

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-534236

(P2018-534236A)

(43) 公表日 平成30年11月22日 (2018. 11. 22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	4 C O 8 5
C07K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 H O 4 5
A61P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A61P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A61P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-507018 (P2018-507018)	(71) 出願人	511060836
(86) (22) 出願日	平成28年8月11日 (2016. 8. 11)		ニューヨーク・ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成30年4月2日 (2018. 4. 2)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニュー
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/046513		ヨーク ワシントン スクエア サウス
(87) 国際公開番号	W02017/027685		7 O
(87) 国際公開日	平成29年2月16日 (2017. 2. 16)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	62/204, 699		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成27年8月13日 (2015. 8. 13)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	62/211, 123	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成27年8月28日 (2015. 8. 28)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 タウの短縮型 A s p 4 2 1 エピトープに特異的な、抗体を基にした分子、ならびにタウ異常症の診断および治療におけるそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、タウの短縮型 Asp421 エピトープと免疫特異的かつ選択的に結合できる、抗体を基にした分子（単ドメイン抗体断片、scFv 分子、抗体、抗体断片、ダイアボディ、およびそれらのエピトープ結合ドメインを含む）に関する。そのような抗体を基にした分子は、特にアルツハイマー病または他のタウ異常症の診断および/または治療と共に、病的タウタンパク質配座異性体が生物試料中に存在する場合にそれを検出するのに有用であり、したがってアルツハイマー病および他のタウ病理に関する診断薬となる。本発明の抗体を基にした分子は、アルツハイマー病および関連するタウ異常症に関する診断マーカーとして、ならびにそのような病状の治療のための薬学的組成物として、特別の有用性がある。

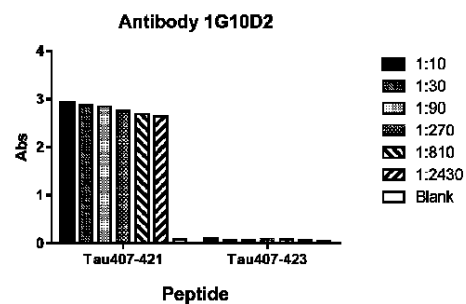


Figure 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的に結合しうる、抗体を基にした分子であって、該エピトープが、タウ407～421の配列
(SEQ ID NO:7): HLSNVSTGSIDMVD

を有するペプチド上に存在する、抗体を基にした分子。

【請求項 2】

抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、および抗体5G2A3からなる群より選択される抗体と結合について競合する、請求項1に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 3】

(a) (1) SEQ ID NO:9、10、および11のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:13、14、および15のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

(b) (1) SEQ ID NO:17、18、および19のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:21、22、および23のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

(c) (1) SEQ ID NO:25、26、および27のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:33、34、および35のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

(d) (1) SEQ ID NO:29、30、および31のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:33、34、および35のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

または

(e) (1) SEQ ID NO:37、38、および39のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:41、42、および43のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3

を含む、請求項1に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 4】

(a) SEQ ID NO:97、98、および99のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(b) SEQ ID NO:100、101、および102のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3

を含む、請求項1に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 5】

レシピエントへ末梢注射されると、タウ凝集物と実質的に共局在する、請求項1～4のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 6】

抗体、ダイアボディ、scFvであるか、または抗体、ダイアボディ、もしくはscFvのエピトープ結合性断片を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 7】

抗体である、請求項6に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 8】

ヒト化抗体であるか、またはヒト化抗体のエピトープ結合性断片を含む、請求項6に記載の抗体を基にした分子。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

scFvである、請求項6に記載の抗体を基にした分子。

【請求項10】

検出可能に標識されている、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子。

【請求項11】

検出可能な標識が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識、または酵素標識である、請求項10に記載の抗体を基にした分子。

【請求項12】

レシピエント対象の脳、脳脊髄液、血液、血清、または血漿における前記短縮型タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、請求項10～11のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子の使用。

【請求項13】

検出または測定が、前記短縮型タウタンパク質と結合した前記抗体を基にした分子の、インビボまたはエクスピボでのイメージングを含む、請求項12に記載の使用。

【請求項14】

検出または測定が、対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するためである、請求項12～13のいずれか一項に記載の使用。

【請求項15】

対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症の治療のためのインビボ医薬であって、該アルツハイマー病または別のタウ異常症を治療するのに有効な量の請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体を基にした分子と、1つまたは複数の担体、希釈剤、および／または安定化剤とを含む、インビボ医薬。

【請求項16】

対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症の治療のための、請求項13に記載のビボ医薬の使用。

【請求項17】

対象がヒトである、請求項12～16のいずれか一項に記載の使用。

【請求項18】

対象の脳における前記短縮型タウタンパク質の存在もしくは量を検出もしくは測定するための、または対象におけるアルツハイマー病もしくは別のタウ異常症を診断するためのキットであって、請求項14に記載の抗体を基にした分子を含む、キット。

【請求項19】

タウ異常症が、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖したパーキンソニズム（FTDP-17）、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、神経原線維変化型認知症（tangle only dementia）、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症パーキンソニズム・認知症複合、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハラーフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、ニーマン・ピック病C型、プリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維変化を伴う非グアナミアン（non-guanamian）運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソニズム、急性外傷性脳損傷、および慢性外傷性脳症を含む群から選択される、請求項14、16、もしくは17のいずれか一項に記載の使用、または請求項15に記載の医薬、または請求項18に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国仮特許出願第62/204,699号（2015年8月13日に提出；係属中）および米国仮特許出願第62/211,123号（2015年8月28日に提出；係属中）に対する優先権を主張し

10

20

30

40

50

、各出願はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

連邦政府の資金援助を受けて行われた研究または開発に関する申告

本発明は、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) (NIH) によって授与された助成金NS077239号、AG032611号およびAG020197号の下で、政府の援助を受けて行われた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

配列表の参照

本出願は、米国特許法規則1.821以降の条文 (37 C.F.R. 1.821 et seq.) に準じて、コンピュータ可読媒体中に開示されている1つまたは複数の配列表を含み (ファイル名: 140 0-0008PCT_ST25.txt、2016年8月11日に作成、サイズは170,987バイト)、このファイルはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0004】

発明の分野

本発明は、タウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的かつ選択的に結合しうる、抗体を基にした分子 (単ドメイン抗体断片、scFv分子、抗体、抗体断片、ダイアボディおよびそれらのエピトープ結合ドメインを含む) に関する。そのような抗体を基にした分子は、特にアルツハイマー病または他のタウ異常症の診断および/または治療と共に、病的タウタンパク質配座異性体が生物試料中に存在する場合にそれを検出するために有用であり、それ故にアルツハイマー病および他のタウ病理に関する診断薬となる。本発明の抗体を基にした分子は、アルツハイマー病および関連するタウ異常症に関する診断マーカーとして、ならびにそのような病状の治療のための薬学的組成物として、特別の有用性がある。

【背景技術】

【0005】

発明の背景

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

【0006】

ここ数年で、脳脊髄液中のホスホ-タウタンパク質の抗体検出は、アルツハイマー病の診断にある程度の有用性があることが示されており (Blennow, K. et al. "Cerebrospinal Fluid And Plasma Biomarkers In Alzheimer Disease," Nat. Rev. Neurol. 6, 131-144 (2010) (非特許文献1) ; Lewis, J. et al. "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein," Nat. Genet. 25, 402-405 (非特許文献3) ; Weiner, M.W. et al. (2013) "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A Review Of Papers Published Since Its Inception," Alzheimers. Dement. 9: e111-e194 (非特許文献2))、この分野におけるさらなる進展が見込まれることが示唆されている (Congdon, E.E. (2014) "Harnessing The Immune System For Treatment And Detection Of Tau Pathology," J. Alzheimers. Dis. 40:S113-S121 (非特許文献4) を参照)。しかし、他のタウ異常症におけるCSFタウレベルは通常、対照と比較して変化しておらず (Theunis, C. et al. "Efficacy And Safety Of A Liposome-Based Vaccine Against Protein Tau, Assessed In Tau.P301L Mice That Model Tauopathy," PLoS. One. 8, e72301 (2013) (非特許文献5) ; Hales, CM. et al. (2013) "From Frontotemporal Lobar Degeneration Pathology To Frontotemporal Lobar Degeneration Biomarkers," Int. Rev. Psychiatry 25:210-220 (非特許文献6))、イメ

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

【0007】

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

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

20

30

40

50

【0008】

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

【非特許文献2】Weiner et al. "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A Review Of Papers Published Since Its Inception," Alzheimers. Dement. 9, e111-e194 (2013)

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

【非特許文献4】Congdon, E.E. (2014) "Harnessing The Immune System For Treatment And Detection Of Tau Pathology," J. Alzheimers. Dis. 40:S113-S121 10

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

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

【非特許文献7】Fodero-Tavoletti, M. T. et al. (2014) "Assessing THK523 Selectivity For Tau Deposits In Alzheimer's Disease And Non-Alzheimer's Disease Tauopathies," Alzheimers. Res. Ther. 6:11 20

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

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

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

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

【非特許文献12】Maruyama, M.H. et al. (2013) "Imaging Of Tau Pathology In A Tauopathy Mouse Model And In Alzheimer Patients Compared To Normal Controls," Neuron 79:1094-1108 30

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

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

【非特許文献15】Ono, M. et al. (2011) "Rhodanine And Thiohydantoin Derivatives For Detecting Tau Pathology In Alzheimer's Brains," ACS Chem. Neurosci. 2:269-275 40

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

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

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

【非特許文献19】Okamura, N. et al. (2014) "Non-Invasive Assessment Of Alzheimer's Disease Using 18F-THK523," J. Nucl. Med. 55:100-106 50

r's Disease Neurofibrillary Pathology Using 18F-THK5105 PET," Brain 137:1762-1771

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

【発明の概要】

【0009】

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

【0010】

本発明は、タウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的かつ選択的に結合しうる、抗体を基にした分子（単ドメイン抗体断片、scFv分子、抗体、抗体断片、ダイアボディ、およびそれらのエピトープ結合ドメインを含む）に関する。そのような抗体を基にした分子は、特にアルツハイマー病または他のタウ異常症の診断および／または治療と共に、病的タウタンパク質配座異性体が生物試料中に存在する場合にそれを検出するのに有用であり、したがってアルツハイマー病および他のタウ病理に関する診断薬となる。本発明の抗体を基にした分子は、アルツハイマー病および関連するタウ異常症に関する診断マーカーとして、ならびにそのような病状の治療のための薬学的組成物として、特に有用性がある。

【0011】

詳細には、本発明は、タウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的に結合しうる結合性分子であって、エピトープが、タウ407～421の配列

(SEQ ID NO:7): HLSNVSTGSIDMVD

を有するペプチド上に存在する、結合性分子に関する。

【0012】

本発明は特に、抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、または抗体5G2A3 / 5G2G6からなる群より選択される抗体と結合について競合する、そのような結合性分子の態様に関する。

【0013】

本発明は特に、以下を含む、そのような結合性分子の態様に関する：

(a) (1) SEQ ID NO:9、10、および11のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:13、14、および15のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

(b) (1) SEQ ID NO:17、18、および19のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:21、22、および23のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

(c) (1) SEQ ID NO:25、26、および27のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:33、34、および35のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

(d) (1) SEQ ID NO:29、30、および31のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:33、34、および35のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

または

10

20

30

40

50

(e) (1) SEQ ID NO:37、38、および39のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:41、42、および43のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3。

【0014】

本発明は特に、以下を含む、上記の結合性分子のいずれかの態様に関する：

(a) SEQ ID NO:97、98、および99のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:100、101、および102のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3。

10

【0015】

本発明は特に、レシピエントへ末梢注射されると、タウ凝集物と実質的に共局在する、上記の結合性分子のいずれかの態様に関する。

【0016】

本発明は特に、抗体、ダイアボディ、scFvであるか、または抗体、ダイアボディ、もしくはscFvのエピトープ結合性断片を含む、上記の結合性分子のいずれかの態様に関する。

【0017】

本発明は特に、抗体である、上記の結合性分子のいずれかの態様に関する。

【0018】

本発明は特に、ヒト化抗体であるか、またはヒト化抗体のエピトープ結合性断片を含む、上記の結合性分子のいずれかの態様に関する。

20

【0019】

本発明は特に、scFvである、上記の結合性分子のいずれかの態様に関する。

【0020】

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

【0021】

本発明はさらに、レシピエント対象の脳、脳脊髄液、血液、血清、または血漿における短縮型タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、そのような抗体を基にした分子のいずれかの使用に関する。

30

【0022】

本発明は特に、検出または測定が、短縮型タウタンパク質と結合した抗体を基にした分子のインビボまたはエクスビボでのイメージングを含む、そのような使用の態様に関する。

【0023】

本発明は特に、検出または測定が、対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するためである、そのような使用の態様に関する。

【0024】

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

40

【0025】

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

【0026】

本発明は特に、対象がヒトである、そのような使用の態様に関する。

【0027】

本発明はさらに、対象の脳における短縮型タウタンパク質の存在もしくは量を検出もし

50

くは測定するための、または対象におけるアルツハイマー病もしくは別のタウ異常症を診断するためのキットであって、上記の抗体を基にした分子を含むキットに関する。

【0028】

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

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1A】抗体1G10D2の、1:10、1:30、1:90、1:270、1:810、および1:2430のハイブリドーマ培養上清の希釈での、タウの短縮型Asp421エピトープに対する免疫特異性を示す。

【図1B】抗体1G11A10の、1:10、1:30、1:90、1:270、1:810、および1:2430のハイブリドーマ培養上清の希釈での、タウの短縮型Asp421エピトープに対する免疫特異性を示す。

【図1C】抗体5B3C11の、1:10、1:30、1:90、1:270、1:810、および1:2430のハイブリドーマ培養上清の希釈での、タウの短縮型Asp421エピトープに対する免疫特異性を示す。

【図1D】抗体5G2A3の、1:10、1:30、1:90、1:270、1:810、および1:2430のハイブリドーマ培養上清の希釈での、タウの短縮型Asp421エピトープに対する免疫特異性を示す。

【図1E】抗体5G2G6の、1:10、1:30、1:90、1:270、1:810、および1:2430のハイブリドーマ培養上清の希釈での、タウの短縮型Asp421エピトープに対する免疫特異性を示す。

【図2】図2A～2Bは、抗体1G11A10（図2A）および5G2A3（図2C）の、1:1000、1:3000、1:9000、1:27000、および1:81000の抗体希釈での、タウの短縮型Asp421エピトープに対する免疫特異性を示す。

【図3】図3A～3Bは、抗体5G2A3および抗体1G11A10（10 μg/mL）の経時的な、PHF（1 μg/mL）で前処理したJNPL3マウスの混合皮質培養物（図3A）または純粋ニューロン培養物（図3B）のリン酸化タウレベルに対する効果を示す。抗体5G2G6もまた、純粋ニューロン培養物において試験した。図3Aに提示した結果は、検出抗体PHF-1（表6）を用いたウエスタンブロット分析から得られる。IgG（10 μg/mL）とインキュベートしたPHF処理した混合培養物を、この実験セットについての対照と考えた。図3Bに提示した結果は、³²P-Ser199タウに特異的な検出抗体を用いたウエスタンブロット分析から、IgG処理した対照を100%と設定して得られる。データは正規化していない。

【図4】図4A～4Bは、抗体5G2A3および抗体1G11A10（10 μg/mL）の経時的な、PHF（1 μg/mL）で前処理したJNPL3マウスの混合皮質培養物（図4A）または純粋ニューロン培養物（図4B）を用いた細胞内タウに対する効果を示す。抗体5G2G6もまた、純粋ニューロン培養物において試験した。図4A（表7）および図4Bに提示した結果は、抗ヒトタウ抗体（Dako）を用いたウエスタンブロット分析から得られる。IgG（10 μg/mL）とインキュベートしたPHF処理した培養物を、両方の実験セットについての対照と考え、図3A～3Bに提示する。データは正規化していない。

【図5】図5A～5Bは、抗体5G2A3が、混合皮質培養物（図5A）および初代ニューロン培養

物（図5B）におけるホスホ-タウレベルの低下において抗体1G11A10よりも有効であるとわかったことを示す。図5A：抗体5G2A3（10 μ g/ml）で48時間、72時間、および96時間、処理した混合皮質培養物は、対照細胞と比較した場合に、Ser199エピトープに対するホスホ-タウレベルの非常に有意な減少、すなわち、それぞれ66%、81%、および94%を $p < 0.001$ で示し、一方、抗体1G11A10（10 μ g/ml）で処理した細胞は、ホスホ-タウレベルを有意に減少させることができなかった。IgG（10 μ g/ml）とインキュベートしたPHF処理した混合皮質培養物を、この実験セットについての対照と考えた。図5B：抗体5G2A3は、それぞれ24時間、48時間、72時間、および96時間について90%、89%、76%、および68%の低下を $p < 0.0001$ で示すことにより、Ser199エピトープでの初代ニューロンにおけるホスホ-タウレベルの低下において非常に有効であるとわかった。10 μ g/mlでの抗体1G11A10処理もまた、24時間から最長で72時間までホスホ-タウレベルの68%、67%、および68%の低下を $p < 0.05$ で示し、これは9%の低下のみを示した96時間でおさまった。

【図6】図6A～6Bは、抗体5G2A3が、混合皮質培養物および初代ニューロン培養物における全タウの低下において有効であるとわかり、一方、抗体1G11A10は、初代ニューロン培養物における全タウレベルの低下においてより有効であったことを示す。図6A：IgG（10 μ g/ml）で処理した対照細胞と比較した場合に、混合皮質培養物を用いた抗体5G2A3処理は、全タウレベルを、すなわち96時間まで最大で54%、 $p < 0.05$ で低下させることができ、一方、抗体1G11A10処理は、24時間（41%）および96時間（36%）でのみ、 $p < 0.0001$ で全タウレベルの有意な低下を示した。図6A：初代ニューロンにおける抗体5G2A3処理は、対照と比較した場合に、24時間（58%）、48時間（45%）、および96時間（43%）で $p < 0.05$ で、全タウレベルの有意な低下において有効であるとわかり、一方、抗体1G11A10は、初代ニューロン培養物において48時間でのみ、65%の低下を $p < 0.05$ で示す、全タウのレベルの有意な低下を示した。

【図7】抗体5G2A3処理が、混合皮質培養物においてNeuNレベルを増大させたことを示す。0日目のJNPL3マウス由来の混合皮質培養物を、PHF（1 μ g/ml）で前処理し、その後、抗体5G2A3（10 μ g/ml）および抗体1G11A10（10 μ g/ml）でさらに24時間、48時間、72時間、または96時間、処理した。ニューロン核マーカーであるNeuNに対して行ったウエスタンブロット分析により、IgG（10 μ g/ml）処理した対照細胞と比較して、72時間（114%）および96時間（170%）でNeuNのレベルの有意な増大が示された。抗体1G11A10処理は、NeuNのレベルにおいていかなる有意な変化も示さなかった。

【図8】Iba1発現が、混合皮質培養物において抗体5G2A3処理後に低下したことを示す。0日目のJNPL3マウス由来の混合皮質細胞を、PHF（1 μ g/ml）で前処理し、その後、抗体5G2A3または抗体1G11A10（それぞれ10 μ g/ml）でそれぞれ24時間、48時間、72時間、または96時間、処理した。ミクログリア特異的マーカーであるIba1抗体に対して行った免疫ブロットにより、それぞれの時点についての対照と比較した場合に、72時間（38%、 $p < 0.05$ ）および96時間（73%、 $p = 0.0004$ ）でIba1のレベルの有意な減少が示され、一方、抗体1G11A10処理は、いずれの時点についてもIba1発現においていかなる有意な差も示すことができなかった。IgG（10 μ g/ml）で処理した細胞を、混合皮質培養物および初代ニューロン培養物の両方についての対照と考えた。

【図9】NeuNレベルにおける変化により測定した際の、混合皮質培養物における高用量PHF（10 μ g/ml）とタウの短縮型Asp421エピトープに対して免疫特異的である抗体（10 μ g/ml）とのコインキュベーションの、NeuNレベルに対する効果を示す。これらのより毒性の強い条件（より高いPHF用量）下では、実施例3におけるものと類似のパターンが観察されて、抗体5G2A3は、病的タウの排除およびその毒性の予防において非常に有効であり、一方、より低い親和性の抗体1G11A10は、有効性がより低い。

【図10】NeuNレベルに対して正規化したSer199エピトープへの結合における変化により測定した際の、混合皮質培養物における高用量PHF（10 μ g/ml）とタウの短縮型Asp421エピトープに対して免疫特異的である抗体（10 μ g/ml）とのコインキュベーション時に見られる、NeuNレベルに対して正規化したリン酸化タウレベルに対する効果を示す。抗体5G2A3抗体とPHFとのコインキュベーションにより、PHF単独およびPHF+IgGで処理した細胞と

比較してホスホ-タウのレベルの有意な減少が示され、一方、抗体1G11A10抗体とPHFとのコインキュベーションは、ホスホ-タウのレベルにおけるいかなるそのような変化も実証することができなかった。

【図11】高用量のPHF (10 µg/ml) とタウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的に結合しうる抗体とのコインキュベート時に見られる、NeuNレベルに対して正規化した全タウ（リン酸化タウおよび非リン酸化タウの両方）に対する効果を示す。

【図12】高用量のPHF (10 µg/ml) とタウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的に結合しうる抗体とのコインキュベート時に見られる、Iba1レベルに対する効果を示す。

【図13】図13A~13Bは、JNPL3タウ異常症マウス（図13A）およびhTauタウ異常症マウス（図13B）における、タウの短縮型Asp421エピトープに対して免疫特異的である抗体の組織反応性を示す。そのようなマウス由来の低速上清（LSS）試料を評価した。図の縦座標の値は、分析した特定のマウスのコード名である。白い棒、抗体5G2A3；灰色の棒、抗体1G11A10；黒い棒、抗タウ抗体C3。

10

【図14】ヒト（対照）脳およびヒトAD脳から精製したPHF由来の脳上清試料における、タウの短縮型Asp421エピトープに対して免疫特異的である抗体の組織反応性を示す。図の縦座標の値は、分析した特定の対象のコード名である。白い棒、抗体5G2A3；灰色の棒、抗体1G11A10；黒い棒、抗タウ抗体C3。

【発明を実施するための形態】

【0030】

発明の詳細な説明

20

本発明は、タウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的かつ選択的に結合しうる、抗体を基にした分子（単ドメイン抗体断片、scFv分子、抗体、抗体断片、ダイアボディ、およびそれらのエピトープ結合ドメインを含む）に関する。そのような抗体を基にした分子は、特にアルツハイマー病または他のタウ異常症の診断および/または治療と共に、病的タウタンパク質配座異性体が生物試料中に存在する場合にそれを検出するために有用であり、それ故にアルツハイマー病および他のタウ病理に関する診断薬となる。本発明の抗体を基にした分子は、タウ異常症（特にアルツハイマー病および関連するタウ異常症）に関する診断マーカーとして、ならびにそのような病状の治療のための薬学的組成物としての特別の有用性がある。

【0031】

30

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

40

【0032】

本発明の抗体を基にした分子は、ADまたは他のタウ異常症の患者におけるタウ病変を検出することに関して、βシート色素よりも高い特異性をもたらす。特に、タウと結合する比較的小型の抗体断片は、インビボでのイメージング用のリガンドとして魅力的である。抗体と比較してそれらのサイズが小さいことは、タウ凝集物へのより優れた到達性につながる。もう1つの利点は、より長い半減期を有する非改変抗体に比しての、循環血中からのそれらの比較的迅速な排出である。癌の分野では、治療用抗体はイメージング剤として慣行的に共同開発されてきており、より優れた薬物動態学的特性を備えるいくつかのその

50

ような抗体およびFab'またはより小型のダイアボディおよびscFv分子は、腫瘍イメージング剤として承認されているかまたはそれが提唱されている (Kaur, S. et al. (2012) "Recent Trends In Antibody-Based Oncologic Imaging," Cancer Lett. 315:97-111; Olafsen, T. et al. (2010) "Antibody Vectors For Imaging," Semin. Nucl. Med. 40:167-181)。

【0033】

I. タウおよび本発明の好ましい免疫原性タウペプチド

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

【0034】

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

SEQ ID NO:1:

```
MAEPRQEFEEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTTEIPEG
TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK
IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTTPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP
GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM
PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
PGGGSVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV
QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS
GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L
```

【0035】

「ホスホ-タウ」または「P-タウ」という用語は、1つまたは複数のセリン残基またはトレオニン残基でリン酸化されているタウタンパク質またはペプチドのことを指す。本明細書で用いる場合、「^{P}Ser」または「^{P}S」という表記は、アミノ酸残基ホスホセリンを意味する。例えば、「^{P}Ser199」という表記は、SEQ ID NO:1の残基199に対応する残基がホスホセリン残基である、SEQ ID NO:1のポリペプチド部分のことを指す。一方、「Ser199」という表記は、SEQ ID NO:1の残基199に対応する残基がセリン残基である、SEQ ID NO:1のポリペプチド部分のことを指す。

【0036】

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

書で用いる場合、「病的タウ」という用語は、アルツハイマー病および他のタウ異常症の特徴である過剰リン酸化タウのことを指す。

【0037】

II. 本発明における好適な、抗体を基にした分子

本発明の「抗体を基にした分子」は、タウのAsp421エピトープと免疫特異的かつ選択的に結合しうる抗体、ならびにそのような結合免疫特異性および選択性を呈するそれらの断片および誘導体を含む。本明細書で用いる場合、分子は、それがそのような親分子の実際の断片化を通して得られる場合に（例えば、Fabまたは(Fab)₂断片）、またはそれがそのような親分子のアミノ酸配列の一部分を含むアミノ酸配列を含む場合に、別の分子の「断片」であるという。本明細書で用いる場合、分子は、それがそのような親分子もしくはその一部分の実際の化学修飾を通して得られる場合に、またはそれがそのような親分子もしくはその関連する一部分のアミノ酸配列に実質的に類似しているアミノ酸配列を含む場合に（例えば、そのような親分子もしくはそのようなその関連する一部分から30%未満、20%未満、10%未満、もしくは5%未満が、または、そのような親分子もしくはその関連する一部分から10アミノ酸残基、または10、9、8、7、6、5、4、3、もしくは2アミノ酸残基より少しが異なっている）、別の分子（またはその関連する一部分）の「誘導体」であるという。

【0038】

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

【0039】

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

rd et al., (1988) “Single-Chain Antigen-Binding Proteins” Science 242:423-426 ; およびHuston et al. (1988) “Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In Escherichia coli” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883を参照)。または、単一のポリペプチド鎖のVL領域およびVH領域が一つに会合することを可能にするには短すぎる柔軟なリンカー（例えば、約9残基未満）を使用することによって、二重特異性抗体、ダイアボディまたは類似の分子を形成させることもできる（そのような2つのポリペプチド鎖が一つに会合して二価のエピトープ結合性分子を形成する）。（例えば、ダイアボディの説明については、Holliger, P. et al. (1993) “ ‘Diabodies’ : Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90(14), 6444-8 (1993)を参照）。単ドメイン抗体断片は、1つのみの可変ドメイン（例えば、VLまたはVH）を保有する。本発明の範囲に含まれるエピトープ結合性断片の例には、(i) VL、VN、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片、またはW02007059782号に記載されている一価抗体である、Fab'断片もしくはFab断片；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片である、F(ab')₂断片；(iii) VHドメインおよびCH1ドメインから本質的になるFd断片；(iv) VLドメインおよびVHドメインから本質的になるFv断片、(v) VHドメインから本質的になり、ドメイン抗体とも呼ばれる（Holt, L.J. et al.; (2003) “Domain Antibodies: Proteins For Therapy,” Trends Biotechnol. 21(11):484-490）、dAb断片（Ward, E.S. et al. “Binding Activities Of A Repertoire Of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From Escherichia coli,” Nature 341, 544-546 (1989)）；(vi) キャメリド（camelid）またはナノボディ（Revs, H. et al. (2005) “Nanobodies As Novel Agents For Cancer Therapy,” Expert Opin. Biol. Ther. 5 (1) :111-124）、ならびに(vii) 単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別々の遺伝子によってコードされるが、それらを、VL領域およびVH領域が対合して一価分子（単鎖抗体または単鎖Fv（scFv）として知られる。例えば、Bird et al., (1988) “Single-Chain Antigen-Binding Proteins,” Science 242, 423-426およびHuston et al., (1988) “Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In Escherichia coli,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883を参照）を形成する1つのタンパク質鎖として作り出されることを可能にする合成リンカーによって、組換え方法を用いて連結されてもよい。本発明の文脈における、これらおよび他の有用な抗体断片については本明細書においてさらに考察する。抗体という用語は、別様に定めのない限り、抗体様ポリペプチド、例えばキメラ抗体およびヒト化抗体など、ならびに任意の公知の手法、例えば酵素切断、ペプチド合成および組換え手法によってもたらされる、抗原と特異的に結合する能力を保持している抗体断片（抗原結合断片）も含むことも理解されるべきである。作製される抗体は任意のアイソタイプを有してよい。本明細書で用いる場合、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM）のことを指す。アイソタイプの選択は、典型的には、ADCC誘導などの所望のエフェクター機能によって導かれると考えられる。例示的なアイソタイプには、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4がある。ヒト軽鎖定常領域であるκまたはλのいずれかを用いることができる。所望であれば、本発明の抗タウ抗体のクラスを公知の方法によってスイッチすることができる。例えば、最初にIgMであった本発明の抗体を、本発明のIgG抗体にクラススイッチすることができる。さらに、クラススイッチ手法を用いて、あるIgGサブクラスを別のIgGサブクラスに、例えばIgG1からIgG2に変換することもできる。したがって、本発明の抗体のエフェクター機能は、さまざまな治療用途に合わせて、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体へのアイソタイプスイッチによって変更することができる。1つの態様において、本発明の抗体は、IgG1抗体、例えばIgG1, κである。

【0040】

10

20

30

40

50

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

【0041】

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

【0042】

同様に、1つの態様において、抗体は、以下を含む一価抗体である：

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

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

れている、免疫グロブリンのCH領域、またはCH2領域およびCH3領域を含むその断片。

【0043】

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

【0044】

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

【0045】

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

【0046】

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

【0047】

本明細書で用いる場合、抗体またはそのエピトープ結合性断片は、それが、非短縮型ペプチドエピトープと結合する（それが仮に結合するとして）よりも高い親和性でそのようなエピトープと免疫特異的に結合する場合に、短縮型ペプチドエピトープと「選択的に」結合するという。本明細書で用いる場合、「短縮型エピトープ」という用語は、非短縮型エピトープが、短縮型エピトープのC末端および／またはN末端から延びる1つまたは複数のアミノ酸残基を保有するように、天然に存在する（「非短縮型」）エピトープの一部分であるエピトープを意味する。最も好ましくは、そのようなより高い親和性は、少なくとも10倍高い、少なくとも30倍高い、少なくとも100倍高い、少なくとも300倍高い、少なくとも1,000倍高い、少なくとも3,000倍高い、または少なくとも10,000倍高いと考えられる。短縮型タウに対する、抗体またはそのエピトープ結合性断片の「選択性」の程度は、ELISAまたはBiacoreを介して、それが、短縮型エピトープと免疫特異的に結合する親和性を、その非短縮型エピトープに比して比較することによって決定される。例えば、「非短縮型Asp421エピトープ」を含むポリペプチドは、SEQ ID NO:1の位置Asp421を含むタウエピトープを保有する。「短縮型Asp421エピトープ」を含むポリペプチドは、SEQ ID NO:1の

位置Asp421を含むタウエピトープを保有し、ここでそのようなAsp421残基は、そのようなポリペプチドのN末端またはC末端タウ残基である。短縮型Asp421エピトープに対して免疫特異性を呈する抗体は、非短縮型Asp421エピトープに比して強化された、短縮型Asp421エピトープに対する免疫特異性を呈する。したがって、短縮型Asp421エピトープに対して免疫特異性を呈する抗体は、タウ (SEQ ID NO:1) の位置Asp421のC末端にタウ配列を含有するポリペプチドに対して実質的に減少した結合を呈する。

【0048】

「エピトープ」という用語は、抗体と免疫特異的に結合することのできる抗原決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の表面原子団を含み、通常、特定の三次元構造特性ならびに特定の電荷特性を有する。立体構造エピトープおよび非立体構造エピトープは、後者ではなく前者との結合が、変性溶媒の存在下で失われるという点で区別される。エピトープは、結合に直接的に関与するアミノ酸残基（エピトープの免疫優性構成要素とも呼ばれる）、および、特定の抗原結合ペプチドによって効果的に遮断されるアミノ酸残基（言い換えると、そのアミノ酸残基は特定の抗原結合ペプチドのフットプリント内にある）などの、結合に直接的に関与しない他のアミノ酸残基を含みうる。

【0049】

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

【0050】

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

10

20

30

40

50

る。さまざまな抗体に対するこれらのアプローチの適用は、Sato, K. et al. (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289; および Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," *J. Immunol.* 148:1149-1154に記載されている。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、すべてのCDR配列（例えば、マウス抗体由来の6つすべてのCDRを含むヒト化マウス抗体）を保持している。他の態様において、ヒト化抗体は、元の抗体に関して変更された1つまたはそれを上回るCDR（1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ）を有し、これらは元の抗体由来の1つまたはそれを上回るCDR「に由来する」1つまたはそれを上回るCDRとも名付けられる。抗体をヒト化しうことは周知である（例えば、米国特許第5,225,539号；第5,530,101号；第5,585,089号；第5,859,205号；第6,407,213号；第6,881,557号）。

【0051】

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

【0052】

HuMAbマウスは、再編成されていないヒト重鎖可変鎖および定常鎖（ μ およびY）ならびに軽鎖可変鎖および定常（K）鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ座位を、内因性 μ 鎖およびK鎖座位を不活性化する標的化突然変異とともに含有する（Lonberg, N. et al. (1994) "Antigen-Specific Human Antibodies From Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications," *Nature* 368:856-859）。したがって、そのようなマウスは、マウスIgMまたはIgKの発現の低下を呈し、免疫処置に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子が、クラススイッチおよび体細胞突然変異を受けて高親和性ヒトIgG, κ モノクローナル抗体を生じる（Lonberg, N. et al. (1994) "Antigen-Specific Human Antibodies From Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications," *Nature* 368:856-859; Lonberg, N. (1994) "Human Monoclonal Antibodies from Transgenic Mice," In: *HANDBOOK EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY*, Volume 181 (Starke, K. et al., Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," *Intern. Rev. Immunol.* 13(1):65-93; Harding, F. et al. (1995) "Class Switching In Human Immunoglobulin Transgenic Mice," *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546)。HuMAbマウスの調製は、Taylor, L. et al. (1992) "A Transgenic Mouse That Expresses A Diversity Of Human Sequence Heavy And Light Chain Immunoglobulins," *Nucl. Acids Res.* 20(23):6287-6295; Chen, J. et al. (1993) "Immunoglobulin Gene Rearrangement In B Cell Deficient Mice Generated By Targeted Deletion Of The JH Locus," *Int'l. Immunol.* 5:647-656; Tuailon, N. et al. (

1994) "Biased Utilization Of DHQ52 And JH4 Gene Segments In A Human Ig Transgenic Minilocus Is Independent Of Antigenic Selection," J. Immunol. 152:2912-2920 ; Taylor, L. et al. (1994) "Human Immunoglobulin Transgenes Undergo Rearrangement, Somatic Mutation And Class Switching In Mice That Lack Endogenous IgM," Int'l. Immunol. 6:579-591 ; Fishwild, D. et al. (1996) "High-Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," Nature Biotechnol. 14:845-851に詳述されている ; 米国特許第5,545,806号 ; 第5,569,825号 ; 第5,625,126号 ; 第5,633,425号 ; 第5,789,650号 ; 第5,877,397号 ; 第5,661,016号 ; 第5,814,318号 ; 第5,874,299号 ; 第5,770,429号 ; 第5,545,807号 ; PCT公報WO 98/24884号、WO 94/25585号、WO 93/1227号、WO 92/22645号、WO 92/03918号およびWO 01/09187号も参照されたい。

10

【0053】

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

20

【0054】

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

【0055】

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

30

【0056】

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

40

【0057】

50

いくつかの抗体では、ヒト化抗体における結合を保つために、CDRの一部のみ、すなわち結合に必要な「SDR」と呼ばれるCDR残基のサブセットのみが必要とされる。抗原に接触せず、SDR内に位置しないCDR残基は、Chothia超可変ループ (Kabat et al. (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917を参照) の外側に存在するカバットCDRの領域から分子モデリングによってかつ／もしくは経験的に、またはGonzales, N.R. et al. (2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity," Mol. Immunol. 41:863-872に記載された通りに、以前の研究に基づいて特定することができる (例えば、CDR H2 10 内の残基H60~H65は必要でないことが多い)。そのようなヒト化抗体において、1つもしくは複数のドナーCDR残基が存在しないか、またはドナーCDR全体が欠失している位置では、その位置を占めるアミノ酸は、アクセプター抗体配列における (カバット番号付けによる) 対応する位置を占めるアミノ酸でありうる。含めるCDRにおけるドナーアミノ酸のアクセプターによるそのような置換の数は、競合する考慮事項のバランスを反映している。そのような置換は、ヒト化抗体におけるマウスアミノ酸の数を減少させるのに有益な可能性があり、その結果として免疫原性を低下させる可能性がある。しかし、置換が親和性の変化を引き起こす可能性もあり、親和性の著しい減少は回避されることが好ましい。CDRにおける置換の位置および置換するアミノ酸を経験的に選択することもできる。

【0058】

CDR残基の単一アミノ酸の変更が機能的結合の喪失をもたらするという事実 (Rudikoff, S. et al. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6):1979-1983) は、代替的な機能的CDR配列を系統的に同定する手段を提供する。そのような変異体CDRを得る1つの好ましい方法では、CDRをコードするポリヌクレオチドを (例えばランダム突然変異誘発を介して、または部位指定的方法 (例えば、突然変異した遺伝子座をコードするプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖増幅) によって) 突然変異を誘発し、置換されたアミノ酸残基を有するCDRを生じさせる。元の (機能的) CDR配列の該当する残基の実体を、置換された (非機能的) 変異体CDR配列の実体と比較することにより、その置換に関してBLOSUM62.iiij置換スコアを同定することができる。BLOSUMシステムは、信頼できるアラインメントについて配列のデータベースを分析することによって作成されたアミノ酸置換の行列を提供している (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?," Nature Biotech. 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective," J. Mol. Biol. 219, 555-565. 現在、最も 30 先端的なBLOSUMデータベースはBLOSUM62データベース (BLOSUM62.iiij) である。表1はBLOSUM62.iiij置換スコアを提示している (スコアが高いほど、置換は保存的であり、したがって置換が機能に影響しない可能性が高い)。例えば、結果的に得られたCDRを含む抗原結合断片がROR1と結合することができない場合には、BLOSUM62.iiij置換スコアは、保存性が不十分とされ、より高い置換スコアを有する新しい候補置換が選択され、作製される。したがって、例えば、元の残基がグルタミン (E) であり、非機能的置換残基がヒスチジン (H) であった場合、BLOSUM62.iiij置換スコアは0になり、より保存的な変化 (アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、またはリシンなど) が好ましい。

【0059】

(表1)

10

20

30

40

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

10

【0060】

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

20

【0061】

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

【0062】

(表2) 保存的置換に関するアミノ酸残基のクラス

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

30

【0063】

(表3) 代替的な保存的アミノ酸残基置換のクラス

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

40

【0064】

(表4) アミノ酸残基の代替的な物理的および機能的な分類

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

10

【0065】

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

【0066】

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

【0067】

20

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

30

40

【0068】

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

50

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

【0069】

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

【0070】

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

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

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

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

を有する。

【0071】

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

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

(SEQ ID NO:6) GAYPYDVPDYAS

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

【0072】

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

【0073】

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

10

20

30

40

50

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

【0074】

上記で考察するように、過剰リン酸化タウタンパク質の蓄積を含む神経原線維変化 (NFT) の形成は、アルツハイマー病、ピック病、および進行性核上性麻痺などの神経変性疾患の特有の特徴である。カスパーゼ活性化の効果としてのAsp421 (すなわち、SEQ ID NO: 1の残基D421) でのタウのタンパク質分解性切断は、タウの重合をさらに刺激し、NFTの発生を加速することが知られている短縮型タウの生成をもたらす。したがって、そのような切断は、過剰リン酸化タウの蓄積と関連するいくつかの機序の1つと考えられる (Pedersen, J.T. et al. (2015) "Tau Immunotherapy For Alzheimer's Disease," Trends Mol. Med. 2015 Apr 3. pii: S1471-4914(15)00058-1; pages 1-9, Jarero-Basulto, J.J. et al. (2013) "Luna Proteolytic Cleavage Of Polymeric Tau Protein By Caspase-3: Implications For Alzheimer Disease," J. Neuropathol. Exp. Neurol. 72(12):1145-1161; Mondragon-Rodriguez, S. et al. (2014) "Phosphorylation Of Tau Protein At Sites Ser(396-404) Is One Of The Earliest Events In Alzheimer's Disease And Down Syndrome," Neuropathol. Appl. Neurobiol. 40(2):121-135; Lerchundi, R. et al. (2011) "Tau Cleavage At D421 By Caspase-3 Is Induced In Neurons And Astrocytes Infected With Herpes Simplex Virus Type 1," J. Alzheimers Dis. 23(3):513-520; Quintanilla, R.A. et al. (2009) "Caspase-Cleaved Tau Expression Induces Mitochondrial Dysfunction In Immortalized Cortical Neurons: Implications For The Pathogenesis Of Alzheimer Disease," J. Biol. Chem. 284(28):18754-18766; Mondragon-Rodriguez, S. et al. (2008) "Cleavage And Conformational Changes Of Tau Protein Follow Phosphorylation During Alzheimer's Disease," Int. J. Exp. Pathol. 89(2):81-90; Mondragon-Rodriguez, S. et al. (2008) "Conformational Changes And Cleavage Of Tau In Pick Bodies Parallel The Early Processing Of Tau Found In Alzheimer Pathology," Neuropathol. Appl. Neurobiol. 34(1):62-75; Guillozet-Bongaarts, A.L. et al. (2006) "Pseudophosphorylation Of Tau At Serine 422 Inhibits Caspase Cleavage: In Vitro Evidence And Implications For Tangle Formation in vivo," J. Neurochem. 97(4):1005-1014; Fasulo, L. et al. (2005) "Apoptotic Effect Of Caspase-3 Cleaved Tau In Hippocampal Neurons And Its Potentiation By Tau FTDP-Mutation N279K," J. Alzheimers. Dis. 7(1):3-13; Guillozet-Bongaarts, A.L. et al. (2005) "Tau Truncation During Neurofibrillary Tangle Evolution In Alzheimer's Disease," Neurobiol. Aging ;26(7):1015-1022; Cho, J.H. et al. (2004) "Glycogen Synthase Kinase 3 Beta Induces Caspase-Cleaved Tau Aggregation In Situ," J. Biol. Chem. 279(52):54716-54723; およびBerry, R.W. et al. (2003) "Inhibition Of Tau Polymerization By Its Carboxy-Ter

minal Caspase Cleavage Fragment," Biochemistry 42(27):8325-8331を参照されたく、これらの参照文献のそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる）。

【0075】

本発明の抗体を基にした分子は、「短縮型Asp421エピトープ」に対して免疫特異性を呈する。(SEQ ID NO:1)の遊離Asp421残基を含有する任意の免疫原が、そのような抗体を単離および特徴決定するために使用されてもよいが、タウ (SEQ ID NO:1) のアミノ酸残基407~421に対応する

HLSNVSSSTGSDMVD (SEQ ID NO:7)

のアミノ酸配列を有するペプチドを使用することが好ましい。使用する免疫原は、このペプチドを含有してもよく、好ましくは、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) にコンジュゲートされるN末端システイン残基を含有するように改変される。遊離Asp421残基を選択的に認識する抗体をスクリーニングするために、この免疫原に対する結合を、タウ (SEQ ID NO:1) のアミノ酸残基407~423に対応する

HLSNVSSSTGSDMVDSP (SEQ ID NO:105)

などの遊離Asp421残基を含有しないペプチドと比較することができる。抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、抗体5G2A3、および抗体5G2G6は、短縮型Asp421エピトープに対して免疫特異性を呈する例示的な抗体である。

【0076】

A. 抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、抗体5G2A3、および抗体5G2G6

そのような取り組みが、Asp421エピトープと免疫特異的に結合する、抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、抗体5G2A3、および抗体5G2G6の単離につながった。抗体1G10D2、抗体5B3C11、抗体5G2A3、および抗体5G2G6は、短縮型Asp421エピトープを標的とし、ELISAにより決定した場合に高い親和性で結合する。抗体5G2B3は、Biacore分析を用いて決定した場合に高い親和性 (10^{-9} M) で短縮型Asp421エピトープと結合する。対照的に、抗体1G11A10は、Biacore分析を用いて決定した場合により低い親和性 (10^{-6} M) で短縮型Asp421エピトープと結合する。配列分析時に、抗体5G2A3と抗体5G2G6は配列が同一であることが見いだされた。したがって、そのような抗体へのさらなる言及は、抗体5G2A3についてのみすることになる。

【0077】

1. 抗体1G10D2

抗体1G10D2の軽鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:8; CDRに下線を付している) :

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
LLIYKVSNRF SGVPDRFGSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP
WTFGGGTKLE IK

を有する。

【0078】

抗体1G10D2の軽鎖可変ドメインCDR1は、したがって、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:9): RSSQSILNSNGNTYLE

を有する。

【0079】

抗体1G10D2の軽鎖可変ドメインCDR2は、したがって、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:10): KVSNRFS

を有する。

【0080】

抗体1G10D2の軽鎖可変ドメインCDR3は、したがって、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:11): FQGSHPWT

を有する。

【0081】

抗体1G10D2の重鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:12; CDRに下線を付して

いる) :

EVKLVESGGD LVTPGGSLKV SCAASGLTFS DSAMSWVRLT PEKRLEWVAS
ISTGGATYYP DGLKGRFTIS RDDARNILFL QMNSLRSEDT AMYYCTRRGV
SSGNLFTYWG QGTLVTVSA

を有する。

【0082】

したがって、抗体1G10D2の重鎖可変ドメインCDR1は、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:13) :
 DSAMSを有する。

【0083】

したがって、抗体1G10D2の重鎖可変ドメインCDR2は、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:14): **SISTGGATYYPDGLKG**

を有する。

【0084】

したがって、抗体1G10D2の重鎖可変ドメインCDR3は、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:15): **RGVSSGNLF**TY

を有する。

【0085】

2. 抗体1G11A10

抗体1G11A10の軽鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:16 ; CDRに下線を付して
 いる) :

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSII NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVETEDLGI YYCFQGSHVP
WTFGGGTKLE IK

を有する。

【0086】

抗体1G11A10の軽鎖可変ドメインCDR1は、したがって、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:17): **RSSQSI**INSNGNTYLE

を有する。

【0087】

抗体1G11A10の軽鎖可変ドメインCDR2は、したがって、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:18): **KVSNRF**S

を有する。

【0088】

抗体1G11A10の軽鎖可変ドメインCDR3は、したがって、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:19): **FQGS**HVPWT

を有する。

【0089】

抗体1G11A10の重鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:20 ; CDRに下線を付して
 いる) :

EVKLVESGGG LMKPGGSLKL SCAASGFTFS SYAMSWVRQS PEKRLEWVAS
ISSGGQTYSP DSVKGRFTIS RDNARNILYL QMRNLRSED T AMYYCASRGD
PTMTATLFVY WGQGTTLVTVS

を有する。

【0090】

したがって、抗体1G11A10の重鎖可変ドメインCDR1は、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:21)
 : SYAMSを有する。

【0091】

したがって、抗体1G11A10の重鎖可変ドメインCDR2は、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:22): **SISSGGQ**TYSPDSVKG

を有する。

10

20

30

40

50

【0092】

したがって、抗体1G11A10の重鎖可変ドメインCDR3は、アミノ酸配列
(SEQ ID NO:23): RGDPTMTATLFVY
を有する。

【0093】

3. 抗体5B3C11

時折、複数種類の抗体配列が、同じハイブリドーマ細胞により発現されることがあり、これは、モノクローナルではないハイブリドーマ、または再編成の結果、または融合パートナーの遺伝的バックグラウンドに起因しうる。この場合は、2種の軽鎖可変ドメイン：軽鎖VL1および軽鎖VL2が、抗体5B3C11について同定された。

10

【0094】

a. 抗体5B3C11の軽鎖VL1

抗体5B3C11の軽鎖VL1は、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:24 ; CDRに下線を付している) :
DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSNQSIL HSNGNTYLDW YLQKPGQSPK
LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDLGV YYCFQGSSHIP
WTFGGGTKLE IK

を有する。

【0095】

抗体5B3C11の軽鎖VL1可変ドメインCDR1は、したがって、アミノ酸配列
(SEQ ID NO:25): RSNQSILHSNGNTYLD
を有する。

20

【0096】

抗体5B3C11の軽鎖VL1可変ドメインCDR2は、したがって、アミノ酸配列
(SEQ ID NO:26): KVSNRFS
を有する。

【0097】

抗体5B3C11の軽鎖VL1可変ドメインCDR3は、したがって、アミノ酸配列
(SEQ ID NO:27): FQGSSHIPWT
を有する。

30

【0098】

b. 抗体5B3C11の軽鎖VL2

抗体5B3C11の軽鎖VL2は、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:28 ; CDRに下線を付している) :
ENVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCRASSSVS SSYLHWYQQK SGASPKLWIY
STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSVE AEDAATYYCQ QYSGYPRTFG
GGTKLEIK

を有する。

【0099】

抗体5B3C11の軽鎖VL2可変ドメインCDR1は、したがって、アミノ酸配列
(SEQ ID NO:29): RASSSVSSYLH
を有する。

40

【0100】

抗体5B3C11の軽鎖VL2可変ドメインCDR2は、したがって、アミノ酸配列
(SEQ ID NO:30): STSNLAS
を有する。

【0101】

抗体5B3C11の軽鎖VL2可変ドメインCDR3は、したがって、アミノ酸配列
(SEQ ID NO:31): QQYSGYPRT
を有する。

【0102】

抗体5B3C11の重鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:32 ; CDRに下線を付して

50

いる) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NYALSWVRQT PEKRLEWVAS
ISSGGNTYYP DSVKGRFTIS RDNARNILYL QMSSLRSED AMFYCTSRGD
TTLITTLFTY WGQGTLLTVS A

を有する。

【0103】

したがって、抗体5B3C11の重鎖可変ドメインCDR1は、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:33) :
 NYALSを有する。

【0104】

したがって、抗体5B3C11の重鎖可変ドメインCDR2は、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:34): SISSGGNTYYPDSVKG

を有する。

【0105】

したがって、抗体5B3C11の重鎖可変ドメインCDR3は、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:35): RGDTTLITTLFTY

を有する。

【0106】

4. 抗体5G2A3

抗体5G2A3の軽鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:36 ; CDRに下線を付してい
 る) :

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL HRNGNTYLDW FLLKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV
WTFGGGTKLE IK

を有する。

【0107】

抗体5G2A3の軽鎖可変ドメインCDR1は、したがって、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:37): RSSQSILHRNGNTYLD

を有する。

【0108】

抗体5G2A3の軽鎖可変ドメインCDR2は、したがって、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:38): KVSNRFS

を有する。

【0109】

抗体5G2A3の軽鎖可変ドメインCDR3は、したがって、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:39): FQGSHPVWT

を有する。

【0110】

抗体5G2A3の重鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:40 ; CDRに下線を付してい
 る) :

EVKLVESGGG LVKPGGSLTL SCAASGFTFS SYAMSWVRQT PEKSLEWVAS
ISSGGNTFYYP DTVKGRFTIS RDNARNILYL QMSGRLRSED AIYYCARRGD
PNMITTLFGY WGQGTLLVTIS A

を有する。

【0111】

したがって、抗体5G2A3の重鎖可変ドメインCDR1は、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:41) : S
 YAMSを有する。

【0112】

したがって、抗体5G2A3の重鎖可変ドメインCDR2は、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:42): SISSGGNTFYYPDTVKG

を有する。

10

20

30

40

50

【0113】

したがって、抗体5G2A3の重鎖可変ドメインCDR3は、アミノ酸配列
(SEQ ID NO:43): RGDPNMITTLFGY
を有する。

【0114】

B. scFv分子

scFv分子は、抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、または抗体5G2A3から作製されてもよく、そのような抗体と同じ軽鎖および重鎖可変ドメインCDR1、CDR2、およびCDR3を保有することになる。そのようなscFv分子の末梢注射は、トランスジェニックタウ異常症マウスにおいて強いインビボ脳シグナルをもたらすが、野生型マウスまたはアミロイド-β斑マウスにおいてはもたらさない。イメージングシグナルは、ニューロン内タウ凝集物を伴うプローブの共局在と極めてよく相関し、かつエンドソーム、オートファゴソームおよびリソソームのマーカーと関連性があり、このことは、これらの分解経路におけるそれらの相互作用を示唆する。抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、または抗体5G2A3に由来するscFv分子は、ADおよび関連するタウ異常症に関する診断マーカーとして大きな可能性がある。

【0115】

1つの好ましい態様において、このようなscFvは、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:44): IQEEFKMKKTAIAIAVALAGFATVAQAA

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

(SEQ ID NO:45): AKTTPPSVTSGQAGQ

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

(SEQ ID NO:5): HHHHHH

) など、および／またはHA-Tag、例えば

(SEQ ID NO:6): GAYPYDVPDYAS

など、または任意の順序でのそれらの任意の組み合わせもしくは部分的組み合わせ。好ましいC末端ペプチド部分は、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:46): AKTTPPSVTSGQAGQHSHHHHGAYPYDVPDYAS

を有し、それ故に (N末端からC末端の方向に) SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 5、およびSEQ ID NO: 6を含む。

【0116】

1. 抗体1G10D2から作製したscFv分子

抗体1G10D2から作製した例示的なscFv分子の全配列は、(SEQ ID NO:47) (CDR残基に下線を付している)：

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV
WTFGGGTKLE IKSSGGGGSG GGGGGSSRSS EVKLVESGGD LVTPGGSLKV
SCAASGLTFS DSAMSWVRLT PEKRLWVAS ISTGGATYYP DGLKGRFTIS
RDDARNILFL QMNSLRSED AMYYCTRGRV SSGNLFTYWG QGTLVTVSA

であり、配列中、アミノ酸残基1～112は、抗体1G10D2の軽鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:8) のアミノ酸残基であり、アミノ酸残基113～130は、リンカー (SEQ ID NO:4) のアミノ酸残基であり (小文字斜体で示す)、アミノ酸残基131～249は、抗体1G10D2の重鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:12) のアミノ酸残基である。

【0117】

したがって、好ましい態様において、そのようなscFv融合タンパク質は、SEQ ID NO:48

～56（配列中、ScFv融合体のN末端および／またはC末端ペプチド部分に下線を付している）のいずれかのアミノ酸配列を含むことになる。

SEQ ID NO:48 (SEQ ID NO:44および57の融合体):

IQEEFKMKKT **AIAIAVALAG** **FATVAQAADV** LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSILNS NGNTYLEWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLTKISR VEAEDLGVIY CFQGSHVPWT FGGGTKLEIK ***ssggggsggg***
gggssrssEV KLVESGGDLV TPGGSLKVSC AASGLTFSDS AMSWVRLTPE
 KRLEWVASIS TGGATYYPDG LKGRFTISR DARNILFLQM NSLRSEDAM
 YYCTRRGVSS GNLFITYWGQ TLVTVSA

SEQ ID NO:49 (SEQ ID NO:47および45の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHVP
 WTEFGGGTKLEIK***ssggggsg*** ***gggggssrss*** EVKLVESGGDLVTPGGSLKV
 SCAASGLTFSDSAMS WVRLTPEKRLEWVASISTGGATYYPDGLKGRFTISR
 RDDARNILFLQMNSLRSEDAMYYCTRRGVSSGNLFITYWGQGTLVTVSA**A**
KTTPPSVTSG **QAGQ**

SEQ ID NO:50 (SEQ ID NO:47および5の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRFS GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP
 WTFGGGTKLE IK*ssggggsg gggggssrss* EVKLVESGGD LVTPGGSLKV
 SCAASGLTFS DSAMSWRLT PEKRLEWVAS ISTGGATYYP DGLKGRFTIS
 RDDARNILFL QMNSLRSED AMYYCTRGRV SSGNLFTYWG QGTLVTVSAH
HHHH

SEQ ID NO:51 (SEQ ID NO:47および6の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRFS GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP
 WTFGGGTKLE IK*ssggggsg gggggssrss* EVKLVESGGD LVTPGGSLKV
 SCAASGLTFS DSAMSWRLT PEKRLEWVAS ISTGGATYYP DGLKGRFTIS
 RDDARNILFL QMNSLRSED AMYYCTRGRV SSGNLFTYWG QGTLVTVSAG
AYPYDVPDYA S

10

SEQ ID NO:52 (SEQ ID NO:47および46の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRFS GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP
 WTFGGGTKLE IK*ssggggsg gggggssrss* EVKLVESGGD LVTPGGSLKV
 SCAASGLTFS DSAMSWRLT PEKRLEWVAS ISTGGATYYP DGLKGRFTIS
 RDDARNILFL QMNSLRSED AMYYCTRGRV SSGNLFTYWG QGTLVTVSAA
KTPPSVTSG QAGQH HHHH GAYPYDVPDY AS

20

SEQ ID NO:53 (SEQ ID NO:44、47、および45の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSILNS NGNTYLEWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VEAEDLGVIY CFQGSHVPWT FGGGTKLEIK *ssggggsggg*
*gggssrss*EV KLVESGGDLV TPGGSLKVSC AASGLTFSDS AMSWRLTPE
 KRLEWVASIS TGGATYYPDG LKGRFTISR DARNILFLQM NSLRSEDAM
 YYCTRGRVSS GNLFTYWGQG TLVTVSAAKT TPPSVTSGQA GQ

30

SEQ ID NO:54 (SEQ ID NO:44、47、および5の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSILNS NGNTYLEWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VEAEDLGVIY CFQGSHVPWT FGGGTKLEIK *ssggggsggg*
*gggssrss*EV KLVESGGDLV TPGGSLKVSC AASGLTFSDS AMSWRLTPE
 KRLEWVASIS TGGATYYPDG LKGRFTISR DARNILFLQM NSLRSEDAM
 YYCTRGRVSS GNLFTYWGQG TLVTVSAHHH HHH

SEQ ID NO:55 (SEQ ID NO:44、47、および6の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSILNS NGNTYLEWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VEAEDLGVIY CFQGSHVPWT FGGGTKLEIK *ssggggsggg*
*gggssrss*EV KLVESGGDLV TPGGSLKVSC AASGLTFSDS AMSWRLTPE
 KRLEWVASIS TGGATYYPDG LKGRFTISR DARNILFLQM NSLRSEDAM
 YYCTRGRVSS GNLFTYWGQG TLVTVSAGAY PYDVPDYAS

40

SEQ ID NO:56 (SEQ ID NO:44、47、および46の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSILNS NGNTYLEWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VEAEDLGVYY CFQGSHPWT FGGGTKLEIK *ssgggsggg*
*gggssrsse*EV KLVESGGDLV TPGGSLKVSC AASGLTFSDS AMSWRLTPE
 KRLEWVASIS TGGATYYPDG LKGRFTISR DARNILFLQM NSLRSEDAM
 YYCTRRGVSS GNLFTYWGQG TLVTVSAAKT TPPSVTSGQA GQHHHHHHGA
YPYDVDPDIAS

【0118】

2. 抗体1G11A10から作製したscFv分子

10

抗体1G11A10から作製した例示的なscFv分子の全配列は、(SEQ ID NO:57

) (CDR残基に下線を付している) :

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSII NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVETEDLGI YYCFQGSHP
WTFGGGTKLE IK*ssggggsg* *gggggssrs* EVKLVESGGG LMKPGGSLKL
 SCAASGFTFS SYAMSWVRQS PEKRLEWVAS ISSGGQTYSP DSVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMRNLRSEDAM AMYYCASRGD PTMTATLFVY WGQGTTLVTVS

であり、配列中、アミノ酸残基1~112は、抗体1G11A10の軽鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:16) のアミノ酸残基であり、アミノ酸残基113~130は、リンカー (SEQ ID NO:4) のアミノ酸残基であり (小文字斜体で示す)、アミノ酸残基131~250は、抗体1G11A10の重鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:20) のアミノ酸残基である。

20

【0119】

したがって、好ましい態様において、そのようなscFv融合タンパク質は、SEQ ID NO:58~66 (配列中、ScFv融合体のN末端および/またはC末端ペプチド部分に下線を付している) のいずれかのアミノ酸配列を含むことになる。

SEQ ID NO:58 (SEQ ID NO:44および57の融合体) :

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSIINS NGNTYLEWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VETEDLGIYY CFQGSHPWT FGGGTKLEIK *ssgggsggg*
*gggssrsse*EV KLVESGGGLM KPGGSLKLSC AASGFTFSSY AMSWVRQSPE
 KRLEWVASIS SGGQTYSPDS VKGRFTISR DARNILYLQM RNLRSSEDTAM
 YYCASRGDPT MTATLFVYWG QGTTLVTVS

30

SEQ ID NO:59 (SEQ ID NO:57および45の融合体) :

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSII NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVETEDLGI YYCFQGSHP
 WTFGGGTKLE IK*ssggggsg* *gggggssrs* EVKLVESGGG LMKPGGSLKL
 SCAASGFTFS SYAMSWVRQS PEKRLEWVAS ISSGGQTYSP DSVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMRNLRSEDAM AMYYCASRGD PTMTATLFVY WGQGTTLVTVS
AKTTPPSVTS GQAGQ

40

SEQ ID NO:60 (SEQ ID NO:57および5の融合体) :

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSII NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVETEDLGI YYCFQGSHP
 WTFGGGTKLE IK*ssggggsg* *gggggssrs* EVKLVESGGG LMKPGGSLKL
 SCAASGFTFS SYAMSWVRQS PEKRLEWVAS ISSGGQTYSP DSVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMRNLRSEDAM AMYYCASRGD PTMTATLFVY WGQGTTLVTVS
HHHHHH

SEQ ID NO:61 (SEQ ID NO:57および6の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSII NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRFS SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVETEDLGI YYCFQGSHVP
 WTFGGGKLE IK*ssggggsg ggggssrss* EVKLVESGGG LMKPGGSLKL
 SCAASGFTFS SYAMSWVRQS PEKRLWVAS ISSGGQTYSP DSVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMRNLRSED AMYYCASRGD PTMTATLFVY WGQGTTLVTVS
GAYPYDVPDY AS

SEQ ID NO:62 (SEQ ID NO:57および46の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSII NSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRFS SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVETEDLGI YYCFQGSHVP
 WTFGGGKLE IK*ssggggsg ggggssrss* EVKLVESGGG LMKPGGSLKL
 SCAASGFTFS SYAMSWVRQS PEKRLWVAS ISSGGQTYSP DSVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMRNLRSED AMYYCASRGD PTMTATLFVY WGQGTTLVTVS
AKTTPPSVTS GQAGQH HHHH HGAYPYDVPD YAS

10

SEQ ID NO:63 (SEQ ID NO:44、57、および45の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSIINS NGNTYLEWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VETEDLGIYY CFQGSHVPWT FGGGTKLEIK *ssggggsggg*
*gggssrss*EV KLVESGGGLM KPGGSLKLSC AASGFTFSSY AMSWVRQSPE
 KRLEWVASIS SGGQTYSPDS VKGRFTISRDNARNILYLQM RNLRS EDTAM
 YYCASRGDPT MTATLFVYWG QGTTLVTVSAK TTPPSVTSGQ AGQ

20

SEQ ID NO:64 (SEQ ID NO:44、57、および5の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSIINS NGNTYLEWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VETEDLGIYY CFQGSHVPWT FGGGTKLEIK *ssggggsggg*
*gggssrss*EV KLVESGGGLM KPGGSLKLSC AASGFTFSSY AMSWVRQSPE
 KRLEWVASIS SGGQTYSPDS VKGRFTISRDNARNILYLQM RNLRS EDTAM
 YYCASRGDPT MTATLFVYWG QGTTLVTVSHH HHHH

30

SEQ ID NO:65 (SEQ ID NO:44、57、および6の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSIINS NGNTYLEWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VETEDLGIYY CFQGSHVPWT FGGGTKLEIK *ssggggsggg*
*gggssrss*EV KLVESGGGLM KPGGSLKLSC AASGFTFSSY AMSWVRQSPE
 KRLEWVASIS SGGQTYSPDS VKGRFTISRDNARNILYLQM RNLRS EDTAM
 YYCASRGDPT MTATLFVYWG QGTTLVTVSGA YPYDVPDYAS

SEQ ID NO:66 (SEQ ID NO:44、57、および46の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSIINS NGNTYLEWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VETEDLGIYY CFQGSHVPWT FGGGTKLEIK *ssggggsggg*
*gggssrss*EV KLVESGGGLM KPGGSLKLSC AASGFTFSSY AMSWVRQSPE
 KRLEWVASIS SGGQTYSPDS VKGRFTISRDNARNILYLQM RNLRS EDTAM
 YYCASRGDPT MTATLFVYWG QGTTLVTVSAK TTPPSVTSGQ AGQH HHHH HHG
AYPYDVPDYA S

40

【0120】

3. 抗体5B3C11から作製したscFv分子

a. 抗体5B3C11の軽鎖VL1から作製したscFv分子

VL1軽鎖可変ドメインを用いて抗体5B3C11から作製した例示的なscFv分子の全配列は、
 (SEQ ID NO:67) (CDR残基に下線を付している):

50

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSNQSIL HSNGNTYLDW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDLGV YYCFQGSHIP
WTFGGGTKLE IK*ssggggsg* *gggggssrss* EVQLVESGGG LVKPGGSLKL
 SCAASGFTFS NYALSWVRQT PEKRLEWVAS ISSGGNTYYP DSVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMSSLRSED AMFYCTSRGD TTLITTLFTY WGQGTSLVTVS
 A

であり、配列中、アミノ酸残基1～112は、抗体5B3C11のVL1軽鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:28) のアミノ酸残基であり、アミノ酸残基113～130は、リンカー (SEQ ID NO:4) のアミノ酸残基であり (小文字斜体で示す)、アミノ酸残基131～251は、抗体5B3C11の重鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:32) のアミノ酸残基である。

10

【0121】

したがって、好ましい態様において、そのようなscFv融合タンパク質は、SEQ ID NO:68～76 (配列中、ScFv融合体のN末端および／またはC末端ペプチド部分に下線を付している) のいずれかのアミノ酸配列を含むことになる。

SEQ ID NO:68 (SEQ ID NO:44および67の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSNQSIHLS NGNTYLDWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLRISR VEAEDLGVYY CFQGSHIPWT FGGGTKLEIK *ssggggsggg*
*gggssrss*EV QLVESSGGGLV KPGGSLKLSC AASGFTFSNY ALSWVRQTPE
 KRLEWVASIS SGGNTYYPDS VKGRFTISRDNARNILYLQM SSLRSEDAM
 FYCTSRGDTT LITTLFTYWG QGTSLVTVSA

20

SEQ ID NO:69 (SEQ ID NO:67および45の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSNQSIHLS HSNGNTYLDW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYYCFQGSHIP
 WTFGGGTKLEIK*ssggggsg* *gggggssrss* EVQLVESGGG LVKPGGSLKL
 SCAASGFTFS NYALSWVRQT PEKRLEWVAS ISSGGNTYYP DSVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMSSLRSED AMFYCTSRGD TTLITTLFTY WGQGTSLVTVS
AAKTTPPSVT SGQAGQ

SEQ ID NO:70 (SEQ ID NO:67および5の融合体):

30

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSNQSIHLS HSNGNTYLDW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYYCFQGSHIP
 WTFGGGTKLEIK*ssggggsg* *gggggssrss* EVQLVESGGG LVKPGGSLKL
 SCAASGFTFS NYALSWVRQT PEKRLEWVAS ISSGGNTYYP DSVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMSSLRSED AMFYCTSRGD TTLITTLFTY WGQGTSLVTVS
AHHHHH

SEQ ID NO:71 (SEQ ID NO:67および6の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSNQISIL HSNNGNTYLDW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRFS SGVPDRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDLGV YYCFQGSHP
 WTFGGGKLE IKssggggsg gggggssrss EVQLVESGGG LVKPGGSLKL
 SCAASGFTFS NYALSWVRQT PEKRLWVAS ISSGGNTYYP DSVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMSSLRSED AMFYCTSRGD TTLITTLFTY WGQGLTVTS
AGAYPYDVPD YAS

SEQ ID NO:72 (SEQ ID NO:67および46の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSNQISIL HSNNGNTYLDW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRFS SGVPDRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDLGV YYCFQGSHP
 WTFGGGKLE IKssggggsg gggggssrss EVQLVESGGG LVKPGGSLKL
 SCAASGFTFS NYALSWVRQT PEKRLWVAS ISSGGNTYYP DSVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMSSLRSED AMFYCTSRGD TTLITTLFTY WGQGLTVTS
AAKTTPPSVT SQAGQH HHHH HHGAYPYDVP DYAS

10

SEQ ID NO:73 (SEQ ID NO:44、67、および45の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSNQISILHS NGNTYLDWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLRISR VEAEDLGVEY CFQGSHPWT FGGGKLEIK ssgggsggg
 gggssrssEV QLVESSGGGLV KPGGSLKLSC AASGFTFSNY ALSWVRQTPE
 KRLEWVASIS SGGNTYYPDS VKGRFTISR NARNILYLQM SSLRSEDAM
 FYCTSRGDTT LITTLFTYWG QGTLTVSAA KTTTPSVTSG QAGQ

20

SEQ ID NO:74 (SEQ ID NO:44、67、および5の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSNQISILHS NGNTYLDWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLRISR VEAEDLGVEY CFQGSHPWT FGGGKLEIK ssgggsggg
 gggssrssEV QLVESSGGGLV KPGGSLKLSC AASGFTFSNY ALSWVRQTPE
 KRLEWVASIS SGGNTYYPDS VKGRFTISR NARNILYLQM SSLRSEDAM
 FYCTSRGDTT LITTLFTYWG QGTLTVSAH HHHHH

30

SEQ ID NO:75 (SEQ ID NO:44、67、および6の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSNQISILHS NGNTYLDWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLRISR VEAEDLGVEY CFQGSHPWT FGGGKLEIK ssgggsggg
 gggssrssEV QLVESSGGGLV KPGGSLKLSC AASGFTFSNY ALSWVRQTPE
 KRLEWVASIS SGGNTYYPDS VKGRFTISR NARNILYLQM SSLRSEDAM
 FYCTSRGDTT LITTLFTYWG QGTLTVSAG AYPYDVPDYA S

SEQ ID NO:76 (SEQ ID NO:44、67、および46の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSNQISILHS NGNTYLDWYL QKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLRISR VEAEDLGVEY CFQGSHPWT FGGGKLEIK ssgggsggg
 gggssrssEV QLVESSGGGLV KPGGSLKLSC AASGFTFSNY ALSWVRQTPE
 KRLEWVASIS SGGNTYYPDS VKGRFTISR NARNILYLQM SSLRSEDAM
 FYCTSRGDTT LITTLFTYWG QGTLTVSAA KTTTPSVTSG QAGQH HHHHHH
GAYPYDVPDY AS

40

【 0 1 2 2 】

b. 抗体5B3C11の軽鎖VL2から作製したscFv分子

VL2軽鎖可変ドメインを用いて抗体5B3C11から作製した例示的なscFv分子の全配列は、
 (SEQ ID NO:77) (CDR残基に下線を付している) :

ENVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCRASSSVS SSYLHWYQQK SGASPKLWIY
STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSVE AEDAATYYCQ QYSGYPRTFG
GGTKLEIK*ss* *ggggsggggg* *gssrs*EVQL VESGGGLVKP GGSLKLSCAA
SGFTFSNYAL SWVRQTPEKR LEWVASISSG GNTYYPDSVK GRFTISRDNA
RNILYLQMSS LRSEDAMFY CTSRGDTTLI TTLFTYWGQG TLVTVSA

であり、配列中、アミノ酸残基1～108は、抗体5B3C11のVL2軽鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:28) のアミノ酸残基であり、アミノ酸残基109～126は、リンカー (SEQ ID NO:4) のアミノ酸残基であり (小文字斜体で示す)、アミノ酸残基127～247は、抗体5B3C11の重鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:32) のアミノ酸残基である。

【0123】

したがって、好ましい態様において、そのようなscFv融合タンパク質は、SEQ ID NO:78～86 (配列中、ScFv融合体のN末端および／またはC末端ペプチド部分に下線を付している) のいずれかのアミノ酸配列を含むことになる。

SEQ ID NO:78 (SEQ ID NO:44および77の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAAEN VLTQSPAIMS ASPGEKVTMT
CRASSSVSSS YLHWYQQKSG ASPKLWIYST SNLASGVPAR FSGSGSGTSY
SLTISSVEAE DAATYYCQQY SGYPRTFGGG TKLEIK*ssgg* *ggsgggggggs*
*srs*EVQLVE SGGGLVKPGG SLKLSCAASG FTFSNYALSW VRQTPEKRLE
WVASISSGN TYYPDSVKGR FTISRDNARN ILYLQMSSLR SEDTAMFYCT
SRGDTTLITT LFTYWGQGT L VTVSA

SEQ ID NO:79 (SEQ ID NO:77および45の融合体):

ENVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCRASSSVS SSYLHWYQQK SGASPKLWIY
STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSVE AEDAATYYCQ QYSGYPRTFG
GGTKLEIK*ss* *ggggsggggg* *gssrs*EVQL VESGGGLVKP GGSLKLSCAA
SGFTFSNYAL SWVRQTPEKR LEWVASISSG GNTYYPDSVK GRFTISRDN
RNILYLQMSS LRSEDAMFY CTSRGDTTLI TTLFTYWGQG TLVTVSAAKT
TPPSVTSGQA GQ

SEQ ID NO:80 (SEQ ID NO:77および5の融合体):

ENVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCRASSSVS SSYLHWYQQK SGASPKLWIY
STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSVE AEDAATYYCQ QYSGYPRTFG
GGTKLEIK*ss* *ggggsggggg* *gssrs*EVQL VESGGGLVKP GGSLKLSCAA
SGFTFSNYAL SWVRQTPEKR LEWVASISSG GNTYYPDSVK GRFTISRDN
RNILYLQMSS LRSEDAMFY CTSRGDTTLI TTLFTYWGQG TLVTVSAHHH
HHH

10

20

30

SEQ ID NO:81 (SEQ ID NO:77および6の融合体):

ENVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCRASSSVS SSYLHWYQQK SGASPKLWIY
 STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSVE AEDAATYYCQ QYSGYPRTFG
 GGTKLEIKss *ggggsggggg gssrss*EVQL VESGGGLVKP GGSLKLSCAA
 SGFTFSNYAL SWVRQTPEKR LEWVASISSG GNTYYPDSVK GRFTISRDN
 RNILYLQMS LRSEDAMFY CTSRGDTTLI TTLFTYWGG TLVTVSAGAY
PYDVDPDYAS

SEQ ID NO:82 (SEQ ID NO:77および46の融合体):

ENVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCRASSSVS SSYLHWYQQK SGASPKLWIY
 STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSVE AEDAATYYCQ QYSGYPRTFG
 GGTKLEIKss *ggggsggggg gssrss*EVQL VESGGGLVKP GGSLKLSCAA
 SGFTFSNYAL SWVRQTPEKR LEWVASISSG GNTYYPDSVK GRFTISRDN
 RNILYLQMS LRSEDAMFY CTSRGDTTLI TTLFTYWGG TLVTVSAAKT
TPPSVTSGQA GQH HHHHGA YPYDVDPDYAS

10

SEQ ID NO:83 (SEQ ID NO:44、77、および45の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAAEN VLTQSPAIMS ASPGEKVTMT
 CRASSSVSS YLHWYQQKSG ASPKLWIYST SNLASGVPAR FSGSGSGTSY
 SLTISSVEAE DAATYYCQQY SGYPRTFGGG TKLEIKss*gg gsgggggggs*
*srss*EVQLVE SGGGLVKPGG SLKLSCAASG FTFSNYALSW VRQTPEKRLE
 WVASISSGN TYYPDSVKGR FTISRDNARN ILYLQMSLR SEDTAMFYCT
 SRGDTTLITT LFTYWGGTL VTVSAAKTTP PSVTSGQAGQ

20

SEQ ID NO:84 (SEQ ID NO:44、77、および5の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAAEN VLTQSPAIMS ASPGEKVTMT
 CRASSSVSS YLHWYQQKSG ASPKLWIYST SNLASGVPAR FSGSGSGTSY
 SLTISSVEAE DAATYYCQQY SGYPRTFGGG TKLEIKss*gg gsgggggggs*
*srss*EVQLVE SGGGLVKPGG SLKLSCAASG FTFSNYALSW VRQTPEKRLE
 WVASISSGN TYYPDSVKGR FTISRDNARN ILYLQMSLR SEDTAMFYCT
 SRGDTTLITT LFTYWGGTL VTVSAHHHHH H

30

SEQ ID NO:85 (SEQ ID NO:44、77、および6の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAAEN VLTQSPAIMS ASPGEKVTMT
 CRASSSVSS YLHWYQQKSG ASPKLWIYST SNLASGVPAR FSGSGSGTSY
 SLTISSVEAE DAATYYCQQY SGYPRTFGGG TKLEIKss*gg gsgggggggs*
*srss*EVQLVE SGGGLVKPGG SLKLSCAASG FTFSNYALSW VRQTPEKRLE
 WVASISSGN TYYPDSVKGR FTISRDNARN ILYLQMSLR SEDTAMFYCT
 SRGDTTLITT LFTYWGGTL VTVSAGAYPY DVPDYAS

SEQ ID NO:86 (SEQ ID NO:44、77、および46の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAAEN VLTQSPAIMS ASPGEKVTMT
 CRASSSVSS YLHWYQQKSG ASPKLWIYST SNLASGVPAR FSGSGSGTSY
 SLTISSVEAE DAATYYCQQY SGYPRTFGGG TKLEIKss*gg gsgggggggs*
*srss*EVQLVE SGGGLVKPGG SLKLSCAASG FTFSNYALSW VRQTPEKRLE
 WVASISSGN TYYPDSVKGR FTISRDNARN ILYLQMSLR SEDTAMFYCT
 SRGDTTLITT LFTYWGGTL VTVSAAKTTP PSVTSGQAGQ HHHHHGA
YDVDPDYAS

40

【 0 1 2 4 】

4. 抗体5G2A3から作製したscFv分子

抗体5G2A3（または同じ配列を有する抗体5G2G6）から作製した例示的なscFv分子の全配列は、(SEQ ID NO:87) (CDR残基に下線を付している) :

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL HRNGNTYLDW FLLKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHP
WTFGGGTKLE IK*ssggggsg* *gggggssrss* EVKLVESGGG LVKPGGSLTL
 SCAASGFTFS SYAMSWVRQT PEKSLEWVAS ISSGGNTFYP DTVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMSGLRSED AIYYCARRGD PNMITTLFGY WGQGTSLVTIS
 A

であり、配列中、アミノ酸残基1～112は、抗体5G2A3の軽鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:36) のアミノ酸残基であり、アミノ酸残基113～130は、リンカー (SEQ ID NO:4) のアミノ酸残基であり (小文字斜体で示す)、アミノ酸残基131～251は、抗体5G2A3の重鎖可変ドメイン (SEQ ID NO:40) のアミノ酸残基である。

10

【0125】

したがって、好ましい態様において、そのようなscFv融合タンパク質は、SEQ ID NO:96～104 (配列中、ScFv融合体のN末端および/またはC末端ペプチド部分に下線を付している) のいずれかのアミノ酸配列を含むことになる。

SEQ ID NO:88 (SEQ ID NO:44および87の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSILHR NGNTYLDWFL LKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VEAEDLGVIY CFQGSHPWT FGGGTKLEIK *ssggggsggg*
*gggssrss*EV KLVESGGGLV KPGGSLTLSC AASGFTFSSY AMSWVRQTPE
 KSLEWVASIS SGGNTFYPTD VKGRFTISRDNARNILYLQMSGLRSED
 AIYYCARRGDPN MITTLFGYWG QGTSLVTISA

20

SEQ ID NO:89 (SEQ ID NO:87および45の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL HRNGNTYLDW FLLKPGQSPK
 LLIYKVSNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHP
WTFGGGTKLE IK*ssggggsg* *gggggssrss* EVKLVESGGG LVKPGGSLTL
 SCAASGFTFS SYAMSWVRQT PEKSLEWVAS ISSGGNTFYP DTVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMSGLRSED AIYYCARRGD PNMITTLFGY WGQGTSLVTIS
AAKTTPPSVT SGQAGQ

SEQ ID NO:90 (SEQ ID NO:87および5の融合体):

30

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL HRNGNTYLDW FLLKPGQSPK
 LLIYKVSNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHP
WTFGGGTKLE IK*ssggggsg* *gggggssrss* EVKLVESGGG LVKPGGSLTL
 SCAASGFTFS SYAMSWVRQT PEKSLEWVAS ISSGGNTFYP DTVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMSGLRSED AIYYCARRGD PNMITTLFGY WGQGTSLVTIS
AHHHHH

SEQ ID NO:91 (SEQ ID NO:87および6の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL HRNGNTYLDW FLLKPGQSPK
 LLIYKVSNRFS SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV
 WTFGGGKLE IKssggggsg gggggssrss EVKLVESGGG LVKPGGSLTL
 SCAASGFTFS SYAMSWVRQT PEKSLEWVAS ISSGNTFYF DTVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMSGLRSED AIYYCARRGD PNMITTLFGY WGQGLVTIS
AGAYPYDVPD YAS

SEQ ID NO:92 (SEQ ID NO:87および46の融合体):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIL HRNGNTYLDW FLLKPGQSPK
 LLIYKVSNRFS SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV
 WTFGGGKLE IKssggggsg gggggssrss EVKLVESGGG LVKPGGSLTL
 SCAASGFTFS SYAMSWVRQT PEKSLEWVAS ISSGNTFYF DTVKGRFTIS
 RDNARNILYL QMSGLRSED AIYYCARRGD PNMITTLFGY WGQGLVTIS
AAKTTPPSVT SQAGQH HHHH HGAYPYDVP DYAS

10

SEQ ID NO:93 (SEQ ID NO:44、87、および45の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSILHR NGNTYLDWFL LKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VEAEDLGVYY CFQGSHPVWT FGGGKLEIK ssgggsggg
 gggssrssEV KLVESGGGLV KPGGSLTLSC AASGFTFSSY AMSWVRQTPE
 KSLEWVASIS SGGNTFYFDT VKGRFTISR NARNILYLQM SGLRSEDAT
 YYCARRGDPN MITTLFGYWG QGTLVTISAA KTTPPSVTSG QAGQ

20

SEQ ID NO:94 (SEQ ID NO:44、87、および5の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSILHR NGNTYLDWFL LKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VEAEDLGVYY CFQGSHPVWT FGGGKLEIK ssgggsggg
 gggssrssEV KLVESGGGLV KPGGSLTLSC AASGFTFSSY AMSWVRQTPE
 KSLEWVASIS SGGNTFYFDT VKGRFTISR NARNILYLQM SGLRSEDAT
 YYCARRGDPN MITTLFGYWG QGTLVTISAH HHHHH

30

SEQ ID NO:95 (SEQ ID NO:44、87、および6の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSILHR NGNTYLDWFL LKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VEAEDLGVYY CFQGSHPVWT FGGGKLEIK ssgggsggg
 gggssrssEV KLVESGGGLV KPGGSLTLSC AASGFTFSSY AMSWVRQTPE
 KSLEWVASIS SGGNTFYFDT VKGRFTISR NARNILYLQM SGLRSEDAT
 YYCARRGDPN MITTLFGYWG QGTLVTISAG AYPYDVPDYA S

SEQ ID NO:96 (SEQ ID NO:44、87、および46の融合体):

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADV LMTQTPLSLP VSLGDQASIS
 CRSSQSILHR NGNTYLDWFL LKPGQSPKLL IYKVSNRFSG VPDRFSGSGS
 GTDFTLKISR VEAEDLGVYY CFQGSHPVWT FGGGKLEIK ssgggsggg
 gggssrssEV KLVESGGGLV KPGGSLTLSC AASGFTFSSY AMSWVRQTPE
 KSLEWVASIS SGGNTFYFDT VKGRFTISR NARNILYLQM SGLRSEDAT
 YYCARRGDPN MITTLFGYWG QGTLVTISAA KTTPPSVTSG QAGQH HHHHH
GAYPYDVPDY AS

40

【0126】

scFvは血液脳関門を越えて移行しうるが、そのような移行をさらに促進するためにさまざまな補助的なアプローチを用いることもできる (Huang, L. et al. (2013) "Single-Chain Fragment Variable Passive Immunotherapies For Neurodegenerative Diseases," Int. J. Mol. Sci. 14(9): 19109-19127)。タンパク質およびペプチドの限定的なセット

50

が、受容体媒介性トランスサイトosisを介して血液脳関門を越えて輸送され (Herve, F. et al. (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis," AAPS J. 10(3):455-472)、最も研究されている3つのリガンドは、インスリン、鉄トランスフェリンおよびLDL-コレステロールである (Bickel, U. et al. (2001) "Delivery Of Peptides And Proteins Through The Blood-Brain Barrier," Adv. Drug Deliv. Rev. 46:247-279; Tuma, P.L. et al. (2003) "Transcytosis: Crossing Cellular Barriers," Physiol. Rev. 83:871-932)。したがって、血液脳関門を越えてのscFvの輸送は、scFvを、そのようなりガンドの受容体 (例えば、ヒトインスリン受容体 (HIR)、トランスフェリン受容体 (TfR)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1 (LRP1) および2 (LRP2)、非毒性ジフテリア毒素受容体/ヘパリン結合上皮増殖因子様増殖因子など) に対して免疫特異的である抗体またはそのエピトープ結合性断片と融合させることによって促進することができる。結果的に得られた融合タンパク質は、受容体とのその結合を通じて血液脳関門を越えて輸送することができる (Boado, R.J. et al. (2010) "IgG-Single-Chain Fv Fusion Protein Therapeutic For Alzheimer's Disease: Expression In CHO cells And Pharmacokinetics And Brain Delivery In The Rhesus Monkey," Biotechnol. Bioeng. 105:627-635; Jones, A.R. et al. (2007) "Blood-Brain Barrier Transport Of Therapeutics Via Receptor-Mediation," Pharm. Res. 24(9):1759-1771; Wang, Y.Y. et al. (2009) "Receptor-Mediated Therapeutic Transport Across The Blood-Brain Barrier," Immunotherapy 1(6):983-993; Lajoie, J.M. et al. (2015) "Targeting Receptor-Mediated Transport For Delivery Of Biologics Across The Blood-Brain Barrier," Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 55:613-631; Pardridge, W.M. (2102) "Drug Transport Across The Blood-Brain Barrier," J. Cereb. Blood Flow Metab. 32(11): 1959-1972; Bhaskar, S. et al. (2010) "Multifunctional Nanocarriers For Diagnostics, Drug Delivery And Targeted Treatment Across Blood-Brain Barrier: Perspectives On Tracking And Neuroimaging," Part. Fibre. Toxicol. 7:3 pp. 1-25)。

【0127】

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

【0128】

または、scFvを、細胞透過性ペプチド (「CPP」) を含有するように強化することもできる (Rao, K.S. et al. (2009) "Targeting Anti-HIV Drugs To The CNS," Expert Opin. Drug Deliv. 6(8):771-784; Mathupala, S.P. et al. (2009) "Delivery Of Small-Interfering RNA (siRNA) To The Brain," Expert Opin. Ther. Pat. 19(2):137-140; Herve, F. et al. (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis," AAPS J. 10(3):455-472)。そのようなペプチドには、HIV-1トランス活性化転写アクチベーター (TAT) ペプチド、単純ヘルペスウイルス1型転写因子 (HSV VP-22) ペプチド、アンテナペディアおよびペネトラチンが含まれる (Wadia, J.S. et al. (2004) "Transducible TAT-HA Fusogenic Peptide Enhances Escape Of TAT-Fusion Proteins After Lipid Raft Macropinocytosis," Nat. Med. 10:310-315; Richard, J.P. et al. (2003) "Cell-Penetrating Peptides. A Reevaluation Of The Mechanism Of Cellular Uptake," J. Biol. Chem. 278:585-590; Temsamani, J. et al. (2004) "The Use Of Cell-Penetrating Peptides For Drug Delivery," Drug Discov. Today 9: 1012-1019)。

【0129】

C. コンセンサスCDR配列

コンセンサスCDR配列、ならびに抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、および／または抗体5G2A3のものに類似の結合属性を提供するであろう有望な変異体CDR配列を同定するために、同定された抗体のCDRの分析を実施した。そのような変異体CDRを、表1によるBlosum62.iiij分析を用いてコンピュータ計算した。表1は、Blosum62.iiij置換スコアを提示する。スコアが高ければ高いほど、置換はより保存的であり、したがって置換が機能に影響を及ぼさない可能性がより高い。

【0130】

本発明により、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つの変異体CDRを有する新規の抗体および抗原結合性断片の形成が可能になる。本発明の方法は、かなりの数の別個のCDRを同定したため、本発明により、特定の同定されたCDRのいずれかの変異体において必要とされる可能性が高いCDR残基の認識が可能になる。そのような残基を、表5および表6において太字で示す。比較されるCDRの間で異なることが見いだされているそれらの残基に関して、表1の置換スコアは、有望な置換の実体を決定するための手段を提供する。例えば、特定のCDRの特定の残基が、RまたはSとして異なることが見いだされる場合、そのときは、RおよびSは、-1の置換スコアを有するため、-1以上の置換スコアを有するRまたはSに対するいずれかの置換は、変異体CDRが機能的な抗体または抗原結合性断片を形成するためにその代わりに使用されることを可能にする、特定のCDRのものと十分に類似する結合属性を有する変異体CDRを作り出すのに、観察された変異体（RまたはS）と同様に有望である（かまたはRまたはSよりも有望である）。各位置について、より高い置換スコアを有する残基の選択が、より低い置換スコアを有する残基の選択を上回って好ましい。

【0131】

表5は、抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、および抗体5G2A3の軽鎖CDRの分析を提示し、本発明の開示した抗体の観察された軽鎖CDRのコンセンサス配列を提供する。

【0132】

（表5）軽鎖コンセンサスCDR

軽鎖 CDR1			
抗体	変異体	配列	SEQ ID NO
1G10D2		RSS QSILN S NGNTYLE	9
1G11A10		RSS QSIIN S NGNTYLE	17
5B3C11	1	RSN QSILH S NGNTYLD	25
5G2A3		RSS QSILH R NGNTYLD	37
軽鎖CDR1コンセンサス配列:		RSX ₁ QSILX ₂ X ₃ NGNTYLX ₄	97
X ₁ は、N/Sの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア（すなわち、 $\geq +1$ ）を有する置換： NまたはSである X ₂ は、N/Hの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア（すなわち、 $\geq +1$ ）を有する置換： NまたはHである X ₃ は、S/Rの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア（すなわち、 ≥ -1 ）を有する置換： A、R、N、Q、E、H、K、M、S、またはTである X ₄ は、E/Dの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア（すなわち、 $\geq +2$ ）を有する置換： EまたはDである			
軽鎖 CDR2			
抗体	変異体	配列	SEQ ID NO
1G10D2		KVSNRFS	10
1G11A10		KVSNRFS	18
5B3C11	1	KVSNRFS	26
5G2A3		KVSNRFS	38
軽鎖CDR2コンセンサス配列:		KVSNRFS	98
軽鎖 CDR3			
抗体	変異体	配列	SEQ ID NO
1G10D2		FQGSHV PWT	11
1G11A10		FQGSHV PWT	19
5B3C11	1	FQGSHI PWT	27
5G2A3		FQGSHV PWT	39
軽鎖CDR3コンセンサス配列:		FQGSHX ₁ PWT	99
X ₁ は、V/Iの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア（すなわち、 $\geq +3$ ）を有する置換： VまたはIである			

10

20

【 0 1 3 3 】

表6は、抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、および抗体5G2A3の重鎖CDRの分析を提示し、本発明の開示した抗体の観察された重鎖CDRのコンセンサス配列を提供する。

【 0 1 3 4 】

30

（表 6）重鎖コンセンサスCDR

重鎖 CDR1			
抗体	変異体	配列	SEQ ID NO
1G10D2		D S A M S	13
1G11A10		S Y A M S	21
5B3C11	1	N Y A L S	33
5G2A3		S Y A M S	41
重鎖CDR1コンセンサス配列:		X₁X₂A X ₃ S	100
X ₁ は、D/N/Sの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ 0) を有する置換: N、D、Q、E、またはSである X ₂ は、S/Yの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ -2) を有する置換: A、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、S、T、Y、またはVである X ₃ は、L/Mの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 $\geq +2$) を有する置換: LまたはMである			
重鎖 CDR2			
抗体	変異体	配列	SEQ ID NO
1G10D2		S I S T G G A T Y Y P D G L K G	14
1G11A10		S I S S G G Q T Y S P D S V K G	22
5B3C11	1	S I S S G G N T Y Y P D S V K G	34
5G2A3		S I S S G G N T F Y P D T V K G	42
重鎖CDR2コンセンサス配列:		S I S X₁ G G X₂ T X₃ X₄ P D X₅ X₆ K G	101
X ₁ は、S/Tの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 $\geq +1$) を有する置換: SまたはTである X ₂ は、A/Q/Nの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ -2) を有する置換: A、R、N、D、Q、E、G、H、K、M、P、S、T、またはYである X ₃ は、F/Yの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 $\geq +3$) を有する置換: FまたはYである X ₄ は、S/Yの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ -2) を有する置換: A、R、N、C、Q、E、H、I、L、K、M、F、S、T、Y、またはVである X ₅ は、G/S/Tの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ -2) を有する置換: A、R、N、D、Q、E、G、H、I、L、K、P、S、またはTである X ₆ は、L/Vの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 $\geq +1$) を有する置換: I、L、M、またはVである			
重鎖 CDR3			
抗体	変異体	配列	SEQ ID NO
1G10D2		R G V S S G N L F T Y	15
1G11A10		R G D P T M T A T L F V Y	23
5B3C11		R G D T T L I T T L F T Y	35
5G2A3		R G D P N M I T T L F G Y	43
重鎖CDR3コンセンサス配列:		R G X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ L F X₈ Y	102
X ₁ は、存在しないか、またはDである X ₂ は、存在しないか、または、P/Tの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ -1) を有する置換: A、D、Q、E、K、P、S、またはTである X ₃ は、V/T/Nの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ -3) を有する置換: A、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、Y、またはVである X ₄ は、S/L/Mの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ -2) を有する置換: A、R、C、I、L、K、M、F、S、T、Y、またはVである X ₅ は、S/T/Iの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ -2) を有する置換: A、C、I、L、M、F、S、T、Y、またはVである X ₆ は、G/A/Tの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ -2) を有する置換: A、R、N、D、Q、E、G、H、I、L、K、P、S、またはTである X ₇ は、N/Tの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ 0) を有する置換: N、S、またはTである X ₈ は、T/V/Gの置換、または、同等もしくはより大きい置換スコア (すなわち、 ≥ -3) を有する置換: A、R、N、D、C、Q、E、G、H、K、M、F、P、S、T、W、Y、またはVである			

【 0 1 3 5 】

したがって、本発明は、抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、または抗体5G2A3のCDRを保有する抗体およびその抗原結合性断片に加えて、そのような軽鎖および／または重鎖コンセンサスCDR配列から導き出されるアミノ酸配列を有するCDRを保有する抗体およびその抗原結合性断片を追加的に提供する。

【 0 1 3 6 】

10

20

30

40

50

scFvは血液脳関門を越えて移行しうるが、そのような移行を促進させるためにさまざまな補助的なアプローチを用いることもできる (Huang, L. et al. (2013) "Single-Chain Fragment Variable Passive Immunotherapies For Neurodegenerative Diseases," *Int. J. Mol. Sci.* 14(9): 19109-19127)。タンパク質およびペプチドの限定的なセットが、受容体媒介性トランスサイトシスを介して血液脳関門を越えて輸送されるが (Herve, F. et al. (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis," *AAPS J.* 10(3):455-472)、最も研究されている3つのリガンドはインスリン、鉄トランスフェリンおよびLDL-コレステロールである (Bickel, U. et al. (2001) "Delivery Of Peptides And Proteins Through The Blood-Brain Barrier," *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46:247-279; Tuma, P.L. et al. (2003) "Transcytosis: Crossing Cellular Barriers," *Physiol. Rev.* 83:871-932)。したがって、血液脳関門を越えてのscFvの輸送は、scFvを、そのようなりガンドの受容体 (例えば、ヒトインスリン受容体 (HIR)、トランスフェリン受容体 (TfR)、低比重リポタンパク質受容体関連タンパク質1 (LRP1) および2 (LRP2)、非毒性ジフテリア毒素受容体/ヘパリン結合上皮増殖因子様増殖因子など) に対して免疫特異的である抗体またはそのエピトープ結合性断片と融合させることによって促進させることができる。結果的に得られた融合タンパク質は、受容体とのその結合を通じて血液脳関門を越えて輸送される (Boado, R.J. et al. (2010) "IgG-Single Chain Fv Fusion Protein Therapeutic For Alzheimer's Disease: Expression In CHO cells And Pharmacokinetics And Brain Delivery In The Rhesus Monkey," *Biotechnol. Bioeng.* 105:627-635; Jones, A.R. et al. (2007) "Blood-Brain Barrier Transport Of Therapeutics Via Receptor-Mediation," *Pharm. Res.* 24(9):1759-1771; Wang, Y.Y. et al. (2009) "Receptor-Mediated Therapeutic Transport Across The Blood-Brain Barrier," *Immunotherapy* 1(6):983-993; Lajoie, J.M. et al. (2015) "Targeting Receptor-Mediated Transport For Delivery Of Biologics Across The Blood-Brain Barrier," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55:613-631; Pardridge, W.M. (2002) "Drug Transport Across The Blood-Brain Barrier," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32(11): 1959-1972; Bhaskar, S. et al. (2010) "Multifunctional Nanocarriers For Diagnostics, Drug Delivery And Targeted Treatment Across Blood-Brain Barrier: Perspectives On Tracking And Neuroimaging," *Part. Fibre. Toxicol.* 7:3 pp. 1-25)。

【0137】

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

【0138】

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

inocytosis," Nat. Med. 10:310-315 ; Richard, J.P. et al. (2003) "Cell-Penetrating Peptides. A Reevaluation Of The Mechanism Of Cellular Uptake," J. Biol. Chem. 278:585-590 ; Temsamani, J. et al. (2004) "The Use Of Cell-Penetrating Peptides For Drug Delivery," Drug Discov. Today 9: 1012-1019)。

【0139】

III. 本発明の抗体および抗体断片の使用

本発明は、対象患者におけるアルツハイマー病またはタウ異常症を診断および／または治療するための、Asp421エピトープに対して免疫特異的である抗体を基にした分子の使用に関する。そのような診断的有用性に関して、そのような使用は、対象において（すなわち、インビボで）、好ましくは検出可能に標識された、例えば、抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11もしくは抗体5G2A3、またはそれらのAsp421エピトープ結合性断片（および特にそれらのscFv断片）を用いて（そのような分子は本明細書中で本発明の診断用分子と総称される）、病的タウ配座異性体の存在を検出することを伴ってよい。または、そのような使用は、エクスピボで（例えば、生検試料または死後において）、本発明の診断用分子を用いて病的タウ配座異性体の存在を検出することを伴ってもよい。

【0140】

1つの態様において、本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子は、ヒト化抗体であってよい。

【0141】

本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子の治療的有用性に関して、そのような有用性は、アルツハイマー病またはそのようなタウ異常症の1つまたは複数の症状を有し、それ故にそのような治療法を必要とする患者に対する、そのような抗体を基にした分子（例えば、抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、抗体5G2A3または抗体5G2G6、およびより詳細には、それらのscFv断片）の治療的有効量の投与を伴ってよく、または、そのような症状を呈していないか、または初期のアルツハイマー病もしくはタウ異常症を指し示す軽度認知症もしくはプレ-タウ異常症（pre-tauopathy）の症状を呈している患者に対する、そのような抗体を基にした分子の予防的有効量の投与を伴ってもよく、そのような分子は本明細書中で本発明の治療用分子と総称される。

【0142】

本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子は、Asp421エピトープ以外のエピトープに対して免疫特異性を有する抗体および抗体を基にした分子と合わせて、診断目的および／または治療目的で用いることもできる。

【0143】

IV. 本発明のタウ結合性分子の産生

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

【0144】

本発明の文脈における発現ベクターは、染色体核酸ベクター、非染色体核酸ベクター、および合成核酸ベクター（発現制御エレメントの適したセットを含む核酸配列）を含む、任意の適したDNAベクターまたはRNAベクターであってよい。そのようなベクターの例には、SV40、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ならびにウイルス核酸（RNAまたはDNA）ベクターの誘導体が含まれる。1つの態様において、抗タウ抗体をコードする核酸は、例えば直鎖発現エレメントを含む、裸のDNAベクターもしくはRNAベクター（例えば、Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)に記載されたような）、圧縮された核酸ベクター（例えば、US 6,077,835号および／もしくはWO 00/70087号に記載されたような）、プラスミドベクター、例えばpBR322、pUC19/18、もしくはpUC118/119など、「超小型（midge）」最小サイズ核酸ベクター（例えば、Schakowski et al., Mol Ther 3,

793-800 (2001) に記載されたような)、または沈殿された核酸ベクター構築物、例えばCaPO4によって沈殿された構築物(例えば、WO 00/46147号、Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al, Cell 14, 725 (1978)、およびCoraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 2, 603 (1981)に記載されたような)の中に含まれる。そのような核酸ベクターおよびその利用は当技術分野において周知である(例えば、US 5,589,466号およびUS 5,973,972号を参照)。

【0145】

1つの態様において、ベクターは、細菌細胞における、本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子の発現のために適している。そのようなベクターの例には、発現ベクター、例えばBlueScript (Stratagene)、pINベクター (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)、pETベクター (Novagen, Madison WI) など) が含まれる。同様にまたは代替的に、発現ベクターは、酵母系におけるそのような抗体を基にした分子の発現に適したベクターでもよい。酵母系における発現に適した任意のベクターを用いることができる。適したベクターには、例えば構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター、例えば α 因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHを含むベクターが含まれる (F. Ausubel et al, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987)、およびGrant et al, Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)に概説)。

【0146】

本発明の発現ベクターにおいて、本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子をコードする核酸分子は、任意の適したプロモーター、エンハンサー、および他の発現促進エレメントを含んでもよく、これらが会合してもよい。そのようなエレメントの例には、強発現プロモーター(例えば、ヒトCMV IEプロモーター/エンハンサーならびにRSV、SV40、SL3-3、MMTV、およびHIV LTRプロモーター)、有効なポリ(A)終結配列、大腸菌におけるプラスミド産物用の複製起点、選択マーカーとしての抗生物質耐性遺伝子、ならびに/または便利なクローニングサイト(例えば、ポリリンカー)が含まれる。核酸はまた、構成的プロモーターとは反対に誘導性プロモーター、例えばCMV IEを含んでもよい(当業者は、そのような用語がある特定の条件下での遺伝子発現の度合いに関する実際の記述語であることを認識しているであろう)。

【0147】

1つの別のさらなる局面において、本発明は、本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子を産生する、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞、例えばトランスフェクトーマに関する。宿主細胞の例には、酵母細胞、細菌細胞、および哺乳動物細胞、例えばCHO細胞またはHEK細胞が含まれる。例えば、1つの態様において、本発明は、本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子の発現をコードする配列を含む核酸が細胞ゲノムに安定に組み込まれている細胞を提供する。別の態様において、本発明は、本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子の発現をコードする配列を含む、非組み込み型核酸、例えばプラスミド、コスミド、ファージミド、または直鎖発現エレメントなどを含む細胞を提供する。

【0148】

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子を産生させるための方法であって、a) 本明細書において前述された本発明のハイブリドーマまたは宿主細胞を培養する段階、およびb) 培地から本発明の抗体を精製する段階、を含む方法に関する。

【0149】

一般に、本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子は、任意の適した数の修飾アミノ酸を含めることによって、かつ/またはそのようなコンジュゲートされた置換基との会合によって改変することができる。この文脈における適合性は一般に、誘導体化されていない親抗タウ抗体のAsp421エピトープに対する免疫特異性を少なくとも実質的に保っている能力によって判定される。1つまたは複数の修飾アミノ酸の存在は、例えば、

ポリペプチドの血清中半減期を延長させること、ポリペプチドの抗原性を低下させること、またはポリペプチドの貯蔵安定性を高めることにおいて有利でありうる。アミノ酸は、例えば、組換え体産生中に翻訳時または翻訳後に修飾されるか（例えば、哺乳類細胞における発現中のN-X-S/TモチーフでのN結合型グリコシル化）、または合成手段によって修飾される。修飾アミノ酸の非限定的な例には、グリコシル化アミノ酸、硫酸化アミノ酸、プレニル化（例えば、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化）アミノ酸、アセチル化アミノ酸、アシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ビオチニル化アミノ酸、カルボキシシル化アミノ酸、リン酸化アミノ酸などが含まれる。アミノ酸の修飾について当業者の手引きとなる適切な参考文献は、あまねく文献に豊富である。例示的なプロトコールは、Walker (1998) Protein Protocols On CD-Rom, Humana Press, Totowa, NJに記載がある。修飾アミノ酸は、例えば、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチニル化アミノ酸、脂質モイエティーにコンジュゲートされたアミノ酸、または有機誘導体化剤にコンジュゲートされたアミノ酸から選択されうる。

【0150】

上に指摘したように、投与される本発明の治療用分子の半減期を延長させることが望ましい場合には、そのような分子に、ポリオキシエステル化ポリオールまたはポリエチレングリコール（PEG）など（例えば、分子量が約1,000～約40,000、例えば約2,000～約20,000、例えば、約3,000～12,000g/molなどであるPEG）を含めるか（Moosmann, A. et al. (2014) "Purification Of PEGylated Proteins, With The Example Of PEGylated Lysozyme and PEGylated scFv," Methods Mol. Biol. 1129:527-538; Jevsevar, S. et al. (2010) "PEGylation Of Therapeutic Proteins," Biotechnol. J. 5:113-228）、もしくはグリコシル化によって糖質モイエティーを含めるか、またはヒト血清アルブミンなどのタンパク質を付加または会合させるように形成させるとよい（Muller, M.R. et al. (2012) "Improving The Pharmacokinetic Properties Of Biologies By Fusion To An Anti-HSA Shark VNAR Domain," MAbs. 4(6):673-685; Stork, R. et al. (2008) "N-Glycosylation As Novel Strategy To Improve Pharmacokinetic Properties Of Bispecific Single-Chain Diabodies," J. Biol. Chem. 283:7804-7812; Alt, M. et al. (1999) "Novel Tetraivalent And Bispecific IgG-like Antibody Molecules Combining Single-Chain Diabodies With The Immunoglobulin Gammal Fc or CHS Region FEBS Lett. 454:90-94; Peters T. et al. (1985) "Serum Albumin Adv. Protein Chem. 37:161-245）。例示的なポリマー、およびポリマーをペプチドに結びつける方法は公知である（例えば、米国特許第4,766,106号；第4,179,337号；第4,495,285号および第4,609,546号を参照）。

【0151】

V. 本発明の薬学的組成物

本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子は、活性治療薬および種々の他の薬学的に許容される構成要素のうちの1つ以上を含む薬学的組成物として有利に投与される。REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (21st Edition) (2005) (Troy, D.B. et al. (Eds.) Lippincott Williams & Wilkins (Pubis.), Baltimore MD)を参照されたく、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。好ましい形態は、意図する投与様式および治療的適用に依存する。組成物はまた、所望の製剤に応じて、薬学的に許容される、非毒性の担体、添加剤、希釈剤、増量剤、塩、緩衝剤、界面活性剤（例えば、Tween-20またはTween-80などの非イオン性界面活性剤）、安定化剤（例えば、糖またはタンパク質非含有アミノ酸）、保存料、組織固定剤、溶解補助剤、および／または薬学的組成物に含めるのに適する他の材料、ならびに動物またはヒトへの投与用の薬学的組成物を製剤化するために一般的に用いられる媒体も含みうる。希釈剤は、配合物の生物学的活性に影響を与えないように選択される。そのような希釈剤の例には、蒸留水、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、およびハックス溶液がある。加えて、薬学的組成物または製剤が、他の担体、または非毒性、非治療的、非免疫原性の安定剤などを含んでもよい。本発明の薬学的組成物において使用しうる適した水性および非水性の担体の例には、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオー

ル（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適した混合物、植物油、例えばオリーブ油、トウモロコシ油、ラッカセイ油、綿実油および胡麻油など、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントゴムおよび注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルなど、ならびに／またはさまざまな緩衝剤が含まれる。他の担体も薬学の技術分野において周知である。

【0152】

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

10

【0153】

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

20

【0154】

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

【0155】

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

30

【0156】

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

40

【0157】

1つの態様において、本発明の化合物を、インビボでの適正な分布が確保されるように製剤化することもできる。非経口的投与のための薬学的に許容される担体には、滅菌した水溶液または分散液、および滅菌した注射液または分散液を即時調製するための滅菌した散剤が含まれる。薬学的活性物質のためのそのような媒質および作用物質の使用は当技術

50

分野において公知である。いずれかの従来の媒質または作用物質が活性化合物と不適合である場合を除き、本発明の薬学的組成物におけるそれらの使用を想定している。補助的な活性化合物を組成物中に組み入れてもよい。

【0158】

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

【0159】

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

【0160】

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

【0161】

典型的には、組成物はそのように液体溶液または懸濁液のいずれかとしての注射液として調製される；注射前に液体媒体中に溶解または懸濁するのに適切な固体形態も調製できる。調製物はまた、上記のようにアジュバント効果を強化するために、乳化させること、またはリポソームもしくは微粒子、例えばポリラクチド、ポリグリコリドもしくはコポリマー中に封入することもできる（Langer, et al., Science 249: 1527 (1990); Hanes, et al., Advanced Drug Delivery Reviews 28:97-119 (1997)、これらはその全体が参照に

より本明細書に組み入れられる)。他の投与様式に適するそのほかの製剤には、経口製剤、鼻腔内製剤および肺用製剤、坐薬、ならびに経皮適用が含まれる。

【0162】

VI. 本発明の薬学的組成物の投与

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

10

【0163】

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

【0164】

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

20

【0165】

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

30

【0166】

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

40

【0167】

当技術分野における通常の技能を有する医師または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師または獣医師は、薬学的組成物中に用いられる抗タウ抗体または断片の用量を、所望の治療効果を達成するのに必要なものよりも低いレベルで開始し、次いで、所望の効果が達成されるまで投与量を徐

50

々に増やすことができる。一般に、本発明の組成物の適切な一日量は、治療効果を生じるのに有効な最小用量である化合物の量である。そのような有効量は一般に、上記の要因に依存すると考えられる。投与は、例えば静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下であってよく、例えば標的部位の近位に投与される。所望であれば、薬学的組成物の有効な一日量を、1日にわたって適切な間隔で別個に投与される、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ以上の分割用量として投与してもよく、任意で、単位剤形で投与されてもよい。本発明の化合物は単独で投与することも可能であるが、上記のように薬学的組成物として化合物を投与することが好ましい。

【0168】

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

【0169】

投与の用量および頻度は、治療が予防的であるかまたは治療的であるかに応じて異なりうる。予防的適用においては、比較的低い投与量が、長期間にわたって比較的頻繁でない間隔で投与される。患者の中には、残りの生涯の間、継続して治療を受ける者もいる。治療的適用においては、比較的短い間隔での比較的高い投与量が、疾患の進行が減少または終了するまで、および好ましくは、患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで、時折必要とされる。その後は患者に予防的投与レジメンを用いてそのような治療用分子を投与することができる。

【0170】

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

【0171】

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

【0172】

VII. 本発明のタウ結合性分子の有用性

A. 診断的有用性

本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした診断用分子を用いて、対象における病的タウ配座異性体の存在を検出することは、対象から生物試料（例えば、血液、尿、脳脊髄液）を入手すること、生物試料を前記診断用抗体と接触させること、および対象由来の試料における病的タウタンパク質配座異性体に対する診断用分子の結合を検出することによって達成しうる。本発明の診断用分子の検出に容易に適応させることができる、生体

試料における病的タウタンパク質の検出を実施するためのアッセイは当技術分野において周知であり、これにはELISA、免疫組織化学、ウエスタンブロットなどが非限定的に含まれる。

【0173】

または、本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした診断用分子を用いて、対象における病的タウ配座異性体の存在を検出することを、インビボイメージング手法を用いて達成することもできる。インビボイメージングは、病的タウペプチドに対する抗原特異性を有する診断用抗体を対象に投与すること、および病的タウ配座異性体に対する診断用抗体試薬の結合をインビボで検出することを伴う。

【0174】

本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした診断用分子は、注射（例えば、静脈内注射、頸動脈内注射など）によって患者の体内に投与すること、または頭蓋内注射によって脳内に直接的に投与することができる。そのような分子の投与量は、宿主体重当たりで約0.0001mg/kg～約100mg/kgであるべきであり、より一般的には約0.01mg/kg～約5mg/kgである。例えば、投与量は約1mg/kg体重もしくは約10mg/kg体重、または約1～10mg/kg体重の範囲内にありうる。

【0175】

典型的には、本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした診断用分子は標識されるが、いくつかの方法では、分子を標識せずに、二次標識剤を用いてそのような分子に結合させる（当技術分野において公知の手法を用いて、分子と直接的に、または仲介物（例えば、当技術分野において公知のリンカー）を経由して間接的に、カップリングまたはコンジュゲートさせる）。標識の選択は検出の手段に依存する。例えば、蛍光標識（希土類キレート（例えば、ユーロピウムキレート）など）、フルオレセイン型標識（例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン）、ローダミン型標識（例えば、ALEXA FLUOR（登録商標）568（Invitrogen）、TAMRA（登録商標）またはダンシルクロリド）、VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME（商標）（Perkin Elmer）、フィコエリトリン；ウンベリフェロン、リサミン；シアニン；フィコエリトリン、テキサスレッド、BODIPY FL-SE（登録商標）（Invitrogen）またはそれらの類似体が、光学検出に適している。化学発光性標識を用いることもできる（例えば、ルミノール、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリン）。また、そのような診断および検出を、本発明の診断用分子を、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼを非限定的に含む酵素であるさまざまな酵素、または限定はされないがストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンなどの補欠分子族複合体を非限定的に含む検出可能な物質とカップリングさせることによって実現することもできる。常磁性標識および放射性同位体標識を用いることもでき、これらは好ましくは陽電子放出断層撮影法（PET）または単一光子放出型断層撮影法（SPECT）を用いて検出される。放射標識には、ビスマス（ ^{213}Bi ）、炭素（ ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C ）、クロム（ ^{51}Cr ）、コバルト（ ^{57}Co 、 ^{60}Co ）、銅（ ^{64}Cu ）、ジスプロシウム（ ^{165}Dy ）、エルビウム（ ^{169}Er ）、フッ素（ ^{18}F ）、ガドリニウム（ ^{153}Gd 、 ^{159}Gd ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、ゲルマニウム（ ^{68}Ge ）、金（ ^{198}Au ）、ホルミウム（ ^{166}Ho ）、水素（ ^3H ）、インジウム（ ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{113}In 、 ^{115}In ）、ヨウ素（ ^{121}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、イリジウム（ ^{192}Ir ）、鉄（ ^{59}Fe ）、クリプトン（ $^{81\text{m}}\text{Kr}$ ）、ランタニウム（ ^{140}La ）、ルテニウム（ ^{177}Lu ）、マンガン（ ^{54}Mn ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、窒素（ ^{13}N 、 ^{15}N ）、酸素（ ^{15}O ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、リン（ ^{32}P ）、カリウム（ ^{42}K ）、プラセオジウム（ ^{142}Pr ）、プロメチウム（ ^{149}Pm ）、レニウム（ ^{186}Re 、 ^{188}Re ）、ロジウム（ ^{105}Rh ）、ルビジウム（ ^{81}Rb 、 ^{82}Rb ）、ルテニウム（ ^{82}Ru 、 ^{97}Ru ）、サマリウム（ ^{153}Sm ）、スカンジウム（ ^{47}Sc ）、セレン（ ^{75}Se ）、ナトリウム（ ^{24}Na ）、ストロンチウム（ ^{85}Sr 、 ^{89}Sr 、 ^{92}Sr ）、イオウ（ ^{35}S ）、テクネシウム（ ^{99}Tc ）、タリウム（ ^{201}Tl ）、スズ（ ^{113}Sn 、 ^{117}Sn ）、キセノン（ ^{133}Xe ）、イッテルビウム（ ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Yb ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、亜鉛（ ^{65}Zn ）、および

10

20

30

40

50

ジルコニウム (^{89}Zr) ; さまざまな陽電子放出断層撮影法を用いる陽電子放出性金属、および非放射性常磁性金属イオン (例えば、アルミニウム (Al)、バリウム (Ba)、カルシウム (Ca)、セリウム (Ce)、ジスプロシウム (Dy)、エルビウム (Er)、ユーロピウム (Eu)、ガドリニウム (Gandolinium) (Gd)、ホルミウム (Ho)、イリジウム (Ir)、リチウム (Li)、マグネシウム (Mg)、マンガン (Mn)、モリブデン (M)、ネオジウム (Nd)、オスミウム (Os)、酸素 (O)、パラジウム (Pd)、白金 (Pt)、ロジウム (Rh)、ルテニウム (Ru)、サマリウム (Sm)、ナトリウム (Na)、ストロンチウム (Sr)、テルビウム (Tb)、ツリウム (Tm)、スズ (Sn)、チタン (Ti)、タングステン (W)、およびジルコニウム (Zr) の常磁性イオン、特に Co^{+2} 、 C^{+2} 、 Cr^{+3} 、 Cu^{+2} 、 Fe^{+2} 、 Fe^{+3} 、 Ga^{+3} 、 Mn^{+3} 、 Ni^{+2} 、 Ti^{+3} 、 V^{+3} 、および V^{+4} が非限定的に含まれる。放射標識アミノ酸および関連するペプチド誘導体を調製するための方法は、当技術分野において公知である (例えば、Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2nd edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) ならびに米国特許第4,681,581号; 第4,735,210号; 第5,101,827号; 第5,102,990号; RE 35,500号; 第5,648,471号および第5,697,902号を参照されたい。例えば、放射性同位体をクロラミンT法によってコンジュゲートさせることができる (Lindgren, S. et al. (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl)Benzoate As An Intermediate," Nucl. Med. Biol. 25(7):659-665; Kurth, M. et al. (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor," J. Med. Chem. 36(9):1255-1261; Rea, D.W. et al. (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors," Cancer Res. 50(3 Suppl):857s-861s)。

【0176】

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

【0177】

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

【0178】

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

【0179】

標識された抗タウ抗体またはそれらのタウ結合性断片の存在を、診断目的でインビボで

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

【0180】

B. 治療的有用性

以上に指摘したように、本発明の1つの局面は、対象におけるアルツハイマー病または他のタウ異常症を予防または治療する方法であって、そのようなアルツハイマー病または他のタウ異常症を予防または治療するために、本発明のAsp421エピトープ特異的な抗体を基にした分子（特に抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、抗体5G2A3、またはそれらのscFv断片）の有効量の投与を介する方法に関する。そのような投与は、対象の脳からのタウ凝集物の排除を促進する目的で提供してもよく、または対象における神経原線維変化関連の行動的表現型を緩徐化する目的で提供してもよい。加えて、そのような投与を、アルツハイマー病、または神経原線維変化と関連のある他のタウ異常症の発病を遅らせる、妨げる、弱める、または予防する目的で予防的に提供することもできる。

【0181】

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

【0182】

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

【0183】

治療的または予防的処置を達成するために適切な量は、それぞれ治療的有効用量または予防的有効用量と定義される。予防的レジメンおよび治療的レジメンの両方において、薬剤は通常、十分な免疫応答が達成されるまで数回の投薬として投与される。典型的には、免疫応答をモニターし、免疫応答が減弱し始めたならば反復投薬を行う。そのような抗体

またはそのエピトープ結合性断片の治療的有効用量または予防的有効用量は、個体の疾患状態、年齢、性別および体重、ならびに分子が対象において所望の応答を誘発する能力などの要因に応じて異なる。治療的有効量はまた、治療的に有益な効果が、抗体または抗体部分のあらゆる毒性作用または有害作用を上回る量でもある。

【0184】

治療の対象となる患者には、そのような病状の臨床的に認識されている症状または徴候を示す、アルツハイマー病または他のそのようなタウ異常症を有する個体のほかに、そのような病状の症状を現時点では示していない患者も含まれる。アルツハイマー病は死後生検でのみ確定診断されるが、アルツハイマー病に罹患した個体は、「アルツハイマー病関連疾患協会 (Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) (「ADDA」) 基準を用いて臨床的に診断されている (Carrillo, M.C. et al. (2013) "Revisiting The Framework Of The National Institute On Aging-Alzheimer's Association Diagnostic Criteria," *Alzheimers Dement.* 9(5):594-601; Budson, A.E. et al. (2012) "New Criteria For Alzheimer Disease And Mild Cognitive Impairment: Implications For The Practicing Clinician," *Neurologist* 18(6):356-363; Sarazin, M. et al. (2012) "Clinical And Research Diagnostic Criteria For Alzheimer's Disease," *Neuroimaging Clin. N. Amer.* 22(1):23-32; Husain, M.M. (2005) "Clinical Diagnosis And Management Of Alzheimer's Disease," *Neuroimaging Clin. N. Amer.* 15(4):767-777; Small, G.W. et al. (1997) "Diagnosis And Treatment Of Alzheimer Disease And Related Disorders. Consensus Statement Of The American Association For Geriatric Psychiatry, The Alzheimer's Association, And The American Geriatrics Society," *JAMA* 278(16):1363-1371)。または、そのような個体を、相関性がある危険因子（すなわち、アルツハイマー病または他のそのようなタウ異常症と50%を上回る一致をみることが見いだされている1つまたは複数の因子）の存在によって、アルツハイマー病とも他のタウ異常症とも関連のない疾患または病状を有する個体と鑑別することもできる。そのような相関性がある危険因子には、その患者がアルツハイマー病もしくは他のそのようなタウ異常症を来した親族を有する、または高コレステロール血症もしくはアテローム性動脈硬化症の家族歴を呈するという所見が含まれる。そのような相関性がある危険因子には、患者が、そのような実際の疾患の発生と相関性がある（すなわち、50%を上回る一致をみることが見いだされている）1つまたは複数の遺伝的または生化学的マーカーを有するという所見が特に含まれる。アルツハイマー病のリスクとなるそのような遺伝的マーカーの例には、APP遺伝子における相関性がある突然変異、例えば、APP遺伝子の位置717ならびに位置670および671にある突然変異（それぞれHardy突然変異およびSwedish突然変異と称されている）が含まれる。遺伝的リスクが判明している他の適したマーカーには、プレセニリン遺伝子 (PS1およびPS2) ならびにApoE4遺伝子における相関性がある突然変異が含まれる (Bekris, L.M. et al. (2010) "Genetics of Alzheimer Disease," *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23(4):213-227)。

【0185】

PS1のアイソフォーム1のアミノ酸配列は (SEQ ID NO:103) である。
 MTELPAPLSY FQNAQMSEDN HLSNTVRSQN DNRERQEHND RRSLGHPEPL
 SNGRPQGNSR QVVEQDEEED EELTLKYGAK HVIMLFVPVT LCMVVVVATI
 KSVSFYTRKD GQLIYTPFTE DTETVGQRAL HSILNAAIMI SVIVVMTILL
 VVLYKYRCYK VIHAWLISS LLLLFFFSFI YLGEVFKTYN VAVDYITVAL
 LIWNFGVVGM ISIHWKGPLR LQQAYLIMIS ALMALVFIKY LPEWTAWLIL
 AVISVYDLVA VLCPKGPLRM LVETAQERNE TLFPALIYSS TMVWLVNMAE
 GDPEAQRRVS KNSKYNAEST ERESQDTVAE NDDGGFSEEW EAQRDSHLGP
 HRSTPESRAA VQELSSSILA GEDPEERGVK LGLGDFIFYS VLVGKASATA
 SGDWNNTTIAC FVAILIGLCL TLLLLAIFKK ALPALPISIT FGLVIFYFATD
 YLVQPFMDQL AFHQFYI

【0186】

そのようなPS1突然変異には以下の置換が含まれる：

10

20

30

40

50

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

10

20

。

【 0 1 8 7 】

PS2のアイソフォーム1のアミノ酸配列は (SEQ ID NO:104) である。
 MLTFMASDSE EEVCDERTSL MSAESPTPRS CQEGRQGPED GENTAQWRSQ
 ENEEDGEEDP DRYVCSGVPG RPPGLEEELT LKYGAKHVIM LFVPVTLDMI
 VVVATIKSVR FYTEKNGQLI YTPFTEDTPS VGQRLLNSVL NTLIMISVIV
 VMTIFLVVLY KYRCYKFIHG WLIMSSLMLL FLFTYIYLGE VLKTYNVAMD
 YPTLLLTWN FGAUGMVCIH WKGPLVLQQA YLIMISALMA LVFIKYLPEW
 SAWVILGAIS VYDLVAVLCP KGPLRMLVET AQERNEPIFP ALIYSSAMVW
 TVGMAKLDPS SQGALQLPYD PEMEEDSYDS FGEPSEPEVF EPPLTGYPGE
 ELEEEERGV KLGLGDFIFY SVLVGKAAAT GSGDWNTTLA CFVAILIGLC
 LTLALLAVFK KALPALPISI TFGLIFYFST DNLVRPFMDT LASHQLYI

30

【 0 1 8 8 】

そのようなPS2突然変異には以下の置換が含まれる：

R29H; G34S; R62C; R62H;

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

40

。

【 0 1 8 9 】

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

【 0 1 9 0 】

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

50

ルの上昇およびA β 42レベルの低下は、アルツハイマー病の存在を表す。

【0191】

アルツハイマー病の場合には、事実上すべての人にアルツハイマー病に罹患するリスクがある。このため、本発明の治療用分子は、対象患者のリスクのいかなる評価の必要もなしに、一般集団に予防的に投与することができる。本方法は、アルツハイマー病の既知の遺伝的リスクを有しない個体の予防的処置のために特に有用である。無症候性患者では、処置をあらゆる年齢で開始することができる（例えば、10歳、20歳、30歳）。しかし通常は、患者が40歳、50歳、60歳、70歳、80歳または90歳になるまで処置を開始する必要はない。処置は典型的には、ある期間にわたっての多回投薬投与を必要とする。処置は、抗体を、または治療薬に対する活性化T細胞もしくはB細胞の応答をアッセイすることによって

10

【0192】

本発明は、以下を提供する：

1. タウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的に結合しうる結合性分子。
2. 抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、および5G2A3からなる群より選択される抗体と結合について競合する、そのような結合性分子の態様。
3. 以下を含む、そのような結合性分子の態様：

(a) (1) SEQ ID NO:9、10、および11のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:13、14、および15のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

(b) (1) SEQ ID NO:17、18、および19のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:21、22、および23のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

(c) (1) SEQ ID NO:25、26、および27のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:33、34、および35のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

(d) (1) SEQ ID NO:29、30、および31のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:33、34、および35のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

(e) (1) SEQ ID NO:37、38、および39のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:41、42、および43のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3；

(f) (1) SEQ ID NO:45、46、および47のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:49、50、および51のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3。

4. 以下を含む、そのような結合性分子の態様：

(a) SEQ ID NO:115、116、および117のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖CDR1、CDR2、CDR3；ならびに

(2) SEQ ID NO:118、119、および120のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変重鎖CDR1、CDR2、CDR3。

5. レシピエントへ末梢注射されると、タウ凝集物と実質的に共局在する、いずれかのそのような結合性分子の態様。

50

6. 抗体、ダイアボディ、scFvであるか、または抗体、ダイアボディ、もしくはscFvのエピトープ結合性断片を含む、いずれかのそのような結合性分子の態様。
7. 抗体である、いずれかのそのような結合性分子の態様。
8. 抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、または抗体5G2A3である、いずれかのそのような結合性分子の態様。

9. タウ407~421ペプチド

(SEQ ID NO:7): HLSNVSSSTGSDMVD

と免疫特異的に結合する、上記の結合性分子のいずれかの態様。

10. 検出可能に標識されている、上記の結合性分子のいずれかの態様。

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

10

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

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

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

20

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

ここで検出または測定は、短縮型タウタンパク質と結合した結合性分子のインビボでのイメージングを含む。

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

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

30

ここで検出または測定は、短縮型タウタンパク質と結合した結合性分子のエクシボでのイメージングを含む。

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

(1) 検出可能に標識された、上記の結合性分子のいずれかの態様；または

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

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

40

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

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

(1) 検出可能に標識された、上記の結合性分子のいずれかの態様；または

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

50

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

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

ここで医薬は対象に投与されるインビボ医薬である。

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

(1) 検出可能に標識された、上記の結合性分子のいずれかの態様；または

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

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

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

ここで医薬は対象の生検試料とともにエクスピボでインキュベートされる。

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

【実施例】

【0193】

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

【0194】

実施例1

抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、抗体5G2A3（または抗体5G2G6）のタウの短縮型A_{sp}421エピトープに対する特異性

抗体1G10D2、抗体1G11A10、抗体5B3C11、抗体5G2A3/5G2G6の抗体の、タウの短縮型A_{sp}421エピトープと免疫特異的に結合する能力を実証するために、抗体調製物を、タウ残基407~421 (SEQ ID NO:7) または407~423 (SEQ ID NO:105)（それぞれ、SEQ ID NO:1のそれぞれ残基407~421および407~423に対応する）のいずれかに対応する固定化したペプチドの存在下でインキュベートし、固定化したペプチドと結合した抗体の量を、ELISAを介して決定した。抗体1G10D2 (図1A)、抗体1G11A10 (図1B)、抗体5B3C11 (図1C)、抗体5G2A3 (図1D)、および抗体5G2G6 (図1E) はそれぞれ、短縮型（タウ407~421）ペプチド (SEQ ID NO:7) と強く結合しうるが、非短縮型エピトープを含有するペプチド（タウ407~423；SEQ ID NO:105）には結合しえないことが見いだされた。したがって、このデータにより、抗体1G11A10、5G2A3、および5G2G6の、タウの短縮型A_{sp}421エピトープと免疫特異的に結合する能力が確認される。

【0195】

図2A~2Bに示すように、抗体1G11A10と5G2A3の結合親和性プロファイルは異なり、抗体

1G11A10は、非常に低い抗体濃度でも短縮型Asp421エピトープに対して高親和性結合を呈する抗体5G2A3に比して（図2B）、より高い抗体希釈でより少ない結合が観察されるように（図2A）、より低い親和性で短縮型Asp421エピトープと結合する。

【0196】

ELISAデータから推測された結合親和性を、Biacore分析により確認した。分析の結果を表7に示す。

【0197】

（表7）

分析物	抗体 5G2A3	抗体1G11A10
タウ407～421 (SEQ ID NO:7)	7.46×10^{-9}	1.07×10^{-6}
タウ407～423 (SEQ ID NO:105)	5.07×10^{-6}	結合しない

10

【0198】

このように、抗体5G2A3は、短縮型Asp421エピトープを標的とし、高い親和性（ 10^{-9} M）で結合する。対照的に、抗体1G11A10は、より低い親和性（ 10^{-6} M）で短縮型Asp421エピトープと結合するが、非短縮型エピトープとは検出可能に結合しない。

【0199】

20

実施例2

タウのAsp421エピトープを認識する抗体の病的タウを排除する能力

位置396および404にホスホセリン残基（ P -Ser396および P -Ser404）を有するタウを含む、「 P -Ser396/ P -Ser404タウエピトープ」などのタウエピトープに対するモノクローナル抗体を用いた免疫療法は、過剰リン酸化タウレベルおよびそれと関連のある病理の低下を実証した。本発明の短縮型タウエピトープ結合性分子の治療能力をさらに実証するために、短縮型Asp421エピトープと免疫特異的に結合するモノクローナル抗体5G2A3/5G2G6および1G11A10の過剰リン酸化タウに影響を及ぼす能力を、初代ニューロン培養物を用いて検討した。加えて、抗体5G2A3および1G11A10の過剰リン酸化タウに影響を及ぼす能力を、混合皮質培養物を用いて検討した。

30

【0200】

したがって、0日目のJNPL3マウス由来の初代ニューロンおよび混合皮質培養物を、PHF（ $1 \mu\text{g/mL}$ ）で24時間、前処理し、その後、抗体5G2A3/5G2G6（純粋ニューロン培養物のみ）または抗体1G11A10（ $10 \mu\text{g/mL}$ ）をさらに24時間、48時間、72時間、または96時間、添加した。免疫プロットを、抗体PHF-1（ P -Ser396/ P -Ser404エピトープと結合する）、抗ヒトタウ抗体（Dako）およびリン酸化タウ（ P -Ser199）に対して行った。

【0201】

表8は、PHFで前処理した混合ニューロン培養物についてのこの実験の結果を示す。

【0202】

（表8）

40

	PHF処理した細胞 (PHF-1化学発光シグナル値)			
	24hr	48hr	72hr	96hr
	751300	1224982	1622299	1828209
	688635	1321391	1523903	1729813
	670977	1449190	1637642	1843552
	645829	1507930	1629707	1835617
	649657	1380862	1595397	1801307
	425133	1354053	1648179	1854089
平均値	638588.5	1373068	1609521	1815431
SD	111351.5	98999.8	45576.12	45576.14
	IgG処理した細胞 (PHF-1化学発光シグナル値)			
	24hr	48hr	72hr	96hr
	583074	1422041	1443397	2201538
	641161	1417630	1464404	1814748
	708202	1457702	1662020	1766616
	688516	1373635	1521455	1679659
	687360	1320653	1834901	1629244
	622845	1417484	1512274	1574982
平均値	655193	1401524	1573075	1818361
SD	47748.37	47768	149299.2	225335.3
	5G2A3処理した細胞 (PHF-1化学発光シグナル値)			
	24hr	48hr	72hr	96hr
	571503	435510.8	543829.3	229600
	399505	418450.8	533115.5	212540
	413940	418883.4	445210	212973
	413921	464627.2	539038.1	258717
	408297	434414.7	425200.4	228504
	322745	471881.4	535928.9	265971
平均値	421651.8	440628	503720.4	234717.5
SD	81272.39	22725.25	53565.64	22725.4
	1G11A10処理した細胞 (PHF-1化学発光シグナル値)			
	24hr	48hr	72hr	96hr
	351671	414222.4	606166.6	543586
	568261	423511.5	595803.6	636088
	436208	425164.2	570901.7	918583
	382948	432781.3	630724.7	1165849
	313133	435635.4	559424.1	1209264
	257632	460723.8	556335.5	1141208
平均値	384975.5	432006.4	586559.4	935763
SD	108359.9	15960.63	29378.37	287698.8

【0203】

表8のデータを、図3Aにグラフで示す。データにより、そのような細胞（生後0日目）は、対照細胞と比較した場合に、抗体5G2A3および1G11A10での処理後に有意に減少したPHF-1 (^3H Ser396/ ^3H Ser404) のレベルを有する ($p < 0.0001$) が示される。

【0204】

表9は、抗ヒトタウ抗体 (Dako) で免疫プロットした、したがって全タウを示す、混合ニューロン培養物についてのこの実験の結果を示す。

10

20

30

40

50

【0205】

(表9)

	PHF処理 (全タウ値)			
	24hr	48hr	72hr	96hr
	1273302	2097159	1771592	2651642
	1361667	1949165	1749614	2463713
	1389425	1631917	2058003	2738844
	1315507	1827079	1916164	2308258
	1403872	1893961	2156769	2442688
	1431630	1873666	1672630	3030670
平均値	1380420	1878825	1930428	2605969
SD	58959.05	152653	190270.9	259091.5
	IgG処理 (全タウ値)			
	24hr	48hr	72hr	96hr
	1510411	1809605	1824976	2575640
	1403872	2030118	1918718	2726928
	1347143	1807288	1864949	2688261
	1402882	1824177	2019845	2617819
	1415410	1982228	1810848	2657325
	1390445	1927370	2058342	2700656
平均値	1420475	1896798	1916280	2661105
SD	53881.43	96845.96	102956.8	56261.23
	5G2A3処理 (全タウ値)			
	24hr	48hr	72hr	96hr
	1101694	1108014	1222242	883267.9
	991056	1090107	1145993	1042934
	1015557	1140544	1238038	1147477
	984736	1102489	1251133	974776
	985154	1029836	1133375	1242680
	1101469	1079134	527897	2025784
平均値	1029944	1091687	1198156	1219487
SD	56626.95	36758.35	54531.71	414713.6
	1G11A10処理 (全タウ値)			
	24hr	48hr	72hr	96hr
	1036131	1533105	1374552	1717181
	982975	1502506	1751198	1750701
	916187	1547973	1606475	1798726
	968581	1464179	1446938	1763811
	978434	1464597	1790780	1628009
	1047353	1580912	1255174	1569623
平均値	988276.8	1515545	1537520	1704675
SD	47937.2	46982.87	214026.5	88016.1

【0206】

表9のデータを、図4Aにグラフで示す。データにより、5G2A3処理は、IgGで処理した対照細胞と比較した場合に、96時間で、1G11A10（36%、 $p<0.05$ ）よりも全タウレベルの低下においてより有効であった（54%、 $p<0.0001$ ）ことが示される。

【0207】

10

20

30

40

50

短縮型Asp421エピトープに対して特異的なより高い親和性の抗体（抗体5G2A3）の存在は、影響を有さなかった対照IgGと比較して、混合培養物におけるホスホ-タウ（96時間で最大で87%、 $p<0.001$ ）および全タウ（96時間で最大で54%、 $p<0.0001$ ）の両方において有意なかつ持続性の低下をもたらした（図3Aおよび4A）。このタウ抗体は、初代ニューロンにおいて24時間および48時間で明白な効果（ホスホ-タウ：両方の時点で89%の低下、 $p<0.001$ ；全タウ：24時間で58%、 $p=0.001$ 、および48時間で45%、 $p=0.005$ ）を有し、それは、後の時点でわずかにおさまった（ホスホ-タウ：72時間で75%の低下、 $p=0.003$ および96時間で68%の低下、 $p=0.008$ ；全タウ：72時間で6%の低下、 $p>0.05$ 、および96時間で43%の低下、 $p=0.006$ ；図3Bおよび4B）。

【0208】

短縮型Asp421エピトープに対して特異的なより低い親和性の抗体（抗体1G11A10）の存在は、混合皮質培養物におけるホスホ-タウおよび全タウの低下（それぞれ、96時間で最大で49%の低下、 $p<0.0001$ 、および96時間で36%の低下、 $p<0.0001$ ）において有効性がより低く（図3Aおよび4A）、初代ニューロン培養物においてはホスホ-タウまたは全タウのいずれも低下するのに無効であった（図3Bおよび4B）。

【0209】

結論として、本研究は、明らかに、1) Asp421で短縮されたタウタンパク質のターゲティングの治療的有効性；2) この特定のエピトープに対するより高い親和性の抗体がより有効であること、および3) おそらくタウ-抗体複合体の分解を促進する食作用性ミクログリアの寄与のために、初代ニューロンよりも混合皮質培養物においてより大きな有効性が観察されることを示す。混合培養物におけるニューロンはまた、より健康的でもあり、そのため、そのような複合体を排除／分解するのにによりよく適している可能性が高い。

【0210】

本研究は、明らかに、抗体5G2A3の、混合皮質細胞および初代ニューロン細胞の両方における過剰リン酸化タウレベルの有意な低下、および全細胞内タウレベルの有意な低下を媒介する能力を実証する。この知見は、したがって、タウ免疫療法のための治療標的としてのAsp421エピトープの重要性を実証する。

【0211】

これらのデータにより、複数の機序が存在すること、ならびに、細胞外遮断および細胞内排除の促進の両方が、タウ病理および関連がある毒性の種をまくのを防ぐための妥当な方法であることが示される。両方の経路に影響を及ぼすことができる抗体は、1つの区画内でのみ作用するものよりも有効である可能性が高い。

【0212】

実施例3

タウタンパク質のAsp421をターゲティングする抗体での処理は、関連がある小膠細胞症の低下とともに、病的タウの毒性を予防し、かつ排除する

タウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的に結合しうる抗体の効果を解明するために、混合皮質培養物および初代ニューロンを両方とも、PHF（ $1\mu\text{g/ml}$ ）で24時間、前処理し、その後、 $10\mu\text{g/ml}$ の抗体5G2A3および抗体1G11A10をさらに24時間、48時間、72時間、または96時間、投与して、細胞内タウの排除に対するそのような処理の効果を評価した。

【0213】

細胞内タウ排除の程度を、0日目のJNPL3の子由来の混合皮質培養物および初代ニューロン培養物について、ホスホSer 199エピトープに対するウエスタン免疫ブロット分析を行うことにより決定した。混合皮質培養物および初代ニューロン培養物の両方を、PHF（ $1\mu\text{g/ml}$ ）で24時間、前処理し、その後、抗体5G2A3（ $10\mu\text{g/ml}$ ）または抗体1G11A10（ $10\mu\text{g/ml}$ ）の抗体でさらに24時間、48時間、72時間、または96時間、処理した。抗体5G2A3は、混合皮質および初代ニューロンの両方において、ホスホ-タウのレベルの低下を示した。

【0214】

全タウおよびホスホ-タウの値を、GAPDHに対して標準化して、PHFの排除における抗体5G2A3および抗体1G11A10の効果を決定した。混合皮質培養物と初代ニューロンとの間の比

10

20

30

40

50

較分析により、抗体5G2A3は、両方の細胞モデルにおけるホスホ-タウの低下において有効であるとわかり、最大の低下は、混合皮質培養物について96時間で観察された（94%）（図5A）ことが示された。初代ニューロン（図5B）において、抗体5G2A3の投与は、IgG（10 μ g/ml）で処理した対照細胞と比較して、すべての時点について、すなわち24時間から96時間まで、ホスホタウのレベルの有意な減少と関連があることが見いだされたが、それぞれの時点についてホスホタウのレベルのかすかな増大が観察されて、抗体5G2A3が、混合皮質培養物と比較した場合に初代ニューロン内でのホスホタウレベルの低下を持続できないことをもっともらしく描写する。

【0215】

抗体1G11A10処理は、初代ニューロンにおけるホスホ-タウレベルの低下において有効であるとだけわかり、24時間から72時間まで約68%の低下を示したが、抗体1G11A10処理は、混合皮質培養物においてホスホタウのレベルを有意に低下できないことが見いだされた。

【0216】

混合皮質培養物と初代ニューロンとの間の比較分析により、抗体5G2A3処理後に両方の細胞タイプにおいて全タウレベルの低下が示された。ウエスタンブロットを、0日目のJNP L3マウス由来の混合皮質培養物および初代ニューロン培養物の両方において全タウ（Dako）に対して行った。皮質培養物および初代ニューロン培養物の両方を、PHF（1 μ g/ml）で24時間、前処理し、その後、抗体5G2A3（10 μ g/ml）または抗体1G11A10（10 μ g/ml）でさらに24時間、48時間、72時間、または96時間、処理した。IgG（10 μ g/ml）で処理した細胞を、混合皮質培養物および初代ニューロンの両方についての対照と考えた。48時間から96時間までの全タウレベルの持続性の低下（54%）が、抗体5G2A3処理後に混合皮質培養物において示され（図6A）、一方、約50%の低下が、初代ニューロンにおいて24時間、48時間、および96時間で観察されて（図6B）、混合皮質培養物および初代ニューロン培養物の両方における全タウレベルの低下における抗体5G2A3の有益な効果を示す。

【0217】

抗体1G11A10は、混合皮質培養物における全タウレベルの低下において24時間（41%）および96時間（36%）で有効であるとわかった（図6A）が、全タウのレベルの有意な低下は、対照と比較した場合に初代ニューロンにおいて48時間（65%）でのみ明らかであった（図6B）。

【0218】

GAPDHを、すべての実験についてのローディング対照と考えた。GAPDHレベルは、混合皮質および初代ニューロンにおいて抗体5G2A3または抗体1G11A10処理後に変化しなかった。PHF（1 μ g/ml）で前処理し、その後、10 μ g/mlで抗体5G2A3または抗体1G11A10処理した混合皮質培養物および初代ニューロン培養物は、それぞれ、IgG処理した対照と比較した場合に24時間、48時間、72時間、および96時間、GAPDHレベルのいかなる有意なレベルにおける変化も実証しなかった（ $p > 0.05$ ）。

【0219】

タウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的に結合しうる抗体の効果をさらに特徴決定するために、NeuNおよびIba1のレベルを、抗体5G2A3または抗体1G11A10で処理した混合皮質培養物において測定した。NeuNレベルの減少がニューロンの喪失または障害を示唆するように、NeuNを、ニューロンの形態・機能的状態を判定するための有糸分裂後ニューロンマーカーとして使用する。抗体5G2A3処理した細胞は、それぞれの時点についてIgGで処理した対照細胞と比較した場合に、24時間から96時間までNeuNレベルの徐々の増大を示し、72時間および96時間で統計学的に有意な増大が観察された（図7）。NeuNのレベルにおけるいかなる有意な変化も、対照またはPHFのみで処理した細胞と比較した場合に、抗体1G11A10処理した細胞について観察されなかった。

【0220】

Iba1は、活性化ミクログリアにおいて上方制御されていることが知られているグリア特異的マーカーである。Iba1を、PHFおよび抗体処理の結果としてのミクログリア活性化の

10

20

30

40

50

効果を調査するためのマーカーとして使用した。Iba1のレベルの有意な減少が、対照およびPHFのみで処理した細胞に比して、抗体5G2A3処理した混合皮質培養物において72時間および96時間で観察された（図8）。タウ凝集物は、炎症応答の増大をさらに招くサイトカインの刺激を引き起こすことが次に知られている、ミクログリアを活性化することが知られている。ミクログリアの活性化の増大は、PHFの排除をさらに手助けすると考えられるが、ミクログリアおよび炎症性サイトカインの持続性増加はまた、細胞損傷の上昇を引き起こすことによって全体の病理を増すことも知られている。抗体5G2A3処理後のIba1発現の減少は、抗体-タウ複合体のミクログリア媒介性排除による炎症応答機序の低下を示唆し、一方、有効性がより低い抗体1G11A10処理は、対照と比較した場合に、Iba1のレベルにおいていかなる有意な変化も示すことができなかった。

10

【0221】

抗体5G2A3処理した混合皮質培養物における、NeuNレベルの増大を伴うホスホタウ（pSer199）、全タウ、およびIba1レベルの有意な減少は、ミクログリア活性化、炎症応答のさらなる低下、およびNeuN発現の増大を通して観察されたニューロン生理機能の維持による、PHFの排除における抗体5G2A3の有益な効果をおそらく示唆する。

【0222】

実施例4

混合皮質培養物における、高用量PHF（10 μ g/ml）とタウの短縮型Asp421エピトープに対して免疫特異的である抗体（10 μ g/ml）とのコインキュベーション

タウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的に結合しうる抗体の効果をさらに解明するために、生後0日目のJNPL3マウス由来の混合ニューロン培養物を、PHF（10 μ g/ml）および抗体5G2A3（10 μ g/ml）または抗体1G11A10（10 μ g/ml）と24時間、48時間、72時間、または96時間の持続時間にわたってコインキュベートした。ウエスタン免疫ブロットをNeuNに対して行い、無処理の細胞と比較した場合に、PHFのみで処理した細胞およびPHF+IgGコインキュベートした細胞について、48時間（27%）、72時間（37%）、および96時間（53%）でNeuNのレベルの有意な減少を示した（ $p<0.0001$ ）。NeuNレベルにおけるいかなる有意な変化も、抗体5G2A3とコインキュベートした細胞について24時間から72時間まで観察されず（ $p=0.18$ ）、一方、突然の増大（122%、 $p<0.0001$ ）が、無処理の細胞と比較した場合に96時間で観察された。抗体1G11A10およびPHFとコインキュベートした細胞は、無処理の細胞と比較した場合に、48時間までNeuNのレベルにおけるいかなる有意な変化も示さず、その後、72時間（18%）および96時間（24%）でNeuNレベルの徐々の減少を示した。この調査の結果を図9に示す。

20

30

【0223】

タウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的に結合しうる抗体の効果をさらに解明するために、生後0日目のJNPL3マウス由来の混合ニューロン培養物を、PHF（10 μ g/ml）および抗体5G2A3（10 μ g/ml）または抗体1G11A10（10 μ g/ml）と24時間、48時間、72時間、または96時間の持続時間にわたってコインキュベートした。免疫ブロットを、Ser199エピトープに対して行い、NeuNレベルに対して正規化した（図10）。抗体5G2A3抗体とPHFとのコインキュベーションにより、PHFのみおよびPHF+IgGで処理した細胞と比較して、48時間（78%）、72時間（92%）、および96時間（95%）でホスホ-タウのレベルの有意な減少が示され（ $p<0.0001$ ）、一方、それぞれの時点についての無処理の細胞と比較した場合に、いかなる有意な変化も、抗体5G2A3およびPHFとコインキュベートした細胞についてホスホ-タウレベルにおいて観察されなかった。抗体1G11A10抗体とPHFとのコインキュベーションにより、すべての時点についてPHFのみおよびPHF+IgGで処理した細胞と比較した場合に、ホスホ-タウのレベルにおけるいかなる有意な変化も実証することができなかった。

40

【0224】

生後0日目のJNPL3マウス由来の混合ニューロン培養物をまた、PHF（10 μ g/ml）およびタウの短縮型Asp421エピトープと免疫特異的に結合しうる抗体（抗体5G2A3（10 μ g/ml）および抗体1G11A10（10 μ g/ml））と24時間、48時間、72時間、または96時間の持続時間

50

にわたってコインキュベートした。免疫プロットを、細胞内のリン酸化タウ種および非リン酸化タウ種の両方を認識するタウ（Dako）に対して行った。値を、NeuNに対して正規化した（図11）。抗体5G2A3および抗体1G11A10の抗体の間で、抗体5G2A3のみが、全タウレベルの低下において有効であるとわかり、対照細胞（PHF+IgGで処理した細胞）と比較してそれぞれ48時間、72時間、および96時間で32%、37%、および91%の低下を $p<0.0001$ で示した。抗体1G11A10は、対照細胞と比較した場合にすべての時点について、全タウレベルの低下において無効であった。

【0225】

生後0日目のJNPL3マウス由来の混合ニューロン培養物をまた、PHF（10 μ g/ml）および抗体5G2A3（10 μ g/ml）または抗体1G11A10（10 μ g/ml）と24時間、48時間、72時間、または96時間の持続時間にわたってコインキュベートし、そのような抗体投与のミクログリア活性に対する効果を実証するために、Iba1に対して免疫プロットを行った。抗体5G2A3抗体とPHFとのコインキュベーションにより、無処理の対照細胞と比較した場合に、Iba1レベルにおけるいかなる有意な変化も実証されず、一方、Iba1のレベルの有意な増大が、PHFのみ、PHF+IgG、およびPHF+抗体1G11A10で処理した細胞について72時間および96時間で $p<0.0001$ で観察された（図12）。

【0226】

実施例5

タウの短縮型Asp421エピトープに対して免疫特異的である抗体のタウ異常症マウスにおける組織反応性

タウの短縮型Asp421エピトープに対して免疫特異的である抗体の組織反応性を評価するために、ドットプロット分析を、JNPL3タウ異常症マウス由来（図13A）およびhTauタウ異常症マウス由来（図13B）の脳上清試料に対して実施した。

【0227】

JNPL3タウ異常症マウスに関しては（図13A）、より強いシグナルが、より高い親和性の抗体5G2A3でマウスの大部分において検出された。しかし、より低い親和性の抗体1G11A10は、マウスのいくらかにおいてより強いシグナルを与え、これらの2種の抗体により認識される厳密なエピトープが異なることが示唆された。同じエピトープに対する市販の抗体である、抗タウ抗体C3（Millipore Sigma；Abcam；Delobel, P. et al. (2008) "Analysis of Tau Phosphorylation and Truncation in a Mouse Model of Human Tauopathy," Am. J. Pathol. 172(1):123-131）は、ほぼすべての試料において最低のシグナルを示した。

【0228】

実施例6

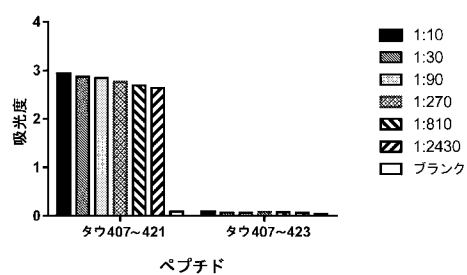
ヒト（対照）脳およびヒトAD脳から精製したPHF由来の脳上清試料における組織反応性

タウの短縮型Asp421エピトープに対して免疫特異的である抗体の組織反応性の評価をまた、ヒト（対照）脳由来およびヒトAD脳から精製したPHF由来の脳上清試料に対しても実施した。この調査の結果を図14に示す。ヒト試料において、抗体5G2A3は、アルツハイマー脳から単離したPHF物質を検出する最強のシグナルを与える。これはまた、対照脳上清（C1~C6）において低いシグナルを有するため、最良の特異性も有する。抗体1G11A10および市販のC3抗体は、病的PHF物質を検出する、匹敵するシグナルを有するが、抗体1G11A10は、対照脳においてC3よりも低いシグナルを有するため、より良い特異性を有する。

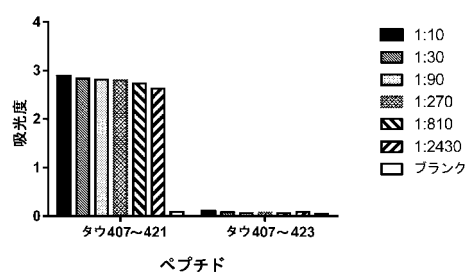
【0229】

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

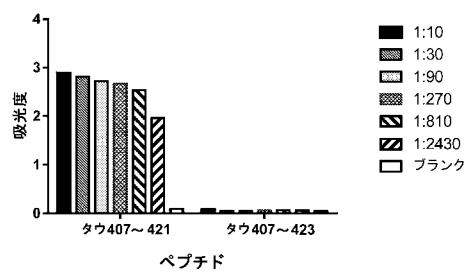
抗体 1G10D2



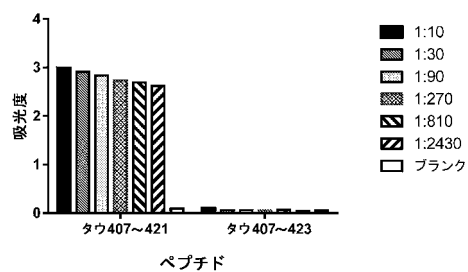
抗体 5B3C11



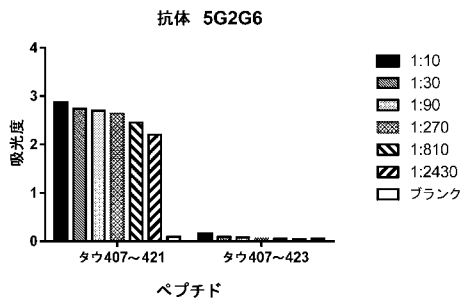
抗体 1G11A10



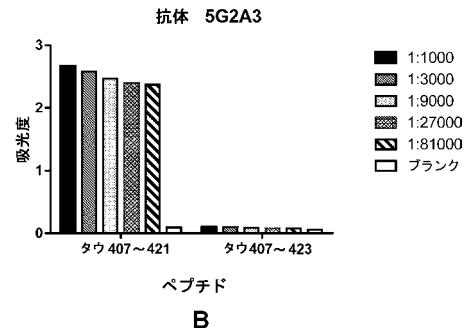
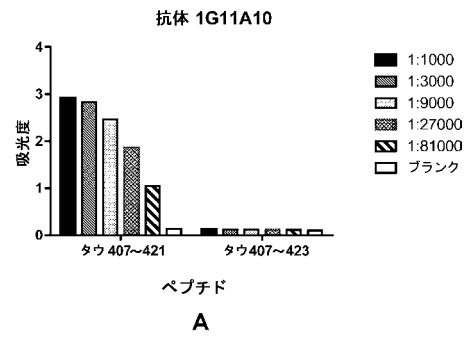
抗体 5G2A3



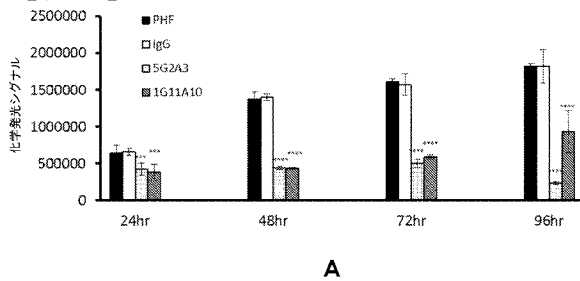
【図 1 E】



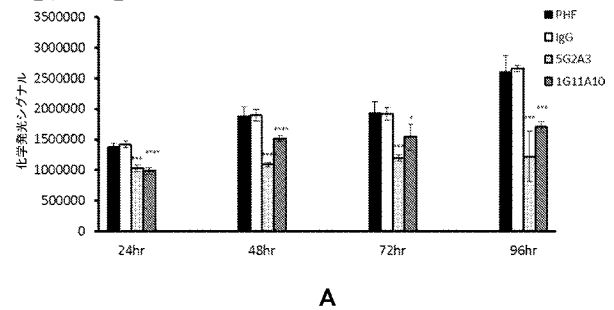
【図 2】



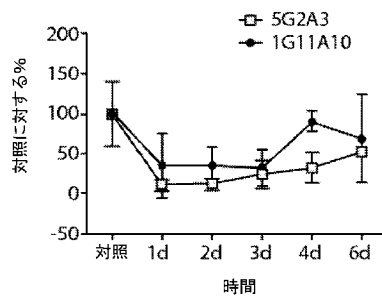
【図 3】



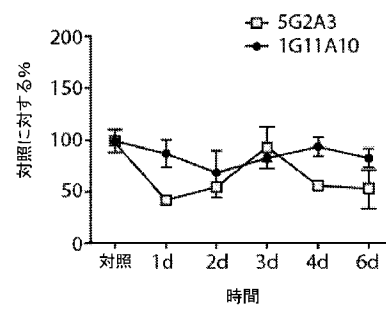
【図 4】



前処理 PHF

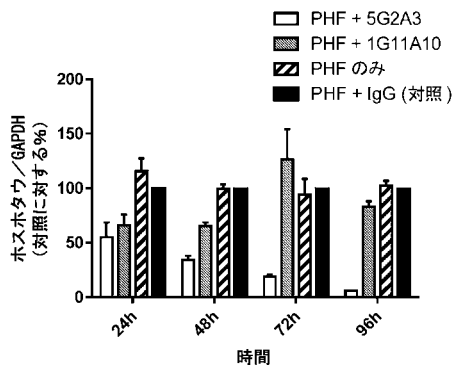


前処理 PHF



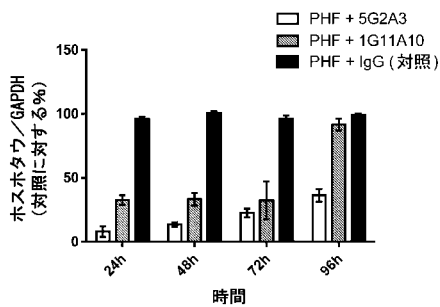
【図 5】

混合皮質培養物におけるホスホタウレベル



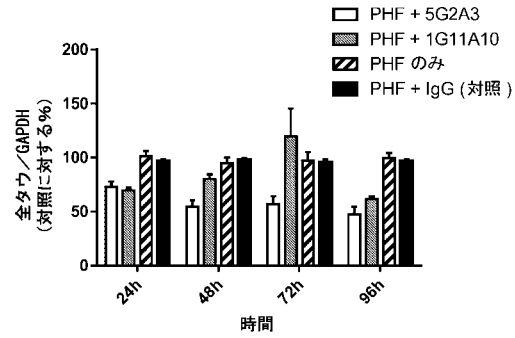
A

初代ニューロン培養物におけるホスホタウレベル

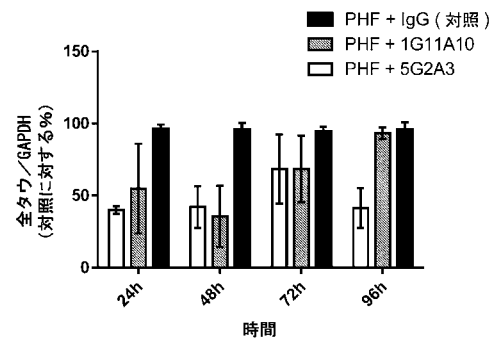


B

【図 6】

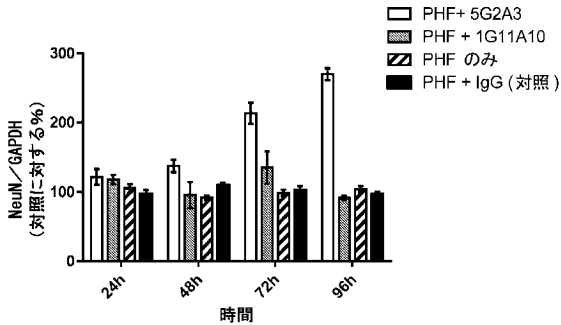


A

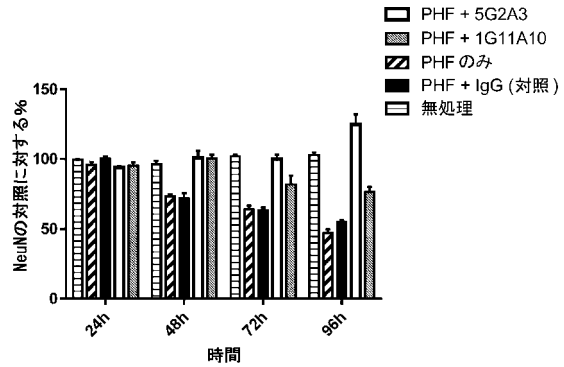


B

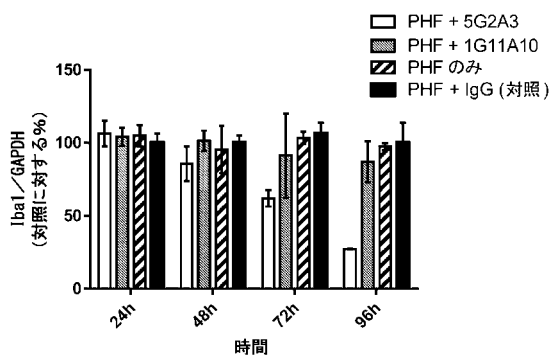
【図 7】



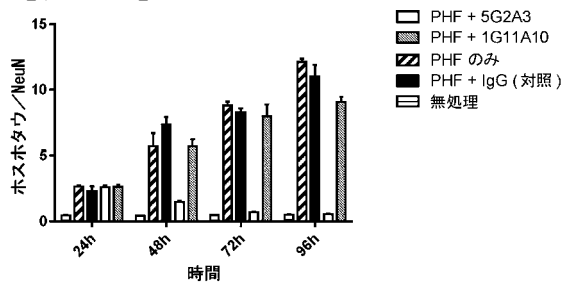
【図 9】



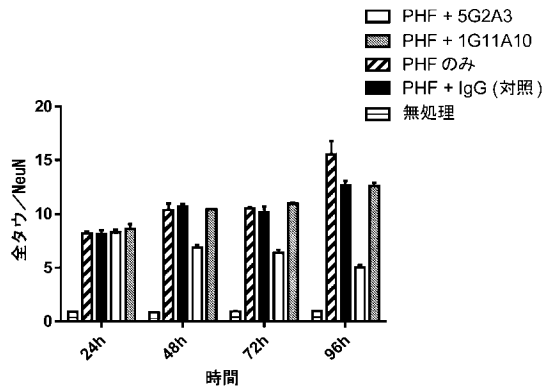
【図 8】



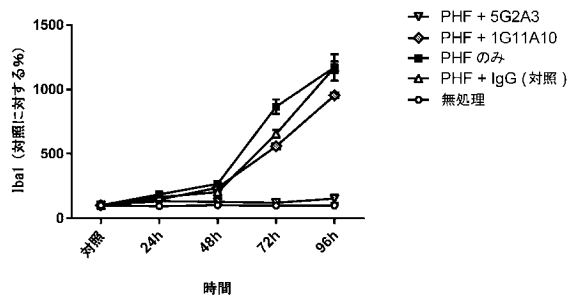
【図 10】



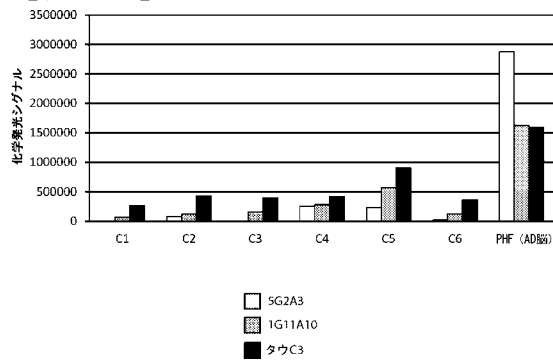
【図 1 1】



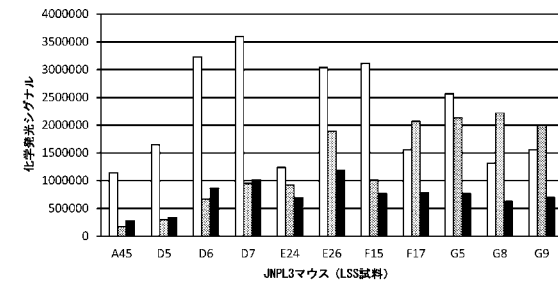
【図 1 2】



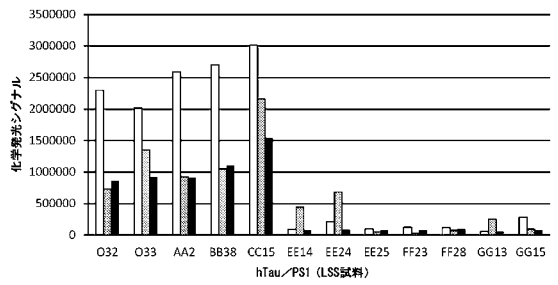
【図 1 4】



【図 1 3】



A



B

5G2A3
1G11A10
タウC3

【配列表】

2018534236000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/46513																											
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/00, 39/395, 51/10; A61P 25/00, 25/28; C07K 16/18 (2017.01) CPC - A61K 2039/505, 2039/0007, 2039/3955; G01N 2800/2821, 33/6896; C07K 16/18 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																													
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 39/00, 39/395, 51/10; A61P 25/00, 25/28; C07K 16/18 (2016.01) CPC: A61K 2039/505, 2039/0007, 2039/3955; G01N 2800/2821, 33/6896; C07K 16/18 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: A61K 2039/505, 2039/0007, 2039/3955; G01N 2800/2821, 33/6896; C07K 16/18 (text search) USPC: 424/185.1, 139.1; 435/7.1; 530/387.9, 388.1 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PatBase; Google Patents; Google Scholar Search terms: Truncated Asp421 epitope of Tau, antibody, HLSNVSTGSIDMVD, monoclonal antibody 1G10D2, 5G2A3, scFv, CDR%, tauopathy, aggregation, neurofibrillary tangles, Alzheimer's disease, diagnostic marker, immunotherapy, caspase cleavage Asp421																													
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2010/0316564 A1 (SIGURDSSON) 16 December 2010 (16.12.2010). Especially para [0008], SEQ ID NO: 101</td> <td>1, 5/1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>2-4, 5/(2-4)</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2009/0317805 A1 (WANG et al.) 24 December 2009 (24.12.2009). Especially para [0239], SEQ ID NO: 141</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2005/0266003 A1 (LIN et al.) 1 December 2005 (01.12.2005). Especially SEQ ID NO: 23</td> <td>2-4, 5/(2-4)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 20050255102 A1 (VIOLETTE et al.) 17 November 2005 (17.11.2005). Especially SEQ ID NO: 23</td> <td>2-4, 5/(2-4)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013/0058960 A1 (Genentech, Inc.) 7 March 2013 (07.03.2013). Especially SEQ ID NO: 3</td> <td>2-4, 5/(2-4)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2015/0118184 A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha) 30 April 2015 (30.04.2015). Especially SEQ ID NO: 28</td> <td>2-4, 5/(2-4)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2012/0244146 A1 (CHAIN) 27 September 2012 (27.09.2012). Especially claim 1, claim 10, SEQ ID NO: 60</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2010/0316564 A1 (SIGURDSSON) 16 December 2010 (16.12.2010). Especially para [0008], SEQ ID NO: 101	1, 5/1	A		2-4, 5/(2-4)	X	US 2009/0317805 A1 (WANG et al.) 24 December 2009 (24.12.2009). Especially para [0239], SEQ ID NO: 141	1	A	US 2005/0266003 A1 (LIN et al.) 1 December 2005 (01.12.2005). Especially SEQ ID NO: 23	2-4, 5/(2-4)	A	US 20050255102 A1 (VIOLETTE et al.) 17 November 2005 (17.11.2005). Especially SEQ ID NO: 23	2-4, 5/(2-4)	A	US 2013/0058960 A1 (Genentech, Inc.) 7 March 2013 (07.03.2013). Especially SEQ ID NO: 3	2-4, 5/(2-4)	A	US 2015/0118184 A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha) 30 April 2015 (30.04.2015). Especially SEQ ID NO: 28	2-4, 5/(2-4)	A	US 2012/0244146 A1 (CHAIN) 27 September 2012 (27.09.2012). Especially claim 1, claim 10, SEQ ID NO: 60	1
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																											
X	US 2010/0316564 A1 (SIGURDSSON) 16 December 2010 (16.12.2010). Especially para [0008], SEQ ID NO: 101	1, 5/1																											
A		2-4, 5/(2-4)																											
X	US 2009/0317805 A1 (WANG et al.) 24 December 2009 (24.12.2009). Especially para [0239], SEQ ID NO: 141	1																											
A	US 2005/0266003 A1 (LIN et al.) 1 December 2005 (01.12.2005). Especially SEQ ID NO: 23	2-4, 5/(2-4)																											
A	US 20050255102 A1 (VIOLETTE et al.) 17 November 2005 (17.11.2005). Especially SEQ ID NO: 23	2-4, 5/(2-4)																											
A	US 2013/0058960 A1 (Genentech, Inc.) 7 March 2013 (07.03.2013). Especially SEQ ID NO: 3	2-4, 5/(2-4)																											
A	US 2015/0118184 A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha) 30 April 2015 (30.04.2015). Especially SEQ ID NO: 28	2-4, 5/(2-4)																											
A	US 2012/0244146 A1 (CHAIN) 27 September 2012 (27.09.2012). Especially claim 1, claim 10, SEQ ID NO: 60	1																											
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐																													
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																													
Date of the actual completion of the international search 18 January 2017		Date of mailing of the international search report 07 FEB 2017																											
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																											

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/48513

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOs: 4, 7-15, 36-43,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. - - -

PCT/US 16/46513

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-19
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-5, drawn to an antibody-based molecule that is capable of immunospecifically binding to the Truncated Asp421 Epitope of Tau.

The antibody-based molecule will be searched to the extent that it competes for binding with the first named antibody, 1G10D2 (Variable Light Chains CDRs 1-3 respectively having SEQ ID NOs: 9, 10, 11; and Variable Heavy Chain CDRs 1-3 respectively having SEQ ID NOs: 13, 14, 15). It is believed that claims 1-5 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass antibody 1G10D2 and SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 13, 14, 15) [Note: Claim 4 discloses Consensus Variable Light Chains CDRs 1-3 (SEQ ID NOs: 97, 98, 99) and Consensus Variable Heavy Chain CDRs 1-3 (SEQ ID NOs: 100, 101, 102) will also be searched since these consensus encompass SEQ ID NOs: 9-11 and SEQ ID NOs: 13-15]. Additional antibodies will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional elected antibodies.

-----go to Extra Sheet for continuation-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-5 limited to 1G10D2 (SEQ ID NOs: 9-11, 13-15), 5G2A3 (SEQ ID NOs: 37-39, 41-43)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/46513

---continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)---

Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: antibody 1G11A10 (Variable Light Chains CDRs 1-3 respectively having SEQ ID NOs: 17, 18, 19; and Variable Heavy Chain CDRs 1-3 respectively having SEQ ID NOs: 21, 22, 23 (claims 1-5).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Among the inventions listed as Groups I+ are the specific antibodies comprising sequences for variable light chain CDRs and variable heavy chain CDRs, recited therein. Each of the inventions of Group I+ requires an unique antibody, not required by the other inventions.

Common Technical Feature:

Group I+ claims share the common technical feature of claim 1.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is anticipated by US 2009/0317805 A1 to WANG et al. (hereinafter "Wang").

As to claim 1, Wang teaches an antibody-based molecule that is capable of immunospecifically binding to the Truncated Asp421 Epitope of Tau, wherein said epitope is present on a peptide having the sequence of Tau 407-421 (SEQ ID NO:7): HLSNVSTGSDMVD (SEQ ID NO: 141; 15 AA, 1- HLSNVSTGSDMVD -15, 100% sequence identity; para [0239]; "In a preferred embodiment, the antibodies specifically bind biomarkers identified by SEQ ID NOs.: 1-148")

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Group I+ lacks unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Continuation of Item 4:

Claims 6-19 have been held unsearchable because they are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/02	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
G 0 1 N	33/532	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/566	(2006.01)	G 0 1 N	33/532	A
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	G 0 1 N	33/566	
			C 1 2 N	15/13	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 シグルドソン エイナー

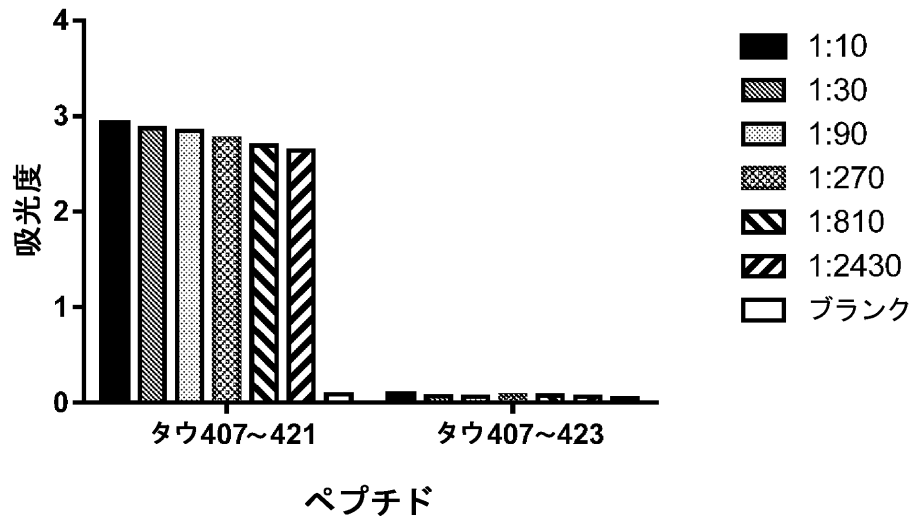
アメリカ合衆国 1 0 8 5 3 ニューヨーク州 スカーズデール ダウナー アベニュー 2 3

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB11 CC22 CC23 EE01

4H045 AA11 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50

【要約の続き】

ペプチド



专利名称(译)	基于抗体的分子特异性针对tau的截短的Asp 421表位及其在tau病症的诊断和治疗中的用途		
公开(公告)号	JP2018534236A	公开(公告)日	2018-11-22
申请号	JP2018507018	申请日	2016-08-11
[标]申请(专利权)人(译)	纽约大学		
申请(专利权)人(译)	纽约大学		
发明人	シグルドソン エイナー		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/46 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/00 A61P9/00 A61P29/00 A61P21/04 A61P25/02 A61P17/02 A61K39/395 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/566 C12N15/13		
CPC分类号	A61P17/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 C07K16/18 C07K2317/622 C07K2317/92 A61K38/00 G01N33/532 G01N2800/2821		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C07K16/46 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/00 A61P9/00 A61P29/00 A61P21/04 A61P25/02 A61P17/02 A61K39/395.D A61K39/395.N G01N33/53.D G01N33/532.A G01N33/566 C12N15/13		
F-TERM分类号	4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/204699 2015-08-13 US 62/211123 2015-08-28 US		
其他公开文献	JP2018534236A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了基于抗体的分子，该分子能够与tau截短的Asp421表位（单域抗体片段，scFv分子，抗体，抗体片段，双抗体及其表位结合）免疫特异性结合并选择性结合。（包括域）。当存在于生物样品中时，这种基于抗体的分子特别地检测阿尔茨海默氏病或其他tau异常以及病理性tau蛋白构象异构体的诊断和/或治疗。，因此是阿尔茨海默氏病和其他tau病理的诊断剂。本发明的基于抗体的分子具有特别的用途，作为阿尔茨海默氏病和相关tau疾病的诊断标记，以及用于治疗此类病理的药物组合物。

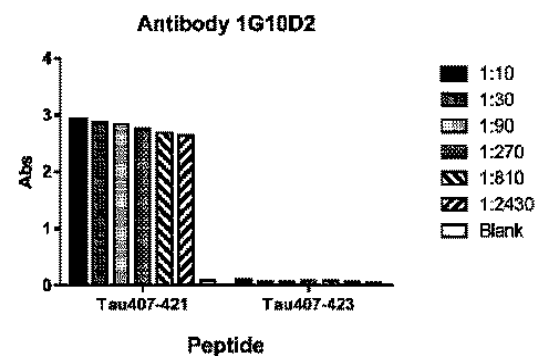


Figure 1A