

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6913018号  
(P6913018)

(45) 発行日 令和3年8月4日(2021.8.4)

(24) 登録日 令和3年7月13日(2021.7.13)

(51) Int.Cl.	F 1			
CO7K 16/18	(2006.01)	CO7K	16/18	Z NA
GO1N 21/78	(2006.01)	GO1N	21/78	C
GO1N 21/64	(2006.01)	GO1N	21/64	F
GO1N 33/53	(2006.01)	GO1N	33/53	D
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D

請求項の数 13 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-500891 (P2017-500891)	(73) 特許権者	511060836 ニューヨーク・ユニバーシティ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニューヨーク ワシントン スクエア サウス 70
(86) (22) 出願日	平成27年7月6日(2015.7.6)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(65) 公表番号	特表2017-532288 (P2017-532288A)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(43) 公表日	平成29年11月2日(2017.11.2)	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/039205	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開番号	W02016/007414	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(87) 國際公開日	平成28年1月14日(2016.1.14)		
審査請求日	平成30年7月4日(2018.7.4)		
(31) 優先権主張番号	62/021,897		
(32) 優先日	平成26年7月8日(2014.7.8)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】タウイメージングリガンド、ならびにタウ異常症の診断および治療におけるそれらの使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(A) 非リン酸化タウに対してよりも高い選択性でリン酸化タウと免疫特異的に結合しうる、抗体のエピトープ結合性断片であって、

(1) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；および

(2) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、かつ

(3) タウ396 / 404ペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO:7) : TDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLからなり、その位置11および19にあるセリン残基がリン酸化されている、リン酸化タウのペプチド部分にあるリン酸化タウのエピトープと結合することができ、かつ

10

(4) 非リン酸化タウと比較して10倍以上高い選択性でリン酸化タウの該エピトープと免疫特異的に結合しうる、

前記エピトープ結合性断片；ならびに

(B) 薬学的に許容される非毒性の担体、希釈剤、および/または安定化剤を含む、薬学的組成物。

## 【請求項2】

前記エピトープ結合性断片が、単一ドメイン抗体断片、scFv、またはダイアボディである、請求項1に記載の薬学的組成物。

## 【請求項3】

前記エピトープ結合性断片が、レシピエントに末梢注射されると、タウ凝集物と共局在

20

する、請求項1～2のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項4】

前記エピトープ結合性断片が、scFVまたはその融合タンパク質であり、かつSEQ ID NO : 18、SEQ ID NO : 22、SEQ ID NO : 23、SEQ ID NO : 24、SEQ ID NO : 25、およびSEQ ID NO : 26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項5】

前記エピトープ結合性断片が検出可能に標識されている、請求項1～4のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項6】

検出可能な標識が、蛍光性標識、化学発光性標識、常磁性標識、放射性同位体標識、または酵素標識である、請求項5に記載の薬学的組成物。

10

【請求項7】

レシピエント対象の脳生検試料、脳脊髄液、血液、血清、または血漿におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、請求項1～6のいずれか一項に記載の薬学的組成物のエクスピボでの使用であって、前記組成物の前記エピトープ結合性断片の、該対象の脳生検試料、脳脊髄液、血液、血清、または血漿におけるリン酸化タウへの結合を、もしあれば、検出または測定することを含む、前記使用。

【請求項8】

検出または測定が、リン酸化タウタンパク質と結合した前記エピトープ結合性断片のエクスピボでのイメージングを含む、請求項7に記載の使用。

20

【請求項9】

対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症の治療における使用のための医薬であって、該アルツハイマー病または他のタウ異常症を治療するのに有効な量にある請求項1～4のいずれか一項に記載の薬学的組成物を含む、医薬。

【請求項10】

前記医薬が、前記対象のアルツハイマー病の治療における使用のためである、請求項9に記載の医薬。

【請求項11】

前記医薬が、前記対象のタウ異常症の治療における使用のためである、請求項9に記載の医薬であって、ここで、該タウ異常症が、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖したパーキンソニズム(FTDP-17)、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、タングルのみの認知症(tangle only dementia)、石灰化を伴うびまん性神経原線維タングル、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症パーキンソニズム・認知症複合、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハラーフォルデン・シュバッツ病(Hallerworden-Spatz disease)、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症(multiple system atrophy)、ニーマン・ピック病C型、プリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維タングルを伴う非グアナミン運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソニズム、急性外傷性脳損傷、および慢性外傷性脳症を含む群から選択される、医薬。

30

【請求項12】

アミノ酸配列(SEQ ID NO:7): TDHGAEIVYKSPVSGDTSPRHLからなり、その位置11および19にあるセリン残基がリン酸化されている、リン酸化タウのペプチド部分のエクスピボ検出もしくは測定のための、または、アルツハイマー病もしくは別のタウ異常症のエクスピボ診断のためのキットであって、ここで、該キットは、請求項1～6のいずれか一項に記載の薬学的組成物、および、それに対する結合特異性を有する試薬とを含むキット。

40

【請求項13】

前記対象がヒトである、請求項9～11のいずれか一項に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

50

**【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は、米国仮特許出願第62 / 021,897号（2014年7月8日に提出；係属中）に対する優先権を主張し、その出願はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

**【0002】****連邦政府の資金援助を受けて行われた研究または開発に関する申告**

本発明は、米国国立衛生研究所（National Institutes of Health）（NIH）によって授与された助成金NS077239号、AG032611号およびAG020197号の下で、政府の援助を受けて行われた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

10

**【0003】****配列表の参照**

本出願は、米国特許法規則1.821以降の条文（37 C.F.R. 1.821 et seq.）に準じて、コンピュータ可読媒体中に開示されている1つまたは複数の配列表を含み（ファイル名：SIG-09-0927-WO-PCT\_Sequence\_Listing\_ST25.txt、2015年7月3日に作成、サイズは28,918バイト）、このファイルはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

**【0004】****発明の分野**

本発明は、タウのホスホセリン含有エピトープ、例えばタウ-ホスホセリン396 / 404ペプチドなどと免疫特異的かつ選択的に結合しうる、抗体を基にしたプローブ（單一ドメイン抗体断片、scFv分子、抗体、抗体断片、ダイアボディおよびそれらのエピトープ結合ドメインを含む）に関する。そのようなイメージングリガンドは、特にアルツハイマー病または他のタウ異常症の診断と併せて、病的タウタンパク質配座異性体が生物試料中に存在する場合にそれを検出するために有用であり、それ故にアルツハイマー病および他のタウ病理に関する診断薬となる。本発明のscFv分子は、アルツハイマー病および関連するタウ異常症に関する診断マーカーとして、ならびにそのような病状の治療のための薬学的組成物としての有用性がある。

20

**【背景技術】****【0005】****発明の背景**

30

アルツハイマー病は、認知症の最も多い病型であり、全世界で2000万人を超える人々が罹患している。

**【0006】**

本疾患の診断、特に早期での診断は手間がかかる上に困難であり、アルツハイマー病などのタウ異常症の正確な診断に対する需要がある。脳脊髄液中の異常タウの抗体検出について、ある程度の有望性が示されている（Blennow et al. "Cerebrospinal Fluid And Plasma Biomarkers In Alzheimer Disease," Nat. Rev. Neurol. 6, 131-144 (2010)（非特許文献1）およびWeiner et al. "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A Review Of Papers Published Since Its Inception," Alzheimers. Dement. 9, e111-e194 (2013)（非特許文献2））。

40

**【0007】**

ここ数年で、脳脊髄液中のホスホ-タウタンパク質の抗体検出は、アルツハイマー病の診断にある程度の有用性があることが示されており（Blennow et al. "Cerebrospinal Fluid And Plasma Biomarkers In Alzheimer Disease," Nat. Rev. Neurol. 6, 131-144 (2010)（非特許文献1）；Lewis, J. et al. "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein," Nat. Genet. 25, 402-405（非特許文献3）；Weiner, M.W. et al. (2013) "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A Review Of Papers Published Since Its Inception," Alzheimers. Dement. 9: e111-e194（非特許文献2））、この分野におけるさらなる進展が見込まれることが示唆されている（Congdon, E.E. (2014) "Harnessing The Immun

50

e System For Treatment And Detection Of Tau Pathology," *J. Alzheimers. Dis.* 40:S 113-S121 (非特許文献4) を参照)。しかし、他のタウ異常症におけるCSFタウレベルは通常、対照と比較して変化しておらず (Theunis, C. et al. "Efficacy And Safety Of A Liposome-Based Vaccine Against Protein Tau, Assessed In Tau.P301L Mice That Model Tauopathy," *PLoS. One.* 8, e72301 (2013) (非特許文献5) ; Hales, CM. et al. (2013) "From Frontotemporal Lobar Degeneration Pathology To Frontotemporal Lobar Degeneration Biomarkers," *Int. Rev. Psychiatry* 25:210-220 (非特許文献6) )、イメージング色素によってすべてのタウ異常症で病的タウが検出可能なわけでもない (Fodero-Tavoletti, M. T. et al. (2014) "Assessing THK523 Selectivity For Tau Deposits In Alzheimer's Disease And Non-Alzheimer's Disease Tauopathies," *Alzheimers. Res. Ther.* 6:11 (非特許文献7) )。タウ凝集物の領域パターンは種々のタウ異常症ごとに異なることから、これらのタウ病変をアミロイド- $\beta$  (A $\beta$ )と併せてイメージングすることにより、正確な診断につながる可能性が高くなる。その上、アルツハイマー病を除いてこれらはすべて、A $\beta$ 沈着が存在しないことによって一部が定義されている。-シートとよく結合する化合物を用いたA $\beta$ 斑のインビボでのイメージングは既に臨床で用いられている (Mason, N.S. et al. (2013) "Positron Emission Tomography Radioligands For In Vivo Imaging Of ABeta Plaques," *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 56:89-95 (非特許文献8) )。色素を基にしたいくつかのそのようなタウ結合リガンドが前臨床試験において最近同定されており、それらのいくつかは評価が進行中である (Fodero-Tavoletti, M. T. et al. (2014) "Assessing THK523 Selectivity For Tau Deposits In Alzheimer's Disease And Non-Alzheimer's Disease Tauopathies," *Alzheimers. Res. Ther.* 6:11 (非特許文献7) ; Fodero-Tavoletti, M. T. et al. (2011) "18F-THK523: A Novel In Vivo Tau Imaging Ligand For Alzheimer's Disease," *Brain* 134:1089-1100 (非特許文献9) ; Zhang, W. et al. (2012) "A Highly Selective And Specific PET Tracer For Imaging Of Tau Pathologies," *J. Alzheimers. Dis.* 31:601-612 (非特許文献10) ; Chien, D.T. et al. (2013) "Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [F-18]T807," *J. Alzheimers. Dis.* 34:457-468 (非特許文献11) ; Maruyama, M.H. et al. (2013) "Imaging Of Tau Pathology In A Tauopathy Mouse Model And In Alzheimer Patients Compared To Normal Controls," *Neuron* 79:1094-1108 (非特許文献12) ; Okamura, N. et al. (2005) "Quinoline And Benzimidazole Derivatives: Candidate Probes For In Vivo Imaging Of Tau Pathology In Alzheimer's Disease," *J. Neurosci.* 25:10857-10862 (非特許文献13) ; Harada, R., et al. (2013) "Comparison Of The Binding Characteristics Of [18F]THK-523 And Other Amyloid Imaging Tracers To Alzheimer's Disease Pathology," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 40:125-132 (非特許文献14) ; Ono, M. et al. (2011) "Rhodanine And Thiohydantoin Derivatives For Detecting Tau Pathology In Alzheimer's Brains," *ACS Chem. Neurosci.* 2:269-275 (非特許文献15) ; Xia, C.F. et al. (2013) "[18F]T807, A Novel Tau Positron Emission Tomography Imaging Agent For Alzheimer's Disease," *Alzheimers. Dement.* 9:666-676 (非特許文献16) ; Chien, D.T. (2014) "Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [F18]-T808," *J. Alzheimers. Dis.* 38:171-184 (非特許文献17) ; Villemagne, V.L. et al. (2014) "In Vivo Evaluation Of A Novel Tau Imaging Tracer For Alzheimer's Disease," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 41:816-826 (非特許文献18) ; Okamura, N. et al. (2014) "Non-Invasive Assessment Of Alzheimer's Disease Neurofibrillary Pathology Using 18F-THK5105 PET," *Brain* 137:1762-1771 (非特許文献19) )。タウを基にしたリガンドについて期待され、見込まれているのは、それらがA $\beta$ リガンドよりも神経変性の状況および進行をモニターする上で優れるということである。抗体を基にしたプローブでは、タウ病変の検出に関してより高い特異性が得られる可能性が高い。特に、タウと結合する比較的小型の抗体断片は、アルツハイマー病または他のタウ異常症の患者におけるタウ病変を検出するためのインビボでのイメージング用のリガンドとして魅力がある。

## 【0008】

癌の分野では、治療用抗体はイメージング剤として慣行的に共同開発されてきており、いくつかのそのような抗体およびFab分子は腫瘍イメージングを目的としてFDAに承認されている (Kaur, S. et al. "Recent Trends In Antibody-Based Oncologic Imaging," *Cancer Lett.* 315, 97-111 (2012) (非特許文献20) )。

## 【0009】

本発明者らは、タウ病変を検出する上で優れた特異性を与える抗体由来のイメージングリガンド、特にタウ凝集物のインビオでのイメージング用に魅力的である、比較的小型の单鎖抗体可変断片 (scFv分子) を見いだした。これらの抗体由来イメージングリガンドは、タウ病理の疾患進行、タウターゲティング療法の有効性をモニターするために、かつA 10 隆性のタウ異常症を同定するために有用な可能性があると想定される。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0010】

【非特許文献1】Blennow et al. "Cerebrospinal Fluid And Plasma Biomarkers In Alzheimer Disease," *Nat. Rev. Neurol.* 6, 131-144 (2010)

【非特許文献2】Weiner et al. "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A Review Of Papers Published Since Its Inception," *Alzheimers. Dement.* 9, e111-e 194 (2013)

【非特許文献3】Lewis, J. et al. "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein," *Nat. Genet.* 25, 402-405 20

【非特許文献4】Congdon, E.E. (2014) "Harnessing The Immune System For Treatment And Detection Of Tau Pathology," *J. Alzheimers. Dis.* 40:S113-S121

【非特許文献5】Theunis, C. et al. "Efficacy And Safety Of A Liposome-Based Vaccine Against Protein Tau, Assessed In Tau.P301L Mice That Model Tauopathy," *PLoS. One.* 8, e72301 (2013)

【非特許文献6】Hales, CM. et al. (2013) "From Frontotemporal Lobar Degeneration Pathology To Frontotemporal Lobar Degeneration Biomarkers," *Int. Rev. Psychiatry* 25:210-220 30

【非特許文献7】Fodero-Tavoletti, M. T. et al. (2014) "Assessing THK523 Selectivity For Tau Deposits In Alzheimer's Disease And Non-Alzheimer's Disease Tauopathies," *Alzheimers. Res. Ther.* 6:11

【非特許文献8】Mason, N.S. et al. (2013) "Positron Emission Tomography Radioligands For In Vivo Imaging Of ABeta Plaques," *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 56:89-95

【非特許文献9】Fodero-Tavoletti, M. T. et al. (2011) "18F-THK523: A Novel In Vivo Tau Imaging Ligand For Alzheimer's Disease," *Brain* 134:1089-1100

【非特許文献10】Zhang, W. et al. (2012) "A Highly Selective And Specific PET Tracer For Imaging Of Tau Pathologies," *J. Alzheimers. Dis.* 31:601-612 40

【非特許文献11】Chien, D.T. et al. (2013) "Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [F-18J-T807]," *J. Alzheimers. Dis.* 34:457-468

【非特許文献12】Maruyama, M.H. et al. (2013) "Imaging Of Tau Pathology In A Tauopathy Mouse Model And In Alzheimer Patients Compared To Normal Controls," *Neuron* 79:1094-1108

【非特許文献13】Okamura, N. et al. (2005) "Quinoline And Benzimidazole Derivatives: Candidate Probes For In Vivo Imaging Of Tau Pathology In Alzheimer's Disease," *J. Neurosci.* 25:10857-10862

【非特許文献14】Harada, R., et al. (2013) "Comparison Of The Binding Characteristics Of [18F]THK-523 And Other Amyloid Imaging Tracers To Alzheimer's Disease 50

Pathology," Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 40:125-132

【非特許文献 15】Ono, M. et al. (2011) "Rhodanine And Thiohydantoin Derivatives For Detecting Tau Pathology In Alzheimer's Brains," ACS Chem. Neurosci. 2:269-275

【非特許文献 16】Xia, C.F. et al. (2013) "[<sup>18</sup>F]T807, A Novel Tau Positron Emission Tomography Imaging Agent For Alzheimer's Disease," Alzheimers. Dement. 9:6 66-676

【非特許文献 17】Chien, D.T. (2014) "Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [<sup>18</sup>F]T808," J. Alzheimers. Dis. 38:171-184

【非特許文献 18】Villemagne, V.L. et al. (2014) "In Vivo Evaluation Of A Novel Tau Imaging Tracer For Alzheimer's Disease," Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 41: 816-826

【非特許文献 19】Okamura, N. et al. (2014) "Non-Invasive Assessment Of Alzheimer's Disease Neurofibrillary Pathology Using <sup>18</sup>F-THK5105 PET," Brain 137:1762-1771

【非特許文献 20】Kaur, S. et al. "Recent Trends In Antibody-Based Oncologic Imaging," Cancer Lett. 315, 97-111 (2012)

【発明の概要】

【0011】

本発明は、タウのホスホセリン含有エピトープ、例えばタウ-ホスホセリン396 / 404ペプチドなどと免疫特異的かつ選択的に結合しうる、抗体を基にしたプローブ（単ードメイン抗体断片、scFv分子、抗体、抗体断片、ダイアボディおよびそれらのエピトープ結合ドメインを含む）に関する。そのようなイメージングリガンドは、特にアルツハイマー病または他のタウ異常症の診断と併せて、病的タウタンパク質配座異性体が生物試料中に存在する場合にそれを検出するために有用であり、それ故にアルツハイマー病および他のタウ病理に関する診断薬となる。本発明のscFv分子は、アルツハイマー病および関連するタウ異常症に関する診断マーカーとして、ならびにそのような病状の治療のための薬学的組成物としての有用性がある。

【0012】

詳細には、本発明は、タウ396 / 404ペプチドのアミノ酸配列  
(SEQ ID NO:7): TDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHL

からなるアミノ酸配列を有するリン酸化タウペプチドと免疫特異的に結合しうる結合性分子であって、その位置11および19にあるセリン残基（下線を付して示されている）がリン酸化されており、さらに、非リン酸化タウに対してよりも高い選択性でリン酸化タウと免疫特異的に結合しうる、結合性分子に関する。

【0013】

本発明はまた、分子が抗体であるか、またはそのエピトープ結合性断片を含む、そのような結合性分子の態様にも関する。本発明はさらに、結合性分子がそのようなエピトープ結合性断片を含み、より詳細には、分子が単離されたCDR、単ードメイン抗体断片、scFvまたはダイアボディである、そのような結合性分子のいずれかの態様にも関する。本発明は特に、レシピエントに末梢注射されると、結合性分子がタウ凝集物と実質的に共局在する、そのような結合性分子のいずれかの態様に関する。

【0014】

本発明はまた、エピトープ結合性断片が、以下のいずれか1つ、いずれか2つ、いずれか3つ、いずれか4つ、いずれか5つ、または6つすべてを含む、そのような結合性分子の態様にも関する：

- (a) SEQ ID NO : 12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) SEQ ID NO : 13のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) SEQ ID NO : 14のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) SEQ ID NO : 15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；

10

20

30

40

50

(e) SEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および／または

(f) SEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3。

【0015】

本発明はまた、結合性分子がscFv235 (SEQ ID NO: 18) である、そのような結合性分子の態様にも関する。

【0016】

本発明はまた、検出可能に標識されているそのような結合性分子のいずれか、特に、検出可能な標識が蛍光性標識、化学発光性標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、そのような結合性分子のいずれかの態様にも関する。

【0017】

本発明はまた、レシピエント対象の脳における、または生体液（例えば、脳脊髄液、血液、血清、血漿など）における、リン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、上記の結合性分子のいずれかの使用にも関する。本発明は特に、検出または測定が、リン酸化タウタンパク質と結合した結合性分子のインビボまたはエクスピボでのイメージングを含み、より詳細には、検出または測定が、対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するためである、そのような使用に関する。

【0018】

本発明はまた、対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症の治療のためのインビボ医薬であって、アルツハイマー病または他のタウ異常症を治療するのに有効な量にある請求項1～8のいずれか一項記載の結合性分子、ならびに1つまたは複数の担体、希釈剤および／または安定化剤を含む医薬にも関する。

【0019】

本発明はまた、対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症の治療のため、そのようなインビボ医薬の使用にも関する。

【0020】

本発明は特に、対象がヒトである、以上に列挙した使用に関する。

【0021】

本発明はまた、対象の脳におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出もしくは測定するため、または対象におけるアルツハイマー病もしくは別のタウ異常症を診断するためのキットであって、以上に列挙した結合性分子のいずれかを含むキットにも関する。

【0022】

本発明はさらに、タウ異常症が、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖したパーキンソニズム (FTDP-17)、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、タングルのみの認知症 (tangle only dementia)、石灰化を伴うびまん性神経原線維タングル、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症パーキンソニズム・認知症複合、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハラーフォルデン・シュパツ病 (Hallerwerden-Spatz disease)、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症 (multiple system atrophy)、ニーマン・ピック病C型、ブリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維タングルを伴う非グアナミン運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソニズム、急性外傷性脳損傷および慢性外傷性脳症を含む群から選択される、以上に列挙した使用のいずれか、または以上に列挙した医薬のいずれか、または以上に列挙したキットのいずれかにも関する。

[本発明1001]

タウ396 / 404ペプチドのアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 7) : TDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLからなるアミノ酸配列を有するリン酸化タウペプチドと免疫特異的に結合しうる結合性分子であって、その位置11および19にあるセリン残基がリン酸化されており、さらに、結合性分子は、非リン酸化タウに対してよりも高い選択性でリン酸化タウと免疫特異的に結合しうる、結合性分子。

10

20

30

40

50

[本発明1002]

抗体であるか、または抗体のエピトープ結合性断片を含む、本発明1001の結合性分子。

[本発明1003]

抗体のエピトープ結合性断片を含み、かつ、単離されたCDR、單一ドメイン抗体断片、scFv、またはダイアボディである、本発明1002の結合性分子。

[本発明1004]

抗体またはそのエピトープ結合性断片であり、レシピエントに末梢注射されると、タウ凝集物と実質的に共局在する、本発明1001～1003のいずれかの結合性分子。

[本発明1005]

エピトープ結合性断片が、以下のいずれか1つ、いずれか2つ、いずれか3つ、いずれか4つ、いずれか5つ、または6つすべてを含む、本発明1001～1004のいずれかの結合性分子：

- (a) SEQ ID NO : 12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) SEQ ID NO : 13のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) SEQ ID NO : 14のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) SEQ ID NO : 15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) SEQ ID NO : 16のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および／または
- (f) SEQ ID NO : 17のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3。

[本発明1006]

scFv235 (SEQ ID NO : 18) である、本発明1006の結合性分子。

[本発明1007]

検出可能に標識されている、本発明1001～1006のいずれかの結合性分子。

[本発明1008]

検出可能な標識が、蛍光性標識、化学発光性標識、常磁性標識、放射性同位体標識、または酵素標識である、本発明1007の結合性分子。

[本発明1009]

レシピエント対象の脳、脳脊髄液、血液、血清、または血漿におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、本発明1001～1008のいずれかの結合性分子の使用。

[本発明1010]

検出または測定が、リン酸化タウタンパク質と結合した結合性分子のインビボまたはエクスピボでのイメージングを含む、本発明1009の使用。

[本発明1011]

検出または測定が、対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するためである、本発明1009～1010のいずれかの使用。

[本発明1012]

対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症の治療のためのインビボ医薬であって、該アルツハイマー病または他のタウ異常症を治療するのに有効な量にある本発明1001～1008のいずれかの結合性分子、ならびに1つまたは複数の担体、希釈剤、および／もしくは安定化剤を含む、医薬。

[本発明1013]

対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症の治療のための、本発明1012のインビボ医薬の使用。

[本発明1014]

対象がヒトである、本発明1009～1011および1013のいずれかの使用。

[本発明1015]

対象の脳におけるリン酸化タウタンパク質の存在もしくは量を検出もしくは測定するため、または対象におけるアルツハイマー病もしくは別のタウ異常症を診断するためのキットであって、本発明1001～1008のいずれかの結合性分子を含むキット。

[本発明1016]

タウ異常症が、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖したパーキンソニズム (FTDP-17)

10

20

30

40

50

)、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、タングルのみの認知症 (tangle only dementia)、石灰化を伴うびまん性神経原線維タングル、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症パーキンソニズム・認知症複合、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハラーフォルデン・シュバッツ病 (Hallerwerden-Spatz disease)、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症 (multiple system atrophy)、ニーマン・ピック病C型、プリオントンパク質脳アミロイド血管障害、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維タングルを伴う非グアナミン運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソニズム、急性外傷性脳損傷、および慢性外傷性脳症を含む群から選択される、本発明1011、1013、もしくは1014のいずれかの使用、または本発明1012の医薬、または本発明1015のキット

10

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】抗体6B2G12から作製され、無作為に選択されたscFvクローニング (図1Aおよび1B) の、SEQ ID NO: 27の非リン酸化エピトープまたはSEQ ID NO: 28のリン酸化タウエピトープに対する結合を示している。図1Aのクローニングは、リン酸化エピトープ (SEQ ID NO: 28) に対してパニングした。図1Bのクローニングは、非リン酸化エピトープ (SEQ ID NO: 27) に対してパニングした。

【図2 A】scFv235は、アルツハイマー病の脳ホモジネート中のホスホ-タウエピトープおよびタウタンパク質と選択的に結合する。図2Aは、scFv235が、その非ホスホ同等エピトープ (Ser396 / 404) と比較して、ELISAにおいてホスホ-タウ-セリン396 / 404 (P-Ser396 / 404) エピトープと選択的に結合することを示している。

20

【図2 B】scFv235は、アルツハイマー病の脳ホモジネート中のホスホ-タウエピトープおよびタウタンパク質と選択的に結合する。図2Bは、scFv235がアルツハイマー病の脳ホモジネートのタウと特異的に結合することを示している。アルツハイマー病の個体由来の脳ホモジネートとscFv235とのインキュベーションは、50~70kDaの範囲にあるタウのバンドの免疫沈降をもたらす。CP27 (ヒトのタウ) とポリクローナル全タウ抗体 (Dako) とのウエスタンプロットでも同様の結果が示され、他のバンドは検出されなかった。比較のために、ほかに数個のタウ陽性バンドを伴う脳ホモジネートの低速上清 (LSS) を、同じプロットによる隣接レーンに示している。

30

【図2 C】scFv235は、アルツハイマー病の脳ホモジネート中のホスホ-タウエピトープおよびタウタンパク質と選択的に結合する。図2Cは、アルツハイマー病の個体由来の脳ホモジネートと6B2G12とのインキュベーションは、50~70kDaの範囲にあるタウのバンド、および20~30kDaの範囲にある分解断片の免疫沈降をもたらす。CP27 (ヒトのタウ) とポリクローナル全タウ抗体 (Dako) とのウエスタンプロットでは、CP27によるインタクトタウ、およびDakoタウによるより小型のタウ断片のより高度な検出が示された。比較のために、ほかに数個のタウ陽性バンドを伴う脳ホモジネートの低速上清 (LSS) を、同じプロットによる隣接レーンに示している。

【図2 D】scFv235は、アルツハイマー病の脳ホモジネート中のホスホ-タウエピトープおよびタウタンパク質と選択的に結合する。図2Dは、4種のヒト脳切片に関する分染法の結果を示している。行1: アルツハイマー病個体AD-1由来の脳切片；行2: アルツハイマー病個体AD-2由来の脳切片；行3: ピック病個体由来の脳切片；行4: 健常対照個体由来の脳切片。列A: 核を示すためにHoechstで染色した切片；列B: scFv235で染色した切片；列C: PHF1で染色した切片；列D: 局在 (矢印参照) を示すために合成した切片。scFv235によるヒト脳切片の染色により、PHF1染色による部分的局在を示す高度のニューロン染色が判明した。対照ヒト組織では極めて限定的な染色のみが観察された。スケールバー = 20 μm。

40

【図2 E】scFv235は、アルツハイマー病の脳ホモジネート中のホスホ-タウエピトープおよびタウタンパク質と選択的に結合する。図2Eは、scFv 235がアルツハイマー病ヒト脳切片上の病的タウとは結合するが、対照ヒト脳切片に対しては限定的な結合のみを呈することを示している。

50

【図3 A】図3は、蛍光標識したscFv235または6B2G12を頸動脈内または静脈内に注射した後の、P301Lマウス、htau / PS1マウス、htauマウス、Tg-SwDIマウスおよび野生型マウスにおけるタウ封入体のインビボでのイメージングを示す。さまざまな群からの代表的な画像を、別々のパネルに示している。図3Aは、頸動脈内イメージングを示す。注射前（列A）および注射後に特定の間隔（列B、列Cおよび列D）で記録した画像。行1：近赤外色素（680nm）でタグ標識したscFv235の注射を行った、注射前（列A）ならびに注射から38分後（列B）、82分後（列C）および220分後（列D）にイメージングしたP301L（12カ月齢）トランスジェニックマウスの画像。シグナルは身体全体で検出され、脳で強度が最も高く、時間経過とともに緩徐に減少している。脳シグナルは35～38分にピークがあり（注射前ベースラインシグナルの1714%）、注射から82分後および330分後にも強く保たれた（それぞれ1675%および1468%）。列2：注射前ならびに注射から37分後（列B）、65分後（列C）および176分後（列D）に記録した、scFv235を注射したhtau / PS1（22カ月）トランスジェニックマウスからの画像。この場合も、最も強いシグナルは脳で検出され、それが時間経過とともに徐々に減少した。脳シグナルは37分にピークがあり（注射前ベースラインシグナルの1443%）、注射から65分後および176分後にも強く保たれた（それぞれ1144%および1093%）。列3：注射前ならびに注射から37分後（列B）、75分後（列C）および265分後（列D）の、scFv235を注射した野生型（9カ月）マウスの画像。注射後には極めて限定的な脳シグナルが検出され、周辺には全くシグナルが検出されなかった。列4：注射前ならびに注射から37分後（列B）、170分後（列C）および291分後（列D）に記録した、6B2G12を注射したP301L（10カ月）トランスジェニックマウスの画像。シグナルは脳で最も強く、時間経過とともに徐々に減少し、同程度のシグナルが注射20～95分後にも得られ（ベースライン値の600～632%）、170分後および291分後の描写では幾分減少している（それぞれ497%および431%）。列5：注射前ならびに注射から37分後（列B）、90分後（列C）および225分後（列D）後に記録した、6B2G12を注射した野生型マウス（8カ月）の画像。シグナルは事実上全く検出されていない。スケールバーは最大ピクセル強度を示しており、一方、関心対象領域（ROI）は、合計ピクセル強度の総放射効率（TRE）である。

【図3 B】頸動脈内注射後の経時的なIVIS（インビボイメージングシステム）脳シグナルの定量分析：最も高度のシグナルは、scFv235を注射したP301Lマウスで検出された。比較的高齢のマウス（11カ月および12カ月）では総放射効率（TRE）がそれぞれ2.23E+11および2.64E+11にピークがあり、一方、比較的若齢のマウス（3カ月および8カ月）ではピークシグナルがより弱かった（それぞれ1.88E+11および1.86E+11）。同じP301Lモデル（7～10カ月）は、6B2G12注射後に強いものより弱い脳シグナルを有し、2.20E+11～1.16E+11の範囲であった。同程度のシグナル強度は、scFv235を注射した高齢htau / PS1マウス（22カ月；ピークは1.40E+11）でも観察されたが、タウ病理を持たないことが確認された7カ月齢htau / PS1マウスでは限定的であった。野生型マウス（12～13カ月）および1匹のhtauマウス（13カ月）はすべての時点で低シグナルであり、それはタウ病理を有していないかった。高齢htau / PS1マウス（23カ月）およびP301Lマウス（7カ月）への蛍光タグのみの注射は、scFv235または抗体を注射された野生型マウスよりも高度の脳シグナルをもたらしたが、それはscFv235または6B2G12を注射されたタウ異常症マウスのいずれよりも実質的に弱かった。これらの2種の色素が注射されたマウスは高度のタウ病理を有することが確認された（図4B参照）。

【図3 C】静脈内イメージング。注射前（列A）および注射後に特定の間隔（列B、列Cおよび列D）で記録した画像。行1：近赤外色素（680nm）でタグ標識したscFv235の注射を行った、注射前（列A）ならびに注射から18分後（列B）、210分後（列C）および11520分後（8日目）（列D）にイメージングしたP301L（13カ月齢）トランスジェニックマウスの画像。ピークの脳シグナルは18分（注射前ベースラインの1754%）であり、210分ではより弱いシグナルとなり（ピークのシグナルから18%の低下）、8日の時点では実質的に元に戻った（43%の低下）。列2：注射前ならびに注射から25分後（列B）、60分後（列C）および11520分後（8日目）（列D）に記録した、Tg-SwDI斑マウス（12カ月）からの画像。注射後に極めて限定的な脳シグナルが検出され、周辺には全くシグナルが検出されなか

10

20

30

40

50

った。列3：注射前ならびに注射から25分後（列B）、120分後（列C）および11520分後（8日目）（列D）の、6B2G12を注射したP301L（7カ月）トランスジェニックマウスの画像。脳シグナルは25分の時点で強く（注射前ベースラインの1211%）、35分でピークとなり（1445%）、120分ではより弱いシグナルとなり（ピークシグナルから11%の低下）、8日目および12日目までにははるかに弱くなった（それぞれ67%および70%の低下）。列4：注射前ならびに注射から25分後（列B）、180分後（列C）および11520分後（8日目）（列D）に記録した、6B2G12を注射したTg-SwDIマウス（12カ月）の画像。注射後には極めて限定的な脳シグナルが検出され、周辺には全くシグナルが検出されなかった。

【図3 D】静脈内注射後の経時的なIVIS脳シグナルの定量分析：scFv235および6B2G12をP301Lマウスに注射した。これらのマウスは、頸動脈内に注射したマウスよりも早い時点で10注射後にイメージングを行うことができたが、これは後者の経路が出血を防ぐためにより長時間にわたる術後処置を必要とするためである。ピークのシグナルは、動物個体にはよるが概ね注射から1時間後以内に得られ、すべてのプローブに関して同程度の間隔であった。総シグナルは、IgGを注射したマウスが最も強固なタウ病理を有していたにもかかわらず、対照IgGと比較してscFv235および6B2G12の方が実質的に高度であった（表6参照）。6B2G12を注射したマウスの1匹（B15）は、IVISシグナルがIgGを注射したマウスと同等であったが、タウ病理がより軽度であった。シグナルは、個々のP301Lマウスで速さは異なるものの14日間のうちに徐々に元に戻った。注射を受けたTg-SwDIマウスおよび野生型マウスでは、いずれのプローブを用いてもすべての時点で極めて限定的なシグナルが検出された。

【図4 A】図4は、注射したscFv235および6B2G12とニューロン内タウタンパク質、エンドソーム-オートファゴソーム-リソソームのマーカーおよびミクログリアとの共局在を示す。脳を頸動脈内注射およびIVISイメージングから3~4時間後に取り出し、固定し、冠状切片にした上で、以下に関して染色した：（1）タウ5（全タウ）、MC1（コンフォメーション）、PHF1（ホスホ-タウ）によるタウ、および（2）初期エンドソーム（EEA1）；（3）後期エンドソーム/リソソーム（Rab 7）；および（4）オートファゴソーム（LC3、P62）。切片をミクログリア（Iba-1）によっても染色した。図4Aは、scFv235を注射したP301Lマウス（行1~2、4および7：マウス「A12」；列3：マウス「BB8」；行5~6：マウス「A13」）を、核を同定するためにイメージングし（列A）、scFv235によりイメージングし（列B）、PHF1（列C）を示すためにイメージングし、そして合成画像を作成した（列D）。画像は、MC1、タウ5およびPHF1との部分的な共局在を示しており、Rab7、EEA1、LC3およびP62との完全な共局在を示している。

【図4 B】scFv235を注射したhtau/PS1マウス（行1、5、7~8：マウス「A47」；行2~4および6：マウス「B32」）を、核を同定するためにイメージングし（列A）、scFv235によりイメージングし（列B）、PHF1を示すためにイメージングし（列C）、そして合成画像を作成した（列D）。画像は注射したscFv235のMC1、タウ5およびIba-1との部分的な共局在を示しており（提示せず）、PHF1、Rab7、EEA1、LC3およびP62抗体との完全な共局在を示している。

【図4 C】6B2G12を注射したP301Lマウス（行1および7：マウス「A52」；行2~6：マウス「A50」）を、核を同定するためにイメージングし（列A）、scFv235によりイメージングし（列B）、PHF1を示すためにイメージングし（列C）、そして合成画像を作成した（列D）。画像は、MC1、タウ5、PHF1、Rab7、EEA1、LC3およびP62との部分的な共局在を示している。

【図4 D】scFv235（行1~3）または6B2G12（行4~6）を注射した野生型マウスを、核を同定するためにイメージングし（列A）、scFv235によりイメージングし（列B）、PHF1を示すためにイメージングし（列C）、そして合成画像を作成した（列D）。画像は、抗体断片による限定的なシグナルを示し、タウ5により検出された正常タウを例外として、抗体マーカーによる限定的な染色を示した。核はHoechst核染色によって青色に染色される。スケールバー=10 μm。矢印は、部分的な共局在を伴うニューロンのいくつかを示している。完全な共局在がみられる場合は矢印を用いなかった。

10

20

30

40

50

【図5】scFv235が、P301L(F6)およびhtau/PS1(A47)タングルマウスへの頸動脈内注射後には脳ニューロン内部で病的タウと共局在していることが、対照野生型マウス(R1)では検出可能な取り込みがないことを示している。

【図6】IVISシグナルと、(図6A~6B)脳組織プローブシグナルとの間(scFv235:  $r = 0.98$ 、6B2G12:  $r = 0.87$ )および(図6C~6D)タウ病理との間(scFv235:  $r = 0.94$ 、6B2G12:  $r = 0.75$ )に観察された優れた相関を示している。脳組織プローブシグナルは、(図6E~6F)脳タウ病理とも非常に高く相関した(scFv235:  $r = 0.99$ 、6B2G12:  $r = 0.97$ )。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0024】

###### 発明の詳細な説明

10

本発明は、タウのホスホセリン含有エピトープ、例えばタウ-ホスホセリン396/404ペプチドなどと免疫特異的かつ選択的に結合しうる、抗体を基にしたプローブ(単一ドメイン抗体断片、scFv分子、抗体、抗体断片、ダイアボディ、およびそれらのエピトープ結合ドメインを含む)に関する。そのようなイメージングリガンドは、特にアルツハイマー病または他のタウ異常症の診断と併せて、病的タウタンパク質配座異性体が生物試料中に存在する場合にそれを検出するために有用であり、それ故にアルツハイマー病および他のタウ病理に関する診断薬となる。本発明のscFv分子は、アルツハイマー病および関連するタウ異常症に関する診断マーカーとして、ならびにそのような病状の治療のための薬学的組成物としての有用性がある。

##### 【0025】

20

本発明の抗体を基にしたプローブは、ADまたは他のタウ異常症の患者におけるタウ病変を検出することに関して、シート色素よりも高い特異性をもたらす。特に、タウと結合する比較的小型の抗体断片は、インビボでのイメージング用のリガンドとして魅力的である。抗体と比較してそれらのサイズが小さいことは、タウ凝集物へのより優れた到達性につながる。もう1つの利点は、より長い半減期を有する非改変抗体に比しての、循環血中からのそれらの比較的迅速な排出である。癌の分野では、治療用抗体はイメージング剤として慣行的に共同開発されてきており、より優れた薬物動態学的特性を備えるいくつかのそのような抗体およびFab'またはより小型のダイアボディおよびscFv分子は、腫瘍イメージング剤として承認されているかまたはそれが提唱されている(Kaur, S. et al. (2012)

"Recent Trends In Antibody-Based Oncologic Imaging," Cancer Lett. 315:97-111; Olafsen, T. et al. (2010) "Antibody Vectors For Imaging," Semin. Nucl. Med. 40:167-181)。

30

##### 【0026】

###### I. タウおよび本発明の好ましい免疫原性タウペプチド

本明細書で用いる場合、「タウ」という用語はタウタンパク質と同義であり、タウタンパク質アイソフォームのいずれか(例えばUniProtにP10636、1~9として特定されている)を指す。タウのアミノ酸番号付けは、以下に示されているSEQ ID NO:1を基準にして与えられ、Metがアミノ酸1である。「P-タウ」は、1つまたは複数のセリン残基またはトレオニン残基でリン酸化されているタウタンパク質のことを指す。例えば、P-Ser 396/404は、セリン残基396および404がリン酸化されているSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含むタウのポリペプチドのことを指す。

40

SEQ ID NO:1:

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGLTD AGLKESPLQT  
 PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG  
 TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK  
 IATPRGAAPP GQKGQANATR I PAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP  
 GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKAVVTPPKSPSSAK SRLQTAPVPM  
 PDLKNVKSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV  
 PGGGSVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV  
 QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS  
 GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

## 【0027】

10

タウは、細胞周期の間にキナーゼ酵素の宿主によって動的にリン酸化および脱リン酸化される可溶性微小管結合タンパク質である。微小管を安定化するタウの能力は、そのリン酸化の程度に依存する。その脱リン酸化形態では、このタンパク質はチューブリンと相互作用し、微小管を安定化してチューブリンの微小管（これは細胞の細胞骨格を形成し、有糸分裂中に真核生物染色体を引き離す紡錘体の主要な構成要素である）への集合を促進することができる。そのリン酸化形態では、タウは微小管から解離することができ、それによって有糸分裂が起こることを可能にする。タウのリン酸化はそれ故に、ニューロン内での直接的な微小管の会合-解離スイッチとして作用する (Pedersen, J.T. et al. (2015) "Tau Immunotherapy For Alzheimer's Disease," Trends Mol. Med. 2015 Apr 3. pii: S 1471-4914(15)00058-1 ; pages 1-9、これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。

## 【0028】

20

タウの過剰リン酸化は、本明細書中で「タウ凝集物」と称される、対らせん状細線維および直鎖状細線維の不溶性自己集合性「タングル」の形成をもたらしうる。そのようなタウ凝集物は細胞内（例えば、ニューロン内）にあることもあるが、細胞の外側に形成されることもある。タウ凝集物の存在はタウが微小管を安定化する能力を損なわせ、それ故に微小管の解体、樹状突起棘の崩壊、および軸索の変性を招く。正常タウは平均で2個のリン酸化部位を含有する；過剰リン酸化されたタウ細線維では7~8個のリン酸化部位が平均である。過剰リン酸化タウは、アルツハイマー病の主要な顕著な特徴である細胞内神経原線維タングルの主要な構成要素である。

30

## 【0029】

## II. 本発明の好ましい抗体およびエピトープ結合性断片

本明細書で用いる場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリン、ならびにそのエピトープ結合性断片を有する分子のことを指す。天然に存在する抗体は、典型的には、少なくとも2つの重（H）鎖および少なくとも2つの軽（L）鎖で通常は構成される四量体を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略記される）、および、通常は3つのドメイン（CH1、CH2およびCH3）で構成される重鎖定常領域で構成される。重鎖は、IgG（IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4サブタイプ）、IgA（IgA1およびIgA2サブタイプ）、IgMならびにIgEを含む、いずれのアイソタイプのものであってもよい。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと略記される）および軽鎖定常領域（CL）で構成される。軽鎖は鎖および鎖を含む。重鎖可変領域および軽鎖可変領域は典型的には抗原認識を担当し、一方、重鎖定常領域および軽鎖定常領域は、免疫系のさまざまな細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第一成分（C1q）を含む、宿主組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介することができる。VH領域およびVL領域は「相補性決定領域」と名付けられた超可変領域にさらに細分することができ、それらの間には「フレームワーク領域」（FR）と名付けられたより保存的な配列の領域が散在している。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端の向きに以下の順に並んだ3つのCDRドメインおよび4つのFRドメインで構成される：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。特に関連性が高いのは、天然に存在しうるものとは異なる物理的環境に存在させるために「単離された」、または天然に存在する抗体

40

50

とはアミノ酸配列が異なるように改変された、抗体、およびそれらのエピトープ結合性断片である。

【 0 0 3 0 】

エピトープ結合能を呈する抗体の断片 (Fab断片および(Fab)<sub>2</sub>断片を含む) は、例えば、抗体のプロテアーゼ切断によって得ることができる。より好ましくは、そのような断片は、組換え手法を用いて形成される単一ドメイン抗体断片、scFv分子、および抗体のエピトープ結合ドメインであると考えられる。例えば、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別々の遺伝子によってコードされるが、そのような遺伝子配列またはそれらをコードするcDNAを、組換え方法を用いて、それらを、VL領域およびVH領域が会合して一価エピトープ結合性分子を形成した单一のタンパク質鎖として作り上げることができる柔軟なリンカー (典型的には約10個、12個、15個またはそれを上回るアミノ酸残基のもの) によって連結させることができる (単鎖Fv (scFv) 分子として知られる; 例えば、Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; およびHuston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:5879-5883を参照)。または、単一のポリペプチド鎖のVL領域およびVH領域が一つに会合することを可能にするには短すぎる柔軟なリンカー (例えば、約9残基未満) を使用することによって、二重特異性抗体、ダイアボディまたは類似の分子を形成させることもできる (そのような2つのポリペプチド鎖が一つに会合して二価のエピトープ結合性分子を形成する)。 (例えば、ダイアボディの説明については、PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993)を参照)。単一ドメイン抗体断片は、1つのみの可変ドメイン (例えば、VLまたはVH) を保有する。本発明の範囲に含まれるエピトープ結合性断片の例には、(i) VL、VN、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片、またはWO2007059782号に記載されている一価抗体である、Fab'断片もしくはFab断片; (ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片である、F(ab')<sub>2</sub>断片; (iii) VHドメインおよびCH1ドメインから本質的になるFd断片; (iv) VLドメインおよびVHドメインから本質的になるFv断片、(v) VHドメインから本質的になり、ドメイン抗体とも呼ばれる (Holt et al; *Trends Biotechnol.* 2003 Nov;21(11):484-90)、dAb断片 (Ward et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)) ; (vi) キャメリド (camelid) またはナノボディ (Revets et al; *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Jan;5(1):111-24)、ならびに (vii) 单離された相補性決定領域 (CDR) が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別々の遺伝子によってコードされるが、それらを、VL領域およびVH領域が対合して一価分子 (単鎖抗体または単鎖Fv (scFv) ) として知られる。例えば、Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988) およびHuston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) を参照) を形成する1つのタンパク質鎖として作り出されることを可能にする合成リンカーによって、組換え方法を用いて連結されてもよい。本発明の文脈における、これらおよび他の有用な抗体断片については本明細書においてさらに考察する。抗体という用語は、別様に定めのない限り、抗体様ポリペプチド、例えばキメラ抗体およびヒト化抗体など、ならびに任意の公知の手法、例えば酵素切断、ペプチド合成および組換え手法によってもたらされる、抗原と特異的に結合する能力を保っている抗体断片 (抗原結合断片) も含むことも理解されるべきである。作製される抗体は任意のアイソタイプを有してよい。本明細書で用いる場合、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンクラス (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM) のことを指す。アイソタイプの選択は、典型的には、ADCC誘導などの所望のエフェクター機能によって導かれると考えられる。例示的なアイソタイプには、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4がある。ヒト軽鎖定常領域である または のいずれかを用いることができる。所望であれば、本発明の抗タウ抗体のクラスを公知の方法によってスイッチすることができる。例えば、最初にIgMであった本発明の抗体を、本発明のIgG抗体にクラススイッチすることができる。さらに、クラススイッチ手法を用いて、あるIgGサブクラスを別のIgGサブクラスに、例えばIgG1からIgG2に変換することもできる。したがって、本発明の抗体のエフェクター機能は、さまざまな治療用途に合わせて、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体へのアイソタイプスイッチによって変更することができる。1つの態様において

10

20

30

40

50

、本発明の抗体は、IgG1抗体、例えばIgG1<sub>1</sub>、である。

【0031】

そのような抗体断片は、当業者に周知の従来の手法を用いて得ることができる。例えば、F(ab')2断片は、抗体をペプシンで処理することによって作製することができる。その結果得られたF(ab')2断片を、ジスルフィド架橋を還元するように処理して、Fab'断片を作製することができる。Fab断片は、IgG抗体をババインで処理することによって得ることができる；Fab'断片は、IgG抗体のペプシン消化によって得ることができる。F(ab')断片はまた、チオエーテル結合またはジスルフィド結合を介して下記のFab'を結合することによって作製することもできる。Fab'断片は、F(ab')2のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することによって得られる抗体断片である。Fab'断片は、F(ab')2断片をジチオスレイトールなどの還元剤で処理することによって得ることができる。抗体断片はまた、そのような断片をコードする核酸の組換え細胞における発現によって作製することもできる（例えば、Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)を参照）。例えば、そのような短縮型抗体断片分子を生じさせるために、F(ab')2断片の一部分をコードするキメラ遺伝子を、H鎖のCH1ドメインおよびヒンジ領域をコードするDNA配列に含め、その後に翻訳終止コドンを含めることができる。所望のエピトープと結合しうる適した断片は、インタクト抗体と同じ様式で、有用性に関して容易にスクリーニングすることができる。

【0032】

1つの態様において、そのような抗体断片は、一価抗体、好ましくは、ヒンジ領域の欠失を有する、PCT公報WO 2007 / 059782号（これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる）に記載されたような一価抗体である。そのような抗体は、以下の段階を含む方法によって構築しうる：i) 前記一価抗体の軽鎖をコードする核酸構築物を用意する段階であって、前記構築物が、選択された抗原特異的抗シヌクレイン抗体のVL領域をコードするヌクレオチド配列およびIgの定常CL領域をコードするヌクレオチド配列を含み、前記選択された抗原特異的抗体のVL領域をコードするヌクレオチド配列および前記IgのCL領域をコードするヌクレオチド配列が機能的に一つに連結され、かつIgG1サブタイプの場合には、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、または動物もしくはヒトに投与された時に、CL領域の同一のアミノ酸配列を含む他のペプチドとジスルフィド結合または共有結合を形成することができるいかなるアミノ酸もCL領域が含有しないように、CL領域をコードするヌクレオチド配列が改変されている段階；ii) 前記一価抗体の重鎖をコードする核酸構築物を用意する段階であって、前記構築物が、選択された抗原特異的抗体のVH領域をコードするヌクレオチド配列およびヒトIgの定常CH領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ヒンジ領域に対応する領域、およびIgサブタイプにより必要とされる場合にはCH領域の他の領域、例えばCH3領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、または動物もしくはヒトに投与された時に、ヒトIgのCH領域の同一のアミノ酸配列を含む他のペプチドとのジスルフィド結合、または共有結合もしくは安定した非共有結合による重鎖間結合の形成に関与するいかなるアミノ酸残基も含まないように、CH領域をコードするヌクレオチド配列が改変されており、前記選択された抗原特異的抗体のVH領域をコードするヌクレオチド配列および前記IgのCH領域をコードするヌクレオチド配列が機能的に一つに連結されている段階；iii) 前記一価抗体を産生させるための細胞発現系を用意する段階；iv) (iii)の細胞発現系の細胞において(i)および(ii)の核酸構築物を共発現させることによって、前記一価抗体を産生させる段階。

【0033】

同様に、1つの態様において、抗体は、以下を含む一価抗体である：

(i) 本明細書に記載の本発明の抗体の1つの可変領域または前記領域の1つの抗原結合部分、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域、および免疫グロブリンがIgG4サブタイプでない場合はCH領域の他の領域、例えばCH3領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で同一のCH領域とのジスルフィド結合または同一のCH領域との他の共有結合もしくは安定した非共有結合による重鎖間結合を形成することができるいかなるアミノ酸残基も含まないように改変さ

10

20

30

40

50

れている、免疫グロブリンのCH領域、またはCH2領域およびCH3領域を含むその断片。

【0034】

1つのさらなる態様において、一価抗体の重鎖は、ヒンジ全体が欠失されるように改変されている。

【0035】

もう1つのさらなる態様において、前記一価抗体の配列は、N結合型グリコシル化のアクセプター部位を含まないように改変されている。

【0036】

本明細書で用いる場合、抗体またはそのエピトープ結合性断片は、それが代替的なエピトープに比してそのエピトープと、より高頻度に、より急速に、より上回る持続期間で、および／またはより上回る親和性もしくは結合力で反応するかまたは会合する場合に、別の分子（すなわち、エピトープ）の領域と「免疫特異的に」結合するという。また、この定義を読むことにより、例えば、第1の標的と特異的に結合する抗体またはそのエピトープ結合性断片が、第2の標的と特異的または選好的に結合してもよく、または結合しなくてもよいことも理解されよう。

10

【0037】

本明細書で用いる場合、抗体またはその結合性断片の所定の抗原に対する結合の文脈における「結合」という用語は、典型的には、例えばBIAcore 3000機器における表面プラズモン共鳴（SPR）技術によって（好ましくはリガンドとして抗原、分析物として抗体を用いて）決定した時に、約 $10^{-7}$ Mもしくはそれ未満、例えば約 $10^{-8}$ Mもしくはそれ未満、例えば約 $10^{-9}$ Mもしくはそれ未満の $K_D$ に対応する親和性での結合のことを指し、所定の抗原または類縁の抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA、カゼイン）との結合の親和性の少なくとも1/10未満、例えば少なくとも1/100未満、例えば少なくとも1/1,000未満、例えば少なくとも1/10,000未満、例えば少なくとも1/100,000未満の $K_D$ に対応する親和性で所定の抗原に結合する。親和性が小さくなる量は抗体の $K_D$ に依存し、その結果、抗体の $K_D$ が非常に低い（すなわち、抗体が高特異性である）場合、抗原に対する親和性が非特異的抗原に対する親和性よりも小さくなる量は少なくとも1/10,000以下でありうる。「 $k_d$ 」（ $\text{sec}^{-1}$ または $1/\text{s}$ ）という用語は、本明細書で用いる場合、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数のことを指す。前記の値は、 $k_{off}$ 値とも称される。本明細書で用いる「 $k_a$ 」（ $\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$ または $1/\text{M}$ ）という用語は、本明細書で用いる場合、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度定数のことを指す。「 $K_D$ 」（ $\text{M}$ ）という用語は、本明細書で用いる場合、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数のことを指す。「 $K_A$ 」（ $\text{M}^{-1}$ または $1/\text{M}$ ）という用語は、本明細書で用いる場合、特定の抗体-抗原相互作用の会合平衡定数のことを指し、 $k_a$ を $k_d$ で除算することによって得られる。

20

【0038】

本明細書で用いる場合、抗体またはそのエピトープ結合性断片は、それが、同じアミノ酸配列を有する非リン酸化ペプチドエピトープと（それが仮に結合するとして）高い親和性でそのようなエピトープと免疫特異的に結合する場合に、リン酸化ペプチドエピトープと「選択的に」結合するという。最も好ましくは、そのようなより高い親和性は、少なくとも10倍の高さであり、少なくとも30倍の高さであり、少なくとも100倍の高さであり、少なくとも300倍の高さであり、少なくとも1,000倍の高さであり、少なくとも3,000倍の高さであり、または少なくとも10,000倍の高さであると考えられる。scFv235は、非リン酸化ペプチドに比して、リン酸化P-Ser396 / 404ペプチドと「選択的に」結合する（約4,000倍の「選択性」を呈する）。リン酸化タウに関する、抗体またはそのエピトープ結合性断片の「選択性」の程度は、ELISAまたはBiacoreを介して、そのような抗体のscFvが、非リン酸化標的タウペプチドおよびそのリン酸化変異体と免疫特異的に結合する親和性を比較することによって決定される。

30

【0039】

「エピトープ」という用語は、抗体との特異的結合を可能にする抗原決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の表面原子団からなり、通常、特

40

50

定の三次元構造特性ならびに特定の電荷特性を有する。立体構造エピトープおよび非立体構造エピトープは、後者ではなく前者との結合が、変性溶媒の存在下で失われるという点で区別される。エピトープは、結合に直接的に関与するアミノ酸残基（エピトープの免疫優性構成要素とも呼ばれる）、および、特定の抗原結合ペプチドによって効果的に遮断されるアミノ酸残基（言い換えると、そのアミノ酸残基は特定の抗原結合ペプチドのフットプリント内にある）などの、結合に直接的に関与しない他のアミノ酸残基を含みうる。

#### 【0040】

本明細書で用いる場合、「抗体のエピトープ結合性断片」という用語は、エピトープと免疫特異的に結合しうる抗体の断片を意味する。エピトープ結合性断片は、そのような抗体のCDRドメインの1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つすべてを含むことができ、そのようなエピトープと免疫特異的に結合しうるが、そのような抗体のものとは異なるようなエピトープに対する免疫特異性、親和性または選択性を呈することもある。しかし、好ましくは、エピトープ結合性断片は、そのような抗体のCDRドメインの6つすべてを含むと考えられる。抗体のエピトープ結合性断片は、単一のポリペプチド鎖であってもよく（例えば、scFv）、またはそれがアミノ末端およびカルボキシ末端を有する2つもしくはそれを上回るポリペプチド鎖を含んでもよい（例えば、ダイアボディ、Fab断片、Fab<sub>2</sub>断片など）。

#### 【0041】

本発明の抗体、およびそれらのタウエピトープ結合性断片は、好ましくは「ヒト化されている」と考えられ、特に治療目的に使用される場合はそうである。「ヒト化された」という用語は、一般に組換え手法を用いて調製され、非ヒト種由来の免疫グロブリンに由来する抗原結合部位を有し、残りの免疫グロブリン構造がヒト免疫グロブリンの構造および/または配列を基にしているキメラ分子のことを指す。抗原結合部位は、ヒト定常ドメインと融合された完全な非ヒト可変ドメイン、またはヒト可変ドメイン内の適切なヒトフレームワーク領域にグラフティングされたそのような可変ドメインの相補性決定領域（CDR）のみのいずれかを含みうる。そのようなヒト化分子のフレームワーク残基は野生型（例えば、完全ヒト性）であってもよく、またはそれらが、その配列がヒト化のための基盤として役立てられてきた、ヒト抗体には見いだされない1つもしくは複数のアミノ酸置換を含んでもよい。ヒト化は、分子の定常領域がヒト個体において免疫原として作用する見込みを少なくするかまたはなくすが、外来性可変領域に対する免疫応答の可能性は残る（Lo Buglio, A.F. et al. (1989) *Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224）。もう1つのアプローチは、ヒト由来の定常領域を提供するだけでなく、それらをできるだけヒト形態に近くなるように作り直すように可変領域を改変することにも焦点を当てる。重鎖および軽鎖の両方の可変領域は、当該エピトープに対する応答が異なり、結合能を決定する、3つの相補性決定領域（CDR）を含むことが知られており、これらは所与の種において比較的保存され、CDRのスカフォールドを提供すると推定される4つのフレームワーク領域（FR）によって挟まれている。非ヒト抗体を特定のエピトープに関して調製する場合、可変領域は、改変しようとするヒト抗体に存在するFR上の非ヒト抗体に由来するCDRをグラフティングすることによって、「作り直す」または「ヒト化」することができる。さまざまな抗体に対するこれらのアプローチの適用は、Sato, K. et al. (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," *Nature* 332:323-327 ; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," *Science* 239:1534-1536 ; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," *Protein Engineering* 4:773-783 ; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134 ; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185 ; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody

10

20

30

40

50

To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9:266-271 ; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873 ; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289 ; およびCo, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154に記載されている。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、すべてのCDR配列（例えば、マウス抗体由来の6つすべてのCDRを含むヒト化マウス抗体）を保持している。他の態様において、ヒト化抗体は、元の抗体に関して変更された1つまたはそれを上回るCDR（1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ）を有し、これらは元の抗体由来の1つまたはそれを上回るCDR「に由来する」1つまたはそれを上回るCDRとも名付けられる。抗体をヒト化しうることは周知である（例えば、米国特許第5,225,539号；第5,530,101号；第5,585,089号；第5,859,205号；第6,407,213号；第6,881,557号）。

#### 【 0 0 4 2 】

1つの態様において、抗体はヒト抗体である。適したヒトモノクローナル抗体は、マウスの系ではなくヒト免疫系の一部を保有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウスを用いて作製することができる。そのようなトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウスには、それぞれ、本明細書においてHuMAbマウスおよびKMマウスと称されるマウスが含まれ、これらは本明細書において「トランスジェニックマウス」と総称される。

#### 【 0 0 4 3 】

HuMAbマウスは、再編成されていないヒト重鎖可変鎖および定常鎖（ $\mu$  および $\gamma$ ）ならびに軽鎖可変鎖および定常（K）鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ座位を、内因性 $\mu$ 鎖およびK鎖座位を不活性化する標的化突然変異とともに含む（Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)）。このため、そのようなマウスはマウスIgMまたはIgKの発現の低下を示し、免疫処置に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチおよび体細胞突然変異を受けて高親和性ヒトIgG、モノクローナル抗体を生じる（Lonberg, N. et al. (1994)、前出；；Lonberg, N., Hand book of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995) and Harding, F. and Lonberg, N., An n. N. Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)に概説）。HuMAbマウスの調製は、Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuailion et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に詳述されている。US 5,545,806号、US 5,569,825号、US 5,625,126号、US 5,633,425号、US 5,789,650号、US 5,877,397号、US 5,661,016号、US 5,814,318号、US 5,874,299号、US 5,770,429号、US 5,545,807号、WO 98 / 24884号、WO 94 / 25585号、WO 93 / 1227号、WO 92 / 22645号、WO 92 / 03918号およびWO01 / 09187号も参照されたい。

#### 【 0 0 4 4 】

HCo7マウスは、内因性軽鎖（）遺伝子におけるJKD破壊（Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)に記載されたような）、内因性重鎖遺伝子におけるCMD破壊（WO 01 / 14424号の実施例1に記載されたような）、KCo5ヒト 軽鎖導入遺伝子（Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載されたような）、およびHCo7ヒト重鎖導入遺伝子（US 5,770,429号に記載されたような）を有する。

#### 【 0 0 4 5 】

HCo12マウスは、内因性軽鎖（）遺伝子におけるJKD破壊（Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)に記載されたような）、内因性重鎖遺伝子におけるCMD破壊（WO 01 / 14424号の実施例1に記載されたような）、KCo5ヒト 軽鎖導入遺伝子（Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載されたような）、およびHCo12ヒト重鎖

10

20

30

40

50

導入遺伝子 (WO 01 / 14424号の実施例2に記載されたような) を有する。

【0046】

KMマウス系統では、内因性マウス 軽鎖遺伝子は、Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)に記載されたようにホモ接合性に破壊されており、内因性マウス重鎖遺伝子は、WO 01 / 09187号の実施例1に記載されたようにホモ接合性に破壊されている。このマウス系統は、Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載されたように、ヒト 軽鎖導入遺伝子KCo5を有する。このマウス系統はまた、WO 02 / 43478号に記載されたように、染色体14断片hCF (SC20) で構成されるヒト重鎖トランスクロモソームも有する。

【0047】

これらのトランスジェニックマウスからの脾細胞を、周知の手法に従って、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製するために用いることができる。本発明のヒトモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、または他の種に起源を持つ本発明の抗体を、関心対象の免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列に関してトランスジェニック性である別の非ヒト哺乳動物または植物の作製、およびそれらから回収可能な形態にある抗体の產生を通じて、トランスジェニック性に作製することもできる。哺乳動物におけるトランスジェニック性產生に関連して、抗体をヤギ、ウシまたは他の哺乳動物の乳中に產生させて、それから回収することもできる。例えば、US 5,827,690号、US 5,756,687号、US 5,750,172号およびUS 5,741,957号を参照されたい。

【0048】

いくつかの抗体では、ヒト化抗体における結合を保つために、CDRの一部のみ、すなわち結合に必要なSDRと呼ばれるCDR残基のサブセットのみが必要とされる。抗原に接触せず、SDR内に位置しないCDR残基は、Chothia超可変ループ (Kabat et al. (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242 ; Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917を参照) の外側に存在するカバットCDRの領域から分子モデリングによってかつ／もしくは経験的に、またはGonzales, N.R. et al. (2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity," Mol. Immunol. 41:863-872に記載された通りに、以前の研究に基づいて特定することができる (例えば、CDR H2内の残基H60～H65は必要でないことが多い)。そのようなヒト化抗体において、1つもしくは複数のドナーCDR残基が存在しないか、またはドナーCDR全体が欠失している位置では、その位置を占めるアミノ酸は、アクセプター抗体配列における (カバット番号付けによる) 対応する位置を占めるアミノ酸であります。含めるCDRにおけるドナーアミノ酸のアクセプターによるそのような置換の数は、競合する考慮事項のバランスを反映している。そのような置換は、ヒト化抗体におけるマウスアミノ酸の数を減少させるのに有益な可能性があり、その結果として免疫原性を低下させる可能性がある。しかし、置換が親和性の変化を引き起こす可能性もあり、親和性の著しい減少は回避されることが好ましい。CDRにおける置換の位置および置換するアミノ酸を経験的に選択することもできる。

【0049】

CDR残基の單一アミノ酸の変更が機能的結合の喪失をもたらしうるという事実 (Rudikoff, S. etc. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6):1979-1983) は、代替的な機能的CDR配列を系統的に同定する手段を提供する。そのような変異体CDRを得る1つの好ましい方法では、CDRをコードするポリヌクレオチドを (例えばランダム突然変異誘発を介して、または部位指定的方法 (例えば、突然変異した遺伝子座をコードするプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖媒介增幅) によって) 突然変異を誘発し、置換されたアミノ酸残基を有するCDRを生じさせる。元の (機能的) CDR配列の該当する残基の実体を、置換された (非機能的) 变異体CDR配列の実体と比較することにより、その置換に関してBLOSUM62.ij置換スコアを同定することができる。BLOSUMシステムは、信頼できるアラインメントについて配列

10

20

30

40

50

のデータベースを分析することによって作成されたアミノ酸置換の行列を提供している (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?," Nature Biotech. 22(8):1035-1036 ; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:10915-10919 ; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:2264-2268 ; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective," J. Mol. Biol. 219, 555-565. 現在、最も先端的なBLOSUMデータベースはBLOSUM62データベース (BLOSUM62.ijj) である。表1はBLOSUM62.ijj置換スコアを提示している (スコアが高いほど、置換は保存的であり、したがって置換が機能に影響しない可能性が高い)。例えば、結果的に得られたCDRを含む抗原結合断片がROR1と結合することができない場合には、BLOSUM62.ijj置換スコアは、保存性が不十分とされ、より高い置換スコアを有する新しい候補置換が選択され、作製される。したがって、例えば、元の残基がグルタミン (E) であり、非機能的置換残基がヒスチジン (H) であった場合、BLOSUM62.ijj置換スコアは0になり、より保存的な変化 (アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、またはリシンなど) が好ましい。

## 【0050】

(表1)

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

## 【0051】

したがって、本発明は、改良されたCDRを同定するためにランダム突然変異誘発を用いることを想定している。

## 【0052】

本発明の文脈において、保存的置換は、以下の3つの表のうち1つまたは複数に表されたアミノ酸のクラス内部での置換によって定義しうる。

## 【0053】

(表2) 保存的置換に関するアミノ酸残基のクラス

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

10

20

30

40

50

## 【0054】

(表3) 代替的な保存的アミノ酸残基置換のクラス

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

## 【0055】

10

(表4) アミノ酸残基の代替的な物理的および機能的な分類

アルコール基含有残基	S および T
脂肪族残基	I, L, V および M
シクロアルケニル関連残基	F, H, W および Y
疎水性残基	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W および Y
負荷電残基	D および E
極性残基	C, D, E, H, K, N, Q, R, S および T
正荷電残基	H, K および R
小型残基	A, C, D, G, N, P, S, T および V
極めて小型の残基	A, G および S
ターン形成に関与する残基	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P および T
柔軟な残基	Q, T, K, S, G, P, D, E および R

## 【0056】

より保存的な置換のグループ分けには、以下が含まれる：バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリンおよびアスパラギン-グルタミン。

## 【0057】

アミノ酸のそのほかの群を、例えば、Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Companyに記載された原理を用いて策定することもできる。

30

## 【0058】

ファージディスプレイ技術を代替的に用いて、CDRの親和性を高める（または低下させる）ことができる。この技術は親和性成熟と称され、突然変異誘発または「CDRウォーキング」を使用し、再選択では標的抗原またはその抗原断片を用いて、初期抗体または親抗体と比較した場合により高い（または低い）親和性で結合するCDRを有する抗体を同定する（例えば、Glaser et al. (1992) *J. Immunology* 149:3903を参照）。単一ヌクレオチドではなくコドン全体で突然変異を誘発すると、半ランダム化されたアミノ酸突然変異のレパートリーがもたらされる。それぞれが单一CDRの単一アミノ酸の変化だけ異なり、各CDR残基で可能な各アミノ酸置換を表す変異体を含有する変異体クローンのプールで構成されたライブラリを構築することができる。固定化した突然変異体を標識を付けた抗原と接触させることにより、抗原に対する結合親和性が高まった（または低下した）突然変異体をスクリーニングすることができる。当技術分野において公知の任意のスクリーニング法を用いて、抗原に対する親和性が高まるかまたは低下した突然変異抗体を同定することができる（例えば、ELISA）(Wu et al. 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 95:6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155:1994を参照）。軽鎖をランダム化するCDRウォーキングを使用することも可能である (Schier et al., 1996, *J. Mol. Bio.* 263:551を参照）。

40

## 【0059】

そのような親和性の成熟を達成する方法は、例えば、以下に記載されている：Krause, J.C. et al. (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Ar

50

chitecture Enhances Function Of A Human Antibody," *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi:10.1128/mBio.00345-10 ; Kuan, C.T. et al. (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas," *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645 ; Hackel, B.J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes," *J. Mol. Biol.* 401(1): 84-96 ; Montgomery, D.L. et al. (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41," *MAbs* 1(5):462-474 ; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth," *Virology* 393(1):112-119 ; Finlay, W.J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions," *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558 ; Bostrom, J. et al. (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development," *Methods Mol. Biol.* 525:353-376 ; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification," *Mol. Immunol.* 46(1):135-144 ; 10 および Barderas, R. et al. (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 105(26):9029-9034. 20

#### 【 0 0 6 0 】

「トランスジェニック非ヒト動物」という用語は、1つまたは複数のヒト重鎖および/または軽鎖の導入遺伝子またはトランスクロモソームを（動物の天然ゲノムDNAに組み込まれるか、または組み込まれずに）含むゲノムを有し、完全なヒト抗体を発現することができる非ヒト動物のことを指す。例えば、トランスジェニックマウスは、タウ抗原および/またはタウを発現する細胞による免疫処置を行った時にヒト抗タウ抗体を産生するように、ヒト重鎖導入遺伝子と、ヒト重鎖導入遺伝子またはヒト重鎖トランスクロモソームのいずれかとを有することができる。ヒト重鎖導入遺伝子は、トランスジェニックマウス、例えばHuMAbマウス、例えばHCo7もしくはHCo12マウスのようにマウスの染色体DNAに組み込まれてもよく、または、ヒト重鎖導入遺伝子は、WO 02 / 43478号に記載されたトランスクロモソームKMマウスのように染色体外に維持されてもよい。そのようなトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソームマウス（本明細書では「トランスジェニックマウス」と総称される）は、V-D-J組換えおよびアイソタイプスイッチを受けることによって、ある特定の抗原に対して、複数のアイソタイプのヒトモノクローナル抗体（例えば、IgG、IgA、IgM、IgD、および/またはIgE）を産生することができる。 30

#### 【 0 0 6 1 】

タウイメージングプローブとしての本発明の抗体またはそれらのエピトープ結合性断片の使用は、それらの特異性が理由で大きな可能性がある。血液脳関門の全般的な不透過性からみて、比較的小型の単鎖抗体可変断片（scFv分子）が、タウ病変を検出するためのインビオでのイメージングリガンドとして好ましいことが見いだされている。scFv分子は、約10～約25アミノ酸残基の短いリンカーペプチドを介して互いに接続された、抗体の重鎖（H）および軽鎖（L）ドメインの可変領域の融合タンパク質として形成される。リンカーペプチドは通常、柔軟性のためにグリシンを多く含み（例えば、 40

#### GGGGSGGGGSGGGS (SEQ ID NO:2)

(Fisher, A. et al. (2009) "Efficient Isolation Of Soluble Intracellular Single-Chain Antibodies Using The Twin-Arginine Translocation Machinery," *J. Mol. Biol.* 385(1):299-311 ; Bird, R.E. et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," *Science* 242:423-426 ; Huston, J.S. et al. (1988) "Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In *Escherichia coli*," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:50

879-5883)、溶解性のためにセリンまたはトレオニンを多く含み、重鎖可変ドメインのN末端を軽鎖可変ドメインVLのC末端と接続させるか、またはその反対に接続させることができる (Huang, L. et al. (2013) "Single-Chain Fragment Variable Passive Immunotherapies For Neurodegenerative Diseases," *Int. J. Mol. Sci.* 14(9):19109-19127 ; Ahmad, Z.A. et al. (2012) "scFv Antibody: Principles And Clinical Application," *Clin. Dev. Immunol.* 2012:980250 ; Huhalov, A. et al. (2004) "Engineered Single Chain Antibody Fragments For Radioimmunotherapy," *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 48(4):279-288)。そのようなリンカーの一例は、

**GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:3)**

である (Whitlow, M. et al. (1993) "An Improved Linker For Single-Chain Fv With Reduced Aggregation And Enhanced Proteolytic Stability," *Protein Eng.* 6:989-995)。本発明に関して特に好ましいリンカーは、アミノ酸配列

**(SEQ ID NO:4): SSGGGGSGGGGGSSRSS**

を有する。

**【0062】**

精製および/または回収を容易にするために、scFvにポリヒスチジン（「His-Tag」）（例えば、(SEQ ID NO:5) HHHHHHH）を含めることができる。His-Tagのヒスチジン残基のイミダゾール側鎖は、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>および特にNi<sup>2+</sup>といった、ある特定の遷移金属イオンと可逆的な配位結合で係合することができる。したがって、Hisタグで標識したscFv分子をそのような金属イオンを含有するマトリックスに適用すると、それらはマトリックスと特異的に結合するが、ほとんどの非タグ標識タンパク質は結合しない。scFvが追加的または代替的に、

**(SEQ ID NO:6) GAYPYDVPDYAS**

などの「HA-Tag」を含んでもよい。ヒトインフルエンザ血球凝集素（HA）は、ヒトウイルスの感染性のために必要とされる表面糖タンパク質である。HA-tagは、ヒトインフルエンザ血球凝集素（HA）表面糖タンパク質に由来し、抗HA-Tag抗体（Millipore）を用いてのscFvの検出を可能にする。

**【0063】**

scFv分子を、直接的に、またはscFvを生じさせる目的で切断されるN末端リーダーペプチドと連結された融合タンパク質として発現させることもできる（例えば、Huston, J.S. et al. (1988) "Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In *Escherichia coli*," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:5879-5883を参照）。例えば、scFvを変更trp LEリーダーペプチド（MLE）と融合させて、Asp-Proペプチド結合の酸切断によって切断させることができる（Piszkielwicz, D. et al. (1970) "Anomalous Cleavage Of Aspartyl-Proline Peptide Bonds During Amino Acid Sequence Determinations," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40(5):1173-1178 ; Fraser, K.J. et al. (1972) "Specific Cleavage Between Variable And Constant Domains Of Rabbit Antibody Light Chains By Dilute Acid Hydrolysis," *Biochemistry* 11(26):4974-4977 ; Poulsen, K. et al. (1972) "An Active Derivative Of Rabbit Antibody Light Chain Composed Of The Constant And The Variable Domains Held Together Only By A Native Disulfide Bond," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 69(9):2495-2499）。

**【0064】**

1つのさらなる態様において、二価分子を形成させる目的で、scFvをもう1つのscFv（これらは同じであっても異なってもよい）と連結させることもできる。これは、2つのVH領域および2つのVL領域を有する単一のペプチド鎖を作製して、縦列scFv分子を生じさせることによって行うことができる (Xiong, C.-Y. et al. (2006) "Development Of Tumor Targeting Anti-MUC-1 Multimer: Effects Of di-scFv Unpaired Cysteine Location On Pegylation And Tumor Binding," *Protein Engineering Design and Selection* 19(8):359-367 ; Kufer, P. et al. (2004) "A Revival Of Bispecific Antibodies," *Trends in Bi*

10

20

30

40

50

otechnology 22(5) :238-24)。または、ドメイン同士が互いに複合体化してエピトープ結合部位を形成するには短すぎるリンカーによって重鎖可変ドメインがその軽鎖可変ドメインと隔てられているscFvを形成させることによって、2つのscFv分子をダイアボディとして二量体化することを強制することもできる (Hollinger, P. et al. (1993) "Diabodies," : Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90(14):6444-6448)。ダイアボディは対応するscFv分子よりも最大で40分の1の小さな解離定数を有することが示されており、これはそれらがそれらの標的に対するよりもはるかにより高い親和性を有することを意味する。その結果として、ダイアボディ薬は他の治療用抗体よりもはるかに低い用量で投与することができ、インビポで腫瘍の高度に特異的なターゲティングが可能である (Adams, G.P. et al. (1998) "Prolonged in vivo Tumour Retention Of A Human Diabody Targeting The Extracellular Domain Of Human HER2/neu," Brit. J. Cancer 77(9):1405-1412)。さらに短いリンカー (1または2アミノ酸) は、三量体、いわゆるトリアボディまたはトリボディの形成をもたらす。テトラボディも作製されている。それらは、それらの標的に対してダイアボディよりもさらに高い親和性を示す (Le Gall, F. et al. (1999) "Di-, Tri- And Tetrameric Single Chain Fv Antibody Fragments Against Human CD19: Effect Of Valency On Cell Binding," FEBS Letters 453(1):164-168)。これらの形式のすべてを、2種またはそれを上回る異なるエピトープに対する特異性を有する二量体、三量体など (すなわち、二重特異性ダイアボディなど) を形成させるために、さまざまなscFv分子から構成することができる (Dincq, S. et al. (2001) "Expression And Purification Of Monospecific And Bispecific Recombinant Antibody Fragments Derived From Antibodies That Block The CD80/CD86-CD28 Costimulatory Pathway," Protein Express. Purificat. 22(1):11-24)。

#### 【0065】

以下に考察するように、コンビナトリアルファージディスプレイ技術を用いてタウ抗体ハイブリドーマから作製したscFv分子のライプラリから、適したscFv分子を単離した (例えば、米国特許第5,565,332号 ; 第5,580,717号 ; 第5,733,743号 ; 第6,265,150号 ; および Winter, G. et al. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology," Annu. Rev. Immunol. 12:433-455を参照)。数多くのホスホ-タウ選択的scFv分子が同定され、タウに対するそれらの反応性が、免疫沈降、ヒトおよびマウスのタウ異常症組織の染色、ならびに親和性アッセイによって確かめられた。これらのscFv分子の末梢注射は、トランスジェニックタウ異常症マウスでは強いインビポ脳シグナルをもたらしたが、野生型マウスおよびアミロイド- 斑マウスではそうではなかった。イメージングシグナルは、ニューロン内タウ凝集物を伴うプローブの共局在と極めてよく相關することが示された。両方ともエンドソーム、オートファゴソームおよびリソソームのマーカーと関連性があり、このことはこれらの分解経路におけるそれらの相互作用を示唆する。そのような特異的な抗体由来イメージングプローブは、ADおよび関連するタウ異常症に関する診断マーカーとして大きな可能性がある。

#### 【0066】

そのような取り組みにより、好ましい抗ホスホ-タウ396,404抗体6B2G12の単離が導かれ、これはタウタンパク質 (SEQ ID NO:1) のアミノ酸残基386～408に対応するアミノ酸配列

(SEQ ID NO:7): TDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHL

を有するペプチドに対して誘発された。SEQ ID NO:7の位置11および19にある下線を付したセリン残基 (タウ (SEQ ID NO:1) の位置396および404に対応する) は、リン酸化されている。使用した免疫原は、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と結合させたN末端システイン残基を含むように改変されたこのペプチドを含有した。

#### 【0067】

抗体6B2G12の軽鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:8) を有する (CDRには下線を付している) :

10

20

30

40

50

ELDVQMTQTP LTLSVTIGQP ASIS**KSSQS** **LLYSNGKTYL** **NWLLQRPGQS**  
 PKRLIY**LVSK** **LDS**GVPDRFT GSGSGTDFTL KISRVEAEDL GVYYC**VQGTH**  
**SPLT**FGAGTK LELK

【 0 0 6 8 】

抗体6B2G12の重鎖可変ドメインはアミノ酸配列 (SEQ ID NO:9) を有する (CDRには下線を付している) :

LEVQLQQSGP ELVKPGASVK ISCKTS**EYTF** **TEYTKH**WVKQ SHGKSLEWIG  
**SINPNNGDTY** **YNQKFTD**KAT LTVDKSSTTA SMELRSLTTE DSAVYYCAM**G**  
**DSAWFAY**WGQ GTLVTVS

【 0 0 6 9 】

10

この抗体を用いて、scFv分子 : scFv235を形成させた。

【 0 0 7 0 】

scFv235の軽鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:10) を有する (CDRには下線を付し、親抗体との違いは斜体で示している) :

ELDVVMTQTP LTLSVTIGQP ASIS**KSSQS** **LLYSNGKTYL** **NWLLQRPGQS**  
 PKRLIY**LVSK** **LDS**GVPDRFT GSGSGTDFTL KISRVEAEDL GVYYC**VQGTH**  
**SPLT**FGAGTK LELK

【 0 0 7 1 】

scFv235の重鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 (SEQ ID NO:11) を有する (CDRには下線を付している) :

20

LEVQLQQSGP ELVKPGASVK ISCKTS**EYTF** **TEYTKH**WVKQ SHGKSLEWIG  
**SINPNNGDTY** **YNQKFTD**KAT LTVDKSSTTA SMELRSLTTE DSAVYYCAM**G**  
**DSAWFAY**WGQ GTLVTVS

【 0 0 7 2 】

このように、scFv235および抗体6B2G12の軽鎖可変ドメインCDR1は両方ともアミノ酸配列

(SEQ ID NO:12): KSSQSLLYSNGKTYLN  
 を有する。

【 0 0 7 3 】

scFv235および抗体6B2G12の軽鎖可変ドメインCDR2は両方ともアミノ酸配列 (SEQ ID NO:13) : LVSKLDSを有する。

【 0 0 7 4 】

scFv235および抗体6B2G12の軽鎖可変ドメインCDR3は両方ともアミノ酸配列

(SEQ ID NO:14): VQGTHSPLT  
 を有する。

【 0 0 7 5 】

scFv235および抗体6B2G12の重鎖可変ドメインCDR1は両方ともアミノ酸配列

(SEQ ID NO:15): EYTFTEYTKH  
 を有する。

【 0 0 7 6 】

40

scFv235および抗体6B2G12の重鎖可変ドメインCDR2は両方ともアミノ酸配列

(SEQ ID NO:16): SINPNNGDTYYNQKFTD

を有する。

【 0 0 7 7 】

scFv235および抗体6B2G12の重鎖可変ドメインCDR3は両方ともアミノ酸配列

(SEQ ID NO:17): GDSAWFAY

を有する。

【 0 0 7 8 】

scFv235の全配列は (SEQ ID NO:18) である :

ELDVVMTQTP LTLSVTIGQP ASISCKSSQS LLYSNGKTYL NWLLQRPGQS  
 PKRLIYLVSK LDSGVPDRFT GSGSGTDFTL KISRVEAEDL GVYYCVQGTH  
 SPLTFGAGTK LEIKSSGGGG SGGGGGGSSR SSLEVQLQQS GPELVKPGAS  
 VKISCKTSEY TFTEYTKHWV KQSHGKSLEW IGSINPNNGD TYYNQKFTDK  
 ATLTVDKSST TASMELRSLT FEDSAVYYCA MGDSAWFAYW GQGTLVTVSA  
 ここで、アミノ酸残基1～114は、scFv235の軽鎖可変ドメイン (SEQ ID NO: 10) のアミノ酸残基であり、アミノ酸残基115～132はリンカー (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸残基であり、アミノ酸残基133～249は、scFv235の重鎖可変ドメイン (SEQ ID NO: 11) のアミノ酸残基である。

【 0 0 7 9 】

10

1つの好ましい態様において、scFv235は、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:19): IQEEFKMKKTAIAIAVALAGFATVAQAA

を有するN末端リーダーペプチド部分、および/またはC末端配列ペプチド部分を含む融合タンパク質として調製される。C末端配列ペプチド部分は以下を含みうる：抗体定常ドメイン、例えば

(SEQ ID NO:20): AKTTPPSVTSGQAGQ

など (Hussein, A.H. et al. (2007) "Construction and Characterization of Single-C chain Variable Fragment Antibodies Directed against the *Bordetella pertussis* Surface Adhesins Filamentous Hemagglutinin and Pertactin," *Infect. Immun.* 75(11):5476-5482)、His-Tag、例えば (SEQ ID NO: 5) : HHHHHH) など、および/またはHA-Tag、例えば

20

(SEQ ID NO:6): GAYPYDVPDYAS

など、または任意の順序でのそれらの任意の組み合わせもしくは部分的組み合わせ。好ましいC末端ペプチド部分は、アミノ酸配列

(SEQ ID NO:21): AKTTPPSVTSGQAGQHHHHHGAYPYDVPDYAS

を有し、それ故に (N末端からC末端の方向に) SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 5、およびSEQ ID NO: 6を含む。

【 0 0 8 0 】

したがって、1つの好ましい態様において、scFv235融合タンパク質は、SEQ ID No: 22～26のいずれかのアミノ酸配列を含むと考えられる (ScFv融合体のN末端および/またはC末端ペプチド部分には下線を付している) :

30

SEQ ID NO: 22 (SEQ ID NO: 19および18の融合体) :

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAAEL DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS  
 ISCKSSQSL YSNGKTYLNW LLQRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS  
 GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCVQGTHSP LTFGAGTKLE LKSSGGGGSG  
 GGGGGSSRSS LEVQLQQSGP ELVKPGASVK ISCKTSEYTF TEYTKHWVKQ  
 SHGKSLEWIG SINPNNGDTY YNQKFTDKAT LTVDKSSTTA SMELRSLTFE  
 DSAVYYCAMG DSAWFAYWGQ GTLVTVSA

【 0 0 8 1 】

SEQ ID NO: 23 (SEQ ID NO: 18および20の融合体) :

40

ELDVVMTQTP LTLSVTIGQP ASISCKSSQS LLYSNGKTYL NWLLQRPGQS  
 PKRLIYLVSK LDSGVPDRFT GSGSGTDFTL KISRVEAEDL GVYYCVQGTH  
 SPLTFGAGTK LEIKSSGGGG SGGGGGGSSR SSLEVQLQQS GPELVKPGAS  
 VKISCKTSEY TFTEYTKHWV KQSHGKSLEW IGSINPNNGD TYYNQKFTDK  
 ATLTVDKSST TASMELRSLT FEDSAVYYCA MGDSAWFAYW GQGTLVTVSA  
AKTTPPSVTS GQAGQ

【 0 0 8 2 】

SEQ ID NO: 24 (SEQ ID NO: 18および21の融合体) :

ELDVVMTQTP LTLSVTIGQP ASISCKSSQS LLYSNGKTYL NWLLQRPGQS  
 PKRLIYLVSK LDSGVPDRFT GSGSGTDFTL KISRVEAEDL GVYYCVQGTH  
 SPLTFGAGTK LELKSSGGGG SGGGGGGSSR SSLEVQLQQS GPELVKPGAS  
 VKISCKTSEY TTFTEYTKHWV KQSHGKSLEW IGSINPNNGD TYYNQKFTDK  
 ATLTVDKSST TASMELRSLT FEDSAVYYCA MGDSAWFAYW GQGTLVTVS**A**  
**KTPPSVTSG QAGQHHHHHH GAYPYDVPDY AS**

## 【 0 0 8 3 】

SEQ ID NO : 25 ( SEQ ID NO : 19、18および20の融合体 ) :

**IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAAEL DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS**  
 ISCKSSQSLL YSNGKTYLNW LLQRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS 10  
 GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCVQGTHSP LTFGAGTKLE LKSSGGGGSG  
 GGGGGSSRSS LEVQLQQSGP ELVPGASVK ISCKTSEYTF TEYTKHWVKQ  
 SHGKSLEWIG SINPNNGDTY YNQKFTDKAT LTVDKSSTTA SMELRSLTFE  
 DSAVYYCAMG DSAWFAYWGQ GTLVTVSA**AK** **TTPPSVTSGQ AGQ**

## 【 0 0 8 4 】

SEQ ID NO : 26 ( SEQ ID NO : 19、18および21の融合体 ) :

**IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAAEL DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS**  
 ISCKSSQSLL YSNGKTYLNW LLQRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS  
 GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCVQGTHSP LTFGAGTKLE LKSSGGGGSG 20  
 GGGGGSSRSS LEVQLQQSGP ELVPGASVK ISCKTSEYTF TEYTKHWVKQ  
 SHGKSLEWIG SINPNNGDTY YNQKFTDKAT LTVDKSSTTA SMELRSLTFE  
 DSAVYYCAMG DSAWFAYWGQ GTLVTVSA**AK** **TTPPSVTSGQ AGQHHHHHHG**  
**AYPYDVPDYA S**

## 【 0 0 8 5 】

scFvは血液脳関門を越えて移行しうるが、そのような移行を促進させるためにさまざまな補助的なアプローチを用いることもできる (Huang, L. et al. (2013) "Single-Chain Fragment Variable Passive Immunotherapies For Neurodegenerative Diseases," Int. J. Mol. Sci. 14(9): 19109-19127)。

## 【 0 0 8 6 】

タンパク質およびペプチドの限定的なセットが、受容体媒介性トランスサイトシスを介して血液脳関門を越えて輸送されるが (Herve, F. et al. (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis," AAPS J. 10(3):455-472)、最も研究されている3つのリガンドはインスリン、鉄トランスフェリンおよびLDL-コレステロールである (Bickel, U. et al. (2001) "Delivery Of Peptides And Proteins Through The Blood-Brain Barrier," Adv. Drug Deliv. Rev. 46:247-279 ; Tuma, P.L. et al. (2003) "Transcytosis: Crossing Cellular Barriers," Physiol. Rev. 83:871-932)。したがって、血液脳関門を越えてのscFvの輸送は、scFvを、そのようなリガンドの受容体（例えば、ヒトインスリン受容体 (HIR)、トランスフェリン受容体 (TfR)、低比重リポタンパク質受容体関連タンパク質1 (LRP1) および2 (LRP2)、非毒性ジフテリア毒素受容体 / ヘパリン結合上皮増殖因子様増殖因子など）に対して免疫特異的である抗体またはそのエピトープ結合性断片と融合させることによって促進させることができる。結果的に得られた融合タンパク質は、受容体との結合を通じて血液脳関門を越えて輸送される (Boado, R.J. et al. (2010) "IgG-Single Chain Fv Fusion Protein Therapeutic For Alzheimer's Disease: Expression In CHO cells And Pharmacokinetics And Brain Delivery In The Rhesus Monkey," Biotechnol. Bioeng. 105:627-635 ; Jones, A.R. et al. (2007) "Blood-Brain Barrier Transport Of Therapeutics Via Receptor-Mediation," Pharm. Res. 24(9):1759-1771 ; Wang, Y.Y. et al. (2009) "Receptor-Mediated Therapeutic Transport Across The Blood-Brain Barrier," Immunotherapy 1(6):983-993 ; Lajoie, J.M. et al. (2015) "Targeting Receptor-Mediated Transport For Delivery Of Biologics Across The Blood-Brain Barrier," Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 55:613-631 ; Pardridge, W.M. (2002) "Dru 30

10

20

40

50

g Transport Across The Blood-Brain Barrier," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32(11): 1959-1972 ; Bhaskar, S. et al. (2010) "Multifunctional Nanocarriers For Diagnostics, Drug Delivery And Targeted Treatment Across Blood-Brain Barrier: Perspectives On Tracking And Neuroimaging," *Part. Fibre. Toxicol.* 7:3 pp. 1-25)。

【0087】

scFvを、吸着媒介トランスサイトシスを助長するポリカチオンペプチドを含むように強化することもできる。適したポリカチオンペプチドには、ヘキサメチレンジアミン、ブトレシン、スペルミジンおよびスペルミンが含まれる (Herve, F. et al. (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis," *AAPS J.* 10(3):455-472 ; Kandimalla, K.K. et al. (2006) "Physiological And Biophysical Factors That Influence Alzheimer's Disease Amyloid Plaque Targeting Of Native And Putrescine Modified Human Amyloid Beta40," *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318:17-25)。scFvを、そのカルボキシル基（すなわち、scFvのカルボキシ末端基、またはグルタミン酸もしくはアスパラギン酸残基のカルボキシ側鎖）の一部またはすべてをアミド化する処理を介して、ポリカチオン基を含むように強化することもできる。

【0088】

または、細胞透過性ペプチド（「CPP」）を含むようにscFvを強化することもできる (Rao, K.S. et al. (2009) "Targeting Anti-HIV Drugs To The CNS," *Expert Opin. Drug Deliv.* 6(8):771-784 ; Mathupala, S.P. et al. (2009) "Delivery Of Small-Interfering RNA (siRNA) To The Brain," *Expert Opin. Ther. Pat.* 19(2):137-140 ; Herve, F. et al. (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis," *AAPS J.* 10(3):455-472)。Such peptides include the HIV-1 trans-activating transcriptional activator (TAT) peptide, the Herpes Simplex Virus type-1 transcription factor (HSV VP-22) peptide, antennapedia and penetratin (Wadia, J.S. et al. (2004) "Transducible TAT-HA Fusogenic Peptide Enhances Escape Of TAT-Fusion Proteins After Lipid Raft Macropinocytosis," *Nat. Med.* 10:310-315 ; Richard, J.P. et al. (2003) "Cell-Penetrating Peptides. A Reevaluation Of The Mechanism Of Cellular Uptake," *J. Biol. Chem.* 278:585-590 ; Temsamani, J. et al. (2004) "The Use Of Cell-Penetrating Peptides For Drug Delivery," *Drug Discov. Today* 9: 1012-1019)。

【0089】

III. 本発明の抗体および抗体断片の使用

本発明は、対象患者におけるアルツハイマー病またはタウ異常症を診断および/または治療するための、タウ免疫特異的でホスホ-タウ選択的な抗体、またはタウ免疫特異的でホスホ-タウ選択的なその結合性断片の使用に関する。そのような診断的有用性について、そのような使用は、対象において（すなわち、インビボで）、好ましくは検出可能に標識された、本発明の6B2G12抗体またはそのエピトープ結合性断片（特にscFv235）を用いて（そのような分子は本明細書中で本発明の診断用分子と総称される）、病的タウ配座異性体の存在を検出することを伴ってよい。または、そのような使用が、エクスピボで（例えば、生検試料または死後において）、本発明の診断用分子を用いて病的タウ配座異性体の存在を検出することを伴ってよい。

【0090】

1つの態様において、そのようなタウ免疫特異的でホスホ-タウ選択的な抗体またはタウ免疫特異的でホスホ-タウ選択的な結合断片は、ヒト化抗体であってよい。

【0091】

そのような治療的有用性について、そのような使用は、アルツハイマー病またはそのようなタウ異常症の1つまたは複数の症状を有し、それ故にそのような治療法を必要とする患者に対する、本発明の6B2G12抗体またはそのエピトープ結合性断片（特にscFv235）の治療的有効量の投与を伴ってよく、またはそれが、そのような症状を呈していないか、または初期のアルツハイマー病もしくはタウ異常症を指し示す軽度認知症もしくはプレ-タウ異常症（pre-tauopathy）の症状を呈している患者に対する、本発明の6B2G12抗体また

10

20

30

40

50

はそのエピトープ結合性断片（特にscFv235）の予防的有効量の投与を伴ってもよく、そのような分子は本明細書中で本発明の治療用分子と総称される。

【0092】

前記のように、好ましいscFv抗体（scFv235）は、P-Ser 396 / 404に対する特異性を有するが、他のタウペプチド、例えば、US 2008 / 0050383号に記載されたものに対する特異性を有するscFv分子を、scFv235と合わせて用いることもできる。

【0093】

「タウ異常症」という用語は、本明細書で用いる場合、脳内部での微小管タンパク質タウの病的凝集を伴うあらゆる神経変性疾患を範囲に含む。したがって、家族性および孤発性アルツハイマー病の両方に加えて、本発明のタウ異常症には、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖したパーキンソニズム（FTDP-17）、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、タングルのみの認知症（tangle only dementia）、石灰化を伴うびまん性神経原線維タングル、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症パーキンソニズム・認知症複合、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハラーフォルデン・シュパッツ病（Hallerwerden-Spatz disease）、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症（multiple system atrophy）、ニーマン・ピック病C型、ブリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維タングルを伴う非グアナミン運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソニズム、急性外傷性脳損傷および慢性外傷性脳症が非限定的に含まれる。

10

【0094】

#### IV. 本発明のタウ結合性分子の產生

本発明のタウ結合性分子は、好ましくは、それらの構成要素ポリペプチド鎖をコードする核酸分子の組換え発現を介して產生される。本発明はしたがって、本発明の抗体のそのような1つもしくは複数のポリペプチド鎖またはそれらの断片をコードする発現ベクターにも関する。

【0095】

本発明の文脈における発現ベクターは、染色体核酸ベクター、非染色体核酸ベクター、および合成核酸ベクター（発現制御エレメントの適したセットを含む核酸配列）を含む、任意の適したDNAベクターまたはRNAベクターであってよい。そのようなベクターの例には、SV40、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ならびにウイルス核酸（RNAまたはDNA）ベクターの誘導体が含まれる。1つの態様において、抗タウ抗体をコードする核酸は、例えば直鎖発現エレメントを含む、裸のDNAベクターもしくはRNAベクター（例えば、Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997) に記載されたような）、圧縮された核酸ベクター（例えば、US 6,077,835号および／もしくはWO 00 / 70087号に記載されたような）、プラスミドベクター、例えばpBR322、pUC19/18、もしくはpUC118/119など、「超小型（midge）」最小サイズ核酸ベクター（例えば、Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001) に記載されたような）、または沈殿された核酸ベクター構築物、例えばC aP04によって沈殿された構築物（例えば、WO 00 / 46147号、Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al, Cell 14, 725 (1978)、およびCoraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 2, 603 (1981)に記載されたような）の中に含まれる。そのような核酸ベクターおよびその利用は当技術分野において周知である（例えば、US 5,589,466号およびUS 5,973,972号を参照）。

20

30

【0096】

1つの態様において、ベクターは、細菌細胞における抗タウ抗体またはそのタウ結合性断片の発現のために適している。そのようなベクターの例には、発現ベクター、例えばBl ueScript (Stratagene)、pINベクター (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)、pETベクター (Novagen, Madison WI) など) が含まれる。

【0097】

40

50

同様にまたは代替的に、発現ベクターは、酵母系における発現に適したベクターでもよい。酵母系における発現に適した任意のベクターを用いることができる。適したベクターには、例えば構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター、例えば 因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHを含むベクターが含まれる (F. Ausubel et al, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987)、およびGrant et al, Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987) に概説)。

#### 【0098】

本発明の発現ベクターにおいて、抗タウ抗体をコードする核酸分子（またはそのタウ結合性断片をコードする核酸分子）は、任意の適したプロモーター、エンハンサー、および他の発現促進エレメントを含んでもよく、これらが会合してもよい。そのようなエレメントの例には、強発現プロモーター（例えば、ヒトCMV IEプロモーター／エンハンサーならびにRSV、SV40、SL3-3、MMTV、およびHIV LTRプロモーター）、有効なポリ(A)終結配列、大腸菌におけるプラスミド産物用の複製起点、選択マーカーとしての抗生物質耐性遺伝子、ならびに／または便利なクローニングサイト（例えば、ポリリンカー）が含まれる。核酸はまた、構成的プロモーターとは反対に誘導性プロモーター、例えばCMV IEを含んでもよい（当業者は、そのような用語がある特定の条件下での遺伝子発現の度合いに関する実際の記述語であることを認識しているであろう）。

#### 【0099】

1つの別のさらなる局面において、本発明は、本明細書において定義される本発明の抗体または本明細書において定義される本発明の二重特異性分子を產生する、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞、例えばトランスフェクトーマに関する。宿主細胞の例には、酵母細胞、細菌細胞、および哺乳動物細胞、例えばCHO細胞またはHEK細胞が含まれる。例えば、1つの態様において、本発明は、本発明の抗タウ抗体またはそのタウ結合性断片の発現をコードする配列を含む核酸が細胞ゲノムに安定に組み込まれている細胞を提供する。別の態様において、本発明は、本発明の抗タウ抗体またはそれらのそのような断片の発現をコードする配列を含む、非組み込み型核酸、例えばプラスミド、コスミド、ファージミド、または直鎖発現エレメントなどを含む細胞を提供する。

#### 【0100】

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明の抗タウ抗体を產生させるための方法であって、a) 本明細書において前述された本発明のハイブリドーマまたは宿主細胞を培養する段階、およびb) 培地から本発明の抗体を精製する段階、を含む方法に関する。

#### 【0101】

一般に、產生された抗タウ抗体およびそのタウ結合性断片は、任意の適した数の修飾アミノ酸を含めることによって、かつ／またはそのようなコンジュゲートされた置換基との会合によって改変することができる。この文脈における適合性は一般に、誘導体化されていない親抗タウ抗体の抗タウ選択性および／または抗タウ特異性を少なくとも実質的に保っている能力によって判定される。1つまたは複数の修飾アミノ酸を含めることは、例えば、ポリペプチドの血清中半減期を延長させること、ポリペプチドの抗原性を低下させること、またはポリペプチドの貯蔵安定性を高めることにおいて有利でありうる。アミノ酸は、例えば、組換え体產生中に翻訳時または翻訳後に修飾されるか（例えば、哺乳類細胞における発現中のN-X-S/TモチーフでのN結合型グリコシル化）、または合成手段によって修飾される。修飾アミノ酸の非限定的な例には、グリコシル化アミノ酸、硫酸化アミノ酸、ブレニル化（例えば、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化）アミノ酸、アセチル化アミノ酸、アシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ビオチニル化アミノ酸、カルボキシル化アミノ酸、リン酸化アミノ酸などが含まれる。アミノ酸の修飾について当業者の手引きとなる適切な参考文献は、あまねく文献に豊富である。例示的なプロトコールは、Walker (1998) Protein Protocols On CD-Rom, Humana Press, Totowa, NJに記載がある。修飾アミノ酸は、例えば、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチニル化アミノ酸、脂質モイエティーにコンジュゲートされたアミノ酸、または有機誘導体化剤にコンジュゲートされたアミノ酸から選択されうる。

10

20

30

40

50

## 【0102】

上に指摘したように、投与される本発明の治療用分子の半減期を延長させることが望ましい場合には、そのような分子に、ポリオキシエステル化ポリオールまたはポリエチレングリコール(PEG)など(例えば、分子量が約1,000～約40,000、例えば約2,000～約20,000、例えば、約3,000～12,000g/molなどであるPEG)を含めるか(Moosmann, A. et al. (2014) "Purification Of PEGylated Proteins, With The Example Of PEGylated Lysozyme and PEGylated scFv," Methods Mol. Biol. 1129:527-538; Jevsevar, S. et al. (2010) "PEGylation Of Therapeutic Proteins," Biotechnol. J. 5:113-228)、もしくはグルコシル化によって糖質モイエティーを含めるか、またはヒト血清アルブミンなどのタンパク質を付加または会合させるように形成させるとよい(Muller, M.R. et al. (2012) "Improving The Pharmacokinetic Properties Of Biologics By Fusion To An Anti-HSA Stark VNAR Domain," MAbs. 4(6):673-685; Stork, R. et al. (2008) "N-Glycosylation As Novel Strategy To Improve Pharmacokinetic Properties Of Bispecific Single-Chain Diabodies," J. Biol. Chem. 283:7804-7812; Alt, M. et al. (1999) "Novel Tetraivalent And Bispecific IgG-like Antibody Molecules Combining Single-Chain Diabodies With The Immunoglobulin Gammal Fc or CHS Region FEBS Lett. 454:90-94; Peters T. et al. (1985) "Serum Albumin Adv. Protein Chem. 37:161-245)。例示的なポリマー、およびポリマーをペプチドに結びつける方法は公知である(例えば、米国特許第4,766,106号;第4,179,337号;第4,495,285号および第4,609,546号を参照)。

## 【0103】

## V. 本発明の薬学的組成物

本発明のタウ結合性分子は、多くの場合、活性治療薬および種々の他の薬学的に許容される構成要素を含む薬学的組成物として投与される。REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (21st Edition) (2005) (Troy, D.B. et al. (Eds.) Lippincott Williams & Wilkins (Pubis.), Baltimore MD) を参照されたく、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。好ましい形態は、意図する投与様式および治療的適用に依存する。組成物はまた、所望の製剤に応じて、薬学的に許容される、非毒性の担体、添加剤、希釈剤、增量剤、塩、緩衝剤、界面活性剤(例えば、Tween-20またはTween-80などの非イオン性界面活性剤)、安定化剤(例えば、糖またはタンパク質非含有アミノ酸)、保存料、組織固定剤、溶解補助剤、および/または薬学的組成物に含めるのに適する他の材料、ならびに動物またはヒトへの投与用の薬学的組成物を製剤化するために一般的に用いられる媒体も含みうる。希釈剤は、配合物の生物学的活性に影響を与えないように選択される。そのような希釈剤の例には、蒸留水、リン酸緩衝食塩水、リゲル液、デキストロース溶液、およびハンクス溶液がある。加えて、薬学的組成物または製剤が、他の担体、または非毒性、非治療的、非免疫原性の安定剤などを含んでもよい。本発明の薬学的組成物において使用しうる適した水性および非水性の担体の例には、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの適した混合物、植物油、例えばオリーブ油、トウモロコシ油、ラッカセイ油、綿実油および胡麻油など、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントゴムおよび注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルなど、ならびに/またはさまざまな緩衝剤が含まれる。他の担体も薬学の技術分野において周知である。

## 【0104】

薬学的に許容される担体には、滅菌した水溶液または分散液、および滅菌した注射液または分散液を即時調製するための滅菌した散剤が含まれる。薬学的活性物質のためのそのような媒質および作用物質の使用は当技術分野において公知である。いずれかの従来の媒質または作用物質が活性化合物と不適合である場合を除き、本発明の薬学的組成物におけるそれらの使用を想定している。

## 【0105】

組成物は、緩徐に代謝される大きな高分子、例えば、タンパク質、キトサンのような多

10

20

30

40

50

糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコポリマー（例えば、ラテックス官能化セファロース、アガロース、セルロースなど）、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマー、および脂質凝集体（例えば、油滴またはリポソーム）も含むことができる。薬学的組成物の担体および他の構成要素の適合性は、本発明の選ばれた化合物または薬学的組成物の所望の生物学的特性に対して顕著な悪影響を及ぼさないことに基づいて判定される（例えば、抗原結合に対する実質的未満の影響（10%またはそれ未満の相対的阻害、5%またはそれ未満の相対的阻害など）。

【0106】

本発明の薬学的組成物はまた、薬学的に許容される酸化防止剤、例えば、（1）水溶性の酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；（2）油溶性の酸化防止剤、例えばアスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、-トコフェロールなど；および（3）金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などを含んでもよい。

【0107】

本発明の薬学的組成物はまた、組成物中に、等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、グリセロールまたは塩化ナトリウムなどを含んでもよい。

【0108】

本発明の薬学的組成物はまた、薬学的組成物の貯蔵寿命または有効性を強化することができる、選ばれた投与経路に適した1種類または複数種の補助剤、例えば保存料、湿潤剤、乳化剤、分散剤、保存料または緩衝剤を含んでもよい。本発明の化合物を、例えばインプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセルに封入された送達系を含む徐放製剤などの、急速に放出されないように化合物を保護する担体を用いて調製することもできる。そのような担体には、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリン、ジステアリン酸グリセリン、生分解性生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のみもしくはポリ乳酸とワックス、または当技術分野において周知の他の材料を含んでもよい。そのような製剤の調製のための方法は当業者に一般に公知である。例えば、*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0109】

1つの態様において、本発明の化合物を、インピボでの適正な分布が確保されるように製剤化することもできる。非経口的投与のための薬学的に許容される担体には、滅菌した水溶液または分散液、および滅菌した注射液または分散液を即時調製するための滅菌した散剤が含まれる。薬学的活性物質のためのそのような媒質および作用物質の使用は当技術分野において公知である。いずれかの従来の媒質または作用物質が活性化合物と不適合である場合を除き、本発明の薬学的組成物におけるそれらの使用を想定している。補助的な活性化合物を組成物中に組み入れてもよい。

【0110】

注射用の薬学的組成物は、典型的には、製造および貯蔵の条件下で無菌かつ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬物濃度に適した他の規則的構造として調製されうる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど）、ならびにそれらの適した混合物、植物油、例えばオリーブ油、および注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルなどであってよい。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティング材料の使用によって、分散系の場合は必要とされる粒子径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトールなど、また

10

20

30

40

50

は塩化ナトリウムを組成物中に含めることが好ましいと考えられる。注射用組成物の長期的吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含めることによって実現することができる。無菌注射用溶液は、必要に応じて、前述の成分の1種または組み合わせとともに、適切な溶媒中で必要な量の活性化合物を混合し、続いて滅菌精密濾過することによって調製することができる。一般に、分散液は、基本となる分散媒および前述したもののうち必要とされる他の成分を含む無菌媒体中に活性化合物を混合することによって調製される。無菌注射用溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、あらかじめ滅菌濾過したその溶液から、活性成分および任意の付加的な所望の成分の粉末を生じる、真空乾燥およびフリーズドライ法（凍結乾燥）である。

10

#### 【0111】

無菌注射用溶液は、必要に応じて、前述の成分の1種または組み合わせとともに、適切な溶媒中で必要な量の活性化合物を混合し、続いて滅菌精密濾過することによって調製することができる。一般に、分散液は、基本となる分散媒および前述したもののうち必要とされる他の成分を含む無菌媒体中に活性化合物を混合することによって調製される。無菌注射用溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、あらかじめ滅菌濾過したその溶液から、活性成分および任意の付加的な所望の成分の粉末を生じる、真空乾燥およびフリーズドライ法（凍結乾燥）である。

#### 【0112】

非経口的投与の場合、本発明の作用物質は、典型的には、生理的に許容される希釈剤に物質を溶解させた溶液または懸濁液の注射投与物として、水、油、食塩水、グリセロール、またはエタノールなどの無菌の液体であってよい薬学的担体とともに製剤化される。加えて、補助的な物質、例えば湿潤剤または乳化剤、界面活性剤、pH緩衝物質などが組成物中に存在してもよい。薬学的組成物の他の構成要素は、石油、動物、植物、または合成に由来するものである。落花生油、ダイズ油および鉛油はすべて、有用な材料の例である。一般に、グリコール、例えばプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどは、特に、注射液にとって好ましい液体担体である。本発明の作用物質は、有効成分を持続放出するように製剤化できるデポー注射剤またはインプラント調製物の形態で投与することができる。例示的な組成物は、scFv235を約5mg / mLとして含み、50mM L-ヒスチジン、150mM NaClからなり、HClによってpH 6.0に調整された水性緩衝液中に製剤化される。

20

#### 【0113】

典型的には、組成物はそのように液体溶液または懸濁液のいずれかとしての注射液として調製される；注射前に液体媒体中に溶解または懸濁するのに適切な固体形態も調製できる。調製物はまた、上記のようにアジュバント効果を強化するために、乳化させること、またはリポソームもしくは微粒子、例えばポリラクチド、ポリグリコリドもしくはコポリマー中に封入することもできる（Langer, et al., Science 249: 1527 (1990) ; Hanes, et al., Advanced Drug Delivery Reviews 28:97-119 (1997)、これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる）。他の投与様式に適するそのほかの製剤には、経口製剤、鼻腔内製剤および肺用製剤、坐薬、ならびに経皮適用が含まれる。

#### 【0114】

30

#### VI. 本発明の薬学的組成物の投与

本発明の分子は、予防的および/または治療的処置のための非経口的、局所的、経口的または鼻腔内手段によって投与することができる。筋肉内注射（例えば、腕または足の筋肉内）および静脈内注入が、本発明の分子の好ましい投与方法である。いくつかの方法では、そのような分子は、持続放出組成物またはデバイス、例えば、Medipad（登録商標）デバイス（Elan Pharm. Technologies, Dublin, Ireland）などとして投与される。いくつかの方法では、本発明の分子は、沈着物が蓄積している特定の組織中に、例えば頭蓋内注射によって直接注射される。

#### 【0115】

1つの態様において、本発明の薬学的組成物は非経口的に投与される。本明細書で用い

40

50

る「非経口的投与」および「非経口的に投与される」という語句は、通常は注射による、経腸投与および局所投与以外の投与様式のことを意味し、これには表皮、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、囊内、頭蓋内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、腱内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、頭蓋内、胸腔内、硬膜外および胸骨内への注射、皮下および注入が含まれる。1つの態様において、薬学的組成物は静脈内または皮下への注射または注入によって投与される。

【0116】

予防的適用において、薬学的組成物または医薬は、アルツハイマー病に対する感受性があるかまたは他の様式でリスクがある患者に対して、そのリスクを消失もしくは低下させる、重症度を軽減する、または本疾患の生化学的、組織学的および/または行動的症状、その合併症ならびに本疾患の発症の間に提示される中間的な病理学的表現型を含む、疾患の発生を遅延させるために十分な量で投与される。

10

【0117】

治療的適用において（すなわち、アルツハイマー病または他のタウ異常症を有すると診断された患者にかかる適用において）、本発明の治療用分子は、そのような患者に対して、その合併症および本疾患の発症における中間的な病理学的表現型を含む、疾患の症状（生化学的、組織学的および/または行動的評価によって証拠が得られる）を治癒させる、治療する、または少なくとも部分的に停止させるために十分な量で投与される。いくつかの態様において、本発明の治療用分子の投与は、特徴的なアルツハイマーの病態をまだ発症していない患者において軽度の認知障害を軽減するかまたは消失させる。

20

【0118】

上記の病状の治療のための、本発明の提供される治療用分子の有効量は、投与の手段、標的部位、患者の生理的状態、投与される他の医薬、および処置が予防的であるかまたは治療的であるかを含む、多くの要因に応じて異なりうる。安全性および有効性を最適化するために、治療投与量は典型的には微調整される。投薬を行う任意の所与の日に、投与量は、宿主体重当たりで約0.0001～約100mg/kg、より一般的には約0.01～約5mg/kgの範囲であります。例えば、投与量は1mg/kg体重もしくは10mg/kg体重、または1～10mg/kg体重の範囲内にあります。したがって、例示的な投与量には以下が含まれる：約0.1～約10mg/kg/体重、約0.1～約5mg/kg/体重、約0.1～約2mg/kg/体重、約0.1～約1mg/kg/体重、例えば約0.15mg/kg/体重、約0.2mg/kg/体重、約0.5mg/kg/体重、約1mg/kg/体重、約1.5mg/kg/体重、約2mg/kg/体重、約5mg/kg/体重、または約10mg/kg/体重。

30

【0119】

当技術分野における通常の技能を有する医師または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師または獣医は、薬学的組成物中に用いられる抗タウ抗体または断片の用量を、所望の治療効果を達成するのに必要なものよりも低いレベルで開始し、次いで、所望の効果が達成されるまで投与量を徐々に増やすことができる。一般に、本発明の組成物の適切な一日量は、治療効果を生じるのに有効な最小用量である化合物の量である。そのような有効量は一般に、上記の要因に依存すると考えられる。投与は、例えば静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下であってよく、例えば標的部位の近位に投与される。所望であれば、薬学的組成物の有効な一日量を、1日にわたって適切な間隔で別個に投与される、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ以上の分割用量として投与してもよく、任意で、単位剤形で投与されてもよい。本発明の化合物は単独で投与することも可能であるが、上記のように薬学的組成物として化合物を投与することが好ましい。

40

【0120】

例示的な治療レジメンは、2週間毎に1回または1ヶ月に1回または3～6ヶ月毎に1回の投与を伴う。いくつかの方法では、1種、2種またはそれを上回る抗体（またはそれらのエピトープ結合性断片）が、本発明の治療用分子の投与とともに投与されると考えられ、この場合には、投与されるそのような各抗体の投与量は指定された範囲内に収められる。

50

## 【0121】

投与の用量および頻度は、治療が予防的であるかまたは治療的であるかに応じて異なりうる。予防的適用においては、比較的低い投与量が、長期間にわたって比較的頻繁でない間隔で投与される。患者の中には、残りの生涯の間、継続して治療を受ける者もいる。治療的適用においては、比較的短い間隔での比較的高い投与量が、疾患の進行が減少または終了するまで、および好ましくは、患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで、時折必要とされる。その後は患者に予防的投与レジメンを用いてそのような治療用分子を投与することができる。

## 【0122】

治療目的の場合、本発明の分子は通常、複数の機会に投与される。単回の投薬（例えばボーラスまたは注入）の間の間隔は、毎週、毎月、または毎年でありうる。いくつかの方法では、投与量は、1~1000 μg/mlの血漿中濃度が達成されるように、またいくつかの方法では25~300 μg/mlが達成されるように調整される。または、本発明の治療用分子を持続放出製剤として投与することもでき、この場合にはより頻度が少ない投与が必要とされる。投与量および頻度は、患者における抗体の半減期に応じて異なる。一般に、ヒト抗体が最長の半減期を示し、その次がヒト化抗体、キメラ抗体、そして非ヒト抗体の順である。scFv分子は一般に短い血清中半減期を有する。

10

## 【0123】

本発明のもう1つの局面は、タウタンパク質またはその免疫原性エピトープを認識するさらなる抗体またはそのエピトープ結合性断片を、本発明の治療用分子と組み合わせて投与する併用療法である。アルツハイマー病およびダウン症候群などのアミロイド形成性疾患の場合には、アミロイド- $\beta$ （A $\beta$ ）沈着物を排除するための免疫調節が新たな治療法として登場しつつある。A $\beta$ を標的とする免疫療法により、一貫して認知の改善がもたらされている。タウ病理とA $\beta$ 病理は相乗的である可能性が高い。このため、両方の病態の排除を同時に標的とする併用療法は、それぞれを個別に標的とするものよりも有効である可能性がある。パーキンソン病および関連する神経変性疾患の場合には、凝集形態にある $\alpha$ -シヌクレインタンパク質を排除するための免疫調節も、新たな治療法として登場しつつある。タウタンパク質および $\alpha$ -シヌクレインタンパク質の両方の排除を同時に標的とする併用療法は、それぞれを個別に標的とするものよりも有効である可能性がある。

20

## 【0124】

30

## VII. 本発明のタウ結合性分子の有用性

## A. 診断的有用性

本発明の診断用分子を用いて、対象における病的タウ配座異性体の存在を検出することは、対象から生物試料（例えば、血液、尿、脳脊髄液）入手すること、生物試料を前記診断用抗体と接触させること、および対象由来の試料における病的タウタンパク質配座異性体に対する診断用分子の結合を検出することによって達成しうる。本発明の診断用分子の検出に容易に適応させることができる、生体試料における病的タウタンパク質の検出を実施するためのアッセイは当技術分野において周知であり、これにはELISA、免疫組織化学、ウエスタンプロットが非限定的に含まれる。

## 【0125】

40

または、本発明の診断用分子を用いて、対象における病的タウ配座異性体の存在を検出することを、インビボイメージング手法を用いて達成することもできる。インビボイメージングは、病的タウペプチドに対する抗原特異性を有する診断用抗体を対象に投与すること、および病的タウ配座異性体に対する診断用抗体試薬の結合をインビボで検出することを伴う。

## 【0126】

本発明の診断用分子は、注射（例えば、静脈内注射、頸動脈内注射など）によって患者の体内に投与すること、または頭蓋内注射によって脳内に直接的に投与することができる。そのような分子の投与量は、宿主体重当たりで約0.0001mg/kg~約100mg/kgであるべきであり、より一般的には約0.01mg/kg~約5mg/kgである。例えば、投与量は約1mg/kg

50

体重もしくは約10mg / kg体重、または約1~10mg / kg体重の範囲内にありうる。

【0127】

典型的には、本発明の診断用分子は標識されるが、いくつかの方法では、分子を標識せずに、二次標識剤を用いてそのような分子に結合させる（当技術分野において公知の手法を用いて、分子と直接的に、または仲介物（例えば、当技術分野において公知のリンカー）を経由して間接的に、カップリングまたはコンジュゲートさせる）。標識の選択は検出の手段に依存する。例えば、蛍光性標識（希土類キレート（例えば、ユーロピウムキレート）など）、フルオレセイン型標識（例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン）、ローダミン型標識（例えば、ALEXA FLUOR（登録商標）568（Invitrogen）、TAMRA（登録商標）またはダンシルクロリド）、VIVOTAG 680 XL F LUOROCHROME（商標）（Perkin Elmer）、フィコエリトリン；ウンベリフェロン、リサミン；シアニン；フィコエリトリン、テキサスレッド、BODIPY FL-SE（登録商標）（Invitrogen）またはそれらの類似体が、光学検出に適している。化学発光性標識を用いることができる（例えば、ルミノール、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリン）。また、そのような診断および検出を、本発明の診断用分子を、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼを非限定的に含む酵素であるさまざまな酵素、または限定はされないがストレプトアビシン/ビオチンおよびアビシン/ビオチンなどの補欠分子族複合体を非限定的に含む検出可能な物質とカップリングさせることによって実現することもできる。常磁性標識および放射性同位体標識を用いることもでき、これらは好ましくは陽電子放出断層撮影法（PET）または単一光子放出型断層撮影法（SPECT）を用いて検出される。放射標識には、ビスマス（<sup>213</sup>Bi）、炭素（<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>C）、クロム（<sup>51</sup>Cr）、コバルト（<sup>57</sup>Co、<sup>60</sup>Co）、銅（<sup>64</sup>Cu）、ジスプロシウム（<sup>165</sup>Dy）、エルビウム（<sup>169</sup>Er）、フッ素（<sup>18</sup>F）、ガドリニウム（<sup>153</sup>Gd、<sup>159</sup>Gd）、ガリウム（<sup>68</sup>Ga、<sup>67</sup>Ga）、ゲルマニウム（<sup>68</sup>Ge）、金（<sup>198</sup>Au）、ホルミウム（<sup>166</sup>Ho）、水素（<sup>3</sup>H）、インジウム（<sup>111</sup>In、<sup>112</sup>In、<sup>113</sup>In、<sup>115</sup>In）、ヨウ素（<sup>121</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I）、イリジウム（<sup>192</sup>Ir）、鉄（<sup>59</sup>Fe）、クリプトン（<sup>81m</sup>Kr）、ランタニウム（<sup>140</sup>La）、ルテニウム（<sup>177</sup>Lu）、マンガン（<sup>54</sup>Mn）、モリブデン（<sup>99</sup>Mo）、窒素（<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>N）、酸素（<sup>15</sup>O）、パラジウム（<sup>103</sup>Pd）、リン（<sup>32</sup>P）、カリウム（<sup>42</sup>K）、プラセオジム（<sup>142</sup>Pr）、プロメチウム（<sup>149</sup>Pm）、レニウム（<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re）、ロジウム（<sup>105</sup>Rh）、ルビジウム（<sup>81</sup>Rb、<sup>82</sup>Rb）、ルテニウム（<sup>82</sup>Ru、<sup>97</sup>Ru）、サマリウム（<sup>153</sup>Sm）、スカンジウム（<sup>47</sup>Sc）、セレン（<sup>75</sup>Se）、ナトリウム（<sup>24</sup>Na）、ストロンチウム（<sup>85</sup>Sr、<sup>89</sup>Sr、<sup>92</sup>Sr）、イオウ（<sup>35</sup>S）、テクネシウム（<sup>99</sup>Tc）、タリウム（<sup>201</sup>Tl）、スズ（<sup>113</sup>Sn、<sup>117</sup>Sn）、キセノン（<sup>133</sup>Xe）、イッテルビウム（<sup>169</sup>Yb、<sup>175</sup>Yb、<sup>177</sup>Yb）、イットリウム（<sup>90</sup>Y）および亜鉛（<sup>65</sup>Zn）；さまざまな陽電子放出断層撮影法を用いる陽電子放出性金属、および非放射性常磁性金属イオン（例えば、アルミニウム（Al）、バリウム（Ba）、カルシウム（Ca）、セリウム（Ce）、ジスプロシウム（Dy）、エルビウム（Er）、ユーロピウム（Eu）、ガドリニウム（Gandolinium）（Gd）、ホルミウム（Ho）、イリジウム（Ir）、リチウム（Li）、マグネシウム（Mg）、マンガン（Mn）、モリブデン（M）、ネオジウム（Nd）、オスミウム（Os）、酸素（O）、パラジウム（Pd）、白金（Pt）、ロジウム（Rh）、ルテニウム（Ru）、サマリウム（Sm）、ナトリウム（Na）、ストロンチウム（Sr）、テルビウム（Tb）、ツリウム（Tm）、スズ（Sn）、チタン（Ti）、タンゲステン（W）、およびジルコニウム（Zr）の常磁性イオン、特に $Co^{+2}$ 、 $C^{+2}$ 、 $Cr^{+3}$ 、 $Cu^{+2}$ 、 $Fe^{+2}$ 、 $Fe^{+3}$ 、 $Ga^{+3}$ 、 $Mn^{+3}$ 、 $Ni^{+2}$ 、 $Ti^{+3}$ 、 $V^{+3}$ 、および $V^{+4}$ ）が非限定的に含まれる。放射標識アミノ酸および関連するペプチド誘導体を調製するための方法は、当技術分野において公知である（例えば、Junghans et al., in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2nd edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))ならびに米国特許第4,681,581号；第4,735,210号；第5,101,827号；第5,102,990号；RE 35,500号；第5,648,471号および第5,697,902号を参照されたい。例えば、放射性同位体をクロラミンT法によってコンジュゲートさせることができる（Lindegren, S. et al. (1998) "Chlora

10

20

30

40

50

mine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl)Benzoate As An Intermediate," Nucl. Med. Biol. 25(7):659-665 ; Kurth, M. et al. (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor," J. Med. Chem. 36(9):1255-1261 ; Rea, D.W. et al. (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors," Cancer Res. 50(3 Suppl):857s-861s)。

#### 【 0 1 2 8 】

診断は、対象からの試料中または対象における、標識された病的タウ配座異性体、タウ凝集物、および／または神経原線維タングルの数、サイズ、および／または強度を、対応するベースライン値と比較することによって行われる。ベースライン値は、非罹患個体の集団における平均レベルを表すことができる。また、ベースライン値が、同じ対象において決定された以前のレベルを表すこともできる。

10

#### 【 0 1 2 9 】

上記の診断方法を、治療に対する対象の反応をモニターするために用いることもできる。この態様において、対象における病的タウの存在の検出は、治療の開始前に判定される。この時点での対象における病的タウのレベルは、ベースライン値として用いられる。治療の過程におけるさまざまな時点で、病的タウタンパク質配座異性体、タウ凝集物、および／または神経原線維タングルの検出を繰り返し、測定した値をその後でベースライン値と比較する。ベースラインに比しての値の減少は、治療に対するポジティブな反応の表れである。病的タウが脳から排除されることから、値が生体液中で一時的に増加することもありうる。

20

#### 【 0 1 3 0 】

本発明はさらに、上記の診断方法およびモニタリング方法を行うためのキットにも向けられる。典型的には、そのようなキットは、本発明の診断用抗体を含む。キットはまた、検出可能な標識も含みうる。診断用抗体それ自体が、直接的に検出可能であるかまたは二次反応（例えば、ストレプトアビジンとの反応）を介して検出可能である検出可能な標識（例えば、蛍光性分子、ビオチンなど）を含んでもよい。または、検出可能な標識を含む第2の試薬を利用してよく、ここでこの第2の試薬は一次抗体に対する結合特異性を有する。生体試料中の病的タウタンパク質を測定するのに適した診断用キットにおいて、キットの抗体は、マイクロタイターディッシュのウェルなどの固相に対してあらかじめ結合された上で供給されてもよい。

30

#### 【 0 1 3 1 】

#### B. 治療的有用性

標識された抗タウ抗体またはそれらのタウ結合性断片の存在を、診断目的でインピボで検出することもできる。1つの態様において、そのような診断は以下を含む：a) 対象に対してそのような標識分子の有効量を投与する段階；b) 標識分子が凝集タウの部位（あれば）に濃縮するように、かつ非結合標識分子が排除されてバックグラウンドレベルになるように、投与後にある時間間にわたって待機する段階；c) バックグラウンドレベルを決定する段階；およびd) バックグラウンドレベルを上回る標識分子の検出によってその対象がタウ異常症を有することが指示され、またはそのようなタウ異常症の重症度が指示されるように、対象におけるそのような標識分子を検出する段階。そのような態様によれば、抗体は、当業者に公知である特定のイメージングシステムを用いた検出用に適するイメージングモイエティーによって標識される。バックグラウンドレベルは、検出された標識分子の量を特定のイメージングシステムに関して以前に決定された標準的な値と比較することを含む、当技術分野において公知のさまざまな方法によって決定しうる。本発明の診断方法に用いうる方法およびシステムには、コンピュータ断層撮影法（CT）、陽電子放出断層撮影法（PET）、磁気共鳴イメージング（MRI）および超音波検査などの全身スキャンが非限定的に含まれる。

40

#### 【 0 1 3 2 】

50

本明細書で用いる「治療」または「治療すること」という用語は、疾患もしくは障害の進行もしくは重症度を改善すること、緩徐化すること、もしくは好転させること、またはそのような疾患もしくは障害の1つもしくは複数の症状もしくは副作用を改善すること、緩徐化すること、もしくは好転させることを意味する。本発明において、「治療」または「治療すること」はさらに、有益なまたは所望の臨床結果を得るためにアプローチも意味し、ここで「有益なまたは所望の臨床結果」には、症状の軽減、障害または疾患の程度の減少、疾患または障害の状態の安定化（すなわち、悪化しないこと）、疾患または障害の状態の進行の遅延または緩徐化、疾患または障害の状態の改善または緩和、および疾患または障害の寛解が、部分的であるか完全であるか、検出可能であるか検出不能であるかを問わず、非限定的に含まれる。

10

### 【0133】

「有効量」とは、本発明の抗体に適用される場合、必要な投与量および期間で、臨床結果を非限定的に含む意図する生物学的効果または所望の治療結果を達成するのに十分である量のことを指す。「治療的有効量」という語句は、本発明の抗体に適用される場合、障害もしくは疾患の状態の進行または障害もしくは疾患の症状を改善する、緩和する、安定化する、好転させる、緩徐化する、または遅らせるのに十分である抗体の量を表すことを意図している。1つの態様において、本発明の方法は、他の化合物との組み合わせでの抗体の投与を提供する。そのような場合に、「有効量」とは、意図する生物学的効果を生じさせるのに十分である組み合わせの量のことである。

### 【0134】

20

以上に指摘したように、本発明の1つの局面は、対象におけるアルツハイマー病または他のタウ異常症を予防または治療する方法であって、そのようなアルツハイマー病または他のタウ異常症を予防または治療するために、抗体6B2G12またはそのエピトープ結合性断片（特にscFv235）の有効量の投与を介する方法に関する。そのような投与は、対象の脳からのタウ凝集物の排除を促進する目的で提供してもよく、または対象におけるタングル関連の行動的表現型を緩徐化する目的で提供してもよい。加えて、そのような投与を、アルツハイマー病、または神経原線維タングルと関連のある他のタウ異常症の発病を遅らせる、妨げる、弱める、または予防する目的で予防的に提供することもできる。治療的または予防的処置を達成するために適切な量は、それぞれ治療的有効用量または予防的有効用量と定義される。予防的レジメンおよび治療的レジメンの両方において、薬剤は通常、十分な免疫応答が達成されるまで数回の投薬として投与される。典型的には、免疫応答をモニターし、免疫応答が減弱し始めたならば反復投薬を行う。そのような抗体またはそのエピトープ結合性断片の治療的有効用量または予防的有効用量は、個体の疾患状態、年齢、性別および体重、ならびに分子が対象において所望の応答を誘発する能力などの要因に応じて異なる。治療的有効量はまた、治療的に有益な効果が、抗体または抗体部分のあらゆる毒性作用または有害作用を上回る量である。

30

### 【0135】

治療の対象となる患者には、そのような病状の臨床的に認識されている症状または徵候を示す、アルツハイマー病または他のそのようなタウ異常症を有する個体のほかに、そのような病状の症状を現時点では示していない患者も含まれる。アルツハイマー病は死後生検でのみ確定診断されるが、アルツハイマー病に罹患した個体は、「アルツハイマー病関連疾患協会（Alzheimer's Disease and Related Disorders Association）（「ADRDA」）基準を用いて臨床的に診断されている（Carrillo, M.C. et al. (2013) "Revisiting The Framework Of The National Institute On Aging-Alzheimer's Association Diagnostic Criteria," *Alzheimers Dement.* 9(5):594-601 ; Budson, A.E. et al. (2012) "New Criteria For Alzheimer Disease And Mild Cognitive Impairment: Implications For The Practicing Clinician," *Neurologist* 18(6):356-363 ; Sarazin, M. et al. (2012) "Clinical And Research Diagnostic Criteria For Alzheimer's Disease," *Neuroimaging Clin. N. Amer.* 22(1):23-32 ; Husain, M.M. (2005) "Clinical Diagnosis And Management Of Alzheimer's Disease," *Neuroimaging Clin. N. Amer.* 15(4):767-777 ; Small, G.W.

40

50

et al. (1997) "Diagnosis And Treatment Of Alzheimer Disease And Related Disorders. Consensus Statement Of The American Association For Geriatric Psychiatry, The Alzheimer's Association, And The American Geriatrics Society," JAMA 278(16):1363-1371)。または、そのような個体を、相関性がある危険因子（すなわち、アルツハイマー病または他のそのようなタウ異常症と50%を上回る一致をみることが見いだされている1つまたは複数の因子）の存在によって、アルツハイマー病とも他のタウ異常症とも関連のない疾患または病状を有する個体と鑑別することもできる。そのような相関性がある危険因子には、その患者がアルツハイマー病もしくは他のそのようなタウ異常症を来たした親族を有する、または高コレステロール血症もしくはアテローム性動脈硬化症の家族歴を呈するという所見が含まれる。そのような相関性がある危険因子には、患者が、そのような実際の疾患の発生と相関性がある（すなわち、50%を上回る一致をみることが見いだされている）1つまたは複数の遺伝的または生化学的マーカーを有するという所見が特に含まれる。アルツハイマー病のリスクとなるそのような遺伝的マーカーの例には、APP遺伝子における相関性がある突然変異、例えば、APP遺伝子の位置717ならびに位置670および671にある突然変異（それぞれHardy突然変異およびSwedish突然変異と称されている）が含まれる。遺伝的リスクが判明している他の適したマーカーには、プレセニリン遺伝子（PS1およびPS2）ならびにApoE4遺伝子における相関性がある突然変異が含まれる（Bekris, L.M. et al. (2010) "Genetics of Alzheimer Disease," J. Geriatr. Psychiatry Neurol. 23(4):213-227）。

#### 【 0 1 3 6 】

そのようなPS1突然変異には以下の置換が含まれる：  
R35Q; A79V; V82L; L85P; V89L;

V94M; V96F; V97L; F105I; F105L; F105V; L113P; L113Q; Y115C; Y115D; Y115H; T116I; T116N; P117A; P117L; P117R; P117S; E120D; E120D; E120G; E120K; E123K; N135D; N135S; A136G; M139I; M139I; M139K; M139T; M139V; I143F; I143M; I143N; I143T; I143V; M146I; M146I; M146L; M146L; M146V; T147I; L153V; Y154C; Y154N; H163R; H163Y; W165C; W165G; L166H; L166P; L166R; S169L; S169P; S170F; L171P; L173F; L173W; L174M; L174R; F175S; F177L; F177S; S178P; G183V; E184D; V191A; G206A; G206D; G206S; G206V; G209E; G209R; G209V; S212Y; I213F; I213L; I213T; H214D; H214Y; G217D; G217R; L219F; L219P; Q222H; Q222R; Q223R; L226F; L226R; I229F; A231T; A231V; M233I; M233L; M233L; M233T; M233V; L235P; L235V; F237I; F237L; K239N; T245P; A246E; L248R; L250S; L250V; Y256S; A260V; V261F; V261L; L262F; C263F; C263R; P264L; G266S; P267L; P267S; R269G; R269H; L271V; V272A; E273A; T274R; R278I; R278K; R278S; R278T; E280A; E280G; L282F; L282R; L282V; P284L; P284S; A285V; L286P; L286V; T291P; E318G; R358Q; S365A; R377M; G378E; G378V; L381V; G384A; F386S; S390I; V391F; L392P; L392V; G394V; N405S; A409T; C410Y; V412I; L418F; L420R; L424F; L424H; L424R; L424V; A426P; A431E; A431V; A434C; L435F; P436Q; P436S; および I439S

#### 【 0 1 3 7 】

そのようなPS2突然変異には以下の置換が含まれる：

R29H; G34S; R62C; R62H;

R71W; A85V; T122P; T122R; S130L; V139M; N141I; L143H; V148I; R163H; M174V; S175C; Y231C; Q228L; M239V; M230I; A252T; P334R; T430M; および D439A

【 0 1 3 8 】

そのようなApoE4アレルには、 4アレル、 3アレルおよび 2アレルが含まれる (Vergheze, P.B. et al. (2011) "Apolipoprotein E In Alzheimer's Disease And Other Neurological Disorders," Lancet Neurol. 10(3):241-252)。

【 0 1 3 9 】

加えて、いくつかの診断検査が、アルツハイマー病を有する個体を同定するために利用可能である。これらにはCSFのタウレベルおよびA 42レベルの測定が含まれる。タウレベルの上昇およびA 42レベルの低下は、アルツハイマー病の存在を表す。

【 0 1 4 0 】

アルツハイマー病の場合には、事実上すべての人にアルツハイマー病に罹患するリスクがある。このため、本発明の治療用分子は、対象患者のリスクのいかなる評価の必要もなしに、一般集団に予防的に投与することができる。本方法は、アルツハイマー病の既知の遺伝的リスクを有しない個体の予防的処置のために特に有用である。無症候性患者では、処置をあらゆる年齢で開始することができる（例えば、10歳、20歳、30歳）。しかし通常は、患者が40歳、50歳、60歳、70歳、80歳または90歳になるまで処置を開始する必要はない。処置は典型的には、ある期間にわたっての多回投薬投与を必要とする。処置は、抗体を、または治療薬に対する活性化T細胞もしくはB細胞の応答をアッセイすることによってモニターすることができる。応答が低下した場合には、追加投薬の適応となる。ダウン症候群の可能性のある患者の場合は、治療薬を妊娠中の母体に対して、または患者に出生後間もなく投与することによって、処置を出生前に開始することができる。

【 0 1 4 1 】

本発明は、以下を提供する：

1. 非リン酸化タウよりも2000倍を上回る高い選択性でリン酸化タウと免疫特異的に結合しうる結合性分子であって、抗体またはそのエピトープ結合性断片である分子。

2. 抗体のエピトープ結合性断片である、そのような結合性分子の態様。

3. scFvまたはダイアボディである、そのような抗体のエピトープ結合性断片の態様。

4. 位置11および19にあるセリン残基がリン酸化されているタウ396 / 404ペプチド

(SEQ ID NO:7): TDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHL

と免疫特異的に結合する、上記の結合性分子のいずれかの態様。

5. エピトープ結合性断片が以下の1つまたは複数を含む、上記の結合性分子のいずれかの態様：

(a) SEQ ID NO : 12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；

(b) SEQ ID NO : 13のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；

(c) SEQ ID NO : 14のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；

(d) SEQ ID NO : 15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；

(e) SEQ ID NO : 16のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；または

(f) SEQ ID NO : 17のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3。

6. エピトープ結合性断片が以下を含む、上記の結合性分子のいずれかの態様：

(a) SEQ ID NO : 12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；

(b) SEQ ID NO : 13のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；

(c) SEQ ID NO : 14のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；

(d) SEQ ID NO : 15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；

(e) SEQ ID NO : 16のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および

(f) SEQ ID NO : 17のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3。

7. (a) SEQ ID NO : 12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；

(b) SEQ ID NO : 13のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；

10

20

30

40

50

- (c) SEQ ID NO: 14のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3;
- (d) SEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1;
- (e) SEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2; および
- (f) SEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3,

を有し、分子がscFv235 (SEQ ID NO: 18) である、上記の結合性分子の態様。

8. 検出可能に標識されている、上記の結合性分子のいずれかの態様。

9. 検出可能な標識が、蛍光性標識、化学発光性標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様。

10. (A) レシピエント対象の脳におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための医薬の製造における使用のための、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様、または

(B) レシピエント対象の脳におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、上記の検出可能な標識結合性分子の態様の使用。

11. (A) レシピエント対象の脳におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量の検出または測定のための医薬の製造に用いるための、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様、または

(B) レシピエント対象の脳におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；ここで検出または測定は、リン酸化タウタンパク質と結合した結合性分子のインビポでのイメージングを含む。

12. (A) レシピエント対象の脳におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための医薬の製造に用いるための、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様、または

(B) レシピエント対象の脳におけるリン酸化タウタンパク質の存在または量を検出または測定するための、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；ここで検出または測定は、リン酸化タウタンパク質と結合した結合性分子のエクスピボでのイメージングを含む。

13. (A) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための医薬の製造に用いるための、(1) 検出可能に標識された、上記の結合性分子のいずれかの態様；または

(2) 検出可能な標識が、蛍光性標識、化学発光性標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様；または

(B) (1) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；または

(2) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可能な標識が、蛍光性標識、化学発光性標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用。

14. (A) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための医薬の製造に用いるための、(1) 検出可能に標識された、上記の結合性分子のいずれかの態様；または

(2) 検出可能な標識が、蛍光性標識、化学発光性標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様；または

(B) (1) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；もしくは

(2) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可能な標識が、蛍光性標識、化学発光性標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；

ここで医薬は対象に投与されるインビポ医薬である。

10

20

30

40

50

15. (A) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための医薬の製造に用いるための、(1) 検出可能に標識された、上記の結合性分子のいずれかの態様；または

(2) 検出可能な標識が、蛍光性標識、化学発光性標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、上記の検出可能に標識された結合性分子のいずれかの態様；または

(B) (1) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；または

(2) 対象のアルツハイマー病または別のタウ異常症を診断するための、検出可能な標識が、蛍光性標識、化学発光性標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識である、検出可能に標識された結合性分子の上記の態様のいずれかの使用；

ここで医薬は対象の生検試料とともにエクスピボでインキュベートされる。

16. タウ異常症が、前頭側頭型認知症、17番染色体に連鎖したパーキンソニズム (FTDP-17)、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、神経原線維変化型認知症 (tangle only dementia)、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症パーキンソニズム・認知症複合、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハラーフォルデン・シュバッツ病 (Hallerworden-Spatz disease)、封入体筋炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症 (multiple system atrophy)、ニーマン・ピック病C型、ブリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、亜急性硬化性全脳炎、筋強直性ジストロフィー、神経原線維変化を伴う非グアナミン運動ニューロン疾患、脳炎後パーキンソニズム、急性外傷性脳損傷および慢性外傷性脳症を含む群から選択される、そのような使用のいずれかの態様。

#### 【実施例】

##### 【0142】

以下の実施例は、本発明の診断方法または治療方法における組成物に関するさまざまな方法を例示している。これらの実施例は、例示を意図しており、本発明の範囲を限定することは全く意図していない。

##### 【0143】

#### 実施例1

##### scFv235の単離

ハイブリドーマクローン6B2G12から作製したscFv分子（タウタンパク質のP-Ser396 / 404に対して産生させた）(Congdon, E.E. et al. (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcgamma Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288:35452-35465 ; Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol. Chem. 288(46):33081-33095)。手短に述べると、ハイブリドーマ細胞株6B2G12を、ストレプトマイシン (50 μg / ml) およびペニシリング (50U / ml) を含有するRPMI培地中で5% CO<sub>2</sub>を用いて37 °Cで増殖させ、RNA単離キット (Promega) のプロトコールに従ってそのmRNAを単離して精製し、その後に-80 °Cで保存した。第一鎖cDNAは、第一鎖cDNA合成キット (Takaraキット (TAK6115A)) のプロトコールに従って構築した。

##### 【0144】

クローンを、タウ-セリン396 / 404 (SEQ ID NO : 27) :

RENAKAKTDHGAEIVYKSPVSGDTSPRHL

およびタウ-ホスホセリン396 / 404 (SEQ ID NO : 28) :

RENAKAKTDHGAEIVYKSPVSGDTSPRHL

の配列を有するペプチド (Keck Foundation, Yale University) を用いて、それらがP-Ser396、404タウエピトープに対して免疫特異的であるscFv分子を発現する能力に関してスクリーニングしたが、ここで、SEQ ID NO : 28の位置18および26にある下線を付したセリ

10

20

30

40

50

ン残基（タウ（SEQ ID NO:1）の位置396および404に対応）はリン酸化されている。これらのペプチドを、パニング、ELISA、および結合試験におけるBiacoreのためにも用いた。数千種ものクローンが作製され、そのうち無作為に選択した90種のクローンの結合を図1A～1Bに描写している。選択したそのようなscFv分子の中にscFv235があった（図1A参照）。

#### 【0145】

##### 可溶性抗体の产生

scFvは、Barbas, C. F., III et al. (2001) "Phage Display: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYに記載された通りに产生させた。  
手短に述べると、scFv235を、1リットル当たり50 μg/mlのカルベニシリンおよび20mlの1M MgCl<sub>2</sub>を含むsuper broth (SB) 培地 (1リットル当たり10gのMOPS、30gのトリプトン、20gの酵母エキス) 中で、コンピテントノンサブレッサー大腸菌 (E. coli) 細胞 (Top 10細胞、Invitrogen) において产生させた。Barbas, C. F., III et al. (2001)に記載された通りに、1mM IPTG (イソプロピル-D-チオガラクトシド) を添加することによって培養物を誘導し、scFv235を単離した。

#### 【0146】

##### 実施例2

##### scFv235の特性決定

それらのうち1つの構築物であるscFv235は、ペプチドをELISAプレート上にコーティングした場合（図2A）も、分子が固定化されて結合性ペプチドが溶液中にあるBiacoreでも両方とも、相対的に優れたホスホ-エピトープ特異性を示した。その上、scFv235またはその親抗体である6B2G12は、アルツハイマー病を有していた個体の脳モジメント中のタウタンパク質を免疫沈降させ（図2B～2C）、かつアルツハイマー病およびピック病の固定脳組織上で病的タウとの部分的な共局在染色を示した（図2D～2E）。意義深いこととして、scFv235は完全長タウタンパク質のバンドのみを検出し、一方、6B2G12は完全長のものと分解タウ断片の両方と結合した

#### 【0147】

Hisタグ標識したscFv235を、Qiagenキットプロトコールに従い、重力式カラムにローディングしたNi-NTAアガロース樹脂を用いて精製した。続いて抗体断片をPBS中で透析し、さらに特性決定のために用いた。まず、精製scFvのホスホ選択性を、タウ-ホスホ-セリン396 / 404およびタウ-セリン396 / 404ペプチドを4℃で一晩かけてプレート上にコーティングし、プロッキングの後に2.5 μgのscFv235とともに2時間インキュベートする、Asuni, A. A. et al. (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangie Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements," J. Neurosci. 27:9115-9129に記載された通りのELISAアッセイによって確かめた。HRP結合抗HA二次抗体を用いたところ、結合したscFv235は450nmで検出された。

#### 【0148】

##### 表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析

scFv235およびその親抗体である6B2G12のこれらの標的分子に対する結合動態を、Biacore 2000 (GE Healthcare) におけるSPRにより、製造元の指示および以前の記載に従って測定した (Krishnaswamy, S. et al. (2009) "Cloning Antifungal Single Chain Fragment Variable Antibodies By Phage Display And Competitive Panning Elution," Anal. Biochem. 395:16-24; Krishnaswamy, S. et al. (2011) "Isolation And Characterization Of Recombinant Single Chain Fragment Variable Anti-Idiotypic Antibody Specific To Aspergillus fumigatus Membrane Protein," J. Immunol. Methods 366:60-68)。  
手短に述べると、scFv235 / 抗体 (10 μg/ml) を10mM酢酸ナトリウム、pH 5.0中に希釈し、アミンカップリングキットを用いて別々のCM5センサーチップ上に固定化した（流速5 μl / 分で接触時間7分）。未反応の表面結合材料はエタノールアミンでブロックした。scFv235も抗体も用いずに同じやり方で調製した各センサーチップの1つのチャンネルを、ペプチドの非特異的結合をモニターするために用いた。測定はすべて、HBS-EP緩衝液 (10mM H

EPES、pH 7.4、150mM NaCl、3.4mM EDTAおよび0.005%の界面活性剤P20)を流速5μl/分で25で用いて行った。各測定後に、チップ表面を、500mM NaClおよび0.1MグリシンHCl、pH 8.0を含有する緩衝液10μlによって再生させた。タウ-ホスホセリン396/404ペプチドおよびタウ-セリン396/404ペプチドの結合をさまざまな濃度で決定し、BIA評価ソフトウェアを用いて平衡解離定数(Kd)を $K_d = k_{off} / k_{on}$ として算出した。表5および表6は、6B2G12抗体およびscFv235の結合の動態および特異性をまとめている。

## 【0149】

(表5)

分析物ペプチド	K <sub>D</sub> 親和性 (M)	
	6B2G12	scFv235
ホスホ-タウ-セリン396/404	$3.95 \times 10^{-10}$	$1.04 \times 10^{-6}$
タウ-セリン396/404	$2.51 \times 10^{-9}$	$4.06 \times 10^{-3}$

10

## 【0150】

非リン酸化ペプチド(SEQ ID NO:27)を基準とする、リン酸化ペプチド(SEQ ID NO:28)に対するscFv235の選択性(1/[ $1.04 \times 10^{-6} / 4.06 \times 10^{-3}$ ])は $3.9 \times 10^3$ である。

## 【0151】

(表6)

分析物 ペプチド	会合(1/Ms)		解離(1/S)		K <sub>D</sub> (M)	
	6B2G12	scFv235	6B2G12	scFv235	6B2G12	scFv235
ホスホ-タウ- セリン396/404	$3.69 \times 10^6$	$3.93 \times 10^3$	$1.46 \times 10^{-3}$	$3.9 \times 10^{-3}$	$3.95 \times 10^{-10}$	$9.94 \times 10^{-7}$
タウ-セリン 396/404	$1.16 \times 10^6$	9.74	$2.92 \times 10^{-3}$	$3.96 \times 10^{-2}$	$2.51 \times 10^{-9}$	$4.06 \times 10^{-3}$

20

## 【0152】

scFv235はしたがって、リン酸化P-Ser396/404ペプチドに対する親和性が抗体6B2G12よりもおよそ2,508分の1であり(すなわち、ホスホ-タウ-セリン396/404に関して、[6B2G12会合/6B2G12解離]と[scFv235会合/scFv235解離]との比=2,508である)、非リン酸化P-Ser396/404ペプチドに対する親和性は抗体6B2G12よりも162万分の1である(すなわち、非リン酸化タウ396/404に関して、[6B2G12会合/6B2G12解離]と[scFv235会合/scFv235解離]との比=162万である)。

30

## 【0153】

抗体6B2G12はそれ故、非リン酸化ペプチドに対するK<sub>a</sub>が、リン酸化ペプチドに対するそのK<sub>a</sub>の約3分の1であり、非リン酸化ペプチドに対するK<sub>d</sub>はリン酸化ペプチドに対するそのK<sub>d</sub>の約2倍である。対照的かつ予想外のことには、この抗体に由来するscFv235が示す非リン酸化ペプチドに対するK<sub>a</sub>は、リン酸化ペプチドに対するそのK<sub>a</sub>の約400分の1であり、非リン酸化ペプチドに対するK<sub>d</sub>はリン酸化ペプチドに対するそのK<sub>d</sub>の約10分の1である。

40

## 【0154】

免疫沈降

AD脳ホモジネート(250μg)中のタウのscFv235または抗体(10μg)による免疫沈降には、Dynabeads His-Tag単離キットおよびDynabeadsプロテインGキット(Invitrogen)を、キットの指示にあるプロトコールに従って用いた。プルダウンされたタンパク質を10%アクリルアミドゲルで分離し、その後にウエスタンプロット法を行った。タンパク質をゲルからニトロセルロース膜上に移行させた。膜をPBS中の5%脱脂乳によって室温で1時間かけてブロックした。続いてプロットを、CP27(ヒト特異的タウ抗体)または全タウ抗体(Dako)の1:1000希釈物とともに4で一晩インキュベートした。これに続いて、5%脱脂乳を含むPBS中でHRP結合二次抗体(1:1000)との2時間のインキュベーションを行った。洗浄後に、膜上のタンパク質を増強化学発光(ECL; Pierce)によって検出した。免疫

50

反応バンドの画像を、Fuji LAS-4000イメージングシステムを用いて取得した。

#### 【0155】

scFv分子は50～70kDaの範囲にあるタウのバンドを特異的にプルダウンし、ADおよびピック病の脳切片中の病的タウと結合し、Biacoreでホスホ-エピトープ ( $1.04 \times 10^{-6}$ ～ $6.05 \times 10^{-8}$ M) および非ホスホ-エピトープ ( $4.06 \times 10^{-3}$ ～ $1.86 \times 10^{-8}$ M) に対する親和性を有した。

#### 【0156】

##### ヒト脳組織染色

His-Tag精製したscFv235を、ALEXA（登録商標）FLUOR 568タンパク質標識キット（Molecular Probes, Invitrogen）をキットの指示に従って用いて標識した。いくつかのAD脳、ピック病の脳および年齢を一致させた対照脳（National Disease Research Interchange）を、標準的な手順を用いて568-標識scFv235によって染色した。手短に述べると、スライドにマウントしたパラフィン包埋脳切片をキシレン中で脱パラフィン処理し、エタノール勾配で浄化してPBS中で洗浄し、その後に0.3%ギ酸中でエピトープのアンマスキングを行い、PBS洗浄後に、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のscFv235とPHF1タウ抗体培養上清の1:1000希釈物の混合物とともに4℃で一晩インキュベートした。結合したPHF1は、蛍光タグで標識した二次抗体（Alexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG、1:500希釈、Life Technologies）によって検出した。核は、DAPI、およびProLong Gold退色防止試薬封入剤（Life Technologies）を用いてカバーガラスをかけたスライドを用いて検出した。画像は、Fluoview 1000レーザー走査共焦点顕微鏡（Olympus）により、フルオロフォアの特性に応じた波長およびフィルターを用いて取り込んだ。

#### 【0157】

##### 実施例3

##### 動物、標識抗体の注射およびIVISイメージング

その優れた特性を考慮した上で、scFv235をマウスにおけるインビボイメージングのために選択した。マウスはAAALAC認可施設で飼育し、食餌および水は自由摂取させた。実験はIACUCにより承認されたプロトコールの下で行った。3種類のトランスジェニックタンゲルモデルを用いた：htau (Andorfer, C. et al. (2003) "Hyperphosphorylation And Aggregation Of Tau In Mice Expressing Normal Human Tau Isoforms," J. Neurochem. 86: 582-590) ; htau/PS1 (Boutajangout, A. et al. (2010) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model," J. Neurosci. 30:16559-16566) 、およびJNPL3 (Lewis, J. et al. (2000) "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P30 1L) Tau Protein," Nat. Genet. 25:402-405)。対照は、野生型マウスおよびトランスジェニックA斑マウス (Tg-SwDI (Davis, J. et al. (2004) "Early-Onset And Robust Cerebral Microvascular Accumulation Of Amyloid Beta-Protein In Transgenic Mice Expressing Low Levels Of A Vasculotropic Dutch/Iowa Mutant Form Of Amyloid Beta-Protein Precursor," J. Biol. Chem. 279:20296-20306) )とした。

#### 【0158】

頸動脈内注射は、Asuni, A.A. et al. (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements," J. Neurosci. 27, 9115-9129によって記載された通りに行った。手短に述べると、マウスに2%イソフルランで麻酔を施し、30%  $\text{O}_2$ 中にて1.5%イソフルラン下に維持した。頸動脈鞘を露出させた後に、左総頸動脈（CCA）、外頸動脈（ECA）および内頸動脈（ICA）を正中切開によって露出させた。絹糸縫合でECAの遠位端を結紮し、左CCA、ICAおよび翼口蓋動脈を一時的に結紮した。PE-10チューブ（Becton Dickinson, San Diego, CA）に接続した30ゲージ針を1mlシリンジに結びつけ、続いて400～500  $\mu\text{l}$ のPBS中にある250  $\mu\text{g}$ の標識scFv235を、10～15分間の期間をかけて総頸動脈内に投与した。術後出血を防ぐためにKRAZY（登録商標）グルーを注射部位に適用した。または、マウスの大腿静脈内に同じ用量を注射した。右大腿の内側を剃毛し、ベタジン溶液および

10

20

30

40

50

70%エタノールで清拭した。大腿の内側の皮膚に、静脈に平行するように小切開(0.5cm)を加えた。皮膚にボタンホール切開を行うと、大腿静脈が見えるようになる。PE-10チューブに接続した30ゲージ針を1mlシリンジに結びつけ、大腿静脈内に上向きに穿刺した針を通して3~5分間かけて徒手的に投与した。針を除去した上で、出血を避ける目的で穿刺部位を綿付きアプリケーターで圧迫した。血流が止まった直後に、4/0編み絹糸で単一結節縫合を用いて皮膚を縫合した。IVISイメージングのために、scFv235または6B2G12をVIVOTAG 680 XL FLUOROCROME(商標)(Perkin Elmer)と結合させた。毛皮によって引き起こされる光回折を避けるためにマウスの頭部および身体を剃毛した。注射後に、図3A~3Dに詳記されているさまざまな間隔で、マウスをIVIS Lumina XR(Perkin Elmer)における675nmの励起フィルターおよびCy5.5検出フィルターを用いるイメージングに供した。

10

### 【0159】

フルオロフォアでタグ標識したscFv235の頸動脈内注射は、トランスジェニックタウ異常症マウス(n=6)では脳内の染色されたニューロン内タウ凝集物との部分的(タウ-5)ないし完全な共局在(PHF-1)をもたらしたが、野生型マウス(n=4)ではそれはみられなかった。その上、scFvは、タウ凝集物を含有することが知られているエンドソーム-オートファゴソーム-リソソームのマーカーとも共局在し、このことはこの相互作用がこれらの分解経路において起こっていることを示唆する。生存マウスにおけるIVISイメージングによる予備的所見では、右頸動脈内注射から約30分後にイメージングを行った場合、トランスジェニックマウスの右半球では野生型マウスと比較して実質的により強いシグナルが示されている。このシグナルは徐々に減衰し、数時間が経つうちに脳から末梢に広がった。

20

### 【0160】

#### IVIS画像の分析

画像は、Perkin ElmerのLiving Imagingソフトウェアを、オンラインのプロトコールに従って用いて分析した。囲まれた関心対象領域(脳)内の総放射効率(合計シグナル強度)を算出した。総放射効率は：

$$\text{総放射効率} = \frac{p/\text{秒}/\text{cm}^2/\text{sr}}{\mu\text{W}/\text{cm}^2}$$

として算出した。

30

### 【0161】

#### マウス脳切片の免疫組織化学

イメージングの後に、組織を、Asuni, A.A. et al. (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements," J. Neurosci. 27, 9115-9129に記載された通りに加工処理した。手短に述べると、マウスにPBSの経大動脈的灌流を行い、脳を摘出して、2%PLP中で一晩かけて固定し、2%DMSOを含む20%グリセロールリン酸緩衝液中に一晩おき、繰り返して、680XL-scFv235シグナルを検出するため、ならびにタウタンパク質およびエンドソーム/オートファゴソーム/リソソーム系のマーカーとの共染色によってscFvの細胞内位置を決定するために、切片にした。脳の連続的な冠状40μm切片を調製し、標準的なプロトコールに従って、浮遊切片に対して免疫蛍光染色を行った。手短に述べると、PBS洗浄、0.3% Triton-X-100による透過処理、および5% BSA中のブロッキング後に、組織を、抗体(1:500~1:1000)とともに4度で一晩インキュベートした[タウ(タウ5、MC1、PHF1)、ミクログリア(Iba1)、初期エンドソーム(EEA1)、後期エンドソーム(rab7)、後期エンドソーム/リソソーム(lamp2、P62)、およびオートファゴソーム(LC3およびP62)]。結合した抗体はAlexa Fluor 488ヤギ抗マウス/ウサギIgG(Invitrogen)によって、核はDAPIによって検出した。ProLong Goldを用いてカバーガラスをかけた後に、LSM 700 Zeiss共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて組織を分析した。各標識による染色およびそれらの共局在の程度を0~4の半定量的尺度を用いて採点し、ここで1~4はこれらのパラメーターの度合いを指し示す(1:わずか; 2:低め; 3:中程度; 4:高度)

40

50

。そのような分析を以下に関して行った：1) 注射した蛍光タグ標識scFv / 抗体の残留シグナル；2) 脳タウ病理の度合い；3~4) 注射したscFv / 抗体シグナルの3) タウ抗体染色または4) エンドソーム / リソソーム / オートファゴソーム抗体染色との共局在の程度。

#### 【 0 1 6 2 】

##### 統計

図6A~6Fに記載された種々のパラメーター間の相関分析を、Spearman順位相関によって分析した。scFv235または抗体の脳組織シグナルが1つのパラメーターである場合には、注射から数時間以内に摘出したマウス脳のみを含めたが、これは脳組織シグナルが時間経過とともに弱くなるためである。IVISシグナルとタウ病理との相関については、注射した全マウスを含めた。

10

#### 【 0 1 6 3 】

##### イメージング分析

インビボイメージングシステム（「IVIS」）を用いるイメージング検査により、近赤外色素で標識したscFv235を右頸動脈に注射した場合にトランスジェニック（「tg」）タウ異常症マウスからの強い脳シグナルが判明した（ $250\text{ }\mu\text{g} / 450\sim500\text{ }\mu\text{l}$ ）。シグナルは、少なくとも最長で250~300分にわたって高く保たれ、比較的安定していた（図3A~3D）。P301Lタウ突然変異を伴うXNPL3マウス（Lewis, J. et al. (2000) "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein," Nat. Genet. 25:402-405）は、全体的なタウ病理がより軽度であるhtau / PS1マウス（Boutajangout, A. et al. (2010) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model," J. Neurosci. 30:16559-16566）よりも強いシグナルを示した。scFv235を注射したP301Lマウスからの脳シグナルは35~38分にピークがあり（注射前ベースラインシグナルの1714%）、注射から82分後および330分後にも強く保たれた（それぞれ1675%および1468%）。htau / PS1マウスでは、scFv235脳シグナルは37分にピークがあり（注射前ベースラインシグナルの1443%）、注射から65分後および176分後にも強く保たれた（それぞれ1144%および1093%）。htau / PS1モデルでは、脳および末梢の両方ともにP301Lマウスよりもシグナルが弱かった。各遺伝子型の中ではより高齢のマウスの方がより若齢のマウスよりもシグナルが強かったが、これはより進展したタウ病理を有するはずであることから予想されたことであった。同じプローブを注射した野生型（wt）マウス、またはscFvを伴わずに蛍光性色素のみを投与されたタングルマウスでは、わずかなシグナルしか観察されなかった。scFvの由来元となった抗体である6B2G12については、同じ用量を同じ経路を介して注射した場合には同様の結果が得られたが、そのシグナル強度は実質的により弱かった。注射から20~95分後のイメージングでは、ベースライン値の600~632%のシグナルが示され、170分後および291分後の描写では幾分減少していた（それぞれ497%および431%）。scFv235を注射した比較的高齢（11~12カ月）のP301Lマウスでは、ピーク脳シグナル [ 総放射効率 (TRE) ] がそれぞれ $2.23 \times 10^{11}$ および $2.64 \times 10^{11}$ であったが、一方、より若齢のマウス（3カ月および8カ月）では、それぞれ $1.88 \times 10^{11}$ および $1.86 \times 10^{11}$ とピークシグナルがより弱かった。同じP301Lモデル（7~10カ月）は、6B2G12注射後に強いもののより弱い脳シグナルを有し、 $2.20 \times 10^{11} \sim 1.16 \times 10^{11}$ の範囲であった。同程度のシグナル強度は、scFv235を注射した高齢htau / PS1マウス（22カ月；ピークは $1.40 \times 10^{11}$ ）でも観察されたが、タウ病理を持たないことが確認された7カ月齢htau / PS1マウスでは限定的であった。野生型マウス（12~13カ月）および1匹のhtauマウス（13カ月）はすべての時点で低シグナルであり、タウ病理を有していなかった。高齢htau / PS1マウス（23カ月）およびP301Lマウス（7カ月）への蛍光タグのみの注射は、scFv235または6B2G12を注射された野生型マウスよりも高度の脳シグナルをもたらしたが、それはscFvまたは抗体を注射されたタウ異常症マウスのいずれよりも実質的に弱かった。これらの2種の色素が注射されたマウスは高度のタウ病理を有することが確認された。

20

#### 【 0 1 6 4 】

脳におけるscFvまたは抗体の存在および細胞内位置を確認するためのさらなる分析のた

30

40

50

めに、脳をその後に摘出した（図4A～4D）。両方とも主としてニューロン内で検出され、病的タウタンパク質と部分的に共局在しており、エンドソーム-オートファゴソーム-リソソーム系とはすべてで共局在していた。より小型の部分がミクログリア内で検出された。若齢であること、モデルの違い、またはモデル内のはらつきが理由で、タウ病理が限定的であったトランスジェニックマウスは、診断用リガンド注射後に弱いIVIS脳シグナルを有していた。

#### 【0165】

本発明者らはまた、多回注射および臨床使用に対してより有用に適用可能である、静脈内（i.v.）経路を用いる実行可能性についても評価した。重要なこととして、同じ用量でこの投与経路を用いた場合にも両方のリガンドで強い脳シグナルが観察され、このことは初回通過肝クリアランスを受けても十分な量のリガンドが脳内に入り、タウ病変をはっきりと検出することを可能にしたことを指し示している。静脈内注射マウスではより長期のイメージングセッションを実施しており、8～14日をかけてシグナルが徐々に排除されたことが示されている（図3C～3D）。皮内（i.c.）注射については、scFvを注射したマウスの方が、タウ抗体を注射したマウスよりも一般により強いシグナルを示した。静脈内注射したP301Lマウスでは、ピークのscFv235脳シグナルは18分（注射前ベースラインの1754%）であり、210分ではより弱いシグナルとなり（ピークのシグナルから18%の低下）、8日の時点では実質的に元に戻った（43%の低下）。6B2G12抗体を注射したマウスでは、脳シグナルは25分の時点で強く（注射前ベースラインの1211%）、35分でピークとなり（1445%）、120分ではより弱いシグナルとなり（ピークシグナルから11%の低下）、8日目および12日目までにははるかに弱くなった（それぞれ67%および70%の低下）。対照プールIgGを注射したP301Lマウスは、極めて高度のタウ病変を有したにもかかわらずIVISシグナルは少なめであり、脳シグナルはタウマーカーと共に局在していなかった。このことは、対照IgGの頸動脈内注射後のP301Lマウスにおける本発明者らの以前の組織所見と一致する（Asuni, A.A. et al. (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements," J. Neurosci. 27:9115-9129）。野生型（Wt）マウスまたはA斑を有するマウス（Tg-SwDI, (Davis, J. et al. (2004) "Early-Onset And Robust Cerebral Microvascular Accumulation Of Amyloid Beta-Protein In Transgenic Mice Expressing Low Levels Of A Vasculotrophic Dutch/Iowa Mutant Form Of Amyloid Beta-Protein Precursor," J. Biol. Chem. 279:20296-20306）は、すべての時点で脳シグナルがわずかであり、タウ病変に対するこれらのプローブの特異性を強く示している。皮内注射の場合と同じく、scFvまたはタウ抗体は病的タウと共に局在し、これらのプローブはニューロン内部でエンドソーム-オートファゴソーム-リソソーム系において検出され（図3A～3D、図4A～4D）、ミクログリア内でもある程度検出された。

#### 【0166】

scFv235は、P301L（F6）およびhtau / PS1（A47）タンブルマウスへの頸動脈内注射後に脳ニューロン内部で病的タウと共に局在していることが見いだされた（図5）。脳を最後のイメージングセッション後に採取した。タウ凝集物はPHF-1およびタウ-5抗体とともに検出され、scFv235と部分的な共局在を示している。核特異的染色を、細胞核を同定するために用いた。図5はまた、対照野生型マウス（R1）では頸動脈内注射後にscFv235の検出可能な脳取り込みがないことも示している。タウ-5は主に正常軸索タウを染色し、病的PHF1染色は観察されなかった。

#### 【0167】

以上をまとめると、両方の経路での投与後の、切片化した脳からのIVISシグナル、残留scFvまたは抗体シグナルの度合い、およびタウ病変の程度の比較により、これらのパラメーター間の優れた相関が明らかとなった（図4A～4D、表7、表8（パートA～C）、図5および図6A～6F）、scFv : IVISシグナルと脳組織scFvシグナルとの比較、 $r = 0.93$ 、 $p < 0.0006$ ；IVISシグナルと脳タウ病変との比較、 $r = 0.86$ 、 $p < 0.0002$ ；脳組織scFvシグナルと脳タウ病変との比較、 $r = 0.87$ 、 $p < 0.01$ ；6B2G12 : IVISシグナルと脳組織6B2G12シグナルとの

10

20

30

40

50

比較、 $r = 0.87$ 、 $p = 0.1$ ；IVISシグナルと脳タウ病理との比較、 $r = 0.9$ 、 $p < 0.0004$ ；脳組織6B2G12シグナルと脳タウ病理との比較、 $r = 0.8$ 、 $p = 0.05$ 。これらの所見は、この特定のscFv、親抗体および全体的アプローチが、生存動物におけるタウ病理を検出して、その度合いの評価を評価する上で非常にうまく作用したことを指し示している。

【0168】

(表7) 診断用プローブscFv235または6B2G12抗体の頸動脈内または静脈内注射を受けたマウスのIVISイメージング検査の概要

注射経路 および プローブ	マウス	結果	
目的：		脳内でのscFv235の取り込みおよびニューロン内部の病的タウとの結合	
結合色素：		Alexa Fluor 568	
頸動脈内- scFv235	3 htau/ PS1	Tau5およびMC1抗体とよく共局在する良好なscFvシグナル	
頸動脈内- scFv235	2 WT	限定的なscFvシグナル	
目的：		scFv235/6B2G12に関するライブIVISイメージング	
結合色素：		VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME (商標)	
頸動脈内- scFv235	3 htau/ PS1	IVISシグナル	染色シグナル
		B32マウスについては イメージングを行わなかった	B32マウスについては、タウ凝集物および エンドソーム/オートファゴソーム/リソソーム (e/a/l)マーカーとよく共局在する強い scFvシグナル
		BB5マウスについては 弱いシグナル	BB5マウスについては弱いscFvシグナルで、 タウ病理はなし
		A47マウスについては 右半球に強いシグナルがあり、 最長で4時間までに 緩徐に減少する	A47マウスについては、タウ凝集物および e/a/lマーカーとよく共局在する 強いscFvシグナル
頸動脈内- scFv235	4 P301L	強いscFvシグナル、 5時間後も持続	タウ凝集物およびe/a/lマーカーと よく共局在する強いscFvシグナル
頸動脈内- scFv235	2 WT および 1 htau	弱いシグナル	弱いscFvシグナル。タウ病理は限定的(htau) またはなし(wt)
頸動脈内- 遊離色素	2 P301L	弱めのシグナル	タウ凝集物と共局在しない 弱いシグナル
頸動脈内- 6B2G12	3 P301L	強いシグナル、 以後3~5時間で緩徐に減少	タウ凝集物およびe/a/lマーカーと よく共局在する強い6B2G12シグナル
頸動脈内- 6B2G12	3 WT	弱いシグナル	弱い6B2G12シグナル;タウ病理はなし
静脈内- scFv235	3 P301L	最長で1時間は強いシグナル、 以後3時間で緩徐に減少	7~31日後に弱いscFvシグナル、 タウ凝集物およびe/a/lマーカーと よく共局在する
静脈内- scFv235	1 TgSwDI, 1 WT	弱いシグナル	弱いscFvシグナルおよびタウ抗体シグナル
静脈内- 6B2G12	3 P301L	最長で1時間は強いシグナル、 以後3時間で緩徐に減少	7~31日後に弱いscFvシグナル、 タウ凝集物およびe/a/lマーカーと よく共局在する
静脈内- 6B2G12	1 Tg-SwDI, 1 WT	弱いシグナル	弱い6B2G12シグナル。タウ病理はなし
静脈内- 対照IgG	2 P301L	弱めのシグナル	弱い対照IgGシグナル。高度のタウ病理、 しかし対照IgGはタウ凝集物と共局在せず

【0169】

(表8) (パートA) IVISシグナル(最大総放射効率)、ならびに脳切片からのプローブシグナル、タウ病理、ならびに注射したプローブとタウタンパク質およびエンドソーム-オートファゴソーム-リソソーム系のさまざまなマーカーとの共局在の半定量的評価

マウスID	系統	齢数 (月)	注射した材料/経路 頸動脈内 (IC) 静脈内 (IV)	IVIS-最大 総放射効率	注射後の 脳摘出
<b>BB8</b>	P301L	8	IC- scFv235	1.86E+11	180 分
<b>A12</b>	P301L	12	IC- scFv235	2.64E+11	330 分
<b>A13</b>	P301L	11	IC- scFv235	2.23E+11	252 分
<b>F6</b>	P301L	3	IC- scFv235	1.88E+11	280 分
<b>A50</b>	P301L	9	IC - 6B2G12	1.16E+11	291 分
<b>A52</b>	P301L	9	IC - 6B2G12	1.23E+11	235 分
<b>C1</b>	P301L	7	IC - 6B2G12	2.20E+11	7日目
<b>B32</b>	htau/PS1	23	IC - scFv235	-	120 分
<b>A47</b>	htau/PS1	22	IC- scFv235	1.40E+11	200 分
<b>BB5</b>	htau/PS1	7	IC- scFv235	2.56E+10	200 分
<b>R1</b>	WT	11	IC- scFv235	4.36E+10	125 分
<b>4</b>	WT	8	IC- scFv235	1.34E+10	265 分
<b>N32</b>	htau	11	IC- scFv235	3.87E+10	7日目
<b>A56</b>	htau/PS1	23	IC - 680 色素	7.45E+10	122 分
<b>D24</b>	P301L	7	IC - 680 色素	6.56E+10	165 分
<b>1</b>	WT	8	IC - 6B2G12	1.22E+10	290 分
<b>2</b>	WT	8	IC - 6B2G12	1.48E+10	225 分
<b>3</b>	WT	8	IC - 6B2G12	1.21E+10	180 分
<b>A55</b>	P301L	9	IV- scFv235	2.07E+11	7日目
<b>B11</b>	P301L	13	IV- scFv235	2.28E+11	31日目
<b>E19</b>	P301L	8	IV- scFv235	1.13E+11	7日目
<b>A49</b>	P301L	11	IV - 6B2G12	1.48E+11	12日目
<b>C2</b>	P301L	7	IV - 6B2G12	1.85E+11	12日目
<b>B15</b>	P301L	13	IV - 6B2G12	7.62E+10	31日目
<b>VN139</b>	Tg-SwDI	12	IV- scFv235	1.58E+10	31日目
<b>6</b>	WT	8	IV- scFv235	1.11E+10	7日目
<b>VN142A</b>	Tg-SwDI	12	IV - 6B2G12	1.49E+10	31日目
<b>7</b>	WT	8	IV - 6B2G12	8.95E+09	7日目
<b>D13</b>	P301L	13	IV- 対照 IgG	8.94E+10	16日目
<b>D15</b>	P301L	13	IV- 対照 IgG	9.03E+10	16日目

【 0 1 7 0 】

(表8) (パートB) IVISシグナル(最大総放射効率)、ならびに脳切片からのプローブシグナル、タウ病理、ならびに注射したプローブとタウタンパク質およびエンドソーム-オートファゴソーム-リソソーム系のさまざまなマーカーとの共局在の半定量的評価

10

20

30

マウスID	切片中の 脳シグナル	脳の タウ病理	タウマーカーとの共局在		
			Tau5	MC1	PHF1
BB8	+++	+++	+++	+++	+++
A12	++++	++++	+++	+++	+++
A13	++++	+++	+++	+++	+++
F6	+++	++	+++	+++	+++
A50	+++	+++	+++	+++	++
A52	+++	+++	+++	+++	+++
C1	++	++++	+++	+++	+++
B32	+++	+++	+++	+++	+++
A47	+++	+++	+++	+++	+++
BB5	+	0	0	0	0
R1	+	0	0	0	0
4	+	0	0	0	0
N32	+	0	+	0	+
A56	+	++	0	0	0
D24	++	+++	0	0	0
1	+	0	0	0	0
2	+	0	0	0	0
3	+	0	0	0	0
A55	++	+++	++++	++++	+++
B11	+	+++	++++	++++	+++
E19	+	+++	++++	++++	+++
A49	++	+++	++++	++++	++
C2	++	+++	++++	++++	++
B15	+	+++	++++	++++	++
VN139	0	0	0	0	0
6	+	0	0	0	0
VN142A	0	0	0	0	0
7	+	0	0	0	0
D13	+	+++	0	0	0
D15	+	+++	0	0	0

## 【 0 1 7 1 】

(表8) (パートC) IVISシグナル(最大総放射効率)、ならびに脳切片からのプローブシグナル、タウ病理、ならびに注射したプローブとタウタンパク質およびエンドソーム-オートファゴソーム-リソソーム系のさまざまなマーカーとの共局在の半定量的評価

10

20

30

マウス ID	エンドソーム/リゾーム/自己貪食マーカーとの共局在			
	EEA1	Rab7	LC3	P62
BB8	+++	+++	+++	+++
A12	+++	+++	+++	+++
A13	+++	+++	++++	+++
F6	+++	+++	++++	+++
A50	+++	+++	+++	+++
A52	+++	+++	+++	+++
C1	+++	+++	+++	+++
B32	+++	+++	+++	+++
A47	+++	+++	+++	+++
BB5	0	0	0	0
R1	0	0	0	0
4	0	0	0	0
N32	+	0	0	0
A56	0	0	0	0
D24	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
A55	+++	+++	+++	+++
B11	+++	+++	+++	+++
E19	+++	+++	+++	+++
A49	+++	+++	+++	+++
C2	+++	+++	+++	+++
B15	+++	+++	+++	+++
VN13 9	0	0	0	0
6	0	0	0	0
VN14 2A	0	0	0	0
7	0	0	0	0
D13	-	-	-	-
D15	-	-	-	-

## 【0172】

したがって、以上をまとめると、モノクローナルタウ抗体のscFv分子を、ファージディスプレイ技術を用いて作製した。詳細な特性決定の後に、scFv235を、生存しているタウ異常症マウスにおける診断用イメージングプローブとして評価した。scFv235は、2種のタウ異常症タングルマウスモデルにおける末梢注射後に強い脳シグナルを一貫して示したが、野生型およびA斑マウスではそうではなかった。親抗体の投与は類似の結果をもたらしたが、シグナル強度はより弱かった。両方のプローブとも、ニューロン内タウ凝集物、およびエンドソーム/オートファゴソーム/リソソーム経路のマーカーと共に局在した。

## 【0173】

本データは、末梢性に投与したタウ抗体およびそれらの誘導体を、生存動物におけるタウ脳病変のイメージングのために用いることを示している。重要なこととして、脳シグナル強度はタウ病理の程度と極めて良好な相関性があり、このことからこのアプローチの実験的および臨床的使用には大きな意義がある。これはタウ病理の非侵襲的モニタリングのために、およびタウ異常症の動物モデルにおける治療有効性に関して、この形態で用い

10

20

30

40

50

ることができ、そのようなリガンドには同じことを目的とする臨床用PETリガンドとして大きな可能性がある。

#### 【0174】

IVISシグナルと、脳組織における残留プローブシグナル、およびタウ病理との間の優れた相関は、このアプローチが、ヒトおよび関連する動物モデルにおけるアルツハイマー病および他のタウ異常症の診断のために有用であること、ならびにこれがそのような患者および関連する動物モデルにおける治療有効性をモニターするための手段を提供することを裏づけるものである。

#### 【0175】

本scFv分子またはその親抗体は、主としてニューロン内で検出され、エンドソーム-オートファゴソーム-リソソーム系において病的タウタンパク質と共に局在していた。このことは、頸動脈内注射後に、またはタウ異常症マウスに由来する脳スライス培養に対するそのような分子の投与後に観察される、標識タウ抗体およびそれらのFab断片の類似の分布と一致する (Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol. Chem. 288:33081-33095 ; Congdon, E. E. et al. (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fc $\gamma$  Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288:35452-35465 ; Asuni, A.A. et al. (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements," J. Neurosci. 27:9115-9129 ; Krishnamurthy, P.K. et al. (2011) "Mechanistic Studies Of Antibody-Mediated Clearance Of Tau Aggregates Using An Ex Vivo Brain Slice Model," Front. Psychiatry 2:59)。しかし、これは、抗体またはそれらの断片をイメージング剤として用いてインビボでそのような凝集物を検出した初の報告である。A $\beta$ 、 $\tau$ -シヌクレインまたはタウタンパク質を標的とするこれまでの前臨床試験および臨床試験では、抗体が脳内に入ってこれらのペプチド/タンパク質の凝集物に実質的に到達することが実証されており、これはおそらく血液脳関門の開通を招く随伴性炎症が理由であると考えられる (Congdon, E.E. et al. (2014) "Harnessing The Immune System For Treatment And Detection Of Tau Pathology," J. Alzheimers. Dis. 40:S113-S121 ; Lemere, C.A. et al. (2010) "Can Alzheimer Disease Be Prevented By Amyloid-Beta Immunotherapy?," Nat. Rev. Neurol. 6:108-119)。

#### 【0176】

この抗体のシグナルがscFvと比較して弱いことについては、いくつかの説明が考えられる。この抗体はscFvのサイズ約6倍であり (150kDa対25kDa)、その結果として脳およびニューロンへの取り込みが少なくなった可能性がある。注射物は両方とも同じ重量 (250 $\mu$ g) であり、このため、抗体の分子を断片と比較して6分の1しか含有していない。この初期用量は、タグ標識されたポリクローナル抗タウマウスIgGの脳取り込みに関する以前の研究に基づいて選択した (Asuni, A.A. et al. (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements," J. Neurosci. 27:9115-9129)。scFvと比較してタウに対する抗体の親和性がより高いことにより、これらの問題は相殺される可能性がある。

#### 【0177】

タウ病理が限定的であるTgマウスにおけるIVIS脳シグナルの弱さは、Tgマウスにおける強化されたシグナルがタウ過剰発現の単なる反映ではなく、タウ病理の存在を指し示しているという結論のさらなる裏づけとなる。JNPL3 (P301L) マウスは、htau / PS1マウスよりも強い脳シグナルおよび末梢シグナルを呈する。脳内では、このことはタウ病理がより重度であることに該当する。P301Lマウスで観察されたより強い末梢シグナルは、一部には、このモデルで高度のタウ病変を有することが知られている脊髄に由来すると思われる (Lewis, J. et al. "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein," Nat. Genet. 25, 402-405)。

5)。また、そのhtau / PS1モデルにおけるよりも、より全般的なタウ発現をもたらす。このことがさまざまな臓器におけるタウ凝集を招いている可能性がある。

#### 【0178】

動物試験に関して、IVISイメージングは陽電子放出断層撮影法（PET）試験よりもコスト効果が高く、必要となるプローブ調製もはるかに容易である；現地にサイクロトロンを必要とする可能性のあるより複雑な放射標識手順の代わりに、その標識は近赤外色素による。このため、IVISイメージングは、その後のPET試験のためのリガンドを選択するためのプローブ開発にとって理想的である。縦断的試験の間に各動物がそれ自体の対照として役立つことから、そのような試験により、それがタウ病理の発生をモニターするため、およびタウ療法によって媒介されるタウ凝集物の排除に関してスクリーニングするための効率的なやり方であることがさらに指し示される。

#### 【0179】

これらの所見は、インビボでタウ病変を検出することに関するタウ抗体および/またはそれらのscFv分子の能力および使用を強く裏づける。シート結合色素とは対照的に、異なるエピトープを標的とするタウ抗体由来のプローブ（例えば、scFv235）は、各個体におけるタウタンパク質の病理学的プロフィールのより詳細な病像を与えると考えられる。この情報は、イメージングによって検出されたものと同じタウエピトープを標的とする能動的または受動的なタウ免疫療法を含みうる治療レジメンの手引きとなりうると予想される。そのような適合化されたアプローチは、標的とされるタウ異常症の進行を緩徐化するために、より有効である可能性が高い（例えば、Gu, J. et al. (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," *J. Biol Chem.* 288:33081-33095 ; Congdon, E. E. et al. (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcgamma Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance," *J. Biol Chem.* 288:35452-35465 ; Boutajangout, A. et al. (2010) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model," *J. Neurosci.* 30:16559-16566 ; Asuni, A.A. et al. (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements," *J. Neurosci.* 27:9115-9129 ; Boutajangout, A. et al. (2011) "Passive Immunization Targeting Pathological Phospho-Tau Protein In A Mouse Model Reduces Functional Decline And Clears Tau Aggregates From The Brain," *J. Neurochem.* 118:658-667 ; Boimel, M. et al. (2010) "Efficacy And Safety Of Immunization With Phosphorylated Tau Against Neurofibrillary Tangles In Mice," *Exp. Neurol.* 224, 472-485 (2010) ; Chai, X. et al. (2011) "Passive Immunization With Anti-Tau Antibodies In Two Transgenic Models: Reduction Of Tau Pathology And Delay Of Disease Progression," *J. Biol Chem.* 286:34457-34467 (2011) ; Bi, A. et al. (2011) "Tau-Targeted Immunization Impedes Progression of Neurofibrillary Histopathology in Aged P301L Tau Transgenic Mice," *PLoS. One.* 6:e26860 ; d'Abramo, C. et al. (2013) "Tau Passive Immunotherapy in Mutant P301L Mice: Antibody Affinity versus Specificity," *PLoS ONE* 8:e62402 ; Troquier, L. et al. (2012) "Targeting Phospho-Ser422 By Active Tau Immunotherapy In The THY-Tau22 Mouse Model : A Suitable Therapeutic Approach," *Curr. Alzheimer Res.* 9, 397-405 ; Kfouri, N. et al. (2012) "Trans-cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species," *J. Biol. Chem.* 287:19440-19451 ; Theunis, C. et al. (2013) "Efficacy And Safety Of A Liposome-Based Vaccine Against Protein Tau, Assessed In Tau.P301L Mice That Model Tauopathy," *PLoS. One.* 8:e72301: Yanamandra, K. et al. (2013) "Anti-Tau Antibodies That Block Tau Aggregate Seeding In Vitro Markedly Decrease Pathology And Improve Cognition in vivo," *Neuron* 80:402-414 ; Castillo-Carranza, D.L. et al. (2014) "Specific Targeting Of Tau Oligomers In Htau Mice Prevents Cognitive Impairment And Tau Toxicity Following Injection With Brain-Derived Tau Oligomer

10

20

30

40

50

ic Seeds," *J. Alzheimers. Dis.* 40:S97-S111 ; Castillo-Carranza, D.L. et al. (2014) "Passive Immunization with Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles," *J. Neurosci.* 34:4260-4272を参照)。標的的関与、排除および疾患進行を判定するための選択的バイオマーカーが利用可能であることは、アルツハイマー病の過去の免疫療法の臨床治験における、長い時間がかかり、費用が高く、かつ結論が不確かな試験を回避するために不可欠である。これらのタウ病変のイメージングは、将来の治験の有効性を評価することに加えて、A 陰性タウ異常症を診断するのにも極めて役立つであろう。

## 【0180】

実施例4

10

インビボでのトランスジェニックタウ異常症マウスにおけるタウ凝集物の特異的かつエピトープ依存的な検出

以上に指摘したように、抗体6B2G12から作製された単鎖抗体可変断片 (scFv) の末梢注射は、インビボイメージングシステム (IVIS) を用いたところトランスジェニックタウ異常症マウスにおいて強いインビボ脳シグナルをもたらしたが、野生型マウスおよびアミロイド斑マウスではそうではなかった (Krishnaswamy S. et al. (2014) "Antibody-Derived *in vivo* Imaging of Tau Pathology," *J. Neurosci.* 34:16835-16850 ; これは参照により本明細書に組み入れられる)。シグナルはより弱いものの類似の特異性は、親6B2G12抗体でも観察された。重要なこととして、イメージングシグナルの強度は、タウ病理の度合いおよびプローブとニューロン内タウ凝集物との共局在とよく相關した。どちらの属性もエンドソーム、オートファゴソームおよびリソソームのマーカーと関連があり、このことはこれらの分解経路におけるそれらの相互作用を指し示している。

## 【0181】

同一のトランスジェニックタウ異常症マウス (P301L, htau) において、種々のタウ抗体の単回静脈内注射を投与することによって、種々のタウエピトープに対するさまざまなタウ抗体のシグナル強度の比較を実施した。時には同一の動物において2種類の用量 (50  $\mu$ g対250  $\mu$ g) も比較した。脳シグナルがベースラインのバックグラウンド値に復帰するように、注射の間には少なくとも1週間の間隔をあいた。予想された通り、すべての抗体に関して、より高い用量の方が脳シグナルが数倍の高さとなり、このことから、それらの脳取り込みは比較的低い用量では飽和していないことが示唆された。一般に、6B2G12抗体 (親和性がnM ~ pMの範囲) の投与は、以下のものよりもおよそ2~3倍強いシグナルをもたらした: (1) 同じp396,404エピトープと免疫特異的に結合する、親和性はより低いが (nM ~  $\mu$ M) 、よりホスホ選択性的な抗体によって得られるシグナル; (2) p396,404エピトープとは異なるエピトープと免疫特異的に結合する、親和性の高い (nM) 抗体によって得られるシグナル; または (3) コンフォーメーションナルタウエピトープと免疫特異的に結合する低親和性抗体によって得られるシグナル。これらの違いは、これらの動物においてこれらのタウ抗体エピトープが比較的顕著であること、および抗体の親和性の両方を反映している可能性が高い。評価した抗体はすべて、タウ病理に対する特異性を示し、その結果、A 斑- (Tg-SwDI) マウスまたは野生型マウスにおける極めて弱い脳シグナルと比較して、タウ異常症マウスでははるかに強い脳シグナルが生じた。限定的なシグナルは、対照IgG抗体を用いても検出された。重要なこととして、観察されたシグナルは、6B2G12抗体の場合に観察されたのと同じく、タウ病理の度合いとよく相關し、静脈内注射した抗体は、染色されたニューロンタウ凝集物 (PHF1、MC1およびtau-5) ならびにエンドソーム、オートファゴソームおよびリソソームのマーカー (EEA1、LC3、P62およびRab7) と部分的に共局在した。

## 【0182】

全体として、これらの所見は、マウスモデルにおけるインビボでのエピトープの顕著さを評価するために、種々のエピトープに対するタウ抗体を用いることを指し示している。そのようなイメージングプローブのより小型の抗体断片はさらに優れた脳浸透性を備えており、その結果、臨床用イメージングリガンドとして大きな可能性のある、より強い脳

20

30

40

50

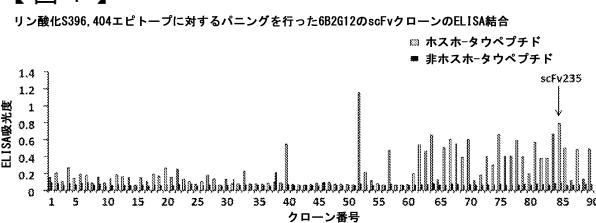
シグナル (scFv235など) をもたらす。

【0183】

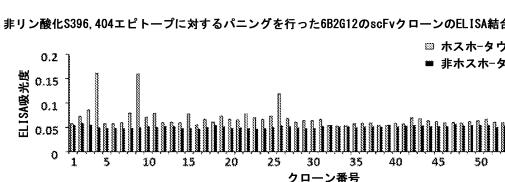
本明細書において言及されたすべての刊行物および特許は、それぞれの個々の刊行物または特許出願が、その全体が参照により組み入れられることが特定的および個別に示されている場合と同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。本発明をその具体的な態様に関連して説明してきたが、さらなる変更が可能であり、本出願は一般に、本発明の原則に準じ、本発明が属する技術分野において既知または習慣的な実施の範囲内にあり、本明細書に以前に記載した本質的な特徴に適用でき、添付の請求の範囲内で追従される、本発明の開示からのそのような逸脱を含む、本発明の任意の変更、使用または適応を含む意図があることが理解されるであろう。

10

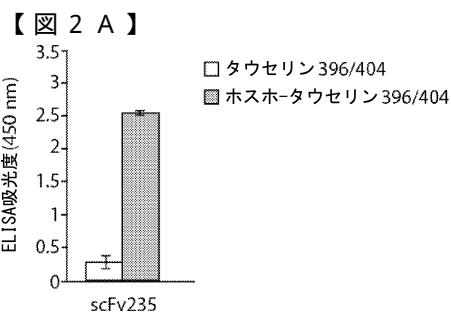
【図1】



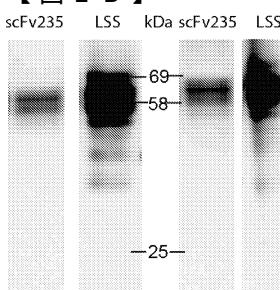
A



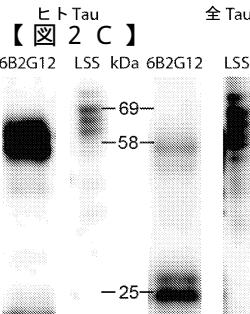
B



【図2 B】



ヒトTau 全Tau



ヒトTau 全Tau

【図2D】

列A

列B

列C

列D

行1: AD-1

核

scFv235

PHF1

合成

行2: AD-2

行3: ピック病

行4: 対照

核

scFv235

PHF1

合成

核

scFv235

PHF1

合成

核

scFv235

PHF1

合成

核

scFv235

PHF1

合成

【図2E】

行1: scFv235はアルツハイマー病ヒト脳切片上の病的タウと結合する

核

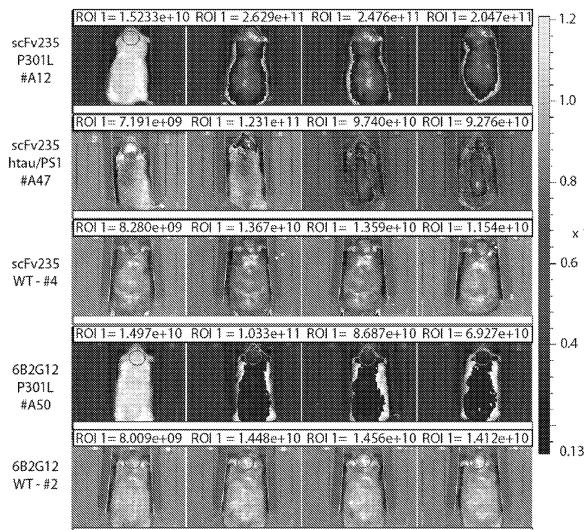
scFv235

PHF1

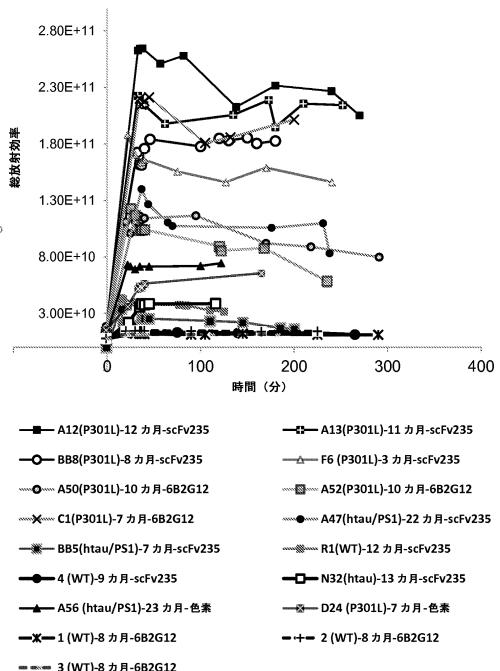
合成

行2: scFv235の対照ヒト脳切片との結合は限定的である

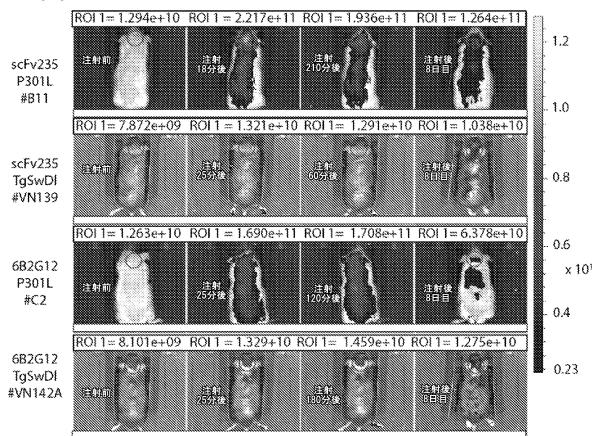
【図3A】



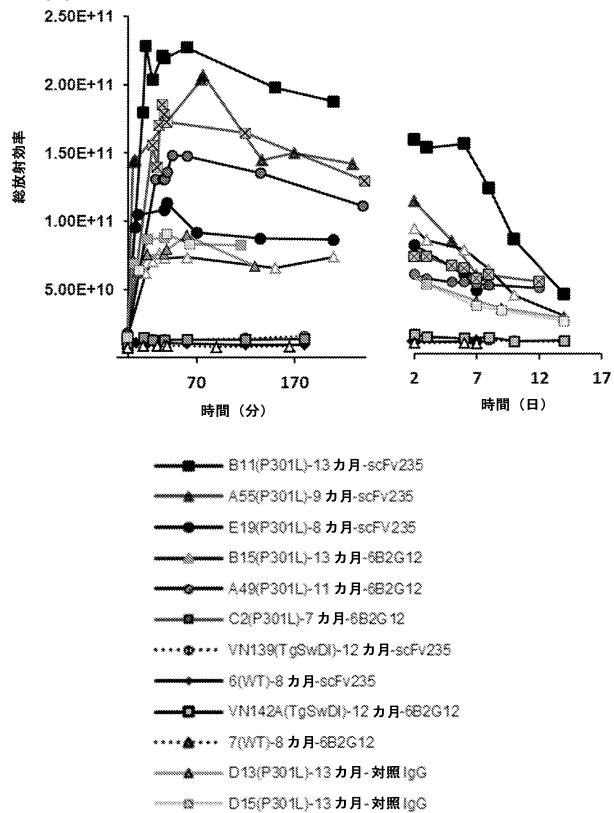
【図3B】



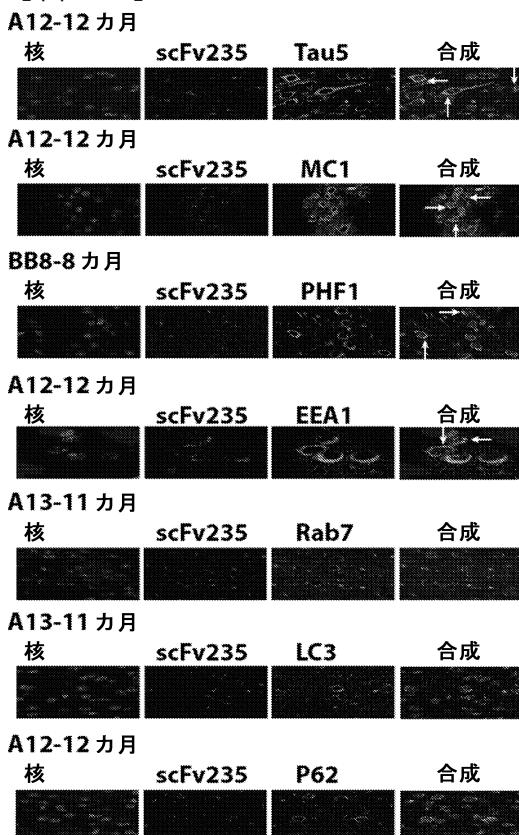
【図3C】



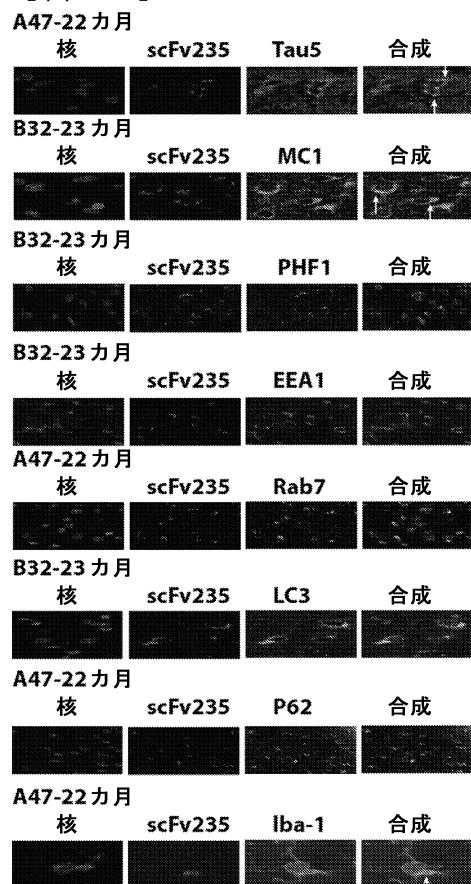
【図3D】



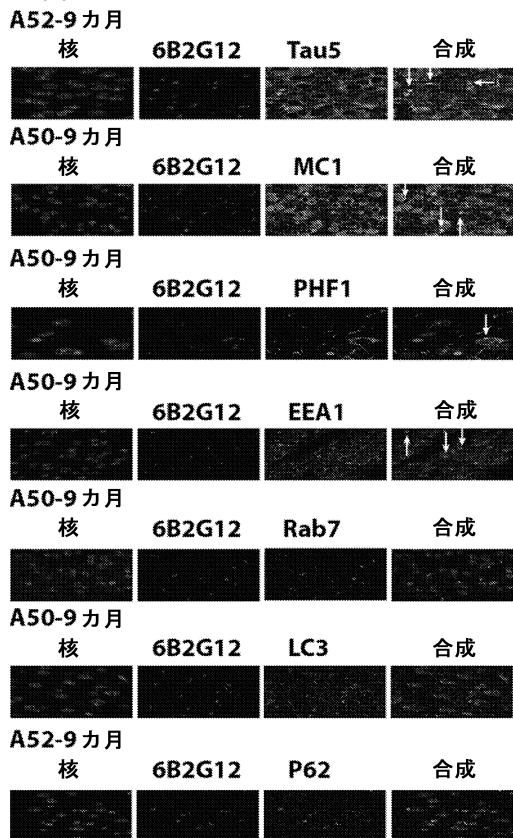
【図4A】



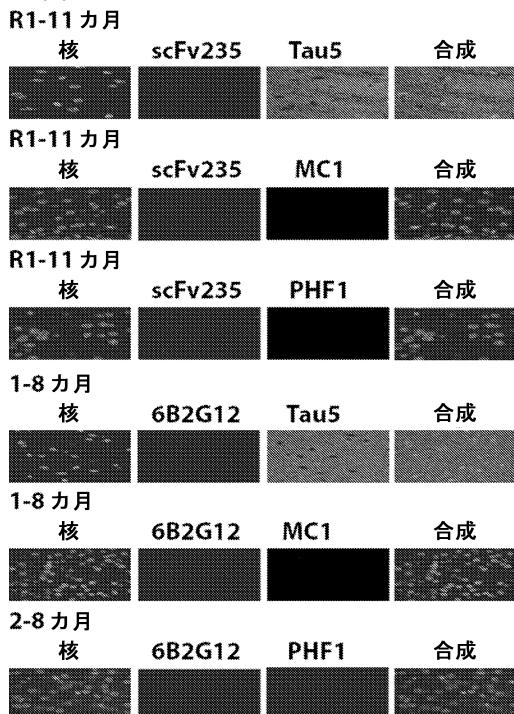
【図4B】



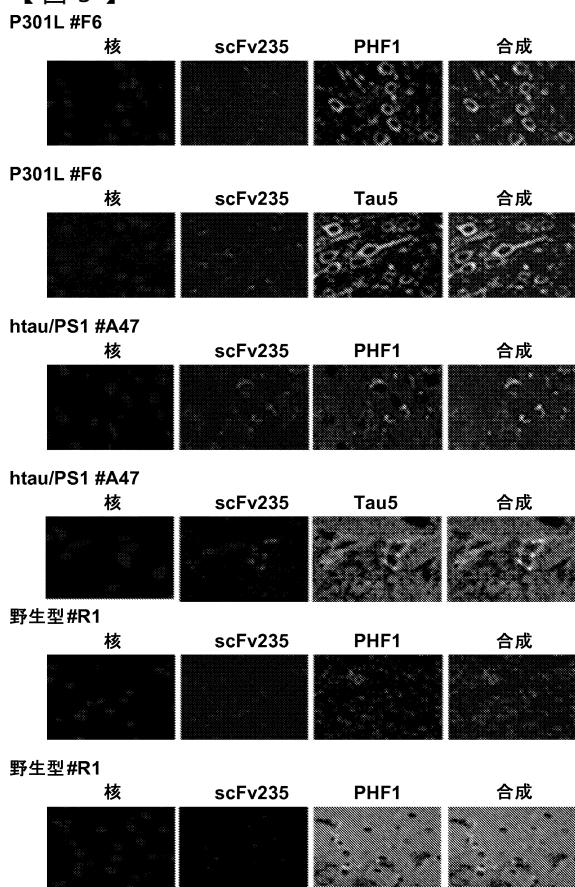
【図4C】



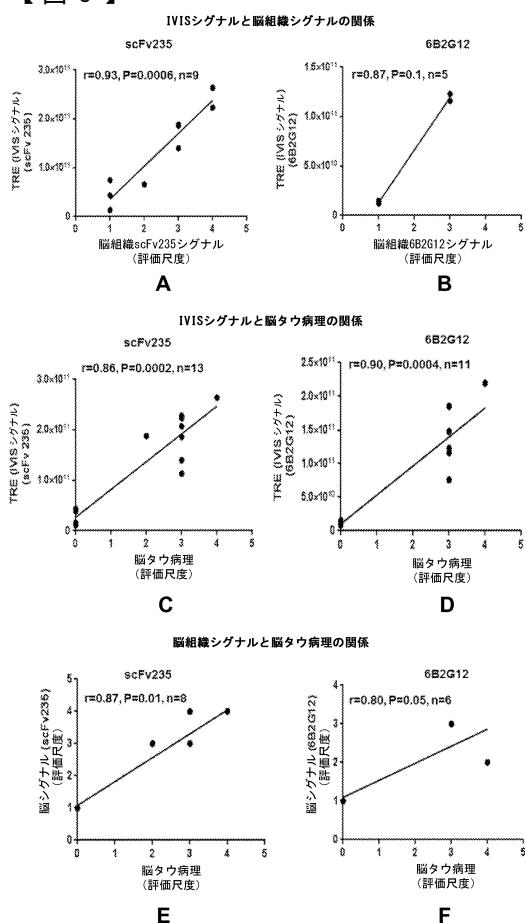
【図4D】



【図5】



【図6】



【配列表】

0006913018000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	A 6 1 P	21/02	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
			C 1 2 P	21/08	

(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 シグルドソン エイナー エム .

アメリカ合衆国 1 0 8 5 3 ニューヨーク州 スカーズデール ダウナー アベニュー 2 3

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 特表2 0 1 2 - 5 3 0 0 5 5 ( J P , A )

Gu J et al. , The Journal of Biological Chemistry , 2 0 1 3 年 , Vol.288 , No.46 , p.33081-33095

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 7 K 1 6 / 1 8  
 A 6 1 K 3 9 / 3 9 5  
 A 6 1 P 2 1 / 0 2  
 A 6 1 P 2 5 / 0 0  
 A 6 1 P 2 5 / 1 6  
 A 6 1 P 2 5 / 2 8  
 G 0 1 N 2 1 / 6 4  
 G 0 1 N 2 1 / 7 8  
 G 0 1 N 3 3 / 5 3  
 C 1 2 N 1 5 / 1 3  
 C 1 2 P 2 1 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q