

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-512056

(P2017-512056A)

(43) 公表日 平成29年5月18日(2017.5.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B064
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B065
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C084
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4C086
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-550794 (P2016-550794)  
 (86) (22) 出願日 平成27年2月9日 (2015.2.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年9月9日 (2016.9.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/014976  
 (87) 国際公開番号 W02015/120364  
 (87) 国際公開日 平成27年8月13日 (2015.8.13)  
 (31) 優先権主張番号 61/937,898  
 (32) 優先日 平成26年2月10日 (2014.2.10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596129215  
 メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション  
 Merck Sharp & Dohme Corp.  
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907 ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126  
 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 U. S. A.

(74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト・タウに結合する抗体および該抗体を使用してヒト・タウを定量するためのアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、ヒト・タウに結合する新規抗体、およびこれらの抗体を使用してヒト・タウを定量するためのアッセイを提供する。

【選択図】 図 1

1	MAPKCFEADHPTLGGKGGSTYINIDGSDTALG	44	TALJUMAN 352
1	MAPKCFEADHPTLGGKGGSTYINIDGSDTALG	45	TALJUMAN 351
1	MAPKCFEADHPTLGGKGGSTYINIDGSDTALG	46	TALJUMAN 410
1	MAPKCFEADHPTLGGKGGSTYINIDGSDTALG	47	TALJUMAN 383
1	MAPKCFEADHPTLGGKGGSTYINIDGSDTALG	48	TALJUMAN 412
1	MAPKCFEADHPTLGGKGGSTYINIDGSDTALG	49	TALJUMAN 441
45	-----AEAGDIPPLEEAG	62	TALJUMAN 389
61	SEISASTFTFAEALVKEAFQDAAQHTIE	61	TALJUMAN 381
61	SEISASTFTFAEALVKEAFQDAAQHTIE	129	TALJUMAN 410
45	-----AEAGDIPPLEEAG	62	TALJUMAN 383
61	SEISASTFTFAEALVKEAFQDAAQHTIE	61	TALJUMAN 412
61	SEISASTFTFAEALVKEAFQDAAQHTIE	129	TALJUMAN 441
63	HYFQVMSKSDIISDINGAGKDKLAFPSAAPPQDQNNTEPKTPPAE	122	TALJUMAN 352
62	HYFQVMSKSDIISDINGAGKDKLAFPSAAPPQDQNNTEPKTPPAE	151	TALJUMAN 381
121	HYFQVMSKSDIISDINGAGKDKLAFPSAAPPQDQNNTEPKTPPAE	122	TALJUMAN 410
63	HYFQVMSKSDIISDINGAGKDKLAFPSAAPPQDQNNTEPKTPPAE	122	TALJUMAN 383
62	HYFQVMSKSDIISDINGAGKDKLAFPSAAPPQDQNNTEPKTPPAE	151	TALJUMAN 412
121	HYFQVMSKSDIISDINGAGKDKLAFPSAAPPQDQNNTEPKTPPAE	122	TALJUMAN 441
121	TPPSEAFPSDSDGSGSGPCINSGRTPSLFPTPEEHWVWVTPSPSSK	182	TALJUMAN 352
122	TPPSEAFPSDSDGSGSGPCINSGRTPSLFPTPEEHWVWVTPSPSSK	211	TALJUMAN 381
181	TPPSEAFPSDSDGSGSGPCINSGRTPSLFPTPEEHWVWVTPSPSSK	240	TALJUMAN 410
122	TPPSEAFPSDSDGSGSGPCINSGRTPSLFPTPEEHWVWVTPSPSSK	182	TALJUMAN 383
122	TPPSEAFPSDSDGSGSGPCINSGRTPSLFPTPEEHWVWVTPSPSSK	211	TALJUMAN 412
181	TPPSEAFPSDSDGSGSGPCINSGRTPSLFPTPEEHWVWVTPSPSSK	240	TALJUMAN 441
	[SEQ ID NO: 1]		
183	SLQAPPAPRLNFKSISDTELKPPGAGGQ	215	TALJUMAN 352
212	SLQAPPAPRLNFKSISDTELKPPGAGGQ	244	TALJUMAN 381
241	SLQAPPAPRLNFKSISDTELKPPGAGGQ	273	TALJUMAN 410
183	SLQAPPAPRLNFKSISDTELKPPGAGGQ	215	TALJUMAN 383
212	SLQAPPAPRLNFKSISDTELKPPGAGGQ	244	TALJUMAN 412
241	SLQAPPAPRLNFKSISDTELKPPGAGGQ	273	TALJUMAN 441
	[SEQ ID NO: 2]		
216	-----KVVYTPVLSVYSSDSDLNHPFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	271	TALJUMAN 352
245	-----KVVYTPVLSVYSSDSDLNHPFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	300	TALJUMAN 381
274	-----KVVYTPVLSVYSSDSDLNHPFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	329	TALJUMAN 410
245	-----KVVYTPVLSVYSSDSDLNHPFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	300	TALJUMAN 383
272	-----KVVYTPVLSVYSSDSDLNHPFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	329	TALJUMAN 412
245	-----KVVYTPVLSVYSSDSDLNHPFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	300	TALJUMAN 441
	[SEQ ID NO: 3]		
272	TRFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	329	TALJUMAN 352
301	TRFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	358	TALJUMAN 381
330	TRFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	387	TALJUMAN 410
359	TRFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	416	TALJUMAN 383
328	TRFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	397	TALJUMAN 412
357	TRFQDQVNSKLDKIDKQSKISLDM	426	TALJUMAN 441
	[SEQ ID NO: 4]		
332	SPQLALKEKSKLWGL 352	TALJUMAN 352	
381	SPQLALKEKSKLWGL 381	TALJUMAN 381	
359	SPQLALKEKSKLWGL 410	TALJUMAN 410	
383	SPQLALKEKSKLWGL 383	TALJUMAN 383	
382	SPQLALKEKSKLWGL 412	TALJUMAN 412	
441	SPQLALKEKSKLWGL 441	TALJUMAN 441	

FIG.1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

アミノ酸 220 - 224 からなるヒト・タウのエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

**【請求項 2】**

配列番号 20 (CDRL1)、配列番号 21 (CDRL2) および配列番号 22 (CDRL3) の 3 個の軽鎖 CDR ならびに配列番号 26 (CDRH1)、配列番号 27 (CDRH2) および配列番号 28 (CDRH3) の 3 個の重鎖 CDR を含む、請求項 1 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

**【請求項 3】**

配列番号 24 の軽鎖可変領域および配列番号 30 の重鎖可変領域を含む、請求項 1 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

**【請求項 4】**

モノクローナル抗体 10H8 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 1 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

**【請求項 5】**

抗体軽鎖可変領域および抗体重鎖可変領域の一方または両方をコードする単離された核酸であって、該抗体軽鎖可変領域が配列番号 24 のものであり、抗体重鎖可変領域が配列番号 30 のものである、単離された核酸。

**【請求項 6】**

請求項 5 記載の単離された核酸を含む発現ベクター。

**【請求項 7】**

請求項 6 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

**【請求項 8】**

アミノ酸 189 - 194 からなるヒト・タウのエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

**【請求項 9】**

配列番号 32 (CDRL1)、配列番号 33 (CDRL2) および配列番号 34 (CDRL3) の 3 個の軽鎖 CDR ならびに配列番号 38 (CDRH1)、配列番号 39 (CDRH2) および配列番号 40 (CDRH3) の 3 個の重鎖 CDR を含む、請求項 8 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

**【請求項 10】**

配列番号 36 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 42 の重鎖可変ドメインを含む、請求項 8 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

**【請求項 11】**

モノクローナル抗体 19G10 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 8 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

**【請求項 12】**

抗体軽鎖可変領域および抗体重鎖可変領域の一方または両方をコードする単離された核酸であって、該抗体軽鎖可変領域が配列番号 36 のものであり、抗体重鎖可変領域が配列番号 42 のものである、単離された核酸。

**【請求項 13】**

請求項 12 記載の単離された核酸を含む発現ベクター。

**【請求項 14】**

請求項 13 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

**【請求項 15】**

配列番号 9 記載の単離されたタウ 166 ペプチド。

**【請求項 16】**

配列番号 9 のペプチドをコードする単離された核酸で宿主細胞をトランスフェクトすることにより製造される、配列番号 9 の単離されたタウ 166 ペプチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 17】

請求項 16 記載の単離されたタウ 166 ペプチドをコードする核酸でトランスフェクトされた宿主細胞。

## 【請求項 18】

宿主細胞が大腸菌 (E. coli) 細胞である、請求項 17 記載の宿主細胞。

## 【請求項 19】

(a) 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントと生物学的サンプルを、ヒト・タウと該抗体またはその抗原結合性フラグメントとの免疫複合体の形成を可能にする条件下で接触させること、および

(b) 形成した免疫複合体を検出すること  
を含む、生物学的サンプル中のヒト・タウを定量する方法。

10

## 【請求項 20】

該抗体がモノクローナル抗体 10H8 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 19 記載の方法。

## 【請求項 21】

(a) 請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントと生物学的サンプルを、ヒト・タウと該抗体またはその抗原結合性フラグメントとの免疫複合体の形成を可能にする条件下で接触させること、および

(b) 形成した免疫複合体を検出すること  
を含む、生物学的サンプル中のヒト・タウを定量する方法。

20

## 【請求項 22】

該抗体がモノクローナル抗体 19G10 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 21 記載の方法。

## 【請求項 23】

脳脊髄液サンプル中のヒト・タウを定量するための方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント (ここで、該抗体または抗原結合性フラグメントは固体支持体上に固定化されている) と該サンプルを、捕捉抗体 / タウ複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、該サンプルからのヒト・タウを捕捉すること、および

(b) 請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項記載の検出可能な様態で標識された抗体またはその抗原結合性フラグメントと該捕捉抗体 / タウ複合体を、捕捉抗体 / タウ / 検出可能標識抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、捕捉されたタウを検出すること  
を含む方法。

30

## 【請求項 24】

捕捉抗体がモノクローナル抗体 10H8 またはその抗原結合性フラグメントであり、検出可能な様態で標識される抗体がモノクローナル抗体 19G10 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 23 記載の方法。

## 【請求項 25】

固体支持体が、磁気粒子、マイクロスフェア、磁気マイクロスフェア、ビーズ、膜、プラスチックチューブ、マイクロタイターウェルからなる群から選択される、請求項 23 記載の方法。

40

## 【請求項 26】

固体支持体が磁気マイクロスフェアである、請求項 25 記載の方法。

## 【請求項 27】

検出可能な様態で標識された抗体が、放射性同位体、酵素、ビオチン、色素、蛍光標識および化学発光標識からなる群から選択される試薬で標識されている、請求項 23 記載の方法。

## 【請求項 28】

試薬がビオチンである、請求項 27 記載の方法。

50

## 【請求項 29】

ビオチンがストレプトアビジン - フィコエリトリンコンジュゲートに結合する、請求項 28 記載の方法。

## 【請求項 30】

アルツハイマー病を有する疑いのある患者においてアルツハイマー病を診断するための方法であって、該方法が、

(a) 請求項 23 記載の方法を用いて該患者の脳脊髄液サンプル中のヒト・タウの量を定量すること、および

(b) 工程 (a) におけるヒト・タウの濃度を決定すること  
を含み、

184 pg / mL より大きな値が該患者における AD の診断を示す、方法。

10

## 【請求項 31】

(c) 該患者の脳脊髄液サンプル中の A<sub>1-42</sub> の量を定量すること、および

(d) 該患者のサンプルにおけるヒト・タウ / A<sub>1-42</sub> の比を決定すること  
を更に含み、

0.215 より大きな比の値が該患者における AD の診断を示す、請求項 30 記載の方法。

## 【請求項 32】

工程 (c) において、6E10、12F4、1-11-3、G2-11 および 4G8 からなる群から選択される少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはこれらの抗体のいずれかの抗原結合性フラグメントを使用して、A<sub>1-42</sub> の量を定量する、請求項 31 記載の方法。

20

## 【請求項 33】

工程 (c) において、

(i) A<sub>1-42</sub> の C 末端のエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメント (ここで、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは固体支持体上に固定化されている) と該サンプルを、捕捉抗体 / A<sub>1-42</sub> 複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、該サンプルからの A<sub>1-42</sub> を捕捉すること、および

(ii) A<sub>1-42</sub> の N 末端のエピトープに特異的に結合する検出可能な状態で標識された抗体またはその抗原結合性フラグメントと該捕捉抗体 / A<sub>1-42</sub> 複合体を、検出可能標識抗体 / A<sub>1-42</sub> / 捕捉抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、捕捉された A<sub>1-42</sub> を検出すること

30

により、脳脊髄液サンプル中の A<sub>1-42</sub> の量が定量される、請求項 31 記載の方法。

## 【請求項 34】

工程 (c) (i) において使用する抗体がモノクローナル抗体 1-11-3 であり、工程 (c) (ii) において使用する抗体がモノクローナル抗体 6E10 である、請求項 33 記載の方法。

## 【請求項 35】

(a) 請求項 30、31、32、33 および 34 のいずれか 1 項記載の診断方法を用いて、治療を要する患者を選択すること、および

40

(b) AD 治療用物質の治療的有効量を該患者に投与すること

を含む、アルツハイマー病の治療を要する患者におけるアルツハイマー病の治療方法。

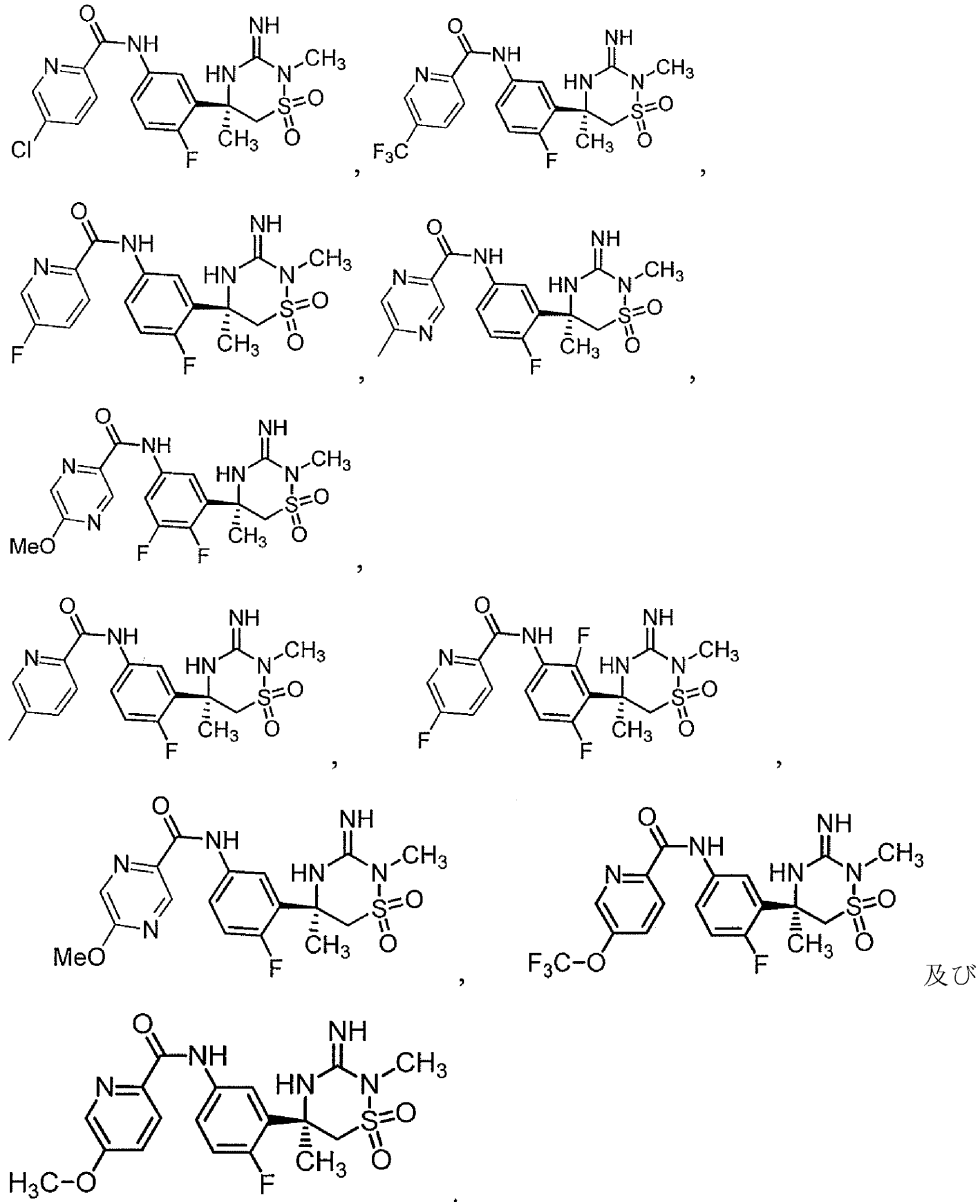
## 【請求項 36】

AD 治療用物質が BACE-1 インヒビターである、請求項 35 記載の方法。

## 【請求項 37】

BACE-1 インヒビターが、

## 【化 1】

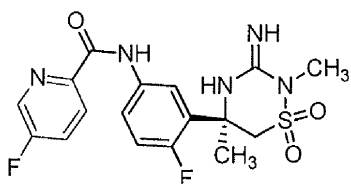


からなる群から選択される化合物もしくはその互変異性体または該化合物もしくは互変異性体の医薬上許容される塩である、請求項 3 6 記載の方法。

## 【請求項 3 8】

BACE - 1 インヒビターが、構造

## 【化 2】

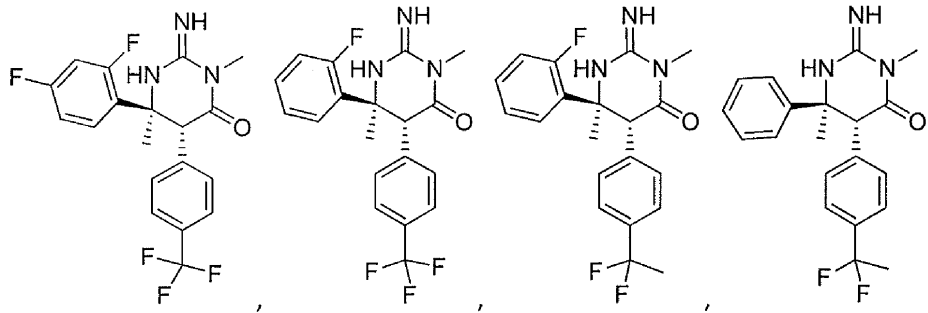


を有する化合物もしくはその互変異性体または該化合物もしくは互変異性体の医薬上許容される塩である、請求項 3 7 記載の方法。

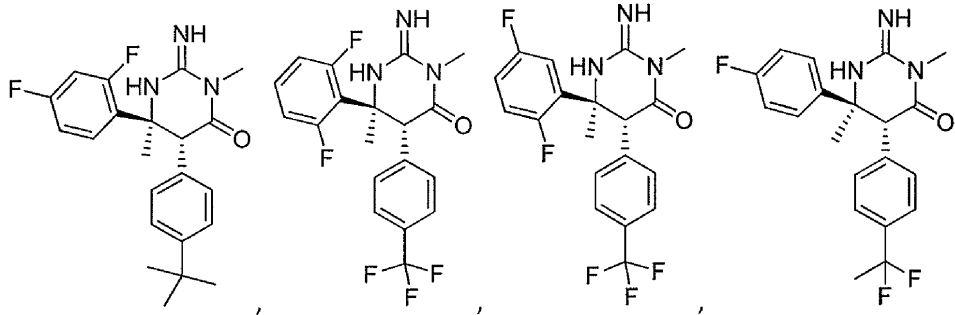
## 【請求項 3 9】

BACE - 1 インヒビターが、

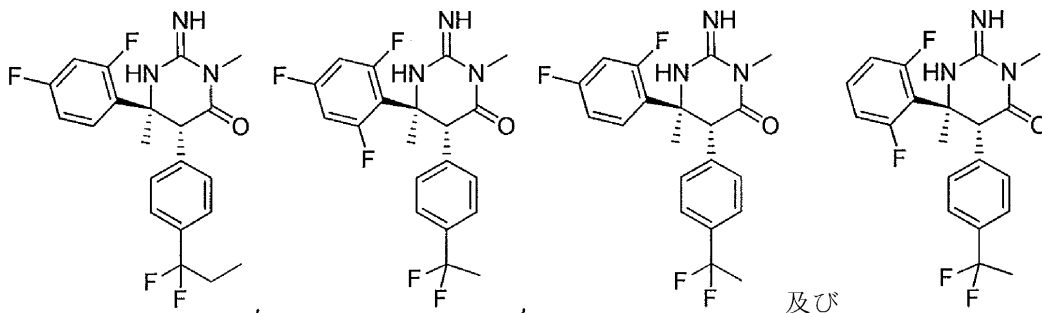
## 【化 3】



10



20



からなる群から選択される化合物もしくはその互変異性体または該化合物もしくは互変異性体の医薬上許容される塩である、請求項 3 6 記載の方法。

## 【請求項 4 0】

30

(a) 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメントと、

(b) 請求項 8 ~ 1 1 のいずれか 1 項記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメントと

を含むキット。

## 【請求項 4 1】

成分 (a) の単離された抗体が、磁気マイクロスフェアに結合した m A b 1 0 H 8 またはその抗原結合性フラグメントであり、成分 (b) の単離された抗体がビオチン化 m A b 1 9 G 1 0 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 4 0 記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

40

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、ヒト・タウ [ h - タウ ( T a u ) ] に特異的に結合し、生物学的サンプル中の h - タウの定量に有用な抗体に関する。本発明はまた、これらの抗体を使用するアッセイに関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

認知症の最も一般的な原因であるアルツハイマー病 ( A D ) は、記憶および認知機能の低下の増進により特徴づけられる進行性神経変性障害である。A D において存在する神経病理学的特徴には、A ペプチド (最も優勢なのは A<sub>1 - 4 2</sub> ペプチドである) から構

50

成されるアミロイド斑および神経原線維変化 ( N F T ) が含まれる。

【 0 0 0 3 】

特に、NFTは対らせん状細線維 ( P H F ) からなり、そしてこれは微小管関連タンパク質 h - タウ ( h - T a u ) から構成される。通常、h - タウは、ニューロン内にタンパク質および栄養素を分布させるために必須である、微小管の中心的細胞ネットワークを安定化する。しかし、AD患者においては、h - タウは高リン酸化されて、その正常機能が破壊され、それがPHFへと凝集する可能性が増大し、最終的にはNFTが形成される。NFTの形成はシナプスおよびニューロンの喪失を招き、したがって最終的に認知症の発生に寄与すると仮定されている。

【 0 0 0 4 】

脳の細胞外空間はCSFと直接接触しているため、脳内の生化学的变化はCSFにも影響を及ぼす ( B l e n n o w ら , T h e L a n c e t N e u r o l o g y , V o l . 2 , p p . 6 0 5 - 6 1 3 , 2 0 0 3 ) 。 AD患者のCSFにおいては、正常被験者と比べてh - タウタンパク質のレベルが高いことを、研究は示しており ( V a n d e r m e e r e n ら , J . N e u r o c h e m . , V o l . 6 1 , p p . 1 8 2 8 - 1 8 3 4 , 1 9 9 3 ; B l e n n o w ら , 前掲 , H a m p e l ら , E x p . G e r o n t o l , V o l . 4 5 , p p . 3 0 - 4 0 , 2 0 1 0 ) 、したがって、h - タウは、ADを診断するためのバイオマーカーとして使用されている ( H a m p e l ら , 前掲 ) 。 AD患者におけるCSFのh - タウのレベルの上昇はNFTの病理と相関することも示されている ( T a p i o l a ら , N e u r o R e p o r t , V o l . 8 , p p . 3 9 6 1 - 3 9 6 3 , 1 9 9 7 ) 。

【 0 0 0 5 】

最近の研究は、CSFにおけるA<sub>1-42</sub>の濃度の減少と組合された、CSFにおけるh - タウの濃度の上昇の測定が、ADの診断を補助しうることも示している ( T a p i o l a ら , A r c h . N e u r o l . , V o l . 6 6 , p p . 3 8 2 - 3 8 9 , 2 0 0 9 ) 。 更なる研究は、CSF h - タウ / A<sub>1-42</sub>の比が、アミロイド斑の病理を有する個体を特定するのに有用であることも示している ( F a g a n ら , A r c h . N e u r o l . , V o l . 6 8 , p p . 1 1 3 7 - 1 1 4 4 , 2 0 1 1 ) 。 CSF h - タウ / A<sub>1-42</sub>の比は、軽度のADを有する非認知症高齢者における将来の認知機能低下を予測することも示されている ( F a g a n ら , A r c h . N e u r o l . , V o l . 6 4 , p p . 3 4 3 - 3 4 9 , 2 0 0 7 ) 。

【 0 0 0 6 】

前記のCSFバイオマーカーはアミロイド病理、神経変性を反映することが示されており、認知機能低下を予測しうることを考慮すると、それは無症候性または軽症のAD患者の特定において重要となる可能性があり、そのような患者は新規治療介入の恩恵を受ける可能性が最も高い。

【 0 0 0 7 】

これらのCSFバイオマーカーの前記用途の要件は患者のCSF中に存在するバイオマーカーの正確な定量である。特にh - タウは、以下の理由により、定量することが困難なタンパク質である。h - タウには、352 ~ 441アミノ酸の種々のサイズの、6個の異なるアイソフォームが存在し、全ては選択的mRNAスプライシングにより単一遺伝子から誘導される ( H i m m l e r ら , M o l . C e l l B i o l . , V o l . 9 , p p . 1 3 8 1 - 1 3 8 8 , 1 9 8 9 ; 図1を参照されたい ) 。 前記の6個のh - タウアイソフォームは微小管結合ドメインの個数 ( 3または4個 ) およびそれぞれ29アミノ酸のアミノ末端インサートの個数 ( 0、1または2個 ) において互いに異なっている ( G o e d e r t ら , N e u r o n , V o l . 3 , p p . 5 1 9 - 5 2 6 , 1 9 8 9 ) 。 h - タウタンパク質における不均一性は、リン酸化、ユビキチン化、酸化などを含む翻訳後修飾により生じる。また、h - タウは健康な個体における約300 ng / LからAD患者における900 ng / Lまでの低濃度でCSF中に存在する ( B l e n n o w および H a m p e l , L a n c e t N e u r o l . , V o l . 2 , p p . 6 0 5 - 6 1 3 , 2 0 0 3 ) 。

10

20

30

40

50

## 【0008】

C S F中のh - タウを定量するために、モノクローナル抗体を使用するイムノアッセイが開発されている ( H a m p e l ら , 前掲 ; および K a n g ら , C l i n i c a l C h e m . , V o l . 5 9 , p p . 9 0 3 - 9 1 6 , 2 0 1 3 ) 。 C S F中のh - タウの分子的不均一性および低濃度、ならびにA Dの種々の病期の患者でのA Dの診断におけるh - タウバイオマーカーの重要性および将来の認知機能低下を予測するためのその使用を考慮すると、C S Fにおけるh - タウの全アイソフォームを正確に定量しうる詳細に特徴づけられたアッセイを開発することが尚も絶えず必要とされている。

## 【発明の概要】

## 【0009】

発明の概括

本発明は、h - タウの6個の公知アイソフォーム、すなわち、h - タウ - 4 4 1、4 1 2、4 1 0、3 8 3、3 8 1および3 5 2 ( 以下の表 1 に示されている、それぞれ配列番号 2 ~ 7 ; 図 1 も参照されたい ) におけるアミノ酸配列において保存されたh - タウの領域 ( アミノ酸 1 0 4 - 2 7 7 ) 内のエピトープに特異的に結合する抗体、特にモノクローナル抗体 ( m A b ) に関する。



【表1】

表1. h-タウアイソフォーム、タウ166ペプチド、A $\beta$ 1-142ペプチド、  
 アミロイドベータA4タンパク質アイソフォームA前駆体、  
 mAbs10H8、19G10及びAT120が特異的に結合するh-タウのエピトープ並びに  
 mAbAT120に対して反応性/非反応性のh-タウのアミノ酸配列；  
 タウ166ペプチドをコードする核酸配列

ヒトタウアイ フォーム又は ペプチド	アミノ酸配列	配列 番号
タウアイソフォーム 2-441 (太字の HISタグ及び 斜字の TEV 切断部位を 含む)	<b>MHHHHHHHDYDIPTTENLYFQ</b> MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDR KDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEdgSEEPGSETSDAKST PTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLED EAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP GQKQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGS RSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKN VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVP GGGSVQIVYKPVDSLKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDK DRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIV YKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQ GL	1
タウアイソフォーム 2-441 (NCBI 受託番号 NP 005901.2)	MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGL KESPLQTPTEdgSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAA AQPHTTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTG SDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIPAKTPPAPKTP PSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVR TPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQI INKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVT SKCG SLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN KIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGS IDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	2
タウアイソフォーム 5-412 (NCBI 受託番号 NP 0011165 39.1)	MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTD AGLKESPLQTPTEdgSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAEAGIG DTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGK KIATPRGAAPPGQKQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEP KSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVV RTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVKSKIGSTENLKHQ PGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIV YKPVDSLKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDR VQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHG AEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMVDS PQLATLA DEV SASLAKQGL	3

10

20

30

タウアイソフォーム 8-410 (NCBI 受託番号 NP 001190181. 1)	MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD AGLKESPLQPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLV DEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP GQKQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSP GSPGTPGSRRTPSLPTPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK SRLQTAPVMPDLKKNVSKIGSTENLKHQGGGKVQIVYK PVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQ SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRNAAKAKTDHGAE IVYKSPVVSAGDTSRHLNSVSTGSIDMVDSPLATLADE VSASLAKQGL	4	10
タウアイソフォーム 3-383 (NCBI 受託番号 NP 058518.1)	MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD AGLKAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGS DKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIPAKTPPA PKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPT PTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVKS KIGSTENLKHQGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIK HVPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN HHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN KKIETHKLTFRNAAKAKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTSRHL NSVSTGSIDMVDSPLATLADEVSASLAKQGL	5	20
タウアイソフォーム 7-381 (NCBI 受託番号 NP 001190180. 1)	MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD AGLKESPLQPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIG DTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGK KIATPRGAAPPGQKQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEP KSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPTPTREPKKVAVV RTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKIGSTENLKHQ PGGGKVQIVYKPVLDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVK SEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFR NAKAKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTSRHLNSVSTGSIDMV DSPQLATLADEVSASLAKQGL	6	30
タウアイソフォーム 4-352 (NCBI 受託番号 NP 058525.1)	MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD AGLKAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGS DKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIPAKTPPA PKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPT PTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVKS KIGSTENLKHQGGGKVQIVYKPVLDLSKVTSKCGSLGNIH HKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN KKIETHKLTFRNAAKAKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTSRHL NSVSTGSIDMVDSPLATLADEVSASLAKQGL	7	40
タウ 166 ペプチド (太字の HISタグ及び 斜字のTEV 切断部位を 含む)	<b>MSYYHHHHHH</b> <i>DYDIPTTENLYFQ</i> GEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQA RMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATR IPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPT REPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKIGSTENL KHQ	8	40

ﾀﾞ166 ﾊﾟﾌﾟﾄ (h-ﾀﾞ1の AA104 - AA269)	EEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKT KIATPRGAAPPQKQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYS SPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAP VPMPDLKNVKSIGSTENLKHQ	9
ﾀﾞ166核酸  (太字の ﾀﾞ166質を ｺｰﾄﾞする 配列)	GAAGAAGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGC TGCTGGTCACGTGACCCAAGCTCGCATGGTCAGTAAAAGCAAAGA CGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATGGTA AAACGAAGATCGCCACACCCGCGGGGAGCAGCCCCCAGGCCAG AAGGGCCAGGCCAACGCCACCGAGGATTCCAGCAAAAACCCCGCCC GCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAATCAGGG GATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGC AGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGC CCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTC CGCCAAGAGCCGCTGCAGACAGCCCCCGTGCCCATGCCAGACCT GAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCA CCAG	10
10H8 mAbの ﾈﾟｰﾌﾟ	TREPK	11
19G10 mAb120の ﾈﾟｰﾌﾟ	PKSGDR	12
米国特許第 5,861,257号 に記載のmAb AT120の ﾈﾟｰﾌﾟ	PPTREPK	13
米国特許第 5,861,257 号に記載の mAb AT120 と反応する ﾊﾟﾌﾟﾄ 配列	PPTREPKKVAVV	14
米国特許第 5,861,257 号に記載の mAb AT120 に非反応性 であった ﾊﾟﾌﾟﾄ 配列	PTREPKKVAVV	15
mAb 1-11-3の ﾈﾟｰﾌﾟ	GLMVGGVVIA	16

10

20

30

40

mAb 6E10の エピトープ	EFRHDS	17
Aβ <sub>1-42</sub> ペプチド	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA	18
アミロイドβペプ タA4タンパク質 アイソフォームa 前駆体 [ホモサヒェンス] (NCBI 受託番号 NP_ 000475.1)	MLPGLALLLLAAWTARALEVPTDGNAGLLAEPQIAMFCGRLNMH MNVQNGKWSDSPSGTKTCIDTKEGILQYCQEVYPELQITNVVEAN QPVTIQNWCKRGRKQCKTHPHFVIPYRCLVGEFVSDALLVPDKCKF LHQERMDVCETHLHWHTVAKETCSEKSTNLHDYGMLLPCGIDKFR GVEFVCCPLAEESDNVDSADAEEDSDVWW GGADTDYADGSEDKVVVEVAEEEEVAEVEEEEADDDDEDDEDGDEV EEEAEPEYBEATERTTSIATTTTTTTTTEVVEEVVREVCSEQAETGPCRA MISRWFYFDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEYCMAVCGSAMS QSLKTTQEPLARDPVKLPPTAASTPDAVDKYLETPGDENEHAHFQ KAKERLEAKHRERMSQVMREWEEAERQA KNLPKADKKAIVIQHFQEKVESLEQEAANERQQLVETHMARVEAML NDRRLALENYITALQAVPPRPRHVFNMLKKYVRAEQKDRQHTLK HFEHVRMVDPKKAAQIRSQVMTHLRVIYERMNQSLSLLYNVPAVA EEIQDEVDELLOKEQNYSDDLANMISEPRISYGNLALMPSLTETKT TVELLPVNGEFLSDDLQPWHSFGADSV ANTENEVEPVDARPAADRGLTTRPGSGLTNIKTEEISEVKMDAEFR HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG AIIGLMVGGGVVIATVIVITLVMLKKKQYTSIHGVEVDAAVTPEER HLSKMQQNGYENPTYKFFEQMQN	19

10

20

【0010】

本発明者らは、h - タウアッセイにおいて一緒に使用された場合に、CSF中のh - タウの6つのアイソフォームの全てを定量するのに必要な感度（分析性能）および健常対照からAD患者を識別する能力（診断性能）（特に、AD治療用物質での治療のための患者を選択することを目的としたもの）の両方を有する抗体のペアの開発に関心を持った。前記特性を有する抗体のペアを得るために、3つの免疫原、すなわち、h - タウ441、h - タウ352およびタウ166ペプチド（これは、h - タウの保存領域のアミノ酸104 - 269（配列番号9）に伸長する合成ペプチドである）を使用した。本発明者らは、免疫原としてタウ166ペプチドを使用した場合、その他の2つの免疫原を使用して産生された親クローンの量と比較して、h - タウの保存領域に特異的に結合する抗体を有する、より多数の親クローンが産生されることを見出した。特に、h - タウの保存領域に特異的な抗体に関して該クローンをスクリーニングした際に、免疫原としてタウ166ペプチドを使用して産生され該保存領域に特異的である2つの新規mAb 10H8および19G10を特定した。mAb 10H8は、h - タウのアミノ酸220 - 224に対応する5アミノ酸エピトープTRPK（配列番号11）に特異的に結合する。mAb 19G10は、h - タウのアミノ酸189 - 194に対応する6アミノ酸エピトープPKSGDR（配列番号12）に特異的に結合する（mAb 10H8および19G10のエピトープのアミノ酸配列に関しては、それぞれ、表2および3も参照されたい）。特に、h - タウアッセイにおける検出抗体としてのmAb 19G10と捕捉抗体としてのmAb 10H8とをペアにした場合、このようにしてペアにされたmAb 10G8および19G10は、CSF中のh - タウの全アイソフォームの定量に関して、8つの異なる抗体ペアのうちで最高の臨床感度および特異性の両方を、そしてh - タウに対して産生されたmAbの他のペアと比較して、AD患者を正常患者から識別する最高の能力を示すことを、本発明者らは見出した（実施例1）。抗体の産生のための免疫原としてアイソフォームh - タウ441およびh - タウ352を使用することは公知であるが、h - タウの全アイソフォームを認識してCSF中のそれらの定量を可能にする抗体を選択的に産生させるための免疫原としてタウ166ペプチドを使用することは初めてだと考えられる。

30

40

【0011】

50

1つの態様においては、本発明は、アミノ酸220 - 224（アミノ酸220から224まで）（配列番号11）からなるh - タウのエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。

【0012】

1つの実施形態においては、h - タウのアミノ酸220 - 224からなるエピトープに結合する単離された抗体または抗原結合性フラグメントは配列番号20（CDRL1）、配列番号21（CDRL2）および配列番号22（CDRL3）の3個の軽鎖CDRならびに配列番号26（CDRH1）、配列番号27（CDRH2）および配列番号28（CDRH3）の3個の重鎖CDRまたは該抗体の変異体を含む。1つの実施形態においては、該抗体の変異体は前記CDRの1以上における1、2、3、4、5および6個のアミノ酸置換を含むが、アミノ酸220 - 224（配列番号11）からなるh - タウのエピトープに結合する能力を保有している。

10

【0013】

もう1つの実施形態においては、h - タウのアミノ酸220 - 224からなるエピトープに結合する単離された抗体または抗原結合性フラグメントは配列番号24の軽鎖可変領域および配列番号30の重鎖可変領域または該抗体の変異体を含む。1つの実施形態においては、該抗体の変異体はこれらの配列の一方または両方における1 ~ 20個のアミノ酸置換を含むが、アミノ酸220 - 224（配列番号11）からなるh - タウのエピトープに結合する能力を保有している。

【0014】

20

もう1つの態様においては、本発明は、アミノ酸189 - 194（配列番号12）からなるh - タウのエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。

【0015】

もう1つの実施形態においては、h - タウのアミノ酸189 - 194からなるエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントは配列番号32（CDRL1）、配列番号33（CDRL2）および配列番号34（CDRL3）の3個の軽鎖CDRならびに配列番号38（CDRH1）、配列番号39（CDRH2）および配列番号40（CDRH3）の3個の重鎖CDRまたは該抗体の変異体を含む。1つの実施形態においては、該抗体の変異体は前記CDRの1以上における1、2、3、4、5および6個のアミノ酸置換を含むが、アミノ酸189 - 194（配列番号12）からなるh - タウのエピトープに結合する能力を保有している。

30

【0016】

もう1つの実施形態においては、h - タウのアミノ酸189 - 194からなるエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントは配列番号36の軽鎖可変ドメインおよび配列番号42の重鎖可変ドメインまたは該抗体の変異体を含む。1つの実施形態においては、該抗体の変異体はこれらの配列の一方または両方における1 ~ 20個のアミノ酸置換を含むが、アミノ酸189 - 194（配列番号12）からなるh - タウのエピトープに結合する能力を保有している。

【0017】

40

他の態様においては、本発明は、これらの抗体の可変軽鎖および重鎖をコードする核酸、これらの核酸を含む発現ベクター、該発現ベクターを含む宿主、および該抗体またはその抗原結合性フラグメントの製造方法を提供する。

【0018】

もう1つの態様においては、本発明は、特に、本発明の抗体を製造するための免疫原としての使用のための、単離されたタウ166ペプチド（配列番号9）を提供する。1つの実施形態においては、本発明はまた、タウ166ペプチドをコードする核酸でトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

【0019】

もう1つの態様においては、本発明は、前記抗体の一方または両方を使用してh - タウ

50

を定量するための方法、ならびに A D の診断における、および A D 治療用物質、例えば B A C E - 1 インヒビターでの治療のための A D 患者の選択における使用のための、これらの抗体を含むキットを提供する。

【 0 0 2 0 】

1 つの実施形態においては、本発明は、アルツハイマー病を有する疑いのある患者においてアルツハイマー病を診断するための方法であって、該方法が、

( a ) 該患者の脳脊髄液サンプル中のヒトタウの量を定量し、この場合、これを、

( 1 ) ( i ) 配列番号 2 0 ( C D R L 1 )、配列番号 2 1 ( C D R L 2 ) および配列番号 2 2 ( C D R L 3 ) の 3 個の軽鎖 C D R ならびに配列番号 2 6 ( C D R H 1 )、配列番号 2 7 ( C D R H 2 ) および配列番号 2 8 ( C D R H 3 ) の 3 個の重鎖 C D R を含む抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは該抗体の変異体、ならびに

( i i ) 配列番号 2 4 の軽鎖可変領域および配列番号 3 0 の重鎖可変領域を含む単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは該抗体の変異体からなる群から選択される、h - タウのアミノ酸 2 2 0 - 2 2 4 からなるエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメント（ここで、該抗体または抗原結合性フラグメントは固体支持体上に固定化されている）と該サンプルを、捕捉抗体 / タウ複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、該サンプルからのヒトタウを捕捉し、

( 2 ) ( i ) 配列番号 3 2 ( C D R L 1 )、配列番号 3 3 ( C D R L 2 ) および配列番号 3 4 ( C D R L 3 ) の 3 個の軽鎖 C D R ならびに配列番号 3 8 ( C D R H 1 )、配列番号 3 9 ( C D R H 2 ) および配列番号 4 0 ( C D R H 3 ) の 3 個の重鎖 C D R を含む抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは該抗体の変異体、ならびに

( i i ) 配列番号 3 6 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 4 2 の重鎖可変ドメインを含む抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは該抗体の変異体からなる群から選択される、アミノ酸 1 8 9 - 1 9 4 からなるエピトープに特異的に結合する検出可能な様態で標識された抗体または抗体フラグメントと該捕捉抗体 / タウ複合体を、捕捉抗体 / タウ / 検出可能標識抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、捕捉されたタウを検出することにより行い、

( b ) 工程 ( a ) におけるヒトタウの濃度を決定することを含み、ここで、1 8 4 p g / m L より大きな値が該患者における A D の診断を示す、方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

アルツハイマー病を有する疑いのある患者においてアルツハイマー病を診断する前記方法のもう 1 つの実施形態においては、該方法は更に、

( c ) 該患者の脳脊髄液サンプル中の A<sub>1-42</sub> の量を定量し、

( d ) 該患者のサンプルにおけるヒトタウ / A<sub>1-42</sub> の比を決定することを含み、ここで、0 . 2 1 5 より大きな比の値は該患者における A D の診断を示す。

【 0 0 2 2 】

更にもう 1 つの態様においては、アルツハイマー病の治療を要する患者におけるアルツハイマー病の治療方法を提供する。該方法は、

( a ) 前記診断方法を用いて、治療を要する患者を選択し、

( b ) A D 治療用物質の治療的有効量を該患者に投与することを含む。

【 0 0 2 3 】

アルツハイマー病を治療する前記方法の 1 つの実施形態においては、A D 治療用物質は、構造

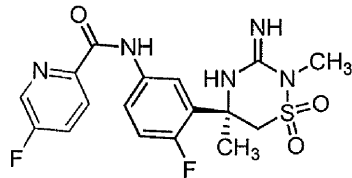
10

20

30

40

## 【化1】



## 【0024】

を有するBACE-1インヒビター、その互変異性体または該化合物もしくは互変異性体の医薬上許容される塩である。

## 【0025】

発明の詳細な説明

## 定義

本発明がより容易に理解されうるように、ある科学技術用語を以下に明確に定義する。本明細書中の他の箇所で特に定められていない限り、本明細書中で用いる全ての他の科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されている意味を有する。

## 【0026】

添付の特許請求の範囲を含む本出願において用いる単数形表現は、文脈に明らかに矛盾しない限り、その複数形対象物を含む。

## 【0027】

「A<sub>1-42</sub>ペプチドまたはA<sub>1-42</sub>」は、 $\beta$ -および $\gamma$ -セクレターゼによるアミロイドベータA4タンパク質アイソフォーム $\alpha$ 前駆体タンパク質(配列番号19)のタンパク質分解切断により産生される、アミノ酸672-713に対応する42アミノ酸のペプチド(配列番号18)を意味する。

## 【0028】

AD治療用物質の「投与」または「投与する」は、治療を要する患者にAD治療用物質を与えることを意味する。

## 【0029】

本明細書中で用いる「アルツハイマー病またはAD」は、脳内のA $\beta$ 斑またはNFTの形成または沈着に関連したニューロン分解から生じる認知症または認知障害の範囲を意味し、前臨床アルツハイマー病、アルツハイマー病による軽度認知障害、早発性アルツハイマー病、家族性アルツハイマー病(これらに限定されるものではない)を含むアルツハイマー病の範囲から、アルツハイマー病による認知症の進行性認知障害(Jackら, Alzheimer's Dement., May 7(3), pp. 257-262, 2011)およびApo4対立遺伝子の存在に関連した疾患までを包含する。

## 【0030】

本明細書中で用いる「AD治療用物質」は、ADまたはその症状の根本的な病態生理の1以上に対処する治療または介入を意味する。

## 【0031】

AD治療用物質の例には、限定的なものではないが以下のものが含まれる: 本明細書に記載されているBACE-1インヒビター、BACE-1インヒビターCTS-21166 (CoMentis Inc.)、AZD3293 (AstraZeneca)、E-2609 (Eisai)、TAK-070 (Takeda) およびHPP-854 (TransTech)、ガンマセクレターゼインヒビター(例えば、WO2007/084595 およびWO2009/008980に記載されているもの)、ガンマセクレターゼモジュレーター(例えば、WO2008/153793 およびWO2010/056849に記載されているもの)、ソラネズマブ(solanezumab) (Eli Lilly)、リラグルチド(liraglutide) (Lancaster University)、ベキサロテン(bexarotene) (商標名Targretin (登録商標))、ACC-001 (ワクチン)、ムスカリンアンタゴニスト(例えば、m<sub>1</sub>アゴニスト(例えば、アセチルコリン、オキソトレモリン(oxotremorine)、カル

10

20

30

40

50

バコール (carbachol) または McNA343) または m<sub>2</sub> アンタゴニスト (例えば、アトロピン、ジシクロベリン (dicycloverine)、トルテロジン (tolterodine)、オキシブチニン (oxybutynin)、イプラトロピウム (ipratropium)、メクトラミン (methoctramine)、トリピタミン (tripitamine) またはガラミン (gallamine)); コリンエステラーゼインヒビター (例えば、アセチル - および / または ブチリルコリンエステラーゼインヒビター、例えば、ドネペジル (donepezil) (Aricept (登録商標))、ガランタミン (galantamine) (Razadyne (登録商標)) および リバスタジミン (rivastigimine) (Exelon (登録商標)); N - メチル - D - アスパラギン酸受容体アンタゴニスト (例えば、Namenda (登録商標) (メマンチン (memantine) HCl; Forrest Pharmaceuticals, Inc. から入手可能); コリンエステラーゼインヒビターと N - メチル - D - アスパラギン酸受容体アンタゴニストとの組合せ; 非ステロイド抗炎症剤; 神経炎症を軽減しうる抗炎症剤; 抗アミロイド抗体 (例えば、バピニューゼマブ (bapineuzemab)、Wyeth/Elan); ビタミン E; ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト; CB1 受容体インバースアゴニストまたは CB1 受容体アンタゴニスト; 抗生物質; 成長ホルモン分泌促進物質; ヒスタミン H<sub>3</sub> アンタゴニスト; AMPA アゴニスト; PDE4 インヒビター; GABA<sub>A</sub> インバースアゴニスト; アミロイド凝集のインヒビター; グリコーゲンシンターゼキナーゼベータインヒビター; アルファセクレターゼ活性の促進物質; PDE-10 インヒビター; タウキナーゼインヒビター (例えば、GSK3 ベータインヒビター、cdk5 インヒビターまたは ERK インヒビター); タウ凝集インヒビター (例えば、Remember (登録商標)); RAGE インヒビター (例えば、TTP 488 (PF-4494700)); 抗ベータアミロイドワクチン; APP リガンド; インスリンをアップレギュレーションする物質、コレステロール低下剤、例えば HMG-CoA レダクターゼインヒビター (例えば、スタチン、例えば、アトルバスタチン (Atorvastatin)、フルバスタチン (Fluvastatin)、ロバスタチン (Lovastatin)、メバスタチン (Mevastatin)、ピタバスタチン (Pitavastatin)、プラバスタチン (Pravastatin)、ロスバスタチン (Rosuvastatin)、シンバスタチン (Simvastatin)) および / または コレステロール吸収インヒビター (例えば、エゼチミブ (Ezetimibe))、または HMG-CoA レダクターゼインヒビターとコレステロール吸収インヒビターとの組合せ (例えば、Vytorin (登録商標)); フィブラート (fibrate) (例えば、クロフィブラート (clofibrate)、クロフィブリド (Clofibrate)、エトフィブラート (Etofibrate) および アルミニウムクロフィブラート); フィブラート および コレステロール低下剤 および / または コレステロール吸収インヒビターの組合せ; ニコチン受容体アゴニスト; ナイアシン; ナイアシン および コレステロール吸収インヒビター および / または コレステロール低下剤の組合せ (例えば、Simcor (登録商標) (ナイアシン / シンバスタチン; Abbott Laboratories, Inc. から入手可能); LXR アゴニスト; LRP 模倣物質; H<sub>3</sub> 受容体アンタゴニスト; ヒストンデアセチラーゼインヒビター; hsp90 インヒビター; 5-HT<sub>4</sub> アゴニスト (例えば、PRX-03140 (Epix Pharmaceuticals)); 5-HT<sub>6</sub> 受容体アンタゴニスト; mGluR1 受容体モジュレーターまたはアンタゴニスト; mGluR5 受容体モジュレーターまたはアンタゴニスト; mGluR2/3 アンタゴニスト; プロスタグランジン EP<sub>2</sub> 受容体アンタゴニスト; PAI-1 インヒビター; ベータアミロイド (Aβ) 流出を誘導しうる物質、例えば ゲルソリン (gelsolin); 金属 - タンパク質減弱化合物 (例えば、PBT2); および GPR3 モジュレーター; および 抗ヒスタミン物質、例えば ジメボリン (Dimebolol) (例えば、Dimebon (登録商標), Pfizer)。

#### 【0032】

本明細書中で用いる「抗体」なる語は、所望の生物活性を示す、抗体の任意の形態を意

10

20

30

40

50



味しうる。したがって、それは最も広い意味で用いられ、特に、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト化完全ヒト抗体、キメラ抗体およびラクダ化単ドメイン抗体（これらに限定されるものではない）を含む。

#### 【0033】

一般に、基本的な抗体構造単位は四量体を含む。各四量体は、ポリペプチド鎖の、2つの同一ペアを含み、各ペアは1つの「軽」鎖（約25kDa）および1つの「重」鎖（約50~70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識をもたらす約100~110個またはそれ以上のアミノ酸の変領域を含む。重鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主にもたらす定常領域を定めうる。典型的には、ヒト軽鎖はカッパおよびラムダ軽鎖として分類される。更に、ヒト重鎖は、典型的には、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファまたはイプシロンとして分類され、それぞれIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとしての、抗体のアイソタイプを定める。軽鎖および重鎖においては、変領域および定常領域は約12個以上のアミノ酸の「J」領域により連結されており、重鎖は約10個以上のアミノ酸の「D」領域をも含む。全般的には、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W. 編, 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))を参照されたい。

10

#### 【0034】

各軽/重鎖ペアの変領域は抗体結合部位を形成する。したがって、一般に、無傷抗体は2つの結合部位を有する。二官能性または二重特異性抗体の場合を除き、それらの2つの結合部位は一般に同じである。

20

#### 【0035】

典型的には、重鎖および軽鎖の両方の可変ドメインは、比較的保存されたフレームワーク領域（FR）内に位置する、相補性決定領域（CDR）とも称される3つの超可変領域を含む。CDRは、通常、特定のエピトープへの結合が可能になるように、フレームワーク領域により整列されている。一般に、N末端からC末端方向に、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方はFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の帰属は、一般に、Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabatら; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5<sup>th</sup> ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32: 1-75; Kabatら (1977) J. Biol. Chem. 252: 6609-6616; Chothiaら (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917またはChothiaら (1989) Nature 342: 878-883の定義に基づいている。

30

#### 【0036】

本明細書中で用いる「超可変領域」なる語は、抗原結合をもたらす、抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は「相補性決定領域」または「CDR」（すなわち、軽鎖可変ドメイン内のCDRL1、CDRL2およびCDRL3ならびに重鎖可変ドメイン内のCDRH1、CDRH2およびCDRH3）からのアミノ酸残基を含む。Kabataら (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.（配列により抗体のCDR領域を定めている）を参照されたい。また、ChothiaおよびLesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917（構造により抗体のCDR領域を定めている）も参照されたい。本明細書中で用いる「フレームワーク」または「FR」残基なる語は、CDR残基として本明細書中で定義されている超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を意味する。

40

#### 【0037】

本明細書中で用いる抗体10H8は、以下の表2に記載されている軽鎖および重鎖可変

50

領域（それぞれ配列番号24および30）を含む、ハイブリドーマサブクローンMEBクローン10H8.25.6.10H8（マウスIgG1アイソタイプ）により産生される抗体である。

【表2】

表2. モノクローナル抗体10H8の特性

抗体の特徴	アミノ酸配列又は核酸配列	配列番号
軽鎖		
CDRL1	RSSQNIHSNGSTYLE	20
CDRL2	KVSNRFS	21
CDRL3	FQGSHPWT	22
リーダー配列	MKLPVRLLVLMFWIPASSS	23
可変領域 (CDRは 太字、 FRは 斜字)	<i>DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIHSNGSTYLEWYLQ</i> <i>KPGQSPKLLIYKVS<b>NRFS</b>GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE</i> <i>DLGIYYC<b>FQGSHPWT</b>FGGGTKLEIK</i>	24
可変領域 をコード する	<i>GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTC</i> <i>TTGGAGATCAAGCTCCATCTCTTGC<b>AGATCTAGTCAGAACAT</b></i> <i>TATACATAGTAATGGAAGCACCTATTTAGAA<b>TGGTACCTGCAG</b></i>	

10

20

DNA配列 (CDRは 太字、FRは 斜字)	AAACCGGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTAC <b>AAAGTTTCCA</b> <b>ACCGATTTTCT</b> GGGGTCCAGACAGGTT <b>CAGTGGCAGTGGATC</b> AGGGACAGATTT <b>CACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAG</b> GATCTGGGAATTTATTACTGCTTT <b>CAAGGTTACACATGTTCCGT</b> <b>GGACGTT</b> CGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA	25
重鎖		
CDRH1	GFNIKDEYMN	26
CDRH2	WIDPENGDAAYASKFQG	27
CDRH3	FYSNYDGYFDV	28
リーガー配列	MKCSWVIFFLMAVVIGVNS	29
可変領域 (CDRは 太字、FRは 斜字)	<i>EVQLQQSGAELVLRPGASVKLSCTASGFNIKDEYMNWVKQRP</i> <i>GLEWIGWIDPENGDAAYASKFQ</i> <b>Q</b> <i>KATMTADTSSNTAYLQLSSL</i> <i>TSED</i> <b>AVYFCTFFYSNYDGYFDV</b> <i>WGAGTTVTVSS</i>	30
可変領域 をコード する DNA配列  (CDRは 太字、FRは 斜字)	<i>GAGGTT</i> <b>CAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGGCCAG</b> <i>GGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTTAACAT</i> <b>TAAAGACGAGTATATGAAC</b> <i>TGGGTGAAGCAGAGGCCCTGAACGG</i> <i>GGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAAAATGGTGATG</i> <b>CTGCATATGCCTCGAAGTTCCAGGGAAAGGCCACTATGACTGC</b> <i>AGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTG</i> <i>ACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTTCTGTACTTTCTTTTACA</i> <b>GTA</b> <b>ACTACGACGGGTACTTCCGATGTC</b> <i>TGGGGCGCAGGGACCAC</i> <i>GGTCACCGTCTCCTCA</i>	31

10

20

30

## 【 0 0 3 8 】

本明細書中で用いる抗体 19G10 は、以下の表 3 に記載されている軽鎖および重鎖可変領域（それぞれ配列番号 36 および 42）を含む、ハイブリドーマサブクローン MEB . 19G10 . 10 . 5（マウスアイソタイプ IgG2b）により産生される抗体である。

【表 3】

表3. モノクローナル抗体19G10の特性

抗体の特徴	アミノ酸配列又は核酸配列	配列番号
軽鎖		
CDRL1	KSSQSLLYSNNQKNYLA	32
CDRL2	WASTRES	33
CDRL3	QQYYSYPLWT	34
リーダー配列	MDSQAQVLMLLLLWVSGTCG	35
可変領域 (CDRは 太字、 FRは斜字)	<i>DI</i> VMSQSPSSLAVSIGEKVTMSCK <b>S</b> QSLLYSNNQKNYLAWYQ <i>R</i> KPGQSPKLLI <b>W</b> ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTITSVKA <i>E</i> DLAVYYC <b>Q</b> QYYSYPLWTFGGGTKLEIK	36
可変領域 をコード する DNA配列  (CDRは 太字、 FRは斜字)	<i>G</i> ACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAA <i>T</i> TGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTG <b>C</b> AAGTCCAGTCAGAGCCT <b>T</b> TTATATAGTAACAATCAA <b>A</b> AGAACTACTTGGCCTGGTACCAG <i>C</i> GGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACT <b>G</b> GGCAT <b>C</b> CACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG <i>A</i> TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTGTGAAGGCT <i>G</i> AAGACCTGGCAGTTTATTACTGT <b>C</b> AGCAATATTATAGTTATC <b>C</b> TCTGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA	37
重鎖		
CDRH1	GFSLSTSGMGVG	38
CDRH2	HIWWDDDKYYNAVLKS	39
CDRH3	IGIDGPYAMDY	40
リーダー配列	MGRLTSSFLLLIVPAYVLS	41

10

20

30

可変領域 (CDRは 太字、 FRは斜字)	<i>QVTLKESGPGILQPSQTL<sup>SL</sup>TCSFSGFSL<sup>ST</sup>SGMGV<sup>GW</sup>IRQPS GKGLEWLAHIWDDDKYYNAVLK<sup>SR</sup>LTI<sup>SK</sup>DT<sup>SK</sup>NQVFLKIAS VDTADTATYYCARIGIDGPYAM<sup>DY</sup>WGQ<sup>GS</sup>TSVTVSS</i>	42
可変領域 をコード する DNA配列  (CDRは 太字、 FRは斜字)	<i>CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCT CCCAGACCCCTCAGTCTGACTTGTCTTTCTCTGGGTTTTCACT GAGCACTTCTGGTATGGGTGTAGGC<sup>TGGATT</sup>CGTCAGCCTTCA GGGAAGGGTCTGGAATGGCTGGCACACATT<sup>TGGTGGGATGATG</sup> ATAAGTACTATAACGCAGT<sup>CCTGAAGAGC</sup>CGGCTCACAATCTC CAAGGATACCTCCAAAAACCAGGTTTTCTCAAGATCGCCAGT GTGGACACTGCAGATACTGCCACATATTACTGTGCTCGAATAG GGATTGATGGTCTTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAAC CTCAGTCACCGTCTCCTCA</i>	43

10

20

30

40

50

## 【0039】

本明細書中で用いる抗体が「h - タウ上のエピトープに特異的に結合する」と言えるのは、それがh - タウの公知の6個のアイソフォーム上のそのエピトープには結合するが、h - タウ上の他のエピトープには結合しない場合である。

## 【0040】

本明細書中で用いる抗体が「A<sub>1-42</sub>のN末端またはC末端のエピトープに特異的に結合する」と言えるのは、それがそのエピトープには結合するが、A<sub>1-42</sub>上の他のエピトープには結合しない場合である。

## 【0041】

本明細書中で用いる「抗体フラグメント」または「抗原結合性フラグメント」は、抗体の抗原結合性フラグメント、すなわち、完全長抗体により結合される抗原に特異的に結合する能力を保有する抗体フラグメント、例えば、1以上のCDR領域を保有するフラグメントを意味する。抗体結合性フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>およびFvフラグメント；ジアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子、例えばscFv；ナノボディ（登録商標）、ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されるものではない。

## 【0042】

1つの実施形態においては、該抗体または抗原結合性フラグメントは重鎖定常領域、例えばヒト定常領域、例えば1、2、3もしくは4ヒト重鎖定常領域またはそれらの変異体を含む。もう1つの実施形態においては、該抗体または抗原結合性フラグメントは、軽鎖定常領域、例えばヒト軽鎖定常領域、例えばラムダもしくはカッパヒト軽鎖領域またはそれらの変異体を含む。例えば、限定的なものではないが、ヒト重鎖定常領域は1であることが可能であり、ヒト軽鎖定常領域はカッパであることが可能である。

## 【0043】

本明細書中で用いる「生物学的サンプル」はいずれかのタイプの流体または組織サンプルを意味する。本発明におけるアッセイにおいて使用されうる典型例としては、全血、血漿、血清、尿、脳脊髄液（CSF）および脳組織の抽出物が挙げられる。

## 【0044】

本明細書中で用いる「捕捉抗体」は、h - タウを構成するアイソフォームの全てを生物学的サンプルから回収するために、開示されているアッセイにおいて使用される抗体を意味する。1つの態様においては、本明細書中で用いる捕捉抗体は、アミノ酸TREP K（アミノ酸220 - 224、配列番号11）からなるh - タウ上のエピトープに特異的に結合する。1つの実施形態においては、h - タウ上の前記エピトープに結合する捕捉抗体はmAb 10H8である。もう1つの態様においては、本明細書中で用いる捕捉抗体はA<sub>1-42</sub>のN末端および/またはC末端のエピトープに特異的に結合する。1つの実施

形態においては、捕捉抗体は、アミノ酸 G L M V G G V V I A (配列番号 18 のアミノ酸 33 - 42 に対応する配列番号 16) を含む A<sub>1-42</sub> の C 末端のエピトープに特異的に結合する。もう 1 つの実施形態においては、A<sub>1-42</sub> 上の前記エピトープに結合する捕捉抗体はウサギ mAb<sub>1-11-3</sub> である。

【0045】

本明細書中で用いる「制御配列」なる語は、特定の宿主生物における機能的に連結されたコード配列の発現に必要な DNA 配列を意味する。原核生物に適した制御配列には、例えば、プロモーター、所望により、オペレーター配列、およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを用いることが公知である。

10

【0046】

「検出可能な様態で標識された抗体」は、抗体を検出する試薬で標識された抗体を意味する。該試薬には、放射性同位体、酵素、ビオチン、色素、蛍光標識および化学発光標識(後記のとおり)が含まれるが、これらに限定されるものではない。「検出可能な様態で標識された抗体」は、捕捉抗体により保持された h-タウまたは A<sub>1-42</sub> の量を検出するために使用される。1 つの様態においては、本明細書中で用いる検出可能な様態で標識された抗体は、アミノ酸 189 - 194 (PKSGDR、配列番号 12) からなる、h-タウ上のエピトープに特異的に結合する。1 つの実施形態においては、h-タウ上の前記エピトープに特異的に結合する検出可能な様態で標識された抗体は mAb<sub>19G10</sub> である。もう 1 つの様態においては、本明細書中で用いる検出可能な様態で標識された抗体は A B<sub>1-42</sub> の N 末端および/または C 末端のエピトープに特異的に結合する。1 つの実施形態においては、検出可能な様態で標識された抗体は、アミノ酸 E F R H D S (アミノ酸 3 - 8、配列番号 17) を含む、A<sub>1-42</sub> の N 末端のエピトープに特異的に結合する。もう 1 つの実施形態においては、A<sub>1-42</sub> の前記エピトープに結合する検出可能な様態で標識された抗体は mAb<sub>6E10</sub> である。

20

【0047】

「ジアボディ」は、2 つの抗原結合部位を有する小型抗体フラグメントを意味し、該フラグメントは、同一ポリペプチド鎖内で軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に連結された重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を含む(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>またはV<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>)。同一鎖上の 2 つのドメイン間のペア形成を可能にするには短すぎるリンカーを用いることにより、それらのドメインは別の鎖の相補的ドメインとのペア形成を強要され、2 つの抗原結合部位を形成する。ジアボディは、例えば E P<sub>404,097</sub>、W O<sub>93/11161</sub> および H o l l i g e r ら (1993) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90:6444-6448 に更に詳しく記載されている。操作された抗体変異体の概説としては、全般的には、H o l l i g e r および H u d s o n (2005) N a t . B i o t e c h n o l , 23:1126-1136 を参照されたい。

30

【0048】

「ドメイン抗体」なる語は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する免疫学的に機能性の免疫グロブリンフラグメントである。幾つかの場合には、2 以上の V<sub>H</sub> 領域がペプチドリンカーにより共有結合されて 2 価ドメイン抗体を形成する。2 価ドメイン抗体の、2 個の V<sub>H</sub> 領域は、同じまたは異なる抗原を標的化する。

40

【0049】

「エピトープ」は、本発明の抗 h-タウ抗体または他の抗 h-タウ抗体により認識され結合される、h-タウ上のアミノ酸のセグメント、あるいは抗体により認識され結合される、A<sub>1-42</sub> 上のアミノ酸のセグメントを意味する。

【0050】

「Fab フラグメント」は 1 個の軽鎖ならびに 1 個の重鎖の C<sub>H1</sub> および可変領域から構成される。Fab 分子の重鎖は別の重鎖分子とはジスルフィド結合を形成し得ない。「Fab フラグメント」は抗体のパパイン切断の産物でありうる。

【0051】

50

「F<sub>c</sub>」領域は、抗体のC<sub>H</sub>1およびC<sub>H</sub>2ドメインを含む2個の重鎖フラグメントを含有する。それらの2個の重鎖フラグメントは2以上のジスルフィド結合により、およびC<sub>H</sub>3ドメインの疎水性相互作用により結合している。

【0052】

「Fab'フラグメント」は1個の軽鎖、ならびにV<sub>H</sub>ドメインおよびC<sub>H</sub>1ドメインを含有する1個の重鎖の部分または断片、そしてまた、C<sub>H</sub>1およびC<sub>H</sub>2ドメイン間の領域を含有し、その結果、2個のFab'フラグメントの、2個の重鎖間で鎖間ジスルフィド結合が形成されてF(ab')<sub>2</sub>分子を形成しうる。

【0053】

「F(ab')<sub>2</sub>フラグメント」は、2個の軽鎖、ならびにC<sub>H</sub>1およびC<sub>H</sub>2ドメイン間の定常領域の部分を含む2個の重鎖を含有し、その結果、それらの2個の重鎖の間で鎖間ジスルフィド結合が形成される。したがって、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、それらの2個の重鎖の間のジスルフィド結合により連結された2個のFab'フラグメントから構成される。「F(ab')<sub>2</sub>フラグメント」は抗体のペプシン切断の産物でありうる。

10

【0054】

「Fv領域」は重鎖および軽鎖の両方からの可変領域を含むが、定常領域を欠いている。

【0055】

本明細書中で用いる「h-タウ」は、h-タウ(Tau)の6個の公知アイソフォームを含むh-タウを意味する。h-タウの定量は、h-タウの6個の公知アイソフォームから得られるh-タウの量に関するものである。

20

【0056】

「単離された抗体」は精製状態を指し、そのような文脈において、分子が、他の生物学的分子、例えば核酸、タンパク質、脂質、炭水化物または他の物質、例えば細胞残渣および増殖培地を実質的に含有しないことを意味する。一般に、「単離(された)」なる語は、そのような物質の完全な非存在または水、バッファーもしくは塩の非存在を意味するものではないが、それらは、本明細書に記載されている結合性化合物の実験用途または治療用途を実質的に妨げる量で存在してはならない。

【0057】

「単離された核酸分子」は、ゲノム、mRNA、cDNAまたは合成由来のDNAまたはRNAあるいはそれらの何らかの組合せであって、単離されたポリヌクレオチドが天然で見出される場合のポリヌクレオチドの全部または一部に付随していないもの、またはそれが天然で連結されていないポリヌクレオチドに連結されているものを意味する。本開示の目的においては、特定のヌクレオチド配列を「含む核酸分子」は無傷染色体を含まないと理解されるべきである。特定された核酸配列を「含む」単離された核酸分子は、特定されている配列に加えて、10個まで又は更には20個以上の他のタンパク質またはその一部もしくは断片のコード配列を含むことが可能であり、または挙げられている核酸配列のコード領域の発現を制御する機能的に連結された調節配列を含むことが可能であり、および/またはベクター配列を含むことが可能である。

30

40

【0058】

核酸が「機能的に連結」されていると言えるのは、それが別の核酸配列に対して機能的な関係で配置されている場合である。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAがポリペプチドのDNAに機能的に連結されていると言えるのは、それが、該ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合であり、プロモーターまたはエンハンサーがコード配列に機能的に連結されていると言えるのは、それが該配列の転写に影響を及ぼす場合であり、あるいはリボソーム結合部位がコード配列に機能的に連結されていると言えるのは、翻訳を促進するようにそれが位置している場合である。一般に、「機能的に連結(されている)」は、連結されているそれらのDNA配列が連続的であり、分泌リーダーの場合には、連続的であり、かつ、リーディングフレームが一致していることを

50

意味する。しかし、エンハンサーは連続的である必要はない。連結は簡便な制限部位における連結により達成される。そのような部位が存在しない場合には、通常の慣例に従って合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが使用される。

【0059】

本明細書中で用いる「Kd」は、当技術分野で公知のとおり、特定の抗体 - 抗原相互作用の「解離定数」を意味する。

【0060】

本明細書中で用いる「モノクローナル抗体またはmAb」なる語は実質的に均一な抗体の集団を意味し、すなわち、該集団を構成する抗体分子は、僅かな量で存在しうる考えられうる自然突然変異以外は、アミノ酸配列において同一である。これとは対照的に、通常の（ポリクローナル）抗体調製物は、典型的には、異なるエピトープに対して特異的であることが多い可変ドメイン、特にCDR内に異なるアミノ酸配列を有する多数の異なる抗体を含む。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られるという該抗体の特性を示しており、いずれかの特定の方法による該抗体の製造を要すると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従い使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら(1975) Nature 256, 495により最初に記載されたハイブリドーマ法により製造可能であり、あるいは組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）により製造可能である。また、「モノクローナル抗体」は、例えば、Clacksonら(1991) Nature 352:624-628およびMarksら(1991) J. Mol. Biol. 222:581-597に記載されている技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離されうる。Presta(2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731も参照されたい。

10

20

【0061】

「ポリクローナル抗体」は、1以上の他の非同一抗体のなかで又は存在下で産生された抗体を意味する。一般に、ポリクローナル抗体は、例えば、関心のある免疫原（これは、全てが該免疫原に対するものである異なる抗体の集団を産生する）で処理された動物のB-リンパ球のような異なるB-リンパ球の集合体から産生される。通常、ポリクローナル抗体は、免疫化動物、例えば脾臓、血清または腹水から直接得られる。

【0062】

本明細書中で用いる「塩」なる語は、無機酸および/または有機酸で形成される酸性塩、ならびに無機塩基および/または有機塩基で形成される塩基性塩を示す。また、本発明の化合物が塩基性部分（限定的なものではないが例えば、ピリジンまたはイミダゾール）と酸性部分（限定的なものではないが例えば、カルボン酸）との両方を含む場合、両性イオン（「内部塩」）が形成されることがあり、本明細書中で用いる「塩」なる語に含まれる。医薬上許容される（すなわち、無毒性の生理的に許容される）塩が好ましいが、他の塩も有用である。本明細書に記載されているBACE-1インヒビターの塩は、例えば、塩が沈殿する媒体のような媒体または水性媒体中でBACE-1インヒビターを酸または塩基の或る量（例えば、同等量）と反応させ、ついで凍結乾燥させることにより形成されうる。

30

【0063】

典型的な酸付加塩には、酢酸塩、アスコルビン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、硫酸水素塩、ホウ酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ショウノウ酸塩、カンファースルホン酸塩、フマル酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンズルホン酸塩、ナフタレンスルホン酸塩、硝酸塩、シュウ酸塩、リン酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンズルホン酸塩（トシル酸塩としても公知である）などが含まれる。また、塩基性医薬化合物からの医薬上有用な塩の形成に適していると一般にみなされる酸は、例えば、P. Stahlら, Camille G. (編) Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use. (2002) Zurich: Wiley-VCH; S. Bergeら, Journal of

40

50



Pharmaceutical Sciences (1977) 66(1) 1-19; P. Gould, International J. of Pharmaceutics (1986) 33 201-217; Andersonら, The Practice of Medicinal Chemistry (1996), Academic Press, New York; および The Orange Book (Food & Drug Administration, Washington, D.C. (それらのウェブサイト上)) に記載されている。

【0064】

典型的な塩基性塩には、アンモニウム塩、アルカリ金属塩、例えばナトリウム、リチウムおよびカリウム塩、アルカリ土類金属塩、例えばカルシウムおよびマグネシウム塩、有機塩基（例えば、有機アミン）、例えばジシクロヘキシルアミン、*t*-ブチルアミンとの塩、ならびにアミノ酸、例えばアルギニン、リジンなどとの塩が含まれる。塩基性窒素含有基は、ハロゲン化低級アルキル（例えば、塩化、臭化およびヨウ化メチル、エチルおよびブチル）、硫酸ジアルキル（例えば、硫酸ジメチル、ジエチルおよびジブチル）、長鎖ハロゲン化物（例えば、塩化、臭化およびヨウ化デシル、ラウリルおよびステアリル）、ハロゲン化アルアルキル（例えば、臭化ベンジルおよびフェネチル）などのような物質で第四級化されうる。

10

【0065】

全てのそのような酸塩および塩基塩は医薬上許容される塩であると意図され、全ての酸および塩基塩は、本明細書に記載されている対応BACE-1インヒビターの遊離形態と同等であるとみなされる。

20

【0066】

「一本鎖Fv」または「scFv」抗体なる語は、抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む抗体フラグメントであって、これらのドメインが単一ポリペプチド鎖内に存在するものを意味する。一般に、Fvポリペプチドは更に、抗原結合のための所望の構造をscFvが形成することを可能にする、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメイン間のポリペプチドリンカーを含む。scFvの総説としては、Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGICAL MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, RosenbergおよびMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315を参照されたい。また、国際特許出願公開番号WO 88/01649ならびに米国特許第4,946,778号および第5,260,203号を参照されたい。

30

【0067】

「治療」または「治療する」なる語は、所望の薬理学的および/または生理的効果を得るためのAD治療用物質の任意の投与を意味する。該効果は、疾患もしくはその症状を完全もしくは部分的に予防するという点で予防的であることが可能であり、ならびに/または疾患および/もしくは該疾患に起因する有害な効果の部分的もしくは完全な治癒の点で治療的であることが可能である。治療は、(1)該疾患の病理または総体症状を経験している又は示している患者、例えばヒトにおける該疾患を抑制すること(すなわち、病理および/または総体症状の更なる進展を阻止すること)、あるいは(2)該疾患の病理または総体症状を経験している又は示している患者における該疾患を改善すること(すなわち、病理および/または総体症状を逆転させること)を含む。

40

【0068】

いずれかの特定の疾患症状を軽減するのに有効であるAD治療用物質の量(「治療的有効量」とも称される)は、患者の病態、年齢および体重ならびに対象または患者において所望の応答を該薬物が惹起する能力のような要因に応じて変動しうる。疾患症状が軽減したかどうかは、その症状の重症度または進行状態を評価するために医師または他の熟練した医療提供者によって典型的に用いられるいずれかの臨床的測定により評価されうる。

【0069】

典型的な抗h-タウ抗体および抗原結合性フラグメントの物理的および機能的特性

50

本発明は、単離された抗h - タウ抗体およびその抗原結合性フラグメント、ならびにこれらの抗体およびその抗原結合性フラグメントを使用して、生物学的サンプル、例えばCSF中のh - タウを定量する方法を提供する。本発明の抗h - タウ抗体の例には、マウスアイソタイプIgG1のmAb 10H8（表2を参照されたい；それぞれ配列番号24および30の軽鎖および重鎖可変領域）およびマウスアイソタイプIgG2bの19G10（表3を参照されたい；それぞれ配列番号36および42の軽鎖および重鎖可変領域）が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0070】

10H8および19G10抗体は、h - タウのアミノ酸104 - 277（図1を参照されたい）に伸長する、h - タウの全6個のアイソフォームにより共有される保存領域に位置する非同ーエピトープに特異的に結合する。

10

【0071】

1つの態様においては、配列番号11に記載されているアミノ酸220 - 224（TR E P K）からなるh - タウ上のエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。米国特許第5,861,257号は、h - タウのアミノ酸P r o 218 ~ L y s 224に対応するアミノ酸P P T R E P K（配列番号13）を含むh - タウ上のエピトープに特異的に結合するmAb AT120を記載している。mAb 10H8により例示される、エピトープT R E P K（配列番号11）に特異的に結合する本発明の抗体は、それぞれのエピトープにおける相違を考慮すると、米国特許第5,861,257号に記載されているmAb AT120とは異なる抗体であると考  
えられている。これに関して、mAb AT120のエピトープマッピング（米国特許第5,861,257号の第19~20欄にわたる段落を参照されたい）は、mAb AT120はペプチド配列P P T R E P K K V A V V（配列番号14）とは反応するが、mAb AT120はペプチド配列P T R E P K K V A V V（配列番号15）とは反応しないことを示した。mAb AT120のこれらの及び追加的なペプチドマッピングの結果は、mAb AT120によって特異的に結合されるエピトープがP P T R E P K（配列番号13）であり、mAb 10H8により例示される本発明の抗体によって特異的に結合されるエピトープT R E P K（配列番号11）ではないことを示した（mAb 10H8に関するエピトープマッピングの結果を示す実施例2を参照されたい）。

20

【0072】

もう1つの実施形態においては、配列番号11（T R E P K）のエピトープに特異的に結合する単離された抗体または抗原結合性フラグメントは配列番号20（C D R L 1）、配列番号21（C D R L 2）および配列番号22（C D R L 3）の3個の軽鎖CDRならびに配列番号26（C D R H 1）、配列番号27（C D R H 2）および配列番号28（C D R H 3）の3個の重鎖CDRまたは該抗体の変異体を含む。1つの実施形態においては、該抗体の変異体は前記CDRの1以上における1、2、3、4、5および6個のアミノ酸置換を含むが、アミノ酸220 - 224（配列番号11）からなるh - タウのエピトープに結合する能力を保有している。

30

【0073】

もう1つの実施形態においては、配列番号11（T R E P K）のエピトープに結合する単離された抗体または抗原結合性フラグメントは配列番号24の軽鎖可変領域および配列番号30の重鎖可変領域または該抗体の変異体を含む。もう1つの実施形態においては、該抗体の変異体は一方または両方の配列における1~20個のアミノ酸置換を含むが、アミノ酸220 - 224（配列番号11）からなるh - タウのエピトープに結合する能力を保有している。

40

【0074】

もう1つの態様においては、配列番号11（T R E P K）のエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントはmAbまたはその抗原結合性フラグメントである。特に有用な実施形態においては、該mAbは、ハイブリドーマサブクローン\_\_クローン10H8.25.6.10H8により産生されるmAb 10H8（マウスIg

50

G 1 アイソタイプを有する、それぞれ配列番号 2 4 および 3 0 の可変軽鎖および重鎖) または m A b 1 0 H 8 の抗原結合性フラグメントである。

【 0 0 7 5 】

もう 1 つの実施形態においては、配列番号 1 1 ( T R E P K ) のエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントは免疫グロブリンのいずれかのクラス、例えば I g A、I g D、I g E、I g G および I g M のものであり、これらの幾つかは更に、サブクラス ( アイソタイプ )、例えば I g G - 1、I g G - 2、I g G - 3 および I g G - 4 ; I g A - 1 および I g A - 2 に分類されうる。特に有用な実施形態においては、m A b 1 0 H 8 はマウス I g G 1 アイソタイプを有する。

【 0 0 7 6 】

もう 1 つの実施形態においては、配列番号 1 1 ( T R E P K ) のエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントは低いマイクロモル (  $10^{-6}$  ) ~ ナノモル (  $10^{-7}$  ~  $10^{-9}$  ) の範囲の  $K_d$  値で結合する。1 つの実施形態においては、m A b 1 0 H 8 は約 1 7 n M の  $K_d$  で h - タウに結合する ( 実施例 3 を参照されたい )

【 0 0 7 7 】

もう 1 つの態様においては、配列番号 1 2 に記載されているアミノ酸 1 8 9 - 1 9 4 ( P K S G D R ) からなる h - タウ上のエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。

【 0 0 7 8 】

1 つの実施形態においては、配列番号 1 2 ( P K S G D R ) のエピトープに特異的に結合する単離された抗体または抗原結合性フラグメントは配列番号 3 2 ( C D R L 1 )、配列番号 3 3 ( C D R L 2 ) および配列番号 3 4 ( C D R L 3 ) の 3 個の軽鎖 C D R ならびに配列番号 3 8 ( C D R H 1 )、配列番号 3 9 ( C D R H 2 ) および配列番号 4 0 ( C D R H 3 ) の 3 個の重鎖 C D R または該抗体の変異体を含む。1 つの実施形態においては、該抗体の変異体は前記 C D R の 1 以上における 1、2、3、4、5 および 6 個のアミノ酸置換を含むが、配列番号 1 1 のアミノ酸 2 2 0 - 2 2 4 からなる h - タウのエピトープに結合する能力を保有している。

【 0 0 7 9 】

もう 1 つの実施形態においては、配列番号 1 2 ( P K S G D R ) のエピトープに結合する単離された抗体または抗原結合性フラグメントは配列番号 3 6 の軽鎖可変領域および配列番号 4 2 の重鎖可変領域または該抗体の変異体を含む。1 つの実施形態においては、該抗体の変異体はこれらの配列の一方または両方における 1 ~ 2 0 個のアミノ酸置換を含むが、アミノ酸 1 8 9 - 1 9 4 ( 配列番号 1 2 ) からなる h - タウのエピトープに結合する能力を保有している。

【 0 0 8 0 】

もう 1 つの態様においては、配列番号 1 2 ( P K S G D R ) のエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントは m A b またはその抗原結合性フラグメントである。特に有用な実施形態においては、該 m A b は、ハイブリドーマサブクローン \_\_\_ クローン 1 9 G 1 0 . 1 0 . 5 . 1 9 G 1 0 により産生される m A b 1 9 G 1 0 ( マウス I g G 2 b アイソタイプを有する、それぞれ配列番号 3 6 および 4 2 の可変軽鎖および重鎖 ) または m A b 1 9 G 1 0 の抗原結合性フラグメントである。

【 0 0 8 1 】

もう 1 つの実施形態においては、配列番号 1 2 ( P K S G D R ) のエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントは免疫グロブリンのいずれかのクラス、例えば I g A、I g D、I g E、I g G および I g M のものであり、これらの幾つかは更に、サブクラス ( アイソタイプ )、例えば I g G - 1、I g G - 2、I g G - 3 および I g G - 4 ; I g A - 1 および I g A - 2 に分類されうる。

【 0 0 8 2 】

特に有用な実施形態においては、配列番号 1 2 ( P K S G D R ) のエピトープに結合す

10

20

30

40

50

る単離された抗体（例えば、mAb 19G10）またはその抗原結合性フラグメントはIgG2bアイソタイプを有する。

【0083】

もう1つの実施形態においては、配列番号12（PKSGDR）のエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントは低いマイクロモル（ $10^{-6}$ ）～ナノモル（ $10^{-7}$ ～ $10^{-9}$ ）の範囲の $K_d$ 値で結合する。もう1つの実施形態においては、mAb 19G10は約6.3 nMの $K_d$ でh-タウに結合する（実施例3を参照されたい）。

【0084】

核酸分子、ベクターおよび宿主細胞

もう1つの態様においては、アミノ酸220-224（TREP K、配列番号11）からなるh-タウ上のエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントの可変軽鎖および重鎖をコードする単離された核酸を提供する。1つの実施形態においては、抗体軽鎖可変領域および抗体重鎖可変領域の一方または両方をコードする単離された核酸を提供し、ここで、該抗体軽鎖可変領域は配列番号24のものであり、抗体重鎖可変領域は配列番号30のものである。

【0085】

もう1つの態様においては、アミノ酸189-194（PKSGDR、配列番号12）からなるh-タウ上のエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントの可変軽鎖および重鎖をコードする単離された核酸を提供する。1つの実施形態においては、抗体軽鎖可変領域および抗体重鎖可変領域の一方または両方をコードする単離された核酸を提供し、ここで、該抗体軽鎖可変領域は配列番号36のものであり、抗体重鎖可変領域は配列番号42のものである。

【0086】

もう1つの態様においては、本発明の単離された核酸を含む発現ベクターを提供し、ここで、該核酸は、宿主細胞が該ベクターでトランスフェクトされた場合に該宿主細胞により認識される制御配列に機能的に連結されている。したがって、1つの実施形態においては、配列番号25および配列番号31の単離された核酸の一方もしくは両方、または配列番号37および配列番号43の単離された核酸の一方もしくは両方を含む発現ベクターを提供する。

【0087】

また、発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。また、本明細書に開示されている抗体またはその抗原結合性フラグメントの製造方法を提供し、該製造方法は、該抗体または抗原結合性フラグメントをコードする発現ベクターを含有する宿主細胞を培地内で培養し、該抗原またはその抗原結合性フラグメントを該宿主細胞または培地から単離することを含む。

【0088】

タウ166ペプチド

もう1つの態様においては、タウ166ペプチドとして公知の配列番号9の単離されたペプチドを提供し、これは、本発明の抗体を製造するための免疫原として使用される。タウ166ペプチドは、標準的な組換え法を用いて製造されうる。例えば、タウ166ペプチドをコードする単離された核酸を適当な発現ベクター内にクローニングすることが可能である。1つの実施形態においては、タウ166ペプチドをコードする単離された核酸は配列番号10である。ついで該組換えベクターをいずれかの適当な宿主細胞内に導入する。1つの実施形態においては、宿主細胞はsf9（昆虫）細胞である。もう1つの実施形態においては、宿主細胞は大腸菌（E. coli）である（実施例1を参照されたい）。ついで、該宿主細胞から発現されたタウ166ペプチドを標準的な方法（例えば、Ausubelら（1991）Current Protocols in Molecular Biology Ch. 16（John Wiley & Sons, NYを参照されたい）により宿主細胞から精製することが可能である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 9 】

抗体およびその抗原結合性フラグメントの製造方法

抗体を製造するために、適当な動物、例えばマウス、ラット、ハムスター、サルまたは他の哺乳動物をタウ166ペプチドで免疫化して、抗体分泌細胞を産生させる。1つの実施形態においては、動物、例えばマウスをタウ166ペプチド、および免疫応答を増強するために使用するアジュバントで免疫化する。アジュバントの例には、フロイントアジュバント（完全および不完全）、無機塩、例えば水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウム、界面活性物質、キトサン、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン（免疫化プロトコルに関しては実施例1を参照されたい）が含まれるが、これらに限定されるものではない。もう1つの実施形態においては、タウ166ペプチドを別の免疫原性分子または「担体タンパク質」に結合させることにより、タウ166ペプチドに対する免疫応答を増強することが可能である。担体タンパク質の例には、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、オボアルブミン、コレラトキソイドおよびそれらの免疫原性断片が含まれるが、これらに限定されるものではない。ペプチド免疫原を担体タンパク質に結合させる場合の指針に関しては、例えば、Ausubelら（1989）*Current Protocols in Molecular Biology* Ch. 11.15（John Wiley & Sons, NY）；ならびにHarlowおよびLane（1988）*Antibodies: A Laboratory Manual* Ch. 5（Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.）を参照されたい。

10

20

## 【 0 0 9 0 】

本発明の親（例えば、げっ歯類）抗h-タウ mAbを産生するハイブリドーマ細胞は、当技術分野で一般に公知の方法により製造されうる。これらの方法には、Kohlerら（1975）（*Nature* 256: 495-497）により最初に開発されたハイブリドーマ技術およびトリオーマ技術（Heringら（1988）*Biomed. Biochim. Acta*. 47: 211-216およびHagiwaraら（1993）*Hum. Antibod. Hybridomas* 4: 15）、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozborら（1983）*Immunology Today* 4: 72およびCoteら（1983）*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 2026-2030）、EBV-ハイブリドーマ技術（Coleら, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985）およびサイトバルス大チャンバ細胞融合エレクトロポレーター（Cyto Pulse large chamber cull fusion electroporator）（Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD）を使用する電場に基づく電気融合が含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、マウス脾細胞を単離し、標準的なプロトコルに従い、PEGで又は電気融合によりマウス骨髄腫細胞系と融合させる。ついで、生じたハイブリドーマを抗原特異的抗体の産生に関してスクリーニングすることが可能である。例えば、タウ166抗原で免疫化されたマウスからの脾臓リンパ球の単細胞浮遊液を、例えばバッファー（pH 8.0）中の50% ポリエチレングリコール-1500（PEG-1500）溶液を使用して、SP2/0非分泌マウス骨髄腫細胞と融合させることが可能である。ついで融合細胞をマイクロタイタープレート上にプレーティングし、HAT（ナトリウム-ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンの液体混合物）で補足されたハイブリドーマ培地内で約2週間インキュベートすることが可能である。ついで、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）のような良く知られた方法により、抗体分泌ハイブリドーマを特定するために、各プレートからの培養上清をスクリーニングすることが可能である。該抗体分泌ハイブリドーマを再プレーティングし、再びスクリーニングすることが可能である。スクリーニングされたハイブリドーマが所望の抗h-タウ抗体に関して尚も陽性である場合には、それを少なくとも2回サブクローニン

30

40

50

グすることが可能である。サブクローニングは限界希釈により実施可能であり、この場合、該ハイブリドーマ細胞を細胞の最終濃度（例えば、2.5細胞/mL）までの系列希釈により培地内で希釈する。該細胞のアリコート、例えば200 $\mu$ L（ウェル当たり約1/2の細胞）を各ウェル内にプレATINGし、約2週間インキュベートする。ついで各ウェル内の単一ハイブリドーマ細胞を顕微鏡的に特定し、その単一ハイブリドーマからの上清を本発明の抗h-タウ抗体に関してELISAによりスクリーニングすることが可能である。所望のサブクローンを選択し、抗体産生のために増殖させ、あるいは液体窒素冷凍庫内で凍結させることが可能である。研究のために必要な場合には、凍結ハイブリドーマのバイアルを解冻し、ハイブリドーマ培地内で増殖させて、抗体を産生させ、それを精製することが可能である。本発明の抗h-タウ抗体の製造方法は実施例1に記載されている。

10

**【0091】**

本発明の抗h-タウ抗体は組換え法によって（例えば、大腸菌（*E. coli*）/T7発現系において）も製造されうる。この実施形態においては、本発明の抗体分子（例えば、 $V_H$ または $V_L$ ）をコードする核酸をpET系プラスミド内に挿入し、大腸菌（*E. coli*）/T7系内で発現させることが可能である。当技術分野で公知である組換え抗体を製造するための幾つかの方法が存在する。抗体の組換え製造のための方法の一例は米国特許第4,816,567号に開示されている。形質転換は、ポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するためのいずれかの公知方法により行われうる。哺乳類細胞内に異種ポリヌクレオチドを導入するための方法は当技術分野でよく知られており、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リボソーム内へのポリヌクレオチドの封入、遺伝子銃注入および核内へのDNAの直接マイクロインジェクションを包含する。また、ウイルスベクターにより哺乳類細胞内に核酸分子を導入することが可能である。細胞を形質転換する方法は当技術分野でよく知られている。例えば、米国特許第4,399,216号、第4,912,040号、第4,740,461号および第4,959,455号を参照されたい。

20

**【0092】**

抗h-タウ抗体は、米国特許第6,331,415号に記載されている方法のいずれかによっても合成されうる。

30

**【0093】**

本明細書に開示されている抗体またはフラグメントの発現のための宿主として利用可能な哺乳類細胞系は当技術分野でよく知られており、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な多数の不死化細胞系を包含する。これらは、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、NSO、SP2細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞、サル腎細胞 (COS)、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、A549細胞、3T3細胞、HEK-293細胞および多数の他の細胞系を包含する。哺乳類宿主細胞はヒト、マウス、ラット、イヌ、サル、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマおよびハムスター細胞を包含する。特に好ましい細胞系は、どの細胞系が高い発現レベルを有するのかを決定することにより選択される。使用されうる他の細胞系としては、昆虫細胞、例えばSf9細胞、両生類細胞、細菌細胞、植物細胞および真菌細胞が挙げられる。重鎖またはその抗原結合部分もしくはフラグメント、軽鎖および/またはその抗原結合性フラグメントをコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞内に導入する場合、該宿主細胞における該抗体の発現、またはより好ましくは、該宿主細胞が培養される培地内への該抗体の分泌を可能にするのに十分な時間にわたって該宿主細胞を培養することにより、該抗体を製造する。

40

**【0094】**

抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培地から回収されうる。更に、生産細胞系からの本発明の抗体（またはそれ由来の他の部分）の発現は幾つかの公知技術により増強されうる。例えば、グルタミンシンターゼ遺伝子発現系 (GS系) は、一定条件下で発

50

現を増強するための一般的アプローチである。GS系は欧州特許第0 2 1 6 8 4 6号、第0 2 5 6 0 5 5号および第0 3 2 3 9 9 7号ならびに欧州特許出願第8 9 3 0 3 9 6 4 . 4号において全体的または部分的に考察されている。

【0095】

診断アッセイ、治療方法およびキット

もう一つの態様においては、生物学的サンプル中のh - タウを定量する方法を提供し、該方法は、

( a ) 生物学的サンプルを本発明の抗h - タウ抗体、例えばm A b 1 0 H 8またはm A b 1 9 G 1 0または該抗体の変異体(前記のもの)またはそれらの抗原結合性フラグメントと、h - タウおよび該抗体またはその抗原結合性フラグメントの間の免疫複合体の形成を可能にする条件下で接触させ、

10

( b ) 形成した免疫複合体を検出することを含む。

【0096】

前記方法は、前記の生物学的サンプル、例えばCSF、血漿、全血、血清または脳組織の抽出物中のh - タウを定量するために使用されうる。

【0097】

h - タウを定量するための前記方法の1つの実施形態においては、本発明の抗h - タウ、例えばm A b 1 0 H 8またはm A b 1 9 G 1 0または該抗体の変異体を固相上にコーティングし、ついで生物学的サンプルを該固相と接触させる。この方法において使用されうる固相の例としては、マイクロタイターウェル、プラスチックチューブ、膜、ラテックス粒子、磁気粒子、マイクロスフェアおよびビーズが挙げられる。生物学的サンプル中のh - タウは該抗体に結合し、h - タウの量は直接または間接法により決定されうる。

20

【0098】

該直接法は、h - タウ/抗h - タウ抗体複合体自体の存在、したがってh - タウの存在および量を、該抗体またはその抗原結合性フラグメントに標識を結合させることにより検出することを含む。標識の例としては、放射性同位体(例えば、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $\text{I}^{125}$ および $^3\text{H}$ )、検出可能な反応産物を有する酵素(例えば、ルシフェラーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼなど)、蛍光標識(例えば、ローダミン、フィコエリトリン、フルオレセインイソチオシアナート、レゾルフィンなど)、化学発光化合物(例えば、アクリジニウム塩、ルミノール、イソルミノールなど)および生物発光化合物(例えば、ルシフェリン、エクオリンなど)が挙げられる。

30

【0099】

間接法においては、本発明の抗h - タウ抗体は、マウス抗h - タウ抗体に対するアフィニティを有する物質(例えば、ヤギ抗マウスまたはウサギ抗マウスIgG)、または前記のとおり放射性、蛍光性または化学発光性である検出可能な試薬で標識された二次抗体と抗h - タウ抗体を反応させ、二次抗体の存在を検出することにより間接的に標識されうる。

【0100】

もう一つの実施形態においては、h - タウのアミノ酸104 - 277に伸長するh - タウの保存領域に対してそれぞれが特異的である抗h - タウ抗体のペアを使用して、h - タウの量を定量する。抗体のペアの一方は本発明の抗h - タウ抗体、例えばm A b 1 0 H 8もしくはm A b 1 9 G 1 0またはそれらの2つの抗体の変異体であり、該ペアを構成する他方の抗体もh - タウに特異的である。よく知られた抗h - タウ抗体、特に、アミノ酸104 - 277に伸長するh - タウの保存領域上のエピトープに結合するm A bの例としては、タウ5、BT2およびHT7(Covanceにおいて商業的に入手可能)が挙げられる。抗体のペアの一方は「捕捉」抗体として使用可能であり、該ペアの他方は「検出可能な様態で標識された抗体」として使用可能である。したがって、1つの実施形態は、生物学的サンプル中のh - タウを検出するために二重抗体サンドイッチ法を用い、ここで、h - タウは、捕捉抗体、すなわち、m A b 1 0 H 8もしくはm A b 1 9 G 1 0または該抗体の変異体と、検出可能な様態で標識された抗体、すなわち、BT2との間でサ

40

50

ンドイッチ化され（挟まれ）、該捕捉抗体は固相上に固定化されている。

【0101】

該二重サンドイッチ法の1つの実施形態は、本発明の抗h-タウ抗体またはその抗原結合性フラグメントの使用を含む酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）である。例えば、ELISAは以下の工程を含む：

（a）本発明の抗h-タウ抗体またはその抗原結合性フラグメント、例えばmAb 10H8もしくはmAb 19G10またはこれらの抗体の変異体で固相（例えば、マイクロタイタープレートウェルの表面）をコーティングすること；

（b）h-タウの存在に関して試験されるべきサンプルを該固相に適用すること；

（c）該プレートを洗浄して、該サンプル中の未結合物質を除去すること；

（d）h-タウ抗原、例えばタウ5、BT2またはHT7に同様に特異的である検出可能な様態で標識された抗h-タウ抗体（例えば、酵素結合抗体）を適用すること；

（e）該固相を洗浄して、未結合標識抗体を除去すること；

（f）標識抗体が酵素結合体である場合には、蛍光シグナルへと酵素により変換される化学物質を適用すること；および

（g）標識抗体の存在を検出すること。

【0102】

ELISAの一例としては、検出可能な様態で標識される抗体はペルオキシダーゼで標識され、これはABTS（例えば、2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸））または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンと反応して、検出可能な変色をもたらす。

【0103】

二重抗体サンドイッチアッセイの特に有用な実施形態においては、アミノ酸104-277に伸長するh-タウの保存領域上の非同ーエピトープにそれぞれが特異的に結合する本発明の抗h-タウ抗体（例えば、mAb 10H8およびmAb 19G10またはこれらの抗体の変異体）のペアを使用して、CSFのサンプル中のh-タウの量を定量する。アミノ酸220-224（TREP K、配列番号11）からなるh-タウのエピトープに特異的に結合する抗体、例えばmAb 10H8または該抗体の変異体を「捕捉抗体」として使用し、アミノ酸188-194（PKSGDR、配列番号12）からなるh-タウのエピトープに特異的に結合する抗体、例えば19G10または該抗体の変異体を「検出可能な様態で標識される（または標識された）抗体」として使用する。CSFサンプル中のh-タウを定量するためのこの方法は、

（a）アミノ酸220-224（TREP K、配列番号11）からなるh-タウのエピトープに特異的に結合する抗体、例えば10H8または該抗体の変異体またはそれらの抗原結合性フラグメント（ここで、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは固体支持体上に固定化されている）と該サンプルを、捕捉抗体/h-タウ複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、該サンプルからのh-タウを捕捉し、

（b）アミノ酸189-194（PKSGDR、配列番号12）からなるh-タウのエピトープに特異的に結合する検出可能な様態で標識された抗体、例えば19G10または該抗体の変異体またはそれらの抗原結合性フラグメントと該捕捉抗体/h-タウ複合体を、捕捉抗体/h-タウ/検出可能標識抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、捕捉されたh-タウを検出することを含む。

【0104】

前記のとおり、固体支持体の例としては、マイクロタイターウェル、プラスチックチューブ、膜、ラテックス粒子、磁気粒子、磁気微粒子、マイクロスフェアおよびビーズが挙げられる。固体支持体のための適当な物質には、ナイロン、ニトロセルロース、ポリアクリルアミド、酢酸セルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリメタクリレート、スチレン、カルボキシル化スチレンおよび繊維含有紙、例えば濾紙、クロマトグラフィー紙およびガラス繊維紙が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0105】

10

20

30

40

50



特に有用な実施形態においては、固体支持体は磁気マイクロスフェア（Luminesx Corporation, Austin, TXから商業的に入手可能なカルボキシル化ポリスチレン微粒子またはビーズであるMagPlex（登録商標）Microspheres）である（例えば、米国特許第7,718,262号、第6,514,295号、第6,599,331号、第6,632,526号、第6,929,859号、第7,445,844号、第8,283,037号および第8,568,881号を参照されたい）。「検出可能な様態で標識される抗体」を標識するための試薬には、放射性同位体、酵素、ビオチン、色素、蛍光標識および化学発光標識が含まれるが、これらに限定されるものではない。特に有用な実施形態においては、該試薬は、ストレプトアビジン-フィコエリトリンコンジュゲートに結合されるビオチンである。

10

## 【0106】

生物学的サンプル、例えばCSF中のh-タウを定量するための前記方法の一例は、ビーズに基づく技術（Luminesx Corporation, Austin, TX）を用い、この場合、mAb 10H8（「捕捉抗体」）を磁気マイクロスフェアに結合させる。該結合マイクロスフェアを96ウェルプレートのウェル内で種々の濃度のh-タウ（標準として使用される）またはCSFサンプルと共にインキュベートし、ついでビオチン化mAb 19G10（「検出可能な様態で標識された抗体」）を加えてmAb 10H8/h-タウ/ビオチン化mAb 19G10複合体を形成させる。該ビオチン化複合体の検出は、該ビオチン化抗体に結合するストレプトアビジン-フィコエリトリンコンジュゲートの存在下のインキュベーションにより行う。xMAP Technology装置（FlexMap 3D, Luminesx Corporation, Austin, TX）は、特異的マイクロスフェアを特定するための分類レーザー（classification laser）（638nm）、およびコンジュゲートに結合したフィコエリトリン分子を励起させるための第2レポーターレーザー（532nm）を使用する。該複合体に結合したフィコエリトリンからの蛍光出力を、検出器（565nm～585nm）またはCCD（電荷結合素子）イメージング検出器を使用して測定し、CSFサンプル中のh-タウの種々の濃度から作成された検量線で読取られたCSFサンプル中のh-タウの量と直接的に関連づける。

20

## 【0107】

もう1つの態様においては、ADを有する疑いのある患者においてADを診断するための方法を提供する。この方法は、例えば、AD治療用物質、例えばBACE-1インヒビターでの治療のための患者を選択するために使用されうる。該方法は、

30

(a) 患者から得られた生物学的サンプル中のh-タウの量を定量し、この場合、これを、

(i) アミノ酸220-224（TREP K、配列番号11）からなるh-タウのエピトープに特異的に結合する抗体、例えば10H8または該抗体の変異体またはそれらの抗原結合性フラグメント（ここで、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは固体支持体上に固定化されている）と該サンプルを、捕捉抗体/h-タウ複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、該サンプルからのh-タウを捕捉し、

(ii) 189-194（PKSGDR、配列番号12）からなるh-タウのエピトープに特異的に結合する検出可能な様態で標識された抗体、例えば19G10または該抗体の変異体またはそれらの抗原結合性フラグメントと該捕捉抗体/h-タウ複合体を、捕捉抗体/h-タウ/検出可能標識抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、捕捉されたh-タウを検出することにより行い、

40

(c) 工程(a)で得たサンプル中のh-タウの濃度を決定することを含み、ここで、184pg/mLより大きな値は該患者におけるADの診断を示す。

## 【0108】

h-タウの量を定量することにより、ADを有する疑いのある患者においてADを診断する方法は、例えば実施例4および5に記載されている。

## 【0109】

50

1つの実施形態においては、アルツハイマー病を有する疑いのある患者においてアルツハイマー病を診断するための前記方法は、

(a) 該患者の脳脊髄液サンプル中のヒトタウの量を定量し、この場合、これを、

(1) (i) 配列番号20 (CDRL1)、配列番号21 (CDRL2) および配列番号22 (CDRL3) の3個の軽鎖CDRならびに配列番号26 (CDRH1)、配列番号27 (CDRH2) および配列番号28 (CDRH3) の3個の重鎖CDRを含む抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは該抗体の変異体、ならびに

(ii) 配列番号24の軽鎖可変領域および配列番号30の重鎖可変領域を含む単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは該抗体の変異体

からなる群から選択される、h-タウのアミノ酸220-224からなるエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメント(ここで、該抗体または抗原結合性フラグメントは固体支持体上に固定化されている)と該サンプルを、捕捉抗体/タウ複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、該サンプルからのヒトタウを捕捉し、

(2) (i) 配列番号32 (CDRL1)、配列番号33 (CDRL2) および配列番号34 (CDRL3) の3個の軽鎖CDRならびに配列番号38 (CDRH1)、配列番号39 (CDRH2) および配列番号40 (CDRH3) の3個の重鎖CDRを含む抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは該抗体の変異体、ならびに

(ii) 配列番号36の軽鎖可変ドメインおよび配列番号42の重鎖可変ドメインを含む抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは該抗体の変異体

からなる群から選択される、アミノ酸189-194からなるエピトープに特異的に結合する検出可能な状態で標識された抗体または抗体フラグメントと該捕捉抗体/タウ複合体を、捕捉抗体/タウ/検出可能標識抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、捕捉されたタウを検出することにより行い、

(b) 工程(a)におけるヒトタウの濃度を決定することを含み、ここで、184 pg/mLより大きな値は該患者におけるADの診断を示す。

【0110】

ADを有する疑いのある患者においてADを診断する前記方法のもう1つの実施形態においては、該方法は更に、

(c) 該患者のCSFサンプル中のA<sub>1-42</sub>の量を定量し

(d) 該患者のサンプルにおけるh-タウ/A<sub>1-42</sub>の比を決定する工程を含み、ここで、0.215より大きな比の値は該患者におけるADの診断を示す。

【0111】

工程(c)において、CSFサンプル中のA<sub>1-42</sub>の量は、h-タウの定量に関して前記で記載されているとおりのイムノアッセイにおいて、A<sub>1-42</sub>のN末端および/またはC末端のエピトープに特異的に結合する商業的に入手可能な抗体を使用して定量されうる。商業的に入手可能な抗体の例には、mAb 6E10 (N末端, Covance)、mAb 12F4 (C末端, Covance)、mAb 1-11-3 C末端, BioLegend (登録商標)、mAb G2-11 (C末端, EMD Millipore) および mAb 4G8 (N末端, BioLegend (登録商標)) が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0112】

1つの実施形態においては、CSF中のA<sub>1-42</sub>の量を定量する前記方法の工程(c)は、

(i) A<sub>1-42</sub>のC末端のエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメント(ここで、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは固体支持体上に固定化されている)とサンプルを、捕捉抗体/A<sub>1-42</sub>複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、サンプルからのA<sub>1-42</sub>を捕捉し、

(ii) A<sub>1-42</sub>のN末端のエピトープに特異的に結合する検出可能な状態で標識された抗体またはその抗原結合性フラグメントと該捕捉抗体/A<sub>1-42</sub>複合体を、検

10

20

30

40

50

出可能標識抗体 / A<sub>1-42</sub> / 捕捉抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、捕捉された A<sub>1-42</sub> を検出することを含む。

【0113】

一例としては、工程(c)において、サンドイッチELISA系を使用してCSF中の A<sub>1-42</sub> を測定することが可能であり、この場合、商業的に入手可能なmAb、例えばmAb 6E10を捕捉抗体として使用し、アルカリホスファターゼ(AP)結合mAb 12F4を検出可能標識抗体として使用する。この系においては、96ウェルプレートを一晩のインキュベーションによりmAb 6E10でコーティングし、ついで該プレートをバッファーで洗浄して、未結合mAb 6E10を除去することが可能である。ついで種々の濃度の標準AB<sub>1-42</sub>ペプチドおよび希釈サンプルを、APが結合した検出可能標識抗体と共にインキュベートし、ついでCDP-Star(登録商標)化学発光基質(Chemiluminescent Substrate)(Applied Biosystems)を加える。化学発光はEnVision(登録商標)プレートリーダー(Perkin Elmer)で測定されう。

10

【0114】

特に有用な実施形態においては、工程(c)における A<sub>1-42</sub> を定量する方法は、ビーズに基づく技術(Luminex Corporation, Austin, TX)を用い、この場合、「捕捉抗体」として使用されるmAb 1-11-3(BioLegend(登録商標))を磁気マイクロスフェア上に結合させる。該結合マイクロスフェアを96ウェルプレートのウェル内で種々の濃度の A<sub>1-42</sub> (標準として使用される)またはCSFサンプルと共にインキュベートし、ついでビオチン化mAb 6E10(「検出可能な状態で標識された抗体」)を加えてmAb 1-11-3 / A<sub>1-42</sub> / ビオチン化mAb 6E10複合体を形成させる(工程(b)(ii))。該ビオチン化複合体の検出は、該ビオチン化抗体に結合するストレプトアビジン-フィコエリトリンコンジュゲートの存在下のインキュベーションにより行う。xMAP技術の装置(FlexMap 3D, Luminex Corporation, Austin, TX)は、特異的マイクロスフェアを特定するための分類レーザー(classification laser)(638nm)、およびコンジュゲートに結合したフィコエリトリン分子を励起させるためのレポーターレーザー(532nm)を使用する。該複合体に結合したフィコエリトリンからの蛍光出力を、検出器(565nm~585nm)またはCCD(電荷結合素子)イメージング検出器を使用して測定し、CSFサンプル中の A<sub>1-42</sub> の種々の濃度から作成された検量線で読取られたCSFサンプル中の A<sub>1-42</sub> の量と直接的に関連づける。

20

30

【0115】

患者のCSF中のh-タウおよび A<sub>1-42</sub> の量の定量の後、該患者のCSF h-タウ / A<sub>1-42</sub> の比を決定する(工程(d))。前記のとおり、最近の研究は、CSF h-タウ / A<sub>1-42</sub> の比が、アミロイド斑病理を有する個体の特定に有用であることを示している(Faganら, Arch. Neurol., Vol. 68, pp. 1137-1144, 2011)。CSF h-タウ / A<sub>1-42</sub> の比は非認知症高齢者および軽度ADを有する成人における将来の認知機能低下を予測することも示されている(Faganら, Arch. Neurol., Vol. 64, pp. 343-349, 2007)。したがって、CSF h-タウ / A<sub>1-42</sub> の比は、AD修飾物質での治療のための患者を選択する際の補助として使用可能であり、実施例6に記載されているとおりに決定された(実施例5ならびに図2および3も参照されたい)。

40

【0116】

もう一つの態様においては、ADの治療を要する患者においてADを治療する方法を提供し、該方法は、

(a) h-タウおよび / または h-タウ / A<sub>1-42</sub> 比を定量する前記診断方法を用いて、治療を要する患者を選択し、

(b) AD治療用物質の治療的有効量を該患者に投与することを含む。

50

## 【0117】

1つの実施形態においては、AD治療用物質は前記のものから選択される。

## 【0118】

1つの実施形態においては、AD治療用物質はBACE-1インヒビターである。BACE-1は、アルツハイマー病の治療のための、受け入れられた治療標的となっている。例えば、McConlogueら, *J. Biol. Chem.*, Vol. 282, No. 36 (Sept. 2007)は、BACE-1酵素活性の部分的低下およびそれに付随したA $\beta$ レベルの低下がA $\beta$ 誘導性AD様病理の劇的な抑制を招くことを示しており、したがって、 $\gamma$ -セクレターゼがADにおける治療介入の標的となる。Ohnoら, *Neurobiology of Disease*, No. 26 (2007), 134-145は、5XFADマウスにおけるBACE-1の遺伝的欠失がA $\beta$ 産生を抑制し、アミロイド沈着を阻止し、大脳皮質および海馬台(5XFADマウスにおいて最も重篤なアミロイド症を示す脳領域)で見出されるニューロン喪失を防ぎ、5XFADマウスにおける記憶障害を救うと報告している。該グループはまた、A $\beta$ がADにおけるニューロン死を最終的に引き起こすと報告しており、BACE-1抑制がADの治療アプローチとして妥当だと確認されたと結論づけている。Roberdsら, *Human Mol. Genetics*, 2001, Vol. 10, No. 12, 1317-1324は、 $\gamma$ -セクレターゼ活性の抑制または喪失が顕著な表現型欠損をもたらさない一方で、A $\beta$ の付随的減少を誘導することを確認している。Luoら, *Nature Neuroscience*, Vol. 4, No. 3, March 2001は、BACE-1欠損マウスが正常表現型を有し、 $\gamma$ -アミロイド産生を消失していることを報告している。

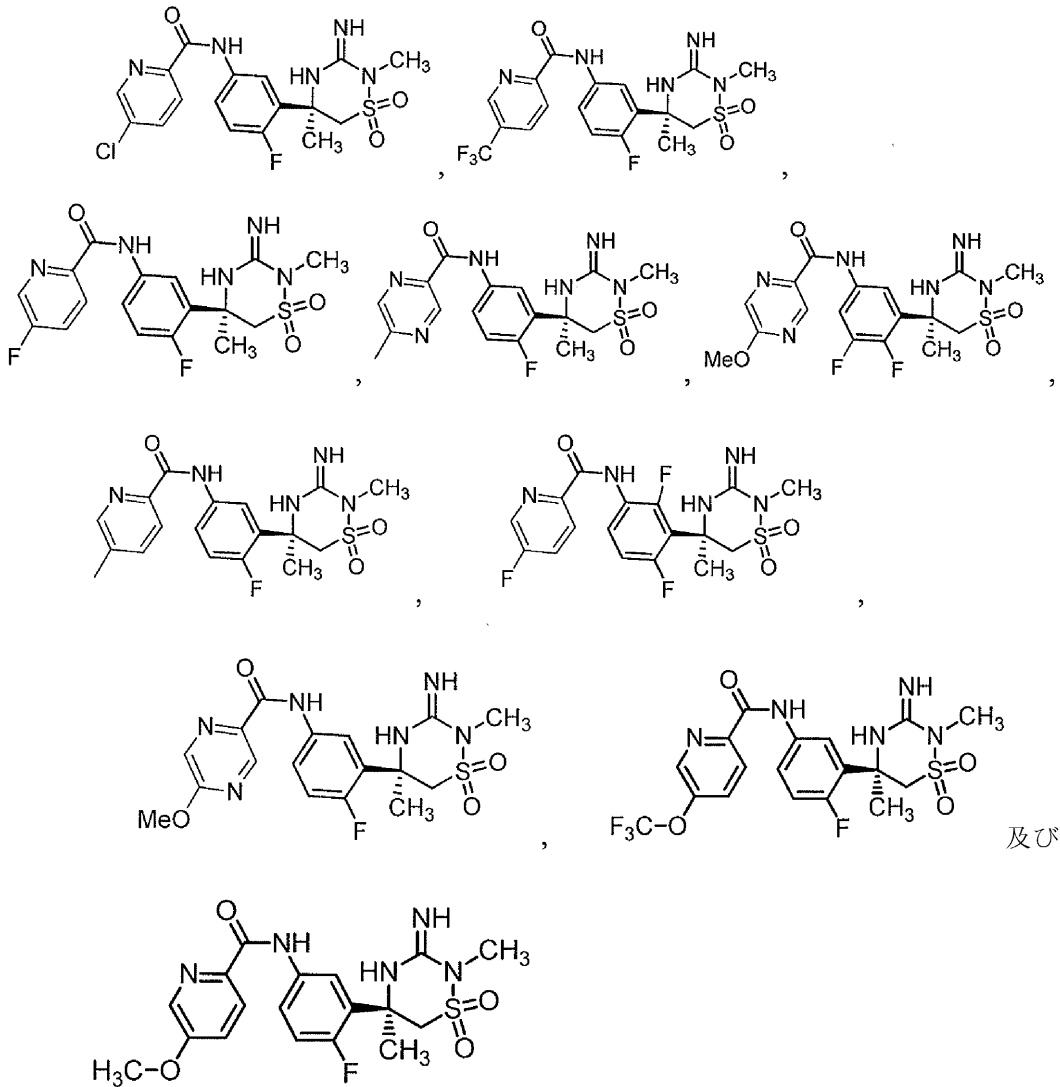
10

20

## 【0119】

ADを治療するための前記方法の1つの実施形態においては、BACE-1インヒビターは、WO2011044181に記載されている化合物、例えば、

## 【化2】



10

20

30

40

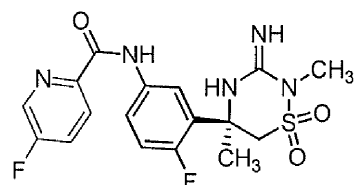
## 【0120】

からなる群から選択される化合物もしくは互変異性体または該化合物もしくは該互変異性体の医薬上許容される塩である。

## 【0121】

もう1つの実施形態においては、BACE-1インヒビターは、構造

## 【化3】



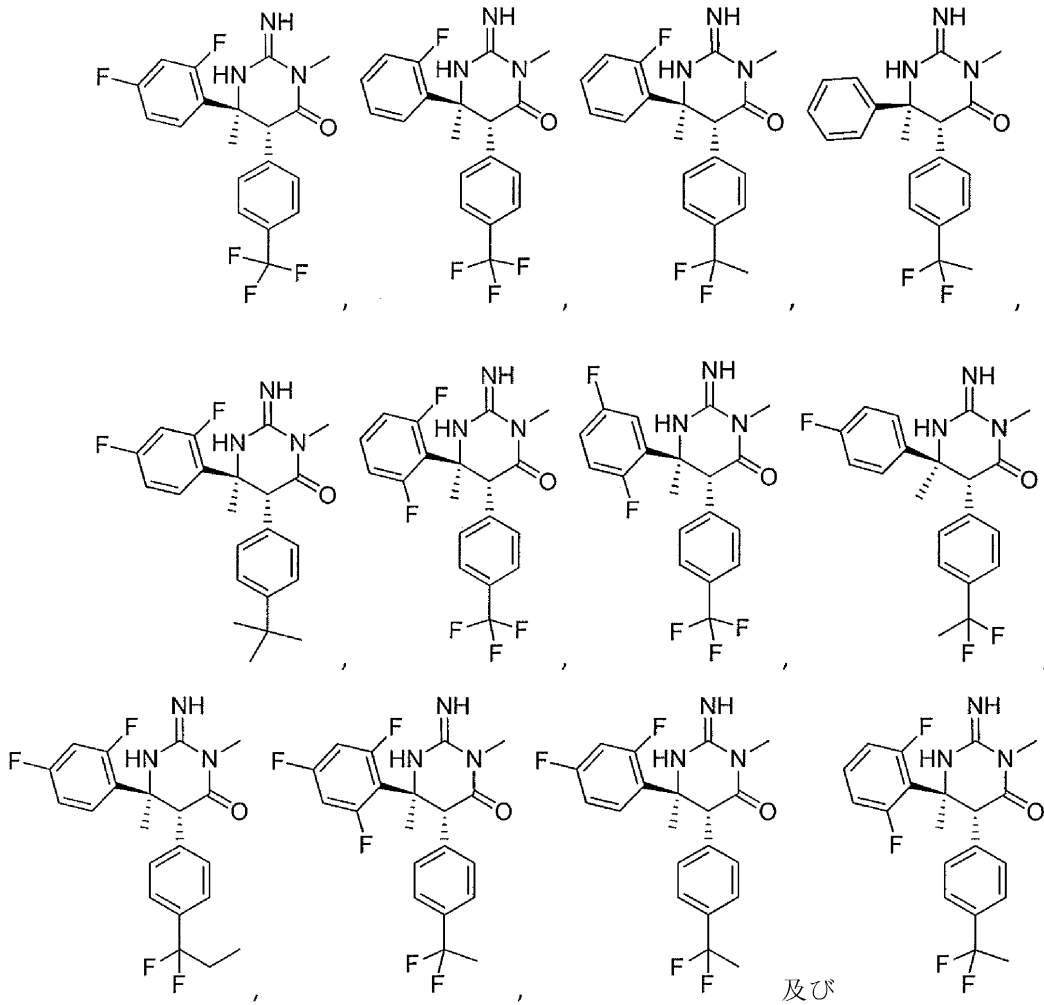
## 【0122】

を有するベルベセスタット (verubecestat) またはその互変異性体である。ベルベセスタットの医薬上許容される塩も想定される。適当な許容される塩には、HCl およびトシル酸塩が含まれるが、これらに限定されるものではない。

## 【0123】

もう1つの実施形態においては、BACE-1インヒビターは、WO2008/103351に記載されている化合物、例えば、

## 【化4】



## 【0124】

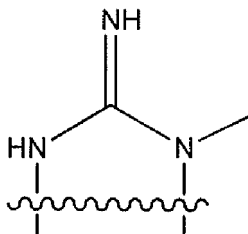
からなる群から選択される化合物もしくは互変異性体または該化合物もしくは該互変異性体の医薬上許容される塩である。

30

## 【0125】

また、

## 【化5】

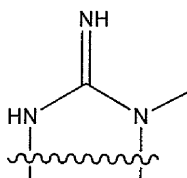


40

## 【0126】

なる部分を有する前記化合物は、異なる互変異性体で存在しうる。全てのそのような形態がこれらのBACE-1インヒビターの範囲内に含まれる。したがって、例えば、式：

## 【化6】

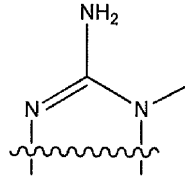


50

## 【 0 1 2 7 】

およびその互変異性体：

## 【 化 7 】



## 【 0 1 2 8 】

に合致する B A C E - 1 インヒビターは共に前記の B A C E - 1 インヒビターの範囲内に含まれると意図される。

10

## 【 0 1 2 9 】

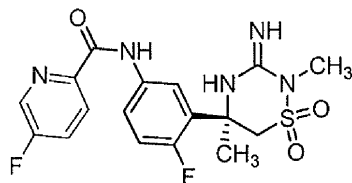
前記 A D 治療用物質、例えば B A C E - 1 インヒビターを患者に投与するための適当な用量は、当業者、例えば担当医師、薬剤師または他の熟練者によって容易に決定可能であり、患者の健康状態、年齢、体重、投与頻度、他の有効成分との併用および/または該化合物が投与される適応症に応じて変動しうる。用量は A D 治療用物質約 0 . 0 0 1 ~ 5 0 0 m g / k g 体重 / 日の範囲でありうる。1つの実施形態においては、投与量は A D 治療用物質約 0 . 0 1 ~ 約 2 5 m g / k g 体重 / 日である。もう1つの実施形態においては、単位用量の製剤中の A D 治療用物質の量は個々の適用に応じて約 1 m g ~ 約 1 0 0 m g 、好ましくは約 1 m g ~ 約 5 0 m g 、より好ましくは約 1 m g ~ 約 2 5 m g の範囲で改変または調節されうる。もう1つの実施形態においては、経口投与のための典型的な推奨 1 日投与レジメンは 2 ~ 4 分割量における約 1 m g / 日 ~ 約 5 0 0 m g / 日、好ましくは 1 m g / 日 ~ 2 0 0 m g / 日の範囲でありうる。

20

## 【 0 1 3 0 】

もう1つの実施形態においては、A D 治療用物質は、構造

## 【 化 8 】



30

## 【 0 1 3 1 】

を有する B A C E - 1 インヒビター、その互変異性体または該化合物もしくは該互変異性体の医薬上許容される塩であり、所望により、製剤化に適した医薬上許容される賦形剤を含有し、ここで、該用量は、1日 1 ~ 4 回投与される 5 m g 、 1 0 m g 、 1 2 m g 、 4 0 m g 、 6 0 m g または 1 0 0 m g / 用量である。有用な実施形態においては、この特定の B A C E - 1 インヒビターの用量は 1 日当たり 1 回で 4 0 m g または 6 0 m g である。

## 【 0 1 3 2 】

前記のとおり、前記 A D 治療用物質の投与の量および頻度は、患者の年齢、状態およびサイズならびに治療される症状の重症度のような要因を考慮して、担当臨床家の判断に従い調節される。

40

## 【 0 1 3 3 】

A D 治療用物質が B A C E - 1 インヒビターである実施形態においては、B A C E - 1 インヒビターはもう1つの A D 治療用物質と共に使用されうる。B A C E - 1 インヒビターは、1以上の追加的な A D 治療用物質と共に使用される場合、一緒に又は連続的に投与されうる。連続的に投与される場合、B A C E - 1 インヒビターは、当業者による判断により、1以上の追加的な A D 治療用物質の前または後で投与されうる。

## 【 0 1 3 4 】

一定の用量として製剤化される場合、そのような組合せ体は、本明細書に記載されている投与量範囲内の B A C E - 1 インヒビターおよび投与量範囲内のその他の医薬上活性な

50

物質または治療を使用する。

【0135】

したがって、1つの態様においては、本発明は、少なくとも1つのBACE-1インヒビターもしくはその互変異性体またはBACE-1インヒビターもしくは互変異性体の医薬上許容される塩の或る量と、前記の1以上の追加的なAD治療用物質の有効量との組合せを含む。

【0136】

前記BACE-1インヒビターの薬理学的特性は、WO2011/044181に例示されている幾つかの薬理学的アッセイにより確認されうる。

【0137】

前記AD治療用物質から医薬組成物を製造する場合、不活性の医薬上許容される担体は固体または液体でありうる。固体形態の製剤には、散剤、錠剤、分散性顆粒剤、カプセル剤、カシェ剤および坐剤が含まれる。散剤および錠剤は約5～約95%の有効成分を含みうる。適当な固体担体は当技術分野で公知であり、例えば炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖またはラクトースが挙げられる。錠剤、散剤、カシェ剤およびカプセル剤は、経口投与に適した固体剤形として使用されうる。医薬上許容される担体の例および種々の組成物の製造方法の例はA. Gennaro (編), Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvaniaに見出されうる。

10

20

【0138】

液体形態の製剤には、溶液(水剤)、懸濁剤および乳剤(エマルション)が含まれる。一例として、経口注射には水または水-プロピレングリコール溶液が使用可能であり、あるいは経口溶液、懸濁剤および乳剤には甘味剤および乳白剤が加えられうる。液体形態の製剤には鼻腔内投与用の溶液も含まれうる。

【0139】

吸入に適したエアゾール製剤には溶液および粉末形態の固体が含まれることが可能であり、これらは医薬上許容される担体、例えば不活性圧縮ガス、例えば窒素と組合せられうる。

【0140】

経口または非経口投与用の液体形態の製剤へと使用直前に変換されることが意図される固体形態の製剤も含まれる。そのような液体形態には溶液、懸濁液および乳剤が含まれる。

30

【0141】

前記AD治療用物質は経皮的にも運搬可能でありうる。経皮組成物はクリーム剤、ローション剤、エアゾール剤および/または乳剤の形態をとることが可能であり、この目的に当技術分野で通常に使用されるマトリックスまたはリザーバー型の経皮パッチ内に含まれうる。

【0142】

前記AD治療用物質は皮下運搬されることも可能である。

40

【0143】

1つの実施形態においては、AD治療用物質、例えばBACE-1インヒビターは経口投与される。

【0144】

幾つかの実施形態においては、1以上のAD治療用物質を含む医薬製剤は単位投与形で製造されることが有利でありうる。そのような形態においては、該製剤は、適当な量(例えば、所望の目的を達成するための有効量)の有効成分を含有する適切なサイズの単位用量へと細分される。

【0145】

もう1つの態様においては、例えば前記のとおりのアルツハイマー病の診断およびAD

50



治療のための患者の選択のような目的のために生物学的サンプル中の h - タウの量を定量するためのキットを提供する。該キットは、

( a ) アミノ酸 2 2 0 - 2 2 4 からなる h - タウ上のエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント、例えば、m A b 1 0 H 8 もしくは該抗体の変異体 ( 前記のとおり ) またはそれらの抗原結合性フラグメント、および

( b ) アミノ酸 1 8 9 - 1 9 4 からなる h - タウ上のエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント、例えば、m A b 1 9 G 1 0 もしくは該抗体の変異体 ( 前記のとおり ) またはそれらの抗原結合性フラグメントを含む。

【 0 1 4 6 】

該キットの 1 つの実施形態においては、該キットの成分 ( a ) の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント、例えば m A b 1 0 H 8 は前記の固相支持体 ( 例えば、磁気マイクロスフェア ) に連結され、該キットの成分 ( b )、例えば m A b 1 9 G 1 0 はビオチン化される。

10

【 0 1 4 7 】

もう 1 つの実施形態においては、前記キットは、前記の A<sub>1-42</sub> ペプチドに特異的な抗体のペアを含む第 2 キットと共に使用されうる。第 2 キットのもう 1 つの実施形態においては、A<sub>1-42</sub> に特異的な抗体は、磁気マイクロスフェアに結合した m A b 1 - 1 1 - 3、およびビオチン化 m A b 6 E 1 0 である。

【 0 1 4 8 】

前記キットは更に、特定の目的 ( 例えば、A D 治療用物質、例えば B A C E - 1 インヒビターでの治療のための患者を選択する目的のための A D 患者の診断 ) のために該抗体を使用するための説明を含みうる。該キットは、個々の用途において通常使用されるバッファーおよび他の試薬、ならびに標識を検出するための物質、例えば酵素標識に対する酵素基質、二次標識、例えば二次抗体をも含みうる。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 4 9 】

【 図 1 】 図 1 は、6 個の公知 h - タウアイソフォーム ( それぞれ h - タウ 4 4 1、h - タウ 4 1 2、h - タウ 4 1 0、h - タウ - 3 8 1、h - タウ 3 8 3 および h - タウ 3 5 2 ) のアミノ酸配列 ( 配列 2 ~ 7 ) を示す。m A b 1 0 H 8 に対するエピトープ ( h - タウのアミノ酸 2 2 0 - 2 2 4 に対応する T R E P K ( 配列番号 1 1 ) ) および m A b 1 9 G 1 0 に対するエピトープ ( h - タウのアミノ酸 1 8 9 - 1 9 4 に対応するエピトープ P K S G D R ( 配列番号 1 2 ) ) が太枠内に示されている。

30

【 図 2 】 図 2 は C S F A<sub>42</sub>、タウおよびタウ / A<sub>42</sub> に関する推定 R O C 曲線 ( 1 0 0 \* 感度対 1 0 0 \* ( 1 - 特異性 ) ) を示す。8 0 % の感度および 6 0 % の特異性における基準線が示されている。

【 図 3 】 図 3 は、対数目盛を用いた、C S F h - タウ / A<sub>42</sub> に関する予想閾値に対する、感度、特異性および P E T ( フルメタモル視覚的読取り ) との一致総量 ( total agreement ) の推定を示す。感度 ( 実線 ) および特異性 ( 実線 ) が 9 5 % 下側信頼限界 ( 破線 ) と共に示されている。一致総量 ( 実線 ) の推定はノンパラメトリック密度評価に基づいている。垂直線 ( 実線 ) は、許容可能な感度および特異性性能を達成する C S F ウィンドウ ( 0 . 1 6 9、0 . 3 6 0 ) を示す。このウィンドウ内の一致総量を最大にする値 ( 0 . 2 1 5 ) も垂直線で示されており、最上部の軸上に示されている。

40

【 0 1 5 0 】

実施例

実施例 1

モノクローナル抗体 1 0 H 8 および 1 9 G 1 0 の製造

1 . タウ 1 6 6 抗原の製造

1 0 0 μ g / m L アンピシリンおよび 3 4 μ g / m L クロラムフェニコールを含有する L B ( L u r i a - B e r t a n i ) 培地内に最近の形質転換からのコロニーを接種することにより、タウ 1 6 6 ペプチド ( 抗原 ) を大腸菌 ( E . c o l i ) ( B L 2 1 ( D

50

E3) pLysS)内で発現させた。接種後、該培養を飽和状態まで37℃で一晩成長させた。該一晩培養を使用して、6×2Lを0.07(A<sub>600</sub>)の初期光学濃度で接種した。該培養を、225RPMで振とうしながら、0.6(A<sub>600</sub>)の光学濃度まで、37℃でインキュベートした。IPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)を同じ温度で1mMの最終濃度まで加えることにより、タンパク質発現を誘導した。誘導の4時間後(A<sub>600</sub>=0.63)、該培養物を9180×gで10分間の遠心分離により回収した。

#### 【0151】

回収された細胞ペーストを500mLの細胞溶解バッファー(TBS-Tris緩衝食塩水(pH8.0)+プロテアーゼインヒビター)に懸濁させた。得られた溶液を手短かにホモジナイズし、マイクロフルイダイザーに3回通過させることにより細胞溶解した。ライセートを20,000×gで20分間の遠心分離により清澄化した。

10

#### 【0152】

15mLのカラム床体積を有する2.5cm Econo-カラム上のNi-NTA(NTA-ニトリロトリ酢酸)クロマトグラフィーを使用して、タウ166ペプチドを該ライセートから精製した。Ni-NTA his結合カラム(Novagen)をバッファーA(10mM イミダゾール, pH8.0)中で前平衡化した。可溶性ライセート画分中のタウ166ペプチドを15mLのNi-NTA樹脂に4℃で2時間、バッチ結合させた。該樹脂を2.5cm Econo-カラム内に集め、以下の順序で洗浄した; 10カラム体積のバッファーA、10カラム体積のバッファーB(10mM イミダゾール, 0.5% トリトン X-100, pH 8.0)、10カラム体積のバッファーC(10mM イミダゾール, 0.5% デオキシコール酸Na, pH 8.0)、そして最後に10カラム体積のバッファーA。以下のとおりに段階勾配(ステップグラジエント)を用いて、タウ166ペプチドを溶出した: 10カラム体積のバッファーD(25mM イミダゾール, pH 8.0)、10カラム体積のバッファーE(300mM イミダゾール, pH 8.0)。5mL画分を集め、SDS-PAGEにより分析した後、関心のあるタンパク質を含有する溶出画分をプールし、バッファーDでの洗浄に付した。

20

#### 【0153】

該Ni-NTAプールを2.6cm×60cm SECカラム(Superdex 200, GE Healthcare)(バッファー(PBS, pH 7.4)で前平衡化されたもの)上に注入した。5mL画分を1.1カラム体積上で集め、SDS-PAGEにより分析した後、関心のあるタンパク質を含有する画分をプールした。このプールからのタンパク質を、3000kDa MWC0(分子量カットオフ)の遠心分離装置(PALL Corporation)を使用して2倍濃縮した。PBS(pH 7.4)に再懸濁されたタウ166ペプチドの最終ストックを濃度に関して分析し、アリコートで凍結させた。

30

#### 【0154】

##### 2. 免疫化プロトコル

38日間のスケジュールのプロトコルを用いるハイブリドーマ融合における使用に備えて、動物を免疫化した。簡潔に説明すると、該プロトコルの第1日に、完全フロイントアジュバント中の50μgのタウ166抗原を使用してマウスに注射した。ついで28日後、不完全フロイントアジュバント中の50μgの抗原を該マウスに再び注射した。10日後、該動物から採血し、スクリーニング抗原、すなわち、タウ166ペプチドに対する血清のEC50希釈力価の測定により該動物の免疫応答を判定した。50,000を超える力価値を有する動物を融合プロトコルにおける使用のために選択した。該動物に50μgの抗原を連続した3日間にわたって追加抗原接種(ブースター接種)し、ついで第4日に融合プロトコルにおける使用のために該動物を犠死させた。

40

#### 【0155】

##### 3. 融合プロトコル

ハイブリドーマ融合法は、選択された動物脾細胞の融合相手としてSP2/0マウス骨

50

髄腫細胞系を利用した。SP2/0をその対数増殖期に使用した。それは融合時点で>90%生存可能である。マウス脾臓を、選択されたマウスから集め、灌流し、浸漬軟化させ、引っ張った。該細胞を集め、計数した。SP2/0を計数し、1:5~1:2のSP2/0対脾細胞の融合比が可能となるように適量を集めた。

#### 【0156】

両方の細胞調製物を別々にDMEM/F12中で2回洗浄し、ついで一緒にし、3回目の洗浄に付した。上清をデカントし、得られたペレットを残存培地に穏やかに再懸濁させた。1mlの加温PEG(ポリエチレングリコール)を1分間にわたって該ペレットに滴下し、ついで1分間静置させた。ついで次の3分間にわたって合計10mlの培地を該懸濁液に加え、該懸濁液を37℃の水浴内で5分間インキュベートした。該細胞を遠心沈殿させ、20%フェタルクロン(Fetalclone)および2xHAT(ヒポキサンチンナトリウム、アミノプテリンおよびチミジンの液体混合物)を含有する融合培地に再懸濁させた。ついで該細胞を96ウェル培養プレート上にプレティングし、37℃でインキュベートした。7日後、20%追加的な105μlのFetalcloneおよび1xHATを含有する培地を該培養に加え、該プレートを更に7日間インキュベートした。この時点で、該培地の80%を該ウェルから除去し、新鮮培地と交換した。該プレートを更に7日間インキュベートし、ついで各ウェルからの上清をスクリーニング抗原に対する抗体反応性に関してELISAによりスクリーニングした。

10

#### 【0157】

##### 4. ELISAスクリーニング

抗原のスクリーニングのために、ビオチン化タウ166ペプチドをストレプトアビジンコート化96ウェル培養プレートの表面に結合させ、ウェルを150μlの1%BSAでブロッキングした。該抗原コート化およびブロック化プレート上の融合プレートからの50μlの培養上清および50μlの1%BSAブロッキング剤をインキュベートすることにより、スクリーニングを行った。ヤギ抗マウスIgG-HRP(ホースラディッシュペルオキシダーゼ)コンジュゲートおよびABTS(2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸])水溶性HRP基質を使用して、検出を行った。培養ウェルは、それらが0.5より大きな吸光度を示した場合に、抗体産生に関して「陽性」とみなされた。これらの陽性ウェル内の細胞を96ウェルプレートから集め、24ウェル培養プレート内に20%FetalcloneおよびHTを含有する0.5mlの培地上にプレティングした。陽性ウェルを7日間の増殖に付し、ついで追加的な0.5mlのHT培地を含有する第2のウェルへと拡張し、更に3日間の増殖に付した。選択された抗体がIgGであることを確認するために、ヤギ抗マウスIgG-HRPおよびヤギ抗マウスIgM-HRPの両方を使用して、ウェルをスクリーニング抗原に対してELISAによりスクリーニングした。ついで、0.5を超える吸光度を示すIgG抗体のみに陽性であったウェルはサブクロニングが考慮された。

20

30

#### 【0158】

タウ166を抗原として使用して9個のmAbを開発し、これらのうちの6個を8個の異なるペアとして試験した。NHVおよびAD患者のCSFにおけるh-タウ濃度を測定することにより、全てのこれらのペアをそれらの診断性能に関して試験した。ROC曲線およびそれらの対応AUC(曲線下面積)値を計算した。最高AUC値を有する抗体ペアは10H8および19G10であることが判明した。このことは、正常被験者をAD被験者から識別する場合に、それらが、試験されたペアの残りのものより優れていることを示している。したがって、これらの2つのmAbを更なる開発のために選択した。

40

#### 【0159】

##### 5. サブクロニング

24ウェルプレートの2ウェル内に拡張されたマウスIgGに対する陽性体としてスクリーニングされたウェルからの細胞を、それらが50%コンフルエントかつ90%を超える生存度になるまでインキュベートした。該細胞をプールし、計数した。ついで十分な細胞を取り出して、20%Fetalclone培地内に40mlの5細胞/mlを含有

50

する懸濁液を得た。残りの細胞を再び凍結させた。3 × 96 ウェルプレート上で105 μl / ウェル (0.5 細胞 / ウェルと同等) で該細胞をプレATINGした。該プレートを約1週間インキュベートし、ついで追加的な105 μl の培地を加え、更に1週間、またはそれらが > 25 % コンフルエントになるまでの増殖に付した。増殖細胞の単一「コロニー」を含有するウェルを、既に記載されているとおりにヤギ抗マウス IgG - HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) を使用するELISAによるスクリーニングのために選択した。スクリーニングされたクローンの90%以上がタウ166抗原に対して陽性となるまで、スクリーニング抗原に関して陽性であったウェルを使用して、該プロセスを繰返した。この時点で、陽性クローンのサブセットを12ウェル培養プレート内の1mlの培地へと拡張した。該細胞を複数ウェル内で増殖させ、再び凍結させた。これらのクローンの選択物から細胞バンクを作製した。

10

#### 【0160】

##### 6. GMP (医薬品製造品質管理基準) 細胞バンクの作製

凍結サブクローンからGMP細胞バンクを作製した。小容量の培養を10% Fetal clone 培地内で増殖させて、バンク化前品質スクリーニングにおける使用のためのサンプルを得た。このスクリーニングはバイオバーデン無菌性試験およびマイコプラズマ検出試験を含む。試験結果を受領した後、QC試験および細胞バンクの作製のために細胞を再び凍結させた。

#### 【0161】

品質試験に合格した細胞のアリコートを増殖させ、 $5 \times 10^6$  c/mlにてバンク化バイアルのための適当な体積に増量した。バンク化前に該培養をアイソタイプ決定した。該細胞を24~72時間ごとに計数し、培地内の $5 \times 10^4$  c/mlへの希釈による増殖に付した。適当な体積の培養が得られている場合には、細胞を計数し、生存度が91%以上であれば、該バンク化を進めた。細胞培養を遠心沈殿させ、上清を廃棄した。適当な量の細胞凍結培地(90% Fetal clone, 10% DMSO)に細胞を再懸濁させた。該細胞を直ちに低温チューブ内に配置し、-70で>24~72時間放置し、ついで液体窒素中で保存した。液体窒素中で少なくとも24時間の後、バンク化後QCを行った。充填プロセスの初期、中期および終期からの代表的な細胞バイアルを解凍し、増殖させた。充填の初期および終期からの培養の時間の倍化を行った。中期充填サンプルから増殖させた培養のアイソタイプ決定を行い、該培養を回収し、バンク後マイコプラズマ試験へと送り、サンプルをバイオバーデン無菌性試験のために送った。該バンクは、全ての品質結果が合格し陰性であった場合に解放された。

20

30

#### 【0162】

##### 7. 10H8および19G10抗体産生

解放されたGMP細胞バンクから抗体産生を行った。バンク化細胞のバイアルを解凍し、10% Fetal clone 培地内で培養した。培養を24~72時間ごとに計数し、必要に応じて、 $5 \times 10^4$  細胞/mlへと培養を希釈することにより増殖させた。該培養を適当な体積に増殖させ、計数し、生存度が30%以上でだと決定されたら、上清を集めた。培養を3000 × gで20分間遠心させ、上清を適当な保存容器内にデカントした。この段階で、IsoStripマウスモノクローナルアイソタイプ決定キット(Mouse Monoclonal Isotyping Kit) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) を使用して、上清をアイソタイプ決定し、ついで精製まで2~8で保存した。

40

#### 【0163】

##### 8. 精製

GMP細胞バンクからの培養から増殖させた上清を、専用プロテインAカラム上のAKTA液体クロマトグラフィー系を用いて精製した。抗体を、pH8.8のバッファーを該カラムに結合させ、pH3.3のバッファーを使用して溶出した。産物(10H8または19G10)をバッファー透析し、濃縮し、最終バッファーはPBS(pH7.4)であった。産物(10H8または19G10)を試験し、HPLCにより90%を超える純度

50

を有していた。タンパク質濃度をA280(280nmでタンパク質濃度を測定する吸光アッセイ)により測定した。産物を500 $\mu$ gのアリコート中で2.0mg/mlで保存し、-10~-25で保存した。mAb 10H8は、マウスIgG1アイソタイプを有する、それぞれ配列番号24および30の可変軽鎖および重鎖配列を有する。mAb 19G10は、マウスIgG2bアイソタイプを有する、それぞれ配列番号36および42の可変軽鎖および重鎖配列を有する。

#### 【0164】

##### 実施例2

##### 10H8および19G10のエピトープマッピング

JPTペプチド・テクノロジーズ(Peptide Technologies)のRepliTope(商標)ペプチドマイクロアレイを使用して、クローン10H8および19G10のエピトープマッピングを完了した。この技術は、ガラス表面に化学選択的かつ共有結合的に固定化された精製合成ペプチドを使用することにある。立体障害により引き起こされる偽陰性を回避するために、最適化親水性リンカー部分をガラス表面と抗原由来ペプチド配列との間に挿入する。使用されるペプチドはアミノ酸104~アミノ酸269(タウ166)の166アミノ酸のタウ中央領域タンパク質配列に伸長するものであった。同時に1または2アミノ酸下流に伸長する15アミノ酸長のペプチドをこの実験において使用した。

10

#### 【0165】

該アッセイは、自動化TECAN HS4X00マイクロアレイ・プロセッシング・ステーションを使用して行った。マイクロアレイを洗浄し、ブロッキングバッファーと共に30で60分間、ついで、ブロッキングバッファー中で希釈されたクローン10H8および19G10と共に30で120分間インキュベートした。マイクロアレイを洗浄し、ブロッキングバッファー中で希釈された二次抗体と共に30で45分間インキュベートし、ついで乾燥させた。高分解能蛍光スキャナーを使用して定量を行った。スポット認識ソフトウェアGenePix(Molecular Devices)を使用して、得られたイメージを分析し、定量した。各スポットに関して平均シグナル強度を抽出し、任意蛍光単位で表した。

20

#### 【0166】

10H8および19G10のエピトープマッピングの結果を表4および5に示す。第1欄は、RepliTope(商標)マイクロアレイ実験において使用した推定エピトープを含有するペプチドを示し、第2欄はその実験からの任意蛍光単位を示す。任意蛍光単位の太数字は強力な反応性を示し、したがってエピトープの存在を示す。この反応性に基づいて、mAb 10H8に対するエピトープはアミノ酸TREP Kからなり、mAb 19G10に対するエピトープはアミノ酸PKSGDRからなると結論づけられた。

30

【表 4】

表4

ID	蛍光強度
PGSRSRTPSLPTPPT (配列番号: 44)	570.33
SRSRTPSLPTPPTRE (配列番号: 45)	552.00
SRTPSLPTPPTREP <b>K</b> (配列番号: 46)	<b>57972.33</b>
TPSLPTPPTREP <b>K</b> KV (配列番号: 47)	<b>56714.33</b>
SLPTPPTREP <b>K</b> KVAV (配列番号: 48)	<b>63929.00</b>
PTPPTREP <b>K</b> KVAVVR (配列番号: 49)	<b>53033.33</b>
PP <b>TREP</b> KKVAVVRTP (配列番号: 50)	<b>61139.33</b>
<b>TREP</b> KKVAVVRTPPK (配列番号: 51)	<b>32352.00</b>
<b>EP</b> KKVAVVRTPPKSP (配列番号: 52)	2101.67
KKVAVVRTPPKSPSS (配列番号: 53)	750.33
SLPTPPTREP <b>K</b> KVAV (配列番号: 54)	<b>64393.00</b>

10

20

30

LPTPTREP <del>K</del> KVAVV (配列番号: 55)	59474.00
PTPTREP <del>K</del> KVAVVR (配列番号: 56)	64238.67
TPPTREP <del>K</del> KVAVVRT (配列番号: 57)	60638.00
PPTREP <del>K</del> KVAVVRTP (配列番号: 58)	60153.33
PTREP <del>K</del> KVAVVRTPP (配列番号: 59)	64284.33
TREP <del>K</del> KVAVVRTPPK (配列番号: 60)	58813.67
REP <del>K</del> KVAVVRTPPKS (配列番号: 61)	1399.33
EP <del>K</del> KVAVVRTPPKSP (配列番号: 62)	889.67

10

20

クローン10H8エヒトープマッピングの結果 = TREP~~K~~

## 【表 5】

表5

ID	蛍光強度
PPAPKTPPSSGEP <del>P</del> PK (配列番号: 63)	891.67
APKTPPSSGEP <del>P</del> PKSG (配列番号: 64)	760.67
KTPPSSGEP <del>P</del> PKSGDR (配列番号: 65)	55751.67
PPSSGEP <del>P</del> PKSGDRSG (配列番号: 66)	62047.67
SSGEP <del>P</del> PKSGDRSGYS (配列番号: 67)	62721.33
GE <del>P</del> PKSGDRSGYSSP (配列番号: 68)	58008.00

30

40

号: 68)	
PPKSGDRSGYSSPGS (配列番号: 69)	53418.00
KSGDRSGYSSPGSPG (配列番号: 70)	1814.00
GDRSGYSSPGSPGTP (配列番号: 71)	588.33
SSGEPKSGDRSGYS (配列番号: 72)	55441.00
SGEPPKSGDRSGYSS (配列番号: 73)	59686.33
GEPPKSGDRSGYSSP (配列番号: 74)	58865.67
EPPKSGDRSGYSSPG (配列番号: 75)	63089.00
PPKSGDRSGYSSPGS (配列番号: 76)	58692.67
PKSGDRSGYSSPGSP (配列番号: 77)	49555.33
KSGDRSGYSSPGSPG (配列番号: 78)	1548.67
SGDRSGYSSPGSPGT (配列番号: 79)	618.67

10

20

30

クローン19G10のエピトープマッピングの結果 = PPKSGDR

【 0 1 6 7 】

実施例 3

m A b 1 0 H 8 および 1 9 G 1 0 の相対結合アフィニティの測定

固定化 h - タウ 4 4 1 を捕捉タンパク質として使用する B I A c o r e C M 3 センサーチップ ( B i a c o r e , P i s c a t a w a y , N J ) により、 1 0 H 8 および 1 9 G 1 0 m A b の結合アフィニティ ( K d ) を決定した。

【表 6】

表 6

40

抗体	$K_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{off} (s^{-1})$	$K_d (nM)$
10H8 mAb	$1.82E+04 \pm 9.84E+03$	$3.06E-04 \pm 1.50E-04$	$17 \pm 2.1$
19G10 mAb	$2.59E+04 \pm 7.05E+03$	$1.76E-04 \pm 1.37E-04$	$6.3 \pm 3.5$

【 0 1 6 8 】

実施例 4

h タウ および A<sub>1-42</sub> の定量

h - タウアッセイのための h - タウ 4 4 1 標準体の製造

50



h - タウ 4 4 1 の配列 ( 配列番号 1 ) を p e t 3 A ベクター内に N D E I / B a m H I 切断部位においてクローニングした。H i s タグ、T E V 切断部位および h - タウ 4 4 1 配列は表 1 に示されている。該ベクターを大腸菌 ( E . c o l i ) ( B L 2 1 ( D E 3 ) p L y s S ) 内に形質転換し、I P T G の添加によりタンパク質発現を誘導した。N i - N T A H i s 結合カラム ( N o v a g e n ) を使用して、h - タウ 4 4 1 の精製を完了した。

#### 【 0 1 6 9 】

##### h - タウアッセイ

h - タウアッセイは、ビーズに基づく技術 ( L u m i n e x C o r p o r a t i o n , A u s t i n , T X ) を用い、この場合、2 工程のカルボジイミド反応プロトコルを用いて、1 . 0 m L の M a g P l e x ( 登録商標 ) ミクロスフェアに対して 1 0 0 μ g の m A b 1 0 H 8 の比で、タウ特異的 m A b ( m A b 1 0 H 8 , M e r c k ) を磁気ミクロスフェア上に結合させた。該 2 工程法においては、まず、ミクロスフェアの表面上のカルボキシル基をカルボジイミド誘導體 E D C ( 1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) カルボジイミド ) で活性化して、スルホ - N H S ( N - ヒドロキシルホスクシンイミドナトリウム塩 ) で安定化される中間体を形成させる。ついで該中間体をタンパク質の第 1 級アミドと反応させてアミド結合を形成させ、それによりミクロスフェアの表面上で安定複合タンパク質を得る。該アッセイにおいて、該結合ミクロスフェアを 9 6 ウェルプレートのウェル内で標準物質 ( h - タウ 4 4 1 : 1 5 . 6 ~ 1 0 0 0 p g / m L ) または C S F サンプルと共に、振とうしながら室温で 2 時間インキュベートした。ついで、2 0 倍モル過剰で標識された h - タウに特異的なビオチン化 m A b ( m A b 1 9 G 1 0 , M e r c k ) を該反応に加え、振とうしながら室温で 1 時間インキュベートし、ついで、該ビオチン化抗体に結合するストレプトアビジン - フィコエリトリン ( S A P E ) コンジュゲート ( M o s s , I n c . , P a s a d e n a , M D ) と共に 3 0 分間インキュベートした。インキュベーション工程のそれぞれの間に、磁気洗浄系を用いて 2 × 1 5 0 μ L での洗浄 ( P B S - T B N ) を行った。該反応の完了後、該ミクロスフェアを 1 0 0 μ L の洗浄バッファーに再懸濁させ、ついで、特異的ミクロスフェアを特定するために分類レーザー ( 6 3 8 n m ) または分類励起 ( 6 2 1 n m ) を、そして該コンジュゲートに結合したフィコエリトリン分子を励起するためにレポーターレーザー ( 5 3 2 n m ) またはレポーター励起 ( 5 1 1 n m ) を用いる x M A P 装置 ( F l e x M a p 3 D , L u m i n e x C o r p o r a t i o n , A u s t i n , T X ) で直ちに分析した。蛍光出力を、作成された検量線で読取られたサンプル中の h - タウの濃度と直接的に関連づける。

#### 【 0 1 7 0 】

##### A<sub>1-42</sub> アッセイ

A<sub>1-42</sub> アッセイも、ビーズに基づく技術 ( L u m i n e x C o r p o r a t i o n , A u s t i n , T X ) を用い、2 工程のカルボジイミド反応プロトコルを用いて、m A b 1 - 1 1 - 3 ( B i o L e g e n d ) を磁気ミクロスフェア ( M a g P l e x ( 登録商標 ) ミクロスフェア ) 上に結合させた。該 2 工程法においては、まず、ミクロスフェアの表面上のカルボキシル基をカルボジイミド誘導體 E D C ( 1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) カルボジイミド ) で活性化して、スルホ - N H S ( N - ヒドロキシルホスクシンイミドナトリウム塩 ) で安定化される中間体を形成させる。ついで該中間体をタンパク質の第 1 級アミドと反応させてアミド結合を形成させ、それによりミクロスフェアの表面上で安定複合タンパク質を得る。該アッセイにおいて、該結合ミクロスフェアを 9 6 ウェルプレートのウェル内で標準物質 ( 標準 A<sub>1-42</sub> : 5 . 4 7 ~ 7 0 0 p g / m L ) または C S F サンプルと共に、振とうしながら室温で 2 時間インキュベートした。ついで、2 0 倍モル過剰で標識されたビオチン化 6 E 1 0 m A b ( C o v a n c e ) を該反応に加え、振とうしながら室温で 1 時間インキュベートし、ついで、該ビオチン化抗体に結合するストレプトアビジン - フィコエリトリン ( S A P E ) コンジュゲート ( M o s s , I n c . , P a s a d e n a , M D ) と共に 3 0 分間インキュベートした。インキュベーション工程のそれぞれの間に、磁気洗浄系を用いて 2 × 1 5 0 μ L での洗

浄 ( P B S - T B N ) を行った。該反応の完了後、該マイクロスフェアを 1 0 0 μ L の洗浄バッファーに再懸濁させ、ついで、特異的マイクロスフェアを特定するために分類レーザー ( 6 3 8 n m ) または分類励起 ( 6 2 1 n m ) を、そして該コンジュゲートに結合したフィコエリトリン分子を励起するためにレポーターレーザー ( 5 3 2 n m ) またはレポーター励起 ( 5 1 1 n m ) を用いる X M A P 装置で直ちに分析した。蛍光出力を、作成された検量線で読取られたサンプル中の A<sub>1-42</sub> アナライトの濃度と直接的に関連づける。

【 0 1 7 1 】

実施例 5

A D 診断と h - タウレベルおよび h - タウ / A<sub>42</sub> 比との間の相関性

実施例 4 に記載されている h - タウアッセイを用いて、代表的な健常対照 ( n = 1 8 8 ) および A D 被験者 ( n = 1 5 5 ) の集合において、ヒト個体の C S F 中の h - タウレベルを決定した。施設の指針に従い、C S F を集めた。健常対照 ( H C ) および A D 患者は性別 ( A D に関しては男性 4 5 % および H C においては男性 4 5 % ) および年齢 ( 平均年齢は A D においては 6 4 歳、健常ボランティアにおいては 6 7 歳 ) において類似していた。以下の表 7 に示すとおり、平均 C S F h - タウ濃度は A D 被験者 ( 2 0 8 ± 8 3 ) においては健常対照被験者 ( 1 2 6 ± 3 9 ) と比べて高かった。h - タウ / A<sub>1-42</sub> の平均比は健常対照においては 0 . 1 7 5 ± 0 . 0 9 6 であったが、それは A D においては 0 . 6 1 3 ± 0 . 3 0 2 であった。この生データは、A D または H C である被験者を識別するために h - タウレベルまたは比を用いることが可能であることを表している。

10

20

【 表 7 】

表 7

タウ	臨床Dx	(N)	平均	SD
	健常対照	188	126	39
	AD	155	208	83
タウ/AB42	臨床Dx	(N)	平均	SD
	健常対照	188	0.175	0.096
	AD	155	0.613	0.302

30

【 0 1 7 2 】

実施例 6

h - タウおよび h - タウ / A<sub>1-42</sub> 比のカットオフ値を確定するための方法

統計分析計画

C S F サンプルを国際的な 5 箇所からの 1 8 8 名の H C および 1 5 5 名の A D 被験者から集め、前記の h - タウおよび A<sub>1-42</sub> アッセイを用いてアッセイした。カットオフを確定するために 2 工程アプローチを用いた。第 1 に、h - タウ / A<sub>1-42</sub> 比を用いて少なくとも 8 0 % の感度および 6 0 % の特異性で A D を H C から識別する、A D と健常対照とを最も良く識別する可能なカットオフ値の範囲を決定した。H C からのサンプルと A D 被験者からのサンプルとを識別する C S F におけるアッセイの性能を特徴づけるために、受信者動作特性 ( R O C ; P e p e , M . S . The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, 2003 Oxford University Press : Oxford , Great Britain を参照されたい ) 曲線法を用いた。第 2 に、A D および他の認知機能低下の原因に関して評価されている認知障害を有する成人患者における A 老人斑の存在を推定するための脳のイメージングに関して承認された V i z a m y l ( 商標 ) ( <sup>18</sup> F - フルテメタモール ) を使用するポジトロン放出断層撮影 ( P E T ) イメージング ( G e n e r a l E l e c t r i c V i z a m y l ( 商標 ) パッケージインサート , 2 0 1 3 年 1 0 月改訂 ) を行い、結果を用いて、

40

50

確定範囲内の特異的カットオフ値を選択した。Vizamy1(商標)のFDA承認ラベルに記載されている、これらの脳領域のイメージの配向および表示のための推奨方法に従い、イメージを陽性または陰性スキャンとして評価した。第1段階における感度および特異性の評価ならびに第2段階におけるPETの一致の推定の両方のために、アミロイドPETイメージングを有するAD被験者および健常対照を用いた。本発明者らの感度および特異性基準を満たしアミロイドPETとの一致を最大にしたウィンドウ内のCSF hタウおよびhタウ/A<sub>1-42</sub>値はhタウに関しては184 pg/mL、そしてhタウ/A<sub>1-42</sub>に関しては0.251の比であった(図2および3)。

【 図 1 】

1	MAEPRQEFVEMEDHAGTYLGLGRRKDDGGYTMHQDQEGDIDAGLK	44	TAU_HUMAN	352
1	MAEPRQEFVEMEDHAGTYLGLGRRKDDGGYTMHQDQEGDIDAGLKESPLQPTIEDGSEEPG	60	TAU_HUMAN	381
1	MAEPRQEFVEMEDHAGTYLGLGRRKDDGGYTMHQDQEGDIDAGLKESPLQPTIEDGSEEPG	60	TAU_HUMAN	410
1	MAEPRQEFVEMEDHAGTYLGLGRRKDDGGYTMHQDQEGDIDAGLK	44	TAU_HUMAN	383
1	MAEPRQEFVEMEDHAGTYLGLGRRKDDGGYTMHQDQEGDIDAGLKESPLQPTIEDGSEEPG	60	TAU_HUMAN	412
1	MAEPRQEFVEMEDHAGTYLGLGRRKDDGGYTMHQDQEGDIDAGLKESPLQPTIEDGSEEPG	60	TAU_HUMAN	441
45	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	62	TAU_HUMAN	352
61	SETSDAKSTPTAE-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	91	TAU_HUMAN	381
61	SETSDAKSTPTAEDVNTAPLYDEGAPGKQAADPHITEIPGEGTAAEAGIGDTPSLEDEAAG	120	TAU_HUMAN	410
45	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	62	TAU_HUMAN	383
61	SETSDAKSTPTAE-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	91	TAU_HUMAN	412
61	SETSDAKSTPTAEDVNTAPLYDEGAPGKQAADPHITEIPGEGTAAEAGIGDTPSLEDEAAG	120	TAU_HUMAN	441
63	HVTOARWVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQGGGANATRIIPAKTPPAPK	122	TAU_HUMAN	352
92	HVTOARWVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQGGGANATRIIPAKTPPAPK	151	TAU_HUMAN	381
121	HVTOARWVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQGGGANATRIIPAKTPPAPK	180	TAU_HUMAN	410
63	HVTOARWVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQGGGANATRIIPAKTPPAPK	122	TAU_HUMAN	383
92	HVTOARWVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQGGGANATRIIPAKTPPAPK	151	TAU_HUMAN	412
121	HVTOARWVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQGGGANATRIIPAKTPPAPK	180	TAU_HUMAN	441
123	TPPSSGEFPPKSSDREGYSSFGSPGTPGSRGRTPLSPPTPTREPKVAVVIRTPPKSPSSAK	182	TAU_HUMAN	352
152	TPPSSGEFPPKSSDREGYSSFGSPGTPGSRGRTPLSPPTPTREPKVAVVIRTPPKSPSSAK	211	TAU_HUMAN	381
181	TPPSSGEFPPKSSDREGYSSFGSPGTPGSRGRTPLSPPTPTREPKVAVVIRTPPKSPSSAK	240	TAU_HUMAN	410
123	TPPSSGEFPPKSSDREGYSSFGSPGTPGSRGRTPLSPPTPTREPKVAVVIRTPPKSPSSAK	182	TAU_HUMAN	383
152	TPPSSGEFPPKSSDREGYSSFGSPGTPGSRGRTPLSPPTPTREPKVAVVIRTPPKSPSSAK	211	TAU_HUMAN	412
181	TPPSSGEFPPKSSDREGYSSFGSPGTPGSRGRTPLSPPTPTREPKVAVVIRTPPKSPSSAK	240	TAU_HUMAN	441
	19G10 10H			
183	SRLQIAPVMPDLKNNKSKIGSTENLKHDPGGC	215	TAU_HUMAN	352
212	SRLQIAPVMPDLKNNKSKIGSTENLKHDPGGC	244	TAU_HUMAN	381
241	SRLQIAPVMPDLKNNKSKIGSTENLKHDPGGC	273	TAU_HUMAN	410
183	SRLQIAPVMPDLKNNKSKIGSTENLKHDPGGCKVQIINKKLDLSNWSKQSSKQNIKHV	242	TAU_HUMAN	383
212	SRLQIAPVMPDLKNNKSKIGSTENLKHDPGGCKVQIINKKLDLSNWSKQSSKQNIKHV	271	TAU_HUMAN	412
241	SRLQIAPVMPDLKNNKSKIGSTENLKHDPGGCKVQIINKKLDLSNWSKQSSKQNIKHV	300	TAU_HUMAN	441
216	-----KVQIYYKPVLDLKVTSKQSLGNIHHPGGGGQVEVSEKLFKDRVQSKIIGSLDNI	271	TAU_HUMAN	352
245	-----KVQIYYKPVLDLKVTSKQSLGNIHHPGGGGQVEVSEKLFKDRVQSKIIGSLDNI	300	TAU_HUMAN	381
274	-----KVQIYYKPVLDLKVTSKQSLGNIHHPGGGGQVEVSEKLFKDRVQSKIIGSLDNI	329	TAU_HUMAN	410
243	PGGGSVDIYYKPVLDLKVTSKQSLGNIHHPGGGGQVEVSEKLFKDRVQSKIIGSLDNI	302	TAU_HUMAN	383
272	PGGGSVDIYYKPVLDLKVTSKQSLGNIHHPGGGGQVEVSEKLFKDRVQSKIIGSLDNI	331	TAU_HUMAN	412
301	PGGGSVDIYYKPVLDLKVTSKQSLGNIHHPGGGGQVEVSEKLFKDRVQSKIIGSLDNI	360	TAU_HUMAN	441
272	THVPGGNKKIETHLKTFRENAKAKTDHGAEIYKSPVVSQDTSRHLSNVSSGSDIMV	331	TAU_HUMAN	352
301	THVPGGNKKIETHLKTFRENAKAKTDHGAEIYKSPVVSQDTSRHLSNVSSGSDIMV	360	TAU_HUMAN	381
330	THVPGGNKKIETHLKTFRENAKAKTDHGAEIYKSPVVSQDTSRHLSNVSSGSDIMV	389	TAU_HUMAN	410
303	THVPGGNKKIETHLKTFRENAKAKTDHGAEIYKSPVVSQDTSRHLSNVSSGSDIMV	362	TAU_HUMAN	383
332	THVPGGNKKIETHLKTFRENAKAKTDHGAEIYKSPVVSQDTSRHLSNVSSGSDIMV	391	TAU_HUMAN	412
361	THVPGGNKKIETHLKTFRENAKAKTDHGAEIYKSPVVSQDTSRHLSNVSSGSDIMV	420	TAU_HUMAN	441
332	DSPLATLADVEVSASLAKQL	352	TAU_HUMAN	352
361	DSPLATLADVEVSASLAKQL	381	TAU_HUMAN	381
390	DSPLATLADVEVSASLAKQL	410	TAU_HUMAN	410
363	DSPLATLADVEVSASLAKQL	383	TAU_HUMAN	383
392	DSPLATLADVEVSASLAKQL	412	TAU_HUMAN	412
421	DSPLATLADVEVSASLAKQL	441	TAU_HUMAN	441

FIG.1

【 図 2 】

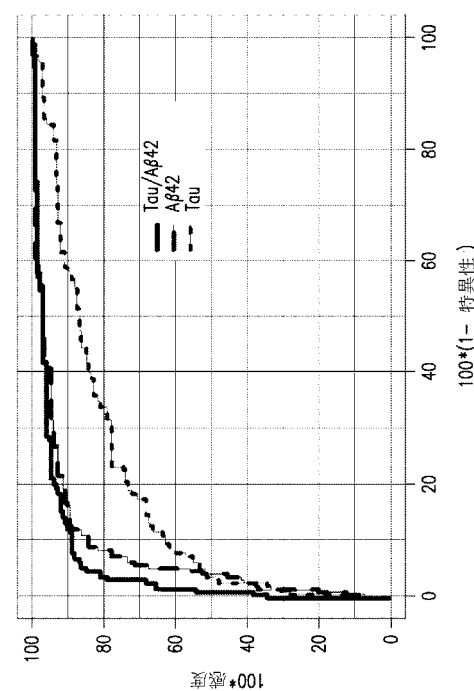


FIG.2

【 図 3 】

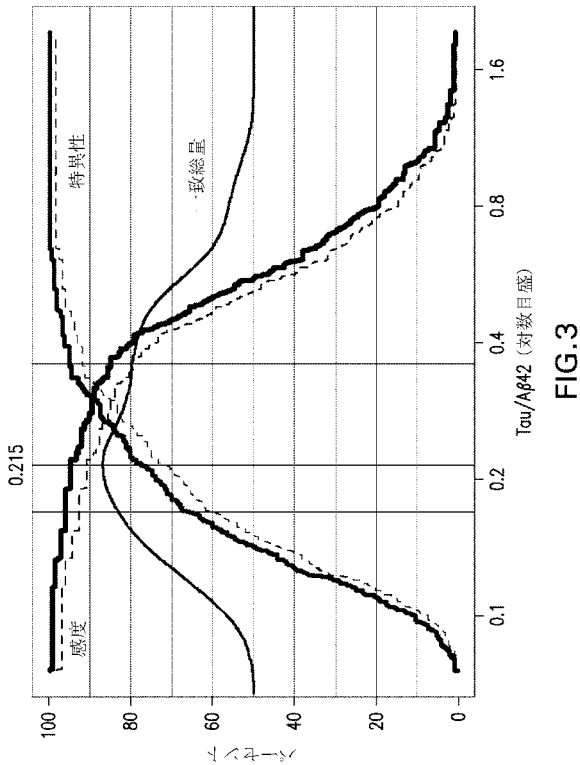


FIG.3

## 【 配列表 】

2017512056000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成28年12月2日(2016.12.2)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

## 【 補正の内容 】

## 【 特許請求の範囲 】

## 【 請求項 1 】

アミノ酸 220 - 224 からなるヒト・タウのエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【 請求項 2 】

配列番号 20 (CDRL1)、配列番号 21 (CDRL2) および配列番号 22 (CDRL3) の 3 個の軽鎖 CDR ならびに配列番号 26 (CDRH1)、配列番号 27 (CDRH2) および配列番号 28 (CDRH3) の 3 個の重鎖 CDR を含む、請求項 1 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

## 【 請求項 3 】

配列番号 24 の軽鎖可変領域および配列番号 30 の重鎖可変領域を含む、請求項 1 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

## 【 請求項 4 】

モノクローナル抗体 10H8 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 1 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

## 【 請求項 5 】

アミノ酸 189 - 194 からなるヒト・タウのエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 6】

配列番号 32 (CDRL1)、配列番号 33 (CDRL2) および配列番号 34 (CDRL3) の 3 個の軽鎖 CDR ならびに配列番号 38 (CDRH1)、配列番号 39 (CDRH2) および配列番号 40 (CDRH3) の 3 個の重鎖 CDR を含む、請求項 5 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 7】

配列番号 36 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 42 の重鎖可変ドメインを含む、請求項 5 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 8】

モノクローナル抗体 19G10 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 5 記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 9】

(a) 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントと生物学的サンプルを、ヒト・タウと該抗体またはその抗原結合性フラグメントとの免疫複合体の形成を可能にする条件下で接触させること、および

(b) 形成した免疫複合体を検出すること  
を含む、生物学的サンプル中のヒト・タウを定量する方法。

【請求項 10】

該抗体がモノクローナル抗体 10H8 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

(a) 請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントと生物学的サンプルを、ヒト・タウと該抗体またはその抗原結合性フラグメントとの免疫複合体の形成を可能にする条件下で接触させること、および

(b) 形成した免疫複合体を検出すること  
を含む、生物学的サンプル中のヒト・タウを定量する方法。

【請求項 12】

該抗体がモノクローナル抗体 19G10 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

脳脊髄液サンプル中のヒト・タウを定量するための方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント (ここで、該抗体または抗原結合性フラグメントは固体支持体上に固定化されている) と該サンプルを、捕捉抗体 / タウ複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、該サンプルからのヒト・タウを捕捉すること、および

(b) 請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項記載の検出可能な様態で標識された抗体またはその抗原結合性フラグメントと該捕捉抗体 / タウ複合体を、捕捉抗体 / タウ / 検出可能標識抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、捕捉されたタウを検出すること  
を含む方法。

【請求項 14】

捕捉抗体がモノクローナル抗体 10H8 またはその抗原結合性フラグメントであり、検出可能な様態で標識される抗体がモノクローナル抗体 19G10 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

固体支持体が、磁気粒子、マイクロスフェア、磁気マイクロスフェア、ビーズ、膜、プラスチックチューブ、マイクロタイターウェルからなる群から選択される、請求項 13 記載の方法。

## 【請求項 16】

固体支持体が磁気マイクロスフェアである、請求項 15 記載の方法。

## 【請求項 17】

検出可能な状態で標識された抗体が、放射性同位体、酵素、ビオチン、色素、蛍光標識および化学発光標識からなる群から選択される試薬で標識されている、請求項 13 記載の方法。

## 【請求項 18】

試薬がビオチンである、請求項 17 記載の方法。

## 【請求項 19】

ビオチンがストレプトアビジン - フィコエリトリンコンジュゲートに結合する、請求項 18 記載の方法。

## 【請求項 20】

アルツハイマー病を有する疑いのある患者においてアルツハイマー病の診断を補助するための方法であって、該方法が、

(a) 請求項 13 記載の方法を用いて該患者の脳脊髄液サンプル中のヒト・タウの量を定量すること、および

(b) 工程 (a) におけるヒト・タウの濃度を決定すること  
を含み、

184 pg / mL より大きな値が該患者における AD の診断を示す、方法。

## 【請求項 21】

(c) 該患者の脳脊髄液サンプル中の A<sub>1-42</sub> の量を定量すること、および

(d) 該患者のサンプルにおけるヒト・タウ / A<sub>1-42</sub> の比を決定することを更に  
含み、

0.215 より大きな比の値が該患者における AD の診断を示す、請求項 20 記載の方法。

## 【請求項 22】

工程 (c) において、6E10、12F4、1-11-3、G2-11 および 4G8 からなる群から選択される少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはこれらの抗体のいずれかの抗原結合性フラグメントを使用して、A<sub>1-42</sub> の量を定量する、請求項 21 記載の方法。

## 【請求項 23】

工程 (c) において、

(i) A<sub>1-42</sub> の C 末端のエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメント (ここで、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは固体支持体上に固定化されている) と該サンプルを、捕捉抗体 / A<sub>1-42</sub> 複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、該サンプルからの A<sub>1-42</sub> を捕捉すること、および

(ii) A<sub>1-42</sub> の N 末端のエピトープに特異的に結合する検出可能な状態で標識された抗体またはその抗原結合性フラグメントと該捕捉抗体 / A<sub>1-42</sub> 複合体を、検出可能標識抗体 / A<sub>1-42</sub> / 捕捉抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより、捕捉された A<sub>1-42</sub> を検出すること

により、脳脊髄液サンプル中の A<sub>1-42</sub> の量が定量される、請求項 21 記載の方法。

## 【請求項 24】

工程 (c) (i) において使用する抗体がモノクローナル抗体 1-11-3 であり、工程 (c) (ii) において使用する抗体がモノクローナル抗体 6E10 である、請求項 23 記載の方法。

## 【請求項 25】

AD 治療用物質を含む、アルツハイマー病の治療のための医薬組成物であって、当該治療が、

(a) 請求項 20、21、22、23 および 24 のいずれか 1 項記載の方法を用いて、治療を要する患者を選択すること、および

(b) 前記 A D 治療用物質の治療的有効量を該患者に投与することを含む、医薬組成物。

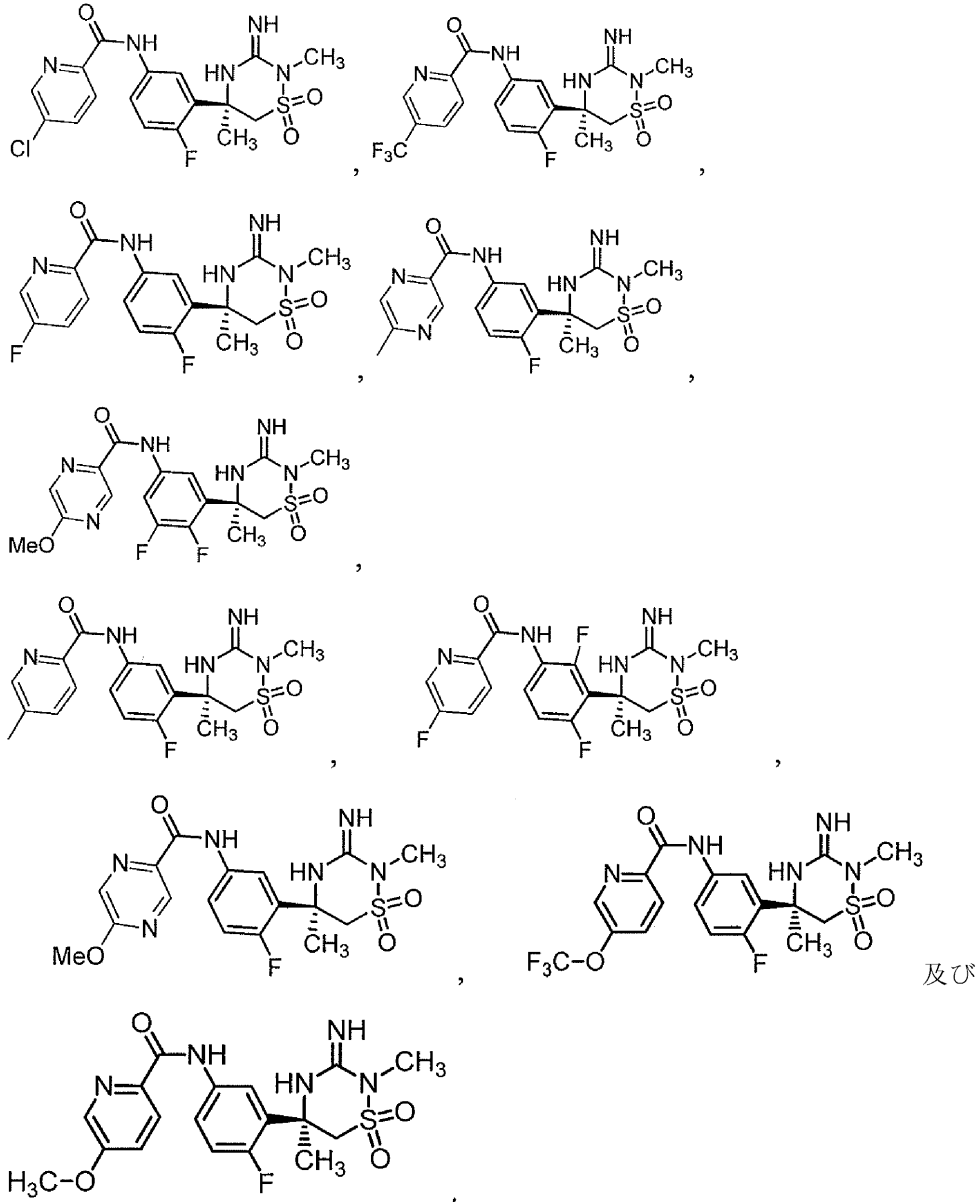
【請求項 26】

A D 治療用物質が BACE-1 インヒビターである、請求項 25 記載の 医薬組成物。

【請求項 27】

BACE-1 インヒビターが、

【化 1】

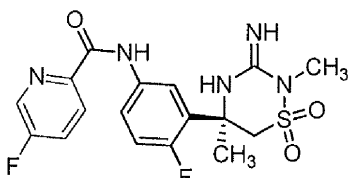


からなる群から選択される化合物もしくはその互変異性体または該化合物もしくは互変異性体の医薬上許容される塩である、請求項 26 記載の 医薬組成物。

【請求項 28】

BACE-1 インヒビターが、構造

【化 2】



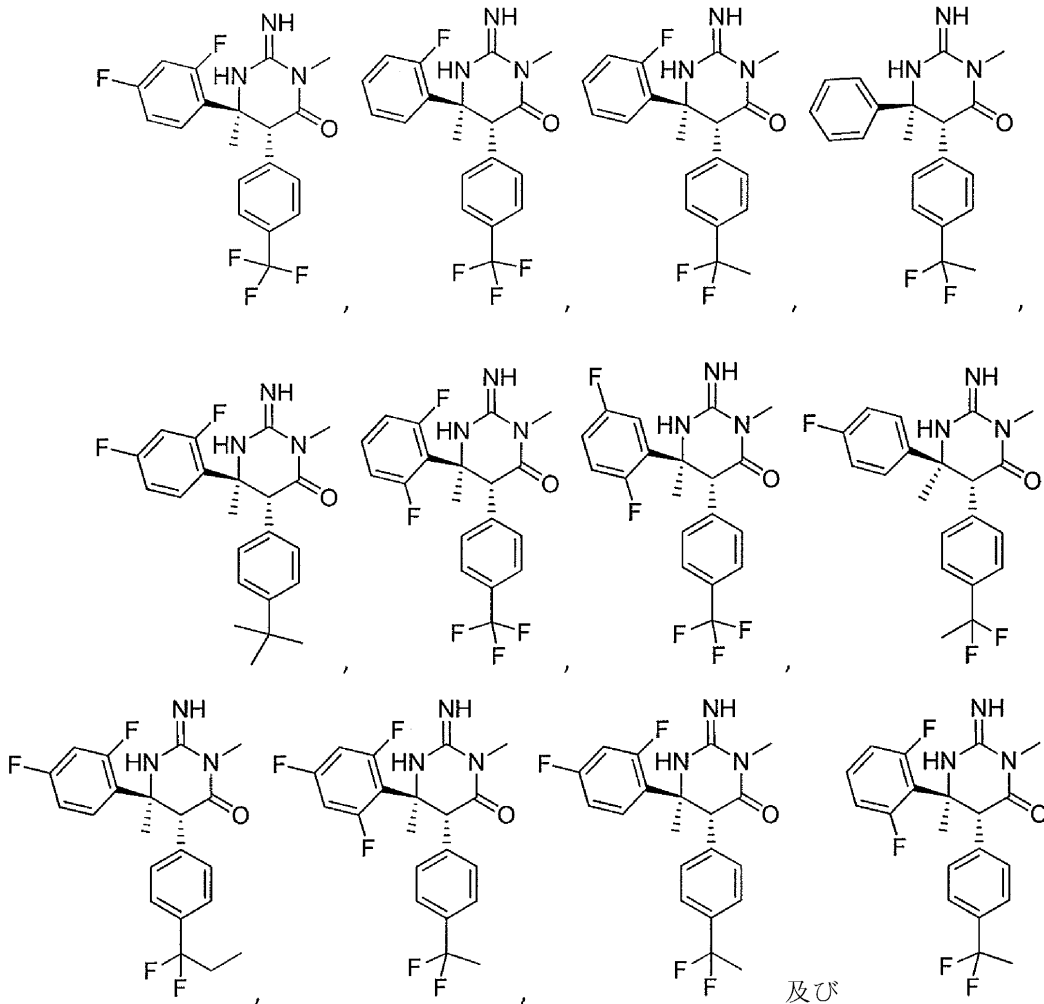
を有する化合物もしくはその互変異性体または該化合物もしくは互変異性体の医薬上許容

される塩である、請求項 27 記載の医薬組成物。

【請求項 29】

BACE-1インヒビターが、

【化 3】



からなる群から選択される化合物もしくはその互変異性体または該化合物もしくは互変異性体の医薬上許容される塩である、請求項 26 記載の医薬組成物。

【請求項 30】

(a) 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメントと、

(b) 請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメントと

を含むキット。

【請求項 31】

成分 (a) の単離された抗体が、磁気マイクロスフェアに結合した mAb 10H8 またはその抗原結合性フラグメントであり、成分 (b) の単離された抗体がビオチン化 mAb 19G10 またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 30 記載のキット。



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US15/14976
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07K 16/18; A61K 39/395 (2015.01) CPC - A61K 2039/505; C07K 16/18 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): G01N 33/566; C07K 16/18; A61K 39/00, 51/10, 39/395, 49/04; A61P 25/00, 25/28 (2015.01) CPC: A61K 2039/505; C07K 16/18; A61K 39/0005, 39/3955, 39/0007, 2039/507; G01N 2800/2821, 33/6896 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google/Google Scholar; NCBI/BLAST/PubMed; Dialog ProQuest; tau, antibody, antigen, isolated, monoclonal, '10H8,' '19G10'		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0316564 A1 (SIGURDSSON, EM); December 16, 2010; paragraphs [0007], [0039]; table 1	1-14
A	US 2013/0260393 A1 (MORPHOTEK, INC.); October 3, 2013; paragraphs [0120], [0122]	4
A	US 2013/0164299 A1 (SPEE, P.JL et al.); June 27, 2013; SEQ ID NO: 7	2-7
A	US 2012/0321618 A1 (OSTERROTH, F et al.); December 20, 2012; SEQ ID NO:2	3-7
A	US 2013/0158236 A1 (BOWDISH, KS et al.); June 20, 2013; SEQ ID NO: 201	2-7
A	US 2009/0202627 A1 (NICOLAU, YC); August 13, 2009; SEQ ID NO:4	3-7
A	WO 2009/132821 A1 (GIULIANI INTERNATIONAL LIMITED); November 5, 2009; SEQ ID NOs: 5, 19	2
A	US 2013/0224191 A1 (STULL, RA et al.); August 29, 2013; SEQ ID NO:42	2
A	US 2012/0177664 A1 (YOKOSEKI, T et al.); July 12, 2012; SEQ ID NOs:242, 2628	9, 10, 12-14
A	US 2013/0302353 A1 (BIONOVION HOLDING B.V.); November 14, 2013; SEQ ID NO:7	9, 10, 12-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 June 2015 (15.06.2015)		Date of mailing of the international search report <b>09 JUL 2015</b>
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/14976

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-\*\*\*-Please See Supplemental Page-\*\*\*-

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- Group I: Claims 1-7; Group II: Claims 8-14
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/US15/14976

---Continued from Box No. III: Observations Where Unity Of Invention Is Lacking:

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

Group I: Claims 1-7 are directed toward an isolated antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds an epitope on human Tau consisting of amino acids 220 to 224.

Group II: Claims 8-14 are directed toward an isolated antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds an epitope on human Tau consisting of amino acids 189 to 194.

Group III: Claims 15-18 are directed toward an isolated Tau 166 peptide of SEQ ID NO: 9 and a host cell transfected with a nucleic acid encoding the isolated Tau 166 peptide.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include an isolated antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds an epitope on human Tau consisting of amino acids 220 to 224, which is not present in either of Groups II or III, the special technical features of Group II including an isolated antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds an epitope on human Tau consisting of amino acids 189 to 194, which is not present in either of Groups I or III, the special technical features of Group III including an isolated Tau 166 peptide of SEQ ID NO: 9.

Groups I-III share the technical features including Tau peptides and host cells transfected with nucleic acids encoding peptides or polypeptides. Groups I and II share the technical features including an isolated antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds an epitope on human Tau; an isolated nucleic acid which encodes one or both of an antibody light chain variable region and an antibody heavy chain variable region; an expression vector comprising the nucleic acid; and a host cell comprising the expression vector.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2013/0295021 A1 to Chen, et al. (hereinafter "Chen").

Chen discloses Tau peptides (Tau isoforms (peptides), paragraph [0006]); an isolated (paragraph [0043]) antibody or antigen binding fragment thereof (monoclonal antibody; paragraph [0005]) that specifically binds an epitope on human Tau (paragraphs [0025], [0026]); an isolated nucleic acid (paragraph [0045]) which encodes (paragraphs [0011], [0111]) one or both of an antibody light chain variable region (paragraphs [0011], [0111]) and an antibody heavy chain variable region (paragraphs [0011], [0111]); an expression vector (paragraphs [0012], [0101], [0188]) comprising the nucleic acid (paragraphs [0012], [0101], [0188]); and a host cell comprising the expression vector (paragraphs [0012], [0188]).

Since none of the special technical features of the Groups I-III inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Chen reference, unity of invention is lacking.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 31/54 (2006.01)	A 6 1 K 31/54	
A 6 1 K 31/505 (2006.01)	A 6 1 K 31/505	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/553 (2006.01)	G 0 1 N 33/553	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 1 B
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	U
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
	C 0 7 K 14/47	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

- (74) 代理人 100119253  
弁理士 金山 賢教
- (74) 代理人 100124855  
弁理士 坪倉 道明
- (74) 代理人 100129713  
弁理士 重森 一輝
- (74) 代理人 100137213  
弁理士 安藤 健司
- (74) 代理人 100143823  
弁理士 市川 英彦
- (74) 代理人 100151448  
弁理士 青木 孝博
- (74) 代理人 100183519  
弁理士 櫻田 芳恵
- (74) 代理人 100196483  
弁理士 川崎 洋祐
- (74) 代理人 100203035  
弁理士 五味淵 琢也
- (74) 代理人 100185959  
弁理士 今藤 敏和
- (74) 代理人 100160749  
弁理士 飯野 陽一
- (74) 代理人 100160255  
弁理士 市川 祐輔

- (74)代理人 100202267  
弁理士 森山 正浩
- (74)代理人 100146318  
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812  
弁理士 城山 康文
- (72)発明者 ラテルツァ, オマール  
アメリカ合衆国、07065-0907・ニュー・ジャージー、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126
- (72)発明者 タナン, マイケル  
アメリカ合衆国、07065-0907・ニュー・ジャージー、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126
- (72)発明者 ウォン, オイタク  
アメリカ合衆国、07065-0907・ニュー・ジャージー、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126
- F ターム(参考) 4B064 AG27 AG31 CA02 CA10 CA19 CA20 CC06 CC10 CC12 CC24  
CE02 CE03 CE06 CE12 DA01 DA13  
4B065 AA26X AA91X AA91Y AA93Y AB01 AC14 BA02 BA08 BC03 BC09  
BC11 BD01 BD09 BD14 BD15 CA24 CA25 CA44 CA46  
4C084 AA17 NA14 ZA161 ZA162  
4C086 AA01 AA02 BC42 BC87 MA01 MA04 NA14 ZA16 ZC20  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA20 EA54 FA74  
GA01 GA10 GA15 GA26