しくは複数のリボソーム若しくはナノ担体；又は 1 つ若しくは複数のナノ粒子、ナノワイヤ、ナノチューブ、若しくは量子ドットである、請求項 24 又は 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記投与が、静脈内（i v）、皮下（s c）、又は筋肉内（i m）である、請求項 24 ～ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

対象の B B B を通過して送達されたカーゴ分子の量を定量する方法であって、

カーゴ分子が、1 つ又は複数の、請求項 11 に記載の単離又は精製抗体又はその断片に連結され、

a) 対象から脳脊髄液（C S F）を回収するステップ、及び

b) 標的化プロテオミクス方法を使用して、前記 C S F における前記 1 つ又は複数の単離又は精製抗体又はその断片に連結された前記カーゴ分子の量を定量するステップを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

本発明は、インスリン様成長因子 1 受容体特異的抗体、それらの断片、及びそれらの使用に関する。より詳細には、本発明は、血液脳関門を通過するインスリン様成長因子 1 受

10

20

30

40

50

容体特異的抗体及びそれらの断片、並びにそれらの使用に関する。

【発明の背景】

【0002】

神経変性疾患、たとえばアルツハイマー病及びパーキンソン病は、我々の高齢化社会において大きな負担となってきた。なぜなら、現在のところ、これらの障害に対して有効な治療法がないからである。脳に生じるこれら及び他の疾患の治療は、早期診断とともに、困難なものであり続けている。なぜなら、好適な治療用分子及び診断剤の大半が、密着し高度に制約的な血液脳関門（BBB）を透過できないからである（Abbott、2013）。BBBは、血管を裏打ちし、密着結合を介して互いに結合する脳内皮細胞（BEC）により形成される物理的障壁を構成する（Abbott、2013）。BEC間に形成される密着結合は、BBBの完全性に必須であり、500ドルトン（Da）より大きな分子の傍細胞輸送を妨げる。脳内皮細胞は、非常に低い飲作用速度を示す（Abbott、2013）ので、より大きな分子の傍細胞輸送は、高度に特異的な受容体媒介性トランスサイトーシス（RMT）経路、及び受動性の、電荷に基づく吸着媒介性トランスサイトーシスに限定される（Abbott、2013；Pardridge、2002）。加えて、排出ポンプ、たとえばP-糖タンパク質又は多剤耐性タンパク質-1（MDR-1）の高密度に存在することは、脳からの望ましくない物質の除去に貢献する（Abbott、2013）。

10

【0003】

すべてのこれらの特性が、病原体及び毒素から脳を保護する一方で、同程度に、ほとんどの治療剤の侵入を妨げる。実際に、薬理学的に適切な（すなわち、中枢神経系（CNS）標的に関与し、薬理学的／治療的反応を誘発するのに十分な）濃度でBBBを通過できるのは、特異的に「フェリー（ferried）」されない限り、すなわち、輸送体分子とカップリングされない限り、小分子治療剤の5%未満であり、より大きな治療剤は事実上一切通過できない。BBBを通過させて分子を輸送する有効な「担体」の欠如により、神経変性疾患に対する数多くの薬物は、さらなる開発が「棚上げ」にされるか、又は中止されてきた。なぜならそれらの薬物は、十分な量で脳に送達されえないからである。

20

【0004】

より大きな分子を脳内に送達する異なるアプローチが探究されてきた。たとえば、BBBの完全性を破壊し、漏出性BBB（leaky BBB）をもたらすことができ、ひいては、脳内へのより大きな分子の非制約的な傍細胞侵入を可能にする。密着結合は、様々なアプローチで、うまくゆるめたり破壊したりできる。たとえば、浸透圧衝撃を誘導する物質（たとえば、マンニトール、高張液）の血流内への注入は、細胞収縮を引き起こし、密着結合の破壊をもたらす、したがってBBBを激しく損なう（Guillaume、2010）。他の密着結合のモジュレーターには、アルキルグリセロール、ブラジキニン及びそのいくつかのアナログが、密着結合の維持に関与するタンパク質の発現を調節するウイルスとともに含まれる（Erdlenbruchら、2003；Prestonら、2008；Ganら、2013）。BBBのより限局的な破壊が、超音波の適用によって可能である（Nhanら、2013）。しかしながら、BBBが破壊されている期間は、脳恒常性を変化させ、有害な化学物質、毒素及び病原体の脳への侵入を可能にするのに十分であり、これは、深刻な副作用、たとえば発作並びに脳腫脹、感染症及び場合によって恒久的な神経病理学的変化をもたらす。当業者には明らかであろうとおり、複数の脳領域に発症する慢性及びびまん性脳疾患に対するこれら技術による反復治療は、実際的ではない。これらの治療のほとんどが高コストであり、入院を必要とし、いくつかのアプローチは麻酔を必要とする。

30

40

【0005】

BBBを回避するための別のアプローチは、脳脊髄液（CSF）、実質空間（parenchymal space）、又は脳の他の部分内への治療用分子の直接注射である。注入又は対流増強拡散（CED：convection-enhanced diffusion）ポンプを介した大脳内（実質内）、脳室内、及び髄腔内送達を含む、複数の送

50

達方法が開発されてきた。しかしながら、どのタイプの脳内への直接注射又は大脳内移植片も、侵襲性で高コストの処置である。なぜならそれは、入院、麻酔、及び多くの場合に手術を必要とするからである。さらに、治療剤、特に大きな生物製剤の脳実質内での乏しい拡散率は、治療剤の透過を、注射／移植の部位を囲むきわめて小さな領域に制限する。注射、カテーテル、及び移植片の正確な配置は、困難であるが、脳の標的領域への薬物の拡散を達成するのに決定的に重要である。加えて、カテーテル及び移植片は、部位に感染症及び／又は異物に対する免疫反応をもたらす。

【0006】

B B Bを通過する送達を増加させる別の試みにおいて、C N S薬は、それらの脳への取込みが増加するよう改変されてきた。かかる改変には、それらの表面電荷の変化、分子サイズの低減、及び薬物の親油性 (l i p o h i l i c i t y) の変化が含まれる。しかしながら、脳透過性を増加させるどのような改変もまた、薬物の薬理全体、たとえばその所望の活性及び／又は特異性を変化させる可能性が高い。加えて、親油性分子は、P－糖タンパク質排出ポンプによって脳から排出される傾向にある。

【0007】

最後に、B B Bを通過する内因性輸送機序が利用されてきた。B B Bを通過するより大きな分子の輸送を可能にする生理機序は、高度に特異的な受容体媒介性トランスサイトosis (R M T) 経路と非特異的な電荷ベースの吸着媒介性エンドサイトosis経路とに分けられる。エンドサイトosisはそれぞれ、その受容体に対する特異的なリガンドの結合に際して、又はカチオン性リガンド若しくは薬物と脳内皮細胞表面 (管腔側) 上のアニオン性官能基との間の静電相互作用に際して誘発される。続いて、新しく形成されたエンドソームが細胞を通過して反管腔側へとトランスサイトosisされ、そのカーゴを放出する。

【0008】

吸着媒介性トランスサイトosisは非特異的な電荷媒介性相互作用であるので、すべての血管床及び器官で生じ、脳送達のための薬物の利用可能性を制限する。したがって、R M T経路を利用することは、唯一の、生理的で非侵襲的だが高度に受容体特異的な脳送達方法である。

【0009】

ごく少数の受容体が、B B BでR M Tを生じ、それらの天然リガンドを、B B Bを通過させて「フェリー」すると、現在のところ知られている。これらは、よく研究されているトランスフェリン受容体 (T f R) 、インスリン受容体 (I R) 、低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質1及び2 (L R P－1及び－2) 、ジフテリア毒素受容体、及びT M E M 3 0 Aである。これらの受容体と結合し、内因性R M T経路を利用する薬物の脳への輸送体として機能するペプチド、天然リガンド、及び抗体又は抗体断片が開発されてきた (P a r d r i d g e ら、1991 ; Y u ら、2011 ; M u r u g a n a n d a m ら、2001 ; A b u l r o b ら、2005 ; D e m e u l e、2008 ; S u m b r i a ら、2013) 。しかしながら、これまで、第I相臨床研究で解析されたのはたった1つのペプチド (A n g i o p e p A N G 1 0 0 5、L R P－1を標的とする) のみで、他の候補は実験室環境で研究されている。R M T経路は、脳への薬物輸送のための最も有望な経路であるようであるが、現在のアプローチには、B B Bにおける標的受容体の非選択的発現、受容体に対する担体と天然リガンドとの間の競合、受容体の無効なトランスサイトosis及びエンドサイトosisされた担体のリソソーム分解を含む制約がある (X i a o 及び G u n、2013) 。

【0010】

高性能及び高選択性B B B担体の欠如は、脳腫瘍及び神経変性疾患を含む脳に起因する疾患のための新しい治療剤及び診断剤の開発を遅滞させる。B B Bの生理及び恒常性を破壊することなしに、小さい及び大きい治療及び診断分子を、薬理学的に有用な用量で脳内に送達する非侵襲的方法が明らかに必要とされている。

【発明の概要】

【0011】

10

20

30

40

50

本発明は、インスリン様成長因子1受容体（IGF1R）特異的抗体及びそれらの使用に関する。より詳細には、本発明は、血液脳関門を通過するインスリン様成長因子1受容体特異的抗体及びそれらの断片、並びにそれらの使用に関する。

【0012】

本発明は、インスリン様成長因子1受容体（IGF1R）エピトープに特異的に結合する単離又は精製抗体又はその断片を提供し、抗体又はその断片は血液脳関門を通過し、エピトープは、配列番号5の抗体により特異的に結合される。IGF1Rエピトープは、IGF1R細胞外ドメイン内にありうる。

【0013】

本発明は、

GGTVSPTAの相補性決定領域（CDR）1配列（配列番号1）、

ITWSRGTTのCDR2配列（配列番号2）、及び

AASTFLRLILPEESAYTYのCDR3配列（配列番号3）

を含み、インスリン様成長因子1受容体（IGF1R）に特異的に結合する単離又は精製抗体又はその断片をさらに提供する。

【0014】

たとえば、いかなる形で限定することも望まないが、IGF1Rに特異的な単離又は精製抗体又はその断片は、

X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCX₅X₆SGGTVSPTAM
GWX₇RQAPGKX₈X₉EX₁₀VX₁₁ITWSRGTTTRX₁₂ASSVK
X₁₃RFTISRDX₁₄X₁₅KNTX₁₆YLMNSLX₁₇X₁₈EDTAV
YYCAASTFLRLILPEESAYTYWGQGT X₁₉VTVSS（配列番号4）
（式中、X₁はE又はQであり、X₂はK又はQであり、X₃はV又はEであり、X₄はA又はPであり、X₅はA又はEであり、X₆はV又はAであり、X₇はV又はFであり、X₈はG又はEであり、X₉はL又はRであり、X₁₀はF又はWであり、X₁₁はG又はSであり、X₁₂はV又はYであり、X₁₃はD又はGであり、X₁₄はN又はSであり、X₁₅はA又はSであり、X₁₆はL又はVであり、X₁₇はK又はRであり、X₁₈はA又はSであり、X₁₉はL又はQである）、

又はそれと実質的に同一の配列でありうる。より具体的で非限定的な例において、単離又は精製抗体は、

本明細書においてIGF1R-4と呼ばれる、QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRGTTTRVASSVKDRFTISRDSAKNTVYLMNSLKSEDTAVYYCAASTFLRLILPEESAYTYWGQGTQVTVSS（配列番号5）、

本明細書においてIGF1R-4__H2と呼ばれる、QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWVRQAPGKGLEWVGHITWSRGTTTRYASSVKGRFTISRDNSSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRLILPEESAYTYWGQGTLLVTVSS（配列番号6）、

本明細書においてIGF1R-4__H3と呼ばれる、QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRGTTTRYASSVKGRFTISRDNSSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRLILPEESAYTYWGQGTLLVTVSS（配列番号7）、

本明細書においてIGF1R-4__H4と呼ばれる、QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRGTTTRYASSVKGRFTISRDSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRLILPEESAYTYWGQGTLLVTVSS（配列番号8）、

本明細書においてIGF1R-4__H5と呼ばれる、QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRGTTTRYASSVKGRFTISRDSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRLILPEESAYTYWGQGTLLVTVSS（配列番号9）、及び

10

20

30

40

50

又はそれと実質的に同一の配列からなる群から選択される配列を含みうる。

【0015】

上述の単離又は精製抗体又はその断片は、単ドメイン抗体 (s d A b) でありえ、s d A b は、ラクダ科動物由来でありうる。

【0016】

本発明の単離又は精製抗体又はその断片は、多価ディスプレイ形式 (m u l t i v a l e n t d i s p l a y f o r m a t) で提示されうる。多価ディスプレイ形式において、抗体又はその断片は、F c 断片に連結されることがあり、F c 断片は、マウス F c 2 b 又はヒト F c 1 である。たとえば、いかなる形で限定することも望まないが、多価ディスプレイにおいて単離又は精製抗体又はその断片は、配列番号 10 の配列 (本明細書にお

10

【0017】

本明細書に記載の単離又は精製抗体又はその断片は、血液脳関門を通過できる。

【0018】

本発明はまた、本明細書に記載の単離又は精製抗体又はその断片をコードする核酸分子を提供する。前述の核酸分子を含むベクターもまた提供される。

【0019】

本明細書に記載の単離又は精製抗体又はその断片は、表面に固定化できる。

20

【0020】

本発明は、カーゴ分子に連結された本明細書に記載の単離又は精製抗体又はその断片をさらに提供し、カーゴ分子は、約 1 k D ~ 約 200 k D a の範囲の分子量を有しうる。抗体又はその断片に連結されたカーゴ分子は、検出可能な試剤、治療剤、薬物、ペプチド、成長因子、サイトカイン、受容体トラップ (r e c e p t o r t r a p)、化合物、炭水化物部分、酵素、抗体若しくはその断片、D N A ベース分子、ウイルスベクター、若しくは細胞毒性剤；検出可能な試剤、治療剤、薬物、ペプチド、酵素、抗体若しくはその断片、D N A ベース分子、ウイルスベクター、若しくは細胞毒性剤が充填された 1 つ若しくは複数のリポソーム若しくはナノ担体；又は 1 つ若しくは複数のナノ粒子、ナノワイヤ、ナノチューブ、若しくは量子ドットでありうる。

30

【0021】

加えて、本発明は、本明細書に記載の 1 つ又は複数の単離又は精製抗体又はその断片及び薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤を含む組成物を提供する。

【0022】

I G F 1 R を検出するインビトロ方法もまた提供され、この方法は、

a) 組織試料を、検出可能な試剤に連結された本明細書に記載の 1 つ又は複数の単離又は精製抗体又はその断片と接触させるステップ、及び

b) 組織試料において、I G F 1 R に結合した抗体又はその断片に連結された検出可能な試剤を検出するステップを含む。

40

【0023】

上述の方法において、試料は、ヒト又は動物対象からの血清試料、血管組織試料、腫瘍組織試料、又は脳組織試料でありうる。上述の方法において、検出するステップ (ステップ b)) は、光学イメージング、免疫組織化学、分子画像診断、E L I S A、イメージング質量分析、又は他の好適な方法を使用して実施できる。

【0024】

さらに提供されるのは、対象における I G F 1 R 発現を検出するインビボ方法であり、この方法は、

a) 検出可能な試剤に連結された本明細書に記載の 1 つ又は複数の単離又は精製抗体又はその断片を、対象に投与するステップ、及び

50

b) I G F 1 R に結合した抗体又はその断片に連結された検出可能な試剤を検出するステップを含む。

【0025】

上述の方法において、検出するステップ（ステップb））は、P E T（ポジトロン放出断層撮影）、S P E C T（単光子放出コンピュータ断層撮影）、蛍光イメージング、又は任意の他の好適な方法を使用して実施できる。

【0026】

本発明が提供するものは、血液脳関門（B B B）を通過させて目的の分子を輸送する方法であり、この方法は、

a) 血液脳関門を通過する、目的の分子に連結された本明細書に記載の1つ又は複数の単離又は精製抗体又はその断片を、対象に投与するステップを含む、

1つ又は複数の抗体又はその断片は、B B Bを通過させて目的の分子をフェリーする。前述の方法において、目的の分子は、約1 k D ~ 約2 0 0 k D a の範囲の分子量を有することがあり、目的の分子は、検出可能な試剤、治療剤、薬物、ペプチド、成長因子、サイトカイン、受容体トラップ、化合物、炭水化物部分、酵素、抗体若しくはその断片、D N A ベース分子、ウイルスベクター、若しくは細胞毒性剤；検出可能な試剤、治療剤、薬物、ペプチド、酵素、抗体若しくはその断片、若しくは細胞毒性剤が充填された1つ若しくは複数のリポソーム若しくはナノ担体；又は1つ若しくは複数のナノ粒子、ナノワイヤ、ナノチューブ、若しくは量子ドットでありうる。上述の方法において、投与は、静脈内（i v）、皮下（s c）、又は筋肉内（i m）でありうる。

【0027】

本発明はまた、対象のB B Bを通過して送達されたカーゴ分子の量を定量する方法を包含し、カーゴ分子は、本明細書に記載の1つ又は複数の単離又は精製抗体又はその断片に連結され、この方法は、

a) 対象から脳脊髄液（C S F）を回収するステップ、及び

b) 標的化プロテオミクス方法を使用して、C S Fにおける1つ又は複数の単離又は精製抗体又は断片に連結されたカーゴ分子の量を定量するステップを含む。

【0028】

カーゴ分子は前述のカーゴ分子を含む任意の所望の分子でありえ、抗体又はその断片はB B Bを通過し、前述のとおり、分子は抗体又はその断片に「連結」できる。上の方法において、C S Fは、当技術分野において知られている任意の好適な方法を使用して対象から回収される。ステップb)における標的化プロテオミクス方法に必要なC S Fの量は、約1 ~ 1 0 μ l の間でありうる。カーゴ分子に連結された1つ又は複数の抗体又はその断片の量を定量するのに使用される標的化プロテオミクス方法は、当技術分野において知られている任意の好適な方法でありうる。たとえば、限定することは望まないが、標的化プロテオミクス方法は、質量分析法、たとえば多重反応モニタリングー同位体標識化内部標準（M R M - I L I S : m u l t i p l e r e a c t i o n m o n i t o r i n g - i s o t y p e l a b e l e d i n t e r n a l s t a n d a r d s）でありうる。

【0029】

密着し高度に選択的なB B Bを通過する診断剤又は薬物の送達が不十分なことは、脳疾患、たとえば、これに限定されないが、脳腫瘍及び神経変性疾患の治療法の開発の障害となる。B B Bを通過する分子を輸送する担体の欠如は、かかる疾患のための新しい治療剤及び診断剤の開発を遅滞させる。本明細書に記載のとおり、B B Bを通過した脳内の標的への、抗体にコンジュゲートされた薬物の送達のための、効果的な輸送プラットフォームをもたらす、I G F 1 R 結合性V_HHが製造された。本明細書に記載の抗体は、B B B 形成脳内皮細胞の管腔側から反管腔側へのI G F 1 R の天然R M T 経路を利用する。I G F

10

20

30

40

50

1 Rへの抗体の結合後、RMTが開始され、抗体は、コンジュゲートされた分子（カーゴ）とともに、細胞を通過して反管腔側へとトランスサイトosisされ、そこでそれらは両方とも脳微小環境内へと放出される。抗IGF1R V_HHが、IGF1Rに結合し（図3C）、BBB細胞内に内部移行し（図4）、インビトロBBBモデルの反管腔側へと横断する（図6B）ことを確認した。薬物の脳内送達のインビボ研究もまた、IGF1R V_HHが、コンジュゲートされたペプチド（ガラニン、約3kDa）を、大きなタンパク質融合物（約80kDa）とともに、BBBを通過させて「運搬」することを示した（図9A及び図9B、図9C）。

【0030】

結果はまた、抗IGF1R V_HHが、Fc（結晶性断片）断片と融合して発現し、循環半減期を約75倍（V_HH単体の約20分と比較して約25時間）に延長できることを示す。この高分子量融合コンストラクト（約80kDa）もまた、BBBを通過して効率的に輸送される。長い血漿内半減期は、IGF1R V_HH-mFc（mFc＝マウスFc）コンジュゲートのCSF曝露を、V_HH単体と比較して有意に増加させ、CNSに標的を有する慢性疾患の治療のためのBBB送達担体として有用である。コンジュゲートは、免疫蛍光検出を使用して、脳実質において容易に検出される。結果は、IGF1R V_HH担体が、大きな分子（サイズにおいて、抗体、酵素、成長因子、ペプチド、サイトカイン、受容体トラップと同等）を、BBBを通過させて「フェリー」できることを示す。

【0031】

したがって、抗体送達は、短期治療（たとえば、てんかん発作）に有用でありうるだけでなく、中期（たとえば、癌）及び長期（たとえば、アルツハイマー病又はパーキンソン病）治療にも有用でありうる。

【0032】

本発明の追加の態様及び利点は、以下の説明により明らかになる。詳細な説明及び実施例は、本発明の好ましい実施形態を示す一方で、例示のためにのみ記載される。なぜなら、本発明の範囲内の様々な変更及び修正が、本発明の教示に照らして当業者に明らかになると考えられるからである。

【0033】

ここで、本発明のこれら及び他の特徴が、添付の図面を参照しながら例として説明される。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】インスリン様成長因子1受容体（IGF1R）の概略図である。IGF1Rは、細胞表面に見出され、2つのサブユニット、アルファサブユニット及びベータサブユニットを含む。アルファサブユニット（インスリン様成長因子1結合部位を有する細胞外部分を含む）は、ジスルフィド結合によりベータサブユニット（小さな細胞外ドメイン、膜貫通領域、及び細胞内部分を含む）と接続される。IGF1受容体は、ダイマーを形成する。灰色のボックス内に示されるアルファサブユニット及びベータサブユニットの細胞外部分を含む933アミノ酸長断片（M1-F933、SwissProt受託番号P08069、図2を参照のこと）が、組換えにより製造され、ラマの免疫化のために使用された。

【図2】IGF1Rの配列（SwissProt受託番号P08069 933）を示す図である。免疫化及びパニングのために使用されたアミノ酸長タンパク質断片を太字で示す、全外部ドメインは2アミノ酸長い。アルファ及びベータサブユニットを隔てるフーリン切断部位を、イタリックの小文字で示す。シグナルペプチドを太字のイタリックで示す。

【図3A】Superdex 75カラムを通したIGF1R結合性V_HH IGF1R-4及びそのヒト化変異体（H1、H2、H3、H4、H5、H6）のサイズ排除クロマトグラムを示す図である。プロファイルは、IGF1R H1以外のすべてのV_HHがモノマー性であり、非凝集性であることを示唆する。

10

20

30

40

50

【図 3 B】 I G F 1 R - 4 V_H H 及びそのヒト化変異体 (H 2、H 3、H 4、H 5、H 6) について、円偏光二色性 (C D) により決定される融解温度 (T_m) を示す図である。タンパク質を 9 0 °C 超まで加熱し、測定値を C D 機器で取り、融解曲線 (上の曲線) 及び T_m を決定した。続いて、タンパク質を室温まで冷却し、再度加熱し、C D により解析した (I G F 1 R - 4 V_H H について下の曲線、ヒト化抗体については 0 % リフォールド付近の線又は点)。これは、リフォールドしたタンパク質の割合の決定を可能にし、ヒト化バージョンについてゼロ、I G F 1 R - 4 について 8 0 % だった。

【図 3 C】 0 . 1 ~ 5 n M の I G F 1 R - 4 V_H H 及びそのヒト化変異体 (H 2、H 3、H 4、H 5、H 6) の、ヒト I G F 1 R 断片の組換え細胞外部分への結合について、表面プラズモン共鳴 (S P R) センサーグラム (s e n s o g r a m) の重ね合わせを示す図である。データは、1 : 1 モデルによくフィットする。

【図 3 D】 I G F 1 の存在下でのヒト I G F 1 R 断片の組換え細胞外部分に対する I G F 1 R - 4 V_H H 結合の S P R センサーグラムを示す図である。1 0 0 倍の過量の I G F 1 は、I G F 1 R - 4 V_H H 結合に影響を及ぼさなかったことから、両者が受容体上の異なるエピトープに結合することが示される。

【図 3 E】 I G F 1 R - 4 V_H H が、S P R 表面に固定化されたヒトインスリン受容体 (I R) の組換え細胞外部分に結合しなかった一方で、ヒト I G F 1 R の対照表面に結合したことを示す図である。

【図 4】 C y - 5 . 5 標識化 I G F 1 R - 4 V_H H 及び対照 V_H H の細胞取込みの画像結果を示す図である。C y 5 . 5 標識化 I G F 1 R - 4 V_H H (又は陽性対照としての F C 5 V_H H ; M u r u g a n a n d a m ら、2 0 0 2 ; H a q q a n i ら、2 0 1 2) を、S V 4 0 不死化ラット脳内皮細胞 (s v A R B E C) と 4 °C (上パネル) 又は 3 7 °C (下パネル) でインキュベートし、I G F 1 R - 4 が受動的に (4 °C)、又は能動的機序、たとえば受容体媒介性エンドサイトーシスをによって (3 7 °C) 内部移行したかどうかを評価した。コムギ胚芽凝集素及び D A P I での共染色を実施し、細胞表面及び核をそれぞれ視覚化した。上パネル：4 °C でインキュベートされたとき、I G F 1 R - 4 及び F C 5 V_H H は、細胞の外部に (矢頭印)、細胞膜に結合して見出された (コムギ胚芽凝集素と共局在化)。下パネル：3 7 °C で、F C 5 及び I G F 1 R - 4 V_H H の両方が、エンドソームである可能性が高い小胞様構造で細胞の内部に蓄積した (矢頭印) ことから、能動輸送機序による内部移行が示唆される。

【図 5 A】 マウス F c 断片 (I G F 1 R - 4 - m F c) との I G F 1 R - 4 V_H H の C 末端融合物の配列を示す図である。I G F 1 R - 4 V_H H を黒色、マウス F c (C H 2 及び C H 3) を灰色で示す。

【図 5 B】 構築された融合タンパク質の概略図である。I G F 1 R - 4 V_H H を黒色、マウス F c (C H 2 及び C H 3) を灰色で示す。

【図 6 A】 様々な V_H H について B B B を横断する能力を評価するための、インビトロ B B B モデルの使用を要約する流れ図である。等モル量 (5 . 6 μ M 又は 1 . 2 5 μ M) の正 (F C 5) 及び負 (A 2 0 . 1、クロストリジウム・ディフィシル (C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e) 毒素 A 結合性 V_H H、及び E G F R 結合性 V_H H である E G 2) の対照の V_H H 及び I G F 1 R - 4 を、ラットインビトロ B B B モデルを横断するそれらの能力について同時に試験した。成体ラットからの S V 4 0 不死化脳内皮細胞 (s v A R B E C) を、下のチャンバーではラット星状膠細胞馴化培地、上のチャンバーでは標準培地の存在下で、インサートの膜上で単層で培養した。B B B モデルの管腔側への、等モル量の様々な V_H H の同時添加後に、試料を 1 5、3 0、及び 6 0 分後に下のチャンバーから採取した。次に、これらの試料において各 V_H H の濃度を、質量分析 (多重反応モニタリングー同位体標識化内部標準、M R M - I L I S) により定量した。P_{a p p} 値 [Q r / d t = レシーバーコンパートメントにおける累積量対時間、A = 細胞単層の面積、C 0 = 投与溶液の初期濃度] が、分子について B B B を横断する能力を決定するために一般に使用される。

【図 6 B】 4 つの同時投与された V_H H の P_{a p p} 値を示す図である。I G F 1 R - 4

$V_H H$ は、FC5よりも有意に高い P_{app} 値を有する一方で、両方の陰性対照が、低い P_{app} 値を有し、対照 $V_H H$ の低い非特異的輸送又は傍細胞輸送と比較して、FC5及びIGF1R-4 $V_H H$ の促進輸送を示す。

【図6C】対照として同じウェルにおいて試験されたA20.1 $V_H H$ （灰色バー）（平均A20.1値を灰色の点線で示す）と比較した、ヒト化IGF1R-4単ドメイン抗体（H2、H3、H4、H5、H6）（黒色バー）の P_{app} 値を示す図である。結果は、IGF1Rの結合だけ（ヒト化6変異体（H6）に見られる）では、BBBの通過を誘発するのに十分でないことを明確に示す。

【図6D】同じウェル中で試験され、非常に低い P_{app} 値を有するA20.1-マウスFc（A20.1mFc）（灰色）と比較した、マウスFc（黒色）とのIGF1R-4 $V_H H$ のC末端融合物の P_{app} 値を示す図である。IGF1R-4mFcは、FC5-mFc（灰色の点線で示すとおり、典型的にはおよそ180cm/min）よりも有意に高い P_{app} 値を有する。別のIGF1R結合性 $V_H H$ である、Fcと融合したIGF1R-1は、負の内部対照A20.1 $V_H H$ よりもわずかに高い P_{app} 値しか有さない。この結果も、すべてのIGF1R結合性抗体がBBBを通過するわけではないことを実証する。データは、IGF1R-4-mFcが、一価IGF1R-4 $V_H H$ と比較して、同等に高いBBB通過輸送率を有することをさらに示す。結果は、3～6つの独立実験において得られた平均 P_{app} 値である。FC5（ $V_H H$ ）及びA20.1（ $V_H H$ ）の平均 P_{app} 値もまた、比較のため点線により示す。

【図7】（上パネル）PBS（未処置）又は2.5mg/kgのCy5.5-IGF1R-4 $V_H H$ 若しくはCy5.5-A20.1 $V_H H$ のいずれか（注射された分子の概略図を上部に示す）を静脈内注射され、eXplore Optix時間領域光学画像装置で注射30分後にスキャンされたCD-1マウスのインビボ全身画像を示す図である。下パネルは、 $V_H H$ 注射1時間後、循環から抗体を除去する経心腔的灌流後に得られた同じ動物のエクスピボ脳画像を示す。矢印は、Cy5.5-IGF1R-4を注射された動物の頭部及びエクスピボ脳における蛍光トレーサーの高い光学シグナル（薄灰色）を示す一方で、Cy5.5-A20.1対照（黒色）を注射された動物にはそれは検出できない。

【図8A】IGF1R-4 $V_H H$ -ガラニンコンジュゲートの化学合成のためのスキームを示す図である。まず、IGF1R-4を、スルホ-SMCCクロスリンカーのNHS基にコンジュゲートし（1）、次に、マレイミド活性化IGF1R-4-スルホ-SMCCを、ガラニンの還元型システインにコンジュゲートした（2）。

【図8B】IGF1R-4（レーン2）、IGF1R-4-SMCC（レーン3）、及びIGF1R-4-ガラニンコンジュゲート（レーン4）のSDS-PAGEゲルを示す図である。「バンド形成」パターンは、1つのIGF1R-4当たり1～2個のガラニン分子の結合を示す。同じコンジュゲーション方法を、ガラニンをIGF1R-mFcと連結するために使用した。

【図9A】化学的にコンジュゲートされたペプチドガラニンのIGF1R-4媒介性脳送達を示す図である。図9Aは、ハーグリーヴズ疼痛モデル（Hargreaves pain model）を使用して、IGF1R-4について、薬理的に有効な用量の鎮痛性ペプチドガラニン（3.2kD）を脳内に送達する能力を示すグラフである。このモデルにおいて、雄ウィスターラット（4～6週齢）において、100μlの完全フロイントアジュバント（CFA）を左足底表面に注射し、数時間以内に局所炎症を引き起こすことにより、局所的な慢性的疼痛が誘導される。BBB担体 $V_H H$ -薬物コンジュゲート又はガラニン単体の尾静脈注射後に、ガラス表面上にセットされたプレキシグラスの囲いの中にラットを入れる。温度的刺激を、角度を付けた鏡を介して炎症性又は対側の足に集中させた。刺激の適用と足の退避（足をなめるか、又は動かすこと）との間の潜時は、鎮痛性効果（温熱性痛覚の阻害）の尺度として解釈される。1mg/kgガラニンの全身（尾静脈）注射後の鎮痛効果の欠如により実証されるとおり、ペプチドガラニン単体はBBBを通過できない（黒い三角）。IGF1R-4-ガラニンコンジュゲート（3mg/kg）

10

20

30

40

50

の全身注射は、熱痛覚過敏を阻害し、投与30分後に最大反転 (reversal) に到達し (黒丸)、効果は 6 mg/kg の FC5-ガラニンコンジュゲートで観察されたもの (白い四角) よりも顕著だった。

【図9B】化学的にコンジュゲートされたペプチドガラニンの IGF1R-4 媒介性脳送達を示す図である。図9Bは、これらの結果を、最大可能効果 (MPE、対照足) と比較した反応の曲線下面積 (AUC) として示す。

【図9C】炎症性疼痛のハーグリーブズモデルにおける、iv投与された IGF1R-4-mFc-ガラニンコンジュゲートでの熱痛覚過敏の用量依存的 (2 mg/kg 及び 5 mg/kg) 阻害を示す図である。対照的に、A20.1-mFc-ガラニン (5 mg/kg) は、熱痛覚過敏の反転を一切誘導しなかった。

【図9D】様々な用量の A20.1-mFc-ガラニン及び IGF1R-4-mFc-ガラニンで達成される反応のピークでの熱痛覚過敏のパーセント反転 (Emax) を示す図である。

【図10】IGF1R-4、並びに「正」の対照 $V_H H$ 、FC5及び「負」の対照 $V_H H$ A20.1の、 6 mg/kg の各抗体の全身 (尾静脈) 同時投与30分後の血漿及びCSFレベルを示す図である。CSFを大槽から回収した。IGF1R-4、FC5及びA20.1の血漿及びCSFレベルを、特定のタンパク質ペプチドサインを「追跡」して定量するMRM-ILIS法を使用して決定した。CSFにおけるアルブミンレベルを、MRMにより同時に決定した。1500よりも低い血漿/CSF比を有するすべてのCSF試料を、潜在的に血液汚染されているものとして除外した。IGF1R-4のCSF/血清比は、FC5の0.9%及びA20.1の0.017%と比較して、1.2%だった。

【図11】 6 mg/kg の用量の尾静脈投与24時間後の脳切片における IGF1R-4-mFcの免疫検出を示す図である。PBSでの屠殺灌流がラットにおいて実施され、ビブラトームを使用して脳切片 ($12 \mu\text{m}$) が得られた。IGF1R-4-mFcを、抗マウスFc抗体を使用して免疫検出した (赤色、赤色チャンネルはインサートにのみ示す)。脳切片 (歯状回、A; 前頭皮質、B) における血管を、レクチン RCA1 を使用して検出した (緑色)。IGF1R-4-mFcを、矢頭印により示すとおり、血管及び血管外 (すなわち、脳実質中であり、BBBを通過している) の両方において検出できた。

【図12A】IGF1R-4が、インスリン受容体又はIGF1Rを介したインスリン又はIGF-1シグナル伝達を妨げないことを示す図である。図12Aは、IGF1R-4又は試験された任意の他の抗IGF1R $V_H H$ (IGF1R-1、-3、-5又は-6) のいずれも、単体では下流Aktリン酸化を 100 nM の濃度で誘導しないことを示す、代表的なウエスタンブロットである。 100 nM のIGF1R-4又は任意の他の抗IGF1R $V_H H$ のいずれの存在も、 $10 \mu\text{g/ml}$ のインスリンにより誘導されるAktリン酸化を阻害しない。3つの独立実験からのウエスタンブロットバンド密度の定量を、ゲル画像の下棒グラフ (平均 $\pm$ SD) で示す。

【図12B】IGF1R-4が、インスリン受容体又はIGF1Rを介したインスリン又はIGF-1シグナル伝達を妨げないことを示す図である。図12Bは、 100 nM のIGF1R-4又は試験された任意の他の抗IGF1R $V_H H$ (IGF1R-4、-5又は-6) のいずれも、それら自体ではAktのリン酸化を誘導しなかったこと、及び 200 ng/ml のIGF-1での刺激の際に誘導されるIGF-1誘導性Aktリン酸化 (すなわちシグナル伝達) を阻害しなかったを示す、代表的なウエスタンブロットである。3つの独立実験からのウエスタンブロットバンド密度の定量を、ゲル画像の下棒グラフ (平均 $\pm$ SD) で示す。

【図12C】IGF1R-4が、インスリン受容体又はIGF1Rを介したインスリン又はIGF-1シグナル伝達を妨げないことを示す図である。図12Cは、リン酸化IGF1Rについてプローブされたウエスタンブロットを示す。細胞を、 100 nM 又は 500 nM のいずれかのIGF1R-4-mFc又は任意の他の抗IGF1R $V_H H$ -mFc融合物 (IGF1R-1、-3又は-4-mFc) とインキュベートしたか、又はそれぞれのIGF1R $V_H H$ -mFc融合タンパク質の存在下で 200 ng/ml IGF-

10

20

30

40

50

1で刺激した。ウェスタンブロットは、融合コンストラクトのいずれもIGF1RのIGF-1誘導性リン酸化を阻害せず、それら自体では受容体リン酸化も誘導しなかったことを示す。

【発明の詳細な説明】

【0035】

本発明は、インスリン様成長因子1受容体特異的抗体、それらの断片、及びそれらの使用に関する。より詳細には、本発明は、血液脳関門を通過するインスリン様成長因子1受容体特異的抗体又はそれらの断片、及びそれらの使用に関する。

【0036】

本発明は、インスリン様成長因子1受容体(IGF1R)エピトープに特異的に結合する単離又は精製抗体又はその断片を提供し、抗体又はその断片は血液脳関門を通過し、エピトープは、配列番号5の抗体により特異的に結合される。IGF1Rエピトープは、IGF1R細胞外ドメイン内にありうる。

【0037】

本発明は、

GGTVSPTAの相補性決定領域(CDR)1配列(配列番号1)、

ITWSRGTTのCDR2配列(配列番号2)、及び

AASTFLRLILPEESAYTYのCDR3配列(配列番号3)

を含み、インスリン様成長因子1受容体(IGF1R)に特異的に結合する単離又は精製抗体又はその断片を提供する。

【0038】

本明細書において使用される「抗体」という用語は、当技術分野において「免疫グロブリン」(Ig)とも呼ばれ、対となるポリペプチド重鎖及び軽鎖から構築されるタンパク質を指し、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMを含む様々なIgアイソタイプが存在する。抗体が正確にフォールドされる時、各鎖は、より直鎖状のポリペプチド配列により連結された数多くの別個の球状ドメインへとフォールドする。たとえば、免疫グロブリン軽鎖は、可変(V_L)及び定常(C_L)ドメインへとフォールドする一方で、重鎖は、可変(V_H)及び3つの定常(C_H、C_{H2}、C_{H3})ドメインへとフォールドする。重鎖及び軽鎖可変ドメイン(V_H及びV_L)の相互作用は、抗原結合領域(Fv)の形成をもたらす。各ドメインは、当業者が精通するよく確立された構造を有する。

【0039】

軽鎖及び重鎖可変領域は、標的抗原との結合を担い、したがって、抗体間での顕著な配列多様性を示しうる。定常領域は、比較的低い配列多様性を示し、重要な生化学的事象を誘発するための数多くの天然タンパク質との結合を担う。抗体の可変領域は、分子の抗原結合決定基を含有し、したがって、抗体のその標的抗原に対する特異性を決定する。配列変異性の大多数は6つの超可変領域において生じ、これらは可変重鎖(V_H)及び軽鎖(V_L)にそれぞれ3つずつある。超可変領域は組み合わせあって抗原結合部位を形成し、抗原決定基との結合及びその認識に寄与する。抗体のその抗原に対する特異性及び親和性は、超可変領域の構造とともに、それらのサイズ、形状、及びそれらが抗原に対して提示する表面の化学的性質により決定される。超可変性の領域の同定のための様々なスキームが存在し、最も一般的な2つは、Kabattのもの並びにChothia及びLeskのものである。Kabattら(1991)は、V_H及びV_Lドメイン抗原結合領域配列変異性に基いて「相補性決定領域」(CDR)を定義する。Chothia及びLesk(1987)は、V_H及びV_Lドメインにおける構造的ループ領域の位置に基いて「超可変ループ」(H又はL)を定義する。これらの個別のスキームは、隣接又はオーバーラップするCDR及び超可変ループ領域を定義するので、抗体技術分野の当業者は、「CDR」及び「超可変ループ」という用語を多くの場合互換的に用い、本明細書においてもそのように使用できる。CDR/ループは、可変ドメインの比較を容易にするために開発された、より最近のIMGTナンバリングシステム(Lefranc, M. -P. ら、2003)に従って、本明細書において参照される。このシステムにおいて、保存アミノ酸(たと

10

20

30

40

50

えばCys23、Trp41、Cys104、Phe／Trp118、及び位置89の疎水性残基）は常に同じ位置を占める。加えて、フレームワーク領域（FR1：位置1～26；FR2：39～55；FR3：66～104；及びFR4：118～129）及びCDR（CDR1：27～38、CDR2：56～65；及びCDR3：105～117）の標準化された境界設定が提供される。

【0040】

本明細書において称される「抗体断片」は、当技術分野において知られている任意の好適な抗原結合抗体断片を含みうる。抗体断片は、天然抗体断片でもよく、又は天然抗体の操作若しくは組換え方法の使用により得られてもよい。たとえば、抗体断片には、Fv、単鎖Fv（scFv、ペプチドリンカーで接続されたV_L及びV_Hからなる分子）、Fab、F（ab'）₂、単一ドメイン抗体（sdAb、単一V_L又はV_Hからなる断片）、及びこれらのうちの任意のものの多価提示が含まれうるが、これに限定されない。抗体断片、たとえばすぐ上で述べられたものは、断片の異なる部分を連結するためのリンカー配列、ジスルフィド結合、又は他のタイプの共有結合を必要とすることがあり、当業者は、異なるタイプの断片の要件及びそれらの構築のための様々なアプローチに精通していると考えられる。

【0041】

非限定的な一例において、抗体断片は、天然ソースに由来するsdAbでありうる。ラクダ科動物由来の重鎖抗体（Hamers-Castermanら、1993）は軽鎖を欠き、したがって、それらの抗原結合部位は、V_HHと呼ばれる1つのドメインからなる。sdAbはまた、サメにおいても観察されており、V_{NAR}と呼ばれる（Nuttallら、2003）。他のsdAbが、ヒトIg重鎖及び軽鎖配列に基づいて設計されうる（Jespersenら、2004；Toら、2005）。本明細書において使用される「sdAb」という用語には、任意の由来のV_H、V_HH、V_L又はV_{NAR}リザーバーから、ファージディスプレイ又は他の技術によって直接単離されるsdAb、前述のsdAbに由来するsdAb、組換え産生sdAbが、ヒト化、親和性成熟、安定化、可溶化、ラクダ化、又は抗体工学の他の方法によるかかるsdAbのさらなる改変によって作製されるsdAbとともに含まれる。本発明には、sdAbの抗原結合機能及び特異性を保持するホモログ、誘導体、又は断片も包含される。

【0042】

sdAbは、抗体分子の所望の特性、たとえば高い熱安定性、高い耐洗剤性、相対的に高いプロテアーゼ耐性（Dumoulinら、2002）及び高い生産収率（Arbabi-Ghahroudiら、1997）を有し、また、免疫ライブラリーからの単離（Liら、2009）、又はインビトロ親和性成熟（Davies & Reichmann、1996）により、非常に高い親和性を有するよう設計できる。安定性を高めるためのさらなる改変、たとえば非カノニカルなジスルフィド結合の導入（Hussackら、2011；Kimら、2012）もまた、sdAbにもたらされうる。

【0043】

当業者は、単一ドメイン抗体の構造によく精通していると考えられる（たとえば、タンパク質構造データバンクの3DWT、2P42を参照のこと）。sdAbは、免疫グロブリンフォールドを保持する単一の免疫グロブリンドメインを含み、とりわけ、3つのCDR／超可変ループのみが抗原結合部位を形成する。しかしながら、当業者に理解されていると考えられるとおり、すべてのCDRが抗原の結合に必要とされるわけではない。たとえば、限定することは望まないが、1つ、2つ又は3つのCDRが、本発明のsdAbによる抗原との結合及びその認識に寄与しうる。sdAb又は可変ドメインのCDRは、本明細書において、CDR1、CDR2、及びCDR3と呼ばれ、LeFranc, M. - P. ら（2003）による定義どおりナンバリングされる。

【0044】

本発明の抗体又はその断片は、細胞表面に見出される受容体である、インスリン様成長因子1受容体（IGF1R）に特異的である。IGF1Rは、インスリン様成長因子1結

10

20

30

40

50

合部位を有する細胞外部分を含むアルファサブユニットを含み、これは、ジスルフィド結合により、小さな細胞外ドメイン、膜貫通領域、及び細胞内部分を含むベータサブユニットと接続される。IGF1受容体は、ホモダイマーへと構築されるか、又はインスリン受容体とのヘテロダイマーを形成しうる。IGF1Rの配列は、図2に示すもの（SwissProt受託番号P08069、配列番号12）、又はそれと実質的に同一の配列でありうるが、これに限定されない。

【0045】

本明細書に記載の抗体又はその断片は、インスリン受容体（IR）又はIGF1Rを介したシグナル伝達を妨げないはずである。具体的には、本明細書に記載の抗体又はそれらの断片は、インスリンにより誘導されるAKTリン酸化を阻害しないはずであり、又は、それら自体でIRのリン酸化を誘導したり、インスリン誘導性シグナル伝達を阻害したりしないはずである。加えて、本明細書に記載の抗体又はそれらの断片は、IGF1RのIGF-1誘導性リン酸化を阻害しないはずである。さらに、それらは、インスリン受容体に結合しないはずである。

【0046】

前述のとおり、抗体又はその断片は、sdAbでありうる。sdAbは、ラクダ科動物由来又はラクダ科動物V_HH由来でありえ、したがってラクダ科動物フレームワーク領域に基づきうる。代わりに、上述のCDRは、V_{NAR}、V_{HH}、V_H又はV_Lフレームワーク領域上にグラフトされうる。また別の選択肢において、上述の超可変ループは、任意のソース（たとえば、マウス）の他のタイプの抗体断片（Fv、scFv、Fab）のフレームワーク領域又はCDRをグラフトできる類似のサイズ及び性質のタンパク質上にグラフトされうる（たとえば、Nicaisseら、2004を参照のこと）。

【0047】

本発明は、当技術分野において知られている任意の好適な方法、たとえばこれに限定されないが、CDRグラフティング及びベニアリング（veneer ing）を使用して「ヒト化」された抗体又は断片をさらに包含する。抗体又は抗体断片のヒト化は、抗原結合能又は特異性を失うことなしに、配列中のアミノ酸を、ヒトコンセンサス配列に見出されるそのヒト対応物と置き換えることを含む。このアプローチは、ヒト対象に導入されたときに、抗体又はその断片の免疫原性を低減する。CDRグラフティングのプロセスにおいて、本明細書において定義される1つ又は複数のCDRが、ヒト可変領域（V_H、又はV_L）、他のヒト抗体（IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM）、他のヒト抗体断片フレームワーク領域（Fv、scFv、Fab）又はCDRがグラフトされうる類似のサイズ及び性質の他のタンパク質に、融合又はグラフトされうる（Nicaisseら、2004）。かかる場合において、前記1つ又は複数の超可変ループのコンフォメーションは、保存されている可能性が高く、sdAbのその標的（すなわち、IGF1R）に対する親和性及び特異性は、最小限の影響しか受けない可能性が高い。CDRグラフティングは、当技術分野において知られており、少なくとも以下に記載されている。すなわち、米国特許第6180370号、米国特許第5693761号、米国特許第6054297号、米国特許第5859205号、及び欧州特許第626390号。当技術分野において「可変領域リサーフェイシング（variable region resurfacing）」とも呼ばれるベニアリングは、抗体又は断片の溶媒に露出した位置をヒト化することを伴う。したがって、CDRコンフォメーションにとって重要でありうる埋没した非ヒト化残基は保存される一方で、溶媒に露出した領域に対する免疫反応の可能性は最小化される。ベニアリングは、当技術分野において知られており、少なくとも以下に記載されている。すなわち、米国特許第5869619号、米国特許第5766886号、米国特許第5821123号、及び欧州特許第519596号。当業者はまた、かかるヒト化抗体断片を調製し、アミノ酸位置をヒト化する方法にも十分に精通していると考えられる。

【0048】

たとえば、いかなる形で限定することも望まないが、IGF1Rに特異的な単離又は精製抗体又はその断片は、

10

20

30

40

50

X₁ V X₂ L X₃ E S G G G L V Q X₄ G G S L R L S C X₅ X₆ S G G T V S P T A M
G W X₇ R Q A P G K X₈ X₉ E X₁₀ V X₁₁ H I T W S R G T T R X₁₂ A S S V K
X₁₃ R F T I S R D X₁₄ X₁₅ K N T X₁₆ Y L Q M N S L X₁₇ X₁₈ E D T A V
Y Y C A A S T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T X₁₉ V T V S S (配列番号4)
(式中、X₁はE又はQであり、X₂はK又はQであり、X₃はV又はEであり、X₄
はA又はPであり、X₅はA又はEであり、X₆はV又はAであり、X₇はV又はFであ
り、X₈はG又はEであり、X₉はL又はRであり、X₁₀はF又はWであり、X₁₁は
G又はSであり、X₁₂はV又はYであり、X₁₃はD又はGであり、X₁₄はN又はS
であり、X₁₅はA又はSであり、X₁₆はL又はVであり、X₁₇はK又はRであり、
X₁₈はA又はSであり、X₁₉はL又はQである)、

又はそれと実質的に同一の配列でありうる。代わりに、単離又は精製抗体は、
本明細書において I G F 1 R-4 と呼ばれる、Q V K L E E S G G G L V Q A G G S L R
L S C E V S G G T V S P T A M G W F R Q A P G K E R E F V G H I T W S R G T T R
V A S S V K D R F T I S R D S A K N T V Y L Q M N S L K S E D T A V Y Y C A A S
T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号5)、

本明細書において I G F 1 R-4 __H2 と呼ばれる、Q V Q L V E S G G G L V Q P G G
S L R L S C A V S G G T V S P T A M G W V R Q A P G K G L E W V G H I T W S R G
T T R Y A S S V K G R F T I S R D N S K N T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
A A S T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T L V T V S S (配列番号6)、

本明細書において I G F 1 R-4 __H3 と呼ばれる、Q V Q L V E S G G G L V Q P G G
S L R L S C A V S G G T V S P T A M G W F R Q A P G K G L E F V G H I T W S R G
T T R Y A S S V K G R F T I S R D N S K N T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
A A S T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T L V T V S S (配列番号7)、

本明細書において I G F 1 R-4 __H4 と呼ばれる、Q V Q L V E S G G G L V Q P G G
S L R L S C A V S G G T V S P T A M G W F R Q A P G K G L E F V G H I T W S R G
T T R Y A S S V K G R F T I S R D S S K N T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
A A S T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T L V T V S S (配列番号8)、

本明細書において I G F 1 R-4 __H5 と呼ばれる、Q V Q L V E S G G G L V Q P G G
S L R L S C A V S G G T V S P T A M G W F R Q A P G K E R E F V G H I T W S R G
T T R Y A S S V K G R F T I S R D S S K N T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
A A S T F L R I L P E E S A Y T Y W G Q G T L V T V S S (配列番号9)、及び
又はそれと実質的に同一の配列からなる群から選択される配列を含みうる。

【0049】

実質的に同一の配列は、1つ又は複数の保存的アミノ酸変異を含みうる。基準配列に対
する1つ又は複数の保存的アミノ酸変異は、基準配列と比較して、生理的、化学的、物理
化学的又は機能的特性において実質的変化のない変異体ペプチドをもたらしうるものが当
技術分野において知られており、かかる場合に、基準配列及び変異体配列は「実質的に同
一」のポリペプチドと考えられる。保存アミノ酸置換は、アミノ酸残基の、類似の化学的
特性（たとえば、サイズ、電荷、又は極性）を有する別のアミノ酸残基との置換として本
明細書に定義される。これらの保存的アミノ酸変異は、s d A b のフレームワーク領域に
生じうる一方で、上に挙げた C D R 配列及び抗体又は断片の C D R の全体構造を維持する
。したがって、抗体の特異性及び結合は維持される。

【0050】

非限定的な一例において、保存的変異は、アミノ酸置換でありうる。かかる保存アミノ
酸置換は、塩基性、中性、疎水性、又は酸性アミノ酸を、同じ群の別のものに置換しうる
。「塩基性アミノ酸」という用語により、7を超える側鎖 p K 値を有する親水性アミノ酸
が意図され、これは生理的 p H で正の電荷を典型的には有する。塩基性アミノ酸には、ヒ
スチジン (H i s 又は H)、アルギニン (A r g 又は R)、及びリシン (L y s 又は K)
が含まれる。「中性アミノ酸」(「極性アミノ酸」とも呼ばれる)という用語により、生
理的 p H で無電荷であるが、2つの原子により共有される電子対がそれら原子の一方によ

10

20

30

40

50

ってより近接して保持される少なくとも1つの結合を有する側鎖を有する親水性アミノ酸が意図される。極性アミノ酸には、セリン (Ser又はS)、トレオニン (Thr又はT)、システイン (Cys又はC)、チロシン (Tyr又はY)、アスパラギン (Asn又はN)、及びグルタミン (Gln又はQ)が含まれる。「疎水性アミノ酸」(「非極性アミノ酸」とも呼ばれる)という用語は、Eisenberg (1984)の標準化された合意されている疎水性スケールに従って、ゼロを超える疎水性を示すアミノ酸を含むことが意図される。疎水性アミノ酸には、プロリン (Pro又はP)、イソロイシン (Ile又はI)、フェニルアラニン (Phe又はF)、バリン (Val又はV)、ロイシン (Leu又はL)、トリプトファン (Trp又はW)、メチオニン (Met又はM)、アラニン (Ala又はA)、及びグリシン (Gly又はG)が含まれる。「酸性アミノ酸」は、7未満の側鎖pK値を有する親水性アミノ酸を指し、これは、生理的pHで負の電荷を典型的には有する。酸性アミノ酸には、グルタミン酸 (Glu又はE)、及びアスパラギン酸 (Asp又はD)が含まれる。

10

【0051】

配列同一性が、2つの配列の類似性を評価するために使用される。それは、残基位置間が最大限対応するよう2つの配列をアラインしたときに同一である残基のパーセントを計算することにより決定される。配列同一性を計算するために、任意の既知の方法を使用でき、たとえば、配列同一性を計算するのにコンピュータソフトウェアを利用可能である。限定することは望まないが、配列同一性は、ソフトウェア、たとえばSwiss Institute of Bioinformaticsにより維持されている(そして、c

20

【0052】

本発明の実質的に同一の配列は、少なくとも90%同一でありうる。別の一例において、実質的に同一の配列は、アミノ酸レベルで本明細書に記載の配列に対し、少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%、又はこれらの間の任意のパーセンテージで同一である。重要なことだが、実質的に同一の配列は、基準配列の活性及び特異性を保持する。非限定的一実施形態において、配列同一性の差は、保存的アミノ酸変異(複数可)によるものでありうる。非限定的な一例において、本発明は、本明細書に記載の抗体の配列と少なくとも95%、98%、又は99%同一の配列を含む抗体又はその断片に関するものでありうる。

30

【0053】

本発明の抗体又はその断片はまた、組換え抗体又はその断片の発現、検出又は精製を補助する追加の配列を含みうる。当業者に知られている任意のかかる配列又はタグを使用できる。たとえば、限定することは望まないが、抗体又はその断片は、標的化又はシグナル配列(たとえば、これに限定されないが、ompA)、検出/精製タグ(たとえば、これに限定されないが、c-Myc、His₅、又はHis₆)、又はそれらの組合せを含みうる。別の一例において、追加の配列は、ビオチン認識部位、たとえばCronanらにより国際公開第95/04069号に記載されたもの又はVogesらにより国際公開第2004/076670号に記載されたものでありうる。やはり当業者に知られているとおり、リンカー配列を、追加の配列又はタグと併せて使用でき、又は検出/精製タグとして役立ちうる。

40

【0054】

本発明の抗体又はその断片は、本明細書において多価提示とも呼ばれる、多価ディスプレイ形式でもありうる。多量体化は、当技術分野において知られている任意の好適な方法により達成できる。たとえば、いかなる形で限定することも望まないが、多量体化は、自己組織化分子、たとえばZhangら(2004a、2004b)及び国際公開第2003/046560号に記載のものを使用して達成できる。これらの文献では、本発明の抗体又はその断片及びAB₅毒素ファミリーのB-サブユニットの五量体化ドメイン(Me

50

rritt & Hol, 1995) を含む融合タンパク質を発現させることによりペンタボディ (pentabodies) が製造された。Zhu ら (2010) により記述された多量体化ドメインを使用しても、多量体を形成できる。本明細書において「コンボディ (combody)」形態と呼ばれるこの形態は、本発明の抗体又は断片と多量体分子をもたらすコイルドコイルペプチドとの融合物である (Zhu ら、2010)。多価ディスプレイの他の形態もまた、本発明に包含される。たとえば、限定することは望まないが、抗体又はその断片が、ダイマー、トリマー、又は任意の他の好適なオリゴマーとして提示される。これは、当技術分野において知られている方法、たとえば直接連結接続 (Nielson ら、2000)、c-jun/Fos 相互作用 (de Kruijf & Logtenberg, 1996)、「ノブ・イントゥー・ホールズ (Knob into holes)」相互作用により達成できる (Ridgway ら、1996)。

【0055】

多量体化のための当技術分野において知られている別の方法は、Fc ドメイン、たとえば、これに限定されないが、ヒト Fc ドメインを使用して、抗体又はその断片をダイマー化するものである。Fc ドメインは、IgG、IgM を含むが、これに限定されない様々なクラス、又は、IgG1、IgG2 等を含むが、これに限定されない様々なサブクラスから選択できる。このアプローチにおいて、Fc 遺伝子が、sdAb-Fc 融合タンパク質を作製するために、sdAb 遺伝子とともにベクター内に挿入される (Bell ら、2010; Iqbal ら、2010)。融合タンパク質が組換え発現させられ、次に精製される。たとえば、いかなる形で限定することも望まないが、多価ディスプレイ形式は、Fc ドメインに連結された抗 IGF1R-4 V_HH のキメラ形式、又は2つ若しくは3つの抗 IGF1R-4 V_HH 認識特異エピトープとの二重若しくは三重特異性抗体融合物を包含しうる。かかる抗体は、設計及び製造が容易であり、sdAb の血清中半減期を大きく延長させることができ、優れた腫瘍画像化試薬でありうる (Bell ら、2010)。

【0056】

すぐ上で述べた多量体複合体における Fc ドメインは、当技術分野において知られている任意の好適な Fc 断片でありうる。Fc 断片は、任意の好適なソースに由来しうる。たとえば、Fc は、マウス又はヒト由来でありうる。具体的で非限定的な一例において、Fc は、マウス Fc2b 断片又はヒト Fc1 断片でありうる (Bell ら、2010; Iqbal ら、2010)。Fc 断片は、本発明の抗 IGF1R-3 V_HH 又はヒト化バージョンの N 末端又は C 末端と融合できる。具体的で非限定的な一例において、すぐ上で述べた多量体化単離又は精製抗体又は断片は、配列番号 10、38、又は 11 の配列を含みうる。

【0057】

上述の多量体の各サブユニットは、同じ又は異なる本発明の抗体又はそれらの断片を含むことができ、これは、同じ又は異なる特異性を有しうる。加えて、多量体化ドメインを、必要に応じてリンカーを使用して抗体又は抗体断片に連結できる。かかるリンカーは、2つの分子の柔軟な結合を提供するのに十分な長さ及び適切な組成を有するはずであるが、抗体の抗原結合特性を妨げないはずである。

【0058】

本明細書に記載の抗体又はその断片は、血液脳関門を通過できる。脳は、血液脳関門 (BBB) として知られている特化した内皮組織により身体の一部から分離される。BBB の内皮細胞は、密着結合により接続され、多くの治療化合物が脳に侵入するのを効率的に妨げる。低効率の小胞輸送に加えて、BBB の具体的な特徴の1つは、酵素障壁 (複数可) の存在及び BBB の反管腔 (脳) 側での ATP 依存性輸送体、たとえば P-糖タンパク質 (Gottesman ら、1993; Watanabe, 1995) の高レベル (複数可) の発現であり、これは、様々な分子を脳から血流内へと能動輸送する (Samuelis, 1993)。小さく (<500 ダルトン) 疎水性 (Pardridge, 1995) の分子だけが、より容易に BBB を横断できる。したがって、上述の抗体又はその断

片が、表面受容体に特異的に結合し、脳内皮細胞内に内部移行し、リソソーム分解を回避することによりBBBを通過するトランスサイトosisを受ける能力は、神経学分野において有用である。

【0059】

本発明はまた、本明細書に記載の分子をコードする核酸配列を包含する。遺伝コードの縮重を鑑みると、当業者により容易に理解され则认为らるゝとおり、数多くの核酸配列が、ポリペプチドをコードする効果を有すると考えられる。核酸配列は、様々な微生物における発現のためにコドン最適化できる。本発明はまた、すぐ上で述べた核酸を含むベクターを包含する。さらに、本発明は、上述の核酸及び／又はベクターを含む細胞を包含する。

10

【0060】

本発明は、様々な方法を使用して表面に固定化された単離又は精製抗体又はその断片をさらに包含する。たとえば、限定することは望まないが、抗体又は断片は、Hisタグカップリング、ビオチン結合、共有結合、吸着等を介して表面に連結又はカップリングできる。本発明の抗体又はその断片の固定化は、タンパク質を捕捉、精製又は単離するための様々な用途において有用でありうる。固体表面は、任意の好適な表面、たとえば、これに限定されないが、マイクロタイタープレートのウェル表面、表面プラズモン共鳴（SPR）センサーチップのチャンネル、膜、ビーズ（たとえば磁気ベース又はセファロースベースビーズ又は他のクロマトグラフィー樹脂）、ガラス、プラスチック、ステンレス鋼、薄膜、又は任意の他の有用な表面、たとえばナノ粒子、ナノワイヤ及びカンチレバー表面でありうる。

20

【0061】

本発明はまた、カーゴ分子に連結された上述の抗体又はその断片を包含する。カーゴ分子は、任意の好適な分子でありえ、抗体又はその断片によりBBBを通過して送達される。カーゴ分子は、約1kDa～約200kDaの範囲の分子量を有しうる。たとえば、カーゴ分子は、約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、若しくは200kDaの分子量、又はこれらの間の任意の分子量、又は任意の2つの前述の分子量により定義される任意の範囲の分子量を有しうる。具体的で非限定的な例において、カーゴ分子は、1kDa（たとえば、これに限定されないが、小分子、たとえばCy5.5）、1～10kDa（たとえば、これに限定されないが、ペプチド、たとえばガラニン、3kDa）、約80kDa（たとえば、これに限定されないが、Fc断片、酵素、タンパク質、抗体等）、又は約200kDa（たとえば、これに限定されないが、モノクローナル抗体）の分子量を有しうる。

30

【0062】

たとえば、いかなる形で限定することも望まないが、カーゴ分子は、検出可能な試剤、治療剤、薬物、ペプチド、酵素、成長因子、サイトカイン、受容体トラップ、抗体若しくはその断片（たとえば、IgG、scFv、Fab、V_HH、V_H、V_L等）、化合物、炭水化物部分、DNAベース分子（アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロRNA、siRNA、プラズミド）、細胞毒性剤、ウイルスベクター（アデノー、レンチー、レトロ）、任意の前述のタイプのカーゴ分子が充填された1つ若しくは複数のリボソーム若しくはナノ担体、又は1つ若しくは複数のナノ粒子、ナノワイヤ、ナノチューブ、若しくは量子ドットでありうる。上述のカーゴ分子は、検出可能な試剤でありうる。たとえば、IGF1R特異的抗体又はその断片を、放射性同位体、常磁性標識、フルオロフォア、蛍光剤、近赤外（NIR、たとえばCy5.5）蛍光色素若しくは染料、エコー源性マイクロバブル、親和性標識、検出可能なタンパク質ベース分子、ヌクレオチド、量子ドット、ナノ粒子、ナノワイヤ、又はナノチューブ又は画像化方法により検出できる任意の他の好適な試剤に連結できる。抗体又はその断片は、当技術分野において知られている任意の方法

40

50

(組換え技術、化学的コンジュゲーション等)を使用してカーゴ分子に連結できる。

【0063】

本明細書に記載のカーゴ分子を、当技術分野において知られている任意の好適な方法により抗体又はその断片に連結でき、本明細書においては「コンジュゲート」できるとも言う。たとえば、限定することは望まないが、カーゴ分子は、共有結合又はイオン性相互作用によりペプチドに連結できる。連結は、化学的架橋反応、又は組換えDNA法を任意のペプチド発現系、たとえば細菌、酵母又は哺乳動物細胞ベースの系と組み合わせて使用した融合によって達成できる。カーゴ分子を抗体又はその断片にコンジュゲートするとき、好適なリンカーを使用できる。抗体又はその断片をカーゴ分子、たとえば治療剤又は検出可能な試剤に連結するための方法は、当業者によく知られていると考えられる。

10

【0064】

非限定的な一例において、カーゴ分子は、検出可能な標識、放射性同位体、常磁性標識、たとえばガドリニウム若しくは酸化鉄、フルオロフォア、近赤外(NIR)蛍光色素若しくは染料、エコー源性マイクロバブル、親和性標識(たとえばビオチン、アビジン等)、酵素、又は画像診断法により検出できる任意の他の好適な試剤でありうる。具体的で非限定的な一例において、抗IGF1R-4又はその断片は、近赤外蛍光(NIRF)画像化染料、たとえば、これに限定することを望まないが、Cy5.5、Alexa680、Dylight680、又はDylight800に連結できる。

【0065】

したがって、本発明は、組織試料を、検出可能な試剤に連結された本発明の1つ又は複数の単離又は精製抗体又はその断片と接触させるステップを含む、IGF1Rを検出するインビトロ方法をさらに提供する。次に、当技術分野において知られている検出及び/又は画像化技術を使用して、IGF1R抗体複合体を検出できる。すぐ上で述べた方法における組織試料は、任意の好適な組織試料、たとえば、これに限定されないが、血清試料、血管組織試料、腫瘍組織試料、又は脳組織試料でありえ、組織試料は、ヒト又は動物対象からのものでありうる。接触させるステップは、当業者に知られている、抗体又はその断片とIGF1Rとの間の複合体の形成に好適な条件下でなされる。検出するステップは、当技術分野において知られている任意の好適な方法、たとえば、これに限定されないが、光学イメージング、免疫組織化学、分子画像診断、ELISA、イメージング質量分析、又は他の好適な方法により達成できる。たとえば、いかなる形で限定することも望まないが、検出可能な試剤に連結された単離又は精製抗体又はその断片は、免疫アッセイ(IA)、たとえば、これに限定されないが、酵素IA(EIA)、ELISA、「迅速抗原捕捉」、「迅速クロマトグラフィーIA」、及び「迅速EIA」において使用できる。(たとえば、Plancherら、2008; Sloanら、2008; Russmannら、2007; Musherら、2007; Turgeonら、2003; Fennerら、2008を参照のこと)。

20

30

【0066】

本発明はまた、対象におけるIGF1R発現を検出するインビボ方法を提供する。この方法は、検出可能な試剤に連結された本明細書に記載の1つ又は複数の単離又は精製抗体又はその断片を、対象に投与するステップ、及びそれに続く、IGF1Rに結合した標識化抗体又はその断片を検出するステップを含む。検出するステップは、当技術分野において知られている任意の好適な方法、たとえば、これに限定されないが、PET、SPECT、又は蛍光イメージング、又は任意の他の好適な方法を含みうる。すぐ上で述べた方法は、血管又は組織、たとえば、これに限定されないが、腫瘍組織におけるIGF1R発現の検出において有用でありうる。

40

【0067】

上述の方法におけるインビボ検出ステップは、診断目的の全身イメージング又は特定の部位、たとえば、これに限定されないが、脳血管又は脳腫瘍血管の、疾患の進行又は治療計画に対する宿主反応を評価するための定量的方法での局所イメージングでありうる。上述の方法における検出ステップは、免疫組織化学、又は以下を含むが、これに限定されな

50

い非侵襲的（分子的）画像診断技術でありうる。すなわち、
光学イメージング；

ポジトロン放出断層撮影（PET）、検出可能な試剤は、同位体、たとえば ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{124}I 、 ^{76}Br 、 ^{82}Rb 及び ^{68}Ga であり、 ^{18}F が最も臨床的に利用されている；

単光子放出コンピュータ断層撮影（SPECT）、検出可能な試剤は、放射性トレーサー、たとえば、具体的な用途に応じて、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{201}Tl 、 ^{133}Xe である。

磁気共鳴画像法（MRI）、検出可能な試剤は、たとえば、これに限定されないが、ガドリニウム、酸化鉄ナノ粒子及び炭素被覆鉄コバルトナノ粒子でありえ、そのことにより、プラークの検出についてMRIの感度を高める。

造影超音波検査（CEUS：Contrast-Enhanced Ultrasonography）又は超音波、検出可能な試剤は、少なくとも1つの音響的に活性で気体が充満したマイクロバブルである。超音波は、ヒト疾患のスクリーニング及び早期検出のために広範に用いられている技術である。それは、MRI又はシンチグラフィよりも安価であり、放射線を伴わないので、分子的画像診断法、たとえば放射性核種イメージングよりも安全である。

【0068】

本発明は、血液脳関門を通過させて目的の分子を輸送する方法をさらに提供する。この方法は、本明細書に記載の抗体又はその断片と連結された分子を対象に投与するステップを含み、抗体又はその断片は血液脳関門を通過する。分子は、前述のカーゴ分子を含む任意の所望の分子でありえ、分子は、融合タンパク質におけるコンジュゲーション又は発現を含むが、これに限定されない任意の好適な方法を使用して、抗体又はその断片に「連結」できる。投与は、任意の好適な方法、たとえば、静脈内（iv）、皮下（sc）、及び筋肉内（im）投与を含むが、これに限定されない非経口投与によるものでありうる。この方法において、本発明の抗体又はその断片は、BBBを通過させて目的の分子をその脳標的へと「フェリー」する。

【0069】

本発明はまた、本明細書に記載の1つ又は複数の単離又は精製抗体又はその断片を含む組成物を包含する。組成物は、上述の単一の抗体若しくは断片を含みうるか、又は抗体若しくは断片の混合物でありうる。さらに、本発明の抗体又は断片の混合物を含む組成物において、抗体は、同じ特異性を有しうるか、又はそれらの特異性において異なりうる。たとえば、いかなる形で限定することも望まないが、組成物は、IGF1R（同じ又は異なるエピトープ）に特異的な抗体又はそれらの断片を含みうる。

【0070】

組成物はまた、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、又は担体を含みうる。希釈剤、賦形剤、又は担体は、当技術分野において知られている任意の好適な希釈剤、賦形剤、又は担体でありえ、組成物中の他の成分、組成物の送達方法と適合性でなければならず、組成物のレシピエントにとって有害ではない。組成物は、任意の好適な形態でありうる。たとえば、組成物は、懸濁液形態、粉末形態（たとえば、これに限定されないが、凍結乾燥又はカプセル化されて）、カプセル又は錠剤形態で提供できる。たとえば、限定することは望まないが、組成物が懸濁液形態で提供されるとき、担体は、水、生理食塩水、好適な緩衝液、又は溶解性及び／又は安定性を改善するための添加剤を含みうる。懸濁液をもたらしするための再構成は、抗体又はその断片の生存性を保証するのに好適なpHの緩衝液中で実行される。乾燥粉末もまた、安定性を改善する添加剤及び／又はバルク／体積を増加させる担体を含みうる。たとえば、限定することは望まないが、乾燥粉末組成物は、スクロース又はトレハロースを含みうる。具体的で非限定的な一例において、組成物は、抗体又はその断片を対象の胃腸管に送達するように配合されうる。したがって、組成物は、カプセル化、持続放出、又は抗体又はその断片の送達のための他の好適な技術を含みうる。本発明の化合物を含む好適な組成物を調製することは、当業者の能力の範囲内であると考えら

れる。

【0071】

本発明はまた、対象のBBBを通過して送達されたカーゴ分子の量を定量する方法を包含し、カーゴ分子は、本明細書に記載の1つ又は複数の単離又は精製抗体又はその断片に連結され、この方法は、

a) 対象から脳脊髄液(CSF)を回収するステップ、及び

b) 標的化プロテオミクス方法を使用して、CSFにおける1つ又は複数の抗体又はその断片に連結されたカーゴ分子の量を定量するステップを含む。

【0072】

カーゴ分子は、前述のカーゴ分子を含む任意の所望の分子でありうる。単離又は精製抗体又はその断片は、血液脳関門を通過する。分子は、前述のとおり、融合タンパク質におけるコンジュゲーション又は発現を含むが、これに限定されない任意の好適な方法を使用して、前述の抗体又はその断片に「連結」できる。上の方法において、CSFは、当技術分野において知られている任意の好適な方法を使用して対象から回収される。ステップb)における標的化プロテオミクス方法に必要とされるCSFの量は、約1~10 μ lの間でありうる。たとえば、必要とされるCSFの量は、約1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、又は10 μ l、又はそれらの間の任意の量、又はすぐ上で述べた量により定義される任意の範囲でありうる。カーゴ分子に連結された抗体又は断片は、CSFの回収前に対象に投与されえただろう。投与から、カーゴ分子に連結された抗体又は断片がBBBを通過して送達されるまでの間の好適な遅延が必要とされうる。遅延は、カーゴ分子に連結された抗体又は断片の投与後少なくとも30分でありうる。たとえば、いかなる形で限定することも望まないが、遅延は、少なくとも30分、1時間、1.5時間、2時間、2.5時間、3時間、3.5時間、4時間、4.5時間、又は5時間でありうる。カーゴ分子に連結された1つ又は複数の抗体又はその断片の量を定量するのに使用される標的化プロテオミクス方法は、当技術分野において知られている任意の好適な方法でありうる。たとえば、限定することは望まないが、標的化プロテオミクス方法は、質量分析法、たとえば、これに限定されないが、同位体標識化内部標準を使用した多重反応モニタリング(MRM-ILIS、たとえばHaqqaniら、2013を参照のこと)でありうる。MRMは、生物学的試料中の未標識標的解析物(たとえば、本明細書に記載の抗体又はその断片)の迅速で、感度が高く、特異的な定量を可能にする点で有利である。アッセイのマルチプレクシング能が、抗体又はその断片とカーゴ分子との両方の定量を可能にしうる。

【0073】

本発明を、以下の実施例においてさらに例証する。しかしながら、これらの実施例は、例示のみを目的としており、いかなる形でも本発明の範囲を限定するのに使用すべきでないことが理解されるべきである。

【0074】

実施例1：IGF1R組換え断片の精製

IGF1Rの細胞外ドメインの933アミノ酸長の組換え断片(図1に灰色のボックスで示す、配列番号12のアミノ酸1~933もまた参照のこと)を調製した。断片は、N末端30アミノ酸シグナルペプチド、全長アルファサブユニット、フューリン切断部位(RKRR、配列番号13、アルファ及びベータサブユニットを分離)を、ベータサブユニットの細胞外部分の大部分とともに含んでいた(図1及び図2)。

【0075】

クローニング。目的のIGF1R外部ドメインの配列を、以下のプライマー

5'-CGGGATCCGCGCCACCATGAAGTCTGGCTCCGGAAG-3'
(フォワード、配列番号14)

5'-GCTCTAGATCAGAAAGTTTTCATATCCTGTTTTTG-3'

10

20

30

40

50

’ (リバーサス、配列番号 15)

を使用して PCR により増幅し、Puc 19 の Sma I 部位内にサブクローニングした。次に、IGF1R⁹³³配列を、pCDN4/myc-His (Invitrogen) 内にサブクローニングし pIGF1R⁹³³-His を作製したが、これは、以前に記述されたとおり、His-タグ化外部ドメインの発現を可能にする (Samanir 2004)。

【0076】

一過性トランスフェクション。IGF1R⁹³³-His を発現するレンチウイルス粒子を、以前に詳述されたとおり、パッケージング細胞株 293SF-PacLV において生成した (Broussau ら、2008)。簡潔に述べると、細胞に、ポリエチレンイミンを使用してベクターをトランスフェクトした。1 μg/ml のドキシサイクリン及び 10 μg/ml の cumate を含有する新鮮な培地 (LC-SFM) を、トランスフェクションの 5 時間後に細胞に添加し、LV 粒子を含有する上清を、48~72 時間後に回収し、100,000×g、2 時間、4℃、20% スクロースクッション上での超遠心により濃縮し (Gaillet B ら 2007)、1% FBS を添加した LC-SFM 培地中に再懸濁させ、使用まで -70℃ で保存した。

【0077】

安定発現。安定細胞株 293SF-cum2-CR5-IGF1R-His を、以前に記述されたプロトコルを使用して、293SF-Cum2 細胞株にそれぞれのレンチウイルス粒子を形質導入することにより作製した (Gaillet B ら 2010)。簡潔に述べると、0.5~1.0×10⁵ 個の 293SF-Cum2 細胞を、24 ウェルプレートにおいて硫酸デキストランなしの 200 μl の LC-SFM 培地中に播種した。200~500 μL の LV を、8 μg/ml のポリブレンと混合することにより、LV 懸濁液を調製し、それを 30 分間、37℃ でインキュベートした。調製したばかりの LV 懸濁液を、播種 4 時間後の細胞に添加した。24 時間後、硫酸デキストランを添加した 500 μL の培地を細胞に添加した。発現のレベルを高めるため、細胞回復の 3~4 日後に、同じプロトコルを使用して 6 回まで細胞に再形質導入した。最後に、6 ウェルプレート及び振盪フラスコにおいて細胞を増殖させた。

【0078】

大規模タンパク質製造及び精製。最高産生株として同定されたクローンを、振盪又は攪拌フラスコ内で増殖させた。新鮮な培地に 1 μg/ml の cumate を添加することにより、タンパク質製造を開始し、その後、37℃ で 24 時間、30℃ で 4~8 日間インキュベートした。遠心により細胞を除去し、Tangential Flow Filtration Systems (Pellicon 限外濾過カセット、EMD Millipore) を使用して、上清を濾過及び濃縮 (10×) した。

【0079】

His Prep カラム (GE Healthcare) を製造者の指示に従い使用して、IGF1R⁹³³-His を精製した。簡潔に述べると、濃縮試料を、His-prep FF (16/10) カラム (GE Healthcare) に適用し、50 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl、5 mM イミダゾール pH 7.5 で平衡化及び洗浄し、50 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl、500 mM イミダゾール pH 7.5 で溶出した。0.1 M クエン酸ナトリウム pH 4.5~pH 2.5 の段階溶出を、タンパク質を溶出するために使用し、ピーク画分をプールした。50 kDa カットオフ膜又は脱塩カラムを 50 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl 及び 0.01% Tween-80、pH 7.2 を含む緩衝液とともに使用して、限外濾過により緩衝液交換を実施した。SDS-PAGE により両方のタンパク質の純度を検証し、それらを使用 (以下の実施例を参照のこと) まで -80℃ で保存した (この後に続く実施例を参照のこと)。

【0080】

実施例 2：ラマ免疫化及び血清反応

10

20

30

40

50

I G F 1 Rの細胞外ドメインを標的とするV_HHを単離するため、ラマを、実施例1で得られた組換えI G F 1 R^{9 3 3}-H i s断片で免疫化した。

【0081】

1頭の雄ラマ(L a m a g l a m a)を、I G F 1 R^{9 3 3}-H i s組換え抗原(実施例1)の皮下腰部注射により免疫化した。第1日に、P B S中1 m lまで希釈された200 μ gの抗原を、1 m lのフロイント完全アジュバント(S i g m a、S t. L o u i s、M O)とともに注射した。100 μ gのI G F 1 R^{9 3 3}-H i s抗原プラスフロイント不完全アジュバント(S i g m a)の3回のさらなる注射を第22、36、及び50日に実施した。アジュバントなしの100 μ gの抗原の最終注射を、第77日に実施した。第1日の最初の注射前に、免疫前の血液を採血し、陰性対照として役立てた。血液(10~15 m l)を、第29、43、57及び84日に回収した。第84日の血液を、末梢血単核細胞(P B M C)を単離するようすぐに処理した。血液を、リン酸緩衝生理食塩水(P B S)で1:1希釈し、L y m p h o p r e p T u b e(A x i s S h i e l d)を使用して血液からP B M Cを精製した。細胞を計数し、約1×10⁷個の細胞のアリコートとして、-80℃で今後の使用のために保存した。

【0082】

免疫前及び免疫後の全血清を、I G F 1 R^{9 3 3}-H i s抗原に対する特異的反応について、E L I S Aにより第57日に解析した。第84日のラマ血清を、以前に記述されたとおり分画した(D o y l eら、2008)。得られた画分、A1(H C A b)、A2(H C A b)、G1(H C A b)及びG2(c I g G)を、I G F 1 R^{9 3 3}-H i s抗原との特異的結合について、E L I S Aにより解析した。簡潔に述べると、P B S中に希釈された5 μ gのI G F 1 R^{9 3 3}-H i s組換え抗原を、96ウェルM a x i s o r pプレート(N a l g e n e、N u n c)において一晚インキュベート(100 μ l/ウェル、18時間、4℃)し、プレートをコーティングした。ウシ血清アルブミン(B S A)でプレートをブロッキングし、P B S-T(P B S+0.05%(v/v)T w e e n-20)で洗浄し、免疫前全血清、免疫後全血清(第57日)、分画血清(第84日)の連続希釈を適用した。室温での1.5時間のインキュベーション後、P B S-Tでプレートを洗浄し、その後、ヤギ抗ラマI g G(P B S中1:1,000)を添加し、プレートを1時間、37℃でインキュベートした。P B S-Tでの洗浄後、ブタ抗ヤギI g G-H R Pコンジュゲート(P B S中1:3,000)を添加し、プレートを1時間、37℃でインキュベートした。最終P B S-T洗浄を実施し、その後、100 μ l/ウェルT M B基質(K P L、G a i t h e r s b u r g、M D)を添加し、基質を10分間インキュベートした。100 μ l/ウェルの1 M H₃P O₄で反応を停止した。吸光度を450 nmで読み取った。

【0083】

実施例3：ライブラリー構築及びI G F 1 R結合性V_HHの選択

実施例2においてP B M Cから単離されたR N Aに基づいて、過免疫化ラマV_HHライブラリーを構築した。

【0084】

基本的に以前に記述されたとおり、ライブラリー構築及びパニングを実施した(A r b a b i-G h a h r o u d iら、2009a、2009b;T a n h aら、2003)。全R N Aを、Q I A a m p R N A B l o o d M i n i K i t(Q i a g e n)を使用して、免疫化後第84日に回収されたおよそ10⁷個のP B M C(実施例2)から単離した。約5 μ gの全R N Aを、F i r s t-S t r a n d c D N A S y n t h e s i s K i t(G E H e a l t h c a r e)を使用したオリゴdTプライマーでの第1鎖c D N A合成の鋳型として使用した。以下の3つの可変領域特異的センスプライマー、

M J 1:5'-G C C C A G C C G G C C A T G G C C S M K G T G C A G C T G G T G G A K T C T G G G G G A-3'(配列番号16)

M J 2:5'-G C C C A G C C G G C C A T G G C C C A G G T A A A G C T G G A G G A G T C T G G G G G A-3'(配列番号17)

MJ3: 5' - G C C C A G C C G G C C A T G G C C C A G G C T C A G G T A C A
G C T G G T G G A G T C T - 3' (配列番号18)、

及び2つのアンチセンスCH₂特異的プライマー、

CH₂: 5' - C G C C A T C A A G G T A C C A G T T G A - 3' (配列番号19)

CH₂b₃: 5' - G G G G T A C C T G T C A T C C A C G G A C C A G C T G A -
3' (配列番号20)

の等モルミックスによりcDNAを増幅した。

【0085】

簡潔に述べると、PCR反応混合物を、以下の成分で50 µlの総量で準備した。すな
わち、1~3 µl cDNA、5 pmolのMJ1~3プライマー混合物、5 pmolの
CH₂又はCH₂b₃プライマー、5 µlの10×反応緩衝液、1 µlの10mM dN
TP、2.5単位のTaq DNAポリメラーゼ(Hoffmann-La Roche)
(i) 3分間94℃での初期ステップ、(ii) 続いて1分間
94℃、30秒間55℃、30秒間72℃の30サイクル、及び(iii) 7分間72℃
の最終伸長ステップからなる。増幅PCR産物を、2%アガロースゲルに走らせ、2つの
主要なバンドが観察された。すなわち、従来のIgGに対応する約850 bpのバンド、
及びラクダ科動物重鎖抗体のV_HH-CH₂領域に対応するおよそ600 bpの第2のバ
ンドである。より小さなバンドを切断し、QIAquick Gel Extracti
on Kit (Qiagen) を使用して精製し、1 µl (30 ng) のDNA鋳型、5
pmolのMJ7プライマー(5' - C A T G T G T A G A C T C G C G G C C C A G
C C G G C C A T G G C C - 3' 配列番号21) 及びMJ8プライマー(5' - C A T
G T G T A G A T T C C T G G C C G G C C T G G C C T G A G G A G A C G G T G A C
C T G G - 3' 配列番号22) の各プライマー、5 µlの10×反応緩衝液、1 µlの
10mM dNTP、2.5単位のTaq DNAポリメラーゼを使用して、50 µlの
総量で第2のPCRで再増幅した。PCRプロトコルは、(i) 3分間94℃での初期ス
テップ、(ii) 続いて30秒間94℃、30秒間57℃及び1分間72℃の30サイク
ル、並びに(iii) 7分間72℃の最終伸長ステップからなる。340 bp~420 b
pの間の範囲で重鎖抗体のV_HH断片に相当する増幅されたPCR産物を、QIAqu
ick PCR Purification Kit (Qiagen) を使用して精製し、
SfiI制限酵素(New England BioLabs)で消化し、同じキットを
使用して再精製した。

【0086】

80 µgのpMED1ファージミドベクター(Arbabi-Ghahroudiら、
2009b)を、SfiIで一晩50℃で消化した。自己連結を最小化するため、20単
位のXhoI及びPstI制限酵素を添加して切除断片を切断し、消化反応物をさらに2
時間、37℃でインキュベートした。60 µgの消化ファージミドDNAを、6 µgの消
化(5時間、50℃でSfiI)V_HH断片(モル比1:1)と、3時間室温で、Lig
aFast Rapid DNA Ligation System(Promega)
を製造者の指示に従い使用して連結した。連結されたプラズミドを、QIAqu
ick PCR Purification Kit (Qiagen) を使用して精製し、100
µlの最終体積で溶出し、以前記述されたとおり、エレクトロコンピテントTG1 E.
coli(Stratagene)内に、1形質転換反応当たり5 µlの連結DNAアリ
コートを使用して形質転換した(Arbabi-Ghahroudiら、2009b)。
ライブラリーのサイズを、(Arbabi-Ghahroudiら、2009b)に記載
のとおり、5×10⁷個と決定した。20個のクローンをシーケンシングし、すべての
ユニークV_HH配列を含んでいた。ライブラリーを含有するE. coliを、2~3時間
、37℃、250 rpm、2% (w/v) グルコースの存在下で成長させた。次に、細菌
を沈殿させ、35% (v/v) グリセロールを有する2×YT/Amp/Glu(100
µg/mlアンピシリン及び2% (w/v) グルコースを有する2×YT培地)中に再懸
濁させ、-80℃で小さなアリコートで保存した。

10

20

30

40

50

【0087】

パニング実験を、基本的に (Arbabiら、1997) に記載のとおり実施した。2 ミリリットルのライブラリー (2.0×10^{10} 個の細菌) を氷上で解凍し、 $2 \times \text{YT} / \text{Amp} / \text{Glu}$ 中、約2時間、 37°C で成長させた ($A_{600} = 0.4 \sim 0.5$)。続いて、*E. coli* を、 $20 \times$ 過量 M13KO7 ヘルパーファージ (New England Biolabs) に1時間、 37°C で感染させた。次に、培養物を 4°C で遠心し、感染細菌沈殿物を、 $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ カナマイシンを有する 200 ml の $2 \times \text{YT} / \text{Amp}$ 中に再懸濁させ、 37°C 及び 250 rpm でインキュベートした。培養上清中のファージ粒子を、 $1/5$ 体積の $20\% \text{ PEG } 8000 / 2.5 \text{ M NaCl}$ とともに、氷上で1時間インキュベートし、 $10,000 \text{ rpm}$ で15分間遠心した。ファージ沈殿物を 1.5 ml の無菌 PBS 中に再懸濁させ、滴定し、パニングのためのインプットファージとして使用した。パニングラウンド1のために、 96 ウェル Maxisorp (商標) プレートを、1ウェル当たり $10 \mu\text{g}$ の組換え $\text{IGF1R}^{933}\text{-His}$ で、 $100 \mu\text{l}$ PBS 中一晚 4°C でコーティングした。ウェルを PBS ですすぎ、 PBS プラス $1\% (\text{w/v})$ カゼインで2時間、 37°C でブロックした。およそ 10^{12} 個のファージを、ブロックされたウェルに添加し、2時間、 37°C でインキュベートした。 $\text{PBS} / 0.1\% (\text{v/v})$ $\text{Tween } 20$ で $10 \times$ 洗浄後、結合ファージを、 0.1 M トリエチルアミンで溶出し、中和 ($50 \mu\text{l}$ の 1 M トリス- HCl 、 $\text{pH } 7.4$) し、指数関数的に成長する $\text{TG1 } E. coli$ と混合した。溶出ファージの滴定を実施し、感染細菌を M13KO7 で重感染させ、一晚 37°C で成長させた。一晚の培養物からの精製ファージを、パニングの次のラウンドのインプットとして使用した。さらに3ラウンド、パニングを継続した。プレートをコーティングするために使用した組換え抗原の量を、第2、第3及び第4ラウンドのパニングについてそれぞれ $7 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 及び $5 \mu\text{g}$ に減らしたことを除いて、上述と同じプロトコルを使用した。

【0088】

ラウンド4のパニング後に得られた個々の TG1 コロニーは、マイクロタイタープレートをコーティングするのに $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の $\text{IGF1R}^{933}\text{-His}$ 組換え抗原を使用したことを除いて、基本的に別の文献に記載のとおり (Doylら、2008)、ファージ ELISA スクリーニングにかけた。すべての陽性クローンを、 DNA シークエンシングに送った。高いファージ ELISA シグナルを与えたユニーククローンを、既知の方法を使用した大規模発現及び精製のために選択した (実施例4を参照のこと)。 IGF1R-4 と呼ばれるクローンをさらなる研究のため同定した。その配列を下に示す。

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPPTAMGWFRQA
PGKEREFVGHITWSRGTTTRVASSVKDRFTISRDSAKNTVY
LQMNSLKSEDTAVYYCAASTFLRLPEESAITYWGGQTQV
TVSS (配列番号5)

【0089】

実施例4：IGF1R-4のヒト化

治療剤のための BBB 担体として適用されたときのラマ由来 IGF1R-4 の潜在的免疫原性を回避するため、ラクダ科動物由来 s dAb を、 V_H Hにおける「ラクダ科動物」残基の変異により「ヒト化」した。ヒト化のため、 CDR 残基の同定に Kabatat ナンバリング (Kabatat ら、1991) を使用したことに留意すべきである。

【0090】

ラクダ科動物 V_H Hの3D構造モデリング。タンパク質構造データバンク (PDB) に対する BLAST 検索を使用して、 $\text{IGF1R-4 } \text{V}_\text{H}$ Hと類似した鋳型構造を同定した。 $4\text{FHB} | \text{D}$ からの追加情報とともに、主要な鋳型として $4\text{KRP} | \text{B}$ (PDB コード $| \text{Chain ID}$) に基づき相同性モデリングを使用して、おおよその IGF1R-4 の3D構造を得た。次に、主要な鋳型の構造を IGF1R-4 配列に変異させることにより、 $\text{IGF1R-4 } \text{V}_\text{H}$ H構造を構築した。これは、様々な位置に35の変異を含んでいた。次に、 AMBER 力場でのエネルギー最小化、及び、最初に緩和された CDRL

ープから、最終段階になって初めて完全に緩和されたフレームワーク領域の主鎖重原子までの範囲の段階的な拘束の緩和により、I G F 1 R-4 V_H Hモデルを洗練させた。次に、V_H HモデルのC D R-H 3ループを、C D R-H 3領域の二面角をサンプリングした後にエネルギー最小化するモンテカルロ最小化(MCM)コンフォメーションサンプリングにより洗練させた。

【0091】

ラクダ科動物C D Rのためのヒト重鎖フレームワークの選択。ヒト重鎖フレームワークは、ヒト生殖細胞系列データベース(V B A S E)、他の配列データベース(G e n b a n k及びS w i s s P r o t)、及びヒトフレームワークコンセンサス配列に対する標準的な配列相同性比較により選択される。フレームワーク領域のみにおいて(すなわち、C D Rを除いて)最高の相同性を有する一方で、C D Rの長さとは一致する配列一致を検索するため、B L A S T検索を実行した。I G F 1 R-4 V_H Hについて同定された最も近いヒトフレームワークは、ヒトV H-3サブグループに相当した。ヒトV H-3コンセンサス配列に加えて、I G F 1 R-4 V_H Hに最も類似する複数のヒト生殖細胞系列V H-3フレームワーク配列もまた保持された。I G F 1 R-4 V_H Hフレームワーク配列は、100%フレームワークヒト化のためコンセンサスヒトV H-3配列に到達するために、18の変異を必要とした。

【0092】

復帰変異のためのフレームワーク残基の同定。I G F 1 R-4 V_H Hモデル及びその完全ヒト化対応物を、ヒト度指数(humanness index)、抗原接触傾向指数を推定し、C D R、カノニカルな残基、異常なフレームワーク残基、潜在的グリコシル化部位、埋没残基、V e r n i e rゾーン残基(V e r n i e r z o n e r e s i d u e s)、及びC D Rとの近接性を推定するために特徴づけた。これらのデータの解析は、抗I G F 1 R V_H Hの複数のヒト化変異体のデザインを示唆し、各変異体は、様々な位置に親ラクダ科動物残基への様々な数の復帰変異を有する。6つのヒト化変異体を、I G F 1 R-4 V_H H(I G F 1 R-4__H1からI G F 1 R-4__H6)についてデザインし、変異体は10までの復帰変異を含有していた。これらのラクダ科動物復帰変異残基のいくつかは、V_H Hドメインコア内に埋没しており、それゆえ免疫反応を誘導しないと予測される。

【0093】

実施例5：選択されたV_H Hコンストラクトの発現及び精製

実施例3において同定されたI G F 1 R-4及び実施例4において構築されたヒト化バージョン(合わせて本明細書において「V_H Hコンストラクト」と呼ばれる)を、タンパク質発現及び精製のための発現プラズミド内にサブクローニングした。

【0094】

V_H H I G F 1 R-4クローンのDNAを含有するファージミドベクターを、M i n i P r e p K i t (Q i a g e n)を使用して精製した。I G F 1 R結合性V_H H I G F 1 R-4を、p M E D 1ファージミドベクターからP C R増幅し、N末端B b s I切断部位及びC末端にB a m H I切断部位を、以下のプライマーを使用して付加した。すなわち、

5'-T A T G A A G A C A C C A G G C C C A G G T A A A G C T G G A G G A G T C T-3'(フォワード、配列番号23)

5'-T T G T T C G G A T C C T G A G G A G A C G G T G A C C T G-3'(リバー、配列番号24)

【0095】

P C R断片及びp S J F 2 H発現ベクターを、B b s I及びB a m H I制限酵素(N E B)で、製造者の指示に従い消化した。消化後、各消化I G F 1 R-4 V_H H断片を、消化p S J F 2 H発現ベクター内に、A r b a b i-G h a h r o u d iら(2009b)に記載のものと同様の方法を使用して連結した。次に連結産物を、エレクトロコンピテントT G 1 E. c o l i内に形質転換した。L Bアガープレート+100µg/mlア

ンピシリン上でクローンを選択し、DNAシーケンシングにより検証した。

【0096】

ヒト化クローンを合成し、上述したのと同様にpS J F 2 H内に直接クローニングし、続いてE. coli TG1内に形質転換し、上述のとおり選択した。

【0097】

タンパク質発現。すべてのIGF1R-4 V_HHコンストラクトを、TG1 E. coliにおいて発現させた。LB/amp/glu培地(100 µg/mlアンピシリン及び1%グルコースを添加したLB培地)中の一晚の培養物を、1:100希釈で1LのLB/amp/glu中で継代培養した。0.2 mMの最終濃度までのIPTGの添加により、0.8~0.9のOD₆₀₀でタンパク質発現を誘導した。220 rpmで一晩、37 °Cで培養物を成長させた。6000 rpmでの12分間の遠心により細菌を沈殿させた。沈殿物を35 mlの冷たいTES緩衝液(0.2 Mトリス-Cl pH 8.0、20%スクロース、0.5 mM EDTA)中に再懸濁させた懸濁液を、氷上でインキュベートし、10分ごとに1時間、ボルテックスにかけた。次に、45 mlの冷たいTES(総体積の1/8体積)を添加し、すぐに1分間及び15秒間、その後10分間ごとに1時間、ボルテックスにかけ、周辺質からタンパク質を抽出した。V_HHを含有する得られた上清を、0.22 µm膜を通して濾過し、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)緩衝液A(10 mM HEPES pH 7.0、500 mM NaCl)中に一晚透析した。HiTrap Chelating HP columns(GE Healthcare)を以前に記述されたとおり使用してタンパク質を精製した(Arbabi-Ghahroudi 2009b)。溶出タンパク質画分を、以前に記述されたとおり、PBSに対して透析する前にSDS-PAGE及びウエスタンブロットティングにより解析した(Arbabi-Ghahroudi 2009b)。精製タンパク質画分をプールし、PBS+3 mM EDTAに対して透析し、タンパク質濃度を決定した。

【0098】

実施例6：抗IGF1R V_HH IGF1R-4の生物物理学的特徴づけ

実施例4において発現させ精製した抗IGF1R V_HH IGF1R-4コンストラクトを、サイズ排除クロマトグラフィー、融解温度解析、及び表面プラズモン共鳴を使用して特徴づけた。

【0099】

サイズ排除クロマトグラフィー：Superdex(商標)75(GE Healthcare)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを、表面プラズモン共鳴(SPR)解析前に任意の生じうる凝集物を除去するために使用した。使用したランニング緩衝液は、150 mM NaCl、3 mM EDTA及び0.005% P20を含有する10 mM HEPES、pH 7.4だった。SPR解析のために使用した画分の濃度を、280 nm波長で吸光度を測定することにより決定した。SEC解析は、標準と比較した溶出体積に基づいて、H1以外のすべてのIGF1R-4 V_HHコンストラクトがモノマー性であることを示唆した(図3A)。したがって、IGF1R-4 H1を、さらなる評価から除外した。

【0100】

融解温度：IGF1R-4 V_HH及びヒト化コンストラクトの熱安定性を、CDスペクトル測定による融解温度(T_m)測定を使用して評価した。Pelitier熱電性型温度制御システムを備えるJasco J-815分光偏光計(Jasco, Easton, MD, USA)を、実験を実施するために使用した。1 mmのパス長を有するCDキュベットを使用した。180~260 nmの波長にわたって、50 nm/minの走査速度、4秒のデジタル積分時間(DIT)、1 nmのバンド長、1 nmのデータピッチ、及び1秒の積分時間でスペクトルを記録した。融解温度又はT_mを測定するため(Greenfield, 2006a; 2006b)、30 °Cから96 °Cの温度範囲にわたってCDスペクトルを記録した。すべてのCDスペクトルを、緩衝液スペクトルに相当するブランクから減算した。測定は、100 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4中50 µg/m

L V_H Hの濃度で実施した。熱誘導タンパク質変性を、210nmですべての変異体についてモニタリングした。フォールド率 (ff: fraction folded) は、以前に記述された以下の式により得られた (Greenfield, 2006a; 2006b)。

$$ff = ([\theta]_T - [\theta]_U) / ([\theta]_F - [\theta]_U) \dots \text{式 I}$$

式中、 $[\theta]_T$ は、任意の温度のモル楕円率であり、 $[\theta]_F$ は、30℃で完全にフォールドしたタンパク質のモル楕円率であり、 $[\theta]_U$ は、90℃での未フォールドタンパク質のモル楕円率である。融解温度 (T_m) は、グラフソフトウェア GraphPad Prism (Windows用バージョン4.02) を使用して、非線形回帰曲線フィッティング (ボルツマンシグモイド方程式 (Boltzmann sigmoidal equation)) により、アンフォールディング曲線 (フォールド率 (ff) 対温度) の中点として得られた。V_H Hの融解温度 (T_m) を、変性への急激な遷移に相当する観察された変性曲線と一致する二状態系を仮定して楕円率データに基づいて決定した。 T_m 値は、フォールド率 (ff) 対温度のシグモイド変性曲線の中点でとった。

【0101】

結果を図3Bに示す。ヒト化V_H H H3、H4及びH5の融解温度が、IGF1R-4 V_H Hと比較して改善していた (より高かった) ことから、生物物理学的特性が改善されたことが示唆される。ヒト化コンストラクトH2及びH6は、IGF1R-4 V_H Hと比較して、より貧弱な融解温度を有していた。IGF1R-4 V_H Hとは対照的に、どのヒト化V_H Hも熱曝露後にリフォールドしなかった。

【0102】

表面プラズモン共鳴 (SPR) : 固定化組換えヒトIGF1R (実施例1) に対するモノマー性IGF1R-4 V_H Hコンストラクトの結合を、BIACORE 3000 (GE Healthcare) を使用してSPRにより決定した。およそ3000共鳴単位 (RU) の組換えヒトIGF1Rを、センサーチップCM5上に固定化した。固定化は、製造者により供給されたアミンカップリングキットを使用して、pH4.0の10mM酢酸塩中10µg/mlの濃度で実施した。残りの結合部位を、1MエタノールアミンpH8.5でブロックした。エタノールアミンでブロックした表面を、基準表面として使用した。結合研究のため、25℃で、150mM NaCl、3mM EDTA及び0.005% 界面活性剤P20 (ポリオキシエチレンソルビタン、GE Healthcare) を含有する10mM HEPES、pH7.4中で解析を実施した。様々な濃度のIGF1R-4 V_H Hを、20µl/minの流量で固定化ヒトIGF1R及び基準表面上に注入した。表面を、10mMグリシンpH2.0で、24秒の接触時間で再生した。BIAevaluation 4.1ソフトウェア (GE Healthcare) でデータを解析した。図3Cのセンサーグラムは、データが1:1モデルによく適合し、表1に示すK_D及び「オフレート」を与えることを示す。これは、IGF1R-4及びヒト化変異体が、ヒトIGF1Rの細胞外ドメインに結合する高親和性単一ドメイン抗体であることを示す。

【0103】

【表1】

表1. 表面プラズモン共鳴により決定されるヒトIGF1Rに対するIGF1R-4コンストラクトの親和性

	K _D (nM)	k _d (s ⁻¹)
IGF1R-4	0.32	2.9 × 10 ⁻⁴
IGF1R-4 H2	1.07	6.1 × 10 ⁻⁴
IGF1R-4 H3	0.39	3.4 × 10 ⁻⁴
IGF1R-4 H4	0.45	3.9 × 10 ⁻⁴
IGF1R-4 H5	0.52	4.6 × 10 ⁻⁴
IGF1R-4 H6	0.52	3.8 × 10 ⁻⁴

【0104】

I G F 1 R - 4 V_H Hが、天然リガンド I G F - 1と同じ受容体上のエピトープに結合しないことを実証するために、S P R解析をさらに使用した(図3 D)。上述のとおり、実験を準備し、実施し、解析した。新たに固定化されたヒト I G F 1 R表面に対する結合を、 $25 \times K_D$ の濃度のヒト I G F 1 リガンドの注入と、続く両方が $25 \times K_D$ の濃度での I G F 1 R - 4の同時注入により、 $20 \mu l / min$ の流量、5分の注入時間で研究した。表面を、ランニング緩衝液での洗浄により再生した。天然リガンド I G F - 1は、70 R Uに及ぶ飽和度で受容体に結合した。I G F 1 R - 4 V_H Hは、I G F 1 R - I G F - 1複合体に、予測された約265 R U(相対的単位、結合飽和)で結合した。受容体に対する I G F 1 R - 4 V_H H及び I G F - 1の両方の同時結合は、両方が異なるエピトープに結合することを実証する。

10

【0105】

ヒトインスリン受容体に結合する I G F 1 R - 4の結合交差反応性もまた、S P Rを使用して評価した。上述のとおり、実験を準備し、実施し、解析した。簡潔に述べると、ヒト I G F 1 Rに加えて、およそ4000共鳴単位(R U)の組換えヒトインスリン受容体(R & D systems)を、センサーチップCM5上の分離細胞上に固定化した。続いて、異なる濃度の I G F 1 R - 4を表面上に流した(0.5~50 nM)。0.5 nM

I G F 1 R - 4ですでに I G F 1 Rに結合することが観察できた一方で、50 nMでもインスリン受容体表面への結合は観察されず(図3 E)、I G F 1 R - 5がインスリン受容体に結合できないことを示唆する。

【0106】

実施例7：脳内皮細胞による I G F 1 R - 4の内部移行

I G F 1 R - 4が細胞内に内部移行するかどうかを決定するため、s v A R B E C細胞をCy5-5標識化 I G F 1 R - 4とインキュベートした。

20

【0107】

I G F 1 R - 4 V_H HをN H S - C y 5. 5で標識化した。(タンパク質のN末端及び/又はリジン側鎖の)一級アミンとN H S エステルとの間の安定アミン結合によって標識化を行った。典型的には、10% v/vの1 M炭酸塩/重炭酸塩緩衝液(759 mM重炭酸塩、258 mM炭酸塩) pH 9. 3を、P B S (1. 06 mM K H₂ P O₄、154 mM N a C l、5. 6 mM N a₂ H P O₄) pH 7. 4中に調製された4 mgのV_H Hに添加し、4 mg/mLの最終濃度に調整した。10 mg/mLでD M S O中に溶解されたN H S - C y 5. 5を、染料のタンパク質に対する2×モル比で添加した。混合物を、1. 5 mL微量遠心管中で何度か反転させながら室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、未結合染料及び反応副産物を、Z e b a S p i n D e s a l t i n g C o l u m n s、7 K M W C O (P i e r c e)を使用して濾過し、B e c k m a n D U 5 3 0分光光度計(B e c k m a n C o u l t e r)を使用して測定した。C y 5. 5標識化 I G F 1 R - 4又は陽性対照としてのF C 5 (1 mg/mL)を、S V 4 0不死化ラット脳内皮細胞(s v A R B E C)と4℃(図4、上パネル)で、したがって受動的で非特異的な輸送機序のみが生じることを可能にして、又は37℃(図4、下パネル)で、能動的機序、たとえば受容体媒介性エンドサイトーシスが生じることを可能にして、インキュベートした。コムギ胚芽凝集素及びD A P Iでの共染色を実施し、細胞表面及び核をそれぞれ視覚化した。蛍光顕微鏡下で細胞を観察し、画像をキャプチャーした。

30

40

【0108】

4℃でインキュベートされた場合、I G F 1 R - 4は、細胞の外部に、コムギ胚芽凝集素で染色された細胞膜と共局在して見出された。対照的に、37℃でインキュベートされたとき、I G F 1 R - 4は、細胞内部の小胞、おそらくはエンドソームに蓄積し、抗体が能動輸送機序によって細胞内に内部移行したことを示唆する。同様の振舞いが、クラスリン被覆小胞を介したエネルギー依存性エンドサイトーシスにより細胞に侵入することが前に示されているF C 5について観察された(A b u l r o bら2005)。

【0109】

50

実施例 8 : I G F 1 R - 4 - m F c コンストラクトの製造

マウス抗体結晶性断片 (F c、m F c 2 b) と融合した I G F 1 R - 4 V_H H を含むコンストラクトを調製し、発現させ、単離した。I G F 1 R - 4 - m F c コンストラクトの配列を図 5 A に示し、分子の概略図を図 5 B に示す。融合タンパク質はまた、図 5 A の配列に示されていない N 末端シグナルペプチド (M E F G L S W V F L V A I L K G V Q C、配列番号 37) を含んでいた。

【0110】

I G F 1 R - 4 c D N A を、マウス F c 2 b 断片を含有する哺乳動物発現ベクター p T T 5 (D u r o c h e r、2002) 内にクローニングした。得られたベクターのポリプレックスを、187.5 μg の p T T 5 - I R 5 m F c 2 b、56.25 μg の p T T - A K T d d (プロテインキナーゼ B の活性化変異体)、18.75 μg の p T T o - G F P (トランスフェクション効率をモニタリングするため)、及び 112.5 μg のサケ精巢 DNA (S i g m a - A l d r i c h) を含有する 25 ml のプラズミド DNA 溶液、並びに、1.125 mg の P E I p r o (商標) (P o l y P l u s T r a n s f e c t i o n) を含有する 25 ml の P E I 溶液を混合することにより事前に形成した。両方の溶液が、F 17 培地中で作られた。混合物を、細胞培地への添加の 10 分前にインキュベートした。短縮 E B N A 1 タンパク質を安定的に発現する C H O 細胞の 450 ml 培養物 (C H O - 3 E 7) を F 17 培地 (I n v i t r o g e n) 中で成長させ、50 ml のポリプレックスをトランスフェクトした。トランスフェクション 24 時間後、培養物に 12.5 ml の 40% (w/v) トリプトン N 1 (O r g a n o t e c h n i e) 溶液及び 1.25 ml の 200 mM バルプロ酸溶液を加えた。トランスフェクション 8 日後に培養物を回収し、遠心により清澄化した。清澄化培地を、5 ml のプロテイン A M a b S e l e c t S u R e 樹脂 (G E H e a l t h c a r e) を充填したカラムへのその適用前に、0.22 μm 膜に通して濾過した。ローディング後、5 容量のリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) p H 7.1 でカラムを洗浄し、100 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 p H 3.0 で抗体を溶出した。溶出抗体を含有する画分をプールし、P B S 中で平衡化した脱塩 E c o n o - P a c カラム (B i o R a d) 上にローディングすることにより緩衝液交換を実施した。次に、M i l l e x G P (M i l l i p o r e) フィルターユニット (0.22 μm) を通過させることにより、脱塩抗体を無菌濾過し、アリコートにした。

【0111】実施例 9 : インビトロ血液脳関門モデルを通過する I G F 1 R - 4 の輸送

I G F 1 R - 4 V_H H、そのヒト化バージョン (H 2 ~ H 6)、及び I G F 1 R - 4 - m F c (実施例 8) が血液脳関門を通過するかどうかを評価するため、下に述べるインビトロアッセイを使用した。実験を要約するフローチャートを図 6 A に示す。

S V 40 不死化成体ラット脳内皮細胞 (S v - A R B E C) を、以前に記述されたとおりインビトロ血液脳関門 (B B B) モデルを作製するために使用した (G a r b e r g ら、2005; H a q q a n i ら、2012)。S v - A R B E C (細胞 80,000 個/膜) を、1 ml の成長培地中の 0.1 mg/mL ラット尾コラーゲン I 型被覆組織培養物インサート (細孔サイズ 1 μm、表面積 0.9 cm²、F a l c o n) 上に播種した。インサートアセンブリの下チャンバーは、不死化新生仔ラット星状細胞馴化培地を 1:1 (v/v) 比で添加した 2 ml の成長培地を含有していた。等モル量 (5.6 μM) の正 (F C 5) 又は負 (A 20.1、クロストリジウム・ディフィシル毒素 A 結合性 V_H H、及び E G F R 結合性 V_H H である E G 2) の対照、I G F 1 R - 4 V_H H、ヒト化バージョン (H 2 - H 6) 又は I G F 1 R - 4 m F c を、このラットインビトロ B B B モデルを横断するそれらの能力について試験した。B B B の管腔側への等モル量の s d A b の曝露後に、試料を 15、30、及び 60 分後に反管腔側から採取した。次に、各試料の s d A b 含有量を、H a q q a n i ら (2012) により記述されたとおり、質量分析 (多重反応モニタリングー同位体標識化内部標準、M R M - I L I S) により定量した (下の方法の説明を参照のこと)。

【0112】

見かけ透過係数の決定：定量値を直接プロットでき、又は P_{app} （見かけ透過係数）値を所定の式で決定し（図 6 A）、プロットできる。 P_{app} 値が、分子について BBB を横断する能力を決定するために一般に使用される。[Q_r/dt = レシーバーコンパートメントにおける累積量対時間、 A = 細胞単層の面積、 C_0 = 投与溶液の初期濃度]。 P_{app} 値は、脳内皮単層を通過する化合物の特異的透過性の尺度である。

【0113】

結果を図 6 B ~ 図 6 D に示す。得られた結果は、複数の独立実験から得られた平均 P_{app} 値である。両方の陰性対照が、非常に低い P_{app} 値を有し、BBB モデルを通過するこれらの $V_H H$ の非特異的輸送又は傍細胞輸送が最小限であることを示す。IGF1R-4 $V_H H$ は、高い P_{app} 値を有し、インビトロ BBB モデルを通過する高い輸送率を示す。IGF1R-4 $V_H H$ の P_{app} は、陽性対照、すなわち BBB 透過性 $V_H H$ FC5（国際公開第 02/057445 号）のものよりも 4 倍高い。結果は、IGF1R-4 がインビトロで脳内皮細胞を通過する促進された細胞間輸送を受け、インビボで類似の特性を有しうることの強い示唆を与える。ヒト化 IGF1R-4 $V_H H$ 変異体 H3、H4 及び H5 は、IGF1R-4 $V_H H$ と比較して、同等（H3）又はわずかに低い P_{app} 値を示した。H2 変異体は、有意に減弱化されたインビトロ BBB モデル通過能力を示した一方で、H6 変異体はこの能力を完全に失い、内部対照 $V_H H$ A20.1（図 6 C）と同じ P_{app} 値を示し、さらなる研究から除外した。IGF1R-4 mFc の P_{app} 値（図 6 D）は、IGF1R-4 $V_H H$ （図 6 B）の 6 倍小さい値と同等であり、IGF1R-4 が大きな（抗体サイズの）分子を、BBB を通過させて「運搬」できることを示す。陽性対照である FC5 mFc の P_{app} 値は、IGF1R-4 mFc の値よりも 3 倍低かった。カージオ分子に連結された IGF1R-5 又はヒト化バージョンを含むコンストラクト（MW 約 110 kDa 又は 180 kDa）もまた、BBB を通過してフェリーされると示されたことに留意する価値はある（データは示さず）。

【0114】

別の IGF1R 結合性 $V_H H$ である IGF1R-1 もまた、mFc 融合物としてこのアッセイにおいて試験した。IGF1R-1 mFc は、対照 A20.1 $V_H H$ （図 6 D）よりもわずかに高い P_{app} 値しか有さなかったことから、免疫ラマライブラリーから単離された IGF1R 結合性 $V_H H$ のサブセットだけが、BBB 通過特性を有することが示される。

【0115】

MRM-ILIS 法を使用した $V_H H$ の絶対量測定。本方法は、すべて Haqqani ら（2012）に記載されたとおりである。簡潔に述べると、 $V_H H$ について SRM（選択反応モニタリング、多重反応モニタリング（MRM）としても知られている）アッセイを開発するため、各 $V_H H$ をまず、データ依存性取得を使用してナノ LC-MS/MS により解析し、すべてのイオン性ペプチドを同定した。各ペプチドについて、3 ~ 5 個の最も強力な断片イオンを選択した。これらの断片を消化物のアトモル量（約 100 ~ 300 amol）でモニタリングするための初期 SRM アッセイを開発した。低い量での再現性のある強度比を示した（すなわち、より高い量と比較してピアソン $r^2 \geq 0.95$ を有していた）断片を、安定的であると考え、最終 SRM アッセイのために選択した。アッセイのさらなる最適化のため、近接した m/z （質量対電荷比）及び溶出時間を有するペプチドを選択しないよう注意しながら、各ペプチドの溶出時間もまた含めた。

【0116】

細胞培地又は体液（血清又は脳脊髄液（CSF））における $V_H H$ の典型的なマルチプレックス SRM 解析は、既知の量の ILIS（0.1 ~ 10 nM）を添加し、その後、100 ~ 400 ng の CSF 又は培養された培地タンパク質（0.3 ~ 1 μ l）又は約 50 ~ 100 ng の血清タンパク質（1 ~ 3 ナノリットル）をナノ LC-MS システム内に注入することを伴った。各標的ペプチドイオンの前駆 m/z が、標的のための特定の溶出時間においてイオントラップ内で選択され（残りの無関係なイオンは破棄された）、衝突誘起解離（CID）フラグメンテーション、及び検出器によるモニタリングのためのイオン

トラップ内の所望の断片イオンのみの選択が続いた。定量解析のため、LTQ (ThermoFisher) により生成された生ファイルを、標準質量分析データ形式m/zXMLに変換し、MatchRxソフトウェアの修正バージョンである、Q-MRM (定量的-MRM、Haqqaniら 2012を参照のこと) と呼ばれるインハウスのソフトウェアを使用して強度を抽出した。各V_HHについて、抽出イオンクロマトグラフを、全溶出時間にわたる0.25Da以内の断片m/zの合計強度からなるその断片イオンのそれぞれについて得た。各断片について最終強度値を得るため、0.5分以内の予測保持時間のすべての強度を合計した。V_HHを、そのペプチドのうちの少なくとも1つの断片が予測強度比を示す、すなわち、最終強度値がその対応する純V_HHの最終強度値と比較して強いピアソン相関 $r \geq 0.95$ 及び $p < 0.05$ を示す場合に、試料において検出可能なものとして定義した。

10

【0117】

V_HHの混合物を含有する試料 (培地、血清、CSF) を、以前に記述されたとおり、還元し、アルキル化し、トリプシン消化した。(Haqqaniら、2012; Gergovら、2003) 消化物 (トリプシンペプチド) を酢酸で酸性化させ (5%最終濃度)、LTQ XL ETD又はLTQ Orbitrap ETD質量分析計 (ThermoFisher、Waltham、MA) と組み合わせた逆相ナノAcquity UPLC (Waters、Milford、MA) 上で解析した。試料の所望のアリコートを注入して300µm I.D. × 0.5mm 3µm PepMaps C18トラップ (ThermoFisher) 上に充填し、次に100µm I.D. × 10cm 1.7µm BEH130C18 ナノLCカラム (Waters) 上に、1分間で0%~20%、16分間で20%~46%、1分間で46%~95%アセトニトリル (0.1%ギ酸中) の勾配を使用して、400nL/minの流量で溶出した。溶出ペプチドを、ペプチドイオンのフラグメンテーションのためのCIDを使用したMS/MS及びSRM解析のため、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) により質量分析計内へとイオン化した。ヘリウムを衝突ガスとして、35%の標準化衝突エネルギー及び30msの活性化時間でCIDを実施した。線形イオントラップ内へのイオン注入時間を、 6×10^3 の自動利得制御 (AGC) 標的値及び200msの最大蓄積時間を使用して機器により調整した。

20

マルチプレックスアッセイにおいて各V_HHの検出及び定量のために使用されたV_HH特異的ペプチドを表2に示す。

30

【0118】

【表 2】

表2.FC5、FC5-ILIS、EG2、A20.1、IGF-1R-5及びアルブミンのナノLC-SRM検出において使用されたペプチド。(a)以前に記述されてきた様々な研究において、アッセイは、同じ試料における同時モニタリングについての異なる組合せでのマルチプレックスだった。(b)重標識化ペプチド(heavy-labeled peptide)。(c)各ペプチドについてSRMアッセイの検出及び定量の限界は1.5~2.5ng/mlだった。1ng/mlは、約60~70pMのV_HHに相当する。A20-1はHussackら、2011bに記載のもの。EG2はIqbalら、2010に記載のもの。

タンパク質	表示	配列番号	ユニーク
IGF1R-4	EFVGHITWSR	25	はい
	LSCEVSGGTVSPTAMGWFR	26	はい
FC5	ITWGGDNTFYNSVK	27	はい
FC5-ILIS	ITWGGDNTFYNSVK ^(b)	27	はい
A20.1	TTYADSVK	28	はい
	EFVAAGSSTGR	29	はい
	TFSMDPMAWFR	30	はい
	DEYAYWGQGTQVTVSSGQAGQGSEQK	31	はい
EG2	DFSDYVMGWFR	32	はい
	LEESGGGLVQAGDSLR	33	はい
	NMVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVNSAGTYVSPR	34	はい
アルブミン	APQVSTPTLVEAAR	35	はい

【0119】

実施例10：インビボ及びエクスビボ光学イメージング

IGF1R-4 V_HHが静脈内(i.v.)注射後に脳内に蓄積するかどうかを決定するため、IGF1R-4 V_HH及び陰性対照A20.1 V_HHを、近赤外蛍光トレーサーであるCy5.5にコンジュゲートし、実施例7に記載のとおり精製した。2.5mg/kgのIGF1R-Cy5.5又はA20.1 Cy5.5のいずれか(150µl容量中)を、尾静脈を介してCD-1ヌードマウスに注射し、それらを腹臥位で、eXplore Optix前臨床画像装置MX2(Advanced Research Technologies, QC)で、注射30分後に生きたまま撮像した。注射の1時間後、2%イソフルラン(Baxter Canada, Mississauga, ON, Canada)で動物を麻酔にかけ、心穿刺を行い、1EU/mLヘパリン(Organon, Toronto, ON, Canada)を添加した10mLの生理食塩水(Baxter Canada, Mississauga, ON, Canada)を、同じニードルから2mL/minで灌流し、血液を除去した(右室切開の部位での血液非含有流体の出現により確認した)。灌流した脳を除去し、eXplore Optixを使用してエクスビボで撮像した。イメージングプロトコルは、Iqbalら、2011に詳細に記載のとおりだった。

【0120】

結果を図7に示す。Cy5.5-IGF1R-4を注射されたマウスは、増強された光学シグナルをインビボの頭部領域(上パネル、矢印)及び灌流後のエクスビボ脳(下パネル、矢印)において示した一方で、Cy5.5-A20.1注射マウスは、低いバックグラウンドシグナルしか示さなかった。データは、IGF1R-4 V_HHが、造影剤(Cy5.5、1kD)を、インビボで血液脳関門を通過させて送達できることを示唆する。

【0121】

実施例11：ガラニンへのIGF1R-4のコンジュゲーション

IGF1R-4 V_HHがインビボで血液脳関門(BBB)を通過し、それ自体ではBBBを通過できない分子を、BBBを通過させて「フェリー」できるかどうかを決定するため、神経ペプチドガラニンを、IGF1R-4 V_HH又はIGF1R4-mFcに化

学的にコンジュゲートし、全身投与した。ガラニンは、脳組織において発現する Gal R 1 及び Gal R 2 に結合することにより鎮痛をもたらす向神経活性ペプチドである。末梢的に与えられた場合、ガラニンは鎮痛効果を有さない。なぜなら、それ自体は BBB を通過できないからである (Robertson ら、2011)。

【0122】

IGF1R-4 V_HH を、システアミド修飾 C 末端を有するラットガラニン (Gal) 断片 (Biomat ic) (GWT LNSAGYLLGPHAI DNHR SFSDKH GLT-システアミド、配列番号 36) にコンジュゲートした。コンジュゲーションのスキームを図 8A に示す。

【0123】

簡潔に述べると、0.5×PBS、2.5mM EDTA 中の [2mg/ml] での 5mg の IGF1R-4 V_HH (実施例 4) を、436.4μl の 2.5mg/ml スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート (スルホ-SMCC) (7.5×過剰モル比) と混合した。次に、窒素ガスで混合物を洗い流し、30 分間室温 (RT) でインキュベートし、スルホ-SMCC の NHS エステルアームを V_HH 上のアミンと反応させた。続いて、10ml の 7K Zeba カラム (Pierce) を使用して、未反応スルホ-SMCC をマレイミド-活性化 IGF1R-5 V_HH から除去した。試料ローディングの前に、カラムを 5ml PBS で 3 回洗浄し、1000×g で 2 分間回転させた。試料ローディング後に、カラムに 200μl の PBS を補給し、2 分間、1000×g で回転させた。IGF1R-Fc コンストラクトについて、5mg を約 68μl のスルホ-SMCC (6.5×過剰モル比) と、上述と同様に反応させた。

【0124】

別々に並行して、システアミド修飾 C 末端ガラニン (Gal-cya) を、10mg の凍結乾燥粉末を 10ml のエンドトキシンフリー水中に溶解させることにより調製し、1mg/ml ストックを作った (ガラニン-cya 粉末は、精製中のジスルフィド架橋形成を防止するため、少量の DTT を有する)。最後に、100μl の 0.5M EDTA を添加した (5mM 最終濃度)。

【0125】

精製マレイミド活性化 IGF1R-4 V_HH 及び IGF1R-Fc コンストラクト (2.6ml) を、0.5×PBS、2.5mM EDTA で 5ml まで希釈し、次に、ボルテックスをかけながら 5ml 又は 1ml の Gal-cya をそれぞれ添加した。試料を窒素で洗い流し、密封し、一晚 4℃ でインキュベートした。翌日、Amicon-15 10K 及び 30K カラム (Millipore) をそれぞれ使用して、未反応の Gal-cya を除去した。試料をカラムに添加し、4000×g で 7 分間、体積が 5ml に減少するまで回転させた。5ml の 0.5×PBS、2.5mM EDTA を、カラムのインサート中の残りの 5ml 試料に添加し、試料が 4ml に減少するまで再び回転させた。次に、コンジュゲートされた試料を、10ml 7K Zeba カラム (Pierce) に添加し、上述のとおり調製し、次に 2 分間、1000xg で回転させた。

【0126】

次に、コンジュゲートされた IGF1R-4-Gal 及び IGF1R-4 Fc-Gal 試料を、16% 又は 10% SDS-PAGE 非還元ゲル上に走らせ、銀染色し、コンジュゲーション後の分子量サイズの変化を確認した。1つの V_HH 又は IGF1R-Fc コンストラクト当たり約 1~2 個のガラニン分子を達成するため、反応を滴定した。結果は、IGF1R-4 V_HH 上へのガラニンのロードを確認する (図 8B を参照のこと)。

【0127】

エンドトキシン除去及びエンドトキシンレベルの決定: Amicon Ultra 分子量カットオフ (MWCO) セルロース膜スピンカラム (Millipore) を使用して、エンドトキシンを除去した。第 1 に、15ml の V_HH 調製物を、4000×g で 10 分間の遠心により Amicon-15~50K MWCO カラムを通過させた。溶出物

10

20

30

40

50

を回収した。次に、この溶出物を、Amicon-15~10K MWCOCラムに添加し、4000×gで7~10分間回転させ、15mlから7.5mlへの上清体積の低減をもたらした。ラム内の上清体積を、PBSを添加することにより15mlに戻すよう調整した。ラムを上述のとおり再び回転させた。上清を回収し、10~0.1EU/mlの感度範囲を有するカートリッジを使用したEndoSafe-PTSシステム(Charles River Laboratories International)でエンドトキシンレベルを測定した。25μlの試料を、カートリッジ上の4つのウェルのそれぞれにロードし、必要に応じて希釈した。1mg当たりEU<1を有する試料のみを、動物研究に使用した。

【0128】

実施例12：ハーグリーブズモデルを使用したIGF1R-4-Galの輸送

IGF1R-4-Gal又はIGF1R-4-mFc-Gal(実施例11)が血液脳関門を通過するかどうかを評価するため、インビボアッセイを、国際特許公開第2011/127580号に以前に記載のとおり利用した。

【0129】

Hargreavesら(1988)に記載のものと類似した炎症性痛覚過敏のラットモデルを使用した。動物をポリプロピレンケージ1つ当たり3匹の群で入れ(ハーグリーブズモデル)、餌及び水を自由に与えた。12時間の明/暗サイクル、24℃の温度及び50±5%の相対湿度で実験を行った。すべての動物処置が、NRC動物ケア委員会により認可され、カナダ動物ケア評議会ガイドラインを順守していた。

【0130】

このモデルにおいて、6~8週齢の雄ウィスターラット(体重範囲230~250g)に、低体積(30ゲージニードルで100μl)の完全フロイントアジュバント(CFA、油：生理食塩水1：1エマルジョン中に懸濁された熱殺傷M.チューバークュロシス(M. tuberculosis)(Sigma))を、右後足に短いイソフルラン麻酔(3%)下で注射した。CFAは、侵害受容体を活性化し、慢性的疼痛状態及び痛覚過敏(有害な熱に対する高められた感受性)を創出する炎症促進性物質の放出を誘導する。足退避潜時を、足刺激に対する足底無痛測定器具(IITC Model # 336 TGLife Science, Inc.)を使用した、両後足(炎症性及び非炎症性対照足)の足底表面における放射刺激の適用により測定した。動物がその足をなめるか又は動かすことにより反応するのにかかった時間を、陽性反応として解釈した(足退避潜時)。CFA投与前に、光強度灯を、ベースライン足退避潜時を17~20秒の間で両後足に誘発するよう調整した。20秒以内に退避応答が生じない場合、光線を自動的に消灯して組織損傷を回避し、その足には最大スコアが割り当てられる。

【0131】

CFA注射の2日後、化合物の投与前に、動物を操作し、ストレスを低減し、偽陽性反応を防止する目的で、少なくとも60分間無痛測定器具に順化させた。疼痛の発症(熱痛覚過敏)を検証するため、両足でベースラインを測定した。非炎症性の足を、注射された足に対する対照として使用した。「炎症性の足」について6秒超及び「正常な足」について17秒未満の足退避潜時を有する動物を、実験から除外した。

【0132】

IGF1R-4-Galが血液脳関門を通過させて送達され、脳実質において標的受容体(GalR1及び2)に結合できるかどうかを決定するため、ラットに、IGF1R-4-ガラニン(3mg/kg)若しくはIGF1R-4-mFc-ガラニン(2mg/kg又は5mg/kg)又は対照化合物の1回の尾静脈注射をCFA注射3日後に投与した。各後足(炎症性及び非炎症性)について、15分ごとに3時間、足退避潜時(PWL)を試験した。足退避潜時の増加は、熱痛覚過敏の抑制を示し、これは、IGF1R-4による脳実質内へのガラニンの送達の成功によってしか得られない。ガラニンが鎮痛を誘導できるのは、脳実質内に存在するときだけであり、それ自体では無傷BBBを通過できない(Robertsonら、2011)。

10

20

30

40

50

【0133】

足退避潜時（PWL、秒）対時間（分又は時間）の時間経過として結果を解析した（図9A及び9C）。図9Bは、結果を曲線下面積（AUC）として示し、それを最大可能効果の％（％MPE）と比較する。図9Dは、ピーク反応（Emax）での結果を（熱痛覚過敏の）パーセント反転として示す。

【0134】

結果は、静脈内投与されたガラニンが、PBSと比較して疼痛を低減しないことを示す。対照的に、FC5-Gal又はIGF1R4-Galの単回注射は、測定可能な鎮痛効果をもたらし、このV_HHが、BBBを通過させてガラニンを「フェリー」し、脳実質においてGalR1及び／又は2に結合することで鎮痛効果をもたらすことを示唆する。IGF1R4-ガラニンの効果はFC5-Galにより誘導されるものよりも有意に顕著であり、IGF1R受容体が、推定されるFC5受容体よりも高いBBB輸送率を有することを示唆する。結果は、IGF1R4 V_HHが、受容体媒介性トランスサイトーシス経路を使用し、少なくとも3000Daの分子を、BBBを通過させて「フェリー」できることを実証する（抗体-ペプチドコンジュゲートの合計MWは、約18kDaである）。能動的な受容体媒介性輸送が必要とされる。なぜなら、BBBは、0.5kDaを超えるすべての親水性分子の通過を妨げると知られているからである。同様に、IGF1R4-mFc-ガラニンは、熱痛覚過敏の用量依存性抑制をもたらす一方で、A201-mFc-ガラニンは無効である。これは、IGF1R4 V_HHが、抗体（約80kD）とサイズが類似した分子を、BBBを通過させてフェリーできることを示唆する。IGF1R4-mFc-ガラニンは、熱痛覚過敏の抑制において、IGF1R4-ガラニンよりも約5倍強力だったことから、二価ディスプレイ及び延長された血漿半減期が、脳送達の有効性の改善に寄与することが示唆される。

【0135】

実施例13：CSF及び血漿におけるIGF1R4レベル

IGF1R4 V_HHが脳内へと、具体的には脳脊髄液（CSF）中へと透過可能かどうかを決定するとともに、CSF及び血漿におけるその存在を定量するために、インビボアッセイを実施した。

【0136】

動物をポリプロピレンケージに単独で入れ、餌及び水を自由に与えた。12時間の明／暗サイクル、24℃の温度及び50±5％の相対湿度で実験を行った。すべての動物処置が、NRC動物ケア委員会（NRC's Animal Care Committee）により認可され、カナダ動物ケア評議会（the Canadian Council of Animal Care）ガイドラインを順守していた。

【0137】

8～10週齢の雄ウィスターラット（体重範囲、230～250g）を使用した。CSF試料採取のため、動物の頸部及び頭部領域の毛を剃り、次に動物をプレキシグラスチャンバーに入れ、3％イソフルランで適度に麻酔した。基本的にNirogira（2009）に記載されたとおり、CSFを回収した。麻酔ラットを、金属柙器具（Vinicio Granados-Soto博士により寛大にも提供された；CINVESTAV、Mexico）に入れ、イヤーパーを使用して固定した。動物の頭部の位置を、およそ45°下向きに維持した。後頭隆起と脊椎の環椎との間に菱脳が現れる押圧可能な表面を、エタノール（75％）を浸した綿でこすることにより視覚可能にした。切開を伴わないCSF回収のため、100ccインスリンシリンジと接続された長さ10cmのPE-10チュービングで覆われた27Gニードル（Becton Dickinson、Mississauga、ON、Canada）を、水平に大槽の中心に挿入した。皮膚の断裂及び環椎後頭膜の断裂ゆえに、ニードルパスに沿った2つの抵抗点（クリック）を容易に感じることができる。ニードルが第2の抵抗点を通じたとき、CSF（40～100μL）を、インスリンシリンジの穏やかな吸引を適用することによりニードルを通じて回収した。CSF試料採取後に、後開胸の心穿刺により対応する血液を回収し、バキュテナーチ

ューブ (Becton Dickinson、Mississauga、ON、Canada) 内に凝固活性化剤及びゲルとともに入れ、次に $3,000 \times g$ で 15 分間遠心した。マイクロピペットを使用して血清を除去し、さらなる解析まで -80°C で急速冷凍した。

【0138】

血清及び CSF 試料を、実施例 9 に記載のとおり、質量分析及びナノ LC-SRM ベース定量により解析した。

【0139】

CSF 回収は繊細な処置であり、その間、CSF は容易に血液で汚染されうる。V_HH の量は、血中よりも CSF においてはるかに小さい ($<0.1\%$) と予測されるので、血液でのわずかな汚染でさえも、個別の CSF 試料の値を深刻に損ないうる。したがって、血液汚染 CSF 試料のためのストリンジェントな除外基準を開発することが必要だった。血液-CSF アルブミン比を評価するため、血漿及び CSF 中のアルブミンレベルを定量するためのナノ LC-SRM 法を開発した。アルブミンペプチド APQVSTPTLVEAAR (配列番号 37) を、マルチプレックスアッセイにおいて他のペプチドピークへの干渉を最小にするため、その固有の保持時間及び m/z 値に基づいて選択した (Mol Pharm)。SRM を上述のとおり使用して、CSF 及び血漿試料の両方において、ペプチドの強度を定量した。アルブミン比を以下のとおり各ラットについて算出した。

アルブミン比 = 1 nL の解析された血漿当たりの強度 / 1 nL の解析された CSF 当たりの強度

1500 以下の比が、血液汚染と考えられた。

【0140】

結果を図 10 に示す。動物に、それぞれ 6 mg/kg の IGF1R-4、FC5 又は A20.1 を同時注射し、CSF 及び血清を注射 30 分後に回収した。図は、IGF1R-4 の CSF/血清比が、FC5 の 0.98% 及び A20.1 の 0.017% と比較して、 1.2% であることを示し、IGF1R-4 及び FC5 の両方が、同時注射された対照抗体である A20.1 よりも高い CSF 透過性及び脳曝露を有することを示唆する。

【0141】

実施例 14: IGF1R-4-mFc の免疫検出

末梢投与後に CSF において検出された高レベルの IGF1R-4-mFc が、少なくとも部分的に実質細胞外空間に由来すること、言い換えれば、無傷コンストラクトが BBB を横断したことを確認するため、ラット脳における IGF1R-4-mFc の免疫検出を実施した。

【0142】

簡潔に述べると、IGF1R-4-mFc 又は A20.1 mFc のいずれかの 6 mg/kg 尾静脈注射 24 時間後の PBS での動物還流直後に、動物の脳を回収した。脳を凍結し、cryotome 上で $12\text{ }\mu\text{m}$ 切片に切断した。10 分間、RT、 100% メタノール中で切片を固定し、PBS 中で $3 \times$ 洗浄し、1 時間、 $1 \times$ PBS 中の 0.3% Triton X-100 を含有する 10% 正常ヤギ血清 (NGS) 中でインキュベートした。 $1 \times$ PBS 中の 0.3% Triton X-100 を含有する 5% NGS 中のヤギ抗 m-IGG Fcy-cy3 (Cat # 115-165-071、Jackson Immuno Research、ロット # 106360) $1:200$ を、一晚 4°C で適用した。切片を $1 \times$ で 3 回洗浄し、次に、 $1 \times$ PBS 中の脈管構造染色レクチン RCAI (Cat # FL-1081、Vector) $1:500$ を 10 分間添加した。 $1 \times$ PBS で 3 回洗浄後、切片を Dako 蛍光封入剤 (Cat # S3023、Dako) 中においてカバースリップで被覆し、 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ の Hoechst (Cat # H3570、Invitrogen) を添加し、核を染色した。 $10 \times$ 及び $60 \times$ 対物レンズ及び表 3 に示すチャンネルを使用して、Olympus 1×81 蛍光顕微鏡で画像をキャプチャーした。

【0143】

【表 3】

表3.蛍光顕微鏡に使用された対物レンズ及びチャンネル。

	蛍光分子	励起(nm)	発光(nm)
RCAI-血管	FITC	495	518
Hoechst33342-核	Hoechst	350	461
IGF1R-5-m-Fc	Cy3	531	593

【0144】

結果を図11に示す。マウスFcの免疫検出は、異なる脳領域に渡る脳血管の強力な染色を、血管周囲の脳実質の染色とともに示したが、これは、IGF1R-4-mFcが脳血管に蓄積し、脳実質の周囲へとBBBを通過していることを示す。対照的に、mFc特異的染色は、A20.1mFc注射動物において検出できなかった。結果は、IGF1R-4-mFcのCSFレベルの増加は、コンストラクトのBBB通過の指標であるという主張を支持する。これは、IGF1R-4に連結されたガラニンが実質GalR1及びGalR2受容体上の薬理的反応（鎮痛）を誘導したという観察によりさらに強力に支持される。合わせて、インビトロBBB通過結果、インビボ薬物動態学的（血清／CSFレベル）及び薬力学的（ハーグリーヴズモデル）結果は、IGF1R-4 V_HHが、そのIGF1Rエピトープへの結合により誘発される能動的受容体媒介性トランスサイトーシスを介して、他のV_HHよりもかなり高い割合で無傷BBBを通過すること、及び、それがさもなければ血液脳関門非透過性である一定範囲（1～80kD）の分子を「フェリー」できることを実証する。

【0145】

実施例15：IGF1Rの「生理」機能に対するIGF1R-4効果

安全性の観点から、本発明の抗体が、受容体媒介性トランスサイトーシスを介した薬物の送達のために受容体に結合するときに、その受容体の生理機能、すなわち、その天然リガンドであるIGF-1により誘導されるシグナル伝達を妨げないと示すことが重要である。この観点から、IGF1R-4 V_HH又はIGF1R-4-mFcが、IGF1R又は関連インスリン受容体（IR）を介してそれらの天然リガンドにより誘導される生理的シグナル伝達を妨げないと実証することが重要である。

【0146】

IGF1R-4が、IGF1R又はIRのみを介してシグナル伝達を誘導するかどうか、又は受容体の天然リガンドであるIGF-1又はインスリンにより刺激されるシグナル伝達を妨げるかどうかを決定するため、それらが受容体自体又は受容体に刺激される下流キナーゼであるAktのリン酸化に与える効果を、SV-ARBE C細胞において決定した。

【0147】

当技術分野において知られている方法に従い、SV-ARBE Cを、ペプトン、D-グルコース、BMEアミノ酸、BMEビタミン、抗生／抗真菌性溶液及び胎仔ウシ血清を添加したM199基本培地中でコンフルエンスまで成長させた。細胞を、処置18時間前に無血清培地へと切り替えた。IGF1R-4 V_HH又はIGF1R-4-Fc融合物（100nM又は500nM）を、200ng/mlのIGF-1、10μg/mlのインスリン又はビヒクルのいずれかの添加の1時間前に細胞に添加した。細胞を、リガンド又はビヒクルと20分間インキュベートし、次に、ハンクス平衡塩類溶液中で2回洗浄した。続いて、1% Triton-x 100及びプロテアーゼ阻害剤カクテル（Sigma）を添加した1×RIPA緩衝液（Cell Signaling Technology）を使用して細胞を溶解させた。細胞に、水浴超音波処理器において2×20秒バーストを与え、14,000rpmでの10分間の遠心により溶解物を清澄化した。DCタンパク質アッセイシステム（BIO-RAD laboratories）を使用してタンパク質濃度を決定した。等μgのタンパク質試料を、125Vで4～20%勾配SDSポリアクリルアミドゲル上に拡散させ、PVD F膜に転写した。ホスホ-Akt（Ser

473) を、この標的に対する一次抗体の 1 : 1000 希釈液 (Cell Signaling Technology) 中での一晚のインキュベーションにより検出し、その後、ヤギ抗ウサギ IgG-HRP 二次抗体とともに 1 時間インキュベートし、次に、ECL Plus 試薬と反応させ、オートラジオグラフィフィルム上に視覚化した。Un-Scan-It ソフトウェア (Silk Scientific Inc.) を使用して、デンシトメトリー値を決定した。

【0148】

結果を図 12 に示す。Akt リン酸化のウェスタンブロット解析は、IGF1R-4 が、10 µg/ml のインスリン又は 200 ng/ml の IGF-1 により誘導される Akt リン酸化を、100 nM の IGF1R-4 若しくは IGF1R-4-mFc 又は 500 nM の IGF1R-4-mFc と同時適用されたときに阻害しなかったことを示した。また、V_HH 又は Fc 融合物のいずれも、Akt シグナル伝達をそれ自体では誘導しなかった (図 12 A、図 12 B 及び図 12 C、「-4」と表示)。結果は、Fc 融合形式での二価ディスプレイにおいてさえも、IGF1R-4 が、受容体二量体化及び下流シグナル伝達を誘発せず、したがって、天然リガンドの存在下での受容体機能を妨げないことを実証する。IGF1R-4 のこの特徴 (「サイレントバインダー」) は、治療剤の BBB 担体としてのその適用にとって重要である。なぜなら、それは好ましい安全性プロファイルを付与するからである。

【0149】

本明細書に記載の実施形態及び実施例は例示的であり、特許請求の範囲に記載の発明の範囲を限定することを意図していない。代替物、改変物及び均等物を含む上述の実施形態の変形形態が、特許請求の範囲により包含されると本発明者らにより意図されている。さらに、論じられた特徴の組合せが、本発明の解決策に必要なであるとは限らない。

【0150】

参考文献

本明細書において、また本願全体を通じて参照されたすべての特許、特許出願及び公開が、ここに参照により組み込まれる。

Abbott NJ (2013) Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis*. 36(3):437-49.

Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D (2005) The blood-brain barrier transmigration of single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem*. 2005 Nov;95(4):1201-14.

Arbabi-Ghahroudi, M., Desmyter A, Wyns L, Hamers R., and Muyldermans S (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies, *FEBS Lett* 414, 521-526

Arbabi-Ghahroudi, M., To, R., Gaudette, N., Hiramata, T., Ding, W., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2009a) *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 59-66.

Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2009b) *Methods Mol. Biol.* 525, 187-216.

Bell, A., Wang, Z.J., Arbabi-Ghahroudi, M., Chang, T.A., Durocher, Y., Trojahn, U., Baardsnes, J., Jaramillo, M.L., Li, S., Baral, T.N., O'Connor-McCourt, M., MacKenzie, R., and Zhang, J. (2010) *Cancer Lett.* 289, 81-90.

Broussau, S., Jabbour, N., Lachapelle, G., Durocher, Y., Tom, R., Transfiguration, J., Gilbert, R. and Massie, B. (2008) *Mol Ther* 16, 500-507.

Chothia, C., and Lesk, A.M. (1987) *J. Mol. Biol.* 196, 901-917.

Davies J., and L. Riechmann, Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding. *Immunotechnology* 2 (1996) 169-179

De Kruif, J., and Logtenberg, T. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 7630-7634.

- Demeule, M.; Currie, J. C.; Bertrand, Y.; Che, C.; Nguyen, T.; Regina, A.; Gabathuler, R.; Castaigne, J. P.; Beliveau, R. Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopoietin-2. *J. Neurochem.* 2008, 106, 1534-1544.
- Dumoulin, M., Conrath, K., VanMeirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.G., Muyldermans, S., Wyns, L., and Matagne, A. (2002) *Protein Sci* 11, 500-515.
- Durocher, Y., S. Perret, et al. (2002). "High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells." *Nucleic Acids Res* 30(2): E9. 10
- Doyle, P.J., Arbabi-Ghahroudi, M., Gaudette, N., Furzer, G., Savard, M.E., Gledhill, S., McLean, M.D., MacKenzie, C.R., and Hall, J.C. (2008) *Mol. Immunol.* 45, 370-3713.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., and Wall, R. (1984) *J. Mol. Biol.* 179, 125-142
- Erdlenbruch B, Alipour M, Fricker G, Miller DS, Kugler W, Eibl H, Lakomek M (2003) Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries. *Br J Pharmacol.* 140(7):1201-10.
- Fenner, L., Widmer, A.F., Goy, G., Rudin, S., and Frei, R. (2008) *J. Clin. Microbiol.* 46, 328-330. 20
- Gaillet, B., Gilbert, R., Broussau, S., Pilotte, A., Malenfant, F., Mullick, A., Garnier, A., and Massie, B. (2010) *Biotechnol Bioeng* 106, 203-215.
- Gan Y, Jing Z, Stetler RA, Cao G (2013) Gene delivery with viral vectors for cerebrovascular diseases. *Front Biosci (Elite Ed).* 5:188-203. Review.
- Garberg, P.; Ball, M.; Borg, N.; Cecchelli, R.; Fenart, L.; Hurst, R. D.; Lindmark, T.; Mabondzo, A.; Nilsson, J. E.; Raub, T. J.; Stanimirovic, D.; Terasaki, T.; Oberg, J. O.; Osterberg, T. In vitro models for the blood-brain barrier, *Toxicol. In Vitro* 2005, 19, 299-334.
- Gergov, M.; Ojanpera, I.; Vuori, E. Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, 795, 41-53. 30
- Gaillet B, Gilbert R, Amziani R, Guilbault C, Gadoury C, Caron AW, Mullick A, Garnier A, Massie B (2007) High-level recombinant protein production in CHO cells using an adenoviral vector and the cumate gene-switch. *Biotechnol Prog.* Jan-23(1):200-9
- Gottesman et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 62, 385-427 (1993)
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Song, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993) *Nature* 363, 446-448.
- Haqqani AS, Caram-Salas N, Ding W, Brunette E, Delaney CE, Baumann E, Boileau E, Stanimirovic D (2012) Multiplexed evaluation of serum and CSF pharmacokinetics of brain-targeting single-domain antibodies using a NanoLC-SRM-ILIS method. *Mol Pharm.* 2013 May 6;10(5):1542-56. 40
- Hargreaves KM, Troullos ES, Dionne RA, Schmidt EA, Schafer SC, Joris JL (1988) Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin Pharmacol Ther.* 44(6):613-21.
- Huang YL, Saljo A, Suneson A, Hansson HA (1995) A new approach for multiple sampling of cisternal cerebrospinal fluid in rodents with minimal trauma and inflammation. *J Neurosci Methods.* 63(1-2):13-22.
- Hussack, G., Hirama, T., Ding, W., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2011) *PLoS ONE* 6 50

, e28218.

Hussack G, Arbabi-Ghahroudi M, vanFaassen H, Songer JG, Ng KK, MacKenzie R, Tanha J (2011b) Neutralization of Clostridium difficile toxin A with single-domain antibodies targeting the cell receptor binding domain. *J Biol Chem.* 286(11): 8961-76.

Iqbal U. Abulrob A. Stanimirovic D B (2011) Integrated platform for brain imaging and drug delivery across the blood-brain barrier. *Methods Mol. Biol.* 686, 465-481.

Iqbal, U., Trojahn, U., Albaghdadi, H., Zhang, J., O'Connor, M., Stanimirovic, D., Tomanek, B., Sutherland, G., and Abulrob, A. (2010) *Br. J. Pharmacol.* 160, 1016-1028. 10

Jespers, L., Schon, O., Famm, K., and Winter, G. (2004) *Nat. Biotechnol.* 22, 1161-1165.

Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol.* 1991;147:1709-19.

Kim, D.Y., Kandalaft, H., Ding, W., Ryan, S., van Fassen, H., Hiram, T., Foote, S.J., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2012) PEDS advance access August 30, 2012, 1-9. 20

Kornhuber ME, Kornhuber J, Cimniak U (1986) A method for repeated CSF sampling in the freely moving rat. *J Neurosci Methods.* 17(1):63-8.

Lefranc, M.-P. et al., (2003) *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77.

Li S, Zheng W, Kuolee R, Hiram, T, Henry M, Makvandi-Nejad S, Fjallman T, Chen W, Zhang J. Pentabody-mediated antigen delivery induces antigen-specific mucosal immune response. *Mol Immunol* 2009;46:1718-26.

Merritt, E.A., and Hol, W.G. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 165-171.

Muruganandam A, Tanha J, Narang S, Stanimirovic D (2001) Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmute across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J.* 2002 Feb;16(2):240-2. 30

Musher, D.M., Manhas, A., Jain, P., Nuila, F., Waqar, A., Logan, N., Marino, B., Graviss, E.A. (2007) *J. Clin. Microbiol.* 45, 2737-2739.

Nhan T, Burgess A, Cho EE, Stefanovic B, Lilge L, Hynynen K. (2013) Drug delivery to the brain by focused ultrasound induced blood-brain barrier disruption: Quantitative evaluation of enhanced permeability of cerebral vasculature using two-photon microscopy. *J Control Release.* 172(1):274-280.

Nicaise M, Valeio-Lepiniec M, Minard P, Desmadril M. (2004) Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold. *Protein Sci.* 13(7): 1882-1891.

Nielsen, U.B., Adams, G.P., Weiner, L.M., and Marks, J.D. (2000) *Cancer Res.* 60, 6434-6440. 40

Nirogi, R.; Kandikere, V.; Mudigonda, K.; Bhyrapuneni, G.; Muddana, N.; Saralaya, R.; Benade, V. (2009) A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system, *J. Neurosci. Methods*, 178, 116-119.

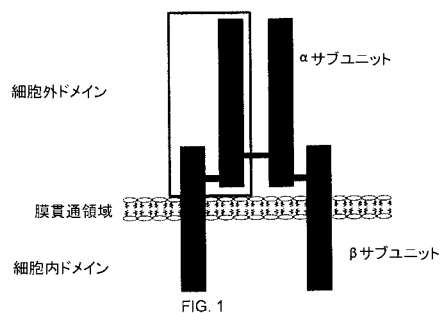
Nuttall, S.D., Krishnan, U.V., Doughty, L., Pearson, K., Ryan, M.T., Hoogenraad, N.J., Hattarki, M., Carmichael, J.A., Irving, R.A., and Hudson, P.J. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554.

Pardridge, W. M.; Buciak, J. L.; Friden, P. M. Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991, 259, 66-70. 50

- Pardridge, W.M., *Adv. Drug Delivery Reviews*, 15, 5-36 (1995)
- Pardridge, W. M. Drug and gene delivery to the brain: the vascular route, *Neuron*. 2002, 36, 555-558.
- Planche, T., Aghaizu, A., Holliman, R., Riley, P., Poloniecki, J., Breathnach, A., and Krishna, S. (2008) *Lancet Infect. Dis.* 8, 777-784.
- Preston E, Slinn J, Vinokourov I, Stanimirovic D. (2008) Graded reversible opening of the rat blood-brain barrier by intracarotid infusion of sodium caprate. *J Neurosci Methods*. 168(2):443-9.
- Ridgway, J.B., Presta, L.G., and Carter, P. (1996) *Protein Eng.* 9, 617-621.
- Robertson CR, Flynn SP, White HS, Bulaj G (2011) Anticonvulsant neuropeptides as drug leads for neurological diseases. *Nat Prod Rep.* 28(4):741-62. 10
- Russmann, H., Panthel, K., Bader, R.C., Schmitt, C., and Schaumann, R. (2007) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 115-119.
- Samani, A.A., Chevet, E., Fallavollita, L., Galipeau, J., and Brodt, P. (2004) *Cancer Research* 64, 3380-3385.
- Samuels B.L., *J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 54, 421-429 (1993)
- Sloan, L.M., Duresko, B.J., Gustafson, D.R., and Rosenblatt, J.E. (2008) *J. Clin. Microbiol.* 46, 1996-2001.
- Sumbria RK, Zhou QH, Hui EK, Lu JZ, Boado RJ, Pardridge WM. (2013) Pharmacokinetics and brain uptake of an IgG-TNF decoy receptor fusion protein following intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous administration in mice. *Mol Pharm.* 10(4):1425-31. 20
- Tanha, J., Muruganandam, A., and Stanimirovic, D. (2003) *Methods Mol. Med.* 89, 435-449.
- To, R., Hiramata, T., Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., Wang, P., Xu, P., Ni, F., and Tanha, J. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 41395-41403.
- Turgeon, D.K., Novicki, T.J., Quick, J., Carlson, L., Miller, P., Ulness, B., Cent, A., Ashley, R., Larson, A., Coyle, M., Limaye, A.P., Cookson, B.T., and Fritsche, T.R. (2003) *J. Clin. Microbiol.* 41, 667-670.
- Watanabe, T., *Acta Oncol.*, 34, 235-241 (1995) 30
- Xiao G, Gan LS. (2013) Receptor-mediated endocytosis and brain delivery of therapeutic biologics. *Int J Cell Biol.* doi: 10.1155/2013/703545. Epub 2013 Jun 11. Yaksh TL, Rudy TA (1976) Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav.* 17(6):1031-6.
- Yu, Y. J.; Zhang, Y.; Kenrick, M.; Hoyte, K.; Luk, W.; Lu, Y.; Atwal, J.; Elliott, J. M.; Prabhu, S.; Watts, R.J.; Dennis, M. S. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target, *Sci. Transl. Med.* 2011, 3, 84ra44.
- Zhang, J., Li, Q., Nguyen, T.-D., Tremblay, T.-L., Stone, E., To, R., Kelly, J., and MacKenzie, C.R. (2004a) *J. Mol. Biol.* 341, 161-169. 40
- Zhang, J., Tanha, J., Hiramata, T., Khiew, N.H., To, R., Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J.R., and MacKenzie, C.R. (2004b) *J. Mol. Biol.* 335, 49-56.
- Zhu et al., *Immunology and Cell Biology* (2010) 88:667-675.
- European Patent No. 519596
- European Patent No. 626390
- US Patent No. 5693761
- US Patent No. 5766886
- US Patent No. 5821123
- US Patent No. 5859205
- US Patent No. 5869619 50

US Patent No. 6054297
US Patent No. 6180370
WO 02/057445
WO 2011/127580
WO 95/04069
WO/2004/076670
WO2003/046560

【 図 1 】



【 図 2 】

```

NKSQGGGSP TSLNGLLPLS AALSINFTSG EICQPGIDIR NDIQQLKRLS NCTVIRGYLS 50
ILLISKAEDE RSTRFFKLTV ITETLLLFHV AGLESGLGLY PHLVINGMK LFINIALVIF 120
ENCNLKDIGL YLNRNITRGA INIEKADLC ELATVDWSLI LDVSRNITV QNKPPKECOD 180
LCPGTMRERF MCKNTLIRE TWIRCWITWR QGNCPSTCG KRACENNEC CPBECLOSCS 240
AFDNDTACVA CRHYITAGVC VPACPFMYR FEGNRCDVDR FCANTLSAES SDSRGFVHD 300
GECNQRCPSG FIRNGSQSMY CIPCEGCPCK VCKEKKKKT IDSVTSAQML QGCTIFKGNL 360
LNIIRGNMI ASLENFMGL IEVVTGIVKI RSEHALVSLF FLKRLRLILG HQQLSGNYSF 420
YVLNQNLQQ LWDNDHNLIT IKAGOMYFAP NPKLCVSEIY RMEVVTGTG RQSKGDINTF 480
NNGERASCES DVLHPTSTT SKNRILITWH RYRPPDYRDL ISTVTYIKRA PFKNVTETDG 540
QDACGSHSWN MVDVDLPFK DVEPGILLSE LKPTQXAVY VKAVLTWVE NDIRGAKSE 600
ILYIRTNASV PSIPDLVLSA SNSSSGLIVK WNPPLPNGN LSYIIVRMQR QPDGGLYR 660
NYCSKDKIPI RHYADGTIDI EHVTEHPKTE VCGGKGPCC ACPTAEASKQ ASKEBAFRK 720
VFENFLHNSI FVPRPScrrt DVMQVANTIM SSKSRNCTAA DFNITDPEE LSEYIPFVES 780
RVDNKERTVI SNLAPFLER IDLNSCHREA EKLOCSASF VFANTMPARG ADDIPGPVTW 840
EPRFENSIPL KWPEFMPHG LILNTEIKTG SQVEDQRECV SRQETRYGG AKLNRNLPWN 900
YFARIQATGL SNGSWIDPV PFTVQAKTGY ENFIHLIAL FVAVLLIVCG LVIMLYVFHR 960
KRNNRLGNG VLYASVNEY PSAADVYVD EWEVAREKIT MSRELGGSP GHVYGVAKG 1020
VVKDEPETRV AIKTVNEAAS MKRIRFPLNE ASVMKEFNCH HVRLLGVVS QSQPTLVIME 1080
LMTRGDLKSY LRSRLPEMEN NPVLAPFSL KMIQMAEIA DGMVILNANK TVHRDLAARN 1140
CHVAEDFTVK IGDPMTRDI YETDYRKGG KGLLPVRWMS PESLKDGVFT TVSDVWSFV 1200
VLWEIATLAE QFYQGLSNEQ VLRVMEGGL LDKFDNCPDM LFEIMRMCWQ YNFAMKPSFL 1260
HIISIKKEEM EPGFREVSFY YSEENKLPF EELDLEFENM ESUPLDPSAS SSSLPLPDNI 1320
SGHKAENGPG FGVVLVRAAF DERQFYAHN GGRKNRRLP LPQSTC 1367
```

FIG. 2

【図 3 A】

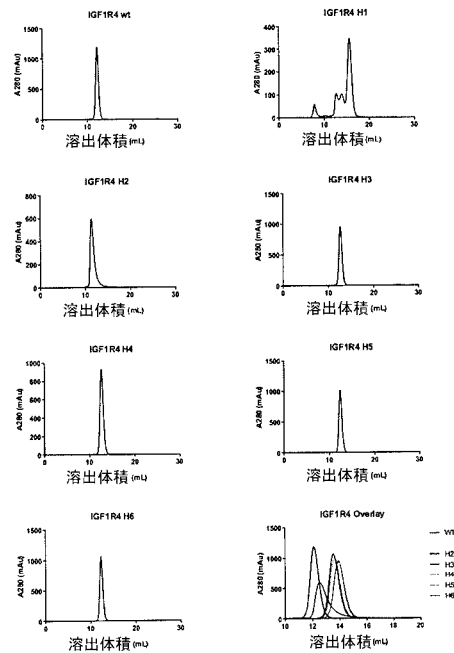


FIG. 3A

【図 3 B】

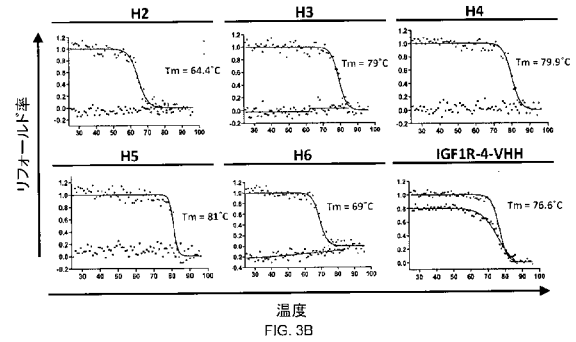


FIG. 3B

【図 3 C】

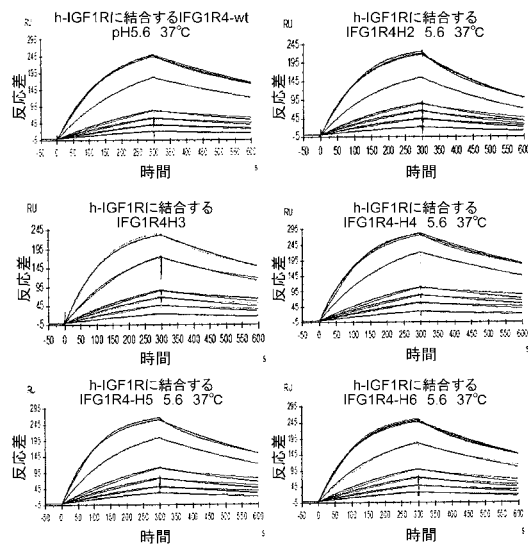


FIG. 3C

【図 3 D】

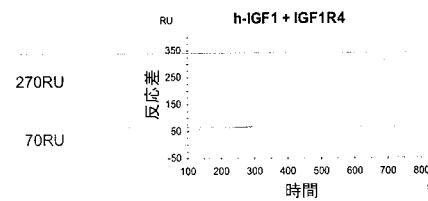
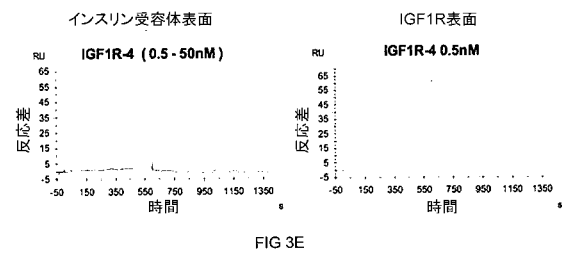
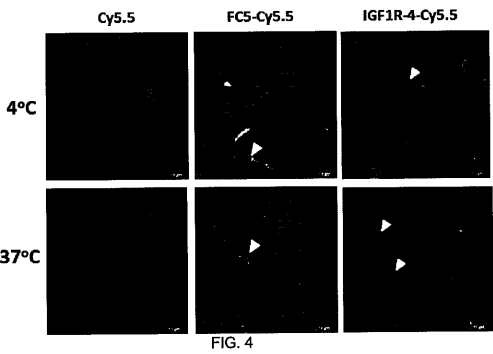


FIG 3D

【 図 3 E 】



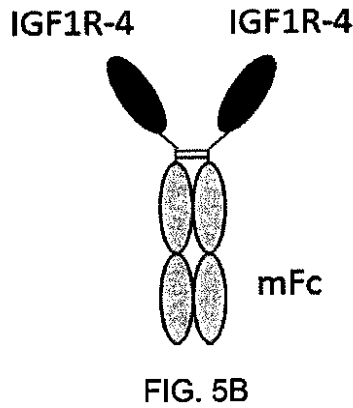
【 図 4 】



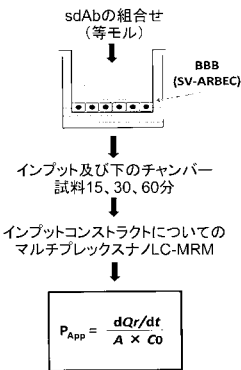
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 A 】



【図 6 B】

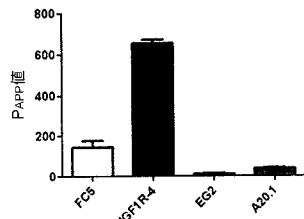


FIG. 6B

【図 6 C】

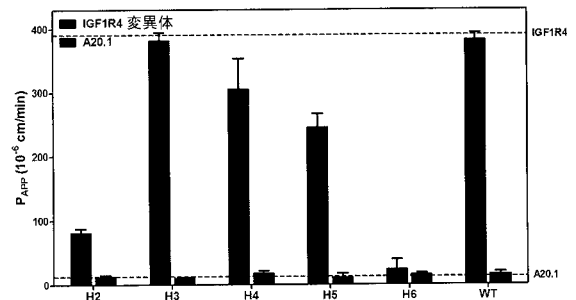


FIG. 6C

【図 6 D】

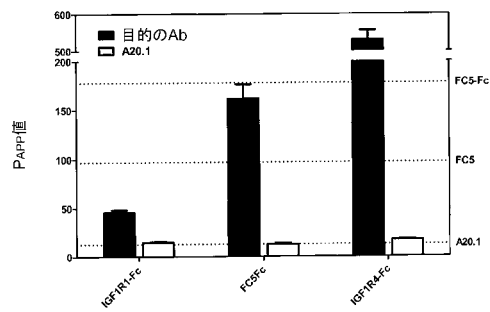


FIG. 6D

【図 7】

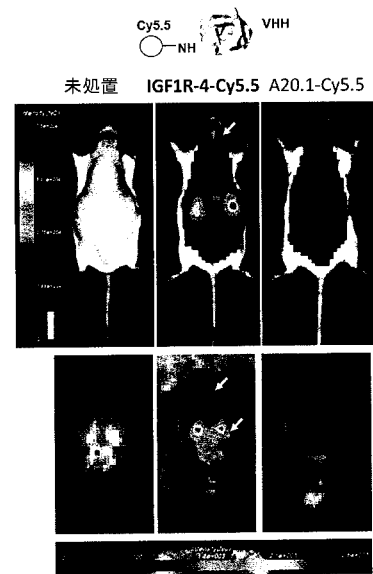


FIG. 7

【図 8 A】

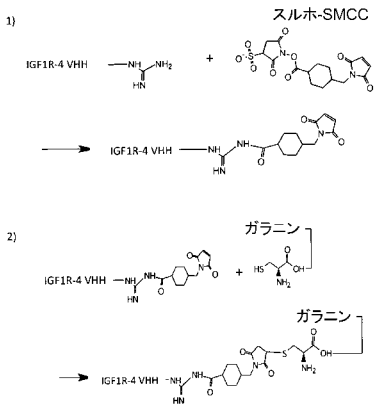


FIG. 8A

【図 8 B】

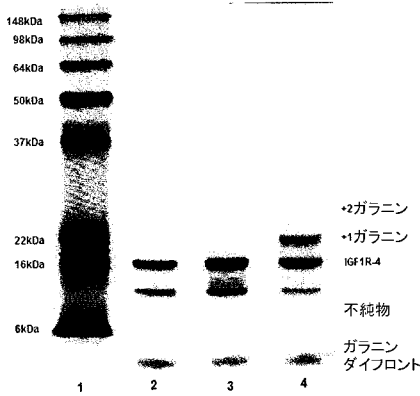


FIG. 8B

【図 9 A】

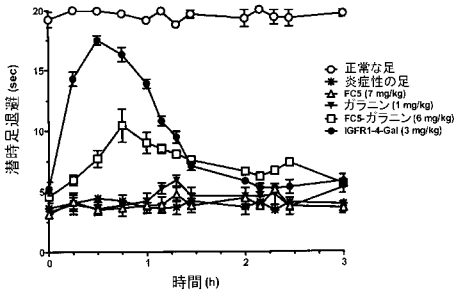


FIG. 9A

【図 9 B】

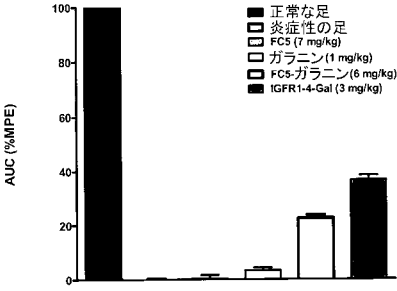
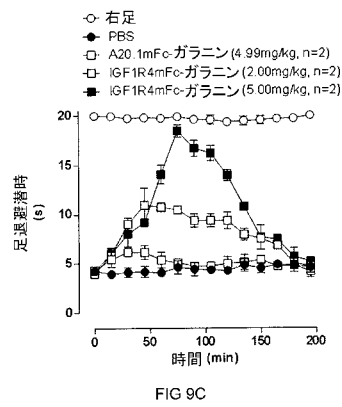
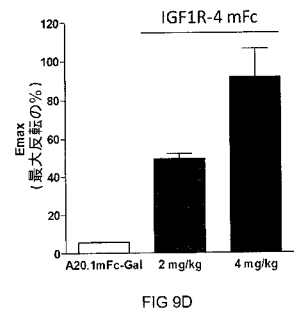


FIG. 9B

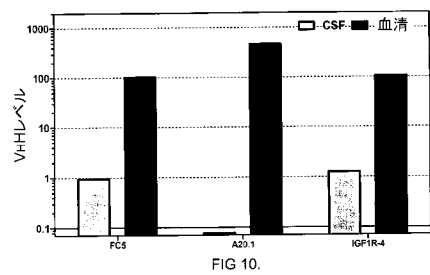
【 図 9 C 】



【 図 9 D 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】

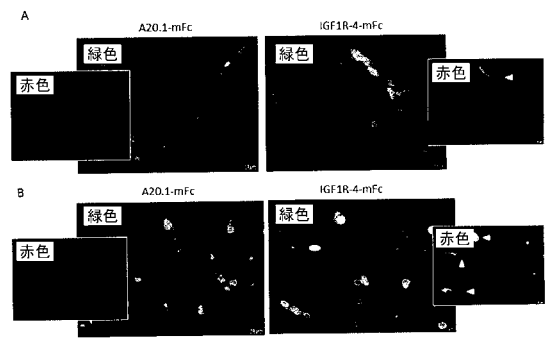


FIG. 11

【図 1 2 A】

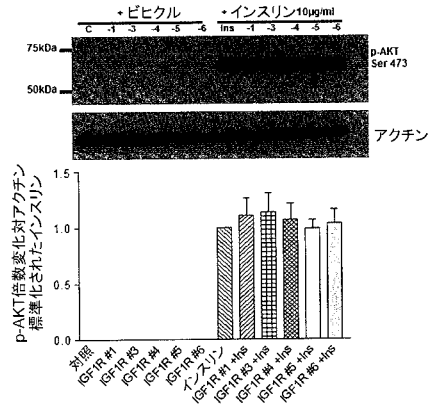


FIG. 12A

【図 1 2 B】

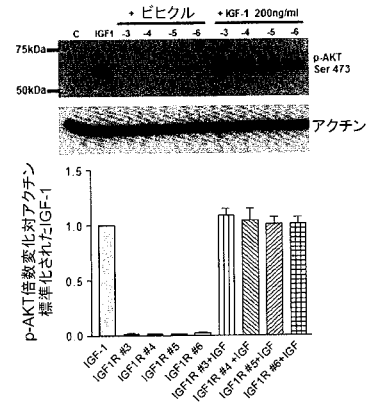


FIG. 12B

【図 1 2 C】

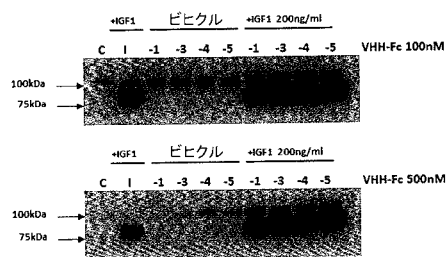


FIG. 12C

【配列表】

2017512464000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2014/000861
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 16/28</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61K 49/00</i> (2006.01), <i>C07K 16/46</i> (2006.01), <i>C07K 17/00</i> (2006.01), <i>C12N 15/13</i> (2006.01), <i>G01N 33/53</i> (2006.01)		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: <i>C07K 16/28</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61K 49/00</i> (2006.01), <i>C07K 16/46</i> (2006.01), <i>C07K 17/00</i> (2006.01), <i>C12N 15/13</i> (2006.01), <i>G01N 33/53</i> (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: Canadian Patent Database, CAPIus, Questel Orbit, Pubmed, Scopus, Google Scholar and Genome Quest. Keywords: blood brain barrier, blood-brain, antibody, VHH, insulin, insulin-like growth factor, IGF1R, camelid, llama, VHH, transcytosis, receptor mediated transcytosis, RMT, Stanimirovic, Pardridge, Sulea, Arbabi-Ghahroudi, Haqqani, Abulrob		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/150061 A1 (DIEM M & O'NEIL KT) 1 December 2011 (01-12-2011) Whole document	1, 5 – 9 and 12 – 23
Y	WO 2011/044542 A1 (PARDRIDGE WM & BOADO RJ) 14 April 2011 (14-04-2011) Paragraphs 3, 66 and 73 – 89	1, 5 – 9 and 12 – 23
☒ 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 "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 11 February 2015 (11-02-2015)		Date of mailing of the international search report 06 March 2015 (06-03-2015)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Jacinth Abraham (819) 934-7598

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2014/000861

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Gabathuler R Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. Neurobiol Dis. Vol. 37, Pages 48-57 January 2010 (01-2010) ISSN 0969-9961 Page 54, section bridging left and right columns	1, 5 – 9 and 12 – 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2014/000861

Box No. 1	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☒ on paper or in the form of an image file. b. ☒ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2014/000861

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the 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. ☒ Claim Nos.: 24 - 28 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims 24 – 28 are directed to methods for treatment of the human or animal body, which the International Search Authority is not required to search. The step of “collecting cerebrospinal fluid (CSF)” causes claim 28 to fall into this category. Nevertheless, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the antibody in these claims. 2. ☐ Claim 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. ☐ Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.: 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim 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.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CA2014/000861

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO 2011/150061 A1	01 December 2011 (01-12-2011)	WO2011150061A1 AU2011258301A1 AU2011258301B2 CA2800744A1 CN103025341A EA201291416A1 EP2575846A1 EP2575846A4 IL223030D0 JP2013534811A KR20130111237A MX2012013710A SG186068A1 US2011294748A1 US8415306B2	01 December 2011 (01-12-2011) 06 December 2012 (06-12-2012) 21 November 2013 (21-11-2013) 01 December 2011 (01-12-2011) 03 April 2013 (03-04-2013) 28 June 2013 (28-06-2013) 10 April 2013 (10-04-2013) 11 December 2013 (11-12-2013) 03 February 2013 (03-02-2013) 09 September 2013 (09-09-2013) 10 October 2013 (10-10-2013) 20 May 2013 (20-05-2013) 30 January 2013 (30-01-2013) 01 December 2011 (01-12-2011) 09 April 2013 (09-04-2013)
WO 2011/044542 A1	14 April 2011 (14-04-2011)	WO2011044542A1 EP2485761A1 EP2485761A4 JP2013507131A US2011110935A1 US8834874B2 US2015004160A1	14 April 2011 (14-04-2011) 15 August 2012 (15-08-2012) 03 April 2013 (03-04-2013) 04 March 2013 (04-03-2013) 12 May 2011 (12-05-2011) 16 September 2014 (16-09-2014) 01 January 2015 (01-01-2015)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 K 47/50 (2017.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 K 47/46 (2006.01)	A 6 1 K	47/48	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K	47/46	
	G 0 1 N	33/53	Y

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NL,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 スタニミロヴィッチ, ダニカ
カナダ, ケー4ピー 1アール7 オンタリオ, オタワ, スパークリング レイク ウェイ
6 8 9 2

(72)発明者 ケメリック, クリスティン
カナダ, ケー1ワイ 0エー5 オンタリオ, オタワ, アイランド パーク ドライブ 2
5 7

(72)発明者 ハッカニ, アルサラーン エス.
カナダ, ケー2ティー 0エー8 オンタリオ, カナダ, フレッチャー サークル 7 6 6

(72)発明者 スレア, トライアン
カナダ, エイチ9ジェー 3エー2, ケベック, カークランド, オールド フォレスト
6 1

(72)発明者 アルバビ - ガロディ, マハディ
カナダ, ケー1ダブリュー 1ケー1, オンタリオ, オタワ, デ グラン シャン 2 2
4 2

(72)発明者 マッシー, ベルナール
カナダ, エイチ7エイチ 1アール2, ケベック, ラヴァル, リオベル 6 6 4 0

(72)発明者 ギルバート, レナルド
カナダ, エイチ4ヴィー 2ビー4, ケベック, モントリオール, アヴェニュー ドエル
ティー 5 2 6 1

Fターム(参考) 4C076 BB11 CC01 EE56 EE59
4C085 AA13 AA14 BB11 BB42 CC21 CC23 EE01 GG01 HH03 HH11
KA03 KA04 KB82 LL15
4H045 AA11 AA30 BA41 DA75 EA20 EA50 FA74 GA22 GA26

专利名称(译)	胰岛素样生长因子1受体特异性抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2017512464A	公开(公告)日	2017-05-25
申请号	JP2016555727	申请日	2014-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	加拿大国家研究委员会		
申请(专利权)人(译)	加拿大国家研究理事会		
[标]发明人	スタニミロヴィッチダニカ ケメリッククリスティン ハッカニアルサラーンエス スレアトリアン アルバビガロディマハディ マッシーベルナール ギルバートレナルド		
发明人	スタニミロヴィッチ, ダニカ ケメリック, クリスティン ハッカニ, アルサラーン エス. スレア, トリアン アルバビ-ガロディ, マハディ マッシー, ベルナール ギルバート, レナルド		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 A61K39/395 A61K49/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P25/16 A61K47/50 A61K47/46 G01N33/53		
CPC分类号	A61K47/6849 A61K49/0002 A61K49/0058 A61K2039/505 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 C07K16/2863 C07K16/465 C07K2317/22 C07K2317/24 C07K2317/35 C07K2317/51 C07K2317/52 C07K2317/565 C07K2317/569 C07K2317/64 C07K2317/70 C07K2317/77 C07K2317/90 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/57492 G01N33/68 G01N33/74 G01N2333/71 G01N2333/72 G01N2570/00 G01N2800/28		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K49/00.A A61P25/00 A61P25/28 A61P25/16 A61K47/48 A61K47/46 G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4C076/BB11 4C076/CC01 4C076/EE56 4C076/EE59 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB42 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KB82 4C085/LL15 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/GA26		
代理人(译)	池田 成人 小泉纯酒卷 山口和弘		
优先权	61/948818 2014-03-06 US		
其他公开文献	JP6541237B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

血脑屏障 (BBB) 可防止大于500道尔加仑的分子从血液转移到大脑。受体介导的转胞吞作用 (RMT) 促进跨特定分子的BBB的转运, 所述特定分子结合形成BBB的脑内皮细胞上的受体。鉴定了通过RMT转移BBB的胰岛素样生长因子1受体 (IGF1R) 结合抗体或其片段。抗体或片段用于通过BBB递送货物分子, 其中货物分子可以是治疗剂或可检测剂。抗体是骆驼科动物VHH, 通过用933个氨基酸的IGF1R多肽免疫美洲驼制备。还产生骆驼科动物VHH的人源化形式。

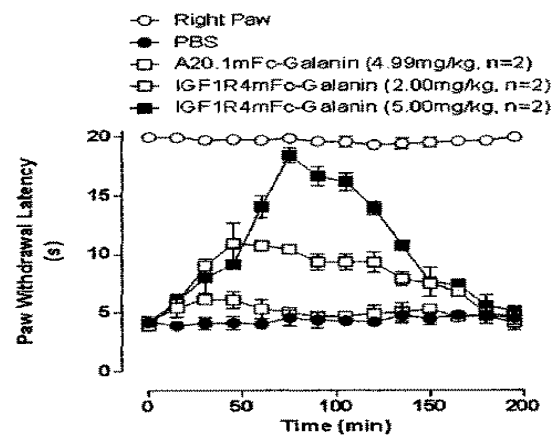


FIG 9C