

(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2020-513804

(P2020-513804A)

(43) 公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z N A Z	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-549574 (P2019-549574)
 (86) (22) 出願日 平成30年3月16日 (2018. 3. 16)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年9月11日 (2019. 9. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/022782
 (87) 国際公開番号 WO2018/170351
 (87) 国際公開日 平成30年9月20日 (2018. 9. 20)
 (31) 優先権主張番号 62/472, 214
 (32) 優先日 平成29年3月16日 (2017. 3. 16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

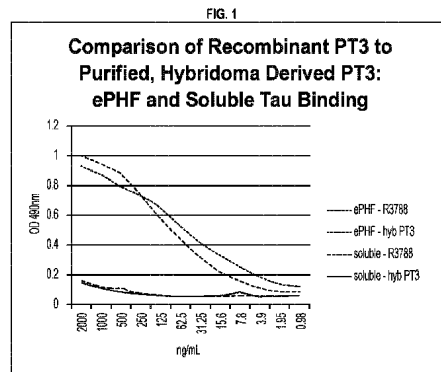
(71) 出願人 509087759
 ヤンセン バイオテック, インコーポレー
 テッド
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 4
 4 ホーシヤム・リッジビユードライブ 8 0
 0 / 8 5 0
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100093676
 弁理士 小林 純子
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PHF-タウ抗体及びその使用

(57) 【要約】

モノクローナル抗PHF-タウ抗体及びその抗原結合断片が記載されている。抗体をコードする核酸、抗体を含む組成物、並びに抗体の製造方法、及びタウ異常症などの状態を治療又は予防するための、抗体の使用方法についてもまた、記載されている。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リン酸化エピトープにおいてリン酸化タウタンパク質に結合する、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であって、

(a) 前記タウタンパク質のリン酸化 T 2 1 2 及びリン酸化 T 2 1 7、並びに配列番号：48 のアミノ酸配列を有する、又はその中にある前記リン酸化エピトープ；

(b) 前記タウタンパク質のリン酸化 T 2 1 7、及び配列番号：52 のアミノ酸配列を有する、又はその中にある前記リン酸化エピトープ；又は

(c) 前記タウタンパク質のリン酸化 T 2 1 2、及び配列番号：54 のアミノ酸配列を有する、又はその中にある前記リン酸化エピトープ；

を含む、前記単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 2】

前記モノクローナル抗体が、配列番号：1、4、7、10、71、80 のいずれかの H C D R 1；配列番号：2、5、8、11、72、81 のいずれかの H C D R 2；配列番号：3、6、9、12、73 のいずれかの H C D R 3；配列番号：13、16、19、22、70 のいずれかの L C D R 1；配列番号：14、17、20、23 のいずれかの L C D R 2；配列番号：15、18、21、24 のいずれかの L C D R 3 を含む、請求項 1 に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3】

(a) それぞれ配列番号：7、8、及び 9 のポリペプチド配列を有する免疫グロブリン重鎖相補性決定領域 (H C D R) H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：19、20、及び 21 のポリペプチド配列を有する免疫グロブリン軽鎖相補性決定領域 (L C D R) L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

20

(b) それぞれ配列番号：1、2、及び 3 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：13、14、及び 15 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(c) それぞれ配列番号：4、5、及び 6 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：16、17、及び 18 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(d) それぞれ配列番号：10、11、及び 12 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：22、23、及び 24 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

30

(e) それぞれ配列番号：80、81、及び 9 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：70、20、及び 21 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(f) それぞれ配列番号：71、72、73 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：70、20、及び 21 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(g) それぞれ配列番号：71、72、及び 73 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：19、20、及び 21 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

40

(h) 配列番号：26 のポリペプチド配列を有する V_H 領域の H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、配列番号：31 のポリペプチド配列を有する V_L 領域の L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(i) 配列番号：28 のポリペプチド配列を有する V_H 領域の H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、配列番号：34 のポリペプチド配列を有する V_L 領域の L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(j) 配列番号：26 のポリペプチド配列を有する V_H 領域の H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに配列番号：34 のポリペプチド配列を有する V_L 領域の L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；又は

50

(k) 配列番号：28のポリペプチド配列を有する V_H 領域のHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、並びに、配列番号：31のポリペプチド配列を有する V_L 領域のLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；

を含み、前記抗体又は、その抗原結合断片はPHF-タウに結合している、請求項2に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片。

【請求項4】

配列番号：26、27、28、及び29のいずれか1つと少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、並びに、配列番号：31、32、33、及び34のいずれか1つと少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、請求項3に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片。

10

【請求項5】

配列番号：26、27、28、及び29のいずれかのポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、並びに、配列番号：31、32、33、及び34のいずれかのポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、請求項4に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片。

【請求項6】

配列番号：45、74、76、及び78のいずれかのポリペプチド配列を有する重鎖に由来する V_H と少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、並びに、配列番号：31、75、77、79のいずれかの軽鎖に由来する V_L と少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、請求項3

20

【請求項7】

配列番号：45、74、76、及び78のいずれかのポリペプチド配列を有する重鎖に由来する V_H のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、並びに、配列番号：31、75、77、79のいずれかの軽鎖に由来する V_L のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、請求項6に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片。

【請求項8】

(a) 配列番号：26のポリペプチド配列を有する V_H 、及び配列番号：31のポリペプチド配列を有する V_L ；

(b) 配列番号：28のポリペプチド配列を有する V_H 、及び配列番号：34のポリペプチド配列を有する V_L ；

30

(c) 配列番号：26のポリペプチド配列を有する V_H 、及び配列番号：34のポリペプチド配列を有する V_L ；

(d) 配列番号：28のポリペプチド配列を有する V_H 、及び配列番号：31のポリペプチド配列を有する V_L ；

(e) 配列番号：27のポリペプチド配列を有する V_H 、及び配列番号：31のポリペプチド配列を有する V_L ；

(f) 配列番号：74の重鎖に由来する V_H 、及び配列番号：75の軽鎖に由来する V_L ；

(g) 配列番号：76の重鎖に由来する V_H 、及び配列番号：77の軽鎖に由来する V_L ；又は

40

(h) 配列番号：78の重鎖に由来する V_H 、及び配列番号：79の軽鎖に由来する V_L ；

を含む、請求項3に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片。

【請求項9】

配列番号：45、74、76、及び78のいずれかと少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖、並びに、配列番号：46、75、77、及び79のいずれかと少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、請求項8に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片。

【請求項10】

50

配列番号：４５、７４、７６、及び７８のいずれかのポリペプチド配列を有する重鎖、並びに、配列番号：４６、７５、７７、及び７９のいずれかのポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、請求項９に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片。

【請求項１１】

- (a) 配列番号：４５の重鎖、及び配列番号：４６の軽鎖；
- (b) 配列番号：７４の重鎖、及び配列番号：７５の軽鎖；
- (c) 配列番号：７６の重鎖、及び配列番号：７７の軽鎖；又は
- (d) 配列番号：７８の重鎖、及び配列番号：７９の軽鎖；

を含む、請求項１０に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片。

【請求項１２】

ヒト重鎖 I g G １定常領域及びヒト軽鎖 定常領域を含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片。

【請求項１３】

請求項１～１２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又は抗原結合断片をコードする、単離核酸。

【請求項１４】

請求項１３に記載の単離核酸を含む、ベクター。

【請求項１５】

請求項１４に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項１６】

請求項１～１２のいずれか一項に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片、及び医薬上許容できる担体を含む、医薬組成物。

【請求項１７】

病理学的タウ凝集の低減、又はタウ異常症の拡大の低減を必要とする対象における、病理学的タウ凝集の低減、又はタウ異常症の拡大の低減方法であって、前記対象に、請求項１６に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項１８】

タウ異常症の治療を必要とする対象における、タウ異常症の治療方法であって、前記対象に、請求項１６に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項１９】

前記タウ異常症は、家族性アルツハイマー病、散発的アルツハイマー病、染色体１７（F T D P - １７）に関連したパーキンソン症候群による前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下神経膠症、線維変化優位型認知症、石灰化によるび慢性神経原線維濃縮、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン症候群認知症合併症、ダウン症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラールフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、C型ニーマン・ピック病、プリオンタンパク質大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、神経原線維濃縮による非ガマニアン（Guamanian）運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソン症候群、慢性外傷性脳症、及び拳闘家認知症（ボクサー病）からなる群から選択される、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】

前記抗体又は抗原結合断片を製造する条件下において、前記抗体又は抗原結合断片をコードする核酸を含む細胞を培養することと、前記細胞又は細胞培養液から前記抗体又は抗原結合断片を回収することとを含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又は抗原結合断片の製造方法。

【請求項２１】

対象の生体サンプルにおける P H F - タウの存在の検出方法であって、前記生体サンプルを、請求項１～１２のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片と接触させることと、前記対象の前記サンプルにおいて、前記抗体又は抗原結合断片の P H F - タウへの結合を検出することとを含む、前記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

前記生体サンプルが、血液、血清、血漿、間質液、又は大脳脊髄液サンプルである、請求項 2 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗 P H F - タウ抗体、抗体をコードする核酸及び発現ベクター、ベクターを含有する組み換え細胞、並びに抗体を含む組成物に関する。抗体の作製方法、タウ異常症を含む状態を治療するための抗体の使用法、及び、タウ異常症などの疾病を診断するための、抗体の使用法もまた提供する。

10

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病 (A D) は、徐々に激しい精神機能低下を導き、最終的には死に至らしめる、記憶、認知、論理的思考、判断力、及び情動安定性の進行性喪失を臨床的特徴とする、退行性脳障害である。A D は、高齢者の進行性精神機能不全 (認知症) の非常に一般的な原因であり、米国では 4 番目に多い医学的死亡原因を表すと考えられている。A D は、世界中の民族で観察され、現在及び未来の、主たる公衆の健康上の問題を提示する。

【0003】

A D 個体の脳は、老人性 (又はアミロイド) 斑、アミロイド血管症 (血管におけるアミロイド沈着) 及び神経原線維変化と呼ばれる特徴的な病変を呈する。これら病変の大多数、特にアミロイド斑及び対らせん状細線維の神経原線維変化は、一般に A D 患者の記憶及び認知機能に重要なヒトの脳のいくつかの領域で見られる。

20

【0004】

現在の A D 治療の状況には、認知症を患う患者における認知症状を治療するために認可された治療法のみが含まれる。A D の進行を改変又は遅延させる、認可済みの治療法は存在しない。潜在的な疾病改変剤としては、軽度の A D を患う患者用の、E l i L i l l y ヒト化抗 - A モノクローナルソラネズマブ、及び、軽度 ~ 中度の A D を患う患者用の、M e r c k 小分子 B A C E 阻害剤であるベルベセスタットが挙げられる。これらの治療法、及び次の十年で発売され得る、大部分の他の潜在的な疾患改変剤は、A (A D の「特徴」的な 2 つの病理学的兆候のうちの 1 つである、アミロイドプラークの本質的構成成分) を標的にする。

30

【0005】

A D の第 2 の特徴的な病理学的兆候である神経原線維濃縮体は主に、過剰リン酸化タウタンパク質のアグリゲートで構成される。タウの主な生理学的機能は、微小管の重合及び安定化である。タウの微小管への結合は、タウの微小管結合領域における正電荷と、微小管格子における負電荷とのイオン性相互作用により発生する (B u t n e r a n d K i r s c h n e r , J C e l l B i o l . 1 1 5 (3) : 7 1 7 - 3 0 , 1 9 9 1) 。タウタンパク質は、85個の可能なリン酸化反応部位を含有し、これらの部位の多くにおけるリン酸化反応が、タウの一次機能を妨げる。軸索の微小管格子に結合したタウは、擬リン酸化状態にあるが、A D 内で凝集したタウは過剰リン酸化状態にあり、タウの生理学的に活性なプールとは異なる独自のエピトープをもたらす。

40

【0006】

タウ異常症の伝播及び拡大仮説が説明されており、これは、ヒトの脳におけるタウ異常症進行の B r a a k 段階、及びタウ凝集の、前臨床タウモデルへの注射後のタウ異常症の拡大に基づいている (F r o s t e t a l . , J B i o l C h e m . 2 8 4 : 1 2 8 4 5 - 5 2 , 2 0 0 9 ; C l a v a g u e r a e t a l . , N a t C e l l B i o l . 1 1 : 9 0 9 - 1 3 , 2 0 0 9) 。

【0007】

タウの凝集を予防又は一掃するための治療薬の開発は長年関心が持たれており、抗凝集化合物及びキナーゼ阻害剤を含む候補薬剤が、臨床試験に導入されてきた (B r u n d e

50

n et al., Nat Rev Drug Discov. 8:783-93, 2009)。トランスジェニックマウスにおける、能動タウ免疫付与及び受動タウ免疫付与の両方の、有益な治療効果を示す、複数の研究が刊行されている (Chai et al., J Biol Chem. 286:34457-67, 2011; Boutajangout et al., J Neurochem. 118:658-67, 2011; Boutajangout et al., J Neurosci. 30:16559-66, 2010; Asuni et al., J Neurosci. 27:9115-29, 2007)。ホスホ特異的及び非ホスホ特異的抗体の両方において、活性が報告されている (Schroeder et al., J Neuroimmune Pharmacol. 11(1):9-25, 2016)。

10

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0008】**

当該技術分野における進展にもかかわらず、タウ凝集及びタウ異常症の進行を予防して、AD及び他の神経変性病などのタウ異常症を治療するのに効果的な治療薬が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】**【0009】**

本発明は、対らせん状細線維 (PHF) - タウに対して高い結合親和性を有し、リン酸化タウに対して選択的である抗PHF - タウ抗体又はその抗原結合断片を提供することによりこの必要性を満たす。マウスPHF - タウ特異的抗体の、ヒトフレームワークへの適応 (HFA) により、本発明の抗体は生成された。リン酸化タウに対する抗体の選択性により、通常のタウ機能を妨げずに病原性タウに対する効能が可能となると考えられる。本発明は、抗体をコードする核酸、抗体を含む組成物、並びに抗体の製造方法及び抗体の使用方法もまた提供する。本発明の抗PHF - タウ抗体、又はその抗原結合断片は、HEK細胞可溶化物に由来する、又は変異体タウトランスジェニックマウスの脊髄溶解物に由来するタウシードを使用する細胞アッセイにより測定されるように、タウシードを阻害する。更に、本発明の抗PHF - タウ抗体の変領域及びマウスIg定常領域 (例えばマウスIgG2a定常領域) を有するキメラ抗体は、in vivoでの変異体タウトランスジェニックマウスにおいてシーディング活性をブロックした。

20

30

【0010】

AD脳におけるタウ異常症の進行は、異なる特殊な拡大パターンに従う。前臨床モデルにおいては、細胞外ホスホ - タウシードがニューロンでのタウ異常症を誘発し得ることが示されている (Clavaguera et al., PNAS 110(23):9535-40, 2013)。それ故、タウ異常症はある脳の領域から次の領域に、プリオンのように拡大し得ると考えられている。この拡大プロセスには、近くのニューロンにより取り込まれることができ、更なるタウ異常症を引き起こし得るタウシードの外在化が伴う。理論に束縛されるものではないが、本発明の抗PHF - タウ抗体又はその抗原結合断片は、脳内でホスホ - タウシードと相互作用することにより、タウ凝集又はタウ異常症の拡大を予防すると考えられている。

40

【0011】

一般的な一態様において、本発明は、PHF - タウに結合する単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。特定の実施形態では、抗体はヒト化モノクローナル抗体である。

【0012】

特定の態様に従うと、本発明は、タウタンパク質のプロリンリッチなドメインにおけるリン酸化エピトープにおいてリン酸化タウタンパク質に結合する、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。より具体的な態様において、リン酸化エピトープは、タウタンパク質のリン酸化T212及び/又はリン酸化T217、並びに、配列番号: 48、52、及び54のアミノ酸配列のいずれかを有する、又はこれらのいずれかの中にあ

50

るリン酸化エピトープを含む。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、タウタンパク質のリン酸化 T 2 1 2 及びリン酸化 T 2 1 7 を含むリン酸化エピトープに結合する。

【 0 0 1 3 】

特定の態様に従うと、本発明は、

(1) それぞれ配列番号： 4、 5、 及び 6 のポリペプチド配列を有する免疫グロブリン重鎖相補性決定領域 (H C D R) H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3、 並びに、それぞれ配列番号： 1 6、 1 7、 及び 1 8 のポリペプチド配列を有する免疫グロブリン軽鎖相補性決定領域 (L C D R) L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ；

(2) それぞれ配列番号： 1、 2、 及び 3 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3、 並びに、それぞれ配列番号： 1 3、 1 4、 及び 1 5 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ；

(3) それぞれ配列番号： 7、 8、 及び 9 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3、 並びに、それぞれ配列番号： 1 9、 2 0、 及び 2 1 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ；

(4) それぞれ配列番号： 1 0、 1 1、 及び 1 2 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3、 並びに、それぞれ配列番号： 2 2、 2 3、 及び 2 4 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ；

(5) それぞれ配列番号： 8 0、 8 1、 及び 9 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3、 並びに、それぞれ配列番号： 7 0、 2 0、 及び 2 1 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ；

(6) それぞれ配列番号： 7 1、 7 2、 7 3 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3、 並びに、それぞれ配列番号： 7 0、 2 0、 及び 2 1 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ；

(7) それぞれ配列番号： 7 1、 7 2、 及び 7 3 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3、 並びに、それぞれ配列番号： 1 9、 2 0、 及び 2 1 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ；

(8) 配列番号： 2 6 のポリペプチド配列を有する V_H 領域の H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3、 並びに、配列番号： 3 1 のポリペプチド配列を有する V_L 領域の L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ；

(9) 配列番号： 2 8 のポリペプチド配列を有する V_H 領域の H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3、 並びに、配列番号： 3 4 のポリペプチド配列を有する V_L 領域の L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ；

(1 0) 配列番号： 2 6 のポリペプチド配列を有する V_H 領域の H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3、 並びに、配列番号： 3 4 のポリペプチド配列を有する V_L 領域の L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ；又は

(1 1) 配列番号： 2 8 のポリペプチド配列を有する V_H 領域の H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3、 並びに、配列番号： 3 1 のポリペプチド配列を有する V_L 領域の L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ；

を含み、

抗体又はその抗原結合断片が、 P H F - タウ、 好ましくはヒト P H F - タウに結合している、

単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。

【 0 0 1 4 】

より具体的な態様において、重鎖可変領域ドメインのフレームワーク領域及び軽鎖可変領域ドメインのフレームワーク領域は、ヒト免疫グロブリンからのアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 5 】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号： 2 6、 2 7、 2 8、 及び 2 9 のいずれか 1 つと少なくとも 8 0 %、 好ましくは少なくとも 8 5 %、 好ましくは少なくとも 9 0 %、 より好ましくは少なくとも 9 5 %、 より好ましくは少なくとも 9 8 % の同一性を有し、 最も好ましくは 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、 若

10

20

30

40

50

しくは配列番号：74、76、及び78のいずれか1つの任意の重鎖のV_H領域、又は、配列番号：31、32、33、及び34のいずれか1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域、若しくは配列番号：75、77、及び79の軽鎖のいずれか1つのV_L領域を含む、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0016】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：45、74、76、及び78のいずれか1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖；並びに、配列番号：46、75、77、及び79のいずれか1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。

10

【0017】

別の具体的な態様に従うと、本発明の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、定常領域、例えばヒト又はマウス重鎖IgG定常領域、及びヒト又はマウス抗体軽鎖又は定常領域を更に含む。

20

【0018】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする単離核酸に関する。

【0019】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする単離核酸を含むベクターに関する。

【0020】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする単離核酸を含む宿主細胞に関する。

30

【0021】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片、及び医薬上許容できる担体を含む医薬組成物に関する。

【0022】

別の一般的な態様において、本発明は、病理学的タウ凝集の低下又はタウ異常症の拡大の低下を必要とする対象における、病理学的タウ凝集の低下又はタウ異常症の拡大の低下方法であって、対象に本発明の医薬組成物を投与することを含む、方法に関する。

【0023】

別の一般的な態様において、本発明は、タウ異常症の治療を必要とする対象におけるタウ異常症の治療方法であって、対象に本発明の医薬組成物を投与することを含む方法に関する。タウ異常症としては、家族性アルツハイマー病、散発的アルツハイマー病、染色体17(F T D P - 17)に関連したパーキンソン症候群による前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下神経膠症、線維変化優位型認知症、石灰化によるび漫性神経原線維濃縮、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン症候群認知症合併症、ダウン症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラールフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、C型ニーマン・ピック病、プリオンタンパク質大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、神経原線維濃縮による非ガマニアン(Guamanian)運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソン症候群、慢性外傷性脳症、及び拳闘家認知症(ボクサー病)からなる群から選択される1つ以上が挙げられるが、これらに限

40

50

定されない。

【0024】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片の製造方法であって、モノクローナル抗体又は抗原結合断片をコードする核酸を含む細胞を、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を製造する条件下にて培養することと、細胞又は細胞培養液からモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を回収することを含む、方法に関する。

【0025】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物の製造方法であって、医薬組成物を得るために、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を医薬上許容できる担体と組み合わせることを含む、方法に関する。

10

【0026】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を用いて、対象におけるリン酸化PHF-タウの存在を検出する方法、又は、対象においてPHF-タウの存在を検出することにより、対象のタウ異常症を診断する方法に関する。

【0027】

本発明の他の態様、特徴、及び利点は、発明の詳細な説明、並びにその好ましい実施形態及び添付の特許請求の範囲を含む以下の開示より明らかとなる。

20

【図面の簡単な説明】

【0028】

上述の「課題を解決するための手段」及び以降の「発明を実施するための形態」は、添付の図面と併せて読むことでより良好に理解されるであろう。本発明は、図面に示される実施形態そのものに限定されない点は理解されるべきである。

【図1】組み換えにより発現したPT3（「R3788」）、及びハイブリドーマにより発現したPT3（「hyb」）の、PHF-タウ及び可溶性タウへの結合を示す図である。

【図2】通常の組み換えヒトタウ（「NT」）及びサルコシル不溶性PHF-タウ（「PT」）のSDS-PAGE後の、マウス抗タウモノクローナル抗体のウェスタンブロット分析を示す図である。

30

【図3A】抗アミロイド4G8陽性であるAD海馬組織における、PT3の免疫組織化学分析を示す図である。使用したモノクローナル抗体は、(A)PT1、(B)PT2、(C)PT3、(D)AT8、及び(E)HT7であった。

【図3B】抗アミロイド4G8陽性であるAD海馬組織における、PT3の免疫組織化学分析を示す図である。使用したモノクローナル抗体は、(A)PT1、(B)PT2、(C)PT3、(D)AT8、及び(E)HT7であった。

【図3C】抗アミロイド4G8陽性であるAD海馬組織における、PT3の免疫組織化学分析を示す図である。使用したモノクローナル抗体は、(A)PT1、(B)PT2、(C)PT3、(D)AT8、及び(E)HT7であった。

40

【図3D】抗アミロイド4G8陽性であるAD海馬組織における、PT3の免疫組織化学分析を示す図である。使用したモノクローナル抗体は、(A)PT1、(B)PT2、(C)PT3、(D)AT8、及び(E)HT7であった。

【図3E】抗アミロイド4G8陽性であるAD海馬組織における、PT3の免疫組織化学分析を示す図である。使用したモノクローナル抗体は、(A)PT1、(B)PT2、(C)PT3、(D)AT8、及び(E)HT7であった。

【図4A】抗アミロイド4G8陰性である対照海馬組織における、PT3の免疫組織化学分析を示す図である。使用したモノクローナル抗体は、(A)PT1、(B)PT2、(C)PT3、(D)AT8、及び(E)HT7であった。

【図4B】抗アミロイド4G8陰性である対照海馬組織における、PT3の免疫組織化学

50

分析を示す図である。使用したモノクローナル抗体は、(A)PT1、(B)PT2、(C)PT3、(D)AT8、及び(E)HT7であった。

【図4C】抗アミロイド4G8陰性である対照海馬組織における、PT3の免疫組織化学分析を示す図である。使用したモノクローナル抗体は、(A)PT1、(B)PT2、(C)PT3、(D)AT8、及び(E)HT7であった。

【図4D】抗アミロイド4G8陰性である対照海馬組織における、PT3の免疫組織化学分析を示す図である。使用したモノクローナル抗体は、(A)PT1、(B)PT2、(C)PT3、(D)AT8、及び(E)HT7であった。

【図4E】抗アミロイド4G8陰性である対照海馬組織における、PT3の免疫組織化学分析を示す図である。使用したモノクローナル抗体は、(A)PT1、(B)PT2、(C)PT3、(D)AT8、及び(E)HT7であった。

【図5A】(A)タウノックアウト又は(B)野生型マウスの脳における、PT3のホスホ-タウ特異的染色パターンを示す図である。

【図5B】(A)タウノックアウト又は(B)野生型マウスの脳における、PT3のホスホ-タウ特異的染色パターンを示す図である。

【図6A】(A)タウノックアウト又は(B)野生型マウスの脳における、タウ-1の非ホスホ-タウ特異的染色パターンを示す図である。

【図6B】(A)タウノックアウト又は(B)野生型マウスの脳における、タウ-1の非ホスホ-タウ特異的染色パターンを示す図である。

【図7】PT3 Fab + pT212 / pT217 - タウペプチド複合体の結晶構造を示す図であり、PT3 Fabを、空間を塗りつぶす表示(ライトグレー)で示し、タウペプチドを棒状(黒)の表示で示す。

【図8】PT3 Fab + pT212 / pT217 - タウペプチド複合体の結晶構造を示す図であり、PT3をリボン状(ライトグレー)で示し、そのパラトープ残基を棒状の表示で示し、タウペプチドを棒状(黒)の表示で示す。

【図9】PT3 Fab + pT212 / pT217 タウペプチド構造の相互作用図を示す図であり、ペプチド残基を、白色でレタリングした黒の箱で示し、VH残基をダークグレーで示し、VL残基をライトグレーで示し、点線は水素結合を示して、実線はファン・デル・ワールス接触を示す。

【図10】HFA PT3重鎖及び軽鎖可変領域の配列を示す図であり、HFA多様体がPT3マウス親V領域(VH10及びVL7)にアラインメントされており、ヒトFRへ転写された親CDRには下線を引いており、残基付番は連続している。

【図11】B324 + pT212 / pT217 - タウペプチド複合体の結晶構造を示す図であり、B324を、空間を塗りつぶす表示(ライトグレー)で示し、タウペプチドを棒状(黒)の表示で示す。

【図12】B324 + pT212 / pT217 タウペプチド複合体の結晶構造を示す図であり、B324をリボン状(ライトグレー)で示し、そのパラトープ残基を棒状の表示で示し、タウペプチドを棒状(黒)の表示で示す。ただし、D92(L)及びE93(L)はC及び側鎖のカルボキシレート原子に対して電子密度を有していない。

【図13】B324 + pT212 / pT217 タウペプチド構造の相互作用図を示す図であり、ペプチド残基を、白色でレタリングした黒の箱で示し、VH残基をダークグレーで示し、VL残基をライトグレーで示し、点線は水素結合を示して、実線はファン・デル・ワールス接触を示す。

【図14】FRETバイオセンサセルモデルの概略図である。

【図15】BRETアッセイを使用して測定した、GFP-タウP301Lアグリゲートを含むHEK細胞ホモジェネートによりシードされた、PT3によるK18アグリゲート導入の阻害を示す図である。

【図16】FRETアッセイを使用して測定した、TgP301S脊髄ホモジェネートによりシードされた、PT3によるK18アグリゲート導入の阻害を示す図である。

【図17】2つの独立した実験のデータを用いた、マウスTgP301S脊髄抽出物の免

10

20

30

40

50

疫枯濁アッセイの結果を示す図である。

【図18】2つの実験のデータを用いた、ヒトAD脳抽出物免疫枯濁アッセイの結果を示す図である(n=1である、HT7及びAT8の場合を除く)。FRETアッセイを用いて測定すると、PT3はタウシーディングを阻害する。

【図19-1】変異体ヒトP301Lタウを発現するトランスジェニックマウスにおける、注射モデルの概略図を示す図である。IHC画像は、注射後3ヶ月の対照抽出物(A~B)を有するマウス、注射後1ヶ月のAD脳由来のePHF-タウ(C~D)を有するマウス、注射後3ヶ月のAD脳由来のePHFタウ(E~F)を有するマウスからの、注射済み半球の代表的なAT8染色を示す。

【図19-2】変異体ヒトP301Lタウを発現するトランスジェニックマウスにおける、注射モデルの概略図を示す図である。(G)ヒストグラムは、ePHFの量を増加させて治療したマウスの代表的な生化学データを示す。

【図20】PT3の末梢投与(IP)に続いての変異体ヒトP301Lタウを発現するトランスジェニックマウスにおけるAD脳由来のPHF-タウによるシーディングの、タウ凝集における効果を示す図である。

【図21】PT3の用量を低下させた同時注射に続いての変異体ヒトP301Lタウを発現するトランスジェニックマウスにおけるAD脳由来のPHF-タウによりシーディングの、タウ凝集における効果を示す図である。

【図22A】PT3アイソタイプのIP末梢投与と組み合わせた同時投与に続いての変異体ヒトP301Lタウを発現するトランスジェニックマウスにおけるAD脳由来のPHF-タウにおけるシーディングの、タウ凝集における効果を示す図である。(A)に従い治療したマウスは、(B)注射済み半球、及び(C)非注射半球において効果を示す。

【図22B】PT3アイソタイプのIP末梢投与と組み合わせた同時投与に続いての変異体ヒトP301Lタウを発現するトランスジェニックマウスにおけるAD脳由来のPHF-タウにおけるシーディングの、タウ凝集における効果を示す図である。(A)に従い治療したマウスは、(B)注射済み半球、及び(C)非注射半球において効果を示す。

【図22C】PT3アイソタイプのIP末梢投与と組み合わせた同時投与に続いての変異体ヒトP301Lタウを発現するトランスジェニックマウスにおけるAD脳由来のPHF-タウにおけるシーディングの、タウ凝集における効果を示す図である。(A)に従い治療したマウスは、(B)注射済み半球、及び(C)非注射半球において効果を示す。

【図23A】AD患者に由来する脳ホモジェネートの濃度と比較した、PSP患者由来の脳ホモジェネートにおける凝集タウの濃度を示す図である。使用したモノクローナル抗体は(A)AT8及び(B)PT3であった。

【図23B】AD患者に由来する脳ホモジェネートの濃度と比較した、PSP患者由来の脳ホモジェネートにおける凝集タウの濃度を示す図である。使用したモノクローナル抗体は(A)AT8及び(B)PT3であった。

【図24】A~Jは、(A、D)AD患者、又は(B、C、E、F)PSP患者の脳組織の凍結切片を、(A~C)AT8、又は(D~F)PT3抗体で染色すると、PSPの影響を受けた解剖学領域において染色を示したことを示す図である。(G~J)対照は染色を示さなかった。

【図25】A~Hは、PHF-タウを有する親和性成熟mAb、及びこれらのFabに関する、SPR結合のセンサーグラムを示す図である。実線(灰色)は、二価の結合モデル(mAb)又は1:1ラングミュアモデル(Fab)を用いる、反応速度の合致を示す。(A)B296 mAb、(B)B711 mAb、(C)B809 mAb、(D)B333 mAb、(E)B296のB324 Fab、(F)B711のB330 Fab、(G)B809のB332 Fab、(H)B333のB331 Fab。

【図26A】(A)mAb、又は(B)Fabを用いる直接ELISA実験における、PT3-HFA及び親和性成熟多様体の、pT212/pT217ペプチドへの結合を示す図である。

【図26B】(A)mAb、又は(B)Fabを用いる直接ELISA実験における、P

10

20

30

40

50

T 3 - H F A 及び親和性成熟多様体の、p T 2 1 2 / p T 2 1 7 ペプチドへの結合を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0029】

発明の背景において、また、本明細書全体を通じて各種刊行物、論文及び特許を引用又は記載する。これら参照文献の各々はその全容が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれる文書、操作、材料、デバイス、物品などの考察は、本発明のコンテキストを与えるためのものである。かかる考察は、これらの事物のいずれか又は全てが、開示又は特許請求されるいかなる発明に対しても先行技術の一部を構成することを容認するものではない。

10

【0030】

定義

別の定義がなされない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。そうでない場合、本明細書で使用される特定の用語は、本明細書に記載される意味を有するものである。本明細書に引用する全ての特許、公開された特許出願及び刊行物は、参照によって恰もその全体が本明細書に記載されているものと同様にして組み込まれる。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される単数形「a」、「an」及び「the」は、特に文脈上明らかでない限り、複数の指示対象物を含むことに留意すべきである。

【0031】

20

特に断らない限り、本明細書に記載される濃度又は濃度範囲などのあらゆる数値は、全ての場合において、「約」なる語によって修飾されているものとして理解されるべきである。したがって、数値は、典型的には、記載される値の $\pm 10\%$ を含む。例えば、 1 mg/mL の濃度は $0.9\text{ mg/mL} \sim 1.1\text{ mg/mL}$ を含む。同様に、 $1\% \sim 10\%$ (w/v)の濃度範囲は $0.9\% (w/v) \sim 11\% (w/v)$ を含む。本明細書で使用する場合、数値範囲の使用は、文脈上そうでない旨が明確に示されない限り、その範囲内の整数及び値の分数を含む、全ての可能な部分範囲、その範囲内の全ての個々の数値を明示的に含む。

【0032】

30

本明細書で使用するところの「単離された」なる用語は、生物学的構成成分（例えば、核酸、ペプチド、又はタンパク質）が、これらの構成成分が天然に生じる生物の他の生物学的構成成分（すなわち、他の染色体及び染色体外DNA及びRNA、並びにタンパク質）から実質的に分離されたか、これらの他の成分とは別に生成されたか、又はこれらの他の成分から精製されたものであることを意味する。このため、「単離」された核酸、ペプチド、及びタンパク質は、標準的な精製法により精製された核酸及びタンパク質を含む。「単離された」核酸、ペプチド、及びタンパク質は、組成物の一部であることができ、このような組成物が核酸、ペプチド、又はタンパク質の本来の環境の一部ではない場合であっても単離されている。また、この用語は、宿主細胞中での組み換え発現により調製された核酸、ペプチド、及びタンパク質、並びに化学合成された核酸も包含する。

【0033】

40

本明細書で使用する場合、用語「抗体」又は「免疫グロブリン」は広い意味で用いられ、ポリクローナル抗体を含む免疫グロブリン又は抗体分子、マウス、ヒト、ヒト適合、ヒト化、及びキメラモノクローナル抗体及び抗体断片を含むモノクローナル抗体を含む。

【0034】

一般に抗体とは、特定の抗原に対する結合特異性を示すタンパク質又はペプチド鎖である。抗体の構造は、公知である。免疫グロブリンは、重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて5つの主なクラス、すなわち、Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、及びIg Mに割り当てることができる。Ig A及びIg Gは、アイソタイプのIg A 1、Ig A 2、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3及びIg G 4として更に細分類される。したがって、本発明の抗体は、5つの主要なクラス又は対応する下位クラスのいずれかのものであることができ

50

る。本発明の抗体はIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4であることが好ましい。本発明の抗体としては、半減期の延び、ADCC又はCDCの増減、及びサイレンシングされたFcエフェクター機能が挙げられるがこれらに限定されない、野生型Fc領域と比較して変化した特性を有するように、Fc領域に多様性を有するものが挙げられる。いずれの脊椎動物種の抗体軽鎖も、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて2つの明確に異なるタイプ、すなわち及びのうちの一方に割り当てることができる。したがって、本発明の抗体は、又は軽鎖定常ドメインを含有することができる。特定の実施形態に従うと、本発明の抗体は、マウス抗体又はヒト抗体の重鎖及び/又は軽鎖定常領域を含む。

【0035】

重鎖及び軽鎖定常領域に加えて、抗体は軽鎖及び重鎖可変領域を含有する。免疫グロブリン軽鎖又は重鎖可変領域は、「抗原結合部位」が割り込んだ「フレームワーク」領域からなる。抗原結合部位は、以下のとおり様々な用語及び符番スキームを用いて定義される：

(i) Kabat：「相補性決定領域」又は「CDR」は、配列の変動性に基づく（Wu and Kabat, J Exp Med. 132: 211-50, 1970）。一般に、抗原結合部位は、各可変領域に3つのCDR（例えば、重鎖可変領域（VH）にHC DR1、HC DR2、及びHC DR3、並びに軽鎖可変領域（VL）にLC DR1、LC DR2、及びLC DR3）を有する。

(ii) Chothia：用語「超可変領域」、「HVR」、又は「HV」は、Chothia及びLesk（Chothia and Lesk, J Mol Biol. 196: 901-17, 1987）により定義されているように、構造中で超可変性である抗体可変ドメインの領域を意味する。一般的に、抗原結合部位は、各VH（H1、H2、H3）及びVL（L1、L2、L3）に3つの超可変領域を有する。符番システム、並びにCDR及びHVのアノテーションは、Abhinandan及びMartin（Abhinandan and Martin, Mol Immunol. 45: 3832-9, 2008）により改訂されている。

(iii) IMGT：抗原結合部位を形成する領域の別の定義が、免疫グロブリン及びT細胞受容体のVドメインの比較に基づいて、Lefranc（Lefranc et al., Dev Comp Immunol. 27: 55-77, 2003）により提案されている。International Immunogenetics（IMGT）データベースが、標準化したこれらの領域の符番及び定義を提供している。CDR、HV、及びIMGTの描写の対応は、Lefranc et al., 2003, Idに記載されている。

(iv) AbM：Kabat及びChothiaの符番スキームの妥協点は、Martin（Martin ACR (2010) Antibody Engineering, eds Kontermann R, Dubel S (Springer-Verlag, Berlin), Vol 2, pp 33-51）に記載されている、AbM符番の取り決めである。

(v) 抗原結合部位は、「Specificity Determining Residue Usage」（SDRU）（Almagro, Mol Recognit. 17: 132-43, 2004）に基づいてもまた描写されることができ、ここでは、SDRは、抗原接触に直接関与する免疫グロブリンのアミノ酸残基を意味する。

【0036】

「フレームワーク」又は「フレームワーク配列」は、抗原結合部位の配列であると定義されるもの以外の、抗体の可変領域内の残りの配列である。抗原結合部位の正確な定義は、上述したような様々な描写により決定され得るため、正確なフレームワーク配列は、抗原結合部位の定義に依存する。フレームワーク領域（FR）は、より高度に保存された可変ドメインの部分である。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは各々、3つの超可変ループにより接続された、シート構成を一般的に用いる4つのFR（それぞれFR1、FR

10

20

30

40

50

2、FR3、及びFR4)を含む。各鎖の超可変ループはFRにより互いに緊密に折りたたまれ、他の鎖の超可変ループと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。抗体の構造分析により、相補性決定領域により形成される、配列と結合部位の形状との関係が明らかとなった(Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799-817, 1992; Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175-182, 1990)。これらの高い配列変動性にもかかわらず、6つのループのうち5つだけが、「標準構造」と言われる、小さなレパートリーの主鎖構造を採用する。これらの構造はまず、ループの長さにより決定され、次に、折りたたみ、水素結合、又は異常な主鎖構造を推定する能力により構造が決定される、ループ及びフレームワーク領域の特定の位置における鍵となる残基の存在により決定される。

10

【0037】

本明細書で使用する時、用語「抗原結合断片」は、例えば、ダイアボディ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、ジスルフィド安定化Fv断片(dsFv)、(dsFv)₂、二重特異性dsFv(dsFv-dsFv')、ジスルフィド安定化ダイアボディ(dsダイアボディ)、単鎖抗体分子(scFv)、単ドメイン抗体(sda)、scFv二量体(二価ダイアボディ)、1つ以上のCDRを含む抗体の一部分から形成される多重特異的抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、二価ドメイン抗体、又は抗原に結合するが完全な抗体構造を含まない任意の他の抗体断片などの抗体断片を指す。抗原結合断片は、親抗体又は親抗体断片が結合する同じ抗原に結合することができる。特定の実施形態に従うと、抗原結合断片は、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域、及び重鎖の定常領域のFdセグメントを含む。他の特定の実施形態に従うと、抗原結合断片はFab及びF(ab')を含む。

20

【0038】

本明細書で使用する時、用語「ヒト化抗体」とは、抗体の抗原結合特性が保持されるが、人体における抗原の抗原性が低下するように、改変により配列相同性をヒト抗体のそれに対して増加させた非ヒト抗体を意味する。

【0039】

本明細書で使用する時、用語「エピトープ」とは、免疫グロブリン、抗体又はその抗原結合断片が特異的に結合する、抗原上の部位を意味する。エピトープは、タンパク質の三次折りたたみにより並置された連続アミノ酸から、又は非連続アミノ酸からの両方で形成することができる。連続アミノ酸から形成したエピトープは、典型的には、変性溶媒にさらして保持されるが、三次折りたたみにより形成したエピトープは、典型的には、変性溶媒による処理で喪失される。エピトープは、典型的には、独自の空間構造の中に、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のアミノ酸を含む。エピトープの空間構造を決定する方法としては、例えば、x線結晶構造解析、及び2次元核磁気共鳴が挙げられる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照のこと。

30

【0040】

本明細書で使用する時、用語「タウ」又は「タウタンパク質」とは、複数のアイソフォームを有する、多くある中枢神経系及び末梢神経系のタンパク質を意味する。ヒト中枢神経系(CNS)において、長さが352~441個のアミノ酸のサイズの範囲となる、6つの主要なタウアイソフォームが、選択的スプライシングにより存在する(Hanger et al., Trends Mol Med. 15:112-9, 2009)。アイソフォームは、0~2個のN末端挿入、及び、3又は4個の一行に配列した微小管結合反復を制御して含めることにより互いに異なり、0N3R(配列番号:64)、1N3R(配列番号:65)、2N3R(配列番号:66)、0N4R(配列番号:67)、1N4R(配列番号:68)、及び2N4R(配列番号:69)と呼ばれる。本明細書で使用する時、用語「対照タウ」とは、リン酸化反応及び他の翻訳後修飾を欠いている、配列番号:69のタウアイソフォームを意味する。本明細書で使用する時、用語「タウ」は

40

50

、完全長野生型タウの変異（例えば点変異、フラグメント、挿入、欠失、及びスプライスパリアント）を含むタンパク質を含む。用語「タウ」はまた、タウアミノ酸配列の翻訳後修飾を包含する。翻訳後修飾としては、リン酸化が挙げられるが、これに限定されない。

【0041】

タウは、微小管に結合しており、タウのリン酸化によって調節され得るプロセスである、細胞を通じたカーゴの輸送を制御する。AD及び関連する疾患においては、タウの異常リン酸化が広く生じ、これは、タウの対らせん状細線維（PHF）と呼ばれる原線維への凝集の前に生じ、及び/又はその凝集を誘発すると考えられる。PHFの主要構成成分は、過剰リン酸化タウである。本明細書で使用する場合、用語「対らせん状細線維-タウ」又は「PHF-タウ」とは、対らせん状細線維中のタウのアグリゲートを意味する。PHF構造における2つの主要な領域は電子顕微鏡、ファジーコート、及びコア細線維により明らかであり、ファジーコートはタンパク質分解に敏感であり、細線維の外側に位置し、細線維のプロテアーゼ耐性コアは、PHFの主鎖を形成する（Wischik et al. Proc Natl Acad Sci USA. 85: 4884-8, 1988）。

10

【0042】

本明細書で使用する場合、「PHF-タウに結合する単離ヒト化抗体」、又は「単離ヒト化抗PHF-タウ抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない、ヒト化抗PHF-タウ抗体を意味することを意図する（例えば、単離ヒト化抗PHF-タウ抗体はPHF-タウ以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかし、単離ヒト化抗PHF-タウ抗体は、例えば他の種（PHF-タウ種のホモログなど）の他の関連抗原に対して交差反応性を有する。

20

【0043】

本明細書で使用する場合、用語「特異的に結合する（「specifically binds」又は「specific binding」）とは、本発明の抗PHF-タウ抗体が、約 1×10^{-6} Mか、又はそれよりタイトな、例えば、約 1×10^{-7} M以下、約 1×10^{-8} M以下、約 1×10^{-9} M以下、約 1×10^{-10} M以下、約 1×10^{-11} M以下、約 1×10^{-12} M以下、若しくは約 1×10^{-13} M以下の解離定数（ K_D ）にて、所定の標的に結合する能力を意味する。 K_D は、 K_a に対する K_d の比率（すなわち、 K_d / K_a ）から得られ、モル濃度（M）として表される。抗体の K_D 値は、本開示を考慮して当該技術分野における方法を用いて決定することができる。例えば、抗PHF-タウ抗体の K_D 値は、表面プラズモン共鳴を用いることにより、バイオセンサシステム、例えば、Biacore（登録商標）システム、Proteon機器（BioRad）、KinExA機器（Sapidyne）、ELISA、又は当業者に知られている競合結合アッセイを用いることなどにより、決定することができる。典型的には、抗PHF-タウ抗体は、例えばProteOn機器（BioRad）を使用した表面プラズモン共鳴によって測定した場合に、非特異的標的に対する K_D よりも少なくとも10倍低い K_D で所定の標的（すなわち、PHF-タウ）に結合する。しかし、PHF-タウに特異的に結合する抗PHF-タウ抗体は、他の関連標的、例えば他の種（ホモログ）の所定の同一標的に対する交差反応性を有することができる。

30

40

【0044】

本明細書で使用するところの「ポリヌクレオチド」なる用語は、同義的に、「核酸分子」、「ヌクレオチド」、又は「核酸」とも称され、非修飾RNA若しくはDNA又は修飾RNA若しくはDNAであってよい、任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを指す。「ポリヌクレオチド」としては、これらに限定されるものではないが、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖の領域の混合物であるDNA、一本鎖及び二本鎖RNA、並びに一本鎖及び二本鎖の領域の混合物であるRNA、一本鎖又はより典型的には二本鎖又は一本鎖及び二本鎖の領域の混合物であってよいDNA及びRNAを含むハイブリッド分子が挙げられる。加えて、「ポリヌクレオチド」は、RNA若しくはDNA又はRNA及びDNAの両方を含む三本鎖領域を指す。用語、ポリヌクレオチドに

50

は、1つ以上の修飾塩基を含有するDNA又はRNA、及び安定性若しくは他の理由により修飾された主鎖を有するDNA又はRNAも含まれる。「修飾」塩基は、例えば、トリチル化塩基及び異常な塩基、例えば、イノシンを含む。様々な修飾をDNA及びRNAに行うことができる。したがって、「ポリヌクレオチド」は、典型的に天然に認められるポリヌクレオチドの化学的、酵素的又は代謝的に修飾された形態、並びにウイルス及び細胞のDNA及びRNAの特徴を有する化学的形態を包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、比較的短い核酸鎖（多くの場合、オリゴヌクレオチドと呼ばれる）も包含する。

【0045】

本明細書で使用するときの「ベクター」なる用語は、別の核酸セグメントを機能的に挿入することによってそのセグメントの複製又は発現を行うことができるレプリコンのことである。

10

【0046】

本明細書で使用するときの「宿主細胞」なる用語は、本発明の核酸分子を含む細胞を指す。「宿主細胞」は、例えば、初代細胞、培養中の細胞、又は細胞株由来の細胞のいずれのタイプの細胞であってもよい。一実施形態では、「宿主細胞」は、本発明の核酸分子をトランスフェクトした細胞である。別の実施形態では、「宿主細胞」は、かかるトランスフェクトされた細胞の子孫又は潜在的な子孫である。ある細胞の子孫は、例えば、後続の世代で生じ得る変異若しくは環境の影響、又は宿主細胞ゲノムへの核酸分子の組み込みによって、親細胞との同一性を有していない場合がある。

【0047】

本明細書で使用するときの「発現」なる用語は、遺伝子産物の生合成を指す。かかる用語には、遺伝子のRNAへの転写が含まれる。また、かかる用語には、RNAの1つ以上のポリペプチドへの翻訳も含まれ、全ての天然に生じる転写後及び翻訳後修飾も更に含まれる。PHF-タウに結合する、発現したヒト化抗体又はその抗原結合断片は、宿主細胞の細胞質内に存在することができ、細胞培養液の増殖培地などの細胞外環境に入ることができ、又は細胞膜に固着することができる。

20

【0048】

本明細書で使用するときの「担体」なる用語は、あらゆる賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、バッファー、安定剤、可溶化剤、油、脂質、脂質含有小胞、マイクロスフェア、リポソーム封入体、又は医薬製剤で使用するための当該技術分野では公知の他の材料を指す。担体、賦形剤又は希釈剤の特性は、特定の用途の投与経路によって決まる点は理解されよう。本明細書で使用するころの「医薬上許容できる担体」なる用語は、本発明による組成物の効果又は本発明による組成物の生物活性を妨げない無毒性材料を指す。特定の実施形態によると、本開示を考慮して、抗体の医薬組成物での使用に好適ないずれの医薬上許容できる担体も、本発明において使用することができる。

30

【0049】

本明細書で使用するときの「対象」なる用語は、動物、好ましくは哺乳動物を指す。特定の実施形態によれば、対象は、非霊長類（例えば、ラクダ、ロバ、シマウマ、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ラット、ウサギ、モルモット又はマウス）、又は霊長類（例えば、サル、チンパンジー、又はヒト）を含む哺乳動物である。特定の実施形態では、対象はヒトである。

40

【0050】

本明細書で使用するときの「治療的有効量」なる用語は、対象に所望の生物学的又は薬理的応答を誘導する活性成分又は構成成分の量を指す。治療有効量は、記載される目的に対して経験的かつ一般的な方法で決定することができる。例えば、インビトロアッセイを任意選択的に用いて、最適な用量範囲を特定することができる。具体的な有効量の選択は、治療又は予防される疾病、伴う症状、患者の体重、患者の免疫状態、及び当業者が知っている他の因子を含むいくつかの因子の考慮に基づいて、当業者によって（例えば、臨床試験により）決定することができる。また、製剤に用いられる正確な用量は、投与経路及び疾患の重症度に応じて決まり、医師の判断及び各患者の状況に従って決定されるべき

50

である。有効量は、インビトロ又は動物モデル試験系から導かれる用量応答曲線から推定することができる。

【0051】

本明細書で使用する場合、用語「治療する (treat)」、「治療する (treating)」、及び「治療 (treatment)」は全て、タウ異常症に関連した少なくとも1つの測定可能な物理的パラメータの改善又は逆転を指すものであり、これは対象において必ずしも認識されとは限らないが、対象において認識可能な場合もある。「治療する (treat)」、「治療する (treating)」、及び「治療 (treatment)」なる用語はまた、疾患、障害、又は病態の退縮を生じる、その進行を防止する、又は少なくともその進行を遅らせることを指す場合もある。特定の実施形態では、「治療する (treat)」、「治療する (treating)」、及び「治療 (treatment)」は、タウ異常症に関連する1つ以上の症状の緩和、進展若しくは発症の予防、又はその期間の短縮を指す。特定の実施形態では、「治療する」、「治療する」、及び「治療」は、疾患、障害、又は病態の再発の防止を指す。特定の実施形態では、「治療する」、「治療する」、及び「治療」は、疾患、障害、又は病態を有する対象の生存率の向上を指す。特定の実施形態では、「治療する」、「治療する」、及び「治療」は、対象における疾患、障害、又は病態の消失を指す。

10

【0052】

本明細書で使用する時、「タウ異常症」は、脳内のタウの病理学的凝集を伴う任意の神経変性疾患を包含する。家族性及び特発性ADに加えて、他の例示的なタウ異常症は、染色体17 (FTDP-17)に関連したパーキンソン症候群による前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下神経膠症、線維濃縮変化優位型認知症、石灰化によるび慢性神経原線維濃縮、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン症候群認知症合併症、ダウン症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラールフォルデン-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、C型ニーマン・ピック病、プリオンタンパク質大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、神経原線維濃縮による非ガマニアン (Guamanian) 運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソン症候群、及び、拳闘家認知症 (ボクサー病) などの慢性外傷性脳症である (Morris et al., Neuron, 70: 410-26, 2011)。

20

【0053】

本明細書で使用するところの「併用される」なる用語は、対象への2種以上の治療薬の投与との関連において、複数の治療の使用を指す。「併用される」なる用語の使用は、治療が対象に投与される順序を限定しない。例えば、第1の治療 (例えば、本明細書に記載される組成物) を、対象への第2の治療の投与の前 (例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間前)、同時に、又はその後 (例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間後) に投与することができる。

30

40

【0054】

抗PHF-タウ抗体

一般的な一態様において、本発明は、PHF-タウに結合する単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。このような抗PHF-タウ抗体は、PHF-タウにてリン酸化エピトープを結合させる特性、又はPHF-タウにて非リン酸化エピトープを結合させる特性を有することができる。抗PHF-タウ抗体は治療薬として有用である場合があり、また、例えば組織又は細胞中での、生体サンプルにおけるPHF-タウを検出するための調査又は診断試薬としても有用である場合がある。

【0055】

特定の態様に従うと、本発明は、タウタンパク質のプロリンリッチなドメインにおける

50

エピトープにおいてリン酸化タウタンパク質に結合する単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。より具体的な態様において、本発明は、リン酸化T212及び/又はT217残基を含むエピトープにおいてリン酸化タウタンパク質に結合する単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。より具体的な態様において、本発明は、配列番号：48、52、及び54のいずれかのリン酸化エピトープに結合する単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。また更に具体的な態様において、本発明は、配列番号：48のリン酸化エピトープに結合する単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。本発明の抗体は、ヒト化抗体であることができる。

【0056】

表1は、配列番号によりホスホ-タウに結合する、5個のヒト化mAbの重鎖及び軽鎖可変領域を示す。重鎖及び軽鎖配列は、ヒト化mAb B296についてもまた示されている。このmAbは、親和性成熟していた(表3を参照)。

10

【0057】

表2は、Chothia、ABM、Kabatt、及びIMGT符番スキームに従い定義される、本発明の例示的抗体の抗原結合部位残基(すなわち、CDR領域)を示す。例示的な重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号：26~29に示し、例示的な軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号：31~34に示す。

【0058】

表3は、B296から生成した、親和性成熟モノクローナル抗体(すなわち、B333、B711、及びB809)の配列を示す。可変領域配列は重鎖及び軽鎖配列中で下線を引いている。親和性成熟モノクローナル抗体のCDR中の太字のアミノ酸は、B296CDR配列と比較した際の置換を示す。CDR配列はKabatt符番スキームにより決定される。

20

【0059】

【表1】

表1：ヒト化ホスホータウmAb

mAb	V _H	V _L	重鎖	軽鎖
B235	26	31		
B252	28	34		
B280	26	34		
B282	28	31		
B296	27	31	45	46

30

【0060】

【表 2】

表 2 : ヒト化抗 PHF-ータウ抗体 B 2 9 6 の VH (VH10) 及び VL (VL7) ドメイン用の CDR 配列

Chothia 符番スキーム			
V 領域 ID	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSY (配列番号:1)	SKGGN (配列番号:2)	GWGDYGWFA Y (配列番号:3)
VL7	KASQDINRYLN (配列番号:13)	RANRLLD (配列番号:14)	LQYDEFPLT (配列番号:15)
ABM 符番スキーム			
V 領域 ID	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSYAMS (配列番号:4)	SISKGGNTY (配列番号:5)	GWGDYGWFA Y (配列番号:6)
VL7	KASQDINRYLN (配列番号:16)	RANRLLD (配列番号:17)	LQYDEFPLT (配列番号:18)
Kabat 符番スキーム			
V 領域 ID	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	SYAMS (配列番号:7)	SISKGGNTYYPNSVKG (配列番号:8)	GWGDYGWFA Y (配列番号:9)
VL7	KASQDINRYLN (配列番号:19)	RANRLLD (配列番号:20)	LQYDEFPLT (配列番号:21)
IMGT 符番スキーム			
V 領域 ID	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSYA (配列番号:10)	ISKGGNT (配列番号:11)	ARGWGDYGWFA YW (配列番号:12)
VL7	QDINRY (配列番号:22)	RAN (配列番号:23)	LQYDEFPLT (配列番号:24)

10

20

【 0 0 6 1 】

【表 3 - 1】

表 3：親和性成熟 B 2 9 6

mAb	名称	配列番号	配列	
PT1B333				
	V _H	CDR1	80	SSYAMS
		CDR2	81	SISKGGNTYYADSVKG
		CDR3	9	GWGDYGWFAF
		重鎖	74	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVASISKGGNTYYADSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGWFA</u> <u>YWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA</u> <u>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS</u> <u>GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK</u> <u>VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK</u> <u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP</u> <u>VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA</u> <u>LHNHYTQKSLSLSPGK</u>
	V _L	CDR1	70	KASQDINRWLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		輕鎖	75	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRWLNWF</u> <u>QQKPGKAPKSLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDFT</u> <u>LTISLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKEIKRTV</u> <u>AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ</u> <u>WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK</u> <u>ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
PT1B711				
	V _H	CDR1	71	TSYAMS
		CDR2	72	SITKGGNTYYADSVKG
		CDR3	73	GWGIYGWFAF
		重鎖	76	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTSYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVASITKGGNTYYADSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGIYGWFAF</u> <u>WGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA</u> <u>GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG</u> <u>LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV</u> <u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK</u> <u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP</u> <u>VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA</u> <u>LHNHYTQKSLSLSPGK</u>
	V _L	CDR1	70	KASQDINRWLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		輕鎖	77	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRWLNWF</u> <u>QQKPGKAPKSLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDFT</u> <u>LTISLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKEIKRTV</u> <u>AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ</u> <u>WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK</u> <u>ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>

10

20

30

40

【 0 0 6 2 】

【表 3 - 2】

(表 3 の続き)

mAb	名称	配列番号	配列	
PT1B809				
	V _H	CDR1	71	TSYAMS
		CDR2	72	SITKGGNTYYADSVKG
		CDR3	73	GWGIYGFAY
		重鎖	78	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTSYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVASITKGGNTYYADSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGIYGFAY</u> <u>WGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL</u> <u>GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG</u> <u>LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK</u> <u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK</u> <u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP</u> <u>VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA</u> <u>LHNHYTQKSLSLSPGK</u>
	V _L	CDR1	19	KASQDINRYLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		軽鎖	79	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYLNWFQ</u> <u>QKPKGAPKSLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSDFTLT</u> <u>ISLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAA</u> <u>PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW</u> <u>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLKA</u> <u>DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>

10

20

【0063】

ヒト化抗体は、実質的にヒト抗体からの可変領域フレームワーク残基（「アクセプター抗体」と呼ばれる）、及び、実質的に非ヒト抗体（すなわち、マウス抗体）からの相補性決定領域（ドナー免疫グロブリンと呼ばれる）を有する。Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029 - 10033, 1989、国際公開第90/07861号、米国特許第5693762号、同第5693761号、同第5585089号、同第5530101号、及び同第5225539号を参照のこと。存在する場合、定常領域もまた実質的に、又は全体的にヒト免疫グロブリンに由来する。ヒト可変ドメインは通常、フレームワーク配列が、CDRが由来するマウス可変領域ドメインと高度な配列同一性を示す、ヒト抗体から選択される。重鎖及び軽鎖可変領域フレームワーク残基は、同一の又は異なるヒト抗体配列に由来することができる。ヒト抗体配列は、自然に生じるヒト抗体の配列であることができる、又は、いくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であることができる。国際公開第92/22653号を参照されたい。CDR構造及び/又は抗原への結合に対する有り得る影響に基づいて、ヒト可変領域フレームワーク残基からの特定のアミノ酸が、置換のために選択される。このような有り得る影響の調査は、モデリング、特定の位置におけるアミノ酸特性の検査、又は、特定のアミノ酸の置換若しくは変異誘発の影響についての実験的観察によるものである。

30

40

【0064】

例えば、アミノ酸の、マウス可変領域フレームワーク残基と選択されたヒト可変領域フレームワーク残基とが異なる場合、アミノ酸が、（1）抗原に直接非共有結合する、（2）CDR領域に隣接する、（3）別様においてはCDR領域と相互作用する（例えば、約6オングストロームのCDR領域の中に存在する）、又は（4）V_L-V_H界面に関与することが合理的に予想されるのであれば、ヒトフレームワークアミノ酸は通常、マウス抗体の等価なフレームワークアミノ酸により置換されるべきである。

【0065】

置換の他の候補は、その位置におけるヒト免疫グロブリンにとっては通常のものではな

50

い、アクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。これらのアミノ酸は、マウスドナー抗体の等価な位置のアミノ酸、又は、より典型的なヒト免疫グロブリンの等価な位置のアミノ酸で置換することができる。置換の他の候補は、その位置におけるヒト免疫グロブリンにとっては通常のものではない、アクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。ヒト化免疫グロブリンの可変領域フレームワークは通常、ヒト可変領域フレームワーク配列、又はそのようなコンセンサス配列に対して少なくとも85%の配列同一性を示す。

【0066】

抗体のヒト化は、公知の方法、例えば特異性決定残基のリサーフェニング (S D R R) (米国特許公開第2010/0261620号)、リサーフェニング (Padlane et al., Mol. Immunol. 28: 489-98, 1991)、スーパーヒト化 (国際公開第04/006955号)、及びヒトのストリング内容物の最適化 (米国特許第7657380号) を用いて達成することができる。グラフト化又はヒト化に有用なヒトフレームワーク配列は、当業者であれば関連するデータベースから選択することができる。選択したフレームワークを、Queen et al., 1989, Idに開示されているような技術により更に改変し、結合親和性を保存又は向上させることができる。特定の実施形態に従うと、マウス親抗体の抗PHF-タウ抗体をヒト化する方法としては、以下の実施例4に記載されているものが挙げられる。

【0067】

本発明の抗体は様々な技術により、例えばハイブリドーマ法 (Kohler and Milstein, Nature. 256: 495-7, 1975) により製造することができる。ドナー抗体 (典型的にはマウス) に由来する軽鎖及び重鎖可変領域と共に、アクセプター抗体 (典型的にはヒトなどの別の哺乳類種) に由来する軽鎖及び重鎖定常領域を含有するキメラモノクローナル抗体を、米国特許第4816567号に記載されている方法により調製することができる。非ヒトドナー免疫グロブリン (典型的にはマウス) に由来するCDRを有し、分子の残りの、免疫グロブリンに由来する部分は1種以上のヒト免疫グロブリンに由来する、CDRグラフトモノクローナル抗体を、例えば米国特許第5225539号に開示されている、当業者に知られている技術により調製することができる。非ヒト配列を全く欠いている完全ヒトモノクローナル抗体を、(Lonberg et al., Nature. 368: 856-9, 1994; Fishwild et al., Nat Biotechnol. 14: 845-51, 1996; Mendez et al., Nat Genet. 15: 146-56, 1997) を参照する技術により、ヒト免疫グロブリントランスジェニックマウスから調製することができる。ヒトモノクローナル抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーから調製及び最適化することができる (Knappik et al., J Mol Biol. 296: 57-86, 2000; Krebs et al., J Immunol Methods. 254: 67-84, 2001; Shi et al., J Mol Biol. 397: 385-96, 2010)。

【0068】

本発明のモノクローナル抗体は、配列番号: 1、4、7、10、71、80のいずれかのHC DR 1; 配列番号: 2、5、8、11、72、81のいずれかのHC DR 2; 配列番号: 3、6、9、12、73のいずれかのHC DR 3; 配列番号: 13、16、19、22、70のいずれかのLC DR 1; 配列番号: 14、17、20、23のいずれかのLC DR 2; 配列番号: 15、18、21、24のいずれかのLC DR 3を有する抗体を含む。本発明は、配列番号: 1、4、7、10、71、80のいずれかのHC DR 1; 配列番号: 2、5、8、11、72、81のいずれかのHC DR 2; 配列番号: 3、6、9、12、73のいずれかのHC DR 3; 配列番号: 13、16、19、22、70のいずれかのLC DR 1; 配列番号: 14、17、20、23のいずれかのLC DR 2; 配列番号: 15、18、21、24のいずれかのLC DR 3と少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、より好ましくは少なくとも99%の同一性を有するCDR配列を有するモノクローナル抗体もまた包含する

。

【0069】

特定の態様に従うと、本発明は、

(1) それぞれ配列番号：4、5、及び6のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、それぞれ配列番号：16、17、及び18のポリペプチド配列を有するLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；

(2) それぞれ配列番号：1、2、及び3のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、並びに、それぞれ配列番号：13、14、及び15のポリペプチド配列を有するLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；

(3) それぞれ配列番号：7、8、及び9のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、並びに、それぞれ配列番号：19、20、及び21のポリペプチド配列を有するLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；

(4) それぞれ配列番号：10、11、及び12のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、並びに、それぞれ配列番号：22、23、及び24のポリペプチド配列を有するLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；

(5) それぞれ配列番号：80、81、及び9のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、並びに、それぞれ配列番号：70、20、及び21のポリペプチド配列を有するLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；

(6) それぞれ配列番号：71、72、73のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、並びに、それぞれ配列番号：70、20、及び21のポリペプチド配列を有するLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；

(7) それぞれ配列番号：71、72、及び73のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、並びに、それぞれ配列番号：19、20、及び21のポリペプチド配列を有するLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；

(8) 配列番号：26のポリペプチド配列を有するV_H領域のHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、並びに、配列番号：31のポリペプチド配列を有するV_L領域のLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；

(9) 配列番号：28のポリペプチド配列を有するV_H領域のHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、並びに、配列番号：34のポリペプチド配列を有するV_L領域のLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；

(10) 配列番号：26のポリペプチド配列を有するV_H領域のHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、並びに、配列番号：34のポリペプチド配列を有するV_L領域のLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；又は

(11) 配列番号：28のポリペプチド配列を有するV_H領域のHCDR1、HCDR2、及びHCDR3、並びに、配列番号：31のポリペプチド配列を有するV_L領域のLCDR1、LCDR2、及びLCDR3；

を含み、

抗体又はその抗原結合断片が、PHF-タウ、好ましくはヒトPHF-タウに結合しており、重鎖可変領域ドメインのフレームワーク領域、及び軽鎖可変領域ドメインのフレームワーク領域は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を含む、

単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0070】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：26、27、28、若しくは29と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、又は、配列番号：31、32、33、若しくは34と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0071】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：74、76、及び78の重鎖の可変領域と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、又は、配列番号：75、77、及び79のいずれかの軽鎖の可変領域と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

10

【0072】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：26と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び、配列番号：31と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

20

【0073】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：28と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び、配列番号：34と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0074】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：26と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び、配列番号：34と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

30

【0075】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：28と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び、配列番号：31と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

40

【0076】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：27と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有

50

するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び、配列番号：31と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0077】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：74の重鎖の可変領域と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び、配列番号：75の軽鎖の可変領域と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

10

【0078】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：76の重鎖の可変領域と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び、配列番号：77の軽鎖の可変領域と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

20

【0079】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：78の重鎖の可変領域と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び、配列番号：79の軽鎖の可変領域と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

30

【0080】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：45と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖、及び、配列番号：46と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：45のポリペプチド配列を有する重鎖、及び配列番号：46のポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

40

【0081】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：74と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖、及び、配列番号：75と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を

50

有するポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：74のポリペプチド配列を有する重鎖、及び配列番号：75のポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0082】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：76と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖、及び、配列番号：77と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：76のポリペプチド配列を有する重鎖、及び配列番号：77のポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

10

【0083】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：78と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖、及び、配列番号：79と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。別の具体的な態様に従うと、本発明は、配列番号：78のポリペプチド配列を有する重鎖、及び配列番号：79のポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

20

【0084】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、ヒト重鎖IgG1定常領域及びヒト軽鎖定常領域を含む、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0085】

別の具体的な態様に従うと、本発明は、単離ヒト化抗体又はその抗原結合断片に関し、抗体又は抗原結合断片はヒトPHF-タウに、 5×10^{-9} M以下の解離定数(K_D)、好ましくは 1×10^{-9} M以下、又は 1×10^{-10} M以下の K_D で結合しており、 K_D は、Biacore又はProteinシステムを用いるなどの、表面プラズモン共鳴分析により測定される。

30

【0086】

PHF-タウに結合するヒト化抗体及びその抗原結合断片の機能活性は、当該技術分野において既知の方法により、そして本明細書に記載のとおり特性決定することができる。PHF-タウに結合する抗体及びその抗原結合断片の特性決定方法としては、Biacore、ELISA、及びFACS分析を含む親和性及び特異性アッセイ；免疫組織化学分析；タウシーディングの阻害における抗体の効能を測定するための、インビトロ細胞アッセイ及びインビボ注射アッセイ；抗体の、抗体依存性細胞介在性傷害(ADCC)、及び補体依存性細胞傷害(CDC)活性の存在を検出するための細胞傷害性アッセイ；等が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態に従うと、PHF-タウに結合する抗体及びその抗原結合断片の特性決定方法としては、以下の実施例5、6、8、及び9に記載するものが挙げられる。対照タウではなくPHF-タウに結合するヒト化抗体の、例示的なマウス親抗体は抗体PT3であり、これは配列番号：25の重鎖可変領域、及び配列番号：30の軽鎖可変領域を有する(例えば、米国特許第9,371,376号を参照のこと。この全容が参照により組み込まれる)。

40

【0087】

50

いくつかの公知の方法を用いて本発明の抗体の結合エピトープを決定することができる。例えば、両方の個別の構成成分の構造が知られている場合、インシリコでタンパク質-タンパク質ドッキングを行って、適合する相互作用部位を特定することができる。抗原抗体複合体を用いて水素-重水素(H/D)交換を行うことによって、抗体が結合する抗原の領域をマッピングすることができる。抗原のセグメント及び点変異誘導を用いることにより、抗体の結合に重要なアミノ酸の位置を特定することができる。抗体-抗原複合体の共結晶構造を使用して、エピトープ及びパラトープに寄与する残基を特定することができる。特定の実施形態に従うと、本発明の抗体の結合エピトープの決定方法としては、以下の実施例2、3、及び7に記載するものが挙げられる。

【0088】

本発明の抗体は、二重特異的又は多重特異的であってよい。例示的な二重特異的抗体は、PHF-タウの2つの異なるエピトープに結合することができるか、又はPHF-タウ及びアミロイドベータ(A β)に結合することができる。別の例示的な二重特異的抗体は、PHF-タウと、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、インスリン様成長因子-1受容体、及びリポタンパク質受容体等の内因性血液脳関門トランスサイトシス受容体とに結合することができる。例示的な抗体は、IgG1タイプである。

【0089】

本発明の抗体の免疫エフェクターの特性は、当業者には既知の技術により、Fc修飾によって強化又はサイレンシングすることが可能である。例えば、C1q結合、補体依存性細胞傷害(CDC)、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)、貧食、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体(BCR))の下方制御などのFcエフェクター機能は、これらの活性を担うFcの残基を修飾することによって提供及び/又は制御され得る。薬物動態学特性は、抗体の半減期を延ばすFcドメイン内で残基を変異させることによってもまた向上することができる(Strohl, Curr Opin Biotechnol, 20:685-91, 2009)。

【0090】

更に、本発明の抗体は、グリコシル化、異性化、脱グリコシル化、又はポリエチレングリコール部分の付加及び脂質化等の自然界では生じない共有結合修飾等のプロセスによって、翻訳後修飾してもよい。このような修飾はインビボ又はインビトロで行われ得る。例えば、本発明の抗体はポリエチレングリコールと接合(コンジュゲート)(PEG化)することによって薬物動態的なプロファイルを向上させることができる。接合(コンジュゲーション)は、当業者に既知の方法によって行うことができる。治療用抗体のPEGとのコンジュゲーションは、機能を妨げずに医薬動態を向上させることが示されている(Knight et al., Platelets, 15:409-18, 2004; Leong et al., Cytokine, 16:106-19, 2001; Yang et al., Protein Eng, 16:761-70, 2003)。

【0091】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする単離ポリヌクレオチドに関する。タンパク質のアミノ酸配列を変えずに、タンパク質のコード配列を変える(例えば置換する、欠失する、挿入するなど)ことができることが、当業者には理解されよう。したがって、本発明のヒト化抗体又はその抗原結合断片をコードする核酸配列は、タンパク質のアミノ酸配列を変えずに変更することができることが当業者には理解されよう。例示的な単離ポリヌクレオチドは、それぞれ配列番号:4、5、及び6に示す免疫グロブリン重鎖CDR HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むポリペプチド、又は、それぞれ配列番号:16、17、及び18に示す免疫グロブリン軽鎖CDR LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドである。他の例示的な単離ポリヌクレオチドは、本発明の抗体の可変領域をコードする、配列番号:36~39、又は41~44に示す配列を有するポリヌクレオチドである。遺伝コードの縮重又は所与の発現系におけるコドンの選好性を考慮すると、本発明の抗体をコードする他のポリヌクレオチドも本発

10

20

30

40

50

明の範囲内に含まれる。本発明の単離核酸は、公知の組み換え又は合成技術を用いて作製することができる。モノクローナル抗体をコードするDNAは、当該技術分野において公知の方法を用いて容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマが生成される場合、そのような細胞はそれらのDNAの供給源として機能することができる。あるいは、コード配列と翻訳生成物が結合したディスプレイ技術、例えばファージ又はリボソームディスプレイライブラリーを使用することができる。

【0092】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする単離ポリヌクレオチドを含むベクターに関する。プラスミド、コスミド、ファージベクター、又はウイルスベクターなどの、本開示の観点から当業者に公知の任意のベクターも使用することができる。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミドなどの組み換え発現ベクターである。ベクターは、例えば、プロモーター、リボソーム結合エレメント、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、及び複製起点という、発現ベクターの従来の機能を確立するための任意のエレメントを含むことができる。プロモーターは、常時発現型、誘導型、又は再形成可能なプロモーターであり得る。細胞に核酸を送達することができる多数の発現ベクターが当該技術分野において知られており、細胞内で抗体又はその抗原結合断片を製造するために、本明細書で使用することができる。従来のクローニング技術、又は人工遺伝子合成を使用して、本発明の実施形態に従った組み換え発現ベクターを生成することができる。

10

【0093】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする単離ポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関する。本開示の観点から、当業者に知られている任意の宿主細胞を、本発明の抗体又は抗原結合断片の組み換え発現に使用することができる。そのような宿主細胞は、真核細胞、細菌細胞、植物細胞又は古細菌細胞であってよい。例示的な真核細胞は、哺乳動物、昆虫、鳥類、又は他の動物由来のものであってもよい。哺乳類真核細胞としては、SP2/0（アメリカ培養コレクション（ATCC）、Manassas, Va, CRL-1581）、NS0（ヨーロッパ細胞培養コレクション（ECCACC）、Salisbury, Wiltshire, UK, ECCACC No. 85110503）、FO（ATCC CRL-1646）及びAg653（ATCC CRL-1580）ネズミ細胞株などといった、ハイブリドーマ又は骨髓腫の細胞株などの不死化細胞株が挙げられる。例示的なヒト骨髓腫細胞株は、U266（ATTC CRL-TIB-196）である。他の有用な細胞株としては、CHO-K1SV（Lonza Biologics）、CHO-K1（ATCC CRL-61、Invitrogen）、又はDG44などのチャイニーズハムスターの卵巣（CHO）細胞に由来するものが挙げられる。

20

30

【0094】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片の製造方法であって、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を製造する条件下において、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドを含む細胞を培養することと、細胞又は細胞培養液から（例えば上清から）、抗体又はその抗原結合断片を回収することを含む、方法に関する。発現した抗体又はその抗原結合断片を細胞から回収して、当該技術分野において通常的な技術に従い精製することができる。

40

【0095】

医薬組成物及び治療方法

本発明の抗PHF-タウ抗体、又は本発明のその断片は、脳内でのタウの病理学的凝集を伴う神経変性病、又はタウ異常症を有する患者、例えばADを患う患者における症状の治療、低減、又は予防に使用することができる。

【0096】

したがって、別の一般的な態様において、本発明は、本発明の単離モノクローナル抗体

50

又はその抗原結合断片、及び医薬上許容できる担体を含む、医薬組成物に関する。

【0097】

別の一般的な態様において、本発明は、タウ異常症などの病気、疾患又は状態の症状の治療又は低減を必要とする対象における、タウ異常症などの病気、疾患又は状態の症状の治療又は低減方法であって、対象に本発明の医薬組成物を投与することを含む、方法に関する。

【0098】

別の一般的な態様において、本発明は、病理学的タウ凝集の低下又はタウ異常症の拡大の低下を必要とする対象における、病理学的タウ凝集の低下又はタウ異常症の拡大の低下方法であって、対象に本発明の医薬組成物を投与することを含む、方法に関する。

10

【0099】

本発明の実施形態に従うと、医薬組成物は、治療有効量のモノクローナル抗PHF-タウ抗体又はその抗原結合断片を含む。ヒト化抗PHF-タウ抗体又はその抗原結合断片に言及して本明細書で用いられる場合、「治療有効量」とは、病気、疾患又は状態の治療をもたらす；病気、疾患又は状態の進行を予防する若しくは遅延させる；又は、免疫による病気、疾患又は状態に関連する症状を低減する若しくは完全に緩和する、モノクローナル抗PHF-タウ抗体又はその抗原結合断片の量を意味する。

【0100】

特定の実施形態によれば、治療有効量は、以下の効果のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、又はそれ以上を達成するのに十分な治療の量を指す：(i)治療される疾患、障害若しくは病態又はそれに関連する症状の重症度を低下又は改善すること、(ii)治療される疾患、障害若しくは病態、又はそれに関連する症状の期間を短縮すること、(iii)治療される疾患、障害若しくは病態、又はそれに関連する症状の進行を防止すること、(iv)治療される疾患、障害若しくは状態、又はそれに関連する症状の退縮を生じさせること、(v)治療される疾患、障害又は病態、又はそれに関連する症状の進展又は発症を予防すること、(vi)治療される疾患、障害又は病態、又はそれに関連する症状の再発を防止すること、(vii)治療される疾患、障害、若しくは状態、又はそれに関連する症状を有する対象の入院を減少させること、(viii)治療される疾患、障害若しくは状態、又はそれに関連する症状を有する対象の入院期間を短縮させること、(ix)治療される疾患、障害又は病態、又はそれに関連する症状を有する対象の生存率を高めること、(xi)治療される対象の疾患、障害若しくは状態、又はそれに関連する症状を阻害又は軽減すること、及び/又は(xii)別の治療の予防又は治療効果を強化又は改善すること。

20

30

【0101】

特定の実施形態に従うと、治療される病気、疾患又は状態はタウ異常症である。より具体的な実施形態に従うと、治療される病気、疾患又は状態としては、家族性アルツハイマー病、散発的アルツハイマー病、染色体17(F T D P - 17)に関連したパーキンソン症候群による前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下神経膠症、線維変化優位型認知症、石灰化によるび慢性神経原線維濃縮、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン症候群認知症合併症、ダウン症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラールフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、C型ニーマン・ピック病、プリオンタンパク質大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、神経原線維濃縮による非ガマニアン(Guamanian)運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソン症候群、慢性外傷性脳症、又は拳闘家認知症(ボクサー病)が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0102】

タウ異常症に関連する行動的表現型としては、認知障害、初期人格変化及び脱抑制、感情鈍麻、無為症、無言症、失行症、反復症、常同運動/拳動、口愛過度、混乱、連続タスクを計画又は組織化する能力の欠如、利己的行動/無神経、反社会的特徴、共感の欠如、

50

言葉のつかえ、錯誤的誤りは頻繁にあるが比較的理解力は保たれている失文症的な話し方、理解障害及び換語欠陥、緩徐進行性歩行不安定性、後方突進、すくみ、頻繁な転倒、非レボドパ反応性軸剛性、核上性注視麻痺、方形波痙攣、緩徐な垂直断続性運動、仮性球麻痺、四肢失行症、筋緊張異常、皮質性感覚消失、及び振戦が挙げられる。

【0103】

治療を受けやすい患者としては、AD又は他のタウ異常症のリスクがある無症候性の個体、及び現在症状を示している患者が挙げられるが、これらに限定されない。治療の影響を受けやすい患者としては、ADの家族歴又はゲノムにおける遺伝的リスク因子の存在等、ADの公知の遺伝的リスクを有する個体が挙げられる。例示的なリスク因子は、特に、位置717、並びに位置670及び671におけるアミロイド前駆体タンパク質（APP）の変異（それぞれ、Hardy及びSwedish変異）である。他のリスク因子は、プレセニン遺伝子PS1及びPS2、並びにApoE4における変異、高コレステロール血症又はアテローム性動脈硬化症の家族歴である。現在ADに罹患している個体は、上記リスク因子の存在によって特徴的な認知症から認識することができる。更に、ADを有する個体を特定するために、多数の診断試験が利用可能である。これらとしては、脳脊髄液のタウ濃度及びA_β42濃度の測定が挙げられる。タウ濃度の上昇及びA_β42濃度の低下は、ADの存在を表す。また、ADに罹患している個体は、AD及び関連障害の協会の基準によって診断することもできる。

10

【0104】

本発明の抗PHF-タウ抗体は、AD又は他のタウ異常症等、タウの病理学的凝集を伴う神経変性疾患を治療又は予防するための治療剤及び予防剤の両方に好適である。無症候性患者では、治療は何歳から開始してもよい（例えば、約10、15、20、25、30歳）。しかし、通常、患者が約40、50、60、又は70歳に達するまで治療を始める必要はない。治療は、典型的には、ある期間にわたる複数回投与を伴う。治療は、経時的に治療剤に対する抗体、又は活性化T細胞若しくはB細胞の応答を評価することによってモニタリングしてもよい。応答（反応）が低下した場合、追加用量を指示してよい。

20

【0105】

予防用途では、医薬組成物又は薬剤は、疾患の生化学的、組織学的、及び/又は挙動的な症状、その合併症、並びに疾患の発現中に提示される中間病理学的表現型を含む、疾患のリスクをなくす又は低減する、重症度を低下させる、又は疾患の発症を遅らせるのに十分な量で、ADに罹患しやすいか又はそうでなければADのリスクを有する患者に投与される。治療用途では、組成物又は薬剤は、疾患の症状（生化学的、組織学的、及び/又は挙動的）のいずれかを低減、阻止、又は遅延させるのに十分な量で、かかる疾患が疑われるか又は既に罹患している患者に投与される。治療薬の投与により、特徴的なアルツハイマー病状を未だ発現していない患者における軽度の認知障害を低減又はなくすことができる。

30

【0106】

治療有効量又は用量は、治療される疾患、障害又は病態、投与手段、標的部位、対象の生理学的状態（例えば、年齢、体重、健康状態を含む）、対象がヒトであるか動物であるか、投与される他の薬剤、及び、治療が予防的なものであるか治療的なものであるか、などの様々な因子によって異なり得る。治療用量は、安全性及び効能を最適化するために最適に漸増される。

40

【0107】

本発明の抗体は、医薬上許容できる担体内の活性成分として、治療有効量の抗体を含有する医薬組成物として調製することができる。担体は、液体、例えば水、及び落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油等の、石油、動物、植物、又は合成起源のものを含む油であってよい。例えば、0.4%生理食塩水及び0.3%グリシンを用いることができる。これらの溶液は滅菌され、一般には粒子状物質を含まない。これらは、従来から公知の滅菌技術（例えば、濾過）によって滅菌することができる。組成物は、生理学的条件に近似させるのに必要な医薬上許容できる補助物質、例えばpH調節剤、並びに緩衝剤、安定化剤、増粘

50

剤、潤滑剤、及び着色剤などを含有することができる。このような医薬配合物における本発明の抗体の濃度は広い範囲で、すなわち約0.5重量%未満から、通常は約1重量%又は少なくとも約1重量%から、最大15又は20重量%まで変えることができ、主に必要とされる用量、液の体積、粘度などに基づいて、選択される特定の投与様式に従って選択される。

【0108】

本発明の抗体を治療的に使用するための投与様式は、薬剤を宿主に送達する任意の好適な経路であってもよい。例えば、本明細書に記載する組成物は、非経口的投与、例えば皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻孔内、若しくは頭蓋内投与に好適であるように配合することができ、又は、脳若しくは脊椎の脳脊髄液内に投与することができる。

10

【0109】

治療は、単回投与スケジュール、又は複数回投与スケジュールで行ってもよく、複数回投与計画では、一次治療過程が1~10回の別個の投与と、応答を維持しかつ/又は強化するのに必要な後続の時間間隔で他の投与とを行い、例えば第2の投与を、1~4ヶ月で行い、また必要であれば、次の投与を数ヶ月後に行う。好適な治療スケジュールの例としては、(i)0、1ヶ月及び6ヶ月、(ii)0、7日及び1ヶ月、(iii)0及び1ヶ月、(iv)0及び6ヶ月、又は疾病の症候を軽減し、若しくは疾病の重症度を低下させることが期待される、所望の応答を誘発するのに十分な他のスケジュールが挙げられる。

【0110】

本発明の抗体は、保存のために凍結乾燥させ、使用前に好適な担体に溶解させることができる。この技術は、抗体及び他のタンパク質調製物に効果的であることが示されており、当該技術分野において公知の凍結乾燥及び溶解技術を用いることができる。

20

【0111】

特定の実施形態に従うと、タウ異常症の治療で使用される組成物を、関係する神経変性病の治療に効果的な他の作用物質と組み合わせて使用することができる。ADの場合、本発明の抗体は、アミロイドベータ(A β)の沈着を低減又は予防する作用物質と組み合わせて投与することができる。PHF-タウ及びA β の病理は相乗的である可能性がある。したがって、PHF-タウ、並びにA β 及びA β 関連病理の両方のクリアランスを同時に標的とする併用療法は、各々を個々に標的とするよりも効果的である場合がある。パーキンソン病及び関連する神経変性疾患の場合、 α -シヌクレインタンパク質の凝集形態をクリアランスするための免疫修飾も新たに開発された治療法である。タウ及び α -シヌクレインタンパク質のクリアランスを同時に標的とする併用療法は、いずれかのタンパク質を個々に標的とするよりも効果的であり得る。

30

【0112】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物の製造方法であって、医薬組成物を得るために、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を医薬上許容できる担体と組み合わせることを含む、方法に関する。

【0113】

診断方法及びキット

本発明のモノクローナル抗PHF-タウ抗体を、対象におけるAD又は他のタウ異常症の診断方法において使用することができる。

40

【0114】

したがって、別の一般的な態様において、本発明は、対象にPHF-タウが存在することを検出する方法、及び、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を使用して対象にPHF-タウが存在することを検出することにより、タウ異常症を診断する方法に関する。

【0115】

生体サンプルを診断抗体試薬と接触させ、対象のサンプルにおいて、診断抗体試薬のり

50

ン酸化タウへの結合を検出することにより、対象の生体サンプル（例えば血清、血漿、間質液、又は大脳脊髄液サンプル）においてリン酸化タウを検出することができる。検出を実施するためのアッセイとしては、公知の方法、例えばELISA、免疫組織化学法、ウェスタンブロット、又はインビトロイメージングが挙げられる。例示的な診断抗体は、本発明の抗体PT3である。

【0116】

診断抗体又は同様の試薬は、患者の体内に静脈内注射により投与することができ、又は作用物質を宿主に送達する任意の好適な経路により脳内に直接投与することができる。抗体の用量は、治療方法と同じ範囲内であるべきである。典型的には、抗体は標識されるが、いくつかの方法において、リン酸化タウに対して親和性を有する一次抗体は未標識であり、二次標識剤が、一次抗体に結合させるために用いられる。標識の選択は、検出手段に依存する。例えば、蛍光標識は、光学検出に好適である。常磁性標識の使用は、外科的介入のないトモグラフィ検出に好適である。また、放射標識は、PET又はSPECTを用いて検出され得る。

10

【0117】

診断は、対象由来のサンプル又は対象における、標識PHF-タウ、タウ凝集体、及び/又は神経原線維変化の数、大きさ、及び/又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、健全な個体の集団における平均レベルを表し得る。また、ベースライン値は、同じ対象において決定された以前の値を表す。

20

【0118】

また、上記の診断方法は、治療前、治療中、又は治療後の対象におけるリン酸化タウの存在を検出することによって治療に対する対象の応答をモニタリングするために用いることもできる。ベースラインに対する値の減少は、治療に対する陽性応答を示す。また、値は、病理学的タウが脳からクリアランスされたとき、生物学的流体において一時的に増加する場合がある。

【0119】

本発明は、更に、上記診断及びモニタリング方法を実施するためのキットに関する。典型的には、このようなキットには、本発明の抗体等の診断試薬と、任意選択的に検出可能な標識とが入っている。診断抗体自体は、直接検出可能であるか又は二次反応（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、蛍光標識、ビオチン等）を含有してもよい。あるいは、検出可能な標識を含有する第2の試薬を使用してもよく、この場合、第2の試薬は、一次抗体に対する結合特異性を有する。生物学的サンプルにおけるPHF-タウを測定するのに好適な診断キットでは、キットの抗体は、マイクロタイターディッシュのウェル等の固相に予め結合して供給され得る。

30

【0120】

本出願全体で引用した全ての引用参考文献（論文参考文献、交付済み特許、公開された特許出願、及び同時係属の特許出願を含む）の内容は、参照により本明細書に明白に組み込まれる。

【0121】

実施形態

本発明は以下の非限定的な実施形態も提供する。

40

【0122】

実施形態1は、タウタンパク質のプロリンリッチなドメインにおけるリン酸化エピトープにおいてリン酸化タウタンパク質に結合する、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片である。

【0123】

実施形態2は、タウタンパク質のリン酸化T212を含むリン酸化エピトープにおいてリン酸化タウタンパク質に結合する単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号：54のアミノ酸配列を有する、又はその中のリン酸化エピトープに結合するのが好ましい。

50

【 0 1 2 4 】

実施形態 3 は、タウタンパク質のリン酸化 T 2 1 7 を含むリン酸化エピトープにおいてリン酸化タウタンパク質に結合する単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号：5 2 のアミノ酸配列を有する、又はその中のリン酸化エピトープに結合するのが好ましい。

【 0 1 2 5 】

実施形態 4 は、タウタンパク質のリン酸化 T 2 1 2 及びリン酸化 T 2 1 7 を含むリン酸化エピトープにおいてリン酸化タウタンパク質に結合する単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号：4 8 のアミノ酸配列を有する、又はその中にあるリン酸化エピトープに結合するのが好ましい。

10

【 0 1 2 6 】

実施形態 5 は、

(1) それぞれ配列番号：4、5、及び 6 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、それぞれ配列番号：1 6、1 7、及び 1 8 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(2) それぞれ配列番号：1、2、及び 3 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：1 3、1 4、及び 1 5 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(3) それぞれ配列番号：7、8、及び 9 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：1 9、2 0、及び 2 1 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

20

(4) それぞれ配列番号：1 0、1 1、及び 1 2 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：2 2、2 3、及び 2 4 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(5) それぞれ配列番号：8 0、8 1、及び 9 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：7 0、2 0、及び 2 1 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(6) それぞれ配列番号：7 1、7 2、7 3 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：7 0、2 0、及び 2 1 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

30

(7) それぞれ配列番号：7 1、7 2、及び 7 3 のポリペプチド配列を有する H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、それぞれ配列番号：1 9、2 0、及び 2 1 のポリペプチド配列を有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(8) 配列番号：2 6 のポリペプチド配列を有する V_H 領域の H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、配列番号：3 1 のポリペプチド配列を有する V_L 領域の L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

(9) 配列番号：2 8 のポリペプチド配列を有する V_H 領域の H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、配列番号：3 4 のポリペプチド配列を有する V_L 領域の L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

40

(1 0) 配列番号：2 6 のポリペプチド配列を有する V_H 領域の H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、配列番号：3 4 のポリペプチド配列を有する V_L 領域の L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；又は

(1 1) 配列番号：2 8 のポリペプチド配列を有する V_H 領域の H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3、並びに、配列番号：3 1 のポリペプチド配列を有する V_L 領域の L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3；

を含み、

抗体又はその抗原結合断片が、P H F - タウと結合しており、

重鎖可変領域ドメイン及び軽鎖可変領域ドメインのフレームワーク領域が、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を含む、

50

単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

【0127】

実施形態6は、配列番号：26、27、28、若しくは29と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、又は、配列番号：31、32、33、若しくは34と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

10

【0128】

実施形態7は、配列番号：74、76、及び78の重鎖の可変領域と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、又は、配列番号：75、77、及び79のいずれかの軽鎖の可変領域と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

20

【0129】

実施形態8は、

(1) 配列番号：26のポリペプチド配列を有するV_H、及び配列番号：31のポリペプチド配列を有するV_L；

(2) 配列番号：28のポリペプチド配列を有するV_H、及び配列番号：34のポリペプチド配列を有するV_L；

(3) 配列番号：26のポリペプチド配列を有するV_H、及び配列番号：34のポリペプチド配列を有するV_L；

(4) 配列番号：28のポリペプチド配列を有するV_H、及び配列番号：31のポリペプチド配列を有するV_L；

(5) 配列番号：27のポリペプチド配列を有するV_H、及び配列番号：31のポリペプチド配列を有するV_L；

30

(6) 配列番号：74の重鎖のポリペプチド配列を有するV_H、及び配列番号：75の軽鎖のポリペプチド配列を有するV_L；

(7) 配列番号：76の重鎖のポリペプチド配列を有するV_H、及び配列番号：77の軽鎖のポリペプチド配列を有するV_L；又は

(8) 配列番号：78の重鎖のポリペプチド配列を有するV_H、及び配列番号：79の軽鎖のポリペプチド配列を有するV_L；

を含む、単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

【0130】

実施形態9は、配列番号：45と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する重鎖、及び、配列番号：46と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の同一性を有し、最も好ましくは100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する軽鎖を含む、単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

40

【0131】

実施形態10は、ヒト重鎖IgG1定常領域及びヒト軽鎖定常領域を含む、実施形態1～9のいずれか1つに記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

【0132】

50

実施形態 11 は、抗体又は抗原結合断片が、 5×10^{-9} M 以下の K_D 、好ましくは 1×10^{-9} M 以下、又は 1×10^{-10} M 以下の K_D でヒト PHF - タウに結合しており、 K_D は、Biacore システムを用いるなどにより、表面プラズモン共鳴分析により測定される、実施形態 1 ~ 10 のいずれかの単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

【0133】

実施形態 12 は、実施形態 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載のモノクローナル抗体又は抗原結合断片をコードする、単離核酸である。

【0134】

実施形態 13 は、実施形態 12 に記載の単離核酸を含む、ベクターである。

10

【0135】

実施形態 14 は、実施形態 13 に記載の核酸を含む、宿主細胞である。

【0136】

実施形態 15 は、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片、及び医薬上許容できる担体を含む、医薬組成物である。

【0137】

実施形態 16 は、病理学的タウ凝集の低減、又はタウ異常症の拡大の低減を必要とする対象における、病理学的タウ凝集の低減、又はタウ異常症の拡大の低減方法であって、対象に、実施形態 15 に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法である。

【0138】

実施形態 17 は、タウ異常症の治療を必要とする対象におけるタウ異常症の治療方法であって、対象に、実施形態 15 に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法である。

20

【0139】

実施形態 18 は、タウ異常症の治療を必要とする対象において、対象に、タウ異常症を治療するための追加の作用物質を投与することを更に含む、実施形態 17 に記載の方法である。

【0140】

実施形態 19 は、タウ異常症の治療を必要とする対象におけるタウ異常症の治療方法であって、対象に実施形態 15 に記載の医薬組成物を投与することを含み、タウ異常症は、家族性アルツハイマー病、散発的アルツハイマー病、染色体 17 (FTDP - 17) に関連したパーキンソン症候群による前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下神経膠症、線維変化優位型認知症、石灰化によるびまん性神経原線維濃縮、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン症候群認知症合併症、ダウン症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラールフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、C 型ニーマン・ピック病、プリオンタンパク質大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、神経原線維濃縮による非ガマニアン (Guamanian) 運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソン症候群、慢性外傷性脳症、及び拳闘家認知症 (ボクサー病) からなる群から選択される、方法である。

30

【0141】

実施形態 20 は、タウ異常症の治療を必要とする対象において、対象に、タウ異常症を治療するための追加の作用物質を投与することを更に含む、実施形態 19 に記載の方法である。

40

【0142】

実施形態 21 は、抗体又は抗原結合断片を製造する条件下において、抗体又は抗原結合断片をコードする核酸を含む細胞を培養することと、細胞又は細胞培養液から抗体又は抗原結合断片を回収することとを含む、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載のモノクローナル抗体又は抗原結合断片の製造方法である。

【0143】

実施形態 22 は、医薬組成物を得るために、抗体又は抗原結合断片を医薬上許容できる

50

担体と組み合わせることを含む、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載のモノクローナル抗体又は抗原結合断片を含む、医薬組成物の製造方法である。

【0144】

実施形態 23 は、タウ異常症の治療を必要とする対象において、タウ異常症の治療に使用するための、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

【0145】

実施形態 24 は、タウ異常症の治療を必要とする対象における、家族性アルツハイマー病、散発的アルツハイマー病、染色体 17 (FTDP-17) に関連したパーキンソン症候群による前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下神経膠症、線維変化優位型認知症、石灰化によるび慢性神経原線維濃縮、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン症候群認知症合併症、ダウン症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラールフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、C型ニーマン・ピック病、プリオンタンパク質大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、神経原線維濃縮による非ガマニアン (Guamanian) 運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソン症候群、慢性外傷性脳症、又は拳闘家認知症 (ボクサー病) などの、タウ異常症の治療に使用するための、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片、又は実施形態 15 に記載の医薬組成物である。

10

【0146】

実施形態 25 は、タウ異常症の治療を必要とする対象における、タウ異常症の治療における薬剤を製造するための、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片の使用である。

20

【0147】

実施形態 26 は、タウ異常症の治療を必要とする対象における、家族性アルツハイマー病、散発的アルツハイマー病、染色体 17 (FTDP-17) に関連したパーキンソン症候群による前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下神経膠症、線維変化優位型認知症、石灰化によるび慢性神経原線維濃縮、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン症候群認知症合併症、ダウン症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラールフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、C型ニーマン・ピック病、プリオンタンパク質大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、神経原線維濃縮による非ガマニアン (Guamanian) 運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソン症候群、慢性外傷性脳症、又は拳闘家認知症 (ボクサー病) などの、タウ異常症の治療用薬剤を製造するための、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片の使用である。

30

【0148】

実施形態 27 は、対象の生体サンプルにおけるリン酸化タウの存在を検出する方法であって、生体サンプルを、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の抗体又は抗原結合断片と接触させることと、対象のサンプルにおいて、抗体又は抗原結合断片の PHF - タウへの結合を検出することを含む、方法である。

40

【0149】

実施形態 28 は、生体サンプルが血液、血清、血漿、間質液、又は大脳脊髄液サンプルである、実施形態 27 に記載の方法である。

【0150】

実施形態 29 は、対象における、対象の生体サンプルでのリン酸化タウの存在を検出することによる、タウ異常症の診断方法であって、生体サンプルを、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の抗体又は抗原結合断片と接触させることと、対象のサンプルにおいて、抗体又は抗原結合断片の PHF - タウへの結合を検出することを含む、方法である。

【実施例】

50

【0151】

以下の本発明の実施例は、本発明の本質を更に説明するためのものである。以下の実施例は本発明を限定するものではなく、本発明の範囲は添付の請求項によって定められる点を理解されたい。

【0152】

実施例1：抗体の特性決定

PT3、及びAD脳からの、PHF-タウが富化した(ePHF-タウ)のBalb/cマウスの免疫付与に由来する1組の抗体を、直接酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ウェスタンブロット、及び免疫組織化学(IHC)で、ホスホ-タウ対非ホスホ-タウでの標的選択性について試験した。PT3は、配列番号：25の重鎖可変領域アミノ酸配列、及び配列番号：30の軽鎖可変領域アミノ酸配列を有するマウス-ハイブリドーマ由来の抗体である。PT3のVH及びVLドメインについてのCDR配列は、米国特許第9,371,376号に示されている。ヒトフレームワーク適応(HFA)法(実施例4を参照)を用いてPT3をヒト化し、本発明のヒト化抗-ホスホ-タウ抗体を生成した(表1及び2を参照)。ヒト化B296は、PT3と同じCDR配列を有する。ヒト化mAb B296は親和性成熟しており、本発明の更なる抗体を生成した(表3を参照)。

10

【0153】

ELISA

マウスIgG1(mIgG1)としての組み換えPT3を、ELISAフォーマットにおいて、富化PHF-タウ及び組み換えヒト野生型タウへの結合について評価した。この組み換えに由来するPT3を、ハイブリドーマ由来の精製PT3と比較した。結果は、精製ハイブリドーマ由来のPT3抗体バッチ、及び組み換え由来のPT3抗体のバッチの両方の間で相当の結合力価曲線を示した(図1)。強力な結合がPHF-タウには存在し、最小の結合がより高濃度にて可溶性タウに存在した。

20

【0154】

ウェスタンブロット

PT3を用いて、精製非リン酸化組み換えヒトタウ、及びAD脳から調製したサルコシル不溶性PHF-タウに対してウェスタンブロット分析を実施した。PT3は、ホスホ選択性参照抗体AT8 pS202/pT205/pS208と同様に、PHF-タウとの選択交差性を示した(Mercken et al., Acta Neuropathol. 84(3):265-72, 1992; Malia et al., Proteins. 84:427-434, 2016) and AT100 pT212/pS214(Mercken et al., 1992, Id.; Hoffmann et al., Biochemistry. 36(26):8114-24, 1997)(図2)。ホスホとは無関係の参照抗体HT7(Mercken, Ph.D. Thesis: University of Antwerp, Wilrijk-Antwerp, 1991)を、組み換えタウ及びPHF-タウの両方と反応させた。ホスホ選択性であるエピトープに向けられるBT2は、S199/S202においてリン酸化タウではなく、組み換えタウのみと反応した(Mercken, 1991, Id.)。他のウェスタンブロット実験では、PT3は、より高濃度にてブロットした際でも、組み換えタウとは弱い反応性を示した。

30

40

【0155】

ヒト脳における免疫組織化学法

AD及び対照脳の、ホルマリン固定したパラフィン埋め込み切片で免疫組織化学分析を実施し、in situでタウ異常症との反応性を確認した。PT3は、参照タウ異常症特異的診断抗体陽性対照AT8と同様の、しかしより強力な反応性パターンを示した(図3)。これらの実験条件下においては、対照脳の通常のタウとは、有意な反応が検出されなかった(図4)。

【0156】

野生型及びタウノックアウトマウスでの免疫組織化学法

50

IHC分析を、野生型及びノックアウトマウス脳のPT3で実施した。野生型マウス脳のPT3でのIHC分析では、最適なエピトープ保存条件下にて、野生型タウの選択的プールとの反応性を観察することが可能であることが示される。PT3の染色パターンにより、細胞体樹状突起の局在性(図5、矢印)が明らかとなり、ラット及びヒト生検由来組織の抗ホスホ-タウ抗体について、文献に記載された染色が想起される(Matsuo et al., Neuron, 13(4): 989-1002, 1994)。タウ-1抗体で観察された、タウの典型的な非ホスホ軸索染色パターン(図6、矢印)は存在せず、これは、PT3が微小管結合タウの生理学的に重要なプールとは限定的な反応性を有することを示している。タウノックアウト動物での反応性の欠如により、PT3染色パターンのタウ特異性が確認される。

10

【0157】

野生型マウス脳のPT3エピトープ(pT212/pT217、実施例2を参照)におけるリン酸化反応の存在は、Morris et al. (Nat Neurosci, 18(8): 1183-9, 2015)による、質量分光分析における、T212及びT217のマウスホモログにおいてリン酸化が検出されることにより支持される。PT3エピトープは、タウリン酸化及びアグリゲート形成の初期段階にもまた存在することが示唆され、このことは、治療用抗体エピトープに対して好ましい。

【0158】

表面プラズモン共鳴(SPR)による結合評価

PT1及びPT3抗PHF-タウ抗体について、Protein (Bio-Rad, Hercules, CA)及びBiacore (Biacore, Uppsala, Sweden)機器にてSPRを行うことにより、PHF-タウ及び組み換えタウとの相互作用を評価した。全てのタウ抗体HT7を陽性対照として試験し、AT8を参照抗PHF-タウ抗体として試験した。

20

【0159】

表4及び5は、PHF-タウ及び組み換えタウとの、抗体の親和性評価の代表的な結果を示す。PT3モノクローナル抗体は、PHF-タウに対して非常に強力な結合を示した(表4)。

【0160】

【表4】

30

表4: ハイブリドーマ並びに組み換えmAb及びFabの、PHF-タウとのProtein SPR親和性

mAb/Fabの名称	$k_{on}(1/MS)$	$k_{off}(1/s)$	$K_D(pM)^a$
HT7 mAb	$(7.06 \pm 0.62) \times 10^5$	$(9.26 \pm 2.77) \times 10^{-5}$	131 ± 41
PT1 mAb(hyb)	2.01×10^5	6.47×10^{-5}	322
PT3 mAb(rec mG2a)	$(3.12 \pm 0.40) \times 10^6$	$< 5.0 \times 10^{-5}$	≤ 16
PT3 Fab	$(1.83 \pm 0.08) \times 10^6$	$(1.15 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	63 ± 3
AT8 mAb(hyb)	$(2.30 \pm 0.19) \times 10^6$	$(2.11 \pm 0.07) \times 10^{-4}$	92 ± 8
AT8 Fab	$(8.89 \pm 0.87) \times 10^5$	$(2.30 \pm 0.14) \times 10^{-2}$	$25,844 \pm 2,995$

n 3の複製物に関しては、標準偏差を報告する;

40

hyb、ハイブリドーマにより発現したmAb; rec、組み換えmAb;

括弧内の^aK_D値は、75 nMの注射したmAb濃度を除外することにより得られた。

【0161】

組み換えPT3-mG2aの見かけの結合親和性(K_D)は、16 pMに等しいか又はこれより強く、非常に遅い解離速度を有した。組み換えタウへの非常に弱い結合のみが、4つの複製物のうちの1つにおける、ハイブリドーマにより発現したPT3に関して観察された(表5)。

【0162】

【表5】

表5：ハイブリドーマ並びに組み換えmAb及びFabの、組み換えタウとの
Biacore SPR親和性

mAb/Fabの名称	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)
HT7 mAb	$(3.86 \pm 2.00) \times 10^6$	$(1.18 \pm 0.54) \times 10^2$	$3,050 \pm 2,110$
PT1 mAb(hyb)		有意な結合は存在しない ^a	
PT3 mAb(hyb)		4つの複製物のうち1つにおいてのみ、弱い結合が観察された ^a	
PT3 mAb(rec mG2a)		結合せず ^a	
PT3 Fab		結合せず ^a	
AT8 mAb(hyb)		結合せず ^a	

10

hyb、ハイブリドーマにより発現したmAb；rec、組み換え：

^a Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo)製の組み換えタウ(5倍希釈液にて0.12~75nM)によりProteOnにて試験をし、その後凝集したと判断した。他の全ての試験サンプルについて、インハウスで生成した組み換えタウをBiacoreで使用した。

【0163】

エピトープの複数のコピーを有するPHF-タウの多重結合/凝集性質、及び、IgGの二価の性質のために、モノクローナル抗体の親和性が、本研究フォーマットの結合活性により影響を受けた。Fabの親和性は、抗体の固有親和性についての情報をもたらす。PT3 Fabは、PHF-タウへの強力な固有結合親和性($K_D = 63$ pM)、及び遅い解離速度を示した(表4)。Biacore SPRにおける、組み換えタウとのFabの反応性は、分析条件下において検出限界を下回っていた(表5)。

20

【0164】

特性決定研究により、PT3はPHF-タウに選択的に結合し、AD脳に由来するPHF-タウに対して高親和性を有することが示された。

【0165】

実施例2 - PT3のエピトープマッピング

表6に示すホスホペプチドのパネルを用いた表面プラズモン共鳴(ProteOn)により、PT3のエピトープを決定した。

30

【0166】

材料及び方法。PT3 Fab(B187)を、マウス可変領域及びヒトIgG1/定常領域を有するキメラ版として作製し、重鎖のC末端に6xHisタグが存在する(VH10、配列番号：25及びVL7、配列番号：30)。FabをHEK293細胞の一時的発現により作製し、Ni-アフィニティクロマトグラフィーにより精製し、20mMのTris(pH7.4、50nMのNaCl)(Sino Biologicals)に透析した。

【0167】

表6に示す14個のタウホスホペプチドの各々に対する、PT3 Fabの結合親和性を、Bio-Rad ProteOn XPR36を使用して表面プラズモン共鳴(SPR)により評価した。短鎖ビオチン、及びN末端のPEG4部分を用いる標準的な化学的方法により、ペプチド(New England Peptide)を合成した。ビオチン化ペプチドを、ニュートラアビジンでコーティングしたNLCバイオセンサチップ上で捕捉し、PT3 Fabを表面に流して反応速度論的パラメータを測定した。

40

【0168】

全ての実験は、25にて、ランニング緩衝液及びサンプル希釈緩衝液の両方としてリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4、0.005% Tween20(PBST))を使用して実施した。サンプルをランニングする前に、チップ表面にPBSTを1時間ランニングすることにより、NLCチップをコンディショニングした。ペプチドをPBST中で10ng/mLまで希釈し、30μL/分にて100秒流路上に注入することにより、約5

50

~ 10RUのペプチドをチップ表面上に捕捉した。PT3 Fabの連続希釈液(1.1~90nM)を分析し、ペプチド-8を除いて、各濃度を重複して測定した。ペプチドの捕捉後、抗体滴定には、緩衝液のみを、60μL/分にて3分間(会合段階)、続いて300秒間、注入した(解離段階)。

【0169】

スポット間の応答を差し引くことによりデータを二重参照し、緩衝液のみを注入することにより、曲線を生成した。30μL/分で100秒の接触時間にわたり、0.85%リン酸を一度注入し、続いて、次の抗体滴定注入の前にランニング緩衝液を4回注入することで、チップ表面を再生した。データ処理及び反応速度論的解析を、機器ソフトウェアを使用して行った。単純なラングミュア1:1結合モデルを用いてデータを分析した。

10

【0170】

結果。PT3 Fabの反応速度論的速度定数及び平衡結合親和性を表6に示す。

【0171】

【表6】

表6: PT3 Fabのペプチドへの結合についての、Protein SPR親和性データ

ペプチド名	ホスホリル化部位	配列***	平均KD (nM)	KD範囲又はSTDEV(nM)	平均ka (1/Ms)	ka範囲又はSTDEV(1/Ms)	平均kd (1/s)	kd範囲又はSTDEV(1/s)	複製物の数
ペプチド-1	212/214/217	GTPGSRSR(pT)P(pS)LP(pT)PPTREPKK(配列番号:47)	0.26	0.14-0.38	1.27E+06	(0.87-1.67)E+06	2.80E-04	(2.36-3.24)E-04	2
ペプチド-2	212/217	GTPGSRSR(pT)PSLP(pT)PPTREPKK(配列番号:48)	0.27	0.09-0.45	7.64E+05	(5.46-9.82)E+05	1.68E-04	(0.91-2.45)E-04	2
ペプチド-3*	214/217	GTPGSRSRTP(pS)LP(pT)PPTREPKK(配列番号:49)	5.57	1.64	1.04E+06	2.83E+06	5.47E-03	1.77E-04	3
ペプチド-4	210/217	GTPGSR(pS)RTPSLP(pT)PPTREPKK(配列番号:50)	6.60	6.48-6.71	9.68E+05	(9.22-9.68)E+05	6.27E-03	(6.19-6.27)E-03	2
ペプチド-5	210/214/217	GTPGSR(pS)RTP(pS)LP(pT)PPTREPKK(配列番号:51)	8.70	6.6-10.8	7.04E+05	(5.45-8.63)E+05	5.84E-03	(5.69-5.98)E-03	2
ペプチド-6	217	GTPGSRSRTPSLP(pT)PPTREPKK(配列番号:52)	11.4	10.9-11.9	5.41E+05	(5.24-5.58)E+05	6.16E-03	(6.06-6.25)E-03	2
ペプチド-7	212/214	GTPGSRSR(pT)P(pS)LPTPPTREPKK(配列番号:53)	13.5	11.3-15.7	4.22E+05	(3.57-4.87)E+05	5.55E-03	(5.49-5.60)E-03	2
ペプチド-8**	212	GTPGSRSR(pT)PSLPTPPTREPKK(配列番号:54)	23	n/a	2.81E+05	n/a	6.46E-03	n/a	1
ペプチド-9	214	GTPGSRSRTP(pS)LPTPPTREPKK(配列番号:55)	>500	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1
ペプチド-10	210/214	GTPGSR(pS)RTP(pS)LPTPPTREPKK(配列番号:56)	>500	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	2
ペプチド-11#	208/212/214	SPGTPG(pS)RSR(pT)P(pS)LPTPPT(配列番号:57)	結合せず	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1
ペプチド-12	210	GTPGSR(pS)RTPSLPTPPTREPKK(配列番号:58)	結合せず	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	2
ペプチド-13	214/220	GTPGSRSRTP(pS)LPTPP(pT)REPKK(配列番号:59)	結合せず	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	2
ペプチド-C	なし	GTPGSRSRTPSLPTPPTREPKK(配列番号:60)	結合せず	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	4

20

30

n = 2 について、範囲を報告する；

* ペプチド - 3 について、n = 3 であり、標準偏差を報告する；

** ペプチド - 8 について、n = 1 であり、平均又は範囲は報告されない；

*** 注記しない限り、全てのペプチドはタウ残基204~225を含み(アイソフォーム2N4R)、N末端に短鎖ビオチン部位(SCBiot)及びdPEG4、並びにC末端にアミドを含有する。

ペプチド - 11 は、タウ残基202~220を含む(アイソフォーム2N4R)。

【0172】

PT3 Fabは、T212又はT217がリン酸化したペプチドにナノ分子結合したことを示し、PT3 Fabの結合は、T212及びT217の両方がリン酸化した際に向上した。PT3 Fabは、pT212及び/又はpT217を含有するペプチドに最も良く結合した。PT3 Fabは、T212/T217がリン酸化したタウペプチド(ペプチド-2)、及びT212/S214/T217がリン酸化したタウペプチド(ペプチド-1)に、同様の親和性で結合し、このことは、S214における追加のリン酸化が、PT3 Fabの結合を向上させないことを示している。PT3 Fabは、pS214-タウペプチド(ペプチド-9)に非常に弱い結合のみを有した。S210が単独で、又は他のリン酸化残基と組み合わせるとリン酸化された場合、結合はほとんど、ないしは全く観察されなかった。T220のリン酸化は、PT3 Fabに対する結合活性の喪失に寄与するようであった(ペプチド-9対ペプチド-13)。非リン酸化タウペプチド(ペ

40

50

プチド - C) に対して、PT3 Fab の結合活性は検出されなかった。PT3 はタウの
 プロリンリッチなドメイン内のホスホエピトープに結合する。

【0173】

結合の検討は、PT3 エピトープが pT212 及び pT217 を含むこと、並びに、PT3
 の最大結合エピトープが、二重リン酸化した pT212 / pT217 - タウを含むこと
 を示唆している。PT3 のエピトープは、ホスホ依存性の抗タウ抗体用の、報告されて
 いる他のエピトープ、例えば AT8 (pS202 / pT205 / pS208 ; Malia
 et al. , 2016 Id.)、AT180 (pT231 ; Goedert et
 al. , Biochemical J. 301 (Pt3) : 871 - 877)、AT2
 70 (pT181 ; Goedert et al. , Id.)、PHF1 (pS396 /
 pS404 ; Otvos et al. , J Neurosci Res. 39 (6) :
 669 - 73 , 1994)、12E8 (pS262 ; Seubert et al. , J
 Biol Chem. 270 (32) : 18917 - 22 , 1995)、抗タウ pS4
 22 抗体 (Collin et al. , Brain. 137 (Pt 10) : 2834
 - 46 , 2014)、及び抗タウ pS409 抗体 (Lee et al. , Cell R
 ep. 16 (6) : 1690 - 700 , 2016) とは異なる。

10

【0174】

実施例 3 - PT3 Fab + pT212 / pT217 - タウペプチド複合体の結晶構造
 X線結晶構造解析により、2つのタウホスホペプチドを有する PT3 Fab (B18
 7) の共構造を測定し、これにより、タウエピトープ及び PT3 パラトープの同定を行っ
 た。

20

【0175】

サンプル調製及び結晶化。New England Peptides により結晶化用
 のペプチドを合成した。これは、以下の配列を有した：残基 T212、S214、及び T
 217 がリン酸化した、タウ - 441 (2N4R アイソフォーム) の残基 207 ~ 220
 に対応する、Ac - GSRSR (pT) P (pS) LP (pT) PPT - OH (配列番号
 : 61) (pT212 / pS214 / pT217 - タウペプチド)、並びに、T212 及
 び T217 がリン酸化した、残基 210 ~ 222 に対応する Ac - SR (pT) PSLP
 (pT) PPTRE - OH (配列番号 : 62) (pT212 / pT217 - タウペプチド
)。凍結乾燥したペプチドを 100 mM の Tris (pH 8.5、約 55 mg / mL) に
 溶解させた。

30

【0176】

PT3 Fab を 19.64 mg / mL 又は 17.76 mg / mL まで濃縮し、10.
 7 モル過剰、又は 9.3 モル過剰の pT212 / pS214 / pT217 - タウペプチド
 、又は pT212 / pT217 ペプチドと混合し、それぞれ、20 mM の Tris (pH
 7.5) 中で 16.9 mg / mL、及び 100 mM 又は 50 mM の NaCl 中で 16.7
 mg / mL の最終複合体濃度にした。Mosquito 結晶化ロボットを使用し、150
 nL の複合体及び 150 nL のリザーバ溶液を混合して、インハウススクリーン及び PEG
 (QiaGen) により、結晶化を実施した。回折用結晶を、以下の条件で入手した：
 0.1 M のアセテート (pH 4.5)、18% の PEG3350、0.2 の MgCl₂ 中
 の、PT3 Fab + pT212 / pS214 / pT217 - タウペプチド複合体、及び
 20% の PEG3350、0.2 M のリン酸アンモニウム (一塩基性) 中の PT3 Fa
 b + pT212 / pT217 - タウペプチド複合体。

40

【0177】

データ収集及び構造測定。PT3 Fab + pT212 / pS214 / pT217 - タ
 ウペプチド複合体の結晶を、0.1 M のアセテート (pH 4.5)、18% の PEG33
 50、0.2 M の MgCl₂ (母液) から回収し、20% グリセロールを補充した母液か
 らなる凍害防止溶液と混合した。液体窒素中で結晶を急速冷却し、OsmicTM Va
 rriMax (商標) 共焦点光学素子、Saturn 944 CCD 検出器、及び X - s
 tream (商標) 2000 凍結冷却システム (リガク) を装着した、Rigaku M

50

MicroMaxTM-007HF 微焦点 X 線発生器でデータを収集した。

【0178】

データを XDS (Kabsch, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 66 (Pt 2): 125-32, 2010) で処理した。Fab H3-23: L1-39 (PDB ID: 5I19) Fab を研究モデルとして使用し、PHENIX スイートのプログラム (Adams et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 66 (Pt 2): 213-21, 2010) にて、フェーザー (McCoy et al., J Appl Crystallogr. 40 (Pt 4): 658-674, 2007) を用いて分子交換を実施した。Phenix.xtriage により、7% 双晶画分による結晶中で、擬欠面双晶を同定した。大多数のモデルビルディングについて双晶精密化を用いて、精密化を実施した。モデルビルディングには Coot (Emsley and Cowtan, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 60 (Pt 12 Pt 1): 2126-32, 2004) を用い、精密化には phenix.refine (Adams et al., 2010, Id.) を用いた。双晶精密化はマップを改善しなかったことが後で判明したため、精密化の最終段階では、双晶精密化を用いなかった。データ及び精密化の統計を表 7 に示す。

10

【0179】

【表 7】

表 7: X 線データ及び精密化の統計

20

	PT3 Fab+pT212/pS214/ pT217-タウペプチド複合体	PT3 Fab+pT212/pT217- タウペプチド複合体
ビームライン/検出器	Rigaku MicroMax-007HF/ Saturn 944	APS IMCA-CAT/Pilatus 6M
データ		
波長 (Å)	1.5418	1.000
解像度範囲 (Å)	30-2.5(2.6-2.5)	8.94-2.0(2.05-2.00)
空間群	C2	C2
単位細胞軸 (Å)	125.21, 83.50, 167.41	126.24, 83.66, 166.87
単位細胞角度 (°)	90.00, 91.71, 90.00	90.00, 92.50, 90.00
分子/非対称単位	3	3
V_m (Å ³ /Da)/溶媒 (%)	2.92/58	3.08/60
完全性 (%)	97.0(89.3)	99.2(99.6)
R_{merge}	0.108(0.318)	0.053(0.555)
平均 $I/\sigma(I)$	4.9(1.7)	13.09(2.49)
観測された反射数	177373(11739)	384718(27833)
特異的反射数	57942(3878)	116430(8607)
B 因子 (Wilson) (Å ²)	29.1	36.49
精密化の統計		
原子数	11165	10968
水分子の数	961	779
R_{work}/R_{free} (%)	19.4/23.1	18.6/21.3
理想的な幾何学的配置からの、 R. m. s. d.		
結合長 (Å)	0.005	0.008
結合角度 (°)	1.005	1.215
B 因子の平均値 (Å ²)	26.87	41.2
ラマチャンドラプロット		
好ましい領域中の残基 (%)	97.23	98.31
許容される領域内の残基 (%)	2.47	1.62
アウトライヤー (%)	0.31	0.08

30

40

最高の解像度シェルについての値を、括弧内に示す。

【0180】

PT3 Fab + pT212 / pT217 - タウペプチド複合体の単結晶を、結晶化液

50

滴から取り出し、20%グリセロールを補充したリザーバ溶液(20%のPEG3350、2Mリン酸アンモニウム(一塩基性))中に数秒間浸漬させ、液体窒素中で急速冷却した。Advanced Photon Source (Argonne, IL) IMCA-CATビームライン17-ID-Bにて、100Kでデータを収集した。画像半度当たり0.5秒の曝露時間で、180°回転でPilatus 6M検出器にて回折強度を収集した。XDS (Kabsch, 2010, Id.)でデータを、2.0の最大解像度まで処理した。調査モデルとしてPT3 Fab+pT212/pS214/pT217-タウペプチド構造を使用して、プログラムフェーザー (McCoy et al., 2007, Id.)での分子交換により、構造を決定した。NCS (Adams et al., 2010, Id.)を使用して、phenix.refineにより構造精密化を行った。プログラムCoot (Emsley及びCowtan, 2004, Id.)を使用して、モデル調節を実施した。X線データ収集及び精密化の統計を、表7に示す。4.0の距離カットオフを用いて、CONTACT (Collaborative Computational Project, Number 4, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 50 (Pt 5): 760-3, 1994)により分子間接触距離を計算し、Pymolにより目視検査した。

【0181】

構造分析。pT212/pS214/pT217-タウペプチドを有するPT3 Fabの構造を、2.5の解像度で測定した。PT3 Fab+pT212/pT217-タウペプチド構造について以下で記載するように、非対称ユニット当たり、複合体の3つのコピーが存在する。T212及びT217もまたリン酸化された場合に、PT3はpS214のホスフェートとは相互作用しない(データは図示せず)ことが、構造により示され、このことは、Protonによるホスホペプチドマッピングにより支持される(実施例2)。

【0182】

pT212/pT217-タウペプチドを有するPT3 Fabの構造を、2.0の解像度にてX線結晶構造解析により決定した(図7)。非対称ユニット中には複合体の3つのコピー(コピー1:鎖A、C、E;コピー2:鎖B、D、F;コピー3:鎖H、L、P)が存在し、これらは重鎖A、C、及びH、軽鎖B、D、及びL、並びにペプチド鎖E、F、及びPからなる。3つのコピーは非常に類似しており、可変領域は0.3 rmsd以内であった。図7~8は、コピー3(鎖H、L、P)のものである。図7に示すように、Fab重鎖及び軽鎖は浅い結合ポケットを形成し、ペプチドがFabを横切って配置される。タウホスホペプチドは、ポリプロリン-IIヘリックス二次構造に一致する特徴を有する、延びた構造の中にある。

【0183】

相互作用海面を含む、PT3 Fabパラトープ及びpT212/pT217-タウペプチドエプトープ残基を、図8及び9、並びに表8に示す。PT3とそのエプトープペプチドとの界面はファン・デル・ワールス及び静電相互作用で構成され、ペプチド残基211から221まで延びる。pT212/pT217-タウペプチドとの複合体中のPT3 Fabの構造は、エプトープがpT212及びpT217のホスフェートを含むことを示す。重鎖Y32ヒドロキシル基は、pT212のホスフェート酸素と重要な水素結合を形成する。T28(VH)の側鎖のヒドロキシル基もまた、pT212のホスフェート酸素と水素結合を形成する。重鎖K53は、鍵となる塩橋相互作用をpT217と形成する。重鎖W99は、ペプチドのL215及びP216の側鎖残基と疎水性相互作用を形成する。重鎖残基W104は、ペプチドと広範囲にわたる相互作用を有し、また、VH/VL界面の一部を形成する。軽鎖Y32は、P219と疎水性相互作用を形成する。pT212及びpT217のホスフェートとの静電相互作用は、ホスホ-タウに対するPT3の選択性に決定的なものであり、疎水性相互作用は更に、pT212/pT217-タウ(実施例5)並びにPHF-タウ(実施例1及び6)に対する、PT3の高親和性に寄与する。

。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 4 】

表 8 : P T 3 F a b + p T 2 1 2 / p T 2 1 7 - タウペプチドのエピトープ及びパラトープ。p T 2 1 2 / p T 2 1 7 - タウペプチド残基と相互作用する P T 3 F a b V H 又は V L からの残基が示される。水素結合相互作用を太字の活字で示す。

【 0 1 8 5 】

【 表 8 】

V _H	ペプチド	V _L
T28	R211	
F27、T28、S31、Y32	pT212	
S31	P213	
S31、K53	S214	
S31、Y32、K53、W99	L215	
W99、G100	P216	
S52、K53、W104	pT217	
W99、G100、G103、W104	P218	
G100、D101	P219	Y32
W104	T220	Y91、D92、E93、F94、L96
	R221	D92、E93、F94

10

【 0 1 8 6 】

実施例 4 - P T 3 に対するヒトフレームワーク適合

ヒトフレームワーク適合 (HFA) 法 (Fransson et al., J Mol Biol. 398 (2) : 214 - 31, 2010) を使用して、抗タウマウス抗体 P T 3 をヒト化した。Martin (Martin and Thornton, J Mol Biol. 263 (5) : 800 - 15, 1996) に従い、ヒトフレームワーク適合のため、CDR を規定した。ヒト化 H C 及び L C の最も良い組み合わせを発見するために、いくつかのヒト重鎖 V 領域配列及び軽鎖 V 領域配列を試験のために選択した。4 つのヒトフレームワーク適合 P T 3 重鎖可変領域、及び 4 つのヒトフレームワーク適合 P T 3 軽鎖可変領域を設計し、完全ヒト重鎖 I g G 1 及びヒト軽鎖 分子として生成した (図 1 0) 。フレームワーク領域 (F R) のみの中のマウス P T 3 V H 及び V L に対する配列類似性に基づいて、ヒト生殖細胞系 V 遺伝子 (V H に関して 4 つ : I G H V 3 - 2 3 * 0 1、I G H V 3 - 3 3 * 0 1、I G H V 3 - 1 1 * 0 1、及び I G H V 1 - 3 * 0 1 ; V L に関して 4 つ : I G V K 1 - 1 6 * 0 1、I G V K 1 - 1 6 * 0 1 +、I G K V 1 - 3 9 * 0 1、及び I G K V 2 - 2 4 * 0 1) を、ヒトフレームワーク適合 V H 及び V L 多様体を製造するために選択した。V L 7 8 (I G V K 1 - 1 6 * 0 1 +) は V L 7 7 (I G V K 1 - 1 6 * 0 1) の単一点変異体であり、潜在的な異性化のリスクを排除するために、D 5 6 S 変異を含有する。4 つの H F A H C 及び 4 つの H F A L C 分子を組み合わせ得られる、1 6 個の H F A 多様体モノクローナル抗体の名称を、表 9 に示す。

20

30

【 0 1 8 7 】

表 9 : H F A - P T 3 多様体。B 2 3 4 はマウス親可変領域を含有し、陽性対照として含められた。対応するヒト生殖細胞系遺伝子を括弧の中に示す。V L 7 8 (I G V K 1 - 1 6 * 0 1 +) は V L 7 7 (I G V K 1 - 1 6 * 0 1) 単一点変異を含有する。

【 0 1 8 8 】

40

【表 9】

	VH10 (PT3) (配列番号: 35)	VH91 (IGHV3- 23*01) (配列番号: 36)	VH92 (IGHV3- 33*01) (配列番号: 37)	VH93 (IGHV3- 11*01) (配列番号: 38)	VH94 (IGHV1- 3*01) (配列番号: 39)
VL7 (PT3) (配列番号:40)	B234				
VL77 (IGVK1-16*01) (配列番号:41)		B235	B296	B282	B268
VL78 (IGVK1-16*01+) (配列番号:42)		B250	B236	B297	B283
VL79 (IGKV1-39*01) (配列番号:43)		B265	B251	B237	B298
VL80 (IGKV2-24*01) (配列番号:44)		B280	B266	B252	B238

10

【0189】

16個のHFA-PT3(hIgG1/)多様体のパネルに対するクローニング及びDNA合成を、標準的な方法により実施した。標準的な手順によりDNAをHEK(Exp293)細胞にトランスフェクションし、細胞の上清を、培養液中で5日後に収集した。1x dPBS(pH7.2)中にて予備平衡化したMabSelectSure Protein A樹脂上でIgGを捕捉することにより、高スループットの並行精製用Protein BioSolutions ProteinMaker(Gaithersburg, MD)を使用して、透明にした上清を精製した。1x dPBS(pH7.2)でカラムを洗浄した後、0.1Mの酢酸ナトリウム(pH3.5)を使用してモノクローナル抗体を溶出した。2.5MのTris-HCl(pH7.2)を、20体積%まで添加して溶出画分を中和し、最終的なタンパク質の配合物は、0.08Mの酢酸ナトリウム、0.5MのTris-HCl(pH7.1)であった。

20

【0190】

HFAパネルの最初の評価は、精製収率、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー(SE-HPLC)プロファイル、ELISA結合アッセイでのPHF-タウへの結合、及び生物物理学的特性決定に基づいた。

30

【0191】

対応するモノクローナル抗体のHC及びLC可変領域を、重鎖のC末端にてヒトIgG1/定常領域及び6xHisタグと対形成することより、B296のFab(B324)及びB252のFab(B326)もまた生成した。B324及びB326はHEK(Exp293)細胞内で発現し、記載したものと類似の方法(Zhao et al., Protein Expr Purif. 67(2):182-9, 2009)により精製した。

40

【0192】

実施例5-ホスホペプチドでのSPRによる、HFA-PT3抗体の特性決定
生物物理学的特性決定、及びPHFへのELISA結合に基づいて選択したHFA-PT3モノクローナル抗体多様体のサブセットを、以下のホスホペプチド:pT212/pT217-タウペプチド(ペプチド-2、配列番号:48)及びpT212-タウペプチド(ペプチド-8、配列番号:54)への結合に関して、ProteOn XPR36で表面プラズモン共鳴(SPR)により分析した。全ての実験は、25にて、ランニング緩衝液及びサンプル希釈緩衝液の両方としてPBST(pH7.4)(Bio-Radカタログ番号176-2720)を用いて実施した。

【0193】

50

モノクローナル抗体 / ペプチド結合。PBSTで予めコンディショニングした後、抗ヒトFc (Jackson 109-005-098) でBiorad GLCチップを約6500RUの密度までコーティングすることにより、バイオセンサ表面を調製した。EDC/NHSを使用して、抗ヒトIgGをチップ表面にアミンカップリングさせ、次いでエタノールアミンで洗浄した。抗体をPBST中に2 μ g/mLまで希釈し、30 μ L/分にて5分間、表面上に注入して900~1000RUの最大密度を達成した。ペプチドを検体として、60 μ L/分にて3分間注入し、続いて5分間解離させた。ペプチド-2をPBSTに希釈させて、3倍希釈系列(0~30nM)を生成し、二重に測定した。ペプチド-8へのモノクローナル抗体結合の一度の測定を、0~100nMの濃度範囲にわたり記録した。

10

【0194】

Fab / ペプチド結合。ビオチン化ペプチドを、PBSTで予めコンディショニングした、ニュートラビジンによりコーティングしたNLCバイオセンサで捕捉し、Fabを表面上で流し、反応速度論的パラメータを測定した。PBST中にペプチドを10ng/mLまで希釈し、30 μ L/分にて100秒間、流路に注入することにより、チップ表面上で約5~10RUのペプチドを捕捉した。PT3 Fabの連続希釈液(1.1nM~90nM)には、緩衝液のみを、60 μ L/分で3分間(会合段階)、続いて300秒間注入した(解離段階)。

【0195】

スポット間の応答を差し引くことによりデータを二重参照し、緩衝液のみの注入により、曲線を作成した。0.85%のリン酸によりチップ表面を再生し、続いて、次の抗体滴注注入の前にPBSTを注入した。データ処理及び分析を、機器のソフトウェアを用いて実施した。単純なラングミュア1:1結合モデルを使用してデータを合致させた。

20

【0196】

ペプチド-8に対するHFA-PT3 IgGの反応速度論的速度定数及び平衡結合親和性を、表10に示す。B234は、マウスPT3可変領域及びヒトIgG1 / 定常領域を含有する。ヒト化多様体の中でも、B296が、ペプチド-8に対して最も強力な結合を示した(pT212-タウ)。

【0197】

【表10】

30

表10: ペプチド-8への、HFA-PT3 mAbパネルの結合についての、ProteOn SPR親和性データ

サンプル	タンパク質の説明	平均 k_a 、(1/Ms)	平均 k_d 、(1/s)	平均 K_D 、nM
B234	マウスPT3、hIgG1	2.31E+06	8.02E-03	3.48
B235	VH91/VL77	結合せず		
B252	VH93/VL80	7.42E+05	2.42E-02	32.6
B280	VH91/VL80	2.18E+05	7.57E-03	34.7(不十分なデータ合致)
B282	VH93/VL77	4.42E+05	3.82E-02	86.5
B296	VH92/VL77	8.56E+05	2.30E-02	26.8

全ての抗体について、n = 2

40

【0198】

ペプチド-2に対する、HFA-PT3 IgGの反応速度論的速度定数及び平衡結合親和性を、表11に示す。B252及びB296は、それぞれ172pM及び190pMの平均 K_D 値を有して、ペプチド-2(pT212/pT217-タウ)に対して最も強力な結合を示した。

【0199】

【表 1 1】

表 1 1 : ペプチド-2 への、HFA-PT3 mAb パネル結合についての、ProteOn SPR 親和性データ

サンプル	タンパク質の説明	平均 k_a (1/Ms)	k_a 範囲	平均 k_d (1/s)	k_d 範囲	平均 K_D (pM)	K_D 範囲 (pM)
B234	マウスPT3、hlgG1	9.35E+06	(8.7-10)E+06	3.25E-04	(2.42-4.08)E-04	29.2	(27.8-30.6)
B235	VH91/VL77	3.21E+06	(2.84-3.58)E+06	5.69E-03	(5.28-6.10)E-03	1790	(1710-1860)
B252	VH93/VL80	5.75E+06	(3.95-7.54)E+06	9.01E-04	(8.56-9.46)E-04	172	(126-217)
B280	VH91/VL80	4.71E+06	(2.21-7.20)E+06	2.74E-03	(2.46-3.01)E-03	769	(418-1120)
B282	VH93/VL77	3.12E+06	(2.34-3.89)E+06	1.32E-03	(1.24-1.40)E-03	445	(360-529)
B296	VH92/VL77	5.00E+06	(3.10-6.90)E+06	8.26E-04	(7.88-8.63)E-04	190	(125-255)

全ての抗体について、 $n = 2$

【0 2 0 0】

B 2 9 6 及び B 2 5 2 の F a b の親和性を、ProteOnにより p T 2 1 2 / p T 2 1 7 - タウペプチド (ペプチド - 2) にて測定し、マウス親 F a b B 1 8 7 と比較した (表 1 2) 。親マウス F a b と比較して、解離速度は 2 . 7 ~ 5 . 1 倍増加し、HFA F a b に対する K_D 値は 3 . 5 ~ 5 . 6 倍増加した。B 2 9 6 の F a b (B 3 2 4) は、B 2 5 2 の F a b (B 3 2 6) よりも、p T 2 1 2 / p T 2 1 7 - タウペプチドに対して強い親和性を、かつ、遅い解離速度を示した。

【0 2 0 1】

【表 1 2】

表 1 2 : ペプチド-2 への、HFA-PT3 の結合についての、ProteOn SPR 親和性データ

サンプル	説明	平均 k_a (1/Ms)	k_a 範囲 (1/Ms)	平均 k_d (1/s)	k_d 範囲 (1/s)	平均 K_D (pM)	K_D 範囲 (pM)
B187	PT3のマウス親Fab	7.76E+05	(4.91-10.6)E+05	6.39E-05	(4.93-7.84)E-05	87.4	(73.8-101)
B324	B296のFab	6.10E+05	(4.27-7.93)E+05	1.74E-04	(1.61-1.86)E-04	305	(234-376)
B326	B252のFab	7.10E+05	(5.07-9.12)E+05	3.29E-04	(3.04-3.53)E-04	493	(387-599)

全ての F a b について、 $n = 2$

【0 2 0 2】

実施例 6 - P H F - タウ及び組み換えタウにおける S P R による、HFA - P T 3 抗体の特性決定

アルツハイマー病の脳から単離した P H F - タウに対する結合について、HFA - P T 3 モノクローナル抗体のサブセットを試験した。3 m M の E D T A 、及び 0 . 0 0 5 % の T w e e n 2 0 を補充した P B S (p H 7 . 4) をランニング又はシステム緩衝液として使用して、2 5 にて全ての相互作用を検討した。マウス抗タウ抗体である H T 7 (P i e r c e 、カタログ番号 M N 1 0 0 0) を陽性対照として使用した。

【0 2 0 3】

H T 7 を捕捉試薬として使用する、P H F - タウの捕捉カップリングにより調製したバイオセンサ表面を使用して、ProteOnにより、P H F - タウを有する抗タウモノクローナル抗体の相互作用を分析した。5 0 0 0 x g 、5 にて 1 0 分間の遠心分離を 2 回繰り返し P H F - タウを調製し、次に、2 回目の遠心分離での上清をランニング緩衝液に、1 / 4 0 に希釈した。チップを調製するために、アミンカップリング化学についての、メーカーの取扱説明書を使用して、H T 7 を G L C (P r o t e O n) センサチップの表面に共有結合により固定化した (約 5 0 0 0 個の応答単位 (R U)) 。カップリング用緩衝液は、1 0 m M の酢酸ナトリウム (p H 4 . 5) であった。H T 7 の固定化の後、P H F - タウを注入し、H T 7 により捕捉した (約 3 0 0 R U) 。捕捉後、アミンカップリング化学についてのメーカーの取扱説明書に従って、チップの活性化によって P H F - タウをセンサチップに共有結合で固定化した。エタノールアミンを注入することによって、残りの反応部位をブロックした。P H F - タウ修飾表面及び参照表面 (抗原を含有しない) の調製及び安定化後、抗 P H F - タウ抗体をランニング緩衝液で希釈し、溶液中に注入した (0 . 1 2 ~ 7 5 n M 、5 倍希釈) 。3 分間会合をモニタリングした (4 0 μ g / 分で 1 2 0 μ L を注入) 。解離を 1 5 分間モニタリングした。1 0 m M の G l y (p H 2 . 0) を用いてセンサ表面を再生した。見かけの親和性 (K_D) を k_{off} / k_{on} の比率として報告した、二価の結合モデルを使用して、モノクローナル抗体用のデータを合致させた。F a b の反応速度分析のために、ラングミュア 1 : 1 結合モデルを使用した。

【0 2 0 4】

大部分の H F A モノクローナル抗体は、2 7 p M ~ 1 6 5 p M の範囲で、マウス親 P T

3モノクローナル抗体と同様の強力な結合を保持した(表13)。2つのトップのHFAモノクローナル抗体であるB252及びB296はそれぞれ、32 pM及び27 pMの親和性を有した。B235は、このパネルでは最も弱いモノクローナル抗体親和性(165 pM)を示した。B324(B296のFab)及びB326(B252のFab)を、PHF-タウの結合について評価すると、それぞれ、マウスPT3親Fab B187よりも2.5倍、及び3.3倍弱い K_D を示した。B324は、B326よりも1.3倍強い親和性(K_D)、及び1.7倍遅い解離速度を示した。Fabの親和性は、対応するモノクローナル抗体よりも弱く、これは、PHF-タウに対してモノクローナル抗体が結合活性を有することを示唆している。同じ可変領域を有する、B296のIgG4多様体であるB352を、PHF-タウへの結合についてもまた試験した。親和性(43 pM)は、B296の親和性の2倍以内であった(表11)。

【0205】

【表13】

表13: PT3 HFA mAb及びFabの、PHF-タウとのProtein SPR親和性

サンプル	説明	$k_{on}(1/Ms)$	$k_{off}(1/s)$	$K_D(pM)$
HT7	マウス(+対照)	(5.69±0.99) E+05	(1.10±0.18) E-04	193±46
B17(mAb)	マウスPT3, muG2a	(2.48±0.20) E+06	(2.68±0.43) E-05	11±1.9
B234(mAb)	マウスPT3, hIgG1	(2.23±0.13) E+06	(2.71±0.17) E-05	12±1.0
B235(mAb)	VH91/VL77	(4.90±0.34) E+05	(8.06±0.24) E-05	165±12
B252(mAb)	VH93/VL80	(1.32±0.09) E+06	(4.28±0.19) E-05	32±2.6
B280(mAb)	VH91/VL80	(1.02±0.03) E+06	(5.63±0.28) E-05	55±3.3
B282(mAb)	VH93/VL77	(6.65±0.09) E+05	(4.08±0.25) E-05	61±3.9
B296(mAb)	VH92/VL77	(1.07±0.02) E+06	(2.93±0.19) E-05	27±1.8
B297(mAb)	VH93/VL78	(1.44±0.07) E+06	(6.03±0.32) E-05	42±3.0
B187(Fab)	PT3 Fab	(1.67±0.05) E+06	(1.13±0.04) E-05	68±3
B326(Fab)	B252 Fab	(1.02±0.05) E+06	(2.30±0.04) E-04	224±12
B324(Fab)	B296Fab	(8.16±0.45) E+05	(1.36±0.06) E-04	167±12
B352(IgG4 mAb)	hIgG4としてのB296	(2.55±0.56) E+05	(1.11±0.54) E-05	43±23

mAb: 各実験において3つの複製物、n = 2

Fab: 各実験において2つの複製物、n = 2

B352: 各実験において4つの複製物、n = 2

【0206】

抗タウモノクローナル抗体と、組み換えにより発現した対照タウ(ヒトタウアイソフォーム2N4R 441aa、N末端6xHisタグ、配列番号: 63)を有するFabとの相互作用を、Biacore T200により検討した。アミンカップリング化学についてのメーカーの取扱説明書を用いて、抗ヒトIgG Fc特異的抗体(Ab)、又は抗Fdを、CM5センサチップの表面にカップリングさせることにより、バイオセンサ表面を調製した(約6500応答単位(RU))。カップリング用緩衝液は、10 mMの酢酸ナトリウム(pH 4.5)であった。抗タウ抗体をランニング緩衝液に希釈し、注入して少なくとも5 RUの捕捉を得た。抗タウモノクローナル抗体又はFabの捕捉に続いて、組み換えにより発現した対照タウの溶液(0.12~75 nM、5倍希釈)を注入した。会

合を3分間モニタリングした(50 μ L/分にて150 μ Lを注入した)。合理的な解離速度測定に関して少なくとも5%のシグナル低下が観察されるまで、解離をモニタリングした。センサ表面の再生を、0.85%のリン酸、続いて50 mMのNaOHにより行った。結合が観察された場合、モノクローナル抗体及びFabの両方についてのデータを、1:1ラングミュア結合モデルを使用して合致させた。

【0207】

B324及びB326のいずれも、対照タウに対する有意な結合を示さなかった。B296もまた、対照タウに対して結合を示さなかった。

【0208】

実施例7 - B324 + pT212 / pT217 タウペプチド複合体の結晶構造

X線結晶構造解析により、pT212 / pT217 - タウペプチド(配列番号: 62)を有するB324の共構造を決定し、これにより、タウエピトープ並びにB324(及びB296)パラトープの同定を行った。

【0209】

サンプル調製及び結晶化。HEK 293細胞内での一時的発現により、VH92及びVL77を有するB296のFabであるB324を製造し、Niアフィニティークロマトグラフィー、SEC、及び20 mMのMES(pH 6.0)、0.2 MのNaClの最終緩衝液中でのイオン交換により精製した。実施例3で記載したように、pT212 / pT217 - タウペプチド(配列番号: 62)を共結晶化のために使用した。B324 Fab + pT212 / pT217 - タウペプチド複合体の調製のために、10倍モル過剰のペ

【0210】

B324 Fab + pT212 / pT217 - タウペプチドの結晶化を、20 mMのMES(pH 6.0)、0.2 MのNaCl中で9~18 mg/mLにて実施した。2つのインハウススクリーン及びPEG(Qiagen)を使用して、20にてシッティングドロップ蒸気拡散法により、Mosquito結晶化ロボットで最初の結晶化スクリーニングを実施した。結晶は0.1 Mの酢酸ナトリウム(pH 4.6)、20%のPEG 10Kから現れ、更なる最適化スクリーニングに使用するために、Seed Beadキット(Hampton Research)を用いた機械的均質化により、シードを作製した。

【0211】

データ収集及び構造測定。結晶は0.1 Mの酢酸ナトリウム(pH 5.5)、37%のPEG 200から現れ、これを回収して、X線回折データ収集のために、冷凍保護することなく液体窒素内で急速冷却した。100 Kにて、IMCA-CATビームライン17-ID-B上でAdvanced Photon Source(Argonne, IL)にて、結晶構造解析データを収集した。画像半度当たり0.5秒の曝露で、180°回転でPilatus 6M検出器にて回折強度を収集した。XDS(Kabsch, 2010, Id.)でデータを、2.6の最大解像度まで処理した。pT212 / pT217 - タウペプチドと複合体化したB324のX線結晶構造を、関連するFab構造を調査モデルとして用いて、Phaser(McCoy et al., 2007, Id.)で分子交換により解像し、Refmac(Murshudov et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 53(Pt 3): 240-55, 1997)により精密化した(表14)。4.0の距離カットオフを使用して、CONTACT(Collaborative Computational Project, 1994, Id.)により分子間の接触距離を計算し、Pymolで目視検査した。

【0212】

10

20

30

40

【表 1 4】

表 1 4 : X線データ

データ収集		
内容物	B324+pT212/pT217ペプチド	
母液	0.1MのNaAct 5.5、37%のPEG200	
凍結	なし	
線源/検出器	APS IMCA-CAT 17ID-B/Pilatus 6M	
波長(Å)	1.000	
温度(K)	100	
距離(mm)	450	
全回転(°)	180**	
発現(秒)/0.5°	0.5	
空間群	I222	
単位セル軸(Å)	97.60、104.43、133.35	
ユニットセル角(°)	90、90、90	
分子/非対称単位	1	
V _m (Å ³ /Da)/溶媒(%)	3.43/64	
分解能(Å)	30-2.6	(2.67-2.60)
測定した反射数	113,798	(6,597)
独立の反射数	21,019	(1,367)
完全性(%)	98.6	(87.6)
多重度(Redundancy)	5.4	(4.8)
R-merge	0.040	(0.417)
<I/σ>(非平均)	10.8	(1.1)
<I/σ>(平均)	24.5	(3.5)
B因子(Wilson)(Å ²)	69.4	
精密化統計		
原子数	3331	
R _{work} /R _{free}	0.230/0.265	
理想からのr. m. s. d.		
幾何学的形状		
結合長(Å)	0.005	
結合角度(°)	1.027	
平均B因子(Å ²)	96.2	
ラマチャンドラプロット		
好ましい残基		
領域(%)	95.14%	
許容される残基		
領域(%)	3.94%	
アウトライヤー(%)	0.93%	
最も高い解像度シエルの値を括弧内に示す。		

10

20

30

40

【0 2 1 3】

構造分析。B 3 2 4 + p T 2 1 2 / p T 2 1 7 タウペプチド相互作用の全体的な構造を図 1 1 に示す。p T 2 1 2 / p T 2 1 7 - タウペプチドは、B 3 2 4 V_H及びV_Lの界面に形成した溝に合致する。B 3 2 4 と p T 2 1 2 / p T 2 1 7 タウペプチドとの界面には、ファン・デル・ワールス及び静電相互作用が含まれ、これらはペプチド残基 2 1 1 から 2 2 1 まで延びる(図 1 2)。以下のCDRが、p T 2 1 2 / p T 2 1 7 - タウペプチドへの直接結合に関与する: CDR - H 1、CDR - H 2、CDR - H 3、CDR - L 1、CDR - L 3。p T 2 1 2 / p T 2 1 7 タウペプチドと複合体化したB 3 2 4の構造は

50

、エピトープが、p T 2 1 2 及び p T 2 1 7 のホスフェートを含むことを示す。B 3 2 4 F a b 残基と、p T 2 1 2 / p T 2 1 7 - タウペプチド残基との相互作用図を、図 1 3 に示す。鍵となる相互作用のいくつかは、以下のとおりである：V H Y 3 2 ヒドロキシル基と、V H T 2 8 ヒドロキシル基とが、各々、p T 2 1 2 の異なるホスフェート酸素と水素結合を形成する；V H Y 3 2 と V H W 9 9 の側鎖からは、タウペプチドの L 2 1 5 のメチル基に疎水性相互作用が存在する；V H K 5 3 は、タウペプチドの残基 p T 2 1 7 と塩橋相互作用を形成する；V H W 1 0 4 の側鎖は、p T 2 1 7 のメチル基と疎水性相互作用を、及び P 2 1 8 と C H - スタッキング相互作用を形成し、V H / V L 界面の一部を形成する；V H W 1 0 4 のインドールアミドは、T 2 2 0 の側鎖ヒドロキシルと水素結合を形成する；V L Y 3 2 の側鎖と P 2 1 9 との間には、疎水性相互作用が存在する；V L L 9 6 と、T 2 2 0 のメチル基との間には、疎水性相互作用が存在する；並びに、V L F 9 4 の側鎖と T 2 2 0 のメチル基とにより疎水性相互作用が形成される。p T 2 1 2 及び p T 2 1 7 のホスフェートとの静電相互作用は、ホスホ - タウに対する B 3 2 4 の選択性に決定的なものであり、疎水性相互作用は更に、p T 2 1 2 / p T 2 1 7 - タウペプチド（実施例 5）及び P H F - タウ（実施例 6）に対する B 3 2 4 の高親和性に寄与する。マウス P T 3 と B 3 2 4 との、エピトープ及びパラトープは非常に類似しており、このことは、エピトープ及びパラトープのいずれもが、ヒト化の後に有意に変化していないことを示す（図 9 及び図 1 3、表 8 及び表 1 5）。

10

20

30

40

50

【 0 2 1 4 】

表 1 5 : B 3 2 4 + p T 2 1 2 / p T 2 1 7 - タウペプチドのエピトープ及びパラトープ。p T 2 1 2 / p T 2 1 7 - タウペプチド残基と相互作用する B 3 2 4 V H 又は V L の残基を示す。水素結合相互作用を太字の活字で示す。

【 0 2 1 5 】

【表 1 5】

VH	ペプチド	VL
G26、T28	R211	
F27、T28、S31、Y32	pT212	
S31	P213	
S31	S214	
S31、Y32、K53、W99	L215	
K53、W99、G100	P216	
S52、K53、W104	pT217	
G100、W104	P218	
G100、D101	P219	Y32
W104	T220	Y91、D92、E93、F94、L96
	R221	D92、E93、F94

【 0 2 1 6 】

実施例 8 - 細胞アッセイにおける機能試験

2 種類の細胞アッセイ：同時培養アッセイ及び枯渇アッセイにおける、タウシーディングの阻害について P T 3 を試験した。両方のアッセイ種において、例えば凝集により非常に近接した際にシグナルを生成する、2 つの発色団タグ K 1 8 タウフラグメントを発現する H E K 細胞を使用する。細胞を、凝集してリン酸化した、異なる源由来の完全長タウのシードで処理した場合、生物発光共鳴エネルギー移動（B R E T）比の変化（すなわち、B R E T アッセイ）により、又は、蛍光活性化細胞選別（F A C S）を用いた、蛍光共鳴エネルギー移動（F R E T）陽性細胞の数を数えること（すなわち、F R E T アッセイ；図 1 4）により、定量化可能な K 1 8 アグリゲートが生じる（H o l m e s e t a l . , 2 0 1 4 , P N A S 1 1 1 (4 1) : E 4 3 7 6 - 8 5）。

【 0 2 1 7 】

H E K 細胞ホモジェネート同時培養アッセイ（B R E T アッセイ）

同時培養用のタウシードを含有するホモジェネートを、K 1 8 により誘発された、凝集 G F P タグ完全長タウを含有する安定した G F P - タウ P 3 0 1 L 過剰発現 H E K 細胞株から生成した。レシピエント細胞は、K 1 8 / P 3 0 1 L - N a n o L u c 及び K 1 8 /

P301L-HaloTagを安定して発現するHEK細胞であった。タウシードを、試験抗体、及び受容する発色団-K18含有HEK細胞と、72時間同時培養した。K18アグリゲート形成を、BRET比(590nm/450nm)の変化により測定した。PT3は、凝集の誘発を300nMにおいて46.97%、30nMにおいて18.02%、及び3nMにおいて12.57%ブロックした(図15)。

【0218】

脊髄同時培養アッセイ(FRETアッセイ)

凝集トランスジェニックヒトタウを含有する、週齢22~23のP301Sの脊髄から、同時培養用のタウシードを含有するホモジェネートを生成した。感度の増加のために、このアッセイで使用したレシピエント細胞は、K18/P301S-YFP及びK18/P301S-CFPを安定して発現するHEK細胞であった。タウシードを、試験抗体、及び受容する発色団-K18含有HEK細胞と、72時間同時培養した。K18アグリゲート形成を、FACSによりFRET陽性細胞の数を数えることにより測定した。PT3は、凝集の誘発を300nMにおいて34.03%、30nMにおいて37.02%、及び3nMにおいて30.68%ブロックした(図16)。

10

【0219】

免疫枯渇細胞アッセイ

最大阻害割合(%)の値が、シードのエピトープの密度、又はPT3エピトープを含有するシードの数に関係するか否かを調査するために、免疫枯渇アッセイを実施した。免疫枯渇アッセイにおいて、タウシードを試験抗体により培養(インキュベーション)し、Gタンパク質のビーズを用いて溶液から除去した。枯渇した上清を、発色団-K18含有HEK細胞内での残留シーディング能力について試験し、上述したようにFACSにより分析した(Holmes et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 111(41):E4376-85, 2014)。

20

【0220】

免疫枯渇のためのタウシードを含有するホモジェネートを、週齢22~23のP301Sトランスジェニック動物の脊髄から(図17)、又は、冷凍保護したヒトAD脳組織から(図18)生成した。ヒトAD脳免疫枯渇アッセイにおいて、トランスフェクション試薬Lipofectamine 2000の存在下において、枯渇後に上清を試験紙、許容されるアッセイウィンドウを得た。脊髄抽出物、及びヒトAD脳の全ホモジェネートの両方において、PT3を用いてタウシーディングをほぼ完全に(>90%)枯渇することができた(図17及び18)。

30

【0221】

結果

PT3は、HEK細胞可溶化物、及びTgP301S脊髄溶解物の両方に由来するタウシードを阻害した。アッセイで得た最大阻害は、異なる抗ホスホ-タウ抗体において、及び異なるシードにおいて変化した(表16)。観察された、300nMにおけるPT3に対する阻害値は、HEK細胞シードに対しては46.97±5.87%であり、TgP301S脊髄抽出物に対しては34.03±2.05%であった。異なる細胞アッセイにおける、ホスホ-タウ抗体に対する異なる最大阻害値により、使用したタウシードのリン酸化状態の違いを示すことができる。TgP301S脊髄で生成したタウシードは神経細胞由来のものであり、HEK細胞由来のタウシードよりもPHF-タウに対して類似性が高いことが予想される。このことにより、脊髄抽出物対HEK細胞可溶化物に対するホスホ-タウ抗体で観察された、全般的に高い効能を説明することができる。

40

【0222】

脊髄抽出物、及びヒトAD脳の全ホモジェネートの両方において、PT3によりタウシーディングをほぼ完全に枯渇させることができた。この結果は、脊髄シーディング材料を用いた同時培養実験における完全阻害の欠如が、PT3エピトープを欠くシードが存在することにより生じたのではなく、シードにおける限定的なエピトープの密度により生じたことを示唆している。

50

【 0 2 2 3 】

【 表 1 6 】

表 1 6 : 細胞アッセイにおける機能試験の結果の一覧

MAb	BRET/GFP- タウP301L 同時培養アッセイ	FRET/P301S 脊髄同時培養アッセイ	FRET/P301S 脊髄免疫枯渇アッセイ	FRET/ヒトAD 脳ホモジェネート 免疫枯渇アッセイ
PT3	46.97±5.87	34.03±2.05	96.24±0.43	92.24±2.30
AT8	10.52±9.48	26.4±1.74	96.71±0.42	80.69±5.79
HT7	65.44±1.08 ^a	73.51±1.78 ^b	99.16±0.21	82.99±0.68

単位は陰性対照の% (パーセント)、異なる実験の平均であり、^a 166.67 nM における阻害、及び^b 89.99 nM における阻害を除いて、全てのアッセイにおける抗体濃度は300 nMであった。

【 0 2 2 4 】

タウ抗体治療の作用機序は依然として議論の主題であり、複数の機序が提示されている。小膠細胞による、抗体が媒介する細胞外シードのクリアランスは、1つの優位な作用機序として近年示唆されている (Funk et al., J Biol Chem. 290 (35): 21652-62, 2015 and McEwan et al., 2017, PNAS 114: 574-9)。本文脈では、ヒトの脳に由来するシーディング材料の免疫枯渇が、最も並進的な細胞の結果であると考えることができ、この種の細胞アッセイにおける親マウス抗体PT3の高い効能は、PT3のHFA版が効果的な治療薬であることを示唆している。

【 0 2 2 5 】

実施例 9 - e PHF 注入モデルにおけるマウスPT3のin vivoでの効能

インビボでのタウ抗体の効能を評価するために、脳でタウの病状を示すマウスを、必須のモデルシステムとする (Julien et al., Methods Mol Biol. 849: 473-91, 2012)。これらのモデルのいくつかが記載されており、これらは一般的に、3つの群に分けることができる: 1) 株に応じて、5~9ヶ月後に重篤な病状を示す変異体により、WT又は変異体 (例えば、P301L若しくはP301S) を過剰発現するタウトランスジェニックマウス (Allen et al., J Neurosci. 22 (21): 9340-51, 2002; Scattoni et al., Behav Brain Res. 208 (1): 250-7, 2010; Terwel et al., J Biol Chem. 280 (5): 3963-73, 2005; Yoshiyama et al., Neuron. 53 (3): 337-51, 2007); 2) 変異体タウ (例えば、P301L) を空間時間的に制御して発現するマウス (Liu et al., Brain Imaging Behav. 6 (4): 610-20, 2012)、又は凝集後フラグメント (例えば、K18) を有するマウス (Mocanu et al., J Neurosci. 28 (3): 737-48, 2008); 並びに 3) プラク及びタウの病状の両方を示す、変異体タウ及びAPPの両方を発現するマウス (Oddo et al., J Neurochem. 102 (4): 1053-63, 2007)。

【 0 2 2 6 】

変異体タウを発現するマウスが強い病状を発現する一方で、病状の開始は動物によって変化する可能性があり、検討において変動性を引き起こす。また、細胞の自律神経によるタウ凝集、及び全体のタウ凝集シグナルへの拡散の相対的寄与は、はっきりとしていない。したがって、タウのシーディング及び拡散を効果的に検討するために使用可能なモデル (例えば、de Calignon et al., 2012, Neuron. 73 (4): 685-97, 2012; Liu et al., Id.) は、価値が高い。ALZ17マウス (通常のヒトタウを発現する株) に、異なるタウ異常症に由来する脳のホモジェネートを注射することにより、ヒトの脳におけるタウ異常症に類似するモルホロジーを有して、タウが含まれる形成を誘発することの発見により、このようなモデルの並進的価

10

20

30

40

50

値は更に強化される。例えば、マウスに、嗜銀顆粒性認知症サンプルの材料を注射することにより、疾病そのものに回転楕円体又はコンマ様構造の特徴を有する沈着がもたらされ、AD様のタウ病状が、AD材料を注射したマウスで観察された (Clavaguera et al., 2013, PNAS 110(23): 9535-40)。

【0227】

したがって、タウの凝集後フラグメント、例えば合成K18原線維 (Li and Lee, Biochemistry. 45(51): 15692-701, 2006)、又はヒトAD脳に由来するPHF-タウシードを、細胞の自律神経による凝集が始まっていない年齢のP301Lトランスジェニックマウスモデルにおける、皮質又は海馬領域に注入した、トランスジェニックP301Lマウス注入モデルが確立された。注入モデルは、タウ拡散の決定的な細胞外シーディング構成成分を再現することを目的としている。注入されるK18又はPHF-タウシードは、注入部位にてタウ異常症を誘発し、また、接続した反対側の領域において、より軽度に、タウ異常症を誘発する (Peeraer et al., Neurobiol Dis. 73: 83-95, 2015)。このモデルにより、AD脳由来のPHF-タウシード又はK18原線維と同時注入した際に、本発明の抗タウ抗体などの抗体の、抗シーディング能力の試験が可能となる (Iba et al., 2015, J Neurosci. 33(3): 1024-37, 2013; Iba et al., Acta Neuropathol. 130(3): 349-62)。

10

【0228】

トランスジェニックP301Lマウス注射モデルの概略図を図19に示す。手短かに言えば、死後のAD脳への、サルコシル不溶性画分の皮質注射により、タウ凝集のゆっくりと進行する増加が誘発される。注射された半球では、注射の1ヶ月後に最初のシグナルが測定され、注射の更に3ヶ月後まで進行する。注射の5ヶ月後に、いくつかの動物では、P301L変異により引き起こされる濃縮の形成が開始される (Terwel et al., 2005, Id.)。AT8の染色レベルは、1ヶ月と3ヶ月との間で増加する (図19C~図19D、及び図19E~図19F)ため、抗体の効能実験を、同時注射の2ヶ月後に分析する。更に、死後のAD脳への、サルコシル不溶性画分の海馬注射が、注射した半球のサルコシル不溶性画分をMesoscale Discoveries (MSD)により分析することで測定した、用量依存的なタウ凝集の増加の進行が誘発される (図19G)。

20

30

【0229】

動物治療及び頭蓋内注射

注射の検討のために、P301L変異を有する最長のヒトタウアイソフォーム (タウ-4R/2N-P301L) (Terwel et al., 2005, Id.)を発現するトランスジェニックタウ-P301Lマウスを、月齢3ヶ月にて手術に使用した。現地の倫理委員会が認可した手順を遵守して、全ての実験を実施した。定位的手術のために、マウスは、モノクローナル抗体の存在下又は不存在下にて、毛皮質 (AP+2.0、前頂からML+2.0、DV、硬膜から2.7mm)、又は海馬 (AP-2.0、ML+2.0 (前頂から)、DV 1.8mm (硬膜から))に、3µL (速度: 0.25µL/分)で、死後AD組織 (富化した対らせん状細線維、ePHF)からサルコシル不溶性prepの一側性 (右半球)注射を受けた。抗体又は生理食塩水の腹腔内 (IP)注射の場合、治療 (20mg/kg、2x/週)は頭蓋内注射の1週間前に開始し、マウスを解離のために犠牲にする (頭蓋内注射の2ヶ月後)まで継続した。

40

【0230】

抽出手順

注射した半球のマウス組織の重量を測定し、6体積の均質化緩衝液 (10mM Tris HCl (pH7.6))中で均質化した。27000xgにて20分間、ホモジェネートを遠心分離にかけ、得られた上清 (全ホモジェネート)からアリコートを取り出した後、1%のN-ラウロイルサルコシンを添加した。90分後 (900rpm、37)、溶液を再び、184000xgにて1時間遠心分離にかけた。上清はサルコシル可溶性画

50

分として保持したが、サルコシル不溶性材料を含有するペレットは、均質化緩衝液中に懸濁させた。

【0231】

生化学的分析

被覆抗体（抗AT8又は全タウ抗体のいずれか）をPBSに希釈（ $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ）し、MSDプレート（ウェル当たり $30\mu\text{L}$ ）（L15XA, Mesoscale Discoveries）にアリコートとし、これらを終夜4でインキュベーションした。 $5\times 200\mu\text{L}$ のPBS/0.5%のTween-20で洗浄した後、プレートをPBS中の0.1%のカゼインでブロックし、 $5\times 200\mu\text{L}$ のPBS/0.5%のTween-20で再び洗浄した。サンプル及び標準（共に、PBS中の0.1%のカゼインに希釈）を添加した後、プレートを終夜4でインキュベーションした。その後、プレートを $5\times 200\mu\text{L}$ のPBS/0.5%のTween-20で洗浄し、SULFO-TAG（商標）がコンジュゲートした検出抗体（PBS中の0.1%のカゼイン中）を添加し、 600rpm で振盪しながら室温で2時間インキュベーションした。最後の洗浄（ $5\times 200\mu\text{L}$ のPBS/0.5%のTween-20）の後、 $150\mu\text{L}$ の2x緩衝液Tを添加し、プレートをMSDイメージャで読み取った。死後のAD脳（ePHF）のサルコシル不溶性prepの16個の希釈物からなる検量線に対してそのままのシグナルを正規化し、任意の単位（AU）ePHFとして表した。統計分析（Bonferroni事後テストと合わせたANOVA）を、GraphPadプリズムソフトウェアで行った。

10

20

【0232】

結果

皮質同時注射モデルにおけるマウスPT3の活性（図19）が、4つの独立した検討にて確認された。マウスを表17に従い末梢投与し、結果を図20に示す。モデルの更なる改善（図19D）により、表18に示すように、ePHF-タウの用量及び同時注射される抗体の用量の低下が可能となった（結果を図21に示す）。ePHF-タウのこの低下させた用量を用いることにより、末梢投与した際に、PT3は凝集したタウを低下させる有意な効果を有することもまた、発見された（ $P < 0.0001$ ；図21）。

30

【0233】

【表17】

表17：末梢投与

群	ePHFの量(pmole)	同時注射のAb量(pmole)	抗体IP	n
IgG	0.2	5	20mg/kg(2x/w)	12
PT3	0.2	—	20mg/kg(2x/w)	13
PT3	0.2	5		5

【0234】

【表18】

表18：同時注射の投与

群	ePHFの量(pmole)	同時注射のAb量(pmole)	n
IgG	0.2	5	14
PT3	0.2	5	15
PT3	0.2	0.5	15
PT3	0.2	0.05	15

40

【0235】

図19Aのレイアウトに従い、PT3-HFA IgG2a多様体（mIgG2a/定常領域に、可変領域VH92（配列番号：27）及びVL77（配列番号：31）を含有する）を含む、ePHF及びPT3アイソタイプの同時注射により、P301Lマウスにおける、ePHFにより誘発されたタウ凝集が弱まった（図22）。毛皮質に注射を行った。（海馬ではない）。注射を受けた半球（生化学データ、図22B）、及び注射を受けていない半球（IHCAT100染色、図22C）において、効果を観察した。IgG2a及びIgG1アイソタイプでは共に、AD脳由来のPHF-タウを同時注射したとき

50

、タウ異常症の誘発が有意に低下した ($p < 0.0001$)。結果により、反対側の半球にてIHCが確認された。

【0236】

以上、本発明を詳細に、かつその具体的な実施形態を参照して説明したが、当業者には、発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本発明に様々な変更及び改変を行い得る点は明らかであろう。

【0237】

実施例10 - PSPタウとADタウとの比較

進行性核上性麻痺 (PSP) は、パーキンソン症候群、体位の不安定性及び転倒、核上性注視麻痺、並びに認知症を特徴とする、希少かつ致死性の神経変性疾患である (Ste ele et al., 1964, Archives of Neurology 10 : 333 - 359)。病理学的には、脳幹及び大脳基底核、並びに他の脳領域に、4Rピート (4R) タウの選択的蓄積が存在する (Dickson DW. Handbook of Clinical Neurology 2008; 89 : 487 - 491; Williams & Lees, 2009, The Lancet Neurology 8 : 270 - 279)。アミロイドなどの他の病状の不存在を考慮すると、PSPは一次性タウ異常症であると考えられ、動物モデルデータは、PSPタウが、ADにて生じていると仮説が立てられているものに類似しているシーディングを受け得ることを示唆している (Clavaguera et al., 2013, PNAS 110 : 9535 - 9540; Sanders et al., 2014, Neuron 82 : 1271 - 1288)。そのため、PSPは本発明の抗体で治療することができる。一連の実験を行い、PSPタウとAD PHFタウとの類似性を特性決定した。

10

20

30

40

50

【0238】

方法

ヒト脳組織：臨床診断を受けたPSP ($n = 5$) 患者 (核尾状核 = CAU、及び被殻 = PUT) の、典型的には非常に影響を受けている2つの脳領域、並びに、さほど影響を受けていない脳領域 (上前頭回 = GFS)、並びに、2つの対照 (= タウ異常症を有しない) 患者の同一の脳領域の凍結保存組織を、Netherlands Brain Bankから入手した。後述する凝集アッセイ及び免疫組織化学染色の両方を用いる分析のために、組織を使用した。9名の散発性AD患者の凍結保存組織をUniversity of Pennsylvaniaから入手し、凝集アッセイを用いる分析のために使用した。1名のAD患者の凍結保存組織をUniversity of Newcastleから入手し、免疫組織化学染色に使用した。

【0239】

脳組織の均質化：凍結保存組織を、10mMのTris、150mMのNaCl (pH 7.4)、フィルターで均質化し、0.22 μ m + CompleteミニEDTA非含有プロテアーゼ阻害剤 (Roche、カタログ番号11836170001) を、ダウンズ型ホモジナイザーで1000rpmにて10ストロークし、10% w/vのホモジェネートを得た。ホモジェネートを27,000 \times g、10分、4にて遠心分離にかけ、上清を、使用するまで-80でアリコートに保管した。

【0240】

凝集アッセイ：ホスホ - タウ抗体AT8及びPT3を捕捉及び検出抗体として使用する、凝集特異的サンドイッチMSDイムノアッセイを実施した。被覆抗体をPBS (1 μ g/mL) に希釈し、MSDプレート (ウェル当たり30 μ L) (L15XA, Mesoscale Discoveries) にアリコートとし、4にてインキュベーションした。5 \times 200 μ LのPBS/0.5%のTween-20で洗浄した後、プレートをPBS中の0.1%のカゼインでブロックし、5 \times 200 μ LのPBS/0.5%のTween-20で再び洗浄した。サンプル及び標準 (共に、PBS中の0.1%のカゼインに希釈) を添加した後、プレートを4にてインキュベーションした。その後、プレートを5 \times 200 μ LのPBS/0.5%のTween-20で洗浄し、SULFO-TAG (

商標)がコンジュゲートした検出抗体(PBS中の0.1%のカゼイン中)を添加し、600rpmで振盪しながら室温で2時間インキュベーションした。最後の洗浄(5×200μLのPBS/0.5%のTween-20)の後、150μLの2×緩衝液Tを添加し、プレートをMSDイメージャで読み取る。そのままのシグナルを、1つのAD全脳ホモジェネートの7つの希釈物からなる検量線に対して正規化し、この検量の補間値として、割合(%)で表す。

【0241】

免疫組織化学法：凍結保存したヒト脳組織を冷凍切片(20μmの厚さ)にスライスし、使用前に-80℃で保管した。切片を乾燥させ、続いてホルマリン固定、内因性ペロキシダーゼの3%過酸化水素(DAKO, Glostrup, Denmark, S2023)でのブロック、及びPBS1x+0.3%Triton X-100での1時間の易透化を続けた。一次抗体(0.4μgのPT3/mL; 0.4μg/mLのAT8)を、バックグラウンドの還元構成成分(DAKO, S3022)で抗体希釈液に希釈し、切片に1時間適用した。広範囲を洗浄した後、HRPがコンジュゲートした抗マウス二次抗体(Envision, DAKO, K4000)、続いて色原体DAB標識(DAKO, K4368)により、スライドをインキュベーションした。スライドをヘマトキシリンで対比染色し、無水化して有機固定培地(Vectamount, Vector Labs, Burlingame, CA, USA, H-5000)で固定した。イメージングをHamamatsu NanoZoomer 2.0 rs(浜松ホトニクス(静岡))で実施した。

10

20

【0242】

結果

凝集アッセイ：凝集アッセイを実施して、PSPタウのリン酸化度を特定決定した。PT3反応性アグリゲートはPSP脳の中に存在したが、凝集度はAD脳よりも低かった(図23)。参照抗体AT8を用いて得た結果は、PT3を用いて観察されたものに類似していた。これらの結果は、様々なホスホ-タウ抗体を使用して評価した全てのリン酸化部位がPSPタウに存在するものの、ADと比較して、PSPにはよりわずかしかタウ凝集が存在していないことを示唆している。

【0243】

免疫組織化学法：AD又はPSP脳の凍結切片にて、PT3抗体により染色することによって、解剖学的領域(すなわち、尾状核及び被殻)における染色は、PSPに影響を与えたことを示した(図24)。タウ+ニューロン及び房飾星状細胞を含むPSPの、神経病理学的特徴は、ホスホ-タウ抗体PT3により検出された。AT8を用いて得られた結果は、PT3を用いて観察されたものに類似していた。

30

【0244】

結論

利用可能なデータは、PT3がPSPのタウに結合することを示唆している。

【0245】

実施例11 - PT3 - HFAの親和性成熟

親和性成熟した抗体の、PHF-タウへのSPR結合の特性決定

親和性成熟したモノクローナル抗体を、アルツハイマー病の脳から単離したPHF-タウへの結合について試験した。3mMのEDTA、及び0.005%のTween 20をランニング又はシステム緩衝液として補充したPBS(pH7.4)を用いて、25℃にてProteOn XPR36 system(BioRad, Hercules, CA)を使用して、結合反応速度及び親和性検討を実施した。

40

【0246】

アミンカップリング化学用の、供給元が推奨する手順を用いて、マウス抗タウ抗体であるHT7(ThermoFisher, カタログ番号MN1000)により、GLCセンサチップを共有結合により固定化した(約5000応答単位(RU))。カップリング緩衝液は10mM(pH4.5)の酢酸ナトリウムであった。PHF-タウを、5000x

50

gにて5で10分間、2回遠心分離することにより調製した。2回目の遠心分離での上清をランニング緩衝液に希釈させ(1/125)、HT7固定化表面に捕捉カップリングした(約300RU)。捕捉カップリングの後、表面を活性化及び不活性化して、抗体結合検討用の均質なPHF-タウ表面を生成した。抗タウ抗体及びこれらのFab(ランニング緩衝液にて調製、0.024~75nM、5倍希釈)を、PHF-タウ表面にわたり50µL/分で注入し、結合を測定した。会合及び解離プロファイルをそれぞれ、4分間及び2時間モニタリングした。解離後、10mMのグリシン(pH2.0)及びランニング緩衝液の複数回注入を用いて、センサチップを再生した。参照表面(PHF-タウを全く有しない)を使用して、注入したmAb又はFabの非特異的結合をモニタリングした。HT7抗体を陽性対照として使用した。mAbに対する結合のセンサーグラムを、二価の結合モデルを使用して合致させ、ここでは、見かけの親和性又は結合活性により引き起こされる結合(K_D)は、解離速度と会合速度との比(k_{off}/k_{on})として報告された。1:1ラングミュア結合モデルを、Fabの反応速度論的分析に使用した。

【0247】

親ヒト抗体(B296)は、PHF-タウに対して強力な結合($K_D = 6.2 \text{ pM}$)を示し、非常に遅い解離速度が支配的であり、mAbの5%以下の解離が2時間にわたって観察された(表19、図25)。親和性成熟した抗体は、1.8~2.5pMの範囲で親和性を有してPHF-タウに結合するという改善を示した。B711及びB809は、親抗体と比較して会合速度に3倍の改善を示したが、解離速度は、全ての抗体においての目視での区別はできなかった(図25)。Fabは全体的に、対応するmAbと比較してPHF-タウに対して桁違いに弱い結合を示し、このことにより、mAbのPHF-タウへの、結合活性により引き起こされる結合が示唆された。B324(親mAbであるB296のFab)は、63.2pMの固有の親和性でPHF-タウに結合した。親和性成熟したmAbのFabは、15.6pM~31pMの範囲の値を有し、同様に親和性の改善を示した。2つのFabであるB330(B711のFab)、及びB332(809のFab)は更に、会合速度において、対応するmAbと同様の、3~4倍の改善を示した。

【0248】

【表19】

表19: 親和性成熟したmAb、及びこれらのFabの、PHF-タウとの、Protein SPR結合反応速度及び親和性

サンプル	説明	$k_{on}(x10^6 \text{ 1/Ms})$	$k_{off}(x10^{-5} \text{ 1/s})$	$K_D(\text{pM})$
B296(mAb)	ヒト化親mAb	1.89±0.09	1.17±0.09	6.2±0.5
B711(mAb)	親和性成熟B296	6.17(5.72-6.61)	1.13(1.08-1.17)	1.8(1.6-2.1)
B809(mAb)	親和性成熟B296	6.45±1.18	1.27±0.15	2.0±0.5
B333(mAb)	親和性成熟B296	2.68±0.23	0.68±0.08	2.5±0.4
B324(Fab)	B296のFab	1.43±0.06	9.03±0.08	63.2±2.8
B330(Fab)	B711のFab	4.60(4.53-4.66)	7.15(6.94-7.36)	15.6(15.3-15.8)
B332(Fab)	B809のFab	4.64±0.29	12.0±0.12	25.8±1.7
B331(Fab)	B333のFab	1.72±0.07	5.31±0.10	31.0±1.5

1実験において、N=2~3の複製物。値は平均±SD(又は範囲)として報告した

【0249】

ELISAによるホスホペプチドへの結合

ペプチド(10ng/mL)をプレートに終夜直接コーティングしたELISAにより、タウホスホペプチドの結合を分析した。プレートを洗浄し、PBS中の0.1%のカゼインでブロックした後、異なる濃度のHFA-PT3(B296)並びにHFA-PT3の親和性成熟多様体(B809、B333、及びB711)mAbで、プレートをインキュベーションした(図26A)。抗体とのインキュベーションの後、プレートを洗浄して、ウェル当たり50µLのHRPOで、抗Fab抗体を標識した(Jackson Immunoresearch laboratories)(ブロッキング緩衝液中に1:10000に希釈)。別の洗浄ステップの後、メーカーの取扱説明書に従い、「ワンステップ」TMB(Thermo Scientific)を用いて、検出を実施した。En

10

20

30

40

50

Vision (登録商標) 2102 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) でプレートを分析した。結合曲線を、GraphPad Prism 7.0 ソフトウェアを使用して生成した。図 26 A の結合曲線から、B296 は最も低い親和性を示した一方で、B711 は B296 と、また B333 及び B809 とも比較して、最も強い結合を示したことを知ることができる。これにより、B711 は、pT217 ペプチドに対して最も強い親和性を有するヒト化 PT3 であることが示唆される。Fab を用いる同様の実験 (図 26 B) により、M333 (B711 の Fab) は、親 PT3 分子の Fab である B187 と比較して、同様のペプチド結合を有したことが示された。ここでも、M324 (B296 の Fab、HFA-PT3) は、PT3-HFA の親 Fab 及び親和性成熟した多様体と比較して弱い結合を示した。

10

【0250】

【表 20】

表 20 : ELISA による、pT217 結合の結果の一覧

Fab	EC ₅₀ (pM)	
	平均	SD
B187	109.82	73.70037
M324	340.8333	121.6609
M330	106.5133	62.22259
mAb	平均	SD
B296	433.425	139.2647
B809	91.6675	59.01867
B333	164.345	92.99161
B711	70.745	48.86815

20

少なくとも 2 つの実験にて、N = 2 の複製物である。値は平均 ± SD として報告した。

【0251】

参考文献

Abhinandan and Martin, Mol Immunol. 45: 3832-9, 2008

Adams et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 66 (Pt 2): 213-21, 2010

Allen et al., J Neurosci. 22 (21): 9340-51, 2002

30

Almagro, Mol Recognit. 17: 132-43, 2004

Asuni et al., J Neurosci. 27: 9115-29, 2007

Boutajangout et al., J Neurochem. 118: 658-67, 2011

Boutajangout et al., J Neurosci. 30: 16559-66, 2010

Brunden et al., Nat Rev Drug Discov. 8: 783-93, 2009

Butner and Kirschner, J Cell Biol. 115 (3): 717-30, 1991

40

Chai et al., J Biol Chem. 286: 34457-67, 2011

Chothia and Lesk, J Mol Biol. 196: 901-17, 1987

Clavaguera et al., Nat Cell Biol. 11: 909-13, 2009

Clavaguera et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 110 (23): 9535-40, 2013

Clavaguera et al., Proc Natl Acad Sci US

50

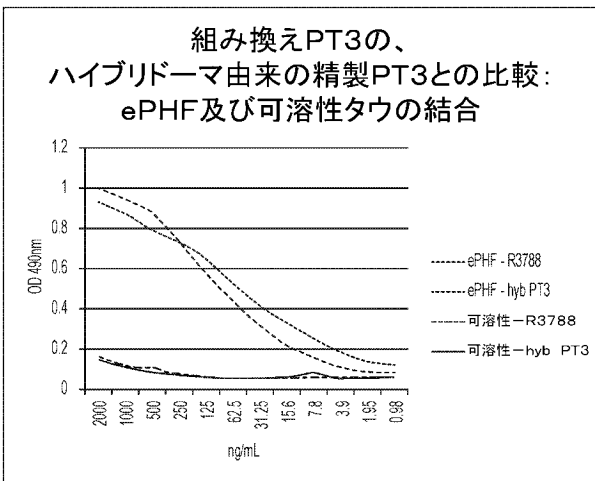
- A . 1 1 0 (2 3) : 9 5 3 5 - 4 0 , 2 0 1 3
 Collaborative Computational Project, Number 4, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr . 5 0 (Pt 5) : 7 6 0 - 3 , 1 9 9 4
 Collin et al. , Brain . 1 3 7 (Pt 1 0) : 2 8 3 4 - 4 6 , 2 0 1 4
 de Calignon et al. , Neuron . 7 3 (4) : 6 8 5 - 9 7 , 2 0 1 2
 Emsley and Cowtan, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr . 6 0 (Pt 1 2 Pt 1) : 2 1 2 6 - 3 2 , 2 0 1 0 10
 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1 9 9 6)
 Fishwild et al. , Nat Biotechnol . 1 4 : 8 4 5 - 5 1 , 1 9 9 6
 Fransson et al. , J Mol Biol . 3 9 8 (2) : 2 1 4 - 3 1 , 2 0 1 0
 Frost et al. , J Biol Chem . 2 8 4 : 1 2 8 4 5 - 5 2 , 2 0 0 9 20
 Funk et al. , J Biol Chem . 2 9 0 (3 5) : 2 1 6 5 2 - 6 2 , 2 0 1 5
 Goedert et al. , Biochemical J . 3 0 1 (Pt 3) : 8 7 1 - 8 7 7
 Hanger et al. , Trends Mol Med . 1 5 : 1 1 2 - 9 , 2 0 0 9
 Hoffmann et al. , Biochemistry . 3 6 (2 6) : 8 1 1 4 - 2 4 , 1 9 9 7
 Holmes et al. , Proc Natl Acad Sci U S A . 1 1 1 (4 1) : E 4 3 7 6 - 8 5 , 2 0 1 4 30
 Iba et al. , Acta Neuropathol . 1 3 0 (3) : 3 4 9 - 6 2 , 2 0 1 5
 Iba et al. , J Neurosci . 3 3 (3) : 1 0 2 4 - 3 7 , 2 0 1 3
 Julien et al. , Methods Mol Biol . 8 4 9 : 4 7 3 - 9 1 , 2 0 1 2
 Kabsch, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr . 6 6 (Pt 2) : 1 2 5 - 3 2 , 2 0 1 0
 Knappik et al. , J Mol Biol . 2 9 6 : 5 7 - 8 6 , 2 0 0 0 40
 Knight et al. , Platelets . 1 5 : 4 0 9 - 1 8 , 2 0 0 4
 Kohler and Milstein, Nature . 2 5 6 : 4 9 5 - 7 , 1 9 7 5
 Krebs et al. , J Immunol Methods . 2 5 4 : 6 7 - 8 4 , 2 0 0 1
 Lee et al. , Cell Rep . 1 6 (6) : 1 6 9 0 - 7 0 0 , 2 0 1 6
 Lefranc et al. , Dev Comp Immunol . 2 7 : 5 5 - 7 7 , 2 0 0 3
 Leong et al. , Cytokine . 1 6 : 1 0 6 - 1 9 , 2 0 0 1
 Li and Lee, Biochemistry . 4 5 (5 1) : 1 5 6 9 2 - 7 0 50

- 1, 2006
 Liu et al., *Brain Imaging Behav.* 6 (4): 610
 - 20, 2012
 Lonberg et al., *Nature.* 368: 856 - 9, 1994
 Malia et al., *Proteins.* 84: 427 - 434, 2016
 Martin and Thornton, *J Mol Biol.* 263 (5): 8
 00 - 15, 1996
 Matsuo et al., *Neuron.* 13 (4): 989 - 1002, 199
 4
 McCoy et al., *J Appl Crystallogr.* 40 (Pt 4 10
): 658 - 674, 2007
 McEwan et al., 2017, *PNAS* 114 (3): 574 - 9
 Mendez et al., *Nat Genet.* 15: 146 - 56, 1997
 Mercken et al., *Acta Neuropathol.* 84 (3): 2
 65 - 72, 1992
 Mercken, Ph.D. Thesis: University of Antwe
 rp, Wilrijk - Antwerp, 1991
 Mocanu et al., *J Neurosci.* 28 (3): 737 - 48, 2
 008
 Morris et al., *Nat Neurosci.* 18 (8): 1183 - 9 20
 , 2015
 Morris et al., *Neuron*, 70: 410 - 26, 2011
 Murshudov et al., *Acta Crystallogr D Bio
 1 Crystallogr.* 53 (Pt 3): 240 - 55, 1997
 Oddo et al., *J Neurochem.* 102 (4): 1053 - 63,
 2007
 Otvos et al., *J Neurosci Res.* 39 (6): 669 - 7
 3, 1994
 Padlan et al., *Mol. Immunol.* 28: 489 - 98, 199
 1 30
 Peeraer et al., *Neurobiol Dis.* 73: 83 - 95, 2
 015
 Queen et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:
 10029 - 33, 1989
 Scattoni et al., *Behav Brain Res.* 208 (1):
 250 - 7, 2010
 Schroeder et al., *J Neuroimmune Pharmacol.* 11 (1): 9 - 25, 2016
 Seubert et al., *J Biol Chem.* 270 (32): 1891
 7 - 22, 1995 40
 Shi et al., *J Mol Biol.* 397: 385 - 96, 2010
 Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* 20: 685 - 91, 2
 009
 Terwel et al., *J Biol Chem.* 280 (5): 3963 - 7
 3, 2005
 Wischik et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 85
 : 4884 - 8, 1988
 Wu and Kabat, *J Exp Med.* 132: 211 - 50, 1970
 Yang et al., *Protein Eng.* 16: 761 - 70, 2003
 Yoshiyama et al., *Neuron.* 53 (3): 337 - 51, 20 50

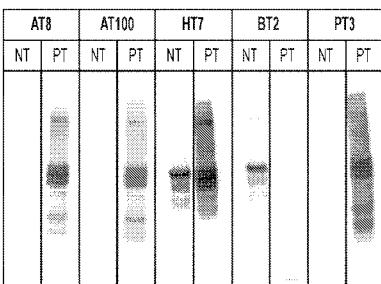
07

Zhao et al., Protein Expr Purif. 67(2):182-9, 2009

【図1】



【図2】



【図3A】



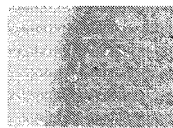
【図3B】



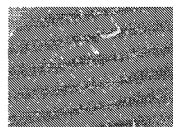
【図3C】



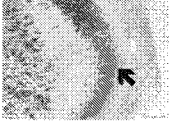
【図3D】



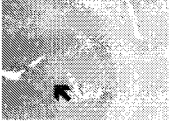
【図3E】



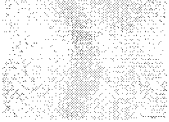
【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



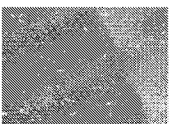
【 図 4 C 】



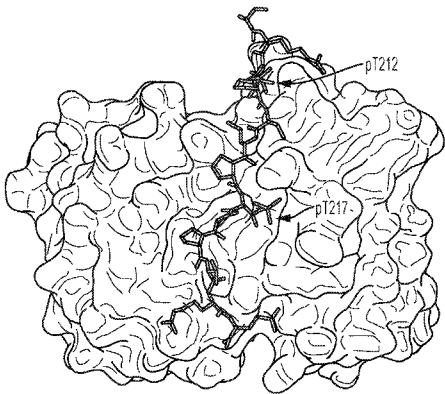
【 図 4 D 】



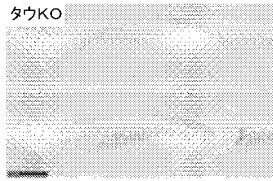
【 図 4 E 】



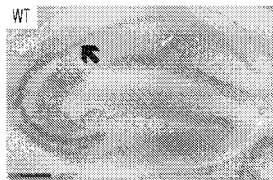
【 図 7 】



【 図 5 A 】



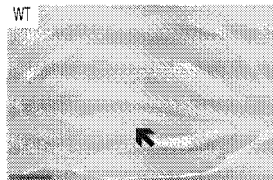
【 図 5 B 】



【 図 6 A 】



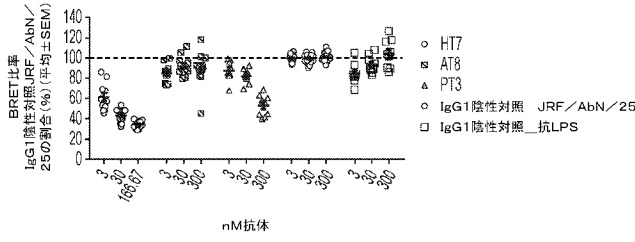
【 図 6 B 】



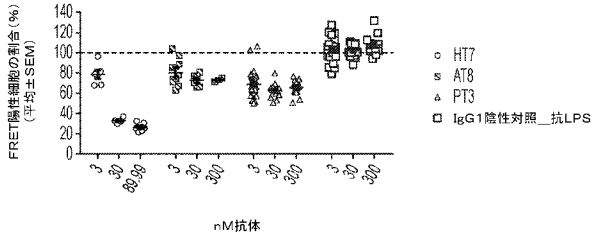
【 図 8 】



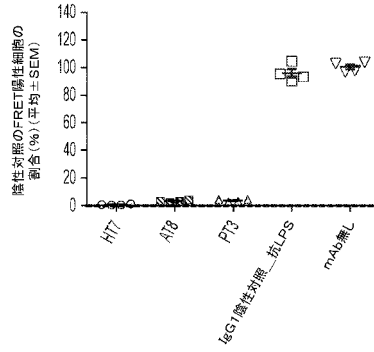
【図 15】



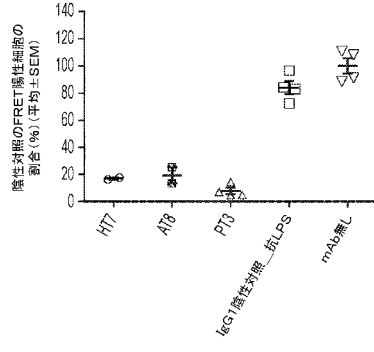
【図 16】



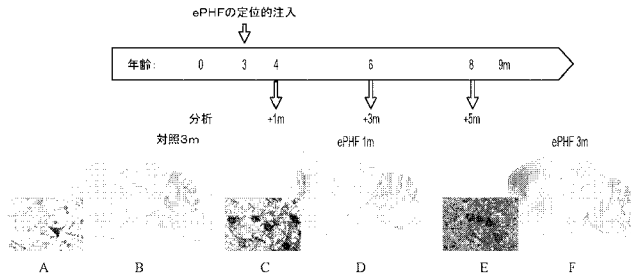
【図 17】



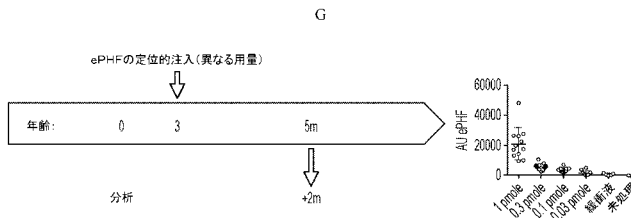
【図 18】



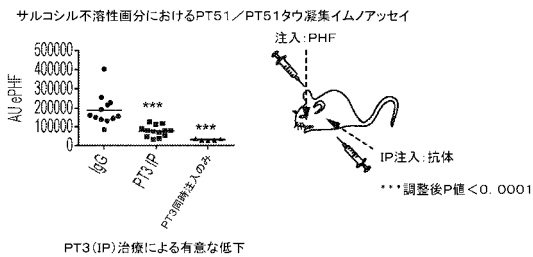
【図 19 - 1】



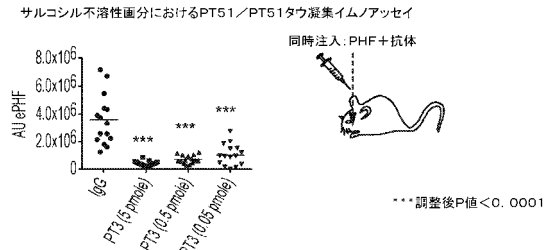
【図 19 - 2】



【図 20】



【図 21】

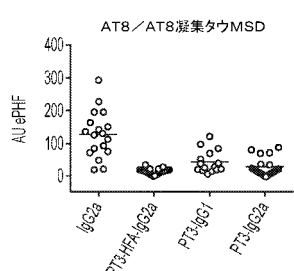


【図 22 A】

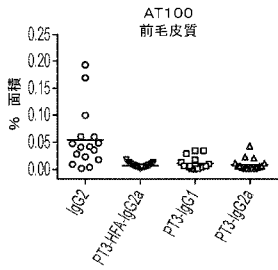
群	同時注入	IP (20mg/kg, 2×/週)	n
1	IgG1	IgG1	19
2	PT3(G1)	PT3(G1)	16
3	PT3(G2a)	PT3(G2a)	18
4	PT3(G2a+HFA)	PT3(G2a+HFA)	15

注入	量	全体的積 (μL)	濃度 (μM)
2.5 μL ePHF	1 pmole タウ	5	0.2
2.5 mL 抗体	25 pmole ab	5	5

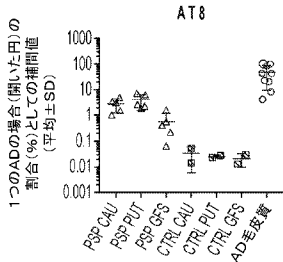
【図 22 B】



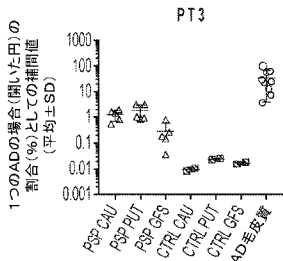
【 図 2 2 C 】



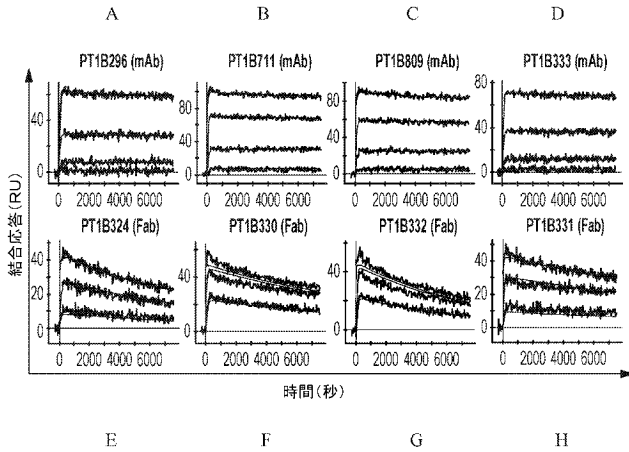
【 図 2 3 A 】



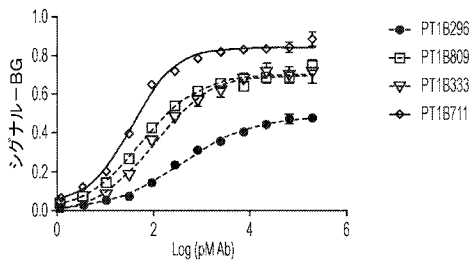
【 図 2 3 B 】



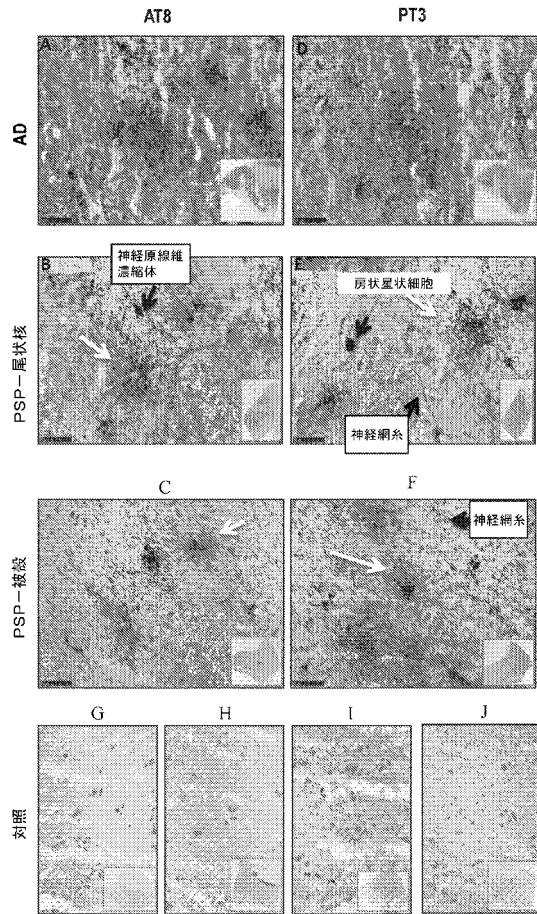
【 図 2 5 】



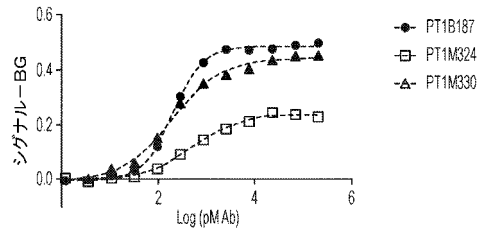
【 図 2 6 A 】



【 図 2 4 】



【 図 2 6 B 】



【配列表】

2020513804000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年10月21日(2019.10.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0060】

【表2】

表2：ヒト化抗PHF- τ 抗体B296のVH（VH10）及びVL（VL7）ドメイン用のCDR配列

Chothia符番スキーム			
V領域ID	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSY (配列番号:1)	SKGGN (配列番号:2)	GWGDYGWFAY (配列番号:3)
VL7	KASQDINRYLN (配列番号:13)	RANRLLD (配列番号:14)	LQYDEFPLT (配列番号:15)
ABM符番スキーム			
V領域ID	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSYAMS (配列番号:4)	SISKGGNTY (配列番号:5)	GWGDYGWFAY (配列番号:6)
VL7	KASQDINRYLN (配列番号:16)	RANRLLD (配列番号:17)	LQYDEFPLT (配列番号:18)
Kabat符番スキーム			
V領域ID	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	SYAMS (配列番号:7)	SISKGGNTYYADSVKG (配列番号:8)	GWGDYGWFAY (配列番号:9)
VL7	KASQDINRYLN (配列番号:19)	RANRLLD (配列番号:20)	LQYDEFPLT (配列番号:21)
IMGT符番スキーム			
V領域ID	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSYA (配列番号:10)	ISKGGNT (配列番号:11)	ARGWGDYGWFAYW (配列番号:12)
VL7	QDINRY (配列番号:22)	RAN (配列番号:23)	LQYDEFPLT (配列番号:24)

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2020513804000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 18/22782
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/00 (2018.01) CPC - C07K 14/4711, C07K 16/18, A61K 39/395, G01N 33/6896, C07K 2317/34, C07K 2317/56		
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)		
See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003/0138972 A1 (VANDERMEEREN) 24 July 2003 (24.07.2003) para [0016]	1-12
A	US 2015/0307600 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 29 October 2015 (29.10.2015) para [0033], [0035], [0037], Table 1, SEQ ID NOs: 13-18, 26, 37-38	1-12
A	US 2012/0058906 A1 (SMIDER et al.) 8 March 2012 (08.03.2012) abstract, Table 41, SEQ ID NO: 3276	1-5, 8, 12/(1-5, 8)
A	US 2005/0288491 A1 (WILSON et al.) 29 December 2005 (29.12.2005) abstract, claim 31, SEQ ID NO: 12	1-5, 8, 12/(1-5, 8)
A	US 2011/0256154 A1 (VINCENT et al.) 20 October 2011 (20.10.2011) para [0009], Table 9	1-12
A	US 2006/0140932 A1 (DICKINSON et al.) 29 June 2006 (29.06.2006) abstract, para [0046], Table 4	1-3, 6-11, 12/(1-3, 8-11)}
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 July 2018		Date of mailing of the international search report 03 AUG 2018
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 18/22782
--

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.: 13-22
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:

----- see extra sheet -----

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.:
claims 1-12
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 18/22782

Continuation of Box No. III, Observations where unity of invention is lacking:

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 1-12, directed to an isolated monoclonal antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to a phosphorylated tau protein at a phosphorylated epitope having or within a sequence comprising phosphorylated T212 and/or phosphorylated T217 of the tau protein. The monoclonal antibody or antigen-binding fragment thereof will be searched to the extent that said antibody comprises HCDRI, HCDR2 and HCDR3 having the polypeptide sequences of SEQ ID NOs: 1, 2 and 3, respectively; LCDRI, LCDR2 and LCDR3 having the polypeptide sequences of SEQ ID NOs: 13, 14 and 15, respectively; a VH having the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 26; and a VL having the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 31. It is believed that claims 1-5, 8 and 12 (in part), limited to the anti-phospho tau mAb comprising HCDR1-3 of SEQ ID NOs: 1-3 and VH SEQ ID NO: 26; and LCDR1-3 of SEQ ID NOs: 13-15 and VL SEQ ID NO: 31 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the anti-phospho tau mAb encompasses amino acids of SEQ ID NOs: 1-3, 13-15, 26 and 31. Additional anti-Phospho Tau mAbs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected monoclonal antibodies. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass 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. An exemplary election would be an anti-Phospho Tau mAb that comprises HCDRI, HCDR2 and HCDR3 having the polypeptide sequences of SEQ ID NOs: 80, 81 and 9, respectively and LCDRI, LCDR2 and LCDR3 having the polypeptide sequences of SEQ ID NOs: 70, 20 and 21, respectively; and a VH having the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 74 and a VL having the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 75 (based on Table 2, instant specification - SEQ ID NOs corresponding to Affinity Matured phospho tau mAb PT1B333) (claims 1-3, 6-11 and 12 (in part)).

The inventions listed as Groups 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

No technical features are shared between the amino acid sequences of the anti-Phospho Tau mAbs of Group I+, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of an isolated monoclonal antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to a phosphorylated tau protein at a phosphorylated epitope having or within a sequence comprising phosphorylated T212 and/or phosphorylated T217 of the tau protein, these shared technical features are previously disclosed by US 2003/0138972/A1 to Vandermeeren et al. (hereinafter 'Vandermeeren'). Vandermeeren discloses monoclonal antibodies or antigen-binding fragment thereof that bind phosphorylated tau protein epitopes comprising T212 and T217 (para [0016] "the monoclonal antibodies of the invention are characterized in that they specifically bind to naturally occurring abnormally phosphorylated tau of which the phosphorylation state is confined to a particular region of the tau molecules ... The epitopes of the present invention are thus defined as the proline rich-region of tau between position 143 and 254 and which can be abnormally phosphorylated at threonine 153 (T153) ... T212, T217 ... and S235 or a combination of these sites included in the epitope of these antibodies, further referred to as a 'PHF-tau epitopes').

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the inventions.

Group I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D

(81)指定国・地域 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

2. T w e e n

(74)代理人 100153693

弁理士 岩田 耕一

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 マーケン, マーク

ベルギー国 2 3 4 0 ベルセ, トルンハウッサーヴェヒ 3 0

(72)発明者 マリア, トーマス

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 1 3 0, フィラデルフィア, ノース 2 9 ティーエイチ
ストリート 8 2 5

(72)発明者 ボージャーズ, マリアンヌ

ベルギー国 2 3 4 0 ベルセ, トルンハウッサーヴェヒ 3 0

(72)発明者 ヴァン コレン, クリストフ

ベルギー国 2 3 4 0 ベルセ, トルンハウッサーヴェヒ 3 0

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C085 AA14 BB11 CC23 DD33 DD62 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA21 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	抗phf-tau抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2020513804A	公开(公告)日	2020-05-21
申请号	JP2019549574	申请日	2018-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	詹森生物科技公司		
申请(专利权)人(译)	扬森Baiotetsuku , Incorporated的忘川每次		
[标]发明人	マーケンマーク マリアトーマス ボージャーズマリアンヌ		
发明人	マーケン,マーク マリア,トーマス ボージャーズ,マリアンヌ ヴァン コレン,クリストフ		
IPC分类号	C12N15/62 C12N15/63 C12N15/12 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395 A61P43/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P25/16 G01N33/53		
CPC分类号	A61K9/0019 A61K2039/505 A61K2039/54 A61P25/28 C07K16/18 C07K16/44 C07K2317/24 C07K2317 /30 C07K2317/34 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/76 C07K2317 /92 G01N33/6896 G01N2800/2821 G01N2800/7047		
FI分类号	C12N15/62.ZNA.Z C12N15/63.Z C12N15/12 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395.N A61P43/00.105 A61P25/00 A61P25/28 A61P25/16 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065 /AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/DD33 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045 /CA40 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 小林顺子 岩田 耕一 铃木康仁		
优先权	62/472214 2017-03-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

已经描述了抗PHF-tau单克隆抗体及其抗原结合片段。还描述了编码抗体的核酸，包含抗体的组合物以及制备抗体的方法和使用抗体治疗或预防诸如tau异常的病症的方法。

FIG. 1

