

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-535921

(P2018-535921A)

(43) 公表日 平成30年12月6日(2018.12.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	ZNA 4C085
A61K 51/08 (2006.01)	A61K 51/08	200 4H045
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	D
A61P 25/28 (2006.01)	A61K 39/395	N
A61P 25/14 (2006.01)	A61P 25/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-507002 (P2018-507002)	(71) 出願人	511060836 ニューヨーク・ユニバーシティ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニュー ヨーク ワシントン スクエア サウス 70
(86) (22) 出願日	平成28年8月11日 (2016.8.11)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成30年4月2日 (2018.4.2)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/046520	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02017/027691	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成29年2月16日 (2017.2.16)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	62/204,711		
(32) 優先日	平成27年8月13日 (2015.8.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タウの {p} Ser404 エピトープに対し選択的な、抗体を基にした分子、ならびにタウ異常症の診断および治療におけるそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、タウの^(P)Ser404 エピトープと免疫特異的かつ選択的に結合できる、抗体を基にした分子（単ドメイン抗体断片、scFv分子、抗体、抗体断片、ダイアボディ、およびそれらのエピトープ結合ドメインを含む）に関する。そのような抗体を基にした分子は、特にアルツハイマー病または他のタウ異常症の診断および/または治療と共に、病的タウタンパク質配座異性体が生物試料中に存在する場合にそれを検出するのに有用であり、したがってアルツハイマー病および他のタウ病理に関する診断薬となる。本発明の抗体を基にした分子は、アルツハイマー病および関連するタウ異常症に関する診断マーカーとして、ならびにそのような病状の治療のための薬学的組成物として、特別の有用性がある。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タウの^(P)Ser404エピトープと免疫特異的に結合しうる、抗体を基にした分子であって

、
該エピトープが、タウ386~408 (^(P)Ser396/^(P)Ser404)の配列

(SEQ ID NO:8): TDHGAEIVYK^(P)SPVVSGDT^(P)SPRHL

(配列中、その位置11および19の残基がホスホセリンである)を有するペプチド上に存在し、

該抗体を基にした分子がさらに、非リン酸化タウに対してよりも高い選択性でリン酸化タウと結合しうる、

抗体を基にした分子。

【請求項 2】

可溶性PHFと結合する、請求項1に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 3】

抗体であるか、または抗体のエピトープ結合性断片を含む、請求項1に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 4】

ヒト化抗体であるか、またはヒト化抗体のエピトープ結合性断片を含む、請求項1に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 5】

抗体の^(P)Ser404エピトープ結合性断片を含み、かつ、単離されたCDR、単ドメイン抗体断片、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、scFv、またはダイアボディである、請求項3に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 6】

抗体またはそのエピトープ結合性断片であり、レシピエントへ末梢注射されると、タウ凝集物と実質的に共局在する、請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 7】

エピトープ結合性断片が、以下：

(a) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；

(b) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；

(c) SEQ ID NO:12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；

(d) SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；

(e) SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および/または

(f) SEQ ID NO:16のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

のいずれか1つ、いずれか2つ、いずれか3つ、いずれか4つ、いずれか5つ、または6つすべてを含む、請求項1~6のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 8】

エピトープ結合性断片が、SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を有する可変軽鎖ドメインおよび/またはSEQ ID NO:13のアミノ酸配列を有する可変重鎖ドメインを含む、請求項1~7のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 9】

SEQ ID NO:17のアミノ酸配列を含むscFvである、請求項8に記載の抗体を基にした分子

【請求項 10】

抗体4E6G7である、請求項8に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 11】

検出可能に標識されている、請求項1~10のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子

【請求項 12】

検出可能な標識が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識、または

10

20

30

40

50

酵素標識である、請求項11に記載の抗体を基にした分子。

【請求項13】

レシピエント対象の脳、脳脊髄液、血液、血清、または血漿における前記リン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、請求項11～12のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子の使用。

【請求項14】

検出または測定が、前記リン酸化タウタンパク質と結合した前記抗体を基にした分子の、インビボまたはエクスピボでのイメージングを含む、請求項13に記載の使用。

10

【請求項15】

検出または測定が、対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するためである、請求項13～14のいずれか一項に記載の使用。

【請求項16】

対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症の治療のためのインビボ医薬であって、該アルツハイマー病または他のタウ異常症を治療するのに有効な量の請求項1～12のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子と、1つまたは複数の担体、希釈剤、および/または安定化剤とを含む、医薬。

【請求項17】

対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症の治療のための、請求項16に記載のピボ医薬の使用。

20

【請求項18】

対象がヒトである、請求項13～15および17のいずれか一項に記載の使用。

【請求項19】

対象の脳における前記リン酸化タウタンパク質の存在もしくは量を検出もしくは測定するための、または対象におけるアルツハイマー病もしくは別のタウ異常症を診断するためのキットであって、請求項1～12のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子を含む、キット。

【請求項20】

タウ異常症が、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖したパーキンソニズム（FTDP-17）、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、神経原線維変化型認知症（tangle only dementia）、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症パーキンソニズム・認知症複合、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハラールフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、ニーマン・ピック病C型、プリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維変化を伴う非グアナムイアン（non-guanamian）運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソニズム、急性外傷性脳損傷、および慢性外傷性脳症を含む群から選択される、請求項13～15もしくは17～18のいずれか一項に記載の使用、または請求項16に記載の医薬、または請求項19に記載のキット。

30

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許出願第62/204,711号（2015年8月13日に提出；係属中）に対する優先権を主張し、当該出願はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

連邦政府の資金援助を受けて行われた研究または開発に関する申告

本発明は、米国国立衛生研究所（National Institutes of Health）（NIH）によって授与された助成金NS077239号、AG032611号およびAG020197号の下で、政府の援助を受けて行

50

われた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

配列表の参照

本出願は、米国特許法規則1.821以降の条文(37 C.F.R. 1.821 et seq.)に準じて、コンピュータ可読媒体中に開示されている1つまたは複数の配列表を含み(ファイル名:1400-0009PCT_ST25.txt、2016年8月6日に作成、サイズは38,518バイト)、このファイルはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0004】

発明の分野

本発明は、タウの^(P)Ser404エピトープと免疫特異的かつ選択的に結合しうる、抗体を基にした分子(単ドメイン抗体断片、scFv分子、抗体、抗体断片、ダイアボディおよびそれらのエピトープ結合ドメインを含む)に関する。そのような抗体を基にした分子は、特にアルツハイマー病または他のタウ異常症の診断および/または治療と共に、病的タウタンパク質配座異性体が生物試料中に存在する場合にそれを検出するのに有用であり、それ故にアルツハイマー病および他のタウ病理に関する診断薬となる。本発明の抗体を基にした分子(特にscFv分子)は、アルツハイマー病および関連するタウ異常症に関する診断マーカーとして、ならびにそのような病状の治療のための薬学的組成物として、特別の有用性がある。

10

【背景技術】

【0005】

発明の背景

アルツハイマー病は、認知症の最も多い病型であり、全世界で2000万人を超える人々が罹患している。本疾患の診断、特に早期での診断は手間がかかる上に困難であり、アルツハイマー病などのタウ異常症の正確な診断に対する需要がある。脳脊髄液中の異常タウの抗体検出について、ある程度の有望性が示されている(Blennow, K. et al. "Cerebrospinal Fluid And Plasma Biomarkers In Alzheimer Disease," Nat. Rev. Neurol. 6, 131-144 (2010) (非特許文献1)およびWeiner et al. "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A Review Of Papers Published Since Its Inception," Alzheimers. Dement. 9, e111-e194 (2013) (非特許文献2))。

20

【0006】

ここ数年で、脳脊髄液中のホスホ-タウタンパク質の抗体検出は、アルツハイマー病の診断にある程度の有用性があることが示されており(Blennow, K. et al. "Cerebrospinal Fluid And Plasma Biomarkers In Alzheimer Disease," Nat. Rev. Neurol. 6, 131-144 (2010) (非特許文献1); Lewis, J. et al. "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein," Nat. Genet. 25, 402-405 (非特許文献3); Weiner, M.W. et al. (2013) "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A Review Of Papers Published Since Its Inception," Alzheimers. Dement. 9: e111-e194 (非特許文献2))、この分野におけるさらなる進展が見込まれることが示唆されている(Congdon, E.E. (2014) "Harnessing The Immune System For Treatment And Detection Of Tau Pathology," J. Alzheimers Dis. 40:S113-S121 (非特許文献4)を参照)。しかし、他のタウ異常症におけるCSFタウレベルは通常、対照と比較して変化しておらず(Theunis, C. et al. "Efficacy And Safety Of A Liposome-Based Vaccine Against Protein Tau, Assessed In Tau.P301L Mice That Model Tauopathy," PLoS. One. 8, e72301 (2013) (非特許文献5); Hales, CM. et al. (2013) "From Frontotemporal Lobar Degeneration Pathology To Frontotemporal Lobar Degeneration Biomarkers," Int. Rev. Psychiatry 25:210-220 (非特許文献6))、イメージング色素によってすべてのタウ異常症で病的タウが検出可能なわけでもない(Fodero-Tavoletti, M. T. et al. (2014) "Assessing THK523 Selectivity For Tau Deposits In Alzheimer's Disease And Non-Alzheimer's Disease Tauopathies," Alzheimers. Res. Ther. 6:11 (非特許文献7))。タウ凝集物の領域パターンは種々のタウ異常症ごとに異

30

40

50

なることから、これらのタウ病変をアミロイド- (A) と併せてイメージングすることにより、正確な診断につながる可能性が高くなる。その上、アルツハイマー病を除いてこれらはすべて、A 沈着が存在しないことによって一部が定義されている。 -シートとよく結合する化合物を用いたA 斑のインビボでのイメージングは既に臨床で用いられている (Mason, N.S. et al. (2013) "Positron Emission Tomography Radioligands For In Vivo Imaging Of ABeta Plaques," J. Labelled Comp. Radiopharm. 56:89-95 (非特許文献8))。色素を基にしたいくつかのそのようなタウ結合リガンドが前臨床試験において最近同定されており、それらのいくつかは評価が進行中である (Fodero-Tavoletti, M. T. et al. (2014) "Assessing THK523 Selectivity For Tau Deposits In Alzheimer's Disease And Non-Alzheimer's Disease Tauopathies," Alzheimers. Res. Ther. 6:11 (非特許文献7) ; Fodero-Tavoletti, M. T. et al. (2011) "18F-THK523: A Novel In Vivo Tau Imaging Ligand For Alzheimer's Disease," Brain 134:1089-1100 (非特許文献9) ; Zhang, W. et al. (2012) "A Highly Selective And Specific PET Tracer For Imaging Of Tau Pathologies," J. Alzheimers. Dis. 31:601-612 (非特許文献10) ; Chien, D. T. et al. (2013) "Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [F-18J-T807," J. Alzheimers. Dis. 34:457-468 (非特許文献11) ; Maruyama, M.H. et al. (2013) "Imaging Of Tau Pathology In A Tauopathy Mouse Model And In Alzheimer Patients Compared To Normal Controls," Neuron 79:1094-1108 (非特許文献12) ; Okamura, N. et al. (2005) "Quinoline And Benzimidazole Derivatives: Candidate Probes For In Vivo Imaging Of Tau Pathology In Alzheimer's Disease," J. Neurosci. 25:10857-10862 (非特許文献13) ; Harada, R., et al. (2013) "Comparison Of The Binding Characteristics Of [18F]THK-523 And Other Amyloid Imaging Tracers To Alzheimer's Disease Pathology," Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 40:125-132 (非特許文献14) ; Ono, M. et al. (2011) "Rhodanine And Thiohydantoin Derivatives For Detecting Tau Pathology In Alzheimer's Brains," ACS Chem. Neurosci. 2:269-275 (非特許文献15) ; Xia, C.F. et al. (2013) "[18F]T807, A Novel Tau Positron Emission Tomography Imaging Agent For Alzheimer's Disease," Alzheimers. Dement. 9:666-676 (非特許文献16) ; Chien, D.T. (2014) "Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [F18]-T808," J. Alzheimers. Dis. 38:171-184 (非特許文献17) ; Villemagne, V.L. et al. (2014) "In Vivo Evaluation Of A Novel Tau Imaging Tracer For Alzheimer's Disease," Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 41:816-826 (非特許文献18) ; Okamura, N. et al. (2014) "Non-Invasive Assessment Of Alzheimer's Disease Neurofibrillary Pathology Using 18F-THK5105 PET," Brain 137:1762-1771 (非特許文献19))。タウを基にしたリガンドについて期待され、見込まれているのは、それらがA リガンドよりも神経変性の状況および進行をモニターする上で優れるということである。抗体を基にしたプローブでは、タウ病変の検出に関してより高い特異性が得られる可能性が高い。特に、タウと結合する比較的小型の抗体断片は、アルツハイマー病または他のタウ異常症の患者におけるタウ病変を検出するためのインビボでのイメージング用のリガンドとして魅力がある。

【0007】

癌の分野では、治療用抗体はイメージング剤として慣行的に共同開発されてきており、いくつかのそのような抗体およびFab分子は腫瘍イメージングを目的としてFDAに承認されている (Kaur, S. et al. "Recent Trends In Antibody-Based Oncologic Imaging," Cancer Lett. 315, 97-111 (2012) (非特許文献20))。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Blennow et al. "Cerebrospinal Fluid And Plasma Biomarkers In Alzheimer Disease," Nat. Rev. Neurol. 6, 131-144 (2010)

【非特許文献2】Weiner et al. "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative:

A Review Of Papers Published Since Its Inception," *Alzheimers. Dement.* 9, e111-e194 (2013)

【非特許文献 3】Lewis, J. et al. "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein," *Nat. Genet.* 25, 402-405

【非特許文献 4】Congdon, E.E. (2014) "Harnessing The Immune System For Treatment And Detection Of Tau Pathology," *J. Alzheimers. Dis.* 40:S113-S121

【非特許文献 5】Theunis, C. et al. "Efficacy And Safety Of A Liposome-Based Vaccine Against Protein Tau, Assessed In Tau.P301L Mice That Model Tauopathy," *PLoS. One.* 8, e72301 (2013)

【非特許文献 6】Hales, CM. et al. (2013) "From Frontotemporal Lobar Degeneration Pathology To Frontotemporal Lobar Degeneration Biomarkers," *Int. Rev. Psychiatry* 25:210-220

【非特許文献 7】Fodero-Tavoletti, M. T. et al. (2014) "Assessing THK523 Selectivity For Tau Deposits In Alzheimer's Disease And Non-Alzheimer's Disease Tauopathies," *Alzheimers. Res. Ther.* 6:11

【非特許文献 8】Mason, N.S. et al. (2013) "Positron Emission Tomography Radioligands For In Vivo Imaging Of ABeta Plaques," *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 56:89-95

【非特許文献 9】Fodero-Tavoletti, M. T. et al. (2011) "¹⁸F-THK523: A Novel In Vivo Tau Imaging Ligand For Alzheimer's Disease," *Brain* 134:1089-1100

【非特許文献 10】Zhang, W. et al. (2012) "A Highly Selective And Specific PET Tracer For Imaging Of Tau Pathologies," *J. Alzheimers. Dis.* 31:601-612

【非特許文献 11】Chien, D.T. et al. (2013) "Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [F-18J-T807," *J. Alzheimers. Dis.* 34:457-468

【非特許文献 12】Maruyama, M.H. et al. (2013) "Imaging Of Tau Pathology In A Tauopathy Mouse Model And In Alzheimer Patients Compared To Normal Controls," *Neuron* 79:1094-1108

【非特許文献 13】Okamura, N. et al. (2005) "Quinoline And Benzimidazole Derivatives: Candidate Probes For In Vivo Imaging Of Tau Pathology In Alzheimer's Disease," *J. Neurosci.* 25:10857-10862

【非特許文献 14】Harada, R., et al. (2013) "Comparison Of The Binding Characteristics Of [¹⁸F]THK-523 And Other Amyloid Imaging Tracers To Alzheimer's Disease Pathology," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 40:125-132

【非特許文献 15】Ono, M. et al. (2011) "Rhodanine And Thiohydantoin Derivatives For Detecting Tau Pathology In Alzheimer's Brains," *ACS Chem. Neurosci.* 2:269-275

【非特許文献 16】Xia, C.F. et al. (2013) "[¹⁸F]T807, A Novel Tau Positron Emission Tomography Imaging Agent For Alzheimer's Disease," *Alzheimers. Dement.* 9:666-676

【非特許文献 17】Chien, D.T. (2014) "Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [F18]-T808," *J. Alzheimers. Dis.* 38:171-184

【非特許文献 18】Villemagne, V.L. et al. (2014) "In Vivo Evaluation Of A Novel Tau Imaging Tracer For Alzheimer's Disease," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 41:816-826

【非特許文献 19】Okamura, N. et al. (2014) "Non-Invasive Assessment Of Alzheimer's Disease Neurofibrillary Pathology Using ¹⁸F-THK5105 PET," *Brain* 137:1762-1771

【非特許文献 20】Kaur, S. et al. "Recent Trends In Antibody-Based Oncologic Imaging," *Cancer Lett.* 315, 97-111 (2012)

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【0009】

本発明者らは、タウ病変を検出する上で優れた特異性を与える抗体由来分子、特にタウ凝集物のインビボでのイメージング用に魅力的である、比較的小型の単鎖抗体可変断片（scFv分子）を見いだした。これらの抗体由来イメージングリガンドは、タウ病理の疾患の進行、タウターゲティング療法の有効性のモニタリングにおいて、およびA 陰性のタウ異常症を同定するために、有用である可能性があると思定される。加えて、そのような抗体由来分子は、アルツハイマー病および他のタウ異常症の予防、治療、および管理における治療薬として有用性がある。

【0010】

本発明は、タウの^{P}Ser404エピトープと免疫特異的かつ選択的に結合しうる、抗体を基にした分子（単ドメイン抗体断片、scFv分子、抗体、抗体断片、ダイアボディ、およびそれらのエピトープ結合ドメインを含む）に関する。そのような抗体を基にした分子は、特にアルツハイマー病または他のタウ異常症の診断および/または治療と共に、病的タウタンパク質配座異性体が生物試料中に存在する場合にそれを検出するのに有用であり、したがってアルツハイマー病および他のタウ病理に関する診断薬となる。本発明の抗体を基にした分子（特にscFv分子）は、アルツハイマー病および関連するタウ異常症に関する診断マーカーとして、ならびにそのような病状の治療のための薬学的組成物として、特に有用性がある。

【0011】

詳細には、本発明は、タウの^{P}Ser404エピトープと免疫特異的に結合しうる抗体を基にした分子であって、該エピトープが、タウ386~408（^{P}Ser396/^{P}Ser404）の配列（SEQ ID NO:8）：

TDHGAEIVYK^{P}SPVVS^{P}SGDT^{P}SPRHL

（配列中、その位置11および19の残基がホスホセリンである）を有するペプチド上に存在し、該抗体を基にした分子がさらに、非リン酸化タウに対してよりも高い選択性でリン酸化タウと結合しうる、抗体を基にした分子に関する。

【0012】

本発明は特に、抗体であるか、または抗体のエピトープ結合性断片を含む、上記の抗体を基にした分子の態様に関する。

【0013】

本発明は特に、ヒト化抗体であるか、またはヒト化抗体のエピトープ結合性断片を含む、上記の抗体を基にした分子の態様に関する。

【0014】

本発明は特に、抗体の^{P}Ser404エピトープ結合性断片を含み、かつ、単離されたCDR、単ドメイン抗体断片、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、scFv、またはダイアボディである、上記の抗体を基にした分子の態様に関する。

【0015】

本発明は特に、抗体またはそのエピトープ結合性断片であり、かつ、レシピエントへ末梢注射されると、タウ凝集物と実質的に共局在する、上記の抗体を基にした分子の態様に関する。

【0016】

本発明は特に、エピトープ結合性断片が、以下：

- (a) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) SEQ ID NO:12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および/または
- (f) SEQ ID NO:16のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

のいずれか1つ、いずれか2つ、いずれか3つ、いずれか4つ、いずれか5つ、または6つすべ

10

20

30

40

50

てを含む、上記の抗体を基にした分子の態様に関する。

【0017】

本発明は特に、エピトープ結合性断片が、SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を有する可変軽鎖ドメインおよび/またはSEQ ID NO:13のアミノ酸配列を有する可変重鎖ドメインを含む、上記の抗体を基にした分子の態様に関する。

【0018】

本発明は特に、SEQ ID NO:17のアミノ酸配列を含むscFvである、上記の抗体を基にした分子の態様に関する。

【0019】

本発明は特に、抗体4E6G7である、上記の抗体を基にした分子の態様に関する。

10

【0020】

本発明は特に、分子が検出可能に標識されており、特に、検出可能な標識が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識、または酵素標識である、上記の抗体を基にした分子のいずれかの態様に関する。

【0021】

本発明は特に、レシピエント対象の脳、脳脊髄液、血液、血清、または血漿におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、上記の抗体を基にした分子のいずれかの使用に関する。

【0022】

本発明は特に、検出または測定が、リン酸化タウタンパク質と結合した抗体を基にした分子のインビボまたはエクシボでのイメージングを含む、上記の抗体を基にした分子のいずれかのそのような使用に関する。

20

【0023】

本発明は特に、検出または測定が、対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するためである、上記の抗体を基にした分子のいずれかのそのような使用に関する。

【0024】

本発明はさらに、対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症の治療のためのインビボ医薬であって、アルツハイマー病または別のタウ異常症を治療するのに有効な量の上記の抗体を基にした分子のいずれかと、1つまたは複数の担体、希釈剤、および/または安定化剤とを含む医薬を提供する。

30

【0025】

本発明はさらに、対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症の治療のための、そのようなビボ医薬の使用を提供する。

【0026】

本発明は特に、対象がヒトである、そのような使用のいずれかに関する。

【0027】

本発明はさらに、対象の脳におけるリン酸化タウタンパク質の存在もしくは量を検出もしくは測定するための、または対象におけるアルツハイマー病もしくは別のタウ異常症を診断するためのキットであって、上記の抗体を基にした分子のいずれかを含むキットを提供する。

40

【0028】

本発明は特に、タウ異常症が、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖したパーキンソニズム (FTDP-17)、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、神経原線維変化型認知症 (tangle only dementia)、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症パーキンソニズム・認知症複合、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハラフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、ニーマン・ピック病C型、プリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維変化を伴う非グアナミアン (non-guanamian) 運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソニズム、急性外傷性脳損傷、および慢性

50

外傷性脳症を含む群から選択される、上記の使用、医薬、またはキットのいずれかに関する。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】パネルA~Bは、抗体4E6G7（パネルA；* p = 0.05）およびIgG対照（パネルB）の、LDH放出により決定される、10 µg/mL PHFによって媒介される細胞毒性に対する効果を示す。

【図2】パネルA~Bは、抗体4E6G7（パネルA；* p = 0.05）およびIgG対照（パネルB）の、LDH放出により決定される、1 µg/mL PHFによって媒介される細胞毒性に対する効果を示す。

【図3】パネルA~Cは、抗体4E6G7（パネルA；10 µg/mL）の、10 µg/mL PHFおよび1 µg/mL L非特異的マウスIgG（パネルB）で処理した細胞に比してNeuNシグナルの喪失を阻止する能力を示す、免疫プロットを示す。パネルCは、PHF単独、またはPHFと抗体4E6G7との組み合わせで処理した試料におけるシグナルの定量を示す。

【図4】パネルA~Cは、PHFが1 µg/mLでNeuNの喪失を誘導すること、およびこの効果を抗体4E6G7で阻止できることを示す。免疫プロットを、1 µg/mL PHF単独、または、1 µg/mL PHFおよび1 µg/mL抗体4E6G7（パネルA）もしくは1 µg/mLの対照IgG（パネルB）のいずれかで処理した試料について示す。パネルCは、PHF単独、またはPHFと抗体4E6G7との組み合わせで処理した試料におけるシグナルの定量を示す。

【図5】パネルA~Dは、抗体4E6G7が、10 µg/mL PHF物質に対する曝露により引き起こされた細胞内タウの増加を阻止できることを示す。パネルAは、汎タウ抗体をプローブとした、PHFまたは抗体4E6G7と組み合わせたPHFとインキュベートした試料の免疫プロットを示す。パネルBは、対照マウスIgGおよびPHFとインキュベートした細胞由来の試料の免疫プロットを示す。パネルCは、PHFおよび抗体4E6G7とインキュベートした試料における全タウレベルの定量を示す。パネルDは、NeuNレベルに対して正規化した結果を示す。

【図6】パネルA~Dは、1 mg/mLのPHFが細胞内タウの増加を促進できること、および抗体4E6G7がこれらの効果を阻止できることを示す。パネルAおよびパネルB：汎タウポリクローナル抗体をプローブとした、PHF、PHF + 抗体、またはPHF + IgG対照に対して曝露した試料についての免疫プロット。パネルC：全タウレベルの定量。パネルD：NeuNに対して正規化した細胞内タウ産生。

【図7】パネルA~Dは、抗体4E6G7の、10 µg/mLのPHFに対する曝露により引き起こされたリン酸化タウの増加を阻止する能力を示す。パネルA~Bは、^{P}Ser199ホスホ-タウを認識するポリクローナル抗体をプローブとした、PHF単独に対して、または抗体4E6G7（パネルA）もしくは対照IgG（パネルB）と組み合わせたPHFに対して曝露した細胞の免疫プロットを示す。パネルCは、無処理の細胞に比して^{P}Ser199ホスホ-タウレベルを定量する。パネルDは、結果をNeuNレベルに対して正規化する。

【図8】パネルA~Dは、より低いレベルのPHF（1 µg/mL）もまた、リン酸化タウレベルの増大を誘導できること、およびそのような増大を抗体4E6G7により阻止できることを示す。パネルA~Bは、^{P}Ser199ホスホ-タウを認識するポリクローナル抗体をプローブとした、PHF単独に対して、または抗体4E6G7（パネルA）もしくは対照IgG（パネルB）と組み合わせたPHFに対して曝露した細胞の免疫プロットを示す。パネルCは、無処理の細胞に比して^{P}Ser199ホスホ-タウレベルを定量する。パネルDは、結果をNeuNレベルに対して正規化する。

【図9】パネルA~Gは、抗体4E6G7が、細胞集団の間での病的タウの伝播を低下できることを示す。図9、パネルAは、マイクロ流体チャンパーの概略図を示し、試料採取された細胞を受け取るリザーバーを示す。図9、パネルBは、パネルAにおける中央の四角の拡大した概略図であり、2つのリザーバーを接続するマイクログループを示す。図9、パネルCは、マイクログループを通して成長する軸索（矢印を付けている）を示す共焦点画像である。細胞を、汎タウ抗体で染色している。図9、パネルD~Fは、JNPL3細胞を含有するマイクロ流体装置のチャンパーに添加した、蛍光標識されたPHF物質（1 µg/mL）を示す。図9、パ

10

20

30

40

50

ネルDは、タウタンパク質の位置を示す。図9、パネルEは、PHFの位置を示す。図9、パネルFは、タウタンパク質の位置とPHFの位置の両方を示す、マージした画像である。

【図10】パネルA~Lは、PHFおよび抗体結合に対する投薬レジメンの効果を示す。パネルA~Dは、ニューロンが容易に培地からPHF-タウを取り込み、PHF陽性の点が、細胞体および神経突起において見られうることを示す。パネルE~Hは、PHFおよび抗体結合に対するPHF抗体の投薬レジメンの効果を示す。パネルI~Lは、PHFおよび抗体結合に対するPHF+抗体の投薬レジメンの効果を示す。一緒に添加した場合、抗体4E6G7とPHF物質は、大きな細胞外凝集物を形成した。

【図11】パネルA~Bは、抗体4E6G7の作用機序が、投薬レジメンによって影響を受けることを示す。10 μ g/mL PHFをJNPL3ニューロンに添加し、抗体4E6G7を、同時または24時間後のいずれかに添加した。パネルAは、PHF+抗体の投薬レジメンを用いて処理した細胞について、タウ/NeuNの比を収集日の関数として示す。パネルBは、PHF抗体の投薬レジメンを用いて処理した細胞について、タウ/NeuNの比を収集日の関数として示す。

【図12】パネルA~Bは、抗体4E6G7で免疫処置したhTauマウスが、クローズフィールド対称性迷路(CFSM)テストにおいて有意な改善を呈し($p < 0.01$) (図12、パネルA)、一方、対照マウスは呈さなかった(図12、パネルB)ことを示す。

【図13】パネルA~Eは、抗体4E6G7で免疫処置したhTau/PS1マウスが、放射状アーム迷路(パネルA)、クローズフィールド対称性迷路(パネルB(1日目)、パネルC(2日目)、およびパネルD(3日目))、ならびに物体認識テスト(パネルE)において対照マウスよりも実質的に良好に動作したことを示す。

【図14】パネルA~Cは、対照マウス(図14、パネルA)および抗体4E6G7で免疫処置したhTau/PS1マウス(図14、パネルB)について、PHF-1染色した脳切片を示す。図14、パネルCは、対照マウスおよび免疫処置したマウスの脳細胞のPHF-1染色の定量分析を示す。

【図15】パネルA~Bは、抗体4E6G7で免疫処置したマウス(パネルA)が、それらの免疫処置前の動作と比較して、クローズフィールド対称性(CFS)迷路において有意な改善を呈し(48%少ないエラー、 $p < 0.01$)、一方、対照IgGで処置したマウスは改善しなかったことを示す。性別により分けた場合には、抗体4E6G7で処置した雄および雌は両方とも、それらの処置前の動作を上回る有意な改善を示した(それぞれ、52%および44%少ないエラー、 $p < 0.01$ および $p < 0.05$ 、平均値およびSEMについては本文を参照されたい)。反復測定、二元配置分散分析により、処置の有意な効果が判明した($p = 0.0018$)が、性別の有意な効果は判明せず($p = 0.5145$)、見られた結果は、性差に起因するものではないことが示された。対照的に、IgGで処置した動物は、すべての動物を一緒に考えた場合、または性別により分けた場合に、改善を示さなかった。パネルBは、抗体6B2G12で免疫処置したマウスが、同じテストにおいて改善しなかったことを示す。* * : $p < 0.01$ 。

【図16】パネルA~Fは、抗体4E6G7および抗体6B2G12が、ヒト由来のPHF物質に対するそれらの結合において異なることを示す。パネルA:さまざまなタウ種を、ニトロセルロース上にスポットし、一次抗体として抗体4E6G7または抗体6B2G12のいずれかとインキュベートした。抗体4E6G7は、可溶化PHFとより良好に結合したが、抗体6B2G12は、サルコシル不溶性タウ画分とより強く反応した。抗体は両方とも、サルコシル可溶性タウタンパク質と限定的な反応性を有していた。パネルB:同じ3種のタウ画分を、対照脳から調製して、ニトロセルロース上にスポットした。抗体はいずれも、サルコシル可溶性画分に対する結合を示さず、可溶化PHFおよびサルコシル不溶性タウに対する限定的な結合のみを示した。(抗体4E6G7および抗体6B2G12で処理した対照脳についてのすべての3種の試料の画像は、同じストリップから取り、明瞭にするために順序を変えた。)パネルC:プレートを、AD脳および対照脳由来の可溶化PHFでコーティングした。抗体6B2G12は、1/200~1/125の希釈で、対照よりも、およびADまたは対照のいずれかに対する抗体4E6G7よりも有意に強い結合を、ADに対して示した($p < 0.0001 \sim 0.05$)。抗体4E6G7は、AD対対照に対して有意により強い結合を示さなかった。パネルD:アッセイプレートを、AD脳および対照脳由来のサルコシル可溶性タウでコーティングして、抗体4E6G7および抗体6B2G12の連続希釈液を添加した。1/200希釈で、抗体6B2G12は、対照よりもADに対して有意に強い結合を示し、

10

20

30

40

50

およびいずれかの画分に対する抗体4E6G7よりも強い結合を示した（それぞれ、 $p < 0.01$ 、 0.05 、および 0.05 ）。パネルE：アッセイプレートに、サルコシル不溶性タウでコーティングした。抗体6B2G12は、 $1/200 \sim 1/125k$ の希釈から、対照に比してADに対して、およびADまたは対照のいずれかに対する抗体4E6G7よりも有意に強い結合を示した（ $p < 0.0001 \sim 0.05$ ）。前のように、ADと対照試料との間の有意な違いは、抗体4E6G7で見られなかった。パネルF：抗体と増大する濃度の可溶性PHF物質（ $0.01 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ ）とをプレインキュベートすることにより、競合ELISAアッセイを行った。抗体6B2G12の結合は、いずれのPHF濃度でも阻害されなかった。しかし、抗体4E6G7の結合は、用量依存様式で阻害され、 71 nM の IC_{50} であった。結果のすべてにより、抗体4E6G7は、可溶性タウ種と優先的に結合するが、抗体6B2G12は、不溶性の高度に凝集したタウと主として結合することが示される。各グラフ上のすべてのカラムまたは点は、SEMエラーバーを有するが、それらのいくつかは小さすぎて見えない。

10

【発明を実施するための形態】

【0030】

発明の詳細な説明

本発明は、タウの^{P}Ser404エピトープと免疫特異的かつ選択的に結合しうる、抗体を基にした分子（単ドメイン抗体断片、scFv分子、抗体、抗体断片、ダイアボディ、およびそれらのエピトープ結合ドメインを含む）に関する。そのような抗体を基にした分子は、特にアルツハイマー病または他のタウ異常症の診断および/または治療と共に、病的タウタンパク質配座異性体が生物試料中に存在する場合にそれを検出するのに有用であり、それ故にアルツハイマー病および他のタウ病理に関する診断薬となる。本発明の抗体を基にした分子（特にscFv分子）は、タウ異常症（特にアルツハイマー病および関連するタウ異常症）に関する診断マーカーとして、ならびにそのような病状の治療のための薬学的組成物としての特別の有用性がある。

20

【0031】

「タウ異常症」という用語は、本明細書で用いる場合、脳内部での微小管タンパク質タウの病的凝集を伴うあらゆる神経変性疾患を範囲に含む。したがって、家族性および孤発性アルツハイマー病の両方に加えて、本発明のタウ異常症には、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖したパーキンソニズム（FTDP-17）、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、神経原線維変化型認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症パーキンソニズム・認知症複合、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハラフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、ニーマン・ピック病C型、プリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維変化を伴う非グアナミン運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソニズム、急性外傷性脳損傷および慢性外傷性脳症が非限定的に含まれる。

30

【0032】

本発明の抗体を基にした分子は、ADまたは他のタウ異常症の患者におけるタウ病変を検出することに関して、シート色素よりも高い特異性をもたらす。特に、タウと結合する比較的小型の抗体断片は、インビボでのイメージング用のリガンドとして魅力的である。抗体と比較してそれらのサイズが小さいことは、タウ凝集物へのより優れた到達性につながる。もう1つの利点は、より長い半減期を有する非改変抗体に比しての、循環血中からのそれらの比較的迅速な排出である。癌の分野では、治療用抗体はイメージング剤として慣行的に共同開発されてきており、より優れた薬物動態学的特性を備えるいくつかのそのような抗体およびFab'またはより小型のダイアボディおよびscFv分子は、腫瘍イメージング剤として承認されているかまたはそれが提唱されている（Kaur, S. et al. (2012) "Recent Trends In Antibody-Based Oncologic Imaging," Cancer Lett. 315:97-111; Olafsen, T. et al. (2010) "Antibody Vectors For Imaging," Semin. Nucl. Med. 40:167-181）。

40

50

【 0 0 3 3 】

1. タウおよび本発明の好ましい免疫原性タウペプチド

本明細書で用いる場合、「タウ」という用語はタウタンパク質と同義であり、タウタンパク質アイソフォームのいずれか（例えばUniProtにP10636、1~9として特定されている）を指す。タウは、細胞周期の間にキナーゼ酵素の宿主によって動的にリン酸化および脱リン酸化される可溶性微小管結合タンパク質である。微小管を安定化するタウの能力は、そのリン酸化の程度に依存する。その脱リン酸化形態では、このタンパク質はチューブリンと相互作用し、微小管を安定化してチューブリンの微小管（これは細胞の細胞骨格を形成し、有糸分裂中に真核生物染色体を引き離す紡錘体の主要な構成要素である）への集合を促進することができる。そのリン酸化形態では、タウは微小管から解離することができ、それによって有糸分裂が起こることを可能にする。タウのリン酸化はそれ故に、ニューロン内での直接的な微小管の会合-解離スイッチとして作用する（Pedersen, J.T. et al. (2015) "Tau Immunotherapy For Alzheimer's Disease," Trends Mol. Med. 2015 Apr 3 . pii: S1471-4914(15)00058-1 ; pages 1-9、これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。

10

【 0 0 3 4 】

本明細書で提供するタウ残基のアミノ酸番号付けは、以下に示すSEQ ID NO:1を基準にして与えられ、メチオニンがその第1アミノ酸残基である。

SEQ ID NO:1:

MAEPRQEFEEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
 PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG
 TTAAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK
 IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPK SGDRSGYSSP
 GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM
 PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
 PGGGSVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV
 QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS
 GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

20

【 0 0 3 5 】

「ホスホ-タウ」または「P-タウ」という用語は、1つまたは複数のセリン残基またはトレオニン残基でリン酸化されているタウタンパク質またはペプチドのことを指す。本明細書で用いる場合、「^{P}Ser」または「^{P}S」という表記は、アミノ酸残基ホスホセリンを意味する。例えば、「^{P}Ser396/^{P}Ser404」という表記は、SEQ ID NO:1の残基396および404に対応する残基（上記に下線を付して示す）がホスホセリン残基である、SEQ ID NO:1のポリペプチド部分のことを指す。対照的に、「Ser396/Ser404」という表記は、SEQ ID NO:1の残基396および404に対応する残基が両方ともセリン残基である、SEQ ID NO:1のポリペプチド部分のことを指す。したがって、例えば、「^{P}Ser396/Ser404」という表記は、SEQ ID NO:1の残基396に対応する残基がホスホセリン残基であり、SEQ ID NO:1の残基404に対応する残基がセリンである、SEQ ID NO:1のポリペプチド部分のことを指す。

30

【 0 0 3 6 】

タウの過剰リン酸化は、本明細書中で「タウ凝集物」と称される、対らせん状細線維および直鎖状細線維の不溶性自己集合性「神経原線維変化（tangle）」の形成をもたらす。そのようなタウ凝集物は、細胞内（例えば、ニューロン内）にあることもあるが、細胞の外側に形成されることもある。タウ凝集物の存在は、タウが微小管を安定化する能力を損なわせ、それ故に微小管の解体、樹状突起棘の崩壊、および軸索の変性を招く。正常タウは、平均で2個のリン酸化部位を含有し；過剰リン酸化されたタウ細線維では、7~8個のリン酸化部位が平均である。過剰リン酸化タウは、アルツハイマー病および他のタウ異常症の主要な顕著な特徴である細胞内神経原線維変化の主要な構成要素である。本明細書で用いる場合、「病的タウ」という用語は、アルツハイマー病および他のタウ異常症の特徴である過剰リン酸化タウのことを指す。

40

50

【0037】

11. 本発明における好適な、抗体を基にした分子

本発明の「抗体を基にした分子」は、タウの^(P)Ser404エピトープと免疫特異的かつ選択的に結合しうる抗体、ならびにそのような結合免疫特異性および選択性を呈するそれらの断片および誘導体を含む。本明細書で用いる場合、分子は、それがそのような親分子の実際の断片化を通して得られる場合に（例えば、Fabまたは(Fab)₂断片）、またはそれがそのような親分子のアミノ酸配列の一部を含むアミノ酸配列を含む場合に、別の分子の「断片」であるという。本明細書で用いる場合、分子は、それがそのような親分子もしくはその一部分の実際の化学修飾を通して得られる場合に、またはそれがそのような親分子もしくはその関連する一部分のアミノ酸配列に実質的に類似しているアミノ酸配列を含む場合に（例えば、そのような親分子もしくはそのようなその関連する一部分から30%未満、20%未満、10%未満、もしくは5%未満が、または、そのような親分子もしくはその関連する一部分から10アミノ酸残基、または10、9、8、7、6、5、4、3、もしくは2アミノ酸残基より少しが異なっている）、別の分子（またはその関連する一部分）の「誘導体」であるという。

10

【0038】

本明細書で用いる場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリン、ならびにそのエピトープ結合性断片を有する分子のことを指す。本明細書で用いる場合、「断片」、「領域」、および「ドメイン」という用語は、当該用語が用いられる文脈がそうでないことを示さない限り、概して同義であることが意図される。天然に存在する抗体は、典型的には、少なくとも2つの重(H)鎖および少なくとも2つの軽(L)鎖で通常は構成される四量体を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書では「VH領域」と略記される）、および、通常は3つのドメイン(CH1、CH2およびCH3ドメイン)で構成される重鎖定常領域で構成される。重鎖は、IgG(IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4サブタイプ)、IgA(IgA1およびIgA2サブタイプ)、IgMならびにIgEを含む、いずれのアイソタイプのものであってもよい。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書では「VL領域」と略記される）および軽鎖定常領域(CL)で構成される。軽鎖は鎖および鎖を含む。重鎖可変領域および軽鎖可変領域は典型的には抗原認識を担当し、一方、重鎖定常領域および軽鎖定常領域は、免疫系のさまざまな細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第一成分(C1q)を含む、宿主組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介することができる。VH領域およびVL領域は「相補性決定領域」または「CDR」と名付けられた超可変領域にさらに細分することができ、それらの間には「フレームワーク領域」(FR)と名付けられたより保存的な配列の領域が散在している。各VHおよびVL領域は、アミノ末端からカルボキシ末端の向きに以下の順に並んだ3つのCDRドメインおよび4つのFRドメインで構成される：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。特に関連性が高いのは、天然に存在しうるものとは異なる物理的環境に存在させるために「単離された」、または天然に存在する抗体とはアミノ酸配列が異なるように改変された、抗体、およびそれらのエピトープ結合性断片である。

20

30

【0039】

エピトープ結合能を呈する抗体の断片(Fab断片および(Fab)₂断片を含む)は、例えば、抗体のプロテアーゼ切断によって得ることができる。より好ましくは、そのような断片は、組換え手法を用いて形成される単一ドメイン抗体断片、scFv分子、および抗体のエピトープ結合ドメインであると考えられる。例えば、Fv断片の2つのドメインであるVL領域およびVH領域は別々の遺伝子によってコードされるが、そのような遺伝子配列またはそれらをコードするcDNAを、組換え手法を用いて、それらを、VL領域およびVH領域が会合して一価エピトープ結合性分子を形成した単一のタンパク質鎖として作り上げることができる柔軟なリンカー（典型的には約10個、12個、15個またはそれを上回るアミノ酸残基のもの）によって連結させることができる（単鎖Fv(scFv)分子として知られる；例えば、Bird et al., (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins" Science 242:423-426；およびHuston et al. (1988) "Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Re

40

50

covery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In Escherichia coli” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883を参照)。または、単一のポリペプチド鎖のVL領域およびVH領域が一つに会合することを可能にするには短すぎる柔軟なリンカー（例えば、約9残基未満）を使用することによって、二重特異性抗体、ダイアボディまたは類似の分子を形成させることもできる（そのような2つのポリペプチド鎖が一つに会合して二価のエピトープ結合性分子を形成する）。（例えば、ダイアボディの説明については、Holliger, P. et al. (1993) “ ‘Diabodies’ : Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90(14), 6444-8 (1993)を参照）。単一ドメイン抗体断片は、1つのみの可変ドメイン（例えば、VLまたはVH）を保有する。本発明の範囲に含まれるエピトープ結合性断片の例には、(i) VL、VN、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片、またはWO2007059782号に記載されている一価抗体である、Fab'断片もしくはFab断片；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片である、F(ab')₂断片；(iii) VHドメインおよびCH1ドメインから本質的になるFd断片；(iv) VLドメインおよびVHドメインから本質的になるFv断片、(v) VHドメインから本質的になり、ドメイン抗体とも呼ばれる（Holt, L.J. et al.; (2003) “Domain Antibodies: Proteins For Therapy,” Trends Biotechnol. 21(11):484-490）、dAb断片（Ward, E.S. et al. “Binding Activities Of A Repertoire Of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From Escherichia coli,” Nature 341, 544-546 (1989)）；(vi) キヤメリド（camelid）またはナノボディ（Revs, H. et al. (2005) “Nanobodies As Novel Agents For Cancer Therapy,” Expert Opin. Biol. Ther. 5(1):111-124）、ならびに(vii) 単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別々の遺伝子によってコードされるが、それらを、VL領域およびVH領域が対合して一価分子（単鎖抗体または単鎖Fv（scFv））として知られる。例えば、Bird et al., (1988) “Single-Chain Antigen-Binding Proteins,” Science 242, 423-426およびHuston et al., (1988) “Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In Escherichia coli,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883を参照）を形成する1つのタンパク質鎖として作り出されることを可能にする合成リンカーによって、組換え方法を用いて連結されてもよい。本発明の文脈における、これらおよび他の有用な抗体断片については本明細書においてさらに考察する。抗体という用語は、別様に定めのない限り、抗体様ポリペプチド、例えばキメラ抗体およびヒト化抗体など、ならびに任意の公知の手法、例えば酵素切断、ペプチド合成および組換え手法によってもたらされる、抗原と特異的に結合する能力を保持している抗体断片（抗原結合断片）も含むことも理解されるべきである。作製される抗体は任意のアイソタイプを有してよい。本明細書で用いる場合、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM）のことを指す。アイソタイプの選択は、典型的には、ADCC誘導などの所望のエフェクター機能によって導かれると考えられる。例示的なアイソタイプには、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4がある。ヒト軽鎖定常領域である または のいずれかを用いることができる。所望であれば、本発明の抗タウ抗体のクラスを公知の方法によってスイッチすることができる。例えば、最初にIgMであった本発明の抗体を、本発明のIgG抗体にクラススイッチすることができる。さらに、クラススイッチ手法を用いて、あるIgGサブクラスを別のIgGサブクラスに、例えばIgG1からIgG2に変換することもできる。したがって、本発明の抗体のエフェクター機能は、さまざまな治療用途に合わせて、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体へのアイソタイプスイッチによって変更することができる。1つの態様において、本発明の抗体は、IgG1抗体、例えばIgG1、である。

【0040】

そのような抗体断片は、当業者に周知の従来手法を用いて得ることができる。例えば、F(ab')₂断片は、抗体をペプシンで処理することによって作製することができる。その

10

20

30

40

50

結果得られたF(ab')₂断片を、ジスルフィド架橋を還元するように処理して、Fab'断片を作製することができる。Fab断片は、IgG抗体をパパインで処理することによって得ることができる；Fab'断片は、IgG抗体のペプシン消化によって得ることができる。F(ab')断片はまた、チオエーテル結合またはジスルフィド結合を介して下記のFab'を結合することによって作製することもできる。Fab'断片は、F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することによって得られる抗体断片である。Fab'断片は、F(ab')₂断片をジチオスレイトールなどの還元剤で処理することによって得ることができる。抗体断片はまた、そのような断片をコードする核酸の組換え細胞における発現によって作製することもできる（例えば、Evans, M.J. et al. (1995) "Rapid Expression Of An Anti-Human C5 Chimeric Fab Utilizing A Vector That Replicates In COS And 293 Cells," J. Immunol. Meth. 184, 123-38を参照）。例えば、そのような短縮型抗体断片分子を生じさせるために、F(ab')₂断片の一部分をコードするキメラ遺伝子を、H鎖のCH1ドメインおよびヒンジ領域をコードするDNA配列に含め、その後翻訳終止コドンを含めることができる。所望のエピトープと結合しうる適した断片は、インタクト抗体と同じ様式で、有用性に関して容易にスクリーニングすることができる。

10

【0041】

1つの態様において、そのような抗体断片は、一価抗体、好ましくは、ヒンジ領域の欠失を有する、PCT公報WO 2007/059782号（これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる）に記載されたような一価抗体である。そのような抗体は、以下の段階を含む方法によって構築しうる：i) 前記一価抗体の軽鎖をコードする核酸構築物を用意する段階であって、前記構築物が、選択された抗原特異的抗シヌクレイン抗体のVL領域をコードするヌクレオチド配列およびIgの定常CL領域をコードするヌクレオチド配列を含み、前記選択された抗原特異的抗体のVL領域をコードするヌクレオチド配列および前記IgのCL領域をコードするヌクレオチド配列が機能的に一つに連結され、かつIgG1サブタイプの場合には、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、または動物もしくはヒトに投与された時に、CL領域の同一のアミノ酸配列を含む他のペプチドとジスルフィド結合または共有結合を形成することができるいかなるアミノ酸もCL領域が含有しないように、CL領域をコードするヌクレオチド配列が改変されている段階；ii) 前記一価抗体の重鎖をコードする核酸構築物を用意する段階であって、前記構築物が、選択された抗原特異的抗体のVH領域をコードするヌクレオチド配列およびヒトIgの定常CH領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ヒンジ領域に対応する領域、およびIgサブタイプにより必要とされる場合にはCH領域の他の領域、例えばCH3領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、または動物もしくはヒトに投与された時に、ヒトIgのCH領域の同一のアミノ酸配列を含む他のペプチドとのジスルフィド結合、または共有結合もしくは安定した非共有結合による重鎖間結合の形成に参与するいかなるアミノ酸残基も含まないように、CH領域をコードするヌクレオチド配列が改変されており、前記選択された抗原特異的抗体のVH領域をコードするヌクレオチド配列および前記IgのCH領域をコードするヌクレオチド配列が機能的に一つに連結されている段階；iii) 前記一価抗体を産生させるための細胞発現系を用意する段階；iv) (iii)の細胞発現系の細胞において(i)および(ii)の核酸構築物を共発現させることによって、前記一価抗体を産生させる段階。

20

30

40

【0042】

同様に、1つの態様において、抗体は、以下を含む一価抗体である：

(i) 本明細書に記載の本発明の抗体の1つの可変領域または前記領域の1つの抗原結合部分、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域、および免疫グロブリンがIgG4サブタイプでない場合はCH領域の他の領域、例えばCH3領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で同一のCH領域とのジスルフィド結合または同一のCH領域との他の共有結合もしくは安定した非共有結合による重鎖間結合を形成することができるいかなるアミノ酸残基も含まないように改変されている、免疫グロブリンのCH領域、またはCH2領域およびCH3領域を含むその断片。

【0043】

50

1つのさらなる態様において、一価抗体の重鎖は、ヒンジ全体が欠失されるように改変されている。

【0044】

もう1つのさらなる態様において、前記一価抗体の配列は、N結合型グリコシル化のアクセプター部位を含まないように改変されている。

【0045】

本明細書で用いる場合、抗体またはそのエピトープ結合性断片は、それが代替的なエピトープに比してそのエピトープと、より高頻度に、より急速に、より上回る持続期間で、および/またはより上回る親和性もしくは結合力で反応するかまたは会合する場合に、別の分子(すなわち、エピトープ)の領域と「免疫特異的に」結合するという。また、この定義を読むことにより、例えば、第1の標的と免疫特異的に結合する抗体またはそのエピトープ結合性断片が、第2の標的と特異的または選好的に結合してもよく、または結合しなくてもよいことも理解されよう。

【0046】

本明細書で用いる場合、抗体またはその結合性断片の所定の抗原に対する結合の文脈における「結合」という用語は、典型的には、例えばbiacore 3000機器における表面プラズモン共鳴(SPR)技術によって(好ましくはリガンドとして抗原、分析物として抗体を用いて)決定した時に、約 10^{-7} Mもしくはそれ未満、例えば約 10^{-8} Mもしくはそれ未満、例えば約 10^{-9} Mもしくはそれ未満の K_D に対応する親和性での結合のことを指し、所定の抗原または類縁の抗原以外の非特異的抗原(例えば、ウシ血清アルブミン(「BSA」)、カゼインなど)との結合の親和性の少なくとも1/10未満、例えば少なくとも1/100未満、例えば少なくとも1/1,000未満、例えば少なくとも1/10,000未満、例えば少なくとも1/100,000未満の K_D に対応する親和性で所定の抗原に結合する。親和性が小さくなる量は抗体の K_D に依存し、その結果、抗体の K_D が非常に低い(すなわち、抗体が高特異性である)場合、抗原に対する親和性が非特異的抗原に対する親和性よりも小さくなる量は少なくとも1/10,000以下でありうる。「 k_d 」(sec^{-1} または $1/\text{s}$)という用語は、本明細書で用いる場合、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数のことを指す。前記の値は、 k_{off} 値とも称される。本明細書で用いる「 k_a 」($\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$ または $1/\text{M}$)という用語は、本明細書で用いる場合、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度定数のことを指す。「 K_D 」(M)という用語は、本明細書で用いる場合、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数のことを指し、 k_d を k_a で割ることにより得られる。「 K_A 」(M^{-1} または $1/\text{M}$)という用語は、本明細書で用いる場合、特定の抗体-抗原相互作用の会合平衡定数のことを指し、 k_a を k_d で除算することによって得られる。

【0047】

本明細書で用いる場合、抗体またはそのエピトープ結合性断片は、それが、同じアミノ酸配列を有する非リン酸化ペプチドエピトープと結合する(それが仮に結合するとして)よりも高い親和性でそのようなエピトープと免疫特異的に結合する場合に、リン酸化ペプチドエピトープと「選択的に」結合するという。最も好ましくは、そのようなより高い親和性は、少なくとも10倍高い、少なくとも30倍高い、少なくとも100倍高い、少なくとも300倍高い、少なくとも1,000倍高い、少なくとも3,000倍高い、または少なくとも10,000倍高いと考えられる。リン酸化タウに対する、抗体またはそのエピトープ結合性断片の「選択性」の程度は、ELISAまたはbiacoreを介して、抗体またはそのエピトープ結合性断片が、非リン酸化標的タウペプチドと免疫特異的に結合する親和性と、そのリン酸化バリエーションと免疫特異的に結合する親和性とを比較することによって決定される。

【0048】

「エピトープ」という用語は、抗体と免疫特異的に結合することのできる抗原決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の表面原子団を含み、通常、特定の三次元構造特性ならびに特定の電荷特性を有する。立体構造エピトープおよび非立体構造エピトープは、後者ではなく前者との結合が、変性溶媒の存在下で失われるという点で区別される。エピトープは、結合に直接的に関与するアミノ酸残基(エピトープ

10

20

30

40

50

の免疫優性構成要素とも呼ばれる)、および、特定の抗原結合ペプチドによって効果的に遮断されるアミノ酸残基(言い換えると、そのアミノ酸残基は特定の抗原結合ペプチドのフットプリント内にある)などの、結合に直接的に関与しない他のアミノ酸残基を含みうる。

【0049】

本明細書で用いる場合、「抗体のエピトープ結合性断片」という用語は、エピトープと免疫特異的に結合しうる抗体の断片を意味する。エピトープ結合性断片は、そのような抗体のCDRドメインの1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つすべてを含むことができ、そのようなエピトープと免疫特異的に結合しうるが、そのような抗体のものとは異なるようなエピトープに対する免疫特異性、親和性または選択性を呈することもある。しかし、好ましくは、エピトープ結合性断片は、そのような抗体のCDRドメインの6つすべてを含むと考えられる。抗体のエピトープ結合性断片は、単一のポリペプチド鎖であってもよく(例えば、scFv)、またはそれぞれがアミノ末端およびカルボキシ末端を有する2つもしくはそれを上回るポリペプチド鎖を含んでもよい(例えば、ダイアボディ、Fab断片、Fab₂断片など)。

10

【0050】

本発明の抗体を基にした分子、およびそれらのタウエピトープ結合性断片は、好ましくは「ヒト化されている」と考えられ、特に治療目的に使用される場合はそうである。「ヒト化された」という用語は、一般に組換え手法を用いて調製され、非ヒト種由来の免疫グロブリンに由来する抗原結合部位を有し、残りの免疫グロブリン構造がヒト免疫グロブリンの構造および/または配列を基にしているキメラ分子のことを指す。抗原結合部位は、ヒト定常ドメインと融合された完全な非ヒト可変ドメイン、またはヒト可変ドメイン内の適切なヒトフレームワーク領域にグラフティングされたそのような可変ドメインの相補性決定領域(CDR)のみのいずれかを含みうる。そのようなヒト化分子のフレームワーク残基は野生型(例えば、完全ヒト性)であってもよく、またはそれらが、その配列がヒト化のための基盤として役立てられてきた、ヒト抗体には見いだされない1つもしくは複数のアミノ酸置換を含んでもよい。ヒト化は、分子の定常領域がヒト個体において免疫原として作用する見込みを少なくするかまたはなくすが、外来性可変領域に対する免疫応答の可能性は残る(LoBuglio, A.F. et al. (1989) *Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86:4220-4224)。もう1つのアプローチは、ヒト由来の定常領域を提供するだけでなく、それらができるだけヒト形態に近くなるように作り直すように可変領域を改変することにも焦点を当てる。重鎖および軽鎖の両方の可変領域は、当該エピトープに対する応答が異なり、結合能を決定する、3つの相補性決定領域(CDR)を含むことが知られており、これらは所与の種において比較的保存され、CDRのスcaffoldingを提供すると推定される4つのフレームワーク領域(FR)によって挟まれている。非ヒト抗体を特定のエピトープに関して調製する場合、可変領域は、改変しようとするヒト抗体に存在するFR上の非ヒト抗体に由来するCDRをグラフティングすることによって、「作り直す」または「ヒト化」することができる。さまざまな抗体に対するこれらのアプローチの適用は、Sato, K. et al. (1993) *Cancer Res* 53:851-856; Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiv

20

30

40

50

iral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873 ; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289 ; および Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154に記載されている。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、すべてのCDR配列（例えば、マウス抗体由来の6つすべてのCDRを含むヒト化マウス抗体）を保持している。他の態様において、ヒト化抗体は、元の抗体に関して変更された1つまたはそれを上回るCDR（1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ）を有し、これらは元の抗体由来の1つまたはそれを上回るCDR「に由来する」1つまたはそれを上回るCDRとも名付けられる。抗体をヒト化しうることが周知である（例えば、米国特許第5,225,539号；第5,530,101号；第5,585,089号；第5,859,205号；第6,407,213号；第6,881,557号）。

10

【 0 0 5 1 】

1つの態様において、抗体を基にした分子は、ヒト抗体である。適したヒトモノクローナル抗体は、マウスの系ではなくヒト免疫系の一部を保有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウスを用いて作製することができる。そのようなトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウスには、それぞれ、本明細書においてHuMAbマウスおよびKMマウスと称されるマウスが含まれ、それらは本明細書において「トランスジェニックマウス」と総称される。

【 0 0 5 2 】

HuMAbマウスは、再編成されていないヒト重鎖可変鎖および定常鎖（ μ および γ ）ならびに軽鎖可変鎖および定常（K）鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ座位を、内因性 μ 鎖およびK鎖座位を不活性化する標的化突然変異とともに含有する（Lonberg, N. et al. (1994) "Antigen-Specific Human Antibodies From Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications," Nature 368:856-859）。したがって、そのようなマウスは、マウスIgMまたはIgKの発現の低下を呈し、免疫処置に应答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子が、クラススイッチおよび体細胞突然変異を受けて高親和性ヒトIgG、モノクローナル抗体を生じる（Lonberg, N. et al. (1994) "Antigen-Specific Human Antibodies From Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications," Nature 368:856-859 ; Lonberg, N. (1994) "Human Monoclonal Antibodies from Transgenic Mice," In: HANDBOOK EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY, Volume 181 (Starke, K. et al., Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg ; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," Intern. Rev. Immunol. 13(1):65-93 ; Harding, F. et al. (1995) "Class Switching In Human Immunoglobulin Transgenic Mice," Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546）。HuMAbマウスの調製は、Taylor, L. et al. (1992) "A Transgenic Mouse That Expresses A Diversity Of Human Sequence Heavy And Light Chain Immunoglobulins," Nucl. Acids Res. 20(23):6287-6295 ; Chen, J. et al. (1993) "Immunoglobulin Gene Rearrangement In B Cell Deficient Mice Generated By Targeted Deletion Of The JH Locus," Int'l. Immunol. 5:647-656 ; Tuailon, N. et al. (1994) "Biased Utilization Of DHQ52 And JH4 Gene Segments In A Human Ig Transgenic Minilocus Is Independent Of Antigenic Selection," J. Immunol. 152:2912-2920 ; Taylor, L. et al. (1994) "Human Immunoglobulin Transgenes Undergo Rearrangement, Somatic Mutation And Class Switching In Mice That Lack Endogenous IgM," Int'l. Immunol. 6:579-591 ; Fishwild, D. et al. (1996) "High-Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," Nature Biotechnol. 14:845-851に詳述されている ; 米国特許第5,545,806号 ; 第5,569,825号 ; 第5,625,126号 ; 第5,633,425号 ; 第5,789,650号 ; 第5,877,397号 ; 第5,661,016号 ; 第5,814,318号 ; 第5,874,299号 ; 第5,770,429号 ; 第5,545,807号 ; PCT公報WO 98/24884号、WO 94/25585号、WO 93/1227号、WO 92/22645号、WO 92/03918号およびWO 01/09187号も参照されたい。

20

30

40

【 0 0 5 3 】

50

HCo7マウスは、内因性軽鎖 () 遺伝子におけるJKD破壊 (Chen et al. (1993) "B Cell Development In Mice That Lack One Or Both Immunoglobulin Kappa Light Chain Genes," EMBO J. 12:821-830に記載されたような)、内因性重鎖遺伝子におけるCMD破壊 (PCT公報WO 01/14424号の実施例1に記載されたような)、KCo5ヒト 軽鎖導入遺伝子 (Fishwild, D. et al. (1996) "High-Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," Nature Biotechnol. 14:845-851に記載されたような)、およびHCo7ヒト重鎖導入遺伝子 (米国特許第5,770,429号に記載されたような)を有する。

【0054】

HCo12マウスは、内因性軽鎖 () 遺伝子におけるJKD破壊 (Chen et al. (1993) "B Cell Development In Mice That Lack One Or Both Immunoglobulin Kappa Light Chain Genes," EMBO J. 12:821-830に記載されたような)、内因性重鎖遺伝子におけるCMD破壊 (PCT公報WO 01/14424号の実施例1に記載されたような)、KCo5ヒト 軽鎖導入遺伝子 (Fishwild, D. et al. (1996) "High-Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," Nature Biotechnol. 14:845-851に記載されたような)、およびHCo12ヒト重鎖導入遺伝子 (PCT公報WO 01/14424号の実施例2に記載されたような)を有する。

【0055】

KMマウス系統において、内因性マウス 軽鎖遺伝子は、Chen et al. (1993) "B Cell Development In Mice That Lack One Or Both Immunoglobulin Kappa Light Chain Genes," EMBO J. 12:821-830に記載されたようにホモ接合性に破壊されており、内因性マウス重鎖遺伝子は、PCT公報WO 01/09187号の実施例1に記載されたようにホモ接合性に破壊されている。このマウス系統は、Fishwild, D. et al. (1996) "High-Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," Nature Biotechnol. 14:845-851に記載されたように、ヒト 軽鎖導入遺伝子KCo5を有する。このマウス系統はまた、PCT公報WO 02/43478号に記載されたように、14番染色体断片hCF (SC20)で構成されるヒト重鎖トランスクロモソームも有する。

【0056】

これらのトランスジェニックマウスからの脾細胞を、周知の手法に従って、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製するために用いることができる。本発明のヒトモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、または他の種に起源を持つ本発明の抗体を、関心対象の免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列に関してトランスジェニック性である別の非ヒト哺乳動物または植物の作製、およびそれらから回収可能な形態にある抗体の産生を通じて、トランスジェニック性に作製することもできる。哺乳動物におけるトランスジェニック性産生に関連して、抗体をヤギ、ウシまたは他の哺乳動物の乳中に産生させて、それから回収することもできる。例えば、US 5,827,690号、US 5,756,687号、US 5,750,172号およびUS 5,741,957号を参照されたい。

【0057】

いくつかの抗体では、ヒト化抗体における結合を保つために、CDRの一部のみ、すなわち結合に必要な「SDR」と呼ばれるCDR残基のサブセットのみが必要とされる。抗原に接触せず、SDR内に位置しないCDR残基は、Chothia超可変ループ (Kabat et al. (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917を参照)の外側に存在するカバットCDRの領域から分子モデリングによってかつ/もしくは経験的に、またはGonzales, N.R. et al. (2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity," Mol. Immunol. 41:863-872に記載された通りに、以前の研究に基づいて特定することができる (例えば、CDR H2内の残基H60~H65は必要でないことが多い)。そのようなヒト化抗体において、1つもしくは複数のドナーCDR残基が存在しないか、またはドナーCDR全体が欠失している位置では

10

20

30

40

50

、その位置を占めるアミノ酸は、アクセプター抗体配列における（カバット番号付けによる）対応する位置を占めるアミノ酸でありうる。含めるCDRにおけるドナーアミノ酸のアクセプターによるそのような置換の数は、競合する考慮事項のバランスを反映している。そのような置換は、ヒト化抗体におけるマウスアミノ酸の数を減少させるのに有益な可能性があり、その結果として免疫原性を低下させる可能性がある。しかし、置換が親和性の変化を引き起こす可能性もあり、親和性の著しい減少は回避されることが好ましい。CDRにおける置換の位置および置換するアミノ酸を経験的に選択することもできる。

【 0 0 5 8 】

CDR残基の単一アミノ酸の変更が機能的結合の喪失をもたらさうという事実（Rudikoff, S. et al. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6):1979-1983）は、代替的な機能的CDR配列を系統的に同定する手段を提供する。そのような変異体CDRを得る1つの好ましい方法では、CDRをコードするポリヌクレオチドを（例えばランダム突然変異誘発を介して、または部位指定的方法（例えば、突然変異した遺伝子座をコードするプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖媒介増幅）によって）突然変異を誘発し、置換されたアミノ酸残基を有するCDRを生じさせる。元の（機能的）CDR配列の該当する残基の実体を、置換された（非機能的）変異体CDR配列の実体と比較することにより、その置換に関してBLOSUM62.iiij置換スコアを同定することができる。BLOSUMシステムは、信頼できるアラインメントについて配列のデータベースを分析することによって作成されたアミノ酸置換の行列を提供している（Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?," Nature Biotech. 22(8):1035-1036 ; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:10915-10919 ; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:2264-2268 ; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective," J. Mol. Biol. 219, 555-565. 現在、最も先端的なBLOSUMデータベースはBLOSUM62データベース（BLOSUM62.iiij）である。表1はBLOSUM62.iiij置換スコアを提示している（スコアが高いほど、置換は保存的であり、したがって置換が機能に影響しない可能性が高い）。例えば、結果的に得られたCDRを含む抗原結合断片がROR1と結合することができない場合には、BLOSUM62.iiij置換スコアは、保存性が不十分とされ、より高い置換スコアを有する新しい候補置換が選択され、作製される。したがって、例えば、元の残基がグルタミン（E）であり、非機能的置換残基がヒスチジン（H）であった場合、BLOSUM62.iiij置換スコアは0になり、より保存的な変化（アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、またはリシンなど）が好ましい。

【 0 0 5 9 】

（表 1）

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

10

【 0 0 6 0 】

したがって、本発明は、改良されたCDRを同定するためにランダム突然変異誘発を用いることを想定している。

20

【 0 0 6 1 】

本発明の文脈において、保存的置換は、以下の3つの表のうち1つまたは複数に表されたアミノ酸のクラス内部での置換によって定義しうる。

【 0 0 6 2 】

(表2) 保存的置換に関するアミノ酸残基のクラス

酸性残基	Asp (D) および Glu (E)
塩基性残基	Lys (K), Arg (R), および His (H)
親水性非荷電残基	Ser (S), Thr (T), Asn (N), および Gln (Q)
脂肪族非荷電残基	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), および Ile (I)
非極性非荷電残基	Cys (C), Met (M), および Pro (P)
芳香族残基	Phe (F), Tyr (Y), および Trp (W)

30

【 0 0 6 3 】

(表3) 代替的な保存的アミノ酸残基置換のクラス

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

40

【 0 0 6 4 】

(表4) アミノ酸残基の代替的な物理的および機能的な分類

アルコール基含有残基	S および T
脂肪族残基	I, L, V および M
シクロアルケニル関連残基	F, H, W および Y
疎水性残基	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W および Y
負荷電残基	D および E
極性残基	C, D, E, H, K, N, Q, R, S および T
正荷電残基	H, K および R
小型残基	A, C, D, G, N, P, S, T および V
極めて小型の残基	A, G および S
ターン形成に参与する残基	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P および T
柔軟な残基	Q, T, K, S, G, P, D, E および R

10

【 0 0 6 5 】

より保存的な置換のグループ分けには、以下が含まれる：バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリンおよびアスパラギン-グルタミン。

【 0 0 6 6 】

アミノ酸のその他の群を、例えば、Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Companyに記載された原理を用いて策定することもできる。

【 0 0 6 7 】

ファージディスプレイ技術を代替的に用いて、CDRの親和性を高める（または低下させる）ことができる。この技術は親和性成熟と称され、突然変異誘発または「CDRウォーキング」を使用し、再選択では標的抗原またはその抗原断片を用いて、初期抗体または親抗体と比較した場合により高い（または低い）親和性で結合するCDRを有する抗体を同定する（例えば、Glaser et al. (1992) "Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System," *J. Immunology* 149:3903-3913を参照）。単一ヌクレオチドではなくコドン全体で突然変異を誘発すると、半ランダム化されたアミノ酸突然変異のレパートリーがもたらされる。それぞれが単一CDRの単一アミノ酸の変化だけ異なり、各CDR残基で可能な各アミノ酸置換を表す変異体を含む変異体クローンのプールで構成されたライブラリを構築することができる。固定化した突然変異体を標識を付けた抗原と接触させることにより、抗原に対する結合親和性が高まった（または低下した）突然変異体をスクリーニングすることができる。当技術分野において公知の任意のスクリーニング法を用いて、抗原に対する親和性が高まるかまたは低下した突然変異抗体を同定することができる（例えば、ELISA）（Wu, H. et al. (1998) "Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized mAb," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037-6042; Yelton et al., (1995) "Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis," *J. Immunology* 155:1994を参照）。軽鎖をランダム化するCDRウォーキングを使用することもできる（Schier, R. et al., (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-c-erbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site," *J. Mol. Bio.* 263:551-567を参照）。

20

30

40

【 0 0 6 8 】

そのような親和性の成熟を達成する方法は、例えば、以下に記載されている：Krause, J.C. et al. (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody," *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi:10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. et al. (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas," *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes," *J. Mol. Biol.* 401(1): 84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) "Affinity Maturation And Characterization

50

Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41," *MAbs* 1(5):462-474 ; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth," *Virology* 393(1):112-119 ; Finlay, W.J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions," *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558 ; Bostrom, J. et al. (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development," *Methods Mol. Biol.* 525:353-376 ; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human G M-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification," *Mol. Immunol.* 46(1):135-144 ; および Barderas, R. et al. (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 105(26):9029-9034.

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

「トランスジェニック非ヒト動物」という用語は、1つまたは複数のヒト重鎖および/または軽鎖の導入遺伝子またはトランスクロモソームを（動物の天然ゲノムDNAに組み込まれるか、または組み込まれずに）含むゲノムを有し、完全なヒト抗体を発現することができる非ヒト動物のことを指す。例えば、トランスジェニックマウスは、タウ抗原および/またはタウを発現する細胞による免疫処置を行った時にヒト抗タウ抗体を産生するように、ヒト軽鎖導入遺伝子と、ヒト重鎖導入遺伝子またはヒト重鎖トランスクロモソームのいずれかとを有することができる。ヒト重鎖導入遺伝子は、トランスジェニックマウス、例えばHuMAbマウス、例えばHCo7もしくはHCo12マウスのようにマウスの染色体DNAに組み込まれてもよく、または、ヒト重鎖導入遺伝子は、PCT公報WO 02 / 43478号に記載されたトランスクロモソームKMマウスのように染色体外に維持されてもよい。そのようなトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソームマウス（本明細書では「トランスジェニックマウス」と総称される）は、V-D-J組換えおよびアイソタイプスイッチを受けることによって、ある特定の抗原に対して、複数のアイソタイプのヒトモノクローナル抗体（例えば、IgG、IgA、IgM、IgD、および/またはIgE）を産生することができる。

【 0 0 7 0 】

タウイメージングプローブとしての、本発明の抗体を基にした分子の使用は、それらの特異性が理由で大きな可能性がある。血液脳関門の全般的な不透過性からみて、比較的小型の単鎖抗体可変断片（scFv分子）が、タウ病変を検出するためのインビボでのイメージングリガンドとして好ましいことが見いだされている。scFv分子は、約10～約25アミノ酸残基の短いリンカーペプチドを介して互いに接続された、抗体の重鎖（H）および軽鎖（L）ドメインの可変領域の融合タンパク質として形成される。リンカーは通常、柔軟性のためにグリシンを多く含み（例えば、GGGGSGGGGSGGGGS **(SEQ ID NO:2)**

(Fisher, A. et al. (2009) "Efficient Isolation Of Soluble Intracellular Single-Chain Antibodies Using The Twin-Arginine Translocation Machinery," *J. Mol. Biol.* 385(1):299-311 ; Bird, R.E. et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," *Science* 242:423-426 ; Huston, J.S. et al. (1988) "Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In *Escherichia coli*," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:5879-5883)、溶解性のためにセリンまたはトレオニンを多く含み、重鎖可変ドメインのN末端を軽鎖可変ドメインVLのC末端と接続させるか、またはその反対に接続させることができる (Huang, L. et al. (2013) "Single-Chain Fragment Variable Passive Immunotherapies For Neurodegenerative Diseases," *Int. J. Mol. Sci.* 14(9):19109-19127 ; Ahmad, Z.A. et al. (2012) "scFv Antibody: Principles And Clinical Application," *Clin. Dev. Immunol.* 2012:980250 ; Huhlov, A. et al. (2004) "Engineered Single Chain

Antibody Fragments For Radioimmunotherapy," Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 48(4): 279-288)。そのようなリンカーの一例は、
GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:3)

である (Whitlow, M. et al. (1993) "An Improved Linker For Single-Chain Fv With Reduced Aggregation And Enhanced Proteolytic Stability," Protein Eng. 6:989-995)。本発明に関して特に好ましいリンカーは、アミノ酸配列
(SEQ ID NO:4): SSGGGGSGGGGGSSRSS

を有する。

【0071】

精製および/または回収を容易にするために、scFvにポリヒスチジン (「His-Tag」) (例えば、
(SEQ ID NO:5) HHHHHH

)を含めることができる。His-Tagのヒスチジン残基のイミダゾール側鎖は、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} および特に Ni^{+2} といった、ある特定の遷移金属イオンと可逆的な配位結合で係合することができる。したがって、Hisタグで標識したscFv分子をそのような金属イオンを含有するマトリックスに適用すると、それらはマトリックスと特異的に結合するが、ほとんどの非タグ標識タンパク質は結合しない。scFvが追加的または代替的に

(SEQ ID NO:6) GAYPYDVPDYAS

などの「HA-Tag」を含んでもよい。ヒトインフルエンザ血球凝集素 (HA) は、ヒトウイルスの感染性のために必要とされる表面糖タンパク質である。HA-tagは、ヒトインフルエンザ血球凝集素 (HA) 表面糖タンパク質に由来し、抗HA-Tag抗体 (Millipore) を用いてのscFvの検出を可能にする。

【0072】

scFv分子を、直接的に、またはscFvを生じさせる目的で切断されるN末端リーダーペプチドと連結された融合タンパク質として発現させることもできる (例えば、Huston, J.S. et al. (1988) "Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In Escherichia coli," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883を参照)。例えば、scFvを改変trp LEリーダーペプチド (MLE) と融合させて、Asp-Proペプチド結合の酸切断によって切断させることができる (Piszkiwicz, D. et al. (1970) "Anomalous Cleavage Of Aspartyl-Proline Peptide Bonds During Amino Acid Sequence Determinations," Biochem. Biophys. Res. Commun. 40(5):1173-1178; Fraser, K.J. et al. (1972) "Specific Cleavage Between Variable And Constant Domains Of Rabbit Antibody Light Chains By Dilute Acid Hydrolysis," Biochemistry 11(26):4974-4977; Poulsen, K. et al. (1972) "An Active Derivative Of Rabbit Antibody Light Chain Composed Of The Constant And The Variable Domains Held Together Only By A Native Disulfide Bond," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 69(9):2495-2499)。

【0073】

1つのさらなる態様において、二価分子を形成させる目的で、scFvをもう1つのscFv (これらは同じであっても異なってもよい) と連結させることもできる。これは、2つのVH領域および2つのVL領域を有する単一のペプチド鎖を作製して、縦列scFv分子を生じさせることによって行うことができる (Xiong, C.-Y. et al. (2006) "Development Of Tumor Targeting Anti-MUC-1 Multimer: Effects Of di-scFv Unpaired Cysteine Location On PEGylation And Tumor Binding," Protein Engineering Design and Selection 19(8):359-367; Kufer, P. et al. (2004) "A Revival Of Bispecific Antibodies," Trends in Biotechnology 22(5):238-24)。または、ドメイン同士が互いに複合体化してエピトープ結合部位を形成するには短すぎるリンカーによって重鎖可変ドメインがその軽鎖可変ドメインと隔てられているscFvを形成させることによって、2つのscFv分子をダイアボディとして二量体化することを強制することもできる (Hollinger, P. et al. (1993) "Diabodies," Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci.

10

20

30

40

50

(U.S.A.) 90(14):6444-6448)。ダイアボディは対応するscFv分子よりも最大で40分の1の小ささの解離定数を有することが示されており、これはそれらがそれらの標的に対するよりもはるかに高い親和性を有することを意味する。その結果として、ダイアボディ薬は他の治療用抗体よりもはるかに低い用量で投与することができ、インビボで腫瘍の高度に特異的なターゲティングが可能である(Adams, G.P. et al. (1998) "Prolonged in vivo Tumour Retention Of A Human Diabody Targeting The Extracellular Domain Of Human HER2/neu," Brit. J. Cancer 77(9):1405-1412)。さらに短いリンカー(1または2アミノ酸)は、三量体、いわゆるトリアボディまたはトリボディの形成をもたらす。テトラボディも作製されている。それらは、それらの標的に対してダイアボディよりもさらに高い親和性を示す(Le Gall, F. et al. (1999) "Di-, Tri- And Tetrameric Single Chain Fv Antibody Fragments Against Human CD19: Effect Of Valency On Cell Binding," F EBS Letters 453(1):164-168)。これらの形式のすべてを、2種またはそれを上回る異なるエピトープに対する特異性を有する二量体、三量体など(すなわち、二重特異性ダイアボディなど)を形成させるために、さまざまなscFv分子から構成することができる(Dincq, S. et al. (2001) "Expression And Purification Of Monospecific And Bispecific Recombinant Antibody Fragments Derived From Antibodies That Block The CD80/CD86-CD28 Costimulatory Pathway," Protein Express. Purificat. 22(1):11-24)。

10

【0074】

A. 「^(P)Ser404エピトープ」

本発明の抗体を基にした分子は、タウ(SEQ ID NO:1)およびその関連するアイソフォームのホスホセリン残基^(P)Ser404に対する免疫特異性を呈し、それ故に「^(P)Ser404エピトープ」に対する免疫特異性を呈すると本明細書中で称される。本明細書で用いる場合、抗体は、Ser404での^(P)Ser404の置き換えが、そのような変異体免疫原に対するそのような^(P)Ser404エピトープ特異的抗体による結合を、そのような免疫原の任意の他の残基の置き換えよりも大きな程度まで減らすように、免疫原の^(P)Ser396または任意の他のアミノ酸残基に比して強化された^(P)Ser404ホスホセリン残基に対する結合を呈する場合に、^(P)Ser404エピトープに対する免疫特異性を呈するという。、そのような抗体を単離および特徴決定するために、^(P)Ser404エピトープを含有する任意の免疫原を使用してもよいが、位置396および404でリン酸化されているアミノ酸配列

20

(SEQ ID NO:7): TDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHL

30

(タウタンパク質(SEQ ID NO:1)のアミノ酸残基386~408に対応する)を有するペプチドを使用することが好ましく、よって好ましい免疫原のアミノ酸配列は、

SEQ ID NO:8: TDHGAEIVYK^(P)SPVVSGDT^(P)SPRHL

のアミノ酸配列を有する。SEQ ID NO:7の位置11および19の下線を付したセリン残基、およびSEQ ID NO:8の位置11および19の下線を付したホスホセリン残基は、タウ(SEQ ID NO:1)の位置396および404に対応する。使用した免疫原は、このペプチドを含有しており、好ましくは、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)にコンジュゲートされるN末端システイン残基を含有するように改変される。そのような取り組みが、^(P)Ser404エピトープと免疫特異的に結合する抗体4E6G7(抗体4E6とも称される)の単離につながった(Congdon, E.E. et al. (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcγ Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288:35452-35465; Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol. Chem. 288(46):33081-33095)。

40

【0075】

以下に考察するように、抗体4E6G7は、特に、急性抗体媒介性の認知の改善を含む、望ましい機能性のスペクトルを呈し、可溶性ホスホ-タウの排除および可溶化PHFに対する高親和性結合に関連する。本発明の1つの局面は、タウ異常症の治療における治療的有効性が、可溶化PHFに対する抗体の親和性と正に相関するという認識に関連する。したがって、本発明は、抗体4E6G7を提供することに加えて、追加の治療的に有効な抗体種を単離す

50

るための方法であって、そのような抗体が、可溶化PHFに対して高い親和性を呈するものについての抗タウ抗体のスクリーニングにより得られる、方法を提供する。

【0076】

B. 抗体4E6G7

抗体4E6G7の軽鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:9 ; CDRに下線を付している) :

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIFE
ASTLYTGVPS RFGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYPWTFGG
 GTKLEIKR

を有する。

10

【0077】

抗体4E6G7の軽鎖可変ドメインCDR1は、したがって、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:10): HASQNINVWLS

を有する。

【0078】

抗体4E6G7の軽鎖可変ドメインCDR2は、したがって、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:11): EASTLYT

を有する。

【0079】

抗体4E6G7の軽鎖可変ドメインCDR3は、したがって、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:12): QQGQSYPWT

20

を有する。

【0080】

抗体4E6G7の重鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:13 ; CDRに下線を付している) :

VQLQQSGAEL VQPGASVKLS CTASGFNIKD TSMHWVRQRP EQGLEWIGRI
APANGNTKYD PKFQGKATIT TDTSSNTAYL QLSSLTSEDT AVYYCSGSGN
YDWGQGTTTLT VS

を有する。

30

【0081】

したがって、抗体4E6G7の重鎖可変ドメインCDR1は、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:14): GFNIKDTSMH

を有する。

【0082】

したがって、抗体4E6G7の重鎖可変ドメインCDR2は、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:15): RIAPANGNTKYDPKFQG

を有する。

【0083】

したがって、抗体4E6G7の重鎖可変ドメインCDR3は、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:16) : SGNYDを有する。

40

【0084】

C. scFv分子

scFv分子は、抗体4E6G7から作製されてもよく、したがって、抗体4E6G7と同じ軽鎖および重鎖可変ドメインCDR1、CDR2、およびCDR3を保有する。

【0085】

例示的なscFvの全配列は、(SEQ ID NO:17) (CDR残基に下線を付している) :

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHASQNIN VWLSWYQOKP GNIPKLLIFE
ASTLYTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISLQP EDIATYYCQQ GQSYPWTFGG
 GTKLEIKR*ss* *ggggsggggg* *gssr*ssVQLQ QSGAELVQPG ASVKLSCTAS
GFNIKDTSMH WVRQRPEQGL EWIGRIAPAN GNTKYDPKFQ GKATITTDTS
 SNTAYLQLSS LTSEDVAVYY CSGSGNYDWG QGTTLTVS

であり、配列中、アミノ酸残基1~108は、抗体4E6G7の軽鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:9) のアミノ酸残基であり、アミノ酸残基109~126は、リンカー (SEQ ID NO:4) のアミノ酸残基であり (小文字斜体で示す)、アミノ酸残基127~238は、抗体4E6G7の重鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:13) のアミノ酸残基である。

【0086】

1つの好ましい態様において、例示的なscFvは、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:18): IQEEFKMKKTAIAIAVALAGFATVAQAA

を有するN末端リーダーペプチド部分、および/またはC末端ペプチド部分を含む融合タンパク質として調製される。C末端ペプチド部分は以下を含みうる：抗体定常ドメイン、例えば

(SEQ ID NO:19): AKTTPPSVTSGQAGQ

など (Hussein, A.H. et al. (2007) "Construction and Characterization of Single-Chain Variable Fragment Antibodies Directed against the Bordetella pertussis Surface Adhesins Filamentous Hemagglutinin and Pertactin," Infect. Immun. 75(11):5476-5482)、His-Tag、例えば

(SEQ ID NO:5): HHHHHH

) など、および/またはHA-Tag、例えば (SEQ ID NO:6): GAYPYDVPDYAS など、または任意の順序でのそれらの任意の組み合わせもしくは部分的組み合わせ。好ましいC末端ペプチド部分は、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:20): AKTTPPSVTSGQAGQHSHHHHHGAYPYDVPDYAS

を有し、それ故に (N末端からC末端の方向に) SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:5、およびSEQ ID NO:6を含む。

【0087】

したがって、好ましい態様において、例示的なscFv融合タンパク質は、SEQ ID NO:21~29 (配列中、ScFv融合体のN末端および/またはC末端ペプチド部分に下線を付している) のいずれかのアミノ酸配列を含むことになる。

10

20

30

SEQ ID NO:21 (SEQ ID NO:18および17の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADI QMNQSPSSLS ASLGDTITIS
 CHASQNINVW LSWYQQKPGN IPKLLIFEAS TLYTGVPSRF SGSSTGTGFT
 LTISSLQPED IATYYCQQGQ SYPWTFGGGT KLEIKRSSGG GSGGGGGGS
 SRSSVQLQGS GAELVQPGAS VKLSCTASGF NIKDTSMHVW RQRPEQGLEW
 IGRIAPANGN TKYDPKFQ GK ATITTDTSN TAYLQLSSLT SEDTAVYYCS
 GSGNYDWGQG TLLTVS

SEQ ID NO:22 (SEQ ID NO:17および19の融合体):

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIFE
 ASTLYTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYWTFGG 10
 GTKLEIKRss ggggsgggg gssrsvQLQ QSGAELVQPG ASVKLSCTAS
 GFNIKDTSMH WVRQRPEQGL EWIGRIAPAN GNTKYDPKFQ GKATITDTS
 SNTAYLQLSS LTSEDVAVYY CSGSGNYDWG QGTLLTVSAK TTPPSVTSGQ
AGQ

SEQ ID NO:23 (SEQ ID NO:17および5の融合体):

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIFE
 ASTLYTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYWTFGG
 GTKLEIKRss ggggsgggg gssrsvQLQ QSGAELVQPG ASVKLSCTAS
 GFNIKDTSMH WVRQRPEQGL EWIGRIAPAN GNTKYDPKFQ GKATITDTS
 SNTAYLQLSS LTSEDVAVYY CSGSGNYDWG QGTLLTVSHH HHHH 20

SEQ ID NO:24 (SEQ ID NO:17および6の融合体):

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIFE
 ASTLYTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYWTFGG
 GTKLEIKRss ggggsgggg gssrsvQLQ QSGAELVQPG ASVKLSCTAS
 GFNIKDTSMH WVRQRPEQGL EWIGRIAPAN GNTKYDPKFQ GKATITDTS
 SNTAYLQLSS LTSEDVAVYY CSGSGNYDWG QGTLLTVSGA YPYDVPDYAS

SEQ ID NO:25 (SEQ ID NO:17および20の融合体):

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIFE
 ASTLYTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYWTFGG 30
 GTKLEIKRss ggggsgggg gssrsvQLQ QSGAELVQPG ASVKLSCTAS
 GFNIKDTSMH WVRQRPEQGL EWIGRIAPAN GNTKYDPKFQ GKATITDTS
 SNTAYLQLSS LTSEDVAVYY CSGSGNYDWG QGTLLTVSAK TTPPSVTSGQ
AGQH HHHHG AYPYDVPDYA S

SEQ ID NO:26 (SEQ ID NO:18、17、および19の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADI QMNQSPSSLS ASLGDITITIS
 CHASQNINVW LSWYQQKPGN IPKLLIFEAS TLYTGVPSRF SGSSTGTGFT
 LTISSLQPED IATYYCQQGQ SYPWTFGGGT KLEIKRSSGG GSGGGGGGS
 SRSSVQLQQS GAELVQPGAS VKLSCTASGF NIKDTSMHV RQRPEQGLEW
 IGRIAPANGN TKYDPKFQ GK ATITTD TSSN TAYLQLSSLT SEDTAVYYCS
 GSGNYDWGQG TLTLSAKTT PPSVTSGQAG Q

SEQ ID NO:27 (SEQ ID NO:18、17、および5の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADI QMNQSPSSLS ASLGDITITIS
 CHASQNINVW LSWYQQKPGN IPKLLIFEAS TLYTGVPSRF SGSSTGTGFT
 LTISSLQPED IATYYCQQGQ SYPWTFGGGT KLEIKRSSGG GSGGGGGGS
 SRSSVQLQQS GAELVQPGAS VKLSCTASGF NIKDTSMHV RQRPEQGLEW
 IGRIAPANGN TKYDPKFQ GK ATITTD TSSN TAYLQLSSLT SEDTAVYYCS
 GSGNYDWGQG TLTLSHHHH HH

10

SEQ ID NO:28 (SEQ ID NO:18、17、および6の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADI QMNQSPSSLS ASLGDITITIS
 CHASQNINVW LSWYQQKPGN IPKLLIFEAS TLYTGVPSRF SGSSTGTGFT
 LTISSLQPED IATYYCQQGQ SYPWTFGGGT KLEIKRSSGG GSGGGGGGS
 SRSSVQLQQS GAELVQPGAS VKLSCTASGF NIKDTSMHV RQRPEQGLEW
 IGRIAPANGN TKYDPKFQ GK ATITTD TSSN TAYLQLSSLT SEDTAVYYCS
 GSGNYDWGQG TLTLSGAYP YDVPDYAS

20

SEQ ID NO:29 (SEQ ID NO:18、17、および20の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADI QMNQSPSSLS ASLGDITITIS
 CHASQNINVW LSWYQQKPGN IPKLLIFEAS TLYTGVPSRF SGSSTGTGFT
 LTISSLQPED IATYYCQQGQ SYPWTFGGGT KLEIKRSSGG GSGGGGGGS
 SRSSVQLQQS GAELVQPGAS VKLSCTASGF NIKDTSMHV RQRPEQGLEW
 IGRIAPANGN TKYDPKFQ GK ATITTD TSSN TAYLQLSSLT SEDTAVYYCS
 GSGNYDWGQG TLTLSAKTT PPSVTSGQAG QHHHHHGAY PYDVPDYAS

30

【 0 0 8 8 】

scFvは血液脳関門を越えて移行しうるが、そのような移行を促進させるためにさまざまな補助的なアプローチを用いることもできる (Huang, L. et al. (2013) "Single-Chain Fragment Variable Passive Immunotherapies For Neurodegenerative Diseases," Int. J. Mol. Sci. 14(9): 19109-19127)。タンパク質およびペプチドの限定的なセットが、受容体媒介性トランスサイトーシスを介して血液脳関門を越えて輸送されるが (Herve, F. et al. (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis," AAPS J. 10(3):455-472)、最も研究されている3つのリガンドはインスリン、鉄トランスフェリンおよびLDL-コレステロールである (Bickel, U. et al. (2001) "Delivery Of Peptides And Proteins Through The Blood-Brain Barrier," Adv. Drug Deliv. Rev. 46:247-279 ; Tuma, P.L. et al. (2003) "Transcytosis: Crossing Cellular Barriers," Physiol. Rev. 83:871-932)。したがって、血液脳関門を越えてのscFvの輸送は、scFvを、そのようなりガンドの受容体 (例えば、ヒトインスリン受容体 (HIR)、トランスフェリン受容体 (TfR)、低比重リポタンパク質受容体関連タンパク質1 (LRP1) および2 (LRP2)、非毒性ジフテリア毒素受容体 / ヘパリン結合上皮増殖因子様増殖因子など) に対して免疫特異的である抗体またはそのエピトープ結合性断片と融合させることによって促進させることができる。結果的に得られた融合タンパク質は、受容体とのその結合を通じて血液脳関門を越えて輸送される (Boado, R.J. et al. (2010) "IgG-Single Chain Fv Fusion Protein Therapeutic For Alzheimer's Disease: Expression In CHO cells And Pharmacokinetics And Brain Delivery In The Rhesus Monkey," Biotechnol. Bioeng. 105:627-635 ; Jones, A.R. et al. (2007) "Blood-Brain Barrier Transport Of Therapeutics Via Receptor-Mediation

40

50

, " Pharm. Res. 24(9):1759-1771 ; Wang, Y.Y. et al. (2009) "Receptor-Mediated Therapeutic Transport Across The Blood-Brain Barrier," Immunotherapy 1(6):983-993 ; Lajoie, J.M. et al. (2015) "Targeting Receptor-Mediated Transport For Delivery Of Biologics Across The Blood-Brain Barrier," Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 55:613-631 ; Pardridge, W.M. (2102) "Drug Transport Across The Blood-Brain Barrier," J. Cereb. Blood Flow Metab. 32(11): 1959-1972 ; Bhaskar, S. et al. (2010) "Multifunctional Nanocarriers For Diagnostics, Drug Delivery And Targeted Treatment Across Blood-Brain Barrier: Perspectives On Tracking And Neuroimaging," Part. Fibre. Toxicol. 7:3 pp. 1-25)。

【 0 0 8 9 】

scFvを、吸着媒介トランスサイトーシスを助長するポリカチオンペプチドを含むように強化することもできる。適したポリカチオンペプチドには、ヘキサメチレン-ジアミン、プトレシン、スペルミジンおよびスペルミンが含まれる (Herve, F. et al. (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis," AAPS J. 10(3):455-472 ; Kandimalla, K.K. et al. (2006) "Physiological And Biophysical Factors That Influence Alzheimer's Disease Amyloid Plaque Targeting Of Native And Putrescine Modified Human Amyloid Beta40," J. Pharmacol. Exp. Ther. 318:17-25) 。 scFvを、そのカルボキシル基 (すなわち、scFvのカルボキシ末端基、またはグルタミン酸もしくはアスパラギン酸残基のカルボキシ側鎖) の一部またはすべてをアミド化する処理を介して、ポリカチオン基を含むように強化することもできる。

【 0 0 9 0 】

または、細胞透過性ペプチド (「CPP」) を含むようにscFvを強化することもできる (Rao, K.S. et al. (2009) "Targeting Anti-HIV Drugs To The CNS," Expert Opin. Drug Deliv. 6(8):771-784 ; Mathupala, S.P. et al. (2009) "Delivery Of Small-Interfering RNA (siRNA) To The Brain," Expert Opin. Ther. Pat. 19(2):137-140 ; Herve, F. et al. (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis," AAPS J. 10(3):455-472) 。 Such peptides include the HIV-1 trans-activating transcriptional activator (TAT) peptide, the Herpes Simplex Virus type-1 transcription factor (HSV VP-22) peptide, antennapedia and penetratin (Wadia, J.S. et al. (2004) "Transducible TAT-HA Fusogenic Peptide Enhances Escape Of TAT-Fusion Proteins After Lipid Raft Macropinocytosis," Nat. Med. 10:310-315 ; Richard, J.P. et al. (2003) "Cell-Penetrating Peptides. A Reevaluation Of The Mechanism Of Cellular Uptake," J. Biol. Chem. 278:585-590 ; Tamsamani, J. et al. (2004) "The Use Of Cell-Penetrating Peptides For Drug Delivery," Drug Discov. Today 9: 1012-1019) 。

【 0 0 9 1 】

III . 本発明の抗体および抗体断片の使用

本発明は、対象患者におけるアルツハイマー病またはタウ異常症を診断および/または治療するための、^(P)Ser404エピトープに対して免疫特異的である抗体を基にした分子の使用に関する。そのような診断的有用性に関して、そのような使用は、対象において (すなわち、インビボで)、好ましくは検出可能に標識された、例えば、抗体4E6G7またはその^(P)Ser404エピトープ結合性断片 (特にそれらのscFv断片) を用いて (そのような分子は本明細書中で本発明の診断用分子と総称される)、病的タウ配座異性体の存在を検出することを伴ってよい。または、そのような使用は、エクスピボで (例えば、生検試料または死後において)、本発明の診断用分子を用いて病的タウ配座異性体の存在を検出することを伴ってもよい。

【 0 0 9 2 】

1つの態様において、本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした分子は、ヒト化抗体であってよい。

【 0 0 9 3 】

本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした分子の治療的有用性に関して、

そのような有用性は、アルツハイマー病またはそのようなタウ異常症の1つまたは複数の症状を有し、それ故にそのような治療法を必要とする患者に対する、そのような抗体を基にした分子（例えば、抗体4E6G7、およびより詳細には、そのscFv断片）の治療的有効量の投与を伴ってよく、または、そのような症状を呈していないか、または初期のアルツハイマー病もしくはタウ異常症を指し示す軽度認知症もしくはプレ-タウ異常症（pre-tauopathy）の症状を呈している患者に対する、そのような抗体を基にした分子の予防的有効量の投与を伴ってもよく、そのような分子は本明細書中で本発明の治療用分子と総称される。

【0094】

本発明の^{P}Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした分子は、^{P}Ser404エピトープ以外のエピトープに対して免疫特異性を有する抗体および抗体を基にした分子と合わせて、診断目的および/または治療目的で用いることもできる。

【0095】

IV. 本発明のタウ結合性分子の産生

本発明のタウ結合性分子は、好ましくは、それらの構成要素ポリペプチド鎖をコードする核酸分子の組換え発現を介して産生される。本発明はしたがって、本発明の抗体のそのような1つもしくは複数のポリペプチド鎖またはそれらの断片をコードする発現ベクターにも関する。

【0096】

本発明の文脈における発現ベクターは、染色体核酸ベクター、非染色体核酸ベクター、および合成核酸ベクター（発現制御エレメントの適したセットを含む核酸配列）を含む、任意の適したDNAベクターまたはRNAベクターであってよい。そのようなベクターの例には、SV40、細菌プラスミド、ファージDNA、パキユロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ならびにウイルス核酸（RNAまたはDNA）ベクターの誘導體が含まれる。1つの態様において、抗タウ抗体をコードする核酸は、例えば直鎖発現エレメントを含む、裸のDNAベクターもしくはRNAベクター（例えば、Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)に記載されたような）、圧縮された核酸ベクター（例えば、US 6,077,835号および/もしくはWO 00/70087号に記載されたような）、プラスミドベクター、例えばpBR322、pUC19/18、もしくはpUC118/119など、「超小型（midge）」最小サイズ核酸ベクター（例えば、Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)に記載されたような）、または沈殿された核酸ベクター構築物、例えばCaPO4によって沈殿された構築物（例えば、WO 00/46147号、Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986)、Wigler et al, Cell 14, 725 (1978)、およびCoraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 2, 603 (1981)に記載されたような）の中に含まれる。そのような核酸ベクターおよびその利用は当技術分野において周知である（例えば、US 5,589,466号およびUS 5,973,972号を参照）。

【0097】

1つの態様において、ベクターは、細菌細胞における、本発明の^{P}Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした分子の発現のために適している。そのようなベクターの例には、発現ベクター、例えばBlueScript（Stratagene）、pINベクター（Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)、pETベクター（Novagen, Madison WI）など）が含まれる。同様にまたは代替的に、発現ベクターは、酵母系におけるそのような抗体を基にした分子の発現に適したベクターでもよい。酵母系における発現に適した任意のベクターを用いることができる。適したベクターには、例えば構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター、例えば 因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHを含むベクターが含まれる（F. Ausubel et al, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987)、およびGrant et al, Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)に概説）。

【0098】

本発明の発現ベクターにおいて、本発明の^{P}Ser404エピトープ特異的な抗体を基にし

10

20

30

40

50

た分子をコードする核酸分子は、任意の適したプロモーター、エンハンサー、および他の発現促進エレメントを含んでもよく、これらが会合してもよい。そのようなエレメントの例には、強発現プロモーター（例えば、ヒトCMV IEプロモーター/エンハンサーならびにRSV、SV40、SL3-3、MMTV、およびHIV LTRプロモーター）、有効なポリ(A)終結配列、大腸菌におけるプラスミド産物用の複製起点、選択マーカーとしての抗生物質耐性遺伝子、ならびに/または便利なクローニングサイト（例えば、ポリリンカー）が含まれる。核酸はまた、構成的プロモーターとは反対に誘導性プロモーター、例えばCMV IEを含んでもよい（当業者は、そのような用語がある特定の条件下での遺伝子発現の度合いに関する実際の記述語であることを認識しているであろう）。

【0099】

1つの別のさらなる局面において、本発明は、本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした分子を産生する、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞、例えばトランスフェクターマに関する。宿主細胞の例には、酵母細胞、細菌細胞、および哺乳動物細胞、例えばCHO細胞またはHEK細胞が含まれる。例えば、1つの態様において、本発明は、本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした分子の発現をコードする配列を含む核酸が細胞ゲノムに安定に組み込まれている細胞を提供する。別の態様において、本発明は、本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした分子の発現をコードする配列を含む、非組み込み型核酸、例えばプラスミド、コスミド、ファージミド、または直鎖発現エレメントなどを含む細胞を提供する。

【0100】

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした分子を産生させるための方法であって、a) 本明細書において前述された本発明のハイブリドーマまたは宿主細胞を培養する段階、およびb) 培地から本発明の抗体を精製する段階、を含む方法に関する。

【0101】

一般に、本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした分子は、任意の適した数の修飾アミノ酸を含めることによって、かつ/またはそのようなコンジュゲートされた置換基との会合によって改変することができる。この文脈における適合性は一般に、誘導体化されていない親抗タウ抗体の^(P)Ser404エピトープに対する免疫特異性を少なくとも実質的に保っている能力によって判定される。1つまたは複数の修飾アミノ酸の存在は、例えば、ポリペプチドの血清中半減期を延長させること、ポリペプチドの抗原性を低下させること、またはポリペプチドの貯蔵安定性を高めることにおいて有利でありうる。アミノ酸は、例えば、組換え体産生中に翻訳時または翻訳後に修飾されるか（例えば、哺乳類細胞における発現中のN-X-S/TモチーフでのN結合型グリコシル化）、または合成手段によって修飾される。修飾アミノ酸の非限定的な例には、グリコシル化アミノ酸、硫酸化アミノ酸、プレニル化（例えば、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化）アミノ酸、アセチル化アミノ酸、アシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ピオチニル化アミノ酸、カルボキシル化アミノ酸、リン酸化アミノ酸などが含まれる。アミノ酸の修飾について当業者の手引きとなる適切な参考文献は、あまねく文献に豊富である。例示的なプロトコルは、Walker (1998) Protein Protocols On CD-Rom, Humana Press, Totowa, NJに記載がある。修飾アミノ酸は、例えば、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ピオチニル化アミノ酸、脂質モイエティーにコンジュゲートされたアミノ酸、または有機誘導体化剤にコンジュゲートされたアミノ酸から選択されうる。

【0102】

上に指摘したように、投与される本発明の治療用分子の半減期を延長させることが望ましい場合には、そのような分子に、ポリオキシエステル化ポリオールまたはポリエチレングリコール（PEG）など（例えば、分子量が約1,000～約40,000、例えば約2,000～約20,000、例えば、約3,000～12,000g/molなどであるPEG）を含めるか（Moosmann, A. et al. (2014) "Purification Of PEGylated Proteins, With The Example Of PEGylated Lysozym

10

20

30

40

50

e and PEGylated scFv," *Methods Mol. Biol.* 1129:527-538 ; Jevsevar, S. et al. (2010) "PEGylation Of Therapeutic Proteins," *Biotechnol. J.* 5:113-228)、もしくはグルコシル化によって糖質モイエティーを含めるか、またはヒト血清アルブミンなどのタンパク質を付加または会合させるように形成させるとよい (Muller, M.R. et al. (2012) "Improving The Pharmacokinetic Properties Of Biologies By Fusion To An Anti-HSA S hark VNAR Domain," *MAbs.* 4(6):673-685 ; Stork, R. et al. (2008) "N-Glycosylation As Novel Strategy To Improve Pharmacokinetic Properties Of Bispecific Single-Chain Diabodies," *J. Biol. Chem.* 283:7804-7812 ; Alt, M. et al. (1999) "Novel Tetravalent And Bispecific IgG-like Antibody Molecules Combining Single-Chain Diabodies With The Immunoglobulin Gammal Fc or CHS Region *FEBS Lett.* 454:90-94 ; Peters T . et al. (1985) "Serum Albumin Adv. *Protein Chem.* 37:161-245)。例示的なポリマー、およびポリマーをペプチドに結び付ける方法は公知である (例えば、米国特許第4,766,106号 ; 第4,179,337号 ; 第4,495,285号および第4,609,546号を参照)。

【0103】

V. 本発明の薬学的組成物

本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした分子は、活性治療薬および種々の他の薬学的に許容される構成要素のうちの1つ以上を含む薬学的組成物として有利に投与される。REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (21st Edition) (2005) (Troy, D.B. et al. (Eds.) Lippincott Williams & Wilkins (Pubis.), Baltimore MD) を参照されたく、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。好ましい形態は、意図する投与様式および治療的適用に依存する。組成物はまた、所望の製剤に応じて、薬学的に許容される、非毒性の担体、添加剤、希釈剤、増量剤、塩、緩衝剤、界面活性剤 (例えば、Tween-20またはTween-80などの非イオン性界面活性剤)、安定化剤 (例えば、糖またはタンパク質非含有アミノ酸)、保存料、組織固定剤、溶解補助剤、および/または薬学的組成物に含めるのに適する他の材料、ならびに動物またはヒトへの投与用の薬学的組成物を製剤化するために一般的に用いられる媒体も含みうる。希釈剤は、配合物の生物学的活性に影響を与えないように選択される。そのような希釈剤の例には、蒸留水、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、およびハックス溶液がある。加えて、薬学的組成物または製剤が、他の担体、または非毒性、非治療的、非免疫原性の安定剤などを含んでもよい。本発明の薬学的組成物において使用しうる適した水性および非水性の担体の例には、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの適した混合物、植物油、例えばオリーブ油、トウモロコシ油、ラッカセイ油、綿実油および胡麻油など、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントゴムおよび注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルなど、ならびに/またはさまざまな緩衝剤が含まれる。他の担体も薬学の技術分野において周知である。

【0104】

薬学的に許容される担体には、滅菌した水溶液または分散液、および滅菌した注射液または分散液を即時調製するための滅菌した散剤が含まれる。薬学的活性物質のためのそのような媒質および作用物質の使用は当技術分野において公知である。いずれかの従来の媒質または作用物質が活性化合物と不適合である場合を除き、本発明の薬学的組成物におけるそれらの使用を想定している。

【0105】

組成物は、緩徐に代謝される大きな高分子、例えば、タンパク質、キトサンのような多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコポリマー (例えば、ラテックス官能化セファロース、アガロース、セルロースなど)、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマー、および脂質凝集体 (例えば、油滴またはリポソーム) も含むことができる。薬学的組成物の担体および他の構成要素の適合性は、本発明の選ばれた化合物または薬学的組成物の所望の生物学的特性に対して顕著な悪影響を及ぼさないことに基づいて判定される (例えば、抗原結合に対する実質的未満の影響 (例えば、10%またはそれ未満の相対的阻害、5%ま

たはそれ未満の相対的阻害など)。

【0106】

本発明の薬学的組成物はまた、薬学的に許容される酸化防止剤、例えば、(1)水溶性の酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；(2)油溶性の酸化防止剤、例えばアスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなど；および(3)金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などを含んでもよい。

【0107】

本発明の薬学的組成物はまた、組成物中に、等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、グリセロールまたは塩化ナトリウムなどを含んでもよい。

【0108】

本発明の薬学的組成物はまた、薬学的組成物の貯蔵寿命または有効性を強化することができる、選ばれた投与経路に適した1種類または複数種の補助剤、例えば保存料、湿潤剤、乳化剤、分散剤、保存料または緩衝剤を含んでもよい。本発明の化合物を、例えばインプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセルに封入された送達系を含む徐放製剤などの、急速に放出されないように化合物を保護する担体を用いて調製することもできる。そのような担体には、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリン、ジステアリン酸グリセリン、生分解性生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のみもしくはポリ乳酸とワックス、または当技術分野において周知の他の材料を含んでもよい。そのような製剤の調製のための方法は当業者に一般に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0109】

1つの態様において、本発明の化合物を、インピボでの適正な分布が確保されるように製剤化することもできる。非経口的投与のための薬学的に許容される担体には、滅菌した水溶液または分散液、および滅菌した注射液または分散液を即時調製するための滅菌した散剤が含まれる。薬学的活性物質のためのそのような媒質および作用物質の使用は当技術分野において公知である。いずれかの従来の媒質または作用物質が活性化化合物と不適合である場合を除き、本発明の薬学的組成物におけるそれらの使用を想定している。補助的な活性化化合物を組成物中に組み入れてもよい。

【0110】

注射用の薬学的組成物は、典型的には、製造および貯蔵の条件下で無菌かつ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬物濃度に適した他の規則的構造として調製される。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど)、ならびにそれらの適した混合物、植物油、例えばオリーブ油、および注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルなどであってよい。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティング材料の使用によって、分散系の場合は必要とされる粒子径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトールなど、または塩化ナトリウムを組成物中に含めることが好ましいと考えられる。注射用組成物の長期的吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含めることによって実現することができる。無菌注射用溶液は、必要に応じて、前述の成分の1種または組み合わせとともに、適切な溶媒中で必要な量の活性化化合物を混合し、続いて滅菌精密濾過することによって調製することができる。一般に、分散液は、基本となる分散媒および前述したもののうち必要とされる他の成分を含む無菌媒体中に活性

10

20

30

40

50

化合物を混合することによって調製される。無菌注射用溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、あらかじめ滅菌濾過したその溶液から、活性成分および任意の付加的な所望の成分の粉末を生じる、真空乾燥およびフリーズドライ法（凍結乾燥）である。

【0111】

無菌注射用溶液は、必要に応じて、前述の成分の1種または組み合わせとともに、適切な溶媒中で必要な量の活性化合物を混合し、続いて滅菌精密濾過することによって調製することができる。一般に、分散液は、基本となる分散媒および前述したもののうち必要とされる他の成分を含む無菌媒体中に活性化合物を混合することによって調製される。無菌注射用溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、あらかじめ滅菌濾過したその溶液から、活性成分および任意の付加的な所望の成分の粉末を生じる、真空乾燥およびフリーズドライ法（凍結乾燥）である。

10

【0112】

非経口的投与の場合、本発明の作用物質は、典型的には、生理的に許容される希釈剤に物質を溶解させた溶液または懸濁液の注射投与物として、水、油、食塩水、グリセロール、またはエタノールなどの無菌の液体であってよい薬学的担体とともに製剤化される。加えて、補助的な物質、例えば湿潤剤または乳化剤、界面活性剤、pH緩衝物質などが組成物中に存在してもよい。薬学的組成物の他の構成要素は、石油、動物、植物、または合成に由来するものである。ラッカセイ油、ダイズ油および鉱油はすべて、有用な材料の例である。一般に、グリコール、例えばプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどは、特に、注射液にとって好ましい液体担体である。本発明の作用物質は、有効成分を持続放出するように製剤化できるデポ注射剤またはインプラント調製物の形態で投与することができる。例示的な組成物は、scFvを約5mg/mLとして含み、50mM L-ヒスチジン、150mM NaClからなり、HClによってpH 6.0に調整された水性緩衝液中に製剤化される。

20

【0113】

典型的には、組成物はそのように液体溶液または懸濁液のいずれかとしての注射液として調製される；注射前に液体媒体中に溶解または懸濁するのに適切な固体形態も調製できる。調製物はまた、上記のようにアジュバント効果を強化するために、乳化させること、またはリポソームもしくは微粒子、例えばポリラクチド、ポリグリコリドもしくはコポリマー中に封入することもできる（Langer, et al., Science 249: 1527 (1990); Hanes, et al., Advanced Drug Delivery Reviews 28:97-119 (1997)、これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる）。他の投与様式に適するその他の製剤には、経口製剤、鼻腔内製剤および肺用製剤、坐薬、ならびに経皮適用が含まれる。

30

【0114】

VI. 本発明の薬学的組成物の投与

本発明の分子は、予防的および/または治療的処置のための非経口的、局所的、経口的または鼻腔内手段によって投与することができる。筋肉内注射（例えば、腕または足の筋肉内）および静脈内注入が、本発明の分子の好ましい投与方法である。いくつかの方法では、そのような分子は、持続放出組成物またはデバイス、例えば、Medipad（登録商標）デバイス（Elan Pharm. Technologies, Dublin, Ireland）などとして投与される。いくつかの方法では、本発明の分子は、沈着物が蓄積している特定の組織中へ、例えば頭蓋内注射によって直接注射される。

40

【0115】

1つの態様において、本発明の薬学的組成物は非経口的に投与される。本明細書で用いる「非経口的投与」および「非経口的に投与される」という語句は、通常は注射による、経腸投与および局所投与以外の投与様式のことを意味し、これには表皮、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、頭蓋内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、腱内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、頭蓋内、胸腔内、硬膜外および胸骨内への注射、皮下および注入が含まれる。1つの態様において、薬学的組成物は静脈内または皮下への注射または注入によって投与される。

50

【0116】

予防的適用において、薬学的組成物または医薬は、アルツハイマー病に対する感受性があるかまたは他の様式でリスクがある患者に対して、そのリスクを消失もしくは低下させる、重症度を軽減する、または本疾患の生化学的、組織学的および/または行動的症状、その合併症ならびに本疾患の発症の間に提示される中間的な病理学的表現型を含む、疾患の発生を遅延させるために十分な量で投与される。

【0117】

治療的適用において(すなわち、アルツハイマー病または他のタウ異常症を有すると診断された患者にかかわる適用において)、本発明の治療用分子は、そのような患者に対して、その合併症および本疾患の発症における中間的な病理学的表現型を含む、疾患の症状(生化学的、組織学的および/または行動的評価によって証拠が得られる)を治癒させる、治療する、または少なくとも部分的に停止させるために十分な量で投与される。いくつかの態様において、本発明の治療用分子の投与は、特徴的なアルツハイマーの病態をまだ発症していない患者において軽度の認知障害を軽減するかまたは消失させる。

10

【0118】

上記の病状の治療のための、本発明の提供される治療用分子の有効量は、投与の手段、標的部位、患者の生理的状态、投与される他の医薬、および処置が予防的であるかまたは治療的であるかを含む、多くの要因に応じて異なりうる。安全性および有効性を最適化するために、治療投与量は典型的には微調整される。投薬を行う任意の所与の日に、投与量は、宿主体重あたりで約0.0001~約100mg/kg、より一般的には約0.01~約5mg/kgの範囲でありうる。例えば、投与量は1mg/kg体重もしくは10mg/kg体重、または1~10mg/kg体重の範囲内にありうる。したがって、例示的な投与量には以下が含まれる: 約0.1~約10mg/kg/体重、約0.1~約5mg/kg/体重、約0.1~約2mg/kg/体重、約0.1~約1mg/kg/体重、例えば約0.15mg/kg/体重、約0.2mg/kg/体重、約0.5mg/kg/体重、約1mg/kg/体重、約1.5mg/kg/体重、約2mg/kg/体重、約5mg/kg/体重、または約10mg/kg/体重。

20

【0119】

当技術分野における通常の技能を有する医師または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師または獣医師は、薬学的組成物中に用いられる抗タウ抗体または断片の用量を、所望の治療効果を達成するのに必要なものよりも低いレベルで開始し、次いで、所望の効果が達成されるまで投与量を徐々に増やすことができる。一般に、本発明の組成物の適切な一日量は、治療効果を生じるのに有効な最小用量である化合物の量である。そのような有効量は一般に、上記の要因に依存すると考えられる。投与は、例えば静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下であってよく、例えば標的部位の近位に投与される。所望であれば、薬学的組成物の有効な一日量を、1日にわたって適切な間隔で別個に投与される、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ以上の分割用量として投与してもよく、任意で、単位剤形で投与されてもよい。本発明の化合物は単独で投与することも可能であるが、上記のように薬学的組成物として化合物を投与することが好ましい。

30

【0120】

例示的な治療レジメンは、2週間毎に1回または1か月に1回または3~6か月毎に1回の投与を伴う。いくつかの方法では、1種、2種またはそれを上回る抗体(またはそれらのエピトープ結合性断片)が、本発明の治療用分子の投与とともに投与されると考えられ、この場合には、投与されるそのような各抗体の投与量は指定された範囲内に収められる。

40

【0121】

投与の用量および頻度は、治療が予防的であるかまたは治療的であるかに応じて異なりうる。予防的適用においては、比較的低い投与量が、長期間にわたって比較的頻繁でない間隔で投与される。患者の中には、残りの生涯の間、継続して治療を受ける者もいる。治療的適用においては、比較的短い間隔での比較的高い投与量が、疾患の進行が減少または終了するまで、および好ましくは、患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すま

50

で、時折必要とされる。その後は患者に予防的投与レジメンを用いてそのような治療用分子を投与することができる。

【0122】

治療目的の場合、本発明の分子は通常、複数の機会に投与される。単回の投薬（例えば、ボラスまたは注入）の間の間隔は、毎週、毎月、または毎年でありうる。いくつかの方法では、投与量は、1~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の血漿中濃度が達成されるように、またいくつかの方法では25~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が達成されるように調整される。または、本発明の治療用分子を持続放出製剤として投与することもでき、この場合にはより頻度が少ない投与が必要とされる。投与量および頻度は、患者における抗体の半減期に応じて異なる。一般に、ヒト抗体が最長の半減期を示し、その次がヒト化抗体、キメラ抗体、そして非ヒト抗体の順である。scFv分子は一般に短い血清中半減期を有する。

10

【0123】

本発明のもう1つの局面は、タウタンパク質またはその免疫原性エピトープを認識するさらなる抗体またはそのエピトープ結合性断片を、本発明の治療用分子と組み合わせて投与する併用療法である。アルツハイマー病およびダウン症候群などのアミロイド形成性疾患の場合には、アミロイド- (A)沈着物を排除するための免疫調節が新たな治療法として登場しつつある。A を標的とする免疫療法により、一貫して認知の改善がもたらされている。タウ病理とA 病理は相乗的である可能性が高い。このため、両方の病態の排除を同時に標的とする併用療法は、それぞれを個別に標的とするものよりも有効である可能性がある。パーキンソン病および関連する神経変性疾患の場合には、凝集形態にある

20

【0124】

VII. 本発明のタウ結合性分子の有用性

D. 診断的有用性

本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした診断用分子を用いて、対象における病的タウ配座異性体の存在を検出することは、対象から生物試料（例えば、血液、尿、脳脊髄液）を入手すること、生物試料を前記診断用抗体と接触させること、および対象由来の試料における病的タウタンパク質配座異性体に対する診断用分子の結合を検出することによって達成しうる。本発明の診断用分子の検出に容易に適応させることができる、生体試料における病的タウタンパク質の検出を実施するためのアッセイは当技術分野において周知であり、これにはELISA、免疫組織化学、ウエスタンブロットなどが非限定的に含まれる。

30

【0125】

または、本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした診断用分子を用いて、対象における病的タウ配座異性体の存在を検出することを、インビボイメージング手法を用いて達成することもできる。インビボイメージングは、病的タウペプチドに対する抗原特異性を有する診断用抗体を対象に投与すること、および病的タウ配座異性体に対する診断用抗体試薬の結合をインビボで検出することを伴う。

40

【0126】

本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした診断用分子は、注射（例えば、静脈内注射、頸動脈内注射など）によって患者の体内に投与すること、または頭蓋内注射によって脳内に直接的に投与することができる。そのような分子の投与量は、宿主体重あたりで約0.0001mg/kg~約100mg/kgであるべきであり、より一般的には約0.01mg/kg~約5mg/kgである。例えば、投与量は約1mg/kg体重もしくは約10mg/kg体重、または約1~10mg/kg体重の範囲内にありうる。

【0127】

典型的には、本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした診断用分子は標識されるが、いくつかの方法では、分子を標識せずに、二次標識剤を用いてそのような分子

50

に結合させる（当技術分野において公知の手法を用いて、分子と直接的に、または仲介物（例えば、当技術分野において公知のリンカー）を經由して間接的に、カップリングまたはコンジュゲートさせる）。標識の選択は検出の手段に依存する。例えば、蛍光標識（希土類キレート（例えば、ユーロピウムキレート）など）、フルオレセイン型標識（例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン）、ローダミン型標識（例えば、ALEXA FLUOR（登録商標）568（Invitrogen）、TAMRA（登録商標）またはダンシルクロリド）、VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME（商標）（Perkin Elmer）、フィコエリトリン；ウンベリフェロン、リサミン；シアニン；フィコエリトリン、テキサスレッド、BODIPY FL-SE（登録商標）（Invitrogen）またはそれらの類似体が、光学検出に
10 適している。化学発光標識を用いることもできる（例えば、ルミノール、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリン）。また、そのような診断および検出を、本発明の診断用分子を、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼを非限定的に含む酵素であるさまざまな酵素、または限定はされないがストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどの補欠分子族複合体を非限定的に含む検出可能な物質とカップリングさせることによって実現することもできる。常磁性標識および放射性同位体標識を用いることもでき、これらは好ましくは陽電子放出断層撮影法（PET）または単一光子放出型断層撮影法（SPECT）を用いて検出される。放射標識には、ビスマス（ ^{213}Bi ）、炭素（ ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C ）、クロム（ ^{51}Cr ）、コバルト（ ^{57}Co 、 ^{60}Co ）、銅（ ^{64}Cu ）、ジスプロシウム（ ^{165}Dy ）、エルビウム（ ^{169}Er ）、フッ素（ ^{18}F ）、ガドリニウム（ ^{153}Gd 、 ^{159}Gd ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、ゲルマニウム（ ^{68}Ge ）、金（ ^{198}Au ）、ホルミウム（ ^{166}Ho ）、水素（ ^3H ）、インジウム（ ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{113}In 、 ^{115}In ）、ヨウ素（ ^{121}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、イリジウム（ ^{192}Ir ）、鉄（ ^{59}Fe ）、クリプトン（ $^{81\text{m}}\text{Kr}$ ）、ランタニウム（ ^{140}La ）、ルテニウム（ ^{177}Lu ）、マンガン（ ^{54}Mn ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、窒素（ ^{13}N 、 ^{15}N ）、酸素（ ^{15}O ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、リン（ ^{32}P ）、カリウム（ ^{42}K ）、プラセオジウム（ ^{142}Pr ）、プロメチウム（ ^{149}Pm ）、レニウム（ ^{186}Re 、 ^{188}Re ）、ロジウム（ ^{105}Rh ）、ルビジウム（ ^{81}Rb 、 ^{82}Rb ）、ルテニウム（ ^{82}Ru 、 ^{97}Ru ）、サマリウム（ ^{153}Sm ）、スカンジウム（ ^{47}Sc ）、セレン（ ^{75}Se ）、ナトリウム（ ^{24}Na ）、ストロンチウム（ ^{85}Sr 、 ^{89}Sr 、 ^{92}Sr ）、イオウ（ ^{35}S ）、テクネシウム（ ^{99}Tc ）、タリウム（ ^{201}Tl ）、スズ（ ^{113}Sn 、 ^{117}Sn ）、キセノン（ ^{133}Xe ）、イッテルビウム（ ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Yb ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、および亜鉛（ ^{65}Zn ）；さまざまな陽電子放出断層撮影法を用いる陽電子放出性金属、および非放射性常磁性金属イオン（例えば、アルミニウム（Al）、バリウム（Ba）、カルシウム（Ca）、セリウム（Ce）、ジスプロシウム（Dy）、エルビウム（Er）、ユーロピウム（Eu）、ガドリニウム（Gandolinium）（Gd）、ホルミウム（Ho）、イリジウム（Ir）、リチウム（Li）、マグネシウム（Mg）、マンガン（Mn）、モリブデン（M）、ネオジウム（Nd）、オスミウム（Os）、酸素（O）、パラジウム（Pd）、白金（Pt）、ロジウム（Rh）、ルテニウム（Ru）、サマリウム（Sm）、ナトリウム（Na）、ストロンチウム（Sr）、テルビウム（Tb）、ツリウム（Tm）、スズ（Sn）、チタン（Ti）、タングステン（W）、およびジルコニウム（Zr）の常磁性イオン、特に Co^{+2} 、 C^{+2} 、 Cr^{+3} 、 Cu^{+2} 、 Fe^{+2} 、 Fe^{+3} 、 Ga^{+3} 、 Mn^{+3} 、 Ni^{+2} 、 Ti^{+3} 、 V^{+3} 、および V^{+4} ）が非限定的に含まれる。放射標識アミノ酸および関連するペプチド誘導体を調製するための方法は、当技術分野において公知である（例えば、Junghans et al., in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2nd edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))ならびに米国特許第4,681,581号；第4,735,210号；第5,101,827号；第5,102,990号；RE 35,500号；第5,648,471号および第5,697,902号を参照されたい。例えば、放射性同位体をクロラミンT法によってコンジュゲートさせることができる（Lindgren, S. et al. (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl)Benzoate As An Intermediate," *Nucl. Med. Biol.* 25(7):659-665；Kurth, M. et al. (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoc
40 50

lonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor," J. Med. Chem. 36(9):1255-1261 ; Rea, D.W. et al. (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors," Cancer Res. 50(3 Suppl):857s-861s)。

【0128】

診断は、対象からの試料中または対象における、標識された病的タウ配座異性体、タウ凝集物、および/または神経原線維変化の数、サイズ、および/または強度を、対応するベースライン値と比較することによって行われる。ベースライン値は、非罹患個体の集団における平均レベルを表すことができる。また、ベースライン値が、同じ対象において決定された以前のレベルを表すこともできる。

【0129】

上記の診断方法を、治療に対する対象の反応をモニターするために用いることもできる。この態様において、対象における病的タウの存在の検出は、治療の開始前に判定される。この時点での対象における病的タウのレベルは、ベースライン値として用いられる。治療の過程におけるさまざまな時点で、病的タウタンパク質配座異性体、タウ凝集物、および/または神経原線維変化の検出を繰り返し、測定した値をその後でベースライン値と比較する。ベースラインに比しての値の減少は、治療に対するポジティブな反応の表れである。病的タウが脳から排除されることから、値が生体液中で一時的に増加することもありうる。

【0130】

本発明はさらに、上記の診断方法およびモニタリング方法を行うためのキットにも向けられる。典型的には、そのようなキットは、本発明の診断用抗体を含む。キットはまた、検出可能な標識も含みうる。診断用抗体それ自体が、直接的に検出可能であるかまたは二次反応（例えば、ストレプトアビジンとの反応）を介して検出可能である検出可能な標識（例えば、蛍光分子、ビオチンなど）を含んでもよい。または、検出可能な標識を含む第2の試薬を利用してよく、ここでこの第2の試薬は一次抗体に対する結合特異性を有する。生体試料中の病的タウタンパク質を測定するのに適した診断用キットにおいて、キットの抗体は、マイクロタイターディッシュのウェルなどの固相に対してあらかじめ結合された上で供給されてもよい。

【0131】

標識された抗タウ抗体またはそれらのタウ結合性断片の存在を、診断目的でインビボで検出することもできる。1つの態様において、そのような診断は以下を含む：a) 対象に対してそのような標識分子の有効量を投与する段階；b) 標識分子が凝集タウの部位（あれば）に濃縮するように、かつ非結合標識分子が排除されてバックグラウンドレベルになるように、投与後にある時間間隔にわたって待機する段階；c) バックグラウンドレベルを決定する段階；およびd) バックグラウンドレベルを上回る標識分子の検出によってその対象がタウ異常症を有することが指し示され、またはそのようなタウ異常症の重症度が指し示されるように、対象におけるそのような標識分子を検出する段階。そのような態様によれば、抗体は、当業者に公知である特定のイメージングシステムを用いた検出用に適するイメージングモイエティーによって標識される。バックグラウンドレベルは、検出された標識分子の量を特定のイメージングシステムに関して以前に決定された標準的な値と比較することを含む、当技術分野において公知のさまざまな方法によって決定しうる。本発明の診断方法に用いる方法およびシステムには、コンピュータ断層撮影法（CT）、陽電子放出断層撮影法（PET）、磁気共鳴イメージング（MRI）および超音波検査などの全身スキャンが非限定的に含まれる。

【0132】

E. 治療的有用性

以上に指摘したように、本発明の1つの局面は、対象におけるアルツハイマー病または他のタウ異常症を予防または治療する方法であって、そのようなアルツハイマー病または他のタウ異常症を予防または治療するために、本発明の^(P)Ser404エピトープ特異的な抗体を基にした分子（特に抗体4E6G7またはそのscFv断片）の有効量の投与を介する方法に

10

20

30

40

50

関する。そのような投与は、対象の脳からのタウ凝集物の排除を促進する目的で提供してもよく、または対象における神経原線維変化関連の行動的表現型を緩徐化する目的で提供してもよい。加えて、そのような投与を、アルツハイマー病、または神経原線維変化と関連のある他のタウ異常症の発病を遅らせる、妨げる、弱める、または予防する目的で予防的に提供することもできる。

【0133】

本明細書で用いる「治療」または「治療すること」という用語は、疾患もしくは障害の進行もしくは重症度を改善すること、緩徐化すること、もしくは好転させること、またはそのような疾患もしくは障害の1つもしくは複数の症状もしくは副作用を改善すること、緩徐化すること、もしくは好転させることを意味する。本発明において、「治療」または「治療すること」はさらに、有益なまたは所望の臨床結果を得るためのアプローチも意味し、ここで「有益なまたは所望の臨床結果」には、症状の軽減、障害または疾患の程度の減少、疾患または障害の状態の安定化（すなわち、悪化しないこと）、疾患または障害の状態の進行の遅延または緩徐化、疾患または障害の状態の改善または緩和、および疾患または障害の寛解が、部分的であるか完全であるか、検出可能であるか検出不能であるかを問わず、非限定的に含まれる。

10

【0134】

「有効量」とは、本発明の抗体に適用される場合、必要な投与量および期間で、臨床結果を非限定的に含む意図する生物学的効果または所望の治療結果を達成するのに十分である量のことを指す。「治療的有效量」という語句は、本発明の抗体に適用される場合、障害もしくは疾患の状態の進行または障害もしくは疾患の症状を改善する、緩和する、安定化する、好転させる、緩徐化する、または遅らせるのに十分である抗体の量を表すことを意図している。1つの態様において、本発明の方法は、他の化合物との組み合わせでの抗体の投与を提供する。そのような場合に、「有効量」とは、意図する生物学的効果を生じさせるのに十分である組み合わせの量のことである。

20

【0135】

治療的または予防的処置を達成するために適切な量は、それぞれ治療的有效用量または予防的有效用量と定義される。予防的レジメンおよび治療的レジメンの両方において、薬剤は通常、十分な免疫応答が達成されるまで数回の投薬として投与される。典型的には、免疫応答をモニターし、免疫応答が減弱し始めたならば反復投薬を行う。そのような抗体またはそのエピトープ結合性断片の治療的有效用量または予防的有效用量は、個体の疾患状態、年齢、性別および体重、ならびに分子が対象において所望の応答を誘発する能力などの要因に応じて異なる。治療的有效量はまた、治療的に有益な効果が、抗体または抗体部分のあらゆる毒性作用または有害作用を上回る量でもある。

30

【0136】

治療の対象となる患者には、そのような病状の臨床的に認識されている症状または徴候を示す、アルツハイマー病または他のそのようなタウ異常症を有する個体の他に、そのような病状の症状を現時点では示していない患者も含まれる。アルツハイマー病は死後生検でのみ確定診断されるが、アルツハイマー病に罹患した個体は、「アルツハイマー病関連疾患協会 (Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) (「ADRDA」) 基準を用いて臨床的に診断されている (Carrillo, M.C. et al. (2013) "Revisiting The Framework Of The National Institute On Aging-Alzheimer's Association Diagnostic Criteria," *Alzheimers Dement.* 9(5):594-601; Budson, A.E. et al. (2012) "New Criteria For Alzheimer Disease And Mild Cognitive Impairment: Implications For The Practicing Clinician," *Neurologist* 18(6):356-363; Sarazin, M. et al. (2012) "Clinical And Research Diagnostic Criteria For Alzheimer's Disease," *Neuroimaging Clin. N. Amer.* 22(1):23-32; Husain, M.M. (2005) "Clinical Diagnosis And Management Of Alzheimer's Disease," *Neuroimaging Clin. N. Amer.* 15(4):767-777; Small, G.W. et al. (1997) "Diagnosis And Treatment Of Alzheimer Disease And Related Disorders . Consensus Statement Of The American Association For Geriatric Psychiatry, The

40

50

Alzheimer's Association, And The American Geriatrics Society," JAMA 278(16):1363-1371)。または、そのような個体を、相関性がある危険因子(すなわち、アルツハイマー病または他のそのようなタウ異常症と50%を上回る一致をみることが見いだされている1つまたは複数の因子)の存在によって、アルツハイマー病とも他のタウ異常症とも関連のない疾患または病状を有する個体と鑑別することもできる。そのような相関性がある危険因子には、その患者がアルツハイマー病もしくは他のそのようなタウ異常症を来した親族を有する、または高コレステロール血症もしくはアテローム性動脈硬化症の家族歴を呈するという所見が含まれる。そのような相関性がある危険因子には、患者が、そのような実際の疾患の発生と相関性がある(すなわち、50%を上回る一致をみることが見いだされている)1つまたは複数の遺伝的または生化学的マーカーを有するという所見が特に含まれる。アルツハイマー病のリスクとなるそのような遺伝的マーカーの例には、APP遺伝子における相関性がある突然変異、例えば、APP遺伝子の位置717ならびに位置670および671にある突然変異(それぞれHardy突然変異およびSwedish突然変異と称されている)が含まれる。遺伝的リスクが判明している他の適したマーカーには、プレセニリン遺伝子(PS1およびPS2)ならびにApoE4遺伝子における相関性がある突然変異が含まれる(Bekris, L. M. et al. (2010) "Genetics of Alzheimer Disease," J. Geriatr. Psychiatry Neurol. 23(4):213-227)。

10

【 0 1 3 7 】

そのようなPS1突然変異には以下の置換が含まれる：

20

R35Q; A79V; V82L; L85P; V89L;
 V94M; V96F; V97L; F105I; F105L; F105V; L113P; L113Q; Y115C; Y115D; Y115H; T116I;
 T116N; P117A; P117L; P117R; P117S; E120D; E120D; E120G; E120K; E123K; N135D;
 N135S; A136G; M139I; M139I; M139K; M139T; M139V; I143F; I143M; I143N; I143T;
 I143V; M146I; M146I; M146I; M146L; M146L; M146V; T147I; L153V; Y154C; Y154N;
 H163R; H163Y; W165C; W165G; L166H; L166P; L166R; S169L; S169P; S170F; L171P;
 L173F; L173W; L174M; L174R; F175S; F177L; F177S; S178P; G183V; E184D; V191A;
 G206A; G206D; G206S; G206V; G209E; G209R; G209V; S212Y; I213F; I213L; I213T;
 H214D; H214Y; G217D; G217R; L219F; L219P; Q222H; Q222R; Q223R; L226F; L226R;
 I229F; A231T; A231V; M233I; M233L; M233L; M233T; M233V; L235P; L235V; F237I;
 F237L; K239N; T245P; A246E; L248R; L250S; L250V; Y256S; A260V; V261F; V261L;
 L262F; C263F; C263R; P264L; G266S; P267L; P267S; R269G; R269H; L271V; V272A;
 E273A; T274R; R278I; R278K; R278S; R278T; E280A; E280G; L282F; L282R; L282V;
 P284L; P284S; A285V; L286P; L286V; T291P; E318G; R358Q; S365A; R377M; G378E;
 G378V; L381V; G384A; F386S; S390I; V391F; L392P; L392V; G394V; N405S; A409T;
 C410Y; V412I; L418F; L420R; L424F; L424H; L424R; L424V; A426P; A431E; A431V;
 A434C; L435F; P436Q; P436S; および I439S

30

40

。

【 0 1 3 8 】

そのようなPS2突然変異には以下の置換が含まれる：

R29H; G34S; R62C; R62H; R71W;
 A85V; T122P; T122R; S130L; V139M; N141I; L143H; V148I; R163H; M174V; S175C;
 Y231C; Q228L; M239V; M230I; A252T; P334R; T430M; および D439A

50

。

【 0 1 3 9 】

そのようなApoE4アレルには、4アレル、3アレルおよび2アレルが含まれる (Vergheze, P.B. et al. (2011) "Apolipoprotein E In Alzheimer's Disease And Other Neurological Disorders," Lancet Neurol. 10(3):241-252)。

【 0 1 4 0 】

加えて、いくつかの診断検査が、アルツハイマー病を有する個体を同定するために利用可能である。これらにはCSFのタウレベルおよびA β 42レベルの測定が含まれる。タウレベルの上昇およびA β 42レベルの低下は、アルツハイマー病の存在を表す。

【 0 1 4 1 】

アルツハイマー病の場合には、事実上すべての人にアルツハイマー病に罹患するリスクがある。このため、本発明の治療用分子は、対象患者のリスクのいかなる評価の必要もなしに、一般集団に予防的に投与することができる。本方法は、アルツハイマー病の既知の遺伝的リスクを有しない個体の予防的処置のために特に有用である。無症候性患者では、処置をあらゆる年齢で開始することができる (例えば、10歳、20歳、30歳)。しかし通常は、患者が40歳、50歳、60歳、70歳、80歳または90歳になるまで処置を開始する必要はない。処置は典型的には、ある期間にわたっての多回投薬投与を必要とする。処置は、抗体を、または治療薬に対する活性化T細胞もしくはB細胞の応答をアッセイすることによってモニターすることができる。応答が低下した場合には、追加投薬の適応となる。ダウン症候群の可能性のある患者の場合は、治療薬を妊娠中の母体に対して、または患者に出生後間もなく投与することによって、処置を出生前に開始することができる。

【 0 1 4 2 】

本発明は、以下を提供する：

1. ^(P)Ser404エピトープ特異的な、抗体を基にした分子。
2. 抗体である、そのような^(P)Ser404エピトープ特異的な、抗体を基にした分子の態様。
3. 抗体4E6G7である、そのような^(P)Ser404エピトープ特異的な、抗体を基にした分子の態様。
4. scFvまたはダイアボディである、そのような^(P)Ser404エピトープ特異的な、抗体を基にした分子の態様。
5. タウ396/404ペプチド

(SEQ ID NO:8): TDHGAEIVYK^(P)SPVVS^(P)GDT^(P)SPRHL

(配列中、その残基11および19がホスホセリンである)と免疫特異的に結合する、上記の結合性分子のいずれかの態様。

6. エピトープ結合性断片が、以下の1つまたは複数を含む、上記の結合性分子のいずれかの態様：

- (a) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) SEQ ID NO:12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；または
- (f) SEQ ID NO:16のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3。

7. エピトープ結合性断片が、以下を含む、上記の結合性分子のいずれかの態様：

- (a) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) SEQ ID NO:12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) SEQ ID NO:16のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3。

8. SEQ ID NO:9の配列を有する軽鎖可変ドメインおよびSEQ ID NO:13の配列を有する重鎖可変ドメインを含む、上記の結合性分子の態様。

10

20

30

40

50

9. SEQ ID NO:9の配列を有する軽鎖可変ドメインおよびSEQ ID NO:13の配列を有する重鎖可変ドメインを含み、抗体4E6G7である、上記の結合性分子の態様。

10. SEQ ID NO:9の配列を有する軽鎖可変ドメインおよびSEQ ID NO:13の配列を有する重鎖可変ドメインを含み、scFvである、上記の結合性分子の態様。

11. SEQ ID NO:17の配列を含む、上記のscFvの態様。

12. 検出可能に標識されている、上記の結合性分子のいずれかの態様。

13. 検出可能な標識が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識、または酵素標識である、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様。

14. (A) レシピエント対象の脳または生物試料におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための医薬の製造における使用のための、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様、または

(B) レシピエント対象の脳または生物試料におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、上記の検出可能に標識された結合性分子の態様のいずれかの使用。

15. (A) レシピエント対象の脳または生物試料におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための医薬の製造における使用のための、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様、または

(B) レシピエント対象の脳または生物試料におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；

ここで検出または測定は、リン酸化タウタンパク質と結合した結合性分子のインピボでのイメージングを含む。

16. (A) レシピエント対象の脳または生物試料におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための医薬の製造における使用のための、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様、または

(B) レシピエント対象の脳または生物試料におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；

ここで検出または測定は、リン酸化タウタンパク質と結合した結合性分子のエキスビボでのイメージングを含む。

17. (A) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための医薬の製造に用いるための、

(1) 検出可能に標識された、上記の結合性分子のいずれかの態様；または

(2) 検出可能な標識が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様；または

(B) (1) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；または

(2) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可能な標識が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用。

18. (A) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための医薬の製造に用いるための、

(1) 検出可能に標識された、上記の結合性分子のいずれかの態様；または

(2) 検出可能な標識が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様；または

(B) (1) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；もしくは

(2) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可

10

20

30

40

50

能な標識が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；

ここで医薬は対象に投与されるインビボ医薬である。

19. (A) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための医薬の製造に用いるための、

(1) 検出可能に標識された、上記の結合性分子のいずれかの態様；または

(2) 検出可能な標識が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様；または

(B) (1) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；または

(2) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可能な標識が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；

ここで医薬は対象の生検試料とともにエクスピボでインキュベートされる。

20. タウ異常症が、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖したパーキンソニズム (FTDP-17)、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下グリオシス、神経原線維変化型認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症パーキンソニズム・認知症複合、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハラールフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、ニーマン・ピック病C型、プリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維変化を伴う非グアナミン運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソニズム、急性外傷性脳損傷および慢性外傷性脳症を含む群から選択される、そのような使用のいずれかの態様。

21. 態様20に列挙したタウ異常症の治療において治療的に有効である抗体を単離するための方法であって、抗タウ抗体を、可溶性PHFに対して高い親和性を呈する種についてスクリーニングする、方法。

【0143】

本発明は、タウの同じエピトープ領域に対して生じた2種の抗体、抗体4E6G7および抗体6B2G12が、初期タウ異常症のマウスモデルにおいて認知に対して非常に異なる効果を有していたという所見を反映する。抗体は両方とも、免疫原に対するホスホ-選択性を有するが、多くの点で異なっている。空間学習および記憶の急性的な改善ならびに可溶性ホスホ-タウの低下において、より低い親和性の抗体4E6G7は有効である一方、より高い親和性の抗体6B2G12は無効である。重要なことに、データにより、アルツハイマー脳から単離した対らせん状細線維 (PHF) で処理した初代ニューロンタウ異常症培養モデルにおける同一の有効性の違いがさらに示される。これにより、エクスピボの培養モデルは、測定されるパラメータの違いにもかかわらず、マウスモデルと類似の予測妥当性を有することが示される。毒性およびタウ播種は両方とも、抗体4E6G7によって阻止されたが、抗体6B2G12によっては阻止されなかった。さらに、抗体4E6G7は、ニューロン間でのPHF伝播を低下させた。したがって、抗体4E6G7の有効性は、可溶性PHFに対するその高親和性結合に関連し、一方、無効の抗体6B2G12は、凝集したPHFと主に結合することが見いだされた。PHFが内部移行した後に抗体を投与した場合、ニューロン中への抗体4E6G7の取り込みの遮断により、その保護効果が阻止された。したがって、これらの条件下で、抗体は細胞内で働いている。抗体4E6G7とPHFとを同時に投与した場合、抗体は細胞外で保護的であった。そのようなシナリオは、タウ異常症において見られる生理機能を模倣するので、データにより、抗体4E6G7の細胞外投与が治療的に有効であろうことが示される。

【0144】

以下に考察するように、少なめのタウ病理が、hTauマウスの脳において免疫組織化学により検出され、処置群と対照群は異なるように見られなかった。そのような初期タウ病理

の条件下では、免疫組織化学によるよりもウエスタンブロット上で初期タウ病理を定量することがより容易であり、そのようなブロット上で、不溶性タウタンパク質が、12~13か月齢のhTauマウスに明らかに存在していた。ヒト特異的なタウ抗体（CP27）により測定した場合に、いずれのタウ抗体も、不溶性タウレベルにおける変化を誘導しなかったが、抗体4E6G7は、空間学習および記憶を顕著に改善した。可溶性タウ画分の分析により、これらの認知上の有益性は、ホスホ-タウタンパク質（PHF-1反応性）のレベルの低下と関連があることが判明した。そのような急性処置条件下では、不溶性タウレベルにおける包括的な変化は、容易に達成可能ではないかもしれないが、一方、可溶性病的タウタンパク質は、排除に対してより影響を受けやすいはずである可能性が高い。実際に、PHF-1抗体は、抗体4E6G7と同じ領域内のホスホ-タウエピトープを認識し、これは、このタウ画分が優先的に排除される理由を説明しうる。しかし、抗体4E6G7で処置したマウスとIgGで処置したマウスとの間でT22免疫ブロットにおいていかなる違いも観察されなかったため、それがオリゴマー特異的な排除であるようには見られない。

10

20

30

40

50

【0145】

連想恐怖記憶の機能的救出は、抗体4E6G7または抗体6B2G12のいずれかでの急性処置後に観察されなかった。これについては多くの可能性のある説明が存在する。第1に、使用した訓練プロトコルがあまりに「強く」、微妙な記憶の欠損を検出できなかった可能性がある。観察されたタウ病理全体は、存在していたが軽度であったため、これは特に重要でありうる。先行の研究において、連想記憶の欠損は、より高いレベルのタウ病理を有する高齢のマウスにおいてのみ観察された（Levenga, J., et al. (2013) "Tau Pathology Induces Loss Of Gabaergic Interneurons Leading To Altered Synaptic Plasticity And Behavioral Impairments," Acta Neuropathol. Commun. 1:34）。

【0146】

使用したさまざまなモデル系にもかかわらず、エクスピボおよびインピボでの実験から得られた所見は一貫しており、かつモデル依存的ではなく、これによりそれらの妥当性が支持される。両方の場合に、抗体4E6G7は、タウ病理および関連のある毒性/認知障害の阻止において有効性を示すが、抗体6B2G12は示さない。

【0147】

関連性のあるタウ種に関する洞察が、可溶性、可溶化、または凝集したヒトタウ種に対する抗体結合のELISAおよびドットプロット研究から得られた。抗体4E6G7は、ELISAおよびドットプロットアッセイにおいて、主として可溶化PHFを認識し、これは、そのような急性条件下での動物におけるより包括的なタウ変化の欠如を説明しうる。少なめのタウ病理を有するこの年齢のマウスは、特に、有益な効果を検出する感度を改善する、本明細書で用いる認知の対比較の下で、治療の急性効果を評価するのに理想的でありうる。htauマウスにおける、抗体4E6G7によるそのようなインピボでの学習および記憶の有益性、ならびに抗体6B2G12についてのそれらの欠如は、インピボおよびタウ異常症培養モデルにおける有効性の結果と一致している。興味深いことに、可溶性タウ種は最近、htauマウスにおいてLTPおよび記憶と結び付けられている（Fa, M. et al. (2016) "Extracellular tau oligomers produce an immediate impairment of LTP and memory," Sci. Rep. 6:19393）。

【0148】

ELISAおよびドットプロットアッセイは、抗体4E6G7および抗体6B2G12のタウ結合特性について有用な情報を提供したが、共焦点イメージングから得られたデータを、有効性における違いについての機序および可能性のある説明の決定においてより大きな価値があると判断した。培養アッセイにおけるコインキュベーションで、抗体4E6G7が可溶性PHFと結合するため、外因性PHFと抗体4E6G7との細胞外複合体が形成した。この複合体形成は、PHFを中和し、その取り込みを阻止した。しかし、抗体6B2G12では、抗体6B2G12が可溶化PHFと十分に結合しないため、そのような複合体が形成せず、PHFがニューロン内で検出された。これにより、抗体6B2G12は、PHFの取り込みおよび毒性を阻止できなかったことが示される。これらの結果により、抗体は、細胞の間隙腔において働くが有益でありうるという結論が支持される。生体脳において、これらのタウ-抗体複合体は、次いで、ミク

ログリアにより取り込まれ、排除されうる (Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol. Chem. 288(46):33081-33095 ; Funk, K.E., et al. (2015) "Distinct Therapeutic Mechanisms of Tau Antibodies: Promoting Microglial Clearance Versus Blocking Neuronal Uptake," J. Biol. Chem. 290(35):21652-21662 ; Luo, W., et al. (2015) "Microglial Internalization And Degradation Of Pathological Tau Is Enhanced By An Anti-Tau Monoclonal Antibody," Sci. Rep. 5:11161)。

【 0 1 4 9 】

以下に考察するように、10または1 μ g/mLのPHFの添加は、LDHおよびNeuNレベルを用いて測定した場合に、用量依存的に細胞喪失を誘導し、ならびに、残ったニューロンにおいて全タウおよびリン酸化タウを増加させた。それは、放出およびその後の他のニューロンによる取り込みを通して、細胞集団の間で伝播する。本発明の分子の有効性をテストするために、3種の異なる投薬法 (タウおよび抗体の投与のタイミングが異なる) を使用した。抗体の1つである抗体4E6G7について、これらの方法のうち2つである、PHFおよび抗体の一緒の添加、ならびにPHFの24時間後の抗体4E6G7の添加は、PHFの毒性、播種、および伝播を阻止した。興味深いことに、同様に有効ではあるが、保護がそれを通して起こる機序は、投薬パラダイムの間で異なっていた。

10

【 0 1 5 0 】

抗体4E6G7または抗体6B2G12を、PHFの24時間後に添加した場合、これらは、細胞内でPHFと共局在したが、抗体4E6G7のみがPHFの毒性を阻止した。コインキュベーション実験からの共焦点データ、ならびにドットプロットおよびELISAデータに基づいて、抗体4E6G7は、抗体6B2G12 (凝集したPHFおよび不溶性タウとより良好に反応する) よりも良好に可溶化PHFと結合することが見いだされた。この特徴は、抗体4E6G7の細胞内有効性、すなわち、抗体4E6G7が、可溶化PHFと結合することにより、PHFの重合を阻止するように作用し、したがって、PHFを排除する、および/または可溶性PHFを直接中和するためのリソソーム酵素の到達を容易にして、毒性を阻止することを説明すると考えられる。しかし、抗体6B2G12-PHFの結合は、解体を促進することなく不活性である可能性がある。さらに、不十分な結合のために、PHF原線維形成および/または可溶性PHFの毒性を阻止することができない可能性がある。

20

【 0 1 5 1 】

以下に提示する所見は、したがって、抗体4E6G7の治療的有効性を説明する。それは、PHFの細胞外遮断および細胞内排除の両方ができる。以前のデータにより、抗体4E6G7は、タウ異常症ニューロン内でエンドソーム/リソソーム系に入り、恐らく凝集を阻止することにより、天然タウの排除を促進することが示される (Congdon, E.E. et al. (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fc γ Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288:35452-35465 ; Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol. Chem. 288(46):33081-33095 ; Krishnamurthy, P.K. et al. et al. (2011) "Mechanistic Studies of Antibody-Mediated Clearance of Tau Aggregates Using an ex vivo Brain Slice Model," Front. Psychiatry 2:59)。他のグループは、タウ抗体の内部移行 (Collin, L., et al. (2014) "Neuronal Uptake Of Tau/Ps422 Antibody And Reduced Progression Of Tau Pathology In A Mouse Model Of Alzheimer's Disease," Brain 137(Pt 10):2834-2846 ; Kondo, A. et al. (2015) "Antibody Against Early Driver Of Neurodegeneration Cis P-Tau Blocks Brain Injury And Tauopathy," Nature 523(7561):431-436) およびリソソーム共局在 (Collin, L., et al. (2014) "Neuronal Uptake Of Tau/Ps422 Antibody And Reduced Progression Of Tau Pathology In A Mouse Model Of Alzheimer's Disease," Brain 137(Pt 10):2834-2846) を観察した。さらに、抗体、標的、およびエンドソーム/リソソームのマーカーの間のニューロン共局在が、PDマウスモデルにおいて -シヌクレイン抗体について見られた (Masliah, E., et al. (20

30

40

50

11) "Passive Immunization Reduces Behavioral And Neuropathological Deficits In A n Alpha-Synuclein Transgenic Model Of Lewy Body Disease," PLoS One 6(4):e19338) 。他の実験において、タウ抗体は、外見上ニューロンに入ることなく、病的タウの取り込みを遮断するか、または実験結果を改善することができる (Castillo-Carranza, D.L., e t al. (2014) "Passive Immunization With Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverse s Tauopathy Phenotypes Without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tan gles," J. Neurosci. 34(12):4260-4272 ; d'Abramo, C. et al. (2013) "Tau Passive Im munotheapy In Mutant P301L Mice: Antibody Affinity Versus Specificity," PLoS On e 8(4):e62402 ; Yanamandra, K. et al. (2013) "Anti-Tau Antibodies That Block Tau Aggregate Seeding in vitro Markedly Decrease Pathology And Improve Cognition in vivo," Neuron 80(2):402-414) 。抗体がニューロン中に取り込まれるかどうかは、電荷、標的、およびFc受容体親和性、ならびに、本明細書に提示するデータが示唆するように、標的の位置および抗体添加のタイミングを含むいくつかの要因によって、影響を受ける可能性が高い。

10

【 0 1 5 2 】

対照的に、抗体4E6G7とのブレインキュベーション (すなわち、PHFの非存在下) は、ひとたびPHFが添加されると起こる毒性またはタウ病理の播種を低下させるのに無効であった。もっともらしい理由は、これらの条件下での標的エピトープの相対的欠如である。以前に、ニューロンの抗体4E6G7の取り込みは、病的細胞内タウレベルと高度に相関することが示された (Congdon, E.E. et al. (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs P rimarily via Clathrin-dependent Fcgamma Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288:35452-35465) 。抗体を最初に添加した場合、有効性には、24時間後のPHFの添加までニューロンにおける保持が必要である。しかし、標的の不足は、共焦点イメージングを介して見られるように、抗体が結合しないままであり、分解または細胞の外へのリサイクリングの傾向がより強いことを意味する。抗体4E6G7は、これらの条件下で無効であったが、循環抗体は、初期のタウ凝集物を排除することにより疾患の開始を阻止できたため、タウ抗体の予防的投与の可能性は捨てられない。実際に、本発明の所見により、タウ異常症のリスクがあるが、実際のタウ異常症は有していない対象に対する、治療的に有効なタウ抗体 (例えば、抗体4E6G7またはそのエピトープ結合性断片) のそのような予防的投与は、有害作用を伴わない、およびそのような投与は、実際のタウ異常症の確立時に有効になるという結論が支持される。外因性抗体は、1~3週間の半減期を有し、より低い用量を、症状が出る前のリスクがある個体において使用することができる。

20

30

【 0 1 5 3 】

注目すべきことに、投薬法の間で異なる有効性は、マイクロ流体チャンバーを用いた伝播アッセイにおいても観察された。両方のモデル系において、コインキュベーション投薬またはPHF Abのみが有効であり、一方、Ab PHFは有効ではなかった。

【 0 1 5 4 】

以前に公開された所見 (Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pat hology," J. Biol. Chem. 288(46):33081-33095) において、抗体4E6G7および抗体6B2G12は両方とも、現在の研究での初代ニューロンにおける抗体6B2G12の無効性とは対照的に、脳スライスモデルにおけるホスホ-タウレベルの増大の阻止において有効性を示した。これらの違いに寄与する、もっともらしい複数の要因が存在する。スライス培養系においては、抗体での処理が6週間まで続き、いかなる外因性タウもその系に導入されなかった。以下に提示した結果においては、ずっと短い時間尺度を使用し (6週間に対して7日)、使用したPHFタウは、ヒトAD脳から単離した。PHF画分において見いだされるタウはまた、神経原線維変化形成の異なる時期に相当する。さらに、AD脳から単離したPHFは、スライスの内因性タウ中には存在しない、追加の翻訳後修飾を有している可能性がある。実験の過程にわたる細胞の健康における違いもまた、培養モデルにより影響を受ける可能性が高い

40

50

。初代培養において、ニューロンには、脳スライス中に存在するグリア細胞によって提供される栄養性支持がない。

【0155】

ニューロン中への抗体の取り込みは、受容体媒介性エンドサイトーシスを遮断する、Fc II/III受容体に対する抗体で、またはダンシルカダペリンで遮断することができる (Congdon, E.E. et al. (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcγ Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288:35452-35465)。コインキュベーション条件下で、抗体の取り込みの遮断は、結果に対していかなる効果も有さなかった。しかし、抗体4E6G7をPHF添加の24時間後に添加した場合、その取り込みの遮断は、その有益な効果を阻

10

【0156】

抗体4E6G7および抗体6B2G12は両方とも、脳スライス培養物および初代培養物においてタウ異常症ニューロン中に取り込まれ、そこでそれらは、エンドソーム-リソソーム系においてタウ凝集物と共局在する (Congdon, E.E. et al. (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcγ Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288:35452-35465; Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol. Chem. 288(46):33081-33095)。さらに、抗体6B2G12およびその単鎖可変断片誘導体を、末梢注射後にインビボでタウ病変をイメージングし、最後には同じニューロン区画に行き着くように使用することができる (Krishnaswamy, S. et al. (2014) "Antibody-Derived in vivo Imaging of Tau Pathology," J Neurosci. 34(50):16835-16850)。そのような取り込みおよび共局在は、それ自体は有効性の指標ではないが、抗体4E6G7のニューロンの取り込みの阻止が、急性抗体媒介性のタウ排除を遮断することを、本発明者らは示している (Congdon, E.E. et al. (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcγ Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288:35452-35465)。培養データにより、そのような細胞内排除が確認され、AD由来のPHF物質を使用するためにヒト疾患に関連性がよりある異なる培養モデルにおける、抗体4E6G7による神経毒性の阻止が加えて示される。さらに、PHFで処理した初代培養物において、抗体6B2G12は、さまざまな実験条件下で複数の結果測定を用いて無効であった。全体的に、したがって、抗体4E6G7は、可溶性タウ種をターゲティングする治療用抗体としてより適していることが見いだされ、抗体6B2G12、または理想的には標的により良好に到達するその比較的小型の誘導体は、不溶性タウ病変に対するイメージングプローブとしてより有用であることが見いだされる。

20

30

【0157】

具体的には、エクスピボ培養モデルにより、ホスホ-セリン396/404領域をターゲティングするモノクローナルタウ抗体である抗体4E6G7が、アルツハイマー脳由来のPHF物質の添加により誘導された毒性を阻止し、タウレベルを低下させたことが示される。重要なことに、タウペプチド免疫原および凝集したPHFタウに対して抗体4E6G7よりも実質的に高い親和性を有する、別のタウモノクローナル抗体6B2G12は、これらの実験条件下で無効であった。さらなる分析により、抗体4E6G7は、培養ニューロンにおいて毒性を促進するために使用した可溶化PHFに対して、抗体6B2G12よりも高い親和性を有することが判明した。これは、前者の抗体の有効性、および後者についてのその欠如を説明する可能性が高い。これらの所見は、受動的タウ免疫療法の開発にとって大きな意味合いを有する。有効性は、免疫原単独、または凝集したタウに対する親和性によって予測することはできないが、タウ病理の生物学的モデルにおいて決定されなければならない。これらの結果は、イメージングデータと組み合わせて、親和性と有効性とがいかに関連するかについての情報を提供する。

40

50

【0158】

他のタウ免疫療法研究により、タウの異なる配列のエピトープを認識する抗体の間での有効性の違い、および、同じエピトープに対して類似の親和性の2種の抗体の異なるアイソタイプの間での1つの研究が報告されている（総説としてPedersen, J.T. et al. (2015) "Tau Immunotherapy for Alzheimer's Disease," Trends Mol. Med. 21(6):394-402を参照されたい）。抗体4E6G7および抗体6B2G12は、同じアイソタイプのIgG1であり、本明細書に提示した所見により、エピトープ認識における微妙な違いが有効性に深く影響を及ぼしうることが初めて示される。重要なことに、そのような所見により、家族性タウ変異を発現する初代ニューロンにおいてアルツハイマー脳由来のPHFでタウ病理が促進される、疾患と関連性のあるエクスピボのニューロン培養モデルにおいて、これらのインピボでの違いに関する機械論的洞察が確認され、提供される。したがって、対照的な有効性は、タウ変異を伴うかまたは伴わないさまざまなモデルにおいて一貫して見られ、家族性タウ異常症および散在性タウ異常症の両方にとって大きな治療的意味合いを有する可能性がある。使用したモデルは、正常なまたは家族性の（変異した）ヒトタウが発現しているように健全な理論的合理に基づくため、強い構成概念妥当性および表面的妥当性を有し、かつ、動物においてタウ異常症と関連のある重要な特徴、すなわちタウ凝集、毒性、および関連のある認知障害を有する。ヒトPHF培養モデルは、動物モデルにおける結果に対して強い予測的妥当性を有する。

10

【実施例】

【0159】

以下の実施例は、本発明の診断方法または治療方法における組成物に関するさまざまな方法を例示している。これらの実施例は、例示を意図しており、本発明の範囲を限定することは全く意図していない。

20

【0160】

実施例1

材料および方法

材料

残基243~441に対応する汎タウウサギポリクローナル抗体を、Dako (Carpinteria, CA) から購入した。^{P}Ser199タウに対して特異的なポリクローナルウサギ抗体を、Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) から購入した。

30

【0161】

マウス

JNPL3マウス系列由来のマウスの子を、初代培養のために生後0日目に収集した。これらの動物は、天然のマウスタウに加えて、天然に存在するP301L変異を含有するON4Rヒトタウアイソフォームを発現している（Lewis, J., et al. (2000) "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein," Nature Genetics 25(4):402-405）。細胞集団の間でのタウの伝播を検討する実験については、トランスジェニック動物と同じ系統バックグラウンド由来の野生型（「WT」）の子も使用した。

40

【0162】

対らせん状細線維（PHF）物質の単離

PHF-タウを、ヒトAD患者の脳から抽出した。組織を、0.75 M NaCl、1 mM EGTA、0.5 mM MgSO₄、100 mM 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、およびRocheプロテアーゼインヒターカクテルを含有する緩衝液（1 mL/組織のg）においてホモジナイズした。次いで、試料を、11,000 gで20分間、4 で遠心分離し、沈殿物を廃棄した。残った上清を、さらに、100,000 gで60分間、4 で遠心分離した。沈殿物を、PHF抽出緩衝液（10 mM トリス、10 % スクロース、0.85 M NaCl、および1 mM EGTA、pH 7.4）中に再懸濁して、15,000 gで20分間、4 で遠心分離した。この同じ再懸濁および遠心分離を繰り返し、最終的な沈殿物を50 mM トリス-HCl（pH 7.4）中に溶解して、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）において6時間透析した。

50

【0163】

蛍光標識

抗体4E6G7およびヒト由来のPHF物質を、それぞれ、Alexa Fluor 488および647標識キットを用いて標識した。抗体またはPHFを反応色素と、攪拌しながら1時間、室温でインキュベートした。説明書通りに、溶出カラムを調製して、色素/基質混合物を添加した。物質を収集して、標識を検証した。

【0164】

初代ニューロン培養

初代ニューロン培養物を、Congdon, E.E. et al. (2013) "Antibody Uptake Into Neurons Occurs Primarily Via Clathrin-Dependent Fcγ Receptor Endocytosis And Is A Prerequisite For Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288(49):35452-35465に記載されているように調製した。簡潔に言うと、プレートを、細胞の添加の前に3時間、ポリ-L-リジンでコーティングした。脳を、生後0日目のマウスの子から採取して、脳幹を廃棄した。髄膜を、皮質および海馬から除去した。組織を粗く刻み、HBSS+++ (ハンクス平衡塩類溶液、10 mL 1M HEPES、5 mL ペニシリン/ストレプトマイシン、10 mL 100 mMピルビン酸ナトリウム) 中で5回洗浄した。洗浄後、組織を20分間、200 μlの0.5%トリプシンとインキュベートした。トリプシンを、5 mLのプレーティング培地 (最小イーグル培地、15 mL GlutaMAX、50 mL FBS、4 mL B27サプリメント、2.5 mL ペニシリン/ストレプトマイシン) で中和し、HBSS+++中でさらに3回洗浄した。この後、細胞を手で解離させ、1分間、0.5 × gで遠心分離した。次いで、細胞をプレーティング培地中に再懸濁し、ウェルの間で均等に分布させた。24時間の培養後に、プレーティング培地を除去して、ニューロン培地 (Neurobasal A、1 mL B27、17 μLイーグル基礎培地) を添加した。同じ手順を、マイクロ流体チャンバーにおいて成長させる培養物に使用した。JNPL3マウス由来の細胞を、軸索単離装置の一方の側面上にプレーティングした。細胞を、72時間インキュベートさせた。この期間の後、WT動物由来の脳を採取し、細胞を反対の側面上にプレーティングした。

10

20

【0165】

LDHアッセイ

7日の培養後に、すべての処理群から培地を収集した。培地におけるLDH (乳酸デヒドロゲナーゼ) レベルを、Roche細胞傷害性検出キットを用いて決定した。毒性の程度を確かめるために、処理した試料から得られた値を、0日目に収集した培地から得られた値と比較した。培養期間にわたる細胞の健康における正常な変化を検討するために、無処理の細胞のセット由来の培地もまた収集した。処理した試料、対照、およびブランクを、96ウェルプレートに添加して、検出試薬を、説明書通りに添加した。プレートを、20分間、37でインキュベートして、BioTek Synergy 2プレートリーダーを用いて読み取った。

30

【0166】

マイクロ流体チャンバーおよびタウの伝播

細胞を採取して、上記のようにプレーティングした。WT細胞の添加の後、培養物を1週間培養して、安定化させた。同じ3種の処理法を使用した。PHFおよび抗体4E6G7 (それぞれ1 μg/mL) を、JNPL3細胞を含有するチャンバーに添加したが、WT細胞を含有する反対のチャンバーは、無処理で放置した。陰性対照として、1つの群の細胞を、1 μg/mLのPHF物質および50 nMのボツリヌス毒素とインキュベートした。膜融合および膜結合小胞の放出を阻止し、したがってPHF-タウの反対のチャンバー中への放出を阻止する能力により、毒素を選択した。ニューロン培養物において、ボツリヌス毒素はまた、シナプス小胞放出の遮断により変異ハンチンチンの伝播を阻止することも示されている (Pecho-Vrieseling, E., et al. (2014) "Transneuronal Propagation Of Mutant Huntingtin Contributes To Non-Cell Autonomous Pathology In Neurons," Nat. Neurosci. 17(8):1064-1072)。すべての群において最終処理後に、細胞を、さらに72時間、培養に維持した。次いで、カバーガラスを固定し、全タウを認識する抗体で標本を染色した。標識されたPHF物質を含有する反対側のチャンバーにおける細胞のパーセンテージを、各処理群について決定した。

40

50

【 0 1 6 7 】

免疫組織化学

培地を除去して、細胞をPBS中で3回洗浄した。カバーガラスを、0.5%スクロースを含有する4%ホルムアルデヒド中で20分間、37℃で固定した。細胞を、透過処理して、3% BSAおよび0.1%サポニンを含有するPBSを用いて20分間、室温でブロッッキングした (Pecho-Vrieseling, E., et al., Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non-cell autonomous pathology in neurons. *Nat Neurosci*, 2014. 17(8): p. 1064-72)。一次抗体を、1:200希釈で1時間使用し、その後、細胞をPBSで、1回の洗浄あたり5分間、3回洗浄した。二次抗体を、1:400希釈で30分間適用し、細胞をさらに3回洗浄した後、Dako Fluorescent封入剤を用いてカバーガラスをマウントした。画像を、Nikon Eclipse Ti共焦点顕微鏡を用いて収集し、Image Jを用いて加工処理した。

10

【 0 1 6 8 】

免疫ブロッティング

細胞を、PBS中で3回洗浄し、次いで、改変RIPA緩衝液 (50 mMトリス-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1 μg/mL completeプロテアーゼインヒビター混合物 (Roche Applied Science)) 中で溶解した。試料を短時間、超音波処理し、体積を全タンパク質濃度に応じて調整した。ローディング緩衝液 (62.5 mMトリス-HCl pH 6.8、5%グリセロール、2-メルカプトエタノール、2.3% SDS、1 mM EDTA、1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、1 mM Na₃VO₄、1 μg/mL Roche Applied Science completeプロテアーゼインヒビター) を添加して、試料を5分間、煮沸した。すべての試料を、12%ポリアクリルアミドゲル上にローディングし、次いで、100 Vで1時間、移した。膜を、5%脱脂乳を含有するトリス緩衝生理食塩水およびTween 20 (TBST) で30分間ブロッッキングし、その後、一次抗体中で一晩、4℃でインキュベートした。プロットを洗浄し、ペルオキシダーゼ標識された二次抗体と1時間インキュベートした。Fuji LAS-4000を用いてバンドを可視化し、Multigaugeを用いて化学発光シグナルを定量した。

20

【 0 1 6 9 】

実施例2

抗体4E6G7のscFv断片の単離

scFv分子は、ハイブリドーマクローン抗体4E6G7 (SEQ ID NO:8のアミノ酸配列: TDHGAEIVYK^{P}SPVVS^{P}GDT^{P}SPRHLを有する好ましい免疫原に対して生じた) から作製されうる (Congdon, E.E. et al. (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcγ Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance," *J. Biol. Chem.* 288:35452-35465; Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," *J. Biol. Chem.* 288(46):33081-33095)。簡潔に言うと、ハイブリドーマ細胞株抗体4E6G7を、ストレプトマイシン (50 μg/mL) およびペニシリンG (50 U/mL) を含有するRPMI培地において37℃、5%CO₂で成長させ、そのmRNAを、RNA単離キット (Promega) のプロトコル通りに単離および精製し、その後、-80℃で保存しうる。ファーストストランドcDNAは、ファーストストランドcDNA合成キット (Takara キット (TAK6115A)) のプロトコル通りに構築されうる。

30

40

【 0 1 7 0 】

クローンは、次いで、タウ379~408 ({P}Ser396/ {P}Ser404) (SEQ ID NO:30) :
RENAKAKTDH GAEIVYK^{P}SPV VSGDT^{P}SPRHL

およびタウ379-408 (Ser396/Ser404) (SEQ ID NO:31) :
RENAKAKTDH GAEIVYK^SSPV VSGDT^SSPRHL

の配列を有するペプチド (Keck Foundation, Yale University) を用いて、^{P}Ser404エピトープに対して免疫特異的であるscFv分子を発現するそれらの能力についてスクリーニングされうる。これらのペプチドはまた、パンニング、ELISAに、および結合性研究のためのBiacoreにおいても使用されうる。

【 0 1 7 1 】

50

実施例3

抗体4E6G7：タウ病理の播種および関連のある毒性の、タウ抗体媒介性阻止

タウ病理は、培養およびインビボにおいてニューロン間で伝播し、細胞内および細胞外の両方において、抗体でターゲティングすることができる。^{P}Ser404エピトープと免疫特異的に結合する抗体4E6G7の、アルツハイマー対象由来の対らせん状細線維（PHF）調製物により媒介されるタウ病理の毒性および伝播を阻止する能力を評価した。この目的で、初代JNPL3（P301L）ニューロン培養物を、記載したように調製し、処理の前に1週間、培養において回復させた。細胞を、1または10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ いずれかのヒト由来のPHF物質とインキュベートし、細胞および培養培地を1、2、3、5、および7日目に収集した。対照培養物を、PHF単独（1または10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で7日間処理した（「PHF単独」で処理した細胞）。PHF（1または10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）と抗体4E6G7（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）との組み合わせで処理する培養物について、3種の異なる処理戦略を使用した。第1に、PHF物質を添加して、24時間、培養物とインキュベートさせた。この期間の後、細胞をニューロン培地で洗浄し、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体4E6G7を含有する新鮮培地を添加した（「PHF 抗体」で処理した細胞）。第2に、PHF物質および抗体4E6G7を培養培地に同時に添加した（「PHF + 抗体」で処理した細胞）。第3の投薬戦略は、第1の逆であり、抗体4E6G7を、PHFの24時間前に添加した（「抗体 PHF」で処理した細胞）。対照として、非特異的なマウスIgGを、タウ抗体の代わりに使用した。ダンシルカダペリン（DC）を用いた実験において、同じ方法を、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DCを抗体とともに添加して使用した。

【0172】

図1、パネルA~Bは、抗体4E6G7（パネルA）およびIgG1対照（パネルB）の、LDH放出により決定される、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHFによって媒介される細胞毒性に対する効果を示す。図1、パネルAに示すように、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHFで処理した細胞において、LDHシグナルは、平均して、無処理の対照のものよりも67%上であった（ $p=0.001$ ）。PHF + 抗体およびPHF 抗体パラダイムにおける抗体4E6G7（1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）は、PHF単独と比較して有意にLDHを低下させ（対照よりも11%上、 $p=0.02$ 、および対照よりも15%上、 $p=0.03$ ）、無処理の試料に匹敵しており、抗体が毒性を阻止できることを示した。しかし、抗体 PHFは、LDHシグナルの低下において有効ではなく（対照よりも53%上、 $p=0.009$ ）、テストした1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度でPHF単独試料を上回る有意な改善を示さなかった。図1、パネルBに示すように、IgG1はまた、PHFの添加により引き起こされたLDHレベルの増大の阻止において有効ではなかった。PHF + 抗体群、PHF 抗体群、および抗体 PHF群におけるLDHは、対照値よりも80、43、および61%上へと増大した（それぞれ、 $p=0.004$ 、0.03、および0.01）。群のいずれも、PHF単独と有意に異ならなかった（* $p=0.05$ ）。

【0173】

図2、パネルA~Bは、抗体4E6G7（パネルA）およびIgG1対照（パネルB）の、LDH放出により決定される、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHFによって媒介される細胞毒性に対する効果を示す。図2、パネルAに示すように、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHFとのインキュベーションは、無処理の対照細胞と比して35%分、LDHシグナルを増大させた（ $p=0.04$ ）。PHF + 抗体またはPHF 抗体条件におけるタウモノクローナル抗体4E6G7は、PHF単独試料と比較して有意にLDHを低下させ（それぞれ、 $p=0.04$ および0.03）、無処理の細胞と有意に異ならなかった。抗体 PHF群は、PHFのみを受けたニューロンと比較して低下したLDHを示さなかった（対照よりも11%上）。図2、パネルBに示すように、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHF用量で、IgG1で処理した試料は、対照細胞よりも有意に高いLDHレベルを示さず、いくらかの非特異的な保護を提供する可能性があることを示した（PHF + 抗体群、PHF 抗体群、および抗体 PHF群は、それぞれ、対照よりも6%上、対照と同等、および対照よりも67%上であった。）。しかし、IgG1試料はまた、PHF単独試料と有意に異ならず（* $p=0.05$ ）、PHF毒性を阻止する抗体4E6G7効果の特異性を再び確認した。

【0174】

毒性を、ニューロンマーカーNeuNを認識する抗体での免疫プロットングを介して、追加的に検討した。NeuNは、成体マウスの神経系を通して大部分のニューロン細胞タイプに

において観察されるニューロン特異的な核タンパク質である (Mullen, R.J. et al. (1992) "NeuN, A Neuronal Specific Nuclear Protein In Vertebrates," Development 116(1): 201-211)。タンパク質は、中枢神経系の明確な細胞新生物の鑑別診断においてニューロンマーカーとして働く (Soylemezoglu, F. et al. (2003) "Neuronal Nuclear Antigen (NeuN): A New Tool In The Diagnosis Of Central Neurocytoma," Pathol. Res. Pract. 199(7):463-468)。

【 0 1 7 5 】

10 μ g/mL PHFの存在下でインキュベートした場合に、NeuNシグナルは、着実に下落し、7日目までに無処理の対照試料と比して94%低下した (図3、パネルA~B)。LDH試料での例のように、PHF + 抗体およびPHF 抗体パラダイムは、PHF単独とインキュベートした試料のものよりも有意に高いNeuNレベルをもたらした (試料は、7日目に無処理の対照よりも16%および24%上であった、 $p = 0.000003$ および 0.00002)。また上記のように、抗体PHF投薬法は、処理期間にわたってNeuNの喪失の阻止において有効ではなく (対照に比して93%喪失、 $p = 0.0008$)、PHF単独試料を上回るいかなる改善も示さなかった (図3、パネルC)。LDHアッセイにおけるように、IgG1は、PHF誘導性の毒性に対していかなる効果も有さなかった。

10

【 0 1 7 6 】

追加のニューロンの群を、1 μ g/mL PHFおよび1 μ g/mLの抗体4E6G7または対照IgGとインキュベートした (図4、パネルA~B)。NeuNシグナルの無処理の対照細胞に比して30%の喪失が、7日の培養後にPHF単独群において観察された ($p = 0.03$) (パネルC)。10 μ g/mLの実験におけるように、PHF + 抗体群およびPHF 抗体群は、NeuNの喪失の阻止において有効性を示し、7日目に無処理の対照に匹敵し、PHF単独試料よりも有意に高かった ($p = 0.03$)。抗体 PHF群はまた、PHF単独試料とインキュベートしたニューロンのものに匹敵する、NeuNレベルの下落 (無処理の対照に比して36%の減少) を示し、使用した投薬量でのこのアプローチの無効性を確認した。より高いPHF用量試料におけるように、対照マウスIgG1は、投薬条件のいずれの下でも毒性の阻止において無効であり、PHF単独で見られた結果と有意に異ならなかった。

20

【 0 1 7 7 】

これらのデータにより、タウ抗体は、誤って折りたたまれたタウ凝集物に対する曝露により引き起こされる毒性を媒介するのに有効でありうることを示される。抗体4E6G7は、ある特定の条件下でのみ、毒性を阻止した。抗体4E6G7をPHFの前に添加した場合には、ニューロンにとって天然である相対的に低いレベルのタウが、細胞を完全に保護するために必要である抗体の保持を促進するのに十分な標的を提供しない可能性がある。

30

【 0 1 7 8 】

実施例4

抗体4E6G7：タウレベルにおける変化の、タウ抗体媒介性阻止

毒性の測定に加えて、PHFおよび抗体処理のタウレベルに対する効果もまた調査した。10 μ g/mLの濃度で、PHF単独群における全タウレベルは、初期の減少、およびそれに続く回復を示した (図5、パネルA~D)。しかし、7日目までに、全タウレベルは、対照細胞に比して有意に低下した (29%の減少、 $p = 0.002$) (パネルC)。しかし、抗体4E6G7 PHF + 抗体群およびPHF 抗体群は、PHF単独とインキュベートした細胞よりも有意に高いタウレベル (対照よりも48%および51%上) を有する (パネルC)。再び、抗体 PHF群およびIgG1群は、PHF単独細胞と比較して、タウレベルにおける変化の阻止において無効であった。

40

【 0 1 7 9 】

これらの結果を、NeuNレベルに対して正規化した場合に、PHF群における残った細胞は、対照細胞よりも有意に多いタウを有することが観察される (5.6倍の増加、 $p = 0.0005$ および 0.04) (図5、パネルD)。PHF + 抗体群およびPHF 抗体群において、調整したタウレベルは、対照に匹敵しており、PHF単独を受けた細胞についてよりも有意に低い (それぞれ、 $p = 0.01$ および 0.001)。対照IgG1で処理した細胞の結果は、PHF単独を受けた細胞のものと有意に異ならなかった。NeuNについての調節は、そのような対照細胞の結果のパタ

50

ーンを変更しなかった。

【0180】

1 µg/mLの用量で、タウレベルの増大は、NeuNレベルでの正規化の前でさえも明らかであった(図6、パネルA~D)。図6、パネルA~Dは、1 mg/mLのPHFが細胞内タウの増加を促進でき、抗体4E6G7がこれらの効果を阻止できることを示す。パネルA~Bは、汎タウポリクローナル抗体をプローブとした、PHF単独、抗体4E6G7(パネルA)または対照IgG(パネルB)のPHF+抗体、PHF 抗体、および抗体 PHFに対して曝露した試料についての免疫ブロットを示す。パネルCは、全タウレベルの定量を示す。1 µg/mLで、PHFは、細胞内タウの有意な増加を促進する(対照よりも95%上、 $p=0.001$)。抗体4E6G7について、PHF+抗体およびPHF 抗体は、PHF単独試料よりも有意に低かった(両方について $p=0.001$)。抗体 PHFで処理した細胞は、PHF単独で処理した細胞に比して低下しなかった。NeuNレベルについて調整すると、再び、PHF単独処理は、対照細胞に比して細胞内タウを有意に増加させた(1.6倍の増加、 $p=0.02$)。抗体4E6G7について、PHF+抗体およびPHF 抗体で処理した細胞は、PHF単独群と比較して有意に低い、補正されたタウレベルを呈し(両方について $p=0.03$)、無処理の対照と異ならなかったが、抗体 PHFで処理した細胞は、そうではなかった(パネルD)。IgG1は、NeuNレベルについての調節を伴うかまたは伴わない、PHFに対する曝露後の全タウの有意な増加に対して阻止しない。

10

【0181】

全タウレベルに加えて、 $\{^P\}$ Ser199でリン酸化されたタウのレベルを調査した。セリン199でのタウのリン酸化($\{^P\}$ Ser199)は、アルツハイマー病および他の神経状態に關与していると思われる(Biernat, J. et al. (1992) "The Switch Of Tau Protein To An Alzheimer-Like State Includes The Phosphorylation Of Two Serine-Proline Motifs Upstream Of The Microtubule Binding Region," EMBO J. 11(4):1593-1597; Takamatsu, J. (1998) "Selective Expression Of Ser 199/202 Phosphorylated Tau In A Case Of Frontotemporal Dementia," Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 9(2):82-89; Itoh, N. et al. (2001) "Large-Scale, Multicenter Study Of Cerebrospinal Fluid Tau Protein Phosphorylated At Serine 199 For The Antemortem Diagnosis Of Alzheimer's Disease," Ann. Neurol. 50(2):150-156; Muraige, C.A. et al. (2003) "Phosphorylated Serine 199 Of Microtubule-Associated Protein Tau Is A Neuronal Epitope Abundantly Expressed In Youth And An Early Marker Of Tau Pathology," Acta Neuropathol. 105(2):89-97; Hampel, H. et al. (2004) "Measurement Of Phosphorylated Tau Epitopes In The Differential Diagnosis Of Alzheimer Disease: A Comparative Cerebrospinal Fluid Study," Arch. Gen. Psychiatry 61(1):95-102; Morioka, M. et al. (2006) "Hyperphosphorylation At Serine 199/202 Of Tau Factor In The Gerbil Hippocampus After Transient Forebrain Ischemia," Biochem. Biophys. Res. Commun. 347(1):273-278; Loeffler, D.A. et al. (2015) "Effects Of Antibodies To Phosphorylated And Non-Phosphorylated Tau On In Vitro Tau Phosphorylation At Serine-199: Preliminary Report," Exp. Gerontol. 67:15-18)。したがって、 $\{^P\}$ Ser199と結合する抗体(抗体AT8など)を、アルツハイマー病の存在を評価するために使用することができる。

20

30

【0182】

10 µg/mL PHF条件下で、PHF単独で処理した試料および抗体 PHFで処理した試料は、無処理の細胞に比して有意に低下したホスホ-タウレベルを有していた(34%、7%、および54%の低下、 $p=0.00004$ 、 0.01 、および 0.01 、図7)。しかし、PHF+抗体処理群およびPHF 抗体処理群は両方とも、PHF単独群よりも有意に高いホスホ-タウレベルを有していた($p=0.00001$ および 0.00007)。IgG1投薬群のいずれも、PHF単独と有意に異ならなかった。

40

【0183】

NeuNレベルに対して補正すると、PHF単独試料は、より高いレベルの $\{^P\}$ Ser199タウを示した(4.1倍の増大、 $p=0.00004$)。PHF+抗体およびPHF 抗体で処理した細胞におけるホスホ-タウレベルは、PHF単独で処理した細胞のものよりも有意に低く($p=0.00001$ お

50

よび0.000007)、無処理の対照に匹敵していた。無補正の値でのように、対照IgG1で追加的に処理した細胞由来の結果は、PHF単独を受けた細胞のものと異ならず、抗体 PHFで処理した群も異ならなかった。

【0184】

1 μ g/mLの投薬条件下でPHF単独とインキュベートした細胞は、無処理の対照細胞よりも有意に高いホスホ-タウレベルを有していた(対照よりも65%上、 $p=0.001$ 、図8、パネルA~D)。図8、パネルA~Dは、より低いレベルのPHF(1 μ g/mL)もまた、リン酸化タウレベルの増大を誘導できること、およびそのような増大を抗体4E6G7により阻止できることを示す。パネルA~Bは、^(P)Ser199ホスホ-タウを認識するポリクローナル抗体をプローブとした、PHF単独に対して、または抗体4E6G7(パネルA)もしくは対照IgG1(パネルB)と組み合わせたPHFに対して曝露した細胞の免疫プロットを示す。パネルCは、無処理の細胞に比して^(P)Ser199ホスホ-タウレベルを定量する。パネルDは、結果をNeuNレベルに対して正規化する。1 μ g/mL PHFおよび抗体4E6G7で処理した細胞において、抗体は、PHF+抗体およびPHF 抗体の投薬条件下で、PHF誘導性病的变化の阻止において有効であった。群は両方とも、無処理の対照に匹敵するレベルの、PHF単独よりも有意に低いホスホ-タウレベルを有していた($p=0.01$ および 0.006)。しかし、抗体 PHFの投薬条件下で、抗体4E6G7は、ホスホ-タウレベルを低下するのに無効であった。IgG群のいずれも、PHF単独試料と比較して異ならなかった。NeuNレベルについて調節しても、これらの違いは残った。PHF単独試料におけるホスホ-タウレベルは、無処理の対照細胞のものよりも1.5倍高かった($p=0.01$)。4E6G7投薬パラダイムのうち、PHF+Ab群およびPHF Ab群は、無処理の対照のものに匹敵し、PHF単独試料において見られるものよりも有意に低いタウレベルを有していた(両方について $p=0.03$)。上記のように、IgG1群のいずれも、PHF単独試料と異ならなかった。

【0185】

実施例5

抗体4E6G7は細胞集団の間での病的タウの伝播を低下させることができる

抗体4E6G7での処理が、細胞の間での病的タウの伝播を遅くできるかどうかを評価するために、JNPL3ニューロンおよびWTニューロンを、マイクロ流体軸索単離チャンパーの反対の側面上にプレーティングした。図9、パネルAは、マイクロ流体チャンパーの概略図を示し、試料採取された細胞を受けるリザーバーを示す。図9、パネルBは、パネルAにおける中央の四角の拡大した概略図であり、2つのリザーバーを接続するマイクログループを示す。JNPL3細胞由来の軸索がマイクログループを通過して交差するが、WT細胞のものはないことを確実にするために、JNPL3マウス由来のニューロンを、WTニューロンの72時間前にプレーティングした。細胞培養物が安定化した後、1 μ g/mLの蛍光標識されたPHF物質を、JNPL3ニューロンを含有するチャンパーに添加した。追加の培養物を、同じように調製し、上記のPHF+抗体、PHF 抗体、抗体 PHFの投薬戦略を用いて、PHFと抗体4E6G7との組み合わせで処理した。陰性対照として、さらなる細胞のセットを、PHFおよび50 nMポツリヌス毒素Aとインキュベートした。この毒素は、シナプス伝達および多胞体(MVB)と形質膜との融合の構成要素である、SNAP-25/23を分解する。72時間後に、カバーガラスを固定し、上記のように、全タウを認識する抗体で染色して、標識されたPHF物質を含有するWT細胞の数を決定した(n =計数した969細胞)。図9、パネルCは、マイクログループを通過して成長する軸索(矢印を付けている)を示す共焦点画像である。細胞を、汎タウ抗体で染色している。図9、パネルD~Fは、JNPL3細胞を含有するマイクロ流体装置のチャンパーに添加した、蛍光標識されたPHF物質(1 μ g/mL)を示す。図9、パネルDは、タウタンパク質の位置を示す。図9、パネルEは、PHFの位置を示す。図9、パネルFは、タウタンパク質の位置とPHFの位置の両方を示す、マージした画像である。

【0186】

PHF単独で処理した培養物において、細胞の $24 \pm 3\%$ が、蛍光標識されたPHF物質を含有していた。50 nMのポツリヌス毒素をPHFで処理した培養物に添加した場合に、これは $4 \pm 0.2\%$ に低下し($p=0.0004$)、WT細胞中のPHFが、シナプス放出を介してそこに到着するこ

とが示された。PHF + 抗体処理群およびPHF 抗体処理群もまた、PHF陽性細胞の数の低下を呈した（それぞれ、 $15 \pm 2\%$ ($p = 0.01$) および $18 \pm 4\%$ ($p = 0.05$)）。しかし、他の結果に基づいて期待されたように、抗体 PHF条件下ではPHF陽性細胞のパーセンテージにおいて有意な変化がなかった（図9、パネルG）。

【0187】

実施例6

PHFのパターンおよび抗体結合に対する投薬法の影響

蛍光標識されたPHF物質および抗体4E6G7を使用して、用いた処理法がPHFのパターンおよび抗体結合に影響を及ぼしたかどうかを検討した。初代ニューロンを、上記のように、PHF単独、PHF + 抗体、PHF 抗体、または抗体 PHFにしたがって $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ PHFまたは $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 抗体4E6G7とインキュベートした。共焦点画像を、最後の処理を適用した24時間後に収集した。すべてのカバーガラスを、Dako汎タウポリクローナル抗体で染色した。PHFは、ニューロン中に容易に取り込まれることが見いだされ、24時間の培養後には細胞全体にわたって見ることができた（図10、パネルA~D）。PHF 抗体処理レジメン由来の細胞において、PHF物質の取り込みおよび広い細胞内分布を見ることができた。この投薬レジメンの下で、抗体4E6G7はまた、内部移行して、事前に添加したPHFと共局在した（図10、パネルE~H）。しかし、異なるパターンが、PHF + Ab群において観察された。これらの条件下で、PHFおよび抗体4E6G7はまた、共局在して見られたが、PHF-抗体複合体は細胞外であった（図10、パネルI~L）。これらの結果により、これらの2種の投薬法は、PHF添加と関連のある病的変化の低下において有効であるが、作用機序が異なることが示される。

【0188】

抗体およびPHFの投与のタイミングおよび相対的順序が、作用機序に影響を及ぼすかどうかをさらに調査するために、追加の細胞の群を、上記のようにプレATINGして投薬した。 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ PHFをJNPL3ニューロンに添加し、4E6G7を、同時または24時間後のいずれかに添加した。追加の培養物において、クラスリン媒介性エンドサイトーシス（Congdon, E.E. et al. (2013) "Antibody Uptake Into Neurons Occurs Primarily Via Clathrin-Dependent Fcγ Receptor Endocytosis And Is A Prerequisite For Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288(49):35452-35465)のインヒビターである $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のダンシルカダベリン（DC）をまた、4E6G7がその効果を発揮するのに抗体内部移行が必要であるかどうかを判定するために、4E6G7とともに添加した。したがって、これらの実験により、PHF誘導性病理を阻止するために内部移行が必要とされるかどうかについての確認が可能になる。

【0189】

全タウレベルを免疫プロットにより検討した場合に、いずれの投薬条件下でも、DCを伴うかまたは伴わずにインキュベートした試料の間で、いかなる有意な違いも観察されなかった。PHF + 抗体レジメンで処理した細胞において、DCの添加は、タウ/NeuN比（図11、パネルA）または対照に比してNeuNレベルを変化させなかった。しかし、PHF 抗体レジメンで処理した細胞を $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ DCとインキュベートした場合に、NeuNの有意な減少が観察された（DCを伴わない細胞と比較して対照の32%に低下、 $p = 0.00005$ ）。さらに、タウ/NeuNの比は、DCを添加した場合に、PHF 抗体レジメンで処理した細胞において有意にシフトした（DCを伴わない細胞について1.18、およびDCで処理した細胞について2.95、 $p = 0.008$ ；図11、パネルB）。これらの結果により、抗体4E6G7およびPHFを一緒に添加した条件下では、抗体がPHF誘導性病的変化を阻止するのにFc受容体を介した内部移行が不必要であることが示される。対照的に、ひとたびPHF物質がニューロンによって取り込まれると、抗体内部移行の阻止が、PHF毒性の阻止におけるその有効性を遮断した。

【0190】

実施例7

抗体4E6G7およびそのタウ結合性断片による毒性の阻止およびタウレベルの低下

データにより、タウタンパク質の^(P)Ser396および^(P)Ser404領域をターゲティングするモノクローナルタウ抗体である抗体4E6G7が、患者由来のPHF物質の添加により誘導された

毒性を阻止し、タウレベルを低下させたことが示される。これらの所見により、抗体4E6G7、およびそのscFv断片などのそのタウ結合性断片の、受動的タウ免疫療法における使用が支持される。

【0191】

単独で、10または1 μ g/mLのPHFの添加は、LDHアッセイおよびNeuN免疫プロットティングアッセイを用いて測定した場合に、細胞喪失を誘導し、ならびに、残ったニューロンにおいて全タウおよびリン酸タウを増加させた。それは、放出およびその後の他のニューロンによる取り込みを通して、細胞集団の間で伝播する。抗体4E6G7の有効性をテストするために、タウおよび抗体の投与のタイミングが異なる、3種の異なる投薬法を使用した。これらの方法のうち2つである、PHFおよび抗体の一緒の添加、ならびにPHFの24時間後の抗体の添加は、PHF毒性およびタウ播種伝播を阻止した。興味深いことに、同様に有効ではあるが、保護がそれを通して起こる機序は異なっていた。コインキュベーションでは、外因性PHFと抗体4E6G7との細胞外複合体が形成され、それがPHFを中和し、その取り込みを阻止した。これらの結果により、抗体は、細胞の間の間質腔において働くが有益でありうるという結論が支持される。生体脳において、これらのタウ-抗体複合体は、次いで、グリア細胞により取り込まれ、排除されうる。抗体4E6G7をPHFの24時間後に添加した場合、2種の分子は細胞内で共同在する。抗体4E6G7は、エンドソーム/リソソーム系に入り、恐らく凝集物の解体を促進することにより、天然タウの排除を促進する (Congdon, E.E. et al. (2013) "Antibody Uptake Into Neurons Occurs Primarily Via Clathrin-Dependent Fc γ Receptor Endocytosis And Is A Prerequisite For Acute Tau Protein Clearance," *J. Biol. Chem.* 288(49):35452-35465 ; Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," *J. Biol. Chem.* 288(46):33081-33095 ; Krishnamurthy, P.K. et al. (2011) "Mechanistic Studies of Antibody-Mediated Clearance of Tau Aggregates Using an ex vivo Brain Slice Model," *Frontiers in Psychiatry / Frontiers Research Foundation* 2:59, pages 1-6)。抗体、標的、およびエンドソーム/リソソームのマーカ-の間このニューロン共同在はまた、パーキンソン病の動物モデルにおける受動的免疫療法を用いた研究においても見ることができる。これらの所見はともに、抗体4E6G7の治療的有効性を説明し；それは、PHF取り込みの細胞外遮断およびその細胞内排除の両方ができる。

【0192】

対照的に、抗体4E6G7とのブレインキュベーションは、使用した投薬レジメンで、毒性およびタウ病理の播種の低下の両方で有意に有効性が低かった。これに対する可能性のある理由は、これらの条件下での標的エピト-プの相対的欠如である。ニューロンにおける抗体4E6G7のレベルは、病的細胞内タウの量と相関している。抗体を最初に添加した場合、有効であるためには、それが24時間後のPHFの添加まで細胞に保持されていなければならない。しかし、標的の不足がある場合、抗体は結合しないままであり、分解または細胞の外へのリサイクリングの傾向がより強いことになる。抗体4E6G7は、これらの条件下で無効であったが、循環抗体は、初期のタウ凝集物を排除することにより疾患の開始を阻止できたため、上記で提示した結果は、それがタウ異常症に対する予防的治療において使用されえないことを示さない。外因性抗体は、1~3週間の半減期を有し、より低い用量を、症状が出る前のリスクがある個体において使用することができる。

【0193】

実施例8

抗体4E6G7およびそのタウ結合性断片の有効性の、急性および長期の研究

抗体4E6G7の治療的有効性を、2種の異なるマウスモデルを用いて、急性および長期の治療条件下で評定した。下記のように、このどちらかと言うと低い親和性の抗体は、急性および長期の治療後に認知上の有益性を提供し、その両方が病的タウタンパク質の排除と関連があった。2種のモデル、hTauおよびhTau/PS1マウスを使用し：hTauマウス (Jackson Laboratories、ストック番号004808 ; Andorfer, C. et al. (2003) "Hyperphosphorylation

10

20

30

40

50

n And Aggregation Of Tau In Mice Expressing Normal Human Tau Isoforms," J. Neurochem. 86:582-590) は、ヌルマウスタウバックグラウンド上に変異していないヒトタウタンパク質を発現し、年齢とともにタウ病理および神経原線維変化を生じる。このモデルを使用して、IgG対照に比して抗体4E6G7での急性受動的免疫療法の治療的有益性を評価した。hTau/PS1マウスを、hTauマウスとPS1変異を発現するマウスとの繁殖によって取得し (M146L; Duff, K. et al. (1996) "Increased Amyloid-Beta 42(43) In Brains Of Mice Expressing Mutant Presenilin 1," Nature 383:710-713)、この交配をマウスタウKOバックグラウンド上で維持した。後者のモデルは、タウ病理を加速している (Boutajangout, A. et al. (2010) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model," J. Neurosci. 30:16559-16566)。このモデルを使用して、同じ抗体での長期受動的免疫処置の有益性を評価した。

10

【0194】

A. 行動 / 認知評価の方法論

ロータロッド

このテストを使用して、前肢および後肢の運動協調性およびバランスを測定した。この手順は、困惑させるような練習を伴わずに運動行動を評価するように設計した。マウスを最初に、第1日目にベースラインレベルの動作に達するように4回の試験において慣らし、次の日に、4回の足跡試験において、試験の間を15分としてテストした (San Diego InstrumentsのSDI Rotor-Rod System)。動物を、ロッド (直径3.6 cm) 上に置いて、初期速度を1.5 rpmに設定し、次いで30秒毎に0.5 rpm分上げた。プラスチックカバーを有する柔らかい発泡体クッションを、落下による損傷を予防するためにロッドの下に置いた。各セッション後に、ロッドを、70%エタノール、および次いで水で清浄にした。動作を評価するために、マウスが回転パレルの上面から落下するかまたは逆さまになった (しがみつくことにより) 時のロッドの速度を記録した。

20

【0195】

歩行活動

マウスを最初に、円形オープンフィールド活動チャンバー (直径55.8 cm) において15分間、群 / ケージで慣らし、次いで、各マウスを、次の日に個々に15分間、同じチャンバーにおいてテストした。各セッション後に、フィールドを、70%エタノール、および次いで水で清浄にした。チャンバーの上部のカメラが、動物の動きを測定することにより、各次元 (すなわち、x、y) における水平移動を自動的に記録した (Noldus Information TechnologyのEthoVison Video Tracking system)。結果を、マウスの移動距離 (cm)、平均休止時間、ならびに速度 (平均および最大) として記録する。

30

【0196】

クローズフィールド対称性迷路 (CFSM)

この器具は、長方形のフィールドであり、10 cmの高さの壁を有する65 cmの正方形が36 cmの正方形に分かれており、透明なPlexiglas (登録商標) の上面により覆われている。各々16 x 23 x 10 cmの2つのボックスを、その対角線の角で正方形に付加した。対称性迷路は、ヘップ・ウィリアムズおよびラビノビッチ・ロズボルトタイプのテストの改変である (Pritchett, K. et al. (2004) "Hebb-Williams Mazes," Contemp. Top. Lab. Anim. Sci. 43(5):44-45; Meunier, M. et al. (1986) "The Hebb-Williams Test To Assess Recovery Of Learning After Limbic Lesions In Mice," Physiol. Behav. 37(6):909-913; Rabinovitch, M.S. et al. (1951) "A Closed-Field Intelligence Test For Rats," Can. J. Psychol. 5(3):122-128)。簡潔に言うと、主な違いは、各々の端のボックスが、スタートボックスおよびゴールボックスの両方として機能することである。マウスは、交互の試験で反対の方向に走り、それにより試験間に手で触れることをなくし、これはストレスを最小化するはずである。マウスが、所定の問題内でいずれかの方向に行く同じ曲がり角に直面するように、対称性のパターンでフィールドに障壁を置く。0日目に、マウスを、水制限スケジュール (1日に2時間、水に到達する) に適合させ、テストに使用したのと同じ環境に慣らした。1日目に、すべてのマウスに、緑色の食用色素で色付けしたサッカ

40

50

リン味の水を、10分間、各ボックスにおいて与えた。2日目に、マウスをスタートボックスに置き、フィールドを探索させ、褒美のサッカー味の水(0.05 mL)が利用できるゴールボックスに入らせた。各ボックスへのドアは、出入りが可能なように手動で開け閉めされた。マウスが確実にスタートボックスからゴールボックスまで走った場合に、同じ条件下で4回の練習試験を与えた。3日目に、ゴールボックスへの直接到達を妨害するために、2つの障壁をフィールドに異なる対称性の位置に置いた単純な問題で、1回の練習セッションを与えた。この練習テストを、4試験にわたって繰り返した。4日目に、正式なテストは、最も難しいグレードの3つの障壁からなった(Boutajangout, A. et al. (2010) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model," J. Neurosci. 30:16559-16566 ; Asuni, A.A. et al. (2006) "Vaccination Of Alzheimer's Model Mice With Abeta Derivative In Alum Adjuvant Reduces A Burden Without Microhemorrhages," Eur. J. Neurosci. 24:2530-2542)。マウスに、2分の試験間の間隔で、5試験を与えた。エラー(すなわち、指定されたエラーゾーン中への侵入および再侵入)ならびに各試験を完了する時間の観点で、同じ観察者により手動で動作をスコア化した。

10

【0197】

急性研究において、マウスを次いで、それらの感覚運動テストでの動作を同様に考慮に入れて、類似した平均テストスコアおよび群分散を有する対照群および処置群に分けた。マウスを、処置後の練習期間なしで再テストした。

【0198】

長期研究については、マウスを、処置期間の終わりにのみテストし、難しいグレードの3種の異なるテストを経験させた(Boutajangout, A. et al. (2010) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model," J. Neurosci. 30:16559-16566 ; Asuni, A.A. et al. (2006) "Vaccination Of Alzheimer's Model Mice With Abeta Derivative In Alum Adjuvant Reduces A Burden Without Microhemorrhages," Eur. J. Neurosci. 24:2530-2542)。

20

【0199】

放射状アーム迷路

このテストは、Boutajangout, A. et al. (2012) "Cognitive And Sensorimotor Tasks For Assessing Functional Impairments In Mouse Models Of Alzheimer's Disease And Related Disorders," Methods Mol. Biol. 849:529-540により記載されているように行なった。簡潔に言うと、器具は、Plexiglas(登録商標)から構築された8アーム高架式放射状迷路である。各アームは、35 cmの長さおよび7 cmの幅で、各アームの端に水カップ(直径1 cm)が配置されている。動物がアームの間を渡るのを阻止するために、15 cmの高さの側壁が、各アーム中に12 cm延びている。中央領域は、直径14 cmの八角形をしたハブである。滑車系により遠隔操作される透明なPlexiglas(登録商標)のギロチンドアが、アームへの到達を調節する。迷路は、床レベルよりも75 cm上の高架式であり、不変の位置のいくつかの特徴的な物体が迷路以外の手がかりとして働く部屋に位置している。テストの前に、マウスを5日間適合させた。この期間の最中に、マウスに、1日あたり1時間、0.1%サッカーの水を受けさせ、次いで、16時間後に、各アームの端に置かれたカップから砂糖溶液に到達するように適合させた。最初の2日の適合は、マウスを自由に探索させたY迷路において行なった。その後の3日の適合は、動物が自分の操作と関連がある音に慣れるように、定期的にドアが上がったり下がったりする放射状アーム迷路において行なった。同じ水欠乏スケジュールを、9日のテスト期間の最中に維持した。マウスは、このスケジュールで良好な健康を維持する。マウスを中央領域に置き、すべてのドアを上げることによって、各テスト試験を始めた。アームに入った時に、すべてのドアが下がった。マウスがサッカー水を消費した後、そのアームへのドアを上げて、マウスを中央アリーナに戻らせた。5秒の間隔の後、再びドアのすべてを同時に上げることによって、次の試験を開始した。この手順を、動物がすべての8アームに入るまで、または10分が経過するまで継続した。毎日の獲得セッションを、9日間継続した。エラー(以前に訪れたアームへの侵

30

40

50

入)の数および各セッションを完了する時間を、記録した。

【0200】

物体認識テスト

このテストは、Boutajangout, A. et al. (2012) "Cognitive And Sensorimotor Tasks For Assessing Functional Impairments In Mouse Models Of Alzheimer's Disease And Related Disorders," *Methods Mol. Biol.* 849:529-540により記載されているように行った。簡潔に言うと、使用した自発的物体認識テストは、短期記憶の欠損を測定し、床から50 cm上げた、正方形をしたオープンフィールドボックス(黒色Plexiglas(登録商標)から構築された18 cmの高さの壁を有する48 cmの正方形)において実施した。光強度を、30 lxに設定した。テストの前日に、マウスを個々に、空のボックスを15分間探索させるセッションにおいて慣らした。訓練セッションの最中に、2つの新規物体を、オープンフィールドの対角線の角に置いて、動物を15分間探索させた。いずれの所定の試験についても、ペアの物体は、10 cmの高さであり、嗅覚の手がかりによって容易に識別できないように同じ物質で構成されていた。各物体を探索するのに費やした時間を、追跡システム(San Diego Instruments)によって記録し、訓練期の終わりに、保持遅延(RD=3時間)の期間、マウスをボックスから除去した。正常マウスは、3時間の遅延後に、特定の物体を覚えており、保持試験の最中には新規物体を調査するのにそれらの時間の大部分を費やす。保持テストの最中に、動物を、訓練の最中に使用した以前に見慣れた物体のうちの1つを新規物体により置き換えた、同じボックス中に戻して置き、6分間自由に探索させた。異なる物体のペアを、所定の動物について各試験に使用し、物体ペアに対する曝露の順序ならびに各ペアについての指定した試料および新規物体を、群内および群にわたって釣り合わせた。新規物体および見慣れた物体を探索するのに費やした時間を、6分間、記録した。短期記憶スコアのパーセンテージは、新規の1つ(保持セッション)と比較した2つの物体のうちのいずれか1つ(訓練セッション)を探索するのに費やした時間である。

【0201】

恐怖条件付け

テストチャンバー(26 cm×22 cm×18 cm高)は、透明なPlexiglas(登録商標)の側面、および軽度のフットショックを送達するために使用したグリッド床を有していた。チャンバーを、マウスを攪乱することなくそれを通して観察できる窓を有する、音響減衰チャンバー(内部の寸法:56 cm×38 cm×36 cm)の内側に置いた(Coulbourn InstrumentのCoulbourn Habitest)。訓練日に、マウスをテストチャンバー中に置き、2分間探索させた。条件刺激(CS;白色雑音80 dBの音)を30秒間提示し、その後直ちに、無条件刺激(US)として働く軽度のフットショック(2秒、0.7 mA)を提示した。2分後に、マウスは、2回目のCS-USの組み合わせを受けた。静止画モニターシステム(San Diego Instruments, San Diego CA)を使用して、CSおよびUSの提示のタイミングを調節し、すくみ行動を記録した。条件付け手順の最中に、フットショックに対する応答(典型的には、走る、跳ぶ、または発声)もまた記録した。マウスを、短期記憶は3時間、長期記憶は24時間で、文脈的恐怖についてテストし、その最中にマウスをCSなしで5分間、元のテストチャンバー中に置き、音およびすくみ行動を記録した。

【0202】

B. hTauマウスを用いた抗体4E6G7の急性有効性研究

hTau急性有効性研究の開始時に、hTauマウスは、11~12か月齢であり、3種の抗体注射を受け、恐怖条件付けテストに加えて同じ行動テストでの再テスト、およびその後の組織分析のための脳抽出を経験する前に、類似した認知状態および運動状態で2種の群に分けた。マウスは、1~10日目に、適合、ならびにロータロッド、オープンフィールドおよびクローズフィールド対称性テストを用いた予備テストを(Boutajangout, A. et al. (2012) "Cognitive And Sensorimotor Tasks For Assessing Functional Impairments In Mouse Models Of Alzheimer's Disease And Related Disorders," *Methods Mol. Biol.* 849:529-540)、その後、11および14日目に抗体注射を、15~18日目に再テストを経験した。3回目の注射は、24日目に送達し、その後、27~28日目に恐怖条件付けテストを、30日目に

灌流を行った。

【0203】

組織分析のために、マウスを、ケタミン/キシラジン (kg体重あたり250 mg/50 mg、i. p.) で麻酔し、Rajamohamedsait, H.B. et al. (2012) "Histological Staining of Amyloid and Pre-amyloid Peptides and Proteins in Mouse Tissue," *Methods Mol. Biol.* 849:411-424により記載されているように加工処理した。簡潔に言うと、マウスを、25 mL PBSで10分間、灌流した。次いで、脳を注意深く取り出し、左半球を凍結して、ウエスタンプロット用に加工処理するまで-80 で保存した。右半球は、24時間、2%過ヨウ素酸-リジン-パラホルムアルデヒド (PLP) 中に保ち、次いで、少なくともさらに24時間、または切開するまでDMSO/グリセロール緩衝溶液中に置いた。冠状切片 (40 μmの厚さ) を、凍結クリオスタット上で取得し、5連続 (200 μm離れたもの) でエチレングリコール凍結保護物質溶液中に置き、免疫組織化学に使用するまで-30 で保存した。免疫染色は、病的タウを染色するマウスモノクローナルタウ抗体、PHF-1 (1:1000)、^{P}Ser396/^{P}404 エピトープに対するもの、および立体構造エピトープを認識するMC1 (1:100) で行った。

10

【0204】

左半球の脳組織を秤量し、(5×v/w) 改変RIPA緩衝液 (50 mMトリス-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1 μg/mL Completeプロテアーゼインヒビター混合物 (Roche Applied Science)) においてホモジナイズした。次いで、ホモジナートを、20分間、20 で遠心分離 (20,000×g) し、上清を低速上清 (LSS) として収集した。タンパク質定量後、体積を、改変O+緩衝液 (62.5 mMトリス-HCl、pH 6.8、5%グリセロール、2-メルカプトエタノール、2.3% SDS、1 mM EGTA、1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、1 mM Na₃VO₄、1 μg/mL Completeプロテアーゼインヒビター) における希釈で同等のタンパク質濃度に調整し、5分間煮沸して、12%ポリアクリルアミドゲル上にローディングした。サルコシル不溶性画分については、10%サルコシル溶液をLSSに添加して、試料を30分間室温で混合し、次いで、100,000×gで1時間、20 で遠心分離した。沈殿物を次いで、1%サルコシル溶液中で洗浄し、再び100,000×gで1時間、20 で遠心分離した。沈殿物を次いで、30分間、風乾し、改変O+緩衝液の50 μlと混合し、1分間ボルテックスし、次いで5分間煮沸して、「サルコシル沈殿 (SP) 画分」と表した。

20

【0205】

試験エラーにより示されるように、抗体4E6G7で免疫処置したhTauマウスは、CFSMテストにおいて有意な改善を呈し (p<0.01) (図12、パネルA)、一方、対照マウスは呈さなかった (図12、パネルB)。マウスの群は両方とも、運動機能テスト (ロータロッドおよびオープンフィールドテスト) において同様に動作し、認知機能における改善は、免疫処置の直接の結果であったが、運動機能変化からの二次的効果ではなかったことが示唆された。しかし、免疫処置したマウスおよび対照マウスは両方とも、処置後の恐怖条件付けテストにおいていかなる改善も示すことができなかった。

30

【0206】

C. hTau/PS1マウスを用いた抗体4E6G7の長期有効性研究

免疫処置を、マウスが8~9か月齢の時に始め、13週間にわたって毎週継続した。屠殺の前の月に、マウスは、一連の認知テスト (上記のような、放射状アーム迷路、さまざまな難しさのクローズフィールド対称性テスト、および物体認識テスト)、ならびに、そのような欠損が認知評価において交絡変数ではないことを検証するための感覚運動テスト (上記のようなロータロッドおよびオープンフィールド) を経験した。

40

【0207】

免疫処置したマウスは、放射状アーム迷路 (p<0.0001; 事後、2、3、5~9日目はp<0.01~0.001) (図13、パネルA)、単純、中間、および複雑な課題で35~69%少ないエラーを有したCSFM (p<0.05~0.003) (図13、パネルB~D)、ならびに物体認識課題 (新規物体で費やした時間63%対対照について46%、p<0.05; 図13、パネルE) において、対照マウスよりも実質的に良好に動作することが見いだされた。群は、さまざまな感覚運動課題

50

において異ならず、堅牢な認知改善は、感覚運動効果により説明できないことが示され、これは結果をさらに強くする。

【0208】

免疫組織化学を、急性有効性研究に記載したように行った。PHF-1染色した脳切片の定量分析により、IgG注射した対照と比較して、免疫処置したマウス中の梨状皮質における病的タウの61%の低下が判明した。図14、パネルA~Cは、対照マウス(図14、パネルA)および抗体4E6G7で免疫処置したhTau/PS1マウス(図14、パネルB)について、PHF-1染色した脳切片を示す。図14、パネルCは、対照マウスおよび免疫処置したマウスの脳細胞のPHF-1染色の定量分析を示す。

【0209】

実施例9

抗体4E6G7は、タウの^{P}Ser404エピトープに対する他の抗体では観察されない特性を呈する

抗体4E6G7の新規の特徴をさらに実証するために、その特徴を、タウの^{P}Ser404エピトープに対して同様に生じた対照抗タウ抗体(抗体6B2G12;抗体6B2とも指定される)のものと比較した(Krishnaswamy, S. et al. (2014) "Antibody-Derived in vivo Imaging of Tau Pathology," J. Neurosci. 34(50):16835-16850; Congdon, E.E., et al. (2013) "Antibody Uptake Into Neurons Occurs Primarily Via Clathrin-Dependent Fcγ Receptor Endocytosis And Is A Prerequisite For Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288(49):35452-35465; Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol. Chem. 288(46):33081-33095)。抗体4E6G7および抗体6B2G12は両方とも、ニューロンに入り、タウと共局在することができる(Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol. Chem. 288(46):33081-33095)。

【0210】

脳スライス培養物において、抗体は両方とも、処理の6週間後に可溶性ホスホ-タウを低下させる。しかし、2種の抗体は、同じエピトープに対して惹起されたにもかかわらず、複数の異なる機能特性を提示する。しかし、抗体4E6G7のみが、細胞内機序を介して初代ニューロンにおけるタウレベルを急性的に低下させることが見いだされ、抗体6B2G12はそれが見いだされない(Congdon, E.E., et al. (2013) "Antibody Uptake Into Neurons Occurs Primarily Via Clathrin-Dependent Fcγ Receptor Endocytosis And Is A Prerequisite For Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288(49):35452-35465; Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol. Chem. 288(46):33081-33095)。2種の抗体は、異なる結合特性を提示し、抗体4E6G7はホスホ-選択的であり、抗体6B2G12は、リン酸化により影響を受ける立体構造特性、およびタウに対する見かけのより高い親和性を有する(Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol. Chem. 288(46):33081-33095)。

【0211】

抗体4E6G7は、hTauマウスにおける認知を急性的に改善し、可溶性ホスホ-タウタンパク質を低下させるが、抗体6B2G12はそうではない。試験エラーにより示されるように、hTauマウスの抗体4E6G7での急性処置は、CFSMテストにおいて決定した場合に認知、空間学習、および記憶における有意な改善につながり(テスト後対テスト前で48%少ないエラー; 13.6(平均エラー) ± 1.2(SEM)対7.1 ± 0.9, p < 0.01)、一方、IgG対照マウスは、それらの注射前動作と比較して改善しなかった(図15、パネルA)。これらの違いは性別と関連しなかった。抗体4E6G7で処置した雄(52%少ないエラー; 14.6 ± 0.8対7.0 ± 1.4, p < 0.01)は、抗体4E6G7で処置した雌(44%少ないエラー; 12.7 ± 2.2対7.1 ± 1.2, p < 0.05)

10

20

30

40

50

と同様に動作した。反復測定、二元配置分散分析により、処置効果が判明した ($p=0.0018$) が、性別効果は判明しなかった ($p=0.5145$)。逆に、抗体6B2G12処置は、このテストにおける改善をもたらさなかった (図15、パネルB)。

【0212】

これらの抗体の特性における追加的な違いもまた、特定した。上記に示したように、 $1\mu\text{g/mL}$ または $10\mu\text{g/mL}$ のAD由来のPHFとのインキュベーションは、LDHアッセイ (例えば、図1~2を参照されたい) およびNeuN免疫プロットイング (例えば、図3~4を参照されたい) により決定した場合に、初代ニューロンにおいて毒性を誘導することが見いだされ、抗体4E6G7は、これらの効果を阻止することが見いだされた; しかし、抗体6B2G12は、これらの効果を阻止できないことが見いだされた。同様に、抗体4E6G7 ($10\mu\text{g/mL}$ または $1\mu\text{g/mL}$) での処理は、PHF曝露により引き起こされたタウレベルにおける変化を阻止することが見いだされ (例えば、図5~6を参照されたい)、一方、抗体6B2G12での処理は効果を有さないことが見いだされた。加えて、抗体4E6G7は、 $1\mu\text{g/mL}$ または $10\mu\text{g/mL}$ PHFに対する曝露により引き起こされるリン酸化タウの増加を阻止できることが見いだされ (例えば、図7~8を参照されたい); 抗体6B2G12は、そのような増加を阻止できないことが見いだされた。

10

【0213】

いずれの抗体も、恐怖条件付けテストにおいて有益性を示さなかった。マウスの処置群は両方とも、運動機能テスト (ロータロッドおよびオープンフィールドテスト) においてIgG対照と同様に動作し、認知機能における抗体4E6G7媒介性の改善は、免疫処置の直接の結果であったが、運動機能変化からの二次的効果ではなかったことが示唆された。

20

【0214】

実施例10

抗体4E6G7は主として可溶化PHFを認識する

抗体4E6G7および抗体6B2G12の異なる特性についての基礎をさらに検討するために、タウペプチド、可溶化PHF、および他のタウ画分に対する抗体の結合を、biacore、ドットプロット、およびELISAアッセイにおいて特徴決定した。

【0215】

Biacoreアッセイ

抗体4E6G7および抗体6B2G12の、タウタンパク質の396/404領域に対応するタウペプチドに対する結合を、biacoreアッセイを用いて検討した。いずれの抗体も、以前に公開されたELISAアッセイとは異なり、P-Ser396に対する結合を示さなかった (Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol. Chem. 288(46):33081-33095)。しかし、すべての他のエピトープペプチドに対して、抗体6B2G12は、抗体4E6G7で見られたもの (10^{-7} M) よりも実質的に低い K_D 値 ($10^{-9}\sim 10^{-10}\text{ M}$) を生じ、免疫原エピトープに対するずっと高い親和性を示した (表5)。ELISAを用いて、抗体4E6G7は、プレート上にコーティングされたP-Ser396エピトープに対する結合が非常に不十分であることが見いだされたが、抗体6B2G12は結合を示した。これは、プレートと結合した時にペプチドにおいて起こる立体構造変化、または、抗体を固定化した時に起こる違いによる可能性がある。競合ELISAにおいて、溶液中のP-Ser396ペプチドに対する抗体4E6G7および抗体6B2G12の結合の同様の欠如が観察され、biacoreデータの精度が確認された。これらの所見により、抗体親和性を評価する場合にはさまざまな方法を使用すべきであることが強調される。

30

40

【0216】

(表5)

K _D (Biacore)	抗体 4E6G7	抗体 6B2G12
30アミノ酸のペプチド		
タウ379~408 [P-Ser396/404]	2.71 x 10 ⁻⁷	3.95 x 10 ⁻¹⁰
タウ379~408	2.12 x 10 ⁻⁷	2.51 x 10 ⁻⁹
23アミノ酸のペプチド		
タウ386~408 [P-Ser396/404]	4.69 x 10 ⁻⁷	2.39 x 10 ⁻⁹
タウ386~408 [P-Ser404]	2.78 x 10 ⁻⁷	4.11 x 10 ⁻⁹
タウ386~408 [P-Ser396]	ND	ND

【 0 2 1 7 】

10

ドットプロットアッセイ

抗体4E6G7および抗体6B2G12のPHFに対する結合を、さまざまなタウ画分のドットプロットを用いてアッセイした（図1、図16、パネルA）。同じヒトAD脳由来の可溶性PHF画分、サルコシル可溶性画分、およびサルコシル不溶性画分を、ニトロセルロース膜上にアプライし、次いで、抗体4E6G7または抗体6B2G12とインキュベートした（図16、パネルA）。抗体4E6G7は、可溶性PHFに対してより高い親和性を有していたが、抗体6B2G12は、サルコシル不溶性画分とより良好に結合した。いずれの抗体も、サルコシル可溶性画分とは十分に結合しなかった。抗体4E6G7および抗体6B2G12は両方とも、ドットプロットを用いて、対照試料に対する限定的な結合を示した（図16、パネルB）。いかなる目に見える反応性も、サルコシル可溶性画分においては見られず、最小の反応性のみが、他の2種の画分において見られた。任意の病的タウおよび沈殿可能な（pelletable）物質が、AD組織においてよりずっと少ない場合には、対照組織は非常に限定されており、さまざまなタンパク質を含有する可能性が高いことに注意されたい。同じ量のタンパク質を、ADおよび対照組織についてプロットした。

20

【 0 2 1 8 】

ELISAアッセイ

抗体4E6G7および抗体6B2G12の、AD脳および対照脳由来のさまざまなタウ画分に対する結合を評価するために、2種の異なるELISAアッセイを行った。最初に、プレートを、サルコシル可溶性画分、可溶性PHF画分、またはサルコシル不溶性画分のいずれか由来の物質でコーティングし（1 μg/ウェル）、抗体の希釈液を添加した。

30

【 0 2 1 9 】

プレートを可溶性PHFでコーティングした場合（図16、パネルC）、抗体6B2G12は、1/125kまでのすべての希釈について、対照よりもAD脳由来の物質でコーティングしたウェルに対して有意により強い結合を示し（ $p < 0.0001 \sim 0.05$ ）、および、1/200 ~ 1/5kでのADまたは対照のいずれかに対する抗体4E6G7よりも有意により強い結合を示した（ $p < 0.0001$ ）。対照的に、抗体4E6G7は、希釈のいずれでも、ADタウ対対照タウに対して有意により強い結合を示さなかった。

【 0 2 2 0 】

サルコシル可溶性タウでコーティングしたプレートにおいては（図16、パネルD）、最高の抗体濃度でも低い結合が検出された。1/200希釈で、抗体6B2G12は、対照脳由来のタウよりもADタウに対して有意により強い結合を示し、また、ADまたは対照タウのいずれかに対して抗体4E6G7よりも強い結合を示した（それぞれ、 $p < 0.01$ 、0.05、および0.05）。他の希釈または条件のいずれも、試料の間でのいかなる有意な違いも示さなかった。

40

【 0 2 2 1 】

最後に、プレートをサルコシル不溶性タウでコーティングした場合（図16、パネルE）、抗体6B2G12は、1/200 ~ 1/125kの希釈で、ADタウに対する抗体4E6G7よりも有意に強い結合を示し（ $p < 0.0001 \sim 0.05$ ）、また、同じ希釈でADタウに対して有意により強い結合を示した（ $p < 0.0001 \sim 0.05$ ）。再び、抗体4E6G7で、AD対対照に対する結合において有意な違いはなかった。

【 0 2 2 2 】

50

次いで、溶液中のPHFに対する抗体結合を決定するために、競合ELISAを行った。このアッセイにおいては、プレートを、上記の可溶化PHFでコーティングしたが、抗体を添加する前に、アリコートをし、増大する濃度の可溶化PHF (0.01 ~ 1 µg/ml) と1時間インキュベートした。これらの条件下で、可溶化PHFに対する結合は、プレート上にコーティングされたPHFに対する抗体4E6G7の結合を顕著に阻害したが、抗体6B2G12結合は影響を受けなかった。最高PHF濃度で、ウェルに対する抗体4E6G7結合は、85%分低下した。IC50値は、71 nMであると決定された (図16、パネルF)。対照的に、抗体6B2G12は、いずれのPHF濃度でもウェルに対する結合の低下を示さなかった。これらのデータにより、2種の抗体は、AD由来のPHF物質内の異なるタウ種と、抗体4E6G7は可溶化PHFと、および抗体6B2G12は凝集したPHFと結合していることが示される。

10

【0223】

ELISAおよびドットプロット結合データにより、特に、共焦点分析および生化学分析からの所見とともに考えた場合に、抗体4E6G7の有効性 (および抗体6B2G12についてのその欠如) は、PHFの相互作用 / 中和のそれぞれの程度によって説明されることが示唆される。ドットプロットアッセイおよびELISAデータにより、抗体4E6G7および抗体6B2G12は両方ともPHFと結合するが、親和性および好ましい種が異なり、抗体6B2G12は潜在的に、より高度に凝集しているが毒性の低いタウ形態と結合することが示される (図16、パネルA)。

【0224】

抗体6B2G12で得られた結果と対照的に、すべてのアッセイにおいて、抗体4E6G7は、凝集したタウに対するより少ない結合、および可溶化PHFに対する優先的な結合を示した。対照試料に比した、ドットプロット上の可溶化PHF画分に対する強い結合にもかかわらず、ELISAアッセイにおいて、抗体4E6G7は、ウェル上に凝集したタウと結合する限定的な能力を示した。Ab-PHF複合体は、抗体6B2G12とPHFとのコインキュベーションでは見られず、それは、後者が、培養培地中で、抗体6B2G12と結合しないその可溶化形態にあるためである (図16、パネルF)。(実験濃度下でのPHF画分の溶解性は、超遠心分離を用いて確認した。) エンドソーム / リソソームにおけるpH変化は、凝集を促進して、PHFの可溶性形態および不溶性形態の混合物をもたらす。そのため、これらの小胞における両方の抗体の結合をもたらす可能性がある (PHF Ab条件)。しかし、可溶化PHF形態に対する抗体4E6G7の結合のみが有益であり、一方、抗体6B2G12による結合は効果を有さない。治療的有効性は、可溶性 (または可溶化) PHFと結合する能力と関連があることが示されるため、この詳細の説明は、タウ免疫療法の開発およびタウ異常症の病因の理解にとって大きな意味合いを有する。

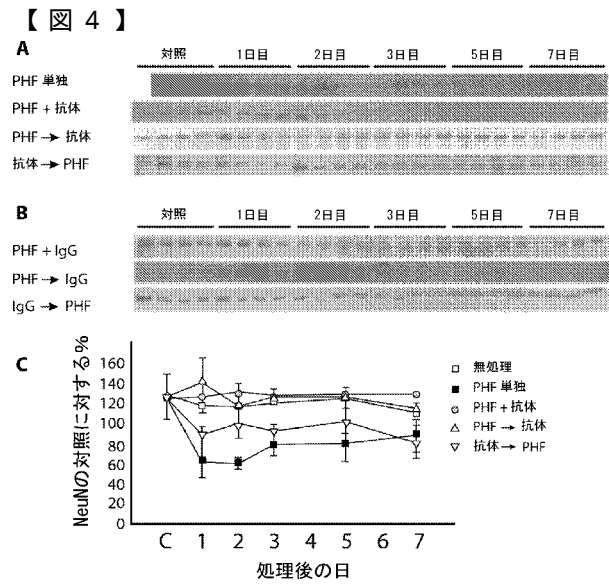
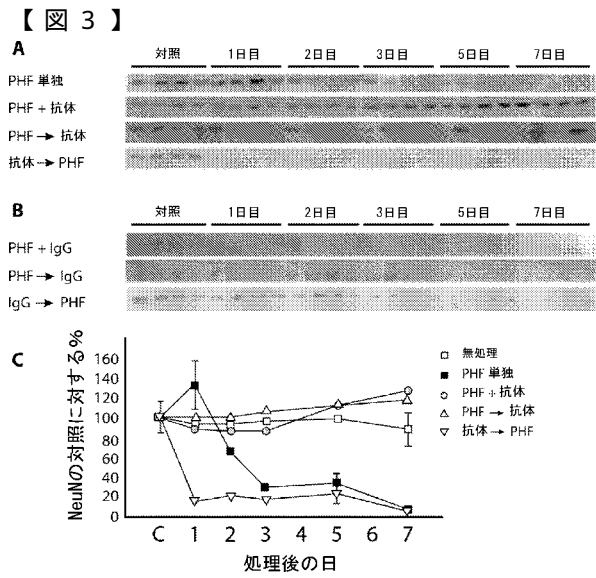
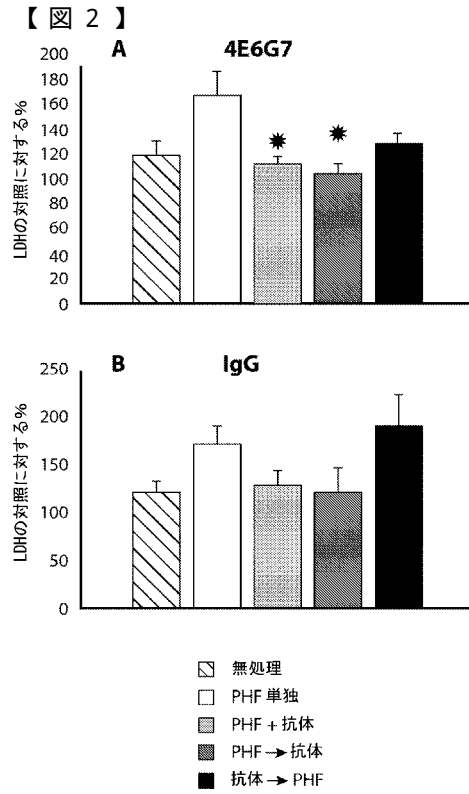
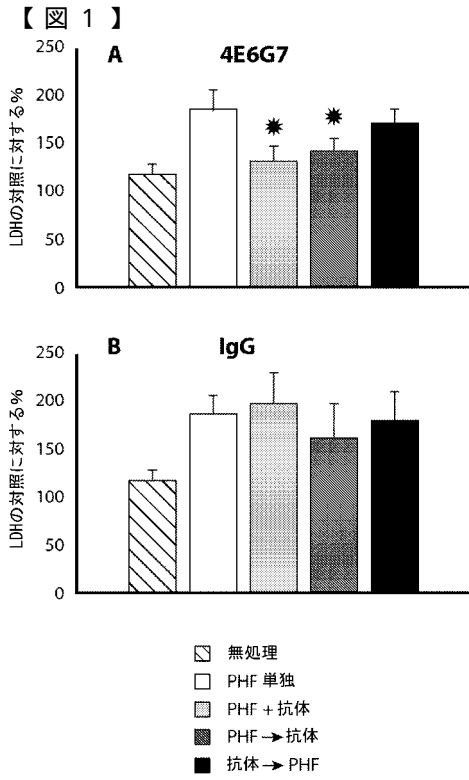
20

30

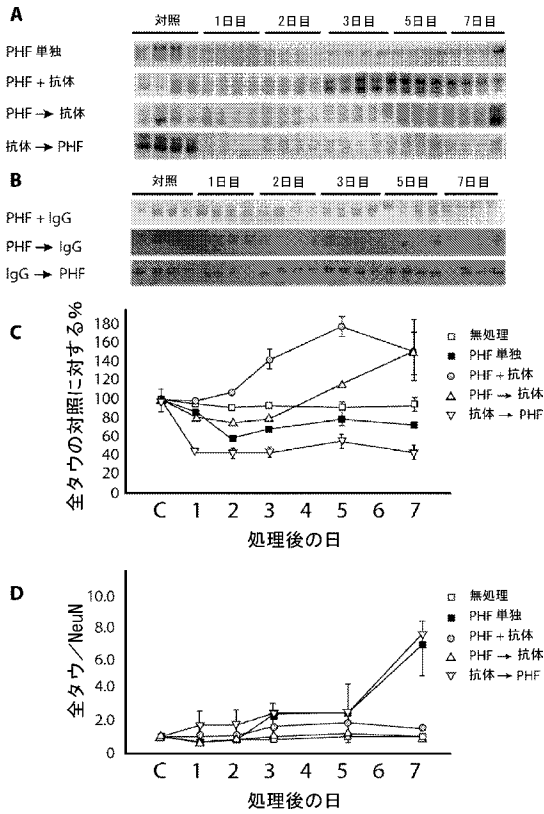
【0225】

本明細書において言及されたすべての刊行物および特許は、それぞれの個々の刊行物または特許出願が、その全体が参照により組み入れられることが特定的および個別に示されている場合と同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。本発明をその具体的な態様に関連して説明してきたが、さらなる変更が可能であり、本出願は一般に、本発明の原則に準じ、本発明が属する技術分野において既知または習慣的な実施の範囲内にあり、本明細書に以前に記載した本質的な特徴に適用でき、添付の請求の範囲内で追従される、本発明の開示からのそのような逸脱を含む、本発明の任意の変更、使用または適応を含む意図があることが理解されるであろう。

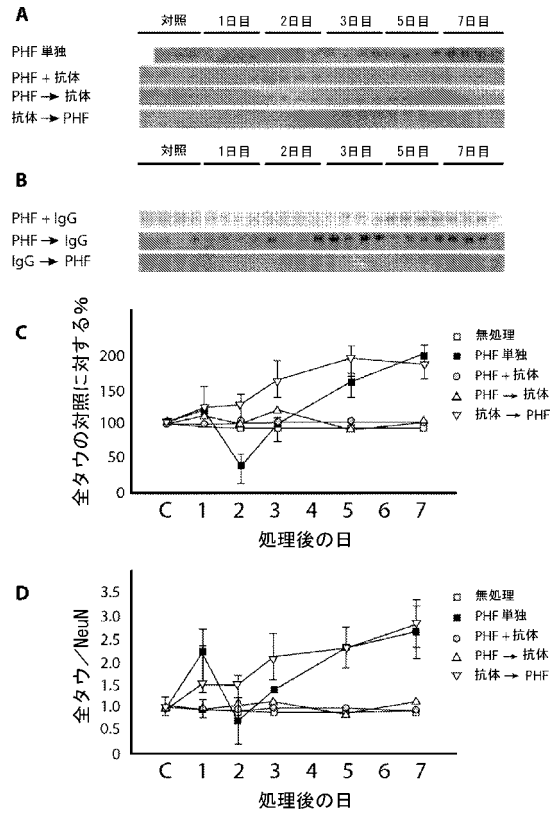
40



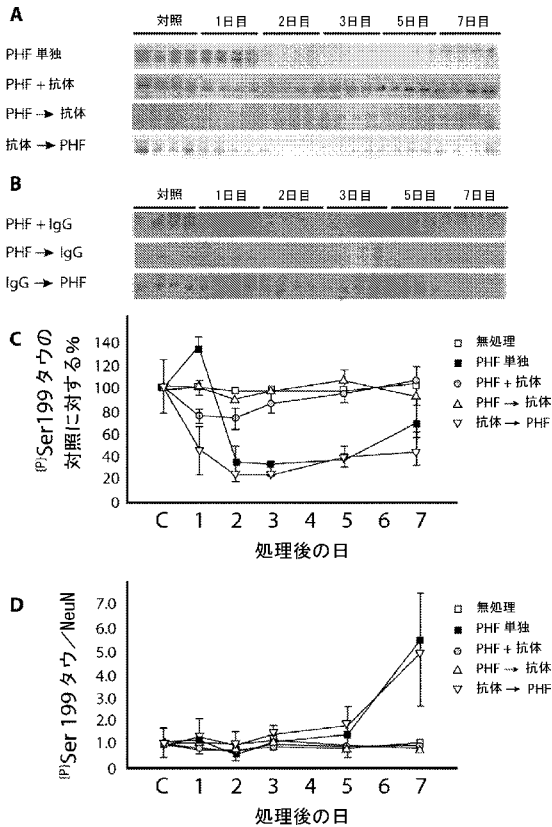
【 図 5 】



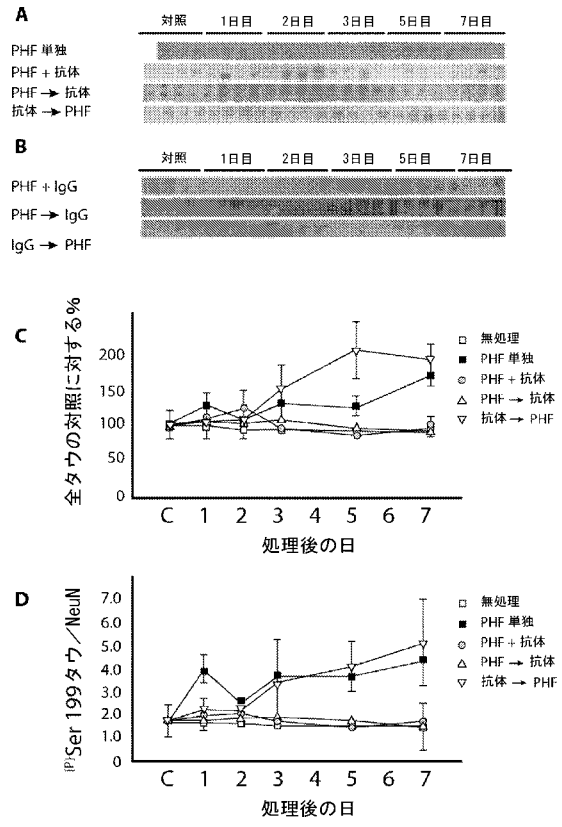
【 図 6 】



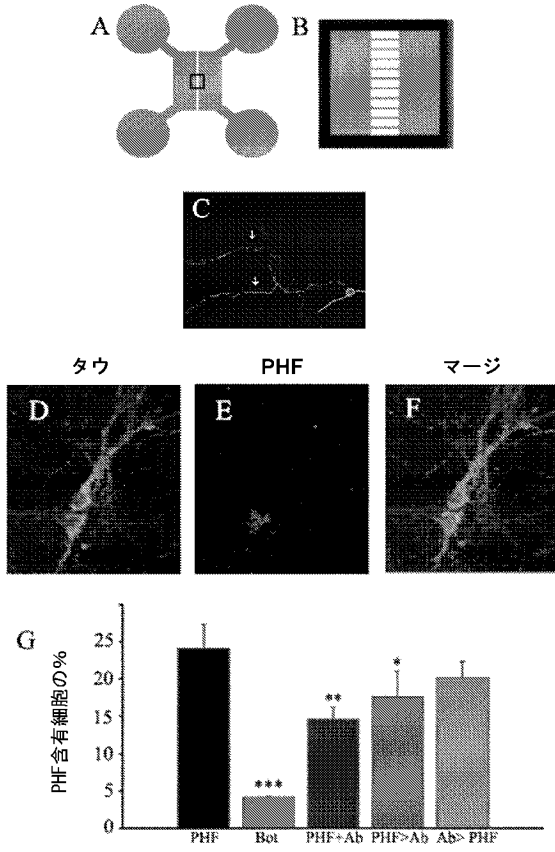
【 図 7 】



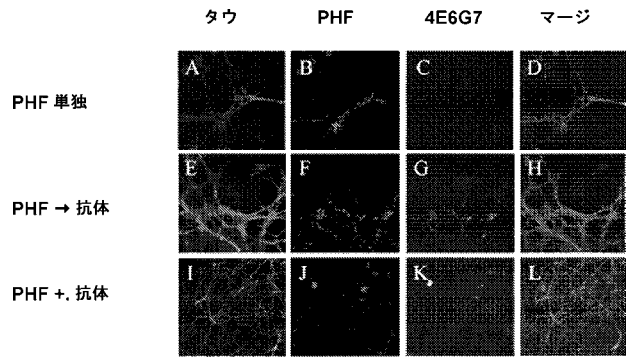
【 図 8 】



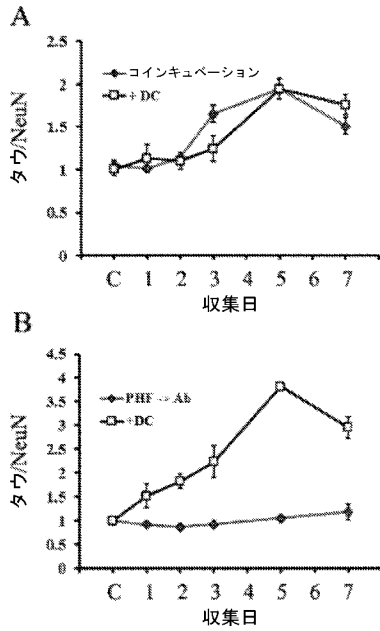
【 図 9 】



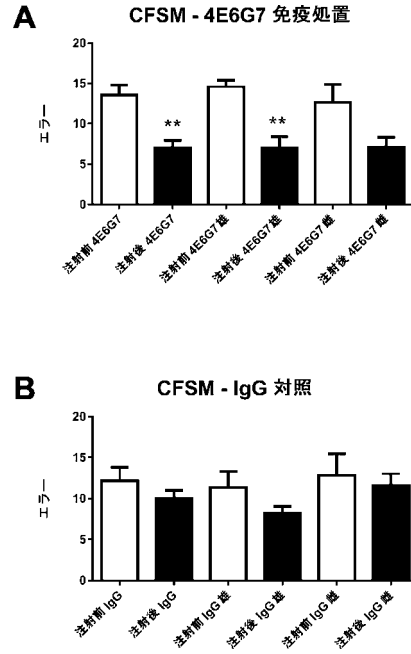
【 図 1 0 】



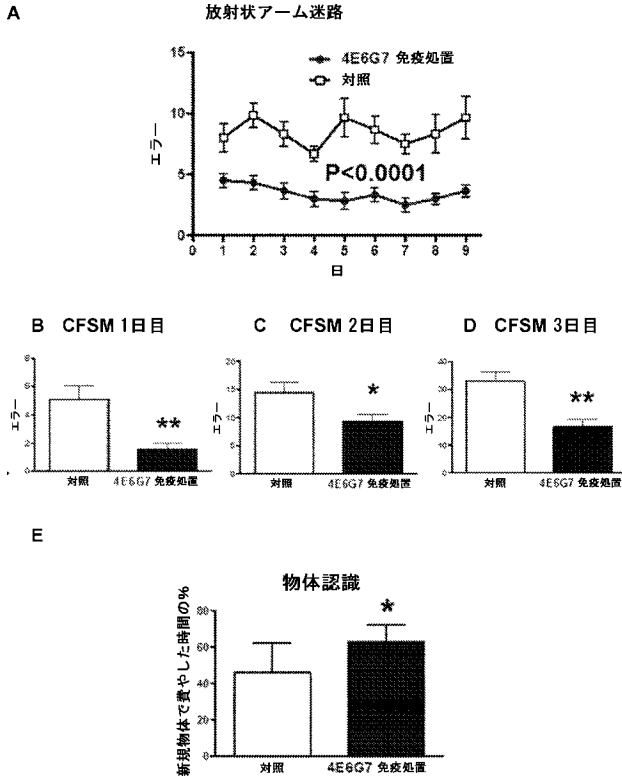
【 図 1 1 】



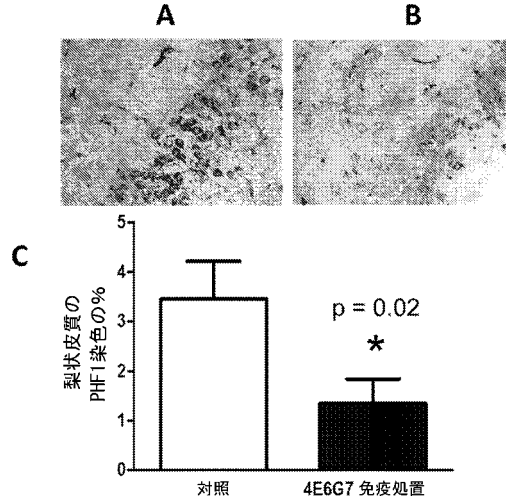
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

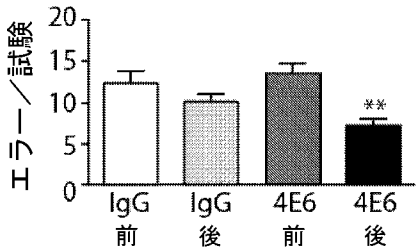


【 図 1 4 】

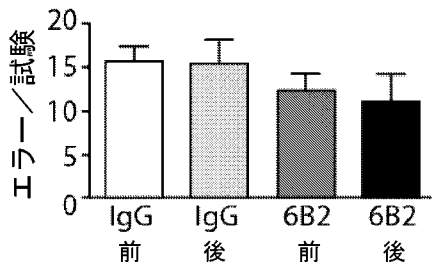


【 図 1 5 】

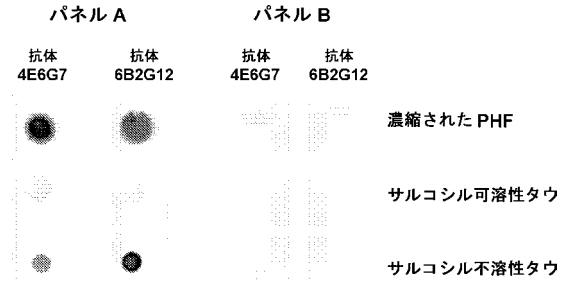
パネルA: 抗体4E6G7、CSF迷路、処置前対処置後



パネルB: 抗体6B2G12、CSF迷路、処置前対処置後

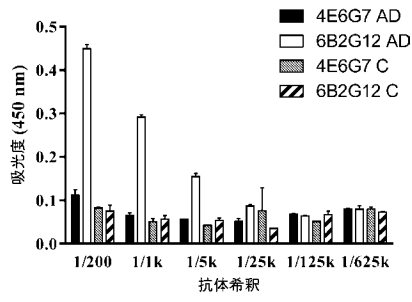


【 図 1 6 - 1 】



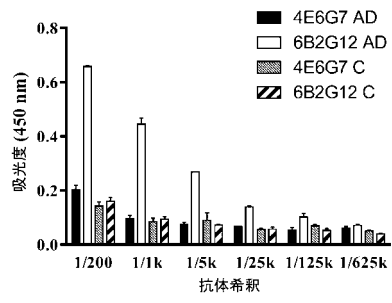
【 図 1 6 - 2 】

パネル C

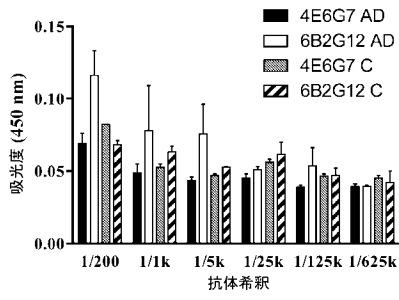


【 図 1 6 - 3 】

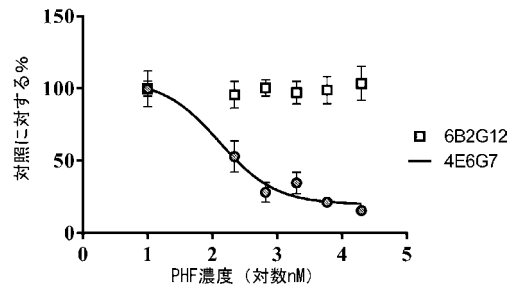
パネル E



パネル D



パネル F



【 配 列 表 】

2018535921000001.app

【 国際調査報告 】

PCT/US2016/046520 07.11.2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/46520

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

PCT/US2016/046520 07.11.2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/46520

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

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

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

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

3. Claims Nos.: 7-20
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT/US2016/046520 07.11.2016**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US 16/46520

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/18 (2016.01) CPC - A61K 39/0007, A61K 2039/505, A61K 39/3955, G01N 33/6896 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C07K 16/18 (2016.01) CPC: A61K 39/0007, A61K 2039/505, A61K 39/3955, G01N 33/6896 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 424/139.1, 424/141.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: antibody-based molecule, antibody, epitope Tau, Tau 386-408(P)Ser396(P)Ser404, phosphorylated Tau, PHF, paired helical filaments, Alzheimer brain filaments, humanized, epitope-binding fragment, phosphoserine, Tau aggregate, isolated CDR, single domain antibody fragment,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/0302046 A1 (NEW YORK UNIVERSITY) 09 October 2014 (09.10.2014) para [0011], [0050], [0062], [0068], [0096], [0097], [0104], [0134], [0141], [0142], Table 1, Figs. 13,14, SEQ ID NO: 13	1-6
A	Congdon et al. Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcγ Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance. J Biol Chem. (6 December 2013) vol 288, no 49, pp 35452-35465, pg 35453, col 1, para 4	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "g" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 October 2016		07 NOV 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	1 0 1
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		C 1 2 N	15/09	Z

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 シグルドソン エイナー

アメリカ合衆国 1 0 8 5 3 ニューヨーク州 スカーズデール ダウナー アベニュー 2 3

Fターム(参考) 4C085 AA13 BB11 EE01 HH03 HH07 HH11 HH20 KA03 LL13

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 EA50 FA72

专利名称(译)	基于抗体的分子选择性tau的{p} Ser 404表位，以及它们在tau病症的诊断和治疗中的用途		
公开(公告)号	JP2018535921A	公开(公告)日	2018-12-06
申请号	JP2018507002	申请日	2016-08-11
[标]申请(专利权)人(译)	纽约大学		
申请(专利权)人(译)	纽约大学		
发明人	シグルドソン エイナー		
IPC分类号	C07K16/18 A61K51/08 A61K39/395 A61P25/28 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/00 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C07K16/44 A61K9/0019 A61K49/0058 A61K2039/505 A61P25/28 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2317/32 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/70 C07K2317/76 G01N33/58 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821		
FI分类号	C07K16/18.ZNA A61K51/08.200 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/28 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/00.101 G01N33/53.D C12N15/09.Z		
F-TERM分类号	4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/EE01 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/HH20 4C085/KA03 4C085/LL13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/204711 2015-08-13 US		
其他公开文献	JP2018535921A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及基于抗体的分子(单结构域抗体片段, scFv分子, 抗体, 抗体片段, 双抗体及其表位, 其能够免疫特异性地和选择性地结合tau的{p} Ser 404表位。包括绑定域。这种基于抗体的分子特别可用于诊断和/或治疗阿尔茨海默病或其他tau病症, 以及检测生物样品中存在的病理性tau蛋白构象异构体。因此成为阿尔茨海默病和其他tau病理的诊断剂。基于本发明抗体的分子特别可用作阿尔茨海默病和相关tau病症的诊断标志物以及用于治疗这些病症的药物组合物。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2018-535921 (P2018-535921A) 平成30年12月6日(2018.12.6)
(5) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考) 4C085 4H045
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 ZNA	
A61K 51/08 (2006.01)	A61K 51/08 200	
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	
A61P 25/28 (2006.01)	A61K 39/395 N	
A61P 25/14 (2006.01)	A61P 25/28	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く		
(2) 出願番号	特願2018-507002 (P2018-507002)	(7) 出願人
(8) (22) 出願日	平成28年8月11日(2016.8.11)	ニューヨーク・ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成30年4月2日(2018.4.2)	アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニュー
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/046520	ヨーク ワシントン スタエア サウス
(87) 国際公開番号	W02017/027691	70
(87) 国際公開日	平成29年2月16日(2017.2.16)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	62/204,711	弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成27年8月13日(2015.8.13)	100102118
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 春名 雅夫
		100160923
		弁理士 山口 裕孝
		100119507
		弁理士 刑部 俊
		100142929
		弁理士 井上 隆一
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 タウの {p} Ser 404 エピトープに対し選択的な、抗体を基にした分子、ならびにタウ異常症の診断および治療におけるそれらの使用		