(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年11月22日(22.11.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/212261 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/019028

(22) 国際出願日： 2018年5月17日(17.05.2018)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2017-098795 2017年5月18日(18.05.2017) JP

(72) 発明者；および
(71) 出願人: 内原 俊記 (**UCHIHARA Toshiki**) [JP/JP]; 〒1568506 東京都世田谷区上北沢二丁目１番６号 公益財団法人東京都医学総合研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 白形 由美子 (**SHIRAKATA Yumiko**); 〒1410031 東京都品川区西五反田１丁目１１番１号 アイオス五反田駅前ビル１００１号 Tokyo (JP).

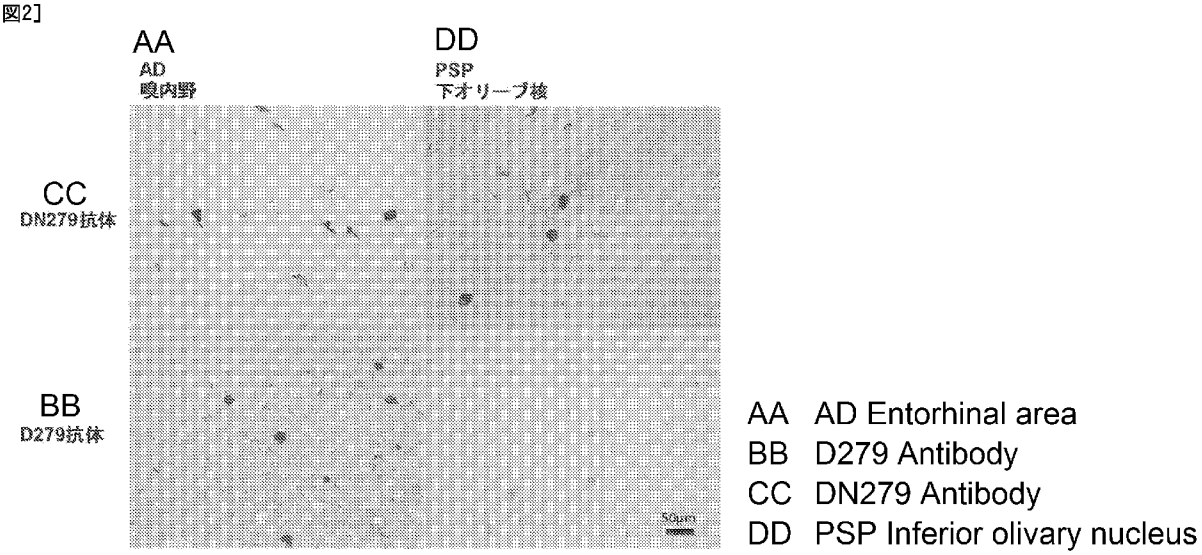
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

WO 2018/212261 A1

(54) **Title:** SPECIFIC BINDING REAGENT FOR DETECTING QUALITATIVE DIFFERENCE OF 4-REPEAT TAU, AND DETECTION METHOD, DETECTION KIT, AND MEDICATION SCREENING METHOD USING SAME

(54) 発明の名称： ４リピートタウの質的違いを検出する特異的結合試薬、これを用いた検査方法、検査キット、及び医薬のスクリーニング方法

[図2]



(57) **Abstract:** It is found that, in an Alzheimer's disease patient, an asparagine at position 279 of a tau protein is deamidated and modified by an aspartic acid. The Alzheimer's disease can be identified and diagnosed by using a reagent for specifically recognizing a peptide in which the asparagine at position 279 of the tau protein is modified by the aspartic acid.

(57) 要約： アルツハイマー病患者では、タウタンパク質の２７９位のアスパラギンが脱アミド化し、アスパラギン酸に修飾されていることを見出した。タウタンパク質の２７９位のアスパラギンがアスパラギン酸に修飾されているペプチドを特異的に認識する試薬を用いることにより、アルツハイマー病を鑑別診断することができる。

[続葉有]

QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称 ：

４リピートタウの質的違いを検出する特異的結合試薬、これを用いた検査方法、検査キット、及び医薬のスクリーニング方法

技術分野

[0001] タウオパチーと総称されるリン酸化タウの蓄積が見られる神経変性疾患を鑑別する検査方法に関する。特に、４リピートタウが蓄積するアルツハイマー病（Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ、以下ＡＤと記載することもある。）と、進行性核上性麻痺（Ｐｒｏｇｒｅｓｓｉｖｅ　ｓｕｐｒａｎｕｃｌｅａｒ　ｐａｌｓｙ、以下ＰＳＰと記載することもある。）／大脳皮質基底核変性症（ｃｏｒｔｉｃｏｂａｓａｌ　ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ、以下ＣＢＤと記載することもある。）を区別することのできる４リピートタウに対する特異的結合試薬、及びこれを用いた検査方法に関する。また、この特異的結合試薬を用いた医薬のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 高齢者人口の増加とともに認知症患者も増加し、平成２４年の認知症患者数は４６２万人に達していると言われている（内閣府　平成２８年版高齢社会白書（概要版））。今後高齢者の増加とともに、認知症患者はますます増加すると考えられており、大きな社会的問題となっている。

[0003] しかしながら、認知症と言っても、同じような症状を呈する原因疾患は多様であることが明らかとなってきた。例えば、大脳皮質基底核変性症候群（Ｃｏｒｔｉｃｏｂａｓａｌ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ：ＣＢＳ）の臨床像を呈する疾患には、ＣＢＤ、ＡＤ、ＰＳＰの他に、ピック病（Ｐｉｃｋ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ、以下ＰｉＤと記載することもある。）をはじめとする様々な疾患が含まれていることが明らかとなっている（非特許文献１）。

[0004] 近年、画像診断の進歩に伴い、認知症の診断にもＣＴやＭＲＩなどの画像診断が欠かせないものとなってきている。しかし、画像診断は局在性変化の

確認と経時的な変化の追跡を可能とするものの、質的な変化をとらえるには十分でなく、客観的な診断基準に反映させるにも限界がある。

[0005] そのため認知症はＭＲＩなどを用いた画像診断による検査所見や臨床所見だけでは正確に生前診断を行うことが未だに困難であると言われており、患者の死後に病理診断を行い、はじめて確定診断を行うことができるのが現状である。したがって、生前の臨床診断が正確でないことから、適切な治療を受けられていない患者も多いと考えられている。そのため、髄液、血液などの体液中のバイオマーカーを用いた診断精度、特異度の高い検査方法の確立が望まれている。

[0006] さらに、神経変性疾患を正確に診断することのできるマーカーは、患者の確定診断により、治療法の選択に寄与するだけではなく、新薬開発にも大きく寄与することができる。例えば、現状では「アルツハイマー病である確率が高い患者群」を対象に、新薬の臨床試験を行っているにすぎない。その結果、臨床試験の対象としている群には、他の神経変性疾患の患者も含まれている可能性が高い。したがって、アルツハイマー病といった特定の神経変性疾患に対する薬剤の効果を的確に判断することができない。臨床症状による医師の判断だけではなく、客観的な検査結果により診断精度を高めることができれば、適切な患者群に対して臨床試験を行うことが可能となり、候補薬の効果について正しい評価をくだすことができる。

[0007] 我が国の認知症の原因疾患は、脳血管性が最も多いとされてきたが、近年の疫学的研究によればアルツハイマー病が最多とも言われている。したがって、アルツハイマー病を他の神経変性疾患と臨床的に区別することは今後の治療薬の開発にとっても非常に重要なこととなる。

[0008] アルツハイマー病の原因としては、病理学的な特徴とされる老人斑を構成するアミロイドβにその原因を求める考えと、神経原線維を構成するタウに注目する立場があるが、原因が明らかではないのが現状である。アルツハイマー病の診断には、体液中のアミロイドβやタウタンパク質を検出する方法や、タウのイメージングプローブにより検出する方法が提案されているが、

未だ臨床診断を左右できるほどの精度には達していない（特許文献１、２）。

[0009] タウは微小管の重合や安定化に寄与するタンパク質であり正常脳にも存在する。タウは、ＡＤ、ＰＳＰ、ＣＢＤ、ＰｉＤなどにおいて異常に蓄積し、神経原線維変化やその他の封入体として観察される。リン酸化タウが異常に蓄積するこれらの疾患を総称して「タウオパチー」と呼んでいる（非特許文献２）。

[0010] タウオパチーでは、正常脳のタウにも起こるリン酸化が亢進して蓄積することが知られている。非特許文献３には、脳脊髄液中のリン酸化タウの全タウタンパク質に対する比により前頭側頭型認知症（ｆｒｏｎｔｏｔｅｍｐｏｒａｌ ｌｏｂａｒ ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ：ＦＴＬＤ）のサブタイプを分類できることが報告されている。例えば、ＡＬＳ（Ａｍｙｏｔｒｏｐｈｉｃ ｌａｔｅｒａｌ ｓｃｌｅｒｏｓｉｓ）を伴うＦＴＬＤ－ＴＤＰなどのサブタイプにおけるタウのリン酸化とともに、タウとアミロイドβが蓄積するＡＤもリン酸化タウの量比が異なっていることが示されている。しかし、統計的にはリン酸化タウの量は、健常者や各サブタイプ群間での差がみられるものの群間の重なりが大きく、個々の臨床例の診断を髄液中のリン酸化タウの量的違いをもとに鑑別するには至っていない。

[0011] タウはエクソン２、３、１０の選択的スプライシングにより６つのアイソフォームが存在する（図１（Ａ）参照。）。このうちＣ末端側に存在する微小管結合領域の繰り返し構造の数が、３つのものを３リピートタウ、４つのものを４リピートタウと呼んでいる。タウアイソフォームは、発生段階で発現調節を受けていることが知られており、成人の脳ではタウの６つのアイソフォーム全てが発現している。

[0012] タウオパチーの変性神経疾患患者脳の封入体中の不溶化タウの解析から、タウオパチーは３リピートタウのみが蓄積するもの（ＰｉＤ）と、４リピートタウのみが蓄積するもの（ＰＳＰ/ＣＢＤ）と、両者が蓄積するもの（ＡＤ）と大別されることが明らかになってきた（非特許文献４）。もし、３リピ

ートタウと４リピートタウの髄液中の量を区別して定量できれば、これらの疾患を質的に区別する手がかりになると期待される。しかし、髄液中の３リピートタウ、４リピートタウの量をイムノＰＣＲ法で測定しても、これらの疾患を区別するにいたってはいない（非特許文献５）。これらアイソフォームは正常脳でも発現しているため、正常例、ＡＤ、その他の認知症の個々の例をタウアイソフォームの量で鑑別できる精度は得られていない。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：国際公開第２０１３／１１１５７８号

特許文献2：国際公開第２０１２／０５７３１２号

特許文献3：特表２００５－５１２５５０号公報

特許文献4：特表２００３－５２１７１３号公報

特許文献5：特表２００３－５０４０１５号公報

非特許文献

[0014] 非特許文献1：徳田　隆彦、2013年、BRAIN and NERVE, Vol.65(1), pp.55-64.

非特許文献2：吉田　眞理、2013年、BRAIN and NERVE, Vol.65(12),pp.1445-1458.

非特許文献3：Pijnenburg, Y. A. L. et al., 2015, Alzheimer’s Dementia, Vol. 1,pp.505-512.

非特許文献4：de Sliva, R. et al., 2003, Neuropathol. Appl. Neurobiol., Vol.29,pp.288-302.

非特許文献5：Luk, C. et al., 2012, J, Neurochem., Vol.123, pp.396-405.

非特許文献6：Dan, A. et al., 2013, Acta Neuropathologica Commun., 1:54, doi: 10.1186/2051-5960-1-54

非特許文献7：大海　忍、2014年、抗ペプチド抗体ベーシック、学研メディカル秀潤社

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 上述のように、脳に病変が生じ、認知症などを生じる疾患の鑑別診断は、現在のところ有効なバイオマーカーが存在しないため、臨床症状と画像診断による確率的推論に頼っているのが現状である。アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患は、同一疾患内でも病変の分布に症例毎の違いがあり、個々の症例における臨床症状、画像所見の違いも大きい。そのため、画像診断、臨床症状のみによる評価、診断方法は、医師の判断によるばらつきが大きいと言われている。適切な治療を行うためには、客観性の高い方法による信頼性の高い診断が必要である。また、各疾患に有効な医薬の開発には、正確な診断がくだされた対象群に対して臨床試験を行い、解析、評価がなされる必要がある。そのためには、各疾患の正確な診断は必須の要件である。本発明は、信頼性の高い検査方法、検査に必要な抗体、検査キット、また、これを用いた医薬のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明は、アルツハイマー病を他の神経変性疾患と臨床的に区別する検査方法、これに用いる検査試薬、検査キット、さらに医薬のスクリーニング方法に関する。

（１）検体中のタウタンパク質の２７９位のアスパラギンがアスパラギン酸に置換しているペプチドに特異的に結合する特異的結合試薬によりアルツハイマー病と、進行性核上性麻痺／大脳皮質基底核変性症を鑑別する検査方法。

（２）前記特異的結合試薬が抗体である（１）記載の検査方法。

（３）前記検体が、髄液、血液、脳神経組織、生検組織である（１）又は（２）に記載の検査方法。

（４）ＥＬＩＳＡ、又は免疫組織染色により検出することを特徴とする（２）又は（３）記載の検査方法。

（５）アルツハイマー病と、進行性核上性麻痺／大脳皮質基底核変性症を鑑

別する特異的結合試薬であって、タウタンパク質の２７９位のアスパラギンがアスパラギン酸に置換しているペプチドに対して特異的に結合することを特徴とする試薬。

（６）前記特異的結合試薬が抗体である（５）記載の特異的結合試薬。

（７）前記抗体がモノクローナル抗体である（６）記載の特異的結合試薬。

（８）前記抗体がポリクローナル抗体を精製して得られたものである（６）記載の特異的結合試薬。

（９）（５）～（８）いずれか１つ記載の特異的結合試薬と検出に必要な試薬を備えていることを特徴とする検査キット。

（１０）前記検出がＥＬＩＳＡ又は免疫染色によるものであることを特徴とする（９）記載の検査キット。

（１１）タウタンパク質の２７９位の脱アミド化を指標としてスクリーニングすることを特徴とする医薬のスクリーニング方法。

（１２）タウタンパク質の２７９位のアスパラギンがアスパラギン酸に置換しているペプチドに特異的に結合する特異的結合試薬が、患者から得られた検体中のタウタンパク質を認識する場合には、アルツハイマー病であると診断する方法。

（１３）前記特異的結合試薬が抗体である（１２）記載の診断方法。

（１４）前記検体が、髄液、血液、脳神経組織、生検組織である（１２）又は（１３）に記載の診断方法。

（１５）ＥＬＩＳＡ、又は免疫組織染色により検出することを特徴とする（１３）又は（１４）記載の診断方法。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図１Ａはタウのアイソフォームを模式的に示した図である。図１（Ｂ）は市販の抗体によるＡＤ、ＰＳＰ症例の病理染色像を示す。

[図2]２７９位のアスパラギン酸を特異的に検出する抗体はＡＤ症例に蓄積したタウを検出することを示す。

[図3]２７９位のアスパラギン酸を特異的に検出する抗体のペプチドに対する

反応性をＥＬＩＳＡにより解析した図。

発明を実施するための形態

[0018] 上述のように、タウオパチーは封入体に蓄積するタウアイソフォームの違いにより大別することができる。３リピートタウは、Ｃ末端側の微小管結合領域ＩとＩＩＩに隣接する領域のペプチド（ＫＨＱＰＧＧＧＫＶＩＶＹＫＰＶ：配列番号１）を認識するＲＤ３抗体により検出することができ、４リピートタウは、微小管結合領域ＩＩを含むペプチド（ＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣ：配列番号２）を認識するＲＤ４抗体により検出することができる（図１（Ａ）参照。）。しかしながら、これら抗体によって、髄液中のタウタンパク質を定量することはできておらず、タウオパチーを鑑別診断するにはいたっていない。本発明者は、ＡＤとＰＳＰの病理標本において、４リピートタウを認識する抗体が脱アミド化により反応性が違うことを見出し、本発明を完成させた。

[0019] ４リピートタウは２７９位がアスパラギンとして翻訳される。その一部は脱アミド化されアスパラギン酸に変化することが報告されている（非特許文献６）。今まで２７９位のアスパラギンが脱アミド化したタウタンパク質は、ＡＤ、ＰＳＰ・ＣＢＤなどの疾患に関わりなく存在すると考えられていた。

[0020] これは、市販の抗体を用いて病理標本を染色すると、２７９位がアスパラギンであるタウペプチド（配列番号２）に対して作製された抗体（ＲＤ４抗体）でも、２７９位をアスパラギン酸に置換したペプチドであるＶＱＩＩＤＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣ（配列番号３、下線部は２７９位のアミノ酸を示す。）に対して作製された抗体（４Ｒ抗体）でも、４リピートタウの蓄積が同じように検出されていたからである（図１（Ｂ）参照。）。

[0021] 本発明者は、配列番号３のペプチドに対して作製された市販ポリクローナル抗体(４Ｒ抗体)に、配列番号２で示されるペプチドを認識する抗体と、配列番号３で示されるペプチドを認識する抗体が混在していることを見出した。精製した抗体を用いて解析した結果、２７９位が脱アミド化したタウは、

ＡＤのみに存在することが明らかとなった。すなわち、２７９位が脱アミド化したペプチドに対して特異的な抗体は、ＡＤに蓄積したタウのみを検出する。

[0022] ２７９位のアスパラギンが脱アミド化したタウが、タウオパチーとして総称される神経変性疾患のうちＡＤで特異的に検出されることは、本発明者がはじめて見出したことである。脱アミド化したタウはここでは抗体により検出しているが、２７９位のアスパラギンが脱アミド化しているタウを検出することができる試薬であれば抗体に限らずどのような試薬を用いてもよい。したがって、本明細書で特異的結合試薬という場合には、抗体に限らず、アプタマーなど特定の分子と特異的に結合する試薬を含むことができる。核酸アプタマー、ペプチドアプタマーは公知の方法によって作製し、２７９位がアスパラギン酸に置換されているタウと特異的に結合することができるものを選択すればよい。さらに、本発明の特異的結合試薬には、修飾された形態のものも含む。具体的には、放射性物質により標識しＰＥＴ診断薬として用いることができるものや、蛍光物質により標識し二次抗体等を使用することなく検出することができるものなどが挙げられる。

[0023] また、本発明で抗体という場合には、Ｆａｂ、Ｆａｂ´、Ｆ（ａｂ´）$_2$、単鎖抗体（ｓｃＦｖ）、ジスルフィド安定化Ｖ領域断片（ｄｓＦｖ）、もしくはＣＤＲを含むペプチド等抗体の機能的断片が含まれる。抗体の機能的断片は、ペプシン、又はパパインなどの酵素によって消化する等公知の方法によって得ることができる。

[0024] さらに、本発明において抗体をはじめとする特異的結合試薬の検出は、特異的結合試薬に直接標識を付与して行ってもよいし、二次抗体、三次抗体を用いた間接法、あるいはアビジン-ビオチンを用いた検出など、公知の検出技術を用いることができる。

[0025] 以下、本発明について説明するが、以下の方法に限らず公知の方法を用いることができることは言うまでもない。

[0026] １．抗体の精製方法

４リピートタウを認識する抗体としては、配列番号２で示すペプチドを免疫原とするモノクローナル抗体（ＲＤ4抗体、メルク株式会社製）、配列番号３で示すペプチドを免疫原とするポリクローナル抗体（４Ｒ抗体、コスモ・バイオ株式会社製）が市販されている。

[0027] 配列番号３に示すペプチドを免疫して得られた市販抗体は、本発明者の解析により２７９位のアミノ酸がアスパラギンのペプチド、アスパラギン酸のペプチドの両者に反応する抗体が混在していることが明らかとなった。２７９位のアミノ酸がアスパラギン酸に脱アミド化されているタウを特異的に認識する抗体（以下Ｄ２７９抗体と記載する。）は、市販の抗体、あるいは配列番号３に示すペプチドを免疫した動物から得られた抗体を、ペプチドカラムにより精製して使用することができる。抗体の精製方法は、抗体とペプチドとの特異的な結合を利用することによって精製すれば良く、公知の抗ペプチド抗体の精製法を組合せて精製することができる。具体的には、例えば以下のようにして精製することができる。

[0028] ２７９位のアミノ酸がアスパラギン、あるいはアスパラギン酸の両者に反応する抗体が混在している抗体から、２７９位がアスパラギン酸であるペプチドにのみ反応するＤ２７９抗体の精製は、例えば、以下のようにして行うことができる。両者が混在する抗体を、配列番号３のペプチド（２７９位がアスパラギン酸に置換したペプチド、以下Ｄ２７９ペプチドと記載することもある。）を結合させたカラムに吸着させ、吸着した分画を溶出したり、あるいは、配列番号２のペプチド（２７９位がアスパラギンに置換したペプチド、以下Ｎ２７９ペプチドと記載することもある。）を結合したカラムに吸着させ、吸着しない分画を採取することによって精製することができる。また、Ｎ２７９ペプチドカラムに吸着しない分画を、さらにＤ２７９ペプチドカラムに吸着させ、吸着分画を溶出させて精製することができる。また、抗体をＮ２７９ペプチドと混和すれば、Ｎ２７９ペプチドに結合する抗体はマスクされることから、Ｄ２７９ペプチドに反応性の高い抗体分画のみを使用することになる。

[0029] ２．抗体の作製方法

抗体は公知の方法（非特許文献７）を参考に作製することができる。配列番号２、又は３に示すペプチドに特異的な抗体を、ウサギ、マウスに抗原を免疫することによって、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体を作製することができる。

[0030] ３．検査方法

Ｄ２７９抗体を検査に用いる場合には、脳脊髄液、血液、尿などの体液や生検検体を試料として用いることができる。生検検体としては、タウやαシヌクレインの検出が認められている鼻粘膜、皮膚、唾液腺、消化管粘膜などを好適に用いることができる。脳脊髄液を用いることが、感度の点から好ましい。免疫染色法、ＥＬＩＳＡを以下に具体例として挙げるが、特異的な反応を検出することができる方法であれば、これに限らずどのような方法を用いてもよい。

[0031] （１）免疫染色法

組織染色は、常法によりホルマリン固定、パラフィン包埋された組織を薄切し、上記のタウペプチドに特異的な一次抗体、標識された二次抗体を用いて染色を行い検出することができる。検出方法は、酵素標識による発色、蛍光標識を検出する方法など、公知の方法を用いて行うことができる。

[0032] （２）ＥＬＩＳＡ

得られた抗体の反応性を確認する場合には、９６穴ＥＬＩＳＡ用プレートに配列番号２又は３のペプチドを入れ、一定時間静置し、固相化を行う。固相化したプレートは洗浄、ブロッキングを行い、検査に使用すればよい。具体的には作製した抗体や精製した抗体をペプチドが固相化されたＥＬＩＳＡ用プレートに入れ、その後、抗マウス抗体、抗ラビット抗体等、抗体を作製した動物の抗体に結合する抗体等を用いて結合させ、常法により検出を行えば良い。検出は、抗体を作製した動物の抗体が酵素標識されている抗体を用いても、あるいは、酵素標識抗体を二次抗体として検出に用いても良い。酵素の基質を加え、一定時間反応後、反応停止し、マイクロプレートリーダー

を用い酵素生成物の測定を行う。

[0033] 患者検体を検査する場合には、例えば、４リピートタウ、３リピートタウに関わらずタウタンパク質に結合する抗体を固相化したプレートに検体を入れ、その後、Ｄ２７９抗体と反応させた後、Ｄ２７９抗体に結合する酵素標識した二次抗体を加え結合させた後、酵素の基質を加え、一定時間反応させ反応停止し、マイクロプレートリーダーを用い酵素生成物の測定を行う。Ｄ２７９抗体の他に、ＲＤ３抗体、ＲＤ４抗体を用いてそれぞれ検出を行うことにより、ＡＤと、ＰＳＰ、ＰｉＤを区別することができる。患者検体としては、髄液、血液などの患者体液を用いることが好ましいが、髄液中により高濃度にタウタンパク質が存在することから、髄液を用いることがより好ましい。

[0034] また、上記ＥＬＩＳＡ法は例示であり、Ｄ２７９抗体を固相化したプレートを用い検体を結合させた後、抗タウタンパク質抗体を用いて検出を行うことができることは言うまでもない。さらに、ＥＬＩＳＡではなく、ＲＩＡ、蛍光標識抗体による検出など、通常、抗体等を用いて行われる検出方法によって検出を行うことができる。

[0035] ４．医薬のスクリーニング方法

Ｄ２７９抗体は、ＡＤ病変を特異的に認識することから、これを用いてアルツハイマー病を治療する医薬をスクリーニングすることが可能となる。

[0036] （１）培養細胞を用いたスクリーニング方法

タウタンパク質の２７９位のアスパラギン酸への脱アミド化を抑制することができる化合物はアルツハイマー病の医薬として有効である可能性が高い。培養細胞を用いて２７９位のアスパラギン酸の脱アミド化を指標として化合物をスクリーニングすることにより、アルツハイマー病に効果のある化合物を選択することができる。

[0037] 用いる培養細胞としては、タウの２７９位の脱アミド化が認められる細胞であればどのような細胞を用いてもよい。好適な培養細胞としては、アルツハイマー病患者、あるいはモデル動物より樹立した神経細胞、また、アルツ

ハイマー病患者より得たｉＰＳ細胞から誘導された神経細胞、４リピートタウを強制発現させ、脱アミド化が起こることを確認した細胞などが挙げられる。

[0038] 培養液に候補化合物を添加した後、Ｄ２７９抗体や同等の反応性をもった特異的結合試薬を用いてＥＬＩＳＡなど公知の方法によりタウの２７９位の脱アミド化を定量し、脱アミド化を抑制する化合物をスクリーニングすることができる。

[0039] 今後の解析を待つ必要があるが、脱アミド化がＡＤ発症の原因の１つであるとすると、脱アミド化を抑制することが知られている化合物は、有力な医薬の候補となる可能性がある。

[0040] （２）モデル動物を用いたスクリーニング方法

培養細胞を用いたスクリーニング系で効果が見られた化合物は、モデル動物を用いてさらに検討することができる。モデル動物としては、加齢した正常動物や老化促進モデルマウスなどの老化モデルを用いることができる。また、特許文献３～５に記載されているタウ遺伝子を改変し、アルツハイマー様の病変を生じるトランスジェニック動物を用いてもよい。

[0041] いずれのモデル動物を使用する場合であっても、候補化合物を動物に投与することによって、タウタンパク質の２７９位の脱アミド化の抑制を指標として医薬のスクリーニングを行うことができる。

[0042] ［実施例１］抗体の精製

以下、データを示しながら、本発明の検査方法を詳細に説明する。抗体を精製するためのアフィニティカラムは、配列番号３のペプチドをセルファインホルミル（ＪＮＣ株式会社製）のホルミル基に結合させて用いた。具体的には、セルファインホルミルを蒸留水で洗浄後、カップリングバッファー（５０ｍＭ炭酸-重炭酸緩衝液、ｐＨ８．５）中で、配列番号３で表されるＤ２７９ペプチドとともに懸濁し、室温で約３０分振盪させる。次に、水酸化シアノホウ素ナトリウムを添加し、４℃、一晩振盪し、余剰のホルミル基を還元する。ブロッキングバッファー（０．１Ｍ　モノエタノールアミン、５０

ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０）で洗浄後、再度水酸化シアノホウ素ナトリウムを添加し、完全に還元を行う。その後、ペプチドを結合させた樹脂をカラムに充填し、蒸留水、溶出バッファー（０．１Ｍ　Ｇｌｙ－ＨＣｌ、ｐＨ２．５）、蒸留水、洗浄バッファー（１Ｍ　ＮａＣｌ、１％　Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ　１００、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｈｃｌ、ｐＨ７．５）、蒸留水の順で洗浄し、アフィニティカラムを作製した。

[0043] 市販のポリクローナル抗体（４Ｒ抗体：２７９位のアミノ酸がアスパラギンであるタウペプチドに反応する抗体と、アスパラギン酸であるタウペプチドに反応する抗体が混在している抗体、以下ＤＮ２７９抗体と記載することもある。）と配列番号２で表されるＮ２７９ペプチドを混合し、ＴＢＳ（０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５）で平衡化したアフィニティカラムに入れ、転倒混和し、４℃で８時間カラムに吸着させる。未吸着の抗体を流出させた後、ＴＢＳ、洗浄バッファー、０．１５ＭＮａＣｌで洗浄した後、溶出バッファーでカラムに吸着した抗体を溶出させる。溶出させた抗体は、ＥＬＩＳＡなどにより、配列番号３に示すＤ２７９ペプチドに特異的に結合することを確認して以後の実験に用いている。

[0044] ［実施例２］組織染色

病理標本を用いて、配列番号３で示すペプチドを用いて作製された未精製ポリクローナル抗体（ＤＮ２７９抗体）、又はペプチドカラムを用いて精製したＤ２７９抗体を用いて組織染色を行った。

[0045] 用いた試料は確定診断によりＡＤと診断された患者の嗅内野、及びＰＳＰと診断された患者の下オリーブ核の病理標本である。ホルマリン固定、パラフィン包埋された病理標本を５～６μｍに薄切し、脱パラフィン後、０．０１Ｍクエン酸バッファー中でオートクレーブにより１２１℃１０分間加熱し、次に、１００％ギ酸に１０分浸漬して、抗原性賦活化処理を行った。１％過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼを不活化し、５％血清を含むＰＢＳでブロッキング後、一次抗体としてＲＤ４抗体（１０００倍希釈）、４Ｒ抗体（ＤＮ２７９抗体、３０，０００希釈）、又は精製したＤ２７９抗体（２０

倍希釈）を４℃で２日以上反応させ、洗浄後、二次抗体としてビオチン化抗ウサギＩｇＧ（Ｖｅｃｔｏｒ社製、１０００倍希釈）、又はビオチン化抗マウスＩｇＧ（Ｖｅｃｔｏｒ社製、１０００倍希釈）と室温で２時間反応させた。二次抗体を洗浄後、Ａｖｉｄｉｎ　ｂｉｏｔｉｎ－ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　ｃｏｍｐｌｅｘ（Ｖｅｃｔｏｒ社製、ＡＢＣ　Ｅｌｉｔｅ、１０００倍希釈）で１時間反応後、ジアミノベンジジンで発色させ検出を行った（図２）。

[0046] タウタンパク質２７９位のアミノ酸がアスパラギン酸、アスパラギン両者を認識する抗体が混在しているＤＮ２７９抗体は、ＡＤ、ＰＳＰどちらの試料のタウも認識するが、Ｄ２７９抗体は、ＡＤのタウは認識するもののＰＳＰのタウを認識することができない。ここでは病理組織を用いて示しているが、脳脊髄液に混入する患者の細胞を用いても同様に検出することができる。

[0047] ［実施例３］ＥＬＩＳＡ

脳脊髄液などの体液中に存在するタウタンパク質はＥＬＩＳＡによっても検出することができる。図３は、配列番号２で示すペプチド（Ｎ２７９ペプチド）、配列番号３で示すペプチド（Ｄ２７９ペプチド）の濃度を変えてマイクロタイタープレートにコートし、Ｄ２７９抗体の反応性を解析したものである。

[0048] ペプチドの固相化は、４℃、１６時間、１．０×１０$^{-16}$～１．０×１０$^{-6}$μＭ／μｌの濃度のペプチド溶液を９６穴ＥＬＩＳＡ用プレート（住友ベークライト株式会社製）に添加して行った。ＥＬＩＳＡ用洗浄バッファー（０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０／ＰＢＳ）で洗浄後、ＥＬＩＳＡ用ブロッキングバッファー（１０％ＢＳＡ／０．０１×ＰＢＳ）でブロッキングを行い、再度洗浄した後、精製したＤ２７９抗体を添加し、室温で１．５時間静置した。洗浄後、二次抗体としてＨＲＰ標識ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｐｉｅｒｃｅ社製）を添加し、１時間室温で静置した。洗浄した後、Ｏ－フェニレンジアミンを用い発色させ、マイクロプレートリーダー（Ｃｈａｍｅｌｅｏｎ、Ｈ

ｉｄｅｘ社製）で測定を行った。

[0049] １Ｘ１０$^{-16}$μｍｏｌ／μｌという非常に低濃度の検体であっても、Ｄ２７９抗体はＤ２７９ペプチドを認識することができる。また、Ｄ２７９抗体はＤ２７９ペプチドに非常に特異性が高いこともこの結果から明らかである。したがって、非常に特異性高くＤ２７９ペプチドを含むタウ、すなわちＡＤを検出することができる。

[0050] 以上、示してきたように、Ｄ２７９抗体によれば、タウオパチーのうち、アルツハイマー病を診断することが可能となる。これまで、客観的な指標が得られなかったタウオパチーの診断を感度・精度ともによく検査を行うことが可能となる。

請求の範囲

[請求項1] 検体中のタウタンパク質の２７９位のアスパラギンがアスパラギン酸に置換しているペプチドに特異的に結合する特異的結合試薬によりアルツハイマー病と、進行性核上性麻痺／大脳皮質基底核変性症を鑑別する検査方法。

[請求項2] 前記特異的結合試薬が抗体である請求項１記載の検査方法。

[請求項3] 前記検体が、

髄液、血液、脳神経組織、生検組織である請求項１又は２に記載の検査方法。

[請求項4] ＥＬＩＳＡ、又は免疫組織染色により検出することを特徴とする請求項２又は３記載の検査方法。

[請求項5] アルツハイマー病と、進行性核上性麻痺／大脳皮質基底核変性症を鑑別する特異的結合試薬であって、

タウタンパク質の２７９位のアスパラギンがアスパラギン酸に置換しているペプチドに対して特異的に結合することを特徴とする試薬。

[請求項6] 前記特異的結合試薬が抗体である請求項５記載の特異的結合試薬。

[請求項7] 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項６記載の特異的結合試薬。

[請求項8] 前記抗体がポリクローナル抗体を精製して得られたものである請求項６記載の特異的結合試薬。

[請求項9] 請求項５～８いずれか１項記載の特異的結合試薬と

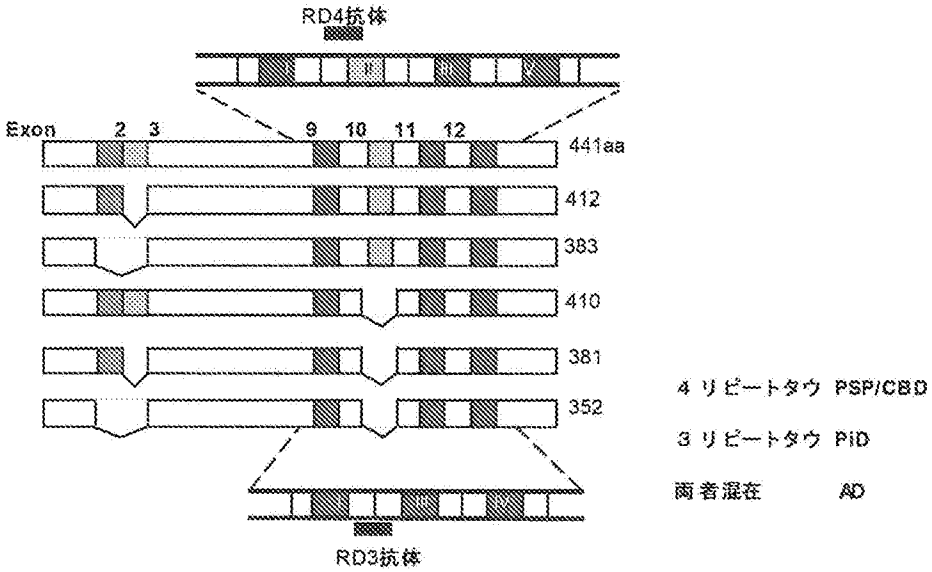
検出に必要な試薬を備えていることを特徴とする検査キット。

[請求項10] 前記検出がＥＬＩＳＡ又は免疫染色によるものであることを特徴とする請求項９記載の検査キット。

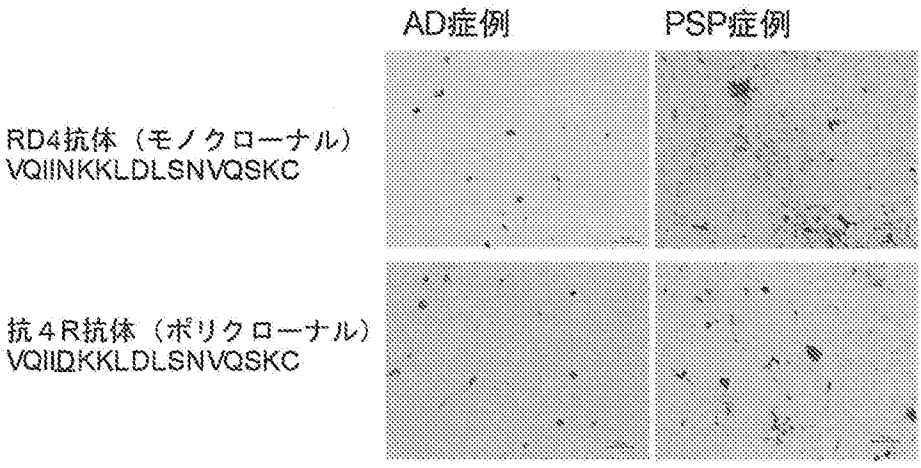
[請求項11] タウタンパク質の２７９位の脱アミド化を指標としてスクリーニングすることを特徴とする医薬のスクリーニング方法。

[図1]

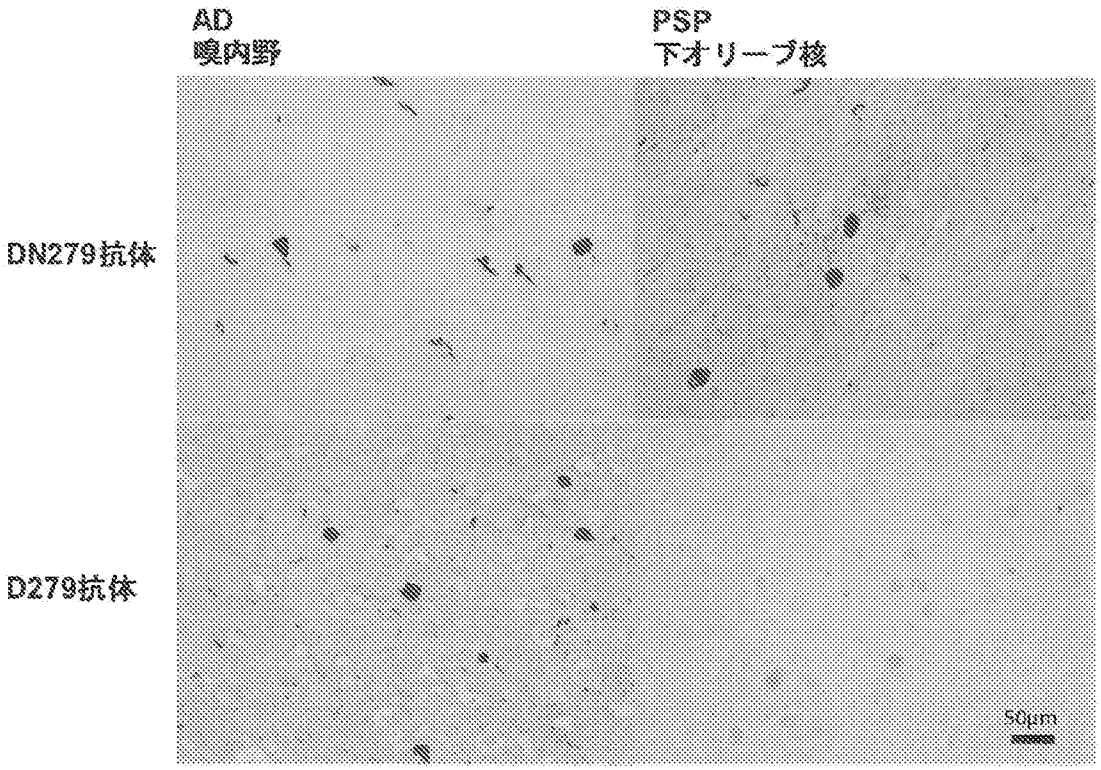
(A)


RD4抗体
Exon 2 3 9 10 11 12
441aa
412
383
410
381
352
RD3抗体
4リピートタウ PSP/CBD
3リピートタウ PiD
両者混在 AD

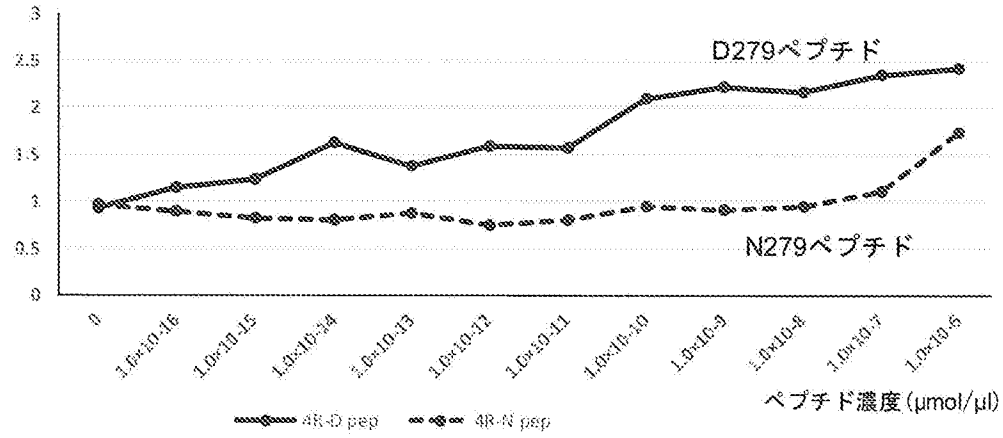
(B)


AD症例
PSP症例
RD4抗体（モノクローナル）
VQIINKKLDLSNVQSKC
抗４R抗体（ポリクローナル）
VQIIQKKLDLSNVQSKC

[図2]


AD
嗅内野
PSP
下オリーブ核
DN279抗体
D279抗体
50μm

[図3]


D279ペプチド
N279ペプチド
4R-D pep
4R-N pep
ペプチド濃度(μmol/μl)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/019028

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. G01N33/53, C07K16/18, G01N33/15, G01N33/50, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DAN, A. et al., "Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain", Acta Neuropathologica Communications, 2013, vol. 1, no. 54, pp. 1-9	1-11
Y	JP 09-210998 A (BAYER AG.) 15 August 1997, paragraphs [0015]-[0016] & EP 787986 A1, column 3, lines 4-28	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
03 August 2018 (03.08.2018)	14 August 2018 (14.08.2018)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/019028

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HASEGAWA, M. et al., "3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease", Acta Neuropathologica, 2014, vol. 127, no. 2, pp. 303-305	1-11
A	UCHIHARA, T. et al., "Specific Detection of Pathological Three-repeat Tau after Pretreatment with Potassium Permanganate and Oxalic Acid in PSP/CBD Brains", Brain Pathology, 12 August 2010, vol. 21, pp. 180-188	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/019028

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/019028

(Box III)

The invention in claim 1 and the invention in claim 11 share the technical feature in which "deamidation at position 279 of tau protein is used as an indicator of a disease".

However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 1 (DAN, A. et al., Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain, Acta Neuropathologica Communications, 2013, Vol. 1, No. 54, pp. 1-9) in which in the Sarkosyl-insoluble fractions of the brain sample (specimen), asparagine residue at position 279 of tau (tau protein) is deamidated in patients having Alzheimer's disease, whereas said mutation does not occur in patients having progressive supranuclear palsy or corticobasal degeneration, and thus cannot be said to be a special technical feature. In addition, there do not exist other identical or corresponding technical features between these inventions.

In addition, the claims of the present application are classified into the 2 inventions each having a special technical feature below.

(Invention 1) Invention in claims 1-10

Invention pertaining to a method for differentiating Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy/corticobasal degeneration by a specific binding reagent that specifically binds to a peptide in which the asparagine at position 279 of tau protein in a sample is substituted with an aspartic acid, and the specific binding reagent.

(Invention 2) Invention in claim 11

Invention pertaining to a medicine screening method characterized by performing a screening with deamidation at position 279 of tau protein as an indicator.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０１９０２８

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/53(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/53, C07K16/18, G01N33/15, G01N33/50, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	DAN, A. et al., Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain, Acta Neuropathologica Communications, 2013, Vol. 1, No. 54, pp. 1-9	1-11
Y	JP 09-210998 A (バイエル・アクチエンゲゼルシヤフト) 1997.08.15, [0015]-[0016] & EP 787986 A1 column 3, ll. 4-28	1-11

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０３．０８．２０１８	１４．０８．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　２Ｊ　６２０２
磯田　真美
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	HASEGAWA, M. et al., 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease, Acta Neuropathologica, 2014, Vol. 127, No. 2, pp. 303-305	1-11
A	UCHIHARA, T. et al., Specific Detection of Pathological Three-repeat Tau after Pretreatment with Potassium Permanganate and Oxalic Acid in PSP/CBD Brains, Brain Pathology, 2010.08.12, Vol. 21, pp. 180-188	1-11

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０１９０２８

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（特別ページ参照）

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

（第Ⅲ欄）

請求項１に係る発明と、請求項１１に係る発明とは、「タウタンパク質の２７９位の脱アミド化を疾患の指標とする」という共通の技術的特徴を有している。

しかしながら、当該技術的特徴は、文献１（DAN, A. et al., Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain, Acta Neuropathologica Communications, 2013, Vol. 1, No. 54, pp. 1-9)における、brain sample(検体)のSarkosyl-insoluble fractionsにおいて、Alzheimer's disease（アルツハイマー病）のpatientでは、tau（タウタンパク質）のasparagine residue at position 279がdeamidateされるのに対し、progressive supranuclear palsy（進行性核上性麻痺）又はcorticobasal degeneration（大脳皮質基底核変性症）のpatientでは、上記変異が生じない旨の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないため、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

そして、本願の請求の範囲は、各々下記の特別な技術的特徴を有する２の発明に区分される。

（発明１）請求項１－１０に係る発明

検体中のタウタンパク質の２７９位のアスパラギンがアスパラギン酸に置換しているペプチドに特異的に結合する特異的結合試薬により、アルツハイマー病と、進行性核上性麻痺／大脳皮質基底核変性症を鑑別する方法の発明及び上記特異的結合試薬の発明。

（発明２）請求項１１に係る発明

タウタンパク質の２７９位の脱アミド化を指標としてスクリーニングすることを特徴とする医薬のスクリーニング方法の発明。