

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7687699号
(P7687699)

(45)発行日 令和7年6月3日(2025.6.3)

(24)登録日 令和7年5月26日(2025.5.26)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H Z N A
A 6 1 K	39/385 (2006.01)	A 6 1 K	39/385	
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	

請求項の数 9 (全16頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-547604(P2022-547604)
 (86)(22)出願日 令和3年9月7日(2021.9.7)
 (86)国際出願番号 PCT/JP2021/032847
 (87)国際公開番号 WO2022/054795
 (87)国際公開日 令和4年3月17日(2022.3.17)
 審査請求日 令和5年3月3日(2023.3.3)
 (31)優先権主張番号 特願2020-150890(P2020-150890)
 (32)優先日 令和2年9月8日(2020.9.8)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)
 前置審査

(73)特許権者 504176911
 国立大学法人大阪大学
 大阪府吹田市山田丘1番1号
 (74)代理人 100188499
 弁理士 勝又 政徳
 (74)代理人 100127568
 弁理士 酒井 善典
 (74)代理人 100171402
 弁理士 上田 茂
 (74)代理人 100213779
 弁理士 小川 有佳子
 (74)代理人 100077012
 弁理士 岩谷 龍
 (72)発明者 中神 啓徳
 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リン酸化タウタンパク質を標的とする免疫原性組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

リン酸化タウタンパク質に対する抗体産生を誘導する抗原性ペプチドとキャリアタンパク質を含む免疫原性組成物であって、抗原性ペプチドが、A K p S p T P p T A E (配列番号5)であるヒトタウタンパク質の断片である組成物。

【請求項2】

リン酸化タウタンパク質が病的過剰リン酸化タウタンパク質である請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

キャリアタンパク質がスカシガイヘモシアニンである、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

抗原性ペプチドとキャリアタンパク質とのコンジュゲートを含む、請求項1～3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】

さらにアジュバントを含む、請求項1～4のいずれかに記載の組成物。

【請求項6】

タウオパチーの治療用である、請求項1～5のいずれかに記載の組成物。

【請求項7】

タウオパチーがアルツハイマー病である、請求項6に記載の組成物。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組成物を含む、タウオパチー治療用ワクチン。

【請求項 9】

タウオパチーがアルツハイマー病である、請求項 8 に記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リン酸化タウタンパク質を標的とする免疫原性組成物に関するものである。

【背景技術】

【0002】

認知症は、老化に伴う記憶力や精神機能の低下といった現象ではなく、脳の器質的障害により、病的に知能が低下した状態を指す。認知症の原因疾患としてアルツハイマー病が知られている。アルツハイマー病の病理学的特徴として老人斑と神経原線維変化 (Neurofibrillary tangle : NFT) がある。老人斑はアミロイド というペプチドが神経細胞外に沈着することで形成される。NFTはタウタンパク質 (Tau protein) が凝集線維化したものである。

【0003】

タウタンパク質は中枢神経系および末梢神経系の神経細胞 (ニューロン) やグリア細胞に発現しているタンパク質で、微小管結合タンパク質 (Microtubule-associated protein; MAP) の一種として発見され、微小管の重合や安定化を調節している。また微小管以外にもさまざまなタンパク質と結合しており、生後の脳の成熟、軸索輸送およびそのシグナル伝達の調節、熱ストレスに対する細胞応答、成体での神経発生など、脳神経系で起こるさまざまな現象に関わっている。タウタンパク質は、アミロイド や炎症などが引き金となり、異常にリン酸化される。その結果、微小管は脱重合化し、タウタンパク質は微小管から外れてモノマーからオリゴマーとなり、さらに凝集・線維化しNFTとなって神経細胞にダメージを与え、細胞死を引き起こす。さらに、病的なタウタンパク質は細胞外へと放出または分泌されて、他の神経細胞に取り込まれ、その細胞内で新たな凝集体を形成することが知られている。この現象は「タウタンパク質の伝播」と称される。アルツハイマー病が重症になっていくにつれてタウ凝集体も広範囲に広がることが知られている。

【0004】

タウタンパク質には多数のリン酸化部位が存在することが知られており、アルツハイマー病患者の脳において検出されるリン酸化部位、アルツハイマー病患者と健常者の両方の脳において検出されるリン酸化部位、健常者の脳において検出されるリン酸化部位に分けられることが報告されている (非特許文献 1)。これまでに、リン酸化タウタンパク質に対する抗体が作製され治療実験が行われているが、高い治療効果を示す有望な抗体は見出されていない。しかし、アルツハイマー病患者の脳において検出されているリン酸化部位のすべてについて抗体が検討されておらず、治療効果の高いエピトープを見出すことにより、アルツハイマー病の進行を阻害するワクチンの開発が期待される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】 Simic G et al, Biomolecules. 2016 Jan 6;6(1):6. doi: 10.3390/biom6010006.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、リン酸化タウタンパク質に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を提供することを課題とする。さらに、本発明はアルツハイマー病患者の脳に存在する病的過剰リン酸化タウタンパク質に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

本発明は、上記課題を解決するために、以下の各発明を包含する。

[1] リン酸化タウタンパク質に対する抗体産生を誘導する抗原性ペプチドとキャリアタンパク質を含む免疫原性組成物であって、抗原性ペプチドが、

(1) Y S p S P G p S P G (配列番号 2)、

(2) A K p S p T P p T A E (配列番号 5)、

(3) A K p S p T P T A E (配列番号 3 1)、

(4) A K p S T P p T A E (配列番号 3 2)、

(5) A K S p T P p T A E (配列番号 3 3) または

(6) I V p Y K p S P V (配列番号 2 4)

を含むヒトタウタンパク質の断片である組成物。

[2] 抗原性ペプチドが少なくとも2個のリン酸化アミノ酸を含む、前記 [1] に記載の組成物。

[3] 抗原性ペプチドが10アミノ酸以下である、前記 [1] または [2] に記載の組成物。

[4] 抗原性ペプチドが (1) ~ (6) のいずれかのリン酸化ペプチドである、前記 [1] に記載の組成物。

[5] リン酸化タウタンパク質が病的過剰リン酸化タウタンパク質である前記 [1] ~ [4] のいずれかに記載の組成物。

[6] キャリアタンパク質がスカシガイヘモシアニンである、前記 [1] ~ [5] のいずれかに記載の組成物。

[7] 抗原性ペプチドとキャリアタンパク質とのコンジュゲートを含む、前記 [1] ~ [6] のいずれかに記載の組成物。

[8] さらにアジュバントを含む、前記 [1] ~ [7] のいずれかに記載の組成物。

[9] タウオパチーの治療用である、前記 [1] ~ [8] のいずれかに記載の組成物。

[1 0] タウオパチーがアルツハイマー病である、前記 [9] に記載の組成物。

[1 1] 前記 [1] ~ [8] のいずれかに記載の組成物を含む、タウオパチー治療用ワクチン。

[1 2] タウオパチーがアルツハイマー病である、前記 [1 1] に記載のワクチン。

【 発明の効果 】

【 0 0 0 8 】

本発明により、アルツハイマー病患者の脳に存在するリン酸化タウタンパク質に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を提供することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 0 9 】

【 図 1 】 30種類のリン酸化タウエピトープ候補の一次スクリーニングの結果を示す図であり、各リン酸化タウエピトープ候補とAJペプチドのコンジュゲートをマウスに投与し、ピトープ候補に対する抗体価を測定した結果を示す図である。

【 図 2 】 一次スクリーニングで選択した11種類のリン酸化タウエピトープ候補の二次スクリーニングの結果を示す図であり、各リン酸化タウエピトープ候補とスカシガイヘモシアニン (KLH) のコンジュゲートをマウスに投与し、ピトープ候補に対する抗体価を測定した結果を示す図である。

【 図 3 】 二次スクリーニングで選択した8種類のリン酸化タウエピトープ候補の三次スクリーニングの結果を示す図であり、各リン酸化タウエピトープ候補とKLHのコンジュゲートをマウスに投与し、誘導された抗体が野生型マウスの脳抽出物中のタウタンパク質を認識せず、タウオパチーモデルマウスであるPS19 Tgマウスの脳抽出物中の過リン酸化タウタンパク質を認識するかどうかをウエスタンブロッティングで確認した結果を示す図である。

【 図 4 】 三次スクリーニングで選択した3種類のリン酸化タウエピトープ候補とKLHのコンジュゲートをウサギに投与し、誘導された抗体がPS19 Tgマウスの脳抽出物中の凝集活

10

20

30

40

50

性を有する過リン酸化タウタンパク質と結合するか否かを検討した結果を示す図である。

【図5】実施例3の実験プロトコールを示す図である。

【図6】リン酸化タウエピトープYAV-5のKLHコンジュゲートを投与したPS19 Tgマウスおよび野生型マウスの血清中和抗体価の推移を示す図である。

【図7】リン酸化タウエピトープYAV-5のKLHコンジュゲートを投与したPS19 Tgマウスの血清中和抗体価と脳脊髄液中中和抗体価の関連性を示す図である。

【図8】リン酸化タウエピトープYAV-5のKLHコンジュゲートを投与したPS19 TgマウスのPBS可溶性脳抽出物のシーディング活性を測定した結果を示す図であり、(A)はタウバイオセンサー細胞における細胞内タウ凝集体の代表的な画像、(B)は細胞数(DAPI陽性細胞数)で正規化した細胞内タウ凝集体の数を示すグラフである。

10

【図9】リン酸化タウエピトープYAV-5のKLHコンジュゲートを投与したPS19 Tgマウスの脳の不溶性画分に含まれるタウ凝集体を測定した結果を示す図である。

【図10】リン酸化タウエピトープYAV-5のKLHコンジュゲートを投与したPS19 Tgマウスの脳のNFT様病変を観察した結果を示す図であり、(A)は抗AT8抗体で脳の組織切片を免疫染色した代表的な画像、(B)は海馬領域のAT8陽性細胞数をカウントした結果を示す図である。

【図11】リン酸化タウエピトープYAV-5のKLHコンジュゲートを投与したPS19 Tgマウスの脳脊髄液のタウ濃度を測定した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

20

本発明は、リン酸化タウタンパク質に対する抗体産生を誘導する抗原性ペプチドとキャリアタンパク質を含む免疫原性組成物を提供する。本発明の免疫原性組成物に含まれる抗原性ペプチドは、以下(1)~(6)のリン酸化ペプチドを含むヒトタウタンパク質の断片であればよい。

(1) Y S p S P G p S P G (配列番号2)

(2) A K p S p T P p T A E (配列番号5)

(3) A K p S p T P T A E (配列番号31)

(4) A K p S T P p T A E (配列番号32)

(5) A K S p T P p T A E (配列番号33)

(6) I V p Y K p S P V (配列番号24)

30

【0011】

ヒトタウ遺伝子は17番染色体長腕に存在し、16個のエクソンからなる。ヒトタウタンパク質は、エクソン2、エクソン2と3、エクソン10の選択的スプライシングにより6種類のアイソフォームが存在する。2N4R(エクソンスキップなし)はアミノ酸数が441個、1N4R(エクソン3スキップ)はアミノ酸数が412個、0N4R(エクソン2と3スキップ)はアミノ酸数が383個、2N3R(エクソン10スキップ)はアミノ酸数が410個、1N3R(エクソン3と10スキップ)はアミノ酸数が381個、0N3R(エクソン2と3と10スキップ)はアミノ酸数が352個である。ヒトタウタンパク質2N4Rのアミノ酸配列を配列番号34に示す。エクソン3がスキップすると配列番号34の74位のアスパラギン酸(D)から102位のトレオニン(T)が欠失する。エクソン2と3がスキップすると配列番号34の45位のグルタミン酸(E)から102位のトレオニン(T)が欠失する。エクソン10がスキップすると配列番号34の275位のバリン(V)から305位のセリン(S)が欠失する。

40

【0012】

(1)のリン酸化ペプチドは、配列番号34の197位から204位の8アミノ酸からなるペプチドにおいて199位のセリン(S)と202位のセリン(S)がリン酸化しているペプチドである。(2)のリン酸化ペプチドは、配列番号34の66位から73位の8アミノ酸からなるペプチドにおいて68位のセリン(S)と69位のトレオニン(T)と71位のトレオニン(T)がリン酸化しているペプチドである。(3)のリン酸化ペプチドは、配列番号34の66位から73位の8アミノ酸からなるペプチドにおいて68位のセリン(S)と69位のトレオニン(T)がリン酸化しているペプチドである。(4)のリン酸化ペプチドは、配列番号34

50

の66位から73位の8アミノ酸からなるペプチドにおいて68位のセリン(S)と71位のトレオニン(T)がリン酸化しているペプチドである。(5)のリン酸化ペプチドは、配列番号34の66位から73位の8アミノ酸からなるペプチドにおいて69位のトレオニン(T)と71位のトレオニン(T)がリン酸化しているペプチドである。(6)のリン酸化ペプチドは、配列番号34の392位から398位の7アミノ酸からなるペプチドにおいて394位のチロシン(Y)と396位のセリン(S)がリン酸化しているペプチドである。

【0013】

本発明の免疫原性組成物に含まれる抗原性ペプチドは、上記(1)~(6)のいずれかのリン酸化ペプチドを含むヒトタウタンパク質の断片であればよい。好ましくは(1)、(2)および(6)のいずれかのリン酸化ペプチドを含むヒトタウタンパク質の断片であり、より好ましくは(1)または(2)のリン酸化ペプチドを含むヒトタウタンパク質の断片である。抗原性ペプチドには少なくとも2個のリン酸化アミノ酸が含まれていることが好ましい。抗原性ペプチドに含まれるリン酸化アミノ酸は、3個以上であってもよく、4個以上であってもよく、5個以上であってもよい。

10

【0014】

抗原性ペプチドのアミノ酸数は特に限定されないが、30以下、25以下、20以下、18以下、16以下、15以下、14以下、13以下、12以下、11以下、10以下であってもよい。好ましくは10アミノ酸以下であり、9アミノ酸であってもよく、8アミノ酸であってもよく、7アミノ酸であってもよい。

【0015】

本発明の免疫原性組成物に含まれる抗原性ペプチドは、上記(1)~(6)のいずれかのリン酸化ペプチドであることが好ましい。中でも、(1)、(2)および(6)のいずれかのリン酸化ペプチドであることが好ましく、(1)または(2)のリン酸化ペプチドであることが好ましい。

20

【0016】

本発明の免疫原性組成物の標的となるリン酸化タウタンパク質は、アルツハイマー病患者の脳に存在する病的過剰リン酸化タウタンパク質であることが好ましい。アルツハイマー病患者の脳に存在する病的過剰リン酸化タウタンパク質は、いわゆるシーディング活性を有する過リン酸化ヒトタウタンパク質を意味する。シーディング活性を有する過リン酸化ヒトタウタンパク質は、凝集し伝播する能力を有する過リン酸化ヒトタウタンパク質であると考えられている。

30

【0017】

本発明の免疫原性組成物に含まれるキャリアタンパク質は特に限定されず、ワクチンに使用できる公知のキャリアタンパク質の中から適宜選択して用いることができる。公知のキャリアタンパク質としては、例えばアルブミン、オボアルブミン、スカシガイヘモシアニン(KLH: keyhole limpet hemocyanin)、緑膿菌外毒素、破傷風毒素、リシン毒素、ジフテリア毒素、コレラ毒素、易熱性エンテロトキシン、上皮細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子、トランスフェリン、血小板由来増殖因子、ポリ-L-リジン、ポリ-L-グルタミン、マンノース-6-ホスフェート、B型肝炎ウイルスコアタンパク質などが挙げられる。なかでも、スカシガイヘモシアニン(KLH)が好ましい。

40

【0018】

また、キャリアタンパク質として、本発明者らが見出したAJペプチド(ELKLIFLHRLKRLRKRLKRLK、配列番号35)を用いてもよい。AJペプチドにはT細胞エピトープが含まれているため、アジュバントを併用しなくても目的の抗体を誘導できる点で有用である(Tenna A et al., FASEB BioAdvances, 2019; 1: 760-772)。

【0019】

抗原性ペプチドとキャリアタンパク質は、連結してコンジュゲートを形成していることが好ましい。抗原性ペプチドとキャリアタンパク質は、融合タンパク質のように直接連結されていてもよく、リンカー(スペーサーと同義)を介して連結されていてもよい。リンカーは抗原性ペプチドとキャリアタンパク質を連結できるものであれば特に限定されない

50

。例えば、 α -アミノアラニン、 α -アミノ酪酸、 α -アミノカプロン酸、 γ -アミノヘブタン酸、12-アミノラウリン酸、グルタミン酸、*p*-アミノ安息香酸等のアミノカルボン酸を用いることができる。また、天然のタンパク質に存在するL-アミノ酸やそれらのD-アミノ酸も用いることができる。また、EMCS (N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide)、グルタルアルデヒド、スルホGMBS (N-maleimidobutyl-oxysulfosuccinimide ester) などのクロスリンカーを用いることができる。

【0020】

キャリアタンパク質として上記のKLHを用いる場合、抗原性ペプチドにリシン(K)が含まれない場合は、グルタルアルデヒドを好ましく用いることができる。抗原性ペプチドにリシンが含まれる場合でも、抗原性ペプチドのN末端またはC末端にのみリシンが含まれる場合は、グルタルアルデヒドを好ましく用いることができる。抗原性ペプチドがN末端またはC末端以外の位置にリシンを含む場合には、抗原性ペプチドのN末端あるいはC末端にシステイン(C)を導入すること、および/または、EMCSを用いて連結することが好ましい。また、抗原性ペプチドの配列に関わらず、C末端にシステインを導入し、スルホGMBSを用いて連結することができる。

10

【0021】

抗原性ペプチドとキャリアタンパク質とのコンジュゲートにおける連結順序は特に限定されず、N末端側がキャリアタンパク質でC末端側が抗原性ペプチドでもよく、逆にN末端側が抗原性ペプチドでC末端側がキャリアタンパク質でもよい。好ましくは、N末端側がキャリアタンパク質でC末端側が抗原性ペプチドの順序である。

20

【0022】

抗原性ペプチドとキャリアタンパク質とのコンジュゲートはそのN末端のアミノ酸がアセチル化されていることが好ましい。また、当該コンジュゲートはそのC末端のアミノ酸がアミド化されていることが好ましい。より好ましくは、コンジュゲートのN末端のアミノ酸がアセチル化されており、かつC末端のアミノ酸がアミド化されていることである。

【0023】

本発明の免疫原性組成物は、さらに1種以上のアジュバントを含んでいてもよい。アジュバントは、公知のアジュバントの中から適宜選択して用いることができる。具体的には、例えば、アルミニウムアジュバント(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム等のアルミニウム塩またはその組み合わせ)、フロイントアジュバント(完全または不完全)、TLRリガンド(例えば、CpG、Poly(I:C)、Pam3CSK4など)、BAY、DC-chol、pcpp、モノホスホリル脂質A、QS-21、コレラ毒素、ホルミルメチオニルペプチドなどが挙げられる。好ましくは、アルミニウムアジュバント、TLRリガンドまたはこれらの組み合わせである。本発明の免疫原性組成物がアジュバントを含む場合、アジュバントの配合量は特に限定されず、アジュバントの種類等により適宜選択すればよい。

30

【0024】

本発明の免疫原性組成物をヒトに投与することにより、病的過剰リン酸化タウタンパク質に対する抗体が産生されるので、タウオパチーを治療することができる。それゆえ、本発明の免疫原性組成物は、タウオパチー治療用ワクチンとして好適に用いることができる。なお、タウオパチーの治療には、タウオパチーの進行を遅延または阻害することが含まれる。それゆえ、本発明の免疫原性組成物を含むタウオパチー治療用ワクチンは、タウオパチー進行遅延用ワクチンまたはタウオパチー進行阻害用ワクチンと称してもよい。

40

【0025】

タウオパチーは、タウタンパク質が過剰なリン酸化を受けて不溶性となり細胞内に異常蓄積したことが重要な発症機序と考えられる疾患の総称である。タウオパチーとしては、例えば、アルツハイマー病、ピック病、進行性核上性麻痺、大脳皮質変性症、ダウン症候群、FTDP-17(第17番染色体に関連したパーキンソンニズムを伴う前頭側頭型認知症)、嗜銀顆粒性認知症、神経原線維変化優位型認知症、亜急性硬化性全脳炎などが挙げられる。本発明の免疫原性組成物は、アルツハイマー病治療用ワクチンとして使用することが好

50

ましい。

【 0 0 2 6 】

本発明の免疫原性組成物は、経口投与または非経口投与により投与することができる。非経口投与としては、例えば腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与、鼻腔内投与、経皮投与、経粘膜投与、舌下投与、吸入投与などが挙げられる。好ましくは、非経口投与であり、より好ましくは、皮内投与、皮下投与または筋肉内投与である。また、非経口投与の手段には、マイクロニードル注射、無針注射、スタンプ等が含まれる。

【 0 0 2 7 】

本発明の免疫原性組成物は、リン酸化タウタンパク質に対する抗体産生を誘導する抗原性ペプチドとキャリアタンパク質と薬学的に許容される担体、さらに添加剤を適宜配合して製剤化することができる。具体的には錠剤、被覆錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤等の経口投与用製剤；注射剤、輸液、坐剤、軟膏、パッチ剤等の非経口投与用製剤とすることができる。担体または添加剤の配合割合については、医薬品分野において通常採用されている範囲に基づいて適宜設定すればよい。配合できる担体または添加剤は特に制限されないが、例えば、水、生理食塩水、その他の水性溶媒、水性または油性基剤等の各種担体；賦形剤、結合剤、pH調整剤、崩壊剤、吸収促進剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、香料等の各種添加剤が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

経口投与用の固形製剤に用いられる添加剤としては、例えば、ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、トウモロコシデンプン等の賦形剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等の結合剤；トウモロコシデンプン等の分散剤；繊維素グリコール酸カルシウム等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤；グルタミン酸、アスパラギン酸等の溶解補助剤；安定剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース等のセルロース類、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等の合成高分子類等の水溶性高分子；白糖、粉糖、ショ糖、果糖、ブドウ糖、乳糖、還元麦芽糖水アメ、粉末還元麦芽糖水アメ、ブドウ糖果糖液糖、果糖ブドウ糖液糖、ハチミツ、ソルビトール、マルチトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、アスパルテム、サッカリン、サッカリンナトリウム等の甘味剤、白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等のコーティング剤等が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

経口投与用の液体製剤は、一般的に用いられる希釈剤に溶解、懸濁又は乳化されて製剤化される。希釈剤としては、例えば、精製水、エタノール、それらの混液等が挙げられる。さらにこの液剤は、湿潤剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含有していてもよい。

【 0 0 3 0 】

非経口投与用の注射剤に用いられる添加剤としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、ブドウ糖、プロピレングリコール等の等張化剤；リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イプシロンアミノカプロン酸緩衝液等の緩衝剤；パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂等の保存剤；ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等の増粘剤；亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシルエン等の安定化剤；塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸等のpH調整剤等が挙げられる。また注射剤には、適当な溶解補助剤、例えば、エタノール等のアルコール；プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等のポリアルコール；ポリソルベート80、

10

20

30

40

50

ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油50、リソレシチン、プルロニックポリオール等の非イオン界面活性剤等をさらに配合してもよい。注射剤等の液状製剤は、凍結保存または凍結乾燥等により水分を除去して保存することもできる。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水等を加え、再溶解して使用される。

【0031】

本発明の免疫原性組成物は、免疫系を有するあらゆる動物（ヒト、非ヒト）を投与対象とすることができる。例えば、ヒト、サル、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、モルモット、ラット、マウス等の哺乳動物；ニワトリ、アヒル、ガチョウ等の鳥類が挙げられる。本発明の免疫原性組成物は、ヒトの小児および成人を対象とすることが好ましい。

10

【0032】

本発明の免疫原性組成物の投与回数および投与間隔は特に限定されない。例えば、単回投与でもよく、約2日～約8週間の間隔で複数回投与してもよい。免疫原性組成物の投与量は、投与対象、投与方法などにより異なるが、1回投与量を、抗原性ペプチド量として約0.01 μ g～約10mgとすることが好ましく、約0.1 μ g～約1mgとすることがより好ましく、約1 μ g～約0.1mgとすることがさらに好ましい。

【0033】

本発明には、以下の各発明が含まれる。

本発明の免疫原性組成物を動物に投与することを含む、タウオパチーの治療方法。

本発明の免疫原性組成物を動物に投与することを含む、アルツハイマー病の治療方法。

20

タウオパチーの治療に使用するための、本発明の免疫原性組成物。

アルツハイマー病の治療に使用するための、本発明の免疫原性組成物。

タウオパチー治療用ワクチンまたは医薬を製造するための、本発明の免疫原性組成物の使用。

アルツハイマー病治療用ワクチンまたは医薬を製造するための、本発明の免疫原性組成物の使用。

【実施例】

【0034】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

30

【0035】

〔実施例1：リン酸化タウエピトープのスクリーニング〕

(1) 一次スクリーニング

少なくとも1個のリン酸化アミノ酸を含み5～9個のアミノ酸からなる30種類のリン酸化タウエピトープ（YAV-1～YAV-30、配列番号1～30）を一次スクリーニングに供した。なお、リン酸化アミノ酸の位置を示す数字は、ヒトタウタンパク質の2N4Rアイソフォームのアミノ酸配列（配列番号34）のアミノ酸位置に対応する。各リン酸化タウエピトープとAJペプチド（配列番号35）とを - アミノカプロン酸（-Acp）を介して連結したコンジュゲートペプチド（表1参照、以下「AJコンジュゲート」と称する）を作製し、BALB/cマウス（雄、7週齢）に皮内投与した（500 μ g/100 μ L/mouse、N=4）。2週後に2

40

【0036】

50

【表 1】

リン酸化タウ エピトープNo.	AJコンジュゲートの構造 (X = ε -Acp)
YAV-1	Ac-AJP-X-VYKpS(396)PVV-amide
YAV-2	Ac-AJP-X-YSpS(199)PGpS(202)PG-amide
YAV-3	Ac-AJP-X-AGTpY(18)GLG-amide
YAV-4	Ac-AJP-X-MVDpS(422)PQL-amide
YAV-5	Ac-AJP-X-AKpS(68)pT(69)PpT(71)AE-amide
YAV-6	Ac-AJP-X-PKpT(181)PPpS(184)pS(185)GE-amide
YAV-7	Ac-AJP-X-KIGpS(356)LDN-amide
YAV-8	Ac-AJP-X-SRpT(212)PpS(214)LP-amide
YAV-9	Ac-AJP-X-RpT(231)PPKpS(235)P-amide
YAV-10	Ac-AJP-X-KpS(258)KIGpS(262)T-amide
YAV-11	Ac-AJP-X-LKEpS(46)PLQ-amide
YAV-12	Ac-AJP-X-DTPpS(113)LED-amide
YAV-13	Ac-AJP-X-GHVPt(123)QAR-amide
YAV-14	Ac-AJP-X-KIAPt(153)PRG-amide
YAV-15	Ac-AJP-X-PAKpT(175)PPA-amide
YAV-16	Ac-AJP-X-PPKpS(191)GDR-amide
YAV-17	Ac-AJP-X-NVQpS(289)KCG-amide
YAV-18	Ac-AJP-X-NVSpS(413)TG-amide
YAV-19	Ac-AJP-X-NVpS(412)pS(413)TG-amide
YAV-20	Ac-AJP-X-EVpS(433)ApS(435)LA-amide
YAV-21	Ac-AJP-X-PGpT(205)PG-amide
YAV-22	Ac-AJP-X-GpS(208)RpS(210)R-amide
YAV-23	Ac-AJP-X-LPpT(217)PP-amide
YAV-24	Ac-AJP-X-IVpY(394)KpS(396)PV-amide
YAV-25	Ac-AJP-X-VVpS(400)GD-amide
YAV-26	Ac-AJP-X-GDpT(403)pS(404)PR-amide
YAV-27	Ac-AJP-X-HLpS(409)NV-amide
YAV-28	Ac-AJP-X-TGpS(416)ID-amide
YAV-29	Ac-AJP-X-LApT(427)LA-amide
YAV-30	Ac-AJP-X-GGpY(29)pT(30)MH-amide

10

20

30

【0037】

抗体価の測定にはELISAを用いた。96ウェルプレートに10 µg/mlの各AJコンジュゲートでコーティングし、4℃で一夜インキュベートした。5%スキムミルクを含有するPBSで2時間ブロッキングした後、希釈した血清を添加して4℃で一夜インキュベートした。0.05% tween20を含有するPBSでプレートを洗浄し、HRP標識抗マウスIgG抗体を添加して3時間インキュベートした。TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzine) を添加してHRPを発色させ、30分後に硫酸を添加し反応を止めた。マイクロプレートリーダー (製品名iMark、Bio-Rad) を用いて、波長450 nmの吸光度を測定した。

40

【0038】

結果を図1に示した。抗体価はhalf maximum値で示した。Half maximum値は、測定機における最大吸光度の半分の吸光度を示す血清の希釈倍率であり、血清希釈倍率と吸光度のシグモイド曲線を作成して算出した。一次スクリーニングに供したAJコンジュゲートの中から、ある程度の抗体価上昇が認められた11種類のリン酸化タウエピトープ (YAV-2、5、6、9、12、15、16、17、18、24および26) を選択した。

【0039】

(2) 二次スクリーニング

一次スクリーニングで選択した11種類のリン酸化タウエピトープとKLH (Keyhole limpet hemocyanin: スカシガイヘモシアニン) とを連結したコンジュゲートペプチド (以

50

下「KLHコンジュゲート」と記す)を作製し、一次スクリーニングと同じ方法でBALB/cマウスに2回投与し、1回目の投与から5週後に採血して血清を分離し、抗体価の測定およびウエスタンブロッティングに供した。リン酸化タウエピトープとKLHとは、リン酸化タウエピトープの配列に応じてグルタルアルデヒドまたはEMCSを介して連結した。

【0040】

抗体価の測定にはELISAを用いた。96ウェルプレートにKLHコンジュゲートをコーティングしたこと以外は一次スクリーニングの方法と同じ方法で抗体価を測定した。結果を図2に示した。抗体価はhalf maximum値で示した。11種類のリン酸化タウエピトープ中8種類(YAV-2、5、6、9、15、16、24および26)のリン酸化タウエピトープが高い抗体価を示した。

10

【0041】

(3) 三次スクリーニング

4か月齢のPS19 Tgマウス(ジャクソン研究所)または野生型マウス(PS19 Tgマウス(遺伝的背景C57/B6xC3H)のWTリターメイト)の脳を採取し、プロテアーゼ阻害剤(Roche)を含む冷却したPBSでホモジナイズした。ホモジネートを超音波処理し、15,000×gで5分間遠心分離した。上清を回収し、-80℃で保存した。PS19 Tgマウスはプリオンプロモーター下流にヒトタウタンパク質のP301S-1N4Rアイソフォームをコードする遺伝子を組み込んだTGマウスであり、6~8か月齢で脳萎縮と神経細胞内タウ凝集体の形成が確認されているタウオパチーモデルマウスである(<https://www.alzforum.org/research-models/tau-p301s-line-ps19>参照)。

20

【0042】

野生型マウス、PS19 Tgマウスからの脳抽出物(各2μg)および組換えタウタンパク質(100 ng)を95℃で5分間煮沸し、SDS-PAGEに供して分離した。分離したタンパク質をPVDFメンブレンに転写し、5%スキムミルクで1時間ブロッキングした。一次抗体には、YAV-2、5、6、9、15、16、24および26のKLHコンジュゲートでそれぞれ免疫したマウスから採取した血清、抗タウ抗体(Tau-5)および抗リン酸化タウ抗体(p396)を用いた。メンブレンを血清または抗体と4℃で一晩インキュベートした。0.05% tween 20を含むPBSでメンブレンを洗浄した後、メンブレンをHRP標識抗ウサギIgG抗体またはHRP標識抗マウスIgG抗体と室温で1時間インキュベートし、化学発光(Chemi-Lumi One L、ナカライテスク)により抗体の結合を評価した。

30

【0043】

結果を図3に示した。YAV-2、YAV-5、YAV-24で免疫したマウスの血清は、PS19 Tgマウスの脳抽出物からの過リン酸化タウのみを認識し、野生型マウスの脳抽出物中のタウは認識しなかった。

【0044】

[実施例2:リン酸化タウエピトープにより誘導される抗体とシーディング活性を有する過リン酸化タウタンパク質との結合の評価]

YAV-2、YAV-5、YAV-24のKLHコンジュゲートでウサギを免疫し、リン酸化タウエピトープ特異的抗体を精製した。各エピトープのKLHコンジュゲートとフロイントのアジュバントをウサギに隔週4回投与した。抗体価を確認した後、採血し血清を分離し、エピトープ特異的アフィニティーカラムを使用して抗体を精製した。

40

【0045】

作製した3種類のウサギ精製抗体、陰性対照としてのコントロールIgGおよび抗タウ抗体(Tau-5)、陽性対照としての抗リン酸化タウ抗体(p396)を用いた。dynabeadsプロテインG(Thermo Fisher)に抗体を結合させ、PS19 Tgマウスの脳抽出物と室温で10分間インキュベートした。抗体と結合するタウを免疫沈降させて除去し、上清を回収してサンプルとした。CFP-/YFP-TauRD(P301S)を発現するHEK293細胞(Proc Natl Acad Sci USA. 2014 Oct 14;111(41):E4376-4385. doi: 10.1073/pnas.1411649111. Nat Commun. 2015 Oct 13;6:8490. doi: 10.1038/ncomms9490.)を384ウェルプレートに播種し、翌日、サンプルをLipofectamine 2000(Life Technologies)

50

と共に細胞に添加した。細胞を4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、ヘキストで核染色した。共焦点顕微鏡の画像をFRETチャンネル(458 nmレーザーで励起、500-550 nmフィルターで蛍光を捕捉)を介して取得した。蛍光強度でタウ凝集を算出し、細胞数でノーマライズした。

【0046】

結果を図4に示した。シーディング活性は、コントロールIgGのタウ凝集率を100%としたときの各抗体のタウ凝集率を示した。YAV-2およびYAV-5で誘導された抗体は凝集率が顕著に低く、シーディング活性を有する過リン酸化タウタンパク質を除去できることが示された。

【0047】

〔実施例3：リン酸化タウエピトープのワクチン効果の評価〕

9週齢のPS19 Tgマウス(ジャクソン研究所)または野生型マウス(PS19 Tgマウス(遺伝的背景C57/B6xC3H)のWTリターメイト)に、YAV-5のKLHコンジュゲートを皮内投与した。1匹あたり200 µgを2か所に分けて投与した(100 µg/50 µL/site)。対照としてコントロールIgGを投与した。11週齢で2回目の投与を行い、15週齢で3回目の投与を行った。9週齢、13週齢、15週齢、19週齢、23週齢、27週齢および31週齢で血液を採取し、抗体価の定量に供した。31週齢で安楽死させて脳および脳脊髄液を採取し、生化学的分析および組織学的分析に供した。実験プロトコルを図5に示した。

【0048】

(1) YAV-5に対する血清中和抗体価

YAV-5に対する血清中和抗体価をELISAで測定した(実施例1参照)。1回目の投与(9週齢)~31週齢の中和抗体価の推移を図6に示した。抗体価はhalf maximum値で示した。YAV-5のKLHコンジュゲートの投与により、PS19 Tgマウスと野生型マウスの両方で、YAV-5に対する中和抗体の強い誘導が認められた。15週齢での3回目の投与後、PS19 Tgマウスの抗体価はわずかに低下したが、31週齢までは非常に高い抗体価を維持した。

【0049】

(2) 血清中和抗体価と脳脊髄液(CSF: cerebrospinal fluid)中和抗体価の関連性

CSFの抗体価は、血清中和抗体価の測定と同様のELISA法を用いて測定した。血清中和抗体価とCSF中和抗体価の関連性を図7に示した。図7において、血清中和抗体価は、9、13、15、19、23および31週齢の各時点で測定した抗体価に基づいて算出したAUC(Area under the curve)の数値で表し、CSF中和抗体価は、31週齢時のELISAでの測定値(OD値)で表している。両者は統計的に有意な正の相関を示し($R^2=0.90$, $p < 0.05$, $n=8$, Pearson)、末梢に誘導されたp-tau抗体に対する中和抗体が、用量依存的に中枢神経系に入ることが示唆された

【0050】

(3) タウの伝播に関わるタウ種に対する効果

本発明者らは、タウの伝播に関与する高分子量のリン酸化タウが脳抽出物のPBS可溶性画分に検出されることを報告している(Nature communications 6:8490、The American journal of pathology 187(6):1399-1412、PloS one 12(5):e0177914、Nature medicine 26(8):1256-1263)。そこで、31週齢で採取した脳からPBS可溶性の脳抽出物を調製し、タウバイオセンサー細胞を用いてタウのシーディング活性を評価した(Takedaら、Nature communications 6:8490参照)。タウバイオセンサー細胞はCFP-/YFP-TauRD(P301S)を安定的に発現しているHEK293細胞であり(Holmes, B. B. et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 111, E4376-E4385 (2014).)、ATCCより購入した。タウバイオセンサー細胞を96ウェルPDLコートプレートに播種し(3×10^4 個/ウェル)、一夜培養した。Lipofectamine 2000(Life technologies社)を含むOpti-MEM(Life technologies社)にPBS可溶性脳抽出物を加え、タウバイオセンサー細胞の培地に添加し、48時間培養した。細胞を4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、フローサイトメトリー(FRETチャンネル)を用いてタウ凝集体陽性細胞の割合をカウントした。統計解析にはウェルチのt検定を用いた。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

結果を図 8 に示した。(A) はタウバイオセンサー細胞における細胞内タウ凝集体の代表的な画像であり、白矢印は細胞内のタウ凝集体を示す。(B) は細胞数 (DAPI 陽性細胞数) で正規化した細胞内タウ凝集体の数を示すグラフである。YAV-5 の KLH コンジュゲートの投与により、PS19 Tg マウスの脳内タウのシーディング活性が約 60% 減少することが示された (* p 0.05)。この結果は、YAV-5 に対する抗体が伝播に関わるタウ種の量や活性を低下させたと考えられた。

【 0 0 5 2 】

(4) 脳の不溶性画分に含まれるタウ凝集体に対する効果

マウス脳を 5 倍容量の PBS (プロテアーゼ阻害剤入り) でホモジネートし、遠心 (10,000g、4、15 分) 後、上清 (PBS 可溶性画分) を取り除いた後のペレットを 1% サルコシルで 37、30 分インキュベートし、20 秒間ソニケーションを行った。100,000g、4、30 分の遠心後、上清を除去し、残ったペレットに 100 μ l の 8 M Urea を添加して可溶化し、100,000g、4、30 分遠心後の上清を脳不溶性画分として測定に用いた。検体中のリン酸化タウ (T181) 量を、ELISA キット (Thermo 社、KHO0631) を用いて測定した。タウ濃度は検体中の総タンパク濃度で補正した。統計解析にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。結果を図 9 に示した。YAV-5 の KLH コンジュゲートの投与により、PS19 Tg マウスの脳内の不溶性リン酸化タウが約 60% 以上減少することが示された (* p 0.05)。

【 0 0 5 3 】

(5) 脳の NFT 様病変に対する効果

Takeda ら (Nature communications 6:8490) に記載の方法に従い、脳の組織切片を作製し、抗 AT8 抗体 (セリン 202 とスレオニン 205 の両方がリン酸化されたタウを認識する抗体) で免疫染色した。また、海馬領域の AT8 陽性細胞数をカウントした。統計解析にはスチューデントの t 検定を用いた。結果を図 10 に示した。(A) は抗 AT8 抗体で免疫染色した代表的な画像であり、上段は脳全体、中段は嗅内皮質、下段は中段の点線枠内の拡大図である。(B) は海馬領域の AT8 陽性細胞数をカウントした結果であり、DG は歯状回、Hip. は海馬全体 (CA1 と CA3 と DG の合計) を表す。YAV-5 の KLH コンジュゲートの投与により、PS19 Tg マウスの嗅内皮質を含む脳全体で AT8 陽性の NFT 様病変が顕著に減少した。また、YAV-5 の KLH コンジュゲートの投与により、PS19 Tg マウスの歯状回および海馬全体の AT8 陽性細胞数が有意に減少した (* p 0.05、** p 0.01)。

【 0 0 5 4 】

(6) 脳脊髄液 (CSF) のタウ濃度に対する効果

CSF のタウ濃度を、ヒトの総タウに対する高感度 ELISA を用いて比較した。Cisterna magna から採取したマウス髄液 5 μ l を使用し、ELISA キット付属のバッファーで 10 倍希釈して測定した。ELISA は Thermo 社の Tau (Total) Human ELISA Kit (KHB0041) を使用した。統計解析にはスチューデントの t 検定を用いた。結果を図 11 に示した。YAV-5 の KLH コンジュゲートの投与により、PS19 Tg マウスの CSF のタウ濃度が約 60% 減少することが示された (* p 0.05)。この結果は、CSF のタウ濃度は脳のタウ病変に対するワクチン効果を追跡するバイオマーカーとして使用できると考えられる。

【 0 0 5 5 】

なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

10

20

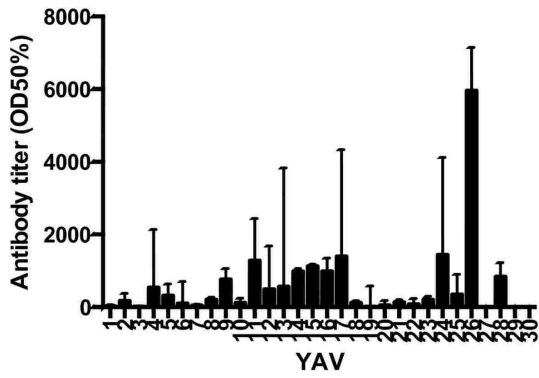
30

40

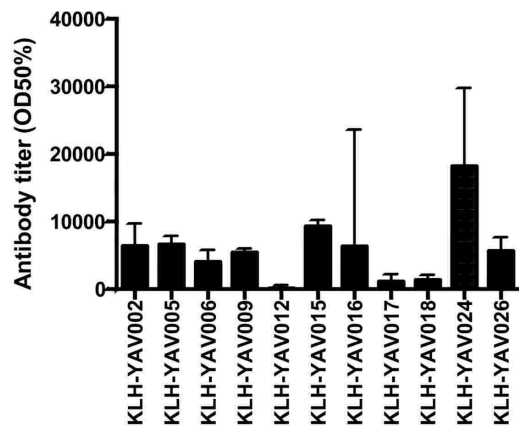
50

【 図面 】

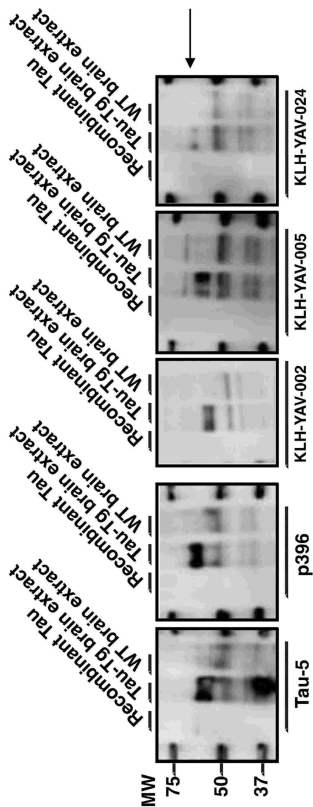
【 図 1 】



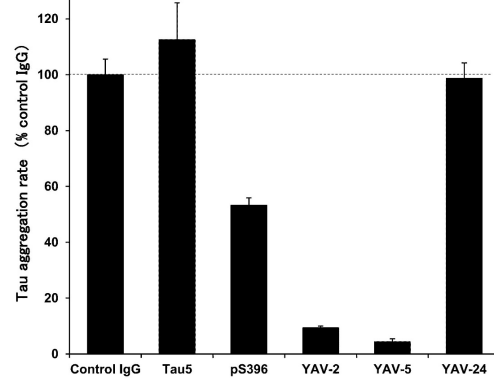
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



10

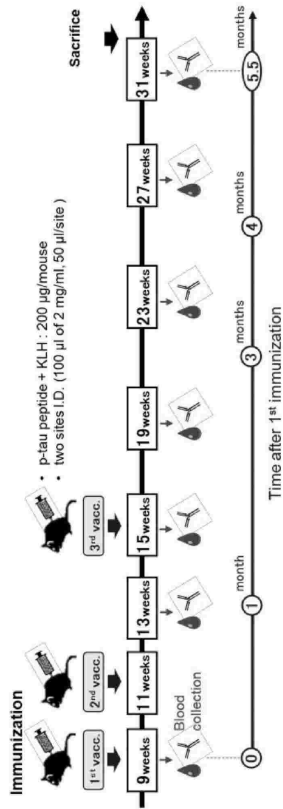
20

30

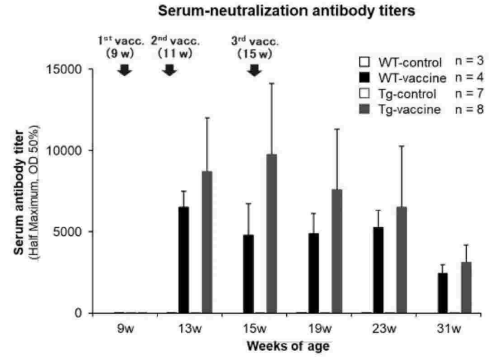
40

50

【 5 】



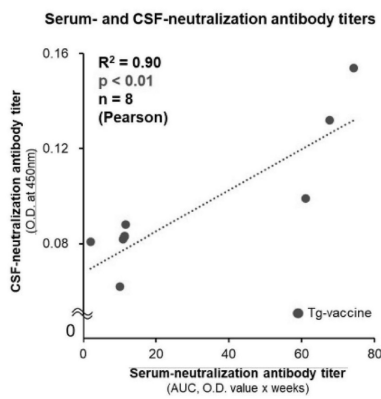
【 6 】



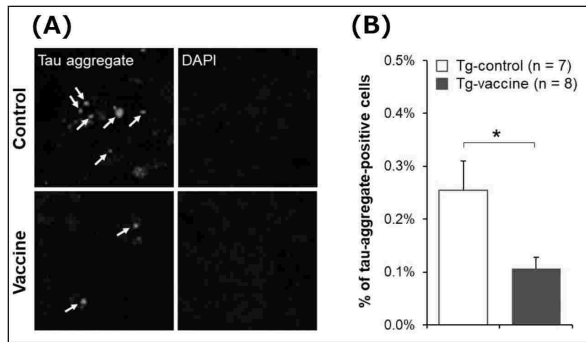
10

20

【 7 】



【 8 】

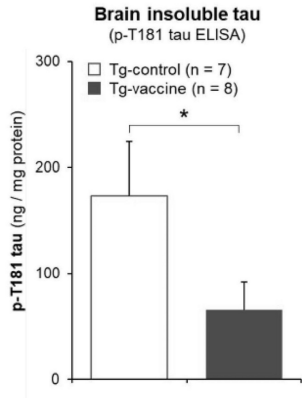


30

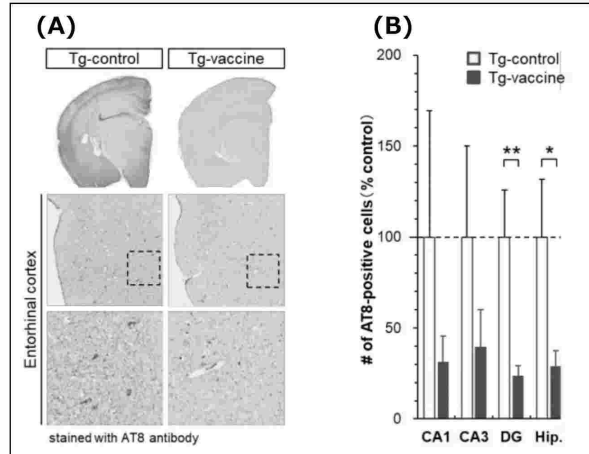
40

50

【 9 】

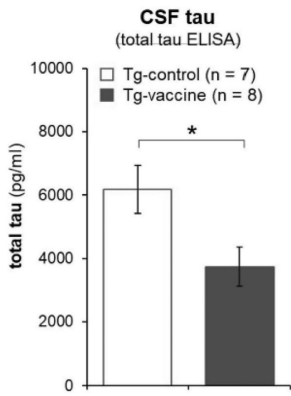


【 1 0 】



10

【 1 1 】



20

【 配列表 】

0007687699000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 43/00 (2006.01)
C 0 7 K 7/06 (2006.01)

F I

A 6 1 P 43/00 1 1 1
C 0 7 K 7/06

法人大阪大学内

(72)発明者 森下 竜一

大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 武田 朱公

大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 林 宏樹

大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

審査官 横田 倫子

(56)参考文献

特表 2 0 1 3 - 5 0 0 3 2 6 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 9 / 0 8 4 1 1 8 (W O , A 1)

KLAVER Andrea C. et al. , Specific serum antibody binding to phosphorylated and non-phosphorylated tau in non-cognitively impaired , Translational Neurodegeneration , 2017年 , Vol.6 No.1 , Article.32 (p.1-9) , ISSN:2047-9158

BIERNAT J. et al. , The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine- pro , The EMBO Journal , 1992年 , Vol. 11 No.4 , p.1593-1597 , ISSN:0261-4189

LEBOUVIER Thibaud et al. , The microtubule-associated protein tau is phosphorylated by Syk , Biochimica et Biophysica Acta , 2008年 , Vol.1783 No.2 , p.188-192 , ISSN:0005-2728

SUBRAMANIAN Sarada, et al. , Passive immunization targeting the N-terminal region of phosphorylated tau (residues 68-71) improves , Biochemical and Biophysical Research Communications , 2017年 , Vol.483 No.1 , p.585-589 , ISSN:0006-291X

中神啓徳、森下竜一、特集 温故知新の医療技術「ワクチン」 6 認知症・生活習慣病を標的とした治療ワクチン、アンチ・エイジング医学 - 日本抗加齢医学会雑誌、2019年、Vol.15 No.1、p.55-59

武田朱公、病的タウの神経細胞間伝播を標的とした認知症治療法の開発、平成30年度精神薬療分野若手研究者継続助成研究成果報告書、2019年、p.70-71

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 P

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

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