

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-522643
(P2014-522643A)

(43) 公表日 平成26年9月8日(2014.9.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 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)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年1月6日 (2014.1.6)
 (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)
 (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)

(71) 出願人 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) 【要約】

A D A M 1 0 などの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ネオエピトープを含む、神経変性状態に関連する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、血液由来の試料を、前記ネオエピトープに特異的な抗体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む、方法。ネオエピトープを含むペプチドのレベルは、認知機能と逆相関を示すことが見出されている。

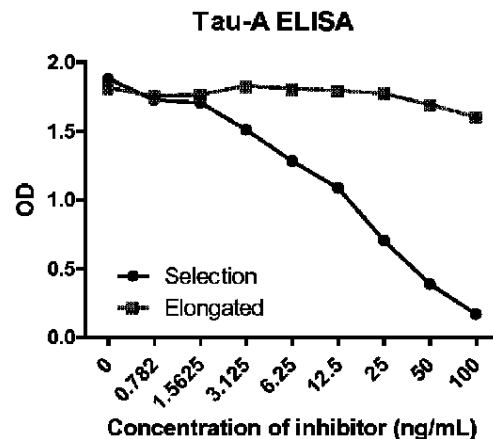


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

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。

【請求項 2】

前記免疫学的結合パートナーが、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、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記免疫学的結合パートナーが、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、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記タンパク質が、T a u - Aである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記ネオエピトープが、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る、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記免疫学的結合パートナーが、以下に示すT a u部分配列：

20

【表 1 A】

AAPPGQKGQAN	配列番号1	
AAPPGQKGQANAT	配列番号2	
APVPMPL	配列番号3	
APVPMPLK	配列番号4	
APVPMPLK	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	
EAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKGAD	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	
GSPGTPGSRSRTPSLTPPT	配列番号30	
GTPGSRSRTPSLTPPTR	配列番号31	
HGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMVDSPQL	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	
KSPVVS G DTSPRHLS	配列番号42	
KTPPAPKTPPSSGEPPK	配列番号43	
KTPPAPKTPPSSGEPPKSGDR	配列番号44	
KTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号45	
LAKQGL	配列番号46	
LATLADEV S ASLAKQGL	配列番号47	
LKNV K SKIGSTENLKHQPGGGKVQII N KKLD	配列番号48	10
LKNV K SKIGSTENLKHQPGGGKVQII N KKLDLSNVQSK	配列番号49	
LPTP P TR	配列番号50	
LPTP P TREP K KVA	配列番号51	
LPTP P TREP K KVAVV	配列番号52	
MHQDQEGD T DAGLK	配列番号53	
<u>M</u> HQDQEGD T DAGLK	配列番号54	
MVDS P QLATLADEV S ASLAKQGL	配列番号55	
NATRI P AKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号56	
NIHHKPGGGQ V E	配列番号57	20
NIHHKPGGGQ V EVK	配列番号58	
PGSPGTPGSR S RTPS	配列番号59	
PMPDLK	配列番号60	
PPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号61	
PPKSGDRSGYS	配列番号62	
PPTREP K KVA	配列番号63	
PSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号64	
PVPMPDLK	配列番号65	
PVPMPDLK	配列番号66	30
QARMVS	配列番号67	
QLATLADEV S ASLAKQGL	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	
RIPAKTPPAPKTPPSSGEPPK	配列番号75	40
RIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDR	配列番号76	
RIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	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	
RTPSLTPPTR	配列番号84	
RTPSLTPPTREP	配列番号85	
RTPSLTPPTREP	配列番号86	
RTPSLTPPTREP	配列番号87	
RTPSLTPPTREP	配列番号88	
RTPSLTPPTREP	配列番号89	
RTPSLTPPTREP	配列番号90	10
RTPSLTPPTREP	配列番号91	
RTPSLTPPTREP	配列番号92	
RTPSLTPPTREP	配列番号93	
RTPSLTPPTREP	配列番号94	
RTPSLTPPTREP	配列番号95	
RTPSLTPPTREP	配列番号96	
RTPSLTPPTREP	配列番号97	
RTPSLTPPTREP	配列番号98	
RTPSLTPPTREP	配列番号99	20
RTPSLTPPTREP	配列番号100	
RTPSLTPPTREP	配列番号101	
RTPSLTPPTREP	配列番号102	
RTPSLTPPTREP	配列番号103	
RTPSLTPPTREP	配列番号104	
RTPSLTPPTREP	配列番号105	
RTPSLTPPTREP	配列番号106	
RTPSLTPPTREP	配列番号107	
RTPSLTPPTREP	配列番号108	30
RTPSLTPPTREP	配列番号109	
RTPSLTPPTREP	配列番号110	
RTPSLTPPTREP	配列番号111	
RTPSLTPPTREP	配列番号112	
RTPSLTPPTREP	配列番号113	
RTPSLTPPTREP	配列番号114	
RTPSLTPPTREP	配列番号115	
RTPSLTPPTREP	配列番号116	
RTPSLTPPTREP	配列番号117	40
RTPSLTPPTREP	配列番号118	
RTPSLTPPTREP	配列番号119	
RTPSLTPPTREP	配列番号120	
RTPSLTPPTREP	配列番号121	
RTPSLTPPTREP	配列番号122	
RTPSLTPPTREP	配列番号123	
RTPSLTPPTREP	配列番号124	

【表 1 D】

TPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号125
TPRGAAPPGQK	配列番号126
TPRGAAPPGQKGQAN	配列番号127
TPRGAAPPGQKGQANAT	配列番号128
TPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKD	配列番号129
TRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号130
TSPRHLSNVSTGSID	配列番号131
TSPRHLSNVSTGSIDMVDSPQL	配列番号132
TSPRHLSNVSTGSID <u>M</u> VDSPQLATLADEVSA S 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、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

20

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：

【表 2 A】

AAPPGQ	配列番号136	
APVPMP	配列番号137	
APVPMP	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	20
EVMEDH	配列番号148	
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	30
HKPGGG	配列番号155	
IPAKTP	配列番号156	
KAKTDH	配列番号157	
KSKDGT	配列番号158	
KSPVVS	配列番号159	
KTPPAP	配列番号160	40
LAKQGL	配列番号46	
LATLAD	配列番号161	
LKNVKS	配列番号162	
LPTPPT	配列番号163	

【表 2 B】

MHQDQE	配列番号164	
MHQDQE	配列番号165	
MVDSPQ	配列番号166	
NATRIP	配列番号167	
NIHHKP	配列番号168	
PGSPGT	配列番号169	10
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	
PVPMPD	配列番号174	
QARMVS	配列番号67	20
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	
RTPPKS	配列番号180	
RTPSLP	配列番号181	30
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	
SPQLAT	配列番号187	40
SPRHLS	配列番号102	
SPSSAK	配列番号188	
SPVVSG	配列番号189	
SRSRTP	配列番号190	

【表 2 C】

SRTPSL	配列番号191	
STENLK	配列番号110	
TAPVPM	配列番号192	
TAPVPM	配列番号193	
TLADEV	配列番号194	
TPPAPK	配列番号117	10
TPPKSP	配列番号195	
TPPSSG	配列番号196	
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	20
VSASLA	配列番号202	

(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する、
 または、ペプチドのC末端における以下の配列：

【表 3 A】

AAGHVT	配列番号203	
AEIVYK	配列番号204	30
AKSRLQ	配列番号205	
APPGQK	配列番号206	
ATRIPA	配列番号8	
DLKNVK	配列番号207	
DQGGYT	配列番号208	
DRSGYS	配列番号209	40
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	

【表 3 B】

GNKKIE	配列番号215	
GQANAT	配列番号216	
GQVEVK	配列番号217	
GSRVRT	配列番号218	
GTPGSR	配列番号153	
HAGTYG	配列番号219	10
INKKLD	配列番号220	
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	20
LPTPPT	配列番号163	
MPDLKN	配列番号225	
NKKIET	配列番号226	
PGSRSR	配列番号227	
PKSGDR	配列番号228	
PKTPPS	配列番号229	30
PMPDLK	配列番号60	
PMPDLK	配列番号230	
PTPPTR	配列番号231	
PTREPK	配列番号232	
QARMVS	配列番号67	
QDQEGD	配列番号233	40
QEGDTD	配列番号234	
QKGQAN	配列番号235	
RSRTPS	配列番号236	
SAKSRL	配列番号237	

【表 3 C】

SASLAK	配列番号182	
SEKLDLDF	配列番号88	
SGEPPK	配列番号184	
SNVQSK	配列番号238	
SPRHLS	配列番号102	
SPSSAK	配列番号188	10
STENLK	配列番号110	
STGSID	配列番号239	
TDAGLK	配列番号240	
TPGSRS	配列番号241	
TPPAPK	配列番号117	
VDSPQL	配列番号242	20
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する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

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、請求項 6 に記載の方法。 30

【請求項 9】

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 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

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 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記競合物質が、合成ペプチドである、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る、請求項 10 に記載の方法。 40

【請求項 12】

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 11 に記載の方法。

【請求項 13】

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 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

50

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1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

Tauタンパク質のセクレターゼ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。

【請求項16】

アミノ酸配列：

【表 4 A】

AAAPGQ	配列番号136	
APVPMP	配列番号137	
APVPMP	配列番号138	
ASLAKQ	配列番号139	
ATLADE	配列番号140	
ATRIPA	配列番号8	
DEAAGH	配列番号141	
DRKDQG	配列番号142	10
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	
EVMEDH	配列番号148	
EVSASL	配列番号149	
GAAPPG	配列番号150	
GEPPKS	配列番号151	
GSPGTP	配列番号152	20
GTPGSR	配列番号153	
HGAEIV	配列番号154	
HKPGGG	配列番号155	
IPAKTP	配列番号156	
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	30
LKNVKS	配列番号162	
LPTPPT	配列番号163	
MHQDQE	配列番号164	
MHQDQE	配列番号165	
MVDSPQ	配列番号166	
NATRIP	配列番号167	
NIHHKP	配列番号168	
PGSPGT	配列番号169	
PMPDLK	配列番号60	
PPAPKT	配列番号170	40
PPKSGD	配列番号171	
PPTREP	配列番号172	
PVPMPD	配列番号173	
PVPMPD	配列番号174	
QARMVS	配列番号67	
QLATLA	配列番号175	

【表 4 B】

QTAPVP	配列番号176	
RENAKA	配列番号177	
RIPAKT	配列番号178	
RKDQGG	配列番号179	
RTPPKS	配列番号180	
RTPSLP	配列番号181	
SASLAK	配列番号182	
SEKLDL	配列番号88	
SGDTSP	配列番号183	10
SGEPPK	配列番号184	
SLAKQG	配列番号185	
SPGSPG	配列番号186	
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	20
TAPVPM	配列番号192	
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	
TPRGAA	配列番号197	
TPSLED	配列番号198	
TRIPAK	配列番号199	
TSPRHL	配列番号200	30
VPGGGN	配列番号201	
VSASLA	配列番号202	

(表中、Mは酸化されたメチオニンを示す)

のいずれか1つのN末端、

または、アミノ酸配列：

【表 5 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	
GSRVRT	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	
PKTPPS	配列番号229	

【表 5 B】

PMPDLK	配列番号60	
PMPDLK	配列番号230	
PTPPTR	配列番号231	
PTREPK	配列番号232	
QARMVS	配列番号67	
QDQEGD	配列番号233	10
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	
SGEPPK	配列番号184	20
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	
TPGSRS	配列番号241	30
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1つのC末端と特異的に免疫反応性である、請求項15に記載の免疫学的結合パートナー。

40

【請求項17】

モノクローナル抗体またはその結合断片である、請求項15または16に記載の免疫学的結合パートナー。

【請求項18】

請求項17に記載のモノクローナル抗体を産生する細胞株。

【請求項19】

請求項6に記載の前記Tau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Tau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。

【請求項20】

50

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た、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た、または、検出可能なマーカーにコンジュゲートした、請求項 19 に記載のペプチド。

【請求項 21】

請求項 6 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 つにおいて、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。

【請求項 22】

請求項 6 に記載の前記タンパク質の部分配列のいずれか 1 つにおいて、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。

10

【請求項 23】

請求項 22 に記載の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。

【請求項 24】

請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項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。

20

【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。

【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 65 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、20 年毎に 2 倍になると予想される。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]。

30

40

【0003】

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

50

が、AD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[27]。

【0004】

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[24、33、34、38、39]。

【0005】

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AD治療法を同定するために500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AD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AD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。

【0006】

アルツハイマーのリスク評価は、APOE 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AD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]。

【0007】

AD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 β)を含む斑の形成と、Tauタンパク質の修飾型を含む神経原線維のもつれの形成[10]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[12]。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 β の堆積は、実際のニューロン損傷よりも先に起こるが[30]、神経原線維のもつれの形成開始にかかわっており[32]、これが、神経細胞死の主な原因のようである[5、18]。APP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。APPの基本的な機能は知られておらず、APPは、最も一般的には、39~42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 β)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[10]。A β 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、 β -セクレターゼ(BACE-1)によってなされ、第二の切断は、 γ -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 β 形成に必須である[10]。さらに、その他の酵素的な切断、例えばADAM10(ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ(A Disintegrin And Metalloproteinase)10)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APP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与ることが予想される[10、11、19、25、40]。

【0008】

Tauタンパク質は、微小管を安定化するタンパク質であり、Tau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CNS以外にはほとんど存在せず、さらにTauは、AD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[10]。さらに、Tau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、Tauタンパク質の変化を伴う最も一般的な病気はADである[10、17]。リン酸化および酵素的な切断などの翻訳後修飾は、Tauの微小管を安定化させる能力を調節して、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

10

20

30

40

50

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 ($2^{-}3^{-}10^{-}$ 、 $2^{+}3^{-}10^{-}$ 、 $2^{+}3^{+}10^{-}$ 、 $2^{-}3^{-}10^{+}$ 、 $2^{+}3^{-}10^{+}$ 、 $2^{+}3^{+}10^{+}$)。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]。

10

【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關する。

20

【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：

30

- セクレターゼ、例えば ADAM9、10、17 (TACE)、19、および BACE2
- 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]。

40

【発明の概要】

【0012】

ここで本発明者らは、セクレターゼが介在する Tau 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】

50

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。

【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。

10

【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。

【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。

20

【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。

【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	
EAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKGAD	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	
HGAEIVYKSPVSGDTSRHLNSVSTGSIDMVDSPL	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	
KSPVVS G DTS P RHLS	配列番号42	
KTPPAPKTPPSSGEP P K	配列番号43	
KTPPAPKTPPSSGEP P KSGDR	配列番号44	
KTPPAPKTPPSSGEP P KSGDRSGYS	配列番号45	
LAKQGL	配列番号46	
LATLADEV S ASLAKQGL	配列番号47	
LKNV K SKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLD	配列番号48	10
LKNV K SKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSK	配列番号49	
LPTP P TR	配列番号50	
LPTP P TREP P KKVA	配列番号51	
LPTP P TREP P KKVAVV	配列番号52	
MHQDQEGD T DAGLK	配列番号53	
<u>MHQDQEGD</u> T DAGLK	配列番号54	
MVDSPQLATLADEV S ASLAKQGL	配列番号55	
NATRIPAKTPPAPKTPPSSGEP P KSGDRSGYS	配列番号56	
NIHHKPGGGQVE	配列番号57	20
NIHHKPGGGQVEVK	配列番号58	
PGSPGTPGSR S RTPS	配列番号59	
PMPDLK	配列番号60	
PPAPKTPPSSGEP P KSGDRSGYS	配列番号61	
PPKSGDRSGYS	配列番号62	
PPTREP P KKVA	配列番号63	
PSSGEP P KSGDRSGYS	配列番号64	
PVPMPDLK	配列番号65	
PVP <u>M</u> PD L K	配列番号66	30
QARMVS	配列番号67	
QLATLADEV S ASLAKQGL	配列番号68	
QTAPVMP P DL	配列番号69	
QTAPVMP P DLK	配列番号70	
QTAPVMP P DLK	配列番号71	
RENAKAKTDHGAEIVYK	配列番号72	
RIPAKTPPAPK	配列番号73	
RIPAKTPPAPKTPPS	配列番号74	
RIPAKTPPAPKTPPSSGEP P K	配列番号75	40
RIPAKTPPAPKTPPSSGEP P KSGDR	配列番号76	
RIPAKTPPAPKTPPSSGEP P KSGDRSGYS	配列番号77	
RKDQGGYTMHQD	配列番号78	
RKDQGGYTMHQDQEGD T D	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】

RTPSLTPPT	配列番号83	
RTPSLTPPTR	配列番号84	
RTPSLTPPTREP	配列番号85	
RTPSLTPPTREP	配列番号86	
SASLAKQGL	配列番号87	
SEKLD	配列番号88	
SGDTSRHL	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	
SPGSPGTPGSR	配列番号94	
SPGSPGTPGSR	配列番号95	
SPGSPGTPGSR	配列番号96	
SPGSPGTPGSR	配列番号97	
SPGSPGTPGSR	配列番号98	
SPGTPGSR	配列番号99	20
SPGTPGSR	配列番号100	
SPQLATLADEV	配列番号101	
SPRHL	配列番号102	
SPSSAKSRL	配列番号103	
SPSSAKSRL	配列番号104	
SPVVS	配列番号105	
SRSRTPSLTPPTR	配列番号106	
SRTSLTPPT	配列番号107	
SRTSLTPPTREP	配列番号108	30
SRTSLTPPTREP	配列番号109	
STENL	配列番号110	
TAPVMPDL	配列番号111	
TAPVMPDL	配列番号112	
TAPVMPDL	配列番号113	
TAPVMPDL	配列番号114	
TAPVMPDL	配列番号115	
TLADEV	配列番号116	
TPPAP	配列番号117	
TPPAPKTPSSGEP	配列番号118	40
TPPAPKTPSSGEP	配列番号119	
TPPAPKTPSSGEP	配列番号120	
TPPKSPSSAK	配列番号121	
TPPKSPSSAKSRL	配列番号122	
TPPKSPSSAKSRL	配列番号123	
TPPSSGEPKSGDR	配列番号124	

【表 1 D】

TPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号125
TPRGAAPPGQK	配列番号126
TPRGAAPPGQKGQAN	配列番号127
TPRGAAPPGQKGQANAT	配列番号128
TPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKD	配列番号129
TRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号130
TSPRHLSNVSTGSID	配列番号131
TSPRHLSNVSTGSIDMVDSPQL	配列番号132
TSPRHLSNVSTGSID <u>M</u> VDSPQLATLADEVSA S 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	
GAAPPQ	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	40
TAPVPM	配列番号192	
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	
GSRSR	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	
PGRSR	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 ₂ 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)

40

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

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。

【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。

【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】

【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（100 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0）中で100 μgおよび1 μg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、Silver Xpress（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。

【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、0.1 μg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

10

20

30

40

50

L D I タンデムの質量スペクトルを、B r u k e r のウルトラフレックスM A L D I - T O F / T O F 質量分析計 (B r u k e r - D a l t o n i c s 、 B r e m e n 、 G e r m a n y) 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「F l e x a n a l y s i s 」 (B r u k e r - D a l t o n i c s 、 B r e m e n 、 G e r m a n y) を用いてスペクトルを解析した。L C M S 試料を限外濾過して、10 k D a より大きいタンパク質を除去し、ギ酸を用いてp H を2 . 0 に調節し、4 μ L の試料をL C - M S / M S によって解析した。L C を、n a n o A C Q U I T Y U P L C B E H C 1 8 カラム (W a t e r s 、 M i l f o r d 、 M A 、 U S A) で、ギ酸 / アセトニトリルの濃度勾配を用いて行った。M S およびM S / M S を、S y n a p t H i g h D e f i n i t i o n M a s s S p e c t r o m e t r y 四重極型飛行時間型質量分析計 (Q U A D - T O F ; W a t e r s 、 M i l f o r d 、 M A 、 U S A) で、350 ~ 1600 m / z (M S) および50 ~ 2000 m / z (M S / M S) の捕捉範囲で行った。ソフトウェア「P r o t e i n L y n x G l o b a l S E R V E R (P L G S) 」 (W a t e r s 、 M i l f o r d 、 M A 、 U S A) 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、M a s c o t 2 . 2 (M a t r i x S c i e n c e 、 B o s t o n 、 M A 、 U S A) ソフトウェアをM A L D I - T O F / T O F またはE S I - Q U A D - T O F 設定のいずれかで用いて、M S およびM S / M S データをT a u (F A S T A) タンパク質データベースで検索した。

10

20

【 0 0 3 7 】

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。

T a u + B A C E 1

【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	
TLADEVASLAKQGL	配列番号116	
ATLADEVASLAKQGL	配列番号7	
TSPRHLSNVSSTGSID	配列番号131	
LATLADEVASLAKQGL	配列番号47	20
EAAGHVTQARMVSKSKD	配列番号15	
QLATLADEVASLAKQGL	配列番号68	
EVMEDHAGTYGLGDRKD	配列番号22	
EVMEDHAGTYGLGDRKD	配列番号23	
SPQLATLADEVASLAKQGL	配列番号101	
RKDQGGYTMHQDQEGDTD	配列番号79	
MVDSPQLATLADEVASLAKQGL	配列番号55	
TSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQL	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 ¹ SGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQL	配列番号32	
TSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL	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	
APVPMPDL	配列番号3	
SPGTPGSRS	配列番号99	
EDHAGTYG	配列番号17	
PVPMPDLK	配列番号65	
EGDTDAGLK	配列番号18	
PVPMPDLK	配列番号66	20
SPSSAKSRL	配列番号103	
TAPVPMPDL	配列番号111	
APVPMPDLK	配列番号4	
APVPMPDLK	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	
RTPSLTPPT	配列番号83	
QTAPVPMPDL	配列番号69	
TAPVPMPDLK	配列番号112	
TPRGAAPPGQK	配列番号126	
TAPVPMPDLK	配列番号113	
SPGSPGTPGSRS	配列番号93	
GAAPPGQKGQAN	配列番号27	40
EVSASLAKQGL	配列番号26	
PPTREPKKVA	配列番号63	
HVPGGGNKKIE	配列番号34	
HKPGGQVEVK	配列番号33	
PPKSGDRSGYS	配列番号62	
SRTPSLTPPT	配列番号107	

【表 5 B】

TAPVMPDLKN	配列番号114	
QTAPVMPDLK	配列番号70	
AAPPGQKGQANAT	配列番号2	
QTAPVMPDLK	配列番号71	
RTPSLTPPTR	配列番号84	
HVPGGGNKKIET	配列番号35	
SPGSPGTPGSRSR	配列番号94	
GAAPPGQKGQANAT	配列番号28	
NIHHKPGGGQVE	配列番号57	10
GEPPKSGDRSGYS	配列番号29	
SPGSPGTPGSRSR	配列番号95	
ATRIPAKTPPAPK	配列番号9	
TPPKSPSSAKSRL	配列番号122	
TAPVMPDLKNVK	配列番号115	
TPPSSGEPPKSGDR	配列番号124	
SGEPPKSGDRSGYS	配列番号90	
LPTPPTREPCKVA	配列番号51	
SPVVSGDTSRHL	配列番号105	
PGSPGTPGSRSRTPS	配列番号59	20
TPRGAAPPGQKGQAN	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	
SPGSPGTPGSRSRTPS	配列番号96	
MHQDQEGDTDAGLK	配列番号53	
SRSRTPSLTPPTR	配列番号106	
RIPAKTPPAPKTPPS	配列番号74	
MHQDQEGDTDAGLK	配列番号54	30
KSPVVSGDTSRHL	配列番号42	
ATLADEVASLAKQGL	配列番号7	
RTPSLTPPTREP	配列番号85	
TPPAPKTPSSGEPPK	配列番号118	
PSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号64	
TPRGAAPPGQKGQANAT	配列番号128	
LPTPPTREPCKVAVV	配列番号52	
RTPPKSPSSAKSRLQ	配列番号82	
ENAKAKTDHGAEIVY	配列番号19	
SRTPSLTPPTREP	配列番号108	40
KTPPAPKTPSSGEPPK	配列番号43	
ENAKAKTDHGAEIVYK	配列番号20	
TPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号125	
GTPGSRSRTPSLTPPTR	配列番号31	
RTPSLTPPTREPCKVA	配列番号86	
RENAKAKTDHGAEIVYK	配列番号72	
GSPGTPGSRSRTPSLTPPT	配列番号30	

【表 5 C】

SRTPSLPTPPTREPCKVA	配列番号109	
TPPAPKTPPSSGEPPKSGDR	配列番号119	
KTPPAPKTPPSSGEPPKSGDR	配列番号44	
SPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT	配列番号97	
RIPAKTPPAPKTPPSSGEPPK	配列番号75	
SPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT	配列番号98	
PPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号61	
KSKDGTGSDDKAKGADGKTKIA	配列番号41	
ATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPK	配列番号10	10
TPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号120	
IPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDR	配列番号38	
KTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号45	
RIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDR	配列番号76	
SPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPCKVA	配列番号100	
ATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDR	配列番号11	
IPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号39	
RIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号77	
TRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号130	
ATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号12	20
NATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYS	配列番号56	

【 0 0 3 8 】

< 免疫化のためのペプチドの選択 >

M S 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 N P S @ : 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 B L A S T 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 : T P R G A A P P G Q - G G C - K L H (配列番号 2 4 8 - K L H) (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 T P R G A A P P G Q (配列番号 2 4 6)、(c) N 末端で 1 つのアミノ酸を伸長させた除外ペプチド A T P R G A A P P G Q (配列番号 2 4 7) (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 】

< E L I S A 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 (1 5 0 m M トリズマ、1 % B S A、0 . 0 5 % トウイン 2 0、0 . 3 6 % プロニドックス L 5、p H 8 . 0 (トリス B T B) で構成され、反応停止緩衝液は、0 . 1 % H ₂ S O ₄ で構成された。

【 0 0 4 1 】

アッセイの開発に用いられた E L I S A プレートを、Roche のストレプトアビジン (カタログ : 1 1 9 4 0 2 7 9) でコーティングした。全ての E L I S A プレートを、Molecular Devices、SpectraMax M、(C A、U S A) の E L I S A リーダーで解析した。

【 0 0 4 2 】

< E L I S A の 開 発 >

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 B a l b / C マウスの皮下に 2 0 0 μ l の乳化した抗原および 5 0 μ g の T P R G A A P P G Q - G G C - K L H（配列番号 2 4 8 - K L H）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、1 0 0 μ l の 0 . 9 % 塩化ナトリウム溶液中の 5 0 μ g の T P R G A A P P G Q - G G C - K L H（配列番号 2 4 8 - K L H）で静脈内に追加免疫した。

10

【 0 0 4 3 】

< 融 合 >

骨髄腫細胞として S P 2 / 0 を用いて、これまでに説明されている融合法 [1 6] を行った。半固形培地を用いる方法で、融合細胞を 3 5 m m の細胞培養皿中でクローニングし、培養皿を C O ₂ 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 1 6 個の 9 6 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。

【 0 0 4 4 】

< 抗体のスクリーニング >

競合 E L I S A 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 T P R G A A P P G Q（配列番号 2 4 6）を用い、伸長ペプチドとして A T P R G A A P P G Q（配列番号 2 4 7）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

【 0 0 4 5 】

< T a u - A E L I S A の 手 順 >

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。T a u - A E L I S A 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 9 6 ウェルの E L I S A プレートをさらに、トリス B T B 緩衝液中に溶解させた 6 n g / m l の合成ペプチド T P R G A A P P G Q - ビオチン（配列番号 2 4 6 - ビオチン）で、2 0 で 3 0 分、3 0 0 r p m 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、2 0 μ l の試料を添加し、続いて 1 0 0 μ l のペルオキシダーゼコンジュゲート抗ヒト m A b - T a u - A 溶液（5 0 n g / m l）を添加した。プレートを、1 0 0 m M トリス B T B 緩衝液中で、3 0 0 r p m で振盪しながら 2 0 で 1 時間インキュベートした。

30

【 0 0 4 6 】

再度プレートを 5 回洗浄し、続いて 1 0 0 μ l のテトラメチルベンジジン（t e t r a m e t h y l b e n z i n i d i n e）（T M B）（K e m - E n - T e c カタログ 4 3 8 O H）を添加した。プレートを暗所で 1 5 分インキュベートし、3 0 0 r p m で振盪した。反応を止めるために、1 0 0 μ l の停止溶液（9 5 ~ 9 7 % H ₂ S O ₄、M e r c k カタログ番号：1 . 0 0 7 3 1）を添加し、E L I S A リーダーで、4 5 0 n m でプレートを解析し、参照として 6 5 0 n m を使用した。

40

【 0 0 4 7 】

< 標 準 >

標準曲線を、T P R G A A P P G Q - ビオチン（配列番号 2 4 6 - ビオチン）の連続希釈によって得た。標準濃度は、0、0 . 7 8 2、1 . 5 6 2 5、3 . 1 2 5、6 . 2 5、1 2 . 5、2 5、5 0、および 1 0 0 n g / m l であった。

【 0 0 4 8 】

< 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。

10

【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]。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

号 2 4 6) に対して発生した N B 1 9 1 - 3 C 4 であった。

【 0 0 5 6 】

< 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。

【 0 0 5 7 】

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) 。

10

【 0 0 5 8 】

< アルツハイマーマウスおよびその対照からの脳の分離 >

T g 4 5 1 0 マウスおよびそれに対応する対照から抽出された脳を N B 1 9 1 - 3 C 4 E L I S A 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 T g 4 5 1 0 は、対応する対照と比較して 10 倍高いレベルの T a u - 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、T g 4 5 1 0 マウスは、極めて高いレベルの T a u - 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 T a u - 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 T a u 凝集と相関する T g 4 5 1 0 において高分子量バンドの強度はより強かったが、全 T a u に対する抗体を用いたプロットは、全 T a u でほぼ同じレベルを示した。

20

【 0 0 5 9 】

< T a u - A の C S F および血清レベルの相関 >

C S F と血清の組み合わせ試料 3 3 個について、本発明者らは、2 つの分析物において T a u - 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 T a u - A が検出され、顕著ではないが適度な相関が観察された。

30

【 0 0 6 0 】

< T a u - A は年齢とは相関するが肥満指数とは相関しない >

O A 研究の血清試料において、本発明者らは、T a u - 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、B M I とは相関しないことを見出した。これらのデータから、T a u - 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。

【 0 0 6 1 】

< 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 1 8 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 T a u - 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、T a u - A は、病気が進行するにつれて増加することが示される。

40

【 実施例 2 】

【 0 0 6 2 】

< 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 2 3 ~ 4 5 歳の健康な成人の志願者 1 5 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。

【 0 0 6 3 】

50

< 動物試料 >

5匹の6月齢のスプレグ・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】

< インビトロでの組織の切断 >

MMP緩衝液(100mMトリスHCl、100mMのNaCl、10mMのCaCl₂、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、ウェスタンブロッティングおよびELISA解析で切断を確認した。

【0065】

< ウェスタンブロッティング >

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¹⁵、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¹⁵。次に、これまでに説明されたようにして¹⁵、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】

< ヒト試料 >

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】

< Tau-A ELISAアッセイの特徴付け >

ADAM10によって生成したTauの切断配列(TPRGAAPPGQ、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】

< Tau-A ELISAの生物学的な確認 >

50

ELISAを用いた解析から、Tg4510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Tau-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、Tg4510マウスは、極めて高いレベルのTau-Aを有するが、一方で対照マウスは、極めてわずかなTau-Aしか有さないことが示された(図7F)。全Tauに対する抗体を用いたプロットを再度精査したところ、Tg4510において、高分子量バンドの強度がより強かったが、全Tauではほぼ同じレベルを示した。

【0069】

< Tau-AレベルはMDRS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Tau-Aレベルと、Mattis認知症評価スケール¹⁰を用いて得られたスコアとを関連付けたところ、MDRSとTau-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、CSF中の無傷のTau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¹⁻³。これは、本発明者らが知る限り、血清中のTau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⁹。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、A42およびリン酸化Tau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⁴、これまでにインビトロで生成したTau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ADAM10とTauとの組み合わせは、ADが進行する間、Tau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Tau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ADAM10によって生成したTauペプチド断片を検出することができ、加えてTg4510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、ADAM10によるTau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Tau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(comprising)」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 & <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=alzheimer>.
Ref Type: Generic 10
2. Understanding stages and symptoms of Alzheimer's disease. 2010. 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 30
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
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. Høglund 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 40
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.*

【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 10
- 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. 20
Biochem.Biophys.Res.Commun.

【 図 1 】

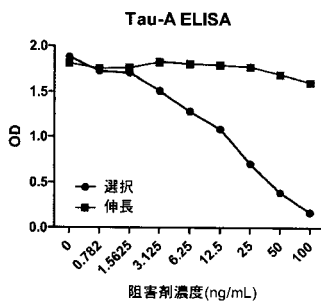


図1

【 図 2 】

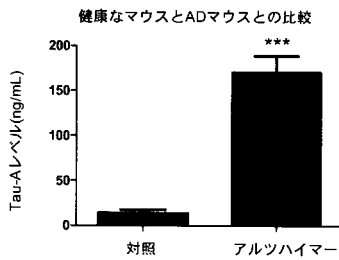


図2

【 図 5 】

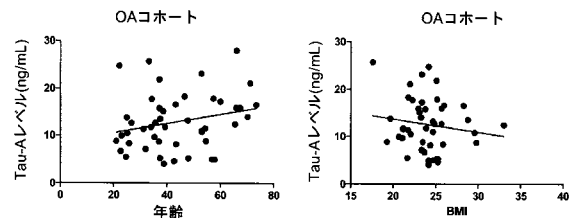


図5

【 図 6 】

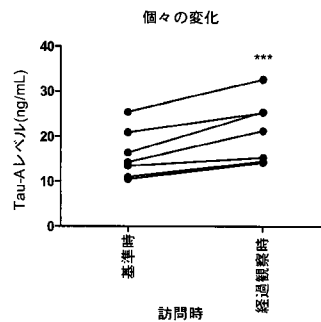


図6

【 図 8 】

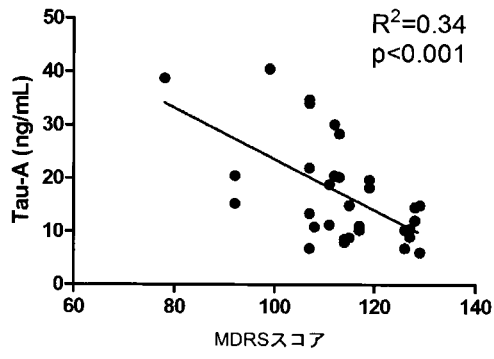


図8

【 図 3 】

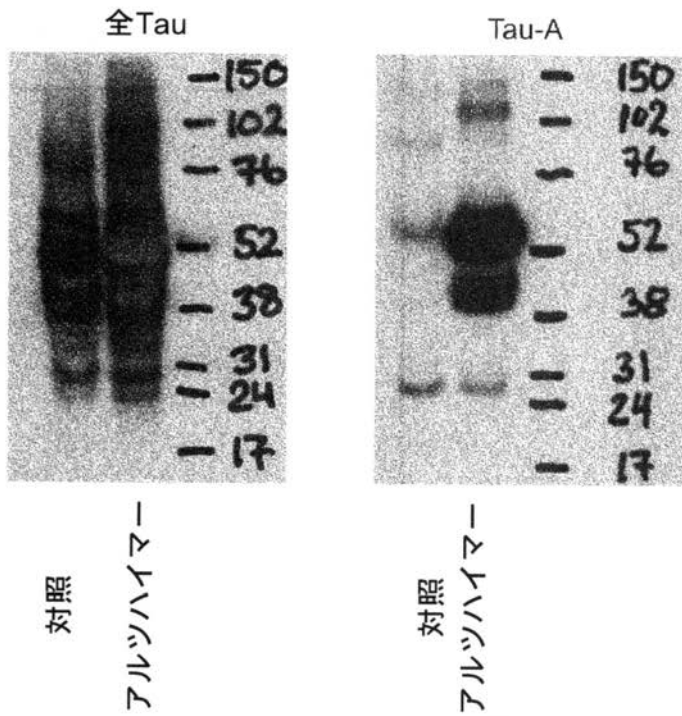


図3

【 図 4 】

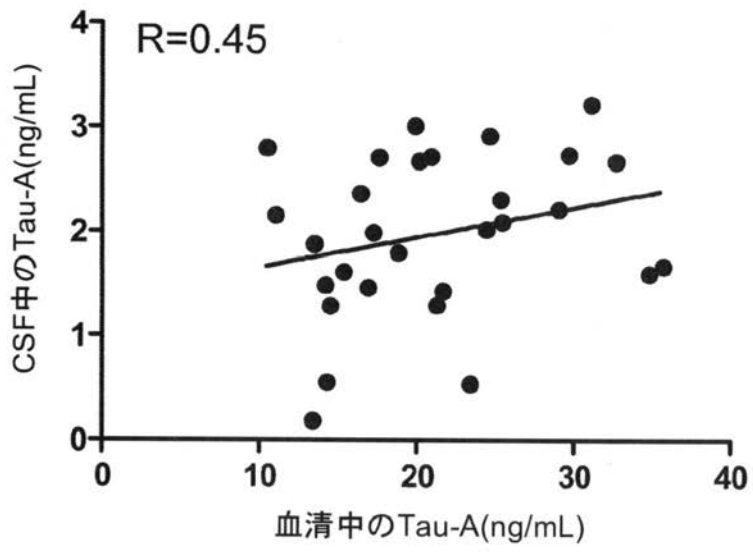


図4

【図7A - F】

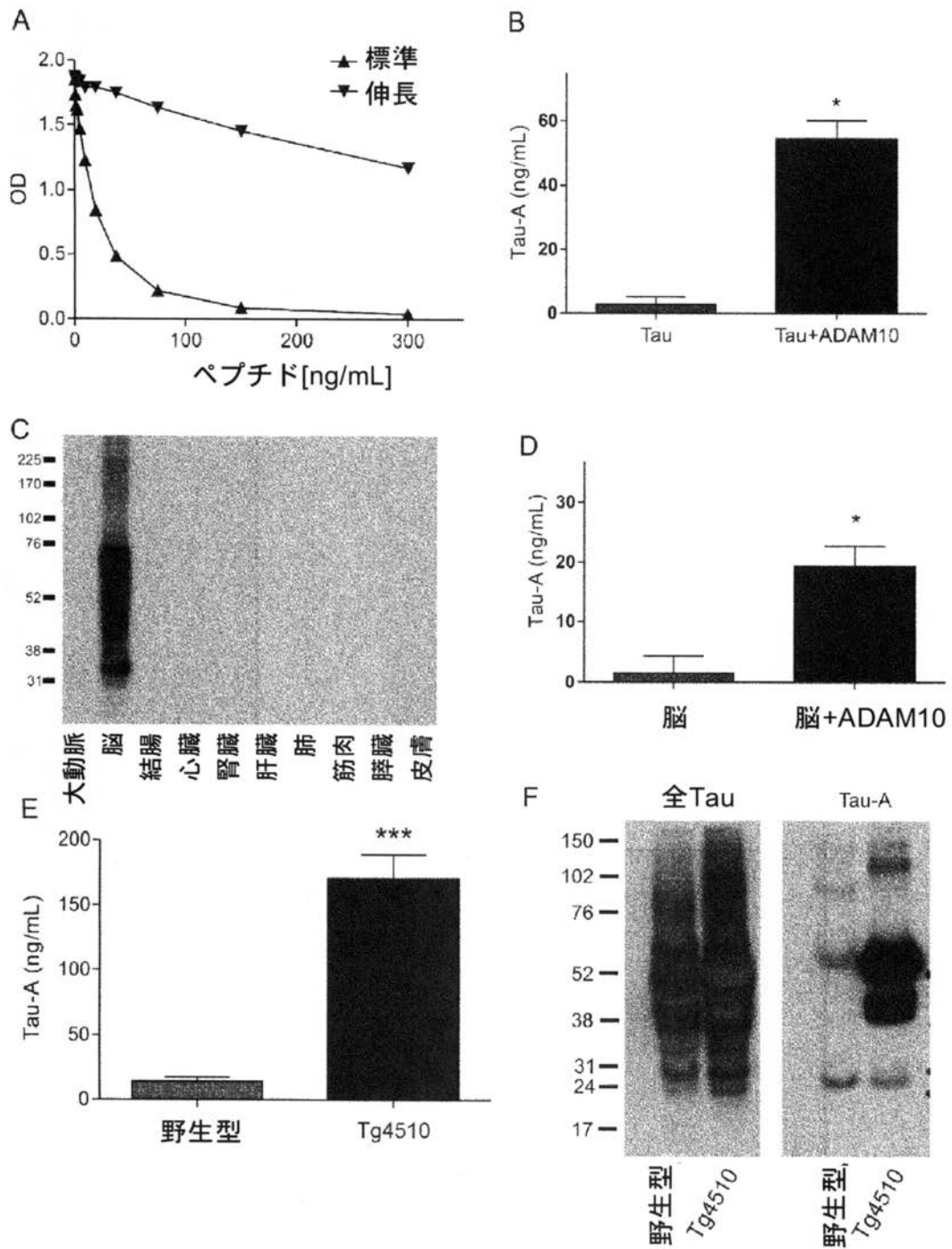


図7A、B、C、D、EおよびF

【配列表】

2014522643000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/062965

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12Q1/37	G01N33/68	C07K14/47 C07K16/00 C12N5/00
ADD.		
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) C12Q G01N C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/032155 A2 (BANYAN BIOMARKERS INC [US]; WANG KEVIN KA-WANG [US]; ZHANG ZHIQUN [US]) 17 March 2011 (2011-03-17) p. 20, paragraph [0090] - p. 29, paragraph [0121], p. 35, paragraph [0144] - 47, paragraph [0176], Tables 7, 8, Fig. 6, SEQ ID NOs: 35, 130 ----- -/--	1-24
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 30 November 2012		Date of mailing of the international search report 13/12/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer R. von Eggelkraut-G.

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/062965

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GARG S ET AL: "Cleavage of Tau by calpain in Alzheimer's disease: the quest for the toxic 17 kD fragment", NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, vol. 32, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 1-14, XP027502788, ISSN: 0197-4580, DOI: 10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2010.09.008 [retrieved on 2010-11-17] the whole document -----	1-24
X	DELLA C. DAVID ET AL: "Proteasomal degradation of tau protein", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 83, no. 1, 1 October 2002 (2002-10-01), pages 176-185, XP55037311, ISSN: 0022-3042, DOI: 10.1046/j.1471-4159.2002.01137.x the whole document -----	15, 17-21,24
X	WO 2010/021755 A2 (OLIGOMERIX INC [US]; MOE JAMES G [US]; DAVIDWITZ ELIOT J [US]) 25 February 2010 (2010-02-25) p. 2, paragraph [0007] - p. 3, paragraph [0014], p. 14, paragraph [0072] - p. 31, paragraph [0131] -----	15-21,24
X	WO 01/55725 A2 (INNOGENETICS NV [BE]; VANMECHELEN EUGEEN [BE]; VANDERSTICHELE HUGO [BE]) 2 August 2001 (2001-08-02) p. 9, line 1 - p. 30, line 6, claims 1-20, Fig. 1, SEQ ID NO: 33 -----	1-24
X	WO 94/13795 A1 (INNOGENETICS NV [BE]; VANDERMEEREN MARC [BE]; MERCKEN MARC [US]; VANME) 23 June 1994 (1994-06-23) p. 1, line 1 - p. 31, SEQ ID NOs: 2, 3 -----	15-24
X	US 2008/050383 A1 (SIGURDSSON EINAR [US] ET AL) 28 February 2008 (2008-02-28) p. 1, paragraph [0007] - p. 2, paragraph [0010], p. 11, paragraph [0036] - p. 16, paragraph [0066], Table I, SEQ ID NOs: 1-3, 5 -----	15-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/062965

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/062965**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 additional 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 an 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.:
1-24 (partially)
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 Application No. PCT/ EP2012/ 062965

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-24(partially)

A peptide fragment of Tau protein A comprising the epitope having SEQ ID NO: 136, an immunological binding partner against the peptide fragment and a method of bioassay for the quantification of Alzheimer's Disease-specific peptide fragments using the generated immunological binding partner against the peptide fragment

2-132. claims: 1-24(partially)

A peptide fragment of Tau protein A comprising the epitope having SEQ ID NOs: 137 (invention 2), 138 (invention 3), ..., 246 (invention 132) as listed in claims 7, 8 and 16, an immunological binding partner against the peptide fragment and a method of bioassay for the quantification of Alzheimer's Disease-specific peptide fragments using the generated immunological binding partner against the peptide fragment.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/062965

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011032155 A2	17-03-2011	AU 2010291933 A1	10-05-2012
		CA 2774173 A1	17-03-2011
		EP 2478360 A2	25-07-2012
		WO 2011032155 A2	17-03-2011

WO 2010021755 A2	25-02-2010	US 2011312059 A1	22-12-2011
		WO 2010021755 A2	25-02-2010
		WO 2012054008 A2	26-04-2012

WO 0155725 A2	02-08-2001	AT 342509 T	15-11-2006
		AU 777837 B2	04-11-2004
		AU 3731901 A	07-08-2001
		BR 0107851 A	29-10-2002
		CA 2397991 A1	02-08-2001
		DE 1250600 T1	06-03-2003
		DE 60123752 T2	23-08-2007
		DK 1250600 T3	05-02-2007
		EP 1250600 A2	23-10-2002
		ES 2274869 T3	01-06-2007
		HK 1048513 A1	07-12-2007
		JP 2003521499 A	15-07-2003
		US 2003194742 A1	16-10-2003
		US 2004091942 A1	13-05-2004
WO 0155725 A2	02-08-2001		

WO 9413795 A1	23-06-1994	AT 165866 T	15-05-1998
		AU 690092 B2	23-04-1998
		AU 5809794 A	04-07-1994
		DE 69318420 D1	10-06-1998
		DE 69318420 T2	28-01-1999
		DK 673418 T3	01-03-1999
		EP 0673418 A1	27-09-1995
		ES 2118373 T3	16-09-1998
		JP 2879975 B2	05-04-1999
		JP H08502898 A	02-04-1996
		US 5843779 A	01-12-1998
WO 9413795 A1	23-06-1994		

US 2008050383 A1	28-02-2008	US 2008050383 A1	28-02-2008
		US 2011318358 A1	29-12-2011

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47
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

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(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, エッケルスベリィスガーデ 1 3

(72) 発明者 ヘンリックセン, 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

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA44 CA02 DA02 EA04 GA11 HA15

4B065 AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25 CA46

4H045 AA11 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19 BA60

CA40 FA16 FA20 FA74

专利名称(译)	神经退行性疾病的生化标志物		
公开(公告)号	JP2014522643A	公开(公告)日	2014-09-08
申请号	JP2014517782	申请日	2012-07-04
申请(专利权)人(译)	北欧生物科学ER / ES		
[标]发明人	バラスククナターシャ カルスダルモルテン ヘンリクセンキム		
发明人	バラスクク,ナターシャ カルスダル,モルテン ヘンリクセン,キム		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/47 C07K17/00 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/32 C07K2317/33 C07K2317/34 C12Q1/37 G01N33/6896 G01N2333/96486 G01N2800/2821 C07K14/4711 G01N2333/47 G01N2800/56		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K14/47 C07K17/00 C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B065 /AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045 /BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA60 4H045/CA40 4H045/FA16 4H045/FA20 4H045/FA74		
代理人(译)	河村 英文 中村綾子 角田恭子 田中宇 徳本光一 渡边淳		
优先权	2011011361 2011-07-04 GB		
其他公开文献	JP6225107B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

包括Tau蛋白的裂解通过分泌如ADAM10形成新的表位，与神经变性病相关的生物测定的方法，用于量化从血液样品中，特别是对新表位的肽片段并确定免疫结合配偶体与样品中肽片段的结合水平。已发现含有新表位的肽的水平与认知功能呈负相关。

Tau-A ELISA

