

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-531580

(P2018-531580A)

(43) 公表日 平成30年11月1日(2018.11.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/06 (2006.01)	C 1 2 N 15/06 1 0 0	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 130 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-501228 (P2018-501228)	(71) 出願人 591143065 ハー・ルンドベック・アクチエゼルスカベ ット デンマーク国, 2500 バルビー, オッ テイリアベエイ, 9
(86) (22) 出願日 平成28年7月12日 (2016.7.12)	
(85) 翻訳文提出日 平成30年3月12日 (2018.3.12)	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2016/066470	
(87) 国際公開番号 W02017/009308	
(87) 国際公開日 平成29年1月19日 (2017.1.19)	(74) 代理人 100092783 弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号 1512211.2	(74) 代理人 100120134 弁理士 大森 規雄
(32) 優先日 平成27年7月13日 (2015.7.13)	(74) 代理人 100141195 弁理士 西澤 恵美子
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	(74) 代理人 100104282 弁理士 鈴木 康仁
(31) 優先権主張番号 1518375.9	
(32) 優先日 平成27年10月16日 (2015.10.16)	
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	
最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 過リン酸化タウに特異的な抗体およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、病理学的過リン酸化 (P H F) タウにおけるリン酸化セリン 3 9 6 残基 (p S 3 9 6) に特異的に結合するモノクローナル抗体の新規な種類、ならびにアルツハイマー病およびタウオパチーの治療にこれらの分子およびそれらのタウ結合フラグメントを使用する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトタウ（配列番号 33）のリン酸化残基 396 に免疫特異的に結合することが可能なモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 2】

無傷の抗体からなる、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

Fv フラグメント（例えば一本鎖 Fv およびジスルフィド結合 Fv）； Fab フラグメント、 Fab' フラグメントおよび F(ab)₂ フラグメントなどの Fab 様フラグメント；および単一の V_H 可変領域または V_L 可変領域などのドメイン抗体からなる群から選択されるエピトープ結合フラグメントを含むかまたはそれからなる、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

10

【請求項 4】

前記抗体が、サブタイプ IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4 の抗体からなる群から選択される、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 5】

ヒトまたはヒト化抗体である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 6】

前記抗体が、タウ（配列番号 33）におけるリン酸化 404 残基に結合することが実質的にできない、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

20

【請求項 7】

- (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR1；
- (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2；
- (c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR3；
- (d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR1；
- (e) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2；および
- (f) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR3

30

を含む、モノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 8】

配列番号 8 の重鎖または配列番号 7 の軽鎖を含む、請求項 7 に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 9】

配列番号 8 の重鎖および配列番号 34 の軽鎖を含む、請求項 7 に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 10】

- (a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR1；
- (b) 配列番号 10 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2；
- (c) 配列番号 11 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR3；
- (d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR1；
- (e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2；および
- (f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR3

40

を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 11】

配列番号 16 の重鎖および / または配列番号 15 の軽鎖を含む、請求項 10 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 12】

50

- (a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ;
- (c) 配列番号 19 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ;
- (d) 配列番号 20 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ;
- (e) 配列番号 21 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ; および
- (f) 配列番号 22 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 13】

配列番号 24 の重鎖および / または配列番号 23 の軽鎖を含む、請求項 12 に記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 14】

- (a) 配列番号 25 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 26 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ;
- (c) 配列番号 27 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ;
- (d) 配列番号 28 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ;
- (e) 配列番号 29 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ; および
- (f) 配列番号 30 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

20

【請求項 15】

配列番号 32 の重鎖および / または配列番号 31 の軽鎖を含む、請求項 14 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 16】

前記重鎖が、配列番号 8、配列番号 16、配列番号 24、配列番号 32、および配列番号 35 からなる群から選択され、前記軽鎖が、配列番号 7、配列番号 15、配列番号 23、および配列番号 36 からなる群から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 17】

- (a) 配列番号 4、配列番号 12、配列番号 20、および配列番号 28 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 5、配列番号 13、配列番号 21、および配列番号 29 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 ; および
- (c) 配列番号 6、配列番号 14、配列番号 22、および配列番号 30 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 ; および
- (d) 配列番号 3、配列番号 11、配列番号 19、および配列番号 27 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

30

【請求項 18】

- (a) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 ;
- (c) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 ; および
- (d) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

40

【請求項 19】

2つの残基がチロシン残基から除去されたリン酸化セリンを含む過リン酸化タウのアミノ酸モチーフに対して選択的なモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

50

【請求項 20】

前記アミノ酸モチーフが、配列：

- Y - X - S (リン酸化) - P -

を有し、ここで、Y がチロシンであり、X が天然アミノ酸であり、P がプロリンであり、S (リン酸化) が、リン酸化ヒドロキシル側鎖を有するセリンである、請求項 19 に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 21】

Fc 領域を含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 22】

物質の生体内半減期を増加させるための部分をさらに含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 23】

i) 抗体は、非リン酸化タウに実質的に結合しない；ii) 抗体は、396 がリン酸化されないとき、404 においてリン酸化されるタウに実質的に結合しない；iii) 抗体は、396 においてリン酸化されるタウに結合する；およびiv) 抗体は、396 および404 が両方ともリン酸化されるとき、タウに結合するという試験基準にしたがって、リン酸化残基 396 を含むヒトタウへの免疫特異的結合を示す、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 24】

2N4R タウの残基 386 ~ 410 をカバーする TDHGA E I V Y K { P } S P V V S G D T { P } S P R H L (配列番号 37) 内の少なくとも 18 連続アミノ酸残基、例えば少なくとも 20 連続アミノ酸残基を含む二リン酸化ペプチドに対して誘導される、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 25】

2N4R タウの残基 386 ~ 410 をカバーする TDHGA E I V Y K { P } S P V V S G D T { P } S P R H L (配列番号 37) を含む 18 ~ 40、例えば 18 ~ 30、例えば 20 ~ 30 連続アミノ酸残基を含む二リン酸化ペプチドに対して誘導される、請求項 24 に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 26】

月齢をマッチさせた健常対照より AD 罹患患者に由来するリン酸化タウ (p タウ) に対する特異性を有するモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントであって、前記モノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが、リン酸化 - および多量体特異的 Setup 1 E L I S A を用いて、AD および健常対照被験体に由来する脳ホモジネート中のリン酸化タウ (p タウ) (配列番号 33) を検出するための E L I S A ベースのアッセイにおいて健常対照材料と比較した AD 疾患材料に対する特異性の 50 倍超、例えば 100 倍超の増加の、月齢をマッチさせた健常対照に由来するタウより AD 罹患患者に由来するリン酸化タウ (p タウ) に対する特異性の差を有するようになっている、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 27】

AD 罹患タウに対する特異性を有するモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントであって、前記モノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが、リン酸化 - および多量体特異的 Setup 1 E L I S A を用いて、AD および健常対照被験体に由来する脳ホモジネート中のリン酸化タウ (p タウ) (配列番号 33) を検出するための E L I S A ベースのアッセイにおいて健常対照材料と比較した AD 疾患材料に対する特異性の 50 倍超、例えば 100 倍超の増加の、月齢をマッチさせた健常対照より AD に対する特異性の差を有するようになっている、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 28】

ヒトタウ (配列番号 33) のリン酸化残基 396 に免疫特異的に結合することが可能な

10

20

30

40

50

、2N4Rタウの残基386～410をカバーするリン酸化ペプチド：TDHGA E I V Y K { P } S P V V S G D T { P } S P R H L（配列番号37）に対して誘導される、請求項1に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項29】

ヒト細胞株、非ヒト哺乳動物細胞株、昆虫、酵母または細菌細胞株などの細胞株において生産または製造された、請求項1～28のいずれか一項に記載の抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項30】

CHO細胞株、HEK細胞株、BHK-21細胞株、マウス細胞株（骨髓腫細胞株など）、線維肉腫細胞株、PER.C6細胞株、HKB-11細胞株、CAP細胞株およびHuH-7ヒト細胞株において生産される、請求項29に記載の抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

10

【請求項31】

前記モノクローナル抗体が、i)リン酸化エピトープS396に対して免疫特異的であり、かつii)ヒトアルツハイマー病の脳に由来する過リン酸化タウを特異的に認識するクローンを単離するために、ヒト病理学的および非病理学的タウでハイブリドーマをスクリーニングすることによって単離されたハイブリドーマによって発現され、前記抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが、病理学的および非病理学的ヒトタウタンパク質を区別することができる、請求項1に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

20

【請求項32】

前記抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが、検出可能な部分をさらに含む、請求項1～31のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項33】

前記検出可能な部分が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、請求項32に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項34】

請求項1～33のいずれか一項に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを含む調製物であって、前記調製物が、タウに結合することが可能でないかまたは前記調製物の抗タウ機能性を実質的に変更しない自然発生する抗体を実質的に含まず、前記機能性が、

30

(i)非リン酸化タウに結合することが実質的にできないこと；

(ii)S404においてリン酸化され、S396においてリン酸化されないタウに結合することが実質的にできないこと；

(iii)S396においてリン酸化されるタウに結合する能力；

(iv)S396およびS404の両方においてリン酸化されるタウに結合する能力；

(v)それがリン酸化404残基に結合することが実質的にできないようにまたはそれがS396に優先的に結合するように、リン酸化タウ残基S396およびS404を選択的に区別する能力；

40

(vi)ヒトアルツハイマー病の脳に由来する過リン酸化タウに結合する能力；

(vii)病理学的および非病理学的ヒトタウタンパク質を区別する能力；および/または

(viii)実施例に記載されるように、トランスジェニックマウスに由来する免疫枯渇されたrTg4510抽出物とともに使用されるとき、過リン酸化タウ64kDaおよび70kDaバンドを少なくとも90%だけ特異的に減少させる一方、55kDaタウバンドを10%超減少させない能力からなる群から選択される調製物。

【請求項35】

50

請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを含む調製物であって、前記抗体または前記そのエピトープ結合フラグメントが、天然抗タウ抗体の構造と比べて、そのアミノ酸配列の構造変化を有し、前記構造変化により、前記抗体または前記フラグメントが、前記天然抗タウ抗体によって示される機能性と比べて変化した機能性を示し、前記機能性が、

(i) 非リン酸化タウに結合することが実質的にできないこと；

(i i) S 4 0 4 においてリン酸化され、S 3 9 6 においてリン酸化されないタウに結合することが実質的にできないこと；

(i i i) S 3 9 6 においてリン酸化されるタウに結合する能力；

(i v) S 3 9 6 および S 4 0 4 の両方においてリン酸化されるタウに結合する能力；

(v) それがリン酸化 4 0 4 残基に結合することが実質的にできないようにまたはそれが S 3 9 6 に優先的に結合するように、リン酸化タウ残基 S 3 9 6 および S 4 0 4 を選択的に区別する能力；

(v i) ヒトアルツハイマー病の脳に由来する過リン酸化タウに結合する能力；

(v i i) 病理学的および非病理学的ヒトタウタンパク質を区別する能力；および / または

(v i i i) 本明細書に記載されるように、トランスジェニックマウスに由来する免疫枯渇された r T g 4 5 1 0 抽出物とともに使用されるとき、過リン酸化タウ 6 4 k D a および 7 0 k D a バンドを少なくとも 9 0 % だけ特異的に減少させる一方、5 5 k D a タウバンドを 1 0 % 超減少させない能力からなる群から選択される調製物。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント、または請求項 3 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の調製物、および薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物。

【請求項 3 7】

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントをコードするか、またはその構成鎖をコードする核酸。

【請求項 3 8】

治療に使用するための、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント、請求項 3 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の調製物、または請求項 3 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 9】

タウオパチーを治療、診断またはイメージングするのに使用するための、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント、請求項 3 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の調製物、または請求項 3 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 0】

アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症 (A G D)、精神病、特に、A D に起因する精神病または A D の患者における精神病、レビー小体型認知症の患者の精神医学的症状、進行性核上まひ (P S P)、前頭側頭認知症 (F T D またはその変異型)、T B I (急性または慢性外傷性脳損傷)、大脳皮質基底核変性症 (C B D)、ピック病、原発性加齢性タウオパチー (P A R T)、神経原線維変化優位型老年性認知症、パンチドランカー、慢性外傷性脳症、脳卒中、脳卒中の回復、パーキンソン病に関連する神経変性、染色体に関連するパーキンソン病、リテスコ - ボディグ病 (グアムパーキンソン認知症複合)、神経節腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳炎後パーキンソン病、亜急性硬化性全脳炎、ハンチントン病、鉛脳症、結節性硬化症、ハレルフォルデン・スパッツ病およびリポフスチン症からなる群から選択されるタウオパチーを治療するのに使用するための、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント、または請求項 3 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の調製物または医薬組成物、または請

10

20

30

40

50

求項 3 6 に記載の組成物。

【請求項 4 1】

タウオパチーを治療、診断またはイメージングするための薬剤の製造に使用するための、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント、または請求項 3 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の調製物、または請求項 3 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 2】

前記薬剤が、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症 (A G D)、進行性核上まひ (P S P)、大脳皮質基底核変性症 (C B D)、A D に起因する精神病または A D の患者における精神病、およびレビー小体型認知症の患者の精神医学的症状を治療するためのものである、請求項 4 1 に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント、または調製物または医薬組成物、または組成物。

10

【請求項 4 3】

被験体におけるアルツハイマー病または他のタウオパチーを治療、診断またはイメージングする方法であって、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント、請求項 3 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の調製物、または請求項 3 6 に記載の医薬組成物を、有効量で前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項 4 4】

前記治療が、長期である、請求項 4 3 に記載の方法。

20

【請求項 4 5】

前記長期治療が、少なくとも 2 週間、例えば少なくとも 1 ヶ月間、6 ヶ月間、1 年間またはそれ以上にわたる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記被験体がヒトである、請求項 4 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

治療に使用するための、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の抗体、またはそのフラグメント、請求項 3 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の調製物、または請求項 3 6 に記載の医薬組成物を含むキット。

【請求項 4 8】

被験体の脳における前記タウの存在または量を検出または測定するのに使用するための、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント、または前記抗体またはフラグメントを含む調製物または医薬組成物。

30

【請求項 4 9】

前記検出または測定が、前記タウに結合された前記抗タウ抗体のインビボイメージングを含む、請求項 4 8 に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント、調製物または医薬組成物。

【請求項 5 0】

前記検出または測定が、前記タウに結合された、前記抗タウ抗体または前記そのフラグメントのエキスピボイメージングを含む、請求項 4 8 または 4 9 に記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント、調製物または医薬組成物。

40

【請求項 5 1】

過リン酸化タウを含むもつれから過リン酸化タウを除去する方法であって、過リン酸化タウを抗体と接触させる工程と含み、前記もつれから 9 0 % の過リン酸化タウが取り除かれるように、前記抗体が、リン酸化残基 3 9 6 を有するタウに対して選択的であり、または請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載されるとおりである方法。

【請求項 5 2】

患者におけるアルツハイマー病の進行を遅らせる方法であって、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のリン酸化残基 3 9 6 を有するタウに対して選択的な抗体を投与することによって、前記患者における病理学的タウタンパク質の蓄積を減少させるかまたは軽減す

50

る工程を含む方法。

【請求項53】

残基リン酸化S396を含む病原性過リン酸化タウに対して免疫特異的な高特異性、高親和性抗体を生成するための方法によって生成される抗体であって、前記方法が、

(A) 2N4Rタウの残基386~410をカバーするTDHGA E I V Y K { P } S P V V S G D T { P } S P R H L (配列番号37)を含む、18~40、例えば18~30、例えば20~30連続アミノ酸残基を含む二リン酸化ペプチドを含む免疫原を哺乳動物に注入して、それによって、前記哺乳動物を免疫する工程と；

(B) 前記哺乳動物の前記免疫化を2回以上繰り返す工程と；

(C) 残基リン酸化S396を含む病原性過リン酸化タウに結合することが可能であるが、非病原性タウに結合する能力が実質的に低い高特異性、高親和性抗体の存在について、前記繰り返し免疫された哺乳動物に由来する血清試料をスクリーニングする工程と；

(D) 前記高特異性、高親和性抗体を回収する工程とを含む抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、病理学的過リン酸化(PHF)タウにおけるリン酸化セリン396残基(pS396)に特異的に結合するモノクローナル抗体の新規な種類、ならびにアルツハイマー病およびタウオパチーの治療にこれらの分子およびそれらのタウ結合フラグメントを使用する方法に関する。

【0002】

配列表の参照

本出願は、米国特許法施行規則(37 C.F.R.)第1.821条に従う1つまたは複数の配列表(以下参照)を含み、これは、コンピュータ可読媒体(ファイル名:0995.txt、2016年6月23日に作成され、40kBのサイズを有する)で開示され、このファイルは、全体が参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0003】

アルツハイマー病(AD)および認知症などの加齢性神経変性疾患は、現在、最大の社会的課題の1つである。世界保健機関(World Health Organization)は、高齢者の介護のコストが、今後増加し続け、診断される認知症事例の数が2050年までに3倍になるであろうと推定している(World Health Organization and Alzheimer's Disease International - Status Report (2012) DEMENTIA: A public health priority, WHO)。ADの最初の治療は、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤およびNMDA調節剤などの神経伝達物質調節剤であった。これらの治療は、世紀の変わり目に利用可能になり、依然として、認知症およびADに関連する記憶障害の症状緩和のための基礎を成すものである。しかしながら、これらの薬剤は、ADの根本原因である、アミロイド-(A)ペプチドおよびタウタンパク質凝集体の蓄積ならびにそれに関連する、ニューロンシナプス、最終的にはニューロンの喪失を標的にしていない。

【0004】

高齢者の長期的なコミュニティ規模の研究(Weiner, M.W. et al. (2014) ADNI online: <http://www.adni-info.org/>; Breteler, M.M. et al. (1992) Neuroepidemiology 11 Suppl 1, 23-28; Launer, L.J. (1992) Neuroepidemiology 11 Suppl 1, 2-13)は、大規模なゲノムワイド関連解析(Lambert, J.C. et al. (2013) Nat. Genet. 45, 1452-1458)とともに、ADが認知症の多様な混合であり、進行

10

20

30

40

50

したAD患者の最大で10パーセントに、アミロイド病変がないことを示した(Crarry, J. F. et al. (2014) *Acta Neuropathol.* 128, 755-766)。さらに、BraakおよびBraakによる重要な病理学的研究(Braak, H. and Braak, E. (1996) *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 165, 3-12)は、解剖前の神経原線維変化病変の程度と認識状態との間の明らかな相関関係を実証した。これらの観察は、幾人かの研究者(Nelson, P. T. et al. (2012) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 362-381)および最近の長期的なバイオマーカー研究によって裏付けられており、このバイオマーカー研究は、タウおよびリン酸化タウの脳脊髄液(CSF)レベルが、疾患の初期および後期を通して増加することを示す(Jack, C. R., Jr. et al. (2013) *Lancet Neurol.* 12, 207-216)。

10

【0005】

上に示されるように、微小管関連タンパク質タウ、およびその過リン酸化形態は、ADの主な特徴の1つである細胞内神経原線維変化の主な構成要素である。さらに、タウの特定の遺伝的変異体が、家族性の前頭側頭型認知症(FTD)に関連している。ADにおけるタウ病変の出現は、内嗅皮質から出発し、その後、海馬および皮質領域が続く明確な空間的パターンで起こる(Braak, H. and Braak, E. (1996) *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 165, 3-12)。また、タウ病変の特定の段階が、認知能力と深く関係している(Nelson, P. T. et al. (2012) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 362-381; Braak, E. et al. (1999) *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 249 Suppl 3, 14-22)。総合すると、このエビデンスは、ADについてのタウに基づく仮説の基礎となる。それは、タウの細胞内蓄積が、微小管変性および脊柱崩壊をもたらすことを含む。結果として、ニューロン間の伝達の機能不全および細胞死が続く。最近、タウ自体が、1つの細胞から次の細胞へと神経変性を伝達し得る内因性病原性(endo-pathogenic)種となり得ることも示された(Clavaguera, F. et al. (2009) *Nat. Cell Biol.* 11, 909-913)。

20

【0006】

I. 内因性病原体としてのタウ

Clavagueraおよび同僚は、タウ自体が内因性病原体(endo-pathogen)として働き得ることを実証した(Clavaguera, F. et al. (2009) *Nat. Cell Biol.* 11, 909-913)。低スピン(low spin)脳抽出物を、P301Sタウトランスジェニックマウスから単離し(Allen, B. et al. (2002) *J. Neurosci.* 22, 9340-9351)、希釈し、幼若ALZ17マウスの海馬および皮質領域に注入した。ALZ17マウスは、遅い病変(late pathology)のみを発現するタウトランスジェニックマウス株である(Probst, A. et al. (2000) *Acta Neuropathol.* 99, 469-481)。注入されたALZ17マウスは、固体線維状病変を直ぐに発現し、P301Sマウスに由来する免疫枯渇された脳抽出物または野生型マウスに由来する抽出物の投与は、タウ病変を誘発しなかった。可溶性(S1)およびサルコシル不溶性タウ(P3)中の脳抽出物の分別(Sahara, N. et al. (2013) *J. Alzheimer's Dis.* 33, 249-263)およびALZ17マウスへのこれらの注入は、P3画分が、病変の誘発に最も有効であることを実証した。それは、細胞内の過リン酸化線維状タウの大部分を含有する。病変の大部分は、P301S抽出物を野生型マウスの脳内に注入した場合にも誘発され得るが、NFTは形成されなかった。その後の研究において、Clavagueraらは、他のタウオパチー(嗜銀顆粒性認知症(AGD)、進行性核上まひ(PSP)、および大脳皮質基底核変性症(CBD))の死後脳組織から抽出されたヒトタウも、ALZ17モデルにおいてタウ病変を誘発し得ることを示した(Clavaguera, F. et al. (2013) *Proc. Na*

30

40

50

t l . A c a d . S c i . U . S . A . 1 1 0 , 9 5 3 5 - 9 5 4 0) 。 これらのデータの提示以来、いくつかの他のタウシーディングおよび拡散モデルが報告されている (A h m e d , Z . e t a l . (2 0 1 4) A c t a N e u r o p a t h o l . 1 2 7 , 6 6 7 - 6 8 3 ; W a l k e r , L . C . e t a l . (2 0 1 3) J A M A N e u r o l . 7 0 , 3 0 4 - 3 1 0) 。 これらの研究からの主な結論は、細胞内封入体中の病原性タウが細胞から細胞周辺腔中へと分泌される機構を示す。次に、病理学的タウ材料は、順行および逆行方向の両方で、小胞の鞘に沿って輸送され、その後、バルクエンドサイトーシスによって、隣接する細胞によって取り込まれる。この機構は、ヒトの疾患において観察される病変の拡散が、明確な解剖学的パターンにしたがう理由を説明する。興味深いことに、病理学的タウの末梢投与は、ALZ17マウスにおけるタウ病変の形成を加速させ得る (C l a v a g u e r a , F . e t a l . (2 0 1 4) A c t a N e u r o p a t h o l . 1 2 7 , 2 9 9 - 3 0 1) 。 この拡散機構は、他のタンパク質症における疾患伝播を説明し得る (G o e d e r t , M . e t a l . (2 0 1 0) T r e n d s N e u r o s c i . 3 3 , 3 1 7 - 3 2 5 ; S i g u r d s s o n , E . M . e t a l . (2 0 0 2) T r e n d s M o l . M e d . 8 , 4 1 1 - 4 1 3) 。

10

【0007】

II. タウ種

タウタンパク質が、内因性病原体として働き得るという発見は、潜在的な介入治療において標的にされ得る「病原性種」への探求を引き起こした。

【0008】

微小管関連タンパク質タウ遺伝子 (M A P T) は、ヒトゲノムの17番染色体に位置し、成人ヒト脳においてタウタンパク質の6つのアイソフォームを発現する。これらのアイソフォームは、M A P T 遺伝子内の16のエクソンのうちのエクソン2、3および10の選択的スプライシングから生じる。エクソン2および3は、29のアミノ酸反復を発現し、エクソン10は、さらなる微小管結合領域を発現する。結果として、タウアイソフォームは、0、1または2つのN末端反復および3または4つのC末端微小管結合領域 (3 R または 4 R タウ) を含有する。一般的に、タウの6つのアイソフォームが発現される。最長 (2 N 4 R) および最短 (0 N 3 R) アイソフォームは、それぞれ441および352アミノ酸からなる (K o l a r o v a , M . e t a l . (2 0 1 2) I n t . J . A l z h e i m e r s . D i s . 2 0 1 2 , 7 3 1 5 2 6) 。 タウのN末端突出領域 (2 N 4 R) は、44のアミノ酸のグリシンに富むテイルからなり、残基45~102は、2つの強酸性領域を包含する (N 1 、 N 2 ドメイン) 。 2つのプロリンに富む領域は、残基151~243 (P 1 、 P 2 ドメイン) において見られる。タンパク質の残りの部分は、4つの微小管結合領域 (R 1 ~ R 4) 、続いて、短いC末端領域によって構成される。

20

30

【0009】

タウは、非常に可溶性でかつ高リン酸化に不安定なタンパク質である。タウの最長アイソフォーム中のアミノ酸残基のうち約20パーセントまたは85個が、潜在的な (S e r 、 T h r または T y r) リン酸化部位である。これらのほぼ半分が、実験的に観察され (H a n g e r , D . P . e t a l . (2 0 0 9) T r e n d s M o l . M e d . 1 5 , 1 1 2 - 1 1 9 ; H a s e g a w a , M . e t a l . (1 9 9 2) J . B i o l . C h e m . 2 6 7 , 1 7 0 4 7 - 1 7 0 5 4) 、微小管結合領域の末端残基の周りに集まる。タウは、細胞周期中に動的にリン酸化および脱リン酸化される。タウは、減数分裂を起こさせるために微小管から解離しなければならない。有糸分裂後細胞 (分化したニューロン) におけるその主な役割は、最適な軸索輸送を可能にするよう、微小管安定剤として働くことである。タウは、そのほぼ脱リン酸化された形態でのみ微小管と結合することができ、したがって、リン酸化は、ニューロン内の直接の微小管結合 / 解離スイッチとして働く。正常な条件下で、細胞質タウは、平均して2つのリン酸化部位を含有する。対らせん状線維状材料において、少なくとも7~8つの部位が、リン酸化されている (H a n g e r , D . P . e t a l . (2 0 0 9) T r e n d s M o l . M e d . 1 5 , 1 1 2 - 1 1 9 ; H a s e g a w a , M . e t a l . (1 9 9 2) J . B i o l . C h e m .

40

50

267, 17047 - 17054)。過リン酸化、対らせん状線維状タウは、アルツハイマー病の主な特徴であり (Kosik et al. (1986) PNAS, 86, 4044 - 4048)、過リン酸化タウの明確な移動度シフトが、ヒトAD脳材料の免疫細胞化学分析において観察される。

【0010】

X線結晶構造解析またはNMR分光法のような従来の構造法を用いてタウタンパク質を研究することは、その準安定性を反映して難しかった。このような研究は、主に、非リン酸化タンパク質のドメインフラグメントにおいて行われた。NMR分光法を用いた、完全長タウ(2N4R)に関するこれまでの構造研究のみが、タンパク質が、安定した二次構造のごくわずかな伸長を含むことを明らかにしている (Mukrasch, M. D. et al. (2009) PLoS Biol. 7, e34)。この分析は、ペプチド骨格の二次構造が、シート構造を取る傾向が高いことを示す。骨格の最初の200残基は、微小管結合領域を包含するC末端よりかなり秩序化されている。溶液中のタンパク質内の多くの特定の長距離相互作用の存在は、それが非常に秩序化されたモルテングロビュール状態で存在することを示す (Ohgushi, M. and Wada, A. (1983) FEBS Lett. 164, 21 - 24)。

10

【0011】

特にカスパーゼおよびカルpain (Asp13、Glu391およびAsp421)によって生成されるタウのプロテアーゼ産物は、もつれ材料(tangle material)中で同定された (Gamblin, T. C. et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 10032 - 10037)。特に、Asp421における切断が、自由Asp421末端に結合するタウC3抗体を用いて詳細に研究された。この切断は、アポトーシスの誘発に関連するAD発症の初期事象として仮定された (deCalignon A. et al. (2010) Nature 464, 1201 - 1204)。Asp13におけるN末端切断およびGlu391におけるC末端切断は、発症の後期事象とみなされる (deCalignon A. et al. (2010) Nature 464, 1201 - 1204; Delobel, P. et al. (2008) Am. J. Pathol. 172, 123 - 131)。最近、さらなるN末端フラグメント(残基1~224)が、ADおよびPSP患者に由来するCSFにおいて同定され、疾患および特に病原の初期マーカーであることが仮定された (米国特許出願第14/092539号明細書; Bright, J. et al. (2014) Neurobiol. Ageing, 1 - 17)。同様のカルpain切断フラグメントが、他のグループによって報告された (Ferreira, A. and Biggio, E. H. (2011) Mol. Med. 17, 676 - 685; Reinecke, J. B. et al. (2011) PLoS One. 6, e23865)。

20

30

【0012】

過リン酸化およびタウの分画のほか、翻訳後アセチル化 (Cohen, T. J. et al. (2011) Nat. Commun. 2, 252; Min, S. W. et al. (2010) Neuron 67, 953 - 966)およびO-GlcNAc化 (Zhu, Y. et al. (2014) J. Biol. Chem.)が、ADに関連するもつれ病変の形成における病変規定過程であることが提示された。

40

【0013】

III. タウ免疫療法

免疫療法は、従来、受動および能動ワクチン手法に分けられる。能動ワクチン手法では、病原因子が患者に注入され、自然免疫系が免疫応答を引き起こす。これは、投与された抗原に対する高親和性抗体を生成するB細胞の成熟を誘発する。受動ワクチン手法では、自然免疫系の誘発は、抗原に対して特異的な抗体を注入することによって回避される。次に、固有のクリアランス系が、抗体結合リガンドを除去する。

【0014】

AC免疫は、タウのリン酸化セリン409に対するマウスモノクローナル抗体を追跡す

50

る。抗体を、ヒトADおよび対照脳組織に対してプロファイリングし、もつれ病変を認識するそれらの能力に基づいて選択した。2つの抗体のヒト化形態、hACI-36-2B6-Ab1およびhACI-36-3A8-Ab1は両方とも、アミノ酸401~418内のタウエピトープに結合する(国際公開第2013/151762号パンフレット)。
【0015】

Roger Nitschのグループは、変性タウオパチーの兆候を有さない高齢の健康個体からタウ自己抗体を単離した。タウ特異的抗体を発見するために、いくつかの抗体を、完全長組み換えヒトタウ(2N4R)を用いて単離した。次に、これらを、疾患および健康個体に由来するタウ単離物を区別するそれらの能力についてスクリーニングした。3つの主要な抗体、4E4、4A3および24B2が、特許文献に記載されている(国際公開第2012049570号パンフレット;米国特許出願公開第2012087861号明細書)。それらのエピトープマッピングは、全てが、位置V339~K369の、微小管結合領域内およびそのC末端のアミノ酸を認識することを示す。これらの抗体は、リン酸化特異性を示さない。

【0016】

C2N Diagnosticsは、主に、神経変性疾患の早期発見のための診断手段の開発に重点を置いている。完全長ヒトおよびマウスタウタンパク質に対する抗体を生成した。ヒトタウおよびマウスタウをそれぞれ認識する、8つおよび5つの抗体を同定した(Yanamandra, K. et al. (2013) Neuron 80, 402-414)。異なる結合反応速度を有する3つの抗体を、インビボの評価のために選択した。すなわち、タウ残基306~320、7~13および25~30をそれぞれ認識する、HJ9.3、HJ9.4およびHJ8.5であり、最後のものは、ヒトタウに特異的である。また、抗体を、タウの細胞間伝播の巧妙な機構的レポーターアッセイにおいて病変の転移を防ぐそれらの能力に基づいて選択した(Sanders, D.W. et al. (2014) Neuron 82, 1271-1288; Kfoury, N. et al. (2012) J. Biol. Chem. 287, 19440-19451)。P301Sトランスジェニックマウスにおける長期の脳室内(i.c.v.)注入試験におけるそれらの評価は、処理されたマウスの免疫組織化学的分析におけるAT8染色によって測定した際の過リン酸化タウタンパク質のレベルを減少させるそれらの能力を実証した。

【0017】

Peter Daviesの抗体は、ADおよび対照脳材料における病理学的タウと正常なタウとを区別し得る診断手段として元々は開発された(Greenberg, S.G. and Davies, P. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 5827-5831)。PHF1およびMC1抗体の治療的有用性の評価を、P301SおよびJPNL3において実証した(P301L)(Boutajangout, A. et al. (2011) J. Neurochem. 118, 658-667; Chai, X. et al. (2011) J. Biol. Chem. 286, 34457-34467; D'Abramo, C. et al. (2013) PLoS One. 8, e62402 mice)。PHF1が、線状リン酸化タウエピトープ(pS396、pS404)を認識する一方、MC1は、線状配列の2つの明確な部分を必要とする構造的タウエピトープ、残基46~202内のエピトープおよび残基312~342間のC末端エピトープを認識する立体配座依存性抗体である(Jicha, G.A. et al. (1997) J. Neurosci. Res. 48, 128-132)。長期の12~13週間の免疫化試験におけるこれらの2つの抗体の注入は、他の脳領域の中でも特に脊髄および脳幹病変のかなりの減少をもたらし、これは、これらのマウスにおいて観察される運動障害の軽減に置き換えられる(D'Abramo, C. et al. (2013) PLoS One. 8, e62402)。

【0018】

iPerian/Bristol Meyers Squibbは、誘導多能性幹細胞に基づく神経培養において活動亢進を促進した、タウのN末端フラグメント(etau:

10

20

30

40

50

残基 1 ~ 224) から構成される仮定された病理学的タウ種に対するタウ抗体を開発した。抗体のポートフォリオが開発されたが、特性決定は、残基 9 ~ 18 内の N 末端エピトープを認識する抗体 IPN001 および IPN002 に重点を置いていた。したがって、これらの抗体は、疾患の初期兆候であり得る、段階的な AD および PSP 患者に由来する CSF における高いタウレベルを検出する。JPNL3 (P301L) マウスにおける抗体のインビボ注入は、進行性運動障害の部分的な回復をもたらした (米国特許出願第 14 / 092539 号明細書)。

【0019】

Einar Sigurdsson は、タウに基づく免疫療法の有効性を実証する最初のプログラムであった。Adju-Phos 補助剤と一緒にタウペプチド 379 ~ 408 [pS396、pS404] からなる能動ワクチンを用いて、JPNL3 (P301L) マウスを免疫した。この研究において、タウ病変の著しい減少が、対照動物と比較したときに、ワクチンで処理されたマウスにおいて観察された。タウオパチー関連運動表現型の軽減が、同様に検出された。その有効性が、突然変異体タウによって駆動されない異なるマウスモデル (htau/PS1) において確認された (Boutajangout, A. et al. (2011) A A I C 2011 (7, issue 4, Supplement edn) p. s 480 - s 431; Congdon, E. E. et al. (2013) J. Biol. Chem. 288, 35452 - 35465; Gu, J. et al. (2013) J. Biol. Chem. 288, 33081 - 33095)。

【0020】

Prothena は、K369I (K3) トランスジェニックタウマウスおよび P301L マウスモデルにおいて 3 つのタウ抗体を評価した。様々な特性を有する抗体を、インビボの評価のために選択した。異なるアイソタイプ (IgG1/k および IgG2a/k) を有する 2 つの pS404 抗体または総 (pan) 抗タウ抗体 (IgG1/k) を、長期のパラダイムで注入した。K369I マウスを、3 週齢から開始して 21 週間にわたって週に 1 回の注入で処理し、P301L マウスを、4 月齢から開始して 7 ヶ月間にわたって週に 1 回の注入で処理した。タウ陽性の神経原線維封入体の減少が、IgG2a/k pS404 抗体を用いた K3 マウスにおいて観察された。pS404 抗体の両方が、pS422 陽性タウのレベルを減少させることができた一方、pan-抗タウ抗体で処理されたマウスにおいて減少は観察されなかった。これらの研究は、1) タウクリアランスは、アイソタイプ依存性であり得ること、および; 2) 総-抗タウ抗体が過リン酸化タウを減少させることができなかったため、疾患に関連するタウ種を標的にすることが重要であり得ることを示唆している (PCT/US2014/025044 号明細書)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

本発明の発明者らは、リン酸化タウセリン残基 396 (pS396) に特異的な抗体を意外にも発見し; これは、先行技術と対照的に、主に、396 および 404 残基の両方においてリン酸化されるか、404 残基のみまたはタウにおける他の残基においてリン酸化されるタウタンパク質を認識する抗体である。

【0022】

本発明者らは、ヒト病理学的タウに対する著しい特異性および選択性をさらに有する抗体を開発した。病原性タウタンパク質に対して非常に選択的かつ特異的な抗体が必要とされている。本発明の抗体は、国際公開第 2013/050567 号パンフレットの抗体 (国際公開第 2013/050567 号パンフレットの図 1 を参照) と比較して、非病理学的タウよりヒト病理学的タウに対するはるかに高度な特異性および選択性を示す。特異的結合を有することが報告された、国際公開第 2012/045882 号パンフレットの抗体は、タウアミノ酸 393 ~ 401、396 ~ 401、394 ~ 400 および 393 ~ 400 の 6 ~ 9 つの残基アミノ酸配列から誘導された。病原性過リン酸化タウに対して誘導された、本発明の抗体からのこの構築物は、本明細書に記載されるより長いアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を含む。

【0023】

実施例に示されるように、5つの公開されたタウ抗体：hACI-2B6（国際公開第2013151762号パンフレットに記載されている）；IPN002（国際公開第2014028777号パンフレットに記載されている）；HJ8.5（国際公開第2014008404号パンフレットに記載されている）；抗タウpS422モノクローナル抗体2.10.3（米国特許第8609097号明細書に記載されている）；PHF13（マウス、ラットおよびヒト由来のSer 396においてリン酸化され、Sankaranarayanan（PLOS ONE, DOI: 10.1371/journal.pone.0125614 May 1, 2015およびOtvos（Biochemist 10
ry 1997, 36, 8114-8124）によって説明されるタウの検出に推奨される市販の抗体（例えばSigmaAldrich）；および4E4抗体（米国特許第8940272号明細書においてV339、E342、D387、E391およびK395に結合することが記載されている）との比較は、本発明の抗体、およびそのエピトープ結合フラグメントが、比較用抗体のいずれよりも、ヒト病理学的タウに対するより高度な特異性および選択性を示すことを示した。

【0024】

さらに、本発明の抗体、およびそのエピトープ結合フラグメントは、病理学的および非病理学的ヒトタウタンパク質を区別し、特に、アルツハイマー病（AD）病変に関連するタウに結合する能力などの多くの有利な特徴を示す。電気生理学的研究において、本発明の抗体、およびそのエピトープ結合フラグメントはさらに、減少した二発刺激促進および自発的な微小興奮性シナプス後電流（mEPSC）を改善することができた。 20

【課題を解決するための手段】

【0025】

本発明は、ヒト（2N4Rアイソフォーム）タウ（配列番号33）のリン酸化残基セリン396に、ならびにこのような特異的な単離および回収を可能にする新規な方法を用いて産生されたこのような抗体に特異的に結合することが可能なモノクローナル抗体、およびそのエピトープ結合フラグメントに関する。抗体は、それらがリン酸化404残基に実質的に結合しないように、リン酸化残基396および404を区別することができるそれらの能力によってさらに特徴付けられる。 30

【0026】

特定の理論によって制約されるものではないが、本発明者らによるエビデンスは、396ではなく残基404においてリン酸化されるタウタンパク質の存在下における、残基396においてリン酸化されるヒトタウタンパク質に対する本発明の抗体の区別および選択性が、病理学的および治療学的観点から顕著であることを実証している。本発明の抗体は、非病理学的であるが、リン酸化されたタウの存在下で、病理学的タウに対して選択的である。本発明の抗体は、正常なタウの存在下で、病理学的タウのタウもつれ（tautangle）を除去することができる。特定の理論によって制約されるものではないが、タウ位置396においてリン酸化されたタウタンパク質を含むタウのもつれを除去することは、タウもつれへの病理学的タウのシーディングを防ぐものと考えられる。したがって、本発明の一態様は、分子がタウ位置404においてリン酸化されたタウタンパク質の存在下にある場合でも、396-リン酸化タウに選択的に結合することが可能な抗体に関する。本発明の関連する態様は、分子が非病原性タウの存在下にある場合でも、396-リン酸化タウに選択的に結合することが可能な抗体に関する。さらに定義される、本発明は、病理学的タウに対して選択的な抗体に関し、前記病理学的タウは、タウのヒト2N4Rアイソフォームを過剰発現するトランスジェニックマウスにおいて（ウエスタンブロット分析によって）64kDaバンドとして現われる過リン酸化タウである。 40

【0027】

本発明の一態様は、以下の試験基準を満たす抗タウ抗体に関する：i) 抗体は、非リン酸化タウに結合しない；ii) 抗体は、404においてリン酸化されるタウにも、および 50

396においてリン酸化されるタウにも結合しない；iii)抗体は、396においてリン酸化されるタウに結合する；iv)抗体は、396および404の両方においてリン酸化されるタウに結合する。本発明者らは、試験基準iii)およびiv)下の結合が、同じ程度であることを発見し、位置404におけるリン酸化が、結合過程を阻害も促進もしないことを主張する。本発明者らは、試験基準ii)に反して、396においてリン酸化されず、404においてリン酸化されるタウタンパク質への結合が、試験モデルにおいて、もつれを除去せず、または病理学的タウも除去しないことをさらに発見した。

【0028】

本発明の一態様は、トランスジェニックマウスに由来する免疫枯渴 r T g 4 5 1 0 抽出物とともに使用されるとき、過リン酸化タウ64および70kDaバンドを少なくとも90%だけ特異的に減少させる一方、55kDaタウバンドを10%以下だけ減少させる抗タウ抗体に関する。本発明のさらなる態様は、過リン酸化タウ64および70kDaバンドを少なくとも90%だけ特異的に減少させる一方、55kDaタウバンドを10%以下だけ減少させる抗タウ抗体；または、本明細書に記載されるようにヒトAD死後脳に由来する抽出物とともに使用されるとき、リン酸化S396過リン酸化タウバンドを少なくとも90%だけ特異的に減少させる一方、非リン酸化タウバンドを10%超減少させない能力に関する。

10

【0029】

本発明の別の態様は、アルツハイマー病などのタウオパチーに罹患した患者を治療する方法であって、もつれを除去するか、または前記もつれの進行を軽減する工程を含む方法に関し、前記もつれは、過リン酸化タウを含み、前記方法は、もつれが除去され、過リン酸化タウのその含有量が減少され、またはもつれ形成の進行が軽減されるように、過リン酸化タウを本発明の抗体と接触させる工程を含む。

20

【0030】

別に定義される、本発明は、アルツハイマー病などのタウオパチーに罹患した患者を治療する方法に関し、前記方法は、もつれから過リン酸化タウが取り除かれるように、リン酸化残基396を有するタウに対して選択的な抗体ともつれを接触させる工程を含む。

【0031】

より詳細には、本発明は、以下を含む群から選択される4つのモノクローナル抗体のうちのいずれか1つに関する：

30

抗体C5.2

ここで、抗体C5.2は、

- (a) 配列番号17のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号18のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号19のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号20のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号21のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号22のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含み；

抗体C8.3

ここで、抗体C8.3は、

- (a) 配列番号25のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号26のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号27のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号28のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号29のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号30のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含み；

抗体C10-2

ここで、抗体C10-2は、

40

50

- (a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ;
- (c) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ;
- (d) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ;
- (e) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ; および
- (f) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3

を含み ;

および

抗体 D 1 . 2

ここで、抗体 D 1 . 2 は、

- (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ;
- (c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ;
- (d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ;
- (e) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ; および
- (f) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3

を含む。

【 0 0 3 2 】

中に定常領域を含む、例示的な抗体 C 5 . 2 の完全軽鎖および重鎖のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 2 3 および配列番号 2 4 に示される（実施例において使用されるように）。

【 0 0 3 3 】

中に定常領域を含む、例示的な抗体 C 8 . 3 の完全軽鎖および重鎖のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 3 1 および配列番号 3 2 に示される（実施例において使用されるように）。

【 0 0 3 4 】

中に定常領域を含む、興味深い抗体 C 1 0 - 2 の完全軽鎖および重鎖のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 1 5 および配列番号 1 6 に示される（実施例において使用されるように）。ヒト化 C 1 0 - 2 抗体の重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 3 5 に示される。ヒト化 C 1 0 - 2 抗体の軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 3 6 に示される。本発明の一態様は、配列番号 3 5 または配列番号 3 6、または両方を含む本発明の抗体に関する。

【 0 0 3 5 】

中に定常領域を含む、例示的な抗体 D 1 . 2 の完全軽鎖および重鎖のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 7 および配列番号 8 に示される（実施例において使用されるように）。

【 0 0 3 6 】

代替的な実施形態において、抗体 D 1 . 2 は、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖を含み、ここで、位置 3 におけるアミノ酸はパリンである（一方、配列番号 7 の例示的な軽鎖において、このアミノ酸はメチオニンである）。この軽鎖は、上述されるように重鎖と組み合わせられてもよく、すなわち、配列番号 4、5 および 6 の C D R を有する。例えば、抗体は、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する重鎖と一緒に、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖を含み得る（抗体「D 1 . 2 *」）。

【 0 0 3 7 】

本発明の一態様は、

- (a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ; および / または
- (c) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3

を含む抗体に関する。

【 0 0 3 8 】

本発明のさらなる態様は、

- (a) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ;

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ; および / または

(c) 配列番号 14 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3

を含むか、またはさらに含む抗体に関する。

【0039】

本発明の抗体、およびそのエピトープ結合フラグメントは、アルツハイマー病 (A D)、嗜銀顆粒性認知症 (A G D)、進行性核上まひ (P S P)、大脳皮質基底核変性症 (C B D)、T B I (軽度、急性または慢性の外傷性脳損傷)、および慢性外傷性脳症 (C T E) などのタウオパチーを治療するのに使用され得る。

【0040】

本発明の抗体、およびそのエピトープ結合フラグメントはさらに、精神病、特に、A D

10

に起因する精神病または A D の患者における精神病の治療に使用することが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図 1】病理学的材料への結合ドットプロット 図 1 (パネル A ~ B) は、病理学的タウの検出 (実施例 3) を評価するために $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の D 1 . 2 または C 1 0 - 2 を用いて調べられた、A D 患者 (A D) および高齢の健常個体 (c o n) の脳に由来するかまたは 3 2 週齢の r T g 4 5 1 0 および非トランスジェニック (w t) 同腹仔に由来する 5 0 0 n g の S 1 および P 3 画分を示すドットプロット分析の結果を示す (S 1 および P 3 画分の生成は、実施例 3 に開示されている)。ドットプロットは、D 1 . 2 (パネル A) または C 1 0 - 2 (パネル B) が、トランスジェニックマウス (T g 4 5 1 0) において発現

20

される際に、A D 患者またはヒト (P 3 0 1 L) タウに由来する疾患材料において特異的に反応することを示す。

【図 2】D 1 . 2 および C 1 0 - 2 抗体のウエスタンプロット分析 図 2 (パネル A ~ B) は、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の D 1 . 2 (パネル A) または C 1 0 - 2 (パネル B) を用いて調べられた、3 2 週齢の r T g 4 5 1 0 および非トランスジェニック (w t) 同腹仔の脳に由来する $2 \mu\text{g}$ の S 1 および P 3 画分または A D 患者 (A D) および高齢の健常個体 (c o n) の脳に由来する $20 \mu\text{g}$ の S 1 および P 3 画分を示すウエスタンプロット分析の結果を示す。0 . 0 1 m g の組織に由来する S 1 および P 3 画分を、(組織重量に基づいて) 1 : 5 0 の比率で充填した。ウエスタンプロットにおいて、正常な P 3 0 1 L 突然変異体ヒト 4 R 0 N タウが、5 5 k D a において示される一方、過リン酸化 P 3 0 1 L 突然変異

30

体ヒト 4 R 0 N タウ種は、6 4 および 7 0 k D a において示される。A D に由来する P 3 画分では、過リン酸化タウが、5 4、6 4、6 9 および 7 4 k D a において示される (実施例 3)。図は、抗体が、過リン酸化された、移動度シフトされたタウタンパク質に特異的に結合することを示す。

【図 3】M S D における病理学的 P 3 材料への結合 図 3 (パネル A ~ D) は、ヒト A D および非罹患対照脳から単離されるタウに対する D 1 . 2 (パネル A)、C 5 - 2 (パネル B)、C 1 0 - 2 (パネル C) および C 8 - 3 (パネル D) の M e s o S c a l e D i s c o v e r y (M S D) E L I S A 結合の結果を示す (実施例 4)。図 1 に示されるのと同様に、E L I S A プレートにおける疾患 (A D) および健常対照脳から単離されるタウの固体化は、本発明の抗体が、病理学的タウ種に特異的に結合することを実証する

40

のに使用され得る。増加する濃度の抗体は、飽和結合をもたらす。多くの結合抗体が、二次抗マウス抗体を用いて検出される。

【図 4】ペプチド親和性および p S 3 9 6 選択性 (ペプチド結合) 図 4 (パネル A ~ D) は、位置 S 3 9 6 および S 4 0 4 におけるリン酸化の全ての組合せを用いた、タウ (3 8 6 - 4 0 9) ペプチドに対する C 1 0 - 2 (パネル A) および D 1 . 2 (パネル B) の特異的結合の分析の結果を示す (実施例 5)。ヒト病理学的材料に対する特異的親和性は、評価するのが難しく、この理由から、本発明者らは、特異的リン酸化および非リン酸化ペプチドを用いて正確なエピトープ親和性を決定するために特異的ペプチド結合を使用する。特異的な用量反応曲線が、残基 S e r 3 9 6 および S e r 4 0 4 においてリン酸化される、ペプチド: T D H G A E I V Y K { P } S P V V S G D T { P } S P R H L (配列

50

番号37)(pS396/pS404)への抗体C10-2(パネルC)およびD1.2(パネルD)の結合について示される。非リン酸化ペプチド(NP)およびリン酸化ペプチド(pS396およびpS404)との競合結合が行われた。さらに、リン酸化セリン262に対応する対照ペプチドが含まれていた。競合結合は、全ての結合がリン酸化396セリン残基を介して得られることを実証する。さらに、データは、残基404におけるリン酸化が、リン酸化セリン396における抗体の結合を妨げないことを実証する。

【図5】病変特異的抗体の組織学的特性評価 図5、パネルAは、C10-2(左列)およびD1.2(右列)抗体が、Tg4510(上行)細胞体および神経網においてp-タウ種に結合することを示す。免疫反応性は、非-Tg脳切片(下行)において検出されない。図5、パネルBは、C10-2(左列)およびD1.2(右列)抗体が、ADドナー(AD)(上行)における細胞体および神経絨毛系(neuropil thread)においてp-タウ種に結合することを示す。対照ドナー脳には、免疫反応性がない(下行)(実施例6)。

【図6】C10-2および対照抗体についての病理学的および非病理学的P3への結合 図6(パネルA~E)は、先行技術の抗体2-10-3(パネルA)、HACI-2B6(パネルB)、IPN002(パネルD)、およびHJ8.5(パネルE)と比較した、病理学的材料を認識する際の本発明の抗体C10-2(パネルC)の優位性を実証する結果を示す。図は、P301L突然変異体ヒトタウを発現する10月齢のTg4510マウスに由来するタウへの結合とともに、健常(対照として)および疾患(AD)ヒト脳に由来するタウへのC10-2の特異的結合を示す。増加する濃度の抗体が、ELISAプレート上に固定されるP3タウ材料に加えられる。病理学的タウに対する選択性の比率が、活性種による完全飽和で決定される。先行技術の抗体のそれぞれに対する選択性倍数(fold selectivity)が、図に示される(実施例7)。

【図7】HEK293細胞およびインビトロにおけるシーディングの防止 図7(パネルA~C)は、Cisbioアッセイによるタウ凝集の定量化を示す。播種されたpcDNA HEK293細胞は、シグナルを示さず、これは、入力シーディング材料の検出がなかったことを確認する。Wt(野生型)シーディング材料(WW)は、シーディングを示さなかったが、対照的に、rTg4510ホモジネート(CC)は、非播種と比較して、効率的に播種された。このシーディング効果は、HELによる処理によって影響されなかったが、タウ抗体による処理によって部分的に改善された(C10-2>D1.2>HACI36-2B6-Ab1)。グラフ(パネルA~C)は、3つの独立した組の試料を示し、相対タウ凝集としてプロットされる(総タンパク質に対して正規化されたバックグラウンドに対するシグナル倍数(fold signal))(実施例8)。

【図8】電気生理学的障害の改善 図8は、Tg4510マウスおよび対照としてのtTAMマウスにおけるC10-2によるCA1垂慢性処理における誘発電場電位を示す、CA1誘発電場電位(C10-2、パネルA;D1.2、パネルB)における二発刺激促(パネルBおよびD)および基底シナプス伝達(パネルAおよびC)障害の抗体による改善を示す。動物を、2週間にわたって15mg/kgの用量の抗体で週に2回処理した(実施例9を参照)。パネルA(C10-2について)およびパネルC(D1.2について)において、電場電位(fEPSP)の傾きが、刺激強度に対してプロットされる。パネルAおよびCは、4.5~5.5月齢のrTg4510(下側の2つの曲線)およびtTA(上側の2つの曲線)対照マウスにおける海馬のCA1領域におけるシナプス伝達および可塑性のインビボの電気生理学的評価において、i)基底シナプス伝達が、tTAMマウスと比較してrTg4510において有意に低下され、ii)二発刺激促通が、tTAMマウスと比較してrTg4510において有意に減少されることを示す。シナプス前機構に依存するものと考えられる短期シナプス可塑性である二発刺激促通を、rTg4510およびtTAMマウスにおいてさらに測定した(C10-2についてはパネルBおよびD1.2についてはパネルD)。簡潔に述べると、25~1000msで変化する刺激間時間間隔(ISI)を有する一対の刺激を、シャフアー側枝に加え、第2のfEPSPの傾きを、第1のfEPSPの傾きと比較した。促通が全てのISIで観察され、50および75m

10

20

30

40

50

s の I S I で最大の促進を有していた。興味深いことに、有意に低い P P F が、t T A マウス（第 1 の 2 つのバー）と比較したとき、r T g 4 5 1 0 マウス（第 2 の 2 つのバー）において観察された。

【図 9】図 1 ~ 8 に概略が示されるスクリーニングの概要 抗体を、2 N 4 R タウの残基 3 8 6 ~ 4 1 0 をカバーするニリン酸化ペプチド：T D H G A E I V Y K { P } S P V V S G D T { P } S P R H L（配列番号 3 7）に対して誘導した。ハイブリドーマを、ドットプロットおよび免疫化されたヒト病理学的および非病理学的タウを用いた M S D E L I S A（実施例 4）を用いてスクリーニングして、リン酸化エピトープ S 3 9 6 および / または S 4 0 4 のいずれかに対して高度に特異的なクローンを単離すると同時に、ヒトアルツハイマー病の脳に由来する過リン酸化タウを特異的に認識した。ドットプロットおよびウエスタンプロットにおいて病理学的および非病理学的ヒトタウタンパク質を区別する能力が、ハイブリドーマの選択に使用される。1 6 のクローンを選択し、そのうちの 4 つのクローン（D 1 . 2、C 1 0 - 2、C 5 . 2 および C 8 . 3）が、ヒト病理学的材料に結合する目立った能力を示す。特異的な免疫化およびスクリーニングプロトコルの使用が、高リン酸化セリン - 3 9 6（p S 3 9 6）特異的抗体を産生する。

10

【図 1 0】残基 p S e r 3 9 6 が、m A b C 5 . 2 の抗原結合部位の中心に結合される 1 . 9 の解像度における、リン酸化ペプチド 3 8 6 ~ 4 1 0 との複合体中の m A b C 5 . 2 の結晶構造。この構造において、残基 3 9 2 ~ 3 9 8 の電子密度が分解される。残基 { P } S e r 3 9 6 が、m A b C 5 . 2 の抗原結合部位の中心に結合される。抗タウ m A b のこの構造試験において、エピトープは、重鎖（右下）および軽鎖（左下）にわたって結合される。

20

【図 1 1】ホスホセリントウ（2 9 2 ~ 2 9 8）ペプチドとの抗体 C 5 . 2 の相互作用 図 1 1 は、抗体 C 5 . 2 と、ホスホセリントウ（2 9 2 ~ 2 9 8）ペプチドとの相互作用を示す。I l e（3 9 2）- V A L（3 9 3）- T y r（3 9 4）- L y s（3 9 5）- P - S e r（3 9 6）- P r o（3 9 7）- V a l（3 9 8）の構造が示される。主な相互作用は、タウペプチドの L 3 : H 3、L 3 : F 8 *、H 1 : H 1 3、H 2 : Y 1、H 2 : Y 3 および Y（3 9 4）によって形成される疎水性ポケットを必要とする。溶媒和 { P } S（3 9 6）および L 3 : T 4、H 1 : R 1 0、H 1 : T 1 1、H 3 : R 1、H 3 : T 3 の間で形成される広範囲の水素結合ネットワークがある。用いられる命名法では、最初の文字（例えば、L 3 : H 3 の「L」）は、含まれる C D R 残基が、軽鎖 C D R であるかまたは重鎖 C D R であるかを示し、最初の数字は、このような鎖のどの C D R が含まれるかを示し（例えば、「L 3」は、軽鎖の C D R 3 を示す）、残りの語（例えば、L 3 : H 3 の「H 3」）は、含まれるアミノ酸の名称および位置を示し（例えば、「H 3」は、C D R の第 3 の残基位置におけるヒスチジンを示し）；したがって、「L 3 : H 3」は、軽鎖 C D R 3 の第 3 の位置におけるヒスチジン残基を示す。Y（3 9 4）側鎖および骨格の間に強い水素結合および電荷 / 極性相互作用があり、{ P } S 3 9 6 のホスホネートが、ペプチド骨格の変化を形成する。（*）L 3 : F 8 は、C D R L 3 のフレームワーク残基に隣接する C 末端である。C 5 . 2 の C D R 配列は、C D R L 1 : Q A S Q D T S I N L N（配列番号 1 7）C D R L 2 : G A S N L E D（配列番号 1 8）C D R L 3 : L Q H T Y L P（配列番号 1 9）C D R H 1 : K A S G Y T F T D R T I H（配列番号 2 0）C D R H 2 : Y I Y P G D D S T K Y N D N F K G（配列番号 2 1）C D R H 3 : R G T M D Y（配列番号 2 2）である。

30

40

【図 1 2】シーディングアッセイ（H E K 2 9 3）のためのタウの欠失 図 1 2（パネル A ~ B）は、マウス C 1 0 - 2（m C 1 0 - 2）およびヒト化 C 1 0 - 2（h C 1 0 - 2）を用いた r T g 4 5 1 0 脳ホモジネートの免疫枯渇を示す。欠失されたホモジネートのウエスタンプロットを、E 1（総タウ；パネル A；下側）および C 1 0 - 2（p S 3 9 6 タウ；パネル A；上側）で検出し、m C 1 0 - 2 および h C 1 0 - 2 は両方とも、過リン酸化タウを効率的に欠失させた（E 1 プロットにおける上側バンドおよび C 1 0 - 2 プロットにおける全てのバンド）。また、欠失されたホモジネートを、C i s b i o アッセイを用いて、凝集タウの欠失について分析した。パネル B は、試料における凝集タウの変

50

化を示す。mC10-2およびhC10-2を用いた欠失試験は、タウ凝集体をそれぞれ99および99.5%除去した(パネルB)。

【図13】欠失された材料を用いたシーディングアッセイ(HEK293) パネルA~Cは、HEK293細胞内にP301L-hタウを播種するのに使用される欠失されたホモジネートを示す。対照動物(WW)に由来するホモジネートが播種しなかった一方、rTg4510ホモジネート(CC)は、総細胞溶解物におけるCisbio凝集アッセイによってまたは1%のtriton-X(不溶性過リン酸化D1.2およびタウ(パネルA、上側および下側)の定量化)中のHEK293細胞の分画によって測定した際、効率的に播種された。HELおよびhHEL抗体による欠失は、シーディングに影響を与えなかった一方、mC10-2およびhC10-2による欠失は、タウ凝集を88%および96%(パネルC)および不溶性タウを97%および100%(パネルB)それぞれ防いだ。

10

【図14】免疫枯渇rTg4510材料(インビボのシーディング試験に使用される) パネルA~Cは、免疫枯渇rTg4510脳抽出物のウエスタンブロット(パネルA;上側、下側)分析を示す。C10-2およびD1.2は、ヒト過リン酸化64kDaバンドを90%だけ特異的に減少させ、55kDaタウ、タウ5に対する効果を与えず、市販の総タウ抗体は、対照的に、正常55kDaタウを74%だけ減少させ、ヒト64kDaタウに対する効果を与えない(パネルB~C)。

【図15】免疫枯渇AD材料(インビボのシーディング試験に使用される) 図15(パネルA~C)は、免疫枯渇されたアルツハイマー病の脳抽出物のウエスタンブロット(パネルA)分析を示す。C10-2およびD1.2を用いた免疫枯渇は、総タウレベルを10%超減少させず、過リン酸化タウを特異的に低下させた(90%の減少)(パネルB~C)。

20

【図16】(パネルA):免疫枯渇rTg4510材料が播種されたrTg4510マウスにおける海馬タウ病変 図16(パネルA)は、rTg4510またはAD脳ホモジネートが播種されたrTg4510脳におけるタウ病変の定量化を示す。シーディングの前に、過リン酸化タウは、C10-2またはD1.2を用いてホモジネート中で90~95%だけ減少されたが、正常タウは減少されなかった。ホモジネートから過リン酸化タウを除去することによって、ホモジネートは、タウ病変のシーディングをもはや誘発しない。

(パネルB)免疫枯渇AD材料が播種されたrTg4510マウスにおける海馬もつれ病変 図16(パネルB)は、rTg4510(A)またはAD(B)脳ホモジネートが播種されたrTg4510脳におけるタウ病変の定量化を示す。シーディングの前に、過リン酸化タウは、C10-2またはD1.2を用いてホモジネート中で90~95%だけ減少されたが、正常タウは減少されなかった。ホモジネートから過リン酸化タウを除去することによって、ホモジネートは、タウ病変のシーディングをもはや誘発しない。

30

【図17】D1.2で処理された播種されたrTg4510マウスにおける海馬もつれ病変 図17は、播種されたrTg4510マウスの海馬におけるもつれを有するニューロンの定量化を示す。病変は、時間とともに増加する(IgG、1ヶ月;IgG 2ヶ月;IgG 3ヶ月)。しかしながら、マウスをD1.2で処理すると、病変は、シーディングの1、2および3ヵ月後に有意に減少される(D1.2 1ヶ月;D1.2 2ヶ月;D1.2 3ヶ月)。

40

【図18】シーディングアッセイ(HEK293)のためのタウの欠失 パネルAは、マウスC10-2(mC10-2)およびヒト化C10-2(hC10-2)を用いたrTg4510脳ホモジネートの免疫枯渇を示す。欠失されたホモジネートのウエスタンブロットを、E1(総タウ)およびC10-2(pS396タウ)で検出し、mC10-2およびhC10-2は両方とも、過リン酸化タウを効率的に欠失させた(E1プロットにおける上側バンドおよびC10-2プロットにおける全てのバンド)。欠失されたホモジネートを、Cisbioアッセイを用いて、凝集タウの欠失について分析した。パネルBは、mC10-2およびhC10-2による欠失が、タウ凝集体をそれぞれ99および99.5%除去したことを示す。

50

【図19】欠失された材料を用いたシーディングアッセイ (HEK293) パネルAは、タウ分画 (不溶性画分に対するウエスタンを示す。パネルBは、ウエスタンプロット定量化を示す。パネルCは、細胞溶解物中の凝集タウを示す。欠失されたホモジネートを用いて、HEK293細胞内にP301L-hタウを播種した。対照動物 (WW) に由来するホモジネートが播種しなかった一方、rTg4510ホモジネート (CC) は、総細胞溶解物におけるCisbio凝集アッセイによってまたは1%のtriton-X中のHEK293細胞の分画 (不溶性過リン酸化D1.2+タウの定量化) によって測定した際、効率的に播種された。HELおよびhHEL抗体による欠失は、シーディングに影響を与えなかった一方、mC10-2およびhC10-2 (パネルC) による欠失は、タウ凝集を88%および96%および不溶性タウを97%および100%それぞれ防いだ (パネルB)。

10

【図20】正常なタウより過リン酸化タウに対するC10-2およびD1.2の免疫選択性。インビボのシーディング試験に使用される免疫枯渇rTg4510材料: パネルAは、免疫枯渇rTg4510脳抽出物のウエスタンプロット分析を示す。パネルBは、C10-2およびD1.2が、有意な量のp396を含まないタウ55kDaバンドより、セリン396においてリン酸化される過リン酸化64kDaバンドを特異的に減少させることを示す。対照的に、市販の総タウ抗体であるタウ5は、正常な55kDaタウを減少させ、64kDaタウへの結合において非効率である。

【図21】正常なタウより過リン酸化タウに対するC10-2およびD1.2の免疫選択性。免疫枯渇AD材料 (インビボのシーディング試験に使用される: パネルAは、免疫枯渇されたアルツハイマー病の脳抽出物のウエスタンプロット分析を示す。mC10-2およびD1.2を用いた免疫枯渇は、総タウレベルを10%超減少させず (パネルB)、過リン酸化タウを特異的に低下させる (90%の減少) (パネルC)。

20

【図22】rTg4510マウスにおける海馬タウ病変 パネルAは、免疫枯渇rTg4510材料が播種されたrTg4510マウスにおける海馬タウ病変を示す。パネルBは、免疫枯渇AD材料が播種されたrTg4510マウスにおける海馬もつれ病変を示す。rTg4510 (A) またはAD (B) 脳ホモジネートが播種されたrTg4510脳におけるタウ病変の定量化。シーディングの前に、過リン酸化タウは、抗体C10-2またはD1.2を用いてホモジネート中で90~95%だけ減少されたが、正常なタウは減少されなかった。ホモジネートから過リン酸化タウを除去することによって、ホモジネートは、タウ病変のシーディングをもはや誘発しない。

30

【図23】D1.2で処理された播種されたrTg4510マウスにおける海馬もつれ病変 播種されたrTg4510マウスの海馬におけるもつれを有するニューロンの定量化。図は、病変が、時間とともに増加し、マウスをD1.2で処理することによって、病変が、シーディングの2および3ヵ月後に有意に低下されることを示す。

【図24】免疫枯渇ヒトAD抽出物のウエスタンプロット分析 図は、C10-2のヒト化形態 (hC10-2)、ならびにmC10-2は、残りの総タウが、2.10.3、C10-2 (hC10-2)、ならびにmC10-2と劇的に異なっていないが (左側のパネル)、免疫枯渇方法によってアルツハイマー病の脳抽出物中に存在するより多くの過リン酸化タウタンパク質を除去する点で、2.10.3 (P-S422) 抗体と異なることを示す。これは、定量化によって図25において確認される。

40

【図25】免疫枯渇後の凝集タウの定量化 hC10-2およびmC10-2抗体は、免疫枯渇方法によってアルツハイマー病の脳抽出物中に存在するより多くの凝集タウタンパク質を除去するその能力が、2.10.3抗体と異なる。

【図26】免疫枯渇後に残っている総タウ 異なる量のヒト化C10-2 () および2.10.3抗体 () を用いてアルツハイマー病の抽出物を免疫枯渇させた後のウエスタンプロットシグナルの定量化。図26において、タウ5を用いた総タウシグナルの定量化 (全てのタウアイソフォームが、分析に含まれていた) が示される。両方の抗体は、アルツハイマー病の脳標本からタウのわずかな部分を除去する。P-S422タウに対する特異性を有することが示された2.10.3は、総タウ量の最大で24%を除去する一方、

50

C10-2は、総タウの最大で15%を除去する(図26を参照)。

【図27】過リン酸化タウの免疫枯渇後に残っている総タウ 図27は、セリン422においてリン酸化される過リン酸化タウの定量化を示す(全てのバンドおよび高分子量塗抹(smear)が分析に含まれていた)。2.10.3()およびC10-2()は両方とも、セリン422においてリン酸化されるタウの90%超を除去する。しかしながら、50%のタウを除去するのに必要な抗体の量は異なる:抗体2.10.3では、0.42μgの抗体が必要とされる一方、C10-2では、0.27μgが同じ効果のために必要とされる。

【図28】過リン酸化タウの免疫枯渇後に残っている総タウ セリン396においてリン酸化される過リン酸化タウの定量化(全てのバンドおよび高分子量塗抹が分析に含まれていた)。C10-2()は、セリン396においてリン酸化されるタウを効率的に除去する(最大の効果:88%および効果の半分には、0.30μgの抗体を用いて達する)。2.10.3()は、セリン396においてリン酸化されるタウのよりわずかな部分を除去する(最大の効果:60%およびその効果の半分には、0.63μgの抗体を用いたときに達する)。これは、セリン422においてリン酸化される全てのタウが、セリン396においてもリン酸化されるが、位置422におけるリン酸化セリンが存在しない場合、セリン396においてリン酸化される過リン酸化タウの部分がなことを示す。

【図29】過リン酸化タウの免疫枯渇後に残っている総タウ セリン199/202においてリン酸化される過リン酸化タウの定量化(全てのバンドおよび高分子量塗抹が分析に含まれていた)。C10-2()によって除去されるタウの大部分はまた、セリン199/202においてリン酸化され、これは、そのリン酸化を有するタウの69%が、免疫枯渇によって影響されるためである(0.34μgの抗体を用いたときの効果の50%)。2.10.3()免疫枯渇は、P-S199/202タウに関するS字形用量反応を示さないが、シグナルの低下が、増加する量の抗体で見られる(最大量の抗体(5μg)を用いたときの最大52%の減少。このデータは、リン酸化セリン396を標的にするC10-2抗体が、422位置におけるリン酸化セリンを標的にする2.10.3抗体より大きいプールの過リン酸化タウに結合することを示す。

【図30】mC10-2被覆プレートにおけるタウ抗原捕捉のmD1.2およびmC10-2阻害 流体相ELISAにおいて、rTg4510 P3標本および可変量のC10-2またはD1.2抗体の混合物を、C10-2被覆プレート上加える。溶液中のP3タウへの抗体結合が多くなるほど、より少ない利用可能なタウエピトープが、プレートに結合することができる。プレートへのタウ結合の量は、スルホタグ化ヒトタウ抗体によって決定される。C10-2()およびD1.2()は、溶液中のタウへの異なる結合を有し、ここで、C10-2は、プレートへの全ての結合を競合し得る(IC50=20nM)。他方、D1.2は、溶液中のタウへの非常に低いレベルの結合を示す。

【図31】mC10-2被覆プレートにおけるタウ抗原捕捉のPHF13およびmC10-2阻害 流体相ELISAにおいて、AD P3標本および可変量のC10-2およびPHF13抗体の混合物を、C10-2被覆プレート上加えた。溶液中のP3タウへの抗体結合が多くなるほど、より少ない利用可能なタウエピトープが、プレートに結合することができる。プレートへのタウ結合の量は、スルホタグ化ヒトタウ抗体によって決定される。C10-2およびPHF13は、溶液中のタウへの異なる結合を有し、ここで、C10-2は、プレートへの全ての結合を競合し得る(IC50=3nM)一方、PHF13は競合しなかった。

【図32】mC10-2およびPFH-13は両方とも、Pタウ386~408(pS396/pS404)に用量依存的に結合する 図32は、mC10-2およびPFH-13が、100ng/mlのp-タウ386~408(pS396/pS404)で被覆されたMSDプレートにおいて同等によく結合することを示す。増加する濃度の抗体(x軸で示される)を、2時間にわたってウェル中でインキュベートした後、洗浄およびスルホタグ化抗ヒトIgG抗体を用いた結合抗体の検出を行った。これは、後の実施例に使用される調製されたPHF-13が活性であることを示す。

10

20

30

40

50

【図33】AD-P3とのmD1.2およびmC10-2結合の比較 図33は、mD1.2およびmC10-2が、1 μ g/mlのAD-P3で被覆されたMSDプレートにおいて同等によく結合することを示す。増加する濃度の抗体(x軸で示される)を、室温で1時間にわたって10 μ Mのp-タウ386~408(pS396/pS404)ペプチドの存在下および非存在下でインキュベートし、続いて、2時間にわたってウェル中でインキュベートした後、スルホタグ化抗ヒトIgG抗体を用いた結合抗体の検出の前に行った。IC50値は、AD-P3およびAD-S1(p)の捕捉について320nMおよび11nMであった。対照的に、mD1.2は、589および503nMのIC50値で、タウ抗原捕捉の著しく弱い阻害を示し、これは、可溶性抗原へのはるかに低親和性の結合を示唆している。アッセイを2工程で行った。A:1 μ g/mlのAD-P3および20ng/mlのAD-S1(p)をそれぞれ、増加する濃度のmD1.2およびmC10-2とともにインキュベートし、室温で1時間インキュベートして、抗体-抗原結合(占有(occupancy))の増加を可能にした。B:試料を、2時間にわたってAD-P3(1 μ g/ml)で被覆されたMSDプレート上でインキュベートした後、洗浄およびスルホタグ化抗総タウG抗体を用いた捕捉されたタウ抗原の検出を行った。

【図34】mC10-2は、固体ファージディスプレイAD-P3抗原に効率的に結合するが、PHF-13は結合しない PHF-13ではなく、mC10-2の高い特異的結合:図34は、mC10-2が、AD-P3抗原で被覆されたMSDプレート(1 μ g/ml)に効率的に結合することを示す。比較すると、PHF-13の低い結合活性は、生理学的p-タウ抗原に対するより低い親和性を示す。さらに、PHF-13は、mC10-2と比較して著しく高度な非特異的結合を実証した(表6を参照)。増加する濃度の抗体(x軸で示される)を、2時間インキュベートした後、スルホタグ化抗ヒトIgG抗体を用いた結合抗体の検出の前に行った。結合シグナルを非特異的結合活性について補正した(10 μ Mのp-タウ386~408(pS396/pS404)ペプチドの存在下で測定されるシグナルとして定義される。IC50値は、AD-P3のmC10-2捕捉について3nMであった。対照的に、PHF-13は、実質的に阻害を示さなかった。アッセイを2工程で行った。A:1 μ g/mlのAD-P3を、増加する濃度のmC10-2およびPHF-13とともにインキュベートし、室温で1時間インキュベートして、抗体-抗原結合(占有)の増加を可能にした。B:試料を、2時間にわたってAD-P3(1 μ g/ml)で被覆されたMSDプレート上でインキュベートした後、洗浄およびスルホタグ化抗総タウ抗体を用いた捕捉されたタウ抗原の検出を行った。

【発明を実施するための形態】

【0042】

参照により援用される配列

配列番号1: D1.2軽鎖CDR1

配列番号2: D1.2軽鎖CDR2

配列番号3: D1.2軽鎖CDR3

配列番号4: D1.2重鎖CDR1

配列番号5: D1.2重鎖CDR2

配列番号6: D1.2重鎖CDR3

配列番号7: D1.2軽鎖

配列番号8: D1.2重鎖

配列番号9: C10-2軽鎖CDR1

配列番号10: C10-2軽鎖CDR2

配列番号11: C10-2軽鎖CDR3

配列番号12: C10-2重鎖CDR1

配列番号13: C10-2重鎖CDR2

配列番号14: C10-2重鎖CDR3

配列番号15: C10-2軽鎖

配列番号16: C10-2重鎖

10

20

30

40

50

配列番号 17 : C 5 . 2 軽鎖 C D R 1
 配列番号 18 : C 5 . 2 軽鎖 C D R 2
 配列番号 19 : C 5 . 2 軽鎖 C D R 3
 配列番号 20 : C 5 . 2 重鎖 C D R 1
 配列番号 21 : C 5 . 2 重鎖 C D R 2
 配列番号 22 : C 5 . 2 重鎖 C D R 3
 配列番号 23 : C 5 . 2 軽鎖
 配列番号 24 : C 5 . 2 重鎖
 配列番号 25 : C 8 . 3 軽鎖 C D R 1
 配列番号 26 : C 8 . 3 軽鎖 C D R 2
 配列番号 27 : C 8 . 3 軽鎖 C D R 3
 配列番号 28 : C 8 . 3 重鎖 C D R 1
 配列番号 29 : C 8 . 3 重鎖 C D R 2
 配列番号 30 : C 8 . 3 重鎖 C D R 3
 配列番号 31 : C 8 . 3 軽鎖
 配列番号 32 : C 8 . 3 重鎖
 配列番号 33 : ヒトタウ
 配列番号 34 : D 1 . 2 * 軽鎖
 配列番号 35 : ヒト化 C 1 0 - 2 重鎖
 配列番号 36 : ヒト化 C 1 0 - 2 軽鎖
 配列番号 37 : タウ残基 3 8 6 ~ 4 0 8 (p S 3 9 6 、 p S 4 0 4)

10

20

【 0 0 4 3 】

本明細書において使用される際、「タウ」という用語は、「タウタンパク質」と同義であり、タウタンパク質アイソフォーム（例えば、P 1 0 6 3 6、1 - 9としてUniProtにおいて同定される）のいずれかを指す。本明細書において使用されるタウのアミノ酸の番号付けは、以下に示されるようにアイソフォーム 2（配列番号 3 3）に対して示され、メチオニン（M）は、アミノ酸残基 1 である：

【 化 1 】

配列番号33:

```

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGD TD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG
TTAEAEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK
IATPRGAAPP GQKGOANATR IPAKTPPAPK TPFSSGEPK SGDRSGYSSP
GSPGTPGSR S RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM
PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
PGGGSVQIVY KPV DLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV
QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLT FRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS
GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

```

30

【 0 0 4 4 】

本発明は、タウ、特に、ヒトタウに特異的に結合することが可能であり、一実施形態において、ヒトタウのリン酸化 S 3 9 6 残基（p S 3 9 6）に特異的に結合する能力を示す抗体およびそのエピトープ結合フラグメントに関する。本発明の抗体およびそのエピトープ結合フラグメントは、例えば抗体制限または非飽和条件下で、ヒトタウにおけるリン酸化 4 0 4（p S 4 0 4）残基に特異的に結合することができないかまたは実質的にできないことによってさらに特徴付けられる。さらに、p S 4 0 4におけるリン酸化は、p S 3 9 6への特異的結合を妨げない。本明細書において使用される際、「p S」および「{ P } S」という表記は、アミノ酸残基ホスホセリンを示す。本明細書において使用される際、抗体は、別のエピトープと比べて、このような結合が、このような他のエピトープで観察される結合の 2 0 % 未満、1 0 % 未満、5 % 未満、2 % 未満、より好ましくは、1 % 未満である場合、エピトープに結合することが「実質的に」できない。

40

50

【0045】

本発明の文脈における「抗体」(Ab)という用語は、分子(「抗原」)のエピトープに特異的に結合する能力を有する、免疫グロブリン分子、または本発明のある実施形態によれば、免疫グロブリン分子のフラグメントを指す。天然抗体は、典型的に、通常、少なくとも2つの重(H)鎖および少なくとも2つの軽(L)鎖から構成される四量体を含む。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書においてVHと略記される)および、3つの領域(CH1、CH2およびCH3)から構成される重鎖定常領域から構成される。重鎖は、IgG(IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4サブタイプ)を含む任意のアイソタイプのものであり得る。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書においてVLと略記される)および軽鎖定常領域(CL)から構成される。軽鎖は、鎖および鎖を含む。重鎖および軽鎖可変領域が、典型的に、抗原認識に関与する一方、重鎖および軽鎖定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第1の成分(C1q)を含む、宿主組織または宿主因子への免疫グロブリンの結合を仲介し得る。VHおよびVL領域は、「フレームワーク領域」(FR)と呼ばれるより保存される配列の領域が散在する「相補性決定領域」と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分され得る。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4で配置される3つのCDR領域および4つのFR領域から構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合領域を含有する。特に関連があるのは、自然界に存在し得るものと異なる物理的環境中で存在するように「単離され」ているか、またはアミノ酸配列中の天然抗体と異なるように修飾された抗体およびそれらのエピトープ結合フラグメントである。

10

20

【0046】

「エピトープ」という用語は、抗体への特異的結合が可能な抗原決定基を意味する。エピトープは、通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の表面基(surface grouping)からなり、通常、特定の三次元構造特性、ならびに特定の電荷特性を有する。立体配座エピトープおよび線状エピトープは、後者ではなく、前者への結合が、変性溶媒の存在下で常に失われる点で区別される。エピトープは、特異的エピトープ結合ペプチドによって有効に遮断されるアミノ酸残基(言い換えると、アミノ酸残基は、特異的エピトープ結合ペプチドのフットプリント内にある)などの、結合に直接関与するアミノ酸残基および結合に直接関与しない他のアミノ酸残基を含み得る。

30

【0047】

本明細書において使用される際、「抗体のエピトープ結合フラグメント」という用語は、エピトープに特異的に結合することが可能な抗体のフラグメント、部分、領域(region)または領域(domain)(それがどのように産生されるかにかかわらず(例えば、切断により、組み換えにより、合成的になど))を意味する。エピトープ結合フラグメントは、このような抗体のCDR領域の1、2、3、4、5または6つ全てを含有してもよく、このようなエピトープに特異的に結合することが可能であるが、このような抗体のものと異なるこのようなエピトープに対して特異性、親和性または選択性を示し得る。しかしながら、好ましくは、エピトープ結合フラグメントは、このような抗体のCDR領域の6つ全てを含有するであろう。抗体のエピトープ結合フラグメントは、単一のポリペプチド鎖(例えば、scFv)の一部であるか、もしくはそれを含んでもよく、またはアミノ末端およびカルボキシル末端(例えば、二重特異性抗体、Fabフラグメント、Fab₂フラグメントなど)をそれぞれ有する2つ以上のポリペプチド鎖の一部であるか、もしくはそれを含んでもよい。エピトープ結合能力を示す抗体のフラグメントは、例えば、無傷の抗体のプロテアーゼ切断によって得られる。より好ましくは、Fvフラグメントの2つの領域、VLおよびVHが、別個の遺伝子によって天然にコードされるが、またはこのような遺伝子配列をコードするポリヌクレオチド(例えば、それらのコードcDNA)が、VLおよびVH領域が結合して一価エピトープ結合分子を形成する単一のタンパク質鎖(単鎖Fv(scFv))として知られている;例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423-426; および Huston et a

40

50

1. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 5879-5883を参照)としてそれらが作製されるのを可能にするフレキシブルリンカーによって、組み換え方法を用いて結合され得る。あるいは、単一のポリペプチド鎖のVLおよびVH領域と一緒に結合するのを可能にするには短すぎるフレキシブルリンカー(例えば、約9個未満の残基)を用いることによって、二重特異性抗体(bispecific antibody)、二重特異性抗体(diabody)、または同様の分子(2つのこのようなポリペプチド鎖と一緒に結合して、二価エピトープ結合分子を形成する)を形成することができる(二重特異性抗体の説明については、例えばPNAS USA 90(14), 6444-8(1993)を参照)。本発明の範囲内に包含されるエピトープ結合フラグメントの例としては、(i) Fab'またはFabフラグメント、VL、VH、CLおよびCH1領域からなる一価フラグメント、または国際公開第2007059782号パンフレットに記載されている一価抗体;(ii) F(ab')₂フラグメント、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント;(iii) VHおよびCH1領域から本質的になるFdフラグメント;(iv) VLおよびVH領域から本質的になるFvフラグメント、(v) VH領域から本質的になり、ドメイン抗体(Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21(11): 484-90)とも呼ばれるdAbフラグメント(Ward et al., Nature 341, 544-546(1989));(vi)ラクダ科動物(camelid)またはナノボディ(Ravets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5(1): 111-24)および(vii)単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。さらに、Fvフラグメントの2つの領域、VLおよびVHが、別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、VLおよびVH領域が組み合わされて、一価分子を形成する単一のタンパク質鎖(単一鎖抗体または単一鎖Fv(scFv))として知られている、例えばBird et al., Science 242, 423-426(1988)およびHouston et al., PNAS USA 85, 5879-5883(1988)を参照)としてそれらが作製されるのを可能にする合成リンカーによって、組み換え方法を用いて結合され得る。本発明の文脈におけるこれらのおよび他の有用な抗体フラグメントは、本明細書においてさらに説明される。抗体という用語は、特に規定されない限り、キメラ抗体およびヒト化抗体などの抗体様ポリペプチド、ならびに酵素的切断、ペプチド合成、および組み換え技術などの任意の公知の技術によって提供される、抗原(エピトープ結合フラグメント)に特異的に結合する能力を保持する抗体フラグメントも含むことも理解されるべきである。生成される抗体は、任意のアイソタイプを有し得る。本明細書において使用される際、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンクラス(例えばIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4)を指す。このような抗体フラグメントは、当業者に公知の従来技術を用いて得られ; 所望のエピトープに結合することが可能な好適なフラグメントは、無傷の抗体と同じように有用性について容易にスクリーニングされ得る。

【0048】

「二重特異性抗体」という用語は、それぞれ独立した標的を標的にする2つの独立したエピトープ結合フラグメントを含有する抗体を指す。これらの標的は、異なるタンパク質上に存在するエピトープ、または同じ標的上に存在する異なるエピトープであり得る。二重特異性抗体分子は、親単一特異性二価抗体分子のHCの定常領域における補償的アミノ酸改変を用いて作製され得る。得られるヘテロ二量体抗体は、2つの異なる親単一特異性抗体から与えられる1つのFabを含有する。Fc領域におけるアミノ酸改変は、時間を経ても安定した二重特異性を有するヘテロ二量体抗体の向上した安定性をもたらす(Ridgway et al., Protein Engineering 9, 617-621(1996)、Gunasekaran et al., JBC 285, 19637-1(2010)、Moore et al., MAbs 3: 6546-557(2011)、Strop et al., JMB 420, 204-219(2012))

、 Metz et al. , Protein Engineering 25 : 10 5 71 - 580 (2012)、 Labrijn et al. , PNAS 110 : 113 , 5145 - 5150 (2013)、 Spreter Von Kreudenstein et al. , MAbs 5 : 5 646 - 654 (2013))。二重特異性抗体は、 ScFv 融合を用いて生成される分子も含み得る。次に、 2つの単一特異性 scfv は、独立して、単一の二重特異性分子を生成するために安定したヘテロ二量体を形成することが可能な Fc 領域に結合される (Mabry et al. , PEDS 23 : 3 115 - 127 (2010))。二重特異性分子は、二重の結合能を有する。例えば、 CN S 疾患を治療するために血液脳関門を横切って治療用抗体を送達するために、治療標的および経細胞輸送表面受容体の両方を標的にする。

10

【 0049 】

「抗体 D 1 . 2 」という用語は、

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1 ;

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2 ; および

(c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3

を有する抗体軽鎖可変領域 ;

ならびに

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1 ;

(e) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2 ; および

(f) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3

を有する抗体重鎖可変領域を含むかまたはそれからなる抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを示すことが意図される。

20

【 0050 】

一実施形態において、抗体 D 1 . 2 またはそのエピトープ結合フラグメントは、配列番号 8 の重鎖および / または配列番号 7 の軽鎖を含むかまたはそれからなり得る。

【 0051 】

関連する実施形態において、抗体 D 1 . 2 * またはそのエピトープ結合フラグメントは、配列番号 8 の重鎖および / または配列番号 3 4 の軽鎖を含むかまたはそれからなり得る。

【 0052 】

「抗体 C 10 - 2 」という用語は、

(a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1 ;

(b) 配列番号 10 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2 ; および

(c) 配列番号 11 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3

を有する抗体軽鎖可変領域 ;

ならびに

(d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1 ;

(e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2 ; および

(f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3

を有する抗体重鎖可変領域を含むかまたはそれからなる抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを示すことが意図される。

30

40

【 0053 】

一実施形態において、抗体 C 10 - 2 またはそのエピトープ結合フラグメントは、配列番号 16 の重鎖および / または配列番号 15 の軽鎖を含むかまたはそれからなり得る。

【 0054 】

さらなる実施形態において、ヒト化抗体 C 10 - 2 またはそのエピトープ結合フラグメントは、配列番号 35 の重鎖、配列番号 36 の軽鎖、または両方を含むかまたはそれからなり得る。本発明の一実施形態は、配列番号 35 の重鎖、配列番号 36 の軽鎖を含むかまたはそれからなる抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関する。

【 0055 】

50

「抗体 C 5 . 2」という用語は、

- (a) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ; および
- (c) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3

を有する抗体軽鎖可変領域 ;

ならびに

- (d) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ;
- (e) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ; および
- (f) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3

を有する抗体重鎖可変領域を含むかまたはそれからなる抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを示すことが意図される。

10

【 0 0 5 6 】

一実施形態において、抗体 C 5 . 2 またはそのエピトープ結合フラグメントは、配列番号 2 4 の重鎖および / または配列番号 2 3 の軽鎖を含むかまたはそれからなり得る。

【 0 0 5 7 】

「抗体 C 8 . 3」という用語は、

- (a) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ; および
- (c) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3

を有する抗体軽鎖可変領域 ;

20

ならびに

- (d) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ;
- (e) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ; および
- (f) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3

を有する抗体重鎖可変領域を含むかまたはそれからなる抗体またはそのエピトープ結合フラグメントをフラグメントを示すことが意図される。

【 0 0 5 8 】

一実施形態において、抗体 C 8 . 3 またはそのエピトープ結合フラグメントは、配列番号 3 2 の重鎖および / または配列番号 3 1 の軽鎖を含むかまたはそれからなり得る。

【 0 0 5 9 】

「抗タウ抗体」は、タウまたはタウフラグメントに特異的に結合する抗体またはそのエピトープ結合フラグメントである。

30

【 0 0 6 0 】

本明細書において使用される際の「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一の分子組成物の抗体分子の調製物を指す。従来のモノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。特定の実施形態において、モノクローナル抗体は、2 つ以上の F a b 領域から構成され得、それによって、2 つ以上の標的に対する特異性を高める。「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、任意の特定の産生方法 (例えば、組み換え、トランスジェニック、ハイブリドーマなど) によって限定されることは意図されていない。

40

【 0 0 6 1 】

本発明の抗体およびそのエピトープ結合フラグメントは、特に治療目的に用いられる場合、好ましくは、「ヒト化」される。「ヒト化」という用語は、一般に組み換え技術を用いて調製される、非ヒト種に由来する免疫グロブリンから得られるエピトープ結合部位、およびヒト免疫グロブリンの構造および / または配列に基づいた残りの免疫グロブリン構造を有する分子を指す。エピトープ結合部位は、ヒト定常領域に融合された完全な非ヒト抗体可変領域、またはヒト可変領域の適切なヒトフレームワーク領域に移植されたこのような可変領域の相補性決定領域 (C D R) のみのいずれかを含み得る。このようなヒト化分子のフレームワーク残基は、野生型 (例えば、完全ヒト) であってもよく、またはそれ

50

らは、配列がヒト化のための基盤として機能したヒト抗体に見られない1つまたは複数のアミノ酸置換を含むように修飾され得る。ヒト化は、分子の定常領域がヒト個体における免疫原として働く可能性を低下させるかまたはなくすが、外来 (foreign) 可変領域に対する免疫応答の可能性は残る (LoBuglio, A. F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 4220 - 4224)。別の手法は、ヒト由来の定常領域を提供することだけでなく、可変領域を改変して、それらをヒト型にできる限り近くなるように再形成することにも焦点を当てている。重鎖および軽鎖の両方の可変領域が、該当する抗原に対する応答が異なり、結合能を決定する3つの相補性決定領域 (CDR) を含み、これらの相補性決定領域 (CDR) には、所与の種において比較的保存され、かつCDRの足場を提供すると考えられる4つのフレームワーク領域 (FR) が隣接することが知られている。非ヒト抗体が、特定の抗原に対して調製される場合、可変領域は、非ヒト抗体に由来するCDRを、改変されるヒト抗体中に存在するFRに移植することによって、「再形成」または「ヒト化」され得る。様々な抗体に対するこの手法の適用は、Sato, K. et al. (1993) Cancer Res 53: 851 - 856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", Nature 332: 323 - 327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", Science 239: 1534 - 1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR - Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation", Protein Engineering 4: 773 - 3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV - Neutralizing Activity", Human Antibodies Hybridoma 2: 124 - 134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 4181 - 4185; Tempest, P. R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo", Bio/Technology 9: 266 - 271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 2869 - 2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89: 4285 - 4289; および Co, M. S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen", J. Immunol. 148: 1149 - 1154 によって報告されている。ある実施形態において、ヒト化抗体は、全てのCDR配列 (例えば、マウス抗体に由来する全ての6つのCDRを含むヒト化マウス抗体) を保存する。他の実施形態において、ヒト化抗体は、元の抗体に対して改変された1つまたは複数のCDR (1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ) を有し、これらは、元の抗体からの1つまたは複数のCDR「に由来する」1つまたは複数のCDRとも呼ばれる。抗原をヒト化する能力は周知である (例えば、米国特許第5, 225, 539号明細書

10

20

30

40

50

；同第5，530，101号明細書；同第5，585，089号明細書；同第5，859，205号明細書；同第6，407，213号明細書；同第6，881，557号明細書を参照）。

【0062】

「抗体「XX」という用語は、そのそれぞれの配列番号によって定義される軽鎖、軽鎖可変領域、または軽鎖可変領域CDR1～3、およびそのそれぞれの配列番号によって定義される重鎖、重鎖可変領域、または重鎖可変領域CDR1～3を含むかまたはそれからなる抗体またはそのエピトープ結合フラグメント（例えば抗体「C10-2」）を示すことが意図される。特定の実施形態において、抗体またはそのエピトープ結合フラグメントは、それらの配列番号によって定義され含まれるそれらの全重鎖可変領域およびそれらの配列番号によって定義されるそれらの軽鎖可変領域によって定義され含まれる。

10

【0063】

本明細書において特に規定されない限り、抗体のFc領域または定常領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、Kabateal., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. 米国保健福祉省の国立衛生研究所（Public Health Service, National Institutes of Health）、Bethesda, MD, 1991に記載されているように、EU indexとも呼ばれるEU番号付与体系にしたがって行われる。

【0064】

本明細書において使用される際、抗体またはそのエピトープ結合フラグメントは、別のエピトープと比べてそのエピトープと、より高頻度で、より迅速に、より長い期間および/またはより高い親和性または結合活性で反応または会合する場合、別の分子（すなわち、エピトープ）の領域に「特異的に」結合するといわれる。この定義を読むことによって、例えば、第1の標的に特異的に結合する抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが、第2の標的に特異的にまたは優先的に結合してもまたは結合しなくてもよいことも理解される。本明細書において使用される際、所定の抗原への抗体の結合の文脈における「結合」という用語は、典型的に、抗原をリガンドとしておよび抗体を検体として用いてBIAcore（登録商標）3000機器において例えば表面プラズモン共鳴（SPR）技術によって決定した際の約 10^{-7} M以下、例えば約 10^{-8} M以下、例えば約 10^{-9} M以下のKDに対応する親和性での結合を指し、所定の抗原または密接に関連している抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA、カゼイン）への結合に対するその親和性より少なくとも10倍低い、例えば少なくとも100倍低い、例えば少なくとも1,000倍低い、例えば少なくとも10,000倍低い、例えば少なくとも100,000倍低いKDに対応する親和性で所定の抗原に結合する。親和性がより低くなる量は、抗体のKDに依存するため、抗体のKDが非常に低い（すなわち、抗体が非常に特異的である）場合、抗原に対する親和性が、非特異的抗原に対する親和性より低くなる量は、少なくとも10,000倍であり得る。

20

30

【0065】

本明細書において使用される際の「kd」（秒⁻¹または1/秒）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数を指す。前記値は、koff値とも呼ばれる。

40

【0066】

本明細書において使用される際の「ka」（M⁻¹×秒⁻¹または1/M秒）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の結合速度定数を指す。

【0067】

本明細書において使用される際の「KD」（M）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指し、kdをkaで除算することによって得られる。

【0068】

本明細書において使用される際の「KA」（M⁻¹または1/M）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の結合平衡定数を指し、kaをkdで除算することによって得られ

50

る。

【0069】

一実施形態において、本発明は、以下の特性：

- (i) 非リン酸化タウに結合することが実質的にできないこと；
- (ii) S404においてリン酸化され、S396においてリン酸化されないタウに結合することが実質的にできないこと；
- (iii) S396においてリン酸化されるタウに結合する能力；
- (iv) S396およびS404の両方においてリン酸化されるタウに結合する能力；
- (v) それがリン酸化404残基(pS404)に結合することが実質的にできないように、リン酸化タウ残基S396およびS404を選択的に区別する能力；
- (vi) ヒトアルツハイマー病の脳に由来する過リン酸化タウに結合する能力；
- (vii) 病理学的および非病理学的ヒトタウタンパク質を区別する能力；および/または

(viii) 本明細書に記載されるように、トランスジェニックマウスに由来する免疫枯渇されたrTg4510抽出物とともに使用されるとき、過リン酸化タウ64kDaおよび70kDaバンドを少なくとも90%だけ特異的に減少させる一方、55kDaタウバンドを10%超減少させない能力；または本明細書に記載されるように、ヒトAD死後脳に由来する抽出物とともに使用されるとき、S396リン酸化過リン酸化タウバンドを少なくとも90%だけ特異的に減少させる一方、非過リン酸化タウバンドを10%超減少させない能力

の1つまたは複数を示す抗タウ抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関する。

【0070】

本発明のさらなる実施形態は、残基リン酸化S396を含む病原性過リン酸化タウに対して免疫特異的な高特異性、高親和性抗体を生成するための方法によって生成される抗体であって、前記方法が、

(A) 2N4Rタウの残基386~410をカバーするTDHGA E I V Y K { P } S P V V S G D T { P } S P R H L (配列番号37)を含む、18~40、例えば18~30、例えば20~30連続アミノ酸残基を含む二リン酸化ペプチドを含む免疫原を哺乳動物に注入して、それによって、前記哺乳動物を免疫する工程と；

(B) 前記哺乳動物の前記免疫化を2回以上繰り返す工程と；

(C) 残基リン酸化S396を含む病原性過リン酸化タウに結合することが可能であるが、非病原性タウに結合する能力が実質的に低い高特異性、高親和性抗体の存在について、前記繰り返し免疫された哺乳動物に由来する血清試料をスクリーニングする工程と；

(D) 前記高特異性、高親和性抗体を回収する工程とを含む抗体に関する。

【0071】

本明細書において使用される際、タウ分子に結合することが「実質的にできないこと」は、対照抗体によって仲介される検出可能な結合と比べて、機能性の20%超の相違、40%超の相違、60%超の相違、80%超の相違、100%超の相違、150%超の相違、2倍超の相違、4倍超の相違、5倍超の相違、または10倍超の相違を示す。

【0072】

「選択的」および「免疫選択的」という用語は、2つのエピトープに対する抗タウ抗体の結合能力に言及する場合、飽和条件下で観察される結合が、少なくとも80%の相違、少なくとも95%の相違、最も好ましくは、100%の相違(すなわち、1つのエピトープへの検出可能な結合なし)を示すことが意図される。「選択的」および「免疫選択的」という用語は、タウ抗体に言及する場合、抗体が、ヒトアルツハイマー病の脳に由来する過リン酸化タウに結合し、病理学的および非病理学的ヒトタウタンパク質を区別することができることを意味することがさらに意図される。

【0073】

TBS - 抽出可能(S1)、高塩/サルコシル - 抽出可能(S3)、およびサルコシル

- 不溶性 (P 3) 画分という用語は、本明細書に記載されるタウ生化学的分画によって得られる画分である。

【 0 0 7 4 】

いくつかの抗体において、CDRのごく一部、すなわち、SDRと呼ばれる、結合に必要とされるCDR残基のサブセットが、ヒト化抗体において結合を保持するのに必要とされる。関連するエピトープに接触せず、SDR中になくCDR残基が、過去の研究に基づいて (例えばCDR H2中の残基H60~H65は、必要とされないことが多い)、Chothia超可変ループの外側にあるKabata CDRの領域から (Kabata et al. (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable domains Of Immunoglobulins", J. Mol. Biol. 196: 901-917を参照)、分子モデリングによっておよび/または実験により、またはGonzales, N. R. et al. (2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity", Mol. Immunol. 41: 863-872に記載されるように特定され得る。1つまたは複数のドナーCDR残基が存在しないかまたは全ドナーCDRが省略される位置におけるこのようなヒト化抗体において、この位置を占めるアミノ酸は、受容体抗体配列において (Kabata番号付けによって) 対応する位置を占めるアミノ酸であり得る。含まれるCDR中のドナーアミノ酸に対する受容体のこのような置換の数は、競合する考慮事項のバランスを反映する。このような置換は、ヒト化抗体中のマウスアミノ酸の数を減少させ、結果として、潜在的な免疫原性を低下させるのに潜在的に有利である。しかしながら、置換は、親和性の変化も引き起こすことがあり、親和性の著しい低下は回避されるのが好ましい。CDR内の置換の位置および置換するアミノ酸も、実験により選択され得る。

【 0 0 7 5 】

CDR残基の単一のアミノ酸改変が、機能的結合の喪失をもたらし得るということ (Rudikoff, S. et c. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6): 1979-1983) は、別の機能的CDR配列を系統的に同定するための手段を提供する。このような変異体CDRを得るための1つの好ましい方法において、CDRをコードするポリヌクレオチドが突然変異を起こされて (例えばランダム突然変異によって、または部位特異的方法 (例えば、突然変異遺伝子座をコードするプライマーによるポリメラーゼ連鎖媒介性増幅) によって)、置換アミノ酸残基を有するCDRを生成する。元の (機能的) CDR配列中の関連する残基の同一性を、置換される (非機能的) 変異体CDR配列の同一性と比較することによって、その置換についてのBLOSUM62. iij置換スコアが特定され得る。BLOSUMシステムは、信頼できるアラインメントについて配列のデータベースを分析することによって作成されるアミノ酸置換のマトリックスを提供する (Eddy, S. R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?", Nature Biotech. 22(8): 1035-1036; Henikoff, J. G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes", P

roc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 2264 - 2268; Altschul, S. F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective", J. Mol. Biol. 219, 555 - 565。現在、最先端のBLOSUMデータベースは、BLOSUM62データベース(BLOSUM62. iij)である。表1は、BLOSUM62. iij 置換スコアを示す(スコアが高くなるほど、置換がより保存的になり、ひいては置換が機能に影響を与えない可能性が高くなる)。得られるCDRを含むエピトープ結合フラグメントが、タウに結合できない場合、例えば、BLOSUM62. iij 置換スコアは、不十分に保存的であると見なされ、より高い置換スコアを有する新たな置換候補が選択され、生成される。したがって、例えば、元の残基がグルタミン酸塩(E)であり、非機能的置換残基がヒスチジン(H)である場合、BLOSUM62. iij 置換スコアは0であり、より保存的な変化(アスパラギン酸塩、アスパラギン、グルタミン、またはリジンなどへの)が好ましい。

10

20

30

40

【0076】

【表1】

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

【0077】

したがって、本発明は、改良されたCDRを同定するためのランダム突然変異の使用を想定している。本発明の文脈において、保存的置換は、表2、3または4の1つまたは複数に反映されているアミノ酸の種類範囲内の置換によって定義され得る。

【0078】

【表 2】

保存的置換のためのアミノ酸残基クラス:

表 2	
酸性残基	Asp (D)および Glu (E)
塩基性残基	Lys (K)、Arg (R)、および His (H)
親水性非荷電性残基	Ser (S)、Thr (T)、Asn (N)、および Gln (Q)
脂肪族非荷電性残基	Cly (G)、Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、および Ile (I)
非極性非荷電性残基	Cys (C)、Met (M)、および Pro (P)
芳香族残基	Phe (F)、Tyr (Y)、および Trp (W)

【 0 0 7 9 】

10

【表 3】

別の保存的アミノ酸残基置換クラス:

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

20

【 0 0 8 0 】

【表 4】

アミノ酸残基の別の物理的および機能的分類:

表 4	
アルコール基含有残基	S および T
脂肪族残基	I、L、V および M
シクロアルケニル結合残基	F、H、W および Y
疎水性残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W および Y
負荷電残基	D および E
極性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S および T
正荷電残基	H、K および R
小型残基	A、C、D、G、N、P、S、T および V
非常に小型の残基	A、G および S
ターン形成に関与する残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P および T
可撓性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E および R

30

【 0 0 8 1 】

40

より保存的な置換基 (substitution grouping) としては、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、およびアスパラギン - グルタミンが挙げられる。

【 0 0 8 2 】

アミノ酸のさらなる基は、例えば、Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company に記載されている原理を用いて配合され得る。

【 0 0 8 3 】

ファージディスプレイ技術が、CDR 親和性を増加させる (または低下させる) のに代

50

わりに使用され得る。親和性成熟と呼ばれるこの技術は、突然変異または「CDRウォーキング(walking)」を用い、再選択(re-selection)は、標的抗原またはその抗原性のエピトープ結合フラグメントを使用して、初期抗体または親抗体と比較した際に、抗原に対するより高い(またはより低い)親和性で結合するCDRを有する抗体を同定する(例えばGlaser et al. (1992) *J. Immunology* 149:3903を参照)。単一のヌクレオチドではなくコドン全体の突然変異誘発は、アミノ酸突然変異の半ランダム化レパートリーをもたらす。変異体クローンのプールからなるライブラリーが構築され得、変異体クローンのそれぞれが、単一のCDR中の単一のアミノ酸改変により異なり、各CDR残基に対して各可能なアミノ酸置換を提示する変異体を含む。抗原に対する増加した(または低下した)結合親和性を有する突然変異体は、固定化突然変異体を標識抗原と接触させることによってスクリーニングされ得る。当該技術分野において公知の任意のスクリーニング方法が、抗原に対する増加したまたは低下した親和性を有する突然変異体抗体を同定するのに使用され得る(例えば、ELISA)(Wu et al. 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155:1994を参照)。軽鎖をランダム化するCDRウォーキングが、使用可能であり得る(Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551を参照)。

10

【0084】

このような親和性成熟を達成するための方法は、例えば：Krause, J. C. et al. (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody", *MBio*. 2(1) pii:e00345-10. doi:10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C. T. et al. (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas", *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B. J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes", *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96; Montgomery, D. L. et al. (2009) "Affinity Maturation and Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41", *MAbs* 1(5):462-474; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth", *Virology* 393(1):112-119;最後に、W. J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions", *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558; Bostrom, J. et al. (2009) "

20

30

40

50

Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development", Methods Mol. Biol. 525: 353-376; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification", Mol. Immunol. 46(1): 135-144; および Barderas, R. et al. (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(26): 9029-9034 に記載されている。

10

【0085】

したがって、包含される抗体またはそれらのエピトープ結合フラグメントのCDR変異体の配列は、置換によって；例えば置換される4つのアミノ酸残基、3つのアミノ酸残基、2つのアミノ酸残基または1つのアミノ酸残基によって、親抗体、D1.2、C10-2、C5.2またはC8.3のCDRの配列と異なり得る。本発明の一実施形態によれば、CDR領域中のアミノ酸が、上記の3つの表において定義されるように、保存的置換で置換され得ることがさらに想定される。例えば、酸性残基 Asp は、抗体の結合特性に実質的に影響を与えずに Glu で置換され得る。

【0086】

「正常なタウ」という用語は、タンパク質のモル当たり2～3モルのホスフェートを含有する正常な脳タウを指す。

20

【0087】

「過リン酸化タウ」という用語は、ウエスタンブロットにおけるポリ-アニオン種に誘発される移動度シフトと一致するタウのポリリン酸化種またはリン酸化された5つ、6つまたは7つ超のセリン、トレオニンまたはチロシン部位を有するタウ種を指す。

【0088】

「リン酸化残基396を有するタウ」という用語は、残基396がリン酸化され、残基404が、リン酸化されるかまたはリン酸化されない過リン酸化タウに関連する。

【0089】

「トランスジェニック非ヒト動物」という用語は、1つまたは複数のヒト重鎖および/または軽鎖導入遺伝子または導入染色体(trans-chromosome)(動物の天然ゲノムDNAへと統合されるかまたは非統合のいずれか)を含み、完全ヒト化抗体を発現することが可能なゲノムを有する非ヒト動物を指す。例えば、トランスジェニックマウスは、マウスが、タウ抗原および/またはタウを発現する細胞で免疫されるときにヒト化抗タウ抗体を産生するように、ヒト化軽鎖導入遺伝子およびヒト化重鎖導入遺伝子またはヒト化重鎖導入染色体のいずれかを有し得る。ヒト化重鎖導入遺伝子は、トランスジェニックマウス、例えばHuMAbマウス(HCo7またはHCo12マウスなど)の場合と同様に、マウスの染色体DNAへと統合され得、またはヒト化重鎖導入遺伝子は、国際公開第02/43478号パンフレットに記載されるように、導入染色体KMマウスの場合と同様に、染色体過剰に(extra-chromosomally)維持され得る。

このようなトランスジェニックおよび導入染色体マウス(本明細書においてまとめて「トランスジェニックマウス」と呼ばれる)は、V-D-J組み換えおよびアイソタイプスイッチングを行うことによって、所与の抗原(IgG、IgA、IgM、IgDおよび/またはIgEなど)に対するヒト化モノクローナル抗体の複数のアイソタイプを産生することが可能である。

30

40

【0090】

トランスジェニック、非ヒト動物も、特定の抗体をコードする遺伝子を誘導することによって、例えば動物の乳汁中で発現される遺伝子間を作動可能に連結することによって、特定の抗原に対する抗体の産生に使用され得る。

【0091】

50

本明細書において使用される際の「治療 (treatment)」または「治療すること (treating)」という用語は、疾患または障害の進行または重症度を改善し、遅らせ、軽減し、または抑制すること、またはこのような疾患または障害の1つまたは複数の症状または副作用を改善し、遅らせ、軽減し、または抑制することを意味する。本発明の趣旨では、「治療」または「治療すること」は、有益なまたは所望の臨床結果を得るための手法をさらに意味し、ここで、「有益なまたは所望の臨床結果」としては、限定はされないが、部分的であるかまたは全体的であるか、検出可能かまたは検出不可能かにかかわらず、症状の軽減、障害または疾患の程度の減少、安定した（すなわち、悪化していない）疾患または障害状態、疾患または障害状態の進行の遅延または緩徐化、疾患または障害状態の改善または緩和、および疾患または障害の寛解が挙げられる。

10

【 0 0 9 2 】

「有効量」は、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに適用される場合、意図される生物学的効果または所望の治療結果（限定はされないが臨床結果を含む）を達成するのに、必要な投与量および期間にわたる、十分な量を指す。「治療的に有効な量」という語句は、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに適用される場合、障害もしくは疾患の状態の進行、または障害もしくは疾患の症状の進行を改善し、緩和し、安定させ、抑制し、遅らせ、軽減し、または遅延させるのに十分な、抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントの量を表すことが意図される。一実施形態において、本発明の方法は、他の化合物と組み合わせた、抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントの投与を提供する。このような場合、「有効量」は、意図される生物学的効果を引き起こすのに十分な組合せの量である。

20

【 0 0 9 3 】

本発明の抗タウ抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの治療的に有効な量は、個体の病状、年齢、性別、および体重、ならびに抗タウ抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが個体における所望の応答を引き起こす能力などの要因に応じて変化し得る。治療的に有効な量はまた、抗体または抗体部分の何らかの毒性または有害作用を、治療的に有益な効果が上回る量である。

【 0 0 9 4 】

上に示されるように、本発明は、特に、モノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント、およびこのような分子（ひいてはそのこのようなエピトープ結合フラグメント）を産生するための完全に新規な方法に関する。この方法は、図9に概略が示される。モノクローナル抗体を単離する新規な方法のこの能力は、ヒトタウ（配列番号33）のリン酸化残基セリン396（ $\{P\}S396$ ）に特異的に結合することが可能なモノクローナル抗体を単離するその使用によって本明細書において例示される。これらの抗体は、タウが残基396においてもリン酸化されない限り、リン酸化セリン404でタウタンパク質に結合しないように、リン酸化残基セリン396およびセリン404（ $pS404$ ）を区別するそれらの能力によってさらに特徴付けられる。

30

【 0 0 9 5 】

本発明の抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントは、 $\{P\}S396$ 特異的抗体（図9）の選択に好ましい新規な方法（図9）の使用によって生成および単離された。さらに、この非常に厳密な抗体クローン選択手順を適用することによって、 $S396$ に対して高度に特異的であるだけでなく、リン酸化 $\{P\}S396$ エピトープに対しても高度に選択的である抗体が得られた。これらの抗体は、アルツハイマー病の脳に由来するタウを独自に認識する。本発明者らは、図9に概略が示されるスクリーニング手順が、機能的および治療的有用性を有する抗体の同定を確実にすることも実証する。

40

【 0 0 9 6 】

抗体を、2N4Rタウの残基386~408をカバーする二リン酸化ペプチド：TDHGAEIVYK $\{P\}$ SPVVS $\{P\}$ SGDT $\{P\}$ SPRHL（配列番号37）に対して誘導した（実施例1）。マウスをリン酸化ペプチドで免疫した。十分な抗体価が得られたら、マウスを殺処分し、ハイブリドーマを生成した（実施例2）。ハイブリドーマを、ドット

50

プロット（実施例 3）および免疫化されたヒト病理学的および非病理学的タウを用いた M S D E L I S A（実施例 4）を用いてスクリーニングした。ドットプロットおよびウエスタンプロットにおいて病理学的および非病理学的ヒトタウタンパク質を区別する能力を、ハイブリドーマの選択に使用した。16 のクローンを選択し、そのうちの 4 つのハイブリドーマクローンを回収し、それにより、ヒト病理学的タウ材料に結合する目立った能力を示す抗体を産生した。

【0097】

また、病理学的および非病理学的タウへの特異的結合を、罹患および非罹患ヒト A D 脳に由来するタウの単離および M S D E L I S A プレートにおけるこの材料の固定化によって決定した（実施例 4）。

10

【0098】

本発明のさらなる態様は、2N4R タウの残基 386 ~ 410 をカバーする T D H G A E I V Y K { P } S P V V S G D T { P } S P R H L（配列番号 37）内の少なくとも 18、例えば少なくとも 20 連続アミノ酸残基を含むニリン酸化ペプチドに対して誘導されるモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関する。本発明のこの態様において、モノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントは、典型的に、2N4R タウの残基 386 ~ 410 をカバーする T D H G A E I V Y K { P } S P V V S G D T { P } S P R H L（配列番号 37）を含む 18 ~ 40、例えば 18 ~ 30、例えば 20 ~ 30 連続アミノ酸残基を含むニリン酸化ペプチドに対して誘導される。

20

【0099】

本発明のさらなる態様は、月齢を健常にマッチさせた対照より A D 罹患患者に由来するリン酸化タウ（p タウ）に対する特異性を有する本発明のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントであって、前記モノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが、本明細書に記載されるように、リン酸化 - および多量体特異的 S e t u p 1 E L I S A を用いて、A D および健常対照被験体に由来する脳ホモジネート中のリン酸化タウ（p タウ）を検出するための E L I S A ベースのアッセイにおいて健常対照材料と比較した A D 疾患材料に対する特異性の 50 倍超、例えば 100 倍超の増加の、月齢をマッチさせた健常対照に由来するタウより A D 罹患患者に由来するリン酸化タウ（p タウ）に対する特異性の差を有するようになっているモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関する。

30

【0100】

本発明の関連する態様は、A D 罹患タウに対する特異性を有する本発明のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントであって、前記モノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが、リン酸化 - および多量体特異的 S e t u p 1 E L I S A を用いて、A D および健常対照被験体に由来する脳ホモジネート中のリン酸化タウ（p タウ）を検出するための E L I S A ベースのアッセイにおいて健常対照材料と比較した A D 疾患材料に対する特異性の 50 倍超、例えば 100 倍超の増加の、月齢を健常にマッチさせた対照より A D に対する特異性の差を有するようになっているモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関する。

40

【0101】

S e t u p 1 E L I S A 方法は、工程 A) C 10 - 2 被覆プレートを用いた A D 脳に由来する病理学的ヒトタウ抗原の捕捉； B) 増加する濃度の p S 396 特異的抗体とともにタウ抗原のインキュベーション；および C) M S D からのスルホタグ化抗ヒト（総）タウ抗体を用いたタウ抗原捕捉および抗体に仲介される阻害の検出を含む。

【0102】

本発明は、残基リン酸化 S 396 を含む病原性過リン酸化タウに対して免疫特異的な高特異性、高親和性抗体を生成するための方法によって生成される抗体であって、前記方法が、

(A) 2N4R タウの残基 386 ~ 410 をカバーする T D H G A E I V Y K { P } S P V V S G D T { P } S P R H L（配列番号 37）を含む、18 ~ 40、例えば 18 ~ 3

50

0、例えば20～30連続アミノ酸残基を含む二リン酸化ペプチドを含む免疫原を哺乳動物に注入して、それによって、前記哺乳動物を免疫する工程と；

(B)前記哺乳動物の前記免疫化を2回以上繰り返す工程と；

(C)残基リン酸化S396を含む病原性過リン酸化タウに結合することが可能であるが、非病原性タウに結合する能力が実質的に低い高特異性、高親和性抗体の存在について、前記繰り返し免疫された哺乳動物に由来する血清試料をスクリーニングする工程と；

(D)前記高特異性、高親和性抗体を回収する工程とを含む抗体にさらに関する。

【0103】

さらに詳細には、工程Aは、C10-2抗体、典型的に、コーティング緩衝液中の0.5 μg/ml(捕捉抗体)によるMSDプレート(典型的に、4Cで一晩)コーティング、ブロッキング(典型的に、室温で1時間)および典型的に、3回の洗浄を含む。工程Bは、AD(3人の患者からプールされる)に由来するP3溶解物(典型的に、1:1000=2~4 μg/mlの総タンパク質)および/またはS1(p)(典型的に、1:3000=20~40 ng/mlの総タンパク質)の試料を、段階的な濃度のpS396ペプチドエピトープ特異的抗体と混合し、(典型的に、室温で1時間)インキュベートすることを含む。続いて、反応物を、工程Aにおいて準備されたプレート上で2時間インキュベートする。工程Cは、スルホタグ化ヒトタウを用いてC10-2で捕捉されたタウを検出することを含む。製造業者の指示にしたがって、MSDからのタウ抗体(典型的に、1:50)。プレートを、MSD SECTOR(登録商標)S600において分析する。AD P3およびAD S1(p)を、同様の設備において試験する。

10

20

【0104】

さらなる実施形態は、ヒト細胞株、非ヒト哺乳動物細胞株、昆虫、酵母または細菌細胞株などの細胞株において生産または製造された、ヒトタウ(配列番号33)のリン酸化残基396に免疫特異的に結合することが可能な抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0105】

CHO細胞株、HEK細胞株、BHK-21細胞株、マウス細胞株(骨髓腫細胞株など)、線維肉腫細胞株、PER.C6細胞株、HKB-11細胞株、CAP細胞株およびHuH-7ヒト細胞株において生産される、ヒトタウ(配列番号33)のリン酸化残基396に免疫特異的に結合することが可能な抗体、またはその抗原結合フラグメント。

30

【0106】

D1.2およびC10-2の特異的親和性および結合特性が、位置396または404(配列番号29~32)においてリン酸化されるかまたはリン酸化されないタウ386~410(2R4N)ペプチドを用いて特性評価された。本出願において概略が示される特異的な免疫化およびスクリーニングプロトコル(図9)を用いると、図4に示されるように高リン酸化セリン-396(pS396)特異的抗体が産生される。

【0107】

抗体が病理学的タウに対して特異的であることを実証するために、D1.2およびC10-2抗体はまた、免疫組織化学的分析によって特性評価された(実施例6)。抗体は、アルツハイマー病の脳およびヒト(P301L)突然変異体タウを発現するTg4510タウトランスジェニックマウスに由来する切片における神経原線維変化への高度に特異的な結合を示す(図5)。ヒト対照脳および非トランスジェニックマウス脳に由来する組織への結合は観察されず、これは、抗体が、ヒトタウ、特に、アルツハイマー病病変に関連するタウに特異的に結合することを実証している。

40

【0108】

疾患病変に関連するタウを認識するこれらの抗体の独自の能力は、実施例7において実証される。本発明者らは、実施例3に記載されているアッセイにおいて病理学的タウ対非病理学的タウの結合を比較している。比較は、5つの公開されたタウ抗体:hACI-2B6、IPN002、HJ8.5、2.10.3、および4E4に対して行われる。図6

50

は、健常および罹患した脳に由来するタウに対する対照抗体のそれぞれの結合、および10月齢のTg4510タウトランスジェニックマウスから単離されたP301Lヒト突然変異体タウへの結合を示す。これは、単離された抗体が、ヒト病理学的タウに対する非常に高度な特異性および選択性を示すことを実証している。この選択性は、表5に示されるように比較用抗体のいずれよりも優れている。

【0109】

【表5】

表 5		
試験される mAb	AD/対照	TG/wt
hACI-2B6	3	1
IPN002	3	37
HJ8.5	3	51
4E4	結合なし	1
2.10.3	5	2
C5-2_C10-2	>100	118

10

20

30

40

50

【0110】

飽和結合において、抗体D1.2およびC10-2は、ヒトAD脳から単離されたP301Lタウに対する100倍超の選択性を示す。

【0111】

選択された抗体が、機能的および治療的有用性を有することを実証するために、抗体を、インビトロおよび細胞内のタウ凝集アッセイにおいて試験した（実施例8）。これらのアッセイは、抗体が、タウの病理学的凝集過程を妨げることができることを実証する機能アッセイである。HEK293細胞を、ヒトタウ-P301L-FLAG(4RON)で一過性にトランスフェクトする。続いて、細胞を、ヒトAD脳またはトランスジェニックTg4510脳に由来するタウ抽出物に曝露する。病理学的タウへのこの曝露は、細胞へのタウの取り込みおよび細胞内凝集を促進する。抗体D1.2およびC10-2を用いたタウ標本の免疫枯渇、およびこれらの抗体による細胞の直接の処理は両方とも、タウ凝集体の形成を劇的に減少させることができる（図7）。

【0112】

抗体D1.2およびC10-2の治療的有用性も、ヒトタウ/PS1マウスにおいて評価された（実施例9）。このマウスモデルは、高齢期（12～18月齢）にのみAD病変を生じるさらなるAD疾患関連動物モデルである。しかしながら、マウスは、固体もつれ病変の発生前にタウ過リン酸化を示す。マウスに、15mg/kgの用量を週に2回、13週間にわたって長期的に注入した。抗体で処理されたマウスは、図9に示されるようにリン酸化タウの劇的な減少を示し、これは、抗体D1.2およびC10-2による長期治療が、もつれ病変、ひいてはその後のインビボの神経変性を減少させることを示す。

【0113】

本発明の抗体は、免疫枯渇方法によってrTg4510マウス脳抽出物から過リン酸化タウを特異的に除去する。さらに、本発明の抗体は、ホモジネートから正常なタウを除去しない一方、市販のタウ5抗体は正常なタウを除去する。残基404または残基404および396の両方においてリン酸化されるタウタンパク質に結合する市販の抗体と対照的に、本発明の抗体は、セリン396においてリン酸化される過リン酸化タウを95%だけ

特異的に除去する。実験（実施例 1 2）は、本発明の抗体が、脳ホモジネート中の総タウのごくわずかな部分（8%）のみを除去するにもかかわらず、抗体は、過リン酸化タウを（90%だけ）特異的に除去することを実証する。したがって、本発明の一態様は、病原性過リン酸化タウに免疫特異的に結合することが可能なモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントに関する。さらに、過リン酸化タウを、本発明の抗体を用いて除去した実験において、シーディング活性がなくなされた。ホモジネートから過リン酸化タウを除去することによって、ホモジネートは、タウ病変のシーディングをほぼ誘発しない。シーディングの減少は、もつれ形成の発生およびアルツハイマー病を含むタウオパチーの進行を軽減することが提示されている。したがって、本発明のさらなる態様は、AD または AD の症状の進行の軽減に使用するための本発明の抗体に関する。

10

【0114】

より詳細には、上に詳述されるように、本発明は、以下を含む群から選択される 4 つのモノクローナル抗体のうちのいずれか 1 つに関する：

抗体 D 1 . 2

- (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ；
- (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ；
- (c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ；
- (d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ；
- (e) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ；および
- (f) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 。

20

【0115】

抗体またはそのエピトープ結合フラグメントは、配列番号 8 の重鎖可変領域および / または配列番号 7 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0116】

関連する実施形態において、抗体 D 1 . 2 またはそのエピトープ結合フラグメントは、配列番号 8 の重鎖および / または配列番号 3 4 の軽鎖を含むかまたはそれからなり得る。

【0117】

抗体 C 1 0 - 2

- (a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ；
- (b) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ；
- (c) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ；
- (d) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ；
- (e) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ；および
- (f) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 。

30

【0118】

抗体またはそのエピトープ結合フラグメントは、配列番号 1 5 の重鎖可変領域および / または配列番号 1 6 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0119】

ヒト化 C 1 0 - 2 抗体の重鎖のアミノ酸配列は、配列番号 3 5 に示される。ヒト化 C 1 0 - 2 抗体の軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号 3 6 に示される。

40

【0120】

全体として、実施例は、C 1 0 - 2 を含む本発明の抗体が、AD - P 3 抗原で被覆された MSD プレートに効率的に結合することを示す。比較すると、PHF - 1 3 などの市販の抗体は、低い結合活性を有する。さらに、PHF - 1 3 は、本発明の抗体と比較してかなり高度な非特異的結合を示した（表 6 A ~ 表 6 D を参照）。表 6 は、C 1 0 - 2 被覆プレートにおける P タウ抗原捕捉の m C 1 0 - 2 流体相阻害が有効である一方（IC₅₀ = 1 0 ~ 2 0 n M）、m D 1 . 2 は有効でない（IC₅₀ = 5 0 0 ~ 1 0 0 0 n M）ことを示す。m C 1 0 - 2 被覆プレートにおける p - タウ抗原捕捉の m C 1 0 - 2 流体相阻害が、IC₅₀ = 1 0 ~ 2 0 n M を有して有効である一方、PHF - 1 3 は有効でない（IC₅₀ = 5 0 0 ~ 1 0 0 0 n M）。

50

【0121】

本発明の一態様は、

- (a) 配列番号9のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3

を含む抗体に関する。

【0122】

本発明のさらなる態様は、

- (d) 配列番号12のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号13のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号14のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含む抗体に関する。

10

【0123】

本発明のさらなる態様は、

- (d) 配列番号12のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号13のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号14のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3ならびに
- (a) 配列番号9のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；および
- (c) 配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3

のうちの1つ、2つまたは3つを含む抗体に関する。

20

【0124】

抗体C5.2

- (a) 配列番号17のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号18のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号19のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号20のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号21のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号22のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3。

【0125】

抗体またはそのエピトープ結合フラグメントは、配列番号23の重鎖可変領域および/または配列番号24の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

30

【0126】

図10の結晶構造から分かるように、エピトープは、C5.2の重鎖および軽鎖にわたって結合される。したがって、関連する実施形態において、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントは、

- (a) 配列番号17のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；または
- (b) 配列番号18のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；または
- (c) 配列番号19のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；および
- (d) 配列番号20のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；または
- (e) 配列番号21のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；または
- (f) 配列番号22のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含む。

40

【0127】

抗体C8.3

- (a) 配列番号25のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号26のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2
- (c) 配列番号27のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号28のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号29のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および

50

(f) 配列番号30のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3。

【0128】

抗体またはそのエピトープ結合フラグメントは、配列番号31の重鎖可変領域および/または配列番号32の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0129】

抗体またはそのエピトープ結合フラグメントは、好ましくは、ヒトまたはヒト化抗体である。

【0130】

上述される抗体およびそのエピトープ結合フラグメントは、一実施形態によれば、(4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有する、このような軽鎖および/または重鎖CDR1、CDR2またはCDR3の変異体をさらに含み得る。

10

【0131】

図11から分かるように、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3およびLC CDR3は、少なくとも一実施形態において、タウの392~398領域への結合のために重要である。本発明の一実施形態において、本発明の抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントは、

a) 配列番号4、配列番号12、配列番号20、および配列番号28からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1；

b) 配列番号5、配列番号13、配列番号21、および配列番号29からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2；および

20

c) 配列番号6、配列番号14、配列番号22、および配列番号30からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3；および

d) 配列番号3、配列番号11、配列番号19、および配列番号27からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む。

【0132】

本発明の抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントは、

a) 配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1；

b) 配列番号21のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2；

c) 配列番号22のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3；および

d) 配列番号19のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3

30

を含み得る。

【0133】

本発明の一態様において、本発明は、タウペプチドのY394とともに、L3:H3、L3:F8*、H1:H13、H2:Y1、H2:Y3によって形成される疎水性ポケットを形成する抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関する。一実施形態において、本発明は、溶媒和^{P}S396およびL3:T4、H1:R10、H1:T11、H3:R1、H3:T3間の水素結合ネットワークの形成について本明細書にさらに記載される抗体と競合する抗体に関し；(*)L3:F8は、CDR L3のフレームワーク残基に隣接するC末端である(図11を参照)。

40

【0134】

X線結晶構造から分かるように、本発明の抗体は、2つのレベルの選択性で結合する。第1のレベルの選択性は、過リン酸化病理学的タウに対する選択性であり、第2のレベルの選択性は、リン酸化セリン残基に対する選択性であり、ここで、前記リン酸化セリンのホスフェートが、2つの残基が前記リン酸化セリンから除去されたチロシン残基の側鎖に水素結合される。したがって、本発明の興味深い態様は、2つの残基がチロシン残基から除去されたリン酸化セリンを含む過リン酸化タウのアミノ酸モチーフに対して選択的な抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関する。典型的に、アミノ酸モチーフは、配列：

50

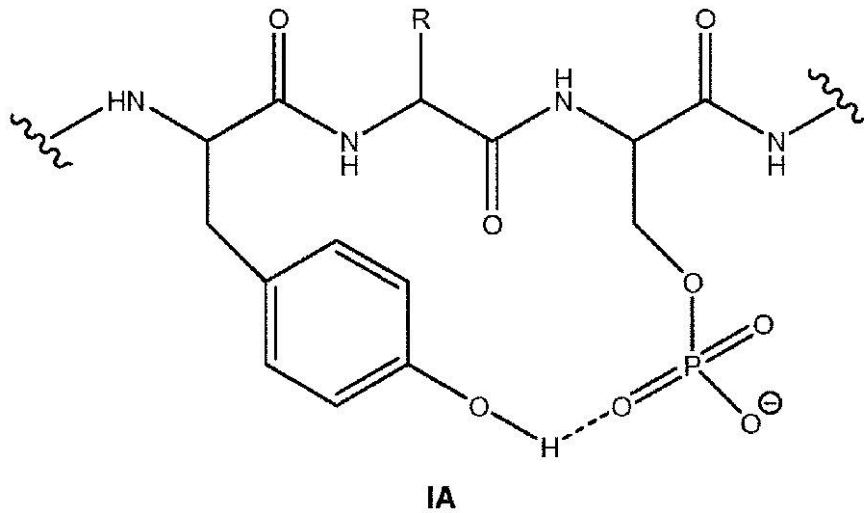
Y - X - S (リン酸化) - P -

を有し、ここで、Yがチロシンであり、Xが天然アミノ酸であり、Pがプロリンであり、S(リン酸化)が、リン酸化ヒドロキシル側鎖を有するセリンである。

【0135】

同様に、本発明の興味深い態様は、リン酸化タウ、好ましくは、過リン酸化タウに結合する抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関し、ここで、前記抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが、アミノ酸残基モチーフIAに対して選択的であり、ここで、Rが、天然アミノ酸の側鎖である。

【化2】



10

20

【0136】

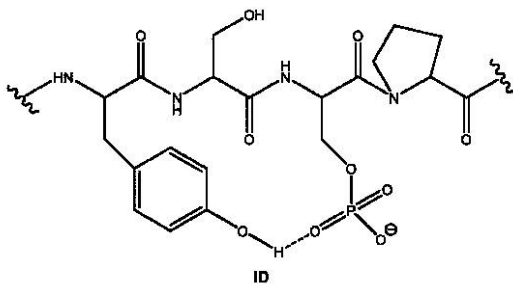
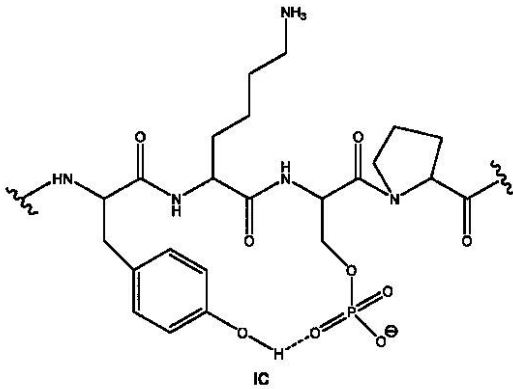
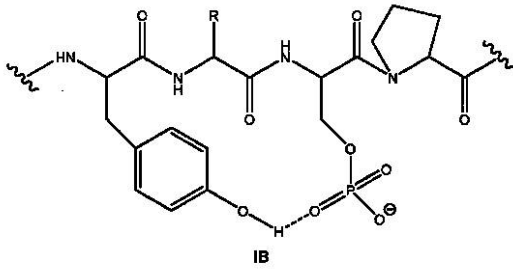
特定の理論によって制約されるものではないが、アミノ酸モチーフIAが病理学的タウによって取られる立体配座にあるとき、本発明の抗体が、前記モチーフに対して選択的であると考えられる。したがって、アミノ酸モチーフIAは、典型的に、本発明の抗体によって選択的に認識される配列である。したがって、本発明の興味深い態様は、リン酸化タウ、好ましくは、過リン酸化タウに結合する抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関し、ここで、前記抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが、アミノ酸残基モチーフIBに対して選択的であり、ここで、Rが、天然アミノ酸の側鎖である。

30

【0137】

本発明のこの態様の典型的な実施形態において、本発明は、リン酸化タウ、好ましくは、過リン酸化タウに結合する抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関し、ここで、前記抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが、アミノ酸残基モチーフIBに対して選択的であり、ここで、Rが、限定はされないがICまたはIDなどの天然アミノ酸の側鎖である。

【化3】



10

20

【0138】

本発明は、患者におけるタウもつれ形成を減少させる方法であって、このような治療を必要とする患者に、治療的に有効な量の本発明の抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントを投与する工程を含む方法も提供する。

30

【0139】

本発明の一態様は、本発明の抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントを用いてタウオパチーを治療する方法に関する。典型的に、タウオパチーは、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、精神病、特に、ADに起因する精神病またはADの患者における精神病、レビー小体型認知症の患者の精神医学的症状、進行性核上まひ（PSP）、前頭側頭認知症（FTDまたはその変異型）、TBI（急性または慢性外傷性脳損傷）、大脳皮質基底核変性症（CBD）、ピック病、原発性加齢性タウオパチー（PART）、神経原線維変化優位型老年性認知症、パンチドランカー、慢性外傷性脳症、脳卒中、脳卒中中の回復、パーキンソン病に関連する神経変性、染色体に関連するパーキンソン病、リテイコ-ボディグ病（Lytic-Bodig disease）（グアムパーキンソン認知症複合）、神経節腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳炎後パーキンソン病、亜急性硬化性全脳炎、ハンチントン病、鉛脳症、結節性硬化症、ハレルフォルデン・スパッツ病およびリポフスチン症からなる群から選択される。より典型的に、タウオパチーは、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、精神病、特に、ADに起因する精神病またはADの患者における精神病、レビー小体型認知症の患者の精神医学的症状、進行性核上まひ（PSP）、前頭側頭認知症（FTDまたはその変異型）、TBI（急性または慢性外傷性脳損傷）、大脳皮質基底核変性症（CBD）、およびピック病からなる群から選択される。特に、タウオパチーは、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、ADに起因する精神病またはADの患者における精神病、およびレビー小体型認知症の

40

50

患者の精神医学的症狀から選択され得る。

【0140】

したがって、本発明のさらなる態様は、タウオパチーの治療に使用するための、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関する。典型的に、タウオパチーは、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、精神病、特に、ADに起因する精神病またはADの患者における精神病、レビー小体型認知症の患者の精神医学的症狀、進行性核上まひ（PSP）、前頭側頭認知症（FTDまたはその変異型）、TBI（急性または慢性外傷性脳損傷）、大脳皮質基底核変性症（CBD）、ピック病、原発性加齢性タウオパチー（PART）、神経原線維変化優位型老年性認知症、パンチドランカー、慢性外傷性脳症、脳卒中、脳卒中の回復、パーキンソン病に関連する神経変性、染色体に関連するパーキンソン病、リテイコ・ボディグ病（グアムパーキンソン認知症複合）、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳炎後パーキンソン病、亜急性硬化性全脳炎、ハンチントン病、鉛脳症、結節性硬化症、ハレルフォルデン・スパッツ病およびリポフスチン症からなる群から選択される。より典型的に、タウオパチーは、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、精神病、特に、ADに起因する精神病またはADの患者における精神病、レビー小体型認知症の患者の精神医学的症狀、進行性核上まひ（PSP）、前頭側頭認知症（FTDまたはその変異型）、TBI（急性または慢性外傷性脳損傷）、大脳皮質基底核変性症（CBD）、およびピック病からなる群から選択される。特に、タウオパチーは、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、ADに起因する精神病またはADの患者における精神病、およびレビー小体型認知症の患者の精神医学的症狀から選択され得る。

10

20

【0141】

本発明のさらなる態様は、薬学的に許容できる担体、希釈剤、補助剤および/または安定剤と一緒に組成物中の、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに関する。本発明の抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントは、タウオパチーの治療のための療法に使用され得る。典型的に、タウオパチーは、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、精神病、特に、ADに起因する精神病またはADの患者における精神病、レビー小体型認知症の患者の精神医学的症狀、進行性核上まひ（PSP）、前頭側頭認知症（FTDまたはその変異型）、TBI（急性または慢性外傷性脳損傷）、大脳皮質基底核変性症（CBD）、ピック病、原発性加齢性タウオパチー（PART）、神経原線維変化優位型老年性認知症、パンチドランカー、慢性外傷性脳症、脳卒中、脳卒中の回復、パーキンソン病に関連する神経変性、染色体に関連するパーキンソン病、リテイコ・ボディグ病（グアムパーキンソン認知症複合）、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳炎後パーキンソン病、亜急性硬化性全脳炎、ハンチントン病、鉛脳症、結節性硬化症、ハレルフォルデン・スパッツ病およびリポフスチン症からなる群から選択される。より典型的に、タウオパチーは、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、精神病、特に、ADに起因する精神病またはADの患者における精神病、レビー小体型認知症の患者の精神医学的症狀、進行性核上まひ（PSP）、前頭側頭認知症（FTDまたはその変異型）、TBI（急性または慢性外傷性脳損傷）、大脳皮質基底核変性症（CBD）、およびピック病からなる群から選択される。特に、タウオパチーは、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、ADに起因する精神病またはADの患者における精神病、およびレビー小体型認知症の患者の精神医学的症狀から選択され得る。

30

40

【0142】

本発明によって想定される治療は、長期であってもよく、患者は、少なくとも2週間、例えば少なくとも1ヶ月間、6ヶ月間、1年間またはそれ以上治療され得る。

【0143】

本発明の抗体は、例えば、Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)によって最初に記載されているハイブリドーマ方法によって産生されるモノクローナル抗体であってもよく、または組み換えDNAもしくは他の方法によって産生されるモノクローナル抗体であってもよく、またはより好ましくは、本明細書に開示され

50

る新規な方法によって産生され得る(図9)。モノクローナル抗体はまた、例えば、Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) および Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991) に記載されている技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離され得る。モノクローナル抗体は、任意の好適な源から得られる。したがって、例えば、モノクローナル抗体は、例えば、表面において抗原を発現する細胞、または該当する抗原をコードする核酸の形態で、該当する抗原で免疫されたマウスから得られるマウス脾臓Bリンパ球細胞から調製されるハイブリドーマから得られる。モノクローナル抗体はまた、免疫されたヒトまたは非ヒト哺乳動物(ラット、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、霊長類など)の抗体発現細胞に由来するハイブリドーマから得られる。

10

【0144】

一実施形態において、本発明の抗体は、ヒト化抗体である。タウに対するヒト化モノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の部分を有するトランスジェニックまたは導入染色体マウスを用いて生成され得る。このようなトランスジェニックおよび染色体導入マウスは、本明細書においてそれぞれHuMAb(ヒト化モノクローナル抗体)マウスおよびKMマウスと呼ばれるマウスを含み、本明細書においてまとめて「トランスジェニックマウス」と呼ばれる。

【0145】

HuMAbマウスは、内因性 μ およびK鎖遺伝子座を不活性化する標的突然変異と一緒に、再配列されていないヒト重鎖可変および定常(μ およびY)ならびに軽鎖可変および定常()鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子のミニ遺伝子座(minilocus)を含む(Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994))。したがって、マウスは、マウスIgMまたはIgKの減少した発現を示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子が、クラススイッチおよび体細胞突然変異を起こして、高親和性ヒトIgG、モノクローナル抗体を生成する(Lonberg, N. et al. (1994)、上記参照; Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994)、Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995) および Harding, F. and Lonberg, N., Ann. N. Y. Acad. Sci. 764 536-546 (1995) に概説されている)。HuMAbマウスの作製は、Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992)、Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993)、Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994)、Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994)、Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996) に詳細に記載されている。米国特許第5,545,806号明細書、米国特許第5,569,825号明細書、米国特許第5,625,126号明細書、米国特許第5,633,425号明細書、米国特許第5,789,650号明細書、米国特許第5,877,397号明細書、米国特許第5,661,016号明細書、米国特許第5,814,318号明細書、米国特許第5,874,299号明細書、米国特許第5,770,429号明細書、米国特許第5,545,807号明細書、国際公開第98/24884号パンフレット、国際公開第94/25585号パンフレット、国際公開第93/1227号パンフレット、国際公開第92/22645号パンフレット、国際公開第92/03918号パンフレットおよび国際公開第01/09187号パンフレットも参照されたい。

20

30

40

【0146】

HCo7、HCo12、HCo17およびHCo20マウスは、それらの内因性軽鎖()遺伝子におけるJKD破壊(Chen et al., EMBO J. 12, 811

50

- 820 (1993)に記載されているように)、それらの内因性重鎖遺伝子におけるC
MD破壊(国際公開第01/14424号パンフレットの実施例1に記載されているよう
に)、およびKCo5ヒト軽鎖導入遺伝子(Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載されて
いるように)を有する。さらに、HCo7マウスは、HCo7ヒト重鎖導入遺伝子(米国
特許第5,770,429号明細書に記載されているように)を有し、HCo12マウス
は、HCo12ヒト重鎖導入遺伝子(国際公開第01/14424号パンフレットの実施
例2に記載されているように)を有し、HCo17マウスは、HCo17ヒト重鎖導入遺
伝子(国際公開第01/09187号パンフレットの実施例2に記載されているように)
を有し、HCo20マウスは、HCo20ヒト重鎖導入遺伝子を有する。得られるマウス
は、内因性マウス重鎖および軽鎖遺伝子座の破壊のためにバックグラウンドのホモ接合
体においてヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖導入遺伝子を発現する。

10

【0147】

KMマウス株において、内因性マウス軽鎖遺伝子は、Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)に記載されているようにホモ接合的に破壊
されており、内因性マウス重鎖遺伝子は、国際公開第01/09187号パンフレットの実
施例1に記載されているようにホモ接合的に破壊されている。このマウス株は、Fis
hwild et al., Nature Biotechnology 14, 845
- 851 (1996)に記載されているように、ヒト軽鎖導入遺伝子、KCo5を保有
する。このマウス株は、国際公開第02/43478号パンフレットに記載されているよう
に、染色体14フラグメントhCF(SC20)から構成されるヒト重鎖導入染色体も
保有する。HCo12-Balb/c、HCo17-Balb/cおよびHCo20-B
alb/cマウスは、国際公開第09/097006号パンフレットに記載されているよう
に、HCo12、HCo17およびHCo20を、KCo5[J/K](Balb)に
交差させることによって生成され得る。

20

【0148】

rTg4510マウスは、突然変異体タウ導入遺伝子発現に対する時間的および空間的
制御を提供する公知のタウオパチーモデルである。KMマウス株において、内因性マウス
軽鎖遺伝子は、Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (19
93)に記載されているようにホモ接合的に破壊されており、内因性マウス重鎖遺伝子は
、国際公開第01/09187号パンフレットの実施例1に記載されているようにホモ接
合的に破壊されている。このマウス株は、Fishwild et al., Natur
e Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載されている
ように、ヒト軽鎖導入遺伝子、KCo5を保有する。このマウス株は、国際公開第02
/43478号パンフレットに記載されているように、染色体14エピトープ結合フラグ
メントhCF(SC20)から構成されるヒト重鎖導入染色体も保有する。

30

【0149】

これらのトランスジェニックマウスに由来する脾細胞は、周知の技術にしたがって、ヒ
ト化モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを生成するのに使用され得る。本発明
のヒト化モノクローナルもしくはポリクローナル抗体、または他の種に由来する本発明の
抗体はまた、該当する免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列についてトランスジェニックな
別の非ヒト哺乳動物または植物の生成、および回収可能な形態での抗体の産生によって遺
伝子導入的に生成され得る。哺乳動物におけるトランスジェニック産生に関連して、抗体
は、ヤギ、ウシ、または他の哺乳動物の乳汁中で産生され、それから回収され得る。例え
ば米国特許第5,827,690号明細書、米国特許第5,756,687号明細書、米
国特許第5,750,172号明細書および米国特許第5,741,957号明細書を参
照されたい。

40

【0150】

本発明の抗体は、任意のアイソタイプのものであり得る。アイソタイプの選択は、典型
的に、ADCC誘導などの所望のエフェクター機能によって導かれる。例示的なアイソタ

50

イブは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4である。ヒト軽鎖定常領域、または のいずれかが使用され得る。必要に応じて、本発明の抗タウ抗体のクラスは、公知の方法によってスイッチされ得る。例えば、元はI g Mであった本発明の抗体は、本発明のI g G抗体にクラススイッチされ得る。さらに、クラススイッチ技術は、あるI g Gサブクラスを別のI g Gサブクラスに、例えばI g G 1からI g G 2に変換するのに使用され得る。したがって、本発明の抗体のエフェクター機能は、様々な治療的使用のために、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g D、I g A、I g EまたはI g M抗体へのアイソタイプスイッチによって変更され得る。一実施形態において、本発明の抗体は、I g G 1抗体、例えばI g G 1、 である。抗体は、そのアミノ酸配列が、他のアイソタイプと比べてそのアイソタイプに最も相同性が高い場合、特定のアイソタイプのものであるといわれる。

10

【0151】

一実施形態において、本発明の抗体は、完全長抗体、好ましくは、I g G抗体、特に、I g G 1、 抗体である。別の実施形態において、本発明の抗体は、抗体エピトープ結合フラグメントまたは一本鎖抗体である。

【0152】

抗体およびそのエピトープ結合フラグメントは、例えば従来の技術を用いたエピトープ結合断片化によって得られ、エピトープ結合フラグメントは、全抗体について本明細書に記載されるのと同じように有用性についてスクリーニングされ得る。例えば、F (a b ') 2エピトープ結合フラグメントは、抗体をペプシンで処理することによって生成され得る。得られるF (a b ') 2エピトープ結合フラグメントは、ジスルフィド架橋を還元するように処理されて、F a b ' エピトープ結合フラグメントを生成し得る。F a b エピトープ結合フラグメントはI g G抗体をパインで処理することによって得られ；F a b ' エピトープ結合フラグメントは、I g G抗体のペプシン消化により得られる。F (a b ') エピトープ結合フラグメントはまた、チオエーテル結合またはジスルフィド結合により、以下に記載されるF a b ' を結合することによって生成され得る。F a b ' エピトープ結合フラグメントは、F (a b ') 2のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することによって得られる抗体エピトープ結合フラグメントである。F a b ' - エピトープ結合フラグメントは、F (a b ') 2エピトープ結合フラグメントを、ジチオスレイトールなどの還元剤で処理することによって得られる。抗体エピトープ結合フラグメントはまた、組み換え細胞におけるこのようなエピトープ結合フラグメントをコードする核酸の発現によって生成され得る（例えばE v a n s e t a l . , J . I m m u n o l . M e t h . 1 8 4 , 1 2 3 - 3 8 (1 9 9 5) を参照）。例えば、F (a b ') 2エピトープ結合フラグメントの一部をコードするキメラ遺伝子は、このような切断された抗体エピトープ結合フラグメント分子を生成するために、H鎖のC H 1領域およびヒンジ領域をコードするD N A配列、続いて翻訳停止コドンを含み得る。

20

30

【0153】

一実施形態において、抗タウ抗体は、一価抗体、好ましくは、ヒンジ領域の欠失を有する国際公開第2007059782号パンフレット（その全体が参照により本明細書に援用される）に記載されている一価抗体である。したがって、一実施形態において、抗体は、一価抗体であり、前記抗タウ抗体は、i) 前記一価抗体の軽鎖をコードする核酸構築物を提供する工程であって、前記構築物が、選択された抗原特異的抗タウ抗体のV L領域をコードするヌクレオチド配列およびI gの定常C L領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、選択された抗原特異的抗体のV L領域をコードする前記ヌクレオチド配列およびI gのC L領域をコードする前記ヌクレオチド配列が、作動可能に一緒に連結され、I g G 1サブタイプの場合、C L領域をコードするヌクレオチド配列は、ポリクローナルヒトI g Gの存在下でまたは動物もしくはヒトに投与されるとき、C L領域の同一のアミノ酸配列を含む他のペプチドとともにジスルフィド結合または共有結合を形成することが可能なアミノ酸をC L領域が含まないように修飾されている工程と；i i) 前記一価抗体の重鎖をコードする核酸構築物を提供する工程であって、前記構築物が、選択された抗

40

50

原特異的抗体のVH領域をコードするヌクレオチド配列およびヒトIgの定常CH領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、CH領域をコードするヌクレオチド配列は、ヒンジ領域に対応する領域および、Igサブタイプによって必要とされるように、CH3領域などのCH領域の他の領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下でまたは動物ヒトに投与されるとき、ヒトIgのCH領域の同一のアミノ酸配列を含む他のペプチドとともに、ジスルフィド結合または共有結合または安定した非共有重鎖間結合の形成に關与するアミノ酸残基を含まないように修飾されており、選択された抗原特異的抗体のVH領域をコードする前記ヌクレオチド配列および前記IgのCH領域をコードする前記ヌクレオチド配列が、作動可能に一緒に連結される工程と；iii)前記一価抗体を生成するために細胞発現系を提供する工程と；iv)(iii)の細胞発現系の細胞内で(i)および(ii)の核酸構築物を共発現することによって、前記一価抗体を生成する工程とを含む方法によって構築される。

【0154】

同様に、一実施形態において、本発明の抗タウ抗体は、

(i)本明細書に記載される本発明の抗体の可変領域または前記領域のエピトープ結合部分、および

(ii)免疫グロブリンのCH領域またはCH2およびCH3領域を含むその領域を含む一価抗体であり、ここで、CH領域またはその領域は、ヒンジ領域に対応する領域および、免疫グロブリンがIgG4サブタイプでない場合、CH3領域などのCH領域の他の領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一のCH領域とともにジスルフィド結合を形成するか、または同一のCH領域とともに他の共有結合または安定した非共有重鎖間結合を形成することが可能なアミノ酸残基を含まないように修飾されている。

【0155】

さらなる実施形態において、本発明の一価抗体の重鎖は、ヒンジ領域全体が欠失しているように修飾されている。

【0156】

別のさらなる実施形態において、前記一価抗体の配列は、それがN結合型グリコシル化のための受容体部位を含まないように修飾されている。

【0157】

本発明は、抗タウ結合領域(例えば、抗タウモノクローナル抗体のタウ結合領域)が、2つ以上のエピトープを標的にする二価または多価二重特異性骨格の一部である「二重特異性抗体」も含む(例えば、第2のエピトープは、二重特異性抗体が、血液脳関門などの生物学的障壁を越える改良されたトランスサイトシスを示し得るように、活性な輸送受容体のエピトープを含み得る)。したがって、別のさらなる実施形態において、抗タウ抗体の一価Fabは、異なるタンパク質を標的にするさらなるFabまたはscfvに結合されて、二重特異性抗体を生成し得る。二重特異性抗体は、二重機能、例えば抗タウ結合領域によって与えられる治療機能、および血液脳関門などの生物学的障壁を越える輸送を促進するために受容体分子に結合し得る輸送機能を有し得る。

【0158】

本発明の抗体、およびそのエピトープ結合フラグメントは、一本鎖抗体も含む。一本鎖抗体は、重鎖および軽鎖Fv領域が結合されたペプチドである。一実施形態において、本発明は、本発明の抗タウ抗体のFvにおける重鎖および軽鎖が、ペプチド一本鎖において(典型的に、約10、12、15つまたはそれ以上のアミノ酸残基の)フレキシブルペプチドリンカーと結合される一本鎖Fv(scFv)を提供する。このような抗体を産生する方法が、例えば米国特許第4,946,778号明細書、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)、Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)、Houston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)およびMc

10

20

30

40

50

Cafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990) に記載されている。一本鎖抗体は、単一のVHおよびVLのみが使用される場合、一価であり、2つのVHおよびVLが使用される場合、二価であり、または3つ以上のVHおよびVLが使用される場合、多価であり得る。

【0159】

本明細書に記載される抗体およびそのエピトープ結合フラグメントは、任意の好適な数の修飾アミノ酸の包含によって修飾され得るおよび/またはこのような共役置換基との結合によって修飾され得る。これに関連する適合性は、一般に、非誘導体化親抗タウ抗体に関連するタウ選択性および/または抗タウ特異性を少なくとも実質的に保持する能力によって決定される。1つまたは複数の修飾アミノ酸の包含は、例えば、ポリペプチド血清半減期を増加させ、ポリペプチド抗原性を低下させ、またはポリペプチド貯蔵安定性を増加させるのに有利であり得る。アミノ酸は、例えば、組み換え産生の際に翻訳と同時に (co-translationally) もしくは翻訳後に (post-translationally) 修飾されるか (例えば、哺乳類細胞における発現の際のN-X-S/TモチーフにおけるN結合型グリコシル化) または合成手段によって修飾される。修飾アミノ酸の非限定的な例としては、グリコシル化アミノ酸、硫酸化アミノ酸、プレニル化 (例えば、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化) アミノ酸、アセチル化アミノ酸、アシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ピオチン化アミノ酸、カルボキシル化アミノ酸、リン酸化アミノ酸などが挙げられる。アミノ酸の修飾の当業者の指針となるのに十分な言及は、文献全体を通して十分にある。例のプロトコルが、Walker (1998) Protein Protocols On CD-Rom, Humana Press, Totowa, NJに見られる。修飾アミノ酸は、例えば、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ピオチン化アミノ酸、脂質部分にコンジュゲートされたアミノ酸、または有機誘導化剤にコンジュゲートされたアミノ酸から選択され得る。

10

20

【0160】

本発明の抗体およびそのエピトープ結合フラグメントはまた、例えばそれらの血中半減期を増加させるために、ポリマーへの共有結合によって化学修飾され得る。例示的なポリマー、およびそれらをペプチドに結合するための方法が、例えば米国特許第4,766,106号明細書、米国特許第4,179,337号明細書、米国特許第4,495,285号明細書および米国特許第4,609,546号明細書に示されている。さらなる例示的なポリマーとしては、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリエチレングリコール (PEG) (例えば、約1,000~約40,000、例えば約2,000~約20,000、例えば、約3,000~12,000 g/molの分子量を有するPEG) が挙げられる。

30

【0161】

本発明の抗体およびそのエピトープ結合フラグメントは、診断法においてまたは画像診断用リガンドとしてさらに使用され得る。

【0162】

一実施形態において、1つまたは複数の放射性標識アミノ酸を含む本発明の抗体およびそのエピトープ結合フラグメントが提供される。放射性標識抗タウ抗体は、診断および治療目的の両方に使用され得る (放射性標識分子への結合は、別の考えられる特徴である)。このような標識の非限定的な例としては、限定はされないが、ビスマス (^{213}Bi)、炭素 (^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C)、クロム (^{51}Cr)、コバルト (^{57}Co 、 ^{60}Co)、銅 (^{64}Cu)、ジスプロシウム (^{165}Dy)、エルビウム (^{169}Er)、フッ素 (^{18}F)、ガドリニウム (^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、ガリウム (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、ゲルマニウム (^{68}Ge)、金 (^{198}Au)、ホルミウム (^{166}Ho)、水素 (^3H)、インジウム (^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{113}In 、 ^{115}In)、ヨウ素 (^{121}I 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、イリジウム (^{192}Ir)、鉄 (^{59}Fe)、クリプトン ($^{81\text{m}}\text{Kr}$)、ランタン (^{140}La)、ルテチウム (^{177}Lu)

40

50

、マンガン (^{54}Mn)、モリブデン (^{99}Mo)、窒素 (^{13}N 、 ^{15}N)、酸素 (^{15}O)、パラジウム (^{103}Pd)、リン (^{32}P)、カリウム (^{42}K)、プラセオジウム (^{142}Pr)、プロメチウム (^{149}Pm)、レニウム (^{186}Re 、 ^{188}Re)、ロジウム (^{105}Rh)、ルビジウム (^{81}Rb 、 ^{82}Rb)、ルテニウム (^{82}Ru 、 ^{97}Ru)、サマリウム (^{153}Sm)、スカンジウム (^{47}Sc)、セレン (^{75}Se)、ナトリウム (^{24}Na)、ストロンチウム (^{85}Sr 、 ^{89}Sr 、 ^{92}Sr)、硫黄 (^{35}S)、テクネチウム (^{99}Tc)、タリウム (^{201}Tl)、スズ (^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、キセノン (^{133}Xe)、イッテルビウム (^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Yb)、イットリウム (^{90}Y)、亜鉛 (^{65}Zn) およびジルコニウム (^{89}Zr) が挙げられる。ジルコニウム (^{89}Zr) が特に興味深い。放射性標識アミノ酸および関連するペプチド誘導体を調製するための方法は、当該技術分野において公知である (例えば Junghans et al., *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2nd edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) ならびに米国特許第 4,681,581 号明細書、米国特許第 4,735,210 号明細書、米国特許第 5,101,827 号明細書、米国特許第 5,102,990 号明細書 (米国再発行特許第 35,500 号明細書)、米国特許第 5,648,471 号明細書および米国特許第 5,697,902 号明細書を参照。例えば、放射性同位体が、クロラミン T 法によって結合され得る (Lindegren, S. et al. (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl) Benzoate As An Intermediate", *Nucl. Med. Biol.* 25 (7): 659-665; Kurth, M. et al. (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor", *J. Med. Chem.* 36 (9): 1255-1261; Rea, D. W. et al. (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors", *Cancer Res.* 50 (3 Suppl): 857s-861s)。

【0163】

本発明は、蛍光標識 (希土類キレート (例えば、ユウロピウムキレート) など)、フルオレセイン型標識 (例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン)、ローダミン型標識 (例えば、ALEXA FLUOR (登録商標) 568 (Invitrogen)、TAMRA (登録商標) またはダンシルクロリド)、VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME (商標) (Perkin Elmer)、フィコエリトリン; ウンベリフェロン、Lissamine; シアニン; フィコエリトリン、Texas Red、BODIPY FL-SE (登録商標) (Invitrogen) またはそれらの類似体 (これらは全て、光学的検出に好適である) を用いて検出可能に標識される抗タウ抗体およびそのエピトープ結合フラグメントも提供する。化学発光標識が、用いられてもよい (例えば、ルミノール、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびイクオリン)。このような診断および検出はまた、本発明の診断用分子を、限定はされないが、様々な酵素、限定はされないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含む酵素を含む検出可能な物質に、または限定はされないが、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどの補欠分子族複合体に結合することによって行われ得る。

【0164】

10

20

30

40

50

化学発光標識が、用いられてもよい（例えば、ルミノール、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびイクオリン）。このような診断および検出はまた、本発明の診断用分子を、限定はされないが、様々な酵素、限定はされないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含む酵素を含む検出可能な物質に、または限定はされないが、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどの補欠分子族複合体に結合することによって行われ得る。常磁性標識も用いられ得、好ましくは、ポジトロン放出型断層撮影法（PET）または単一光子放射コンピュータ断層撮影法（SPECT）を用いて検出される。このような常磁性標識としては、限定はされないが、アルミニウム（Al）、バリウム（Ba）、カルシウム（Ca）、セリウム（Ce）、ジスプロシウム（Dy）、エルビウム（Er）、ユウロピウム（Eu）、ガドリニウム（Gd）、ホルミウム（Ho）、イリジウム（Ir）、リチウム（Li）、マグネシウム（Mg）、マンガン（Mn）、モリブデン（Mo）、ネオジム（Nd）、オスミウム（Os）、酸素（O）、パラジウム（Pd）、白金（Pt）、ロジウム（Rh）、ルテニウム（Ru）、サマリウム（Sm）、ナトリウム（Na）、ストロンチウム（Sr）、テルビウム（Tb）、ツリウム（Tm）、スズ（Sn）、チタン（Ti）、タングステン（W）、およびジルコニウム（Zr）、特に、 Co^{+2} 、 Cr^{+2} 、 Cr^{+3} 、 Cu^{+2} 、 Fe^{+2} 、 Fe^{+3} 、 Ga^{+3} 、 Mn^{+3} 、 Ni^{+2} 、 Ti^{+3} 、 V^{+3} 、および V^{+4} の常磁性イオン、様々なポジトロン放出型断層撮影法を用いたポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンを含有する化合物が挙げられる。

10

20

【0165】

したがって、一実施形態において、本発明の抗タウ抗体またはそのタウ結合フラグメントは、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識で標識され得る。フラグメントの標識抗体は、被験体の脳における前記タウの存在または量を検出または測定するのに使用され得る。この方法は、前記タウに結合された抗タウ抗体またはタウ結合フラグメントのインビボイメージングの検出または測定を含んでもよく、前記タウに結合された前記抗タウ抗体またはタウ結合フラグメントのエクスピボイメージングを含み得る。

【0166】

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗体またはそのタウ結合フラグメントの1つまたは複数のポリペプチド鎖をコードする発現ベクターに関する。このような発現ベクターは、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの組み換え産生に使用され得る。

30

【0167】

本発明の文脈における発現ベクターは、染色体ベクター、非染色体ベクター、および合成核酸ベクター（好適な組の発現制御要素を含む核酸配列）を含む、任意の好適なDNAまたはRNAベクターであり得る。このようなベクターの例としては、SV40の誘導體、細菌プラスミド、ファージDNA、パキウウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組合せに由来するベクター、およびウイルス核酸（RNAまたはDNA）ベクターが挙げられる。一実施形態において、抗タウ抗体コード核酸は、例えば、線形発現要素（linear expression element）（例えば、Sykes and Johnston, Nat Biotech 12, 355-59 (1997)に記載されているように）、圧縮（compact）核酸ベクター（例えば米国特許第6,077,835号明細書および/または国際公開第00/70087号パンフレットに記載されているように）、pBR322、pUC 19/18、またはpUC 118/119、「ミッジ（midge）」最小サイズ核酸ベクターなどのプラスミドベクター（例えば、Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)に記載されているように）を含む裸のDNAまたはRNAベクターにおいて、またはCaPO₄沈殿構築物などの沈殿核酸ベクター構築物（例えば、国際公開第00/46147号パンフレット、Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986)、Wigler et al

40

50

、Cell 14, 725 (1978)、および Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 2, 603 (1981)に記載されているように)として含まれる。このような核酸ベクターおよびその使用法は、当該技術分野において周知である(例えば米国特許第5,589,466号明細書および米国特許第5,973,972号明細書を参照)。

【0168】

一実施形態において、ベクターは、細菌細胞における本発明の抗タウ抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの発現に好適である。このようなベクターの例としては、Blue Script (Stratagene)、pINベクター (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989))、pETベクター (Novagen, Madison, WI) など)などの発現ベクターが挙げられる。

10

【0169】

発現ベクターは、さらにまたは代わりに、酵母系における発現に好適なベクターであり得る。酵母系における発現に好適な任意のベクターが用いられてもよい。好適なベクターとしては、例えば、因子、アルコールオキシダーゼおよびPGHなどの構成的または誘導性プロモータを含むベクターが挙げられる (F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience New York (1987)、Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)、Mattanovich, D. et al. Methods Mol. Biol. 824, 329-358 (2012)、Celik, E. et al. Biotechnol. Adv. 30 (5), 1108-1118 (2012)、Li, P. et al. Appl. Biochem. Biotechnol. 142 (2), 105-124 (2007)、Boeer, E. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77 (3), 513-523 (2007)、van der Vaart, J. M. Methods Mol. Biol. 178, 359-366 (2002)、および Holliger, P. Methods Mol. Biol. 178, 349-357 (2002)に概説されている)。

20

【0170】

本発明の発現ベクターにおいて、抗タウ抗体コード核酸は、任意の好適なプロモータ、エンハンサー、および他の発現促進要素を含むかまたはそれらと結合され得る。このような要素の例としては、強力な発現プロモータ(例えば、ヒトCMV IEプロモータ/エンハンサーならびにRSV、SV40、SL3-3、MMTV、およびHIV LTRプロモータ)、有効なポリ(A)終止配列、大腸菌(E. coli)におけるプラスミド産物の複製起点、選択可能なマーカーとしての抗生物質抵抗性遺伝子、および/または好都合なクロニング部位(例えば、ポリリンカー)が挙げられる。核酸は、CMV IEなどの構成的プロモータとは対照的に誘導性プロモータも含み得る(当業者は、このような用語が、実際に、特定の条件下における遺伝子発現の程度の記述語であることを認識するであろう)。

30

40

【0171】

さらに他の態様において、本発明は、本明細書に定義される本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントまたは本明細書に定義される本発明の二重特異性分子を産生するトランスフェクターマ(transfectoma)などの、組み換え真核生物または原核生物宿主細胞に関する。宿主細胞の例としては、酵母、細菌、および哺乳類細胞(CHOまたはHEK細胞など)が挙げられる。例えば、一実施形態において、本発明は、本発明の抗タウ抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの発現のための配列コードを含む細胞ゲノムに安定に組み込まれた核酸を含む細胞を提供する。別の実施形態において、本発明は、本発明の抗タウ抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの発現のための配列コードを含む、プラスミド、コスミド、ファージミド、または線形発現要素などの、融

50

合されていない核酸を含む細胞を提供する。

【0172】

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗タウ抗体を産生するための方法であって、a)本明細書において上述されるように本発明のハイブリドーマまたは宿主細胞を培養する工程と、b)培地から本発明の抗体を精製する工程とを含む方法に関する。

【0173】

一実施形態において、本発明は、調製物であって、このような用語が本明細書において使用される際、本明細書に定義される抗タウ抗体を含み、タウに結合することが可能でないかまたは調製物の抗タウ機能性を実質的に変更しない自然発生する抗体を実質的に含まない調製物に関する。したがって、このような調製物は、自然発生する血清、またはこの

10

ような血清の精製誘導体を包含せず、抗タウ抗体と、調製物の抗タウ抗体の機能性を変更しない別の抗体との混合物を含み、ここで、このような機能性は、

(i)非リン酸化タウに結合することが実質的にできないこと；

(ii)S404においてリン酸化され、S396においてリン酸化されないタウに結合することが実質的にできないこと；

(iii)S396においてリン酸化されるタウに結合する能力；

(iv)S396およびS404の両方においてリン酸化されるタウに結合する能力；

(v)それがリン酸化404残基に結合することが実質的にできないように、リン酸化タウ残基S396およびS404を選択的に区別する能力；

(vi)ヒトアルツハイマー病の脳に由来する過リン酸化タウに結合する能力；

20

(vii)病理学および非病理学的ヒトタウタンパク質を区別する能力；および/または

(viii)本明細書に記載されるように、トランスジェニックマウスに由来する免疫枯渇されたrTg4510抽出物とともに使用されるとき、過リン酸化タウ64kDaおよび70kDaバンドを少なくとも90%だけ特異的に減少させる一方、55kDaタウバンドを10%超減少させない能力または本明細書に記載されるように、ヒトAD死後脳に由来する抽出物とともに使用されるとき、S396リン酸化過リン酸化タウバンドを少なくとも90%だけ特異的に減少させる一方、非過リン酸化タウバンドを10%超減少させない能力

30

である。

【0174】

本発明は、特に、天然抗タウ抗体の構造と比べてそのアミノ酸配列の構造変化を(そのCDR、可変領域、フレームワーク残基および/または定常領域のいずれかに)有するこのような抗タウ抗体の調製物であって、前記構造変化により、抗タウ抗体が、前記天然抗タウ抗体によって示される機能性と比べて著しく変化した機能性(すなわち、機能性の20%超の相違、40%超の相違、60%超の相違、80%超の相違、100%超の相違、150%超の相違、2倍超の相違、4倍超の相違、5倍超の相違、または10倍超の相違)を示し；ここで、このような機能性は、

(i)非リン酸化タウに結合することが実質的にできないこと；

(ii)S404においてリン酸化され、S396においてリン酸化されないタウに結合することが実質的にできないこと；

40

(iii)S396においてリン酸化されるタウに結合する能力；

(iv)S396およびS404の両方においてリン酸化されるタウに結合する能力；

(v)それがリン酸化404残基に結合することが実質的にできないように、リン酸化タウ残基S396およびS404を選択的に区別する能力；

(vi)ヒトアルツハイマー病の脳に由来する過リン酸化タウに結合する能力；

(vii)病理学および非病理学的ヒトタウタンパク質を区別する能力；および/または

(viii)本明細書に記載されるように、トランスジェニックマウスに由来する免疫枯渇されたrTg4510抽出物とともに使用されるとき、過リン酸化タウ64kDaお

50

よび70kDaバンドを少なくとも90%だけ特異的に減少させる一方、55kDaタウバンドを10%超減少させない能力；または本明細書に記載されるように、ヒトAD死後脳に由来する抽出物とともに使用されるとき、S396リン酸化過リン酸化タウバンドを少なくとも90%だけ特異的に減少させる一方、非過リン酸化タウバンドを10%超減少させない能力

であり、特に、このような変化した機能性は、構造変化の結果であり、したがってそれと切り離すことができない。

【0175】

自然発生する抗体を「実質的に含まない」という用語は、このような調製物におけるこのような自然発生する抗体の、または調製物のタウ結合特性を実質的に変更しないこのような調製物におけるある濃度のこのような自然発生する抗体の包含の完全な非存在を指す。抗体は、それが自然発生する対応物を有さないか、またはそれを自然に伴う成分から分離もしくは精製されている場合、「単離」されているといわれる。

10

【0176】

「自然発生する抗体」という用語は、それがこのような調製物に関する場合、生きたヒトまたは他の動物内で、それらの免疫系の機能の自然な結果として誘発される抗体（自然発生する自己抗体を含む）を指す。

【0177】

したがって、本発明の調製物は、抗タウ抗体およびタウによって保有されないエピトープに結合することが可能な意図的に加えられるさらなる抗体を含有するこのような調製物を除外せず、実際は明確にそれを包含する。このような調製物は、特に、調製物が、アルツハイマー病（AD）、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、進行性核上まひ（PSP）、および大脳皮質基底核変性症（CBD）を治療する際に向上した有効性を示すその実施形態を含む。さらに、本発明は、精神病、特に、ADに起因する精神病またはADの患者における精神病、およびレビー小体型認知症の患者の精神医学的症状の治療に使用することが意図された、抗タウ抗体抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントを含有する調製物に関する。さらに、本発明の調製物は、脳卒中、脳卒中の回復、パーキンソン病に関連する神経変性の治療に使用され得る、抗タウ抗体抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントを含有する。

20

【0178】

さらに他の態様において、本発明は、

(i) 本明細書に定義されるタウ抗体またはそのエピトープ結合フラグメント、または調製物であって、このような用語が本明細書において定義される際、このような抗タウ抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを含む調製物、および

30

(ii) 薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物に関する。

【0179】

医薬組成物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013に開示されているものなどの従来技術にしたがって、薬学的に許容できる担体または希釈剤ならびに任意の他の公知の補助剤および賦形剤とともに製剤化され得る。

40

【0180】

薬学的に許容できる担体または希釈剤ならびに任意の他の公知の補助剤および賦形剤は、本発明の選択された化合物および選択された投与方法に好適であるべきである。医薬組成物の担体および他の成分のための適合性は、本発明の選択された化合物または医薬組成物の所望の生物学的特性に対する大きな悪影響がないことに基づいて決定される（例えば、エピトープ結合に対するそれほど大きくない影響（10%以下の相対的阻害、5%以下の相対的阻害など））。

【0181】

50

本発明の医薬組成物は、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、洗浄剤（例えば、T w e e n - 20またはT w e e n - 80などの非イオン性洗浄剤）、安定剤（例えば、糖またはタンパク質を含まないアミノ酸）、防腐剤、組織固定剤、可溶化剤、および/または医薬組成物に含めるのに好適な他の材料も含み得る。希釈剤は、組合せの生物学的活性に影響を与えないように選択される。このような希釈剤の例は、蒸留水、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、およびハックス溶液である。さらに、医薬組成物または製剤は、他の担体、または非毒性の、非治療的、非免疫原性安定剤なども含み得る。組成物は、タンパク質、キトサンのような多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコポリマー（例えば、ラテックス機能化（l a t e x f u n c t i o n a l i z e d）セファロース、アガロース、セルロースなど）、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、および脂質凝集体（例えば、油滴またはリポソーム）などの、大型のゆっくりと代謝される高分子も含み得る。

10

【0182】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、特定の患者、組成物、および投与方法に対する所望の治療反応を達成するのに有効な活性成分の量を得るように変化され得る。選択された投与量レベルは、用いられる本発明の特定の組成物の活性、またはそのアミド、投与経路、投与時期、用いられる特定の化合物の排せつ速度、治療期間、用いられる特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬剤、化合物および/または材料、治療される患者の年齢、性別、体重、病態、全体的な健康および過去の病歴、ならびに医療分野において周知の同様の要因を含む様々な薬物動態学的要因に応じて決まる。

20

【0183】

医薬組成物は、予防的および/または治療的処置のための非経口、局所、経口または経鼻手段を含む、任意の好適な経路および方法によって投与され得る。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、非経口的に投与される。本明細書において使用される際の「非経口投与」および「非経口的に投与される」という語句は、通常、注射による、腸内および局所投与以外の投与方法を意味し、表皮、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心腔内、皮内、腹腔内、腱内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、頭蓋内、胸腔内、硬膜外および胸骨内注射および注入を含む。

【0184】

インピボおよびインピトロで本発明の化合物を投与するさらなる好適な経路が、当該技術分野において周知であり、当業者によって選択され得る。

30

【0185】

一実施形態において、その医薬組成物は、静脈内または皮下注射または注入によって投与される。

【0186】

薬学的に許容できる担体としては、本発明の化合物と生理学的に適合性の、あらゆる好適な溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張剤、酸化防止剤および吸収遅延剤などが挙げられる。

【0187】

本発明の医薬組成物に用いられ得る好適な水性および非水性担体の例としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの好適な混合物、オリーブ油、トウモロコシ油、ピーナッツ油、綿実油、およびゴマ油などの植物油、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントガムおよび注射可能な有機酸エステル（オレイン酸エチルなど）、および/または様々な緩衝液が挙げられる。他の担体が、医薬品分野において周知である。

40

【0188】

薬学的に許容できる担体は、滅菌注射用溶液または分散体の即時調製用の滅菌水溶液または分散体および滅菌粉末を含む。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野において公知である。従来の媒体または薬剤が活性化合物と適

50

合しない場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるそれらの使用が想定される。

【0189】

適切な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散体の場合、所要の粒度の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。

【0190】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる酸化防止剤、例えば(1)水溶性酸化防止剤(アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど);(2)油溶性酸化防止剤(パルミチン酸アスコルビル、プチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、プチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなど);および(3)金属キレート剤(クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸など)も含み得る。

10

【0191】

本発明の医薬組成物は、組成物中に糖類、ポリアルコール(マンニトール、ソルビトール、グリセロールなど)または塩化ナトリウムなどの等張剤も含み得る。

【0192】

本発明の医薬組成物は、医薬組成物の保存可能期間または有効性を向上させ得る、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、防腐剤または緩衝液などの、選択された投与経路に適切な1つまたは複数の補助剤も含有し得る。本発明の化合物は、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達システムを含む、制御放出製剤などの速放性から化合物を保護する担体とともに調製され得る。このような担体は、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリル、ジステアリン酸グリセリル、生分解性、生体適合性ポリマー(エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸など)を単独でまたはワックスまたは当該技術分野において周知の他の材料とともに含み得る。このような製剤の調製のための方法は、一般に、当業者に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

20

【0193】

一実施形態において、本発明の化合物は、インピボでの適切な分配を確実にするように製剤化され得る。非経口投与用の薬学的に許容できる担体は、滅菌注射用溶液または分散体の即時調製用の滅菌水溶液または分散体および滅菌粉末を含む。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野において公知である。従来の媒体または薬剤が活性化化合物と適合しない場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるそれらの使用が想定される。補助的な活性化化合物も、組成物に組み込まれ得る。

30

【0194】

注射用の医薬組成物は、典型的に、製造および貯蔵の条件下で、滅菌性かつ安定性でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リボソーム、または高い薬剤濃度に好適な他の規則構造として製剤化され得る。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの好適な混合物、植物油(オリーブ油など)、および注射可能な有機酸エステル(オレイン酸エチルなど)を含有する、水性または非水性溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散体の場合、所要の粒度の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば、糖類、ポリアルコール(グリセロール、マンニトール、ソルビトールなど)、または塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射用組成物の持続的吸収が、抗体の吸収を遅らせる物質、例えば、一ステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含むことによってもたらされ得る。滅菌注射用溶液は、例えば上に列挙されるような成分の1つまたは組合せを含む適切な溶媒中に所要量の活性化化合物を組み込むこと、必要に応じて、その後の滅菌精密ろ過によって調製され得る。一般に、分散体は、塩基

40

50

性分散媒および例えば上に列挙される成分からの所要の他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法の例は、予め滅菌ろ過されたそれらの溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を得る真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。

【0195】

滅菌注射用溶液は、上に列挙されるような成分の1つまたは組合せを含む適切な溶媒中に所要量の活性化化合物を組み込むこと、必要に応じて、その後の滅菌精密ろ過によって調製され得る。一般に、分散体は、塩基性分散媒および上に列挙される成分からの所要の他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法の例は、予め滅菌ろ過されたそれらの溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を得る真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。

10

【0196】

治療の上記の方法および本明細書に記載される使用における投与計画は、最適な望ましい反応（例えば、治療反応）を提供するように調整される。例えば、単回ボラスが投与されてもよく、いくつかの分割量が、時間をかけて投与されてもよく、または用量が、治療状況の要件によって示されるように比例的に減少または増加されてもよい。非経口組成物は、投与のしやすさおよび投与の均一性のために単位剤形で製剤化され得る。本明細書において使用される際の単位剤形は、治療される被験体のための統一された投与量として適した物理的に別個の単位を指し；各単位は、所要の医薬担体に関連して所望の治療効果を生じるように計算された所定の量の活性化化合物を含有する。本発明の単位剤形の仕様は、(a) 活性化化合物の独自の特性および得られる具体的な治療効果、ならびに (b) 個体における感受性 (s e n s i t i v i t y) の治療のためのこのような活性化化合物の配合の技術分野に固有の制限に左右され、それらに直接依存する。

20

【0197】

本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの有効投与量および投与計画は、治療される疾患または病態に応じて決まり、当業者によって決定され得る。いずれの日も所定の投与量が投与され、投与量は、約0.0001~約100mg/kg、より通常は約0.01~約5mg/kg 宿主体重の範囲であり得る。例えば、投与量は、1mg/kg 体重または10mg/kg 体重または1~10mg/kg 体重の範囲内であり得る。したがって、例示的な投与量としては、約0.1~約10mg/kg/体重、約0.1~約5mg/kg/体重、約0.1~約2mg/kg/体重、約0.1~約1mg/kg/体重、例えば約0.15mg/kg/体重、約0.2mg/kg/体重、約0.5mg/kg/体重、約1mg/kg/体重、約1.5mg/kg/体重、約2mg/kg/体重、約5mg/kg/体重、または約10mg/kg/体重が挙げられる。

30

【0198】

当該技術分野において通常の技能を有する医師は、必要とされる医薬組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師は、医薬組成物に用いられる本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの用量を、所望の治療効果を得るために必要とされるより少ないレベルから開始し、所望の効果が得られるまで投与量を徐々に増加し得る。一般に、本発明の組成物の好適な1日用量は、治療効果を生じるのに有効な最低用量である化合物の量であろう。このような有効用量は、一般に、上述される要因に応じて決まる。投与は、例えば静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下投与であり得る。必要に応じて、医薬組成物の有効1日用量は、任意選択的に単位剤形で、1日を通して適切な間隔で、別々に投与される2回、3回、4回、5回、6回またはそれ以上の分割用量として投与され得る。本発明の化合物は、単独で投与されることが可能であるが、上述されるように医薬組成物として化合物を投与するのが好ましい。

40

【0199】

本発明の標識抗体またはそのエピトープ結合フラグメントは、疾患または障害を検出、診断、または監視するために、診断目的で使用され得る。本発明は、限定はされないが、

50

アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、進行性核上まひ（PSP）、および大脳皮質基底核変性症（CBD）を含む、神経変性または認知疾患または障害の検出または診断を提供し、（a）タウに特異的に結合する1つまたは複数の抗体を用いて、被験体の細胞または組織試料内のピログルタミル化Aフラグメントの存在を測定する工程と；（b）抗原のレベルを、制御レベル、例えば正常な組織試料におけるレベルと比較し、それによって、抗原の制御レベルと比較した、抗原の測定レベルの増加が、疾患または障害を示すか、または疾患または障害の重症度を示す工程を含む。

【0200】

本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントは、当該技術分野において周知の免疫組織化学法を用いて、生物学的試料内のタウまたはタウのフラグメントを測定するのに使用され得る。タンパク質を検出するのに有用な他の抗体ベースの方法としては、酵素結合免疫測定法（ELISA）、放射免疫測定法（RIA）およびメソスケールディスカバリープラットフォーム（mesoscale discovery platform）ベースのアッセイ（MSD）などの免疫測定法が挙げられる。好適な抗体標識が、このようなキットおよび方法に使用され得、当該技術分野において公知の標識としては、酵素標識（アルカリホスファターゼおよびグルコースオキシダーゼなど）；放射性同位体標識（ヨウ素（ ^{125}I 、 ^{131}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{121}In ）、およびテクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）など）；および発光標識（ルミノールおよびルシフェラーゼなど）；および蛍光標識（フルオレセインおよびローダミンなど）が挙げられる。

10

20

【0201】

標識抗タウ抗体またはそれらのタウ結合フラグメントの存在は、診断目的で、インビボで検出され得る。一実施形態において、診断は、a)有効量のこのような標識分子を被験体に投与する工程；b)投与後、所定の時間間隔にわたって待機して、標識分子を、A堆積の部位（もしあれば）で濃縮させ、非結合標識分子が、バックグラウンドレベルになるまで除去されるのを可能にする工程；c)バックグラウンドレベルを決定する工程；およびd)バックグラウンドレベルを超える標識分子の検出が、被験体が疾患または障害に罹患していることを示すか、または疾患または障害の重症度を示すように、被験体中の標識分子を検出する工程を含む。このような実施形態によれば、分子は、当業者に公知の特定のイメージングシステムを用いた検出に好適なイメージング部分で標識される。バックグラウンドレベルは、検出された標識抗体の量を、特定のイメージングシステムのために予め決定された標準値と比較することを含む、当該技術分野において公知の様々な方法によって決定され得る。本発明の診断法に使用され得る方法およびシステムとしては、限定はされないが、コンピュータ断層撮影法（CT）、ポジトロン放出型断層撮影法（PET）などの全身スキャン、磁気共鳴画像法（MRI）、および超音波検査法が挙げられる。

30

【0202】

さらなる態様において、本発明は、治療に使用するための、本明細書に定義されるモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントを提供する。

【0203】

さらなる態様において、本発明は、タウオパチーを治療、診断またはイメージングするために使用するための、本明細書に定義されるモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントを提供する。

40

【0204】

さらなる態様において、本発明は、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、進行性核上まひ（PSP）、および大脳皮質基底核変性症（CBD）を治療するために使用するための、本明細書に定義されるモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントを提供する。

【0205】

さらなる態様において、本発明は、タウオパチーを治療、診断またはイメージングするための薬剤の製造に使用するための、本明細書に定義されるモノクローナル抗体、または

50

そのエピトープ結合フラグメントを提供する。

【0206】

好ましくは、薬剤は、アルツハイマー病（AD）、嗜銀顆粒性認知症（AGD）、進行性核上まひ（PSP）、および大脳皮質基底核変性症（CBD）、最も好ましくは、アルツハイマー病（AD）を治療するためのものである。薬剤はまた、好ましくは、精神病、特に、ADに起因する精神病またはADの患者における精神病、およびレビー小体型認知症の患者の精神医学的症状の治療のためのものである。

【0207】

さらなる態様において、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病または他のタウオパチーを治療、診断またはイメージングする方法であって、本明細書に定義される薬剤モノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを、有効量で前記被験体に投与する工程を含む方法を提供する。

10

【0208】

好ましい実施形態において、治療は、長期であり、好ましくは、少なくとも2週間、例えば少なくとも1ヶ月間、6ヶ月間、1年間またはそれ以上にわたる。

【0209】

さらなる態様において、本発明は、治療に使用するための、本明細書に定義される抗体、またはそのフラグメントを含むキットを提供する。

【0210】

実施形態

20

1. 配列番号33のリン酸化残基396などの、ヒトタウのリン酸化残基396に免疫特異的に結合することが可能なモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0211】

2. 無傷の抗体からなる、実施形態1に記載の抗体。

【0212】

3. Fvフラグメント（例えば一本鎖Fvおよびジスルフィド結合Fv）；Fab様フラグメント（例えばFabフラグメント、Fab'フラグメントおよびF(ab)2フラグメント）；ミニボディ（Fv）2-CH3領域、およびドメイン抗体（例えば単一のVH可変領域またはVL可変領域）からなる群から選択されるエピトープ結合フラグメントを含むかまたはそれからなる、実施形態1または2に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

30

【0213】

4. 抗体が、サブタイプIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の抗体からなる群から選択される、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0214】

5. ヒトまたはヒト化抗体である、先行する実施形態のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0215】

6. 抗体またはエピトープ結合フラグメントが、以下の特性
 (a) ヒト病理学的タウに対する選択性および特異性；
 (b) 0.5~10nM、例えば1~5nMまたは1~2nMの、p-タウ386~408（pS396/pS404）（配列番号33）に対する結合親和性（KD）
 の1つまたは複数を示す、先行する実施形態のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

40

【0216】

7. 前記抗体が、タウ（配列番号33）におけるリン酸化404残基に実質的に結合しない、先行する実施形態のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

50

【0217】

8. (a) 配列番号1のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；

(b) 配列番号2のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；

(c) 配列番号3のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；

(d) 配列番号4のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；

(e) 配列番号5のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および

(f) 配列番号6のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含む、モノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

10

20

【0218】

9. 配列番号8の重鎖可変領域または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列および/または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有する配列番号7の軽鎖可変領域を含む、実施形態8に記載のモノクローナル抗体。

【0219】

10. (a) 配列番号9のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；

(b) 配列番号10のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；

(c) 配列番号11のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；

(d) 配列番号12のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；

(e) 配列番号13のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および

(f) 配列番号14のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含む、モノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

30

40

【0220】

11. 配列番号16の重鎖可変領域または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列およびまたは配列番号15の軽鎖可変領域または4つ以下のアミノ酸差、または3つ

50

以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を含む、実施形態10に記載のモノクローナル抗体。

【0221】

12. エピトープ結合フラグメントが、

(a) 配列番号17のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；

(b) 配列番号18のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；

(c) 配列番号19のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；

(d) 配列番号20のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；

(e) 配列番号21のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および

(f) 配列番号22のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含むモノクローナル抗体。

10

20

【0222】

13. 配列番号24の重鎖可変領域または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列およびまたは配列番号23の軽鎖可変領域または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を含む、実施形態12に記載のモノクローナル抗体。

【0223】

14. (a) 配列番号25のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；

(b) 配列番号26のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；

(c) 配列番号27のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；

(d) 配列番号28のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；

(e) 配列番号29のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および

(f) 配列番号30のアミノ酸配列または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む、モノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

30

40

【0224】

50

15. 配列番号32の重鎖可変領域または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列およびまたは配列番号31の軽鎖可変領域または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を含む、実施形態14に記載のモノクローナル抗体。

【0225】

16. 前記抗体またはそのフラグメントが、ヒトタウへの結合について、実施形態8~15に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントと競合する、実施形態1~7の1つに記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0226】

17. Fc領域を含む、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0227】

18. 生体内半減期を増加させるための部分をさらに含む、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0228】

19. 生体内半減期を増加させるための部分が、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒト血清アルブミン、グリコシル化基、脂肪酸およびデキストランからなる群から選択される、実施形態18に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0229】

20. 抗体が、検出可能な部分をさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0230】

21. 検出可能な部分が、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識を含む群から選択される、実施形態20に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0231】

22. 検出可能な部分が、放射性同位体を含むかまたはそれからなる、実施形態20または21に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0232】

23. 放射性同位体が、 ^{99m}Tc 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{89}Zr 、 ^{123}I および ^{201}Tl からなる群から選択される、実施形態22に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0233】

24. 検出可能な部分が、常磁性同位体を含むかまたはそれからなる、実施形態21に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0234】

25. 常磁性同位体が、 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Cr および ^{56}Fe からなる群から選択される、実施形態24に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0235】

26. 検出可能な部分が、SPECT、PET、MRI、光学または超音波イメージングなどのイメージング技術によって検出可能である、実施形態20~25のいずれかに記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0236】

27. 検出可能な部分が、結合部分を介して、間接的に抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに結合される、実施形態20~26のいずれかに記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0237】

28. 結合部分が、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10

10

20

30

40

50

、四酢酸（DOTA）の誘導体、デフェロキサミン（DFO）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）の誘導体、S-2-(4-イソチオシアナトベンジル)-1,4,7-トリアザシクロノナン-1,4,7-三酢酸（NOTA）の誘導体および1,4,8,11-テトラアザシクロドデカン-1,4,8,11-四酢酸（TETA）の誘導体からなる群から選択される、実施形態27に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0238】

29. 重鎖が、配列番号8、配列番号16、配列番号24、配列番号32、および配列番号35からなる群から選択され、軽鎖が、配列番号7、配列番号15、配列番号23、および配列番号36からなる群から選択される、モノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

10

【0239】

30. (a) 配列番号4、配列番号12、配列番号20、および配列番号28からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1；

(b) 配列番号5、配列番号13、配列番号21、および配列番号29からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2；および

(c) 配列番号6、配列番号14、配列番号22、および配列番号30からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3；および

(d) 配列番号3、配列番号11、配列番号19、および配列番号27からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3

20

を含む、モノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0240】

31. (a) 配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1；

(b) 配列番号21のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2；

(c) 配列番号22のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3；および

(d) 配列番号19のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3

を含む、実施形態1~7のいずれか1つに記載の本発明の抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0241】

32. 実施形態1~31のいずれかに記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントをコードする単離された核酸分子。

30

【0242】

33. 前記分子がcDNA分子である、実施形態32に記載の核酸分子。

【0243】

34. 実施形態32または33に記載の核酸分子を含むベクター。

【0244】

35. 実施形態32~34のいずれかに記載の核酸分子を含む組み換え宿主細胞。

【0245】

36. 実施形態1~31のいずれかに記載の抗体またはエピトープ結合フラグメントを産生するための方法であって、コードされた抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの発現を可能にする条件下で、実施形態35に記載の宿主細胞を培養する工程を含む方法。

40

【0246】

37. 先行する請求項のいずれか一項に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを含む調製物であって、前記調製物が、タウに結合することが可能でないかまたは前記調製物の抗タウ機能性を実質的に変更しない自然発生する抗体を実質的に含まず、前記機能性が、

(i) 非リン酸化タウに結合することが実質的にできないこと；

(ii) S404においてリン酸化され、S396においてリン酸化されないタウに結合することが実質的にできないこと；

50

- (i i i) S 3 9 6 においてリン酸化されるタウに結合する能力；
- (i v) S 3 9 6 および S 4 0 4 の両方においてリン酸化されるタウに結合する能力；
- (v) それ が リン酸化 4 0 4 残基に結合することが実質的にできないように、リン酸化タウ残基 S 3 9 6 および S 4 0 4 を選択的に区別する能力；
- (v i) ヒトアルツハイマー病の脳に由来する過リン酸化タウに結合する能力；
- (v i i) 病理学のおよび非病理学的ヒトタウタンパク質を区別する能力；および / または

(v i i i) 本明細書に記載されるように、トランスジェニックマウスに由来する免疫枯渇された r T g 4 5 1 0 抽出物とともに使用されるとき、過リン酸化タウ 6 4 k D a および 7 0 k D a バンドを少なくとも 9 0 % だけ特異的に減少させる一方、5 5 k D a タウ

10

からなる群から選択される調製物。

【 0 2 4 7 】

3 8 . 先行する請求項のいずれか一項に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを含む調製物であって、前記抗体または前記そのエピトープ結合フラグメントが、天然抗タウ抗体の構造と比べて、そのアミノ酸配列の構造変化を有し、前記構造変化により、前記抗体または前記フラグメントが、前記天然抗タウ抗体によって示される機能性と比べて変化した機能性を示し、前記機能性が、

20

- (i) 非リン酸化タウに結合することが実質的にできないこと；
- (i i) S 4 0 4 においてリン酸化され、S 3 9 6 においてリン酸化されないタウに結合することが実質的にできないこと；
- (i i i) S 3 9 6 においてリン酸化されるタウに結合する能力；
- (i v) S 3 9 6 および S 4 0 4 の両方においてリン酸化されるタウに結合する能力；
- (v) それ が リン酸化 4 0 4 残基に結合することが実質的にできないように、リン酸化タウ残基 S 3 9 6 および S 4 0 4 を選択的に区別する能力；
- (v i) ヒトアルツハイマー病の脳に由来する過リン酸化タウに結合する能力；
- (v i i) 病理学のおよび非病理学的ヒトタウタンパク質を区別する能力；および / または

30

(v i i i) 本明細書に記載されるように、トランスジェニックマウスに由来する免疫枯渇された r T g 4 5 1 0 抽出物とともに使用されるとき、過リン酸化タウ 6 4 k D a および 7 0 k D a バンドを少なくとも 9 0 % だけ特異的に減少させる一方、5 5 k D a タウバンドを 1 0 % 超減少させない能力；または本明細書に記載されるように、ヒト A D 死後脳に由来する抽出物とともに使用されるとき、S 3 9 6 リン酸化過リン酸化タウバンドを少なくとも 9 0 % だけ特異的に減少させる一方、非過リン酸化タウバンドを 1 0 % 超減少させない能力

からなる群から選択される調製物。

【 0 2 4 8 】

3 9 . 実施形態 1 ~ 3 1 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント、または実施形態 3 7 ~ 3 8 のいずれかに記載の調製物；および薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物。

40

【 0 2 4 9 】

4 0 . 医療に使用するための、実施形態 1 ~ 3 1 のいずれかに記載のモノクローナル抗体、またはそのフラグメント、実施形態 3 7 ~ 3 8 のいずれかに記載の調製物、または実施形態 3 9 に記載の医薬組成物。

【 0 2 5 0 】

4 1 . タウオパチーを治療するのに使用するための、実施形態 1 ~ 3 1 のいずれかに記載のモノクローナル抗体、またはそのフラグメント、実施形態 3 7 ~ 3 8 のいずれかに記

50

載の調製物、または実施形態 39 に記載の医薬組成物。

【0251】

42. タウオパチーが、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症 (AGD)、進行性核上まひ (PSP)、大脳皮質基底核変性症 (CBD)、精神病、特に、AD に起因する精神病または AD の患者における精神病、およびレビー小体型認知症の患者の精神医学的症状からなる群から選択される、実施形態 41 に記載のモノクローナル抗体、またはそのフラグメント、調製物、または医薬組成物。

【0252】

43. タウオパチーを治療するための薬剤の製造における、実施形態 1 ~ 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体、またはそのフラグメント、実施形態 37 ~ 38 のいずれかに記載の調製物、または実施形態 39 に記載の医薬組成物の使用。

10

【0253】

44. タウオパチーが、アルツハイマー病、嗜銀顆粒性認知症 (AGD)、進行性核上まひ (PSP)、大脳皮質基底核変性症 (CBD)、AD に起因する精神病または AD の患者における精神病、およびレビー小体型認知症の患者の精神医学的症状からなる群から選択される、実施形態 43 に記載のモノクローナル抗体、またはそのフラグメント、調製物、または医薬組成物の使用。

【0254】

45. 被験体におけるアルツハイマー病または他のタウオパチーを治療する方法であって、実施形態 1 ~ 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体、またはそのフラグメント、実施形態 37 ~ 38 のいずれかに記載の調製物、または実施形態 39 に記載の医薬組成物を、有効量で前記被験体に投与する工程を含む方法。

20

【0255】

46. 治療が長期である、実施形態 45 に記載の方法。

【0256】

47. 長期治療が、少なくとも 2 週間、例えば少なくとも 1 ヶ月間、6 ヶ月間、1 年間またはそれ以上にわたる、実施形態 46 に記載の方法。

【0257】

48. 被験体がヒトである、実施形態 45 ~ 47 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0258】

49. 医療に使用するための、実施形態 1 ~ 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体、またはそのフラグメント、実施形態 37 ~ 38 のいずれかに記載の調製物、または実施形態 39 に記載の医薬組成物を含むキット。

30

【0259】

50. 被験体の脳における前記タウの存在または量を検出または測定するのに使用するための、実施形態 1 ~ 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体、またはそのフラグメント、実施形態 37 ~ 38 のいずれかに記載の調製物、または実施形態 39 に記載の医薬組成物。

【0260】

51. 前記検出または測定が、前記タウに結合された前記抗タウ抗体のインビボイメージングを含む、実施形態 50 に記載のモノクローナル抗体、またはそのフラグメント、調製物または医薬組成物。

40

【0261】

52. 前記検出または測定が、前記タウに結合された、前記抗タウ抗体または前記そのフラグメントのエクスピボイメージングを含む、実施形態 50 に記載のモノクローナル抗体、またはそのフラグメント、調製物または医薬組成物。

【0262】

53. 残基 404 においてリン酸化されるが、残基 396 においてリン酸化されないヒトタウの存在下で、ヒトタウ (配列番号 33) のリン酸化残基 396 に免疫特異的に結合することが可能なモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

50

【0263】

54. i) 抗体は、非リン酸化タウに実質的に結合しない；ii) 抗体は、396がリン酸化されないとき、404においてリン酸化されるタウに実質的に結合しない；iii) 抗体は、396においてリン酸化されるタウに結合する；およびiv) 抗体は、396および404が両方ともリン酸化されるとき、タウに結合するという試験基準にしたがって、リン酸化残基396を含むヒトタウへの免疫特異的結合を示す、モノクローナル抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0264】

55. ヒトタウ（配列番号33）のリン酸化残基396に免疫特異的に結合することが可能な、2N4Rタウの残基386～410をカバーする二リン酸化ペプチド：TDHGAEIVYK_{P}SPVVS_{GDT}_{P}SPRHL（配列番号37）に対して誘導されるモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

10

【0265】

56. ハイブリドーマが、i) リン酸化エピトープS396のいずれかに対して免疫特異的であり、かつii) ヒトアルツハイマー病の脳に由来する過リン酸化タウを特異的に認識するクローンを単離するために、ヒト病理学および非病理学タウでスクリーニングされ、前記抗体が、病理学および非病理学ヒトタウタンパク質を区別することができる、実施形態55に記載のモノクローナル抗体。

【0266】

57. 過リン酸化タウを含むもつれから過リン酸化タウを除去する方法であって、過リン酸化タウを抗体と接触させる工程を含み、もつれから90%の過リン酸化タウが取り除かれるように、前記抗体が、リン酸化残基396を有するタウに対して選択的である方法。

20

【0267】

58. 患者におけるアルツハイマー病の進行を遅らせる方法であって、前記患者における病理学タウタンパク質の蓄積を減少させるかまたは軽減する工程を含み、リン酸化396残基を有するタウタンパク質を除去する抗体を投与する工程を含む方法。

【0268】

59. 患者におけるアルツハイマー病の進行を遅らせる方法であって、病理学タウタンパク質の基となるタウタンパク質を除去する工程を含み、リン酸化残基396を有するタウタンパク質が除去される方法。

30

【0269】

60. アルツハイマー病の患者を治療する方法であって、過リン酸化タウを、リン酸化残基396を有するタウに対して選択的な抗体と接触させることによって、過リン酸化タウおよび正常なタウを含むもつれから過リン酸化タウを除去する工程を含む方法。

【0270】

61. 実施形態1～31、40～42または50～56のいずれか1つに記載の抗体の使用を含む、実施形態57～59のいずれかに記載の方法。

【0271】

62. ヒトタウ（配列番号33）のリン酸化残基396に免疫特異的に結合することが可能な単離されたモノクローナル抗体、またはその単離されたエピトープ結合フラグメント。

40

【0272】

63. ヒトタウ（配列番号33）のリン酸化残基396に免疫特異的に結合することが可能な組み換えヒトまたは組み換えヒト化モノクローナル抗体、またはその単離されたエピトープ結合フラグメント。

【0273】

64. 2N4Rタウの残基386～410をカバーする二リン酸化ペプチド：TDHGAEIVYK_{p}SPVVS_{GDT}_{p}SPRHL（配列番号37）に対して誘導される組み換えモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメントであって、ヒ

50

トタウ（配列番号 33）のリン酸化残基 396 に免疫特異的に結合することが可能である、組み換えモノクローナル抗体、またはそのエピトープ結合フラグメント。

【0274】

65. 単離されたモノクローナル抗体、またはその単離されたエピトープ結合フラグメントを含む医薬組成物であって、前記単離されたモノクローナル抗体、またはその単離されたエピトープ結合フラグメントが、上の実施形態のいずれか 1 つに記載されるとおりである医薬組成物。

【0275】

66. ヒトタウ（配列番号 33）のリン酸化残基 396 に免疫特異的に結合することが可能なキメラモノクローナル抗体またはその単離されたエピトープ結合フラグメント。

10

【0276】

67. ヒト細胞株、非ヒト哺乳動物細胞株、昆虫、酵母または細菌細胞株などの細胞株において生産または製造された、実施形態 1 ~ 31 および 51 ~ 56 のいずれかに記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0277】

68. CHO 細胞株、HEK 細胞株、BHK-21 細胞株、マウス細胞株（骨髄腫細胞株など）、線維肉腫細胞株、PER.C6 細胞株、HKB-11 細胞株、CAP 細胞株および HuH-7 ヒト細胞株において生産される、実施形態 67 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

20

【実施例】

【0278】

実施例 1：リン酸化ペプチド 396 / 404 によるマウスの免疫化

C56 / BL6 および FVB マウスを、Titer Max 補助剤中で製剤化された 10 μ g の P30 コンジュゲートリン酸化タウ 386 ~ 408 (pS396 / pS404) (配列番号 37) で免疫した。

【0279】

マウス (C56 / BL6 および FVB 株、雌および雄。2 ~ 3 月齢のマウスを、ペプチドエピトープ P30 コンジュゲートリン酸化タウ 386 ~ 408 で免疫した。

【0280】

免疫原性 P30 コンジュゲートリン酸化タウ 386 ~ 408 (pS396 / pS404) ペプチドを、Titer Max / 供給業者のプロトコルにしたがって、Titer Max (1 : 1 vol : vol で混合される 400 μ g / ml のペプチド) 中で製剤化し、マウスに、20 μ g のペプチド (100 μ l) の抗原を皮下注入した。対照マウスに、補助剤のみを注入した。全てのペプチド免疫化マウスを、1 ヶ月間隔で、0.5 μ g のペプチド / Titer max (上述されるように製剤化され、注入される 10 μ g / ml のペプチド) で追加免疫した。最後に、マウスを、脾細胞と SP-2 細胞との融合の 3 日前に Titer max なしの P30 コンジュゲートリン酸化タウ 386 ~ 408 (pS396 / pS404) で追加免疫した。1 μ g / ml のリン酸化タウ 386 ~ 408 (pS396 / pS404) で被覆された ELISA プレートへの陽性結合を示し、AD および TG4510 脳溶解物 (実施例 3 において後述される) に由来する S1 および P3 抗原に対する優先的結合活性を示した後、ハイブリドーマを、再クロニングサイクルのために選択した。ドットプロットおよび脳溶解物で被覆された ELISA または MSD プレートをを用いて、このような結合を、対照に由来する脳溶解物へのこのような抗体の結合活性と比較した。

30

40

【0281】

実施例 2：ハイブリドーマ生成

マウスを、脾細胞と SP-2 細胞との融合の 3 日前に Titer max なしの P30 コンジュゲートリン酸化タウ 386 ~ 408 (pS396 / pS404) で追加免疫した。1 μ g / ml のリン酸化タウ 386 ~ 408 (pS396 / pS404) で被覆された ELISA プレートへの陽性結合、およびドットプロットおよび脳溶解物で被覆された EL

50

I S A または M S D プレートを用いて、対照に由来する脳溶解物と比較した、A D および T G 4 5 1 0 脳溶解物に由来する S 1 および P 3 抗原に対する優先的結合活性の後、ハイブリドーマを、再クローニングサイクルのために選択した。

【0282】

実施例 3 特定の抗体のウエスタンブロットおよびドットブロット分析
 タウ生化学的分画

ヒトタウ突然変異 P 3 0 1 L を過剰発現するヒトまたは r T g 4 5 1 0 マウスに由来する脳組織を、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤を含有する 1 0 体積のトリス - 緩衝生理食塩水中で以下のように均質化した：5 0 m M のトリス / H C l (p H 7 . 4) ; 2 7 4 m M の N a C l ; 5 m M の K C l ; 1 % のプロテアーゼ阻害剤混合物 (R o c h e) ; 1 % のホスファターゼ阻害剤混液 I および I I (S i g m a) ; および 1 m M のフッ化フェニルメチルスルホニル (P M S F ; S i g m a) 。ホモジネートを、4 で 2 0 分間にわたって 2 7 , 0 0 0 × g で遠心分離して、上清 (S 1) およびペレット画分を得た。ペレットを、5 体積の高塩 / スクロース緩衝液 (0 . 8 M の N a C l 、 1 0 % のスクロース、1 0 m M のトリス / H C l 、 [p H 7 . 4] 、 1 m M の E G T A 、 1 m M の P M S F) 中で再度均質化し、上記のように遠心分離した。上清を収集し、3 7 で 1 時間にわたってサルコシル (1 % の最終濃度 ; S i g m a) とともにインキュベートした後、4 で 1 時間にわたって 1 5 0 , 0 0 0 × g で遠心分離して、P 3 画分と呼ばれるサルコシル不溶性ペレットを得た。P 3 ペレットを、脳ホモジネートに使用された元の体積の半分に等しい体積になるまで、T E 緩衝液 (1 0 m M のトリス / H C l [p H 8 . 0] 、 1 m M の E D T A) 中で再懸濁させた。

10

20

【0283】

ウエスタンおよびドットブロット

分画された組織抽出物 S 1 および P 3 を、0 . 1 M の D T T を含有する S D S - 試料緩衝液に溶解させた。熱処理された試料 (9 5 で 1 0 分間) を、4 ~ 1 2 % のビス - トリス S D S - P A G E ゲル (I n v i t r o g e n) におけるゲル電気泳動によって分離し、P V D F 膜 (B i o R a d L a b o r a t o r i e s , H e r c u l e s , C A) 上に移した。ドットブロット試料を、試料にわたって公知の濃度で、ニトロセルロース膜 (A m e r s h a m , P i t t s b u r g h , P A) 上に直接滴下した。ウエスタンおよびドットブロット膜の両方を、T B S - T w e e n (0 . 5 %) p H 7 . 4 中の 5 % の脱脂粉乳中でブロックした後、1 μ g / m l の D 1 . 2 または C 1 0 - 2 中で、4 で一晩インキュベートした。膜を洗浄し、ペルオキシダーゼコンジュゲート抗マウス I g G (1 : 5 0 0 0 ; J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h , W e s t G r o v e , P A) とともにインキュベートした。結合抗体を、強化化学発光システム (E C L P L U S k i t ; P e r k i n E l m e r) を用いて検出した。定量化およびウエスタンおよびドットブロット免疫反応性の視覚分析を、コンピュータに接続された L A S - 4 0 0 0 B i o I m a g i n g A n a l y z e r S y s t e m (F u j i f i l m , T o k y o , J a p a n) および M u l t i G a u g e v 3 . 1 ソフトウェア (F u j i f i l m) を用いて行った。タンパク質充填量を、元の画分の体積によって調整し、これは元の組織の湿重量に換算され得る。結果が図 1 および図 2 に示される。

30

40

【0284】

実施例 4 固定化ヒト病理学的材料を用いた 3 9 6 / 4 0 4 抗体のスクリーニングおよび選択

ハイブリドーマ上清を、0 . 1 M の炭酸塩緩衝液 p H 9 を用いて、1 μ g / m l のペプチドリン酸化タウ 3 8 6 ~ 4 0 8 (p S 3 9 6 / p S 4 0 4) で被覆された n u n c プレートにおける抗体結合についてスクリーニングした。

【0285】

続いて、陽性上清を、それぞれ A D および健常対照 (H C) に由来する脳 (P 3 ペレット、実施例 3 を参照) 溶解物抗原で被覆された E L I S A または M S D プレートにおける結合のために、P B S 、 0 . 1 % の B S A および 0 . 1 の N P 4 0 中で 1 : 5 0 ~ 1 : 8

50

0.0に希釈した。脳溶解物抗原を、ELISAまたはMSDプレートのインキュベーション/コーティングの前に、0.1Mの炭酸塩緩衝液pH9中で1500倍に希釈した。続いて、ウェルを、室温で2時間にわたってブロックし(PBS、3mg/mlのBSA、0.1%のNP-40)、抗体結合活性を、供給業者のプロトコルにしたがって、HRP(DAKO)およびスルホタグ(MSD、product #)コンジュゲート抗マウスIgGを用いて検出した。0.1%のBSAを含むPBS中で希釈された抗体(D1-2、C5-2、C8-3およびC10-2)の選択が、用量反応によって特性評価され、AD-P3抗原で被覆されたプレートに対するサブナノモルないしナノモルの結合活性が、特異的および対照ペプチドの選択に対する結合活性についてさらに特性評価されたことを示した。結果が図3に示される。

10

【0286】

実施例5：ペプチド特異性および結合親和性

病理学的タウへの結合について陽性の抗体を、様々なリン酸化ペプチド(p)エピトープに対する見かけの親和性(IC50)および選択性/特異性についてさらに特性評価した。MSDプレートを、上述されるように、100ng/mlのリン酸化タウ386~408(pS396/pS404)で被覆した。リン酸化タウに対する抗体を、用量反応アッセイにおいて分析して、適切な分析シグナルレベル(最大機器シグナルの0.5~2%に対応するMSDにおける典型的な5,000~20,000RUまたはELISAにおける450nmで1.0~1.5のODシグナルを提供する抗体濃度を特定した。抗体の選択を、2時間/室温で、段階的な濃度(0~1000nM)のリン酸化タウ386~408(pS396/404)とともにインキュベートした。続いて、反応物を、上述されるように、100ng/mlのペプチドリ酸化タウ386~408(pS396/pS404)で被覆されたペプチド被覆MSDプレートに適用し、結合活性を測定した。阻害アッセイからのIC50値は、10~100nMの見かけの親和性(KD)に対応する。

20

【0287】

特異性およびリン酸化選択性：適切な濃度のモノクローナル抗体を、100nMの二リン酸化された(double phosphorylated)(pS396/pS404)、リン酸化されていないかまたは一リン酸化された(pS396またはpS404)リン酸化タウ386~408とともにインキュベートし、結合活性について分析した(阻害アッセイ)。対照リン酸化タウペプチド(リン酸化タウ260~270(pS262)またはリン酸化タウ240~270(pS262)および組み換え非リン酸化タウタンパク質を、比較のために分析した。全てのAD-P3抗原陽性抗体は、リン酸化ペプチドタウ386~408(pS396/pS404)および一リン酸化ペプチドリ酸化タウ386~408(pS396)に対する強い優先性を示し、一リン酸化ペプチドリ酸化タウ386~408(pS404)および非リン酸化ペプチドタウ386~408に対する結合活性を示さなかった。対照リン酸化ペプチドタウ240~270およびリン酸化タウ。結果が図4および図32に示される。

30

【0288】

実施例6：免疫組織化学による抗体の組織学的特性評価

マウス脳組織を、8月齢のrTg4510マウス(CamKIIプロモータ下でヒトP301L-タウを過剰発現する)および非トランスジェニック同腹仔(non-Tg)から収集し、4%のパラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィンに埋め込んだ。パラフィンに埋め込まれる、前頭葉のヒト脳試料は、Tissue Solutions(Glasgow, UK)から入手した。末期アルツハイマー病と診断されたドナーに由来する組織を、月齢をマッチさせた非認知症対照ドナーと比較した。厚さ4umの切片を、脱パラフィンし、10分間にわたって10mMのクエン酸緩衝液、pH6中で切片をマイクロ波処理することによって抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼを、1%の水素ペルオキシダーゼ、続いて、PBS/1%のBSA/0.3%のTriton X-100(PBS-BT)中の5%の正常ブタ血清でブロックした。切片を、様々な濃度で、PBS-BT中で希釈されたD1.2およびC10-2抗体とともに、4で一晚インキュベ-

40

50

トした。切片を、PBS、0.25%のBSA、0.1%のTriton X-100中で洗浄してから、1時間にわたって1:500で、ビオチン化二次ブタ抗マウス抗体(E0464; DAKO, Glostrup, Denmark)とともにインキュベートした。さらなる洗浄の後、ストレプトアビジン-ビオチン複合体キット(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を適用し、免疫反応性を、ジアミノベンジジンで視覚化した。切片を、ヘマトキシリンで対比染色した。結果が図5に示される。

【0289】

実施例7: 病理学的タウに対する抗体の選択性

MSDプレートを、AD脳(1:1500に希釈された)またはTG4510脳(1:3000に希釈された)に由来する可溶性P3抗原で被覆した。結果が図6に示される。

【0290】

検出を、上の実施例4に記載されるように行う。

【0291】

実施例8: HEK細胞シーディングアッセイ

HEK293細胞を、平板培養の24時間後に、6ウェルプレートにおいてヒトタウ-P301L-FLAGで一過性にトランスフェクトし、続いて、24時間後に、24時間にわたって脳ホモジネートとともにインキュベートした後、細胞を分割および再度平板培養し、さらに24時間後に収集した。細胞を溶解させ、1%のtriton X、Phos-stopおよび完全なホスファターゼおよびプロテアーゼ阻害剤(Roche)緩衝液が補充されたPBS中で超音波処理し、30分間にわたって100,000×gで超遠心分離した。ペレットを、SDS中で再懸濁させ、超音波処理し、30分間にわたって100,000×gで超遠心分離した。上清を、ウエスタンブロット法によって分析した。ヒトタウ-P301Lを発現する細胞は、rTg4510タウトランスジェニックマウスに由来する総脳ホモジネートをシーディングすると、不溶性(SDS画分、E1/FLAG検出)、過リン酸化(D1.2}pS396検出)タウを示した。マウスに由来する対照脳ホモジネートで処理された細胞は、凝集過リン酸化ヒトタウが存在しないことを示した。さらに、HEK293細胞の総細胞溶解物を、Cisbio製のタウ凝集アッセイを用いて分析した。このアッセイは、FRETにおいてドナー(Tb3+コンジュゲート)およびアクセプタ(d2コンジュゲート)抗体の両方に同じ抗体を用いた時間分解蛍光に基づくものである。10μlの試料を、10μlの抗体混合物と混合し、20時間インキュベートした。プレートをPherastarプレートリーダーで読み取って、時間分解蛍光(励起光のスイッチング後に測定/積分される(integrated)FRETシグナル)を評価した。アッセイは、ヒト剖検材料、rTg4510マウスにおいて、および高い特異性および感度を有する播種されたHEK細胞において凝集タウを測定する。結果が図7に示され、シーディング効果が、HELによる処理によって影響されなかったが、タウ抗体による処理によって部分的に改善されたことを示す(C10-2>D1.2>hACI36-2B6-Ab1)。

【0292】

実施例9: D1.2およびC10-2に対するインビボの機能的(電気生理学(electrophys))反応の回復

4.5~5.5月齢のrTg4510およびtTA対照マウスにおける海馬のCA1領域におけるシナプス伝達および可塑性のインビボの電気生理学的評価は、i)基底シナプス伝達が、tTAMウスと比較してrTg4510において有意に低下され、ii)二発刺激促進が、tTAMウスと比較してrTg4510において有意に減少されることを示した。

【0293】

全ての実験を、実験動物の世話および使用についてEuropean Communities Council Directive(86/609/EEC)、および動物実験を規制するDanish legislationにしたがって行った。

10

20

30

40

50

【0294】

5 ~ 5.5 月齢の r T g 4 5 1 0 および t T A 雄マウス (T a c o n i c E u r o p e A / S) を、記録の時点で、この試験に使用した。マウスを、制御された温度 (2 2 ± 1 . 5) および湿度条件 (5 5 ~ 6 5 %) で群居させ、12 : 12 時間の明 / 暗サイクル (0 6 : 0 0 h で照明をオンにする) で飼育した。食物および水は自由に摂取可能であった。

【0295】

動物に、ウレタン (1 . 2 g / k g) の腹腔内 (i . p .) 注射で麻酔をかけた。次に、マウスを定位フレームに取り付け、マウスの体温を加熱パッドによって 3 7 . 5 に調整し、頭蓋骨を露出させた。白金線を、基準として働くように前頭骨に設置し、P a x i n o s および F r a n k l i n (P a x i n o s a n d F r a n k l i n , 2 0 0 1) の図解にしたがって以下の配置で、海馬中への記録および刺激電極の挿入のためにさらなる孔を空けた：記録、プレグマの 1 . 5 ~ 1 . 7 m m 後方、正中線の 1 . 0 ~ 1 . 2 m m 側方、脳の表面の 1 . 4 ~ 1 . 7 m m 下；刺激、プレグマの 1 . 8 ~ 2 . 0 m m 後方、正中線の 1 . 5 ~ 1 . 7 m m 側方、脳の表面の 1 . 3 ~ 1 . 7 m m 下。動物を、記録の全期間を通して定位フレームに置いたままにし、それらの麻酔のレベルを定期的に調べた。

10

【0296】

電場電位 (f E P S P) を、30 秒ごとのシャフアー側枝の電気刺激によって C A 1 において誘発し、記録電極の深さを、マイナスの f E P S P が単極方形パルスに応答して記録されるまで調整した。誘発された f E P S P の傾きを、f E P S P の最大振幅の 3 0 ~ 7 0 % で典型的に測定した。

20

【0297】

最適な f E P S P が誘発されたら、基底シナプス伝達を、刺激強度と誘発された f E P S P の傾きとの間の関係 (入出力関係) によって評価した。様々な強度の刺激は、0、25、50、75、100、150、200、300、400、および 500 μ A であり、これを低い方から順に連続して加え、各強度で 2 ~ 3 回繰り返す。基底シナプス伝達は、t T A マウスと比較して r T g 4 5 1 0 マウスにおいて著しく低下したことが分かった。

【0298】

シナプス前機構に依存するものと考えられる短期シナプス可塑性である二発刺激促通を、r T g 4 5 1 0 および t T A マウスにおいてさらに測定した。簡潔に述べると、25 ~ 1000 m s で変化する刺激間時間間隔 (I S I) を有する一対の刺激を、シャフアー側枝に加え、第 2 の f E P S P の傾きを、第 1 の f E P S P の傾きと比較した。促通が全ての I S I で観察され、50 および 75 m s の I S I で最大の促通を有していた。興味深いことに、有意に低い P P F が、t T A マウスと比較したとき、r T g 4 5 1 0 マウスにおいて観察された。

30

【0299】

r T g 4 5 1 0 マウスにおける基底シナプス伝達および二発刺激促通の特定された低下を、抗体有効性を試験するための読み出しとしてさらに使用した。

【0300】

腹腔内 (i . p .) に 2 週間にわたって週に 2 回の、4 つの用量の抗体の投与の 2 ~ 4 日後に、全ての実験において記録を行った。基底シナプス伝達および二発刺激促通を、可能であれば、各動物の両方の海馬において記録し、個別の実験としてさらに使用した。結果が図 8 に示され、C A 1 誘発電場電位において二発刺激促通および基底シナプス伝達障害の抗体による改善を示す。

40

【0301】

実施例 10 : r T g 4 5 1 0 脳抽出物に由来するタウの免疫枯渇

60 μ g のマウスおよびヒト化 C 1 0 - 2 抗体を、300 μ l の M a g n e t i c d y n a b e a d 懸濁液 (I m m u n o p r e c i p i t a t i o n K i t D y n a b e a d s P r o t e i n G N o v e x , C a t n o 1 0 0 0 7 D) に固定した。十分な洗浄の後、ビーズを、60 μ l の r T g 4 5 1 0 脳抽出物と混合し、室温で 1 0

50

分間インキュベートした。電磁ビーズを抽出物から分離し、抽出物をウエスタンブロットによって分析した。mC10-2およびhC10-2による欠失は、タウ凝集体をそれぞれ99および99.5%除去した。結果が図12に示される。

【0302】

実施例11：免疫枯渇された抽出物を用いたHEK細胞シーディングアッセイ

HEK293細胞を、6ウェルプレートにおいてヒトタウ-P301L-FLAGで一過性にトランスフェクトした。24時間後、細胞を、ヒト化またはマウスC10-2を用いて免疫枯渇させた脳ホモジネートとともにインキュベートした。24時間後、細胞を再度平板培養し、さらに24時間後に収集した。細胞を溶解させ、1%のtriton X、ホスファターゼおよびプロテアーゼ阻害剤(Roche)が補充されたTBS中で超音波処理し、30分間にわたって100,000×gで超遠心分離した。ペレットを、1%のSDS中で再懸濁させ、超音波処理し、30分間にわたって100,000×gで超遠心分離した。上清を、ウエスタンブロット法によって分析した。ヒトタウ-P301Lを発現する細胞は、rTg4510タウトランスジェニックマウスに由来する総脳ホモジネートをシーディングすると、不溶性(SDS画分、E1/FLAG検出)、過リン酸化タウ(より高い分子量で動作する、D1.2/pS396タウ)を示した。tTAマウスに由来する対照脳ホモジネートで処理された細胞は、凝集過リン酸化ヒトタウが存在しないことを示した。さらに、HEK293細胞の総細胞溶解物を、Cisbio製のタウ凝集アッセイを用いて分析した。HELおよびhHEL抗体による欠失が、シーディングに影響を与えなかった一方、mC10-2およびhC10-2による欠失はそれぞれ、タウ凝集を88および96%および不溶性タウを97および100%防いだ。結果が図13に示される。

10

20

【0303】

実施例11：rTg4510脳抽出物に由来するタウの免疫枯渇

100μgのマウスC10-2、D1.2およびタウ5(Invitrogen)抗体を、500μlのMagnetic dynabead懸濁液(Immunoprecipitation Kit Dynabeads Protein G Novex, Cat no 10007D)に固定した。十分な洗浄の後、ビーズを、100μlのrTg4510脳抽出物と混合し、室温で10分間インキュベートした。電磁ビーズを抽出物から分離し、抽出物をウエスタンブロットによって分析した。C10-2およびD1.2は、ホモジネートに由来する正常なタウを除去しないが、市販のタウ5抗体は除去する。対照的に、本発明の2つの抗体は、セリン396においてリン酸化されるタウである過リン酸化タウ(64kDa)を95%だけ特異的に除去する。結果が図14に示される。

30

【0304】

実施例12：アルツハイマー病の脳抽出物に由来するタウの免疫枯渇

100μgのマウスC10-2およびD1抗体を、500μlのMagnetic dynabead懸濁液(Immunoprecipitation Kit Dynabeads Protein G Novex, Cat no 10007D)に固定した。十分な洗浄の後、ビーズを、100μlのアルツハイマー病の脳抽出物と混合し、室温で10分間インキュベートした。電磁ビーズを抽出物から分離し、抽出物をウエスタンブロットによって分析した。D1.2およびC10-2は、脳ホモジネート中の総タウのごくわずかな部分(8%)のみを除去する。しかしながら、抗体は、AD患者に特有の過リン酸化タウ(90%)を特異的に除去する。結果が図15に示される。

40

【0305】

実施例13：免疫枯渇された抽出物を用いたrTg4510マウスにおけるシーディング

CamK2陽性ニューロン(rTg4510)中、tet-off応答因子下でヒト突然変異タウ(P301L 0N4R)を発現するトランスジェニックマウスを使用した。このモデルは、通常、3月齢でタウ病変を発生し始めるが、妊娠中および子が生まれてから最初の3週間にわたって母親にドキシサイクリンを供給することによって、病変は、より遅い段階で発生する(6月齢後に開始する)。試験に使用される、ドキシサイクリンで

50

前処理されたマウスは、注入の時点で2.5月齢であった。マウスに、吸入剤の吸入によって麻酔をかけ、定位フレームに固定した。頭蓋骨を露出させ、プレグマおよびラムダが水平になるまで調整した。プレグマの2mm側方(右)および2.4mm後方で、頭蓋骨に孔を空けた。10 μ lのシリンジのベベルチップ(SGE)を用いて、シーディング材料を、上記の配置で、脳表面の1.4mm前面に注入した。2 μ lの、実施例11および12に記載される免疫枯渇された抽出物を、その部位(1 μ l/分)にゆっくりと注入し、シリンジを5分間そのままにして置いてから、それを取り出した。創傷を縫うことによって閉じ、目を覚ますまでマウスを加熱した。マウスを3ヶ月間飼育してから殺処分し、かん流を4%のPFAで固定した。

【0306】

免疫組織化学：固定された脳を、NSAにおいて35 μ mの冠状断面へと切断し、6つ置き切片を、タウもつれ(ガリアス銀染色)および過リン酸化タウ(AT8)について染色した。陽性染色されたニューロン(細胞体)を、全ての脳の海馬の同側および反対側で計数した。海馬の全てのサブ領域が含まれていた。脳当たり8つの切片を計数した。結果は、8つの切片からの陽性ニューロンの合計を反映する。バックグラウンドシグナルを、2匹の非注入マウスにおいて決定した。ホモジネートから過リン酸化タウを除去することによって、ホモジネートは、タウ病変のシーディングをもはや誘発しない。結果が図16に示される。rTg4510(A)またはAD(B)脳ホモジネートが播種されたrTg4510脳におけるタウ病変の定量化。シーディングの前に、過リン酸化タウは、C10-2またはD1.2を用いてホモジネート中で90~95%だけ減少されたが、正常なタウは減少されなかった。ホモジネートから過リン酸化タウを除去することによって、ホモジネートは、タウ病変のシーディングをもはや誘発しない。

【0307】

rTg4510またはアルツハイマー病の脳に由来するホモジネートは、内因性タウ病変が発生されなかった段階で、rTg4510マウスにおいてタウ病変を播種し得る。実施例11および12に記載されているように、D1.2またはC10-2を用いてホモジネートから過リン酸化タウを除去することによって、シーディング活性はなくされる。

【0308】

実施例14：播種されたrTg4510マウスにおける抗体処理

ドキシサイクリンで処理されたrTg4510マウス(実施例13に記載される)を、2月齢から開始して、15mg/kg/週で、マウスD1.2または対照抗体で長期的に処理した。2.5ヶ月の時点で、rTg4510脳抽出物を、海馬(実施例13に記載される)に注入した。マウスを、脳注入の1、2および3ヵ月後に殺処分し、免疫組織化学および以下の分析を、実施例13に記載されるように行った。D1.2処理は、シーディングが開始された2および3ヵ月後に、タウ病変を有意に減少させた。結果が図17に示される。

【0309】

播種されたrTg4510マウスの海馬におけるもつれを有するニューロンの定量化。病変は、時間とともに増加し、マウスをD1.2で処理することによって、病変は、シーディングの2および3ヵ月後に有意に減少される。播種されたrTg4510マウスの海馬におけるもつれを有するニューロンの定量化。病変は、時間とともに増加し、マウスをD1.2で処理することによって、病変は、シーディングの2および3ヵ月後に有意に減少される。

【0310】

rTg4510またはアルツハイマー病の脳に由来するホモジネートは、内因性タウ病変が発生されなかった段階で、rTg4510マウスにおけるタウ病変を播種し得る。マウスをD1.2で全身的に処理することによって、タウ病変の発生が、有意に減少され得る。

【0311】

実施例15：ヒト化タウ抗体を用いたアルツハイマー病の脳抽出物に由来するタウの免疫

枯濁

100 μ gのマウスおよびヒト化C10-2ならびに先行技術の抗体2.10.3およびHJ8.5抗体(ソース)を、500 μ lのMagnetic dynabead懸濁液(Immunoprecipitation Kit Dynabeads Protein G Novex, Cat no 10007D)に固定した。十分な洗浄の後、ビーズを、100 μ lのアルツハイマー病の脳抽出物と混合し、室温で10分間インキュベートした。電磁ビーズを抽出物から分離し、抽出物を、ウエスタンブロットおよびCisBioアッセイによって分析した。マウスおよびヒト化C10-2は、hHe1対照抗体と比較して、pS396リン酸化タウの93および97%を効率的に除去したが、総タウの22および17%のみを除去した。2.10.3抗体は、セリン396リン酸化タウの91%および総タウの10%を除去した。2.10.3は、C10-2抗体(中央の64kDaバンド)と比較して、過リン酸化バンドの1つを除去する効率が低いようである。HJ8.5抗体は、タウの大部分、総タウの89%およびpS396タウの88%を除去することによって、C10-2および2.10.3抗体の両方と、完全に異なるプロファイルを有する。結果が図23~24に示される。

10

【0312】

実施例16: ヒト化タウ抗体を用いたアルツハイマー病の脳抽出物に由来する凝集タウの免疫枯濁

また、実施例13に記載されている免疫枯濁されたAD抽出物を、実施例10に記載されているタウ凝集アッセイを用いて分析した。C10-2およびHJ8.5抗体は、AD材料に由来する凝集タウを、2.10.3抗体より効率的に除去している。全てhHe1抗体と比較して、効率性の順に: HJ8.5(99%)、hC10-2(98%)、mC10-2(96%)および2.10.3(90%)。結果が図25に示される。

20

【0313】

実施例17: タウの免疫枯濁

25 μ gの抗体(ヒト化C10-2または2.10.3)を、125 μ lのMagnetic dynabead懸濁液(Immunoprecipitation Kit Dynabeads Protein G Novex, Cat no 10007D)に固定した。十分な洗浄の後、被覆されたビーズを、可変量の非被覆洗浄ビーズと混合した。5 μ gの抗体に対応する100%のAb被覆ビーズから開始して、100%の非被覆ビーズに到るまで。ビーズの総量は、全ての試料において同じであった。ビーズを、20 μ lのAD抽出物と混合し、室温で10分間インキュベートした。電磁ビーズを抽出物から分離し、抽出物を分割し、急速凍結させ、使用するまで-80Cに保持した。

30

【0314】

ウエスタンブロットを用いた欠失の分析

試料を、1xLDSローディングバッファーおよび100mMのDTT中で沸騰させた。3 μ lの抽出物に相当する体積を、4~12%のビス-トリスNuPAGEゲル(LifeTech Novex)上に充填した。電気泳動の後、タンパク質を、Immobilon-FL PVDF膜(0.45 μ m, IPFL10100, Millipore)上にブロットした。膜を、SEAブロッキング緩衝液(Prod#37527, Thermo)でブロックした。タウおよびP-タウレベルを、タウ5(Abcam ab80579, 1:2000)マウスC10-2(1 μ g/ml)、P-S199/202(Invitrogen 44768 G, 1:1000)、P-S422(Abcam ab79415, 1:750)、ヒトIPN(1 μ g/ml)を用いて試料中で評価した。GAPDHおよびアクチンを、充填対照として使用した(Abcam ab9484, 1:2000, Sigma A5441, 1:20000)。二次蛍光体コンジュゲートIgG抗体を使用し(IRDye 800CWヤギ抗ヒト、IRDye 800CW、ヤギ抗ウサギ、IRDye 680ヤギ抗マウス、LI-COR biosciences)、シグナルを、Odyssey CLxおよびImage studioソフトウェア(LI-COR biosciences)を用いて定量化した。個々のバンドならびにレー

40

50

ン全体におけるシグナルの定量化を行い、これから、S字形用量反応曲線をプロットし、可能であれば、最大効果およびEC50値を推定した。

【0315】

結果

両方の抗体は、アルツハイマー病の脳標本からタウのわずかな部分を除去する。P-S422タウに対する特異性を有することが示された2.10.3は、総タウ量の最大で24%を除去する一方、C10-2は、総タウの最大で15%を除去する(図26を参照)。

【0316】

2.10.3およびC10-2は両方とも、セリン422においてリン酸化されるタウの90%超を除去するが、50%のP-S422タウを除去するのに必要な抗体の量は異なり、2.10.3では、0.42μgの抗体が必要とされ、C10-2では、0.27μgが同じ効果のために必要とされる(図27を参照)。

10

【0317】

C10-2は、セリン396においてリン酸化されるタウを効率的に除去する(最大の効果:88%および効果の半分には、0.30μgの抗体を用いて達する)。2.10.3は、セリン396においてリン酸化されるタウのよりわずかな部分を除去する(最大の効果:60%およびその効果の半分には、0.63μgの抗体を用いて達する)(図28を参照)。これは、セリン422においてリン酸化される全てのタウが、セリン396においてもリン酸化されるが、位置422におけるリン酸化セリンが存在しない場合、セリン396においてリン酸化される過リン酸化タウの部分がないことを示す。

20

【0318】

C10-2によって除去されるタウの大部分はまた、セリン199/202においてリン酸化され、これは、そのリン酸化を有するタウの69%が、免疫枯渇によって影響されるためである(0.34μgの抗体を用いたときの効果の50%)(図29を参照)。2.10.3免疫枯渇は、P-S199/202タウに関するS字形用量反応を示さないが、シグナルの低下が、増加する量の抗体で見られる(最大量の抗体(5μg)を用いたときの最大52%の減少(図29を参照))。

【0319】

このデータは、リン酸化セリン396を標的にするC10-2抗体が、422位置におけるリン酸化セリンを標的にする2.10.3抗体より大きいプールの過リン酸化タウに結合することを示す。

30

【0320】

実施例18:AD脳溶解物における病理学的タウ抗原のmC10-2特異的な捕捉の抗体に仲介される阻害

材料および方法

材料

コーティング緩衝液:炭酸塩緩衝液pH8.5、150mMのNaCl。ブロッキング緩衝液:3%のBSA(画分V)、PBS pH7.4中0.1%のNP40。洗浄緩衝液:0.1%のBSA(画分V)、PBS、pH7.4中0.1%のNP40。スルホタグヤギ総ヒト化タウ抗体(MSD D221LA-1、50μg/ml)。

40

【0321】

方法は、増加する濃度のpS396特異的抗体によるタウ抗原のインキュベーション(工程B)の後、C10-2被覆プレートを用いてAD脳に由来する病理学的ヒトタウ抗原の捕捉(工程A)を測定することを目的としている。タウ抗原の捕捉および抗体に仲介される阻害を、MSDからのスルホタグ化抗ヒト(総)タウ抗体を用いて検出した。

【0322】

A:MSDプレートを、コーティング緩衝液中の0.5μg/mlのmC10-2(捕捉抗体)で被覆し(4Cで一晩)、続いて、室温で1時間ブロックし)、3回洗浄した(図30)。

50

【 0 3 2 3 】

B : A D (3 人 の 患 者 か ら プ ー ル さ れ る) に 由 来 す る 試 料 P 3 溶 解 物 (1 : 1 0 0 0 = 2 ~ 4 μ g / m l の 総 タ ン パ ク 質) お よ び / ま た は S 1 (p) (1 : 3 0 0 = 2 0 ~ 4 0 n g / m l の 総 タ ン パ ク 質) を 、 段 階 的 な 濃 度 の p S 3 9 6 ペ プ チ ド エ ピ ト ー プ 特 異 的 抗 体 と 混 合 し 、 室 温 で 1 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 続 い て 、 反 応 物 を 、 工 程 A に お い て 準 備 さ れ た プ レ ー ト 上 で 2 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た (図 3 1) 。

【 0 3 2 4 】

C : C 1 0 - 2 で 捕 捉 さ れ る タ ウ を 、 ス ル ホ タ グ 化 ヒ ト タ ウ を 用 い て 検 出 し た 。 製 造 業 者 の 指 示 に し た が っ て 、 M S D か ら の タ ウ 抗 体 (1 : 5 0) 。 プ レ ー ト を 、 M S D S E C T O R (登 録 商 標) S 6 0 0 に お い て 分 析 し た 。 A D P 3 お よ び A D S 1 (p) を 、 同 様 の 設 備 に お い て 試 験 し た (図 3 3 / 3 4) 。

10

【 0 3 2 5 】

【 表 6 】

表 6A

マウス C10-2、

+ タウペプチド、10 μ M

	平均		
	シグナル	シグナル	シグナル
PBS/0,1%BSA	388	403	373
C10-2 3ng/ml	366	384	348
C10-2 10ng/ml	383	398	367
C10-2 30ng/ml	345	384	306
C10-2 100ng/ml	357	401	313
C10-2 300ng/ml	407	434	379
C10-2 1000ng/ml	451	462	439
C10-2 10000ng/ml	870	920	820

20

30

【 0 3 2 6 】

【表 7】

表 6B

マウス C10-2、
+ PBS/ 0,1% BSA

	平均			
	シグナル	シグナル	シグナル	
PBS/0,1%BSA + PBS	303	293	312	10
C10-2 3ng/ml+ PBS	1881	1890	1871	
C10-2 10ng/ml+ PBS	5721	5863	5579	
C10-2 30ng/ml+ PBS	11922	12044	11799	
C10-2 100ng/ml+ PBS	21833	21925	21741	
C10-2 300ng/ml+ PBS	30410	30311	30508	
C10-2 1000ng/ml+ PBS	38524	38233	38814	
C10-2 10000ng/ml+ PBS	51171	51253	51089	

10

20

【 0 3 2 7 】

【表 8】

表 6C

マウスクローン PHF 13、
+ タウペプチド、10 μ M

	平均			
	シグナル	シグナル	シグナル	
PBS/0,1%BSA	287	286	287	30
PHF 13 1000000	280	284	276	
PHF 13 300000	299	305	292	
PHF 13 100000	355	370	340	
PHF 13 30000	481	472	490	
PHF 13 10000M	953	1019	886	
PHF 13 3000	2182	2279	2084	
PHF 13 1000	6896	7542	6249	

30

40

【 0 3 2 8 】

【表 9】

表 6D

マウスクローン PHF 13、
± PBS/ 0,1% BSA

	平均			
	シグナル	シグナル	シグナル	
PBS/0,1%BSA + PBS	281	282	280	10
PHF 13 1000000+ PBS	335	358	312	
PHF 13 300000+ PBS	560	568	551	
PHF 13 100000+ PBS	852	856	847	
PHF 13 30000+ PBS	1579	1661	1496	
PHF 13 10000+ PBS	2882	2899	2864	
PHF 13 3000+ PBS	5792	6126	5458	
PHF 13 1000+ PBS	12639	13654	11624	20

【 0 3 2 9 】

表 6 A ~ 6 D : タウ抗原捕捉阻害

【化 5】

<211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> D1.2 CDR 1 重鎖

<400> 4

Lys Ala Ser Gly Asn Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Ile His 10
 1 5 10

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> D1.2 CDR 2 重鎖

<400> 5

Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys 20
 1 5 10 15

Gly

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工 30

<220>
 <223> D1.2 CDR 3 重鎖

<400> 6

Ser Arg Gly Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 7
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工 40

<220>
 <223> D1.2 輕鎖

<400> 7

【化 6】

Asp Val Met Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp His Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

10

Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

20

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130 135 140

30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180 185 190

40

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

【化7】

<210> 8
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> D1.2 重鎖

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala 10
 1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asn Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Ile His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe 20
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Arg Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Ser Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr 30
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser 40
 145 150 155 160

Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu
 165 170 175

【化 8】

Tyr	Thr	Met	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser			
			180					185					190					
Gln	Thr	Val	Thr	Cys	Ser	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Val			
		195					200					205						
Asp	Lys	Lys	Leu	Glu	Pro	Ser	Gly	Pro	Ile	Ser	Thr	Ile	Asn	Pro	Cys			
	210					215					220							
Pro	Pro	Cys	Lys	Glu	Cys	His	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly			
225					230					235					240			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Asn	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met			
				245					250					255				
Ile	Ser	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu			
			260					265					270					
Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Arg	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val			
		275					280					285						
His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ile			
	290					295					300							
Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly			
305					310					315					320			
Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile			
				325					330					335				
Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val			
			340					345					350					
Tyr	Ile	Leu	Pro	Pro	Pro	Ala	Glu	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Asp	Val	Ser			
		355					360					365						
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Val	Gly	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Glu			
	370					375					380							
Trp	Thr	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asp	Thr	Ala	Pro			
385					390					395					400			

10

20

30

40

【化 9】

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asp Ile
 405 410 415

Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg
 420 425 430

His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser
 435 440 445

10

Pro Gly Lys
 450

<210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> C10.2 CDR 1 軽鎖

20

<400> 9

Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn Leu Asn
 1 5 10

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

30

<220>
 <223> C10.2 CDR 2 軽鎖

<400> 10

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp
 1 5

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

40

<220>
 <223> C10.2 CDR 3 軽鎖

<400> 11

【化 1 0】

Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro
1 5

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> C10.2 CDR 1 重鎖

10

<400> 12

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr Ile His
1 5 10

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

20

<220>

<223> C10.2 CDR 2 重鎖

<400> 13

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> C10.2 CDR 3 重鎖

<400> 14

Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

40

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工

【化 1 1】

<220>

<223> C10.2 軽鎖

<400> 15

Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Ile Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn
 20 25 30

10

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Asp
 65 70 75 80

20

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

30

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

40

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

【化 1 2】

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 16
<211> 439
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> C10.2 重鎖

10

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

20

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

30

Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

40

Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser
145 150 155 160

【化 1 3】

Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
165 170 175

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
180 185 190

Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
195 200 205

10

Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys
210 215 220

Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

20

Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
260 265 270

Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
275 280 285

Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
290 295 300

30

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
325 330 335

Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys
340 345 350

40

Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
355 360 365

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
370 375 380

【化 1 4】

Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
 385 390 395 400

Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
 405 410 415

Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
 420 425 430

10

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> C5.2 CDR 1 輕鎖

20

<400> 17

Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn Leu Asn
 1 5 10

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

30

<220>
 <223> C5.2 CDR 2 輕鎖

<400> 18

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp
 1 5

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

40

<220>
 <223> C5.2 CDR 3 輕鎖

<400> 19

【化 1 5】

Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro
1 5

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> C5.2 CDR 1 重鎖

10

<400> 20

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr Ile His
1 5 10

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

20

<220>
<223> C5.2 CDR 2 重鎖

<400> 21

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Asn Asp Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> C5.2 CDR 3 重鎖

<400> 22

Arg Gly Thr Met Asp Tyr
1 5

40

<210> 23
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工

【化 1 6】

<220>

<223> C5.2 輕鎖

<400> 23

Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Ile Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn
20 25 30 10

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Asp
65 70 75 80 20

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125 30

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175 40

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser

【化 1 7】

195	200	205	
Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
210			
<210>	24		
<211>	439		
<212>	PRT		
<213>	人工		10
<220>			
<223>	C5.2 重鎖		
<400>	24		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg			
	20	25	30
Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Asn Asp Met Phe			
	50	55	60
Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Ala Arg Arg Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr			
	100	105	110
Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro			
	115	120	125
Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val			
	130	135	140
Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser			
145	150	155	160

【化 1 8】

Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
 165 170 175

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
 180 185 190

Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
 195 200 205

10

Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys
 210 215 220

Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240

Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255

20

Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
 260 265 270

Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 275 280 285

Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
 290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
 305 310 315 320

30

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
 325 330 335

Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys
 340 345 350

Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
 355 360 365

40

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys

【化 1 9】

370

375

380

Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
405 410 415

Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
420 425 430

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> C8.3 CDR 1 軽鎖

<400> 25

Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn Leu Asn
1 5 10

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> C8.3 CDR 2 軽鎖

<400> 26

Gly Ser Ser Asn Leu Glu Asp
1 5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> C8.3 CDR 3 軽鎖

10

20

30

40

【化 2 0】

<400> 27

Leu Gln His Ser Tyr Leu Pro
 1 5

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工

10

<220>

<223> C8.3 CDR 1 重鎖

<400> 28

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr Ile His
 1 5 10

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

20

<220>

<223> C8.3 CDR 2 重鎖

<400> 29

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

30

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> C8.3 CDR 3 重鎖

<400> 30

Arg Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5

40

<210> 31

<211> 214

<212> PRT

【化 2 1】

<213> 人工

<220>

<223> C8.3 軽鎖

<400> 31

Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

10

Asp Ile Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn
 20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ser Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

20

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Asp
 65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Ser Tyr Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

30

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

40

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

【化 2 2】

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 32
<211> 439
<212> PRT
<213> 人工

10

<220>
<223> C8.3 重鎖

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Asn Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

20

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

30

Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser

【化 2 4】

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
370 375 380

Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
405 410 415

Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
420 425 430

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435

<210> 33
<211> 441
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> No 33 ヒトタウ

<400> 33

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro

10

20

30

40

【化 2 6】

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380

10

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430

20

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

<210> 34
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> D1.2* 軽鎖

<400> 34

30

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp His Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

【化 2 8】

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

10

20

30

40

【化 3 0】

<210> 36
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> hC10.2 LC

<400> 36

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15 10

10

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn
 20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

20

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

30

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

40

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

【化 3 1】

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 37
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> リン酸化S396およびS404を有する386~408タウ
 <400> 37

Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly
 1 5 10 15

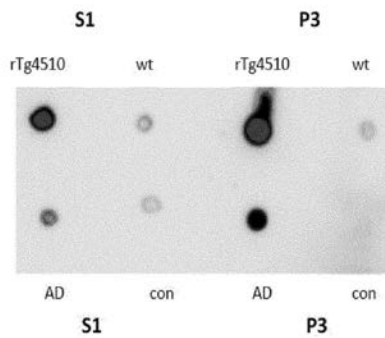
Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 20

10

20

【図 1】

A



B

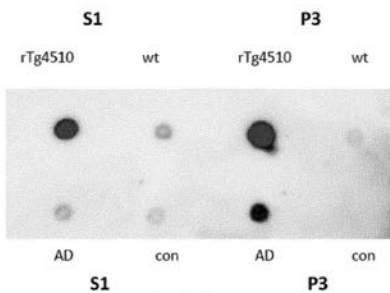


図 1

【図 2 - 1】

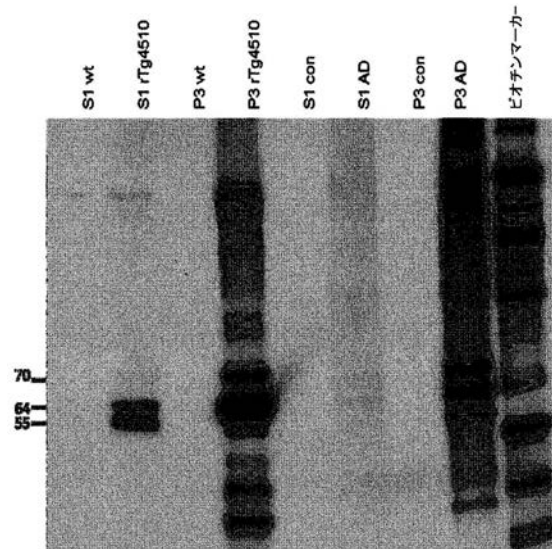


図 2A

【 図 2 - 2 】

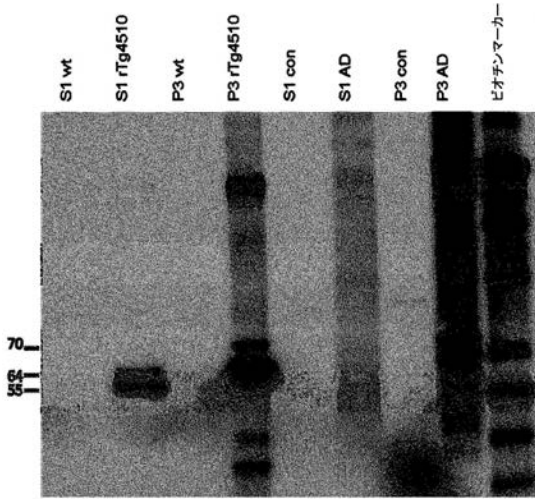


図2B

【 図 3 - 1 】

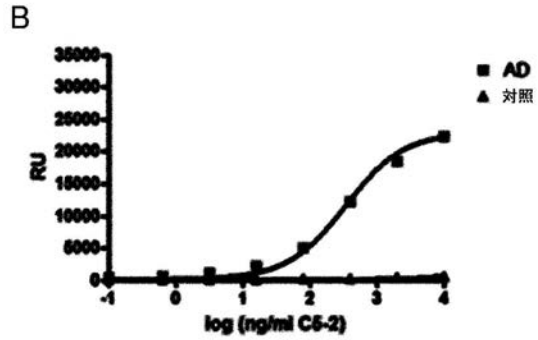
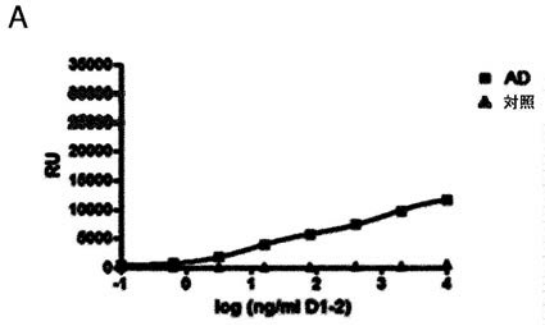


図3Aおよび3B

【 図 3 - 2 】

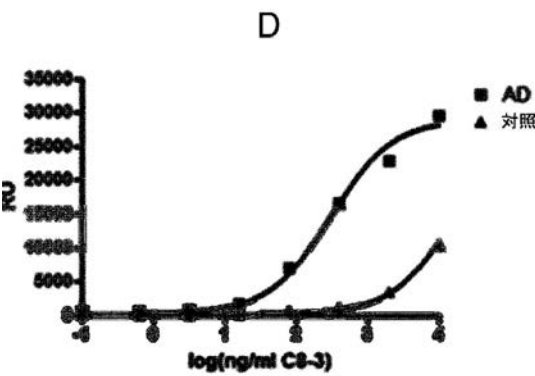
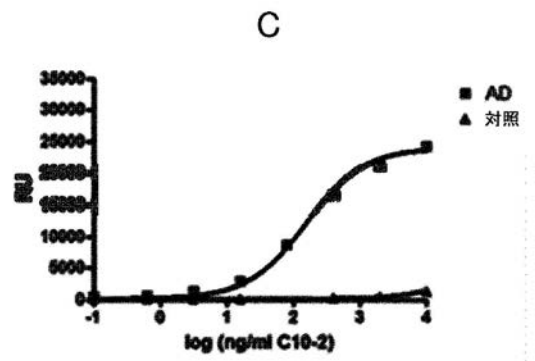


図3Cおよび3D

【 図 4 - 1 】

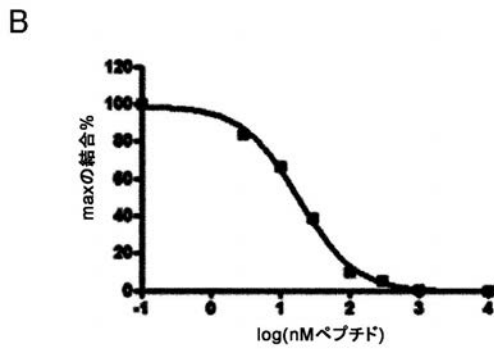
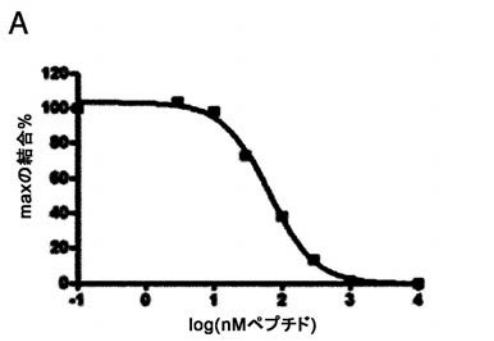


図4Aおよび4B

【 図 4 - 2 】

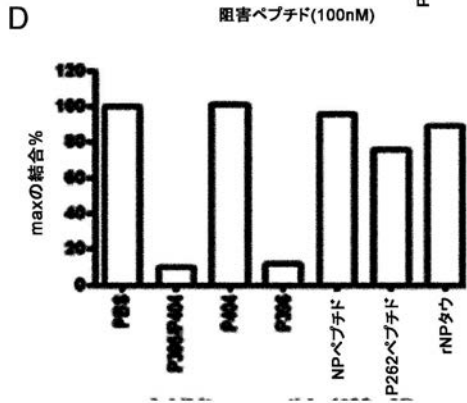
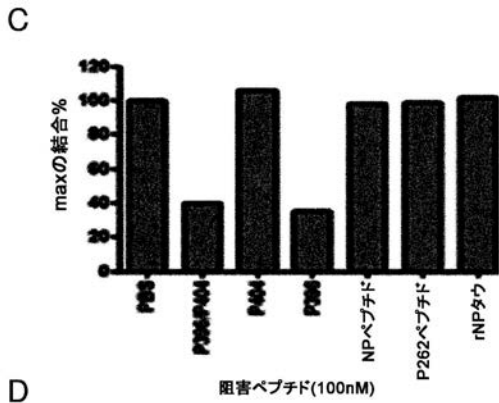


図 4C および 4D

【 図 5 - 1 】

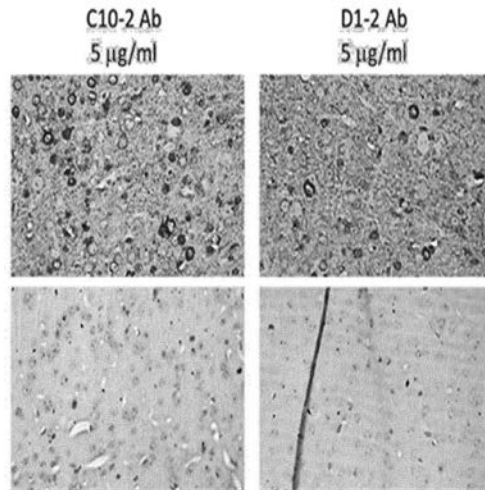


図 5A

【 図 5 - 2 】

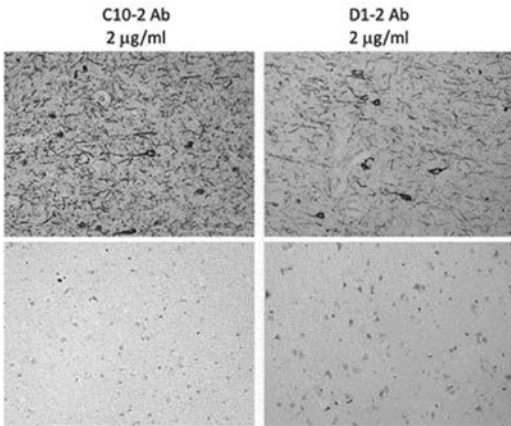


図 5B

【 図 6 - 1 】

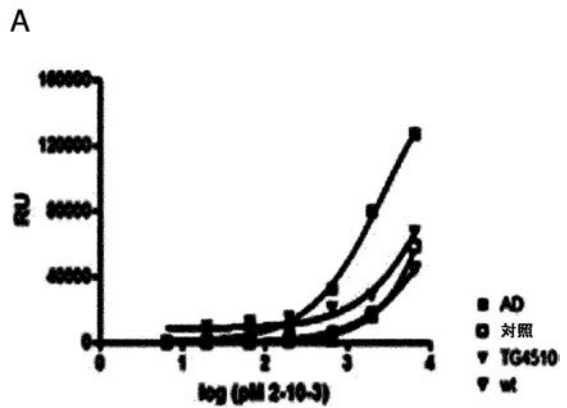


図 6A

【 図 6 - 2 】

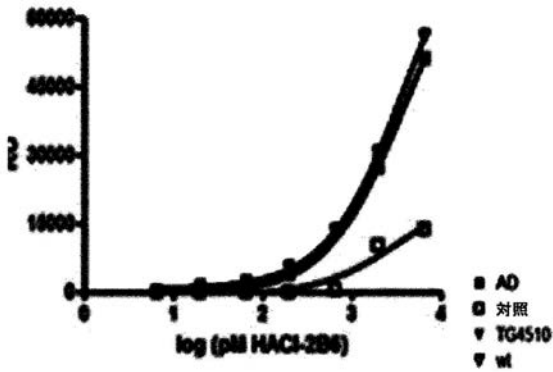
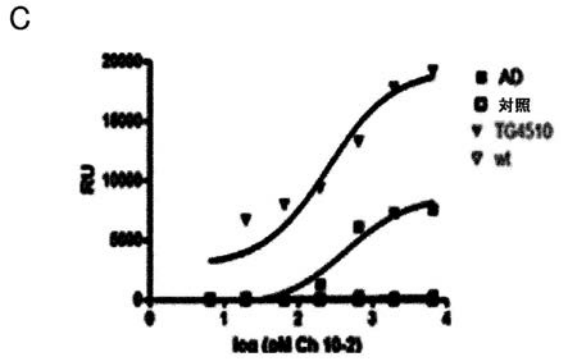


図 6B

【 図 6 - 3 】



D



図 6C および 6D

【 図 6 - 4 】

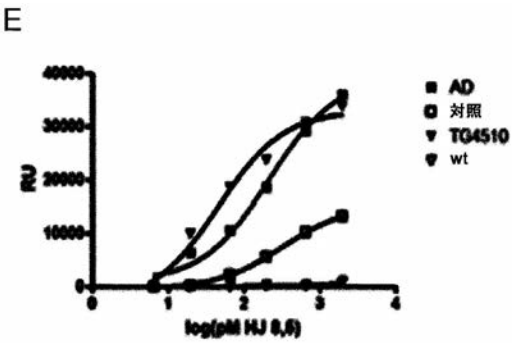
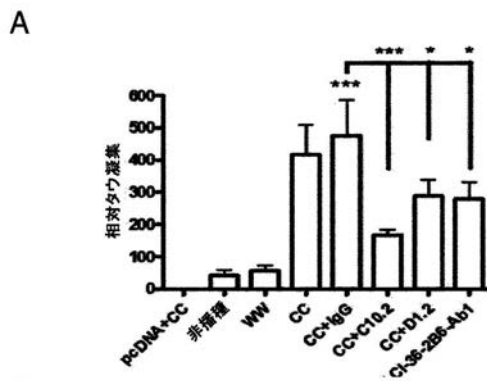


図 6E

【 図 7 - 1 】



B

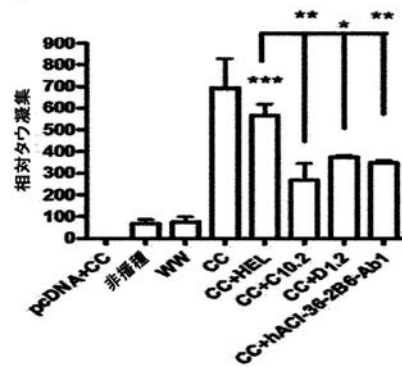


図 7A および 7B

【 図 7 - 2 】

C

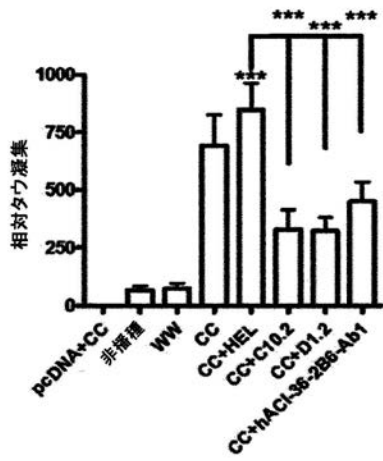
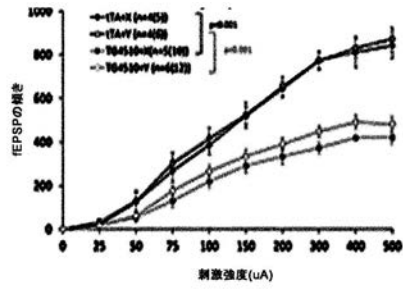


図 7C

【 図 8 - 1 】

A



B

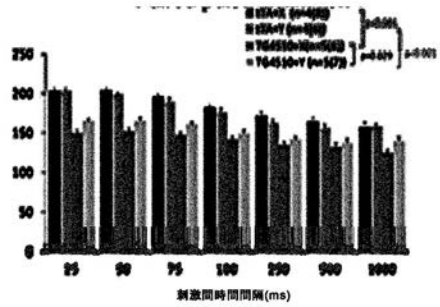
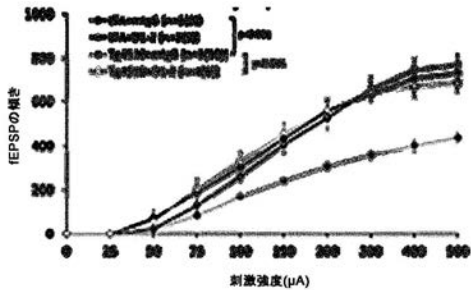


図 8A および 8B

【 図 8 - 2 】

C



D

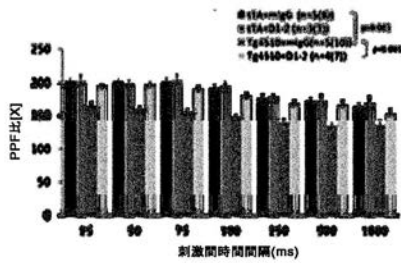


図 8C および 8D

【 図 9 】

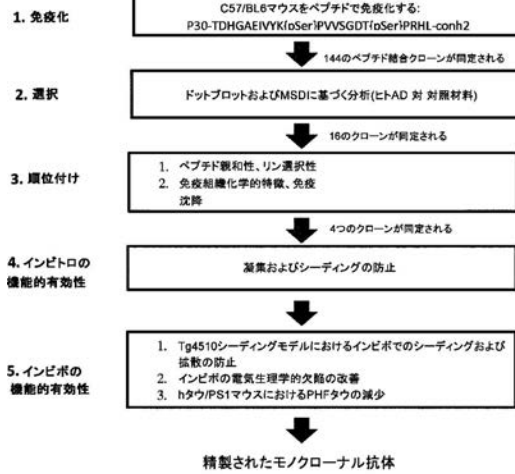


図 9

【 図 1 0 】

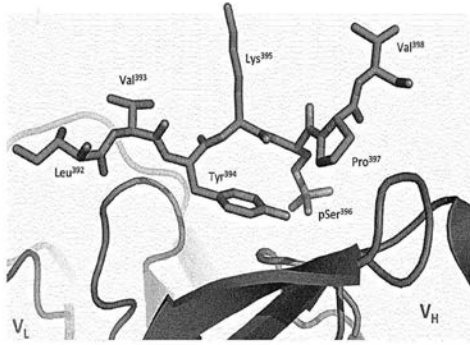


図10

【 図 1 1 】

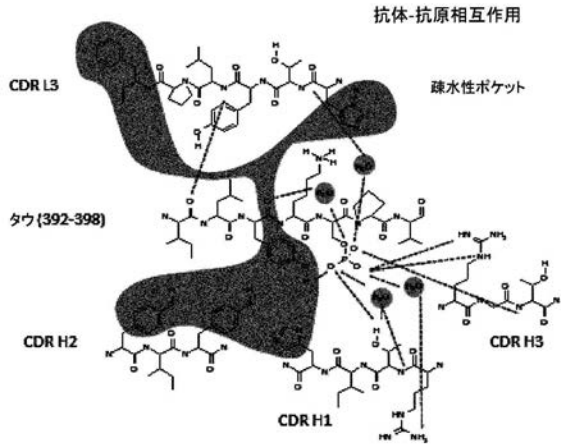
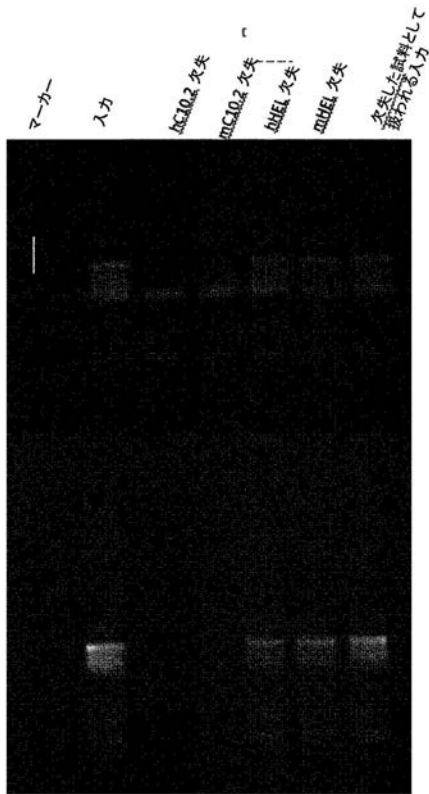


図11

【 図 1 2 - 1 】



A

図12A

【 図 1 2 - 2 】

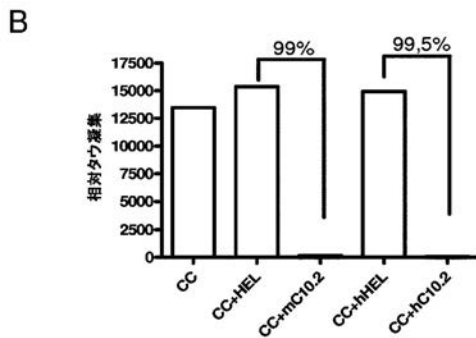


図12B

【 図 1 3 - 1 】

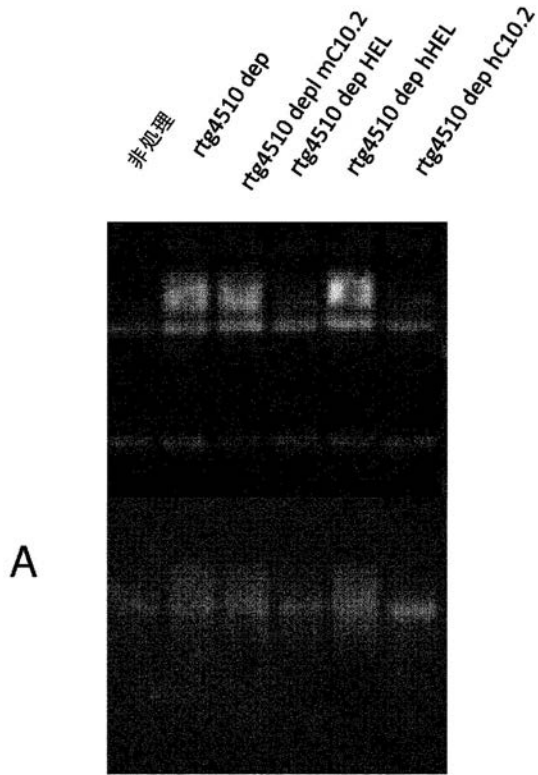


図13A

【 図 1 3 - 2 】

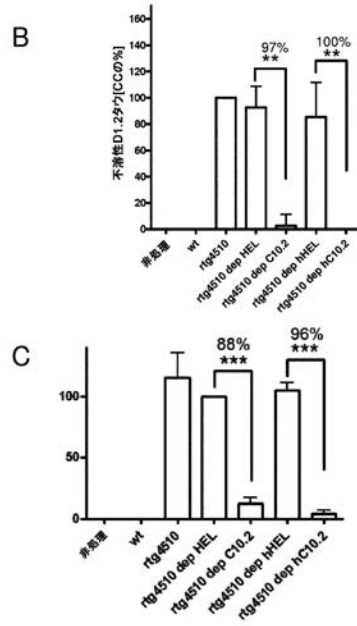


図13Bおよび13C

【 図 1 4 - 1 】

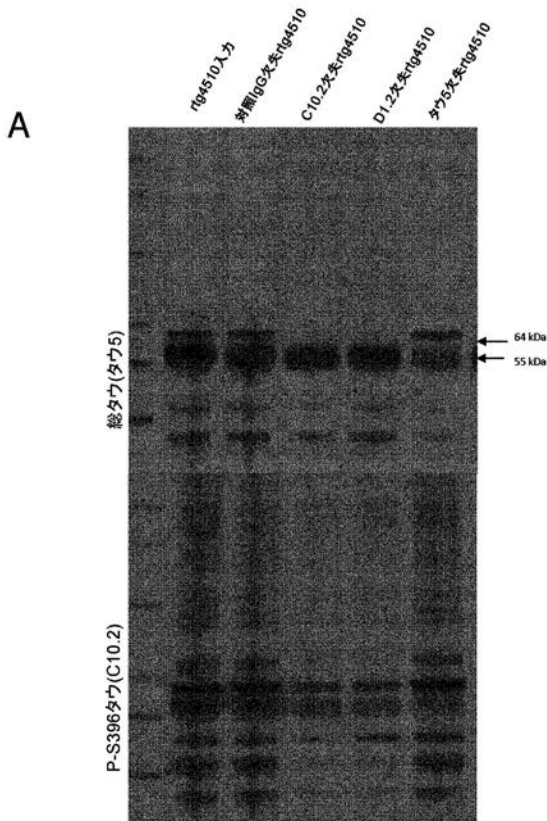


図14A

【 図 1 4 - 2 】

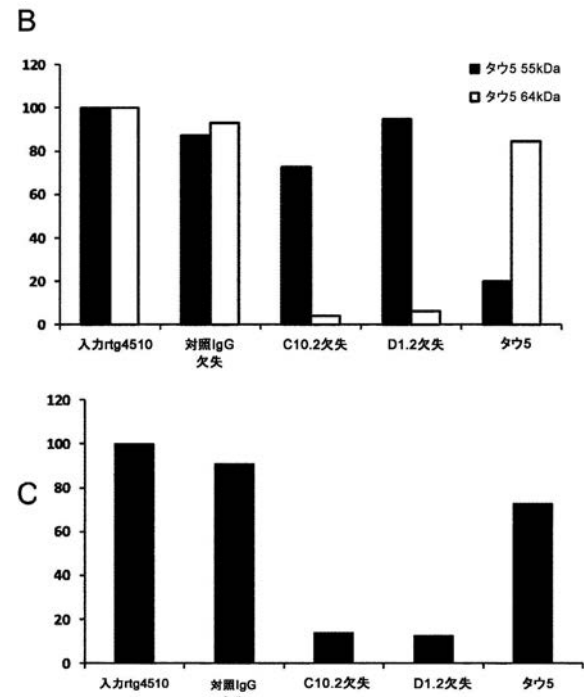


図14Bおよび14C

【 図 15 - 1 】

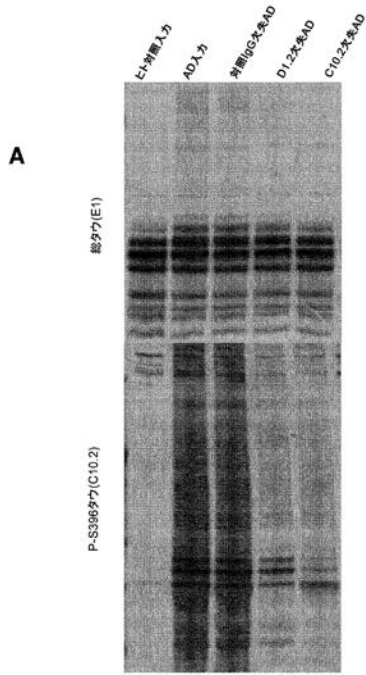


図15A

【 図 15 - 2 】

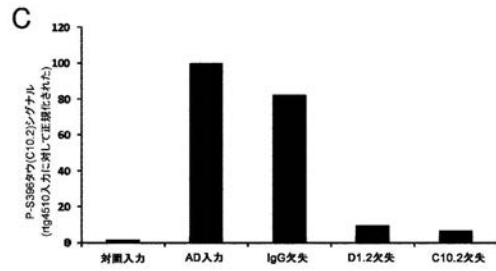
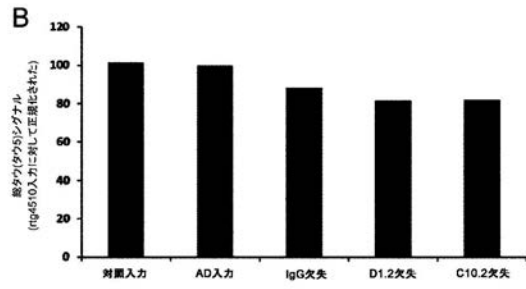


図15Bおよび15C

【 図 16 】

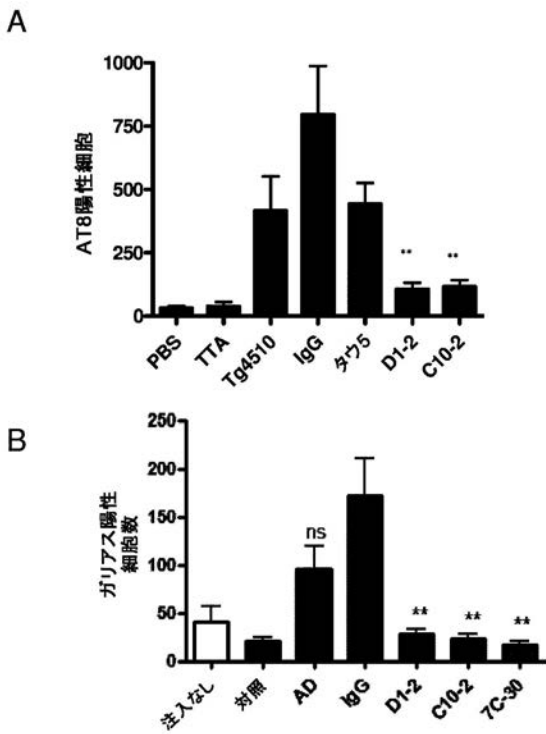


図16Aおよび16B

【 図 17 】

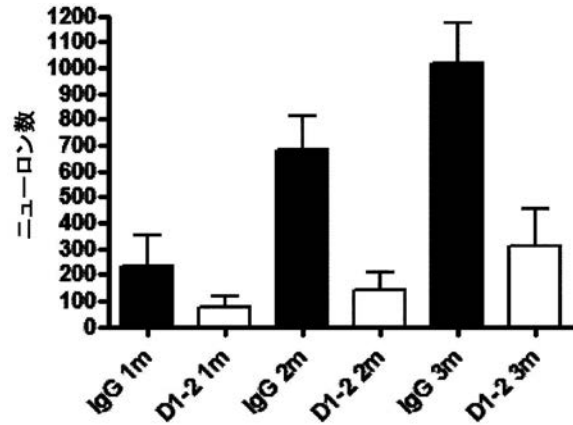


図17

【 図 18 - 1 】

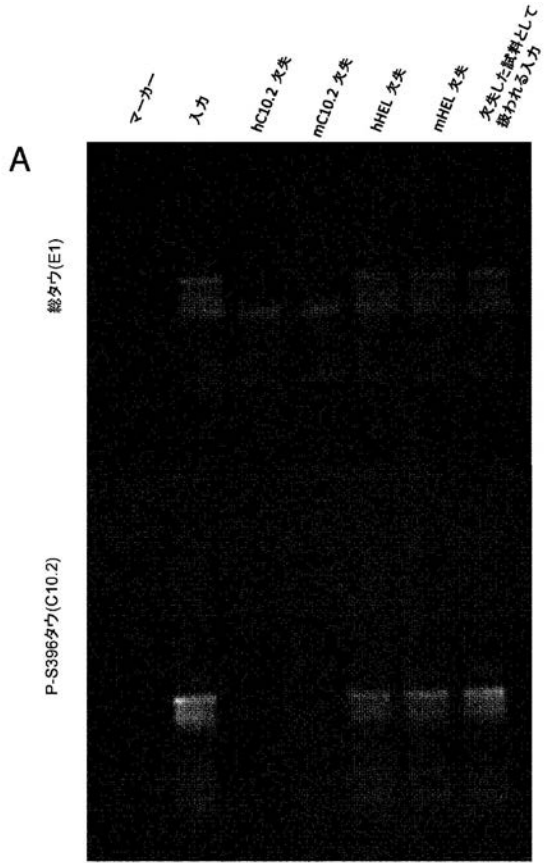


図18A

【 図 18 - 2 】

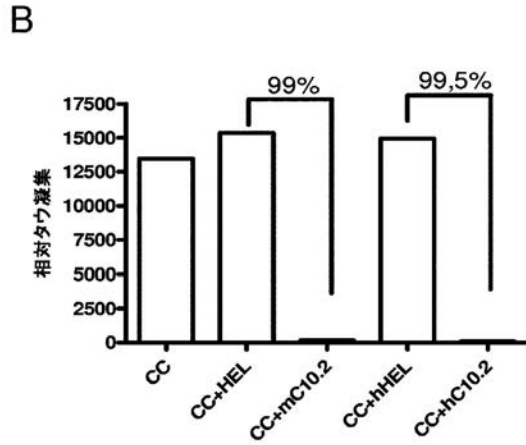


図18B

【 図 19 - 1 】

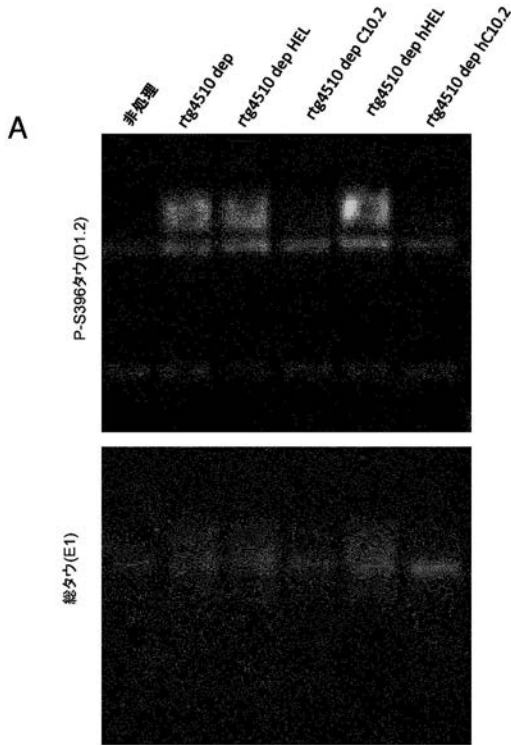
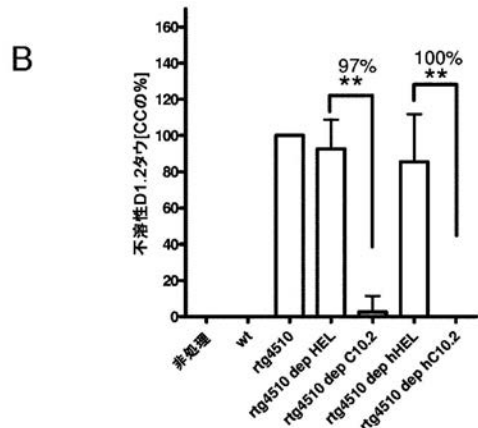


図19A

【 図 19 - 2 】



C

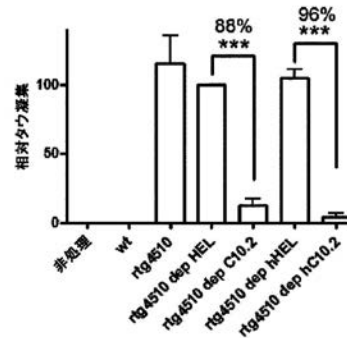


図19B および 19C

【 図 20 - 1 】

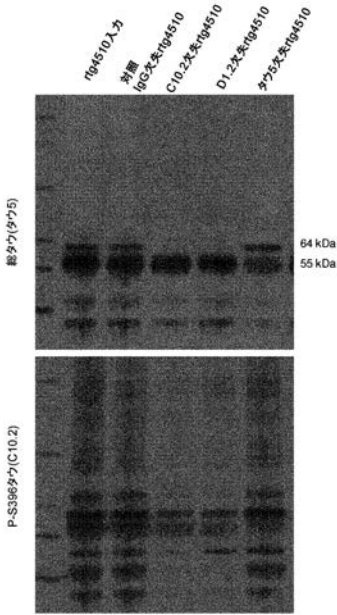


図 20A

【 図 20 - 2 】

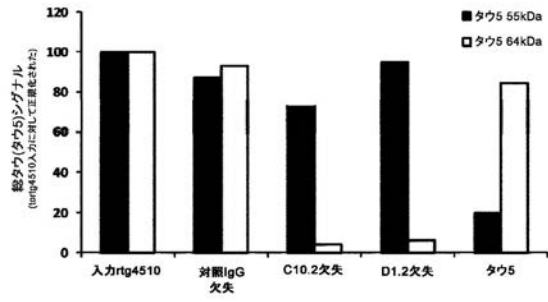


図 20B

【 図 21 - 1 】

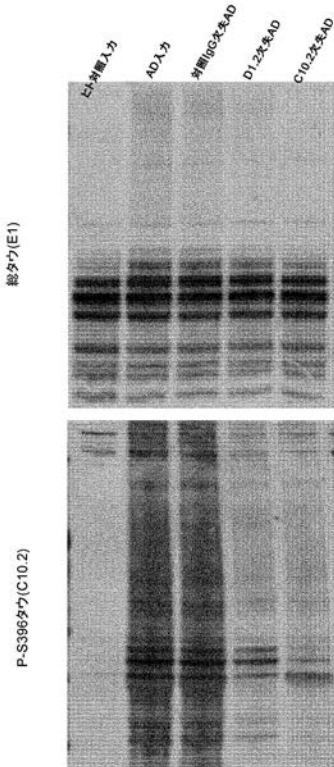


図 21A

【 図 21 - 2 】

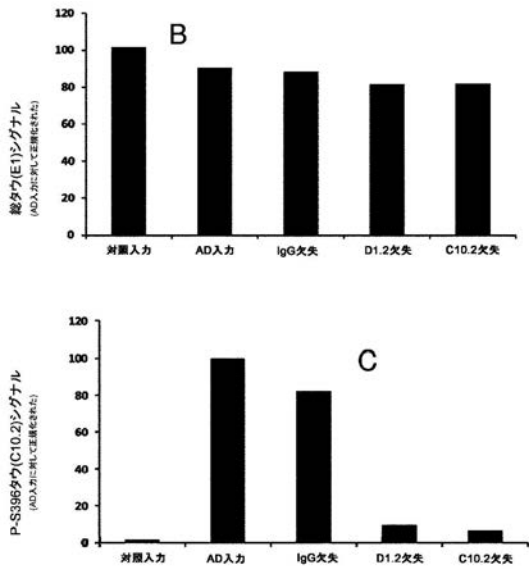


図 21B および 21 C

【 図 2 2 】

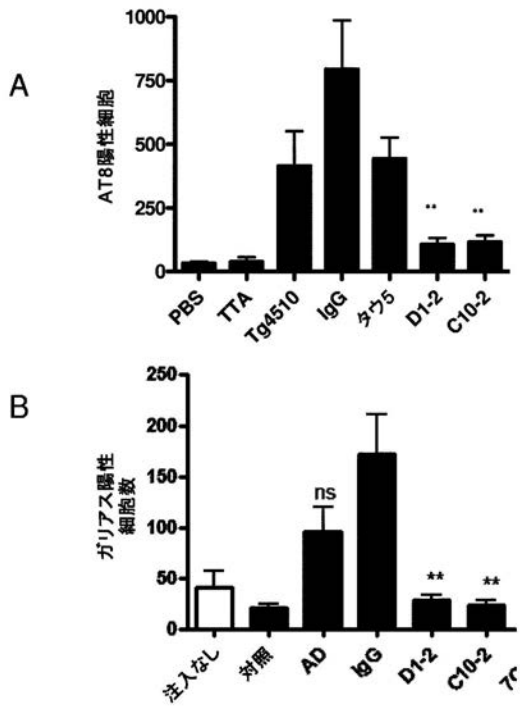


図 22A および 22B

【 図 2 3 】

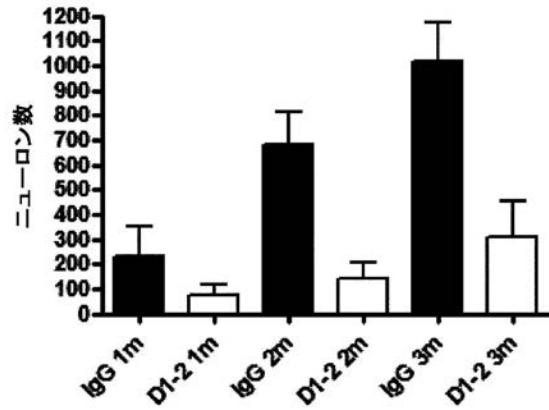


図 23

【 図 2 4 】

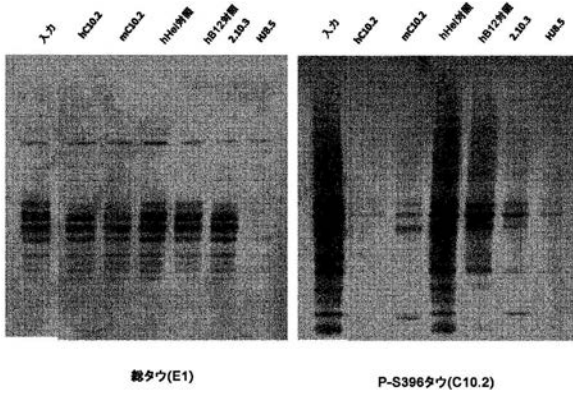


図 24

【 図 2 5 】

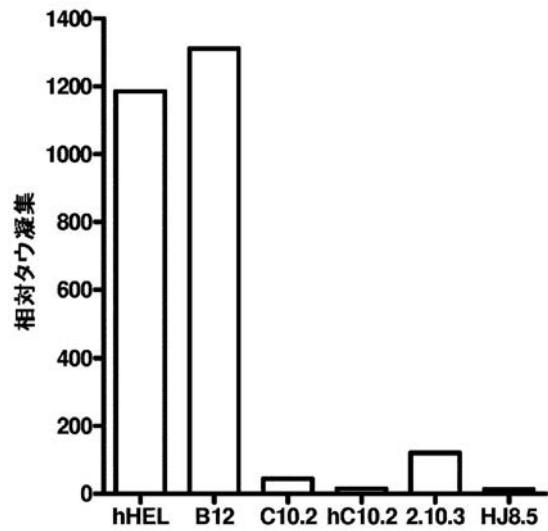


図 25

【 図 2 6 】

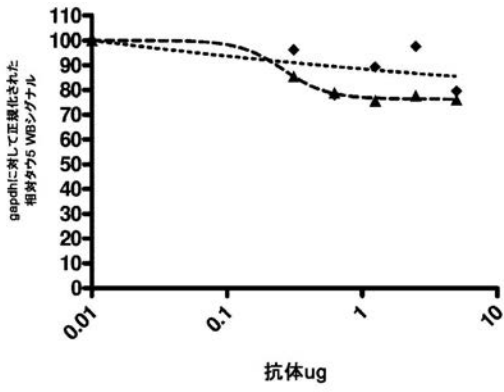


図26

【 図 2 7 】

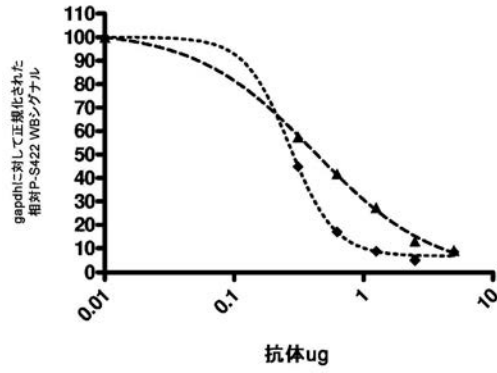


図27

【 図 2 8 】

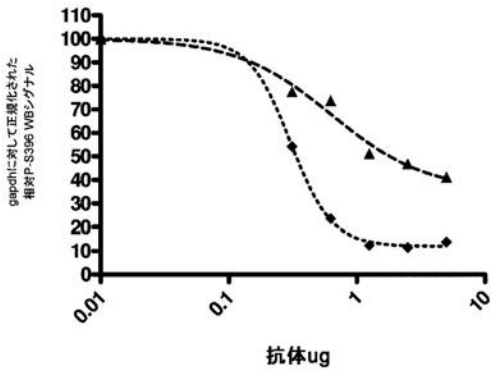


図28

【 図 2 9 】

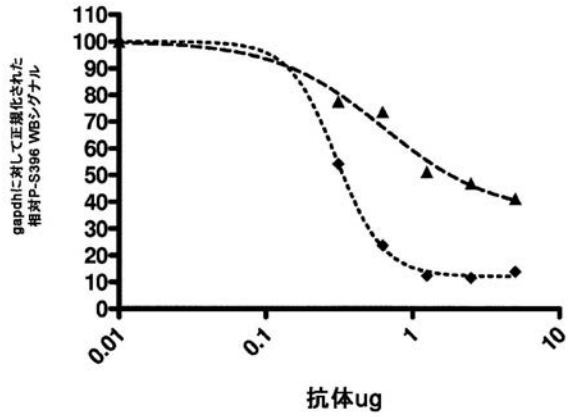


図29

【 図 3 0 】

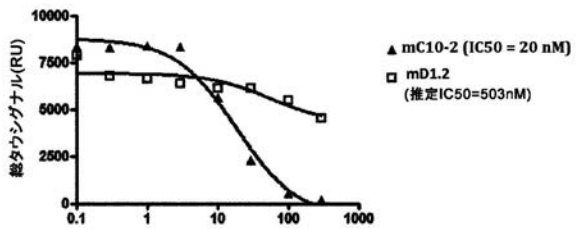


図30

【 図 3 1 】

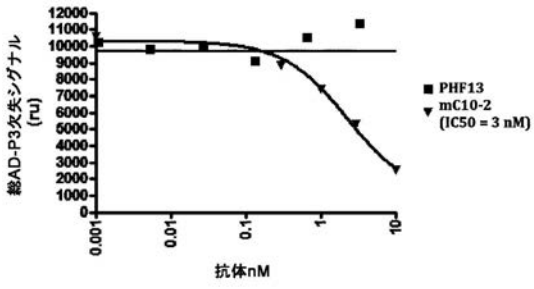


図 31

【 図 3 2 】

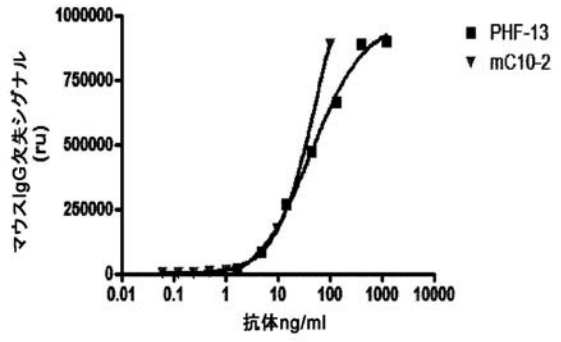


図 32

【 図 3 3 】

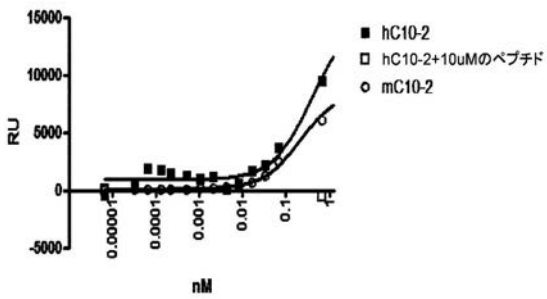


図 33

【 図 3 4 】

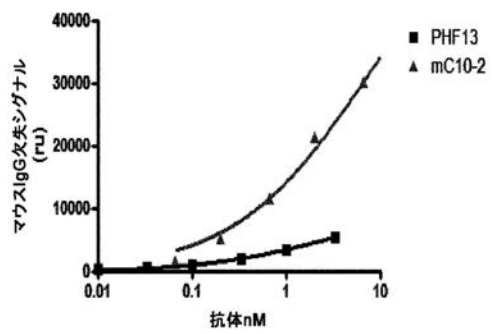


図 34

【配列表】

2018531580000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/066470

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K39/395	C07K16/18	G01N33/68 A61P25/28 A61K49/00
ADD. A61K39/00		
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) A61K C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anonymous: "Mouse anti-Phospho-Tau 396 Mouse anti-Phospho-Tau 396; Catalog No. 35-5300", invitrogen catalogue Catalog No. 35-5300, 1 October 2008 (2008-10-01), XP055308498, Retrieved from the Internet: URL:https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/35-5300_Mouse_anti-Phospho-Tau_396_Rev_1008.pdf [retrieved on 2016-10-07] the whole document ----- -/--	1-9,16, 17,19-53
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 17 February 2017		Date of mailing of the international search report 06/03/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lechner, Oskar

8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/066470

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anonymous: "Product datasheet Anti-Tau (phospho S396) antibody [EPR2731] ab109390", abcam product catalogue, 1 January 2014 (2014-01-01), XP055308426, Retrieved from the Internet: URL:http://www.abcam.com/Tau-phospho-S396-antibody-EPR2731-ab109390.pdf [retrieved on 2016-10-06] the whole document -----	1-9,16, 17,19-53
X	WO 2012/045882 A2 (AC IMMUNE SA [CH]; LEUVEN K U RES & DEV [BE]; PFEIFER ANDREA [CH]; MUH) 12 April 2012 (2012-04-12) page 106; example 5; tables 1, 7 -----	1-9,16, 17,19-53
X	WO 2013/050567 A1 (AC IMMUNE SA [CH]; UNIV LEUVEN KATH [BE]; PFEIFER ANDREA [CH]; MUHS AN) 11 April 2013 (2013-04-11) example 9; table 10 -----	1-9,16, 17,19-53
X	JOËLLE ROSSEELS ET AL: "Tau Monoclonal Antibody Generation Based on Humanized Yeast Models", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 290, no. 7, 24 December 2014 (2014-12-24), pages 4059-4074, XP055250974, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M114.627919 table 3 -----	1-9,16, 17,19-53
X	DAVID SINGER ET AL: "Characterization of Phosphorylation Dependent Antibodies To Study the Phosphorylation Status of the Tau Protein", INTERNATIONAL JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH AND THERAPEUTICS ; FORMERLY KNOWN AS LETTERS IN PEPTIDE SCIENCE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 11, no. 4, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 279-289, XP019287635, ISSN: 1573-3904 abstract -----	1
X	Anonymous: "Application Abreviews Notes", 26 March 2014 (2014-03-26), XP055342014, Retrieved from the Internet: URL:http://www.abcam.com/Tau-phospho-S199-antibody-EPR2401Y-ab81268.pdf [retrieved on 2017-02-03] the whole document -----	19-22, 29,30, 34-37
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/066470

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anonymous: "Tau [pS199] ABfinity (TM) Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody - Purified; Cat.No. 701054" In: "Tau [pS199] ABfinity (TM) Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody - Purified; Cat.No. 701054", 15 September 2011 (2011-09-15), novex, XP055342152, pages 1-2, the whole document -----	19-22, 29,30, 32-50
X	Anonymous: "Anti-phospho-Tau (pSer199/202); Data sheet; Cat.No. T6819" In: "Anti-phospho-Tau (pSer199/202); Data sheet; Cat.No. T6819", 1 January 2006 (2006-01-01), Sigma, XP055342158, the whole document -----	19-22, 29,30, 32-50
X	Anonymous: "Tau Phosphorylation Site-Specific Antibody Sampler (Containing Tau pS199, pT205, pT231, pS262, pS356, pS396, pS404, pS409, pS422 Rabbit Polyclonal & Tau [TAU-5] Monoclonal Antibodies, Unconjugated) PRODUCT ANALYSIS SHEET" In: "Tau Phosphorylation Site-Specific Antibody Sampler (Containing Tau pS199, pT205, pT231, pS262, pS356, pS396, pS404, pS409, pS422 Rabbit Polyclonal & Tau [TAU-5] Monoclonal Antibodies, Unconjugated) PRODUCT ANALYSIS SHEET", 1 January 2010 (2010-01-01), invitrogen, XP055342248, the whole document -----	19-22, 29,30, 34-50
X	WO 02/27017 A2 (BIOSOURCE INTERNAT [US]) 4 April 2002 (2002-04-04) claims 1-11; sequence 1 -----	19-22, 30, 32-50,52
A	MICHAEL A. BRISTER ET AL: "OGlcNAcylation and Phosphorylation Have Opposing Structural Effects in tau: Phosphothreonine Induces Particular Conformational Order", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 136, no. 10, 12 March 2014 (2014-03-12), pages 3803-3816, XP055308062, US ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja407156m abstract ----- -/--	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/066470

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>RUDIKOFF S ET AL: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979 the whole document</p> <p>-----</p>	1-9,16, 17,19-53
A	<p>YEE WAH WONG ET AL: "Structural Requirements for a Specificity Switch and for Maintenance of Affinity Using Mutational Analysis of a Phage-Displayed Anti-Arsonate Antibody of Fab Heavy Chain First Complementarity-Determining Region", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 160, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 5990-5997, XP007916801, ISSN: 0022-1767 the whole document</p> <p>-----</p>	1-9,16, 17,19-53
A	<p>JEFFEREY R JACKSON: "In Vitro Antibody Maturation Improvement of a High Affinity, Neutralizing Antibody Against IL-1 beta", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 154, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 3310-3319, XP55033979, the whole document</p> <p>-----</p>	1-9,16, 17,19-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/066470**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.:
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 additional 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 an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-11, 16-53(all partially)
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 Application No. PCT/ EP2016/ 066470

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 7-9(completely); 1-6, 16, 17, 19-53(partially)

A monoclonal antibody, or an epitope-binding fragment thereof, capable of immunospecifically binding to the phosphorylated residue 396 of human tau, the CDRs of said mAb being encoded by SeqID 1-6.

2. claims: 10, 11(completely); 1-6, 16, 17, 19-53(partially)

A monoclonal antibody, or an epitope-binding fragment thereof, capable of immunospecifically binding to the phosphorylated residue 396 of human tau, the CDRs of said mAb being encoded by SeqID 9-14.

3. claims: 12, 13(completely); 1-6, 16, 17, 19-53(partially)

A monoclonal antibody, or an epitope-binding fragment thereof, capable of immunospecifically binding to the phosphorylated residue 396 of human tau, the CDRs of said mAb being encoded by SeqID 17-22.

4. claims: 14, 15(completely); 1-6, 16, 17, 19-53(partially)

A monoclonal antibody, or an epitope-binding fragment thereof, capable of immunospecifically binding to the phosphorylated residue 396 of human tau, the CDRs of said mAb being encoded by SeqID 25-30.

5. claims: 17-53(partially)

A mAb, or an epitope-binding fragment thereof, capable of immunospecifically binding to the phosphorylated residue 396 of human tau, the CDRs of said mAb being encoded by SeqID 3-6, 11-14, 19-22, 27-30, wherein said mAb is not covered by inventions 1-4.

6. claims: 19-53(partially)

A monoclonal antibody, or an epitope-binding fragment thereof, selective for an amino acid motif of hyperphosphorylated tau comprising a phosphorylated Ser two residues removed from Tyr residue, said invention excluding subject matter of inventions 1-5.

7. claim: 53(partially)

International Application No. PCT/ EP2016/ 066470

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

An antibody generated by a method for generating high specificity, high affinity antibodies that are immunospecific for pathogenic hyperphosphorylated tau comprising residue a phosphorylated S396, wherein said method comprises the steps of:(A) injecting an immunogen into a mammal, said immunogen comprising the bi-phosphorylated peptide comprising 18-40, such as at 18-30, such as 20-30 amino consecutive acid residues comprising TDHGAEIVYK{pI SPVVS GDT{pI SPRHL (SEQ ID NO:37) covering residues 386-410 of 2N4R tau, to thereby immunize said mammal;(B) repeating said immunization of said mammal two or more times;(C) screening a serum sample from said repeatedly immunized mammal for the presence of high specificity, high affinity antibodies capable of binding pathogenic hyperphosphorylated tau comprising residue a phosphorylated S396, but substantially less capable of binding non-pathogenic tau; and(D) recovering said high specificity, high affinity antibodies.

8. claims: 1-6, 16-53(all partially)

Further subject matter covered by the claims but not inventions 1-7.

This group should safeguard the applicant's rights. In case the applicants would select this invention to be searched they need to clearly define the subject matter to be searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/066470

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2012045882	A2	12-04-2012	AU 2011311516 A1	18-04-2013
			CA 2812865 A1	12-04-2012
			CL 2013000951 A1	03-01-2014
			CN 103502272 A	08-01-2014
			CO 6710903 A2	15-07-2013
			CR 20130160 A	03-09-2013
			DK 2625198 T3	28-09-2015
			EC SP13012609 A	31-07-2013
			EP 2625198 A2	14-08-2013
			EP 2987807 A2	24-02-2016
			ES 2548686 T3	20-10-2015
			HK 1187928 A1	17-06-2016
			HK 1216897 A1	09-12-2016
			HU E027649 T2	28-10-2016
			JP 2014502141 A	30-01-2014
			KR 20130115279 A	21-10-2013
			MX 338421 B	15-04-2016
			PE 02182014 A1	01-03-2014
			RU 2013120544 A	20-11-2014
			SG 189136 A1	31-05-2013
			SI 2625198 T1	30-11-2015
			TW 201216985 A	01-05-2012
			US 2012276009 A1	01-11-2012
			US 2016304590 A1	20-10-2016
WO 2012045882 A2	12-04-2012			
WO 2013050567	A1	11-04-2013	AR 092779 A1	06-05-2015
			CA 2850686 A1	11-04-2013
			CN 104080806 A	01-10-2014
			EP 2764022 A1	13-08-2014
			EP 3135689 A1	01-03-2017
			ES 2600915 T3	13-02-2017
			HK 1200469 A1	07-08-2015
			JP 2014531216 A	27-11-2014
			KR 20140070658 A	10-06-2014
			RU 2014118456 A	20-11-2015
			US 2014294731 A1	02-10-2014
			WO 2013050567 A1	11-04-2013
			WO 0227017	A2
CA 2423979 A1	04-04-2002			
EP 1328812 A2	23-07-2003			
EP 2040078 A1	25-03-2009			
EP 2298814 A2	23-03-2011			
JP 2004516823 A	10-06-2004			
JP 2006225396 A	31-08-2006			
US 2003162230 A1	28-08-2003			
US 2009104628 A1	23-04-2009			
US 2011165588 A1	07-07-2011			
US 2012135426 A1	31-05-2012			
WO 0227017 A2	04-04-2002			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
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	
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 K	51/10 (2006.01)	A 6 1 K	51/10	2 0 0
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	9/10 (2006.01)	A 6 1 K	9/10	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. T r i t o n

- (72)発明者 ピーダスン, ヤン, トアライフ
デンマーク国 2 7 0 0 ブランスホイ, ホルクス プラス 1 4
- (72)発明者 ピーダスン, ラース, ウスタゴー
デンマーク国 2 1 0 0 コペンハーゲン ウー, ウスタプロゲーゼ 1 2 2
- (72)発明者 デクセル, ユストゥス, クラウス, アルフレッド
ドイツ国 8 3 6 4 6 パート テルツ, オルタ バーンホーフブラッツ 2 3
- (72)発明者 アブドゥル - ラシード アスニ, アヨデジ
デンマーク国 2 5 0 0 ヴァルビュー, カリン ネレモーセス ヴァイ 1 2
- (72)発明者 ローゼンクヴィスト, ニーナ
スウェーデン国 2 1 6 2 0 マルムー, ルドベックスガタン 1 1 2

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA36 FB03
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
4C076 AA11 AA16 BB13 BB16 CC01 CC29 FF11
4C085 AA14 EE01 GG02 GG04 HH03 HH07 HH11 JJ01 KA04 KA27
KA28 KA29 KA30 KB01 KB45 LL13
4H045 AA11 AA30 BA41 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	特异于过磷酸化tau的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2018531580A	公开(公告)日	2018-11-01
申请号	JP2018501228	申请日	2016-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	ハーランドベックアクチエゼルスカベット		
申请(专利权)人(译)	她的灵北活化埃泽尔·斯卡赌注		
[标]发明人	ピーダスンヤントアライフ ピーダスンラースウスタゴー デクセルユストゥスクラウスアルフレッド アブドゥルラシードアスニアヨデジ ローゼンクヴィストニーナ		
发明人	ピーダスン, ヤン, トアライフ ピーダスン, ラース, ウスタゴー デクセル, ユストゥス, クラウス, アルフレッド アブドゥル-ラシード アスニ, アヨデジ ローゼンクヴィスト, ニーナ		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/18 C12P21/08 C12N15/06 C07K16/46 A61K39/395 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/14 A61P9/00 A61K51/10 A61K9/08 A61K9/10 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	A61K39/395 A61K2039/505 A61P9/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2317/30 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821 A61K49/00 C07K2317/565 C07K2317/94		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/18 C12P21/08 C12N15/06.100 C07K16/46 A61K39/395.N A61P25/28 A61P25/16 A61P25/14 A61P9/00 A61K51/10.200 A61K9/08 A61K9/10 G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064 /CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C076/AA11 4C076/AA16 4C076/BB13 4C076/BB16 4C076/CC01 4C076/CC29 4C076/FF11 4C085/AA14 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/HH03 4C085 /HH07 4C085/HH11 4C085/JJ01 4C085/KA04 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KA30 4C085/KB01 4C085/KB45 4C085/LL13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045 /EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 鈴木康仁		
优先权	2015012211 2015-07-13 GB 2015018375 2015-10-16 GB		
其他公开文献	JP2018531580A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了新型的单克隆抗体，其特异性结合病理性高磷酸化 (PHF) tau中的磷酸化丝氨酸396残基 (pS396) ，以及这些分子及其在治疗阿尔茨海默氏病和tauopathy中的用途。 的tau结合片段

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	2 G O 4 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C O 7 6
C 1 2 N 15/06 (2006.01)	C 1 2 N 15/06 I O O	4 C O 8 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 130 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-501228 (P2018-501228)	(71) 出願人	591143065
(86) (22) 出願日	平成28年7月12日 (2016. 7. 12)		ハー・ルンドベック・アクチエゼルスカベ ット
(85) 翻訳文提出日	平成30年3月12日 (2018. 3. 12)		デンマーク国, 2 5 0 0 ハルビー, オッ テイリアベエイ, 9
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/066470		
(87) 国際公開番号	W02017/009308	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成28年1月19日 (2017. 1. 19)		弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	1512211. 2	(74) 代理人	100120134
(32) 優先日	平成27年7月13日 (2015. 7. 13)		弁理士 大森 規雄
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100141195
(31) 優先権主張番号	1518375. 9		弁理士 西澤 恵美子
(32) 優先日	平成27年10月16日 (2015. 10. 16)	(74) 代理人	100104282
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 過リン酸化タウに特異的な抗体およびその使用方法