

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-513075

(P2022-513075A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 8 5
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D Z N A 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/534 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	G 0 1 N 33/534	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全83頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-527115(P2021-527115)	(71)出願人	508152917
(86)(22)出願日	令和1年11月18日(2019.11.18)		ザ ボード オブ リージェンツ オブ ザ
(85)翻訳文提出日	令和3年7月5日(2021.7.5)		ユニバーシティ オブ テキサス シス
(86)国際出願番号	PCT/US2019/061928		テム
(87)国際公開番号	WO2020/106598		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス,
(87)国際公開日	令和2年5月28日(2020.5.28)		オースティン, ウェスト 7 番 ストリ
(31)優先権主張番号	62/769,281		ート 2 1 0
(32)優先日	平成30年11月19日(2018.11.19)	(74)代理人	100102978
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 清水 初志
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74)代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タウオパチーの処置のための、タウペプチド抗原およびそれに結合する抗体

(57)【要約】

本開示は、タウオパチーを処置および診断するための方法および組成物を提供する。より具体的には、本開示は、タウ上のエピトープの同定、ならびにワクチンとして、またはタウ関連疾患の診断および処置の両方に使用できるモノクローナル抗体を作製するための試薬としてのそれらの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タウオパチーを有するかまたはタウオパチーを発症するリスクのある対象を処置する方法であって、表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドを該対象に投与する段階を含む、前記方法。

【請求項 2】

第2の時点で、表BまたはCからの前記と同じまたは異なるペプチドを投与する段階をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

対象が、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、前頭側頭型認知症、多発性硬化症、嗜銀顆粒病、慢性外傷性脳症、または原発性加齢性タウオパチーに罹患している、請求項1～2のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 4】

対象にアジュバントおよび/または生物学的応答調節物質を投与する段階をさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

対象がタウオパチーと診断されている、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

対象がヒト対象である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

対象が非ヒト哺乳動物対象である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 8】

投与する段階が、筋肉内注射、経口送達、皮下注射、経皮送達、吸入、静脈内注射、くも膜下腔内注射、または脳室内注射を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ペプチドが約100残基長以下、約50残基長以下、または約38残基長以下である、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

ペプチドが少なくとも5残基長である、少なくとも6残基長である、または少なくとも10残基長である、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 11】

タウオパチーを有するかまたはタウオパチーを発症するリスクのある対象を処置する方法であって、表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドによって定義されるタウエピトープに結合する1つまたは複数の抗体または抗体断片を該対象に投与する段階を含む、前記方法。

【請求項 12】

表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドによって定義されるタウエピトープに結合する前記と同じまたは異なる抗体を投与する段階をさらに含む、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

対象が、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、前頭側頭型認知症、多発性硬化症、嗜銀顆粒病、慢性外傷性脳症、または原発性加齢性タウオパチーに罹患している、請求項11～12のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 14】

対象にアジュバントおよび/または生物学的応答調節物質を投与する段階をさらに含む、請求項11～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

対象がタウオパチーと診断されている、請求項11～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

対象がヒト対象である、請求項11～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

50

対象が非ヒト哺乳動物対象である、請求項11～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

投与する段階が、筋肉内注射、経口送達、皮下注射、経皮送達、吸入、静脈内注射、くも膜下腔内注射、または脳室内注射を含む、請求項11～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

抗体断片が、組換えscFv（一本鎖可変断片）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、もしくはFv断片であるか、または抗体がキメラ抗体もしくは二重特異性抗体である、請求項11～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

抗体が、

IgGであるか、あるいは

LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、もしくはLS変異などの、半減期を延長するおよび/もしくは治療有効性を高めるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは強化する）よう変異させたFc部分、またはグリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは規定されたグリコシル化パターンで操作された細胞株での発現などの、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは強化する）よう改変したグリカンを含む、組換えIgG抗体または抗体断片である、

請求項11～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドを、薬学的に許容される希釈剤、緩衝剤、または賦形剤中に含む、ペプチドワクチン。

【請求項22】

アジュバントおよび/または生物学的応答調節物質をさらに含む、請求項21に記載のワクチン。

【請求項23】

筋肉内注射、経口送達、皮下注射、経皮送達、吸入、静脈内注射、くも膜下腔内注射、または脳室内注射のために製剤化される、請求項21～22のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項24】

ペプチドが約100残基長以下、約50残基長以下、または約37残基長以下である、請求項21～23のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項25】

ペプチドが少なくとも5残基長である、少なくとも10残基長である、または少なくとも16残基長である、請求項21～24のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項26】

表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドによって定義されるタウエピトープに結合する1つまたは複数の抗体または抗体断片を含む、ワクチン。

【請求項27】

アジュバントおよび/または生物学的応答調節物質をさらに含む、請求項26に記載のワクチン。

【請求項28】

筋肉内注射、経口送達、皮下注射、経皮送達、吸入、静脈内注射、筋肉内注射、くも膜下腔内注射、または脳室内注射のために製剤化される、請求項26～27のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項29】

抗体断片が、組換えscFv（一本鎖可変断片）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、もしくはFv断片であるか、または抗体がキメラ抗体もしくは二重特異性抗体である、請求項26～28のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項30】

抗体が、

10

20

30

40

50

IgGであるか、あるいは

LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、もしくはLS変異などの、半減期を延長するおよび/もしくは治療有効性を高めるためにFcR相互作用を変化させる(排除もしくは強化する)よう変異させたFc部分、またはグリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは規定されたグリコシル化パターンで操作された細胞株での発現などの、FcR相互作用を変化させる(排除もしくは強化する)よう改変したグリカンを含む、組換えIgG抗体または抗体断片である、

請求項26～29のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項31】

対象におけるタウタンパク質または構造的に関連した抗原を検出する方法であって、

(a) 該対象からの試料を、表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドによって定義されるタウエピトープに結合する1つまたは複数の抗体または抗体断片と接触させる段階；および

(b) 該1つまたは複数の抗体または抗体断片の、該試料中の該タウタンパク質または構造的に関連した抗原への結合により、該試料中の該タウタンパク質または構造的に関連した抗原を検出する段階

を含む、前記方法。

【請求項32】

試料が体液または組織である、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

試料が、血液、喀痰、脳脊髄液、涙液、唾液、粘液、血清、精液、子宮頸部もしくは膣分泌物、羊水、胎盤組織、尿、滲出液、漏出液、組織擦過物、または糞便、または脳組織である、請求項31～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

検出が、ELISA、RIA、ラテラルフローアッセイ、ウェスタンブロット、または免疫組織化学を含む、請求項31～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

段階(a)および(b)を2回目に実施する段階、ならびに

1回目のアッセイと比較して、タウまたは構造的に関連した抗原のレベルの変化を判定する段階

をさらに含む、請求項31～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】

抗体断片が、組換えscFv(一本鎖可変断片)抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、またはFv断片である、請求項31～35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】

対象がタウオパチーを有する疑いがある、請求項31～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

対象が以前にタウオパチーと診断されたことがある、請求項31～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】

対象がヒトまたは非ヒト哺乳動物である、請求項31～38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

タウオパチーが、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、前頭側頭型認知症、多発性硬化症、嗜銀顆粒病、慢性外傷性脳症、または原発性加齢性タウオパチーである、請求項31～39のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権主張

本出願は、2018年11月19日に出願された米国仮特許出願第62/769,281号に対する

10

20

30

40

50

優先権の恩典を主張するものであり、その全内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

1. 分野

本開示は、医学および細胞生物学の分野に関する。より具体的には、本開示は、アルツハイマー病などのタウオパチーの処置および診断のための、ペプチド抗原およびそれに対する抗体を対象にする。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術

多種多様な神経変性障害は、不溶性のタウタンパク質の蓄積を伴う。これらの障害は、タウのもつれが存在することからタウオパチーと総称されるが、その臨床症状は大きく異なる。よく知られているタウオパチーの1つであるアルツハイマー病 (AD) は、アミロイド斑およびタウタンパク質を含む神経原線維変化 (NFT) の蓄積によって神経病理学的に定義される。ADにおけるNFTは、過剰リン酸化型のタウタンパク質からなることが判明している。過剰リン酸化タウは、微小管と結合してそれを安定化する能力の低下を示し、自己凝集して、NFTを構成する不溶性の対らせん状細線維 (PHF) を形成し得る (Gustke et al., 1992; Bramblett et al., 1993; Alonso et al., 1996)。NFTの発生率は、ADにおける認知欠損およびニューロンの減少と正に相関しており (Arriagada et al., 1992; Gomez-Isla et al., 1997)、またタウ遺伝子の変異が常染色体優性型の前頭側頭型認知症の根底にあることが発見されたことから、タウの病理学的変化が神経変性および認知機能障害の主要な原因となり得ることが示唆される (Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998)。このことを考慮して、タウのリン酸化は、タウオパチーの可能なメディエーターとして研究されてきた。しかしながら、リン酸化だけではタウオパチーを駆動するのに十分ではなく、異なる病的構造を考慮しなければならないことが、新たな証拠によって示唆される。特に、タウは、より折り畳まれた局所構造を有する不活性状態から、新たなエピトープを露出するより拡張した形態へと移行するようである (Mirbaha et al., 2018; Chen et al., 2019)。

【発明の概要】

【0004】

概要

よって、本開示に従って、タウオパチーを有するかまたはタウオパチーを発症するリスクのある対象を処置する方法であって、表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドを該対象に投与する段階を含む、前記方法が提供される。本方法は、第2の時点で、表BまたはCからの同じまたは異なるペプチドを投与する段階をさらに含み得る。対象は、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、前頭側頭型認知症、多発性硬化症、嗜銀顆粒病、慢性外傷性脳症、亜急性硬化性全脳炎、または原発性加齢性タウオパチーに罹患してよい。本方法は、前記対象にアジュバントおよび/または生物学的応答調節物質を投与する段階をさらに含み得る。

【0005】

対象は、タウオパチーと診断されていてよい。対象は、ヒト対象または非ヒト哺乳動物対象であってよい。投与する段階は、筋肉内注射、経口送達、皮下注射、経皮送達、吸入、静脈内注射、くも膜下腔内注射、または脳室内注射を含み得る。ペプチドは、約100残基長以下、約50残基長以下、または約38残基長以下であってよい。ペプチドは、少なくとも5残基長であってよく、少なくとも6残基長である、または少なくとも10残基長である。

【0006】

別の態様において、タウオパチーを有するかまたはタウオパチーを発症するリスクのある対象を処置する方法であって、表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドによって定義されるタウエピトープに結合する1つまたは複数の抗体を該対象に投与する段階を含む

10

20

30

40

50

、前記方法が提供される。本方法は、表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドによって定義されるタウエピトープに結合する同じまたは異なる抗体を投与する段階をさらに含み得る。対象は、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、前頭側頭型認知症、多発性硬化症、嗜銀顆粒病、慢性外傷性脳症、または原発性加齢性タウオパチーに罹患してよい。本方法は、前記対象にアジュバントおよび/または生物学的応答調節物質を投与する段階をさらに含み得る。

【0007】

対象は、タウオパチーと診断されていてよい。対象は、ヒト対象または非ヒト哺乳動物対象であってよい。投与する段階は、筋肉内注射、経口送達、皮下注射、経皮送達、吸入、静脈内注射、くも膜下腔内注射、または脳室内注射を含み得る。抗体断片は、組換えscFv（一本鎖可変断片）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、もしくはFv断片であってよく、または前記抗体はキメラ抗体もしくは二重特異性抗体である。抗体は、IgGであってよく、あるいはLALA、N297、GASD/ALIE、YTE、もしくはLS変異などの、半減期を延長するおよび/もしくは治療有効性を高めるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは強化する）よう変異させたFc部分、またはグリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは規定されたグリコシル化パターンで操作された細胞株での発現などの、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは強化する）よう改変したグリカンを含む組換えIgG抗体または抗体断片であってよい。

10

【0008】

表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドを、薬学的に許容される希釈剤、緩衝剤、または賦形剤中に含むペプチドワクチンもまた提供される。ワクチンは、アジュバントおよび/または生物学的応答調節物質をさらに含み得る。ワクチンは、筋肉内注射、経口送達、皮下注射、経皮送達、吸入、静脈内注射、くも膜下腔内注射、または脳室内注射のために製剤化され得る。ペプチドは、約100残基長以下、約50残基長以下、または約37残基長以下であってよい。ペプチドは、少なくとも5残基長であってよく、少なくとも10残基長である、または少なくとも16残基長である。

20

【0009】

別の態様において、表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドによって定義されるタウエピトープに結合する1つまたは複数の抗体を含むワクチンが提供される。ワクチンは、アジュバントおよび/または生物学的応答調節物質をさらに含み得る。ワクチンは、筋肉内注射、経口送達、皮下注射、経皮送達、吸入、静脈内注射、筋肉内注射、くも膜下腔内注射、または脳室内注射のために製剤化され得る。抗体断片は、組換えscFv（一本鎖可変断片）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、もしくはFv断片であってよく、または前記抗体はキメラ抗体もしくは二重特異性抗体である。抗体は、IgGであってよく、あるいはLALA、N297、GASD/ALIE、YTE、もしくはLS変異などの、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは強化する）ため、半減期を延長するおよび/もしくは治療有効性を高めるために変異させたFc部分、またはグリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは規定されたグリコシル化パターンで操作された細胞株での発現などの、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは強化する）ために改変したグリカンを含む組換えIgG抗体または抗体断片であってよい。

30

40

【0010】

なおさらに別の態様において、対象におけるタウタンパク質または構造的に関連した抗原を検出する方法であって、(a) 該対象からの試料を、表BまたはCからの1つまたは複数のペプチドによって定義されるタウエピトープに結合する1つまたは複数の抗体または抗体断片と接触させる段階；および (b) 該1つまたは複数の抗体または抗体断片の、該試料中の該タウタンパク質または構造的に関連した抗原への結合により、該試料中の該タウタンパク質または構造的に関連した抗原を検出する段階を含む、前記方法が提供される。試料は、血液、脳脊髄液、喀痰、涙液、唾液、粘液、血清、精液、子宮頸部もしくは膺分泌物などの体液、羊水、胎盤組織、尿、滲出液、漏出液、組織擦過物、もしくは糞便であってよく、または脳組織などの組織であってよい。

50

【0011】

検出は、ELISA、RIA、ラテラルフローアッセイ、ウェスタンブロット、または免疫組織化学を含み得る。前記方法は、段階 (a) および (b) を2回目に実施する段階、ならびに1回目のアッセイと比較して、タウまたは構造的に関連した抗原のレベルの変化を判定する段階をさらに含み得る。抗体断片は、組換えscFv (一本鎖可変断片) 抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、またはFv断片であってよい。対象は、タウオパチーを有する疑いがあるがよく、または以前にタウオパチーと診断されたことがあってよい。対象は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物であってよい。タウオパチーは、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、前頭側頭型認知症、多発性硬化症、嗜銀顆粒病、慢性外傷性脳症、または原発性加齢性タウオパチーであってよい。

10

【0012】

本明細書に記載される任意の方法または組成物は、本明細書に記載される任意の他の方法または組成物に関して実行できることが企図される。

【0013】

特許請求の範囲および/または明細書において「含む」という用語と共に用いられる場合の「1つの (a)」または「1つの (an)」という語の使用は、「1つの」を意味し得るが、それはまた「1つまたは複数の」、「少なくとも1つの」、「および「1つまたは1つより多くの」という意味と一致する。「約」という語は、指定された数のプラスまたはマイナス5%を意味する。

【0014】

本開示のその他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本開示の精神および範囲の範囲内の様々な変更および修正が、この詳細な説明から当業者に明らかとなると考えられるため、詳細な説明および具体例は、本開示のある特定の態様を示しながら、例示として与えられているにすぎないことが理解されるべきである。

20

【図面の簡単な説明】

【0015】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本開示のある特定の局面をさらに実証するために含めるものである。本開示は、詳細な説明と組み合わせ、これらの図面のうちの1つまたは複数に参照することにより、よりよく理解され得る。

30

【図1】タウオパチー変異は凝集傾向を駆動する。(図1A) タウ-RD、および306VQIVYK³¹¹ (SEQ ID NO: 1) 周囲の最小構造エレメントを表す派生ペプチドの模式図。(図1B) VQIVYK (SEQ ID NO: 1) およびDNIKHV (SEQ ID NO: 2) ヘキサペプチドのThT凝集曲線。(図1C) 306VQIVYK³¹¹ (SEQ ID NO: 1) の近位にある予測される最小R2R3構造エレメントの模式図上にマッピングされた一次アミノ酸配列。変異を球として示してある。(図1D) R2R3野生型ペプチドおよび変異体ペプチドのThT凝集曲線。

【図2】ヘアピン構造を強化すると、自発的凝集の表現型が救済される。(図2A) プロリン、ならびにペプチドモデルのP301 (赤色球) に対応する位置においてシスおよびトランスプロリン配座異性体を生成するために使用されたフッ素化プロリン類似体の模式図。(図2B) R2R3ペプチド (200 μM) に代わりに導入されたシス、トランス、および中性 (Ea) プロリン類似体のThT凝集反応。ThTシグナルは、少なくとも6回の独立した実験の平均値である。

40

【図3】新規治療法および診断法の標的に適しているタウ-RDにおける領域。(図3A) タウ-RD、ならびにR1R2、R3R4、R4R'、およびスプライス変種R1R3を含む、すべてのリピート間領域にまたがる最小構造エレメントを表す派生ペプチドの模式図。(図3B) 各リピート間エレメントにおける、P301 R2R3に相当するプロリンの位置。これらのエレメントのトランスプロリン立体配置は、強力な治療および診断エレメントを表すことが予測される。(SEQ ID NO: 146、147、148、149、および121; 上から下へ)。

【図4】IPおよび上清を用いたシーディング (seeding) アッセイのサンプルデータ。4

50

つの異なるタウオパチーの脳ホモジネートに由来する全タンパク質15 µgを、抗R1R2トランスP270ハイブリドーマの馴化培地100 µlからの抗体で免疫沈降して得られた、IP画分と上清画分のシーディング活性を比較するグラフ。結果はすべて、表示された脳ホモジネートに由来するタンパク質15 µgのIP前シーディング活性に対して正規化してある。

【発明を実施するための形態】

【0016】

例示的態様の説明

タウタンパク質（またはその名称のギリシャ文字をとって タンパク質）は、微小管を安定化するタンパク質である。タウタンパク質は中枢神経系のニューロンに豊富であり、他所ではあまり一般的ではないが、CNSのアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトで

10

【0017】

タウタンパク質は、ヒトではMAPT（微小管関連タンパク質タウ）と命名され、第17染色体に位置する単一遺伝子からの選択的スプライシングの産物である。タウタンパク質は、微小管重合に必須である熱安定性タンパク質として1975年に同定されたが、それ以来、天然変性タンパク質として特徴づけられている。

【0018】

タウタンパク質は、可溶性の高い微小管関連タンパク質（MAP）である。ヒトでは、これらのタンパク質は、非神経細胞に比べ、主にニューロンにおいて見られる。タウの主要な機能の1つは、軸索微小管の安定性を調節することである。タウノックアウトマウスが脳の発生で異常を示さなかったことによって示唆されるように、おそらくは他のMAPによるタウ欠損の補償のゆえに他の神経系のMAPが同様の機能を果たしている可能性がある。タウは樹状突起には存在せず、それが微小管の安定化と必要に応じて柔軟性もまたもたらす軸索の遠位部分において主として活性がある。これは、微小管を本質的に固定する軸索の近位部分におけるMAP6（STOP）タンパク質、および樹状突起において微小管を安定化するMAP2とは対照的である。

20

【0019】

タウタンパク質はチューブリンと相互作用して微小管を安定化し、微小管へのチューブリンの重合を促進する。タウは、微小管の安定性を制御する2つの方法：アイソフォームおよびリン酸化を有する。

30

【0020】

ヒトの脳組織には6種類のタウのアイソフォームが存在し、それらは結合ドメインの数によって区別される。3種類のアイソフォームは3つの結合ドメインを有し、その他の3種類は4つの結合ドメインを有する。結合ドメインはタンパク質のカルボキシ末端に位置し、正に荷電している（それによって負に荷電している微小管に結合することができる）。4つの結合ドメインを有するアイソフォームは、3つの結合ドメインを有するものよりも微小管の安定化に優れている。アイソフォームは、タウ遺伝子のエクソン2、3、および10における選択的スプライシングの結果である。

40

【0021】

タウは、最も長いタウアイソフォームにおいて79個の潜在的なセリン（Ser）およびスレオニン（Thr）リン酸化部位を有するリン酸化タンパク質である。リン酸化は、正常なタウタンパク質ではこれらの部位のうちのおよそ30個で報告されている。タウのリン酸化は、セリン/スレオニンキナーゼであるPKNを含む多くのキナーゼによって調節される。PKNが活性化されると、それはタウをリン酸化し、微小管組織化の破壊を生じる。

【0022】

タウのリン酸化は、発生的にも調節される。例えば、胎児性タウは、胚のCNSにおいて成体のタウよりも高度にリン酸化されている。6つのすべてのアイソフォームにおけるリン酸化の程度は、ホスファターゼの活性化に起因して年齢とともに低下する。キナーゼと

50

同様に、ホスファターゼもタウのリン酸化の調節において役割を担う。例えば、PP2AおよびPP2Bはいずれもヒトの脳組織に存在し、Ser396を脱リン酸化する能力を有する。これらホスファターゼのタウへの結合は、タウのMTとの会合に影響を及ぼす。タウタンパク質の過剰リン酸化（タウ封入体、pタウ）は、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、およびその他のタウオパチーの病態形成に關与する、対らせん状細線維および直線状細線維のもつれの自己組織化を生じ得る。

【0023】

アルツハイマー病の脳由来の対らせん状細線維では、6つのタウアイソフォームのすべてが、しばしば過剰リン酸化状態で存在する。アルツハイマー病を含むその他の神経変性疾患では、ある特定のタウアイソフォームに富む凝集体の沈着が報告されており、それらをまとめて「タウオパチー」と定義する。誤って折り畳まれた場合、さもなければ可溶性の高いこのタンパク質も、多くの神経変性疾患に寄与する極めて不溶性の凝集体を形成し得る。タウタンパク質は、形成されて神経のシナプスを遮断するもつれによって引き起こされる生細胞の破壊に直接影響を及ぼす。もつれは、共に密着したタウタンパク質の凝集塊であり、脳の細胞に分配される必要がある必須栄養素を遮断し、細胞を死滅させる。この疾患がどのように機能するかといういくつかの局面によって、病原型のタウタンパク質が細胞から出て、高次構造的鑄型として作用することにより、脳の細胞間で病態を進行性様式で広げることができるという点で、それがプリオンタンパク質に対するいくつかの類似性を有することもまた示唆される。

【0024】

本発明者は、免疫沈降法と、脳組織に存在する病原性シードであるタウ「プリオン」の存在を報告する細胞ベースのバイオセンサーアッセイの組み合わせに基づいて、タウタンパク質のエピトープを同定する方法を開発した。このアプローチを用いて、適切な抗体によって標的とされた場合に、「天然」（すなわち、非病原性）タウに対して病原性タウプリオンを優先的に免疫沈降させる、タウ上のエピトープを同定した。これらのエピトープは、患者においてタウを標的とした免疫応答をもたらすための能動ワクチン（1つもしくは複数のエピトープを含む）として、またはタウの蓄積によって引き起こされる神経変性疾患の患者において受動ワクチンとして使用するためのモノクローナル抗体を生産するために有用であり得る。

【0025】

本開示のこれらおよびその他の局面を、以下に詳細に記載する。

【0026】

I. タウオパチーおよびタウタンパク質

タウオパチーは、ヒト脳内での神経原線維またはグリア線維のもつれにおけるタウタンパク質の病的凝集と関連した神経変性疾患の一種である。もつれは、タウとして知られる微小管関連タンパク質が過剰リン酸化され、そのタンパク質が微小管から解離して不溶型の凝集体を形成することによって形成される（過剰リン酸化タウタンパク質のこのような凝集体は、対らせん状細線維とも称される）。もつれ形成の正確な機構は完全には理解されておらず、もつれがこの疾患における主要な原因因子であるのか、またはより周辺的な役割を果たしているのかについては、今なお議論の余地がある。

【0027】

A. アルツハイマー病

ADは、記憶障害、言語能力の低下、視空間能力の障害、判断力の低下、無関心な態度を特徴とする進行性の神経変性疾患であるが、運動機能は維持される。ADは通常は65歳以降で始まるが、その発症は40歳という早期に起こる場合もあり、まず記憶力の低下として現れ、数年かけて認知機能、人格、および機能能力を破壊していく。混乱および落ち着きのなさが起こる場合もある。精神的变化の種類、重症度、順序、および進行は大きく異なる。物忘れおよび集中力の低下を含むADの初期症状は、加齢の自然な徴候と似ているため簡単に見逃され得る。同様の症状は、疲労、悲嘆、抑うつ、疾病、視力もしくは聴力の低下、アルコールもしくは特定の薬物の使用、または単に一度にあまりに多くの詳細を

10

20

30

40

50

憶えることの負担から生じる場合もある。

【0028】

ADの治療法はなく、疾患の進行を遅らせる方法もない。疾患の初期または中期段階にある一部の人々に対して、タクリンなどの薬物療法がいくつかの認知症状を軽減する場合もある。Aricept（ドネペジル）、Razadyne（ガランタミン）、およびExelon（リバスチグミン）は、軽度から中等度のアルツハイマー型認知症の処置に適応される可逆的アセチルコリンエステラーゼ阻害剤である。また、いくつかの薬物療法が、不眠、焦燥、徘徊、不安、および抑うつなどの行動症状の制御を助ける場合もある。これらの処置は、患者をより快適にさせることを目的としている。

【0029】

ADは進行性疾患である。疾患の経過は人によって異なる。生涯の最後の5年間だけこの疾患を有する人もいれば、20年もの間この疾患を有する人もいる。AD患者における最も一般的な死因は感染症である。

【0030】

ADの分子的局面は複雑で、まだ完全には解明されていない。前述の通り、ADは、脳における、特に記憶処理の中樞である海馬におけるアミロイド斑および神経原線維変化の形成を特徴とする。いくつかの分子：アミロイドタンパク質（A β ）、プレセニリン（PS）、コレステロール、アポリポタンパク質E（ApoE）、およびタウタンパク質が、これらの構造に寄与している。これらのうち、A β が中心的役割を果たしているようである。

【0031】

A β はおおよそ40個のアミノ酸残基を含む。42および43残基型は、40残基型よりもはるかに毒性が強い。A β は、アミロイド前駆体タンパク質（APP）から連続的なタンパク質分解によって生成される。酵素のうちの一つは配列特異性を欠き、したがって様々な（39~43）長さのA β を生成し得る。毒性型のA β は、アポトーシス、フリーラジカル形成、凝集、および炎症などの異常な事象を引き起こす。プレセニリンは、APPのA β への切断を担う2つのプロテアーゼのうちの一つをコードする。2つの型PS1およびPS2が存在する。PS1の変異は、A β ₄₂の生成を引き起こし、早期発症ADの典型的な原因である。

【0032】

コレステロール低下剤はAD予防能を有すると言われているが、コレステロールの上昇をADのリスク増大に関連づける決定的証拠はない。しかしながら、A β がスフィンゴ脂質結合ドメインを含むという発見により、この理論はさらに信用度が増した。同様に、コレステロールの再分布に關与するApoEも、今ではAD発症に寄与すると考えられている。上記のように、ニューロンからの最低程度のコレステロール流出を示すApoE4対立遺伝子を有する個体は、ADを発症する可能性がより高い。

【0033】

タウタンパク質は、正常な脳では微小管と会合し、ADに罹患した脳では、神経原線維変化の主な構成要素である対らせん状細線維（PHF）を形成する。最近の証拠により、A β タンパク質がタウタンパク質の過剰リン酸化を引き起こし、微小管からの解離およびPHFへの凝集を引き起こすことが示唆される。

【0034】

ADの神経変性は、ニューロンのミトコンドリアの機能障害を伴うことが確立されている（Carvalho et al., 2015）。したがって、A β ARアゴニスト処置でこの機能障害を改善することは、ADの潜在的治療アプローチとなるであろう。

【0035】

B. 多発性硬化症

多発性硬化症（MS）は、脳および脊髄の神経細胞の絶縁被覆が損傷している脱髄疾患である。この損傷により、神経系の各部分の伝達能力が損なわれ、身体的、精神的、および時には精神医学的な問題を含む様々な徴候および症状が生じる。具体的な症状には、複視、片目失明、筋力低下、感覚障害、または協調障害が含まれ得る。MSはいくつかの形態

10

20

30

40

50

をとり、新たな症状は単独の発作で生じるか（再発型）または経時的に蓄積するか（進行型）のいずれかである。発作の間には、症状が完全に消失する場合もある；しかしながら、特に疾患が進行するにつれて、永久的な神経学的問題が残る場合が多い。

【0036】

原因は明らかではないが、根本的な機構は、免疫系による破壊またはミエリン産生細胞の不全のいずれかであると考えられている。これに対して提唱される原因には、遺伝的特質、およびウイルス感染によって誘発されるものなどの環境要因が含まれる。MSは通常、現れた徴候および症状、ならびに裏付けとなる医学的検査の結果に基づいて診断される。

【0037】

多発性硬化症の治療法はわかっていない。処置は、発作後の機能を改善し、新たな発作を予防しようと試みられる。MSの処置に使用される薬物は、効果が比較的小さく、副作用を有し、忍容性が低い場合がある。理学療法は、人々の機能する能力を助け得る。多くの人々は、有益性の証拠が欠如しているにもかかわらず、代替処置を追求する。長期的な転帰を予測するのは困難であり、女性、早期に発症した人、再発性の経過をたどる人、および最初に発作をほとんど経験しなかった人において、良好な転帰が見られる場合が多い。平均余命は平均して、罹患していない集団の平均余命よりも5～10年短い。

10

【0038】

多発性硬化症は、中枢神経系に影響を及ぼす最も一般的な免疫介在性障害である。2015年には世界中で約230万人が罹患し、その割合は異なる地域内および異なる集団間で大きく異なる。同年には約18,900人がMSにより死亡し、1990年の12,000人から増加した。この疾患は通常20歳から50歳の間に発症し、女性では男性の2倍見られる。MSは、1868年にJean-Martin Charcotによって初めて記載された。多発性硬化症という名称は、脳および脊髄の白質に発生する多数の瘢痕（硬化 プラークまたは病変としてよりよく知られている）を指す。多くの新しい処置法および診断法が開発中である。

20

【0039】

MSを有する人は、ほとんどすべての神経学的症状または徴候を有する可能性があり、自律神経系、視覚系、運動系、および感覚系の問題が最もよく見られる。具体的な症状は、神経系内の病変の位置によって決まり、これには、数ある中でも、感度低下または感覚変化、例えば、刺痛、ピリピリした感覚、またはしびれなど、筋力低下、霧視、非常に顕著な反射、筋痙攣、または動作困難；協調および平衡障害（運動失調）；発話または嚥下の障害、視覚障害（眼振、視神経炎、または複視）、疲労感、急性または慢性の疼痛、ならびに膀胱および腸の障害が含まれ得る。思考困難、および抑うつまたは不安定な気分などの情緒障害もまたよく見られる。通常よりも高い温度に曝されることに起因する症状の悪化であるウートフ現象、および首を曲げた時に背中に走る電気的感覚であるレルミット徴候は、特にMSに特有である。身体障害および重症度の主な尺度は総合障害度評価尺度（EDSS）であるが、多発性硬化症機能評価などの他の尺度が研究に使用されることも増えている。

30

【0040】

病態は、85%の症例では、数日間にわたる臨床的に孤立した症候群（CIS）として始まり、45%が運動障害または感覚障害を有し、20%が視神経炎を有し、および10%が脳幹機能不全に関連する症状を有し、残りの25%はこれまでの障害のうちの2つ以上を有する。症状の経過は、最初は、数日～数ヶ月間持続する急激な悪化のエピソード（再発、増悪、発作（bout）、発作（attack）、または再燃と称される）とその後の改善（85%の症例）、または回復期間のない継時的な緩やかな悪化（10～15%の症例）のいずれかとして、2つの主要なパターンで起こる。これら2つのパターンの組み合わせが起こる場合もあり、または再発および寛解の経過から始まり、後に進行性になる場合もある。再発は通常は予測できず、前兆もなく起こる。増悪は、年に2回を超える頻度で起こることはほとんどない。しかしながら、一部の再発は共通の誘因が先行し、春および夏の間により頻繁に起こる。同様に、風邪、インフルエンザ、または胃腸炎などのウイルス感染症もそのリスクを高める。ストレスもまた発作を誘発し得る。MSを有する女性が妊娠すると、再発を経

40

50

験することは少なくなる；しかしながら、出産後の最初の数ヶ月間はリスクが高まる。全体として、妊娠は長期の身体障害に影響しないようである。ワクチン接種、授乳、身体的外傷、およびウートフ現象を含む多くの事象が、再発率に影響しないことが判明している。

【0041】

MSの原因は不明である；しかしながら、遺伝的要因と感染病原体などの環境要因のいくつかの組み合わせの結果として起こると考えられている。理論は、データを組み合わせて可能性のある説明を試みるが、決定的であると判明したものはない。いくつかの環境リスク因子があり、一部は変えることが可能であるが、それらを取り除くことでMSを予防できるかどうかを判断するには、さらなる研究が必要である。

10

【0042】

MSの3つの主要な特徴は、中枢神経系における病変（プラークとも称される）の形成、炎症、およびニューロンのミエリン鞘の破壊である。これらの特徴は、複雑でまだ完全には理解されていない様式で相互作用して、神経組織の破壊ならびにひいてはこの疾患の徴候および症状を引き起こす。コレステロール結晶は、ミエリンの修復を損なうとともに、炎症を悪化させると考えられている。加えて、MSは、個体の遺伝的特徴とまだ同定されていない環境的原因の相互作用によって発症する免疫介在性障害であると考えられている。損傷は、少なくとも部分的には、自身の免疫系による神経系への攻撃によって起こると考えられている。

【0043】

多発性硬化症は、典型的には、現れた徴候および症状に基づき、裏付けとなる医学的画像診断および臨床検査と組み合わせて診断される。多発性硬化症は、徴候および症状が他の医学的問題のものと類似している場合があるため、特に初期には確認が難しい場合がある。異なる時期および異なる領域における病変の臨床的、実験的、および放射線学的証拠に着目したMcDonald基準が、最も一般的に用いられている診断法であり、Schumacher基準およびPoser基準は主に歴史的な意義がある。

20

【0044】

個体がMSに特有の神経学的症状の別個のエピソードを複数有する場合、臨床データ単独でその疾患の診断に十分であり得る。1回だけの発作後に受診する人については、診断のために他の検査が必要となる。最も一般的に用いられる診断ツールは、神経画像診断、脳脊髄液の分析、および誘発電位である。脳および脊椎の磁気共鳴画像診断は、脱髄の領域（病変またはプラーク）を示し得る。ガドリニウムを造影剤として静脈内投与して、活動性プラークを強調することができ、また除去することにより、評価の時点で症状を伴わない過去の病変の存在を実証することができる。腰椎穿刺から得られた脳脊髄液を検査することで、中枢神経系における慢性炎症の証拠を提供することができる。脳脊髄液は、MSを有する人の75～85%に見出される炎症マーカーであるIgGのオリゴクローナルバンドについて電気泳動で試験される。MSにおける神経系は、視神経および感覚神経の刺激に対する応答が弱い場合があるが、それはそのような経路の脱髄のためである。これらの脳応答は、視覚および感覚の誘発電位を用いて検査することができる。

30

【0045】

上記の基準は非侵襲的な診断を可能にする一方で、またMSに典型的な病変が検出される剖検または生検が唯一の決定的証拠であると述べる人もいるが、現在、2017年の時点で、この疾患の確定診断をもたらすことができる単一の検査（生検を含む）は存在しない。複数の報告により、MS患者の脳内にタウ病理が蓄積していることが新たに記載されており、このことから、この障害がタウオパチーであり得ること、およびタウ病理の進行性の蓄積が疾患の絶え間ない進行の根底にあり得ることが示唆される。

40

【0046】

いくつかの表現型（一般的に型と称される）または進行のパターンが記載されている。表現型は、将来の経過を予測する目的で、疾患の過去の経過を使用する。それらは、予後判定のみならず処置決定のためにも重要である。現在、米国国立多発性硬化症協会（Unite

50

d States National Multiple Sclerosis Society) および多発性硬化症国際連盟 (Multiple Sclerosis International Federation) は、MSの4つの型を記載している (2013年に改訂) :

臨床的に孤立した症候群 (CIS) ;

再発寛解型MS (RRMS) ;

一次性進行型MS (PPMS) ;

二次性進行型MS (SPMS)。

【0047】

再発寛解型MSは、予測不可能な再発と、その後の、疾患活動性の新たな徴候のない比較的平穏な数ヶ月～数年の期間 (寛解) を特徴とする。発作中に生じた欠陥は、消散するかまたは問題を残す場合があり、後者は発作の約40%で起こり、罹患期間が長いほど多く見られる。これは、MSを有する個体の80%の初期経過を表す。発作の間に欠陥が常に消散する場合、これは良性MSと称される場合もあるが、それでもなお長期的にはある程度の身体障害を蓄積することになる。一方、悪性多発性硬化症という用語は、短期間に顕著なレベルの身体障害に達したMSを有する人を表すために用いられる。再発寛解サブタイプは通常、臨床的に孤立した症候群 (CIS) から始まる。CISでは、脱髄を示唆する発作を起こすが、多発性硬化症の基準は満たさない。CISを経験した人の30～70%が、後にMSを発症する。

【0048】

一次性進行型MSは、個体のおよそ約10～20%で発症し、初期症状の後に寛解することはない。それは、発症してから身体障害が進行し、寛解および改善が全くないか、または時々でかつ軽微にすぎないことを特徴とする。一次性進行型サブタイプの通常の発症年齢は、再発寛解サブタイプよりも遅い。これは、再発寛解型MSにおいて二次性進行型が通常始まる年齢である40歳前後と類似している。

【0049】

二次性進行型MSは、初期の再発寛解型MSを有する人のおよそ約65%で発症し、そのような人は最終的には、いかなる明確な寛解期間も伴わずに、急性発作の間に進行性の神経学的衰退を有する。時々再発および軽微な寛解が現れる場合もある。発症と再発寛解型MSから二次性進行型MSへの移行との間の最も多く見られる期間は、19年である。

【0050】

その他の非標準型のMSも記載されている：これらには、デビック病または視神経脊髄炎 (NMO)、バロー同心円硬化症、シルダーびまん性硬化症、およびマールブルグ多発性硬化症が含まれる。それらがMS異型であるのか、または異なる疾患であるのかについては、議論がなされている。多発性硬化症は小児では挙動が異なり、進行期に到達するまでにより時間がかかる。それにもかかわらず、彼らはなお、成人が通常到達するのよりも低い平均年齢で進行期に到達する。

【0051】

多発性硬化症のための公知の治療法は存在しないが、いくつかの治療法が役立つことが判明している。治療の主要目的は、発作後に機能を戻し、新たな発作を予防し、かつ身体障害を防止することである。MRIで3つ以上の病変が見られた場合に、初回の発作後の人において薬物療法を開始することが一般的に推奨される。

【0052】

任意の医学的処置と同様に、MSの管理において使用される薬物治療にはいくつかの有害作用がある。裏付けとなる証拠が不足しているにもかかわらず、一部の人々は代替処置を追求する。

【0053】

症候性の発作時には、メチルプレドニソロンなどの静脈内副腎皮質ステロイドの高用量の投与が、通常の治療法であるが、経口副腎皮質ステロイドも同様の有効性および安全性プロファイルを有するようである。一般的に、副腎皮質ステロイド処置は、短期的には症状を緩和するのに効果的であるが、長期的な回復に有意な影響を及ぼさないようである。副

腎皮質ステロイドに反応しない重篤な発作の結果は、プラズマフェレーシスで処置可能である場合がある。

【0054】

2017年の時点で、再発寛解型多発性硬化症（RRMS）に対して、10種類の疾患修飾薬が規制当局により認可されている。それらは、インターフェロン-1a、インターフェロン-1b、グラチラマー酢酸塩、ミトキサントロン、ナタリズマブ、フィンゴリモド、テリフルノミド、フマル酸ジメチル、アレムツズマブ、およびオクレリズマブである。2012年時点でのそれらの費用対効果は不明である。2017年3月、FDAはヒト化抗CD20モノクローナル抗体であるオクレリズマブをRRMSの処置として認可し、いくつかの第IV相臨床試験を必要条件とした。

10

【0055】

RRMSでは、それらが発作の回数を減少させる効果は比較的小さい。インターフェロンおよびグラチラマー酢酸塩は第一選択処置であり、ほぼ等価であり、再発をおよそ30%減少させる。早期に開始した長期治療は安全であり、転帰を改善する。ナタリズマブは、第一選択剤よりも再発率を低下させる；しかしながら、有害作用の問題があるため、その他の処置に反応しないかまたは重篤な疾患を有する人に用意された第二選択剤である。ミトキサントロンは、重度の有害作用によりその使用が制限され、他の薬物療法に反応しない人に対する第三選択肢である。インターフェロンによる臨床的に孤立した症候群（CIS）の処置は、臨床的MSに進行する可能性を減少させる。小児におけるインターフェロンおよびグラチラマー酢酸塩の有効性は、成人のものとほぼ同等であると推定されている。フィンゴリモド、テリフルノミド、およびフマル酸ジメチルなどの、いくつかのより新しい作用物質の役割は、2011年時点ではまだ完全には明らかになっていない。

20

【0056】

2017年の時点で、リツキシマブは、RRMSおよび進行性の一次MSを処置するために適応外で広く使用された。2017年3月、FDAはオクレリズマブを一次性進行型MSの処置として認可したが、これはその認可を得た最初の薬物であり、いくつかの第IV相臨床試験を必要条件とした。

【0057】

2011年の時点で、唯一の薬物であるミトキサントロンが、二次性進行型MSに対して認可された。この集団において、暫定的な証拠により、ミトキサントロンが2年間にわたって疾患の進行を中程度に遅らせ、再発率を低下させることが支持される。

30

【0058】

疾患修飾処置にはいくつかの有害作用がある。最も一般的なものの1つは、グラチラマー酢酸塩およびインターフェロンの注射部位の刺激である（皮下注射で最大90%、および筋肉内注射で33%）。時間の経過とともに、脂肪萎縮として知られる脂肪組織の局所的な破壊による、注射部位の目に見えるへこみが生じる場合がある。インターフェロンは、インフルエンザ様の症状を生じ得る；グラチラマーを服用している一部の人は、紅潮、胸部圧迫感、心臓の動悸、および不安を伴う注射後反応を経験するが、それは通常30分未満しか持続しない。より危険であるがそれほど一般的でないのは、インターフェロンによる肝損傷、ミトキサントロンによる収縮不全（12%）、不妊症、および急性骨髄性白血病（0.8%）、ならびにナタリズマブによって起こる進行性多巣性白質脳症（処置を受けた600人に1人に起こる）である。

40

【0059】

フィンゴリモドは、高血圧および心拍数の低下、黄斑浮腫、肝酵素の上昇、またはリンパ球レベルの低下を引き起こし得る。暫定的な証拠により、テリフルノミドの短期的な安全性が支持され、一般的な副作用には、頭痛、疲労、吐き気、脱毛、および手足の痛みが含まれる。その使用による肝不全およびPMLの報告もあり、胎児の発育にとって危険である。フマル酸ジメチルの最も一般的な副作用は、紅潮および胃腸障害である。フマル酸ジメチルは白血球数の減少を引き起こし得るが、試験中に日和見感染の症例は報告されなかった。

50

【0060】

薬物療法および神経リハビリテーションのいずれも、一部の症状を改善することが示されているが、どちらも疾患の経過を変更するものではない。不安定膀胱および痙攣など、薬物療法によく反応する症状もあれば、ほとんど変化のない症状もある。神経学的問題については、生活の質を向上させるために、集学的なアプローチが重要である；しかしながら、異なる時点で多くの医療サービスが必要となる可能性があるため、「コアチーム」を特定することは困難である。集学的なリハビリテーションプログラムは、MSを有する人の活動および参加を高めるが、機能障害レベルには影響しない。個々の治療分野の全体的な有効性に関する証拠は限られているが、運動などの特定のアプローチおよび心理療法が効果的であるという十分な証拠がある。認知行動療法は、MSの疲労を軽減する効果が比較的小さいことが示されている。

10

【0061】

MSを有する人の50%超が補完代替医療を使用している可能性があるが、その割合は、代替医療がどのように定義されるかによって異なる。大部分の症例におけるそのような処置の有効性の証拠は、弱いかまたは存在しない。MSを有する人が使用している、利点が証明されていない処置には、栄養補助食品およびレジメン、ビタミンD、ヨガなどのリラクゼーション法、生薬（医療用大麻を含む）、高圧酸素療法、鉤虫による自己感染、リフレクソロジー、鍼治療、およびマインドフルネスが含まれる。使用者の特徴に関して、使用者は女性の頻度が高く、長期間MSを有し、より身体障害がある傾向があり、および従来医療に対する満足度が低い。

20

【0062】

この疾患の予測される将来の経過は、疾患のサブタイプ；個体の性別、年齢、および初期症状；ならびにその人が有する身体障害の程度に依存する。女性であること、再発寛解型サブタイプであること、発症時に視神経炎または感覚症状があること、初期年に発作が少ないこと、および特に発症時に若年例であることが、より良好な経過と関連している。

【0063】

平均余命は疾患の開始から30年であり、非罹患者のものより5~10年短い。MSを有する人のほぼ40%は、70歳代に到達する。それにもかかわらず、死亡の3分の2はこの疾患の結果に直接関連している。自殺が多い一方で、感染症およびその他の合併症は、より身体障害がある人にとって特に危険である。大部分の人が死亡する前に歩行能力を失うが、発症から10年で90%および15年で75%が、自立歩行可能である。

30

【0064】

C. 前頭側頭型認知症

前頭側頭型認知症（FTD）は、以前は脱抑制-認知症-パーキンソニズム-筋委縮症複合（DDPAC）として知られていたもので、重度の前頭側頭葉変性を特徴とする神経変性疾患である。本障害は、1994年にKirk Wilhelmsenらによって初めて同定され、彼らは、それがアミロイド斑、神経原線維変化、またはレビー小体を伴って現れないという事実に基づいて、それをアルツハイマー病およびレビー小体型認知症と区別した。FTDは、アルツハイマー病（AD）に次ぐ有病率で、初老期認知症症例の20%を占める。症状は、性別を問わず、平均して45~65歳頃に現れ始め得る。最も一般的な症状には、社会的および個人的な行動の著しい変化、ならびに全般的な感情の鈍化が含まれる。症状は急速で着実な速度で進行する。本疾患に罹患している患者は、2~10年生存することができる。最終的には、患者は、日常的な機能のために24時間の介護を必要とするようになる。FTDは若年層（すなわち、40代または50代）で発症する機会が多いため、家族にも深刻な影響を与え得る。患者には、まだ、家に住んでいる子供がいる場合が多い。経済的にも、本疾患は、人生の中で大抵は最も賃金所得の高い時期に発症するため、壊滅的となり得る。現在、FTDの治療法は存在しない。行動上の症状を管理するための処置は利用可能である。脱抑制および強迫行動は、選択的セロトニン再取り込み阻害剤（SSRI）によって制御することができる。アルツハイマー病とFTDではある種の症状が共通しているが、FTDではコリン作動系が影響を受けていないため、それらを同じ薬理学的作用物質で処置す

40

50

ることはできない。

【0065】

FTDは、関連する症状が不均一であるため、伝統的に診断が難しい。症状は、前頭葉および側頭葉の機能に基づいて3つの群に分類される。行動障害型FTD (bvFTD) は、一方では嗜眠および自発性喪失の症状を示し、他方では脱抑制の症状を示す。無気力な患者は、社会から離脱し、一日中寝ているか、またはもはや自分の身の回りの世話をしなくなる場合がある。脱抑制をきたした患者は、不適切な(時には性的な)発言をし得るか、または不適切な行為をし得る。FTD患者は、窃盗またはスピード違反などの不適切な行動により、時には法に触れる問題を起こし得る。最近の知見により、おそらくは側頭辺縁系の関与が限られているために、FTDでは精神病症状は稀であることが示されている。FTD患者のうち、およそ2%が妄想を呈し、時には偏執的思考を伴う。幻覚は稀である。これらの精神病症状の有病率は、およそ20%が妄想および偏執症を呈するAD患者で見られるものよりも著しく低い。進行性非流暢性失語症(PNFA)は、構音障害、音韻および/または構文の誤りによる発話流暢性の破たんを呈するが、言葉の理解は保たれる。意味性認知症(SD)は、正常な音韻および構文を用いて流暢性を保つが、呼称および言葉の理解が次第に困難になる一部の患者において見出され得る。中にはうつ病になり、抑制が効かなくなり、反社会的な行動さえ示す人もいと、研究されている。

10

【0066】

FTD患者は、むちゃ食いおよび強迫行動に悩まされる傾向がある。これらのむちゃ食い習慣は、過食、食べ物の詰め込み、食嗜好の変化(甘いもの、炭水化物への欲求)、食べられない物を食べる、および他人の食べ物を奪うなどの異常な摂食行動を伴う場合が多い。最近の知見により、FTDにおける摂食変化に関与する神経構造には、構造MRIボクセル単位形態計測(右半球)における右腹側島皮質、線条体、および眼窩前頭皮質の萎縮が含まれることが示されている。

20

【0067】

実行機能とは、計画を立てて整理する認知スキルである。大部分のFTD患者は、複雑な計画または順序付けを必要とするスキルを実行できなくなる。特徴的な認知機能障害に加えて、前頭葉解放徴候として知られるいくつかの原始反射が誘発され得る場合が多い。通常、これらの前頭葉解放徴候のうち最初に現れるのは手掌頤反射であり、これは疾患経過の比較的早期に現れ、一方で手掌把握反射および探索反射は疾患経過の後期に現れる。FTD患者の以下の能力は維持される: 知覚、空間能力、記憶、実行。FTD患者の以下の能力は影響を受ける: 社会的行動/行為、感情の制御、集中力、使用行動(患者が視界に入る物を掴み、誤ったタイミングで正しい行動を取り始める神経行動障害)、および不適切な発話/行為。

30

【0068】

稀に、FTDは、運動ニューロン疾患(MND)(典型的には筋萎縮性側索硬化症)を有する患者で発症し得る。MNDを有する人の予後は、FTDを併発すると悪化し、生存期間が約1年短くなる。現在、前頭側頭型認知症の病理学的根拠に目を向けて、いくつかの症例シリーズが発表されている。前頭側頭葉変性症(FTLD)に関連する他の症候群と同様に、いくつかの異なる病理がFTDと関連している:

40

タウ病理: 健常個体では、タウタンパク質は、細胞骨格の主要構成要素である微小管を安定化させる。例には、現在はFTLD-タウとも称されるピック病、ならびにFTDP-17、大脳皮質基底核変性症、および進行性核上性麻痺を含むその他のタウ陽性病理が含まれる。FTD症例のおよそ50%が、死後にタウ病理を呈する。

TDP-43病理: この病型は以前、運動ニューロン変性を伴うおよび伴わない、ユビキチン陽性、タウおよびシヌクレイン陰性の封入体を伴う認知症として記載されていた。FTLD-TDP43はFTD(±MND)のおよそ40%を占める。

FUS病理: FUS病理が根底にある症例は行動障害型FTD(bvFTD)を呈する傾向があるが、この相関関係は、死後の病理を予測するのに十分な信頼性があるわけでは決していない。FTLD-FUSは、臨床的に診断されたFTDの5~10%を占めるにすぎない。

50

【0069】

特徴的組織像を欠く認知症 (DLHD) は稀な実体であり、死後に上記のいずれとも確実に診断できないFTDの残りのわずかな割合を占める。

【0070】

稀な症例において、臨床的FTDの患者が、剖検でアルツハイマー病と一致する変化を有することが判明した。証拠により、FTDは、ヒト、類人猿、およびクジラの脳でのみ見出されているニューロンの一種である紡錘形ニューロンを選択的に損なうことが示唆される。微量栄養素である葉酸およびB12の欠乏は、FTDを有する個体の認知機能障害と関連づけられている。慢性的な葉酸の欠乏はまた大脳萎縮症にも関係づけられており、神経学的機能障害を引き起こす。

10

【0071】

構造MRIスキャンでは、前頭葉および/または前部側頭葉の萎縮が明らかになる場合が多いが、初期の症例ではスキャンが正常に見える場合もある。萎縮は、両側性または非対称性のいずれかであり得る。異なる時点(例えば、1年後)の画像を登録することで、通常であれば(個々の時点で)正常と報告されるかもしれない萎縮の証拠を示すことができる。多くの研究グループが、FTD患者に早期診断を提供することを目指して、磁気共鳴分光法、機能画像化、および皮質厚測定などの技法を使用し始めている。フッ素18-フルオロデオキシグルコース陽電子放出断層撮影 (FDG-PET) スキャンでは古典的に、前頭部および/または前側頭部の代謝低下が示され、これは本疾患をアルツハイマー病と区別するのに役立つ。アルツハイマー病のPETスキャンでは古典的に、両側頭頂部の代謝低下が示される。前頭側頭型認知症は、社会的認知または「心の理論」に照らして論じられる前頭内側のネットワークに主に影響を及ぼすことが、画像診断法に基づくメタ解析で示されている。これは、認知神経心理学的な証拠に基づいて、行動障害型の前頭側頭型変性症の経過の初期に、腹内側前頭前皮質が機能障害の主要な部位であるという考えと完全に一致する。言語サブタイプの前頭側頭葉変性症(意味性認知症および進行性非流暢性失語症)は、インピボでの画像化アプローチによって領域的に分離することができる。

20

【0072】

アルツハイマー病とFTDの混同は、それらの初期症状の類似性から正当化できる。患者は、動作およびその他の運動課題に困難をきたすことはない。FTDの症状が現れるにつれて、アルツハイマー病とFTDの診断を区別することが難しくなる。2つの認知症の行動症状および感情症状には明確な違いがあり、特筆すべきは、FTD患者では感情の鈍化が見られる。FTDの初期段階では、不安および抑うつが一般的であり、これが曖昧な診断をもたらし得る。しかしながら、時間の経過とともに、この認知症が進行し、FTDに特有の感情鈍麻の決定的な症状が現れ始めるにつれて、このような曖昧さは消えていく。

30

【0073】

[¹⁸F]FDDNP陽電子放出断層撮影を用いる、前頭側頭型認知症におけるタウ凝集のインピボ脳画像診断は、より視覚的であり、前頭側頭型認知症をより深く理解する能力を高めている。アルツハイマー病 (AD) 脳標本の以前の蛍光顕微鏡検査により、[¹⁸F]FDDNPがニューロン間の神経原線維変化 (NFT) を良好に可視化することが示されている。[¹⁸F]FDDNP-PET画像の視覚画像では、ADにおける顕著な側頭部シグナルと比較して、FTDにおける前頭部シグナルが強調された。[¹⁸F]FDDNP-PETにより、患者におけるタウオパチーの可視化の強化が可能になった。これは、FTDと、ADにおける頭頂部および側頭部のシグナルを区別することに役立っている。さらに、[¹⁸F]FDDNPがインピボでタウオパチーと見なす能力は、NFTの蓄積を除去する治療法の効果をモニターするためのツールとなる。数年にわたる最近の研究で、行動障害型前頭側頭型認知症 (bvFTD) の新たな診断基準が策定された。6つの明確な臨床的特徴が、bvFTDの症状として同定された：

40

脱抑制；

感情鈍麻 / 無気力；

思いやり / 共感の欠如；

50

固執 / 強迫行動 ;
口唇傾向 ;
実行機能障害の神経心理学的プロフィール。

【 0 0 7 4 】

bvFTDの可能性があると診断するには、6つの特徴のうち3つが患者に存在する必要がある。標準的なFTDと同様に、一次診断は、画像診断ではなく、関連する症状を特定する臨床試験に由来する。上記の基準は、bvFTDをアルツハイマー病およびその他の原因の認知症などの障害と区別するために用いられる。加えて、新基準により、存在する症状の数に基づいて、bvFTDの可能性が、bvFTDの可能性が高いこと、および確実なbvFTD、を区別する診断階層が可能になる。

10

【 0 0 7 5 】

FTD症例は、アルツハイマー病のようなより一般的な神経変性疾患よりも、家族性の要素を有する割合が高いようである。常にますます多くの変異および遺伝子変種が同定されているため、遺伝的影響のリストは着実に更新する必要がある。パーキンソニズムを伴うタウ陽性前頭側頭型認知症 (FTDP-17) は、タウタンパク質をコードする第17染色体上のMAPT遺伝子の変異によって生じる。タウ変異の種類と遺伝子変異の神経病理との間には直接的な関係があることが判明している。タウのエクソン10のスプライスジャンクションに変異があると、ニューロンおよびグリアに反復性タウが選択的に沈着する。タウの他所の変異に関連した病理学的表現型は予測しにくく、典型的な神経原線維変化 (3回繰り返しおよび4回繰り返しのタウの両方からなる) ならびにピック嗜銀球 (3回繰り返しのタウのみからなる) の両方が記載されている。グリア内のタウ沈着の存在もまた、エクソン10以外の変異を有する家系で可変的である。この疾患は現在、非公式にFTDP-17 Tと称されている。FTDは第17染色体上のタウ遺伝子座の領域との関連を示すが、第17染色体上の互いのメガベース内に、FTDを引き起こす2つの遺伝子座が存在すると考えられている。FTLD-TDP43によって起こるFTDには、数多くの遺伝的原因がある。一部の症例は、同様に第17染色体上に位置するGRN遺伝子の変異に起因する。他のものはVCP変異によって起こるが、これらの患者は、封入体ミオパチー、骨パジェット病、およびFTDの複雑な混合を呈する。ごく最近リストに追加されたのは、C90RF72のプロモーター領域におけるヘキサヌクレオチド反復伸長である。臨床的に純粋なFTD (MNDを伴わないFTD) において、TARDBP (TDP-43遺伝子) 変異を記載した症例は、1~2例しか報告されていない。

20

30

【 0 0 7 6 】

D. 進行性核上性麻痺

進行性核上性麻痺 (PSP; または1963年にこれを記載した医師の名前にちなんでステール・リチャードソン・オルゼウスキー症候群) は、脳の特定の容積が徐々に悪化し、死滅していく変性疾患である。男性も女性もほぼ等しく発症し、人種的、地理的、または職業的な偏りはない。人口100,000万人当たりおよそ6人がPSPを有する。これはタウオパチーと言われている。現在のところPSPには効果的な処置または治療法はないが、症状のいくつかは非特異的な処置に反応し得る。症状発症時の平均年齢は63歳であり、発症からの生存期間は平均7年であるが、大きなばらつきがある。死因としては、肺炎が多い。

40

【 0 0 7 7 】

3分の2の症例における初期症状は、バランスの喪失、移動時の突進、速歩、物体または人への衝突、および転倒である。その他の一般的な初期症状は、人格の変化、全般的な動作緩慢、および視覚症状である。後期の症状および徴候は、認知症 (典型的には抑制および情報整理能力の喪失を含む)、不明瞭な発語、嚥下困難、および特に垂直方向の眼球運動障害である。後者は、これらの患者が上または下を見ることができないために経験する転倒の一部の原因となる。その他の徴候のいくつかは、眼瞼機能不全、顔面筋の拘縮、首の筋肉硬直を伴う頭部の後屈、睡眠障害、尿失禁、および便秘である。

【 0 0 7 8 】

50

この障害の診断では、視覚症状が特に重要である。患者は典型的に、下をよく見ることができないために読書が困難であると訴える。特筆すべきは、これらの患者が経験する眼麻痺は、随意眼球運動、および垂直方向のサッカードを行うことができないことに主に関係しており、下向きのサッカードにおいて悪い場合が多い。患者は、下を向くことが困難になり（下方注視麻痺）、その後、上方注視麻痺が加わる傾向がある。この垂直方向の注視不全麻痺は、試験者が頭位変換眼球反射の検査の一環として患者の頭を受動的に上下させると修正される。例えば、ベル現象によって誘発されるような不随意眼球運動は、正常に近い可能性がある。詳しく調べてみると、患者が遠くを見た時に、「矩形波眼球運動」と称される眼球運動が見られる場合がある。これは、滑動相がなく本質的に衝動性であることを除けば、眼振と間違えられ得る微細運動である。健常個体も矩形波眼球運動を生じるが、PSP患者はよりゆっくりとした矩形波眼球運動を生じ、垂直方向の成分がより小さい。これらの矩形波眼球運動および垂直方向のサッカードの減少を評価することは、進行性核上性麻痺の診断に特に有用であるが、それは、これらの動きによってPSP患者がその他のパーキンソニズム患者と区別されるからである。本のページのような何か近くの物に焦点を合わせた際に目が寄ってしまう輻輳障害（輻輳不全）は、典型的である。近距離では両眼が協力して焦点を合わせるのが難しいため、患者は読書時に二重視（複視）を訴える場合がある。

10

【0079】

主要な徴候には、核上性眼筋麻痺、頸部ジストニア、パーキンソニズム、仮性球麻痺、行動および認知障害、平衡失調および歩行障害、ならびに頻繁な転倒が含まれる。

20

【0080】

PSPの原因は不明である。PSPを有する人のうち、同じ障害を有する家族がいるのは1%未満である。第17染色体上に位置する、H1ハプロタイプと称されるタウタンパク質の遺伝子の変種が、PSPと関連づけられている。PSPを有するほぼすべての人が、それぞれの親からその変種のコピーを受け取っているが、これは一般人口の約3分の2に当てはまる。したがって、H1ハプロタイプは、PSPを引き起こすのに必要ではあるが十分ではないと考えられる。PSPの原因に寄与する可能性があるものとして、他の遺伝子および環境毒素が研究されている。

【0081】

影響を受ける脳細胞は、ニューロンおよびグリア細胞の両方である。ニューロンは、脳細胞の内部構造骨格の正常な部分であるタウタンパク質の凝集塊である神経原線維変化を示す。これらのもつれは、アルツハイマー病で見られるものとは異なる場合が多いが、大脳皮質で生じた場合には構造的に類似している可能性がある。しかしながら、それらの化学組成は通常異なり、大脳皮質基底核変性症で見られるもつれのものとは類似している。アストロサイトにおけるタウタンパク質の房または房状アストロサイトもまた、診断に役立つと考えられる。球状のNFTとは異なり、それらは大脳皮質により広範囲に及んでいる場合がある。一部の症例ではレビー小体が認められるが、これが異型であるのか、または独立した併発過程であるのかは明らかではなく、一部の症例では、PSPは、特に高齢患者において、大脳皮質基底核変性症、パーキンソン病および/またはアルツハイマー病と併発し得る。

30

40

【0082】

影響を受ける脳の主な領域は以下の通りである：
 大脳基底核、特に視床下核、黒質、および淡蒼球；
 脳幹、特に「核上性」眼球運動が存在する中脳の部分；
 大脳皮質、特に前頭葉の大脳皮質；
 小脳の歯状核；
 脊髄、特に膀胱および腸の一部の制御が存在する領域。

【0083】

PSP、大脳皮質基底核変性症、および前頭側頭型認知症を、同じ疾患の変形であると見なす人もいる。それらを別々の疾患であると見なす人もいる。PSPは時折ピック病と併発す

50

ることが示されている。

【0084】

MRIを行ってPSPを診断する場合が多い。MRIは中脳の萎縮と脳橋の維持を示し、「ハチドリ」サインの所見および「ミッキーマウス」サインをもたらす場合がある。PSPは、動作緩慢および歩行困難からパーキンソン病として、または行動変化からアルツハイマー病として誤診される場合が多い。PSPは、まとめてパーキンソンプラス症候群と称されるいくつかの疾患のうちの一つである。対称的な発症と共にレボドパに対する反応不良は、この疾患をPDと区別するのに役立つ。また、リチャードソン異型を有する患者は、他のパーキンソニズム障害の前かがみの姿勢とは対照的に、直立のまたは背中を反らす姿勢をとる傾向があるが、PSP-パーキンソニズム（以下を参照されたい）は前かがみの姿勢を示し得る。特にリチャードソン症候群では、早期の転倒が特徴的である。

10

【0085】

PSPには公知の治療法はなく、管理が主な支援となる。PSP症例は、古典型であるPSP-リチャードソンと、レボドパに対する短期反応が得られ得るPSP-パーキンソニズムの2つのサブグループに分けられる場合が多い。ジスキネジアは、時折見られるが稀な、処置による合併症である。アマンタジンもまた、有用となる場合がある。数年後、パーキンソニアン異型はリチャードソン特性を帯びる傾向がある。その他の異型も記載されている。頸部ジストニアおよび眼瞼痙攣の処置にBotoxを使用することができるが、これは嚥下障害を悪化させ得る。

【0086】

研究により、リバスチグミンが認知的局面に役立つ可能性があることが示唆されているが、両研究の著者は、より多くの標本抽出を使用することを提案している。催眠薬ゾルピデムは運動機能および眼球運動を改善する可能性があるといういくつかの証拠があるが、小規模な研究によるにすぎない。

20

【0087】

PSP患者は通常、作業療法、運動性言語変化のため、典型的には痙攣性失調性構音障害のための音声言語病理学、ならびに頻繁な転倒の報告がある平衡および歩行障害のための理学療法を求めるか、または紹介される。PSPにおけるリハビリテーションへの、根拠に基づくアプローチが不足しており、現在、この主題に関する研究の大半は、少数の患者のみを対象とする症例報告からなる。

30

【0088】

PSP患者に対するリハビリテーションプログラムの症例報告には、一般的に、四肢協調活動、傾斜板バランス、歩行訓練、漸増抵抗運動および等速運動による筋力トレーニング、ならびに首の筋肉のストレッチが含まれる。理学療法によってPSP患者のバランスおよび歩行が改善されることが、いくつかの症例報告により示唆されているが、各症例報告は1人または2人の患者しか追跡していないため、結果をすべてのPSP患者に一般化することはできない。しかしながら、これらの症例研究から得られた知見は、PSPの管理におけるバランスおよび歩行訓練プログラムの有効性に関する今後の研究の誘導を支援する上で、有用であり得る。

【0089】

PSPを有する個体は、状態管理の支援のため、および自立向上の支援のために、作業療法士に紹介されることがよくある。これには、移動補助具の使用法の指導が含まれ得る。後方に転倒する傾向があるため、杖よりも、歩行器、特に前に体重をかけられる歩行器の使用が推奨される。適切な移動補助具の使用は、個体の転倒リスクを軽減し、彼らが地域社会でより安全に自立して歩行するのに役立つ。平衡障害および不規則運動のために、個体は、自宅および地域社会での安全な移動方法の学習に時間を費やすことが必要になる。これには、安全に椅子から立ち上がり椅子に座ることも含まれ得る。

40

【0090】

この疾患は進行性の性質であるため、すべての個体が最終的には歩行能力を失い、車椅子の使用まで進行せざるを得ない。重度の嚥下障害が後に続いて起こる場合が多く、この時

50

点で死は数ヶ月のうちである。

【0091】

E. 大脳皮質基底核変性症

大脳皮質基底核神経節変性症 (CBgD) または大脳皮質基底核神経節変性症 (CBGD) は、大脳皮質および大脳基底核を侵す稀な進行性神経変性疾患である。CBgD症状は典型的には50~70歳の人で発現し、平均罹患期間は6年である。これは顕著な運動障害および認知機能障害を特徴とし、パーキンソンプラス症候群の1つに分類される。CBgDの症状は、パーキンソン病 (PD)、進行性核上性麻痺 (PSP)、およびレビー小体型認知症 (DLB) などの他の障害の症状と類似している場合が多いので、臨床診断は困難である。CBgDには様々な臨床像が付随するため、最終的な診断は神経病理学的検査によってのみ行われ得る。

10

【0092】

CBgDは進行性であるため、疾患の進行に重点を置いた標準的な一組の診断基準を用いることができる。これらの基本的な特徴には、皮質処理障害、大脳基底核の機能障害、および突然の有害な発症が含まれる。精神的機能障害および認知機能障害は、CBgDに見られるものの、有病率ははるかに低く、本疾患の存在を示す一般的な指標としては確立されていない。

【0093】

CBgDを示す人に最も多く見られる症状の種類いくつかは、特定可能な運動障害および皮質処理障害に関係する。これらの症状は、本疾患の存在を示す最初の指標である。付随する運動合併症はそれぞれ、典型的には非対称的に現れ、症状は全身に均一に認められるわけではない。例えば、片方の手にエイリアンハンド症候群(後に説明される)を示す人は、対応して反対側の手足に同じ症状を示すことはない。CBgDに付随する主たる運動障害および大脳皮質機能障害には、パーキンソニズム、エイリアンハンド症候群、失行症(観念運動失行および肢節運動失行)、ならびに失語症が含まれる。

20

【0094】

CBgDの臨床症状としてパーキンソニズムが存在することは、本疾患に対する独自の診断基準の作成を複雑にしている大きな原因である。パーキンソニズムが不可欠な診断特性を形成する他のそのような疾患は、PDおよびPSPである。CBgDにおけるパーキンソニズムは、主に腕などの四肢に見られ、常に非対称性である。非利き腕がより頻繁に影響を受けることが示唆されている。パーキンソニズムを構成する一般的な関連運動機能障害は、硬直、動作緩慢、および歩行障害であり、CBgDでは四肢硬直がパーキンソニズムの最も典型的な徴候を形成する。この硬直は、比較的不明瞭であるにもかかわらず、歩行および相関運動の障害を引き起こし得る。CBgDにおける動作緩慢は、四肢のある特定の運動の完了が顕著に遅れる場合に生じる。関連する研究において、初診から3年後に、CBgDを有する人の71%が動作緩慢の存在を示すことが判明した。

30

【0095】

エイリアンハンド症候群は、CBgDと診断された人のおよそ60%に見られることが示されている。この障害は、個体が自分の手の動きを制御することができず、その結果、手足が「異物」であるという感覚が生じることを伴う。異質な手足の動きは、外部刺激に対する反応であり、散発的にまたは刺激なしに起こるものではない。異質な手足の存在は、CBgDでは明確な所見を有し、診断された個体は「触覚mitgehen」を有する場合がある。このmitgehen(「一緒に行く」を意味するドイツ語)は、CBgDに比較的特有であり、実験者の手と対象の手の両方が直接接触している時に、実験者の手を対象の手が積極的に追いかけることを伴う。CBgDでは、別のより稀な形態のエイリアンハンド症候群も認められており、この場合には、個体の手が外部刺激に対する回避反応を示す。加えて、手足のしびれまたはチクチクする感覚を通じて明らかになる感覚障害もまた、エイリアンハンド症候群と同時に生じる場合があり、どちらの症状も大脳皮質機能障害を示す。ほとんどの運動障害と同様に、エイリアンハンド症候群もまた、CBgDと診断された人に非対称的に現れる。

40

50

【0096】

観念運動失行 (IMA) は、CBgDにおいて明らかに現れるが、本障害を呈する個体には動作緩慢および硬直がさらに存在するため、非定型的に現れる場合が多い。CBgDにおけるIMA症状は、目的の実施を伴うかまたは伴わないかの両方で、特定の動作 (意味のあるものであるか、または思い付きのものであるかを問わず) を反復または模倣ができないことを特徴とする。このような形態のIMAは手および腕に見られ、一方で下肢のIMAは歩行障害を引き起こし得る。CBgDを有する人でIMAを呈する人は、足が床に固定されたように見え得るため、歩行を開始するのが困難であるように見え得る。これは、つまずきおよびバランス維持の困難を引き起こし得る。IMAは、運動前野、頭頂連合野、連結白質路、視床、および大脳基底核の劣化と関連している。CBgDを有する一部の個体は肢節運動失行を呈し、これは、手および指で行われる場合の多い、より細かい運動動作の機能障害を伴う。

10

【0097】

CBgDにおける失語症は、話すことができないこと、または会話を始めることが困難であることを通じて明らかになり、非流暢性 (流暢性 (fluent) または流暢性 (flowing) とは対照的に) サブタイプの障害に該当する。これは、構音障害などの発話障害に関連している可能性があり、したがって真の失語症ではない、というのも、失語症は、単語を引き出すことまたは単語をつなぎ合わせて意味のある文章を形成することが困難であるなど、言語機能の変化に関連しているからである。CBgDにおける発話および/または言語障害は、途切れた話し方および単語の省略を生じる。CBgDのこの症状を有する個体は、疾患の進行に伴い、話す能力を失う場合が多い。

20

【0098】

CBgDに伴う精神的問題は、本疾患の衰弱性症状の結果として現れる場合が多い。CBgDを有する個体で言及される顕著な精神状態および認知状態には、認知症、うつ病、および易怒性が含まれ、認知症は、CBgDの、アルツハイマー病 (AD) などの別の認知障害としての誤診を時として招く重要な特徴を形成する。前頭側頭型認知症は、初期の特徴であり得る。

【0099】

CBgDと関連した神経病理学的所見には、脳内のアストロサイトの異常、およびタンパク質タウの不適切な蓄積 (タウオパチーと称される) の存在が含まれる。CBgDと診断された個体の脳を死後に組織学的に検査すると、局所領域のアストロサイトを伴う独特の特徴が明らかになる。これらのアストログリア封入体の同定に用いられる典型的な手順は、ガリアス・ブランク染色法である。この過程は、タウタンパク質およびアストログリア封入体の異常を示す銀染色材料に組織試料を曝露する段階を伴う。CBgDにおけるアストログリア封入体はアストロサイト斑として同定され、これは、アストロサイトからのぼやけた突起の環状表示として現れる。最近の研究により、CBgDが、前頭葉の前方部分および大脳皮質の運動前野領域に高密度のアストロサイト斑を生じることが示された。

30

【0100】

タンパク質タウは、重要な微小管関連タンパク質 (MAP) であり、典型的にはニューロンの軸索に見出される。しかしながら、このタンパク質の発達が正常に機能しないと、アストロサイトおよびグリア細胞において不自然な高レベルの発現が起こり得る。結果として、これは、組織学的なCBgD検査において顕著に認められるアストロサイト斑の原因となる場合が多い。それらは、CBgDなどの神経変性疾患において重要な役割を果たすことが理解されているが、その正確な作用は謎のままである。

40

【0101】

CBgDに関連する最も重大な問題の1つは、CBgDに関連する症状を示している個体が生存している間に確定診断を行うことができないことである。CBgDの臨床診断は、疾患と関連する症状に主に焦点を当てた既定の診断基準に基づいて行われる。しかしながら、これらの症状は多くの他の神経変性疾患と重複するが多いため、臨床診断はしばしば複雑になる。頻繁には、重複しない特有の症状に基づいて他の疾患を排除する、CBgDの鑑

50

別診断が行われる。しかしながら、この過程で用いられるCBgDの症状のいくつかは本疾患に稀であり、したがって常に鑑別診断を用いることができるというわけではない。

【0102】

死後診断は、CBgDの存在を示す唯一の真の指標をもたらす。これらの診断の大部分は、アストログリア封入体および同時に起こるタウオパチーの存在を同定するのに効果的なガリアス・ブランク染色法を利用している。

【0103】

進行性核上性麻痺（PSP）はしばしば、CBgDと最も頻繁に混同される疾患である。PSPとCBgDはどちらも類似の症状をもたらし、どちらも組織学的検査でタウオパチーを呈する。しかしながら、CBgDの結果として見出されるドーナツ状のアストロサイト斑とは対照的に、PSPにおけるタウオパチーは房状のアストロサイトを生じることが認められている。

10

【0104】

PDと診断された個体は、CBgDと診断された個体と同様の運動機能障害を示す場合が多く、これによってその診断がさらに複雑になる。アルツハイマー病（AD）、レビー小体型認知症（DLB）、および前頭側頭型認知症（FTD）を含むいくつかの他の神経変性疾患もまた、CBgDとの共通性を示す。

【0105】

F. 慢性外傷性脳症

慢性外傷性脳症（CTE）は、以前は「拳闘家認知症」として知られていたもので、複数回の頭部外傷を受けた人に見られる神経変性疾患である。症状には、行動障害、気分障害、および思考障害が含まれ得る。これは典型的には、受傷後数年たってから発症する。これは時間の経過とともに悪化する場合が多く、認知症を引き起こし得る。自殺のリスクが変化するかどうかは不明である。

20

【0106】

記録されている大部分の症例は、ボクシング、アメリカンフットボール、レスリング、アイスホッケー、ラグビー、およびサッカーなどのコンタクトスポーツに参加している運動選手で発生している。その他のリスク因子には、軍隊への所属、過去の家庭内暴力、およびヘッドバンギングの繰り返しが含まれる。この状態が起こるのに必要な外傷の正確な量は不明である。確定診断は、剖検時にのみ行われ得る。これはタウオパチーの一種である。

30

【0107】

2018年の時点で、特定の処置はない。罹患率は、複数回の頭部外傷の既往がある人のうち約30%であることが判明している。しかしながら、母比率は不明である。頭部外傷の繰り返しの結果としての脳損傷に関する研究は1920年代に始まり、当時はこの状態は拳闘家認知症または「パンチドランク症候群」として知られていた。予防の手段として、一部のスポーツでのルール変更が検討されている。

【0108】

CTEの症状は、4段階で発現し、一般的には、運動選手が軽度の外傷性脳損傷を繰り返し経験してから8～10年後に現れる。

40

【0109】

第1段階の症状には、注意欠陥多動性障害、ならびに混乱、見当識障害、めまい、および頭痛が含まれる。第2段階の症状には、記憶消失、社会的不安定性、衝動行動、および判断力の低下が含まれる。第3および第4段階には、進行性認知症、運動障害、仮面様顔貌、発話障害、感覚処理障害、振戦、回転性めまい、難聴、うつ病、および自殺傾向が含まれる。

【0110】

さらなる症状には、構音障害、嚥下障害、健忘症などの認知障害、および眼瞼下垂などの眼球異常が含まれる。

【0111】

50

この状態は、認知症、もしくは知能の低下、記憶障害、自力で短時間歩けないほどのめまい発作もしくはバランスの欠如、および/またはパーキンソンニズム、もしくは振戦および協調の欠如として現れる。これはまた、発話障害および不安定歩行をもたらし得る。CTE患者は、不適切な行動または爆発的な行動を起こしやすい可能性があり、病的な嫉妬または偏執症を示し得る。

【0112】

CTEの神経病理学的所見は、アルツハイマー病などの他のタウオパチーとは区別される。観察可能なCTE障害の4つの臨床段階は、脳組織のタウ病理と相関しており、その重症度は、前頭新皮質における神経原線維変化の限局的な血管周囲の発生場所から、広範な脳領域に影響を及ぼす重度のタウオパチーにまで及ぶ。

10

【0113】

CTEの主要な身体的徴候には、前頭および側頭皮質ならびに内側側頭葉の萎縮に伴う脳重量の減少が含まれる。側脳室および第三脳室は拡大する 경우가多く、第四脳室の拡張は稀な事例である。CTEのその他の身体的徴候には、前方透明中隔腔および後方窓形成、黒質および青斑核の蒼白、ならびに嗅球、視床、乳頭体、脳幹、および小脳の萎縮が含まれる。CTEが進行するにつれて、海馬、嗅内皮質、および扁桃体の顕著な萎縮が存在し得る。

【0114】

微視的スケールでは、病理には、ニューロンの減少、タウの沈着、TAR DNA結合タンパク質43 (TDP 43) の沈着、白質変化、および他の異常が含まれる。タウの沈着は、高密度の神経原線維変化 (NFT)、神経突起、ならびにアストロサイトおよび他のグリア細胞で構成されるグリアのもつれとして起こる。アミロイド沈着は、CTEの比較的珍しい特徴である。

20

【0115】

CTEを有する個体の小集団は、運動ニューロン疾患の症状を特徴とし、かつ筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に似た症状を呈する慢性外傷性脳筋症 (CTEM) を有する。進行性の筋力低下ならびに平衡および歩行障害 (gait problem) (歩行障害 (problem with walking)) が、CTEMの初期徴候であると考えられる。

【0116】

脳によって生成されたエクソソーム小胞は、CTEを含むTBIの潜在的バイオマーカーである。CTEの1つのサブタイプは、拳闘家認知症またはボクサー認知症 (ラテン語のpugilator ボクサーに由来) であり、それが当初、ボクシング歴のある人に見られたことによるもので、「パンチドランク症候群」とも称される。

30

【0117】

ニューロンの減少、脳組織の瘢痕化、タンパク質性老人斑の集積、水頭症、脳梁の減弱、びまん性軸索損傷、神経原線維変化、および小脳への損傷が、この症候群に関係している。この状態は、病因学的にアルツハイマー病と関連している可能性がある。神経原線維変化が拳闘家認知症患者の脳において見出されているが、アルツハイマー病を有する人において通常見出されるものとは分布が同じではない。あるグループが、軽度の外傷性脳損傷を複数回受けた患者由来の脳の切片を調べたところ、細胞の細胞骨格の変化が見出され、これが脳血管の損傷に起因し得ることが示唆された。

40

【0118】

脳震盪および脳震盪以下の打撃への曝露増加が、最も重要なリスク因子と見なされ、それは、総試合数、ノックアウト負けの回数、キャリアの長さ、試合の頻度、引退年齢、およびボクシングスタイルに依存し得る。

【0119】

現在のところ、CTEは、完全なおよび免疫組織化学的な脳の解析を含む、死後の直接的な組織検査によってのみ確定診断され得る。

【0120】

CTEの明確なバイオマーカーを示すためのインピボ技法が欠如していることが、生存中

50

にCTEを現在診断できないことの理由である。CTEの唯一の公知の診断は、死後の脳組織を調べることによって行われる。脳震盪は非構造的損傷であり、脳出血を起こさず、それが、大部分の脳震盪をCTまたはMRIなどの所定の神経画像検査で確認できないことの理由である。急性脳震盪症状（受傷直後に発生する症状）をCTEと混同すべきではない。長期の脳震盪後症候群（PCS、脳震盪直後に症状が始まり、数週間、数ヶ月、および時として数年さえも続く）とCTE症状を区別することは困難であり得る。神経画像検査によって、CTEで起こり得る軸索の完全性のわずかな変化および構造的病変を検出できるかどうかを調べる調査研究が、現在行われている。最近、DTI、fMRI、MRI、およびMRS画像診断を用いて、CTEのインビボ診断技法がさらに進歩している；しかしながら、任意のそのような技法が検証され得るまでには、さらなる研究が行われる必要がある。 10

【0121】

生存個体におけるCTEの診断を支援するために、タウタンパク質に特異的に結合するPETトレーサーが所望されている。1つの候補は、アルツハイマー病、ダウン症、進行性核上性麻痺、家族性前頭側頭型認知症、およびクロイツフェルト・ヤコブ病などのいくつかの認知症性障害を有する個体の脳内に保持されるトレーサー $[^{18}\text{F}]\text{FDDNP}$ である。認知症状および気分症状を有する引退したNFL選手5名の小規模な研究において、PETスキャンにより、脳内のトレーサーの蓄積が明らかになった。しかしながら、 $[^{18}\text{F}]\text{FDDNP}$ は、アミロイドおよびその他のタンパク質にも同様に結合する。さらに、トレーサーが保持された脳内の部位は、CTEの公知の神経病理とは一致しなかった。より有望な候補は、タウにのみ結合するトレーサー $[^{18}\text{F}]\text{-T807}$ である。これは、いくつかの臨床試験において試験中である。 20

【0122】

CTEの推定上のバイオマーカーは、脳に対する自己抗体の血清中の存在である。この自己抗体は、多数の頭部衝突を経験したが脳震盪は経験していないフットボール選手において検出され、このことから、脳震盪以下のエピソードでさえ脳に損傷を与え得ること示唆される。自己抗体は、破壊された血液脳関門によって脳に入り、通常は免疫の猛攻撃から保護されている神経細胞を攻撃し得る。脳には多数のニューロン（860億個）が存在することを所与として、かつ正常な血液脳関門を介した抗体の透過性が低いことを考慮すると、最初の事象（頭部衝突）と任意の徴候または症状の発生との間には、長い期間が存在する。それにもかかわらず、選手の血液中の自己免疫変化は、CTEを予測する最も初期の測定可能な事象であると考えられる。 30

【0123】

II. モノクローナル抗体およびその作製

「単離された抗体」とは、その天然環境の構成要素から分離および/または回収されたものである。その天然環境の混入構成要素は、抗体の診断上または治療上の使用を妨げる物質であり、これには酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質が含まれ得る。特定の態様において、抗体は、(1) ローリー法で決定して95重量%を超える抗体にまで、および最も詳細には99重量%を超えるまで；(2) スピニングカップ配列決定装置を用いて、少なくとも15残基のN末端もしくは内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度まで；または(3) クーマシーブルーもしくは銀染色を用いた還元もしくは非還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで、精製される。抗体の天然環境の少なくとも1つの構成要素が存在しないという理由で、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイチュアの抗体が含まれる。しかしながら、通常、単離された抗体は少なくとも1つの精製段階によって調製される。 40

【0124】

基本的な4鎖抗体単位は、2つの同一の軽（L）鎖および2つの同一の重（H）鎖から構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である。IgM抗体は、J鎖と称される付加的なポリペプチドと共に5つの基本的なヘテロ四量体単位からなり、したがって10個の抗原結合部位を含む一方、分泌型IgA抗体は、重合して、J鎖と共に2～5個の基本的4鎖単位を含む多価集合体を形成し得る。IgGの場合、4鎖単位は一般に約150,000ダルトンである。各L 50

鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に連結されており、2本のH鎖は、H鎖のアイソタイプに応じて1つまたは複数のジスルフィド結合によって互いに連結されている。各H鎖およびL鎖はまた、規則的間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。各H鎖はN末端に可変領域 (V_H) を有し、鎖および鎖の各々については3つの定常ドメイン (C_H)、ならびにμおよびアイソタイプについては4つのC_Hドメインがこれに続く。各L鎖はN末端に可変領域 (V_L) を有し、その他方の末端において定常ドメイン (C_L) が続く。V_LはV_Hと並んでおり、C_Lは重鎖の第1定常ドメイン (C_{H1}) と並んでいる。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変領域と重鎖可変領域の間の界面を形成すると考えられている。V_HとV_Lが互いに対合して、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造および特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71, and Chapter 6を参照されたい。

10

【0125】

任意の脊椎動物種由来のL鎖は、それらの定常ドメイン (C_L) のアミノ酸配列に基づいて、およびと称される2つの明確に異なる種類のうちの1つに割り当てられ得る。免疫グロブリンは、それらの重鎖の定常ドメイン (C_H) のアミノ酸配列に応じて、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てられ得る。免疫グロブリンには、5つのクラス：それぞれ、およびμと命名された重鎖を有するIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMが存在する。およびクラスは、C_H配列および機能における比較的わずかな差異に基づいてサブクラスにさらに分割され、ヒトは以下のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2を発現する。

20

【0126】

「可変」という用語は、Vドメインのある特定のセグメントが、抗体の間で配列が大規模に異なるという事実を指す。Vドメインは、抗原結合を媒介し、かつ特定の抗体のその特定の抗原に対する特異性を規定する。しかしながら、可変性は、可変領域の110アミノ酸の長さによって均等に分布しているわけではない。代わりに、V領域は、それぞれ9~12アミノ酸長である「超可変領域」と称される極度に可変性のより短い領域によって分離された、15~30アミノ酸のフレームワーク領域 (FR) と称される比較的不变なひと続きからなる。天然の重鎖および軽鎖の可変領域はそれぞれ、主としてシート立体配置をとる4つのFRを含み、これらは3つの超可変領域によって連結されており、超可変領域は、シート構造を連結し、場合によってはその一部を形成するループを形成する。各鎖中の超可変領域は、FRによって近接して結びつけられ、他方の鎖からの超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する (Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) を参照されたい)。定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合に直接関与しないが、抗体の抗体依存性細胞傷害 (ADCC)、抗体依存性細胞貪食 (ADCP)、抗体依存性好中球貪食 (ADNP)、および抗体依存性補体沈着 (ADCD) への関与などの様々なエフェクター機能を示す。

30

【0127】

本明細書で用いられる場合の「超可変領域」という用語は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は一般的に、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基 (例えば、Kabat番号付けシステム; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) に従って番号付けた場合の、V_L中の残基約24~34 (L1)、50~56 (L2)、および89~97 (L3) 周辺、ならびにV_H中の約31~35 (H1)、50~65 (H2)、および95~102 (H3) 周辺); ならびに/または「超可変ループ」由来の残基 (例えば、Chothia番号付けシステム; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) に従って番号付けた場合の、V_L中の残基24~34 (L1)、50~56 (L2)、および89~97 (L3))、ならびにV_H中の26~32 (H1)、52~56 (H2) および95~101 (H3)); ならびに/または「超可変ループ」/CDR由来の

40

50

残基（例えば、IMGT番号付けシステム；Lefranc, M. P. et al. Nucl. Acids Res. 27:209-212 (1999)、Ruiz, M. et al. Nucl. Acids Res. 28:219-221 (2000) に従って番号付けた場合の、V_L中の残基27～38 (L1)、56～65 (L2)、および105～120 (L3))、ならびにV_H中の27～38 (H1)、56～65 (H2) および105～120 (H3))を含む。任意に、抗体は、以下の点のうちの1つまたは複数において対称的挿入を有する：A_{H0}；Honneger, A. and Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001) に従って番号付けた場合の、V_L中の28、36 (L1)、63、74～75 (L2)、および123 (L3)、ならびにV_{subH}中の28、36 (H1)、63、74～75 (H2)、および123 (H3)。

【0128】

「生殖系列核酸残基」は、定常領域または可変領域をコードする生殖系列遺伝子中に天然に存在する核酸残基を意味する。「生殖系列遺伝子」は、生殖細胞（すなわち、卵子となる運命の細胞または精子）中に見出されるDNAである。「生殖系列変異」は、生殖細胞または単細胞期の接合体において生じた特定のDNAの遺伝性変化を指し、子孫に伝達された場合、そのような変異は身体のあらゆる細胞に組み込まれる。生殖系列変異は、単一の体細胞が獲得する体細胞変異とは対照的である。場合によっては、可変領域をコードする生殖系列DNA配列中のヌクレオチドが変異しており（すなわち、体細胞変異）、異なるヌクレオチドで置換されている。

【0129】

本明細書で用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量存在し得る潜在的な自然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体が混入することなく合成され得るという点で有利である。「モノクローナル」という修飾語は、任意の特定の方法による抗体の作製を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本開示において有用なモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) によって最初に記載されたハイブリドーマ方法論によって調製することができ、あるいは抗原特異的B細胞、感染もしくは免疫化に応答する抗原特異的形質芽球の単一細胞選別、またはバルク選別された抗原特異的集合中の単一細胞由来の連結された重鎖および軽鎖の捕捉後に、細菌、真核動物、または植物の細胞において組換えDNA法を用いて作製することができる（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)、およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) に記載される技法を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【0130】

A. 一般的方法

タウに結合するモノクローナル抗体は、いくつかの適用を有すると理解される。これらには、タウオパチーの検出および診断において使用するため、ならびにタウオパチーを処置するための診断キットの作製が含まれる。これに関連して、そのような抗体を診断剤もしくは治療剤に連結することができ、それらを捕捉剤もしくは競合アッセイにおける競合物として使用することができ、またはそれらを付加的な薬剤を付着させずに個々に使用することができる。抗体は、以下にさらに考察されるように、変異または改変させてもよい。抗体を調製するおよび特徴づけるための方法は、当技術分野において周知である。

【0131】

モノクローナル抗体 (MAb) を作製する方法は一般に、ポリクローナル抗体を調製するための方針と同じ方針に沿って開始する。これら両方の方法の第1段階は、適切な宿主の免疫化、あるいは以前の自然感染または認可されたもしくは実験的なワクチンの接種により免疫をもつ対象の同定である。当技術分野で周知のように、免疫化のための所与の組成物は、その免疫原性が異なる場合がある。そのため、ペプチドまたはポリペプチド免疫原

10

20

30

40

50

を担体に結合させることによって達成され得るように、宿主免疫系を強化することが必要となる場合が多い。例示的で好ましい担体は、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) およびウシ血清アルブミン (BSA) である。卵白アルブミン、マウス血清アルブミン、またはウサギ血清アルブミンなどの他のアルブミンもまた、担体として使用することができる。ポリペプチドを担体タンパク質にコンジュゲートさせる手段は、当技術分野で周知であり、これにはグルタルアルデヒド、m-マレイミドベンコイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミド、およびビス-ピアゾ化ベンジジンが含まれる。同様に当技術分野で周知のように、特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして公知である免疫応答の非特異的刺激剤を用いることによって増強することができる。動物における例示的で好ましいアジュバントには、完全フロイントアジュバント (死菌結核菌 (Mycobacterium tuberculosis) を含有する免疫応答の非特異的刺激剤)、不完全フロイントアジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントが含まれ、ヒトではミョウバン、CpG、MFP59、および免疫刺激分子の組み合わせ (AS01またはAS03などの「アジュバントシステム」) が含まれる。タウ特異的B細胞を誘導するための接種の付加的な実験形態も可能であり、これには、ナノ粒子ワクチン、または物理的送達系 (脂質ナノ粒子もしくは金バイオリスティックビーズ上など) においてDNAもしくはRNA遺伝子として送達される、および針、遺伝子銃、経皮的エレクトロポレーション装置で送達される、遺伝子によってコードされる抗原が含まれる。抗原遺伝子はまた、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、もしくはアルファウイルスレプリコンなどの複製可能もしくは複製欠損ウイルスベクター、または代わりにウイルス様粒子によりコードされて、運搬することができる。

【0132】

天然病原体に対するヒト抗体の場合、適したアプローチは、その病原体に曝露されたことのある対象、例えば、その疾患に罹患したと診断されたことのある対象、あるいはその病原体に対する防御免疫をもたらすために、または実験的なワクチンの安全性もしくは有効性を試験するために、ワクチン接種を受けたことのある対象を同定することである。循環している抗病原体抗体を検出することができ、次いで、抗体陽性対象由来の、抗体をコードするまたは産生するB細胞を得ることができる。

【0133】

ポリクローナル抗体の産生に使用される免疫原組成物の量は、免疫原の性質および免疫化に使用される動物によって異なる。種々の経路を用いて、免疫原を投与することができる (皮下、筋肉内、皮内、静脈内、および腹腔内)。ポリクローナル抗体の産生は、免疫化後の様々な時点で、免疫化された動物の血液を採取することによってモニターすることができる。2回目のブースター注射を行ってもよい。適した力価が達成されるまで、追加免疫および力価測定のプロセスを繰り返す。所望のレベルの免疫原性が得られたならば、免疫化された動物から採血して、血清を単離および貯蔵することができ、ならびに/またはこの動物を用いてMAbを作製することができる。

【0134】

免疫化の後、抗体を産生する可能性を有する体細胞、具体的にはBリンパ球 (B細胞) を、MAb作製プロトコールにおいて使用するために選択する。これらの細胞は、生検された脾臓、リンパ節、扁桃腺もしくは咽頭扁桃、骨髓穿刺液もしくは生検標本、肺もしくははGI管のような粘膜臓器由来の組織生検標本から、または循環血液から得ることができる。次いで、免疫化動物または免疫のあるヒト由来の抗体産生Bリンパ球を、不死骨髓腫細胞の細胞、一般的には、免疫化された動物と同じ種の細胞、またはヒトもしくはヒト/マウスキメラ細胞と融合させる。ハイブリドーマ作製融合手順における使用に適した骨髓腫細胞株は、好ましくは、非抗体産生性であり、融合効率が高く、かつ所望の融合細胞 (ハイブリドーマ) のみの増殖を支持するある特定の選択培地中で増殖不能にする酵素欠損を有する。当業者に公知であるように、いくつかの骨髓腫細胞のうちの任意の1つを使用することができる。HMMA2.5細胞またはMFP-2細胞は、そのような細胞の特に有用な例である。

【0135】

抗体を産生する脾臓またはリンパ節細胞と骨髄腫細胞とのハイブリッドを作製する方法は、通常、細胞膜の融合を促進する1つまたは複数の作用物質（化学的または電氣的）の存在下で、体細胞を骨髄腫細胞と2:1の割合で混合する段階を含むが、その割合はそれぞれ約20:1から約1:1まで変動し得る。場合によっては、初期段階としてのエプスタイン・バーウイルス（EBV）によるヒトB細胞の形質転換により、B細胞のサイズが大きくなり、比較的大きなサイズの骨髄腫細胞との融合が向上する。EBVによる形質転換効率は、形質転換培地中にCpGおよびChk2阻害剤を使用することで向上する。あるいは、IL-21およびTNFスーパーファミリーのII型メンバーであるヒトB細胞活性化因子（BAFF）などの付加的な可溶性因子を含有する培地中で、CD40リガンド（CD154）を発現する形質転換細胞株と共培養することにより、ヒトB細胞を活性化することができる。センダイウイルスを用いる融合法は、Kohler and Milstein（1975；1976）によって記載されており、37%（v/v）ポリエチレングリコール（PEG）などのPEGを使用する方法は、Geftter et al.（1977）によって記載されている。電氣的に誘導される融合法の使用もまた適しており（Goding, pp. 71-74, 1986）、より良い効率のための過程も存在する（Yu et al., 2008）。融合手順により、通常は約 1×10^{-6} ~ 1×10^{-8} の低頻度で生存可能なハイブリッドが生じるが、手順を最適化すれば、200分の1に近い融合効率を達成することができる（Yu et al., 2008）。しかしながら、選択培地中で培養することにより、生存可能な融合ハイブリッドが親の非融合細胞（特に、通常無制限に分裂し続ける非融合骨髄腫細胞）から区別されるため、比較的低い融合効率は問題とならない。選択培地は一般に、組織培養培地中でヌクレオチドの新規合成を遮断する作用物質を含有する培地である。例示的で好ましい作用物質は、アミノプテリン、メトトレキサート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキサートは、プリンおよびピリミジンの両方の新規合成を遮断する一方、アザセリンはプリン合成のみを遮断する。アミノプテリンまたはメトトレキサートを使用する場合には、ヌクレオチドの供給源として培地にヒポキサンチンおよびチミジンを補充する（HAT培地）。アザセリンを使用する場合には、培地にヒポキサンチンを補充する。B細胞供給源がEBVで形質転換されたヒトB細胞株である場合には、骨髄腫に融合されていないEBV形質転換株を排除するために、ウアバインを添加する。

10

20

【0136】

好ましい選択培地は、HATまたはウアバインを含むHATである。ヌクレオチドサルベージ経路を作動させ得る細胞のみが、HAT培地中で生存することができる。骨髄腫細胞は、サルベージ経路の重要な酵素、例えばヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）を欠損しており、それらは生存することができない。B細胞はこの経路を作動させることができるが、培養での寿命が限られており、一般に約2週間以内に死滅する。したがって、選択培地で生存することができる唯一の細胞は、骨髄腫とB細胞から形成されたハイブリッドである。今回のように、融合に使用されるB細胞の供給源がEBV形質転換B細胞株である場合には、EBV形質転換B細胞が薬物殺傷を受けやすいのに対して、使用される骨髄腫パートナーはウアバイン耐性があるように選択されるため、ハイブリッドの薬物選択にはウアバインを使用することもできる。

30

40

【0137】

培養によりハイブリドーマの集団が提供され、そこから特定のハイブリドーマが選択される。典型的には、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレート中で細胞を単一クローン希釈して培養し、続いて（約2~3週間後に）所望の反応性について個々のクローン上清を試験することによって行われる。アッセイは、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、細胞毒性アッセイ、ブランクアッセイ、ドット免疫結合アッセイなどのように、高感度で、簡便で、かつ迅速であるべきである。次いで、選択されたハイブリドーマを段階希釈するか、またはフローサイトメトリー選別によって単一細胞に選別し、個々の抗体産生細胞株になるようにクローニングし、次いでクローンを無制限に増殖させてmAbを提供することができる。この細胞株は、2つの基本的な方法でmAbの生産に利用する

50

ことができる。ハイブリドーマの試料を動物（例えば、マウス）に（多くの場合、腹腔内に）注射することができる。任意に、注射の前に、動物を炭化水素、特にプリスタン（テトラメチルペンタデカン）などの油で予備刺激する。ヒトハイブリドーマをこの方法で使用する場合には、腫瘍拒絶を防ぐために、SCIDマウスなどの免疫不全マウスに注射することが最適である。注射された動物は、融合細胞ハイブリッドにより産生された特定のモノクローナル抗体を分泌する腫瘍を生じる。次いで、血清または腹水などの動物の体液を採取して、高濃度のMAbを提供することができる。個々の細胞株をインビトロで培養することもでき、その場合MAbは培養液中に自然に分泌され、そこからMAbを容易に高濃度で得ることができる。あるいは、ヒトハイブリドーマ細胞株をインビトロで用いて、細胞上清中に免疫グロブリンを産生させることができる。細胞株は、高純度のヒトモノクローナル免疫グロブリンを回収する能力を最適化するために、無血清培地中で増殖するように適合させることができる。

10

【0138】

いずれかの手段によって産生されたMAbは、所望であれば、濾過、遠心分離、およびFPLCまたはアフィニティークロマトグラフィーなどの様々なクロマトグラフィー法を用いて、さらに精製してもよい。本開示のモノクローナル抗体の断片は、ペプシンもしくはパインなどの酵素による消化を含む方法により、および/または化学的還元によるジスルフィド結合の切断により、精製モノクローナル抗体から得ることができる。あるいは、本開示によって包含されるモノクローナル抗体断片は、自動ペプチド合成装置を使用して合成することができる。

20

【0139】

モノクローナル抗体を作製するために分子クローニングアプローチが使用され得ることもまた企図される。関心対象の抗原で標識された単一のB細胞を、常磁性ビーズ選択またはフローサイトメトリー選別を用いて物理的に選別することができ、次いで、単一の細胞からRNAを単離し、RT-PCRによって抗体遺伝子を増幅することができる。あるいは、抗原特異的なバルク選別された細胞集団を微小胞中に分離し、重鎖と軽鎖のアンプリコンの物理的連結、または小胞からの重鎖および軽鎖遺伝子の共通バーコード化を用いて、対応する重鎖と軽鎖の可変遺伝子を単一細胞から回収することができる。単一細胞由来の対応する重鎖および軽鎖遺伝子はまた、RT-PCRプライマーおよび転写物を標識するためのバーコードを有する細胞透過性ナノ粒子で細胞を処理し、細胞ごとに1つのバーコードを使用することで、抗原特異的B細胞の集団から得ることができる。ハイブリドーマ株からRNAを抽出し、RT-PCRにより抗体遺伝子を得て、免疫グロブリン発現ベクターにクローニングすることにより、抗体可変遺伝子を単離することもできる。あるいは、細胞株から単離されたRNAからコンビナトリアル免疫グロブリンファージミドリブラリーを調製し、タウ抗原を用いてパニングすることにより、適切な抗体を発現するファージミドを選択する。従来のハイブリドーマ技法に対するこのアプローチの利点は、1回のラウンドでおよそ10⁴倍もの多くの抗体を生成してスクリーニングすることができる点、ならびにH鎖とL鎖の組み合わせにより新たな特異性が生じ、それによって適切な抗体を見出す機会がさらに増加する点である。

30

【0140】

本開示において有用な抗体の作製を教示する、それぞれ本明細書に参照により組み入れられる他の米国特許には、コンビナトリアルアプローチを使用したキメラ抗体の作製について記載している米国特許第5,565,332号；組換え免疫グロブリン調製物について記載している米国特許第4,816,567号；および抗体-治療剤コンジュゲートについて記載している米国特許第4,867,973号が含まれる。

40

【0141】**B. 本開示の抗体**

本開示による抗体は、まず第一に、その結合特異性によって規定され得る。当業者は、当業者に周知の技法を使用して所与の抗体の結合特異性/親和性を評価することにより、そのような抗体が本特許請求の範囲内に含まれるかどうかを判定することができる。例えば

50

、所与の抗体が結合するエピトープは、抗原分子内に位置する4個またはそれ以上（例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個）のアミノ酸の単一の連続配列からなっており（例えば、ドメイン内の直鎖状エピトープ）。あるいは、エピトープは、抗原分子内に位置する複数の非連続アミノ酸（またはアミノ酸配列）からなっており（例えば、高次構造エピトープ）。

【0142】

当業者に公知の様々な技法を用いて、抗体がポリペプチドまたはタンパク質内の「1つまたは複数のアミノ酸と相互作用する」かどうかを判定することができる。例示的な技法には、例えば、Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) に記載されているものなどの通例の交差遮断アッセイが含まれる。交差遮断は、ELISA、バイオレイヤー干渉法、または表面プラズモン共鳴などの様々な結合アッセイで測定することができる。その他の方法には、アラニンスキャニング変異解析、ペプチドプロット解析 (Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248: 443-63)、ペプチド切断解析、単粒子再構築、クライオEM、または断層撮影を用いた高分解能電子顕微鏡技法、結晶学的研究、およびNMR解析が含まれる。加えて、エピトープ切除、エピトープ抽出、および抗原の化学修飾などの方法を用いることもできる (Tomer (2000) Prot. Sci. 9: 487-496)。抗体が相互作用するポリペプチド内のアミノ酸を同定するために使用され得る別の方法は、質量分析によって検出される水素/重水素交換である。一般論として、水素/重水素交換法は、関心対象のタンパク質を重水素で標識した後、重水素標識されたタンパク質に抗体を結合させる段階を伴う。次に、タンパク質/抗体複合体を水に移すが、抗体複合体によって保護されているアミノ酸内の交換可能なプロトンは、界面の一部ではないアミノ酸内の交換可能なプロトンよりも遅い速度で重水素から水素への逆交換を受ける。結果として、タンパク質/抗体界面の一部を形成するアミノ酸は重水素を保持することができ、したがって、界面に含まれないアミノ酸と比較して比較的高い質量を示す。抗体の解離後、標的タンパク質をプロテアーゼ切断および質量分析に供し、それによって、抗体が相互作用する特定のアミノ酸に対応する重水素標識残基を明らかにする。例えば、Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267: 252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265Aを参照されたい。

【0143】

「エピトープ」という用語は、B細胞および/またはT細胞が応答する抗原上の部位を指す。B細胞エピトープは、連続アミノ酸、またはタンパク質の三次折り畳みによって並置された非連続アミノ酸の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には変性溶媒に曝露されても保持されるが、三次折り畳みによって形成されたエピトープは、典型的には変性溶媒で処理すると失われる。エピトープは典型的には、特有の空間的高次構造中に少なくとも3アミノ酸、およびより一般的には少なくとも5または8~10アミノ酸を含む。

【0144】

修飾支援プロファイリング (MAP) は、抗原構造に基づく抗体プロファイリング (ASAP) としても公知であり、化学的または酵素的に修飾された抗原表面に対する各抗体の結合プロファイルの類似性に従って、同じ抗原に対する多数のモノクローナル抗体 (mAb) を分類する方法である（その全体が参照により本明細書に具体的に組み入れられるUS2004/0101920を参照されたい）。各カテゴリーは、別のカテゴリーによって表されるエピトープと明らかに異なるかまたは部分的に重複する特有のエピトープを反映し得る。この技術により、遺伝的に同一の抗体の迅速なフィルタリングが可能になり、したがって、特徴づけの焦点を遺伝的に異なる抗体に合わせることができる。ハイブリドーマスクリーニングに適用した場合、MAPにより、所望の特徴を有するmAbを産生する稀なハイブリドーマクロンの同定が容易になる可能性がある。MAPを用いて、本開示の抗体を、異なるエピトープと結合する抗体の群に選別することができる。

【0145】

本開示は、同じエピトープまたは該エピトープの一部に結合し得る抗体を含む。同様に、

本開示はまた、本明細書に記載される特定の例示的な抗体のいずれかと、標的またはその断片への結合について競合する抗体を含む。当技術分野で公知の通例の方法を用いることにより、抗体が参照抗体と同じエピトープに結合するか、または参照抗体と結合について競合するかどうかを、容易に判定することができる。例えば、被験抗体が参照と同じエピトープに結合するかどうかを判定するために、参照抗体を飽和条件下で標的に結合させる。次に、被験抗体が標的分子に結合する能力を評価する。被験抗体が、参照抗体との飽和結合後に標的分子に結合できる場合、被験抗体は参照抗体とは異なるエピトープに結合すると結論づけることができる。その一方で、被験抗体が、参照抗体との飽和結合後に標的分子に結合できない場合、被験抗体は、参照抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する可能性がある。

10

【0146】

抗体が参照抗タウ抗体と結合について競合するかどうかを判定するために、上記の結合方法論を2つの方向性で行う：第1の方向性では、参照抗体を飽和条件下でタウ抗原に結合させた後、被験抗体のタウ抗原への結合を評価する。第2の方向性では、被験抗体を飽和条件下でタウ抗原に結合させた後、参照抗体のタウ抗原への結合を評価する。両方の方向性において、第1の（飽和）抗体のみがタウに結合し得る場合には、被験抗体と参照抗体はタウへの結合について競合すると結論づけられる。当業者によって理解されるように、参照抗体と結合について競合する抗体は、必ずしも参照抗体と同一のエピトープに結合するのではない可能性があり、重複または隣接するエピトープに結合することによって参照抗体の結合を立体的に遮断する可能性もある。

20

【0147】

2つの抗体は、それぞれが、抗原に対する他方の結合を競合的に阻害（遮断）する場合、同じまたは重複するエピトープに結合する。すなわち、1倍、5倍、10倍、20倍、または100倍過剰の一方の抗体は、他方の結合を、競合結合アッセイで測定して少なくとも50%、しかし好ましくは75%、90%、またはさらには99%阻害する（例えば、Junghans et al., *Cancer Res.* 1990 50:1495-1502を参照されたい）。あるいは、2つの抗体は、一方の抗体の結合を減少させるかまたは排除する抗原の本質的にすべてのアミノ酸変異が、他方の結合を減少させるかまたは排除する場合、同じエピトープを有する。2つの抗体は、一方の抗体の結合を減少させるかまたは排除するいくつかのアミノ酸変異が、他方の結合を減少させるかまたは排除する場合、重複エピトープを有する。

30

【0148】

次いで、付加的な通例の実験（例えば、ペプチド変異および結合解析）を実施して、観察された被験抗体の結合の欠如が、実際に参照抗体と同じエピトープに結合することに起因するかどうか、または立体的遮断（もしくは別の現象）が、観察された結合の欠如の原因であるかどうかを確認することができる。この種の実験は、ELISA、RIA、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリー、または当技術分野において利用可能な任意の他の定量的もしくは定性的抗体結合アッセイを用いて行うことができる。EMまたは結晶学を用いた構造研究によっても、結合について競合する2つの抗体が同じエピトープを認識するの否かを実証することができる。

【0149】**C. 抗体配列の操作**

様々な態様において、発現の改善、交差反応性の改善、またはオフターゲット結合の減少などの種々の理由により、同定された抗体の配列を操作することを選択することができる。改変抗体は、標準的な分子生物学的技法による発現またはポリペプチドの化学合成を含む、当業者に公知の任意の技法によって作製することができる。組換え発現の方法については、本書の他所で扱う。以下は、抗体工学のための関連する目標技法の全般的考察である。

40

【0150】

ハイブリドーマを培養し、次いで細胞を溶解し、全RNAを抽出することができる。RTと共にランダムヘキサマーを用いてRNAのcDNAコピーを作製し、次いで、全ヒト可変遺

50

伝子配列を増幅すると予測されるPCRプライマーの多重混合物を用いてPCRを行うことができる。PCR産物をpGEM-T Easyベクターにクローニングし、次いで、標準的なベクタープライマーを用いて自動DNA配列決定により配列決定することができる。ハイブリドーマ上清から収集し、プロテインGカラムを用いてFPLCで精製した抗体を用いて、結合および中和のアッセイを行うことができる。

【0151】

組換え全長IgG抗体は、重鎖および軽鎖Fv DNAをクローニングベクターからIgGプラスミドベクターにサブクローニングし、293（例えば、Freestyle）細胞またはCHO細胞にトランスフェクトすることによって生成することができる。抗体を293細胞またはCHO細胞の上清から収集して精製することができる。その他の適切な宿主細胞系には、大腸菌（E. coli）などの細菌、昆虫細胞（S2、Sf9、Sf29、High Five）、植物細胞（例えば、タバコ、ヒト様グリカンについて操作されているかまたはされていない）、藻類、またはマウス、ラット、ヤギ、もしくはウシなどの種々の非ヒトトランスジェニック状況が含まれる。

10

【0152】

その後の抗体精製の目的のため、および宿主の免疫化のための両方の、抗体をコードする核酸の発現もまた企図される。抗体コード配列は、天然RNAまたは修飾RNAなどのRNAであってよい。修飾RNAは、安定性の向上およびmRNAへの低免疫原性を付与し、それによって治療上重要なタンパク質の発現を促進する、ある特定の化学修飾を企図する。例えば、N1-メチル-シュードウリジン（N1m）は、翻訳能力の点で、他のいくつかのヌクレオシド修飾およびそれらの組み合わせよりも優れている。組み込まれたN1mヌクレオチドは、翻訳の免疫/eIF2リン酸化依存性阻害の抑止に加えて、mRNA上でのリボソームの休止および密度を高めることにより、翻訳過程の動力学を劇的に変化させる。修飾mRNAのリボソーム負荷が増加すると、同じmRNA上でのリボソームリサイクリングまたは新規リボソーム動員のいずれかを支持することにより、開始がより許容されるようになる。このような修飾を用いて、RNAの接種後のインビボでの抗体発現を増強することができる。RNAは、天然であるか修飾されているかにかかわらず、裸のRNAとして、または脂質ナノ粒子などの送達媒体中で送達することができる。

20

【0153】

あるいは、抗体をコードするDNAも同様の目的で用いることができる。DNAを、その設計対象の宿主細胞において活性のあるプロモーターを含む発現カセット中に含める。発現カセットは、従来のプラスミドまたはミニベクターなどの複製可能なベクター中に含めることが有利である。ポックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、およびレンチウイルスなどのウイルスベクターを含むベクターが企図される。VEEウイルスまたはシンドビスウイルスに基づくアルファウイルスレプリコンなどの、抗体遺伝子をコードするレプリコンもまた企図される。このようなベクターの送達は、筋肉内、皮下、もしくは皮内経路を通じて針によって、またはインビボ発現が所望される場合には経皮的エレクトロポレーションによって行うことができる。

30

【0154】

最終的なcGMP製造プロセスと同じ宿主細胞および細胞培養プロセスにおいて生産された抗体を迅速に入手できることには、プロセス開発プログラムの期間を短縮する可能性がある。Lonzaは、CHO細胞において少量（50 gまで）の抗体を迅速に生産するための、CDACF培地中で増殖させたトランスフェクタントプールを用いる一般的な方法を開発した。本来の一過性の系よりもわずかに遅いものの、その利点には、産物濃度がより高いこと、ならびに生産細胞株と同じ宿主およびプロセスを用いることが含まれる。使い捨てバイオリアクターにおける、モデル抗体を発現するGS-CHOプールの増殖および生産性の例：流加培養モードで作動する使い捨てバッグバイオリアクター培養（作業容積5 L）において、トランスフェクションの9週間以内に2 g/Lの収集抗体濃度が達成された。

40

【0155】

抗体分子は、例えばmAbのタンパク質分解切断によって産生される断片（F(ab'）、F(ab

50

'₂など)、または例えば組換え手段によって産生可能な一本鎖免疫グロブリンを含む。F(ab')抗体誘導体は一価であり、F(ab')₂抗体誘導体は二価である。1つの態様においては、そのような断片を、互いに、または他の抗体断片もしくは受容体リガンドと組み合わせ、**「キメラ」結合分子を形成することができる。重要なことには、そのようなキメラ分子は、同じ分子の異なるエピトープに結合することができる置換基を含み得る。**

【0156】

関連する態様において、抗体は、開示された抗体の誘導体、例えば、開示された抗体のものと同じのCDR配列を含む抗体(例えば、キメラまたはCDR移植抗体)である。あるいは、抗体分子に保存的改変を導入するなどの改変を行うことが望まれる場合がある。このような変更を行う際には、アミノ酸のヒドロパシー指数が考慮され得る。相互作用的な生物学的機能をタンパク質に付与する際のヒドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当技術分野で一般に理解されている(Kyte and Doolittle, 1982)。アミノ酸の相対的なヒドロパシー特性は、得られたタンパク質の二次構造に寄与し、次にそれがタンパク質と他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を規定することが認められている。

10

【0157】

類似のアミノ酸の置換を親水性に基づいて効果的に行うことができることもまた、当技術分野において理解されている。参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,554,101号では、その隣接アミノ酸の親水性によって支配されるタンパク質の最大局所平均親水性が、タンパク質の生物学的特性と相関することを述べている。米国特許第4,554,101号に詳述されるように、アミノ酸残基には以下の親水性値が割り当てられている：
塩基性アミノ酸：アルギニン(+3.0)、リジン(+3.0)、およびヒスチジン(-0.5)；酸性アミノ酸：アスパラギン酸(+3.0±1)、グルタミン酸(+3.0±1)、アスパラギン(+0.2)、およびグルタミン(+0.2)；親水性非イオン性アミノ酸：セリン(+0.3)、アスパラギン(+0.2)、グルタミン(+0.2)、およびスレオニン(-0.4)、含硫アミノ酸：システイン(-1.0)およびメチオニン(-1.3)；疎水性非芳香族アミノ酸：バリン(-1.5)、ロイシン(-1.8)、イソロイシン(-1.8)、プロリン(-0.5±1)、アラニン(-0.5)、およびグリシン(0)；疎水性芳香族アミノ酸：トリプトファン(-3.4)、フェニルアラニン(-2.5)、およびチロシン(-2.3)。

20

【0158】

アミノ酸を、類似の親水性を有する別のアミノ酸に対して置換して、生物学的または免疫学的に改変されたタンパク質を生成できることが理解される。このような変化では、親水性値が±2以内のアミノ酸の置換が好ましく、±1以内のものが特に好ましく、および±0.5以内のものがさらにより特に好ましい。

30

【0159】

上記で概説したように、アミノ酸置換は一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。様々な前述の特徴を考慮に入れた例示的な置換は、当業者に周知であり、これには、アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンが含まれる。

40

【0160】

本開示はまた、アイソタイプ改変も企図する。異なるアイソタイプを有するようにFc領域を改変することにより、異なる機能性を達成することができる。例えば、IgG₁への変更により抗体依存性細胞傷害を高めることができ、クラスAへの切り替えにより組織分布を改善することができる、ならびにクラスMへの切り替えにより結合価を改善することができる。

【0161】

あるいはまたは加えて、アミノ酸改変と、IL-23p19結合分子のFc領域のC1q結合および/または補体依存性細胞傷害(CDC)機能を変更する1つまたは複数のさらなるアミノ酸改変を組み合わせることは有用であり得る。特に関心のある結合ポリペプチドは、C1

50

qに結合し補体依存性細胞傷害を示すものであり得る。任意にCDCを媒介する能力をさらに有する、既存のC1q結合活性を備えたポリペプチドを、これらの活性の一方または両方が増強されるように改変することができる。C1qを変更し、および/またはその補体依存性細胞傷害機能を改変するアミノ酸改変は、例えばWO/0042072に記載されており、これは参照により本明細書に組み入れられる。

【0162】

例えば、C1q結合および/またはFc R結合を改変し、それによってCDC活性および/またはADCC活性を変化させることにより、エフェクター機能が変化した抗体のFc領域を設計することができる。「エフェクター機能」は、生物活性(例えば、対象における)の活性化または減少を担う。エフェクター機能の例には、C1q結合;補体依存性細胞傷害(CDC);Fc受容体結合;抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC);貪食;細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体;BCR)の下方制御等が含まれるが、これらに限定されない。このようなエフェクター機能は、Fc領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と結合していることを必要とする場合があり、様々なアッセイ(例えば、Fc結合アッセイ、ADCCアッセイ、CDCアッセイ等)を用いて評価することができる。

【0163】

例えば、C1q結合が改善され、かつFc RIII結合が改善された(例えば、改善されたADCC活性および改善されたCDC活性の両方を有する)抗体の変種Fc領域を作製することができる。あるいは、エフェクター機能の減少または除去が望ましい場合には、CDC活性が減少した、かつ/またはADCC活性が減少した変種Fc領域を操作することができる。他の態様においては、これらの活性のうち的一方のみを増加させ、かつ任意にまた、他方の活性を減少させることができる(例えば、ADCC活性が改善されCDC活性が減少した、およびその逆のFc領域変種を作製するため)。

【0164】

FcRn結合

新生児Fc受容体(FcRn)とのその相互作用を変化させ、その薬物動態特性を改善するために、Fc変異を導入し操作することもできる。FcRnへの結合が改善されたヒトFc変種のコレクションが記載されている(Shields et al., (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc RI, Fc RII, Fc RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc R, (J. Biol. Chem. 276:6591-6604)。半減期の延長をもたらし得るいくつかの方法が公知であり(Kuo and Aveson, 2011)、アミノ酸改変は、アラニンスキャニング変異誘発、ランダム変異誘発、ならびに新生児Fc受容体(FcRn)への結合および/またはインビボ挙動を評価するためのスクリーニングを含む技法を通じて作製され得る。コンピューター戦略とその後の変異誘発を用いて、アミノ酸変異のうちの一つを選択して変異させることもできる。

【0165】

したがって、本開示は、FcRnへの結合が最適化された抗原結合タンパク質の変種を提供する。特定の態様において、抗原結合タンパク質の該変種は、該抗原結合タンパク質のFc領域に少なくとも1つのアミノ酸改変を含み、該改変は、該親ポリペプチドと比較してFc領域の226、227、228、230、231、233、234、239、241、243、246、250、252、256、259、264、265、267、269、270、276、284、285、288、289、290、291、292、294、297、298、299、301、302、303、305、307、308、309、311、315、317、320、322、325、327、330、332、334、335、338、340、342、343、345、347、350、352、354、355、356、359、360、361、362、369、370、371、375、378、380、382、384、385、386、387、389、390、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、403、404、408、411、412、414、415、416、418、419、420、421、422、424、426、428、433、434、438、439、440、443、444、445、446、および447からなる群より選択され、ここで、Fc領域のアミノ酸の番号付けはKabatのEUイン

デックスのものである。本開示のさらなる局面において、改変はM252Y/S254T/T256Eである。

【0166】

加えて、様々な刊行物が、FcRn結合ポリペプチドを分子に導入することにより、またはFcRn結合親和性は保存されているが他のFc受容体に対する親和性は大幅に減少している抗体と分子とを融合させるか、もしくは抗体のFcRn結合ドメインと融合させることにより、半減期が改変された生理活性分子を得るための方法を記載しており、例えば、Kontermann (2009) を参照されたい。

【0167】

誘導体化抗体を用いて、哺乳動物、特にヒトにおける親抗体の半減期（例えば、血清半減期）を変更することができる。そのような変更により、15日を超える、好ましくは20日を超える、25日を超える、30日を超える、35日を超える、40日を超える、45日を超える、2ヶ月を超える、3ヶ月を超える、4ヶ月を超える、または5ヶ月を超える半減期が得られ得る。哺乳動物、好ましくはヒトにおける本開示の抗体またはその断片の半減期の延長により、哺乳動物における該抗体または抗体断片の血清力価が上昇し、それにより、該抗体もしくは抗体断片の投与頻度が減少し、かつ/または投与されるべき該抗体もしくは抗体断片の濃度が低下する。インビボ半減期が延長された抗体またはその断片は、当業者に公知の技法により作製することができる。例えば、インビボ半減期が延長された抗体またはその断片は、FcドメインとFcRn受容体との間の相互作用に關与すると同定されたアミノ酸残基を改変する（例えば、置換、欠失、または付加する）ことにより作製することができる。

10

20

【0168】

Beltramello et al. (2010) は、デングウイルスの感染を増強する傾向があることから、CH2ドメインの1.3位および1.2位のロイシン残基（CドメインのIMGT固有番号付けによる）をアラニン残基で置換したものを作製することによる、中和mAbの改変を以前に報告した。「LALA」変異としても公知であるこの変異は、Hessell et al. (2007) によって記載されているように、Fc RI、Fc RII、およびFc RIIIaに対する抗体の結合を消失させる。変種と未改変の組換えmAbを、4種類のデングウイルス血清型による感染を中和および増強するそれらの能力について比較した。LALA変種は、未改変mAbと同じ中和活性を保持していたが、増強活性は完全に欠いていた。したがって、このような性質のLALA変異は、ここで開示される抗体の状況において企図される。

30

【0169】

グリコシル化の変更

本開示の特定の態様は、シアル酸、ガラクトース、またはフコースを含まない実質的に均一なグリカンを含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片である。モノクローナル抗体は重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、それらはいずれも、それぞれ重鎖または軽鎖定常領域に結合してよい。前述の実質的に均一なグリカンは、重鎖定常領域に共有結合してよい。

【0170】

本開示の別の態様は、新規のFcグリコシル化パターンを有するmAbを含む。単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、GNGNまたはG1/G2グリコフォームによって表される実質的に均一な組成で存在する。Fcのグリコシル化は、治療用mAbの特性において重要な役割を果たす。コアフコースを欠いた均一なグリカンを伴う本開示のこの態様は、特定のウイルスに対する2倍を超える防御の増加を示した。コアフコースの除去は、ナチュラルキラー（NK）細胞によって媒介されるmAbのADCC活性を劇的に改善するが、多形核細胞（PMN）のADCC活性には逆の効果があるようである。

40

【0171】

GNGNまたはG1/G2グリコフォームによって表される実質的に均一な組成を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、実質的に均一なGNGNグリコフォームを含まず、かつG0、G1F、G2F、GNF、GNGNF、またはGNGNFX含有グリコフォ

50

ームを含む同じ抗体と比較して、Fc RIおよびFc RIIIに対する結合親和性の増加を示す。本開示の1つの態様において、抗体は、 1×10^{-8} M以下のKdでFc RIから解離し、 1×10^{-7} M以下のKdでFc RIIIから解離する。

【0172】

Fc領域のグリコシル化は、典型的には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炭水化物部分の結合を指す。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への、糖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うちの1つの結合を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンもまた使用され得る。アスパラギン側鎖ペプチド配列への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列は、アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニンであり、式中、Xはプロリンを除く任意のアミノ酸である。したがって、ポリペプチド中のこれらのペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を形成する。

10

【0173】

グリコシル化パターンは、例えば、ポリペプチド中で見出される1つもしくは複数のグリコシル化部位を欠失させること、および/またはポリペプチド中に存在しない1つもしくは複数のグリコシル化部位を付加することによって変更することができる。抗体のFc領域へのグリコシル化部位の付加は、それが上記のトリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含むようにアミノ酸配列を変更することによって、簡便に達成される（N結合型グリコシル化部位に関する）。例示的なグリコシル化変種は、重鎖の残基Asn 297のアミノ酸置換を有する。変更はまた、元のポリペプチドの配列への、1つもしくは複数のセリンもしくはスレオニン残基の付加またはそれらによる置換によって行うこともできる（O結合グリコシル化部位に関する）。加えて、Asn 297をAlaに変更することで、グリコシル化部位のうちの1つを除去することができる。

20

【0174】

ある特定の態様において、抗体は、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnT III) を発現する細胞で発現され、その結果GnT IIIによってIL-23p19抗体にGlcNAcが付加される。このような様式で抗体を生成する方法は、WO/9954342、WO/03011878、米国特許出願公開第20030003097A1号、およびUmana et al., Nature Biotechnology, 17:176-180, February 1999に記載されている。細胞株は、クラスター化された規則的間隔の短いパンドロームリピート (CRISPR) などのゲノム編集技術を用いて、グリコシル化などのある特定の翻訳後修飾を強化する、または減少させる、または排除するように変更することができる。例えば、CRISPR技術を用いて、組換えモノクローナル抗体の発現に使用される293細胞またはCHO細胞において、グリコシル化酵素をコードする遺伝子を排除することができる。

30

【0175】

モノクローナル抗体タンパク質配列ライアビリティ (liability) の除去
ヒトB細胞から得られた抗体可変遺伝子配列を操作して、その製造可能性および安全性を高めることが可能である。潜在的なタンパク質配列ライアビリティは、以下を含む部位に関連した配列モチーフを検索することによって同定することができる：

40

- 1) 不対Cys残基、
- 2) N-結合型グリコシル化、
- 3) Asn脱アミド、
- 4) Asp異性化、
- 5) SYE切断、
- 6) Met酸化、
- 7) Trp酸化、
- 8) N末端グルタミン酸、
- 9) インテグリン結合、
- 10) CD11c/CD18結合、または

50

11) 断片化。

【0176】

このようなモチーフは、組換え抗体をコードするcDNAの合成遺伝子を変更することによって排除することができる。

【0177】

治療用抗体の開発の分野におけるタンパク質工学の取り組みにより、ある特定の配列または残基が溶解度の違いに関連していることが明らかになる (Fernandez-Escamilla et al., Nature Biotech, 22 (10), 1302-1306, 2004; Chennamsetty et al., PNAS, 106 (29), 11937-11942, 2009; Voynov et al., Biocon. Chem., 21 (2), 385-392, 2010)。溶解度を変化させる変異から得られた文献上の証拠により、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびセリンなどの一部の親水性残基は、アスパラギン、グルタミン、スレオニン、リジン、およびアルギニンなどの他の親水性残基よりも、タンパク質の溶解度に著しくより有利に寄与することが示される。

10

【0178】

安定性

抗体は、生物物理学的特性を高めるように操作することができる。温度上昇を用いて抗体をアンフォールドし、平均の見かけの融解温度を用いて相対的な安定性を決定することができる。示差走査熱量測定 (DSC) は、温度の関数として分子の熱容量 (C_p) (1度当たり、それを温めるのに必要な熱) を測定する。DSCを使用して、抗体の熱安定性を調べることができる。mAbのDSCデータは、時としてmAb構造内の個々のドメインのアンフォールディングを分解し、サーモグラムに最大3つのピーク (Fab、 CH_2 、および CH_3 ドメインのアンフォールディングによる) を生じるという理由で、特に興味深い。典型的には、Fabドメインのアンフォールディングが、最も強いピークを生じる。DSCプロファイルおよびFc部分の相対的な安定性は、ヒトIgG₁、IgG₂、IgG₃、およびIgG₄サブクラスに関して特徴的な違いを示す (Garber and Demarest, Biochem. Biophys. Res. Commun. 355, 751-757, 2007)。円偏光二色性 (CD) 分光計を用いて行われるCDを使用して、平均の見かけの融解温度を決定することもできる。抗体の遠UV CDスペクトルを、200~260 nmの範囲で0.5 nm刻みで測定する。最終的なスペクトルは、20回の蓄積の平均値として決定することができる。バックグラウンドの減算後に、残基楕円率値を算出することができる。抗体 (0.1 mg/mL) の熱アンフォールディングは、235 nm、25~95 °C、および1 °C/分の加熱速度でモニターすることができる。動的光散乱 (DLS) を使用して、凝集の特性を評価することができる。DLSは、タンパク質を含む様々な粒子のサイズを特徴づけるために用いられる。系のサイズが分散していない場合は、粒子の平均有効直径を決定することができる。この測定は、粒子コアのサイズ、表面構造のサイズ、および粒子濃度に依存する。DLSは本質的に粒子による散乱光強度のゆらぎを測定するため、粒子の拡散係数を決定することができる。市販のDLA装置におけるDLSソフトウェアは、異なる直径の粒子集団を表示する。安定性研究は、DLSを使用して簡便に行うことができる。試料のDLS測定は、粒子の流体力学的半径が増加するかどうかを判断することにより、時間経過または温度変化に伴って粒子が凝集するかどうかを示し得る。粒子が凝集する場合には、より大きな半径を有する、粒子のより大きな集団が見られ得る。温度に応じた安定性は、その場で温度を制御することによって解析することができる。キャピラリー電気泳動 (CE) 技法は、抗体安定性の特徴を決定するための実証済みの方法論を含む。iCEアプローチを使用して、脱アミド、C末端リジン、シアリル化、酸化、グリコシル化、およびタンパク質のpIの変化をもたらすタンパク質に対する任意の他の変化に起因する抗体タンパク質の電荷変種を分解することができる。発現した各抗体タンパク質は、Protein Simple Maurice装置を用いて、キャピラリーカラム (cIEF) でのハイスループット自由溶液等電点電気泳動 (IEF) により評価することができる。等電点 (pI) に集束する分子のリアルタイムモニタリングのために、全カラムUV吸収検出を30秒ごとに行うことができる。このアプローチは、移動段階の必要性を排除しながら、従来のゲルIEFの高分解能と、カラムベースの分離において見出される定量化お

20

30

40

50

よび自動化の利点を組み合わせている。この技法により、発現した抗体の同一性、純度、および不均一性プロファイルの再現性のある定量的解析がもたらされる。この結果により、吸光度および自然蛍光の両方の検出モードで、かつ0.7 µg/mLまでの検出感度で、抗体における電荷不均一性および分子サイズ分類が明らかになる。

【0179】

溶解度

抗体配列の固有溶解度スコアを決定することができる。固有溶解度スコアは、CamSol Intrinsic (Sormanni et al., J Mol Biol 427, 478-490, 2015) を用いて算出することができる。scFvなどの各抗体断片のHCDR3内の残基95~102 (Kabat番号付け) のアミノ酸配列を、オンラインプログラムを介して評価して、溶解度スコアを算出することができる。実験技法を用いて溶解度を決定することもできる。溶液が飽和して溶解度限界に達するまでの凍結乾燥タンパク質の溶液へ添加、または適した分子量カットオフを有する微量濃縮器での限外濾過による濃縮を含む、様々な技法が存在する。最も直接的な方法は、硫酸アンモニウムを用いたタンパク質沈殿を伴う方法を使用してタンパク質溶解度を測定する、非晶質沈殿の誘導である (Trevino et al., J Mol Biol, 366: 449-460, 2007)。硫酸アンモニウム沈殿は、相対的溶解度値に関する迅速かつ正確な情報をもたらす。硫酸アンモニウム沈殿では、水相と固相がはっきりした沈殿溶液が生じ、比較的少量のタンパク質を必要とする。硫酸アンモニウムによる非晶質沈殿の誘導を使用して実施される溶解度測定は、異なるpH値で容易に行うことができる。タンパク質の溶解度はpHに大きく依存し、pHは溶解度に影響を及ぼす最も重要な外因性因子であると考えられる。

【0180】

自己反応性

一般的に、自己反応性クローンは、負の選択によって個体発生期に排除されるべきだと考えられているが、自己反応性特性を有する多くのヒト天然抗体が成体の成熟レパートリーに残存しており、自己反応性が多い抗体の機能を高め得ることが明らかになっている。初期のB細胞発生期の抗体におけるHCDR3ループは、正電荷に富んでいる場合が多く、自己反応性パターンを示すことが認められている (Wardemann et al., Science 301, 1374-1377, 2003)。顕微鏡観察 (接着HeLa細胞またはHEp-2上皮細胞を使用) ならびにフローサイトメトリー細胞表面染色 (懸濁Jurkat T細胞および293Sヒト胚性腎細胞を使用) において、ヒト起源の細胞への結合レベルを評価することにより、所与の抗体を自己反応性について試験することができる。自己反応性はまた、組織アレイにおける組織への結合の評価を用いて調べることができる。

【0181】

好ましい残基 (「ヒト類似性」)

供血者由来のヒトB細胞のB細胞レパートリーディープシーケンシングが、最近の多くの研究で大規模に行われている。ヒト抗体レパートリーのかなりの部分に関する配列情報により、健常者において一般的な抗体配列の特徴の統計的評価が容易になる。ヒト組換え抗体可変遺伝子参照データベースにおける抗体配列の特徴に関して知識を得ることで、抗体配列の位置特異的な「ヒト類似性」(HL) の程度を推定することができる。HLは、治療用抗体またはワクチンとしての抗体のように、臨床で使用される抗体の開発に有用であることが示されている。その目的は、抗体のヒト類似性を高めることで、抗体医薬品の有効性を著しく低下させるか、または健康への重大な影響を誘導し得る潜在的有害作用および抗抗体免疫応答を軽減することである。合計で約4億個の配列の、健康なヒト供血者3名の組換え抗体レパートリーの抗体特性を評価することができ、抗体の超可変領域に着目した新規の「相対的ヒト類似性」(rHL) スコアが作成された。rHLスコアにより、ヒト配列 (正のスコア) と非ヒト配列 (負のスコア) を容易に区別することが可能になる。抗体を操作して、ヒトのレパートリーでは一般的ではない残基を除去することができる。

【0182】

D. 一本鎖抗体

一本鎖可変断片 (scFv) は、短い (通常は、セリン、グリシン) リンカーによって共に連結された、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域の融合物である。このキメラ分子は、定常領域の除去およびリンカーペプチドの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。この改変により、通常、特異性は変化しないままである。これらの分子は、歴史的にはファージディスプレイを容易にするために作製され、ファージディスプレイでは、抗原結合ドメインを単一ペプチドとして発現させることが非常に都合が良い。あるいは、ハイブリドーマまたはB細胞由来のサブクローニングされた重鎖および軽鎖から、scFvを直接作製することもできる。一本鎖可変断片は、完全な抗体分子に見出される定常Fc領域、およびひいては、抗体を精製するために用いられる共通の結合部位 (例えば、プロテインA/G) を欠いている。プロテインLは 軽鎖の可変領域と相互作用するため、これらの断片はプロテインLを用いて精製/固定化され得る場合が多い。

10

【0183】

フレキシブルリンカーは一般に、アラニン、セリン、およびグリシンなどの、ヘリックスおよびターン促進アミノ酸残基からなる。しかしながら、他の残基も同様に機能し得る。Tang et al. (1996) は、一本鎖抗体 (scFv) に適合したリンカーをタンパク質リンカーライブラリーから迅速に選択する手段として、ファージディスプレイを使用した。重鎖および軽鎖可変ドメインの遺伝子が、様々な組成の18アミノ酸ポリペプチドをコードするセグメントによって連結されたランダムリンカーライブラリーが構築された。scFvレパートリー (およそ 5×10^6 個の異なるメンバー) が繊維状ファージ上に提示され、ハプテンを用いた親和性選択に供された。選択された変種の集団は、結合活性の顕著な増加を示したが、かなりの配列多様性を保持した。その後、1054個の個々の変種をスクリーニングすることにより、可溶性形態で効率的に産生された触媒活性のあるscFvが得られた。選択されたテザーの唯一の共通の特徴として、V_HC末端の2残基後にリンカー中でプロリンが保存されること、ならびに他の位置にアルギニンおよびプロリンが豊富に存在することが、配列解析により明らかになった。

20

【0184】

本開示の組換え抗体はまた、受容体の二量体化または多量体化を可能にする配列または部分を伴い得る。このような配列には、J鎖と共に多量体の形成を可能にするIgA由来のものが含まれる。別の多量体化ドメインは、Gal4二量体化ドメインである。他の態様において、鎖は、2つの抗体の組み合わせを可能にする、ビオチン/アビジンなどの作用物質で修飾され得る。

30

【0185】

別の態様において、一本鎖抗体は、非ペプチドリナーまたは化学単位を用いて受容体の軽鎖および重鎖を連結させることにより作製することができる。一般に、軽鎖および重鎖は別個の細胞で産生され、精製され、その後適切な様式で共に連結される (すなわち、重鎖のN末端が適切な化学架橋を介して軽鎖のC末端に結合される)。

【0186】

架橋試薬は、2つの異なる分子、例えば安定化剤と凝固剤の官能基を結びつける分子架橋を形成するために用いられる。しかしながら、同じ類似体の二量体もしくは多量体、または異なる類似体からなるヘテロマー複合体が作製され得ることが企図される。2つの異なる化合物を段階的様式で連結するには、不必要なホモポリマー形成を排除するヘテロ二官能性架橋剤を使用することができる。

40

【0187】

例示的なヘテロ二官能性架橋剤は、2つの反応基: 一方は一級アミン基と反応する反応基 (例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド)、および他方はチオール基と反応する反応基 (例えば、ピリジルジスルフィド、マレイミド、ハロゲン等) を含む。架橋剤は、一級アミン反応基を介して、あるタンパク質 (例えば、選択された抗体または断片) のリジン残基と反応することができ、第1のタンパク質に既に結びつけられた架橋剤は、チオール反応基を介して、他方のタンパク質 (例えば、選択剤) のシステイン残基 (遊離のチオール基) と反応する。

50

【0188】

血液中で妥当な安定性を有する架橋剤が用いられることが好ましい。標的化剤と治療/予防剤をコンジュゲートするためにうまく利用することができる非常に多くの種類のジスルフィド結合含有リンカーが公知である。立体障害を受けるジスルフィド結合を含むリンカーは、インビボでより大きな安定性を付与し、作用部位に到達する前に標的化ペプチドが放出されるのを防げるのが判明し得る。したがって、これらのリンカーは連結剤の一群である。

【0189】

別の架橋試薬はSMPTであり、これは隣接するベンゼン環およびメチル基によって「立体障害を受ける」ジスルフィド結合を含む二官能性架橋剤である。ジスルフィド結合の立体障害は、組織および血液中に存在し得るグルタチオンなどのチオレート陰イオンによる攻撃から結合を保護する機能を果たし、それによって、結合された薬剤を標的部位に送達する前にコンジュゲートが分離するのを妨げるのに役立つと考えられている。

【0190】

SMPT架橋試薬は、他の多くの公知の架橋試薬と同様に、システインのSHまたは一級アミン（例えば、リジンのアミノ基）などの官能基を架橋する能力を付与する。別の可能性のある種類の架橋剤には、切断可能なジスルフィド結合を含むヘテロ二官能性光反応性フェニルアジド、例えばスルホスクシンイミジル-2-(p-アジドサリチルアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオン酸などが含まれる。N-ヒドロキシ-スクシンイミジル基は一級アミノ基と反応し、フェニルアジドは（光分解に際し）任意のアミノ酸残基と非選択的に反応する。

【0191】

障害となる（hindered）架橋剤に加えて、障害にならない（non-hindered）リンカーもまた、本明細書に従って用いることができる。保護されたジスルフィドを含まないまたは生成しないと考えられる他の有用な架橋剤には、SATA、SPDP、および2-イミノチオランが含まれる（Wawrzynczak & Thorpe, 1987）。このような架橋剤の使用は、当技術分野において十分に理解されている。別の態様は、フレキシブルリンカーの使用を伴う。

【0192】

米国特許第4,680,338号は、リガンドとアミン含有ポリマーおよび/またはタンパク質とのコンジュゲートを生成するため、特にキレート剤、薬物、酵素、検出可能な標識などとの抗体コンジュゲートを形成するために有用な二官能性リンカーを記載している。米国特許第5,141,648号および第5,563,250号は、種々の穏和な条件下で切断可能な、不安定な結合を含む切断可能なコンジュゲートを開示している。このリンカーは、関心対象の薬剤がリンカーに直接結合され、切断によって活性薬剤の放出がもたらされ得るという点で、特に有用である。特定の使用は、遊離アミノ基または遊離スルフヒドリル基を抗体などのタンパク質または薬物に付加する段階を含む。

【0193】

米国特許第5,856,456号は、ポリペプチド構成要素を連結して融合タンパク質、例えば一本鎖抗体を作製するためのペプチドリンカーを提供する。リンカーは、最長で約50アミノ酸までの長さであり、荷電アミノ酸（好ましくはアルギニンまたはリジン）とそれに続くプロリンの出現を少なくとも1回含み、より高い安定性および凝集の減少を特徴とする。米国特許第5,880,270号は、種々の免疫診断技法および分離技法において有用なアミノオキシ含有リンカーを開示している。

【0194】

E. 多重特異性抗体

ある特定の態様において、本開示の抗体は二重特異性または多重特異性である。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、単一の抗原の2つの異なるエピトープに結合し得る。他のそのような抗体では、第1抗原結合部位を第2抗原に対する結合部位と組み合わせることが

10

20

30

40

50

できる。あるいは、細胞防御機構を感染細胞に集中かつ局在化させるために、抗病原体アームを、白血球上の誘発分子、例えば、T細胞受容体分子（例えば、CD3）、またはFcRI (CD64)、FcRII (CD32)、およびFcRIII (CD16) などのIgGのFc受容体 (FcR) など、に結合するアームと組み合わせることができる。二重特異性抗体を用いて、細胞毒性剤を感染細胞に局在化させることもできる。これらの抗体は、病原体結合アーム、および細胞毒性剤（例えば、サポリン、抗インターフェロン- γ 、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサート、または放射性同位体ハプテン）と結合するアームを有する。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片（例えばF(ab')₂二重特異性抗体）として調製することができる。WO96/16673は二重特異性抗ErbB2 / 抗FcRIII抗体を記載しており、米国特許第5,837,234号は二重特異性抗ErbB2 / 抗FcRI抗体を開示している。二重特異性抗ErbB2 / FcRIII抗体は、WO98/02463に示されている。米国特許第5,821,337号は、二重特異性抗ErbB2 / 抗CD3抗体を教示している。

10

【0195】

二重特異性抗体を作製する方法は、当技術分野において公知である。全長二重特異性抗体の従来生成は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで2つの鎖は異なる特異性を有する (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖が無作為に組み合わせられるため、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は10種の異なる抗体分子の潜在的な混合物を産生し、そのうちの1種のみが正しい二重特異性構造を有する。通常はアフィニティークロマトグラフィー段階によって行われる正しい分子の精製は、かなり煩雑であり、産物の収率は低い。同様の手順が、WO93/08829およびTraunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991) に開示されている。

20

【0196】

別のアプローチによれば、所望の結合特異性を有する抗体可変領域（抗体-抗原結合部位）を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させる。好ましくは、融合は、ヒンジ、CH₂、およびCH₃領域の少なくとも一部を含むIg重鎖定常ドメインとの融合である。軽鎖結合に必要な部位を含む第1重鎖定常領域（CH₁）が、融合の少なくとも1つに存在することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体および所望であれば免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを、別々の発現ベクターに挿入し、適した宿主細胞に同時トランスフェクトする。これにより、構築に使用される3本のポリペプチド鎖の比率が不均等である場合に、所望の二重特異性抗体の最適な収率が得られる場合の態様において、3つのポリペプチド断片の相互の割合を調整する上でのより大きな柔軟性が提供される。しかしながら、少なくとも2本のポリペプチド鎖を等しい比率で発現させることで高収率が得られる場合、またはその比率が所望の鎖の組み合わせの収率に大きな影響を及ぼさない場合には、2本または3本すべてのポリペプチド鎖のコード配列を単一の発現ベクターに挿入することが可能である。

30

【0197】

このアプローチの特定の態様において、二重特異性抗体は、一方のアームにおける第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他方のアームにおけるハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対（第2の結合特異性を提供する）から構成される。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖が存在しないことにより簡便な分離方法が提供されるため、この非対称構造によって、望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二重特異性化合物の分離が容易になることが見出された。このアプローチは、WO 94/04690に開示されている。二重特異性抗体の作製のさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., Methods Enzymol., 121:210 (1986) を参照されたい。

40

【0198】

米国特許第5,731,168号に記載された別のアプローチによれば、一对の抗体分子間の界面を操作して、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の割合を最大にすることができる。好ましい界面は、CH₃ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面由来の1つまたは複数の小さいアミノ酸側鎖を、より大きな側鎖（例えば、

50

チロシンまたはトリプトファン)で置換する。大きな側鎖と同一または類似のサイズの補償的な「空洞」を、大きなアミノ酸側鎖をより小さなアミノ酸側鎖(例えば、アラニンまたはスレオニン)で置換することによって、第2抗体分子の界面上に作出する。これにより、ホモ二量体などの不必要な他の最終産物よりもヘテロ二量体の収率を増加させるための機構が提供される。

【0199】

二重特異性抗体には、架橋抗体または「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲート中の抗体の一方をアビジンに結合し、他方をビオチンに結合することができる。そのような抗体は、例えば、不必要な細胞に対して免疫系細胞を標的化するため(米国特許第4,676,980号)、ならびにHIV感染の処置のために(WO 91/00360、WO 92/200373、およびEP 03089)提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋法を用いて作製することができる。適した架橋剤は当技術分野で周知であり、いくつかの架橋技法と共に、米国特許第4,676,980号に開示されている。

10

【0200】

抗体断片から二重特異性抗体を作製する技法もまた、文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)は、無傷の抗体をタンパク質分解によって切断してF(ab')₂断片を作製する手順を記載している。これらの断片をジチオール錯化剤、亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して、隣接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を妨げる。次いで、作製されたFab'断片をチオニトロ安息香酸(TNB)誘導体に変換する。次いで、Fab'-TNB誘導体の一方をメルカプトエチルアミンによる還元によってFab'-チオールに再変換し、等モル量の他方のFab'-TNB誘導体と混合して、二重特異性抗体を形成させる。生成された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための作用物質として使用することができる。

20

【0201】

大腸菌からのFab'-SH断片の直接的な回収を容易にする技法が存在し、これを化学的に結合して二重特異性抗体を形成させることができる。Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は、ヒト化二重特異性抗体F(ab')₂分子の生成を記載している。各Fab'断片を大腸菌から別々に分泌させ、インビトロで定方向性の化学結合化学に供して、二重特異性抗体を形成させた。このようにして形成された二重特異性抗体は、ErbB2受容体を過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞に結合することができ、ならびにヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の溶解活性を誘発することができた。

30

【0202】

組換え細胞培養物から直接的に二重特異性抗体断片を作製し単離するための様々な技法もまた記載されている(Merchant et al., Nat. Biotechnol. 16, 677-681 (1998). doi: 10.1038/nbt0798-677pmid:9661204)。例えば、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体が生成されている(Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553, 1992)。FosおよびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合により2つの異なる抗体のFab'部分に連結した。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元して単量体を形成し、次いで再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法は、抗体ホモ二量体の生成に利用することもできる。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)によって記載されている「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替的な機構を提供している。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーによってV_Lに連結されたV_Hを含む。したがって、一方の断片のV_HおよびV_Lドメインをもう一方の断片の相補的なV_LおよびV_Hドメインと対形成させ、それにより2つの抗原結合部位を形成させる。一本鎖Fv(sFv)二量体を使用して二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略もまた報告されている。Gruber et al., J Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

40

【0203】

50

特定の態様において、二重特異性抗体または多重特異性抗体は、DOCK-AND-LOCK (商標) (DNL (商標)) 複合体として形成することができる (例えば、米国特許第7,521,056号; 第7,527,787号; 第7,534,866号; 第7,550,143号、および第7,666,400号を参照されたく、そのそれぞれの実施例の項は参照により本明細書に組み入れられる)。一般に、この技法は、cAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA) の調節 (R) サブユニットの二量体化およびドッキングドメイン (DDD) 配列と、種々のAKAPタンパク質のうちのいずれかに由来するアンカードメイン (AD) 配列との間に生じる特異的かつ高親和性の結合相互作用を利用する (Baillie et al., FEBS Letters. 2005; 579: 3264; Wong and Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 959)。DDDペプチドおよびADペプチドは、任意のタンパク質、ペプチド、または他の分子に結合させることができる。DDD配列は自発的に二量体化してAD配列に結合するため、この技法により、DDD配列またはAD配列に結合され得る任意の選択された分子間の複合体の形成が可能になる。

10

【0204】

3つ以上の結合価を有する抗体が企図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる (Tutt et al., J. Immunol. 147: 60, 1991; Xu et al., Science, 358(6359):85-90, 2017)。多価抗体は、その抗体が結合する抗原を発現する細胞によって、二価抗体よりも速く内部移行 (および/または異化) され得る。本開示の抗体は、3つまたはそれ以上の抗原結合部位を有する多価抗体 (例えば、四価抗体) であってよく、これは、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現によって容易に生成することができる。多価抗体は、二量体化ドメインおよび3つまたはそれ以上の抗原結合部位を含み得る。好ましい二量体化ドメインは、Fc領域またはヒンジ領域を含む (またはそれらからなる)。この状況において、抗体は、Fc領域、およびFc領域のアミノ末端側の3つまたはそれ以上の抗原結合部位を含むことになる。本明細書における好ましい多価抗体は、3個~約8個、しかし好ましくは4個の抗原結合部位を含む (またはそれらからなる)。多価抗体は、少なくとも1本のポリペプチド鎖 (および好ましくは2本のポリペプチド鎖) を含み、ここで、ポリペプチド鎖は2つまたはそれ以上の可変領域を含む。例えば、ポリペプチド鎖はVD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fcを含んでよく、式中、VD1は第1可変領域であり、VD2は第2可変領域であり、FcはFc領域の1つのポリペプチド鎖であり、X1およびX2はアミノ酸またはポリペプチドを表し、nは0または1である。例えば、ポリペ

20

30

【0205】

電荷の改変は多重特異性抗体の状況において特に有用であり、ここで、Fab分子におけるアミノ酸置換によって、それらの結合アームの1つ (または、3つ以上の抗原結合Fab分子を含む分子の場合には複数) においてVH/VL交換を有するFabベースの二重/多重特異性抗原結合分子の生成において起こり得る、軽鎖と、適合しない重鎖との誤対合 (ベンス・ジョーンズ型副生成物) が減少する (参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、PCT特許出願公開第WO2015/150447号、特にその中の実施例もまた参照されたい)。

40

【0206】

したがって、特定の態様において、治療剤に含まれる抗体は、

(a) 第1抗原に特異的に結合する第1 Fab分子

(b) 第2抗原に特異的に結合する第2 Fab分子であって、Fab軽鎖とFab重鎖の可変ドメインVLとVHが互いに入れ替えられている、第2 Fab分子

を含み、

50

ここで、第1抗原が活性化T細胞抗原であり、第2抗原が標的細胞抗原であるか、または第1抗原が標的細胞抗原であり、第2抗原が活性化T細胞抗原であり；かつ

ここで、

- i) a) による第1 Fab分子の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸が正荷電アミノ酸によって置換されており（Kabatによる番号付け）、かつa) による第1 Fab分子の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸もしくは213位のアミノ酸が負荷電アミノ酸によって置換されており（Kabat EUインデックスによる番号付け）；または
ii) b) による第2 Fab分子の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸が正荷電アミノ酸によって置換されており（Kabatによる番号付け）、かつb) による第2 Fab分子の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸もしくは213位のアミノ酸が負荷電アミノ酸によって置換されている（Kabat EUインデックスによる番号付け）。

10

【0207】

抗体は、i) およびii) において言及された両方の改変を含むことはできない。第2 Fab分子の定常ドメインCLとCH1は、互いに入れ替えられていない（すなわち、交換されないままである）。

【0208】

抗体の別の態様では、a) による第1 Fab分子の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸が、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）、またはヒスチジン（H）によって（1つの好ましい態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）によって）置換されており（Kabatによる番号付け）、かつa) による第1 Fab分子の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸または213位のアミノ酸が、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）によって置換されている（Kabat EUインデックスによる番号付け）。

20

【0209】

さらなる態様では、a) による第1 Fab分子の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸が、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）、またはヒスチジン（H）によって置換されており（Kabatによる番号付け）、かつa) による第1 Fab分子の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸が、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）によって置換されている（Kabat EUインデックスによる番号付け）。

【0210】

特定の態様では、a) による第1 Fab分子の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸が、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）、またはヒスチジン（H）によって（1つの好ましい態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）によって）置換されており（Kabatによる番号付け）、123位のアミノ酸が、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）、またはヒスチジン（H）によって（1つの好ましい態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）によって）置換されており（Kabatによる番号付け）、かつa) による第1 Fab分子の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸が、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）によって置換されており（Kabat EUインデックスによる番号付け）、213位のアミノ酸が、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）によって置換されている（Kabat EUインデックスによる番号付け）。

30

40

【0211】

より特定の態様では、a) による第1 Fab分子の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸がリジン（K）によって置換されており（Kabatによる番号付け）、123位のアミノ酸がリジン（K）またはアルギニン（R）によって置換されており（Kabatによる番号付け）、かつa) による第1 Fab分子の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸がグルタミン酸（E）によって置換されており（Kabat EUインデックスによる番号付け）、213位のアミノ酸がグルタミン酸（E）によって置換されている（Kabat EUインデックスによる番号付け）。

【0212】

50

さらにより特定の態様では、a) による第1 Fab分子の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸がリジン (K) によって置換されており (Kabatによる番号付け)、123位のアミノ酸がアルギニン (R) によって置換されており (Kabatによる番号付け)、かつa) による第1 Fab分子の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸がグルタミン酸 (E) によって置換されており (Kabat EUインデックスによる番号付け)、213位のアミノ酸がグルタミン酸 (E) によって置換されている (Kabat EUインデックスによる番号付け)。

【0213】

F. 精製

ある特定の態様において、本開示の抗体は精製することができる。本明細書で用いられる「精製された」という用語は、その他の構成要素から単離可能な組成物であって、タンパク質がその天然に得られ得る状態と比較して任意の程度まで精製されている組成物を指すことが意図される。したがって、精製されたタンパク質はまた、それが天然に存在し得る環境から解放されたタンパク質を指す。「実質的に精製された」という用語が用いられる場合、この呼称は、タンパク質またはペプチドが、組成物の主要な構成要素を形成する、例えば、組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、またはそれ以上を構成する組成物を指す。

10

【0214】

タンパク質精製技法は当業者に周知である。これらの技法は、1つのレベルでは、細胞環境をポリペプチド画分と非ポリペプチド画分に粗分画することを伴う。ポリペプチドを他のタンパク質から分離した後、関心対象のポリペプチドを、クロマトグラフィーおよび電気泳動技法を用いてさらに精製して、部分的もしくは完全な精製 (または均一になるまでの精製) を達成することができる。純粋なペプチドの調製に特に適した分析法は、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー; ポリアクリルアミドゲル電気泳動; 等電点電気泳動である。タンパク質精製のためのその他の方法には、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などを用いた、または熱変性による沈殿と、その後の遠心分離; ゲル濾過、逆相、ヒドロキシルアパタイト、およびアフィニティークロマトグラフィー; ならびにそのようなおよびその他の技法の組み合わせが含まれる。

20

【0215】

本開示の抗体の精製において、原核または真核発現系においてポリペプチドを発現させ、変性条件を使用してタンパク質を抽出することが望ましい場合がある。ポリペプチドは、ポリペプチドのタグ化部分に結合するアフィニティークラムを使用して、他の細胞成分から精製することができる。当技術分野において一般に公知のように、様々な精製段階を行う順序を変更してもよく、またはある特定の段階を省略してもよく、それでもなお実質的に精製されたタンパク質またはペプチドを調製するための適した方法をもたらすと考えられている。

30

【0216】

一般的に、完全な抗体は、抗体のFc部分と結合する作用物質 (すなわち、プロテインA) を利用して分画される。あるいは、抗原を使用して、適切な抗体を同時に精製および選択することができる。そのような方法は、カラム、フィルター、またはビーズなどの支持体に結合させた選択剤を利用する場合が多い。抗体を支持体に結合させ、混入物を除去し (例えば、洗浄除去し)、条件 (塩、熱等) を適用することにより抗体を放出させる。

40

【0217】

タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量化するための様々な方法が、本開示に照らして当業者に公知であろう。これらには、例えば、活性画分の比活性を決定すること、またはSDS/PAGE解析により画分内のポリペプチドの量を評価することが含まれる。画分の純度を評価するための別の方法は、画分の比活性を算出すること、それを最初の抽出物の比活性と比較すること、およびこのようにして純度を算出することである。活性の量を表すために用いられる実際の単位は、当然ながら、精製を追跡するために選択された特定のアッセイ技法、および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すか

50

否かに依存することになる。

【0218】

ポリペプチドの移動が、SDS/PAGEの異なる条件によって、時に著しく変動し得ることが公知である (Capaldi et al., 1977)。したがって、異なる電気泳動条件下では、精製または部分精製された発現産物の見かけの分子量は変動し得ることが認識されるであろう。

【0219】

III. タウペプチドエピトープ

本発明者は、診断および受動免疫のための抗体、ならびに対象において治療および/または防御免疫応答を引き起こすための能動ワクチンの生産に有用であると考えられる、いくつかのタウ断片を同定した。いずれの方法論も本書の他所に開示されており、それらの開示は本明細書に組み入れられる。

10

【0220】

本明細書に記載されるペプチドは、病原型タウの状況において特有の露出または構造を有することが予測される配列を表し、したがって有効なワクチンおよび診断用イムノアッセイの作製を促進する重要なエピトープを表すであろう。ペプチドエピトープのリストの下には、本発明者がどのようにして、タウの構造および高次構造に関する出現した情報を使用して、治療および診断の両方のために有効な抗原を設計するためのペプチド配列および該配列の非天然改変物を選び出したかを説明するための詳細な理論的根拠がある。開示されたエピトープ設計の概要は以下の通りである：

20

R1/R3ヘアピン；

R1/R3ヘアピンのN末端部分；

R1/R3ヘアピンのC末端部分；

R2/R3ヘアピン；

R2/R3ヘアピンのN末端部分；

R2/R3ヘアピンのC末端部分；

R1/R2ヘアピン；

R1/R2ヘアピンのN末端部分；

R1/R2ヘアピンのC末端部分；

R3/R4ヘアピン；

R3/R4ヘアピンのN末端部分；

R3/R4ヘアピンのC末端部分；

R4ヘアピン；

R4ヘアピンのN末端部分；

R4ヘアピンのC末端部分；

上記のヘアピン間の介在断片；

タウ274～311；

タウ274～311抗原内の断片；

N末端およびC末端の両方からのタウ274～311の切断体；

タウ274～311抗原の高次構造変異体。

30

40

【0221】

ペプチドは、一般的に約100残基以下のアミノ酸ポリマーと定義される。その最大長は当然のことながら、75残基以下、50残基以下、または37残基のように、より小さくてもよい。本開示によるペプチドの最小長は約5残基であるが、少なくとも6残基、少なくとも7残基、少なくとも10残基、または少なくとも20残基の長さであってもよい。最小長と最大長の範囲は、上記の任意の2つの最小サイズと最大サイズを組み合わせることによって作り出すことができ、例えば、6～38残基、6～100残基、6～50残基、6～25残基、10～30残基などであるが、これらに限定されない。ペプチドはまた、すべてのLアミノ酸、すべてのDアミノ酸、またはLアミノ酸とDアミノ酸の混合物を含み得る。ペプチドはまた、特定もしくは不特定の位置にアミノ酸類似体を、または不特定の位置に非

50

天然アミノ酸を含み得る。また、特定の位置における保存的置換が企図される。

【0222】

ほとんどのワクチンは、関心対象のタンパク質のペプチド配列（以下に定義される）の概念に基づいて開発されるのに対し、本明細書において、本発明者は、タウタンパク質構造の出現した知見を使用して、局所的な二次構造およびさらには三次構造を獲得する短いアミノ配列を同定している。これは、ある特定の例（以下に詳述される、トランス-プロリンペプチドを参照されたい）においては、非天然のポリペプチド配列の作出を伴い得る。特定の高次構造状態の抗原を捕捉することで、タウタンパク質の病原性高次構造に対する特異性が生じる。このように、本明細書におけるペプチドの定義は、純粋なアミノ酸配列に加えて、構造的な情報をとらえている。

10

【0223】

ペプチドは、全長タンパク質と同様に、DNA構築物を用いる発現によって生成することができる。しかしながら、ペプチドの長さはより短いため、化学合成を用いることもできる。有機化学において、ペプチド合成とは、複数のアミノ酸が、ペプチド結合としても公知であるアミド結合を介して連結された化合物であるペプチドの生成である。ペプチドは、一方のアミノ酸のカルボキシル基ともう一方のアミノ酸のアミノ基との縮合反応によって化学的に合成される。様々なアミノ酸側鎖との望ましくない副反応を防ぐためには、保護基戦略が通常必要である。化学的なペプチド合成は、最も一般的には、ペプチドのカルボキシル末端（C末端）から開始し、アミノ末端（N末端）に向かって進行する。生物におけるタンパク質生合成（長いペプチド）は、この逆方向で行われる。

20

【0224】

ペプチドの化学合成は、古典的な液相技法を用いて行うことができるが、大半の研究開発の状況では、固相法（以下を参照されたい）に取って代わられている。しかしながら、工業目的のペプチドの大量生産においては、液相合成はその有用性を維持している。

【0225】

化学合成により、細菌での発現が難しいペプチドの生成、非天然アミノ酸の取り込み、ペプチド/タンパク質骨格の改変、およびD-アミノ酸からなるD-タンパク質の合成が容易になる。

【0226】

研究室で合成ペプチドを生成するための確立された方法は、固相ペプチド合成（SPPS）として公知である。SPPSは、Robert Bruce Merrifieldによって開発されたものであり、これによって、不溶性の多孔質支持体上でのアミノ酸誘導体の逐次反応を通じたペプチド鎖の迅速な構築が可能になる。

30

【0227】

固体支持体は、反応基（アミン基またはヒドロキシル基など）で官能化された小さなポリマー樹脂ビーズからなり、これが新生ペプチド鎖に結びつく。ペプチドは合成を通して支持体に共有結合されたままであるため、過剰な試薬および副生成物を洗浄および濾過によって除去することができる。このアプローチにより、従来の液相合成を使用する場合に必要なとされる、各反応段階後の、溶液からの産物ペプチドの比較的時間を要する単離が回避される。

40

【0228】

ペプチド鎖のN末端に結合させようとする各アミノ酸は、そのN末端および側鎖を、側鎖および使用する保護戦略に応じて、Boc（酸不安定性）またはFmoc（塩基不安定性）などの適切な保護基を用いて保護しなければならない。

【0229】

一般的なSPPS手順は、N末端の脱保護とカップリング反応を交互に行う反復サイクルの1つである。各段階の間に、樹脂を洗浄することができる。まず、アミノ酸を樹脂に結合させる。続いて、アミンを脱保護し、次いで2番目のアミノ酸の遊離酸と結合させる。このサイクルを、所望の配列が合成されるまで繰り返す。SPPSサイクルはまた、未反応のアミノ酸の末端が反応しないように阻止するカップリング段階を含み得る。合成の終了時

50

に、トリフルオロ酢酸のような強酸または求核剤を用いて、すべての保護基を除去すると同時に、固体支持体から粗ペプチドを切断する。有機溶媒可溶性の副産物を除去するために、粗ペプチドをジエチルエーテルのような非極性溶媒から沈殿させることができる。粗ペプチドは、逆相HPLCを用いて精製することができる。特により長いペプチドの精製工程は、産物と非常によく似た少量のいくつかの副産物を除去しなければならないため、困難であり得る。この理由から、純度レベルを犠牲にすることなく収率を最大化するために、MCSGPなどのいわゆる連続クロマトグラフィー工程が、商業的状況においてますます使用されるようになってきている。

【0230】

SPPSは反応収率によって制限され、典型的には、70アミノ酸程度のペプチドおよびタンパク質は、合成の利用可能性の限界を超えてしまう。合成の難しさは配列にも依存する；典型的に、アミロイドなどの凝集しやすい配列は、作製が難しい。より長い長さは、ネイティブケミカルライゲーションなどのライゲーションアプローチを用いて入手することができ、ここで、完全に脱保護された2つのより短い合成ペプチドが溶液中で共に連結され得る。

10

【0231】

SPPSの幅広い適用を可能にした重要な特徴は、カップリング段階において極めて高い収率が生じることである。高効率のアミド結合形成条件が必要であり、各アミノ酸を過剰に（2～10倍）添加すべきである。カップリング中のアミノ酸のラセミ化を最小限に抑えることも、最終ペプチド産物におけるエピマー化を避けるために極めて重要である。

20

【0232】

アミンとカルボン酸との間のアミド結合形成は遅く、そのため通常は「カップリング試薬」または「活性化剤」が必要である。カルボキシル基の活性化は、一般的にその場での「活性エステル」の形成を伴う。

【0233】

アミド結合の形成には、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）およびジイソプロピルカルボジイミド（DIC）などのカルボジイミドが用いられる場合が多い。この反応は、反応性の高いO-アシルイソ尿素の形成を経て進行する。この反応性中間体は、ペプチドのN末端アミンに攻撃され、ペプチド結合を形成する。O-アシルイソ尿素の形成は、ジクロロメタンなどの非極性溶媒中で最も早く進行する。

30

【0234】

DICは、液体として分注が容易であり、かつ尿素副産物（N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド）は容易に洗浄除去されるため、SPPSには特に有用である。逆に、関連するカルボジイミドである1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC）は、水性後処理中に洗浄することによってその尿素副産物が除去され得るため、液相ペプチドカップリングに使用される場合が多い。

【0235】

カルボジイミド活性化により、活性化アミノ酸のラセミ化の可能性が広がる。ラセミ化は、トリアゾール系の1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール（HOBT）および1-ヒドロキシ-7-アザ-ベンゾトリアゾール（HOAt）などの「ラセミ化抑制」添加剤を用いて回避することができる。これらの試薬は、O-アシルイソ尿素中間体を攻撃して活性エステルを形成させ、続いてこれがペプチドと反応して所望のペプチド結合を形成する。カルボジイミドカップリングの添加剤であるシアノヒドロキシイミノ酢酸エチル（Oxyma）は、HOAtの代替物として作用する。

40

【0236】

いくつかのカップリング試薬は、カルボジイミドを完全に省き、HOAt/HOBT部分を非求核性陰イオン（テトラフルオロホウ酸またはヘキサフルオロリン酸）のアミニウム/ウロニウム塩またはホスホニウム塩として組み込む。アミニウム/ウロニウム試薬の例には、HATU（HOAt）、HBTU/TBTU（HOBT）、およびHCTU（6-ClHOBT）が含まれる。HBTUとTBTUは、陰イオンの選択のみが異なる。ホスホニウム試薬には、PyBOP（HOB

50

t) およびPyAOP (HOAt) が含まれる。

【0237】

これらの試薬は、カルボジイミド活性化条件と同じ活性エステル種を形成するが、最初の活性化段階の速度が異なり、これはカップリング試薬の炭素骨格の性質によって決まる。さらに、アミニウム/ウロニウム試薬は、ペプチドのN末端と反応して不活性なグアニジノ副産物を形成し得るが、ホスホニウム試薬はそうではない。

【0238】

ペプチド合成用の固体支持体は、液体の迅速な濾過を可能にするために、物理的安定性に関して選択される。適した支持体は、SPPS中に使用される試薬および溶媒に対して不活性であるが、試薬の浸透を可能にし、かつ第1アミノ酸の結合を可能にするために、使用される溶媒中で膨潤しなければならない。

【0239】

固体支持体の3つの主要な型は：ゲル型支持体、表面型支持体、および複合物である。ペプチド合成に使用される固体支持体の改良により、SPPSの脱保護段階中のTFAの反復使用に耐える能力が強化された。C末端のカルボン酸が所望されるのかまたはアミドが所望されるのかに基づいて、2つの主要な樹脂が使用される。Wang樹脂は、1996年の時点で、C末端カルボン酸を有するペプチドに最も一般的に使用されている樹脂である。

【0240】

アルツハイマー病および関連するタウオパチーでは、タウタンパク質の凝集が神経変性の根底にある。タウには6つのアイソフォームがあり、そのすべてが、病的な集合体または凝集体中に見出され得る。スプライシングに応じて、これらは、0個、1個、または2個のN末端ドメイン、および3個または4個の反復ドメイン配列を含む(表A)。

【0241】

(表A) NおよびRドメインの包含/排除に基づく6つのタウアイソフォームの命名法

0,1,2N	3,4R	タウ命名法
0	3	0N3R
1	3	1N3R
2	3	2N3R
0	4	0N4R
1	4	1N4R
2	4	2N4R

【0242】

Center for Alzheimer's and Neurodegenerative Diseasesの最近の研究により、タウタンパク質は、もともと構造化されていないのではなく、実際には異なる高次構造アンサンブルを形成することが示される。1つ目のクラスの構造は、健常対照において見出され、タンパク質凝集の生化学的アッセイにおいて比較的不活性である(本明細書においてM_iと称される)。2つ目のクラスは、タウ病態の症例において見出され、「シードコンピテント(seed-competent)」である構造を表し、この構造は、自己組織化して、不活性なタウ単量体を凝集状態に変換するための高次構造鋳型として機能し得る(本明細書においてM_sと称される)。Mirbaha et al. (2018)において、発明者は、架橋と質量分析(XL-MS)を用いて、特定の分子内接触によってM_iとM_sが区別されると判断した。これは、2つのアミロイド形成配列であるVQIINK (SEQ ID NO: 3) およびVQIVYK (SEQ ID NO: 1) を露出させる、タウの反復ドメイン(RD、3つまたは4つのR配列からなる)内の高次構造変化に関連している。これらの配列は、4RタウのR2/R3およびR3/R4の接合部に存在する予測されるヘアピン構造内に存在する。R2領域を欠く3Rタウの状況においては、R1/R2、R4/R' (4つ目の反復のすぐC末端側にある配列)、およ

10

20

30

40

50

びR1/R3の接合部に、付加的な予測されるヘアピンが存在する。最近の研究により、これらのヘアピン構造が、M_Sの状況において不安定化することが示される。このことから、これらの構造の内部および周辺の配列が、重要な治療および診断標的となることが予測される。

【0243】

ペプチドの具体的なカテゴリーを以下に記載する：

1. P301に非天然アミノ酸、具体的にはトランス-プロリンを包含するエピトープは、病的な高次構造のタウを検出し、処置するための特異性を生み出す。

公表された (Mirbaha et al., 2018) および未公表の (Drombosky, Biorxiv 2018) 構造生物学的研究により、病的立体配置のタウはトランス立体配置のP301を伴って存在することが示される。このことから、この構造を特異的に包含するエピトープは、免疫療法 (受動および能動ワクチン)、ならびに髄液または血液で使用される診断検査の優れた標的になると予測される。タンパク質の適切な部分を包含するために、本発明者は、aa294~311が最も効果的であると予測する。

10

2. タウタンパク質全体にわたるヘアピン構造を包含するエピトープは、標的とするための重要な残基である。

タウのヘアピン構造に関する本発明者らの研究により、タンパク質中の凝集しやすい配列をマスクする「ゲートキーパー」配列が存在することが示される。本発明者らは、疾患状態では、ゲートキーパー配列が、凝集しやすい配列を脱マスクすると予測する。これにより、ゲートキーパー配列および凝集しやすい配列の両方においてエピトープの露出が可能になり、これらは診断および治療の強力な標的となるであろう。これらの部位においてトランスプロリン残基を利用する非天然エピトープは、重要な治療手段となるであろう。

20

3. aa130~160を包含するエピトープは、病的形態のタウと反応させるための重要な標的となる。Mirbaha et al. (2018) において解明されたXL-MS研究により、タウが不活性型 (Mi) からシードコンピテント型 (Ms) に変換する際に、タウの1つの領域が劇的な高次構造変化を起こすことが示される。

これは、aa140~150と反復ドメイン内との接触を伴う。これはペプチドの劇的な高次構造シフトを示す。本発明者は、これが、治療用または診断用抗体と相互作用するための新たなアミノ酸を示すと予測する。隣接するペプチドを包含することで、潜在的なペプチド標的の範囲は130~160になる。

30

4. 特異的なpSer262は、病的形態のタウ単量体と特異的に関連している。

本発明者は、このリン酸化残基を含むエピトープは、治療および診断適用において病的タウと正常形態を識別する上で予測的であると予測する。これは、マウスおよびヒトの脳試料に由来する病的タウ単量体 対 正常なタウ単量体の質量分析に基づいている。

【0244】

以下の表は、本開示による例示的なタウペプチド配列を提供する：

(表B) タウペプチド

1) R2/R3ヘアピン (295~311) :

40

50

295-311**DNIKHVPGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 4)****295-311 P301L****DNIKHVLGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 5)****295-311 P301S****DNIKHVSGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 6)****295-311 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)****DNIKHV[4S-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 7)**

10

295-311 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)**DNIKHV[4R-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 8)**2) R2/R3ヘアピンのN末端断片 (295 ~ 305) :**295-305****DNIKHVPGGGGS (SEQ ID NO: 9)****295-305 (P301L)****DNIKHVLGGGS (SEQ ID NO: 10)**

20

295-305 (P301S)**DNIKHVSGGGGS (SEQ ID NO: 11)****295-305 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)****DNIKHV[4S-FPro] GGGGS (SEQ ID NO: 12)****295-305 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)****DNIKHV[4R-FPro] GGGGS (SEQ ID NO: 13)**3) R2/R3ヘアピンのC末端断片 (300 ~ 311) :

30

300-311**VPGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 14)****300-311 P301L****VLGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 15)****300-311 P301S****VSGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 16)****300-311 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)****V[4S-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 17)**

40

300-311 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)**V[4R-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 18)**4) R1/R2ヘアピン (258 ~ または 263 ~ 281) :

50

263-281**TENLKHQPGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 19)****263-281 (P270L)****TENLKHQLGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 20)****263-281 (P270S)****TENLKHQSGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 21)****263-281 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)****TENLKHQ[4S-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 22)**

10

263-281 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)**TENLKHQ[4R-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 23)****258-281 (pS262)****SKIGpSTENLKHQPGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 24)****258-281 (P270L)****SKIGpSTENLKHQLGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 25)**

20

258-281 (P270S)**SKIGpSTENLKHQSGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 26)****258-281 (フッ素化 4S-F-プロリン シス)****SKIGpSTENLKHQ[4S-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 27)****258-281 (フッ素化 4R-F-プロリン トランス)****SKIGpSTENLKHQ[4R-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 28)**5) R1/R2ヘアピンのN末端断片 (258 ~ または 263 ~ 274) :

30

40

50

263-274

TENLKHQPGGGK (SEQ ID NO: 29)

263-274 (P270L)

TENLKHQLGGGK (SEQ ID NO: 30)

263-274 (P270S)

TENLKHQSGGGK (SEQ ID NO: 31)

263-274 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)

TENLKHQ[4S-FPro]GGGK (SEQ ID NO: 32) 10

263-274 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)

TENLKHQ[4R-FPro]GGGK (SEQ ID NO: 33)

258-274 (pS262)

SKIGpSTENLKHQPGGGK (SEQ ID NO: 34)

258-274 (P270L)

SKIGpSTENLKHQLGGGK (SEQ ID NO: 35) 20

258-274 (P270S)

SKIGpSTENLKHQSGGGK (SEQ ID NO: 36)

258-274 (フッ素化 4S-F-プロリン シス)

SKIGpSTENLKHQ[4S-FPro]GGGK (SEQ ID NO: 37)

258-274 (フッ素化 4R-F-プロリン トランス)

SKIGpSTENLKHQ[4R-FPro]GGGK (SEQ ID NO: 38)

6) R1/R2ヘアピンのC末端断片 (269~281):

269-281

QPGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 39) 30

269-281 (P270L)

QLGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 40)

269-281 (P270S)

QSGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 41)

269-281 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)

Q[4S-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 42) 40

269-281 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)

Q[4R-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 43)

7) R3/R4ヘアピン (326~343):

326-343

GNIHHKPGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 44)

326-343 (P332L)

GNIHHKLGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 45)

326-343 (P332S)

GNIHHKSGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 46)

326-343 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)

GNIHHK[4S-FPro]GGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 47)

10

326-343 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)

GNIHHK[4R-FPro]GGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 48)

8) R3/R4ヘアピンのN末端断片 (326 ~ 336) :

326-336

GNIHHKPGGGQ (SEQ ID NO: 49)

326-336(P332L)

GNIHHKLGGGQ (SEQ ID NO: 50)

20

326-336(P332S)

GNIHHKSGGGQ (SEQ ID NO: 51)

326-336 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)

GNIHHK[4S-FPro]GGGQ (SEQ ID NO: 52)

326-336(フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)

GNIHHK[4R-FPro]GGGQ (SEQ ID NO: 53)

9) R3/R4ヘアピンのC末端断片 (331 ~ 343) :

30

331-343

KPGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 54)

331-343 (P332L)

KLGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 55)

331-343 (P332S)

KSGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 56)

331-343 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)

K[4S-FPro]GGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 57)

40

331-343 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)

K[4R-FPro]GGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 58)

10) R4ヘアピン 358 ~ 375 :

50

358-375**DNITHVPGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 59)****358-375 (P364L)****DNITHVLGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 60)****358-375 (P364S)****DNITHVSGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 61)****358-375 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)****DNITHV[4S-FPro]GGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 62)**

10

358-375 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)**DNITHV[4R-FPro]GGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 63)**1.1) R4ヘアピンのN末端断片 (358 ~ 368) :**358-368****DNITHVPGGGN (SEQ ID NO: 64)****358-368 (P364L)****DNITHVLGGGN (SEQ ID NO: 65)**

20

358-368 (P364S)**DNITHVSGGGN (SEQ ID NO: 66)****358-368 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)****DNITHV[4S-FPro]GGGN (SEQ ID NO: 67)****358-368 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)****DNITHV[4R-FPro]GGGN (SEQ ID NO: 68)**1.2) R4ヘアピンのC末端断片 (363 ~ 375) :

30

363-375**VPGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 69)****363-375 (P364L)****VLGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 70)****363-375 (P364S)****VSGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 71)****363-375 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)****V[4S-FPro]GGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 72)**

40

363-375 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)**V[4R-FPro]GGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 73)**1.3) ヘアピン間の介在断片

50

231-242 TPPKSPSSAKSR (SEQ ID NO: 150)

237-255 SSAKSRLQTAPVMPDLKN (SEQ ID NO: 151)

243-262 LQTAPVMPDLKNVKSKIGS (SEQ ID NO: 74)

253-262 LKNVKSIGS (SEQ ID NO: 75)

243-252 LQTAPVMPD (SEQ ID NO: 76)

281-294 KLDLSNVQSKCGSK (SEQ ID NO: 77)

10

288-294 QSKCGSK (SEQ ID NO: 78)

281-287 KLDLSNV (SEQ ID NO: 79)

312-325 PVDLSKVTSKCGSL (SEQ ID NO: 80)

319-325 TSKCGSL (SEQ ID NO: 81)

312-318 PVDLSKV (SEQ ID NO: 82)

20

344-357 LDFKDRVQSKIGSL (SEQ ID NO: 83)

351-357 QSKIGSL (SEQ ID NO: 84)

344-350 LDFKDRV (SEQ ID NO: 85)

376-395 LTFRENAKAKTDHGAEIVYK (SEQ ID NO: 86)

385-395 KTDHGAEIVYK (SEQ ID NO: 87)

376-384 LTFRENAKA (SEQ ID NO: 88)

30

1.4) タウ274～311抗原内の断片:

274-288

KVQIINKKLDLSNVQ (SEQ ID NO: 89)

289-300

SKCGSKDNIKHV (SEQ ID NO: 90)

305-320

SVQIVYKPVDLSKVTS (SEQ ID NO: 91) (過去の元の抗原を延長しているが、VQIVYK後の配列を対称的に保持している)

40

1.5) N末端およびC末端の両方からのタウ274～311の切断体:

50

C末端切断体

KVQIINK (SEQ ID NO: 92)
KVQIINKKLDLSNVQSKC (SEQ ID NO: 93)
KVQIINKKLDLSNVQSKCGSK (SEQ ID NO: 94)
KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV (SEQ ID NO: 95)
KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 96)

N末端切断体

10

KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 97)
CGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 98)
PGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 99)

N末端切断体由来の高次構造変種

P301L
KLDLSNVQSKCGSKDNIKHV LGGGSVQIVY (SEQ ID NO: 100)

20

P301L
CGSKDNIKHV LGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 101)

P301S
KLDLSNVQSKCGSKDNIKHV SGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 102)

P301S
CGSKDNIKHV SGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 103)

(フッ素化 4S-F-プロリン; シス)
KLDLSNVQSKCGSKDNIKHV [4S-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 104)

30

(フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)
KLDLSNVQSKCGSKDNIKHV [4R-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 105)

1.6) タウ274 ~ 311抗原の高次構造変異体

40

50

274-311 (P301L)

KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV LGGGSVQIVY K (SEQ ID NO: 106)

274-311 (P301S)

KVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV SGGGSVQIVY K (SEQ ID NO: 107)

274-311 (フッ素化 4S-F-プロリン; シス)

KVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV [4S-FPro] GGGSVQIVY K (SEQ ID NO: 108)

10

274-311 (フッ素化 4R-F-プロリン; トランス)

KVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV [4R-FPro] GGGSVQIVY K (SEQ ID NO: 109)

17) 3R

aa263-311: TENLKHQP GGGKVQIVY K (SEQ ID NO: 110)

18) 4R

aa18-34: YGL GDRKDQGGYT MHQD (SEQ ID NO: 111)

20

aa22-34: DRKDQGGYT MHQD (SEQ ID NO: 112)

aa22-38: RKDQGGYT MHQDQEGD (SEQ ID NO: 113)

aa131-141: SKDGTGSDDK K (SEQ ID NO: 114)

aa130-160: KSKDGTGSDDKKAKGADGKTK IATPRGAAPP (SEQ ID NO: 115)

aa263-281: TENLKHQP GGGKVQIINK K (SEQ ID NO: 116)

aa275-293: VQIINK KLDLSNVQSK CGS (SEQ ID NO: 117)

aa294-311: KDNIKHV PGGGSVQIVY K (SEQ ID NO: 118)

aa326-343: GNIHH KPGGGQVEVK SEK (SEQ ID NO: 119)

aa358-375: DNI THVPGGGNKK IETHK (SEQ ID NO: 120)

30

19) R1/R3ヘアピン (263~280)

40

50

263-281

TENLKHQPGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 121)

P270L 263-280

TENLKHQLGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 122)

P270S 263-2810

TENLKHQSGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 123)

263-280 (フッ素化 4S-F-プロリン シス)

TENLKHQ[4S-F-Pro シス]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 124)

10

263-280 (フッ素化 4R-F-プロリン トランス)

TENLKHQ[4R-F-Proトランス]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 125)

258-280

SKIGpSTENLKHQPGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 126)

P270L 258-280

SKIGpSTENLKHQLGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 127)

20

P270S 258-280

SKIGpSTENLKHQSGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 128)

258-280 (フッ素化 4S-F-プロリン シス)

SKIGpSTENLKHQ[4S-F-Pro シス]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 129)

258-280 (フッ素化 4R-F-プロリン トランス)

SKIGpSTENLKHQ[4R-F-Proトランス]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 130)

20) R1/R3ヘアピンのN末端断片 (263 ~ 274)

30

40

50

263-274

TENLKHQPGGGK (SEQ ID NO: 131)

P270L 263-274

TENLKHQLGGGK (SEQ ID NO: 132)

P270S 263-274

TENLKHQSGGGK (SEQ ID NO: 133)

263-274 (フッ素化 4S-F-プロリン シス)

TENLKHQ[4S-F-Proシス]GGGK (SEQ ID NO: 134) 10

263-274 (フッ素化 4R-F-プロリントランス)

TENLKHQ[4R-F-Proトランス]GGGK (SEQ ID NO: 135)

258-274

SKIGpSTENLKHQPGGGK (SEQ ID NO: 136)

P270L 258-274

SKIGpSTENLKHQLGGGK (SEQ ID NO: 137) 20

P270S 258-274

SKIGpSTENLKHQSGGGK (SEQ ID NO: 138)

258-274 (フッ素化 4S-F-プロリン シス)

SKIGpSTENLKHQ[4S-F-Proシス]GGGK (SEQ ID NO: 139)

258-274 (フッ素化 4R-F-プロリントランス)

SKIGpSTENLKHQ[4R-F-Proトランス]GGGK (SEQ ID NO: 140)

21) R1/R3ヘアピンのC末端断片 (269~280)

269-280 30

QPGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 141)

P270L 269-280

QLGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 142)

P270S 269-280

QSGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 143)

269-280 (フッ素化 4S-F-プロリン シス)

Q[4S-F-Proシス]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 144)

269-280 (フッ素化 4R-F-プロリントランス)

Q[4R-F-Proトランス]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 145) 40

【 0 2 4 5 】

IV. 能動 / 受動免疫およびタウオパチーの処置 / 予防

A. 製剤および投与

本開示は、抗タウ抗体およびそれを生成するための抗原を含む薬学的組成物を提供する。そのような組成物は、予防的または治療的有効量の抗体もしくはその断片またはペプチド免疫原、および薬学的に許容される担体を含む。具体的な態様において、「薬学的に許容される」という用語は、動物、およびより詳細にはヒトにおける使用について、連邦政府

もしくは州政府の規制当局によって承認されているか、または米国薬局方もしくは他の一般的に認識されている薬局方に収載されていることを意味する。「担体」という用語は、治療剤と共に投与される希釈剤、賦形剤、または媒体を指す。このような薬学的担体は水および油などの滅菌液体であってよく、これには石油、動物、植物、または合成起源の油、例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などが含まれる。水は、薬学的組成物を静脈内注射する場合の特定の担体である。生理食塩水および水性デキストロースおよびグリセロール溶液もまた、特に注射用溶液用の液体媒体として用いることができる。その他の適した薬学的賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコー

10

【0246】

組成物は、所望であれば、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤もまた含有し得る。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出製剤などの形態をとることができる。経口用製剤は、標準的な担体、例えば、医薬品等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等を含み得る。適した薬学的作用物質の例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。そのような組成物は、患者への適切な投与のための形態をもたらすように、適量の担体と共に、好ましくは精製形態の、予防的または治療的有効量の抗体またはその断片を含有する。製剤は投与様式に適合するべきであり、投与様式は、経口、静脈内、動脈内、頬内、鼻腔内、噴霧、気管支吸入、直腸内、腔内、局所、または機械的人工呼吸による送達であってよい。

20

【0247】

開示されているような抗体が、タウオパチーを発症するリスクのある対象においてインビボで産生される能動ワクチンもまた想定される。そのようなワクチンは、非経口投与のために製剤化することができ、例えば、皮内、静脈内、筋肉内、皮下、またはさらには腹腔内経路による注射用に製剤化することができる。皮内および筋肉内経路による投与が企図される。あるいは、ワクチンは、例えば、点鼻薬により、吸入により、ネブライザーにより、または直腸内もしくは腔内送達を介して、局所経路により粘膜に直接投与することもできる。薬学的に許容される塩には、酸性塩、および例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸と形成されたものが含まれる。遊離カルボキシル基と形成された塩もまた、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基に由来し得る。

30

【0248】

人為的獲得受動免疫として公知である抗体の受動的移入は、一般に静脈内または筋肉内注射の使用を伴う。抗体の形態は、静脈内 (IVIG) または筋肉内 (IG) 使用のためのプールされたヒト免疫グロブリンとして、免疫化されたまたは疾患から回復しているドナーからの高力価ヒトIVIGまたはIGとして、およびモノクローナル抗体 (MAb) としての、ヒトまたは動物の血漿または血清であってよい。そのような免疫は一般に、短期間しか持続せず、過敏反応、および特に非ヒト起源のグロブリンによる血清病の潜在的リスクもある。しかしながら、受動免疫は即時の防御をもたらす。抗体は、注射に適した、すなわち無菌的で注射針を通過可能な担体中で製剤化される。

40

【0249】

一般に、本開示の組成物の成分は、例えば、活性剤の量を示すアンブルまたはサシェなどの密閉容器中の乾燥凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、別々にまたは共に混合して単位剤形で供給される。組成物が注入によって投与される場合、組成物を、無菌の医薬品等級の水または生理食塩水を含む注入ボトルを用いて調剤することができる。組成物が注射によって投与される場合、投与前に成分を混合できるように、注射用の滅菌水または生理

50

食塩水のアンブルを提供することができる。

【0250】

本開示の組成物は、中性または塩の形態として製剤化することができる。薬学的に許容される塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来するような陰イオンと形成されたもの、および水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来するような陽イオンと形成されたものが含まれる。

【0251】

2. ADCC

抗体依存性細胞傷害 (ADCC) は、抗体でコーティングされた標的細胞の免疫エフェクター細胞による溶解をもたらす免疫機構である。標的細胞は、抗体またはFc領域を含むその断片が、一般的にFc領域のN末端側にあるタンパク質部分を介して特異的に結合する細胞である。「増加/減少した抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (ADCC) を有する抗体」とは、当業者に公知の任意の適した方法により決定して、増加/減少したADCCを有する抗体を意味する。

【0252】

本明細書で用いられる場合、「増加/減少したADCC」という用語は、上記で定義されたADCCの機構によって、標的細胞を取り囲む培地中の所与の抗体濃度で、所与の時間中に溶解される標的細胞の数の増加/減少、および/またはADCCの機構によって、所与の時間中に所与の数の標的細胞の溶解を達成するために必要な、標的細胞を取り囲む培地中の抗体の濃度の減少/増加のいずれかとして定義される。ADCCの増加/減少は、(当業者に公知の) 同じ標準的な産生方法、精製方法、製剤化方法、および貯蔵方法を用いて同じ種類の宿主細胞によって産生されたが、操作されていない同じ抗体によって媒介されるADCCに対するものである。例えば、本明細書に記載される方法によって、グリコシル化のパターンが変化するように(例えば、グリコシルトランスフェラーゼ、GnTIII、または他のグリコシルトランスフェラーゼを発現するように) 操作された宿主細胞によって産生された抗体によって媒介されるADCCの増加は、同じ種類の操作されていない宿主細胞によって産生された同じ抗体によって媒介されるADCCに対するものである。

【0253】

3. CDC

補体依存性細胞傷害 (CDC) は、補体系の機能である。それは、抗体または免疫系の細胞の関与なしに病原体の膜を損傷するによってそれらを死滅させる、免疫系の過程である。3つの主要な過程が存在する。それら3つはいずれも、1つまたは複数の膜侵襲複合体 (MAC) を病原体に挿入し、それが致命的なコロイド浸透圧膨潤、すなわちCDCを引き起こす。

【0254】

V. 抗体コンジュゲート

本開示の抗体を少なくとも1つの作用物質に連結して、抗体コンジュゲートを形成することができる。診断または治療剤としての抗体分子の有効性を高めるために、少なくとも1つの所望の分子または部分と連結させる、または共有結合させる、または複合体形成させることが慣習的である。そのような分子または部分は、少なくとも1つのエフェクターまたはレポーター分子であってよいが、これらに限定されない。エフェクター分子は、所望の活性、例えば細胞傷害活性を有する分子を含む。対照的に、レポーター分子は、アッセイを用いて検出され得る任意の部分として定義される。抗体にコンジュゲートされたレポーター分子の非限定的な例には、酵素、放射標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、光親和性分子、着色粒子、またはビオチンなどのリガンドが含まれる。

【0255】

抗体コンジュゲートは一般に、診断剤として使用するのに好ましい。抗体診断剤は一般に

10

20

30

40

50

、種々のイムノアッセイなどのインビトロ診断において使用するためのもの、および一般に「抗体指向性画像診断」として公知のインビボ診断プロトコールにおいて使用するものの2つのクラスに分類される。多くの適切な画像化剤が当技術分野において公知であり、それらを抗体に付着させる方法も当技術分野において公知である（例えば、米国特許第5,021,236号、第4,938,948号、および第4,472,509号を参照されたい）。使用される画像化部分は、常磁性イオン、放射性同位体、蛍光色素、NMRで検出可能な物質、およびX線画像化剤であってよい。

【0256】

常磁性イオンの場合、例として、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジウム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)、および/またはエルビウム(III)などのイオンが言及され得るが、ガドリニウムが特に好ましい。X線画像化などの他の状況において有用なイオンには、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)、および特にビスマス(III)が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0257】

治療および/または診断適用のための放射性同位体の場合、アスタチン211、14炭素、51クロム、36塩素、57コバルト、58コバルト、銅67、152Eu、ガリウム67、3水素、ヨウ素123、ヨウ素125、ヨウ素131、インジウム111、59鉄、32リン、レニウム186、レニウム188、75セレン、35硫黄、テクニシウム(technicium)99m、および/またはイットリウム90が言及され得る。125Iは、ある特定の態様において使用するのに好ましい場合が多く、テクニシウム99mおよび/またはインジウム111もまた、その低いエネルギーおよび長距離検出への適合性により、好ましい場合が多い。放射標識された本開示のモノクローナル抗体は、当技術分野における周知の方法に従って生成することができる。例えば、モノクローナル抗体は、ヨウ化ナトリウムおよび/またはヨウ化カリウム、ならびに次亜塩素酸ナトリウムなどの化学的酸化剤、またはラクトペルオキシダーゼなどの酵素酸化剤と接触させることによってヨウ素化することができる。本開示によるモノクローナル抗体は、リガンド交換工程により、例えば、過テクネチウム酸を第一スズ溶液で還元し、還元されたテクネチウムをSephadexカラム上にキレート化し、およびこのカラムに抗体を適用することにより、テクネチウム99mで標識することができる。あるいは、例えば、過テクネチウム酸、 SnCl_2 などの還元剤、フタル酸ナトリウム-カリウム溶液などの緩衝液、および抗体をインキュベートすることによる、直接標識技法を用いることもできる。金属イオンとして存在する放射性同位体を抗体に結合させるために使用される場合の多い中間官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)である。

20

30

【0258】

コンジュゲートとして使用するために企図される蛍光標識の中には、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5,6-FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Renographin、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、および/またはTexas Redが含まれる。

40

【0259】

本開示において企図される付加的な種類の抗体は、主にインビトロでの使用が意図されるものであり、その場合、抗体は、二次結合リガンド、および/または発色基質と接触すると着色産物を生じる酵素(酵素タグ)に連結される。適した酵素の例には、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(西洋ワサビ)水素ペルオキシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼが含まれる。好ましい二次結合リガンドは、ビオチンならびにアビジンおよびストレプトアビジン化合物である。そのような標識の使用は当業者に周知であり、例えば、

50

米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号、および第4,366,241号に記載されている。

【0260】

抗体に分子を部位特異的に付着させるさらに別の公知の方法は、ハプテンベースの親和性標識と抗体との反応を含む。本質的に、ハプテンベースの親和性標識は、抗原結合部位内のアミノ酸と反応し、それによってこの部位を破壊して特定の抗原反応を遮断する。しかしながら、これによって抗体コンジュゲートによる抗原結合が失われるため、有益でない場合がある。

【0261】

アジド基を含む分子もまた、低強度紫外光によって生成される反応性ニトレン中間体を通じてタンパク質への共有結合を形成するために使用することができる (Potter and Haley, 1983)。特に、プリンヌクレオチドの2-および8-アジド類似体は、粗細胞抽出物中のヌクレオチド結合タンパク質を同定するための部位特異的光プローブとして使用されている (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985)。2-および8-アジドヌクレオチドはまた、精製タンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするためにも使用されており (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989; Dholakia et al., 1989)、抗体結合剤として使用することもできる。

10

【0262】

抗体をそのコンジュゲート部分に付着またはコンジュゲートさせるための、いくつかの方法が当技術分野において公知である。いくつかの付着方法は、例えば、抗体に付着された有機キレート剤、例えば、ジエチレントリアミン五酢酸無水物 (DTPA); エチレントリアミン四酢酸; N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド; および/またはテトラクロロ-3-6-ジフェニルグリコウリル (diphenylglycouril)-3などを用いた金属キレート錯体の使用を伴う (米国特許第4,472,509号および第4,938,948号)。モノクローナル抗体はまた、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩などのカップリング剤の存在下で酵素と反応し得る。フルオレセインマーカ-とのコンジュゲートは、これらのカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアネートとの反応によって調製される。米国特許第4,938,948号では、モノクローナル抗体を使用して乳房腫瘍の画像化が達成され、検出可能な画像化部分は、メチル-p-ヒドロキシベンズイミデートまたはN-スクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸などのリンカーを用いて抗体に結合される。

20

30

【0263】

他の態様では、抗体の結合部位を変化させない反応条件を使用して、免疫グロブリンのFc領域にスルフヒドリル基を選択的に導入することによる免疫グロブリンの誘導体化が企図される。この方法論に従って生成された抗体コンジュゲートは、寿命、特異性、および感度の改善を示すことが開示されている (参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,196,066号)。レポーターまたはエフェクター分子がFc領域内の炭化水素残基にコンジュゲートされる、エフェクターまたはレポーター分子の部位特異的付着もまた、文献に開示されている (O'Shannessy et al., 1987)。このアプローチは、現在臨床評価中である、診断的および治療的に有望な抗体をもたらすと報告されている。

【0264】

VI. 免疫検出法 / 診断法

なおさらなる態様において、本開示は、タウタンパク質およびその関連抗原を結合する、精製する、除去する、定量化する、およびその他の方法で一般的に検出するための免疫検出法に関する。そのような方法は伝統的な意味で適用することができるが、別の使用は、ワクチンおよび他のウイルス貯蔵物の品質管理およびモニタリングでの使用であり、ここで、本開示による抗体を用いて、ウイルス中の抗原の量または完全性 (すなわち、長期安定性) を評価することができる。あるいは、この方法を用いて、適切な / 所望の反応性プロファイルについて様々な抗体をスクリーニングすることができる。

40

【0265】

他の免疫検出法には、タウオパチ-の診断または鑑別などの目的で、対象におけるタウタ

50

ンパク質の存在を判定するための特異的アッセイが含まれる。多種多様なアッセイ形式が企図されるが、具体的には、唾液、血液、血漿、喀痰、精液、または尿などの、対象から採取された体液中のタウタンパク質を検出するために使用されるものである。アッセイは、非医療（家庭）での使用のために形式化されることが有利であると考えられ、これには家庭用妊娠検査に類似したラテラルフローアッセイ（以下を参照されたい）が含まれる。これらのアッセイは、家族である対象が使用できるように、適切な試薬および説明書を備えたキットの形態で包装され得る。

【0266】

いくつかの免疫検出法には、少し例を挙げれば、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、およびウェスタンブロットが含まれる。特に、試料中の特異的寄生虫エピトープに対するタウ抗体を検出および定量化するための競合アッセイもまた提供される。様々な有用な免疫検出法の段階が、例えば、Doolittle and Ben-Zeev (1999)、Gulbis and Galand (1993)、De Jager et al. (1993)、および Nakamura et al. (1987) などの科学文献に記載されている。一般的に、免疫結合法は、タウタンパク質を含むことが疑われる試料を採取する段階、および場合によっては免疫複合体の形成を可能にするのに効果的な条件下で、試料を本開示による第1抗体と接触させる段階を含む。

10

【0267】

これらの方法は、試料からタウタンパク質または関連抗原を精製する方法を含む。抗体を、好ましくはカラムマトリックスの形態などの固体支持体に連結し、タウタンパク質または抗原成分を含むことが疑われる試料を、固定化抗体に適用する。不必要な成分をカラムから洗浄し、固定化抗体に対して免疫複合体形成したタウ抗原を残し、次いでこれを、カラムから生物または抗原を除去することによって収集する。

20

【0268】

免疫結合法はまた、試料中のタウタンパク質または関連成分を検出し、その量を定量化する方法、ならびに結合過程において形成された任意の免疫複合体を検出および定量化する方法を含む。ここでは、タウタンパク質またはその関連抗原を含むことが疑われる試料を採取し、その試料を、タウタンパク質またはその成分と結合する抗体と接触させた後、特定の条件下で形成された免疫複合体を検出し、その量を定量化する。抗原検出に関して、解析される生体試料は、タウタンパク質または関連抗原を含むことが疑われる任意の試料、例えば、組織切片もしくは標本、ホモジナイズされた組織抽出物、血液および血清を含む体液、または糞便もしくは尿などの分泌物などであってよい。

30

【0269】

免疫複合体（一次免疫複合体）の形成を可能にするのに効果的な条件下でかつ十分な期間にわたり、選択された生体試料を抗体と接触させる段階は、一般に、抗体組成物を試料に単に添加し、抗体が、存在するタウタンパク質または関連抗原と免疫複合体を形成する、すなわちそれらに結合するのに十分に長い期間にわたり、混合物をインキュベートすることである。この期間の後、組織切片、ELISAプレート、ドットブロット、またはウェスタンブロットなどの試料-抗体組成物を、一般的には洗浄して、非特異的に結合した任意の抗体種を除去し、一次免疫複体内で特異的に結合した抗体のみを検出できるようにする。

40

【0270】

一般的に、免疫複合体形成の検出は当技術分野において周知であり、多数のアプローチの適用を通じて達成され得る。これらの方法は一般的に、放射性タグ、蛍光タグ、生物学的タグ、および酵素タグのいずれかなどの、標識またはマーカの検出に基づく。そのような標識の使用に関する特許には、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号、および第4,366,241号が含まれる。当然ながら、当技術分野において公知のように、第2抗体および/またはビオチン/アビジンリガンド結合配置などの二次結合リガンドの使用を通じて、さらな

50

る利点が見出され得る。

【0271】

検出に用いられる抗体は、検出可能な標識にそれ自体連結することができ、その場合には、次いでこの標識を単に検出し、それによって組成物中の一次免疫複合体の量を決定することが可能になる。あるいは、一次免疫複体内で結合した第1抗体は、該抗体への結合親和性を有する第2結合リガンドによって検出することができる。このような場合には、第2結合リガンドを検出可能な標識に連結することができる。第2結合リガンドはそれ自体抗体である場合が多く、したがって「二次」抗体と称され得る。二次免疫複合体の形成を可能にするのに効果的な条件下でかつ十分な期間にわたり、一次免疫複合体を、標識された二次結合リガンドまたは抗体と接触させる。次いで二次免疫複合体を、一般的には洗

10

【0272】

さらなる方法は、2段階アプローチによる一次免疫複合体の検出を含む。上記のように、抗体への結合親和性を有する抗体などの第2結合リガンドを用いて、二次免疫複合体を形成する。洗浄後、同様に免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするのに効果的な条件下でかつ十分な期間にわたり、二次免疫複合体を、第2抗体に対する結合親和性を有する第3結合リガンドまたは抗体と接触させる。第3リガンドまたは抗体は検出可能な標識に連結され、そのように形成された三次免疫複合体の検出が可能になる。この系は、これが所望される場合に、シグナル増幅を提供し得る。

20

【0273】

免疫検出の1つの方法では、2つの異なる抗体を使用する。標的抗原を検出するために第1ビオチン化抗体が用いられ、次いで、複合体形成したビオチンに付着しているビオチンを検出するために第2抗体が用いられる。この方法では、試験しようとする試料を最初に、第1段階の抗体を含む溶液中でインキュベートする。標的抗原が存在する場合、抗体の一部は抗原に結合して、ビオチン化抗体/抗原複合体を形成する。次いで、ストレプトアビジン（もしくはアビジン）、ビオチン化DNA、および/または相補的ビオチン化DNAの連続溶液中でインキュベートすることにより、各段階でさらなるビオチン部位を抗体/抗原複合体に付加しながら、抗体/抗原複合体を増幅する。適したレベルの増幅が達成されるまで増幅段階を繰り返し、その時点で、試料をビオチンに対する第2段階の抗体を含む溶液中でインキュベートする。この第2段階の抗体は、例えば、発色基質を用いる組織酵素学によって抗体/抗原複合体の存在を検出するために使用され得る酵素で標識する。適切に増幅すると、肉眼で見えるコンジュゲートが生成され得る。

30

【0274】

免疫検出の別の公知の方法は、イムノ-PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）の方法論を利用する。このPCR法は、ビオチン化DNAとのインキュベーションまではCantor法と類似しているが、複数ラウンドのストレプトアビジンおよびビオチン化DNAのインキュベーションを用いる代わりに、抗体を放出させる低pHまたは高塩濃度緩衝液でDNA/ビオチン/ストレプトアビジン/抗体複合体を洗い流す。次いで、得られた洗浄液を用いて、適切な対照と共に適したプライマーを用いてPCR反応を行う。少なくとも理論的には、PCRの

40

【0275】

A. ELISA

イムノアッセイは、その最も単純で直接的な意味において、結合アッセイである。ある特定の好ましいイムノアッセイは、当技術分野において公知の様々な種類の酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA）である。組織切片を使用する免疫組織化学もまた、特に有用である。しかしながら、検出はそのような技法に限定されず、ウェスタンブロットリング、ドットブロットリング、FACS解析などもまた使用され得ることが、容易に認識されるであろう。

【0276】

50

1つの例示的なELISAでは、本開示の抗体を、ポリスチレンマイクロタイタープレート中のウェルなどの、タンパク質親和性を示す選択された表面上に固定化する。次いで、タウタンパク質または関連抗原を含むことが疑われる被験組成物をウェルに添加する。結合させ、洗浄して、非特異的に結合した免疫複合体を除去した後、結合した抗原を検出することができる。検出は、検出可能な標識に連結された別の抗タウ抗体を添加することにより達成することができる。この種類のELISAは、単純な「サンドイッチELISA」である。検出はまた、第2抗タウ抗体を添加した後、第2抗体に対する結合親和性を有し、検出可能な標識に連結された第3抗体を添加することにより達成することができる。

【0277】

別の例示的なELISAでは、タウ抗原を含むことが疑われる試料をウェル表面上に固定化し、次いで本開示の抗タウ抗体と接触させる。結合させ、洗浄して、非特異的に結合した免疫複合体を除去した後、結合した抗タウ抗体を検出する。最初の抗タウ抗体が検出可能な標識に連結されている場合には、免疫複合体を直接検出することができる。この場合も同様に、第1抗タウ抗体に対する結合親和性を有し、検出可能な標識に連結された第2抗体を用いて、免疫複合体を検出することができる。

10

【0278】

使用される形式にかかわらず、ELISAは、コーティング、インキュベーションおよび結合、非特異的結合種を除去するための洗浄、ならびに結合した免疫複合体の検出などの、ある特定の特徴を共通して有する。これらを以下に記載する。

【0279】

抗原または抗体のいずれかによるプレートのコーティングでは、一般に、プレートのウェルを抗原または抗体の溶液と共に、一晚または特定の時間インキュベートする。次いで、プレートのウェルを洗浄して、不完全に吸着した材料を除去する。次いで、ウェルの残りすべての利用可能な表面を、被験抗血清に関して抗原として中性である非特異的タンパク質で「コーティング」する。これらには、ウシ血清アルブミン (BSA)、カゼイン、または粉乳の溶液が含まれる。コーティングにより、固定化表面上の非特異的な吸着部位のブロックが可能となり、したがって表面上への抗血清の非特異的結合によって生じるバックグラウンドが減少する。

20

【0280】

ELISAでは、直接的な手法よりもむしろ、二次または三次検出手段を用いることが、おそらくはより慣例的である。したがって、ウェルにタンパク質または抗体を結合させ、バックグラウンドを減少させるために非反応性材料でコーティングし、洗浄して未結合の材料を除去した後、固定化表面を、免疫複合体 (抗原 / 抗体) 形成を可能にするのに効果的な条件下で、試験しようとする生体試料と接触させる。次いで、免疫複合体の検出は、標識された二次結合リガンドまたは抗体、および二次結合リガンドまたは抗体と標識された三次抗体または第3結合リガンドの組み合わせを必要とする。

30

【0281】

「免疫複合体 (抗原 / 抗体) 形成を可能にするのに効果的な条件下」は、条件が好ましくは、抗原および / または抗体を、BSA、ウシグロブリン (BGG)、またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) / Tweenなどの溶液で希釈する段階を含むことを意味する。添加されるこれらの作用物質はまた、非特異的バックグラウンドの減少を助ける傾向がある。

40

【0282】

「適した」条件はまた、インキュベーションが、効果的な結合を可能にするのに十分な温度でまたは十分な期間にわたり行われることを意味する。インキュベーション段階は典型的には、好ましくは25 ~ 27 程度の温度で約1から2時間から4時間程度行うか、または約4 程度で一晚行うことができる。

【0283】

ELISAにおけるすべてのインキュベーション段階の後、複合体を形成しなかった材料を除去するために、接触させた表面を洗浄する。好ましい洗浄手順は、PBS / Tweenまたはホウ酸緩衝液などの溶液による洗浄を含む。被験試料と最初に結合させた材料との間の特

50

異的免疫複合体の形成、およびその後の洗浄の後、微量の免疫複合体の存在さえも決定することができる。

【0284】

検出手段を提供するために、第2または第3抗体は、検出を可能にするための結合した標識を有する。好ましくは、これは、適切な発色基質とインキュベートすることで発色する酵素である。したがって、例えば、第1および第2免疫複合体を、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、または水素ペルオキシダーゼ結合抗体と、さらなる免疫複合体形成の発生を支持する条件下でかつそのように支持する期間にわたり接触させるまたはインキュベートすること（例えば、PBS-TweenなどのPBS含有溶液中、室温で2時間のインキュベーション）が望ましい。

10

【0285】

標識抗体とのインキュベーション後、未結合の材料を除去するための洗浄に続いて、例えば、尿素もしくはプロモクレゾールパープル、または酵素標識としてペルオキシダーゼである場合には2,2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸 (ABTS) もしくはH₂O₂などの発色基質と共にインキュベートすることにより、標識の量を定量化する。次いで、例えば、可視スペクトル分光光度計を使用して発色の程度を測定することにより、定量化を達成する。

【0286】

別の態様において、本開示は競合形式の使用を企図する。これは、試料中のタウ抗体の検出において特に有用である。競合ベースのアッセイにおいて、未知量の分析物または抗体は、既知量の標識抗体または分析物と置き換わるその能力によって決定される。したがって、シグナルの定量化可能な消失は、試料中の未知の抗体または分析物の量の指標である。

20

【0287】

B. ウェスタンブロット

ウェスタンブロット（あるいは、タンパク質イムノブロット）は、組織ホモジネートまたは抽出物の所与の試料中の特定のタンパク質を検出するために用いられる解析技法である。これは、ポリペプチドの長さ（変性条件）によって、またはタンパク質の3-D構造（天然/非変性条件）によって、天然のまたは変性したタンパク質を分離するために、ゲル電気泳動を使用する。次いで、タンパク質を膜（典型的にニトロセルロースまたはPVDF）に転写し、標的タンパク質に特異的な抗体を使用してそれらをプロービング（検出）する。

30

【0288】

試料は、全組織からまたは細胞培養物から採取することができる。ほとんどの場合、固体組織を最初に、ブレンダーを使用して（試料容積がより大きい場合）、ホモジナイザーを使用して（容積がより小さい場合）、または超音波処理によって、機械的に破壊する。細胞もまた、上記の機械的方法の1つによって破碎することができる。しかしながら、細菌、ウイルス、または環境試料がタンパク質の供給源になり得、ウェスタンブロッティングが細胞研究のみに制限されないことに留意すべきである。細胞の溶解を促しかつタンパク質を可溶化するために、界面活性剤、塩、および緩衝液の組み合わせを使用してもよい。それ自体の酵素による試料の消化を防ぐために、多くの場合にプロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤が添加される。タンパク質の変性を回避するために、組織調製は低温で行われる場合が多い。

40

【0289】

試料のタンパク質を、ゲル電気泳動を用いて分離する。タンパク質の分離は、等電点 (pI)、分子量、電荷、またはこれらの因子の組み合わせによるものであってよい。分離の性質は、試料の処理およびゲルの性質に依存する。これは、タンパク質を決定するのに非常に有用な方法である。単一の試料から二次元にタンパク質を展開する二次元 (2-D) ゲルを使用することも可能である。タンパク質は、第1の次元において等電点（それらが中性の正味電荷を有するpH）に従って、および第2の次元においてそれらの分子量に従って

50

分離される。

【0290】

タンパク質を抗体検出に利用しやすくするために、それらをゲル内からニトロセルロースまたはポリフッ化ビニリデン (PVDF) 製の膜上に移動させる。膜をゲルの上に置き、積み重ねた濾紙をその上に置く。積み重ねたもの全体を緩衝液の中に入れると、緩衝液は毛管作用によって濾紙を上昇し、それと共にタンパク質が運ばれる。タンパク質を転写するための別の方法は、エレクトロブロットイングと称され、電流を使用してタンパク質をゲルからPVDFまたはニトロセルロース膜中に引き寄せる。タンパク質は、ゲル内で有した構成を維持しながら、ゲル内から膜上に移動する。このブロットイング過程の結果として、タンパク質は、検出用の薄い表面層上に露出される(以下を参照されたい)。両種の膜とも、非特異的タンパク質結合特性(すなわち、すべてのタンパク質と等しく良好に結合する)について選択されている。タンパク質結合は、疎水性相互作用、および膜とタンパク質との間の電荷相互作用に基づく。ニトロセルロース膜は、PVDFよりも安価であるがはるかにより脆く、プロービングの繰り返しに十分に耐えることができない。ゲルから膜へのタンパク質の転写の均一性および全体的な有効性は、クーマシーブリリアントブルーまたはボンソーS色素で膜を染色することによって確認することができる。転写されたならば、標識一次抗体を用いて、または非標識一次抗体の後に、標識プロテインAもしくは一次抗体のFc領域に結合する二次標識抗体を使用する間接的検出を用いて、タンパク質を検出する。

10

【0291】

C. ラテラルフローアッセイ

ラテラルフローアッセイは、ラテラルフロー免疫クロマトグラフィーアッセイとしても公知であり、特殊で高価な機器を必要とせずに試料(マトリックス)中の標的分析物の存在(または非存在)を検出することが意図された単純な装置であるが、読み取り機器によって支援される実験室ベースの多くの適用も存在する。典型的には、これらの検査は、家庭用検査、ポイントオブケア検査、または実験室での使用のいずれかのための低資源医療診断として用いられる。広く普及している周知の適用は、家庭用妊娠検査である。

20

【0292】

この技術は、多孔性紙または焼結ポリマーの小片などの、一連のキャピラリーベッドに基づいている。これらのエレメントはそれぞれ、流体(例えば、尿)を自発的に輸送する能力を有する。第1エレメント(試料パッド)は、スポンジとしての役割を果たし、過剰な試料流体を保持する。浸漬されると、流体は、製造業者が、標的分子(例えば、抗原)と、粒子の表面上に固定化されたその化学的パートナー(例えば、抗体)との間の最適化された化学反応を保証するためのすべてを含有する塩-糖マトリックス中に乾燥形式の生物活性粒子(以下を参照されたい)であるいわゆるコンジュゲートを貯蔵した第2エレメント(コンジュゲートパッド)に移動する。試料流体は塩-糖マトリックスを溶解しながら、粒子もまた溶解し、1つの混合輸送作用において、多孔質構造の中を流れる間に試料とコンジュゲートが混合される。このようにして、分析物は粒子に結合し、第3キャピラリーベッドを通過してさらに移動する。この材料は、製造業者によって第3分子が固定化された1つまたは複数の部位(ストリップと称される場合が多い)を有する。試料-コンジュゲート混合物がこれらのストリップに到達するまでに、分析物は粒子上に結合しており、第3「捕捉」分子は複合体と結合する。しばらくして、より多くの流体がストリップを通過すると、粒子が蓄積し、ストリップ部位の色が変わる。典型的には、少なくとも2つのストリップが存在する:1つ(対照)は任意の粒子を捕捉し、それにより反応条件および技術が良好に機能したことを示し、第2のものは、特定の捕捉分子を含み、分析物分子が固定化された粒子のみを捕捉する。これらの反応域を通過した後、流体は、単に廃棄物容器としての役割を果たす最後の多孔質材料 ウィック の中に入る。ラテラルフロー検査は、競合アッセイまたはサンドイッチアッセイのいずれかとして動作し得る。ラテラルフローアッセイは、米国特許第6,485,982号に開示されている。

30

40

【0293】

50

D. 免疫組織化学

本開示の抗体はまた、免疫組織化学 (IHC) による研究のために調製された、新鮮凍結した組織ブロックおよび/またはホルマリン固定しパラフィン包埋した組織ブロックの両方と組み合わせて使用することができる。これらの粒子標本から組織ブロックを調製する方法は、様々な予後因子の以前のIHC研究において使用されて成功しており、当業者に周知である (Brown et al., 1990; Abbondanzo et al., 1990; Allred et al., 1990)。

【0294】

簡潔に説明すると、凍結切片は、小さいプラスチックカプセルにおいて、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で、凍結「粉碎」組織 50 ng を室温で再水和する段階; 遠心分離によって粒子をペレット化する段階; それらを粘性の包埋媒体 (OCT) 中に再懸濁する段階; カプセルを反転させ、かつ/もしくは遠心分離によって再度ペレット化する段階; -70 のイソペンタン中で瞬時凍結させる段階; プラスチックカプセルを切断し、かつ/もしくは凍結した円柱状組織を取り出す段階; 円柱状組織を低温槽マイクロームチャック上に固定する段階; および/またはカプセルから 25 ~ 50 個の連続切片を切り出す段階によって調製することができる。あるいは、凍結組織試料全体を連続切片の切り出しに使用することもできる。

10

【0295】

永久切片は、プラスチック微量遠心チューブ中で試料 50 mg を再水和させる段階; ペレット化する段階; 10%ホルマリン中に再懸濁して4時間固定化する段階; 洗浄/ペレット化する段階; 温めた 2.5% 寒天中に再懸濁する段階; ペレット化する段階; 氷水で冷却して寒天を硬化させる段階; 組織/寒天ブロックをチューブから取り出す段階; パラフィン中にブロックを浸潤させかつ/もしくは包埋する段階; および/または50個までの連続永久切片を切り出す段階を伴う同様の方法によって調製することができる。この場合も同様に、組織試料全体を代わりに使用することもできる。

20

【0296】

E. 免疫検出キット

なおさらなる態様において、本開示は、上記の免疫検出法と共に使用するための免疫検出キットに関する。抗体はタウ抗原の検出に使用することができるため、抗体をキット中に含めることができる。したがって、免疫検出キットは、適したな容器手段中に、タウ抗原と結合する第1抗体、および任意に免疫検出試薬を含む。

30

【0297】

ある特定の態様では、抗タウ抗体を、カラムマトリックスおよび/またはマイクロタイタープレートのウェルなどの固体支持体に予め結合させることができる。キットの免疫検出試薬は、所与の抗体に会合または連結された検出可能な標識を含む、種々の形態のうちの任意の1つの形態をとり得る。二次結合リガンドに会合または付着された検出可能な標識もまた企図される。例示的な二次リガンドは、第1抗体に対する結合親和性を有する二次抗体である。

【0298】

本発明のキットにおいて使用するためのさらに適した免疫検出試薬には、第1抗体に対する結合親和性を有する第2抗体と、第2抗体に対する結合親和性を有し、検出可能な標識に連結された第3抗体とを含む2成分試薬が含まれる。上記の通り、いくつかの例示的な標識が当技術分野において公知であり、そのような標識のすべてを本開示と関連して用いることができる。

40

【0299】

キットは、検出アッセイ用の検量線を作成するために使用され得るように、標識または非標識にかかわらず、本明細書に記載されるエピトープを含むペプチドなどのタウまたは関連抗原の適切に分注された組成物をさらに含み得る。キットは、完全にコンジュゲートされた形態で、中間の形態で、またはキットの使用者によってコンジュゲートされる別個の部分として、抗体-標識コンジュゲートを含み得る。キットの構成要素は、水性媒体中または凍結乾燥形態のいずれかで包装され得る。

50

【0300】

キットの容器手段は一般に、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、またはその他の容器手段を含み、その中に抗体を入れるか、または好ましくは適切に分注することができる。本開示のキットはまた典型的に、商業的販売のために厳重に閉じ込めた状態で抗体、抗原、およびその他の任意の試薬容器を含めるための手段を含む。そのような容器には、その中に所望のバイアルが保持される、射出成形または吹込成形プラスチック容器が含まれ得る。

【実施例】

【0301】

VII. 実施例

以下の実施例は、本開示の特定の態様を実証するために含めるものである。以下の実施例において開示される技法は、本開示の実施において良好に機能することが本発明者によって発見された技法を表し、したがってその実施のための特定の様式を構成すると見なされ得ることが、当業者によって認識されるべきである。しかしながら、当業者は、本開示を考慮して、本開示の精神および範囲から逸脱することなく、開示される特定の態様において多くの変更を行い、なお同様のまたは類似の結果を得ることができることを認識すべきである。

【0302】

実施例1 材料および方法

R1/R2、R2/R3、R3/R4、およびR4末端の界面でPGGGモチーフを中心とする阻害性ヘアピンが形成されるという本発明者の知見に基づいて、ペプチドを設計した。設計戦略は、ヘアピン高次構造が、リピートドメイン内で観察される可溶性高次構造とシードコンピテント高次構造との間で変化するという考えに重点を置いている。最初の戦略では、WTおよび変異体の両方の状況でヘアピンを取り囲むエピトープを捕捉し、シスとトランスの高次構造間の変換を促進するプロリン類似体([4S-FPro] および [4R-FPro])もまた組み込んでいる；シスは凝集から保護的であり、トランスは凝集促進性である。無傷のヘアピンをプロービングすることに加えて、本発明者は、ヘアピンの左側および右側を含むエピトープを設計した。おそらくこのような場合には、高次構造を制御する必要はないであろう。ある特定の抗原(14~16)は、275~311エピトープの単純な摂動を含む。

【0303】

実施例2 結果および考察

タウのアミロイド形成は、隣接残基によって支配される。タウタンパク質において、306VQIVYK³¹¹(SEQ ID NO: 1)配列は、アミロイド形成を駆動する重要なモチーフである。これは、タウのリピートドメイン内のR3の最初の部分にコードされている(図1A)。溶液中では、306VQIVYK³¹¹(SEQ ID NO: 1)ヘキサペプチドは、チオフラビンT(ThT)蛍光強度によって測定されるように、自発的かつ迅速に凝集するのに対し、N末端配列295DNIKHV300(SEQ ID NO: 2)は凝集しない(図1B)。これらの配列を組み合わせると、インシリコモデリングによって予測される、R2からR3にまたがる最小構造エレメント

(²⁹⁵DNIKHVPGGGSVQIVYK³¹¹(SEQ ID NO: 4), R2R3)

が得られる(図1A~C)。この配列は、多数の疾患関連変異がクラスター化する場所でもある。実際に、このモチーフを表すWTペプチド断片は容易に凝集せず、96時間までThTは検出されなかった(図1D)。一方、R2R3ペプチド断片に代わりに導入された疾患関連変異(図1D)は、自発的なアミロイド形成を生じるのに十分であった：R2R3-P301S、R2R3-P301L、R2R3-N296、R2R3-G303V、R2R3-S305N、およびR2R3-V300I。大きな構造が見出されなかった野生型R2R3ペプチドを除いて、これらのペプチドはそれぞれ、透過型電子顕微鏡によってアミロイド様の原線維形態を形成することが確認された。

【0304】

10

20

30

40

50

プロリン301のシス-トランス異性化は、凝集を調節する。タウにおけるプロリン異性化事象は、凝集および疾患において役割を果たすと提唱されているが、P301の異性化はタウの凝集および病態に関連づけられていない。306VQIVYK311 (SEQ ID NO: 1) の近位にあるP301におけるセリンまたはロイシン置換は、凝集傾向を劇的に変化させる。本発明者は、P301がP-G-G-Gモチーフのターンを誘導する重要な役割を果たし、それが折り畳み構造を媒介すると仮定した。本発明者らは、P301の異性化が自発的なアミロイド形成に影響を及ぼすかどうかを試験した。以下のいずれかを優先的に含むプロリン類似体を伴う一連のR2R3ペプチドを構築した：(1) シス回転異性体 (2S,4S)-フルオロプロリン、(2) トランス回転異性体 (2S,4R)-フルオロプロリン、または (3) シスとトランスとの間で容易に相互変換するプロリン類似体 (4,4)-ジフルオロプロリン (図2A)。R2R3-トランスのみが自発的に凝集し (図2B)、これにより、タウの病態形成におけるプロリン異性化事象の可能性が示された。加えて、本発明者は、R1R2、R3R4、R4R'断片、およびスプライシング変種R1R3を含む、タウのリピードメイン内の他の領域における高次構造変化が、タウの病態形成を標的とする、または病的形態を検出するための適した部位を提供し得ると予測する (図3A~B)。

10

【0305】

重要なヘアピン領域の要約

以前の研究により、R2R3ドメインが重要なヘアピンを包含することが示される (図1A~2Bに詳述される)。相同性および予測される構造に基づいて、本発明者は、他の接合部ドメインもまた、異なるタウオパチーにおいて高次構造変化を起こすヘアピン構造を具

20

【0306】

実施例3 材料および方法

抗体

直鎖状ペプチド抗原は、契約研究機関 (Genscript、Piscataway, NJ) によって合成されたものであり、付加したN-末端システイン残基を介してKLHにコンジュゲートした。合成トランスプロリン残基には、Fmoc-トランス-4-フルオロ-L-プロリンを使用し、合成シスプロリン残基には、Fmoc-シス-4-フルオロ-L-プロリンを使用した。直鎖状ペプチドエピトープは以下の通りであった：

30

a.a. 22-34 - **DRKDQGGYTMHQD**

a.a. 145-160 - **ADGKTKIATPRGAAPP**

a.a. 244-266 - **QTAPVPMPLKKNVKSIGSTENL**

a.a. 259-266 - **KIGSTENL**

a.a. 263-281 (R1R2)トランス-P270 - **TENLKHQ[トランス-P]GGGKVQIINKK**

a.a. 263-311 Δ275-305 (R1R3)トランス-P270 - **TENLKHQ[トランス-P]GGGKVQIVYK**

a.a. 294-311 (R2R3)トランス-P301 - **KDNIKHV[トランス-P]GGGSVQIVYK**

a.a. 294-311 (R2R3)シス-P301 - **KDNIKHV[シス-P]GGGSVQIVYK**

40

a.a. 326-343 (R3R4)トランス-P332 - **GNIHHK[トランス-P]GGGQVEVKSEK**

a.a. 358-375 (R4R')トランス-P364 - **DNITHV[トランス-P]GGGNKKIETHK**

【0307】

マウスまたはウサギにKLH結合ペプチド抗原を接種し、それぞれモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を作製した。マウスモノクローナル抗体については、ハイブリドーマからの馴化培地を使用することにより複数のハイブリドーマをスクリーニングし、免疫沈降 (IP) を行った。ウサギポリクローナル抗体は、IPに使用する前にアフィニティ精製した。

50

【0308】

免疫沈降

50マイクロリットルのDynabeadsプロテインA (Thermo Fisher、Waltham, MA) を、100ulのハイブリドーマ馴化培地または10ugのアフィニティー精製ウサギポリクローナル抗体と共に1時間インキュベートし、PBS-T (0.02% Tween-20を含む1×PBS) で2回洗浄し、15ugの全脳ホモジネートと共に4 で一晩インキュベートした。上清を収集し、免疫沈降物は、低pH溶出緩衝液 (Thermo Fisher、Waltham, MA) を用いて溶出した。

【0309】

シーディングアッセイ

各IPについて、溶離液および上清中のシーディング活性を、以前に記載されたように、タウRD-CFPおよびタウ-RD-YFPを発現するHEK293 FRETバイオセンサー細胞を用いて測定した (Holmes et al., 2014)。各IPまたは上清試料を用いて、96ウェルプレートの3つのウェルを処理した。それぞれの3つ組について、4.5 μlのLipofectamine 2000 (Thermo Fisher、Waltham, MA) を25.5 μlのOptiMEMに懸濁し、室温で5分間インキュベートした。次いで、Lipofectamine混合物を各試料に添加し、混合物を室温で30分間インキュベートした後、96ウェルプレート内のバイオセンサー細胞の3ウェルに添加した。48時間後、細胞を2% PFAで固定し、フローサイトメトリーを用いてFRETシグナルを測定し、FRET陽性率を決定した。IPまたは上清の各試料について、結果を、15 μlの脳ホモジネート (IP前のホモジネート量) の参照試料中のシーディング活性に対して正規化した。IP画分と上清画分の正規化シーディング活性を用いて、各抗体-脳ペアのIP効率を決定した。

【0310】

実施例4 結果

異なる抗体を用いた免疫沈降のIP画分と上清画分におけるシーディング活性を比較すると、種々のIP効率パターンが示される。アルツハイマー病 (AD)、嗜銀顆粒病 (AGD)、進行性核上性麻痺 (PSP)、および大脳皮質基底核変性症 (CBD) と病理組織学的に診断された4つのヒト脳由来の組織のホモジネートを用いて、抗体をスクリーニングした。図4は、これらの抗体のうちの1つであるR1R2ハイブリドーマ1のIP効率を決定するために用いられたシーディング活性データの一例である。この抗体は、IP画分中の高レベルのシーディング活性、および上清中に残存する比較的lowレベルのシーディング活性によって明らかのように、ADおよびAGDの脳ホモジネート由来の病的タウシードを高い効率で免疫沈降させるが、PSPおよびCBDの脳由来のタウシードについてはIP効率が低い。表Cは、13種類の異なる直鎖状ペプチドタウエピトープに対して産生された抗体の相対的なIP効率を要約したものである。緑色で強調した抗体は、アフィニティー精製したウサギポリクローナル抗体であり、赤色で強調した抗体は、未精製のマウスモノクローナル抗体である。いくつかの抗体は、黄色で強調された疾患依存性のIP効率を示す。異なるエピトープを標的とする抗体の疾患識別特性は、異なるタウオパチーを規定する病的タウ種間の構造的差異を反映している。そのような抗体は、貴重な基礎科学研究ツールであり、潜在的な診断的有用性を有する。さらに、それらは、タウオパチーの免疫療法におけるエピトープ選択の重要性を示している。

【0311】

(表C) ヒトタウオパチー脳ホモジネート由来のタウシードの免疫沈降における、特定のタウ直鎖状ペプチドエピトープに対する抗体の性能

10

20

30

40

抗体	配列	AD	AGD	PSP	CBD
aa 22-34	DRKDQGGYTMHQD	++	++	++	++
aa 145-160	ADGKTKIATPRGAAPP	+	+	+	+
タウA	QTAPVPMPLKKNVKSIGSTENL	+++	+++	+++	+++
タウB	KIGSTENL	+++	+++	+++	+++
R1R2ハイブリドーマ1	TENLKHQ[trans-P]GGGKVQIINKK	+++	+++	+	+
R1R2ハイブリドーマ2	TENLKHQ[trans-P]GGGKVQIINKK	+++	+++	++	+
R1R3ハイブリドーマ1	TENLKHQ[trans-P]GGGKVQIVYK	+++	+++	-	-
R1R3ハイブリドーマ2	TENLKHQ[trans-P]GGGKVQIVYK	++	+	-	-
R2R3tP	KDNIKHV[trans-P]GGGVSQIVYK	++	++	++	++
R2R3cP	KDNIKHV[cis-P]GGGVSQIVYK	++	++	++	++
R3R4	GNIHKK[trans-P]GGGQVEVKSEK	++	n/a	+	+
R4R'ハイブリドーマ1	DNITHV[trans-P]GGGNKKIETHK	++	n/a	+	++
R4R'ハイブリドーマ2	DNITHV[trans-P]GGGNKKIETHK	+	n/a	-	+

10

凡例

カスタムマウス
mAb
ウサギ pAb
疾患識別

20

【0312】

本明細書において開示および特許請求する組成物および/または方法はすべて、本開示に照らして、過度の実験を行うことなく作製および実行することができる。本開示の組成物および方法を好ましい態様に関して説明してきたが、本開示の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載される組成物および/もしくは方法に対して、ならびにそのような方法の段階において、または段階の順序において、変更が加えられ得ることは、当業者に明白であろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連しているある特定の作用物質を、本明細書に記載される作用物質の代わりに用いても、同一または類似の結果が達成され得ることが明白であろう。当業者にとって明白なそのような同様の代替物および変更物はすべて、添付の特許請求の範囲によって規定される本開示の精神、範囲、および概念の範囲内にあると見なされる。

30

【0313】

VIII. 参考文献

以下の参考文献は、それらが、本明細書において記載されるものを補足する例示的な手順の詳細またはその他の詳細を提供する限りにおいて、参照により本明細書に具体的に組み入れられる:

40

50

Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition.

U.S. Patent 3,817,837

U.S. Patent 3,850,752

U.S. Patent 3,939,350

U.S. Patent 3,996,345

U.S. Patent 4,196,265

U.S. Patent 4,275,149

10

U.S. Patent 4,277,437

U.S. Patent 4,366,241

U.S. Patent 4,472,509

U.S. Patent 4,554,101

U.S. Patent 4,680,338

U.S. Patent 4,816,567

U.S. Patent 4,867,973

20

U.S. Patent 4,938,948

U.S. Patent 5,021,236

U.S. Patent 5,141,648

U.S. Patent 5,196,066

U.S. Patent 5,563,250

U.S. Patent 5,565,332

U.S. Patent 5,856,456

U.S. Patent 5,880,270

30

U.S. Patent 6,485,982

“Antibodies: A Laboratory Manual,” Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY,
1988.

Abbondanzo *et al.*, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 12(4), 480-489, 1990.

Alonso *et al.*, *Nat. Med.*, 2:783-787, 1996.

Allred *et al.*, *Arch. Surg.*, 125(1), 107-113, 1990.

Arriagada *et al.*, *Neurology*, 42:631-639, 1992.

40

- Atherton *et al.*, *Biol. of Reproduction*, 32, 155-171, 1985.
- Barzon *et al.*, *Euro Surveill.* 2016 Aug 11; 21(32).
- Beltramello *et al.*, *Cell Host Microbe* 8, 271-283, 2010.
- Bramblett *et al.*, *Neuron.*, 10:1089-1099, 1993.
- Brown *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 12:130(1), :111-121, 1990.
- Campbell, *In: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984. 10
- Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.
- Chen *et al.*, *Nat Commun.* 10(1):2493. doi: 10.1038/s41467-019-10355-1, 2019.
- De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.* 23(2), 165-179, 1993.
- Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.
- Diamond *et al.*, *J Virol* 77, 2578-2586, 2003.
- Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109, :215-237, 1999.
- Duffy *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543, 2009.
- Elder *et al.* Infections, infertility and assisted reproduction. Part II: Infections in reproductive medicine & Part III: Infections and the assisted reproductive laboratory. Cambridge UK: Cambridge University Press; 2005. 20
- Gefter *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
- Gornet *et al.*, *Semin Reprod Med.* 2016 Sep; 34(5):285-292. Epub 2016 Sep 14.
- Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.* 24(12), 1271-1285, 1993.
- Gustke *et al.*, *FEBS Lett.*, 307:199-205, 1992.
- Halfon *et al.*, *PLoS ONE* 2010; 5 (5) e10569.
- Hartig *et al.*, *Eur. J. Neurosci.*, 25:69-80, 2007. 30
- Hessell *et al.*, *Nature* 449, 101–4, 2007.
- Hutton *et al.*, *Nature*, 393:702-705, 1998.
- Khatoon *et al.*, *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.
- King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6, 511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497, 1975.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Mansuy *et al.*, *Lancet Infect Dis.* 2016 Oct; 16(10):1106-7.
- Mirbaha *et al.*, *Elife*, pii: e36584. doi: 10.7554/eLife.36584, 2018. 40

Nakamura *et al.*, In: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*,

Chapter 27, 1987.

O'Shannessy *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.

Persic *et al.*, *Gene* 187:1, 1997

Poorkaj *et al.*, *Ann. Neurol.*, 43:815-825, 1998.

Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.

Purpura *et al.*, *Lancet Infect Dis.* 2016 Oct; 16(10):1107-8. Epub 2016 Sep 19.

10

Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 15th Ed., 3:624-652, 1990.

Spillantini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:7737-7741, 1998.

Tang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:28324-28330, 1996.

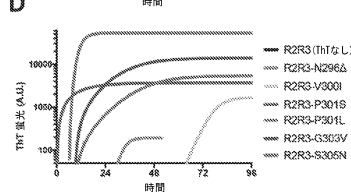
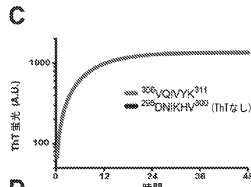
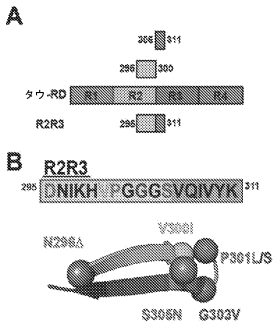
Wawrzynczak & Thorpe, In: *Immunoconjugates, Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.

Yu *et al.*, *J Immunol Methods* 336, 142-151, doi:10.1016/j.jim.2008.04.008, 2008.

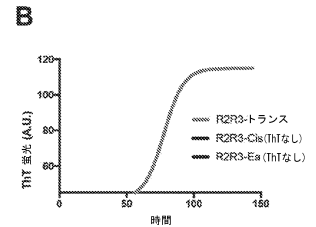
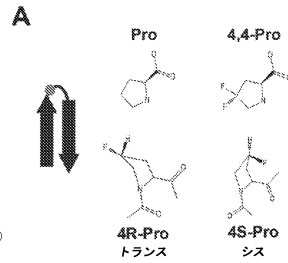
【 図面 】

20

【 図 1 】



【 図 2 】



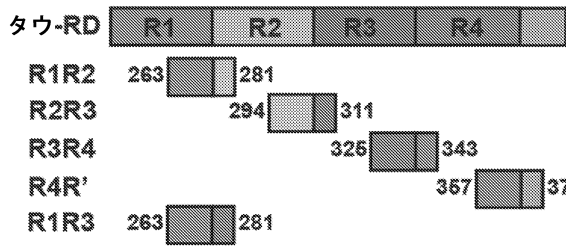
30

40

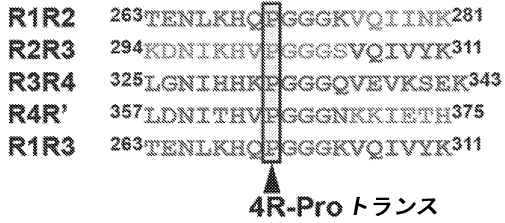
50

【 図 3 】

A

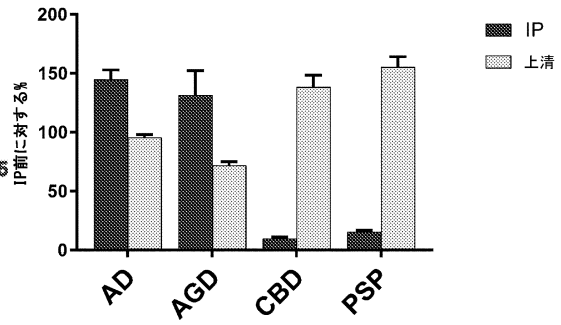


B



【 図 4 】

R1R2トランス-P270
ハイブリドーマ1



10

【 配列表 】

2022513075000001.app

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/61928

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC - A61K 39/00, C07K 16/18 (2020.01)
 CPC - A61K 39/0007, A61K 39/0008, G01N 2800/2821, G01N 33/6896, C07K 2317/34, C07K 14/4711

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

10

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/0145082 A1 (AXON NEUROSCIENCE SE) 25 May 2017 (25.05.2017) Abstract; SEQ ID NO:171; para [0036], [0122], [0135], [0157], [0176], [0190], [0336-0337], [0399], [0441], [0474] [0719]	1-3, 11-13, 21-23, 26-28, 31-33

20

30

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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
16 January 2020

Date of mailing of the international search report
10 FEB 2020

40

Name and mailing address of the ISA/US
 Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
 Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer
 Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/61928

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.: 4-10, 14-20, 24-25, 29-30, 34-40
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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:

- 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.:

20

30

- 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.

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
	C 1 2 N 15/13	

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,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,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,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ダイアモンド マーク アイ .
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイネズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
ティー サウスウェスタン メディカル センター内
- (72)発明者 ドロンボスキー ケネス
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイネズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
ティー サウスウェスタン メディカル センター内
- (72)発明者 チェン ダイル
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイネズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
ティー サウスウェスタン メディカル センター内
- (72)発明者 マノン ヴィクター
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイネズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
ティー サウスウェスタン メディカル センター内
- (72)発明者 リュウ シャオフア
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイネズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
ティー サウスウェスタン メディカル センター内
- (72)発明者 ミルザイ ハミド
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイネズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
ティー サウスウェスタン メディカル センター内

-
- (72)発明者 ヴァケール - アリシア ジャイム
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイーンズ プールバード 5 3 2 3 ユー
ティー サウスウェスタン メディカル センター内
- (72)発明者 ミルバハ ヒルダ
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイーンズ プールバード 5 3 2 3 ユー
ティー サウスウェスタン メディカル センター内
- (72)発明者 ジョーチミアク ルーカス
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイーンズ プールバード 5 3 2 3 ユー
ティー サウスウェスタン メディカル センター内
- F ターム (参考) 4C085 AA02 AA03 AA13 AA14 AA16 AA38 BB11 CC32 EE01 GG01
GG02 GG03 GG04 GG08 GG10
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19 BA20
BA21 CA40 CA45 DA76 DA86 EA21 EA31 EA50 FA40 FA50 FA74