

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6225107号  
(P6225107)

(45) 発行日 平成29年11月1日(2017.11.1)

(24) 登録日 平成29年10月13日(2017.10.13)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/15</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21
<b>C O 7 K</b>	<b>14/47</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 14/47

請求項の数 11 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-517782 (P2014-517782)
(86) (22) 出願日	平成24年7月4日(2012.7.4)
(65) 公表番号	特表2014-522643 (P2014-522643A)
(43) 公表日	平成26年9月8日(2014.9.8)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/062965
(87) 国際公開番号	W02013/004717
(87) 国際公開日	平成25年1月10日(2013.1.10)
審査請求日	平成27年4月3日(2015.4.3)
(31) 優先権主張番号	1111361.0
(32) 優先日	平成23年7月4日(2011.7.4)
(33) 優先権主張国	英国 (GB)

(73) 特許権者	503259129 ノルディック・バイオサイエンス・エー／エ ス N O R D I C B I O S C I E N C E A ／ S デンマーク国、デーカー 2730 ヘル レフ、ヘルレフ・ホーフエダガーデ 20 7
(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性状態の生化学的マーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

セクレターゼによる T a u タンパク質の切断によって形成される N 末端ネオエピトープを含むペプチド断片を定量するためのバイオアッセイの方法であって、前記方法が、前記ペプチド断片を含む試料を、前記 N 末端ネオエピトープに特異的な結合親和性を有する免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、前記免疫学的結合パートナーの前記試料中のペプチド断片に対する結合レベルを決定するステップとを含み、

前記免疫学的結合パートナーが、ペプチドの N 末端における以下の配列：

T P R G A A P P G Q (配列番号 2 4 6)

に特異的な結合親和性を有する、方法。

【請求項 2】

前記免疫学的結合パートナーが、特異的な結合親和性を有するモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体の断片である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記免疫学的結合パートナーおよび競合物質を前記試料の存在下でインキュベートし、前記競合物質を前記試料中の前記ペプチド断片と競合させて、前記免疫学的結合パートナーに結合させる競合的イムノアッセイとして行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記競合物質が、合成ペプチドである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

10

20

前記競合物質が、N末端配列 T P R G A A P P G Q (配列番号 2 4 6) を含むペプチドを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記試料が、尿、血清、血液、血漿または唾液試料である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記試料が、患者由来の試料であり、前記方法が、前記ペプチド断片の前記決定された結合レベルを、(a) 比較可能な健康な個体および/または (b) 病理学的な神経変性状態に特徴的な値と比較するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 8】

T a u タンパク質のセクレターゼ切断によって形成される N 末端ネオエピトープに対する免疫学的結合パートナーであって、

N 末端アミノ酸配列： T P R G A A P P G Q (配列番号 2 4 6) と特異的に免疫反応性である、免疫学的結合パートナー。

【請求項 9】

モノクローナル抗体またはその結合断片である、請求項 8 に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のモノクローナル抗体を産生する細胞株。

20

【請求項 11】

請求項 8 または 9 に記載の免疫学的結合パートナーと、前記免疫学的結合パートナーと結合する競合物質と、任意選択的に、洗浄試薬、緩衝液、停止試薬、酵素標識、酵素標識基質、校正標準、抗マウス抗体、および前記キットを用いたアッセイを行うための説明書のうちの 1 つ以上とを含むイムノアッセイキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経変性状態または神経変性のバイオマーカーの開発に関し、より詳細には、治療計画に対する応答を示す生化学的マーカーを含む、アルツハイマー病および病気発症の予後を診断するのに有用な生化学的マーカーを検出するためのアッセイに関する。

30

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病 (A D) は、しばしばアルツハイマーとも称され、主として 6 5 歳より高齢の人々に影響を与える、進行性の、最終的には死に至る神経学的状態である。世界的に、推定 3 億 5 6 0 0 万人の人が A D に罹っており (2 0 0 9 年)、その数は、2 0 年毎に 2 倍なると予想される。米国だけでも、A D にかかるコストは、年間 1 4 8 0 億ドルを超えており、その金額は、世界規模では 3 2 0 0 億ドルを超え [ 3 ]、認知症 (そのうち 5 0 ~ 7 5 % のケースが A D である) のケアにかかるコストを比較したところ、そのコストは癌および心疾患のケアにかかるコストよりも明らかに高く、このことから、A D は、個人の観点からも健康管理の観点からも深刻な社会的負担であることがわかる。アルツハイマー病の経過は個人個人で異なるが、共通の症状があり、そのうち最も初期は認知に関するものであり、しばしば加齢またはストレスに起因するものと誤って認識される [ 3 7 ]。初期症状としては、短期記憶の衰えが挙げられ、疑わしい場合は、行動評価および認知テストが行われ、可能性がある場合は、診断を強固なものにするために脳の M R スキャンが行われる [ 3 7 ]。病気が進行するにつれ、症状としては、錯乱、興奮および攻撃性、言葉の崩壊、長期持続記録の損失などの一連の神経学的な問題が挙げられ、それにより個体は内向的になる [ 2 ]。最終的に身体機能が崩壊し始め、最後には死に至り、診断後の平均余命はおよそ 7 年である [ 2、2 8 ]。

40

【0003】

50

A Dをよりよく治療し理解することに関する主な問題は、病気の発症初期がはっきりしないため、A Dが完全に明らかになり診断がなされるまで数年進行してしまうことが多いことである [ 1 3 ]。さらにほとんどの場合、A Dの症状を有する個体は、一般的には、症状を引き起こす可能性のあるその他の原因が除外されたときだけ、病気の「可能性がある」罹患者と診断される。知的機能テストの使用により診断基準は標準化されてきているが、A Dは、病理解剖でしか確実に診断できないと一般に認識されている [ 2 7 ]。

#### 【 0 0 0 4 】

近年の研究によれば、イメージング技術に加えて生化学的マーカーを用いることで、ある程度の発展がなされたことが示されている。しかしながら、これらのアプローチは、それでもなおさらなる特徴付けおよび確認を要するため、発症の初期段階における感度が欠如していることによりしばしば限定的である [ 2 4、3 3、3 4、3 8、3 9 ]。

10

#### 【 0 0 0 5 】

現在用いられている治療は、わずかな一時的な緩和効果しかなく、見込みのあるA D治療法を同定するために5 0 0回を超える臨床試験が行われても、これまでに誰も治療可能性を確認していない事実からも説明されるように、進行を遅延または予防する能力による治療は、熱望されており利用価値の高いものである [ 1 ]。これらのデータ、加えて確立されたA Dバイオマーカーがないことから明らかに示されるように、病気の発症、進行、および治療応答などのA Dの重要な局面をより正確に反映することができるバイオマーカーの開発への投資が必要である。

#### 【 0 0 0 6 】

アルツハイマーのリスク評価は、A P O E 4変異体が関与するケースを除き不可能に近い [ 8 ]。さらに、試験薬物の有効性をモニターすることは可能であるが、全体的なA Dの病理学というよりも薬物の作用機序に直接的に関連付けられることが多い [ 8 ]。

20

#### 【 0 0 0 7 】

A D個体の脳組織の解析によれば、主に2つの重要な現象、すなわちベータアミロイド ( A ) を含む斑の形成と、T a uタンパク質の修飾型を含む神経原線維のもつれの形成 [ 1 0 ] とを示す細胞外マトリックスのリモデリング障害が強調されている [ 1 2 ]。これらの過程はいずれも病気の進行に大いに関連しており、興味深いことに、斑中のA の堆積は、実際のニューロン損傷よりも先に起こるが [ 3 0 ]、神経原線維のもつれの形成開始にかかわっており [ 3 2 ]、これが、神経細胞死の主な原因のようである [ 5、1 8 ]。A P Pは、多くの組織で発現される内在性膜タンパク質であり、ニューロンのシナプスで濃縮される。A P Pの基本的な機能は知られておらず、A P Pは、最も一般的には、3 9 ~ 4 2個のアミノ酸からなるペプチドであるベータアミロイド ( A ) の前駆体分子として研究されており、このベータアミロイドは、繊維状アミロイドの形態で存在する場合、アミロイド斑の主成分である [ 1 0 ]。A は、2種類のタンパク質分解による切断によって生産され、第一の切断は、 $\beta$ -セクレターゼ ( B A C E - 1 ) によってなされ、第二の切断は、 $\gamma$ -セクレターゼによってなされる。これらの連続的な生化学的現象は、A 形成に必須である [ 1 0 ]。さらに、その他の酵素的な切断、例えばA D A M 1 0 ( D i s i n t e g r i n A n d M e t a l l o p r o t e i n a s e ) 1 0 ) およびプレセニン - 1 による切断、加えてその他のタイプのA P Pの翻訳後修飾により、修飾されたペプチド断片が生成し、この臨床的有意性はまだ完全に解明されていないが、このような断片は病気の進行に関与することが予想される [ 1 0、1 1、1 9、2 5、4 0 ]。

30

40

#### 【 0 0 0 8 】

T a uタンパク質は、微小管を安定化するタンパク質であり、T a uタンパク質は、中枢神経系のニューロン中に非常に豊富に存在するがC N S以外にはほとんど存在せず、さらにT a uは、A Dにおける神経原線維のもつれの形成における重要な構成要素である [ 1 0 ]。さらに、T a uにおける突然変異は、タウオパチーと称される一群の神経変性障害に関連するが、T a uタンパク質の変化を伴う最も一般的な病気はA Dである [ 1 0、1 7 ]。リン酸化および酵素的な切断などの翻訳後修飾は、T a uの微小管を安定化させ

50

る能力を調節して、神経原線維のもつれを形成し、加えて小さい毒性タンパク質凝集体も形成する可能性があり、このような凝集体は、神経細胞死およびそれによる病気の進行に寄与する可能性がある [ 10、19 ]。tauタンパク質をコードするMAPT ( 微小管結合タンパク質 Tau ) 遺伝子は、16個のエキソンを含む第17染色体q21に存在している。ヒト脳における主要なtauタンパク質は、11個のエキソンによってコードされている。エキソン2、3、および10がオルタナティブスプライシングされることにより、6つの組み合わせが生じる ( 2<sup>-</sup>3<sup>-</sup>10<sup>-</sup>、2<sup>+</sup>3<sup>-</sup>10<sup>-</sup>、2<sup>+</sup>3<sup>+</sup>10<sup>-</sup>、2<sup>-</sup>3<sup>-</sup>10<sup>+</sup>、2<sup>+</sup>3<sup>-</sup>10<sup>+</sup>、2<sup>+</sup>3<sup>+</sup>10<sup>+</sup> )。従って、ヒト脳において、tauタンパク質は、アミノ酸を352~441個の範囲で含む6種のアイソフォームのファミリーによって構成される。これらのアイソフォームは、N末端部分 ( エキソン2および3 ) に29個のアミノ酸のインサートを0、1または2個有すること、およびエキソン10が欠失したC末端部分に3または4つの反復領域を有する点で異なる。従って、CNSにおいて最長のアイソフォームは、4つの反復 ( R1、R2、R3、およびR4 ) と2つのインサート ( 合計で441個のアミノ酸 ) とを有し、一方で最も短いアイソフォームは、3つの反復 ( R1、R3、およびR4 ) を有し、インサートを有さない ( 合計で352個のアミノ酸 ) [ 20 ]。MAPT遺伝子は、2つのハプログループ、H1およびH2を有し、その遺伝子は、逆方向を向いているようである。ハプログループH2は、欧州において、および先祖が欧州系の人々においてのみ一般的である。ハプログループH1は、アルツハイマー病などの所定の認知症の発生率の増加と関連があるようである。これらのアイソフォームはいずれもニューロンに見出されるが、アルツハイマー病の病理にそれぞれのアイソフォームがどの程度の役割を果たしているのかは明らかではない [ 20 ]。

#### 【 0009 】

Tauプロセシングに關与する酵素としては、カスパーゼ、トロンピン、加えて、MMPなどのニューロンにおける組織代謝に高い関連があるその他のプロテアーゼが挙げられる [ 4、10、10、14、15、19、26、29、31 ]。しかしながら本発明は、さらなる酵素群、すなわちセクレターゼに関する。

#### 【 0010 】

セクレターゼには3つのタイプ、すなわち 、 、 および -セクレターゼがある [ 10 ]。セクレターゼと称される酵素は、古典的には細胞外におけるタンパク質切断との関連が示されており、アルツハイマーについては、主にアミロイド前駆タンパク質 ( APP ) の切断、それによるアミロイド斑形成の主要な決定因子のアミロイド 生成との関連が示されている [ 10 ]。これらのカテゴリーは、セクレターゼがAPPを切断するタンパク質中の部位によって定義されるが、病理学的な関連性に関して、3つのタイプのセクレターゼのいずれかの機能に障害があると、アルツハイマーのような病理を引き起こすことがわかっている [ 10、11、35、36 ]。酵素の一覧としては、以下が挙げられる：

- セクレターゼ、例えばADAM9、10、17 ( TACE )、19、およびBACE

2

- セクレターゼ、例えばBACE1および2

- セクレターゼ複合体：プレセニリン1および/または2、ニカストリン、Aph-1a、Aph1b、ならびにPen-2。

#### 【 0011 】

これらの酵素の役割はセクレターゼとして説明されてきたため、これらの酵素のTau分解能はこれまでに評価されてこなかった。しかしながら、Tauは、アルツハイマー病が進行する間にかなりプロセシングされていることがよく知られている [ 14、15、17、26、29 ]。Tauを切断することがわかっており、このことから神経細胞死の誘導に關与することが示されている酵素としては、カスパーゼファミリーおよびカルパインが挙げられ、これらの酵素でTauを処理すると、よく説明された一連の断片の生成が起こることから、このような酵素は神経細胞死を引き起こすという仮説が立てられている [ 10、32 ]。

#### 【 発明の概要 】

10

20

30

40

50

## 【0012】

ここで本発明者らは、セクレターゼが介在するT a uの切断により断片が生成し、このような断片が、アルツハイマー病のバイオマーカーとして使用できるという可能性を調査した。

## 【0013】

ここで本発明は、第一の態様において、セクレターゼによるタンパク質の切断によって形成されるネオエピトープを含むペプチド断片を定量するためのバイオアッセイ方法であって、前記方法が、前記ペプチド断片を含む試料を、前記ネオエピトープに特異的な結合親和性を有する免疫学的結合パートナーと接触させるステップと、前記免疫学的結合パートナーの前記試料中のペプチド断片に対する結合レベルを決定するステップとを含み、前記タンパク質が、T a uタンパク質である、方法を提供する。

10

## 【0014】

T a uタンパク質は、あらゆる哺乳動物由来のものであってもよく、このような動物としては、げっ歯類、例えばマウスまたはラットが挙げられ、さらにイヌまたはサルも挙げられるが、好ましくはヒトである。

## 【0015】

ネオエピトープは、好ましくは、カスパーゼファミリーおよび/またはカルパインによるT a uの切断によって形成されたものではないネオエピトープである。

## 【0016】

任意選択的に、前記免疫学的結合パートナーは、T a uタンパク質のC末端ネオエピトープを含むペプチド断片に特異的な結合親和性を有する。あるいは前記免疫学的結合パートナーは、T a uタンパク質のN末端ネオエピトープを含むペプチド断片に特異的な結合親和性を有する。

20

## 【0017】

T a uタンパク質は、T a u - A、またはT a uファミリーの他のあらゆるメンバーであってよい。ネオエピトープは、2種以上または全てのT a uタンパク質に共通していてもよい。

## 【0018】

ネオエピトープは、好ましくは、A D A M 1 0またはB A S E - 1によるT a uタンパク質の切断によって形成されてもよい。ネオエピトープは、1種または複数のセクレターゼによって形成されてもよい。

30

## 【0019】

前記免疫学的結合パートナーは、好ましくは、以下に示すヒトT a u部分配列(表1) :

【表 1 A】

AAPPGQKGQAN	配列番号1	
AAPPGQKGQANAT	配列番号2	
APVMPDL	配列番号3	
APVMPDLK	配列番号4	
APVMPDLK	配列番号5	
ASLAKQGL	配列番号6	
ATLADEVASLAKQGL	配列番号7	
ATRIPA	配列番号8	10
ATRIPAKTPPAPK	配列番号9	
ATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPK	配列番号10	
ATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDR	配列番号11	
ATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号12	
DEAAGHVT	配列番号13	
DRKDQGGYT	配列番号14	
EAAGHVTQARMVSKSKD	配列番号15	
EAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGAD	配列番号16	
EDHAGTYG	配列番号17	20
EGDTDAGLK	配列番号18	
ENAKAKTDHGAEIVY	配列番号19	
ENAKAKTDHGAEIVYK	配列番号20	
EVMEDHAGTYG	配列番号21	
EVMEDHAGTYGLGDRKD	配列番号22	
EVMEDHAGTYGLGDRKD	配列番号23	
EVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD	配列番号24	
EVSASLAK	配列番号25	
EVSASLAKQGL	配列番号26	30
GAAPPGQKGQAN	配列番号27	
GAAPPGQKGQANAT	配列番号28	
GEPPKSGDRSGYS	配列番号29	
GSPGTPGSRSRTPSLPTPPT	配列番号30	
GTPGSRSRTPSLPTPPT	配列番号31	
HGAEIVYKSPVVS GDTS PRHLS NVSSTGSIDMV DSPQL	配列番号32	
HKPGGGQVEVK	配列番号33	
HVPGGGNKKIE	配列番号34	
HVPGGGNKKIET	配列番号35	40
HVPGGGSVQ	配列番号36	
IPAKTPPAPK	配列番号37	
IPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDR	配列番号38	
IPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号39	
KAKTDHGAEIVYK	配列番号40	

## 【表 1 B】

KSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIA	配列番号41	
KSPVVSGDTSRHL	配列番号42	
KTPPAPKTPSSGEPK	配列番号43	
KTPPAPKTPSSGEPKSGDR	配列番号44	
KTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号45	
LAKQGL	配列番号46	
LATLADEVASLAKQGL	配列番号47	
LKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLD	配列番号48	10
LKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSK	配列番号49	
LPTPPTR	配列番号50	
LPTPPTREPCKVA	配列番号51	
LPTPPTREPCKVAVV	配列番号52	
MHQDQEGDTDAGLK	配列番号53	
MHQDQEGDTDAGLK	配列番号54	
MVDSPLATLADEVASLAKQGL	配列番号55	
NATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号56	
NIHHPGGGQVE	配列番号57	20
NIHHPGGGQVEVK	配列番号58	
PGSPGTPGSRRTPS	配列番号59	
PMPDLK	配列番号60	
PPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号61	
PPKSGDRSGYS	配列番号62	
PPTREPCKVA	配列番号63	
PSSGEPKSGDRSGYS	配列番号64	
PVPMPDLK	配列番号65	
PVPMPDLK	配列番号66	30
QARMVS	配列番号67	
QLATLADEVASLAKQGL	配列番号68	
QTAPVMPDL	配列番号69	
QTAPVMPDLK	配列番号70	
QTAPVMPDLK	配列番号71	
RENAKAKTDHGAEIVYK	配列番号72	
RIPAKTPPAPK	配列番号73	
RIPAKTPPAPKTPPS	配列番号74	
RIPAKTPPAPKTPSSGEPK	配列番号75	40
RIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDR	配列番号76	
RIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号77	
RKDQGGYTMHQD	配列番号78	
RKDQGGYTMHQDQEGDTD	配列番号79	
RTPPKSPSSA	配列番号80	
RTPPKSPSSAKSRL	配列番号81	
RTPPKSPSSAKSRLQ	配列番号82	

## 【表 1 C】

RTPSLPTPPT	配列番号83	
RTPSLPTPPTR	配列番号84	
RTPSLPTPPTREPK	配列番号85	
RTPSLPTPPTREPCKVA	配列番号86	
SASLAKQGL	配列番号87	
SEKLDLDF	配列番号88	
SGDTSRPHLS	配列番号89	
SGEPPKSGDRSGYS	配列番号90	10
SLAKQGL	配列番号91	
SPGSPGTPGSR	配列番号92	
SPGSPGTPGSR	配列番号93	
SPGSPGTPGSRSR	配列番号94	
SPGSPGTPGSRRT	配列番号95	
SPGSPGTPGSRRTPS	配列番号96	
SPGSPGTPGSRRTPSLPTPPT	配列番号97	
SPGSPGTPGSRRTPSLPTPPTR	配列番号98	
SPGTPGSR	配列番号99	20
SPGTPGSRRTPSLPTPPTREPCKVA	配列番号100	
SPQLATLADEVASLAKQGL	配列番号101	
SPRPHLS	配列番号102	
SPSSAKSRL	配列番号103	
SPSSAKSRLQ	配列番号104	
SPVVSAGDTSRPHLS	配列番号105	
SRRTPSLPTPPT	配列番号106	
SRTPSLPTPPT	配列番号107	
SRTPSLPTPPTREPK	配列番号108	30
SRTPSLPTPPTREPCKVA	配列番号109	
STENLK	配列番号110	
TAPVMPDDL	配列番号111	
TAPVMPDLK	配列番号112	
TAPVMPDLK	配列番号113	
TAPVMPDLKN	配列番号114	
TAPVMPDLKNVK	配列番号115	
TLADEVASLAKQGL	配列番号116	
TPPAPK	配列番号117	
TPPAPKTPSSGEPPK	配列番号118	40
TPPAPKTPSSGEPPKSGDR	配列番号119	
TPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号120	
TPPKSPSSAK	配列番号121	
TPPKSPSSAKSRL	配列番号122	
TPPKSPSSAKSRLQ	配列番号123	
TPSSGEPPKSGDR	配列番号124	

## 【表 1 D】

TPSSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号125
TPRGAAPPQK	配列番号126
TPRGAAPPQKQAN	配列番号127
TPRGAAPPQKQANAT	配列番号128
TPSLEDEAAGHVVTQARMVSKSKD	配列番号129
TRIPAKTPPAPKTPSSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号130
TSPRHLSNVSTGSID	配列番号131
TSPRHLSNVSTGSIDMVDSPL	配列番号132
TSPRHLSNVSTGSID <u>M</u> VDSPLATLADEVSA <del>S</del> LAKQGL	配列番号133
VPGGGNKKIE	配列番号134
VSASLAKQGL	配列番号135

10

(表中、Mは酸化されたメチオニンを示す)

のいずれか1つを生成するプロテアーゼによるT a uタンパク質の切断によって形成されるネオエピトープを含むペプチド断片に特異的な結合親和性を有する。

## 【0020】

前記免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端における以下の配列(表2)：

20

## 【表 2 A】

AAPPGQ	配列番号136	
APVPMP	配列番号137	
APVP <u>M</u> P	配列番号138	
ASLAKQ	配列番号139	
ATLADE	配列番号140	
ATRIPA	配列番号8	10
DEAAGH	配列番号141	
DRKDQG	配列番号142	
EAAGHV	配列番号143	
EDHAGT	配列番号144	
EGDTDA	配列番号145	
ENAKAK	配列番号146	
EVMEDH	配列番号147	
E <u>V</u> MEDH	配列番号148	20
EVSASL	配列番号149	
GAAPPG	配列番号150	
GEPPKS	配列番号151	
GSPGTP	配列番号152	
GTPGSR	配列番号153	
HGAEIV	配列番号154	
HKPGGG	配列番号155	
IPAKTP	配列番号156	30
KAKTDH	配列番号157	
KSKDGT	配列番号158	
KSPVVS	配列番号159	
KTPPAP	配列番号160	
LAKQGL	配列番号46	
LATLAD	配列番号161	
LKNVKS	配列番号162	40
LPTPPT	配列番号163	
MHQDQE	配列番号164	
<u>M</u> HQDQE	配列番号165	
MVDSPQ	配列番号166	
NATRIP	配列番号167	

## 【表 2 B】

NIHHKP	配列番号168	
PGSPGT	配列番号169	
PMPDLK	配列番号60	
PPAPKT	配列番号170	
PPKSGD	配列番号171	
PPTREP	配列番号172	
PVPMPD	配列番号173	10
PVPMPD	配列番号174	
QARMVS	配列番号67	
QLATLA	配列番号175	
QTAPVP	配列番号176	
RENAKA	配列番号177	
RIPAKT	配列番号178	
RKDQGG	配列番号179	20
RTPPKS	配列番号180	
RTPSLP	配列番号181	
SASLAK	配列番号182	
SEKLDLDF	配列番号88	
SGDTSP	配列番号183	
SGEPPK	配列番号184	
SLAKQG	配列番号185	
SPGSPG	配列番号186	30
SPQLAT	配列番号187	
SPRHLS	配列番号102	
SPSSAK	配列番号188	
SPVVSG	配列番号189	
SRSRTP	配列番号190	
SRTPSL	配列番号191	
STENLK	配列番号110	
TAPVPM	配列番号192	40
TAPVPM	配列番号193	
TLADEV	配列番号194	
TPPAPK	配列番号117	
TPPKSP	配列番号195	
TPPSSG	配列番号196	

## 【表 2 C】

TPRGAA	配列番号197
TPSLED	配列番号198
TRIPAK	配列番号199
TSPRHL	配列番号200
VPGGGN	配列番号201
VSASLA	配列番号202

10

(表中、Mは酸化されたメチオニンを示す)  
のいずれかに特異的な結合親和性を有していてもよく、またはペプチドのC末端における以下の配列(表3)：

【表 3 A】

AAGHVT	配列番号203	
AEIVYK	配列番号204	
AKSRLQ	配列番号205	
APPGQK	配列番号206	
ATRIPA	配列番号8	
DLKNVK	配列番号207	10
DQGGYT	配列番号208	
DRSGYS	配列番号209	
EPKKVA	配列番号210	
GAEIVY	配列番号211	
GGGQVE	配列番号212	
GGGSVQ	配列番号213	
GKTKIA	配列番号214	20
GNKKIE	配列番号215	
GQANAT	配列番号216	
GQVEVK	配列番号217	
GSRRT	配列番号218	
GTPGSR	配列番号153	
HAGTYG	配列番号219	
INKKLD	配列番号220	30
KAKGAD	配列番号221	
KKVAVV	配列番号222	
KSPSSA	配列番号223	
LAKQGL	配列番号46	
LGDRKD	配列番号224	
LPTPPT	配列番号163	
MPDLKN	配列番号225	40
NKKIET	配列番号226	
PGSRSR	配列番号227	
PKSGDR	配列番号228	

## 【表 3 B】

PKTPPS	配列番号229	
PMPDLK	配列番号60	
<u>P</u> M <sub>2</sub> PDLK	配列番号230	
PTPPTR	配列番号231	
PTREPK	配列番号232	
QARMVS	配列番号67	10
QDQEGD	配列番号233	
QEGDTD	配列番号234	
QKGQAN	配列番号235	
RSRTPS	配列番号236	
SAKSRL	配列番号237	
SASLAK	配列番号182	
SEKLDL	配列番号88	20
SGEPPK	配列番号184	
SNVQSK	配列番号238	
SPRHLS	配列番号102	
SPSSAK	配列番号188	
STENLK	配列番号110	
STGSID	配列番号239	
TDAGLK	配列番号240	30
TPGSRS	配列番号241	
TPPAPK	配列番号117	
VDSPQL	配列番号242	
VPMPDL	配列番号243	
VSKSKD	配列番号244	
YTMHQD	配列番号245	

(表中、Mは酸化されたメチオニンを示す)  
 のいずれかに特異的な結合親和性を有していてもよい。

## 【0021】

好ましくは、前記免疫学的結合パートナーは、ペプチドのN末端における配列TPRGAA PPGQ (配列番号246) に特異的な結合親和性を有する。

## 【0022】

前記免疫学的結合パートナーは、特異的な結合親和性を有するモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体の断片であってもよい。

## 【0023】

前記方法は、前記免疫学的結合パートナーおよび競合物質を前記試料の存在下でインキュベートし、競合物質を、試料中のペプチド断片と競合させて、免疫学的結合パートナー

40

50

に結合させる競合的イムノアッセイとして行ってもよい。前記競合物質は、合成ペプチドであってもよいし、または、前記ネオエピトープが出現するように前記エピトープの元となるタンパク質を切断することによって形成された精製された天然ペプチドであって、特に、N末端における配列 T P R G A A P P G Q (配列番号 2 4 6) を含むペプチドであってもよい。

【0024】

試料は、哺乳動物、例えばマウス、ラット、イヌまたはサルの試料であってもよいが、特にヒトの髄液、尿、血清、血液、血漿または唾液試料であってもよい。試料は、患者由来の試料であってもよく、前記方法は、前記ペプチド断片の前記決定された結合レベルを、(a)比較可能な健康な個体および/または(b)病理学的神経変性状態、特にアルツハイマーに特徴的な値と比較するステップをさらに含む。測定されたレベルは、同じ患者から得られた前の測定値と比較してもよい。

10

【0025】

さらなる態様において、本発明は、セクレターゼによる T a u タンパク質の切断によって形成される C 末端または N 末端ネオエピトープに対する免疫学的結合パートナーを含む。免疫学的結合パートナーは、表 2 に記載のアミノ酸配列のいずれか 1 つの N 末端または表 3 に記載のアミノ酸配列のいずれか 1 つの C 末端と特異的に免疫反応性であってもよい。

【0026】

免疫学的結合パートナーは、モノクローナル抗体またはその結合断片であってもよい。本発明は、このようなモノクローナル抗体または結合断片を産生する細胞株を含む。

20

【0027】

さらなる態様において、本発明は、表 1 に記載の前記 T a u タンパク質の部分配列のいずれか 1 つの末端における、セクレターゼによる T a u タンパク質の切断によって形成される C 末端または N 末端ネオエピトープを含むペプチドを含む。前記ペプチドは、前記ペプチドに対する免疫応答を起こすためのハプテンとして担体にコンジュゲートしてもよいし、あるいはイムノアッセイに使用するために固体表面に固定してもよいし、または検出可能なマーカーにコンジュゲートしてもよい。

【0028】

さらなる態様において、本発明は、表 1 に記載の前記 T a u タンパク質の部分配列のいずれか 1 つ中の、セクレターゼによる前記 T a u タンパク質の切断によって形成される C 末端または N 末端ネオエピトープを含むペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する。

30

【0029】

よりさらなる態様において、本発明は、表 1 に記載の前記タンパク質の部分配列のいずれか 1 つ中の、セクレターゼによる前記 T a u タンパク質の切断によって形成される C 末端または N 末端ネオエピトープを含むペプチドの発現をコードする発現シグナルとコード配列とを含む核酸配列を含むベクターを提供する。

【0030】

よりさらなる態様において、本発明は、上述したベクターで形質転換され、前記ペプチドを発現する宿主細胞を提供する。

40

【0031】

よりさらなる態様において、本発明は、上述した免疫学的結合パートナーと、前記免疫学的結合パートナーと結合する競合物質と、任意選択的に洗浄試薬、緩衝液、停止試薬、酵素標識、酵素標識基質、校正標準、抗マウス抗体、および前記キットを用いたアッセイを行うための説明書のうちの 1 つ以上とを含むイムノアッセイキットを提供する。

【0032】

添付の図面を参照しながら、本発明をさらに説明し図説する。

【図面の簡単な説明】

【0033】

50

【図1】0、0.782、1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、および100 ng/mLの濃度で選択ペプチドまたは伸長ペプチドのいずれかを用いた標準曲線の例を示すグラフである。

【図2】対照またはTg4510マウス(アルツハイマー病モデル)のいずれかから抽出された脳で測定された競合的ELISA試験の結果を示すグラフである。

【図3】野生型およびTg4510マウスからの脳抽出物を比較したウェスタンブロットを示す図である。右：未切断のTau(MAB3420 Chemicon)を認識する抗体を用いて行われたウェスタンブロットである。右：自社製の抗体(NB191)を用いて行われたウェスタンブロットである。

【図4】CSFおよび血清試料中のADAM10によって生成したTau断片のレベルの相関を示すグラフであり、これは、Tau断片が、両方の試料においてモニターが可能なことを示す。

10

【図5】Tau断片は年齢とは相関するがBMIとは相関しないことを示すグラフである。

【図6】女性における重度のアルツハイマーの進行を追跡するための、Tau断片レベルの能力を示すグラフである。

【図7A-F】Tau-Aアッセイを特徴付け、その生物学的バリデーションを示す実施例2の結果を示す図である。A)0、0.59、1.17、2.34、4.69、9.38、18.75、37.5、75、150、および300 ng/mLの濃度で選択ペプチドまたは伸長ペプチドのいずれかを用いた標準曲線。B)インビトロでのTau消化におけるTau-A断片の測定。C)抽出された組織のウェスタンブロット。D)ADAM10の存在下または非存在下における脳抽出物のELISA測定。E)ELISAを用いて測定された、対照またはTg4510マウス(アルツハイマー病モデル)のいずれかから抽出された脳におけるTau-Aレベル。F)野生型およびTg4510マウスからの脳抽出物を比較するウェスタンブロット。左：未切断のTau(MAB3420 Chemicon)を認識する抗体を用いて行われたウェスタンブロット。右：自社製の抗体(NB191)を用いて行われたウェスタンブロット。

20

【図8】Tau-Aレベルの病理学的に関連する変化を示すグラフであり、これにより、Tau-AとMattis認知症評価スケール(MDRS)との逆相関が実証される。

【発明を実施するための形態】

30

【0034】

以下の実施例において本発明をさらに説明し例示する。

【実施例1】

【0035】

<インビトロでの切断>

活性化ADAM10またはBACE1のいずれかを用いて組換えTAUを切断した。セクレターゼ緩衝液(100mM酢酸ナトリウム、pH4.0)中で100μgおよび1μgの酵素(ADAM10またはBACE1)を3日間混合することによってプロテアーゼによる切断を行った。最後に、切断を、SilverXpress(登録商標)銀染色キット(カタログ番号LC6100、インビトロgen、Carlsbad、Ca、USA)を製造元の説明書に従って用いて可視化することにより確認した。

40

【0036】

<ペプチドの同定>

マトリックス支援レーザー脱離飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)および、エレクトロスプレーイオン化(ESI)タンデム質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィー(LC-MS/MS)を用いて、インビトロ切断試料中のペプチド断片を同定した。MALDI-TOF試料を、C18ジップチップ(カタログ番号ZTC18SO24、Millipore、Billerica、MA、USA)を仕様書に従って用いて精製し、0.1μgの材料を、MTP384研削スチール製ターゲットプレート(Bruker-Daltonics、Bremen、Germany)上に溶出させた。MA

50

LDI タンデムの質量スペクトルを、Bruker のウルトラフレックスMALDI - TOF / TOF 質量分析計 ( Bruker - Daltonics、Bremen、Germany ) に陽イオンリフレクターモードで記録した。質量スペクトルを、ウシ - ラクトグロブリンをトリプシン消化することにより生成したペプチドを用いて 800 ~ 4000 m / z の範囲に外部較正した。m / z ソフトウェア「Flexanalysis」( Bruker - Daltonics、Bremen、Germany ) を用いてスペクトルを解析した。LCMS 試料を限外濾過して、10 kDa より大きいタンパク質を除去し、ギ酸を用いて pH を 2.0 に調節し、4  $\mu$ L の試料を LC - MS / MS によって解析した。LC を、nanoACQUITY UPLC BEH C18 カラム ( Waters、Milford、MA、USA ) で、ギ酸 / アセトニトリルの濃度勾配を用いて行った。MS および MS / MS を、Synapt High Definition Mass Spectrometry 四重極型飛行時間型質量分析計 ( QUAD - TOF ; Waters、Milford、MA、USA ) で、350 ~ 1600 m / z ( MS ) および 50 ~ 2000 m / z ( MS / MS ) の捕捉範囲で行った。ソフトウェア「ProteinLynx Global SERVER ( PLGS )」( Waters、Milford、MA、USA ) を用いてスペクトルを解析し、ピークのリストを得た。ペプチドを同定するために、Mascot 2.2 ( Matrix Science、Boston、MA、USA ) ソフトウェアを MALDI - TOF / TOF または ESI - QUAD - TOF 設定のいずれかで用いて、MS および MS / MS データを Tau ( FASTA ) タンパク質データベースで検索した。

10

20

【 0037 】

以下のペプチド断片を同定した。

M は酸化されたメチオニンを示す。

Tau + BACE1

## 【表4】

T a u + B A C E 1

ペプチド

LAKQGL	配列番号46	
SLAKQGL	配列番号91	
ASLAKQGL	配列番号6	
EVSASLAK	配列番号25	
SASLAKQGL	配列番号87	
VSASLAKQGL	配列番号135	10
SPGSPGTPGSRS	配列番号93	
EVSASLAKQGL	配列番号26	
HVPGGGNKKIE	配列番号34	
EVMEDHAGTYG	配列番号21	
RKDQGGYTMHQD	配列番号78	
NIHHKPGGGQVEVK	配列番号58	
TLADEVSASLAKQGL	配列番号116	
ATLADEVSASLAKQGL	配列番号7	
TSPRHLSNVSTGSID	配列番号131	
LATLADEVSASLAKQGL	配列番号47	20
EAAGHVTQARMVSKSKD	配列番号15	
QLATLADEVSASLAKQGL	配列番号68	
EVMEDHAGTYGLGDRKD	配列番号22	
EVMEDHAGTYGLGDRKD	配列番号23	
SPQLATLADEVSASLAKQGL	配列番号101	
RKDQGGYTMHQDQEGDTD	配列番号79	
MVDSPQLATLADEVSASLAKQGL	配列番号55	
TSPRHLSNVSTGSIDMVDSPQL	配列番号132	
TPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKD	配列番号129	
EAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGAD	配列番号16	30
EVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD	配列番号24	
LKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLD	配列番号48	
HGAEIVYKSPVVS <sup>U</sup> SGDTSPRHLSNVSTGSIDMVDSPQL	配列番号32	
TSPRHLSNVSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL	配列番号133	
LKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSK	配列番号49	

T a u + A D A M 1 0

## 【表 5 A】

T a u + A D A M 1 0

ペプチド

TPPAPK	配列番号117	
ATRIPA	配列番号8	
QARMVS	配列番号67	
STENLK	配列番号110	
SPRHLS	配列番号102	
PMPDLK	配列番号60	10
SEKLDL	配列番号88	
LPTPPTR	配列番号50	
DEAAGHVT	配列番号13	
HVPGGGSVQ	配列番号36	
APVMPDL	配列番号3	
SPGTPGSR	配列番号99	
EDHAGTYG	配列番号17	
PVMPDLK	配列番号65	
EGDTDAGLK	配列番号18	
PVMPDLK	配列番号66	20
SPSSAKSRL	配列番号103	
TAPVMPDL	配列番号111	
APVMPDLK	配列番号4	
APVMPDLK	配列番号5	
VPGGGNKKIE	配列番号134	
SPGSPGTPGSR	配列番号92	
TPPKSPSSAK	配列番号121	
IPAKTPPAPK	配列番号37	
RTPPKSPSSA	配列番号80	
AAPPGQKGQAN	配列番号1	30
DRKDQGGYT	配列番号14	
SGDTSPRHLS	配列番号89	
SPSSAKSRLQ	配列番号104	
RTPSLPTPPT	配列番号83	
QTAPVMPDL	配列番号69	
TAPVMPDLK	配列番号112	
TPRGAAPPGQK	配列番号126	
TAPVMPDLK	配列番号113	
SPGSPGTPGSR	配列番号93	
GAAPPGQKGQAN	配列番号27	40
EVSASLAKQGL	配列番号26	
PPTREPCKVA	配列番号63	
HVPGGGNKKIE	配列番号34	
HKPGGGQVEVK	配列番号33	
PPKSGDRSGYS	配列番号62	
SRTPSLPTPPT	配列番号107	

## 【表 5 B】

TAPVPM <del>P</del> DLKN	配列番号114	
QTAPVPM <del>P</del> DLK	配列番号70	
AAPP <del>G</del> QKGQANAT	配列番号2	
QTAPVPM <del>P</del> DLK	配列番号71	
RTPSLPT <del>P</del> PTR	配列番号84	
HVPGGGNKKIET	配列番号35	
SPGSPGTPGSR <del>S</del> R	配列番号94	
GAAPP <del>G</del> QKGQANAT	配列番号28	
NIHHKPGGGQVE	配列番号57	10
GEPPKSGDRSGYS	配列番号29	
SPGSPGTPGSR <del>S</del> R	配列番号95	
ATRIPAKTPPAPK	配列番号9	
TPPKSPSSAKSRL	配列番号122	
TAPVPM <del>P</del> DLKNVK	配列番号115	
TPSSGEPPKSGDR	配列番号124	
SGEPPKSGDRSGYS	配列番号90	
LPTPPTREP <del>K</del> KVA	配列番号51	
SPVVS <del>G</del> DTSPRHLS	配列番号105	
PGSPGTPGSR <del>S</del> RTPS	配列番号59	20
TPRGAAPP <del>G</del> QKGQAN	配列番号127	
KAKTDHGAEIVYK	配列番号40	
TPPKSPSSAKSRLQ	配列番号123	
NIHHKPGGGQVEVK	配列番号58	
RTPPKSPSSAKSRL	配列番号81	
SPGSPGTPGSR <del>S</del> RTPS	配列番号96	
MHQDQEGD <del>T</del> DAGLK	配列番号53	
SRSRTPSLPT <del>P</del> PTR	配列番号106	
RIPAKTPPAPKTPPS	配列番号74	
MHQDQEGD <del>T</del> DAGLK	配列番号54	30
KSPVVS <del>G</del> DTSPRHLS	配列番号42	
ATLADEV <del>S</del> ASLAKQGL	配列番号7	
RTPSLPTPPTREP <del>K</del>	配列番号85	
TPPAPKTPPSSGEPPK	配列番号118	
PSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号64	
TPRGAAPP <del>G</del> QKGQANAT	配列番号128	
LPTPPTREP <del>K</del> KVAVV	配列番号52	
RTPPKSPSSAKSRLQ	配列番号82	
ENAKAKTDHGAEIVY	配列番号19	
SRTPSLPTPPTREP <del>K</del>	配列番号108	40
KTPPAPKTPPSSGEPPK	配列番号43	
ENAKAKTDHGAEIVYK	配列番号20	
TPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号125	
GTPGSR <del>S</del> RTPSLPT <del>P</del> PTR	配列番号31	
RTPSLPTPPTREP <del>K</del> KVA	配列番号86	
RENAKAKTDHGAEIVYK	配列番号72	
GSPGTPGSR <del>S</del> RTPSLPT <del>P</del> P	配列番号30	

## 【表 5 C】

SRTPSLPTPPTREPCKVA	配列番号109	
TPPAPKTPSSGEPKSGDR	配列番号119	
KTPPAPKTPSSGEPKSGDR	配列番号44	
SPGSPGTPGSRRTPSLPTPPT	配列番号97	
RIPAKTPPAPKTPSSGEPK	配列番号75	
SPGSPGTPGSRRTPSLPTPPT	配列番号98	
PPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号61	
KSKDGTGSDDKAKGADGKTKIA	配列番号41	
ATRIPAKTPPAPKTPSSGEPK	配列番号10	10
TPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号120	
IPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDR	配列番号38	
KTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号45	
RIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDR	配列番号76	
SPGTPGSRRTPSLPTPPTREPCKVA	配列番号100	
ATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDR	配列番号11	
IPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号39	
RIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号77	
TRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号130	
ATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号12	20
NATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYS	配列番号56	

## 【 0 0 3 8 】

< 免疫化のためのペプチドの選択 >

MSによって同定された配列それぞれの遊離末端の最初の6個のアミノ酸を、対象のプロテアーゼによって生成したネオエピトープとみなした。得られた全てのプロテアーゼによって生成した配列を相同性および他の切断部位への距離に関して解析し、続いてNPS@：ネットワークタンパク質配列解析を用いて相同性に関してBLAST解析を行った。

## 【 0 0 3 9 】

< 試薬およびペプチド >

全ての試薬は、MerckおよびSigma Aldrichなどの会社から得た標準的な高品質の化学物質であった。モノクローナル抗体生産および確認に用いられた合成ペプチドは、(a)免疫原性ペプチド：TPRGAAPPQ-GGC-KLH(配列番号248-KLH)(キーホール-リンペット-ヘモシニアン)、(b)スクリーニングペプチドTPRGAAPPQ(配列番号246)、(c)N末端で1つのアミノ酸を伸長させた除外ペプチドATPRGAAPPQ(配列番号247)(これは、Chinese Peptide Company、Beijing、Chinaから購入した)であった。ペプチドのコンジュゲート試薬を、Pierce(ThermoFisher、Denmark)によって生産した。

## 【 0 0 4 0 】

< ELISAに用いられた緩衝液 >

コーティングのペプチドを溶解させるのに用いられた緩衝液は、以下のもの、すなわち(150mMトリズマ、1%BSA、0.05%トゥイーン20、0.36%プロニドックスL5、pH8.0(トリスBTB)で構成され、反応停止緩衝液は、0.1% $H_2SO_4$ で構成された。

## 【 0 0 4 1 】

アッセイの開発に用いられたELISAプレートを、Rocheのストレプトアビジン(カタログ：11940279)でコーティングした。全てのELISAプレートを、Molecular Devices、SpectraMax M、(CA、USA)のELISAリーダーで解析した。

## 【0042】

## &lt;ELISAの開発&gt;

モノクローナル抗体開発の方法は、これまでに説明された通りである〔6〕。簡単に言えば、4～6週齢のBalb/Cマウスの皮下に200 $\mu$ lの乳化した抗原および50 $\mu$ gのTPRGAAPPQG-GGC-KLH(配列番号248-KLH)を入れることにより免疫化した。安定な血清抗体価レベルに達するまでフロイント不完全アジュバント中で2週間の間隔で連続的に免疫化し、2回目の免疫化後のマウスから採血した。採血ごとに血清抗体価を検出し、最高の抗血清抗体価を示したマウスを融合用を選択した。選択されたマウスを1ヶ月安静にさせ、続いて、細胞融合のために脾臓を取り出す3日前に、100 $\mu$ lの0.9%塩化ナトリウム溶液中の50 $\mu$ gのTPRGAAPPQG-GGC-KLH(配列番号248-KLH)で静脈内に追加免疫した。

10

## 【0043】

## &lt;融合&gt;

骨髄腫細胞としてSP2/0を用いて、これまでに説明されている融合法〔16〕を行った。半固形培地を用いる方法で、融合細胞を35mmの細胞培養皿中でクローニングし、培養皿をCO<sub>2</sub>インキュベーターでインキュベートした。続いてクローンを16個の96ウェルマイクロタイタープレートで平板培養し、3日間そのままにし、続いて培養上清をスクリーニングした。

## 【0044】

## &lt;抗体のスクリーニング&gt;

競合ELISAの設定で上清をスクリーニングした。選択ペプチドとしてペプチドTPRGAAPPQG(配列番号246)を用い、伸長ペプチドとしてATPRGAAPPQG(配列番号247)を用いた。選択ペプチドに特異的であり、伸長ペプチドに対する交差反応性がない細胞株を選択し、抗体を精製した。

20

## 【0045】

## &lt;Tau-A ELISAの手順&gt;

予備実験において、本発明者らは、数々の交差力価解析を行うことによって試薬、それらの濃度、およびインキュベーション期間を最適化した。Tau-A ELISAを以下のように開発した。ストレプトアビジンで予めコーティングした96ウェルのELISAプレートをさらに、トリスBTB緩衝液中に溶解させた6ng/mlの合成ペプチドTPRGAAPPQG-ビオチン(配列番号246-ビオチン)で、20で30分、300rpmで一定して振盪することによりコーティングした。プレートを洗浄緩衝液中で5回洗浄し、20 $\mu$ lの試料を添加し、続いて100 $\mu$ lのペルオキシダーゼコンジュゲート抗ヒトmAb-Tau-A溶液(50ng/ml)を添加した。プレートを、100mMトリスBTB緩衝液中で、300rpmで振盪しながら20で1時間インキュベートした。

30

## 【0046】

再度プレートを5回洗浄し、続いて100 $\mu$ lのテトラメチルベンジジン(tetramethylbenzidine)(TMB)(Kem-En-Tecカタログ4380H)を添加した。プレートを暗所で15分インキュベートし、300rpmで振盪した。反応を止めるために、100 $\mu$ lの停止溶液(95～97%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、Merckカタログ番号:1.00731)を添加し、ELISAリーダーで、450nmでプレートを解析し、参照として650nmを使用した。

40

## 【0047】

## &lt;標準&gt;

標準曲線を、TPRGAAPPQG-ビオチン(配列番号246-ビオチン)の連続希釈によって得た。標準濃度は、0、0.782、1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、および100ng/mlであった。

## 【0048】

## &lt;抗体の天然の反応性を試験するための試料&gt;

アッセイの開発および確認に、様々な年齢および性別の健康な成人の対象の血清を用い

50

た。血清試料は、23～45歳の若い健康な志願者から得た。本発明者らはまた、種間の交差反応性のレベルを決定するために、マウスおよびラットなどの異なる種の血清試料も試験した。最後に、本発明者らはまた、髄液(CSF)および血漿試料も試験した。

【0049】

<動物試料>

5月齢の5匹の野生型マウスおよび5匹のTg4510タウオパチーマウスの急速冷凍した脳[9]を以下のプロトコールに従って抽出した。

【0050】

Bessman粉砕機を用いて組織を粉砕して、重さを量った。抽出緩衝液(50mM トリスHCl、50mMのHEPES、15%グリセロール、1mMのEDTA、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、Rocheプロテアーゼ阻害剤(カタログ番号05056489001)、最終pH8.3)1mLあたり250mgの組織を用いて、組織を抽出した。溶解産物を超音波破碎で透明化し、4 / 5分 / 10000rpmで遠心分離した後に上清を回収した。BioRadのDC Protein Assayを用いてタンパク質濃度を決定した。

【0051】

<ウェスタンブロッティング>

100μgの各抽出物を、SDS-PAGEゲル上にローディングした。[23]で説明されているようにして、ゲルを泳動し、試料をニトロセルロースメンブレンに移した。スキムミルク粉末を含むTBS-T中で100ng/mLに希釈した一次抗体とインキュベートすることによって、Tau-A断片および全Tauタンパク質のレベルを検出した[22]。続いて、これまでに説明されているようにしてホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートマウスIgGを認識する二次抗体を用いて、最後に増強した化学発光を用いてプロットを可視化した[21]。

【0052】

<ヒト試料>

2セットのヒト試料を用いた。1つのセット(51試料)は、変形性関節症研究の血清試料のコレクションであり、この研究は、18～75歳の参加者、加えて肥満指数データを含んでいた[7]。

【0053】

第二のセットの試料は、重度のアルツハイマー病患者の一对の血清およびCSF試料であった。これらの試料は、基準時および経過観察時(18ヶ月後)に、同じ個体で回収された試料のサブセットを含んでいた。

【0054】

<統計的分析>

アッセイを確認するために、検量線に4つのパラメーターのロジスティック回帰を適用して、光学密度を分析物濃度に対してフィッティングした。全ての標準および試料について、平均、標準偏差、パーセンテージ変動係数(%CV)、および理論値からの差を計算した。GraphPad Prism5(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて定量データを解析した。ガウス分布を仮定するのではなくスチューデントの対応のない両側t検定を用いて平均間の有意差を決定した。線形回帰を用いて、血清Tau値と研究されたその他の変数との相関を解析した。データを平均±標準誤差として示し、p値が0.05またはそれより低い場合に平均および差を有意とみなした。

【0055】

[結果]

<ELISAの技術的な詳細>

脾臓および骨髄腫細胞の融合の後に生成した抗体産生クローンから、アッセイで最も良い天然型の反応性、親和性、および安定性を示した抗体を選択した。抗体精製およびそれに続くELISAの開発のために選択されたクローンは、TPRGAAPPGQ(配列番

10

20

30

40

50

号246)に対して発生したNB191-3C4であった。

【0056】

<標準曲線および回収>

図1に典型的な標準曲線を示したが、これは、0、0.782、1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、および100 ng/mLのペプチド濃度に基づいて試料濃度を決定するための、選択された標準および4つのパラメーターでフィッティングした方程式を示す。加えて、抗体の特異性は、まったく反応を示さなかった同じ濃度の伸長ペプチドとの比較により示される。

【0057】

異なる試料における希釈による直線性または回収率の決定は、以下の通りの結果であった。希釈された試料1+1、1+2、1+3、1+4、1+5、1+6、および1+7から希釈されていない試料に逆算することにより決定された平均回収率は、100%に近く、推奨される±10%の範囲内であった(データ示さず)。

【0058】

<アルツハイマーマウスおよびその対照からの脳の分離>

Tg4510マウスおよびそれに対応する対照から抽出された脳をNB191-3C4 ELISAの構成で測定することによって、それら进行评估した。図2でみられるように、極めて明確な分離が観察され、すなわちTg4510は、対応する対照と比較して10倍高いレベルのTau-Aを示した。加えて、ウェスタンブロットを行ったところ、図3でみられるように、Tg4510マウスは、極めて高いレベルのTau-Aを示したが、対照マウスは、等量のタンパク質をローディングしたとしても極めてわずかなレベルのTau-Aしか示さなかった(データ示さず)。その他の再度の精査でも、この病理におけるTau凝集と関連するTg4510において高分子量バンドの強度はより強かったが、全Tauに対する抗体を用いたブロットは、全Tauでほぼ同じレベルを示した。

【0059】

<Tau-AのCSFおよび血清レベルの相関>

CSFと血清の組み合わせ試料33個について、本発明者らは、2つの分析物においてTau-Aレベルの相関があるかどうかについて調査した。図4でみられるように、両方の分析物において有用なレベルのTau-Aが検出され、顕著ではないが適度な相関が観察された。

【0060】

<Tau-Aは年齢とは相関するが肥満指数とは相関しない>

OA研究の血清試料において、本発明者らは、Tau-Aレベルの評価を年齢および肥満指数との相関に関して行った。ここで(図5)本発明者らは、年齢とは正相関を示す傾向があるが、BMIとは相関しないことを見出した。これらのデータから、Tau-Aは、アルツハイマー病のマーカーとして加齢に伴って増加することが示される。

【0061】

<病気の進行の指標>

アルツハイマーのコホートの血清試料のサブセットは、基準時および18ヶ月後に回収された試料であった。これらのデータは女性のもののみであるが、図6では、これらの7人の女性において、基準時から経過観察時にかけてTau-Aレベルが増加していることが強く示されており、従って、アルツハイマーの進行は連続的な過程であることがよく知られているように、Tau-Aは、病気が進行するにつれて増加することが示される。

【実施例2】

【0062】

<抗体の天然の反応性を試験するための試料>

アッセイの開発および確認のために、男女両方の23~45歳の健康な成人の志願者15人の血清および血漿を用いた。本発明者らはまた、種間の交差反応性のレベルを決定するために、マウスおよびラットの血清試料も試験した。

【0063】

10

20

30

40

50

## &lt; 動物試料 &gt;

5匹の6月齢のスプレーグ・ドーリー・ラットから単離された脳、肝臓、筋肉、結腸、腎臓、肺、皮膚、および膵臓などの組織と、野生型またはTg4510マウスそれぞれの5つの脳とを液体窒素中で瞬間冷凍し、Bessman粉砕機を用いて粉砕した。「粉末」をバイアルに移して、重さを量った。抽出緩衝液(50mMトリスHCl、50mMのHEPES、1mMのEDTA、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、15%グリセロール、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Rochecatalog番号05056489001)、pH8.3)を組織250mgにつき緩衝液1mLの量で添加した。超音波破碎によって溶解産物を透明化した。超音波破碎後、死細胞片を4/5分/10000rpmで遠心除去し、上清を回収し、次に使用するまで-80で保存した。DC Protein Assay(Biorad)を用いてタンパク質濃度を決定した。

10

## 【0064】

## &lt; インビトロでの組織の切断 &gt;

MMP緩衝液(100mMトリスHCl、100mMのNaCl、10mMのCaCl<sub>2</sub>、2mM酢酸亜鉛、pH8.0)中で100μgの組織抽出物と1μgのADAM10とを混合し、7日間インキュベートすることによって、プロテアーゼによる切断を行った。最後に、ウェスタンブロットティングおよびELISA解析で切断を確認した。

## 【0065】

## &lt; ウェスタンブロットティング &gt;

20μgの各ラット組織抽出物および100μgの各マウス組織抽出物を、SDS-PAGEゲル上にローディングした。これまでに説明されたようにして<sup>15</sup>、ゲルを泳動し、試料をニトロセルロースメンブレンに移した。次に、ボンソーレッド染色を用いて、メンブレン上に同量のタンパク質がローディングされたことを確認した。Tau-A断片および全Tauタンパク質のレベルを、スキムミルク粉末を含むTBS-T中で100ng/mLに希釈した一次抗体とインキュベートすることによって検出した<sup>15</sup>。次に、これまでに説明されたようにして<sup>15</sup>、ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートマウスIgGを認識する二次抗体を添加し、最後に増強した化学発光を用いてプロットを可視化した。

20

## 【0066】

## &lt; ヒト試料 &gt;

アルツハイマー病患者(n=21)の血清試料を得た。特徴は、70(+/-7)歳の発病年齢、女性/男性(16/6)、112(+/-12)の基準時のMDRSスコア、849(+/-1009)の無傷のtauレベルである。

30

## 【0067】

## &lt; Tau-A ELISAアッセイの特徴付け &gt;

ADAM10によって生成したTauの切断配列(TPRGAAPPQG、配列番号246)を認識する抗体を選択し、ELISA(Tau-A)の開発に用いた。図7Aで見られるように、このアッセイは、反応性を失わせるように1つのアミノ酸で配列を伸長させた切断部位に特異的であった。さらにADAM10で分解された組換えtauまたは脳抽出物を用いて特異性を確認したところ、切断されたtauへの特異性が確認された(図7B~C)。加えて、組織のプロファイリングにより、Tauは主として脳由来であることが確認された。検出下限(LLOD)は2.9ng/mLと決定され、検出上限(ULOD)は226.3ng/mLであった。このアッセイは技術的にロバストであり、ヒト血清および血漿だけでなくマウスおよびラット血清でも1+2~1+6の希釈範囲内でTau-Aレベルを検出することができた(データ示さず)。加えて、上述した希釈範囲内で直線的な添加回収率を得た(データ示さず)。イントラアッセイの変動係数は5.8%であり、一方でインターアッセイのCV%は12.6%であった。5回の連続した凍結融解サイクル後でも反応性の損失は観察されなかった。

40

## 【0068】

## &lt; Tau-A ELISAの生物学的な確認 &gt;

50

E L I S Aを用いた解析から、T g 4 5 1 0マウスの脳は、それに対応する野生型対照よりも10倍高いレベルのT a u - Aを有することが明らかになった(図7E)。またウェスタンブロッティングによっても、T g 4 5 1 0マウスは、極めて高いレベルのT a u - Aを有するが、一方で対照マウスは、極めてわずかなT a u - Aしか有さないことが示された(図7F)。全T a uに対する抗体を用いたプロットを再度精査したところ、T g 4 5 1 0において、高分子量バンドの強度がより強かったが、全T a uでほぼ同じレベルを示した。

#### 【0069】

< T a u - AレベルはM D R Sスコアと相関する >

マーカーとAD病の段階との関係を確認できるかどうかを調査するために、本発明者らは、AD患者におけるT a u - Aレベルと、M a t t i s認知症評価スケール<sup>10</sup>を用いて得られたスコアとを関連付けたところ、M D R SとT a u - Aとの間に有意な( $p = 0.003$ )逆相関があることを見出した(図8)。このコホートにおいて、C S F中の無傷のT a uまたは年齢などのその他のパラメーターとの相関は観察することはできなかった(データ示さず)。

#### 【0070】

< 考察 >

血清および/または血漿ベースの潜在的ADマーカーは広く調査されているが、これまでのところ認知機能との相関を示す唯一のバイオマーカーしか同定されていない<sup>1-3</sup>。これは、本発明者らが知る限り、血清中のT a uのタンパク質分解過程をモニターする最初の生化学的マーカーであり、AD病理の重要な第一歩と思われる<sup>9</sup>。このマーカーはまた、認知機能と相関する脳特異的タンパク質の最初の唯一の血清バイオマーカーでもある。ADにおいてネオエピトープが広く調査されてきたが、A 42およびリン酸化T a uの測定値が、病気の結果として形成されるネオエピトープとして報告されており<sup>4</sup>、これまでにインビトロで生成したT a u断片に関する選択的な血清のスクリーニングはなされてこなかった。

#### 【0071】

この研究のために選択されたA D A M 1 0とT a uとの組み合わせは、ADが進行する間、T a uは、脳中で直接的に、あるいはその他の脳のプロテアーゼによって生成した断片としてセクレターゼによる切断に曝露され、続いてT a uが循環系に入ると二次的にプロセッシングされという新しい仮説に基づいているが、これは、さらなる研究を必要とする。本発明者らは、血清中で特異的なA D A M 1 0によって生成したT a uペプチド断片を検出することができ、加えてT g 4 5 1 0マウスの脳中で極めて高レベルであることも検出することができた。これらの観察により、確認すべき正確な作用機序はまだ残っているが、A D A M 1 0によるT a uのプロセッシングは、AD中の神経細胞死に関連する過程であることが示唆される。

#### 【0072】

要約すると、本発明者らは、病理学的なT a u断片を検出する最初の血清ベースのアッセイを開発した。この断片は、認知機能に直接的で逆の相関を示した。本アッセイは、ニューロンの損失を診断するための有用で実用的なツールを提供し、治療有効性およびADの進行をモニターするのに用いることができる。

#### 【0073】

本明細書において、明確に他の指定がない限り、「または(or)」という言葉は、述べられている条件のうちどちらかまたはその両方が満たされる場合に真値を返す演算子(operator)の意味で用いられ、条件のうち一つだけが満たされていればよい演算子「排他的or(exclusive or)」とは対照的である。「含む(including)」という言葉は、「からなる(consisting of)」を意味するのではなく、「含む(including)」という意味で用いられる。上記で認められた先の教示はいずれも、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されたどの先の公開文書も、それらの教示が、その文書の日付においてオーストラリアやその他の国

10

20

30

40

50

で共通の一般的な知見であるということの容認または表明と解釈されないものとする。

【 0 0 7 4 】

< 参考文献 >

【表 6 A】

#### Reference List

1. Alzheimer's Disease Clinical Trials. 2010. US National Institutes of Health & 10  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=alzheimer>.  
 Ref Type: Generic
2. Understanding stages and symptoms of Alzheimer's disease. 2010. [www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/stages.htm](http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/stages.htm).  
 Ref Type: Generic
3. World Alzheimer Report 2009. 2010. Alzheimer's Disease International. 20  
 Ref Type: Generic
4. Arai T, Guo JP, McGeer PL (2005) Proteolysis of non-phosphorylated and phosphorylated tau by thrombin. *J.Biol.Chem.* 280:5145-5153
5. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639
6. Barascuk N, Veidal SS, Larsen L, Larsen DV, Larsen MR, Wang J, Zheng Q, Xing R, Cao Y, Rasmussen LM, Karsdal MA (2010) A novel assay for extracellular matrix remodeling associated with liver fibrosis: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for a MMP-9 proteolytically revealed neo-epitope of type III collagen. *Clin.Biochem.* 43:899-904 30
7. Bay-Jensen AC, Liu Q, Byrjalsen I, Li Y, Wang J, Pedersen C, Leeming DJ, Dam EB, Zheng Q, Qvist P, Karsdal MA (2011) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAs) for metalloproteinase derived type II collagen neoepitope, CIIM--increased serum CIIM in subjects with severe radiographic osteoarthritis. *Clin.Biochem.* 44:423-429 40
8. Cummings JL (2011) Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. *Alzheimers.Dement.* 7:e13-e44

## 【表 6 B】

9. de CA, Spires-Jones TL, Pitstick R, Carlson GA, Hyman BT (2009) Tangle-bearing neurons survive despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 68:757-761
10. De SB (2010) Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev.* 90:465-494 10
11. De SB, Annaert W (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J.Cell Sci.* 113 ( Pt 11):1857-1870
12. Fillit H, Leveugle B (1995) Disorders of the extracellular matrix and the pathogenesis of senile dementia of the Alzheimer's type. *Lab Invest* 72:249-253
13. Forstl H, Kurz A (1999) Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.* 249:288-290 20
14. Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL (2003) Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:10032-10037
15. Garcia-Sierra F, Mondragon-Rodriguez S, Basurto-Islas G (2008) Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. *J.Alzheimers.Dis.* 14:401-409 30
16. Gefter ML, Margulies DH, Scharff MD (1977) A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic.Cell Genet.* 3:231-236
17. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519-526 40
18. Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann.Neurol.* 41:17-24

## 【表 6 C】

19. Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8:101-112
20. Hanger DP, Wray S (2010) Tau cleavage and tau aggregation in neurodegenerative disease. *Biochem.Soc.Trans.* 38:1016-1020
21. Henriksen K, Gram J, Schaller S, Dahl BH, Dziegiel MH, Bollerslev J, Karsdal MA (2004) Characterization of osteoclasts from patients harboring a G215R mutation in CLC-7 causing autosomal dominant osteopetrosis type II. *Am J Pathol* 164:1537-1545 10
22. Henriksen K, Gram J, Schaller S, Dahl BH, Dziegiel MH, Bollerslev J, Karsdal MA (2004) Characterization of osteoclasts from patients harboring a G215R mutation in CLC-7 causing autosomal dominant osteopetrosis type II. *Am J Pathol* 164:1537-1545 20
23. Henriksen K, Gram J, Schaller S, Dahl BH, Dziegiel MH, Bollerslev J, Karsdal MA (2004) Characterization of osteoclasts from patients harboring a G215R mutation in CLC-7 causing autosomal dominant osteopetrosis type II. *Am J Pathol* 164:1537-1545
24. Hoglund K, Hansson O, Buchhave P, Zetterberg H, Lewczuk P, Londos E, Blennow K, Minthon L, Wiltfang J (2008) Prediction of Alzheimer's disease using a cerebrospinal fluid pattern of C-terminally truncated beta-amyloid peptides. *Neurodegener.Dis.* 5:268-276 30
25. Jin S, Agerman K, Kolmodin K, Gustafsson E, Dahlqvist C, Jureus A, Liu G, Falting J, Berg S, Lundkvist J, Lendahl U (2010) Evidence for dimeric BACE-mediated APP processing. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 393:21-27
26. Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL (2009) Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology* 150:5294-5301 40
27. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939-944

## 【表 6 D】

28. Molsa PK, Marttila RJ, Rinne UK (1986) Survival and cause of death in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Acta Neurol.Scand.* 74:103-107
29. Park SY, Tournell C, Sinjoanu RC, Ferreira A (2007) Caspase-3- and calpain-mediated tau cleavage are differentially prevented by estrogen and testosterone in beta-amyloid-treated hippocampal neurons. *Neuroscience* 144:119-127 10
30. Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, Niinisto L, Halonen P, Kontula K (1995) Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein. *N.Engl.J.Med.* 333:1242-1247
31. Rametti A, Esclaire F, Yardin C, Terro F (2004) Linking alterations in tau phosphorylation and cleavage during neuronal apoptosis. *J.Biol.Chem.* 279:54518-54528 20
32. Reifert J, Hartung-Cranston D, Feinstein SC (2011) Amyloid {beta}-Mediated Cell Death of Cultured Hippocampal Neurons Reveals Extensive Tau Fragmentation without Increased Full-length Tau Phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 286:20797-20811
33. Schroeter ML, Stein T, Maslowski N, Neumann J (2009) Neural correlates of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic and quantitative meta-analysis involving 1351 patients. *Neuroimage.* 47:1196-1206 30
34. Takeda S, Sato N, Rakugi H, Morishita R (2010) Plasma beta-amyloid as potential biomarker of Alzheimer disease: possibility of diagnostic tool for Alzheimer disease. *Mol.Biosyst.*
35. Vassar R, Kandalepas PC (2011) The beta-secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimers.Res.Ther.* 3:20
36. Vincent B, Checler F (2011) alpha-Secretase in Alzheimer's Disease and Beyond: Mechanistic, Regulation and Function in the Shedding of Membrane Proteins. *Curr.Alzheimer Res.* 40

【表 6 E】

- 37. Waldemar G, Dubois B, Emre M, Georges J, McKeith IG, Rossor M, Scheltens P, Tariska P, Winblad B (2007) Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. Eur.J.Neurol. 14:e1-26
- 38. Zetterberg H (2008) Biomarkers reflecting different facets of Alzheimer's disease. Eur.J.Neurol. 15:1143-1144
- 39. Zetterberg H, Andreasson U, Hansson O, Wu G, Sankaranarayanan S, Andersson ME, Buchhave P, Londos E, Umek RM, Minthon L, Simon AJ, Blennow K (2008) Elevated cerebrospinal fluid BACE1 activity in incipient Alzheimer disease. Arch.Neurol. 65:1102-1107
- 40. Zhang S, Salemi J, Hou H, Zhu Y, Mori T, Giunta B, Obregon D, Tan J (2010) Rapamycin promotes beta-amyloid production via ADAM-10 inhibition. Biochem.Biophys.Res.Commun.

10

20

【 図 1 】

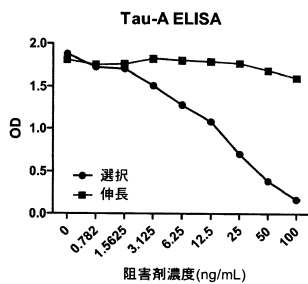


図1

【 図 3 】

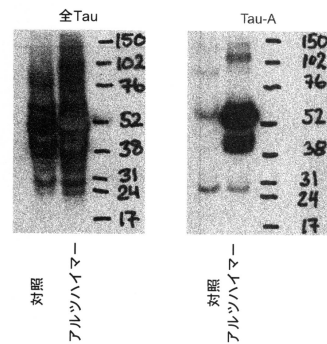


図3

【 図 2 】

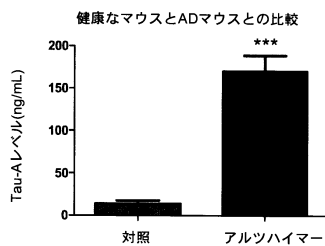


図2

【 図 4 】

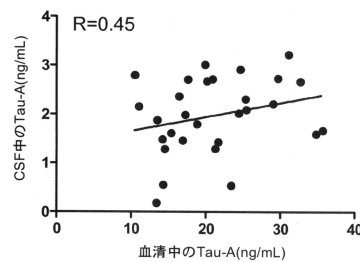


図4

【 図 5 】

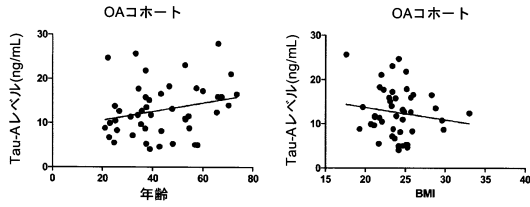


図5

【 図 6 】

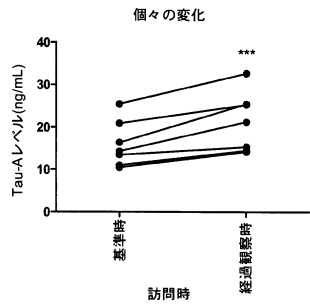


図6

【 図 7 A - F 】

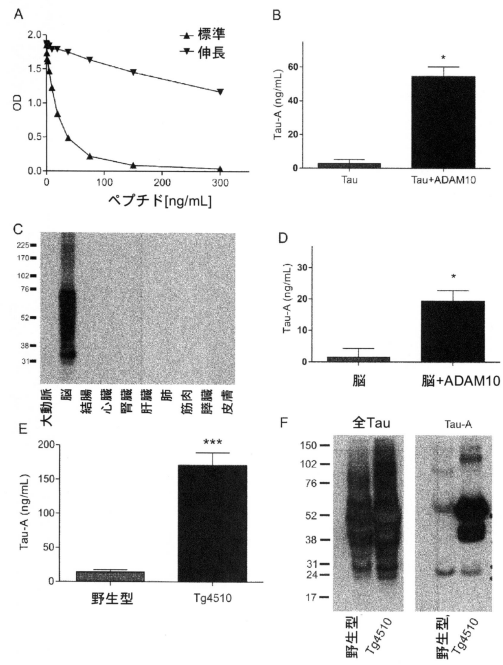


図7A、B、C、D、EおよびF

【 図 8 】

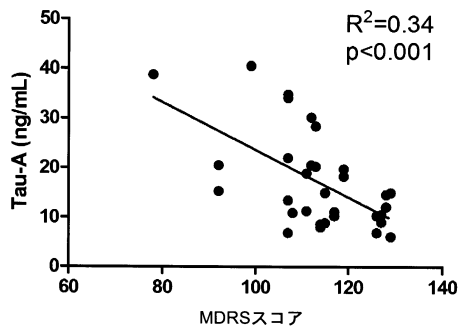


図8

**【配列表】**

0006225107000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
C 0 7 K	17/00	(2006.01)	C 0 7 K	17/00	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	G 0 1 N	33/577	B

(74)代理人 100114591

弁理士 河村 英文

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100154298

弁理士 角田 恭子

(74)代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74)代理人 100170379

弁理士 徳本 浩一

(74)代理人 100161001

弁理士 渡辺 篤司

(74)代理人 100179154

弁理士 児玉 真衣

(74)代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(74)代理人 100184424

弁理士 増屋 徹

(72)発明者 バラスクク, ナターシャ

デンマーク国, 2 3 0 0 コペンハーゲン エス, アイランズ・ブリュッゲ 7 7 C, 1 . t v

(72)発明者 カルスダル, モルテン

デンマーク国, 2 1 0 0 コペンハーゲン オー・スラッシュ, エッケルスベリリスガーデ 1 3

(72)発明者 ヘンリクセン, キム

デンマーク国, 3 4 0 0 ヒレロズ, ディレハーヴェヴァイ 7 4

審査官 三木 隆

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 3 1 6 5 6 4 ( U S , A 1 )

国際公開第 2 0 1 1 / 0 3 2 1 5 5 ( W O , A 2 )

特許第 3 6 1 2 0 7 8 ( J P , B 2 )

特開 2 0 0 3 - 1 0 2 4 8 4 ( J P , A )

特表 2 0 1 2 - 5 2 2 2 3 3 ( J P , A )

特表 2 0 1 1 - 5 0 3 5 6 4 ( J P , A )

特許第 2 8 7 9 9 7 5 ( J P , B 2 )

米国特許第 5 4 9 2 8 1 2 ( U S , A )

KHUEBACHOVA M, Mapping the C terminal epitope of the Alzheimer's disease specific anti body MN423, J Immunol Methods, 2 0 0 2 年, Vol.262 No.1-2, Page.205-215

豊原治彦, かまぼこ成分のライブラリー化とその応用 - ペプチドライブラリーを用いた当室の分解・吸収抑制成分の探索, 食品と科学, 2 0 0 8 年, Vol.50 No.10, Page.80

De Strooper Bart, Protease and proteolysis in Alzheimer's disease: a multifactorial vie

- w on the disease process, *Physiological Review*, 2010年, Vol.90 No.2, Page.465-494  
 BLOCH Laura, Klotho is a substrate for -, -, -secretase, *FEBS Lett*, 2009年, Vol.583 No.19, Page.3221-3224  
 木村俊作, ペプチドライブラリー, *高分子*, 1993年, Vol.42 No.2, Page.108  
 阿部康弘, 蛋白質断片化ペプチドライブラリーを利用した蛋白質機能ドメインの新規探索システムの構築 - その2, *日本薬学会年会要旨集*, 2005年, Vol.125th No.2, Page.153 29-0790  
 王 寧, 認識タンパク質探索・解析を目指したペプチドグリカン・フラグメントライブラリーの構築, *日本糖質学会年会要旨集*, 2011年 6月27日, Vol.30th, Page.138 P-132  
 臼井健二, 種々の配列を有する蛍光標識 平リックスペプチドによる蛋白質の検出, *日本化学会講演予稿集*, 2002年, Vol.81st No.2, Page.883 2F3-33  
 塚本正満, リン酸化ペプチドの合成(1) フェニルをリン酸の保護基として用いたタウ蛋白フラグメントの合成, *日本化学会講演予稿集*, 1991年, Vol.61st No.2 Page.1742 4C817  
 GARG S. et al., Cleavage of Tau by calpain in Alzheimer's disease: The quest for the toxic 17 kD fragment, *Neurobiol Aging*, 2011年 1月, Vol.32, No.1, Page.1-14  
 DAVID D C et al., Proteasomal degradation of tau protein, *J Neurochem*, 2002年, Vol.83, No.1, Page.176-185  
 河野富一, アミロイドベータ産生機構解明を目指したフェニルチオ部を有するペプチド誘導体の合成, *日本薬学会東北支部大会講演要旨集*, 2009年, Vol.48th, Page.21 2A-6  
 KAKIZAWA Taeko, Evaluation of Substrate Specificities for BACE1 using Synthetic Peptide Libraries, *PEPTIDE SCIENCE*, 2011年, Page.121  
 柿澤多恵子, ペプチドライブラリーを用いたBACE1基質特異性の検討, *メディシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集*, 2010年, Vol.29th, Page.340-341  
 船本聡, Profinity eXact Fusion-Tagによる組換え セクレターゼ基質の調製, *日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集*, 2010年, Vol.10th, Page.181

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09  
 C07K 14/47  
 C07K 16/18  
 C07K 17/00  
 C12N 1/15  
 C12N 1/19  
 C12N 1/21  
 G01N 33/53  
 G01N 33/577  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
 CPlus/MEDLINE/BIOSIS(STN)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq