

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6358953号  
(P6358953)

(45) 発行日 平成30年7月18日(2018.7.18)

(24) 登録日 平成30年6月29日(2018.6.29)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/13	(2006.01)
C 12 N 15/06	(2006.01)
C 07 K 16/18	(2006.01)
C 07 K 16/46	(2006.01)
C 12 N 5/10	(2006.01)
	C 12 N 15/13
	C 12 N 15/06
	C 07 K 16/18
	C 07 K 16/46
	C 12 N 5/10

請求項の数 67 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-533928 (P2014-533928)
(86) (22) 出願日	平成24年10月5日 (2012.10.5)
(65) 公表番号	特表2014-531216 (P2014-531216A)
(43) 公表日	平成26年11月27日 (2014.11.27)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/069783
(87) 國際公開番号	W02013/050567
(87) 國際公開日	平成25年4月11日 (2013.4.11)
審査請求日	平成27年10月1日 (2015.10.1)
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2011/067604
(32) 優先日	平成23年10月7日 (2011.10.7)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号	12163319.2
(32) 優先日	平成24年4月5日 (2012.4.5)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁 (EP)

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC3136

(73) 特許権者	513022966 エーシー イミューン エス.エー. スイス国 ツェーハー-1015 ローザ ンヌ, ビルディングビー, イーピーエ フエル イノヴェーション パーク
(73) 特許権者	513086463 カトリーケ ユニヴェルシテート ルーヴ エン ベルギー国 ベー-3000 ルーヴェン , ボックス 5105, ワーイストラ ート 6, カーユー ルーヴェン リサ ーチ アンド ディベロップメント
(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】タウを認識するホスホ特異的抗体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳動物のタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープを認識しそれに特異的に結合する抗体又はその機能断片であって、

(a) 配列番号 106 に示されるアミノ酸配列を含む CDR1 と、配列番号 107 に示されるアミノ酸配列を含む CDR2 と、配列番号 108 に示されるアミノ酸配列を含む CDR3 とを含む軽鎖可変領域、及び配列番号 89 に示されるアミノ酸配列を含む CDR1 と、配列番号 115 に示されるアミノ酸配列を含む CDR2 と、配列番号 91 に示されるアミノ酸配列を含む CDR3 とを含む重鎖可変領域；又は

(b) 配列番号 93 に示されるアミノ酸配列を含む CDR1 と、配列番号 94 に示されるアミノ酸配列を含む CDR2 と、配列番号 95 に示されるアミノ酸配列を含む CDR3 とを含む軽鎖可変領域、及び配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含む CDR1 と、配列番号 90 に示されるアミノ酸配列を含む CDR2 と、配列番号 91 に示されるアミノ酸配列を含む CDR3 とを含む重鎖可変領域

を含む、抗体又はその機能断片。

## 【請求項 2】

前記抗体又は抗体断片が、リン酸化 Ser を 396 番目の位置 (pS396) 及び 404 番目の位置 (pS404) に含むアミノ酸配列 VYKSPVVSGDTSPLHL (配列番号 62) (配列番号 67 のタウ aa 393 - 408) を有する、又はその内部にあるホスホエピトープに結合する、請求項 1 に記載の抗体又はその機能断片。

10

20

## 【請求項 3】

前記抗体又はその抗体断片が、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に特異的に結合する、請求項 1 又は 2 に記載の抗体又はその機能断片。

## 【請求項 4】

前記抗体又はその抗体断片が、2 nM から 80 nM の範囲の解離定数でリン酸化タウタンパク質に特異的に結合する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

## 【請求項 5】

前記抗体又はその抗体断片が、 $1.6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  から  $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  の範囲の会合速度定数でリン酸化タウタンパク質に特異的に結合する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。 10

## 【請求項 6】

前記抗体又は抗体断片が、哺乳動物の脳における可溶性及び / 又は不溶性タウのレベルを調節する調節抗体である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

## 【請求項 7】

前記抗体又は抗体断片が、大脳皮質及び / 又は海馬における可溶性及び / 又は不溶性タウのレベルを調節する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

## 【請求項 8】

前記抗体又は抗体断片が、可溶性及び / 又は不溶性の総タウタンパク質のレベルを低下させる、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。 20

## 【請求項 9】

前記抗体又は抗体断片が、可溶性及び / 又は不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを低下させる、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

## 【請求項 10】

前記抗体又は抗体断片が、過剰リン酸化タウタンパク質を含む対らせん状フィラメントのレベルを低下させる、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

## 【請求項 11】

前記抗体又は抗体断片が、可溶性の総タウタンパク質、可溶性リン酸化タウタンパク質、及び p タウ対らせん状フィラメントのレベルを低下させる、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。 30

## 【請求項 12】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

## 【請求項 13】

前記抗体又は抗体断片が:

a. リン酸化 Ser を 396 番目の位置 (pS396) に含む、VYKSPVVSG (配列番号 67 のタウ aa 393-401) ; 及び

b. リン酸化 Ser を 396 番目の位置 (pS396) に含む、VYKSPVVSG (配列番号 67 のタウ aa 393-400) 40

からなる群から選択されるエピトープに結合する、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

## 【請求項 14】

前記抗体又はその断片が、リン酸化 Ser を 396 番目の位置 (pS396) に含むタウ aa 393-401 (VYKSPVVSG) を含む配列番号 67 に示されるヒトタウタンパク質上のエピトープに結合する、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

## 【請求項 15】

前記抗体又はその断片が、リン酸化 Ser を 396 番目の位置 (pS396) に含むタウ aa 393-400 (VYKSPVVSG) を含む配列番号 67 に示されるヒトタウ 50

タンパク質上のエピトープに結合する、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

【請求項 1 6】

哺乳動物のタウタンパク質上、又はその断片上のホスホエピトープを認識しそれに特異的に結合する、請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片であって、前記抗体又はその断片が：

a. 配列番号 9 3 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1 と、配列番号 9 4 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 2 と、配列番号 9 5 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 とを含む軽鎖可変領域；及び

b. 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1 と、配列番号 9 0 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 2 と、配列番号 9 1 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 とを含むアミノ酸配列を含む重鎖可変領域  
を含む、抗体又はその機能断片。

【請求項 1 7】

哺乳動物のタウタンパク質上、又はその断片上のホスホエピトープを認識しそれに特異的に結合する、請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片であって、前記抗体又はその断片が：

a. 配列番号 1 0 6 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1 と、配列番号 1 0 7 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 2 と、配列番号 1 0 8 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 とを含む軽鎖可変領域；及び

b. 配列番号 8 9 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 1 と、配列番号 1 1 5 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 2 と、配列番号 9 1 に示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 とを含むアミノ酸配列を含む重鎖可変領域  
を含む、抗体又はその機能断片。

【請求項 1 8】

請求項 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片であって：

a. 配列番号 1 1 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号 8 8 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；又は

b. 配列番号 9 2 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号 8 8 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；又は

c. 配列番号 1 0 5 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号 1 0 4 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；又は

d. 配列番号 1 1 8 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号 8 8 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、  
を含む、抗体又はその機能断片。

【請求項 1 9】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、若しくはヒト化抗体、又はそれらの機能断片である、請求項 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

【請求項 2 0】

I g G 2 b、I g G 2 a、又は I g G 3 アイソタイプである、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

【請求項 2 1】

前記哺乳動物のタウタンパク質が、ヒトのタウタンパク質である、請求項 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

【請求項 2 2】

前記抗体又はその断片が、病態タンパク質タウコンフォーマーには結合するが、対応する非リン酸化エピトープ、及び / 又は非関連エピトープには結合しない、請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片。

【請求項 2 3】

10

20

30

40

50

請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 24】

請求項 23 のポリヌクレオチドであって：

a . 配列番号 109、110、113、114、117 又は 119 に示される配列に対して、少なくとも 85% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子；

b . 配列番号 109、110、113、114、117 又は 119 に示される配列に対して、少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子；

c . 配列番号 109、110、113、114、117 又は 119 に示される配列に対して、少なくとも 95% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子；

d . 配列番号 109、110、113、114、117 又は 119 に示される配列に対して、少なくとも 98% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子；

e . 配列番号 109、110、113、114、117 又は 119 に示される配列に対して、100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子；

f . 相補ストランドが、a ) ~ d ) のいずれかの核酸分子とハイブリッド形成するヌクレオチド配列を含む核酸分子；又は

g . 遺伝暗号の縮重によって、a ) ~ e ) のいずれかにおいて定義されるヌクレオチド配列から逸脱しているヌクレオチド配列を含む核酸分子：

からなる群から選択される核酸分子を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 25】

哺乳動物におけるタウオパシーの治療における使用のための薬剤組成物であって、請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその機能断片、又はその組み合わせを、治療有効量で、薬剤的に許容可能な担体とともに含む、薬剤組成物。

【請求項 26】

請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の少なくとも二つの抗体又はその機能断片を含む、請求項 25 に記載の薬剤組成物。

【請求項 27】

アミロイド形成したタンパク質又はペプチドを認識しそれに結合する、さらなる抗体又はその機能断片をさらに含む、請求項 25 又は 26 に記載の薬剤組成物。

【請求項 28】

哺乳動物におけるタウオパシーを治療するための医薬であって、請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の、抗体若しくはその機能断片、若しくは請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の薬剤組成物、又はその組み合わせ、を含む、医薬。

【請求項 29】

哺乳動物がヒトである、請求項 28 に記載の医薬。

【請求項 30】

前記医薬を用いた治療の結果として、哺乳動物における認識障害の進行が停止する、請求項 28 又は 29 に記載の医薬。

【請求項 31】

前記医薬を用いた治療の結果として、治療対象における認識記憶能力の維持が増大する、又は完全に回復する、請求項 28 から 30 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 32】

タウオパシーが、アルツハイマー病、クロイツフェルト - ヤコブ病、パンチドランカー、ダウン症候群、ゲルストマン - ストロイスラー - シャインカー症候群、封入体筋炎、ブリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症 / グアム島パーキンソン痴呆症候群、神経原線維変性病 (neurofibromatosis type 1) を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変性病、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、前頭側頭型認知症、ハラーフォルデン - シュバッツ病、多系統萎縮症、ニーマン - ピック病 C 型、淡蒼球 - 橋脳 - 黒質退行変性、ピック病、進行性皮質下

10

20

30

40

50

膠質症、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維型老年認知症、脳炎後パーキンソン症候群、及び筋強直性ジストロフィーからなる群から選択される、請求項28から31のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項33】

タウオパシーが前頭側頭型認知症である、請求項32に記載の医薬。

【請求項34】

アルツハイマー病の治療における使用のための、請求項32に記載の医薬。

【請求項35】

タウオパシーが、タウとアミロイド両方の病態の存在を示す、請求項28から34のいずれか一項に記載の医薬。

10

【請求項36】

タウオパシーが、神経原線維病変の形成に起因する又は関連する疾患及び障害から選択される、請求項28から35のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項37】

タウオパシーが、タウとアミロイド両方の病態の存在を示す疾患又は障害である、請求項36に記載の医薬。

【請求項38】

疾患及び障害が、アルツハイマー病、クロイツフェルト-ヤコブ病、パンチドランカー、ダウン症候群、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー症候群、封入体筋炎、ブリオンタンパク質脳アミロイド血管症、及び外傷性脳損傷から選択される、請求項37に記載の医薬。

20

【請求項39】

タウオパシーが、明瞭なアミロイド病態を示さない、請求項36に記載の医薬。

【請求項40】

疾患及び障害が、筋萎縮性側索硬化症／グアム島パーキンソン痴呆症候群、神経原線維変化病を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、前頭側頭型認知症、ハラーフォルデン-シュバッツ病、多系統萎縮症、ニーマン-ピック病C型、淡蒼球-橋脳-黒質退行変性、ピック病、進行性皮質下膠質症、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維型老年認知症、脳炎後パーキンソン症候群、及び筋強直性ジストロフィーから選択される、請求項39に記載の医薬。

30

【請求項41】

哺乳動物におけるタウオパシーを治療、軽減、又は予防するための薬剤組成物であって、請求項1から22のいずれか一項に記載の抗体若しくはその機能断片、又はそれらの組み合わせを含む、薬剤組成物。

【請求項42】

タウオパシーが、アルツハイマー病、クロイツフェルト-ヤコブ病、パンチドランカー、ダウン症候群、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー症候群、封入体筋炎、及びブリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症／グアム島パーキンソン痴呆症候群、神経原線維変化病を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、頭側頭型認知症、ハラーフォルデン-シュバッツ病、多系統萎縮症、ニーマン-ピック病C型、淡蒼球-橋脳-黒質退行変性、ピック病、進行性皮質下膠質症、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維型老年認知症、脳炎後パーキンソン症候群、及び筋強直性ジストロフィーからなる群から選択される、請求項41に記載の薬剤組成物。

40

【請求項43】

哺乳動物がヒトである、請求項41又は42に記載の薬剤組成物。

【請求項44】

50

タウオパシーを患う動物において受動免疫応答を誘導するための薬剤組成物であって、請求項1から22のいずれか一項に記載の、抗体若しくはその機能断片、又はその組み合わせを含む、薬剤組成物。

【請求項45】

患者における、タウタンパク質随伴疾患、障害若しくは状態、又はタウタンパク質随伴疾患、障害、若しくは状態の素因を診断するための組成物であって、請求項1から22のいずれか一項に記載の抗体若しくはその機能断片を含む、組成物。

【請求項46】

抗体又は薬剤組成物を用いた治療の後の患者における微小残存病変を監視するための組成物であって、請求項1から22のいずれか一項に記載の抗体若しくはその機能断片を含む、組成物。 10

【請求項47】

抗体又は薬剤組成物を用いて治療されている患者の反応性を予測するための組成物であって、請求項1から22のいずれか一項に記載の抗体若しくはその機能断片を含む、組成物。

【請求項48】

脳脊髄液試料での使用のための、請求項45から47のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項49】

タウ随伴疾患又は障害を患っていることが疑われる対象からの脳試料中のホスホタウ( pタウ)マルチマーを死後検出する方法であって： 20

- a. 対象の脳試料を、請求項1から22のいずれか一項に記載の、ホスホタウタンパク質のエピトープに結合する抗体又はその機能断片に接触させること；
- b. 抗体をホスホタウタンパク質に結合させて免疫複合体を形成させること；
- c. 免疫複合体の形成を検出すること、及び
- d. 対象から得られた試料中の免疫複合体の量又は強度を、健康な対照対象から同一条件を用いて得られた免疫複合体の量又は強度と比較すること

を含み、対照値と比較した前記免疫複合体の量又は強度の増加が、前記対象がタウ随伴疾患又は障害を患っていたことを示す、方法。

【請求項50】

対照試料と比較した、試験試料中に観察される増加が30%から100%の間にある、請求項49に記載の方法。 30

【請求項51】

工程(a)に先立って、固体支持体に付着させた抗タウ抗体又はその機能断片と接触させることにより、試料を免疫濃縮して試料中のタウタンパク質の濃度を増加させる、請求項49又は50に記載の方法。

【請求項52】

固体支持体に付着させた抗タウ抗体又はその機能断片と接触させることにより、免疫濃縮して試料中のタウタンパク質の濃度を増加させた試料で使用するための、請求項45から48のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項53】

タウタンパク質随伴疾患、障害、又は状態を検出し診断するための試験キットであって、請求項1から22のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片を含む、試験キット。

【請求項54】

請求項1から22のいずれか一項に記載の一つ又は複数の抗体又はその機能断片を入れた容器と、タウ抗原を結合させて免疫複合体を形成させ複合体の形成を検出して免疫複合体の存在又は非存在をタウ抗原の存在又は非存在に関連づける目的で該抗体を使用するための指示書とを含む、請求項53に記載の試験キット。

【請求項55】

請求項1から22のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片を産生する、細胞株。

【請求項56】

10

20

30

40

50

DSM ACC 3136として、2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-4A6-48である、請求項55に記載の細胞株。

【請求項57】

DSM ACC 3137として、2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A6-2G5-30である、請求55に記載の細胞株。

【請求項58】

DSM ACC 3138として、2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A6-2G5-41である、請求項55に記載の細胞株。

【請求項59】

DSM ACC 3139として、2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-2A1-18である、請求項55に記載の細胞株。 10

【請求項60】

DSM ACC 3140として、2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-2A1-40である、請求項55に記載の細胞株。

【請求項61】

請求項23又は24に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項62】

請求項61に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項63】

請求項1から22のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片を產生する、請求項6 20  
2に記載の宿主細胞。

【請求項64】

哺乳動物細胞である、請求項62又は63に記載の宿主細胞。

【請求項65】

チャイニーズハムスター卵巣細胞である、請求項64に記載の宿主細胞。

【請求項66】

請求項1から22のいずれか一項に記載の抗体又はその機能断片を產生する方法であつて、請求項55から60又は62から65のいずれか一項に記載の細胞株又は宿主細胞を、抗体又は機能断片の発現に適切な条件下で培養すること、及び抗体又は機能断片を回収することを含む、方法。 30

【請求項67】

脳試料中のホスホタウ(pタウ)マルチマーを検出する方法であつて、

a. 試料を、請求項1から22のいずれか一項に記載の、ホスホタウタンパク質のエピトープに結合する抗体又はその機能断片に接触させること；

b. 抗体又はその断片をホスホタウタンパク質に結合させて免疫複合体を形成させること；及び

c. 免疫複合体の形成を検出すること

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2012年4月5日に出願された欧州特許出願第12163319.2号、及び2011年9月7日に出願された国際特許出願EP2011/067604号の利益を主張するものであり、それぞれの内容は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、神経原線維変化病(neurofibrillary tangle)に起因する又は関連する疾患及び障害の治療において、治療及び診断に使用する方法及び組成物に関する。具体的には、本発明は、リン酸化した病態タンパク質タウコンフォーマーを特異的に認識しそれに結合する抗体と、アルツハイマー病(AD)を含むタウオパシーの 50

治療において治療及び診断に使用する前記抗体を含む方法並びに組成物とに、関連する。

【背景技術】

【0003】

神経原線維変化病及び糸脛状構造物(NT)は、アルツハイマー病(AD)の主要な神経病態的特徴である。それらは、アスパラギル又はアスパルチル残基上のリン酸化、脱アミド化、及び異性化を含む、翻訳後の修飾をうけた微小管随伴タンパク質タウから構成される。それらは、過剰リン酸化タンパク質タウ及びそのコンフォーマーの凝集に由来する。ADは、この病態を、多くの神経変性タウオパシーと、具体的には特定のタイプの前頭側頭性認知症(FTD)と共有する。

【0004】

10

タンパク質タウは、微小管(MT)に強く結合して、それらの集合と安定性を促進する、自由に可溶性の「自然に折りたたまれた」タンパク質である。MTは、神経細胞の細胞骨格の完全性に関して、そしてそれによる、神経回路の適切な形成や機能に関して、従つて学習や記憶に関して、主に重要である。タウのMTへの結合は、動的なリン酸化及び脱リン酸化により制御されており、主にインビトロでそして非神経細胞において実証されている。多数の可能なリン酸化部位(80箇所超)のせいで、それぞれの及ぼす影響や原因となるキナーゼの正体は、インビボにおいてほとんど突き止められていない。

【0005】

AD脳では、タウ病態は、アミロイド病態よりも後、従つておそらくこれに反応して発症し、このことが、アミロイドカスケード仮説の核心を構成している。これは、AD及びダウン症の患者の研究に基づきそしてこれらの研究により示されており、アミロイド及びタウの複合的な病態を伴うトランスジェニックマウスでの研究によって裏付けられている(Lewis et al., 2001; Oddo et al., 2004; Ribe et al., 2005; Muyllaert et al., 2006; 2008; Terwel et al., 2008)。

20

【0006】

アミロイドをタウ病態に結び付ける機序だけでなく、ヒトAD患者における両病態の正確なタイミングは、未だほとんど知られていないが、しかし、主要な「タウキナーゼ」としてのGSK3及びcdk5に従つて又はそれらにより作用する神経細胞情報伝達経路の活性化が関与しているとする説が提唱されている(Muyllaert et al., 2006, 2008の総説)。

30

【0007】

タウオパシーが、ADにおいて無害な副作用ではなく、むしろ病態の主要な遂行者であるという仮説は、互いに完全に裏付けあう、妥当な、遺伝学的な、病態の、そして実験的な観察に基づいており：

- アミロイドタンパク質前駆体(APP)、すなわちプレセニリンにおける突然変異を原因とする早期発症型の家族性ADの例では、偏性の病態の原因は、アミロイドの蓄積であるが、病態は、後期発症型の散発性ADの例におけるものと同一の付随的なタウオパシーを含むのが不可避であり；

- 認知障害及び痴呆症の重症度は、タウオパシーと相間があつても、アミロイド病態ではなく、これは、つい最近、臨床相1及び2のいくつかの研究で実証されており、これらの研究は、アミロイドについてのPIB-PET画像化を含み、多くの「偽陽性」、すなわち認知については正常で脳アミロイド量の高い個体を特定し；

40

- 家族性FTDでは、タウオパシーは、突然変異体タウによって誘発され、アミロイド病態なしに神経変性を直接引き起こし；

- 実験的なマウスモデルでは、アミロイド病態により生じる認知障害は、タンパク質タウの非存在により、ほとんど完全に軽減される(Roberson et al., 2007)。

【0008】

議論の組み合わせにより、タンパク質タウが、ADおよび関連する神経変性タウオパシーにおける認知の消滅において主要な役割を果たすものであるとする仮説が、支持されている。

50

## 【0009】

優れた新しいA D治療は、特異的mAbを用いた受動免疫治療であり、これは、神経毒性又はシナプス毒性があると推定される、アミロイドペプチド及びそれらの凝集体を除去するものである。

## 【0010】

タウ病態を標的とする免疫治療は、本明細書で提唱するとおり、シナプスの機能障害及び神経細胞変性を引き起こすことが知られている又はそれらの前提とされる病態タンパク質タウコンフォーマーの影響を抑えることが期待される。

## 【0011】

タンパク質タウを標的とする他の治療アプローチは多くはなく、主に:

10

- タウのリン酸化を病態レベルにまで増加させると考えられているキナーゼの阻害剤、

- 過剰リン酸化タンパク質タウの細胞質での凝集をブロックする化合物、  
が含まれる。

## 【0012】

これらのアプローチは、特異性及び有効性についての多様な欠点を抱えており、それらに共通の課題は、APP及びアミロイドの代謝を改変しようと試みるものであり、すべて、タウに対する免疫治療を含むさらなる治療の選択肢を持続的に探索することの重要性をきわだたせるものである。実際、複合的なA D様病態を伴う前臨床マウスモデルにおいてアミロイドを標的とする免疫治療もまた、タウ凝集体は存続しているものの、タウ病態に効果があることを実証した(Oddo et al., 2004)。

20

## 【0013】

免疫治療による細胞内タンパク質タウへのアプローチの実現可能性には、いくつかの疑念が投げかけられてきた。これらに対しては、タウオパシーマウスモデルにおける、つい最近の実験的研究からの反論がある(Asuni et al., 2007)。これらの研究は、タンパク質タウに由来するホスホペプチドを用いたワクチン投与による、変化病の病態の低減及び機能改善を示した。これらのデータは、パーキンソン病(PD)及びレビー小体病のモデルにおけるβ-シヌクレインを標的とする免疫治療(Masliah et al., 2005, 2011)の、及び筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルにおけるスーパーオキシドジスムターゼ(Urushitani et al., 2007)の、これまでの報告を裏付けるものである。これらの疾患は、細胞内タンパク質が、未だ完全には理解されていない機序により、シナプス欠陥及び神経変性を生じる例である。

30

## 【0014】

神経変性障害を生じることが知られている、又は予想されている病態タンパク質コンフォーマーの影響を抑制するように働く受動及び/又は能動免疫治療という、未だ満たされていない要求があり、これらの神経変性障害は、アミロイドとしてA Dに典型的な、神経細胞内における過剰リン酸化タンパク質タウの凝集体により例えれば生じる、A Dにおけるアミロイド病態等である。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

40

## 【0015】

【特許文献1】国際公開第2004/058258号

【特許文献2】国際公開第96/13590号

【特許文献3】国際公開第96/29605号

【特許文献4】米国特許出願公開第2002/0038086号

【特許文献5】米国特許出願公開第2003/0083299号

【特許文献6】米国特許出願公開第2002/0025313号

【特許文献7】米国特許出願公開第2004/0204354号

【特許文献8】米国特許出願公開第2004/0131692号

【特許文献9】米国特許出願公開第2002/0065259号

50

- 【特許文献 10】米国特許出願公開第 2003 / 0162695 号  
 【特許文献 11】米国特許出願公開第 2005 / 0124533 号  
 【特許文献 12】米国特許出願公開第 2005 / 0089473 号  
 【特許文献 13】米国特許出願公開第 2003 / 0073713 号  
 【特許文献 14】米国特許出願公開第 2003 / 0129186 号  
 【特許文献 15】米国特許第 5,112,596 号  
 【特許文献 16】米国特許第 5,268,164 号  
 【特許文献 17】米国特許第 5,506,206 号  
 【特許文献 18】米国特許第 5,686,416 号  
 【特許文献 19】米国特許第 5,004,697 号 10
- 【非特許文献】  
 【0016】  
 【非特許文献 1】Alonso A.D., et al. (1997), Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 94, 298-303  
 【非特許文献 2】Alving et al., (1992) Infect. Immun. 60:2438-2444  
 【非特許文献 3】Asuni et al., (2007) J Neurosc. 27 (34), 9115-29  
 【非特許文献 4】Braak and Braak (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 82:239-259)  
 【非特許文献 5】Braak H., et al. (1993), Eur.Neurol., 33, 403-408Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003) 20  
 【非特許文献 6】Greenberg S.G., et al. (1992), J Biol.Chem., 267, 564-569.  
 【非特許文献 7】Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612  
 【非特許文献 8】Hodgson et al., (1991) Bio/Technoloy, 9:421  
 【非特許文献 9】Hoffmann R., et al (1997), Biochemistry, 36, 8114-8124.  
 【非特許文献 10】Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991  
 【非特許文献 11】Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31)  
 【非特許文献 12】Khaw, B. A. et al. (1982) J. Nucl. Med. 23:1011-1019 30  
 【非特許文献 13】Lewis et al., (2000) Nature Genetics, 25 :402-405  
 【非特許文献 14】Masliah et al., (2005) Neuron, 46(6), 857-68  
 【非特許文献 15】Masliah et al., (2011) PLoS ONE, Volume 6(4), e19338, pp- 1-17  
 【非特許文献 16】Muhs et al., (2007) Proc Natl Acad Sci USA, 104(23), 9810-5  
 【非特許文献 17】Muyllaert et al, (2006) Rev Neurol, 162(10), 903-907  
 【非特許文献 18】Muyllaert et al, (2008) Genes Brain Behav., Suppl. 1, 57-66  
 【非特許文献 19】Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989))  
 【非特許文献 20】Nicolau et. al. (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337  
 【非特許文献 21】Nicoll et al., (2003) Nature Med, 9, 448-452 40  
 【非特許文献 22】Oddo et al., (2004) Neuron, 43, 321-332  
 【非特許文献 23】Queen et al., (1989) Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032  
 【非特許文献 24】Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)  
 【非特許文献 25】Reig S., et al. (1995), Acta Neuropathol., 90, 441-447  
 【非特許文献 26】Ribe et al., (2005) Neurobiol Dis, 20(3), 814-22  
 【非特許文献 27】Roberson et al, (2007) Science, 316 (5825), 750-4  
 【非特許文献 28】Rosenmann et al., (2006) Arch Neurol, 63(10), 1459-67  
 【非特許文献 29】Rousseaux et al. Methods Enzymology, (1986) , Academic Press 1  
 21:663-69  
 【非特許文献 30】Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 {Clin. Chim Acta 57:1-40 50

【非特許文献 31】Terwel et al., (2006) J Biol Chem, 280, 3963-3973

【非特許文献 32】Terwel et al, (2008) Am J Pathol., 172(3), 786-98

【非特許文献33】Urushitani et al., (2007) Proc. Natl Acad Sci USA, 104(79, 2495-500)

【非特許文献 34】Vandebroek et al., "Phosphorylation and Aggregation of Protein Tau in Humanized Yeast Cells and in Transgenic Mouse Brain"; 7th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Disease, Sorrento, Italy, March 9-13, 2005, pp 15-19

【非特許文献35】Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259-270

## 【発明の概要】

【 0 0 1 7 】

未だ満たされていないこの要求は、タウタンパク質の主要な病態ホスホエピトープを認識しそれに結合する結合タンパク質を提供する本発明によって満たされる。具体的には、本発明は、タンパク質タウ上の、具体的には、A Dを含むタウオパシーにおけるシナプス毒性、及び神経毒性の原因であると考えられている凝集タウタンパク質上の、線状及び立体構造をとる、単純な及び複雑なホスホエピトープに対する特異的抗体を提供する。

【 0 0 1 8 】

従って、本発明は、一実施形態において、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、結合ペプチド又はタンパク質又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には凝集したタウタンパク質上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び／又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インビボで、具体的には脳内で、検出及び／又は調節することができ、具体的には、少なくとも 10 nM の、具体的には少なくとも 8 nM の、具体的には少なくとも 5 nM 、具体的には少なくとも 2 nM の、具体的には少なくとも 1 nM の、具体的には少なくとも 500 pM の、具体的には少なくとも 400 pM 、具体的には少なくとも 300 pM の、具体的には少なくとも 200 pM の、具体的には少なくとも 100 pM の、具体的には少なくとも 50 pM の解離定数を伴う。

【 0 0 1 9 】

具体的には、解離定数は、2 nMと80 nMの間の範囲にあり、具体的には2 nMと40 nMの間の範囲にあり、具体的には2 nMと10 nMの間の範囲にある。

【 0 0 2 0 】

特定の態様では、本明細書において抗体又はその機能断片が提供され、前記抗体又は抗体断片は、リン酸化 Ser を 396 番目の位置 ( pS396 ) 、及び 404 番目の位置 ( pS404 ) に含むアミノ酸配列 VYKSPVVS GDTSPRHL ( 配列番号 62 ) ( 配列番号 67 のタウ aa 393 - 408 、例えば、表 1 に記載 ) を有する又はその内部にあるホスホエピトープに結合する。

【 0 0 2 1 】

質のレベルを、インピボで、検出及び／又は調節することができ、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の、具体的には  $3 \sim 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の、具体的には  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の、具体的には  $2 \sim 9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の；具体的には  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の、具体的には  $1 \sim 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の、具体的には  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合速度定数を有する。

【0022】

具体的には、会合速度定数は、 $1.6 \times 10^3$  と  $5 \times 10^5$  の間の範囲にあり、より具体的には  $2.4 \times 10^4$  と  $5 \times 10^5$  の間、 $3 \times 10^3$  と  $5 \times 10^5$  の間の範囲にある。

【0023】

第3の実施形態では、本発明は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び／又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インピボで、検出及び／又は調節することができ、高い結合親和性を有し、少なくとも  $4 \text{ nM}$  の解離定数、及び  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合速度定数、具体的には少なくとも  $3 \text{ nM}$  の解離定数、及び  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合速度定数、具体的には少なくとも  $2 \text{ nM}$  の解離定数、及び  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合速度定数、具体的には少なくとも  $1 \text{ nM}$  の解離定数、及び  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合速度定数、具体的には少なくとも  $200 \text{ pM}$  の解離定数、及び  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合速度定数、具体的には少なくとも  $100 \text{ pM}$  の解離定数、及び  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合速度定数を伴う。

【0024】

具体的には、解離定数は、 $2 \text{ nM}$  と  $80 \text{ nM}$  の間の範囲、及び会合速度定数は、 $1.6 \times 10^3$  と  $5 \times 10^5$  の間の範囲、具体的には解離定数は、 $2 \text{ nM}$  と  $40 \text{ nM}$  の間の範囲、会合速度定数は、 $2.4 \times 10^4$  と  $5 \times 10^5$  の間の範囲、具体的には解離定数は、 $2 \text{ nM}$  と  $10 \text{ nM}$  の間の範囲、及び会合速度定数は、 $3 \times 10^3$  と  $5 \times 10^5$  の間の範囲にある。

【0025】

一実施形態(4)では、本発明は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び／又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インピボで、検出及び／又は調節することができ、前記結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトの、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 393-401、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 396-401、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 394-400、リン酸化Serを404番目の位置(pS404)に含むタウ aa 402-406、及びリン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 393-400からなる群から選択される、配列番号67に示すタウタンパク質上のエピトープに結合する。

【0026】

一実施形態(5)は、上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し

10

20

30

40

50

、前記ペプチドは、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上の、しかし具体的には、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 393-401を含む、配列番号67に示すヒトのタウタンパク質上のエピトープに結合する。

【0027】

一実施形態(6)は、上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、前記ペプチドは、哺乳動物、具体的にはヒトのタンパク質上の、しかし具体的には、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 396-401を含む、配列番号67に示すヒトのタウタンパク質上のエピトープに結合する。

【0028】

一実施形態(7)は、上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、前記ペプチドは、哺乳動物、具体的にはヒトのタンパク質上の、しかし具体的には、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 394-400を含む、配列番号67に示すヒトのタウタンパク質上のエピトープに結合する。

10

【0029】

一実施形態(8)は、上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、前記ペプチドは、哺乳動物、具体的にはヒトのタンパク質上の、しかし具体的には、リン酸化Serを404番目の位置(pS404)に含むタウ aa 402-406を含む、配列番号67に示すヒトのタウタンパク質上のエピトープに結合する。

【0030】

一実施形態(9)は、上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、前記ペプチドは、哺乳動物、具体的にはヒトのタンパク質上の、しかし具体的には、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 393-400を含む、配列番号67に示すヒトのタウタンパク質上のエピトープに結合する。

20

【0031】

一実施形態(10)では、本発明は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、しかし、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インビボで、検出及び/又は調節することができ、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号73に示すアミノ酸配列を伴うCDR1と、配列番号74に示すアミノ酸配列を伴うCDR2と、配列番号75に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも96%、具体的には少なくとも97%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%若しくは100%、それに同一なアミノ酸配列を含むCDR3とを、順番に含む第1の結合ドメイン、及び/又は、配列番号70に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも95%、具体的には98%、具体的には99%、それに同一なアミノ酸配列を伴うCDR1と、配列番号71に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも94%、95%、96%、97%、98%、又は99%、それに同一なアミノ酸配列を伴うCDR2と、配列番号72に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも96%、具体的には少なくとも97%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%若しくは100%、それに同一なアミノ酸配列を伴うCDR3とを、順番に含む第2の結合ドメインを含む。

30

40

50

## 【0032】

一態様では、本明細書において、抗体又はその断片を提供し、抗体又はその断片は、哺乳動物のタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープを認識しそれに特異的に結合し、前記抗体又はその断片は：

(a) 配列番号73に示すアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号74に示すアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号75に示すアミノ酸配列を含むCDR3とを含む第1の結合ドメイン；及び／又は

(b) 配列番号70に示すアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号71に示すアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号72に示すアミノ酸配列を含むCDR3とを含むアミノ酸配列を含む、第2の結合ドメインを含む。

10

## 【0033】

一実施形態(11)では、本発明は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び／又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インビボで、検出及び／又は調節することができ、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号81に示すアミノ酸配列を伴う含CDR1と、配列番号82に示すアミノ酸配列を伴うCDR2と、配列番号83に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも96%、具体的には少なくとも97%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%若しくは100%、それに同一なアミノ酸配列を含むCDR3とを、順番に含む第1の結合ドメイン、及び／又は、配列番号78に示すアミノ酸配列を伴うCDR1と、配列番号79に示すアミノ酸配列を伴うCDR2と、配列番号80に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも96%、具体的には少なくとも97%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%若しくは100%、それに同一なアミノ酸配列を伴うCDR3とを、順番に含む第2の結合ドメインを含む。

20

## 【0034】

一態様では、本明細書において、抗体又はその断片を提供し、抗体又はその断片は、哺乳動物のタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープを認識しそれに特異的に結合し、前記抗体又はその断片は：

(a) 配列番号81に示すアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号82に示すアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号83に示すアミノ酸配列を含むCDR3とを含む第1の結合ドメイン；及び／又は

40

(b) 配列番号78に示すアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号79に示すアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号80に示すアミノ酸配列を含むCDR3とを含むアミノ酸配列を含む、第2の結合ドメインを含む。

## 【0035】

一実施形態(12)では、本発明は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体

50

的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び／又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インビオで、検出及び／又は調節することができ、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号93に示すアミノ酸配列を伴うCDR1と、配列番号94に示すアミノ酸配列を伴うCDR2と、配列番号95に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも96%、具体的には少なくとも97%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%若しくは100%、上のCDRのいずれか一つに同一なアミノ酸配列を含むCDR3とを、順番に含む第1の結合ドメイン、及び／又は、配列番号12に示すアミノ酸配列を伴うCDR1と、配列番号90示すアミノ酸配列を伴うCDR2と、配列番号91に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも96%、具体的には少なくとも97%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%若しくは100%、上のCDRのいずれか一つに同一なアミノ酸配列を伴うCDR3とを、順番に含む第2の結合ドメインを含む。

10

20

## 【0036】

特定の態様では、本明細書において、抗体又はその断片を提供し、抗体又はその断片は、哺乳動物のタウタンパク質上又はその部分上のホスホエピトープを認識しそれに特異的に結合し、前記抗体又はその断片は：

(a) 配列番号93に示すアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号94に示すアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号95に示すアミノ酸配列を含むCDR3とを含む第1の結合ドメイン；及び／又は

(b) 配列番号12に示すアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号90に示すアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号91に示すアミノ酸配列を含むCDR3とを含むアミノ酸配列を含む、第2の結合ドメインを含む。

30

## 【0037】

一実施形態(13)では、本発明は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び／又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インビオで、検出及び／又は調節することができ、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号101に示すアミノ酸配列を伴う含むCDR1と、配列番号102に示すアミノ酸配列を伴うCDR2と、配列番号103に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも96%、具体的には少なくとも97%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%若しくは100%、上のCDRのいずれか一つに同一なアミノ酸配列を含むCDR3とを、順番に含む第1の結合ドメイン、及び／又は、配列番号98に示すアミノ酸配列を伴うCDR1と、配列番号99示すアミノ酸配列を伴うCDR2と、配列番号100に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも少なくとも60%、少なくとも70%、少なくともと

40

50

も 80%、具体的には少なくとも 85%、具体的には少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、具体的には少なくとも 95%、具体的には少なくとも 96%、具体的には少なくとも 97%、具体的には少なくとも 98%、具体的には少なくとも 99%若しくは 100%、上の CDR のいずれか一つに同一なアミノ酸配列を伴う CDR 3 とを、順番に含む第 2 の結合ドメインを含む。

【0038】

一態様では、本明細書において、抗体又はその断片を提供し、抗体又はその断片は、哺乳動物のタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープを認識しそれに特異的に結合し、前記抗体又はその断片は：

(a) 配列番号 101 に示すアミノ酸配列を含む CDR 1 と、配列番号 102 に示すアミノ酸配列を含む CDR 2 と、配列番号 103 に示すアミノ酸配列を含む CDR 3 とを含む第 1 の結合ドメイン；及び／又は

(b) 配列番号 98 に示すアミノ酸配列を含む CDR 1 と、配列番号 99 に示すアミノ酸配列を含む CDR 2 と、配列番号 100 に示すアミノ酸配列を含む CDR 3 とを含むアミノ酸配列を含む、第 2 の結合ドメインを含む。

【0039】

一実施形態(14)では、本発明は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び／又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インピボで、検出及び／又は調節することができ、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号 106 に示すアミノ酸配列を伴う含む CDR 1 と、配列番号 107 に示すアミノ酸配列を伴う CDR 2 と、配列番号 108 に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、具体的には少なくとも 85%、具体的には少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、具体的には少なくとも 95%、具体的には少なくとも 96%、具体的には少なくとも 97%、具体的には少なくとも 98%、具体的には少なくとも 99%若しくは 100%、上の CDR のいずれか一つに同一なアミノ酸配列を含む CDR 3 とを、順番に含む第 1 の結合ドメイン、及び／又は、配列番号 89 に示すアミノ酸配列を伴う CDR 1 と、配列番号 115 示すアミノ酸配列を伴う CDR 2 と、配列番号 91 に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、具体的には少なくとも 85%、具体的には少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、具体的には少なくとも 95%、具体的には少なくとも 96%、具体的には少なくとも 97%、具体的には少なくとも 98%、具体的には少なくとも 99%若しくは 100%、上の CDR のいずれか一つに同一なアミノ酸配列を伴う CDR 3 とを、順番に含む第 2 の結合ドメインを含む。

【0040】

具体的な態様では、本明細書において、抗体又はその断片を提供し、抗体又はその断片は、哺乳動物のタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープを認識しそれに特異的に結合し、前記抗体又はその断片は：

(a) 配列番号 106 に示すアミノ酸配列を含む CDR 1 と、配列番号 107 に示すアミノ酸配列を含む CDR 2 と、配列番号 108 に示すアミノ酸配列を含む CDR 3 とを含む第 1 の結合ドメイン；及び／又は

(b) 配列番号 89 に示すアミノ酸配列を含む CDR 1 と、配列番号 115 に示すアミノ酸配列を含む CDR 2 と、配列番号 91 に示すアミノ酸配列を含む CDR 3 とを含むアミノ酸配列を含む、第 2 の結合ドメインを含む。

10

20

30

40

50

**【0041】**

特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体又はその抗体断片の第1の結合ドメインは、軽鎖可変領域であり、本明細書に記載の抗体又はその抗体断片の第2の結合ドメインは、重鎖可変領域である。

**【0042】**

別の実施形態(15)では、本発明は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インビボで、検出及び/又は調節することができ、前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号69、77、116/92、118、97、105に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも96%、具体的には少なくとも97%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%若しくは100%、それらに同一なアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び/又は、配列番号68、76、88、96、104に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも86%、具体的には少なくとも87%、具体的には少なくとも88%、具体的には少なくとも89%、具体的には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも96%、具体的には少なくとも97%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%、若しくは100%、それらに同一なアミノ酸配列を含む第2の結合ドメインを含む。

**【0043】**

本明細書の一実施形態(16)は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インビボで、検出及び/又は調節することができ、前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号69に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも98%、若しくは99%、それに同一なアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び/又は、配列番号68に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも90%、91%、92%、若しくは93%、それに同一なアミノ酸配列を含む第2の結合ドメインを含む。

**【0044】**

本明細書の一実施形態(17)は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパ

10

20

30

40

50

ク質のレベルを、インビボで、検出及び／又は調節することができ、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号77に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも93%、94%、若しくは95%、それに同一なアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び／又は、配列番号76に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも88%、89%、若しくは90%、それに同一なアミノ酸配列を含む第2の結合ドメインを含む。

#### 【0045】

本明細書の一実施形態(18)は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び／又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インビボで、検出及び／又は調節することができ、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号116、92、又は118に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも93%、94%、若しくは95%、それらに同一なアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び／又は、配列番号88に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも90%、91%、若しくは93%、それに同一なアミノ酸配列を含む第2の結合ドメインを含む。

10

#### 【0046】

本明細書の一実施形態(19)は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び／又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インビボで、検出及び／又は調節することができ、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号97に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも99%、それに同一なアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び／又は、配列番号96に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも86%、87%、88%、若しくは90%、それに同一なアミノ酸配列を含む第2の結合ドメインを含む。

20

#### 【0047】

本明細書の一実施形態(20)は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び／又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インビボで、検出及び／又は調節することができ、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号105に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも98%、若しくは99%、それに同一なアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び／又は、配列番号104に示すアミノ酸配列、若しくは、少なくとも88%、89%、88%、若しくは90%、それに同一なアミノ酸配列を含む第2の結合ドメインを含む。

30

#### 【0048】

本明細書の一実施形態(21)は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分

40

50

、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号 6 9 に示すアミノ酸配列、若しくは、9 9 %、それに同一なアミノ酸配列を含む第 1 の結合ドメイン；及び／又は、配列番号 6 8 に示すアミノ酸配列、若しくは、9 3 %、それに同一なアミノ酸配列を含む第 2 の結合ドメインを含む。

【 0 0 4 9 】

本明細書の一実施形態（2 2 ）は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号 7 7 に示すアミノ酸配列、若しくは、9 5 %、それに同一なアミノ酸配列を含む第 1 の結合ドメイン、及び／又は、配列番号 7 6 に示すアミノ酸配列、若しくは、9 0 %、それに同一なアミノ酸配列を含む第 2 の結合ドメインを含む。

10

【 0 0 5 0 】

本明細書の一実施形態（2 3 ）は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号 1 1 6 , 9 2 、又は 1 1 8 に示すアミノ酸配列、若しくは、9 3 9 5 % それらに同一なアミノ酸配列を含む第 1 の結合ドメイン；及び／又は、配列番号 8 8 に示すアミノ酸配列、若しくは、9 3 %、それに同一なアミノ酸配列を含む第 2 の結合ドメインを含む。

20

【 0 0 5 1 】

本明細書の一実施形態（2 4 ）は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号 9 7 に示すアミノ酸配列、若しくは、9 9 %、それに同一なアミノ酸配列を含む第 1 の結合ドメイン；及び／又は、配列番号 9 6 に示すアミノ酸配列、若しくは、9 0 %、それに同一なアミノ酸配列を含む第 2 の結合ドメインを含む。

【 0 0 5 2 】

本明細書の一実施形態（2 5 ）は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、前記結合ペプチド又はその抗体は、配列番号 1 0 5 に示すアミノ酸配列、若しくは、9 8 % 若しくは 9 9 %、それに同一なアミノ酸配列を含む第 1 の結合ドメイン；及び／又は、配列番号 1 0 4 に示すアミノ酸配列、若しくは、9 0 %、それに同一なアミノ酸配列を含む第 2 の結合ドメインを含む。

30

【 0 0 5 3 】

本明細書の一実施形態（2 6 ）は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的には実施形態（1 6 ）の、モノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、前記第 1 の結合ドメインは、配列番号 7 3 ~ 7 5 に示す C D R を含み、前記第 2 の結合ドメインは、配列番号 7 0 ~ 7 2 に示す C D R を含む。

40

【 0 0 5 4 】

本明細書の一実施形態（2 7 ）は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的には実施形態（1 7 ）の、モノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、前記第 1 の結合ドメインは、配列番号 8 1 ~ 8 3 に示す C D R を含み、前記第 2 の結合ドメインは、配列番号 7 8 ~ 8 0 に示す C D R を含む。

【 0 0 5 5 】

本明細書の一実施形態（2 8 ）は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的には実施形態（1 8 ）の、モノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、前記第 1 の結合ドメインは、配列番号 9 3 ~ 9 5 に示す C D R を含み、前記第 2 の結合ドメインが配列番号 1 2 , 9 0 , 及び 9 1 に示す C D R を含む。

50

## 【0056】

本明細書の一実施形態(29)は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的には実施形態(19)の、モノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、前記第1の結合ドメインは、配列番号101～103に示すCDRを含み、前記第2の結合ドメインが配列番号98～100に示すCDRを含む。

## 【0057】

本明細書の一実施形態(30)は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的には実施形態(18)の、モノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、前記第1の結合ドメインは、配列番号89、115、及び91に示すCDRを含み、前記第2の結合ドメインは、配列番号106～108に示すCDRを含む。

10

## 【0058】

さらに別の実施形態(31)では、本発明は、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、具体的には上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチド又は抗体に関連し、結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上のホスホエピトープ、具体的には、病態タンパク質タウコンフォーマーを認識しそれに特異的に結合するが、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質に高い結合親和性を有し、可溶性の、オリゴマーの、及び不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、インビボで、検出及び/又は調節することができ、前記結合ペプチド又は抗体は、

20

a. 配列番号69に示すアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び/若しくは、配列番号68に示すアミノ酸配列を含む第2の結合ドメイン；又は、

b. 配列番号77に示すアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び/若しくは、配列番号76に示すアミノ酸配列を含む第2の結合ドメイン；又は、

c. 配列番号116に示すアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び/若しくは、配列番号88に示すアミノ酸配列を含む第2の結合ドメイン；又は、

d. 配列番号92に示すアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び/若しくは、配列番号88に示すアミノ酸配列を含む第2の結合ドメイン；又は、

e. 配列番号97に示すアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び/若しくは、配列番号96に示すアミノ酸配列を含む第2の結合ドメイン；又は、

30

f. 配列番号105に示すアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び/若しくは、配列番号104に示すアミノ酸配列を含む第2の結合ドメイン；

g. 配列番号118に示すアミノ酸配列を含む第1の結合ドメイン、及び/若しくは、配列番号88に示すアミノ酸配列を含む第2の結合ドメイン、  
を含む。

## 【0059】

本発明の一実施形態(32)では、上記実施形態のいずれかに記載の結合ペプチドは、抗体、具体的にはIgG2a、IgG2b、又はIgG3アイソタイプの抗体、具体的には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は完全ヒト抗体である。

40

## 【0060】

本発明の一実施形態(33)は、上記実施形態のいずれか一つに記載の結合ペプチドをコードするポリヌクレオチドに関連する。

## 【0061】

一実施形態(34)では、前記ポリヌクレオチドは：

a. 配列番号84～87；配列番号109～114、117、及び119に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子；

b. 配列番号84～87、配列番号109～114、117、及び119に示す配列に対して、少なくとも85%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子；

50

c. 配列番号 84～87、配列番号 109～114、117、及び 119 に示す配列に対して、少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子；

d. 配列番号 84～87、配列番号 109～114、117、及び 119 に示す配列に対して、少なくとも 95% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子；

e. 配列番号 84～87、配列番号 109～114 及び 117、及び 119 に示す配列に対して、少なくとも 98% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子；

f. 配列番号 84～87、配列番号 109～114、117 及び 119 に示す配列に対して、99% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子；

g. 相補ストランドが、a)～f) のいずれかの核酸分子とハイブリッド形成する 10 ヌクレオチド配列を含む核酸；

h. a)～g) のいずれかおいて遺伝コードの縮重によって定義されるヌクレオチド配列から逸脱しているヌクレオチド配列を含む核酸分子；

からなる群から選択される核酸分子を含み、

a)～h) のいずれかに定義される前記核酸分子は、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上又はその断片上の、具体的には、リン酸化 Ser を 396 番目の位置 (pS396) に含むタウ aa 393-401、リン酸化 Ser を 396 番目の位置 (pS396) に含むタウ aa 396-401、リン酸化 Ser を 396 番目の位置 (pS396) に含むタウ aa 394-400、リン酸化 Ser を 404 番目の位置 (pS404) に含むタウ aa 402-406、及びリン酸化 Ser を 396 番目の位置 (pS396) に含むタウ aa 393-400 からなる群から選択される、配列番号 67 に示す、ヒトのタウタンパク質上の、ホスホエピトープを認識しそれに特異的に結合し、一実施形態では、前記結合ペプチドは、高い結合親和性を有し、少なくとも 10nM の、具体的には少なくとも 8nM の、具体的には少なくとも 5nM の、具体的には少なくとも 2nM の、具体的には少なくとも 1nM の、具体的には少なくとも 500pM の、具体的には少なくとも 400pM の、具体的には少なくとも 300pM の、具体的には少なくとも 200pM の、具体的には少なくとも 100pM の、具体的には少なくとも 50pM の解離定数を伴い、及び / 又は、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の、具体的には、 $3 \sim 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  の間又はそれ以上の、具体的には  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の；具体的には  $6 \sim 9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  又はそれ以上の；具体的には  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の、具体的には  $1 \sim 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  又はそれ以上の、具体的には  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合速度定数を有するが、しかし、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び / 又は非関連エピトープには結合しない。 20

#### 【0062】

本発明の多様な実施形態 (35) では、結合ペプチド若しくはその機能部分、具体的には抗体、具体的には前述の実施形態のいずれか一つのモノクローナル抗体若しくはその機能部分若しくはポリヌクレオチド、又はその組成物を提供し、それは、哺乳動物、具体的にはヒトのタウタンパク質上の、具体的には、神経原線維変性病、糸状構造物、及びジストロフィー性神経突起において支配的な構造である対らせん状フィラメント (PHF) に存在するもの等の微小管随伴及び過剰リン酸化タウタンパク質タウ上のホスホエピトープを特異的に認識しそれに結合することができるが、しかし、一実施形態では、対応する非リン酸化エピトープ及び / 又は非関連エピトープには結合しない。 30

#### 【0063】

本発明の特定の実施形態 (36) では、ヒトタウタンパク質は、配列番号 67 に示すヒトタウタンパク質である。

#### 【0064】

上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド及び抗体は、従って、(37) 可溶性総タウタンパク質の、具体的には可溶性リン酸化タウタンパク質のレベルを、可溶性タウタンパク質及び / 又は可溶性リン酸化タウタンパク質のレベルが増加した哺乳動物又はヒトの、脳、具体的には、大脳皮質及び / 又は海馬において、減少させるのに使用する 40

ことができる。

【0065】

上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド及び抗体はまた、(38)過剰リン酸化タウタンパク質(pタウ-PHF)を含む対らせん状フィラメントのレベルを、前記pタウ対らせん状フィラメントのレベルが増加した哺乳動物又はヒトの脳において、具体的には大脳皮質及び/又は海馬において減少させるのに使用することができる。

【0066】

総可溶性タウタンパク質及び/又は可溶性リン酸化タウタンパク質及び/又はpタウ対らせん状フィラメントのレベルを、脳において、具体的には、前記哺乳動物又はヒトにおいてタウタンパク質随伴疾患、障害又は状態の原因となる前記タウタンパク質変異体のレベルが増加した哺乳動物又はヒトの脳において、具体的には、大脳皮質及び/又は海馬において、減少させることによって、そのようなタウタンパク質随伴疾患、障害又は状態を伴う症状の改善及び/又は軽減という結果が得られる可能性がある(39)。

10

【0067】

上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド及び抗体を、従って、(40)タウタンパク質随伴疾患、障害、若しくは状態の進行を減速させる又は停止させる治療において、具体的にはヒトの治療において、使用することができる。

【0068】

上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド及び抗体をさらに、(41)例えば、論理的思考、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーション(special navigation)等を含む認知機能の欠陥又は喪失等のタウタンパク質随伴疾患、障害、又は状態を伴う症状を改善又は軽減する治療において、具体的にはヒトの治療において、使用することができる。

20

【0069】

一実施形態(42)では、本発明は、治療に使用する、具体的には、タウオパシー、すなわち一群のタウタンパク質随伴疾患及び障害を治療するのに、又はタウオパシーを伴う症状を軽減させるのに使用する、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド及び抗体に関連する。

【0070】

一実施形態(43)では、本発明は、タウオパシーを患う哺乳動物における認知記憶能力を保持又は増加させる、上記実施形態のいずれか一つに記載の結合ペプチド及び抗体に関連する。

30

【0071】

本発明の別の具体的な実施形態(44)では、配列番号73~75, 81~83, 93~95, 101~103, 106~108に与えられる、抗体ACI-35-2A1-Ab1; ACI-35-2A1-Ab2; ACI-35-4A6-Ab1; ACI-35-4A6-Ab2; ACI-35-1D2-Ab1; ACI-35-2G5-Ab1; ACI-35-2G5-Ab2; ACI-35-2G5-Ab3; の軽鎖CDRの少なくとも一つ又は全部、及び/又は、配列番号70~72, 78~80、(12, 90, 91)、98~100、(89, 115, 91)に与えられる、抗体ACI-35-2A1-Ab1; ACI-35-2A1-Ab2; ACI-35-4A6-Ab1; ACI-35-4A6-Ab2; ACI-35-1D2-Ab1; ACI-35-2G5-Ab1; ACI-35-2G5-Ab2; ACI-35-2G5-Ab3; の重鎖CDRの少なくとも一つ又は全部を含む結合ペプチド及び抗体を、例えば、論理的思考、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーション(special navigation)等を含む認知機能の欠陥又は喪失等のタウタンパク質随伴疾患、障害、又は状態を伴う症状を改善又は軽減させる治療において、具体的にはヒトの治療において使用する。

40

【0072】

本発明の別の具体的な実施形態(45)では、配列番号106~108に与えられる、抗体ACI-35-2G5-Ab2; ACI-35-2G5-Ab3; の軽鎖CDRの少

50

なくとも一つ又は全部、及び／又は、配列番号89、115、及び91に与えられる、抗体A C I - 35 - 2G5 - A b 2；A C I - 35 - 2G5 - A b 3；の重鎖C D Rの少なくとも一つ又は全部を含む結合ペプチド及び抗体を、例えば、論理的思考、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーション等を含む認知機能の欠陥又は喪失等のタウタンパク質随伴疾患、障害、又は状態を伴う症状を改善又は軽減させる治療において、具体的にはヒトの治療において使用する。

【0073】

上記実施形態のいずれか一つに記載した、ペプチド又は抗体の、脳上のタウタングル及びpタウへの結合は、実施例に記載のとおり、選別された脳切片をそれぞれ、タンパク質免疫反応性試験に適用すること、及び脳ホモジネートをウェスタンプロット法に適用することにより定量してもよい。10

【0074】

別の実施形態(46)では、本発明は、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド又はその機能部分、具体的には、抗体、具体的には、モノクローナル抗体若しくはその機能部分若しくはポリヌクレオチド、又はその組み合わせを、薬剤的に許容できる担体とともに治療有効量で含む薬剤組成物を提供する。

【0075】

別の実施形態(47)では、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド又はその機能部分、具体的には抗体、具体的には、モノクローナル抗体若しくはその機能部分若しくはポリヌクレオチド若しくは薬剤組成物、又はその組み合わせを、タウオパシー等の神経変性障害を含むタウタンパク質随伴疾患又は障害の症状を治療又は低減する治療において、具体的には、ヒトの治療において使用する。20

【0076】

上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド、抗体及び／又は薬剤組成物を、従って、(48)タウタンパク質随伴疾患、障害又は状態の進行を減速させるまたは停止させるために、前記結合ペプチド、抗体及び／又は薬剤組成物を、そうした疾患又は状態を患う、動物、具体的には哺乳動物、具体的にはヒトに投与して、用いてもよい。

【0077】

上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド、抗体及び／又は薬剤組成物はさらに、(49)例えば、論理的思考、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーション等を含む認知機能の欠陥又は喪失等の、タウタンパク質随伴疾患、障害、又は状態を伴う症状を改善又は軽減するために、前記結合ペプチド、抗体及び／又は薬剤組成物を、そうした疾患又は状態を患う、動物、具体的には哺乳動物、具体的にはヒトに投与して、用いてもよい。30

【0078】

一実施形態(50)では、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体若しくはその機能部分若しくはポリヌクレオチド若しくは薬剤組成物、又はそれらの組み合わせを、アルツハイマー病、クロイツフェルト-ヤコブ病、パンチドランカー、ダウン症候群、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー症候群、封入体筋炎、及びブリオンタンパク質脳アミロイド血管症を含むが、これらには限定されない、タウ及びアミロイド両方の病態を発現する疾患又は障害を含む神経変性疾患又は障害と、外傷性脳損傷と、筋萎縮性側索硬化症／グアム島パーキンソン痴呆症候群、神経原線維変化病を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハラーフォルデン-シユバツ病、多系統萎縮症、ニーマン-ピック病、C型、淡蒼球-橋脳-黒質退行変性、ピック病、進行性皮質下膠質症、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維型老年認知症、脳炎後パーキンソン症候群、及び筋強直性ジストロフィー含むが、これらには限定されない、明瞭なアミロイド病態を示さないさらなる疾患又は障害との、異種の群を含むタウオパシーにおける脳の主要な病態である、神経原線維病変の形成を原因とする4050

又は伴う疾患及び障害の治療において使用する。

【0079】

一実施形態（51）では、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド若しくはその機能部分、具体的には抗体、具体的には、モノクローナル抗体若しくはその機能部分若しくはポリヌクレオチド若しくは薬剤組成物、又はそれらの組み合わせを、アルツハイマー病の治療において用いる。

【0080】

本発明の一実施形態（52）では、可溶性の及び／又はオリゴマーの及び／又は不溶性のリン酸化タウタンパク質のレベルを、具体的にはインビボで、具体的には動物の、具体的には哺乳動物又はヒトの、脳、具体的には大脳皮質及び／又は海馬において、検出及び／又は調節する方法を提供し、方法は、前記動物、具体的には前記哺乳動物又はヒトに、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド若しくはその機能部分、具体的には抗体、具体的には、モノクローナル抗体若しくはその機能部分若しくはポリヌクレオチド若しくは薬剤組成物、又はその組み合わせを投与することを含む。

10

【0081】

一態様では、調節は、可溶性タウタンパク質の、具体的には可溶性リン酸化タウタンパク質のレベルを、可溶性タウタンパク質及び／又は可溶性リン酸化タウタンパク質の増加した動物の、具体的には、哺乳動物又はヒトの、脳、具体的には大脳皮質及び／又は海馬において、低減させることに関連する。

【0082】

20

本発明の一実施形態（53）では、不溶性タウタンパク質の、具体的には、過剰リン酸化タウタンパク質（pタウPHF）を含む対らせん状フィラメントのレベルを、不溶性タウタンパク質の増加した動物、具体的には、哺乳動物又はヒトの、脳、具体的には、大脳皮質及び／又は海馬において、低減する方法を提供し、方法は、前記動物、具体的には前記哺乳動物又はヒトに、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド若しくはその機能部分、具体的には抗体、具体的には、モノクローナル抗体若しくはその機能部分若しくはポリヌクレオチド若しくは薬剤組成物、又はそれらの組み合わせを投与することを含む。

【0083】

30

一実施形態（54）では、本発明は、タウタンパク質随伴疾患、障害又は状態を、動物において、具体的には哺乳動物又はヒトにおいて減速させる又は停止させる方法に関連し、方法は、そうした疾患又は状態を患う前記動物に、具体的には前記哺乳動物又はヒトに、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド若しくはその機能部分、具体的には抗体、具体的には、モノクローナル抗体若しくはその機能部分若しくはポリヌクレオチド若しくは薬剤組成物、又はそれらの組み合わせを投与することを含む。

【0084】

30

一実施形態（55）では、本発明は、例えば、論理的思考、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーション等を含む認知機能の欠陥又は喪失等の、タウタンパク質随伴疾患、障害、又は状態を伴う症状を、動物において、具体的には哺乳動物又はヒトにおいて、改善又は軽減する方法に関連し、方法は、そうした疾患又は状態を患う前記動物に、具体的には前記哺乳動物又はヒトに、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド若しくはその機能部分、具体的には抗体、具体的には、モノクローナル抗体若しくはその機能部分、若しくはポリヌクレオチド、若しくは又は薬剤組成物、又はそれらの組み合わせを投与することを含む。

40

【0085】

一実施形態（56）では、本発明はタウオパシーを患う哺乳動物における認知記憶能力を保持又は増加させる方法に関連する。

【0086】

50

本発明のさらに別の実施形態（57）では、タウオパシー等の神経変性疾患又は障害を含む、タウタンパク質随伴疾患又は障害を治療する方法を提供し、方法は、そうした疾患

又は障害を患う動物に、具体的には哺乳動物に、しかし具体的にはヒトに、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド若しくはその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体若しくはその機能部分、若しくはポリヌクレオチド、若しくは薬剤組成物、又はそれらの組み合わせを投与することを含む。

【0087】

本発明の一実施形態(58)では、アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病、パンチドランカー、ダウン症候群、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、封入体筋炎、及びプリオントンパク質脳アミロイド血管症を含むがこれらには限定されない、タウ及びアミロイドの両方の病態の存在を示す疾患又は障害を含む神経変性疾患又は障害と、外傷性脳損傷と、筋萎縮性側索硬化症／グアム島パーキンソン痴呆症候群、神経原線維変化病を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病、17番染色体に連鎖しパーキンソンズムを伴う前頭側頭型認知症、ハーラーフォルデン・シュバッツ病、多系統萎縮症、ニーマン・ピック病、C型、淡蒼球・橋脳・黒質退行変性、ピック病、進行性皮質下膠質症、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維型老年認知症、脳炎後パーキンソン症候群、及び筋強直性ジストロフィー含むが、これらには限定されない、明瞭なアミロイド病態を示さないさらなる疾患又は障害と、の異種の群を含むタウオパシーにおける脳の主要な病態である、神経原線維病変の形成を原因とする又は伴う疾患及び障害を治療する方法を提供し、方法は、こうした疾患又は障害を患う動物に、具体的には哺乳動物に、しかし具体的にはヒトに、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド若しくはその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体若しくはその機能部分、若しくはポリヌクレオチド、若しくは薬剤組成物、又はそれらの組み合わせを投与することを含む。

【0088】

本発明の別の実施形態(59)では、タウオパシー等の神経変性障害を患う動物に、具体的には哺乳動物又はヒトに、受動免疫応答を、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド若しくはその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体若しくはその機能部分、若しくはポリヌクレオチド、若しくは薬剤組成物、又はそれらの組み合わせを前記動物又はヒトに投与することによって、誘導する方法を提供する。

【0089】

本発明のさらに別の実施形態(60)では、患者において、タウタンパク質随伴疾患、障害又は状態を診断する方法を提供し、方法は、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド又はその活性断片、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分の、タウタンパク質のエピトープへの免疫特異的結合を、試料において又はインサイチュで検出することを含み、

a. タウタンパク質を含むことが疑われる、試料又は体の特定部分若しくは体の面積を、上記の請求項のいずれか一項に記載の、結合ペプチド又はその断片、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分に接触させる工程(前記結合ペプチド又は抗体又はその断片は、タウタンパク質のエピトープに結合する)；

b. 前記結合ペプチド、具体的には前記抗体、具体的には前記モノクローナル抗体又はその機能部分をタウタンパク質に結合させて免疫複合体を形成させる工程；

c. 免疫複合体の形成を検出する工程；及び

d. 免疫複合体の存在又は非存在を、試料又は体の特定部分若しくは面積におけるタウ抗原の存在又は非存在に関連づける工程を含む。

【0090】

本発明のさらに別の実施形態(61)では、患者において、タウタンパク質随伴疾患、障害又は状態の素因を診断する方法を提供し、方法は、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド又はその活性断片、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分の、タウタンパク質のエピトープへの免疫特異的結合を、試料において

10

20

30

40

50

又はインサイチュで検出することを含み、

a . タウ抗原を含むことが疑われる、試料又は体の特定部分若しくは体の面積を、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド又はその活性断片、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分に接触させる工程（結合ペプチド又はその断片は、タウタンパク質のエピトープに結合する）；

b . 前記結合ペプチド、具体的には前記抗体、具体的には前記モノクローナル抗体又はその機能部分をタウ抗原に結合させて免疫複合体を形成させる工程；

c . 免疫複合体の形成を検出する工程；及び

d . 免疫複合体の存在又は非存在を、試料又は体の特定部分若しくは面積におけるタウ抗原の存在又は非存在と関連づける工程、

e . 前記免疫複合体の量を対照正常値と比較する工程；

を含み、対照正常値と比較した前記凝集体の量の増加は、前記患者がタウタンパク関連疾患又は状態を患っている、又は発症するリスクのあることを示す。

#### 【0091】

本発明の一実施形態（62）では、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド若しくはその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体若しくはその機能部分、若しくはポリヌクレオチド、又は薬剤組成物を用いた治療の後に、患者において、微小残存病変を監視する方法を提供し、方法は：

a . タウ抗原を含むことが疑われる、試料又は体の特定部分若しくは面積を、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分に接触させること（結合ペプチド又はその断片は、タウタンパク質のエピトープに結合する）；

b . 前記結合ペプチド、具体的には前記抗体、具体的には前記モノクローナル抗体又はその機能部分をタウ抗原に結合させて免疫複合体を形成させること；

c . 免疫複合体の形成を検出すること；及び

d . 免疫複合体の存在又は非存在を、試料又は体の特定部分若しくは面積におけるタウ抗原の存在又は非存在と関連づけること、

e . 前記免疫複合体の量を対照正常値と比較すること；

を含み、対照正常値と比較した前記凝集体の量の増加は、前記患者が依然として微小残存病変を患っていることを示す。

#### 【0092】

一実施形態（63）では、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分、又はポリヌクレオチド、又は薬剤組成物を用いて治療されている患者の反応性を予測する方法が提供され、方法は、

a . タウ抗原を含むことが疑われる、試料又は体の特定部分若しくは体の面積を、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド又はその活性断片、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分に接触させること（前記結合ペプチド又はその断片は、タウタンパク質のエピトープに結合する）；

b . 前記結合ペプチド、具体的には前記抗体、具体的には前記モノクローナル抗体又はその機能部分をタウ抗原に結合させて免疫複合体を形成させ；

c . 免疫複合体の形成を検出すること；及び

d . 免疫複合体の存在又は非存在を、試料又は体の特定部分若しくは面積におけるタウ抗原の存在又は非存在と関連づけること、

e . 前記免疫複合体の量を治療開始の前後で比較すること；

を含み、前記免疫複合体の量の減少が、前記患者が有する治療応答性の潜在能力が高いことを示す。

#### 【0093】

抗タウ抗体及びその断片を、本発明の上述の方法において用いていよい。上述の方法では、抗体又はその断片を含む試料を、固体支持体に付着させた抗タウ抗体又はその断片

10

20

30

40

50

と試料を接触させることにより免疫濃縮し、試料中のタウタンパク質の濃度を増加させてよい。

【0094】

工程(a)に先立って、試料を、固体支持体に付着させた抗タウ抗体又はその断片と試料を接触させることにより免疫濃縮し、試料中のタウタンパク質の濃度を増加させてよい。

【0095】

別の実施形態(64)では、本発明は、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド又はその活性断片、具体的には抗体、具体的には、モノクローナル抗体又はその機能部分を含む、タウタンパク質随伴疾患、障害、又は状態を検出及び診断する試験キットに関連する。

【0096】

一実施形態(65)では、前記試験キットは、上記実施形態のいずれか一つに記載の、一つ又は複数の結合ペプチド又はその活性断片、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分を入れた容器と、タウ抗原を結合させて免疫複合体を形成させ、免疫複合体の存在又は非存在をタウ抗原の存在又は非存在に関連づけるように複合体の形成を検出する目的で結合ペプチド又は抗体を使用するための指示書とを含む。

【0097】

さらに別の実施形態(66)では、本発明は、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 393-401、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 396-401、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 394-400、リン酸化Serを404番目の位置(pS404)に含むタウ aa 402-406、及びリン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含むタウ aa 393-400、からなる群から選択される、配列番号67に示す、哺乳動物の、具体的にはヒトのタウタンパク質上のエピトープに関連する。

【0098】

一実施形態(67)では、前記エピトープは、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含む、タウ aa 393-401からなる。

【0099】

一実施形態(68)では、前記エピトープは、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含む、タウ aa 396-401からなる。

【0100】

一実施形態(69)では、前記エピトープは、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含む、タウ aa 394-400からなる。

【0101】

一実施形態(70)では、前記エピトープは、リン酸化Serを404番目の位置(pS404)に含む、タウ aa 402-406からなる。

【0102】

一実施形態(71)では、前記エピトープは、リン酸化Serを396番目の位置(pS396)に含む、タウ aa 393-400からなる。

【0103】

別の実施形態(72)では、本発明は、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド又はその活性断片、具体的には抗体、具体的には、モノクローナル抗体又はその機能部分を産生する細胞株に関連する。

【0104】

一実施形態(73)では、本発明は、DSM ACC3136として2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-4A6-48である細胞株に関連する。

【0105】

一実施形態(74)では、本発明は、DSM ACC3137として2011年8月30

10

20

30

40

50

0日に寄託されたハイブリドーマ細胞株 A 6 - 2 G 5 - 3 0 である細胞株に関連する。

【 0 1 0 6 】

一実施形態(75)では、本発明は、D S M A C C 3 1 3 8 として2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株 A 6 - 2 G 5 - 4 1 である細胞株に関連する。

【 0 1 0 7 】

一実施形態(76)では、本発明は、D S M A C C 3 1 3 9 として2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株 A 4 - 2 A 1 - 1 8 である細胞株に関連する。

【 0 1 0 8 】

一実施形態(77)では、本発明は、D S M A C C 3 1 4 0 として2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株 A 4 - 2 A 1 - 4 0 である細胞株に関連する。

10

【 0 1 0 9 】

一実施形態(78)では、本発明は、D S M A C C 3 1 4 1 として2011年9月6日に寄託されたハイブリドーマ細胞株 A 6 - 1 D 2 - 1 2 である細胞株に関連する。

【 0 1 1 0 】

一実施形態(79)では、本発明は、軽鎖(V L)及び/又は重鎖(V H)ドメインを含む、モノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、モノクローナル抗体又はその機能部分は、2011年8月30日にD S M A C C 3 1 3 9 として寄託されたハイブリドーマ細胞株 A 4 - 2 A 1 - 1 8 のD N Aを

a . 第1の結合ドメインを増幅する、配列番号149の5'プライマー及び配列番号51の3'プライマーを含むプライマー対；並びに/又は

20

b . 第2の結合ドメインを増幅する、配列番号120、123、124、136、137、138、139、及び140からなる群から選択される5'プライマー、及び、配列番号131、134、及び141～148からなる群から選択される3'プライマーを含むプライマーの混合物、

を用いてP C R増幅により得ることができるヌクレオチド断片上に位置するポリヌクレオチドによりコードされる。

【 0 1 1 1 】

一実施形態(80)では、本発明は、軽鎖(V L)及び/又は重鎖(V H)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、モノクローナル抗体又はその機能部分は、2011年8月30日にD S M A C C 3 1 3 7 として寄託されたハイブリドーマ細胞株 A 6 - 2 G 5 - 3 0 のD N Aを、

30

a . 第1の結合ドメインを増幅する、配列番号51及び169～174からなる群から選択される5'プライマー、及び配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合物；並びに/又は

b . 第2の結合ドメインを増幅する、配列番号124、127、及び150～158からなる群から選択される5'プライマー、及び、配列番号130、及び159～168からなる群から選択される3'プライマーを含むプライマーの混合物、  
を用いてP C R増幅により得ることができるヌクレオチド断片上に位置するポリヌクレオチドによりコードされる。

【 0 1 1 2 】

40

一実施形態(81)では、本発明は、軽鎖(V L)及び/又は重鎖(V H)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、モノクローナル抗体又はその機能部分は、2011年8月30日にD S M A C C 3 1 4 0 として寄託されたハイブリドーマ細胞株 A 4 - 2 A 1 - 4 0 のD N Aを

a . 第1の結合ドメインを増幅する、配列番号178、179、及び180からなる群から選択される5'プライマー、及び配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合物；並びに/又は

b . 第2の結合ドメインを増幅する、配列番号121、127、139、154、155、及び175からなる群から選択される5'プライマー、及び配列番号128、129、147、176、及び177からなる群から選択される3'プライマーを含むプライマ

50

ーの混合物、

を用いて P C R 増幅により得ることができるヌクレオチド断片上に位置するポリヌクレオチドによりコードされる。

【 0 1 1 3 】

一実施形態 ( 8 2 ) では、本発明は、軽鎖 ( V L ) 及び / 又は重鎖 ( V H ) ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、モノクローナル抗体又はその機能部分は、2011年8月30日に D S M A C C 3 1 3 8 として寄託されたハイブリドーマ細胞株 A 6 - 2 G 5 - 4 1 の D N A を、

a . 第 1 の結合ドメインを増幅する、配列番号 5 1 、及び 1 8 8 ~ 1 9 2 からなる群から選択される 5 ' プライマー、及び配列番号 5 1 の 3 ' プライマーを含むプライマーの混合物；並びに / 又は、

b . 第 2 の結合ドメインを増幅する、配列番号 1 2 0 、 1 2 4 、 1 2 6 、 1 8 1 、 1 8 2 、及び 1 8 3 からなる群から選択される 5 ' プライマー、及び配列番号 1 4 4 、 1 4 5 、及び 1 8 4 ~ 1 8 7 からなる群から選択される 3 ' プライマーを含むプライマーの混合物、

を用いて P C R 増幅により得ることができるヌクレオチド断片上に位置するポリヌクレオチドによりコードされる。

【 0 1 1 4 】

一実施形態 ( 8 3 ) では、本発明は、軽鎖 ( V L ) 及び / 又は重鎖 ( V H ) ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、モノクローナル抗体又はその機能部分は、2011年8月30日に D S M A C C 3 1 3 6 として寄託されたハイブリドーマ細胞株 A 4 - 4 A 6 - 4 8 の D N A を、

a . 第 1 の結合ドメインを増幅する、配列番号 5 0 、及び 2 0 1 ~ 2 0 4 からなる群から選択される 5 ' プライマー、及び配列番号 5 1 の 3 ' プライマーを含むプライマーの混合物；並びに / 又は

b . 第 2 の結合ドメインを増幅する、配列番号 1 2 1 、 1 3 7 、 1 5 1 、及び 1 9 3 ~ 1 9 7 からなる群から選択される 5 ' プライマー、及び配列番号 1 3 1 、 1 4 1 、 1 4 4 、 1 6 6 、 1 9 8 、 1 9 9 、及び 2 0 0 からなる群から選択される 3 ' プライマーを含むプライマー混合物、

を用いて P C R 増幅により得ることができるヌクレオチド断片上に位置するポリヌクレオチドによりコードされる。

【 0 1 1 5 】

一実施形態 ( 8 4 ) では、本発明は、軽鎖 ( V L ) 及び / 又は重鎖 ( V H ) ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、2011年9月6日に D S M A C C 3 1 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞株 A 6 - 1 D 2 - 1 2 の D N A を、

a . 第 1 の結合ドメインを増幅する、配列番号 2 0 9 ~ 2 1 4 、及び 2 1 9 ~ 2 2 1 からなる群から選択される 5 ' プライマー、及び配列番号 2 1 5 の 3 ' プライマーを含むプライマー混合物；並びに / 又は

b . 第 2 の結合ドメインを増幅する、配列番号 2 1 6 、 2 1 7 、及び 2 1 8 からなる群から選択される 5 ' プライマー、及び、配列番号 2 0 8 からなる群から選択される 3 ' プライマーを含むプライマー混合物、

を用いて P C R 増幅により得ることができるヌクレオチド断片上に位置するポリヌクレオチドによりコードされる。

【 0 1 1 6 】

一実施形態 ( 8 5 ) では、上記実施形態のいずれか一つに記載の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ラクダ科動物抗体、二価抗体、又は修飾若しくは変形抗体であってもよい。

【 0 1 1 7 】

一実施形態 ( 8 6 ) では、本発明は、上記実施形態のいずれか一つに記載の結合ペプチド又は抗体を産生する方法を提供し、方法は、上記実施形態のいずれかに記載の細胞株を

適切な培地で培養し、隨意に、結合ペプチド又は抗体を細胞株又は培地から精製する工程を含む。

【0118】

他の実施形態（87）において、本発明は、脳試料中にホスホタウ（pタウ）マルチマーーを検出する方法を提供し、方法は：

- a. 試料を、上記請求項のいずれか一つに記載の抗体又はその断片に接触させること（ペプチド又はその断片が、ホスホタウタンパク質のエピトープに結合する）；
- b. 抗体をタウタンパク質に結合させて免疫複合体を形成させること；
- c. 免疫複合体の形成を、具体的にはELISAアッセイを適用して検出することを含む。

10

【0119】

具体的には、本発明は、特定の実施形態（88）において、タウ随伴疾患又は障害を患っていることが疑われる対象から、及び健康な対照対象から得られた脳ホモジネート中のホスホタウ（pタウ）マルチマーを死後検出する方法に関連し、方法は：

- a. 両対象の脳ホモジネートを、上記請求項のいずれか一つに記載の抗体又はその断片に接触させること（ペプチド又はその断片が、ホスホタウタンパク質のエピトープに結合する）；
- b. 抗体をタウタンパク質に結合させて免疫複合体を形成させること；
- c. 免疫複合体の形成を、具体的にはELISAアッセイを適用して検出すること、及び
- d. タウ随伴疾患を患っていることが疑われる対象から得られた試料中の免疫複合体の量又は強度を、対照試料のそれと比較することを含み、

20

対照値と比較した前記免疫複合体の量又は強度の増加は、前記患者が微小残存病変を患っていたことを示す。

【0120】

一実施形態（89）では、対照試料と比較した、試験試料に観察される増加は、30%と50%の間、具体的には35%と45%の間である。

【0121】

一実施形態（90）では、本発明は、上記実施形態のいずれか一つに記載の、結合ペプチド若しくはタンパク質又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分を提供し、抗体又は断片は、好都合なPKプロファイルを示す。具体的には、前記抗体又は断片は、投与後10日まで高い血清濃度を有し、このことは、前記抗体を治療抗体として使用することを好都合に裏付ける薬物動態（PK）プロファイルを示すものである（Deng et al., Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012, 8(2) 141-60; Putman et al., Trends Biotech, 2010 (28) 509-516 ; Bai, S. Clin Pharmacokinet 2012; 51 (2): 119-135）。

30

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図1】ACI-35-2A1-Ab1（左パネル）、ACI-35-2G5-Ab3（中パネル）、及び対照抗体（HT7；右パネル）により、対照及びAD対象からのヒト脳ホモジネート中に、リン酸化タウマルチマーを検出した結果を示す。

40

【図2A】総タウ、及びpタウを、市販の抗体によりヒト脳ホモジネート中に検出した結果を、（2A及び2B）に示す。

【図2B】同上。

【図3A】ホスホタウを、ACI-35-2A1-Ab1（A）、ACI-35-1D2-Ab1（B）、及びACI-35-2G5-Ab3（C）によりヒト脳ホモジネート中に検出した結果を、（3A、3B、3C）に示す。

【図3B】同上。

【図3C】同上。

【図4A】タウ-pS396を、ヒトAD及び対照（Ctr1）の脳中に、ACI-35

50

- 2 A 1 - A b 1 ( A )、 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 ( B )、 及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 ( C )の抗体により、 A l p h a L I S A を用いて検出した結果を、 ( 4 A , 4 B , 4 C ) に示す。マン・ホイットニーの検定により、 \* \* \* \* は、  $p < 0.0001$  、 \* \* は、  $p < 0.01$  である。

【図 4 B】同上。

【図 4 C】同上。

【図 5 A】 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 を用いてタウトランスジェニックマウスを治療した後の、扁桃体 ( A ) 及び海馬 ( B ) におけるタウ - p T 2 3 1 ( A T 1 8 0 ) の I H C 染色を、 ( 5 A 及び 5 B ) に示す。

【図 5 B】同上。

10

【図 6 A】 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 を用いてタウトランスジェニックマウスを治療した後の、扁桃体 ( A ) 及び海馬 ( B ) における総タウ ( H T 7 ) の I H C 染色を、 ( 6 A 及び 6 B ) に示す。

【図 6 B】同上。

【図 7】異なる G S K 3 条件、及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 抗体を用いてプロットしたメンブレンを用いて生成したタウ - p S 3 9 6 についての S D S - P A G E を示す。

【図 8】 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 - B T 、及びタウ - 1 3 抗体を用いた特異的 A l p h a L I S A アッセイのセットアップ示す。

【図 9】タウ - p S 3 9 6 を、一人の A D ドナーから得られたヒト S 1 脳画分に検出したこと； I P 及び非 I P 試料により濃縮された試料から得られたシグナルの比較を示す。

20

【図 10】タウ - p S 3 9 6 を、ヒト A D 及び対照 ( C t r 1 ) C S F 中に、 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 抗体により I P を用いて検出した後の A l p h a L I S A の結果を示す。マン・ホイットニーの検定により \* \* \* は、  $p = 0.0003$  である。

【 0 1 2 3 】

配列

配列番号 4 6 ~ 5 7 は、 V H / V K 順方向及び逆方向プライマーのヌクレオチド配列を表す。

配列番号 6 2 は、タウ抗原、ペプチド T 3 のアミノ酸配列を表す ( 表 1 を見られたい ) 。

配列番号 6 7 は、タウ 4 0 とも称される、ヒトタウの最長のアイソフォーム ( 4 4 1 a ) のアミノ酸配列を表す。

30

配列番号 6 8 は、ハイブリドーマ細胞株 A 4 - 4 A 6 - 1 8 により産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) のアミノ酸配列を表す。

配列番号 6 9 は、ハイブリドーマ細胞株 A 4 - 4 A 6 - 1 8 により産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) のアミノ酸配列を表す。

配列番号 7 0 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 1 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 7 1 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 2 のアミノ酸配列を表す。

40

配列番号 7 2 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 3 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 7 3 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 1 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 7 4 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 2 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 7 5 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 3 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 7 6 は、ハイブリドーマ細胞株 A 6 - 1 D 2 - 1 2 により産生されるモノクロ

50

－ナル抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) のアミノ酸配列を表す。

配列番号 7 7 は、ハイブリドーマ細胞株 A 6 - 1 D 2 - 1 2 により産生されるモノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) のアミノ酸配列を表す。

配列番号 7 8 は、モノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 1 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 7 9 は、モノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 2 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 8 0 は、モノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 3 のアミノ酸配列を表す。 10

配列番号 8 1 は、モノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 1 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 8 2 は、モノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 2 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 8 3 は、モノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 3 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 8 4 は、ハイブリドーマ細胞株 A 4 - 4 A 6 - 1 8 により産生されるモノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) のヌクレオチド配列を表す。 20

配列番号 8 5 は、ハイブリドーマ細胞株 A 4 - 4 A 6 - 1 8 により産生されるモノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) のヌクレオチド配列を表す。

配列番号 8 6 は、ハイブリドーマ細胞株 A 6 - 1 D 2 - 1 2 により産生されるモノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) のヌクレオチド配列を表す。

配列番号 8 7 は、ハイブリドーマ細胞株 A 6 - 1 D 2 - 1 2 により産生されるモノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) のヌクレオチド配列を表す。

配列番号 8 8 は、それぞれハイブリドーマ細胞株 A 4 - 2 A 1 - 1 8 、 A 4 - 2 A 1 - 4 0 、及び A 4 - 4 A 6 - 4 8 により産生される、それぞれモノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 1 、 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 2 、及び A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 2 の重鎖可変領域 ( V H ) のアミノ酸配列を表す。 30

配列番号 8 9 は、それぞれモノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 2 、及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 3 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 1 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 9 0 は、それぞれモノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 1 、 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 2 、及び A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 2 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 2 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 9 1 は、それぞれモノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 1 、 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 2 、 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 2 、 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 2 、及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 3 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 3 のアミノ酸配列を表す。 40

配列番号 9 2 は、ハイブリドーマ細胞株 A 4 - 2 A 1 - 4 0 により産生されるモノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) のアミノ酸配列を表す。

配列番号 9 3 は、モノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 1 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 9 4 は、モノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 2 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 9 5 は、モノクロ－ナル抗体 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( 50

V K ) の C D R 3 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 9 6 は、ハイブリドーマ細胞株 A 6 - 2 G 5 - 0 8 により產生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) のアミノ酸配列を表す。

配列番号 9 7 は、ハイブリドーマ細胞株 A 6 - 2 G 5 - 0 8 により產生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) のアミノ酸配列を表す。

配列番号 9 8 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 1 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 9 9 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 2 のアミノ酸配列を表す。 10

配列番号 1 0 0 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 3 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 1 0 1 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 1 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 1 0 2 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 2 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 1 0 3 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 3 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 1 0 4 は、それぞれハイブリドーマ細胞株 A 6 - 2 G 5 - 3 0 、及び A 6 - 2 G 5 - 4 1 により產生される、それぞれモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 2 、及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 3 の重鎖可変領域 ( V H ) のアミノ酸配列を表す。 20

配列番号 1 0 5 は、それぞれハイブリドーマ細胞株 A 6 - 2 G 5 - 3 0 、及び A 6 - 2 G 5 - 4 1 により產生される、それぞれモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 2 、及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 3 の軽鎖可変領域 ( V K ) のアミノ酸配列を表す。

配列番号 1 0 6 は、それぞれモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 2 、及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 3 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 1 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 1 0 7 は、それぞれモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 2 、及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 3 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 2 のアミノ酸配列を表す。 30

配列番号 1 0 8 は、それぞれモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 2 、及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 3 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 3 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 1 0 9 は、それぞれハイブリドーマ細胞株 A 4 - 2 A 1 - 1 8 、 A 4 - 2 A 1 - 4 0 、及び A 4 - 4 A 6 - 4 8 により產生される、それぞれモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 1 、 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 2 、及び A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 2 の重鎖可変領域 ( V H ) のヌクレオチド配列を表す。

配列番号 1 1 0 は、ハイブリドーマ細胞株 A 4 - 2 A 1 - 4 0 により產生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) のヌクレオチド配列を表す。 40

配列番号 1 1 1 は、ハイブリドーマ細胞株 A 6 - 2 G 5 - 0 8 により產生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 1 の重鎖可変領域 ( V H ) のヌクレオチド配列を表す。

配列番号 1 1 2 は、ハイブリドーマ細胞株 A 6 - 2 G 5 - 0 8 により產生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) のヌクレオチド配列を表す。

配列番号 1 1 3 は、それぞれハイブリドーマ細胞株 A 6 - 2 G 5 - 3 0 、及び A 6 - 2 G 5 - 4 1 により產生される、それぞれモノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 2 、及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A B 3 の重鎖可変領域 ( V H ) のヌクレオチド配列を表す。 50

す。

配列番号 114 は、それぞれハイブリドーマ細胞株 A6-2G5-30、及び A6-2G5-41 により產生される、それぞれモノクローナル抗体 ACI-35-2G5-AB2、及び ACI-35-2G5-AB3 の輕鎖可変領域 (VK) のヌクレオチド配列を表す。

配列番号 115 は、モノクローナル抗体 ACI-35-2G5-AB2、及び ACI-35-2G5-AB3 の重鎖可変領域 (VH) の CDR2 のアミノ酸配列を表す。

配列番号 116 は、ハイブリドーマ細胞株 A4-2A1-18 により產生されるモノクローナル抗体 ACI-35-2A1-Ab1 の輕鎖可変領域 (VK) のアミノ酸配列を表す。 10

配列番号 117 は、ハイブリドーマ細胞株 A4-2A1-18 により產生されるモノクローナル抗体 ACI-35-2A1-Ab1 の輕鎖可変領域 (VK) のヌクレオチド配列を表す。

配列番号 118 は、ハイブリドーマ細胞株 A4-4A6-48 により產生されるモノクローナル抗体 ACI-35-4A6-Ab2 の輕鎖可変領域 (VK) のアミノ酸配列を表す。 20

配列番号 119 は、ハイブリドーマ細胞株 A4-4A6-48 により產生されるモノクローナル抗体 ACI-35-4A6-Ab2 の輕鎖可変領域 (VK) のヌクレオチド配列を表す。

配列番号 120 ~ 221 は、VH / VK 順方向及び逆方向プライマーのヌクレオチド配列を表す。 20

#### 【0124】

##### 用語の定義

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書で使用されるとおり、交換可能であり、ペプチド結合により連結されるアミノ酸から構成される生体分子を意味するように定義される。

#### 【0125】

「ペプチド」、又は「結合ペプチド」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、一つのアミノ酸のアルファ炭素のカルボキシル基と、もう一つのアミノ酸のアルファ炭素のアミノ基との間の縮合反応により形成されるペプチド結合を介してアルファ炭素が連結するアミノ酸（典型的には L-アミノ酸）鎖をさす。鎖の一方の端（すなわち、アミノ末端）での末端アミノ酸が、遊離アミノ基を有する一方、鎖のもう一方の端（すなわちカルボキシ末端）での末端アミノ酸が、遊離カルボキシル基を有する。従って、「アミノ末端」（省略して N-末端）という用語は、ペプチドのアミノ末端でのアミノ基酸の遊離アルファアミノ基を、又はペプチド内での他の任意の場所にあるアミノ酸のアルファアミノ基（ペプチド結合に関与している場合にはイミノ基）をさす。同様に「カルボキシ末端」（省略して C-末端）という用語は、ペプチドのカルボキシ末端でのアミノ酸上の遊離カルボキシル基を、又はペプチド内での他の任意の場所にあるアミノ酸のカルボキシル基をさす。結合ペプチドは、本明細書に定義される、ポリクローナル若しくはモノクローナル抗体、ヒト若しくはヒト化抗体、二重特異性抗体、ラクダ化動物抗体等、又はその機能部分、等の抗体を構成することもある。 30

#### 【0126】

ペプチドに関する文脈において本明細書で使用される、「その断片」又は「断片」という用語は、本明細書に定義される完全なペプチドと実質的に同一の（生物学的）活性を有する機能性ペプチド断片をさす。抗体に関する文脈において本明細書で使用される場合、これらの用語は、完全抗体の抗原結合領域又は可変領域を含む完全抗体の部分を含む抗体断片をさす。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及び Fv 断片；二価抗体；单鎖 Fv (scFv) 分子等の单鎖抗体分子；及び二重特異性及び多重特異性抗体、並びに / または抗体断片が挙げられる。 40

#### 【0127】

典型的には、ペプチドを構成するアミノ酸は、ペプチドのアミノ末端に始まり、カルボキシ末端に向けて増加する順番に番号付けされる。従って、一つのアミノ酸が、他のもの「の後に続く(follow)」と言われる場合には、そのアミノ酸は、前にあるアミノ酸よりも、ペプチドのカルボキシ末端にさらに近接する位置にある。

【0128】

「残基」という用語は、本明細書では、アミド結合によりペプチドに組み込まれたアミノ酸をさすのに用いられる。従って、アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸であることもあり、又は、他に制限されない限り、天然に存在するアミノ酸と類似の形で機能する、天然アミノ酸の類似体（すなわち、アミノ酸模倣体）を包含することもある。さらに、アミド結合模倣体には、当業者に周知のペプチド骨格修飾体が挙げられる。

10

【0129】

「～から実質的になる」という表現は、本明細書では、その表現がさし示すペプチドの基本的な性質を実質的に変更する可能性のあるいかなる要素も排除するために使用される。従って、「～から実質的になる」というペプチドに関する記述は、そのペプチドの生物活性を実質的に変更する可能性のあるいかなるアミノ酸置換体、付加体、又は欠失体も排除する。

【0130】

さらに、当業者は、上述したように、コードされた配列中の单一アミノ酸、又は複数アミノ酸の少数パーセント割合（典型的には5%未満、より典型的には1%未満）を変更、付加、又は欠失する、個々の置換体、欠失体、又は付加体が、保存的に修飾された変異体であり、それらの変異体では変更の結果として、化学的に同様なアミノ酸によるアミノ酸の置換が起きることを理解するであろう。機能的に同様なアミノ酸を提供する保存的置換の表は、当業者に周知である。以下の6個の群はそれぞれ、互いに保存的置換体となるアミノ酸を含んでいる：

- 1) アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；及び
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

20

【0131】

「単離された」又は「生物学的に純粋な」という表現は、自然状態で正常見られる場合には付随する構成成分を、本質的に又は実質的に含まない物質をさす。従って、本明細書に記載されるペプチドは、インサイチュ環境では正常伴う物質を含まない。典型的には、本明細書に記載された、単離された、免疫原性ペプチドは、銀染色ゲル上のバンド強度により測定して、少なくとも約80%純粋、正常少なくとも約90%、そして好ましくは少なくとも約95%である。

【0132】

タンパク質純度又は均質性は、タンパク質試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動等の、当業者に周知の多くの方法を用いた後、染色時の可視化により表示してもよい。特定の目的のためには、高分解能が必要となるので、HPLC又は精製を行う同様な手段が使用されるであろう。

40

【0133】

免疫原性ペプチドは、その長さが比較的短い（すなわち、約50個未満のアミノ酸）場合には、標準的な化学的ペプチド合成技術により合成されることが多い。

【0134】

固相合成法は、配列のC-末端アミノ酸を不溶性の支持体に付着させた後、順次、配列の残りのアミノ酸を連続して付加させるものであり、本明細書に記載の免疫原性ペプチドを化学合成する好ましい方法である。固相合成する技術は、当業者には既知である。

【0135】

50

代わりに、本明細書に記載の免疫原性ペプチドは、組み換え核酸技術を用いて合成される。これは一般的に、ペプチドをコードする核酸配列を創生し、特定のプロモータの制御下で発現力セット中に核酸を配置し、宿主中にペプチドを発現させ、発現したペプチド又はポリペプチドを単離し、もし必要であれば、ペプチドを再生することを含んでいる。こうした手順を通じて当業者を指導するのに充分な技術は、文献に見出される。

【0136】

組み換えペプチドは、いったん発現すると、硫酸アンモニウム沈殿法、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等の標準的な手順番に従って精製することができる。約50%から95%の均質性の、実質的に純粋な組成物が好ましく、治療剤として使用するには80%から95%又はそれ以上の均質性が非常に好ましい。

10

【0137】

当業者は、化学合成、生物学的発現、又は精製の後、免疫原性ペプチドが、構成ペプチドの本来の立体構造とは実質的に異なる立体構造を有することもあるのを理解するであろう。この場合にはしばしば、抗増殖ペプチドを変性させ還元した後、好ましい立体構造へのリフォールディングをこのペプチドに生じさせる必要がある。たんぱく質の還元、変性、及びリフォールディング誘導の方法は、当業者には周知である。

【0138】

精製タンパク質の抗原性は、例えば、免疫血清、又はタンパク質それ自体に対して産生した抗血清との反応を実証することによって確認してもよい。

【0139】

本明細書で使用される、「a」、「an」、及び「the」という用語は、文脈が不適切でない限り、「一つ又は複数」を意味し複数を含んでいると定義される。

20

【0140】

本明細書で使用される、「検出する」、又は「検出される」という用語は、免疫化学的又は組織学的方法等、生物分子を検出する既知の技術を使用することを意味し、調べている生物分子の存在又は濃度を定性的又は定量的に決定することをさす。

【0141】

「単離される」は、天然には共存している少なくとも幾つかの構成成分を含まない生物分子を意図している。

【0142】

本明細書で使用される、「抗体」若しくは「抗体（複数）」又は「その機能部分」という用語は、当技術分野で認められている用語であり、既知の抗原、具体的には、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリンの免疫学的に活性な部分に結合する、分子又は分子の活性断片、すなわち抗原に免疫特異的に結合する結合部位を含む分子をさすものと理解される。本発明の免疫グロブリンは、(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA、及びIgY)のいずれかのタイプ、若しくは(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)のクラス、又は免疫グロブリン分子のサブクラスであってもよい。

30

【0143】

本発明の範囲では「抗体」には、モノクローナル抗体、ポリクローナル、キメラの、単鎖の、二重特異性の、サル化、ヒト及びヒト化抗体、ラクダ科動物抗体、二価抗体、並びにその機能部分又は活性断片が挙げられる。既知の抗原に結合する分子の活性断片の例は、Fab及びF(ab')<sub>2</sub>断片を含み、Fab免疫グロブリン発現ライブラリーの産生物、並びに上述の抗体及び断片のいずれかのエピトープ結合断片が挙げられる。

40

【0144】

これらの活性断片は、多数の技術による本発明の抗体に由来してもよい。例えば、精製されたモノクローナル抗体は、ペプシン等の酵素で開裂させて、HPLCゲルろ過に付すことができる。Fab断片を含む適切な画分はその後、メンブレンろ過法等により集めて濃縮することができる。抗体の活性断片を単離する一般的な技術のさらなる記載については、例えば、Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, (1986)を見られたい。

50

## 【0145】

「ヒト化抗体」とは、改变抗体のタイプであって、そのCDRは、非ヒトであるドナーの免疫グロブリンに由来し、その分子の、免疫グロブリン由来する残りの部分は、一つ(又は複数)のヒト免疫グロブリンに由来するものをさす。

## 【0146】

ヒト化抗体はさらに、それが有する可変領域において、その一つ又は複数の骨格領域がヒト又は靈長類のアミノ酸を有するものをさすこともある。加えて骨格支持残基が、結合親和性を保存するように改変されていてもよい。「ヒト化抗体」を得る方法は、当業者には周知である(例えば、Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)を見られたい)。

10

## 【0147】

「ヒト化抗体」はまた、親和性成熟したヒト様ポリクローナル抗体の産生を、大きな動物、例えばウサギ等において可能にする新規の遺伝子工学的手法により、得てもよい(<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>)。

## 【0148】

「完全ヒト抗体」、又は「ヒト」抗体という用語は、ヒト抗体遺伝子をもつトランスジェニックマウスに由来する、又はヒト細胞に由来する抗体をさすことを意図している。ヒト免疫系に対しては、しかしながら、「完全ヒト」抗体、「ヒト」抗体、及び「ヒト化」抗体の間にある差異は、無視してもよいか存在せず、従ってこれら三つは、等しい効能と安全性をもつとしてよい。

20

## 【0149】

「モノクローナル抗体」という用語はまた、当技術分野でよく理解されており、実験室で單一クローンから大量に産生され、ただ一つの抗原を認識する抗体をさす。モノクローナル抗体は典型的には、正常短寿命の抗体産生B細胞を、増殖の速い細胞、例えばがん細胞(「不死化」細胞と称されることもある)に融合させることによって作成される。結果として得られるハイブリッド細胞、すなわちハイブリドーマは急速に増殖し、大量の抗体を産生するクローンを創生する。

## 【0150】

「抗原」という用語は、生物体、具体的には動物、さらに具体的にはヒトを含む哺乳動物において、免疫応答を誘導することができる実体又はその断片をさす。この用語は、免疫原と、免疫原性又は抗原決定因子の原因となる領域とを含む。

30

## 【0151】

本明細書に使用されるとおり、「可溶性」という用語は、水溶液に部分的又は完全に溶解したことを意味する。

## 【0152】

また本明細書に使用されるとおり、「免疫原性」という用語は、免疫原性をもつ作用物質に対する、抗体、T細胞、及び他の反応性免疫細胞の産生を誘導し促進させ、ヒト又は動物における免疫応答に寄与する物質をさす。

## 【0153】

免疫応答は、治療しようとする障害を和らげる又は緩和するために投与された、免疫原性をもつ本発明の組成物に対して、充分な抗体、T細胞、及び他の反応性免疫細胞を、個体が産生する場合に生じる。

40

## 【0154】

「ハイブリドーマ」という用語は、当技術分野で認められており、抗体産生細胞と不死化細胞、例えば多発性骨髄腫細胞の融合により産生される細胞をさすことが当業者によって理解されている。このハイブリッド細胞は、抗体を絶え間なく供給することができる。上の「モノクローナル抗体」の定義、及び融合方法のより詳細な記載については以下の実施例を参照されたい。

## 【0155】

本明細書で使用される「担体」という用語は、抗原ペプチド又は超分子コンストラクト

50

を内部に組み込むことができ、又は伴うことができ、それによって抗原ペプチド又はペプチドの部分を、ヒト又は動物の免疫系に提示する又は露出させることができる構造体を意味する。動物又はヒトの治療において適切に使用することのできる、例えば、ベシクル、粒子又は粒子状物質等のいかなる粒子も、本発明の文脈の範囲内で担体として使用してもよい。

【0156】

「担体」という用語はさらに送達の方法も含んでもよく、その場合、抗原ペプチドを含む超分子コンストラクト組成物を、送達機構により所望の部位に輸送してもよい。こうした送達系の一例では、コロイド状の金等のコロイド状金属を使用する。

【0157】

本発明の超分子抗原コンストラクト組成物において使用することのできる担体タンパク質には、マルトース結合ペプチド「M B P」；ウシ血清アルブミン「B S A」；キー・ホーリンペット・ヘモシニアン「K L H」；卵アルブミン；フラジエリン(flagellin)；チログロブリン(thyroglobulin)；あらゆる種類の血清アルブミン；あるゆる種類のガンマグロブリン；同系細胞；I a 抗原をもつ同系細胞；及びD-及び/又はL-アミノ酸のポリマーが挙げられるが、これらには限定されない。

【0158】

さらに、「治療有効量」又は「薬剤有効量」という用語は、ヒト又は動物に投与された場合に、前記ヒト又は動物に治療効果を結果として生じさせるのに充分である結合ペプチドの量をさす。有効量は、当業者により以下の正常の手順番において容易に決定される。

【0159】

「pタウPHF」、「PHF」、及び「らせん状フィラメント」は、本明細書では同義的に用いられ、電子顕微鏡で見ることができる160nm周期のらせん状に巻かれたおよそ10nmのフィラメント対をさす。幅は、10から22nmの間で変化する。PHFは、アルツハイマー病(AD)の神経原線維変性病および糸状構造物における支配的構造体である。PHFはまた、老人斑を伴うジストロフィー性神経突起の、全部ではないがいくつかの中に見られることもある。PHFの主要構成成分は、微小管随伴タンパク質タウの過剰リン酸化形態である。PHFは、ジスルフィド結合した逆並行の過剰リン酸化タウタンパク質から構成される。PHFタウは、そのC-末端のアミノ酸残基20個が欠失していることもある。PHF形成の根底にある機序は確かではないが、タウの過剰リン酸化が、それを微小管から切り離し、タウの可溶性プールを増加させている可能性がある。

【0160】

本発明の範囲内では、本発明の抗原性組成物に対する抗体誘導反応は、おおむねT細胞に依存しないことが実証された。この点に関しては、ヌードマウスモデルを使用し、ヌードマウスにワクチン投与し、抗体反応を測定して、免疫されたヌードマウスにおいて本発明の抗原性組成物により誘導されたA-特異抗体反応を評価した。ヌードマウスは、Foxn1nu変異体をもち、その結果として、適切な胸腺の欠損により低下したT細胞機能を有する。

【0161】

本明細書で使用される「薬剤有効量」とは、治療しようとする疾患、障害若しくは状態、又はそれに伴うあらゆる合併症の症状を治療する、又は少なくとも部分的に停止させるのに適切な、薬剤組成物中の活性成分の用量をさす。

【0162】

本発明は、タウタンパク質の主要な病態ホスホエピトープを認識しそれに結合する結合ペプチドを提供する。具体的には、本発明は、ADを含むタウオパシーにおいてシナプス毒性及び神経毒性の原因となると考えられている、タンパク質タウ上の直線状、立体構造の、単純な、及び複雑なホスホエピトープに対する特異的抗体を提供する。

【0163】

従って、本発明は、一つの実施形態においては、結合ペプチド又はその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその機能部分に関連し、結合ペプチド又

10

20

30

40

50

は抗体は、哺乳動物の、具体的にはヒトのタウタンパク質又はその断片上のホスホエピトープを認識しそれに特異的に結合し、具体的には病態タンパク質タウコンフォーマーに結合するが、一実施形態では、関連する非リン酸化エピトープ及び/又は非関連エピトープには結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、高い結合親和性を有し、少なくとも10nMの、具体的には少なくとも8nMの、具体的には少なくとも5nMの、具体的には少なくとも2nMの、具体的には少なくとも1nMの、具体的には少なくとも500pMの、具体的には少なくとも400pMの、具体的には少なくとも300pMの、具体的には少なくとも200pMの、具体的には少なくとも100pMの、具体的には少なくとも50pMの解離定数を伴う。

## 【0164】

10

本明細書で使用される「可溶性タウ」タンパク質は、完全に可溶化したタウタンパク質/ペプチドモノマーからなる、又はタウ様ペプチド/タンパク質からなる、又は修飾された若しくは切断型タウペプチド/タンパク質からなる、又はタウペプチド/タンパク質モノマーの他の由来物からなるタンパク質と、タウタンパク質オリゴマーからなるタンパク質との、両方からなるタンパク質をさす。「可溶性タウ」は、具体的には神経原線維変化病(NFT)を除外する。

## 【0165】

本明細書で使用される「不溶性タウ」は、タウペプチド若しくはタンパク質の、又はタウ様ペプチド/タンパク質の、又は修飾された若しくは切断型タウペプチド/タンパク質の、又はタウペプチド/タンパク質の他の由来物の、多数の凝集モノマーであって、インビトロでは水性媒質においても、インビボでは哺乳動物又はヒトの体、より具体的には脳においても、どちらでも不溶性であるオリゴマー又はポリマー構造を形成するモノマーを、しかし具体的には、哺乳動物の又はヒトの体において、具体的には脳においてそれぞれ不溶性である、タウの、若しくは修飾された若しくは切断型タウペプチド/タンパク質の、又はその誘導体の、多数の凝集モノマーをさす。「不溶性タウ」は、具体的には「神経原線維変化病(NFT)」を含む。

20

## 【0166】

本明細書で使用される「モノマーのタウ」又は「タウモノマー」は、凝集した複合体を伴わずに水性媒質に完全に可溶化したタウタンパク質をさす。

## 【0167】

30

「凝集タウ」、「オリゴマーのタウ」及び「タウオリゴマー」は、タウペプチド若しくはタンパク質の、又はタウ様ペプチド/タンパク質の、又は修飾された若しくは切断型タウペプチド/タンパク質の、又はタウペプチド/タンパク質の他の由来物の、多数の凝集モノマーであって、インビトロでは水性媒質においても、インビボでは哺乳動物又はヒトの体、より具体的には脳においても、どちらでも不溶性又は可溶性であるオリゴマー又はポリマー構造を形成するモノマーを、しかし具体的には、哺乳動物の又はヒトの体において、具体的には脳においてそれぞれ不溶性又は可溶性である、タウの、若しくは修飾された若しくは切断型タウペプチド/タンパク質の、又はその誘導体の、多数の凝集モノマーをさす。

## 【0168】

40

「調節抗体」とは、本明細書において多様な実施形態に記載される抗体又はその機能断片をさし、抗体又はその機能断片は、可溶性及び/若しくは不溶性及び/若しくはオリゴマーのタウタンパク質の、具体的には可溶性リン酸化タウタンパク質の、機能的性質、生物活性、又はレベルを、インビボで、具体的には、可溶性タウタンパク質及び/又は可溶性リン酸化タウタンパク質のレベルが増加した動物、具体的には、哺乳動物又はヒトの、脳、具体的には、大脳皮質及び/又は海馬において、上方制御する(例えば、活性化する又は刺激する)、下方制御する(例えば、阻害する又は抑制する)又はそうでなければ変化させる、のいずれかであることもある。調節抗体又はその機能断片が作用して、タウタンパク質、又は前記タウタンパク質をコードするポリペプチドを、直接的に又は間接的に、のいずれかにより調節することもある。特定の実施形態では、調節抗体又はその機能断

50

片は、可溶性及び／又は不溶性及び／又はオリゴマーの、具体的には可溶性及び不溶性タウタンパク質、具体的には可溶性及び不溶性及びオリゴマーのタウタンパク質のレベルを減少させる。一態様では、可溶性の及び／又は不溶性の及び／又はオリゴマーのタウタンパク質は、リン酸化タウタンパク質、具体的には、動物の、具体的には、タウタンパク質及び／又はリン酸化タウタンパク質、具体的には、可溶性タウタンパク質及び／又は可溶性リン酸化タウタンパク質の増加した哺乳動物又はヒトの、脳、具体的には大脳皮質及び／又は海馬における、可溶性リン酸化タウタンパク質である。

【0169】

一実施形態では、本発明は、本明細書において記載され特許請求される実施形態のいずれか一つの、結合ペプチド若しくはその機能部分、具体的には抗体、具体的にはモノクローナル抗体若しくはその機能部分、若しくは前記結合ペプチド若しくは抗体をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド、又はその組み合わせを、薬剤有効量で、薬剤的に許容できる担体とともに含む薬剤組成物を提供する。

【0170】

適切な薬剤担体、希釈剤及び／又は賦形剤は、当技術分野で周知であり、例えば、リン酸塩緩衝食塩水、水、油／水エマルジョン等のエマルジョン、多様なタイプの湿潤剤、滅菌溶液等が挙げられる。

【0171】

抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む、本発明の結合ペプチドは、生理的に許容できる製剤に調製することができ、既知の技術を用いた、薬剤的に許容できる担体、希釈剤及び／又は賦形剤を含んでいてもよい。例えば、機能的に等価なあらゆる結合ペプチド又はその機能部分を、具体的には、機能的に等価なあらゆる抗体又はその機能部分を含む本発明のモノクローナル抗体を含む、本明細書に記載の本発明の結合ペプチドを、薬剤的に許容できる担体、希釈剤／又は賦形剤と組み合わせて、治療組成物を形成する。適切な薬剤担体、希釈剤及び／又は賦形剤は、当技術分野では周知であり、例えば、リン酸塩緩衝食塩水、水、油／水エマルジョン等のエマルジョン、多様なタイプの湿潤剤、滅菌溶液等が挙げられる。

【0172】

本発明の薬剤組成物の製剤は、当業者に既知の標準的な方法に従って遂行することができる。

【0173】

本発明の組成物は、固体、液体、又はエアロゾルの形態で、適切な薬剤有効用量で、対象に投与してもよい。固体組成物の例には、錠剤、クリーム、及び移植可能な投与ユニットが挙げられる。錠剤は、経口投与してもよい。治療クリームは局所投与してもよい。移植可能な投与ユニットは、限局的に、例えば、腫瘍部位に投与してもよく、又は移植して治療組成物を系統的に皮下に放出してもよい。液体組成物の例には、筋肉内、皮下、静脈内、動脈内への注射に適応させた製剤、並びに局所的に及び眼内に投与する製剤が挙げられる。エアロゾル製剤の例には、肺投与のための吸入製剤が挙げられる。

【0174】

組成物は、標準的な投与経路により投与してもよい。概して、組成物は、局所的、経口的、直腸内の、経鼻的、皮内の、腹腔内の、非経口的(例えば、静脈内、皮下、筋肉内)経路で投与してもよい。

【0175】

加えて、組成物は、生物分解性ポリマー、すなわち送達が望まれる場所の近傍、例えば腫瘍部位に移植されたポリマー等の持続放出マトリクスに組み込んでもよい。方法には、単回投与、予定の時間間隔での反復投与、及び所定の期間の持続投与が挙げられる。

【0176】

持続性放出マトリクスは、本明細書で使用されるとおり、酵素による若しくは酸／塩基による加水分解、又は溶解により分解される物質、正常はポリマーで作られたマトリクスである。マトリクスは、ひとたび体内に挿入されると、酵素及び体液の作用を受ける。持

10

20

30

40

50

続性放出マトリクスは、リポソーム、ポリ乳酸 (polylactide) (ポリ乳酸 (polylactide acid))、ポリグリコール酸(グリコール酸のポリマー)、ポリ乳酸コグリコール酸(乳酸とグリコール酸のコポリマー)、ポリ無水物、ポリ(オルト)エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、コンドロイチン乳酸、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、多糖類、核酸、ポリアミノ酸、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシン等のアミノ酸、ポリヌクレオチド、ポリビニルプロピルレン、ポリビニルピロリドン、及びシリコーン等の、生体適合性のある物質から選択されるのが望ましい。好ましい生体適合性のあるマトリクスは、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、又はポリ乳酸コグリコール乳酸(乳酸とグリコール酸のコポリマー)のいずれかのうち一つのマトリクスである。

【0177】

10

組成物の投与は、多様な因子、例えば、治療している状態、使用する具体的な組成物、並びに、患者の体重、大きさ、性別、総合的な健康状態、体表面積、投与しようとする具体的な化合物又は組成物、同時に投与する他の薬物、及び投与経路等の他の臨床因子に依存することは、関連技術の業者には周知である。

【0178】

本発明の組成物は、アミロイド、又はアルツハイマー病に関するアミロイドタンパク質等のアミロイド様タンパク質を伴う一群の疾患及び障害である、タウオパシーの及び/又はアミロイドーシスの薬物療法において使用する既知の化合物等の生物活性をもつ物質又は化合物を含む、他の組成物と組み合わせて投与してもよい。

【0179】

20

他の生物学的活性な物質又は化合物は、本発明の治療ワクチンと同一若しくは同様な機序により、又は無関係の作用機序により、又は関連する及び/若しくは無関係の多くの作用機序により、その生物学的效果を発揮することもある。

【0180】

概して、他の生物学的活性な化合物は、中性子透過増強剤 (neutron-transmission enhancer)、精神治療薬、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、カルシウムチャネル遮断薬、生体アミン、ベンゾジアゼピン精神安定剤、アセチルコリン合成 (acetylcholine synthesis)、ストレージ又はリリースエンハンサー (storage or release enhancer)、アセチルコリン後シナプス受容体作動薬 (acetylcholine postsynaptic receptor agonist)、モノアミンオキシダーゼ - A 又は B 阻害剤、N - メチル - D - アスパルテートグルタミン酸受容体拮抗剤、非ステロイド系抗炎症薬、抗酸化剤、及びセロトニン受容体を含んでよい。

30

【0181】

具体的には、生物学的活性な薬剤又は化合物は、酸化ストレスに対抗する化合物、抗アポトーシス性化合物、金属キレート剤、ビレンゼピン及び代謝物質等のDNA修復の阻害剤、3 - アミノ - 1 - プロパンスルホン酸 (3APS)、1, 3 - プロパンニスルホン酸塩 (1, 3PDS)、セクレターゼ活性化剤、[ベータ] - 及び7セクレターゼ阻害剤、タウタンパク質、神経伝達物質、/3 - シートブレイカ - 、抗炎症分子、例えばクロザピン、ジプラジドン、リスペリドン、アリピラゾール若しくはオランザピン等の「非定型抗精神病薬」、又はタクリン、リバスチグミン、ドネペジル、及び/若しくはガランタミン等のコリンエステラーゼ阻害剤 (ChEI)、並びにビタミンB12、システイン、アセチルコリン前駆体、レシチン、コリン、銀杏、アセチル - L - カルニチン、イデベノン、プロペントフィリン、若しくはキサンチン誘導体等の他の薬物及び栄養補助剤、からなる群から選択される、少なくとも一つの化合物を、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む本発明の結合ペプチド、及び、随意に、薬剤的に許容できる担体及び/又は希釈剤及び/又は賦形剤、並びに疾患を治療するための説明書とともに含んでよい。

40

【0182】

さらなる実施形態では、本発明の組成物は、ナイアシン又はメマンチンを、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片、並びに、随意に、薬剤的に許容できる担体

50

及び／又は希釈剤及び／又は賦形剤を含む、本発明の結合ペプチドとともに含んでいてもよい。

【0183】

本発明のさらなる実施形態では、幻覚、妄想、思考障害(顕著な思考散乱、脱線、脱線思考によって表される)、及び奇妙な又は混乱した振る舞い、並びに快感喪失、平坦な情動、感情鈍麻、及び引きこもりを含む、陽性又は陰性の精神病症状を治療する、例えばクロザピン、ジプラジドン、リスペリドン、アリピプラゾール又はオランザピン等の「非定型抗精神病薬」を、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片、並びに、随意に、薬剤的に許容できる担体及び／又は希釈剤及び／又は賦形剤を含む本発明の結合ペプチドとともに含む、組成物を提供する。

10

【0184】

本発明の結合ペプチドに加えて、組成物で適切に使用できる他の化合物は、例えば国際公開第2004/058258号に開示されているもの(具体的には16頁と17頁を見たい)であり、それらには、治療薬物標的(36頁～39頁)、アルカンスルホン酸及びアルカノール硫酸(39頁～51頁)、コリンセステラーゼ阻害剤(51頁～56頁)、NMDA受容体拮抗薬(56頁～58頁)、エストロゲン(58頁～59頁)、非ステロイド系抗炎症薬(60頁～61頁)、抗酸化剤(61頁～62頁)、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)拮抗薬(63頁～67頁)、コレステロール降下剤(68頁～75頁)；アミロイド阻害剤(75頁～77頁)、アミロイド形成阻害剤(77頁～78頁)、金属キレート剤(78頁～79頁)、抗精神薬及び抗うつ剤(80頁～82頁)、栄養補助剤(83頁～89頁)、及び脳内で生物学的に活性な物質の効用を増加させる化合物(89頁～93頁を参照されたい)、並びにプロドラッグ(93頁～94頁)が挙げられ、その文書は、参照により本明細書に組み込まれるが、しかし、特に、その頁で言及される化合物を上に示す。

20

【0185】

タンパク質性の薬剤活性物質が、単位用量あたり1ngと10mgの間の量で存在してもよい。概して、投与レジームは、本発明の抗体0.1μgと10mgの間の範囲内の、本発明の抗体、具体的には1.0μg～1.0mgの範囲内、及びさらに具体的には1.0μg～100μgの範囲内であるべきであり、それらの範囲に収まるそれぞれの数字全部もまた、本発明の一部である。もし投与が、連続的な注入を通じて生じるならば、さらに適切な用量は、1時間当たり、体重1キログラムあたり0.01μgと10mg単位の間の範囲内にあってもよく、それらの範囲に収まるそれぞれの数字全部もまた、本発明の一部である。

30

【0186】

投与は、概して非経口的、例えば静脈内又は皮下になされるであろう。非経口投与のための調製物には、滅菌された水溶液又は非水溶液、懸濁液、及びエマルジョンが挙げられる。非水性溶媒には、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、オリーブ油等の植物油、及びオレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルが挙げられるが、これらには限定されない。水性溶媒は、水、アルコール／水溶液、食塩水及び緩衝媒体を含むエマルジョン又は懸濁液からなる群から選択してもよい。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖、ブドウ糖と塩化ナトリウム、乳酸リンゲル、又は不揮発性油が挙げられる。静脈内ビヒクルには、流体と栄養素の補充剤、電解質の補充剤(リンゲルブドウ糖を用いたもの等)及びその他が挙げられる。保存剤もまた存在してもよく、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス等が挙げられる。

40

【0187】

薬剤組成物はさらに、例えば、血清アルブミン又は免疫グロブリン、具体的にはヒト由来のもの等の、タンパク質性の担体を含んでいてもよい。さらに生物学的に活性な薬剤が、その意図された使用に応じて、本発明の薬剤組成物中に存在してもよい。

【0188】

結合標的が脳内に位置している場合には、本発明の特定の実施形態は、脳血液閥門を通

50

過する、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む、本発明の結合ペプチドを提供する。特定の神経変性疾患は、抗体、具体的にはモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明の結合ペプチドが容易に脳に取り込まれるような、脳血液関門の浸透性の増加と関連している。脳血液関門が無傷のままである場合には、そこを越えて分子を輸送する、当技術分野で知られたアプローチが存在し、それらには、物理的方法、脂質を用いる方法、及び、受容体とチャネルに基づく方法が挙げられるが、これらには限定されない。

#### 【0189】

抗体、具体的にはモノクローナル抗体、又はその活性断片を含む本発明の結合ペプチドを、脳血液関門を越えて輸送する物理的方法には、脳血液関門を完全に迂回するもの、又は脳血液関門に開口を創生することによるものが挙げられるが、これらには限定されない。迂回方法には、脳内への直接注射（例えば、Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)を見られたい）、及び脳内への送達デバイスの移植（例えば、Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003)；およびGliadel Wafers(TM), Guildford Pharmaceuticalを見られたい）が挙げられるが、これらには限定されない。関門に開口を創生する方法には、超音波（例えば、米国特許出願公開第2002/0038086号を見られたい）、浸透圧（例えば、高膨性マンニトールの投与(Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989))、例えば、プラジキン又は透過剤A-7による透過処理（例えば、米国特許第5,112,596号、同第5,268,164号、同第5,506,206号、及び同5,686,416号を見られたい）、及び、結合ペプチド又は抗原結合断片をコードする遺伝子を含むベクターを用いた、脳血液関門をまたぐニューロンの移入（例えば、米国特許出願公開第2003/0083299号を見られたい）が挙げられるが、これらには限定されない。

#### 【0190】

抗体、具体的にはモノクローナル抗体、又はその活性断片を含む、本発明の結合ペプチドを、脳血液関門を越えて輸送する、脂質を用いる方法には、抗体、具体的にはモノクローナル抗体、又はその活性断片を含む本発明の結合ペプチドをリポソームに封入し、リポソームをその活性断片に結合させ、活性断片を、脳血液関門の血管内皮上の受容体に結合させること（例えば、米国特許出願公開第20020025313号を見られたい）、及び、抗体、具体的にはモノクローナル抗体、又はその活性断片を含む本発明の結合ペプチドを、低濃度リポプロテイン粒子（例えば、米国特許出願公開第20040204354号を見られたい）、又はアポリポプロテインE（例えば、米国特許出願公開第20040131692号を見られたい）中に被覆することが挙げられるが、これらには限定されない。

#### 【0191】

抗体、具体的にはモノクローナル抗体、又はその活性断片を含む、本発明の結合ペプチドを、脳血液関門を越えて輸送する、受容体とチャネルに基づく方法には、グルココルチコイド遮断薬を用いて脳血液関門の透過性を増加させること（例えば、米国特許出願公開第2002/0065259号、同第2003/0162695号、及び同第2005/0124533号を見られたい）；カリウムチャンネルを活性化させること（例えば、米国特許出願公開第2005/0089473号）、ABC薬物トランスポーターを阻害すること（例えば、米国特許出願公開第2003/0073713号を見られたい）；抗体をトランスフェリンで被覆し、一つ又は複数のトランスフェリン受容体の活性を調節すること（例えば、米国特許出願公開第2003/0129186号）、及び抗体のカチオン化（例えば、米国特許第5,004,697号を見られたい）が挙げられるが、これらには限定されない。

#### 【0192】

抗体、具体的にはモノクローナル抗体、又はその活性断片を含む、本発明の結合ペプチド、又は本発明の薬剤組成物の単回又は反復投与を、対象に長期間にわたって提供しても

10

20

30

40

50

よい。投与の期間は、1週間から12ヶ月まで、またはそれ以上であってもよい。この期間中、結合ペプチド、抗体又は薬剤組成物は、1週間に1回、2週間、3週間、4週間に1回等、又は治療される対象の必要に応じてさらに高い若しくは低い頻度で投与してもよい。

【0193】

さらなる実施形態では、本発明は、タウタンパク質随伴疾患、障害、又は状態を検出及び診断する方法及びキットを提供し、タウタンパク質随伴疾患、障害、又は状態には、アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病、パンチドランカー、ダウン症候群、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、封入体筋炎、及びプリオンタンパク質脳アミロイド血管症を含むが、これらには限定されない、タウ及びアミロイド両方の病態を発現する疾患又は障害を含む神経変性疾患又は障害と、外傷性脳損傷と、筋萎縮性側索硬化症／グアム島パーキンソン痴呆症候群、神経原線維変化病を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハーラーフォルデン・シュバッツ病、多系統萎縮症、ニーマン・ピック病、C型、淡蒼球・橋脳・黒質退行変性、ピック病、進行性皮質下膠質症、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維型老年認知症、脳炎後パーキンソン症候群、及び筋強直性ジストロフィー含むが、これらには限定されない、明瞭なアミロイド病態を示さないさらなる疾患又は障害との、異種の群を含むタウオパシー等の神経変性の疾患又は障害が挙げられる。病態異常性は、神経原線維病変の形成、すなわちタウオパシーにおける主要な脳病態に起因する、又は関連することもある。

【0194】

さらに、本発明は、タウとアミロイドの両方の病態を共発現する疾患若しくは障害を含む神経変性疾患若しくは障害の異種の群を含むタウオパシー等の、神経変性疾患若しくは障害を含む、タウタンパク質随伴疾患、障害、若しくは状態の素因を診断する、又は、患者における微小残存病変を監視する、又は、抗体、具体的には、モノクローナル抗体、及びその活性断片を含む本発明の結合ペプチド、若しくは本明細書に記載の本発明の組成物を用いた治療に対する患者の反応性を予測する、方法及びキットを提供する。これらの方法には、生体試料において、又はインサイチュ条件において、物質を検出又は定量するのに一般に使用される既知の免疫学的方法が挙げられる。

【0195】

タウとアミロイドの両方の病態を発現する疾患又は障害を含む、神経変性の疾患又は障害の異質な群を含むタウオパシー等の、神経変性の疾患又は障害を含む、診断の必要な対象、具体的には哺乳動物、さらに具体的にはヒトにおけるタウタンパク質随伴疾患若しくは状態、又はタウタンパク質随伴疾患若しくは状態の素因の診断は、タウタンパク質のエピトープへの、本発明の結合ペプチドの、具体的には抗体の、具体的にはモノクローナル抗体又はその活性断片の免疫特異的結合を、試料において又はインサイチュで、検出することにより達成してもよく、それには、タウタンパク質を含むと疑われる試料又は体の特定部分若しくは体の面積を、タウタンパク質のエピトープに結合する抗体に接触させ、抗体をタウタンパク質に結合させて免疫複合体を形成させ、免疫複合体の形成を検出し、免疫複合体の存在又は非存在を、試料又は体の特定部分若しくは面積におけるタウタンパク質の存在又は非存在に関連づけ、随意に、免疫複合体の量を対照正常値と比較することを含み、対照正常値と比較した免疫複合体の量の増加は、対象がタウタンパク質随伴疾患若しくは状態を患っている又はその発症のリスクがあることを示している。

【0196】

抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む本発明の結合ペプチド、又は本発明の組成物を用いた治療の後での、対象、具体的には哺乳動物、さらに具体的にはヒトにおける微小残存病変の監視は、タウタンパク質のエピトープへの、本発明の結合ペプチド、具体的には抗体の、具体的にはモノクローナル抗体又はその活性断片の免疫特異的結合を、試料中において又はインサイチュで、検出することにより達成してもよく、

10

20

30

40

50

それには、タウタンパク質を含むと疑われる試料又は体の特定部分若しくは体の面積を、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含みタウタンパク質のエピトープに結合する、本発明の結合ペプチドに接触させ、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む結合ペプチドを、タウタンパク質に結合させて免疫複合体を形成させ、免疫複合体の形成を検出し、免疫複合体の存在又は非存在を、試料又は体の特定部分若しくは面積におけるタウタンパク質の存在又は非存在に関連づけ、隨意に、前記免疫複合体の量を対照正常値と比較することを含み、対照正常値と比較した前記免疫複合体の量の増加は、対象が微小残存病変を依然として患っていることを示している。

【0197】

抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む、本発明の結合ペプチド、又は本発明の組成物を用いた治療に対する、対象、具体的には哺乳動物、さらに具体的にはヒトの反応性を予測することは、タウタンパク質のエピトープへの、結合ペプチドの、具体的にはモノクローナル抗体又はその活性断片の免疫特異的結合を、試料において又はインサイチュで、検出することにより達成してもよく、それには、タウタンパク質を含むと疑われる試料又は体の特定部分若しくは体の面積を、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含みタウタンパク質のエピトープに結合する、本発明の結合ペプチドに接触させ、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む結合ペプチドをタウタンパク質に結合させて免疫複合体を形成させ、免疫複合体の形成を検出し、免疫複合体の存在又は非存在を、試料又は体の特定部分若しくは面積におけるタウタンパク質の存在又は非存在に関連づけ、隨意に、前記免疫複合体の治療開始の前後での量を比較することを含み、前記免疫複合体の量の減少は、治療に対する前記患者の有する反応性の潜在能力が高いことを示している。

10

20

30

【0198】

タウとアミロイドの両方の病態を発現する疾患又は障害を含む、神経変性の疾患又は障害の異質な群を含むタウオパシー等の神経変性の疾患又は障害を含む、タウタンパク質随伴疾患若しくは状態状態の素因を診断するために、又は、患者における微小残存病変を監視するために、又は、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む本発明の結合ペプチド、又は本明細書に記載の本発明の組成物を用いた治療に対する患者の反応性を予測するために、タウタンパク質随伴疾患又は状態の診断において使用してもよい生物学的試料は、例えば、血清、血漿、唾液、胃液分泌、粘液、脳脊髄液、リンパ液等の流体、又は、神経の、脳の、心臓の、血管の組織等の、生物から得られる組織又は細胞の試料である。試料中のタウタンパク質の存在又は非存在を定量するには、当業者に既知のあらゆるイムノアッセイを使用してもよく、例えば、検出用の二次試薬を用いる間接検法を使用するアッセイ、E L I S A、免疫沈降法、及び凝集アッセイ等がある。これらのアッセイの詳細な記載は、例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612、Maertens and Stuyver, Zrein et al. (1998)の国際公開第96/13590号、及び国際公開第96/29605号から得られる。

【0199】

インサイチュ診断のためには、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む、本発明の結合ペプチド、又はそのあらゆる活性及び機能部分を、診断される生物体に、例えば、静脈内、皮下、鼻腔内、腹腔内、脳内、動脈内への注射等の、当技術分野で既知の方法により投与してもよく、それにより、本発明の抗体とアミロイドタンパク質上のエピトープ領域との特異的結合が生じてもよい。結合ペプチド/抗原複合体は、抗体、具体的にはモノクローナル抗体、又はその機能断片を含む、本発明の結合ペプチドに付着する標識、又は当技術分野で既知の他のあらゆる検出方法を通じて検出するのが好都合なこともある。

40

【0200】

診断的応用、すなわち、タウとアミロイドの両方の病態を発現する疾患又は障害を含む、神経変性の疾患又は障害の異質な群を含むタウオパシー等の神経変性の疾患又は障害を

50

含む、タウタンパク質隨伴疾患若しくは状態の素因を診断する、又は、患者における微小残存病変を監視する、又は、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む本発明の結合ペプチド、若しくは本明細書に記載の本発明の組成物を用いた治療に対する患者の反応性を予測する応用において使用されるイムノアッセイは、典型的には、標識された、抗原、結合ペプチド、又は検出用の二次試薬に依存している。これらのタンパク質、又は試薬は、当業者に概して既知の化合物で標識してもよく、化合物には、酵素、放射性同位元素、並びに蛍光を発する、発光する、及び色素を生成する物質が挙げられ、物質には、コロイド状金及びラテックスピーズ等の着色粒子が挙げられるがこれらには限定されない。これらのうち、放射性標識は、ほとんどすべてのタイプのアッセイで多くの変形を伴って使用することができる。酵素に結合させた標識は、放射能を避けなければならない場合、又は結果をすぐに得たい場合にとりわけ役に立つ。蛍光色素は、その使用には高価な機器が必要ではあるが、非常に高感度な検出方法である。これらのアッセイで役立つ結合ペプチドは、本明細書に開示、特許請求されるものであり、それらには、抗体、具体的にはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、及びアフィニティー精製したポリクローナル抗体が挙げられる。

#### 【0201】

代りに、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む、本発明の結合ペプチドを、タンパク質A若しくはG又は二次抗体等の、免疫グロブリンに対する親和性を有する標識された物質との反応により、間接的に標識してもよい。抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む、本発明の結合ペプチドを、第2の物質に結合させ、抗体に結合した第2の物質に親和性を有する、標識された第3の物質で検出してもよい。例えば、抗体、具体的にはモノクローナル抗体及びその活性断片を含む、本発明の結合ペプチドを、ビオチンに結合させて、結合ペプチド/ビオチン結合体を、標識されたアビジン又はストプトアタビジンを用いて検出してもよい。同様に、結合ペプチドを、ハプテンに結合させて、結合ペプチド/ハプテン結合体を、標識された抗ハプテン結合ペプチドを用いて検出してもよい。

#### 【0202】

当業者は、本発明に従って適用することのできる、これらの及び他の適切な標識について知るであろう。結合ペプチド又はその断片へのこれらの標識の結合は、当業者に周知の標準的な技術を用いて実行することができる。典型的な技術は、Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31), and Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim Acta 57:1-40)に記載されている。以下に言及するカップリング技術は、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸塩法、ジマレイミド法、その他であり、すべて、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0203】

現在のイムノアッセイは、分析物の存在を検出する二重抗体法を使用し、その場合、抗体は、検出可能な標識すでに標識されている二次抗体との反応性により、間接的に標識される。二次抗体は、モノクローナル抗体が由来するもとの動物の抗体に結合するものであるのが好ましい。換言すれば、もし、モノクローナル抗体が、マウス抗体であるなら、その場合、標識された二次抗体は、抗マウス抗体である。本明細書に記載のアッセイにおいて使用される抗体については、この標識は、抗体結合ビーズ、具体的には磁気ビーズであるのが好ましい。本明細書に記載のイムノアッセイにおいて適用される抗体については、標識は、放射性の、蛍光を発する、又は電気化学発光する物質等の、検出可能な分子であるのが好ましい。

#### 【0204】

代りの二重抗体系は、分析物の存在を高速定量するのに適合しているので、しばしば高速フォーマット (fast format) 系と称され、本発明の範囲内でも使用してもよい。この系は、抗体と分析物との間に高い親和性が必要である。本発明の一実施形態によれば、アミロイドタンパク質の存在は、一対の抗体を用いて定量され、それぞれアミロイドタンパク質に特異的である。前記一対の抗体の一つは、本明細書では「ディテクター (detect

10

20

30

40

50

or) 抗体」と称し、前記一対の抗体のもう一つを「キャプチャー(capture)抗体」と称する。本発明のモノクローナル抗体は、キャプチャー抗体又はディテクター抗体のどちらかとして使用することができる。本発明のモノクローナル抗体はまた、単一アッセイにおいて、キャプチャー及びディテクターの両方としても使用することができる。本発明の一実施形態はこのように、二重抗体によるサンドイッチ法を使用して、生物学的流体の試料中にアミロイドタンパク質を検出する。この方法では、分析物(アミロイドタンパク質)は、ディテクター抗体とキャプチャー抗体の間に挟まみこまれ、キャプチャー抗体は、不可逆的に固体支持体上に固定化される。ディテクター抗体は、抗体-分析物サンドイッチの存在、従って分析物の存在を同定するために、検出可能な標識を含む可能性がある。

## 【0205】

10

例示的な固相物質には、ラジオイムノアッセイ、及び酵素イムノアッセイの分野で周知の、マイクロタイタープレート、ポリスチレン製テストチューブ、磁性のプラスチック製又はガラス製のビーズ、及びスライドが挙げられるが、これらには限定されない。抗体を固相に結合させる方法もまた、当業者には周知である。さらに最近では、ナイロン、ニトロセルロース、セルロースアセテート、グラスファイバー、及び他の多孔性ポリマー等の多くの多孔性物質が、固体支持体として使用されている。

## 【0206】

本発明はまた、上に定義された組成物を含む、生物学的試料中のタウタンパク質を検出する診断キットに関連する。さらに、本発明は、上に定義された組成物に加えて、上に定義された検出試薬も含む最近の診断キットに関連する。「診断キット」という用語は概ね、当技術分野で既知のあらゆるキットをさす。より具体的は、最近の用語は、Zrein et al. (1998)に記載の診断キットをさす。

20

## 【0207】

本発明のさらに他の目的は、タウタンパク質随伴疾患及び状態を検出し診断する、本発明の結合ペプチドを含む新規の免疫プローブ及び試験キットを提供することである。免疫プローブの目的には、結合ペプチドは、適切なリポーター分子、例えば、酵素、又は放射性核種に、直接的又は間接的に付着する。試験キットは、本発明の一つ又は複数の結合ペプチドを保持する容器と、タウ抗原を結合させて免疫複合体を形成させ、免疫複合体の存在を検出して、免疫複合体の存在又は非存在をタウタンパクの存在又は非存在に関連づけるようにするのを目的として結合ペプチドを使用するための説明書とを含む。

30

## 【実施例1】

## 【0208】

## ハイブリドーマ及び抗体の生成とスクリーニング

この研究の目的は、抗タウmAbs(モノクローナル抗体)を生成してスクリーニングすることであった。ハイブリドーマを、タウワクチン免疫化マウス脾臓細胞と骨髄腫細胞株との融合により生成した。ハイブリドーマを、ワクチン調製に使用したリン酸化及び非リン酸化タウ抗原ペプチドだけでなく、リン酸化及び非リン酸化の両方の完全長タウタンパク質に対する反応性について評価した。ハイブリドーマのスクリーニングもまた、タウタングルに対するハイブリドーマ上清の反応性について、タウトランスジェニックマウス脳切片上での免疫化学を用いて実行した。

40

## 【0209】

## 1.1 方法

## 1.1.1 融合

ハイブリドーマの產生には、ACI-35(タウ393-408 [pS396, pS404])をワクチン投与した野生型C57BL/6マウスを用いた。マウスを、0日目に、その後、再び4日目に、ACI-35ワクチンを用いて追加免疫し、融合を7日目に実行した。

## 【0210】

免疫マウスからの $6 \times 10^7$ 個(ACI-35)の脾細胞を、 $2 \times 10^7$ 個のSP2-O-Ag14骨髄腫細胞と、脾細胞3個/骨髄腫細胞1個の比率で融合させた。

50

## 【0211】

融合は、8×96ウェルプレート中で生じ、クローンを、プレート(1～8)、さらに列(A～G)、最後に行(1～12)に従って命名した。

## 【0212】

## 1.1.2 クローンを選択するスクリーニング

8×96ウェルプレートをまず、IgGに発現に関して2回、スクリーニングした。陽性発現するクローンをその後、24ウェルプレートに移し、増殖細胞の細胞上清(=クローン)を、タウELISAスクリーン、及び免疫組織学的TAUPIRスクリーンにおいて試験した。ELISA及び/又はTAUPIRでの陽性の上清をT25フラスコに移して、クローンを再び、タウELISAスクリーン及びTAUPIRスクリーンにおいて、IgG発現に関してスクリーニングした。

10

## 【0213】

## 1.1.3 IgGスクリーン

ELISAプレート(Costar;シグマ社(Sigma))を、コーティング緩衝液中の50μl/ウェルの抗マウスIgG抗体(AbDセロテック社(ABD Serotec)、ドイツ、デュッセルドルフ)で、16時間4でコーティングした。プレートをPBS/Tweenで洗浄した後、ウェルを、100μl/ウェルのブロッキング溶液で1時間、外界温度でブロッキング処理した。希釈しないハイブリドーマ上清(1ウェルあたり50μl)を、1時間、外界温度でインキュベートした。洗浄の後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合抗マウスIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、又はIgM(ABDセロテック社)の混合物を、1時間、外界温度で塗布した。最終洗浄の後、HRP基質(TMB;3-3',5,5'-テトラメチルベンジジン)を用いて検出を実行し、プレートを405nmで、マイクロプレートリーダーを用いて読み取った。結果は、光学濃度(O.D.)で表現する。

20

## 【0214】

## 1.1.4 ハイブリドーマタウELISAスクリーン

ハイブリドーマELISAスクリーンを、タウペプチド(ACI-35、T3.5:タウ393-408[PS396/PS404;ポリペプチドラボラトリーズ(Poly Peptide Laboratories)、デンマーク、ヒレレズ)、対応する非リン酸化タウペプチド(T3.6:タウ393-408、ポリペプチドラボラトリーズ)、リン酸化完全長(441aa)タウタンパク質(pタウタンパク質、Vandebroek et al., 2005)、及び完全長(441aa)タウタンパク質(タウタンパク質、シグマケム社(SignalChem)、カナダ、リッチモンド)上で実行した。最後に、ウシ血清アルブミン( BSA)を、陰性対照として用いた。

30

## 【0215】

プレートを、10μg/mlの対応するタウペプチド、及び1μg/mlの対応するタウタンパク質を用いて一晩、4でコーティングした。各ウェルを、PBS-0.05%のTween 20で洗浄し、PBS-0.05%のTween 20中、1%のBSAでブロッキング処理した後、希釈しないハイブリドーマ上清又は培地の陰性対照をプレートに加えて、37で2時間、インキュベートした。洗浄の後、プレートをアルカリホスファターゼ(AP)結合抗マウスIgG総抗体(ジャクソンラボラトリーズ(Jackson Laboratories)、米国、ペンシルベニア州、ボルチモア)で2時間、37でインキュベートした。洗浄の後、プレートをpNPP(パラニトロフェニルリン酸塩)、すなわちAPに対するホスファターゼ基質でインキュベートし、405nmで、ELISAプレートリーダーを用いて読み取った。結果を、O.D.(光学濃度)として表現する。

40

## 【0216】

## 1.1.5 ハイブリドーマIHCスクリーン:トランスジェニックマウス(TAUPIR)からの脳断片における抗タウ抗体の変化病への結合

TAUPIR実験を、実施例3.1.2.からのプロトコルに従って行った。

50

## 【0217】

## 1.1.6 T25 フラスコ IgG スクリーン

ELISA プレートを、炭酸塩 - 重炭酸塩コーティング緩衝液 pH 9.6 (シグマ社、イス、ブーフス) 中の 5  $\mu$ g / ml の抗マウス IgG F(ab')2 断片特異抗体 (ジャクソンラボラトリーズ、米国、ペンシルベニア州、ボルチモア) を用いて一晩、4 でコーティングした。プレートを洗浄後、希釈しないハイブリドーマ上清、陽性対照 IgG1 抗体 (1  $\mu$ g / ml で 6E10: コーバンス社 (Covance)、米国、カリフォルニア州、エメリービル) 又は陰性対照 (培地単独) を、1 時間、室温でインキュベートした。洗浄工程の後、二次 AP 結合ヤギ抗マウス IgG (1 + 2a + 2b + 3 のサブクラス) Fc 断片特異抗体 (ジャクソンラボラトリーズ、米国、ペンシルベニア州、ボルチモア) を、プレート上で 2 時間、37°でインキュベートした。最終洗浄の後、pNPP (パラニトロフェニルリン酸塩)、すなわち AP に対するホスファターゼ基質で検出を行ない、プレートを、405 nm で、ELISA プレートリーダーを用いて読みとった。結果を、結果を、O.D. (光学濃度) として表現する。

## 【0218】

## 1.2 結果

融合の結果得られた、8 × 96 ウェルプレートからの細胞上清を、IgG の產生に関してスクリーニングした。試験した 768 ウェル (8 × 96 ウェル) から、IgG 產生に対して陽性の 48 ウェルを、ワクチンホスホペプチド、及び完全長ホスホタウに最も良好に結合した結果に基づいて選択した。選択は、ELISA による、ペプチド及び完全長ホスホタウタンパク質への結合、並びに、非ホスホペプチド及び非ホスホ完全長タウタンパク質と比較した場合の選択性に基づいた。24 とおりの選別されたハイブリドーマを、ハイブリドーマあたり 2 プレートに 1 個の細胞 / ウェルで、及び 1 プレートに 0.5 個の細胞 / ウェルで播種して、サブクローニングした。上清を再び試験して、ホスホペプチド及びホスホタウタンパク質に結合させて結合プロファイルを確認し、その後、6 週間の培養後に安定性を評価した。その後、8 とおりの安定クローナーを選択し、「方法」に記載の ELISA 及び TAUPIR を用いて、アイソタイプ判定及び結合に関して試験した。

## 【0219】

## 1.3. 結論

生成した抗体は、p タウペプチドへの高い特異性を示し、非リン酸化ペプチドには限界でしか結合しなかった。

## 【0220】

全部で 8 とおりのクローナーを、さらなるサブクローニングのために選別し、配列決定し (表 6 及び表 7 を見られたい)、6 とおりのクローナーを DSMZ (表 10 を見られたい) に寄託した。

## 【0221】

上述の陽性の母クローナーを、さらに 96 ウェルプレート中、その後、24 ウェルプレート中、最後に T25 フラスコ中で培養した。各段階で、ハイブリドーマクローナーの上清を ELISA、Taupir、及びウェスタンプロット法によりスクリーニングした。

## 【実施例 2】

## 【0222】

## 抗体の軽鎖及び重鎖可変領域のクローニング

ハイブリドーマ細胞からの、抗体の重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子を、クローニングし、抗体結合の特徴だけでなく、DNA 配列、相補性決定領域 (CDR) の位置を決定した。

## 【0223】

総 RNA を、 $3 \times 10^6$  個のハイブリドーマ細胞 (1 バイアル) から、Qiagen RNeasy Mini Kit (カタログ番号: 74104) を用いて調製した。RNA を 50  $\mu$ L の水中に溶出し、1.2% のアガロースゲル上で調べた。

## 【0224】

$V_H$  及び  $V_K$  の cDNA を、逆転写酵素を IgG 及びカッパ定常領域プライマーとともに

10

20

30

40

50

用いて調製した。第1のストランドcDNAを、大きいセットのシグナル配列プライマーを用いるPCRにより増幅した。増幅したDNAを、ゲル精製し、ベクターpGem(登録商標)-T Easy(プロメガ社(Promega))にクローニングした。得られたV<sub>H</sub>及びV<sub>K</sub>クローンを、予想サイズのインサートに関してスクリーニングした。選択したクローンのDNA配列を、自動化された塩基配列決定により両方向で決定した。配列中の相補性決定領域(CDR)の位置を、他の抗体配列を参照して決定した(Kabat EA et al., 1991)。

【実施例3】

【0225】

結合の研究

10

目的は、タウリポソームワクチンで免疫されたマウスに由来するサブクローニングされたハイブリドーマから生成した抗体のホスホタウ(pタウ)結合を測定することであった。これを試験するため、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を用いて、リポソームワクチン調製に使用したリン酸化及び非リン酸化タウ抗原ペプチドだけでなく、リン酸化及び非リン酸化された両方の完全長タウタンパク質への、精製抗体の結合を測定した。

【0226】

スクリーニングを、2つの他の方法で実行した。抗タウ抗体を一次抗体として用いる、タウトランスジェニック動物(TAUPIR)からの脳断片上での免疫組織化学(IHC)を行った。加えて、トランスジェニックマウスからの脳タンパク質ホモジネート上でのウェスタンプロット法(WB)を、抗タウ抗体をプロッティング抗体として用いて実行した。

20

【0227】

3.1 方法

3.1.1. ELISA: ホスホタウ結合アッセイ

精製抗体のタウ又はpタウへの結合を試験するため、ELISAアッセイを使用した。簡潔には、Nunc MaxiSorp 96ウェルプレート(ヌンク社(Nunc)、デンマーク、ロスキレ)を、1 μg/mLの完全長(441 aa)タウタンパク質(シグナルケム社(SignalChem)、カナダ、リッチモンド)、又はリン酸化完全長(441 aa)タウタンパク質(Vandebroek et al., 2005)でコーティングした。加えて、プレートを、10 μg/mLのタウ由来のワクチンペプチド、タウ393-408(S396及びS404上でリン酸化された、又はそうでないもの)でコーティングした。ワクチン調製で使用しなかった異なるpタウエピトープのタウ及びpタウ配列への交差反応性について試験するため、プレートを、10 μg/mLの以下のペプチド:タウ393-408(S396及びS404上でリン酸化された、又はそうでないもの)でコーティングした。コーティングは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中、4℃で一晩、行った。プレートを、0.05%のTween 20/PBSを用いて完全に洗浄した後、0.05%のTween 20/PBS中の1%ウシ血清アルブミン( BSA)を用いて1時間、37℃でプロッキング処理した。試験される抗体をその後、20から0 μg/mLの間の、8又は16とおりの2倍希釈系列に加え、37℃で2時間、インキュベートした。プレートをその後、前述のとおり洗浄し、AP結合抗マウスIgG二次抗体(ジャクソンイムノリサーチラボラトリーズ(Jackson Immuno Research Laboratories)、英国、サフォーク)を1/6000に希釈して、0.05%のTween 20/PBS中に、37℃で2時間、加えた。洗浄の後、プレートを、pニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物(pNPP; グマアルドリッチ社、スイス、ブーフス)すなわちホスファターゼ基質溶液を用いてインキュベートし、30分、1、2、又は16時間の培養時間の後に、405 nmで、ELISAプレートリーダーを用いて読み取った。

30

【0228】

3.1.2. TAUPIR及びウェスタンプロット: タウトランスジェニック動物(TAUPIR)からの脳断片におけるタウタングルへの抗タウ抗体の結合

40

50

TAUPIR染色のために、脳断片を、TPLHマウス(hTau<sup>301</sup>Lの最長のアイソフォーム(441aa)を発現するトランスジェニックマウス)、老いた(18月齢より高齢)ダブルトランスジェニックbigT(TPLHと交配させたGSK-3トランスジェニックマウス)マウス、及びダブルトランスジェニックbigAT(TPLHと交配させたAPP<sup>V717I</sup>トランスジェニックマウス)マウスから得た。陰性対照については、タウノックアウトマウス(TKO; 6月齢)からの断片を使用した。脳断片を、5分間、PBS中で洗浄した後、15分間、室温で、PBS:MeOH(1:1)中の1.5%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中でインキュベートして、内因性のペルオキシダーゼ活性をブロッキング処理した。断片を3回、PBST(PBS/0.1%のTrition X100)中で洗浄した後、それらを30分間、室温でPBST+10%のFCS(ウシ胎仔血清)ブロッキング溶液中でインキュベートした。試験している抗タウ抗体を用いるインキュベーションを一晩、4で、以下の抗体濃度: PBST/10%FCS中、0.0053μg/mLのACI-35-2A1-Ab1、0.0048μg/mLのACI-35-2A1-Ab2、0.015μg/mLのACI-35-4A6-Ab1、0.0047μg/mLのACI-35-1D2-Ab1、0.0055μg/mLのACI-35-2G5-Ab1、並びに、0.01μg/mLのACI-35-2G5-Ab2及びACI-35-2G5-Ab3、を用いて行った。断片を次に3回、PBST中で洗浄した後、PBST/10%FCS中のHRP結合ヤギ抗マウス(ダコ社(Dakocytomation)、デンマーク、グロスストルプから購入)二次抗体を用いて、一時間、室温でインキュベートした。検出に先立って、断片を3回、PBSTで洗浄し、50mMのトリス/HCl、pH7.6中で5分、インキュベートした。検出は、ジアミノベンジジン(DAB:50mMのトリスHClを10ml+30%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を3μlの中に1錠剤; MPバイオケミカルズ社(MP Biomedicals)米国、オハイオ州、ソロン)中で3分間、断片をインキュベートすることにより、実行した。反応を、断片を3回、PBST中で洗浄することにより停止させた。断片をその後、シラン処理したガラスプレートに移し、ウォームプレート上で2時間、50で風乾した。対比染色を、マイヤーヘマトキシリン(フルカケミ社(Fluka Chemie)、イス、ブーフス)を用いた1分間の培養を用いて実行した後、水道水を流して4分間の洗浄工程を実行した。断片を、50%、70%、90%のエタノール槽に通し、100%のエタノール槽に2回通した後、キシロール中を2回、1分間通すことにより脱水させた。最後に断片を、DexEx(BDHケミカル社(BDH Chemicals Ltd.))、英国、プール)を用いてマウントし、撮像のため上にカバースリップガラスを置いた。

### 【0229】

さらなる染色(ウェスタンプロット法の実行)を、野生型マウス(FVB)タウトランスジェニックマウス(TPLH及びbigT)、又はタウノックアウトマウス(TKO)からの、SDS-PAGE(10%)で分離した脳ホモジネートタンパク質上で行った。ウェスタンプロット法実行のため、抗体を、以下の濃度で使用した: 0.53μg/mLのACI-35-2A1-Ab1、0.48μg/mLのACI-35-2A1-Ab2、0.5μg/mLのACI-35-4A6-Ab1、0.47μg/mLのACI-35-1D2-Ab1、0.55μg/mLのACI-35-2G5-Ab1、0.33μg/mLのACI-35-2G5-Ab2、及び0.5μg/mLのACI-35-2G5-Ab3。

### 【0230】

#### 3.2 結果

抗体ACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-2A1-Ab2、ACI-35-1D2-Ab1、ACI-35-2G5-Ab2、及びACI-35-2G5-Ab3は、リン酸化ヒトタウタンパク質への高い結合活性と特異性を示し(表2)、より詳細には、対応するワクチンにおいて使用した抗原性ホスホタウペプチドへの高い結合活性と特異性を示した。非リン酸化タウへの、又は他のリン酸化及び非リン酸化タウ由来の試験ペプチドへの交差反応性は、観察されなかった。抗体ACI-35-4A6-Ab1は、その

10

20

30

40

50

選択のとおり、ワクチン調製に使用した抗原性ホスホタウペプチドへのみ高い結合活性を示した。ワクチン調製に使用した抗原性ペプチドの、非リン酸化対応物への低い交差反応性が見出され、これはクローン選択にもとづいて予測されていたものである。抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 は、ワクチン調製において使用した抗原性リン酸化タウペプチドへのみ、高い結合活性と特異性を示した。ワクチンにおいて使用した抗原性ペプチド配列の一部を含む T 4 . 5 リン酸化ペプチドへの小さい交差反応性が観察された。

#### 【 0 2 3 1 】

TAUPIR 及び WB を使用して、進行したタウオパシー ( b i G T > 1 8 か月 ) を伴うマウスの脳におけるタウタングルへの、及びこれらのマウスに由来する変性したホモジネートにおける完全長タウへの結合を見た。異なる脳領域：大脳皮質、並びに海馬の C A 1 、 C A 3 、及び歯状回 ( D G ) 部分を分析した。抗体 A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 1 、及び A C I - 3 5 - 2 A 1 - A b 2 は、最良の TAUPIR 結果を示し、特に海馬の C A 1 及び C A 3 領域において、濃い細胞質染色及び明瞭な糸層状構造物が見られた。抗体 A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 は、 TAUPIR において陰性であり、散在するかすかなタングル状構造が軽度に染色されているのみであった。抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 は、良好な細胞質 TAUPIR 染色を示し、糸層状構造物が C A 1 領域に見られた。抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 は、 TAUPIR において陰性であり、核染色および一部のみのタングル染色が見られた。最後に、 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 2 及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 抗体は、同様に良好な細胞質 TAUPIR 染色を示し、海馬の C A 1 及び C A 3 に糸層状構造物が見られた。+ 又は - 符号を用いた染色の質の等級づけを、表 2 に示す。タウトランスジェニックマウスからの脳ホモジネートをプロットし、予想されたタウバンドに良好にすべての抗体が結合したことが示され ( 表 2 、 + として等級づけ ) 、 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 、及び A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 もまた、さらなる非特異的結合 ( - / + ) を示している。

#### 【 実施例 4 】

#### 【 0 2 3 2 】

##### 結合の研究 II

###### 4 . 1 方法

###### 4 . 1 . 1 SPR 結合アッセイ

すべての SPR 実験を、 Biacore X 機器 ( GE ヘルスケア社 ( G E H e a l t h c a r e ) ) 上で実行した。センサーチップ S A ( カルボキシメチルデキストランに由来するストレプトアビシン ) は、 G E ヘルスケア社から購入した。ランニング緩衝液 ( Running buffer ) は、 PBS ( ダルベッコ PBS 、シグマ社 D 8 5 3 7 ) であった。まず、結合しないストレプトアビシンを、 1 6 m M の N a O H ( a q ) を 8 パルス ( それぞれ約 1  $\mu$  L ) 、注入することにより、センサー表面から除去した。ホスホタウペプチドをその後、 PBS 中に可溶化して、最終ペプチド濃度 1  $\mu$  M にし、その後、センサーチップのフローセル ( f c ) 2 の上に、 5  $\mu$  l / 分で注入 ( 3 5  $\mu$  L ) した。カップリングの後、最終の固定化レベルの 1 3 0 R U が得られた。チップ表面への抗体の結合を研究するため、ランニング緩衝液を連續して 2 倍希釈することにより、いくつかの抗体濃度を調製した。注入を、 f c 1 及び 2 の両方の上に、流量 5 0  $\mu$  L / 分で 1 2 0 秒間、実行した。フローセル 1 は誘導体化させず、 f c 1 の応答を f c 2 から引き算して、機器ノイズ及び、バルク反射率の変化を補正した。各注入の後、表面をランニング緩衝液で即座に、 1 0 0 秒間洗浄した。残存するあらゆる結合した抗体をチップから除去し、表面の再生を、 1  $\mu$  L の 1 0 m M グリシン - H C l 、 p H 1 . 7 を注入することにより実行した。動態解析を、数値積分のアルゴリズム、及び B I A e v a l u a t i o n 3 . 0 を用いた大域解析を用いて実行した。異なる濃度抗体の注入に関して得られたセンサーグラム ( s e n s o g r a m ) を重ね合わせ、ベースラインをゼロに調節した。曲線のフィッティングのために、すべてのデータを同時に 1:1 均質 ( L u n g m u i r ) モデルにフィッティングした。

## 使用ペプチド

T3.30	ビオチン-LC リンカー -GVYKS[P03H2]PVVSGDTS[P03H2]PRHL-NH2	ロット MI89P9-P12-2 (64 %の純度)
		ロット MI89P9-P12-3 (87 %の純度)

10

## 【0233】

## 4.2 結果

抗タウ抗体の、リン酸化タウペプチドへの結合を、S P R を用いてリアルタイムで監視した。抗体結合の結合相及び解離相の解析を用いて、解離定数  $K_D$  だけでなく、会合速度定数 ( $k_a$ )、解離速度定数 ( $k_d$ ) を決定することができた。

## 【0234】

すべての抗体は、誘導体化されなかったカルボキシメチルデキストラン表面上のペプチド T 3 . 3 0 に、解析した抗体 4 6 7 3 4 n M の範囲 (又は、A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 については 1 1 . 5 1 8 4 n M ) で、特異的に結合することが見出された。センサーーグラムの動態解析により、様々な抗体と T 3 . 3 0 との間の結合相互作用に対する解離定数  $K_D$  は、2 と 8 2 n M の間であることが明らかになった。従ってこのことは、抗体が、ホスホペプチド T 3 . 3 0 を非常に高い親和性で識別することを示している (表 3 ) 。

20

## 【実施例 5】

## 【0235】

結合の研究 I I I ヒト脳試料上での E L I S A (リン酸化タウのマルチマーを検出する E L I S A )

## 5.1 方法

## 5.1.1 ヒト試料：本明細書に記載のアッセイに使用されるヒト脳試料の調製

アルツハイマー病 (A D ) の 1 0 人、及び年齢適合対照 1 0 人についての死後の側頭皮質を、マイアミ大学の脳遺贈バンク (B r a i n E n d o w m e n t B a n k ) から得た。A D 患者 (女性 7 人、男性 3 人) について死後時の平均年齢は、8 1 . 1 ± 7 . 3 歳であり、対照 (神経学的症状なし；女性 9 人、男性 1 人) については、8 7 . 0 ± 5 . 8 歳であった (スチューデント t 検定によれば、A D 患者との有意差無し)。すべての試料は、白人起源であった。A D 試料を、表 4 に示すとおり、ブラーク (B r a a k ) 病期 (Braak and Braak (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 82:239-259) について評価した。

30

## 【0236】

A D の 1 0 人、及び年齢適合対照 1 0 人について死後の側頭皮質を、以下のプロトコルに従ってホモジネートした。脳断片を計量し、ホスファターゼ阻害剤 (3 0 m M の N a F 、0 . 2 m M の N a 3 V O 4 、1 n M のオカダ酸、1 m M の P M S F 、5 m M の N a 4 P 2 O 7 ) 、及びプロテアーゼ阻害剤 (C o m p l e t e M i n i ; ロッシュ社 (R o c h e ) 、スイス) を含む、9 体積の 2 5 m M のトリス H C l 、p H 7 . 4 、1 5 0 m M の N a C l 、1 m M の E D T A 、1 m M の E G T A 中でホモジネートした。ホモジネーションはガラス製ポッター (p o t t e r ) を用いて実行した。これは、総ホモジネート (T o t a l H o m o g e n a t e (T H )) 画分を構成する。タンパク質濃度を、プラットフォード (B r a d f o r d ) 試薬 (シグマ社) を用いて測定した。

40

## 【0237】

5.1.2 セットアップ 1 の E L I S A : A D に冒された個体及び年齢適合対照からのヒト死後皮質脳ホモジネートにおけるリン酸化タウのマルチマーの存在を検出するセ

50

### ツトアップ1のELISAアッセイ

マルチタイター96ウェルプレートを、炭酸塩／重炭酸塩緩衝剤中、抗体を用い一晩、4、5 µg / mLでコーティングした。PBS-Tween中で4回の洗浄の後、プレートに、PBS-Tween中10%のBSAを、37で1時間、染み込ませた。脳モジネートをその後、ウェルに、50 µLのPBS中、100 ng / µLの濃度で加え、37で2時間、インキュベートした。プレートを洗浄した後、コーティングに使用したのと同じ抗体、しかしふオチン化したものを、37で1時間、5 µg / mLの最終濃度でインキュベートした。プレートを洗浄し、アビジンペルオキシダーゼ( Vectastain ABC kit、ベクターラボラトリーズ社( Vector Laboratories) )、及びその基質( ABTS、ロッシュ 10881420)を加えた後、プレートを、異なる時点で読み取った。値は、AD10人、及び対照対象10人に関して、平均のOD ± SDとして表現される。 10

### 【0238】

#### 5.2 結果

抗体ACI-35-2A1-Ab1、及びACI-35-2G5-Ab3を、AD及び対照の対象からの脳モジネート中のホスホタウ( pタウ)マルチマーを検出する能力に関して、ホスホ及びマルチマー特異的なツトアップ1のELISAを用いて試験した。我々は、両抗体についてのこのアッセイにおいて、ADと年齢適合対照( n = 10)との間の高度に有意な( p < 0.001) 差異を観察した(図1)。AD及び年齢適合対照の脳からのヒト死後皮質モジネートを用いて、我々は、死後ヒト脳試料におけるタウ-pS396のマルチマーを検出する、ACI-35-2A1-Ab1及びACI-35-2G5-Ab3抗pタウ抗体の能力を実証した。 20

### 【実施例6】

### 【0239】

#### 結合の研究IV - ヒト脳試料上のウェスタンプロット

##### 6.1 方法

6.1.1. ヒト試料：方法5.1.1に記載のヒト試料を調製する同じ方法  
6.1.2. ウェスタンプロット：ADに冒された個体及び年齢適合対照からのヒト死後皮質脳モジネートにおけるリン酸化タウの存在を検出するウェスタンプロットアッセイ 30

### 【0240】

この研究に使用した抗ヒタウ抗体は、マウスACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-1D2-Ab1、及びACI-35-2G5-Ab3であり、すべて、タウpS396に対するものであった。総ヒタウに対するマウスモノクローナルタウ13抗体(アブカム社( Abcam ) ab24636)、及びタウpS396(アブカム社 ab32057)に対するウサギモノクローナル抗体E178を、対照として用いた。それぞれ20 µgの総モジネートをレーンごとに、10%のポリアクリルアミドビストリスプレキャストゲル( NuPage Novex 10%の Bis-TRIS Mid Gels、インビトロジエン社( Invitrogen ) )上に添加した。タンパク質を、NuPAGE MOPS SDSランニング緩衝液( インビトロジエン社NP0001 )中で、製造元の推奨のとおりに分離した。タンパク質プロッティングを、PVDFメンブレン( Immobilon-FL、ミリポア社( Millipore ) IPFL00010 )上で3時間、25 mMのトリス、pH 8.6、190 mMのグリシン緩衝液、20%のメタノール中、氷上で行った。メンブレンを、PBS中1/3に希釈したLICORブロッキング緩衝液( オデッセイ社( Odyssey ) )中で、1時間、ブロックキング処理した。メンブレンを一晩、一次抗体を用いて以下の濃度でインキュベートした：0.6 µg / mLのTAU-13、1/5000に希釈したE178、0.53 µg / mLのACI-35-2A1-Ab1、0.47 µg / mLのACI-35-1D2-Ab1、及び0.5 µg / mLのACI-35-2G5-Ab3、1/3のLICOR緩衝液、及び2/3の0.1%のTween-20を含むPBS( PBS-T )で希釈。PBS-T中で4回、洗浄した後、メンブレンを、LICOR 800染料( ヤギ抗マウスIRDy 40

e 800 CW、オデッセイ社)に室温で1時間、カップリングさせたヤギ抗マウス抗体でインキュベートし、再び4回、PBS-Tで洗浄し、LICORシステムを用いてスキャンし画像生成した。

【0241】

6.2 結果

抗体ACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-1D2-Ab1、及びACI-35-2G5-Ab3を、AD及び対照の対象からの脳ホモジネートにおけるホスホタウ(pタウ)を検出するその能力について、ホスホ特異的ウェスタンプロットを用いて試験した。すべての死後ヒト皮質試料をまず、ヒトタウに対する市販の抗体を用いて評価した：抗総タウ(TAU-13)及び抗pS396タウ(E178)抗体。図2Aに示すとおり、我々は、TAU-13抗体を用いて、すべての試料に、50~70kDaの範囲の異なるタウアイソマーに対応する特徴的なタウラダーを検出した。興味深いことに、AD脳ホモジネートでは、我々はまた、AD脳における過剰リン酸化タウの存在に関して予想されていた、タウの移動パターンにおける相対的なずれを観察した。市販の抗pS396タウ抗体は、この仮説を確認し、対照とADを非常に良好に識別した(図2B)。実際、抗pS396タウ抗体は、タウの(過剰)リン酸化アイソフォームに対応する、三つの主要な免疫反応性バンドを、すべてのAD脳ホモジネートにおいて、そして健康な対照には、非常に弱い強度で、又は存在しないことを明らかにした。加えて、AD試料は、凝集タウの存在を反映する可能性の高い、高分子量のTAU-13免疫反応性塗抹を示した(図2A)。

10

20

【0242】

ACI-35-2A1-Ab1を用いたウェスタンプロッティングは、ホスホタウについて予想されたサイズの二つの免疫反応性タンパク質バンドが、AD脳ホモジネートには存在するが、しかし対照には存在しないことを明らかにした(図3A)。ACI-35-2A1-Ab1を用いたウェスタンプロットによる弱い免疫反応は、約35と約40kDaでの二つの主要な非特異的バンドの存在により説明することもできる。ACI-35-1D2-Ab1を用いたウェスタンプロッティングは、ホスホタウについて予想されたサイズの二つの免疫反応性タンパク質バンドが、AD脳ホモジネートには存在するが、しかし対照には存在しないことを明らかにした(図3B)。ACI-35-1D2-Ab1を用いたウェスタンプロットによる弱い免疫反応は、80kDaと150kDaの間での四つの非特異的バンドだけでなく、約40と約50kDaでの非特異的バンドの存在により説明することもできる。ACI-2G5-Ab3を用いたウェスタンプロットは、タウの(過剰)リン酸化アイソフォームに対応する三つの主要な免疫反応性バンドが、すべてのAD脳ホモジネートに存在するが、しかし健康な対照には、一人の対照対象(C22)を例外として存在しないことを明らかにしたが、この一人にはADの家族歴があった(図3C)。この報告は、ACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-1D2-Ab1、及びACI-35-2G5-Ab3が、ヒト死後皮質におけるpS396タウの存在について、ADと年齢適合対照とを識別することができること、従って、これらのモノクローナル抗体がAD随伴病態タウアイソフォームを認識することを実証した。

30

40

【実施例7】

【0243】

結合研究V-セットアップ1 (ヒト脳試料上でのELISA)

7.1 方法

7.1.1. ヒト試料。方法5.1.1.に記載の方法と同じであるが、最後の部分、S1画分の調整は別であるヒト試料を調製する方法

7.1.2. S1タウタンパク質画分：可溶性タウ及びホスホタウタンパク質を得る、総ホモジネート画分の細分画

AlphalISAアッセイに使用する可溶性タウ(S1)画分の調整のため、TH画分を等分して、半分の体積を-80で保存した。残りのTH画分をさらに処理し、Trition X-100を加えて最終濃度0.4%にした。試料をよく混合して、何回か攪拌

50

拌した後、5'000 rpmで5分間、4°で遠心分離した。上清は、S1画分を構成する。試料を等分し、-80°で保存した。タンパク質濃度を、ブレッドフォード試薬を用いて測定した。

【0244】

7.1.3. AlphaLISA: ADに冒された個体及び年齢適合対照からのヒト死後皮質脳モジネートにおけるリン酸化タウの存在を検出する、AlphaLISAアッセイ

抗体ACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-1D2-Ab1、及びACI-35-2G5-Ab3は、すべてタウpS396に対するものであり、EZ-Link Micro Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit (サーモサイエンティフィック社(Thermo Scientific))を用いて、製造元の推奨に従ってビオチン化した。標識化反応においては、抗体に対して25倍のモル過剰なビオチンを使用した。ビオチン化の後、Slide-A-Lyzer MINI透析デバイス、10K MWCO (サーモサイエンティフィック社)を用いて、PBSに対する透析により、過剰な遊離ビオチンを除去した。ビオチン化抗体を、ACI-35-2A1-Ab1-BT、ACI-35-1D2-Ab1-BT、及びACI-35-2G5-Ab3-BTと表した。抗体Tau-13を、活性化したAlphaアセプタービーズ(Alpha Acceptor beads) (パーキンエルマー社(Perkin Elmer))に、以下のプロトコルを用いて結合させた: 0.1mgのTau-13抗体溶液(タンパク質Aカラムで精製)を、1mgのAlphaLISAアセプタービーズペレットと混合し、0.13Mのリン酸塩緩衝液(pH 8.0)で補充して200μLの最終反応体積にした。次に、10%のTween-20を1.25μL及び25mg/mLのNaBH<sub>3</sub>CNの溶液10μLを加え、チューブを37°で48時間、軽度の回転数(7 rpm)で回転させてインキュベートした。結合反応の後、ビーズ上の活性部位を、10μLのカルボキシメトキシルアミン溶液を加えることによりブロッキング処理し、さらに、37°で1時間、インキュベートした。最後に、ビーズを2回、200μLの0.1MトリスHCl、pH 8.0で洗浄し、200μLの保存緩衝液(0.05%のプロクリン300を含むPBS)中に4°Cで保存し、最終的に、AlphaLISAアセプタービーズ濃度を5mg/mlにした。

【0245】

AlphaLISAは、近接化学発光法(proximity chemiluminescence)を用いる均質系のアッセイである。もし、Alphaドナー(Donor)及びアセプター(Acceptor)ビーズが近接していると、レーザー励起されるとすぐに、化学反応のカスケードにより増幅信号を生じる。680nmで励起が生じるとすぐに、ドナービーズに含まれる光増感剤が、周囲の酸素をさらに反応性の高い一重項酸素種に転換する。これらの一重項酸素は、拡散し(4μsecの半減期以内に200nmまで)、アセプタービーズ中で化学発光反応を生じ、その結果として光が放出される。このアッセイの設定は以下のとおりである:

S1試料をAlphaアッセイ緩衝液(パーキンエルマー AL000C)中であらかじめ希釈して、20μg/mlの貯蔵濃度を得た。以下の試薬を384ウェルの白色のOptiPlate(パーキンエルマー)に加えて、50μLの最終体積にした: S1脳モジネート(5μL)、10μLのACI-35-2A1-Ab1-BT、ACI-35-1D2-Ab1-BT、又はACI-35-2G5-Ab3-BTは、それぞれ0.2nM、0.5nM、又は0.5nMの最終抗体濃度、及び10μLのタウ13-アセプタービーズ結合体は、2.5μg/mlの最終ビーズ濃度。反応混合物を、1時間、室温でインキュベートし、25μLのストレプトアビジンドナービーズを加えて、さらに2時間、室温、暗所でインキュベートした。読み出しへは、EnSpire Alpha機器を用いて行い、分析は、EnSpire Workstation version 3.00を用いて行った。データの統計分析を、GraphPad Prismソフトウェアを用いて実行した。結果を、Alpha単位±SDとして表示する。

10

20

30

40

50

## 【0246】

## 7.2 結果

AlphaLISAアッセイを使用して、抗体ACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-1D2-Ab1、及びACI-35-2G5-Ab3を、死後ヒト脳モジネット中のタウpS396を検出し、ADを年齢適合対照から識別する能力について試験した。すべての抗体が、タウpS396を検出した（図4A、4B、4C）。ADと対照（n=10）の間の信号検出の差異はまた、すべての抗体について高度に有意であり、AD対象の脳において信号の増加を示した；ACI-35-2A1-Ab1（p<0.0001）、ACI-35-1D2-Ab1（p<0.0001）、及びACI-35-2G5-Ab3（p=0.002）。結論として、AlphaLISA技術を使用して、ACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-1D2-Ab1、及びACI-35-2G5-Ab3の、AD対象の脳におけるpS396タウを検出し、ADと対照のドナーを差別化する能力を実証した。  
10

## 【実施例8】

## 【0247】

インビボでのACI-35-2G5-Ab3抗体の有効性

## 8.1 方法

8.1.1. 研究のセットアップ：タウトランスジェニックマウスにおける、抗pタウ抗体ACI-35-2G5-Ab3の投与例2例の、インビボでの治療効果

C57BL/6×DBAの背景を有する、6～7月齢の雌及び雄のタウトランスジェニックマウス（TMHT）に、i.p.注射により3又は10mg/kgのACI-35-2G5-Ab3、又はビヒクル（PBS）を2回、1週間空けて投与した。14日目に、免疫組織学（IHC）のために、動物を安樂死させ、脳を採取し、処理した。海馬及び扁桃体におけるタウ病態の定量のために、脳1個あたり、5枚の切片（各高さから1枚）を、AT180（タウpT231に関して）及びHT7（総ヒトタウ抗体に関して）抗体を用いて標識し、続いて、免疫活性な面積を、Pro Plus（v6.2）ソフトウェアを用いて評価した。免疫活性な対象を、サイズ制限（扁桃体では30μm<sup>2</sup>、海馬では7μm<sup>2</sup>）以上、及び動態強度閾値以上で測定した。対象の全面積及び強度、並びに各閾値は、自動的に保管した。もし使用した場合には、動態閾値は、強度面積（area of intensity）（AOI）内の平均強度に加えてAOI内のピクセル強度の標準偏差を係数倍したものとして定義した。領域サイズは、海馬及び扁桃体を手作業で線引きして測定した。AT180及びHT7のIR面積データは、（海馬では）領域、又は（扁桃体では）AOIサイズで規格化した。  
20  
30

## 【0248】

## 8.2 結果

AT180pタウ抗体は、内因性でヒトのヒトpタウ（Thr231及びSer235で二重にリン酸化された）を検出する。この研究で使用したタウトランスジェニックマウスに関しては、AT180の組織学的測定は、海馬の及び類扁桃の神経細胞に対して集中的に行なった。ACI-35-2G5-Ab3で治療したマウスは、扁桃体と海馬の両方で、体細胞標識のAT180の平均強度及び規格化された総和強度について有意な減少を有し（図5A及び5B）、治療マウスにおける、体細胞のAT180陽性pタウ全体の減少を示していた。  
40

## 【0249】

総ヒト（トランスジェニック）タウに関しては、HT7抗体を使用した。HT7は、残基159及び163の間の正常のヒトタウを認識する。組織学的測定は、海馬の及び類扁桃の神経細胞の免疫反応性細胞体に対して集中的に行なった。ACI-35-2G5-Ab3で治療したマウスは、扁桃体における免疫反応性の総和の及び平均のHT7強度だけでなく、HT7免疫活性面積も減少させた（図6A）。海馬では、平均強度に関して同じことが観察された（図6B）。しかしながら、10mg/kgで治療したマウスにおいて、海馬における免疫活性面積、及び総和強度に関して、HT7標識の増加が観察された。海  
50

馬に観察されたこの増加は主に、調査した全8匹のマウスのうち3匹のマウスによるものであった。

【0250】

ACI-35-2G5-Ab3治療は、AT180免疫反応性pタウレベルを、両方の調査領域において、従って、海馬の及び類扁桃の神経細胞の細胞体において有意に減少させた。扁桃体においては、標識の総和強度は、AT180免疫反応性pタウ及びHT7免疫反応性総ヒトタウの両方に關して減少した。3mg/kgの用量での治療もまた、平均HT7強度を、両領域において有意に減少させた。しかしながら、10mg/kgでは、海馬における平均のHT7免疫反応性面積及び総和強度は、対照の治療マウスに対して増大し、ACI-35-2G5-Ab3治療が、結果として病態pタウからの転換をもたらすことを示した。

10

【実施例9】

【0251】

抗pタウ抗体のエピトープマッピング

9.1 方法

抗ホスホタウマウスのモノクローナル抗体のエピトープマッピングを、異なるホスホ及び非ホスホペプチドライブラーを用いてELISAにより実行した。使用したペプチドライブラーT3のアミノ酸配列を、表11Aに示す。各ライブラーは、ペプチドワクチン中に存在するホスホ及び非ホスホ配列にまたがる、短いビオチン化ペプチドからなる。加えて、ペプチドライブラーを、抗体に結合するペプチド配列の各残基をアラニン(A1a)で置換して生成し、それらは表11B及び11Cに示すとおりである。各ライブラーは、ペプチドワクチンに存在するホスホ及び非ホスホ配列にまたがる短いビオチン化ペプチドからなる。ペプチドライブラーは、ANAWAトレーディングSA社(ANAWA Trading SA)から購入した。ペプチドライブラーは、ANAWAトレーディングSA社Aから購入した。エピトープマッピングを、製造元(ミモトープス社(Mimotopes))の指示に従って行った。簡単に述べると、ストレプトアビジンでコーティングしたプレート(NUNC社)を、リン酸塩緩衝正常生理食塩水(PBS)中、0.1%のBSAで、4で一晩、ブロッキング処理した。PBS-0.05%のTween 20で洗浄の後、プレートを室温で1時間、各ライブラーからの異なるペプチドでコーティングし、PBS中、0.1%のBSA、0.1%のアジ化ナトリウムで希釈して、10μMの最終濃度とした。洗浄の後、プレートを室温で1時間、PBS中の2%BSA及び0.1%アジ化ナトリウム中に40ng/mlに希釈した試験抗体でインキュベートした。プレートを再び洗浄した後、AP結合抗マウスIgG二次抗体(ジャクソンイムノリサーチラボラトリーズ、英国、サフォーク)を用いて、1/6000希釈で1時間、室温でインキュベートした。最終洗浄の後、プレートを、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物(pNPP;シグマアルドリッヂ社、スイス、ブーフス)ホスファターゼ基質溶液でインキュベートし、2時間のインキュベートした後、405nmで、ELISAプレートリーダーを用いて読み取った。もし、光学強度(O.D.)が、バックグラウンドO.D.の少なくとも2倍であった場合には、結合は陽性であると考えた。

20

【0252】

30

9.2 結果

40

エピトープマッピング実験の結果として、本明細書に開示の抗体が特異的に結合する、必須のリン酸化アミノ酸残基(表5を見られたい)を含め、エピトープを同定することができた。

- タウ aa 393-401、pS396(ACI-35-2A1-Ab1; ACI-35-2A1-Ab2)を必須
- タウ aa 396-401、pS396(ACI-35-4A6-Ab1)を必須
- タウ aa 394-400、pS396(ACI-35-1D2-Ab1)を必須

50

・ タウ aa 402 - 406、pS404 (ACI-35-2G5-Ab1) を必須

・ タウ aa 393 - 400、p396 (ACI-35-2G5-Ab2；ACI-35-2G5-Ab3) を必須

【実施例10】

【0253】

GSK3 キナーゼを用いた、セリン396 (pS396) でのタウのリン酸化、及び SDS-PAGE / ウエスタンプロット分析

10.1 方法

16  $\mu$ M (20  $\mu$ g のタウ / 25  $\mu$ L の反応物) の最終濃度での、ヒト完全長タウの最長のアイソフォーム (TAU441；シグマケム社 (SignalChem)) を、HEPES、pH 7.64 (40 mM)、EGTA (5 mM)、MgCl<sub>2</sub> (3 mM)、及び ATP (2 mM) を含むリン酸化緩衝液中、0.018 単位 (U) の GSK3 / pmol のタウで、1、6、又は 20 時間、4、30、又は 37 で、インキュベートした。GSK3 の 1 単位は、製造元 (ニューイングランドバイオラボ社 (New England Biolabs)) によって、1 pmol のホスフェートを 30 で ATP から CREB リン酸化ペプチド (KRRREILSRRPPSRYR) に 1 分間で転写する酵素量として定義される。GSK3 でリン酸化されたタウ (pタウ-GSK3) を、セリン 202、396、404、409、トレオニン 181、205、及び 231 の位置でリン酸化されたタウ、並びに総タウに対する抗体を用い、直接 ELSA 及びウエスタンプロット (WB) 上で泳動させて調べ、キナーゼ活性及び特異性 (示さず) を最適化し実証した。加えて、プロットを、GSK3 の存在について、抗 GSK3 / 抗体 (バイオソース社、インビトロジエン社) を用いて調べた。すべての WB について、pタウ-GSK3 を、等体積の試料緩衝液 A (125 mM のトリス HCl、pH 6.8、4% [w/v] のドデシル硫酸ナトリウム [SDS]、20% のグリセロール、0.01% のプロモフェノールブルー、5% の - メルカプトエタノール) を加えて希釈し、試料を 95 に 10 分間、加熱した。30  $\mu$ g の試料を、4 ~ 12% のビストリスゲル (インビトロジエン社) 上に載せて、MOD SDS 緩衝液 (インビトロジエン社) 中で泳動させ、タンパク質を、転写緩衝液 (25 mM のトリス、pH 8.6、190 mM のグリシン、20% のメタノール) 中の、0.45  $\mu$ m の PVDF メンブレンに転写した。タンパク質の転写を確認するため、メンブレンを、Ponceau S で 5 分間、染色した。続いてメンブレンを洗浄した後、1 時間、ブロッキング緩衝液 (TBS [50 mM のトリス HCl、pH 7.6、150  $\mu$ M の NaCl] 中、5% の BSA) 中でブロッキング処理した。メンブレンを 4 で一晩、ブロッキング緩衝液、及び 0.1% の Tween 中、一次抗体で染色した。ACI-35-2G5-Ab3 を用いたプロットを、0.5  $\mu$ g / mL の抗体希釈で行った。

【0254】

10.2 結果

GSK3 で治療したタウは、異なるタウホスホセリン及びタウホスホトレオニン残基 (示さず) に特異的な抗体を用いて確認したとおり、タウセリン 396 (タウ - pS396) でのリン酸化が高度に存在する結果となった。図 7 に、異なる GSK3 条件を用いて生成したタウ pS396 に関する SDS-PAGE、及び ACI-35-2G5-Ab3 抗体を用いてプロットしたメンブレンを示す。ACI-35-2G5-Ab3 抗体は、タウ pS396 について特異的であり、タウ pS396 に対して良好な信号を示し、ともに観察されたバンドは、これがタウ pS396 ダイマーに結合することを示唆している (図 7、レーン 11、及び 13)。GSK3 治療が存在しない場合には、バンドは観察されなかった (レーン 6 ~ 8、及び 14 ~ 15)。

【実施例11】

【0255】

ヒト脳脊髄液 (CSF) 試料におけるタウ (pSer396) のリン酸化の検出

10

20

30

40

50

## 11.1 方法

## 11.1.1 ヒト試料 - 死後脳試料

1人のアルツハイマー病(AD)のドナー、AD19の死後の側頭皮質が、マイアミ大学の脳遺贈バンクから得られた。我々は、この研究のための試料提供に関し、マイアミ大学の脳遺贈バンクに心から感謝する。ドナーに関する人口統計学的情報を以下の表12に示し、その中でブラーク病期(Braak and Braak (1991) *Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes*. *Acta Neuropathol* 82:239-259)もまた表示する。

表12. この研究において使用した脳試料AD19の記述

試料ID	性別	死亡時年齢	診断時年齢	罹病期間	病期
AD19	女性	81	77	4	ブラークV

10

## 【0256】

## 11.1.2. 死後脳からのホモジネート画分S1の調整

AD19ドナーの死後の側頭皮質を、以下のプロトコルに従って、ホモジネートした。脳断片を計量し、ホスファターゼ阻害剤(30 mMのNaF、0.2 mMのNa<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1 nMのオカダ酸、1 mMのPMSF、5 mMのNa<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)及びプロテアーゼ阻害剤(Complete Mini、ロッシュ社(Roche) 04 693 124 001)を含む、9体積の25 mMのトリスHCl、pH 7.4、150 mMのNaCl、1 mMのEDTA、1 mMのEGTA中でホモジネートした。ホモジネートは、ガラス製ポッターを用い氷上で行った。これは、総ホモジネート(Total Homogenate (TH))画分を構成する。TH画分を、半分の体積に等分し、-80で保存した。TH画分の残りをさらにTriton x-100を加えて処理し、0.4%の最終濃度にした。試料をよく混合し、数回攪拌した後、5'000 rpmで5分間、4で遠心分離した。上清はS1画分から構成される。試料を等分して、-80で保存した。タンパク質濃度を、ブラッドフォード試薬(シグマ社 B6916-500)を用いて測定した。

20

## 【0257】

## 11.1.3 ヒトCSF試料

30

臨床的に確認された軽度～中程度のアルツハイマー病(AD)患者、及び健康なボランティア対照ドナー(Ctrl)からの脳脊髄液(CSF)試料の提供を、ベルリン医科大学チャリテ(Charite School of Medicine Berlin)から受けた。我々は、試料提供について、ベルリン医科大学チャリテに、心から感謝する。試料を等分して-80で保存し、それ以上処理せずに使用した。CSF試料ドナーに関する人口学的及び臨床的な情報を、以下の表13に示す。

表13. CSF試料ドナーに関する人口学的及び臨床的情報

診断	n	平均年齢 (標準偏差)	年齢の範囲	女性の%	MMSEスコア (標準偏差)	MMSE範囲
AD	17	72.5(8)	57～85	35	21.2(4)	13～27
Ctrl	16	65(7)	53～77	69	29(1)	27～30

40

## 【0258】

## 11.1.4 CSFタウの免疫濃縮

## 11.1.4.1 抗体カッピング

CSFタウの免疫濃縮に関しては、市販のヒトタウ抗体(クローンHT7、サーモサイエンティフィック社 MN 1000)を使用した。HT7をタンパク質Gダイナビーズ

50

(Dyna brads) (ライフテクノロジーズ (Life Technologies) 10004D) にカップリングさせるため、各試料に対して、1.5 mg (50 µL) のタンパク質Gダイナビーズを、攪拌により再懸濁させて、1.7 mL のMaximum Recoveryチューブ (アキシジエン社 (Axygen) MCT-175-L-C) に移した。ビーズをチューブ側面に集めて緩衝液を除去するため、チューブを磁気支持体 (DynaMag、ライフテクノロジーズ社 123.21D) 上に置いた。200 µL のPBS中、1 µg のHT7を、Hula Mixer (ライフテクノロジーズ社) を用い、10 / 20 rpm、25° / 10 のtilt、5° / 2 のvibroで10分間、タンパク質Gダイナビーズに結合させた後、チューブを磁石上に置き、緩衝液を除去し、チューブを1回、200 µL のPBS / 0.02% のTween 20を用い優しいピペット操作で、そして2回、200 µL の結合緩衝液 (新たに調製した、20 mMのリン酸Na、150 mMのNaCl) で、洗浄した。洗浄緩衝液は常に、磁石上で除去した。HT7をタンパク質Gダイナビーズへ架橋させるために、HT7-ビーズを、結合緩衝液中に溶解させた5 mMのBS3溶液 (シグマアルドリッヂ社 S5799) 250 µL の中に再懸濁させて、室温 (RT) で30分間、回転させて (上のセッティングと同じ) 、インキュベートし、12.5 µL のクエンチング緩衝液 (1MのトリスHCl、pH 7.5) を15分間、加えて反応を停止させた後、200 µL のPBS / 0.02% のTween 20で3回、洗浄した。

#### 【0259】

##### 11.1.4.2 CSFタウの免疫濃縮

CSFを希釈せずに使用し、各ドナーについて1 mL のCSFを、HT7架橋ビーズを含むチューブに移し、4で1時間、連続回転 (10 rpm) 下でインキュベートした。結合しなかった物質を磁石上で除去した後、ビーズを200 µL のPBS / 0.02% のTween 20で洗浄し、タウを、PBS中、20 µL の1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 中に、70で10分間、溶出した。ビーズの沈降を避けるために、チューブを短時間 (加熱した水平ミキサー中、300 rpmで1分ごとに5秒間) 混合した。このインキュベーションの後、チューブを磁石上に置いて、溶出試料を集めた。

#### 【0260】

陽性対照として、タウをまた、ヒト脳モジネートから濃縮した。このため、AD19ドナーからのヒト脳S1画分の一連の希釈物をPBS中で調整した (0.5 µg / mL、0.17 µg / mL、0.056 µg / mL、0.019 µg / mL、0.006 µg / mL、0.002 µg / mL、0.0007 µg / mL)。次に、各試料 (1 mL) を、上に記載のとおりに処理し、25 µL 1% のSDSに溶出した。

#### 【0261】

##### 11.1.5 AlphaLISA

##### 11.1.5.1 AlphaLISAアッセイの記述

#### 【0262】

AlphaLISAは、ビーズを用いるAlpha技術を用いる均質系アッセイである。AlphaLISAを、工程数が最小限であるということ及び感度に基づき、技術プラットホームとして選択した。簡潔に述べると、アッセイは、ビーズの近接性に基づいている。680 nmで励起されると、ドナービーズを含む光増感剤が、周囲の酸素を一重項酸素種に転換し、これらが (4 µsecの半減期以内で200 nmまで) 拡散し、アクセプタービーズに化学発光反応を生成させる結果、光が放出される。

#### 【0263】

我々の実験に使用したアッセイのセッティングは、以下のとおりである (図8も見られたい) :

- Alphaアクセプタービーズにカップリングした、汎タウ (Pan-Tau) 抗体タウ-13 (アブカム社 (Abcam) ab24636) が、試料中に存在するヒトタウに結合し、「タウタンパク質-タウ-13抗体-アクセプタービーズ」複合体を形成する。

10

20

30

40

50

・ 検出抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 - B T が、ヒトタウの p S 3 9 6 に結合することにより、ストレプトアビジン ( S A v ) でコーティングした A l p h a ドナービーズが複合体に結合する。

すべての試薬を反応させた後、化学発光信号を、 E n S p i r e A l p h a 2 3 9 0 リーダーを用いて読み出す。

【 0 2 6 4 】

1 1 . 1 . 5 . 2 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 抗体のビオチン化

A l p h a L I S A アッセイで使用するため、抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 を、製造元の指示に従って、 E Z - L i n k M i c r o S u l f o - N H S - L C - B i o t i n y l a t i o n K i t ( サーモサイエンティフィック社 2 1 9 3 5 ) を用いてビオチン化した。抗体に対し 2 5 倍過剰のモル数のビオチンを、標識反応に用いた。ビオチン化の後、過剰の遊離ビオチンを除去し、抗体を 4 回、 P B S 中で、 5 0 ' 0 0 0 M W C O S p i n - X U F 5 0 0 C o n c e n t r a t o r ( コーニング社 ( C o r n i n g ) 4 3 1 4 8 0 ) を用いて洗浄した。ビオチン化した A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 抗体を、 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 - B T と表示する。

【 0 2 6 5 】

1 1 . 1 . 5 . 3 A l p h a L I S A アクセプタービーズへのタウ - 1 3 抗体のカップリング

A l p h a L I S A アッセイで使用するため、抗体タウ - 1 3 を、活性化 A l p h a アクセプタービーズ ( パーキンエルマー社 ( P e r k i n E l m e r ) 6 7 7 2 0 0 1 ) に結合させた。以下の結合プロトコルを使用した： 0 . 1 m g のタウ - 1 3 抗体溶液 ( タンパク質 A カラム上で精製 ) を、 1 m g の A l p h a L I S A アクセプタービーズのペレットと混合し、 0 . 1 3 M のリン酸塩緩衝液 ( p H 8 . 0 ) で補充し、最終反応体積の 2 0 0  $\mu$  L とした。次に、 1 0 % の T w e e n - 2 0 を 1 . 2 5  $\mu$  L 、及び 2 5 m g / m L の N a B H <sub>3</sub> C N 溶液 1 0  $\mu$  L を加え、チューブを 3 7 で 4 8 時間、優しく回転 ( 7 r p m ) させてインキュベートした。結合反応の後、ビーズ上の活性部位を、 1 0  $\mu$  L のカルボキシメトキシルアミン溶液を加えることによりプロッキング処理し、さらに 3 7 で 1 時間、インキュベートした。最後に、ビーズを 2 回、 2 0 0  $\mu$  L の 0 . 1 M トリス - H C l 、 p H 8 . 0 で洗浄し、 2 0 0  $\mu$  L の保存緩衝液 ( 0 . 0 5 % のプロクリン - 3 0 0 を含む P B S ) 中、最終の A l p h a L I S A アクセプタービーズ濃度 5 m g / m l として、 4 で保存した。

【 0 2 6 6 】

1 1 . 1 . 5 . 4 脳 p S 3 9 6 - タウを用いた定量の検出限界

免疫濃縮したタウ脳試料、 S 1 脳画分試料及び緩衝液ブランクを、この実験に使用した。各試料を、 5 0  $\mu$  L の最終体積中で、 3 8 4 ウェルの白色 O p t i P l a t e ( パーキンエルマー社 6 0 0 7 2 9 1 ) を用いて分析した。すべての試薬の希釈を、 A l p h a アッセイ緩衝液 ( パーキンエルマー社 A L 0 0 0 C ) を用いて行った。

・ 5  $\mu$  L の試料 ( 最終体積の 1 / 1 0 、従って、アッセイにおける最終タンパク質濃度は、試料濃度の 1 / 1 0 に相当する ) 。

・ S 1 脳画分試料については 0 . 5 % の S D S 、 1 0  $\mu$  L を、又は免疫濃縮されたタウ脳試料については 1 0  $\mu$  L の単独の緩衝剤を加えた。

・ 1 5  $\mu$  L の A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 - B T 抗体 ( 最終濃度 : 5 n M ) をタウ 1 3 - アクセプタービーズ結合体と混合させた ( 最終ビーズ濃度 : 2 . 5  $\mu$  g / m L ) 。

・ 室温で 1 時間、インキュベート。

・ 2 0  $\mu$  L のストレプトアビジンドナービーズ ( 最終ビーズ濃度 : 2 5  $\mu$  g / m L ) 。

・

・ 室温 3 0 分、インキュベート ( 遮光 ) 。

・ E n S p i r e A l p h a 機器を用いて読み取り、 E n S p i r e W o r k s t a t i o n v e r s i o n 3 . 0 0 を用いて分析。

【 0 2 6 7 】

### 11.1.5.5 C S F 中の免疫濃縮された p S 3 9 6 - タウの定量

各試料を、50  $\mu$  L の最終体積中で、384ウェルの白色 OptiPlate (パーキンエルマー社 6007291) を用いて分析した。すべての試薬の希釈を、Alpha アッセイ緩衝液 (パーキンエルマー社 AL000C) を用いて行った。

- 各ドナーから免疫沈降させた溶出物 5  $\mu$  L。
- 20  $\mu$  L の A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 - B T 抗体 (最終濃度: 5 nM) を、タウ 1 3 - アクセプタービーズ結合体と混合 (最終ビーズ濃度: 2.5  $\mu$  g / mL)。
- 室温で 1 時間、インキュベート。
- 25  $\mu$  L のストレプトアビジンドナービーズ (最終ビーズ濃度: 25  $\mu$  g / mL)。

10

- 室温で 30 分、インキュベート (遮光)。
- EnSpirre Alpha 機器で読み出し、EnSpirre Workstation version 3.00 で分析。

#### 【0268】

### 11.1.6 統計解析

データの統計解析を、GraphPad Prism ソフトウェアを用いて実行した。

#### 【0269】

### 11.2 結果

予備実験からは、ヒト C S F 中に存在する p S 3 9 6 の量が、検出するには少なすぎる事が示された。この理由から、高感度免疫検出と組み合わせた免疫学的濃縮プロトコルを開発した。免疫学的濃縮プロトコルを最初に、ヒト A D 死後脳物質を用いて確認した。未処理の脳ホモジネート試料の、タウ免疫学的濃縮試料との対照比較から、対応する濃度では、タウ 1 3 / A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 A l p h a L I S A アッセイの検出限界は、未処理の試料については 0.5  $\mu$  g / mL、免疫学的に濃縮した試料については 0.002 ~ 0.006  $\mu$  g / mL の間に達し、100 倍の濃縮を示すことが明らかになった (図 9)。

20

#### 【0270】

次に、免疫学的濃縮プロトコルを、生きたドナー C S F 試料 (軽度から中程度の A D 患者については n = 17、年齢適合させた健康なボランティアについては n = 16) に適用した。得られたデータ (図 10) から: a) 免疫学的濃縮プロトコルの後、タウ 1 3 / A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 の A l p h a L I S A は、すべてのヒト C S F 試料中の p S 3 9 6 - タウを検出したこと; 及び b) さらに重要なことには、対照と比較した場合、A D の C S F 中の p S 3 9 6 - タウの量に有意な増加が観察された (マン・ホイットニーの検定により p = 0.0003) ことが示された。

30

#### 【0271】

結論として、免疫学的濃縮 / 免疫検出プロトコルを開発し、ヒト C S F 中の p S 3 9 6 - タウを検出することが可能になった。軽度から中程度の A D の C S F における p S 3 9 6 - タウの増加は、この方法が、疾患の進行、患者の層別化、及び治療有効性を評価する臨床学的生物マーカー研究において成功裏に使用できる可能性があることを示唆している。A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 抗体は、すべてのヒト C S F 試料中の p S 3 9 6 - タウを検出し、さらに重要なことには、抗体は、対照と比較した場合に、A D の C S F を識別することができた。

40

#### 【0272】

表1. タウ配列、ワクチン、及び抗体の記述

記述	ワク チン	配列*、長さ(n), 配列番号	ハイブリ ドーマ	抗体
T3: タウ 393-408 [pS396, pS404]	ACI- 35	VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n = 16) (配列番号 62)	A4-4A6-48	ACI-35-4A6-Ab2
			A6-2G5-30	ACI-35-2G5-Ab2
			A6-2G5-41	ACI-35-2G5-Ab3
			A4-2A1-18	ACI-35-2A1-Ab1
			A4-2A1-40	ACI-35-2A1-Ab2
			A6-1D2-12	ACI-35-1D2-Ab1
			A4-4A6-18	ACI-35-4A6-Ab1
			A6-2G5-08	ACI-35-2G5-Ab1

\*ヒトタウの最長のアイソフォーム（タウ441）に基づき、pはリン酸化残基を表す。

【0273】

10

20

表2. 標的に結合するハイブリドーマのスクリーニング

ハイブリ ドーマ	抗体	ELISA				TAUPIR	ウエス タンブ ロット
		タウ p ペプ チド	タウ p ペプチ ド	完全長 p タウ	完全長 p タウ		
A4-2A1-18	ACI-35-2A1-Ab1	+	-	+	-	+++	+
A4-2A1-40	ACI-35-2A1-Ab2	+	-	+	-	+++	+
A4-4A6-18	ACI-35-4A6-Ab1	+	-	-	+	-	+
A6-1D2-12	ACI-35-1D2-Ab1	+	-	+	-	++	-/+
A6-2G5-08	ACI-35-2G5-Ab1	+	-	-	-	-	-/+
A6-2G5-30	ACI-35-2G5-Ab2	+	-	+	-	++	+
A6-2G5-41	ACI-35-2G5-Ab3	+	-	+	-	++	+

結合の強度は、同一列内でのみ、同一アッセイ（ELISA、又はTAUPIR、又はWB）内でのみ比較することができる。

- 良好でない結合又は存在しない； + 良好な結合； ++ 非常に良好な結合； +++ 非常に大きな結合（非常に良好な結合よりも良好）

表 3. 抗タウ抗体の結合親和性

ハイブリドーマ	抗体	会合速度定数 ( $k_d$ ) (1/Ms)	解離速度定数 ( $k_a$ ) (1/s)	解離定数 ( $K_D$ ) (nM)
A4-4A6-18	ACI-35-4A6-Ab1	2.00 x 10 <sup>5</sup>	3.10 x 10 <sup>-3</sup>	16 <sup>a</sup>
		1.10 x 10 <sup>5</sup>	1.70 x 10 <sup>-3</sup>	15 <sup>b</sup>
A6-1D2-12	ACI-35-1D2-Ab1	1.60 x 10 <sup>3</sup>	9.30 x 10 <sup>-6</sup>	≤ 6 <sup>a</sup>
		2.20 x 10 <sup>4</sup>	1.80 x 10 <sup>-3</sup>	82 <sup>b</sup>
A6-2G5-08	ACI-35-2G5-Ab1	4.80 x 10 <sup>5</sup>	5.30 x 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>a</sup>
		3.20 x 10 <sup>4</sup>	2.20 x 10 <sup>-3</sup>	70 <sup>b</sup>
A6-2G5-30	ACI-35-2G5-Ab2	2.40 x 10 <sup>4</sup>	2.30 x 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>b</sup>
A6-2G5-41	ACI-35-2G5-Ab3	1.70 x 10 <sup>4</sup>	3.80 x 10 <sup>-5</sup>	2 <sup>b</sup>
A4-2A1-18	ACI-35-2A1-Ab1	2.70 x 10 <sup>4</sup>	1.00 x 10 <sup>-3</sup>	38 <sup>b</sup>
A4-2A1-40	ACI-35-2A1-Ab2	3.00 x 10 <sup>4</sup>	9.00 x 10 <sup>-4</sup>	30 <sup>b</sup>

a 分析は、HPLCによる64%のリン酸化ペプチド純度で実行した。

b 分析は、HPLCによる87%のリン酸化ペプチド純度で実行した。

表4. この研究で使用したAD対象の記述

AD 対照 ID	性別	死亡時年齢	診断時年齢	病患の期間	AD ブラーカー期
AD 18	女性	82	66	16	ブラーカー V
AD 19	女性	81	77	4	ブラーカー V
AD 20	男性	88	82	6	ブラーカー V
AD 21	女性	82	77	5	ブラーカー VI
AD 22	男性	62	49	13	ブラーカー V
AD 23	女性	76	65	11	ブラーカー VI
AD 24	女性	86	84	2	ブラーカー V
AD 25	男性	81	78	3	ブラーカー V
AD 26	女性	88	83	5	ブラーカー V
AD 27	女性	85	82	3	ブラーカー V

10

20

30

【0276】

表5. 抗体結合に必須のタウアミノ酸及びリン酸化残基

ハイブリ ドーマ	抗体	エピトープ*
A4-2A1-18	ACI-35-2A1-Ab1	タウ aa 393-401、pS396 が必須
A4-2A1-40	ACI-35-2A1-Ab2	タウ aa 393-401、pS396 が必須
A4-4A6-18	ACI-35-4A6-Ab1	タウ aa 396-401、pS396 が必須
A6-1D2-12	ACI-35-1D2-Ab1	タウ aa 394-400、pS396 が必須
A6-2G5-08	ACI-35-2G5-Ab1	タウ aa 402-406、pS404 が必須
A6-2G5-30	ACI-35-2G5-Ab2	タウ aa 393-400、pS396 が必須
A6-2G5-41	ACI-35-2G5-Ab3	タウ aa 393-400、pS396 が必須

\*ヒトタウの最長のアイソフォーム（タウ441）に基づく

【0277】

表 6. 重鎖及び軽鎖可変部領域 (VH 及び VK) 並びに CDR のアミノ酸配列

抗体	ハイブリド マウス	VH	VK	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VK CDR1	VK CDR2	VK CDR3
ACI-35-4A6-Ab1	A4-4A6-18	QYQLQQPGAEELLKPGASVKSC KASGYTFTSYMMWVKQRPGRG LEWIGRIDPNSDRTKYMNEKFKR KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTS EDSAVYYCARDYAWFAWYGQG TLVTVSA (配列番号 68)	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASIS CRSSQSYVHSNGNTYLEWYLQK PGQSPKLLIYKLSNRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDL GYYYCFQGSHWPPTFGGGTKE IK (配列番号 69)	GYTFTSYWMH (配列番号 70)	RDIDPNSDR TKYNEKFKY R (配列番号 71)	DDYAWFA Y (配列番号 72)	RSSQSIVMIS NGNTYLE 73)	KLSNRES (配列番号 74)	FQGSWHPPT (配列番号 75)
ACI-35-1D2-Ab1	A6-1D2-12	QVTLKESGPGLQSSQTLSLTC SFSGFSLSSTSGMGSWTRQPSG KGLEWLAHYWDDDKRVMASLK SRLTISKDTSRNQVFLKITCVD TADATAYYCARLLRPLYALDYWG QGTSVTVS (配列番号 76)	NILMTQSDSSLAWSAGEKVMTMS CKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWAESTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISSVQAED LAVYYCLQYISSLTFGGATKLE IK (配列番号 77)	GFSLSTSGM GVS (配列番号 78)	HIIWDDDK RYNASLKS DY (配列番号 79)	LLRIVYAL D (配列番号 80)	KSSQSVLYS SNQKNYLA (配列番号 81)	WASTRES LQYISSLT (配列番号 83)	
ACI-35-2A1-Ab1	A4-2A1-18	EVQLQQSGPELVKPGASVKSC KASGYTFTDYMMWVKQSHGKS LEWIGDINPNNGGTSYNNQKFKG KATLTVDKSSSTAYMELRSLTS EDSAVYYCVRERGRFAWGHGTL VTVSA (配列番号 88)	DIVMTQAAAPSVPVTPGESVSI CRSSKSLIHSNGNTYLWFLQR PGQSPQLLIYRMSNLAvgPDR FSGSGSGTAFTLRISRVEAEDV GYYVYCMQHJKSPYTFGGGTKE IK (配列番号 116)	GYTFDYYM N (配列番号 12)	DINPNNGG TSYNNQKFK G (配列番号 90)	EGRFAV (配列番号 91)	RSSKSLIHS NGNTYLY 93)	RMSNLAS (配列番号 94)	MQHJKSPYT (配列番号 95)
ACI-35-2A1-Ab2	A4-2A1-40	EVQLQQSGPELVKPGASVKSC KASGYTFTDYMMWVKQSHGKS LEWIGDINPNNGGTSYNNQKFKG KATLTVDKSSSTAYMELRSLTS EDSAVYYCVRERGRFAWGHGTL VTVSA (配列番号 88)	DIX*MTQAAAPSVPVTPGESVSI CRSSKSLIHSNGNTYLWFLQ RPGQSPQLLIYRMSNLAvgPDR FSGSGSGTAFTLRISRVEAEDV GYYVYCMQHJKSPYTFGGGTKE EIK (配列番号 92)	GYTFDYYM N (配列番号 12)	DINPNNGG TSYNNQKFK G (配列番号 90)	EGRFAV (配列番号 91)	RSSKSLIHS NGNTYLY 93)	RMSNLAS (配列番号 94)	MQHJKSPYT (配列番号 95)
ACI-35-A46-Ab2	A4-4A6-48	EVQLQQSGPELVKPGASVKSC KASGYTFTDYMMWVKQSHGKS LEWIGDINPNNGGTSYNNQKFKG KATLTVDKSSSTAYMELRSLTS EDSAVYYCVRERGRFAWGHGTL VTVSA (配列番号 88)	DIVMTQAAAPSVPVTPGESVSI CRSSKSLIHSNGNTYLWFLQR PGQSPQLLIYRMSNLAvgPDR FSGSGSGTAFTLRISRVEAEDV GYYVYCMQHJKSPYTFGGGTKE IK (配列番号 118)	GYTFDYYM N (配列番号 12)	DINPNNGG TSYNNQKFK G (配列番号 90)	EGRFAV (配列番号 91)	RSSKSLIHS NGNTYLY 93)	RMSNLAS (配列番号 94)	MQHJKSPYT (配列番号 95)

0 2 7 8 ]

抗体	ハイブリド 一マ	VH	VK	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VK CDR1	VK CDR2	VK CDR3
ACI-35-2 G5-Ab1	A6-265-08	QVQLKQSGAELVRPGASVKLSC KASGYTFTDYYINWYKQRPQGG LEWIARIYPGRGNIYYNEKFKG KATLTAEKSSSTAYMQLSSLTS EDSAVYFCARFWDVTVWQCTL VTVSA (配列番号 96)	DVLMQTQTPSLPVSLGDQASIS CRSSQS-VHSGNGNTYLEWFLQK PGQSPKLLIKVSNRFSGPVPDF FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDL GYYYCFQGSHWPYTFGGGTKLE IK (配列番号 97)	GYTFTDYYI N (配列番号 98)	R1YPGRGN IYYNEKFKG G (配列番号 99)	FWDVY I (配列番号 100)	RSSQSIVHS NGNTYLE I (配列番号 101)	KVSNRHS (配列番 号 102)	FQGSHWPYT (配列番 号 103)
ACI-35-2 G5-Ab2	A6-265-30	EVQLQQSGPELVKPGASVKISC KASGFTFTDYYMNWVKQSHGKS LEWIGDINPNNGGTSYHQKFKG KATLTVDKSSSTAYMELRLSTS EDSAVYYCVRERGRFAWQGCTL VTVSA (配列番号 104)	DIVMTQSQQKFMSTSVGDRVSVT CKASQNVGTNVAWYQQKPGQSP KALIYSASYRVSGVPDRFTGSG SGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC QQYNSYPITFGGTKLEIK (配列番号 105)	GFTFTDYYM N (配列番 号 89)	DINPNNGG TSYHQKFK G (配列番 号 115)	EGRFAY V (配列番 号 91)	KASQNVGTN VA (配列番 号 106)	SASVYVS (配列番 号 107)	QQVNSYPYT (配列番 号 108)
ACI-35-2 G5-Ab3	A6-265-41	EVQLQQSGPELVKPGASVKISC KASGFTFTDYYMNWVKQSHGKS LEWIGDINPNNGGTSYHQKFKG KATLTVDKSSSTAYMELRLSTS EDSAVYYCVRERGRFAWQGCTL VTVSA (配列番号 104)	DIVMTQSQQKFMSTSVGDRVSVT CKASQNVGTNVAWYQQKPGQSP KALIYSASYRVSGVPDRFTGSG SGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC QQYNSYPITFGGTKLEIK (配列番号 105)	GFTFTDYYM N (配列番 号 89)	DINPNNGG TSYHQKFK G (配列番 号 115)	EGRFAY V (配列番 号 91)	KASQNVGTN VA (配列番 号 106)	SASVYVS (配列番 号 107)	QQVNSYPYT (配列番 号 108)

表7. 重鎖及び軽鎖可変部領域（VH及びVK）のヌクレオチド配列

抗体	ハイブリド ーマ	VH	VK
ACI-35- 4A6-Ab1	A4-4A6-18	CAGGTCCAACACTGCAGCAGCCCTGGGCTGAGCTCTGAAGCTGGGGCTTC AGTGAAGAAACTGCTCTGCAAGGCCCTCTGGCTACACCTTACCAAGCTACTGG TGCACTGGGTGAAAGCAGAGGCCCTGAGCAGGGCTTGAAGTGGATTGAAAGG ATTGATCCTAAATAGTGTACTAAGTACAATGAGAAAGTCAACGGCAA GGCCACACTGACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCGCTCA GCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGTCTATTATTGTCAAGGGATGAT TAAGGCCCTGGTTGCTTAAGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGC A (配列番号 84)	GATGTTTGATGACACAGTCGCCATCATCTGGCTGTCTGCAGGAGAAAAG GCCCTCCAATCTCTGGCAGATCTAGTCAGGCTTAAAGTCTAAATCAGAG TATTAGAAATGGTACCTGAGTGGATTCTGAGTGGATTCTGAGTGGATC AAACTTTCACACGATTCTGGGTCCAGACGGTCAAGGCCAGTCTGAGTCA GGGACAGATTICACACTCAAGAATCAGCAGAGTGGGGCTGAGGATCTGGGAGT TATTACTGCTTCAAGGTTCACATGTTCTCCAGTCAGTGGTGGAGGCCAAG CTGGAAATCAA (配列番号 85)
ACI-35- 1D2-Ab1	A6-1D2-12	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCCTGGCCTGGGATATTGCACTCCTCCAGAC CCTCAGTCTGACTGTCTTCTCTGGTTTCACTGAGGACTCTGGTA TGGGTGTGAGCTGGATTCTGCAAGGCTTCAAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTG GCACACATTACTGGGATGATGACAAGGCCTATAACGCATCCCTGAAGAG CCGGCTCACAACTCCAAGGATAACCTCCAGAAACCAGGTATTCCTCAAGA TCACCTGTGACACTGGCAGAATCTGCACATACTACTGTCTCGGTTA CTGCGTCCTTATGCTTGGACTACTGGGTCAGGAACCTCAGTCACCGT CTCCCTCA (配列番号 86)	ACATTTTGATGACACAGTCGCCATCATCTGGCTGTCTGCAGGAGAAAAG GTCACATGAGCTGTAAGTCCAGTCAGTGGTTTAAAGTCTAAATCAGAG AACTACTTGCCTGGTACCCAGCAAAACAGGGCAGTCCTCCTAAACTGCTGATC TACTGGGCATTCACCTAGGAATCTGGCTGTCCTGATGCGCTTCACAGGCAGTGG TCTGGGACAGATTACTCTTACCATCAGTGAAGACTGTGAAGACCTGGCA GTTTATTACTGCTTCAATACACTCTCCGTCACGTCAGTGGCTGGGACCAAG CTGGAGCTGAAA (配列番号 87)
ACI-35 -2A1-18 -2A1-A b1	A4-2A1-18	GAGGTCCAAGCTGCAACAAATCTGGACCTGAGCTGGTAAGCTGGCTTC AGTGAAGAATATCTGTAAGGGCTCTGGATACACGTTACACTGACTACTACA TGAAACTGGTGAAGCAGAGGCCATGAAAGAGCCCTGAGTGGATTGAGAT ATTAACTCTAACAAATGGTGTACTAGCTACAACCAAGAAGTCAAGGGCAA GGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCC GCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGGCAGTCTATTATTGTGAAGAGGGG CGGTTTGCTTAAGGGTCAATGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (配列番号 109)	GATATTGATGACTCAGGCTGCCACCTCTGTACCTCTGGAGAGTCA GTATCCCATCTCTGAGGCTAGTAAGAGTCTCTGATAGTAATGGCAACACT TACTTGTATTGGTCTCTGAGGGCAGTCTCCCTCAGTCTGATACAT CGGATGTCCACCTGGCTCAGGACTCCAGACAGGTTCAAGGCTCA GGAACACTGCTTCACACTGAGAATCTGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTT TATTACTGTATGCAACATCTAAATCTCCGTCACCTGGAGGGGACCAAG CTGGAAATAAAA (配列番号 117)

抗体	ハイブリド ーマ	VH	VK
ACI-35 -2A1-A b2	A4-2A1-40	<p>GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTAAGCTGGCTGGGCITC</p> <p>AGTGAAGATACTCTGTAAGGCTCTGGATACACGTCACACTACA</p> <p>TGAACCTGGTGAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCCTTGAGTGGATTGAGAT</p> <p>ATTAATCCTAACATAATGGTGGTACTAGTACAACAGAAAGTCAAGGGCAA</p> <p>GGCCACATGACTGAGACAAGTCTCCAGCACAGCTACATGGAGCTCC</p> <p>GCAGTCGACATCTGAGGACTCTGAGCTATTATGCTAAGAGGGG</p> <p>CGTTTGCTTACTGGGTCACTGGACTCTGGTCACTGTCACCTCTGCA (配列番号 109)</p>	<p>GATATTC*TGATGACTCAGGCTGACCCCTGTACCTGTACTCTGGAGAGTC</p> <p>AGTATCCATCTCCTGAGGTCTAGTAAGAGTCCTCGATAGTATGGCAACAC</p> <p>TACTCTGTATGGTCCCTGAGGCTCCAGAGCCAGTCAGTCCTGATATA</p> <p>TGGGATGTCACCTGGCTCAGAGTCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGCTC</p> <p>AGGAACATGCTTICACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGCTGAGGATGTGGTGT</p> <p>TTATTACTGATGCAACATCTAAATCTCCGTACACGTTGGAGGGGACCAA</p> <p>GCTGGAAATAAAA (配列番号 110)</p> <p>R* = A or G</p>
ACI-35 -4A6-A b2	A4-4A6-48	<p>GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTAAGGCTGGGCTTC</p> <p>AGTGAAGATACTCTGTAAGGCTCTGGATACACGTCACACTACA</p> <p>TGAACCTGGTGAGCAGACCCATGGAAAGAGCCCTTGAGTGGATTGAGAT</p> <p>ATTAATCCTAACATAATGGTGGTACTAGTACAACAGAAAGTCAAGGGCAA</p> <p>GGCCACATGACTGAGACAAGTCTCCAGCACAGCTACATGGAGCTCC</p> <p>GCAGTCGACATCTGAGGACTCTGAGCTATTATGCTAAGAGGGG</p> <p>CGTTTGCTTACTGGGTCACTGGACTCTGGTCACTGTCACCTCTGCA (配列番号 109)</p>	<p>GATATTGCTATGACTCAGGCTGACCCCTGTACCTGTACTCTGGAGAGTC</p> <p>GTATCCCATCTCCTGAGGTCTAGTAAGAGTCCTCGATAGTATGGCAACACT</p> <p>TACTCTGTATGGTCCCTGAGGCCAGTCAGTCCTCGATAGTCTGATATA</p> <p>CGGATGTCACCTGGCTCAGGACTCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGCTC</p> <p>GGAACTGCTTICACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGTGAGGATGTGGTGT</p> <p>TATTACTGATGCAACATCTAAATCTCCGTACACGTTGGAGGGGACCAA</p> <p>CTGGAAATAAAA (配列番号 110)</p>
ACI-35 -2G5-A b1	A6-2G5-08	<p>CAGGTCCAGCTGAAAGCAGTCGGGGCTGAGCTGGTAGGGCTGGGCTTC</p> <p>AGTGAAAACTGTCCTGCAAGGCTCTGGTACACTCTTCAGACTACTATA</p> <p>TAAACTGGCTGAGCAGAGCCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGCAAGG</p> <p>ATTATATCCTGGAAAGGGTAATAATTACTACAATGAGAAGTCAAGGGCAA</p> <p>GGCCACACTGACTGCAAGAAAATCCTCCAGCACTGCTACATGCACTCA</p> <p>GCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCCTGTCAGATCTGG</p> <p>GACGTGACTTACTGGGCCAAGGAACTCTGGTCACTGTCACCTCTGCA (配列番号 111)</p>	<p>GATGTTTGTAGTGAACCCAACTCCACTCTCCCTGGCTGAGCTGGAGATCAA</p> <p>GCCTCCATCTCTGAGAICTAGTCAGAGCATTGACATAGTAAATGGAAACACC</p> <p>TATTTAGAATGGTCCCTGAGAAACAGCCAGTCAGTCCTGATCTAC</p> <p>AAAGTTTCACCCGATTTCCTGGGTCCAGACAGGTCAAGTGGCAGTGGATCA</p> <p>GGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAAGTGGAGGTGAGGATCTGGGAGT</p> <p>TATTACTGCTTCAAGGTCACTGTTCCGTACACGTTGGAGGGGACCAA</p> <p>CTGGAAATAAAA (配列番号 112)</p>

抗体	ハイブリド 一々	VH	VK
ACI-35 -2G5-A b2	A6-2G5-30	<p>GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGCTTC AGTGAAGATACTCTGTAAGGCTTCTGGATTACGTTCACTGACTACTACA TGAACTGGGTGAAGCAGAGCATTGGAAAGAGCCCTGAGTTGAGTTGGAGAT ATTAACTCTAACAAATGGTGGACTAGCTAACCCAGAAGTCAAGGGCAA GGCACACATGACTGTAGAACAGTCCTCCAGCACAGCTACATGGAGCTCC GCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGTAAGAGGGAA AGATTIGCTTACTGGGCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (配 列番号 113)</p>	<p>GACATTGTGATGACCCAGTCCTCAGGACATGTCACATCAGTAGGAGACAGG GTCAAGCGTCACCTGCAAGGCCACTCAGAATGTGGTACTAATGTAAGCTGGTAT CAACAGAAACAGGGCAATCTCCTAACAGGCTTCACAGGCAGTGGCATCCCTACCGG TACAGTGGAGTCCTGATGGCTAACAGGCAGTGGATCTGGACAGAATTTCACCT CTCACCATCAGCAATGTGGCAGTCTGAAGAAGCTTGGCAGATTTCTGTAGCAA TATAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGGGACAAAGCTGGAAATAAAA (配 列番号 114)</p>
ACI-35 -2G5-A b3	A6-2G5-41	<p>GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGCTTC AGTGAAGATACTCTGTAAGGCTTCTGGATTACGTTCACTGACTACTACA TGAACTGGGTGAAGCAGAGCATTGGAAAGAGCCCTGAGTTGGAGAT ATTAACTCTAACAAATGGTGGACTAGCTAACCCAGAAGTCAAGGGCAA GGCACACATGACTGTAGAACAGTCCTCCAGCACAGCTACATGGAGCTCC GCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGTAAGAGGGAA AGATTIGCTTACTGGGCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (配 列番号 113)</p>	<p>GACATTGTGATGACCCAGTCCTCAGGACATGTCACATCAGTAGGAGACAGG GTCAAGCGTCACCTGCAAGGCCACTCAGAATGTGGTACTAATGTAAGCTGGTAT CAACAGAAACAGGGCAATCTCCTAACAGGCTTCACAGGCAGTGGCATCCCTACCGG TACAGTGGAGTCCTGATGGCTAACAGGCAGTGGATCTGGACAGAATTTCACCT CTCACCATCAGCAATGTGGCAGTCTGAAGAAGCTTGGCAGATTTCTGTAGCAA TATAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGGGACAAAGCTGGAAATAAAA (配 列番号 114)</p>

表8. 抗体可変領域のCDRの配列決定に使用したプライマー

サブクローン	Ab アイソタイプ	VH プライマー	VK プライマー	プライマー配列	配列番号
A4-4A6-48	IgG2b			5' ACTAGTCGACATGGATGGAGCTTATCATGTTCTT ACTAGTCGACATGGATGGAGCTTATCATGCTCT GGGAAATTCATGGAATGGACCTGGGTTCCTCT GGGAAATTCATGGAATGGACCTGGGTCTTCCT GGGAAATTCATGAAATGGAGCTGGGTATTCTCT GGGAAATTCATGGAATGGAGCTGGGTATTCTCT GGGAAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCTTCCT 3' CCCAAGGCTTCCAGGGCCAATGGATAGACGATGG CCCAAGGCTTCCAGGGACCAAGGGATAGACGATGG CCCAAGGCTTCCAGGGCCAATGGATAACGGTGG CCCAAGGCTTCCAGGGACCAAGGTGATAAAACGATGG CCCAAGGCTTCCAGGGACCAATGGATAAAACGATGG CCCAAGGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAAACGATGG 5' ACTAGTCGACATGAGTACCCGGCTCAGTTCTGGG ACTAGTCGACATGAGGACTTCGATTCAAGTTCTGGG ACTAGTCGACATGAAGTGCCTGTTAGGCTGGTGGCT ACTAGTCGACATGAAGTGCCTGTTAGGCTGGTGGCT 3' CCCAAGGCTTACTGGATGGGAAGATGGA ATGGGATGGAGCTTATCATSYTCTT ATGAAAGWTGTGGBTAAACTGGRT ATGGRA1GGASCKKIRTCRTTMCT	193 194 137 195 196 197 151 121 198 199 200 141 166 131 144 201 202 203 204 50 51 205 206 207
A4-4A6-18	IgG2b				

サブクローン	Ab アイソタイプ	プライマー配列	配列番号
	VK プライマー	3' CCAGGGRCARKGGATARAC1GRTGG 5' ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGT	208
		ATGAAAGTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGC ATGGATTTCARGTGCAGATTWTCAGCTT ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG	209 210 211 212 213
		3' ACTGGATGGTGGGAAGATGGA	214
A6-1D2-12	IgG2a	VH プライマー 3' CCAGGGRCARKGGATARAC1GRTGG 5' ATGAAAATGCCAGCTGRTYATSTTCTT ATGGRCAGRCCTACWYYTCAATTCT ATGATGGTTAAAGTCTCTGTAACT	215 216 217 218
	VK プライマー	3' ATGRAGWCACAKWYCAGGTCTT ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGT ATGAGGRCCTGCTAGWTTYTGGIWTCTT ATGGGCWTCAGATGRAGTCACAKWYYCWGG ATGAAAGTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGC ATGGATTTCARGTGCAGATTWTCAGCTT ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGCTATGG	219 209 210 220 221 211 212 213 214
		3' ACTGGATGGTGGGAAGATGGA	215

サブクローン	Ab アイソタイプ	VH ブライマー配列	配列番号
A4-2A1-18	1gG2b	<p>5'</p> <p>GGAAATTCAATGGAATGGAGCTGGTCATTCTCTT GGCAATTCAATGGAATGGAGCTGGGTTTCTCTT GGAAATTCAATGGAATGGCACCCTGGGTTTCTCTT GGCAATTCAATGGAATGGAGCTGGGCTCTCTCTT GGAAATTCAATGGAATGGAGCTGGGTCATCCTCTT GGCAATTCAATGGAATGGAGCTGGGTTATTCTCTT ACTAGTCGACATGGGATGAGCTTATCATCCTCTT</p> <p>3'</p> <p>CCCAAGCTTCAGGGCCAATGGATAACGGTGG CCCCAAGCTTCAGGGGACCAAGTGGGATAAACGGGTGG CCCCAAGCTTCAGGGGCCAATGGATAAACGGGTGG CCCCAAGCTTCAGGGGACCAAGGGATAACGGGTGG CCCCAAGCTTCAGGGGACCAAGGGATAAACGGATGG CCCCAAGCTTCAGGGGACCAAGGGATAAACGGATGG CCCCAAGCTTCAGGGGACCAATGGATAAACGGATGG CCCCAAGCTTCAGGGGCCAGGGATAAACGGGTGG CCCCAAGCTTCAGGGGCCAATGGATAAACGGGTGG CCCCAAGCTTCAGGGGACCAAGGTGGATAAACGGTGG</p> <p>5'</p> <p>ACTAGTCGACATGGTGTCAACAGCTCAAGTCAGTTCCTTG</p> <p>3'</p>	<p>136 120 123 137 138 139 124 140 141 142 134 143 144 145 131 146 147 148 149 51</p>
A4-2A1-40	1gG2b	<p>VH ブライマー</p> <p>5'</p>	<p>GGAAATTCAATGGAATGGAGCTGGGTCATCCTCTT GGGAATTCAATGGAATGGAGCTGGGTTTCTCTT GGCAATTCAATGGAATGGAGCTGGGTTTCTCTT GGCAATTCAATGGAATGGAGCTGGGCTCTCTT ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTTATCATCCTCTT</p>



10

20

30

40

サブクローン	Ab $\gamma$	Ab $\gamma$	Ab $\gamma$	アライマー配列	配列番号
A6-2G5-41	IgG2b	VH アライマー —	3', 5'	CCCAAGCTTACTGGATGGTGGAAAGATGGA GGAAATTATGGAAATGGCAGCTGGGTTCTCTCT GGAAATTATGGAAATGGCAGCTGGGTTATCTCT GGAAATTATGGAAATGGCAGCTGGGTTATCTCT GGAAATTATGGAAATGGCAGCTGGGTTATCTCT 3', CCCAAGCTTCCAGGGACCAGGGATAAACGGTGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGACGGTGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACAGATGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGATGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGATGG VK アライマー —	51 181 120 182 124 126 183 184 185 186 144 145 187 188 189 190 191 192 51 51
				D=A 又は G 又は T M=C 又は T K=G 又は T	
				S=C 又は G W=A 又は T	
				H=A 又は C 又は T V=A 又は G 又は C	

縮重コドシ : R=A 又は G      S=C 又は G      D=A 又は G 又は T      B=C 又は G 又は T

Y=C 又は T      M=A 又は C      H=A 又は C 又は T  
K=G 又は T      W=A 又は T      V=A 又は G 又は C

表9. ヒトタウの最長の、Tau40とも呼ばれるアイソフォーム (441aa)

ヒトタウの最長の、Tau40とも呼ばれるアイソフォーム(441aa) (配列番号 67)	MAEPRQEFEV MHQDQEGDTD SETSDAKSTP AQPHTEIPEG HVTQARMVSK IATPRGAAPP TPPSSGEPPK RTPSLPTPPT SRLQTAPVPM GGGKVQIINK PGGGSVQIVY KPGGGQVEVK THVPGGGNKK EIVYKSPVVS DSPQLATLAD	MEDHAGTYGL AGLKESPLQT TAEDVTAPLV TPSLEDEAAG SKDGTGSDDK GQKGQANATR SGDRSGYSSP REPKKVAVVR PDLKNVSKI CGSKDNIKHV KPVDLSKVTS QSKIGSLDNI IETHKLTFRE GDTSPRHLSN EVSASLAKQG L	GDRKDQGGYT DEGAPGKQAA KAKGADGKTK IPAKTPPAPK GSPGTPGSRS TPPKSPSSAK GSTENLKHQP KCGSLGNIHH NAKAKTDHGA VSSTGSIDMV (配列番号 67)
--	--	---	---

10

## 【0281】

寄託 :

表10. 以下のハイブリドーマ細胞株を、A C Immune S A社 スイス ローザンヌ 1015 P S E - E P F L ビルディング B ( P S E - E P F L Build ing B, 1015 Lausanne / Switzerland )、及びルーベンカトリック大学 ベルギー ルーヴェン 3000、ワアイストラート 6 - Box 5105 ( Waaistraat 6 - Box 5105, 3000 Leuven / Belgium ) の名のもとで、「ドイツ微生物収集および細胞培養 ( Deuts che Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen ) G m b H ( D S M Z ) ブラウンシュヴァイヒ 38124 インホッフェンシュトラーセ 7 B ( Inhoffenstrasse 7 B, 38124 Braunschweig )」に、ブダペスト条約の定めるところに従って寄託した :

20

ハイブリドーマ名	受託番号	受託日
A4-4A6-48	DSM ACC3136	2011年8月30日
A6-2G5-30	DSM ACC3137	2011年8月30日
A6-2G5-41	DSM ACC3138	2011年8月30日
A4-2A1-18	DSM ACC3139	2011年8月30日
A4-2A1-40	DSM ACC3140	2011年8月30日
A6-1D2-12	DSM ACC3141	2011年9月6日

30

40

## 【0282】

表11A. エビトープマッピングに使用したペプチドライブリーリー

**Peptide library for T3**

Tau(441) amino acid number

Amino acid	Peptide no.	Phospho peptides										Non-phospho peptides									
		393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412
		V	Y	K	S(p)	P	V	V	S	G	D	T	S(p)	P	R	H	L				
	T3.9	V	Y	K	S(p)	P	V	V	S	G	D	T	S(p)	P	R	H	L				
	T3.10	Y	K	S(p)	P	V	V	S	G	D	T	S(p)	P	R	H	L					
	T3.11		K	S(p)	P	V	V	S	G	D	T	S(p)	P	R	H	L					
	T3.12			S(p)	P	V	V	S	G	D	T	S(p)	P	R	H	L					
	T3.13				P	V	V	S	G	D	T	S(p)	P	R	H	L					
	T3.14					P	V	V	S	G	D	T	S(p)	P	R	H	L				
	T3.15						V	V	S	G	D	T	S(p)	P	R	H	L				
	T3.16							V	S	G	D	T	S(p)	P	R	H	L				
	T3.17								G	D	T	S(p)	P	R	H	L					

Amino acid

Peptide no.

Amino acid	Peptide no.	Phospho peptides										Non-phospho peptides									
		393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412
		V	Y	K	S	P	V	V	S	G	D	T	S	P	R	H	L				
	T3.18	V	Y	K	S	P	V	V	S	G	D	T	S	P	R	H	L				
	T3.19	Y	K	S	P	V	V	S	G	D	T	S	P	R	H	L					
	T3.20		K	S	P	V	V	S	G	D	T	S	P	R	H	L					
	T3.21			S	P	V	V	S	G	D	T	S	P	R	H	L					
	T3.22				P	V	V	S	G	D	T	S	P	R	H	L					
	T3.23					V	V	S	G	D	T	S	P	R	H	L					
	T3.24						V	S	G	D	T	S	P	R	H	L					
	T3.25							G	D	T	S	P	R	H	H	L					
	T3.26								G	D	T	S	P	R	H	L					

[ 0 2 8 3 ]

10

20

30

40

表11B. pS396特異抗体のエピトープマッピングに使用した、アラニン (A 1a) 置換ペプチドライブラー

ペプチド番号	393	394	395	396	397	398	399	400
T3-Ala.A1	V	Y	K	S	P	V	V	S
T3-Ala.A2	V	Y	K	S(p)	P	V	V	S
T3-Ala.A3	A	Y	K	S(p)	P	V	V	S
T3-Ala.A4	V	A	K	S(p)	P	V	V	S
T3-Ala.A5	V	Y	A	S(p)	P	V	V	S
T3-Ala.A6	V	Y	K	A	P	V	V	S
T3-Ala.A7	V	Y	K	S(p)	A	V	V	S
T3-Ala.A8	V	Y	K	S(p)	P	A	V	S
T3-Ala.A9	V	Y	K	S(p)	P	V	A	S
T3-Ala.A10	V	Y	K	S(p)	P	V	V	A

10

## 【0284】

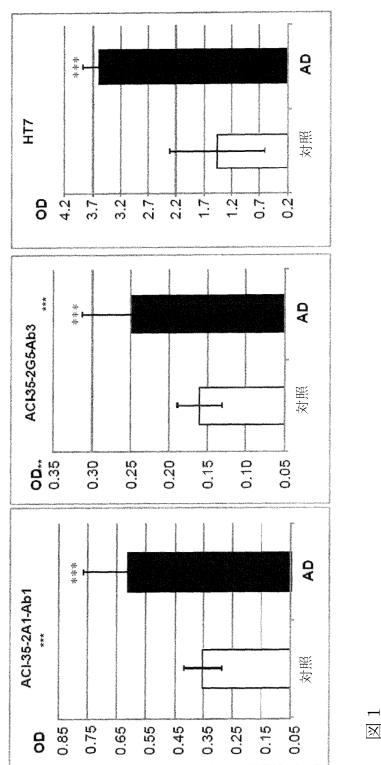
表11C. pS404特異抗体のエピトープマッピングに使用した、アラニン (A 1a) 置換ペプチドライブラー

ペプチド番号	400	401	402	403	404	405	406	407
T3-Ala.B1	S	G	D	T	S	P	R	H
T3-Ala.B2	S	G	D	T	S(p)	P	R	H
T3-Ala.B3	A	G	D	T	S(p)	P	R	H
T3-Ala.B4	S	A	D	T	S(p)	P	R	H
T3-Ala.B5	S	G	A	T	S(p)	P	R	H
T3-Ala.B6	S	G	D	A	S(p)	P	R	H
T3-Ala.B7	S	G	D	T	A	P	R	H
T3-Ala.B8	S	G	D	T	S(p)	A	R	H
T3-Ala.B9	S	G	D	T	S(p)	P	A	H
T3-Ala.B10	S	G	D	T	S(p)	P	R	A

20

30

【図1】



【図2 A】

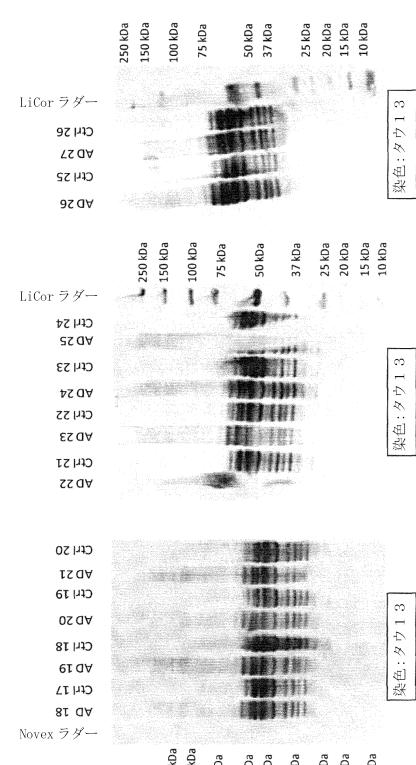


図2 A

【図2 B】

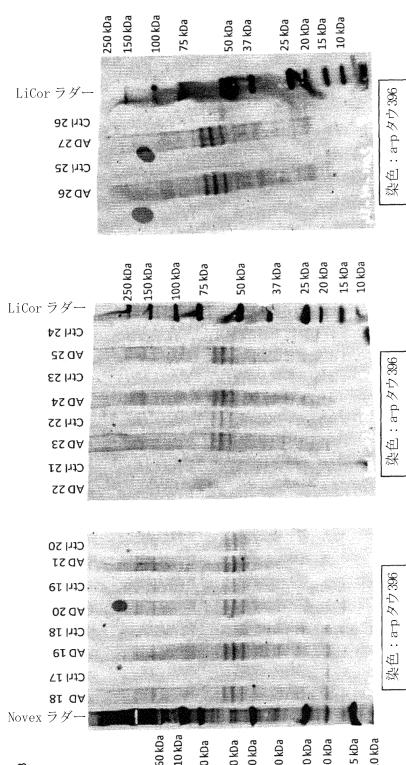


図2 B

【図3 A】

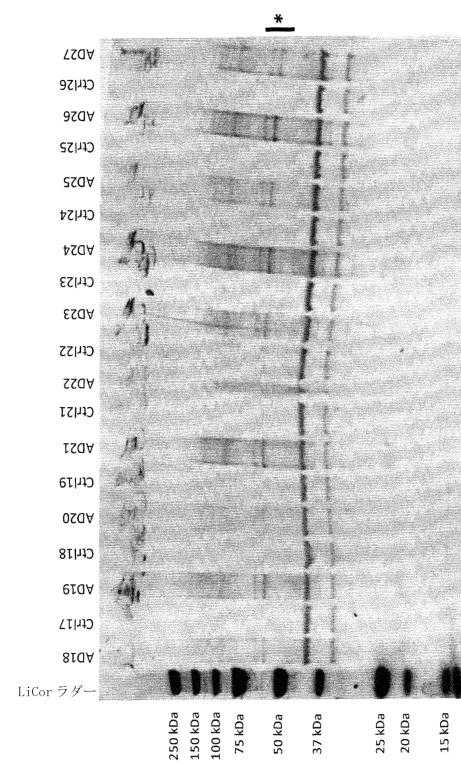


図3 A

【図3B】

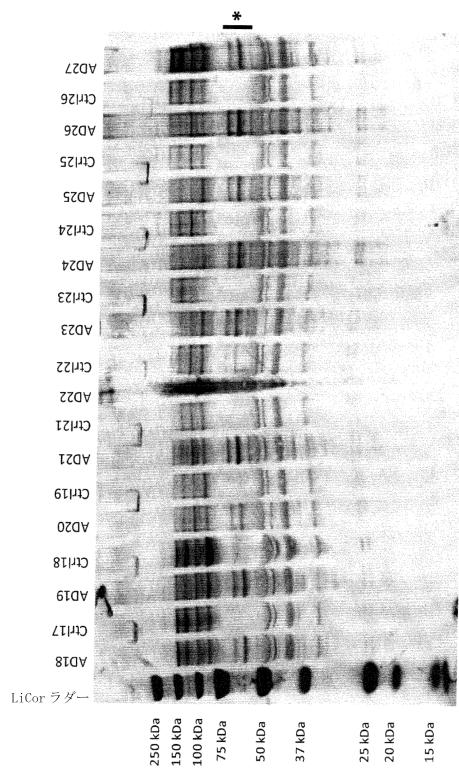


図3B

【図3C】

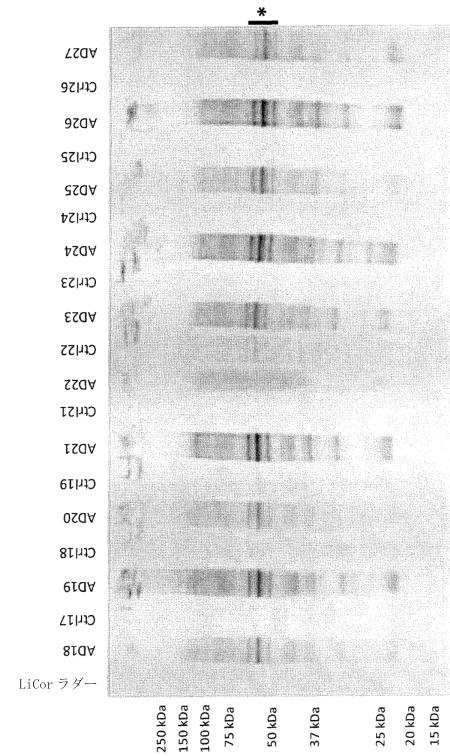


図3C

【図4A】

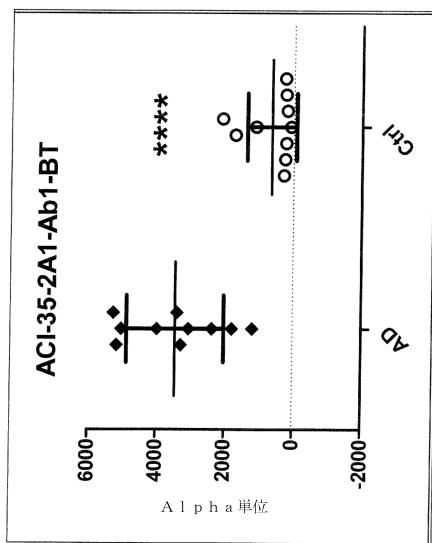


図4A

【図4B】

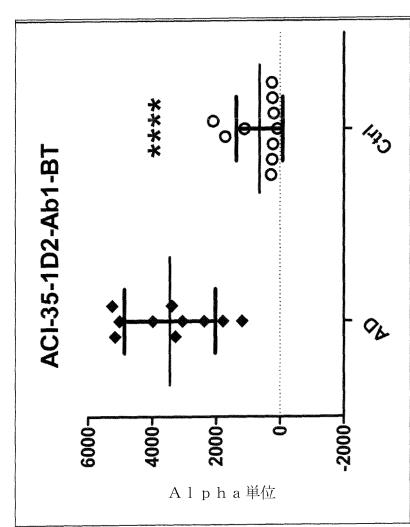
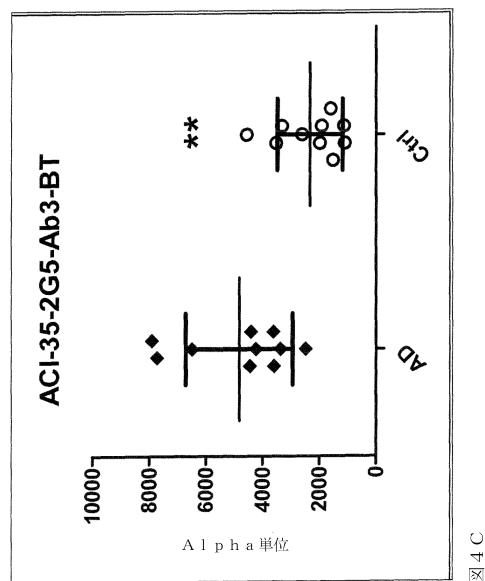


図4B

【図 4 C】



【図 5 A】

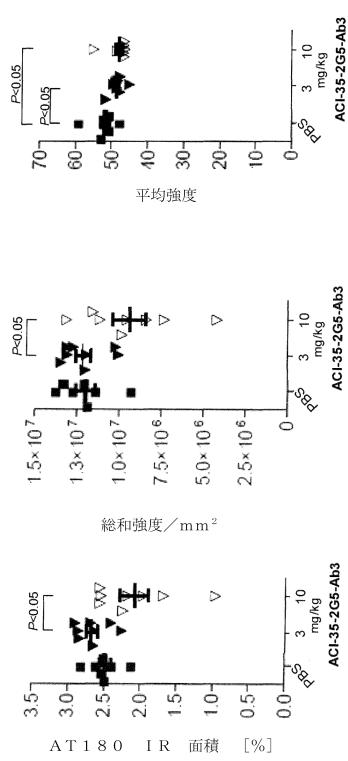
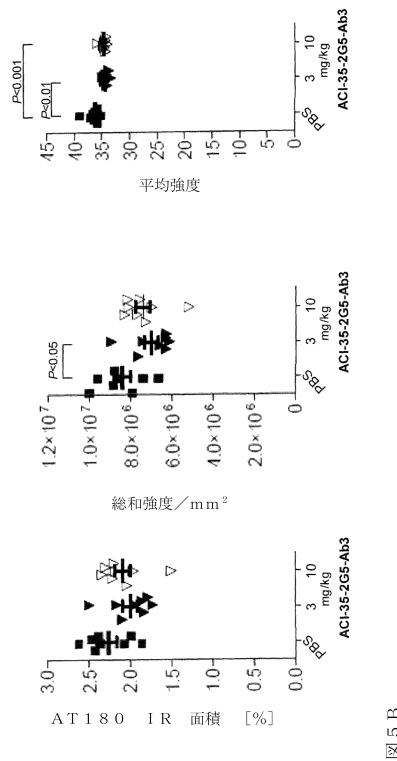


図 5 A

【図 5 B】



【図 6 A】

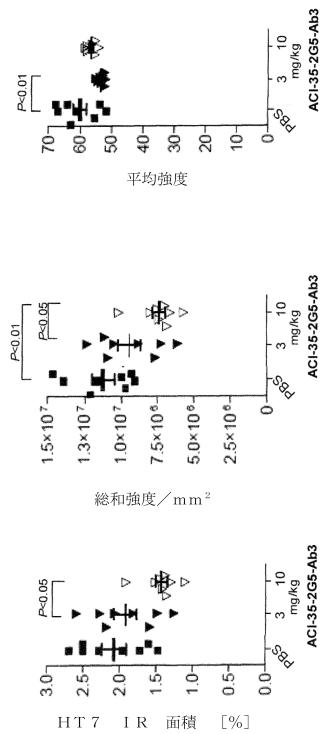


図 6 A

【図 6 B】

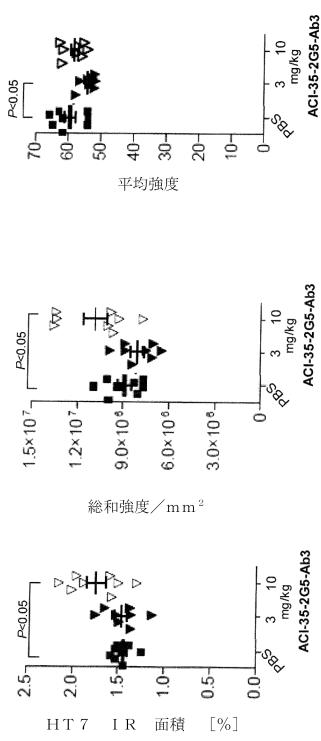


図 6 B

【図 7】

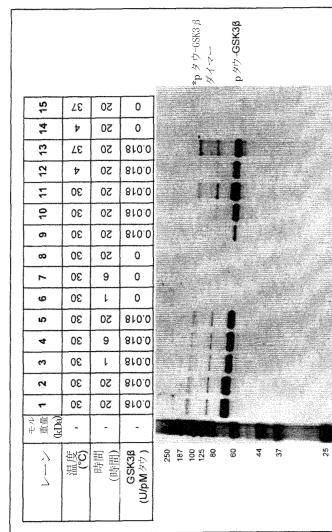


図 7

【図 8】



図 8

【図 9】

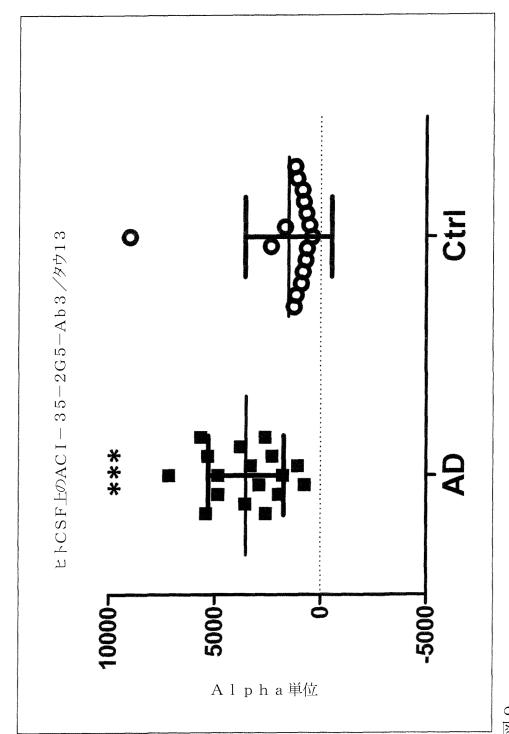


図 9

【図10】

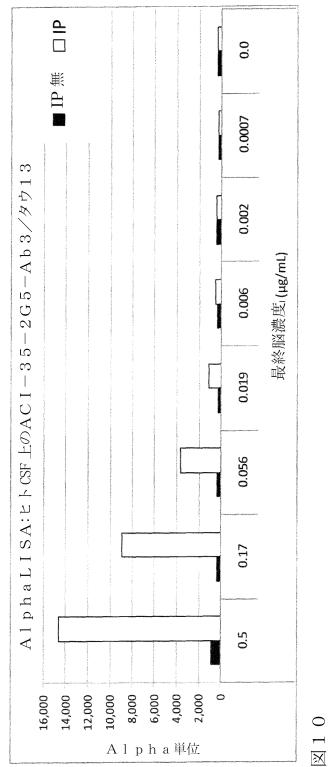


図10

【配列表】

0006358953000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	5/16	(2006.01)	C 1 2 N	5/16	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC3137

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC3138

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC3139

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC3140

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC3141

(74)代理人 100101199

弁理士 小林 義教

(72)発明者 ファイファー, アンドレア

スイス国 ツェーハー- 1806 サン - レジエ, ルート ドゥ フニル 16 ア-

(72)発明者 ムース, アンドレアス

スイス国 ツェーハー- 1009 ピュリー, アベニュー デ セリジエ 39 ベ-

(72)発明者 ピルグレン, マリア

スイス国 ツェーハー- 1052 モン - シュル - ローザンヌ, シュマン デュ テサン 6 ベ

-

(72)発明者 アドルフソン, オスカル

スイス国 ツェーハー- 1038 ベルシェ, シュマン ドゥ ラリー 16

(72)発明者 ヴァン ルーヴェン, フレッド

ベルギー国 ベ- 3210 リンデン, ヘルトゲンラーン 18

審査官 北田 祐介

(56)参考文献 米国特許出願公開第2008/0050383(US, A1)

米国特許出願公開第2008/0220449(US, A1)

国際公開第2010/106127(WO, A1)

国際公開第2010/115843(WO, A1)

国際公開第98/022120(WO, A1)

国際公開第2010/144711(WO, A1)

Biochemistry, 1997年, Vol.36, p.8114-8124

Proc. Natl. Acad. Sci., 1992年, Vol.89, p.5384-5388

Molecular Brain Research, 2000年, Vol.78, p.181-185

Journal of Neuroscience Research, 1994年, Vol.39, p.669-673

Neuroscience Letters, 2009年, Vol.450, p.51-55

Biochemistry, 2005年, Vol.44, p.11466-11475

JICHA, G.A. et al., J. Neurosci., 1999年, Vol.19, No.17, pp.7486-7494

SAHARA, N. et al., J. Neurochem., 2004年, Vol.90, pp.829-838

BOUTAJANGOUT, A. et al., J. Neurochem., 2011年 7月 1日, Vol.118, pp.658-667

LEE, G. et al., J. Neurosci., 2004年, Vol.24, No.9, pp.2304-2312

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90  
C07K 1/00 - 19/00  
A61K 39/00 - 39/44  
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)  
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)  
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq  
UniProt / GeneSeq