

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7623699号
(P7623699)

(45)発行日 令和7年1月29日(2025.1.29)

(24)登録日 令和7年1月21日(2025.1.21)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
		Z N A	
		N	
請求項の数 31 (全105頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号 特願2021-524282(P2021-524282)		(73)特許権者 513250798	
(86)(22)出願日 令和1年11月8日(2019.11.8)		プロセナ バイオサイエンシーズ リミテ	
(65)公表番号 特表2022-506719(P2022-506719		ッド	
A)		アイルランド, ディー02 ブイケー6	
(43)公表日 令和4年1月17日(2022.1.17)		0, ダブリン2, グランドキャナル	
(86)国際出願番号 PCT/US2019/060616		ドックランズ ブロックシー, サー ジ	
(87)国際公開番号 WO2020/097561		ョン ロジャーソンズ クエイ 77	
(87)国際公開日 令和2年5月14日(2020.5.14)		77 Sir John Rogers o	
審査請求日 令和4年11月7日(2022.11.7)		n's Quay, Block C Gra	
(31)優先権主張番号 PCT/US2018/059895		nd Canal Docklands,	
(32)優先日 平成30年11月8日(2018.11.8)		Dublin 2, DO2 VK60,	
(33)優先権主張国・地域又は機関		Ireland	
米国(US)		(74)代理人 100114775	
(31)優先権主張番号 62/758,421		弁理士 高岡 亮一	
(32)優先日 平成30年11月9日(2018.11.9)		(74)代理人 100121511	
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 タウ認識抗体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

配列番号8または配列番号86を含むCDR-H1、配列番号87、配列番号88、または配列番号92を含むCDR-H2、およびLDFのアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む成熟重鎖可変領域と、

配列番号12または配列番号89を含むCDR-L1、配列番号13を含むCDR-L2、および配列番号14を含むCDR-L3を含む成熟軽鎖可変領域と、

を含む、ヒトタウに特異的に結合する抗体または抗原結合抗体フラグメントであって、
カバット位置H1、H5、H11、H20、H23、H38、H75、L10、L17、L37、L83、L86、L100、L106から選択される少なくとも1つの位置が、以下のように特定されるアミノ酸により占められる：

カバット位置H1がQにより占められる、カバット位置H5がQにより占められる、カバット位置H11がLにより占められる、カバット位置H20がLにより占められる、カバット位置H23がTにより占められる、カバット位置H38がKにより占められる、カバット位置H75がSにより占められる、カバット位置L10がTにより占められる、カバット位置L17がEにより占められる、カバット位置L37がQにより占められる、カバット位置L83がLにより占められる、カバット位置L86がHにより占められる、カバット位置L100がAまたはQにより占められる、カバット位置L106がLにより占められる、

抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 2】

C D R－H 1 が、配列番号 8 6 を含み、C D R－H 2 が、配列番号 9 2 を含み、C D R－H 3 が、L D F のアミノ酸配列を含み、C D R－L 1 が、配列番号 1 2 または配列番号 8 9 を含み、C D R－L 2 が、配列番号 1 3 を含み、かつ C D R－L 3 が、配列番号 1 4 を含む、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 3】

C D R－H 1 が、配列番号 8 6 を含むアミノ酸配列を有し、
C D R－H 2 が、配列番号 8 7、配列番号 8 8、または配列番号 9 2 を含むアミノ酸配列を有し、かつ
C D R－L 1 が、配列番号 8 9 を含むアミノ酸配列を有する、
請求項 1 に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

10

【請求項 4】

前記抗体または抗原結合抗体フラグメントが、ヒト化抗体もしくは抗原結合抗体フラグメント、ベニヤ抗体 (veneered antibody) もしくは抗原結合抗体フラグメント、またはキメラ抗体もしくは抗原結合抗体フラグメントである、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 5】

前記抗体または抗原結合抗体フラグメントが、ヒト化抗体または抗原結合抗体フラグメントである、請求項 4 に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 6】

前記ヒト化抗体または抗原結合抗体フラグメントが、配列番号 7 6～8 0 および配列番号 9 0～9 1 のいずれか 1 つと少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を有するヒト化成熟重鎖可変領域と、配列番号 8 3～8 5 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有するヒト化成熟軽鎖可変領域とを含む、請求項 5 に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

20

【請求項 7】

前記ヒト化成熟重鎖可変領域が、配列番号 7 6～8 0 および配列番号 9 0～9 1 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有し、かつ前記ヒト化成熟軽鎖可変領域が、配列番号 8 3～8 5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有する、請求項 6 に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

30

【請求項 8】

抗体である、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 9】

抗原結合抗体フラグメントである、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 10】

前記抗体が、ヒト I g G 1 のアイソタイプを有する、請求項 8 に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 11】

前記ヒト化成熟軽鎖可変領域が、軽鎖定常領域に融合され、かつ前記ヒト化成熟重鎖可変領域が、重鎖定常領域に融合される、請求項 6 または 7 に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

40

【請求項 12】

前記重鎖定常領域が、天然のヒト重鎖定常領域と比較して F c γ 受容体への低減された結合を有する、前記天然のヒト重鎖定常領域の変異型である、請求項 11 に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 13】

前記重鎖定常領域が、I g G 1 アイソタイプである、請求項 11 または請求項 12 に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

50

【請求項 14】

前記ヒト化成熟重鎖可変領域が、C末端リシンを有するもしくは有しない配列番号103の配列を有する重鎖定常領域に融合され、および／または前記ヒト化成熟軽鎖可変領域が、配列番号104の配列を有する軽鎖定常領域に融合される、請求項13に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 15】

前記重鎖定常領域中に少なくとも1つの変異を有する請求項11に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 16】

前記少なくとも1つの変異が、前記重鎖定常領域による補体の結合または活性化を低減する、請求項15に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 17】

前記抗体が、ヒトIgG2またはIgG4のアイソタイプを有する、請求項8に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 18】

請求項1～17のいずれか1項で定められる抗体または抗原結合抗体フラグメント、および薬学的に許容されるキャリアを含む、医薬組成物。

【請求項 19】

請求項1～8、10および17のいずれか1項に記載の抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸。

【請求項 20】

配列番号93～99、100～102、および105～106のいずれか1つを含む配列を有する請求項19に記載の核酸。

【請求項 21】

請求項19または20に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 22】

哺乳動物細胞で抗体を発現させる方法であって、インビトロで前記哺乳動物細胞中に請求項21に記載のベクターを導入することを含み、それにより前記抗体が発現される、方法。

【請求項 23】

抗体の哺乳動物細胞での発現を実行するために各々が1つまたは複数の調節配列に作動可能に連結される、請求項1～8、10、17のいずれか1項に記載の抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸をそれぞれ含む第一および第二のベクター。

【請求項 24】

哺乳動物細胞で抗体を発現させる方法であって、インビトロで前記哺乳動物細胞中に請求項23に記載のベクターを導入することを含み、それにより前記抗体が発現される、方法。

【請求項 25】

請求項4に記載のヒト化抗体、キメラ抗体またはベニヤ抗体を産生する方法であって、
(a) 細胞が前記抗体を分泌するように、前記抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸で形質転換された前記細胞を培養すること；ならびに

(b) 細胞培養培地から前記抗体を精製すること
を含む、方法。

【請求項 26】

請求項4に記載のヒト化抗体、キメラ抗体またはベニヤ抗体を産生する細胞株を製造する方法であって、

(a) インビトロで細胞中に抗体の重鎖および軽鎖および選択可能マーカーをコードするベクターを導入すること；

(b) 前記ベクターの増大したコピー数を有する細胞を選択する条件下で前記細胞を増殖すること；

10

20

30

40

50

(c) 選択された細胞から単細胞を単離すること；ならびに

(d) 前記抗体の収率に基づいて選択された単細胞からクローニングされた細胞を保存することを含む、方法。

【請求項 27】

タウ媒介アミロイド症の対象またはそれを発症するリスクのある対象におけるタウの凝集を抑制するまたは減らすための薬剤の製造における、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメントの使用。

【請求項 28】

対象においてタウ関連疾患を処置するまたは予防するための薬剤の製造における、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメントの使用。

【請求項 29】

前記タウ関連疾患が、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C 型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）である、請求項 28 に記載の使用。

【請求項 30】

タウ凝集または沈着に関連する疾患を有するまたはその疾患のリスクのある対象におけるタウタンパク質沈着物を検出するインビトロの方法であって、前記対象から得た生物試料においてタウに結合した請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合抗体フラグメントを検出することを含む、インビトロの方法。

【請求項 31】

前記タウの凝集または沈着に関連する疾患が、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C 型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）である、請求項 30 に記載のインビトロの方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018 年 11 月 9 日に出願された米国特許出願第 62／758,421 号および 2018 年 11 月 8 日に出願された PCT 出願第 PCT／US2018／059895 号の優先権を主張するものである。これらの出願特許のそれぞれは、本出願において参照によりその全体が組み込まれる。

【0002】

配列リストの参照

本出願は、2019 年 11 月 8 日に作成され、96,408 バイトを含む、ファイル名 2019-11-08536322WO_ST25.TXT の電子配列リストを含む。この配列リストは、本出願において参照によりその全体が組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

タウは、リン酸化型で存在し得るよく知られたヒトタンパク質である（例えば、Goedert, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:4051-40

10

20

30

40

50

55 (1988); Goeder t, EMBO J. 8:393-399 (1989); Lee, Neuron 2:1615-1624 (1989); Goeder t, Neuron 3:519-526 (1989); Andreadis, Biochemistry 31:10626-10633 (1992)を参照されたい)。タウは、特に中枢神経系における微小管の安定化に関与すると報告されている。総タウ (t-タウ、すなわち、リン酸化型および非リン酸化型) ならびにリン酸化タウ (phospho-tau) (p-タウ、すなわち、リン酸化されたタウ) は、神経損傷および神経変性に応答して脳によって放出され、母集団と比べて、アルツハイマー病患者のCSFにおいてレベルが増加していることが報告されている (Jack et al., Lancet Neurol 9:119-28 (2010))。

10

【0004】

タウは、神経原線維濃縮体の主要な構成成分であり、プラークと共にアルツハイマー病の顕著な特徴である。濃縮体は、80nmの規則的な周期で螺旋状に巻かれたペアで生じる直径10nmの異常な原線維で構成されている。神経原線維濃縮体内のタウは、分子上の特定の部位に結合したリン酸基で異常にリン酸化 (高リン酸化) されている。アルツハイマー病における神経原線維濃縮体の強い関与は、嗅内皮質層IIニューロン、海馬のCA1領域および海馬台領域、扁桃体、ならびに新皮質のより深い層 (層III、V、および表面のVI) に見られる。高リン酸化タウはまた、微小管アセンブリーを妨害することが報告されており、これは神経回路網の破壊を促進し得る。

【0005】

20

タウ封入体は、アルツハイマー病、前頭側頭葉変性症、進行性核上性麻痺およびピック病を含むいくつかの神経変性疾患の神経病理を特徴付ける要素である。

【発明の概要】

【0006】

一態様では、本発明は、位置H28がNまたはTにより占められ得ること、H54がNまたはDにより占められ得ること、H56がDまたはEにより占められ得ること、および位置H58がVまたはIにより占められること以外は、それぞれ配列番号8、9、および10を含むCDRH1、H2およびH3を含む成熟重鎖可変領域と、位置L24がKまたはRにより占められ得ること以外は、それぞれ配列番号12、13、および14を含むCDRL1、L2およびL3を含む成熟軽鎖可変領域とを含む、ヒトタウに特異的に結合する抗体を提供し、次に示す位置の少なくとも1つは指定したアミノ酸により占められる: H1はQにより占められ、H5はQにより占められ、H11はLにより占められ、H20はLにより占められ、H23はTにより占められ、H38はKにより占められ、H75はSにより占められ、H56はEにより占められ、H58はIにより占められ、L10はTにより占められ、L17はEにより占められ、L24はRにより占められ、L37はQにより占められ、L83はLにより占められ、L86はHにより占められ、L100はAまたはQにより占められ、L106はLにより占められる。

30

【0007】

いくつかのこのような抗体では、CDRH1は、配列番号8または配列番号86を含み、CDRH2は、配列番号9、配列番号87、配列番号88、または配列番号92を含み、CDRH3は、配列番号10を含み、CDRL1は、配列番号12または配列番号89を含み、CDRL2は、配列番号13を含み、CDRL3は、配列番号14を含む。いくつかのこのような抗体では、CDRH1は、配列番号8または配列番号86を含み、CDRH2は、配列番号9、配列番号87、または配列番号88を含み、CDRH3は、配列番号10を含み、CDRL1は、配列番号12または配列番号89を含み、CDRL2は、配列番号13を含み、CDRL3は、配列番号14を含む。いくつかのそのような抗体では、CDRH1は、配列番号86を含み、CDRH2は、配列番号92を含み、CDRH3は、配列番号10を含み、CDRL1は、配列番号12または配列番号89を含み、CDRL2は、配列番号13を含み、CDRL3は、配列番号14を含む。

40

50

【0008】

いくつかのこのような抗体では、CDR-H1は、配列番号86を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのこのような抗体では、CDR-H2は、配列番号87を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのこのような抗体では、CDR-H2は、配列番号88を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのこのような抗体では、CDR-H2は、配列番号92を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのこのような抗体では、CDR-L1は、配列番号89を含むアミノ酸配列を有する。

【0009】

いくつかのこのような抗体では、CDR-H1は、配列番号86を含むアミノ酸配列を有し、CDR-H2は、配列番号87を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのこのような抗体では、CDR-H1は、配列番号86を含むアミノ酸配列を有し、CDR-H2は、配列番号88を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのこのような抗体では、CDR-H1は、配列番号86を含むアミノ酸配列を有し、CDR-H2は、配列番号92を含むアミノ酸配列を有する。

10

【0010】

いくつかのこのような抗体では、抗体は、ヒト化抗体、ベニヤ抗体 (veneered antibody)、またはキメラ抗体である。

【0011】

いくつかの抗体では、ヒト化成熟重鎖可変領域は、配列番号76～80および配列番号90～91のいずれか1つと少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有し、ヒト化成熟軽鎖可変領域は、配列番号83～85のいずれか1つと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、ヒト化成熟重鎖可変領域は、配列番号76～80のいずれか1つと少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有し、ヒト化成熟軽鎖可変領域は、配列番号83～85のいずれか1つと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、ヒト化成熟重鎖可変領域は、配列番号90～91のいずれか1つと少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有し、ヒト化成熟軽鎖可変領域は、配列番号83～85のいずれか1つと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する。

20

【0012】

いくつかのこのような抗体では、VH領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H93はSにより占められ、H94はTにより占められる。いくつかのこのような抗体では、位置H93およびH94は、それぞれ、SおよびTにより占められる。

30

【0013】

いくつかのこのような抗体では、VH領域中の位置H91は、Fにより占められる。

【0014】

いくつかのこのような抗体では、VH領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H1はEにより占められ、H5はVにより占められ、H11はVにより占められ、H20はIにより占められ、H23はKにより占められ、H38はRにより占められ、H42はGにより占められ、H43はKにより占められ、H66はRにより占められ、H75はTにより占められ、H76はDにより占められ、H81はEにより占められ、H108はLにより占められ、H109はVにより占められる。いくつかの抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H75、H76、H81、H108、およびH109は、それぞれ、E、V、V、I、K、R、G、K、R、T、D、E、L、およびVにより占められる。

40

【0015】

いくつかのこのような抗体では、VH領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H17はTにより占められ、H80はMにより占められ、H83はRにより占められる。いくつかの抗体では、VH領域内の位置H17、H80およびH83は、それぞれ、T、M、およびRにより占められる。

【0016】

50

いくつかのこのような抗体では、VH領域中の位置H58は、Iにより占められる。

【0017】

いくつかのこのような抗体では、VH領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H28はTにより占められ、H67はVにより占められる。いくつかの抗体では、VH領域内の位置H28およびH67は、それぞれ、TおよびVにより占められる。

【0018】

いくつかのこのような抗体では、VH領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H54はDにより占められ、H56はEにより占められる。いくつかの抗体では、VH領域内の位置H54およびH56は、それぞれ、DおよびEにより占められる。

【0019】

いくつかのこのような抗体では、VH領域の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H1はQまたはEにより占められ、H5はQまたはVにより占められ、H11はLまたはVにより占められ、H17はSまたはTにより占められ、H20はLまたはIにより占められ、H23はTまたはKにより占められ、H28はNまたはTにより占められ、H38はKまたはRにより占められ、H42はEまたはGにより占められ、H43はQまたはKにより占められ、H54はNまたはDにより占められ、H56はDまたはEにより占められ、H58はVまたはIにより占められ、H66はKまたはRにより占められ、H67はAまたはVにより占められ、H75はSまたはTにより占められ、H76はNまたはDにより占められ、H80はLまたはMにより占められ、H81はQまたはEにより占められ、H83はTまたはRにより占められ、H91はFまたはYにより占められ、H93はSにより占められ、H94はTにより占められ、H108はTまたはLにより占められ、H109はLまたはVにより占められる。

【0020】

いくつかの抗体では、VH領域中の位置H91、H93、およびH94は、それぞれ、F、S、およびTにより占められる。いくつかの抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H75、H76、H81、H91、H93、H94、H108、およびH109は、それぞれ、E、V、V、I、K、R、G、K、R、T、D、E、F、S、T、L、およびVにより占められる。いくつかの抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H58、H66、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108、およびH109は、それぞれ、E、V、V、T、I、K、R、G、K、I、R、T、D、M、E、R、S、T、L、およびVにより占められる。いくつかの抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H58、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108、およびH109は、それぞれ、E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、I、R、V、T、D、M、E、R、S、T、L、およびVにより占められる。いくつかの抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H58、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108、およびH109は、それぞれ、E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、D、E、I、R、V、T、D、M、E、R、S、T、L、およびVにより占められる。いくつかの抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108、およびH109

9は、それぞれ、E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、D、E、R、V、T、D、M、E、R、S、T、L、およびVにより占められる。

【0021】

いくつかのこのような抗体では、VL領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：L7はSにより占められ、L10はSにより占められ、L15はLにより占められ、L83はVにより占められ、L86はYにより占められ、L106はIにより占められる。いくつかの抗体では、位置L7、L10、L15、L83、L86、およびL106は、それぞれ、S、S、L、V、Y、およびYにより占められる。

【0022】

いくつかのこのような抗体では、VL領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：L7はTまたはSにより占められ、L10はTまたはSにより占められ、L15はIまたはLにより占められ、L17はQまたはEにより占められ、L24はKまたはRにより占められ、L37はLまたはQにより占められ、L45はKまたはRにより占められ、L83はLまたはVにより占められ、L86はHまたはYにより占められ、L100はAまたはQにより占められ、L106はLまたはIにより占められる。

【0023】

いくつかの抗体では、VL領域中の位置L7、L10、L15、L83、L86、およびL106は、それぞれ、S、S、L、V、Y、およびIにより占められる。いくつかの抗体では、VL領域中の位置L7、L10、L15、L17、L24、L37、L45、L83、L86、L100、およびL106は、それぞれ、S、S、L、E、R、Q、R、V、Y、Q、およびIにより占められる。

【0024】

いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号76～80および配列番号90～91のいずれか1つのアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号83～85のいずれか1つのアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号76～80のいずれか1つのアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号83～85のいずれか1つのアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号90～91のいずれか1つのアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号83～85のいずれか1つのアミノ酸配列を有する。

【0025】

いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号76のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号83のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号76のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号84のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号76のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号85のアミノ酸配列を有する。

【0026】

いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号77のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号83のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号77のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号84のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号77のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号85のアミノ酸配列を有する。

【0027】

いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号78のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号83のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号78のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号84のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号78のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号85のアミノ酸配列を有する。

【0028】

いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号79のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号83のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖

10

20

30

40

50

可変領域は、配列番号 79 のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号 84 のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号 79 のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号 85 のアミノ酸配列を有する。

【0029】

いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号 80 のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号 83 のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号 80 のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号 84 のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号 80 のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号 85 のアミノ酸配列を有する。

【0030】

いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号 90 のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号 83 のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号 90 のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号 84 のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号 90 のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号 85 のアミノ酸配列を有する。

【0031】

いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号 91 のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号 83 のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号 91 のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号 84 のアミノ酸配列を有する。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、配列番号 91 のアミノ酸配列を有し、成熟軽鎖可変領域は、配列番号 85 のアミノ酸配列を有する。

【0032】

例えば、抗体は、キメラ抗体であってよい。例えば、抗体は、ベニヤ抗体であってよい。

【0033】

抗体は、完全マウス抗体、キメラ抗体、ベニヤ抗体もしくはヒト化抗体または結合フラグメント、単鎖抗体単鎖抗体 Fab フラグメント、Fab'2 フラグメント、または単鎖 Fv であってよい。いくつかの抗体は、ヒト IgG1 アイソタイプを有し、一方、他の抗体は、ヒト IgG2 または IgG4 アイソタイプを有してもよい。いくつかの抗体は、軽鎖定常領域に融合された成熟軽鎖可変領域および重鎖定常領域に融合された成熟重鎖可変領域を有する。いくつかの抗体の重鎖定常領域は、天然のヒト定常領域と比較して、Fcγ 受容体への結合が低減した天然のヒト定常領域の変異型である。いくつかの抗体では、成熟重鎖可変領域は、C 末端リシンを有する、もしくは有しない配列番号 103 の配列を有する重鎖定常領域に融合されており、および／または成熟軽鎖可変領域は、配列番号 104 の配列を有する軽鎖定常領域に融合されている。

【0034】

いくつかの抗体は、定常領域に少なくとも 1 つの変異、例えば、補体結合または定常領域による活性化を減少させる変異、例えば、EU ナンバリングで、位置 241、264、265、270、296、297、318、320、322、329 および 331 の 1 つまたは複数の位置での変異を有し得る。いくつかの抗体は、位置 318、320 および 322 にアラニンを含む。いくつかの抗体は、少なくとも 95 % w/w の純度であり得る。抗体は、治療薬、細胞傷害剤、細胞分裂停止剤、神経栄養剤、または神経保護剤にコンジュゲートすることができる。

【0035】

別の態様では、本発明は、本明細書で開示のいずれかの抗体および薬学的に許容可能なキャリアを含む医薬組成物を提供する。

【0036】

別の態様では、本発明は、本明細書で開示のいずれかの重鎖および／または軽鎖をコードする核酸、該核酸を含む組換え体発現ベクター、および組換え体発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。例えば、核酸は、配列番号 30～31、93～99、100～102、および 105～106 のいずれか 1 つを含む配列を有してよい。別の例では

10

20

30

40

50

、核酸は、配列番号 30～31、93～97、100～102、および 105～106 のいずれか 1 つを含む配列を有してよい。別の例では、核酸は、配列番号 30～31、98～99、100～102、および 105～106 のいずれか 1 つを含む配列を有してよい。
【0037】

別の態様では、本発明は、本明細書に開示された抗体のいずれかの哺乳動物細胞での発現を実行するための 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結された成熟重鎖可変領域および成熟軽鎖可変領域をコードする核酸を含むベクターと、この核酸を含む宿主細胞と、この抗体が発現される遺伝子導入動物のゲノムにこの核酸を組み込むことを含む哺乳動物細胞で抗体を発現させる方法とを提供する。

【0038】

いくつかのベクターは、該成熟重鎖可変領域に融合された重鎖定常領域と、該成熟軽鎖可変領域に融合された軽鎖定常領域とをさらにコードする核酸を含む。いくつかのベクターでは、コードされた重鎖定常領域は、C 末端リシンを有する、または有しない配列番号 103 の配列を有し、コードされた軽鎖定常領域は、配列番号 104 の配列を有する。いくつかのベクターでは、重鎖定常領域は、配列番号 105 の配列によりコードされ、軽鎖定常領域は、配列番号 106 の配列によりコードされる。

【0039】

いくつかのベクターでは、核酸によりコードされた発現される抗体は、s c F v である。いくつかのベクターでは、核酸によりコードされた発現される抗体は、F a b フラグメントである。

【0040】

いくつかのベクターでは、1 つまたは複数の調節配列は、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、および転写終結シグナルの 1 つまたは複数を含む。いくつかのベクターでは、核酸は、成熟重鎖および軽鎖可変領域に融合されたシグナルペプチドをさらにコードする。いくつかのベクターでは、核酸は、宿主細胞内での発現のためにコドン最適化される。いくつかのベクターでは、1 つまたは複数の調節配列は、真核生物プロモーターを含む。いくつかのベクターでは、核酸は、選択可能な遺伝子をさらにコードする。

【0041】

別の態様では、本発明は、それぞれ成熟重鎖可変領域および成熟軽鎖可変領域をコードする核酸を含む、第一および第二のベクターであって、各々のベクターが本明細書に開示された抗体のいずれかの哺乳動物細胞での発現を実行するための 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結される、第一および第二のベクターと、核酸を含む宿主細胞と、この抗体が発現される遺伝子導入動物のゲノムにこの核酸を組み込むことを含む哺乳動物細胞で抗体を発現させる方法とを提供する。

【0042】

いくつかのベクターでは、核酸は、成熟重鎖可変領域に融合された重鎖定常領域と、成熟軽鎖可変領域に融合された軽鎖定常領域とをさらにコードする。いくつかのベクターでは、コードされた重鎖定常領域は、C 末端リシンを有する、または有しない配列番号 103 の配列を有し、コードされた軽鎖定常領域は、配列番号 104 の配列を有する。いくつかのベクターでは、重鎖定常領域は、配列番号 105 の配列によりコードされ、軽鎖定常領域は、配列番号 106 の配列によりコードされる。

【0043】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に記載のいずれかの非ヒト抗体、例えば、マウス抗体 3 D 6 をヒト化する方法を提供する。この 3 D 6 は、配列番号 7 の成熟重鎖可変領域および配列番号 11 の成熟軽鎖可変領域を特徴とする。このような方法は、1 種または複数の受容体抗体を選択すること、マウス重鎖の C D R を含むヒト化重鎖をコードする核酸およびマウス抗体軽鎖の C D R を含むヒト化軽鎖をコードする核酸を合成すること、ならびに、宿主細胞中で該核酸を発現してヒト化抗体を産生することを含み得る。

【0044】

ヒト化、キメラまたはペニヤ抗体、例えば、3 D 6 のヒト化、キメラまたはペニヤ型な

10

20

30

40

50

どの抗体の産生方法も提供される。このような方法では、抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸で形質転換された細胞は、抗体を分泌するように培養される。その後、抗体は、細胞培養培地から精製される。

【0045】

本明細書で開示のいずれかの抗体を産生する細胞株は、抗体の重鎖および軽鎖ならびに選択マーカーをコードするベクターおよび選択可能マーカーを細胞中に導入し、コピー数が増加したベクターを有する細胞を選択する条件下で細胞を増殖させ、選択細胞から単細胞を単離し、抗体の収量に基づいて選択した単細胞からクローニングした細胞を保存することにより、産生することができる。

【0046】

いくつかの細胞は、選択条件下で増幅させて、自然に発現し、少なくとも100mg/L/10⁶細胞/24時間の量で抗体を分泌する細胞株をスクリーニングできる。単細胞は、選択細胞から単離できる。単細胞からクローニングした細胞は、その後、保存できる。単細胞は、抗体の収率などの望ましい特性に基づいて選択できる。代表的細胞株は、3D6を発現する細胞株である。

【0047】

本発明はまた、タウ媒介アミロイド症の対象を発症するリスクのある対象におけるタウの凝集を抑制するまたは減らす方法も提供し、方法は、対象に本明細書で開示の抗体の有効な投与計画を投与し、それにより、対象におけるタウの凝集を抑制するかまたは減らすことを含む。代表的抗体は、3D6のヒト化型を含む。

【0048】

また、対象のタウ関連疾患を処置するまたは予防する方法も提供され、方法は、本明細書で開示の抗体の有効な投与計画を投与し、それにより、疾患の処置または予防をすることを含む。このような疾患の例は、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー (glubular glial tauopathy)、グアム筋萎縮性側索硬化症-パーキンソン病/認知症複合；大脳皮質基底核変性症 (CBD)、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病 (LBVAD)、慢性外傷性脳症 (CTE)、球状グリア性タウオパチー (GGT)、または進行性核上麻痺 (PSP) である。いくつかの方法では、タウ関連疾患は、アルツハイマー病である。いくつかの方法では、患者はApoE4保因者である。

【0049】

また、タウの異常伝播を減らす方法も提供され、方法は、本明細書で開示の抗体の有効な投与計画を投与し、それにより、タウの伝播を減らすことを含む。

【0050】

また、タウの食作用を誘導する方法も提供され、方法は、本明細書で開示の抗体の有効な投与計画を投与し、それにより、タウの食作用を誘導することを含む。

【0051】

また、タウの凝集または沈着を抑制する方法も提供され、方法は、本明細書で開示の抗体の有効な投与計画を投与し、それにより、タウの凝集または沈着を抑制することを含む。

【0052】

また、タウの濃縮体の形成を抑制する方法も提供され、方法は、本明細書で開示の抗体の有効な投与計画を投与することを含む。

【0053】

本発明はまた、タウ凝集または沈着に関連のある疾患の対象またはその疾患のリスクのある対象におけるタウタンパク質沈着物の検出方法が提供され、方法は、本明細書で開示の抗体を対象に投与し、対象のタウに結合した抗体を検出することを含む。このような疾患の例は、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニー

10

20

30

40

50

マン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（C B D）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（L B V A D）、慢性外傷性脳症（C T E）、球状グリア性タウオパチー（G G T）、または進行性核上麻痺（P S P）である。いくつかの実施形態では、抗体は、静脈内注射により対象の身体に投与される。いくつかの実施形態では、抗体は、頭蓋内注射により、または対象の頭蓋骨を通る孔をあけることにより、対象の脳に直接投与される。いくつかの実施形態では、抗体は標識される。いくつかの実施形態では、抗体は、蛍光標識、常磁性標識、または放射性標識により標識される。いくつかの実施形態では、放射性標識は、陽電子放出断層撮影（P E T）または単一光子放射型コンピュータ断層撮影（S P E C T）を用いて検出される。

10

【0054】

本発明はまた、タウ凝集または沈着に関連する疾患を処置される対象の処置の効力を測定する方法も提供し、方法は、本明細書で開示の抗体を対象に投与することによる処置の前に対象のタウタンパク質沈着物の第1のレベルを測定すること、ならびに対象のタウに結合した抗体の第1の量を測定すること、対象に処置を投与すること、対象に抗体を投与することによる処置後に対象のタウタンパク質沈着物の第2のレベルを測定すること、および対象のタウに結合した抗体を検出することを含み、タウタンパク質沈着物のレベルの減少が処置に対する陽性の反応を示す。

【0055】

20

本発明はまた、タウ凝集または沈着に関連する疾患を処置される対象の処置の効力を測定する方法も提供し、方法は、本明細書で開示の抗体を対象に投与することによる処置の前に対象のタウタンパク質沈着物の第1のレベルを測定すること、ならびに対象のタウに結合した抗体の第1の量を測定すること、対象に処置を投与すること、対象に抗体を投与することによる処置後に対象のタウタンパク質沈着物の第2のレベルを測定すること、および対象のタウに結合した抗体の第2の量を検出することを含み、タウタンパク質沈着物のレベルの無変化またはタウタンパク質沈着物の小さい増加が処置に対する陽性の反応を示す。

【図面の簡単な説明】

【0056】

30

【図1】マウス3D6抗体の重鎖可変領域（配列番号7）および3D6抗体のヒト化型の重鎖可変領域（hu3D6VHvb1、hu3D6VHvb2、hu3D6VHvb3、hu3D6VHvb4、hu3D6VHvb5、hu3D6VHvb6、およびhu3D6VHvb7）に加え、ヒト生殖細胞系列重鎖可変領域配列IGHV1-69-2*01（配列番号25）およびヒト受容体重鎖可変領域配列2RCS VH hFrwk（配列番号75）の配列比較を示す。hu3D6VHvb1は、配列番号76であり、hu3D6VHvb2は、配列番号77であり、hu3D6VHvb3は、配列番号78であり、hu3D6VHvb4は、配列番号79であり、hu3D6VHvb5は、配列番号80であり、hu3D6VHvb6は、配列番号90であり、hu3D6VHvb7は、配列番号91である。カバット／コチアの組み合わせにより定義されるCDRは、太字で示している。

40

【図2】マウス3D6抗体の軽鎖可変領域（配列番号11）および3D6抗体のヒト化型の軽鎖可変領域（hu3D6VLvb1、hu3D6VLvb2、およびhu3D6VLvb3）に加え、ヒト生殖細胞系列軽鎖可変領域配列IGKV2-30*02（配列番号27）およびヒト受容体ARX71335_VL_hFrwk（配列番号82）の配列比較を示す。hu3D6VLvb1は、配列番号83であり、hu3D6VLvb2は、配列番号84であり、hu3D6VLvb3は、配列番号85である。カバットにより定義されるCDRは、太字で示している。

【図3A】選択マウスモノクローナル抗タウ抗体のためのELISAスクリーニングの結果を示す。

50

【図 3 B】選択マウスモノクローナル抗タウ抗体のための E L I S A スクリーニングの結果を示す。

【図 3 C】選択マウスモノクローナル抗タウ抗体のための E L I S A スクリーニングの結果を示す。

【図 4】選択マウスモノクローナル抗タウ抗体の組換えヒトタウに対する結合動力学を示す。

【図 5】選択マウスモノクローナル抗タウ抗体に対する機能ブロッキングアッセイの結果を示す。

【図 6】選択マウスモノクローナル抗タウ抗体に対する脱凝集アッセイの結果を示す。

【図 7】3 D 6 および 5 G 8 がヒトアルツハイマー病組織由来のタウを免疫捕獲すること
を示す実験の結果を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0057】

配列の簡単な説明

配列番号 1 は、ヒトタウのアイソフォーム（スイスプロット P 1 0 6 3 6 - 8）のアミノ酸配列を示す。

【0058】

配列番号 2 は、ヒトタウのアイソフォーム（スイスプロット P 1 0 6 3 6 - 7）のアミノ酸配列を示す。

【0059】

配列番号 3 は、ヒトタウのアイソフォーム（スイスプロット P 1 0 6 3 6 - 6）、（4 R O N ヒトタウ）のアミノ酸配列を示す。

20

【0060】

配列番号 4 は、ヒトタウのアイソフォーム（スイスプロット P 1 0 6 3 6 - 5）のアミノ酸配列を示す。

【0061】

配列番号 5 は、ヒトタウのアイソフォーム（スイスプロット P 1 0 6 3 6 - 4）のアミノ酸配列を示す。

【0062】

配列番号 6 は、ヒトタウのアイソフォーム（スイスプロット P 1 0 6 3 6 - 2）のアミノ酸配列を示す。

30

【0063】

配列番号 7 は、マウス 3 D 6 抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0064】

配列番号 8 は、マウス 3 D 6 抗体のカバット／コチアの組み合わせ C D R - H 1 のアミノ酸配列を示す。

【0065】

配列番号 9 は、マウス 3 D 6 抗体のカバット C D R - H 2 のアミノ酸配列を示す。

【0066】

配列番号 10 は、マウス 3 D 6 抗体のカバット C D R - H 3 のアミノ酸配列を示す。

40

【0067】

配列番号 11 は、マウス 3 D 6 抗体およびマウス 6 A 1 0 抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0068】

配列番号 12 は、マウス 3 D 6 抗体およびマウス 6 A 1 0 抗体のカバット C D R - L 1 のアミノ酸配列を示す。

【0069】

配列番号 13 は、マウス 3 D 6 抗体およびマウス 6 A 1 0 抗体のカバット C D R - L 2 のアミノ酸配列を示す。

【0070】

50

配列番号 14 は、マウス 3 D 6 抗体およびマウス 6 A 1 0 抗体のカバット C D R - L 3 のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 7 1 】

配列番号 15 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V H v 1 の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 7 2 】

配列番号 16 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V H v 2 の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 7 3 】

配列番号 17 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V H v 1 b の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

10

【 0 0 7 4 】

配列番号 18 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V H v 1 b A 1 1 の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 7 5 】

配列番号 19 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V H v 5 の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 7 6 】

配列番号 20 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V L v 1 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

20

【 0 0 7 7 】

配列番号 21 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V L v 2 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 7 8 】

配列番号 22 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V L v 3 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 7 9 】

配列番号 23 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V L v 4 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 0 】

30

配列番号 24 は、重鎖可変受容体受入番号 B A C 0 1 9 8 6 . 1 のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 1 】

配列番号 25 は、重鎖可変受容体 I M G T 受入番号 I G H V 1 - 6 9 - 2 * 0 1 のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 2 】

配列番号 26 は、重鎖可変受容体 I M G T 受入番号 I G K J 1 * 0 1 のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 3 】

配列番号 27 は、軽鎖可変受容体 I M G T 受入番号 I G K V 2 - 3 0 * 0 2 のアミノ酸配列を示す。

40

【 0 0 8 4 】

配列番号 28 は、軽鎖可変受容体 I M G T 受入番号 I G K J 2 * 0 1 のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 5 】

配列番号 29 は、軽鎖可変受容体受入番号 A A Z 0 9 0 4 8 . 1 のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 8 6 】

配列番号 30 は、マウス 3 D 6 抗体の重鎖可変領域をコードする核酸配列を示す。

【 0 0 8 7 】

配列番号 31 は、マウス 3 D 6 抗体の軽鎖可変領域をコードする核酸配列を示す。

【 0 0 8 8 】

50

配列番号 32 は、マウス 3 D 6 抗体のカバット C D R - H 1 のアミノ酸配列を示す。

【0089】

配列番号 33 は、マウス 3 D 6 抗体のコチア C D R - H 1 のアミノ酸配列を示す。

【0090】

配列番号 34 は、マウス 3 D 6 抗体のコチア C D R - H 2 のアミノ酸配列を示す。

【0091】

配列番号 35 は、マウス 3 D 6 抗体の A b M C D R - H 2 のアミノ酸配列を示す。

【0092】

配列番号 36 は、マウス 3 D 6 抗体の C o n t a c t C D R - L 1 のアミノ酸配列を示す。

10

【0093】

配列番号 37 は、マウス 3 D 6 抗体の C o n t a c t C D R - L 2 のアミノ酸配列を示す。

【0094】

配列番号 38 は、マウス 3 D 6 抗体の C o n t a c t C D R - L 3 のアミノ酸配列を示す。

【0095】

配列番号 39 は、マウス 3 D 6 抗体の C o n t a c t C D R - H 1 のアミノ酸配列を示す。

【0096】

配列番号 40 は、マウス 3 D 6 抗体の C o n t a c t C D R - H 2 のアミノ酸配列を示す。

20

【0097】

配列番号 41 は、マウス 3 D 6 抗体の C o n t a c t C D R - H 3 のアミノ酸配列を示す。

【0098】

配列番号 42 は、ヒト化 3 D 6 抗体 (h u 3 D 6 V H v 5、h u 3 D 6 V H v 1 b A 1 1 B 6 G 2、h u 3 D 6 V H v 1 b A 1 1 B 6 H 3、h u 3 D 6 V H v 1 e、および h u 3 D 6 V H v 1 f と同様) の別のカバット-コチアの組み合わせ C D R - H 1 のアミノ酸配列を示す。

30

【0099】

配列番号 43 は、ヒト化 3 D 6 抗体 (h u 3 D 6 V H v 5 および h u 3 D 6 V H v 1 b A 1 1 B 6 H 3 と同様) の別のカバット C D R - H 2 のアミノ酸配列を示す。

【0100】

配列番号 44 は、マウス 3 D 6 および選択ヒト化 3 D 6 抗体 (V H v 1、V H v 2、V H v 1 b、V H v 1 b A 1 1、および V H v 5) (P C T / I B 2 0 1 7 / 0 5 2 5 4 4 号の図 2 で「M a j o r i t y」と標識) の重鎖可変領域中のコンセンサスアミノ酸配列を示す。

【0101】

配列番号 45 は、マウス 3 D 6 および選択ヒト化 3 D 6 抗体 (P C T / I B 2 0 1 7 / 0 5 2 5 4 4 号の図 3 で「M a j o r i t y」と標識) の軽鎖可変領域間のコンセンサスアミノ酸配列を示す。

40

【0102】

配列番号 46 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V H v 1 b A 1 1 B 6 G 2 の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0103】

配列番号 47 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V H v 1 b A 1 1 B 6 H 3 の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0104】

配列番号 48 は、ヒト化 3 D 6 抗体 h u 3 D 6 V H v 1 c の重鎖可変領域のアミノ酸配

50

列を示す。

【0105】

配列番号49は、ヒト化3D6抗体hu3D6VHv1dの重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0106】

配列番号50は、ヒト化3D6抗体hu3D6VHv1eの重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0107】

配列番号51は、ヒト化3D6抗体hu3D6VHv1fの重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0108】

配列番号52は、ヒト化3D6抗体hu3D6VHv3の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0109】

配列番号53は、ヒト化3D6抗体hu3D6VHv3bの重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0110】

配列番号54は、ヒト化3D6抗体hu3D6VHv3cの重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0111】

配列番号55は、ヒト化3D6抗体hu3D6VHv4の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0112】

配列番号56は、ヒト化3D6抗体hu3D6VHv4bの重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0113】

配列番号57は、ヒト化3D6抗体hu3D6VHv4cの重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0114】

配列番号58は、ヒト化3D6抗体(hu3D6VH1cと同様)の別のカバットーコチアの組み合わせCDR-H1のアミノ酸配列を示す。

【0115】

配列番号59は、ヒト化3D6抗体(hu3D6VHv1d、hu3D6VHv3c、およびhu3D6VHv4cと同様)の別のカバットーコチアの組み合わせCDR-H1のアミノ酸配列を示す。

【0116】

配列番号60は、ヒト化3D6抗体(hu3D6VHv3bおよびhu3D6VHv4bと同様)の別のカバットーコチアの組み合わせCDR-H1のアミノ酸配列を示す。

【0117】

配列番号61は、ヒト化3D6抗体(hu3D6VHv1bA11B6G2と同様)の別のカバットCDR-H2のアミノ酸配列を示す。

【0118】

配列番号62は、ヒト化3D6抗体(hu3D6VHv1c、hu3D6VHv3b、およびhu3D6VHv4bと同様)の別のカバットCDR-H2のアミノ酸配列を示す。

【0119】

配列番号63は、ヒト化3D6抗体(hu3D6VHv1d、hu3D6VHv1f、hu3D6VHv3c、およびhu3D6VHv4cと同様)の別のカバットCDR-H2のアミノ酸配列を示す。

【0120】

配列番号64は、ヒト化3D6抗体(hu3D6VHv1eと同様)の別のカバットC

10

20

30

40

50

DR-H2のアミノ酸配列を示す。

【0121】

配列番号65は、ヒト化3D6抗体(hu3D6VHv1fと同様)の別のカバットCDR-H3のアミノ酸配列を示す。

【0122】

配列番号66は、マウス6A10抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0123】

配列番号67は、マウス6A10抗体のカバット／コチアの組み合わせCDR-H1のアミノ酸配列を示す。

【0124】

配列番号68は、マウス6A10抗体のカバットCDR-H2のアミノ酸配列を示す。

【0125】

配列番号69は、マウス6A10抗体のカバットCDR-H3のアミノ酸配列を示す。

【0126】

配列番号70は、重鎖ヒト化のための構造テンプレートとして使用したマウス抗体(pdbコード1CR9)のVH領域のアミノ酸配列を示す。

【0127】

配列番号71は、選択ヒト化3D6抗体(VHv1、VHv1b、VHv1bA11、VHv1bA11B6G2、VHv1bA11B6H3、VHv1c、VHv1d、VHv1e、VHv1f、VHv2、VHv3、VHv3b、VHv3c、VHv4、VHv4b、VHv4c、およびVHv5)(PCT/IB2017/052544号の図4Aおよび4Bでは「Majority」と標識)の重鎖可変領域中のコンセンサスアミノ酸配列を示す。

【0128】

配列番号72は、キメラ3D6抗体の重鎖のアミノ酸配列を示す。

【0129】

配列番号73は、キメラ3D6抗体の軽鎖のアミノ酸配列を示す。

【0130】

配列番号74は、重鎖可変構造モデル受入番号5MYX-VH__mStのアミノ酸配列を示す。

【0131】

配列番号75は、重鎖可変受容体受入番号2RCS-VH__huFrwkのアミノ酸配列を示す。

【0132】

配列番号76は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb1のアミノ酸配列を示す。

【0133】

配列番号77は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb2のアミノ酸配列を示す。

【0134】

配列番号78は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb3のアミノ酸配列を示す。

【0135】

配列番号79は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb4のアミノ酸配列を示す。

【0136】

配列番号80は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb5のアミノ酸配列を示す。

【0137】

配列番号81は、軽鎖可変構造モデル受入番号5MYX-VL__mStのアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を示す。

【0138】

配列番号82は、軽鎖可変受容体受入番号ARX71335-VL_huFrwkのアミノ酸配列を示す。

【0139】

配列番号83は、ヒト化3D6抗体の軽鎖可変領域hu3D6VLvb1のアミノ酸配列を示す。

【0140】

配列番号84は、ヒト化3D6抗体の軽鎖可変領域hu3D6VLvb2のアミノ酸配列を示す。

【0141】

配列番号85は、ヒト化3D6抗体の軽鎖可変領域hu3D6VLvb3のアミノ酸配列を示す。

【0142】

配列番号86は、ヒト化3D6抗体の別のカバットーコチアの組み合わせCDR-H1のアミノ酸配列を示す(hu3D6VHvb4およびhu3D6VHvb5と同様)。

【0143】

配列番号87は、ヒト化3D6抗体の別のカバットCDR-H2のアミノ酸配列を示す(hu3D6VHvb3およびhu3D6VHvb4と同様)。

【0144】

配列番号88は、ヒト化3D6抗体の別のカバットCDR-H2のアミノ酸配列を示す(hu3D6VHvb5と同様)。

【0145】

配列番号89は、ヒト化3D6抗体の別のカバットCDR-L1のアミノ酸配列を示す(hu3D6VLvb3と同様)。

【0146】

配列番号90は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb6のアミノ酸配列を示す。

【0147】

配列番号91は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb7のアミノ酸配列を示す。

【0148】

配列番号92は、ヒト化3D6抗体の別のカバットCDR-H2のアミノ酸配列を示す(hu3D6VHvb6およびhu3D6VHvb7と同様)。

【0149】

配列番号93は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb1をコードする核酸配列を示す。

【0150】

配列番号94は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb2をコードする核酸配列を示す。

【0151】

配列番号95は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb3をコードする核酸配列を示す。

【0152】

配列番号96は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb4をコードする核酸配列を示す。

【0153】

配列番号97は、ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb5をコードする核酸配列を示す。

【0154】

10

20

30

40

50

配列番号 98 は、ヒト化 3 D 6 抗体の重鎖可変領域 h u 3 D 6 V H v b 6 をコードする核酸配列を示す。

【 0 1 5 5 】

配列番号 99 は、ヒト化 3 D 6 抗体の重鎖可変領域 h u 3 D 6 V H v b 7 をコードする核酸配列を示す。

【 0 1 5 6 】

配列番号 100 は、ヒト化 3 D 6 抗体の軽鎖可変領域 h u 3 D 6 V L v b 1 をコードする核酸配列を示す。

【 0 1 5 7 】

配列番号 101 は、ヒト化 3 D 6 抗体の軽鎖可変領域 h u 3 D 6 V L v b 2 をコードする核酸配列を示す。

【 0 1 5 8 】

配列番号 102 は、ヒト化 3 D 6 抗体の軽鎖可変領域 h u 3 D 6 V L v b 3 をコードする核酸配列を示す。

【 0 1 5 9 】

配列番号 103 は、代表的な I g G 1 重鎖定常領域のアミノ酸配列を示す。

【 0 1 6 0 】

配列番号 104 は、代表的なカップ軽鎖定常領域のアミノ酸配列を示す。

【 0 1 6 1 】

配列番号 105 は、代表的な I g G 1 重鎖定常領域をコードする核酸配列を示す。

【 0 1 6 2 】

配列番号 106 は、代表的なカップ軽鎖定常領域をコードする核酸配列を示す。

【 0 1 6 3 】

定義

モノクローナル抗体またはその他の生物学的実体は通常、単離型で提供される。これは、抗体またはその他の生物学的実体が通常、干渉タンパク質およびその製造または精製から生じる他の混入物に対して少なくとも 50 % w / w の純度であることを意味するが、そのモノクローナル抗体が、過剰の薬学的に許容されるキャリア（単一または複数）または使用を容易にすることが意図される他のピークルと組み合わせられる可能性を排除しない。時には、モノクローナル抗体は、干渉タンパク質および製造または精製から生じる他の混入物に対して少なくとも 60 %、70 %、80 %、90 %、95 % または 99 % w / w の純度である。単離モノクローナル抗体またはその他の生物学的実体は、多くの場合、その精製後に残る主要な巨大分子種である。

【 0 1 6 4 】

抗体のその標的抗原に対する特異的結合は、少なくとも 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、または 10^{12} M^{-1} の親和性および／または結合活性を意味する。特異的結合は、それが大きさにおいて検出可能なほど高く、さらに少なくとも 1 つの無関係な標的に生じる非特異的結合と区別可能である結合である。特異的結合は、特定の官能基または特定の空間的嵌合（例えば、ロック・アンド・キータイプ）間の結合の形成の結果であり得るが、非特異的結合は、通常、ファンデルワールス力の結果である。しかし、特異的結合は、必ずしも抗体が唯一の標的に結合することを意味するものではない。

【 0 1 6 5 】

基本的な抗体構造単位は、サブユニットの四量体である。四量体はそれぞれ、ポリペプチド鎖の 2 つの同一の対を含み、各対は 1 つの「軽」鎖（約 25 kDa）および 1 つの「重」鎖（約 50 ~ 70 kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に関与する約 100 ~ 110 個またはそれを超えるアミノ酸の可変領域を含む。切断可能なシグナルペプチドに連結されたこの可変領域が、最初に発現される。シグナルペプチドを含まない可変領域は、しばしば成熟可変領域と呼ばれる。したがって、例えば、軽鎖の成熟可変領域は、軽鎖シグナルペプチドを含まない軽鎖可変領域を意味する。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に関与する定常領域を規定する。

【0166】

軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類され、それぞれIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEとして抗体のアイソタイプを規定する。軽鎖および重鎖内で、可変領域および定常領域は、約12個以上のアミノ酸の「J」領域によって連結されており、重鎖はまた、約10個以上のアミノ酸の「D」領域を含む。（概論としては、Fundamental Immunology, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y., 1989, Ch. 7（本出願において、参照によりその全体が組み込まれる））。

【0167】

免疫グロブリン軽鎖または重鎖可変領域（本明細書においては、それぞれ、「軽鎖可変ドメイン」（VLドメイン）または「重鎖可変ドメイン」（「VHドメイン」）としても参照される）は、3つの「相補性決定領域」または「CDR」により分断された「フレームワーク」領域からなる。フレームワーク領域は、抗原のエピトープに特異的に結合するためにCDRを整列させる役割をする。CDRは、主に抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を含む。アミノ末端からカルボキシル末端まで、VLおよびVHの両ドメインは、次のフレームワーク（FR）およびCDR領域：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含む。VLドメインのCDR1、2、および3はまた、本明細書では、それぞれ、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3；VHドメインのCDR1、2、および3はまた、本明細書では、それぞれ、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3とも呼ばれる。本出願が、C末端残基としてRを有するVL配列を開示する場合、このRは代わりに、軽鎖定常領域のN末端残基であると見なすことができる。したがって本出願は、C末端Rを有しないVL配列を開示していることも理解されなければならない。

【0168】

アミノ酸のそれぞれVLおよびVHドメインへの帰属は、CDRのいずれかの従来の定義と一致する。従来の定義は、カバットによる定義（Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)、コチアによる定義（Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342:878-883, 1989）; Chothia Kabat CDRの組合せ、この場合、CDR-H1は、ChothiaとKabat CDRの組み合わせである; Oxford Molecular's antibody modelling softwareにより使用されるAbMの定義; および、Martinら（bioinfo.org.uk/abs）によるcontactの定義を含む（表1参照）。カバットは、異なる重鎖間または異なる軽鎖間の対応する残基に同じ番号が割り当てられる、広く使用されているナンバリング規則（カバットナンバリング）を提供する。抗体が特定のCDR定義（例えば、カバット）によるCDRを含むと言われる場合、その定義は、抗体中に存在する最小数のCDR残基（すなわち、カバットCDR）を規定する。別の従来のCDR定義内に入るが、その指定定義外であるその他の残基も同様に存在することを排除しない。例えば、カバットにより定義されるCDRを含む抗体は、他の可能性の内で、CDRがカバットCDR残基を含み、他のCDR残基を含まない抗体、およびCDR H1がコチア-カバットの組み合わせCDR H1であり、その他のCDRがカバットCDR残基を含み、他の定義に基づく追加のCDR残基を含まない抗体を含む。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1 カバットナンバリングを用いた C D R の従来の定義

ループ	カバット	コチア	カバットと コチアとの 組み合わせ	AbM	Contact
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

*コチアによる C D R - H 1 は、H 3 2、H 3 3、または H 3 4 で終わる場合がある（ループの長さに応じて）。これは、カバットナンバリングスキームが追加の残基を 3 5 A および 3 5 B に置き、コチアナンバリングは、それらを 3 1 A および 3 1 B に置いているためである。H 3 5 A も H 3 5 B（カバットナンバリング）も存在しない場合、コチア C D R - H 1 ループは H 3 2 で終わる。H 3 5 A のみが存在する場合、それは H 3 3 で終わる。H 3 5 A および H 3 5 B の両方が存在する場合、それは H 3 4 で終わる。

【0169】

「抗体」という用語は、完全な抗体およびその結合フラグメントを含む。通常、単離された重鎖、軽鎖 F a b、F a b'、F (a b')₂、F (a b)₂ c、D a b、ナノボディ、および F v を含む、フラグメントは、由来元の完全な抗体と標的への特異的結合を競合する。フラグメントは、組換え DNA 技術によって、または完全な免疫グロブリンの酵素的または化学的分離により産生できる。用語「抗体」はまた、二重特異性抗体および／またはヒト化抗体も含む。二重特異性または二価抗体は、2つの異なる重鎖／軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である（例えば、Song s i v i l a i and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992) を参照されたい）。いくつかの二重特異性抗体では、2つの異なる重鎖／軽鎖対は、ヒト化 3 D 6 重鎖／軽鎖対および 3 D 6 により結合されるものよりタウ上の異なるエピトープに特異的な重鎖／軽鎖対を含む。

【0170】

いくつかの二重特異性抗体では、1つの重鎖／軽鎖対は、以下でさらに開示されるヒト化 3 D 6 抗体であり、もう一方の重鎖／軽鎖対は、血液脳関門上に発現した受容体、例えば、インスリン受容体、インスリン様増殖因子 (I G F) 受容体、レプチン受容体、またはリポタンパク質受容体、またはトランスフェリン受容体に結合する抗体由来である (F r i d e n et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4771-4775, 1991; F r i d e n et al., Science 259:373-377, 1993)。このような二重特異性抗体は、受容体媒介トランスサイトーシスにより、血液脳関門を横切って移送できる。二重特異性抗体の脳による取込は、特異的抗体を血液脳関門受容体に対する親和性を減らすように設計することにより、さらに高めることができる。受容体に対する低下した親和性により、脳内でのより広汎な分布が得られる（例えば、Atwal et al., Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yu et al., Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2

011を参照)。

【0171】

代表的二重特異性抗体は、次記であってもよい：(1)二重可変ドメイン抗体(DVD-Ig)、この場合、各軽鎖および重鎖は、短ペプチド結合を介して直列の2つの可変ドメインを含む(Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010))；(2) Tandab、これは、2つの単鎖ディアボディの融合体で、それぞれの標的抗原に対し2つの結合部位を有する四価の二重特異性抗体を生じる。(3)フレキシボディ(flexibody)、これは、scFvとディアボディの組み合わせで、多価分子を生ずる；(4)いわゆる「dock and lock」分子、プロテインキナーゼAにおける「二量体化およびドッキングドメイン」に基づいたもので、これをFabに適用すると、異なるFabフラグメントに結合した2つの同じFabフラグメントからなる三価の二重特異性結合タンパク質を得ることができる；または(5)いわゆるスコープオン分子、これは、例えば、ヒトFc領域の両方の終端に融合した2つのscFvを含む。二重特異性抗体を調製するのに有用なプラットフォームの例は、BiTE (Micromet)、DART (MacroGenics)、FcabおよびMab2 (F-star)、Fc改変IgG (Xencor) または DuoBody (Fabアーム交換に基づく、Genmab) を含む。

【0172】

用語「エピトープ」は、抗体が結合する抗原上の部位を意味する。エピトープは、連続アミノ酸または1つもしくは複数のタンパク質の3次折り畳み構造によって並置された非連続アミノ酸から形成され得る。連続アミノ酸から形成されるエピトープ(線形エピトープとしても知られる)は通常、変性溶媒に曝露されても保持されるが、三次フォールディングによって形成されたエピトープ(立体構造エピトープとしても知られる)は通常、変性溶媒での処理で失われる。エピトープは、典型的には、独特の空間高次構造において少なくとも3個以上、通常は少なくとも5個または8~10個のアミノ酸を含む。エピトープの空間的高次構造を決定する方法は、例えば、x線結晶学および2次元核磁気共鳴を含む。例えば、Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)を参照されたい。

【0173】

同じまたは重複するエピトープを認識する抗体は、標的抗原に対して他方の抗体の結合と競合する一方の抗体の能力を示す簡単な免疫アッセイで特定できる。抗体のエピトープはまた、その抗原に結合した抗体のX線結晶解析により接触残基を特定して、決定することもできる。あるいは、一方の抗体の結合を低減または解消する抗原内の全てのアミノ酸変異が、他方の結合を低減または解消する場合は、2つの抗体は同じエピトープを有する。一方の抗体の結合を低減または解消するいくつかのアミノ酸変異が、他方抗体の結合を低減または解消する場合は、2つの抗体は重複するエピトープを有する。

【0174】

抗体間の競合は、試験抗体が共通抗原への参照抗体の特異的結合を阻害するアッセイによって決定される(例えば、Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990)。競合結合アッセイで測定した時、過剰(例えば、少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍または100倍)の試験抗体が参照抗体の結合を少なくとも50%阻害する場合、試験抗体は参照抗体と競合する。いくつかの試験抗体は、参照抗体の結合を、少なくとも75%、90%または99%阻害する。競合アッセイによって特定される抗体(競合抗体)は、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体、および立体障害が起こるために、参照抗体が結合するエピトープに十分近位にある隣接エピトープに結合する抗体を含む。

【0175】

用語の「薬学的に許容可能な」は、キャリア、希釈剤または賦形剤、または補助材料が、他の製剤成分と適合し、レシピエントに実質的に有害ではないことを意味する。

【0176】

「患者」という用語は、予防的処置または治療的処置のいずれかを受けるヒトおよび他の哺乳動物対象を含む。

【0177】

対象が、少なくとも1つの既知のリスク因子（例えば、遺伝的、生化学的、家族歴、状況暴露）を有し、そのリスク因子を有する個体で、そのリスク因子がない個体よりも疾患を発症するリスクが統計的に有意に高くなる場合、個体は疾患のリスクが高い。

10

【0178】

用語の「生物試料」は、生物源、例えば、ヒトまたは哺乳動物対象内のまたはそれから得ることができる生体物質の試料を意味する。このような試料は、臓器、オルガネラ、組織、組織の切片、体液、末梢血、血漿、血清、細胞、タンパク質およびペプチドなどの分子、およびこれら由来の任意の部分またはその組み合わせであってよい。用語の「生物試料」はまた、試料の処理により得られる任意の材料を包含し得る。由来材料には、細胞またはそれらの子孫を含み得る。生物試料の処理は、濾過、蒸留、抽出、濃縮、固定、干渉成分の不活化、などの1種または複数を含み得る。

【0179】

用語の「コントロール試料」は、タウ関連疾患罹患領域を含むことが知られていないもしくはそのように疑われていないか、または少なくとも所定のタイプの疾患領域を含むと知られていないもしくはそれを含まないと疑われていない生物試料を意味する。コントロール試料は、タウ関連疾患に罹患していない個体から得ることができる。あるいは、コントロール試料は、タウ関連疾患に罹患していない患者から得ることができる。このような試料は、生物試料がタウ関連疾患を含むと考えられるのと同時にまたは別の時期に得ることができる。生物試料およびコントロール試料は両方とも、同じ組織から得ることができる。好ましくは、コントロール試料は、基本的にまたは完全に、健常な領域からなり、タウ関連疾患罹患領域を含むと思われる生物試料と比較して使用できる。好ましくは、コントロール試料の組織は、生物試料中の組織と同じタイプである。好ましくは、生物試料中にあると思われるタウ関連疾患罹患細胞は、コントロール試料中の細胞型と同じ細胞型（例えば、ニューロンまたはグリア）から生ずるのが好ましい。

20

30

【0180】

用語の「疾患」は、生理学的機能を損なう何らかの異常な状態を意味する。この用語は、病因の性質に関係なく、生理学的機能が障害される、任意の障害、疾病、異常性、病理学、病的状態、状態、または症候群を包含する広い意味で使用される。

【0181】

用語の「症状」は、対象が気付くような歩調の変化などの疾患の主観的証拠を意味する。「徴候」は、医師が認めるような疾患の客観的証拠を意味する。

【0182】

用語の「処置に対する陽性反応」は、処置を受けていないコントロール集団での平均的反応と比較して、患者集団中の個々の患者におけるより好ましい反応または平均的反応を意味する。

40

【0183】

アミノ酸置換を保存的または非保存的アミノ酸置換として分類する目的のために、アミノ酸は次のようにグループ化される：グループI（疎水性側鎖）：met、ala、val、leu、ile；グループII（中性親水性側鎖）：cys、ser、thr；グループIII（酸性側鎖）：asp、glu；グループIV（塩基性側鎖）：asn、gln、his、lys、arg；グループV（鎖の配向に影響を与える残基）：gly、pro；およびグループVI族（芳香族側鎖）：trp、tyr、phe。保存的置換は、同じクラスのアミノ酸間の置換を含む。非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバ

50

ーを別のクラスのメンバーと交換することである。

【0184】

パーセント配列同一性は、カバットナンバリング規則により最大限整列させた抗体配列を用いて決定される。整列後、対象抗体領域（例えば、重鎖または軽鎖の全体の成熟可変領域）を参照抗体の同じ領域と比較する場合、対象抗体領域と参照抗体領域の間のパーセント配列同一性は、対象抗体領域と参照抗体領域の両方において同じアミノ酸が占有する位置の数を、整列させた2つの領域内の位置の総数（ギャップはカウントしない）で割り、100を乗じてパーセンテージに変換したものである。

【0185】

1つまたは複数の記述要素を「含む (comprising)」または「含む (including)」組成物または方法は、特に記述していない他の要素を含んでよい。例えば、抗体を「含む (comprises)」または「含む (includes)」組成物は、抗体単独、または他の成分と組み合わせた抗体を含んでもよい。

【0186】

値の範囲の表記は、その範囲内またはその範囲を規定する全ての整数、およびその範囲内の整数により規定される全ての部分範囲を含む。

【0187】

文脈から別義が明らかでない限り、用語の「約」は、ごくわずかな変動、例えば、示した値の測定の標準的許容誤差（例えば、SEM）を包含する。

【0188】

統計的有意性とは、 $p < 0.05$ を意味する。

【0189】

冠詞の単数形（「a」、「an」および「the」）は、文脈により明確に別義が示されない限り、複数の参照物を包含する。例えば、用語「化合物 (a compound)」または用語「少なくとも1つの化合物」は、その混合物を含めて、複数の化合物を包含することができる。

【0190】

詳細な説明

I. 概要

本発明は、タウに結合する抗体を提供する。いくつかの抗体は、ヒトのタウの微小管結合領域 (MTBR) 領域内のエピトープに特異的に結合する。いくつかの抗体は、リン酸化状態に関係なくタウに結合する。本発明のいくつかの抗体は、タウに関連する病勢悪化およびタウに関連する病状悪化を抑制するかまたは遅らせるのに役立つ。機序を理解することは本発明の実施に必要なではないが、数ある機序の中でも特に、非毒性高次構造を安定化することにより、病原性タウ形態の細胞間もしくは細胞内伝播を抑制することにより、タウのリン酸化の阻害により、タウの細胞への結合を妨害することにより、またはタウのタンパク質切断を誘導することにより、抗体による、タウの食作用の誘導、タウの分子間もしくは分子内凝集の抑制または他の分子に対する結合の抑制がもたらされる結果として、毒性の低下が生じ得る。このような抗体を誘導する本発明の抗体または薬剤は、アルツハイマー病およびタウと関連する他の疾患の処置法または効果的な予防法に使用できる。

【0191】

II. 標的分子

文脈から別義が明らかな場合を除き、タウへの言及は、翻訳後修飾（例えば、リン酸化、糖化、またはアセチル化）が存在するか否かにかかわらず、全てのアイソフォームを含む天然のヒト型タウを意味する。ヒトの脳にはタウの6つの主要なアイソフォーム（スプライスバリエント）が生じる。これらの変異型の最長のものは、最初のメチオニン残基が切断された441個のアミノ酸を有する。残基は、441アイソフォームに従って番号が付けられている。したがって、例えば、位置404でのリン酸化への言及は、441アイソフォームの位置404、または441アイソフォームと最大限整列させた場合には任意の他のアイソフォームの対応する位置を意味する。アイソフォームのアミノ酸配列および

10

20

30

40

50

スイスプロット番号を以下に示す。

P 1 0 6 3 6 - 8 (配列番号 1)

1 0	2 0	3 0
MAEPRQEF EV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT
4 0	5 0	6 0
MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
7 0	8 0	9 0
SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA
1 0 0	1 1 0	1 2 0
AQPHTEIPEG	TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG
1 3 0	1 4 0	1 5 0
HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK
1 6 0	1 7 0	1 8 0
IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK
1 9 0	2 0 0	2 1 0
TPPSSGEPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSR
2 2 0	2 3 0	2 4 0
RTPSLPTPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
2 5 0	2 6 0	2 7 0
SRLQTAPVPM	PDLKNVKS KI	GSTENLKHQP
2 8 0	2 9 0	3 0 0
GGGKVQIINK	KLDLSNVQSK	CGSKDNIKHV
3 1 0	3 2 0	3 3 0
PGGGSVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH
3 4 0	3 5 0	3 6 0
KPGGGQVEVK	SEKLD FKDRV	QSKI GSLDNI
3 7 0	3 8 0	3 9 0
THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA
4 0 0	4 1 0	4 2 0
EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN	VSSTG SIDMV
4 3 0	4 4 0	
DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L

P 1 0 6 3 6 - 7 (配列番号 2)

1 0	2 0	3 0
MAEPRQEF EV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT
4 0	5 0	6 0
MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
7 0	8 0	9 0
SETSDAKSTP	TAEAE EAGIG	DTPSLEDEAA
1 0 0	1 1 0	1 2 0
GHVTQARMVS	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT
1 3 0	1 4 0	1 5 0
KIATPRGAAP	PGQKGQANAT	RIPAKTPPAP
1 6 0	1 7 0	1 8 0
KTPPSSGEP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
1 9 0	2 0 0	2 1 0
SRTPSLPTPP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA
2 2 0	2 3 0	2 4 0
KSRLQTAPVP	MPDLKNVKS KI	IGSTENLKHQ
2 5 0	2 6 0	2 7 0

10

20

30

40

50

P G G G K V Q I I N K K L D L S N V Q S K C G S K D N I K H
280 290 300
V P G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N I H
310 320 330
H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V Q S K I G S L D N
340 350 360
I T H V P G G G N K K I E T H K L T F R E N A K A K T D H G
370 380 390
A E I V Y K S P V V S G D T S P R H L S N V S S T G S I D M
400 410
V D S P Q L A T L A D E V S A S L A K Q G L
P 10636-6 (4RONヒトタウ) (配列番号3)

10 20 30
M A E P R Q E F E V M E D H A G T Y G L G D R K D Q G G Y T
40 50 60
M H Q D Q E G D T D A G L K A E E A G I G D T P S L E D E A
70 80 90
A G H V T Q A R M V S K S K D G T G S D D K K A K G A D G K
100 110 120
T K I A T P R G A A P P G Q K G Q A N A T R I P A K T P P A
130 140 150
P K T P P S S G E P P K S G D R S G Y S S P G S P G T P G S
160 170 180
R S R T P S L P T P P T R E P K K V A V V R T P P K S P S S
190 200 210
A K S R L Q T A P V P M P D L K N V K S K I G S T E N L K H
220 230 240
Q P G G G K V Q I I N K K L D L S N V Q S K C G S K D N I K
250 260 270
H V P G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N I
280 290 300
H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V Q S K I G S L D
310 320 330
N I T H V P G G G N K K I E T H K L T F R E N A K A K T D H
340 350 360
G A E I V Y K S P V V S G D T S P R H L S N V S S T G S I D
370 380
M V D S P Q L A T L A D E V S A S L A K Q G L
P 10636-5 (配列番号4)

10 20 30
M A E P R Q E F E V M E D H A G T Y G L G D R K D Q G G Y T
40 50 60
M H Q D Q E G D T D A G L K E S P L Q T P T E D G S E E P G
70 80 90
S E T S D A K S T P T A E D V T A P L V D E G A P G K Q A A
100 110 120
A Q P H T E I P E G T T A E E A G I G D T P S L E D E A A G
130 140 150
H V T Q A R M V S K S K D G T G S D D K K A K G A D G K T K
160 170 180

10

20

30

40

50

IATPRGAAPP	GQKGGQANATR	IPAKTPPAPK
190	200	210
TPPSSSGEPPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSR
220	230	240
RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
250	260	270
SRLQTAPVPM	PDLKNVKS	IGSTENLKHQP
280	290	300
GGGKVQIVYK	PVDLSKVT	CGSLGNIHHK
310	320	330
PGGGQVEVKS	EKLDFKDRVQ	SKIGSLDNIT
340	350	360
HVPGGGGNKKI	ETHKLTFR	AKAKTDHGAE
370	380	390
IVYKSPVVSG	DTSPRHLSNV	SSTGSI
400	410	

SPQLATLADE VSASLAKQGL

P10636-4 (配列番号5)

10	20	30
MAEPRQEF	MEDHAGTYGL	GDRKDDQGGYT
40	50	60
MHQDQEGD	AGLKE	PTEDGSEEPG
70	80	90
SETSDAKSTP	TAEAE	DTPSLEDEAA
100	110	120
GHVTQARMVS	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT
130	140	150
KIATPRGAAP	PGQKGGQANAT	RIPAKTPPAP
160	170	180
KTPPSSSGEPP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
190	200	210
SRTPSLPTPP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA
220	230	240
KSRLQTAPVP	MPDLKNVKS	IGSTENLKHQ
250	260	270
PGGGKVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH
280	290	300
KPGGGQVEVK	SEKLDFKDRV	QSKIGSLDNI
310	320	330
THVPGGGNKK	IETHKLTFR	NAKAKTDHGA
340	350	360
EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN	VSSTGSI
370	380	

DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

P10636-2 (配列番号6)

10	20	30
MAEPRQEF	MEDHAGTYGL	GDRKDDQGGYT
40	50	60
MHQDQEGD	AGLKAEEAGI	GDTPSLEDEA
70	80	90

10

20

30

40

50

```

AGHVTQARMV  SKSKDGTGSD  DKKAKGADGK
      100          110          120
TKIATPRGAA  PPGQKGQANA  TRIPAKTPPA
      130          140          150
PKTPPSSGEP  PKSGDRSGYS  SPGSPGTPGS
      160          170          180
RSRTPSLPTP  PTREP KKVAV  VRTPPKSPSS
      190          200          210
AKSRLQTAPV  PMPDLKNVKS  KIGSTENLKH
      220          230          240
QPGGGKVQIV  YKPVDLSKVT  SKCGSLGNIH
      250          260          270
HKPGGGQVEV  KSEKLD FKDR  VQSKIGSLDN
      280          290          300
ITHVPGGGNK  KIETHKLTFR  ENAKAKTDHG
      310          320          330
AEIVYKSPVV  SGDTSPRHLS  NVSSTGSI DM
      340          350
VDSPQLATLA  DEVSASLAKQ  GL

```

【0192】

タウへの言及は、スイスプロットデータベースおよびその順列に列挙されている約30個の既知の天然の多様性、ならびに認知症、ピック病、核上性麻痺などのタウ病理に関連する変異を含む（例えば、スイスプロットデータベースおよびPorkaj, et al. Ann Neurol. 43: 815-825 (1998)を参照されたい）。441アイソフォームにより番号付けされたタウ変異のいくつかの例としては、アミノ酸残基257におけるリシンからスレオニンへの変異（K257T）、アミノ酸位置260におけるイソロイシンからバリンへの変異（I260V）、アミノ酸位置272におけるグリシンからバリンへの変異（G272V）、アミノ酸位置279におけるアスパラギンからリシンへの変異（N279K）、アミノ酸位置296におけるアスパラギンからヒスチジンへの変異（N296H）、アミノ酸位置301におけるプロリンからセリンへの変異（P301S）、アミノ酸301におけるプロリンからロイシンへの変異（P301L）、アミノ酸位置303におけるグリシンからバリンへの変異（G303V）、位置305におけるセリンからアスパラギンへの変異（S305N）、アミノ酸位置335におけるグリシンからセリンへの変異（G335S）、位置337におけるバリンからメチオニンへの変異（V337M）、位置342におけるグルタミン酸からバリンへの変異（E342V）、アミノ酸位置369におけるリシンからイソロイシンへの変異（K369L）、アミノ酸位置389におけるグリシンからアルギニンへの変異（G389R）、位置406におけるアルギニンからトリプトファンへの変異（R406W）が挙げられる。

【0193】

タウは、アミノ酸位置18、29、97、310、および394におけるチロシン、アミノ酸位置184、185、198、199、202、208、214、235、237、238、262、293、324、356、396、400、404、409、412、413、および422におけるセリン、ならびにアミノ酸位置175、181、205、212、217、231、および403におけるスレオニンを含む1つまたは複数のアミノ酸残基がリン酸化され得る。文脈から別義が明らかでない限り、タウまたはそれらのフラグメントへの言及は、そのアイソフォーム、変異体、およびアレルバリエントを含む天然のヒトアミノ酸配列を含む。

【0194】

III. 抗体

A. 結合特異性および機能特性

本発明は、タウに結合する抗体を提供する。いくつかの抗体は、ヒトのタウの微小管結合領域（MTBR）領域内のエピトープに特異的に結合する。いくつかの抗体はリン酸化状態に関係なくタウに結合する。いくつかの抗体は、リン酸化を受ける残基を含まないエピトープに結合する。これらの抗体は、天然源から精製するかまたは組換え発現させたタウポリペプチドで免疫することにより取得できる。抗体は、非リン酸化型のタウ、およびリン酸化を受けやすい1つもしくは複数の残基がリン酸化された形態のタウへの結合に関してスクリーニングできる。このような抗体は、好ましくは、非リン酸化タウと比較して、区別できない親和性で結合するか、またはリン酸化タウに少なくとも1.5倍、2倍または3倍の係数の範囲内で結合する（すなわち、「汎特異的である」）。3D6は、汎特異的モノクローナル抗体の一例である。本発明はまた、例えば、3D6のエピトープなどの上記の抗体のいずれかと同じエピトープに結合する抗体を提供する。また、例えば、3D6と競合するものなどの上記の抗体のいずれかとタウへの結合に関して競合する抗体も含まれる。

【0195】

文脈から別義が明らかでない限り、3D6への言及は、この抗体の、マウス、キメラ、ベニヤおよびヒト化型のいずれかに言及していると理解されるべきである。この抗体は、[受託番号]として寄託されている。この抗体は、配列番号1のMTBR領域内に特異的に結合する。この抗体は、リン酸化および非リン酸化タウの両方、非病理学的および病理学的形態ならびに高次構造のタウの両方、および誤って折り畳まれた／凝集した形態のタウに結合する能力をさらに特徴とする。6A10と呼称される抗体は、別のこのような代表的マウス抗体である。文脈から別義が明らかでない限り、6A10への言及は、この抗体の、マウス、キメラ、ベニヤおよびヒト化型のいずれかに言及していると理解されるべきである。6A10の重鎖のカバット／コチアの組み合わせCDRは、配列番号67、68、および69にそれぞれ示されており、また、6A10の軽鎖のカバットCDRは、それぞれ、配列番号12、13、および14に示されている。マウス6A10は、マウス3D6のVH鎖およびVL鎖と、それぞれ、82.1%のVH配列同一性および100%のVL配列同一性を共有している。

【0196】

本発明のいくつかの抗体は、3D6と呼称される抗体と、同じまたは重なり合うエピトープに結合する。この抗体の重鎖および軽鎖成熟可変領域の配列は、それぞれ、配列番号7および11に示されている。

【0197】

3D6の重鎖のカバット／コチアの組み合わせCDRは、配列番号8、9、および10にそれぞれ示されており、また、3D6の軽鎖のカバットCDRは、それぞれ、配列番号12、13、および14に示されている。

【0198】

表2は、カバット、コチア、コチアとカバットの組み合わせ（これは、本明細書では、「カバット／コチアの組み合わせ」とも呼ばれる）、AbM、およびContactにより定義される3D6 CDRを示す。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2 カバット、コチア、コチアとカバットとの組み合わせ、AbM、およびContactにより定義される3D6 CDR

ループ	カバット	コチア	カバットとコチアとの組み合わせ	AbM	Contact
L1	L24--L34 配列番号12	L24--L34 配列番号12	L24--L34 配列番号12	L24--L34 配列番号12	L30--L36 配列番号36
L2	L50--L56 配列番号13	L50--L56 配列番号13	L50--L56 配列番号13	L50--L56 配列番号13	L46--L55 配列番号37
L3	L89--L97 配列番号14	L89--L97 配列番号14	L89--L97 配列番号14	L89--L97 配列番号14	L89--L96 配列番号38
H1	H31--H35B 配列番号32	H26--H32 配列番号33	H26--H35B 配列番号8	H26--H35B 配列番号8	H30--H35B 配列番号39
H2	H50--H65 配列番号9	H52--H56 配列番号34	H50--H65 配列番号9	H50--H58 配列番号35	H47--H58 配列番号40
H3	H95--H102 配列番号10	H95--H102 配列番号10	H95--H102 配列番号10	H95--H102 配列番号10	H93--H101 配列番号41

【0199】

他の抗体は、3D6などの代表的な抗体の重鎖および軽鎖をコードするcDNAの変異誘発によって取得できる。成熟重鎖および／または軽鎖可変領域のアミノ酸配列において3D6または任意の他の代表的抗体もしくは抗体鎖と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であり、その機能特性を保持するモノクローナル抗体、および／または少数の機能的に重要でないアミノ酸置換（例えば、保存的置換）、欠失、もしくは挿入によってそれぞれの抗体とは異なるモノクローナル抗体も、本発明に含まれる。カバットによって定義されるような、3D6の対応するCDRと90%、95%、99%または100%同一であるいずれか従来の定義、好ましくはカバットの定義による少なくとも1つ、または全6つのCDRを有するモノクローナル抗体も含まれる。

【0200】

本発明はまた、完全にまたは実質的に3D6に由来するいくつかのまたは全ての（例えば、3、4、5、および6つの）CDRを有する抗体も提供する。このような抗体には、完全にまたは実質的に3D6の重鎖可変領域に由来する、少なくとも2つの、および通常3つ全てのCDRを有する重鎖可変領域および／または完全にまたは実質的に3D6の軽鎖可変領域に由来する、少なくとも2つの、および通常3つ全てのCDRを有する軽鎖可変領域を含めることができる。抗体は、重鎖および軽鎖の両方を含むことができる。CDRは、4、3、2、または1以下の置換、挿入、または欠失を含む場合、CDR-H2（カバットにより定義される場合）が6、5、4、3、2、または1以下の置換、挿入、または欠失を有することができることを除いて、実質的に、対応する3D6 CDR由来である。このような抗体は、成熟重鎖および／または軽鎖可変領域のアミノ酸配列で3D6と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有し、その機能特性を保持し得、および／または少数の機能的に重要でないアミノ酸置換（例えば、保存的置換）、欠失、もしくは挿入によって3D6の抗体とは異なり得る。

【0201】

このようなアッセイにより特定されたいくつかの抗体は、モノマー、誤って折り畳まれた、凝集した、リン酸化された、または非リン酸化形態のタウ等に結合できる。同様に、いくつかの抗体は、タウの非病理学的および病理学的形態および高次構造に対し免疫反応性である。

【0202】

B. ヒト化抗体

ヒト化抗体は遺伝子改変された抗体であり、非ヒト「ドナー」抗体由来のCDRがヒト「受容体」抗体配列にグラフト化されている（例えば、Queenの米国特許第5,530,101号および同第5,585,089号；Winterの米国特許第5,225,539号、Carterの米国特許第6,407,213号、Adairの米国特許第5,859,205号、およびFootteの米国特許第6,881,557号を参照されたい）。受容体抗体の配列は、例えば、成熟ヒト抗体配列、そのような配列の複合体、ヒト抗体配列のコンセンサス配列、または生殖細胞系列領域の配列であり得る。したがって、ヒト化抗体は、完全にもしくは実質的にドナー抗体由来の少なくとも3つ、4つ、5つまたは全てのCDR、ならびに可変領域フレームワーク配列および存在する場合には、完全にもしくは実質的にヒト抗体配列に由来する定常領域を有する抗体である。同様に、ヒト化重鎖は、完全にもしくは実質的にドナー抗体重鎖由来の少なくとも1つ、2つ、通常は全3つCDR、存在する場合には、実質的にヒト重鎖可変領域フレームワークおよび定常領域配列由来の重鎖可変領域フレームワーク配列および重鎖定常領域を有する。同様に、ヒト化軽鎖は、完全にもしくは実質的にドナー抗体軽鎖由来の少なくとも1つ、2つ、通常は全3つCDR、存在する場合には、実質的にヒト軽鎖可変領域フレームワークおよび定常領域配列由来の軽鎖可変領域フレームワーク配列および軽鎖定常領域を有する。ナノボディおよびdAb以外に、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖およびヒト化軽鎖を含む。ヒト化抗体中のCDRは、対応する残基（いずれかの従来方式により定義されるが好ましくは、カバットにより定義される）の少なくとも85%、90%、95%、または100%がそれぞれのCDR間で同一である場合に、実質的に非ヒト抗体中の対応するCDRに由来する。抗体鎖の可変領域フレームワーク配列または抗体鎖の定常領域は、カバットによって定義される対応する残基の少なくとも85%、90%、95%または100%が同一である場合に、それぞれ実質的にヒト可変領域フレームワーク配列またはヒト定常領域に由来する。2014年世界保健機関（WHO）ヒト化抗体の国際一般的名称（INN）定義に従いヒト化として分類されるためには、ヒト生殖細胞系列抗体配列と（すなわち、体細胞超変異の前に）少なくとも85%の同一性がなければならない。混合抗体は、1つの抗体鎖（例えば、重鎖）が閾値を満たし、残りの鎖（例えば、軽鎖）が閾値を満たさない抗体である。いずれの鎖も閾値を満たさない場合には、たとえ、両方の鎖の可変フレームワーク領域がいくつかの逆突然変異を有する実質的にヒトであるとしても、抗体はキメラとして分類される。Jones et al. (2016) The INNs and outs of antibody nonproprietary names, mAbs 8:1, 1-9, DOI:10.1080/19420862.2015.1114320を参照されたい。また、“WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)” (Internet) 2014. <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf> から入手可能。本文献は、参照により本明細書に組み込まれる。誤解を避けるために記すと、本明細書で使用される場合、用語の「ヒト化」は、2014 WHO INNヒト化抗体の定義に限定されることを意図していない。本明細書で提供されるいくつかのヒト化抗体は、ヒト生殖細胞系列配列に少なくとも85%の配列同一性を有し、また、本明細書で提供されるいくつかのヒト化抗体は、ヒト生殖細胞系列配列に対し85%未満の配列同一性を有する。本明細書で提供されるヒト化抗体のいくつかの重鎖は、ヒト生殖細胞系列配列に対し約60%~100%の

10

20

30

40

50

配列同一性、例えば、約60%~69%、70%~79%、80%~84%、または85%~89%の範囲などの配列同一性を有する。いくつかの重鎖は2014 WHO INN定義を下回り、例えば、ヒト生殖細胞系列配列に対し、約64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、または82%、83%または84%の配列同一性を有し、一方、他の重鎖は2014 WHO INN定義に適合し、ヒト生殖細胞系列配列に対し、約85%、86%、87%、88%、89%またはそれを超える配列同一性を有する。本明細書で提供されるヒト化抗体のいくつかの軽鎖は、ヒト生殖細胞系列配列に対し約60%~100%の配列同一性、例えば、80%~84%、または85%~89%の範囲などの配列同一性を有する。いくつかの軽鎖は2014 WHO INN定義を下回り、例えば、ヒト生殖細胞系列配列に対し、約81%、82%、83%、または84%の配列同一性を有し、一方、他の軽鎖は2014 WHO INN定義を満たし、ヒト生殖細胞系列配列に対し、約85%、86%、87%、88%、89%またはそれを超える配列同一性を有する。本明細書で提供される、2014 WHO INN定義により「キメラ」であるいくつかのヒト化抗体は、ヒト生殖細胞系列配列に対して85%未満の同一性を有する重鎖を、ヒト生殖細胞系列配列に対して85%未満の同一性を有する軽鎖と対をなして、有する。例えば、ヒト生殖細胞系列配列に対して少なくとも85%の同一性を有する重鎖を、ヒト生殖細胞系列配列に対して85%未満の同一性を有する軽鎖と対をなして有する本明細書で提供されるいくつかのヒト化抗体は、2014 WHO INN定義により「混合」であり、またはその逆も「混合」である。本明細書で提供されるいくつかのヒト化抗体は、2014 WHO INNの「ヒト化」の定義に適合し、ヒト生殖細胞系列配列に対して少なくとも85%の同一性を有する重鎖を、ヒト生殖細胞系列配列に対して少なくとも85%の同一性を有する軽鎖と対をなして有する。本発明の追加のヒト化抗体は、2014 WHO INNの「混合」の定義に適合する。

【0203】

ヒト化抗体は、マウス抗体由来の全6つのCDR（いずれかの従来方式により定義されるが、好ましくはカバットによって定義されるような）を包含する場合が多いが、マウス抗体由来の全てより少ないCDR（例えば、少なくとも3、4、または5個のCDR）でも作製できる（例えば、Pascalis et al., J. Immunol. 169: 3076, 2002; Vajdos et al., J. of Mol. Biol., 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36: 1079-1091, 1999; Tamura et al., J. Immunol., 164: 1432-1441, 2000）。

【0204】

いくつかの抗体では、CDRの一部のみ、すなわち、SDRと呼ばれる結合に必要なCDR残基のサブセットは、ヒト化抗体において結合を保持するために必要とされる。抗原に接触せず、SDR中に存在しないCDR残基は、以前の研究に基づいて（例えば、CDR H2中の残基H60~H65は必要とされない場合が多い）、コチア高頻度可変性ループ（Chothia, J. Mol. Biol. 196: 901, 1987）の外側にあるカバットCDRの領域から分子モデリングおよび／もしくは経験的に、またはGonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004に記載の通りに特定することができる。このようなヒト化抗体では、1つまたは複数のドナーCDR残基が存在しないか、またはドナーCDR全体が除去されている位置において、その位置を占めるアミノ酸は、受容体抗体配列中の対応する位置（カバットナンバリングによる）を占めるアミノ酸であり得る。CDR中に包含するドナーアミノ酸のための受容体のこのような置換の数は、競合する考慮事項のバランスを反映している。このような置換は、潜在的に、ヒト化抗体中のマウスアミノ酸の数を減少させ、結果として潜在的な免疫原性を減少させる点で、および／またはWHO INNの「ヒト化」の定義に適合させるために、都合がよい。しかし、置換はまた、親和性の変化を生ずることがあり、親和性の顕著な低下は避けるのが好ましい。CDR内の置換の位置および置換するアミノ酸も経験的に選択

できる。

【0205】

ヒト受容体抗体配列は、ヒト受容体配列の可変領域フレームワークとドナー抗体鎖の対応する可変領域フレームワークとの間に高度な配列同一性（例えば、65～85%の同一性）を提供するために、必要に応じて、多くの既知のヒト抗体配列の中から選択できる。

【0206】

重鎖の受容体配列の例は、PDBアクセッションコード2RCS-VH_huFrwk（配列番号75）のヒト化48G7Fabのヒト成熟重鎖可変領域である。3D6および48G7Fabの可変ドメインはまた、CDR-H1、H2ループについて同一の長さを共有する。重鎖の受容体配列の別の例は、IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）のヒト成熟重鎖可変領域である。IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）は、正準型のマウス3D6重鎖CDR-H1およびH2を共有する。IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）は、ヒト重鎖サブグループ1に属する。軽鎖の受容体配列の例は、PDBアクセッションコードヒト抗体ARX71335VL（配列番号82）のヒト成熟軽鎖可変領域である。3D6およびARX71335VL抗体の可変軽鎖ドメインはまた、CDR-L1、L2およびL3ループについて同一の長さを共有する。軽鎖の受容体配列の別の例は、IMGT番号IGKV2-30*02（配列番号27）のヒト成熟軽鎖可変領域である。IMGT番号IGKV2-30*02（配列番号27）は、マウス3D6と同じCDR-L1、CDR-L2およびL3の正準クラスを有する。IMGT番号IGKV2-30*02（配列番号27）は、ヒトカッパサブグループ2に属する。

【0207】

2つ以上のヒト受容体抗体配列が選択される場合、これらの受容体の複合体またはハイブリッドを使用でき、ヒト化軽鎖および重鎖可変領域の異なる位置で使用されるアミノ酸は、いずれかの使われるヒト受容体抗体配列から選択できる。例えば、IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）およびPDBアクセッションコード番号2RCS-VH_huFrwk（配列番号75）のヒト成熟重鎖可変領域が、3D6成熟重鎖可変領域のヒト化のための受容体配列として使用された。これらの2つの受容体が異なる位置の例が、位置H17（TまたはS）である。3D6重鎖可変領域のヒト化型は、この位置にどちらかのアミノ酸を含めることができる。例えば、ヒト成熟軽鎖可変領域IMGT番号IGKV2-30*02（配列番号27）およびPDBコード番号ARX71335VL_huFrwk（配列番号82）は、3D6成熟軽鎖可変領域のヒト化のための受容体配列として用いられた。これらの2つの受容体が異なる位置の例は、位置L100（QまたはA）である。3D6軽鎖可変領域のヒト化型は、この位置のどちらかのアミノ酸を含んでよい。

【0208】

ヒト可変領域フレームワーク残基由来の特定のアミノ酸は、CDR高次構造および／または抗原への結合に対するそれらの可能な影響に基づいて置換に関し選択できる。このような可能な影響の研究は、モデリング、特定の位置でのアミノ酸の特徴の検査、または特定のアミノ酸の置換もしくは変異誘発の効果の経験的観察によるものである。

【0209】

例えば、アミノ酸がマウス可変領域フレームワーク残基と選択したヒト可変領域フレームワーク残基との間で異なる場合、ヒトフレームワークアミノ酸は、マウス抗体由来の等価のフレームワークアミノ酸によって置換でき、その際、アミノ酸が、

（1）直接抗原と非共有結合する、

（2）CDR領域に隣接しているまたはカバットではなくコチアにより定義されたCDR内にある、

（3）そうでなければ、CDR領域と相互作用する（例えば、CDR領域の約6 Å内である）、（例えば、相同な既知免疫グロブリン鎖の解析された構造上で軽鎖または重鎖をモデリングすることにより識別される）、または

(4) VL-VH界面に関与する残基である、
ことを想定することは理にかなっている。

【0210】

本発明は、ヒト化型のマウス3D6抗体を提供し、これは、7個の例示されたヒト化重鎖成熟可変領域(hu3D6VHvb1(配列番号76)、hu3D6VHvb2(配列番号77)、hu3D6VHvb3(配列番号78)、hu3D6VHvb4(配列番号79)、hu3D6VHvb5(配列番号80)、hu3D6VHvb6(配列番号90)、およびhu3D6VHvb7(配列番号91))および3個の例示されたヒト化軽鎖成熟可変領域(hu3D6VLvb1(配列番号83)、hu3D6VLvb2(配列番号84)、およびhu3D6VLvb3(配列番号85))を含む。

10

【0211】

ある実施形態では、ヒト化配列は、QuickChange部位特異的変異誘発[Wang, W. and Malcolm, B. A. (1999) BioTechniques 26:680-682]を用いて複数の変異、欠失、および挿入が導入可能な2段PCRプロトコルを用いて生成される。

【0212】

Queenの米国特許第5,530,101号により定義されるとおり、クラス(1)~(3)のフレームワーク残基は、交互に正準およびバーニア(vernier)残基と呼ばれることもある。CDRループの高次構造の決定を支援するフレームワーク残基は、正準残基と呼ばれることもある(Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196,901-917(1987), Thornton & Martin J. Mol. Biol., 263:800-815(1996))。抗原結合ループの高次構造を支持し、抗原に対する抗体の適合を微調整する役割を果たすフレームワーク残基は、バーニア残基と呼ばれることもある(Foote & Winter, J. Mol. Bio 224:487-499(1992))。

20

【0213】

置換候補である他のフレームワーク残基は、潜在的なグリコシル化部位を作り出す。さらなる他の置換候補は、ヒト免疫グロブリンにとってその位置のものとしては通常とは異なる受容体ヒトフレームワークアミノ酸である。これらのアミノ酸は、マウスドナー抗体の等価位置のアミノ酸またはより典型的なヒト免疫グロブリンの等価位置由来のアミノ酸で置換できる。

30

【0214】

置換候補であるその他のフレームワーク残基は、ピログルタミン酸変換の可能性を最小化するためにグルタミン酸(E)を置換されてもよいN末端グルタミン残基(Q)である[Y. Diana Liu, et al., 2011, J. Biol. Chem., 286:11211-11217]。ピログルタミン酸(pE)へのグルタミン酸(E)の変換は、グルタミン(Q)からよりもゆっくり起こる。グルタミンのpEへの変換での一級アミンの減少のために、抗体はより酸性になる。不完全な変換は、抗体の不均一性をもたらし、これは、電荷に基づく分析方法により複数のピークとして観察できる。不均一性の差異は、プロセス制御が不十分であることを示し得る。

40

【0215】

代表的ヒト化抗体は、Hu3D6と呼称されるマウス3D6のヒト化型である。

【0216】

マウス抗体3D6は、それぞれ、配列番号7および11を含むアミノ酸配列を有する成熟重鎖および軽鎖可変領域を含む。本発明は、7個の例示されたヒト化成熟重鎖可変領域: hu3D6VHvb1、hu3D6VHvb2、hu3D6VHvb3、hu3D6VHvb4、hu3D6VHvb5、hu3D6VHvb6、およびhu3D6VHvb7を提供する。本発明はさらに、3個の例示されたヒト成熟軽鎖可変領域: hu3D6VLvb1、hu3D6VLvb2、およびhu3D6VLvb3を提供する。図1および2は、マウス3D6および種々のヒト化抗体の、それぞれ、重鎖可変領域および軽鎖可変領

50

域の配列比較を示す。

【0217】

C D R 高次構造および／または抗原への結合、重鎖と軽鎖間の相互作用の媒介、定常領域との相互作用、望ましいまたは望ましくない翻訳後修飾のための部位であること、ヒト可変領域中のその位置にとって通常とは異なる残基であるために免疫原性の可能性があること、凝集潜在能力の取得、に対し影響を与える可能性などの理由のために、およびその他の理由のために、さらに例により明示されるように、次の31個の可変領域フレームワーク位置を、3個の例示されたヒト成熟軽鎖可変領域および7個の例示されたヒト成熟重鎖可変領域における置換候補として検討した：L 7 (T 7 S、生殖細胞系列から)、L 10 (T 10 S、生殖細胞系列から)、L 15 (I 15 L、生殖細胞系列から)、L 17 (Q 17 E、安定性を増強するため)、L 37 (L 37 Q、生殖細胞系列から)、L 45 (K 45 R、生殖細胞系列から)、L 83 (L 83 V、生殖細胞系列から)、L 86 (H 86 Y、マウス3D6から)、L 100 (A 100 Q、生殖細胞系列から)、L 106 (L 106 I、生殖細胞系列から)、H 1 (Q 1 E、マウス3D6から)、H 5 (Q 5 V、生殖細胞系列から)、H 11 (L 11 V、生殖細胞系列から)、H 17 (S 17 T、生殖細胞系列から)、H 20 (L 20 I、生殖細胞系列から)、H 23 (T 23 K、生殖細胞系列から)、H 38 (K 38 R、マウス3D6から)、H 42 (E 42 G、生殖細胞系列から)、H 43 (Q 43 K、生殖細胞系列から)、H 66 (K 66 R、生殖細胞系列から)、H 67 (A 67 V、生殖細胞系列から)、H 75 (S 75 T、生殖細胞系列から)、H 76 (N 76 D、生殖細胞系列から)、H 80 (L 80 M、生殖細胞系列から)、H 81 (Q 81 E、生殖細胞系列から)、H 83 (T 83 R、生殖細胞系列から)、H 91 (Y 91 F、マウス3D6から)、H 93 (A 93 S、マウス3D6から)、H 94 (S 94 T、マウス3D6から)、H 108 (T 108 L、生殖細胞系列から)、およびH 109 (L 109 V、生殖細胞系列から)。ここおよび他の箇所で置換を記載する上で、括弧内のコメントは、置換についての1つの原理を示している。いくつかの置換は、複数の原理を有する。次の5個の可変領域C D R位置を、さらに例により明示されるように、3個の例示されたヒト成熟軽鎖可変領域および7個の例示されたヒト成熟重鎖可変領域における置換候補として検討した：L 24 (K 24 R、生殖細胞系列から)、H 28 (N 28 T、生殖細胞系列から)、H 54 (N 54 D、生殖細胞系列から)、H 56 (D 56 E、生殖細胞系列から)、およびH 58 (V 58 I、生殖細胞系列から)。いくつかのヒト化3D6抗体では、カバットC D R-H 2は、配列番号87を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのヒト化3D6抗体では、カバット-コチアの組み合わせC D R-H 1は、配列番号86を含むアミノ酸配列を有し、カバットC D R-H 2は、配列番号87を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのヒト化3D6抗体では、カバット-コチアの組み合わせC D R-H 1は、配列番号86を含むアミノ酸配列を有し、カバットC D R-H 2は、配列番号88を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのヒト化3D6抗体では、カバット-コチアの組み合わせC D R-H 1は、配列番号86を含むアミノ酸配列を有し、カバットC D R-H 2は、配列番号92を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのヒト化3D6抗体では、カバットC D R-L 1は、配列番号89を含むアミノ酸配列を有する。

【0218】

ここでは、他の箇所と同様に、最初に言及される残基は、カバットC D RまたはC D R-H 1の場合にはコチア-カバットの組み合わせC D Rをヒト受容体フレームワークにグラフト化することにより形成されたヒト化抗体の残基であり、2番目に言及される残基は、このような残基を置換するために検討されている残基である。したがって、可変領域フレームワーク内で最初に言及される残基はヒトであり、C D R内で最初に言及される残基はマウスである。

【0219】

例示された抗体は、次に例示された成熟重鎖および軽鎖可変領域の任意の順列または組み合わせを含む：V H v b 1 / V L v b 1、V H v b 1 / V L v b 2、V H v b 1 / V L v b 3、V H v b 2 / V L v b 1、V H v b 2 / V L v b 2、V H v b 2 / V L v b 3、

VHvb3/VLvb1、VHvb3/VLvb2、VHvb3/VLvb3、VHvb4/VLvb1、VHvb4/VLvb2、VHvb4/VLvb3、VHvb5/VLvb1、VHvb5/VLvb2、VHvb5/VLvb3、VHvb6/VLvb1、VHvb6/VLvb2、VHvb6/VLvb3、VHvb7/VLvb1、VHvb7/VLvb2、VHvb7/VLvb3。

【0220】

例示された抗体は、例示された成熟重鎖可変領域hu3D6VHvb1（配列番号76）、hu3D6VHvb2（配列番号77）、hu3D6VHvb3（配列番号78）、hu3D6VHvb4（配列番号79）、hu3D6Hvb5（配列番号80）、hu3D6VHvb6（配列番号90）、およびhu3D6VHvb7（配列番号91）と、ヒト化3D6VL軽鎖可変領域hu3D6VLvb1（配列番号20）、hu3D6VLvb2（配列番号21）、hu3D6VLvb3（配列番号22）、およびhu3D6VLvb4（配列番号22）のいずれかとの順列または組み合わせを含む。例示された抗体は、例示された成熟軽鎖可変領域hu3D6VLvb1（配列番号83）、hu3D6VLvb2（配列番号84）、またはhu3D6VLvb3（配列番号85）と、ヒト化3D6V6重鎖可変領域hu3D6VHv1（配列番号15）；hu3D6VHv2（配列番号16）；hu3D6VHv1b（配列番号17）；hu3D6VHv1bA11（配列番号18）；hu3D6VHv5（配列番号19）；hu3D6VHv1bA11b6G2（配列番号46）；hu3D6VHv1bA11b6H3（配列番号47）；hu3D6VHv1c（配列番号48）；hu3D6VHv1d（配列番号49）；hu3D6VHv1e（配列番号50）；hu3D6VHv1f（配列番号51）；hu3D6VHv3（配列番号52）；hu3D6VHv3b（配列番号53）；hu3D6VHv3c（配列番号54）；hu3D6VHv4（配列番号55）；hu3D6VHv4b（配列番号56）；およびhu3D6VHv4c（配列番号57）のいずれかとの順列または組み合わせを含む。

【0221】

本発明は、3D6ヒト化型抗体のバリエーションを提供し、これは、ヒト化成熟重鎖可変領域が、hu3D6VHvb1（配列番号76）、hu3D6VHvb2（配列番号77）、hu3D6VHvb3（配列番号78）、hu3D6VHvb4（配列番号79）、hu3D6VHvb5（配列番号80）、hu3D6VHvb6（配列番号90）、またはhu3D6VHvb7（配列番号91）に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を示し、ヒト化成熟軽鎖可変領域は、hu3D6VLvb1（配列番号83）、hu3D6VLvb2（配列番号84）、またはhu3D6VLvb3（配列番号85）に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を示す。いくつかのこのような抗体は、配列番号76～80、配列番号90～91、および配列番号83～85中の、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35または全36個の逆突然変異またはその他の変異を保持する。いくつかのこのようなヒト化抗体は、配列同一性を定義する例示された配列と同じセットの逆突然変異または他の変異を含む。

【0222】

したがって例えば本発明は、配列番号77の成熟重鎖可変領域と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性、および配列番号77について表6に列挙されたものと同じセットの変異、および配列番号77の3個のCDRを有する成熟重鎖可変領域と、配列番号84または85と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性、およびそれぞれ配列番号84または85について表7に列挙されたものと同じセットの変異、およびそれぞれ配列番号84または85の3個のCDRを有する成熟軽鎖配列とを有するヒト化抗体を含む。いくつかの抗体は、配列番号77の成熟重鎖可変領域と、配列番号84または85の成熟

軽鎖可変領域とを含む。

【0223】

本発明はまた、配列番号90の成熟重鎖可変領域と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性、および配列番号90について表6に列挙されたものと同じセットの変異、および配列番号90の3個のCDRを有する成熟重鎖可変領域と、配列番号84または85と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性、およびそれぞれ配列番号84または85について表7に列挙されたものと同じセットの変異、およびそれぞれ配列番号84または85の3個のCDRを有する成熟軽鎖配列とを有するヒト化抗体を含む。いくつかの抗体は、配列番号90の成熟重鎖可変領域、および配列番号84または85の成熟軽鎖可変領域を含む。

10

【0224】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H93はSにより占められ、H94はTにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、位置H93およびH94（バーニア残基）は、例えばhuVHvb1、huVHvb2、huVHvb3、huVHvb4、huVHvb5、huVHvb6、およびhuVHvb7の場合と同様に、それぞれ、SおよびTにより占められる。

【0225】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H91（界面残基）は、例えばhuVHvb1、huVHvb2、およびhuVHvb6の場合と同様に、Fにより占められる。

20

【0226】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H1はEにより占められ、H5はVにより占められ、H11はVにより占められ、H20はIにより占められ、H23はKにより占められ、H38はRにより占められ、H42はGにより占められ、H43はKにより占められ、H66はRにより占められ、H75はTにより占められ、H76はDにより占められ、H81はEにより占められ、H108はLにより占められ、H109はVにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H75、H76、H81、H108、およびH109は、例えばhuVHvb2、huVHvb3、huVHvb4、huVHvb5、huVHvb6、およびhuVHvb7と同様に、それぞれ、E、V、V、I、K、R、G、K、R、T、D、E、L、およびVにより占められる。

30

【0227】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H17はTにより占められ、H80はMにより占められ、H83はRにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H17、H80、およびH83は、例えばhuVHvb3、huVHvb4、huVHvb5、huVHvb6、およびhuVHvb7の場合と同様に、それぞれ、T、M、およびRにより占められる。

40

【0228】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H58（CDR-H2残基）は、例えばhuVHvb3、huVHvb4、およびhuVHvb5の場合と同様に、Iにより占められる。

【0229】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H28はTにより占められ、H67はVにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H28およびH67は、例えばhuVHvb4、huVHvb5、huVHvb6、およびhuVHvb7の場合と同様に、

50

それぞれ、TおよびVにより占められる。

【0230】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H54はDにより占められ、H56はEにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H54およびH56（CDR-H2残基）は、例えばhuVHvb6およびhuVHvb7の場合と同様に、それぞれ、DおよびEにより占められる。

【0231】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：H1はQまたはEにより占められ、H5はQまたはVにより占められ、H11はLまたはVにより占められ、H17はSまたはTにより占められ、H20はLまたはIにより占められ、H23はTまたはKにより占められ、H28はNまたはTにより占められ、H38はKまたはRにより占められ、H42はEまたはGにより占められ、H43はQまたはKにより占められ、H54はNまたはDにより占められ、H56はDまたはEにより占められ、H58はVまたはIにより占められ、H66はKまたはRにより占められ、H67はAまたはVにより占められ、H75はSまたはTにより占められ、H76はNまたはDにより占められ、H80はLまたはMにより占められ、H81はQまたはEにより占められ、H83はTまたはRにより占められ、H91はFまたはYにより占められ、H93はSにより占められ、H94はTにより占められ、H108はTまたはLにより占められ、H109はLまたはVにより占められる。

【0232】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H91、H93、およびH94は、huVHvb1と同様に、それぞれ、F、S、およびTにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H75、H76、H81、H91、H93、H94、H108、およびH109は、huVHvb2と同様に、それぞれ、E、V、V、I、K、R、G、K、R、T、D、E、F、S、T、L、およびVにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H58、H66、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108、およびH109は、huVHvb3と同様に、それぞれ、E、V、V、T、I、K、R、G、K、I、R、T、D、M、E、R、S、T、L、およびVにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H58、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108、およびH109は、huVHvb4と同様に、それぞれ、E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、I、R、V、T、D、M、E、R、S、T、L、およびVにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H91、H93、H94、H108、およびH109は、huVHvb5と同様に、それぞれ、E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、D、E、I、R、V、T、D、M、E、R、S、T、L、およびVにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108、およびH109は、huVHvb6と同様に、それぞれ、E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、D、E、R、V、T、D、M、E、R、F、S、T、L、およびVにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、VH領域中の位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108、およびH109は、huVHvb7と同様に、それぞれ、E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、D、E、R、

10

20

30

40

50

V、T、D、M、E、R、S、T、L、およびVにより占められる。

【0233】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VL領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：L7はSにより占められ、L10はSにより占められ、L15はLにより占められ、L83はVにより占められ、L86はYにより占められ、L106はIにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、位置L7、L10、L15、L83、L86、およびL106は、例えばh u V H v b 2およびh u V H v b 3の場合と同様に、それぞれ、S、S、L、V、Y、およびYにより占められる。

【0234】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VL領域中の次の位置の少なくとも1つが指定したアミノ酸により占められる：L7はTまたはSにより占められ、L10はTまたはSにより占められ、L15はIまたはLにより占められ、L17はQまたはEにより占められ、L24はKまたはRにより占められ、L37はLまたはQにより占められ、L45はKまたはRにより占められ、L83はLまたはVにより占められ、L86はHまたはYにより占められ、L100はAまたはQにより占められ、L106はLまたはIにより占められる。

【0235】

いくつかのヒト化3D6抗体では、VL領域中の位置L7、L10、L15、L83、L86、およびL106は、h u V L v b 2と同様に、それぞれ、S、S、L、V、Y、およびIにより占められる。いくつかのヒト化3D6抗体では、VL領域中の位置L7、L10、L15、L17、L24、L37、L45、L83、L86、L100およびL106は、h u V L v b 3と同様に、それぞれ、S、S、L、E、R、Q、R、V、Y、QおよびIにより占められる。

【0236】

いくつかのヒト化3D6抗体では、重鎖可変領域は、ヒト配列に、 $\geq 85\%$ の同一性を有する。いくつかのヒト化3D6抗体では、軽鎖可変領域は、ヒト配列に、 $\geq 85\%$ の同一性を有する。いくつかのヒト化3D6抗体では、重鎖可変領域および軽鎖可変領域のそれぞれは、ヒト生殖細胞系列配列に、 $\geq 85\%$ の同一性を有する。いくつかのヒト化3D6抗体では、3つの重鎖CDRは、カバット／コチアの組み合わせにより定義される通り（配列番号8、9、および10）であり、3つの軽鎖CDRは、カバット／コチアの組み合わせにより定義される通り（配列番号12、13、および14）である。但し、位置H28がNまたはTにより占められ、位置H54がNまたはDより占められ、位置H56がDまたはEにより占められ、位置H58がVまたはIにより占められ、位置L24がKまたはRにより占められるという条件の場合である。いくつかのヒト化3D6抗体では、カバット／コチアの組み合わせCDR-H1は、配列番号86を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのヒト化3D6抗体では、カバットCDR-H2は、配列番号87、配列番号88、または配列番号92を含むアミノ酸配列を有する。いくつかのヒト化3D6抗体では、カバットCDR-L1は、配列番号89を含むアミノ酸配列を有する。

【0237】

このようなヒト化抗体のCDR領域は、3D6のCDR領域と同一または実質的に同一であり得る。CDR領域は、任意の従来定義（例えば、コチア、またはコチアとカバットの組み合わせ）によって定義できるが、好ましくはカバットによって定義されるものである。

【0238】

別に定める場合を除き、可変領域フレームワーク位置は、カバットナンバリングと一致する。その他のこのようなバリエーションは通常、例示H u 3 D 6重鎖および軽鎖の配列とは、少数（例えば、通常、1、2、3、5、10、または15個）の置換、欠失または挿入だけ異なる。このような差異は通常、フレームワーク中にあるが、CDR中でも発生し得る。

【0239】

ヒト化3D6バリエーションにおける追加の多様性の1つの可能性は、可変領域フレームワークでの追加の逆突然変異である。ヒト化mAb中のCDRと接触しないフレームワーク残基の多くは、ドナーマウスmAbまたは他のマウスもしくはヒトの抗体の対応する位置のアミノ酸の置換に順応でき、さらに多くの潜在的なCDR接触残基もまた置換を受けやすい。CDR内のアミノ酸でさえ、例えば、可変領域フレームワークを提供するために使用されるヒト受容体配列の対応する位置に見られる残基で変更され得る。さらに、例えば、重鎖および／または軽鎖に対し、別のヒト受容体配列が使用できる。異なる受容体配列が使用される場合、対応するドナーおよび受容体残基はすでに逆突然変異を含まないものであるため、上記で推奨する逆突然変異のうちの1つまたは複数は実行されなくてもよい。

【0240】

10

ヒト化3D6バリエーションにおける置換または逆突然変異は（保存的であるか、そうでないかにかかわらず）、ヒト化mAbの結合親和性または能力、すなわち、タウに結合する能力、に実質的に影響を与えないのが好ましい。

【0241】

ヒト化3D6抗体は、リン酸化および非リン酸化タウの両方、ならびに誤って折り畳まれた／凝集した形態のタウに結合する能力をさらに特徴とする。いくつかのヒト化抗体は、マウス3D6と同様の、またはより強い（例えば、最大で2倍、5倍、10倍または20倍の）、ヒトタウへの結合または、神経細胞へのタウ結合の阻害またはタウの脱凝集などの、他の機能的特性の保有を特徴とする。そのような特性は、実施例に記載されるアッセイのいずれかにより比較できる。

20

【0242】

C. 定常領域の選択

キメラ抗体、ベニヤ抗体、またはヒト化抗体の重鎖および軽鎖の可変領域は、ヒト定常領域の少なくとも一部に連結できる。定常領域の選択は、ある程度、抗体依存性細胞傷害、抗体依存性細胞食作用および／または補体依存性細胞毒性が所望されるか否かに依存する。例えば、ヒトアイソタイプIgG1およびIgG3は、補体依存性細胞傷害を有し、ヒトアイソタイプIgG2およびIgG4は有しない。ヒトIgG1およびIgG3はまた、ヒトIgG2およびIgG4より強力な細胞媒介エフェクター機能を誘導する。軽鎖定常領域は、ラムダまたはカッパであり得る。定常領域のナンバリング規則には、EUNanバリング (Edelman, G. M. et al., Proc. Natl. Acad. U S A, 63, 78-85 (1969))、カバットナンバリング (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991))、IMGT独自ナンバリング (Lefranc M.-P. et al., IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains, Dev. Comp. Immunol., 29, 185-203 (2005))、およびIMGTエキソンナンバリング (Lefranc, 上掲書) が挙げられる。

30

【0243】

重鎖のC末端リシンなどの軽鎖および／または重鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端における1つまたはいくつかのアミノ酸は、分子の一部または全てを欠損していても、または誘導体化されていてもよい。置換は、補体媒介性細胞傷害もしくはADCCなどのエフェクター機能を低減または増加させるために（例えば、Winterらの米国特許第5,624,821号、Tsoらの米国特許第5,834,597号、およびLazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006を参照されたい）、またはヒトにおける半減期を延長するために定常領域で行われ得る（例えば、Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004を参照されたい）。抗体の半減期を増加させるための代表的な置換は、位置250におけるGlnおよび／または位置428におけるLeuを含む（定常領域のEUNan

40

50

バリングがこの段落で使用される)。位置 234、235、236 および／もしくは 237 のいずれかまたは全ての置換は、Fcγ 受容体、特に、FcγRI 受容体の親和性を低下させる(例えば、米国特許第 6,624,821 号を参照されたい)。ヒト IgG1 の位置 234、235 および 237 でのアラニン置換は、エフェクター機能を低下させるために使用できる。いくつかの抗体は、エフェクター機能を低下させるために、ヒト IgG1 の位置 234、235 および 237 でのアラニン置換を有する。必要に応じて、ヒト IgG2 中の 234、236 および／または 237 はアラニンと置換され、位置 235 はグルタミンと置換されている(例えば、米国特許第 5,624,821 号を参照されたい)。いくつかの抗体では、EUN ンバリングで、ヒト IgG1 の位置 241、264、265、270、296、297、322、329 および 331 の 1 つまたは複数の位置での変異が使用される。いくつかの抗体では、EUN ンバリングで、ヒト IgG1 の位置 318、320、および 322 の 1 つまたは複数の位置での変異が使用される。いくつかの抗体では、位置 234 および／または 235 はアラニンで置換され、および／または位置 329 はグリシンで置換される。いくつかの抗体では、位置 234 および 235 はアラニンで置換される。いくつかの抗体では、アイソタイプは、ヒト IgG2 または IgG4 である。

【0244】

代表的なヒト軽鎖カップ定常領域は、配列番号 104 (N 末端アルギニンを有する、または有しない)のアミノ酸配列を有する。代表的なヒト IgG1 重鎖定常領域は、配列番号 103 (C 末端リシンを有する、または有しない)のアミノ酸配列を有する。抗体は、2 つの軽鎖および 2 つの重鎖を含む四量体として、別々の重鎖、軽鎖として、Fab、Fab'、F(ab')₂、および Fv として、または重鎖および軽鎖の成熟可変ドメインがスパーサーを介して連結されている単鎖抗体として発現させることができる。

【0245】

ヒト定常領域は、異なる個体間でアロタイプ変異およびイソアロタイプ変異を示す。すなわち、定常領域は、1 つまたは複数の多型位置で別々の個体において異なり得る。イソアロタイプは、イソアロタイプを認識する血清が 1 つまたは複数の他のアイソタイプの非多型領域に結合する点で、アロタイプとは異なる。したがって、例えば、別の重鎖定常領域は、C 末端リシンを有する、または有さない IgG1 G1m3 である。ヒト定常領域への言及は、任意の天然のアロタイプまたは天然のアロタイプ中の位置を占める残基の任意の順列を有する定常領域を含む。

【0246】

D. 組換え抗体の発現

抗体発現細胞株(例えば、ハイブリドーマ)を用いた、キメラおよびヒト化抗体の産生に関するいくつかの方法が知られている。例えば、抗体の免疫グロブリン可変領域は、よく知られた方法を用いて、クローン化および配列決定できる。一方法では、重鎖可変 VH 領域は、ハイブリドーマ細胞から調製した mRNA を用いて RT-PCR によりクローン化される。コンセンサスプライマーを、翻訳開始を 5' プライマーとして、g2b 定常領域を特異的 3' プライマーとして包含する VH 領域リーダーペプチドに用いる。代表的プライマーは、Schenk らによる米国特許出願公開第 2005/0009150 号(以降では「Schenk」)に記載されている。複数の独立に誘導されたクローン由来の配列を比較して、増幅中に変化が導入されていないことを保証できる。VH 領域の配列はまた、5' RACE RT-PCR 法および 3' g2b 特異的プライマーにより得た VH フラグメントをシーケンシングすることにより決定または確認できる。

【0247】

軽鎖可変 VL 領域は、類似の方法でクローン化できる。一手法では、コンセンサスプライマーセットが、翻訳開始コドンを含む VL 領域および V-J 結合領域の下流にある Ck 領域に特異的な 3' プライマーにハイブリッド形成するように設計された 5' プライマーを用いて VL 領域の増幅のために設計される。2 つ目の手法では、5' RACE RT-PCR 法を用いて、VL をコードする cDNA をクローン化する。代表的プライマーは S

chenk（上記参照）に記載されている。クローン化配列はその後、ヒト（またはその他の非ヒト種）定常領域をコードする配列と結合される。ヒト定常領域をコードする代表的な配列としては、ヒトIgG1定常領域（配列番号103）をコードする配列番号105、およびヒトカッパ軽鎖定常領域（配列番号104）をコードする配列番号106が挙げられる。

【0248】

一手法では、重鎖および軽鎖可変領域は、それぞれのVDJまたはVJ接合部の下流にスプライスドナー配列をコードするように再改変され、重鎖用のpCMV- γ 1および軽鎖用のpCMV-McIなどの哺乳動物発現ベクター中に挿入される。これらのベクターは、ヒト γ 1およびCk定常領域を、挿入された可変領域カセットの下流にエキソントラグメントとして、コードする。配列検証後に、重鎖および軽鎖発現ベクターを、CHO細胞中に同時形質導入して、キメラ抗体を産生することができる。遺伝子導入の48時間後に培養上清を収集し、ウェスタンブロット分析により抗体産生を、またはELISAにより抗原結合を分析する。キメラ抗体は上述のようにヒト化される。

【0249】

キメラ、ペニヤ、ヒト化抗体およびヒト抗体は通常、組換え発現により産生される。組換えポリヌクレオチド構築物は通常、天然関連または異種発現制御配列、例えば、プロモーター、を含む抗体鎖コード配列に作動可能に連結された発現制御配列を含む。発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換または遺伝子導入することができるベクター中のプロモーター系であり得る。ベクターが適切な宿主に組み込まれた後、宿主は、ヌクレオチド配列の高レベル発現、ならびに交差反応抗体の収集および精製に好適する条件下で維持される。

【0250】

これらの発現ベクターは通常、宿主生物中で、エピソームとして、または宿主染色体DNAの一体化部分として、複製可能である。一般に、発現ベクターは、例えば、アンピシリン耐性またはヒグロマイシン耐性などの選択マーカーを含み、目的のDNA配列で形質転換されたこれらの細胞の検出を可能とする。

【0251】

大腸菌は、抗体、特に、抗体フラグメントを発現させるのに有用な原核生物宿主の1種である。酵母などの微生物も発現に有用である。サッカロミセス属は、必要に応じて、発現制御配列、複製起点、および終止配列などを有する適切なベクターを有する酵母宿主である。代表的なプロモーターは、3-ホスホグリセリン酸キナーゼおよび他の糖分解酵素を含む。誘導性酵母プロモーターは、特に、アルコール脱水素酵素、イソチトクロームC、およびマルトースおよびガラクトース利用に関与する酵素由来のプロモーターを含む。

【0252】

哺乳動物細胞は、免疫グロブリンまたはそのフラグメントをコードするヌクレオチドセグメントを発現するために使用できる。Winnacker, From Genes to Clones (VCH Publishers, NY, 1987)を参照されたい。完全な異種タンパク質を分泌することができるいくつかの適切な宿主細胞株が開発されており、これらは、CHO細胞株、様々なCOS細胞株、HeLa細胞、HEK293細胞、L細胞、ならびにSP2/0およびNS0を含む非抗体産生骨髓腫を含む。細胞は、非ヒトであり得る。これらの細胞用の発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサーなどの発現制御配列(Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986))、ならびにリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列などの必要な情報処理部位を含んでよい。発現制御配列は、内因性遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、およびウシパピローマウイルスなどに由来するプロモーターを含んでよい。Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992)を参照されたい。

【0253】

あるいは、遺伝子導入動物のゲノムへの導入およびその後の遺伝子導入動物のミルク中

での発現のために、抗体コード配列を導入遺伝子中に組み込むことができる（例えば、米国特許第5,741,957号、同第5,304,489号、および同第5,849,992号を参照されたい）。好適な導入遺伝子は、乳腺特異的遺伝子、例えば、カゼインまたはベータラクトグロブリン由来のプロモーターおよびエンハンサーと作動可能に連結された軽鎖および／または重鎖のコード配列を含む。

【0254】

目的のDNAセグメントを含むベクターは、宿主細胞型の種類に応じた方法を用いて、宿主細胞中に導入できる。例えば、塩化カルシウム遺伝子導入は通常、原核細胞に用いられ、一方、リン酸カルシウム処理、電気穿孔、リポフェクション、遺伝子銃、またはウイルス系遺伝子導入は、その他の細胞宿主に使用できる。哺乳動物細胞を形質転換するのに使用される他の方法には、ポリブレン、原形質融合、リポソーム、電気穿孔、および微量注入の使用が含まれる。遺伝子導入動物の産生のために、導入遺伝子は、受精卵母細胞中に微量注入でき、または胚性幹細胞のゲノム中に組み込みことができ、このような細胞の細胞核は、除核卵母細胞中に導入できる。

【0255】

細胞培養物中に抗体の重鎖および軽鎖をコードするベクター（単一または複数）を導入し、無血清培地中で増殖生産性および製品品質に関して細胞プールをスクリーニングできる。その後、最高産生細胞プールをFACSベースの単細胞クローニングに供し、モノクローナル株を生成できる。7.5g/L超の培養物の製品力価に相当する、一日あたり細胞あたり50pgまたは100pgを上回る比生産性を使用できる。単細胞クローンが産生する抗体はまた、濁度、濾過特性、PAGE、IEF、UVスキャン、HPSEC、炭水化物-オリゴ糖マッピング、質量分析、およびELISAまたはBiacoreなどの結合アッセイの試験をすることができる。その後、選択されたクローンは、複数のバイアルに入れ、後の使用のために凍結保存され得る。

【0256】

発現されると、抗体は、プロテインA捕捉、HPLC精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動法などを含む、当技術分野の標準的な手順に従って精製できる（概要については、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)を参照されたい）。

【0257】

コドン最適化、プロモーターの選択、転写エレメントの選択、ターミネーターの選択、無血清の単細胞クローニング、細胞保存、コピー数の増幅のための選択マーカーの使用、CHOTターミネーター、またはタンパク質力価の改善を含む抗体の商業生産のための方法論を用いることができる（例えば、米国特許第5,786,464号、同第6,114,148号、同第6,063,598号、同第7,569,339号、国際公開第2004/050884号、同第2008/012142号、同第2008/012142号、同第2005/019442号、同第2008/107388号、および同第2009/027471号、ならびに米国特許第5,888,809号を参照されたい）。抗体はまた、抗体の重鎖および／または軽鎖をコードする核酸の形態で投与できる。重鎖および軽鎖の両方が存在する場合、鎖は好ましくは、単鎖抗体として連結される。受動的投与のための抗体はまた、例えば、ペプチド免疫原で処置した患者の血清からアフィニティークロマトグラフィーにより調製できる。

【0258】

DNAは、裸の形態で（すなわち、コロイド状またはカプセル化材料なしで）送達できる。あるいは、MLLV、HIV-1、およびALVなどのレトロウイルス由来のベクターを含むレトロウイルス系（例えば、Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993) 参照）；アデノウイルスベクター（例えば、Bett et al., J. Virol. 67, 5911 (1993) 参照）；アデノ随伴ウイルスベクター（例えば、Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994) 参照）；HIVまたはFIV gag 配列に基づ

くものなどのレンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスおよびトリのポックスウイルスを含むポックスファミリーのウイルスベクター、シンドビスおよびセムリキ森林ウイルス由来のものなどのアルファウイルス属のウイルスベクター（例えば、Dubensky et al., J. Virol. 70, 508-519 (1996) 参照）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（米国特許第5,643,576号参照）および水疱性口内炎ウイルスなどのラブドウイルス（国際公開第96/34625号参照）ならびにパピローマウイルス（Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo et al., 国際公開第94/12629号およびXiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)）を含むいくつかのウイルスベクター系が使用できる。

10

【0259】

免疫原をコードするDNA、または抗体重鎖および／もしくは軽鎖をコードするDNA、またはそれを含有するベクターは、リポソームにパッケージすることができる。適切な脂質および関連類似体は、米国特許第5,208,036号、同第5,264,618号、同第5,279,833号および同第5,283,185号に記載されている。免疫原をコードする、または抗体重鎖および／もしくは軽鎖をコードするベクターおよびDNAはまた、微粒子キャリアに吸着または結合させることもでき、その例としては、ポリメチルメタクリレートポリマーおよびポリラクチドならびにポリ（ラクチド-ε-ε-グリコリド）が挙げられる（例えば、McGee et al., J. Micro Encap. 1996を参照されたい）。

20

【0260】

抗体重鎖および／または軽鎖をコードするそれらからのベクターまたはセグメントは、エクスピボで細胞中に、例えば個々の患者から外移植された細胞（例えば、リンパ球、骨髓吸引物、組織生検）または汎用ドナー造血幹細胞に組み込まれ、続いて、通常はトランスジーンを取り込んだ細胞を選択した後に、細胞を患者に再移植することができる（例えば、国際公開第2017/091512号参照）。代表的な患者由来細胞としては、患者由来の多能性幹細胞（iPSC）または他の型の幹細胞（胚、造血、神経、または間葉系）が挙げられる。

【0261】

抗体重鎖および／または軽鎖をコードするベクターまたはそれからのセグメントは、アルブミン遺伝子または他の安全なハーバー遺伝子などの細胞中の目的のいずれかの領域にエクスピボで導入できる。ベクターを組み込む細胞は、予め分化を行い、または行わずに、移植できる。細胞は、病変の分泌組織もしくは場所などの特異的組織に、または血液中への輸液などにより全身に、移植できる。例えば細胞は、肝臓などの、患者の分泌組織中に、場合により、肝臓の場合には肝細胞などの、その組織中に存在する細胞に予め分化させて、移植できる。肝臓中での抗体の発現は、血液への抗体の分泌をもたらす。

30

【0262】

E. 抗体スクリーニングアッセイ

上記のように、抗体は、最初に目的とする結合特異性に関しスクリーニングされ得る。能動免疫原は、同様に、このような結合特異性を有する抗体を誘導する能力に関しスクリーニングされ得る。この場合、能動免疫原を用いて実験動物を免疫し、得られた血清を適切な結合特異性に関し試験する。

40

【0263】

その後、目的とする結合特異性を有する抗体を、細胞および動物モデルで試験できる。このようなスクリーニングに使用される細胞としては神経細胞を優先すべきである。神経芽腫細胞に、必要に応じてタウ病理と関連する変異と共に、タウの4リピートドメインを遺伝子導入したタウ病理の細胞モデルが報告されている（例えば、デルタK280、Khlistunova, Current Alzheimer Research 4, 544-546 (2007)を参照されたい）。別のモデルでは、ドキシサイクリンを添加することにより、タウが神経芽細胞腫N2a細胞株中で誘導される。この細胞モデルは、可

50

溶性または凝集状態で細胞に対するタウの毒性、タウ遺伝子発現のスイッチをオンにした後のタウ凝集体の外観、再び遺伝子発現のスイッチをオフにした後のタウ凝集体の溶解、ならびにタウ凝集体の形成抑制またはそれらを脱凝集における抗体の効率を研究するのを可能とする。

【0264】

抗体はまた、タウと関連する疾患の遺伝子導入動物モデルでスクリーニングできる。このような遺伝子導入動物は、タウ導入遺伝子（例えば、ヒトアイソフォームのいずれか）および必要に応じて、とりわけタウ、ApoE、プレセニリンまたはアルファシヌクレインをリン酸化するキナーゼなどのヒトAPP導入遺伝子を含み得る。このような遺伝子導入動物は、タウと関連する疾患の少なくとも1つの徴候または症状を発症するように処理されている。

【0265】

代表的な遺伝子導入動物は、マウスのK3株である（Itner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(41):15997-6002(2008)）。これらのマウスは、K369I変異（この変異はピック病と関連している）およびThy1.2プロモーターを有するヒトタウ導入遺伝子を有する。このモデルは、神経変性、運動障害ならびに求心性繊維および小脳顆粒細胞の変性の急速な経過を示す。別の代表的な動物は、マウスのJNPL3株である。これらのマウスは、P301L変異（この変異は前頭側頭型認知症と関連している）およびThy1.2プロモーターを有するヒトタウ導入遺伝子を有する（Taconic, Germantown, N.Y., Lewis, et al., Nat Genet. 25:402-405(2000)）。これらのマウスは、神経変性のより緩やかな経過を有する。このマウスは、いくつかの脳領域および脊髄における神経原線維濃縮体を発症し、これは本明細書にその全体が参照により組み込まれる。これは、濃縮体の発症の結果を研究するため、およびこれらの凝集体の生成を抑制することができる治療法をスクリーニングするための優れたモデルである。これらの動物の別の利点は、病変の比較的早い段階での発症である。ホモ接合系統では、タウ病理と関連する行動異常は、少なくとも、早ければ3ヶ月目に観察できるが、これらの動物は少なくとも生後8ヶ月まで比較的健康を維持する。つまり、8ヶ月の時点で、これらの動物は歩き回り、それら自体で摂食し、処置効果の監視を可能にするのに十分なほど行動タスクを実行できる。6～13ヶ月間、これらのマウスをAIWI KLH-PHF-1で能動免疫することにより、約1,000の力価を生じさせ、未処置のコントロールマウスと比較して神経原線維濃縮体はより少なく、pSer422も、体重減少も低下した。

【0266】

抗体活性は、総タウまたはリン酸化タウの量の減少、Aβのアミロイド沈着物などの他の病理学的特徴の減少、および阻害または遅延または行動欠陥を含む様々な基準によって評価できる。抗体は、遺伝子導入動物の血液脳関門から脳内への抗体の通過に関し試験され得る。抗体または抗体を誘発するフラグメントはまた、天然または誘導を介してタウを特徴とする疾患の症状を発症する非ヒト霊長類で試験され得る。抗体の試験は通常、抗体または活性剤が存在しない（例えば、ブイクルで置き換えられる）ことを除いて並列に行われるコントロール実験と同時に実行される。その後、試験中の抗体または活性剤に起因する疾患の徴候または症状の減少、遅延または抑制がコントロールと比較して評価され得る。

【0267】

IV. 処置の対象となる患者

神経原線維濃縮体の存在は、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソンニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症-パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型ア

10

20

30

40

50

ルツハイマー病（L B V A D）、慢性外傷性脳症（C T E）、球状グリア性タウオパチー（G G T）、および進行性核上麻痺（P S P）を含むいくつかの疾患で認められている。本投与計画はまた、これらの疾患のいずれかの処置または予防にも使用できる。神経疾患および病状とタウの間の広範囲に及ぶ関係のために、本投与計画は、神経疾患のない個体の平均値と比較して、（例えば、C S F内の）タウもしくはリン酸化タウのレベルの上昇を示す任意の対象の処置または予防に使用できる。本投与計画は、神経疾患と関連するタウの変異を有する個体における神経疾患の処置または予防にも使用できる。本方法は、アルツハイマー病、および特に患者における処置または予防に特に適している。

【0268】

処置の対象となる患者は、疾患のリスクはあるが、症状を示さない個体および現在症状を示す患者を含む。疾患のリスクのある患者は、疾患の既知の遺伝的リスクを有する患者を含む。このような個体は、この疾患を経験している親族を有する個体、およびそのリスクが遺伝子マーカーまたは生化学的マーカーの分析によって決定されている個体を含む。リスクの遺伝子マーカーは、上述したものなどのタウの変異、ならびに神経疾患と関連する他の遺伝子の変異を含む。例えば、ヘテロ接合型でのA p o E 4対立遺伝子およびさらにホモ接合型でのA p o E 4対立遺伝子も、アルツハイマー病のリスクと関連している。アルツハイマー病のリスクの他のマーカーは、A P P 遺伝子の変異、特に717位での変異およびハーディ変異およびスウェーデン変異と呼ばれる位置670および671での変異、プレセニリン遺伝子のP S 1およびP S 2の変異、A D、高コレステロール血症またはアテローム性動脈硬化症の家族歴を含む。現在アルツハイマー病に罹患している個体は、特徴的な認知症、および上述の危険因子の存在から、P E Tイメージングによって認識できる。さらに、いくつかの診断テストは、A Dを有する個体を同定するために利用可能である。これらは、C S Fタウまたはリン酸化タウおよびA β 42レベルの測定を含む。タウまたはリン酸化タウのレベルの上昇およびA β 42レベルの低下は、A Dの存在を意味する。いくつかの変異はパーキンソン病と関連する。A l a 30 P r oもしくはA l a 53、またはロイシンリッチリピートキナーゼのP A R K 8などの他の遺伝子の変異は、パーキンソン病と関連する。個体はまた、D S M I V T Rの基準によって、上述の神経疾患のいずれかであると診断され得る。

【0269】

無症状の患者では、処置は全ての年齢（例えば、10、20、30）で開始できる。しかし、通常、患者が40、50、60または70歳に達するまでは処置を開始する必要はない。処置は通常、一定の期間にわたり複数投薬を必要とする。処置は、経時的に抗体レベルをアッセイすることにより監視できる。応答が低下した場合は、追加免疫投与が必要である。潜在的なダウン症候群患者の場合には、母親に治療薬を投与することによって処置を出生前に開始するか、または出生直後に開始できる。

【0270】

V. 核酸

本発明はさらに、上記重鎖および軽鎖のいずれか（例えば、配列番号7、配列番号11、配列番号76～80、配列番号90～91および配列番号83～85）をコードする核酸を提供する。代表的な核酸としては、配列番号30～31、93～99、100～102、および105～106が挙げられる。場合によりこのような核酸はさらに、シグナルペプチドをコードし、重鎖可変領域または軽鎖可変領域に連結されたシグナルペプチドを発現できる。核酸のコード配列は、調節配列に作動可能に連結され、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終結シグナル、などのコード配列の発現を確実にできる。調節配列は、プロモーター、例えば原核生物プロモーターまたは真核生物プロモーターを含んでよい。重鎖または軽鎖をコードする核酸は、宿主細胞中での発現のためにコドン最適化できる。重鎖および軽鎖をコードする核酸は、選択可能な遺伝子をコードできる。重鎖および軽鎖をコードする核酸は、単離型で生じ得、または1つまたは複数のベクター中に挿入できる。核酸は、例えば、固相合成またはオーバーラッピングオリゴヌクレオチドのP C Rにより合成できる。重鎖および軽鎖をコードする核酸は、例えば、発現ベ

クター内の1つの連続した核酸として連結でき、または別々の、例えば、それぞれ自身の発現ベクター中に挿入できる。

【0271】

VI. コンジュゲート抗体

タウなどの抗原に特異的に結合するコンジュゲート抗体は、タウの存在の検出；アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）と診断された患者を処置するのに使用される治療薬の効力の監視および評価；タウの凝集の抑制または低減；タウ原線維形成の抑制または低減；タウ沈着物の低減または除去；タウの非毒性高次構造の安定化；または患者のアルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）の処置もしくは予防、に有用である。例えば、このような抗体は、他の治療薬の部分、他のタンパク質、他の抗体、および／または検出可能な標識とコンジュゲート化できる。国際公開第03／057838号；米国特許第8,455,622号を参照されたい。このような治療薬の部分は、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）などの患者の望ましくない状態または疾患を処置する、と戦う、緩和する、防止する、または改善するのに使用できる任意の薬剤であり得る。

【0272】

コンジュゲート化した治療薬部分は、細胞傷害薬、細胞分裂阻害剤、神経分化誘導物質、神経保護薬、放射線治療薬、免疫調節物質、または抗体の活性を推進または強化するいずれかの生理活性物質を含み得る。細胞傷害薬は、細胞に対し毒性である任意の薬剤であり得る。細胞傷害薬は、細胞増殖を阻害する任意の薬剤であり得る。神経分化誘導物質は、ニューロン維持、増殖、または分化を促進する化学またはタンパク質物質を含む任意の薬剤であり得る。神経保護薬は、急性侵襲または変性過程からニューロンを保護する、化学またはタンパク質物質を含む、薬剤であり得る。免疫調節物質は、免疫応答の発生または維持を刺激または抑制する任意の薬剤であり得る。放射線治療薬は、放射線を放出する任意の分子または化合物であり得る。このような治療薬部分が、本明細書に記載の抗体などのタウ特異的抗体に結合される場合、結合された治療薬部分は、正常細胞に勝るタウ関連疾患罹患細胞に対する特異的親和性を有するであろう。したがって、コンジュゲート抗体の投与は、周囲の健全な組織に対しては最小限の損傷で、癌細胞を直接標的とする。これは、治療薬部分がそれら単独で投与されるには毒性が高すぎる場合には特に有用であり得る。さらに、より少ない量の治療薬部分を使用できる。

【0273】

いくつかのこのような抗体は、免疫毒素として作用するように修正できる。例えば、米国特許第5,194,594号を参照されたい。例えば、植物に由来する細胞毒素であるリシンを、抗体に対する二官能性試薬S－アセチルメルカプトコハク酸無水物およびリシ

10

20

30

40

50

ンに対するスクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネートを用いて、抗体に結合させることができる。Pietersz et al., Cancer Res. 48(16):4469-4476(1998)を参照されたい。結合により、リシンのB鎖結合活性は低下するが、リシンA鎖の毒性潜在能力および抗体活性のいずれも損なわれない。同様に、リボソームアセンブリーの阻害剤であるサポリンも、化学的に挿入されたスルフヒドリル基間のジスルフィド結合を介して抗体に結合させることができる。Polito et al., Leukemia 18:1215-1222(2004)を参照されたい。

【0274】

いくつかのこのような抗体は、放射性同位元素に連結できる。放射性同位元素の例には、としては、例えば、イットリウム⁹⁰(⁹⁰Y)インジウム¹¹¹(¹¹¹In)、¹³¹I、^{99m}Tc、放射性銀-111、放射性銀-199、およびビスマス²¹³が挙げられる。放射性同位元素の抗体への連結は、従来の二官能キレートで実施し得る。放射性銀-111および放射性銀-199の連結に対しては、硫黄系リンカーを使用し得る。Hazra et al., Cell Biophys. 24-25:1-7(1994)を参照されたい。銀放射性同位元素の連結は、免疫グロブリンのアスコルビン酸による還元を必要とする場合がある。¹¹¹Inおよび⁹⁰Yなどの放射性同位元素に対しては、イブリツモマブチウキセタンを使用でき、このような同位体と反応して、それぞれ¹¹¹In-イブリツモマブチウキセタンおよび⁹⁰Y-イブリツモマブチウキセタンを形成する。Witzig, Cancer Chemother. Pharmacol., 48 Suppl 1:S91-S95(2001)を参照されたい。

【0275】

いくつかのこのような抗体は、その他の治療薬の部分に連結できる。このような治療薬部分は、例えば、細胞傷害性、細胞分裂停止性、神経栄養性、または神経保護性であり得る。例えば、抗体は、メイタンシン、ゲルダナマイシン、チューブリン結合剤(例えば、オーリスタチン)などのチューブリン阻害剤、またはカリチアマイシンなどの小溝結合剤などの毒性化学療法剤と結合できる。他の代表的治療薬の部分は、患者のアルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソンズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症-パーキンソン病/認知症複合;大脳皮質基底核変性症(CBD)、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病(LBVAD)、慢性外傷性脳症(CTE)、球状グリア性タウオパチー(GGT)、または進行性核上麻痺(PSP)の処置、管理、もしくは改善に有用であることが知られている薬剤を含む。

【0276】

抗体はまた、他のタンパク質と結合されてよい。例えば、抗体はフィノマーと結合されてよい。フィノマーは、ヒト癌遺伝子Fyn SH3ドメイン由来の小さい結合タンパク質(例えば、7kDa)である。それらは、安定で可溶性であり得、システイン残基およびジスルフィド結合を欠いている場合がある。フィノマーは、抗体と同じ親和性および特異性で標的分子に結合するように遺伝子改変できる。それらは、抗体をベースにした多重特異的融合タンパク質を生成するのに好適である。例えば、フィノマーを抗体のN末端および/またはC末端に融合して、異なる構造を有する二重または三重特異性FynomAbを生成できる。フィノマーは、フィノマーライブラリーに対し、最適特性を有するフィノマーの効率的な選択を可能にするFACS、Biacore、および細胞ベースのアッセイを用いるスクリーニング技術を通して、選択できる。フィノマーの例は、Grabulovski et al., J. Biol. Chem. 282:3196-3204(2007);Bertschinger et al., Protein Eng. Des. Sel. 20:57-68(2007);Schlatter et al., MAbs. 4:497-508(2011);Banner et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 69(Pt6):1124-11

37 (2013) ; および Brack et al. , Mol. Cancer Ther. 13 : 2030-2039 (2014) に開示されている。

【0277】

本明細書で開示の抗体はまた、1種または複数の他の抗体に結合またはコンジュゲート化できる（例えば、抗体ヘテロコンジュゲートを形成するために）。このような他の抗体は、タウ内の異なるエピトープに結合でき、または異なる標的抗原に結合できる。

【0278】

抗体はまた、検出可能な標識とも結合されてよい。このような抗体は、例えば、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）の診断、および／または処置の効力を評価するために使用できる。このような抗体は、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）、の対象またはこれらの病気に罹患しやすい対象における、またはこのような対象から得た適切な生物試料におけるこのような判断を行うのに特に有用である。抗体に結合または連結し得る検出可能な代表的標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどの種々の酵素；ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンなどの補欠分子団；ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンなどの蛍光材料；ルミノールなどの発光材料；ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンなどの生物発光材料；放射性銀-111、放射性銀-199、ビスマス²¹³、ヨウ素（¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、¹²¹I）、炭素（¹⁴C）、硫黄（⁵S）、トリチウム（³H）、インジウム（¹¹⁵In、¹¹³In、¹¹²In、¹¹¹In）、テクネチウム（⁹⁹Tc）、タリウム（²⁰¹Ti）、ガリウム（⁶⁸Ga、⁶⁷Ga）、パラジウム（¹⁰³Pd）、モリブデン（⁹⁹Mo）、キセノン（¹³³Xe）、フッ素（¹⁸F）、¹⁵³Sm、¹⁷⁷Lu、¹⁵⁹Gd、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁰La、¹⁷⁵Yb、¹⁶⁶Ho、⁹⁰Y、⁴⁷Sc、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁴²Pr、¹⁰⁵Rh、⁹⁷Ru、⁶⁸Ge、⁵⁷Co、⁶⁵Zn、⁸⁵Sr、³²P、¹⁵³Gd、¹⁶⁹Yb、⁵¹Cr、⁵⁴Mn、⁷⁵Se、¹¹³Sn、および¹¹⁷Tiなどスズなどの放射性の材料；種々のポジトロン放射型断層撮影法を用いたポジトロン放出金属；非放射性常磁性金属イオン；および放射標識されたまたは特定の放射性同位元素にコンジュゲート化された分子、が挙げられる。

【0279】

放射性同位元素の抗体への連結は、従来の二官能キレートで実施し得る。放射性銀-111および放射性銀-199の連結に対しては、硫黄系リンカーを使用し得る。Hazra et al. , Cell Biophys. 24-25 : 1-7 (1994) を参照されたい。銀放射性同位元素の連結は、免疫グロブリンのアスコルビン酸による還元を必要とする場合がある。111Inおよび90Yなどの放射性同位元素に対しては、イブリツモマブチウキセタンを使用でき、このような同位体と反応して、それぞれ111In-イブリツモマブチウキセタンおよび90Y-イブリツモマブチウキセタンを形成する。Witzig, Cancer Chemother. Pharmacol. , 48 Suppl

10

20

30

40

50

1 : S 9 1 - S 9 5 (2 0 0 1) を参照されたい。

【 0 2 8 0 】

治療薬の部分、他のタンパク質、他の抗体、および／または検出可能な標識は、仲介物（例えば、リンカー）を介して本発明の抗体に直接的にまたは間接的に、結合またはコンジュゲート化され得る。例えば、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985) 中のArnon et al., “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy,”; Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987) 中のHellstrom et al., “Antibodies For Drug Delivery,”; Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985) 中のThorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,”; “Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) 中のAnalysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy,”; およびThorpe et al., Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982) を参照されたい。好適なリンカーとしては、例えば、切断可能および非切断可能リンカーが挙げられる。酸性または還元条件下で特定のプロテアーゼに曝露時に、またはその他の所定の条件下で、結合した治療薬部分、タンパク質、抗体、および／または検出可能標識を放出する異なるリンカーを用いることができる。

【 0 2 8 1 】

V I I . 医薬組成物および使用方法

予防的適用では、抗体またはその医薬組成物は、疾患（例えば、アルツハイマー病）に罹患しやすい患者、あるいは、疾患のリスクのある患者に、疾患のリスクを低減する、疾患の重症度を軽減する、または疾患の少なくとも1つの徴候もしくは症状の発症を遅延させるのに有効な投与計画（投与の用量、頻度および経路）で投与される。特に、投与計画は、好ましくは脳内でタウもしくはリン酸化タウおよびそれから形成されるフィラメント対を抑制もしくは遅延させるか、および／またはその毒性作用を抑制もしくは遅延させるか、および／または行動欠陥の発症を抑制もしくは遅延させるのに有効である。治療用途では、抗体は、疾患の少なくとも1つの徴候または症状の改善または少なくともさらなる悪化を抑制するのに効果的な投与計画（投与の用量、頻度および経路）で疾患（例えば、アルツハイマー病）の疑いのある患者、または既に疾患に罹患している患者に投与される。特に、この投与計画は、タウ、リン酸化タウ、もしくはそれから形成されるフィラメント対のレベルのさらなる上昇、関連する毒性および／または行動障害を低減または少なくとも抑制するのに効果的であるのが好ましい。

【 0 2 8 2 】

個々の処置された患者が、本発明の方法によって処置されない同等の患者のコントロール集団における平均的な治療成績よりも良好な治療成績を達成した場合、または比較臨床試験（例えば、第I I 相、第I I / I I I 相または第I I I 相試験）で、コントロール患者に対する処置患者のより良好な治療成績が $p < 0.05$ または 0.01 、あるいはさらに 0.001 のレベルで示される場合には、投与計画は治療的または予防的に効果的であると見なされる。

【 0 2 8 3 】

多くの異なる要因、例えば、投与手段、標的部位、患者の生理的状态、患者がApoE保因者であるか否か、患者がヒトまたは動物であるか否か、他の薬剤が投与されるか、処置が予防的または治療的であるか否かに応じて、有効用量は変化する。

【0284】

抗体の代表的な用量範囲は、患者の体重1kg当たり約0.01~60mg/kg、または約0.1~3mg/kgまたは0.15~2mg/kgまたは0.15~1.5mg/kgである。抗体は、このような用量で毎日、一日置きに、毎週、隔週、毎月、四半期ごと、または実証的分析によって決定された任意の他のスケジュールに従って投与できる。代表的な処置は、長期間にわたって、例えば、少なくとも6ヶ月間、複数回投与での投与を必要とする。さらなる代表的な投与計画は、2週間に1回ごと、または月に1回、または3~6ヶ月に1回の投与を必要とする。

10

【0285】

抗体は、好ましくは末梢経路（すなわち、投与または誘導される抗体が血液脳関門を通過し、脳内の意図された部位に到達する経路）を介して投与される。投与経路は、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、鼻腔内、眼内または筋肉内投与を含む。好ましい抗体の投与経路は、静脈内および皮下経路である。能動免疫に好ましい経路は、皮下および筋肉内経路である。この種の注射は、最も典型的には、腕または脚の筋肉に行われる。いくつかの方法では、薬剤は、沈着物が蓄積した特定の組織に直接注射、例えば、頭蓋内注射される。

【0286】

非経口投与のための医薬組成物は、好ましくは無菌であり、実質的に等張で、GMP条件下で製造される。医薬組成物は、単位剤形（すなわち、単回投与のための投与量）で提供され得る。医薬組成物は、1つまたは複数の生理学的に許容されるキャリア、希釈剤、賦形剤または補助剤を用いて処方できる。製剤は、選択された投与経路に依存する。注射のために、抗体は、水溶液で、好ましくは、（注射部位での不快感を軽減するために）ハンクス液、リンゲル液、もしくは生理食塩水または酢酸緩衝液などの生理的に適合性のある緩衝液で処方できる。溶液は、懸濁剤、安定化剤および／または分散剤などの製剤化剤を含有できる。あるいは、抗体は、使用前に適切なブークル、例えば、無菌で発熱物質を含まない水で構成するために凍結乾燥形態であり得る。

20

【0287】

本投与計画は、処置される疾患の処置または予防に有効な別の薬剤と組み合わせて投与され得る。例えば、アルツハイマー病の場合、本投与計画は、Aβ（国際公開第2000/072880号）、コリンエステラーゼ阻害剤もしくはメマンチンに対する免疫療法と組み合わせることができ、またはパーキンソン病の免疫療法の場合には、α-シヌクレイン（国際公開第2008/103472号）、レボドパ、ドーパミン作動薬、COMT阻害剤、MAO-B阻害剤、アマンタジン、もしくは抗コリン薬に対する免疫療法と組み合わせることができる。

30

【0288】

抗体は効果的投与計画で投与され、これは、発症を遅らせる、重症度を低減する、さらなる悪化を抑制する、および／または処置される障害の少なくとも1つの徴候または症状を改善する投与量、投与経路および投与頻度を含む投与計画を意味する。患者が既に障害に罹患している場合は、投与計画は治療的に効果的な投与計画と称される場合もある。患者が母集団に比べて障害の高いリスクを有するが、まだ症状がない場合、投与計画は、予防的に効果的な投与計画と称される場合もある。いくつかの事例では、治療的または予防的効力は、同じ患者のヒストリカルコントロールまたは過去の経験に対して個別の患者で観察され得る。他のケースでは、治療的または予防的効力は、非処置患者のコントロール集団に比べて、処置患者集団の臨床前または臨床試験中に実証できる。

40

【0289】

抗体の代表的投与量は、0.1~60mg/kg（例えば、0.5、3、10、30、または60mg/kg）、または0.5~5mg/kg体重（例えば、0.5、1、2、

50

3、4または5mg/kg)または固定投与量として、10～4000mgまたは10～1500mgである。投与量は、特に、患者の状態および前の処置がある場合その応答に、処置が予防的であるかまたは治療的であるか、および障害が急性であるかまたは慢性であるかに依存する。

【0290】

投与は、非経口、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、鼻腔内または筋肉内投与であり得る。いくつかの抗体は、静脈内または皮下投与により体循環中に投与できる。静脈内投与は、例えば、30～90分にわたる輸注であり得る。

【0291】

投与頻度は、特に、循環中の抗体の半減期、患者の状態および投与経路に依存する。頻度は、患者の状態または処置される障害の進行の変化に応じて、毎日、毎週、毎月、3ヶ月毎、または不規則な間隔とすることができる。静脈内投与の代表的頻度は、処置の原因によって毎週～3ヶ月毎であるが、さらに多いまたは少ない頻度の投与も可能である。皮下投与としては、代表的投与頻度は、毎日から毎月であるが、さらに多いまたは少ない頻度の投与も可能である。

【0292】

投薬の回数は、障害が急性であるか慢性であるかおよび処置に対する障害の応答に依存する。急性障害または慢性障害の急性悪化に対しては、多くの場合1～10回の服用量である。時には、急性障害または慢性障害の急性悪化に対しては、必要に応じ分割形態とした、単一急速投与量で十分である。急性障害または急性悪化の再発に対しては、処置を回復し得る。慢性障害に対しては、抗体は、規則的な間隔、例えば、毎週、隔週、毎月、3ヶ月毎、6ヶ月毎を少なくとも1、5または10年間、または患者の一生の間投与され得る。

【0293】

A. 診断および監視方法

インビボイメージング、診断方法、および最適化免疫療法

本発明は、患者のタウタンパク質沈着物（例えば、神経原線維濃縮体およびタウ封入体）をインビボイメージングする方法を提供する。本方法は、本発明のヒト化抗体を患者に投与し、その後、結合した後の抗体を検出することにより作用する。投与した抗体の除去反応は、Fabなどの完全長の定常領域を欠く抗体フラグメントを使用することによって回避または低減することができる。いくつかの方法では、同一の抗体は、処置および診断試薬の両方として機能し得る。

【0294】

診断試薬は、患者の体内への静脈内注射によって、または頭蓋内注射によるかもしくは、頭蓋骨に孔を穿孔することによって脳に直接投与できる。試薬の投与量は、処置方法の場合と同じ範囲内である必要がある。典型的には、試薬は標識されるが、いくつかの方法では、タウに対する親和性を有する一次試薬は標識されず、二次標識剤を一次試薬に結合させるために使用される。標識の選択は検出の手段に依存する。例えば、蛍光標識は光学的検出に適する。常磁性標識の使用は、外科的介入を用いない断層撮影検出に適する。放射性標識はまた、陽電子放出断層撮影（PET）または単一光子放射型コンピュータ断層撮影（SPECT）を用いて検出できる。

【0295】

タウタンパク質沈着物のインビボイメージングの方法は、アルツハイマー病、前頭側頭葉変性症、進行性核上性麻痺およびピック病、またはそのような疾患に対する感受性などのタウオパチーを診断するのに、またはその診断を確定するのに有用である。例えば、本方法は、認知症の症状を示す患者に使用できる。患者に異常な神経原線維濃縮体がある場合、その患者は、アルツハイマー病を罹患している可能性がある。別の選択肢としては、患者に異常なタウ封入体がある場合には、封入体の位置に応じて、その患者は前頭側頭葉変性症に罹患している可能性がある。本方法はまた、無症状の患者にも使用できる。異常なタウタンパク質沈着物の存在は、将来、症候性疾患に罹りやすいことを示す。この方法

はまた、以前にタウ関連疾患と診断された患者における疾患の進行および／または処置に対する応答を監視するのに有用である。

【0296】

診断は、標識された遺伝子座の数、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得る。ベースライン値は、非疾患個体集団における平均レベルを表し得る。ベースライン値はまた、同じ患者で決定された以前のレベルを表し得る。例えば、患者のベースライン値は、タウ免疫療法処置を開始する前に測定することができ、その後、測定値とベースライン値と比較できる。ベースラインシグナルに対する値の減少は、処置に対する陽性反応を示す。

【0297】

一部の患者では、タウオパチーの診断は、PETスキャンを実行することによって支援され得る。PETスキャンは、例えば、従来のPET撮像装置および補助装置を用いて実施され得る。スキャンは通常、タウタンパク質沈着物と関連することが一般に知られている脳の1つまたは複数の領域、およびあったとしても少数の沈着物が通常、存在してコントロールとしての役割を果たす1つまたは複数の領域を含む。

【0298】

PETスキャンで検出したシグナルは、多次元画像として表すことができる。多次元画像は、二次元では脳の断面を表し、三次元では三次元脳を表すか、または四次元では三次元脳の経時的变化を表し得る。カラースケールは、異なる色を用いて行うことができ、異なる標識量および検出される推定タウタンパク質沈着物を示す。スキャンの結果はまた、検出される標識の量およびその結果としてのタウタンパク質沈着物の量と関連する数で数値的に提示できる。特定のタウオパチー（例えば、アルツハイマー病）の、沈着物と関連することが知られている脳の領域に存在する標識は、前者の領域内における沈着物の程度を表す比率を提供するために、沈着物と関連することが知られていない領域内に存在する標識と比較できる。同じ放射性標識リガンドに対するこのような比率は、タウタンパク質沈着物の比較可能な尺度および異なる患者間でのその変化を与える。

【0299】

いくつかの方法では、PETスキャンは、MRIまたはCATスキャンと同時に、またはMRIまたはCATスキャンと同じ患者の訪問で実施される。MRIまたはCATスキャンは、PETスキャンよりも脳のより解剖学的詳細を提供する。しかし、PETスキャンからの画像は、脳内の解剖学的構造に対するPETリガンドおよび推定タウ沈着物の位置をより正確に示すMRIまたはCATスキャン画像上に重ね合わせることができる。一部の装置は、スキャンの間に患者が位置を変えことなく患者のPETスキャンとMRIまたはCATスキャンの両方を実行し、画像の重ね合わせを容易にすることができる。

【0300】

好適なPETリガンドは、本発明の放射標識抗体（例えば、マウス、ヒト化、キメラまたはベニヤ3D6抗体）を含む。使用される放射性同位体は、例えば、 C^{11} 、 N^{13} 、 O^{15} 、 F^{18} 、または I^{123} であり得る。PETリガンドの投与と、スキャンを実行する間隔は、PETリガンド、特に脳への取り込み速度および除去速度、ならびにその放射性標識物の半減期に依存し得る。

【0301】

PETスキャンはまた、無症状の患者または軽度認知障害の症状を有するが、タウオパチーと診断されておらず、それでもタウオパチーを発症するリスクが高い患者で予防処置として実施することもできる。無症状の患者では、スキャンは、家族歴、遺伝的もしくは生化学的危険因子または熟年のためにタウオパチーのリスクが高いと考えられる個体に特に有用である。予防的スキャンは、例えば、45～75歳の年齢の患者で開始できる。一部の患者では、最初のスキャンは50歳で行われる。

【0302】

予防的スキャンは、例えば、6ヶ月～10年、好ましくは、1～5年の間隔で行われ得る。一部の患者では、予防的スキャンが毎年行われる。予防的措置として行われるPET

10

20

30

40

50

スキャンが異常に高いレベルのタウタンパク質沈着物を示す場合、免疫療法が開始され、その後、PETスキャンが、タウオパチーと診断された患者と同様に開始できる。予防処置として行われるPETスキャンが正常レベル内にあるタウタンパク質沈着物のレベルを示す場合、さらにPETスキャンが、前述のように、6ヶ月～10年、好ましくは、1～5年の間隔で、またはタウオパチーもしくは軽度認知障害の徴候および症状の出現にตอบสนองして行われ得る。上記の正常レベルのタウタンパク質沈着物が検出される場合、予防的スキャンとタウ標的化免疫療法の投与を組み合わせることによって、タウタンパク質沈着物のレベルは正常レベルまで低下するかもしれないもしくはそれにより近いレベルになるか、または少なくともさらに増加するのを防ぐことができ、患者は、予防的スキャンおよびタウ標的化免疫療法を受けていない場合よりも長い期間（例えば、少なくとも5、10、15もしくは20年、または患者の残りの人生の間）、タウオパチーのない状態のままであり得る。

【0303】

正常レベルのタウタンパク質沈着物は、特定のタウオパチー（例えば、アルツハイマー病）と診断されておらず、このような疾患を発症するリスクが高いとみなされていない母集団の個体の代表的な試料（例えば、年齢が50歳未満の無病の個体の代表的な試料）の脳内における神経原線維濃縮体またはタウ封入体の量によって決定され得る。あるいは、タウタンパク質沈着物が生じることが知られている脳の領域における、本発明の方法によるPETシグナルが、このような沈着物が通常生じることが知られている脳の領域からのシグナルと（測定の精度内で）異なっていない場合には、正常なレベルが個々の患者で認識され得る。個体におけるレベルの上昇は、正常レベルとの比較（例えば、平均＋標準偏差の分散の外側のレベル）によってまたは、単に、沈着物と関連することが知られていない領域と比較したタウタンパク質沈着物と関連する脳の領域における実験誤差を超えて上昇したシグナルから認識され得る。個体および集団におけるタウタンパク質沈着物のレベルを比較する目的の場合、タウタンパク質沈着物は、好ましくは、脳の同じ領域（複数可）において決定されるべきであり、これらの領域は、特定のタウオパチー（例えば、アルツハイマー病）と関連するタウタンパク質沈着物を形成することが知られている少なくとも1つの領域を含む。タウタンパク質沈着物のレベルが上昇した患者は、免疫療法を開始するための候補である。

【0304】

免疫療法を開始した後のタウタンパク質沈着物のレベルの低下は、最初に、処置が所望の効果を有していることを示すものとして見ることができる。観察された減少は、例えば、ベースライン値の1～100%、1～50%、または1～25%の範囲内であり得る。このような効果は、沈着物を形成することが知られている脳の1つまたは複数の領域で測定できるか、またはそのような領域の平均値から測定できる。処置の総合効果は、処置しない場合に、平均的な非処置患者で生じるタウタンパク質沈着物の増加にベースラインに対する減少率を加えることによって概算できる。

【0305】

タウタンパク質沈着物のほぼ一定のレベルでの維持またはタウタンパク質沈着物が少しでも増加することは、準最適な応答ではあるが、処置に対する応答の指標となり得る。このような応答は、免疫療法がタウタンパク質沈着物のさらなる増加を抑制する効果を有するか否かを決定するために、処置を受けていない特定のタウオパチー（例えば、アルツハイマー病）を有する患者におけるタウタンパク質沈着物のレベルの時間経過と比較できる。

【0306】

タウタンパク質沈着物の変化の監視は、その処置にตอบสนองした免疫療法または他の治療計画の調整を可能にする。PET監視は、処置に対する応答の性質および程度の指標を提供する。その後、処置の調整を行うべきか否かを判断することができ、必要であれば、処置はPET監視に応じて調整できる。したがって、他のバイオマーカー、MRIまたは認知の測定が検出可能なほど応答する前に、PET監視は、タウ標的化免疫療法または他の処置の投与計画の調整を可能にする。著しい変化は、ベースに対する処置後のパラメータの値を比較することで、処置が有益な効果をもたらしたかまたはもたらしていないという証

抛が得られることを意味する。いくつかの事例では、患者自身におけるパラメータの値の変化は、処置が有益な効果をもたらしたかまたはもたしていないという証拠を与える。他の例では、患者における値の変化がある場合、免疫療法を受けていない患者の代表的なコントロール集団における値の変化がある場合にはその変化と比較される。特定の患者の応答とコントロール患者の正常な応答との差異（例えば、平均値プラス標準偏差の分散）はまた、免疫療法の投与計画が患者において有益な効果を達成しているかまたはしていないかという証拠を提供できる。

【0307】

一部の患者では、監視はタウタンパク質沈着物の検出可能な低下を示すが、タウタンパク質沈着物のレベルは正常を上回ったままである。このような患者では、許容できない副作用がない場合、そのままの投与頻度および／もしくは用量で、または最大推奨用量でない場合は、投与頻度および／もしくは用量を増加させて、治療計画を継続することができる。

【0308】

監視が、患者におけるタウタンパク質沈着物のレベルが正常またはほぼ正常まで低下したことを示す場合は、免疫療法の投与計画は、誘導の投与計画（すなわち、タウタンパク質沈着物のレベルを低下させる計画）から維持の投与計画（すなわち、ほぼ一定のレベルでタウタンパク質沈着物を維持する計画）に調整されてよい。このような投与計画は、免疫療法の用量および／または投与頻度を減少させることによって行われ得る。

【0309】

他の患者では、監視は、免疫療法がいくつかの有益な効果を有しているが準最適な効果であることを示し得る。最適な効果は、治療の開始後の所定の時点で免疫療法を受けているタウオパチー患者の代表的な試料の（タウタンパク質沈着物が形成することが知られているその全体脳もしくは代表的な領域（単一または複数）にわたって測定または計算された）タウタンパク質沈着物の変化の上半分または四分位内のタウタンパク質沈着物のレベルの減少率として定義され得る。タウタンパク質沈着物が少し低下した患者、またはタウタンパク質沈着物が一定のままの患者、または増加するが、免疫療法の非存在下で（例えば、免疫療法を投与されていない患者のコントロール群から推測したときに）予想される値よりも低い程度までの増加である患者は、陽性ではあるが準最適な反応を経験する患者として分類され得る。このような患者には、必要に応じて、薬剤の用量および／または投与頻度を増加させる投与計画の調整が施され得る。

【0310】

一部の患者では、タウタンパク質沈着物は、免疫療法を受けていない患者におけるタウ沈着と同様にまたはそれを上回って増加し得る。このような増加が、18ヶ月または2年などの期間にわたって継続する場合は、薬剤の頻度または用量が増加した後であっても、必要に応じて、他の処置を優先して免疫療法が中断され得る。

【0311】

タウオパチーの診断、監視、および処置の調整に関する前述の説明は、主にPETスキンの使用に焦点を置いてきた。しかし、本発明のタウ抗体（例えば、マウス、ヒト化、キメラもしくはベニヤ3D6抗体）の使用の影響を受けやすいタウタンパク質沈着物の視覚化および／または測定のための任意の他の技術が、このような方法を実行するためにPETスキンの代わりに使用できる。

【0312】

タウ関連疾患に罹患しているまたは罹患しやすい患者のタウに対する免疫応答の検出方法も提供される。この方法を用いて、本明細書で提供される作用物質による治療および予防処置の過程を監視することができる、受動的免疫化後の抗体プロファイルは通常、直後の抗体濃度のピークとそれに続く指数関数的減衰を示す。さらに投与がなければ、減衰は、投与され多孔体の半減期に応じて、数日から数ヶ月の期間内に処置前のレベルに近づく。例えば、いくつかのヒト抗体の半減期は、20日の程度である。

【0313】

いくつかの方法では、対象のタウに対する抗体のベースライン測定は投与前に行われ、第2の測定は、その直ぐ後に、抗体のピークレベルを測定するために行われ、さらに1回または複数回のさらなる測定は、抗体のレベルの減衰を監視するために間隔を置いて行われる。抗体のレベルがベースラインまたはベースラインを差し引いたピークの所定のパーセンテージ（50%、25%または10%）まで低下すると、さらなる用量の抗体の投与が行われる。いくつかの方法では、ピークまたはバックグラウンドを差し引いたその後の測定レベルがあらかじめ決定した基準レベルと比較され、他の対象に対する有益な予防または治療処置投与計画が作成される。測定抗体レベルが基準レベルより大きく低い場合（例えば、処置から利益を受ける対象集団の基準値の平均マイナス1標準偏差、好ましくは2標準偏差未満の場合）には、追加の抗体投与量が必要である。

10

【0314】

例えば、対象由来の試料中のタウを測定することにより、または対象のタウのインビロイメージングにより、対象のタウを検出する方法も提供される。このような方法は、タウに関連する疾患、またはそれに対する罹りやすさの診断または診断の確定に有用である。この方法はまた、無症状の対象にも使用できる。タウの存在は、将来、症候性疾患に罹りやすいことを示す。この方法はまた、以前に、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、

20

【0315】

アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）を有する、有すると疑われる、または有するリスクのある対象から得た生物試料を、本明細書で開示の抗体に接触させて、タウの存在を評価することができる。例えば、このような対象のタウのレベルが健康な対象に存在するタウのレベルと比較され得る。あるいは、疾患の処置を受けているこのような対象のタウのレベルが、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）の処置を受けたことがない対象のタウのレベルと比較され得る。いくつかのこのような試験は、このような対象から得た組織の生検材料を必要とする。ELISAアッセイはまた、例えば、流体試料中のタウを評価するために有用な方法であり得る。

30

40

【0316】

VII. キット

本発明波佐羅にキット（例えば、容器）を提供し、キットは、本明細書で開示の抗体および関連物、例えば、使用説明書（例えば、添付文書）を含む。使用説明書は、例えば、抗体および必要に応じ、1種または複数の追加の薬剤の投与のための説明書を含んでよい。抗体の容器は、単位用量、大量包装（例えば、複数回投与用包装）または分割単位用量であってよい。

50

【0317】

添付文書は、適応症、使用法、投与量、投与、このような治療薬の使用に関する禁忌および／または警告についての情報を含む治療薬の商業用パッケージに習慣的に含まれる説明書を意味する。

【0318】

キットはまた、無菌注射用水（BWFI）、リン酸塩緩衝生理食塩水、リンゲル液およびデキストロース溶液などの薬学的に許容可能な緩衝液を含む第2の容器を含む。キットはまた、商業上およびユーザーの点から見て望ましい他の材料を含んでもよく、これらは、他の緩衝液、希釈液、フィルター、針、シリンジを含む。

【0319】

VIII. その他の用途

臨床診断または処置または研究の場合、抗体は、タウまたはそのフラグメントの検出に使用できる。例えば、抗体を使用して、生物試料がタウ沈着物を含むという指標として生物試料中のタウの存在を検出することができる。抗体の生物試料への結合は、抗体のコントロール試料への結合と比較できる。コントロール試料および生物試料は、同じ組織起源の細胞を含み得る。コントロール試料および生物試料は、同じ個体または異なる個体から、同じ時期または異なる時期に得ることができる。必要に応じ、複数の生物試料および複数のコントロール試料が複数の時期に評価され、試料間の差異とは関係のないランダムな変動に対し保護される。その後、生物試料（単一または複数）とコントロール試料（単一または複数）との間の直接比較が行われ、生物試料（単一または複数）に対する抗体結合（すなわち、タウの存在）がコントロール試料（単一または複数）に対する抗体結合と比べて、増加、減少、または同じであるかどうか判定される。抗体の、コントロール試料（単一または複数）に対する結合と比べて、生物試料（単一または複数）に対する結合の増加は、生物試料（単一または複数）中のタウの存在を示す。いくつかの事例では、抗体結合の増加は統計的に有意である。場合により、生物試料に対する抗体結合は、コントロール試料に対する抗体結合よりも、少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍または100倍である。

【0320】

さらに、抗体を使用して、生物試料中のタウの存在を検出し、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）と診断された患者の処置に使用されている治療薬の効力を監視および評価することができる。アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）と診断された患者由来の生物試料を評価して、その治療薬による治療を開始する前に、その試料に対する抗体の結合のベースライン（すなわち、試料中のタウの存在に対するベースライン）が確定される。いくつかの事例では、患者由来の複数の生物試料が複数の時期に評価されて、処置には無関係のランダムな変動のベースラインおよび基準の両方が確定される。その後、治療薬が投与計画により投与される。投与計画は、一定の期間にわたり薬剤の複数の投与を含んでもよい。場合により、抗体の結合（すなわち、タウの存在）は、複数の時期に複数の生物試料で評価され、ランダムな変動の基準を確定し、免疫療法に応答する傾向を示す。生物試料に対する抗体結合の種々の比較評価がその後行

10

20

30

40

50

われる。2つのみの評価を行う場合には、2つの評価間で直接評価がなされて、抗体結合（すなわち、タウの存在）が、2つの評価間で増加、減少、または同じで維持されるかどうか決定される。3回以上の測定がなされる場合は、測定値は、治療薬による処置前に開始される経時変化としておよび治療過程を介して進行する経時変化として分析できる。患者において、生物試料に対する抗体結合（すなわち、タウの存在）が低減した場合、患者のアルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）、または進行性核上麻痺（PSP）の処置に治療薬が効果的であると結論できる。抗体結合の低減は統計的に有意である。場合により、結合は、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%減少する。抗対結合の評価は、アルツハイマー病、ダウン症候群、軽度認知障害、原発性年齢関連タウオパチー、脳炎後パーキンソニズム、外傷後認知症またはボクサー認知症、ピック病、C型ニーマン・ピック病、核上性麻痺、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、嗜銀性顆粒病、球状グリア性タウオパチー、グアム筋萎縮性側索硬化症－パーキンソン病／認知症複合；大脳皮質基底核変性症（CBD）、レビー小体型痴呆、レビー小体型アルツハイマー病（LBVAD）、慢性外傷性脳症（CTE）、球状グリア性タウオパチー（GGT）または進行性核上麻痺（PSP）の徴候および症状の評価と併せて行うことができる。

【0321】

抗体は、タウまたはそのフラグメント検出研究用の研究試薬としても使用できる。このような用途では、抗体は、蛍光分子、スピン標識分子、酵素、放射性同位元素で標識でき、検出アッセイの実施に必要な全ての試薬と共に、キットの形で提供できる。また、抗体を用いて、例えば、親和性クロマトグラフィーにより、タウ、またはタウの結合相手を精製することができる。

【0322】

上記または下記で引用した全ての特許申請、ウェブサイト、その他の刊行物、受入番号などは、あたかも個別の項目が具体的に、個別に参照により組み込まれることが示される場合と同じ程度に、参照によりその全体が、本出願において組み込まれる。配列の異なるバージョンが異なる時間の受入番号と関連する場合は、本出願の有効な出願日の受入番号に関連するバージョンを意味している。有効な出願日は、実際の出願日または該当する場合は、受入番号に関する優先権出願の出願日より早い日付を意味する同様に、刊行物、ウェブサイトなどの異なるバージョンが異なる時間に発表された場合には、別段の指示がない限り、出願の有効出願日で、最近発表されたバージョンを意味する。本発明の任意の特徴、工程、要素、実施形態、または態様は、特に別義が示されない限り、任意の他のものと組み合わせて使用できる。本発明は、明確さおよび理解の目的のために例示および実施例によっていくらか詳細に説明してきたが、特定の変更および修正が、添付の特許請求の範囲内で実施され得ることは明らかであろう。

【0323】

実施例

実施例1. タウモノクローナル抗体の特定

タウに対するモノクローナル抗体を以下のように生成した。P301S変異を含む組換えN末端Hisタグ付き383a.a. ヒトタウ（4RON）[免疫原A]またはP301S変異を含み、N末端Hisタグを欠く組換え383a.a. ヒトタウ（4RON）[免疫原B]を用いて、免疫化を実施した。免疫原は、RIBIアジュバント中に乳化した。

【0324】

5週齢雌Balb/cマウスを25μgの免疫原Aで0日目に腹腔内免疫し、また、1

0 μ g の免疫原 A で各 7、14、21、27、34、48、55、および 62 日目に腹腔内免疫した。マウスを 76 および 90 日目に 10 μ g の免疫原 B で免疫した。43 および 98 日目に、マウスを採血し、免疫原 A に対する力価を測定した；101 日目に最高力価の動物に 50 μ g の免疫原 B の終末免疫で追加免疫した。この追加免疫は、1/2 を腹腔内送達し、1/2 を静脈内に送達した。融合ハイブリドーマを ELISA により両方の免疫原に対しスクリーニングし、最も高いシグナルを有するものをエピトープマッピングした（実施例 2 参照）。

【0325】

実施例 2．抗体 3D6 のエピトープマッピング

383aa 4RON ヒトタウタンパク質全体にわたる一連の重複ビオチン化ペプチドをマウス 3D6 抗体のマッピングに使用した。別のペプチドを使用して、タンパク質の C 末端および N 末端の潜在的翻訳後修飾のモデル化を行った。

【0326】

ビオチン化ペプチドを、ストレプトアビジンコート ELISA プレートの別々のウェルに結合させた。プレートをブロッキングし、マウス 3D6 で処理し、続けて、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体と共にインキュベートした。完全な洗浄後、OPD をプレートに適用し、発色させた。450 nm でプレートの吸光度を読み取った。一次抗体を含まないウェル由来の吸光度値のバックグラウンド除去を実施し、陽性結合の閾値 0.2 吸光度単位に設定した。結合を MTBR 領域内の部位にマッピングした。

【0327】

実施例 3．ヒト化 3D6 の設計

ヒト化のための出発点またはドナー抗体は、マウス抗体 3D6 であった。成熟 m3D6 の重鎖可変アミノ酸配列は、配列番号 7 として提供されている。成熟 m3D6 の軽鎖可変アミノ酸配列は、配列番号 11 として提供されている。重鎖カバット／コチアの組み合わせ CDR1、CDR2、および CDR3 アミノ酸配列は、配列番号 8～10 としてそれぞれ提供されている。軽鎖カバット CDR1、CDR2、および CDR3 アミノ酸配列は、配列番号 12～14 としてそれぞれ提供されている。カバットナンバリングが全体を通して使用される。

【0328】

3D6 抗体の可変カッパ (V κ) は、ヒトカバットサブグループ 2 に対応するマウスカバットサブグループ 2 に属し、可変重質 (V h) は、ヒトカバットサブグループ 1 に対応するマウスカバットサブグループ 2c に属する [Kabat E. A., et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242]。16 個の残基のコチア CDR-L1 は V κ の正準クラス 4 に属し、7 個の残基のコチア CDR-L2 はクラス 1 に属し、9 個の残基のコチア CDR-L3 はクラス 1 に属する [Martin A. C, and Thornton J. M. (1996) J. Mol. Biol. 263:800-15. [Martin & Thornton, 1996]。10 個残基のコチア CDR-H1 はクラス 1 に属し、17 個の残基のコチア CDR-H2 はクラス 2 に属する [Martin & Thornton, 1996]。CDR-H3 は、正準クラスを有さない。3D6 の抗体の大まかな構造モデルを与える構造を見つけるために、PDB データベースのタンパク質配列に対し検索した [Deshpande N, et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33:D233-7]。3D6 の Fv モデルを構築するために、1.4 Å の解像度を有するマウス抗ピログルタミン酸 A ベータ抗体 Fab c 番号 24 (pdb コード 5MYX) [Piechotta, A. et al., 2017, J Biol Chem 292:12713-12724] の構造を使用した。これは、3D6 のループと同じ正準構造を保持していた。

【0329】

3D6 VH のフレームワークは、Wedemayer, G. J., et al. (1997

10

20

30

40

50

； Science 276： 1665－1669）により設計されたヒト化48G7 Fab PDB：2RCSの対応する領域と高度の配列類似性を共有する。3D6および48G7 Fabの可変ドメインもまた、CDR-H1、H2ループについて同一の長さを共有する。同様に、3D6 VLのフレームワークは、Dafferner, A. J., et al. (2017; Direct Submission)によりクローニングされたヒト抗体ARX71335 VLの対応する領域と高度の配列類似性を共有する。3D6およびARX71335抗体の可変軽鎖ドメインもまた、CDR-L1、L2およびL3ループについて同一の長さを共有する。したがって48G7 VH (2RCS-VH) およびARX71335 VLのフレームワーク領域を、3D6のCDRのための受容体配列として選択した。VHおよびVLの各ヒトフレームワーク上にグラフト化された3D6 CDRのモデルを構築し、さらなる逆突然変異のガイダンスとして使用した。

10

【0330】

抗体ヒト化プロセスから生じた重鎖および軽鎖バリエーション配列を、IMGT Domain GapAlignツールを用いて、ヒト生殖細胞系列配列にさらに整列させて、WHO INN 委員会ガイドラインに概要が示されているように、重鎖および軽鎖のヒト化度を評価した。(WHO-INN：生物学および生物工学的物質のための国際一般名称 (INN) (概説) (インターネット) 2014. <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf> から入手可能) 可能であれば、残基を、対応するヒト生殖細胞系列配列に対応するように変更し、ヒト化度を高め、かつ潜在的免疫原性を低下させた。ヒト化VLvb2およびVLvb3バリエーションでは、配列をヒト生殖細胞系列遺伝子IGKV2-30*02 (配列番号27) により類似させるために、変異を導入した。ヒト化VHvb2、VHvb3、VHvb4、VHvb5、VHvb6、およびVHvb6バリエーションでは、配列をヒト生殖細胞系列遺伝子IGHV1-69-2*01 (配列番号25) により類似させるために、変異を導入した。

20

【0331】

hu3D6-VHおよびhu3D6-VLの型を、抗原結合、熱安定性、および免疫原性へのそれらの寄与について、ならびにグリコシル化、凝集、N末端異種性、熱安定性、表面露出電荷パッチ (surface exposed charged patches)、表面露出電荷パッチ、脱アミノ化、およびプロテイナーゼ感受性の最適化について様々なフレームワーク残基の評価を可能にするように設計した。変異について検討された位置としては、

30

－ 正準CDR立体構造を定義する位置 (Kontermann R and Dübels (eds). Antibody Engineering. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG. の中の、Martin, A. C. R. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. で要約される)、

－ バーニアゾーン内にある位置 (Foote J and Winter G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol Biol. 224 (2): 487-99.)、

40

－ VH/VLドメイン界面に局在する位置 (Shepherd P and Dean C (eds). Monoclonal Antibodies: a Practical Approach. Oxford, UK: Oxford University Press. の中の、Le'ger OJP and Saldanha J. (2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting. で要約される)、

－ グリコシル化もしくはピログルタミン酸化などの、翻訳後修飾を受け易い位置、

50

- － V HおよびV Lフレームワーク上にグラフト化された3 D 6 C D Rのモデルに従い、C D Rと衝突すると予測される残基により占められる位置、または
- － 親マウス3 D 6 残基もしくはいくつかの他の残基のどちらかがヒト抗体レパートリー内ではるかに多く見られる、シーケンシングされたヒト抗体の中で希少な残基により占められる位置、
が挙げられる。

【0332】

マウス3 D 6 および様々なヒト化抗体の配列比較を、軽鎖可変領域（表4および図2）および重鎖可変領域（表3および図1）について示す。

【0333】

7個のヒト化重鎖可変領域バリエーションおよび3個のヒト化軽鎖可変領域バリエーションを、異なる置換順列h u 3 D 6 V H v b 1、h u 3 D 6 V H v b 2、h u 3 D 6 V H v b 3、h u 3 D 6 V H v b 4、h u 3 D 6 V H v b 5、h u 3 D 6 V H v b 6、またはh u 3 D 6 V H v b 7（それぞれ配列番号76～80および90～91）、およびh u 3 D 6 V L v b 1、h u 3 D 6 V L v b 2、またはh u 3 D 6 V L v b 3（それぞれ配列番号83～85）（表3および4）を含んで構築した。選択ヒトフレームワークに基づく逆突然変異およびその他の変異を有する、代表的ヒト化V kおよびV hの設計をそれぞれ、表3および4に示す。表3および4の太字の領域は、カバット／コチアの組み合わせにより定義されるC D Rを示している。配列番号：76～80および配列番号：90～91は、表5に示すように、逆突然変異およびその他の変異を含む。h u 3 D 6 V H v b 1、h u 3 D 6 V H v b 2、h u 3 D 6 V H v b 3、h u 3 D 6 V H v b 4、h u 3 D 6 V H v b 5、h u 3 D 6 V H v b 6、およびh u 3 D 6 V H v b 7中の位置でのアミノ酸を、表6に示す。h u 3 D 6 V L v b 1、h u 3 D 6 V L v b 2、およびh u 3 D 6 V L v b 3中の位置でのアミノ酸を、表7に示す。ヒト化V H鎖h u 3 D 6 V H v b 1、h u 3 D 6 V H v b 2、h u 3 D 6 V H v b 3、h u 3 D 6 V H v b 4、h u 3 D 6 V H v b 5、h u 3 D 6 V H v b 6、およびh u 3 D 6 V H v b 7（それぞれ、配列番号76～80および90～91）のパーセンテージヒト化度、ならびにヒト化V L鎖h u 3 D 6 V L v b 1、h u 3 D 6 V L v b 2、およびh u 3 D 6 V L v b 3（それぞれ、配列番号83～85）のパーセンテージヒト化度を、表8に示す。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウス3D6 VH (配列番号7)	IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	2RCS-VH_huFrwk (配列番号75)	Hu3D6 VHvb1 (配列番号76)	Hu3D6 VHvb2 (配列番号77)	Hu3D6 VHvb3 (配列番号78)	Hu3D6 VHvb4 (配列番号79)	Hu3D6 VHvb5 (配列番号80)	Hu3D6 VHvb6 (配列番号90)	Hu3D6 VHvb7 (配列番号91)
1	1	Fr1	E	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	Q	Q	V	V	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	D	E	E	E	E	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	V	V	V	V	V	V	V	V
13	13	Fr1	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	L	T	S	S	S	T	T	T	T	T
18	18	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	I	L	L	I	I	I	I	I	I
21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	T	T	K	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A

10

20

30

40

50

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウス3D6 VH (配列番号7)	IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	2RCS-VH_huFrwk (配列番号75)	Hu3D6 VHvb1 (配列番号76)	Hu3D6 VHvb2 (配列番号77)	Hu3D6 VHvb3 (配列番号78)	Hu3D6 VHvvb4 (配列番号79)	Hu3D6 VHvb5 (配列番号80)	Hu3D6 VHvb6 (配列番号90)	Hu3D6 VHvb7 (配列番号91)
25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	Y	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	N	N	N	N	T	T	T	T
29	29	CDR-H1	I	F	I	I	I	I	I	I	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	K	K	K	K	K	K	K	K
31	31	CDR-H1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
32	32	CDR-H1	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	L	M	M	L	L	L	L	L	L	L
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
35A		CDR-H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-
35B		CDR-H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	R	Q	K	K	R	R	R	R	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	R	R	R	R	R	R	R	R
41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	E	E	G	G	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	K	Q	Q	K	K	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W

10

20

30

40

50

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウス3D6 VH (配列番号7)	IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	2RCS-VH_huFrwk (配列番号75)	Hu3D6 VHvb1 (配列番号76)	Hu3D6 VHvb2 (配列番号77)	Hu3D6 VHvb3 (配列番号78)	Hu3D6 VHvb4 (配列番号79)	Hu3D6 VHvb5 (配列番号80)	Hu3D6 VHvb6 (配列番号90)	Hu3D6 VHvb7 (配列番号91)
48	48	Fr2	I	M	I	I	I	I	I	I	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L	R	W	W	W	W	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	V	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	CDR-H2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	54	CDR-H2	E	E	A	E	E	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	D	E	N	D	D	D	D	E	E	E
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	V	I	K	V	V	I	I	I	V	V
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	D	A	D	D	D	D	D	D	D	D
61	62	CDR-H2	P	E	P	P	P	P	P	P	P	P
62	63	CDR-H2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	K	K	R	R	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	A	A	A	A	V	V	V	V
68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

10

20

30

40

50

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウス3D6 VH (配列番号7)	IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	2RCS-VH_huFrwk (配列番号75)	Hu3D6 VHvb1 (配列番号76)	Hu3D6 VHvb2 (配列番号77)	Hu3D6 VHvb3 (配列番号78)	Hu3D6 VHvb4 (配列番号79)	Hu3D6 VHvb5 (配列番号80)	Hu3D6 VHvb6 (配列番号90)	Hu3D6 VHvb7 (配列番号91)
70	71	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	S	S	T	T	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D	N	N	D	D	D	D	D	D
77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M	L	L	L	M	M	M	M	M
81	82	Fr3	Q	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E
82	83	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	T	T	T	R	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	F	Y	Y	F	F	Y	Y	Y	F	Y

10

20

30

40

50

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウス3D6 VH (配列番号7)	IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	2RCS-VH_huFrwk (配列番号75)	Hu3D6 VHvb1 (配列番号76)	Hu3D6 VHvb2 (配列番号77)	Hu3D6 VHvb3 (配列番号78)	Hu3D6 VHvb4 (配列番号79)	Hu3D6 VHvb5 (配列番号80)	Hu3D6 VHvb6 (配列番号90)	Hu3D6 VHvb7 (配列番号91)
92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S
94	98	Fr3	T	T	S	T	T	T	T	T	T	T
95	99	CDR-H3	L		Y	L	L	L	L	L	L	L
96		CDR-H3	-		Y	-	-	-	-	-	-	-
97		CDR-H3	-		G	-	-	-	-	-	-	-
98		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
99		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100A		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100B		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100C		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100D		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100E		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100F		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100G		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100H		CDR-H3	-			-	-	-	-	-	-	-
100I		CDR-H3	-			-	-	-	-	-	-	-
100J		CDR-H3	-			-	-	-	-	-	-	-
100K		CDR-H3	-			-	-	-	-	-	-	-
101	100	CDR-H3	D	Q	I	D	D	D	D	D	D	D
102	101	CDR-H3	F	H	Y	F	F	F	F	F	F	F
103	102	Fr4	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
105	104	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q

10

20

30

40

50

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウス3D6 VH (配列番号7)	IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	2RCS-VH_huFrwk (配列番号75)	Hu3D6 VHvb1 (配列番号76)	Hu3D6 VHvb2 (配列番号77)	Hu3D6 VHvb3 (配列番号78)	Hu3D6 VHvb4 (配列番号79)	Hu3D6 VHvb5 (配列番号80)	Hu3D6 VHvb6 (配列番号90)	Hu3D6 VHvb7 (配列番号91)
106	105	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	T	L	T	T	L	L	L	L	L	L
109	108	Fr4	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウスVL 3D6 (配列番号11)	ARX71335-VL_huFrwk (配列番号82)	IMGT番号IGKV2-30*02 (配列番号27)	Hu3D6VLvb1 (配列番号83)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	T	S	T	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P	P

10

20

30

40

50

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウスVL 3D6 (配列番号11)	ARX71335-VL_huFrwk (配列番号82)	IMGT番号IGKV2-30*02 (配列番号27)	Hu3D6VLvb1 (配列番号83)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)
9	9	Fr1	L	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	T	S	T	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	S	P	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	I	L	I	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	E
18	18	Fr1	P	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	R	K	K	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
27 A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27 B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
27 C	30	CDR-L1	L	L	V	L	L	L
27 D	31	CDR-L1	D	Y	H	D	D	D
27 E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27 F		CDR-L1	-					

10

20

30

40

50

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウス VL 3D6 (配列番号 11)	ARX71335-VL_huFrwk (配列番号82)	IMGT番号IGKV2-30*02 (配列番号27)	Hu3D6VLvb1 (配列番号83)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)
28	33	CDR-L1	D	N	D	D	D	D
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	K	K	N	K	K	K
31	36	CDR-L1	T	T	T	T	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	N	N	N	N	N	N
35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	L	L	F	L	L	L
37	42	Fr2	L	L	Q	L	L	Q
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	R	R	R	R	R	R
40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	K	K	R	K	K	R
46	51	Fr2	R	R	R	R	R	R
47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	L	L	K	L	L	L
51	56	CDR-L2	V	V	V	V	V	V
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	K	K	N	K	K	K
54	59	CDR-L2	L	L	R	L	L	L
55	60	CDR-L2	D	D	D	D	D	D

10

20

30

40

50

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウスVL 3D6 (配列番号11)	ARX71335-VL_huFrwk (配列番号82)	IMGT番号IGKV2-30*02 (配列番号27)	Hu3D6VLvb1 (配列番号83)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	T	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	K	K	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	L	L	V	L	V	V

10

20

30

40

50

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウスVL 3D6 (配列番号11)	ARX71335-VL_huFrwk (配列番号82)	1MGT番号-IGKV2-30*02 (配列番号27)	Hu3D6VLvb1 (配列番号83)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)
84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	H	Y	H	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	W	E	M	W	W	W
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	G	G	G	G	G	G
92	97	CDR-L3	T	T	T	T	T	T
93	98	CDR-L3	H	H	H	H	H	H
94	99	CDR-L3	F	F	W	F	F	F
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P	P
95 A		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95 B		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95 C		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95 D		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95 E		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95 F		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	Y	L	Y	Y	Y	Y
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	A	Q	A	A	Q
101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G

10

20

30

40

50

カバット残基番号	線形残基番号	FRまたはCDR	マウスVL 3D6 (配列番号11)	ARX71335-VL_huFrwk (配列番号82)	IMGT番号IGKV2-30*02 (配列番号27)	Hu3D6VLvb1 (配列番号83)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)
102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	L	L	L	L	L
105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	L	I	L	I	I
106A	112	Fr4	K	K	K	K	K	K
107	113	Fr4	R			R	R	R

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5 ヒト化 3 D 6 のための V_H、V_L 逆突然変異および他の変異

V _H または V _L バリエーション	V _H または V _L エキソン受容体配列	受容体フレームワーク（または C D R）残基からの変化（カバット／コチアの組み合わせ C D R による）
Hu3D6VHvb1 (配列番号76)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (配列番号75) IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	H91, H93, H94
Hu3D6VHvb2 (配列番号77)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (配列番号75) IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H67, H75, H76, H81, H91, H93, H94
Hu3D6VHvb3 (配列番号78)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (配列番号75) IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6VHvb4 (配列番号79)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (配列番号75) IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6VHvb5 (配列番号80)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (配列番号75) IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6 VHvb6 (配列番号90)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (配列番号75) IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H91, H93, H94, H108, H109
Hu3D6 VHvb7 (配列番号91)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (配列番号75) IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6VLvb1 (配列番号83)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (配列番号82) ; IMGT番号IGKV2-30*02 (配列番号27)	
Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (配列番号82) ; IMGT番号IGKV2-30*02 (配列番号27)	L7, L10, L15, L83, L86, L106
Hu3D6VLvb3 (配列番号85)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (配列番号82) ; IMGT番号IGKV2-30*02 (配列番号27)	L7, L10, L15, L17, L24, L37, L45, L83, L86, L100, L106

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6 ヒト化 3 D 6 抗体の重鎖中の逆突然変異および他の変異に対するフレームワーク（または C D R）残基のカバットナンバリング（カバット／コチアの組み合わせ C D R による）

残基	2RCS-VH_huFrwk（配列番号75）	（重鎖）IMGT 番号 IGHV1-69-2*01（配列番号25）	マウス 3D6（配列番号7）	Hu3D6 VHvb1（配列番号76）	Hu3D6 VHvb2（配列番号77）	Hu3D6 VHvb3（配列番号78）	Hu3D6 VHvb4（配列番号79）	Hu3D6 VHvb5（配列番号80）	Hu3D6 VHvb6（配列番号90）	Hu3D6 VHvb7（配列番号91）
H1	Q	E	E	Q	E	E	E	E	E	E
H5	Q	V	Q	Q	V	V	V	V	V	V
H11	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V
H17	S	T	L	S	S	T	T	T	T	T
H20	L	I	L	L	I	I	I	I	I	I
H23	T	K	K	T	K	K	K	K	K	K

残基	2RCS-VH_huFrwk (配列番号75)	(重鎖) IMGT番号IGHV1-69-2*01 (配列番号25)	マウス3D6 (配列番号7)	Hu3D6 VHvb1 (配列番号76)	Hu3D6 VHvb2 (配列番号77)	Hu3D6 VHvb3 (配列番号78)	Hu3D6 VHvb4 (配列番号79)	Hu3D6 VHvb5 (配列番号80)	Hu3D6 VHvb6 (配列番号90)	Hu3D6 VHvb7 (配列番号91)
H28	N	T	N	N	N	N	T	T	T	T
H38	K	Q	R	K	R	R	R	R	R	R
H42	E	G	E	E	G	G	G	G	G	G
H43	Q	K	Q	Q	K	K	K	K	K	K
H54	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D
H56	N	E	D	D	D	D	D	E	E	E
H58	K	I	V	V	V	I	I	I	V	V
H66	K	R	K	K	R	R	R	R	R	R
H67	A	V	A	A	A	A	V	V	V	V
H75	S	T	S	S	T	T	T	T	T	T
H76	N	D	N	N	D	D	D	D	D	D
H80	L	M	L	L	L	M	M	M	M	M
H81	Q	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E
H83	T	R	T	T	T	R	R	R	R	R
H91	Y	Y	F	F	F	Y	Y	Y	F	Y
H93	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S
H94	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H108	T	L	T	T	L	L	L	L	L	L
H109	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7 ヒト化 3 D 6 抗体の軽鎖中の逆突然変異および他の変異に対するフレームワーク残基のカバットナンバリング (カバット/コチアの組み合わせ C D R による)

残基	ARX71335-VL_huFwk (配列番号82)	(軽鎖) IMGT番号IGKV2-30*02 (配列番号27)	マウス3D6 (配列番号11)	Hu3D6VLvb1 (配列番号83)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)
L7	T	S	T	T	S	S
L10	T	S	T	T	S	S
L15	I	L	I	I	L	L
L17	Q	Q	Q	Q	Q	E
L24	K	R	K	K	K	R
L37	L	Q	L	L	L	Q
L45	K	R	K	K	K	R
L83	L	V	L	L	V	V
L86	H	Y	Y	H	Y	Y
L100	A	Q	G	A	A	Q
L106	L	I	I	L	I	I

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8 ヒト化 3 D 6 抗体の重鎖および軽鎖のパーセンテージヒト化度

V _H または V _L バリエーション	%ヒト化度
Hu3D6VHvb1 (配列番号76)	65.3%
Hu3D6VHvb2 (配列番号77)	76.5%
Hu3D6VHvb3 (配列番号78)	81.6%
Hu3D6VHvb4 (配列番号79)	83.7%
Hu3D6VHvb5 (配列番号80)	85.7%
Hu3D6 VHvb6 (配列番号90)	83.7%
Hu3D6 VHvb7 (配列番号91)	84.7%
Hu3D6VLvb1 (配列番号83)	82.0%
Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	87.0%
Hu3D6VLvb3 (配列番号85)	89.0%

10

20

【0334】

マウスとヒト受容体配列の間で、正準残基、バーニア残基、または界面残基が異なる位置は、置換の候補である。正準／CDR相互作用残基の例としては、表3中のカバット残基H54およびH94が挙げられる。バーニア残基の例としては、表3中のカバット残基H28、H67、H93、およびH94が挙げられる。界面／パッキング（VH+VL）残基の例としては、表3中のカバット残基H91およびH93が挙げられる。

【0335】

重鎖可変領域中の表3に示す位置の置換候補としての選択の原理は、以下の通りである。

【0336】

重鎖可変領域

h u 3 D 6 V H v b 1

－ 位置H91（Y91F）、H93（A93S）、およびH94（S94T）に逆突然変異を有する48G7-VH（RCS-VH）のフレームワーク上にグラフト化された3D6-VHのCDR-H1、H2、およびH3ループからなる。

【0337】

h u 3 D 6 V H v b 2

－ コチア正準クラスを定義するのに重要である位置、バーニアゾーンの一部である位置、またはVH／VLドメイン界面に局在する位置、または構造安定性に寄与する位置の全てのフレームワーク置換を復元する。3D6-VH__vb2は、逆突然変異または置換Q1E、Q5V、L11V、L20I、T23K、K38R、E42G、Q43K、K66R、S75T、N76D、Q81E、Y91F、A93S、S94T、T108L、およびL109Vを組み込んで、これらの位置の、抗原結合親和性および免疫原性への寄与の評価を可能にする。

30

40

【0338】

h u 3 D 6 V H v b 3、h u 3 D 6 V H v b 4、h u 3 D 6 V H v b 5、h u 3 D 6 V H v b 6、およびh u 3 D 6 V H v b 7

は、さらなる置換からなり、かつ抗体安定性を増大させるならびに／またはグリコシル化、凝集、N末端異種性、熱安定性、表面露出電荷パッチ、表面露出電荷パッチ、脱アミノ化およびプロテイナーゼ感受性の最適化を増す。

【0339】

50

Q1Eは、ピログルタミン酸形成能を軽減するために安定性を増強する変異である（L i u、上掲書）。Q1Eは、逆突然変異である。

【0340】

Q5Vは、頻度に基づく（frequency-based）および生殖細胞系列整列（germ line-aligning）変異である。Valは、この位置でヒト配列中に最も多く存在する。Valはこの位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

【0341】

L11Vは、生殖細胞系列整列変異である。Valは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

【0342】

S17Tは、生殖細胞系列整列変異である。Thrは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

【0343】

L20Iは、生殖細胞系列整列変異である。Ileは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

【0344】

T23Kは、頻度に基づくおよび生殖細胞系列整列変異である。Lysは、この位置で最も多く存在する。Lysは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

【0345】

N28T：これは、ThrへのCDR-H1残基置換である。N28Tは、生殖細胞系列整列変異である。Thrは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

【0346】

K38Rは、頻度に基づく逆突然変異である。Argは、この位置で最も多く存在する。この位置でのArgは、1つのH結合に加えGlu46との2つのH結合、重鎖中の各々Asp86およびTyr90とのH結合を生成すると予測され、それゆえArgは、この位置でのLysよりも安定性を増強する可能性がある。

【0347】

E42Gは、頻度に基づくおよび生殖細胞系列整列変異である。Glyは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。Glyは、この位置で最も多く存在する。Gly置換は、安定性に影響を及ぼさないと予測される。

【0348】

Q43K：この位置でのLys側鎖は、主鎖に加えG42側鎖とH結合を生成しGln39およびArg40とH結合を生成すると予測され、それによりLys置換は、この位置でのQよりも安定性を増強する可能性がある。Q43Kは、生殖細胞系列整列変異である。Lysは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

【0349】

N54DおよびD56Eは、CDR残基の置換であり、相同性モデルによる非抗原接触位置であると予測される。N54DおよびD56E置換は、抗体構造を安定化すると予測される。N54DおよびD56Eは、生殖細胞系列整列変異である。ヒト生殖細胞系列遺伝子IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）中で、Aspは、位置H54にあり、Gluは、位置H56にある。

【0350】

V58Iは、CDR-H2残基の置換である。生殖細胞系列遺伝子IMGT番号IGHV1-69-2*01（配列番号25）は、この位置でIleを有する。この残基は、抗原と接触しないと予測される。

10

20

30

40

50

【0351】

K66R：この位置でのArgは、Asp86とH結合および塩架橋を生成することに加え、Ser82aおよびThr83とH結合を生成すると予測される。K66Rは、生殖細胞系列整列変異である。Argは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

【0352】

A67Vは、バーニアゾーン残基の置換である。生殖細胞系列遺伝子IGHV1-69-2*01（配列番号25）は、この位置でValを有する。

【0353】

S75T：この位置でのSerは、Asp72およびTyr76とH結合を生成すると予測される。この位置でのThrはまた、これらの接触を生成すると予測されるが、表面露出残基であるThrは、抗体安定性を増強する可能性がある。S75Tは、生殖細胞系列整列変異である。Thrは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

10

【0354】

N76D：Aspは、生殖細胞系列整列変異である。Aspは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

【0355】

L80M：Metは、生殖細胞系列整列変異である。Metは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

20

【0356】

Q81E：Gluは、K19とH結合+塩架橋を生成すると予測され、このためこの位置でのGluは、抗体安定性を増強する。Q81Eは、生殖細胞系列整列変異である。Gluは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

【0357】

T83Rは、熱安定性を増強し、ヒト化度を上昇させる。Argは、生殖細胞系列整列変異である。Argは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。Argは、この位置で最も多く存在する。

【0358】

Y91Fは、界面残基の変異であり、逆突然変異である。この位置でのTyrは、抗体安定性を増強する可能性がある。

30

【0359】

A93Sは、バーニアゾーンおよび界面ゾーン残基の逆突然変異である。

【0360】

S94Tは、コチアが定義した正準構造残基およびバーニア残基の逆突然変異である。

【0361】

T108L：Leuは、生殖細胞系列整列変異である。Leuは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。この位置でのLeuは、抗体の免疫原性を低下させ、抗体安定性への影響を有しないと予測される。

40

【0362】

L109Vは、頻度に基づく変異である。Valは、この位置で最も多く存在する。L109Vは、生殖細胞系列整列変異である。Valは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IGHV1-69-2*01（配列番号25）中にある。

【0363】

軽鎖可変領域中の表4に示す位置の置換候補としての選択の原理は、以下の通りである。

【0364】

カップ軽鎖可変領域

【0365】

50

h u 3 D 6 V L v b 1

ー A R X 7 1 3 3 5 V L のフレームワーク上にグラフト化された 3 D 6 - V L の C D R - L 1、L 2、および L 3 ループからなる。

【0366】

h u 3 D 6 V L v b 2 および h u 3 D 6 V L v b 3

ー コチア正準クラスを定義するのに重要である位置、バーニアゾーンの一部である位置、または V H / V L ドメイン界面に局在する位置の全てのフレームワーク置換を復元する。H u 3 D 6 - V L v b 2 および h u 3 D 6 - V L v b 3 はまた、構造安定性に寄与する置換を含み、h u 3 D 6 - V L - v b 2 は、逆突然変異 T 7 S、I 1 5 L、L 8 3 V、H 8 6 Y および L 1 0 6 I を組み込んで、これらの位置の、抗原結合親和性および免疫原性への寄与の評価を可能にする。H u 3 D 6 - V L - v b 3 の全ての置換は、Q 1 7 E、K 2 4 R、L 3 7 Q、K 4 5 R、および L 1 0 6 I での追加的变化と共に v b 2 について述べられる。

【0367】

T 7 S は、生殖細胞系列整列変異である。S e r は、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子 I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 27) 中にある。

【0368】

T 1 0 S は、頻度に基づくおよび生殖細胞系列整列変異である。S e r は、この位置で多く存在する。S e r は、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子 I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 27) 中にある。

【0369】

I 1 5 L は、生殖細胞系列整列変異である。L e u は、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子 I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 27) 中にある。

【0370】

Q 1 7 E : この位置での G l u は、両者とも軽鎖残基である、T 1 4 との H 結合および L y s 1 0 7 との塩架橋を生成すると予測され、抗体安定性を増強すると予測される。

【0371】

K 2 4 R は、C D R 残基の変異である。L y s および A r g は両者とも、軽鎖中の A s p 7 0 と H 結合および塩架橋を生成すると予測される。A r g は、立体構造においてより良好にフィットすると予測される。A r g はまた、生殖細胞系列整列変異である。A r g は、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子 I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 27) 中にある。

【0372】

L 3 7 Q : これは、深く埋め込まれた残基であると予測され、L e u は、周囲の残基と相互作用すると予測されないが、G l n は、軽鎖中の Q 3 8 および A s p 8 2 と H 結合を生成すると予測される。G l n はまた、生殖細胞系列整列変異である。G l n は、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子 I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 27) 中にある。

【0373】

K 4 5 R : L y s は、S 5 6 および G l y 5 7 と H 結合を生成すると予測され ; D 5 5 との塩架橋、A r g 4 6 との H 結合、および S 5 6 との二重 H 結合を形成すると予測されるため、A r g の、隣接残基との予測される相互作用は、はるかに広範囲である。A r g はまた、生殖細胞系列整列変異である。A r g は、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子 I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 27) 中にある。

【0374】

L 8 3 V : これは、表面が露出されていると予測される残基の頻度に基づく変異である。V a l はまた、生殖細胞系列整列変異である。V a l は、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子 I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 27) 中にある。

【0375】

H 8 6 Y : マウス 3 D 6 V L は、この位置で T y r を有する。T y r はまた、この位置で最も多い残基である。

10

20

30

40

50

【0376】

A100Q: Alaは、この位置では希少である。Alaは、表面露出残基であると予測され、周辺残基と相互作用すると予測されない。Glnは、この位置で最も多く、生殖細胞系列整列変異でもある。Glnは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IGKV2-30*02（配列番号27）中にある。Glnは、Ser7とH結合を生成し鎖内を安定化すると予測される。

【0377】

L106Iは、頻度に基づくおよび生殖細胞系列整列変異である。Ileは、この位置で最も多く存在する。Ileは、この位置でヒト生殖細胞系列遺伝子IGKV2-30*02（配列番号27）中にある。

10

【0378】

これらのヒトフレームワークに基づく設計を以下に示す：

【0379】

重鎖可変領域

>hu3D6VHvb1（配列番号76）

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYYLHWVKQR
PEQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQ GKATITADTSSNTAY
LQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTLT VSS

【0380】

>hu3D6VHvb2（配列番号77）

EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQ GRATITADTSTDTAY
LELSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGT LVT VSS

20

【0381】

>hu3D6VHvb3（配列番号78）

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPENGDTIYDPKFQ GRATITADTSTDTAY
MELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGT LVT VSS

【0382】

hu3D6VHvb4（配列番号79）

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPENGDTIYDPKFQ GRVTITADTSTDTAY
MELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGT LVT VSS

30

【0383】

>hu3D6VHvb5（配列番号80）

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPEDGETIYDPKFQ GRVTITADTSTDTAY
MELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGT LVT VSS

【0384】

>hu3D6VHvb6（配列番号90）

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPEDGETVYDPKFQ GRVTITADTSTDTAY
MELSSLRSEDTAVYFCSTLDFWGQGT LVT VSS

40

【0385】

>hu3D6VHvb7（配列番号91）

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPEDGETVYDPKFQ GRVTITADTSTDTAY
MELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGT LVT VSS

【0386】

カップ軽鎖可変領域

50

h u 3 D 6 V L v b 1 (配列番号 83)

D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W
L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
S R V E A E D L G V H Y C W Q G T H F P Y T F G A G T K L E L K R
【0387】

> h u 3 D 6 V L v b 2 (配列番号 84)

D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W
L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G A G T K L E I K R
【0388】

> h u 3 D 6 V L v b 3 (配列番号 85)

D V V M T Q S P L S L S V T L G E P A S I S C R S S Q S L L D S D G K T Y L N W
L Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R
【0389】

ヒト化配列は、QuickChange 部位特異的変異誘発を用いて複数の変異、欠失、および挿入を導入可能な 2 段 PCR プロトコルを用いて生成される [Wang, W. and Malcolm, B. A. (1999) BioTechniques 26:680-682]。

【0390】

実施例 4. マウスモノクローナル抗体は ELISA アッセイでタウに結合する

方法：間接 ELISA：96 ウェルポリスチレンプレートを、1 x PBS 中に懸濁させた捕捉抗体の抗-6 x His (図 3 A) またはポリクローナル抗タウ (Dako # A20024、図 3 B) で、室温で 2 時間または 4 °C で 16 時間コートした。コーティング液を除去し、プレートを 1 x PBS 中の 1 % BSA で 1 時間ブロッキングし、続けて、ヒト組換えタウと共に、タンパク質の N 末端にポリヒスチジンタグを付加した場合 (図 3 A) と付加しない場合 (図 3 B) について、インキュベートした。洗浄後、プレートを示した抗体と共にインキュベートし、HRP 標識ヤギ抗マウス二次抗体と共にインキュベートした。プレートを TMB で発色させ、A₄₅₀ をプレートリーダーで測定した。

【0391】

サンドウィッチ ELISA：96 ウェルポリスチレンプレートを、1 x PBS 中の抗マウス抗体を用いて、室温で 2 時間または 4 °C で 16 時間コートした。コーティング液を除去し、プレートを 1 x PBS 中の 1 % BSA で 1 時間ブロッキングした。次に、プレートを示した同じ濃度の抗体と共にインキュベートし、1 x PBS 中の 0.1 % BSA で希釈した。プレートを、ヒトタウ、ポリクローナルウサギ抗タウ (Dako # A0024)、および HRP 標識ヤギ抗ウサギ抗体で連続的に処理した。全て、PBS 中の 0.1 % BSA で希釈し、各ステップの間で洗浄を行った。ストレプトアビジン-HRP を加え、プレートを TMB で発色させ、A₄₅₀ をプレートリーダーで測定した。図 3 C を参照されたい。

【0392】

結果：いくつかの異なる ELISA フォーマットにより、一連のハイブリドーマ産生抗体のタウへの結合に関し、アッセイした。タウの検出は、間接フォーマットを用い、タウの N 末端に融合したポリヒスチジンタグにより固定されたタウタンパク質を使って確認された (図 3 A)。未変性の非タグタンパク質も同様に確認された (図 3 B)。種々の抗体の養液親和性を評価するために、試験したハイブリドーマ抗体を捕捉試薬として使用するサンドイッチ ELISA フォーマットを使用した (図 3 C)。

【0393】

実施例 5. タウに対するマウスモノクローナル抗体の親和性

方法：Biacore T200 を使って、SPR 分析を実施し、マウス抗体の組換えヒトタウに対する結合動力学を測定した。センサー表面を調製するために、抗マウス抗体

10

20

30

40

50

(GE Life Sciences) をアミンカップリングを介してセンサーチップCM5上に固定し、50RUの最大結合を確保するレベルで抗体を捕捉した。10~0.14 nMの範囲の種々の濃度の組換えタウを、180秒の結合および900秒の解離のために、ランニングバッファー(HBS+0.05%P-20、1mg/mL BSA)中で、50μL/分の流速で捕捉リガンド上を通過させた。データを、捕捉部分からのリガンドの解離を捕捉するために、抗体リガンド不含の無関係のセンサー、および0 nMの分析物濃度の両方に対する二重基準とした。その後、データをグローバル1:1フィットを用いて分析した。

【0394】

結果：複数のマウス抗体を一連のELISAアッセイの成績に基づいて選択し、それらの結合親和性をSPRにより評価した。抗体を同時に数セット試験し、それらの結合と解離速度を比較して組換えヒトタウに対する最高結合物質を選択した。最大結合親和性は、抗体クローン3D6で観察された。結合親和性を図4に示す。

【0395】

実施例6. マウスモノクローナル抗体はヒトタウの不死化神経細胞表面に対する結合を妨害する

方法：B103神経芽腫細胞へのタウの結合の抗タウモノクローナル抗体による阻害

1. B103細胞を 5×10^5 細胞/mLの濃度で再懸濁する。MSD高結合プレートにウェル当たり50μLの細胞懸濁液を蒔く。これにより、25k細胞/ウェルが得られる。プレートを覆い、37℃、5%CO₂下で2時間細胞を付着させる。

2. 細胞付着後、プレートを反転することにより、ウェルからPBSを除去し、静かにタッピングして過剰緩衝液を除去する。50μLのPBS中の3%MSDブロッカーA緩衝液または他の好適するブロッキング緩衝液を各ウェルに加え、震盪せずに室温でプレートを1時間インキュベートした。

3. プレートブロッキングステップ中に、タウおよび抗タウ抗体を以下のように共インキュベートする：

a. 2mg/mLの抗タウ抗体から出発し、PBSで1:2の系列希釈により追加の7種の希釈を行う。

b. タウをPBS中20 nMに希釈する。タウ濃度はそれぞれのウェルで一定になる。

c. 10 nMの最終タウ濃度となるように、また1mg/mLの開始抗タウ濃度として、タウおよび抗タウ抗体を1:1で混合する。

d. 混合物を室温で約1時間震盪(600rpm)しながらインキュベートする。

4. ステップ2のプレートブロッキング後、プレートを反転してウェルからブロッキング緩衝液を除去し、静かにタッピング後、マルチチャンネルピペットを用いてプレートをPBSで2回洗浄した。過剰緩衝液を確実に完全に除去する。タウ：抗タウ複合体を加える前に、蒔いた細胞を4℃に冷却する。

5. ステップ3の50μLの冷却した複合体を播種した細胞に加え、氷上で30分間インキュベートする。

6. 以前記載したように、プレートを冷却PBSで2回洗浄する。

7. 細胞表面結合タウの検出のために、ウェル当たり50μLの16B5.SULFO-TAGを加える。氷上で30分間インキュベートする。

8. 以前記載したように、プレートを再度、冷却PBSで2回洗浄する。

9. ウェル当たり150μLの1X界面活性剤不含リードバッファT(H₂Oで希釈)を加え、MSD SECTOR(商標)600測定器で直ちに読み取る。リードバッファを加えるときに、気泡の混入を避ける。

10. MSDシグナル対タウの濃度を報告する。

【0396】

試験した抗体は、抗タウ抗体3D6、16G7、3H9、4C5、および5G8、ならびにアイソタイプコントロールであった。

【0397】

結果：試験抗体の増加と共に生じるスルホタグ抗タウシグナルの減少は、タウの神経細胞への結合の機能的ブロックを示す。アイソタイプコントロール、16G7、または3H9では、ブロックは観察されなかった。機能的ブロック活性の量の増加が4C5、5G8、および3D6で観察された。3D6は、試験した抗体の中で最も強いブロック活性を示した。図5を参照されたい。

【0398】

実施例7．脱凝集活性

方法：組換えタウ-N末端6xHisタグを有する精製組換えタウを、1xPBS（pH7.4）中の等モル量の低分子量ヘパリンと混合し、旋回装置を用いて37℃で96時間インキュベートした。チオフラビンTに対する結合により、試料の凝集を確認した。抗体とインキュベーション凝集した組換えタウと共に抗体を、回転または旋回装置を用いないで37℃で96時間インキュベートした。実験の終わりに、試料を25mMのチオフラビンTと共にインキュベートし、放出蛍光（450／482 ex/em）を測定することにより、凝集を測定した。シグナルから、緩衝液試料までバックグラウンドを差し引いた。

【0399】

結果：図6に示すように、3D6は、完全なタウ原線維を選択的に分解する。種々のモル比の3D6（三角形）、アイソタイプコントロール（円）および16G7（四角）をアミロイド含有タウ原線維と共に96時間インキュベートした。この期間の最後に、チオフラビンTに対する結合により凝集の程度が評価された。3D6は、アイソタイプコントロール抗体ならびに異なる領域のタウに結合する抗タウ抗体の16G7と比べて、試料中に存在するチオフラビンTシグナルを選択的に低減させる。

【0400】

実施例8．3D6および5G8がヒト疾患組織由来のタウを免疫捕獲する。

方法：高塩可溶性タンパク質画分を1mg/mlに調製した。それぞれの免疫沈殿に対し、200μgの試料を使用した。10μgの示した抗体（アイソタイプコントロール、3D6、または抗タウ抗体5G8）を高塩試料調製物に加え、2時間インキュベートした。その後、プロテインG磁気ビーズを混合物に加え、さらに1時間インキュベートして、抗体／抗原複合体を捕捉した。試料を1xPBSで完全に洗浄し、ビーズを還元／変性試料緩衝液中で煮沸し、捕捉したタンパク質を放出させた。得られた試料をSDS-PAGEにより分離し、ポリクロナル抗タウ抗体（Dako、#A0024）を用いて、ウェスタンブロッティングを実施した。

【0401】

結果：図7に示すように、3D6および5G8は、アルツハイマー疾患組織由来タウと免疫沈降した。高塩可溶性画分を示した抗体で免疫沈降し、3D6とタウ抗体Aの結合部位から分離したタウ分子の領域に対するポリクロナル抗タウ抗体で検出した。3D6は、この画分からタウを確実に捕捉した。入力（高塩可溶性試料）を右側に示す。

【0402】

実施例9．3D6の免疫組織化学による免疫反応性

前頭側頭皮質を、死後評価時に確認された、神経変性疾患のない患者またはアルツハイマー病の患者から得た。免疫組織化学を、スライドにマウントし、軽くアセトン固定した10μmの凍結切片上で行った。Leica BOND Rx自動免疫染色装置とLeica消耗品を用いて全染色ステップを実施した。マウスまたはヒト型の3D6を組織切片とともにインキュベートし、続けて、HRPポリマーにコンジュゲートした、種に適切な二次抗体を加えた。ヒト化抗体をヒト組織に対して使用した場合の内在性免疫グロブリンの非特異的結合を防ぐために、組織のインキュベーションの前に、抗体を、ビオチンコンジュゲート抗ヒト一価Fabフラグメントで非共有結合によりインビトロ標識した。一次抗体-ビオチンFabフラグメント複合体で標識した組織を、アビジン-ビオチン増幅システム（Vector Laboratories, Burlingame, CA）を用いてさらに増殖した。染色をDAB色素原を用いて可視化し、これにより褐色の沈着物が生

成した。ネガティブコントロールは、I g Gアイソタイプコントロール抗体を用いて、隣接切片上で全免疫組織化学的手順を実行することにより作成した。

【0403】

試験した抗体は、マウスCD6、キメラ3D6（これは、ヒト定常領域を有するマウス抗体由来のVHとVL、重鎖配列番号72および軽鎖配列番号73を含んでいた）、およびヒト化バリエーションhu3D6VHv5/hu3D6VLv2であった。

【0404】

マウス、キメラ、およびヒト化型の3d6に実施した染色を、染色強度および輝度、ならびに免疫反応性の局在化を定性的に比較し、評価した。染色輝度は、マウス型の抗体と比較して、3D6のキメラおよびヒト化型で類似であり、類似の局在化パターンを示した。神経原線維濃縮体、原線維、糸屑状構造物中、および変性した軸索中でタウを検出した。顕著な細胞体染色も検出された。

【0405】

実施例10．ヒト化バリエーションのタウに対する親和性

方法：間接ELISA：96ウェルポリスチレンプレートを、1xPBS中に懸濁したヒト組換えタウを用いて、室温で2時間または4℃で16時間コートする。コーティング液を除去し、プレートを1xPBS中の1%BSAで1時間ブロッキングする。1xPBS中の0.1%BSA中の1μg/mLのヒト化バリエーション抗体をプレートに加え、1時間の保持に続けて洗浄し、HRP標識ヤギ抗ヒト抗体を加える。プレートをTMBで発色させ、A₄₅₀をプレートリーダーで測定する。

【0406】

サンドイッチELISA：96ウェルポリスチレンプレートを、1xPBS中の抗ヒト抗体を用いて、室温で2時間または4℃で16時間コートする。コーティング液を除去し、プレートを1xPBS中の1%BSAで1時間ブロッキングする。種々の濃度のヒト化バリエーション抗体を、1xPBS中の0.1%BSAで希釈してプレートに加え、1時間の保持に続けて洗浄し、1xPBS中の0.1%BSAで希釈したビオチン化組換えヒトタウを加える。洗浄後、ストレプトアビジン-HRPを加え、プレートをTMBで発色させ、A₄₅₀をプレートリーダーで測定する。

【0407】

実施例11．ヒト化3D6バリエーションの分析

ヒト化3D6バリエーションを、標的結合親和性、細胞に基づくアッセイでの活性、熱安定性、発現力価、および凝集の存在を含む、複数の特徴について分析した。

【0408】

重鎖hu3D6VHvb1、hu3D6VHvb2、hu3D6VHvb3、hu3D6VHvb4、hu3D6VHvb5、hu3D6VHvb6、およびhu3D6VHvb7と、軽鎖hu3D6VLvb1、hu3D6VLvb2、およびhu3D6VLvb3をコードするDNAを含むプラスミドを、生成した。重鎖と軽鎖の異なる組み合わせを、HEK-293細胞中で完全な抗体として一過的に発現させ、抗体を、プロテインAクロマトグラフィーを利用してコンディション培地から精製した。精製された抗体を、サイズ排除クロマトグラフィー-高速液体クロマトグラフィー（SEC-HPLC）により分析して、凝集の存在を検出した。結果を、表9の「%モノマー」と表記された列に示す。

【0409】

精製された抗体を示差走査熱量測定（DSC）により分析して、各バリエーションの熱安定性を測定した。熱安定性値を、示差走査熱量測定を利用して測定した。DSC走査は全て、VP-キャピラリーDSCシステム（Malvern）を利用して実施した。試料を全て、1xPBS中で0.5mg/mLに調製し、1xPBSを参照にした。およそ0.5mLのタンパク質溶液および緩衝液を、試料および参照細胞に導入した。熱量の走査速度を、一定圧力の下、25℃～110℃で60℃/時の走査速度で実行した。分析を、独自のソフトウェアを用いて実施した。報告値は、Fabピークの最大熱量が記録される温度である。結果を、表9の「熱安定性（℃）」と表記された列に示す。

10

20

30

40

50

【0410】

力価を、以下のとおり測定した。293浮遊細胞での発現の後、抗体を、標準法を利用するプロテインAクロマトグラフィーを用いて精製した。精製の後、抗体を1xPBS中に交換し、タンパク質濃度を、280nmでの吸光度により測定した。力価を、精製タンパク質の最終収量を発現培養物の出発容量で割ることにより計算し、ミリグラム／リットルで報告した。結果を、表9の「発現力価 (mg/L)」と表記された列に示す。

【0411】

タウに対する精製されたヒト化バリアントの親和性を、表面プラズモン共鳴 (SPR) により測定した。SPR分析を、Biacore T200を用いて実施して、組換えヒトタウに対するヒト化抗体の結合動力学を測定した。センサー表面を調製するために、抗ヒト抗体 (GE Life Sciences) を、アミンカップリングを介してセンサーチップCM3上に固定し、抗体を、50RUの最大結合を確保するレベルで捕捉した。50~0.62nMの範囲の種々の濃度の組換えタウを、1回の周期で、ランニングバッファー (HBS+0.05%P-20、1mg/mL BSA) 中50μL/分の流速で捕捉リガンド上を通過させた。データを、捕捉部分からのリガンドの解離を捕捉するために、抗体リガンド不含の無関係のセンサー、および0nMの分析物濃度の両方に対し二重に参照した。データをその後、1:1フィットを用いて分析した。結果を、表9の「 k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)、 k_{off} (s^{-1})、および K_d (nM)」と表記された列に示す。

【0412】

タウの内在化をブロッキングする精製ヒト化バリアントの能力を、細胞内在化アッセイにより測定した。蛍光活性化セルソーティング (FACS) を用いる内在化アッセイを実施して、タウの神経細胞内在化をブロッキングする様々な抗体の能力を評価した。内在化をブロッキングする抗体は、タウの伝播をブロッキングするようである。pHrodo標識された4RONヒトタウP301L可溶性オリゴマー (1.5μg/mL最終濃度) を、細胞培地中で室温にて30分間ヒト化バリアント (用量力価: 80μg/mL出発濃度、続いて4倍系列希釈) とプレインキュベートした。タウ/抗体混合物をその後、500,000細胞/mL最終濃度のB103神経芽細胞腫細胞系列に添加し、組織培養インキュベーター (5%CO₂) 中で37℃にて3~4時間インキュベートした。細胞をその後、培地で3回洗浄し、次に培地と10分間インキュベートし、FACS緩衝液 (PBS中の1%FBS) で2回洗浄した。細胞を100μL FACS緩衝液に懸濁し、テキサスレッド平均蛍光強度をFACS LSR IIにより測定した。pHrodoからのテキサスレッド蛍光は、内在化によるリソソーム内コンパートメントに関連して低pHで活性化される。FACSは、内在化による細胞およびpHrodoのみの蛍光を検出するため、細胞により内在化されたタウだけが、検出される。平均蛍光強度が低いほど、内在化されたタウの量は少なく、検査された抗体のブロッキング活性は大きい。結果を表9に示す。

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9. 3D6 ヒト化バリエーションの生物物理学的／発現の特徴、親和性、および内在化アッセイ結果

抗体名		生物物理学的／発現の特徴			親和性			細胞による内在化の阻害 (133nM抗体濃度、最大蛍光シグナルに対する阻害率%)
重鎖	軽鎖	熱安定性 (°C)	発現力価 (mg/L)	% モノマー	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_d (nM)	
Hu3D6VHvb1 (配列番号76)	Hu3D6VLvb1 (配列番号83)	69.4	176	96	1.40E+06	9.00E-04	0.64	80.0
Hu3D6VHvb2 (配列番号77)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	80.4	478	98	1.50E+06	5.70E-05	0.04	84.9
Hu3D6VHvb2 (配列番号77)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)	83.5	435	100	1.60E+06	3.00E-04	0.19	85.0
Hu3D6VHvb3 (配列番号78)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	80.8	528	100	1.40E+06	1.50E-03	1.07	71.2
Hu3D6VHvb3 (配列番号78)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)	83.15	529	100	1.60E+06	1.80E-03	1.13	72.1
Hu3D6VHvb4 (配列番号79)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	81.3	557	98	6.90E+05	2.90E-03	4.20	61.0

抗体名		生物物理学的／発現の特徴			親和性			細胞による内在化
Hu3D6VHvb4 (配列番号79)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)	83.5	575	100	9.10E+05	3.40E-03	3.74	49.0
Hu3D6VHvb5 (配列番号80)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	80.6	597	100	1.80E+06	2.60E-03	1.44	67.2
Hu3D6VHvb5 (配列番号80)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)	82.9	612	100	2.00E+06	2.80E-03	1.40	67.7
Hu3D6VHvb6 (配列番号90)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	79.9	395	100	3.45E+06	3.69E-04	0.107	76.3
Hu3D6VHvb6 (配列番号90)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)	82.5	350	100	3.54E+06	5.38E-04	0.152	70.0
Hu3D6VHvb7 (配列番号91)	Hu3D6VLvb2 (配列番号84)	80.6	478	100	3.09E+06	7.79E-04	0.252	74.5
Hu3D6VHvb7 (配列番号91)	Hu3D6VLvb3 (配列番号85)	83.0	447	99	3.69E+06	7.70E-04	0.209	66.0

【0413】

配列リスト

P10636-8 (配列番号1)

MAEPRQEFV MEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTD

AGLKESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLV
DEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAAEEAGIGDTPSLEDEAAAG
HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP
GQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSSGEPPKSGDRSGYSSP
GSPGTPGSRSRTPPSLPTPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK
SRLQTAPVPMPDLKNVKS SKIGSTENLKHQPGGGKVKIINK
KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTS
KCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FFKDRVQSKIGSLDNI
THVPGGGNKKIETHKLTFR ENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS
GDTSPRHL SNVSSTGSI DMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL
【0414】

10

P10636-7 (配列番号2)

MAEPRQEF EVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTD
AGLKESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAKSTPTAAEEAGIG
DTPSLEDEAAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKT
KIATPRGAAPP GQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSSGEPP
KSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPPSLPTPTPTREPKKVAVV
RTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKS SKIGSTENLKHQ
PGGGKVKIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIV
YKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FFKDR
VQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFR ENAKAKTDHG
AEIVYKSPVVS GDTSPRHL SNVSSTGSI DMVDSPQLATLA
DEV SASLAKQGL
【0415】

20

P10636-6 (4RONヒトタウ) (配列番号3)

MAEPRQEF EVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTD
AGLKAEEAGIGDTPSLEDEAAAGHVTQARMVSKSKDGTGS
DKKAKGADGKTKIATPRGAAPP GQKGQANATRIPAKTPPA
PKTPPSSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPPSLPTP
PTREPKKVAVVRTPPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKS
KIGSTENLKHQPGGGKVKIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIK
HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVE
VKSEKLD FFKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFR
ENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHL SNVSSTGSI
DMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL
【0416】

30

P10636-5 (配列番号4)

MAEPRQEF EVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTD
AGLKESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLV
DEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAAEEAGIGDTPSLEDEAAAG
HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP
GQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSSGEPPKSGDRSGYSSP
GSPGTPGSRSRTPPSLPTPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK
SRLQTAPVPMPDLKNVKS SKIGSTENLKHQPGGGKVKIIVYK
PVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FFKDRVQ
SKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFR ENAKAKTDHGAE
IVYKSPVVS GDTSPRHL SNVSSTGSI DMVDSPQLATLADE
VSASLAKQGL
【0417】

40

P10636-4 (配列番号5)

50

MAEPRQEF EVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TD
AGLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAE EAGIG
DTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKT
KIATPRGAAPP GGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSSGEPP
KSGDRSGYSSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTPREPKKVAVV
RTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKS KIGSTENLKHQ
PGGGKVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVK
SEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGGNKKIETHKLT FRE
NAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNVSSSTGSDMV
DSPQLATLADEV SASLAKQGL

10

【0418】

P10636-2 (配列番号6)

MAEPRQEF EVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TD
AGLKAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSD
DKKAKGADGKT KIATPRGAAPP GGQKGQANATRIPAKTPPA
PKTPPSSSGEPPKSGDRSGYSSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTP
PTREPKKVAVVVRTPPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKS
KIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIH
HKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNK
KIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLS
NVSSSTGSDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL

20

【0419】

配列番号7；マウス3D6 VHアミノ酸配列：

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYYLHWVRQR
PEQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQ GKATITADTSSNTAY
LQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTLT VSS

【0420】

配列番号8；カバット／コチアHCDR1：

GFNIKDYYLH

【0421】

配列番号9；カバットHCDR2：

WIDPENGDTVYDPKFQG

【0422】

配列番号10；カバットHCDR3：

LDF

【0423】

配列番号11；マウス3D6 VLアミノ酸配列：

DVVMTQTPLT LSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNW
LLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLG VYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIKR

40

【0424】

配列番号12；マウスカバットLCDR1：

KSSQSLLDSDGKTYLN

【0425】

配列番号13；マウスカバットLCDR2：

LVSKLDS

【0426】

配列番号14；マウスカバットLCDR3：

WQGTHFPYT

【0427】

50

配列番号15 ; hu3D6VHv1 :

EVQLVQSGAEVVRPGALVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQA
PEQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQ GKATITADTSTNTAY
LQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGGLVTVSS
【0428】

配列番号16 ; hu3D6VHv2 :

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNIKDYYLHWVRQA
PEQGLEWMGWIDPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAY
MELSSLTSEDTAVYYCSTLDFWGQGGLVTVSS
【0429】

10

配列番号17 ; hu3D6VHv1b :

EVQLVQSGAEVVRPGALVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQR
PEQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQ GKATITADTSTNTAY
LQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGGLVTVSS
【0430】

配列番号18 ; hu3D6VHv1bA11 :

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQR
PGQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGRATITADTSTDTAY
LQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGGLVTVSS
【0431】

20

配列番号19 ; hu3D6VHv5 :

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQR
PGQGLEWIGWIDPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDTAY
LQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGGLVTVSS
【0432】

配列番号20 ; hu3D6VLv1 :

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNW
LLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTTKLEIKR
【0433】

30

配列番号21 ; hu3D6VLv2 :

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNW
LLQRPQGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTTKLEIKR
【0434】

配列番号22 ; hu3D6VLv3 :

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNW
LLQRPQGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTTKLEIKR
【0435】

40

配列番号23 ; hu3D6VLv4 :

DIVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNW
LLQKPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTTKLEIKR
【0436】

配列番号24 ; 重鎖可変受容体受入番号BAC01986.1

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFGSYAISWVRQA
PGQGLEWMGRIIPILGIATYAQKFQGRVTITADKSTSTAY
MDLSSSLRSEDTAVYYCARGKGEFEGMDVWGQGTTVTVSS
【0437】

50

配列番号25；重鎖可変受容体IMGT受入番号IGHV1-69-2*01
EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHWVQQA
PGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAY
MELSSLRSEDTAVYYCAT

【0438】

配列番号26；重鎖可変受容体IMGT受入番号IGKJ1*01
QHWGQGTLVTVSS

【0439】

配列番号27；軽鎖可変受容体IMGT受入番号IGKV2-30*02IMGT受入
番号IGKV2-30*02

DVVMTQSPVSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNW
FQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYYCMQGTHWP

【0440】

配列番号28；軽鎖可変受容体IMGT受入番号IGKJ2*01
YTFGQGTKLEIK

【0441】

配列番号29；軽鎖可変受容体受入番号AAZ09048.1
DVVMTQSPVSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNW
FQQRPGQSPRRLIYRVSHWDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYYCMQGTYWPLTFGQGTKLEIK

【0442】

配列番号30；マウス3D6 VH核酸配列：

GAGGTTCAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGACCTTGTGAGGC
CAGGGGCTTAGTCAAGTTGTCCTGCAAAGCTTCTGGCTT
CAACATTAAAGACTACTATTTGCACTGGGTGAGGCAGAGG
CCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTG
AGAATGGTGATACTGTATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAA
GGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAATACAGCCTAC
CTGCAGCTCGGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCT
ATTTCTGTCTTCTACCCCTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCAC
TCTCACAGTCTCCTCA

【0443】

配列番号31；マウス3D6 VL核酸配列：

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCTGGTTA
CCATTGGACAACAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCA
GAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGG
TTGTTACAGAGGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCT
ATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTT
CACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACTGAAAATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCT
GGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGAC
CAAGCTGGAAATAAAACGT

【0444】

配列番号32；マウスCDR-H1カバット

DYYLH

【0445】

配列番号33；マウスCDR-H1コチア

GFNIKDY

【0446】

10

20

30

40

50

配列番号 34 ; マウス CDR-H2 コチア
D P E N G D
【0447】
配列番号 35 ; マウス CDR-H2 A b M
W I D P E N G D T V
【0448】
配列番号 36 ; マウス CDR-L1 C o n t a c t
K T Y L N W L
【0449】
配列番号 37 ; マウス CDR-L2 C o n t a c t
R L I Y L V S K L D
【0450】
配列番号 38 ; マウス CDR-L3 C o n t a c t
W Q G T H F P Y
【0451】
配列番号 39 ; マウス CDR-H1 C o n t a c t
K D Y Y L H
【0452】
配列番号 40 ; マウス CDR-H2 C o n t a c t
W I G W I D P E N G D T V
【0453】
配列番号 41 ; マウス CDR-H3 C o n t a c t
S T L D
【0454】
配列番号 42 ; 別のカバットーコチア CDR-H1
G F T I K D Y Y L H
【0455】
配列番号 43 ; 別のカバット CDR-H2
W I D P E D G D T V Y A P K F Q G
【0456】
配列番号 44 ; P C T / I B 2 0 1 7 / 0 5 2 5 4 4 号の図 2 からのコンセンサス V H
アミノ酸配列
E V Q L V Q S G A E V V X P G A L V K I S C K A S G F N I K D Y Y L H W V R Q R
P E Q G L E W I G W I D P E N G D T V Y D P K F Q G X A T I T A D T S T N T A Y
L Q L G S L T S E D T A V Y F C S T L D F W G Q G T L V T V S S
【0457】
配列番号 45 ; P C T / I B 2 0 1 7 / 0 5 2 5 4 4 号の図 3 のコンセンサス V L アミ
ノ酸配列
D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W
L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K R
【0458】
配列番号 46 ; h u 3 D 6 V H v 1 b A 1 1 B 6 G 2 :
E V Q L V Q S G A E V V K P G A T V K I S C K A S G F T I K D Y Y L H W V R Q R
P G K G L E W I G W V D P E D G D T V Y A P K F Q G R A T I T A D T S T D T A Y
L E L G S L T S E D T A V Y F C S T L D F W G Q G T L V T V S S
【0459】
配列番号 47 ; h u 3 D 6 V H v 1 b A 1 1 B 6 H 3 :
E V Q L V Q S G A E V V K P G A T V K I S C K A S G F T I K D Y Y L H W V R Q R
P G K G L E W I G W I D P E D G D T V Y A P K F Q G R A T I T A D T S T D T A Y

10

20

30

40

50

LELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

【0460】

配列番号48; hu3D6VHv1c:

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGFNFKDYYLHWVRQR
PEQGLEWMGWIDPENGDTVYDEKFKQGRVTITADTSTNTAY
LELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

【0461】

配列番号49; hu3D6VHv1d:

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGYTFTDYYLHWVRQR
PEQGLEWMGWVDPEDGDTVYAEKFKQGRVTITADTSTNTAY
LELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

10

【0462】

配列番号50; hu3D6VHv1e:

EVQLVQSGADVVKPGALVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQR
PEQGLEWIGWIDPENGDTVYAEKFKQGRVTITADTSTNTAY
LELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSS

【0463】

配列番号51; hu3D6VHv1f:

EVQLVQSGADVVKPGALVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQR
PGQGLEWIGWVDPEDGDTVYAEKFKQGRVTITADTSTD TAY
MELGSLTSEDTAVYFCSTLDYWGQGTTTLTVSS

20

【0464】

配列番号52; hu3D6VHv3:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVRQA
PGKGLEWMGWIDPENGDTVYDPKFKQGRVTITADTSTD TAY
MELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

【0465】

配列番号53; hu3D6VHv3b:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYNFKDYYLHWVRQA
PGKGLEWMGWIDPENGDTVYDEKFKQGRVTITADTSTNTAY
MELGSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

30

【0466】

配列番号54; hu3D6VHv3c:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYTFTDYYLHWVRQA
PGKGLEWMGWVDPEDGDTVYAEKFKQGRVTITADTSTNTAY
MELGSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

【0467】

配列番号55; hu3D6VHv4:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFKQGKATITADTSTNTAY
LELGSLTSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

40

【0468】

配列番号56; hu3D6VHv4b:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYNFKDYYLHWVRQR
PGKGLEWMGWIDPENGDTVYDEKFKQGRVTITADTSTD TAY
LELGSLTSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

【0469】

配列番号57; hu3D6VHv4c:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYTFTDYYLHWVRQR
PGKGLEWMGWVDPEDGDTVYAEKFKQGRVTITADTSTD TAY

50

L E L G S L T S E D T A V Y Y C S T L D F W G Q G T L V T V S S

【0470】

配列番号58；別のカバットーコチアCDR-H1（hu3D6VH1cと同様）。

G F N F K D Y Y L H

【0471】

配列番号59；別のカバットーコチアCDR-H1（hu3D6VHv1d、hu3D6VHv3c、およびhu3D6VHv4cと同様）。

G Y T F T D Y Y L H

【0472】

配列番号60；別のカバットーコチアCDR-H1（hu3D6VHv3bおよびhu3D6VHv4bと同様）

G Y N F K D Y Y L H

【0473】

配列番号61；別のカバットCDR-H2（hu3D6VHv1bA11B6G2と同様）。

W V D P E D G D T V Y A P K F Q G

【0474】

配列番号62；別のカバットCDR-H2（hu3D6VHv1c、hu3D6VHv3b、およびhu3D6VHv4bと同様）。

W I D P E N G D T V Y D E K F Q G

【0475】

配列番号63；別のカバットCDR-H2（hu3D6VHv1d、hu3D6VHv1f、hu3D6VHv3c、およびhu3D6VHv4cと同様）

W V D P E D G D T V Y A E K F Q G

【0476】

配列番号64；別のカバットCDR-H2（hu3D6VHv1eと同様）。

W I D P E N G D T V Y A E K F Q G

【0477】

配列番号65；別のカバットCDR-H3（hu3D6VHv1fと同様）

L D Y

【0478】

配列番号66；マウス6A10抗体の重鎖可変領域

E V Q L Q Q S G A E L V R S G A S V K L S C T A S G L N I K D Y Y I H W V K Q R
P E Q G L E W I G W I D P E N D D T E Y A P K F Q G R A T L T T D T S S N T A Y
L Q L S S L T S E D T A V Y Y C T P L D Y W G Q G T S V T V S S

【0479】

配列番号67；マウス6A10抗体のカバット／コチアの組み合わせCDR-H1

G L N I K D Y Y I H

【0480】

配列番号68；マウス6A10抗体のカバットCDR-H2

W I D P E N D D T E Y A P K F Q G

【0481】

配列番号69；マウス6A10抗体のカバットCDR-H3

L D Y

【0482】

配列番号70；Mus VH構造テンプレート（PDB番号1CR9__H）

K V K L Q Q S G A E L V R S G A S V K L S C T A S G F N I K D Y Y I Q W V K Q R
P E Q G L E W I G W I D P E N G N S E Y A P R F Q G K A T M T A D T L S N T A Y
L Q L S S L T S E D T A V Y Y C N A D L H D Y W G Q G T T L T V S S

【0483】

10

20

30

40

50

配列番号 71 ; PCT / IB 2017 / 052544 号の図 4 A および 4 B からのコン
センサス V H アミノ酸配列

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQR
PGQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAY
LELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

【0484】

配列番号 72 ; キメラ 3 D 6 抗体の重鎖

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYYLHWVRQR
PEQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSSNTAY
LQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
GK

【0485】

配列番号 73 ; キメラ 3 D 6 抗体の軽鎖

DVVMQTQTPPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNW
LLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGGTTKLEIKRTVAAPSV
FIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0486】

配列番号 74 ; 重鎖可変構造モデル受容体受入番号 5 MYX - V H _ m S t のアミノ酸
配列

EVQLQQSGAEELVRPGSSVKISCKASGYIFNNYWINWVKQR
PGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAY
MQLSSLTSEDSAVYFCAREGYIVYWGQGTLVTVSA

【0487】

配列番号 75 ; 重鎖可変受容体受入番号 2 RCS - V H _ h u F r w k のアミノ酸配列

QVQLQQSGAEELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQR
PEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAY
LQLSSLTSEDTAVYYCASYYGIYWGQGTTTLTVSS

【0488】

配列番号 76 ; ヒト化 3 D 6 抗体の重鎖可変領域 h u 3 D 6 V H v b 1 のアミノ酸配列

QVQLQQSGAEELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYYLHWVKQR
PEQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSSNTAY
LQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSS

【0489】

配列番号 77 ; ヒト化 3 D 6 抗体の重鎖可変領域 h u 3 D 6 V H v b 2 のアミノ酸配列

EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGRATITADTSTDYAY
LELSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

【0490】

配列番号 78 ; ヒト化 3 D 6 抗体の重鎖可変領域 h u 3 D 6 V H v b 3 のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDY YLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPENGD TIYDPKFQGRATITADTSTDTAY
MELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

【0491】

配列番号79；ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb4のアミノ酸配列
EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDY YLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPENGD TIYDPKFQGRVTITADTSTDTAY
MELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

【0492】

配列番号80；ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb5のアミノ酸配列
EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDY YLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPEDGETIYDPKFQGRVTITADTSTDTAY
MELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

【0493】

配列番号81；軽鎖可変構造モデル受入番号5MYX-VL__mStのアミノ酸配列
DVVLTQTPLTTL SVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNW
LLQRPQGQSPKRLIYVVS KLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLG VYYCVQGTHFPFTFGSGGTKLEIK

【0494】

配列番号82；軽鎖可変受容体受入番号ARX71335-VL__huFrwkのアミノ酸配列

DVVMTQTPLTTL SVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNW
LLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLG VHYCEQGTHFPLTFGAGTKLELK

【0495】

配列番号83；ヒト化3D6抗体の軽鎖可変領域hu3D6VLvb1のアミノ酸配列
DVVMTQTPLTTL SVTIGQPASISCKSSQSLLDS DGKTYLNW
LLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLG VHYCWQGTHFPYTFGAGTKLELKR

【0496】

配列番号84；ヒト化3D6抗体の軽鎖可変領域hu3D6VLvb2のアミノ酸配列
DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDS DGKTYLNW
LLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGAGTKLEIKR

【0497】

配列番号85；ヒト化3D6抗体の軽鎖可変領域hu3D6VLvb3のアミノ酸配列
DVVMTQSPLSLSVTLGEPASISCRSSQSLLDS DGKTYLNW
LQQRPQGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGGTKLEIKR

【0498】

配列番号86；ヒト化3D6抗体の別のカバットーコチアの組み合わせCDR-H1の
アミノ酸配列(hu3D6VHvb4およびhu3D6VHvb5と同様)

GFTIKDY YLH

【0499】

配列番号87；ヒト化3D6抗体の別のカバットCDR-H2のアミノ酸配列(hu3D6VHvb3およびhu3D6VHvb4と同様)

WIDPENGD TIYDPKFQG

【0500】

配列番号88；ヒト化3D6抗体の別のカバットCDR-H2のアミノ酸配列(hu3D6VHvb5と同様)

10

20

30

40

50

WIDPEDGETIYDPKFQG

【0501】

配列番号89；ヒト化3D6抗体の別のカバットCDR-L1のアミノ酸配列(hu3D6VLvb3と同様)

RSSQSLLDSDGKTYLN

【0502】

配列番号90；ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb6のアミノ酸配列

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDY YLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPEDGETVYDPKFQGRVTITADTSTDTAY
MELSSSLRSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

10

【0503】

配列番号91；ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb7のアミノ酸配列

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDY YLHWVRQR
PGKGLEWIGWIDPEDGETVYDPKFQGRVTITADTSTDTAY
MELSSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

【0504】

配列番号92；ヒト化3D6抗体の別のカバットCDR-H2のアミノ酸配列(hu3D6VHvb6およびhu3D6VHvb7と同様)

WIDPEDGETVYDPKFQG

【0505】

20

配列番号93；ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb1をコードする核酸配列

CAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGGGCAGAATTGGTCAAGC
CCGGAGCGTCAAGTGAAGCTGAGCTGCACCGCCTCCGGCTT
CAACATCAAAGACTACTATCTTCACTGGGTCAAGCAACGG
CCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGTTGGATCGACCCAG
AAAACGGCGACACCGTGTAACGATCCGAAGTTTTCAGGGGAA
GGCCACCATCACTGCTGATACGTCCCTCGAACACCGCCTAC
CTCCAACCTGAGCTCCCTGACTTCCGAGGACACTGCCGTGT
ACTTCTGTTCACCCCTGGACTTCTGGGGACAGGGAACTAC
CCTCACCGGTGTCCTCGGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTC
TTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACTTTCGGGTGGAA
CCGCGGCACTGGGGGTGCCTCG

30

【0506】

配列番号94；ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb2をコードする核酸配列

GAAGTGCAGCTCGTGCAGTCCGGTGCCGAAGTCGTGAAAC
CGGGAGCCAGCGTGAAGATTAGCTGCAAGGCCTCAGGGTT
CAACATCAAAGGACTATTACCTTCACTGGGTCAAGACAGCGG
CCTGGAAAGGGCTTGGAGTGGATCGGATGGATTGACCCCG
AGAACGGCGACACCGTGTAACGATCCGAAGTTTTCAGGGCCG
CGCAACCATCACTGCTGACACCTCCACCGATACCGCGTAC
CTGGAACTCTCGAGCCTGACTTCCGAGGATACGGCCGTGT
ACTTCTGTTCACCCCTGGACTTCTGGGGACAAGGGACTCT
GGTCACCGGTGTCCTCGGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTC
TTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACTTTCGGGTGGAA
CCGCGGCACTGGGGGTGCCTCG

40

【0507】

配列番号95；ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb3をコードする核酸配列

50

GAGGTGCAACTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCGTGAAGC
CGGGAGCCACCGTGAAAGATTTCTGTGCAAAGCGTCAGGGTT
TAACATCAAGGACTACTATCTGCACTGGGTCCGCCAGAGG
CCCGGGAAGGGCCTCGAGTGGATCGGTTGGATCGACCCCTG
AAAACGGCGACACCATCTACGATCCAAAGTTCCAGGGCAG
AGCCACTATTACCGCTGACACGAGCACCGATACTGCATAC
ATGGAATTGTCTCTCCCTGCGGTCCGAGGATACTGCCGTGT
ACTACTGTAGCACCCCTGGACTTCTGGGGACAGGGGAACCT
TGTGACCGTGTCTCGTCCGCCAGCACTAAGGGGGCCTAGCGTC
TTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCAATTTCGGGTGGAA
CCGCGGCACTGGGGGTGCCTCG

10

【0508】

配列番号96；ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb4をコードする核
酸配列

GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCCGGTGCTGAAGTCGTGAAGC
CCGGCGCAACTGTGAAGATTAGCTGCAAGGCCTCAGGGTT
CACGATCAAGGACTACTATCTGCACTGGGTCCGCCAACGG
CCAGGAAAGGGACTGGAGTGGATCGGATGGATCGATCCTG
AAAACGGCGACACCATCTACGACCCGAAATTTTCAGGGGAG
AGTGACCAATTACCGCCGATACCTCCACCGACACTGCGTAC
ATGGAACTGTCCAGCCTTCGGTCCGAGGACACCGCCGTGT
ACTACTGTTTCGACCCCTGGATTTCTGGGGACAGGGCACTCT
CGTGACTGTGTCTCGTCCGCCAGCACTAAGGGGGCCTAGCGTC
TTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCAATTTCGGGTGGAA
CCGCGGCACTGGGGGTGCCTCG

20

【0509】

配列番号97；ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb5をコードする核
酸配列

GAAGTGCAACTGGTGCAGTCCGGCGCAGAAGTCGTGAAGC
CTGGAGCCACCGTGAAAGATCAGCTGCAAGGCCTCCGGCTT
CACCATCAAAGACTACTACTTTGCACTGGGTGAGACAGCGC
CCAGGAAAGGGTCTGGAATGGATTGGATGGATTGACCCCG
AGGACGGGGGAGACTATCTACGATCCGAAGTTTTCAGGGCCG
GGTCACCATCACGGCTGATACCTCGACCGACACTGCGTAC
ATGGAACTTTCTCTCGCTGCGGTCCGAGGACACCGCCGTGT
ATTACTGTTCCACCCCTGGATTTCTGGGGACAGGGGACTCT
CGTGACTGTGTCAAGCGCCAGCACTAAGGGGGCCTAGCGTC
TTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCAATTTCGGGTGGAA
CCGCGGCACTGGGGGTGCCTCG

30

【0510】

配列番号98；ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb6をコードする核
酸配列

GAAGTGCAACTGGTGCAGTCCGGCGCAGAAGTCGTGAAGC
CTGGAGCCACCGTGAAAGATCAGCTGCAAGGCCTCCGGCTT
CACCATCAAAGACTACTACTTTGCACTGGGTGAGACAGCGC
CCAGGAAAGGGTCTGGAATGGATTGGATGGATTGACCCCG
AGGACGGGGGAGACTGTGTACGATCCGAAGTTTTCAGGGCCG
GGTCACCATCACGGCTGATACCTCGACCGACACTGCGTAC
ATGGAACTTTCTCTCGCTGCGGTCCGAGGACACCGCCGTGT
ATTTCTGTTCCACCCCTGGATTTCTGGGGACAGGGGACTCT

40

50

CGTGACTGTGTCAAGCGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCT
TTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACTTCGGGGTGGAA
CCGCGGGCACTGGGGTGCCTCG

【0511】

配列番号99；ヒト化3D6抗体の重鎖可変領域hu3D6VHvb7をコードする核酸配列

G A A G T G C A A C T G G T G C A G T C C G G C G C A G A A G T C G T G A A G C
C T G G A G C C A C C G T G A A G A T C A G C T G C A A G G C C T C C G G C T T
C A C C A T C A A A G A C T A C T A C T T G C A C T G G G T C A G A C A G C G C
C C A G G A A A G G G T C T G G A A T G G A T T G G A T G G A T T G A C C C C G
A G G A C G G G G A G A C T G T G T A C G A T C C G A A G T T T C A G G G C C G
G G T C A C C A T C A C G G C T G A T A C C T C G A C C G A C A C T G C G T A C
A T G G A A C T T T C C T C G C T G C G G T C C G A G G A C A C C G C C G T G T
A T T A C T G T T C C A C C C T G G A T T T C T G G G G A C A G G G G A C T C T
C G T G A C T G T G T C A A G C G C C A G C A C T A A G G G G C C T A G C G T C
T T T C C G C T G G C C C C G T C C T C C A A G T C C A C T T C G G G T G G A A
C C G C G G C A C T G G G G T G C C T C G

【0512】

配列番号100；ヒト化3D6抗体の軽鎖可変領域hu3D6VLvb1をコードする核酸配列

G A T G T C G T G A T G A C C C A G A C G C C G C T G A C C C T G T C C G T G A
C T A T C G G C C A G C C C G C G T C C A T T T C G T G C A A G A G C A G C C A
G T C C C T G C T G G A C T C C G A C G G A A A G A C C T A C C T G A A C T G G
C T G T T G C A A C G G C C G G G A C A G T C A C C C A A G C G C C T C A T C T
A T C T G G T G T C C A A G C T C G A C T C G G G A G T G C C T G A T A G G T T
T T C G G G A T C C G G C A G C G G G A C C G A C T T C A C C C T G A A A A T C
T C A A G A G T G G A A G C C G A G G A C C T T G G T G T C C A T T A C T G T T
G G C A G G G T A C C C A C T T C C C A T A C A C T T T C G G G G C C G G C A C
T A A G C T C G A A C T G A A G

【0513】

配列番号101；ヒト化3D6抗体の軽鎖可変領域hu3D6VLvb2をコードする核酸配列

G A T G T C G T G A T G A C C C A G T C G C C G C T G T C C C T G T C C G T G A
C C C T G G G A C A G C C A G C C T C C A T T A G C T G C A A G A G C A G C C A
G T C C T T G C T G G A C T C A G A C G G A A A G A C C T A T C T G A A C T G G
C T G C T G C A A A G G C C C G G C C A G T C C C C G A A G A G A C T C A T C T
A C C T C G T G T C G A A G C T G G A C T C C G G C G T G C C T G A T C G C T T
C T C G G G T T C C G G G T C T G G A A C T G A C T T C A C C C T C A A A A T C
T C A C G G G T C G A A G C C G A G G A C G T G G G C G T G T A C T A C T G T T
G G C A G G G T A C C C A C T T T C C C T A C A C T T T C G G G G C G G G A A C
T A A G C T T G A G A T C A A G

【0514】

配列番号102；ヒト化3D6抗体の軽鎖可変領域hu3D6VLvb3をコードする核酸配列

G A T G T C G T G A T G A C C C A G A G C C C C C T G T C C C T G A G C G T G A
C T C T G G G G G A A C C G G C C A G C A T T T C A T G C C G G T C C T C A C A
A T C G C T G C T C G A C T C C G A C G G A A A G A C C T A T T T G A A C T G G
C T G C A G C A A A G A C C A G G A C A G T C C C C T C G C C G G C T C A T C T
A C C T G G T G T C C A A G C T T G A C T C G G G C G T G C C G G A T A G G T T
C T C C G G G T C C G G A A G C G G C A C C G A C T T C A C T C T G A A A A T C

TCGCGCGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTCTACTACTGTT
GGCAGGGTACCCACTTCCCCCTACACGTTTGGCCAGGGTAC
CAAGCTCGAGATCAAG

【0515】

配列番号103；代表的なIgG1重鎖定常領域のアミノ酸配列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

【0516】

配列番号104；代表的なカップ軽鎖定常領域のアミノ酸配列

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC

【0517】

配列番号105；代表的なIgG1重鎖定常領域をコードする核酸配列

GCCAGCACTAAGGGGCGCTAGCGTCTTTCCGCTGGCCCCGT
CCTCCAAGTCCACTTCGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTG
CCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCGGTCACCGTGTTCC
TGGAACCTCGGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACTTTCC
CTGCGGTGCTGCAGTCCTCCGGGGCTCTACTCGCTGTCAAG
CGTGGTCACCGTCCCGAGCTCATCCCTGGGTACTCAGACC
TACATTTTGCAACGTGAACCAACAACCTTCCAACACCAAGG
TCGACAAGAAAGTGAGGAGCCTAAGAGCTGCGACAAGACCCA
CACCTGTCCCCCGTGTCGCCGCCCTGAGCTGCTGGGCGGC
CCCAGCGTGTTCTCTTCCCGCCTAAGCCGAAGGACACTC
TGATGATCTCGAGAACCCTGAAGTGACCTGTGTGGTGGT
GGATGTGTCCCACGAGGATCCGGGAAGTGAAAGTTCAATTGG
TACGTGGACGGAGTGGAAGTCCATAACGCCAAGACCAAGC
CCCGCGAGGAACAGTACAACCTCAACTTACCGGGTGGTGTC
AGTGCTGACCGTGCTGCACCAAGATTGGCTGAACGGGAAG
GAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCGCTGCCGGCCC
CCATTGAAAAGACCATCAGCAAGGCTAAGGGCCAGCCCCG
GGAACCAACAGGTCTACACCTTGCCCCCTTCCCGGGAGGAA
ATGACCAAGAACAAGTGTCGCTGACGTGCCTGGTCAAGG
GCTTTTATCCATCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAAGCAA
CGGCCAGCCGGAAAACAACCTACAAGACTACCCCGCCTGTG
CTGGACTCCGACGGCTCGTTCTTCTCTGTATTCCAAGCTCA
CCGTGGATAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAATGTGTTCAG
CTGCAGCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAACCACTACACT
CAGAAATCACTGTCCCTTTCCCCCGGAAAGTAA

【0518】

配列番号106；代表的なカップ軽鎖定常領域をコードする核酸配列

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTGTGTG

10

20

30

40

50

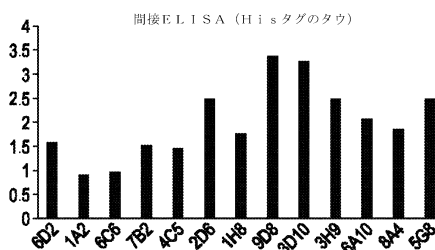
CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAG
TGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCCAGG
AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG
CCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG
AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGGCC
TGAGCTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
TTAA

【図面】

【図 1】

	10	20	30	40
EVQILQSGADLVRRPDAALVKLSCKASGGMMIKDDYLLHWMVRRQ				40
EVQILVQSGAEVLKPKGAVVKLSCKVSGMMIKDDYLLHWMVRRQ				40
2RCS_VH_hFrwK				40
hu3D6VL				40
hu3D6VLv01				40
hu3D6VLv02				40
hu3D6VLv03				40
hu3D6VLv04				40
hu3D6VLv05				40
hu3D6VLv06				40
hu3D6VLv07				40
	50	60	70	80
EVQILQSGADLVRRPDAALVKLSCKASGGMMIKDDYLLHWMVRRQ				
EVQILVQSGAEVLKPKGAVVKLSCKVSGMMIKDDYLLHWMVRRQ				
2RCS_VH_hFrwK				
hu3D6VL				
hu3D6VLv01				
hu3D6VLv02				
hu3D6VLv03				
hu3D6VLv04				
hu3D6VLv05				
hu3D6VLv06				
hu3D6VLv07				
	90	100	110	
EVQILQSGADLVRRPDAALVKLSCKASGGMMIKDDYLLHWMVRRQ				
EVQILVQSGAEVLKPKGAVVKLSCKVSGMMIKDDYLLHWMVRRQ				
2RCS_VH_hFrwK				
hu3D6VL				
hu3D6VLv01				
hu3D6VLv02				
hu3D6VLv03				
hu3D6VLv04				
hu3D6VLv05				
hu3D6VLv06				
hu3D6VLv07				

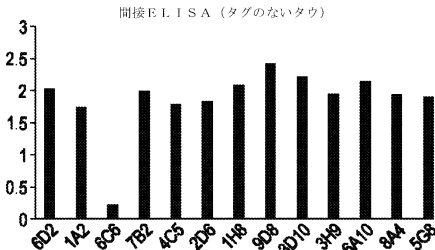
【図 3 A】



【図 2】

	10	20	30	40
DVVMTQITLTLTSLSVTIIGQPASISCSQSSQSLLDSDSGMMIKDDYLLHWMVRRQ				40
DVVMTQITLTLTSLSVTIIGQPASISCSQSSQSLLDSDSGMMIKDDYLLHWMVRRQ				40
2RCS_VH_hFrwK				40
hu3D6VL				40
hu3D6VLv01				40
hu3D6VLv02				40
hu3D6VLv03				40
	50	60	70	80
DVVMTQITLTLTSLSVTIIGQPASISCSQSSQSLLDSDSGMMIKDDYLLHWMVRRQ				
DVVMTQITLTLTSLSVTIIGQPASISCSQSSQSLLDSDSGMMIKDDYLLHWMVRRQ				
2RCS_VH_hFrwK				
hu3D6VL				
hu3D6VLv01				
hu3D6VLv02				
hu3D6VLv03				
	90	100	110	
DVVMTQITLTLTSLSVTIIGQPASISCSQSSQSLLDSDSGMMIKDDYLLHWMVRRQ				
DVVMTQITLTLTSLSVTIIGQPASISCSQSSQSLLDSDSGMMIKDDYLLHWMVRRQ				
2RCS_VH_hFrwK				
hu3D6VL				
hu3D6VLv01				
hu3D6VLv02				
hu3D6VLv03				

【図 3 B】



10

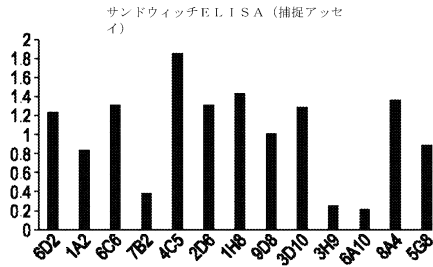
20

30

40

50

【図 3 C】

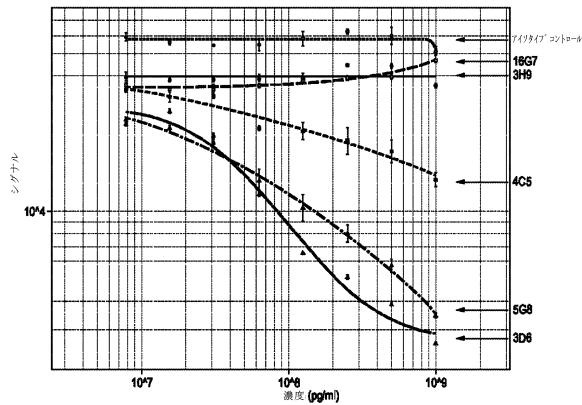


【図 4】

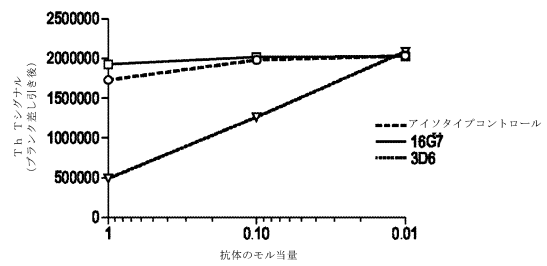
名称	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$
3D6	2.58×10^6	1.19×10^{-3}	0.46
1H8	5.07×10^6	5.61×10^{-3}	11.1
3H9	4.71×10^6	1.41×10^{-3}	3.0
5G8	3.75×10^6	2.54×10^{-3}	6.78
6D2	3.83×10^6	3.18×10^{-3}	8.29
7G6	5.76×10^6	3.32×10^{-3}	5.77
8A4	5.99×10^6	2.27×10^{-3}	3.8

10

【図 5】

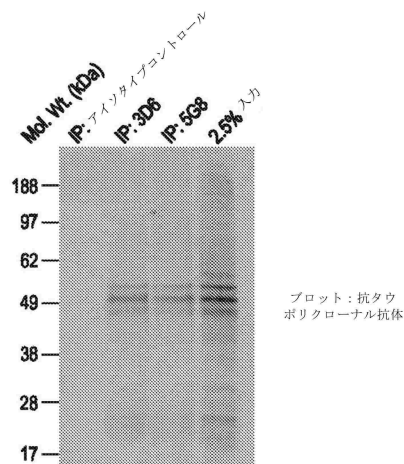


【図 6】



20

【図 7】



30

【配列表】

0007623699000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100208580

弁理士 三好 玲奈

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 ニジャール, ターロチャン エス

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 5 6 3, 7 1 2 アイアンパーク コート オリンダ

(72)発明者 バブアー, ロビン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 5 9 8, 2 5 0 ノルマンディー レーン ウォルナット
クリーク

(72)発明者 ドーラン サード, フィリップ ジェームズ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 4 0 4, 6 2 2 エッジウォーター ブールバール # 3
0 3 フォスター シティ

(72)発明者 リウ, ユエ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 4 0 4, 8 1 5 ピアリー レーン フォスター シティ

(72)発明者 アレクサンダー, スヴェトラナ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 0 8 7, 9 1 3 ホレンベック アベニュー サニーベール

(72)発明者 レンツ, マーク イー.

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 0 3 0, 8 0 8 マーチソン ドクター ミルブラエ

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 1 5 6 0 (WO, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B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 0
 A 6 1 P 2 5 / 0 0
 A 6 1 P 2 5 / 1 6
 A 6 1 P 2 5 / 2 8
 C 1 2 N 1 / 1 5
 C 1 2 N 1 / 1 9
 C 1 2 N 1 / 2 1
 C 1 2 N 5 / 1 0
 C 1 2 N 1 5 / 1 3
 C 1 2 N 1 5 / 6 3
 C 1 2 P 2 1 / 0 8
 G 0 1 N 3 3 / 5 3

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