

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6541236号  
(P6541236)

(45) 発行日 令和1年7月10日(2019.7.10)

(24) 登録日 令和1年6月21日(2019.6.21)

(51) Int.Cl.	F I	
<b>C 1 2 N 15/13 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/13	Z N A
<b>C O 7 K 16/28 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/28	
<b>C O 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46	
<b>C O 7 K 17/02 (2006.01)</b>	C O 7 K 17/02	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	Y
請求項の数 16 (全 51 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-555678 (P2016-555678)	(73) 特許権者	595006223
(86) (22) 出願日	平成26年12月4日 (2014.12.4)		ナショナル リサーチ カウンシル オブ カナダ
(65) 公表番号	特表2017-513461 (P2017-513461A)		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
(43) 公表日	平成29年6月1日 (2017.6.1)	(74) 代理人	100107456
(86) 国際出願番号	PCT/CA2014/000862		弁理士 池田 成人
(87) 国際公開番号	W02015/131258	(74) 代理人	100162352
(87) 国際公開日	平成27年9月11日 (2015.9.11)		弁理士 酒巻 順一郎
審査請求日	平成29年11月21日 (2017.11.21)	(74) 代理人	100123995
(31) 優先権主張番号	61/948, 831		弁理士 野田 雅一
(32) 優先日	平成26年3月6日 (2014.3.6)	(74) 代理人	100148596
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

G R T I D N Y A の相補性決定領域 ( C D R ) 1 配列 ( 配列番号 1 ) 、  
I D W G D G G X ( 式中、 X は A 又は T である ) の C D R 2 配列 ( 配列番号 2 ) 、 及び  
A M A R Q S R V N L D V A R Y D Y の C D R 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 ( I G F 1 R ) に特異的に結合する単離又は精製  
単一ドメイン抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項2】

配列

X<sub>1</sub> V X<sub>2</sub> L X<sub>3</sub> E S G G G L V Q X<sub>4</sub> G G S L R L S C A A S G R T I D N Y A M A W  
X<sub>5</sub> R Q A P G K X<sub>6</sub> X<sub>7</sub> E X<sub>8</sub> V X<sub>9</sub> T I D W G D G G X<sub>10</sub> R Y A N S V K G R F T  
I S R D N X<sub>11</sub> K X<sub>12</sub> T X<sub>13</sub> Y L Q M N X<sub>14</sub> L X<sub>15</sub> X<sub>16</sub> E D T A V Y X<sub>17</sub>  
C A M A R Q S R V N L D V A R Y D Y W G Q G T X<sub>18</sub> V T V S S ( 配列番号 4 ) ( 式  
中、 X<sub>1</sub> は E 又は Q であり、 X<sub>2</sub> は K 又は Q であり、 X<sub>3</sub> は V 又は E であり、 X<sub>4</sub> は A 又  
は P であり、 X<sub>5</sub> は V 又は S であり、 X<sub>6</sub> は D 又は G であり、 X<sub>7</sub> は L 又は R であり、 X  
8 は F 又は W であり、 X<sub>9</sub> は A 又は S であり、 X<sub>10</sub> は A 又は T であり、 X<sub>11</sub> は A 又は  
S であり、 X<sub>12</sub> は G 又は N であり、 X<sub>13</sub> は M 又は L であり、 X<sub>14</sub> は N 又は R であり  
、 X<sub>15</sub> は E 又は R であり、 X<sub>16</sub> は P 又は A であり、 X<sub>17</sub> は S 又は Y であり、 X<sub>18</sub>  
は Q 又は L である )

を含む、請求項1に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性断片。

## 【請求項 3】

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

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

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

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G R T I D N Y A M A W S R Q A  
P G K D R E F V S T I D W G D G G T R Y A N S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A M A R Q S R V N L D V A R Y D Y W G Q G T L V  
T V S S (配列番号 10)

からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性断片。

## 【請求項 4】

前記抗体がラクダ科動物由来である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性断片。

## 【請求項 5】

多価ディスプレイ形式である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性断片。

## 【請求項 6】

F c 断片に連結されている、請求項 5 に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性断片。

## 【請求項 7】

表面に固定化されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性断片。

## 【請求項 8】

カーゴ分子に連結されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性断片。

## 【請求項 9】

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 8 に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性断片。

## 【請求項 10】

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

10

20

30

40

50

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る、請求項8又は9に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項11】

1つ又は複数の、請求項1～10のいずれか一項に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性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12】

請求項1～6のいずれか一項に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性断片をコードする核酸分子。

10

【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】

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1～6のいずれか一項に記載の単離又は精製単一ドメイン抗体又はその抗原結合性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に結合した前記単一ドメイン抗体又はその抗原結合性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。

20

【請求項15】

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14に記載の方法。

【請求項16】

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、ELISA、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14又は15に記載の方法。

【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。

30

【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、より大きな分子の経細胞輸送は、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)。

40

【0003】

50

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、薬理的に適切な(すなわち、中枢神経系(CNS)標的に関与し、薬理的/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(ferrid)」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。

#### 【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し、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。

#### 【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】

BBBを通過する送達を増加させる別の試みにおいて、CNS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(lipophilicity)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、BBBを通過する内因性輸送機序が利用されてきた。BBB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シス(RMT)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シス経路とに分けられる。エンドサイトシスはそれぞれ、その受容体に対する特異的リガンドの結合に

10

20

30

40

50

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ーシスされ、そのカーゴを放出する。

【0008】

吸着媒介性トランスサイトーシス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、RMT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、BBBでRMTを生じ、それらの天然リガンドを、BBB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（TfR）、インスリン受容体（IR）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1及び2（LRP-1及び-2）、ジフテリア毒素受容体、及びTMEM30Aである。これらの受容体と結合し、内因性RMT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（Pardridgeら、1991；Yuら、2011；Muruganandamら、2001；Abulrobら、2005；Demeule、2008；Sumbria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（Angiopep ANG1005、LRP-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。RMT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、BBB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ーシス及びエンドサイトーシスされた担体のリソソーム分解を含む制約がある（Xiao及びGun、2013）。

【0010】

高性能及び高選択性BBB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。BBB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】

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細胞外ドメイン内であってもよく、配列FENFLHNSIFVPR（配列番号11）、又はその断片を含みうる。

【0013】

本発明は、GRTIDNYAの相補性決定領域（CDR）1配列（配列番号1）、IDWGDGGX（式中、XはA又はTである）のCDR2配列（配列番号2）、及びAMARQSRVNLDVARYDY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。一実施形態において、単離又は精製抗体又はその断片は、IDWGDGGAのCDR2配列を含む。

【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

10

20

30

40

50

製抗体又はその断片は、

X<sub>1</sub> V X<sub>2</sub> L X<sub>3</sub> E S G G G L V Q X<sub>4</sub> G G S L R L S C A A S G R T I D N Y A M A W  
 X<sub>5</sub> R Q A P G K X<sub>6</sub> X<sub>7</sub> E X<sub>8</sub> V X<sub>9</sub> T I D W G D G G X<sub>10</sub> R Y A N S V K G R F T  
 I S R D N X<sub>11</sub> K X<sub>12</sub> T X<sub>13</sub> Y L Q M N X<sub>14</sub> L X<sub>15</sub> X<sub>16</sub> E D T A V Y X<sub>17</sub>  
 C A M A R Q S R V N L D V A R Y D Y W G Q G T X<sub>18</sub> V T V S S (配列番号4) (式  
 中、X<sub>1</sub>はE又はQであり、X<sub>2</sub>はK又はQであり、X<sub>3</sub>はV又はEであり、X<sub>4</sub>はA又  
 はPであり、X<sub>5</sub>はV又はSであり、X<sub>6</sub>はD又はGであり、X<sub>7</sub>はL又はRであり、X  
 8はF又はWであり、X<sub>9</sub>はA又はSであり、X<sub>10</sub>はA又はTであり、X<sub>11</sub>はA又は  
 Sであり、X<sub>12</sub>はG又はNであり、X<sub>13</sub>はM又はLであり、X<sub>14</sub>はN又はRであり  
 、X<sub>15</sub>はE又はRであり、X<sub>16</sub>はP又はAであり、X<sub>17</sub>はS又はYであり、X<sub>18</sub>  
 はQ又はLである)、

10

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I G F 1 R - 5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 A A S G R T I D N Y A M A W S R Q A P G K D R E F V A T I D W G D G G A R  
 Y A N S V K G R F T I S R D N A K G T M Y L Q M N N L E P E D T A V Y S C A M A  
 R Q S R V N L D V A R Y D 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 - 5 \_\_ H 1と呼ばれる、E V Q L V E S G G G L V Q P G G  
 S L R L S C A A S G R T I D N Y A M A W V R Q A P G K G L E W V S T I D W G D G  
 G T R Y A N S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C  
 A M A R Q S R V N L D V A R Y D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号6)、

20

本明細書においてI G F 1 R - 5 \_\_ H 2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 A S G R T I D N Y A M A W V R Q A P G K G L E W V A T I D W G D G  
 G T R Y A N S V K G R F T I S R D N S K N T M Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C  
 A M A R Q S R V N L D V A R Y D 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 - 5 \_\_ H 3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 A S G R T I D N Y A M A W S R Q A P G K G L E F V A T I D W G D G  
 G T R Y A N S V K G R F T I S R D N S K N T M Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C  
 A M A R Q S R V N L D V A R Y D 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 - 5 \_\_ H 5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 A S G R T I D N Y A M A W S R Q A P G K D R E F V A T I D W G D G  
 G T R Y A N S V K G R F T I S R D N S K G T M Y L Q M N S L R A E D T A V Y S C  
 A M A R Q S R V N L D V A R Y D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号9)、及び

30

本明細書においてI G F 1 R - 5 \_\_ H 6と呼ばれる、E V Q L V E S G G G L V Q P G G  
 S L R L S C A A S G R T I D N Y A M A W S R Q A P G K D R E F V S T I D W G D G  
 G T R Y A N S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C  
 A M A R Q S R V N L D V A R Y D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号10)、

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、単一ドメイン抗体(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。抗体又はその断片は、配列F E N F L H N S I  
 F V P R (配列番号11)を含むエピトープに結合しうる。

40

#### 【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、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42の配列(本明細書  
 において、I G F 1 R - 5 - m F c コンセンサスと呼ばれる)、又は43(本明細書にお  
 いて、m F c - I G F 1 R - 5 コンセンサスと呼ばれる)、配列番号12(本明細書にお

50

いて、Fc-IGF1R-5-mFcと呼ばれる)、又は13(本明細書において、mFc-IGF1R-5と呼ばれる)を含みうる。

【0017】

本明細書に記載の単離又は精製抗体又はその断片は、任意の形式で、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。

10

【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1kD~約200kDa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(receptor trap)、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りうる。

20

【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】

IGF1R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、IGF1R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。

30

【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、ELISA、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IGF1R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

b) IGF1R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

【0025】

上述の方法において、検出するステップ(ステップb))は、PET(ポジトロン放出断層撮影)、SPECT(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(BBB)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、

50

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み、

1つ又は複数の抗体又はその断片は、BBB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1kD~約200kDa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、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ポソーム；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(iv)、皮下(sc)、又は筋肉内(im)でありうる。

10

#### 【0027】

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。

20

#### 【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BBB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、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なCSFの量は、約1~10 $\mu$ 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-同位体標識化内部標準(MRM-ILIS: multiple reaction monitoring - isotope labeled internal standards)でありうる。

30

#### 【0029】

密着し高度に選択的なBBB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。BBB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、BBB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、IGF1R結合性V<sub>H</sub>Hが製造された。本明細書に記載の抗体は、BBB形成脳内皮細胞の管腔側から反管腔側へのIGF1Rの天然RMT経路を利用する。IGF1R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ーシスされ、そこでそれらは両方とも脳微小環境内へと放出される。これは、RMTによってBBBを通過する抗IGF1R結合性ドメイン抗体の最初の同定及び実証である。IGF1R V<sub>H</sub>Hが、IGF1Rに結合し(図2B)、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5B)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<sub>H</sub>H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7A及び図7B、図9)。

40

#### 【0030】

50

結果はまた、抗IGF1R V<sub>H</sub>H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<sub>H</sub>H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<sub>H</sub>H-mFc(mFc=マウスFc)コンジュゲートのCSF曝露を、V<sub>H</sub>H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<sub>H</sub>H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】

10

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。

20

【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、ダイマーを形成しうる。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。

30

【図2】IGF1Rの配列(SwissProt受託番号P08069)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933アミノ酸長タンパク質断片は太字で示され、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。IGF1R-5 V<sub>H</sub>Hが結合する可能性のある推定エピトープに下線を引く。

【図3A】Superdex 75カラムを通したIGF1R結合性V<sub>H</sub>H IGF1R-5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、V<sub>H</sub>Hがモノマー性であり、非凝集性であることを示唆する。

40

【図3B】IGF1R-5 V<sub>H</sub>H及びそのヒト化変異体(5H1、5H2、5H3、5H5、5H6と表示)について、円偏光二色性(CD)により決定される融解温度(T<sub>m</sub>)を示す図である。タンパク質を90℃超まで加熱し、測定値をCD機器で取り、融解曲線(黒色又は黒丸)及びT<sub>m</sub>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、CDにより解析した(灰色の曲線又は四角)。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た。

【図3C】0.1~10nMのIGF1R-5 V<sub>H</sub>H及びそのヒト化変異体(5H1、5H2、5H3、5H5、5H6と表示)の、ヒトIGF1R断片(h-IGF1R)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(SPR)センサーグラム(sensoragram)の重ね合わせを示す図である。この特定の方法及び実験セットアップ

50

で得られたデータは、1 : 1モデルによく適合し、表2に詳述するとおり、低いナノモル (nM) 範囲 (0.6 ~ 16.4 nM) の $K_D$ 値を与える。

【図3D】ヒトIGF1R断片の組換え細胞外部分に対するIGF1R-5  $V_H$ H結合と、それに続く、受容体に同時に結合できるIGF1の付加のSPRセンサーグラムを示す図である。グラフに示すとおり、実験を2度反復した。

【図4】Cy-5.5標識化IGF1R-5  $V_H$ 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。Cy5.5標識化IGF1R-5  $V_H$ H (又は陽性対照としてのFC5  $V_H$ H; Muruganandamら、2002; Haqqaniら、2012) を、SV40不死化ラット脳内皮細胞 (svAREC) と4 (上パネル) 又は37 (下パネル) でインキュベートし、IGF1R-5が受動的に(4)、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(37)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DAPI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でインキュベートされたとき、IGF1R-5及びFC5  $V_H$ 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: 37で、FC5及びIGF1R-5  $V_H$ 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。

10

【図5A】マウスFc断片(IGF1R-5-mFc)とのIGF1R-5  $V_H$ HのC末端融合物の配列を示す図である。IGF1R-5  $V_H$ Hを黒色、マウスFc(CH2及びCH3)を灰色で示す。

20

【図5B】N末端融合配列(mFc-IGF1R-5-Gal)を示す図である。IGF1R-5  $V_H$ Hを黒色、マウスFc(CH2及びCH3)を灰色で示す。

【図5C】構築された融合タンパク質の概略図を示す図である。IGF1R-5  $V_H$ Hを黒色、マウスFc(CH2及びCH3)を灰色で示す。

【図6A】様々な $V_H$ HについてBBBを横断する能力を評価するための、インビトロBBBモデルの使用を要約する流れ図である。等モル量(5.6  $\mu$ M又は1.25  $\mu$ M)の正(FC5)及び負(A20.1、クロストリジウム・ディフィシル(Clostridium difficile)毒素A結合性 $V_H$ H、及びEGFR結合性 $V_H$ HであるEG2)の対照の $V_H$ H及びIGF1R-5を、ラットインビトロBBB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SV40不死化脳内皮細胞(svAREC)を、下のチャンパーではラット星状膠細胞馴化培地、上のチャンパ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。BBB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15、30、及び60分後に下のチャンパーから採取した。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-同位体標識化内部標準、MRM-ILIS)により定量した。 $P_{app}$ 値[ $Qr/dt = \text{レシーバーコンパートメントにおける累積量対時間}$ 、 $A = \text{細胞単層の面積}$ 、 $C_0 = \text{投与溶液の初期濃度}$ ]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。

30

【図6B】4つの同時投与された $V_H$ Hの $P_{app}$ 値を示す図である。IGF1R-5は、FC5と同等の $P_{app}$ 値を有する一方で、陰性対照は両方とも、非常に低い $P_{app}$ 値を有し、対照 $V_H$ Hの非常に低い非特異的輸送又は傍細胞輸送と比較して、FC5及びIGF1R-5  $V_H$ Hの促進輸送を示す。結果は、5~6つの独立実験において得られた平均 $P_{app}$ 値である。

40

【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(白色バー)と比較した、ヒト化IGF1R-5単ドメイン抗体(H1、H2、H3、H5、H6)(黒色バー)の $P_{app}$ 値を示す図である。平均FC5及びA20.1値を灰色の点線で示す。

【図6D】同じウェル中で対照として試験され、非常に低い $P_{app}$ 値を有するA20.1-マウスFc(A20.1mFc)(濃灰色)と比較した、マウスFc(薄灰色)とのIGF1R-5のN末端及びC末端融合物の $P_{app}$ 値を示す図である。FC5-Fc(

50

Fcと融合されたFC5)、FC5(V<sub>H</sub>H)、IGF1R-5(V<sub>H</sub>H)及びA20.1(V<sub>H</sub>H)の平均Papp値を、比較のため点線により示す。

【図7】IGF1R-5 V<sub>H</sub>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-5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-5-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8A】化学的にコンジュゲートされたペプチドガラニンのIGF1R-5媒介性脳送達を示す図である。図8Aは、ハーグリーヴズ疼痛モデル(Hargreaves pain model)を使用して、IGF1R-5について、薬理的に有効な用量のコンジュゲートされた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、雄ウイスターラット(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<sub>H</sub>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。3mg/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(灰色の中の埋まった丸)。IGF1R-5-ガラニンコンジュゲート(2.93mg/kg又は5.85mg/kg)の全身注射は、3時間

10

20

【図8B】化学的にコンジュゲートされたペプチドガラニンのIGF1R-5媒介性脳送達を示す図である。これらの結果を、最大可能効果(MPE、対照足)と比較した薬力学反応の曲線下面積(AUC)として示す図である。2.93mg/kgのIGF1R-5-ガラニンがMPEの28%を誘導したのに対し、5.85mg/kgのIGF1R-5-ガラニンは、MPEの55%を3時間にわたって誘導し、全身注射後のガラニン単体(MPEの<5%)と比較して、コンジュゲートの有意な脳透過性を実証した。

【図8C】mFc-IGF1R-5-Galについて、ハーグリーヴズ疼痛モデルにおいて異なる濃度の静脈内注射後に熱痛覚過敏を抑制する能力を示すグラフである。

30

【図8D】IGF1R-5-mFc-Gal又はmFc-IGF1R-5-Galコンジュゲートのいずれかのiv注射後のハーグリーヴズモデルにおける熱痛覚過敏の用量依存性反応(ピーク反応での反転(reverseal)のパーセント)を示す図である。

【図9】5mg/kgの全身(尾静脈)投与後の、IGF1R-5-mFc及び対照V<sub>H</sub>HであるA20.1マウスFc融合物(A20.1-mFc)の血漿及びCSF薬物動態を示す図である。連続的CSF回収(1~48時間)のため、大槽にカニューレ挿入した。IGF1R-5-mFc及びA20.1-mFc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-5-mFc及びA20.1-mFcの血漿内半減期は同等だった(それぞれ23時間及び25時間)。融合タンパク質の全身注射24時間後のIGF1R-5-mFc及びA20.1-mFcの血漿/CSF比はそれぞれ、2%及び0.04%だった。

40

【図10】5mg/kgの用量の尾静脈投与48時間後の脳切片におけるIGF1R-5-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、ピプラトームを使用して脳切片(35μm)が得られた。IGF1R-5-mFcを、抗マウスFc抗体を使用して免疫検出した。皮質切片における血管を、レクチンRCA1を使用して検出した(左上)。グリア線維酸性タンパク質(GFAP)に対する抗体により、同じ切片において星状細胞を検出した(右上)。IGF1R-5-mFcを、矢頭印によ

50

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（左下）。血管の管腔側からBBBを通過して脳実質内へのIGF1R-5-mFcの通過を示す、すべての染色の複合顕微鏡写真を右下に示す。

【図11A】IGF1R-5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11Aは、IGF1R-5又は試験された任意の他の抗IGF1R V<sub>H</sub>H（IGF1R-1、-3、-4又は-6）のいずれも、単体では下流Aktリン酸化を100nM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。100nMのIGF1R-5又は任意の他の抗IGF1R V<sub>H</sub>Hのいずれの存在も、10μg/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、ゲル画像の下の棒グラフ（平均+/-SD）で示す。

10

【図11B】IGF1R-5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11Bは、100nMのIGF1R-5又は試験された任意の他の抗IGF1R V<sub>H</sub>H（IGF1R-1、-3、-4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200ng/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、ゲル画像の下の棒グラフ（平均+/-SD）で示す。

【図11C】IGF1R-5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11C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、C末端でマウスFc単体と融合された（たとえばIGF1R-5-mFc）100nM又は500nMのいずれかのIGF1R-5又は任意の他の抗IGF1R V<sub>H</sub>H（IGF1R-1、-3又は-4）とインキュベートしたが、又はそれぞれのIGF1R V<sub>H</sub>H-mFc融合タンパク質の存在下で200ng/ml IGF-1で刺激した。ウエスタンブロットは、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。

20

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0035】

30

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ってもよく、配列FENFLHNSIFVPR（配列番号11）、又はその断片を含みうる。

#### 【0037】

40

本発明は、  
GRTIDNYAの相補性決定領域（CDR）1配列（配列番号1）、  
IDWGDGGX（式中、XはA又はTである）のCDR2配列（配列番号2）、及び  
AMARQS RVNLDVARYDY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。一実施形態において、単離又は精製抗体又はその断片は、IDWGDGGAのCDR2配列を含む。

#### 【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

50

質を指し、I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mを含む様々なI g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( $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ )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させ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、Kabatのもの並びにChothia及びLeskのものである。Kabat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(Hammers-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I g重鎖及び軽鎖配列に基いて設計されうる(Jaspersら、2004; Toら、2005)。本明細書において使用される「s

10

20

30

40

50

「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&Riechmann、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。

10

【0043】

当業者は、単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。

20

【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14)、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。

30

【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。

40

【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】

50

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<sub>H</sub>、又はV<sub>L</sub>)、他のヒト抗体 (IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM)、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、

X<sub>1</sub>VX<sub>2</sub>LX<sub>3</sub>ESGGGLVQX<sub>4</sub>GGSLRLSCAASGRTIDNYAMAW  
 X<sub>5</sub>RQAPGKX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>EX<sub>8</sub>VX<sub>9</sub>TIDWGDGGX<sub>10</sub>RYANSVKGRFT  
 ISRDNX<sub>11</sub>KX<sub>12</sub>TX<sub>13</sub>YLQMNX<sub>14</sub>LX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>EDTAVYX<sub>17</sub>  
 CAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTX<sub>18</sub>VTVSS (配列番号4) (式  
 中、X<sub>1</sub>はE又はQであり、X<sub>2</sub>はK又はQであり、X<sub>3</sub>はV又はEであり、X<sub>4</sub>はA  
 又はPであり、X<sub>5</sub>はV又はSであり、X<sub>6</sub>はD又はGであり、X<sub>7</sub>はL又はRであり、X  
 8はF又はWであり、X<sub>9</sub>はA又はSであり、X<sub>10</sub>はA又はTであり、X<sub>11</sub>はA又は  
 Sであり、X<sub>12</sub>はG又はNであり、X<sub>13</sub>はM又はLであり、X<sub>14</sub>はN又はRであり  
 、X<sub>15</sub>はE又はRであり、X<sub>16</sub>はP又はAであり、X<sub>17</sub>はS又はYであり、X<sub>18</sub>  
 はQ又はL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IGF1R-5と呼ばれる、QVKLEESGGGLVQAAGGSLR  
 LSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGAR  
 YANSVKGRFTISRDNKGMTMYLQMNNLEPEDTAVYSCAMA  
 RQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS (配列番号5)、

本明細書においてIGF1R-5\_\_H1と呼ばれる、EVQLVESGGGLVQP  
 GGSRLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVSTIDWGDG  
 GTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
 AMARQSRVNLDVARYDYWGQGTLLVTVSS (配列番号6)、

本明細書においてIGF1R-5\_\_H2と呼ばれる、QVQLVESGGGLVQP  
 GGSRLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATIDWGDG  
 GTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYC  
 AMARQSRVNLDVARYDYWGQGTLLVTVSS (配列番号7)、

10

20

30

40

50

本明細書において I G F 1 R - 5 \_\_ H 3 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 A S G R T I D N Y A M A W S R Q A P G K G L E F V A T I D W G D G G T R Y A N S V K G R F T I S R D N S K N T M Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A M A R Q S R V N L D V A R Y D 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 - 5 \_\_ H 5 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 A S G R T I D N Y A M A W S R Q A P G K D R E F V A T I D W G D G G T R Y A N S V K G R F T I S R D N S K G T M Y L Q M N S L R A E D T A V Y S C A M A R Q S R V N L D V A R Y D Y W G Q G T L V T V S S ( 配列番号 9 )、及び  
 本明細書において I G F 1 R - 5 \_\_ H 6 と呼ばれる、E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G R T I D N Y A M A W S R Q A P G K D R E F V S T I D W G D G G T R Y A N S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A M A R Q S R V N L D V A R Y D Y W G Q G T L V T V S S ( 配列番号 1 0 )、  
 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。

10

【 0 0 4 9 】

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すこと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。

20

【 0 0 5 0 】

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 ( S e r 又は S )、トレオニン ( T h r 又は T )、システイン ( C y s 又は C )、チロシン ( T y r 又は Y )、アスパラギン ( A s n 又は N )、及びグルタミン ( G l n 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、E i s e n b e r g ( 1 9 8 4 ) 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 ( P r o 又は P )、イソロイシン ( I l e 又は I )、フェニルアラニン ( P h e 又は F )、バリン ( V a l 又は V )、ロイシン ( L e u 又は L )、トリプトファン ( T r p 又は W )、メチオニン ( M e t 又は M )、アラニン ( A l a 又は A )、及びグリシン ( G l y 又は G ) が含まれる。「酸性アミノ酸」は、7未満の側鎖 p K 値を有する親水性アミノ酸を指し、これは、生理的 p H 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 ( G l u 又は E )、及びアスパラギン酸 ( A s p 又は D ) が含まれる。

30

40

【 0 0 5 1 】

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 S w i s s I n s

50

t i t u t e o f B i o i n f o r m a t i c s により維持されている（そして、c a . e x p a s y . o r g / t o o l s / b l a s t / で見られる）N C B I B L A S T 2 サービス、B L A S T - P、B l a s t - N、若しくはF A S T A - N、又は当技術分野において知られている任意の他の適切なソフトウェアにより計算できる。

【 0 0 5 2 】

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。

10

【 0 0 5 3 】

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、His<sub>5</sub>、又はHis<sub>6</sub>）、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。

20

【 0 0 5 4 】

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AB<sub>5</sub>毒素ファミリーのB-サブユニットの五量体化ドメイン（Merritt & 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ずコイルドコイルペプチドとの融合物である。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うる。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）。

30

40

【 0 0 5 5 】

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

50

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-5 V<sub>H</sub>Hのキメラ形式、又は2つ若しくは3つの抗IGF1R-5 V<sub>H</sub>H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)。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単離又は精製抗体又は断片は、配列番号42、43、12又は13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他の部分から分離される。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シスを受ける能力は、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ると考えられるとおり、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。

#### 【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。

## 【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1kD~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。

10

## 【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<sub>H</sub>H、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>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、プラスミド）、細胞毒性剤、ウイルスベクター（アデノ-、レンチ-、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（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。

20

30

## 【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。

## 【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-5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。

40

## 【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

50

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)。

10

#### 【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。

20

#### 【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、これに限定されない非侵襲的(分子的)画像診断技術でありうる。すなわち、

30

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 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{82}\text{Rb}$ 及び $^{68}\text{Ga}$ であり、 $^{18}\text{F}$ 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、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{133}\text{Xe}$ 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。

40

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ーよりも安価であり、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

50

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（i v）、皮下（s c）、及び筋肉内（i m）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、B B B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、I G F 1 R（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。懸濁液をもたらすための再構成は、抗体又はその断片の生存性を保証するのに好適なp H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、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とされるC S Fの量は、約1 ~ 10  $\mu$  lの間でありうる。たとえば、必要とされるC S F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  $\mu$  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、C S F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

10

20

30

40

50

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。

10

#### 【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14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、フーリン切断部位(RKRR、配列番号15、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)。

20

#### 【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'-CGGGATCCGCCACCATGAAGTCTGGCTCCGGAG-3'  
(フォワード、配列番号16)

5'-GCTCTAGATCAGAAGTTTTCATATCCTGTTTTGG-3'  
(リバーズ、配列番号17)

30

を使用してPCRにより増幅し、Puc19のSmaI部位内にサブクローニングした。次に、IGF1R<sup>933</sup>配列を、pCDN4/myc-His(Invitrogen)内にサブクローニングしpIGF1R<sup>933</sup>-Hisを作製したが、これは、以前に記載されたとおり、His-タグ化外部ドメインの発現を可能にする(Samaniら2004)。

#### 【0076】

一過性トランスフェクション。IGF1R<sup>933</sup>-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、ポリエチレンジアミンを使用してベクターをトランスフェクトした。1µg/mlのドキシサイクリン及び10µg/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。

40

#### 【0077】

安定発現。安定細胞株293SF-cum2-CR5-IGF1R-Hisを、以前に記載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、0.5~1.0×10<sup>5</sup>個の293SF-Cum2細胞を、24ウェルプレ

50

ートにおいて硫酸デキストランなしの200 $\mu$ lのLC-SFM培地中に播種した。200~500 $\mu$ LのLVを、8 $\mu$ g/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 $^{\circ}$ C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 $\mu$ L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 $\mu$ g/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 $^{\circ}$ Cで24時間、30 $^{\circ}$ C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 $\times$ )した。

#### 【0079】

HisPrepカラム(GE Healthcare)を製造者の指示に従い使用して、IGF1R<sup>933</sup>-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、50mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl、5mMイミダゾール pH7.5で平衡化及び洗浄し、50mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl、500mMイミダゾール pH7.5で溶出した。0.1Mクエン酸ナトリウム pH4.5~pH2.5での段階溶出を、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。50kDaカットオフ膜又は脱塩カラムを50mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl及び0.01% Tween-80、pH7.2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 $^{\circ}$ C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

IGF1Rの細胞外ドメインを標的とするV<sub>H</sub>Hを単離するため、ラマを、実施例1で得られた組換えIGF1R<sup>933</sup>-His断片で免疫化した。

#### 【0081】

1頭の雄ラマ(Lama glama)を、IGF1R<sup>933</sup>-His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、PBS中1mlまで希釈された200 $\mu$ gの抗原を、1mlのフロイント完全アジュバント(Sigma, St. Louis, MO)とともに注射した。100 $\mu$ gのIGF1R<sup>933</sup>-His抗原プラスフロイント不完全アジュバント(Sigma)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 $\mu$ 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(10~15ml)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(PBMC)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(PBS)で1:1希釈し、Lymphoprep Tube(Axis Shield)を使用して血液からPBMCを精製した。細胞を計数し、約1 $\times$ 10<sup>7</sup>個の細胞のアリコートとして、-80 $^{\circ}$ C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、IGF1R<sup>933</sup>-His抗原に対する特異的反応について、ELISA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(Doylerら、2008)。得られた画分、A1(HCAb)、A2(HCAb)、G1(HCAb)及びG2(cIgG)を、IGF1R<sup>933</sup>-His抗原との特異的結合について、ELISAにより解析した。簡潔に述べると、PBS中に希釈

10

20

30

40

50

された5 μgのIGF1R<sup>933</sup>-His組換え抗原を、96ウェルMaxisorpプレート(Nalgene、Nunc)において一晚インキュベート(100 μl/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(BSA)でプレートをブロッキングし、PBS-T(PBS+0.05%(v/v)Tween-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、PBS-Tでプレートを洗浄し、その後、ヤギ抗ラマIgG(PBS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。PBS-Tでの洗浄後、ブタ抗ヤギIgG-HRPコンジュゲート(PBS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PBS-T洗浄を実施し、その後、100 μl/ウェルTMB基質(KPL、Gaithersburg、MD)を添加し、基質を10分間インキュベートした。100 μl/ウェルの1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>で反応を停止した。吸光度を450 nmで読み取った。

10

【0083】

実施例3：ライブラリー構築及びIGF1R結合性V<sub>H</sub>Hの選択

実施例2においてPBMCから単離されたRNAに基づいて、過免疫化ラマV<sub>H</sub>H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(Arabi-Ghahroudiら、2009a、2009b;Tanhaら、2003)。全RNAを、QIAamp RNA Blood Mini Kit(Qiagen)を使用して、免疫化後第84日に回収されたおよそ10<sup>7</sup>個のPBMC(実施例2)から単離した。約5 μgの全RNAを、First-Strand cDNA Synthesis Kit(GE Healthcare)を使用したオリゴdTプライマーでの第1鎖cDNA合成の鑄型として使用した。以下の3つの可変領域特異的センスプライマー、

20

MJ1:5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCSMKGTGCAGCTGGTGGAKTCTGGGGGA-3'(配列番号18)

MJ2:5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAAGGTAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGA-3'(配列番号19)

MJ3:5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAAGGCTCAGGTACAGCTGGTGGAGTCT-3'(配列番号20)、

30

及び2つのアンチセンスCH<sub>2</sub>特異的プライマー、

CH<sub>2</sub>:5'-CGCCATCAAGGTACCAGTTGA-3'(配列番号21)

CH<sub>2</sub>b<sub>3</sub>:5'-GGGGTACCTGTCAATCCACGGACCAGCTGA-3'(配列番号22)

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CH<sub>2</sub>又はCH<sub>2</sub>b<sub>3</sub>プライマー、5 μlの10x反応緩衝液、1 μlの10 mM dNTP、2.5単位のTaq DNAポリメラーゼ(Hoffmann-La Roche)。PCRプロトコルは、(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<sub>H</sub>H-CH<sub>2</sub>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 Extraction Kit(Qiagen)を使用して精製し、1 μl(30 ng)のDNA鑄型、5 pmolのMJ7プライマー(5'-CATGTGTAGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC-3'配列番号23)及びMJ8プライマー(5'-CAT

40

50

GTGTAGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACGGTGACCTGG-3' 配列番号24)の各プライマー、5 $\mu$ lの10 $\times$ 反応緩衝液、1 $\mu$ lの10mM dNTP、2.5単位のTaq DNAポリメラーゼを使用して、50 $\mu$ l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 $^{\circ}$ Cでの初期ステップ、(ii)続いて30秒間94 $^{\circ}$ C、30秒間57 $^{\circ}$ C及び1分間72 $^{\circ}$ Cの30サイクル、並びに(iii)7分間72 $^{\circ}$ Cの最終伸長ステップからなる。340bp~420bpの間の範囲で重鎖抗体のV<sub>H</sub>H断片に相当する増幅されたPCR産物を、QIAquick 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。

10

## 【0086】

80 $\mu$ gのpMED1ファージミドベクター(Arbabi-Ghahroudiら、2009b)を、SfiIで一晩50 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。60 $\mu$ gの消化ファージミドDNAを、6 $\mu$ gの消化(5時間、50 $^{\circ}$ CでSfiI)V<sub>H</sub>H断片(モル比1:1)と、3時間室温で、LigaFast Rapid DNA Ligation System(Promega)を製造者の指示に従い使用して連結した。連結されたプラスミドを、QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen)を使用して精製し、100 $\mu$ l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 $\mu$ l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 $\times 10^7$ 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<sub>H</sub>H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 $^{\circ}$ C、250rpm、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 $\times$ YT/Amp/Glu(100 $\mu$ g/mlアンピシリン及び2%(w/v)グルコースを有する2 $\times$ YT培地)中に再懸濁させ、-80 $^{\circ}$ Cで小さなアリコートで保存した。

20

## 【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 $\times 10^{10}$ 個の細菌)を氷上で解凍し、2 $\times$ YT/Amp/Glu中、約2時間、37 $^{\circ}$ Cで成長させた(A<sub>600</sub>=0.4~0.5)。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 $^{\circ}$ Cで感染させた。次に、培養物を4 $^{\circ}$ Cで遠心し、感染細菌沈殿物を、50 $\mu$ g/mlカナマイシンを有する200mlの2 $\times$ YT/Amp中に再懸濁させ、37 $^{\circ}$ C及び250rpm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%PEG 8000/2.5M NaClとともに、氷上で1時間インキュベートし、10,000rpmで15分間遠心した。ファージ沈殿物を1.5ml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 $\mu$ gの組換えIGF1R<sup>933</sup>-Hisで、100 $\mu$ l PBS中一晩4 $^{\circ}$ Cでコーティングした。ウェルをPBSですすぎ、PBSプラス1%(w/v)カゼインで2時間、37 $^{\circ}$ Cでブロックした。およそ10<sup>12</sup>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 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。PBS/0.1%(v/v)Tween 20で10 $\times$ 洗浄後、結合ファージを、0.1Mトリエチルアミンで溶出し、中和(50 $\mu$ lの1M トリス-HCl、pH7.4)し、指数関数的に成長する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、一晩37 $^{\circ}$ Cで成長させた。一晩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

30

40

50

続した。プレートに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 µg、5 µg及び5 µg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 µg/mlのIGF1R<sup>933</sup>-His組換え抗原を使用することを除いて、基本的に別の文献に記載のとおり(Doyler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シーケンシングに送った。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-5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。

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQA  
PGKDRFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDNKGMTMY  
LQMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQV  
TVSS(配列番号5)

#### 【0089】

##### 実施例4: IGF1R-5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-5の潜在的免疫原性を回避するため、ラクダ科動物由来sdAbを、V<sub>H</sub>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Kabataナンバリング(Kabata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<sub>H</sub>Hの3D構造モデリング。タンパク質構造データベース(PDB)に対するBLAST検索を使用して、IGF1R-5 V<sub>H</sub>Hと類似した鋳型構造を同定した。4FHB|Dからの追加情報とともに、主要な鋳型として4KRP|B(PDBコード|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-5の3D構造を得た。次に、主要な鋳型の構造をIGF1R-5配列に変異させることにより、IGF1R-5 V<sub>H</sub>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CDRループから、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、IGF1R-5 V<sub>H</sub>Hモデルを洗練させた。次に、V<sub>H</sub>HモデルのCDR-H3ループを、CDR-H3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CDR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(VBASE)、他の配列データベース(GenBank及びSwissProt)、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、CDRを除いて)最高の相同性を有する一方で、CDRの長さとも一致する配列一致を検索するため、BLAST検索を実行した。IGF1R-5 V<sub>H</sub>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VH-3サブグループに相当した。ヒトVH-3コンセンサス配列に加えて、IGF1R-5 V<sub>H</sub>Hに最も類似する複数のヒト生殖細胞系列VH-3フレームワーク配列もまた保持された。IGF1R-5 V<sub>H</sub>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VH-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。IGF1R-5 V<sub>H</sub>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、CDR、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

10

20

30

40

50

化部位、埋没残基、Vernierゾーン残基(Vernier zone residues)、及びCDR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IGF1R V<sub>H</sub>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。5つのヒト化変異体を、IGF1R-5 V<sub>H</sub>H(IGF1R-5 H1、H2、H3、H5、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<sub>H</sub>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<sub>H</sub>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IGF1R-5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<sub>H</sub>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スミド内にサブクローニングした。

### 【0094】

IGF1R-5クローンのDNAを含有するファージミドベクターを、MiniPrep Kit(Qiagen)を使用して精製した。IGF1R結合性V<sub>H</sub>H IGF1R-5を、pMED1ファージミドベクターからPCR増幅し、N末端BbsI切断部位及びC末端にBamHI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'-TATGAAGACACCAGGCCAGGTAAGCTGGAGGAGTCT-3'(フォワード、配列番号25)

5'-TTGTTTCGGATCCTGAGGAGACGGTGACCTG-3'(リバース、配列番号26)

### 【0095】

PCR断片及びpSJF2H発現ベクターを、BbsI及びBamHI制限酵素(NEB)で、製造者の指示に従い消化した。消化IGF1R-5 V<sub>H</sub>H断片を、消化pSJF2H発現ベクター内に、Arbabi-Ghahroudi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TG1E.coli内に形質転換した。LB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、上述と同様の方法を使用して、pSJF2H内に直接クローニングし、続いてE.coli TG1内に形質転換した。クローンは上述のとおり選択した。

### 【0097】

タンパク質発現。すべてのIGF1R-5 V<sub>H</sub>Hコンストラクトを、TG1E.coliにおいて発現させた。LB/amp/glu培地(100µg/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。0.2mMの最終濃度までのIPTGの添加により、0.8~0.9のOD<sub>600</sub>でタンパク質発現を誘導した。220rpmで一晩、37°Cで培養物を成長させた。6000rpmでの12分間の遠心により細菌を沈殿させた。沈殿物を35mlの冷たいTES緩衝液(0.2Mトリス-Cl pH8.0、20%スクロース、0.5mMEDTA)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、45ml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<sub>H</sub>Hを含有する得られた上清を、0.22µm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(10mM HEPES pH7.0、500mM 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

10

20

30

40

50

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+3mM 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<sub>V<sub>H</sub>H</sub> IGF1R-5の生物物理学的特徴づけ

実施例5において発現させ精製した抗IGF1R<sub>V<sub>H</sub>H</sub> IGF1R-5コンストラクトを、サイズ排除クロマトグラフィー、表面プラズモン共鳴解析、及び融解温度解析を使用して特徴づけた。IGF1R-5<sub>V<sub>H</sub>H</sub>のエピトープマッピングもまた実施した。

【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、150mM NaCl、3mM EDTA及び0.005% P20を含有する10mM HEPES、pH7.4だった。SPR解析のために使用した画分の濃度を、280nm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、抗体がモノマー性であることを示唆した(図3A)。

【0100】

融解温度：IGF1R-5<sub>V<sub>H</sub>H</sub>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。Peltier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。1mmのパス長を有するCDキュベットを使用した。180~260nmの波長にわたって、50nm/minの走査速度、4秒のデジタル積分時間(DIT)、1nmのバンド長、1nm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 から96 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、100mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4中50µg/mL<sub>V<sub>H</sub>H</sub>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)の中心として得られた。<sub>V<sub>H</sub>H</sub>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(図2D)。 $T_m$ 値は、フォールド率( $ff$ )対温度のシグモイド変性曲線の中心でとった。結果を図3Bに示す。すべてのヒト化<sub>V<sub>H</sub>H</sub>の融解温度が、IGF1R-5<sub>V<sub>H</sub>H</sub>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。

【0101】

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-5<sub>V<sub>H</sub>H</sub>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(R&D Systems)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、1 M エタノールアミン pH 8.5 でブロッキングした。エタノールアミンでブロッキングした表面を、基準表面として使用した。結合研究のため、25 °C で、150 mM NaCl、3 mM 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 10 mM HEPES、pH 7.4 中で解析を実施した。様々な濃度の IGF1R-5 V<sub>H</sub>H を、20 µl/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、10 mM グリシン pH 2.0 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。結果 (図 3C を参照のこと) は、データが 1:1 モデルによく適合し、表 1 に示す K<sub>D</sub> を与えることを示す。これは、IGF1R-5 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。

10

【0102】

【表1】

表1.表面プラズモン共鳴により決定されるヒト(h)IGF1Rに対するIGF1R-5 V<sub>H</sub>Hコンストラクトの親和性

	h-IGF1R表面		
	K <sub>D</sub> (nM)	k <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
IGF1R-5	0.6	3.4 × 10 <sup>-4</sup>	5.3 × 10 <sup>5</sup>
IGF1R-5 H1	11.0	4.3 × 10 <sup>-3</sup>	3.9 × 10 <sup>5</sup>
IGF1R-5 H2	7.5	2.9 × 10 <sup>-3</sup>	3.8 × 10 <sup>5</sup>
IGF1R-5 H3	0.8	4.1 × 10 <sup>-4</sup>	5.2 × 10 <sup>5</sup>
IGF1R-5 H5	1.6	8.0 × 10 <sup>-4</sup>	5.0 × 10 <sup>5</sup>
IGF1R-5 H6	1.7	7.2 × 10 <sup>-4</sup>	4.3 × 10 <sup>5</sup>

20

【0103】

IGF1R-5 V<sub>H</sub>H が、天然リガンド IGF-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、SPR 解析をさらに使用した (図 3D)。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 IGF1R 表面に対する結合を、25 × K<sub>D</sub> の濃度の IGF1R-5 V<sub>H</sub>H の注入と、続く両方が 25 × K<sub>D</sub> の濃度での IGF1R-5 及びヒト IGF-1 リガンドの同時注入により、20 µl/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。IGF1R-5 V<sub>H</sub>H は受容体に結合し、非再生表面上で約 38 RU で飽和に達した。IGF-1 リガンドは、予測された約 70 RU (相対的単位) で IGF1R-5 V<sub>H</sub>H の存在下で IGF1R 受容体に結合可能だった。受容体に対する IGF1R-5 V<sub>H</sub>H 及び IGF-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。IGF1R-5 V<sub>H</sub>H 及びインスリン受容体の SPR 解析は、IGF1R-5 V<sub>H</sub>H がインスリン受容体に結合できないことを示唆した (データは示さず)。再生表面対新しい非再生表面で異なる相対的単位 (RU) の IGF1R-5 が結合するにもかかわらず、両表面上で決定される結合親和性はきわめて類似し、異なる実験で再現可能だった (データは示さず)。

30

【0104】

エピトープマッピング: エピトープマッピングサービスは、Pepscan (Lelystad, The Netherlands; pepscan.com) により提供された。IGF1R の全長配列を図 2 に示す。エピトープマッピング結果及び関連インスリン受容体構造の 3 次元レンダリング (タンパク質構造データバンク受託番号 2DTG に公開、示さず) に基づいて、IGF1R-5 V<sub>H</sub>H が結合するエピトープは、FENFLHNSIFVPR (配列番号 11) と示唆された。

40

【0105】

#### 実施例 7: 脳内皮細胞による IGF1R-5 の内部移行

IGF1R-5 が細胞内に内部移行するかどうかを決定するため、svAREC 細胞を Cy5-5 標識化 IGF1R-5 とインキュベートした。

50

## 【0106】

IGF1R-5 V<sub>H</sub>HをNHS-Cy5.5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NHS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1M炭酸塩/重炭酸塩緩衝液(759mM重炭酸塩、258mM炭酸塩)pH9.3を、PBS(1.06mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、154mM NaCl、5.6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)pH7.4中に調製された4mgのV<sub>H</sub>Hに添加し、4mg/mLの最終濃度に調整した。10mg/mLでDMSO中に溶解されたNHS-Cy5.5を、染料のタンパク質に対する2xモル比で添加した。混合物を、1.5mL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、Zeba Spin Desalting Columns、7K MWCO(Pierce)を使用して濾過し、Beckman DU530分光光度計(Beckman Coulter)を使用して測定した。Cy5.5標識化IGF1R-5又は陽性対照としてのFC5(1mg/mL)を、SV40不活化ラット脳内皮細胞(svAREC)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DAPI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。

10

## 【0107】

4でインキュベートされた場合、IGF1R-5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同在して見出された。対照的に、37でインキュベートされたとき、IGF1R-5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以前に示されているFC5について観察された(Abulrobr2005)。

20

## 【0108】

実施例8: IGF1R-5-Fcコンストラクトの製造

マウス抗体結晶性断片(Fc、mFc2b)と融合したIGF1R-5 V<sub>H</sub>Hを含むコンストラクトを調製し、発現させ、単離した。C末端コンストラクト(IGF1R-5-mFc)及びN末端IGF1R-5マウスFc融合コンストラクト(mFc-IGF1R-5)の両方を作製した。それらの配列を図5A~図5Bに示し、分子の概略図を図5Cに示す。融合タンパク質(約80kDa)はまた、図5A~図5Bの配列に示されていないN末端シグナルペプチド(MEFGLSWVFLVAILKGVQC、配列番号40)を含んでいた。なぜならそれは、分泌後に切断されるからである。

30

## 【0109】

IGF1R-5 cDNAを、マウスFc2b断片を含有する哺乳動物発現ベクターpTT5(Durocher2002)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、187.5µgのpTT5-IR5mFc2b、56.25µgのpTT-AKTdd(プロテインキナーゼBの活性化変異体)、18.75µgのpTTo-GFP(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112.5µgのサケ精巢DNA(Sigma-Aldrich)を含有する25mLのプラスミドDNA溶液、並びに、1.125mgのPEIpro(商標)(PolyPlus Transfection)を含有する25mLのPEI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、F17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EBNA1タンパク質を安定的に発現するCHO細胞の450mL培養物(CHO-3E7)をF17培地(Invitrogen)中で成長させ、50mL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12.5mLの40%(w/v)トリプトンN1(Organotechnie)溶液及び1.25mLの200mM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

40

50

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 Mab Select Sure樹脂 (GE Healthcare) 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 (PBS) pH 7.1でカラムを洗浄し、100 mMクエン酸ナトリウム緩衝液 pH 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、PBS中で平衡化した脱塩 Econo-Pacカラム (BioRad) 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、Millex GP (Millipore) 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。

【0110】

実施例9：CSF及び血漿におけるIGF1R-5-mFcの薬物動態

10

IGF1R-5-mFc (実施例8) 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。

【0111】

大槽CSFの多数試料採取のために使用された技術を、以前に記述された方法の修正によりNRCで開発した (Huangら、1995; Kornhuberら、1986; Yaksh及びRudy、1976)。動物をポリプロピレンケージに単独に入れ、餌及び水を自由に与えた。12時間の明/暗サイクル、24時間の温度及び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。

20

【0112】

8~10週齢の雄ウイスターラット (体重範囲、230~250g) をケタミン/キシラジン混合物 (45/12 mg/kg, i.p.) で麻酔し、定位機器にマウントした (動物の頭部を固定する任意の他のデバイスを使用できる)。両耳を接続する線で始まり、尾側方向に約3cm延びる切開を正中線で行った。筋膜が頭蓋骨から除かれ、頸筋の表層を露出させ、次にこれらは、後頭稜に始まり、尾側に約2cm延びる正中線切開により分離された。表層筋肉組織の分離は、筋肉の下層を露出させ、これは鈍的切開により正中線に沿って容易に分離された。後頭骨上の元の位置から正中線のいずれかの側に約0.5cm筋肉を除くために、擦過器具を使用した。頸部筋肉組織を穏やかによけることで、環椎後頭膜を露出させた。次に、ラットの頭部を下方向に約45°の角度で回転させた。27G使い捨てニードルの先端を使用して小さな穴を作った。切開が正確に実施されるとき、透明なCSFがすぐにスリットを通じて湧き出てくるはずである。次に、スリット内にポリエチレンチューブ (PE-20) を0.5cm挿入した。次に、Histoacryl接着剤又はVetbond接着剤の補助によりカニユーレを環椎後頭膜に固定し、長期 (1週間超) にわたる試料回収を可能にし、また、感染物又は他の汚染物がCSFに侵入するのを防止した。次に、カニユーレを人工CSFで十分に洗い流した。カニユーレの回収部を、歯科用セメントで後頭骨にしっかりと取り付けた。カニユーレを固定したら、自由部 (4~5cm) を20Gニードルとともに皮膚に通し、次に筋肉及び皮膚を閉じて、曝露部を所望の長さに切断し、CSFの逆流を防止するために先端をわずかに加熱した。最後に、動物を回復室に少なくとも1週間置き、大槽が閉じることを可能にする。この技術は、他の方法により記述されているように、頭蓋骨を貫通して穴を開けることを伴わず、髄膜及び隣接する神経組織の損傷を回避する。

30

40

【0113】

大槽カニユーレ挿入の1週間後、5 mg/kgのIGF1R-5mFc又は対照A20.1mFc融合物を尾静脈に注射した。ラットを3%イソフルランで麻酔した。カニユーレに蓄積した最初の10 μlのCSFは廃棄した。10 μlのCSFを、注射0.5、1、2、24及び48時間後に回収した。同じ時点でポリマーゲルチューブ (Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ

50

USA)を使用して血液試料(50 µl)を尾静脈から採取した(Flutterら、2000)。試料を遠心した(15分間1600 rcfで、室温)。試料を解析まで-80で保存した。実験の最後にラットを麻酔下で断頭により屠殺した。

【0114】

血清及びCSF試料を、実施例7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。

【0115】

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<sub>H</sub>H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エ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38)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。

【0116】

結果を図9及び表2に示す。図は、Fc含有分子の「典型的」血清薬物動態学的プロファイルを示す。IGF1R-5FcのCSFレベルは時間経過とともに増加し、注射24時間後、2%の血清レベルに達したときに頂点に達した。血清レベル/減衰は対照A20.1Fc融合分子と同等である一方で、そのCSFレベルは最小限であり、24時間で血清レベルの0.04%に達した。表2は、等モル用量(5 mg/kgのV<sub>H</sub>H-Fc融合物)の全身静脈内投与後のCSF及び血清中のIGF1R5-Fc及び対照A20.1-Fcの薬物動態学的パラメータを示す。IGF1R5-Fc及び対照A20.1-Fcの血清中半減期はそれぞれ、23時間及び25時間だった。

【0117】

陰性対照A20.1Fc(75 kD)は、類似のサイズの分子について文献に記載のものと類似した24時間での血清/CSF比を示す。安定状態でのアルブミン(60 kD)について典型的な血清/CSF(腰部)比が0.1%である一方で、IgGについて血清/CSF比は、0.07である(Shenら、2004; Lin、2008)。24時間でのIGF1R5-Fc血清/CSF比は、A20.1mFcのそれよりも50倍高い。

【0118】

各分子についてのCSF/血清AUC比は、48時間にわたるコンストラクトのCNS「曝露」の指標である。IGF1R-5-Fcは、A20.1Fcと比較して33倍高いCNS曝露を示す。結果は、IGF1R-5Fcが、対照V<sub>H</sub>H-Fc融合分子と比較して、CSFへの促進されたアクセスを得ることを示す。これは、脈絡叢による特異的「分泌」、又はBBBを横断した後の脳実質からの「洗い流し」(上衣層ライニング脳室系ependymal layer lining brain ventricular system)を通じた、又は間質液の総体流を介した拡散)、又はその両方を介して生じうる(Abbott 2004; DeLange、2002; Groothuis、2007)。

【0119】

約110 kDa及び180 kDaの追加のコンストラクトもまた、BBBを通過してIGF1R-5及びヒト化バージョンによりフェリーされると示された(データは示さず)。

【0120】

## 【表2】

表2.ラットの血清及び大槽CSFにおける全身注射されたIGF1R-5Fc及びA20.1Fcの薬物動態学的パラメータ。

		IGF1R-5Fc	A20.1Fc
CSF	AUC (h*ng/ml)	15750.5	774
血清	AUC (h*ng/ml)	1369563	2247094
	半減期(分布相)(h)	22.89	25.46
	クリアランス(ml/h)	1.003	0.66
CSF/血清比(24h) (%)		1.988	0.04
CSF/血清AUC比(%)		1.150038	0.034
倍数増加(CSF曝露)			<b>33.82</b>

10

## 【0121】

実施例10：インビトロ血液脳関門モデルを通過するIGF1R-5の輸送

実施例8のIGF1R-5 V<sub>H</sub>H及びコンストラクト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6Aに示す。

## 【0122】

SV40不死化成体ラット脳内皮細胞(Sv-ARBE C)を、以前に記述されたとおりインビトロ血液脳関門(BBB)モデルを作製するために使用した(Garbergら、2005; Haqqaniら、2012)。Sv-ARBE C(細胞80,000個/膜)を、1mlの成長培地中の0.1mg/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-1µm、表面積0.9cm<sup>2</sup>、Falcon)上に播種した。インサートアセンブリの下のチャンパーは、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2mlの成長培地を含有していた。

20

## 【0123】

等モル量(5.6µM)の正(FC5)又は負(A20.1、クロストリジウム・ディフィシル毒素A結合性V<sub>H</sub>H、及びEGFR結合性V<sub>H</sub>HであるEG2)の対照、IGF1R-5 V<sub>H</sub>H、並びに実施例8のC及びN末端mFc-IFG1R-5コンストラクトを、このラットインビトロBBBモデルを横断するそれらの能力について試験した。

30

## 【0124】

BBBの管腔側への等モル量のsdAb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sdAb含有量を、Haqqani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-同位体標識化内部標準、MRM-ILIS)により定量した(下の方法の説明を参照のこと)。

## 【0125】

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<sub>app</sub>(見かけ透過係数)値を所定の式で決定し(図5A)、プロットできる。P<sub>app</sub>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<sub>r</sub>/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<sub>0</sub> = 投与溶液の初期濃度]。P<sub>app</sub>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。

40

## 【0126】

結果を図6B~図6D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<sub>app</sub>値である。両方の陰性対照が、非常に低いP<sub>app</sub>値を有し、BBBモデルを通過するこれらのV<sub>H</sub>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-5は、高いP<sub>app</sub>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-5 V<sub>H</sub>HのP<sub>app</sub>(図6B)は、陽性対照、すなわちBBB透過性V<sub>H</sub>H FC5(国際公開第02/057445号)のものと同等である。ヒト化IGF1R

50

- 5変異体は、野生型 IGF1R-5 と同等又はそれより高い Papp 値を示した (図 6 C)。注目すべきことに、IGF1R-5 H2 は、野生型 IGF1R5 と比較して有意な、35% の Papp 値の増加を示した (図 6 C)。インビトロ BBB 横断 (Papp 値) の改善を示した 2 つのヒト化変異体、IGF1R-5 H1 及び IGF1R H2 はまた、ここで実施された SPR による受容体結合研究において、より速い「オフレート」を示した (図 3 C) ことから、BBB 受容体媒介性トランスサイトーシス受容体 IGF1R に結合する抗体のトランスサイトーシスの改善のために、より速い「オフレート」が望ましいことが示唆される。マウス Fc (80 kD) の N 又は C 末端のいずれかに融合された IGF1R-5 は、単ドメイン抗体 IGF1R-5 (15 kD) と同等の Papp 値を有していたことから、IGF1R と融合されたときに 80 kD の分子がインビトロで BBB を効率的に横断できることが示される。注目すべきことに、Fc の N 末端との融合は、一定の利益 (Papp の 15% の改善) をもたらした。これらのデータは、IGF1R-5 を、特に脳内への輸送を必要とする治療機能を有する完全 IgG の C 末端と融合される二重特異性抗体を設計するためのプラットフォームとして使用できることを示す。これらの結果は、IGF1R-5 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。カージン分子に連結された 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)。

#### 【0127】

MRM-ILIS 法を使用した V<sub>H</sub>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<sub>H</sub>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<sub>H</sub>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<sup>2</sup> = 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。

#### 【0128】

細胞培地又は体液 (血清又は脳脊髄液 (CSF)) における V<sub>H</sub>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 µl) 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 mzXML 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<sub>H</sub>H 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 0.25 Da 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<sub>H</sub>H を、そのペプチドのうち少なくとも 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<sub>H</sub>H の最終強度値と比較して強いピアソン相関 r = 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。

## 【0129】

V<sub>H</sub>H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の活性化時間を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<sup>3</sup>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。

10

## 【0130】

マルチプレックスアッセイにおいて各V<sub>H</sub>Hの検出及び定量的のために使用されたV<sub>H</sub>H特異的ペプチドを表3に示す。

20

## 【0131】

## 【表3】

表3.FC5、FC5-ILIS、EG2、A20.1、IGF1R-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的の限界は1.5~2.5ng/mlだった。1ng/mlは、約60~70pMのV<sub>H</sub>H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-5	EFVATIDWGDGGAR	27	はい
	TIDNYAMAWSR	28	はい
	LEESGGGLVQAGGSLR	29	
FC5	ITWGGDNTFYSNSVK	30	はい
FC5-ILIS	ITWGGDNTFYSNSVK <sup>(b)</sup>	30	はい
A20.1	TTYADSVK	31	はい
	EFVAAGSSTGR	32	はい
	TFSMDPMAWFR	33	はい
	DEYAYWGQGTQVTVSSGQAGQGSEQK	34	はい
EG2	DFSDYVMGWFR	35	はい
	LEESGGGLVQAGDSLRL	36	はい
	NMVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVNSAGTYVSPR	37	はい
アルブミン	APQVSTPTLVEAAR	38	はい

30

40

## 【0132】

## 実施例11: ガラニンへのIGF1R-5のコンジュゲーション

IGF1R-5がインピボで血液脳関門(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-5 V<sub>H</sub>H又はマウスFcのC若しくはN末端のいずれかに融合されたIGF1R-5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GalR1及びGalR2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

50

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)。

【0133】

IGF1R-5 V<sub>H</sub>H及びFc融合コンストラクトを、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 (Biomatic) (GWTLSAGYLLGPH AIDNHRSFSDKHGLT - システアミド、配列番号39) 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7に示す。

【0134】

簡潔に述べると、0.5 × PBS、2.5 mM EDTA中の [2 mg/ml] での5 mgのIGF1R-5 V<sub>H</sub>H (実施例5) を、436.4 μlの2.5 mg/mlスルホスクイニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (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NHSEステルアームをV<sub>H</sub>H上のアミンと反応させた。続いて、10 ml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<sub>H</sub>Hから除去した。試料ローディングの前に、カラムを5 ml 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200 μlのPBSを補給し、2分間、1000 × gで回転させた。IGF1R-Fcコンストラクトの場合、5 mgを約68 μlのスルホ-SMCC (6.5 × 過剰モル比) と、上述のように反応させた。

【0135】

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、10 mgの凍結乾燥粉末を10 ml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、1 mg/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、100 μlの0.5 M EDTAを添加した (5 mM最終濃度)。

【0136】

精製マレイミド活性化IGF1R-5 V<sub>H</sub>H及びIGF1R-Fcコンストラクト (2.6 ml) を、0.5 × PBS、2.5 mM EDTAで5 mlまで希釈し、次に、ポルテックスにかけながら5 ml又は1 ml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、一晩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5 mlに減少するまで回転させた。5 mlの0.5 × PBS、2.5 mM EDTAを、カラムのインサート中の残りの5 ml試料に添加し、試料が4 ml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、10 ml 7K Zebaカラム (Pierce) に添加し、上述のとおり調製し、次に2分間、1000 × gで回転させた。

【0137】

次に、コンジュゲートされたIGF1R-5-Gal及びIGF1R-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<sub>H</sub>H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。

【0138】

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、15 mlのV<sub>H</sub>H調製物を、4000 × gでの10分間の遠心によりAmicon-15~50K MWCOカラムを通過させた。溶出物を回収した。次に、この溶出物を、Amicon-15~10K MWCOカラムに添加し、4000 × gで7~10分間回転させ、15 mlから7.5 mlへの上清体積の低減をもたらした。カラム内の上清体積を、PBSを添加することにより15 mlに戻すよう

10

20

30

40

50

調整した。カラムを上述のとおり再び回転させた。上清を回収し、 $10 \sim 0.1 \text{ EU/ml}$ 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。 $25 \mu\text{l}$ 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。 $1 \text{ mg}$ 当たり $\text{EU} < 1$ を有する試料のみを、動物研究に使用した。

【0139】

哺乳動物細胞において無菌条件下でFc融合コンストラクトを製造した。エンドトキシンレベルを、以前に記述されたとおり、細胞から精製された試料において測定した。 $1 \text{ mg}$ 当たり $0.5 \text{ EU}$ 未満の試料のみを動物研究のために使用した。

10

【0140】

実施例12：ハーグリーブズモデルを使用したIGF1R-5-Galの輸送

IGF1R-5-Gal、mFc-IGF1R-5-Gal、及びIGF1R-5-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、インビオアッセイを、国際特許公開第2011/127580号に以前に記載のとおり利用した。

【0141】

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、 $24 \text{ }^\circ\text{C}$ の温度及び $50 \pm 5\%$ 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。

20

【0142】

このモデルにおいて、6~8週齢の雄ウイスターラット(体重範囲 $230 \sim 250 \text{ g}$ )に、低体積( $30$ ゲージニードルで $100 \mu\text{l}$ )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 # 336TG Life 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 $17 \sim 20$ 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。

30

【0143】

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。

40

【0144】

IGF1R-5-Gal、mFc-IGF1R-5-Gal、及びIGF1R-5-mFc-Galが血液脳関門を通過して送達され、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-5-ガラニン( $2.93 \text{ mg/kg}$ 又は $5.85 \text{ mg/kg}$ 、エンドトキシン $\text{EU} = 1/\text{mg}$ )、又はmFc-IGF1R-5-Gal Gal( $1.98 \text{ mg/kg}$ 又は $4.96 \text{ mg/kg}$ ;  $< 0.5 \text{ EU/mg}$ )、又はIGF1R-5-mFc-Gal( $2.0 \text{ mg/kg}$ 又は $5.0 \text{ mg/kg}$ ;  $< 0.5 \text{ EU/mg}$ )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

50

避潜時 ( P W L ) を試験した。足退避潜時の増加は、鎮痛の誘導の成功を示し、これは、 I G F 1 R - 5 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 B B B を通過できない ( R o b e r t s o n ら、 2 0 1 1 ) 。

【 0 1 4 5 】

足退避潜時 ( P W L、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 8 A ~ D ) 。

【 0 1 4 6 】

結果は、静脈内投与されたガラニンが、 P B S と比較して疼痛を低減しないことを示す。対照的に、 F C 5 - G a l、 I G F 1 R 5 - G a l、 m F c - I G F 1 R - 5 - G a l、又は I G F 1 R - 5 - m F c - G a l の単回注射はすべて、用量依存的な熱痛覚過敏の抑制をもたらした。これは、 I G F 1 R - 5 V<sub>H</sub>H が、 B B B を通過させてガラニンを「フェリー」する役目を負う存在であり、脳実質において G a l R 1 及び / 又は 2 に結合することで薬理学的効果をもたらすことを示唆する。 I G F 1 R - 5 - G a l 効果は用量依存的であり、 F C 5 - G a l により誘導されるものよりも有意に顕著であり、 I G F 1 R 受容体が、推定される F C 5 受容体よりも高い B B B 輸送率を有することを示唆する。これらの結果は、 I G F 1 R - 5 V<sub>H</sub>H が、受容体媒介性トランスサイトーシス経路を使用し、大きな分子 ( 3 k D a ~ 8 0 k D a ) を、 B B B を通過させて「フェリー」できることを実証する。能動的な受容体媒介性輸送が必要とされる。なぜなら、 B B B は、 0 . 5 k D a 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。

【 0 1 4 7 】

#### 実施例 1 3 : I G F 1 R - 5 - m F c の免疫検出

末梢投与後に C S F において検出された高レベルの I G F 1 R - 5 m F c 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 B B B を横断したことを確認するため、ラット脳における I G F 1 R - 5 - m F c の免疫検出を実施した。

【 0 1 4 8 】

簡潔に述べると、実施例 1 1 の実験からの動物の脳を、 P B S での動物還流直後 ( すなわち、 I G F 1 R - 5 - m F c の 5 m g / k g 尾静脈注射 4 8 時間後 ) に回収した。脳を凍結し、 c r y o t o m e 上で 1 2 μ m 切片に切断した。 1 0 分間、 R T、 1 0 0 % メタノール中で切片を固定し、 P B S 中で 3 x 洗浄し、 1 時間、 1 x P B S 中の 0 . 3 % T r i t o n X - 1 0 0 を含有する 1 0 % 正常ヤギ血清 ( N G S ) 中でインキュベートした。 1 x P B S 中の 0 . 3 % T r i t o n X - 1 0 0 を含有する 5 % N G S 中のヤギ抗 m - I g G F c y - c y 3 ( C a t # 1 1 5 - 1 6 5 - 0 7 1、 J a c k s o n I m m u n o R e a s e a r c h、ロット # 1 0 6 3 6 0 ) 1 : 2 0 0 を、一晩 4 で適用した。切片を 1 x P B S で 3 回洗浄し、 5 % N G S / 1 x P B S 中のウサギ抗 G F A P ( C a t # Z 0 3 3 4、 D a k o ) 1 : 5 0 0 中で 1 時間、室温でインキュベートした。切片を再び 1 x P B S で 3 回洗浄し、次に、 1 x P B S 中の 1 : 3 0 0 ヤギ抗マウス A l e x a 6 4 7 ( A 2 1 2 3 5、 I n v i t r o g e n ) 又は 1 : 5 0 0 ヤギ抗ウサギ A l e x a 6 4 7 ( A 2 1 2 4 4、 I n v i t r o g e n ) 中でインキュベートした。次に、 1 x P B S 中の脈管構造染色レクチン R C A I ( C a t # F L - 1 0 8 1、 V e c t o r ) 1 : 5 0 0 を 1 0 分間添加した。 1 x P B S で 3 回洗浄後、切片を D a k o 蛍光封入剤 ( C a t # S 3 0 2 3、 D a k o ) 中においてカバースリップで被覆し、 2 μ g / m l の H o e c h s t ( C a t # H 3 5 7 0、 I n v i t r o g e n ) を添加し、核を染色した。 1 0 x 及び 6 0 x 対物レンズ及び表 4 に示すチャンネルを使用して、 O l y m p u s 1 x 8 1 蛍光顕微鏡で画像をキャプチャーした。

【 0 1 4 9 】

## 【表4】

表4. 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
GFAP	Alexa 647	628	692

## 【0150】

結果を図10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-5Fc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。結果は、IGF1R-Fc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-5に連結されたガラニンが実質GalR1及びGalR2受容体上の薬理的な反応(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(ハーグリーブズモデル)結果は、IGF1R-5 V<sub>H</sub>H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<sub>H</sub>H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。

## 【0151】

## 実施例14: IGF1Rの「生理」機能に対するIGF1R-5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、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-5 V<sub>H</sub>H又はIGF1R-5-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。

## 【0152】

IGF1R-5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。

## 【0153】

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-5 V<sub>H</sub>H又はIGF1R-5-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秒パーストを与え、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(Ser473)を、この標的に対する一次抗体の1:1000希釈液(Cell Signa

ling 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。

#### 【0154】

結果を図 11 に示す。Akt リン酸化のウエスタンブロット解析は、IGF1R - 5 が、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  のインスリン又は  $200 \text{ ng}/\text{ml}$  の IGF - 1 により誘導される Akt リン酸化を、 $100 \text{ nM}$  の IGF1R - 5 若しくは IGF1R - 5 - mFc 又は  $500 \text{ nM}$  の IGF1R - 5 - 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<sub>H</sub>H 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 11 A、図 11 B 及び図 11 C、「- 5」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 - 5 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 - 5 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。

#### 【0155】

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とは限らない。

#### 【0156】

##### 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 Inherit Metab Dis.* 36(3):437-49.

Abbott, N. J. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology, *Neurochem. Int.* 2004, 45, 545-552.

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.* 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., Transfiguracion 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.

10

20

30

40

50

- De Lange, E. C.; Danhof, M. Considerations in the use of cerebrospinal fluid pharmacokinetics to predict brain target concentrations in the clinical setting: implications of the barriers between blood and brain, *Clin. Pharmacokinet.* 2002, 41, 691-703.
- 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 angiopep-2, *J. Neurochem.* 2008, 106, 1534-1544.
- Dumoulin, M., Conrath, K., VanMeirhaighe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.G., Muyldermans, S., Wyns, L., and Matagne, A. (2002) *Protein Sci* 11, 500-515. 10
- Durocher, Y., S. Perret, et al. (2002). "High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-E BNA1 cells." *Nucleic Acids Res* 30(2): E9.
- 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, 3703-3713.
- 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. 20
- Fenner, L., Widmer, A.F., Goy, G., Rudin, S., and Frei, R. (2008) *J. Clin. Microbiol.* 46, 328-330.
- Fluttert, M., Dalm, S., and Oitzl, M.S. (2000) *Lab Anim* 34, 372-378.
- 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. 30
- 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-ionspray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, 795, 41-53.
- 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) 40
- Groothuis D. R.; Vavra M. W.; Schlageter K. E.; Kang E. W.; Itskovich A. C.; Hertzler S.; Allen C. V.; Lipton H. L. Efflux of drugs and solutes from brain: the interactive roles of diffusional transcapillary transport, bulk flow and capillary transporters, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007, 27, 43-56.
- 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 50

- brain-targeting single-domain antibodies using a NanoLC-SRM-ILIS method. *Mol Pharm.* 2013 May 6;10(5):1542-56.
- 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, e28218. 10
- 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., Trojahn U., Albaghdadi H., Zhang J., O' Connor M., Stanimirovic D., Tomasek B., Sutherland G., and Abulrob A. (2010) *Br. J. Pharmacol.* 160, 1016-1028.
- Jaspers, 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. 20
- Kim, D.Y., Kandalaft, H., Ding, W., Ryan, S., van Fassen, H., Hirama, T., Foote, S.J., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2012) *PEDS* advance access August 30, 2012, 1-9.
- 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, Kuo Lee R, Hirama 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. 30
- Lin, J. H. CSF as a surrogate for assessing CNS exposure: an industrial perspective, *Curr. Drug Metab* 2008, 9, 46-59.
- 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 transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J.* 2002 Feb;16(2):240-2.
- 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, Lilje 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. 40
- 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.
- 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. 50

- 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.
- 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. 10
- 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.
- 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)
- Shen, D. D.; Artru, A. A.; Adkison, K.K. Principles and applicability of CSF sampling for the assessment of CNS drug delivery and pharmacodynamics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004, 56, 1825-1857. 20
- 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.
- Tanha, J., Muruganandam, A., and Stanimirovic, D. (2003) *Methods Mol. Med.* 89, 435-449. 30
- 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)
- 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. 40
- 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.
- 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 50

European Patent No. 626390  
 US Patent No. 5693761  
 US Patent No. 5766886  
 US Patent No. 5821123  
 US Patent No. 5859205  
 US Patent No. 5869619  
 US Patent No. 6054297  
 US Patent No. 6180370  
 WO 02/057445  
 WO 2011/127580  
 WO 95/04069  
 WO/2004/076670  
 WO2003/046560

【 図 1 】

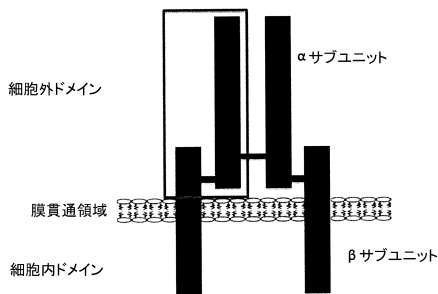


FIG. 1

【 図 2 】

```

MKSQSGGGSP FSLNGLLFLS AALSMPFSS EICQPGIDIR NDTQQLEHL NCTVIRGTLH 60
ILLIIGASDY RHYFPFELFV ITETLLIFVY AGLSELGLF PMLCTVRGNK LFNHALVIF 120
EMNLMDIGL YNLNIRGGA IRIKCHADLC YLSVDMSLI LNAVSHNIV GHEKPPKCGD 180
LCFGZHEEP MCKEYIINNE IYKCHADLC CQDMCPSTCG KRACTENBEC CHEKPCGSGS 240
AFQNDKACVA CRHYIAGVC VPACFPFTYR FEGMRCVDRD FCABILSAS SDBSGFVIRD 300
GECMBCFSG FIRNGSQMY CIPCBCPCPK VCEERKTYE IDRVTSAGML QCCIFRAGL 360
LNIIRGNM ASLESFPHL IYVYOTVKI KESLALVSLI YLDELKILG EMLSGHYF 420
YVLDGMLQG LMDWHERMLT IYKCHIFAP NPKLCVSEIY NGEVYOTGK RQKGDZFYR 480
NNGSASCSH DVLKFTSTT SKRILLIYMS KIRPPYIRGL ISFTVYKKA PFKVYVZDQ 540
QDAGSNSM MVDVLPFNK DVEPGILLG LKPPYIYAVY VRAVTLKVE NDEIRGAKSE 600
ILYIRTMASV PSIFLDVLSA SHSSQLIVK WHPFSLPNG LSTIVRMQR QPDGQYLKE 660
NYCSKDIKX KRYADGTIDI SVYENPKIE VCGGKGPCC ACPATASAG ASREASTK 720
VLSLSEGL FZTPEFMT DYNQVAKTM SGRSRRTLA DTYITDPEK LKTYVFFES 780
KVMKKEVY SMLRPFYLR IDHSCHEKA EKLCCASMF VFARTNPAEG ADLPGPVTW 840
EPRPENSIFL KWPSPENPHG LILMKIKIG SQVEDQRECV SRQETRYGG AKLMLNPGN 900
YIARIQATSL SNGSNWDFV FTYDQAKTY ENFHLILAL FVAULLVGG LVIMLYVFER 960
KRNSRLGNG VLYASVPEY FSAADVTVF EWEVAREKIT MSHRELGGSF GAVYGVANG 1020
VVNDPFTVY AIKYNREAS KGRRIEYNS ASVKEKFWCH HVVYELGVG QQQPLVIME 1080
LMPGDLKSY IRLSLRPMEN NFVLAPPSL S KIQVAGSIA DGMALNANK FVRDLAARN 1140
CMVAEDFTK IGDYQYTRDI YETDYIKGG KGLLPVRMS PSLKLDGVTY TYSDVHSGV 1200
VLAETLAE QPYQGLSNEQ VLRVMDGGL LKDFNCPDM LPELDMCQY YNFKMRPSEL 1260
EIISSIKEM EPGFREVSPY YSEKMLPEP EELDLEPENM ESWFLDPSAS SSSLPLPRH 1320
SGHKAENGPG PGLVLRASF DERQYAHNM GGRNERALP LFQSSTC 1367

```

FIG. 2

【 図 3 A 】

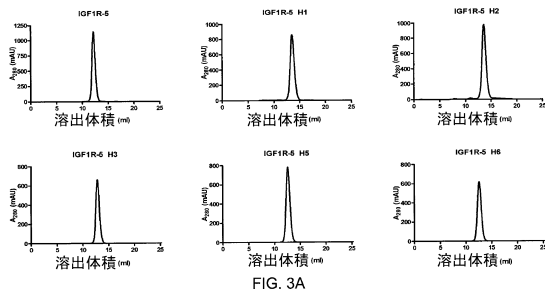


FIG. 3A

【 図 3 B 】

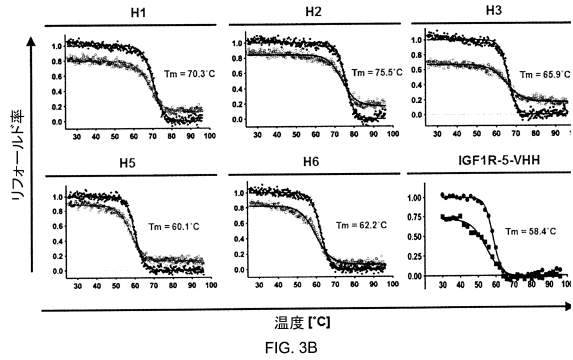


FIG. 3B

【 図 3 C 】

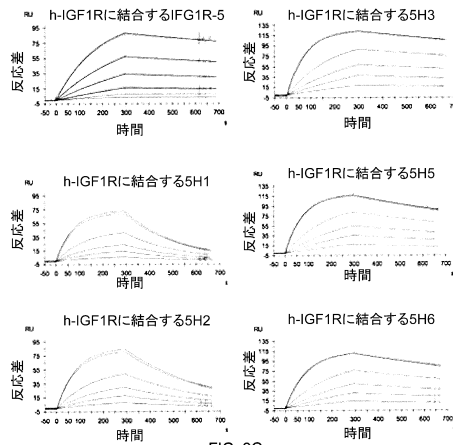


FIG. 3C

【 図 3 D 】

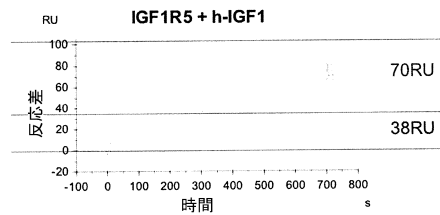


FIG. 3D

【 図 4 】

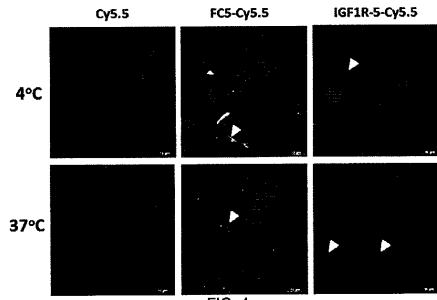


FIG. 4

【 図 5 A 】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDRFVATIDWGDGGARYANS  
 VKGRFTISRDNAGKTMYLQMNPLEPDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS  
 MTVDKKLEPSPGISTINPCPPCKECKPCAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTGVVVDVSE  
 DDPDVQISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKI  
 IERTISKI KGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFPNGDISVETWSNGHTEENYKDTAPVLD  
 SDGSYFIYSKLNMTSKWEKTDSPFCNVRHEGLKNYLLKTTISRSPGK

FIG. 5A

【 図 5 B 】

EPSGPISTINPCPPCKECKPCAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTGVVVDVSEDDPDVQI  
 SWFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKI  
 KGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFPNGDISVETWSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSY  
 FIYSKLNMTSKWEKTDSPFCNVRHEGLKNYLLKTTISRSPGGGGGGGGGQVQKLEESGGGLVQ  
 AGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDRFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDN  
 KGTMYLQMNPLEPDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS

FIG 5B

【 図 5 C 】

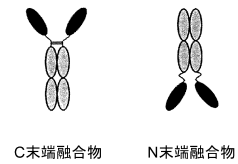


FIG. 5C

【 図 6 A 】

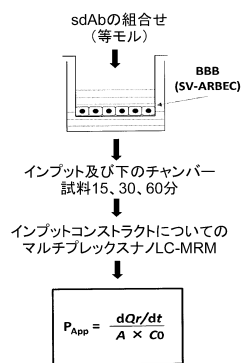


FIG. 6A

【 図 6 B 】

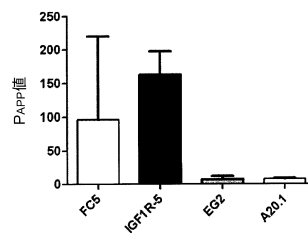


FIG. 6B

【 図 6 C 】

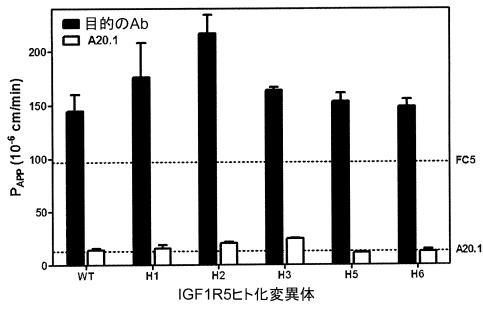


FIG. 6C

【 図 6 D 】

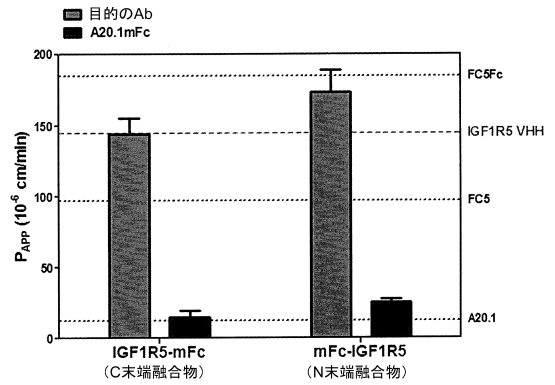


FIG. 6D

【 図 7 】

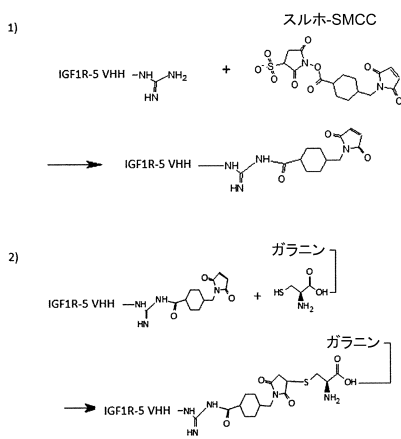


FIG. 7

【 図 8 A 】

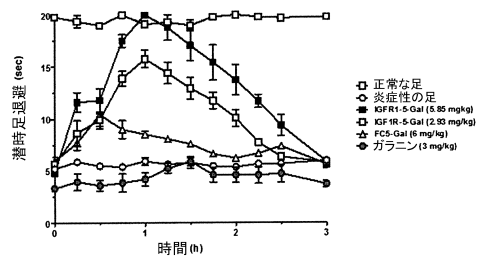


FIG. 8A

【 図 8 B 】

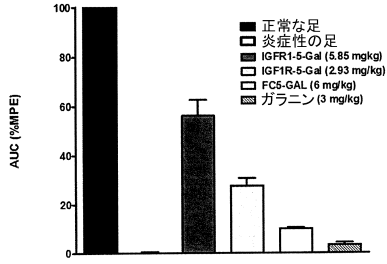


FIG. 8B

【 図 8 C 】

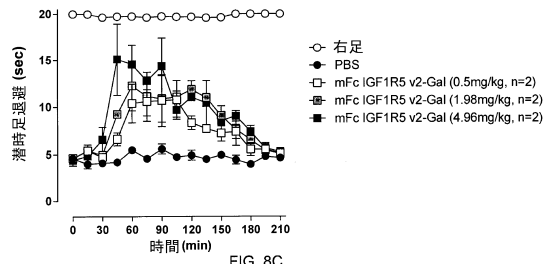


FIG. 8C

【 図 8 D 】

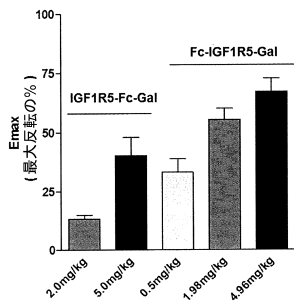


FIG. 8D

【 図 9 】

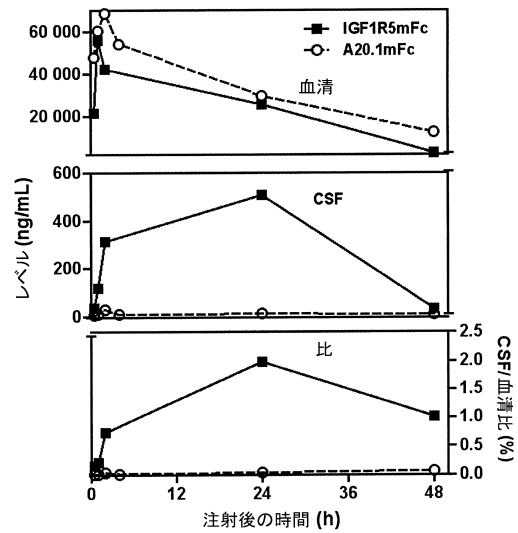


FIG. 9

【 図 1 0 】

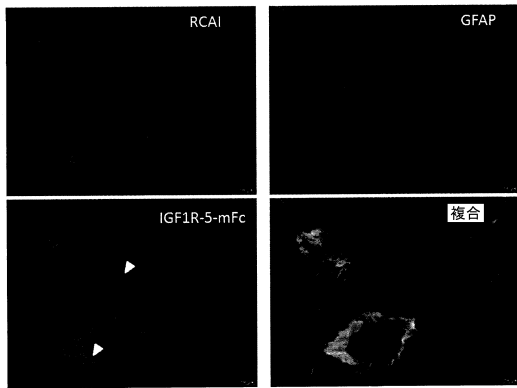


FIG. 10

【 図 1 1 A 】

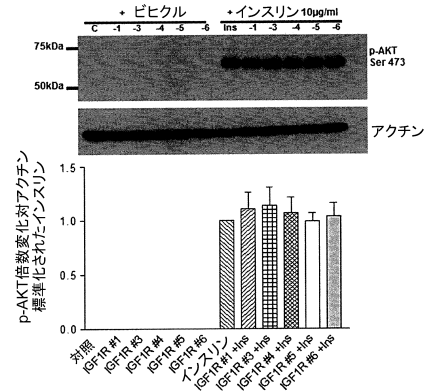


FIG. 11A

【 図 1 1 B 】

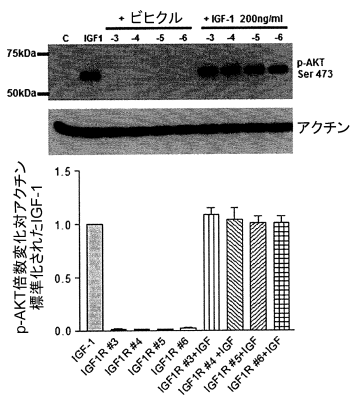


FIG. 11B

【 図 1 1 C 】

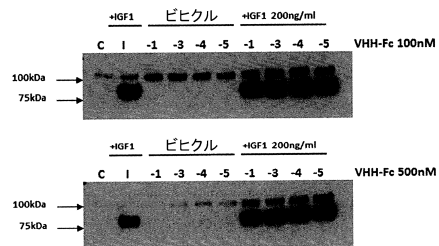


FIG. 11C

【配列表】

0006541236000001.app

## フロントページの続き

- (51) Int.Cl. F I  
**G 0 1 N 33/53 (2006.01)** G 0 1 N 33/53 D  
 C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08
- (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, カナタ, 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ピー4 ケベック, モントリオール, アヴェニュー ドエルテ  
 イー 5 2 6 1

審査官 伊藤 良子

- (56)参考文献 国際公開第2007/000328(WO, A1)  
 特表2013-534811(JP, A)  
 米国特許出願公開第2005/0085419(US, A1)  
 特表2009-511032(JP, A)  
 特表2006-511516(JP, A)  
 Biotechnol Bioeng, 2013年, Vol.110, No.5, p.1456-1465  
 Neuron, 2014年 1月 8日, Vol.81, p.49-60

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8  
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 U n i P r o t / G e n e S e q  
 P u b M e d

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	<a href="#">JP6541236B2</a>	公开(公告)日	2019-07-10
申请号	JP2016555678	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		
当前申请(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, ベルナル ギルバート, レナルド		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K16/46 C07K17/02 A61K39/395 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K47/6811 A61K47/6849 A61K49/0002 A61K49/0058 A61K2039/505 C07K16/2863 C07K16/465 C07K2317/22 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/35 C07K2317/565 C07K2317/569 C07K2317/64 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	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C07K16/46 C07K17/02 A61K39/395.Y G01N33/53.D C12P21/08		
代理人(译)	池田 成人 小泉纯酒卷 山口和弘		
审查员(译)	伊藤凉子		
优先权	61/948831 2014-03-06 US		
其他公开文献	JP2017513461A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

血脑屏障 ( BBB ) 可防止大于500道尔加仑的分子从血液运输到大脑。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。抗体或片段用于将货物分子递送穿过BBB, 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。

(5) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/13</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/13 Z N A
<b>C O 7 K</b>	<b>16/28</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 16/28
<b>C O 7 K</b>	<b>16/46</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 16/46
<b>C O 7 K</b>	<b>17/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 17/02
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 Y

請求項の数 16 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-555678 (P2016-555678)	(73) 特許権者	595008223
(86) (22) 出願日	平成26年12月4日 (2014.12.4)		ナショナル リサーチ カウンシル オブ
(65) 公表番号	特表2017-513461 (P2017-513461A)		カナダ
(43) 公表日	平成29年6月1日 (2017.6.1)		カナダ国, オンタリオ ケー1エー オア
(86) 国際出願番号	PCT/CA2014/000862		ール6, オタワ, モントリオール ロード
(87) 国際公開番号	W02015/131258		1 2 0 0
(87) 国際公開日	平成27年9月11日 (2015.9.11)	(74) 代理人	100107456
審査請求日	平成29年11月21日 (2017.11.21)		弁理士 池田 成人
(31) 優先権主張番号	61/948, 831	(74) 代理人	100162352
(32) 優先日	平成26年3月6日 (2014.3.6)		弁理士 濱巻 順一郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(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