

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年1月15日 (15.01.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/008529 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/062650
- (22) 国際出願日: 2008年7月7日 (07.07.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-178583 2007年7月6日 (06.07.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人東京都医学研究機構 (TOKYO METROPOLITAN ORGANIZATION FOR MEDICAL RESEARCH) [JP/JP]; 〒1638001 東京都新宿区西新宿二丁目8番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長谷川成人 (HASEGAWA, Masato) [JP/JP]; 〒1820025 東京都調布市多摩川3-46-36 Tokyo (JP). 新井哲明 (ARAI, Tetsuaki) [JP/JP]; 〒1510053 東京都渋谷区代々木4-42-17-805 Tokyo (JP). 野中隆 (NONAKA, Takashi) [JP/JP]; 〒1140003 東京都北区豊島8-27-18-504 Tokyo (JP). 亀谷富由樹 (KAMETANI, Fuyuki) [JP/JP]; 〒2430014 神奈川県厚木市旭町3-5-19 Kanagawa (JP). 秋山治彦 (AKIYAMA, Haruhiko) [JP/JP]; 〒1920372 東京都八王子市下柚木3-2-1-608 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小林浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: ANTIBODY BINDING SPECIFICALLY TO TDP-43 AGGREGATE

(54) 発明の名称: TDP-43凝集物に特異的に結合する抗体

(57) Abstract: It is intended to provide an antibody which binds specifically to an abnormal aggregate of TDP-43 protein. It is also intended to provide a drug for detecting a TDP-43 proteinopathy lesion which contains this antibody, a method of detecting or diagnosing a TDP-43 proteinopathy lesion by using the antibody and so on.

(57) 要約: 本発明は、TDP-43蛋白異常凝集物に特異的に結合する抗体を提供し、また、当該抗体を含有する、TDP-43プロテノパチー病変の検出薬、及び当該抗体を用いたTDP-43プロテノパチー病変の検出方法又は診断方法等を提供する。

WO 2009/008529 A1

明細書

TDP-43 凝集物に特異的に結合する抗体

5 技術分野

本発明は、TDP-43 蛋白異常凝集物に特異的に結合する抗体、該抗体を含有する TDP-43 プロテイノパチー病変の検出薬及び検出方法、並びに TDP-43 プロテイノパチーの治療用医薬組成物に関する。

10 背景技術

TDP-43 (TAR DNA-binding protein of 43 kDa) は、TAR (trans activation responsive region) DNA に結合し、転写調節や選択的スプライシング (alternative splicing) に関与する核因子であることが知られている。

また、TDP-43 は、ユビキチン陽性細胞内封入体 (NCI) や変性突起様構造物などの形態で、前頭側頭型認知症を含む前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD) などの変性神経細胞に凝集、蓄積するタンパク質である (Arai T et al., Biochem Biophys Res Commun. 2006 Dec 22; 351(3):602-11. Epub 2006 Oct 30, Neumann M et al., Science. 2006 Oct 6; 314(5796):130-3)。TDP-43 は、FTLD 以外にも筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS)、グアム島パーキンソン認知症複合、紀伊半島パーキンソン認知症複合等の神経細胞やグリア細胞にも蓄積することが知られており、これらの疾患は TDP-43 プロテイノパチー (TDP-43 蛋白蓄積症) と総称される。TDP-43 の異常蓄積は、それぞれの疾患の病変部位に見られ、これらの疾患における神経変性の原因と密接な関係があると考えられる。

25 現在、TDP-43 の研究や TDP-43 プロテイノパチーの病理診断には、市販されている 2 種類の抗体が用いられているが、これらの抗体は患者の脳又は脊髄内に異常蓄積する TDP-43 と結合するだけでなく、脳又は脊髄などに正常に存在する TDP-43 とも強く結合し、脳又は脊髄標本の免疫染色でも核に存在する正常の TDP-43 を染め出すことが知られていた。

一方、TDP-43 は、患者の脳又は脊髄において高度にリン酸化されて蓄積していることが判明した (Arai T et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Dec 22; 351(3):602-11. Epub 2006 Oct 30、Neumann M et al., *Science.* 2006 Oct 6; 314(5796):130-3)。しかしながら、そのリン酸化部位やリン酸化に関わる酵素については未だ報告はない。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その解決しようとする課題は、TDP-43 蛋白異常凝集物に特異的に結合する抗体、および該抗体を含有する TDP-43 プロテインパチー病変の検出薬及び検出方法、並びに TDP-43 プロテ

10 ィンパチーの治療用医薬組成物を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究した結果、変性神経細胞に異常蓄積した TDP-43 (ユビキチン陽性封入体を構成する) において、構成アミノ酸の一部がリン酸化されていることを見出した。さらにこのリン酸化アミノ酸を含む合成ペプチドを抗原として調製した抗体は、TDP-43 蛋白異常凝集物と特異的に結合

15 することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 以下の (a) 若しくは (b) のタンパク質又は (c) のペプチドと特異的に結合する抗体。

20 (a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸残基がリン酸化されたアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入若しくは付加された変異型アミノ酸配列を含み、かつ TDP-43 活性を有するタンパク質であって、当該変異型アミノ酸配列のうち少なく

25 とも 1 つのアミノ酸残基がリン酸化された前記タンパク質

(c) 上記 (a) 又は (b) のタンパク質のアミノ酸配列において、リン酸化されたアミノ酸残基を含む一部のアミノ酸配列を含む部分ペプチド

(2) 少なくとも 1 つのアミノ酸残基が、セリン残基、トレオニン残基及びチロシン残基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである、(1) に記載の抗体。

- (3) 少なくとも1つのアミノ酸残基が、配列番号1に示されるアミノ酸配列の第393番目、第403番目、第404番目、第409番目及び第410番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる少なくとも1つである、(1)又は(2)に記載の抗体。
- 5 (4) ペプチドのアミノ酸配列が配列番号5～11のいずれかに示されるものである(1)～(3)のいずれか1項に記載の抗体。
- (5) リン酸化により(a)若しくは(b)のタンパク質又は(c)の部分ペプチドの構造が変化した部位に結合することができる、(1)～(4)のいずれか1項に記載の抗体。
- 10 (6) リン酸化がカゼインキナーゼ1によるものである(1)～(5)のいずれか1項に記載の抗体。
- (7) 抗体がモノクローナル抗体である(1)～(6)のいずれか1項に記載の抗体。
- (8) 抗体がポリクローナル抗体である(1)～(6)のいずれか1項に記載の抗体。
- 15 (9) 受領番号が **FERM ABP-10984** であるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体。上記ハイブリドーマは、2008年7月3日付で、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に寄託されている。
- 20 (10) (7)～(9)のいずれか1項に記載の抗体が結合する抗原決定基に結合する抗体。
- (11) 抗体が、キメラ抗体、ヒト型化抗体又はヒト化抗体である、(7)、(9)又は(10)のいずれか1項に記載の抗体。
- (12) (7)又は(9)～(11)のいずれか1項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。
- 25 (13) 受領番号が **FERM ABP-10984** であるハイブリドーマ。
- (14) (1)～(11)のいずれか1項に記載の抗体を含有する、リン酸化 TDP-43 検出薬。
- (15) (1)～(11)のいずれか1項に記載の抗体を含有する、TDP-43 プロ

テイノパチー病変検出薬。

(16)(1)～(11)のいずれか1項に記載の抗体を含有する、TDP-43 プロ
テイノパチーの診断薬。

5 (17)(1)～(11)のいずれか1項に記載の抗体を有効成分として含有する
医薬組成物。

(18)(1)～(11)のいずれか1項に記載の抗体と採取された被験試料とを
反応させることを特徴とする、TDP-43 プロテイノパチー病変の検出方法。

(19)(14)若しくは(15)に記載の検出薬、(16)に記載の診断薬、又は
10 (17)に記載の医薬組成物の製造における、(1)～(11)のいずれか1項に
記載の抗体の使用。

本発明により、TDP-43 蛋白異常凝集物に特異的に結合する抗体、および該抗体
を含有する TDP-43 プロテイノパチー病変の検出薬及び検出方法、並びに TDP-43
プロテイノパチーの治療用医薬組成物等が提供される。

15 本発明の抗体は、FTLD や ALS 等の TDP-43 プロテイノパチーを発症した患者
で認められる TDP-43 蛋白異常凝集物に特異的に結合することができるため、これ
らの疾患の診断や治療に有用である。

図面の簡単な説明

20 図1は、本発明の抗体の特異性をウエスタンブロッティングにより解析した結
果を示す図である。

図2は、ELISA 法による抗 pSer409 リン酸化ペプチド抗体の反応性(特異性)
の検討結果を示す図である。

25 図3は、ELISA 法による抗 pSer410 リン酸化ペプチド抗体の反応性(特異性)
の検討結果を示す図である。

図4は、ELISA 法による抗 pSer409,410 リン酸化ペプチド抗体の反応性(特
異性)の検討結果を示す図である。

図5は、市販 TDP-43 抗体及び pS409 抗体を用いた FTLD 脳組織の免疫染色
結果を示す図である。

図 6 は、ELISA 法による異常 TDP-43 の検出結果を示す図である。

図 7 は、ウエスタンブロットティング法による異常 TDP-43 の検出結果を示す図である。

図 8 は、ウエスタンブロットティング法による異常 TDP-43 の検出結果を示す図
5 である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための
例示であり、本発明をこの実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、そ
10 の要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

なお、本明細書において引用した全ての文献、および公開公報、特許公報その他
の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、2007
年 7 月 6 日に出願された本願優先権主張の基礎となる日本国特許出願（特願
2007-178583 号）の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

15

1. 概要

本発明は、リン酸化 TDP-43 に特異的に結合する抗体、該抗体を含有する TDP-43
プロテノパチー病変の検出薬及び検出方法、及び TDP-43 プロテノパチーの治
療用医薬組成物等に関する。

20 TDP-43 は、TDP-43 プロテノパチー患者の脳又は脊髄の神経細胞などにおい
て異常に蓄積し、ユビキチン陽性細胞内封入体 (NCI) や変性突起様構造物などの
TDP-43 蛋白異常凝集物を形成する。そして、TDP-43 蛋白異常凝集物は高度にリ
ン酸化されている。また、凝集、蓄積している TDP-43 は線維状構造をとっており、
リン酸化によって TDP-43 は本来の構造が変化して β シート構造に富むコンホメ
25 ーションをとっていると考えられる。

本発明者らは、異常蓄積した TDP-43 の構成アミノ酸の一部がリン酸化されてい
ることに着目し、さらにこのリン酸化アミノ酸を有する合成ペプチドを抗原として
調製した抗体が、TDP-43 蛋白異常凝集物と特異的に結合することを見出し、本発
明を完成するに至ったものである。また、本発明においては、リン酸化により

TDP-43 の構造が変化した部分にも、本発明の抗体が結合することを見出した。

さらに、本発明者は、TDP-43 がカゼインキナーゼ 1 (CK1) の基質になることを見出し、その基質結合部位の多くが患者脳でもリン酸化されていることを見出した。したがって、TDP-43 のアミノ酸配列の中で CK1 のリン酸化コンセンサス配列 (pS/T-X-X-S/T, pS/T-X-X-X-S) に合う部位、すなわち TDP-43 のアミノ酸配列部位のうち CK1 が結合しリン酸化する部位は、本発明の抗体がよく結合する部位であると考えられる。

本発明の抗体は、リン酸化されていない TDP-43 には結合しないのに対し、リン酸化 TDP-43 及びその一部を有するペプチドと特異的に結合することができる。従って、本発明の抗体は、FTLD や ALS 等の TDP-43 プロテインオパチーの診断や治療に有用である。

2. リン酸化 TDP-43 に特異的に結合する抗体

本発明の「抗体」は、上記リン酸化 TDP-43 と特異的に結合する抗体又はその断片を意味し、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。本明細書においては、リン酸化 TDP-43 又はリン酸化 TDP-43 部分ペプチドと特異的に結合する抗体又はその断片を「抗リン酸化 TDP-43 抗体」と称する。

本発明の抗体には、本発明の抗体が結合する抗原決定基 (エピトープ) と結合する抗体も含まれる。抗原決定基はリン酸化 TDP-43 の全部又は一部の領域であり、例えば上記 CK1 のリン酸化コンセンサス配列 (pS/T-X-X-S/T, pS/T-X-X-X-S) に合う部位、すなわち TDP-43 のアミノ酸配列部位のうち CK1 が結合しリン酸化する部位が挙げられる。

本発明において、「特異的に結合する」とは、リン酸化された TDP-43 タンパク質若しくは TDP-43 ペプチド (リン酸化により構造が変化した部位を含む) には結合する (反応する) が、リン酸化されていないタンパク質又はペプチドには結合しない (反応しない) ことを意味する。結合が特異的か否かであることの確認は、免疫学的手法、例えば ELISA 法、ウエスタンブロット法、又は免疫組織学的染色等によって確認することができる。

本発明の抗体には、抗体断片が含まれる。抗体の断片としては、例えば、Fab

(antigen-binding fragment)、F(ab')₂、Fab'、Fv、diabody (dibodies)、dsFv、線状抗体、scFv (single chain Fv)、相補性決定領域 (complementarity determining region : CDR) を少なくとも一部に含むペプチド等などが挙げられる。抗体のアミノ酸配列が改変されたとしても、上記リン酸化 TDP-43 又はリン酸化 TDP-43 5 部分ペプチドと特異的に結合することができる限り、そのような抗体は本発明の範囲内に含まれる。

また、本発明の抗体には、キメラ抗体、ヒト型化抗体、ヒト化抗体が含まれる。

3. 抗体の製造

10 以下、抗リン酸化 TDP-43 抗体の調製方法について説明する。

(1) 抗原の調製

(1-1) 全長 TDP-43

リン酸化 TDP-43 は、本発明の抗体を作製するための免疫源として使用される。また、抗原には、上記リン酸化 TDP-43 の全長配列のうち一部のアミノ酸配列を含むペプチドを使用することも可能である。 15

ここで、リン酸化 TDP-43 としては、以下の (a) 又は (b) のタンパク質が挙げられる。

(a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸残基がリン酸化されたアミノ酸配列を含むタンパク質

20 (b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入若しくは付加された変異型アミノ酸配列を含み、かつ TDP-43 活性を有するタンパク質であって、当該変異型アミノ酸配列のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基がリン酸化された前記タンパク質

すなわち、本発明において、抗原として用いるリン酸化 TDP-43 において、アミノ酸配列部分は配列番号 1 に示されるが、これ以外に、以下の (i)~(iv) の変異型アミノ酸配列を有するリン酸化 TDP-43 を使用することも可能である。 25

(i) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち 1 個又は数個 (例えば 1 個~10 個、さらに好ましくは 1 個~5 個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列

(ii) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち 1 個又は数個 (例えば 1 個~10 個、

さらに好ましくは1個～5個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号1に示すアミノ酸配列のうち1個又は数個(例えば1個～10個、さらに好ましくは1個～5個)の他のアミノ酸が付加又は挿入されたアミノ酸配列

本発明においては、上記(i)～(iii)を組み合わせたアミノ酸配列からなり、かつ上
5 記 TDP-43 活性と同様の作用を有する変異型の TDP-43 を使用することもできる。

ここで、「TDP-43 活性」とは、TG(チミン-グアニン)あるいは UG(ウラシル-グアニン)の繰り返しを有する核酸との結合活性を意味する。このような結合活性は、UV cross-linking とその競合阻害試験を行うことにより、あるいは公知の EMSA 法により測定することができる。

10 また、本発明で用いられる TDP-43 は、TDP-43 活性を有する限り、上記アミノ酸配列とホモロジーを有するタンパク質でもよい。そのようなタンパク質としては、配列番号1に示すアミノ酸配列と85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

このような配列番号1で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミ
15 ノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列をコードする DNA は、TDP-43 をコードする DNA の塩基配列を用いて、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6 等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製する
20 ことができる。

また、DNA に変異を導入するには、Kunkel 法や Gapped duplex 法等の部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えば QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社製)、GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (インビトロジェン社製)、TaKaRa
25 Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km 等：タカラバイオ社製)等を用いて行うことができる。

その後、通常の遺伝子工学的手法を用いた宿主-発現系により、目的とする TDP-43 タンパク質を得ることができる (Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)))。

リン酸化の対象となるアミノ酸残基は、特に限定されるものではないが、セリン (Ser) 残基、トレオニン (Thr) 残基及びチロシン (Tyr) 残基からなる群から選ばれる少なくとも1つであることが好ましい。

また、上記リン酸化コンセンサス配列 (pSer/Thr-X-X-Ser/Thr (配列番号 1 2) 又は pSer/Thr-X-X-X-Ser (配列番号 1 3)) (X は任意のアミノ酸配列を表し、pSer/Thr はその配列中でリン酸化されるセリン若しくはトレオニンを表す) を含む部位としては、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち以下のものが挙げられる。

Thr25 (第 25 番目の Thr を指す。以下同様。)、Ser29、Thr141、Thr153、Ser180、Ser254、Ser347、Ser369、Ser373、Ser375、Ser389、Ser403、Ser404、Ser407。

10 本発明においては、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち第 393 番目、第 403 番目、第 404 番目、第 409 番目及び第 410 番目のアミノ酸配列 (Ser 又は Thr) の 1 つ又は複数のアミノ酸残基をリン酸化することが好ましい。上記変異型アミノ酸配列の場合も、配列番号 1 のアミノ酸配列に対応する位置、すなわち、変異前のアミノ酸残基が上記第 393 番目、第 403 番目、第 404 番目、第 409 番目及び第 410
15 番目のアミノ酸配列 (Ser 又は Thr) の 1 つ又は複数のアミノ酸残基をリン酸化したものを抗原とすることができる。

なお、配列番号 1 に示すアミノ酸配列とその位置を表示するために、本明細書においてはその位置の次にアミノ酸の 3 文字表記又は 1 文字表記をすることがある。例えば、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち第 393 番目のアミノ酸がセリンの
20 ときは、「Ser393」又は「S393」のように表示する。これと同様に、第 403 番目アミノ酸残基がセリンのときは、「Ser403」、「S403」のように表示する。他のアミノ酸残基と位置についても、この表記に準じて表示する。

アミノ酸残基へのリン酸化の方法は、TDP-43 を含む基質溶液にカゼインキナーゼ 1 (CK1)、カゼインキナーゼ 2 (CK2)、その他のリン酸化酵素、あるいはそれらを含む粗酵素液と ATP を混合し、数分から数十時間インキュベートすることによって TDP-43 をリン酸化することができる。TDP-43 を含む基質溶液は大腸菌や培養細胞内に TDP-43 を挿入したプラスミドを導入した細胞を増殖させる方法がある。この他、試験管内で合成したり、生体材料から調製することも可能である。また全長の TDP-43 だけでなく、部分分解物や部分ペプチドを基質とし、上記のよ

うな酵素を用いてリン酸化することも可能である。

(1-2) リン酸化 TDP-43 の部分ペプチド

本発明においては、リン酸化 TDP-43 の全長のみならず、リン酸化部位（リン酸化されたアミノ酸残基）を含む限り、一部の長さの部分断片を抗原として使用することが可能である。本発明においては、この一部の長さの部分断片を「部分ペプチド」と呼ぶ。ペプチドにはポリペプチドも含まれるが、本発明においては、アミノ酸配列の長さに関係なく、リン酸化 TDP-43 の一部の配列を有し、かつ、少なくとも1つのアミノ酸残基がリン酸化されている限り「部分ペプチド」と総称する。

本発明において、抗原として使用するのに好ましい部分ペプチドのアミノ酸配列は、上記(1-1)の項に記載の(a)又は(b)のタンパク質のアミノ酸配列において、リン酸化されたアミノ酸残基を含む一部のアミノ酸配列であり、好ましくは連続する4個以上のアミノ酸配列を含む。より好ましくは、部分ペプチドの長さは配列番号1に示すアミノ酸配列の8~15個の配列であり、さらに好ましくは、配列番号1に示すアミノ酸配列の10~11個の配列である。神経病理学、及び生化学的解析結果によると、部分ペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のC末端側の部分配列を有することが好ましい。そのような部分配列としては、以下の配列番号2~4に示されるものを例示することができる。

ペプチド 388-397 : ASNAGSGSGF (配列番号2)

ペプチド 398-408 : NGGFGSSMDSK (配列番号3)

20 ペプチド 405-414 : MDSKSSGWGM (配列番号4)

配列番号2、3、4に示されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1で示されるアミノ酸配列における388~397番目、398~408番目、405~414番目のアミノ酸配列である。但し、本発明においては、上記部分配列を一部改変して用いることができる。例えば、Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) 又は Thyroglobulin などの担体蛋白質を架橋させるために、上記配列番号2~4に示すアミノ酸配列のN末端側又はC末端側に、システイン (Cys) 残基を付加することができる。

また、前記の通り、TDP-43のアミノ酸配列の中でCK1のリン酸化コンセンサス配列 (pS/T-X-X-S/T, pS/T-X-X-X-S) でCK1が結合しリン酸化する部位のアミノ酸配列も、本発明における部分ペプチドとして使用することが可能である。

さらに、上記タンパク質及び部分ペプチドは、マウス、ヒト等の脳や脊髄などの組織や細胞から精製された天然型の TDP-43 及びその部分ペプチドでもよいし、遺伝子工学的に生産された TDP-43 又はその部分ペプチドでもよい。また、そのアミノ酸配列を指定することにより、固相法などの公知のタンパク質合成法又は市販の

5 タンパク質合成装置を用いて合成することもできる。

ここで、リン酸化されるアミノ酸残基としては、Ser、Thr 及び Tyr 残基が挙げられるが、好ましくは Ser 及び Thr 残基である。置換による変異処理が施された変異型アミノ酸配列において、置換後のアミノ酸残基が Ser、Thr 又は Tyr のときは、これらのアミノ酸残基もリン酸化の対象となる。

10 より具体的には、リン酸化部分ペプチドは例えば以下の配列番号 5～11 に示すものが挙げられる。

CASNAGS(PO₃H₂)GSGF (配列番号 5)

CNGGFGS(PO₃H₂)SMDSK (配列番号 6)

CNGGFGSS(PO₃H₂)MDSK (配列番号 7)

15 CNGGFGS(PO₃H₂)S(PO₃H₂)MDSK (配列番号 8)

CMDSKS(PO₃H₂)SGWGM (配列番号 9)

CMDSKSS(PO₃H₂)GWGM (配列番号 10)

CMDSKS(PO₃H₂)S(PO₃H₂)GWGM (配列番号 11)

上記アミノ酸配列において「(PO₃H₂)」はその前に記載のアミノ酸残基がリン酸化されたことを意味する。例えば、上記アミノ酸配列において、「S(PO₃H₂)」は、

20 Ser がリン酸化されていることを意味する。

配列番号 5 に示すアミノ酸配列は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列の第 6 番目の Ser 残基をリン酸化し、かつ、N 末端に Cys を付加したものである。

配列番号 6 に示すアミノ酸配列は、配列番号 3 に示すアミノ酸配列の第 6 番目の

25 Ser 残基をリン酸化し、かつ、N 末端に Cys を付加したものである。

配列番号 7 に示すアミノ酸配列は、配列番号 3 に示すアミノ酸配列の第 7 番目の Ser 残基をリン酸化し、かつ、N 末端に Cys を付加したものである。

配列番号 8 に示すアミノ酸配列は、配列番号 3 に示すアミノ酸配列の第 6 番目及び第 7 番目の Ser 残基をリン酸化し、かつ、N 末端に Cys を付加したものである。

配列番号 9 に示すアミノ酸配列は、配列番号 4 に示すアミノ酸配列の第 5 番目の Ser 残基をリン酸化し、かつ、N 末端に Cys を付加したものである。

配列番号 10 に示すアミノ酸配列は、配列番号 4 に示すアミノ酸配列の第 6 番目の Ser 残基をリン酸化し、かつ、N 末端に Cys を付加したものである。

- 5 配列番号 11 に示すアミノ酸配列は、配列番号 4 に示すアミノ酸配列の第 5 番目及び第 6 番目の Ser 残基をリン酸化し、かつ、N 末端に Cys を付加したものである。

これらのリン酸化 TDP-43 又は部分ペプチドは、TDP-43 プロテノパチー病変が認められるマウス、ヒト等の脳や脊髄などの組織又は細胞から精製された天然型のリン酸化 TDP-43 でもよいし、遺伝子工学的に生産されたリン酸化 TDP-43 でもよい。例えば、TDP-43 プロテノパチー病変が認められる脳や脊髄などの組織を各種界面活性剤、例えば Triton-X、Sarkosyl などを用い、可溶性画分と不溶性画分に分画する。さらに不溶性画分を尿素やグアニジン塩酸などに溶解し、各種カラム、例えばヘパリンカラムあるいは結合樹脂に結合させることによりリン酸化 TDP-43 を得ることができる。また、抗原として用いるリン酸化 TDP-43 は、そのアミノ酸配列を指定することにより、固相法などの公知のタンパク質合成法又は市販のタンパク質合成装置を用いて合成することもできる。合成したペプチドは、Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) 又は Thyroglobulin などの担体蛋白質と結合させ、免疫原として用いることができる。

20 (2) ポリクローナル抗体の作製

前記のようにして作製したリン酸化 TDP-43 又は部分ペプチドをそれ自体で、あるいは担体、希釈剤と共に温血動物、例えばウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヤギ等に投与することにより免疫する。抗原の動物 1 匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは 1~10mg であり、アジュバントを用いるときは 5~500 μ g である。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント (FCA)、フロイント不完全アジュバント (FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下又は腹腔内等に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは 1~2 週間間隔で、2~10 回、好ましくは 3~5 回免疫を行う。免疫の間隔は、当業者

であれば得られる抗体価を勘案して設定することができる。3回～4回皮下免疫を行った時点で試採血を行い、抗体価を測定することが好ましい。血清中の抗体価の測定は、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、EIA (enzyme immunoassay)、放射性免疫測定法 (RIA; radioimmuno assay) 等によって行うことができる。抗体価が十分上昇したことを確認した後、全採血し、通常行われる方法により抗体を分離精製することができる。例えば、目的の抗体を含有する血清を、リン酸化されていない TDP-43 又はリン酸化されていない合成ペプチド(以下、「非リン酸化 TDP-43」という)を結合したカラムに通し、素通り画分を採取することにより、リン酸化 TDP-43 に対する特異性を向上させたポリクローナル抗体を得ることができる。

(3) モノクローナル抗体の作製

(i) 抗体産生細胞の採取

前記のようにして作製したリン酸化 TDP-43 又は部分ペプチドをそれ自体で、あるいは担体及び希釈剤と共に温血動物に投与することにより免疫する。抗原の動物 1 匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは 1～10mg であり、アジュバントを用いるときは 5～500 μ g である。用いられるアジュバントの種類、免疫方法、免疫の間隔はポリクローナル抗体の作製と同様である。最終の免疫日から 1～30 日後、好ましくは 2～5 日後に、抗体価の認められた個体を選択し抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又はリンパ節細胞が好ましい。

(ii) 細胞融合

ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。融合操作は既知の方法、例えば Kohler らの方法に従い実施できる。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態では HAT 選択培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む) で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えば PA1、P3U1、NSI/1-Ag4-1、NSO/1 などのマウスミエローマ細胞株、YB2/0 などのラットミエローマ細胞株などが挙げ

られる。

上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞との細胞融合は、血清を含まない DMEM、RPMI-1640 培地などの動物細胞培養用培地中で、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 個の抗体産生細胞と $2 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ 個のミエローマ細胞とを混合し（抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比 1 : 1 ~ 1 : 10）、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量 1000 ~ 6000 ダルトンのポリエチレングリコール又はセンダイウイルス等を使用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

10 (iii) ハイブリドーマの選別及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を、例えば 10 ~ 20% のウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地などで適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に 5×10^7 個/well 程度まき、各ウェルに HAT 培地などの選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、10 日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

次に、生育してきたハイブリドーマをさらにスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマを培養したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法等によって、スクリーニングすることができる。具体的には、96 ウェルプレートに抗原を吸着させた後、仔牛血清でブロッキングする。ハイブリドーマ細胞の培養上清を固相化した抗原に 37°C で 1 時間反応させた後、ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG を 37°C で 1 時間反応させ、オルトフェニレンジアミンを基質として用いて発色させる。酸で反応を停止させた後、490nm の波長における吸光度を測定することにより、スクリーニングすることができる。上記測定法により陽性を示したモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、限界希釈法等によりクローニングする。そして、最終的に、リン酸化 TDP-43 に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する細胞であるハイブリドーマを樹立する。

(iv) モノクローナル抗体の採取

樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法又は腹水形成法等を採用することができる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを 10%ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地、MEM 培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば 37°C、5% CO₂ 濃度）で 7~14 日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物、例えばマウス (BALB/c) の腹腔内にハイブリドーマを約 2×10^7 個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~2 週間後に腹水を採取する。上記抗体の採取方法において抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせるにより精製することができる。

なお、ヒト型化抗体は、免疫原（抗原）をヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫し、既存の一般的な抗体産生方法によって取得することができる。ヒト型化抗体産生非ヒト哺乳動物、特にヒト型化抗体産生トランスジェニックマウスの作製方法は公知である (Nature Genetics 7: 13-21 (1994) ; Nature Genetics 15: 146-156 (1997) 等)。

(4) 微生物の寄託

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ（識別のための表示：TDP43-pS409/410）は、2008年7月3日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に FERM ABP-10984 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

(5) 遺伝子組換え抗体の作製

本発明の抗リン酸化 TDP-43 抗体の好ましい態様の一つとして、遺伝子組換え抗体が挙げられる。遺伝子組換え抗体としては、限定はされないが、例えば、キメラ抗体、ヒト型化抗体 及びヒト化抗体等が挙げられる。

キメラ抗体（すなわちヒト型キメラ抗体）は、マウス由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に連結（接合）した抗体であり (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851-6855, (1984) 等を参照)、キメラを作製する場合は、そのように連結した抗

体が得られるよう、遺伝子組換え技術によって容易に構築できる。

ヒト型化抗体を作製する場合は、いわゆる CDR グラフティング (CDR 移植) と呼ばれる手法を採用することができる。CDR グラフティングとは、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域 (CDR) をヒト可変領域に移植して、フレームワーク領域 (FR) はヒト由来のもので CDR はマウス由来のものからなる、再構成した可変領域を作製する方法である。次に、これらのヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。このようなヒト型化抗体の作製法は、当分野において周知である (Nature, 321, 522-525 (1986) ; J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987) ; Queen C et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033 (1989) ; 特許第 2828340 号公報等を参照)。

ヒト化抗体 (完全ヒト抗体) は、一般に V 領域の抗原結合部位である超過変領域 (Hyper Variable region)、V 領域のその他の部分及び定常領域の構造が、ヒトの抗体と同じ構造を有するものである。但し、超可変部位は他の動物由来であってもよい。ヒト化抗体を作製する技術も公知であり、ヒトに共通の遺伝子配列については遺伝子工学的手法によって作製する方法が確立されている。ヒト化抗体は、例えば、ヒト抗体の H 鎖及び L 鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法 (Tomizuka, K. et al., Nature Genetics, (1977)16, 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nuc. Acids Res., (1998)26, 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects, (1999)10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2000)97, 722-727 等を参照) や、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法 (Wormstone, I. M. et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science., (2002)43 (7), 2301-8; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics, (2002)1 (2), 189-203; Siriwardena, D. et al., Ophthalmology, (2002)109 (3), 427-431 等を参照) により取得することができる。

また、本発明においては、本発明のハイブリドーマ (例えば受領番号 FERM ABP-10984 のハイブリドーマ) 又は当該ハイブリドーマから抽出した DNA 若しくは RNA などを原料として、上述した周知の方法に準じてキメラ抗体、ヒト型化

抗体、ヒト化抗体を作製することができる。

(6) 抗体断片の作製

本発明の抗体断片としては、例えば、Fab (antigen - binding fragment)、F(ab')₂、Fab'、Fv、diabody (dibodies)、dsFv、線状抗体、scFv (single chain Fv)、相補
5 性決定領域 (complementarity determining region : CDR) を少なくとも一部に
含むペプチド等などが挙げられる。

Fab は、抗体分子をタンパク質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち、
H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体とがジスルフィド結合で結合した抗体断片であ
る。Fab は、抗体の Fab をコードする DNA を、発現ベクターに挿入し、該ベク
10 ターを宿主生物に導入することにより発現させて、製造することができる。

F(ab')₂ は、抗体分子をタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片の
うち、Fab がヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大き
い抗体断片である。F(ab')₂ は、Fab をチオエーテル結合又はジスルフィド結合さ
せて作製することができる。

15 Fab'は、上記 F(ab')₂ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した抗体断片であ
る。Fab'は、抗体の Fab'断片をコードする DNA を、発現ベクターに挿入し、該ベ
クターを宿主生物に導入することにより発現させて、製造することができる。

scFv は、1本の H 鎖 V 領域 (VH) と1本の L 鎖 V 領域 (VL) とを適当なペ
プチドリンカーを用いて連結したポリペプチドであり、抗原結合活性を有する抗体
20 断片である。scFv は、抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv
をコードする DNA を構築して、該 DNA を発現ベクターに挿入し、該発現ベクタ
ーを宿主生物に導入することにより発現させて、製造することができる。

diabody は、scFv が二量体化した抗体断片であり、二価の抗原結合活性を有す
る抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異
25 なる抗原結合活性とすることもできる。diabody は、抗体の VH および VL をコー
ドする cDNA を取得し、ペプチドリンカーのアミノ酸配列の長さが8残基以下と
なるように scFv をコードする DNA を構築して、該 DNA を発現ベクターに挿入
し、該発現ベクターを宿主生物に導入することにより発現させて、製造することが
できる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを、該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994)。dsFv は、

5 抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築して、該 DNA を発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主生物に導入することにより発現させて、製造することができる。

CDR を含むペプチドは、VH 又は VL の CDR (CDR1~3) の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の CDR を含むペプチドは、直接又は適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。CDR を含むペプチドは、抗体の VH

10 および VL の CDR をコードする DNA を構築し、該 DNA を発現ベクターに挿入して、該発現ベクターを宿主生物に導入することにより発現させて、製造することができる。CDR を含むペプチドは、Fmoc 法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法) 及び tBoc 法 (t-ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法によって製

15 造することができる。

本発明においては、本発明のハイブリドーマ (例えば受領番号 FERM ABP-10984 のハイブリドーマ) 又は当該ハイブリドーマから抽出した DNA 若しくは RNA などを原料として、上述した周知の方法に準じて抗体断片を作製することができる。

20

4. 検出薬及び検出方法、並びに診断薬および診断方法

本発明の抗体は、TDP-43 プロテイノパチー病変を検出するための試薬として用いることができる。TDP-43 プロテイノパチー病変は、TDP-43 プロテイノパチーの患者の脳、脊髄などで認められ、ユビキチン陽性封入体 (NCI) などの TDP-43

25 蛋白異常凝集物の発生などを呈する。さらに、TDP-43 の蓄積、不溶化、漏出、あるいはこれに伴う細胞や組織の形態的又は生化学的変化などが生じる。

また、本発明の抗リン酸化 TDP-43 抗体は、リン酸化 TDP-43 の検出及び定量ができるので、TDP-43 プロテイノパチーの診断薬に用いることができる。

TDP-43 プロテイノパチー病変検出には、検出感度の点から、Ser409 及び/又

はSer410がリン酸化されたタンパク質又はペプチドと結合する抗体を用いることが好ましい。

抗リン酸化 TDP-43 抗体を用いて TDP-43 プロテノパチー病変の検出又は TDP-43 プロテノパチーの診断をする方法は、例えば、

- 5 (a) 本発明の抗体またはその断片と試料とを反応させる工程、及び
(b) 工程 (a) で形成した抗原抗体複合体と、検出のための標識抗体とを反応させる工程

を含む。反応後、標識抗体から発するシグナルを検出する。

- 10 本発明の検出又は診断薬を用いる検出方法又は診断方法は、抗体を用いるアッセイ、即ち免疫アッセイであれば、いずれの方法でもよく、例えば、酵素免疫測定法 (ELISA)、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法 (RIA)、発光免疫測定法、酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応、粒子凝集反応又はウエスタンブロット法等が挙げられる。

- 15 本発明の検出及び/又は定量法、あるいは診断法に供される試料としては、脳又は脊髄などの神経組織 (例えば脳の組織切片) 及び神経細胞、脳脊髄液、血液等の体液試料等、リン酸化 TDP-43 が含まれる可能性のある生体試料であれば特に限定されるものではない。

- 20 本発明の検出及び/又は定量法、あるいは診断法を酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法等の標識抗体を用いた免疫測定法により実施する場合には、サンドイッチ法又は競合法により行うこともでき、サンドイッチ法の場合には固相化抗体及び標識抗体のうち少なくとも1種が本発明の抗体であればよい。

- 25 標識抗体とは、標識物質で標識された抗体を意味し、これらの標識抗体は、試料 (例えば、脳、脊髄などの神経組織及び神経細胞、脳脊髄液、血液等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等) 中に含まれる抗原を検出または定量するために用いることができる。

本発明で用いることができる標識物質は、抗体に物理的結合又は化学的結合等により結合させることによりそれらの存在を検出可能にするものであれば特に限定されない。標識物質の具体例としては、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、

アビジンあるいは放射性同位体等が挙げられ、より具体的には、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、カタラーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}I 等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、または化学発光物質が挙げられる。標識物質と抗体との結合法は、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルスルフィド法又は過ヨウ素酸法等の公知の方法を用いることができる。

- 10 ここで、放射性同位体及び蛍光物質は単独で検出可能なシグナルをもたらすことができるが、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは、単独では検出可能なシグナルをもたらすことができないため、さらに1種以上の他の物質と反応することにより検出可能なシグナルを生じる。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性を測定する方法（比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法等）に依存して種々の基質が用いられる。また、ビオチンの場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジンを反応させるのが一般的である。必要に応じてさらに該基質に依存する種々の発色物質が用いられる。

- 20 固定化抗体は、試料（例えば、脳、脊髄などの神経組織及び神経細胞、脳脊髄液、血液等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれる抗原を検出、定量、分離または精製するために用いることができる。

- 25 抗体を固定化するために使用できる不溶性担体としては、例えば、(i) ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂又はナイロン樹脂等、(ii) ガラス、(iii) セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等が挙げられる。これらの担体は、ビーズ、フィルター又はメンブレン等の形態で、あるいはアフィニティークロマトグラフィー用の担体として使用することができる。

5. 検出用又は診断用キット

本発明の TDP-43 プロテイノパチー病変検出用キット又は TDP-43 プロテイノパチー診断用キットは、本発明の抗体を含むものである。ここで用いる抗体は、上記した固定化抗体や標識抗体でもよい。例えば、本発明の抗体を一次抗体として使用する場合、本発明のキットには、抗原抗体結合反応により形成された複合体を検出するための二次抗体を含めてもよい。本発明のキットには、該キットを効率的かつ簡便に利用できるようにするために、これら抗体以外に種々の補助剤を含めてもよい。補助剤としては、例えば固体状の二次抗体を溶解させるための溶解剤、不溶化担体を洗浄するために使用される洗浄剤、抗体の標識物質として酵素を使用した場合に酵素活性を測定するための基質、その反応停止剤などの免疫学的測定試薬のキットとして通常使用されるものが挙げられる。

6. 医薬組成物

本発明の医薬組成物は、本発明の抗体を有効成分として含有するものであり、TDP-43 プロテイノパチー、アルツハイマー病、レビー小体型認知症、運動ニューロン疾患などの関連の神経変性疾患等の疾患の予防、治療に有効である。用いられる抗体としては、例えば、ヒトキメラ抗体またはヒト化抗体が挙げられる。さらに、血液脳関門 (BBB) を通過させるために、ペプチド化した抗体又はこれらのペプチドと BBB 透過性運搬体との結合体が挙げられる。

本発明の抗体は、単独で、あるいは薬学的に許容される担体または希釈剤等と共に投与することができ、またその投与は1回または数回に分けて行うことができる。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トローチ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口又は非経口的に投与することができる。

経口投与の場合、微晶質セルロース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸ジカリウム、グリシン等の種々の賦形剤を、崩壊剤、結合剤等とともに使用する

ることができる。崩壊剤としては、澱粉、アルギン酸、ある種のケイ酸複塩などが挙げられ、結合剤としては、例えばポリビニルピロリドン、蔗糖、ゼラチン、アラビアゴムなどが挙げられる。また、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、タルク等の滑沢剤は錠剤形成に非常に有効である。経口投与用として水性懸濁液又はエリキシルにする場合は、必要により乳化剤、懸濁化剤を併用し、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン等、およびそれらを組み合わせた希釈剤と共に使用することができる。

非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される注射剤などが含まれる。

10 注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の薬学的に許容される担体中に $0.1 \mu\text{g}$ 抗体/ml 担体～ 10mg 抗体/ml 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において 1kg 体重あたり、 $10 \mu\text{g}$ ～ 50mg の割合で、好ましくは $100 \mu\text{g}$ ～ 2mg の割合で、1日あたり15 回～数回投与することができる。但し、この範囲に限定されるものではなく、患者の体重および症状や個々の投与経路によって変動し得る。治療する患者の薬物に対する感受性の差異、薬剤の処方の仕方、投与期間および投与間隔によっても投与量に変動が生じてくるので、場合によっては前記範囲の下限より低い投与量が適当なこともある。

20 投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射などが挙げられるが、好ましくは静脈内注射である。また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油、エタノール等のアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として25 製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

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

実施例 1 抗体の調製

(1) 抗原の調製

本発明の抗体を得るための抗原ペプチドとして、ヒト TDP-43 (配列番号 1) に
5 おけるアミノ酸配列番号 388-397、398-408、又は 405-414 のアミノ酸配列の N 末
端にシステインを付加した配列 (CASNAGSGSGF、CNGGFGSSMDSK、
CMDKSKSSGWGM) を有し、且つリン酸化セリン残基を有する以下のペプチドを
固相法により合成した (シグマジェノシス、又はサーモクエスト) [S(PO₃H₂)はリ
ン酸化セリンを表す]。また、カラム作製、コントロール等に使用するため、配列
10 番号 2~4 に示されるアミノ酸配列を有する非リン酸化ペプチドも合成した。

1. CASNAGS(PO₃H₂)GSGF (配列番号 5)
2. CNGGFGS(PO₃H₂)SMDSK (配列番号 6)
3. CNGGFGSS(PO₃H₂)MDSK (配列番号 7)
4. CNGGFGS(PO₃H₂)S(PO₃H₂)MDSK (配列番号 8)
- 15 5. CMDKSKS(PO₃H₂)SGWGM (配列番号 9)
6. CMDKSKSS(PO₃H₂)GWGM (配列番号 10)
7. CMDKSKS(PO₃H₂)S(PO₃H₂)GWGM (配列番号 11)

(2) 免疫

20 前記合成ペプチドを Thyroglobulin 又は KLH と定法に従ってコンジュゲートし、
抗原として用いた。抗原ペプチドを含有する 1ml の 1mg/ml 抗原ペプチド生理食
塩水溶液と 1ml のフロイント完全アジュバント (Difco 社) を合わせ、超音波処理
によってエマルジョン化し、ウサギ (ニュージーランドホワイト、体重 2.5kg、雌)
の背中数カ所以上に分けて免疫した。初回免疫から 2 週間後に 0.5ml の 1mg/ml
25 抗原ペプチド生理食塩水溶液と 1ml のフロイント不完全アジュバントを合わせ、超
音波処理によりエマルジョン化したものを追加免疫した。免疫した 1 週間後に採血
を行い、採取した血液は室温で 1 時間静置後、4℃で一晩静置し、5000 x g、10 分
間の遠心分離を行い、抗血清を得た。

(3) 抗体の精製

抗体を精製するため、ホルミルセルロファイン（生化学工業）、あるいはトヨパール AF トレシル 650M（東ソー）約 2ml に対し、TDP-43 におけるアミノ酸配列番号 388-397、398-408 又は 405-414 のアミノ酸配列を有する非リン酸化合成ペプチド約 2mg を反応させたカラムを作製した。抗血清 2ml をこのカラムにおいて
5 10-20 時間循環させ、カラムに吸着されなかった抗体を抗リン酸化 TDP-43 抗体とした。

抗リン酸化 TDP-43 抗体のうち、Ser409 及び Ser410 がリン酸化されたペプチドに対するポリクローナル抗体を、pSer409/410 ポリクローナル抗体と名づけた。

10 実施例 2 モノクローナル抗体の調製

(1) ハイブリドーマの作製

上記「実施例 1 (2) 免疫」の方法に準じて初回免疫及び追加免疫を行なった。最終免疫の 3 日後に、免疫したマウスから脾臓を採取した。採取した脾臓細胞とミエローマ細胞株とを 5 : 1 の割合で混合し、ポリエチレングリコール法により細胞
15 融合を行った。HAT（アミノプテリン、ヒポキサンチン、チミジン）を含む選択培地を用い、5% CO₂ インキュベーターで培養した。7 ~ 14 日間培養し、増殖してきたハイブリドーマに対しさらにスクリーニングを行った。

スクリーニングは、FTLD 患者脳の Triton 不溶性画分を PLL コートしたスライドガラス上に塗布し、それにハイブリドーマの培養上清を反応させ、異常構造物と
20 反応する（異常構造物を染める）抗体を産生するクローンを選択することにより行った。その後、限界希釈法により、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのクローンを得た。

(2) モノクローナル抗体の調製

本発明のモノクローナル抗体は、上記方法で作製したハイブリドーマのクローンを
25 を BALB/c マウスの腹腔内に投与して腹水を採取するか、高濃度培養上清を作製することにより得た。

具体的には、上記方法で作製したハイブリドーマのクローンを、予め（10 日前）2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン（プリスタン）を投与された BALB/c マウスの腹腔内に 1×10^7 個投与し、2 週間後の腹水を採取した。

このようにして得られたモノクローナル抗体を pSer409/410 モノクローナル抗体と名づけた。

(3) ハイブリドーマの寄託

上記方法により得られたハイブリドーマのうち、pSer409/410 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、「TDP43-pS409/410」と称して、2008年7月3日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に国際寄託した（受領番号：FERM ABP-10984）。

実施例3 ウェスタンブロッティング法及びELISA法による抗体の特異性の検討

10 実施例1において調製した抗体が、それぞれリン酸化した抗原ペプチドと特異的に反応するか否かをウェスタンブロッティング法及びELISA法により確認した。

ウェスタンブロッティング法による検討においては、抗原ペプチドとして、2種類のリン酸化リコンビナントヒトTDP-43及び非リン酸化TDP-43（コントロール）を用い、抗体としては、Ser409がリン酸化されたペプチド（pSer409（pS409））
15 に対する抗体、Ser410がリン酸化されたペプチド（pSer410）に対する抗体並びにSer409及びSer410がリン酸化されたペプチド（pSer409,410）に対する抗体を用いた。また、アミノ酸配列番号405-414のアミノ酸配列を有する非リン酸化TDP-43ペプチドに対する抗体をコントロールとして用いた。

上記抗原ペプチドを、SDS-PAGEにより分離し、PVDF膜に転写し、転写したペプチドと上記抗体との反応性を調べた。その結果、これらの抗体は、CK1によりリン酸化したリコンビナントヒトTDP-43とは強く反応したが、CK1によりリン酸化しないTDP-43とは反応が見られなかった（図1）。図1において、「CK1」はカゼインキナーゼ1、「CK2」はカゼインキナーゼ2を表し、それぞれ、CK1、CK2を用いてリン酸化させたものである。

25 ELISA法による検討では、定法に従って96ウエルプレート（住友ベークライト）に5 μ g/wellの非リン酸化ペプチド、あるいは抗原ペプチドを底面に吸着させた後、実施例1で調製した抗体を500-1000倍希釈して反応させ、定法を用いて発色させた。その結果、非リン酸化ペプチドとは反応しなかったが、抗原ペプチドとは強い反応性を示した（図2～4）。

実施例 4 抗体の免疫組織染色

FTLD 患者から採取された脳大脳皮質をホルマリン固定後、50 ミクロン厚に薄切し、市販されている抗ヒト TDP43 抗体 (ProteinTech 社) (図 5、「リン酸化非依存性抗 TDP-43 抗体」、及び本発明の抗リン酸化 TDP-43 抗体 (図 5、「リン酸化依存性抗 TDP-43 抗体 (pS409)')) を用い、アビジン・ビオチン複合体法により免疫染色し、ジアミノベンチジンをを用いて発色させた。

その結果、本発明の抗リン酸化 TDP-43 抗体を用いた場合は、大脳皮質において強い陽性反応 (褐色) が認められ、変性神経突起様、球状、あるいはドット状の TDP-43 プロテノパチー病変が認められた。これに対し、細胞核に局在する正常の TDP-43 とはほとんど反応が見られなかった (図 5 右パネル)。一方、市販の抗ヒト TDP43 抗体を用いた場合は、細胞核に局在する正常の TDP-43 との反応が認められた (図 5 左パネル)。また、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者に出現する skein 様封入体も本発明の抗体に対して強い陽性反応を示した。さらに、本発明の抗体は市販の抗 TDP-43 抗体よりも広汎な TDP-43 の異常を高感度に検出した。

実施例 5 ELISA 法、及びウエスタンブロットティング法による異常 TDP-43 の検出

(1) 試料の調製

FTLD、ALS、プログらニューリン変異を有する FTLD (mPGRN)、TDP-43 蓄積が認められたアルツハイマー病 (AD) 及びレビー小体型認知症 (DLB) の患者から採取した大脳皮質 (0.5g) 並びにこれらの疾患に罹患していない患者又は正常人 (Control 又は Con) から採取した大脳皮質 (0.5g) をそれぞれ 5mL の緩衝液 A (10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EGTA, 0.8M NaCl, 10% sucrose) にてホモジナイズし、35000rpm, 20 分遠心した。その後、沈殿を 1% Triton を含む 5mL の同緩衝液 A にてホモジナイズし、35000rpm, 20 分遠心し、得られた沈殿をさらに 1% Sarkosyl を含む 5mL の同緩衝液 A にてホモジナイズして 35000rpm, 20 分の遠心を行った。得られた沈殿を 1mL の 8M 尿素溶液、あるいは 1%SDS 溶液に溶かし、ELISA あるいはウエスタンブロットの検出に供した。脱リン酸化は 8M 尿

素画分を透析後、 λ Protein phosphatase (λ PPase) にて 30°C で 2 時間処理した。

(2) ELISA 法による検出

TDP-43 蓄積のない正常脳(Control)、及びTDP-43 蓄積のあるFTLD脳(FTLD)の不溶性画分を、50mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.8)により 4 μ g から倍々希釈して 96 ウエルプレートに 4°C で一晚コーティングした。その後、一次抗体として市販 TDP-43 抗体、本発明の pSer409/410 ポリクローナル抗体 (実施例 1)、及び pSer409/410 モノクローナル抗体 (実施例 2) を 2 時間反応させ、さらにペルオキシダーゼ標識した二次抗体を 2 時間反応させた後、オルトフェニレンジアミンを基質として発色させて検出した。

市販抗体では正常 (Control) と FTLD の間に違いは検出されなかった (図 6 パネル A) のに対し、本発明の抗リン酸化 TDP-43 抗体を用いた場合、pSer409/410 モノクローナル抗体 (図 6 パネル B)、及び pSer409/410 ポリクローナル抗体 (図 6 パネル C) のいずれにおいても、FTLD 患者由来の試料に対し強い陽性反応が認められ、その反応は量依存的であった。

(3) ウェスタンブロッティングによる検出 (1)

TDP-43 蓄積のない正常脳(Control)、TDP-43 蓄積のある FTLD 脳(FTLD)、及び ALS 患者の脳の不溶性画分を 10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、市販抗体、あるいは本発明の pSer409/410 モノクローナル抗体と反応させた。ウェスタンブロッティングは、上記と同様アビジン・ビオチン複合体法を用い、ジアミノベンチジンにより発色させた。

その結果、市販抗体では 43kDa の位置に泳動される正常 TDP-43 のバンドが強く認識され、正常 TDP-43 と異常 TDP-43 の区別が困難であるのに対し (図 7 パネル A)、本発明の pSer409/410 モノクローナル抗体は正常 TDP-43 バンドとは反応せず、FTLD、あるいは ALS 患者にみられる 45kDa バンド、18~26kDa バンド、レーン全体がスメア状に染まる反応 (図中「smear」) など、異常な TDP-43 バンドを特異的に検出した (図 7 パネル B)。またこの反応は λ Protein phosphatase (図中「 λ PPase」) による脱リン酸化処理 (図 7 の「+」のパネル) によって消失

することから、抗体が患者脳に蓄積するリン酸化 TDP-43 を特異的に認識していることが確認された。

(4) ウェスタンブロッティングによる TDP-43 断片の検出(2)

5 TDP-43 の蓄積病変は疾患によって異なる病変を示すことが知られている。突起内封入体が主な病変である 1 型、円形の細胞内封入体が多い 2 型、さらにはその両者が混在する 3 型に分類され、孤発性 FTL D は 1 型、FTLD-MND 及び ALS は 2 型、PGRN 変異を有する家族性 FTL D (mPGRN) は 3 型に分類される (図 8 パネル A)。

10 また、最近 TDP-43 蓄積が認められるアルツハイマー病 (AD) 及びレビー小体病 (DLB) の症例が報告されたが、これらは 3 型の病変を示していた (図 8 パネル A)。これらの患者脳から上記のように調製した不溶性画分を 15%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、本発明の pSer409/410 抗体と反応させ、その違いについて検討した。

15 その結果、孤発性 FTL D 症例 (1 型) は、23 及び 24 kDa の二本の主要バンド (断片 A 群) 並びに 18 及び 19 kDa の二本の弱いバンド (断片 B 群) が検出された。これに対し、FTLD-MND 及び ALS 症例 (2 型) では、23、24 及び 26kDa の 3 本の主要バンド (断片 A 群) 並びに 18 及び 19 kDa の二本の弱いバンド (断片 B 群) が検出された。23 kDa バンドは孤発性 FTL D 例で最も強いのに対し、
20 24 kDa バンドは FTLD-MND あるいは ALS で最も強かった。さらに mPGRN 症例並びに TDP-43 蓄積のある AD 及び DLB (3 型) は、孤発性 FTL D と FTLD-MND/ALS 症例の中間型を示した (図 8 パネル B, C)。

本実施例により、本発明の抗体がリン酸化 TDP-43 を特異的に認識できることが
25 示された。また、本発明の抗体を用いることにより、TDP-43 プロテノパチー病変を特異的に検出することができ、さらに TDP-43 プロテノパチー病変の種類を判別できることが示された。

以上より、本発明の抗体は、リン酸化 TDP-43 検出薬、TDP-43 プロテノパチー病変の検出薬及び TDP-43 プロテノパチーの診断薬として有用である。

産業上の利用可能性

本発明により、生体内で検出されるユビキチン陽性封入体等の TDP-43 蛋白異常凝集物に特異的に結合する抗体の提供が可能となる。本発明の抗体は、TDP-43 プ

- 5 ロテインパチー患者で認められる TDP-43 蛋白異常凝集物を構成するリン酸化 TDP-43 及びその一部を有するペプチドと特異的に結合することができる。従って、本発明の抗体は、FTLD や ALS 等の TDP-43 プロテインパチーの診断や治療に有用である。

10 配列表フリーテキスト

配列番号 2 : 合成ペプチド

配列番号 3 : 合成ペプチド

配列番号 4 : 合成ペプチド

配列番号 5 : リン酸化合成ペプチド

- 15 配列番号 6 : リン酸化合成ペプチド

配列番号 7 : リン酸化合成ペプチド

配列番号 8 : リン酸化合成ペプチド

配列番号 9 : リン酸化合成ペプチド

配列番号 10 : リン酸化合成ペプチド

- 20 配列番号 11 : リン酸化合成ペプチド

配列番号 12 : リン酸化コンセンサス配列

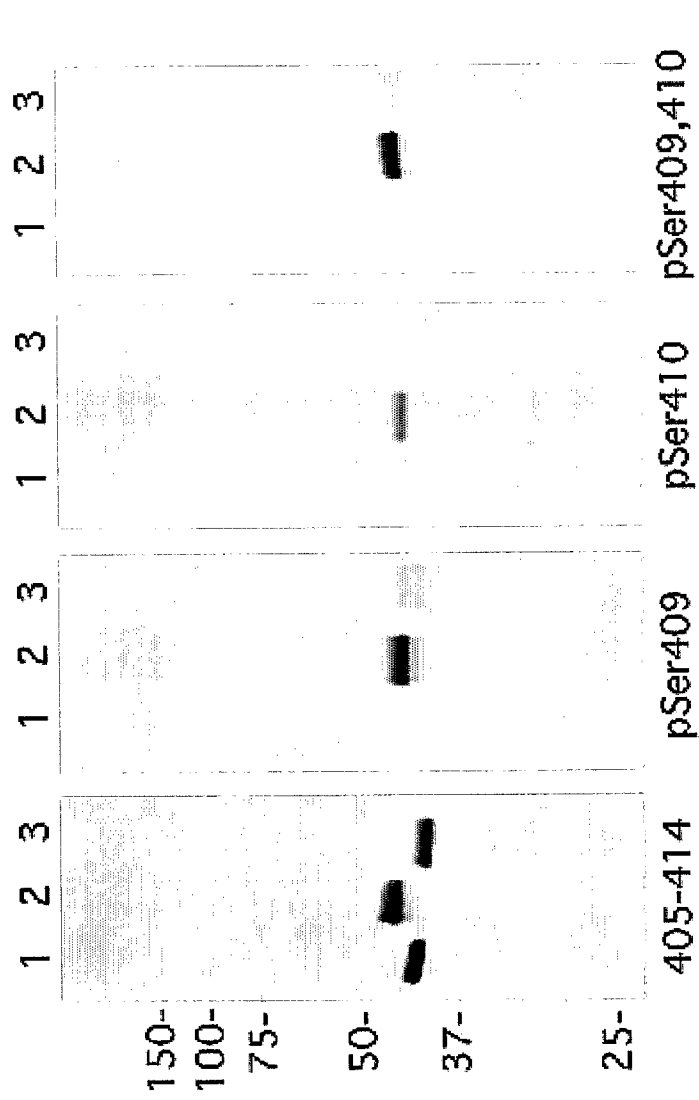
配列番号 13 : リン酸化コンセンサス配列

請求の範囲

1. 以下の (a) 若しくは (b) のタンパク質又は (c) のペプチドと特異的に結合する抗体。
 - 5 (a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸残基がリン酸化されたアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入若しくは付加された変異型アミノ酸配列を含み、かつ TDP-43 活性を有するタンパク質であって、当該変異型アミノ酸配列のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基がリン酸化された前記タンパク質
 - 10 (c) 上記 (a) 又は (b) のタンパク質のアミノ酸配列において、リン酸化されたアミノ酸残基を含む一部のアミノ酸配列を含む部分ペプチド
2. 少なくとも 1 つのアミノ酸残基が、セリン残基、トレオニン残基及びチロシン残基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである、請求項 1 に記載の抗体。
15
3. 少なくとも 1 つのアミノ酸残基が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の第 393 番目、第 403 番目、第 404 番目、第 409 番目及び第 410 番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。
20
4. ペプチドのアミノ酸配列が配列番号 5 ~ 11 のいずれかに示されるものである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。
5. リン酸化により (a) 若しくは (b) のタンパク質又は (c) の部分ペプチドの構造が変化した部位に結合することができる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。
25
6. リン酸化がカゼインキナーゼ 1 によるものである請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体。
7. 抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体。

8. 抗体がポリクローナル抗体である請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の抗体。
9. 受領番号が FERM ABP-10984 であるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体。
- 5 10. 請求項 7～9 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する抗原決定基に結合する抗体。
- 11 抗体が、キメラ抗体、ヒト型化抗体又はヒト化抗体である、請求項 7、9 又は 10 のいずれか 1 項に記載の抗体。
12. 請求項 7 又は 9～11 のいずれか 1 項に記載の抗体を産生するハイブリ
10 ドーマ。
13. 受領番号が FERM ABP-10984 であるハイブリドーマ。
14. 請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の抗体を含有する、リン酸化 TDP-43 検出薬。
15. 請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の抗体を含有する、TDP-43 プロテ
15 イノパチー病変検出薬。
16. 請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の抗体を含有する、TDP-43 プロテ
イノパチーの診断薬。
17. 請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の抗体を有効成分として含有する
医薬組成物。
- 20 18. 請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の抗体と採取された被験試料とを
反応させることを特徴とする、TDP-43 プロテイノパチー病変の検出方法。
19. 請求項 14 若しくは 15 に記載の検出薬、請求項 16 に記載の診断薬、又
は請求項 17 に記載の医薬組成物の製造における、請求項 1～11 のい
ずれか 1 項に記載の抗体の使用。

図 1



1: 非リン酸化TDP43, 2:リン酸化TDP43(CK1), 3:リン酸化TDP43(CK2)

図2

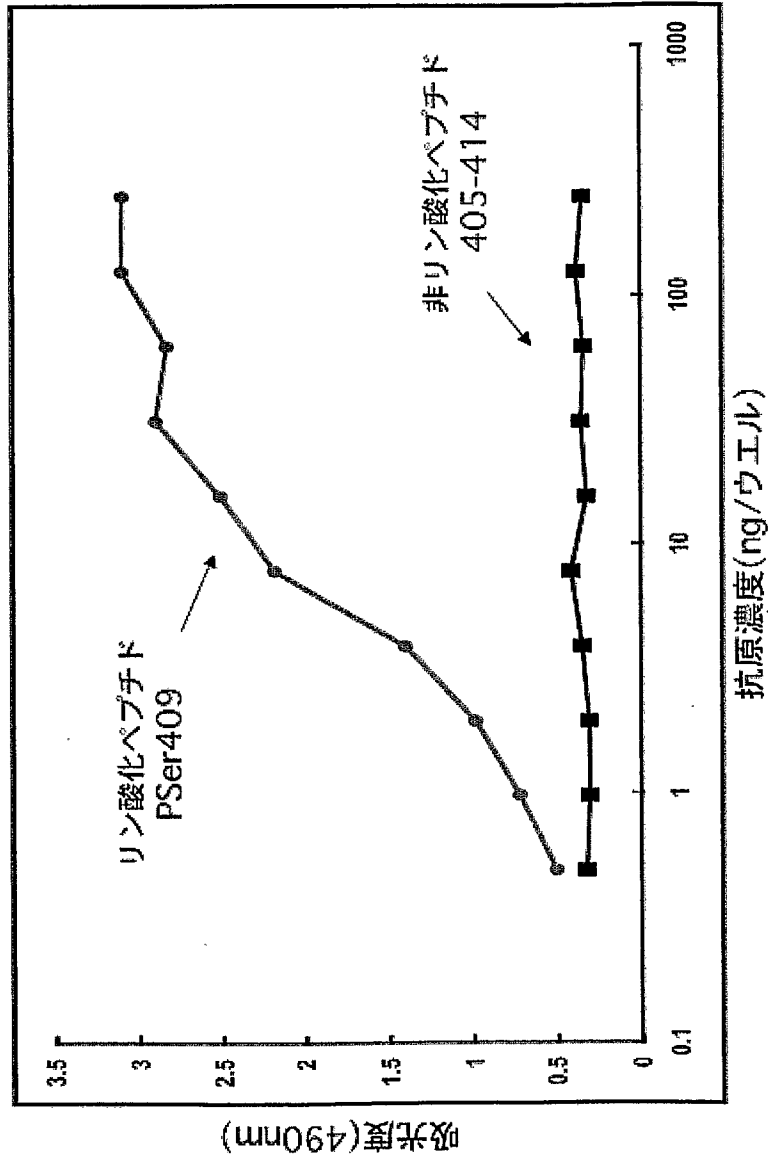


図3

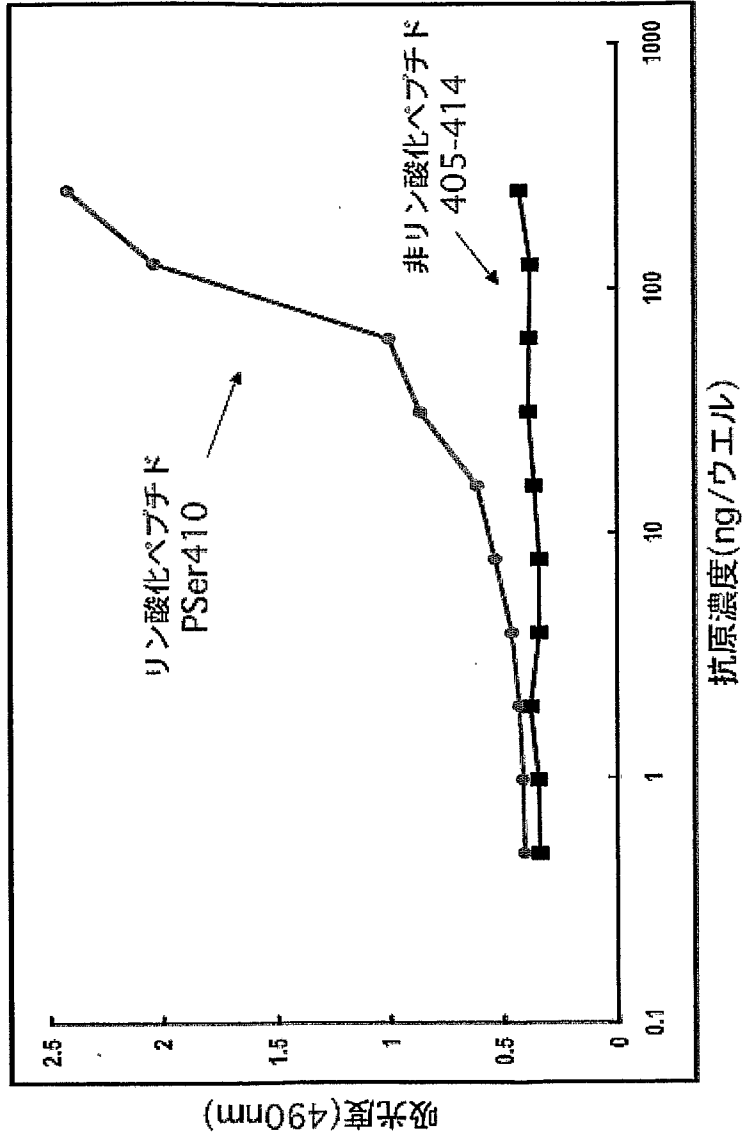


図4

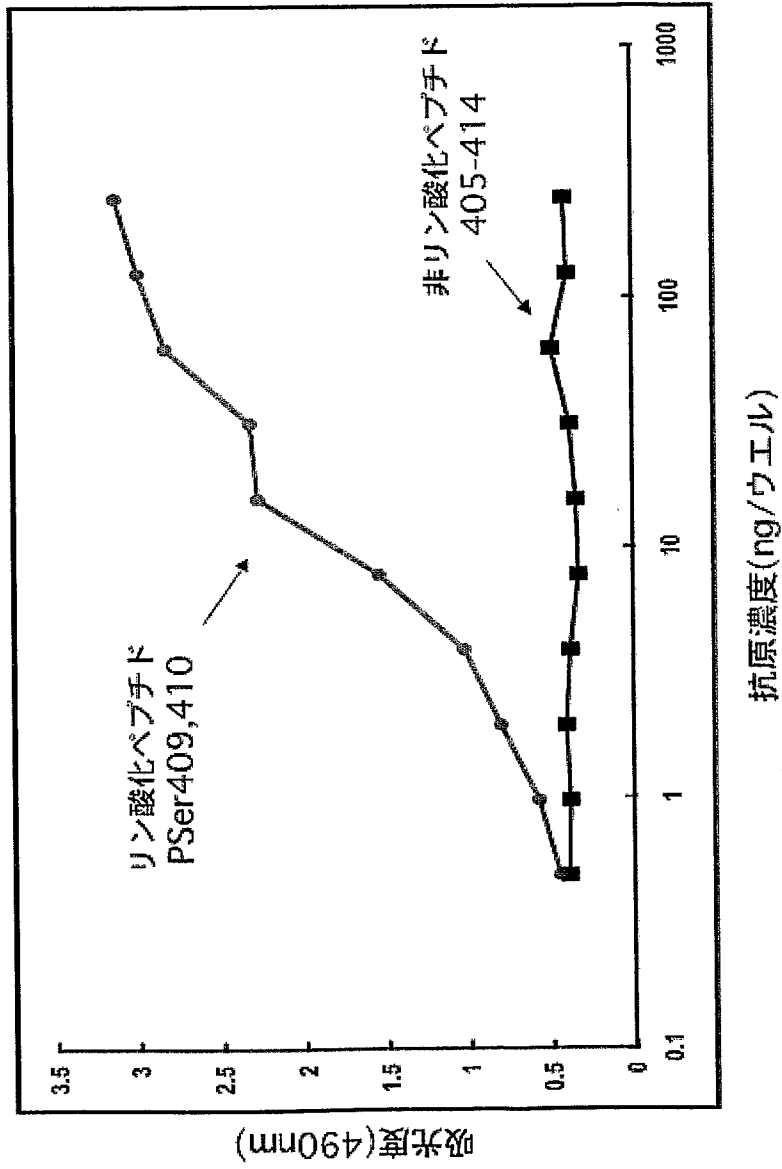


図5

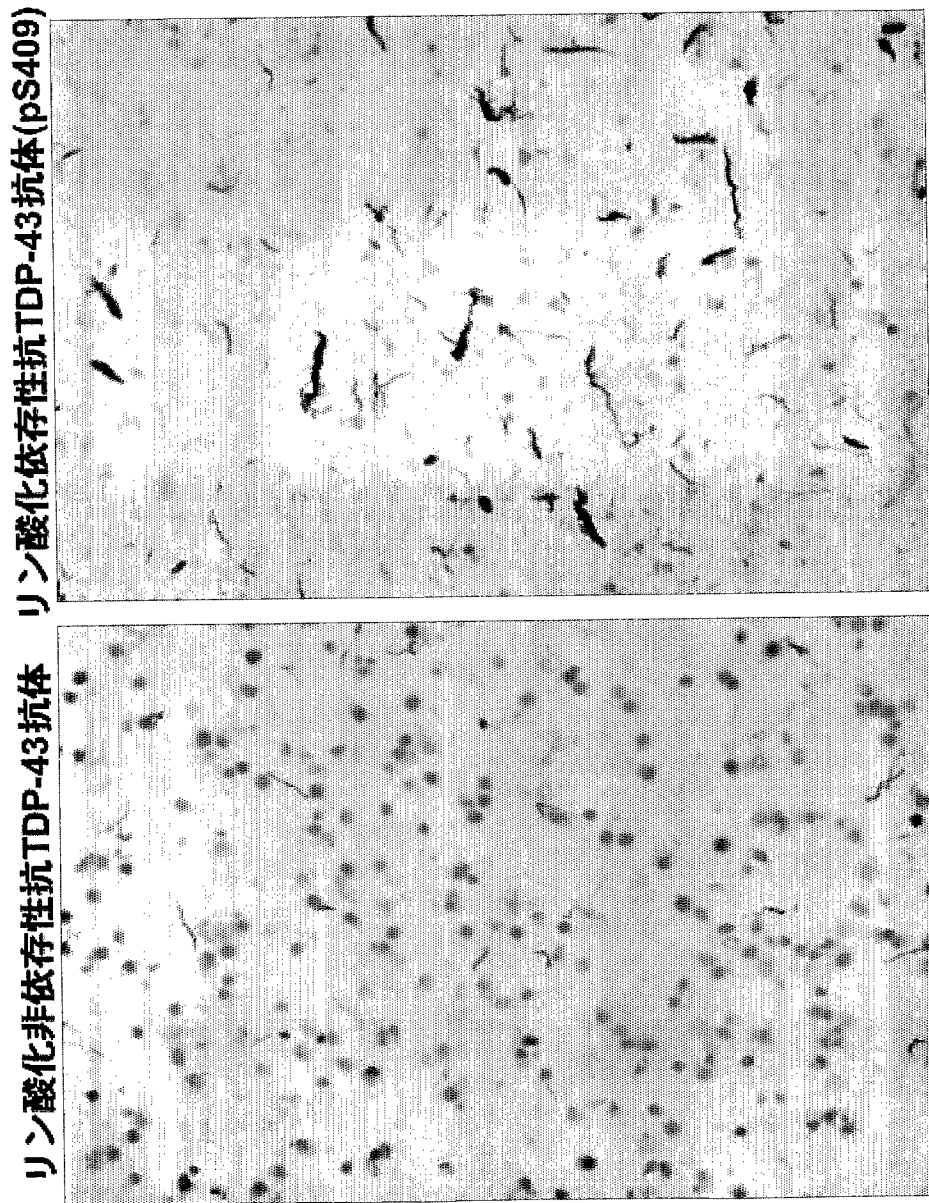
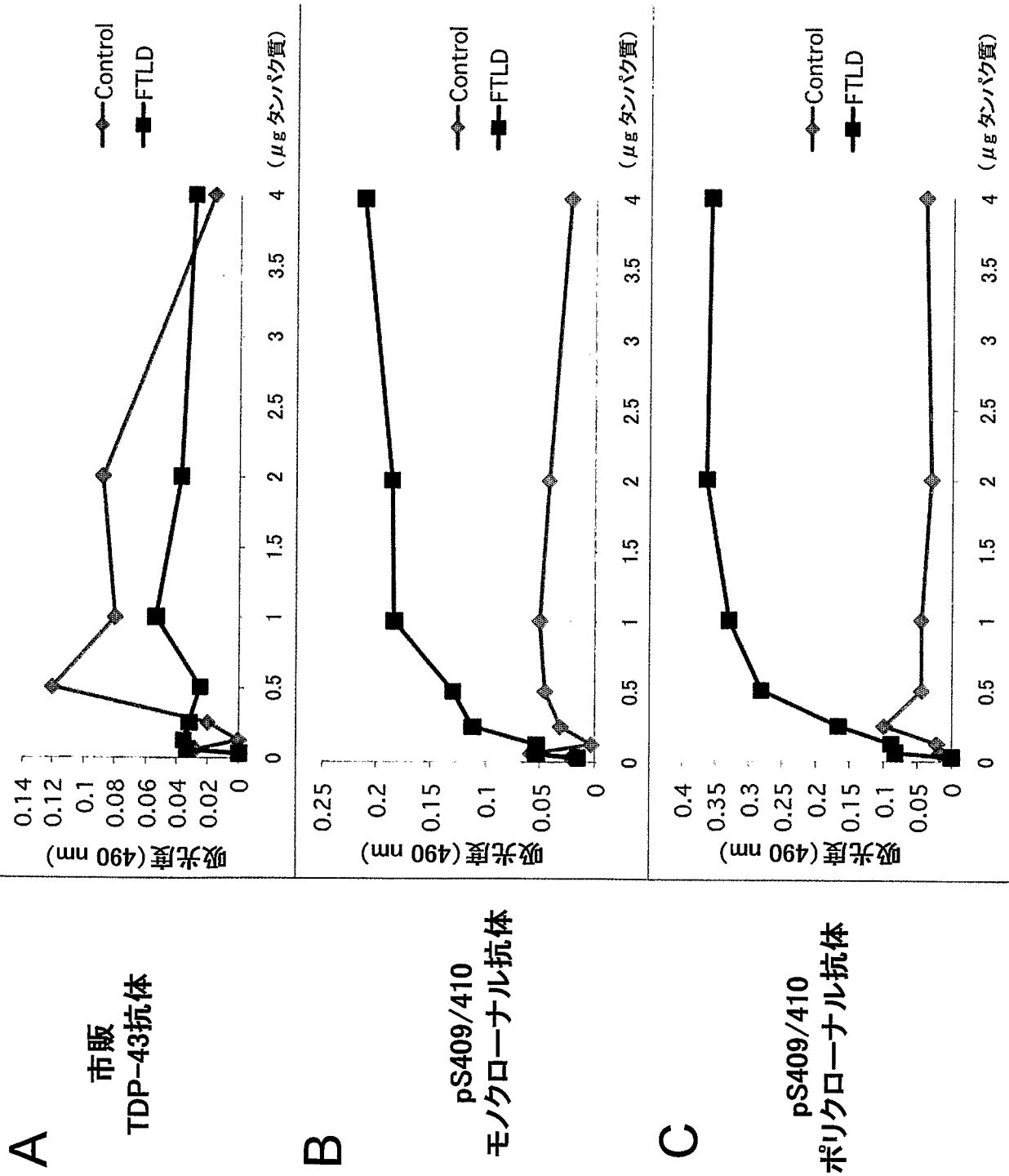
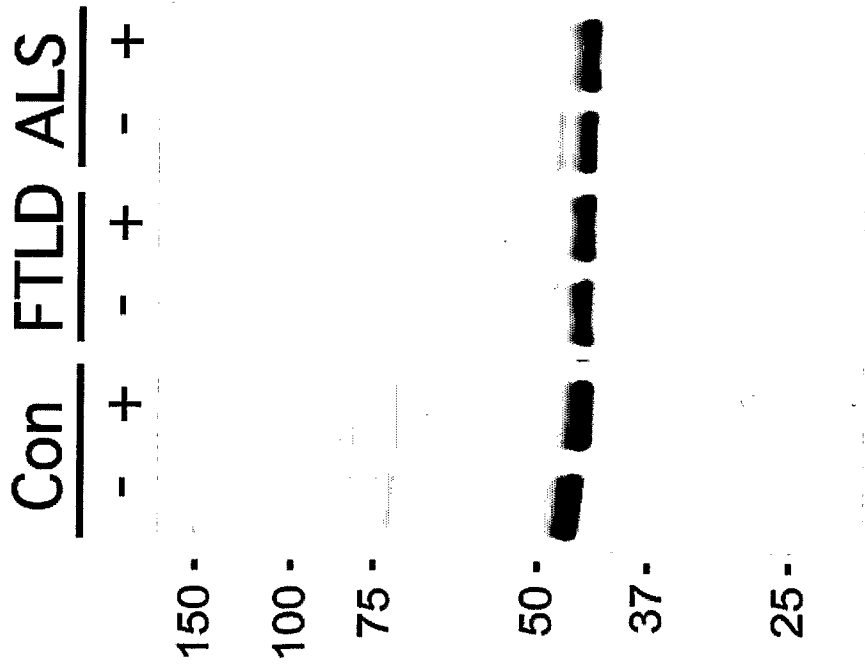


図6

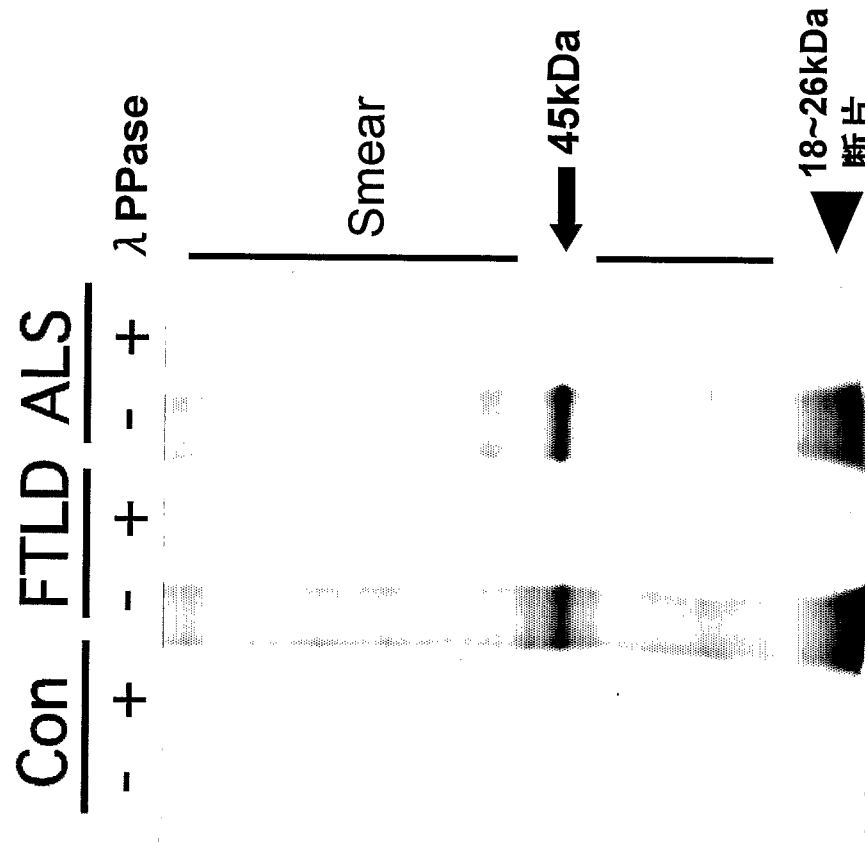


A



市販TDP-43抗体

B

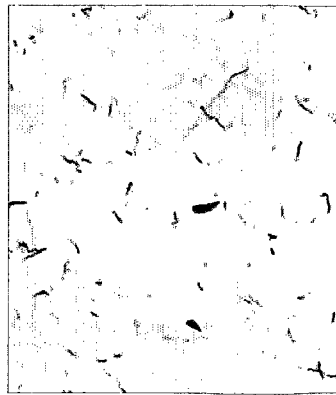


pS409/410モノクローナル抗体

A

1型

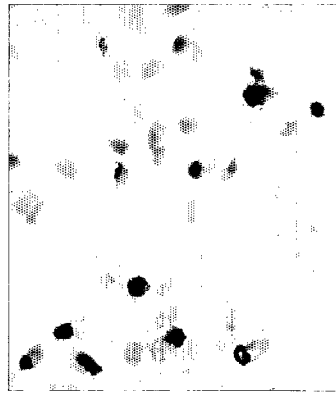
(FTLD-U)



突起内封入体

2型

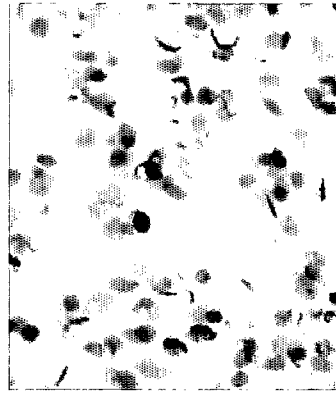
(FTLD-MND, ALS)



円形細胞内封入体

3型

(mPGRN, AD, DLB)



突起+円形封入体

図8

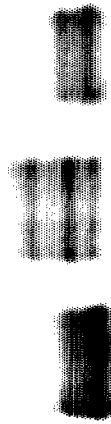
B

1型 2型 3型

C

1型 2型 3型

25 -
20 -



]断片A群

]断片B群

25 -
20 -



1 2 3

1 2 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/062650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09(2006.01) i, A61K39/395(2006.01) i, A61P21/04(2006.01) i, A61P25/16(2006.01) i, C07K16/18(2006.01) i, C12N5/10(2006.01) i, G01N33/53(2006.01) i, C12P21/08(2006.01) n</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12N15/09, A61K39/395, A61P21/04, A61P25/16, C07K16/18, C12N5/10, G01N33/53, C12P21/08</i>		
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) <i>BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAplus (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)</i>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	NEUMANN M., et al., Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, <i>Science</i> , 2006.10.06, Vol.314, No.5796, p.130-133	<u>1-8, 10-12,</u> <u>14-19</u> 9, 13
<u>Y</u> A	ARAI T. et al., TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 2006.12.22, Vol.351, No.3, p.602-611	<u>1-8, 10-12,</u> <u>14-19</u> 9, 13
<u>Y</u> A	HASEGAWA M. et al., TDP-43 is deposited in the Guam parkinsonism-dementia complex brains, <i>Brain</i> , 2007.05, Vol.130, Pt.5, p.1386-1394	<u>1-8, 10-12,</u> <u>14-19</u> 9, 13
<input checked="" 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 "L" 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 01 August, 2008 (01.08.08)		Date of mailing of the international search report 12 August, 2008 (12.08.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/062650

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	Shinobu OMI et al., Shinpan Ko Peptide Kotai Jikken Protocol -Idenshi Sanbutsu no Dotei kara Tanpakushitsu Kino Kaiseki Made-, 2nd edition, Shujunsha Co., Ltd., 06 September, 2004 (06.09.04), pages 106 to 129	<u>1-8, 10-12,</u> <u>14-19</u> 9, 13
A	WO 1997/034145 A1 (MITSUBISHI CHEMICAL CORP.), 18 September, 1997 (18.09.97), Abstract; Claims & US 2002/0086009 A1	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P21/04(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61P21/04, A61P25/16, C07K16/18, C12N5/10, G01N33/53, C12P21/08		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CPlus(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	NEUMANN M., et al., Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, Science, 2006.10.06, Vol.314, No.5796, p.130-133	1-8, 10-12, 14-19 9, 13
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 01.08.2008	国際調査報告の発送日 12.08.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小金井 悟 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3961

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	ARAI T. et al., TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006.12.22, Vol.351, No.3, p.602-611	<u>1-8, 10-12,</u> <u>14-19</u> 9, 13
Y A	HASEGAWA M. et al., TDP-43 is deposited in the Guam parkinsonism-dementia complex brains, Brain, 2007.05, Vol.130, Pt.5, p.1386-1394	<u>1-8, 10-12,</u> <u>14-19</u> 9, 13
Y A	大海忍 他, 新版抗ペプチド抗体実験プロトコールー遺伝子産物の 同定からタンパク質機能解析までー, 第2版, 株式会社秀潤社, 2004.09.06, 第106-129頁	<u>1-8, 10-12,</u> <u>14-19</u> 9, 13
A	WO 1997/034145 A1 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) 1997.09.18, 要約, 特許請求の範囲 & US 2002/0086009 A1	1-19