

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6300842号  
(P6300842)

(45) 発行日 平成30年3月28日 (2018. 3. 28)

(24) 登録日 平成30年3月9日 (2018. 3. 9)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/18 (2006. 01)

C O 7 K 16/18 Z N A

C O 7 K 16/46 (2006. 01)

C O 7 K 16/46

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C O 7 K 14/47 (2006. 01)

C O 7 K 14/47

C 1 2 Q 1/68 (2018. 01)

C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 21 外国語出願 (全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-16975 (P2016-16975)  
 (22) 出願日 平成28年2月1日 (2016. 2. 1)  
 (62) 分割の表示 特願2013-532287 (P2013-532287)  
                   の分割  
           原出願日 平成23年10月11日 (2011. 10. 11)  
 (65) 公開番号 特開2016-138102 (P2016-138102A)  
 (43) 公開日 平成28年8月4日 (2016. 8. 4)  
           審査請求日 平成28年2月1日 (2016. 2. 1)  
 (31) 優先権主張番号 61/391, 751  
 (32) 優先日 平成22年10月11日 (2010. 10. 11)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 10013494. 9  
 (32) 優先日 平成22年10月11日 (2010. 10. 11)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 513083820  
                   バイオジェン インターナショナル ニュ  
                   ーロサイエンス ゲーエムベアー  
                   スイス国 ツェーハー 6 3 0 0, ツー  
                   ク, ランディス+ギアーストラッセ 3  
 (73) 特許権者 504022504  
                   ユニバーシティ オブ チューリッヒ  
                   スイス国 チューリッヒ ツェーハー 8  
                   0 0 6, レイミストラッセ 7 1  
 (74) 代理人 100078282  
                   弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
                   弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
                   弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト抗タウ抗体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) それぞれ配列番号 2 3、2 4 および 2 5 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む重鎖可変領域、ならびにそれぞれ配列番号 2 6、2 7 および 2 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む軽鎖可変領域；  
 または

(b) それぞれ配列番号 3 5、3 6 および 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む重鎖可変領域、ならびにそれぞれ配列番号 3 8、3 9 および 4 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む軽鎖可変領域；  
 を含む、単離されたヒトモノクローナル抗タウ抗体またはそのタウ結合断片。

## 【請求項 2】

それぞれ配列番号 2 3、2 4 および 2 5 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む重鎖可変領域、ならびにそれぞれ配列番号 2 6、2 7 および 2 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗体またはそのタウ結合断片。

## 【請求項 3】

それぞれ配列番号 9 および 1 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗体またはそのタウ結合断片。

## 【請求項 4】

それぞれ配列番号 9 3 および 1 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領

域を含む、請求項 1 に記載の抗体またはそのタウ結合断片。

【請求項 5】

それぞれ配列番号 17 および 19 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗体またはそのタウ結合断片。

【請求項 6】

単鎖 Fv 断片 (scFv)、F(ab') 断片、F(ab) 断片および F(ab')<sub>2</sub> 断片からなる群より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのタウ結合断片。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのタウ結合断片をコードするポリヌクレオチド (複数可)。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のポリヌクレオチド (複数可) を含むベクター (複数可)。

【請求項 9】

請求項 7 に記載のポリヌクレオチド (複数可) または請求項 8 に記載のベクター (複数可) を含む宿主細胞。

【請求項 10】

抗タウ抗体またはそのタウ結合断片を調製するための方法であって、

(a) 請求項 9 に記載の宿主細胞を培養すること；および

(b) 前記培養物から前記抗体またはそのタウ結合断片を単離することを含む方法。

【請求項 11】

請求項 7 に記載のポリヌクレオチド (複数可) によってコードされる、または請求項 10 に記載の方法によって獲得可能である抗タウ抗体またはそのタウ結合断片。

【請求項 12】

(a) 酵素、放射性同位元素、フルオロフォアおよび重金属からなる群より選択される標識で検出可能であるように標識される；または

(b) 薬品に結合される

請求項 1 ~ 6 または 11 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのタウ結合断片。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 6、11 もしくは 12 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはそのタウ結合断片、請求項 7 に記載のポリヌクレオチド (複数可)、請求項 8 に記載のベクター (複数可) または請求項 9 に記載の宿主細胞を含む組成物であって、

(i) 薬剂的に許容可能な担体をさらに含む医薬組成物；または

(ii) 免疫ベースもしくは核酸ベースの診断方法で従来使用される 1 つ以上の試薬をさらに含む診断用組成物である組成物。

【請求項 14】

神経変性タウオパチーの処置に有用な神経保護薬剤をさらに含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

神経変性タウオパチーがアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 / パーキンソン症 - 認知症複合体、嗜銀性グレイン型認知症、英国型アミロイド血管症、脳アミロイド血管症、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクシング認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、ダウン症候群、前頭側頭型認知症、17 番染色体に連鎖しパーキンソン症を伴う前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハレルフォルデン・スパッツ病、封入体筋炎、多系統萎縮症、筋強直性ジストロフィー、C 型ニーマン・ピック病、神経原線維変化を伴う非グアム島人型運動ニューロン病、ピック病、脳炎後パーキンソン症、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変

10

20

30

40

50

化型認知症、多発梗塞性認知症および虚血性脳卒中からなる群より選択されるものであって、ヒト対象における前記神経変性タウオパチーの予防処置もしくは治療処置に使用される、請求項 1 ~ 6、1 1または1 2のいずれか 1 項に記載の抗タウ抗体またはそのタウ結合断片を含む組成物。

【請求項 1 6】

前記神経変性タウオパチーがアルツハイマー病である、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

神経変性タウオパチーがアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 / パーキンソン症 - 認知症複合体、嗜銀性グレイン型認知症、英国型アミロイド血管症、脳アミロイド血管症、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクシング認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、ダウン症候群、前頭側頭型認知症、17 番染色体に連鎖しパーキンソン症を伴う前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハレルフォルデン・スパッツ病、封入体筋炎、多系統萎縮症、筋強直性ジストロフィー、C 型ニーマン・ピック病、神経原線維変化を伴う非グアム島人型運動ニューロン病、ピック病、脳炎後パーキンソン症、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、多発梗塞性認知症および虚血性脳卒中からなる群より選択されるものであって、ヒト対象における前記神経変性タウオパチーの進行もしくはヒト対象における前記神経変性タウオパチーの治療に対する反応のモニタリングに使用される、請求項 1 ~ 6、1 1または1 2のいずれか 1 項に記載の抗タウ抗体またはそのタウ結合断片を含む組成物。

【請求項 1 8】

ヒト対象において神経変性タウオパチーの進行の指標として病理的修飾型タウまたは凝集型タウのレベルと参照標準との間の差異または類似性を使用する方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 6、1 1または1 2のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの抗体を用いて、診断される前記ヒト対象に由来する試料中の病理的修飾型タウまたは凝集型タウのレベルを評価すること；および

(b) 修飾型タウまたは凝集型タウのレベルを、1 つ以上の対照ヒト対象における病理的修飾型タウまたは凝集型タウのレベルを示す参照標準と比較すること

を含み、前記神経変性タウオパチーがアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 / パーキンソン症 - 認知症複合体、嗜銀性グレイン型認知症、英国型アミロイド血管症、脳アミロイド血管症、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクシング認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、ダウン症候群、前頭側頭型認知症、17 番染色体に連鎖しパーキンソン症を伴う前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハレルフォルデン・スパッツ病、封入体筋炎、多系統萎縮症、筋強直性ジストロフィー、C 型ニーマン・ピック病、神経原線維変化を伴う非グアム島人型運動ニューロン病、ピック病、脳炎後パーキンソン症、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、多発梗塞性認知症および虚血性脳卒中からなる群より選択される、方法。

【請求項 1 9】

ヒトまたは動物の身体でのタウのインビボ検出、または治療薬剤もしくは診断薬剤のタウへのターゲティングに使用するための請求項 1 ~ 6、1 1または1 2のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのタウ結合断片を含む組成物であって、前記インビボ検出が陽電子放出トモグラフィー (PET)、単一光子放出トモグラフィー (SPECT)、近赤外 (NIR) 光学イメージングまたは磁気共鳴イメージング (MRI) を含む、組成物。

【請求項 2 0】

ヒト対象における神経変性タウオパチーの指標として、対象由来の生物試料において、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体と結合するタウの存在を使用する方法であって、前記対象の前記生物試料において、前記抗体に結合するタウの存在を検出することを含む、方法。

## 【請求項 2 1】

神経変性タウオパチーの診断に有用なキットであって、請求項 1 ~ 6、1 1 または 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはそのタウ結合断片、請求項 7 に記載のポリヌクレオチド（複数可）、請求項 8 に記載のペクター（複数可）または請求項 9 に記載の宿主細胞を、試薬または取扱説明書と共に含むキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

## 本発明の分野

本発明は全般的に、病的リン酸化タウおよび凝集型のタウを含むタウタンパク質を認識する新規のタウ特異的結合分子、特に、ヒト抗体ならびにその断片、誘導体および異体に関連する。さらに、本発明は、血漿および脳脊髄液（CSF）中でタウおよび有毒性タウ種を同定するための診断用ツールとして、ならびに、アルツハイマー病（AD）、筋委縮性側索硬化症／パーキンソン認知症複合（ALS - PDC）、嗜銀性グレイン型認知症（AGD）、英国型アミロイド血管症、脳アミロイド血管症、大脳皮質基底核変性症（CBD）、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、ボクシング認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、ダウン症候群、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖しパーキンソン症を伴う前頭側頭型認知症（FTDP - 17）、前頭側頭葉変性症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハレルフォルデン・スパッツ病、封入体筋炎、多系統委縮症、筋強直性ジストロフィー、C型ニーマン・ピック病（NP - C）、神経原線維変化を伴う非グアム島人型運動ニューロン病、ピック病（PiD）、脳炎後パーキンソン症、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺（PSP）、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、多発梗塞性認知症および虚血性脳卒中などの神経変性タウオパチーの治療のための受動的ワクチン投与戦略においても、両方で有用な、そのような結合分子、抗体およびそれらの模倣物を含む医薬組成物および診断用組成物に関連する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

## 本発明の背景

タンパク質の蓄積、修飾および凝集は多数の神経変性疾患の病的態様である。高リン酸化タウコンフォーマーを含む、病的修飾型タウおよび凝集型タウはタウオパチーの不変の顕著な特徴であり、疾患の重症度と相関する。

## 【0 0 0 3】

タウは、主要な機能が微小管を安定させることである、中枢神経系で発現する微小管結合タンパク質である。主に成体期のヒトの脳で発現するタウには6つの主要なアイソフォームが存在するが、それらはオルタナティブスプライシングによって、1つの遺伝子から得られる。病的条件下で、タウタンパク質は高リン酸化され、その結果、チューブリンと結合しなくなり、微小管が不安定化し、病理性神経原線維濃縮体にタウが凝集および蓄積することになる。タウに関連する障害は神経変性タウオパチーと集合的に称されるが、それらは、数ある中でもアルツハイマー病（AD）、進行性核上性麻痺、ピック病、皮質基底核変性症、FTDP - 17を含むタンパク質ミスフォールディング性障害グループの一部である。タウ遺伝子の40よりも多い突然変異が遺伝性前頭側頭型認知症と関連があることが報告されており、このことは、タウ遺伝子の突然変異が神経変性を引き起こすのに充分であることを示している（非特許文献1）。遺伝子導入マウスと培養細胞での研究により、ADにおいて、アミロイドがタウの上流に位置する病的カスケードによってタウ病理が引き起こされる可能性があることが示されている（非特許文献2）。しかしながら、他の発見は、両方のカスケードが互いに独立して機能する二重経路モデルを指し示す（非特許文献3）。ADにおけるアミロイドを標的とする免疫療法が励みになるような結果を動物モデルでもたらしており、臨床試験での明るい見込みを示している。さらに最近の少数の対象の生検データは、進行したADを有する患者でのアミロイド斑の除去

は認知衰退を停止させるのに充分ではあり得ないことを示唆し、ADに対するその他の治療戦略の必要性を強調している（非特許文献4；非特許文献5）。形質導入動物モデルでのアミロイドベータの免疫療法の成功にならない、能動的免疫療法の構想がタウタンパク質にまで広がった。しかしながら、タウタンパク質を用いる野生型マウスの能動的ワクチン投与は、神経障害を伴う神経原線維濃縮体の形成、軸索の損傷および単核性の浸潤物を中枢神経系において誘導することが明らかになった（非特許文献6）。遺伝子導入マウス系列でのリン酸化タウペプチドによる能動的ワクチン投与を用いるその後の研究により、脳におけるタウ凝集物の脳内レベルの低下と行動障害の進行の遅滞が明らかになった（非特許文献7；非特許文献8）。これらの発見は、タウを標的とする能動的免疫療法に係る潜在的な利益を強調するが、途方もない危険性をも強調する。有効で安全な治療法を用いて病理的タウタンパク質を処理する新規の治療戦略が緊急に必要とされる。

10

進化的に最適化され、ヒトの免疫系によって親和性成熟を経た、健康なヒト対象に由来するヒト抗体を用いる受動免疫によって、極めて有効であり、安全である可能性が高い、見込みのある新しい治療手段が提供されるであろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】 Cairns et al., Am. J. Pathol. (2007) 171, 227-40

【非特許文献2】 Goetz et al., Science (2001) 293, 1491-1495

20

【非特許文献3】 van de Nes et al., Acta Neuropathol. (2006) 111, 126-138

【非特許文献4】 Holmes et al., Lancet (2008) 372, 216-223

【非特許文献5】 Boche et al., Acta Neuropathol. (2010) 120, 13-20

【非特許文献6】 Rosenmann et al., Arch Neurol. (2006) 63, 1459-1467

【非特許文献7】 Sigurdsson, J. Alzheimers Dis. (2008) 15, 157-168

30

【非特許文献8】 Boimel et al., Exp. Neurol. (2010) 224, 472-485

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、天然抗タウ特異的ヒトモノクローナル抗体の単離のために健康なヒト対象のタウ特異的免疫反応を活用する。特に、本発明に従って行われた実験は、神経変性タウオパチーの徴候を示さない健康なヒト対象のプールからモノクローナルタウ特異的抗体を単離することに成功した。

40

【0006】

したがって、本発明は、タウを特異的に認識することが可能であるヒト抗体、抗原結合断片および類似の抗原結合分子に向けられたものである。「タウを特異的に認識する」という表現によって、「タウ特異的抗体」および「抗タウ抗体」は天然型タウまたは凝集型タウアイソフォームまたは病理的修飾型タウアイソフォームに対する抗体を具体的に、全般的に、そして、集合的に意味する。全長型形態、病理的リン酸化形態および凝集型形態に選択的なヒト抗体が本明細書において提供される。

【0007】

本発明の特定の実施形態において、前記ヒト抗体またはその抗原結合断片は、図1に示されるようなV<sub>H</sub>可変領域および/またはV<sub>L</sub>可変領域を特徴とする抗体の免疫学的結合

50

特性を示す。

【0008】

前記抗体の抗原結合断片は単鎖F<sub>v</sub>断片、F(a b')断片、F(a b)断片およびF(a b')<sub>2</sub>断片、または他の任意の抗原結合断片であり得る。特定の実施形態において、以後、前記抗体またはその断片はヒトIgGアイソタイプ抗体である。あるいは、前記抗体はヒト・マウスキメラ抗体またはマウス化抗体であり、後者は動物での診断方法および診断的研究に特に有用である。

【0009】

また、本発明は、本発明の抗体もしくはその活性断片、またはアゴニストおよび同じ性質の分子、または代わりにそのアンタゴニストを含む組成物に関連し、そして、タウオパチーの予防、診断または治療にそのような組成物を使用する、有効量の前記組成物がそれを必要とする患者に投与される免疫療法的な方法および免疫診断的方法に関連する。

【0010】

当然、本発明は、それぞれ、以下に限定するように、明確でユニークな特徴を有する抗体を産生する不死化ヒトメモリーBリンパ球およびB細胞にまで範囲が広がる。

【0011】

本発明はまた、本発明の抗体の免疫グロブリン鎖の少なくとも可変領域をコードするポリヌクレオチドに関連する。1つの実施形態において、前記可変領域は、図1に示されるようなV<sub>H</sub>可変領域および/またはV<sub>L</sub>可変領域の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含む。

【0012】

したがって、本発明はまた、前記ポリヌクレオチドを含むベクターおよびそれを用いて形質転換された宿主細胞ならびにタウに特異的な抗体および同等の結合分子の生産のためのそれらの使用を包含する。抗体およびその模倣物の組換え技術による生産の手段と方法、ならびに、抗体であってもなくてもよい、競合的結合分子のスクリーニング方法は当技術分野において公知である。しかしながら、本明細書に記載されるように、特にヒトでの治療用途に関連して、ヒト抗体でなければ、キメラ抗体およびヒト化抗体にさえ観察される、そのような抗体に対して向けられる免疫反応が無いという意味で、本発明の抗体はヒト抗体である。

【0013】

また、試料中のタウを同定するために使用され得る組成物および方法が本明細書において開示される。例えば、ELISAベースの測定法または表面順応測定法(surface adapted assay)を用いることにより、試料中のタウの存在についてヒトの血液、脳脊髄液(CSF)および尿をスクリーニングするために、開示された抗タウ抗体を使用することができる。本明細書において開示される方法および組成物は、アルツハイマー病などの神経変性タウオパチーでの診断の役に立ち、そして、疾患の進行および治療の有効性をモニターするために使用され得る。

【0014】

それ故に、アルツハイマー病、筋委縮性側索硬化症/パーキンソン症-認知症複合体、嗜銀性グレイン型認知症、英国型アミロイド血管症、脳アミロイド血管症、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクシング認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、ダウン症候群、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖しパーキンソン症を伴う前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハレルフォルデン・スパッツ病、封入体筋炎、多系統委縮症、筋強直性ジストロフィー、C型ニーマン・ピック病、神経原線維変化を伴う非グアム島人型運動ニューロン病、ピック病、脳炎後パーキンソン症、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、多発梗塞性認知症および虚血性脳卒中などの神経変性タウオパチーの治療、診断または予防のための方法を提供することは、本発明に特有の目的である。前記方法は、前記対象に有効濃度の、タウを標的とする抗体であるヒト抗体または抗体誘導体を投与することを含

10

20

30

40

50

む。

【0015】

本発明のさらなる実施形態は、以下の説明と実施例から明らかになるであろう。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

ヒトモノクローナル抗タウ抗体またはそのタウ結合断片。

(項目2)

項目1に記載の抗体であって、

(i) 組換えヒトタウに結合可能である；

(ii) 病理的修飾型タウに結合可能である；

(iii) 脳内の神経原線維濃縮体(NFT)、糸屑状構造物および/またはジストロフィー性神経突起におけるプレタングルステージ(pre-tangle stage)の病理的凝集型タウに結合する；

(iv) 脳内で生理型タウに実質的に結合しない；

(v) 配列番号1～6によって表されるタウアイソフォームB～Fまたは胎児型タウのいずれか1つに特異的に結合する；

(vi) タウC末端に特異的に結合する；

(vii) タウN末端に特異的に結合する；

(viii) 生理的微小管結合タウではマスクされている微小管結合ドメインに局在するタウエピトープに特異的に結合する；

(ix) 脳内の神経原線維濃縮体(NFT)、糸屑状構造物および/またはジストロフィー性神経突起におけるプレタングルステージ(pre-tangle stage)の病理的凝集型タウに特異的に結合する；

(x) 配列番号7のアミノ酸配列を含むタウエピトープに特異的に結合する；

(xi) 配列番号41のアミノ酸配列を含むタウエピトープに特異的に結合する；

(xii) 配列番号7および41のアミノ酸配列を含むタウエピトープに特異的に結合する；または

(xiii) 配列番号42のアミノ酸配列を含むタウエピトープに特異的に結合する前記抗体。

(項目3)

(a) 配列番号23、29および35からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号24、30および36からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、ならびに配列番号25、31および37からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3；

(b) 配列番号26、32および38からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号27、33および39からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、ならびに配列番号28、34および40からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3；

(c) 配列番号9、13、17および93からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；または

(d) 配列番号11、15および19からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、項目1または2に記載の抗体またはそのタウ結合断片。

(項目4)

キメラマウス-ヒト抗体またはマウス化抗体である、項目1～3のいずれか1項に記載の抗体またはそのタウ結合断片。

(項目5)

項目1～4のいずれか1項に記載の抗体とタウに対する特異的結合について競合する抗体またはその抗原結合断片。

(項目6)

単鎖 Fv 断片 ( s c F v )、F ( a b ' ) 断片、F ( a b ) 断片および F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片からなる群より選択される、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのタウ結合断片。

( 項目 7 )

項目 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのタウ結合断片をコードするポリヌクレオチド。

( 項目 8 )

項目 7 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

( 項目 9 )

項目 7 に記載のポリヌクレオチドまたは項目 8 に記載のベクターを含む宿主細胞。

10

( 項目 10 )

抗タウ抗体またはそのタウ結合断片を調製するための方法であって、

( a ) 項目 9 に記載の細胞を培養すること ; および

( b ) 前記培養物から前記抗体またはそのタウ結合断片を単離することを含む前記方法。

( 項目 11 )

項目 7 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる、または項目 10 に記載の方法によって獲得可能である抗タウ抗体またはそのタウ結合断片。

( 項目 12 )

( a ) 酵素、放射性同位元素、フルオロフォアおよび重金属からなる群より選択される標識で検出可能であるように標識される ; または

20

( b ) 薬品に結合される

項目 1 ~ 6 または 11 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのタウ結合断片。

( 項目 13 )

項目 1 ~ 6、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのタウ結合断片、項目 7 に記載のポリヌクレオチド、項目 8 に記載のベクターまたは項目 9 に記載の宿主細胞を含む組成物であって、

( i ) 薬剂的に許容可能な担体をさらに含む医薬組成物 ; または

( i i ) 免疫ベースもしくは核酸ベースの診断方法で従来使用される 1 つ以上の試薬をさらに含む診断用組成物である前記組成物。

30

( 項目 14 )

神経変性タウオパチーの治療に有用な追加的な薬剤をさらに含む、項目 13 に記載の組成物。

( 項目 15 )

神経変性タウオパチーがアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 / パーキンソン症 - 認知症複合体、嗜銀性グレイン型認知症、英国型アミロイド血管症、脳アミロイド血管症、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクシング認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、ダウン症候群、前頭側頭型認知症、17 番染色体に連鎖しパーキンソン症を伴う前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハレルフォルデン・スパッツ病、封入体筋炎、多系統萎縮症、筋強直性ジストロフィー、C 型ニーマン・ピック病、神経原線維変化を伴う非グアム島人型運動ニューロン病、ピック病、脳炎後パーキンソン症、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、多発梗塞性認知症および虚血性脳卒中からなる群より選択されるものであって、

40

( i ) 対象における前記神経変性タウオパチーの予防処置もしくは治療処置、または

( i i ) 対象における前記神経変性タウオパチーの進行もしくは対象における神経変性タウオパチーの治療に対する反応のモニタリング

に使用される項目 1 ~ 6、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の抗タウ抗体またはその

50



タウ結合断片、項目 7 に記載のポリヌクレオチド、項目 8 に記載のベクターまたは項目 9 に記載の宿主細胞。

(項目 16)

対象において神経性タウオパチーの進行を診断またはモニターする方法であって、

(a) 項目 1 ~ 6、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの抗体を用いて、診断される前記対象に由来する試料中の病理的修飾型タウまたは凝集型タウのレベルを評価すること；および

(b) 修飾型タウまたは凝集型タウのレベルを、1 つ以上の対照対象における病理的修飾型タウまたは凝集型タウのレベルを示す参照標準と比較すること  
を含み、

病理的修飾型タウまたは凝集型タウのレベルと参照標準の間の差異または類似性が、前記対象が神経変性タウオパチーを持っていることを示し、前記神経変性タウオパチーがアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン症-認知症複合体、嗜銀性グレイン型認知症、英国型アミロイド血管症、脳アミロイド血管症、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクシング認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、ダウン症候群、前頭側頭型認知症、17 番染色体に連鎖しパーキンソン症を伴う前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハレルフォルデン・スパッツ病、封入体筋炎、多系統萎縮症、筋強直性ジストロフィー、C 型ニーマン・ピック病、神経原線維変化を伴う非グアム島人型運動ニューロン病、ピック病、脳炎後パーキンソン症、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、多発梗塞性認知症および虚血性脳卒中からなる群より選択される前記方法。

(項目 17)

ヒトまたは動物の身体でのタウのインビボ検出、または治療薬剤もしくは診断薬剤のタウへのターゲティングに使用するための項目 1 ~ 6、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのタウ結合断片であって、前記インビボ検出が陽電子放出トモグラフィー (PET)、単一光子放出トモグラフィー (SPECT)、近赤外 (NIR) 光学イメージングまたは磁気共鳴イメージング (MRI) を含む、前記抗体またはそのタウ結合断片。

(項目 18)

項目 1 ~ 6、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の抗体によって特異的に認識されるタウのエピトープを有するペプチドであって、配列番号 9、41、42 およびそれらの組合せからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む前記ペプチド。

(項目 19)

対象において神経変性タウオパチーを診断するための方法であって、前記対象の生物試料中に項目 18 に記載のペプチドに結合する抗体の存在を検出することを含む前記方法。

(項目 20)

神経変性タウオパチーの診断に有用なキットであって、項目 1 ~ 6、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはそのタウ結合断片、項目 7 に記載のポリヌクレオチド、項目 8 に記載のベクターまたは項目 9 に記載の宿主細胞または項目 18 に記載のペプチドを試薬または取扱説明書と共に含む前記キット。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図 1】ヒト抗体 NI - 105 - 4E4 (A)、NI - 105 - 24B2 (B) および NI - 105 - 4A3 (C) の可変領域、すなわち、重鎖およびラムダ軽鎖のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列。フレームワーク (FR) および相補性決定領域 (CDR) が、下線が引かれた CDR と共に示されている。クローニング戦略のため、重鎖の N 末端のアミノ酸配列および軽鎖は、FR1 にプライマーにより引き起こされた変異を潜在的に含む可能性があるが、しかしながら、それらは前記抗体の生物活性に実質的に影響を与えない。ヒトコンセンサス抗体を提供するために、オリジナルのクローンのヌクレオチド配列お

10

20

30

40

50

よびアミノ酸配列を、データベース内のヒト生殖系列の可変領域配列と整列させ、そしてそれに従って調整した。例えば、MRCタンパク質工学センター（ケンブリッジ、英国）が主催するVbase（<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>）を参照のこと。PCRプライマーのためコンセンサス生殖系列配列から潜在的に逸脱しているとみなされ、したがって、アミノ酸配列内で置換されたアミノ酸は太字で示されている。

【図2】ELISAプレートは、 $1\mu\text{g/mL}$ の濃度の組換えヒトタウ（hTau40アイソフォーム）を用いてコーティングされ、そして、提示された濃度のNI-105.4E4抗体と共にインキュベートされた。組換えヒト由来抗体NI-105.4E4は、 $2\text{nM}$ の $\text{EC}_{50}$ という高い親和性で組換えタウに結合する。

10

【図3】PHFTauおよび組換えhTau40をグラジエントSDS-PAGEによって分離し、次にウェスタンブロットで分析した。ブロットを一次抗体であるNI-105.4E4（ヒト）またはマウスモノクローナルTau12抗体とインキュベートし、次にHRP複合体化二次抗体とインキュベートした。組換えヒトタウ抗体NI-105.4E4は、ウェスタンブロット分析で組換えhTau40ならびにADの脳から抽出した病理的修飾型タウアイソフォーム（PHFTau）に結合する。

【図4A】NI-105.4E4結合エピトープのhTau40上でのマッピング。PeppSpot（JPT）テクノロジー：検出抗体のみ（B）と比較すると、二群の隣接するペプチドスポット（ペプチド83、84および85；ペプチド96および97）がNI105.4E4によって特異的に同定された（AおよびA'）。HRP複合体化ヤギ抗ヒトIgG検出抗体のみでは、1つのスポット（ペプチド50）上に強いシグナルがもたらされるが、ペプチド83、84、85、96および97は検出されない。

20

【図4A-1】同上。

【図4B】同上。

【図4C】アラニンスキャニング：（C）スポット番号35～50および番号51～68はオリジナルのペプチド（スポット番号35および番号51）とそれらの置換異型体（番号36～50および番号52～68）を含む。

【図4D】（DおよびE）オリジナルのペプチドおよび置換型ペプチドのアミノ酸配列（番号35～50および番号51～68）。アラニンスキャンは残基V339、E342、D387、E391およびK395がNI-105.4E4の結合に寄与することを示唆している。

30

【図4E】同上。

【図5】ヒト組換えNI-105.4E4抗体が、hTau40のアミノ酸333～346に対応するタウペプチドに特異的に結合することの確認。

【図6】NI-105.4E4はADの脳およびヒトTauP301Lを発現するマウスにおいて神経原線維濃縮体（NFT）、ジストロフィー性神経突起および糸屑状構造物に結合する。NI105.4E4染色はADの脳においてNFTおよび糸屑状構造物を同定し（A）、健康な対照対象の脳においてはタウへの有意な結合を示さない（B）。TauP301L遺伝子導入マウスでは（E～I）、NI-105.4E4はNFT（E、FおよびH）、糸屑状構造物（EおよびG）およびジストロフィー性神経突起（EおよびH）に似た病理的なタウに強く結合する。さらに、NI-105.4E4はまた、プレタングルステージ（pre-tangle stage）のタウ凝集体を同定する（I）。NI-105.4E4は、スウェーデン型および北極型突然変異を有するヒトAPPならびにTauP301Lを発現する遺伝子導入マウスでNFT、ジストロフィー性神経突起および糸屑状構造物に結合する。矢印は、NI-105.4E4によって認識されるジストロフィー性神経突起が取り囲むアミロイド斑を示す（J）。二次抗体だけではヒトAD（C）および健常対照（D）の両方でシグナルが得られない。

40

【図7】ELISAプレートは、 $3\mu\text{g/mL}$ の濃度の組換えヒトタウ（hTau40）を用いてコーティングされ、そして、提示された濃度のNI-105.24B2抗体と共にインキュベートされた。組換えヒト由来抗体NI-105.24B2は、 $6\text{nM}$ のEC

50

50 という高い親和性で h T a u 4 0 に結合する。

【図 8】 P H F T a u および組換え h T a u 4 0 をグラジエント S D S - P A G E によって分離し、次にウェスタンブロットで分析した。ブロットを一次抗体である N I - 1 0 5 . 2 4 B 2 ( ヒト ) と一晩インキュベートし、次に H R P 複合体化抗ヒト I g G とインキュベートした。組換えヒトタウ抗体 N I - 1 0 5 . 2 4 B 2 は、ウェスタンブロット分析で組換え h T a u 4 0 ならびに A D の脳から抽出した病理的修飾型タウアイソフォーム ( P H F T a u ) に結合する。

【図 9】組織アミロイド斑免疫反応性 ( T A P I R ) アッセイ。老齢の対象から単離された血清を A D の脳の組織学的切片に添加した。比較として、市販されている A T 1 0 0 抗リン酸化タウ抗体を用いる免疫組織学的染色を実行した。単離された血清にさらされると、神経原線維濃縮体が、A T 1 0 0 抗リン酸化タウ抗体を用いる対照染色で染色される。このことは、試験した血清中に神経原線維濃縮体に反応する抗体種が存在することを示している。

【図 1 0】組換えヒト抗体 N I - 1 0 5 . 4 A 3 は E L I S A によってヒトタウに特異的に結合する。ウシ血清アルブミン ( B S A ) に対して結合は観察されない。

【図 1 1】N I - 1 0 5 . 4 E 4 エピトープおよび N I - 1 0 5 . 4 A 3 エピトープおよび一般的に使用される市販されているマウスモノクローナルタウ抗体のエピトープが示される。ヒト抗体 N I - 1 0 5 . 4 E 4 は、2 つの直鎖状ポリペプチドを含むユニークなエピトープを標的とし、そのうちの 1 つは、生理的微小管結合タウではマスクされているタウの微小管結合ドメイン ( R 4 ) に局在する。T a u - 1 2 ( C o v a n c e 社、カリフォルニア州、米国 )、H T 7、A T 8、A T 1 8 0 ( T h e r m o S c i e n t i f i c 社、米国 )、P H F 1 ( L e w i s e t a l . , S c i e n c e 2 9 3 ( 2 0 0 1 ) , 1 4 8 7 - 1 4 9 1 ) 。

【図 1 2】E L I S A プレートは、組換えヒトタウ ( h T a u 4 0、1  $\mu$  g / m L )、P H F T a u ( 1 : 1 0 0 ) および対照調製物 ( 1 : 1 0 0 ) を用いてコーティングされ、そして、提示された濃度の N I - 1 0 5 . 4 A 3 と共にインキュベートされた。4 A 3 は、1 . 4 n M の E C 5 0 で r T a u 4 0 に結合し、1 . 2 n M の E C 5 0 で P H F T a u に結合する。

【図 1 3】N I - 1 0 5 . 4 A 3 結合エピトープの h T a u 4 0 上でのマッピング。( A ) 使用された 4 つの重複 h T a u 4 0 ドメインの模式図による表示 (ドメイン I (アミノ酸 1 ~ 1 5 8 )、ドメイン I I (アミノ酸 1 3 6 ~ 2 5 8 )、ドメイン I I I (アミノ酸 2 3 5 ~ 3 7 3 )、およびドメイン I V (アミノ酸 3 5 5 ~ 4 4 1 ) )。( B ) N I - 1 0 5 . 4 A 3 はタウドメイン I と全長型 h T a u 4 0 ポリペプチドにだけ結合する。( C ) ウェスタンブロットにより N I - 1 0 5 . 4 A 3 のタウドメイン I への特異的な結合が確認される。

【図 1 4】P e p S p o t ( J P T ) テクノロジーを用いる N I - 1 0 5 . 4 A 3 エピトープのマッピング ( A ) およびアラニンスキャニング ( B および C ) 。

【図 1 5】c h 4 E 4 と異型体の組換えタウへの結合 ( E L I S A ) 。

【図 1 6】3 0 m g / k g の 4 E 4 ヒト抗タウ抗体または 4 A 3 ヒト抗タウ抗体の腹腔内投与後のマウス血漿におけるヒト I g G のレベル。

【図 1 7】3 0 m g / k g の 4 E 4 ヒト抗タウ抗体または 4 A 3 ヒト抗タウ抗体の腹腔内投与後のマウスの脳ホモジネートにおけるヒト I g G のレベル。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 7 】

本発明の詳細な説明

I . 定義

神経変性タウオパチーは、ニューロンおよび / またはグリア細胞において主に病的に高リン酸化されたタウより構成される異常な線維の細胞内凝集体からなる共通した病的傷害を共有する多様な集団の神経変性障害である。タウオパチーの臨床的特色は不均一であり、認知症および / または運動性症候群を特徴とする。線維性タウ封入体の累進的な蓄

10

20

30

40

50

積は、例えば、アルツハイマー病における アミロイドのような他の沈着物と組み合わせ、または、家族型前頭側頭型認知症および 17 番染色体連鎖パーキンソン症 (FTDP-17) に関係するタウ遺伝子内の突然変異によって示されるような唯一の病原性実体として、ニューロンとグリア細胞の変性の原因となる可能性がある。それらの臨床症状が不均一であるため、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 / パーキンソン症 - 認知症複合体、嗜銀性グレイン型認知症、英国型アミロイド血管症、脳アミロイド血管症、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクシング認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、ダウン症候群、前頭側頭型認知症、17 番染色体に連鎖しパーキンソン症を伴う前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハレルフォルデン・スパッツ病、封入体筋炎、多系統萎縮症、筋強直性ジストロフィー、C 型ニーマン・ピック病、神経原線維変化を伴う非グアム島人型運動ニューロン病、ピック病、脳炎後パーキンソン症、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、多発梗塞性認知症および虚血性脳卒中を含むタウオパチー疾患の潜在的に非排他的なリストが提供され得る。レビューとして、例えば、その表 1 がタウオパチーの特有のメンバーをカタログ化する Lee et al., Annu. Rev. Neurosci. 24 (2001), 1121-1159、または、Sergeant et al., Biochim. Biophys. Acta 1739 (2005), 179-97 をその中の図 2 内のリストと共に参照のこと。

10

【0018】

20

本明細書において、用語「タウ」は、天然単量体型のタウを特異的に指すために互換的に使用される。用語「タウ」はまた、他のコンフォーマーのタウ、例えば、タウオリゴマーまたはタウ凝集体を全般的に特定するために使用される。用語「タウ」はまた、全ての種類と形態のタウを集合的に指すために使用される。オルタナティブスプライシングによって、ヒトの脳の中には 6 つのタウアイソフォームが存在する。これらのアイソフォームのタンパク質配列は以下のとおりである。

## 【化 1】

## 352アミノ酸の胎児型タウアイソフォーム

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA  
AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPA  
PKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSA  
KSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKP  
GGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYK  
SPVVSGDTS PRHLSNV SSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL (配列番号1)

10

## 381アミノ酸のTau-Bアイソフォーム

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG  
SETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKI  
ATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSR  
PSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGG  
KVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGG  
GNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNV SSTGSIDMV DSPQLATLA  
DEV SASLAKQGL (配列番号2)

20

## 410アミノ酸のTau-Cアイソフォーム

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG  
SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEAGIGDTPSLEDEAAGHV  
TQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPP  
SSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQ  
TAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQV  
EVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS  
GDTSPRHLSNV SSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL (配列番号3)

30

## 【化2】

## 383アミノ酸のTau-Dアイソフォーム

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA  
 AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPA  
 PKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSA  
 KSRLQTAPVMPD LKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDSL NVQSKCGSKDNIKHVP  
 GGGSVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEK LDFKDRVQSKIGSLDNITHV  
 PGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNV SSTGSIDMV DSPQL  
 ATLADEV SASLAKQGL (配列番号4)

10

## 412アミノ酸のTau-Eアイソフォーム

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG  
 SETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKI  
 ATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSR  
 TPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPD LKNVSKIGSTENLKHQPGGG  
 KVVQIINKKLDSL NVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQ  
 VEVKSEK LDFKDRVQSKIGSLDNITHV PGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPV  
 VSGDTSPRHLSNV SSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL (配列番号5)

20

## 441アミノ酸のTau-Fアイソフォーム

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG  
 SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEAGIGDTPSLEDEAAGHV  
 TQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPP  
 SSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQ  
 TAPVMPD LKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDSL NVQSKCGSKDNIKHVPGGGSV  
 QIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEK LDFKDRVQSKIGSLDNITHV PGGGN  
 KKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNV SSTGSIDMV DSPQLATLADE  
 VSASLAKQGL (配列番号6)

30

## 【0019】

「野生型」タウアミノ酸配列は、「hTau40」、「TauF」、「Tau-4」または「全長型タウ」としてもさらに参照される441アミノ酸のTau-Fアイソフォーム（配列番号6）によって表される。タウのアミノ酸配列を文献と適切なデータベースから引き出すことができる。Goedert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 4051-4055、Goedert et al., EMBO J. 8 (1989), 393-399、Goedert et al., EMBO J. 9 (1990), 4225-4230および GenBank UniProtKB/swissprot: locus TAU\_HUMAN, アクセス番号 P10636-2 (胎児型タウ) および P10636-4 ~ -8 (Bアイソフォーム ~ Fアイソフォーム) を参照のこと。

40

50

## 【0020】

タウタンパク質の別の顕著な特色はリン酸化であり、それは、79か所の潜在的なセリン(Ser)リン酸化部位とトレオニン(Thr)リン酸化部位のうちの約30か所で起こる。タウは脳の発生の間に高リン酸化される。成体期ではリン酸化の程度は減少する。リン酸化部位のいくつかはタウの微小管結合ドメイン内に局在し、そして、タウのリン酸化の増加が微小管の結合を負に調節することが示されている。例えば、セリン262およびセリン396は微小管結合モチーフ内に、または、それに隣接して位置するが、AD患者の脳中の神経原線維濃縮体(NFT)の主要な構成成分である異常対らせん状細線維(PHF)のタウタンパク質では、それらは高リン酸化される。PHFは、異常なほど高リン酸化されているタウタンパク質の線維状凝集体であり、そして、特異的な抗タウ抗体で染色し、光学顕微鏡法で検出することができる。いわゆる直鎖状タウ線維について同じことが当てはまる。PHFは、約80nmの周期性で互いに巻きつく2つの線維からなるねじれたリボンを形成する。これらの病理的特色は「タウ病理」、「タウオパソロジー」または「タウ関連病理」と一般的に称される。タウオパチーの神経病理的特色のさらに詳細な説明については、Lee et al., Annu. Rev. Neurosci. 24 (2001), 1121-1159および Goetz, Brain. Res. Rev. 35 (2001), 266-286を参照のこと。その開示の内容が参照により本明細書に組み込まれる。生理的なタウタンパク質はニューロンにおいて微小管を安定化する。病理的なリン酸化により、タウの異常な局在と凝集が起こり、それが微小管の不安定化と細胞輸送の障害を引き起こす。凝集したタウはインビトロでは神経毒性を有する (Khlistunova et al., J. Biol. Chem. 281 (2006), 1205-1214)。しかしながら、ニューロンを死に至らしめる機序を実行する、的確な神経毒性を有する種類は不明確なままである。アルツハイマー病(AD)、前頭側頭型認知症、核上性麻痺、ピック病、嗜銀性グレイン型疾患(AGD)、大脳皮質基底核変性症、FTDP-17、パーキンソン病、ボクシング認知症などの多くのタウオパチーでの神経原線維濃縮体(NFT)の主要な構成成分としてタウ凝集体を観察することができる (Gendron and Petrucelli, Mol. Neurodegener. 4:13 (2009)に概説されている)。これらの観察の他にも、タウが介在するニューロンの死が、濃縮体形成が無い状態であっても起こり得るという証拠が明らかになっている。可溶性リン酸化タウ種は脳脊髄液(CSF)に存在する (Aluise et al., Biochim. Biophys. Acta. 1782 (2008), 549-558)。タウ凝集体は細胞の外から内に誤って折りたたまれた状態を伝達し、そして、共培養されている細胞の間でその状態を伝達することができる (Frost et al., J. Biol. Chem. 284 (2009), 12845-12852)。

## 【0021】

神経変性タウオパチーへの関与に加えて、虚血/再灌流の間および後に観察されるタウリン酸化の変化は、虚血性脳卒中などの神経血管性障害の神経損傷と臨床病態生理においてタウが果たす重要な役割を示唆する (Zheng et al., J. Cell. Biochem. 109 (2010), 26-29)。

## 【0022】

本明細書において開示されるヒト抗タウ抗体はタウおよびそのエピトープならびに様々な立体構造のタウおよびそのエピトープに特異的に結合する。例えば、タウ、その全長のタウ、病理的修飾型タウアイソフォームおよびタウ凝集体に特異的に結合する抗体が本明細書において開示される。本明細書において使用される場合、タウに「特異的に結合する」、「選択的に結合する」または「優先的に結合する」抗体への言及は、他の無関連のタンパク質には結合しない抗体に当てはまる。1つの例では、本明細書において開示されるタウ抗体はタウまたはそのエピトープに結合することが可能であり、そして、他のタンパク質にはバックグラウンドの約1.5倍を超える結合を示さない。タウコンフォーマーに「特異的に結合する」または「選択的に結合する」抗体は、あらゆる立体構造のタウに結合

する訳ではない、すなわち、少なくとも1つの他のタウコンフォーマーに結合しない抗体を意味する。例えば、AD組織内の凝集型タウに優先的に結合することができる抗体が本明細書において開示される。本発明のヒト抗タウ抗体は、タウ特異的免疫反応を示す健康なヒト対象のプールから単離されているので、それらの抗体が前記対象によって実際に発現されたのであって、例えば、ヒト様抗体を提供しようとするための一般的な1つの方法を今まで代表した、ヒト免疫グロブリンを発現するファージライブラリーから単離したのではないということを強調するために、本発明のタウ抗体を「ヒト自己抗体」と呼ぶこともまた可能である。

#### 【0023】

用語「単数(a)」または「単数(an)」の実体は1つ以上のその実態に当てはまることに留意するものとする。例えば、「単数の(an)抗体」は1つ以上の抗体を表すと理解される。したがって、用語「単数(a)」(または「単数(an)」)、「1つ以上」および「少なくとも1つ」は本明細書において互換的に使用され得る。

#### 【0024】

本明細書において使用される場合、用語「ポリペプチド」は単数の「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を包含することが意図されており、そして、用語「ポリペプチド」は(ペプチド結合としても知られる)アミド結合により直鎖状に連結したモノマー(アミノ酸)から構成される分子を意味する。用語「ポリペプチド」は2個以上のアミノ酸からなる任意の単数の鎖または複数の鎖を意味し、そして、特定の長さの前記産物を意味しない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」または2個以上のアミノ酸からなる単数の鎖または複数の鎖を意味するために使用される他のどのような用語も「ポリペプチド」の定義内に含まれ、そして、これらの用語のいずれかの代わりに、または、それと互換的に用語「ポリペプチド」を使用することができる。

#### 【0025】

用語「ポリペプチド」はまた、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解による切断、または非天然アミノ酸による修飾を含むが、これらに限定されないポリペプチドの発現後修飾産物を意味することが意図されている。ポリペプチドは天然の生物源から得られる、または、組換え技術によって作製され得るが、必ずしも所定の核酸配列から翻訳される訳ではない。それは、化学合成を含む任意の方法で生成され得る。

#### 【0026】

本発明のポリペプチドは、サイズが約3以上、5以上、10以上、20以上、25以上、50以上、75以上、100以上、200以上、500以上、1,000以上または2,000以上のアミノ酸であり得る。ポリペプチドは一定の三次元構造を有する可能性があるが、しかし、それらは必ずしもそのような構造を有する訳ではない。一定の三次元構造を有するポリペプチドは折りたたまれたポリペプチドと呼ばれ、そして、一定の三次元構造を持たないどころか、非常に多数の異なる立体構造を採用することができるポリペプチドは折りたたまれていないポリペプチドと呼ばれる。本明細書において使用される場合、糖タンパク質という用語は、アミノ酸残基、例えば、セリン残基またはアスパラギン残基の酸素含有側鎖または窒素含有側鎖を介してタンパク質に結合する少なくとも1つの炭水化物部分に結合したタンパク質を意味する。

#### 【0027】

「単離された」ポリペプチドまたはその断片、異型体もしくは誘導体という表現によって、その自然環境の状態ではないポリペプチドが意図される。特定の精製レベルは必要とされない。例えば、単離されたポリペプチドはその天然または自然の環境から取り出され得る。宿主細胞で発現する組換え技術により作製されたポリペプチドおよびタンパク質は、任意の適切な技術により分離され、分画され、または部分的もしくは実質的に精製された天然ポリペプチドまたは組換えポリペプチドがそうであるように、本発明の目的のために単離されたとみなされる。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 2 8 】

本発明のポリペプチドとして、前述のポリペプチドの断片、誘導体、類似体または異型体およびそれらの任意の組合せもまた含まれる。用語「断片」、「異型体」、「誘導体」および「類似体」には、本発明の抗体または抗体ポリペプチドに言及するとき、対応する天然結合分子、抗体またはポリペプチドの抗原結合特性の少なくともいくつかを保持する任意のポリペプチドが含まれる。本発明のポリペプチド断片は、本明細書の他の箇所では考察される具体的な抗体断片に加えて、タンパク質分解断片ならびに欠失断片を含む。本発明の抗体および抗体ポリペプチドの異型体は上述したような断片、およびまたアミノ酸置換、欠失または挿入によりアミノ酸配列が変化したポリペプチドも含む。異型体は天然に生じる、または、非天然的に生じることができる。非天然的に生じた異型体は当技術分野で公知の突然変異形成技術を用いて作製され得る。異型体ポリペプチドは保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換、欠失または付加を含むことができる。タウ特異的結合分子、例えば、本発明の抗体および抗体ポリペプチドの誘導体は、天然型ポリペプチドでは見られない追加的な特色を示すように改変されたポリペプチドである。例には融合タンパク質が含まれる。異型体ポリペプチドはまた本明細書において「ポリペプチド類似体」とも称され得る。本明細書において使用される場合、結合分子もしくはその断片、抗体または抗体ポリペプチドの「誘導体」は、側鎖官能基の反応により化学的に誘導体化した1つ以上の残基を有する対象ポリペプチドを意味する。「誘導体」として、1つ以上の20種の標準的アミノ酸の天然に生じたアミノ酸誘導体を含むポリペプチドもまた含まれる。例えば、4 - ヒドロキシプロリンをプロリンの代わりに置換することができ、5 - ヒドロキシリシンをリシンの代わりに置換することができ、3 - メチルヒスチジンをヒスチジンの代わりに置換することができ、ホモセリンをセリンの代わりに置換することができ、そしてオルニチンをリシンの代わりに置換することができる。

10

20

## 【 0 0 2 9 】

用語「ポリヌクレオチド」は単数の核酸ならびに複数の核酸を包含することが意図され、そして、単離された核酸分子またはコンストラクト、例えば、メッセンジャーRNA (mRNA) またはプラスミドDNA (pDNA) を意味する。ポリヌクレオチドは通常ホスフォジエステル結合または非通常型結合 (例えば、ペプチド核酸 (PNA) に見られるようなアミド結合) を含むことができる。用語「核酸」は、ポリヌクレオチドに存在する任意の1つ以上の核酸断片、例えば、DNA断片またはRNA断片を意味する。「単離された」核酸またはポリヌクレオチドという表現によって、その天然環境から取り出された核酸分子、DNAまたはRNAが意図される。例えば、ベクターに含まれる抗体をコードする組換えポリヌクレオチドは、本発明の目的のために、単離されたものとみなされる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例には、異種の宿主細胞で維持される組換えポリヌクレオチドまたは溶液中に (部分的または実質的に) 精製されたポリヌクレオチドが含まれる。単離されたRNA分子には、本発明のポリヌクレオチドのインビボRNA転写物またはインビトロRNA転写物が含まれる。本発明に従って単離されたポリヌクレオチドまたは核酸は、合成により作製されたそのような分子をさらに含む。さらに、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位または転写ターミネーターなどの調節エレメントであり得る、またはそれらのような調節エレメントを含むことができる。

30

40

## 【 0 0 3 0 】

本明細書において使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の部分である。「停止コドン」(TAG、TGAまたはTAA) はアミノ酸に翻訳されないが、それはコード領域の一部とみなされ得る。しかし、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロンなどの任意の隣接配列はコード領域の一部ではない。本発明の2つ以上のコード領域が単一のポリヌクレオチドコンストラクト内に、例えば、単一のベクターに、または別々のポリヌクレオチドコンストラクト内に、例えば、別々の (異なる) ベクターに存在することができる。また、どんなベクターも1つのコード領域を含有することができ、または、2つ以上のコード領域を含むことができ、例えば、単一のベクターが免疫グロブリン重鎖可変領域と免疫グロブリン軽鎖

50

可変領域を別々にコードすることができる。さらに、本発明のベクター、ポリヌクレオチドまたは核酸は、結合分子、抗体またはそれらの断片、異型体もしくは誘導体をコードする核酸に融合した、または、融合していない異種のコード領域をコードすることができる。異種のコード領域は分泌シグナルペプチドまたは異種機能性ドメインなどの特別なエレメントまたはモチーフを含むが、これらに限定されない。

#### 【0031】

ある実施形態において、前記ポリヌクレオチドまたは核酸はDNAである。DNAの場合では、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは通常、1つ以上のコード領域と機能するように結合したプロモーターおよび/または他の転写制御エレメントもしくは翻訳制御エレメントを含むことができる。遺伝子産物、例えば、ポリペプチドのコード領域が1つ以上の調節配列と、前記遺伝子産物の発現を前記調節配列の影響下または制御下に置くような方法で結合しているときに機能的な結合である。プロモーター機能の誘導が所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写という結果になる場合、および、2つのDNA断片の間の結合の性質が前記遺伝子産物の発現を制御する発現調節配列の能力を妨害しない、または、前記鋳型DNAが転写される能力を妨害しない場合、(ポリペプチドコード領域およびそれと結合するプロモーターなどの)その2つのDNA断片は「機能するように結合している」または「機能するように連結している」。したがって、プロモーターがポリペプチドをコードする核酸の転写をもたらすことが可能であるなら、前記プロモーター領域はその核酸と機能するように結合しているであろう。プロモーターは、予定された細胞でのみDNAの実質的な転写を制御する細胞特異的プロモーターであり得る。プロモーターの他には、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサーおよび転写終結シグナルなどの他の転写制御エレメントが、細胞特異的転写を制御するために前記ポリヌクレオチドと機能するように結合することができる。適切なプロモーターおよび他の転写制御領域は本明細書において開示される。

#### 【0032】

様々な転写制御領域が当業者に知られている。これらには、サイトメガロウイルス(イントロン-Aを含む最初期プロモーター)、シミアンウイルス40(初期プロモーター)および(ラウス肉腫ウイルスなどの)レトロウイルスに由来するプロモーター断片およびエンハンサー断片などの、しかし、これらに限定されない脊椎動物細胞で機能する転写制御領域が含まれるが、これらに限定されない。他の転写制御領域には、アクチン、ヒートショックプロテイン、ウシ成長ホルモンおよびウサギ グロビンなどの脊椎動物の遺伝子に由来するもの、ならびに真核細胞での遺伝子発現を制御することができる他の配列が含まれる。その他の適切な転写制御領域には組織特異的プロモーターおよびエンハンサー、ならびにリンホカイン誘導性プロモーター(例えば、インターフェロンまたはインターロイキンによって誘導可能なプロモーター)が含まれる。

#### 【0033】

同様に、様々な翻訳制御エレメントが当業者に知られている。これらにはリボソーム結合部位、翻訳開始コドンおよび翻訳停止コドン、およびピコルナウイルスに由来するエレメント(特に、CITE配列とも称される、配列内リボソーム侵入部位、すなわち、IRES)が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0034】

他の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドはRNA、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)の形態のRNAである。

#### 【0035】

本発明のポリヌクレオチドコード領域および核酸コード領域は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を制御する分泌ペプチドまたはシグナルペプチドをコードする追加的なコード領域と結合することができる。シグナル仮説によれば、哺乳類細胞によって分泌されたタンパク質は、一旦、成長しつつあるタンパク質鎖の粗面小胞体からの搬出が始まると、成熟型タンパク質から切り出されるシグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有する。当業者は、哺乳類細胞によって分泌されたポリペプチド

は前記タンパク質のN末端に融合したシグナルペプチドを一般的に有し、それは前記の完全体のポリペプチドまたは「全長」のポリペプチドから切り出されて、分泌型または「成熟」型の前記ポリペプチドを産生するということを理解している。ある実施形態において、天然のシグナルペプチド、例えば、免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖のシグナルペプチド、または、その配列の機能性誘導体であって、それと機能するように結合しているポリペプチドの分泌を制御する能力を保持している機能性誘導体を使用される。あるいは、異種性の哺乳類シグナルペプチドまたはその機能性誘導体を使用することができる。例えば、野生型リーダー配列をヒト組織プラスミノーゲン活性化因子(TPA)またはマウス-グルクロニダーゼのリーダー配列で置換することができる。

【0036】

10

別途、明言されない限り、用語「障害」および「疾患」は本明細書において互換的に使用される。

【0037】

本発明の文脈で使用される場合、「結合分子」は主に、抗体およびその断片に関連するが、ホルモン、受容体、リガンド、主要組織適合複合体(MHC)分子、ヒートショックプロテイン(HSP)などのシャペロンならびにカドヘリン、インテグリン、C型レクチンおよび免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーなどの細胞間接着分子を含むが、これらに限定されない、タウに結合する非抗体分子を意味することも可能である。したがって、本発明の範囲を限定することなく、ただ明確にすることを目的として、治療用薬剤および診断用薬剤の開発のための結合分子についての特定の実施形態を表す抗体および抗体様分子に関して、以下の実施形態の大半が考察される。

20

【0038】

用語「抗体」および「免疫グロブリン」は本明細書において互換的に使用される。抗体または免疫グロブリンは、少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、そして通常、少なくとも重鎖と軽鎖の可変ドメインを含む、タウ結合分子である。脊椎動物系における基本的な免疫グロブリンの構造は比較的によく理解されている。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988)を参照のこと。

【0039】

30

以下により詳細が考察されるように、用語「免疫グロブリン」は、生化学的に区別することができる、さまざまな広範なクラスのポリペプチドを含む。当業者は、重鎖がガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロン( $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ )とそれらの間のいくつかのサブクラス(例えば、 $\gamma 1 \sim \gamma 4$ )に分類されることを理解するであろう。この鎖の性質こそが抗体の「クラス」をそれぞれIgG、IgM、IgA、IgGまたはIgEと決定する。免疫グロブリンサブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1などはよく特徴づけられており、そして、機能分化を付与することが知られている。これらのクラスおよびアイソタイプの各々の修飾型は、本開示を考慮すると、当業者にとって容易に識別可能であり、したがって、本発明の範囲内である。全ての免疫グロブリンのクラスが明らかに本発明の範囲内にあり、以下の考察は全般的にIgGクラスの免疫グロブリン分子に向けられるものである。IgGに関して、標準的な免疫グロブリン分子は約23,000ダルトンの分子量の2つの同一な軽鎖ポリペプチド、および53,000~70,000の分子量の2つの同一な重鎖ポリペプチドを含む。典型的には、4本の鎖が「Y」字形にジスルフィド結合によって結合され、軽鎖が、「Y」字の口の部分で始まり、可変領域を通じて継続する重鎖とひとまとまりに繋がっている。

40

【0040】

軽鎖はカッパまたはラムダ( $\kappa$ 、 $\lambda$ )のどちらかに分類される。各重鎖クラスはカッパ軽鎖またはラムダ軽鎖のどちらかと結合することができる。一般に、ハイブリドーマ、B細胞または遺伝子操作した宿主細胞のいずれかによって免疫グロブリンが生成されるとき

50

、軽鎖および重鎖は互いに共有結合し、そして、2本の重鎖の「テール」部分が互いに共有結合性ジスルフィド結合により結合する。重鎖では、アミノ酸配列は、Y字形のフォークヘッド末端にあるN末端から各鎖の下部にあるC末端へと延びている。

#### 【0041】

軽鎖および重鎖の両方が構造的および機能的相同性がある領域に分けられる。用語「定常」および「可変」を機能的に使用する。この点について、軽鎖部分および重鎖部分の可変ドメイン( $V_L$ および $V_H$ )が抗原認識と抗原特異性を決定することが理解されるであろう。反対に、軽鎖の定常ドメイン( $CL$ )および重鎖の定常ドメイン( $CH1$ 、 $CH2$ または $CH3$ )が、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合などのような重要な生物学的特性を付与する。慣習的に、定常領域ドメインが抗原結合部位または抗体のアミノ末端から遠ざかるにつれ、定常領域ドメインの番号付が増加する。N末端部分は可変領域であり、定常領域はC末端部分にある。 $CH3$ ドメインと $CL$ ドメインは実際には、それぞれ、重鎖と軽鎖のカルボキシ末端を含む。

#### 【0042】

先に示したように、抗体が抗原上のエピトープを選択的に認識し、特異的に結合することが可変領域によって可能になる。すなわち、抗体の $V_L$ ドメインおよび $V_H$ ドメインまたは相補性決定領域(CDR)のサブセットが組み合わさって、三次元の抗原結合部位を限定する可変領域を形成する。この四要素から成る抗体構造が、Y字の各アームの末端にある抗原結合部位を形成する。さらに具体的には、 $V_H$ 鎖と $V_L$ 鎖の各々の3つのCDRによって抗原結合部位が限定される。タウに特異的に結合するのに十分な構造を含有する任意の抗体断片または免疫グロブリン断片は「結合断片」または「免疫特異的断片」として互換的に本明細書に示される。

#### 【0043】

天然の抗体では、抗体は、各抗原結合ドメインに存在する「相補性決定領域」または「CDR」と時々呼ばれる6つの超可変領域を含み、それらは、水性環境での抗体の三次元構造を想定すると、抗原結合ドメインを形成するように特異的に配置されるアミノ酸の短い非連続的な配列である。分子間の多様性がより少ない、4つの比較的保存された「フレームワーク」領域または「FR」が「CDR」に隣接する。フレームワーク領域は主としてシート立体構造を採り、CDRは、前記シート構造と連結し、いくつかの場合では、その一部を形成するループを形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖間非共有結合性相互作用によりCDRの正しい方向での配置を規定する足場を形成するように作用する。配置されたCDRによって形成された抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに対して相補的な表面を限定する。この相補性表面が、抗体のその同種のエピトープへの非共有結合を促進する。CDRとフレームワーク領域をそれぞれ含むアミノ酸は、正確に定義されているので、任意の所与の重鎖可変領域または軽鎖可変領域について当業者によって容易に同定され得る。“Sequences of Proteins of Immunological Interest,” Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983)、および Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917を参照のこと。それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0044】

当技術分野内で使用および/または受容される用語に2つ以上の定義がある場合、本明細書において使用される用語の定義が、明確に反論されない限り、そのような意味を全て含むと意図される。具体的な例は、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見られる非連続的な抗原結合部位を説明するために、「相補性決定領域」(「CDR」)という用語を使用することである。この特定の領域は、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983)およびChothia and Lesk,

10

20

30

40

50

J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917によって説明されており、互いに比較されると、アミノ酸残基の重複またはサブセットが定義に含まれる。それらの文献は参照により本明細書に組み込まれる。それでもなお、抗体またはその異型体のCDRを意味するいずれかの定義の適用は、本明細書において定義され、使用される用語の範囲内にあると意図される。先に引用した参考文献の各々が定義するCDRを包含する適切なアミノ酸残基は、比較として、以下の表1に示される。特定のCDRを包含する正確な残基の番号は、CDRの配列とサイズに応じて変化する。当業者は、どの残基がヒトIgGサブタイプの抗体の特定の超可変領域またはCDRを含むか、その抗体の可変領域のアミノ酸配列を得てルーチン的に決定することができる。

【表1】

10

【表1】

表1:CDRの限定<sup>1</sup>

|         | Kabat法 | Chothia法 |
|---------|--------|----------|
| VH CDR1 | 31～35  | 26～32    |
| VH CDR2 | 50～65  | 52～58    |
| VH CDR3 | 95～102 | 95～102   |
| VL CDR1 | 24～34  | 26～32    |
| VL CDR2 | 50～56  | 50～52    |
| VL CDR3 | 89～97  | 91～96    |

20

<sup>1</sup>表1における全てのCDRの限定に関する番号付はKabatら(以下を参照)により示された番号付の規約に従う。

【0045】

Kabatらはまた、いかなる抗体にも適用できる可変ドメイン配列の番号付システムを定義した。当業者は、配列そのものの以外のいかなる実験データにも頼ることなく、任意の可変ドメイン配列にこの「Kabat番号付」システムを明確に割り当てることができる。本明細書において使用される場合、「Kabat番号付」は、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)によって示される番号付システムを指す。別途、明示されない限り、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体における特定のアミノ酸残基の位置の番号付に対する言及はKabat番号付システムに従うものであるが、しかしながら、それは理論上のものであり、本発明の全ての抗体を等しく適用することができない。例えば、最初のCDRの位置に応じて、以降のCDRがどちらかの方向に移動する可能性がある。

30

40

【0046】

本発明の抗体、またはその抗原結合断片、免疫特異的断片、異型体もしくは誘導体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、マウス化抗体またはキメラ抗体、単鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、Fab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、V<sub>L</sub>ドメインかV<sub>H</sub>ドメインのどちらかを含む断片、Fab発現ライブラリーによって産生される断片、ならびに抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本明細書において開示される抗体に対する抗Id抗体を含む)が含まれるが、これらに限定されない。scFv分子は当技術分野において公知であり、そして、例えば、米国特許第5,892,019号に記載される。本発明の免疫グロブリンまた

50

は抗体分子は免疫グロブリン分子の任意の型（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g AおよびI g Y）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1およびI g A 2）またはサブクラスであり得る。

【0047】

1つの実施形態において、本発明の抗体はI g Mまたは5価構造を有するその誘導体ではない。とりわけ、本発明の特定の用途、特に治療上の使用において、I g Mは多くの場合、その5価構造と親和性成熟の欠如のために非特異的な交差反応性と非常に低い親和性を示すので、I g MはI g Gおよび他の2価の抗体または対応する結合分子よりも有用ではない。

【0048】

特定の実施形態において、本発明の抗体はポリクローナル抗体ではない、すなわち、それは、血漿免疫グロブリン試料から得られる混合物である、というよりもむしろ1つの特定の抗体種から実質的になる。

【0049】

単鎖抗体を含む抗体断片は、可変領域のみ、または次のもの、すなわち、ヒンジ領域、C H 1ドメイン、C H 2ドメインおよびC H 3ドメインの全体もしくは一部と併せて含むことができる。可変領域のヒンジ領域、C H 1ドメイン、C H 2ドメインおよびC H 3ドメインとの任意の組合せをまた含むタウ結合断片もまた本発明に含まれる。本発明の抗体またはその免疫特異的断片は、鳥類および哺乳類動物を含む任意の動物起源であり得る。1つの実施形態において、抗体はヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、リャマ、ウマまたはニワトリ抗体である。別の実施形態において、可変領域は、起源がコンドリクトイド（condri c t h o i d）（例えば、サメ由来）であり得る。

【0050】

1つの態様において、本発明の抗体は、ヒトから単離されたヒトモノクローナル抗体である。所望により、ヒト抗体のフレームワーク領域が、データベース中の適切なヒト生殖系列可変領域配列に従って整列され、採択される。例えば、M R Cタンパク質工学センター（ケンブリッジ、英国）によって主催されるV b a s e（<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>）を参照のこと。例えば、本当の生殖系列配列から潜在的に逸脱しているとみなされるアミノ酸は、クローニング工程の間に組み込まれたP C Rプライマーの配列に起因する可能性がある。ファージディスプレイ抗体ライブラリーまたはゼノジニックマウスに由来する単鎖抗体断片（s c F v）などの人工的に生成されたヒト様抗体と比較して、本発明のヒトモノクローナル抗体は、（i）代用とした動物の免疫反応よりもむしろヒト免疫反応を用いて得られていること、すなわち、人体においてその適切な立体構造をとる天然のタウに対する反応でその抗体が生成されたこと、（i i）個体を保護してきたこと、または、タウの存在について少なくとも重要であること、および（i i i）抗体の起源がヒトであるので、自己抗原に対する交差反応性の危険性が最小化されることを特徴とする。なので、本発明に従って、タウ結合分子の起源がヒトである、すなわち、B細胞またはそのハイブリドーマなどのヒト細胞から単離された、または、そのc D N Aがヒト細胞、例えば、ヒトメモリーB細胞のm R N Aから直接的にクローンされたことを示すために、用語「ヒトモノクローナル抗体」、「ヒトモノクローナル自己抗体」、「ヒト抗体」などが使用される。ヒト抗体は、例えば、結合特性を改善するためにその抗体にアミノ酸置換がなされてもなお、「ヒト」抗体である。

【0051】

以下に記載するような、および、例えば、K u c h e r l a p a t iらによる米国特許第5,939,598号に記載されるような、ヒト免疫グロブリンライブラリー、または内在性免疫グロブリンを発現しない、1つ以上のヒト免疫グロブリンについての遺伝子導入動物に由来する抗体は、それらを本発明の真のヒト抗体から区別するためにヒト様抗体と示される。

【0052】

例えば、典型的にはファージディスプレイから単離された合成抗体および半合成抗体な

10

20

30

40

50

どのヒト様抗体の重鎖と軽鎖の対合は、オリジナルのヒトB細胞で生じた通りのオリジナルの対合を必ずしも反映している訳ではない。したがって、先行技術において一般的に用いられるような組換え発現ライブラリーから得られたF a b断片とs c F v断片は、関連の、免疫原性と安定性へのあらゆる可能な効果に関して人工的であるとみなされ得る。

【0053】

対照的に、本発明は、ヒトにおけるその治療上の有用性とその許容性を特徴とする、選別されたヒト対象から単離された親和性成熟抗体を提供する。

【0054】

本明細書において使用される場合、用語「マウス化抗体」または「マウス化免疫グロブリン」は、本発明のヒト抗体由来の1つ以上のCDR、およびマウス抗体配列に基づくアミノ酸置換および/または欠失および/または挿入を含有するヒトフレームワーク領域を含む抗体を指す。CDRを提供するヒト免疫グロブリンは「親」または「アクセプター」と呼ばれ、フレームワーク変化をもたらすマウス抗体は「ドナー」と呼ばれる。定常領域は存在する必要がないが、存在する場合、それらはたいていマウス抗体の定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85~90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上同一である。それ故に、いくつかの実施形態において、全長のマウス化ヒト重鎖免疫グロブリンまたは軽鎖免疫グロブリンはマウス定常領域、ヒトCDR、および多数の「マウス化」アミノ酸置換を有する実質的にヒトのフレームワークを含有する。典型的には、「マウス化抗体」はマウス化可変軽鎖および/またはマウス化可変重鎖を含む抗体である。例えば、マウス化抗体は、例えば、キメラ抗体の可変領域全体は非マウスであるため、典型的なキメラ抗体を包含しないであろう。「マウス化」の工程により「マウス化」した修飾型抗体は、CDRを提供する親抗体と同じ抗原に結合し、そして、親抗体と比較して、マウスではたいてい免疫原性が低い。

【0055】

本明細書において使用される場合、用語「重鎖部分」は、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列を含む。重鎖部分を含むポリペプチドはCH1ドメイン、ヒンジ（例えば、上部ヒンジ領域、中部ヒンジ領域および/または下部ヒンジ領域）ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインまたはその異型体もしくは断片のうちの少なくとも1つを含む。例えば、本発明において使用される結合ポリペプチドは、CH1ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部およびCH2ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメインおよびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部およびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖、またはCH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖を含むことができる。別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、CH3ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。また、本発明において使用される結合ポリペプチドは、CH2ドメインの少なくとも一部（例えば、CH2ドメインの全体または部分）を欠失することができる。先に示したように、これらのドメイン（例えば、重鎖部分）のアミノ酸配列が天然の免疫グロブリン分子と異なるように、これらのドメインを修飾することができると当業者により理解される。

【0056】

本明細書において開示される特定の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体では、多量体の1つのポリペプチド鎖の重鎖部分は、前記多量体の2つ目のポリペプチド鎖上の重鎖部分と同一である。あるいは、本発明の重鎖部分含有単量体は同一ではない。例えば、各単量体は、異なる標的結合部位を含むことができ、例えば、二重特異性抗体または二特異性抗体を形成する。

【0057】

別の実施形態において、本明細書において開示される抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体は、s c F vなどの単一ポリペプチド鎖から構成され、そして、潜在的なインビボ治療用途および診断用途のために細胞内に発現され得る（細胞内抗体）。

【0058】

本明細書において開示される診断方法および治療方法において使用される結合ポリペプチドの重鎖部分は様々な免疫グロブリン分子に由来し得る。例えば、ポリペプチドの重鎖部分は、IgG 1分子に由来するCH1ドメインとIgG 3分子に由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例では、重鎖部分は、部分的にIgG 1分子と部分的にIgG 3分子に由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例では、重鎖部分は、部分的にIgG 1分子と部分的にIgG 4分子に由来するキメラヒンジを含むことができる。

【0059】

本明細書において使用される場合、用語「軽鎖部分」は免疫グロブリン軽鎖に由来するアミノ酸配列を含む。1つの実施形態において、軽鎖部分はVLドメインまたはCLドメインのうちの少なくとも1つを含む。

10

【0060】

抗体のペプチドエピトープまたはポリペプチドエピトープの最小サイズは約4～5アミノ酸であると考えられている。ペプチドエピトープまたはポリペプチドエピトープは少なくとも7、少なくとも9または少なくとも約15～約30の間のアミノ酸を含有することができる。CDRはその三次形態をとる抗原性ペプチドまたはポリペプチドを認識することができるので、エピトープを含むアミノ酸は連続的である必要はなく、いくつかの場合では、同じペプチド鎖上に存在していなくてもよい。本発明において、本発明の抗体によって認識されるペプチドエピトープまたはポリペプチドエピトープは、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、または約5～約30個の間、約10～約30個の間または約15～約30個の間の連続的または非連続的なタウのアミノ酸からなる配列を含有する。

20

【0061】

本明細書において互換的に使用される「特異的に結合する」または「特異的に認識する」という表現によって、結合分子、例えば、抗体はその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、および、その結合が抗原結合ドメインとエピトープの間のある程度の相補性を必要とすることが一般的に示される。この定義によれば、抗体が無作為な関係が無いエピトープに結合する場合よりも容易に、その抗原結合ドメインを介してエピトープに結合するとき、その抗体はそのエピトープに「特異的に結合する」と言われる。抗体は、非連続的エピトープの直鎖状部分に対応するアミノ酸残基を含む、または、それらからなる単離されたポリペプチドに特異的に結合する、またはそのようなポリペプチドを特異的に認識することができることを当業者は理解する。ある抗体があるエピトープに結合する相対的親和性を限定するために用語「特異性」は本明細書において使用される。例えば、抗体「A」は抗体「B」よりも所与のエピトープへの高い特異性を有するとみなされ得る、または、抗体「A」は、関連するエピトープ「D」について有する特異性よりも高い特異性でエピトープ「C」に結合すると言することができる。

30

【0062】

存在する場合、用語「免疫学的結合特性」または抗体の抗原とのその他の結合特性は、その全ての文法の形式で、抗体の特異性、親和性、交差反応性および他の結合特性を指す。

40

【0063】

「優先的に結合する」という表現により、結合分子、例えば、抗体が、関連する、同様の、相同な、または類似のエピトープに結合する場合よりも容易にエピトープに特異的に結合することが示される。したがって、所与のエピトープに「優先的に結合する」抗体は、そのような抗体が、関連するエピトープに交差反応することが可能であっても、関連のエピトープよりもそのエピトープに結合する可能性が高いであろう。

【0064】

非限定的な例として、結合分子、例えば、抗体が、その抗体の第2エピトープに対する解離定数( $K_D$ )よりも低い $K_D$ で第1エピトープと結合する場合、それは前記第1エピトープに優先的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体が、その抗体の

50



第2エピトープに対する $K_D$ よりも少なくとも1桁低い親和性で第1エピトープに結合する場合、前記抗体は前記第1抗原に優先的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体が、その抗体の第2エピトープに対する $K_D$ よりも少なくとも2桁低い親和性で第1エピトープに結合する場合、前記抗体は前記第1エピトープに優先的に結合するとみなされ得る。

【0065】

別の非限定的な例では、結合分子、例えば、抗体が、その抗体の第2エピトープに対する解離速度( $k_{off}$ )よりも低い $k_{off}$ で第1エピトープと結合する場合、それは前記第1エピトープに優先的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体が、その抗体の第2エピトープに対する $k_{off}$ よりも少なくとも1桁低い親和性で第1エピトープに結合する場合、前記抗体は前記第1抗原に優先的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体が、その抗体の第2エピトープに対する $k_{off}$ よりも少なくとも2桁低い親和性で第1エピトープに結合する場合、前記抗体は前記第1エピトープに優先的に結合するとみなされ得る。

【0066】

本明細書において開示される結合分子、例えば、抗体または抗原結合断片、異型体、または誘導体は、 $5 \times 10^{-2} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^{-2} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ または $10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ 以下の解離速度( $k_{off}$ )でタウまたはその断片もしくは異型体と結合すると言うことができる。1つの実施形態において、本発明の抗体は、 $5 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{ 秒}^{-1}$ 、または $10^{-5} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^{-6} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-7} \text{ 秒}^{-1}$ または $10^{-7} \text{ 秒}^{-1}$ 以下の解離速度( $k_{off}$ )でタウまたはその断片もしくは異型体と結合すると言うことができる。

【0067】

本明細書において開示される結合分子、例えば、抗体または抗原結合断片、異型体、または誘導体は、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ または $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 以上の結合速度( $k_{on}$ )でタウまたはその断片もしくは異型体と結合すると言うことができる。1つの実施形態において、本発明の抗体は、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$  or  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 以上の結合速度( $k_{on}$ )でタウまたはその断片もしくは異型体と結合すると言うことができる。

【0068】

結合分子、例えば、抗体が、基準抗体の所与のエピトープへの結合を幾分妨げる程度まで、そのエピトープに優先的に結合する場合、それは前記基準抗体の前記エピトープへの結合を競合的に阻害すると言われる。当技術分野において公知の任意の方法、例えば、競合ELISA法によって競合的阻害を判定することができる。抗体が前記基準抗体の所与のエピトープへの結合を少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%競合的に阻害すると言うことができる。抗体のそのエピトープへの結合がまた、抗体ではない結合分子によって競合的に阻害され得るということを当業者は理解する。例えば、本明細書に記載される抗体のタウ、例えば、hTau40への特異的な結合が微小管により競合的に阻害され得る。

【0069】

本明細書において使用される場合、用語「親和性」は、結合分子、例えば、免疫グロブリン分子のCDRとの個々のエピトープの結合強度の程度を意味する。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)の27頁~28頁を参照のこと。本明細書において使用される場合、用語「結合活性」は、免疫グロブリンの集団と抗原の間の複合体の総合的な安定性、すなわち、免疫グロブリン混合物の前記抗原との機能的結合強度を意味する。例えば、Harlowの29頁~34頁を参照のこと。結合活性は、集団中の個々の免疫グロブリン分子の特異的エピトープとの親和性、およびまた、免疫グロブリンと抗原の結合

価の両方に関連する。例えば、2価のモノクローナル抗体とポリマーなどの高頻度反復エピトープ構造を有する抗原の間の相互作用は高い結合活性の1つであるであろう。任意の適切な方法を用いて抗体の抗原への親和性または結合活性を実験的に決定することができる。例えば、Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984) 内の Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions", Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992)、および本明細書に記載される方法を参照のこと。抗体の抗原への親和性を測定するための一般的な技術にはELISA、RIAおよび表面プラズモン共鳴が含まれる。塩濃度、pHなどの異なる条件下で測定される場合、特定の抗体抗原間相互作用の測定された親和性は変化し得る。したがって、標準化した抗体抗原溶液および標準化した緩衝液を用いて、親和性と他の抗原結合パラメータ、例えば、 $K_D$ 、 $IC_{50}$ を測定することが好ましい。

10

#### 【0070】

本発明の結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体はまた、それらの交差反応性に関して、記載または明示され得る。本明細書において使用される場合、用語「交差反応性」は、1つの抗原に対して特異的な抗体の第2抗原と反応する能力、つまり、2つの異なる抗原性物質の間の関連性の程度を意味する。したがって、抗体が、その抗体の形成を誘導したエピトープと異なるエピトープに結合する場合、その抗体は交差反応性である。交差反応性エピトープは一般的に、抗体を誘導したエピトープと同じ相補的な構造的特色の多くを含み、いくつかの場合では、実際にはオリジナルのエピトープよりも適合する可能性がある。

20

#### 【0071】

例えば、ある抗体が、関連するが同一ではないエピトープ、例えば、基準エピトープに対して少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、および少なくとも50%の（当技術分野において公知の、および本明細書に記載される方法を用いて計算されるような）同一性を有するエピトープに結合するという点で、それらはある程度の交差反応性を有する。抗体が基準エピトープに対して95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、および50%未満の（当技術分野において公知の、および本明細書に記載される方法を用いて計算されるような）同一性を有するエピトープに結合しない場合、それは交差反応性をほとんど、または全く持たないと言することができる。抗体があるエピトープの他の任意の類似体、オソログまたは相同体に結合しない場合、それはそのエピトープに対して「非常に特異的である」とみなすことができる。

30

#### 【0072】

本発明の結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体はまたタウに対する親和性に関して記載または明示され得る。1つの実施形態において、結合親和性には $5 \times 10^{-2}$  M、 $10^{-2}$  M、 $5 \times 10^{-3}$  M、 $10^{-3}$  M、 $5 \times 10^{-4}$  M、 $10^{-4}$  M、 $5 \times 10^{-5}$  M、 $10^{-5}$  M、 $5 \times 10^{-6}$  M、 $10^{-6}$  M、 $5 \times 10^{-7}$  M、 $10^{-7}$  M、 $5 \times 10^{-8}$  M、 $10^{-8}$  M、 $5 \times 10^{-9}$  M、 $10^{-9}$  M、 $5 \times 10^{-10}$  M、 $10^{-10}$  M、 $5 \times 10^{-11}$  M、 $10^{-11}$  M、 $5 \times 10^{-12}$  M、 $10^{-12}$  M、 $5 \times 10^{-13}$  M、 $10^{-13}$  M、 $5 \times 10^{-14}$  M、 $10^{-14}$  M、 $5 \times 10^{-15}$  M、または $10^{-15}$  M未満の解離定数、すなわち、 $K_d$ を有する結合親和性が含まれる。

40

#### 【0073】

先に示したように、様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造および三次元構造が周知である。本明細書において使用される場合、用語「 $V_H$ ドメイン」は免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、そして、用語「 $CH1$ ドメイン」は

50

免疫グロブリン重鎖の第1（最もアミノ末端の）定常領域ドメインを含む。CH1ドメインはV<sub>H</sub>ドメインに隣接し、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域に対してアミノ末端側にある。

【0074】

本明細書において使用される場合、用語「CH2ドメイン」は、例えば、従来の番号付体系を用いて、抗体の約残基244から残基360まで（Kabat番号付システムでは残基244～残基360、およびEU番号付システムでは残基231～残基340、Kabat E Aら、前掲書を参照のこと）にわたる重鎖分子の部分を含む。CH2ドメインは、別のドメインと密接に対合していないという点でユニークである。どちらかということ、完全な天然IgG分子の2つのCH2ドメインの間に2つのN-結合分岐型炭水化物鎖が挿入される。CH3ドメインがCH2ドメインからIgG分子のC末端までにわたり、そして、約108残基を含むこともまた詳細に記載されている。

10

【0075】

本明細書において使用される場合、用語「ヒンジ領域」は、CH1ドメインをCH2ドメインに結合する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域は約25残基を含み、そして、柔軟であり、したがって、2つのN末端抗原結合領域が独立的に動くことを可能にする。ヒンジ領域を、3つの明確なドメイン、すなわち上部ヒンジドメイン、中部ヒンジドメイン、および下部ヒンジドメインに細分化することができる。Roux et al., J. Immunol. 161 (1998), 4083を参照のこと。

20

【0076】

本明細書において使用される場合、用語「ジスルフィド結合」は2個のイオウ原子の間に形成される共有結合を含む。アミノ酸システインは、ジスルフィド結合を形成することができる、または、第2のチオール基と架橋を形成することができるチオール基を含む。大半の天然のIgG分子では、CH1領域とCL領域はジスルフィド結合によって連結されており、そして、Kabat番号付システムを用いる、239番と242番に対応する位置で（EU番号付システムでは、位置226または位置229）2本の重鎖が2つのジスルフィド結合によって連結される。

【0077】

本明細書において使用される場合、用語「結合した」、「融合した」または「融合」は互換的に使用される。これらの用語は、化学的複合体化または組換え技術を含むどのような手段によっても2つ以上の要素または構成部分を1つにまとめることを指す。「インフレーション融合」は、オリジナルのオープンリーディングフレーム（ORF）の正しい翻訳上の読み枠が維持されるように、2つ以上のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム（ORF）を結合してより長い連続的なORFを形成することを指す。したがって、組換え融合タンパク質は、オリジナルのORFによってコードされるポチペプチドに対応する（自然界では通常、そのように結合していない）2つ以上の区分を含有する単一のタンパク質である。読み枠は、このように、融合した区分を通して連続的になっているが、前記区分は、例えば、インフレーションリンカー配列によって物理的または空間的に区切られる可能性がある。例えば、免疫グロブリン可変領域のCDRをコードするポリヌクレオチドがインフレーションで融合され得るが、その「融合した」CDRが連続的なポリペプチドの一部として共翻訳される限り、それは、少なくとも1つの免疫グロブリンのフレームワーク領域または付加的なCDR領域をコードするポリヌクレオチドにより区切られ得る。

30

40

【0078】

用語「発現」は、本明細書において使用される場合、遺伝子が生化学物質、例えば、RNAまたはポリペプチドを産生する工程を意味する。その工程は、遺伝子ノックダウンならびに一過性発現と安定発現の両方を含むが、これらに限定されない、細胞内での遺伝子の機能的存在のどのような顕在化をも含む。それは、遺伝子のメッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、短ヘアピンRNA（shRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）または他の任意のRNA産物への転写、およびそのようなmRNAのポリペプチドへの翻訳を含むが、これらに限定されない。最終目的物質が生化学

50

物質である場合、発現にはその生化学物質と任意の前駆体の作製が含まれる。遺伝子の発現が「遺伝子産物」を作製する。本明細書において使用される場合、遺伝子産物は核酸、例えば、遺伝子の転写により産生されるメッセンジャーRNA、または転写物から翻訳されるポリペプチドのどちらかであり得る。本明細書に記載される遺伝子産物には、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化を受けた核酸、または翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、タンパク質分解性切断などを受けたポリペプチドがさらに含まれる。

#### 【0079】

本明細書において使用される場合、用語「試料」は、対象または患者から得られる任意の生物物質を意味する。1つの態様において、試料は血液、脳脊髄液（「CSF」）または尿を含み得る。他の態様において、試料は全血、血漿、血液試料から濃縮されたB細胞、および培養細胞（例えば、対象に由来するB細胞）を含み得る。試料はまた、生検試料、または神経組織を含む組織試料を含み得る。さらに他の態様において、試料は細胞全体および/または細胞の溶解物を含み得る。当技術分野において公知の方法により血液試料を採取することができる。1つの態様において、200  $\mu$ Lの緩衝液（20 mM トリス、pH 7.5、0.5% ノニデット、1 mM EDTA、1 mM PMSF、0.1 M NaCl、1 X シグマ・プロテアーゼ阻害剤、および1 X シグマ・ホスファターゼ阻害剤1および2）中に4 でボルテックスすることにより沈殿物を再懸濁することができる。断続的にボルテックスをしながら、前記懸濁液を氷上で20分間放置することができる。約4 で5分間、15,000  $\times$  gで遠心した後に、上清のアリコットを約 - 70 で保存することができる。

#### 【0080】

本明細書において使用される場合、用語「治療する」または「治療」は、治療的処置、およびパーキンソン症などの望まれない生理的变化または障害を防止する、または遅延（減少）させることを目的とする予防的または防止的手段の両方を意味する。有益な、または、所望の臨床結果には、検出可能であろうと検出不可能であろうと、症状の軽減、疾患の程度の縮小、安定化した（すなわち、悪化していない）疾患状態、疾患の進行の遅延または緩慢化、疾患状態の寛解または緩和、および（部分的であろうと完全であろうと）寛解が含まれるが、これらに限定されない。「治療」はまた、治療を受けない場合に予想される生存期間と比較して生存期間を延長させることを意味し得る。治療を必要とする人々には、症状または障害を既に有する人々、ならびに症状または障害を有する傾向がある人々、または症状または障害の出現が防止されるべき人々が含まれる。

#### 【0081】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳類動物」は、診断、予後予測、予防または治療が望ましい任意の対象、特に哺乳類の対象、例えば、ヒトの患者を意味する。

#### 【0082】

##### II. 抗体

本発明は全般的にヒト抗タウ抗体およびその抗原結合断片に関連する。1つの実施形態において、本発明の抗体は、実施例において例証される抗体について概説されるような免疫学的結合特性および/または生物学的特質を示す。本発明に従って、タウに特異的なヒトモノクローナル抗体が健康なヒト対象のプールからクローン化された。

#### 【0083】

本発明に従って実行される実験の過程で、最初の試みはタウ特異的抗体をクローン化することに失敗したが、ほぼ毎回偽陽性のクローンをもたらした。この問題を回避するために、組換えタウタンパク質、ADの脳から抽出されたPHF tau、健常対照の脳抽出物およびウシ血清アルブミン（BSA）への結合について、ヒトメモリーB細胞培養物の条件培地中の抗体を並行してスクリーニングした。組換えタウおよび/またはPHF tauについて陽性であるが対照脳抽出物またはBSAについて陽性ではないB細胞培養物のみが抗体のクローン化の対象とされた。

## 【 0 0 8 4 】

循環するタウ抗体血漿のレベルの上昇を示唆する、タウに対する高い血漿結合活性を有する健康なヒト対象のプールに、特異的な抗体を単離する最初の試みを集中した。予想外にも、これらの試みはタウ特異的ヒトメモリーB細胞を作製することに失敗し、そして、本発明において記載される抗体は、高いタウ血漿反応性について予備選択されていない、または、タウに対して低い血漿反応性を有する健康なヒト対象のプールから単離された。

## 【 0 0 8 5 】

この方法によって、いくつかの抗体を単離することができた。クラスと軽鎖サブクラスの決定のために、選択された抗体をさらに分析した。メモリーB細胞培養物からの選択された適切な抗体のメッセージは、次に、RT-PCRによって転写され、クローン化され、そして、組換え体の生産のために発現ベクターに組み込まれる。添付されている実施例を参照のこと。HEK293細胞またはCHO細胞でのヒト抗体の組換え発現、ならびにその後の、全長型タウ(図2、図7および図12)、ウェスタンブロットでのその病理的修飾型(図3および図8)に対するそれらの結合特異性の性質決定および病理的凝集型タウに対するそれらの特色のある結合についての性質決定によって、初めて、タウに対して非常に特異的であり、そして、病理的修飾型タウタンパク質を特徴的に認識するヒト抗体がクローン化されたことが確認された。

## 【 0 0 8 6 】

したがって、本発明は全般的に、単離された天然のヒトモノクローナル抗タウ抗体、ならびにその結合断片、誘導体および異型体に関連する。本発明の1つの実施形態において、前記抗体は、ウェスタンブロットで全長型組換えタウならびに/またはADの脳から単離した病理的凝集型および/もしくはリン酸化型(PHFTau)に変性条件下で結合することが可能である。図3および図8を参照のこと。

## 【 0 0 8 7 】

1つの実施形態において、本発明は、NI-105-4E4、NI-105-24B2またはNI-105-4A3からなる群より選択される基準抗体と同じエピトープに特異的に結合する抗タウ抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を対象とする。さらに、例示的な抗体であるNI-105-4E4を使用して実行された直接ELISA法の予備的な結果により、NI-105-4E4はタウのC末端を特異的に認識することが明らかになった。実行されたさらなる測定により、NI-105-4E4は2つの直鎖状配列を含む断続的なエピトープ、すなわち、図11に示されるようなR4微小管結合ドメイン内の第1直鎖状配列とR4ドメインとCドメインの間の領域内の第2直鎖状配列を認識することが示唆されている。1つの実施形態において、非連続的なエピトープから構成される直鎖状ポリペプチド、すなわち、本発明によって提供される抗体が認識するエピトープはタウの微小管結合ドメイン内に局在し、それは生理的微小管結合タウではマスクされている。本発明の抗体NI-105-4E4が認識するエピトープによって構成されるユニークな直鎖状ポリペプチドとして、アミノ酸337~343 VEVKSEK(配列番号7)を含むヒトタウの微小管結合ドメイン内の第1配列がエピトープマッピングにより同定された。さらなる実験および市販されているAT180マウスモノクローナルタウ抗体との比較により、NI-105-4E4が配列番号7のユニークなエピトープを特異的に認識することが確認された。最も有利なことに、本発明の抗体NI-105-4E4が認識する配列番号7のエピトープは、配列番号1~6によって表されるアミノ酸配列を有する、ヒト脳に存在する6つのタウアイソフォーム全てで100%保存されており、そして、マウスおよびラットなどの他の種においても同様に100%保存されており、各動物モデルでの追加的な試験手段に本発明の抗体を提供する。配列番号6の残基V339および残基E342に対応する、配列番号7のポリペプチドの残基3および残基6がNI-105-4E4の結合に寄与することがさらなる実験法により示された。本発明の抗体NI-105-4E4が認識するエピトープから構成されるユニークな直鎖状ポリペプチドとして、ヒトタウの微小管結合ドメイン内に配列番号6のアミノ酸387~397を含む第2配列(配列番号41)がエピトープマッピングによりさらに同定された。配列番

号6の残基D387、E391およびK395に対応する配列番号41の残基1、5および9がNI-105.4E4の結合に寄与する。

【0088】

1つの実施形態において、本明細書に記載される抗体は、配列番号7のアミノ酸残基を含むエピトープでタウに特異的に結合する。別の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、配列番号41のアミノ酸残基を含むエピトープでタウに特異的に結合する。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、配列番号7と配列番号41のアミノ酸残基を含むエピトープでタウに特異的に結合する。さらなる実施形態において、本明細書に記載される抗体は、配列番号6の残基V339、E342、D387、E391およびK395からなる群より選択される1つ以上のアミノ酸残基を含むエピトープでタウに特異的に結合する。前記エピトープは、配列番号6の残基V339、E342、D387、E391およびK395からなる群のいずれか1つの、いずれか2つの、いずれか3つの、いずれか4つの、または5つ全ての残基を含む可能性がある。特定の実施形態において、タウはhTau40である。

【0089】

1つの実施形態において、本明細書に記載される抗体は、タウの微小管結合ドメインを含むエピトープでタウに結合する。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、図11に示されるようなタウのR4領域に由来するアミノ酸残基を含むエピトープでタウに結合する。1つの実施形態において、本明細書に記載される抗体はタウへの特異的結合について微小管と競合する。別の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、微小管と結合していないタウへの抗体結合親和性と比較して、微小管が結合したタウへの低下した結合親和性を有する。さらなる実施形態において、本明細書に記載される抗体は、微小管と結合したタウに結合しない、または実質的に結合しない。特定の実施形態において、タウタンパク質は天然タウタンパク質または組換えタウタンパク質であり得る。特定の実施形態において、タウはhTau40である。

【0090】

エピトープマッピングにより、本発明の抗体NI-105.4A3が認識するユニークな直鎖状エピトープとして、配列番号6のアミノ酸35~49を含むヒトタウの配列(配列番号42)がさらに同定された。配列番号6の残基D40、A41およびK44に対応する配列番号42の残基6、7および10がNI-105.4A3の結合に寄与する。1つの実施形態において、本明細書に記載される抗体は、配列番号42のアミノ酸残基を含むエピトープでタウに特異的に結合する。さらなる実施形態において、本明細書に記載される抗体は、配列番号6の残基D40、A41およびK44からなる群より選択される1つ以上のアミノ酸残基を含むエピトープでタウに特異的に結合する。前記エピトープは、配列番号6の残基D40、A41およびK44からなる群のいずれか1つの、いずれか2つの、または3つ全ての残基を含む可能性がある。特定の実施形態において、タウはhTau40である。

【0091】

また、実施例で実証され、そして、図6に示されるような最初の実験観察にとらわれるつもりはないが、本発明のヒトモノクローナルNI-105-4E4抗タウ抗体は、脳組織において病理的凝集型タウに特異的に結合するが、生理型タウを実質的に認識しないことを特徴とする。1つの実施形態において、本発明のヒト抗タウ抗体は、脳組織において病理的凝集型タウに特異的に結合するが、生理型タウを実質的に認識しない可能性がある。さらに、本発明のヒト抗タウ抗体は、脳内で神経原線維濃縮体(NFT)、糸屑状構造物および/またはジストロフィー性神経突起の中の、プレタングルステージ(pre-tangle stage)のタウを認識するその能力をさらに特徴とする可能性がある。それ故に、本発明は、診断目的および治療目的にかように特に有用である、結合特異性を有するヒトタウ抗体一式を提供する。

【0092】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、実施例において記載されるように、例示的

なNI-105-4E4抗体の結合特性を示す。さらに、または代わりに、本発明の抗タウ抗体は、特に実施例4に従って解析されると、生理的形態よりもむしろ病理的凝集型のタウを優先的に認識する。さらに、または代わりに、本発明の抗タウ抗体は、ヒトタウの疾患の原因となる突然変異体、特に実施例4において記載されるものに結合する。これに関連して、結合特異性は、例示的なNI-105-4E4抗体、NI-1054A3抗体およびNI-105-24B2抗体について、それぞれ、図2、図12および図7に示されるような範囲内であり得る、すなわち、約100pM~100nMの2分の1最大有効濃度(EC50)、または野生型タウに対して約100pM~10nMのEC50を有する。

【0093】

それ故に、本発明の抗タウ抗体は、実施例4に記載される免疫組織学的染色により例示されるように、脳内においてタウの病理的修飾形態、例えばタウの病理的凝集体に優先的に結合する。別の実施形態において、本発明の抗タウ抗体は、ウェスタンブロットによって実施例2において例示されるように、組換えタウと病理的修飾型タウの両方に優先的に結合する。

【0094】

本発明は、NI-105-4E4、NI-105-24B2およびNI-105-4A3からなる群より選択される抗体の抗原結合ドメインと同一の抗原結合ドメインを含む抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体に関連する。

【0095】

本発明は、図1に示されるアミノ酸配列うちのいずれか1つを含むV<sub>H</sub>可変領域および/またはV<sub>L</sub>可変領域の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を可変領域、例えば、結合ドメインに含むことを特徴とし得る、そのような結合分子、例えば、抗体およびその結合断片をさらに例示する。先に特定された可変領域をコードする、対応するヌクレオチド配列は以下の表2に示される。図1に示されるようなV<sub>H</sub>領域および/またはV<sub>L</sub>領域の上記のアミノ酸配列を有する例示的な一式のCDR。しかしながら、以下に考察するように、さらに、または代わりに、CDR2およびCDR3の場合では、図1に示されるものとそれらのアミノ酸配列が、1個、2個、3個、またはもっと多くのアミノ酸だけ異なるCDRを使用することが可能であるという事実を当業者はよく理解する。

【0096】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号23~25、26~28、29~31、32~34、35~37および38~40からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなる少なくとも1つのCDRを含む。1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号23~25、26~28、29~31、32~34、35~37および38~40からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなる1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含む。前記抗体は、配列番号23、29もしくは35のV<sub>H</sub> CDR1；配列番号24、30もしくは36のV<sub>H</sub> CDR2；または配列番号25、31もしくは37のV<sub>H</sub> CDR3を含む重鎖可変領域を含む可能性がある。前記抗体は、配列番号26、32もしくは38のV<sub>L</sub> CDR1；配列番号27、33もしくは39のV<sub>L</sub> CDR2；または配列番号28、34もしくは40のV<sub>L</sub> CDR3を含む軽鎖可変領域を含む可能性がある。前記抗体は、配列番号23、29もしくは35のV<sub>H</sub> CDR1；配列番号24、30もしくは36のV<sub>H</sub> CDR2；または配列番号25、31もしくは37のV<sub>H</sub> CDR3を含む重鎖可変領域を含む可能性があり、そして、配列番号26、32もしくは38のV<sub>L</sub> CDR1；配列番号27、33もしくは39のV<sub>L</sub> CDR2；または配列番号28、34もしくは40のV<sub>L</sub> CDR3を含む軽鎖可変領域をさらに含む可能性がある。

【0097】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号23、29または35のV<sub>H</sub> CDR1；配列番号24、30または36のV<sub>H</sub> CDR2；および配列番号25、31ま

10

20

30

40

50

たは37のVH CDR3を含む重鎖可変領域を含む可能性がある。1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号26、32または38のVL CDR1；配列番号27、33または39のVL CDR2；および配列番号28、34または40のVL CDR3を含む軽鎖可変領域を含む可能性がある。前記抗体は、配列番号23、29または35のVH CDR1；配列番号24、30または36のVH CDR2；および配列番号25、31または37のVH CDR3を含む重鎖可変領域をさらに含む可能性があり、ならびに配列番号26、32または38のVL CDR1；配列番号27、33または39のVL CDR2；および配列番号28、34または40のVL CDR3を含む軽鎖可変領域をさらに含む可能性がある。

【0098】

10

1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号23のVH CDR1、配列番号24のVH CDR2、および配列番号25のVH CDR3を含む重鎖可変領域を含む可能性がある。1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号29のVH CDR1、配列番号30のVH CDR2、および配列番号31のVH CDR3を含む重鎖可変領域を含む可能性がある。1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号35のVH CDR1、配列番号36のVH CDR2、および配列番号37のVH CDR3を含む重鎖可変領域を含む可能性がある。

【0099】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号26のVL CDR1、配列番号27のVL CDR2、および配列番号28のVL CDR3を含む軽鎖可変領域を含む可能性がある。1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号32のVL CDR1、配列番号33のVL CDR2、および配列番号34のVL CDR3を含む軽鎖可変領域を含む可能性がある。1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号38のVL CDR1、配列番号39のVL CDR2、および配列番号40のVL CDR3を含む軽鎖可変領域を含む可能性がある。

20

【0100】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号23のVH CDR1、配列番号24のVH CDR2、および配列番号25のVH CDR3を含む重鎖可変領域を含む可能性があり、ならびに配列番号26のVL CDR1、配列番号27のVL CDR2、および配列番号28のVL CDR3を含む軽鎖可変領域をさらに含む可能性がある。

30

【0101】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号29のVH CDR1、配列番号30のVH CDR2、および配列番号31のVH CDR3を含む重鎖可変領域を含む可能性があり、ならびに配列番号32のVL CDR1、配列番号33のVL CDR2、および配列番号34のVL CDR3を含む軽鎖可変領域をさらに含む可能性がある。

【0102】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号35のVH CDR1、配列番号36のVH CDR2、および配列番号37のVH CDR3を含む重鎖可変領域を含む可能性があり、ならびに配列番号38のVL CDR1、配列番号39のVL CDR2、および配列番号40のVL CDR3を含む軽鎖可変領域をさらに含む可能性がある。

40

【0103】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、図1に示されるようなV<sub>H</sub>領域および/またはV<sub>L</sub>領域のアミノ酸配列を含む抗体のいずれか1つである。1つの実施形態において、本発明の抗体は、ヒトB細胞で存在したような、重鎖と軽鎖の同じ性質の対合を維持していることを特徴とする。

【0104】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号9、13、17および93からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなる重鎖可変領域(VH)を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号11、15および19からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配

50



列からなる軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体は、配列番号9、13、17および93からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなる重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）を含み、ならびに配列番号11、15および19からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）をさらに含む。特定の実施形態において、前記抗体は、配列番号9のV<sub>H</sub>および配列番号11のV<sub>L</sub>、または配列番号93のV<sub>H</sub>および配列番号11のV<sub>L</sub>、配列番号13のV<sub>H</sub>および配列番号15のV<sub>L</sub>、または配列番号17 V<sub>H</sub>および配列番号19のV<sub>L</sub>を含む。

#### 【0105】

あるいは、本発明の抗体は、図1に示されるようなV<sub>H</sub>領域および/またはV<sub>L</sub>領域を有する抗体のうちの少なくとも1つと、例えば、hT<sub>a</sub>u40などのタウへの結合について競合する抗体、またはその抗原結合断片、誘導体もしくは異型体である。1つの実施形態において、本発明の抗体はhT<sub>a</sub>u40への特異的結合についてN<sub>I</sub>-105-4E4、N<sub>I</sub>-105-24B2またはN<sub>I</sub>-105-4A3と競合する。それらの抗体は、特に、治療用途について、同様にヒト抗体であり得る。あるいは、前記抗体は、診断方法と動物での研究に特に有用なマウス抗体、マウス化抗体およびキメラマウス-ヒト抗体である。

#### 【0106】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、培養されている単クローン性B細胞またはオリクローン性B細胞の培養物によって供給され、そして、前記B細胞が産生する抗体を含有する前記培養物の上清をその中の抗タウ抗体の存在と親和性についてスクリーニングする。スクリーニングの工程は、その開示の内容が参照により本明細書に組み込まれる国際出願公開第W<sub>O</sub>2004/095031号に記載されるような、鋭敏な組織アミロイド斑免疫反応性（T<sub>A</sub>P<sub>I</sub>R）アッセイの工程；脳切片でのP<sub>H</sub>F<sub>T</sub>auへの結合についてのスクリーニングの工程；アミノ酸セリン202およびトレオニン205にリン酸基を有する、配列番号6によって表されるアミノ酸配列のタウに由来するペプチドの結合についてのスクリーニングの工程；アミノ酸トレオニン231にリン酸基を有する、配列番号6によって表されるアミノ酸配列のタウに由来するペプチドの結合についてのスクリーニングの工程；および/または前記配列のアミノ酸トレオニン231、および/またはアミノ酸セリン396およびセリン404にリン酸基を有する、配列番号6によって表されるアミノ酸配列のタウに由来するペプチドの結合についてのスクリーニングの工程；配列番号6によって表されるアミノ酸配列の組換えヒトタウの結合についてのスクリーンの工程；および結合が検出される抗体または前記抗体を産生する細胞の単離の工程、を含む。

#### 【0107】

先に言及したように、ヒト免疫反応に応じて生成されるため、本発明のヒトモノクローナル抗体は、特定の病理と関連があり、例えば、マウスモノクローナル抗体の生成のための免疫過程の場合、およびファージディスプレイライブラリーのインビトロスクリーニングの場合、それぞれ、アクセスできる可能性が無い、または免疫原性が低い可能性が無いエピトープを認識する。したがって、本発明のヒト抗タウ抗体のエピトープはユニークであり、本発明のヒトモノクローナル抗体が認識するエピトープに結合することが可能である他の抗体は存在しないと明記することが賢明である。抗体N<sub>I</sub>-105-4E4およびN<sub>I</sub>-105-4A3のユニークなエピトープを示す図11も参照のこと。したがって、本発明はまた全般的に、本発明のヒトモノクローナル抗体とタウに対する特異的結合について競合する抗タウ抗体およびタウ結合分子にまで及ぶ。本発明は、N<sub>I</sub>-105-4E4、N<sub>I</sub>-105-24B2およびN<sub>I</sub>-105-4A3からなる群より選択される基準抗体と同じタウのエピトープに特異的に結合する抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体をより具体的に対象とする。

#### 【0108】

試験している免疫グロブリンが基準抗体の、タウなどの共通の抗原への特異的な結合を阻害する測定法により抗体間の競合を判定する。多種類の競合的結合アッセイが公知であ

10

20

30

40

50

る。例えば、固相直接または間接放射免疫アッセイ (RIA)、固相直接または間接酵素免疫アッセイ (EIA)、サンドイッチ競合アッセイについて、Stahli et al., Methods in Enzymology 9 (1983), 242-253 を参照のこと；固相直接ビオチン-アビジン EIA について、Kirkland et al., J. Immunol. 137 (1986), 3614-3619 and Cheung et al., Virology 176 (1990), 546-552 を参照のこと；固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイについて Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988) を参照のこと；I<sup>125</sup> 標識を用いる固相直接標識 RIA について、Morel et al., Molec. Immunol. 25 (1988), 7-15 および Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32 (1990), 77-82 を参照のこと。典型的には、そのような測定法は、固相表面に結合した精製されたタウもしくはその凝集体、またはこれらのいずれかを担持する細胞、未標識の試験免疫グロブリンおよび標識された基準免疫グロブリン、すなわち、本発明のヒトモノクローナル抗体の使用を含む。試験免疫グロブリンの存在下で前記の固相表面または細胞に結合した標識の量を測定することにより競合的阻害を測定する。通常、試験免疫グロブリンは過剰に存在する。1つの実施形態において、添付されている実施例における ELISA 法について説明されるような条件で、競合的結合アッセイを実行する。競合的測定法 (競合性抗体) により同定された抗体には、基準抗体と同じエピトープに結合する抗体、および基準抗体が結合するエピトープに立体障害が生じるほど充分近位の隣接するエピトープに結合する抗体が含まれる。通常、競合性抗体が過剰に存在するとき、それは基準抗体の共通の抗原への特異的な結合を少なくとも 50% または 75% 阻害する。それ故に、本発明は、NI-105.4E4、NI-105.24B2 または NI-105.4A3 からなる群より選択される基準抗体がタウに結合することを競合的に阻害する抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体にさらに関連する。

#### 【0109】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域の V<sub>H</sub>-CDR の少なくとも 1 つまたは重鎖可変領域の V<sub>H</sub>-CDR の少なくとも 2 つが、本明細書において開示される抗体の基準重鎖 V<sub>H</sub>-CDR 1 アミノ酸配列、V<sub>H</sub>-CDR 2 アミノ酸配列または V<sub>H</sub>-CDR 3 アミノ酸配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一である免疫グロブリン重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) を含む、そのような免疫グロブリン重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) から基本的になる、またはそのような免疫グロブリン重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) からなる単離されたポリペプチドを提供する。あるいは、前記 V<sub>H</sub> の V<sub>H</sub>-CDR 1 領域、V<sub>H</sub>-CDR 2 領域および V<sub>H</sub>-CDR 3 領域は、本明細書において開示される抗体の基準重鎖 V<sub>H</sub>-CDR 1 アミノ酸配列、V<sub>H</sub>-CDR 2 アミノ酸配列および V<sub>H</sub>-CDR 3 アミノ酸配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一である。このように、この実施形態に従って、本発明の重鎖可変領域は、図 1 に示される群に関連する V<sub>H</sub>-CDR 1 ポリペプチド配列、V<sub>H</sub>-CDR 2 ポリペプチド配列および V<sub>H</sub>-CDR 3 ポリペプチド配列を有する。図 1 は Kabat システムにより定義された V<sub>H</sub>-CDR を示すが、他の CDR 定義、例えば、Chothia システムにより定義された V<sub>H</sub>-CDR もまた本発明に含まれ、そして、それは、図 1 に提示されるデータを使用して当業者により容易に特定され得る。1つの実施形態において、基準 V<sub>H</sub>-CDR 1 のアミノ酸配列は配列番号 23、29 または 35 であり、基準 V<sub>H</sub>-CDR 2 のアミノ酸配列は配列番号 24、30 または 36 であり、そして、基準 V<sub>H</sub>-CDR 3 のアミノ酸配列は配列番号 25、31 または 37 である。

#### 【0110】

別の実施形態において、本発明は、図 1 に示される V<sub>H</sub>-CDR 1 群、V<sub>H</sub>-CDR 2 群および V<sub>H</sub>-CDR 3 群と同一であるポリペプチド配列を有する V<sub>H</sub>-CDR 1 領域、

V<sub>H</sub>-CDR2領域およびV<sub>H</sub>-CDR3領域を持つ免疫グロブリン重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)を含む、そのような免疫グロブリン重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)から基本的になる、またはそのような免疫グロブリン重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)からなる単離されたポリペプチドを提供する。1つの実施形態において、V<sub>H</sub>-CDR1のアミノ酸配列は配列番号23、29、または35であり、V<sub>H</sub>-CDR2のアミノ酸配列は配列番号24、30または36であり、そして、V<sub>H</sub>-CDR3のアミノ酸配列は配列番号25、31または37である。

【0111】

別の実施形態において、本発明は、図1に示されるV<sub>H</sub>-CDR1群、V<sub>H</sub>-CDR2群およびV<sub>H</sub>-CDR3群と、いずれか1つのV<sub>H</sub>-CDRにおける1、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸置換を例外として、同一であるポリペプチド配列を有するV<sub>H</sub>-CDR1領域、V<sub>H</sub>-CDR2領域およびV<sub>H</sub>-CDR3領域を持つ免疫グロブリン重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)を含む、そのような免疫グロブリン重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)から基本的になる、またはそのような免疫グロブリン重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)からなる単離されたポリペプチドを提供する。ある実施形態において、前記アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。1つの実施形態において、V<sub>H</sub>-CDR1のアミノ酸配列は配列番号23、29または35であり、V<sub>H</sub>-CDR2のアミノ酸配列は配列番号24、30または36であり、そして、V<sub>H</sub>-CDR3のアミノ酸配列は配列番号25、31または37である。

【0112】

別の実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域のV<sub>L</sub>-CDRの少なくとも1つまたは軽鎖可変領域のV<sub>L</sub>-CDRの少なくとも2つが、本明細書において開示される抗体の基準軽鎖V<sub>L</sub>-CDR1アミノ酸配列、V<sub>L</sub>-CDR2アミノ酸配列またはV<sub>L</sub>-CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である免疫グロブリン軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)を含む、そのような免疫グロブリン軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)から基本的になる、またはそのような免疫グロブリン軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)からなる単離されたポリペプチドを提供する。あるいは、前記V<sub>L</sub>のV<sub>L</sub>-CDR1領域、V<sub>L</sub>-CDR2領域およびV<sub>L</sub>-CDR3領域は、本明細書において開示される抗体の基準軽鎖V<sub>L</sub>-CDR1アミノ酸配列、V<sub>L</sub>-CDR2アミノ酸配列およびV<sub>L</sub>-CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。このように、この実施形態に従って、本発明の軽鎖可変領域は、図1に示される群に関連するV<sub>L</sub>-CDR1ポリペプチド配列、V<sub>L</sub>-CDR2ポリペプチド配列およびV<sub>L</sub>-CDR3ポリペプチド配列を有する。図1はKabataシシステムにより定義されたV<sub>L</sub>-CDRを示すが、他のCDR定義、例えば、Chothiaシシステムにより定義されたV<sub>L</sub>-CDRもまた本発明に含まれる。1つの実施形態において、基準V<sub>L</sub>-CDR1のアミノ酸配列は配列番号26、32または38であり、基準V<sub>L</sub>-CDR2のアミノ酸配列は配列番号27、33または39であり、そして、基準V<sub>L</sub>-CDR3のアミノ酸配列は配列番号28、34または40である。

【0113】

別の実施形態において、本発明は、図1に示されるV<sub>L</sub>-CDR1群、V<sub>L</sub>-CDR2群およびV<sub>L</sub>-CDR3群と同一であるポリペプチド配列を有するV<sub>L</sub>-CDR1領域、V<sub>L</sub>-CDR2領域およびV<sub>L</sub>-CDR3領域を持つ免疫グロブリン軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)を含む、そのような免疫グロブリン軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)から基本的になる、またはそのような免疫グロブリン軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)からなる単離されたポリペプチドを提供する。1つの実施形態において、V<sub>L</sub>-CDR1のアミノ酸配列は配列番号26、32または38であり、V<sub>L</sub>-CDR2のアミノ酸配列は配列番号27、33または39であり、そして、V<sub>L</sub>-CDR3のアミノ酸配列は配列番号28、34または40である。

【0114】

別の実施形態において、本発明は、図1に示されるV<sub>L</sub>-CDR1群、V<sub>L</sub>-CDR2群およびV<sub>L</sub>-CDR3群と、いずれか1つのV<sub>L</sub>-CDRにおける1、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸置換を例外として、同一であるポリペプチド配列を

有する $V_L$ -CDR1領域、 $V_L$ -CDR2領域および $V_L$ -CDR3領域を持つ免疫グロブリン軽鎖可変領域( $V_L$ )を含む、そのような免疫グロブリン軽鎖可変領域( $V_L$ )から基本的になる、またはそのような免疫グロブリン軽鎖可変領域( $V_L$ )からなる単離されたポリペプチドを提供する。ある実施形態において、前記アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。1つの実施形態において、 $V_L$ -CDR1のアミノ酸配列は配列番号26、32または38であり、 $V_L$ -CDR2のアミノ酸配列は配列番号27、33または39であり、そして、 $V_L$ -CDR3のアミノ酸配列は配列番号28、34または40である。

#### 【0115】

免疫グロブリンまたはそれをコードするcDNAをさらに修飾することができる。したがって、さらなる実施形態において、本発明の方法は、キメラ抗体、マウス化抗体、単鎖抗体、Fab断片、二重特異性抗体、融合抗体、標識化抗体またはこれらのいずれか1つの類似体を作製する工程のいずれか1つを含む。対応する方法が当業者に知られており、そして、例えば、Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988)に記載される。ファージディスプレイ技術によって前記抗体の誘導体を得るとき、本明細書に記載される抗体のいずれか1つのものと同じエピトープに結合するファージ抗体の効率性を上昇させるために、BIAcoreシステムにおいて使用されるような表面プラズモン共鳴を使用することができる(Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13)。例えば、国際出願公開第WO89/09622号にキメラ抗体の作製が記載される。欧州出願公開第EP-A1 0 239 400号および国際出願公開第WO90/07861号にヒト化抗体の作製方法が記載される。本発明に従って利用される抗体のさらなる供給源はいわゆるゼノジニック抗体である。例えば、国際出願公開第WO91/10741号、第WO94/02602号、第WO96/34096号および第WO96/33735号に、マウスにおけるヒト様抗体などのゼノジニック抗体の作製についての一般的原理が記載される。先に考察したように、本発明の抗体は完全抗体の他に、例えば、Fv、FabおよびF(ab)<sub>2</sub>を含む様々な形態で、ならびに単鎖形態で存在し得る。例えば、国際出願公開第WO88/09344号を参照のこと。

#### 【0116】

当技術分野において公知の従来の技術を用いて、例えば、アミノ酸欠失、挿入、置換、付加、および/または組換えおよび/または当技術分野において公知の他の任意の修飾を単独か併用のどちらかで用いることにより、本発明の抗体またはそれらの対応する免疫グロブリン鎖をさらに修飾することができる。免疫グロブリン鎖アミノ酸配列の基礎となるDNA配列にそのような修飾を導入する方法は当業者によく知られている。例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.および Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994)を参照のこと。本発明の抗体の修飾には、アセチル化、ヒドロキシル化、メチル化、アミド化、および炭水化物もしくは脂質部分、補因子などの結合を含む、側鎖修飾、骨格修飾、ならびにN末端およびC末端修飾を含む、1つ以上の構成アミノ酸における化学的および/または酵素的誘導体化が含まれる。同様に、本発明は、アミノ末端に記載の抗体またはそのある断片を含み、それに融合した免疫刺激性リガンドなどの異種性分子をカルボキシル末端に含むキメラタンパク質の作製を包含する。対応する技術の詳細について、例えば、国際出願公開第WO00/30680号を参照のこと。

#### 【0117】

さらに、例えば、重鎖CDR3(HCDR3)は可変性の程度がより大きく、そして、

10

20

30

40

50

抗原抗体相互作用への関与が顕著である領域であるということがしばしば観察されているので、言及した抗体のいずれか1つの可変領域のCDR3領域、特に重鎖のCDR3を含有する、上述したような結合分子を含有するものが含まれるペプチドを本発明は包含する。組換え技術により、そのようなペプチドを容易に合成または作製して、本発明に従って有用な結合因子を作製することができる。そのような方法は当業者によく知られている。例えば、市販されている自動化ペプチド合成機を用いて、ペプチドを合成することができる。前記ペプチドを発現するDNAを発現ベクターに組み込み、そして、前記ペプチドを産生するその発現ベクターで細胞を形質転換することにより、前記ペプチドを組換え技術によって作製することもできる。

#### 【0118】

それ故に、本発明は、本発明のヒト抗タウ抗体に適合し、そして、言及された特性を示す、すなわち、タウを特異的に認識する任意の結合分子、例えば、抗体またはその結合断片に関連する。そのような抗体および結合分子は、本明細書に記載されるようなELISAおよびウェスタンブロットおよび免疫組織化学によりそれらの結合特異性と親和性について試験され得る。例えば、実施例を参照のこと。また、本発明に従って実行される以後の実験の予備的結果により、本発明のヒト抗タウ抗体、特に抗体NI-105.4E4が、アルツハイマー病(AD)に冒されている患者のヒト脳切片に存在する神経原線維濃縮体(NFT)、糸屑状構造物にさらに共通点がある病理的凝集型タウに主に結合することが明らかになった。したがって、本発明の特定の好ましい実施形態において、ヒト抗体、またはその結合断片、誘導体もしくは異型体はヒトADの脳の切片上でタウを認識する。さらに、ヒトタウP301Lを過剰発現する遺伝子導入マウスにおいて、病理的タウに差示的に結合する抗体NI-105.4E4の明確な能力がまた示され得るであろう。既に言及したNFTと糸屑状構造物に加えて、抗体NI-105.4E4はマウス脳切片上でジストロフィー性神経突起にも結合し、そして、プレタングルステージ(pre-tangle stage)のタウ凝集体を同定する。実施例4および図6を参照のこと。

#### 【0119】

不死化したB細胞またはメモリーB細胞の培養物から直接的に免疫グロブリンを得る代わりに、前記的不死化細胞を、その後の発現および/または遺伝子操作のために、再構成された重鎖および軽鎖の供給源として使用することができる。再構成された抗体遺伝子について、適切なmRNAから逆転写してcDNAを作製することができる。所望により、重鎖定常領域を異なるアイソタイプの重鎖定常領域と交換する、または、完全に除去することができる。単鎖Fv領域をコードするために可変領域を連結することができる。複数のFv領域を連結して1つよりも多い標的への結合能を付与することができ、または、キメラ重鎖軽鎖結合体を使用することができる。一旦、前記遺伝物質が利用可能になると、それら両方の所望の標的に結合する能力を保持する、上述したような類似体の設計は簡単である。抗体可変領域のクローン化と組換え抗体の作製の方法は当業者に知られており、そして、例えば、Gilliland et al., Tissue Antigen 47 (1996), 1-20、Doenecke et al., Leukemia 11 (1997), 1787-1792に記載されている。

#### 【0120】

一旦、適切な遺伝物質を得て、所望により、類似体をコードするように修飾すると、最小でも重鎖および軽鎖の可変領域をコードするものを含む、そのコード配列を、標準的な組換え宿主細胞に形質移入することができるベクターに含有される発現システムに挿入することができる。そのような様々な宿主細胞を使用することができる。しかしながら、哺乳類細胞が効率的な処理に向いていると考えられ得る。この目的に有用な典型的な哺乳類細胞株にはCHO細胞、HEK293細胞またはNSO細胞が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0121】

次に、前記宿主細胞の増殖と前記コード配列の発現に適切な培養条件下で、改変された組換え宿主を培養することにより、前記抗体または類似体の作製を行う。次に、前記培養

10

20

30

40

50

物から抗体を単離することによりそれらを回収する。前記発現システムはシグナルペプチドを含むように設計されており、結果生じる抗体が培地中に分泌される。しかしながら、細胞内生産もまた可能である。

【0122】

上記に従って、本発明はまた、本発明の抗体または同等の結合分子をコードするポリヌクレオチドに関連する。1つの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは上述の抗体の免疫グロブリン鎖の少なくとも可変領域をコードする。典型的には、前記ポリヌクレオチドによりコードされる前記可変領域は、前記抗体の可変領域である $V_H$ および/または $V_L$ の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含む。

【0123】

当業者は、所望の特異性と生物学的機能を有する他のポリペプチドまたは抗体の構築のために上述の可変ドメインを有する前記抗体の可変ドメインを使用することができることを容易に理解する。したがって、本発明はまた、上述の可変ドメインの少なくとも1つのCDRを含むポリペプチドおよび抗体を包含し、そして、それらは、添付されている実施例に記載されている抗体と実質的に同じ、または、同様の結合特性を有利なことに有する。当業者は、CDR内、またはKabatにより定義されたようなCDRと部分的に重複する超可変ループ(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol.

196 (1987), 901-917)内でアミノ酸置換を行うことにより結合親和性が増大し得ることを知っている。例えば、Riechmann, et al, Nature 332 (1988), 323-327を参照のこと。したがって、本発明はまた、言及されたCDRのうちの1つ以上が1つ以上の、または2つ以下のアミノ酸置換を含む抗体に関連する。1つの実施形態において、本発明の抗体は、その免疫グロブリン鎖の一方または両方に、図1に示されるような可変領域の2つ、または3つ全てのCDRを含む。

【0124】

本発明の結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体は、当業者に知られるように、1つ以上のエフェクター機能を仲介する定常領域を含むことができる。例えば、補体のC1成分の抗体定常領域への結合が補体系を活性化し得る。補体の活性化はオプソニン作用と細胞病原体の溶解に重要である。補体の活性化はまた炎症反応を刺激し、そしてまた、自己免疫過敏症に関与する可能性がある。また、抗体のFc領域にあるFc受容体結合部位が細胞上のFc受容体(FcR)に結合して、抗体がFc領域を介して様々な細胞の受容体に結合する。IgG(ガンマ受容体)、IgE(イプシロン受容体)、IgA(アルファ受容体)およびIgM(ミュー受容体)を含む様々なクラスの抗体に特異的な多数のFc受容体受容体が存在する。抗体の細胞表面上のFc受容体への結合が、抗体に覆われた粒子の貪食と分解、免疫複合体の除去、キラー細胞による抗体に覆われた標的細胞の溶解(抗体依存性細胞介在性細胞傷害、またはADCCと呼ばれる)、炎症メディエーターの放出、胎盤通過および免疫グロブリン生産の制御を含む多数の重要で多様な生物学的反応を引き起こす。

【0125】

したがって、本発明のある実施形態には、ほぼ同じ免疫原性を有する改変されていない抗体全体と比較するとき、低下したエフェクター機能、非共有結合により二量体化する能力、タウが凝集および沈着した部位に局在する上昇した能力、減少した血清中半減期、または増加した血清中半減期などの所望の生化学的性質をもたらすように、定常領域ドメインの1つ以上の少なくとも小断片を欠失、または、欠失でなければ、改変した抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体が含まれる。例えば、本明細書に記載される診断方法および治療方法で使用されるある抗体は、免疫グロブリン重鎖に類似のポリペプチド鎖を含むが、1つ以上の重鎖ドメインの少なくとも一部を欠くドメイン欠失抗体である。例えば、ある抗体では、修飾型抗体の定常領域の1つのドメイン全体を欠失する。例えば、CH2ドメインの全てまたは一部を欠失する。他の実施形態において、本明細書に記載される診断方法および治療方法で使用されるある抗体は、本明細書の他の箇所で脱グ

リコシル化抗体または「アグリ」抗体と称される、グリコシル化を除くように改変されている定常領域、例えば、IgG重鎖定常領域を有する。酵素的に、ならびに定常領域内のグリコシル化コンセンサス配列を操作することにより、そのような「アグリ」抗体を調製することができる。理論にとらわれるものではないが、「アグリ」抗体はインビボで改善された安全性および安定性プロファイルを有する可能性があると考えられている。所望のエフェクター機能を有する脱グリコシル化抗体の作製方法は、例えば、国際出願公開第WO2005/018572号に見出され、その全体が参照により組み込まれる。

#### 【0126】

本明細書に記載されるある抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体では、当技術分野において公知の技術を用いてFc部分に突然変異を形成し、エフェクター機能を減少させることができる。例えば、定常領域ドメインの（点突然変異または他の手段による）欠失または不活化が、循環する修飾型抗体のFc受容体結合を低下させることができ、それによって、タウへの局在性が増加する。他の場合では、本発明と矛盾しない定常領域の修飾が補体の結合を軽減し、したがって、血清中半減期と共役化細胞毒の非特異的結合を低下させることがあり得る。上昇した抗原特異性または抗体柔軟性が原因の局在の向上を可能とするジスルフィド結合またはオリゴサッカリド部分を修飾するために、定常領域のさらに他の修飾を用いることができる。その修飾の結果の生理学的プロファイル、生物学的利用能、および他の生化学効果、例えば、タウ局在性、生体内分布および血清中半減期を、周知の免疫学的技術を用いて、過度に実験を行うことなく、容易に測定および定量することができる。

#### 【0127】

本明細書に記載されるある抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体では、例として、Fc受容体、LRP、もしくはThy1受容体を介した抗体の受容体介在性飲食作用を増強させることにより、または、抗体が生きている細胞を損傷することなくそれらに輸送されることを可能とすると言われている「スーパー抗体技術」(Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241)により抗体の細胞内取込を増加させるために、Fc部分に突然変異を形成する、またはFc部分を別のタンパク質配列と交換することができる。例えば、前記抗体結合領域と細胞表面受容体の同種のタンパク質リガンドの融合タンパク質、またはタウと細胞表面受容体に同様に結合する特異的配列を有する二重特異性もしくは多重特異性抗体の生成が当技術分野において公知の技術を用いて操作され得る。

#### 【0128】

本明細書に記載されるある抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体では、血液脳関門透過性を上昇させるために、Fc部分に突然変異を形成する、またはFc部分を別のタンパク質配列と交換することができ、または化学的に前記抗体を修飾することができる。

#### 【0129】

当技術分野において公知の技術を用いて前駆体全体または親抗体から本発明の修飾型抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を作製することができる。本明細書においてより詳細に代表的な技術が考察される。当技術分野において公知の技術を用いて、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を作製または製造することができる。ある実施形態において、抗体分子またはその断片が「組換え技術によって作製」される、すなわち、組換えDNA技術を用いて作製される。本明細書の他の箇所でもより詳細に、抗体分子またはその断片を作製するための代表的な技術が考察される。

#### 【0130】

本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体はまた、例えば、前記抗体への任意の種類の分子の共有結合であって、前記抗体のその同じ性質のエピトープへの特異的な結合を妨げないような共有結合によって修飾されている誘導体を含む。例えば、限定するものではないが、前記抗体誘導体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解

による切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への結合などにより修飾された抗体を含む。特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝性合成などを含むが、これらに限定されない、多数の化学修飾のいずれかを公知の技術により実行することが可能である。さらに、前記誘導体は1個以上の非古典的アミノ酸を含有することができる。

#### 【0131】

特定の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体は、治療される動物、例えば、ヒトにおいて有害な免疫反応を誘発しない。ある実施形態において、本発明の結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は患者、例えばヒトの患者に由来し、そして、それらが由来する同じ種、例えば、ヒトにおいて使用され、有害な免疫反応の発生を軽減または最小化する。

10

#### 【0132】

抗体の免疫原性を低下させるために脱免疫化を用いることも可能である。本明細書において使用される場合、用語「脱免疫化」には、T細胞エピトープを修飾するための抗体の改変が含まれる。例えば、国際出願公開第WO98/52976号および第WO00/34317号を参照のこと。例えば、出発抗体のV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列が分析され、そして、各V領域に由来するヒトT細胞エピトープ「マップ」が配列内の相補性決定領域(CDR)と他の重要な残基との関係でエピトープの位置を示す。最終抗体の活性を変える危険性が低い代替的アミノ酸置換を特定するために、T細胞エピトープマップの個々のT細胞エピトープが分析される。アミノ酸置換の組合せを含む、様々な代替的V<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列が設計され、そして、これらの配列がその後様々な結合ポリペプチド、例えば、本明細書において開示される診断方法および治療方法において使用されるタウ特異的抗体またはその免疫特異的断片に組み込まれ、それらは次に機能試験を受ける。典型的には、12個と24個の間の異型抗体が生成され、試験される。次に、修飾型V領域およびヒトC領域を含む完全な重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子が発現ベクターにクローン化され、そして、それに引き続くプラスミドが抗体全体の生産のために細胞株に導入される。次に、適切な生化学的測定法および生物学的測定法で前記抗体を比較して、最適な異型体を特定する。

20

#### 【0133】

ハイブリドーマ技術、組換え技術、およびファージディスプレイ技術またはそれらの組合せの使用を含む、多種多様の、当技術分野において公知の技術を用いて、モノクローナル抗体を調製することができる。例えば、当技術分野において公知の、および、例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)、Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier, N.Y., 563-681 (1981)に教示されるものを含む、ハイブリドーマ技術を用いてモノクローナル抗体を作製することができる。前記参照文献は全体が参照により組み込まれる。用語「モノクローナル抗体」は、本明細書において使用される場合、ハイブリドーマ技術により作製される抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」は、任意の真核生物クローン、原核生物クローンまたはファージクローンを含む、単一クローンに由来する抗体を意味し、それが作製される方法を意味しない。したがって、用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術により作製される抗体に限定されない。ある実施形態において、本発明の抗体は、本明細書に記載されるように、エプスタイン・パール・ウイルスを用いる形質転換により不死化したヒトB細胞から得られる。

30

40

#### 【0134】

周知のハイブリドーマ工程 (Kohler et al., Nature 256 (1975), 495)では、哺乳類由来の比較的生存期間が短い、または致死性のリンパ球、例えば、ヒト対象に由来するB細胞が、本明細書に記載されるように、不死性

50



腫瘍細胞株（例えば、骨髄腫細胞株）と融合し、そうして、不死であり、且つ、B細胞の遺伝的にコードされた抗体を産生することが可能であるハイブリッド細胞、すなわち、「ハイブリドーマ」を作製する。その結果のハイブリッドは選別、希釈および再増殖により単一の遺伝的系統へと分離され、各々個々の系統が、単一の抗体を形成する特異的な遺伝子を含む。それらは、所望の抗原に対して均一である抗体を産生し、そして、その純粋な遺伝的系統に関して、「モノクローナル」と呼ばれる。

#### 【0135】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞は、未融合の親骨髄腫細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含有する適切な培地に蒔かれ、培養される。当業者は、ハイブリドーマの形成、選別および増殖のための試薬、細胞株および培地が多数の供給元から市販されており、そして、標準的なプロトコルがよく確立されていることを理解する。一般的に、所望の抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてハイブリドーマ細胞が増殖する培地を試験する。本明細書に記載されるような、免疫沈降、放射免疫アッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）などのインビトロ測定法により、ハイブリドーマ細胞が産生するモノクローナル抗体の結合特異性を決定する。所望の特異性、親和性および/または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後に、限界希釈法によりそのクローンをサブクローン化し、標準的な方法で培養することができる。例えば、Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp 59-103 (1986)を参照のこと。サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体が、例えば、プロテインA、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析または親和性クロマトグラフィーなどの従来の精製法により、培地、腹水または血清から分離されることがさらに理解される。

#### 【0136】

別の実施形態において、顕微操作によりリンパ球を選別し、そして、可変遺伝子を単離することができる。例えば、末梢血液単核細胞を免疫した哺乳類動物または自然免疫性哺乳類動物、例えば、ヒトから単離し、そして、インビトロで約7日間培養することができる。選別基準に合う特定のIgGについて前記培養物を選別することができる。陽性のウェルから細胞を単離することができる。個々の免疫グロブリン産生B細胞を、FACSにより、または補体介在溶血性ブラークアッセイでそれらを同定することにより単離することができる。顕微操作により免疫グロブリン産生B細胞をチューブに移すことができ、そして、 $V_H$  遺伝子および $V_L$  遺伝子を、例えば、RT-PCRを用いて増幅することができる。 $V_H$  遺伝子および $V_L$  遺伝子を抗体発現ベクターにクローン化し、そして、発現のために細胞（例えば、真核細胞または原核細胞）に形質移入することができる。

#### 【0137】

あるいは、当業者に周知の技術を用いて抗体産生細胞株を選択および培養することができる。様々な実験マニュアルおよび一次刊行物にそのような技術が記載されている。この点に関し、Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991)に以下に記載されるような、本発明での使用に適切な技術が記載されている。その全体が、補遺を含み、参照胃より本明細書に組み込まれる。

#### 【0138】

公知の技術により、特定のエピトープを認識する抗体断片を生成することができる。例えば、Fab断片および $F(ab')_2$ 断片を組換え技術により、または、(Fab断片を作製するために)パインまたは $F(ab')_2$ 断片を作製するために)ペプシンなどの酵素を用いる免疫グロブリン分子のタンパク質分解性切断により作製することができる。 $F(ab')_2$ 断片は可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のCH1ドメインを含有する。そのような断片は、例えば、免疫グロブリンの免疫特異的部分を放射性同位元素など

の検出試薬に結合させることを含む免疫診断的方法で使用するのに充分である。

【0139】

本明細書に記載されるようなヒト抗体はヒトの患者での治療上の使用に特に望ましい。本発明のヒト抗体を、例えば、その年齢のため、タウオパチー障害、例えば、アルツハイマー病になる危険性があると疑うことができる健康なヒト対象、または前記障害が持病であるが、著しく安定した疾患経過を有する患者から単離する。しかしながら、老齢で健康な対象および老齢で無症状の対象は、それぞれ、より若い対象よりも本式に保護性抗タウ抗体を生じているであろうと予測するのが賢明ではあるが、本発明のヒト抗体を得るための供給源として、後者も同様に使用することができる。このことは、家族型タウオパチー疾患になりやすいが、免疫系がより老齢の成人よりも有効に機能するので無症状なままである、より若い患者に特に当てはまる。

10

【0140】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、抗体分子の少なくとも1つの重鎖CDRまたは軽鎖CDRを含有する。別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも2つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも3つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも4つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも5つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも6つのCDRを含む。前記対象抗体に含まれ得る少なくとも1つのCDRを含む例示的抗体分子は本明細書に記載される。

20

【0141】

抗体を合成するための、当技術分野において公知の任意の方法により、特に、化学合成により、または本明細書に記載されるような組換え発現技術により本発明の抗体を作製することができる。

【0142】

1つの実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体は、1つ以上のドメインが部分的または全体的に欠失している合成定常領域を含む（「ドメイン欠失抗体」）。ある実施形態において、互換的修飾型抗体は、CH2ドメイン全体が除去されたドメイン欠失構成体または異型体（CH2構成体）を含む。他の実施形態において、欠失したドメインの代わりに短鎖連結ペプチドを置換して、可変領域に柔軟性と運動の自由をもたらすことができる。そのような構成体は、抗体の分解速度についてのCH2ドメインの調節特性のために、特に好ましいことを当業者は理解する。IgG<sub>1</sub>ヒト定常ドメインをコードするベクターを用いてドメイン欠失構成体を得ることができる。例えば、国際出願公開第WO02/060955号および第WO02/096948A2号を参照のこと。このベクターを操作してCH2ドメインを欠失し、そしてドメイン欠失IgG<sub>1</sub>定常領域を発現する合成ベクターを提供する。

30

【0143】

ある実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体はミニ抗体（minibody）である。当技術において説明される方法を用いてミニ抗体を作製することができる。例えば、米国特許第5,837,821号または国際出願公開第WO94/09817号を参照のこと。

40

【0144】

1つの実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体は、単量体サブユニット間の結合が可能である限り、2、3個の、または1個でもアミノ酸が欠失または置換した免疫グロブリン重鎖を含む。例えば、CH2ドメインの選択された領域内での1アミノ酸の突然変異が、Fc結合を実質的に低下させ、それによってタウ局在性を増加させるのに充分であり得る。同様に、調節されるエフェクター機能（例えば、補体結合）を制御する1つ以上の定常領域ドメインの一部を単に欠失することが望ましい可能性がある。定常領域のそのような部分的欠失が抗体の選択された特性（血清中

50

半減期)を改善し、一方、対象定常領域ドメインに付随する他の望ましい機能をそのままにしておくことができる。さらに、先に言及されたように、開示される抗体の定常領域は、結果生じる構成体のプロファイルを改善する1つ以上のアミノ酸の突然変異または置換により合成されたものであり得る。この点に関して、修飾型抗体の立体構造と免疫原性プロファイルを実質的に維持しつつ、保存された結合部位によりもたらされる活性(例えば、Fc結合)を破壊することが可能であり得る。さらに他の実施形態は、エフェクター機能などの所望の特性を増強するように、または、より多くの細胞毒もしくは炭水化物が結合するように、定常領域へ1つ以上のアミノ酸を付加することを含む。そのような実施形態において、選択された定常領域ドメインに由来する特定の配列を挿入または複製することが望ましい可能性がある。

10

#### 【0145】

本発明はまた、抗体またはその断片がタウに免疫特異的に結合する、本明細書に記載される抗体分子(例えば、 $V_H$ 領域および/または $V_L$ 領域)の(誘導体を含む)異型体を含む、そのような異型体から基本的になる、またはそのような異型体からなる抗体を提供する。抗体をコードするヌクレオチド配列に突然変異を導入するために、アミノ酸置換をもたらすことになる部位特異的突然変異形成およびPCR介在性突然変異形成を含むが、これらに限定されない、当業者に知られている標準的な技術を使用することができる。1つの実施形態において、(誘導体を含む)異型体が、基準 $V_H$ 領域、 $V_H$ -CDR1、 $V_H$ -CDR2、 $V_H$ -CDR3、 $V_L$ 領域、 $V_L$ -CDR1、 $V_L$ -CDR2または $V_L$ -CDR3に対して、50アミノ酸未満の置換、40アミノ酸未満の置換、30アミノ酸未満の置換、25アミノ酸未満の置換、20アミノ酸未満の置換、15アミノ酸未満の置換、10アミノ酸未満の置換、5アミノ酸未満の置換、4アミノ酸未満の置換、3アミノ酸未満の置換、または2アミノ酸未満の置換をコードする。「保存的アミノ酸置換」は、類似の電荷を有する側鎖を持つアミノ酸残基でアミノ酸残基を置換するアミノ酸置換である。類似の電荷を有する側鎖を持つアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、分岐側鎖を有するアミノ酸(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。あるいは、飽和突然変異誘発などにより、コード配列の全体または一部に無作為的に突然変異を導入することができ、そして、活性を保持する突然変異体を同定するために、結果生じた突然変異体を生物活性(例えば、タウ結合能)についてスクリーニングすることができる。

20

30

#### 【0146】

例えば、抗体分子のフレームワーク領域のみに、またはCDR領域のみに突然変異を導入することが可能である。導入された突然変異はサイレント突然変異または中立的ミスセンス突然変異である、例えば、抗体の抗原に結合する能力に全く、またはほとんど効果が無い可能性があり、実際にいくつかのそのような突然変異はアミノ酸配列を全く変えない。これらの種類の突然変異は、コドン使用頻度を最適化する、またはハイブリドーマの抗体産生を改善するために有用であり得る。本発明の抗体をコードするコドン最適化コード領域が本明細書の他の箇所で開示される。あるいは、非中立的ミスセンス突然変異が抗体の抗原に結合する能力を変える可能性がある。大半のサイレント突然変異および中立的ミスセンス突然変異の位置はフレームワーク領域内である可能性があり、一方、大半の非中立的ミスセンス突然変異の位置はCDR内である可能性があるが、これは絶対的な必要条件ではない。当業者は、抗原結合活性の無変化または結合活性の変化(例えば、抗原結合活性の改善または抗体特異性の変化)などの所望の特質を持つ突然変異体分子を設計および試験することができるであろう。突然変異形成の後に、本明細書に記載される技術を用

40

50

いて、または当技術分野において公知のルーチンの修正技術により、コードされるタンパク質をルーチ的に発現することができ、そして、コードされるタンパク質の機能的活性および/または生物活性（例えば、タウの少なくとも1つのエピトープに免疫特異的に結合する能力）を測定することができる。

【0147】

神経変性タウオパチーのインビボモデルまたはインビトロモデルを用いてタウ結合因子、例えば、これらに限定されないが、本発明のタウ結合抗体の特性解析を行うことができる。神経変性タウオパチーのマウスモデルで本発明のタウ結合因子（例えば、抗体）の特性解析を行うことができると当業者は容易に理解する。例えば、これに限定されないが、本発明のタウ抗体（およびその結合特異性を有する分子）の特性解析を行い、そして検証するために、タウオパチーの以下の3つの異なる動物モデルのいずれか1つを用いることができる。

10

【0148】

1. 遺伝子導入Tau P301Lマウス（系統183）：マウスThy1.2プロモーターの制御下で、P301L突然変異を有するヒトタウ40を発現する。（これらの遺伝子導入動物の作製は、Goetz et al., J. Biol. Chem. 276 (2001), 529-534および国際出願公開第WO2003/017918号に記載される。その開示の内容が参照により本明細書に組み込まれる。）

【0149】

2. マウスPrPプロモーターの制御下で、P301L突然変異を有する最短4Rヒトタウアイソフォームを発現するJNPL3マウス（米国、ニューヨーク州、ハドソンのTaconic社より入手可能）。

20

【0150】

3. マウスPrPプロモーターの制御下で、P301S突然変異を有するヒトタウを発現するP301STau（系統PS19）マウス（米国、メイン州、バー・ハーバーのJackson Laboratory社より入手可能）。

【0151】

神経変性タウオパチーの実験モデルを予防的環境で使用する、またはそれを治療的環境で使用する、またはそれを当業者は理解する。予防的環境では、神経変性タウオパチーまたはその症状の発症の前に動物への投与が始まる。予防的環境では、本発明のタウ結合因子（例えば、抗体）は、神経変性タウオパチーまたはその症状の発症を防ぐ、低減させる、または遅延させるその能力について評価される。治療的環境では、神経変性タウオパチーまたはその症状の発症の後に動物への投与が始まる。治療的環境では、本発明のタウ結合因子（例えば、抗体）は、神経変性タウオパチーまたはその症状と治療する、低減させる、または軽減するその能力について評価される。神経変性タウオパチーの症状には実験対象のニューロン、脳、脊髄、脳脊髄液または血清における病理的タウ沈着物、神経原線維濃縮体（NFT）、高リン酸化タウポリペプチド、不溶性タウ画分の蓄積が含まれるが、これらに限定されない。神経変性タウオパチーの任意の動物モデルでのポジティブな予防的結果または治療的結果が、その特定のタウ結合因子（例えば、抗体）を予防目的または治療目的のために実験モデル生物以外の対象で使用する、例えば、それを必要とするヒト対象で神経変性タウオパチーを治療するためにそれを使用することが可能であることを示していると当業者は理解する。

30

40

【0152】

1つの実施形態において、タウオパチーマウスモデルと対応する対照野生型マウスに本発明のタウ結合因子（例えば、抗体）を投与することができる。投与された抗体は本発明のマウス化抗体または本発明の抗体のヒト-マウスキメラであり得る。例えば、実施例6および7を参照のこと。当技術分野において公知の任意の手段、例えば、腹腔内投与、頭蓋内投与、筋肉内投与、静脈内投与、皮下投与、経口投与およびエアロゾル投与によりタウ結合因子（例えば、抗体）を投与することができる。実験動物に1、2、3、4、5もしくはそれ以上の用量のタウ結合因子（例えば、抗体）またはPBSなどの対照組成物を

50

与えることができる。1つの実施形態において、実験動物に1用量または2用量のタウ結合因子（例えば、抗体）を与える。例えば、実施例9を参照のこと。別の実施形態において、数週間または数か月にわたって、動物にタウ結合因子（例えば、抗体）を慢性的に投与する。例えば、実施例10を参照のこと。当業者は、実験目的に合う投与計画、例えば、急性試験用の投与計画、慢性試験用の投与計画、毒性試験用の投与計画、予防的試験用の投与計画または治療的試験用の投与計画を容易に設計することができる。当技術分野の周知の方法を用いて、実験動物の特定の組織区画、例えば、これらに限定されないが、血清、血液、脳脊髄液、脳組織におけるタウ結合因子（例えば、抗体）の存在を確認することができる。例えば、実施例9および10を参照のこと。1つの実施形態において、本発明のタウ結合因子（例えば、抗体）は血液脳関門を透過することが可能である。タウ結合因子（例えば、抗体）の用量と投与頻度を調節することにより実験動物において所望のタウ結合因子（例えば、抗体）の濃度を維持することができることを当業者は理解する。治療した動物および対照動物におけるタウのレベル、生化学的特性または分布を比較することにより、タウオパチーモデルにおける本発明のタウ結合因子（例えば、抗体）の効果を評価することができる。一例では、神経原線維濃縮体（NFT）中の病理的リン酸化タウを認識する、Gallyasの鍍銀染色技術を用いて、またはモノクローナルマウス抗体AT100およびAT180による免疫染色によりNFTを調査する。抗体で処理したマウスと対照動物の脳と脊髄におけるGallyas陽性ニューロンおよび/またはAT100、AT180標識ニューロンの数と頻度が抗体処理の効果を評価すると判断することができる。1つの実施形態において、本発明の抗体は動物モデルの脳または脊髄における神経原線維濃縮体のレベル、量または濃度を減少させることができる。前記抗体は神経原線維濃縮体のレベル、量または濃度を少なくとも約5%、10%、20%、30%、50%、70%、90%またはそれ以上減少させることができる。別の実施形態において、本発明の抗体は動物モデルの脳または脊髄におけるGallyas陽性ニューロンの数または頻度を、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、50%、70%、90%またはそれ以上減少させることができる。さらなる実施形態において、本発明の抗体は動物モデルの脳または脊髄におけるAT100抗体またはAT180抗体陽性ニューロンの数または頻度を、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、50%、70%、90%またはそれ以上減少させることができる。抗体投与後のタウの分布および生化学的性質を調査することにより、本発明の抗体の効果を評価することができる。1つの実施形態において、本発明の抗体は動物モデルの脳または脊髄におけるタウタンパク質の量または濃度を、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、50%、70%、90%またはそれ以上減少させることができる。別の実施形態において、本発明の抗体は動物モデルの脳または脊髄における不溶性タウタンパク質の量または濃度を、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、50%、70%、90%またはそれ以上減少させることができる。例えば、実施例10またはGoedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Neuron 8, 159 (1992)に記載されるように不溶性タウ画分を調製することができる。例えば、実施例10に記載されるような当業者に公知の任意の方法により生物試料中のタウタンパク質の量を測定することができる。さらなる実施形態において、本発明の抗体は動物モデルの脳または脊髄における高リン酸化タウタンパク質の量または濃度を、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、50%、70%、90%またはそれ以上減少させることができる。AT100またはAT180などの病理的高リン酸化型タウに特異的な抗体を用いて高リン酸化タウを検出することができる。本発明の抗体はまた、動物モデルの血液、血清または脳脊髄液におけるタウの濃度を、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、50%、70%、90%またはそれ以上変化、例えば、減少または増加させることができる。1つの実施形態において、%減少または%増加は、治療前に存在したレベル、数、頻度、量もしくは濃度、または未処理/対照処理対象に存在するレベル、数、頻度、量もしくは濃度に対して相関的である。

1つの実施形態において、本発明の抗体は対象における神経変性タウオパチーの少なくとも1つの症状の発症を予防する、または遅延させることができる。1つの実施形態において、本発明の抗体は対象における神経変性タウオパチーの少なくとも1つの症状を低減または除去することができる。前記症状は、対象の脳または脊髄における病理的タウ沈着物、高リン酸化タウ沈着物、不溶性タウ沈着物、神経原線維性線維、神経原線維性線維、プレタングル (pre-tangle) リン酸化タウ凝集体、ニューロン内神経原線維濃縮体またはニューロン外神経原線維濃縮体の形成であり得る。例えば、Augustinack et al, Acta Neuropathol 103:26-35 (2002)を参照のこと。前記症状はまた、血清、血液、尿または脳脊髄液中のタウの存在、または健康対象と比較した濃度もしくは量の上昇であり得る。前記症状は神経性の症状、例えば、条件味覚嫌悪の変化、恐怖条件付け文脈の変化、記憶障害、運動機能の喪失であり得る。1つの実施形態において、2試験性Y迷路試験を用いて記憶障害を評価する。特定の実施形態において、実質的に実施例10に記載されるように2試験性Y迷路試験を実行する。1つの実施形態において、少なくとも1つの症状が少なくとも約5%、10%、15%、20%、30%、50%、70%または90%減少する。別の実施形態において、2試験性Y迷路試験比率は対照対象よりも抗体処理対象において著しく高い。特定の実施形態において、2試験性Y迷路試験比率は少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%増加する。別の実施形態において、2試験性Y迷路試験比率は少なくとも約2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、または20倍高い。本発明はまた、治療上有効量の本明細書に記載されるタウ抗体を投与することを含む、それを必要とする対象の神経変性タウオパチーの少なくとも1つの症状の発症を予防する、または遅延させる方法を提供する。本発明は、治療上有効量の本明細書に記載されるタウ抗体を投与することを含む、それを必要とする対象の神経変性タウオパチーの最小の1つの症状を低減または除去する方法をさらに提供する。1つの実施形態において、前記対象は、これに限定されないが、遺伝子導入マウスなどの実験生物である。1つの実施形態において、前記対象はヒトである。

#### 【0154】

##### III. 抗体をコードするポリヌクレオチド

抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成されることができ、それは非修飾型RNAもしくはDNAまたは修飾型RNAもしくはDNAであり得る。例えば、抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNA、一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖RNAおよび二本鎖RNA、および一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖領域もしくは、より典型的には、二本鎖領域、または一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であり得るDNAとRNAを含むハイブリッド分子から構成され得る。さらに、抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAまたはRNAとDNAの両方を含む三重鎖領域から構成され得る。抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドはまた1つ以上の修飾型塩基、または安定性もしくは他の理由のために修飾されたDNA骨格もしくはRNA骨格を含有することができる。「修飾型」塩基には、例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどの非通常型塩基が含まれる。DNAおよびRNAに様々な修飾を行うことができる。したがって、「ポリヌクレオチド」は化学的、酵素的、または代謝的に修飾された形態を包含する。

#### 【0155】

免疫グロブリンに由来するポリペプチド（例えば、免疫グロブリン重鎖部分または軽鎖部分）の非天然型異型体をコードする単離されたポリヌクレオチドを、その免疫グロブリンのヌクレオチド配列に1つ以上のヌクレオチド置換、付加または欠失を導入することにより作製することができ、そのコードするタンパク質に1つ以上のアミノ酸置換、付加または欠失が導入される。部位特異低突然変異形成およびPCR介在性突然変異形成などの

標準的技術により突然変異を導入することができる。1つの実施形態において、1つ以上の非必須アミノ酸残基で保存的アミノ酸置換を行う。

【0156】

良く知られるように、グアニジンイソチオシアネート抽出および沈殿とそれに続く遠心分離またはクロマトグラフィーなどの標準的技術によりオリジナルのB細胞、ハイブリドーマ細胞から、または他の形質転換細胞からRNAを単離することができる。所望により、オリゴdTセルロースでのクロマトグラフィーなどの標準的技術により全RNAからmRNAを単離することができる。適切な技術は当技術分野においてよく知られている。1つの実施形態において、周知の方法に従って、逆転写酵素およびDNAポリメラーゼを用いて同時または別々のどちらかで抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAを作製することができる。コンセンサス定常領域プライマーにより、または公表されている重鎖DNAおよび軽鎖DNAおよびアミノ酸配列に基づくより特異的なプライマーによりPCRを開始することができる。先に考察したように、PCRはまた、抗体の軽鎖および重鎖をコードするDNAクローンを単離するために用いられ得る。この場合では、コンセンサスプライマーまたはヒト定常領域プローブなどのより大きい相同性プローブによりライブラリーをスクリーニングすることができる。

10

【0157】

DNA、典型的にはプラスミドDNAが、当技術分野において公知の技術を用いて細胞から単離され、例えば、組換えDNA技術に関する先述の参考文献に詳細が示される標準的な周知の技術に従って制限酵素地図が作製され、そして、シーケンス解析され得る。当然、単離工程とその後の分析の間のいかなる点でも、本発明によれば前記DNAは合成物であり得る。

20

【0158】

1つの実施形態において、本発明は、重鎖可変領域のCDRの少なくとも1つ、または重鎖可変領域のV<sub>H</sub>-CDRの少なくとも2つが、本明細書において開示される抗体の基準重鎖V<sub>H</sub>-CDR1アミノ酸配列、V<sub>H</sub>-CDR2アミノ酸配列またはV<sub>H</sub>-CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、約97%、98%または99%同一である免疫グロブリン重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)をコードする核酸を含む、そのような核酸から基本的になる、またはそのような核酸からなる単離されたポリヌクレオチドを提供する。あるいは、前記V<sub>H</sub>のV<sub>H</sub>-CDR1領域、V<sub>H</sub>-CDR2領域またはV<sub>H</sub>-CDR3領域は、本明細書において開示される抗体の基準重鎖V<sub>H</sub>-CDR1アミノ酸配列、V<sub>H</sub>-CDR2アミノ酸配列およびV<sub>H</sub>-CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、約97%、98%または99%同一である。したがって、この実施形態によれば、本発明の重鎖可変領域は、図1に示されるポリペプチド配列に関連するV<sub>H</sub>-CDR1ポリペプチド配列、V<sub>H</sub>-CDR2ポリペプチド配列またはV<sub>H</sub>-CDR3ポリペプチド配列を有する。1つの実施形態において、基準V<sub>H</sub>-CDR1のアミノ酸配列は配列番号23、29または35であり、基準V<sub>H</sub>-CDR2のアミノ酸配列は配列番号24、30または36であり、そして、基準V<sub>H</sub>-CDR3のアミノ酸配列は配列番号25、31または37である。

30

【0159】

1つの実施形態において、本発明は、図1に示されるV<sub>H</sub>-CDR1群、V<sub>H</sub>-CDR2群およびV<sub>H</sub>-CDR3群と、いずれか1つのV<sub>H</sub>-CDRにおける1、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸置換を例外として、同一であるポリペプチド配列を有するV<sub>H</sub>-CDR1領域、V<sub>H</sub>-CDR2領域およびV<sub>H</sub>-CDR3領域を含む免疫グロブリン重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)をコードする核酸を含む、そのような核酸から基本的になる、またはそのような核酸からなる単離されたポリヌクレオチドを提供する。ある実施形態において、前記アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。1つの実施形態において、V<sub>H</sub>-CDR1のアミノ酸配列は配列番号23、29または35であり、V<sub>H</sub>-CDR2のアミノ酸配列は配列番号24、30または36であり、そして、V<sub>H</sub>-CDR3のアミノ酸配列は配列番号25、31または37である。

40

50

## 【0160】

別の実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域の $V_L$ -CDRの少なくとも1つ、または軽鎖可変領域の $V_L$ -CDRの少なくとも2つが、本明細書において開示される抗体の基準軽鎖 $V_L$ -CDR1アミノ酸配列、 $V_L$ -CDR2アミノ酸配列または $V_L$ -CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、約97%、98%または99%同一である免疫グロブリン軽鎖可変領域( $V_L$ )をコードする核酸を含む、そのような核酸から基本的になる、またはそのような核酸からなる単離されたポリヌクレオチドを提供する。あるいは、前記 $V_L$ の $V_L$ -CDR1領域、 $V_L$ -CDR2領域または $V_L$ -CDR3領域は、本明細書において開示される抗体の基準軽鎖 $V_L$ -CDR1アミノ酸配列、 $V_L$ -CDR2アミノ酸配列および $V_L$ -CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、約97%、98%または99%同一である。したがって、この実施形態によれば、本発明の軽鎖可変領域は、図1に示されるポリペプチド配列に関連する $V_L$ -CDR1ポリペプチド配列、 $V_L$ -CDR2ポリペプチド配列または $V_L$ -CDR3ポリペプチド配列を有する。1つの実施形態において、基準 $V_L$ -CDR1のアミノ酸配列は配列番号26、32または38であり、基準 $V_L$ -CDR2のアミノ酸配列は配列番号27、33または39であり、そして、基準 $V_L$ -CDR3のアミノ酸配列は配列番号28、34または40である。

10

## 【0161】

別の実施形態において、本発明は、図1に示される $V_L$ -CDR1群、 $V_L$ -CDR2群および $V_L$ -CDR3群と、いずれか1つの $V_L$ -CDRにおける1、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸置換を例外として、同一であるポリペプチド配列を有する $V_L$ -CDR1領域、 $V_L$ -CDR2領域および $V_L$ -CDR3領域を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域( $V_L$ )をコードする核酸を含む、そのような核酸から基本的になる、またはそのような核酸からなる単離されたポリヌクレオチドを提供する。ある実施形態において、前記アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。1つの実施形態において、 $V_L$ -CDR1のアミノ酸配列は配列番号26、32または38であり、 $V_L$ -CDR2のアミノ酸配列は配列番号27、33または39であり、そして、 $V_L$ -CDR3のアミノ酸配列は配列番号28、34または40である。

20

## 【0162】

別の実施形態において、本発明は、図1に示される $V_H$ -CDR群、 $V_H$ -CDR2群および $V_H$ -CDR3群と同一であるポリペプチド配列を有する $V_H$ -CDR1領域、 $V_H$ -CDR2領域および $V_H$ -CDR3領域を含む免疫グロブリン重鎖可変領域( $V_H$ )をコードする核酸を含む、そのような核酸から基本的になる、またはそのような核酸からなる単離されたポリヌクレオチドを提供する。1つの実施形態において、 $V_H$ -CDR1のアミノ酸配列は配列番号23、29または35であり、 $V_H$ -CDR2のアミノ酸配列は配列番号24、30または36であり、そして、 $V_H$ -CDR3のアミノ酸配列は配列番号25、31または37である。

30

## 【0163】

別の実施形態において、本発明は、図1に示される $V_L$ -CDR1群、 $V_L$ -CDR2群および $V_L$ -CDR3群と同一であるポリペプチド配列を有する $V_L$ -CDR1領域、 $V_L$ -CDR2領域および $V_L$ -CDR3領域を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域( $V_L$ )をコードする核酸を含む、そのような核酸から基本的になる、またはそのような核酸からなる単離されたポリヌクレオチドを提供する。1つの実施形態において、 $V_L$ -CDR1のアミノ酸配列は配列番号26、32または38であり、 $V_L$ -CDR2のアミノ酸配列は配列番号27、33または39であり、そして、 $V_L$ -CDR3のアミノ酸配列は配列番号28、34または40である。

40

## 【0164】

当技術分野において知られるように、1つのポリペプチドまたはポリヌクレオチドのアミノ酸配列または核酸配列を2つ目のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの配列と比較することにより2つのポリペプチド間または2つのポリヌクレオチド間の「配列同一性」

50



を決定する。本明細書において考察されるとき、任意の特定のポリペプチドが別のポリペプチドに対して少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%同一であるか、これに限定されないが、BESTFITプログラム（ウィスコンシン配列解析パッケージ、Unix（登録商標）用第8版、ジェネティクス・コンピュータ・グループ、ユニバーシティー・リサーチ・パーク、575 サイエンス・ドライブ、マジソン、ウィスコンシン州 53711）などの当技術分野において公知の方法およびコンピュータプログラムを用いて決定することができる。BESTFITは、2つの配列間の最も良い相同性区間を見つけ出すためにスミスおよびウォーターマンの局所的相同性アルゴリズム（Advances in Applied Mathematics 2（1981），482-489）を使用する。特定の配列が本発明に従う基準配列に対して、例えば、95%同一であるか決定するためにBESTFITまたは他の任意の配列整列プログラムを使用するとき、同一性のパーセンテージが基準ポリペプチド配列の全長にわたって計算され、そして、基準配列の総アミノ酸数の5%までの相同性のギャップが許容されるように、パラメータが当然設定される。

10

#### 【0165】

本発明の1つの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、表2に示されるような抗タウ抗体のV<sub>H</sub>領域またはV<sub>L</sub>領域のポリヌクレオチド配列を有する核酸を含む、そのような核酸から基本的になる、またはそのような核酸からなる。この点に関して、少なくとも軽鎖および/または重鎖の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドは両方の免疫グロブリン鎖または一方のみの可変ドメインをコードする可能性があることを当業者は容易に理解する。本発明は、配列番号93のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、またはそのようなヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドをさらに提供する。

20

## 【表 2 - 1】

## 【表2】

表2: タウ特異的抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域の核酸配列

| 抗体                                   | 可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)の核酸配列  |    |
|--------------------------------------|---|----|
| NI-105.4E4 -V <sub>H</sub><br>配列番号8  | GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGG<br>GGATCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGTTCAATTTCAACA<br>TCTCTGCTATACACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGG<br>AGTGGGTTGGCCGAATAAGAAGTAAATCTCACAATTACGCGACTTT<br>ATATGCTGCGTCCCTGAAAGGCCGGTTCACCCCTCTCCAGAGATGAT<br>TCAAGGAACACGGCGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGCAAACCGAG<br>GATATGGCCGTCTATTACTGTACTGTTCTGAGTGCGAATTACGACA<br>CCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG | 10 |
| NI-105.4E4 -V <sub>L</sub><br>配列番号10 | TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGA<br>CAGACGGCCAGGATCTCCTGCTTTGGAGATACATTGCCAAAGCAAT<br>ATACTTATTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCCCTGTGTTAGT<br>GATTTATAAAGACACTGAGAGGCCCTCAGGGATCCCCGAGCGATTG<br>TCTGGCTCCAGCTCAGGGACAACAGTCACCTTGACCATCAGTGGA<br>GTCCAGGCAGAAGACGAGGCTGACTATTACTGTCTATCAGCTGACA<br>ACAGTGCTACTTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGACCGTCC<br>TA   | 20 |
| NI-105.24B2-V <sub>H</sub><br>配列番号12 | CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG<br>GCCTCGGTGAAGGTTTCCTGTAAGGCATCTGGATACACCTTCGTCA<br>ATTACATTATACACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGA<br>GTGGATGGGAATCATCAATCCTAATGGCGGAAACACAAGTTATGCA<br>GAGAAATTCCAGGCCCGAGTCACCTTGACCAGCGACACGTCTACG<br>AGTACGGTGTACATGGACCTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACACG<br>GCCGTCTATTACTGTGCCGTCTTTCCCTTCGAATCCCTGGGGCC<br>AGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG                        | 30 |
| NI-105.24B2-V <sub>L</sub><br>配列番号14 | TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGA<br>CAGACGGCCGGGATCACCTGCTCTGGAGATGCTTTGCCAAAGCAA  | 40 |

【表 2 - 2】

|                                     |  |    |
|-------------------------------------|--|----|
|                                     | TTTGTTTATTGGTACCAGAAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGTTAT<br>TGATATATAAAGACACTGAGAGGCCCTCACGAATCCCTGAGCGCTT<br>CTCTGGCTCCACCTCAGGGACAACAGTCGCGTTGACCATCAATGG<br>GGTCCAGGCAGAGGACGAGGCTGACTATTACTGTCAATCAGCCGA<br>CCGCAGTGGTGCTCTTTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC<br>CGTCCTA   | 10 |
| NI-105.4A3-V <sub>H</sub><br>配列番号16 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGCGGTCCAGCCTGGG<br>GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTG<br>ACTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGC<br>AGTGGGTGGCAGTTATATCGTATGAGGGAACCTATAAATACTATGC<br>AGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAA<br>GAACACGCTGAACTTGCAGATGAGCAGCCTGAGAGTTGAAGACAC<br>GGCTGTGTATTTCTGTGTGAAAGCTCGAGCCTTTGCCTCCGGACAG<br>CGAAGCACCTCCACCGTACCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG<br>GTCACCGTCTCCTCG | 20 |
| NI-105.4A3-V <sub>L</sub><br>配列番号18 | TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGA<br>CAAACGGCCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCATTGCCAAAAAAT<br>ATGCTTATTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCCAGGCCCTGTGTTGGT<br>CATCTATGAGGACAACAAACGACCCTCCGGGATCCCTGAGAGATT<br>CTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAGTGGCCACCTTGACTATCAGTGG<br>GGCCAGGTGGACGATGAAGCTGACTACTACTGCTACTCGACAGA<br>CATCAGTGGTGACCTTCGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC<br>CGTCCTC   | 30 |

## 【0166】

1つの実施形態において、本発明は、基準重鎖V<sub>H</sub>と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、約97%、98%または99%または95%同一である免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする核酸を含む、そのような核酸から基本的になる、またはそのような核酸からなる単離されたポリヌクレオチドを提供する。1つの実施形態において、基準重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号9、13、17または93である。

## 【0167】

1つの実施形態において、本発明は、基準軽鎖V<sub>L</sub>と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、約97%、98%または99%または95%同一である免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする核酸を含む、そのような核酸から基本的になる、またはそのような核酸からなる単離されたポリヌクレオチドを提供する。1つの実施形態において、基準軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号11、15または19である。

## 【0168】

10

20

30

40

50

本発明はまた、他の箇所で記載されるような、本発明のポリヌクレオチドの断片を含む。さらに、本明細書に記載されるような融合ポリヌクレオチド、F a b断片および他の誘導体をコードするポリヌクレオチドもまた本発明によって考慮される

#### 【0169】

当技術分野において公知の任意の方法によって前記ポリヌクレオチドを作製または製造することができる。例えば、前記抗体のヌクレオチド配列が公知である場合、例えば、K ut m e i e r e t a l . , B i o T e c h n i q u e s 17 (1994) , 242に記載されるように、その抗体をコードするポリヌクレオチドを化学合成したオリゴヌクレオチドから組み立てることができ、それは、簡単に述べると、前記抗体をコードする配列の一部を含有する重複するオリゴヌクレオチドの合成とそれらのオリゴヌクレオチドのアニールングおよびライゲーション、ならびにその次の連結されたオリゴヌクレオチドのP C Rによる増幅を含む。

#### 【0170】

あるいは、適切な供給源に由来する核酸から抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドを生成することができる。特定の抗体をコードする核酸を含有するクローンが利用可能ではないが、その抗体分子の配列が知られている場合、前記抗体をコードする核酸を化学合成することができ、または、前記配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズする合成プライマーを用いるP C R増幅により、もしくは、例えば、c D N Aライブラリーから前記抗体をコードするc D N Aクローンを同定するために、特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いてクローン化することにより適切な供給源（例えば、抗体c D N Aライブラリー、または抗体を発現する選択されたハイブリドーマ細胞などのタウ特異的抗体を発現する任意の組織または細胞から単離された核酸、好ましくはポリA<sup>+</sup>RNAから作製されたc D N Aライブラリー）から前記抗体をコードする核酸を得ることができる。次に、当技術分野において周知の任意の方法を用いて、P C Rにより生成された増幅核酸を複製可能なクローニングベクターにクローン化することができる。

#### 【0171】

一旦、前記抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製するために、例えば、アミノ酸置換、欠失および/または挿入を生成するために、ヌクレオチド配列を操作するための当技術分野において周知の方法、例えば、組換えDNA技術、部位特異的突然変異形成、P C Rなどを用いてそのヌクレオチド配列を操作することができる（例えば、S a m b r o o k e t a l . , M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l , 2 d E d . , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . (1990) および A u s u b e l e t a l . , e d s . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s , N Y (1998)に記載される技術を参照のこと。それらは両方の全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

#### 【0172】

##### I V . 抗体ポリペプチドの発現

本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体をもたらし単離された遺伝物質の操作に続いて、前記抗体をコードするポリヌクレオチドを、典型的には、所望の量の抗体を産生するために使用することができる宿主細胞への導入用の発現ベクターに挿入する。抗体またはその断片、誘導体もしくは類似体、例えば、標的分子に結合する抗体の重鎖または軽鎖の組換え発現が本明細書に記載される。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、または（好ましくは重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインを含有する）それらの部分をコードするポリヌクレオチドが得られると、当技術分野において周知の技術を用いる組換えDNA技術により前記抗体分子の産生用のベクターを作製することができる。したがって、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌ

クレオチドを発現することによるタンパク質を調製するための方法が本明細書に記載される。抗体をコードする配列と適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築するために、当業者に周知の方法を用いることができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術およびインビボ遺伝的組換えが含まれる。したがって、本発明は、プロモーターに機能するように結合した、本発明の抗体分子、またはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖可変ドメインもしくは軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。そのようなベクターは、前記抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むことが可能であり（例えば、国際出願公開第WO 86 / 05807号および第WO 89 / 01036号、ならびに米国特許第5,122,464号を参照のこと）、そして、重鎖または軽鎖の全体を発現するために前記抗体の可変ドメインをそのようなベクターにクローン化することができる。

10

#### 【0173】

用語「ベクター」または「発現ベクター」は、宿主細胞に所望の遺伝子を導入し、そしてそれを発現させるための媒体として、本発明に従って使用されるベクターを意味するために本明細書において使用される。当業者に知られるように、そのようなベクターをプラスミド、ファージ、ウイルスおよびレトロウイルスからなる群より容易に選択することができる。一般に、本発明と適合するベクターは選択マーカー、所望の遺伝子のクローニングを容易にする適切な制限酵素部位、ならびに真核細胞もしくは原核細胞に侵入および／またはそれらの中で複製する能力を含む。本発明の目的のために、多数の発現ベクターシステムを使用することができる。例えば、1つのクラスのベクターは、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（RSV、MMTVまたはMOMLV）またはSV40ウイルスなどの動物ウイルスに由来するDNAエレメントを活用する。他のベクターは、内部リボソーム結合部位を用いるポリシストロン性システムの使用を含む。さらに、形質移入宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することにより、DNAをその染色体に組み込んだ細胞を選択することができる。前記マーカーは栄養要求性宿主に原栄養性を、殺生物剤（例えば、抗生物質）耐性または銅などの重金属に対する耐性を付与することができる。選択マーカー遺伝子は、発現されるDNA配列に直接連結されるか、または、共形質転換により同じ細胞に導入されるかのどちらかであり得る。最適のmRNA合成のためにその他のエレメントも必要とされ得る。これらのエレメントには、シグナル配列、スプライシングシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサーおよびターミネーションシグナルが含まれ得る。

20

30

#### 【0174】

特定の実施形態において、先に考察したように、クローンした可変領域遺伝子が重鎖定常領域遺伝子および軽鎖定常領域遺伝子（例えば、ヒト重鎖定常領域遺伝子および軽鎖定常領域遺伝子）と共に発現ベクターに挿入される。1つの実施形態において、米国特許第6,159,730号に開示されるNEOSPLAという名称の、Biogen IDEC, Inc. 社の特許権がある発現ベクターを用いてこれがもたらされる。このベクターはサイトメガロウイルスプロモーター／エンハンサー、マウス グロビンメジャープロモーター、SV40の複製起点、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ネオマイシン・ホスフォトランスフェラーゼのエクソン1およびエクソン2、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子およびリーダー配列を含有する。このベクターは、可変領域遺伝子と定常領域遺伝子の組み込み、CHO細胞への形質移入とそれに続くG418含有培地での選別とメトトレキサート増幅により、非常に高レベルで抗体を発現することが分かった。当然、真核細胞での発現を誘発することが可能である任意の発現ベクターを本発明において使用することができる。適切なベクターの例にはプラスミドpcDNA3、pHCMV / Zeo、pCR3.1、pEF1 / His、pIND / GS、pRc / HCMV2、pSV40 / Zeo2、pTRACER - HCMV、pUB6 / V5 - His、pVAX1およびpZeoSV2（カリフォルニア州、サンディエゴのInvitrogen社から入手可能）およ

40

50

びプラスミド p C I ( ウィスコンシン州、マジソンの P r o m e g a 社から入手可能 ) が含まれるが、これらに限定されない。一般に、適切にも高レベルの免疫グロブリン重鎖および軽鎖を発現する細胞について大多数の形質転換細胞をスクリーニングすることは、例えば、ロボットシステムによって実行可能であるルーチ的な実験である。ベクターシステムはまた、米国特許第 5 , 7 3 6 , 1 3 7 号および第 5 , 6 5 8 , 5 7 0 号において教示され、それらの各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる。このシステムは高い発現レベル、例えば、 $> 30 \text{ pg} / \text{細胞} / \text{日}$  をもたらす。他の例示的なベクターシステムは、例えば、米国特許第 6 , 4 1 3 , 7 7 7 号に開示される。

#### 【 0 1 7 5 】

他の実施形態において、米国特許出願公開第 2 0 0 3 - 0 1 5 7 6 4 1 A 1 号に開示され、その全体が本明細書に組み込まれるものなどのポリシストロン性コンストラクトを用いて本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を発現させることができる。これらの発現システムでは、単一のポリシストロン性コンストラクトから、抗体の重鎖および軽鎖などの目的の複数の遺伝子産物を産生することができる。これらのシステムは、有利なことに、比較的高いレベルの抗体を供給するために配列内リボソーム進入部位 ( I R E S ) を使用する。適合性の I R E S 配列は米国特許第 6 , 1 9 3 , 9 8 0 号に開示され、それもまた本明細書に組み込まれる。本願に開示される最大限の抗体を効果的に産生するためにそのような発現システムを用いることができると当業者は理解する。

#### 【 0 1 7 6 】

より一般的には、一旦、抗体の単量体サブユニットをコードするベクターまたは D N A 配列が調製されると、適切な宿主細胞にその発現ベクターが導入され得る。当業者に周知の様々な技術により宿主細胞へのプラスミドの導入を達成することができる。これらには、例えば、F u G e n e ( 登録商標 ) またはリポフェクタミンを用いるリポトランスフェクション、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、被覆 D N A を用いる細胞融合、マイクロインジェクション、およびウイルス完全体を用いる感染を含む形質移入が含まれるが、これらに限定されない。典型的には、宿主へのプラスミド導入は標準的なリン酸カルシウム共沈殿法によるものである。発現コンストラクトを保持する宿主細胞は軽鎖および重鎖の産生に適切な条件下で培養され、そして、重鎖タンパク質合成および / または軽鎖タンパク質合成についてアッセイされる。例示的なアッセイ技術には、酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) 、放射免疫アッセイ ( R I A ) 、または蛍光活性化セルソーター分析 ( F A C S ) 、免疫組織化学などが含まれる。

#### 【 0 1 7 7 】

従来の技術により宿主細胞に発現ベクターを導入し、そして、次に従来の技術によりその形質移入細胞を培養して、本明細書に記載される方法において使用される抗体を産生する。したがって、本発明は、異種性プロモーターに機能するように結合した本発明の抗体またはその重鎖もしくは軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を含む。二本鎖抗体の発現についての特定の実施形態において、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のために重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターを宿主細胞中で共発現させることができる。

#### 【 0 1 7 8 】

本発明の 2 つの発現ベクター、つまり、重鎖由来のポリペプチドをコードする第 1 ベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第 2 ベクターで宿主細胞を共形質移入することができる。その 2 つのベクターは、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの等発現を可能にする同一の選択マーカーを含有することができる。あるいは、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一のベクターを使用することができる。そのような状況では、有害な遊離重鎖が過剰であることを避けるために、軽鎖を重鎖の前に配置することが有利である。P r o u d f o o t , N a t u r e 3 2 2 ( 1 9 8 6 ) , 5 2 ; K o h l e r , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 7 ( 1 9 8 0 ) , 2 1 9 7 を参照のこと。重鎖および軽鎖のコード配列は

cDNAまたはゲノムDNAを含むことができる。

【0179】

本明細書において使用される場合、「宿主細胞」は、組換えDNA技術を用いて構築され、そして、少なくとも1つの異種性遺伝子をコードするベクターを保持する細胞を意味する。組換え宿主からの抗体の単離工程の説明では、用語「細胞」および「細胞培養物」は、別途、明確に特定されない限り、抗体の供給源を示すために互換的に使用される。言い換えると、「細胞」からのポリペプチドの回収は、遠心沈殿した細胞全体からの回収、または、培地と懸濁細胞の両方を含む細胞培養物からの回収のどちらかを意味することができる。

【0180】

本明細書に記載される方法において使用される抗体分子を発現するために、様々な宿主-発現ベクターシステムを活用することができる。そのような宿主-発現システムは、目的のコード配列が精製される前にそれを産生する媒体を表すが、しかしまた、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換または形質移入されると、インサイチュで本発明の抗体分子を発現することができる細胞をも表す。これらには、抗体をコードする配列を含有する組換えバクテリオファージDNA発現ベクター、プラスミドDNA発現ベクターまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換される細菌などの微生物（例えば、大腸菌、枯草菌）；抗体をコードする配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換される酵母（例えば、サッカロマイセス属（*Saccharomyces*）、ピチア属（*Pichia*））；抗体をコードする配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）で感染される昆虫細胞システム；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）で感染される、または組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換される植物細胞システム；または細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）もしくは哺乳類ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組換え発現コンストラクトを保持する哺乳類細胞システム（例えば、COS細胞、CHO細胞、NSO細胞、BLK細胞、293細胞、3T3細胞）が含まれるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、大腸菌などの細菌細胞、およびより好ましくは特に組換え抗体分子全体の発現のために真核細胞を、組換え抗体分子の発現のために使用する。例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの哺乳類細胞は、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーターエレメント（major intermediate early gene promoter element）などのベクターと共に、抗体にとって有効な発現システムである。例えば、Foecking et al., Gene 45 (1986), 101; Cockett et al., Bio/Technology 8 (1990), 2を参照のこと。

【0181】

タンパク質発現に使用される宿主細胞系列は、多くの場合、哺乳類起源である。当業者は、所望の遺伝子産物が中で発現するのに最も適した特定の宿主細胞系列を決定する能力を持っていると信じられている。例示的な宿主細胞系列にはCHO（チャイニーズハムスター卵巣）、DG44およびDUXB11（チャイニーズハムスター卵巣系列、DHFRマイナス）、HELA（ヒト子宮頸部癌）、CVI（サル腎臓系列）、COS（SV40T抗原を用いるCVIの誘導体）、VERY、BHK（ベビーハムスター腎臓）、MDC K、WI38、R1610（チャイニーズハムスター線維芽細胞）BALBC/3T3（マウス線維芽細胞）、HAK（ハムスター腎臓系列）、SP2/O（マウス骨髄腫）、P3x63-Ag3.653（マウス骨髄腫）、BFA-1c1BPT（ウシ内皮細胞）、RAJI（ヒトリンパ球）および293（ヒト腎臓）が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、宿主細胞系列はCHO細胞または293細胞である。宿主細胞株は、典型的には、商用サービス、米国培養細胞系統保存機関から、または公開され

10

20

30

40

50

た文献により入手可能である。

#### 【0182】

さらに、所望の特定の様式で挿入配列の発現を調節し、または、遺伝子産物を修飾およびプロセッシングする宿主細胞株を選ぶことができる。タンパク質産物のそのような修飾（例えば、グリコシル化）とプロセッシング（例えば、切断）はそのタンパク質の機能にとって重要であり得る。様々な宿主細胞が、タンパク質と遺伝子産物の翻訳後プロセッシングと修飾に特徴的で、特異的な機構を持っている。発現される外来タンパク質の正しい修飾とプロセッシングを確実にするために、適切な細胞株または宿主システムを選ぶことができる。この目的のため、一次転写物の適切なプロセッシング、グリコシル化、および遺伝子産物のリン酸化のための細胞装置を所有する真核宿主細胞を使用することができる。

10

#### 【0183】

長期にわたる高収量の組換えタンパク質の産生のために、安定的な発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定的に発現する細胞株を操作して作製することができる。ウイルス性複製起点を含有する発現ベクターを使用するよりはむしろ、適切な発現制御配列（例えば、プロモーター配列、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）で制御されるDNAおよび選択マーカーを用いて宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAの導入の後に、操作した細胞を1～2日間富化培地中で増殖させておくことができ、次に、選択培地に切り替える。組換えプラスミド中の選択マーカーが選択に対する耐性を付与し、そして、細胞がその染色体にプラスミドを組み込むこと、および、後にクローン化し、そして、細胞株に発展することができる増殖巣を形成することを可能とする。有利なことに、抗体分子を安定的に発現する細胞株を操作して作製するためにこの方法を使用することができる。

20

#### 【0184】

tk<sup>-</sup>細胞、hgp<sup>+</sup>rt<sup>-</sup>細胞またはap<sup>+</sup>rt<sup>-</sup>細胞でそれぞれ使用することができる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子(Wigler et al., Cell 11 (1977), 223)、ヒポキサンチン-グアニンホスフォリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202)およびアデニンホスフォリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(Lowy et al., Cell 22 (1980), 817)を含むが、これらに限定されない多くの選択システムを使用することができる。また、次の遺伝子について選択の原理として抗代謝物耐性を用いることができる：メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357、O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527)；ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072)；アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与するneo (Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12 (1993), 488-505、Wu and Wu, Biotherapy 3 (1991), 87-95、Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 (1993), 573-596、Mulligan, Science 260 (1993), 926-932、および Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 (1993), 191-217；TIB TECH 11 (1993), 155-215)；およびハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygro (Santerre et al., Gene 30 (1984), 147)。使用することができる、組換えDNA技術の技術分野で通常知られている方法はAusubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley

30

40

50



y & Sons, NY (1993)、Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); ならびに Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994) の第12章および第13章、Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981) に記載される。それらは全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0185】

ベクター増幅により抗体分子の発現レベルを増大させることができる。レビューには、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987) を参照のこと。抗体を発現するベクターシステム内のマーカーが増幅可能であるとき、宿主細胞の培養物に存在する阻害剤のレベルの上昇によって、マーカー遺伝子のコピー数が増加する。前記増幅領域は抗体遺伝子と結合しているので、抗体の産生もまた増大する。Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257を参照のこと。

#### 【0186】

大量の所望のポリペプチドをもたらすスケールアップがインビトロ生産により可能になる。組織培養条件下での哺乳類細胞培養の技術は当技術分野において公知であり、そして、それには、例えば、エアリフト反応器もしくは連続攪拌反応器における均一懸濁培養、または例えば、中空糸中、マイクロカプセル中、アガロースマイクロビーズもしくはセラミックカートリッジ上での固定化細胞培養もしくは封入細胞培養が含まれる。必要に応じて、および/または所望により、例えば、合成ヒンジ領域ポリペプチドの優先的な生合成の後に、または本明細書に記載されるHICクロマトグラフィー工程の前もしくは後に、通常のクロマトグラフィー方法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAEセルロース上のクロマトグラフィー、または(免疫)親和性クロマトグラフィーにより、ポリペプチド溶液を精製することができる。

#### 【0187】

本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体をコードする遺伝子はまた、細菌または昆虫または酵母または植物の細胞などの非哺乳類細胞で発現させることができる。核酸を容易に取り込む細菌には、大腸菌またはサルモネラ属(*Salmonella*)の細胞株などのエンテロバクター科; 枯草菌(*Bacillus subtilis*)などのバシラス科; ニューモコッカス属(*Pneumococcus*); ストレプトコッカス属(*Streptococcus*)のメンバーおよびヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)が含まれる。細菌内で発現すると、異種性ポリペプチドは典型的には封入体の一部になることがさらに理解される。異種性ポリペプチドは単離され、精製され、それから、機能性の分子に組み立てられなければならない。四価形態の抗体が望ましい場合、その時にはサブユニットが四価抗体に自己組織化する。例えば、国際出願公開第WO 02/096948号を参照のこと。

#### 【0188】

細菌システムでは、有利なことに、発現する抗体に意図されている使用法に応じて多数の発現ベクターを選択することができる。例えば、抗体分子からなる医薬組成物の作製のために大量のそのようなタンパク質を生産する予定であるとき、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を制御するベクターが望ましい可能性がある。そのようなベクターには、抗体コード配列が個々にlacZコード領域とインフレームでベクターに連結されることができ、それによって融合タンパク質が産生される大腸菌発現ベクターpUR278(Ruther et al., EMBO J. 2 (1983), 1

10

20

30

40

50

791) ; pINベクター (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509) などが含まれるが、これらに限定されない。外来ポリペプチドをグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させるために pGEXベクターもまた使用することができる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、そして、溶解した細胞からグルタチオンアガロースビーズマトリックスへの吸着および結合と引き続く遊離グルタチオンの存在下での溶出により容易に精製され得る。pGEXベクターはトロンピン切断部位または第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計されており、クローン化した標的遺伝子産物をGST部分から解離することができる。

10

#### 【0189】

原核生物に加えて、真核微生物もまた使用することができる。多数のその他の株、例えば、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) が一般的に利用可能であるが、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、すなわち一般的なパン酵母が真核微生物の中で最も一般的に使用される。サッカロマイセス属 (*Saccharomyces*) での発現には、例えば、プラスミド YRp7 (Stinchcomb et al., Nature 282 (1979), 39; Kingsman et al., Gene 7 (1979), 141; Tschemper et al., Gene 10 (1980), 157) が一般的に使用される。このプラスミドは、トリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母の突然変異株、例えば、ATCC番号44076またはPEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12) 用の選択マーカーを提供するTRP1遺伝子を既に含有する。前記酵母宿主細胞ゲノムの特性としてのtrp1損傷の存在が、次にトリプトファンの非存在下での増殖によって形質転換を検出するための有効な環境をもたらす。

20

#### 【0190】

昆虫システムでは、オートグラファ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) が、典型的には、外来遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。前記ウイルスはヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞で増殖する。抗体コード配列を前記ウイルスの非必須領域 (例えば、ポリヘドリン遺伝子) に個々にクローン化し、そして、AcNPVプロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の制御下に置くことができる。

30

#### 【0191】

一旦、本発明の抗体分子が組換え技術により発現すると、例えば、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、特にプロテインA後の特定の抗原に対する親和性クロマトグラフィー、およびサイズ排除カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、硫酸アンモニウム沈殿などの差示的溶解性による、またはタンパク質精製の他の任意の標準的な技術による方法を含む、当技術分野の標準的な方法に従って、本発明の抗体全体、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を精製することができる。例えば、Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982) を参照のこと。あるいは、本発明の抗体の親和性を上昇させる別の方法が米国特許出願公開第2002-0123057 A1号に開示される。

40

#### 【0192】

##### V. 融合タンパク質および複合体

ある実施形態において、前記抗体ポリペプチドは、通常、抗体と結合していないアミノ酸配列または1つ以上の部分を含む。以下により詳細に例示的修飾が説明される。例えば、本発明の単鎖Fv抗体断片はフレキシブルリンカー配列を含むことができ、または機能性部分 (例えば、PEG、薬剤、毒物または蛍光標識、放射性標識、酵素標識、核磁気標識、重金属標識などの標識) を付加するために修飾され得る。

50

## 【0193】

本発明の抗体ポリペプチドは融合タンパク質を含む、融合タンパク質から基本的になる、または融合タンパク質からなることができる。融合タンパク質は、例えば、免疫グロブリンタンパク質結合ドメインを少なくとも1つの標的結合部位および少なくとも1つの異種性部分、すなわち、自然界では本来それと結合していない部分と共に含むキメラ分子である。前記アミノ酸配列は通常、融合ポリペプチドにおいてひとまとまりになる別々のタンパク質に存在することができ、または、それらは通常同じタンパク質に存在することができるが、融合ポリペプチドでは新しい配置になる。例えば、化学合成によって、または所望の位置関係でペプチド領域がコードされるポリヌクレオチドを作製し、そしてそれを翻訳することにより融合タンパク質を作製することができる。

10

## 【0194】

用語「異種性」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに適用される場合、そのポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、それが比較されている実体の残りのものとは別個の実体に由来するということを意味する。例えば、本明細書において使用される場合、抗体、またはその抗原結合断片、異型体、もしくは類似体に融合される「異種性ポリペプチド」は、同じ種の非免疫グロブリンポリペプチドまたは異なる種の免疫グロブリンポリペプチドもしくは非免疫グロブリンポリペプチドに由来する。

## 【0195】

本明細書の他の箇所により詳細が考察されるように、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体は、異種性ポリペプチドとN末端もしくはC末端で組換え技術によりさらに融合され、またはポリペプチドもしくは他の組成物と化学的に複合体化（共有結合的複合体化および非共有結合的複合体化を含む）され得る。例えば、検出アッセイでの標識として有用な分子および異種性ポリペプチド、薬剤、放射性核種または毒物などのエフェクター分子に抗体を組換え技術により融合する、または複合体化することができる。例えば、国際出願公開第WO92/08495号、第WO91/14438号、第WO89/12624号、米国特許第5,314,995号、および欧州特許出願第EP0396387号を参照のこと。

20

## 【0196】

本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体は、ペプチド結合または改変型ペプチド結合、すなわち、ペプチドイソエステルによって互いに結合するアミノ酸から構成されることができ、そして、20種の遺伝子にコードされるアミノ酸以外のアミノ酸を含むことができる。翻訳後プロセッシングなどの天然の過程により、または当技術分野において周知の化学修飾技術により抗体を修飾することができる。そのような修飾は、基本的な教科書、およびより詳細にはモノグラフとおびたしい研究文献によく記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノ末端もしくはカルボキシル末端を含む抗体、または炭水化物などの部分のどこにでも生じ得る。所与の抗体に同じ、または、異なる程度で同じ種類の修飾がいくつかの部位に存在し得ることが理解される。また、所与の抗体は多くの種類の修飾を含有し得る。抗体は、例えば、ユビキチン化の結果として分岐状抗体である可能性があり、そして、それらは分岐を持つ、または、持たない環状抗体である可能性がある。環状抗体、分岐状抗体および分岐環状抗体は翻訳後の天然の過程により生じることができ、または、合成方法によって作製され得る。修飾にはアセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋形成、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合性架橋形成、システイン形成、ピログルタメート形成、ホルミル化、 $\alpha$ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、peg化、タンパク質分解性プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質へのトランスファーRNA介在性付加、およびユビキチン化が含まれる。例えば、Proteins - Structure And Molecular

30

40

50

Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993)、Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983)、Seifter et al., Meth. Enzymol. 182 (1990)、626-646、Rattan et al., Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992)、48-62) を参照のこと。

【0197】

本発明はまた、抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体および異種性ポリペプチドを含む融合タンパク質を準備する。1つの実施形態において、本発明の融合タンパク質は、本発明の抗体の $V_H$ 領域のうちのいずれか1つ以上のアミノ酸配列、または本発明の抗体もしくはその断片もしくは異型体の $V_L$ 領域のうちのいずれか1つ以上のアミノ酸配列を有するポリペプチド、および異種性ポリペプチド配列を含む、それらから基本的になる、またはそれらからなる。別の実施形態において、本明細書において開示される診断方法および治療方法に使用される融合タンパク質は、抗体、もしくはその断片、異型体もしくは誘導体の $V_H$ -CDRのうちのいずれか1つ、2つ、3つのアミノ酸配列、または抗体、もしくはその断片、異型体もしくは誘導体の $V_L$ -CDRのうちのいずれか1つ、2つ、3つのアミノ酸配列を有するポリペプチド、および異種性ポリペプチド配列を含む、それらから基本的になる、またはそれらからなる。1つの実施形態において、前記融合タンパク質は、本発明の抗体、もしくはその断片、誘導体もしくは異型体の $V_H$ -CDR3のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび異種性ポリペプチド配列を含み、その融合タンパク質はタウに特異的に結合する。別の実施形態において、融合タンパク質は、本発明の抗体の少なくとも1つの $V_H$ 領域のアミノ酸配列および本発明の抗体、またはその断片、誘導体もしくは異型体の少なくとも1つの $V_L$ 領域のアミノ酸配列を有するポリペプチドならびに異種性ポリペプチド配列を含む。1つの実施形態において、前記融合タンパク質の $V_H$ 領域および $V_L$ 領域は、タウに特異的に結合する単一起源抗体（またはs c F v断片またはF a b断片）に対応する。さらに別の実施形態において、本明細書において開示される診断方法および治療方法で使用される融合タンパク質は、抗体の $V_H$  CDRのうちのいずれか1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のアミノ酸配列、および抗体、またはその断片もしくは異型体の $V_L$  CDRのうちのいずれか1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに異種性ポリペプチド配列を含む。1つの実施形態において、 $V_H$ -CDRまたは $V_L$ -CDRのうちの2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上が本発明の単一起源抗体（またはs c F v断片またはF a b断片）に対応する。これらの融合タンパク質をコードする核酸分子もまた本発明に包含される。

【0198】

文献に報告される例示的な融合タンパク質は、T細胞受容体 (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 2936-2940); CD4 (Capon et al., Nature 337 (1989), 525-531; Traunecker et al., Nature 339 (1989), 68-70; Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA 9 (1990), 347-353およびByrn et al., Nature 344 (1990), 667-670); L-セレクチン(ホーミング受容体)(Watson et al., J. Cell. Biol. 110 (1990), 2221-2229、およびWatson et al., Nature 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo et al., Cell 61 (1990), 1303-1313); CD28とB7 (Linsley et al., J. Exp. Med. 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (L

10

20

30

40

50

isley et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66 (1991), 1133-1144); TNF受容体 (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886、および Peppel et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 1483-1489 (1991))、および IgE受容体 (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), Abstract No. 1448) の融合を含む。

10

#### 【0199】

本明細書の他の箇所では考察されるように、ポリペプチドのインビボ半減期を増加させるため、または当技術分野において公知の方法を用いる免疫アッセイで使用するために、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を異種性ポリペプチドに融合することができる。例えば、1つの実施形態において、本発明の抗体に、そのインビボ半減期を増加させるために、PEGを複合体化させることができる。例えば、Leonget al., Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531または Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512を参照のこと。

20

#### 【0200】

さらに、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体をマーカー配列、例えば、それらの精製または検出を容易にするためのペプチドに融合することができる。特定の実施形態において、前記マーカーアミノ酸配列は、市販されている多くのものの中でも pQEベクター (QIAGEN, Inc. 社、9259 Eton Avenue、Chatsworth、カリフォルニア州、91311) に提供されるタグのようなヘキサ-ヒスチジンペプチド (HIS) である。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824に記載されるように、例えば、ヘキサ-ヒスチジンは融合タンパク質の簡便な精製を準備する。精製に有用な他のペプチドタグには、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに対応する「HA」タグ (Wilson et al., Cell 37 (1984), 767) および「FLAG」タグが含まれるが、これらに限定されない。

30

#### 【0201】

当技術分野において周知の方法を用いて融合タンパク質を調製することができる。例えば米国特許第5,116,964号および第5,225,538号を参照のこと。融合タンパク質の分泌特性または結合特性を最適化するための融合が行われる正確な部位は実証的に選択され得る。次に、融合タンパク質をコードするDNAは、発現のため宿主細胞に形質移入される。

#### 【0202】

非複合体化形態で本発明の抗体を使用することができ、または、様々な分子の少なくとも1つと、例えば、前記分子の治療特性を改善するために、標的の検出を容易にするために、または患者のイメージングもしくは治療のために、本発明の抗体を複合体化することができる。本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を、精製が行われるとき、精製の前に、または後に標識または複合体化することができる。特に、治療薬、前駆薬、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物学的反応修飾因子、医薬薬剤またはPEGに本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を複合体化することができる。

40

#### 【0203】

従来の抗体を含む免疫毒素である複合体は当技術分野において広く説明されている。従

50

来のカップリング技術により毒素を抗体に結合することができ、または、タンパク質毒素部分を含有する免疫毒素を融合タンパク質として産生することができる。そのような免疫毒素を得るための対応する方法で本発明の抗体を使用することができる。Byers, Seminars Cell Biol. 2 (1991), 59-70およびFanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54によって記載されるものがそのような免疫毒素を説明する。

#### 【0204】

複合体はまた、複合体化される選択された因子に応じて、様々な技術を用いて組み立てられ得ることを当業者は理解する。例えば、ピオチンとの複合体を、例えば、タウ結合ポリペプチドをピオチンN-ヒドロキシスクシンイミドエステルなどのピオチンの活性化エステルと反応させることにより調製する。同様に、蛍光マーカーとの複合体を、カップリング剤、例えば、本明細書に記載されるカップリング剤の存在下で、または、イソチオシアネート、すなわち、フルオレセイン-イソチオシアネートとの反応により調製することができる。本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体の複合体を類似の方法で調製する。

#### 【0205】

本発明は、診断薬または治療薬に複合体化した本発明の抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を包含する。例えば、所与の治療計画および/または予防計画の有効性を判定するための臨床試験手順の一部として、例えば、神経性疾患の存在を示すために、神経性疾患になる危険性を示すために、神経性疾患、すなわち、タウオパチー疾患の発生または進行をモニターするために、診断的に前記抗体を使用することができる。抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を検出可能な物質に結合することにより検出を容易にすることができる。検出可能な物質の例には様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、様々なポジトロン放射トモグラフィーを使用するポジトロン放射金属、および非放射性常磁性金属イオンが含まれる。例えば、本発明による診断薬として使用される抗体に複合体化され得る金属イオンについて、米国特許第4,741,900号を参照のこと。適切な酵素の例にはホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族複合体の例にはストレプトアビジン/ピオチンおよびアビジン/ピオチンが含まれる。適切な蛍光物質の例にはウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリスリンが含まれる。発光物質の例にはルミノールが含まれる。生物発光物質の例にはルシフェラーゼおよびイクオリンが含まれる。そして、適切な放射性物質の例には $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ または $^{99}\text{Tc}$ が含まれる。

#### 【0206】

抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体はまた、それを化学発光化合物に結合させることにより検出可能であるように標識され得る。化学発光タグ化抗体の存在は、次に、化学反応の最中に生じる発光の存在を検出することにより決定される。特に有用な化学発光標識化合物の例はルミノール、イソルミノール、セロマチックアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。

#### 【0207】

検出可能であるように抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を標識することができる1つの方法は同物質を酵素に結合し、そして酵素免疫アッセイ(EIA)(Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7)、Voller et al., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520、Butler, Meth. Enzymol.

73 (1981), 482-523、Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980)、Ishikawa, E. et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kaku Shoin, Tokyo (1981))で前記結合産物を使用することによる。分光光度法、蛍光定量法または視覚的手段により検出することができる化学部分を生じるように、抗体に結合している酵素が適切な基質、好ましくは発色性基質と反応する。検出可能であるように抗体を標識するために使用され得る酵素にはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ-グリセロホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼが含まれるが、これらに限定されない。さらに、前記酵素の発色性基質を使用する比色分析法によって検出を達成することができる。同様に調製した標準物質との比較で、基質の酵素反応の程度を視覚的に比較することにより検出を達成することもできる。

#### 【0208】

様々な他の免疫アッセイのいずれかを用いて検出を達成することもできる。例えば、抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を放射性物質で標識することにより、放射免疫アッセイ(RIA)(例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986)を参照のこと)の使用により前記抗体を検出することが可能である。ガンマカウンター、シンチレーションカウンターまたはオートラジオグラフィを含むが、これらに限定されない手段により放射性同位元素を検出することができる。

#### 【0209】

抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体を、 $^{152}\text{Eu}$ またはランタノイド系の他のものなどの蛍光放射金属を用いて、検出可能であるように標識することもできる。ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などの金属キレート性基を用いてこれらの金属を抗体に結合させることができる。

#### 【0210】

様々な部分を抗体、またはその抗原結合断片、異型体もしくは誘導体に複合体化する技術は周知である。例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985)、Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987)、Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)、"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In

10

20

30

40

50

Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985)、および Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158を参照のこと。

#### 【0211】

言及したように、ある実施形態において、結合分子、例えば、結合ポリペプチド、例えば、抗体またはその免疫特異的断片の安定性または有効性を向上させる部分を複合体化することができる。例えば、1つの実施形態において、本発明の結合分子に、そのインビロ半減期を増加させるためにPEGを複合体化することができる。Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; or Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

#### 【0212】

##### VI. 組成物および使用方法

本発明は前述のタウ結合分子、例えば、本発明の抗体もしくはその抗原結合断片、またはその誘導体もしくは異型体、または本発明のポリヌクレオチド、ベクターもしくは細胞を含む組成物に関連する。本発明の組成物は薬剂的に許容可能な担体をさらに含むことができる。また、本発明の医薬組成物は、その医薬組成物の意図した使用法に応じて、インターロイキンまたはインターフェロンなどの薬剤をさらに含むことができる。タウオパチー疾患、例えば、アルツハイマー病の治療での使用には、前記の追加的な薬剤が、小有機分子、抗タウ抗体、およびそれらの組合せからなる群より選択され得る。それ故に、特定の実施形態において、本発明は、タウオパチー疾患の予防的処置および治療的処置のための医薬組成物もしくは診断用組成物の調製のために、対象におけるタウオパチー疾患の進行もしくはタウオパチー疾患の治療に対する反応をモニターするために、または、対象のタウオパチー疾患になる危険性を判定するために、タウ結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片を使用すること、またはそれらのいずれか1つと実質的に同じ結合特異性を有する結合分子、本発明のポリヌクレオチド、ベクターもしくは細胞を使用することに関連する。

#### 【0213】

それ故に、1つの実施形態において、本発明は、それぞれ、脳および中枢神経系内のタウの異常蓄積および/または沈着を特徴とする神経性障害を治療する方法であって、治療上有効量の前述の本発明のタウ結合分子、抗体、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞のうちのいずれか1つを、それを必要とする対象に投与することを含む方法に関連する。用語「神経性障害」にはアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン症-認知症複合体、嗜銀性グレイン型認知症、英国型アミロイド血管症、脳アミロイド血管症、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクシング認知症、石灰化を伴うまん性神経原線維変化、ダウン症候群、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖しパーキンソン症を伴う前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハレルフォルデン・スパッツ病、封入体筋炎、多系統萎縮症、筋強直性ジストロフィー、C型ニーマン・ピック病、神経原線維変化を伴う非グアム島人型運動ニューロン病、ピック病、脳炎後パーキンソン症、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、多発梗塞性認知症および虚血性脳卒中などのタウオパチー疾患が含まれるが、これらに限定されない。別途、明言されない限り、神経変性、神経性または精神神経性という用語は本明細書において互換的に使用される。

#### 【0214】



本発明の抗体は、タウオパチー疾患の徴候が無い健康なヒト対象のB細胞またはメモリーB細胞に由来し、したがって、ある確率で、臨床的に明らかなタウオパチー疾患を予防することができる、または前記の臨床的に明らかな疾患が発生する危険性を減少させることができる、または前記の臨床的に明らかな疾患の発症もしくは進行を遅延させることができるという事実本発明の治療アプローチの特定の利点がある。典型的には、本発明の抗体はまた、体細胞成熟、すなわち、標的タウ分子への高親和性結合における選択性と有効性について、抗体の可変領域の体細胞変異による最適化にすでに成功している。

#### 【0215】

インビボでの、例えば、ヒトのそのような細胞は、自己免疫反応またはアレルギー反応という意味で、関連の、または他の生理的なタンパク質または細胞構造によって活性化されていないという知識もまた、このことが臨床試験相を通して成功的に生存する著しく増大した可能性を示すので、医学的に非常に重要である。言わば、少なくとも1つのヒト対象において、予防用抗体または治療用抗体の臨床前開発または臨床開発の前に、有効性、受容性、および耐容性がすでに示されている。したがって、本発明のヒト抗タウ抗体の、その治療薬としての標的構造に特異的な有効性とその減少した副作用の可能性の両方が、その臨床上の成功の可能性を著しく増加させることを想定することができる。

#### 【0216】

本発明はまた、上述の成分、例えば、本発明の抗タウ抗体、その結合断片、誘導体または異型体、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞のうちの1つ以上で満たされた1つ以上の容器を含む、それぞれ、医薬用および診断用のパックまたはキットを提供する。そのような容器には、薬学的製品または生物学的製品の製造、使用または販売を監督する官庁が規定する形態の通知書を付随させることができ、その通知書は製造、使用または販売についての前記監督官庁によるヒトへの投与に対する認可を反映する。さらに、または代わりに、前記キットは、適切な診断アッセイでの使用のための試薬および/または説明書を含む。前記組成物、例えば、本発明のキットは、当然、タウの存在に伴う障害の危険性評価、診断、予防および治療に特に適切であり、そして、アルツハイマー病(AD)、筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン症-認知症複合体(ALS-PDC)、嗜銀性グレイン型認知症(AGD)、英国型アミロイド血管症、脳アミロイド血管症、大脳皮質基底核変性症(CBD)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ボクシング認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、ダウン症候群、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖しパーキンソン症を伴う前頭側頭型認知症(FTDP-17)、前頭側頭葉変性症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハレルフォルデン・スパッツ病、封入体筋炎、多系統萎縮症、筋強直性ジストロフィー、C型ニーマン・ピック病(NP-C)、神経原線維変化を伴う非グラム島人型運動ニューロン病、ピック病(PiD)、脳炎後パーキンソン症、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺(PSP)、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、多発梗塞性認知症および虚血性脳卒中の治療に特に適用できる。

#### 【0217】

当技術分野において周知の方法に従って本発明の医薬組成物を製剤することができる。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472を参照のこと。適切な医薬担体の例は当技術分野において周知であり、そして、それらにはリン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油/水乳剤などの乳剤、様々な種類の湿潤剤、滅菌溶液などが含まれる。周知の従来の方法によってそのような担体を含む組成物を製剤することができる。適切な用量で対象にこれらの医薬組成物を投与することができる。様々な方法で、例えば、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、局所投与または皮内投与または脊髄送達または脳送達により適切な組成物の投与をもたらすことができる。点鼻薬製剤などのエアロゾル製剤は、保存剤および等張剤を有する、活性薬剤の精製した水溶液または他の溶液を含む。そのような製剤は、鼻粘膜に適合するp

10

20

30

40

50

Hと等張状態に調節される。直腸投与用または経腔投与用の製剤は、適切な担体を有する坐剤として提供され得る。

【0218】

また、本発明は、今では標準的な（幸いにも、まれではあるが）本発明の薬品を投与するために頭骨に小さい穴をあける方法を含むが、1つの態様では、本発明の結合分子、特に抗体または抗体ベースの薬品は血液脳関門を越えることができ、静脈内投与または経口投与を可能とする。

【0219】

投薬計画は、担当の医師および臨床的要因によって決定される。医学分野で周知である  
とおり、任意の1人の患者への投薬量は、その患者の体格、体表面、年齢、投与される特  
定の化合物、性別、投与時間および経路、一般的健康状態、同時に投与されている他の薬  
品を含む多数の因子次第である。典型的な用量は、例えば、0.001~1000  $\mu\text{g}$  の  
範囲内であり得る（すなわち、この範囲内の、発現のための、または発現の阻害のための  
核酸）。しかしながら、この例示的な範囲の下または上の用量が、特に前述の因子を考慮  
して、想定される。一般的に、用量は、例えば、宿主の体重に対して約0.0001 mg  
/ kg から100 mg / kg までの範囲であることが可能であり、より一般的には0.0  
1~5 mg / kg（例えば、0.02 mg / kg、0.25 mg / kg、0.5 mg / kg  
、0.75 mg / kg、1 mg / kg、2 mg / kg など）の範囲であることが可能で  
ある。例えば、用量は1 mg / kg 体重または10 mg / kg 体重または1~10 mg /  
kg の範囲内または少なくとも1 mg / kg であり得る。上記の範囲の中間の用量もまた  
本発明の範囲内であると意図される。対象はそのような用量を毎日、隔日、毎週または実  
証的な分析により決定される他のスケジュールに従って投与され得る。例示的な治療は、  
長期、例えば、少なくとも6か月にわたる複数回の投薬を伴う。その他の例示的な治療計  
画は、二週間毎に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。  
例示的な投薬スケジュールには、連日1~10 mg / kg もしくは15 mg / kg、隔日  
30 mg / kg、または毎週60 mg / kg が含まれる。いくつかの方法では、異なる結  
合特異性を有する2つ以上のモノクローナル抗体を同時に投与し、その場合、投与された  
各抗体の投薬量は示された範囲内に収まる。定時的評価によって経過をモニターすること  
ができる。非経口投与用の製剤は滅菌水性または非水性溶液、懸濁液および乳剤を含む。  
非水性溶媒の例はプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植  
物油、およびエチルオレエートなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、生  
理食塩水および緩衝媒体を含む、水、アルコール溶液/水溶液、乳剤または懸濁液が含ま  
れる。非経口投与用担体には塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖液、ブドウ糖および  
塩化ナトリウム、乳酸化リンゲル液、または固定化油が含まれる。静脈内投与用担体には  
、体液および栄養補充液、（リンゲルブドウ糖液に基づくものなどの）電解質補充液など  
が含まれる。例えば、抗微生物薬、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどのよう  
な保存剤および他の添加物も存在し得る。また、本発明の医薬組成物は、その医薬組成物  
の意図される使用方法に応じて、ドーパミンまたは精神薬理学的薬品などの薬剤をさらに含  
むことができる。

【0220】

また、本発明の特定の実施形態において、例えば、本発明の医薬組成物が受動免疫のため  
に抗タウ抗体またはその結合断片、誘導体もしくは異型体を含む場合、ワクチンとして  
前記医薬組成物を製剤することができる。背景技術の節で言及したように、リン酸化タウ  
種が細胞外に、血漿および脳脊髄液（CSF）に存在することが報告されており（Alu  
ise et al., Biochim. Biophys. Acta. 1782  
（2008）, 549-558）、そして、遺伝子導入マウス系列でのリン酸化タ  
ウペプチドを使用する能動的ワクチン投与を用いる研究により、タウ凝集体の脳内レベル  
の低下と行動障害の進行の遅滞が明らかになった（Sigurdsson, J. Al  
zheimers Dis. 15（2008）, 157-168; Boimel  
et al., Exp Neurol. 224（2010）, 472-485

10

20

30

40

50

）。したがって、本発明のヒト抗タウ抗体および同等のタウ結合分子を用いる受動免疫は、背景技術の節で既に考察したように、能動免疫療法構想のいくつかの有害作用を回避するのに役立つであろうと想定するのが賢明である。したがって、本発明の本抗タウ抗体およびそれらの同等物は、AD、ALS - PDC、AGD、CBD、CJD、FTD、FTDP - 17、NP - C、PiD、PSPまたは以前に言及したような他のタウオパチーなどのタウオパチー疾患の予防または改善のためのワクチンとして特に有用である。

#### 【0221】

1つの実施形態において、本発明の抗体の組換え二重特異性または多重特異性構成体を使用することが有益である可能性がある。参考に、Fischer and Leger, Pathobiology 74 (2007), 3 - 14を参照のこと。そのような二重特異性分子を、1つの結合アームでタウを標的とし、そして2つ目の結合アームで アミロイドまたは - シヌクレインまたは異なるタウの病理的立体構造などの別の病理的実体を標的とするように設計することができる。あるいは、脳への抗体の透過を促進するために、血液脳関門に存在するタンパク質を標的とするように第2の結合アームを設計することができる。

#### 【0222】

1つの実施形態において、細胞膜をより容易に透過することができる、本発明の抗体の組換えFab (rFab) 断片および単鎖断片 (scFv) を使用することが有益であり得る。例えば、先にインターネット上で公開されたRobert et al., Protein Eng. Des. Sel. (2008) Oct 16; S174 1 - 0134は、アミロイドのN末端領域にあるエピトープを認識するモノクローナル抗体WO - 2のキメラ組換えFab (rFab) 断片および単鎖断片 (scFv) の使用について記載する。操作された断片は、IgG分子全体と同じ程度に有効に (i) アミロイド線維形成を防止し、(ii) 先に形成されたA<sub>β</sub> 1 - 42原線維を脱凝集させ、そして、(iii) A<sub>β</sub> 1 - 42原線維オリゴマー介在性神経毒性をインビトロで阻害することができた。エフェクター機能を欠く小さいFab操作抗体フォーマットおよびscFv操作抗体フォーマットを使用することに認められた利点には、血液脳関門のより効率的な通過および炎症性副反応の危険性の最小化が含まれる。また、scFvと単ドメイン抗体が全長型抗体の結合特異性を保持することに加えて、それらは単一遺伝子として発現することができ、そして哺乳類細胞では細胞内に、それらの標的の折りたたみ構造、相互作用、修飾または細胞内局在を変える可能性がある細胞内抗体として発現することができる。レビューとして、例えば、Miller and Messer, Molecular Therapy 12 (2005), 394 - 401を参照のこと。

#### 【0223】

異なるアプローチでは、Muller et al., Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237 - 241が「スーパー抗体技術」と称される技術プラットフォームについて記載しており、その技術は、抗体が細胞を損傷することなくそれらに輸送されることを可能にされている。そのような細胞透過性抗体は新しい診断的および治療的な窓口を開く。用語「TransMab」はこれらの抗体のために造り出された。

#### 【0224】

さらなる実施形態において、タウオパチー疾患の治療に有用な他の抗体の共投与または連続投与が望ましい可能性がある。1つの実施形態において、追加の抗体が本発明の医薬組成物に含まれる。対象を治療するために使用することができる抗体の例には アミロイド、- シヌクレイン、TDP - 43およびSOD - 1を標的とする抗体が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0225】

さらなる実施形態において、タウオパチー疾患の治療に有用な他の神経保護薬剤の共投与または連続投与が望ましい可能性がある。1つの実施形態において、追加の薬剤が本発明の医薬組成物に含まれる。対象を治療するために使用することができる神経保護薬剤の

例にはアセチルコリンエステラーゼ阻害剤、グルタミン酸作動性受容体アンタゴニスト、キナーゼ阻害剤、H D A C 阻害剤、抗炎症剤、ジバルプロエクスナトリウム、またはそれらの任意の組合せが含まれるが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物と同時に使用することができる他の神経保護薬剤の例は当技術分野において説明されている。例えば、国際出願公開第 W O 2 0 0 7 / 0 1 1 9 0 7 号を参照のこと。1つの実施形態において、その追加的な薬剤はドーパミンまたはドーパミン受容体アゴニストである。

#### 【0226】

治療上有効用量または治療上有効量は、症状または病状を改善するのに十分な有効成分の量を意味する。細胞培養物または実験動物において標準的な薬学的手順、例えば、E D<sub>50</sub>（集団の50%で治療的に有効な用量）およびL D<sub>50</sub>（集団の50%にとって致死10  
的である用量）によって、そのような化合物の治療上の有効性および毒性を決定することができる。治療的效果と有毒的效果の間の用量比が治療指数であり、そして、それはL D<sub>50</sub> / E D<sub>50</sub> の割合として表すことができる。1つの実施形態において、前記組成物中の治療薬は、A D、A L S - P D C、A G D、C B D、C J D、F T D、F T D P - 1 7、N P - C、P i D、P S P、または以前に言及されたような他のタウオパチー疾患の場合、正常な行動および/または認知特性を再建または保護するのに十分な量で存在する。

#### 【0227】

前述したことから、とりわけ、先に言及したようなタウオパチー疾患、特に、アルツハイマー病の診断および/または治療のために、上述した抗体の少なくとも1つのC D Rを含むタウ結合分子のいかなる使用法をも本発明は包含する。1つの実施形態において、前20  
記結合分子は本発明の抗体またはその免疫グロブリン鎖である。さらに、本発明は、上文に記載される言及された抗体のいずれか1つの抗イディオタイプ抗体に関連する。これらは、抗体の抗原結合部位の近くの可変領域に位置するユニークな抗原性ペプチド配列に結合する抗体または他の結合分子であり、そして、例えば、対象の試料での抗タウ抗体の検出に有用である。

#### 【0228】

別の実施形態において、本発明は、上述の本発明のタウ結合分子、抗体、抗原結合断片、ポリヌクレオチド、ベクター細胞のうちのいずれか1つ、および、所望により、免疫ベースまたは核酸ベースの診断方法で従来使用されている試薬などの検出に適切な手段を含む診断用組成物に関連する。本発明の抗体は、例えば、それらを液相で、または、固相担30  
体に結合して利用することができる免疫アッセイでの使用に適している。本発明の抗体を利用することができる免疫アッセイの例は、直接的フォーマットか間接的フォーマットのどちらかの競合的および非競合的免疫アッセイである。そのような免疫アッセイの例は放射免疫アッセイ（R I A）、サンドイッチ（免疫アッセイ）、フローサイトメトリーおよびウェスタンブロットアッセイである。多くの異なる担体に本発明の抗原および抗体を結合させることができ、そして、それらに特異的に結合する細胞を単離するために本発明の抗原および抗体を使用することができる。周知の担体の例にはガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然型および修飾型セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、およびマグネタイトが含まれる。前記担体の性質は、本発明の目的のため、可溶性または40  
不溶性のどちらかであり得る。当業者に知られている多くの異なる標識および標識方法がある。本発明において使用することができる標識の種類例には酵素、放射性同位元素、コロイド状金属、蛍光化合物、化学発光化合物および生物発光化合物が含まれる。本明細書上部で考察された実施形態も参照のこと。

#### 【0229】

さらなる実施形態によって、試験される個体から血液試料、リンパ液試料または他の任意の体液試料であり得る体液試料を取得し、そして、抗体抗原複合体の形成を可能とする条件下で前記体液試料を本発明の抗体と接触させることによる、個体において障害を診断するための方法にタウ結合分子、特に本発明の抗体を使用することもできる。次に、そのような複合体のレベルは当技術分野において公知の方法によって決定され、対照試料で生50

じたレベルよりも著しく高いレベルが、試験された個体での疾患を示す。同じ方法で、本発明の抗体が結合する特異的な抗原も使用することができる。したがって、本発明は、結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片を含むインビトロ免疫アッセイに関連する。

#### 【0230】

これに関して、本発明はまた、この目的のために特異的に設計される手段に関連する。例えば、タウを特異的に認識する本発明の抗体または同等の抗原結合分子が負荷された抗体ベースのアレイを使用することができる。マイクロアレイ免疫アッセイの設計は Kusnezow et al., Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696 に要約される。したがって、本発明はまた、本発明に従って同定されたタウ結合分子が負荷されたマイクロアレイに関連する。

10

#### 【0231】

1つの実施形態において、本発明は、対象においてタウオパチー疾患を診断する方法であって、少なくとも1つの本発明の抗体、そのタウ結合断片、またはそれらのいずれか1つと実質的に同じ結合特異性を有するタウ結合分子を用いて、診断される対象に由来する試料中にタウおよび/または病理的修飾型タウおよび/または凝集型タウの存在を判定することを含む方法に関連し、その方法では、病理的修飾型タウおよび/または凝集型タウの存在が神経変性タウオパチーの指標であり、そして、生理的タウ形態のレベルと比較した病理的修飾型タウおよび/または凝集型タウのレベルの上昇が前記対象における神経変性タウオパチーの進行の指標である。

20

#### 【0232】

診断される対象は前記疾患について無症状または前臨床段階であり得る。1つの実施形態において、対照対象はタウオパチー疾患、例えば、AD、ALS-PDC、AGD、CBD、CJD、FTD、FTDP-17、NP-C、PiD、PSPまたは以前に言及された他のタウオパチーを持ち、病理的修飾型タウおよび/または凝集型タウのレベルと参照標準の間の類似性により、診断される対象がタウオパチー疾患を持っていることが示される。あるいは、またはさらに、第2の対照として、対照対象はタウオパチー疾患を持たず、タウおよび/または病理的修飾型タウおよび/または凝集型タウのレベルと参照標準の間の差異により、診断される対象がタウオパチー疾患を持っていることが示される。1つの実施形態において、診断される対象および対照対象の年齢が一致する。分析される試料は、病理的修飾型タウおよび/または凝集型タウを含有すると疑われる任意の体液、例えば、血液試料、脳脊髄液(CSF)試料または尿試料であり得る。

30

#### 【0233】

例えば、ウェスタンブロット、免疫沈降、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、蛍光活性細胞選別(FACS)、二次元ゲル電気泳動、質量分光分析法(MS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化-飛行時間-MS(MALDI-TOF)、表面増強レーザー脱離イオン化-飛行時間(SELDI-TOF)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)、多次元液体クロマトグラフィー(LC)後のタンデムマスマスペクトロメトリー(MS/MS)、およびレーザーデンストメトリーから選択される1つ以上の技術によるタウの分析を含む、当技術分野において公知の任意の適切な方法によりタウおよび/または病理的修飾型タウおよび/または凝集型タウのレベルを評価することができる。1つの実施形態において、タウの前記インビボ画像化法は陽電子放出トモグラフィー(PET)、単一光子放出トモグラフィー(SPECT)、近赤外(NIR)光学イメージングまたは磁気共鳴イメージング(MRI)を含む。

40

#### 【0234】

本発明に従って適応することができる抗体および関連の手段を用いる、アルツハイマー病などのタウオパチー疾患を診断する方法、タウオパチー疾患の進行をモニターする方法、およびタウオパチー疾患の治療をモニターする方法はまた、国際出願公開第WO93/08302号、第WO94/13795号、第WO95/17429号、第WO96/0

50

4309号、第WO2002/062851号および第WO2004/016655号に記載される。同様に、タウの抗体ベースの検出方法は国際出願公開第WO2005/080986号に記載される。全ての開示の内容が参照により本明細書に組み込まれる。本発明のタウ特異的抗体、結合断片、誘導体または異型体を用いることを除いて、記載されるとおりそれらの方法を適用することができる。

#### 【0235】

さらなる態様において、本発明はまた、本発明の任意の抗体によって特異的に認識されるタウのエピトープを有するペプチドに関連する。1つの実施形態において、そのようなペプチドは、配列番号7、配列番号41、配列番号42に示されるアミノ酸配列、または1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個もしくはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失および/または付加されたそれらの改変された配列を含み、前記ペプチドは本発明の任意の抗体、例えば、抗体NI-105.4E4またはNI-105.4E3によって認識される。

10

#### 【0236】

本発明の1つの実施形態において、そのようなペプチドは、対象における神経変性タウオパチーの診断であって、前記対象の生物試料中のペプチドに結合する抗体の存在を判定する工程を含む診断に使用されることが可能であり、そして、そのようなペプチドは、上述の本発明のペプチドを認識する抗体のレベルを測定し、そして、同等の年齢と性別の健康な対象に見出されるレベルに対してその測定値を比較することによる、前記対象におけるタウオパチーの診断に使用される。本発明の前記ペプチドに特異的な測定された抗体のレベル上昇は前記対象におけるタウオパチーの指標である。本発明のペプチドは、上文に記載されるようにアレイ、キットおよび組成物にそれぞれ製剤され得る。

20

#### 【0237】

これらおよび他の実施形態は、本発明の記述および実施例によって開示および包含される。本発明に従って採用される材料、方法、使用法および化合物のうちのいずれか1つに関するさらなる文献は公開ライブラリーおよびデータベースから、例えば、電子機器を使用して引き出され得る。例えば、米国国立衛生研究所の国立生物工学情報センターおよび/または国立医学図書館が主催する公開データベース「Medline」を活用することができる。欧州分子生物学研究所(EMBL)の一部である欧州バイオインフォマティクス研究所(EBI)のデータベースとアドレスなどのさらなるデータベースとウェブアドレスが当業者に知られており、そして、インターネットの検索エンジンを用いてそれらを得ることもできる。遡及的な検索および現状の認識に有用な生物工学の特許情報の概要、および関連する特許情報の供給源の調査は、Berk, TIBTECH 12 (1994), 352-364において与えられる。

30

#### 【0238】

上記の開示は全般的に本発明を説明する。別途、明言されない限り、本明細書において使用される用語には、Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997年, 2000年改訂および2003年再版, ISBN 0 19 850673 2において提供されるような定義が与えられる。いくつかの文献が本明細書の本文を通して引用される。本明細書の末尾、特許請求の範囲の直前に、完全な書誌引用を見出すことができる。引用した(参考文献、公開された特許、本願を通して引用された特許出願公開、および製造業者の仕様書、説明書などを含む)参考文献全ての内容は本明細書に参照により明確に組み込まれる。しかしながら、引用したいかなる文書も実に本発明に対する先行技術であると認めるものではない。

40

#### 【0239】

以下の具体的な実施例を参照することにより、さらに完全な理解を得ることができるが、それは例証のみを目的として本明細書に提供されるものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

#### 【実施例】

50

## 【0240】

以下の実施例は本発明をさらに解説するが、本発明の範囲を多少なりとも限定するものと理解されてはならない。クローン化された抗体NI-105.4E4、NI-105.24.B2および105.4A3、すなわち、ヒト可変重鎖および軽鎖の生殖系列(GL)配列に適合していないフレームワーク1(FR1)免疫グロブリン可変領域に関して、実施例1～4の以下の実験を解説および記述する。図1を参照のこと。

## 【0241】

## 材料と方法

引用した参考文献中に、本明細書において使用した方法などの、従来の方法についての詳細な説明を見出すことができる。“The Merck Manual of Diagnosis and Therapy” Seventeenth Ed. edited by Beers and Berkow (Merck & Co., Inc. 2003)もまた参照のこと。

10

## 【0242】

本発明の実施は、別途、示されない限り、当分野の技術の範囲内である、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子導入生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来の技術を使用する。本発明の実施において有用な一般的な技術のさらなる詳細については、実施者は細胞生物学と組織培養の標準的な教科書と概説を参照することができる。実施例において引用される参考文献もまた参照のこと。分子生化学および細胞生化学の一般的な方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames and Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (Ausubel et al., eds.); および Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press)のような標準的な教科書に見つけ出すことができる。Gene Transfer vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 および 155 (Wu et al., eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); 学術論文、Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1

20

30

40

50

986)。Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Non-viral vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); Viral vectors (Kaplit & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997); and Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)。本開示において言及される遺伝子操作の試薬、クローニングベクターおよびキットはBioRad社、Stratagene社、Invitrogen社、Sigma-Aldrich社およびClonTech社のような販売業者から入手可能である。細胞培養と培地コレクションについての一般的な技術はLarge Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); および Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch et al., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251); Extracting information from cDNA arrays, Herzog et al., CHAO S 11 (2001), 98-107に概説されている。

#### 【0243】

タウ特異的B細胞の同定とそれぞれの抗体のクローン化の方法

以下において、別途、示されない限り、タウ特異的B細胞の同定および目的の特異性を示す抗タウ抗体の分子的クローン化ならびにそれらの組換え発現および機能的特性解析は一般的に、その開示の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる国際出願公開第WO 2008/081008号として公開された国際出願第PCT/EP2008/000053号の実施例および補足の方法の節において記載されるとおりに実行されており、または実行することができる。本願において、タウ特異的B細胞の同定および目的の特異性を示すタウ抗体の分子的クローン化ならびにそれらの組換え発現および機能的特性解析の新しい方法が提供される。上述したように、本発明の1つの実施形態において、単一クローン性B細胞またはオリゴクローン性B細胞の培養物を培養し、そして、前記B細胞が産生した抗体を含有する前記培養物の上清を、その中の新しい抗タウ抗体の存在と親和性についてスクリーニングする。そのスクリーニング工程は、実施例1で説明され、図9に示されるような鋭敏な組織アミロイド斑免疫反応性(TAIR)アッセイの工程; 実施例2で説明され、図3および8に示されるようなPHF Tauへの結合についての脳抽出液のスクリーンの工程; アミノ酸セリン202およびセリン205にリン酸基を有する配列番号6に表されるアミノ酸配列のタウに由来するペプチドの結合についてのスクリーニングの工程; アミノ酸トレオニン231にリン酸基を有する配列番号6に表されるアミノ酸配列のタウに由来するペプチドの結合についてのスクリーニングの工程; および/または抗体NI-105.4E4のエピトープ確定実験のため、非リン酸化ペプチドを用いる、同様に実施例3で説明され、図5に示される、前記配列のアミノ酸セリン396およびセリン404にリン酸基を有するタウに由来するペプチドの結合についてのスクリーニングの工程; 国際特許公開第WO 2008/081008号に記載され、そして、実施例1で説明され、図2、5および7に示されるように、配列番号6で表されるアミノ酸配列の全長型タウの結合についてのスクリーンの工程および結合が検出される抗体または前記抗体を産生する細胞を単離する工程を含む。

#### 【0244】



## 抗原の精製

組換えヒトタウ40をrPeptide社(Bogart、ジョージア州、米国)より購入した。PHFTauはADの脳から抽出された。

### 【0245】

改変したGoedertらの方法(Goedert et al., Neuron 8 (1992), 159-168)に従って病的リン酸化タウ線維(PHFTau)を含有する対らせん状細線維の単離を実行した。1グラムのADの脳組織を、目に見える全ての血管を取り除き、5mmの小片に切断した。前記組織を40mLの氷冷洗浄溶液(100mM トリス pH7.4、6mM EGTA、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>および1mM NaF)で3回洗浄し、引き続いて20mLの溶解緩衝液(10mM トリス pH7.4、0.8M NaCl、1mM EGTA、1×プロテアーゼ阻害剤カクテル、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1mM NaF、1mM AEBSEF、10%ショ糖)を用いてホモジナイズした。ホモジネートを4、20,000×gで20分間遠心分離した。上清を回収し、N-ラウロイルサルコシネート(Sigma社、スイス)を1%(重量/体積)まで添加した。振盪しながら37で2時間保温した後、上清を4、100,000×gで1時間遠心分離した。沈殿物を回収し、そして、PBSに再懸濁した。プロテインA磁性ビーズで混入している可能性がある免疫グロブリンを除去した後に、PHFTau懸濁液を使用前に-80で保存した。健常対照のヒト脳組織からの対照抽出物を同様に調製した。

### 【0246】

#### ヒトタウ抗体スクリーニング

##### ELISA:

炭酸ELISAコーティング緩衝液(pH9.6)中の標準的な濃度である1μg/mLの組換えタウタンパク質(rPeptide社、Bogart、米国)を用いて4で一晩、96ウェル・ハーフ・エリア・マイクロプレート(Corning社)をコーティングした。PHFTauのスクリーニングには、炭酸ELISAコーティング緩衝液(pH9.6)中に1:100で希釈したヒトADの脳から抽出したPHFTauを用いて4で一晩、96ウェル・イモビライザー・マイクロプレート(Nunc社、デンマーク)をコーティングした。プレートをPBS-T、pH7.6で洗浄し、そして、2%BSA(Sigma社、Buchs、スイス)を含有するPBS-Tを用いて室温で2時間非特異的結合部位をブロックした。B細胞条件培地をメモリーB細胞培養プレートからELISAプレートに移し、そして室温で1時間インキュベートした。PBS-TでELISAプレートを洗浄し、次に、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(HRP)複合体化ロバ抗ヒトIgG(Fc断片特異的)ポリクローナル抗体(Jackson ImmunoResearch社、ニューマーケット、英国)とインキュベートした。PBS-Tを用いて洗浄した後、標準的な比色分析でHRP活性を測定することによりヒト抗体の結合を決定した。

### 【0247】

#### マルチアレイ(登録商標)マイクロプレートスクリーニング

標準的な96ウェル10-スポットマルチ-スポットプレート(Meso Scale Discovery社、米国)をPBS中の30μg/mLのrTau(rPeptide社)、PHFTau脳抽出物および健常対照脳抽出物を用いてコーティングした。3%BSAを含有するPBS-Tを用いて室温で1時間非特異的結合部位をブロックし、引き続いてB細胞条件培地と室温で1時間インキュベートした。PBS-Tでプレートを洗浄し、次に、SULFO-タグ複合体化抗ヒトポリクローナル抗体(Meso Scale Discovery社、米国)とインキュベートした。PBS-Tを用いて洗浄した後、SECTORイメージャ6000(Meso Scale Discovery社、米国)を用いる電気化学発光測定により抗体の結合を検出した。

### 【0248】

#### タウ抗体の分子的クローン化

健康なヒト対象からメモリーB細胞を含有する試料を得た。選別されたメモリーB細胞培養物の生きているB細胞を回収し、そして、mRNAを調製する。次にネステッドPCRアプローチを用いて免疫グロブリン重鎖配列および軽鎖配列を得る。

#### 【0249】

ヒト免疫グロブリン生殖系列レパートリーの全ての配列ファミリーに対応するプライマーの組合せを、リーダーペプチド、V断片およびJ断片の増幅のために使用する。5'末端のリーダーペプチド特異的プライマーと3'末端の定常領域特異的プライマーを用いて1回目の増幅を行う(Smith et al., Nat Protoc. 4 (2009), 372-384)。重鎖およびカッパ軽鎖については、5'末端のV断片特異的プライマーと3'末端のJ断片特異的プライマーを用いて2回目の増幅を行う。ラムダ軽鎖については、5'末端のV断片特異的プライマーと3'末端のC領域特異的プライマーを用いて2回目の増幅を行う(Marks et al., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597、de Haard et al., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230)。

#### 【0250】

完全抗体を組換え発現させて、ELISAに基づく再スクリーニングにより、所望の特異性を有する抗体クローンの同定を行う。5'末端にリーダーペプチドをコードする配列および3'末端に適切な定常ドメインをコードする配列を有する可変領域配列を相補する、可変重鎖配列および軽鎖配列が「正しい読み枠で」発現ベクターに挿入されて、完全ヒトIgG1抗体またはキメラIgG2a抗体の組換え発現が達成される。その目的のために、プライマーは、抗体発現ベクターへの可変重鎖配列および軽鎖配列のクローン化を容易にするように意図された制限酵素部位を含んだ。シグナルペプチドとヒト免疫グロブリン 1またはマウス免疫グロブリン 2aの定常ドメインを担持する重鎖発現ベクターに免疫グロブリン重鎖RT-PCR産物をインフレームで挿入することにより、重鎖免疫グロブリンが発現する。シグナルペプチドとヒトカッパ軽鎖免疫グロブリンの定常ドメインを提供する軽鎖発現ベクターにカッパ軽鎖RT-PCR産物をインフレームで挿入することにより、カッパ軽鎖免疫グロブリンが発現する。シグナルペプチドとヒトまたはマウスのラムダ軽鎖免疫グロブリンの定常ドメインを提供するラムダ軽鎖発現ベクターにラムダ軽鎖RT-PCR産物をインフレームで挿入することにより、ラムダ軽鎖免疫グロブリンが発現する。

#### 【0251】

免疫グロブリン重鎖発現ベクターおよびカッパまたはラムダ免疫グロブリン軽鎖発現ベクターをHEK293細胞またはCHO細胞(または、ヒトもしくはマウス起源の他の適切な受容細胞株)に共形質移入して、機能性組換えモノクローナル抗体を得る。その後標準的なプロテインAカラム精製を用いて条件培地から組換えヒトモノクローナル抗体を精製する。一過性形質移入細胞か安定的形質移入細胞のどちらかを用いて無限量の組換えヒトモノクローナル抗体を産生することができる。前記免疫グロブリン発現ベクターを直接使用するか、異なる発現ベクターに免疫グロブリン可変領域を再クローン化するかのどちらかにより、組換えヒトモノクローナル抗体を産生する細胞株を構築することができる。F(ab)、F(ab)<sub>2</sub>およびscFvなどの誘導体をこれらの免疫グロブリン可変領域から作製することもできる。

#### 【0252】

##### 抗体

製造業者のプロトコルに従って、マウスモノクローナル抗ヒトタウ抗体Tau12(Covance社、カリフォルニア州、米国)およびマウスモノクローナルタウ抗体AT180(Thermo Scientific社、米国)を使用した。組換えヒトタウ抗体NI-105.4E4、NI105.24B2およびNI-105.4A3は本発明の抗体である。それらはHEK293細胞またはCHO細胞で発現され、条件培地から精製され、そして、この後の適用では、別途、示されない限り、直接的に使用された。実施例1~4では、精製された本発明の組換え抗体が使用された。

## 【0253】

## 直接ELISA

炭酸ELISAコーティング緩衝液(50mM、pH9.6)中に1 $\mu$ g/mLの濃度に希釈した組換えタウタンパク質(hTau40、rPeptide社、Bogart、米国)を用いて4 $\times$ で一晚、96ウェルマイクロプレート(Costar、Corning社、米国)をコーティングした。2%BSA(Sigma社、Buchs、スイス)および0.5%ツイーン20を含有するPBSを用いて室温で2時間非特異的結合部位をブロックした。HRP複合体化ヤギ抗ヒトIgG Fc(Jackson Immuno Research社、ニューマーケット、英国)を用い、引き続いて標準的な比色分析でHRP活性を測定して本発明のヒト抗体(NI-105.4E4、NI-105.24B2およびNI-105.4A3)の結合が測定された。GraphPad Prismソフトウェア(サンディエゴ、米国)を用いる非線形回帰によりEC<sub>50</sub>値を推定した。

10

## 【0254】

## ウェスタンブロットティングタンパク質 染色

PHFTauおよび組換えhTau40をグラジエントSDS-PAGE(NuPAGE 4~12%; Invitrogen社、バーゼル、スイス)により分離し、引き続いてニトロセルロース膜へのエレクトロブロットティングを行った。2%BSAを用いて室温で1時間非特異的な結合をブロックした後、プロットを一次抗体NI-105.4E4、NI-105.24B2(ヒト)またはTau12(マウスモノクローナル抗体、Covance社、カリフォルニア州、米国)と一晚インキュベートし、引き続いてHRP複合体化ヤギ抗ヒトIgG Fc 二次抗体(ヒト一次抗体用)またはHRP複合体化ヤギ抗マウスIgG二次抗体とインキュベートした。

20

## 【0255】

ECIおよびImageQuant 350検出法(GE Healthcare社、Oetelfingen、スイス)を用いてプロットを現像した。

## 【0256】

## ADの脳からのPHFTauの抽出

改変したGoedertらの方法(Goedert et al., Neuron 8 (1992), 159-168)に従って病理的リン酸化タウ線維(PHFTau)を含有する対らせん状細線維の単離を実行した。1グラムのADの脳組織を、目に見える全ての血管を取り除き、5mmの小片に切断した。前記組織を40mLの氷冷洗浄溶液(100mM トリス pH7.4、6mM EGTA、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>および1mM NaF)で3回洗浄し、引き続いて20mLの溶解緩衝液(10mM トリス pH7.4、0.8M NaCl、1mM EGTA、1 $\times$ プロテアーゼ阻害剤カクテル、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1mM NaF、1mM AEBF、10%ショ糖)を用いてホモジナイズした。ホモジネートを4 $\times$ 、20,000 $\times$ gで20分間遠心分離した。上清を回収し、N-ラウロイルサルコシネート(Sigma社、スイス)を1%(重量/体積)まで添加した。振盪しながら37 $^{\circ}$ Cで2時間保温した後、上清を4 $\times$ 、100,000 $\times$ gで1時間遠心分離した。沈殿物を回収し、そして、PBSに再懸濁した。プロテインA磁性ビーズで混入している可能性がある免疫グロブリンを除去した後に、PHFTau懸濁液を使用前に-80 $^{\circ}$ Cで保存した。健常対照のヒト脳組織からの対照抽出物を同様に調製した。

30

40

## 【0257】

## タウ ペプチドの合成

PeptSpotマッピングにより特定されたNI-105.4E4のエピトープ(アミノ酸337~343)を含むhTau40のアミノ酸333~346に対応するペプチド(<sub>333</sub>GGGQVEVKSEKLD<sub>346</sub>)がSchaefer-N社(コペンハーゲン、デンマーク)により合成された。イモビライザー・マイクロプレート(Nunc社、デンマーク)への共有結合を可能にするために追加のシステインをC末端に付加した。市販されているマウスモノクローナルタウ抗体AT180(Thermo Scientific

50

f i c 社、米国) の同じ性質のエピトープである、ヒトタウのアミノ酸 226 ~ 239 に対応する第2ペプチド( <sub>226</sub> V A V V R p T P P K S P S S A <sub>239</sub> ) が同様に合成され、そして、対照として使用された。

#### 【0258】

##### 遺伝子導入マウス

本発明のタウ抗体(およびその結合特異性を有する分子)を検証するために、3つの異なるタウオパチーの動物モデルを使用する。

#### 【0259】

1. 遺伝子導入 T a u P 3 0 1 L マウス(系統 183): マウス T h y 1.2 プロモーターの制御下で、P 3 0 1 L 突然変異を有するヒトタウ 40 を発現する。(これらの遺伝子導入動物の作製は、G o e t z e t a l. , J. B i o l. C h e m. 276 (2001), 529-534 および国際出願公開第 W O 2 0 0 3 / 0 1 7 9 1 8 号に記載される。その開示の内容が参照により本明細書に組み込まれる。)

10

#### 【0260】

2. マウス P r P プロモーターの制御下で、P 3 0 1 L 突然変異を有する最短 4 R ヒトタウアイソフォームを発現する J N P L 3 マウス(米国、ニューヨーク州、ハドソンの T a c o n i c 社より入手可能)。

#### 【0261】

3. マウス P r P プロモーターの制御下で、P 3 0 1 S 突然変異を有するヒトタウを発現する P 3 0 1 S T a u (系統 P S 19) マウス(米国、メイン州、バー・ハーバーの J a c k s o n L a b o r a t o r y 社より入手可能)。

20

#### 【0262】

タウオパチーマウスモデルおよび対応する野生型マウスは、自由に摂食と飲水が可能であり、12時間:12時間転換の明暗周期で標準的な居住条件下で飼育される。処理群は年齢と性別について釣り合いがとれている。

#### 【0263】

##### 実施例1: ヒトタウ - 抗体の標的と結合特異性の検証

単離した抗体が認識する標的としてのタウを検証するために、上述したように直接 E L I S A 法を実行した。例示的な組換えヒト N I - 105.4A3 抗体について、炭酸 E L I S A コーティング緩衝液(pH 9.6)中に 3 μg/mL の濃度に希釈した組換えヒトタウ(h T a u 40、r P e p t i d e 社、B o g a r t、米国)、または炭酸 E L I S A コーティング緩衝液(pH 9.6)中の B S A を用いて 96 ウェルマイクロプレート(C o s t a r、C o r n i n g 社、米国)をコーティングし、そして、前記抗体の結合効率を試験した。例示的な N I - 105.4A3 抗体は、E L I S A によりヒトタウに特異的に結合する。B S A に対して結合は観察されない(図10)。

30

#### 【0264】

例示的な抗体 N I - 105.4E4 および N I - 105.24B2 の2分の1最大有効濃度(E C<sub>50</sub>)の決定のために、様々な濃度の抗体を用いる追加的な直接 E L I S A 実験を行った。炭酸 E L I S A コーティング緩衝液中に(N I - 105.4E4 抗体を用いるアッセイについて)1 μg/mL の濃度、または(N I - 105.24B2 抗体を用いるアッセイについて)3 μg/mL の濃度に希釈した組換えヒトタウ(h T a u 40、r P e p t i d e 社、B o g a r t、米国)を用いて 96 ウェルマイクロプレート(C o s t a r、C o r n i n g、米国)をコーティングし、そして、前記抗体の結合効率を試験した。G r a p h P a d P r i s m ソフトウェアを用いる非線形回帰により E C<sub>50</sub> 値を推定した。組換えヒト由来抗体 N I - 105.4E4 は 2.4 nM E C<sub>50</sub> という低ナノモル範囲の高親和性で h T a u 40 に結合する(図2)。N I - 105.24B2 は 6.6 nM の E C<sub>50</sub> という低ナノモル範囲の高親和性で h T a u 40 に結合する(図7)。

40

#### 【0265】

直接 E L I S A 実験を用いて例示的な抗体 N I - 105.4A3 の2分の1最大有効濃

50

度 ( $EC_{50}$ ) もまた決定された。組換えヒトタウ ( $hTau40$ 、 $1 \mu g/mL$ )、 $PHFTau$  ( $1:100$ ) および対照調製物 ( $1:100$ ) を用いて  $ELISA$  プレート をコーティングし、そして、さまざまな濃度の抗体とインキュベートした。 $NI-105.4A3$  は  $1.4 nM$  の  $EC_{50}$  という低ナノモル範囲の高親和性で  $rTau$  に結合する。 $NI-105.4A3$  は  $1.2 nM$  の  $EC_{50}$  という低ナノモル範囲の高親和性で  $PHFTau$  に結合する (図 12)。

#### 【0266】

実施例 2：組換えタウおよび AD の脳から抽出された病理的タウへの組換えヒト抗体の結合の解析

AD の脳から抽出された病理的タウ種への  $NI-105.4E4$  および  $NI-105.24B2$  の結合能を決定するために、先に詳細を説明したとおり、 $SDS-PAGE$  とウェスタンブロット分析を実行した。ブロットを一次抗体  $NI-105.4E4$  (ヒト)、 $NI-105.24B2$  (ヒト) または  $Tau12$  (マウスモノクローナル抗体、 $Covance$  社、カリフォルニア州、米国) と一晩インキュベートし、引き続いて  $HRP$  複合体化ヤギ抗ヒト  $IgG-Fc$  二次抗体 (ヒト抗体用) または  $HRP$  複合体化ヤギ抗マウス  $IgG$  二次抗体とインキュベートした。

#### 【0267】

組換え抗体  $NI-105.4E4$  (図 3) および  $NI-105.24B2$  (図 8) はウェスタンブロットで組換え  $hTau40$  ならびに AD の脳から抽出された病理的修飾型  $PHFTau$  を認識する。予想されたとおり、対照抗体  $Tau12$  は同様に両方のタウ種を認識する (図 3)。

#### 【0268】

さらに、上記の実施例 1 で考察したように、 $PHFTau$  を用いる直接  $ELISA$  実験で、例示的な抗体  $NI-105.4A3$  の 2 分の 1 最大有効濃度 ( $EC_{50}$ ) が決定された。 $NI-105.4A3$  は  $1.2 nM$  の  $EC_{50}$  という低ナノモル範囲の高親和性で  $PHFTau$  に結合する (図 12)。

#### 【0269】

実施例 3： $hTau40$  上の  $NI-105.4E4$  および  $NI-105.4A3$  の結合エピトープのマッピング

2 つの隣接するペプチドの間で 11 個のアミノ酸が重複する 118 ペプチド配列からなる、全長型  $hTau40$  (アミノ酸 1 ~ 441) をカバーするペプチドアレイ ( $JPT Peptide Technologies GmbH$  社、ベルリン、ドイツ) をニトロセルロース膜にスポットした。製造業者の使用説明書に従って抗体の免疫標識ならびに膜の再生を行った。検出抗体の非特異的な結合を除外するために、最初に一次抗体を省略して  $HRP$  複合体化ヤギ抗ヒト  $IgG$  によって前記膜を探索した (図 4B)。再生した後に、 $100 nM$  の組換え  $NI-105.4E4$  抗体で前記膜を探索した。 $ECL$  および  $ImageQuant 350$  検出法 ( $GE Healthcare$  社、 $Otelfingen$ 、スイス) を用いて結合した抗体を検出した。

#### 【0270】

検出抗体のみと比較されると (図 4B)、2 つのグループの隣接するペプチドスポット (ペプチド 83、84 および 85；ペプチド 96 および 97) が  $NI-105.4E4$  によって特異的に同定された (図 4A および A')。これらの 2 つのグループのペプチドによってカバーされる配列は  $hTau40$  のアミノ酸 329 ~ 351 および 387 ~ 397 に対応する。これらのデータは、 $NI-105.4E4$  が 2 つの直鎖状配列、すなわち、R4 微小管結合ドメイン内の 1 つの配列と C 末端ドメインの別の配列を含む非連続的なエピトープを認識することを示唆する。

#### 【0271】

ペプチド 83 ~ 85 によって共有される配列は  $hTau40$  のアミノ酸残基 337 ~ 343 を含む。  $PeptideSpot (JPT)$  のデータは、 $NI-105.4E4$  が、ヒトタウのアミノ酸 337 ~ 343 を含む  $hTau$  内のエピトープを認識することを示唆する。こ

の領域はタウの微小管結合ドメイン内に局在し、そして、全ての神経性ヒトタウアイソフォームの間ならびにマウスおよびラットを含む他の種の間にも保存されている。

【0272】

生理的微小管結合タウでは、このドメインは微小管と結合しているので、NI-105.4E4は、微小管から脱離した病理的に関連のあるタウのプールを優先的に標的とする

【0273】

NI-105.4E4結合ペプチド内の重要な残基を決定するために、アラニンスキャニングを実行して、1つずつ各残基をアラニンで置換した。オリジナルの配列中のアラニン残基(A384およびA390)はプロリンとグリシンに置換された(図4E)。スポット35~50および51~68(図4C)はオリジナルのペプチド(スポット35およびスポット51)およびそれらのアラニン置換異型体であり、それらのアミノ酸配列は図4DおよびEに示される。アラニンスキャンは、V339、E342、D387、E391およびK395がNI-105.4E4の結合に必要なことを示唆している。

【0274】

NI-105.4E4のタウペプチドへの結合を試験することにより、追加の実験が行われた。NI-105.4E4は、PeptSpotマッピングにより同定されたアミノ酸残基337~343を含有する、hTau40のアミノ酸333~346に対応するペプチドを特異的に認識することが直接ELISAによって示されている(図5)。AT180エピトープをカバーする対照ペプチドに対して、NI-105.4E4の交差反応性は観察されていない。その反対に、AT180はその同じ性質のエピトープを含有するペプチドを認識するが、NI-105.4E4特異的ペプチドに結合することができない。種特異的二次抗体は前記ペプチドのいずれにも結合しない。まとめると、NI-105.4E4は、PeptSpotマッピングにより同定された、ヒトタウのアミノ酸残基337~343を含有するペプチドを特異的に認識することが被覆ペプチドを用いる直接ELISAにより、確認される。

【0275】

hTau40上のNI-105.4A3結合エピトープの位置を全体的に特定するために、4つのタウドメインポリペプチド(タウドメインI、ドメインII、ドメインIIIおよびドメインIV)を作製した。N末端に6xヒスチジンでタグした各タウドメインをコードする、GeneArt(登録商標)(Invitrogen社)を用いて合成したDNA断片をpRSET-A発現ベクター(Invitrogen社)にクローン化し、大腸菌BL21(DE3)株(New England Biolabs社)に形質移入した。ヒスチジntag化タウドメインの発現を0.5mMのIPTGにより6時間誘導した後に細菌をリゾチームと超音波処理により溶解した。溶菌液を5分間煮沸した後に、Ni-NTA Superflowカラム(Qiagen社)を用いてさらに精製した。溶出したヒスチジntag化タウドメインは、ELISAプレートのコーティングに用いられるか、またはウェスタンブロットのためにポリアクリルアミドゲルに負荷された。これらの連続的に重複するタウドメインポリペプチドはhTau40の全長をカバーする(図13A)。精製したタウドメインがELISAプレートのコーティングに用いられ、そして、NI-105.4A3の結合が試験された。NI-105.4A3はタウドメインIおよび全長型hTau40にのみ結合し、このことは、前記エピトープがhTau40のN末端部分(アミノ酸1~136)の内部にあることを示している(図13B)。NI-105.4A3のタウドメインIへの特異的な結合がウェスタンブロットにより確認される(図13C)。

【0276】

PeptSpot(JPT)テクノロジーを用いるNI-105.4A3エピトープマッピングがヒトTau40のアミノ酸Q35~Q49を特定した(図14AおよびC)。NI-105.4A3の結合にとっての前記エピトープ内の重要な残基を決定するために、アラニンスキャニングを実行し、1つずつ各残基をアラニンで置換した。オリジナルの配

10

20

30

40

50

列中のアラニン残基（A 4 1）をグリシンまたはプロリンで置換した（図 1 4 B）。左から右へ 1 および 1 7 で番号付けしたスポットはオリジナルのエピトープ（スポット 1）およびそのアラニン置換体であり、それらのアミノ酸配列は図 1 4 C に示されている。アラニンスキャンは、D 4 0、A 4 1 および K 4 4 が N I - 1 0 5 . 4 A 3 の結合に重要な残基であることを示している。

#### 【 0 2 7 7 】

実施例 4：A D の脳組織およびヒトタウ遺伝子導入マウスにおけるタウの生理的形態ならびに病理的凝集体への N I - 1 0 5 . 4 E 4 の結合の評価

高リン酸化タウ線維から構成される神経原線維濃縮体（N F T）は A D の神経病理的特徴である。高リン酸化タウ線維はまたジストロフィー性神経突起および糸屑状構造物の主要な成分でもあり、それらの両方が A D の共通した神経病理的特色である。家族性 P 3 0 1 L タウ突然変異を含有するヒトタウのマウスでの過剰発現が 6 か月齢での N F T 形成を誘導する（G o t z e t a l . , 2 0 0 1 a）。

#### 【 0 2 7 8 】

タウの生理的形態ならびに病理的凝集体への組換えヒトタウ抗体の結合を評価するために、本発明の例示的な N I - 1 0 5 . 4 E 4 抗体を用いて A D の脳組織と T a u P 3 0 1 L 遺伝子導入マウスでの免疫組織学的染色を実行した。

#### 【 0 2 7 9 】

深麻酔下、室温で 2 0 m L の 1 0 0 m M トリス C l / 6 m M E G T A ( p H 7 . 4 ) を用いてマウスに灌流を行った。脳を取り出し、固定のために 4 で一晩、P B S ( p H 7 . 4 ) 中の 4 % P F A に浸漬し、引き続いてパラフィンに包埋した。ヒト組織については、A D および健康な対照対象に由来する脳組織のパラフィンプロックを用いた。標準的なプロトコルに従って D A B 染色を行った。陽性対照として、マウスモノクローナル抗体 T a u - 1 2 ( C o v a n c e 社、カリフォルニア州、米国)を用いた。一次抗体無し

#### 【 0 2 8 0 】

の H R P 複合体化検出抗体もまた含まれた。

組換えヒト抗体 N I - 1 0 5 . 4 E 4 が A D の脳で多数の N F T および糸屑状構造物を同定したが（図 6 A）、それらは健常対照の脳では存在しない（図 6 B）。二次抗体のみでは A D（図 6 C）と対照の脳（図 6 D）の両方でシグナルが得られない。P 3 0 1 L タウ遺伝子導入マウスの脳では、N I - 1 0 5 . 4 E 4 は、N F T（図 6 E、F および H）、糸屑状構造物（図 6 E および G）およびジストロフィー性神経突起（図 6 E および H）に類似する病理的タウに強く結合する。さらに、N I - 1 0 5 . 4 E 4 はまたプレタングルステージ（p r e - t a n g l e s t a g e）のタウ凝集体を同定する（図 6 I）。ヒト P 3 0 1 L タウならびにスウェーデン型および北極型突然変異を有するヒト A P P の両方を過剰発現する遺伝子導入マウスの脳では、N I - 1 0 5 . 4 E 4 は、アミロイド斑を取り囲むジストロフィー性神経突起に特異的に結合する（図 6 J）。

#### 【 0 2 8 1 】

実施例 5：本発明の抗体のインビボ試験

既に上述したように、遺伝子導入マウス系列でのリン酸化タウペプチドを使用する能動的ワクチン投与を用いる研究により、脳におけるタウ凝集体の脳内レベルの減少と行動障害の進行の遅滞が明らかになった（S i g u r d s s o n , J . A l z h e i m e r s D i s . 1 5 ( 2 0 0 8 ) , 1 5 7 - 1 6 8 ; B o i m e l e t a l . , E x p . N e u r o l . 2 2 4 ( 2 0 1 0 ) , 4 7 2 - 4 8 5）。しかしながら、老齢集団のかなりの部分がワクチン投与に対する非反応者であると予想されるので、能動的ワクチン投与はヒトではあまり使用に適していない可能性がある。また、タウ指向性免疫反応に関連する潜在的な副作用が制御しがたい可能性がある。本発明のタウ結合分子は、病理的タウ種に対する類似の結合特異性のため、マウス抗体について上述したように、同様のタウ凝集体の脳内レベルの減少を達成すると合理的に予想することができる。しかしながら、進化的に最適化とヒト免疫システム内での親和性成熟のため、本発明の抗体は、優れた安全性プロファイルと免疫原性の欠如の可能性が高い健康なヒト対象から

10

20

30

40

50

単離されたことにより、価値のある治療手段を提供する。これらの予想される治療効果の確証は、先に言及したマウス抗体を用いる実験において説明された試験方法によってもたらされ得る。特に、腹腔内抗体注射、頭蓋内注射、脳室内脳点滴などのありとあらゆる経路で前記動物にスクリーニングする抗体を投与し、治療効果について試験することができる。アミロイド誘導性タウ病理への治療効果を評価するために、タウ遺伝子導入マウスの脳へのアミロイド調製物の先の脳内注射の後に、先に言及した応用可能性のいずれかを用いることもできる。

【0282】

Gallias 陽性細胞数、総ヒトタウ染色量、リン酸化タウの脳負荷の定量化および / または連続的な脳抽出に基づく脳内の可溶性タウおよび不溶性タウおよびリン酸化タウのレベルの生化学的決定を含む組織化学的方法により治療効果の評価を行うことができる。さらに、本発明の抗体の治療効果の確認のために、処理されたマウスの行動試験、例えば、味覚嫌悪条件づけまたは文脈恐怖条件づけを行うことができる (Pennanen, Genes Brain Behav. 5 (2006), 369-79、Pennanen Neurobiol Dis. 15 (2004), 500-9.)。

10

【0283】

実施例 6：抗体 4E4 と 4A3 のマウス IgG2a 定常ドメインとのキメラ化

慢性治療試験用の免疫原性が低下した抗体を作製するために、組換え DNA 技術を用いて、マウスキメラ版の抗体 4E4 と 4A3 を作製した。高い親和性でマウス Fc-ガンマ受容体に結合し、したがって、免疫エフェクター反応を誘導することが可能である分子を作製するため、これらのキメラ抗体用にマウス IgG2a / ラムダアイソタイプを選択した。キメラ 4E4 (ch4E4) およびキメラ 4A3 (ch4A3) 重鎖コンストラクトおよび軽鎖コンストラクトのアミノ酸配列が下記に示される。

20



## 【表 3】

## 【表3】

表3:キメラ4E4(ch4E4)およびキメラ4A3(ch4A3)のアミノ酸配列

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| 成熟型ch4E4重鎖<br>(マウスIgG2a)<br>配列番号20 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFNISAIHWVRQASGK<br>GLEWVGRIRSKSHNYATLYAASLKGRFTLSRDDSRNTAYLQMS<br>SLQTEDMAVYYCTVLSANYDTFDYWGGQGLTVTVSSAKTTAPSV<br>YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH<br>TFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDK<br>KIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIAPPKIKDVLMSLSPIV<br>TCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV<br>VSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAP<br>QVYVLPPEEEMTKKQVTLCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTEL<br>NYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL<br>HNHHTTKSFSRTPGK |
| 成熟型ch4E4軽鎖<br>(マウス λ 鎖)<br>配列番号21  | SYELTQPPSVSVSPGQTARISCFGDTLPKQYTYWYQQKPGQAP<br>VLVIYKDTERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCL<br>SADNSATWVFGGGTKVTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELETNKA<br>TLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNKY<br>MASSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS  |

10

20

## 【0284】

30

実施例7:抗体4E4と4A3のマウスIgG2a定常ドメインとのキメラ化

4E4重鎖のCDR1領域にコンセンサスN-結合型グリコシル化部位が特定された。哺乳類(CHO)細胞で発現すると、マスマスペクトロメトリーにより示されるとおり、予想されたN-グリコシル化部位(アスパラギン30)が完全にグリカンによって占められた。この領域でのN-グリコシル化を除去し、そして、産物の不均質性を低下させるために、ch4E4の重鎖のアスパラギン30がグルタミンに変更された(表4)。産生され、CHO細胞から精製されると、その改変型抗体は、オリジナルのグリコシル化抗体に対して見かけ上、約4倍高い結合親和性で組換えタウに結合した(図15を参照のこと)。

## 【表 4】

## 【表4】

表4:成熟型ch4E4(N30Q)重鎖(マウスIgG2a)のアミノ酸配列

置換グルタミン残基は太字および下線で示してある。

|  |   |
|--|---|
| 成熟型ch4E4<br>(N30Q)重鎖<br>(マウスIgG2a)<br>配列番号22 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFNFQISAIHWVRQASGKG<br>LEWVGRIRSKSHNYATLYAASLKGRFTLSRDDSRNTAYLQMSSL<br>QTEDMAVYYCTVLSANYDTFDYWGGQGLTVTVSSAKTTAPSVYPL<br>APVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPA<br>VLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPR<br>GPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI <del>FPPKIKD</del> VLMISLSPIVTCVVV<br>DVSEDDPDVQISW <del>FVNN</del> EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI<br>QH <del>QD</del> WMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP<br>PPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEP<br>VLDS <del>D</del> GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKS<br>FSRTPGK |
|--|---|

10

20

## 【0285】

実施例8：脱グリコシル化キメラ4E4(ch4E4(N30Q)mIgG1アグリ)抗体の作製

抗体のエフェクター機能と活性の間関係の評価するために、4E4のマウスキメラ脱グリコシル化異型体を作製した(ch4E4(N30Q)IgG1-アグリ抗体)。重鎖については、コンセンサスFcグリコシル化部位を除去するためのアスパラギンからグルタミンへの突然変異を含有するマウスIgG1重鎖定常領域に4E4の可変ドメインを融合させた。前記重鎖可変領域はまた、CDR1のコンセンサスN-グリコシル化部位(実施例7)を除去するために、N30Q変異を含有した。軽鎖は上述したch4E4ラムダ軽鎖であった。

30

## 【0286】

実施例9：ヒト4E4および4A3の急性脳透過性試験

CHO細胞の一過性形質移入によりヒト4E4および4A3を産生し、そして、親和性精製により精製した。エンドトキシンのレベルが管理され、それらは全て1EU/mgよりも低かった。30mg/kgの4E4抗体(n=7)、4A3抗体(n=7)または等体積のPBS(n=7)で第1日と第4日にTauP301Lマウスを腹腔内注射した。第5日に、麻酔下で、1Unit/mlのヘパリンを含有するPBSを用いてマウスに灌流を行った。分析のために血液、脳および脊髄を採取した。脳の右半球は-80℃で凍結し、脳の左半球と脊髄は、10%の中和化ホルマリン中に4℃で2日間後固定された後にパラフィンブロックに包埋され、切片が作製された。血漿はアリコットに分けて-80℃で保存された。

40

## 【0287】

脳タンパク質の抽出：凍結した右半球の重量を量り、そして、5倍の体積(5mL/g湿組織)の50mM NaCl、0.2%ジエチルアミン、プロテアーゼ阻害剤(Roche Diagnostics GmbH社)およびホスファターゼ阻害剤(Roche Diagnostics GmbH社)を含有する溶液中でホモジナイズした。次に、試料をポリカーボネート製のチューブに移し、さらに5倍の体積のホモジナイズ溶液を加

50

え、そして、氷上で30分間保持した。次に、100,000g、4で30分間の遠心分離の後、可溶性画分を回収した。ヒトIgGアッセイにこの可溶性画分を使用した。3倍の体積の、プロテアーゼ阻害剤とホスファターゼ阻害剤を含むPBSに沈殿物を再懸濁した。16,000g、4で30分間の遠心分離の後に、さらなる不溶性タウ抽出のために上清と沈殿物を別々に-80で保存した。改変サルコシル抽出 (Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Neuron 8, 159 (1992))を用いて沈殿物をさらに抽出した。

#### 【0288】

ヒトIgG特異的サンドイッチELISA: 50mM炭酸ELISAコーティング緩衝液(pH9.6)中の2μg/mLのヤギ抗ヒトIgG Fab (Jackson社)を捕捉抗体として使用した。捕捉抗体を用いて30μL/ウェルでハーフ・エリア・96ウェル・マイクロプレートに4で一晩コーティングした。次に、0.1%ツイーン20を含有するPBSを用いて前記プレートを4回洗浄した後に、2%BSAを含有するPBSを50μL/ウェルで用いて室温で1時間インキュベートした。脳抽出物の可溶性画分、血漿試料および標準抗体(4A3)を、2%BSAおよび0.1%ツイーン20を含有するPBS中に希釈した。30μLの希釈した試料を各ウェルに添加し、そして、室温で1時間インキュベートした。次に、0.1%ツイーン20を含有するPBSを200μL/ウェルで用いて前記プレートを4回洗浄した後に、HRP複合体化ロバ抗ヒトFc (Jackson社、2%BSAおよび0.1%ツイーン20を含有するPBS中に1:10,000で希釈)と室温で1時間インキュベートした。次に、0.1%ツイーン20を含有するPBSを200μL/ウェルで用いて前記プレートを4回洗浄した後に、テトラメチルベンジジン(TMB)(10mMクエン酸溶液pH=4.1中に1:20で希釈)を20μL/ウェルで添加した。次に、各ウェルに10μLの1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加することにより、反応を停止した。4A3の段階希釈から抗体の検量線を得た。前記検量線に従って、血漿および脳試料中の抗体濃度を計算した。次に、図17に示されるように、脳ヒトIgGレベルをμg抗体/g新鮮脳組織(1g/10mLと仮定する)に変換した。

#### 【0289】

4E4および4A3で処理されたマウス全てで血漿中に高レベルのヒトIgGが検出された。対照的に、PBSで処理されたマウスの血漿中にはヒトIgGは検出されなかった(図16)。4E4および4A3で処理されたマウスの脳ホモジネートで著しい量のヒトIgGが検出された(図17)。

#### 【0290】

実施例10: キメラ4E4および4A3を用いる慢性試験

オリジナルのヒト抗体の可変ドメインとマウスIgG2aの定常領域を含有するキメラ4E4および4A3をCHO細胞の一過性形質移入より作製することができ、そして、親和性精製により精製することができる。抗体の各バッチのエンドトキシンのレベルが管理され、そして、1Eu/mgより低く保たれる。性別について釣り合いをとった、7.5~8か月齢のTauP301Lマウスに10mg/kg、3mg/kgの抗体溶液、または等体積のPBS対照を用いて腹腔内注射する。各処理群は20~25匹のマウスを有する。前記処理は26週間にわたって週に1回行われる。あるいは、前記処理は13週間にわたって週に2回行われる。体重を2週間ごとにモニターする。処理期間の最後に麻酔下でマウスに灌流を行う。脳、脊髄および血液を回収する。脳の半分と脊髄を10%ホルマリン中で後固定した後、パラフィンブロックに包埋することができる。これらの組織ブロックから作製された4~6μmの厚みの切片を免疫組織化学試験に使用することができる。他方の脳の半分の重量を量り、生化学分析のためにそれを-80で深凍結する。

#### 【0291】

神経原線維濃縮体(NFT)のレベルと様々な可溶性特性を有するタウのレベルを処理試料と対照試料で比較することにより、薬品の効果を評価する。Gallyasの鍍銀染色(F Gallyas Acta Morphol. Acad. Sci. Hun

10

20

30

40

50

g 19.1 (1971))、または、NFT中の病的リン酸化タウを認識するモノクローナルマウス抗体AT100およびAT180を用いる免疫染色によりNFTを可視化することができる。抗体処理マウスおよび対照動物の脳および脊髄中のGalleyas陽性ニューロンおよび/またはAT100、AT180標識化ニューロンの数または頻度によって、抗体処理の効果が評価されると判断することができる。

#### 【0292】

本明細書に記載される脳タンパク質抽出プロトコルに従って、可溶性タウおよび不溶性タウを抽出することができる。あるいは、可変サルコシル抽出(Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Neuron 8, 159 (1992))を用いて可溶性タウおよび不溶性タウを抽出することができる。簡単に説明すると、凍結した脳を10倍の体積(重量/体積)の、10mM トリス塩酸(pH7.4)、0.8M NaCl、1mM EGTA、1mM Na3VO4、1mM NaF、1mM AEB SF、プロテアーゼ阻害剤(Roche Diagnostics GmbH社)およびホスファターゼ阻害剤(Roche Diagnostics GmbH社)からなる10%ショ糖ホモジネート緩衝液の中でホモジナイズする。ホモジネートを20,000gで20分間遠心分離し、上清を保持する。沈殿物を10倍の体積のホモジナイズ緩衝液中でホモジナイズし、そして、2回目の遠心分離を行う。上清を一つにまとめることができ、そして、N-ラウリル-サルコシネート(Sigma社)を1%(重量/体積)の終濃度まで添加し、そして、300rpmで回転しながら37℃で1.5時間保温し、引き続き100,000gで1時間遠心分離を行う。サルコシル可溶性画分として上清を回収し、そして、沈殿物1gの脳組織の沈殿物をPHF画分として0.2mLの50mM トリス塩酸(pH7.4)に再懸濁する。

#### 【0293】

市販されているタウELISAキット(Invitrogen社)を用いて可溶性タウおよび不溶性タウのレベルを測定する。さらに、脳タンパク質抽出物を4~12%Bis-トリスSDS-PAGEで分離し、Tau12(ヒトタウ)抗体、AT8(pS202/pT205)抗体、AT100(pT212/pS214)抗体、AT180(pT231)抗体およびE178(pS396)抗体を用いるイムノブロットングを行った。既知の量のタウの標準物質に対する各試料の総密度を測定することで半定量的分析を行う。

#### 【0294】

さらに、先に実施例5で示したように、行動試験を行うことができる。例えば、2試験性Y迷路試験を用いて、抗体処理TauP301Lマウスにおける作業記憶の改善を試験することができる(例えば、Pennanen, Genes Brain Behav. 5 (2006), 369-79、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。その迷路の3つのアームは長さが22cmであり、幅が5cmであり、高さが15cmである。迷路を囲む黒いカーテンに黒と白の抽象的な迷路の手がかりが配置される。暗期の間は、6ルクスの環境光を用いて実験を実行する。各実験はトレーニングセッションと観察セッションを含む。トレーニングセッションの間では、3つのアームのうちの2つ(開始アームおよび第2アーム)にマウスを配置し、マウスがそれらのアームを4分間自由に探索することができるが、第3アーム(新規のアーム)にはアクセスできない。次に、マウスが迷路から取り出され、そして、いかなる嗅覚の手がかりも除去するために70%エタノールで迷路を徹底的に掃除している間、マウスがかごに1.5~5分間保持される。次に、前記マウスが再び迷路に戻され、3つのアーム全てをアクセス可能にして4分間観察される。各アームへの進入の順序、進入の回数および各アームで過ごした時間が記録される。その記録から、新規の第3アームで過ごした時間の、他の2つのアーム(開始アームおよび第2アーム)で過ごした時間の平均値に対する割合が計算され、そして、タウオパチーマウスモデルの異なる処理群および対応する対照野生型マウスの間で比較される。げっ歯類動物は、典型的には、既に訪れたアームに戻るよりはむしろ迷路の新しいアームを調べることを好む。タウオパチーマウスモデルの疾患に関連する作業記憶障害のた

め、未処理のマウスの区別できない行動と比べて、処理されたタウオパチーモデルマウスがこの好みを取り戻すことについて、抗体の効果をモニターすることができる。したがって、1に近い割合は作業記憶障害を表す。割合が高いほど、良い作業記憶を表す。T a u P 3 0 1 Lマウスの作業記憶障害は、ヒトタウの過剰発現から生じるタウ病理に起因すると考えられる。したがって、対照T a u P 3 0 1 Lマウスよりも抗タウ抗体処理T a u P 3 0 1 Lマウスで観察された著しく高い割合は、抗タウ抗体がタウ病理に治療効果を有することを表す。

【 0 2 9 5 】

本発明は、本発明の個々の態様の1つの例示として意図される、記載の特定の実施形態によって本発明の範囲が限定されることがないものとする。そして機能的に同等の任意の組成物または方法は本発明の範囲内である。実に、本明細書において示され、そして、記載されるものに加えて、本発明の様々な改変が、前出の説明および添付の図面から当業者に明らかとなるであろう。そのような改変は添付の特許請求項の範囲の範囲内に収まるものと意図される。

10

【 図 1 】

A NI-105.4E4-VH ( 可変重鎖配列 VH; 配列番号:9 )  
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFNFI~~SAIHWVRQASGKLEWVGRIRSKSHNYATLY~~  
-----FR3-----CDR3-----FR4-----  
~~AASLKGRTLSRDDSRTAYLQMSLQTEDMVYYCTVLSANYDTFDYWGQGLVTVSS~~

NI-105.4E4-VL ( 可変軽鎖配列 VL; 配列番号:11 )  
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---  
~~SYELTQPPSVSVSPGQTARISCFGGTLFKQYTYWYQKPGQAPVLVIYK~~SD~~TERPFGIPERFS~~  
~~LPV~~  
-----CDR3-----FR4-----  
GSSSGTIVTLTISGVAEDEADYCL~~SA~~DN~~SA~~TWVFGG~~TK~~VTVL

B NI-105.24B2-VH ( 可変重鎖配列 VH; 配列番号:13 )  
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFVNYII~~HWVRQAPGQGLEWMGIINP~~NGGNTSYAE  
~~E~~  
-----FR3-----CDR3---FR4-----  
~~KFQARVTLTSDTSTVYMDLSLTSEDTAVYYCAVLSPSNF~~WGQ~~GTIVTVSS~~

NI-105.24B2-VL ( 可変軽鎖配列 VL; 配列番号:15 )  
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---  
~~SYELTQPPSVSVSPGQTAGITCSGDALPKQFVYWKPGQAPVLLIYK~~SD~~TERPFRIPERFS~~  
~~V~~  
-----CDR3-----FR4-----  
GSTSGITVLTINGVAEDEADYCC~~Q~~ADRSGALWVFGG~~TK~~TLTVL

C NI-105.4A3-VH ( 可変重鎖配列 VH; 配列番号:17 )  
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
QVQLVESGGGAVQPGGSLRLS~~CAASGFTFS~~~~DYAMHWVRQAPGKGLQWVA~~VISYEGTYKY~~YAD~~  
~~E~~  
~~T~~  
-----FR3-----CDR3-----FR4-----  
~~SVKGRFTISRDNKNTLNQMSLRLVEDTAVYFCVKARAFASGQRSTSTVFDYWGQGLVTV~~  
~~SS~~

NI-105.4A3-VL ( 可変軽鎖配列 VL; 配列番号:19 )  
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---  
~~SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQKSGQAPVLVIYSDNKR~~FGIPERFS  
-----CDR3---FR4-----  
GSSSGTIVTLTISGAQVD~~EADYCYSTD~~ISGDLRVFGG~~TK~~TLTVL

図 1

【 図 2 】

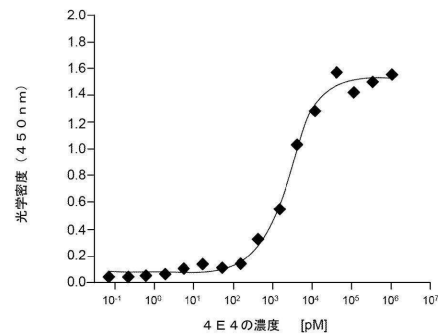


図 2

## 【図 3】

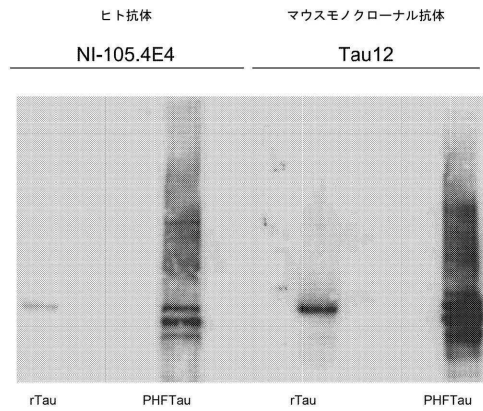
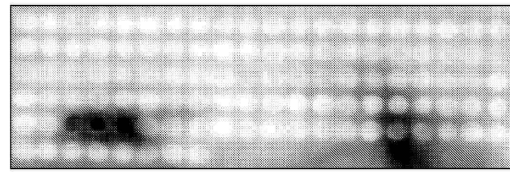


図 3

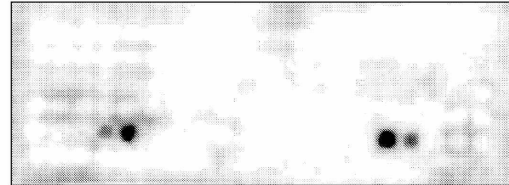
## 【図 4 A】

FIG. 4A



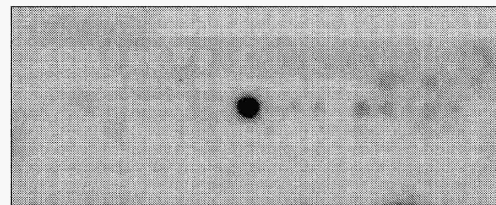
## 【図 4 A - 1】

FIG. 4A'



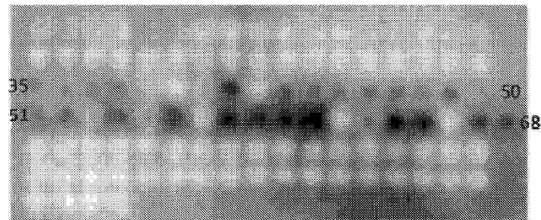
## 【図 4 B】

FIG. 4B



## 【図 4 C】

FIG. 4C



## 【図 4 D】

図 4 D

アラニン突然変異形成表 (4 E 4 エピトープ)

335 GQVEVK SEKLDFKDR<sub>349</sub>

|    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |         |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---------|
| 35 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | 配列番号:43 |
| 36 | A | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | 配列番号:44 |
| 37 | G | A | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | 配列番号:45 |
| 38 | G | Q | A | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | 配列番号:46 |
| 39 | G | Q | V | A | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | 配列番号:47 |
| 40 | G | Q | V | E | A | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | 配列番号:48 |
| 41 | G | Q | V | E | V | A | G | E | K | L | D | F | K | D | R | 配列番号:49 |
| 42 | G | Q | V | E | V | K | A | E | K | L | D | F | K | D | R | 配列番号:50 |
| 43 | G | Q | V | E | V | K | S | A | K | L | D | F | K | D | R | 配列番号:51 |
| 44 | G | Q | V | E | V | K | S | E | A | L | D | F | K | D | R | 配列番号:52 |
| 45 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | A | D | F | K | D | R | 配列番号:53 |
| 46 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | A | F | K | D | R | 配列番号:54 |
| 47 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | A | K | D | R | 配列番号:55 |
| 48 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | A | D | R | 配列番号:56 |
| 49 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | A | R | 配列番号:57 |
| 50 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | A | 配列番号:58 |

## 【図 4 E】

図 4 E

アラニン突然変異形成表 (4 E 4 エピトープ)

383 KAKTDHGA EIVYKSP<sub>397</sub>

|    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |         |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---------|
| 51 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | 配列番号:59 |
| 52 | A | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | 配列番号:60 |
| 53 | K | G | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | 配列番号:61 |
| 54 | K | P | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | 配列番号:62 |
| 55 | K | A | A | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | 配列番号:63 |
| 56 | K | A | K | A | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | 配列番号:64 |
| 57 | K | A | K | T | A | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | 配列番号:65 |
| 58 | K | A | K | T | D | A | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | 配列番号:66 |
| 59 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | 配列番号:67 |
| 60 | K | A | K | T | D | H | G | P | E | I | V | Y | K | S | P | 配列番号:68 |
| 61 | K | A | K | T | D | H | G | A | A | I | V | Y | K | S | P | 配列番号:69 |
| 62 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | A | V | Y | K | S | P | 配列番号:70 |
| 63 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | A | K | S | P | 配列番号:71 |
| 64 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | A | V | K | S | P | 配列番号:72 |
| 65 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | A | K | S | P | 配列番号:73 |
| 66 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | A | S | P | 配列番号:74 |
| 67 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | A | P | 配列番号:75 |
| 68 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | A | 配列番号:76 |

【図 5】

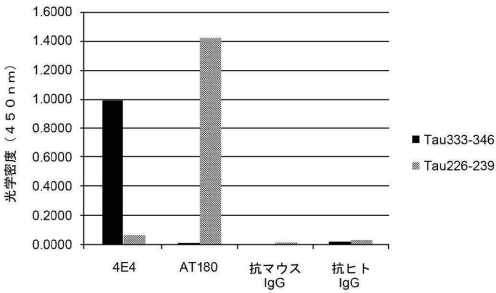


図 5

【図 6】

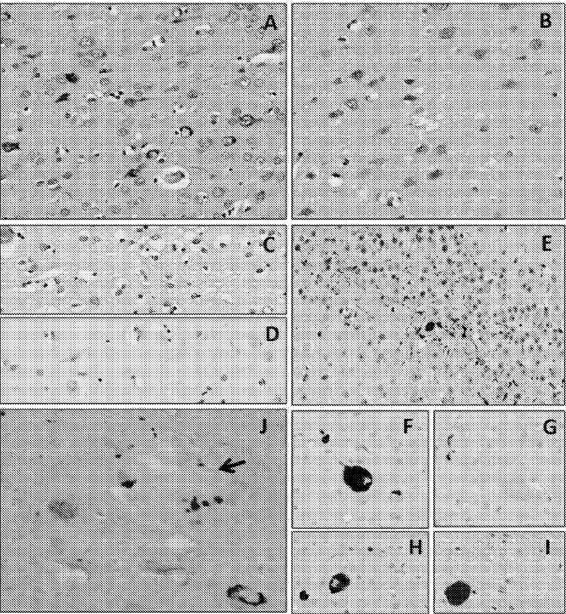


FIG. 6

【図 7】

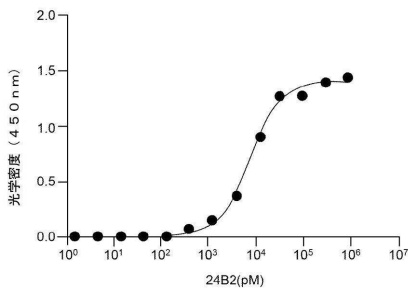
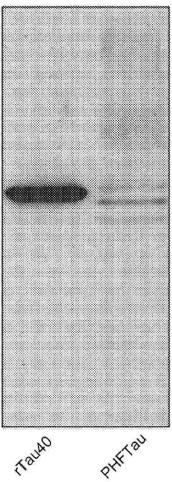


図 7

【図 8】



【図 9】

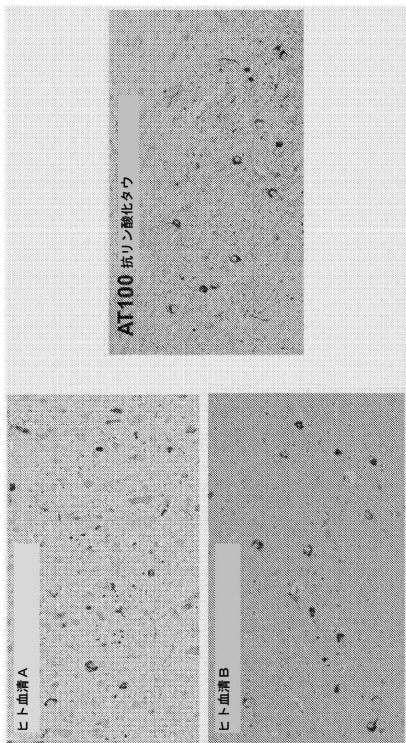


図 9

【図 10】

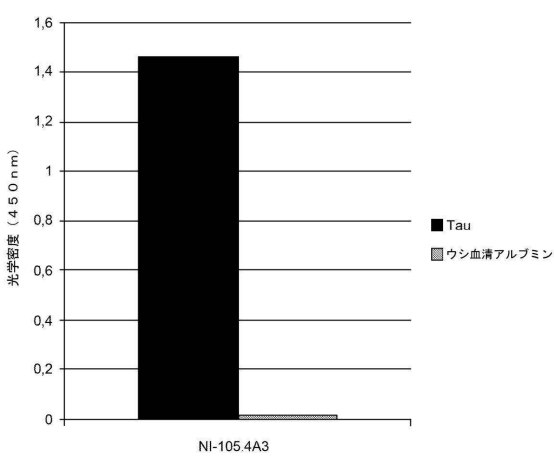


図 10

【図 11】

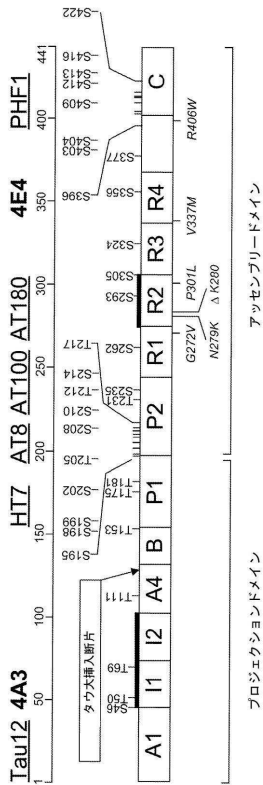


図 11

【図 12】

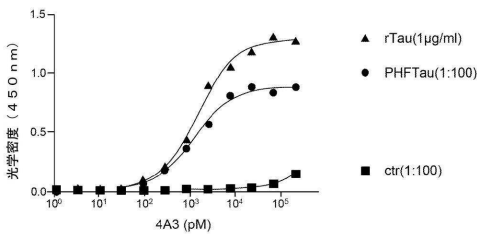


図 12



【図 13】

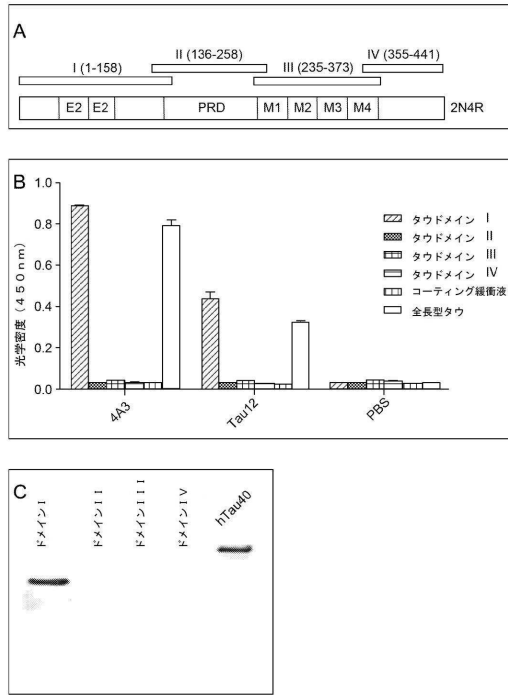


図 13

【図 14】

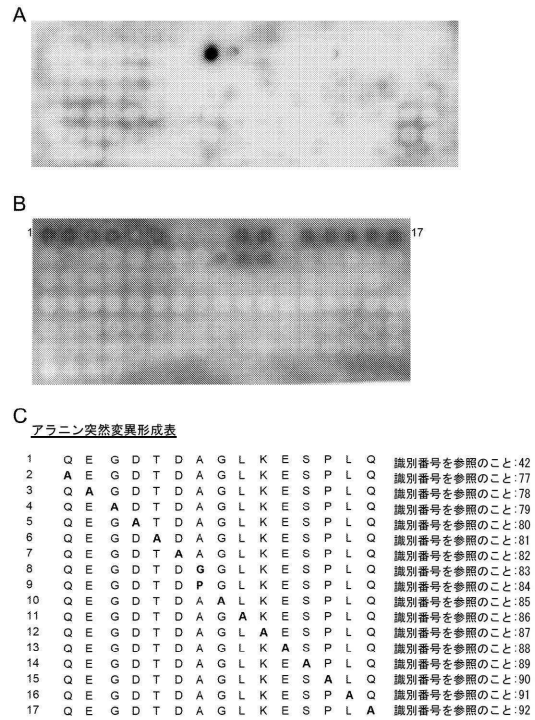


図 14

【図 15】

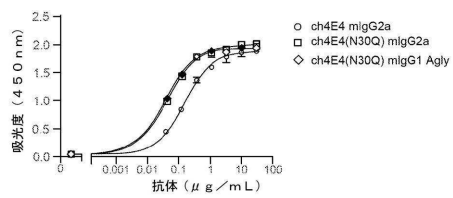
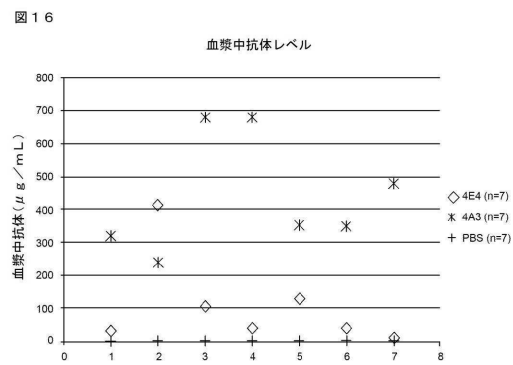
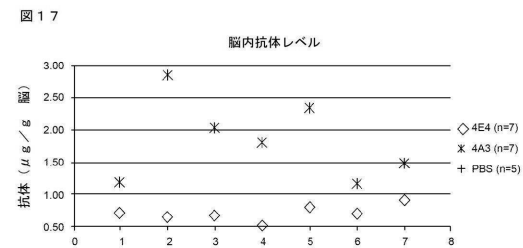


図 15

【図 16】



【図 17】



【配列表】

0006300842000001.app

## フロントページの続き

|             |                  |         |          |
|-------------|------------------|---------|----------|
| (51)Int.Cl. |                  | F I     |          |
| C 1 2 N     | 1/15 (2006.01)   | C 1 2 N | 1/15     |
| C 1 2 N     | 1/19 (2006.01)   | C 1 2 N | 1/19     |
| C 1 2 N     | 1/21 (2006.01)   | C 1 2 N | 1/21     |
| C 1 2 N     | 5/10 (2006.01)   | C 1 2 N | 5/10     |
| A 6 1 K     | 39/395 (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 N |
| A 6 1 K     | 45/00 (2006.01)  | A 6 1 K | 45/00    |
| A 6 1 P     | 9/00 (2006.01)   | A 6 1 P | 9/00     |
| A 6 1 P     | 21/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 21/00    |
| A 6 1 P     | 25/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 25/00    |
| A 6 1 P     | 25/16 (2006.01)  | A 6 1 P | 25/16    |
| A 6 1 P     | 25/28 (2006.01)  | A 6 1 P | 25/28    |
| G 0 1 N     | 33/53 (2006.01)  | G 0 1 N | 33/53 D  |
| C 1 2 P     | 21/08 (2006.01)  | C 1 2 P | 21/08    |

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 チェン フェン

スイス国 ツェーハー - 8 0 3 7 チューリッヒ, ブライトアインシュタインシュトラッセ 8  
4

(72)発明者 ヤン グリム

スイス国 ツェーハー - 8 6 0 0 デューベンドルフ, ビュルクリシュトラッセ 1 6

(72)発明者 ジャン - リュ ベリスヴィル

スイス国 ツェーハー - 8 0 3 7 チューリッヒ, ロートブックシュトラッセ 2 7

(72)発明者 ローガー ニッチ

スイス国 ツェーハー - 8 1 2 6 ツミコン, ランクヴィスシュトラッセ 2 7

(72)発明者 クリストフ ホック

スイス国 ツェーハー - 8 7 0 3 エルレンバッハ, リーシュトラッセ 4 3

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特表 2 0 0 4 - 5 3 8 3 2 4 ( J P , A )

特表平 0 7 - 5 0 2 8 8 8 ( J P , A )

米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 5 0 3 8 3 ( U S , A 1 )

特開 2 0 0 4 - 0 0 8 2 1 8 ( J P , A )

特表 2 0 1 0 - 5 1 4 4 5 4 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 7 2 0 7 ( W O , A 1 )

Acta Neuropathol, 2002, vol.103, no.1, p.26-35

Biochemistry, 1997, vol.36, no.26, p.8114-8124

J Neurosci, 2007, vol.27, no.34, p.9115-9129

Int J Cancer, 2004, vol.108, no.4, p.564-570

老年期認知症研究会誌, 2010年7月28日, vol.17, p.12-15

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 人抗tau抗体  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP6300842B2</a>  | 公开(公告)日 | 2018-03-28 |
| 申请号            | JP2016016975   | 申请日     | 2016-02-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 国际生物遗传神经门EM为主硬<br>苏黎世大学  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 生物遗传神经科学国际有限公司<br>苏黎世大学  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 生物遗传神经科学国际有限公司<br>苏黎世大学  |         |            |
| [标]发明人         | チェンフェン<br>ヤングリム<br>ジャンリュベリスヴィル<br>ローガーニッチ<br>クリストフホック  |         |            |
| 发明人            | チェン フェン<br>ヤン グリム<br>ジャン-リュ ベリスヴィル<br>ローガー ニッチ<br>クリストフ ホック  |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/18 C07K16/46 C12N15/09 C07K14/47 C12Q1/68 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10<br>A61K39/395 A61K45/00 A61P9/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 G01N33/53 C12P21<br>/08  |         |            |
| CPC分类号         | A61P9/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 C07K16/18 C07K2317/10 C07K2317/21<br>C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/41 C07K2317/52 C07K2317/565 C07K2317/90 C07K2317/92<br>A61K39/3955 A61K2039/505 C07K14/47 C07K14/4711 C07K2317/56 G01N33/6896 G01N2333/47<br>G01N2800/56  |         |            |
| FI分类号          | C07K16/18.ZNA C07K16/46 C12N15/00.A C07K14/47 C12Q1/68.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21<br>C12N5/10 A61K39/395.N A61K45/00 A61P9/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 G01N33<br>/53.D C12P21/08 C12N15/13 C12N15/63.Z C12Q1/68   |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024<br>/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA06 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA14<br>4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063<br>/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/DA01 4B064/DA13<br>4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/BA02<br>4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084<br>/ZA012 4C084/ZA022 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA362 4C084/ZC412 4C085/AA14 4C085<br>/AA15 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30<br>4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045<br>/FA20 4H045/FA74 |         |            |
| 代理人(译)         | 夏木森下<br>饭田TakashiSatoshi<br>石川大介<br>山本健作   |         |            |
| 优先权            | 61/391751 2010-10-11 US  |         |            |

其他公开文献 JP2016138102A

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

要解决的问题：提供新的人类tau特异性抗体及其片段，衍生物和异构体及其相关方法。种类代码：A1一种在健康人体中利用tau特异性免疫应答分离天然抗tau特异性人单克隆抗体的方法。具体而言，从健康人受试者集合中分离的单克隆tau特异性抗体不显示神经变性tau蛋白病的迹象。

|   |  |  |
|---|--|--|
| (19) 日本国特許庁 (JP)  | (12) 特 許 公 報 (B2)  | (11) 特許番号<br>特許第6300842号<br>(P6300842) |
| (45) 発行日 平成30年3月28日 (2018. 3. 28)   | (24) 登録日 平成30年3月9日 (2018. 3. 9)  |  |
| (51) Int. Cl.<br><b>C 07 K 16/18 (2006.01)</b><br><b>C 07 K 16/46 (2006.01)</b><br><b>C 12 N 15/09 (2006.01)</b><br><b>C 07 K 14/47 (2006.01)</b><br><b>C 12 Q 1/68 (2018.01)</b> | F I<br>C 07 K 16/18 Z N A<br>C 07 K 16/46<br>C 12 N 15/00 A<br>C 07 K 14/47<br>C 07 K 1/68 A<br>C 12 Q |  |
| (21) 出願番号 特願2016-16975 (P2016-16975)  | (73) 特許権者 513083820  |  |
| (22) 出願日 平成28年2月1日 (2016. 2. 1)   | バイオジェン インターナショナル ニュ  |  |
| (62) 分割の表示 特願2013-532287 (P2013-532287) の分割   | ーロサイエンス ゲーエムバーハー   |  |
| 原出願日 平成23年10月11日 (2011. 10. 11)   | スイス国 ツェーハー-6300, ツー  |  |
| (65) 公開番号 特開2016-138102 (P2016-138102A)   | ク, ランディス+ギアーストラーセ 3  |  |
| (43) 公開日 平成28年8月4日 (2016. 8. 4)   | (73) 特許権者 504022504  |  |
| 審査請求日 平成28年2月1日 (2016. 2. 1)  | ユニバーシティー オブ チューリッヒ   |  |
| (31) 優先権主張番号 61/391, 751  | スイス国 チューリッヒ ツェーハー-8  |  |
| (32) 優先日 平成22年10月11日 (2010. 10. 11)   | 006, レイミストラッセ 71   |  |
| (33) 優先権主張国 米国 (US)   | (74) 代理人 100078282   |  |
| (31) 優先権主張番号 10013494. 9  | 弁理士 山本 秀敏  |  |
| (32) 優先日 平成22年10月11日 (2010. 10. 11)   | (74) 代理人 100113413   |  |
| (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  | 弁理士 森下 夏樹  |  |
|   | (74) 代理人 100181674   |  |
|   | 弁理士 飯田 貴敏  |  |
|   |  | 最終頁に続く                                 |
| (54) 【発明の名称】 ヒト抗タウ抗体  |  |  |