

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】平成30年8月9日(2018.8.9)

【公表番号】特表2017-521097(P2017-521097A)  
 【公表日】平成29年8月3日(2017.8.3)  
 【年通号数】公開・登録公報2017-029  
 【出願番号】特願2017-520755(P2017-520755)  
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
 C 0 7 K 16/46 (2006.01)  
 C 0 7 K 16/18 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/16 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/14 (2006.01)  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 C 1 2 N 1/15  
 C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 N 5/10  
 C 0 7 K 16/46  
 C 0 7 K 16/18  
 A 6 1 K 39/395 N  
 A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 P 21/00  
 A 6 1 P 25/16  
 A 6 1 P 25/28  
 A 6 1 P 25/14  
 A 6 1 P 43/00 1 1 1

【手続補正書】

【提出日】平成30年6月26日(2018.6.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】ヒト化抗タウ抗体

【技術分野】

【0001】

#### 関連出願の相互参照

本出願は、2015年6月2日に出願された米国特許出願第62/170,036号、2014年11月17日に出願された米国特許出願第62/080,903号および2014年6月27日に出願された米国特許出願第62/018,436号の35 U.S.C. § 119(e)の下での優先権の利益を主張するものであり、これらの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0002】

##### 配列表の組み込み

添付の配列表の内容は、参照により本出願に組み込まれる。付属の配列表のテキストファイル、名称C2N1120\_4WO\_Sequence\_Listingは、2015年6月26日に作成され、9kbである。このファイルは、Windows OSを使用するコンピュータ上でMicrosoft Wordを用いて評価することができる。

#### 【0003】

本発明は、タウに結合するヒト化抗体およびこの抗原結合フラグメントならびにタウオパチーを治療するためにこのような抗体を使用する方法に関する。特に、本発明は、タウの特異的エピトープに結合し、タウの播種を妨げるヒト化抗体および抗原結合フラグメントに関する。

#### 【背景技術】

#### 【0004】

タウオパチーは、脳内の不溶性過剰リン酸化タウタンパク質の蓄積を共通して有する。20を超える種々の神経変性障害がある程度の神経細線維変性を特徴とし、タウオパチーと分類され得る(Williams 2006)。進行性核上性麻痺(PSP)および皮質基底核変性症(CBD)などの基本型タウオパチーは、唯一のまたは主たる中枢神経系病変であるタウ封入体の特徴とする。基本型タウオパチーは、アルツハイマー病(AD)で認められるアミロイドベータ( )斑またはパーキンソン病(PD)で認められるレビー小体のように、他の神経病理学的特徴の存在下でタウ凝集体が認められる他のタウオパチーとは異なる。これらの非基本型タウオパチーでは、タウ病変が一次疾患駆動因子であるのかまたは他のタンパク質のミスフォールディングおよび神経変性に続発するのかはより不確かである。

#### 【0005】

進行性核上性麻痺(PSP、スティール リチャードソン オルスゼフスキー症候群としても知られる。)は、進行性の神経変性障害であり、推定年間発生率は10万人当たり5-7人である(Golbe 2014)。米国内では、約2万人がこの疾患に罹患する。PSPの頻度に明らかな地理的、民族的、性別または人種的相違は存在しない。PSPは、最初は、特発性パーキンソン病を含む他の脳障害と類似の臨床症状を呈し得る。この理由から、PSPの正しい診断は時として遅れ、通常は臨床症状の最初の発症の1から3年後に診断される。症状の発症はほとんどの場合50歳から70歳の間であり、臨床経過には変動があるが、症状の発症時からの典型的な生存期間は5から9年である(Houghton, 2007)。臨床像の不均一性はあるが、現在リチャードソン症候群と称される、最も一般的で最初に記述されたPSP症候群は、転倒を引き起こす顕著な姿勢の不安定性および軸性硬直、視界障害を生じさせる核上性注視麻痺、前頭葉-皮質下型認知症および吸引の原因となる嚥下困難の存在である。疾患の経過は進行性であり、一様に致死的である(Williams and Lees 2009)。

#### 【0006】

病理学的には、PSPは、脳幹、小脳、基底核および大脳皮質におけるニューロンおよびグリア中のタウタンパク質の過剰リン酸化された不溶性凝集体の異常蓄積を特徴とする(Williams and Lees 2009)。PSPにおけるタウ凝集の程度と分布は、生存期間中のPSPの総体的症状と強く相関する(Schofield et al., 2012)。リチャードソン症候群を表す米国国立神経疾患研究所および進行性核上性麻痺学会(National Institute of Neurologica

l Disorders and the Society for Progressive Supranuclear Palsy) (NINDS - SPSP)の研究基準は、根底にあるPSP病変を高度に予測する(Litvan et al. 1996)。脳の様々な領域におけるニューロン喪失は、タウ凝集体から成る神経原線維変化(NFT)を伴う。特定のドーパミン作動性、コリン作動性、GABA作動性およびノルアドレナリン作動性の系を侵すものを含む、多数の神経伝達物質異常も生じる。

【0007】

現在承認されているPSPのための治療はない(Stamelou et al. 2010)。PSPにおける治療効果試験の残念な結果は、証拠に基づく標準的な治療法を推奨することを不可能にする(Boxer et al. 2014)。有効な疾患修飾療法または神経保護療法が存在しない状況で、PSPは、満たされていない緊急の医学的必要性である。

【0008】

アルツハイマー病(AD)は、認知および行動機能の不可逆的な喪失が存在する、一般的な慢性進行性神経変性疾患である。この疾患は10年以上にわたって持続することがあり、軽度の症状から極めて重篤な症状発現まで進行する。ADは、65歳以上の集団の約10%および80歳以上の集団の30%以上が罹患すると言われている。アルツハイマー病は、病理学的には細胞外アミロイド斑および細胞内神経原線維変化として現れる。神経原線維変化は、例えば、対らせん状および直線状フィラメントへと集合する、微小管結合タンパク質タウから成る。これらの実体は機能的に関連し得ることが示唆されているが、アミロイド沈着が病的タウフィラメント集合を促進する機構かまたはこの逆の場合の機構かは明らかではない。

【0009】

タウオパチーの細胞内神経細線維構造体(神経原線維変化、変性神経突起および神経絨毛糸)は、ペアードヘリカルフィラメント(PHF)を有する。PHFの主要なタンパク質サブユニットは、異常に過剰リン酸化された形態の微小管関連タンパク質タウである。神経細線維変化を有するニューロンは変性し、この変性の程度は罹患個人における認知症の程度と直接相関する。

【0010】

微小管関連タンパク質タウを含む線維状細胞封入体を有することが公知の他のタウオパチーには、ピック病(PiD)、第17番染色体に連鎖するパーキンソン症候群を伴う、集合的に前頭側頭型認知症と称される関連障害の群(FTDP-17)、筋委縮性側索硬化症(ALS)、クロイツフェルト ヤコブ病(CJD)、ボクサー認知症(DP)、ゲルストマン ストロイスラー シャインカー病(GSSD)、レヴィー小体病、慢性外傷性脳症(CTE)およびハンチントン病が含まれる。これらの疾患における病因、臨床症状、病理所見および線維状細胞封入体の生化学的組成物は異なるが、正常な細胞タンパク質が凝集して様々な線維状封入体を形成することに関与する機構は同様であることを示唆する新たな証拠が存在する。微小管関連タンパク質タウのコンフォメーションの初期変化は、フィラメント集合体の核または種の生成を開始するように働く、つまり鍵となる特徴の1つであると考えられる。この工程は、正常タンパク質の翻訳後修飾によって、特定の遺伝子の変異または欠失によって、および正常タンパク質に結合し、結果としてこれらのコンフォメーションを改変する因子によって影響され得る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の1つの態様として、タウに特異的に結合する単離された抗体または抗原結合フラグメントが提供される。抗体またはフラグメントは重鎖可変(VH)領域および軽鎖可変(VL)領域を含み、VHおよびVL領域の各々は、図1および2に示すアミノ酸配列から選択される配列を有する。より特定すると、VL領域は、配列番号1、2、3および4[VK1、VK2、VK3およびVK4]から成る群より選択されるアミノ酸配列を有

することができ、VH領域は、配列番号5、6、7および8[VH1、VH2、VH3およびVH4]から成る群より選択されるアミノ酸配列を有し得る。幾つかの実施形態では、VL領域は配列番号2[VK2]のアミノ酸配列を有し、およびVH領域は配列番号5[VH1]のアミノ酸配列を有する。幾つかの実施形態では、抗体はFc領域を含み、これはヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはこの変異体、例えばS241Pヒンジ安定化変異を含むヒトIgG4であり得る。抗体は、ヒトアイソタイプまたはこの変異体の軽鎖定常領域を含み得る。幾つかの実施形態では、抗体またはフラグメントはscFvまたはFabである。幾つかの実施形態では、抗体またはフラグメントは、ヒト化抗体もしくはフラグメントまたはキメラ抗体もしくはフラグメントである。抗体またはフラグメントはモノクローナル抗体であり得る。幾つかの実施形態では、抗体またはフラグメントは、ヒトタウタンパク質への特異的結合に関してHJ8.5と競合する。幾つかの実施形態では、抗体またはフラグメントは、少なくとも $10^{-4}$  Mの平衡解離定数(Kd)でヒトタウタンパク質に結合する。

#### 【0012】

本発明の別の態様として、複数の抗原結合領域を有する多重特異性抗体または抗原結合フラグメントが提供される。多重特異性抗体またはフラグメントの少なくとも1つの抗原結合領域はヒトタウタンパク質に結合する。または、2つの抗原結合領域を有する二重特異性抗体または抗原結合フラグメントが提供される。二重特異性抗体またはフラグメントの抗原結合領域の1つはヒトタウタンパク質に結合する。または、抗体または抗原結合フラグメントの1本の腕がヒトタウタンパク質への特異的結合に関してHJ8.5と競合する、二重特異性抗体または抗原結合フラグメントが提供される。または、抗体または抗原結合フラグメントの1本の腕が重鎖可変(VH)領域および軽鎖可変(VL)領域を含んで成り、VHおよびVL領域の各々が、図1および2に示すアミノ酸配列から選択される配列を有する、二重特異性抗体または抗原結合フラグメントが提供される。

#### 【0013】

前記抗体または抗原結合フラグメントのいずれかは、毒性ペイロード、任意選択により薬物複合体または放射性核種をさらに含み得る。

#### 【0014】

本発明のさらに別の態様として、前記抗体もしくは抗原結合フラグメントのいずれか、または図1もしくは2に示すVH領域もしくはVL領域をコードする単離された核酸分子が提供される。このような核酸分子を含むベクター(例えば発現ベクターなど)が提供され得る。このようなベクターを含む単離された宿主細胞が提供され得る。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞、例えば哺乳動物細胞であり得る。

#### 【0015】

本発明の別の態様として、医薬組成物が提供される。医薬組成物は、前記抗体もしくは抗原結合フラグメントのいずれかまたは本明細書で述べる核酸分子、および医薬として許容される担体を含む。

#### 【0016】

本発明のさらに別の態様として、図1および2に示す軽鎖の1つの配列を含む単離されたアミノ酸配列が提供される。またはもしくは加えて、図1および2に示す重鎖の1つの配列を含む単離されたアミノ酸配列が提供される。

#### 【0017】

本発明のさらなる態様として、アミノ酸配列DQGGYT(配列番号9)を含むエピトープに特異的に結合する単離されたヒト化抗体または抗原結合フラグメントが提供される。抗体または抗原結合フラグメントは、ドナー抗体に由来するVHおよびVL領域のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、抗体は、Fc領域、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはこの変異体のFc領域を含む。Fc領域は、ヒトIgG4またはこの変異体、例えばS241Pヒンジ安定化変異を含むヒトIgG4であり得る。抗体は、ヒトアイソタイプまたはこの変異体の軽鎖定常領域を含み得る。幾つかの実施形態では、抗体またはフラグメントはscFvまたはFabである。幾つかの実施形態では、

抗体またはフラグメントは、ヒト化抗体もしくはフラグメントまたはキメラ抗体もしくはフラグメントである。抗体またはフラグメントはモノクローナル抗体であり得る。抗体またはフラグメントは、抗体またはフラグメントの1本の腕がアミノ酸配列D Q G G Y T (配列番号9)を含むエピトープに特異的に結合する二重特異性抗体または抗原結合フラグメントであり得る。幾つかの実施形態では、検出可能部分または治療部分に連結された前記抗体またはフラグメントの1つを含む免疫複合体が提供される。

【0018】

別の態様として、アミノ酸配列G Y T M H Q D Q (配列番号10)を含むエピトープに特異的に結合する単離されたヒト化抗体または抗原結合フラグメントが提供される。抗体またはフラグメントは、ドナー抗体由来のV HおよびV L領域のC D Rを有し得る。幾つかの実施形態では、抗体またはフラグメントは、F c領域、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4またはこの変異体のF c領域を含む。F c領域は、ヒトI g G 4およびS 2 4 1 Pヒンジ安定化変異を含むこの変異体であり得る。抗体は軽鎖定常領域を含み得る。幾つかの実施形態では、抗体またはフラグメントはs c F vまたはF a bである。抗体の1本の腕がアミノ酸配列G Y T M H Q D Q (配列番号10)を含むエピトープに特異的に結合する二重特異性抗体または抗原結合フラグメントも提供される。幾つかの実施形態では、前記抗体またはフラグメントのいずれかを含む免疫複合体は、検出可能部分または治療部分に結合している。

【0019】

本発明のさらなる態様として、タウオパチーの治療を必要とするヒトに本明細書で述べる抗体またはフラグメントの1つ以上を投与することを含む、被験者においてタウオパチーを予防するまたは治療する方法。抗体または抗原結合フラグメントは、タウオパチーを予防するまたは治療するのに有効な条件下および量で投与される。タウオパチーは、アルツハイマー病(A D)、進行性核上性麻痺(P S P)、皮質基底核変性症(C B D)、ピック病(P i D)、第17番染色体に連鎖するパーキンソン症候群を伴う、集合的に前頭側頭型認知症と称される関連障害の群(F T D P - 17)、筋委縮性側索硬化症(A L S)、クロイツフェルト ヤコブ病(C J D)、ボクサー認知症(D P)、ゲルストマン ストロイスラー シャインカー病(G S S D)、レヴィー小体病、慢性外傷性脳症(C T E)またはハンチントン病の1つ以上であり得る。

【0020】

治療を必要とする被験体に抗タウ抗体またはフラグメントを投与することを含む、タウオパチーを治療する方法であって、ここで抗体または抗原結合フラグメントはタウに特異的に結合し、ならびに重鎖可変(V H)領域および軽鎖可変(V L)領域を含み、ここでV HおよびV L領域の各々は図1および2に示すアミノ酸配列から選択される配列を有し、および抗体またはフラグメントを約0.1mg/kgから約250mg/kg、または約1mg/kgから約25mg/kgの用量で被験体に投与する、方法が提供される。幾つかの実施形態では、抗体またはフラグメントは、配列番号1、2、3および4[V K 1、V K 2、V K 3およびV K 4]から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むV L領域を有する；またはもしくは加えて、抗体またはフラグメントは、配列番号5、6、7および8[V H 1、V H 2、V H 3およびV H 4]から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むV H領域を有する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】マウスH J 8.5抗体の可変領域配列ならびに重鎖および軽鎖の各々についての4つのヒト化変異体配列(4V Hおよび4V L/V K配列)を示す。M u V L (配列番号11)；V K 1 (配列番号1)；V K 2 (配列番号2)；V K 3 (配列番号3)；V K 4 (配列番号4)；M u V H (配列番号12)；V H 1 (配列番号5)；V H 2 (配列番号6)；V H 3 (配列番号7)；V H 4 (配列番号8)。

【図2-1】図2Aは、重鎖V H 1 (配列番号13)についてのヒト化可変領域および定常領域配列の配列を示す。図2Bは、重鎖V H 2 (配列番号14)についてのヒト化可変

領域および定常領域配列を示す。図 2 C は、重鎖 V H 3 (配列番号 1 5) についてのヒト化可変領域および定常領域の配列を示す。図 2 D は、重鎖 V H 4 (配列番号 1 6) についてのヒト化可変領域および定常領域の配列を示す。可変重鎖を、S 2 4 1 P ヒンジ安定化変異を含むヒト I g G 4 の定常重鎖に移植している。

【図 2 - 2】図 2 E は、軽鎖 V L 1 (配列番号 1 7) についてのヒト化可変領域および定常領域の配列を示す。図 2 F は、軽鎖 V L 2 (配列番号 1 8) についてのヒト化可変領域および定常領域の配列を示す。図 2 G は、軽鎖 V L 3 (配列番号 1 9) についてのヒト化可変領域および定常領域の配列を示す。図 2 H は、軽鎖 V L 4 (配列番号 2 0) についてのヒト化可変領域および定常領域の配列を示す。

【図 3】V H および V K 領域をコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトした細胞の 2 回の一過性発現からの発現データを示す。結果は、ヒト化重鎖および軽鎖可変領域の種々の組合せに基づく 1 3 のヒト化抗タウ抗体に関して要約しており、種々のレベルの発現が認められる。

【図 4】E L I S A 型形式での、ヒトタウへの結合に関してもとのマウス H J 8 . 5 (親抗体) と競合する本発明の抗タウ抗体の能力を評価する効力アッセイからのデータを示す。

【図 5】ヒトタウに対する 6 つの最良発現ヒト化構築物の結合動態を測定する、表面プラズモン共鳴 (S P R) 分析からの結果を要約する。

【図 6】サンドイッチ型 E L I S A における可溶性ヒトタウへの 4 つのヒト化抗体変異体の結合を示す。

【図 7 A】野生型マウス (陰性対照組織)、P 3 0 1 S マウス (P 3 0 1 S 変異を有するヒトタウを発現し、加齢に関連するタウ病変を発症する。) およびアルツハイマー病または進行性核上性麻痺 (P S P) のいずれかを有するヒト由来の組織へのヒト化抗体および対照抗体の結合を示す。マウスおよびヒト組織へのキメラ (陽性対照) の結合。

【図 7 B】野生型マウス (陰性対照組織)、P 3 0 1 S マウス (P 3 0 1 S 変異を有するヒトタウを発現し、加齢に関連するタウ病変を発症する。) およびアルツハイマー病または進行性核上性麻痺 (P S P) のいずれかを有するヒト由来の組織へのヒト化抗体および対照抗体の結合を示す。マウスおよびヒト組織への非特異的ヒト I g G 4 (陰性対照) の結合。

【図 7 C】野生型マウス (陰性対照組織)、P 3 0 1 S マウス (P 3 0 1 S 変異を有するヒトタウを発現し、加齢に関連するタウ病変を発症する。) およびアルツハイマー病または進行性核上性麻痺 (P S P) のいずれかを有するヒト由来の組織へのヒト化抗体および対照抗体の結合を示す。マウスおよびヒト組織への V H 1 / V K 2 の結合。

【図 7 D】野生型マウス (陰性対照組織)、P 3 0 1 S マウス (P 3 0 1 S 変異を有するヒトタウを発現し、加齢に関連するタウ病変を発症する。) およびアルツハイマー病または進行性核上性麻痺 (P S P) のいずれかを有するヒト由来の組織へのヒト化抗体および対照抗体の結合を示す。マウスおよびヒト組織への V H 1 / V K 3 の結合。

【図 7 E】野生型マウス (陰性対照組織)、P 3 0 1 S マウス (P 3 0 1 S 変異を有するヒトタウを発現し、加齢に関連するタウ病変を発症する。) およびアルツハイマー病または進行性核上性麻痺 (P S P) のいずれかを有するヒト由来の組織へのヒト化抗体および対照抗体の結合を示す。マウスおよびヒト組織への V H 2 / V K 2 の結合。

【図 7 F】野生型マウス (陰性対照組織)、P 3 0 1 S マウス (P 3 0 1 S 変異を有するヒトタウを発現し、加齢に関連するタウ病変を発症する。) およびアルツハイマー病または進行性核上性麻痺 (P S P) のいずれかを有するヒト由来の組織へのヒト化抗体および対照抗体の結合を示す。マウスおよびヒト組織への V H 2 / V K 3 の結合。

【図 7 G】野生型マウス (陰性対照組織)、P 3 0 1 S マウス (P 3 0 1 S 変異を有するヒトタウを発現し、加齢に関連するタウ病変を発症する。) およびアルツハイマー病または進行性核上性麻痺 (P S P) のいずれかを有するヒト由来の組織へのヒト化抗体および対照抗体の結合を示す。マウスおよびヒト組織への V H 3 / V K 2 の結合。

【図 7 H】野生型マウス (陰性対照組織)、P 3 0 1 S マウス (P 3 0 1 S 変異を有する

ヒトタウを発現し、加齢に関連するタウ病変を発症する。) およびアルツハイマー病または進行性核上性麻痺 ( P S P ) のいずれかを有するヒト由来の組織へのヒト化抗体および対照抗体の結合を示す。マウスおよびヒト組織への V H 3 / V K 3 の結合。

【図 8】ヒトタウのアミノ酸配列に対するマウス抗体 H J 8 . 5 についてのエピトープマッピングを示す。ヒト、アカゲザルおよびマウスのタウ配列を示す (それぞれ、配列番号 2 1、2 2、2 3)。 ペプチド P E P \_ 2 8 7 5 8 0 0 から P E P \_ 2 8 7 5 8 3 0 の配列を示す (それぞれ、配列番号 2 4 から 5 4)。

【図 9】H J 8 . 5 および C<sub>2</sub>N - 8 E 1 2 の詳細なペプチドベースのエピトープマッピングを示す。マッピングは、C<sub>2</sub>N - 8 E 1 2 の結合エピトープが <sub>2 5</sub> D Q G G Y T <sub>3 0</sub> (配列番号 9) であり、マウス親、H J 8 . 5 のエピトープとマッチすることを示す。

【図 10】ヒトまたはアカゲザルタウのいずれかへの種々の抗ヒトタウ抗体の結合結果を例示する。結果は、C<sub>2</sub>N - 8 E 1 2 および H J 8 . 5 がアカゲザルタウには結合しないが、これらがヒトタウへの明確な結合を示すことを明らかにする。H J 8 . 7 はヒトおよびアカゲザルの両方のタウに結合する。

【図 11】様々なタウオパチーを有するヒト被験者由来の C S F 中のタウへのヒト化抗タウ抗体の結合を示す。様々なタウオパチーを有すると診断された被験者由来の C S F 試料中のタウへの C<sub>2</sub>N - 8 E 1 2 の結合を評価した。

【発明を実施するための形態】

【0022】

神経変性におけるタウ病変に対抗する方法としてのタウ免疫療法戦略を支持する強力な実験証拠および生物学的論拠が存在する。第一に、タウは、通常は高度に可溶性で、天然にアンフォールドの細胞内タンパク質であり、そのため細胞外抗体はタウの正常な機能に影響を及ぼす可能性が低い。第二に、タウ病変の負荷は、タウオパチーのヒトおよびトランスジェニックマウスモデルにおける進行性神経機能不全、シナプス喪失および機能低下と関連する。第三に、病的条件下では、タウはミスフォールドとなり、病的タウ原線維から成るニューロン内神経原線維変化 ( N F T ) へと凝集する。ヒトタウオパチーでは、この病変は、疾患特異的パターンで1つの脳領域から別の脳領域へと進行する。実験データは、タウ凝集体が細胞から細胞へと広がり、脳内でさらなるタウ凝集とタウ病変の拡大を誘導できることを示唆する。このデータは、1つの細胞内で生成された凝集体が細胞外間隙に放出され、隣接細胞または結合細胞中で凝集を促進できることを示唆する。最後に、抗タウ抗体が、変異ヒト形態のタウを担持するマウスの脳においてタウ病変の進行を防ぐまたは遅くすることができることを実証する先行技術が存在する。

【0023】

「ヒト化抗体」は、投与後にヒトにおいて免疫応答を誘発する非ヒト抗体の危険性を低減するように修飾されている抗体またはこの変異体、誘導體、類似体もしくはフラグメントである。ヒト化抗体は、本明細書で使用される場合、非ヒト抗体 (ドナー抗体) と同じまたは類似のエピトープに免疫特異的に結合する。幾つかの実施形態では、ヒト化抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク ( F R ) 領域および非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域 ( C D R ) を含む。C D R に関連して「実質的に」という用語は、非ヒト抗体 C D R のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % 同一のアミノ酸配列を有する C D R を指す。ヒト化抗体は、全部または実質的に全部の C D R 領域が非ヒト免疫グロブリン (即ちドナー抗体) のものに対応し、および全部または実質的に全部のフレームワーク領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変ドメイン ( F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F a b C、F v ) の実質的に全部を含む。好ましくは、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域 ( F c ) の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのものも含む。新規フレームワーク領域を含むヒト化抗体が本発明において提供される。

【0024】

一部の実施形態では、ヒト化抗体は、軽鎖ならびに少なくとも重鎖の可変ドメインの両方を含む。抗体はまた、重鎖のC H 1、ヒンジ、C H 2、C H 3およびC H 4領域も含み得る。幾つかの実施形態では、ヒト化抗体はヒト化軽鎖だけを含む。幾つかの実施形態では、ヒト化抗体はヒト化重鎖だけを含む。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメインおよび/またはヒト化重鎖だけを含む。

【0025】

抗体は、I g M、I g G、I g D、I g AおよびI g Eを含む免疫グロブリンの任意のクラスならびに、限定されることなく、I g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4を含む任意のアイソタイプから選択され得る。ヒト化抗体は、1つより多いクラスまたはアイソタイプからの配列を含んでよく、個々の定常ドメインは、当分野で周知の技術を用いて所望のエフェクター機能を最適化するように選択され得る。

【0026】

抗体またはこの抗原結合フラグメントは、ジスルフィド結合したF v、モノクローナル抗体、一本鎖可変フラグメント(s c F v)、キメラ抗体、CDR移植抗体、ダイアボディ、ヒト化抗体、多重特異性抗体、F a b (抗原結合フラグメント)、二重特異性抗体、F ( a b ' ) 2 (典型的にはペプシンでの抗体の切断によって調製される2本の腕の抗原結合フラグメント)、F a b ' (典型的には穏やかな還元によって、F ( a b ' ) 2を2つの抗原結合フラグメントに分割した成果物)、またはF v (抗原結合可変フラグメント)から成る群より選択される。

【0027】

「キメラ抗体」という用語は、1つの種に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列と別の種に由来する定常領域配列を含む抗体、例えばヒト定常領域に連結されたマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体を指す。

【0028】

「V H領域」、「V L領域」または「V K領域」は、それぞれ重鎖の可変領域(V H)、軽鎖の可変領域(V L)または軽鎖の可変領域(V K)を指す。V HおよびV L領域は、フレームワーク領域(F R)と称されるより保存された領域が散在して組み入れられた、相補性決定領域(C D R)と称される超可変性の領域にさらに細分することができる。各々のV HおよびV Lは、以下の順にアミノ末端からカルボキシ末端に配置された、3つのC D Rと4つのF Rで構成される：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ(例えばI g G、I g E、I g M、I g D、I g AおよびI g Y)、クラス(例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1およびI g A 2)またはサブクラスであり得る。

【0029】

「フレームワーク」または「フレームワーク配列」という用語は、可変領域からC D Rを除いた残りの配列を指す。C D R配列の正確な定義は種々のシステムによって決定され得るため、フレームワーク配列の意味はこれに対応して異なる解釈に従う。6つのC D R(軽鎖のC D R - L 1、C D R - L 2およびC D R - L 3ならびに重鎖のC D R - H 1、C D R - H 2およびC D R - H 3)も、軽鎖および重鎖上のフレームワーク領域を各々の鎖上の4つのサブ領域(F R 1、F R 2、F R 3およびF R 4)に分類し、C D R 1はF R 1とF R 2の間に位置し、C D R 2はF R 2とF R 3の間、およびC D R 3はF R 3とF R 4の間に位置する。特定のサブ領域をF R 1、F R 2、F R 3またはF R 4と指定することなく、他の語でも称される、フレームワーク領域は、1本の天然に存在する免疫グロブリン鎖の可変領域内の組み合わせられたF Rを表す。1つのF Rは4つのサブ領域の1つを表し、複数のF Rは、フレームワーク領域を構成する4つのサブ領域の2つ以上を表す。

【0030】

これまでに記述されている多くのヒト化免疫グロブリン(Jones et al., Verhoeyen et al., Riechmann et al.)は、特定のヒト免疫グロブリン鎖のフレームワークと同一であるフレームワーク、アクセプターおよび

非ヒトドナー免疫グロブリン鎖からの3つのCDRを含んでいる。「ヒト化抗タウ」抗体は、タウに結合することができる非ヒト(ドナー)抗体から作製され、前記結合がヒト抗体(アクセプター)に移植されている抗体を指す。

【0031】

「CDR」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域の各々には3つのCDRが存在し、これらは可変領域の各々についてCDR1、CDR2およびCDR3と称される。特許請求される本発明のVHおよびVL/K領域のCDRのアミノ酸配列を図1に示す。

【0032】

本明細書で使用される場合、一本鎖抗体とも称される、一本鎖Fvという用語は、結合抗体の結合ドメイン(重鎖および軽鎖の両方)を単離し、結合機能の保存を可能にする連結部分を与えることによって調製される改変抗体構築物を指す。2本の鎖の間に挿入されたリンカーペプチドは、適切な折りたたみおよび活性結合部位の創製を妨げることなく可変ドメインの安定化を可能にする。このリンカーは5から30個のアミノ酸長であってよく、典型的には「GGGGS」((Gly)4Ser)(配列番号55)アミノ酸配列の反復から成る。これは、基本的に、抗原に結合するのに必要な可変ドメインだけを有する大きく短縮された抗体を形成する。

【0033】

ダイアボディ、トリアボディおよびテトラボディならびにより高次の変異体は、典型的には上記で言及したリンカーペプチドの長さをゼロから数アミノ酸まで変化させることによって創製される。変異体は、VHおよびVLドメインが1本のポリペプチド鎖上で発現されるが、同じ鎖上の2つのドメイン間での対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、これらのドメインが別の鎖の相補的ドメインと対合することを強いられ、2つの抗原結合部位を創製する、多価・多重特異性抗体である(例えばHolliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123参照)。このような抗体結合部分は当分野で公知である(Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York, p. 790 (ISBN 3-540-41354-5)。または、多価結合抗体変異体が、可変ドメインに連結された自己集合性ユニットを使用して作製できることも当分野で周知である。

【0034】

二重特異性、三重特異性または多重特異性の抗体は、1つの抗体の重鎖および軽鎖を1つ以上の他の抗体の重鎖および軽鎖と組み合わせることによって創製される。これらの鎖は共有結合で連結され得る。例えば「二重特異性抗体」という用語は、クアドローマ技術(Milstein and Cuello (1983) Nature 305 (5934): 537-40参照)によって、2つの異なるモノクローナル抗体の化学的結合によって(Staerz et al. (1985) Nature 314 (6012): 628-31参照)、またはFc領域に変異を導入し、このうちの1つだけが機能的二重特異性抗体である多数の異なる免疫グロブリン種を生じさせるノブ・イントゥ・ホールもしくは類似のアプローチ(Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (14): 6444-6448参照)によって作製される完全長抗体を指す。分子機能により、二重特異性抗体は、この2本の結合腕(一对のHC/LC)の1本上の1つの抗原(またはエピトープ)に結合し、およびこの2番目の腕(異なる対のHC/LC)上の異なる抗原(またはエピトープ)に結合する。二重特異性抗体は2つの異なる結合腕(特異性およびCDR配列の両方において)を有し、これが結合する各々の抗原に関して一価である。

【0035】

タウに結合することができる一連のマウス抗体が、当分野で公知の方法を用いて惹起さ

れた。Holtzman et al., WO2014/08404 参照。さらに、これらの抗体は、これらを治療用途のための適切な候補物にし得る特異的生物活性を有する抗体を同定するためにスクリーニングされた。

【0036】

1つの態様では、本開示は複合ヒト化抗体を提供する。Composite Human Antibody (商標) 技術は、ドナー抗体の可変領域 (V 領域) 配列中の潜在的 T 細胞エピトープを同定し、潜在的 T 細胞エピトープへの結合が排除されるように抗体または抗原結合フラグメントを操作することによってヒト化抗体を作製する (EP2, 388, 871 参照)。単一のヒト軽鎖および重鎖 V 領域フレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをドナー抗体 (典型的にはマウス) 由来のそれぞれの相補性決定領域 (CDR) の軽鎖および重鎖「アクセプター」として使用する他のヒト化技術と異なり、Composite Human Antibodies (商標) は、無関係な複数のヒト抗体の V 領域由来の複数の配列セグメント (「複合材料」) を含む。

【0037】

無関係なヒト V 領域のデータベース由来の配列セグメントは、出発抗体の抗原結合に不可欠と見なされるアミノ酸を決定した後に選択される。ヒト V 領域データベース由来のすべての選択した配列セグメントを、当分野で公知のコンピュータツールを使用して潜在的 CD4+ T 細胞エピトープの存在に関してフィルターにかける。Composite Human Antibodies (商標) は、出発抗体の V 領域のすべての部分とヒト配列セグメントの密接な適合により、標準的なヒト化抗体よりも良好な親和性および特異性を保持する。Composite Human Antibodies (商標) は、T 細胞エピトープが激減しており、それゆえヒト化および脱免疫化の両方と見なされる。

【0038】

1つの実施形態では、ドナー抗体由来のマウス可変領域がヒトアクセプター IgG 中のヒト可変領域に取って代わり、キメラ抗体を生成する。

【0039】

さらなる実施形態では、ドナー抗体由来のマウス CDR 配列がヒトアクセプター IgG 中の CDR 配列に取って代わり、ヒト化抗体を創製する。ドナー抗体の結合特性を維持するのに不可欠と見なされる潜在的 T 細胞エピトープおよびフレームワーク残基を除去するためにさらなる変化がヒト化抗体に組み込まれる。当業者は、CDR 移植などの他の方法が抗体をヒト化するために使用できることを認識する。

【0040】

さらなる実施形態では、ヒトタウに結合することができる非ヒト抗体がヒト化される。

【0041】

本発明の抗体は、ドナー抗体と比較して変化した結合親和性および/または変化した免疫原性を示し得る。幾つかの実施形態では、キメラまたはヒト化抗体は、タウのエピトープに関してドナー抗体と同じ結合親和性を実質的に有する。

【0042】

さらなる実施形態では、本明細書で述べるヒト化抗体、例えばヒト化抗タウ抗体に基づく一本鎖可変フラグメントは、単量体として結合し得る。

【0043】

さらなる実施形態では、抗体フラグメントを使用した多価結合は、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディおよび調製され得る他のより高次の変異体を使用することによって達成できる。

【0044】

さらなる実施形態では、ヒト化抗タウ抗体の重鎖および軽鎖を他の抗体の重鎖および軽鎖と組み合わせて、二重特異性または他のさらなる多重特異性の抗体を形成し得る。

【0045】

さらに本発明のヒト化抗体、例えばヒト化抗タウ抗体はまた、抗体フラグメント、例えば Fab、Fab' 単量体、F(ab)'<sub>2</sub> 二量体または全免疫グロブリン分子の形態で

あり得る。

【0046】

1つの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列、D Q G G Y T (配列番号9)から成る単離されたペプチドを提供する。このペプチドは、C<sub>2</sub>N-8E12またはHJ8.5として本明細書で述べる抗体のコアエピトープである。本発明の1つの態様では、ペプチドはX<sub>(0-8)</sub>D Q G G Y T X<sub>(0-8)</sub> (配列番号56)を含み、ここでXは任意のアミノ酸である。説明例は15マー(図11参照)を示すが、当業者は、異なる長さのペプチドが本発明に包含されることを認識する。従って、本発明の抗体またはフラグメントは、アミノ酸配列D Q G G Y T (配列番号9)を含むエピトープに特異的に結合し得る。エピトープは、線状または立体構造エピトープであり得、約6から22個のアミノ酸長であり得る。

【0047】

他の実施形態では、本発明の方法は、抗体または抗原結合フラグメントでタウオパチーを治療することに関し、ここで抗体またはフラグメントは、タウオパチーを有する被験体に一定の用量で投与される。

【0048】

抗体または抗原結合フラグメントの適切な用量は、被験体の体重kg当たりの薬剤mgの単位で表され得る。抗体または抗原結合フラグメントの適切な用量には、少なくとも約0.1mg/kg、または約0.2mg/kg、または約0.25mg/kg、または約0.3mg/kg、または約0.5mg/kg、または約0.75mg/kg、または約1mg/kg、または約1.25mg/kg、または約1.5mg/kg、または約2mg/kg、または約5mg/kg、または約7.5mg/kg、または約10mg/kg、または約12.5mg/kg、または約15mg/kg、または約20mg/kg、または約25mg/kg、または約30mg/kg、または約50mg/kg、または約100mg/kgが含まれる。抗体または抗原結合フラグメントの適切な用量は、多くても約250mg/kg、または多くても約200mg/kg、または多くても約175mg/kg、または多くても約150mg/kg、または多くても約125mg/kg、または多くても約100mg/kg、または多くても約75mg/kg、または多くても約50mg/kg、または多くても約25mg/kg、または多くても約20mg/kg、または多くても約15mg/kgであり得る。範囲の最小値が範囲の最大値より低い限り、前記最小値および最大値のいずれかを組み合わせて範囲を定義し得る(例えば約0.1mg/kgから約250mg/kgまで)。

【0049】

抗体または抗原結合フラグメントの適切な用量は、被験体に投与される薬剤mgの単位で表され得る。ヒト化抗体または抗原結合フラグメントの適切な用量には、少なくとも約2.5mg、または少なくとも約5mg、または少なくとも約10mg、または少なくとも約15mg、または少なくとも約20mg、または少なくとも約25mg、または少なくとも約30mg、または少なくとも約40mg、または少なくとも約50mg、または少なくとも約60mg、または少なくとも約70mg、または少なくとも約80mg、または少なくとも約90mg、または少なくとも約100mg、または少なくとも約125mg、または少なくとも約150mg、または少なくとも約175mg、または少なくとも約200mg、または少なくとも約250mg、または少なくとも約100mg、または少なくとも約125mg、または少なくとも約300mgが含まれる。抗体または抗原結合フラグメントの適切な用量は、多くても約2500mg、または多くても約2000mg、または多くても約1500mg、または多くても約1000mg、または多くても約750mg、または多くても約500mg、または多くても約400mg、または多くても約300mg、または多くても約275mg、または多くても約250mg、または多くても約200mg、または多くても約150mgであり得る。範囲の最小値が範囲の最大値より低い限り、前記最小値および最大値のいずれかを組み合わせて範囲を定義し得る(例えば約5mgから約2500mgまで)。

## 【 0 0 5 0 】

C<sub>2</sub>N - 8 E 1 2 は、ヒト化組換え I g G 4 抗ヒトタウ抗体である。C<sub>2</sub>N - 8 E 1 2 の I g G 4 骨格は、半抗体の形成を最小限に抑える S 2 4 1 P ヒンジ安定化変異を含む。C<sub>2</sub>N - 8 E 1 2 は、すべてのヒトタウスプライス変異体ならびにタウのアミノ末端フラグメントに存在する配列である、ヒトタウ中のアミノ酸 2 5 - 3 0 個 ( D Q G G Y T ) ( 配列番号 9 ) に結合する。この抗体は、タウオパチー患者由来のヒト脳組織中の単量体タウおよび凝集タウの両方に結合する。C<sub>2</sub>N - 8 E 1 2 は高度に安定であり、凝集または分解をほとんど伴わない。C<sub>2</sub>N - 8 E 1 2 の一般的な物理特性を表 1 に列挙する。

## 【 0 0 5 1 】

## 【表 1】

表 1

分子量	1 4 5 . 7 2 k D a
立体化学	L-アミノ酸
外観	透明で、無色から明黄色の液体
溶解度	~ 1 3 0 m g / m L

## 【 0 0 5 2 】

本発明を添付の実施例を参照して説明しているが、修正および変法は本発明の精神および範囲内に包含されることが理解される。ここに添付するのは本発明を説明するための実施例であり、これらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【実施例】

## 【 0 0 5 3 】

## [ 実施例 1 ]

この実施例は、マウス抗タウ抗体 H J 8 . 5 のヒト化のための取り組みと結果を述べる。この取り組みは、4つのヒト化軽鎖可変領域 ( V L または V K ) および4つのヒト化重鎖可変領域 ( V H ) を生じた。

## 【 0 0 5 4 】

ヒト化とは、一般に、慢性処置のために非ヒトモノクローナル抗体を使用することに関連する潜在的免疫性を低減する技術を指す。免疫原性を低減するために典型的に使用される2つの方法は、C D R 移植および脱免疫化である。マウス抗体 H J 8 . 5 は、A n t i t o p e によって開発された方法を用いて脱免疫化された。

## 【 0 0 5 5 】

C D R 移植はタンパク質の遺伝子操作アプローチである。簡単に述べると、これは抗体の基本構造および種間でのこの保存の両方の理解に基づく。マウス抗体とヒト抗体は共通の / 保存された構造を共有する。抗体構造は定常領域と可変領域に分けられる。可変領域はさらに、いわゆるフレームワーク領域と C D R 領域に分けることができる。可変領域は4つのフレームワーク ( F w k ) と3つの C D R で構成されることがわかる。フレームワークと C D R の配置は、軽鎖と重鎖の可変ドメインにおいて同じである。

## 【 0 0 5 6 】

C D R 移植では、非ヒト定常領域をヒト定常領域で置換して、いわゆるキメラ抗体を生じさせる。加えて、マウス C D R 領域をヒトフレームワーク領域に移植する ; 生じる可変ドメインは、ヒトフレームワークとマウス C D R の混合物である。最終段階として、親和性を維持するのに重要な役割を果たすと考えられる、幾つかのマウスフレームワーク残基を移植する ( 示していない。 ) 。

## 【 0 0 5 7 】

脱免疫化 : A n t i t o p e からの C o m p o s i t e H u m a n A n t i b o d y ( 商標 ) 技術は、C D R および結合に役割を果たすと考えられるフレームワーク中の鍵となるアミノ酸の両方を同定することと組み合わせて使用される脱免疫化技術であると言

われている。生じる完全ヒト化抗体は、出発モノクローナル抗体の結合親和性と特異性を保持し、同時にCD4+ T細胞エピトープを有さず、これによりヒトにおける望ましくない免疫原性を回避する。

【0058】

Composite Human Antibodies (商標)は、100,000個の無関係な完全ヒト抗体可変領域配列を含むAntitopeデータベースからのヒト抗体配列の複数のセグメントを組み合わせることによって作製される。HJ8.5抗体の可変領域配列の初期モデリングを使用して、抗体結合に必須のアミノ酸を同定し、次にこれらを使用してヒト配列セグメントの選択を拘束する。その後、CD4+ T細胞エピトープを欠く完全ヒト可変領域配列の選択のために2つのコンピュータによる特許技術(iTope (商標)およびTCED (商標))を用いて個々の配列セグメントおよび隣接セグメント間の接合部を分析する。Composite Human Antibodiesについての可変領域をコードするDNAを合成し、ヒト定常領域と共に発現ベクターにクローニングして、ヒト化抗体の生成のために哺乳動物細胞に移植する。

【0059】

HJ8.5のヒト化：HJ8.5マウス抗タウ412抗体V領域の構造モデルを、Swiss PDBを用いて作成し、抗体の結合特性のために必須である可能性が高いV領域中の重要な「拘束」アミノ酸を同定するために分析する。分析から、幾つかの拘束フレームワーク残基を完全ヒト化V領域に含めるための候補物として同定した。これらの残基の1つ以上を含むようにヒト可変領域配列のセグメントを選択した。

【0060】

完全ヒト化HJ8.5抗体を創製するのに使用できるヒト配列セグメントの予備的なセットを選択し、ヒトMHCクラスII対立遺伝子に結合するペプチドのコンピュータ解析のためにiTope (商標)技術を使用し(Perry et al 2008)、および公知の抗体配列関連T細胞エピトープのTCED (商標) (T細胞エピトープデータベース)を用いて(Bryson et al 2010)分析した。ヒトMHCクラスIIへの重要な非ヒト生殖細胞系結合因子として同定された、またはTCED (商標)に対する有意のヒットを得た配列セグメントを廃棄した。セグメント間の接合部が潜在的T細胞エピトープを含まないことを確実にするため、配列セグメントの組合せも分析した。次に選択したセグメントを組み合わせ、合成のために重鎖および軽鎖V領域配列を作製した。HJ8.5のために、4本のVH鎖および4本のVL鎖を設計し、構築した。

【0061】

図1は、マウスHJ8.5抗体の可変領域配列ならびに重鎖および軽鎖の各々についての4つのヒト化変異体配列(4VHおよび4VL/VK配列)を示す。これら4本のVH鎖および4本のVL鎖のアミノ酸配列を図1に示す。Kabata et alによって定義されたCDR配列を赤色でハイライトする(下線を付している)。もとのマウス配列からのフレームワーク変化を青色および太字でハイライトする。

【0062】

表B-1は、重鎖および軽鎖可変ドメインの各変異体中に導入されたフレームワーク変化の数を要約する。

【0063】

## 【表 2】

表 B-1

可変ドメイン	フレームワーク 変化の数
VH1	4
VH2	5
VH3	10
VH4	11
VK1	6
VK2	7
VK3	11
VK4	12

## 【0064】

図 2 は、重鎖および軽鎖の各々についてのヒト化可変および定常領域配列（4 VH および 4 VL / VK 配列）の配列を示す。可変重鎖を、S241P ヒンジ安定化変異を含むヒト IgG4 の定常重鎖に移植している。可変軽鎖をヒト軽鎖の定常軽鎖に移植している。この表は、理論的等電点（PI）および分子量（Mw）も列挙する。

## 【0065】

図 3 は、VH および VK 領域をコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトした細胞の 2 回の一過性発現からの発現データを示す。13 のヒト化抗タウ抗体に関する結果を要約する。重鎖と軽鎖の種々の組合せは、観察された著明に異なるレベルの発現をもたらした。1 回目では、VH と VL 領域のすべての変異体を互いに組み合わせた（試験した 16 のうち 13 についての結果だけを示す。2 回目には、1 回目で認められた 6 つの最良発現の組合せを試験した。発現を培地 mL 当たりの抗体  $\mu\text{g}$  として示す。より高いレベルの発現は、抗体が正しく折りたたまれ、予想されたように分泌され、非毒性で一般に安定であることを示唆するので、有益である。

## 【0066】

図 4 は効力アッセイからのデータを示す。ヒト化抗タウ抗体変異体をさらに特性づけるため、効力アッセイは、ELISA 型形式で、ヒトタウへの結合に関してもとのマウス HJ8.5（親抗体）と競合する抗体の能力を評価する。このアッセイ形式は、ELISA プレートにヒトタウで被覆し、次に試験抗体ならびにビオチン化 HJ8.5 をタウへの結合に関して競合させることを含む。アッセイは、各ヒト化抗体変異体に関する相対的 IC50 値を測定することを可能にする。プレート間での比較を可能にするため IC50 値をキメラ HJ8.5 の IC50 値に標準化する。このデータは、ヒト化工程がヒトタウへのヒト化抗体の結合を有意に変化させなかったことを実証する。

## 【0067】

## [実施例 2]

この試験は、組換えヒトタウ - 412 タンパク質と、6 つの完全ヒト化（実施例 1 で上述した、VH1 / VK2、VH1 / VK3、VH2 / VK2、VH2 / VK3、VH3 / VK2 および VH3 / VK3）モノクローナル抗体ならびに HJ8.5 に基づく 1 つのキメラモノクローナル抗体との間の相互作用の結合特性を測定し、比較するための Biacore T200 の使用を説明する。この試験の目的は、タウ - 412 とこれら 7 つの mAb との間の相互作用の高分解能の動態特性づけのために Biacore T200 表面プラズモン共鳴装置を使用することであった。

## 【0068】

抗体を4℃で保存した。タウ-412を製造者の指示に従って-20℃で保存した。ひとたび再溶解すれば、タウ-412溶液を氷上で保存し、24時間以内に使用した。再溶解したタウ-412のアリコートは、再溶解から30分以内に凍結し、-20℃で保存した。

【0069】

Biacore装置をBiacore T200 Evaluation Software V1.1 (Uppsala, Sweden)で作動させた。すべての材料は、特に明記されない限りBiacoreからであった：

Biacore 保守保全キット2	BR-1006-51
シリーズS CM5センサーチップ	BR-1006-68
アミンカップリングキット	BR-1000-50
10 mM アセテート pH 4.5	BR-1003-51
HBS-E Pランニング緩衝液	BR-1006-69
10 mM グリシン-HCl pH 1.5	BR-1003-54
10 mM グリシン-HCl pH 2.0	BR-1003-55
プロテインA (Sigma)	P6031
4 M MgCl <sub>2</sub> ヘキサハイドレート (Sigma)	M9272-500G

【0070】

すべての実験はBiacore「wizard」ソフトウェアで開発した。以下のBiacore法を使用した：固定化；動態/親和性；ならびに脱着および消毒。

【0071】

あらゆる試料を試験する前および試験中に、システムチェック (Biacore 保守保全キット2) を実施した。試験したすべてのシステムが合格し (試薬ポンプ、屈折計、注入、ノイズ、混合および緩衝液セクター)、装置が製造者によって定められた基準通りに機能していることを示した。

【0072】

CM5 / プロテインAチップの挿入後、システムを準備し、次にBIA標準化溶液 (Biacore 保守保全キット2) で標準化した。5℃でインキュベートした試料ラックを用いてすべての試料を25℃で検査した。チップをシステムに添加し、HBS-E Pをランニング緩衝液として使用した。

【0073】

mAbを供給されたように保存し、すべての固定化 (捕捉) 試験のために100 nMに希釈した。抗原タウ-412を、乾燥粉末からMilli-Q水を用いて1 mg/mLの最終濃度に再溶解した；動態試験のためにさらなる希釈を実施した。濃度計算に使用したタウ-412の質量および分子量は、試薬製造によって提供された (100 μg / バイアルおよび42.9 kDa)。この溶液には担体タンパク質を添加しなかった。抗原のバイアルは必要時にのみ再溶解し、使用時まで粉末形態にて-20℃で保存した。ひとたび再溶解すれば、抗原溶液を氷上に保持し、24時間以内に使用した。

【0074】

プロテインAによる捕捉アッセイをこの試験のために選択した。プロテインA表面の性能は、同じく試験した抗ヒトプロテインA/G、プロテインGおよびプロテインL表面より優れていた。プロテインAチップを、標準的なアミンカップリング化学を用いた固定化を介して調製した。固定化は、CM5シリーズSセンサーチップ (Biacore) で500反射率単位 (RU) の標的応答レベルに対して10 mM アセテート緩衝液 pH 4.5 中5 μg/mLのタンパク質濃度で実施した。

【0075】

プロテインAチップの「全部」および指定F<sub>c</sub>sについての最終応答レベルを表G-1に示す。

【0076】

【表 3】

表G-1

	リガンド	最終応答 レベル(RU)
F <sub>c</sub> 1	プロテインA	697.1
F <sub>c</sub> 2	プロテインA	691.4
F <sub>c</sub> 3	プロテインA	708.3
F <sub>c</sub> 4	プロテインA	704.6

## 【0077】

動態実験に関して、チップの表面での物質移動効果を回避するために固定化/捕捉リガンドの量を制限する必要がある。動態実験のために、表面は、理想的には50 - 100 RUの最大分析物結合レベル(R<sub>max</sub>)を有するべきである。固定化するリガンドの量は、それゆえ、方程式1:

## 【0078】

## 【数1】

$$\text{分析物結合能力(RU)} = \frac{\text{分析物MW}}{\text{リガンドMW}} * \text{固定化リガンド(RU)} * S_m$$

## 【0079】

を用いて計算する。

## 【0080】

分析物タウ - 412に関しては42.9 kDaの平均MW(試薬製造によって提供された)、リガンドについては150 kDa(抗体に関する推定値)(mAb)、R<sub>max</sub>については100 RUを使用し、化学量論(S<sub>m</sub>)を1として、300 RUの標的をすべての試験抗体の捕捉に関して設定した。試験内で得られた捕捉レベルは約280 - 400 RUまで様々であった。2回目および3回目に関しては、所望の300 RU捕捉レベルにより近づくように注入抗体の量を調整した。

## 【0081】

非特異的結合は、リガンド(非特異的で検出が困難)、捕捉タンパク質またはセンサーチップ表面のいずれかと相互作用する分析物または分析物混入物に起因し得る。タウ - 412の比較的高い濃度(40 nM)の300秒の注入後にブランクF<sub>c</sub>1表面の応答を分析することにより、カルボキシ - デキストラン表面またはプロテインA捕捉表面に対するNSB(非特異的結合)は観察されなかった。タウ - 412濃度 > 100 nMでは、カルボキシ - デキストランチップ表面への有意のNSBが認められた;しかしながら、この範囲内の濃度はこの後の動態分析には必要でなかった。

## 【0082】

再生条件検討を実施し、プロテインA表面上のキメラおよびVH1/VK2抗体の再生のための最適条件は以下のとおりであった。すべて40 μL/分で、10 mMグリシン - HCl pH 1.7の3回の240秒注入の後に1回の4 M MgCl<sub>2</sub>の300秒注入を実施した。次の結合サイクルを開始する前に表面を安定させるため、最後の再生注入後に600秒の待機段階を導入した。

## 【0083】

初期試験は、選択した緩衝液「HBS - EP」が動態分析に適した再現可能な系を生じ示したので、緩衝液の検討実験は実施しなかった。

## 【0084】

表面の性能を、開始時、間隔をおいておよび動態試験の最後に2.5 nMタウ - 412の反復制御注入によって分析した。安定な結合が動態試験全体を通じて認められ、動態分

析のための系の適切性を強調した。

【0085】

会合の速度が、チップ表面へのおよびチップ表面からの分析物の移動の速度に関連する有意の成分を含む場合、物質移動制限が起こる。物質移動が有意であると認められる場合、生じる動態分析は不正確であり得る。固定化リガンドの密度を低下させるまたは流量を増加させることにより、質量移動制限を低減することができる。低密度表面および類似の分子量の抗原を使用した以前の実験から、 $40 \mu\text{L}/\text{分}$ の流量をこの試験のために選択した。

【0086】

1対1結合モデルからの逸脱を調べるために、関連反応制御実験を使用してリガンド-分析物相互作用を評価する。分析物を種々の時間（接触時間）表面に注入し、解離速度を分析して、解離速度が接触時間と共に変化するかどうかを決定する。このような関係が認められる場合、これは、表面に安定化複合体を生じる初期結合事象後に2番目の相互作用事象が起こっていることを示す。

【0087】

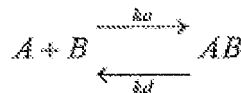
捕捉アッセイ形式を用いた以前の実験、1.5の見掛け結合化学量論および1対1モデルが生じる動態データに信頼性を持って適合し得ることから、より複雑な動態相互作用を支持するさらなる証拠は存在しないので、関連反応制御実験は実施しなかった。

【0088】

1対1結合モデルを使用して、生じる動態データに適合させた（方程式2）。捕捉される抗体の量に変動があるため、パラメータ  $R_{max}$  は、各々の抗体動態分析の大域解析とは対照的に局所解析に設定した。

【0089】

【数2】



【0090】

抗体特性づけ：プロテインA捕捉表面に関して実施した特性づけおよび制御実験は、これがタウ-412相互作用についての動態値を決定するための適切な系であることを示唆した。試験プロテインA表面の277RUの捕捉VH1/VK2上に飽和濃度のタウ-412（ $1000 \text{ nM}$ ）を注入することによって結合化学量論を評価した。 $1000 \text{ nM}$ のタウ-412の2回の連続注入は、122RUで飽和結合を生じさせると思われた。これは、1個のタウ-412分子に対する1個の抗体分子の結合に関して予想されるよりも高い、150%の結合化学量論をもたらした。この理由には、タウ-412の2個の分子への抗体の結合またはチップの表面でのタウ-412のオリゴマー化が含まれると考えられた。

【0091】

潜在的な質量移動効果を最小限に抑えるために $40 \mu\text{L}/\text{分}$ の流量で動態データを得た。動態サイクルの間の表面および分析物の両方の安定性を調べるために、ブランク（抗原なし）および $2.5 \text{ nM}$ 濃度の分析物の2回の反復を動態試験に組み込んだ。初期動態試験に関しては、 $40 \text{ nM}$ から $0.156 \text{ nM}$ のタウ-412の2倍希釈を試験した。動態分析のためおよびこの後の試験時には、 $20 \text{ nM}$ から $0.625 \text{ nM}$ の分析物範囲を選択した。この範囲は、報告されている $K_D$ より上と下の両方の多数の分析物濃度を含んだ。

【0092】

より高濃度の分析物の一部を定常状態に至らせるために会合相を500秒間観測した。動態サイクルの解離相の間の十分なシグナル低下（ $> 10\%$ ）を観察するため、解離を1200秒間測定した。第5章で論じたように、 $F_{cs}$ を各再生段階後600秒間安定化させた。参照チャンネル $F_{c1}$ からのシグナルを $F_{c2}$ 、 $F_{c3}$ および $F_{c4}$ のシグナルから

差し引いた。

【0093】

Biacore T200でプロテインA捕捉システムを使用して測定した7つのmAbとタウ-412の相互作用に関する動態パラメータを表F-2に示す。各結合サイクル間の抗体の捕捉レベルの差を補正するため、局所 $R_{max}$ パラメータを1対1結合モデルで使用した。タウ-412および抗体の新鮮調製物を使用した3回の独立した実験で動態分析を実施した。1回目と2+3回目は、抗原タウ-412の異なるバイアルを使用した；それゆえ平均応答に関連する報告された誤差は、おそらく分析物の調製別の変動およびアッセイの設定と実施における相違である。1回目から2+3回目まで、標的の300RU捕捉レベルにより近づけるように注入抗体の量を調整した。1回目に関しては、キメラ抗体を3回重複して試験し、3つ全部のデータセットの分析を表F-2に示す。これら3つのデータセットから導かれた $K_D$ のCV%は4.3%であり、結果がアッセイの変動性の範囲内であることを示した。

【0094】

【表 4】

表 F-2

リガンド	チップ	$k_a$ (1/Ms)	SE( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SE( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ )	Chi <sup>2</sup>	付属物:II
VH1/VK2	A11/1	$2.80 \times 10^5$	$4.40 \times 10^2$	$5.11 \times 10^{-2}$	$2.80 \times 10^{-7}$	2.18		1.28	A3-4
VH1/VK2	A11/3	$3.25 \times 10^5$	$1.00 \times 10^3$	$6.32 \times 10^{-2}$	$8.20 \times 10^{-7}$	1.95		0.64	A5-6
		$k_a$ (1/Ms)	SD( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SD( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ ) (nM)		
平均		$3.02 \times 10^5$	$3.19 \times 10^2$	$5.21 \times 10^{-2}$	$1.48 \times 10^{-6}$	2.06	0.17		
リガンド	チップ	$k_a$ (1/Ms)	SE( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SE( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ )	Chi <sup>2</sup>	付属物:II
VH1/VK3	A11/1	$2.80 \times 10^5$	$9.30 \times 10^2$	$5.28 \times 10^{-2}$	$8.50 \times 10^{-7}$	2.24		0.99	A7-8
VH1/VK3	A11/2	$2.95 \times 10^5$	$4.40 \times 10^2$	$5.72 \times 10^{-2}$	$2.70 \times 10^{-7}$	1.94		0.52	A9-10
		$k_a$ (1/Ms)	SD( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SD( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ ) (nM)		
平均		$2.87 \times 10^5$	$1.07 \times 10^3$	$5.99 \times 10^{-2}$	$3.76 \times 10^{-7}$	2.09	0.21		
リガンド	チップ	$k_a$ (1/Ms)	SE( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SE( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ )	Chi <sup>2</sup>	付属物:II
VH2/VK2	A11/1	$2.62 \times 10^5$	$4.30 \times 10^2$	$6.28 \times 10^{-2}$	$2.80 \times 10^{-7}$	2.40		0.83	A11-12
VH2/VK2	A11/2	$2.94 \times 10^5$	$4.10 \times 10^2$	$5.87 \times 10^{-2}$	$2.50 \times 10^{-7}$	2.06		0.70	A13-14
		$k_a$ (1/Ms)	SD( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SD( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ ) (nM)		
平均		$2.73 \times 10^5$	$1.89 \times 10^2$	$6.08 \times 10^{-2}$	$2.94 \times 10^{-7}$	2.23	0.24		
リガンド	チップ	$k_a$ (1/Ms)	SE( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SE( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ )	Chi <sup>2</sup>	付属物:II
VH2/VK3	A11/1	$2.58 \times 10^5$	$8.80 \times 10^2$	$6.53 \times 10^{-2}$	$9.00 \times 10^{-7}$	2.44		1.11	A15-16
VH2/VK3	A11/2	$2.92 \times 10^5$	$4.40 \times 10^2$	$5.33 \times 10^{-2}$	$2.80 \times 10^{-7}$	1.83		0.50	A17-18
		$k_a$ (1/Ms)	SD( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SD( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ ) (nM)		
平均		$2.80 \times 10^5$	$1.71 \times 10^3$	$5.93 \times 10^{-2}$	$8.44 \times 10^{-7}$	2.33	0.43		
リガンド	チップ	$k_a$ (1/Ms)	SE( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SE( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ )	Chi <sup>2</sup>	付属物:II
VH3/VK2	A11/1	$2.62 \times 10^5$	$3.20 \times 10^2$	$5.46 \times 10^{-2}$	$2.20 \times 10^{-7}$	2.08		0.45	A19-20
VH3/VK2	A11/2	$2.90 \times 10^5$	$3.70 \times 10^2$	$4.85 \times 10^{-2}$	$2.20 \times 10^{-7}$	1.67		0.71	A21-23
		$k_a$ (1/Ms)	SD( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SD( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ ) (nM)		
平均		$2.76 \times 10^5$	$1.95 \times 10^2$	$5.15 \times 10^{-2}$	$4.28 \times 10^{-7}$	1.88	0.28		
リガンド	チップ	$k_a$ (1/Ms)	SE( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SE( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ )	Chi <sup>2</sup>	付属物:II
VH3/VK3	A11/1	$2.54 \times 10^5$	$3.10 \times 10^2$	$5.59 \times 10^{-2}$	$2.00 \times 10^{-7}$	2.20		0.80	A23-24
VH3/VK3	A11/2	$2.76 \times 10^5$	$3.80 \times 10^2$	$4.56 \times 10^{-2}$	$2.20 \times 10^{-7}$	1.55		0.50	A25-25
		$k_a$ (1/Ms)	SD( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SD( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ ) (nM)		
平均		$2.65 \times 10^5$	$1.56 \times 10^2$	$5.07 \times 10^{-2}$	$7.40 \times 10^{-7}$	1.92	0.39		
リガンド	チップ	$k_a$ (1/Ms)	SE( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SE( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ )	Chi <sup>2</sup>	付属物:II
Chimeric	A11/1	$7.18 \times 10^5$	$1.50 \times 10^2$	$1.50 \times 10^{-1}$	$2.40 \times 10^{-5}$	2.23		1.17	A27-29
Chimeric	A11/2	$7.22 \times 10^5$	$3.00 \times 10^2$	$1.30 \times 10^{-1}$	$3.50 \times 10^{-5}$	1.79		0.97	A30-31
Chimeric	A11/3	$7.23 \times 10^5$	$2.60 \times 10^2$	$1.40 \times 10^{-1}$	$3.30 \times 10^{-5}$	1.94		0.49	A32-33
		$k_a$ (1/Ms)	SD( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SD( $k_d$ )	$K_D$ (nM)	SD( $K_D$ ) (nM)		
平均		$7.21 \times 10^5$	$2.87 \times 10^2$	$1.43 \times 10^{-1}$	$1.54 \times 10^{-5}$	1.99	0.22		

## 【0095】

Chi<sup>2</sup> 値は、会合データと解離データが提案された1対1結合モデルにどの程度良好に適合するかを示し、値が低いほど適合が良好である。速度定数に関する関連SE値は、記述されているモデルにデータを適合させることに関連する不確実性を表し、真の動態値についての全面的な不確実性を示すわけではない。平均応答データは、2または3つの独立した分析からの平均動態値および関連SDを表す。

## 【0096】

表F-2からの平均K<sub>D</sub>値を使用して、親和性に基づき抗体を以下のように順位づけることができる: VH3/VK2 > VH3/VK3 > キメラ > VH2/VK3 > VH1/VK3 > VH1/VK2 > VH2/VK2。平均動態パラメータに関連するCV%は10-20%の範囲であり、従ってすべての抗体が非常の類似した親和性を有しており、差は純粋にアッセイ変動の結果である可能性が高い。一般に、抗体間結合の差はアッセイ変動に

起因すると考えられ、キメラ抗体と比較してヒト化抗体のKD値に有意差はないと考えられる。

【0097】

抗体とタウ-412の間の相互作用に関してBiacore T200でプロテインA捕捉アッセイを用いて測定した動態値の比較を示す。キメラ抗体は、ヒト化抗体と比較した場合、親和性は同様であるが、有意に異なる結合プロフィールを示すと思われる。 $k_d$ 対 $k_a$ のプロットは、Biacore T200でプロテインA捕捉アッセイを用いて測定した試験抗体とタウ-412との相互作用の相対的動態値を示す。破線の対角線は等親和性のラインを表す。プロット上のヒト化抗体の明瞭さを高めることを目的として、軸は異なるデータ範囲を示すことに留意されたい。

【0098】

図5は、ヒトタウに対する6つの最良発現ヒト化構築物の結合動態を測定する、表面プラズモン共鳴(SPR)分析からの結果を要約する。試験抗体を種々の濃度のヒトタウと共にSPRチップ上に固定化し、次にチップの上を流動させる。測定された結合事象に基づき会合速度と解離速度ならびに親和性を変異体の各々に関して計算する。キメラ変異体も試験した。

【0099】

[実施例3]

図6は、サンドイッチ型ELISAにおける可溶性ヒトタウへの4つのヒト化抗体変異体の結合を示す。受動吸着に依存するアッセイ方法は、人為的結合結果を作り出す潜在的な可能性を有する。この可能性を克服するため、ヒト化抗体変異体の結合活性を測定する溶液ベースの方法を用いた。このアッセイ形式では、抗原(ヒトタウ)を、HJ8.5とは異なるエピトープを認識するモノクローナル抗ヒトタウ抗体によって捕捉する。捕捉されたヒトタウへのヒト化抗タウ抗体のこの後の結合は抗原濃度に依存するが、IgG4アイソタイプ対照は全く結合を示さない。このアッセイは、ヒトタウへのヒト化抗タウ抗体の結合が特異的であり、抗体が可溶性ヒトタウに結合することを明らかにする。

【0100】

[実施例4]

図7(A-H)は、野生型マウス(陰性対照組織)、P301Sマウス(P301S変異を有するヒトタウを発現し、加齢に関連するタウ病変を発症する。)およびアルツハイマー病または進行性核上性麻痺(PSP)のいずれかを有するヒト由来の組織へのヒト化抗体および対照抗体の結合を示す。この試験の目的は、ヒト化抗体が、キメラ形態のHJ8.5と比較して組織中の凝集タウに結合する能力を保持することを確認することであった。図は、ヒト化HJ8.5抗体の種々の変異体でヒトおよびマウス脳を染色した代表的な画像を示す。4か月齢および9か月齢のP301Sマウスを試験し、両方の時点のマウスがタウの病的凝集体を示し、9か月齢のマウスは4か月齢のマウスよりも多くのタウ病変を有していた。ヒト染色に関しては、PSPを有する1名の被験者由来の脳組織の試料およびADを有する1名の被験者由来の脳組織の試料を検査した。図7Aは、マウスおよびヒトAD組織に関するキメラHJ8.5での染色を例示する。図7Bは、陰性対照抗体(非特異的ヒトIgG4)での染色を例示する。図7C-7Hは、6つのヒト化抗体での染色を例示する。マウスHJ8.5抗体のすべてのヒト化変異体は、P301Sマウス脳において認められるタウ凝集体ならびにADまたはPSPのいずれかを有すると診断された被験者の脳組織中で認められるタウ凝集体に結合する。

【0101】

[実施例5]

図8は、ヒトタウ中のHJ8.5のエピトープを示す。酵母ディスプレイを用いてエピトープをマッピングした。この方法のために、酵母を使用してヒトタウの配列をカバーする様々なペプチドを発現させた。培養下の酵母へのHJ8.5抗体の結合を免疫蛍光検査によって測定した。最初の34個のアミノ酸を含むタウの変異体を発現する酵母への結合が認められたが、酵母がタウの最初の32個のアミノ酸だけを発現する場合は結合が認め

られなかった。これは、エピトープが最初の34個のアミノ酸内に存在することを示唆する。加えて、HJ8.5は、ペプチドがアミノ酸27-135個を含む場合は結合するが、ペプチドがアミノ酸30-135個にわたる場合は結合しない。これは、エピトープがアミノ酸27個より大きいアミノ酸を含むことを示唆する。このデータに基づき、エピトープはヒトタウの27-34個の配列(GYTMHQDQ)(配列番号10)内に含まれる。図8はまた、アカゲザルおよびマウスタウ配列も示し、ヒトタウからのアミノ酸変化を赤色でハイライトする。

#### 【0102】

図9は、HJ8.5およびC<sub>2</sub>N-8E12のより詳細なペプチドベースのエピトープマッピングを示す。ヒトタウの完全配列(IN4R、412個のアミノ酸)にわたる線状15量体のペプチドライブラリを創製した。加えて、アミノ酸10個および11個がアラニンに変化したこれらのペプチドの二重アラニン型も作製した。二重アラニンライブラリのために、10または11位の任意の天然に存在するアラニンをグリシンに変異させた。すべてのペプチドをペプチドアレイ上にスポットし、次にHJ8.5またはC<sub>2</sub>N-8E12でプローブして、結合を測定した。両抗体のタウ結合エピトープを、これらのペプチドアレイを用いて信頼できるようにマッピングした。C<sub>2</sub>N-8E12の結合エピトープは<sub>25</sub>DQGGYT<sub>30</sub>(配列番号9)であり、マウス親、HJ8.5のエピトープにマッチする。HJ8.5およびC<sub>2</sub>N-8E12のタウペプチドへの結合は、エピトープ中のアミノ酸D、Q、YまたはTをアラニンで置き換えた場合、大きく低下し、これらが抗体結合において極めて重要な役割を果たすことを示唆した。しかし、エピトープ中の中央の2個のグリシンをアラニンで置き換えた場合は、タウペプチドへの抗体の結合はあまり低下しなかった(PEP 2875811)。これは、これらのアミノ酸が結合に重要ではないことを示すのではなく、アラニンとグリシンアミノ酸との間の置換の保存的性質に起因する可能性が高い。これらのより詳細な方法を用いてマッピングしたエピトープは、酵母ディスプレイを使用してマッピングしたものとわずかに異なる(図8)。この相違は結合アッセイの相違に帰せられ、酵母ディスプレイシステムではより大きなペプチドが使用される。15量体ペプチドアレイの方法は酵母ディスプレイ法よりも優れていると考えられる。

#### 【0103】

##### [実施例6]

図10は、ヒトまたはアカゲザルタウのいずれかへの種々の抗ヒトタウ抗体の結合結果を例示する。ヒト化変異体VH1/VK2(C<sub>2</sub>N-8E12とも称される。)と共にマウス抗ヒトタウ抗体HJ8.5およびHJ8.7を試験した。図8は、特許請求される結合エピトープ配列GYTM(H/L)QDQ(配列番号57)において、ヒトとアカゲザルタウの間で32位に1個のアミノ酸相違が存在することを示す。図8は、特許請求される結合エピトープ配列DQ(G/E)GYT(配列番号58)において、ヒトとアカゲザルタウの間で27位に1個のアミノ酸相違が存在することを示す。2つの種のタウの間でのこれらのアミノ酸相違が抗体HJ8.5/C<sub>2</sub>N-8E12の結合能力に影響を及ぼすかどうかを調べるため、以下の実験を実施した。ヒトおよびアカゲザルタウへのC<sub>2</sub>N-8E12、HJ8.5(C<sub>2</sub>N-8E12のマウス前駆体)およびHJ8.7(ヒトとアカゲザルのアミノ酸配列が100%保存されているタウのエピトープに結合するマウス抗ヒトタウ抗体)の結合を、96ウェルELISAプレートを様々な濃度のヒトタウまたはアカゲザルタウのいずれかで被覆することによって測定した。本発明者らの結果は、C<sub>2</sub>N-8E12およびHJ8.5はアカゲザルタウには結合しないが、これらがヒトタウへの明確な結合を示すことを明らかにした。予想されたように、HJ8.7はヒトおよびアカゲザルの両方のタウに結合する。

#### 【0104】

##### [実施例7]

図11は、様々なタウオパチーを有するヒト被験者由来のCSF中のタウへのヒト化抗タウ抗体の結合を示す。様々なタウオパチーを有すると診断された被験者ならびに年齢が

マッチする健常対照および若年健常対照被験者由来のCSF試料中のタウへのC<sub>2</sub>N-8E12の結合を評価した。サンドイッチELISAを使用して、AD、CBD、FTDまたはPSPを有する被験者ならびに年齢がマッチするおよび若年/成人対照由来のヒトCSF中のタウへのC<sub>2</sub>N-8E12の結合を明らかにした。C<sub>2</sub>N-8E12を、CSF試料中のタウを捕捉するための被覆抗体として使用した。ビオチン化マウスモノクローナルタウ抗体HJ8.7を検出抗体として使用した。対照ヒトIgG4で被覆したウェルは実験の陰性対照としての役割を果たした。C<sub>2</sub>N-8E12被覆ウェルと対照IgG4被覆ウェルからのシグナルには大きな差が観察され、ヒトCSF試料中のタウへのC<sub>2</sub>N-8E12の特異的結合を明らかにした。標準曲線(組換えタウ)を含めることにより、これらのCSF試料中のタウ濃度に関する定量的情報を得ることが可能である。

#### 【0105】

##### [実施例8]

この試験は、最大10施設までで実施される無作為化、二重盲検、プラセボ対照、単回増加量(SAD)第1相試験である。C<sub>2</sub>N-8E12の単回与の安全性、耐受性、免疫原性およびPKを評価し、今後の反復投与試験において使用されるMTDを確立するように設計されている。

#### 【0106】

この試験の主要目的は、PSPを有する被験者においてC<sub>2</sub>N-8E12の単回投与の安全性、耐受性、免疫原性および最大耐容量(MTD)を決定することである。安全性評価には、理学的小および神経学的検査、臨床安全性検査室検査、免疫原性、有害事象、生命徴候および併用薬検査が含まれる。

#### 【0107】

副次的目的は、単回注入後の最大血漿濃度；単回注入後の曲線下面積(AUC)；注入後に最大濃度が達成される時間；C<sub>2</sub>N-8E12の終末半減期；脳脊髄液(CSF)へのC<sub>2</sub>N-8E12の分配；ならびに血液およびCSF中の可溶性タウレベルの測定を介した生物学的標的係合を含む、単回投与の全身薬物動態を測定することならびにC<sub>2</sub>N-8E12-タウ複合体の存在を評価することである。

#### 【0108】

この試験は、PSPを有する32名の被験者(処置群24名およびプラセボ群8名)を登録する予定である。被験者は、4名の患者の8ブロックに登録され、各ブロック中の1名の患者がプラセボに無作為に割り当てられ、3名がMTDの現在の推定値に割り当てられる。DLTが起こる場合は付加的な被験者が登録され得る。しかし、用量増加工程の間に、用量を飛ばして進むことはできない。

#### 【0109】

統計的設計の章で述べるように用量増加に関する連続再評価法(CRM)を使用する。用量ごとのDLTの確率を同定するためにロジスティックモデルを使用する。

#### 【0110】

C<sub>2</sub>N-8E12は、20mg/mLの名目濃度で使い捨てボトル中の凍結液体として臨床施設に発送される。各ボトルはC<sub>2</sub>N-8E12 300mgを含有し、-70から-80で保存しなければならない。

#### 【0111】

患者は、選択基準および除外基準を満たすどうかを評価するスクリーニングを受ける。スクリーニングは、血液およびCSFの評価ならびにMRIも含む。投与の当日(0日目)、C<sub>2</sub>N-8E12の単回用量を、IVラインを介して投与し、投与後24時間、臨床施設で被験者を注意深く観察する。これは、安全性およびPK評価のための血液試料を含む。これに続く3日間ならびに注入後1週目と2週目に、さらなる臨床検査と血液採取を行う。さらなる安全性MRIおよびCSF試料採取を注入後4日目に実施する。被験者を、投与の日から2か月間以上、28日ごと(例えば56日目)に追跡調査する。この後、以下の事象のいずれかが早期に発生するまで、月1回の測定を継続する：(i)C<sub>2</sub>N-8E12がもはや血液中では検出できない；(ii)主催者が試験の完了を決定する；(i

i i) 被験者が試験への参加を早期に中止することを決定する。

【0112】

第1相試験の目標は、この後の第2相/MAD試験における評価のための用量の推奨範囲を決定するための、臨床検査室検査、理学的小および神経学的検査ならびに有害事象の発生を含む安全性評価によって評価される、MTDの確立を含む。被験者の無作為な割り当ておよびプラセボ群を含めることにより、バイアスを回避し、既知および未知の両危険因子が処置群の間で均一に分布する可能性を高める。

【0113】

データ安全性監視委員会(DSMC)は、安全性データを継続的に検討する。安全性監視委員会は、最小限で2名の独立した医師、1名の生物統計解析者、PSPに関する専門知識を有する1名の医師および主催者からの投票権のない1名の成員で構成される。いずれかの個別の試験被験者がSAEを経験した場合、この被験者に関するすべての利用可能な安全性データを検討し、事象がDLTの定義に合致するかどうかおよびMTDが確立されているかどうかを判定する。MTDが確立されておらず、および患者の登録が継続される場合、DSMCは、この後の登録患者の安全性を確保するために何らかのさらなる措置またはプロトコルの修正が必要かどうかの勧告を主催者に提供する。主催者は、試験の何らかの修正または早期中止に関する最終的な決定を下す。

【0114】

用量制限毒性は、i) C<sub>2</sub>N-8E12が事象を引き起こした妥当な可能性が存在する、リウマチ学共通毒性基準(Rheumatology Common Toxicity Criteria)v2による何らかのグレード3以上のAE；(ii)臨床的に有意と見なされ、C<sub>2</sub>N-8E12が事象を引き起こした妥当な可能性が存在する、NCIの有害事象に関する共通用語基準(Common Terminology Criteria for Adverse Events)v4.0(CTCAE)の神経系および精神障害の器官別大分類の何らかのグレード2のAE；または(iii)C<sub>2</sub>N-8E12の注入中または注入の完了後24時間以内に発生し、注入速度の低下および/または支持療法で速やかに消失しない、何らかの注入関連毒性(例えばアレルギー反応/過敏症)と定義される。

【0115】

用量増加：用量コホートへの被験者の割り当ては以下の規則によって決定される：(1)4名の患者の各ブロック内で、1名の患者はプラセボ群に割り当てられる；(2)より高い用量レベルに増加する前の用量レベルで少なくとも3名の患者に関して完全な毒性情報が必要である；(3)1つのコホートから次のコホートへの増加の最大増分は1用量レベルである；および(4)少なくとも12名の被験者(3ブロック)はMTD用量レベルで投与されるべきである。

【0116】

各々4名の患者のコホート内で、患者に連続的に投与し、安全性保証のさらなる測定を提供するために連続する被験者の投与の間には少なくとも2日の最低間隔をおく。

【0117】

最初のコホートはd<sub>1</sub>に割り当てられる。コホートごとに完全な毒性情報が得られた後、統計モデルを更新する。規則に従って、直近のコホートのすべての被験者についての完全な毒性情報が得られる前に1つの追加コホートを登録し得る。次のコホートが登録され、無作為化されるまで、3名以下の患者に関しては不完全な毒性データが許容される。

【0118】

後続の各コホートは、上記の定義に従ってMTDであると推定される用量に割り当てられる。患者の集積が遅れる場合は、各患者が登録され、後続の各患者が現在の推定MTDを投与されるときにモデルを更新し得る。

【0119】

試験集団：この試験は、50歳から85歳までの進行性核上性麻痺(PSP)を有する男性および女性被験者を登録する。

## 【0120】

選択基準：試験に組み入れるために、各被験者はインフォームドコンセントを提供する意思があり、提供することができなければならない。処置プロトコルの開始前に、各患者が処置プロトコルについての同意を提供できることが確認される。被験者は試験に参加することを要請され、インフォームドコンセント書式に署名した後、スクリーニング手順が実施される。被験者が選択基準を満たすことができないまたは除外基準のいずれかに合致する場合、被験者はスクリーニング評価または処置スケジュールに登録されない。

## 【0121】

各被験者は、この試験に登録されるには以下の基準を満たさなければならない：男性または女性；50歳から85歳までの年齢；以下を含む、NNIPP SおよびAL-108-231臨床試験に関して修正されたNINDS-SPPの可能性または蓋然性基準を満たす：(d)核上性注視麻痺または衝動性眼球運動速度低下、(ii)症状の最初の3年以内の歩行不安定性または転倒；スクリーニング時の脳MRIがPSPと一致する(<4の微小出血および大きな脳卒中または重篤な白質疾患なし)；PSP評価スケールで20から50のスコア；基線時に参加に対するインフォームドコンセントを提供することができるまたはインフォームドコンセントを提供することができない場合は、参加への同意を提供することができ、およびコンセントを与えることができる正式な医療担当者を有している；少なくとも週に5時間患者に会い、患者の試験参加のための受診および同意に付き添うことができる試験パートナーを有している；他の併用非生物学的製剤療法は許容されるが、登録前の少なくとも30日間用量が安定していなければならない；最小限の補助（一方の腕の安定化または杖/歩行具の使用）で5歩歩くことができる；レボドパ、ドーパミンアゴニスト、ラサギリン、COMT阻害剤、アマタジン、メマンチンまたはコリンエステラーゼ阻害剤を含む、スクリーニング前少なくとも2か月間のパーキンソン症候群のための安定な薬物治療；4-18か月間にわたる3回までの腰椎穿刺、被験者が第1相/SAD試験と第2相/MAD試験の両方に参加する場合は6回までの腰椎穿刺に同意する；被験者から署名と日付の入った書面のインフォームドコンセントが得られる；プロトコルで規定された避妊方法を使用することに同意する（下記参照）。

## 【0122】

以下の基準のいずれかに合致する被験者は試験から除外される：以下を含む、PSP以外の神経障害のタイプの基準により良好に合致する進行性神経障害の徴候：(a)蓋然的アルツハイマー病の基準を満たすまたは(b)レヴィー小体を伴うパーキンソン認知症、多系統萎縮症(MSA)もしくは筋萎縮性側索硬化症(ALS)の研究基準を満たす；スクリーニングの5年以内の何らかの悪性疾患（皮膚の非転移性基底細胞癌以外）；試験者の専門的判断に基づく、スクリーニング時の臨床的に有意の腎または肝機能不全；試験者の専門的判断に基づく、試験登録前3か月以内の臨床的に有意の心臓血管事象；試験者の専門的判断に基づく、スクリーニングの間の臨床的に有意の血液学的異常または化学検査室検査結果の異常；直近90日以内に何らかの理由で事前のモノクローナル抗体療法を受けているまたは過去30日以内もしくは5半減期以内（いずれか長い方）に何らかの他の試験薬を摂取した。C<sub>2</sub>N-8E12の事前投与はこの除外基準には適用されず、それゆえ被験者が第2相/MAD試験に参加することは不適格と見なさない；現在何らかの他の生物学的または免疫調節療法を受けている；症状の発症以来5年を超える疾患持続期間；スクリーニングMRIスキャンで中脳体積>8,600mm<sup>3</sup>；高度看護施設または認知症ケア施設に居住する被験者；ALS病変と一致する、検査での運動ニューロン疾患の明確な証拠を有する（これはCBS（大脳皮質基底核症候群）の症状を伴うC90RF72遺伝子保因者において記述されている。）；試験者の専門的判断に基づく、認知障害を説明し得る他の何らかの重要な無関係の神経または精神障害（例えば活動性発作障害、脳卒中、血管性認知症）の診断；臨床判断およびGDS（高齢者うつ病評価尺度）の結果に基づく、基線評価時の未処置の大うつ病；他の重要な精神疾患の病歴；自殺未遂の前歴；試験者の見解で転帰測定の収集を不可能にする、MMSEによって評価される重度の認知障害(<17)；評価プロトコルに参加することができない；安全上のリスクを高めるまた

は試験データの適切な解釈を妨げる、一般にスクリーニング時に採取された血液試料からの有意の異常値；臨床的に有意の細菌、真菌またはミコプラズマ感染の現在または最近の既往歴（スクリーニング前4週間以内）；スクリーニング時のMRIスキャンを耐容できないまたはMRIに対する他の何らかの禁忌；ワルファリンなどの抗凝固薬の使用を含む、スクリーニング時の腰椎穿刺に対する何らかの禁忌または腰椎穿刺を耐容できない。81mgのアスピリンまたは類似の抗凝固薬の毎日の投与は、用量がスクリーニング前30日間安定である限り、許容される；試験者の見解で、投与スケジュールまたは試験評価に従うことができないまたは従わない可能性が高い被験者；スクリーニングの3か月以内の別の介入的臨床試験への参加；スクリーニングの30日以内の別試験薬での処置；450ミリ秒を超える何らかの既存のQTcF持続時間；被験者が主催者の従業員もしくは家族の一員または試験施設の職員もしくは職員の家族の一員である。

【0123】

被験者は、試験全体を通しておよび最後の処置期間の最後の試験薬投与後56日目まで、基線受診時に開始される許容される避妊方法を使用する（および/またはパートナーに使用させる。）ことに同意しなければならない。許容される避妊方法を以下に列挙する。

【0124】

試験薬：第1相/SAD試験は、拡大アクセス（治験用新薬利用範囲拡大制度）IND 119404において現在使用されているDPロット番号1018775 - 研究細胞バンク（Research Cell Bank）（RCB）材料からのC<sub>2</sub>N-8E12を使用する。これはpH5.5の25mMアセテート緩衝液中に製剤されており、20mg/mLの濃度で提供される。プラセボ：プラセボは、活性試験薬を含まずにC<sub>2</sub>N-8E12と同一に製剤されている。

【0125】

用量の理論的根拠：最大推奨出発用量（MRSD）は、食品医薬品局（FDA）の製薬業界向けガイダンス「Estimating the Safe Starting Dose in the Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers」を用いて計算した。ガイダンスにより、IV投与される分子量>100,000ダルトンの試験治療用タンパク質に関して、MRSDは、体表面積スケールリングによってではなく種間で標準化することによって推定されるべきである。マウス毒性試験で認められた250mg/kgの無影響量（No Observed Effect Level）（NOEL）に基づき、10の標準安全係数で用量を25mg/kgに制限する。

【0126】

第1相/SAD試験の出発用量はIV投与で2.5mg/kgである。この出発用量は、4週間のマウス毒性試験に基づく最大許容出発用量より10倍低く、拡大アクセスおよびC<sub>2</sub>N-8E12を含む例外的使用のヒト処置プロトコルで投与される現在の最大用量（15mg/kg）より6倍低い（「試験者資料集」参照）。

【0127】

単一患者試験からの予備的血漿PKに基づき、2.5mg/kg用量のC<sub>2</sub>N-8E12投与後の様々な時点でC<sub>2</sub>N-8E12によって結合されるCSF中のタウのパーセントを推定することが可能である。この計算のために、ヒト化抗体のCSF濃度は血漿濃度の0.1%であり、CSF中のタウの濃度は500pg/mLであると仮定する。これらの仮定に基づき、2.5mg/kgの用量は、最初の1か月間にわたってCSF中のタウのモル濃度より3から40倍高いC<sub>2</sub>N-8E12のCSF濃度をもたらす。C<sub>2</sub>N-8E12のK<sub>D</sub>に基づき、2.5mg/kg用量は抗体によるCSF中のタウの3-26%の結合を生じさせる。同様のモデリングを、これまでにヒトに投与された最高用量（15mg/kg）からのPKデータに関して実施し、28日間にわたる平均タウ結合は約50%（最大72%、最小40%結合）であると推定された。また、CSF区画を介してアクセスできないが、抗体が結合することができる細胞外タウが脳内に豊富に存在する可能性も高い。それゆえ、脳内で有意の標的係合をもたらす可能性が高い用量の安全性を評価する

ために用量増加を25 mg / kgに進める。

【0128】

試験者によって承認されない限り、処置期間中、試験被験者は以下を摂取してはならない：何らかの他の生物学的または免疫調節療法；何らかの他の試験薬；ワルファリン；CSF試料採取前の処置の一時的な停止が医学的危険性を与える状態に対しての何らかの抗凝固薬（81 mgの毎日のアスピリン以外）。

【0129】

インフォームドコンセント：インフォームドコンセントを提供した後、各被験者は、選択基準を満たし得ることおよびこのプロトコルの下で処置を受けることに対していかなる禁忌も存在しないことを再確認するスクリーニング評価を受ける。具体的には、各被験者を、スクリーニング時に診断を確認するための臨床および神経学的検査で評価する。PSP評価尺度による簡単な認知スクリーニングおよび面接を伴ううつ病スケールを実施し、完全な病歴および薬物/薬歴を得る。被験者がすべての選択基準を満たし、除外基準を有さない場合、さらなる検査を実施する。スクリーニング受診は、基線/0日目受診の28日前から7日前までに行われる。

【0130】

薬物動態評価：以下の表3に示す様々な時点でPK分析のために試料を収集する。

【0131】

【表5】

表3

投与前	15分 (#)	3時間目	6時間目	12時間目	24時間目	48時間目	168 時間目	336 時間目	28日目	28日目 以降
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	(*)

(\*) 早期中止が起こる場合は、最終PK評価のために早期中止受診時に最終血液試料を得る；

(#) 注入完了から15分以内；

(@) 28日目以降、以下の事象のいずれかの早期発生まで28日ごとにPK試料を採取する：(i) 試験中止；(ii) C<sub>2</sub>N-8E12の検出可能な血液レベルの不在。

【0132】

有害事象評価：AEを観測するために以下の安全性評価を実施する：生命徴候（血圧、脈拍/心拍数、体温、呼吸速度、SPO<sub>2</sub>）；認知評価（精神状態検査）を含む、完全な神経学的検査；検査室検査：(1) 血液学パネル：白血球分画、ヘマトクリットおよびヘモグロビン(Hb)、血小板数を伴う完全血球算定(CBC)；(2) 化学パネル：血清電解質、グルコース、尿酸、血液尿素窒素(BUN)、クレアチニン、総タンパク質量、アルブミン、ビリルビン（総、直接および間接）、アルカリホスファターゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、肝酵素(AST、ALTおよびGGT)、鉄、コレステロールパネル、CPK、アミラーゼおよびリパーゼ；(3) 凝固パネル：プロトロンビン時間(PT)、INRおよび部分トロンボプラスチン時間(PTT)；Hb、WBCおよびタンパク質含量の測定を含む尿検査；ECG-連続モニタリングまたは12誘導ECG；フレイア法(fluid attenuated inversion recovery)(FLAIR)を含むMRI脳イメージング；細胞数(WBCおよびRBC)、総タンパク質量およびグルコースの測定を伴うCSFサンプリング。

【0133】

ヒト血漿およびCSF中のC<sub>2</sub>N-8E12の定量：血漿およびCSF中のC<sub>2</sub>N-8E12の濃度を測定するためにサンドイッチELISAアッセイを開発した。Charles River Laboratoriesは、様々な異なるマトリックスにおける使

用のためにこれらのアッセイの有効性を確認した（表4参照）。

【0134】

【表6】

表4

CRL試験番号	試験名
20056682 完了	ヒト血漿（K2EDTA）中のC <sub>2</sub> N-8E12の定量のための酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）法の有効性確認
20057088 進行中	ヒト脳脊髄液中のC <sub>2</sub> N-8E12の定量のための酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）法の有効性確認

【0135】

ヒト血漿中の抗C<sub>2</sub>N-8E12抗体の定量：初回投与前および薬剤の投与後14日目と28日目に抗薬剤抗体（ADA）開発の評価のために血液試料を収集した。終了時に最終測定を実施する。血漿中のC<sub>2</sub>N-8E12に対する抗体（ADA）の存在を測定するためにECLに基づくサンドイッチELISAアッセイを開発した。Charles River Laboratoriesは、ヒト血漿中のADA応答の検出のためにこのアッセイの有効性を確認した（表5参照）。

【0136】

【表7】

表5

CRL試験番号	試験名
20056686 完了	ヒト血漿（K2EDTA）中の抗C <sub>2</sub> N-8E12抗体の検出のための定性的電気化学発光（ECL）アッセイの有効性確認

【0137】

臨床および機能評価は、コロンビア自殺重大度評価尺度（Columbia - Suicide Severity Rating Scale）を含む：安全性パラメータとして、自殺念慮に関するコロンビア自殺重大度評価尺度（C-SSRS）を使用する（Posner et al. 2011）。高齢者うつ病評価尺度（Geriatric Depression Scale）：C-SSRSと同様に、試験期間中の全体的な気分を評価するために高齢者うつ病評価尺度（GDS）を使用する。高齢者うつ病評価尺度（GDS）は、高齢者におけるうつ病を同定するために使用される30項目の自己報告評価である（Yesavage et al. 1983）。PSP評価尺度：PSP評価尺度（PSPRS）を、選択のためのスクリーニング時ならびに基線時と試験の最後に経時的な尺度の変化を評価するために使用する（Golbe and Ohman-Strickland 2007）。臨床全般印象尺度（Clinical Global Impressions）：症状の重症度を評価するために臨床全般印象変化度（CGIC）および重症度（CGIS）スケールを使用する。シュワブ・イングランド日常生活活動（Schwab and England Activities of Daily Living）：シュワブ・イングランド日常生活活動（SEADL）スケールを、日常活動を実施する被験者の能力を評価する手段として用いる（Schwab and England 1969）。臨床的認知症重症度判定尺度 - 前頭側頭葉型認知症（Clinical Dementia Rating Sum of Boxes Frontotemporal Lobe Dementia）：臨床的認知症重症度判定尺度 - 前頭側頭葉型認知症（CDR-SB-FTLD）は、行動、態度、人格および言語の評価を含む、CDR-SB認知評価検査の一種である（Knopman et al. 2008）。精神状態短時間検査（Mini Mental State Examination）：精神状態短時間検査（MMSE）は、認知障害を測定する信頼性のある30問の質問表である（Folstein, Folstein, and McHugh 1975）。

【0138】

脳脊髄液：CSFを腰椎穿刺によってL3 - 4間から採取する。CSF試料採取が成功しない場合は、ローカルプロトコルに従って地域の臨床施設職員の裁量でCT/X線透視下腰椎穿刺を用いることができる。CSFに関する安全性検査室検査は、各々の腰椎穿刺/CSF収集後に該当臨床施設において地域で分析される。これらの測定は、細胞数(WBCおよびRBC)、総タンパク質量およびグルコースを含む。他のCSF測定(例えばC<sub>2</sub>N-8E12濃度、標的係合および他の探索的バイオマーカー)は、該当する指定検査室によって分析される。

【0139】

イメージング：被験者はまた、構造、フレアー、拡散強調および磁化率強調画像による基線MRIスキャンを受ける。投与後の画像解析は事象スケジュール(Schedule of Events)に従って実施される。

【0140】

探索的薬理ゲノム解析：基線時にDNA抽出のために血液試料を収集する。すべての個人は、H1(A-D)およびH2保因状態を調べるために拡張MAPTハプロタイプ配列解析を受ける。DNAを試料から抽出し、このDNAをこの試験のための指定薬理ゲノムコア施設に発送する。

【0141】

以下の事象のいずれかの早期発生まで被験者をこの試験に登録する：(i)被験者が自らの参加および事象スケジュール全体を完了する；(ii)被験者または試験者が被験者の参加を中止することを決定する；(iii)該当する被験者が、試験者がこの試験へのさらなる参加を不可能にすると判断し、この後の第2相/MAD試験についての適格性を除外する、何らかのDLTまたはSAEを経験する。加えて、試験者の裁量で、何らかの選択基準を満たさなくなった、または試験期間中に1つ以上の除外基準に合致した被験者は、試験への参加を継続する資格がないまたはこの後の第2相/MAD試験に参加する資格がないと決定され得る。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離されたモノクローナル抗タウ抗体であって、  
配列番号2のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び、  
配列番号5のアミノ酸配列を含む重鎖  
を含む、抗タウ抗体。

【請求項2】

ヒト化IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4抗体である、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

S241Pヒンジ安定化変異を含むヒト化IgG4抗体である、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】

配列番号9のアミノ酸配列を含むエピトープに結合する請求項1に記載の抗体。

【請求項5】

請求項1に記載の抗タウ抗体と、薬理的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項6】

単離されたモノクローナル抗タウ抗体であって、  
配列番号18のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び、  
配列番号13のアミノ酸配列を含む重鎖

を含む、抗タウ抗体。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の抗タウ抗体と、薬理的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 8】

配列番号 9 のアミノ酸配列を含むエピトープに結合する請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 9】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖と、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む抗体重鎖とをコードする核酸分子。

【請求項 10】

配列番号 18 のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む重鎖とをコードする請求項 9 に記載の核酸分子。

【請求項 11】

ヒトアイソタイプ 〃 の軽鎖定常領域を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 12】

請求項 3 に記載の抗タウ抗体と、薬理的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

可変領域配列

C2N を移植した V 領域配列

**軽鎖**

	CDR1	CDR2	CDR3
MuVL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGLVPSRPFSGSGGFTFLNIHPLEEEEDAATYYCHHSWEIPLTFGAGTKLELK		(配列番号 11)
VK1	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGLVPSRPFSGSGGFTFLNIHPLEEEEDFATYYCHHSWEIPLTFGGTKLEIK		(6) (配列番号 1)
VK2	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGLVPSRPFSGSGGFTFLNIHPLEPEPDFATYYCHHSWEIPLTFGGTKLEIK		(7) (配列番号 2)
VK3	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGLVPSRPFSGSGGFTFLTISSLPEDFATYYCHHSWEIPLTFGGTKLEIK		(11) (配列番号 3)
VK4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGLVPSRPFSGSGGFTFLTISSLPEDFATYYCHHSWEIPLTFGGTKLEIK		(12) (配列番号 4)

**重鎖**

	CDR1	CDR2	CDR3
MuVH	EVKVVEESGGGLVQPGGSMKLSVVVSGFTFSNYWVWVVRQSPKGLLEWVAQIPLKSDNYATHYEESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNILRAEDSGIYYCTNWEDYWGQGTTLITVSSASTKGPSVF		(配列番号 12)
VH1	EVKVVEESGGGLVQPGGSMKLSVVVSGFTFSNYWVWVVRQAPGKLEWVAQIPLKSDNYATHYEESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNILRAEDSGIYYCTNWEDYWGQGTTLITVSSASTKGPSVF		(4) (配列番号 5)
VH2	EVKVVEESGGGLVQPGGSLKLSVVVSGFTFSNYWVWVVRQAPGKLEWVAQIPLKSDNYATHYEESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTIGIYYCTNWEDYWGQGTTLITVSSASTKGPSVF		(7) (配列番号 6)
VH3	EVOVVEESGGGLVQPGGSLKLSVVVSGFTFSNYWVWVVRQAPGKLEWVAQIPLKSDNYATHYEESVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNILRAEDTAIYYCTNWEDYWGQGTTLITVSSASTKGPSVF		(10) (配列番号 7)
VH4	EVOVVEESGGGLVQPGGSLKLSVVVSGFTFSNYWVWVVRQAPGKLEWVAQIPLKSDNYATHYEESVKGRFTISRDDSKNSLILQMNILRAEDTAIYYCTNWEDYWGQGTTLITVSSASTKGPSVF		(12) (配列番号 8)

キーワード:

- Mu: マウス配列を表す
- VH: ヒト化可変重鎖を表す
- VL: ヒト化可変軽鎖を表す
- CDR: 相補性決定領域
- AAA: Antitope によって提案されたフレームワーク変化

FIG. 1

【手続補正4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2 - 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【 図 2 - 1 】

**C<sub>2</sub>N 重鎖及び軽鎖変異体の完全アミノ酸配列****移植重鎖変異体****gVH1 理論的 pI/Mw: 6.80 / 48822.90**

EVKVVESGGGLVQPGGSMKLS CVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKSDNYATHYEESVKGRFTISR  
 DSKSSVYLQMNLR AEDSGIYYCTNWEDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE  
 PVTVSWNSGALTS GVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP  
 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(配列番号 13)

**FIG. 2A****C<sub>2</sub>N 重鎖及び軽鎖変異体の完全アミノ酸配列****移植重鎖変異体****gVH2 理論的 pI/Mw: 6.80/48791.87**

EVKVVESGGGLVQPGGSLKLS CVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKSDNYATHYEESVKGRFTISR  
 DSKSSVYLQMNLSLRAEDTGIYYCTNWEDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE  
 PVTVSWNSGALTS GVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP  
 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(配列番号14)

**FIG. 2B****C<sub>2</sub>N 重鎖及び軽鎖変異体の完全アミノ酸配列****移植重鎖変異体****gVH3 理論的 pI/Mw: 6.51 /48832.88**

EVQVVESGGGLVQPGGSLKLS CVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKSDNYATHYEESVKGRFTISR  
 DSKNSVYLQMNLSLRAEDTAIYYCTNWEDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE  
 PVTVSWNSGALTS GVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP  
 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(配列番号15)

**FIG. 2C****C<sub>2</sub>N 重鎖及び軽鎖変異体の完全アミノ酸配列****移植重鎖変異体****gVH4 理論的 pI/Mw: 6.51 /48860.93**

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKSDNYATHYEESVKGRFTISR  
 DSKNSLYLQMNLSLRAEDTAIYYCTNWEDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE  
 PVTVSWNSGALTS GVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP  
 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(配列番号16)

**FIG. 2D**

【手続補正 5】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図 2 - 2  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【図 2 - 2】

**C<sub>2</sub>N 重鎖及び軽鎖変異体の完全アミノ酸配列**

**移植軽鎖変異体**

**gVL1 理論的 pI/Mw: 6.08 / 24100.81**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDF  
 TLNIHPLEEEEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号17)

**FIG. 2E**

**C<sub>2</sub>N 重鎖及び軽鎖変異体の完全アミノ酸配列**

**移植軽鎖変異体**

**gVL2 理論的 pI/Mw: 6.33 / 24068.81**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDF  
 TLNIHPLEPEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号18)

**FIG. 2F**

**C<sub>2</sub>N 重鎖及び軽鎖変異体の完全アミノ酸配列**

**移植軽鎖変異体**

**gVL3 理論的 pI/Mw: 6.57 / 23994.72**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDF  
 TLTISLQPEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号19)

**FIG. 2G**

**C<sub>2</sub>N 重鎖及び軽鎖変異体の完全アミノ酸配列**

**移植軽鎖変異体**

**gVL4 理論的 pI/Mw: 6.57 / 24012.76**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDF  
 TLTISLQPEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号20)

**FIG. 2H**

【手続補正 6】



【 図 9 】

C<sub>2</sub>N-8E12 および HJ8.5 のエピトープマッピング

		抗体	コアエピトープ		
		HJ8.5 および C <sub>2</sub> N-8E12	25DQGGYT <sub>30</sub> (配列番号 9)		
Pep 検査室データ	配列	識別子	標識	HJ8.5 (結合シグナル)	C <sub>2</sub> N-8E12 (結合シグナル)
PEP_2875800	DHAGTYGLGDRKDQG	配列番号 24	LIN	61	78
PEP_2875801	DHAGTYGLGAAKDQG	配列番号 25	LIN.AA	52	90
PEP_2875802	HAGTYGLGDRKDQGG	配列番号 26	LIN	63	65
PEP_2875803	HAGTYGLGDAADQGG	配列番号 27	LIN.AA	51	65
PEP_2875804	AGTYGLGDRKDQGGY	配列番号 28	LIN	427	1286
PEP_2875805	AGTYGLGDRAAQGGY	配列番号 29	LIN.AA	58	76
PEP_2875806	GTYGLGDRKDQGGYT	配列番号 30	LIN	2638	1714
PEP_2875807	GTYGLGDRKAAGGYT	配列番号 31	LIN.AA	110	114
PEP_2875808	TYGLGDRKDQGGYTM	配列番号:32	LIN	2640	2588
PEP_2875809	TYGLGDRKDAAGYTM	配列番号:33	LIN.AA	2814	2755
PEP_2875810	YGLGDRKDQGGYTMH	配列番号:34	LIN	2844	2671
PEP_2875811	YGLGDRKDQAAYTMH	配列番号:35	LIN.AA	1780	1876
PEP_2875812	GLGDRKDQGGYTMHQ	配列番号:36	LIN	2824	2729
PEP_2875813	GLGDRKDQGAATMHQ	配列番号:37	LIN.AA	80	65
PEP_2875814	LGDRKDQGGYTMHQD	配列番号:38	LIN	2835	2749
PEP_2875815	LGDRKDQGGGAAMHQD	配列番号:39	LIN.AA	69	99
PEP_2875816	GDRKDQGGYTMHQDQ	配列番号:40	LIN	2647	2699
PEP_2875817	GDRKDQGGYAAHQDQ	配列番号:41	LIN.AA	2635	661
PEP_2875818	DRKDQGGYTMHQDQE	配列番号:42	LIN	2692	2788
PEP_2875819	DRKDQGGYTAAQDQE	配列番号:43	LIN.AA	2697	2585
PEP_2875820	RKDQGGYTMHQDQEG	配列番号:44	LIN	2699	2779
PEP_2875821	RKDQGGYTMHAADQEG	配列番号:45	LIN.AA	2713	2791
PEP_2875822	KDQGGYTMHQDQEGD	配列番号:46	LIN	2701	2680
PEP_2875823	KDQGGYTMHAAQEGD	配列番号:47	LIN.AA	2707	2712
PEP_2875824	DQGGYTMHQDQEGDT	配列番号:48	LIN	2677	2648
PEP_2875825	DQGGYTMHQAAEGDT	配列番号:49	LIN.AA	2707	2585
PEP_2875826	QGGYTMHQDQEGDTD	配列番号:50	LIN	399	789
PEP_2875827	QGGYTMHQDAAGDTD	配列番号:51	LIN.AA	427	636
PEP_2875828	GGYTMHQDQEGDTDA	配列番号:52	LIN	109	110
PEP_2875829	GGYTMHQDQAADTDA	配列番号:53	LIN.AA	106	118
PEP_2875830	GYTMHQDQEGDTDAG	配列番号:54	LIN	77	97

FIG. 9