

(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2015-532592

(P2015-532592A)

(43) 公表日 平成27年11月12日 (2015. 11. 12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 C O 7 6
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 120 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-527645 (P2015-527645)	(71) 出願人	509343507
(86) (22) 出願日	平成25年8月15日 (2013. 8. 15)		アイビエリアン, インコーポレイティド
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月7日 (2015. 4. 7)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 940
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/055203		80, サウス サンフランシスコ, ゲート
(87) 国際公開番号	W02014/028777		ウェイ ブールバード 951
(87) 国際公開日	平成26年2月20日 (2014. 2. 20)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	61/683, 902		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成24年8月16日 (2012. 8. 16)	(74) 代理人	100084146
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	61/754, 085	(74) 代理人	100122301
(32) 優先日	平成25年1月18日 (2013. 1. 18)		弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100156111
(31) 優先権主張番号	61/781, 823		弁理士 山中 伸一郎
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タウオパチーの処置方法

(57) 【要約】

本発明は、抗 T a u 抗体を投与することを含む、タウオパチーの処置方法を提供する。本発明はまた、該方法における使用のための、抗 T a u 抗体、該抗体を含む製剤を提供する。

Hybridoma IPN001 Heavy Chain Sequences

```

1  E V Q L V E S G E D L V K P G G S L K L
2  GAGTGCAGT TGGTGGAGTC TGGGAGAGC TTAGTGAGC CTGGAGGTC CCGAAGCTC
61  S C V A S G F A F S R Y G M S W V R Q T
   TCGTGTGG CTCTTGATT CGCTTCAGT ACTGATGCA TGCTTGGGT TGGCAGACT
121  P D M R L E W V A T T S S S G S R T V F
   CCAGACATGA GCGTGGAGTC GGTGCGAACA ATTAGTAGCA GTGATAGTCG CACCTACTTT
181  P D S V K G R L T I S R D N D K N I L Y
   CCAGACATGA TGATAGGCGCT ACTCACCATC TCGAGAGACA ATGACAAGAA GATCCTATAC
241  L Q M S S L R S E D T A M Y Y C T I T W
   CTACAAATGA GCAGTGTGAG GTCTGAGGAC ACAGCCATGT ACTATTGTAC GATTACCTGG
301  D G A M D Y W G R G I S V T V S S (SEQ ID NO:14)
   GACCTGCTTA TGATAGTTC GGTGCTGGA ATATCACTCA CGCTCTCTC A (SEQ ID NO:18)

```

CDR definitions and protein sequence numbering according to Kabat numbering system.
CDRs, and nucleotide sequences encoding the CDRs, are in bold text and underlined.

FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープに特異的に結合する、単離されたヒト化モノクローナル抗体、またはそのフラグメント。

【請求項 2】

エピトープが直鎖状エピトープである、請求項 1 に記載の単離されたヒト化モノクローナル抗体、またはそのフラグメント。

【請求項 3】

エピトープが、Tauポリペプチドのアミノ酸 2-176 内にある、請求項 1 または 2 に記載の単離されたヒト化モノクローナル抗体、またはそのフラグメント。

10

【請求項 4】

エピトープが、Tauポリペプチドのアミノ酸 15-24 内にある、請求項 1 または 2 に記載の単離されたヒト化モノクローナル抗体、またはそのフラグメント。

【請求項 5】

エピトープ内のアミノ酸のリン酸化に関係なく該エピトープに特異的に結合する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の単離されたヒト化モノクローナル抗体、またはそのフラグメント。

【請求項 6】

エピトープがリン酸化アミノ酸を含まない、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の単離されたヒト化モノクローナル抗体、またはそのフラグメント。

20

【請求項 7】

エピトープがニトロ化アミノ酸を含まない、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の単離されたヒト化モノクローナル抗体、またはそのフラグメント。

【請求項 8】

エピトープがリン酸化アミノ酸、ニトロ化アミノ酸、またはリン酸化アミノ酸とニトロ化アミノ酸の両方を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の単離されたヒト化モノクローナル抗体、またはそのフラグメント。

【請求項 9】

ヒト化軽鎖フレームワーク領域およびヒト化重鎖フレームワーク領域を含む単離された抗体であって、該単離された抗体が、TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を、

30

a) (i) 配列番号 1 または配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、
(i i) 配列番号 2 または配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および
(i i i) 配列番号 3 または配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3
を含む軽鎖領域、ならびに

b) (i) 配列番号 4 または配列番号 10 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、
(i i) 配列番号 5 または配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および
(i i i) 配列番号 6 または配列番号 12 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3
を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する、単離された抗体。

【請求項 10】

40

軽鎖領域および重鎖領域が、別個のポリペプチド中に存在する、請求項 9 に記載の単離された抗体。

【請求項 11】

軽鎖領域および重鎖領域が、単一のポリペプチド中に存在する、請求項 9 に記載の単離された抗体。

【請求項 12】

重鎖領域が、アイソタイプ I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 のものである、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 13】

抗体が、F v、s c F v、F a b、F (a b') 2、または F a b' である、請求項 9

50

から 12 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 14】

抗体が、共有結合した非ペプチド性合成ポリマーを含む、請求項 9 から 13 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 15】

合成ポリマーがポリ（エチレングリコール）ポリマーである、請求項 14 に記載の単離された抗体。

【請求項 16】

抗体が、血液脳関門の通過を促進する担体分子、ペプチドまたはタンパク質に直接またはリンカーを介して結合されている、請求項 9 から 15 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

10

【請求項 17】

エピトープが、T a u ポリペプチドのアミノ酸 15 - 24 内にある、請求項 9 から 16 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 18】

ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、表 3 に記載のアミノ酸置換の 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個を含む、請求項 9 から 17 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 19】

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、表 2 に記載のアミノ酸置換の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 個を含む、請求項 9 から 18 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

20

【請求項 20】

抗体が、F v、s c F v、F a b、F（a b'）₂、または F a b' である、単離された抗体であって、該抗体が、T a u ポリペプチドの N 末端領域内のエピトープへの結合を、

- a）（i）配列番号 1 または配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、
- （i i）配列番号 2 または配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および
- （i i i）配列番号 3 または配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、

30

- を含む軽鎖領域、ならびに
- b）（i）配列番号 4 または配列番号 10 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、
- （i i）配列番号 5 または配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および
- （i i i）配列番号 6 または配列番号 12 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3

を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する、単離された抗体。

【請求項 21】

単離された抗体がヒト化軽鎖フレームワーク領域を含む、請求項 20 に記載の単離された抗体。

【請求項 22】

ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、表 3 に記載のアミノ酸置換の 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個を含む、請求項 21 に記載の単離された抗体。

40

【請求項 23】

単離された抗体がヒト化重鎖フレームワーク領域を含む、請求項 20 から 22 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 24】

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、表 2 に記載のアミノ酸置換の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 個を含む、請求項 23 に記載の単離された抗体。

【請求項 25】

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、V H 変異体 1 について表 2 に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、V κ 変異体 1 について表 3 に記載のアミノ酸置換を含む、

50

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体1について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体2について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体1について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体3について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体1について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体4について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体2について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体1について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体2について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体2について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体2について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体3について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体2について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体4について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体3について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体1について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体3について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体2について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体3について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体3について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体3について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体4について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体4について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体1について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体4について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体2について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体4について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体3について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、VH変異体4について表2に記載のアミノ酸置換を含み、ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、Vk変異体4について表3に記載のアミノ酸置換を含む、

請求項18、19、および21から24のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項26】

ヒト軽鎖定常領域およびヒト重鎖定常領域を含む単離された抗体であって、該単離された抗体が、TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を、

a) (i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むVL CDR1、

10

20

30

40

50

(i i) 配列番号 2 または配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および

(i i i) 配列番号 3 または配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3

を含む軽鎖領域、ならびに

b) (i) 配列番号 4 または配列番号 10 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、

(i i) 配列番号 5 または配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および

(i i i) 配列番号 6 または配列番号 12 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3

を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する、単離された抗体。

【請求項 27】

10^{-7} M、 10^{-8} M または 10^{-9} M の解離定数 (K_D) で、完全長組み換え t a u (r T a u 383) に結合する、請求項 1 から 26 のいずれか一項に記載の単離された抗体、またはそのフラグメント。

10

【請求項 28】

抗体またはそのフラグメントが、e T a u 仲介性ニューロン過活動を低減させる、請求項 1 から 27 のいずれか一項に記載の単離された抗体、またはそのフラグメント。

【請求項 29】

抗体またはそのフラグメントが、低い免疫原性を有する、請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の単離された抗体、またはそのフラグメント。

【請求項 30】

抗体またはそのフラグメントが、インビボにおけるリン酸化 T a u レベルを低下させる、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の単離された抗体、またはそのフラグメント。

20

【請求項 31】

間質液 (I S F) および脳脊髄液 (C S F) 中の遊離 t a u レベルを低減させる、請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の単離された抗体、またはそのフラグメント。

【請求項 32】

抗体またはフラグメントが運動障害を軽減させる、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の単離された抗体、またはそのフラグメント。

【請求項 33】

抗体またはフラグメントが、ヒト大脳皮質由来の初代神経細胞により分泌される A β 40 および／または A β 42 の量を低減させ、および／または神経細胞および／または細胞外液中の A β 40 および／または A β 42 の量を低減する、請求項 1 から 32 のいずれか一項に記載の単離された抗体、またはそのフラグメント。

30

【請求項 34】

a) 1 - 33 のいずれか一項に記載の抗体、および

b) 薬学的に許容される賦形剤

を含む、医薬製剤。

【請求項 35】

a) (i) 配列番号 1 または配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、

(i i) 配列番号 2 または配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、

(i i i) 配列番号 3 または配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、

(i v) 配列番号 4 または配列番号 10 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、

(v) 配列番号 5 または配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および

(v i) 配列番号 6 または配列番号 12 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3

を含む、T a u の N 末端部分内のエピトープに特異的に結合する抗体

ならびに、

b) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤

を含む、エンドトキシン不含有の医薬製剤。

【請求項 36】

抗体が、ヒト化軽鎖フレームワーク領域を含む、請求項 35 に記載の医薬製剤。

【請求項 37】

ヒト化軽鎖フレームワーク領域が、表 3 に記載の 1、2、3、4、5、6、7、8、9

50

、または10個のアミノ酸置換を含む、請求項36に記載の医薬製剤。

【請求項38】

抗体が、ヒト化重鎖フレームワーク領域を含む、請求項35から37のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項39】

ヒト化重鎖フレームワーク領域が、表2に記載の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個のアミノ酸置換を含む、請求項38に記載の医薬製剤。

【請求項40】

抗体がリポソームに封入されている、請求項35から39のいずれか一項に記載の医薬製剤。

10

【請求項41】

抗体が、血液脳関門の通過を促進する薬物と共に製剤されている、請求項35から40のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項42】

抗体が、血液脳関門の通過を促進する担体分子、ペプチドまたはタンパク質に直接またはリンカーを介して結合されている、請求項35から41のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項43】

抗体が、Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、またはFab'である、請求項35から42のいずれか一項に記載の医薬製剤。

20

【請求項44】

ヌクレオチド配列が、真核細胞において活性な転写調節要素に操作可能に連結されている、請求項1から33のいずれか一項に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクター。

【請求項45】

請求項44に記載の組換え発現ベクターで遺伝子組み換えされたインビトロの宿主細胞。

【請求項46】

請求項34から43のいずれか一項に記載の医薬製剤を含む、滅菌容器。

【請求項47】

容器がシリンジである、請求項46に記載の容器。

30

【請求項48】

医薬としての使用のための、請求項1から33のいずれか一項に記載の抗体、請求項34から43のいずれか一項に記載の医薬製剤、または

a) TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を競合する、i) 図1Bに記載の抗体の軽鎖相補性決定領域(CDR)；および、図1Aに記載の抗体の重鎖CDR；もしくは

ii) 図2Bに記載の抗体の軽鎖CDR；および、図2Aに記載の抗体の重鎖CDR；を含む、抗体、および

b) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤；を含む、医薬組成物。

40

【請求項49】

個体におけるタウオパチーの処置方法であって、請求項1から33のいずれか一項に記載の抗体、請求項34から43のいずれか一項に記載の医薬製剤、または

a) TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を競合する、i) 図1Bに記載の抗体の軽鎖相補性決定領域(CDR)；および、図1Aに記載の抗体の重鎖CDR；もしくは

ii) 図2Bに記載の抗体の軽鎖CDR；および、図2Aに記載の抗体の重鎖CDR；を含む、抗体、および

b) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤；

50

を含む、医薬組成物を、該個体に投与することを含む、方法。

【請求項 50】

タウオパチーの処置における使用のための、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 34 から 43 のいずれか一項に記載の医薬製剤、または

a) T a u ポリペプチドの N 末端領域内のエピトープへの結合を、i) 図 1 B に記載の抗体の軽鎖相補性決定領域 (C D R) ; および、図 1 A に記載の抗体の重鎖 C D R ; もしくは

i i) 図 2 B に記載の抗体の軽鎖 C D R ; および、図 2 A に記載の抗体の重鎖 C D R ; を含む、抗体と競合する抗体、および

b) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤 ;

を含む、医薬組成物。

10

【請求項 51】

タウオパチーの処置用医薬の製造を目的とする、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 34 から 43 のいずれか一項に記載の医薬製剤、または

a) T a u ポリペプチドの N 末端領域内のエピトープへの結合を、i) 図 1 B に記載の抗体の軽鎖相補性決定領域 (C D R) ; および、図 1 A に記載の抗体の重鎖 C D R ; もしくは

i i) 図 2 B に記載の抗体の軽鎖 C D R ; および、図 2 A に記載の抗体の重鎖 C D R ; を含む、抗体と競合する抗体、および

b) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤 ;

を含む、医薬組成物、の使用。

20

【請求項 52】

該抗体または医薬組成物の投与が、

a) 脳組織における細胞外遊離 t a u の量 ;

b) 間質液 (I S F) における細胞外遊離 t a u の量 ;

c) 脳脊髄液 (C S F) における細胞外遊離 t a u の量 ;

d) ニューロンから他のニューロンへの t a u の拡散 ;

e) ニューロン内の t a u 凝集の量 ;

f) ミクログリアおよび／またはアストロサイトの活性化の低減 ;

g) リン酸化または過剰リン酸化 t a u の量 ;

h) I S F または C S F における、全量 t a u または遊離 t a u の量 ;

i) 細胞内の t a u の N 末端フラグメントの量 ;

j) ニューロン過活動 ;

k) C S F における、A β 40 および／または A β 42 の量 ;

l) A β プラーク面積率 ;

m) ニューロンからの A β 40 および／または A β 42 の分泌 ;

n) アミロイド前駆体タンパク質 (A P P) プロモーター活性 ;

o) A P P m R N A および／またはタンパク質レベル ;

p) β -セクレターゼおよび／または γ -セクレターゼの活性 ;

q) A β 仲介シグナル伝達経路の活性化状態 ;

r) 細胞内全量 t a u または遊離 t a u の量 ;

s) I S F または C S F における、抗 t a u 抗体-結合 t a u の量、および

t) 細胞内抗 T a u 抗体-結合 t a u の量、

のうち、1 つまたはそれ以上の変化をもたらす、請求項 49 に記載の方法、請求項 50 に記載の抗体、または請求項 51 に記載の使用。

30

40

【請求項 53】

該抗体または医薬組成物の投与が、

a) 個体の認知機能の改善 ;

b) 個体の認知機能の低下率の低下 ;

c) 個体の運動機能の改善 ; および、

50

d) 個体の運動機能の低下率の低下

の1つまたはそれ以上をもたらす、請求項49に記載の方法、請求項50に記載の抗体、または請求項51に記載の使用。

【請求項54】

タウオパチーを処置する少なくとも1つの付加的薬物を投与することをさらに含む請求項49に記載の方法、またはタウオパチーを処置する少なくとも1つの付加的薬物をさらに含む、請求項50に記載の抗体、または請求項51に記載の使用。

【請求項55】

該投与が、静脈内または髄腔内に行われる、請求項49に記載の方法、または請求項50に記載の抗体、該処置が、抗体または医薬組成物の静脈内または髄腔内投与により行われる、請求項50に記載の抗体、または請求項51に記載の使用。

10

【請求項56】

TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を競合する抗体が、
(i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含む、VL CDR1、
(ii) 配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含む、VL CDR2、
(iii) 配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含む、VL CDR3、
(iv) 配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含む、VH CDR1、
(v) 配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含む、VH CDR2、および、
(vi) 配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含む、VH CDR3
を含む、請求項48から55のいずれか一項に記載の抗体、方法、または使用。

20

【請求項57】

TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を競合する抗体が、ヒト化軽鎖フレームワーク領域を含む、請求項48から56のいずれか一項に記載の抗体、方法または使用。

【請求項58】

TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を競合する抗体が、ヒト化重鎖フレームワーク領域を含む、請求項48から57のいずれか一項に記載の抗体、方法または使用。

【請求項59】

TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を競合する抗体が、リボソームに封入されている、請求項48から58のいずれか一項に記載の抗体、方法または使用。

30

【請求項60】

TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を競合する抗体が、血液脳関門の通過を促進する薬物と共に製剤される、請求項48から59のいずれか一項に記載の抗体、方法または使用。

【請求項61】

TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を競合する抗体が、血液脳関門の通過を促進する担体分子、ペプチドまたはタンパク質に直接またはリンカーを介して結合されている、請求項48から60のいずれか一項に記載の抗体、方法または使用。

40

【請求項62】

TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を競合する抗体が、Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、またはFab'である、請求項48から61のいずれか一項に記載の抗体、方法または使用。

【請求項63】

個体におけるタウオパチーの進行をモニターする方法であって、

a) 第一の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおけるTauポリペプチドの第一レベルを決定し、

b) 第二の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおけるTauポリペプチドの第二レベルを決定し、そして

50

c) T a u の第一レベルと T a u の第二レベルを比較すること（ここで、該決定は、i) 該生物学的サンプルを請求項 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の抗体と接触させ、i i) 該サンプル中に存在する T a u ポリペプチドへの抗体の結合を定量することを含む）を含む、方法。

【請求項 6 4】

生物学的サンプルが、脳脊髄液、血液、血漿、血清、尿、または唾液である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

定量された T a u ポリペプチドが全量 T a u ポリペプチドである、請求項 6 3 または 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

定量された T a u ポリペプチドが、完全長 T a u ポリペプチドの N 末端フラグメントである、請求項 6 3 または 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

第一の時点が処置レジメンの開始前の時点であり、第二の時点が処置レジメンの開始後の時点である、請求項 6 3 から 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

生きている個体において、インビボで T a u ポリペプチドを検出する方法であって、

a) 個体に請求項 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の抗体を投与し、

b) 個体の脳組織における t a u ポリペプチドへの抗体の結合を画像検査法を用いて検出することを含む、方法。

【請求項 6 9】

画像検査法における使用に好適な造影剤を含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

画像検査法が、磁気共鳴映像法または陽電子放出断層撮影法である、請求項 6 8 または 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

個体から得られた生物学的サンプルにおける T a u ポリペプチドのインビトロでの検出方法であって、

a) 生物学的サンプルを、T a u の N 末端領域内のエピトープへの結合を、i) 図 1 B に記載の抗体の軽鎖相補性決定領域 (C D R) ；および、図 1 A に記載の抗体の重鎖 C D R ；または

i i) 図 2 B に記載の抗体の軽鎖 C D R ；および、図 2 A に記載の抗体の重鎖 C D R ；を含む抗体と競合する抗体、と接触させ、

b) サンプル中に存在する T a u ポリペプチドへの抗体の結合を検出することを含む、方法。

【請求項 7 2】

生物学的サンプルが、血液、血清、血漿、尿、唾液、または脳脊髄液である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

個体が、タウオパチーを有する疑いがある、タウオパチーを有すると診断されている、またはタウオパチーの遺伝的発症素因を有する、請求項 7 1 または 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

該方法が定量法である、請求項 7 1 から 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

検出される T a u ポリペプチドが、全量 T a u ポリペプチドである、請求項 7 1 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

検出される T a u ポリペプチドが、完全長 T a u ポリペプチドの N 末端フラグメントである、請求項 7 1 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 77】

個体における神経細胞および／または細胞外液中の $A\beta_{40}$ および／または $A\beta_{42}$ のレベルを低下させる方法であって、個体に

- a) 有効量の、 τ ポリペプチドの N 末端領域に結合するヒト化抗体、または
- b) ヒト化抗体を含む医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 78】

N 末端領域が、 τ のアミノ酸 2-176 を含む、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

抗体が、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の抗体であり、医薬組成物が、請求項 34 から 43 のいずれか一項に記載の医薬製剤である、請求項 77 に記載の方法。 10

【請求項 80】

抗 $e\tau$ 抗体を用いる処置を施されている対象から得られた脳脊髄液 (CSF) または間質液 (ISF) のサンプルにおける、抗 $e\tau$ 抗体に結合しない細胞外 τ ($e\tau$) の量を決定する方法であって、

- a) 固定化抗体を対象から得られた CSF または ISF のサンプルと接触させ (ここで、該固定化抗体は、 $e\tau$ への結合に対して、対象に投与された抗 $e\tau$ 抗体と競合し、該接触は、固定化抗体への非結合型 $e\tau$ の結合に好適な条件下で行われる)、そして

- b) 固定化抗体に結合した $e\tau$ の量を決定すること (ここで、固定化抗体に結合する $e\tau$ の量は、サンプル中の抗 τ 抗体に結合しない $e\tau$ の量の指標である) を含む、方法。 20

【請求項 81】

固定化抗体に結合する $e\tau$ の量が、 $e\tau$ への結合に対して固定化抗体と競合しない、検出可能に標識した第三の抗体を用いて決定される、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

サンプルが脳脊髄液である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 83】

抗 $e\tau$ 抗体が治療的ヒト化抗 $e\tau$ 抗体である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 84】

抗 $e\tau$ 抗体が、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の抗体である、請求項 83 に記載の方法。 30

【請求項 85】

サンプル中の全量 τ レベルを決定することを含む、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 86】

サンプル中の結合していない τ のレベルを、抗 $e\tau$ 抗体での処置の前に個体から得られた CSF または ISF サンプル中の全量 τ レベルと比較することを含む、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 87】

結果を提供するレポートを作成することを含む、請求項 80 から 86 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 88】

比較したレベルに基づいて処置レジメンを調節することを含む、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 89】

治療的抗 $e\tau$ 抗体を用いる処置を施された対象から得られた脳脊髄液 (CSF) または間質液 (ISF) のサンプルにおける治療的抗 $e\tau$ 抗体に結合する細胞外 τ ($e\tau$) の量を決定する方法であって、

- a) 固定化抗体と対象から得られた CSF または ISF のサンプルを接触させ (ここで、固定化抗体は、 $e\tau$ への結合に対して、対象に投与された抗 $e\tau$ 抗体と競合せず 50

、該接触は、固定化抗体への治療的抗体に結合した e T a u の結合に好適な条件下で行われる)、そして

b) 固定化抗体に結合した治療的抗 e T a u / e T a u の量を決定すること(ここで、固定化抗体に結合する治療的抗 e T a u / e T a u の量は、サンプル中に存在する治療的抗体に結合した e T a u の量の指標である)

を含む、方法。

【請求項 90】

固定化抗体に結合する治療的抗 e T a u / e T a u の量が、治療的抗 e T a u 抗体に結合する、検出可能に標識した第三の抗体を用いて決定される、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

サンプルが脳脊髄液である、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 92】

治療的抗 e T a u 抗体がヒト化抗 e T a u 抗体である、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 93】

抗 e T a u 抗体が、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の抗体である、請求項 89 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2012年8月16日に出願した米国仮特許出願第61/683,902号、2013年1月18日に出願した同第61/754,085号、2013年3月14日に出願した同第61/781,823号、2013年4月19日に出願した同第61/813,797号、および2013年6月10日に出願した同第61/833,355号に基づいて優先権の利益を主張し、これらの仮特許出願の開示は、引用によりその全体を本明細書に包含させる。

【0002】

テキストファイルとして提供される配列表の引用による挿入

配列表は、2013年8月15日に作成された“IPRN-745WO SeqList_ST25.txt”と称されるテキストファイルとして提供され、69KBのサイズである。該テキストファイルの内容は、引用によりその全体を本明細書中に包含させる。

【背景技術】

【0003】

序章

微小管結合タンパク質 t a u は、中枢神経系に豊富に存在し、主にニューロンにより産生される。t a u の主要な機能は、微小管の安定化である。t a u の6種のイソ型が成人のヒト脳に存在する。t a u イソ型は、単一遺伝子の選択的スプライシングの産物である。

【0004】

タウオパチーは、いわゆる脳内の神経原線維変化(NFT)におけるt a u タンパク質の病的凝集の結果生じる神経変性疾患の1つである。タウオパチーのいくつかの例には、前頭側頭骨性認知症(FTD)、アルツハイマー病、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、および前頭側頭葉変性症が含まれる。

【0005】

当技術分野では、タウオパチーの処置方法、およびかかる方法における使用に好適な反応材が必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

概要

本発明は、抗T a u 抗体を投与することを含む、タウオパチーの処置方法を提供する。

10

20

30

40

50

本発明は、該方法における使用のための、抗 T a u 抗体、および該抗体を含む製剤もまた提供する。

【0007】

特徴

本発明は、T a u ポリペプチドのアミノ酸 1 5 - 2 4 内のエピトープに特異的に結合する単離されたヒト化モノクローナル抗体を提供する。ある場合において、エピトープは、リン酸化アミノ酸を含まない。ある場合において、エピトープは、ニトロ化アミノ酸を含まない。ある例において、エピトープは、リン酸化アミノ酸、ニトロ化アミノ酸、またはリン酸化アミノ酸およびニトロ化アミノ酸の両方を含む。

【0008】

本発明は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域およびヒト化重鎖フレームワーク領域を含む単離された抗体を提供し、ここで、単離された抗体は、T a u ポリペプチドの N 末端領域内のエピトープへの結合を、a) (i) 配列番号 1 または配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V_L C D R 1、(i i) 配列番号 2 または配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V_L C D R 2、および (i i i) 配列番号 3 または配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V_L C D R 3 を含む軽鎖領域、ならびに b) (i) 配列番号 4 または配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む V_H C D R 1、(i i) 配列番号 5 または配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む V_H C D R 2、および (i i i) 配列番号 6 または配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む V_H C D R 3 を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する。ある場合において、軽鎖領域および重鎖領域は、別個のポリペプチド中に存在する。ある場合において、軽鎖領域および重鎖領域は、単一のポリペプチド中に存在する。ある場合において、重鎖領域は、アイソタイプ I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 のものである。ある場合において、重鎖領域は、アイソタイプ I g G 4 のものである。これらの態様のいくつかにおいて、ヒンジ領域は S 2 4 1 P 置換を含む。例えば、Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105 を参照のこと。ある場合において、抗体は、F v、s c F v、F a b、F (a b') 2、または F a b' である。ある場合において、抗体は、共有結合した非ペプチド性合成ポリマー、例えば、ポリ(エチレングリコール)ポリマーを含む。ある場合において、抗体は、血液脳関門の通過を促進する担体分子、ペプチドまたはタンパク質に直接またはリンカーを介して結合されている。ある場合において、エピトープは、T a u ポリペプチドのアミノ酸 1 5 - 2 4 内にある。ある場合において、ヒト化軽鎖フレームワーク領域は、表 3 に記載のアミノ酸置換の 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 個を含む。ある例において、ヒト化重鎖フレームワーク領域は、表 2 に記載のアミノ酸置換の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1 または 1 2 個を含む。

【0009】

本発明は、抗体が、F v、s c F v、F a b、F (a b') 2、または F a b' である、単離された抗体であって、該抗体が、T a u ポリペプチドの N 末端領域内のエピトープへの結合を、a) (i) 配列番号 1 または配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V_L C D R 1、(i i) 配列番号 2 または配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V_L C D R 2、および (i i i) 配列番号 3 または配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V_L C D R 3、を含む軽鎖領域、ならびに、b) (i) 配列番号 4 または配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む V_H C D R 1、(i i) 配列番号 5 または配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む V_H C D R 2、および (i i i) 配列番号 6 または配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む V_H C D R 3、を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する、抗体を提供する。ある場合において、単離された抗体は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域を含む。ある場合において、ヒト化軽鎖フレームワーク領域は、表 3 に記載のアミノ酸置換の 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 個を含む。ある場合において、単離された抗体は、ヒト化重鎖フレームワーク領域を含む。ある場合において、ヒト化重鎖フレームワーク領域は、表 2 に記載のアミノ酸置換の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1 または 1 2 個を含む。

【0010】

本発明は、単離された抗体であって、該単離された抗体が、ヒト軽鎖定常領域およびヒ

ト重鎖定常領域を含み、単離された抗体が、T a uポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を、a) (i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1、(i i) 配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L CDR2、および(i i i) 配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L CDR3、を含む軽鎖領域、ならびに、b) (i) 配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H CDR1、(i i) 配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H CDR2、および(i i i) 配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H CDR3、を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する抗体を提供する。

【0011】

本発明は、a) 本発明の抗T a u抗体、およびb) 薬学的に許容される賦形剤、を含む医薬製剤を提供する。

10

【0012】

本発明は、a) (i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1、(i i) 配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L CDR2、(i i i) 配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L CDR3、(i v) 配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H CDR1、(v) 配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H CDR2、および(v i) 配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H CDR3、を含むT a uのN末端部分内のエピトープに特異的に結合する抗体、ならびに、b) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤、を含むエンドトキシン不含有の医薬製剤を提供する。ある場合において、抗体は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域を含む。ある場合において、ヒト化軽鎖フレームワーク領域は、表3に記載の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸置換を含む。ある場合において、抗体は、ヒト化重鎖フレームワーク領域を含む。ある場合において、ヒト化重鎖フレームワーク領域は、表2に記載の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個のアミノ酸置換を含む。ある場合において、抗体はリボソームに封入されている。ある場合において、抗体は、血液脳関門の通過を促進する薬物と共に製剤されている。ある場合において、抗体は、血液脳関門の通過を促進する担体分子、ペプチドまたはタンパク質に直接またはリンカーを介して結合されている。ある場合において、抗体は、Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、またはFab'である。

20

30

【0013】

本発明は、本発明の抗T a u抗体をコード化するヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターであって、該ヌクレオチド配列が、真核細胞において活性な転写調節要素に操作可能に連結されている、組換え発現ベクターを提供する。本発明は、本発明の組換え発現ベクターで遺伝子組み換えされたインビトロの宿主細胞を提供する。

【0014】

本発明は、本発明の医薬製剤を含む滅菌容器を提供する。ある場合において、該容器はシリンジである。

【0015】

本発明は、個体におけるタウオパチーの処置方法であって、本発明の抗T a u抗体または本発明の医薬組成物を該個体に投与することを含む方法を提供する。

40

【0016】

本発明は、個体におけるタウオパチーの処置方法であって、a) T a uポリペプチドのN末端領域中のエピトープへの結合に対して、i) 図1Bに記載の抗体の軽鎖相補性決定領域(CDR)、および図1Aに記載の抗体の重鎖CDR、またはi i) 図2Bに記載の抗体の軽鎖CDR、および図2Aに記載の抗体の重鎖CDR、を含む抗体と競合する抗体、ならびにb) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物を個体に投与することを含む方法を提供する。ある場合において、抗体は、(i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1、(i i) 配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L CDR2、(i i i) 配列番号3または配列番号9の

50

アミノ酸配列を含む V_L CDR 3、(i v) 配列番号 4 または配列番号 10 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 1、(v) 配列番号 5 または配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 2、および (v i) 配列番号 6 または配列番号 12 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 3、を含む。ある場合において、抗体は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域を含む。ある場合において、抗体は、ヒト化重鎖フレームワーク領域を含む。ある場合において、抗体は、リポソームに封入されている。ある場合において、抗体は、血液脳関門の通過を促進する薬物と共に製剤されている。ある場合において、抗体は、血液脳関門の通過を促進する担体分子、ペプチドまたはタンパク質に直接またはリンカーを介して結合されている。ある場合において、抗体は、Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、または Fab' である。ある場合において、静脈内に投与される。ある場合において、髄腔内に投与される。

10

【0017】

ある場合において、対象への抗 Tau 抗体の投与は、a) 脳組織における細胞外の遊離 tau の量、b) 間質液 (ISF) における細胞外遊離 tau の量、c) 脳脊髄液 (CSF) における細胞外の遊離 tau の量、d) ニューロンから他のニューロンへの tau の拡散、e) ニューロン内の tau 凝集量、f) ミクログリアおよび／またはアストロサイトの活性化の低減、g) リン酸化または過剰リン酸化 tau の量、h) ISF または CSF における、全量 tau または遊離 tau の量、i) 細胞内の tau の N 末端フラグメントの量、j) ニューロン過活動 (neuronal hyperactivity)、k) CSF における、Aβ40 および／または Aβ42 の量、l) Aβ プラーク面積率、m) ニューロンからの Aβ40 および／または Aβ42 の分泌、n) アミロイド前駆体タンパク質 (APP) プロモーター活性、o) APP mRNA および／またはタンパク質レベル、p) β-セクレターゼおよび／または γ-セクレターゼの活性、q) Aβ 仲介シグナル伝達経路の活性化状態、r) 細胞内全量 tau または遊離 tau の量、s) ISF または CSF における、抗 tau 抗体-結合 tau の量、および t) 細胞内抗 Tau 抗体-結合 tau の量、のうち 1 つまたはそれ以上の変化をもたらす。

20

【0018】

ある場合において、個体におけるタウオパチーを処置するための本発明の方法は、タウオパチーを処置する少なくとも 1 つの付加的薬物を投与することをさらに含む。

【0019】

本発明は、個体におけるタウオパチーの進行をモニターする方法であって、a) 第一の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおける Tau ポリペプチドの第一レベルを決定し、b) 第二の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおける Tau ポリペプチドの第二レベルを決定し、そして c) Tau の第一レベルと Tau の第二レベルを比較すること (ここで、該決定は、i) 該生物学的サンプルを請求項 1、5、16 および 21 のいずれか一項に記載の抗体と接触させ、i i) 該サンプル中に存在する Tau ポリペプチドへの抗体の結合を定量することを含む)、を含む方法を提供する。ある場合において、生物学的サンプルは、脳脊髄液、血液、血漿、血清、尿、または唾液である。ある場合において、定量された Tau ポリペプチドは全量 Tau ポリペプチドである。ある場合において、定量された Tau ポリペプチドは、完全長 Tau ポリペプチドの N 末端フラグメントである。ある場合において、第一の時点は、処置レジメンの開始前の時点であり、第二の時点は、処置レジメンの開始後の時点である。

30

40

【0020】

本発明は、生体中、インビボで Tau ポリペプチドを検出する方法であって、a) 個体に請求項 1、5、16、および 21 のいずれか一項に記載の抗体を投与し、b) 個体の脳組織における tau ポリペプチドへの抗体の結合を画像検査法を用いて検出すること、を含む方法を提供する。ある場合において、抗体は、画像検査法における使用に好適な造影剤を含む。ある場合において、画像検査法は、磁気共鳴映像法または陽電子放出断層撮影法である。

【0021】

50

本発明は、個体から得られた生物学的サンプルにおけるT a uポリペプチドのインビトロでの検出方法であって、a)生物学的サンプルを、T a uのN末端領域内のエピトープへの結合を競合する、i)図1 Bに記載の抗体の軽鎖相補性決定領域(C D R)、および図1 Aに記載の抗体の重鎖C D R、またはi i)図2 Bに記載の抗体の軽鎖C D R、および図2 Aに記載の抗体の重鎖C D R、を含む抗体と接触させ、そしてb)サンプル中に存在するT a uポリペプチドへの抗体の結合を検出すること、を含む方法を提供する。ある場合において、生物学的サンプルは、血液、血清、血漿、尿、唾液、または脳脊髄液である。ある場合において、個体は、タウオパチーを有する疑いがある、タウオパチーを有すると診断されている、またはタウオパチーの遺伝的発症素因を有する。ある場合において、該方法は定量法である。ある場合において、検出されるT a uポリペプチドは全量T a uポリペプチドである。ある場合において、検出されるT a uポリペプチドは、完全長T a uポリペプチドのN末端フラグメントである。

10

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1 Aおよび1 Bは、I P N 0 0 1 V H (図1 A) およびV L (図1 B) のアミノ酸配列を提供する。相補性決定領域(C D R)を太字および下線で示す。

【図2】図2 Aおよび2 Bは、I P N 0 0 2 V H (図2 A) およびV L (図2 B) のアミノ酸配列を提供する。相補性決定領域(C D R)を太字および下線で示す。

【図3】図3 A-Dは、皮質ニューロンにおけるT a u 仲介性膜電位脱分極に対する抗T a u 抗体の効果を示す。

20

【図4】図4 A-Cは、脳脊髄液(C S F)からのT a uのアフィニティー分離を示す。

【図5】図5は、T a uアフィニティー分離前および後のC S Fおよび馴化培地(C M)サンプルの定量化を示す。

【図6】図6 A-Dは、完全長ヒトT a uのアミノ酸配列を提供する。

【図7】図7は、P 3 0 1 L t a u マウスからの間質液(I S F)中、ならびに進行性核上性麻痺(P S P)およびアルツハイマー病(A D)患者からのC S F中のT a uフラグメントの検出を示す。

【図8】図8 A-Dは、細胞外t a u (e T a u)フラグメント(図8 A-C)による皮質ニューロン過活動(neuronal hyperactivity)の誘導、および抗T a u抗体I P N 0 0 1によるe T a u誘導性ニューロン過活動の誘導を示す。

30

【図9】図9は、ヒト化I P N 0 0 2 V H変異体1のアミノ酸配列、および該アミノ酸配列をコード化するヌクレオチドを示す。

【図10】図10は、ヒト化I P N 0 0 2 V H変異体2のアミノ酸配列、および該アミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列を示す。

【図11】図11は、ヒト化I P N 0 0 2 V H変異体3のアミノ酸配列、および該アミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列を示す。

【図12】図12は、ヒト化I P N 0 0 2 V H変異体4のアミノ酸配列、および該アミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列を示す。

【図13】図13は、ヒト化I P N 0 0 2 V κ変異体1のアミノ酸配列、および該アミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列を示す。

40

【図14】図14は、ヒト化I P N 0 0 2 V κ変異体2のアミノ酸配列、および該アミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列を示す。

【図15】図15は、ヒト化I P N 0 0 2 V κ変異体3のアミノ酸配列、および該アミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列を示す。

【図16】図16は、ヒト化I P N 0 0 2 V κ変異体4のアミノ酸配列、および該アミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列を示す。

【図17】図17は、ヒト化I P N-0 0 2 変異体のe T a uタンパク質への結合特性を示す表4を提供する。

【図18】図18は、ヒト化I P N-0 0 2 変異体のT a u-3 8 3への結合特性を示す表5を提供する。

50

【図19】図19Aおよび19Bは、ヒト化IPN002変異体の特徴を示す。図19Aは、iPSC-CN馴化培地；iPSC-CN溶解物；AD脳溶解物；P301L tauマウス脳皮質溶解物；および、カニクイザル脳溶解物の存在下での、ヒト化IPN002変異体のtauへの結合を示す。図19Bは、ヒト化IPN002変異体によるeTau誘導性ニューロン過活動(neuronal hyperactivity)の阻害を示す。

【図20】図20は、胎児のtauアミノ酸配列と整列させた、eTauフラグメントのアミノ酸配列を示す。

【図21】図21A-Cは、ヒト化抗Tau抗体(図21A)、キメラ抗体(図21B)、およびヒト化A33(図21C)に対する増殖応答を示す。

【図22】図22は、インビボでのリン酸化TauレベルへのIPN002の効果を示す。

【図23】図23は、IPN002での処理後の、間質液(ISF)中の遊離tauレベルおよび全量tauレベルの減少を示す。

【図24】図24は、IPN002での処理後の、脳脊髄液(CSF)中の遊離tauレベルの減少を示す。

【図25】図25は、IPN002によるeTau誘導性ニューロン過活動(neuronal hyperactivity)の低減を示す。

【図26】図26は、慢性外傷性脳症の可能性のある個体由来のCSF中のTauフラグメントの存在を示す。

【図27】図27は、固相アッセイを用いた、合成tauペプチドへのIPN002のヒト化変異体の結合を示す。

【図28】図28は、液相アッセイを用いた、合成tauペプチドへのIPN002のヒト化変異体の結合を示す。

【図29】図29は、組み換えTauおよびPADペプチドへのIPN002のヒト化変異体の結合を示す。

【図30】図30は、IPN002のヒト化変異体への結合に対する、合成tauペプチドの非ビオチニル化形態と合成tauペプチドのビオチニル化形態の競合を示す。

【図31】図31は、P310Lマウスモデルにおけるクラスピングスコア(clasping score)に対する、対照IgG、PHF1、またはIPN002の投与の効果を示す。

【図32】図32は、P310Lマウスモデルの梁歩行試験(beam walk test)における平均遅延時間(average latency)に対する対照IgG、PHF1、またはIPN002の投与の効果を示す。

【図33】図33は、P310LマウスモデルのCSFサンプルにおける遊離tau(抗Tau抗体に結合しないtau)レベルに対する対照IgG、PHF1、またはIPN002の投与の効果を示す。

【図34】図34は、eTau1a誘導性ニューロン過剰興奮性の抗体による阻害を示す。

【図35】図35は、皮質ニューロンにおけるニューロン過剰興奮性に対する、インビトロでの完全長のPHF1-反応性tau、またはeTau1aの効果を図示する。

【図36】図36は、皮質ニューロンにおけるニューロン過剰興奮性に対する、インビトロでの完全長のPHF1-反応性tau、またはeTau1aの効果を示す。

【図37】図37は、皮質ニューロンから分泌されるAβ40(左パネル)またはAβ42(右パネル)のレベルに対する、対照IgG、BACE阻害剤、またはIPN002の効果を示す。

【図38】図38は、主に皮質ニューロンから分泌されるAβ40のレベルに対する対照IgG、BACE阻害剤、または抗Tau抗体の効果を示す。

【図39】図39は、主に皮質ニューロンから分泌されるAβ42のレベルに対する対照IgG、BACE阻害剤、または抗Tau抗体の効果を示す。

【図40】図40は、IPN002のヒト化変異体(hu-IPN002)のエピトープマッピングの結果を示す。

10

20

30

40

50

【図 4 1】図 4 1 は、C S F における種々の t a u ポリペプチドを検出するためのアッセイを示す。

【図 4 2】図 4 2 は、I P N 0 0 2、P H F 1、または T a u の C 末端中の直鎖状エピトープ（p A b - t a u 直鎖状エピトープ）を結合するポリクローナル抗体による、C S F における T a u の結合を示す。

【図 4 3】図 4 3 は、P 3 0 1 L マウスにおける C S F 中の全量 t a u レベルに対する対照 I g G、P H F 1、または I P N 0 0 2 処理の効果を示す。

【図 4 4】図 4 4 A - H は、P 3 0 1 L マウスにおける種々の脳領域および組織中の A T 8 ホスホ T a u に対する対照 I g G、P H F 1、または I P N 0 0 2 処理の効果を示す。

【図 4 5】図 4 5 A - E は、P 3 0 1 L マウスにおける種々の脳領域および組織中のリン酸化 T a u レベルに対する対照 I g G、P H F 1、または I P N 0 0 2 処理の効果を示す。

【図 4 6】図 4 6 は、P 3 0 1 L マウスにおける後脳中の A T 8 ホスホ T a u 組織学的レベルに対する対照 I g G、P H F 1、または I P N 0 0 2 処理の効果を示す。

【図 4 7】図 4 7 は、P 3 0 1 L マウスにおける後脳中の A T 1 0 0 ホスホ T a u 組織学的レベルに対する対照 I g G、P H F 1、または I P N 0 0 2 処理の効果を示す。

【図 4 8】図 4 8 A および 4 8 B は、P 3 0 1 L マウスにおける海馬ホモジネートおよび皮質ホモジネート中の G F A P タンパク質レベルに対する対照 I g G、P H F 1、または I P N 0 0 2 処理の効果を示す。

【図 4 9】図 4 9 A および 4 9 B は、P 3 0 1 L マウスにおける海馬ホモジネートおよび皮質ホモジネート中の I b a 1 タンパク質レベルに対する対照 I g G、P H F 1、または I P N 0 0 2 処理の効果を示す。

【図 5 0】図 5 0 A および 5 0 B は、P 3 0 1 L マウスにおける皮質ホモジネートおよび皮質 S 1 画分中の A β 4 0 レベルに対する対照 I g G、P H F 1、または I P N 0 0 2 処理の効果を示す。

【図 5 1】図 5 1 は、P 3 1 0 L マウスにおいて梁歩行試験を行うことができるマウスの割合に対する、対照 I g G、P H F 1、または I P N 0 0 2 処理の効果を示す。

【図 5 2】図 5 2 は、種々の T a u ペプチドへの h u - I P N 0 0 2 の結合を示す。

【図 5 3】図 5 3 は、h u - I P N 0 0 2 への種々のビオチニル化 T a u ペプチドの結合を示す。

【図 5 4】図 5 4 A および 5 4 B は、I P N 0 0 2 に結合しない T a u （遊離 T a u ）（図 5 4 A）、および I P N 0 0 2 に結合する T a u （結合 T a u ）（図 5 4 B）用のアッセイの略図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

定義

用語“抗体”および“免疫グロブリン”には、抗体または何れかのアイソタイプの免疫グロブリン、F a b、F v、s c F v、および F d フラグメント、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、および抗体の抗原結合部分と非抗体タンパク質を含む融合タンパク質を含むが、これらに限定されない、抗原への特異的結合性を有する抗体のフラグメントが含まれる。抗体は、例えば、放射性同位体で、検出可能な産物、蛍光タンパク質を生じる酵素などで検出可能に標識することができる。抗体は、特異的結合対のメンバー、例えば、ビオチン（ビオチン-アビジン特異的結合対のメンバー）などのような他の部分とさらに結合されていてよい。抗体はまた、ポリスチレンプレートまたはビーズなどを含むが、これらに限定されない、固体支持体に結合されていてよい。該用語はまた、F a b'、F v、F（a b'）₂、および／または抗原への特異的結合性を有する他の抗体フラグメント、およびモノクローナル抗体を包含する。抗体は、一価でも二価でもよい。

【0024】

本明細書に用いる用語“ヒト化免疫グロブリン”は、異なる起源の免疫グロブリンの複

10

20

30

40

50

数部分を含む免疫グロブリンであって、少なくとも1つの部分がヒト起源のアミノ酸配列を含む免疫グロブリンを意味する。例えば、ヒト化抗体は、例えばマウスのような、必要な特異性を有する非ヒト起源の免疫グロブリンに由来する複数部分、およびヒト起源の免疫グロブリン配列に由来する部分を含み（例えば、キメラ免疫グロブリン）、それらは、従来技術（例えば、合成）により化学的に共に結合されるか、または遺伝子操作技術を用いて（例えば、キメラ抗体のタンパク質部分をコード化するDNAが発現されて、隣接するポリペプチド鎖を生じる）、隣接するポリペプチドとして生成される。ヒト化免疫グロブリンの別の例は、非ヒト起源の抗体に由来するCDRおよびヒト起源の軽鎖および／または重鎖に由来するフレームワーク領域を含む、1つまたはそれ以上の免疫グロブリン鎖を含む免疫グロブリン（例えば、フレームワーク変化を有する、または有しないCDR移植抗体）である。キメラまたはCDR移植一本鎖抗体はまた、用語ヒト化免疫グロブリンに包含される。一本鎖抗体に関して、例えば、Cabillyらの、米国特許番号第4,816,567号；Cabillyらの、欧州特許番号第0,125,023 B1号；Bossらの、米国特許番号第4,816,397号；Bossらの、欧州特許番号第0,120,694 B1号；Neuberger, M. S. らの、WO 86/01533；Neuberger, M. S. らの、欧州特許番号第0,194,276 B1号；Winterの、米国特許番号第5,225,539号；Winterの、欧州特許番号第0,239,400 B1号；Padlan, E. A. らの、欧州特許出願番号第0,519,596 A1号を参照のこと。また、adnerらの、米国特許番号第4,946,778号；Hustonの米国特許番号第5,476,786号；および Bird, R. E. et al., Science, 242: 423-426 (1988)を参照のこと。

10

【0025】

20

例えば、ヒト化免疫グロブリンは、合成および／または組み換え核酸を用いて製造され、所望のヒト化鎖をコード化する遺伝子（例えば、cDNA）を製造することができる。例えば、ヒト化可変領域をコードする核酸（例えば、DNA）配列は、PCR変異導入法を用いて構築され、改変前のヒト化可変領域をDNAテンプレートのようなヒトまたはヒト化鎖をコード化するDNA配列に改変することができる（例えば、Kamman, M., et al., Nucl. Acids Res., 17: 5404 (1989)；Sato, K., et al., Cancer Research, 53: 851-856 (1993)；Daugherty, B. L. et al., Nucleic Acids Res., 19(9): 2471-2476 (1991)；および、Lewis, A. P. and J. S. Crowe, Gene, 101: 297-302 (1991)を参照のこと）。これらの、または他の好適な方法を用いて、変異体を容易に製造することも可能である。例えば、クローン化された可変領域に変異導入することができ、所望の特異性を有する変異体をコードする配列を選択することができる（例えば、ファージライブラリから；例えば、Krebber et al., U.S. Pat. No. 5,514,548；Hoogenboom et al., WO 93/06213, published Apr. 1, 1993)を参照のこと）。

30

【0026】

“抗体フラグメント”は、インタクト抗体の一部、例えば、インタクト抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント；二重特異性抗体；直鎖状抗体(Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995))；一本鎖抗体分子；ならびに、抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が含まれる。抗体のパパイン消化により、“Fab”フラグメントと呼ばれる2つの同一の抗原結合フラグメント（それぞれが1つの抗原結合部位を有する）、および残りの“Fc”フラグメント（容易に結晶化する能力によりそのように呼ばれる）を生じる。ペプシン処理によって、2つの抗原結合部位を有し、かつ依然として抗原と結合することができるF(ab')₂フラグメントを生じる。

40

【0027】

“Fv”は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小限の抗体フラグメントである。この領域は、強力な非共有結合で連結した1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインの二量体から構成される。それぞれの可変ドメインの3つのCDRが相互作用して、V_H-V_L二量体の表面に抗原結合部位を画定する構造をとる。すなわち、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（または、抗原に特異性のある3つのCDRのみを含む半分のFv）でさえも、抗原を認識し結

50

合する能力を有するが、結合部位全体よりも親和性は低い。

【0028】

“Fabフラグメント”もまた、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第1定常ドメイン(CH_1)を含む。Fabフラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の1つまたはそれ以上のシステインを含む重鎖 CH_1 ドメインのカルボキシ末端にいくつかの残基を付加することによって、Fab'フラグメントとは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基(複数)が1つの遊離チオール基を有するFab'の本明細書における名称である。F(ab')₂抗体フラグメントは、元々、Fab'フラグメント間にヒンジシステインを有する一対のFab'フラグメントとして産生された。抗体フラグメントの他の化学的結合も知られている。

10

【0029】

任意の脊椎動物種由来の抗体(免疫グロブリン)の“軽鎖”を、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)およびラムダ(λ)と呼ばれる、明確に区別される2つの型のうちの1つに割り当てることができる。免疫グロブリンは、それらの重鎖定常ドメインのアミノ酸配列によって種々のクラスに分類される。免疫グロブリンには5つの主なクラス、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2にさらに分類され得る。

【0030】

“一本鎖Fv”または“sFv”抗体フラグメントは、抗体の V_H および V_L ドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。ある態様において、Fvポリペプチドは、 V_H と V_L ドメインの間にあるポリペプチドリinkerをさらに含み、これは、抗原結合のためにscFvが所望の構造に形成することを可能にする。scFvについての検討は、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 1 13, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照のこと。

20

【0031】

用語“二重特異性抗体”は、2つの抗原結合部位を有する小型抗体フラグメントであり、該フラグメントは、同じポリペプチド鎖において軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合している重鎖可変ドメイン(V_H)(V_H-V_L)を含む。同じ鎖内で2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、該ドメインは別の鎖の相補ドメインと対を形成して、2つの抗原結合部位を作り出す。二重特異性抗体は、例えば、EP404, 097; WO93/11161; およびHollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448においてより詳細に記載されている。

30

【0032】

本明細書で用いる用語“親和性”は、2つの物質(例えば、抗体および抗原)の可逆的結合の平衡定数を意味し、解離定数(K_d)として示される。親和性は、関係のないアミノ酸配列に対する抗体の親和性より高く、少なくとも1倍以上、少なくとも2倍以上、少なくとも3倍以上、少なくとも4倍以上、少なくとも5倍以上、少なくとも6倍以上、少なくとも7倍以上、少なくとも8倍以上、少なくとも9倍以上、少なくとも10倍以上、少なくとも20倍以上、少なくとも30倍以上、少なくとも40倍以上、少なくとも50倍以上、少なくとも60倍以上、少なくとも70倍以上、少なくとも80倍以上、少なくとも90倍以上、少なくとも100倍以上、または少なくとも1000倍以上、またはそれ以上であり得る。標的タンパク質に対する抗体の親和性は、例えば、約100ナノモル(nM)ないし約0.1 nM、約100 nMないし約1ピコモル(pM)、または約100 nMないし約1フェムトモル(fM)またはそれ以上であり得る。本明細書で用いる用語“親和力(avidity)”は、2種以上の物質の複合体の希釈後の解離に対する抵抗性を意味する。用語“免疫反応性”および“特異的結合(preferentially binds)”は、本明細書中、抗体および/または抗原結合フラグメントに対して互換的に用いられている。

40

【0033】

50

用語“結合”は、例えば、塩架橋および水架橋のような相互作用を含む、共有結合、静電的結合、疎水性結合、ならびにイオン結合および／または水素結合相互作用による、2つの分子間の直接結合を意味する。本発明の抗T a u抗体は、T a uポリペプチド内のエピトープに特異的に結合する。非特異的結合は、約 10^{-7} M未満の親和性での結合、例えば、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} Mなどの親和性での結合を意味し得る。

【0034】

本明細書で用いる用語“CDR”または“相補性決定領域”は、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見出される不連続な抗原結合部位を意味することが意図される。CDRは、Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); および、MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)に記載されており、ここでは、定義は、互いを比較したとき、アミノ酸残基の重複または一部を含む。しかしながら、抗体もしくは移植抗体またはその変異体のCDRについての定義の適用は、本明細書で定義され、かつ使用される用語の範囲内であることが意図される。上記の文献の何れかに定義されるCDRを含むアミノ酸残基は、以下の表1に比較して記載される。

【表1】

表1：CDR 定義

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹上記Kabatらの命名法による残基の番号付け

²上記Chothiaらの命名法による残基の番号付け

³上記MacCallumらの命名法による残基の番号付け

【0035】

本明細書で用いる用語“フレームワーク”は、抗体の可変領域に関して用いるとき、抗体の可変領域内のCDR領域の外側の全てのアミノ酸残基を意味することを意図する。可変領域フレームワークは、一般的に、約100-120個のアミノ酸長の不連続なアミノ酸配列であるが、CDRの外側のアミノ酸のみを意味することが意図される。本明細書で用いる用語“フレームワーク領域”は、CDRにより分断されるフレームワークの各ドメインを意味することが意図される。

【0036】

“単離された”抗体とは、天然環境の成分から同定、分離および／または回収されたものである。天然環境の混入成分は、抗体の診断用途または治療用途を妨げる物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性もしくは非タンパク質性溶質を含み得る。ある態様において、抗体は、(1) ローリー法で決定したとき、抗体が90重量%以上、95重量%以上、または98重量%以上、例えば、99重量%を越えるまで精製され、(2) スピニングカップシーケンエーター (spinning cup sequenator) の使用によってN末端もしくは内部のアミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで精製され、または(3) クマシーブルーまたは銀染色を用いる還元または非還元条件下のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で均質になるまで精製される。単離された抗体には、抗体の天然環境の少なくとも1つの成分も存在しないので、組換え細胞内に存在する抗体が含まれる。ある例において、単離された抗体は、少な

くとも1つの精製ステップによって調製され得る。

【0037】

本明細書中、互換的に用いられる用語“ポリペプチド”、“ペプチド”および“タンパク質”は、何れかの長さのアミノ酸の多量体形態を意味し、それには、遺伝子的にコード化されたおよび非遺伝的にコード化されたアミノ酸、化学的または生化学的に修飾または誘導化されたアミノ酸、ならびに修飾ペプチド主鎖を有するポリペプチドが含まれ得る。該用語は、融合タンパク質を含み、異種アミノ酸配列を含む融合タンパク質、異種および同種リーダー配列を含む融合タンパク質、N末端メチオニン残基を有する、または有しないもの、免疫学的タグ付加タンパク質などを含むがこれらに限定されない。

【0038】

本明細書で用いる用語“処置”、“処置する”などは、所望の薬理学的および／もしくは生理学的効果を得ることを意味する。該効果は、疾患またはその症状の完全または部分的な防止という点で予防的であってよく、かつ／または、疾患および／もしくは該疾患に起因する有害作用に関する部分的または完全な治癒という点で治療的であってもよい。本明細書で用いる“処置”とは、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の全ての処置を包含し、以下の段階を含む。(a) 疾病の素因を持ちうるが、それを有するとまだ診断されていない対象において、疾病の発症を防止する段階、(b) 疾病を阻害する、すなわち、その進行を阻止する段階、および(c) 疾病を緩和する、すなわち、疾病を緩解させる段階。

【0039】

本明細書中、互換的に用いられる用語“個体”、“対象”、“宿主”および“患者”は、マウス(ラット、マウス)、非ヒト霊長類、ヒト、イヌ科、ネコ科、有蹄動物(例えば、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ)などを含むがこれらに限定されない哺乳動物を意味する。

【0040】

“治療の有効量”または“有効量”は、疾患の処置のために哺乳動物または他の対象に投与されるとき、疾患のそのような処置に有効である十分量、抗T_au抗体の量を意味する。“治療の有効量”は、抗T_au抗体、疾患およびその重篤度ならびに処置される対象の年齢、体重などによって変わり得る。

【0041】

“生物学的サンプル”は、個体から得られる種々のサンプルタイプを包含し、診断またはモニタリングアッセイで使用され得る。定義は、生物学的起源の血液および他の液状サンプル、生検標本または組織培養物もしくはそれらに由来する細胞およびその子孫細胞のような固体組織サンプルを包含する。定義はまた、それらを入手後に何れかの方法、例えば、試薬での処理、可溶化、またはポリヌクレオチドのようなある成分の富化により、操作されたサンプルを包含する。用語“生物学的サンプル”は、臨床サンプルを包含し、また、培養細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、生物学的液体、および組織サンプルを包含する。用語“生物学的サンプル”は、尿、唾液、脳脊髄液、血漿および血清のような血液画分などを含む。

【0042】

本発明をさらに記載する前に、本発明が記載される特定の態様に限定されることなく、もちろん変更されてもよいことが理解されるべきである。また、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定され得るため、本明細書で用いる用語は、特定の態様のみを記載する目的であり、限定を意図しないことが理解されるべきである。

【0043】

値の範囲が記載されるとき、その範囲の上限および下限との間の全ての値、他に明確に特記されない限り、下限の単位の10分の1まで、何らかの他の記載または記載の範囲内の間の値は、本発明に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限および下限は、その小さい範囲に独立して包含され得て、また、本発明の範囲内に包含され、特に記載の範囲に限定されることを意図しない。記載される範囲が、限定の一方または両方を包含するとき、それが包含する限定のどちらかまたは両方を除く範囲もまた、本発明

10

20

30

40

50

に包含される。

【0044】

他に特記されない限り、本明細書に用いる全ての技術および科学用語は、本発明の属する技術分野の当業者に通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載の方法および物質と同様のまたは均等な方法および物質もまた、本発明の実施または試験に使用され得るが、好ましい方法および物質が本明細書中に記載される。本明細書に記載の全ての文献は、引用により、その文献が引用される事柄に関する方法および／または物質についての開示および記載が本明細書中に包含される。

【0045】

本明細書中、他に明確に記載がない限り、本明細書中および添付の特許請求の範囲における単数形“a”、“an”および“the”は、複数の意味を含むことが特記されるべきである。従って、例えば、“ヒト化抗Tau抗体”との記載は、そのような抗体の複数を包含し、“タウオパチー”との記載は、1種またはそれ以上のタウオパチーおよび当業者に公知のそれらと同等の疾患などが包含される。さらに、特許請求の範囲は、何らかの任意の要素を除くように記載され得ることが特記される。そのようなものとして、この記載は、“単に”、“のみ”などの排他的用語の使用および特許請求の範囲の要素の記載に関して同様の使用、または“ネガティブ”な限定の使用に対する先行記載となることが意図される。

【0046】

明確にするために、本明細書中、別個の態様で記載される本発明の一定の特徴はまた、単一の態様の組み合わせで提供され得ることが認められている。逆に言えば、簡単にするために、一態様で記載される本発明の種々の特徴はまた、別個に、または任意の好適な下位の組み合わせで提供され得る。全ての本発明に関する態様の組み合わせは、特に本発明に包含され、各々のおよび全ての組み合わせが、個々に、および明確に記載されているように、本明細書に記載される。さらに、種々の態様およびその要素の全ての下位の組み合わせもまた、本発明に特に包含され、各々のおよび全てのかかる下位の組み合わせが、個々に、および明確に記載されているように、本明細書に記載される。

【0047】

本明細書に記載の文献は、本出願の出願日前にそれらの開示内容を単に提供するにすぎない。それらの何れも、本発明が、先行発明として、かかる文献に先行しないと認めるとの認識と解されるべきではない。さらに、提供される文献の出版日は、実際の出版日とは異なり得るので、個々に確認される必要がある。

【0048】

詳細な記載

本発明は、抗Tau抗体を投与することを含む、タウオパチーの処置方法を提供する。本発明はまた、抗Tau抗体、それを含む製剤、または該方法におけるそれらの使用を記載する。本発明は、インビトロおよびインビボにおける、本明細書に記載の抗Tau抗体を用いる検出方法をさらに提供する。

【0049】

タウオパチーの処置方法

本発明は、タウオパチーの処置方法を提供する。該方法は、一般的に、有効量の本発明の抗Tau抗体を、それを必要とする個体に投与することを伴う。ある場合において、対象への抗Tau抗体の投与は、個体の細胞、組織、または体液における病理的tauポリペプチドのレベルを低減させ、タウオパチーを処置する。

【0050】

例えば、ある態様において、本発明の方法は、有効量の単離されたヒト化モノクローナル抗体であって、Tauポリペプチドのアミノ酸15-24内のエピトープに特異的に結合する抗体を、それを必要とする個体に投与することを含み得る。ある態様において、抗体は、薬学的に許容される賦形剤、例えば、ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤として存在する。

【0051】

例えば、ある態様において、本発明の方法は、有効量の、ヒト化軽鎖フレームワーク領域およびヒト化重鎖フレームワーク領域を含む単離された抗体であって、該単離された抗体が、T a uポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を、a) (i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1、(i i) 配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L CDR2、および(i i i) 配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L CDR3を含む軽鎖領域、ならびにb) (i) 配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H CDR1、(i i) 配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H CDR2、および(i i i) 配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H CDR3を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する抗体を、それを必要とする個体に投与することを含み得る。ある態様において、抗体は、薬学的に許容される賦形剤、例えば、ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤として存在する。

【0052】

例えば、ある態様において、本発明の方法は、有効量の、F v、s c F v、F a b、F (a b')₂、またはF a b'である単離された抗体であって、該抗体が、T a uポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を、a) (i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1、(i i) 配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L CDR2、および(i i i) 配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L CDR3、を含む軽鎖領域、ならびにb) (i) 配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H CDR1、(i i) 配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H CDR2、および(i i i) 配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H CDR3を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する抗体を、それを必要とする個体に投与することを含み得る。ある態様において、抗体は、薬学的に許容される賦形剤、例えば、ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤として存在する。

【0053】

例えば、ある態様において、本発明の方法は、有効量の、ヒト軽鎖定常領域およびヒト重鎖定常領域を含む単離された抗体であって、該単離された抗体が、T a uポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を、a) (i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1、(i i) 配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L CDR2、および(i i i) 配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L CDR3を含む軽鎖領域、ならびにb) (i) 配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H CDR1、(i i) 配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H CDR2、および(i i i) 配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H CDR3を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する抗体を、それを必要とする個体に投与することを含み得る。ある態様において、抗体は、薬学的に許容される賦形剤、例えば、ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤として存在する。

【0054】

本発明の抗T a u抗体は、細胞外t a uに結合する。本明細書で用いる“細胞外t a u”(“e T a u”)は、脳脊髄液(C S F)または間質液(I S F)中で検出され得る何れかのT a uポリペプチドを包含する。ある態様において、e T a uは、175アミノ酸長を有し、完全長t a uのアミノ酸2-176を含むポリペプチドである。例えば、ある態様において、e T a uは、配列番号45に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。ある態様において、e T a uは、171アミノ酸長を有し、完全長t a uのアミノ酸2-172(配列番号44)を含むポリペプチドである。例えば、ある態様において、e T a uは、配列番号44に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。ある態様において、e T a uは、配列番号46に記載のアミノ酸配列を含む、e T a u-2ポリペプチドである。ある態様において、e T a uは、配列番号47に記載のアミノ酸配列を含む、

e T a u - 3 ポリペプチドである。ある態様において、e T a u は、配列番号 48 に記載のアミノ酸配列を含む、e T a u - 4 ポリペプチドである。

【0055】

ある場合において、e T a u ポリペプチドは、約 50 アミノ酸～約 175 アミノ酸長、例えば、約 50 アミノ酸 (a a) ～約 75 a a、約 75 a a ～約 100 a a、約 100 a a ～約 125 a a、約 125 a a ～約 150 a a、または約 150 a a ～約 175 a a の長さを有し、完全長 t a u のアミノ酸 2 - 176 の、約 50 ～約 75、約 75 ～約 100、約 100 ～約 125、約 125 ～約 150、または約 150 ～約 175 の隣接アミノ酸を含み得る。e T a u ポリペプチドの例を図 20 に記載する。

【0056】

以下に、より詳細に記載するとおり、本発明の抗 T a u 抗体は T a u に特異的に結合し、該抗体によって結合されるエピトープは直鎖状エピトープであり、T a u のアミノ末端 (N 末端) 部分内の、例えば、T a u のアミノ酸 1 - 25 内の、T a u のアミノ酸 1 - 18 内の、T a u のアミノ酸 9 - 18 内の、T a u のアミノ酸 13 - 24 内の、T a u のアミノ酸 15 - 44 内の、または T a u のアミノ酸 15 - 24 内のアミノ酸残基を含む。ヒト T a u イソ型のアミノ酸配列を、図 6 A - D に示す。T a u のアミノ酸 1 - 18 は、M A E P R Q E F E V M E D H A G T Y (配列番号 53) である。例えば、Garcia-Sierra et al. (2003) J. Alzheimer's Disease 5:65; および、Horowitz et al. (2004) J. Neurosci. 24:7895 を参照のこと。T a u のアミノ酸 15 - 24 は、A G T Y G L G D R K (配列番号 51) である。

【0057】

ある態様において、本発明の抗 T a u 抗体は T a u に特異的に結合し、該抗体によって結合されるエピトープは直鎖状エピトープであり、T a u のアミノ酸 1 - 25 内、T a u のアミノ酸 13 - 24 内、または T a u のアミノ酸 15 - 24 内のアミノ酸残基を含む。ある場合において、本発明のヒト化抗 T a u 抗体は、T a u のアミノ酸 1 - 25 内、T a u のアミノ酸 13 - 24 内、または T a u のアミノ酸 15 - 24 内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープは、リン酸化アミノ酸を含まない。ある場合において、本発明のヒト化抗 T a u 抗体は、T a u のアミノ酸 1 - 25 内、T a u のアミノ酸 13 - 24 内、または T a u のアミノ酸 15 - 24 内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープは、リン酸化アミノ酸を含む。ある場合において、本発明のヒト化抗 T a u 抗体は、T a u のアミノ酸 1 - 25 内、T a u のアミノ酸 13 - 24 内、または T a u のアミノ酸 15 - 24 内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープは、ニトロ化アミノ酸を含まない。ある場合において、本発明のヒト化抗 T a u 抗体は、T a u のアミノ酸 1 - 25 内、T a u のアミノ酸 13 - 24 内、または T a u のアミノ酸 15 - 24 内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープは、ニトロ化アミノ酸を含む。ある場合において、本発明のヒト化抗 T a u 抗体は、T a u のアミノ酸 1 - 25 内、T a u のアミノ酸 13 - 24 内、または T a u のアミノ酸 15 - 24 内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープは、リン酸化アミノ酸を含み、ニトロ化アミノ酸を含まない。ある場合において、本発明のヒト化抗 T a u 抗体は、T a u のアミノ酸 1 - 25 内、T a u のアミノ酸 13 - 24 内、または T a u のアミノ酸 15 - 24 内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープは、リン酸化アミノ酸を含み、ニトロ化アミノ酸を含まない。ある場合において、本発明のヒト化抗 T a u 抗体は、T a u のアミノ酸 1 - 25 内、T a u のアミノ酸 13 - 24 内、または T a u のアミノ酸 15 - 24 内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープは、ニトロ化アミノ酸およびリン酸化アミノ酸を含む。

【0058】

例えば、ある態様において、本発明の抗 T a u 抗体は、T a u のアミノ酸 A G T Y G L G D R K (配列番号 51) 内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合する

。ある態様において、本発明のヒト化抗T a u抗体は、T a uのアミノ酸A G T Y G L G D R K（配列番号51）内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合する。

【0059】

ある場合において、本発明のヒト化抗T a u抗体は、T a uのアミノ酸A G T Y G L G D R K（配列番号51）内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープはリン酸化アミノ酸を含まない。ある場合において、本発明のヒト化抗T a u抗体は、T a uのアミノ酸A G T Y G L G D R K（配列番号51）内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープは、リン酸化アミノ酸を含む。ある場合において、本発明のヒト化抗T a u抗体は、T a uのアミノ酸A G T Y G L G D R K（配列番号51）内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープはニトロ化アミノ酸を含まない。ある場合において、本発明のヒト化抗T a u抗体は、T a uのアミノ酸A G T Y G L G D R K（配列番号51）内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープは、ニトロ化アミノ酸を含む。ある場合において、本発明のヒト化抗T a u抗体は、T a uのアミノ酸A G T Y G L G D R K（配列番号51）内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープはニトロ化アミノ酸を含み、リン酸化アミノ酸を含まない。ある場合において、本発明のヒト化抗T a u抗体は、T a uのアミノ酸A G T Y G L G D R K（配列番号51）内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープはリン酸化アミノ酸を含み、ニトロ化アミノ酸を含まない。ある場合において、本発明のヒト化抗T a u抗体は、T a uのアミノ酸A G T Y G L G D R K（配列番号51）内のアミノ酸残基を含む直鎖状エピトープに特異的に結合し、ここで、該エピトープは、ニトロ化アミノ酸およびリン酸化アミノ酸を含む。

【0060】

ある場合において、本発明のタウオパチーの処置のための方法は、a) i) 1、2または3個の図1に記載の抗体の軽鎖相補性決定領域（C D R）、および1、2または3個の図1に記載の抗体の重鎖C D R、またはi i) 1、2または3個の図2に記載の抗体の軽鎖C D R、および1、2または3個の図2に記載の抗体の重鎖C D R、を含む抗T a u抗体、ならびにb) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物を、それを必要とする個体に投与することを含む。

【0061】

ある場合において、本発明のタウオパチーの処置のための方法は、a) ヒトT a uポリペプチド内のエピトープに特異的に結合する抗体であって、エピトープへの結合に関して、i) 図1 Bに記載の抗体の軽鎖相補性決定領域（C D R）、および図1 Aに記載の抗体の重鎖C D R、またはi i) 図2 Bに記載の抗体の軽鎖C D R、および図2 Aに記載の抗体の重鎖C D R、を含む抗体と競合する抗体、ならびにb) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物を、それを必要とする個体に投与することを含む。

【0062】

ある場合において、本発明のタウオパチーの処置のための方法は、a) h u - I P N 0 0 2（例えば、T a uのN末端部分内、例えば、T a uのアミノ酸1 - 2 5内、T a uのアミノ酸1 - 1 8内、T a uのアミノ酸9 - 1 8内、T a uのアミノ酸1 5 - 4 4内、T a uのアミノ酸1 3 - 2 4内、またはT a uのアミノ酸1 5 - 2 4内の直鎖状エピトープ）により認識される、T a u中のエピトープへの結合を、ヒト化I P N 0 0 2（h u - I P N 0 0 2）と競合する抗体、ならびにb) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物を、それを必要とする個体に投与することを含む。

【0063】

I P N 0 0 1（本明細書中、“I P N 1”または“I P N - 1”とも言う）およびI P N 0 0 2（本明細書中、“I P N 2”または“I P N - 2”とも言う）は、T a uに特異的に結合する。I P N 0 0 1により結合されるエピトープは直鎖状エピトープであり、T a uのアミノ末端（N末端）部分内、例えば、T a uのアミノ酸1 - 2 5内のアミノ酸残

基を含む。

【0064】

ある例において、タウオパチーの処置方法における使用に適する本発明の抗T a u抗体は、a) i) I P N 0 0 1抗体の1、2または3個のV_L C D R、およびi i) ヒト化軽鎖フレームワーク領域、を含む軽鎖可変領域、ならびにb) i) I P N 0 0 1抗体の1、2または3個のV_H C D R、およびi i) ヒト化重鎖フレームワーク領域、を含む重鎖可変領域を含み、ここで、該V_HおよびV_L C D Rは、K a b a tに定義の通りである（例えば、上記の表1、およびKabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991)を参照のこと）。

【0065】

ある例において、タウオパチーの処置方法における使用に適する本発明の抗T a u抗体は、a) i) I P N 0 0 1抗体の1、2または3個のV_L C D R、およびi i) ヒト化軽鎖フレームワーク領域、を含む軽鎖領域、ならびにb) i) I P N 0 0 1抗体の1、2または3個のV_H C D R、およびi i) ヒト化重鎖フレームワーク領域、を含む重鎖領域を含み、ここで、該V_HおよびV_L C D Rは、C h o t h i aに定義の通りである（例えば、上記の表1、およびChothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)を参照のこと）。

【0066】

他の例において、タウオパチーの処置方法における使用に適する本発明の抗T a u抗体は、a) i) I P N 0 0 2抗体の1、2または3個のV_L C D R、およびi i) ヒト化軽鎖フレームワーク領域、を含む軽鎖領域、ならびにb) i) I P N 0 0 2抗体の1、2または3個のV_H C D R、およびi i) ヒト化重鎖フレームワーク領域、を含む重鎖領域を含み、ここで、該V_HおよびV_L C D Rは、K a b a tに定義の通りである（例えば、上記の表1、およびKabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991)を参照のこと）。

【0067】

他の例において、本発明の抗T a u抗体（例えば、T a uポリペプチド内のエピトープに特異的に結合する本発明の抗体であって、ここで、該エピトープは、T a uのアミノ末端（N末端）部分内、例えば、T a uのアミノ酸1-25内、T a uのアミノ酸1-18内、T a uのアミノ酸9-18内、T a uのアミノ酸15-44内、T a uのアミノ酸13-24内、またはT a uのアミノ酸15-24内に存在する）は、a) i) I P N 0 0 2抗体の1、2または3個のV_L C D R、およびi i) ヒト化軽鎖フレームワーク領域、を含む軽鎖領域、ならびにb) i) I P N 0 0 2抗体の1、2または3個のV_H C D R、およびi i) ヒト化重鎖フレームワーク領域、を含む重鎖領域を含み、ここで、該V_HおよびV_L C D Rは、C h o t h i aに定義の通りである（例えば、上記の表1、およびChothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)を参照のこと）。

【0068】

ある場合において、タウオパチーの処置のための本発明の方法は、a) T a uのアミノ末端（N末端）部分内、例えば、T a uのアミノ酸1-25内、T a uのアミノ酸1-18内、T a uのアミノ酸9-18内（ここで、T a uのアミノ酸1-18は、M A E P R Q E F E V M E D H A G T Y；配列番号53である）、T a uのアミノ酸15-44内、T a uのアミノ酸13-24内、またはT a uのアミノ酸15-24内（ここで、T a uのアミノ酸15-24は、A G T Y G L G D R K（配列番号51）である）の直鎖状エピトープに特異的に結合する抗体であって、（i）配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L C D R 1、（i i）配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L C D R 2、（i i i）配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L C D R 3、（i v）配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H C D R 1、（v）配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H C D R 2、（v i）配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H C D R 3を含む抗体、ならびにb) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤を含む、有効量の医薬組成物を、それ

10

20

30

40

50

を必要とする個体に投与することを含む。

【0069】

I P N 0 0 1 の V_H および V_L アミノ酸配列を、図 1 A および 1 B に示す。C D R (K a b a t により定義される) は、太字および下線で示される。I P N 0 0 2 の V_H および V_L アミノ酸配列を、図 2 A および 2 B に示す。C D R (K a b a t により定義される) は、太字および下線で示される。

【0070】

配列番号 1 - 1 2 は、以下の通りである。

R S S Q T I L H S N G N T Y L E (配列番号 1) ;

K V S K R F S (配列番号 2) ;

F Q G S L V P W A (配列番号 3) ;

S Y G M S (配列番号 4) ;

T I S S S G S R T Y F P D S V K G (配列番号 5) ;

T W D G A M D Y (配列番号 6) ;

K S S Q S I V H S N G N T Y L E (配列番号 7) ;

K V S N R F S (配列番号 8) ;

F Q G S L V P W A (配列番号 9) ;

K Y G M S (配列番号 10) ;

T I S S S G S R T Y Y P D S V K G (配列番号 11) ;

S W D G A M D Y (配列番号 12) 。

【0071】

ある場合において、抗体は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域および／またはヒト化重鎖フレームワーク領域を含む。ヒト化抗 T a u 抗体は、以下にて詳しく記載される。

【0072】

タウオパチーは、個体の細胞、組織または体液中の t a u の異常なレベルにより特徴付けられる障害である。ある場合において、タウオパチーは、高レベル（正常より高いレベル）の t a u または t a u ポリペプチドおよび／または t a u の病理的形態が細胞、組織または体液中に存在することにより特徴付けられる。例えば、ある場合において、タウオパチーは、高レベルの t a u または t a u ポリペプチドおよび／または t a u の病理的形態が脳組織および／または脳脊髄液中に存在することにより特徴付けられる。細胞、組織または体液中の“正常より高い”レベルの t a u は、組織または体液中の t a u レベルが、正常レベル、対照レベルより高いレベルであること、例えば、同年齢群の個体または集団の正常レベル、対照レベルよりも高いレベルであることを意味する。例えば、Blomberg et al. (2001) “Cerebrospinal fluid tau levels increase with age in healthy individuals” Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 12:127を参照のこと。ある場合において、タウオパチーを有する個体は、タウオパチーの 1 つまたはそれ以上の付加的症状（例えば、認知低下）を示す。

【0073】

他の場合において、タウオパチーは、正常レベルよりも低いレベルの t a u が細胞、組織または体液中に存在することにより特徴付けられる。組織または体液中の“正常より低い”レベルの t a u は、細胞、組織または体液中の t a u レベルが、正常レベル、対照レベルより低いレベルであること、例えば、同年齢群の個体または集団の正常レベル、対照レベルよりも低いレベルであることを意味する。

【0074】

アルツハイマー病および前頭側頭骨性認知症の任意の病態（ピック病、散発性前頭側頭骨性認知症および染色体 1 7 に連鎖するパーキンソニズムを伴う前頭側頭骨性認知症）は、タウオパチーの最も一般的な病態である。本発明は、上記の処置方法を提供し、ここで、タウオパチーは、アルツハイマー病、ピック病、散発性前頭側頭骨性認知症および染色体 1 7 に連鎖するパーキンソニズムを伴う前頭側頭骨性認知症である。他のタウオパチーには、進行性核上性麻痺（P S P）、大脳皮質基底核変性症（C B D）および亜急性硬化

性全脳炎が含まれるが、これらに限定されない。

【0075】

神経変性タウオパチーは、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症／パーキンソニズムを伴う認知症複合体、嗜銀顆粒性認知症、家族性脳アミロイド血管症(英国型)、脳アミロイド血管症、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルトヤコブ症、ボクシング認知症(Dementia pugilistica)、石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病、ダウン症候群、前頭側頭骨性認知症(FTD)、染色体17に連鎖するパーキンソニズムを伴う前頭側頭骨性認知症、前頭側頭葉変性症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラーフォルデン・シュパッツ病、封入体筋炎、多系統萎縮症、筋強直性ジストロフィー、ニーマン・ピック病C型、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、ピック病、脳炎後パーキンソニズム、プリオンタンパク質大脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維型老年認知症、多発脳梗塞性認知症、虚血性卒中、慢性外傷性脳症(CTE)、外傷性脳損傷(TBI)、および卒中を含む。

10

【0076】

本発明はまた、シヌクレイノパチー、例えば、パーキンソン病(PD)；レビー小体型認知症(DLB)；多系統萎縮症(MSA)などの処置方法を提供し、例えば、認知症を伴うPD(PDD)は、本発明の方法で処置され得る。

【0077】

1つの態様において、本発明の抗Tau抗体は、対象における神経変性疾患であるタウオパチーの少なくとも1つの症状の発症を予防または遅延する。1つの態様において、本発明の抗Tau抗体は、対象における神経変性疾患であるタウオパチーの少なくとも1つの症状を低減または排除する。該症状は、対象の脳または脊髄における、病理的tau蓄積；細胞外可溶性tauおよび／またはtauフラグメント；過剰リン酸化tau蓄積；不溶性tau蓄積；神経原線維変化；神経原線維変性線維症(neurofibrillary fiber)；プレタングルホスホータウ凝集；神経細胞内の神経原線維変化；ニューロン過活動；および、神経細胞外の神経原線維変化の1つまたはそれ以上の形成であり得る。該症状は、神経学的症状、例えば、認知機能の障害、記憶障害、運動機能の低下などであり得る。ある場合において、本発明の抗Tau抗体は、認知機能を改善することができる。ある場合において、本発明の抗Tau抗体は、認知機能の低下速度を遅くし得る。ある場合において、本発明の抗Tau抗体は、運動機能を改善し得る。ある場合において、本発明の抗Tau抗体は、運動機能の低下速度を遅くし得る。

20

30

【0078】

該症状はまた、個体のCSFにおけるtauポリペプチドのレベルであり得る。例えば、ある態様において、本発明の抗Tau抗体は、タウオパチーを有する個体に単剤療法として、または併用療法として、単一用量または複数用量で投与されるとき、個体のCSFにおけるtauポリペプチドのレベルを、抗Tau抗体での処置前の個体のCSFにおけるtauポリペプチドのレベルと比較して、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、または50%以上低減する。

40

【0079】

個体への本発明の抗Tau抗体の投与は、脳組織における細胞外遊離tauの量の減少；tau(例えば、tauフラグメント)の細胞から他の細胞への拡散(例えば、ニューロンから他のニューロンへの拡散)の減少；tau凝集(例えば、細胞内(例えば、ニューロン内)tau凝集)の量の減少；脳組織における神経原線維変化量の減少；ミクログリアの活性化および／またはアストロサイトの活性化のレベルの低下；リン酸化tauの量の減少；過剰リン酸化tauの量の減少；全量tau(例えば、全細胞内tau；および／または全細胞外tau)の減少；遊離tau(例えば、本発明の抗Tau抗体に結合していないtau)の減少；ニューロン過活動の低下；および、N末端tauフラグメントの量の減少、の1つまたはそれ以上をもたらす得る。“全量tau”は、何れかのイソ

50

型の完全長 T a u ; および、存在し、かつ本発明の抗 T a u 抗体に認識されるエピトープを示す N 末端 T a u フラグメントの合計を含み得る。ヒト完全長 T a u のアミノ酸配列を図 6 A - D に示す。リン酸化 T a u の還元は、何れかの公知の方法を用いて、例えば、抗ホスホ-T a u 抗体を用いる免疫学的方法により決定され得る。

【0080】

本発明の抗 T a u 抗体の個体への投与は、a) 脳組織における細胞外遊離 t a u の量；b) 間質液 (I S F) における細胞外遊離 t a u の量；c) 脳脊髄液 (C S F) における細胞外遊離 t a u の量；d) ニューロンから他のニューロンへの t a u の拡散；e) ニューロン内の t a u 凝集量；f) ミクログリアおよび／またはアストロサイトの活性化の低減；g) リン酸化または過剰リン酸化 t a u の量；h) I S F または C S F における、全量 t a u または遊離 t a u の量；i) 細胞内の t a u の N 末端フラグメントの量；j) ニューロン過活動；k) C S F における、A β 40 および／または A β 42 の量；l) A β プラーク面積率；m) ニューロンからの A β 40 および／または A β 42 の分泌；n) アミロイド前駆体タンパク質 (A P P) プロモーター活性；o) A P P m R N A および／またはタンパク質レベル；p) β -セクレターゼおよび／または γ -セクレターゼの活性；q) A β 仲介シグナル伝達経路の活性化状態；r) 細胞内全量 t a u または遊離 t a u の量；s) I S F または C S F における、抗 t a u 抗体-結合 t a u の量、および t) 細胞内抗 T a u 抗体-結合 t a u の量、の 1 つまたはそれ以上の変化をもたらし得る。

10

【0081】

ある場合において、本発明の抗 T a u 抗体の個体への投与は、個体における認知機能を改善する、または少なくとも、個体における認知機能の低下を遅くする。

20

【0082】

ある場合において、本発明の抗 T a u 抗体の個体への投与は、細胞外遊離 T a u ポリペプチドの量 (例えば、脳組織における細胞外遊離 T a u ポリペプチドの量) を、抗 T a u 抗体での処置前の個体における細胞外遊離 T a u ポリペプチドの量と比較して、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 50 %、または 50 % 以上低減する。

【0083】

ある場合において、本発明の抗 T a u 抗体の個体への投与は、細胞から他の細胞 (例えば、ニューロンから他のニューロン) への T a u ポリペプチド (例えば、病的 T a u ポリペプチド) の拡散を、本発明の抗 T a u 抗体での処置前の細胞から他の細胞への拡散と比較して、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 50 %、または 50 % 低減する。

30

【0084】

ある場合において、本発明の抗 T a u 抗体の個体への投与は、t a u 凝集 (例えば、細胞内 (例えば、ニューロン内) t a u 凝集) の量を、抗 T a u 抗体での処置前の t a u 凝集の量と比較して、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 50 %、または 50 % 以上減少する。

【0085】

ある場合において、本発明の抗 T a u 抗体の個体への投与は、個体における神経毒性を減少し、および／または個体における神経炎症を減少し、および／またはアストロサイトおよびミクログリアの活性化を低下し、および／または病理学的電気生理的作用の誘導を減少し、および／またはエキソソーム中の t a u の量を減少させる。

40

【0086】

ある場合において、本発明の抗 T a u 抗体の個体への投与は、ニューロン過活動を、抗 T a u 抗体で処置する前のニューロン過活動のレベルと比較して、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 50 %、または 50 % 以上低下させる。ある場合において、本発明の抗 T a u 抗体の個体への投与は、ニューロンの全細胞パッチクランプ法、例えば、多能性幹細胞に由来する皮質ニューロン (i P S C - C N) またはヒト皮質ニューロン培養物 (H C C) の全細胞パッチクランプ法により決定され

50

る通り、ニューロン過活動を、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、または50%以上低下させる。

【0087】

好適な組成物の投与は、種々の方法、例えば、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、頭蓋内投与、髄腔内投与、動脈内投与（例えば、頸動脈を介して）、筋肉内投与、鼻腔内投与、局所投与または皮内投与または脊髄へもしくは脳への送達により達成され得る。鼻腔用スプレー製剤のようなエアロゾル製剤には、活性剤と共に防腐剤および等張剤を含む精製した水溶液または他の溶液が含まれる。かかる製剤は、鼻粘膜に適合するpHおよび等張性に合わせられる。

【0088】

ある場合において、本発明の抗Tau抗体は、抗体に血液脳関門を通過する能力を提供するような方法で修飾または製剤される。そのような抗体または抗体組成物は、経口投与、静脈内投与などを含む、種々の経腸投与および非経腸投与により、タウオパチーを有する個体に投与され得る。

【0089】

非経腸投与用製剤は、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液、およびエマルジョンを含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、およびオレイン酸エチルのような注射用有機エステルである。水性担体には、生理食塩水および緩衝媒体を含めて、水、アルコール／水溶液、エマルジョンまたは懸濁液が含まれる。非経腸用ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲル・デキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸化リンゲル、または不揮発性油が含まれる。静脈内用ビヒクルには、流動および栄養補充液、電解質補充液（例えば、リンゲル・デキストロースをベースとするもの）等が含まれる。防腐剤および他の添加物、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガス等が存在していてもよい。さらに、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の目的とする使用によっては、ドーパミンまたは精神薬理作用を有する薬剤（psychopharmacologic drug）のようなさらなる薬物を含み得る。

【0090】

投与量レジメンは、担当医または他の医療関係者により、種々の臨床的因子に基づき決定され得る。医薬分野の当業者にはよく知られている通り、何れかの患者に対する投与量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与時期および経路、一般的健康状態、および同時に投与される他の薬物を含む種々の因子によって変わる。本発明の抗Tau抗体の用量は、例えば、 $0.001\mu\text{g} \sim 1000\mu\text{g}$ の範囲であり得る。しかしながら、この例示的範囲以下または以上の用量が考慮され、とりわけ下記の数値が考慮される。一般的に、投与量は、宿主の体重1kg当たり、例えば、約 $0.0001 \sim 100\text{mg}$ 、または約 $0.01 \sim 5\text{mg}$ の範囲（例えば、 0.02mg 、 0.25mg 、 0.5mg 、 0.75mg 、 1mg 、 2mg など）であり得る。例えば、投与量は、 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重または $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重であり得る、または $1 \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲内である、または少なくとも $1\text{mg}/\text{kg}$ である。上記の範囲の中間の用量はまた、本発明の範囲内であることが意図される。対象は、1日1回、2日に1回、1週間に1回または実験的分析により決定される何れかの他のスケジュールで、かかる用量を投与され得る。例示的処置は、長期間、例えば、少なくとも6ヶ月の複数回投与を必要とする。さらなる例示的処置レジメンは、2週間毎に1回または1ヶ月に1回または3～6ヶ月毎に1回の投与を必要とする。例示的投与スケジュールは、1日1回連続して $1 \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ もしくは $15\text{mg}/\text{kg}$ 、2日に1回 $30\text{mg}/\text{kg}$ 、または1週間に1回 $60\text{mg}/\text{kg}$ を含む。ある方法において、2種またはそれ以上の異なる結合特異性を有するモノクローナル抗体を同時に投与し、このとき、投与される各抗体の投与量は、記載した範囲内である。疾患の進行を、定期的な評価によりモニターすることができる。

【0091】

併用療法

本発明の抗Tau抗体は、それを必要とする個体に単独で（例えば、単剤療法として）

、または1つもしくはそれ以上のさらなる治療剤との併用療法にて投与され得る。

【0092】

A Dの処置に関して、好適なさらなる治療剤には、A r i c e p t（ドネペジル）、E x e l o n（リバスチグミン）、メトリホナート、およびタクリン（C o g n e x）を含むが、これらに限定されないアセチルコリンエステラーゼ阻害剤；抗A β 抗体；イブプロフェンおよびインドメタシンを含むが、これらに限定されない非ステロイド性抗炎症剤；C e l e b r e x（セレブレックス）のようなシクロオキシゲナーゼ2（C o x 2）阻害剤；ならびに、セレギリン（Selegilene）（E l d e p r y lまたはデプレニル）のようなモノアミンオキシダーゼ阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。上記の各薬物の投与量は、当技術分野で公知である。

10

【0093】

A Dの処置における別の好適なさらなる治療剤は、t a u凝集を阻害する薬物、例えば、米国特許番号第7, 605, 179号に記載の、t a u凝集を阻害するナフトキノン誘導体である。別の好適なさらなる治療剤は、t a uのリン酸化を阻害する薬物、例えば、米国特許番号第7, 572, 793号に記載の、t a uタンパク質キナーゼ1を阻害する3-置換-4-ピリミドン誘導体である。

【0094】

本明細書で用いる“～との併用”は、例えば、第一の化合物が、第二の化合物の全投与期間中に投与される；第一の化合物が、第二の化合物の投与と重複する期間に投与される、例えば第一の化合物の投与が、第二の化合物の投与前に始まり、そして第一の化合物の投与が、第二の化合物の投与終了後の前に終了する；第二の化合物の投与が、第一の化合物の投与前に始まり、そして第二の化合物の投与が、第一の化合物の投与終了後の前に終了する；第一の化合物の投与が、第二の化合物の投与開始前に始まり、そして第二の化合物の投与が、第一の化合物の投与終了後の前に終了する；第二の化合物の投与が、第一の化合物の投与開始前に始まり、第一の化合物の投与が、第二の化合物の投与終了後の前に終了する、ような使用を意味する。例えば“併用”はまた、2以上の化合物の投与を含むレジメンを意味し得る。本明細書で用いる“～との併用”はまた、同じか、または異なる製剤において、同じか、または異なる投与経路で、そして同じか、または異なる投与量形態タイプで投与され得る、2以上の化合物の投与を意味する。

20

【0095】

投与されるべき個体

本発明の抗T a u抗体での処置に好適な個体には、タウオパチーを有すると診断されている個体；一般集団よりもタウオパチーを発症する危険性の高い個体（例えば、タウオパチーを発症する遺伝的素因を有する個体）；P D Dを有する個体などが含まれる。ある場合において、該個体は、成人である。ある場合において、成人は30歳もしくはそれ以上、40歳もしくはそれ以上、50歳もしくはそれ以上、60歳もしくはそれ以上、70歳もしくはそれ以上、または80歳もしくはそれ以上である。例えば、成人は、40歳から50歳、50歳から60歳、60歳から70歳、または70歳以上であってよい。

30

【0096】

A β 40およびA β 42レベルを低減する方法

本発明は、個体の神経細胞および／または細胞外液中のA β 40および／またはA β 42のレベルを低減する方法を提供する。該方法は、一般的に、a) 有効量のT a uポリペプチドのN末端領域に結合するヒト化抗体；または、b) 該ヒト化抗体を含む医薬組成物を、該個体に投与することを含む。

40

【0097】

T a uポリペプチドのN末端領域に結合し、神経細胞および／または細胞外液中のA β 40およびA β 42を低減する本発明の方法における使用に好適なヒト化抗体は、T a uのアミノ酸2-176内、例えば、T a uのアミノ酸2-15内、T a uのアミノ酸15-24内、T a uのアミノ酸24-50内、T a uのアミノ酸2-25内、T a uのアミノ酸15-50内、T a uのアミノ酸50-75内、T a uのアミノ酸40-60内、T

50

auのアミノ酸75～100内、Tauのアミノ酸60～80内、Tauのアミノ酸100～125内、Tauのアミノ酸80～115内、Tauのアミノ酸125～150内、Tauのアミノ酸115～140内、Tauのアミノ酸150～176内、またはTauのアミノ酸140～160内であるTauのエピトープに結合するヒト化抗体である。Tauポリペプチドの例は、図20に記載する。個体の神経細胞および／または細胞外液中の $A\beta_{40}$ および／または $A\beta_{42}$ のレベルを低減する抗体は、図20に記載のTauポリペプチド内のエピトープに特異的に結合するヒト化抗体であり得る。

【0098】

ある場合において、個体の神経細胞および／または細胞外液中の $A\beta_{40}$ および／または $A\beta_{42}$ のレベルを低減し、本発明の方法における使用に抗体な抗体は、本明細書に記載のヒト化抗Tau抗体である。ある場合において、該抗体は、Tauのアミノ酸15～24内のエピトープに結合するヒト化抗体である。

【0099】

抗TAU抗体

本発明は、単離された抗Tau抗体、およびそれを含む医薬製剤を提供する。

【0100】

本発明は、TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープ（例えば、アミノ末端内の直鎖状エピトープ（TauのN末端部分、例えば、Tauのアミノ酸1～25内、Tauのアミノ酸1～18内、Tauのアミノ酸9～18内（Tauのアミノ酸1～18は、MAEPRQEFVMEHDHAGTY；配列番号53である）、Tauのアミノ酸15～44内、Tauのアミノ酸13～24内、またはTauのアミノ酸15～24内（Tauのアミノ酸15～24は、AGTYGLGDRK（配列番号51）である）））に特異的に結合する単離された抗体を提供する。ある例において、抗体はヒト化されており、例えば、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域の1つまたはそれ以上のフレームワーク領域は、ヒト免疫グロブリンフレームワークに由来する配列を含む。

【0101】

本発明は、Tauポリペプチドのアミノ酸15～24内のエピトープに特異的に結合する単離されたヒト化モノクローナル抗体を提供する。ある場合において、エピトープは、リン酸化アミノ酸を含まない。ある場合において、エピトープは、ニトロ化アミノ酸を含まない。ある場合において、エピトープはリン酸化アミノ酸、ニトロ化アミノ酸、またはリン酸化アミノ酸およびニトロ化アミノ酸の両方を含む。

【0102】

フレームワーク領域（複数可）のヒト化は、ヒトにおけるヒト-抗マウス-抗体（HAMA）応答を誘発する抗体の危険性を低減する。免疫応答を決定する当業者に認められる方法は、特定の患者または臨床試験中の患者におけるHAMA応答をモニターすることで実行され得る。ヒト化抗体を投与される患者は、治療開始時および投与期間中に免疫原性評価をされ得る。HAMA応答は、例えば、表面プラズモン共鳴技術（BIACORE）および／または固相酵素免疫定量法（ELISA）分析を含む当業者に公知の方法を用いて、患者からの血清サンプル中、ヒト化治療用薬剤に対する抗体を検出することにより、測定される。多くの場合に、目的のヒト化抗Tau抗体は、ヒト対象におけるHAMA応答を実質的に誘発しない。ある場合において、目的のヒト化抗Tau抗体は、CD8⁺ 欠失末梢血単核細胞を用いて行われるEpiScreen^{（商標）} アッセイにより決定されたとおり、免疫原性を低減させた。ある場合において、目的のヒト化抗Tau抗体は、2.0未満の刺激指数を示す。

【0103】

ヒト可変領域フレームワーク残基由来の任意のアミノ酸は、それらのCDR立体構造への考えられる影響および／または抗原への結合性に基づいて置換のために選択される。ヒト可変フレームワーク領域を含むマウスCDR領域の天然では生じない並置は、天然では生じない立体構造制限を生じることがあり、この制限は所定のアミノ酸残基の置換により修正されない限り、結合親和性の損失をもたらす。

10

20

30

40

50

【0104】

置換されるアミノ酸残基の選択は、1つには、コンピューターモデリングを用いて決定され得る。免疫グロブリン分子の3次元画像を作成するためのコンピューターハードウェアおよびソフトウェアが、当技術分野で公知である。一般的に、分子モデルは、免疫グロブリン鎖またはそのドメインに関する解明された構造から出発して生成される。モデリングされる鎖は、該鎖のアミノ酸配列の、解明された3次元構造の鎖またはドメインとの類似性が比較され、最大の配列類似性を示す鎖またはドメインが、分子モデル構成の出発点として選択される。少なくとも50%の配列同一性を共有する鎖またはドメインが、モデリングのために選択され、例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%、または90%以上の配列を共有するものがモデリングのために選択される。解明された出発構造は、モデリングされている免疫グロブリン鎖またはドメイン内の実際のアミノ酸と、出発構造内のアミノ酸との差異を許容するよう修飾される。次いで、修飾構造は、複合体免疫グロブリンに組み立てられる。最終的に、モデルは、エネルギー最小化し、また全ての原子が互いから適切な距離内に存在し、結合の長さや角度が化学的に許容される限界内にあることを検証することにより精密化される。

10

【0105】

C D Rおよびフレームワーク領域は、Kabatの、Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991)により定義される。別の構造的定義が、Chothiaらの、J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Nature 342:878 (1989); および、J. Mol. Biol. 186:651 (1989) (まとめて、“Chothia”と言う)により提案されている。上記のKabatに定義されるフレームワーク残基が、上記のChothiaに定義される構造的ループ残基を構成するとき、マウス抗体中に存在するアミノ酸は、ヒト化抗体への置換のために選択され得る。“C D R領域に隣接する”残基は、ヒト化免疫グロブリン鎖の一次配列中の1つまたはそれ以上のC D R、例えば、Kabatにより定義されるC D R、またはChothiaにより定義されるC D Rに直接隣接する位置のアミノ酸残基を含む(例えば、Chothia and Lesk JMB 196:901 (1987)を参照のこと)。これらのアミノ酸は、アクセプターから選択されたとき、特にC D R内のアミノ酸と相互作用し、ドナーC D Rを変形させ、親和性を低減させる。さらに、隣接アミノ酸は、抗原と直接的に相互作用することができ(Amit et al., Science, 233:747 (1986))、これらのアミノ酸をドナーから選択することは、元々の抗体に親和性を提供する全ての抗原接点を維持することが望ましいかもしれない。

20

30

【0106】

本発明は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域およびヒト化重鎖フレームワーク領域を含む単離された抗体を提供し、ここで、単離された抗体は、T a uポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を、a) i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L C D R 1、(i i) 配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L C D R 2、および(i i i) 配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L C D R 3、を含む軽鎖領域、ならびにb) (i) 配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H C D R 1、(i i) 配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H C D R 2、および(i i i) 配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H C D R 3、を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する。ある場合において、軽鎖領域および重鎖領域は、別個のポリペプチド中に存在する。他の場合において、軽鎖領域および重鎖領域は、単一のポリペプチド中に存在する。単離された抗体は、アイソタイプI g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4の定常領域を含む重鎖を含む。他の場合において、抗体は、F v、s c F v、F a b、F (a b') 2、またはF a b'である。抗体は、共有結合した非ペプチド合成ポリマーを含んでいてよく、例えば、合成ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)ポリマーである。ある場合において、単離された抗体は、血液脳関門の通過を促進する担体分子、ペプチドまたはタンパク質に直接またはリンカーを介して結合されている。ある場合において、単離された抗体により結合されるエピトープは、T a uポリペプチドのアミノ酸15-24内である。単離された抗体のヒト化軽鎖フレ

40

50

ームワーク領域は、表3に記載の1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含み得る。単離された抗体のヒト化重鎖フレームワーク領域は、表2に記載の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個のアミノ酸置換を含む。

【0107】

ある態様において、本発明の抗Tau抗体（例えば、Tauポリペプチド内のエピトープ、例えば、Tauのアミノ末端（N末端）部分内の直鎖状エピトープ、例えば、Tauのアミノ酸1-25内、Tauのアミノ酸1-18内、Tauのアミノ酸9-18内（Tauのアミノ酸1-18は、MAEPRQEFVME DHAGTY；配列番号53である）、Tauのアミノ酸15-44内、Tauのアミノ酸13-24内、またはTau
10
のアミノ酸15-24内（Tauのアミノ酸15-24は、AGTYGLGDRK（配列番号51）である）に特異的に結合する本発明の抗体）は、a) i) IPN001抗体の1、2または3個の相補性決定領域（CDR）を含む軽鎖領域を含み、ここで、該CDRは、Kabattに定義の通りである（例えば、上記の表1、およびKabatt et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991)を参照のこと）。

【0108】

ある態様において、本発明の抗Tau抗体（例えば、Tauポリペプチド内のエピトープ、例えば、Tauのアミノ末端（N末端）部分内の直鎖状エピトープ、例えば、Tau
20
のアミノ酸1-25内、Tauのアミノ酸1-18内、Tauのアミノ酸9-18内（Tauのアミノ酸1-18は、MAEPRQEFVME DHAGTY；配列番号53である）、Tauのアミノ酸15-44内、Tauのアミノ酸13-24内、またはTau
のアミノ酸15-24内（Tauのアミノ酸15-24は、AGTYGLGDRK（配列番号51）である）に特異的に結合する本発明の抗体）は、a) i) IPN001抗体の1、2または3個のV_L CDR、およびi) i) ヒト化軽鎖フレームワーク領域を含む軽鎖領域、ならびにb) i) IPN001抗体の1、2または3個のV_H CDR、および
i) i) ヒト化重鎖フレームワーク領域、を含む重鎖領域を含み、ここで、該V_HおよびV
30
L CDRは、Kabattに定義の通りである（例えば、上記の表1、およびKabatt et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991)を参照のこと）。これらの態様のいくつかにおいて、抗Tau抗体は、ヒト化V_Hおよび/またはV_L フレームワーク領域を含む。

【0109】

ある態様において、本発明の抗Tau抗体（例えば、Tauポリペプチド内のエピトープ、例えば、Tauのアミノ末端（N末端）部分内の直鎖状エピトープ、例えば、Tau
40
のアミノ酸1-25内、Tauのアミノ酸1-18内、Tauのアミノ酸9-18内（Tauのアミノ酸1-18は、MAEPRQEFVME DHAGTY；配列番号53である）、Tauのアミノ酸15-44内、Tauのアミノ酸13-24内、またはTau
のアミノ酸15-24内（Tauのアミノ酸15-24は、AGTYGLGDRK（配列番号51）である）に特異的に結合する本発明の抗体）は、a) i) IPN001抗体の1、2または3個のV_L CDR、およびi) i) ヒト化軽鎖フレームワーク領域を含む軽鎖領域、ならびにb) i) IPN001抗体の1、2または3個のV_H CDR、および
i) i) ヒト化重鎖フレームワーク領域、を含む重鎖領域を含み、ここで、該V_HおよびV
L CDRは、Chothiaに定義の通りである（例えば、上記の表1、およびChothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)を参照のこと）。

【0110】

ある態様において、本発明の抗Tau抗体（例えば、Tauポリペプチド内のエピトープ、例えば、Tauのアミノ末端（N末端）部分内の直鎖状エピトープ、例えば、Tau
50
のアミノ酸1-25内、Tauのアミノ酸1-18内、Tauのアミノ酸9-18内（Tauのアミノ酸1-18は、MAEPRQEFVME DHAGTY；配列番号53である）、Tauのアミノ酸15-44内、Tauのアミノ酸13-24内、またはTau

のアミノ酸15-24内（Tauのアミノ酸15-24は、AGTYGLGDRK（配列番号51）である）に特異的に結合する本発明の抗体）は、a）i）IPN002抗体の1、2または3個のV_L CDR、およびi i）ヒト化軽鎖フレームワーク領域、を含む軽鎖領域、ならびにb）i）IPN002抗体の1、2または3個のV_H CDR、およびi i）ヒト化重鎖フレームワーク領域、を含む重鎖領域を含み、ここで、該V_HおよびV_L CDRは、Kabab tに定義の通りである（例えば、上記の表1、および Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991)を参照のこと）。

【0111】

ある態様において、本発明の抗Tau抗体（例えば、Tauポリペプチド内のエピートプ、例えば、Tauのアミノ末端（N末端）部分内の直鎖状エピートプ、例えば、Tauのアミノ酸1-25内、Tauのアミノ酸1-18内、Tauのアミノ酸9-18内（Tauのアミノ酸1-18は、MAEPRQEF EVMEDHAGTY；配列番号53である）、Tauのアミノ酸15-44内、Tauのアミノ酸13-24内、またはTauのアミノ酸15-24内（Tauのアミノ酸15-24は、AGTYGLGDRK（配列番号51）である）に特異的に結合する本発明の抗体）は、a）i）IPN002抗体の1、2または3個のV_L CDR、およびi i）ヒト化軽鎖フレームワーク領域、を含む軽鎖領域、ならびにb）i）IPN002抗体の1、2または3個のV_H CDR、およびi i）ヒト化重鎖フレームワーク領域、を含む重鎖領域を含み、ここで、該V_HおよびV_L CDRは、Chothiaに定義の通りである（例えば、上記の表1、およびChothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)を参照のこと）。

【0112】

ある態様において、本発明の抗Tau抗体（例えば、Tauポリペプチド内のエピートプ、例えば、Tauのアミノ末端（N末端）部分内の直鎖状エピートプ、例えば、Tauのアミノ酸1-25内、Tauのアミノ酸1-18内、Tauのアミノ酸9-18内（Tauのアミノ酸1-18は、MAEPRQEF EVMEDHAGTY；配列番号53である）、Tauのアミノ酸15-44内、Tauのアミノ酸13-24内、またはTauのアミノ酸15-24内（Tauのアミノ酸15-24は、AGTYGLGDRK（配列番号51）である）に特異的に結合する本発明の抗体）は、a）i）配列番号1、配列番号2、および配列番号3から選択される1、2または3個のCDR、およびi i）ヒト化軽鎖フレームワーク領域、を含む軽鎖領域、ならびにb）i）配列番号4、配列番号5、および配列番号6から選択される1、2または3個のCDR、およびi i）ヒト化重鎖フレームワーク領域、を含む重鎖領域を含む。

【0113】

ある態様において、本発明の抗Tau抗体（例えば、Tauポリペプチド内のエピートプ、例えば、Tauのアミノ末端（N末端）部分内の直鎖状エピートプ、例えば、Tauのアミノ酸1-25内、Tauのアミノ酸1-18内、Tauのアミノ酸9-18内（Tauのアミノ酸1-18は、MAEPRQEF EVMEDHAGTY；配列番号53である）、Tauのアミノ酸15-44内、Tauのアミノ酸13-24内、またはTauのアミノ酸15-24内（Tauのアミノ酸15-24は、AGTYGLGDRK（配列番号51）である）に特異的に結合する本発明の抗体）は、a）i）配列番号7、配列番号8、および配列番号9から選択される1、2または3個のCDR、およびi i）ヒト化軽鎖フレームワーク領域、を含む軽鎖領域、ならびにb）i）配列番号10、配列番号11、および配列番号12から選択される1、2または3個のCDR、およびi i）ヒト化重鎖フレームワーク領域、を含む重鎖領域を含む。

【0114】

ある例において、抗体は、a）i）配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1、（i i）配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L CDR2、および（i i i）配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L CDR3、および（i v）ヒト化軽鎖フレームワーク領域、を含む軽鎖領域、ならびにb）（i）

配列番号 4 または配列番号 10 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 1、(i i) 配列番号 5 または配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 2、および (i i i) 配列番号 6 または配列番号 12 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 3、および i v) ヒト化重鎖フレームワーク領域、を含む重鎖領域、を含む。

【0115】

ある態様において、本発明の抗 T a u 抗体は、配列番号 4、5 および 6 の 1 つまたはそれ以上から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖 CDR の 1、2 または 3 個、ならびにヒト化されている 1、2、3 または 4 個の FR 領域（フレームワーク領域）を含む重鎖可変領域を含む。例えば、ある態様において、本発明の抗体は、N 末端から C 末端まで順番に：ヒト化重鎖 FR 1；配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 1；ヒト化重鎖 FR 2；配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 2；ヒト化重鎖 FR 3；配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 3；および、ヒト化重鎖 FR 4 を含む、重鎖可変領域を含む。

10

【0116】

ある態様において、本発明の抗 T a u 抗体は、配列番号 1、2 および 3 の 1 つまたはそれ以上から選択されるポリペプチド配列を有する 1、2 または 3 個の軽鎖 CDR、およびヒト化されている 1、2、3 または 4 個の FR 領域、を含む軽鎖可変領域を含む。例えば、ある態様において、本発明の抗体は、N 末端から C 末端まで順番に：ヒト化軽鎖 FR 1；配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 1；ヒト化軽鎖 FR 2；配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 2；ヒト化軽鎖 FR 3；配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 3、ならびにヒト化軽鎖 FR 4、を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【0117】

ある態様において、本発明の抗 T a u 抗体は、配列番号 10、11 および 12 の 1 つまたはそれ以上から選択されるアミノ酸配列を有する 1、2 または 3 個の重鎖 CDR、ならびに 1、2、3 または 4 個のヒト化されている FR 領域を含む重鎖可変領域を含む。例えば、ある態様において、本発明の抗体は、N 末端から C 末端まで順に、ヒト化重鎖 FR 1；配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 1；ヒト化重鎖 FR 2；配列番号 11 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 2；ヒト化重鎖 FR 3；配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 3；ならびに、ヒト化重鎖 FR 4 を含む重鎖可変領域を含む。

30

【0118】

ある態様において、本発明の抗 T a u 抗体は、配列番号 7、8 および 9 の 1 つまたはそれ以上から選択されるポリペプチド配列を有する 1、2 または 3 個の軽鎖 CDR；ならびに、1、2、3 または 4 個のヒト化されている FR 領域を含む軽鎖可変領域を含む。例えば、ある態様において、本発明の抗体は、N 末端から C 末端まで順に、ヒト化軽鎖 FR 1；配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 1；ヒト化軽鎖 FR 2；配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 2；ヒト化軽鎖 FR 3；配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を含む CDR 3；ならびに、ヒト化軽鎖 FR 4 を含む軽鎖可変領域を含む。

【0119】

I P N 0 0 1 の V_H および V_L アミノ酸配列は、図 1 A および 1 B に記載される。CDR (K a b a t により定義される) は、太字および下線で示される。I P N 0 0 2 の V_H および V_L アミノ酸配列は、図 2 A および 2 B に示される。CDR (K a b a t により定義される) は、太字および下線で示される。

40

【0120】

配列番号 1 - 12 は、下記の通りである。

R S S Q T I L H S N G N T Y L E (配列番号 1)；

K V S K R F S (配列番号 2)；

F Q G S L V P W A (配列番号 3)；

S Y G M S (配列番号 4)；

T I S S S G S R T Y F P D S V K G (配列番号 5)；

T W D G A M D Y (配列番号 6)；

50

K S S Q S I V H S N G N T Y L E （配列番号 7）；
K V S N R F S （配列番号 8）；
F Q G S L V P W A （配列番号 9）；
K Y G M S （配列番号 10）；
T I S S S G S R T Y Y P D S V K G （配列番号 11）；
S W D G A M D Y （配列番号 12）。

【0121】

本発明の抗 T a u 抗体は、図 1 B に記載の配列および配列番号 13 と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み得る。 10

【0122】

本発明の抗 T a u 抗体は、図 1 A に記載の配列および配列番号 14 と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み得る。

【0123】

本発明の抗 T a u 抗体は、図 2 B に記載の配列および配列番号 15 と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み得る。 20

【0124】

本発明の抗 T a u 抗体は、図 2 A に記載の配列および配列番号 16 と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み得る。

【0125】

本発明の抗 T a u 抗体は、図 9 に記載の配列（VH 変異体 1）と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み得る。 30

【0126】

本発明の抗 T a u 抗体は、図 10 に記載の配列（VH 変異体 2）と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み得る。

【0127】

本発明の抗 T a u 抗体は、図 11 に記載の配列（VH 変異体 3）と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み得る。 40

【0128】

本発明の抗 T a u 抗体は、図 12 に記載の配列（VH 変異体 4）と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み得る。

【0129】

本発明の抗 T a u 抗体は、図 13 に記載の配列（V k 変異体 1）と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0130】

本発明の抗T a u抗体は、図14に記載の配列（V k変異体2）と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0131】

本発明の抗T a u抗体は、図15に記載の配列（V k変異体3）と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0132】

本発明の抗T a u抗体は、図16に記載の配列（V k変異体4）と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0133】

本発明の抗T a u抗体は、表2に示すI P N 0 0 2親抗体F Rアミノ酸配列と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個のフレームワーク（F R）アミノ酸置換を含む重鎖可変領域を含み得る。

【表2】

表2： V H変異体

アミノ酸の位置	I P N 0 0 2（親抗体）	V H変異体1	V H変異体2	V H変異体3	V H変異体4
FR1					
3	H	H	H	Q	Q
19	K	R	R	R	R
FR2					
40	T	A	A	A	A
42	D	G	G	G	G
44	R	G	G	G	G
FR3					
66	Q	R	R	R	R
83	S	S	N	N	N
85	L	S	L	L	L
86	K	K	R	R	R
87	S	S	A	A	A
93	S	S	S	S	A
FR4					
108	S	S	T	T	T

【0134】

例えば、本発明の抗T a u抗体は、V H FR1中のアミノ酸位置3におけるH→Q置換および／またはV H FR1中のアミノ酸位置19におけるK→R置換を含む重鎖可変領域を含み得る。

【0135】

別の例としては、本発明の抗T a u抗体は、V H FR2中のアミノ酸位置40におけるT→A置換および／またはV H FR2中のアミノ酸位置42におけるD→G置換および／またはV H FR2中のアミノ酸位置44におけるR→G置換を含む重鎖可変領域を

含み得る。

【0136】

別の例としては、本発明の抗T a u抗体は、VH FR3中のアミノ酸位置66におけるQ→R置換および／またはVH FR3中のアミノ酸位置83におけるS→N置換および／またはVH FR3中のアミノ酸位置85におけるL→S置換および／またはFR3中のアミノ酸位置86におけるK→R置換および／またはVH FR3中のアミノ酸位置87におけるS→A置換および／またはVH FR3中のアミノ酸位置93におけるS→A置換を含む重鎖可変領域を含み得る。

【0137】

別の例としては、本発明の抗T a u抗体は、VH FR4中のアミノ酸位置108におけるS→T置換を含む重鎖可変領域を含み得る。

【0138】

ある場合において、目的の単離された抗T a u抗体は、N末端からC末端まで順に、E V X₁ L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S（配列番号83）；図2Aに示すVH CDR1；W V R Q A P G K G L E W V A（配列番号84）；図2Aに示すVH CDR2；R F T I S R D N A K N T L Y L Q M X₂ S X₃ X₄ X₅ E D T A M Y Y C X₆ I（配列番号85）；図2Aに示すVH CDR3；W G Q G T X₇ V T V S S（配列番号86）（式中、X₁はHまたはQであり、X₂はSまたはNであり、X₃はSまたはLであり、X₄は、KまたはRであり、X₅は、SまたはAであり、X₆はSまたはAであり、X₇はSまたはTである）を含むVH領域を含み得る。

【0139】

本発明の抗T a u抗体は、表3に示す、I P N 0 0 2親抗体FRアミノ酸配列と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のフレームワーク（FR）アミノ酸置換を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【表3】

表3： V k変異体

アミノ酸の位置	IPN002(親抗体)	Vk変異体1	Vk変異体2	Vk変異体3	Vk変異体4
FR1					
3	L	L	V	V	V
7	T	S	S	S	S
14	S	T	T	T	T
17	D	Q	Q	Q	Q
18	Q	P	P	P	P
FR2					
45	K	Q	Q	Q	Q
48	V	V	V	V	I
FR3					
83	L	V	V	V	V
85	T	T	T	V	V
FR4					
104	L	V	V	V	V

【0140】

例えば、本発明の抗T a u抗体は、VL FR1中のアミノ酸位置3におけるL→V置換および／またはVL FR1中のアミノ酸位置7におけるT→S置換および／またはVL FR1中のアミノ酸位置14におけるS→T置換および／またはVL FR1中のアミノ酸位置17におけるD→Q置換および／またはVL FR1中のアミノ酸位置18に

おける Q→P 置換を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0141】

別の例としては、本発明の抗 T a u 抗体は、V L F R 2 中のアミノ酸位置 4 5 における K→Q 置換および／または V L F R 2 中のアミノ酸位置 4 8 における V→I 置換を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0142】

別の例としては、本発明の抗 T a u 抗体は、V L F R 3 のアミノ酸位置 8 3 における L→V 置換および／または V L F R 3 中のアミノ酸位置 8 5 における T→V 置換を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0143】

別の例としては、本発明の抗 T a u 抗体は、V L F R 4 中のアミノ酸位置 1 0 4 における L→V 置換を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0144】

ある場合において、目的の単離された抗 T a u 抗体は、N 末端から C 末端まで順に、D V X₁ M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C (配列番号 5 4) ; 図 2 B に示す V L C D R 1 ; W Y L Q K P G Q S P Q L L X₂ Y (配列番号 5 5) ; 図 2 B に示す V L C D R 2 ; G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G X₃ Y Y C (配列番号 5 6) ; 図 2 B に示す V L C D R 3 ; F G G G T K V E I K (配列番号 5 7) (式中、X₁ は L または V であり、X₂ は V または I であり、X₃ は T または V である) を含む V L 領域を含み得る。

【0145】

ある場合において、本発明の抗 T a u 抗体は、

- a) 図 9 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 1、および図 1 3 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 1 ;
- b) 図 9 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 1、および図 1 4 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 2 ;
- c) 図 9 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 1、および図 1 5 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 3 ;
- d) 図 9 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 1、および図 1 6 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 4 ;
- e) 図 1 0 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 2、および図 1 3 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 1 ;
- f) 図 1 0 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 2、および図 1 4 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 2 ;
- g) 図 1 0 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 2、および図 1 5 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 3 ;
- h) 図 1 0 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 2、および図 1 6 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 4 ;
- i) 図 1 1 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 3、および図 1 3 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 1 ;
- j) 図 1 1 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 3、および図 1 4 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 2 ;
- k) 図 1 1 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 3、および図 1 5 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 3 ;
- l) 図 1 1 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 3、および図 1 6 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 4 ;
- m) 図 1 2 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 4、および図 1 3 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 1 ;
- n) 図 1 2 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 4、および図 1 4 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 2 ;

o) 図 1 2 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 4、および図 1 5 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 3；または

p) 図 1 2 に示すアミノ酸配列を含む V H 変異体 4、および図 1 6 に示すアミノ酸配列を含む V k 変異体 4
を含む。

【0146】

ある態様において、本発明の抗体は、抗 T a u 重鎖 C D R および抗 T a u 軽鎖 C D R の一本鎖ポリペプチドを含み、例えば、ある態様において、本発明の抗体は s c F v である。ある態様において、本発明の抗体は、N 末端から C 末端の順に、約 5 アミノ酸から約 25 アミノ酸長の第一のアミノ酸配列；配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 1；約 5 アミノ酸から約 25 アミノ酸長の第二のアミノ酸配列；配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 2；約 5 アミノ酸から約 25 アミノ酸長の第三のアミノ酸配列；配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 3；約 5 アミノ酸から約 25 アミノ酸長の第四のアミノ酸配列；配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 1；約 5 アミノ酸から約 25 アミノ酸長の第五のアミノ酸配列；配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 2；約 5 アミノ酸から約 25 アミノ酸長の第六のアミノ酸配列；配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 3；および、約 5 アミノ酸から約 25 アミノ酸長の第七のアミノ酸配列を含む。

10

【0147】

ある態様において、本発明の抗体は、N 末端から C 末端の順に、軽鎖 F R 1 領域；配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 1；軽鎖 F R 2 領域；配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 2；軽鎖 F R 3 領域；配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 3；所望により、軽鎖 F R 4 領域；リンカー領域；所望により、重鎖 F R 1 領域；配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 1；重鎖 F R 2 領域；配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 2；重鎖 F R 3 領域；配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 3；および、重鎖 F R 4 領域を含む。これらの態様のいくつかは、1 つまたはそれ以上の F R 領域がヒト化 F R 領域である。これらの態様のいくつかは、各 F R 領域がヒト化 F R 領域である。リンカー領域は、約 5 アミノ酸から約 50 アミノ酸長、例えば、約 5 a a から約 10 a a 長、約 10 a a から約 15 a a 長、約 15 a a から約 20 a a 長、約 20 a a から約 25 a a 長、約 25 a a から約 30 a a 長、約 30 a a から約 35 a a 長、約 35 a a から約 40 a a 長、約 40 a a から約 45 a a 長、または約 45 a a から約 50 a a 長であり得る。

20

30

【0148】

ある態様において、本発明の抗体は、N 末端から C 末端の順に、重鎖 F R 1 領域；配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 1；重鎖 F R 2 領域；配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 2；重鎖 F R 3 領域；配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 3；所望により、重鎖 F R 4 領域；リンカー；所望により、軽鎖 F R 1 領域；配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 1；軽鎖 F R 2 領域；配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 2；軽鎖 F R 3 領域；配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 3；および、軽鎖 F R 4 領域、を含む。これらの態様のいくつかにおいて、F R 領域の 1 つまたはそれ以上は、ヒト化 F R 領域である。これらの態様のいくつかにおいて、各 F R 領域はヒト化 F R 領域である。リンカー領域は、約 5 アミノ酸から約 50 アミノ酸長、例えば、約 5 a a から約 10 a a 長、約 10 a a から約 15 a a 長、約 15 a a から約 20 a a 長、約 20 a a から約 25 a a 長、約 25 a a から約 30 a a 長、約 30 a a から約 35 a a 長、約 35 a a から約 40 a a 長、約 40 a a から約 45 a a 長、または約 45 a a から約 50 a a 長であり得る。

40

【0149】

ある態様において、本発明の抗体は、N 末端から C 末端の順に、軽鎖 F R 1 領域；配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 1；軽鎖 F R 2 領域；配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 2；軽鎖 F R 3 領域；配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を含む C D

50

R 3 ; 所望により、軽鎖 F R 4 領域 ; リンカー領域 ; 所望により、重鎖 F R 1 領域 ; 配列番号 1 0 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 1 ; 重鎖 F R 2 領域 ; 配列番号 1 1 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 重鎖 F R 3 領域 ; 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 3 ; および、重鎖 F R 4 領域を含む。これらの態様のいくつかにおいて、F R 領域の 1 つまたはそれ以上は、ヒト化 F R 領域である。これらの態様のいくつかにおいて、各 F R 領域はヒト化 F R 領域である。リンカー領域は、約 5 アミノ酸から約 5 0 アミノ酸長、例えば、約 5 a a から約 1 0 a a 長、約 1 0 a a から約 1 5 a a 長、約 1 5 a a から約 2 0 a a 長、約 2 0 a a から約 2 5 a a 長、約 2 5 a a から約 3 0 a a 長、約 3 0 a a から約 3 5 a a 長、約 3 5 a a から約 4 0 a a 長、約 4 0 a a から約 4 5 a a 長、または約 4 5 a a から約 5 0 a a 長であり得る。

10

【0150】

ある態様において、本発明の抗体は、N 末端から C 末端の順に、重鎖 F R 1 領域 ; 配列番号 1 0 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 1 ; 重鎖 F R 2 領域 ; 配列番号 1 1 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 重鎖 F R 3 領域 ; 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 3 ; 所望により、重鎖 F R 4 領域 ; リンカー ; 所望により、軽鎖 F R 1 領域 ; 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 1 ; 軽鎖 F R 2 領域 ; 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 軽鎖 F R 3 領域 ; 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を含む C D R 3 ; および、軽鎖 F R 4 領域を含む。これらの態様のいくつかにおいて、F R 領域の 1 つまたはそれ以上は、ヒト化 F R 領域である。これらの態様のいくつかにおいて、各 F R 領域はヒト化 F R 領域である。リンカー領域は、約 5 アミノ酸から約 5 0 アミノ酸長、例えば、約 5 a a から約 1 0 a a 長、約 1 0 a a から約 1 5 a a 長、約 1 5 a a から約 2 0 a a 長、約 2 0 a a から約 2 5 a a 長、約 2 5 a a から約 3 0 a a 長、約 3 0 a a から約 3 5 a a 長、約 3 5 a a から約 4 0 a a 長、約 4 0 a a から約 4 5 a a 長、または約 4 5 a a から約 5 0 a a 長であり得る。

20

【0151】

本発明の抗体への使用に好適なリンカーは、“可動性リンカー”を含む。リンカー分子は、それが存在するとき、一般的に、結合された領域間の柔軟な動きを可能にするのに十分な長さである。リンカー分子は一般的に、約 6 ~ 5 0 個の原子の長さである。これらのリンカー分子はまた、例えば、アリールアセチレン、2 ~ 1 0 のモノマー単位を含むエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二酸、アミノ酸、またはそれらの組み合わせであることもできる。ポリペプチドに結合し得る他のリンカー分子は、本明細書に記載の長さで使用する事ができる。

30

【0152】

好適なリンカーは、容易に選択することができ、かつ 1 アミノ酸 (例えば、G l y) から 2 0 アミノ酸長、2 アミノ酸から 1 5 アミノ酸長、3 アミノ酸から 1 2 アミノ酸長、4 アミノ酸から 1 0 アミノ酸長、5 アミノ酸から 9 アミノ酸長、6 アミノ酸から 8 アミノ酸長、または 7 アミノ酸から 8 アミノ酸長のようないずれかの好適な異なる長さであってよく、1、2、3、4、5、6 または 7 アミノ酸長であり得る。

【0153】

可動性リンカーの例には、グリシンポリマー (G) _n、グリシン-セリンポリマー (例えば、(G S) _n、G S G G S _n (配列番号 5 8) および G G G S _n (配列番号 5 9)、ここで、n は少なくとも 1 の整数である)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、および当技術分野で公知の他の可動性リンカーが含まれる。グリシンおよびグリシン-セリンポリマーは、それらが両方とも比較的構造化されておらず (unstructured)、そのため成分間のニュートラルなテザーとして機能することができるため興味深い。グリシンポリマーは、グリシンが、アラニンよりも有意に p h i - p s i 空間に到達し、より長い側鎖を有する残基よりも制限されないため、特に興味深い (Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992) を参照のこと)。可動性リンカーの例には、G G S G (配列番号 6 0)、G G S G G (配列番号 6 1)、G S G S G (配列番号 6 2)、G S G G G (配列番号 6 3)、G G G S G (配列番号 6 4)、G S S S G (配列番号 6 5)

40

50

などが含まれるが、これらに限定されない。当業者は、上記の何れかの成分に結合するペプチドの設計が、全体または部分的に可動性のリンカーを含み得ることを認識し得る。例えば、該リンカーは、可動性リンカー、ならびにより柔軟性に劣る構造を与える1またはそれ以上の部分を含み得る。

【0154】

ある場合において、目的の単離された抗体は抗体フラグメント、Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、またはFab'である。故に、本発明は、単離された抗体であって、該抗体が、Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、またはFab'であり、該抗体が、TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を、a)(i)配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1、(ii)配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L CDR2、および(iii)配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L CDR3を含む軽鎖領域、ならびにb)(i)配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H CDR1、(ii)配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H CDR2、および(iii)配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H CDR3を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する、抗体を提供する。これらの態様のいくつかにおいて、単離された抗体は、上記の通り、1、2、3または4個のヒト化V_Lフレームワーク領域を含む。これらの態様のいくつかにおいて、単離された抗体は、上記の通り、1、2、3または4個のヒト化V_Hフレームワーク領域を含む。

【0155】

ある態様において、本発明の抗Tau抗体は、scFv抗体である。ある態様において、本発明の抗Tau抗体は、scFv多量体を含む。例えば、ある態様において、本発明の抗体は、scFv二量体（例えば、2つのタンデムscFv(scFv₂)を含む）、scFv三量体（例えば、3つのタンデムscFv(scFv₃)を含む）、scFvテトラマー（例えば、4つのタンデムscFv(scFv₄)を含む）であり、または5つ以上のscFvの多量体（例えば、タンデムで）である。scFv単量体は、約2アミノ酸から約10アミノ酸(aa)長、例えば、2aa、3aa、4aa、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、または10aa長のリンカーを介してタンデムに結合されていてよい。好適なリンカーには、例えば、(Gly)_x（式中、xは、2から10の整数である）が含まれる。他の好適なリンカーは、上記のものである。ある態様において、目的のscFv多量体における各scFv単量体は、上記の通り、ヒト化されている。

【0156】

ある場合において、本発明の抗体は、免疫グロブリンの定常領域（例えば、Fc領域）を含む。Fc領域は、存在するとき、ヒトFc領域であり得る。定常領域が存在するとき、抗体は、軽鎖および重鎖定常領域の両方を含み得る。好適な重鎖定常領域は、CH1、ヒンジ、CH2、CH3、およびCH4領域を含む。本明細書に記載の抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgE、ならびにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含む任意のアイソタイプを含む全タイプの定常領域を有する抗体を含む。好適な重鎖Fc領域の例は、ヒトアイソタイプIgG1 Fcである。ある場合において、該重鎖領域は、アイソタイプIgG4のものである。これらの態様のいくつかにおいて、ヒンジ領域はS241P置換を含む。例えば、Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105を参照のこと。軽鎖定常領域は、λまたはκであり得る。本発明の抗体（例えば、目的のヒト化抗体）は、2以上のクラスまたはアイソタイプ由来の配列を含み得る。抗体は、2つの軽鎖および2つの重鎖を、個別の重鎖、軽鎖として、Fab、Fab' F(ab')₂およびFvとして含むテトラマーとして発現され得るか、または重鎖および軽鎖可変ドメインがスパーサーを介して結合されている一本鎖抗体として発現され得る。

【0157】

ある態様において、本発明は、単離された抗体であって、該単離された抗体がヒト軽鎖定常領域およびヒト重鎖定常領域を含み、該単離された抗体が、TauポリペプチドのN末端領域内のエピトープへの結合を、a)(i)配列番号1または配列番号7のアミノ酸

配列を含む V_L CDR 1、(i i) 配列番号 2 または配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V_L CDR 2、および (i i i) 配列番号 3 または配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V_L CDR 3 を含む軽鎖領域、ならびに b) (i) 配列番号 4 または配列番号 10 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 1、(i i) 配列番号 5 または配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 2、および (i i i) 配列番号 6 または配列番号 12 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 3 を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する、抗体を提供する。これらの態様のいくつかにおいて、単離された抗体は、上記の通り、1、2、3 または 4 個のヒト化 V_L フレームワーク領域を含む。これらの態様のいくつかにおいて、単離された抗体は、上記の通り、1、2、3 または 4 個のヒト化 V_H フレームワーク領域を含む。

【0158】

10

本発明の抗体は、カルボキシル末端に遊離チオール ($-SH$) 基を含んでいてよく、ここで、該遊離チオール基は、第二のポリペプチド (例えば、本発明の抗体を含む別の抗体)、主鎖、担体などに該抗体を結合させるために用いることができる。

【0159】

ある態様において、本発明の抗体は、1 つまたはそれ以上の天然に存在しないアミノ酸を含む。ある態様において、天然にコード化されないアミノ酸には、カルボニル基、アセチル基、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基、セミカルバジド基、アジド基、またはアルキレン基が含まれる。好適な天然に存在しないアミノ酸に関して、例えば、米国特許番号第 7, 632, 924 号を参照のこと。天然に存在しないアミノ酸を含むと、ポリマー、第二のポリペプチド、主鎖などへの結合が可能となる。例えば、水溶性ポリマーに結合した本発明の抗体は、カルボニル基を含む水溶性ポリマー (例えば、PEG) を抗体に反応させることにより作製可能であって、ここで、該抗体は、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド基を含む天然にコード化されないアミノ酸を含む。別の例としては、水溶性ポリマーに結合した本発明の抗体は、アルキレン含有アミノ酸を含む本発明の抗体を、アジド基を含む水溶性ポリマー (例えば、PEG) と反応させて製造することができる。ある態様において、該アジドまたはアルキレン基は、アミド結合を介して PEG 分子に結合している。“天然にコード化されないアミノ酸”は、20 種の必須アミノ酸うちの 1 つまたはパイロリジン (pyrrolysine) またはセレノシステインでないアミノ酸を意味する。用語“天然にコード化されないアミノ酸”と同義に用いられ得る他の用語は、“天然ではないアミノ酸”、“非天然アミノ酸”、“天然に存在しないアミノ酸”ならびにそのハイフンでつないだ変形およびハイフンでつながない変形を含む。用語“天然にコード化されないアミノ酸”はまた、翻訳複合体によりポリペプチド鎖の伸張時に天然に挿入されないが、天然にコード化されるアミノ酸 (20 個の共通アミノ酸またはパイロリジン (pyrrolysine) およびセレノシステイン) の修飾 (例えば、翻訳後修飾) により生じるアミノ酸を含むが、これらに限定されない。かかる天然に存在しないアミノ酸の例には、N-アセチルグルコサミニル-L-セリン、N-アセチルグルコサミニル-L-スレオニン、および O-ホスホチロシンが含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0160】

ある態様において、本発明の抗体は、ポリマー (例えば、ポリペプチド以外のポリマー) に結合 (例えば、共有結合) している。好適なポリマーには、例えば、生体適合性ポリマー、および水溶性の生体適合性ポリマーが含まれる。好適なポリマーには、合成ポリマーおよび天然に存在するポリマーが含まれる。好適なポリマーには、例えば、置換または非置換の直鎖または分枝鎖ポリアルキレン、ポリアルケニレンまたはポリオキシアルキレンポリマー類または分枝状もしくは非分枝状ポリサッカライド類、例えばホモまたはヘテロポリサッカライドが含まれる。好適なポリマーには、例えば、エチレンビニルアルコールコポリマー (一般名 EVOH または商品名 EVAL として知られる) ; ポリブチルメタクリレート ; ポリ (ヒドロキシバレレート) ; ポリ (L-乳酸) ; ポリカプロラクトン ; ポリ (ラクチド-コ-グリコリド) ; ポリ (ヒドロキシブチレート) ; ポリ (ヒドロキシブチレート-コ-バレレート) ; ポリジオキサノン ; ポリオルトエステル ; ポリ酸無

40

50

水物；ポリ（グリコール酸）；ポリ（D，L－乳酸）；ポリ（グリコール酸－コトリメチレンカーボネート）；ポリリン酸エステル；ポリリン酸エステルウレタン；ポリ（アミノ酸）；シアノアクリレート；ポリ（トリメチレンカーボネート）；ポリ（イミノカーボネート）；コポリ（エーテル－エステル）（例えば、ポリ（エチレンオキシド）－ポリ（乳酸）（PEO／PLA）のコポリマー）；ポリアルキレンオキサレート；ポリホスファゼン；フィブリン、フィブリノーゲン、セルロース、デンプン、コラーゲンおよびヒアルロン酸などの生体分子；ポリウレタン；シリコン；ポリエステル；ポリオレフィン；ポリイソブチレンおよびエチレン- α オレフィンコポリマー；アクリルポリマーおよびアクリルコポリマー；ポリ塩化ビニルなどのハロゲン化ビニルポリマーおよびハロゲン化ビニルコポリマー；ポリビニルメチルエーテルなどのポリビニルエーテル類；ポリフッ化ビニリデンおよびポリ塩化ビニリデンなどのポリビニリデンハライド；ポリアクリロニトリル；ポリビニルケトン；ポリスチレンなどのポリビニル芳香族化合物；ポリビニルアセテートなどのポリビニルエステル類；エチレン－メチルメタクリレートコポリマー、アクリロニトリル－スチレンコポリマー、ABS樹脂、およびエチレン－ビニルアセテートコポリマーなどの互いを有するビニルモノマーとオレフィンのコポリマー；ナイロン66およびポリカプロラクタムなどのポリアミド；アルキド樹脂類；ポリカーボネート；ポリオキシメチレン；ポリイミド；ポリエーテル；エポキシ樹脂類；ポリウレタン；レーヨン；レーヨントリアセテート；セルロース；セルロースアセテート；セルロースブチレート；セルロースアセテートブチレート；セロファン；セルロースニトレート；セルロースプロピオネート；セルロースエーテル；アモルファステフロン；ポリ（エチレングリコール）；ならびに、カルボキシメチルセルロースが含まれる。

【0161】

好適な合成ポリマーには、非置換および置換の、直鎖または分枝鎖ポリ（エチレングリコール）、ポリ（プロピレングリコール）ポリ（ビニルアルコール）、およびそれらの誘導体、例えば、置換ポリ（エチレングリコール）、例えばメトキシポリ（エチレングリコール）、およびその誘導体が含まれる。好適な天然に存在するポリマーには、例えば、アルブミン、アミロース、デキストラン、グリコーゲン、およびそれらの誘導体が含まれる。

【0162】

好適なポリマーは、500Daから50000Da、例えば、5000Daから40000Da、または25000から40000Daの範囲の平均分子量を有し得る。例えば、ある態様において、本発明の抗体が、ポリ（エチレングリコール）（PEG）またはメトキシポリ（エチレングリコール）ポリマーを含むとき、PEGまたはメトキシポリ（エチレングリコール）ポリマーは、約0.5キロダルトン（kDa）から1kDa、約1kDaから5kDa、5kDaから10kDa、10kDaから25kDa、25kDaから40kDa、または40kDaから60kDaの範囲の分子量を有し得る。

【0163】

上記の通り、ある態様において、本発明の抗体は、PEGポリマーに共有結合している。ある態様において、目的のscFv多量体は、PEGポリマーに共有結合している。例えば、Albrecht et al. (2006) J. Immunol. Methods 310:100を参照のこと。タンパク質のPEG化に好適な方法および反応材は、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許番号第5,849,860号に見出され得る。タンパク質との結合に好適なPEGは、一般に、室温で水に可溶であり、一般式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ （式中、Rは水素またはアルキルもしくはアルカノール基のような保護基であり、nは1から1000までの整数である）を有する。式中、Rが保護基であるとき、それは一般的に、1から8個の炭素を有する。

【0164】

PEGと複合体形成した本発明の抗体は直鎖状であってよい。PEGと複合体形成した目的のタンパク質はまた、分枝状であってもよい。米国特許番号第5,643,575号に記載のような“star-PEG”、およびShearwater Polymers, Inc. catalog “Po

10

20

30

40

50

lyethylene Glycol Derivatives 1997-1998.”に記載のような多分枝PEGなどの分枝状PEG誘導体が存在し、スターPEGは、例えば、米国特許番号第6,046,305号を含む、当技術分野の文献に記載されている。

【0165】

本発明の抗体は、グリコシル化されていてよく、例えば、本発明の抗体は、共有結合した糖または多糖部分を含み得る。抗体のグリコシル化は、典型的に、N-結合型またはO-結合型のいずれかである。N-結合型は、アスパラギン残基の側鎖への糖部分の結合を意味する。アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニン（ここで、Xは、プロリンを除く任意のアミノ酸である）のトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への糖鎖部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が存在することになる。O-結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはスレオニンに、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの一つが結合することを意味するが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンが用いられることもある。

10

【0166】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を、上記のトリペプチド配列（N-結合グリコシル化部位の場合）の1つまたはそれ以上が含まれるように変化させることによって都合よく達成することができる。この変化は、基となる抗体の配列への1つまたはそれ以上のセリンまたはスレオニン残基の付加または置換によってもなされる（O-結合グリコシル化部位の場合）。同様に、グリコシル化部位の除去は、抗体の天然のグリコシル化部位内のアミノ酸を改変することによって達成され得る。

20

【0167】

本発明の抗体は、ある態様において、“放射線不透過性の”標識、例えば、X線を用いて容易に可視化できる標識を含む。放射線不透過性物質は、当業者に周知である。最も一般的な放射線不透過性物質としては、ヨウ化物、臭化物またはバリウム塩が含まれる。他の放射線不透過性物質もまた公知であり、有機ビスマス誘導体（例えば、米国特許番号第5,939,045号を参照のこと）、放射線不透過性マルチウレタン（米国特許番号第5,346,981号を参照のこと）、有機ビスマス複合材料（例えば、米国特許番号第5,256,334号を参照のこと）、放射線不透過性バリウム多量体（例えば、米国特許番号第4,866,132号を参照のこと）などが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0168】

本発明の抗体は、例えば、グルタルアルデヒド、ホモ二官能性架橋剤、またはヘテロ二官能性架橋剤を用いて、第2の部分（例えば、脂質、本発明の抗体以外のポリペプチド、合成ポリマー、糖など）と共有結合することができる。グルタルアルデヒドは、それらのアミノ部分を介してポリペプチドと結合する。ホモ二官能性架橋剤（例えば、ホモ二官能性イミドエステル、ホモ二官能性N-ヒドロキシスクシンイミド（NH S）エステル、またはホモ二官能性スルフヒドリル反応性架橋剤）は、2つまたはそれ以上の同一の反応性部分を含み、この架橋剤が、結合するポリペプチドの混合物を含む溶液に添加される一段階反応手順で使用することができる。ホモ二官能性NH Sエステルおよびイミドエステルは、ポリペプチドを含むアミンを結合させる。穏やかなアルカリ性のpHでは、イミドエステルは第一級アミンとのみ反応して、イミドアミドを形成し、クロスリンクされたポリペプチドの全体的な電荷は影響を受けない。ホモ二官能性スルフヒドリル反応性架橋剤には、ビスマレイミドヘキサン（BMH）、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン（DFDNB）、および1,4-ジ-（3',2'-ピリジルジチオ）プロピオアミドブタン（DPDPB）が含まれる。

40

【0169】

ヘテロ二官能性架橋剤は、2つまたはそれ以上の異なる反応性部分（例えば、アミン反応性部分およびスルフヒドリル反応性部分）を有し、アミン反応性部分またはスルフヒド

50

リル反応性部分を介して、ポリペプチドの1つとクロスリンクされ、次いで、反応していない部分を介して他のポリペプチドと反応する。ビリジルジスルフィド架橋剤のように、複数のヘテロ二官能性ハロアセチル架橋剤が利用できる。カルボジイミドは、アミド結合をもたらす、アミンにカルボキシルをカップリングするためのヘテロ二官能性架橋剤の典型例である。

【0170】

本発明の抗体は、固体支持体上に固定化することができる。好適な支持体は当技術分野で周知であり、とりわけ、市販のカラム材料、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁気ビーズ、コロイド金属粒子、ガラスおよび／またはシリコンのチップならびにガラスおよび／またはシリコンの表面、ニトロセルロースストリップ、ナイロン膜、シート、デュラサイト (duracyte)、反応トレーのウェル (例えば、マルチウェルプレート)、ならびにプラスチックチューブなどが含まれる。固体支持体は、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然セルロースおよび修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、ならびに磁鉄鉱を含む種々の物質のいずれかを含み得る。固体支持体上に本発明の抗体を固定化するための好適な方法は周知であり、イオン性、疎水性、および共有結合性の相互作用などを含むが、これらに限定されない。固体支持体は、例えば、水溶液に可溶性または不溶性であり得る。ある態様において、好適な固体支持体は、一般に、水溶液に不溶性である

【0171】

ある態様において、本発明の抗体は検出可能な標識を含む。好適な検出可能な標識には、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段または化学的手段により検出可能な任意の組成物が含まれる。好適なものには、磁気ビーズ (例えば、Dynabead (商標))、蛍光色素 (例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、および黄色蛍光タンパク質など)、放射性標識 (例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^{32}P)、酵素 (例えば、酵素免疫測定法 (ELISA) で一般的に用いられる西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、および他の酵素)、ならびにコロイド金もしくは着色ガラスまたはプラスチック (例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、およびラテックスなど) のビーズなどの比色標識が含まれるが、これらに限定されない。

【0172】

ある態様において、本発明の抗体は、造影剤または放射性同位元素を含み、この造影剤または放射性同位元素は、造影、例えば、ヒトで行われる造影法で使用するのに適するものである。標識の非限定的な例としては、 ^{123}I (ヨウ素)、 ^{18}F (フッ素)、 ^{99}Tc (テクネチウム)、 ^{111}In (インジウム)、および ^{67}Ga (ガリウム) などの放射性同位元素、ならびにガドリニウム (Gd)、ジスプロシウム、および鉄などの造影剤が含まれる。放射性Gdアイソトープ (^{153}Gd) も利用可能であり、非ヒト哺乳動物における造影処理に適する。本発明の抗体は、標準的な技術を用いて標識することができる。例えば、本発明の抗体は、クロラミンTまたは1, 3, 4, 6-テトラクロロ-3 α , 6 α -ジフェニルグリコールウリルを用いてヨウ素化することができる。フッ素化では、フッ素は、フッ化物イオンの置換反応によって、合成時に本発明の抗体に添加される。かかる放射性同位元素を用いるタンパク質の合成の概説については、Muller-Gartner, H., TIB Tech., 16:122-130 (1998) and Saji, H., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 16(2):209-244 (1999)を参照のこと。本発明の抗体は、標準的な技術を介して造影剤でも標識することができる。例えば、本発明の抗体は、Gdジエチレントリアミン五酢酸 (GdDTPA) またはGdテトラアザシクロドデカンテトラ酢酸 (GdDOTA) などの低分子Gdキレートに該抗体に結合させることによってGdで標識することができる。Caravan et al., Chem. Rev. 99:2293-2352 (1999) and Lauffer et al., J. Magn. Reson. Imaging, 3:11-16 (1985)を参照のこと。本発明の抗体は、例えば、ポリリジン-G

dキレートを本抗体に結合させることによってG dで標識することができる。例えば、Curtet et al., Invest. Radiol., 33(10):752-761 (1998)を参照のこと。あるいは、本発明の抗体は、アビジンを有するG dキレート脂質を含む常磁性の重合リボソームおよびビオチン化抗体をインキュベートすることによってG dで標識することができる。例えば、Sipkins et al., Nature Med., 4:623-626 (1998)を参照のこと。

【0173】

本発明の抗体に結合することができる好適な蛍光タンパク質には、例えば、米国特許第6,066,476号、同第6,020,192号、同第5,985,577号、同第5,976,796号、同第5,968,750号、同第5,968,738号、同第5,958,713号、同第5,919,445号、同第5,874,304号に記載のオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質またはその変異体もしくは誘導体；例えば、高感度GFP、例えば、クロンテック社から市販されている多くのそのようなGFP；赤色蛍光タンパク質；黄色蛍光タンパク質；ならびに、例えば、Matz et al. (1999) Nature Biotechnol. 17:969-973に記載の、花虫類種由来の種類の蛍光タンパク質および着色タンパク質のいずれかなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0174】

ある態様において、本発明の抗体は、融合パートナー、例えば、リガンド；エピトープタグ；ペプチド；および抗体以外のタンパク質などに結合（例えば、共有結合または非共有結合）させ得る。好適な融合パートナーには、インビボでの安定性の強化（例えば、血清半減期の増加）をもたらすペプチドおよびポリペプチド；精製の容易さをもたらすペプチドおよびポリペプチド、例えば、(His)_n、例えば、6Hisなど；細胞から融合タンパク質を分泌させるペプチドおよびポリペプチド；エピトープタグを提供するペプチドおよびポリペプチド、例えば、GST、ヘマグルチニン(HA；例えば、YPYDVPDYA；配列番号71)、FLAG（例えば、DYKDDDDK；配列番号69）、c-myc（例えば、EQKLISEEDL；配列番号68）など；検出可能なシグナルを提供するペプチドおよびポリペプチド、例えば、検出可能な産物を生成する酵素（例えば、β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ）、またはそれ自体が検出可能であるタンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質など；ならびに、多量体化をもたらすペプチドおよびポリペプチド、例えば、免疫グロブリンのFc部分などの多量体化ドメインが含まれる。

【0175】

融合には、例えば、同定または精製に有用な、固体支持体上に固定化されたものなどの結合パートナーと相互作用することができるペプチド配列を含む親和性ドメインも含まれ得る。ヒスチジンなどの連続した単一アミノ酸は、タンパク質と融合させると、ニッケルセファロースなどの樹脂カラムへの高親和性結合によって、この融合タンパク質の一段階精製のために用いることができる。親和性ドメインの例としては、His5(HHHHHH)（配列番号66）、HisX6(HHHHHH)（配列番号67）、C-myc(EQKLISEEDL)（配列番号68）、Flag(DYKDDDDK)（配列番号69）、StreptTag(WSHPQFEK)（配列番号70）、赤血球凝集素、例えば、HAタグ(YPYDVPDYA；配列番号71)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン、セルロース結合ドメイン、RYIRS（配列番号72）、Phe-His-His-Thr（配列番号73）、キチン結合ドメイン、S-ペプチド、T7ペプチド、SH2ドメイン、C末端RNAタグ、WEAAREACCRECCARA（配列番号74）、金属結合ドメイン、例えば、亜鉛結合ドメイン、またはカルシウム結合タンパク質、例えば、カルモジュリン、トロポニンC、カルシニューリンB、ミオシン軽鎖、リカバリン、S-モジュリン、ビジニン、VILIP、ニューロカルシン、ヒポカルシン、フリクエニン、カルトラクチン、カルパインの大サブユニット、S100タンパク質、パルブアルブミン、カルビンジンD9K、カルビンジンD28K、およびカルレチニン、インティン、ビオチン、ストレプトアビジン、MyoD、ロイシンジッパー配列、およびマルトース結合タンパク質に由来するドメインなどのカルシウム結合ドメイン

が含まれる。

【0176】

ある態様において、本発明の抗体を、内在性血液脳関門（BBB）受容体に結合するポリペプチドに結合させる。内在性BBB受容体に結合するポリペプチドに本発明の抗体を結合すると、例えば、本発明の抗体を、それを必要としている個体に投与することを含む本発明の治療法（以下参照）において、BBBの通過を促進する。内在性BBB受容体に結合する好適なポリペプチドには、内在性BBB受容体に特異的に結合する抗体、例えば、モノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントが含まれる。好適な内在性BBB受容体には、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、レプチン受容体、リポタンパク質受容体、およびインスリン様増殖因子受容体が含まれるが、これらに限定されない。例えば、米国特許公開第2009/0156498号を参照のこと。

10

【0177】

一例として、本発明の抗Tau抗体は、Tauポリペプチド内のエピトープ（例えば、Tauのアミノ末端（N末端）部分内、例えば、Tauのアミノ酸1-25内、Tauのアミノ酸1-18内、またはTauのアミノ酸9から18内の直鎖状エピトープ）に特異的に結合する第一の抗原結合部分、および内在性BBB受容体に結合する第二の抗原結合部分を含む、二重特異性抗体であり得る。例えば、ある例において、本発明の抗Tau抗体は、Tauポリペプチド内のエピトープ（例えば、Tauのアミノ末端（N末端）部分内の、例えば、Tauのアミノ酸1-25内、Tauのアミノ酸1-18内、またはTauのアミノ酸9から18内の直鎖状エピトープ）に特異的に結合する第一の抗原結合部分、およびトランスフェリン受容体に結合する第二の抗原結合部分を含む、二重特異性抗体である。

20

【0178】

例えば、本発明の抗Tau抗体は、BBBの通過を促進するペプチドに結合されていてよく、該ペプチドは、約15アミノ酸から約25アミノ酸長を有し、以下のペプチド：Angiopep-1（TFFYGGCRGKRNNFKTEEY；配列番号75）；Angiopep-2（TFFYGGSRGKRNNFKTEEY；配列番号76）；cys-Angiopep-2（CTFFYGGSRGKRNNFKTEEY；配列番号77）；Angiopep-2-cys（TFFYGGSRGKRNNFKTEEYC；配列番号78）；ならびに、アプロチニンフラグメント（TFVYGGCRAKRNNFKS；配列番号79）のうち1つに少なくとも約85%のアミノ酸配列の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、米国特許公開第2011/0288011号および同第2009/0016959号を参照のこと。BBBの通過を促進するペプチドは、抗Tau軽鎖領域のN末端、抗Tau軽鎖領域のC末端、抗Tau重鎖領域のN末端、抗Tau重鎖領域のC末端、目的の抗Tau一本鎖抗体のN末端、および目的の抗Tau一本鎖抗体のC末端などに連結されていてよい。

30

【0179】

ある態様において、本発明の抗体は、ポリアミン修飾を含む。本発明の抗体のポリアミン修飾は、修飾された抗体のBBBでの透過性を高める。本発明の抗体は、天然に存在するかまたは合成のいずれかであるポリアミンで修飾することができる。例えば、米国特許第5,670,477号を参照のこと。有用な天然に存在するポリアミンには、プトレシン、スペルミジン、スペルミン、1,3-ジアミノプロパン、ノルスペルミジン、合成のホモスペルミジン、テルミン(thermine)、テルモスペルミン、カルドペンタミン、ホモカルドペンタミン、およびカナバルミンが含まれる。プトレシン、スペルミジンおよびスペルミンは、特に有用である。合成ポリアミンは、実験式 $C_xH_yN_z$ で構成され、さらに、1~6個のNR部分または $N(R)_2$ 部分（式中、Rは、H、 (C_1-C_4) アルキル、フェニルまたはベンジルである）を含む、環式もしくは非環式の、分枝状または非分枝状の3~12個の炭素原子の炭化水素鎖であり得る。ポリアミンは、任意の標準的なクロスリンク法を用いて抗体に結合させることができる。

40

【0180】

50

ある態様において、本発明の抗体は、糖部分を含むように改変され、この糖部分は本抗体に共有結合することができる。ある態様において、本発明の抗体は脂質部分を含むように改変され、この脂質部分は本抗体に共有結合することができる。好適な脂質部分には、例えば、N-ラウロイル、N-オレオイルなどのN-脂肪酸アシル基；ドデシルアミン、オレオイルアミンなどの脂肪族アミン；およびC3～C16の長鎖脂肪族脂質などが含まれる。例えば、米国特許第6,638,513号を参照のこと。ある態様において、本発明の抗体はリポソームに組み込まれている。

【0181】

本発明の抗体の製造方法

本発明の抗体は、例えば、常套のタンパク質合成法；組み換えDNA法などのいずれかの公知の方法により製造できる。

【0182】

本発明の抗体が一本鎖ポリペプチドであるとき、それは、標準的化学ペプチド合成法を用いて合成することができる。ポリペプチドが化学的に合成されるとき、合成は、液相または固相を用いて行われ得る。配列のC末端アミノ酸が不溶性支持体に結合され、次いで配列中の残りのアミノ酸の連続的付加を行う、固相ポリペプチド合成法（SPPS）は、本発明の抗体の化学合成のための好適な方法の一例である。FmocおよびBocのようなSPPSの種々の形態が、本発明の抗体を合成するために利用可能である。固相合成法は、Barany and Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284 in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield, et al. J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963); Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); および、Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med Chem. 6:3-10 および、Camarero JA et al. 2005 Protein Pept Lett. 12:723-8に記載される。要約すれば、低分子の不溶性の多孔質ビーズを、ペプチド鎖が構築される機能的単位（functional unit）で処理する。カップリング／脱保護の反復サイクル後、結合した固相の遊離N末端アミンを、単一のN-保護されたアミノ酸単位にカップリングさせる。その後、この単位を脱保護し、さらなるアミノ酸を結合させ得る新しいN末端アミンを出現させる。ペプチドを固相上に固定したままにし、切断前に濾過工程を行う。

【0183】

標準的組み換え法を、本発明の抗体の製造に使用できる。例えば、所望により定常領域に結合した軽鎖および重鎖可変領域をコード化する核酸を、発現ベクター中に挿入する。該軽鎖および重鎖を、同じか、または異なる発現ベクター中でクローニングし得る。免疫グロブリン鎖をコード化するDNA断片を、発現ベクター中の制御配列に操作可能に連結して、免疫グロブリンポリペプチドの発現を確実にする。発現制御配列には、プロモーター（例えば、天然に結合しているか、または異種のプロモーター）、シグナル配列、エンハンサーエレメント、および転写終結配列が含まれるが、これらに限定されない。発現制御配列は、真核宿主細胞（例えば、COSまたはCHO細胞）を形質転換またはトランスフェクトすることの可能なベクター中の真核プロモーターシステムであり得る。一旦、ベクターが適当な宿主に組み込まれると、宿主を、ヌクレオチド配列の高レベルな発現、ならびに抗体の収集および精製に好適な条件下で維持する。

【0184】

コードの縮重のため、種々の核酸配列が各々の免疫グロブリンアミノ酸配列をコードし得る。所望の核酸配列はde novo固相DNA合成または所望のポリヌクレオチドの早期に調製された変異体のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）突然変異誘発によって產生することができる。標的ポリペプチドDNAの置換、欠失および挿入変異体を調製するためには、オリゴヌクレオチドを仲介する突然変異誘発が好ましい方法の一例である。Adelman et al., DNA 2:183 (1983)を参照のこと。要約すれば、標的ポリペプチドDNAは、一本鎖DNA鋳型に対し所望の突然変異をコードするオリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることによって、変性される。ハイブリダイゼーション後、オリゴヌクレオチドプライ

マーを組み込む鋳型の第2の相補鎖全体を合成するためにDNAポリメラーゼが使用され、これが標的ポリペプチドDNA内の選択された変性をコードする。

【0185】

好適な発現ベクターは、典型的に、エピソームとして、または宿主染色体DNAの一部として、宿主生体内で複製可能である。通常、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にするために、選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、カナマイシン耐性またはネオマイシン耐性）を含む。

【0186】

大腸菌は、本発明の抗体をコード化するポリヌクレオチドをクローニングするのに使用され得る原核細胞宿主の一例である。使用に適したその他の微生物宿主には、バチルス・サチリスのようなかん菌、およびサルモネラ、セラチアなどのその他のエンテロバクター、および種々のシュドモナス種が含まれる。これらの原核生物宿主の中で、宿主細胞と相容性のある発現制御配列（例えば複製起点）を典型的に含むような発現ベクターも作ることができる。さらに、ラクトースプロモーター系、トリプトファン（trp）プロモーター系、ベクターラクタマーゼプロモーター系、またはファージラムダからのプロモーター系のような多数の周知のプロモーターが存在し得る。プロモーターは、典型的に、所望によりオペレーター配列と共に発現を制御し、転写および翻訳を開始し完成させるためリボソーム結合部位配列などを有する。

【0187】

酵母のような他の微生物も発現のために有用である。サッカロマイセス属（例えば、出芽酵母）およびピチア属が好ましい酵母宿主細胞の例であり、好適なベクターは、望まれる通りに、発現制御配列（例えば、プロモーター）、複製起点、終結配列などを有する。典型的なプロモーターは、3-ホスホグリセレートキナーゼおよびその他の解糖酵素を含む。酵母の誘導プロモーターは、特に、アルコールデヒドロゲナーゼ由来のプロモーター、イソシトクロムC、およびマルトースおよびガラクトース利用を担う酵素を含む。

【0188】

微生物に加えて、哺乳動物細胞（例えば、インビトロ細胞培養において増殖される哺乳動物細胞）も、本発明の抗Tau抗体（例えば、本発明の抗Tau抗体をコード化するポリヌクレオチド）を発現し産生するのに使用することができる。Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)を参照のこと。好適な哺乳動物宿主細胞には、CHO細胞株、種々のCos細胞株、HeLa細胞株、骨髓腫細胞株、および形質転換したB細胞またはハイブリドーマが含まれる。これらの細胞用の発現ベクターには、発現制御配列、例えば複製起点、プロモーター、およびエンハンサー（Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)）、ならびにリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列といった必要なプロセッシング情報部位が含まれてよい。好適な発現制御配列の例は、免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、サイトメガロウイルスなど由来のプロモーターである。Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992)を参照のこと。

【0189】

一旦、合成されると（化学的に、または組み換え的に何れか）、全抗体、その二量体、個々の軽鎖および重鎖、または本発明の抗体の他の形態（例えば、scFvなど）は、硫酸アンモニウム沈降、親和性カラム、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）精製、ゲル電気泳動などを含む、当技術分野で標準的な方法により精製することができる（一般に、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)を参照のこと）。本発明の抗体は、実質的に純粋であり得て、例えば、少なくとも約80%から85%純粋、少なくとも約85%から90%純粋、少なくとも約90%から95%純粋、または98%から99%、またはそれ以上純粋であり得て、例えば、細胞残屑、本発明の抗体以外的高分子などのような混入物質を含まない。

【0190】

組成物

本発明は、本発明の抗体を含む組成物を提供する。本発明の抗体組成物は、本発明の抗体に加えて、下記の1つまたはそれ以上：塩、例えば、 NaCl 、 MgCl_2 、 KCl 、 MgSO_4 など；緩衝剤、例えば、トリス緩衝液、 N -(2-ヒドロキシエチル)ピペラジーン- N' -(2-エタンスルホン酸) (HEPES)、2-(N -モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES)、2-(N -モルホリノ)エタンスルホン酸ナトリウム塩 (MES)、3-(N -モルホリノ)プロパンスルホン酸 (MOPS)、 N -トリス[ヒドロキシメチル]メチル-3-アミノプロパンスルホン酸 (TAPS) など；可溶化剤；洗浄剤、例えば、 Tween-20 などのような非イオン性洗浄剤；プロテアーゼ阻害剤；グリセロールなどを含み得る。

10

【0191】

核酸、発現ベクター、および宿主細胞

本発明は、本発明の抗 Tau 抗体をコード化するヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

【0192】

本発明の抗 Tau 抗体をコード化するヌクレオチド配列は、軽鎖可変領域をコード化するヌクレオチド配列であって、図1Bに示され、配列番号17に記載のヌクレオチド配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%のヌクレオチドの配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいてよい。

20

【0193】

本発明の抗 Tau 抗体をコード化するヌクレオチド配列は、重鎖可変領域をコード化するヌクレオチド配列であって、図1Aに示され、配列番号18に記載のヌクレオチド配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%のヌクレオチドの配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいてよい。

【0194】

本発明の抗 Tau 抗体をコード化するヌクレオチド配列は、軽鎖可変領域をコード化するヌクレオチド配列であって、図2Bに示され、配列番号19に記載のヌクレオチド配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%のヌクレオチドの配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいてよい。

30

【0195】

本発明の抗 Tau 抗体をコード化するヌクレオチド配列は、重鎖可変領域をコード化するヌクレオチド配列であって、図2Aに示され、配列番号20に記載のヌクレオチド配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%のヌクレオチドの配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいてよい。

【0196】

本発明の抗体をコード化するヌクレオチド配列は、意図する標的細胞（例えば、コードされた抗体を合成するために遺伝指摘に修飾された細胞）中でのヌクレオチド配列の発現を可能にする、プロモーターおよびエンハンサーのような1つまたはそれ以上の制御エレメントに操作可能に結合されていてよい。

40

【0197】

好適なプロモーターおよびエンハンサーエレメントは、当技術分野で公知である。細菌細胞での発現に関して、好適なプロモーターには、 lacI 、 lacZ 、 T3 、 T7 、 gpt 、 lambda P および trc が含まれるが、これらに限定されない。真核細胞における発現に関して、好適なプロモーターには、軽鎖および／または重鎖免疫グロブリン遺伝子プロモーターおよびエンハンサーエレメント；サイトメガロウイルス前初期プロモーター；単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーター；前記および後期 SV40

50

プロモーター；レトロウイルス由来の長い末端反復に存在するプロモーター；マウスメタロチオネイン-I プロモーター；および、多様な当技術分野で公知の組織特異的プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

【0198】

ある態様において、例えば、酵母細胞における発現に関して、好適なプロモーターは、ADH1プロモーター、PGK1プロモーター、ENOプロモーター、PYK1プロモーターなどの構成的プロモーター；または、GAL1プロモーター、GAL10プロモーター、ADH2プロモーター、PHO5プロモーター、CUP1プロモーター、GAL7プロモーター、MET25プロモーター、MET3プロモーター、CYC1プロモーター、HIS3プロモーター、ADH1プロモーター、PGKプロモーター、GAPDHプロモーター、ADC1プロモーター、TRP1プロモーター、URA3プロモーター、LEU2プロモーター、ENOプロモーター、TP1プロモーター、およびAOX1（例えば、Pichiaでの使用用）などの調節可能プロモーターである。適当なベクターおよびプロモーターの選択は、十分に当業者のレベルの範囲内である。

【0199】

原核宿主細胞での使用に好適なプロモーターとしては、バクテリオファージT7 RNAPポリメラーゼプロモーター；trpプロモーター；lacオペロンプロモーター；ハイブリッドプロモーター、例えば、lac/tacハイブリッドプロモーター、tac/trcハイブリッドプロモーター、trp/lacプロモーター、T7/lacプロモーター；trcプロモーター；tacプロモーターなど；araBADプロモーター；インビボで調節されたプロモーター、例えば、ssaGプロモーターまたは関連するプロモーターなど（例えば、米国特許公開第20040131637号を参照のこと）、pagCプロモーター（Pulkkinen and Miller, J. Bacteriol., 1991: 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda et al., PNAS, 1992; 89(21): 10079-83）、nirBプロモーター（Harborne et al. (1992) Mol. Micro. 6:2805-2813）など（例えば、Dunstan et al. (1999) Infect. Immun. 67:5133-5141; McKelvie et al. (2004) Vaccine 22:3243-3255; および、Chatfield et al. (1992) Biotechnol. 10:888-892を参照のこと）；sigma70プロモーター、例えば、コンセンサスsigma70プロモーター（例えば、GenBankアクセッション番号AX798980、AX798961およびAX798183を参照のこと）；静止期プロモーター、例えば、dpsプロモーター、spvプロモーターなど；病原性アイランドSPI-2由来プロモーター（例えば、WO96/17951号を参照のこと）；actAプロモーター（例えば、Shetron-Rama et al. (2002) Infect. Immun. 70:1087-1096を参照のこと）；rpsMプロモーター（例えば、Valdivia and Falkow (1996). Mol. Microbiol. 22:367を参照のこと）；tetプロモーター（例えば、Hillen, W. and Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. and Heinemann, U. (eds), Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction. Macmillan, London, UK, Vol. 10, pp. 143-162を参照のこと）；SP6プロモーター（例えば、Melton et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12:7035を参照のこと）などが含まれるが、これらに限定されない。大腸菌などの原核細胞で使用するのに好適な強力なプロモーターとしては、Trc、Tac、T5、T7およびPLambdaが含まれるが、これらに限定されない。細菌宿主細胞で使用するためのオペレーターの非限定的な例としては、ラクトースプロモーターオペレーター（LacIリプレッサータンパク質は、ラクトースと接触すると、立体構造を変化させて、それによりLacIリプレッサータンパク質がオペレーターと結合するのを防ぐ）、トリプトファンプロモーターオペレーター（トリプトファンと複合体を形成するとき、TrpRリプレッサータンパク質はオペレーターに結合する立体構造を有する；トリプトファンの非存在下では、TrpRリプレッサータンパク質は、オペレーターに結合しない立体構造を有する）、およびtacプロモーターオペレーター（例えば、deBoer et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25を参照のこと）が含まれる。

【0200】

本発明の抗体をコード化するヌクレオチド配列は、発現ベクターおよび／またはクローニングベクター中に存在することができる。本発明の抗体が2つの別個のポリペプチドを含むとき、該2つのポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列は、同じか、または別個のベクター中にクローニングされ得る。発現ベクターは、選択可能マーカー、複製起点、およびベクターの複製および／または維持を提供するその他の機能を含み得る。

【0201】

多数の好適なベクターおよびプロモーターが当業者には知られており、多くが目的の組み換え構築体の生成のために市販されている。以下のベクターは、例示として記載される。細菌：pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs Ks、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA) ; pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540およびpRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)。真核：pWLn eo、pSV2cat、pOG44、PXRL、pSG (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL (Pharmacia)。

【0202】

発現ベクターは、一般に、異種タンパク質をコード化する核酸配列の挿入を可能にするようにプロモーター配列の近くに位置した好都合な制限部位を有する。発現宿主中で作動する選択可能マーカーが存在してもよい。好適な発現ベクターとしては、ウイルスベクター（例えば、種痘ウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス（例えば、Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borrás et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:108 8 1097, 1999; WO 94/12649、WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984およびWO 95/00655を参照のこと）、アデノ随伴ウイルス（例えば、Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998, Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2 857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997, Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591 594, 1996; Srivastava in WO 93/09239, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822 3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154 165; および、Flotte et al., PNAS (1993) 90:10613 10617を参照のこと）、SV40; 単純ヘルペスウイルス; ヒト免疫不全ウイルス（例えば、Miyo shi et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812 7816, 1999を参照のこと）; レトロウイルスベクター（例えば、マウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ならびにラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスなどのレトロウイルス由来のベクター）などが含まれるが、これらに限定されない。

【0203】

上記の通り、目的の核酸は、本発明の抗体をコード化するヌクレオチド配列を含む。目的の核酸は、IPN001の重鎖および軽鎖CDRをコード化するヌクレオチド配列を含み得る。ある態様において、目的の核酸は、IPN002の重鎖および軽鎖CDRをコード化するヌクレオチド配列を含み、ここで、該CDRをコード化する配列は、FRをコード化するヌクレオチド配列と共に組み込まれている。ある態様において、FRをコード化するヌクレオチド配列は、ヒトのFRをコード化するヌクレオチド配列である。

【0204】

宿主細胞

本発明は、目的の核酸で遺伝子的に改変されている、分離された遺伝子的に改変された宿主細胞（例えば、インビトロ細胞）を提供する。ある態様において、目的の分離された遺伝子的に改変された宿主細胞は、本発明の抗体を製造し得る。

【0205】

好適な宿主細胞には、真核宿主細胞、例えば哺乳動物細胞、昆虫宿主細胞、酵母細胞; および、原核細胞、例えば細菌細胞が含まれる。目的の核酸の宿主細胞への導入は、例え

ばリン酸カルシウム沈降、DEAEデキストランが仲介するトランスフェクション、リボソームが仲介するトランスフェクション、エレクトロポレーション、または他の既知の方法によって実施可能である。

【0206】

好適な哺乳動物細胞には、初代細胞および不死化細胞株が含まれる。好適な哺乳動物細胞株としては、ヒト細胞株、非ヒト霊長動物細胞株、齧歯動物（例えば、マウス、ラット）の細胞株などが含まれる。好適な哺乳動物細胞株には、HeLa細胞（例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）番号CCL-2）、CHO細胞（例えば、ATCC番号CRL9618、CCL61、CRL9096）、293細胞（例えば、ATCC番号CRL1573）、ペロ細胞、NIH3T3細胞（例えば、ATCC番号CRL-1658）、Huh-7細胞、BHK細胞（例えば、ATCC番号CCL10）、PC12細胞（ATCC番号CRL1721）、COS細胞、COS-7細胞（ATCC番号CRL1651）、RAT1細胞、マウスL細胞（ATCC番号CCLI-3）、ヒト胎児腎臓（HEK）細胞（ATCC番号CRL1573）、HLHepG2細胞などが含まれるが、これらに限定されない。

【0207】

好適な酵母細胞としては、ピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）、ピチア・フィンランドイカ（*Pichia finlandica*）、ピチア・トレハロフィラ（*Pichia trehalophila*）、ピチア・コクラメ（*Pichia koclamae*）、ピチア・メンブラネファシーエンス（*Pichia membranaefaciens*）、ピチア・オープンチエ（*Pichia opuntiae*）、ピチア・サーモトレランス（*Pichia thermotolerans*）、ピチア・サリクタリア（*Pichia salictaria*）、ピチア・グエルクウム（*Pichia guercuum*）、ピチア・ピエペリ（*Pichia pijperi*）、ピチア・スチピーチス（*Pichia stipitis*）、ピチア・メタノリカ（*Pichia methanolica*）、ピチア属（*Pichia sp.*）、サッカロミセス・セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、サッカロミセス属（*Saccharomyces sp.*）、ハンゼヌラ・ポリモルファ（*Hansenula polymorpha*）、クルイベロミセス属（*Kluyveromyces sp.*）、クルイベロミセス・ラクチス（*Kluyveromyces lactis*）、カンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）、アスペルギルス・ニジューランス（*Aspergillus nidulans*）、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）、アスペルギルス・オリゼ（*Aspergillus oryzae*）、トリコデルマ・レーゼイ（*Trichoderma reesei*）、クリソスポリウム・ルクノウェンス（*Chrysosporium lucknowense*）、フザリウム属（*Fusarium sp.*）、フザリウム・グラミネウム（*Fusarium gramineum*）、フザリウム・ベネナツム（*Fusarium venenatum*）、ニューロスポラ・クラッサ（*Neurospora crassa*）、緑藻クラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）などが含まれるが、これらに限定されない。

【0208】

好適な原核細胞としては、大腸菌、乳酸菌属、サルモネラ属、赤痢菌属などの任意の多様な実験室株が含まれるが、これらに限定されない。例えば、Carrier et al. (1992) J. Immunol. 148:1176-1181; 米国特許番号第6,447,784号; および、Sizemore et al. (1995) Science 270:299-302を参照のこと。典型的に、実験室株は、非病原性の株である。他の好適な細菌の限定されない例としては、枯草菌（*Bacillus subtilis*）などが含まれるが、これらに限定されない。ある態様において、宿主細胞は大腸菌である。

【0209】

医薬製剤

本発明は、本発明の抗体を含む医薬組成物を含む、組成物を提供する。一般に、製剤は、有効量の本発明の抗体を含む。“有効量”は、望まれる結果、例えば、タウオパチーと関係する有害な症状の軽減、タウオパチーの症状の改善、タウオパチーの進行遅延などを生じるのに十分な投与量を意味する。一般に、所望の結果は、対照と比較して、タウオパチーの症状が少なくとも軽減していることである。本発明の抗体は、以下により詳細に記載するとおり、血液脳関門を避けるような方法で送達され得る。本発明の抗体は、該抗体が血液脳関門を通過し得るように、製剤および／または修飾され得る。

【0210】

本発明は、a) T a u のN末端部分内のエピトープに特異的に結合する抗体（ここで、該抗体は、(i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1；(i i) 配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L CDR2；(i i i) 配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L CDR3；(i v) 配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H CDR1；(v) 配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H CDR2；および、(v i) 配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H CDR3を含む）、ならびにb) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤、を含む医薬製剤(該製剤はエンドトキシンを含まない)を提供する。

10

【0211】

本発明は、a) T a u ポリペプチドのアミノ酸15-24内のエピトープに特異的に結合する単離されたヒト化モノクローナル抗体、およびb) 薬学的に許容される賦形剤(ある態様において、該薬学的に許容される賦形剤は、ヒトへの投与に好適である)を含む医薬製剤を提供する。

20

【0212】

本発明は、A) ヒト化軽鎖フレームワーク領域およびヒト化重鎖フレームワーク領域を含む単離された抗体(ここで、単離された抗体は、T a u ポリペプチドのN末端領域内のエピトープに対する結合を、a) (i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1；(i i) 配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L CDR2；および、(i i i) 配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L CDR3、を含む軽鎖領域、ならびにb) (i) 配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H CDR1；(i i) 配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H CDR2；および、(i i i) 配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H CDR3、を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する)、ならびにB) 薬学的に許容される賦形剤(ある態様において、該薬学的に許容される賦形剤は、ヒトへの投与に好適である)を含む医薬製剤を提供する。

30

【0213】

本発明は、A) 単離された抗体であって、該抗体が、F v、s c F v、F a b、F (a b') 2、またはF a b'であり、T a u ポリペプチドのN末端領域内のエピトープに対する結合を、a) (i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1；(i i) 配列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含むV_L CDR2；および、(i i i) 配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含むV_L CDR3、を含む軽鎖領域；ならびに、b) (i) 配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H CDR1；(i i) 配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H CDR2；および、(i i i) 配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H CDR3、を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する抗体；ならびに、B) 薬学的に許容される賦形剤(ある態様において、該薬学的に許容される賦形剤は、ヒトへの投与に好適である)を含む医薬製剤を提供する。

40

【0214】

本発明は、A) 単離された抗体(該単離された抗体は、ヒト軽鎖定常領域およびヒト重鎖定常領域を含み、T a u ポリペプチドのN末端領域内のエピトープに対する結合を、a) (i) 配列番号1または配列番号7のアミノ酸配列を含むV_L CDR1；(i i) 配

50

列番号2または配列番号8のアミノ酸配列を含む V_L CDR2;および、(iii)配列番号3または配列番号9のアミノ酸配列を含む V_L CDR3、を含む軽鎖領域;ならびに、(i)配列番号4または配列番号10のアミノ酸配列を含む V_H CDR1;(ii)配列番号5または配列番号11のアミノ酸配列を含む V_H CDR2;および、(iii)配列番号6または配列番号12のアミノ酸配列を含む V_H CDR3、を含む重鎖領域、を含む抗体と競合する);ならびに、B)薬学的に許容される賦形剤(ある態様において、該薬学的に許容される賦形剤は、ヒトへの投与に好適である)を含む医薬製剤を提供する。

【0215】

製剤

本発明の方法において、本発明の抗体は、所望の治療効果または診断効果をもたらし得るいずれかの便利な手段を用いて宿主に投与され得る。故に、薬物は、治療的投与のために種々の製剤に組み込まれ得る。より具体的には、本発明の抗体は、適当な薬学的に許容される担体または希釈剤と組み合わせて医薬組成物に剤形されてよく、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏、溶液、坐薬、注射、吸入剤およびエアロゾル剤のような固体、半固体、液体またはガス状の製剤に剤形され得る。

【0216】

医薬投与量形態において、本発明の抗体は、それらの薬学的に許容される塩の形態で投与され得るか、またはそれらは、単独もしくは適当に、ならびに他の薬学的に活性な化合物と組み合わせて使用されてもよい。以下の方法および賦形剤は、単に例示として記載され、限定を意図するものではない。

【0217】

経口用製剤に関して、本発明の抗体は、単独で、または錠剤、散剤、顆粒剤またはカプセル剤を製造するための適当な添加剤と組み合わせて、例えば、常套の添加剤、例えばラクトース、マンニトール、コーンデンプンまたはジャガイモデンプンなど;結合剤、例えば結晶質セルロース、セルロース誘導体、アカシア、コーンデンプンまたはゼラチンなど;崩壊剤、例えば、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプンまたはカルボキシメチルセルロースナトリウムなど;滑剤、例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウムなど;および、要すれば、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、防腐剤および着香剤と組み合わせて用いることができる。

【0218】

本発明の抗体は、水溶性溶媒または非水溶性溶媒、例えば、野菜もしくは他の類似の油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸のエステルまたはプロピレングリコールなどに;および、要すれば、可溶化剤、等張剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤および防腐剤などの常套の添加剤と共に、それらを溶解、懸濁または乳化することにより、注射用製剤に製剤することができる。

【0219】

本発明の抗体を含む医薬組成物は、所望の純度を有する抗体を、任意の生理的に許容される担体、賦形剤、安定化剤、界面活性剤、緩衝剤および/または等張化剤と混合することにより製造される。許容される担体、賦形剤および/または安定化剤は、用いる投与量および濃度で受容者(レシピエント)に毒性ではなく、リン酸、クエン酸、および他の有機酸のような緩衝剤;アスコルビン酸、グルタチオン、システイン、メチオニンおよびクエン酸を含む、抗酸化剤;防腐剤(例えば、エタノール、ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、p-クロロ-m-クレゾール、メチルまたはプロピルパラベン、塩化ベンザルコニウム、またはそれらの組合せなど);アミノ酸、例えば、アルギニン、グリシン、オルニチン、リシン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、イソロイシン、ロイシン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、プロリンおよびそれらの組合せなど;単糖類、二糖類および他の炭水化物;低分子量(約10残基未満)ポリペプチド;タンパク質、例えば、ゼラチンまたは血清アルブミン;キレート剤、例えばEDTA;糖、例えばトレハロース、スクロース、ラクトース

10

20

30

40

50

、グルコース、マンノース、マルトース、ガラクトース、フルクトース、ソルボース、ラフィノース、グルコサミン、N-メチルグルコサミン、ガラクトサミン、およびノイラミン酸など；ならびに／または、非イオン性界面活性剤、例えば、Tween、Brij、プルロニック類、トライトン-X、またはポリエチレングリコール（PEG）などが含まれる。

【0220】

医薬組成物は、液体形態、凍結乾燥形態または凍結乾燥形態から再構成された液体形態であってよく、ここで、凍結乾燥製剤は、投与前に滅菌溶液で再構成される。凍結乾燥組成物を再構成するための標準的方法は、（典型的に、凍結乾燥中に除かれる容量と等量の）純水を戻す方法である。しかしながら、抗菌剤を含む溶液は、非経腸投与用医薬組成物の製造に用いられ得る；Chen (1992) Drug Dev Ind Pharm 18, 1311-54もまた参照のこと。

10

【0221】

目的の医薬組成物における抗体濃度の例は、約1 mg/mLから約200 mg/mLまたは約50 mg/mLから約200 mg/mL、または約150 mg/mLから約200 mg/mLの範囲であり得る。

【0222】

抗体の水性製剤は、pH緩衝溶液として、例えば、約4.0から約7.0、または約5.0から約6.0の範囲のpH、あるいは約5.5のpHで製造され得る。この範囲内のpHに好適な緩衝液の例には、ホスフェート、ヒスチジン、クエン酸、コハク酸、酢酸緩衝液、および他の有機酸緩衝液が含まれる。緩衝液の濃度は、約1 mMから約100 mM、または約5 mMから約50 mMであり得て、例えば、緩衝液および製剤の所望の等張性によって変わる。

20

【0223】

等張化剤は、製剤の等張性を調節するために抗体製剤に包含され得る。等張化剤の例としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリンおよびアミノ酸群由来のいずれかの成分、糖類ならびにそれらの組合せが含まれる。ある態様において、高張性または低張性溶液が好適であり得るが、水性製剤は等張性である。用語“等張性”は、例えば、生理的な塩溶液または血清と比較される他の溶液と同程度の等張性を有する溶液を示す。等張化剤は、約5 mMから約350 mMの量、例えば、100 mMから350 mMの量で使用され得る。

30

【0224】

界面活性剤はまた、製剤された抗体の凝集を減らす、および／または製剤中の粒子の形成を最小化する、および／または吸収を減らすために、抗体製剤に追加され得る。界面活性剤の例としては、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（Tween）、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（Brij）、アルキルフェニルポリオキシエチレンエーテル（トライトン-X）、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマー（ポリキサマー、Pluronic）、およびドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が含まれる。好適なポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（Tween）の例は、ポリソルベート20、（Tween 20（商標）の消費名で販売）およびポリソルベート80（Tween 80TM（商標）の消費名で販売）である。好適なポリエチレンポリプロピレンコポリマーの例は、商品名プルロニック（登録商標）F68またはポリキサマー188（商標）で販売されるものである。好適なポリオキシエチレンアルキルエーテルの例は、商標名Brij（商標）で市販されるものである。界面活性剤の濃度の例は、約0.001%から約1% w/vの範囲であり得る。

40

【0225】

凍結乾燥保護剤（lyoprotectant）はまた、凍結乾燥法の間に変化しやすい活性成分（例えば、タンパク質）を保護するために添加され得る。例えば、公知の凍結乾燥保護剤としては、糖類（グルコースおよびスクロースを含む）；ポリオール（マンニトール、ソルビトールおよびグリセロールを含む）；および、アミノ酸（アラニン、グ

50

リシンおよびグルタミン酸を含む)が含まれる。凍結乾燥保護剤は、約10mMから500nMの量で含まれ得る。

【0226】

ある態様において、本発明の製剤は、本発明の抗体、および1つまたはそれ以上の上記の薬物(例えば、界面活性剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤)を含み、1種またはそれ以上の防腐剤、例えばエタノール、ベンジルアルコール、フェノール、*m*-クレゾール、*p*-クロロ-*m*-クレゾール、メチルまたはプロピルパラベン、塩化ベンザルコニウム、およびそれらの組合せを基本的に含まない。他の態様において、防腐剤は、製剤、例えば、約0.001から約2%(w/v)の範囲の濃度で、製剤中に含まれる。

【0227】

例えば、本発明の製剤は、非経腸投与に好適な液体または凍結乾燥製剤であってよく、約1mg/mLから約200mg/mLの本発明の抗体；約0.001%から約1%の少なくとも1種の界面活性剤；約1mMから約100mMの緩衝剤；任意に、約10mMから約500mMの安定化剤；および、約5mMから約305mMの等張化剤を含んでいてよく、約4.0から約7.0のpHを有する。

【0228】

別の例として、本発明の非経腸製剤は、約1mg/mLから約200mg/mLの本発明の抗体；0.04% Tween 20 w/v；20mM L-ヒスチジン；および、250mM スクロースを含み、pH5.5である、液体または凍結乾燥製剤である。

【0229】

別の例として、本発明の非経腸製剤は、1) 15mg/mLの本発明の抗体；0.04% Tween 20 w/v；20mM L-ヒスチジン；および、250mM スクロースを含み、pH5.5である凍結乾燥製剤、または2) 75mg/mLの本発明の抗体；0.04% Tween 20 w/v；20mM L-ヒスチジン；および、250mM スクロースを含み、pH5.5である凍結乾燥製剤、または3) 75mg/mLの本発明の抗体；0.02% Tween 20 w/v；20mM L-ヒスチジン；および、250mM スクロースを含み、pH5.5である凍結乾燥製剤、または4) 75mg/mLの本発明の抗体；0.04% Tween 20 w/v；20mM L-ヒスチジン；および、250mM トレハロースを含み、pH5.5である凍結乾燥製剤、または6) 75mg/mLの本発明の抗体；0.02% Tween 20 w/v；20mM L-ヒスチジン；および、250mM トレハロースを含み、pH5.5である凍結乾燥製剤、を含む。

【0230】

別の例として、本発明の非経腸製剤は、1) 7.5mg/mLの本発明の抗体；0.022% Tween 20 w/v；120mM L-ヒスチジン；および、250125mM スクロースを含み、pH5.5である液体製剤、または2) 37.5mg/mLの本発明の抗体；0.02% Tween 20 w/v；10mM L-ヒスチジン；および、125mM スクロースを含み、pH5.5である液体製剤、または3) 37.5mg/mLの本発明の抗体；0.01% Tween 20 w/v；10mM L-ヒスチジン；および、125mM スクロースを含み、pH5.5である液体製剤、または4) 37.5mg/mLの本発明の抗体；0.02% Tween 20 w/v；10mM L-ヒスチジン；125mM トレハロースを含み、pH5.5である液体製剤、または5) 37.5mg/mLの本発明の抗体；0.01% Tween 20 w/v；10mM L-ヒスチジン；および、125mM トレハロースを含み、pH5.5である液体製剤、または6) 5mg/mLの本発明の抗体；0.02% Tween 20 w/v；20mM L-ヒスチジン；および、250mM トレハロースを含み、pH5.5である液体製剤、または7) 75mg/mLの本発明の抗体；0.02% Tween 20 w/v；20mM L-ヒスチジン；および、250mM マンニトールを含み、pH5.5である液体製剤、または8) 75mg/mLの本発明の抗体；0.02% Tween 20 w/v；20mM L-ヒスチジン；および、140mM

10

20

30

40

50

塩化ナトリウムを含み、pH 5.5である液体製剤、または9) 150 mg/mLの本発明の抗体；0.02% Tween 20 w/v；20 mM L-ヒスチジン；および、250 mM トレハロースを含み、pH 5.5である液体製剤、または10) 150 mg/mLの本発明の抗体；0.02% Tween 20 w/v；20 mM L-ヒスチジン；および、250 mM マンニトールを含み、pH 5.5である液体製剤、または11) 150 mg/mLの本発明の抗体；0.02% Tween 20 w/v；20 mM L-ヒスチジン；および、140 mM 塩化ナトリウムを含み、pH 5.5である液体製剤、または12) 10 mg/mLの本発明の抗体；0.01% Tween 20 w/v；20 mM L-ヒスチジン；および、40 mM 塩化ナトリウムを含み、pH 5.5である液体製剤である。

10

【0231】

本発明の抗体は、吸入により投与されるエアロゾル製剤に利用され得る。本発明の抗体は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などのような加圧された許容される噴射剤に製剤され得る。

【0232】

さらに、本発明の抗体は、乳化基剤または水溶性基剤のような種々の基剤と混合されて坐薬に製剤され得る。本発明の抗体は、坐薬の形で直腸から投与され得る。坐薬は、カカオバター、カーボワックスおよびポリエチレングリコールのようなビークルであって、体温で融解するが、室温では固化するビークルを含み得る。

【0233】

シロップ剤、エリクシル剤、および懸濁液のような経口または直腸投与用単位投与量形態は、各投与量単位、例えば、小さじ一杯、大さじ一杯、錠剤または坐薬が、所定の量の、1つまたはそれ以上の阻害剤を含む組成物を含むように提供され得る。同様に、注射または静脈内投与用の単位投与量形態は、滅菌水、通常の生理食塩水または別の薬学的に許容される担体中の溶液として、組成物中に本発明の抗体を含み得る。

20

【0234】

本明細書で用いる用語“単位投与量形態”は、ヒトおよび動物対象の単位投与量として適する、物理的に分離された単位を意味し、それぞれの単位は、薬学的に許容される希釈剤、担体またはビークルと共に、所望の効果を生じるために十分な量で計算された、事前に決定された量の抗T_au抗体を含む。本発明の抗体の仕様は、用いる特定の抗体および達成する効果、ならびに宿主におけるそれぞれの抗体に関連する薬理学に左右され得る。

30

【0235】

他の投与方法はまた、本明細書に記載の方法との使用が見出され得る。例えば、本発明の抗体は、坐薬に製剤され得て、いくつかの場合に、エアロゾルおよび点鼻組成物に製剤され得る。坐薬について、ビークル組成物は、従来の結合剤および例えばポリアルキレングリコール、またはトリグリセリドのような担体を含み得る。そのような坐薬は、約0.5%から約10% (w/w)、例えば、約1%から約2%の範囲で活性成分を含む混合物から形成され得る。

【0236】

点鼻製剤は、通常、鼻粘膜に炎症を起こさず、繊毛機能を顕著に低下させない、ビークルを含み得る。水、生理食塩水または他の公知の物質のような希釈剤が用いられ得る。鼻用製剤はまた、クロロブタノールおよび塩化ベンザルコニウムのような防腐剤を含み得るが、これらに限定されない。界面活性剤は、鼻粘膜による本発明の抗体の吸収を増強するために存在し得る。

40

【0237】

本発明の抗体は、注射可能製剤として投与され得る。典型的に、注射可能組成物は、液体溶液または懸濁液として製造され、注射前に液体に溶解または懸濁するのに適した固体形態としても製造することができる。該製剤を乳化すること、または該抗体をリボソームビークル中に封入されてもよい。

【0238】

50

好適な賦形剤ビークルは、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組合せである。加えて、要すれば、該ビークルは、少量の補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤またはpH緩衝剤などを含み得る。そのような投与量形態を製造する実際の方法は公知であり、または当業者には明らかであり得る。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17th edition, 1985を参照のこと。いずれにしても、投与される組成物または製剤は、処置されるべき対象を所望の状態にするのに十分な量の本発明の抗体を含み得る。

【0239】

薬学的に許容される賦形剤、例えばビークル、アジュバント、担体または希釈剤は、容易に入手可能である。さらに、薬学的に許容される補助物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、浸透圧調節剤、安定化剤、および湿潤剤などは、容易に入手可能である。

10

【0240】

ある態様において、本発明の抗体を、制御放出製剤に製剤化する。持続放出製剤は、当技術分野で公知の方法を用いて製造され得る。持続放出製剤の好適な例としては、抗体を含む固体の疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、該マトリックスは、成形品の形態、例えばフィルムまたはマイクロカプセルである。持続放出マトリックスの例としては、ポリエステル、L-グルタミン酸およびエチルーL-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、ヒドロゲル、ポリラクチド、分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー、ならびにポリ-D-(+)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。持続放出製剤中に含まれる抗体の生物活性を消失させ、免疫原性を変化させる可能性は、適当な補助物質を用いること、水分含量を調節すること、および特定のポリマーマトリックス組成物を開発することにより、妨げられ得る。

20

【0241】

本発明の範囲内の制御放出は、多くの持続放出投与量形態のいずれか1つを意味すると解釈することができる。以下の用語は、本発明の目的のために、制御放出と実質的に同等とみなすことができる：連続的放出、制御放出、遅延放出 (delayed release)、デポー、徐放、長期放出、プログラム放出、持続放出、比例した放出、遅延放出 (protracted release)、持続性の、遅らせた、遅い放出、間隔をあけた放出、持続放出 (sustained release)、タイムコート、持続放出 (timed release)、遅延作用、延長された作用、レイヤードタイム作用、長時間作用型、持続性作用、反復作用、遅行性、持続作用 (sustained action)、持続作用薬、および持続放出 (extended release)。これらの用語のさらなる詳解は、Lesczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms, 1987 (CRC Press, Inc.)に見出され得る。

30

【0242】

種々の制御放出技術は、非常に広い範囲の薬物投与量形態を包含する。制御放出技術には、物理システムおよび化学システムが含まれるが、これらに限定されない。

【0243】

物理システムには、マイクロカプセル化、マクロカプセル化、および膜システムなどの速度制御膜を含む貯蔵システム；中空繊維、超微小孔性セルローストリアセテート、および多孔質ポリマー基質および発泡体などの速度制御膜を含まない貯蔵システム；非多孔性のポリマーマトリックスまたはエラストマーマトリックス（例えば、浸食されない環境の、浸食され得る環境の、薬剤移入、および分解）に物理的に溶解されるそれらのシステム、および非多孔性のポリマーマトリックスまたはエラストマーマトリックス（例えば、浸食されない環境の、浸食され得る環境の、薬剤移入、および分解）に物理的に分散した物質を含む一体化したシステム；外側制御層に化学的に類似の、または非類似の貯蔵層を含む積層構造；ならびに、浸透圧ポンプ、またはイオン交換樹脂上の吸着などの他の物理的方法が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0244】

化学システムには、ポリマーマトリックスの化学的浸食（例えば、不均一な浸食、もしくは均一な浸食）、またはポリマーマトリックスの生物学的浸食（例えば、不均一、もし

50

くは均一)が含まれるが、これらに限定されない。制御放出システムのカテゴリーのさらなる詳解は、Agis F. Kydonieus, Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications, 1980 (CRC Press, Inc.)中に見出され得る。

【0245】

経口投与用に関連される多くの制御放出製剤がある。これらには、浸透圧制御型消化管送達システム；動水圧制御型消化管送達システム；微多孔膜透過制御型消化管送達デバイスを含む膜透過制御型消化管送達システム；胃液耐性腸標的化制御放出型消化管送達デバイス；ゲル拡散制御型消化管送達システム；および、イオン交換制御型消化管送達システムが含まれるが、これらに限定されず、これらには、カチオン性薬物およびアニオン性薬物が含まれる。制御放出型薬物送達システムに関するさらなる情報は、Yie W. Chien, Novel Drug Delivery Systems, 1992 (Marcel Dekker, Inc.)中に見出され得る。

10

【0246】

投与量

好適な投与量は、担当医または他の有資格医療従事者により、種々の臨床的因子に基づき決定され得る。医学分野の当業者には周知の通り、ある患者への投与量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与されるべき特定の化合物、患者の性別、投与時間および投与経路、一般的健康、ならびに同時に投与される他の薬物を含む、多くの因子によって変わる。本発明の抗体は、1投与当たり、1 ng/kg体重から20 mg/kg体重、例えば0.1 mg/kg体重から10 mg/kg体重、例えば0.5 mg/kg体重から5 mg/kg体重の量で投与され得る。しかしながら、例示範囲以下の用量または以上の用量が、とりわけ上記の因子を考慮して、考えられる。レジメンが持続点滴療法であるとき、それは、体重1 kg当たり、1分当たり、1 μgから10 mgの範囲であり得る。

20

【0247】

当業者なら、用量レベルは、特定の抗体、対象の症状の重症度および副作用に対する感受性に依拠して変えることができることを容易に理解するであろう。所定の化合物の好ましい投与量は、様々な手段によって、当業者が容易に決定することができる。

【0248】

投与経路

本発明の抗体を、インビボ法およびエキソビボ法、ならびに全身投与経路および局所投与経路を含む、薬物送達に適した任意の利用可能な方法および経路を用いて個体に投与する。

30

【0249】

従来の投与経路および薬学的に許容される投与経路には、鼻腔内投与、筋肉内投与、気管内投与、頭蓋内投与、皮下投与、皮内投与、局所適用、静脈内投与、動脈内投与、経腸投与、経鼻投与、経口投与および他の経腸投与ならびに非経口投与が含まれる。投与経路は、必要に応じて、抗体および／または所望の効果に応じて組み合わせるか、または調整することができる。本発明の抗体組成物は、単回用量または複数回用量で投与することができる。ある態様において、本発明の抗体組成物を経口投与する。ある態様において、本発明の抗体組成物を、吸入経路を介して投与する。ある態様において、本発明の抗体組成物を鼻腔内投与する。ある態様において、本発明の抗体組成物を鼻腔内投与する。ある態様において、本発明の抗体組成物を局所投与する。ある態様において、本発明の抗体組成物を頭蓋内投与する。ある態様において、本発明の抗体組成物を静脈内投与する。ある態様において、本発明の抗体組成物を髄腔内投与する。

40

【0250】

本発明の抗体は、全身経路または局所経路を含む従来の薬物の送達に適した任意の利用可能な従来の方法および経路を用いて、宿主に投与することができる。一般に、本発明によって企図される投与経路には、経腸経路、非経腸経路、または吸入経路が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。

【0251】

吸入投与以外の非経腸経路には、局所経路、経皮経路、皮下経路、筋肉内経路、眼窩内

50

経路、囊内経路、脊髄内経路、胸骨内経路、静脈内経路、および動脈内経路、すなわち、消化管を通る経路以外の任意の投与経路が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。非経腸投与は、本発明の抗体の全身送達または局所送達をもたらすために行うことができる。全身送達が望まれるとき、投与には、典型的に、侵襲的または全身に吸収される医薬製剤の局所投与または粘膜投与が含まれる。

【0252】

本発明の抗体は、経腸投与によって、対象に送達することもできる。経腸投与には、経口送達および直腸（例えば、坐剤を使用する）送達が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。

【0253】

治療とは、少なくとも、宿主を苦しめている病的状態と関連する症状の改善を意味し、改善は、少なくとも、あるパラメーター、例えば、タウオパチーのような、治療されている病的状態と関連する症状の大きさの低下を意味ために広い意味で用いられる。このように、治療には、病的状態、または少なくともそれと関連する症状が、完全に抑制される、例えば、発生を防ぐか、または止める、例えば、終わらせる状態も含まれ、その結果、宿主は、もはや病的状態を有しない、または少なくともその病的状態を特徴づける症状を有しない。

【0254】

ある態様において、本発明の抗体は、例えば、脳動脈のある部位に、または脳組織に直接、注射および／または送達により投与される。本発明の抗体はまた、標的部位に直接、例えば、標的部位に微粒子銃送達系（biolistic delivery）により投与される。

【0255】

様々な宿主（ここで、用語“宿主”は、本明細書で“対象”、“個体”および“患者”という用語と互換的に用いられる）は、本方法に従って治療可能である。一般に、かかる宿主は“哺乳動物”または“哺乳類（mammalian）”であり、これらの用語は、飼育肉食動物（例えば、イヌおよびネコ）、齧歯動物（例えば、マウス、モルモット、およびラット）、ならびに霊長動物（例えば、ヒト、チンパンジー、およびサル）を含む哺乳類クラス内の生物を記載するために広く用いられる。ある態様において、これらの宿主はヒトである。

【0256】

本発明の抗体の単位用量、例えば経口または注射用量を含むキットが提供される。かかるキットにおいて、単位用量を含む容器に加えて、目的の病状の治療における抗体の使用および付随する利点を記載する情報のパッケージ挿入物がある。好ましい化合物および単位用量は、上記のものである。

【0257】

検出法

本発明は、個体から得られた生物学的サンプル中のT a uポリペプチドを検出するインビトロ方法、および生存個体中のT a uポリペプチドのインビボ検出方法を提供する。本発明のインビトロ検出方法は、定量的であり得る。故に、T a uは、タウオパチーの進行、またはタウオパチー処置への応答のバイオマーカーとなり得る。

【0258】

検出／定量されるT a uポリペプチドは、a) 完全長T a u；b) 完全長T a uのN末端フラグメント；c) 全量T a u（ここで、“全量T a u”とは、いずれかのイソ形の完全長T a uを含み得る）；d) 遊離T a u、例えば、本発明の抗T a u抗体に結合していないT a u；ならびに、e) 生物学的サンプル中に存在し、本発明の抗T a u抗体により認識されるエピトープを提示する、いずれかのN末端T a uフラグメントであり得る。ヒト完全長T a uのアミノ酸配列は、図6A-Dに示す。

【0259】

ある場合において、本検出法はさらに、生物学的サンプルにおけるA β 40および／またはA β 42のレベルを決定することを含み得る。生物学的サンプルにおけるA β 40お

10

20

30

40

50

よび／またはA β 42のレベルの決定は、免疫学的アッセイ（例えば、ELISA）を用いて、例えば、A β 40および／またはA β 42を結合する抗体を用いて、行われ得る。

【0260】

好適な生物学的サンプルには、例えば、脳脊髄液、血液、血漿、血清、尿、および唾液が含まれる。

【0261】

個体から得られた生物学的サンプル中のTauポリペプチドの本発明のインビトロ検出方法は、a) 本明細書に記載の通り、生物学的サンプルと抗Tau抗体を接触させ、そしてb) サンプル中に存在するTauポリペプチドへの抗体の結合を検出すること、を含む。ある場合において、抗Tau抗体は、図1Aおよび1Bに示されるVHおよび／またはVL CDRを含む。ある場合において、抗Tau抗体は、図2Aおよび2Bに示されるVHおよび／またはVL CDRを含む。

10

【0262】

本発明の検出方法は、個体がタウオパチーを有する、またはその発症リスクを有するかどうかを決定するために用いられ得る。本発明の検出方法は、タウオパチーのステージ（重症度）を決定するために用いられ得る。本発明の検出方法は、タウオパチーを処置するための処置レジメンに対する患者の応答を決定するために用いられ得る。生物学的サンプルは、本発明の検出方法を用いて試験され得て、ここで、該生物学的サンプルは、タウオパチーを有する個体、タウオパチーを有すると診断された個体、タウオパチーを発症する遺伝的素因を有する個体などから得られる。

20

【0263】

本発明は、個体における神経変性タウオパチーの診断方法を提供する。該方法は、一般的に、(a) 個体から得られた生物学的サンプル中のTauポリペプチドのレベルを評価し、そして(b) Tauポリペプチドのレベルを、参照対照値、標準対照値、または正常対照対象におけるTauのレベルを示す正常対照値と比較すること、を含む。生物学的サンプルおよび正常対照値におけるTauポリペプチドのレベルの顕著な相違は、該個体が神経変性タウオパチーを有することを示す。

【0264】

本発明は、個体における神経変性タウオパチーの進行をモニターする方法、またはその処置に対する応答をモニターする方法を提供する。該方法は、一般的に、第一の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおけるTauポリペプチドのレベルを、第二の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおけるTauポリペプチドのレベルと比較することを含む。第二の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおけるTauポリペプチドのレベルの、第一の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおけるTauポリペプチドのレベルとの比較における相違は、i) タウオパチーが進行しているかどうか、または疾患の進行が停止しているかどうか、および／またはii) タウオパチーがどの程度早く進行しているか、および／またはiii) 個体が、タウオパチーを処置するための薬剤または他の処置レジメンでの処置に有益な臨床応答を示しているかどうかの指標を提供し得る。

30

【0265】

本発明は、タウオパチーの診断方法を提供する。例えば、本発明の方法は、アルツハイマー病(AD)の診断を提供し得る。例えば、生きている個体由来の生物学的サンプル（例えば、CSFまたは他の液体生物学的サンプル）におけるTauポリペプチドのレベルは、ADのBraakステージとしての指標を提供し得る。Braak and Braak (1995) Neurobiol. Aging 16:271。例えば、生きている個体由来の生物学的サンプルにおけるTauポリペプチドのレベルは、該個体がADの移行嗅内野ステージ(transentorhinal stage) I-I I; ADの固有海馬ステージ(limbic stage) I I I-I V; または、ADの新皮質連合ステージ(neocortical stage) V-V Iであるかどうかの指標を提供し得る。

40

【0266】

生物学的サンプルにおけるTauポリペプチドのレベルは、当技術分野で公知の好適な

50

方法により評価することができる。好適な方法は、タンパク質（“ウエスタン”）ブロット法、免疫沈降法、酵素免疫吸着測定法（ELISA）、放射免疫測定法（RIA）、蛍光活性化細胞分類法（FACS）、二次元ゲル電気泳動法、質量分析法（MS）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI-TOF）、表面エンハンス型レーザー脱離イオン化法（SELDI-TOF）、高速液体クロマトグラフィー法（HPLC）、高圧タンパク質液体クロマトグラフィー法（FPLC）、多次元液体クロマトグラフィー（LC）とその後のタンデム質量分析（MS/MS）、ならびにレーザー濃度測定法が含まれるが、これらに限定されない。

【0267】

本発明は、個体におけるタウオパチーの進行をモニターする方法を提供し、ここで、該方法は、一般的に、a) 第一の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおけるT a uポリペプチドの第一レベルを決定し、b) 第二の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおけるT a uポリペプチドの第二のレベルを決定し、そしてc) T a uの第一レベルと第二レベルを比較すること、を含む。該決定する工程は、i) 生物学的サンプルを本発明の抗T a u抗体と接触させ、i i) サンプル中に存在するT a uポリペプチドへの抗体の結合を定量すること、を含み得る。

【0268】

ある場合において、第一の時点は、処置レジメンの開始前の時点であり、第二の時点は、処置レジメンの開始後の時点である。従って、本明細書は、タウオパチーを処置する薬物での処置に対する応答をモニターする方法を提供し、ここで、該方法は、a) タウオパチーの薬物処置が始まる前の第一の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおけるT a uポリペプチドの第一レベルを決定し、b) タウオパチーの薬物処置開始後の第二の時点で個体から得られた生物学的サンプルにおけるT a uポリペプチドの第二のレベルを決定し、そしてc) T a uの第一レベルと第二レベルを比較すること、を含む。

【0269】

タウオパチーの進行をモニターする本発明の方法はまた、シヌクレイン病、例えば、パーキンソン病（PD）；レビー小体型認知症（DLB）；多系統萎縮症（MSA）などの進行をモニターする方法にも適用され得て、例えば、認知症を伴うPD（PDD）の進行は、本発明の方法でモニターできる。

【0270】

あるタウオパチーにおいて、T a uのレベルは、疾患の進行に従って増加する。他のタウオパチーにおいて、T a uのレベルは、疾患の進行に従って減少する。従って、例えば、T a uのレベルは、ADの進行に従って増加し、FTDの進行に従って減少する。

【0271】

本発明の方法は、本発明の抗T a u抗体を含むキットまたはアッセイ装置の使用を含み得る。本発明は、本明細書に記載の方法を実行するためのキットおよびアッセイ装置を提供する。本発明のキットは、本明細書に記載の抗T a u抗体を含む。

【0272】

抗T a u抗体は、不溶性支持体（例えば、テストストリップ、マルチウェルプレートの各ウェル、ビーズ（例えば、磁気ビーズ）など）に固定化され得る。好適な支持体は当技術分野で周知であり、とりわけ、市販のカラム材料、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁気ビーズ、コロイド金属粒子、ガラスおよび／またはシリコンのチップならびにガラスおよび／またはシリコンの表面、ニトロセルロースストリップ、ナイロン膜、シート、反応トレイ（例えば、マルチウェルプレート）のウェル、ならびにプラスチックチューブなどが含まれる。固体支持体は、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然セルロースおよび修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、および磁鉄鉱を含む種々の物質のいずれかを含み得る。固体支持体上に本抗体を固定化するための好適な方法は周知であり、イオン性、疎水性、および共有結合性の相互作用などを含むが、これらに限定されない。固体支持体は、例えば、水溶液に可溶または不溶であり得る。

ある態様において、好適な固体支持体は、一般に、水溶液に不溶である。

【0273】

本発明の抗T a u抗体は、検出可能な標識を含む。抗体が検出可能な標識を含むとき、本発明のキットは、検出可能な標識を生じる1種またはそれ以上の試薬を含み得る。標識された抗体は、化学発光剤、微粒子標識、比色剤、エネルギー転移剤、酵素、蛍光剤、または放射性同位元素のような標識を含み得る。好適な検出可能な標識には、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段または化学的手段により検出可能な任意の組成物が含まれる。好適な検出可能な標識には、蛍光標識（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質など）；放射性標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^{32}P ）；および、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、ならびに蛍光的手段、比色手段または分光学的手段により検出され得る生成物を生じる基質として働く他の酵素）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0274】

本発明のキットはさらに、1つまたはそれ以上の付加的成分を含んでいてよく、ここで、好適な付加的成分には、1）陽性対照；2）バッファー（例えば、結合バッファー；洗浄バッファーなど）；3）検出可能なシグナルを生じるのに使用される試薬などが含まれる。該キットの他の任意の成分には、プロテアーゼ阻害剤；検出可能な標識などが含まれる。該キットの種々の成分は、別個の容器中に存在していてよいが、または任意の相溶性成分が、要すれば、単一の容器内で予め混合されていてよい。

20

【0275】

上記の成分に加えて、本発明のキットは、本発明の方法を実行するためのキットの成分の使用のための指示書を含み得る。本発明の方法を実行するための指示書は、一般に、好適な記録媒体に記録されている。例えば、該指示書は、紙またはプラスチックなどのような物質に印刷されていてよい。そのようなものとして、指示書は、パッケージ挿入物としてキット中に存在する、キットまたはその構成要素（すなわち、パッケージまたはサブパッケージと関連して）などの容器の標識に存在していてよい。他の態様において、該指示書は、好適なコンピューターの読み出し可能な記録媒体、例えば、コンパクトディスク読み出し専用記憶装置（C D - R O M）、デジタル多用途ディスク（D V D）、フロッピーディスクなどに存在する電子記憶データとして存在する。さらに他の態様において、実際の指示書は、キットに存在せず、リモート・ソースから、例えばインターネットを介して、指示書を得るための手段が提供される。この態様の例は、指示書が見られ、および／または指示書がダウンロードされ得る、ウェブアドレスを含むキットである。指示書と共に、この指示書を得るための手段が、適当な回路基板に記録される。

30

【0276】

アッセイ装置は、固体基質上に固定された本発明の抗T a u抗体を含んでいてよい。アッセイ装置は、さまざまな形式のもの、例えば、テストストリップ、ディップスティックなどであり得る。

【0277】

インビボイメージング

上記の通り、本発明は、例えば、インビボイメージング技術により、生きている個体におけるT a uポリペプチドの検出方法を提供する。例えば、1つの態様において、T a uポリペプチドのインビボイメージングは、陽電子放出断層撮影（P E T）、単一光子放射断層撮影（S P E C T）、近赤外（N I R）分光法、または核磁気共鳴画像法（M R I）により達成できる。本発明の抗T a u抗体が個体に投与され、T a uポリペプチドの存在および／またはレベルが検出される。抗T a u抗体は、P E T、S P E C T、N I R、またはM R Iにおける使用に好適な標識を含み得る。そのような標識には、造影剤または放射性同位元素が含まれ、該造影剤または放射性同位元素は、イメージング、例えば、上記の通り、ヒトに行われるイメージング方法における使用に好適なものである。ある場合に

40

50

において、抗T a u抗体は、I P N 0 0 1のV Hおよび／またはV L C D Rを含む。ある場合において、抗T a u抗体は、I P N 0 0 2のV Hおよび／またはV L C D Rを含む。抗T a u抗体は、上記の通り、1つまたはそれ以上のヒト化フレームワーク領域を含む。

【0278】

レポート作成

ある例において、本発明の検出方法は、個体から得られた生物学的サンプルにおけるT a uポリペプチドの検出、および検出したT a uポリペプチドのレベルに基づき、レポートの作成および／または生物学的サンプルが得られた個体の治療またはマネジメントの方向付けを行うことを含む。

10

【0279】

レポートは、個体がタウオパチーを有する可能性があるかどうかの指標、タウオパチーの重症度の指標、個体がタウオパチーの処置に対して有益な臨床応答を示すかどうかの指標などの1つまたはそれ以上を含み得る。

【0280】

従って、レポートは、個体がタウオパチーを有する、またはタウオパチーを発症し得るかどうかの予測；さらなる評価に関する勧告；治療薬および／または他の健康管理への介入に関する勧告などのような情報を含み得る。

【0281】

例えば、本明細書に記載の方法はさらに、目的の評価の結果を提供するレポートを作成または出力する工程を含み得て、該レポートは、電子媒体の形態（例えば、コンピューターモニター上の電子表示）で、または有形的表現媒体の形態（例えば、紙に印刷されたものまたは他の有形的表現媒体）で提供され得る。個体がタウオパチーを有する、またはタウオパチーを発症する危険性を有する可能性の評価は、“リスクレポート”、“リスクスコア”または“可能性のスコア”として示され得る。レポートを作成する個人または機関（“レポート作成者”）はまた、サンプル収集、サンプル処理などのような工程を行うこともできる。あるいは、レポート作成者以外の機関は、サンプル収集、サンプル処理などのような工程を行うことができる。リスク評価レポートは、ユーザーに提供され得る。“ユーザー”とは、医療専門家（例えば、臨床医、研究者、または研究医）であり得る。

20

【0282】

健康管理の方向性

ある例において、本発明の検出方法は、個体から得られた生物学的サンプルにおけるT a uポリペプチドを検出すること、および検出されたT a uポリペプチドのレベルに基づき、レポートの作成および／または生物学的サンプルが得られた個体の治療またはマネジメントの方向付けを行うことを含む。

30

【0283】

従って、例えば、本発明の検出方法の結果によって、タウオパチーの治療的介入（処置）を施されている個体および／または特別な健康管理が考慮されている個体に、忠告がなされ得る。

【0284】

治療的介入には、例えば、アルツハイマー病の処置のための薬物療法が含まれ得る。アルツハイマー病の処置のための薬物療法の例としては、A r i c e p t（ドネペジル）、E x e l o n（リバスチグミン）、メトリホナート、およびタクリン（C o g n e x）を含むが、これらに限定されないアセチルコリンエステラーゼ阻害剤；抗A β 抗体（例えば、s o l a n e z u m a b（ソラネズマブ））；抗T a u抗体；イブプロフェンおよびインドメタシンを含むが、これに限定されない非ステロイド性抗炎症剤；C e l e b r e xのようなシクロオキシゲナーゼ2（C o x 2）阻害剤；ならびに、S e l e g i l e n e（E l d e p r y lまたはデプレニル）のようなモノアミンオキシダーゼ阻害剤、が含まれるが、これらに限定されない。上記の各薬物の投与量は、当技術分野で公知である。例えば、A r i c e p tは、6週間の間、1日当たり50mgの経口用量が投与されてよ

40

50

く、個体が良好な耐容性を示すとき、その後1日当たり10mgが投与されてよい。

【0285】

遊離および結合細胞外TAUの量の決定

抗eTau抗体の個体への投与後、CSFまたはISF中に残る、抗eTau抗体に結合していないeTauの量を決定することが目的であり得る。本発明は、そのような遊離eTauの量を決定するための方法を提供する。CSFまたはISF中に残る、抗eTau抗体に結合していないeTauの量を決定するための方法の略図を、図54Aに示す。抗eTau抗体の個体への投与後、抗eTau抗体に結合しているCSFまたはISF中のeTauの量を決定することも興味を持たれ得る。抗eTau抗体に結合しているCSFまたはISF中のeTauの量を決定する方法の略図を、図54Bに示す。

10

【0286】

細胞外遊離Tauの量の決定

本発明は、抗eTau抗体を用いる治療を施されている対象から得られた、CSFまたはISFサンプル中の抗eTau抗体に結合していない細胞外Tau (eTau) の量を決定する方法を提供する。該方法は、一般に、a) 固定化抗体と、対象から得られたCSFまたはISFサンプルを接触させ (ここで、該固定化抗体は、eTauへの結合に対して、対象に投与された抗eTau抗体と競合し、該接触は、固定化抗体への非結合型eTauの結合に好適な条件下で行われる)、そしてb) 固定化抗体に結合したeTauの量を決定すること、を含む。固定化抗体に結合するeTauの量は、サンプル中の抗Tau抗体に結合しないeTauの量の指標である。ある場合において、固定化抗体に結合したeTauの量は、eTauへの結合に対して、固定化抗体と競合しない、検出可能に標識された三次抗体を用いて決定される。

20

【0287】

上記の通り、該アッセイは、抗eTau抗体を用いる治療を施されている個体から得られたCSFまたはISFサンプル中のeTauの量を測定する。ある場合において、抗eTau抗体は、治療的ヒト化抗eTau抗体である。ある場合において、抗eTau抗体は、本明細書に記載のヒト化抗eTau抗体である。ある場合において、抗eTau抗体は、hu-IPN002である。

【0288】

ある場合において、本発明の方法は、a) 上記の通り、抗eTau抗体を用いる治療を施されている個体から得られたCSFまたはISFサンプル中の、抗eTau抗体に結合していないeTauの量を決定すること、およびb) サンプル中の全量tauレベルを決定すること、を含み得る。

30

【0289】

ある場合において、本発明の方法は、a) 上記の通り、抗eTau抗体を用いる治療を施されている対象から得られたCSFまたはISFサンプル中の、抗eTau抗体に結合していないeTauの量を決定すること、およびb) サンプル中の該結合していないTauレベルと、抗eTau抗体での処置前に個体から得られたCSFまたはISFサンプル中の全量tauのレベルを比較すること、を含み得る。

【0290】

本発明の検出方法は、細胞外tauのレベルを決定するのに好適である。本明細書で用いる“細胞外tau”(“eTau”)は、脳脊髄液(CSF)または間質液(ISF)において検出され得るTauポリペプチドを含み得る。ある態様において、eTauは、175アミノ酸長を有し、完全長tauのアミノ酸2-176を含む、ポリペプチドである。例えば、ある態様において、eTauは、配列番号45に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。ある態様において、eTauは、171アミノ酸長を有し、完全長tauのアミノ酸2-172を含む、ポリペプチドである。例えば、ある態様において、eTauは、配列番号44に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。ある態様において、eTauは、配列番号46に記載のアミノ酸配列を含む、eTau-2ポリペプチドである。ある態様において、eTauは、配列番号47に記載のアミノ酸配列を含む

40

50

、e T a u－3ポリペプチドである。ある態様において、e T a uは、配列番号48に記載のアミノ酸配列を含む、e T a u－4ポリペプチドである。

【0291】

ある場合において、e T a uポリペプチドは、約50アミノ酸から約175アミノ酸長、例えば、約50アミノ酸(a a)から約75a a長、約75a aから約100a a長、約100a aから約125a a長、約125a aから約150a a、または約150a aから約175a aを有し、約50から約75、約75から約100、約100から約125、約125から約150、または約150から約175の、完全長t a uのアミノ酸2－176の隣接アミノ酸を含み得る。e T a uポリペプチドの例を、図20に示す。

【0292】

抗e T a u抗体に結合した細胞外T a uの量の決定

本発明は、治療的抗e T a u抗体を用いる治療を受けている対象から得られたC S FまたはI S Fサンプル中の治療的抗e T a u抗体に結合しているe T a uの量を決定する方法を提供する。該方法は、一般に、a)固定化抗体と対象から得られたC S FまたはI S Fサンプルを接触させ(ここで、固定化抗体は、e T a uへの結合に対して、対象に投与される抗e T a u抗体と競合せず、該接触は、固定化抗体への治療的抗体結合型e T a uの結合に好適な条件下で行われる)、そしてb)固定化抗体に結合した治療的抗e T a u/e T a u複合体の量を決定すること(ここで、固定化抗体に結合した治療的抗e T a u抗体/e T a u複合体の量は、サンプル中に存在する治療的抗体結合型e T a uの量の指標である)、を含む。固定化抗体に結合した治療的抗e T a u抗体/e T a u複合体の量は、抗e T a u抗体/e T a u複合体中に存在する抗e T a u抗体を検出することにより決定される。抗e T a u抗体/e T a u複合体中に存在する抗e T a u抗体を検出することにより決定される、固定化抗体に結合した治療的抗e T a u抗体/e T a u複合体の量は、C S FまたはI S Fサンプル中の治療的抗体に結合したT a uの量の指標を提供する。

【0293】

上記の通り、該アッセイは、抗e T a u抗体を用いる治療を施されている個体から得られたC S FまたはI S Fサンプル中の治療的抗体結合型e T a uの量を測定する。ある場合において、抗e T a u抗体は、治療的ヒト化抗e T a u抗体である。ある場合において、抗e T a u抗体は、本明細書に記載のヒト化抗e T a u抗体である。ある場合において、抗e T a u抗体は、h u－I P N 0 0 2である。

【0294】

ある場合において、本発明の方法は、a)上記の通り、抗e T a u抗体を用いる治療を受けている対象から得られたC S FまたはI S Fサンプル中の抗e T a u抗体に結合したe T a uの量を決定し、そしてb)該サンプル中の全量t a uのレベルを決定すること、を含み得る。ある場合において、本発明の方法は、a)上記の通り、抗e T a u抗体を用いる治療を受けている対象から得られたC S FまたはI S Fサンプル中の抗e T a u抗体に結合したe T a uの量を決定すること、そしてb)治療的抗e T a u抗体に結合していない、C S FまたはI S Fサンプル中のe T a uの量を決定すること、を含み得る。ある場合において、本発明の方法は、a)上記の通り、抗e T a u抗体を用いる治療を受けている対象から得られたC S FまたはI S Fサンプル中の抗e T a u抗体に結合したe T a uの量を決定すること、b)該サンプル中の全量t a uレベルを決定すること、そしてc)治療的抗e T a u抗体に結合していない、C S FまたはI S Fサンプル中のe T a uの量を決定すること、を含み得る。

【0295】

ある場合において、本発明の方法は、a)上記の通り、抗e T a u抗体を用いる治療を受けている対象から得られたC S FまたはI S Fサンプル中の抗e T a u抗体に結合したe T a uの量を決定すること、そしてb)該サンプル中の抗e－T a u抗体結合型T a uレベルを、抗e T a u抗体を用いる処置前の個体から得られたC S FまたはI S Fサンプル中の全量t a uレベルと比較すること、を含み得る。

【0296】

ある場合において、本発明の方法は、a) 上記の通り、抗eTau抗体を用いる治療を受けている対象から得られたCSFまたはISFサンプル中の抗eTau抗体に結合していないeTauの量を決定し、b) 上記の通り、抗eTau抗体を用いる治療を受けている対象から得られたCSFまたはISFサンプル中の抗eTau抗体に結合したeTauの量を決定し、そしてc) 該サンプル中の結合していないTauレベルおよび抗eTau抗体結合型Tauレベルと、抗eTau抗体を用いる処置前の個体から得られたCSFまたはISFサンプル中の全量tauレベルを比較すること、を含み得る。

【0297】

本発明の検出方法は、治療的抗体に結合した細胞外tauレベルを決定するのに好適である。本明細書で用いる“細胞外tau”(“eTau”)は、脳脊髄液(CSF)または間質液(ISF)中で検出され得る何れかのTauポリペプチドを包含する。ある態様において、eTauは、175アミノ酸長を有し、完全長tauのアミノ酸2-176を含むポリペプチドである。例えば、ある態様において、eTauは、配列番号45に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。ある態様において、eTauは、171アミノ酸長を有し、完全長tauのアミノ酸2-172を含むポリペプチドである。例えば、ある態様において、eTauは、配列番号44に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。ある態様において、eTauは、配列番号46に記載のアミノ酸配列を含むeTau-2ポリペプチドである。ある態様において、eTauは、配列番号47に記載のアミノ酸配列を含むeTau-3ポリペプチドである。ある態様において、eTauは、配列番号48に記載のアミノ酸配列を含むeTau-4ポリペプチドである。

【0298】

ある場合において、eTauポリペプチドは、約50アミノ酸から約175アミノ酸長、例えば、約50アミノ酸(aa)から約75aa長、約75aaから約100aa長、約100aaから約125aa長、約125aaから約150aa長、または約150aaから約175aa長を有し、約50から約75、約75から約100、約100から約125、約125から約150、または約150から約175の、完全長tauのアミノ酸2-176の隣接アミノ酸を含み得る。eTauポリペプチドの例を、図20に示す。

【0299】

レポート作成

ある場合において、本発明の方法は、a) 上記の通り、抗eTau抗体を用いる治療を受けている対象から得られたCSFまたはISFサンプル中の、抗eTau抗体に結合していないeTauの量を決定すること、そしてb) レポートの作成および／またはサンプルが得られた個体の治療またはマネジメントの方向付けを行うこと、を含み得る。ある場合において、本発明の方法は、a) 上記の通り、抗eTau抗体を用いる治療を受けている対象から得られたCSFまたはISFサンプル中の、抗eTau抗体に結合していないeTauの量を決定すること、b) 該サンプル中の結合していないTauのレベルを、抗eTau抗体を用いる処置前の個体から得られたCSFまたはISFサンプル中の全量tauレベルと比較すること、そしてc) レポートの作成および／またはサンプルが得られた個体の治療またはマネジメントの方向付けを行うこと、を含み得る。

【0300】

ある場合において、本発明の方法は、a) 上記の通り、抗eTau抗体を用いる治療を受けている対象から得られたCSFまたはISFサンプル中の、抗eTau抗体に結合したeTauの量を決定すること、そしてb) 該決定の結果を含むレポートを作成すること、を含み得る。該レポートはさらに、抗Tau抗体を用いる処置後のCSFまたはISFサンプル中の全量tauのレベルに対する該サンプル中の結合していないTauの量、および抗eTau抗体を用いる処置前の個体から得られたCSFまたはISFサンプル中の全量tauの量、の一方または両方を含み得る。

【0301】

レポートは、例えば、個体がタウオパチーの処置に対して有益な臨床応答を示すかどうか

かの指標、抗 e T a u 抗体の投与量を維持、増加または減少などすべきかどうかの指標を含み得る。

【0302】

従って、レポートは、さらなる評価に関する勧告、治療薬物および／または他の健康管理の介入に関する勧告、抗 e T a u 抗体の投与量を増加する勧告、抗 e T a u 抗体の投与量を維持する勧告、抗 e T a u 抗体の投与量を減少する勧告などのような情報を含み得る。

【0303】

例えば、本明細書に記載の方法はさらに、目的の評価の結果を提供するレポートを作成または出力する工程を含み得て、該レポートは、電子媒体の形態（例えば、コンピューターモニター上の電子表示）で、または有形的表現媒体の形態（例えば、紙に印刷されたものまたは他の有形的表現媒体）で提供され得る。レポートを作成する個人または機関（“レポート作成者”）はまた、サンプル収集、サンプル処理などのような工程を行うこともできる。あるいは、レポート作成者以外の機関は、サンプル収集、サンプル処理などのような工程を行うことができる。リスク評価レポートは、ユーザーに提供され得る。“ユーザー”とは、医療専門家（例えば、臨床医、研究者、または研究医）であり得る。

【0304】

健康管理の方向性

ある例において、本発明の方法は、a) 上記の通り、抗 e T a u 抗体を用いる治療を受けている対象から得られた C S F または I S F サンプル中の、抗 e T a u 抗体に結合していない e T a u の量を決定すること、そして b) 抗 e T a u 抗体に結合していない e T a u の決定された量に基づき、レポートを作成および／または生物学的サンプルが得られた個体の治療またはマネジメントを方向付けすることを含む。

【0305】

ある場合において、本発明の方法は、a) 上記の通り、抗 e T a u 抗体を用いる治療を受けている対象から得られた C S F または I S F サンプル中の、抗 e T a u 抗体に結合していない e T a u の量を決定し、そして b) 抗 e T a u 抗体に結合していない e T a u の決定された量に基づき、対象に投与された抗 e T a u 抗体の投与量を維持することを含む。ある場合において、本発明の方法は、a) 上記の通り、抗 e T a u 抗体を用いる治療を受けている対象から得られた C S F または I S F サンプル中の、抗 e T a u 抗体に結合していない e T a u の量を決定し、そして b) 抗 e T a u 抗体に結合していない e T a u の決定された量に基づき、対象に投与された抗 e T a u 抗体の投与量を増加することを含む。ある場合において、本発明の方法は、a) 上記の通り、抗 e T a u 抗体を用いる治療を受けている対象から得られた C S F または I S F サンプル中の、抗 e T a u 抗体に結合していない e T a u の量を決定し、そして b) 抗 e T a u 抗体に結合していない e T a u の決定された量に基づき、対象に投与された抗 e T a u 抗体の投与量を減少することを含む。

【実施例】

【0306】

実施例

以下の実施例は、本発明の作製法および使用法の完全な開示および記載を当業者に提供するために示され、発明者らが彼らの発明と見なすものの範囲を限定するものではなく、また、以下の実験が実行される全ての実験または唯一の実験であると示すためのものでもない。使用する数字（例えば、量、温度など）に関して正確さを確保する努力がなされたが、いくつかの実験誤差および偏差が考慮されるべきである。特に示さない限り、%は重量%であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧力は大気圧またはそれに近いものである。標準的な略語、例えば、b p、塩基対（複数可）；k b、キロベース（複数可）；p l、ピコリットル（複数可）；s または s e c、秒（複数可）；m i n、分（複数可）；h または h r、時（複数可）；a a、アミノ酸（複数可）k b、キロベース（複数可）；b p、塩基対（複数可）；n t、ヌクレオチド（複数可）；i . m

、筋肉内；i. p.、腹腔内；およびs. c.、皮下などを用いることができる。

【0307】

実施例1：IPN001およびIPN002 VHおよびVL領域のクローニングおよび配列決定

IPN001（本明細書中、“IPN1”または“IPN-1”とも言う）およびIPN002（本明細書中、“IPN2”または“IPN-2”とも言う）抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列が決定される。IPN001のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、それぞれ図1Aおよび1Bに示される。IPN002のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、それぞれ図2Aおよび2Bに示される。CDRは、太字および下線で示される。CDRは、Kabat et al. の方法を用いて決定した（表1；および、J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977)；および、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991)を参照のこと）。

【0308】

実施例2：抗Tau抗体の効果の電気生理学的分析

材料および方法

正常なヒトアストロサイトの単層上に培養した人工多能性幹細胞（iPSC）に由来する皮質ニューロンからのホールセル（全細胞）パッチクランプ記録を、K-メチル硫酸（140mM）、NaCl（10mM）、CaCl₂（1mM）、Mg-ATP（3mM）；Na-GTP（0.4mM）、EGTA（0.2mM）、HEPES（10mM）、ホスホクレアチンを含む、pH=7.3およびmOsm=300に調節した溶液で満たしたパッチピペット（2-5MΩ）を用いて行った。ニューロンを、NaCl（140mM）、KCl（2.5mM）、MgCl₂（2mM）、CaCl₂（2mM）、Hepes（10mM）、D-グルコース（10mM）、スクロース（20mM）を含む、pH=7.4、mOsm=310に調節した人工の脳脊髄液（aCSF）でかん流した（2ml/分）。pClamp-10.3データ収集ソフト（Molecular Devices）およびMultiClamp 700B増幅器（Axon Instrument; Foster City CA）を用いて記録を行った。AD-TauおよびIPN001またはIPN002を用いて予めインキュベートしたAD-Tau（10：1の重量比で、室温で2時間または4℃で24時間）を、MiniSquirt マイクロバキュレーションシステム（AutoMate, Berkeley, CA）に適用した。データ分析を、Clampfit 10.2 分析ソフト（Molecular Devices）を用いてオフラインで行った。全ての記録を室温で行った。

【0309】

結果

データを図3A-Dに示す。

AD-Tau（6μg/ml）の適用は、皮質ニューロン膜脱分極を引き起こす（A、B、およびC）。AD-Tau（6μg/ml）をIPN001（60μg/ml）（A）またはIPN002（60μg/ml）（B）と共に、>2時間の間、予めインキュベートすると、AD-Tau 仲介性膜脱分極が減少する。（C）AD-Tau（6μg/ml）をマウスIgG（60μg/ml）と共に予めインキュベートしても、皮質ニューロンにおけるAD-Tau 仲介性膜脱分極は減少しなかった。（D）IPN001およびIPN002がAD-Tau 仲介性膜脱分極を顕著に減少することを示すデータ一覧（対応のあるt検定 * p<0.037；** p<0.009、p<0.003）。

【0310】

実施例3：IPN001およびIPN002の、AD患者からのCSF中のTauとの免疫反応性

脳脊髄液（CSF）を、10名の健常ドナーから集めた（各1ml）。CSFもまた、10名のアルツハイマー病（AD）患者から集めた（各1ml）。集めたCSFのアリコートを用いてELISA分析のために取り置いた。ダウン症候患者由来の人工多能性幹細胞（iPSC）iPSC株（8941.1）から、315日間、分化させた皮質ニューロンからの10mlの馴化培地を、CSFのアフィニティー分離のためのコントロールとして用い

、1つのアリコートをし、ELISA分析のために取り置いた。CSFがIPN002-反応性Tauを含むかどうかを決定するために、CSFの収集サンプルおよび馴化培地のそれぞれを、IgG1結合樹脂上でプレクリア (precleared) をして、その後、IPN001結合樹脂に適用した。IPN001樹脂をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で完全に洗浄し、50mM グリシン、150mM NaCl、pH 2.3で結合タンパク質を溶出し、溶出後に1M Tris、pH 8.3で中和した。溶出タンパク質を、YM10濃縮器を用いて濃縮し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロッティング分析のためにサンプルバッファーに添加した。

【0311】

10

IPN002が、CSF中のいずれかの形態のTauと反応するかどうかを決定するために、IPN002溶出タンパク質のウェスタンブロットを、IPN001、Santa Cruz Tau H-150 (aa1-150) およびTauのC末端 (aa#243-441) と反応するDako's Tau #A0024抗体を用いてプローブ化した。データを図4A-Cに示す。

【0312】

ウェスタンブロットは、~25kdから37kdの分子量範囲に健常およびAD CSFの両方からのIPN002親和性精製タンパク質中に、IPN001 (図4a) およびTau H-150 (図4b) 免疫反応性バンドが存在することを示した。これらのTauフラグメントは、ダウン症患者由来の細胞株の馴化培地から単離されたeTauフラ

20

グメントと比較してそのサイズは類似しているが、相対存在量は異なっていた。Dako C末端Tau抗体 (図4c) は、何れのCSFまたは馴化培地からのIPN002アフィニティー分離からも反応性種を検出しなかった。完全長Tauは、IPN002アフィニティー分離からのTau抗体の何れかにより検出されなかった。IPN002アフィニティー分離されたタンパク質は、ウェスタンブロットにおいてIPN001およびIPN002と反応性であったため、CSF中のTauもIPN001反応性であると結論づけた。

【0313】

その後、IPN002親和性樹脂からのCSFおよび馴化培地フロースルーが、IPN002により単離されなかったtauフラグメントのいずれかのC末端または中間領域が存在するかどうかを決定するために、T46 (Tau #428-441) およびHT7 (Tau #159-163) に連続適用され、溶出された。溶出物をDako C末端抗体 (図4c) を用いてプローブ化した。免疫反応性は検出されなかった。これらのデータは、IPN001およびIPN002免疫反応性tauが、全長、中間領域のみ、またはC末端tauフラグメントよりも豊富に存在することを示唆する。

30

【0314】

CSFおよび馴化培地のそれぞれからのフロースルーのアリコートを、CSF中のTauレベルを決定するのに通常用いられる市販のキットを用いて、全ての検出可能なtauが単離中に除去されたかどうかを決定するために、単離前と単離後の比較のために取り置いた。データを図5に示す。この分析は、全ての検出可能なtauが、アフィニティー分

40

【0315】

これらのデータは、IPN001およびIPN002の両方が、健常者およびAD患者の両方からのCSF中に存在する主なtau種と反応することの強力な証拠を提供する。

【0316】

実施例4：患者サンプル中のeTauの検出

材料および方法

iPSC由来の皮質ニューロンからの馴化培地収集

iPSC (人工多能性幹細胞) を、健常な年齢を適合させた対照およびアルツハイマー患者から、Dimos et al. (2008) Science 321:1218に記載された山中先生の作製方法 (Ta

50

kahashi et al. (2007) Cell 131(5), 861) を用いて作製した。i P S C を、デュアル S M A D 単層培養法 (Chambers et al. (2009) Nat. Biotechnol. 27:275) を用いて公開されたプロトコルにて該株の大部分を皮質ニューロンに分化させ、その後、皮質ニューロン分化を、Shi et al. (2012) Nat. Neurosci. 15:477 に記載の方法と同様の方法で行った。特記されない限り、108 日間培養した i P S C 由来の皮質ニューロン (i P S C - C N) を洗浄し、新鮮な培地を添加し、3 日後に馴化培地を集めた。該株からの多重分化が、e T a u レベルの再現性を確保するために行われた。馴化培地を、ウェスタンブロットまたは t a u E L I S A 法の前に、15,000 rpm で 15 分間、遠心した。ブレフェルディン A 実験のために、i P S C - C N 培養物を P B S で洗浄し、その後、1 μ M のブレフェルディン A を添加した新鮮培地およびブレフェルディン A を添加しない新鮮培地を添加し、収集前の 1 時間、培地を馴化した。

10

【0317】

ヒト初代皮質ニューロンから馴化培地収集

ヒト皮質ニューロン培養 (H C C) を、Wright et al. (2007) Neurobiol. Aging 28:26 に記載の通りに作製した。要約すれば、ヒト胎児脳皮質組織を Advanced Bioscience Resources (Alameda, CA) から得て、胎児研究に関する連邦のガイドラインおよび統一死体提供法 (Uniform Anatomical Gift. Act) に従った。組織を Hank's 緩衝食塩水溶液 (C e l l l g r o) で濯ぎ、1 μ g / m l D N a s e (EMD) の存在下で粉碎し、100 μ m の細胞ストレーナーを通して篩い分けした。遠心後、ペレットを、0.05% トリプシン / E D T A (Invitrogen) 中に、37 $^{\circ}$ C で 20 分間、再懸濁した。トリプシンは、等量の 10% ウシ胎仔血清 (F B S) 含有培地を加えることにより不活性化され、サンプルを D N a s e の存在下で再び穏やかに粉碎した。遠心後、細胞を平板培地 (Neurobasal c ontaining B27, Invitrogen) に再懸濁し、数カウントした。細胞をプレートまたはポリ- d - リシンおよびラミニンでコートしたカバーガラス上に播種した。3 週間後に H C C を洗浄し、新鮮な培地を添加し、馴化の 3 日後に培地を集めた。馴化培地を 15,000 rpm で 15 分間スピンド、その後、ウェスタンブロットした。

20

【0318】

P 3 0 1 L マウス I S F およびヒト C S F 収集

マウスをイソフルラン (2%, 800 mL / 分 O_2) で麻酔した。ブピバカイン / エピネフリンを局所麻酔に用いて、ファインダイナミクスまたはカルプロフェンを術中術後鎮痛に用いた。動物を定位フレーム (Kopf instruments, USA) 中に置いた。プッシュ・プルマイクロダイアリシス法によるプローブ (ホスファチジルエタノールアミン (P E E) 膜、Brainlink, the Netherlands) を、海馬 (3 mm 露出表面) 中に挿入した。マイクロダイアリシス法によるサンプリングを、術後 24 時間および 48 時間に行った。サンプリングの日に、動物のプローブを、微量灌流ポンプと接続されたフッ化エチレンプロピレン (F E P) 管 (Harvard PHD 2000 Syringe pump, Holliston, MA or similar) と接続した。マイクロダイアリシス法によるプローブを、147 mM N a C l、3.0 mM K C l、1.2 mM C a C l₂ および 1.2 mM M g C l₂ を含む人工 C S F (a C S F)、ならびに 0.15% ウシ血清アルブミン (B S A) と共に、0.75 μ L / 分の流速でかん流させた。マイクロダイアリシス法によるサンプルを 60 分間集めた。安定化後、基準サンプルを集めた。サンプリングの 2 日目に、上記の方法を繰り返した (Brains Online)。間質液 (I S F) を 15,000 rpm で 15 分間スピンド、上澄み液を e T a u ウェスタンブロットに用いた。

30

40

【0319】

10 名の健常者 (Precision Med)、10 名の A D 患者 (Precision Med) および 10 名の P S P 患者の集団から、10 mL の C S F (Precision Med) を集め、15,000 rpm で 15 分間スピンド、上清を I g G 親和性樹脂上でプレクリア (precleared) をして、次いで、I P N 0 0 2 抗 t a u 親和性樹脂上で t a u を単離し、洗浄し、1 M T B S、pH 8.3 を含むチューブ中、50 mM グリシン、pH 2.3 と 150 mM N a C l で溶出し、pH を中和し、Y M 1 0 フィルターで濃縮し、t a u ウェスタンブロッ

50

トを行った。f A D P S E N 1 患者からの i P S C - C N 馴化培地を、結合パターンを比較するために陽性対照として、同様に単離した。

【0320】

ウェスタンブロット

馴化培地を L a e m m l i サンプルバッファー (S i g m a) で希釈した。培養ニューロンを P B S で濯ぎ、その後、D M E M 中の 0. 05% トリプシン (Invitrogen) 中でインキュベートし、濯ぎ、そして L a e m m l i サンプルバッファー中で溶解した。全てのサンプルを沸騰させ、トリ-グリシンポリアクリルアミドゲル (Invitrogen) 上で分離させ、i B l o t (Invitrogen) を用いてニトロセルロースに転写した。膜をブロッキングバッファー (L i C o r) 中でインキュベートし、0. 1% T w e e n - 20 を含むブロッキングバッファー中、0. 5 μ g / m l の t a u に対する I P N 001 抗体および β -アクチンに対する抗体 (1 : 2000 ; A b c a m) でプローブ化し、抗マウス 680 および抗ウサギ 800 二次抗体 (L i C o r) でプローブ化した。プロットを O d y s s e y S A のインフラレッドイメージングシステムを用いてスキャンし、O d y s s e y S A ソフトウェア (L i C o r) を用いて分析した。

10

【0321】

T a u E L I S A

i P S C 由来の皮質ニューロン培養物から3日の馴化期間後に培地を集め、A l p h a s c r e e n ホモジニアスアッセイを用いてアッセイして t a u を測定した。10 μ g / m l の抗 t a u A l p h a L I S A アクセプタービーズおよび 1 n M ビオチニル化抗 T a u 抗体を、馴化培地と共に、室温にて一晩、混合した。40 μ g / m l のストレプトアビジンドナービーズ (Perkin Elmer) を、室温で30分間添加し、プレートを E n v i s i o n プレートリーダーにて読み出した。

20

【0322】

e T a u 精製

A D 患者由来の i P S C - C N から集めた馴化培地を、15, 000 r p m で15分間スピンし、I g G 親和性樹脂上でプレクリアした上清を集めた。プレクリアした上清を I P N 002 抗 T a u 抗体樹脂を通して濾過し、洗浄し、1 M T B S 、p H 8. 3 を含むチューブ中、e T a u を 50 m M クエン酸ナトリウム、p H 2. 3 と 150 m M N a C l で溶出し、p H を中和した。溶出物を濃縮し、バッファーを P B S に取り換えた。

30

【0323】

免疫蛍光

M C C を P B S で濯ぎ、4%パラホルムアルデヒドで固定し、P B S 中の 10% ロバ血清 (Jackson ImmunoResearch) でブロックし、P B S 中の 0. 2% T r i t o n - x - 100 で15分間透過処理し (特記されない限り)、t a u に対する I P N 001 抗体とロバー抗マウス-A 488 二次抗体 (Molecular Probes) および D A P I (Invitrogen) を用いて染色した。イメージを、L A S A F ソフトウェア (L e i c a) を用いて40倍で L e i c a D M I 600 B 顕微鏡を用いて得た。共焦点イメージを、ニコン E c l i p s e T i 共焦点顕微鏡 (N i k o n) を用いて得た。

40

【0324】

結果

アッセイを、種々の液体中の e T a u フラグメントを検出することにより行った。結果を図7に示す。図7、左パネルに示す通り、内生 t a u は、ヒト人工多能性幹細胞 (ヒト i P S C - 皮質ニューロン ; i P S C - C N) に由来する皮質ニューロンから分泌され、該分泌された T a u は、細胞外 T a u または “ e T a u ” と呼ばれる。図7、左から2番目のパネルに示す通り、e T a u は、ヒト初代ニューロン (ヒト皮質細胞 ; “ H C C ”) からの馴化培地にも存在し、e T a u が i P S C 分化の人工物ではないことが確認される。これらの e T a u フラグメントは、ニューロンの溶解物にも検出され、t a u が、e T a u 分泌の前にニューロン内部で切断されることが示唆される。

【0325】

50

図7、中パネルに示す通り、類似の *t a u* フラグメントが、P301L *t a u* マウス由来の間質液 (ISF) 中に検出され、完全長 *t a u* はどちらのシステムでも検出されなかった。P301L マウスは、P301L 変異を有するヒト *t a u* 形態の遺伝子導入マウスである。P301L マウスは、ヒトタウオパチーのモデルである。例えば、Goetz et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:529; および、Lewis et al. (2000) Nature Genetics 25:402を参照のこと。

【0326】

図7、右パネルに示す通り、*e T a u* レベルは、健常者のレーンと比較して、AD患者からのCSF、および家族性AD (fAD) 患者からの複数のレーンで増加する。図7、右パネルに示す通り、*e T a u* は、PSP患者からのCSF中でも検出される。

10

【0327】

実施例5：*e T a u* は、ニューロン過活動を誘導する方法

マイクロピペット (2–5 MΩ) を用いて正常なヒトアストロサイトの単層上に培養した iPSC–CN からの全細胞パッチクランプ記録を、K–メチル–硫酸 (140 mM)、NaCl (10 mM)、CaCl₂ (1 mM)、Mg–ATP (3 mM); Na–GTP (0.4 mM)、EGTA (0.2 mM)、HEPES (10 mM)、ホスホクレアチン (10 mM) を含む、pH=7.3 および mOsm=305 に調節した溶液で満たして行った。ニューロンを、NaCl (140 mM)、KCl (2.5 mM)、MgCl₂ (2 mM)、CaCl₂ (2 mM)、Hepes (10 mM)、D–グルコース (10 mM)、スクロース (20 mM) を含む、pH=7.4、mOsm=310 に調節した人工脳脊髄液でかん流した (2 ml/分)。記録を、pClamp–10.3 データ収集ソフトウェア (Molecular Devices) および Multiclamp 700B 増幅器 (Axon Instrument; Foster City CA) を用いて記録を行った。*e T a u*、または阻害剤、テトロドトキシン (TTX) (Tocris)、MK801 (Sigma)、NBQX (Tocris) もしくは抗 *T a u* 抗体、IPN001 を含む *e T a u* のパフアプリケーション (Puff application) を、Minisquirter マイクロパルプーションシステム (AutoMate, Berkeley, CA) を用いて行った。オフラインでデータ分析を、Clampfit 10.2 分析ソフトウェア (Molecular Devices) を用いて行った。記録を 34–37 °C で行った。

20

【0328】

結果

30

e T a u が神経機能を変え得るかどうかを決定するために、精製した *e T a u* フラグメントを、iPSC–CN または HCC に用いた。結果を図8A–Cに示す。

【0329】

図8Aに示す通り、精製した *e T a u* フラグメント混合物のこれらのニューロンへの添加は、ニューロン過活動を促進した。図8Bに示す通り、*e T a u* 混合物により誘導される過活動は、テトロドトキシン (TTX) により、ならびにNMDAおよびAMPAグルタミン酸受容体アンタゴニスト、MK801およびNBQXにより、阻害された。TTXは、神経細胞膜における電位依存性開口型の高速ナトリウムチャンネルに結合することによりニューロンにおける活動電位を阻止する。これらのデータは、*e T a u* 誘導性ニューロン過活動が、グルタミン酸塩の活動電位仲介性放出に依存することを示唆する。対称的に、図8Aの中パネルに示す通り、完全長 *t a u* の適用は、顕著に高い濃度のときでさえもニューロン活動における検出可能な変化を生じず、*e T a u* 誘導性過活動が、*t a u* フラグメントに依存することを示した。これらの *e T a u* 誘導性過活動の結果は、カルシウム動員が、ニューロン内で生じ得ることを強く示唆する。カルシウム動員がニューロン内で生じるかどうかを決定するために、*e T a u* のカルシウム動員への作用を試験した。図8Cに示す通り、*e T a u*–1aは、確実にカルシウムを動員する。このタイプのニューロン過活動は、ADにおけるような慢性化の状態に維持されるとき、変更されたシナプスの発火および異常な神経刺激を回するニューロンの機能不全を結果として生じ得る。*e T a u*–1aは、胎児 *t a u* のアミノ酸 2–166、すなわち、配列番号27のアミノ酸 2–

40

50

166を含む。

【0330】

実施例6：抗Tau抗体は、eTau仲介性ニューロン過活動を低減する。

電気生理的分析を、実施例5に記載の通りに行う。IPN001およびIPN002のeTau仲介性ニューロン過活動への作用を評価した。

【0331】

図8Dに示す通り、IPN001は、eTau-仲介性ニューロン過活動を低減する。

図19Bに示す通り、IPN002は、eTau-仲介性ニューロン過活動を低減する。

【0332】

実施例7：ヒト化抗Tau抗体

IPN002のヒト化変異体を作製した。ヒト化変異体1-4の重鎖VHドメインのアミノ酸配列、および該ヒト化変異体の重鎖VHドメインをコード化するヌクレオチド配列を、図9-12に示す。ヒト化変異体1-4の軽鎖VLドメインのアミノ酸配列、および該ヒト化変異体の軽鎖VLドメインをコード化するヌクレオチド配列を、図13-16に示す。IPN002のアミノ酸配列に対するアミノ酸の相違を表4および5にまとめる。

【表4】

表4：VH変異体

アミノ酸 の位置	IPN002(親抗体)	VH変異体1	VH変異体2	VH変異体3	VH変異体4
3	H	H	H	Q	Q
19	K	R	R	R	R
40	T	A	A	A	A
42	D	G	G	G	G
44	R	G	G	G	G
66	Q	R	R	R	R
83	S	S	N	N	N
85	L	S	L	L	L
86	K	K	R	R	R
87	S	S	A	A	A
93	S	S	S	S	A
108	S	S	T	T	T

10

20

30

【表 5】

表 5：V k 変異体

アミノ酸 の位置	IPN002(親抗体)	Vk変異体1	Vk変異体2	Vk変異体3	Vk変異体4
3	L	L	V	V	V
7	T	S	S	S	S
14	S	T	T	T	T
17	D	Q	Q	Q	Q
18	Q	P	P	P	P
45	K	Q	Q	Q	Q
48	V	V	V	V	I
83	L	V	V	V	V
85	T	T	T	V	V
104	L	V	V	V	V

10

【0333】

一文字アミノ酸コードは以下の通りである。

G — グリシン (G l y)
P — プロリン (P r o)
A — アラニン (A l a)
V — バリン (V a l)
L — ロイシン (L e u)
I — イソロイシン (I l e)
M — メチオニン (M e t)
C — システイン (C y s)
F — フェニルアラニン (P h e)
Y — チロシン (T y r)
W — トリプトファン (T r p)
H — ヒスチジン (H i s)
K — リシン (L y s)
R — アルギニン (A r g)
Q — グルタミン (G l n)
N — アスパラギン (A s n)
E — グルタミン酸 (G l u)
D — アスパラギン酸 (A s p)
S — セリン (S e r)
T — スレオニン (T h r)

20

30

【0334】

40

実施例 8：ヒト化 I P N 0 0 2 変異体の特性化

VH # 1-4 と V k # 1-4 の 16 種の抗体組合せのそれぞれについての、各組み換え t a u (383 アミノ酸の組み換え t a u) ならびに e T a u 1 a、e T a u 1 b、e T a u 2、e T a u 3 および e T a u 4 への相対的 t a u 結合親和性を、図 17 に示す表 4 に記載する。各 t a u および e T a u 種の相対的結合親和性は、VH/V k 抗体組合せのそれぞれについて 121 pM から 1030 pM の範囲である。e T a u 1 a は、胎児 t a u のアミノ酸 2-166、すなわち、配列番号 27 のアミノ酸 2-166 を含み、e T a u 1 b は、胎児 t a u のアミノ酸 2-196 および 217-228、すなわち、配列番号 27 のアミノ酸 2-196 および 217-228 を含む。e T a u 3 および e T a u 4 のアミノ酸配列を図 20 に示す。

50

【0335】

これらのVH/Vkヒト抗体について絶対的親和性ならびに K_{on} および K_{dis} を得るため、Octet分析をtau(383アミノ酸の組み換えtau)を用いて行った。 K_D 値は、42.6pMから2120pMの範囲であった。全てのVH/Vk変異体に関して、Tauおよび各eTau種に対して K_{on} 値が高く、 K_{dis} 値が低かった。データを図18に示す表5に記載する。

【0336】

上記のヒト化IPN002変異体のサブセットを、さらなる分析にて試験した。図19Aに示す通り、3つの変異体、VH2/Vk1、VH2/Vk2およびVH2/Vk3を、tauを含む種々のサンプルと共にウェスタンブロットアッセイに用いた。tau含有サンプルは、iPSC-CN馴化培地、iPSC-CN溶解物、AD脳溶解物、およびP301L tauマウス脳皮質溶解物、およびカニクイザル脳溶解物を含む。データは、上記のヒト化IPN002変異体が、種々のサンプルにおいてtauと反応することを示す。

【0337】

上記のヒト化IPN002変異体のサブセットを、eTau誘導性ニューロン過活動を低減する能力について試験した。図19Bに示す通り、親IPN002、ならびに変異体VH2/Vk1、VH2/Vk2、およびVH2/Vk3が、eTau誘導性過活動を阻止した。

【0338】

実施例9：ヒト化IPN002変異体の免疫原性の試験

ヒト化抗Tau抗体を、免疫原性について評価した。EpiScreen(商標)アッセイを用いた。例えば、Jones et al. (2004) J. Interferon Cytokine Res. 24:560; および、Jones et al. (2005) J. Thromb. Haemost. 3:991を参照のこと。タイムコースT細胞アッセイを、CD8⁺欠損末梢血単核細胞(PBMC)を用いて行い、T細胞増殖を、試験抗体サンプルの添加後の種々の時点で[³H]ーチミジンを挿入することにより測定した。

【0339】

PBMCを、健常なドナー群からのバフィーコート(例えば、試験の24時間以内の採血)から単離した。試験抗体(例えば、ヒト化IPN002変異体)に対するT細胞応答を、臨床基準抗体と比較した。

【0340】

精製した試験抗体(ヒト化IPN002変異体)を、インビトロにてPBMC培養物に、培養培地中の終濃度50μg/mlまで添加し、試験サンプルを作製した。臨床抗体対照(陽性対照)、および培養培地-対照のみ(刺激しない対照)を、対照サンプルとして含んだ。試験サンプル(PBMC+試験抗体)、および対照サンプルを、37℃、5%CO₂にて8日間、インキュベートした。5、6、7および8日目に、試験細胞および対照サンプルを懸濁し、マルチウェル培養プレートのウェルに移した。試験および対照サンプルを、0.75μCi [³H]ーチミジンでパルス標識し、濾過マット上に集める前に、さらに18時間インキュベートした。各ウェルについての(cpm)を、シンチレーション計数法を用いて決定した。

【0341】

増殖アッセイに関して、SI(刺激指数)の等しいか、または2倍以上の閾値を用い、ここで、上記の閾値の増殖性応答をもたらすサンプルを陽性とみなした。SIは、刺激していない対照の平均で割った平均試験サンプル計算値である。

【0342】

データを図21A-Cに示す。健常なドナーT細胞増殖は、ヒト化IPN002試験抗体に対して反応する。バルク培養物からのPBMCは、試験サンプルと共にインキュベート後、5、6、7および8日目にサンプリングし、増殖を評価した。水平な点線で示されるSI≥2.0の増殖反応(p<0.05)は、対応のない2つのサンプルのスチューデ

ントの t 検定を用いて有意であり ($p < 0.05$)、陽性であるとみなされた。

【0343】

図 21A に示す通り、試験完全ヒト化 IPN002 抗体は、低い免疫原性を有した (SI の 2.0 閾値以下)。図 21B は、参照キメラ抗体を用いた結果を示し、該参照キメラ抗体は、IPN002 マウス重鎖および軽鎖可変領域ならびにヒト IgG4 定常領域を有する。図 21C は、免疫原性の臨床対照ヒト化 A33 抗体を用いた結果を示す。

【0344】

実施例 10 : IPN002 は、インビボにてリン酸化 Tau のレベルを低減する

アミノ酸 202 および 205 における Tau のリン酸化レベルに対する IPN002 投与の効果を評価した。

【0345】

P301L マウスモデルを用いた。P301L マウスは、P301L 変異を有するヒト tau の一形態の遺伝子導入マウスである。P301L マウスは、ヒトタウオパチーのモデルである。例えば、Goetz et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:529 を参照のこと。

【0346】

P301L マウス (3-4 月齢) を、1) 対照 IgG ; 2) PHF1 抗リン酸化 Tau 抗体 ; または 3) IPN002 で処理した。IgG 対照および IPN002 抗体を、濃度 10 mg/kg で 4 週間、次いで、20 mg/kg でさらに 4 週間、腹腔内注射した。PHF1 を、全 8 週間の間、10 mg/kg で投与した。抗体処理レジメンの開始後 60 日目に、海馬にてリン酸化 Tau のレベルを測定した。データを図 22 に示す。

【0347】

リン酸化 at アミノ酸 202 および 205 でリン酸化されている Tau を、“AT8” と言う。図 22 に示す通り、IPN002 での処理は、IgG 対照処理と比較して、ELISA により評価される通り、不溶性ホスホ-Tau (AT8) の統計的に有意な減少をもたらした (左パネル)、ウェスタンブロット分析により評価される通り、減少傾向にあった (右パネル)。PHF1 処理は、不溶性 AT8 の減少傾向を示し、これは、Chai et al. ((2011) J. Biol. Chem. 286:34457) および Boutajangout et al. ((2011) J. Neurochem. 118:658) による発見を支持する。

【0348】

実施例 11 : IPN002 は、ISF および CSF の両方における遊離 tau レベルを低減する

CSF および間質液 (ISF) における遊離 tau レベルに対する IPN002 投与の効果を決定した。P301L マウスを、実施例 10 に記載の通りに処理した。IPN002 に結合していない、ISF 中に存在する遊離 tau のレベルを、IPN001 を用いて決定した。図 23 に示す通り、IPN002 処理は、IPN002 で処理した P301L マウスにおいて、ISF における遊離 (IPN002 に結合していない) Tau レベルを低減した (左パネル)。

【0349】

IPN002 が、ISF におけるのと同程度、CSF における遊離 Tau レベルを低減するかどうかを決定するために、P301L マウスを実施例 10 に記載の通りに処理し、処理マウスの CSF における遊離 (IPN002 に結合していない) tau のレベルに対する IPN002 処理の効果を決定した。結果を図 24 に示す。

【0350】

未処理の、対照 IgG 処理、PHF1 処理、および IPN002 処理マウスの CSF における遊離 tau (IPN002 に非結合 ; “(IPN002 の) 遊離 tau” とも言う) のレベルを、図 24 の左パネルに示す。図 24 の右パネルに示す通り、CSF における遊離 tau レベルは、IPN002 処理マウスの ISF における遊離 tau レベルと同程度であり、ISF の tau 分析が、より臨床的に関連した素材である CSF とよく関連していることを証明する。

【0351】

実施例 1 2：抗 T a u 抗体は、e T a u 仲介性ニューロン過活動を低減する

電気生理的分析を実施例 5 に記載の通りに行った。e - T a u 誘導性ニューロン過活動に対する I P N 0 0 2 の効果を評価した。

【0 3 5 2】

図 2 5 に示す通り、I P N 0 0 2 は、e T a u 仲介性ニューロン過活動を低減した。

【0 3 5 3】

実施例 1 3：T a u フラグメントは、慢性外傷性脳症（C T E）の可能性を有する個体から得られた C S F に存在する

C S F サンプルは、全米プロフットボールリーグの前ラインマンから得られ、彼は、行動／認知障害を示し、C T E を有する可能性があると思なされていた。該 C S F サンプルを、e T a u フラグメントの存在についてアッセイした。e T a u フラグメントを、健常な個人および C T E の可能性のある個人から集めた C S F より親和的に単離した。単離された e T a u フラグメントを、ポリアクリルアミド出る電気泳動を用いて分離した。分離したフラグメントを膜に転写した。膜を I P N 0 0 1 でプローブ化した。結果を図 2 6 に示し、それは、T a u フラグメントが、C T E の可能性のある個体から得られた C S F に存在することを示す。

【0 3 5 4】

実施例 1 4：I P N 0 0 2 のヒト化変異体の合成 T a u ペプチドへの結合

I P N 0 0 2 のヒト化変異体（“ h u - I P N 0 0 2 ”）の合成ビオチニル化 T a u ペプチド 1 および 2 への結合を、固相および液相アッセイの両方にて試験した。

【0 3 5 5】

ペプチド 1 およびペプチド 2 のアミノ酸配列は、以下の通りである。

ペプチド 1（T a u アミノ酸 1 3 - 2 4）：D H A G T Y G L G D R K（配列番号 4 9）；

ペプチド 2（T a u アミノ酸 1 5 - 4 4）：A G T Y G L G D R K D Q G G Y T M H Q D Q E G D T D A G L K（配列番号 5 0）。

【0 3 5 6】

抗体またはビオチニル化ペプチドを、リン酸緩衝生理食塩水に希釈した。終濃度は以下の通りである：1 μ g / m l h u - I P N 0 0 2；1 μ g / m l r T a u 3 8 3（全長組み換え T a u）；5 μ g / m l（ビオチニル化ペプチド 1）；および、5 μ g / m l（ビオチニル化ペプチド 2）。1 0 0 μ l の P B S 中の 0. 1 % カゼインを、マルチウェルプレートの複数ウェルに添加した。1 5 0 μ l の h u - I P N 0 0 2 の 1 μ g / m l 溶液を添加した。連続希釈を行った。1 0 0 μ l のビオチン-ペプチドを、連続希釈した抗体を含むウェルに添加した。マルチウェルプレートを、室温にて 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルを、P B S 中の 0. 0 5 % T w e e n 2 0 溶液で 5 回洗浄し、次いで、P B S で 2 回洗浄した。

【0 3 5 7】

ストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ（H R P）結合二次抗体をウェルに添加し、プレートを室温で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルを、P B S 中の 0. 0 5 % T w e e n 2 0 溶液で 5 回洗浄し、次いで、P B S で 2 回洗浄した。

【0 3 5 8】

H R P 基質である 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（T M B）を添加し、1 - 1 5 分間インキュベートした。反応を、1 0 0 μ l の 1 N 硫酸の添加により停止した。4 5 0 n m での吸光度を読み出した。

【0 3 5 9】

結果を図 2 7 および 2 8 に示し、表 6 にまとめる。

【表 6】

表 6

	Hu-I PN002 kD [M] w/ビオチン-r Ta u 383	Hu-I PN002 kD [M] w/ビオチン-ペプチ ド1	Hu-I PN002 kD [M] w/ビオチン-ペプチ ド2
固相	1. 071E-10	1. 062E-10	2. 777E-10
溶相	1. 135E-10	1. 364E-10	3. 698E-10

10

【0360】

図 29 は、完全長組み換え Tau (r Tau-383) およびホスファターゼ活性化ドメイン (PAD) ペプチド (tau アミノ酸 2-28; AEPRQEFVME DHA GTY; 配列番号 80) に対する hu-I PN002 の結合を示す。図 29 に示す通り、hu-I PN002 は PAD ペプチドに結合しない。

【0361】

図 30 は、非ビオチニル化 Tau ペプチド 1 (Tau アミノ酸 13-24) および非ビオチニル化ペプチド 2 (Tau アミノ酸 15-44) が、hu-I PN002 への結合に関して、Tau ペプチド 1 および Tau ペプチド 2 のビオチニル化形態と競合することを示す。これらのデータは、Tau ペプチド 1 および Tau ペプチド 2 の hu-I PN002 への結合が特異的であり、ビオチンの添加によるものではないことを示す。

20

【0362】

実施例 15：病理学における I PN002 のインビボでの効果

この実験において、タウオパチーの遺伝子導入マウスモデル (h Tau. P301L-Tg) における減少した運動性および Tau 病理への治療的介入の効果を調査した。これらのマウスにおいて、ヒト Tau の臨床的変異 (P301L) が、マウス Thy1 プロモーターの制御下で発現された (ニューロン特異的発現)。行動 (梁歩行) を、7 月齢、8 月齢、8.5 月齢および 9 月齢ならびに実験終了の前日に測定した。実験の終点は、(1) 生存、(2) 行動：梁歩行パフォーマンスおよび握り締め (clasping) スコア、(3) 生化学：全ホモジネート、可溶性および不溶性の脳幹画分における、pan-Tau、および (4) バイオマーカー：全ホモジネートおよび不溶性脳幹画分における、AT8、を含む。

30

【0363】

材料および方法

P301L マウス (3-4 月齢) を、1) 対照 IgG; 2) PHF1 抗リン酸化 Tau 抗体; または 3) I PN002 で処理した。IgG 対照および I PN002 抗体を、20 mg/kg の濃度で 1 週間に 1 回、6 週間の間、腹腔内に注射した。PHF1 を、10 mg/kg で 6 ヶ月間投与した。PHF1 は、ホスホ-Ser³⁹⁶ およびホスホ-Ser⁴⁰⁴ を含むエピトープを認識するマウスモノクローナル抗体である。Santacruz et al. (2005) Science 309:476。

40

【0364】

体重および握り締め (clasping) 行動

体重を、処理期間中毎週および解剖時に決定した。体重および握り締めスコアを、7 月齢までの実験開始まで毎週記録した。7 月齢以降より、マウスをケージ中での行動、体重減少ならびに後ろおよび前足の握り締めの最初のサインについて 1 週間に 2 回モニターした。一旦、握り締めのサインが存在したら、体重を毎日決定し、握り締め行動を、‘早期の屠殺 (premature sacrifice)’ の瞬間までスコア化した。握り締め行動をスコア化するために、約 10 秒間、マウスを尾の付け根から約 1.5 cm 上で持った。握り締めに、4 点評価スケールを用いて個々の手足それぞれについてスコア化した。早期に屠殺されたマウスは、最大スコアが原因であった。前肢スコアを、主に、屠殺決定を支持する証拠と

50

して用いた。後肢スコアを、握り締めを観察、体重減少およびホームゲージ内での運動性の組合せで、あらかじめ決められた標準に従って作成した。1つの握り締めスコアに統一した左および右後肢スコアを、実験終了時に、処理中の握り締めの発生の評価およびグループ間の差の評価に用いた。癲癇のために早期に死んだマウスは、分析から除かれる。統計的分析を、それぞれ、繰り返しのある二元配置ANOVAとその後のBonferroniの事後比較試験を用いて、および屠殺前の握り締めスコアのグループ平均に対するチューデントのT検定を用いて行った。

【0365】

梁歩行

運動機能障害および運動学習を決定するために、ベースライン群および処理群の7月齢、8月齢、8.5月齢、および9月齢、ならびに実験終了の前日に、梁歩行試験を行った。所定のマウスの梁上でのバランスを保つ能力および1メートル先まで歩行するのに要する時間は、マウスのバランス、協調、身体状態および運動計画の1つの尺度である。丸い直径12mmの銅線（梁）を、角度30°下に置いた。梁の開始エリアは、卓上スタンドで照らされており、ゲージ内の脱出プラットフォームは末端に置かれた。トレーニングトリアル試験のために、より幅の広い梁を用いてマウスをバランスおよびプラットフォームへの歩行について訓練した。訓練試験後、マウスの実行時間を、1m先までに要した時間とした。さらに、歩行観察により、運動機能障害の初期症状（足を滑らす、および腹部の引きずり）を決定した。待ち時間のスコアの統計分析は、二元配置ANOVAと、その後のBonferroniの事後比較試験を用いて行った。

【0366】

結果

握り締め行動および梁歩行

IPN002の握り締め行動への効果を図31に示す。図31に示す通り、IPN002処理は、対照IgGと比較して、握り締めスコアを低減した。IPN002の運動機能への効果は、梁歩行により評価される通り、図32に示される。図32に示す通り、IPN002処理は、対照IgGと比較して、平均実行時間（average latency）を顕著に減少する（故に、運動機能を改善する）。故に、IPN002処理は、P301L tau遺伝子導入マウスにおける運動障害を顕著に低減する。同じ統計法を用いると、PHF1処理での結果は、統計的に有意に達しなかった。

【0367】

Tauレベル

対照IgG、PHF1、またはIPN002で処理後のP301LマウスのCSFにおける、遊離tau（IPN002に結合していないtau）のレベルを評価した。CSF中に存在する、IPN002に結合していない遊離tauのレベルを、IPN001を用いて決定した。データを図33に示す。図33に示す通り、IPN002処理は、対照IgGで処理したマウスでのレベルと比較して、遊離tau（IPN002に結合していない）レベルを96%低減させた。

【0368】

実施例16：eTau誘導性ニューロン過活動に対するIPN002の効果

材料および方法

全細胞パッチクランプ記録を、ヒト初代皮質培養物に行った。ニューロンを、pH=7.4、mOsm=310に調整した、NaCl（140mM）、KCl（2.5mM）、MgCl₂（2mM）、CaCl₂（2mM）、Hepes（10mM）、D-グルコース（10mM）、スクロース（20mM）を含む、人工脳脊髄液を用いて灌流した（2ml/分）。記録を、pClamp-10.3データ収集ソフトウェア（Molecular Devices）およびMulticlamp 700B増幅器（Axon Instrument; Foster City CA）を用いて行った。1）eTau1a（アミノ酸2-166）；2）阻害剤を含む、リン酸化tauまたはeTau；3）対照IgG；または4）抗Tau抗体、PHF1、IPN001、またはDako（ポリクローナル抗C末端tau）のパフアプリケーションを、

Mini Squirrtのmicro-perfusionシステム (AutoMate, Berkeley, CA) を用いて行った。オンラインデータ分析は、Clampfit 10.2 分析ソフトウェア (Molecular Devices) を用いた。記録を、 $34-37^{\circ}\text{C}$ で行った。

【0369】

結果

データを図34および35に示す。図34に示す通り、IPN002は、eTau1a誘導性ニューロン過活動を低減した。対照IgGと“Dako” (抗C末端ポリクローナルAb) はどちらも、ニューロン過活動を顕著に低減させる効果はなかった。PHF1は、eTau1a誘導性ニューロン過活動を低減させなかった。

10

【0370】

ニューロン過活動へのeTau1aの効果を、全長のPHF1反応性リン酸化Tau (ホスホ-Tau) のニューロン過活動への効果と比較した。図35、中パネルに示す通り、全長のPHF1反応性ホスホ-Tauは、試験した3細胞のうち、2細胞において、ニューロン過活動を誘導しなかった。試験した第3の細胞は、ベースライン (上パネル) と比較して、僅かなニューロン過活動を示した。これに対して、eTau1aは、試験した3つ全ての細胞においてニューロン過活動を誘導した (下パネル)。これらのデータを図36に図示する。

【0371】

実施例17: IPN002のA β レベルへの効果

20

材料および方法

iPSC誘導性皮質ニューロンからのA β 分泌

iPSC誘導性皮質ニューロン (iPSC-CN) を、インビトロで培養した。iPSCを健常個体、プレセニリンタンパク質 (PSEN1) に変異を有する家族性ADの個体、プレセニリンタンパク質 (PSEN2) に変異を有する家族性ADの個体、および散发性AD (AD) の個体から作製した。約55から60日間培養後、iPSC-CNを、成熟皮質ニューロンを富化するL1-CAM (CD171) 発現に基づいて分類した。分類した細胞を、正常なヒト星状細胞と共に30日間、共培養した。30日間の共培養後、iPSC-CNを、週に2回培地を交換しながら、種々の濃度のベーター部位アミロイド前駆体タンパク質切断酵素 (BACE) 阻害剤、対照IgG、またはIPN002でさらに25日間処理した。馴化培地を集め、Milliporeの高感度ヒトアミロイド β 40およびアミロイド β 42 ELISAで試験して、A β_{1-40} (“A β 40”) およびA β_{1-42} (“A42”) を検出した。A β 40およびA β 42は、アミロイド前駆体タンパク質の切断産物である。老人斑は、A β 42およびA β 40の両方を含む。

30

【0372】

初代ヒト皮質ニューロンからのA β 分泌

ヒト胎児大脳皮質組織を、Advanced Bioscience Resources (Alameda, CA) から得て、胎児研究に関する連邦のガイドラインおよび統一死体提供法 (Uniform Anatomical Gift.

Act) に従った。組織をハंक緩衝食塩水溶液 (Cellgro) で濯ぎ、 $1\text{mg}/\text{ml}$ DNase (EMD) の存在下で粉砕し、 100mm の細胞ストレーナーを通して篩い分けした。遠心後、ペレットを、 0.05% トリプシン/EDTA (Invitrogen) 中に、 37°C で20分間、再懸濁した。トリプシンは、等量の 10% ウシ胎仔血清 (FBS) 含有培地を加えることにより不活性化され、サンプルをDNaseの存在下で再び穏やかに粉砕した。遠心後、細胞を平板培地 (Neurobasal containing B27, Invitrogen) に再懸濁し、数カウントした。細胞をプレートに播種し、5週間培養し、一定濃度で抗体を含む新鮮培地を、3-4日毎に培地交換しながら10日間添加して、処理の10日後に馴化培地を集めた。馴化培地を $15,000\text{rpm}$ で15分間スピンドルし、その後、上記の通り、A β 40およびA β 42 ELISA分析を行った。

40

【0373】

結果

50

結果を図 37-39 に示す。

図 37 に示す通り、IPN002 での iPSC-CN の処理は、全ての iPSC-CN により分泌される A β 40 および A β 42 のレベルを低減させ、一方、対照 IgG は、A β 40 または A β 42 分泌を低減しなかった。

【0374】

図 38 は、初代ヒト皮質ニューロンから分泌される A β 40 の量に対する種々の抗体の用量依存的効果を示す。図 38 に示す通り、初代ヒト皮質ニューロンを 10 μ g/ml または 30 μ g/ml IPN001、IPN002 または hu-IPN002 (IPN002 のヒト化変異体) と共にインキュベートすると、A β 40 分泌の量が減少する。対照 IgG と PHF1 は両方とも、A β 40 分泌の量に顕著な効果を有さなかった。

10

【0375】

図 39 は、初代ヒト皮質ニューロンから分泌される A β 42 の量に対する種々の抗体の用量依存的効果を示す。図 39 に示す通り、初代ヒト皮質ニューロンを 10 μ g/ml または 30 μ g/ml IPN001、IPN002、または hu-IPN002 と共にインキュベートすると、A β 42 分泌の量が減少する。対照 IgG と PHF1 は両方とも、A β 42 分泌の量に顕著な効果を有さなかった。

【0376】

実施例 18：IPN002 のヒト化変異体のエピトープマッピング

材料および方法

抗体またはビオチニル化ペプチドを、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈した。終濃度は以下の通りである。1 μ g/ml IPN002 のヒト化変異体 (hu-IPN002)；1 μ g/ml rTau383 (完全長組み換え Tau)；5 μ g/ml ビオチニル化ペプチド。100 μ l の PBS 中の 0.1% カゼインを、マルチウェルプレートの各ウェルに添加した。150 μ l の hu-IPN002 の 1 μ g/ml 溶液を添加した。hu-IPN002 の連続希釈を行い、マルチウェルプレートの各ウェルをコーティングした。100 μ l のビオチン-ペプチドまたはビオチン-完全長 Tau を、連続希釈した抗体を含むウェルに添加した。マルチウェルプレートを、室温で 1 時間、インキュベートした。インキュベーション後、ウェルを PBS 中の 0.05% Tween 20 溶液で 5 回洗浄し、次いで、PBS で 2 回洗浄した。

20

【0377】

ストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合二次抗体をウェルに添加し、プレートを室温で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルを、PBS 中の 0.05% Tween 20 溶液で 5 回洗浄し、次いで、PBS で 2 回洗浄した。

30

【0378】

HRP 基質である 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を添加し、1-15 分間インキュベートした。反応を、100 μ l の 1N 硫酸の添加により停止した。450 nm での吸光度を読み出した。

【0379】

結果

データを図 40 に示す。図 40 に示すデータは、ビオチン-Tau13-24、ビオチン-Tau15-24、ビオチン-Tau15-44、およびビオチン-ホスホTau15-24 (完全長 Tau のアミノ酸 18 に対応するリン酸化 Tyr を有する)、および完全長 Tau (rTau383) が全て、hu-IPN002 に効率よく結合することを示す。従って、hu-IPN002 は、Tau のアミノ酸 15-24 内のエピトープに、Tyr-18 のリン酸化状態に関わらず結合する。

40

【0380】

実施例 19：CSF にて tau に結合する抗体

IPN002、PHF1、直鎖状リン酸化エピトープに特異的な抗体、および対照抗体の、CSF 中に存在する tau への結合を評価した。

50

【0381】

C S F中に存在するt a uに結合する抗体を同定するための結合アッセイを行った。該アッセイを、図41に図示する。対照I g G、直鎖状リン酸化エピトープ（“ポリA b－C末端t a u”）に特異的なポリクローナル抗体、P H F 1、またはI P N 0 0 2を、マルチウェルプレートの複数ウェル上にコーティングした。抗体をリン酸緩衝生理食塩水（P B S）で希釈した。終濃度は以下の通りである。5 μ g / m l I P N 0 0 2、I g G、P H F 1、またはポリA b－C末端t a u。1 0 0 μ lのP B S中の0. 1 %カゼインを、マルチウェルプレートの各ウェルに添加した。1 0 0 μ lのヒトC S Fを添加し、室温で1時間インキュベートした。1 0 0 μ lのビオチン－B T 2 + ビオチン－H T 7を各ウェルに添加した。B T 2は、ヒトt a uのアミノ酸1 9 4－1 9 8内のエピトープに結合するマウスモノクローナル抗体である。H T 7は、ヒトt a uのアミノ酸1 5 9－1 6 3内のエピトープに結合するマウスモノクローナル抗体である。マルチウェルプレートを、室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルをP B S中の0. 0 5 % T w e e n 2 0 溶液で5回洗浄し、次いで、P B Sで2回洗浄した。

10

【0382】

ストレプトアビジン－ホースラディッシュペルオキシダーゼ（H R P）結合二次抗体をウェルに添加し、プレートを室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルを、P B S中の0. 0 5 % T w e e n 2 0 溶液で5回洗浄し、次いで、P B Sで2回洗浄した。H R P基質である3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（T M B）を添加し、1－1 5分間インキュベートした。反応を、1 0 0 μ lの1 N硫酸の添加により停止した。4 5 0 n mでの吸光度を読み出した。

20

【0383】

アッセイを、公知の量の完全長ホスホ－t a uまたは公知の量のe T a u 1 a（t a uのアミノ酸2－1 6 6）を用いて定量化した。図41下パネルに示す通り、アッセイを、完全長t a u（左下パネル）またはe T a u－1 a（右下パネル）を、0 n g / m l、0. 1 6 n g / m l、0. 8 n g / m l、4 n g / m l、2 0 n g / m l、および1 0 0 n g / m lの濃度で用いて行った。図41左下パネルに示す通り、I P N 0 0 2、ポリA b－C末端t a u、およびP H F 1は、完全長t a uに結合する。図41右下パネルに示す通り、I P N 0 0 2のみがe T a u 1 aに結合する。

30

【0384】

上記のアッセイを、1）対照（健常な）患者；2）M C I患者；3）軽度A D患者（“軽度”）；4）中等度A D患者（“中等度”）；および、重度A D患者からの、ヒトC S F中に存在するt a uに対するポリA b－C末端t a u、P H F 1、およびI P N 0 0 2の結合を試験するために行った。結果を図42に示す。図42に示す通り、C S F中に存在するt a uには、I P N 0 0 2が結合するが、p A b－t a u直鎖状エピトープまたはP H F 1は結合しない。データは、1）N末端T a uフラグメントがC S F中に存在すること、2）完全長t a uがC S F中に検出されたこと、および3）B T 2およびH T 7エピトープを含むC末端t a uフラグメントが、C S F中に検出されなかったこと、を示す。

40

【0385】

実施例20：I P N 0 0 2のインビボ効果

結果は、P 3 0 1 L t a u 遺伝子導入マウスにおける6ヶ月のT a u抗体効力試験から得られた。C S F中の顕著に低下した遊離t a uレベル、アストログリオシスのたんぱく質マーカーの低下したレベル、複数の脳領域に亘るt a u病理およびホスホ－t a u－エピトープの改善、ならびに改善された行動的／機能的読み出し結果により例示される通り、I P N 0 0 2が疾患の進行を全体的に阻止することが見出された。I P N 0 0 2は、抗T a u抗体P H F 1と同程度またはより良好に作用した。最後に、インビボでの確認が、新たに分泌されたt a uの作用機序：アミロイドベータレベルの正のフィードバック調節から得られた。この実験は、P H F 1と比較して、アミロイドベータレベルを調節する、e T a u抗体、I P N 0 0 2の能力を明確に特徴付けた。

50

【0386】

材料および方法

動物実験

P301L遺伝子導入マウスモデルを用いた。P301L遺伝子導入マウスは、導入遺伝子としてP301L変異した4R2N ヒトtauを発現するマウスThy1プロモーター（ニューロン特異的発現）を含む。P301L遺伝子導入モデルは、脊髄、脳幹、中脳、および皮質におけるtauの加齢依存性高リン酸化（AT8およびAT100）を示す。高リン酸化tauはtau凝集をもたらし、発症に高い変動があるが、マウスは、6月齢から神経原線維変化を生じる構造変化を示す。病状と共に、これらのマウスは、8-11月齢の範囲で、後肢握り締め、梁歩行における低下した運動性および屠殺の必要性などの運動障害を徐々に生じる。Terwel et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 280: 3963。

10

【0387】

100匹の無作為化マウスに、6月齢から9.5月齢までの3.5ヶ月の間、毎週、抗体を腹腔内投与した。20mg/kg (mpk) のIPN002処理を、陰性対照抗体である20mpk IgG1、および抗Tau抗体である10mpk PHF1と比較した。PHF1は、ホスホ-Ser³⁹⁶およびホスホ-Ser⁴⁰⁴を含むエピトープを認識するマウスモノクローナル抗体である。Santacruz et al. (2005) Science 309:476。生きているマウスを、握り締め欠失および梁歩行能について調査した。終末期疾患まで急速に進行したマウスを、予め決められた基準を用いて、予定より早く（9.5月齢より前に）殺した。血清、CSF、海馬、皮質、中脳および後脳を得た。そして、半脳を組織病理学用に矢状に切片化した。抗体レベルを血清およびCSFにおいて測定した。全量tauおよび遊離tau（IPN002に結合していないtau；“IPN002の遊離”tau）を、CSFにおいて測定した。ヒトおよびマウスtauの生化学的／組織学的分析を行った。そして、マウスのアミロイドベータ、炎症性およびシナプス性タンパク質マーカー、および炎症部位における遺伝子発現変化、シナプス活性およびニューロン活性マーカーを分析した。全ての分析を、盲検法で行った。

20

【0388】

この実験に用いたマウスの数は、1実験当たり25-33匹およびベースラインとして10匹であった。この実験用に確保された全てのマウスは、コンピューターにより無作為に番号が付され、処理に無作為に割り当てられた。マウス群を表7に示す。

30

【表7】

表7

群	N(数)	株	処理
1	10	hTau. P301L-Tg	未処理 (ベースライン群)
2	32	hTau. P301L-Tg	ビークル中の20mpk mIgG1
3	25	hTau. P301L-Tg	ビークル中の10mpk PHF1
4	33	hTau. P301L-Tg	ビークル中の20mpk IPN002

40

【0389】

全ての動物実験は、実験用動物の世話および使用のための国際的に認められた原則に完全に従う生命倫理のガイドラインに従って実施された。表8は処理パラメーターを提供する。

【表 8】

表 8	
投与経路	腹腔内
投与量、濃度	1 0 m l / k g ; 1 m g / m l ; 1 0 m p k / 日
処理頻度	1 週間に 1 回
処理期間	生存によって、6 ヶ月まで
処理群への割り当て	無作為

10

【0390】

体重を、処理中毎週および屠殺時に決定した。握り締めスコアを、7 月齢から毎週記録した。7 月齢から、マウスを、ケージ内での運動性、重量損失および後肢の握り締めの最初のサインについて、週に 2 回モニターした。

【0391】

握り締め行動。握り締め行動をスコア化するために、マウスを 1 0 秒間、その尻尾の付け根で維持した。後肢握り締めを、3 点評価スケールを用いてスコア化した。0、後肢伸張および足指拡大 (toe spread)。1、> 5 0 % の時間の一方の後肢の部分的引き込み。2、> 5 0 % の時間の両方の後肢の部分的引き込み。3、> 5 0 % の時間の両方の後肢の完全な引き込み。前肢の握り締めを、3 点評価スケールに従ってスコア化する。0、身体 20 の前後での前肢伸張。1、> 5 0 % の時間の一方の前肢の部分的引き込み。2、> 5 0 % の時間の両方の前肢の部分的引き込み。3、両方の前肢の完全な引き込み、不動、筋肉喪失 (マウスは、“ 祈っている ”)。重度の握り締め表現型を示すマウスを早期に屠殺した。

【0392】

梁歩行。梁歩行を、運動機能障害および運動学習を決定するために、7 月齢、8 月齢、8. 5 月齢、9 月齢および 9. 5 月齢で行った。マウスの梁の上でバランスを保つ能力および 1 メートル歩くのに要する時間は、そのバランス力、協調、身体状態、および運動計画の 1 つの尺度である。丸い直径 1 2 m m の銅製の梁を 3 0 ° の角度で置いた。出発エリアに照明を当て、ゲージ内の脱出プラットフォームを反対側の終点に置いた。トレーニングトライアル後、マウスの実行時間を計測した。さらに、足を滑らす (foot slip)、および腹部の引きずり (belly dragging) を計数した。 30

【0393】

ベースライン群を、実験開始前に屠殺した。重度の握り締め、体重減少および／または瀕死の状態を示す実験群マウスを、早期に屠殺した (早期屠殺)。残りのマウスは、処理の 6 ヶ月後に屠殺した (後期屠殺)。

【表 9】

表 9	
麻酔	ケタミン、キシラジン 2 %、アトロピンおよび生理食塩水／イソフルランの混合物。
灌流	胸部の空洞は、左心室を経た 3 分間の氷冷食塩水による心臓の横断灌流を経た灌流のに対応する。右心室は流出ルートとして切除した。
左半球	海馬、皮質、中脳、小脳および脳幹およびその他の部分に解剖、液体窒素中で凍結
右半球	4 %パラホルムアルデヒドを含む P B S 中で一晩、予め固定し、0 . 1 %アジ化ナトリウム含有 P B S 中で 4 °C にて貯蔵
C S F	頭蓋骨と最初の頸椎の間の首筋肉の切り込みから収集。大槽は、2 6 ゲージ針で穴を開け、1 0 – 2 0 u l C S F を集め、1 0 , 0 0 0 g で 4 °C にて遠心し、－8 0 °C で貯蔵した。
血液／血漿	破裂した心臓から E D T A チューブに集め、4 °C にて 1 5 分間、2 0 0 0 x g で遠心し、－7 0 °C で貯蔵した。
体重	屠殺時に測定

10

【0 3 9 4】

血漿中の遊離 P H F 1 を、t a u をコーティングしたプレートに適当に希釈した血漿を添加し、H R P - 抗マウス I g G 抗体および T M B を用いる E L I S A を用いて検出することにより測定した。遊離 P H F 1 アッセイの感度は、C S F 中の遊離 P H F 1 レベルを測定するのに不適當であった。

20

【0 3 9 5】

血漿および C S F 中の遊離 I P N 0 0 2 を、t a u をコーティングしたプレートに適当に希釈した血漿または C S F を添加し、H R P - 抗マウス I g G 抗体および T M B を用いる E L I S A を用いて検出することにより測定した。

【0 3 9 6】

C S F 中の全量 t a u を、I P N 0 0 2 または P H F 1 の何れとも競合しないことが証明されたコーティング用抗 T a u 抗体および検出用抗 T a u 抗体の両方を用いるサンドウィッチ E L I S A を用いて測定した。

30

【0 3 9 7】

C S F 中の遊離 t a u (I P N 0 0 2 の) を、C S F 中の t a u を捕捉するために 2 種の抗 T a u 抗体を用いるホモジニアス E L I S A を用いて測定した。これらの抗体の 1 つが I P N 0 0 2 と競合し、故に、C S F 中の I P N 0 0 2 に既に結合している t a u と相互作用しないであろう。

【0 3 9 8】

海馬および皮質を、1 0 容積重量の冷却 T B S / R o c h e のプロテアーゼ／ホスファターゼ阻害剤カクテル中に均質化することにより分別した。ホモジネートを、1 0 , 0 0 0 g で 1 5 分間スピンして、細胞残屑を排除した。B C A タンパク質内容物をホモジネートした。全てのホモジネートを、1 m g / m l に希釈し、対応する画分を同等に希釈した。ホモジネートの一部を、4 °C にて、1 0 0 , 0 0 0 g で 1 時間スピンして、可溶性画分 (S 1) および不溶性ペレットを作製した。不溶性ペレットを、1 % S a r k o s y l / R o c h e プロテアーゼ／ホスファターゼ阻害剤カクテル中に再懸濁し、再び、1 0 0 , 0 0 0 g で 1 時間、スピンした。S a r k o s y l 可溶化上清をラベル付けした (P 1) 。S a r k o s y l 不溶性ペレットを再懸濁して、ラベル付けした (P 2) 。後脳を、高塩濃度 (0 . 8 5 M N a C l) を用いること以外、同様に分画化し、次いで、1 % S a r k o s y l を用いて P 1 ペレットを可溶化した。

40

【0 3 9 9】

ヒト t a u ホモジニアス E L I S A は、ヒト t a u について特に報告し、海馬、皮質お

50

よび後脳におけるホモジネート、S 1、P 1およびP 2画分中のヒト t a u レベルを決定するために用いられた。

【0400】

ヒトAT 8ホモジニアスELISAは、ヒトp 202 / 205 t a u について特に報告し、海馬、皮質および後脳におけるホモジネート、S 1、P 1およびP 2画分中のヒトAT 8レベルを決定するために用いられた。

【0401】

HT 7、IPN 001、D a k o ポリクローナル t a u、AT 8、AT 100、抗p 262、抗p 396およびAD 2、GFAP、I b a 1、シナプシンSDS-PAGEウェスタンブロットを、海馬、皮質および／または後脳画分（ホモジネート、S 1、P 1および／またはP 2）に行った。ゲル間の適切な標準化を保証するために、個々のゲルにおいて1つまたはそれ以上の溶解物対照を流した。全ての分析バンドを、対応するホモジネートサンプルにおけるβ-アクチンに対して標準化した。抗体およびそれらの標的を表10に示す。

【表10】

表10

抗体	標的
IPN 001	T a u および e T a u
HT 7	ヒト t a u
D a k o ポリクローナル t a u	ヒトおよびマウス t a u
AT 8	ヒトおよびマウス p 202 / 205 (S e r 202 および T h r 205 にてリン酸化) t a u
AT 100	ヒトおよびマウス p 212 (S e r 212 にてリン酸化) t a u
抗p 262	ヒト p 262 (S e r 262 にてリン酸化) t a u
AD 2	ヒトおよびマウス p 396 (S e r 396 にてリン酸化) t a u
p 396	ヒトおよびマウス p 396 (S e r 396 にてリン酸化) t a u
グリア細胞繊維性酸性タンパク質 (GFAP)	アストロサイトにおけるマウス GFAP
イオン化カルシウム結合アダプター分子1 (I b a 1)	ミクログリアにおけるマウス I b a 1
シナプシン	マウスシナプシン (シナプスタンパク質)

【0402】

組織病理学のために、6 / 32の無作為化した半脳の矢状断面を、AT 8およびAT 100について染色した。シグナルをDAB発色で生じさせた。視床下核に付随する不確帯（プレグマ2. 08-1. 12）および小脳（前葉および後葉部分）に付随する側方小脳核（I n t A / P / L A T ; プレグマ2. 28-1. 32）の挿入核の両方を定量化した（盲検）。

【0403】

マウスアミロイドベータELISA（Aβ 40およびAβ 42の両方）を、マウス脳ホモジネートにおけるAβ 40およびAβ 42の特異的検出のために行った。マウスAβ 42ELISAは、マウス脳ホモジネートにおけるレベルの正確な検出に十分な感度ではなかった。マウスAβ 40ELISAは、アッセイの線形範囲内にマウスAβ 40レベルを検出した。マウスAβ 40ELISAを、全てのコホートホモジネートおよび可溶性画分

(S1)におけるA β 40レベルを決定するために用いた。

【0404】

Taqman分析を、炎症のマーカー、シナプスマーカーおよびニューロン活動のマーカーについて行った。表11に該マーカーを列記する。

【表11】

表11

遺伝子	機能
APP	アミロイド前駆体タンパク質：あるfAD患者にて変異しており／病因である
ヒトTau	MTBタンパク質；ADにて凝集
Arc	ニューロン活動
シナプシン	シナプスタンパク質
シナプトフィジン	シナプスタンパク質
カルビンジン	シナプスタンパク質
ニューロペプチドY	ニューロン活動
Cox2	炎症
GFAP	炎症－アストロサイト
Iba1	炎症－ミクログリア
IL-1b	炎症
P67phox	炎症
Pg91phox	炎症
PBR1	炎症
TNFa	炎症

10

20

【0405】

統計法

握り締めおよび梁歩行の時系列(longitudinal)統計分析を、独立した統計専門家により行った。要約すれば、低下の曲線の傾きは、握り締めの欠如および梁歩行の両方について各マウスにより決定し、これらの係数を、グループ間で有意な相違が存在するかどうかを決定するために用いた。複数の方法を、曲線の傾きおよび有意性を決定するために用いた。握り締めに関して、これらには、経時観察完全データ解析法(Longitudinal Complete Case Analysis)、欠測データを調整するジョイントモデル法(Joint Model Adjusting for Missing Data)およびベイズ順序経時的分析(Bayesian Ordered Longitudinal Analysis)が含まれた。梁歩行に関して、これらには、経時観察完全データ解析法、欠測データを調整するジョイントモデル法、30秒の値を用いる経時観察分析法(Longitudinal Analysis using 30 Second Values)、欠測値を含むベイズ経時的分析(Bayesian Longitudinal Analysis with Missing Value)および生存するが、交差しない分析(Alive but Non-cross Analysis)が含まれる。

30

40

【0406】

生化学、組織学および遺伝子発現についての有意性を決定するための統計分析を、コホート全体、早期の屠殺および遅い屠殺のコホート群について、一元配置ANOVAを用いて、次いでDunnettのpost-hoc解析を用いて行った。t検定もまた、一元配置ANOVA分析からの有意性に対するコンパレータとして、疾患の進行(3.5ヶ月ベースライン群対9.5ヶ月IgG処置群)について行われた。PHF1またはIPN002が、大きな変化の傾向があるが、一元配置ANOVA分析によりこれを反映しないことが明らかであったとき、IgGとPHF1またはIPN002とを比較するt検定は、傾向パターンが、一元配置ANOVAの有意性に達しない終点を出現させるかどうかを決定するためにのみ行われた。

50

【0407】

116個の終点のうち、どれが互いに相関しているかを決定するために、相関行列を行った。最も高い相関が、それらの r^2 値とp値の組合せに基づいて順にランク付けされた【0408】

結果

抗体レベルおよび標的との結合 (Target Engagement)

血漿およびCSFを、屠殺前に得た。血漿中の遊離IPN002および遊離PHF1、およびCSF中の遊離IPN002を、決定した。遊離PHF1アッセイは、CSF中の遊離PHF1レベルを測定するのに十分な感度ではなかった。十分なCSFはまた、全量tauおよび遊離Tau (IPN002に結合していない) の両方のレベルを決定するために得られた。

【0409】

血漿遊離IPN002および遊離PHF1レベル

P301L Tau遺伝子導入マウスを、20mpk IgG、20mpk IPN002または10mpk PHF1で処理した。これらの投与量は、標的との結合試験 (Target Engagement) #1から得られた結果を基に選択された。まとめたデータを表12に示す。

【表12】

表12

抗体	標的との結合試験 #1		有効性試験	
	投与用量	平均遊離抗体レベル (血漿)	投与用量	平均遊離抗体レベル (血漿)
IPN002	4週間、10mpk → 4週間、20mpk	0.65 μ M	26週間、20mpk	0.9-/+0.26 μ M
PHF1	8週間、10mpk	0.65 μ M	26週間、10mpk	0.55-/+0.05 μ M

【0410】

10mpk IPN002で4週間、その後、20mpk IPN002でさらに4週間の処理により、血漿中に平均で0.65 μ Mの遊離IPN002が得られることが標的との結合試験 #1にて見出された。同じ濃度である0.65 μ Mの遊離PHF1が、一定の10mpk PHF1にて8週間の処理で得られた。本実験において、表12に示す通り、平均血漿濃度は、0.55 μ M 遊離PHF1、および0.9 μ M IPN002であった。従って、遊離IPN002の平均レベルは、血漿中の遊離PHF1よりも高かった。

【0411】

CSFの遊離IPN002レベル

表13に示す通り、平均0.9nMの遊離IPN002が、IPN002処理したP301L tauマウスのCSF中に存在した。これは、CSF：血漿中において0.1%の遊離IPN002である。すなわち、CSFにおけるIPN002の濃度は、血漿中のIPN002の濃度の0.1%である (CSF中、0.9nM；血漿中、0.9 μ M)。CSF中の0.1% 抗体は、末梢投与後の脳へのアクセスおよびCSFへの流出における、他の抗体について決定された割合と一致している。しかしながら、遊離IPN002アッセイは、tauに結合していないIPN002を報告するのみである。Tauは、CSFにてIPN002に結合している。従って、0.1%の値は、CSFにおける全IPN002を実際より少なく示す。遊離IPN002レベルとtauに結合しているIPN002レベルを加算することにより、CSF中の全IPN002レベルが、血漿レベルの~0.2%であることが示唆される。方法に記載の通り、遊離PHF1アッセイは、CS

Fの遊離PHF1レベルの測定に十分な感度ではない。

【表13】

表13

抗体	有効性試験	
	平均遊離抗体（血漿）	平均遊離抗体（CSF）
遊離IPN002	0.9—/+0.26 μ M	0.9—/+0.28 nM

【0412】

CSF中の全量tau

CSF中の全量tauのレベルを、PHF1またはIPN002の何れかが、これらのレベルを変える可動かを決定するために、測定した。図43に示す通り、CSF中の全量tauのレベルは、PHF1またはIPN002処理により顕著に変化しなかった。この結果は、標的との結合試験により得られたデータから予期された。

【0413】

図43：P301L tau 遺伝子導入マウスのCSFにおける全量tauレベルを、Tau抗体サンドウィッチELISAアッセイを用いて測定した。図43に示す通り、CSFにおけるtauレベルは、月齢に応じて顕著に増加した（マウスIgGの3月齢のベースラインと比較して）。PHF1とIPN002は両方とも、全量tauレベルを変化させた。

【0414】

CSF中の（IPN002の）遊離Tau

CSFアッセイにおける（IPN002の）遊離Tauは、方法に記載の通り、2つのTau抗体のうち1つがIPN002と競合するELISAである。故に、該アッセイは、IPN002に結合しているtauを検出しない。このアッセイは、IPN002が、脳およびCSF内に入り、その標的を結合したかどうか（すなわち、tauに結合したかどうか）を示す。IPN002がその標的に結合したとき、アッセイにおけるシグナルは低くなり得る。このアッセイは、IPN002の遊離tauに特異的であり、故に、（PHF1の）遊離Tauを検出しない。図33に示す通り、（IPN002の）遊離Tauレベルは、疾患の進行に伴い増加し、上記のデータと一致している。PHF1は、遊離Tauレベルに影響を与えない。対称的に、IPN002処理は、（IPN002の）遊離Tauシグナルのレベルを96%減少させる。これらのデータは、IPN002がその標的であるCSF tauに完全に結合したことを示す。

【0415】

TauおよびホスホTauの生化学および組織学

方法に記載の通り、海馬、皮質、および後脳を、ホモジネート、可溶性（Sarkosylによる可溶）画分、および不溶性（Sarkosylによる不溶性）画分に断片化した。該画分をヒトおよびマウスtauの両方について、多数のホスホtau エピトープ（AT8、AT100、p262、p396およびAD2）について、それらがアルツハイマー病の脳にて高度にリン酸化されていることを分析した。図44A-Hに示す通り、IPN002処理は、マウスIgG対照抗体での処理と比較して、海馬ホモジネート（図44A）、海馬S1フラクション（図44B）、海馬P1フラクション（図44C）、海馬P2フラクション（図44D）、皮質ホモジネート（図44E）、および皮質P1フラクション（図44G）におけるAT8レベルを低減した。図44A-Hにおけるデータは、IPN002処理が、PHF1処理と同程度またはそれよりもAT8レベルを低減したことを示す。図44A-Hに示すデータは、BCAに対して標準化した。

【0416】

図45Aに示す通り、IPN002処理は、マウスIgG対照抗体での処置と比較して、皮質S1フラクションにおけるヒトp396-tauのレベルを低減した。図45Bおよび45Cに示す通り、IPN002処理は、マウスIgG対照抗体での処理と比較して

、皮質ホモジネート（図45B）および皮質S1フラクション（図45C）におけるホスホーtau S262のレベルを低減した。図45Dおよび45Eに示す通り、IPN002での処理は、マウスIgG対照抗体での処理と比較して、皮質S1フラクション（図45D）におけるマウスp396-tauのレベルを低減し、皮質S1フラクション（図45E）におけるマウスAT100のレベルを低減した。

【0417】

Tau組織病理（AT8およびAT100）を、後脳内の2つの別個の核、視床下核に付随する不確帯（STH）ならびに小脳（前葉および後葉部分）に付随する側方小脳核（IntA/P/LAT）の挿入核にて分析した。図46に示す通り、IPN002は、後期屠殺マウスにおいて、AT8疾患の病理を顕著に改善した。PHF1は、減少させる傾向にあったが、tau組織病理を有意に改善しなかった。図47に示す通り、IPN002処理は、対照IgGでの処理と比較して、AT100およびMC1疾患の病理を改善した。

10

【0418】

炎症

アストログリオシスおよび小神経膠細胞症 (microgliosis)は両方とも、ADおよびタウオパチーのモデルにおいて発症する。しかしながら、活性化アストロサイトまたはミクログリアが疾患にて果たす役割は、完全に明らかではない。アストロサイトまたはミクログリアが、P301L tau遺伝子導入モデルにて活性化されるとき、かかる活性化は、変異したtauの過剰発現に起因し得る。分泌されたtauがAD病理を引き起こすと過程される。分泌されたtauがAD病理を引き起こすとき、それは、グリアの活性化も引き起こし得る。そのようなものとして、該タンパク質が、P301L遺伝子導入マウスモデルにおいて、アストログリオシス（GFAP）または小神経膠細胞症（Iba1）を増加させるかどうかが決定的な結果となった。

20

【0419】

図48Aおよび48Bに示す通り、GFAPタンパク質レベルは、海馬および皮質の両方で疾患の進行に伴い増加した。これらのデータは、アストロサイトが海馬および皮質で活性化されるか、またはそれらが、これらの脳領域に流入したことを示す。IPN002処理は、海馬および皮質の両方におけるGFAPタンパク質レベルを顕著に低減し、IPN002処理が、アストログリオシスにおける疾患に関連する増加を低減することを示した。PHF1は、海馬におけるGFAPを顕著に低減したが、皮質においては低減しなかった。

30

【0420】

ミクログリアのマーカーであるIba1タンパク質レベルを、海馬および皮質の両方で測定した。図49Aおよび49Bに示す通り、Iba1は、海馬における疾患の進行にて増加しなかったが、皮質において増加した。IPN002処理は、疾患の進行に関して、Iba1タンパク質レベルに影響を与えなかった。対称的に、PHF1処理は、Iba1タンパク質レベルを顕著に低減した。データは、IPN002およびPHF1の作用機序の違いを示唆する。

【0421】

アミロイドベータレベルの調節

実施例17に示す通り、iPSC-CNのIPN002での処置は、全てのiPSC-CNより分泌されるAβ40およびAβ42のレベルを低減したが、対照IgGでの処置は、Aβ40またはAβ42分泌を低減しなかった。そこで、IPN002がインビボにおいてもAβレベルを調節するかどうかを決定した。P301Lマウスモデルにおいて、ヒトAPPの過剰発現はなかった、従って、マウスAβレベルが測定された。マウスAβ42 ELISAの感度は、これらのホモジネート中のAβ42レベルを測定するのに十分ではなかった。しかしながら、マウスAβ40 ELISAは、十分な感度であり、故に、theホモジネートおよび上清画分におけるマウスAβ40レベルを決定するために用いられた。マウスAβ40レベルは、疾患の進行に伴い増加する。Aβ40レベルの観

40

50

察された増加は、 τ および／または年齢に依存し得る。図 50 A および 50 B に示す通り、IPN002 処置は、ホモジネート（図 50 A）および可溶性フラクション（図 50 B）の両方において $A\beta$ 40 レベルを低下させた。

【0422】

図 50 A および 50 B のデータは、 τ の過剰発現（多分、加齢と関係する）が、 $A\beta$ 40 レベルの増加と関連して疾患の進行をもたらすことを示す。データは、分泌された τ が $A\beta$ レベルの増加をもたらす原因であることを示唆し、同様に、IPN002 が $e\tau$ 機能を阻止することにより阻害することを示唆する。これに対して、PHF1、非 $e\tau$ 結合抗体は、 $A\beta$ レベルに影響を与えない。

【0423】

運動機能

IPN002 処理の運動機能に対する効果は、握り締めおよび梁歩行試験により評価される通り、決定された。データを図 31、32、51、および 52 に示す。

【0424】

図 31 に示す通り、IPN002 処理は、マウス IgG 対照での処理と比較して、握り締めスコアを改善した。

【0425】

図 32 および 51 に示す通り、IPN002 処理は、マウス IgG 対照での処理と比較して、梁歩行試験における平均実行時間（average latency）を改善し（図 32）、梁を歩行することができないマウスの割合を減らした（図 51）。

【0426】

実施例 21：エピトープマッピング

ペプチド結合および競合アッセイを、上記の実施例 18 に記載の通りに行った。

以下のペプチドを用いた。

IPIG-1：EVMEDHAGTYGLGDRK（配列番号 81； τ のアミノ酸 9-24）；

IPIG-2：DHAGTYGLGDRK（配列番号 49； τ のアミノ酸 13-24）；

IPIG-3：AGTYGLGD（配列番号 82； τ のアミノ酸 15-22）；

IPIG-4：AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLK（配列番号 50； τ のアミノ酸 15-44）；

PAD ペプチド：AEPRQEF EVMEDHAGTY（配列番号 80； τ のアミノ酸 2-18）。

結果を図 53-55 に示す。

【0427】

図 30 は、非ビオチニル化 τ ペプチドが τ のビオチニル化形態と競合することを示す。上パネルは、ビオチニル化 τ 13-24 ペプチド（IPIG-2；配列番号 49）と非ビオチニル化 τ 13-24 の hu-IPN002 への結合に対する競合を示す。

【0428】

図 52 は、完全長 τ 、IPIG-1、IPIG-2、および IPIG-4 が hu-IPN002 に結合したことを示す。残基 23 および 24 を欠く IPIG-3、および PAD は、hu-IPN002 に結合しなかった。従って、残基 23 および 24 は、hu-IPN002 結合に必要なことが明らかである。

【0429】

図 53 は、 $e\tau$ -4 ペプチドが hu-IPN002 に結合することを示す。しかしながら、PAD（ τ 2-18）、 τ 15-22、 τ 19-28、および τ 21-31 ペプチドは、hu-IPN002 に結合しない。

【0430】

データは、残基 15-24 が hu-IPN002 結合に必須なことを示す。

10

20

30

40

50

【0431】

本発明は、その特定の態様を引用して記載されているが、種々の変更が行われ得て、同等物は、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく置き換えることができることが、当業者には理解されるべきである。さらに、多くの改良が、本発明の目的、精神および範囲に、特定の状況、材料、物質の組成、方法、1工程または複数工程を適合させて行うことができる。全てのそのような改良は、本明細書に添付した特許請求の範囲内であることが意図される。

【図1A】

ハイブリドーム IPN001 重鎖配列

```
1 E V Q L V E S G E D L V K P G G S L K L  
2 GAGTGCAGT TGGTGGAGTC TGGGAAGAC TTAGTGAAGC CTGGAGGTC CCTGAAGTC  
61 S C V A S G F A F S S Y G M S W V R Q T  
TCCTGTGTCG CTCTGGATT CGCTTCAGT AGCTATGGCA TGTCTTGGGT TCGCCAGACT  
121 P D M R L E W V A T I S S S G S R T Y F  
CCAGACATGA GGCTGGAGTG GGTGCGACA ATTAGTAGCA GTGCTAGTCG CACCTACTTT  
181 P D S V K G R L T I S R D N D K N I L Y  
CCAGACAGTG TGAAGGGCG ACTCACCATC TCCAGAGACA ATGACAGAA CATCCTATAC  
241 L Q M S S L R S E D T A M Y Y C T I T W  
CTACAAATGA GCAGCTGAG GTCTGAGGAC ACAGCCATGT ACTATTGTAC GATTACCTGG  
301 D G A M D Y W G R G I S V T V S S (配列番号 14)  
GAGGTGCTA TGGACTACT GGTCTGTGGA ATATCAGTCA CCGTCTCCTC A (配列番号 18)
```

CDR 定義およびナンバリング配列の番号付けは、kabatの番号付けシステムに従っている。
CDR および CDR をコード化するスクレオチド配列を、太字および下線で示す。

FIG. 1A

【図1B】

ハイブリドーム IPN001 軽鎖配列

```
1 D V L M T Q T P L S L A V N L G D Q A S  
GATGTTTGA TGACCCAAAC TCCGCTCTCC CTGGCAGTCA ATCTGGAGA TCAAGCCTCC  
61 L S C R S S Q T I L H S N G N T Y L E W  
CTCTCTTGA GATCGAGTCA GACTATTTTA CATAGTAATG GAAATACCTA TTAGAATGG  
121 Y L Q K P G Q S P R L L I Y K V S K R F  
TATTTCAGA AACGAGGCCA GTCCTCAAGA CTCCTGATCT ACAAAGTTTC TAAACGATTT  
181 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I  
TGTGGGTCC CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTCAC ACTCAAGATC  
241 S R V E A D D L G I Y Y C F Q G S L V P  
ACGAGAGTGG AGGCTGACGA TCTGGGAATT TATTACTGCT TTCAAGGTTTC ACTTGTTCCT  
301 W A F G G G T K L E I K (配列番号 13)  
TGGGCGTTCG GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAA (配列番号 17)
```

CDR 定義およびナンバリング配列の番号付けは、kabatの番号付けシステムに従っている。
CDR および CDR をコード化するスクレオチド配列を、太字および下線で示す。

FIG. 1B

【図 2 A】

ハイブリドーマ IPN002 重鎖配列	
1	E V H L V E S G G A L V K P G G S L K L GAGGTTTCATC TGGTGGAGTC TGGGGAGCC TTAGTGAAGC CTGGAGGTC CCTGAAACTC
61	S C A A S G F S F S <u>K Y G M S W V R Q T</u> TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CAGTTTCAGT <u>AAATATGGCA TGCTTGGGT</u> TCGCCAGACT
121	P D K R L E W V A <u>T I S S S G S R T Y Y</u> CCAGACAAGA GGCTGGAGTG GGTGCGAACC <u>ATTAGTAGTA GTGGAGTCG</u> CACCTACTAT
181	<u>P D S V K G Q F T I S R D N A K N T L Y</u> CCAGACAGTG <u>TGAAGGGCA</u> ATTCACCATC TCCAGAGACA ATGCCAAGAA CACCCTGTAC
241	L Q M S S L K S E D T A M Y C S I <u>S W</u> CTGCARAATGA GCAGTCTGAA GTCTGAGGAC ACAGCCATGT ATTACTGTTC AATTAGCTGG
301	<u>D G A M D Y W G Q G T S V T V S S</u> (配列番号 16) <u>GAGGTGCTA TGGACTACTG</u> GGGTCAAGGG ACCTCAGTCA CCGTCTCCTC A (配列番号 20)

CDR 定数およびタンパク質配列の番号付けは、kabatの番号付けシステムに従っている。
CDR および CDR をコード化するヌクレオチド配列を、太字および下線で示す。

FIG. 2A

【図 2 B】

ハイブリドーマ IPN002 軽鎖配列	
1	D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S GATGTTTGA TGACCAAAAC TCCACTCTCC CTGCCTGTCA GTCTTGAGA TCAAGCCTCC
61	I S C K S S Q S I V H S N G N T Y L E W ATCTCTTGOA <u>AACTAGTCA GAGCATTTGA</u> CATAGTAATG GAAACACCTA <u>TTTGAATGG</u>
121	Y L Q K P G Q S P K L L V Y K V S N R F TACCTGCAGA AACGAGGCCA GTCTCCAAAG CTCTGGTCT ACAAAGTTTC CAATCGATT
181	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I <u>TCTGGGTCC</u> CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTCAC ACTCAGATC
241	S R V E A E D L G T Y Y C F Q G S L V P AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TCTGGGAACT TATTACTGCT <u>TTCAAGGTTT</u> ACTTGTTCCT
301	<u>W A F G G G T K L E I K</u> (配列番号 15) <u>TGGCGCTTCG</u> GTGGAGGCAC CAAAGCTGGAA ATCAAA (配列番号 19)

CDR 定数およびタンパク質配列の番号付けは、kabatの番号付けシステムに従っている。
CDR および CDR をコード化するヌクレオチド配列を、太字および下線で示す。

FIG. 2B

【図 3】

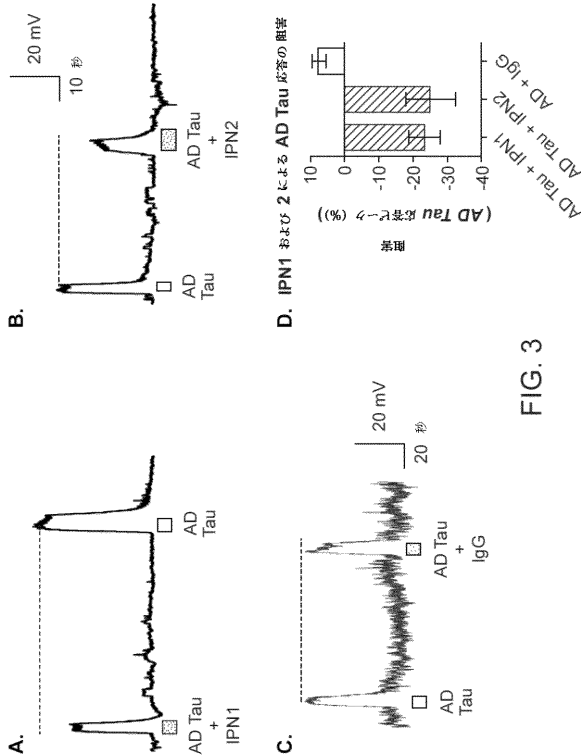


FIG. 3

【図 4 - 1】

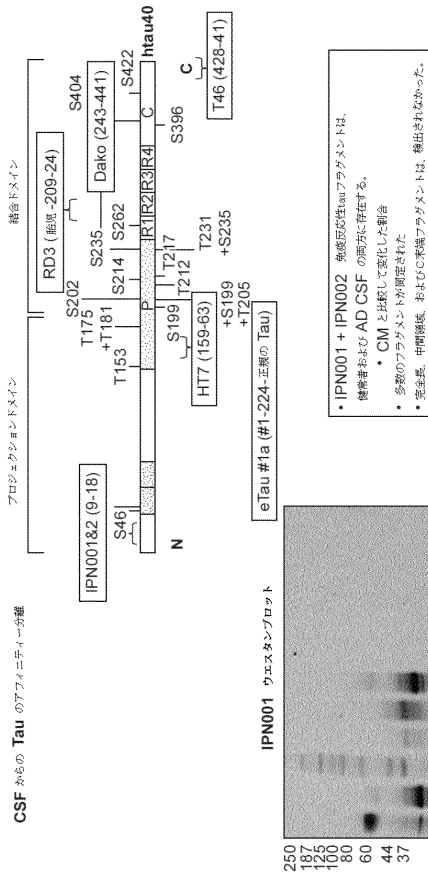


FIG. 4a

【図 4 - 2】

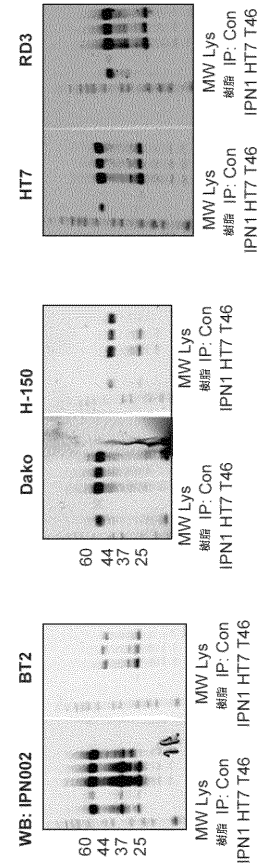


FIG. 4a (Cont.)

【図 4 - 4】

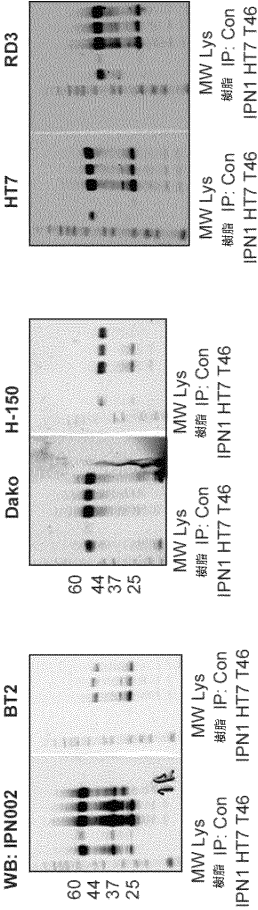


FIG. 4b (Cont.)

【図 4 - 3】

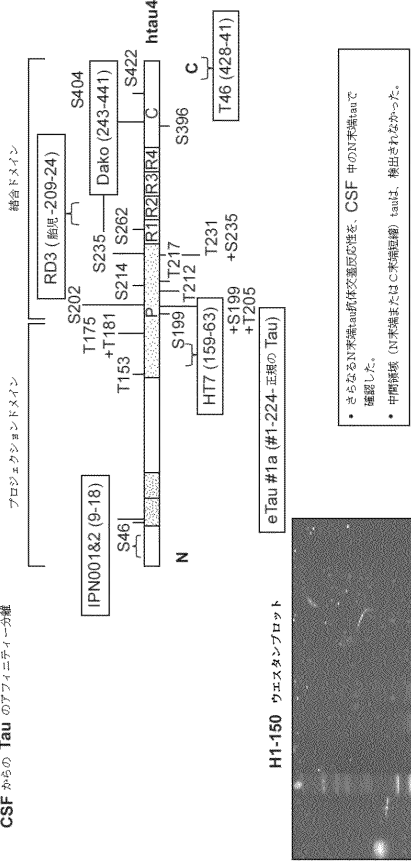


FIG. 4b

【図 4 - 5】

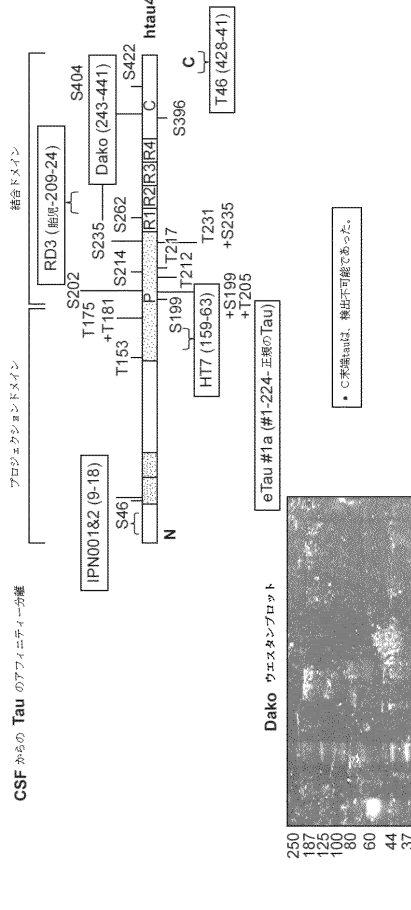


FIG. 4c

【図 4 - 6】

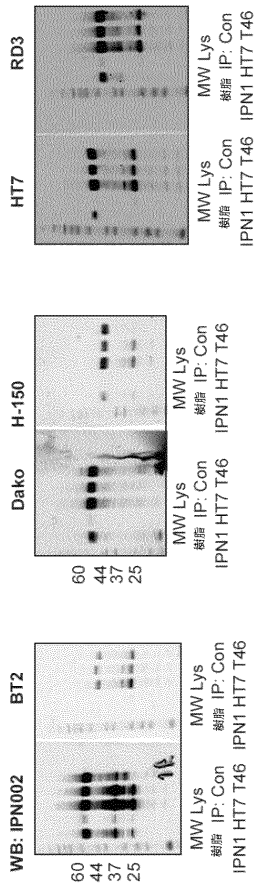


FIG. 4c (Cont.)

【図 6 A】

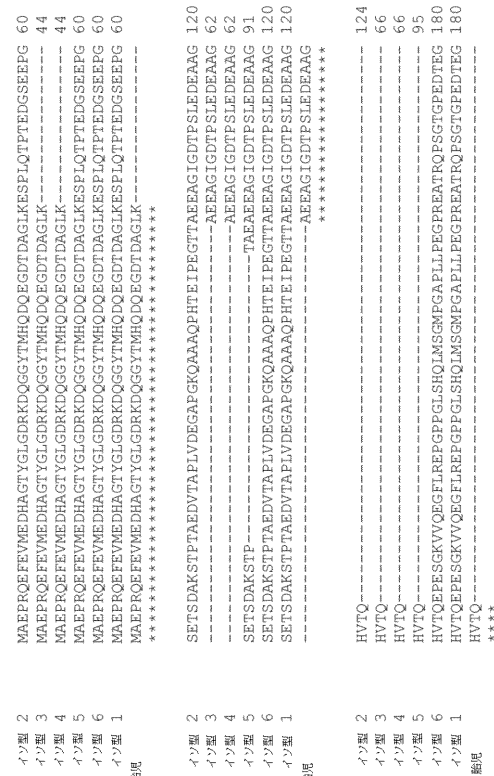


FIG. 6A

【図 5】

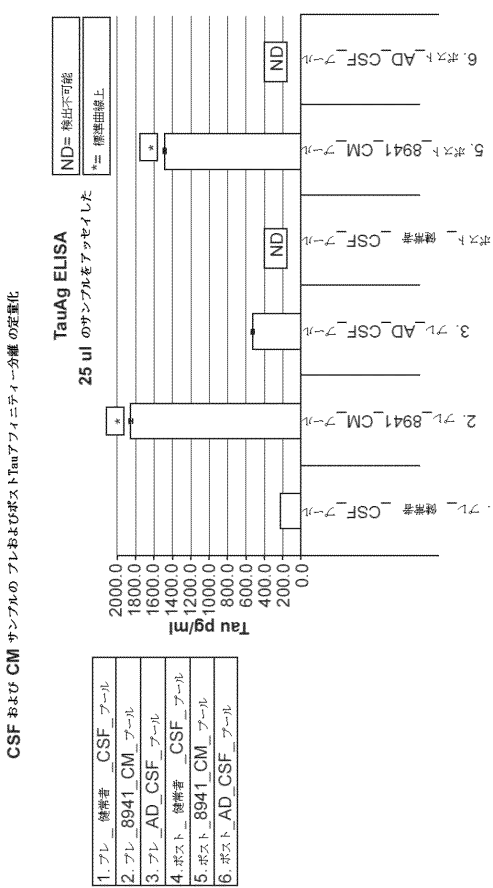


FIG. 5

【図 6 B】



FIG. 6B

IPN002 VH 変異体 3

【☒ 1 1】

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTCACTGGTGGAGCTCTGGGGGAGCCTTAGTGAAGCCTGGAGGTCCTTGAGACTCTCCCTGTGAGCCTCTGTGAGCCTCTGGAATTCAGTTCAATAATATGGCA
E V Q L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
10      20      30
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGCTCTTGGGTTCCGACAGCCCAAGGSCCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAAGTACTAGTGGAGTGGACCTACTATCCAGACACAGTGTGAAGGGCAG
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
40      50     52 A
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCAACATCTCCAGACACATGCCAAGACACCCCTGTACCTGCAATGACAGTCTGAGAGCCGAGACACAGCCATGATTACTGTTCATTTAGCTGG
F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A M Y Y C S I S W
70      80     82 A B C
310     320     330     340     350
GACGGTGTATGGACTACTGGGGTCAAGGACACCGTACCCGTCCTCTCA ( 配列番号 30)
D G A M D Y W G Q G T T V T V S S ( 配列番号 38)
100     110     113
```

CDR 変異およびタンパク質配列の番号付けは、kabatに従った。CDR スクレオチドおよびアミノ酸配列を下線で示す。

FIG. 11

IPN002 VH 変異体 4

【☒ 1 2】

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTCACTGGTGGAGCTCTGGGGGAGCCTTAGTGAAGCCTGGAGGTCCTTGAGACTCTCCTGTGACCTCTGATTCAGTTCAATAATATGGCA
E V Q L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
10      20      30
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGCTCTTGGGTTCCGACAGCCCAAGGSCCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAAGTACTAGTGGAGTGGACCTACTATCCAGACACAGTGTGAAGGGCAG
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
40      50     52 A
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCAACATCTCCAGACACATGCCAAGACACCCCTGTACCTGCAATGACAGTCTGAGAGCCGAGACACAGCCATGATTACTGTTCATTTAGCTGG
F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A M Y Y C A I S W
70      80     82 A B C
310     320     330     340     350
GACGGTGTATGGACTACTGGGGTCAAGGACACCGTACCCGTCCTCTCA ( 配列番号 31)
D G A M D Y W G Q G T T V T V S S ( 配列番号 39)
100     110     113
```

CDR 変異およびタンパク質配列の番号付けは、kabatに従った。CDR スクレオチドおよびアミノ酸配列を下線で示す。

FIG. 12

IPN002 VH 変異体 1

【☒ 9】

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTCACTGGTGGAGCTCTGGGGGAGCCTTAGTGAAGCCTGGAGGTCCTTGAGACTCTCCCTGTGAGCCTCTGGAATTCAGTTCAATAATATGGCA
E V H L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
10      20      30
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGCTCTTGGGTTCCGACAGCCCAAGGSCCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAAGTACTAGTGGAGTGGACCTACTATCCAGACACAGTGTGAAGGGCAG
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
40      50     52 A
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCAACATCTCCAGACACATGCCAAGACACCCCTGTACCTGCAATGACAGTCTGAGACTCTGAGGACACAGCCATGATTACTGTTCATTTAGCTGG
F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S S L K S E D T A M Y Y C S I S W
70      80     82 A B C
310     320     330     340     350
GACGGTGTATGGACTACTGGGGTCAAGGACCCCTCAGTCACCGTCTCTCA ( 配列番号 28)
D G A M D Y W G Q G T S T V T V S S ( 配列番号 36)
100     110     113
```

CDR 変異およびタンパク質配列の番号付けは、kabatに従った。CDR スクレオチドおよびアミノ酸配列を下線で示す。

FIG. 9

IPN002 VH 変異体 2

【☒ 1 0】

```

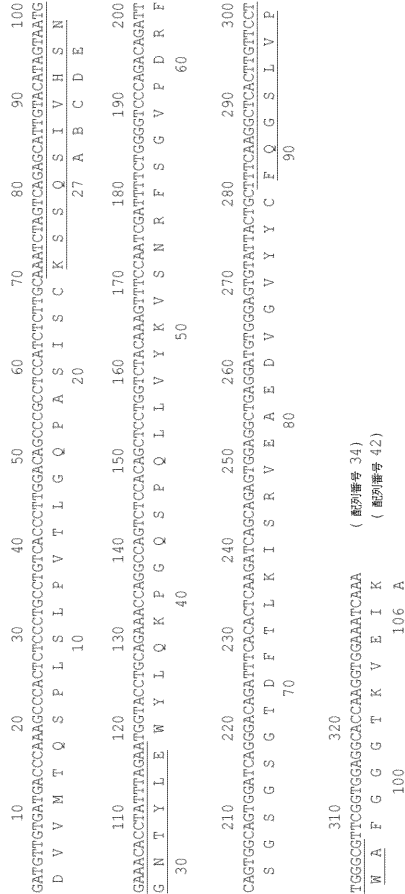
10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTCACTGGTGGAGCTCTGGGGGAGCCTTAGTGAAGCCTGGAGGTCCTTGAGACTCTCCTGTGACCTCTGGAATTCAGTTCAATAATATGGCA
E V H L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
10      20      30
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGCTCTTGGGTTCCGACAGCCCAAGGSCCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAAGTACTAGTGGAGTGGACCTACTATCCAGACACAGTGTGAAGGGCAG
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
40      50     52 A
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCAACATCTCCAGACACATGCCAAGACACCCCTGTACCTGCAATGACAGTCTGAGGACCCGAGACAGCCATGATTACTGTTCATTTAGCTGG
F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A M Y Y C S I S W
70      80     82 A B C
310     320     330     340     350
GACGGTGTATGGACTACTGGGGTCAAGGACACCGTACCCGTCCTCTCA ( 配列番号 29)
D G A M D Y W G Q G T T V T V S S ( 配列番号 37)
100     110     113
```

CDR 変異およびタンパク質配列の番号付けは、kabatに従った。CDR スクレオチドおよびアミノ酸配列を下線で示す。

FIG. 10

IPN002 Vk 変異体 3

【図 1 5】

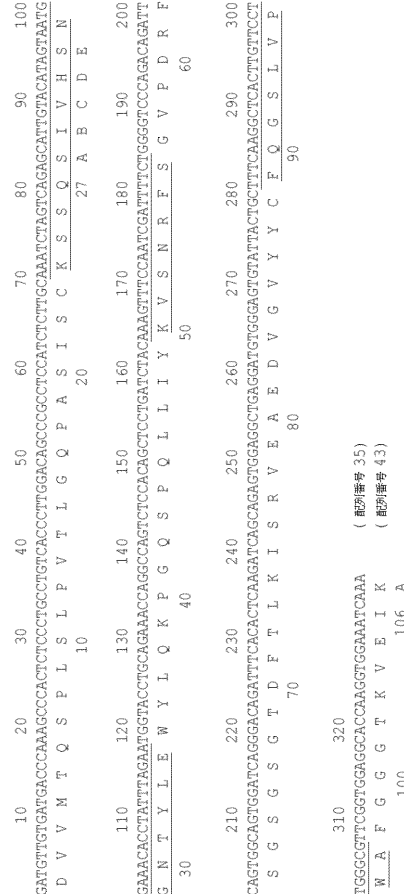


CDR 変異およびタンパク質配列の番号付けは、kabatに従った。CDR スクレオチドおよびアミノ酸配列を下記で示す。

FIG. 15

IPN002 Vk 変異体 4

【図 1 6】

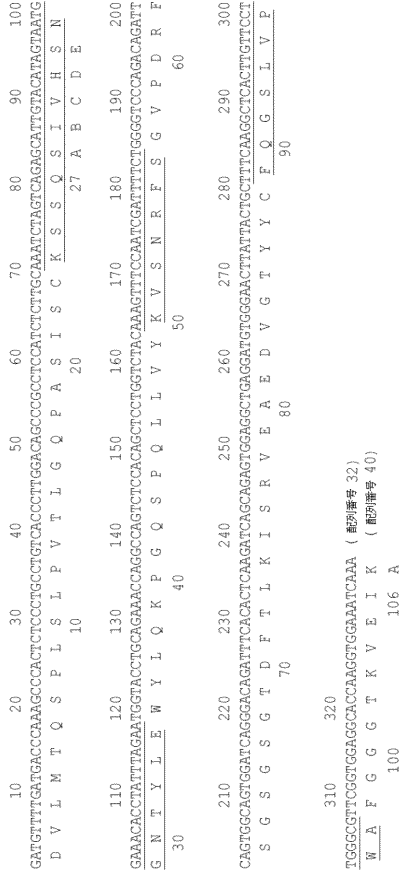


CDR 変異およびタンパク質配列の番号付けは、kabatに従った。CDR スクレオチドおよびアミノ酸配列を下記で示す。

FIG. 16

IPN002 Vk 変異体 1

【図 1 3】

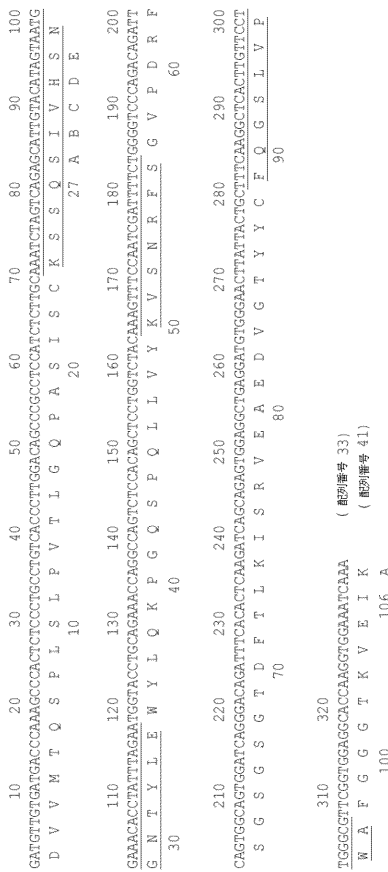


CDR 変異およびタンパク質配列の番号付けは、kabatに従った。CDR スクレオチドおよびアミノ酸配列を下記で示す。

FIG. 13

IPN002 Vk 変異体 2

【図 1 4】



CDR 変異およびタンパク質配列の番号付けは、kabatに従った。CDR スクレオチドおよびアミノ酸配列を下記で示す。

FIG. 14

【図 17】

表 4: IPN002 変異体の Tau タンパク質への結合

抗体	K _D 値 (M)					
	rTau383	eTau 1a	eTau 1b	eTau 2	eTau 4	eTau 4
VH1/VK1	1.83E-10	2.94E-10	7.37E-10	4.65E-10	3.58E-10	5.77E-10
VH1/VK2	1.21E-10	2.12E-10	5.58E-10	3.61E-10	3.21E-10	6.33E-10
VH1/VK3	1.75E-10	2.91E-10	5.90E-10	4.44E-10	4.78E-10	7.61E-10
VH1/VK4	2.86E-10	2.52E-10	5.97E-10	4.27E-10	2.69E-10	8.69E-10
VH2/VK1	2.42E-10	2.81E-10	2.15E-10	2.25E-10	3.69E-10	3.21E-10
VH2/VK2	1.99E-10	3.27E-10	2.29E-10	2.83E-10	2.94E-10	3.94E-10
VH2/VK3	2.23E-10	3.27E-10	2.87E-10	2.61E-10	2.19E-10	4.11E-10
VH2/VK4	2.48E-10	3.43E-10	5.20E-10	3.54E-10	4.18E-10	6.71E-10
VH3/VK1	2.36E-10	2.41E-10	5.29E-10	7.05E-10	4.54E-10	9.21E-10
VH3/VK2	2.58E-10	2.82E-10	6.14E-10	4.08E-10	5.89E-10	7.01E-10
VH3/VK3	2.24E-10	2.20E-10	6.89E-10	4.71E-10	4.69E-10	6.65E-10
VH3/VK4	2.55E-10	2.16E-10	3.82E-10	4.47E-10	3.81E-10	5.86E-10
VH4/VK1	1.87E-10	1.98E-10	3.59E-10	4.05E-10	2.80E-10	4.98E-10
VH4/VK2	1.60E-10	1.91E-10	4.83E-10	4.51E-10	2.91E-10	4.67E-10
VH4/VK3	2.76E-10	1.78E-10	3.13E-10	4.73E-10	6.36E-10	6.29E-10
VH4/VK4	3.79E-10	3.25E-10	5.35E-10	5.64E-10	4.62E-10	1.03E-09

FIG. 17

【図 18】

表 5: ヒト化 IPN002 変異体の Tau383 への結合

抗体	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{dis} (1/s)
VH1/VK1	4.26E-11	2.06E+05	8.75E-06
VH1/VK2	4.46E-10	1.96E+05	8.74E-05
VH1/VK3	1.28E-09	1.82E+05	2.33E-04
VH1/VK4	5.71E-10	1.67E+05	9.52E-05
VH2/VK1	4.67E-10	2.14E+05	1.00E-05
VH2/VK2	2.32E-10	2.05E+05	4.75E-05
VH2/VK3	1.73E-09	1.34E+05	2.32E-04
VH2/VK4	1.66E-09	1.42E+05	2.36E-04
VH3/VK1	1.99E-09	1.29E+05	2.57E-04
VH3/VK2	5.77E-10	1.85E+05	1.07E-04
VH3/VK3	1.69E-10	1.87E+05	3.15E-05
VH3/VK4	4.75E-10	2.11E+05	1.00E-04
VH4/VK1	2.12E-09	1.40E+05	2.97E-04
VH4/VK2	1.88E-09	1.63E+05	3.07E-04
VH4/VK3	5.71E-10	1.64E+05	9.39E-05
VH4/VK4	8.12E-10	1.56E+05	1.26E-04
IPN002	2.06E-10	2.33E+05	4.78E-05

FIG. 18

【図 19】

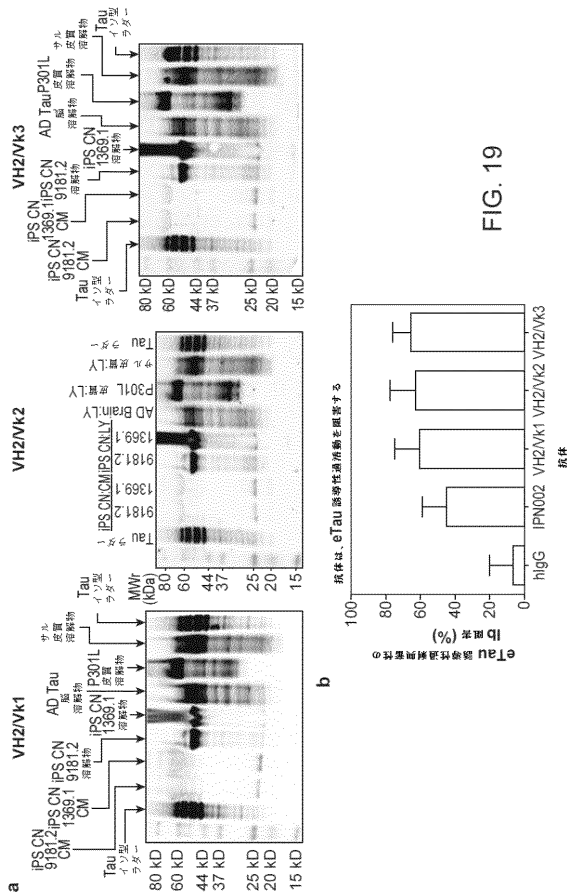


FIG. 19

【図 20】

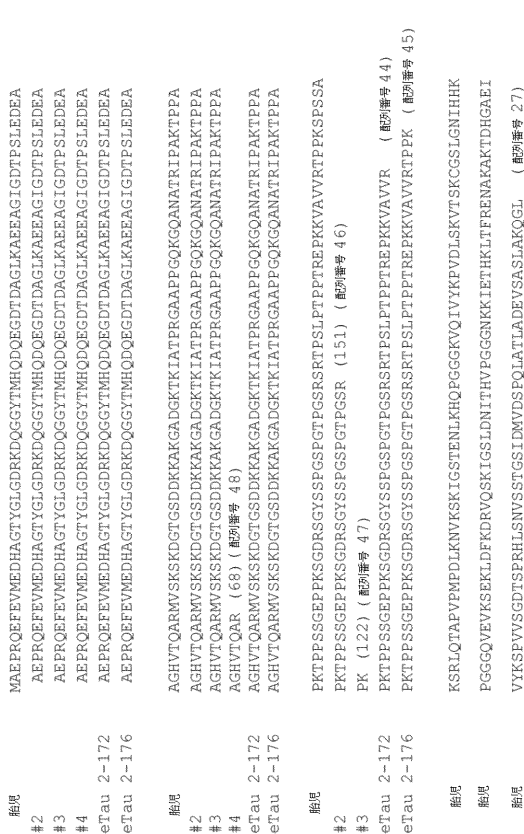


FIG. 20

【図 2 1】

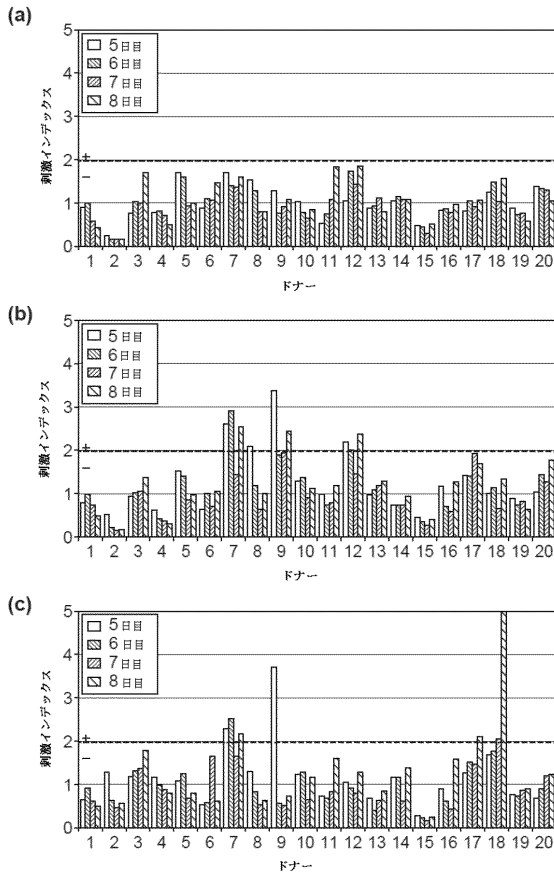


FIG. 21

【图 2 3】

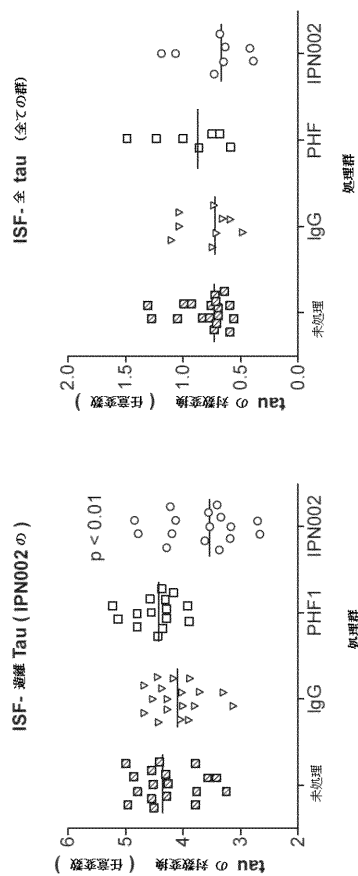


FIG. 23

【図 2 2】

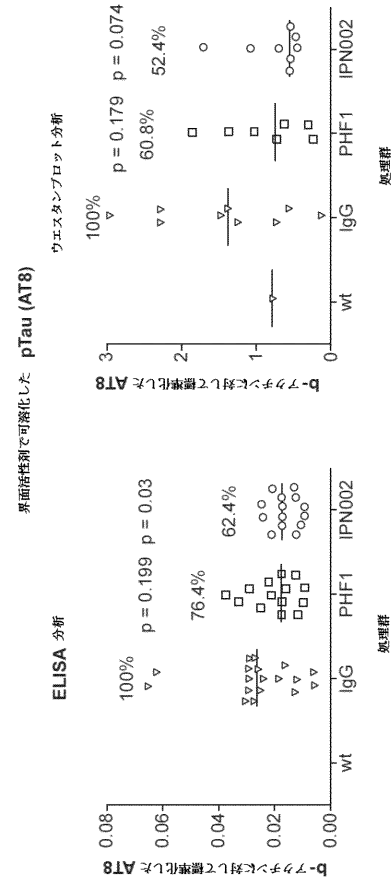


FIG. 22

【図 24】

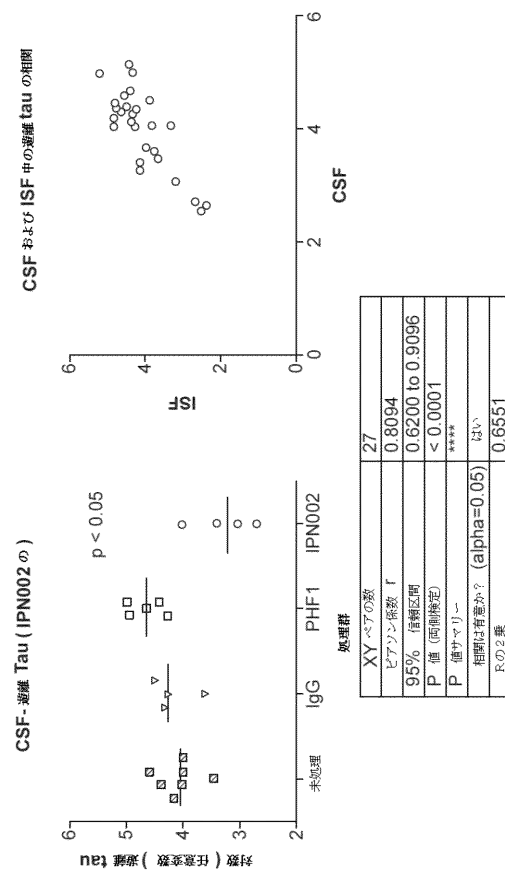
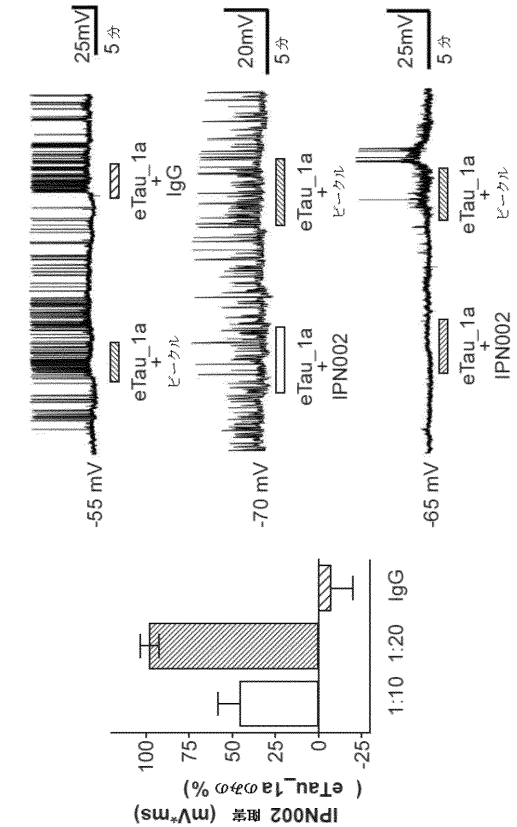


FIG. 24

【図 25】



【図 26】

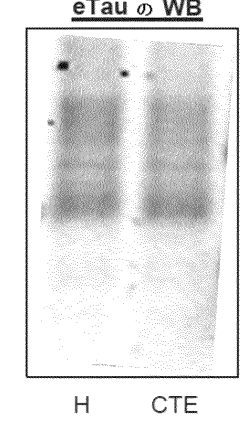
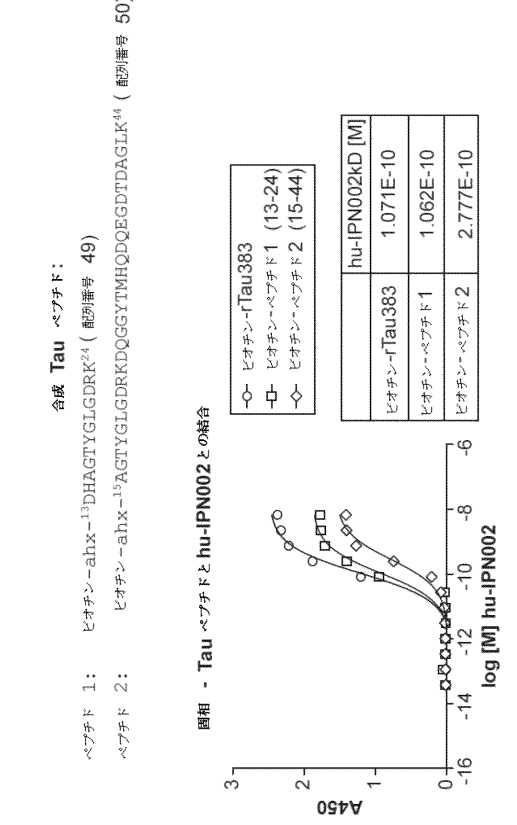


FIG. 26

FIG. 25

【図 27】



【図 28】

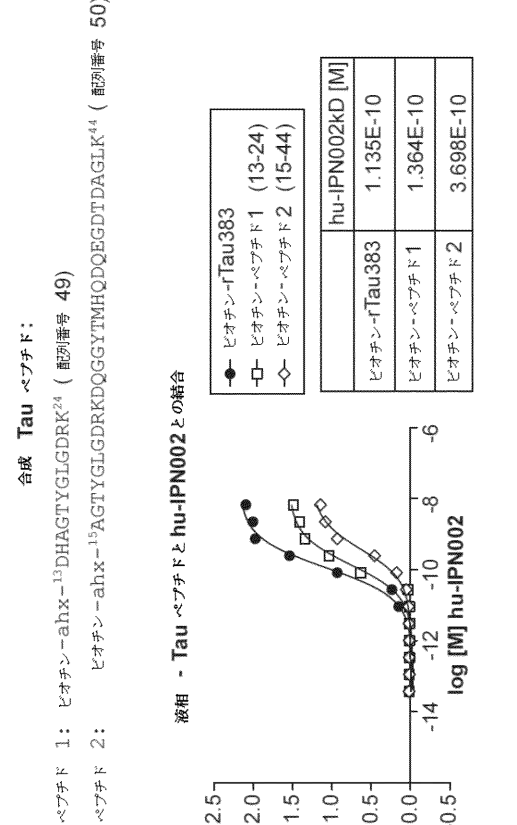


FIG. 28

FIG. 27

【図 29】

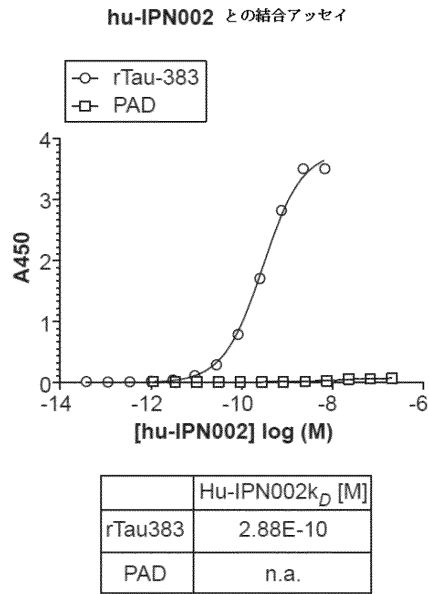
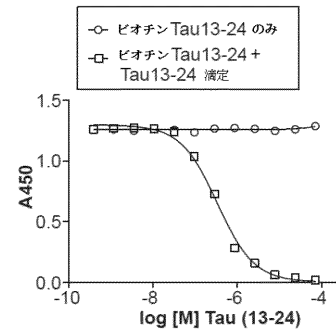


FIG. 29

【図 30】

hu-IPN002 に対する ビオチン-Tau (13-24) 対 Tau (13-24) の競合アッセイ



hu-IPN002 に対する ビオチン-Tau (15-44) 対 Tau (15-44) の競合アッセイ

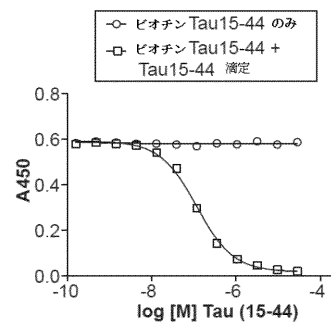


FIG. 30

【図 31】

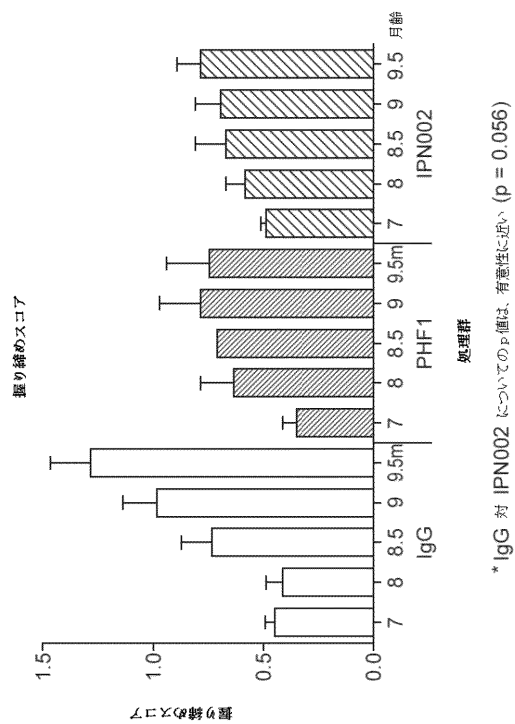


FIG. 31

【図 32】

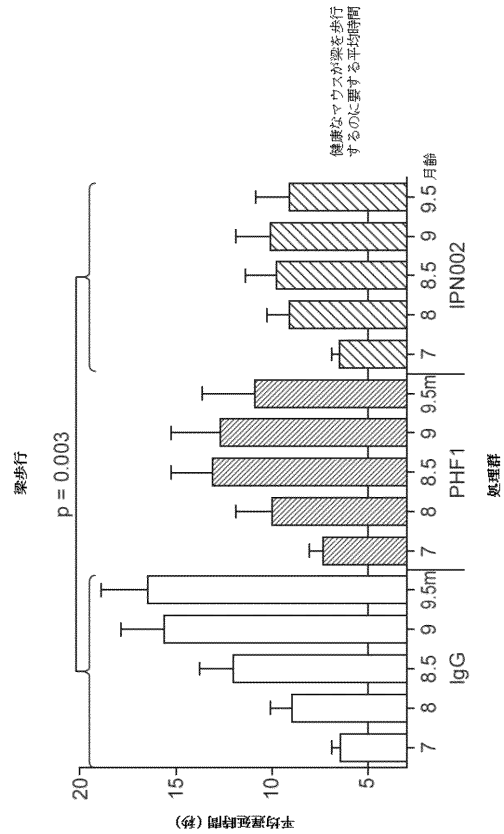


FIG. 32

【図 3 3】

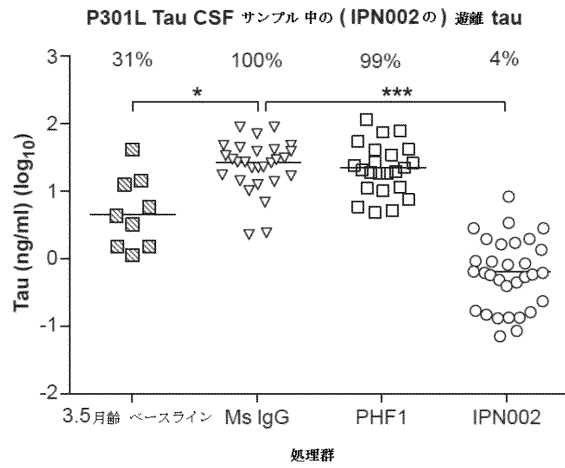
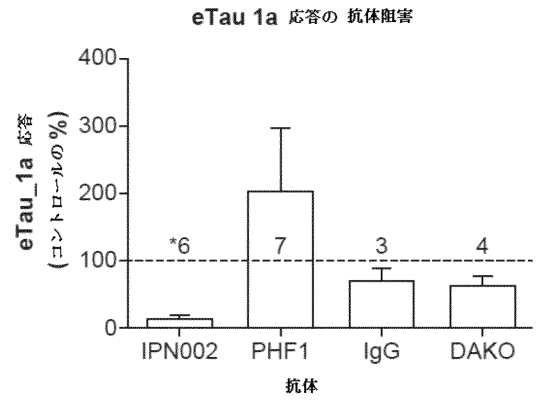


FIG. 33

【図 3 4】



* グラフ中の値は、各抗体について試験したニューロンの数を示す

FIG. 34

【図 3 5】

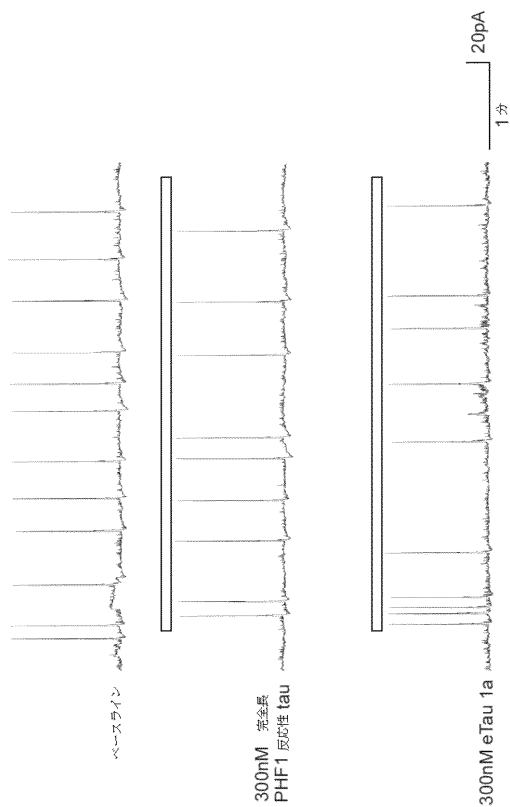


FIG. 35

【図 3 6】

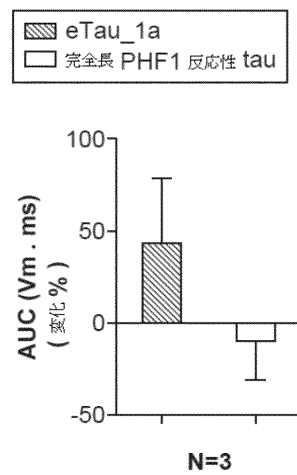


FIG. 36

【図 37】

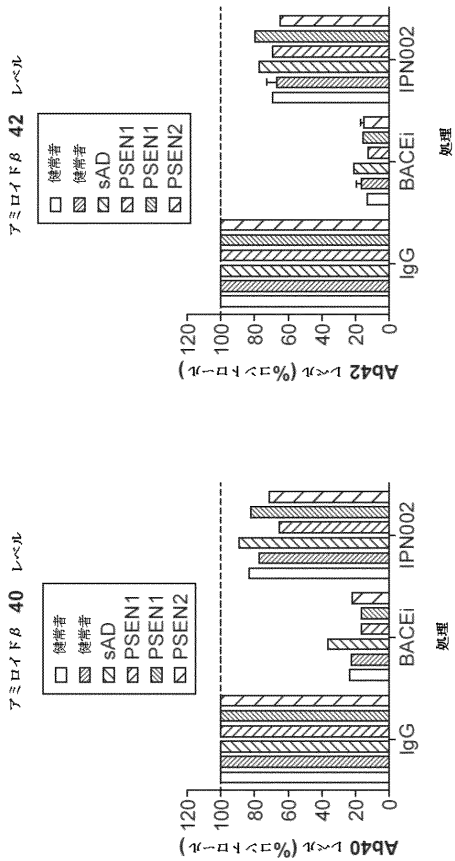


FIG. 37

【図 38】

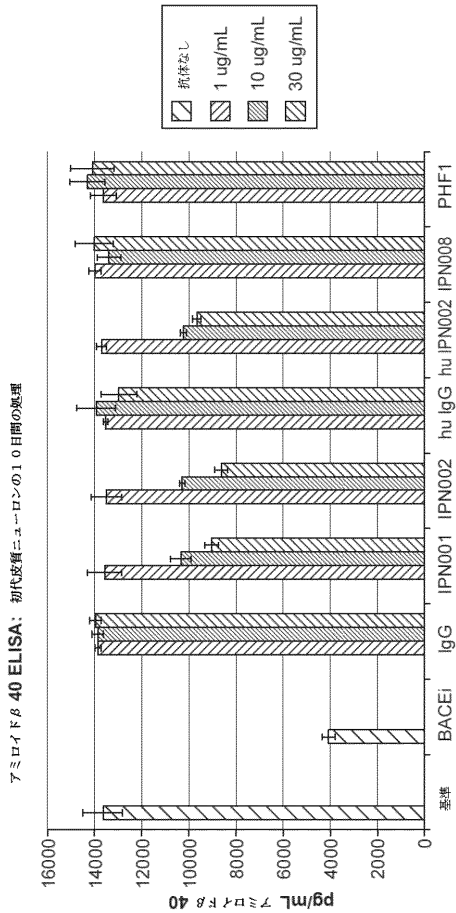


FIG. 38

【図 39】

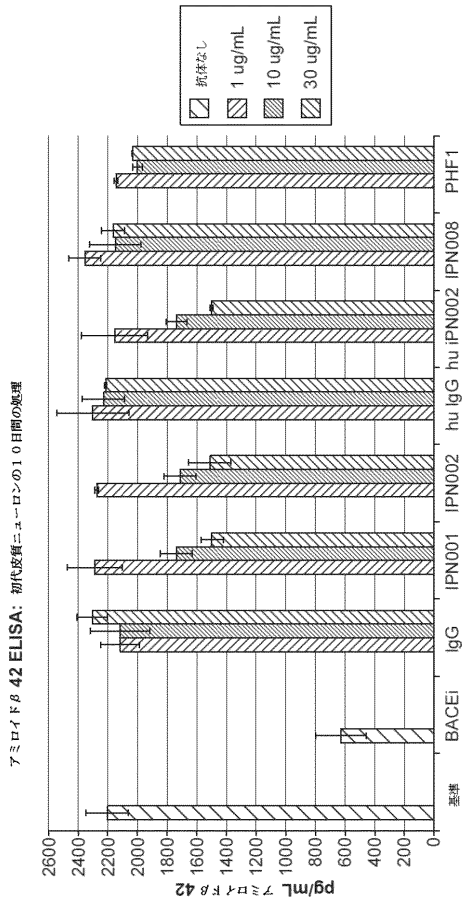


FIG. 39

【図 40】

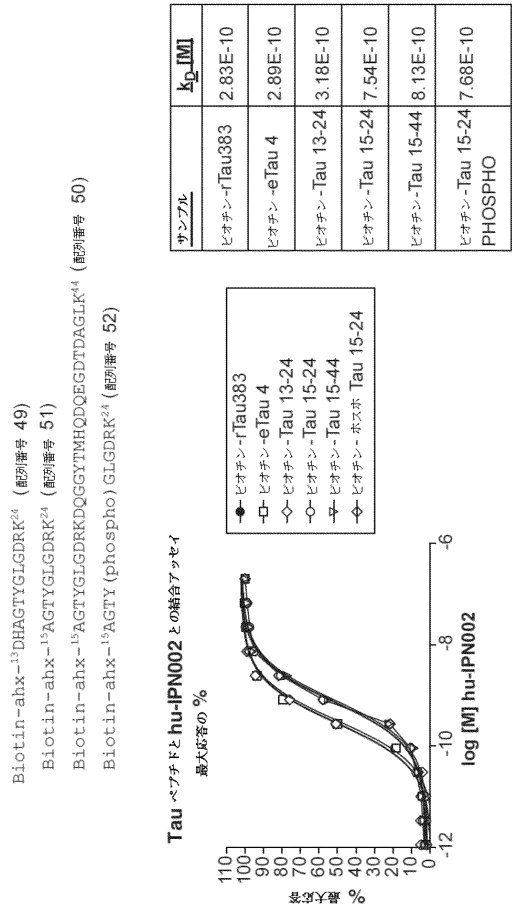
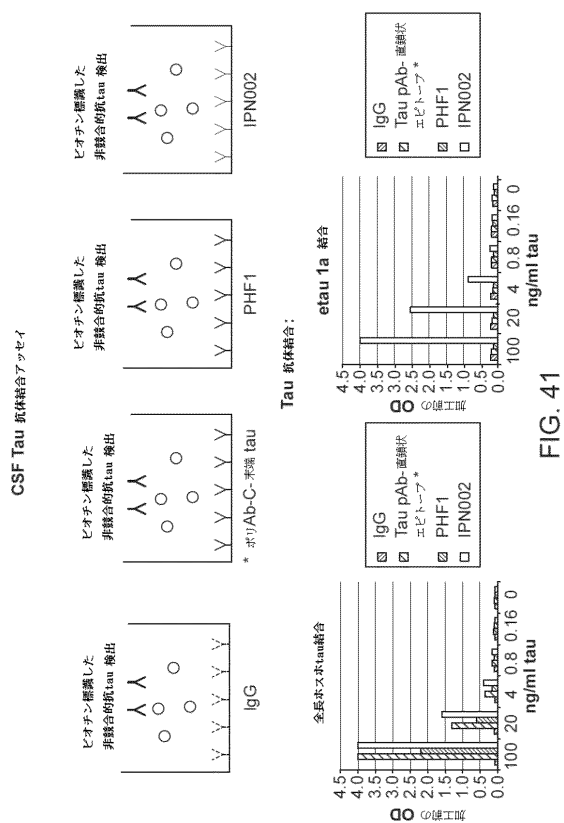
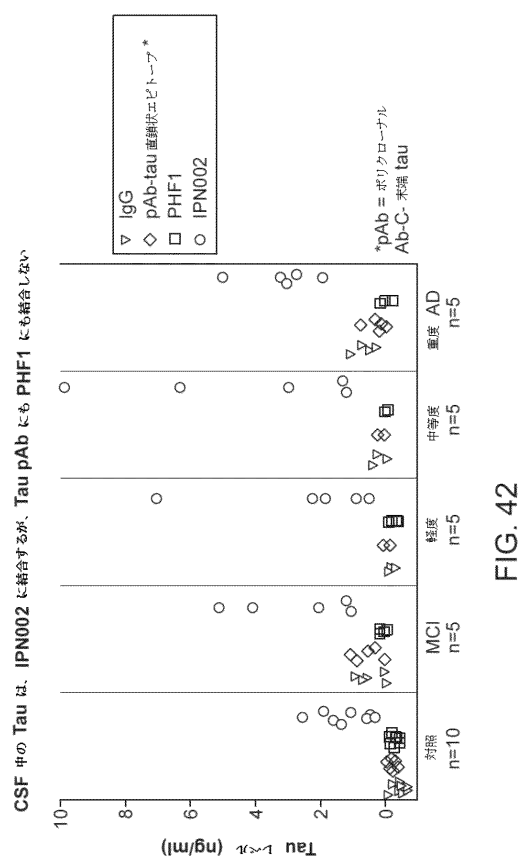


FIG. 40

【図 4 1】



【图 4 2】



【图 4-3】

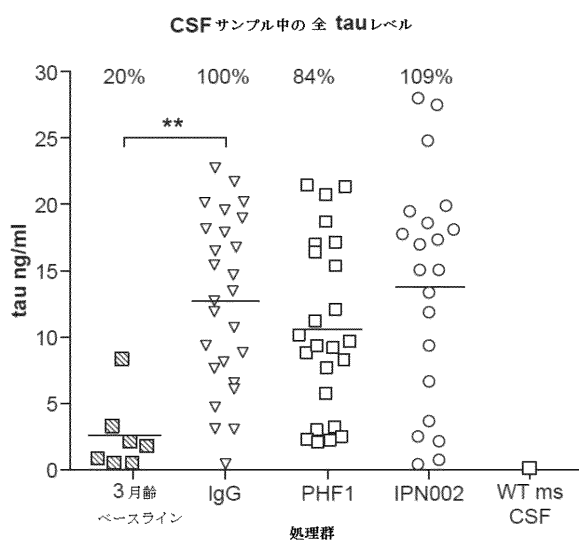


FIG. 43

【图 4-4-1】

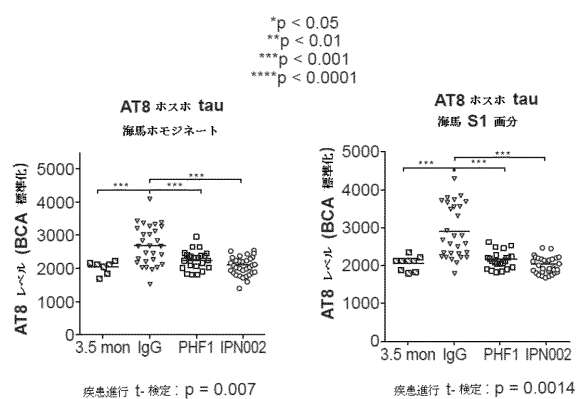


FIG. 44A

FIG. 44B

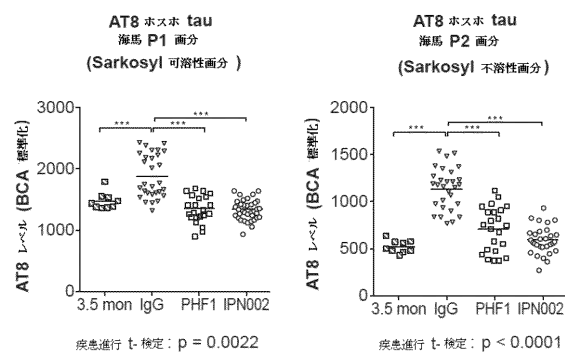


FIG. 44C

FIG. 44D

【図 4 4 - 2】

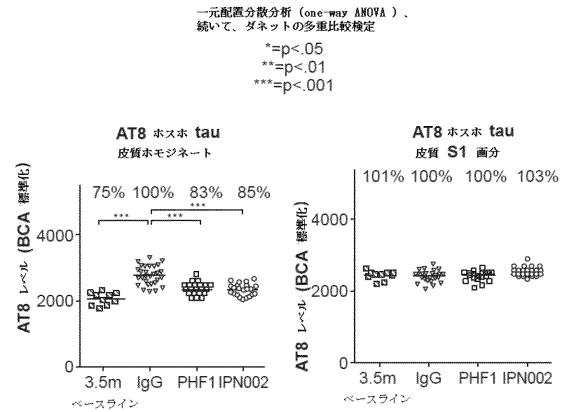


FIG. 44E

FIG. 44F

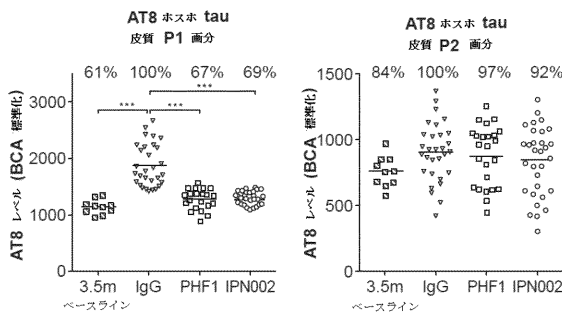


FIG. 44G

FIG. 44H

【図 4 5 - 1】

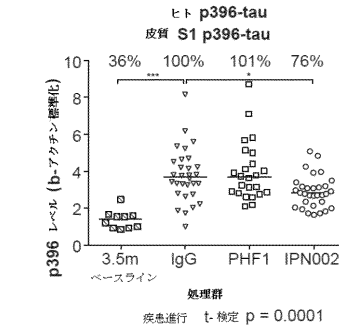


FIG. 45A

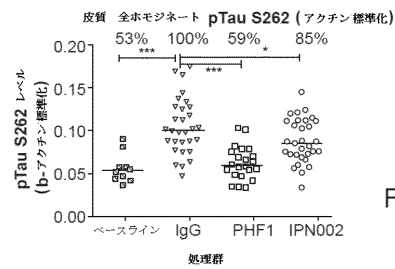


FIG. 45B

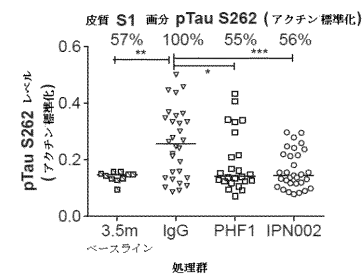


FIG. 45C

【図 4 5 - 2】

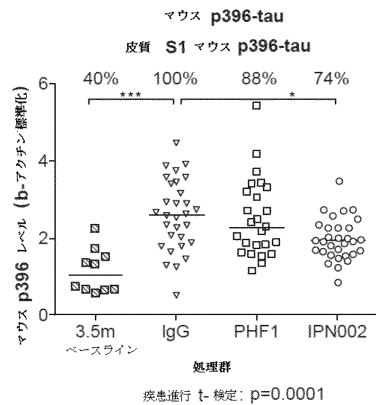


FIG. 45D

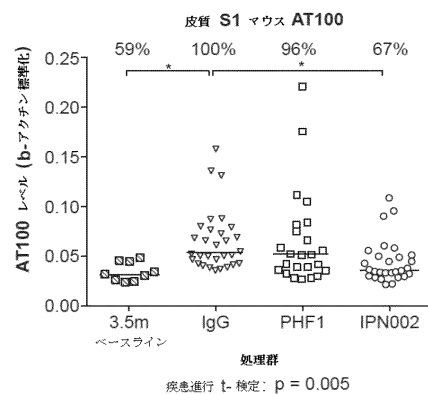


FIG. 45E

【図 4 6】

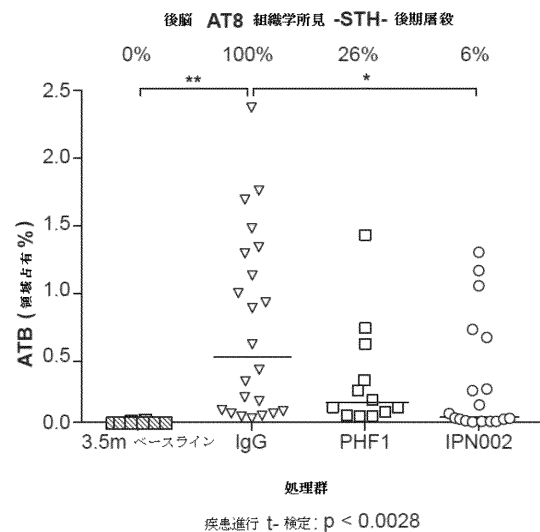


FIG. 46

【図 47】

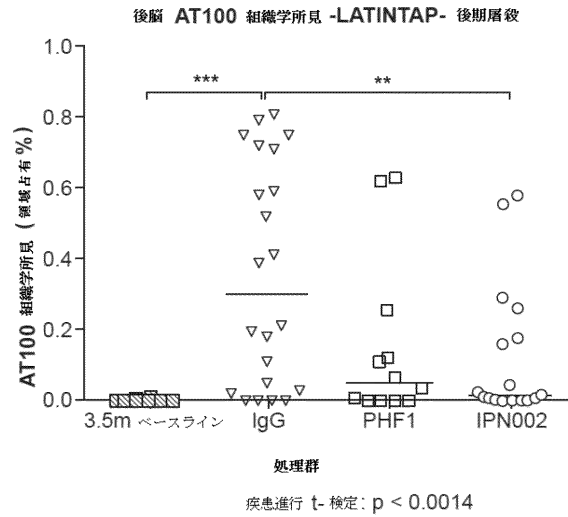


FIG. 47

【図 48】

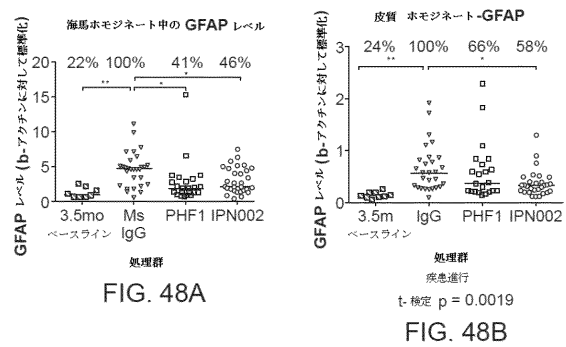


FIG. 48A

FIG. 48B

【図 49】

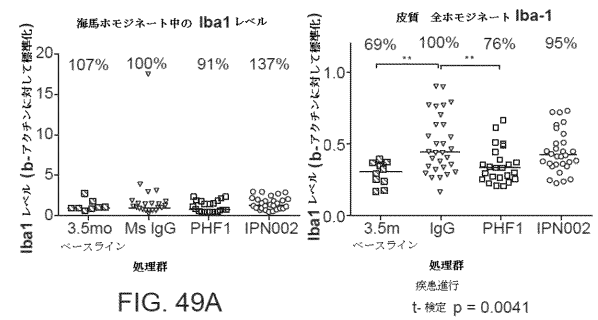


FIG. 49A

FIG. 49B

【図 50】

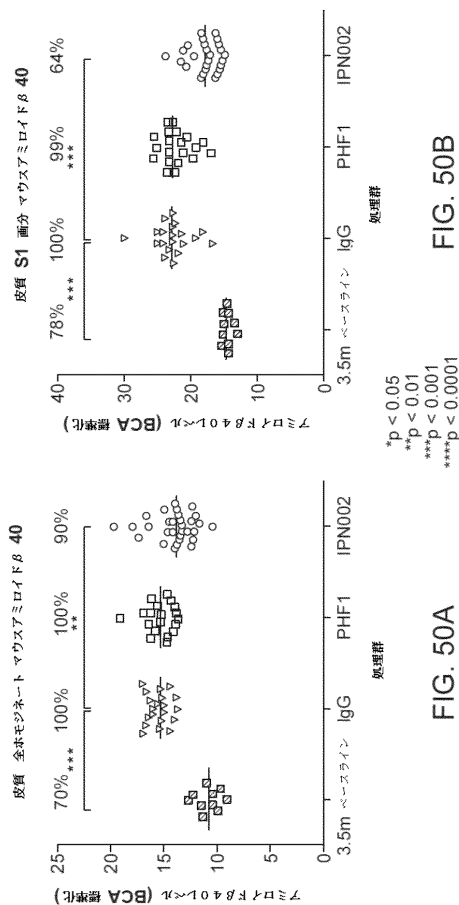


FIG. 50B

FIG. 50A

【図 51】

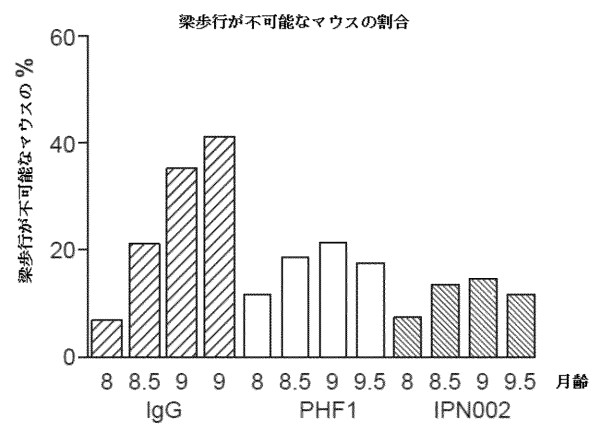


FIG. 51

【図 5 2】

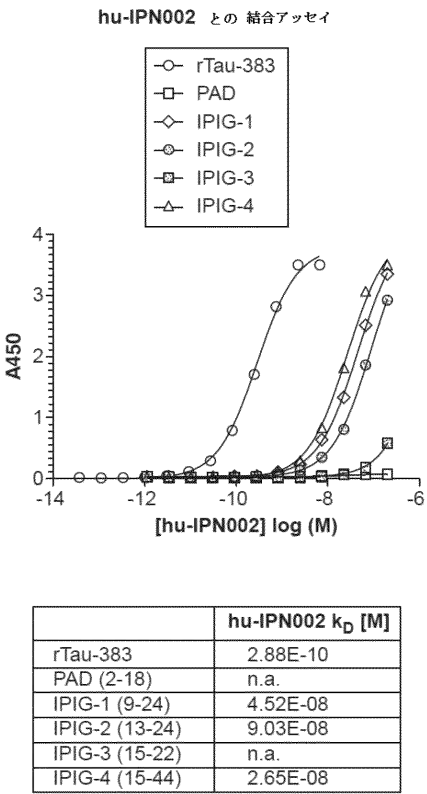
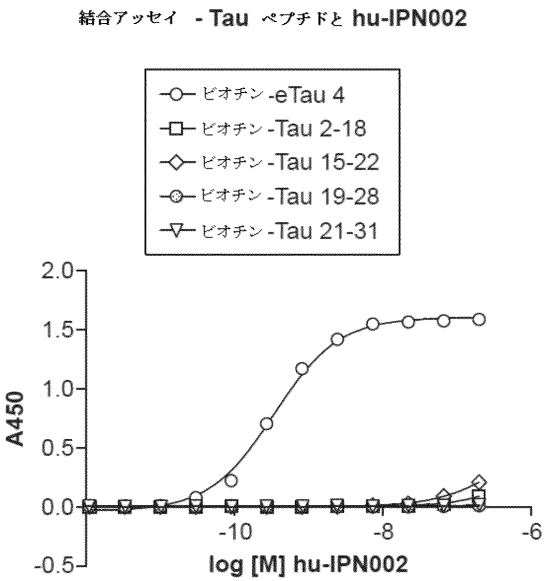


FIG. 52

【図 5 3】



【図 5 4】

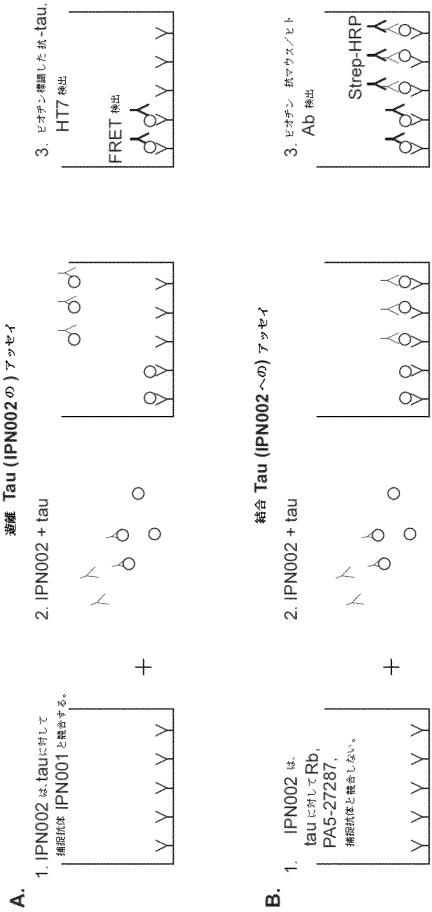


FIG. 54

【配列表】

2015532592000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/55203

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 51/10; C12N 15/13, 15/63 (2014.01)

USPC - 424/149; 530/388.15, 387.9

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8) Classification(s): A61K 51/10; C12N 15/13, 15/63, 1/21, 1/19, 5/10

USPC Classification(s): 424/149; 530/388.15, 387.9, 387.3; 536/23.53; 435/320.1, 252.3

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)

MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C.B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); ScienceDirect; ProQuest; Google/Google Scholar; antibody, epitope, Tau, tau polypeptide, n-terminal, linear, "light chain," heavy chain

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — A	US 2012/0087861 A1 (NITSCH, R et al.) April 12, 2012; paragraphs [0029], [0031], [0069], [0109], [0116], [0124], [0249]	1, 2, 3/1, 3/2, 4/1, 4/2 — 9, 10, 11, 12/9-12/11, 20, 21, 23/20, 23/21, 26, 35, 36, 38/35, 38/36
A	WO 2002/045743 A2 (LI, C et al.) June 13, 2002; figure 2	9, 10, 11, 12/9-12/11, 20, 21, 23/20, 23/21, 26, 35, 36, 38/35, 38/36
A	WO 2005/120166 A2 (REITER, Y et al.) December 22, 2005; page 7, SEQ ID NO: 11	9, 10, 11, 12/9-12/11, 20, 21, 23/20, 23/21, 26, 35, 36, 38/35, 38/36

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2014 (21.02.2014)

Date of mailing of the international search report

18 MAR 2014

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/55203

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.: 5-8, 13-19, 25, 27-34, 40-70, 74-76, 79, 84, 87, 93
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:

Please See Supplemental Page

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2, 3/1, 3/2, 4/1, 4/2, 9-11, 12/9-11, 20, 21, 23/20, 23/21, 26, 35, 36, 38/35, 38/36

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/56203

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

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

Groups I+: Claims 1-4, 9-12, 20-24, 26, 35-39, 71-73 and SEQ ID NOs: 1 (antibody VL CDR1 amino acid sequence), 2 (antibody VL CDR2 amino acid sequence), 3 (antibody VL CDR3 amino acid sequence), 4 (VH CDR1 amino acid sequence), 5 (VH CDR2 amino acid sequence), 6 (antibody VH CDR3 amino acid sequence) are directed to an isolated humanized monoclonal antibody, or a fragment thereof, that specifically binds an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide; an isolated antibody comprising a humanized light chain framework region; and a humanized heavy chain framework region, wherein the isolated antibody competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody that comprises: a) a light chain region comprising: i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:7; ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:8; And iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:9; And b) a heavy chain region comprising: i) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:10; ii) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:11; and iii) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:12; an isolated antibody, wherein the antibody is a Fv, scFv, Fab, Fab'2, or Fab', and wherein the antibody competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody that comprises: a) a light chain region comprising: and i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:7; ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:8; iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:9; b) a heavy chain region comprising: i) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:10; ii) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:11; and iii) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:12; an isolated antibody, wherein the isolated antibody comprises a human light chain constant region and a human heavy chain constant region, and wherein the isolated antibody competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody that comprises: a) a light chain region comprising: i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:7; ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:8; and iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:9; and b) a heavy chain region comprising: i) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:10; ii) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:11; and iii) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:12; a pharmaceutical formulation comprising: a) an antibody that specifically binds an epitope within an N-terminal portion of Tau, wherein the antibody comprises: i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:7; ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:8; iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:9; iv) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:10; v) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:11; and vi) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:12; and b) a pharmaceutically acceptable excipient suitable for administration to a human, wherein the formulation is free of endotoxins; and an in vitro method of detecting a Tau polypeptide in a biological sample obtained from an individual, the method comprising: a) contacting the biological sample with an antibody competes for binding to an epitope within the N-terminal region of Tau with an antibody that comprises: i) light chain complementarity-determining regions (CDRs) of an antibody depicted in Figure 1B; and heavy chain CDRs of an antibody depicted in Figure 1A; or ii) light chain CDRs of an antibody depicted in Figure 2B; and heavy chain CDRs of an antibody depicted in Figure 2A; and b) detecting binding of the antibody to Tau polypeptide present in the sample.

The isolated humanized monoclonal antibody, or a fragment thereof, that specifically binds to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide, comprising a humanized light chain framework region, and a humanized heavy chain framework region; wherein the isolated antibody competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody; wherein the antibody is a Fv, scFv, Fab, Fab'2, or Fab'; wherein the isolated antibody comprises a human light chain constant region and a human heavy chain constant region; a pharmaceutical formulation comprising: a) an antibody that specifically binds an epitope within an N-terminal portion of Tau; and an in vitro method of detecting a Tau polypeptide in a biological sample obtained from an individual, the method comprising: a) contacting the biological sample with an antibody competes for binding to an epitope within the N-terminal region of Tau will be searched to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 1 (antibody VL CDR1 amino acid sequence), 2 (antibody VL CDR2 amino acid sequence), 3 (antibody VL CDR3 amino acid sequence), 4 (VH CDR1 amino acid sequence), 5 (VH CDR2 amino acid sequence), 6 (antibody VH CDR3 amino acid sequence). It is believed that Claims 1-4, 9-12, 20, 21, 23, 26, 35, 36 and 38 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 1 (antibody VL CDR1 amino acid sequence), 2 (antibody VL CDR2 amino acid sequence), 3 (antibody VL CDR3 amino acid sequence), 4 (VH CDR1 amino acid sequence), 5 (VH CDR2 amino acid sequence), 6 (antibody VH CDR3 amino acid sequence). Applicants must indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. Additional SEQ ID NOs can be searched upon the payment of additional fees. An Exemplary Election would be: SEQ ID NOs: 13 (antibody light chain CDR amino acid sequence), 14 (antibody heavy chain CDR amino acid sequence), 15 (antibody light chain CDR amino acid sequence), 16 (antibody heavy chain CDR amino acid sequence).

Group II: Claims 77 and 78 are directed toward a method of reducing the level of Abeta40 and/or Abeta42 in a neuronal cell and/or extracellular fluid in an individual, the method comprising administering to the individual: a) an effective amount of a humanized antibody that binds an N-terminal region of a tau polypeptide; or b) a pharmaceutical composition comprising the humanized antibody.

-***Continued Within the Next Supplemental Box-***

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/55203

---Continued from Previous Supplemental Page:

Group III: Claims 80-83, 85, 86, and 88-92 are directed toward a method of determining the amount of extracellular Tau (eTau) unbound to an anti-eTau antibody in a sample of cerebrospinal fluid (CSF) or interstitial fluid (ISF) obtained from a subject undergoing therapy with the anti-eTau antibody, the method comprising: a) contacting an immobilized antibody with a sample of CSF or ISF obtained from the subject, wherein the immobilized antibody competes for binding to eTau with the anti-eTau antibody administered to the subject, said contacting being under conditions suitable for binding of the unbound eTau to the immobilized antibody; and b) determining the amount of eTau bound to the immobilized antibody, wherein the amount of eTau bound to the immobilized antibody is an indication of the amount of eTau unbound to the anti-Tau antibody in the sample; and a method of determining the amount of extracellular Tau (eTau) bound to a therapeutic anti-eTau antibody in a sample of cerebrospinal fluid (CSF) or interstitial fluid (ISF) obtained from a subject undergoing therapy with the therapeutic anti-eTau antibody, the method comprising: a) contacting an immobilized antibody with a sample of CSF or ISF obtained from the subject, wherein the immobilized antibody does not compete for binding to eTau with the anti-eTau antibody administered to the subject, said contacting being under conditions suitable for binding of the therapeutic antibody-bound eTau to the immobilized antibody; and b) determining the amount of therapeutic anti-eTau/eTau complex bound to the immobilized antibody, wherein the amount of therapeutic anti-eTau/eTau complex bound to the immobilized antibody is an indication of the amount of therapeutic antibody-bound eTau present in the sample.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I + include an isolated humanized monoclonal antibody, or a fragment thereof, that specifically binds an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide; an isolated antibody comprising a humanized light chain framework region; and a humanized heavy chain framework region, wherein the isolated antibody competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody that comprises: a) a light chain region comprising: (i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; and b) a heavy chain region comprising: (i) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (iii) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence; an isolated antibody, wherein the antibody is a Fv, scFv, Fab, (ab')₂, or Fab', and wherein the antibody competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody that comprises: a) a light chain region comprising: and i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; b) a heavy chain region comprising: (i) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (iii) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence; an isolated antibody, wherein the isolated antibody comprises a human light chain constant region and a human heavy chain constant region, and wherein the isolated antibody competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody that comprises: a) a light chain region comprising: i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; and (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; and b) a heavy chain region comprising: (i) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (iii) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence; a pharmaceutical formulation comprising: a) an antibody that specifically binds an epitope within an N-terminal portion of Tau, wherein the antibody comprises: (i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; (iv) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (v) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (vi) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence; and b) a pharmaceutically acceptable excipient suitable for administration to a human, wherein the formulation is free of endotoxins; and an in vitro method of detecting a Tau polypeptide in a biological sample obtained from an individual, the method comprising: a) contacting the biological sample with an antibody competes for binding to an epitope within the N-terminal region of Tau with an antibody that comprises light chain complementarity-determining regions (CDRs) of an antibody and heavy chain CDRs of an antibody; and b) detecting binding of the antibody to Tau polypeptide present in the sample, which are not present in Groups II or III; the special technical features of Group II including a method of reducing the level of Abeta40 and/or Abeta42 in a neuronal cell and/or extracellular fluid in an individual, the method comprising administering to the individual: a) an effective amount of a humanized antibody that binds an N-terminal region of a tau polypeptide; or b) a pharmaceutical composition comprising the humanized antibody, which are not present in Groups I+ or III, the special technical features of Group III including a method of determining the amount of extracellular Tau (eTau) unbound to an anti-eTau antibody in a sample of cerebrospinal fluid (CSF) or interstitial fluid (ISF) obtained from a subject undergoing therapy with the anti-eTau antibody, the method comprising: a) contacting an immobilized antibody with a sample of CSF or ISF obtained from the subject, wherein the immobilized antibody competes for binding to eTau with the anti-eTau antibody administered to the subject, said contacting being under conditions suitable for binding of the unbound eTau to the immobilized antibody; and b) determining the amount of eTau bound to the immobilized antibody, wherein the amount of eTau bound to the immobilized antibody is an indication of the amount of eTau unbound to the anti-Tau antibody in the sample; and a method of determining the amount of extracellular Tau (eTau) bound to a therapeutic anti-eTau antibody in a sample of cerebrospinal fluid (CSF) or interstitial fluid (ISF) obtained from a subject undergoing therapy with the therapeutic anti-eTau antibody, the method comprising: a) contacting an immobilized antibody with a sample of CSF or ISF obtained from the subject, wherein the immobilized antibody does not compete for binding to eTau with the anti-eTau antibody administered to the subject, said contacting being under conditions suitable for binding of the therapeutic antibody-bound eTau to the immobilized antibody; and b) determining the amount of therapeutic anti-eTau/eTau complex bound to the immobilized antibody, wherein the amount of therapeutic anti-eTau/eTau complex bound to the immobilized antibody is an indication of the amount of therapeutic antibody-bound eTau present in the sample.

Groups I+-III share the technical features including an antibody to an N-terminal (eTau) portion of Tau. Groups I+ and II share the technical features of a humanized antibody that binds an N-terminal region of a Tau polypeptide, and a pharmaceutical composition comprising said antibody. Groups II and III share the technical features of a therapy with an anti-Tau antibody and extracellular (cerebrospinal or interstitial) fluids. Groups I+ and III share the technical features including an in vitro method of detecting a Tau polypeptide in a biological sample comprising an antibody that competes for binding to Tau with an anti-Tau antibody and detecting binding of the antibody to a Tau polypeptide present in a sample. . . Continued on Next Supplemental Page ...

---Continued Within the Next Supplemental Box---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/55203

---Continued from Previous Supplemental Page:

... Continued from Previous Supplemental Page ... Groups I+ share the technical features including an isolated humanized monoclonal antibody, or a fragment thereof, that specifically binds an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide; an isolated antibody comprising a humanized light chain framework region; and a humanized heavy chain framework region, wherein the isolated antibody competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody that comprises: a) a light chain region comprising: (i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; and b) a heavy chain region comprising: (i) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (iii) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence; an isolated antibody, wherein the antibody is a Fv, scFv, Fab, (ab)², or Fab', and wherein the antibody competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody that comprises: a) a light chain region comprising: and i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; b) a heavy chain region comprising: (i) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (iii) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence; an isolated antibody, wherein the isolated antibody comprises a human light chain constant region and a human heavy chain constant region, and wherein the isolated antibody competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody that comprises: a) a light chain region comprising: i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; and (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; and b) a heavy chain region comprising: (i) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (iii) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence; a pharmaceutical formulation comprising: a) an antibody that specifically binds an epitope within an N-terminal portion of Tau, wherein the antibody comprises: (i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; (iv) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (v) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (vi) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence; and b) a pharmaceutically acceptable excipient suitable for administration to a human, wherein the formulation is free of endotoxins; and an in vitro method of detecting a Tau polypeptide in a biological sample obtained from an individual, the method comprising: a) contacting the biological sample with an antibody that competes for binding to an epitope within the N-terminal region of Tau with an antibody that comprises light chain complementarity-determining regions (CDRs) of an antibody and heavy chain CDRs of an antibody; and b) detecting binding of the antibody to Tau polypeptide present in the sample.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2012/0087861 A1 to Nitsch, et al. (hereinafter "Nitsch") in view of the article entitled "Mapping Of The Alz 50 Epitope In Microtubule-Associated Proteins Tau" by Ksiezak-Reding, et al. (hereinafter "Ksiezak-Reding"). Nitsch discloses a humanized antibody (humanized antibody; paragraph [0065]) that binds a Tau polypeptide (that binds a Tau polypeptide; paragraph [0008]) and a pharmaceutical composition comprising said antibody (a composition comprising the antibody for therapy (a pharmaceutical composition comprising said antibody); paragraph [0012]), for therapy with an anti-tau antibody (immunotherapy with an anti-tau antibody; abstract); an in vitro method of detecting a Tau polypeptide in a biological sample (an in vitro method of detecting a Tau polypeptide in a biological sample; paragraph [0248]) comprising an extracellular fluid (comprising cerebrospinal fluid (comprising an extracellular fluid); paragraph [0098]), an antibody (comprising an antibody; paragraph [0248]) and detecting binding of the antibody to a Tau polypeptide present in a sample (detecting binding of the antibody to a Tau polypeptide present in a sample; paragraph [0248]), an isolated humanized monoclonal antibody (a humanized antibody (an isolated humanized monoclonal antibody); paragraph [0065]), or a fragment thereof, that specifically binds an epitope in a Tau polypeptide (that specifically binds an epitope in a Tau polypeptide; paragraph [0041]); an isolated antibody comprising a humanized (an isolated antibody comprising a humanized; paragraph [0065]) light chain (light chain; paragraph [0057]) framework regions (framework regions; paragraph [0062]); and a humanized (humanized; paragraph [0065]) heavy chain (heavy chain; paragraph [0057]) framework region (framework region; paragraph [0062]), wherein the isolated antibody competes for binding to an epitope (wherein the antibody competes for binding to an epitope; paragraph [0087]) in a Tau polypeptide with an antibody (of a reference antibody to a given epitope (in a Tau polypeptide with an antibody; paragraph [0087]); an isolated antibody (isolated antibody; paragraph [0008]), wherein the antibody is a Fv, scFv, Fab, f(ab)², or Fab', (wherein the antibody is a scFv; paragraph [0076]); an isolated antibody (isolated antibody; paragraph [0008]), wherein the isolated antibody comprises a human (wherein the isolated antibody comprises a human; paragraph [0089]) light chain constant region (light chain constant region; paragraph [0060]) and a human (and a human; paragraph [0069]) heavy chain constant region (heavy chain constant region; paragraph [0060]), and wherein the isolated antibody competes for binding to an epitope of a Tau polypeptide with an antibody (wherein the antibody competes for binding to an epitope of a reference antibody to a given epitope (wherein the isolated antibody competes for binding to an epitope of a Tau polypeptide with an antibody); paragraph [0087]); a pharmaceutical formulation comprising: a) an antibody (a composition comprising the antibody for therapy (a pharmaceutical formulation comprising said antibody); paragraph [0012]), that specifically binds an epitope within a portion of Tau (that specifically binds an epitope within a portion of Tau; paragraph [0041]), wherein the antibody comprises: (i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; (iv) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (v) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (vi) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence (wherein the antibody comprises: (i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; (iv) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (v) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (vi) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence; paragraph [0061]); and b) a pharmaceutically acceptable excipient suitable for administration to a human (and a pharmaceutically acceptable carrier (a pharmaceutically acceptable excipient suitable for administration to a human); Claim 12), wherein the formulation is free of endotoxins (wherein the endotoxin levels were below 1 EU/mg (wherein the formulation is free of endotoxins); paragraph [0305]); and an in vitro method of detecting a Tau polypeptide in a biological sample obtained from an individual (an in vitro method of detecting a Tau polypeptide in a biological sample obtained from an individual; paragraph [0248]); the method comprising: a) contacting the biological sample with an antibody (comprising contacting the sample with an antibody; paragraph [0248]) that competes for binding to an epitope (that competes for binding to an epitope; paragraph [0087]) within a region of Tau with an antibody (of a reference antibody to a given epitope (within a region of Tau with an antibody); paragraph [0087]); and b) detecting binding of the antibody to Tau polypeptide present in the sample (detecting binding of the antibody to Tau polypeptide present in the sample; paragraph [0248]). Nitsch does not disclose an antibody to an N-terminal (eTau) portion of Tau, that specifically binds an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide; an antibody that competes for binding to Tau with an anti-Tau antibody, or competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody that comprises: a) a light chain region comprising: i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; and b) a heavy chain region comprising: (i) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (iii) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence.

---Continued on Next Supplemental Page---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/55203

-***Continued from Previous Supplemental Page:

Ksiezak-Reding discloses a monoclonal antibody that specifically binds to an epitope in an N-terminal region of Tau (abstract).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of Nitsch, in order to have included the monoclonal antibody of Ksiezak-Reding, including competitive antibodies, as previously disclosed by Nitsch, wherein the antibody that competes for binding to Tau with an anti-Tau antibody, or competes for binding to an epitope in an N-terminal region of a Tau polypeptide with an antibody that comprises: a) a light chain region comprising: (i) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence; (iii) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence; and b) a heavy chain region comprising: (i) a VH CDR1 comprising an amino acid sequence; (ii) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence; and (iii) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence, based on the structure of monoclonal antibodies, which was common and well-known in the art, at the time of the invention. Additionally, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art to have utilized more than one antibody to tau for therapy or detection, as previously disclosed by Nitsch, for enabling the detection of proteolytic fragments of the protein, without undue experimentation or testing.

Since none of the special technical features of the Groups I-III inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Nitsch and Ksiezak-Reding references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 C 0 9 6
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02	C
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	C
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 5 1 A
A 6 1 B 5/055 (2006.01)	A 6 1 B 5/05	3 8 3
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

- (31)優先権主張番号 61/813,797
 (32)優先日 平成25年4月19日(2013.4.19)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/833,355
 (32)優先日 平成25年6月10日(2013.6.10)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,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,UZ

- (72)発明者 アイリーン・グリスウォルド・プレナー
 アメリカ合衆国94080カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ゲートウェイ・ブルバード951番
 (72)発明者 ナンシー・イー・スタリアーノ
 アメリカ合衆国94080カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ゲートウェイ・ブルバード951番
 (72)発明者 ブー・ダン
 アメリカ合衆国94080カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、ゲートウェイ・ブルバード951番

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA02 EA04 GA11
 4B064 AG27 CA02 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA26X AA72X AA90X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
 4C076 AA19 CC01 EE59 FF34
 4C085 AA14 AA16 BB36 BB41 BB43 BB50 CC23 DD62 EE01 EE05
 GG01 GG02 HH01 HH07 KA04 KA05 KA28 KA29 LL13
 4C096 AA11 AC01
 4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 EA21 EA50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015532592A5	公开(公告)日	2016-09-29
申请号	JP2015527645	申请日	2013-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	伊皮埃里安股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Aipierian , Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	アイリーン・グリスウォルド・プレナー ナンシー・イー・スタリアーノ ブー・ダン		
发明人	アイリーン・グリスウォルド・プレナー ナンシー・イー・スタリアーノ ブー・ダン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12N1/19 C12N5/10 A61K39/395 A61P25/28 A61K9/127 A61K47/48 A61K51/00 A61K49/00 G01N33/53 G01N33/543 A61B5/055 C12N1/15 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P25/28 A61K47/60 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/52 A61K39/3955 A61K47/62 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2319/10 C07K16/461		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C12N1/19 C12N5/00.101 A61K39/395.N A61P25/28 A61K9/127 A61K47/48 A61K49/02.C A61K49/00.C G01N33/53.D G01N33/543.551.A A61B5/05.383 C12N1/15 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA19 4C076/CC01 4C076/EE59 4C076/FF34 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE05 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/HH01 4C085/HH07 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/LL13 4C096/AA11 4C096/AC01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二 山中真一郎		
优先权	61/683902 2012-08-16 US 61/754085 2013-01-18 US 61/781823 2013-03-14 US 61/813797 2013-04-19 US 61/833355 2013-06-10 US		
其他公开文献	JP6290212B2 JP2015532592A		

摘要(译)

本发明提供治疗τ蛋白病的方法，包括给予抗-Tau抗体。本发明还提供了抗-Tau抗体，包含该抗体的制剂，用于该方法。

