

(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2014-502141  
(P2014-502141A)

(43) 公表日 平成26年1月30日(2014.1.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B064
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47	4B065
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 102	4C084
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02 C	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 148 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-532226 (P2013-532226)  
 (86) (22) 出願日 平成23年10月7日 (2011.10.7)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年6月7日 (2013.6.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/067604  
 (87) 国際公開番号 WO2012/045882  
 (87) 国際公開日 平成24年4月12日 (2012.4.12)  
 (31) 優先権主張番号 11174248.2  
 (32) 優先日 平成23年7月15日 (2011.7.15)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 10186810.7  
 (32) 優先日 平成22年10月7日 (2010.10.7)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 513022966  
 エーシー イミュン エス. エー.  
 スイス国 ツェーハー 1015 ローザ  
 ヌヌ, ビーエスイー ビルディング ビ  
 ーイーピーエフエル  
 (71) 出願人 513086463  
 カトリーケ ユニヴェルシテート ルーヴ  
 エン  
 ベルギー国 ベー 3000 ルーヴェン  
 , ボックス 5105, ワーイストラ  
 ート 6, カーユー ルーヴェン リサ  
 ーチ アンド ディベロップメント  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タウを認識するリン酸化部位特異的抗体

(57) 【要約】

本発明は、神経原線維変化によって引き起こされるか又は関連付けられる疾患及び障害の治療における治療的及び診断用途のための方法及び組成物に関する。特に、本発明は、リン酸化された病理学的タンパク質タウコンフォーマーを特異的に認識し結合する抗体、及びアルツハイマー病 (AD) を含むタウオパチーの治療における治療的及び診断用途のための前記抗体を含有する組成物及び方法に関する。

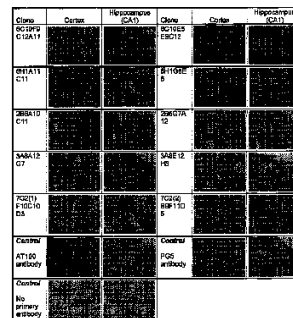


FIGURE 1-1

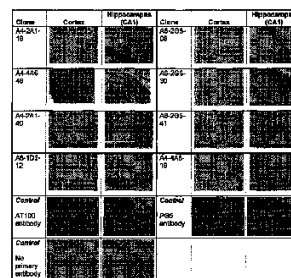


FIGURE 1-2

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳動物のタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープを認識し特異的に結合する抗体、又はその機能性部分であって、該抗体又は抗体断片が可溶性及び不溶性タウタンパク質に対して高い結合親和性を有し、可溶性及び不溶性タウのレベルを調節する抗体又はその機能性部分。

## 【請求項 2】

前記抗体又は抗体断片が、哺乳動物の脳内で可溶性及び不溶性タウのレベルを調節する、請求項 1 に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 3】

前記抗体又は抗体断片が、大脳皮質及び / 又は海馬内で可溶性及び不溶性タウのレベルを調節する、請求項 2 に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 4】

前記抗体又は抗体断片が全可溶性タウタンパク質のレベルを減少させる、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 5】

前記抗体又は抗体断片が可溶性リン酸化タウタンパク質のレベルを減少させる、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 6】

前記抗体又は抗体断片が高リン酸化タウタンパク質を含む対らせん状細線維のレベルを減少させる、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 7】

前記抗体又は抗体断片が全可溶性タウタンパク質、可溶性リン酸化タウタンパク質、及び p T a u 対らせん状細線維のレベルを減少させる、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 8】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 9】

前記抗体又は抗体断片が少なくとも  $10 \text{ n M}$  の解離定数を有する、請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 10】

前記抗体又は抗体断片が少なくとも  $5 \text{ n M}$ 、少なくとも  $2 \text{ n M}$ 、少なくとも  $1 \text{ n M}$ 、少なくとも  $500 \text{ p M}$ 、少なくとも  $300 \text{ p M}$ 、少なくとも  $200 \text{ p M}$ 、少なくとも  $100 \text{ p M}$  の解離定数を有する、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 11】

前記抗体又は抗体断片が  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合定数を有する、請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 12】

前記抗体又は抗体断片が少なくとも  $4 \text{ n M}$  の解離定数と  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合定数を持つ高結合親和性を有する、請求項 1 から 11 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 13】

前記抗体又は抗体断片が少なくとも  $3 \text{ n M}$  の解離定数と  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合定数を持つ高結合親和性を有する、請求項 1 から 12 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 14】

前記抗体又は抗体断片が少なくとも  $2 \text{ n M}$  の解離定数と  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合

10

20

30

40

50

定数を持つ高結合親和性を有する、請求項 1 から 13 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項 15】

前記抗体又は抗体断片が少なくとも  $1 \text{ nM}$  の解離定数と  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合定数を持つ高結合親和性を有する、請求項 1 から 14 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項 16】

前記抗体又は抗体断片が少なくとも  $200 \text{ pM}$  の解離定数と  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合定数を持つ高結合親和性を有する、請求項 1 から 15 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

10

【請求項 17】

前記抗体又は抗体断片が少なくとも  $100 \text{ pM}$  の解離定数と  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合定数を持つ高結合親和性を有する、請求項 1 から 16 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項 18】

前記抗体又は抗体断片が、位置 18 にリン酸化 Tyr (Y18) を含む タウ a a 15 - 20、位置 409 にリン酸化 Ser (pS409) を含む タウ a a 405 - 412、位置 409 にリン酸化 Ser (pS409) を含む タウ a a 405 - 411；位置 212 にリン酸化 Thr (pT212) 及び位置にリン酸化 Ser (pS214) を含む タウ a a 208 - 218；位置 396 にリン酸化 Ser (pS396) を含む タウ a a 393 - 401、位置 396 にリン酸化 Ser (pS396) を含む タウ a a 396 - 401、位置 396 にリン酸化 Ser (pS396) を含む タウ a a 394 - 400、位置 404 にリン酸化 Ser (pS404) を含む タウ a a 402 - 406、及び位置 396 にリン酸化 Ser (pS396) を含む タウ a a 393 - 400 からなる群から選択されるエピトープに結合する、請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

20

【請求項 19】

前記抗体又は抗体断片が位置 18 にリン酸化 Tyr (Y18) を持つ タウ a a 15 - 20 を含むエピトープに結合する、請求項 12 又は 13 に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項 20】

前記抗体又は抗体断片が位置 409 にリン酸化 Ser (pS409) を持つ タウ a a 405 - 412 を含むエピトープに結合する、請求項 14 又は 15 に記載の抗体又はその機能性断片。

30

【請求項 21】

前記抗体又は抗体断片が位置 409 にリン酸化 Ser (pS409) を持つ タウ a a 405 - 411 を含むエピトープに結合する、請求項 16 又は 17 に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項 22】

前記抗体又は抗体断片が位置 396 にリン酸化 Ser (pS396) を含む タウ a a 396 - 401 を含むエピトープに結合する、請求項 12 に記載の抗体又はその機能性断片。

40

【請求項 23】

前記抗体又は抗体断片が位置 404 にリン酸化 Ser (pS404) を含む タウ a a 402 - 406 を含むエピトープに結合する、請求項 12 に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項 24】

配列番号 21、24、27、28、29、32、73、81、93、101、106 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 70%、特に少なくとも 80%、特に少なくとも 85%、特に少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、特に少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を

50

持つCDR1；配列番号22、25、30、33、74、82、94、102、107に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号23、26、31、34、75、83、95、103、108に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも60%、特に少なくとも70%、特に少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号12、15、18、70、78、89、98に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号13、16、19、71、79、90、99、115に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つ配列CDR2；及び配列番号14、17、20、72、80、91、100に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つ配列CDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む、請求項1から23の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

10

20

**【請求項25】**

配列番号21、24、27、28、29、32に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号22、25、30、33に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2及び配列番号23、26、31、34に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン；及び/又は、配列番号12、15、18に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号13、16、19に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号14、17、20に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む請求項1から24の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

30

**【請求項26】**

配列番号21、24、27、28、29、32に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号22、25、30、33に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号23、26、31、34に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン；及び/又は、配列番号12、15、18に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号13、16、19に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号14、17、20に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を含む抗体ドメインを含む請

40

50

求項 1 から 2 5 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項 2 7】

配列番号 2 1、2 4、2 7、2 8、2 9、3 2 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 1 ; 配列番号 2 2、2 5、3 0、3 3 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 2 3、2 6、3 1、3 4 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号 1 2、1 5、1 8 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 1 ; 配列番号 1 3、1 6、1 9 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 1 4、1 7、2 0 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む請求項 1 から 2 6 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

10

【請求項 2 8】

配列番号 2 1、2 4、2 7、2 8、2 9、3 2 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 1 ; 配列番号 2 2、2 5、3 0、3 3 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 2 3、2 6、3 1、3 4 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第一結合ドメイン(抗体ドメイン)、及び/又は、配列番号 1 2、1 5、1 8 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 1 ; 配列番号 1 3、1 6、1 9 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 1 4、1 7、2 0 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む請求項 1 から 2 7 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

20

【請求項 2 9】

配列番号 2 1、2 4、2 7、2 8、2 9、3 2 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 8 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 1 ; 配列番号 2 2、2 5、3 0、3 3 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 2 3、2 6、3 1、3 4 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第一結合ドメイン; 及び/又は、配列番号 1 2、1 5、1 8 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 1 ; 配列番号 1 3、1 6、1 9 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 1 4、1 7、2 0 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む請求項 1 から 2 8 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

30

【請求項 3 0】

配列番号 2 1、2 4、2 7、2 8、2 9、3 2 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 8 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 1 ; 配列番号 2 2、2 5、3 0、3 3 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 2 3、2 6、3 1、3 4 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 8 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第一結合ドメイン; 及び/又は、配列番号 1 2、1 5、1 8 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 1 ; 配列番号 1 3、1 6、1 9 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 8 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 1 4、1 7、2 0 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む請求項 1 から 2 9 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

40

【請求項 3 1】

配列番号 2 1、2 4、2 7、2 8、2 9、3 2 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 1 ; 配列番号 2 2、2 5、3 0、3 3 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 2 3、2 6、3 1、3 4 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第一結合

50

ドメイン、及び/又は、配列番号 12、15、18 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 1；配列番号 13、16、19 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 2、及び配列番号 14、17、20 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む請求項 1 から 30 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項 32】

配列番号 21 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 76% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 1；配列番号 22 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 2、及び配列番号 23 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 66% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 3 を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 1；配列番号 13 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 88% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 2、及び配列番号 14 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 66% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む請求項 1 から 31 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

10

【請求項 33】

配列番号 24 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 88% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 1、配列番号 25 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 2、及び配列番号 26 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 66% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 3 を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 1、配列番号 13 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 88% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 2、及び配列番号 14 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 66% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む請求項 1 から 32 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

20

【請求項 34】

CDR 1 が配列番号 27 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 88% 同一であるアミノ酸配列を有する第一結合ドメインを含む、請求項 33 に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項 35】

CDR 1 が配列番号 28 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 88% 同一であるアミノ酸配列を有する第一結合ドメインを含む、請求項 33 に記載の抗体又はその機能性断片。

30

【請求項 36】

配列番号 29 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 1、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 2、及び配列番号 31 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 3 を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 1；配列番号 16 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 94% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 2、及び配列番号 17 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 36% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む請求項 1 から 35 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

40

【請求項 37】

配列番号 32 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 1、配列番号 33 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 2、及び配列番号 34 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 3 を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 1、配列番号 19 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 2、及び配列番号 20 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 63% 同一であるアミノ酸配列を持つ CDR 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む、請求項 1 から 36 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項 38】

配列番号 73 に示されるアミノ酸配列を持つ CDR 1、配列番号 74 に示されるアミノ

50

酸配列を持つCDR2、及び配列番号75に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号70に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%、特に98%、特に99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号71に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号72に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む、請求項1から37の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

10

20

30

40

50

【請求項39】

配列番号81に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号82に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号83に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号78に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号79に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号80に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む、請求項1から38の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項40】

配列番号93に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号94に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号95に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%上記のCDRの何れか一に同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号89に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号90に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号91に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%上記のCDRの何れか一に同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む、請求項1から39の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項41】

配列番号101に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号102に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号103に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に

少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%上記のCDRの何れか一に同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号98に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号99に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号100に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%上記のCDRの何れか一に同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む、請求項1から40の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

10

20

30

40

50

【請求項42】

配列番号106に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号107に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号108に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%上記のCDRの何れか一に同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号89に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号115に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号91に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%上記のCDRの何れか一に同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む、請求項1から41の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項43】

配列番号6、7、8、9、10、11に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号1、2、3、4、5に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む、請求項1から42の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項44】

配列番号6、7、8、9、10、11に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号1、2、3、4、5に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも91%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む、請求項1から43の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項45】

配列番号6、7、8、9、10、11に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン(抗体ドメイン)；及び/又は、配列番号1、2、3、4、5に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも91%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む、請求項1から44の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項46】

配列番号69、77、116/92、97、105に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、



少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン、及び/又は、配列番号68、76、88、96、104に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む、請求項1から45の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項47】

配列番号6又は配列番号7に示されるアミノ酸配列又はそれに対してそれぞれ少なくとも90%及び94%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン；及び/又は、配列番号1に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも91%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む、請求項1から46の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項48】

配列番号8に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン；及び/又は、配列番号2に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む、請求項1から47の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項49】

配列番号9に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン；及び/又は、配列番号3に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む、請求項1から48の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項50】

配列番号10に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン；及び/又は、配列番号4に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも89%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む、請求項1から49の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項51】

配列番号11に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン；及び/又は、配列番号5に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも87%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む、請求項1から50の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項52】

a. 配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

b. 配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

c. 配列番号8に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

d. 配列番号9に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

e. 配列番号10に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

f. 配列番号11に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

g. 配列番号69に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号68に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

10

20

30

40

50

h . 配列番号 77 に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び / 又は配列番号 76 に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン ; 又は  
 i . 配列番号 116 に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び / 又は配列番号 88 に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン ; 又は  
 j . 配列番号 92 に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び / 又は配列番号 88 に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン ; 又は  
 k . 配列番号 97 に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び / 又は配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン ; 又は  
 l . 配列番号 105 に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び / 又は配列番号 104 に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン  
 を含む請求項 1 から 51 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

10

## 【請求項 53】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又は完全ヒト抗体又はその機能性断片である、請求項 1 から 52 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 54】

IgG2b、IgG2a 又は IgG3 アイソタイプのものである、請求項 1 から 53 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 55】

請求項 1 から 54 の何れか一項に記載の抗体の結合ペプチド又はタンパク質。

20

## 【請求項 56】

前記結合ペプチド、タンパク質抗体又は抗体断片が、哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に凝集したタンパク質のリン酸化エピトープを認識し特異的に結合するが、対応する非リン酸化エピトープ及び / 又は関連しないエピトープに結合しない、請求項 1 から 55 の何れか一項に記載の結合ペプチド又はタンパク質又は抗体又はその機能性断片。

## 【請求項 57】

請求項 1 から 56 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片をコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 58】

30

a . 配列番号 35 - 45 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子 ;

b . 配列番号 35 - 45、配列番号 84 - 87、配列番号 109 - 112 及び 117 - 119 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 85 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子 ;

c . 配列番号 35 - 45、配列番号 84 - 87、配列番号 109 - 112 及び 117 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子 ;

d . 配列番号 35 - 45、配列番号 84 - 87、配列番号 109 - 112 及び 117 - 119 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子 ;

40

e . 配列番号 35 - 45、配列番号 84 - 87、配列番号 109 - 112 及び 117 - 119 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 98 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子 ;

f . a ) - f ) の何れかに記載の核酸分子にハイブリダイズする相補鎖の核酸配列を含む核酸分子 ;

g . 遺伝コードの縮重によって、a ) - g ) の何れかに定められた核酸配列から逸脱するヌクレオチド配列を含む核酸分子からなる群から選択される核酸分子を含み、

a ) - g ) の何れかに定められた前記核酸配列が、哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し

50

、特異的に結合するが、しかし対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、前記抗体が凝集タウタンパク質に対して高親和性を有し、可溶性及び不溶性のタウレベルを調節する、請求項57に記載のポリヌクレオチド。

【請求項59】

請求項1から58の何れか一項に記載の結合ペプチド又はタンパク質、抗体又はその断片、又はポリヌクレオチド、又はそれらの組み合わせを、薬学的に許容される担体と一緒に治療的有効量含有する薬学的組成物。

【請求項60】

哺乳動物のタウタンパク質の2つの異なるリン酸化エピトープを認識し結合する、請求項1から59の何れか一項に記載の少なくとも2つの結合ペプチド又はタンパク質、抗体又はその機能性断片、又はポリヌクレオチドを含む、請求項59に記載の薬学的組成物。

10

【請求項61】

異なるアミロイド形成タンパク質を認識し結合する更なる抗体又はその機能性断片を含む、請求項59又は60に記載の薬学的組成物。

【請求項62】

哺乳動物、特に治療を必要としているヒトにおいて治療に使用するための、特に、タウオパチーなどの神経変性疾患の治療に使用するための、請求項1から61の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片、結合ペプチド又はタンパク質、ポリヌクレオチド又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせ。

【請求項63】

哺乳動物における認知障害、特に該障害に罹患したヒトの認知障害の治療又は緩和において使用のための、請求項1から62に記載の抗体又はその機能性断片、結合ペプチド又はタンパク質、又は薬学的組成物。

20

【請求項64】

哺乳動物、特にヒトの認知障害の治療又は緩和が、認知障害の進行の停止へと導く、請求項1から63に記載の抗体又はその機能性断片、結合ペプチド又はタンパク質、ポリヌクレオチド又は薬学的組成物。

【請求項65】

哺乳動物、特にヒトの認知障害の治療又は緩和が、治療された被験体において、記憶力の増大、特に認知記憶容量の完全な回復へと導く、請求項1から64に記載の抗体又はその機能性断片、結合ペプチド又はタンパク質、ポリヌクレオチド又は薬学的組成物。

30

【請求項66】

アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクサー痴呆、ダウン症候群、ゲルストマン-シュトロイスラー-シャインカー病、封入体筋炎、およびプリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、外傷性脳損傷を含むがこれらに限定されないタウ及びアミロイド病理の共存を示す疾患又は障害、及び、筋萎縮性側索硬化症/グアムのパーキンソニズム-認知症複合、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、第17染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン-スパッツ病、多系統萎縮症、C型ニーマン-ピック病、淡蒼球-橋-黒質変性(Pallido-ponto-nigral degeneration)、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィーを含むがこれらに限定されない、明確なアミロイド病理を示さない更なる疾患又は障害を含む神経変性疾患又は障害の不均一な群を含む、タウオパチーにおける優勢な脳病理である神経原線維の形成によって引き起こされる又は関連する疾患及び障害の治療に使用される、請求項1から65に記載の抗体又はその機能性断片、結合ペプチド又はタンパク質、ポリヌクレオチド又は薬学的組成物。

40

【請求項67】

アルツハイマー病の治療に使用のための、請求項1から66に記載の抗体又はその機能性断片、結合ペプチド又はタンパク質、ポリヌクレオチド又は薬学的組成物。

50

## 【請求項 68】

タウオパチーなどの神経変性疾患又は障害の治療のための方法であって、動物、具体的には哺乳動物に対して、特にそうした疾患又は障害に罹患したヒトに対して、請求項 1 から 67 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片、結合ペプチド又はタンパク質、ポリヌクレオチド又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせを投与することを含む方法。

## 【請求項 69】

アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクサー痴呆、ダウン症候群、ゲルストマン - シュトロイスラー - シャインカー病、封入体筋炎、およびプリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、外傷性脳損傷を含むがこれらに限定されないタウ及びアミロイド病理の共存を示す疾患又は障害、及び、筋萎縮性側索硬化症 / グアムのパーキンソニズム - 認知症複合、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、第 17 染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン - スパッツ病、多系統萎縮症、C 型ニーマン - ピック病、淡蒼球 - 橋 - 黒質変性、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィーを含むがこれらに限定されない、明確なアミロイド病理を示さない更なる疾患又は障害を含む神経変性疾患又は障害の不均一な群を含む、タウオパチーにおける優勢な脳病理である神経原線維の形成によって引き起こされる又は関連する疾患及び障害の治療のための、請求項 1 から 68 に記載の方法。

## 【請求項 70】

請求項 1 から 69 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片、結合ペプチド又はタンパク質又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせを前記動物又はヒトに投与することにより、タウオパチーなどの神経変性疾患に罹患した動物、特に哺乳動物又はヒトにおいて受動免疫応答を誘導するための方法。

## 【請求項 71】

サンプル中又はインサイツで、抗体又はその活性断片のタウタンパク質のエピトープに対する免疫特異的結合を検出することを含む、患者のタウタンパク質に関連した疾患、障害又は状態を診断する方法であって、

- a. タウタンパク質を含有すると疑われるサンプル又は特定の体の部分又は体の領域を、請求項 1 から 70 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片と接触させ、該ペプチド又はその断片がタウタンパク質のエピトープに結合し；
- b. 抗体をタウタンパク質に結合させて免疫複合体を形成し；
- c. 免疫複合体の形成を検出し；そして
- d. サンプル中又は特定の体の部分又は領域において、免疫複合体の存在又は欠損をタウタンパク質の存在又は欠損と関連させる；

工程を含む方法。

## 【請求項 72】

サンプル中又はインサイツで、抗体又はその活性断片のタウタンパク質のエピトープに対する免疫特異的結合を検出することを含む、患者のタウタンパク質に関連した疾患、障害又は状態に対する素因を診断する方法であって、

- a. タウ抗原を含有すると疑われるサンプル又は特定の体の部分又は体の領域を、請求項 1 から 71 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片と接触させ、該ペプチド又はその断片がタウタンパク質のエピトープに結合し；
- b. 抗体をタウ抗原に結合させて免疫複合体を形成し；
- c. 免疫複合体の形成を検出し；そして
- d. サンプル中又は特定の体の部分又は領域において、免疫複合体の存在又は欠損をタウ抗原の存在又は欠損と関連させ；

e. 前記免疫複合体の量を正常コントロール値と比較する、  
工程を含み、

正常コントロール値と比較して前記凝集体の量の増加が、前記患者がタウタンパク質関

10

20

30

40

50

連疾患又は状態に罹患しているか又は発症するリスクがあることを示す方法。

【請求項 7 3】

請求項 1 から 7 2 の何れか一項に記載の抗体又は薬学的組成物による治療後に患者の微小残存病変を監視するための方法であって、

a . タウ抗原を含有すると疑われるサンプル又は特定の体の部分又は体の領域を、請求項 1 から 7 2 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片と接触させ、該ペプチド又はその断片がタウタンパク質のエピトープに結合し；

b . 抗体をタウ抗原に結合させて免疫複合体を形成し；

c . 免疫複合体の形成を検出し；そして

d . サンプル中又は特定の体の部分又は領域において、免疫複合体の存在又は欠損を  
10

e . 前記免疫複合体の量を正常コントロール値と比較する、  
ことを含み、

正常コントロール値と比較して前記凝集体の量の増加が、前記患者が微小残存病変になお罹患していることを示す方法。

【請求項 7 4】

請求項 1 から 7 3 の何れか一項に記載の抗体又は薬学的組成物により治療される患者の応答性を予測するための方法であって、

a . タウ抗原を含有すると疑われるサンプル又は特定の体の部分又は体の領域を、請求項 1 から 7 3 の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片と接触させ、該ペプチド又はその断片がタウタンパク質のエピトープに結合し；  
20

b . 抗体をタウ抗原に結合させて免疫複合体を形成し；

c . 免疫複合体の形成を検出し；そして

d . サンプル中又は特定の体の部分又は領域において、免疫複合体の存在又は欠損を  
タウ抗原の存在又は欠損と関連させ、

e . 治療開始前と後で前記免疫複合体の量を比較する、  
ことを含み、

前記凝集体の量の減少が、前記患者が治療に対して応答する高い可能性を有していることを示す方法。

【請求項 7 5】

請求項 1 から 7 4 の何れか一項に記載の抗体を含む、タウタンパク質関連疾患、障害又は状態の検出又は診断のための検査キット。  
30

【請求項 7 6】

本発明による一以上の抗体又はその機能性断片と、タウ抗原と結合させて免疫複合体を形成させて、免疫複合体の有無がタウ抗原の有無と関連するように免疫複合体の形成を検出する目的で抗体を用いるための説明書とを収容する容器を含む、請求項 1 から 7 5 に記載の検査キット。

【請求項 7 7】

位置 1 8 にリン酸化 Tyr ( Y 1 8 ) を含むタウ a a 1 5 - 2 0、位置 4 0 9 にリン酸化 Ser ( p S 4 0 9 ) を含むタウ a a 4 0 5 - 4 1 2、位置 4 0 9 にリン酸化 Ser ( p S 4 0 9 ) を含むタウ a a 4 0 5 - 4 1 1；及び位置 2 1 2 にリン酸化 Thr ( p T 2 1 2 ) 及び位置にリン酸化 Ser ( p S 2 1 4 ) を含むタウ a a 2 0 8 - 2 1 8；位置 3 9 6 にリン酸化 Ser ( p S 3 9 6 ) を含むタウ a a 3 9 3 - 4 0 1、位置 3 9 6 にリン酸化 Ser ( p S 3 9 6 ) を含むタウ a a 3 9 6 - 4 0 1、位置 3 9 6 にリン酸化 Ser ( p S 4 0 4 ) を含むタウ a a 4 0 2 - 4 0 6、及び位置 3 9 6 にリン酸化 Ser ( p S 3 9 6 ) を含むタウ a a 3 9 3 - 4 0 0 からなる群から選択されるエピトープ。  
40

【請求項 7 8】

請求項 1 から 7 7 の何れかに記載の抗体を産生する細胞株。

【請求項 7 9】

10

20

30

40

50

2010年8月25日にDSM ACC3079として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10F9C12A11である、請求項78に記載の細胞株。

【請求項80】

2010年8月25日にDSM ACC3081として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10E5E9C12である、請求項78に記載の細胞株。

【請求項81】

2010年8月25日にDSM ACC3080として寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1A11C11である、請求項78に記載の細胞株。

【請求項82】

2010年8月25日にDSM ACC3088として寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1G6E6である、請求項78に記載の細胞株。

10

【請求項83】

2010年8月25日にDSM ACC3084として寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6A10C11である、請求項78に記載の細胞株。

【請求項84】

2010年3月10日にDSM ACC3087として寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6G7A12である、請求項78に記載の細胞株。

【請求項85】

2010年8月25日にDSM ACC3086として寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8A12G7である、請求項78に記載の細胞株。

20

【請求項86】

2010年8月25日にDSM ACC3085として寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8E12H8である、請求項78に記載の細胞株。

【請求項87】

2010年8月25日にDSM ACC3082として寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2(1)F10C10D3である、請求項78に記載の細胞株。

【請求項88】

2010年8月25日にDSM ACC3083として寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2(2)B9F11D5である、請求項78に記載の細胞株。

【請求項89】

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号54の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマー対；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号53及び配列番号54の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマーの混合

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3079として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10F9C12A11のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片

30

【請求項90】

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号48及び配列番号49の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号53及び配列番号54の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマーの混合

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3081として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10E5E9C12のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片。

40

【請求項91】

50

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 50 の 5' プライマーと配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマー対; 及び / 又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号 46 の 5' プライマーと配列番号 47 の 3' プライマーを含むプライマー対  
を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3080として寄託されたハイブリドーマ細胞株 6H1A11C11のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項92】

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 50 の 5' プライマーと配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマー対; 及び / 又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号 46 の 5' プライマーと配列番号 47 の 3' プライマーを含むプライマー対  
を用いて

2010年8月25日にDSM ACC3088として寄託されたハイブリドーマ細胞株 6H1G6E6のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項93】

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 50 の 5' プライマーと配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマー対; 及び / 又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号 46 及び配列番号 52 の 5' プライマーと配列番号 47 の 3' プライマーを含むプライマーの混合  
を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3084として寄託されたハイブリドーマ細胞株 2B6A10C11のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項94】

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 50 の 5' プライマーと配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマー対; 及び / 又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号 46 及び配列番号 52 の 5' プライマーと配列番号 47 の 3' プライマーを含むプライマーの混合  
を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3087として寄託されたハイブリドーマ細胞株 2B6G7A12のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項95】

a<sub>1</sub>. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 48 及び配列番号 49 の 5' プライマーと配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマーの混合; 又は

a<sub>2</sub>. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 50 の 5' プライマーと配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマー対; 及び / 又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号 46 の 5' プライマーと配列番号 47 の 3' プライマーを含むプライマー対  
を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3086として寄託されたハイブリドーマ細胞株 3A8A12G7のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片。

10

20

30

40

50

## 【請求項 96】

a<sub>1</sub> . 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 48 及び配列番号 49 の 5' プライマーと配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマーの混合 ; 又は

a<sub>2</sub> . 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 50 の 5' プライマーと配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマー対 ; 及び / 又は

b . 第二結合ドメインの増幅のために配列番号 46 の 5' プライマーと配列番号 47 の 3' プライマーを含むプライマー対

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3085として寄託されたハイブリドーマ細胞株 3A8E12H8 の DNA の PCR 増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 1 に記載の抗体又はその機能性断片。

10

## 【請求項 97】

a . 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 49 ; 配列番号 56 及び配列番号 57 の 5' プライマーと配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマーの混合 ;

b . 第二結合ドメインの増幅のために配列番号 53 及び配列番号 55 の 5' プライマーと配列番号 47 の 3' プライマーを含むプライマーの混合

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3082として寄託されたハイブリドーマ細胞株 7C2(1)F10C10D3 の DNA の PCR 増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 1 に記載の抗体又はその機能性断片。

20

## 【請求項 98】

a . 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 57 の 5' プライマーと配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマーの対 ;

b . 第二結合ドメインの増幅のために配列番号 53 及び配列番号 55 の 5' プライマーと配列番号 47 の 3' プライマーを含むプライマーの混合

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3083として寄託されたハイブリドーマ細胞株 7C2(2)B9F11D5 の DNA の PCR 増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 1 に記載の抗体又はその機能性断片。

30

## 【請求項 99】

a . 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 149 の 5' プライマーと配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマー対 ; 及び / 又は

b . 第二結合ドメインの増幅のために配列番号 120、123、124、136、137、138、139、及び 140 からなる群から選択される 5' プライマーと配列番号 131、134、及び 141 - 148 からなる群から選択される 3' プライマーを含むプライマーの混合

を用いて、

2011年8月30日にDSM ACC3139として寄託されたハイブリドーマ細胞株 A4-2A1-18 の DNA の PCR 増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 1 に記載の抗体又はその機能性断片。

40

## 【請求項 100】

a . 第一結合ドメインの増幅のために配列番号 51 及び 169 - 174 からなる群から選択される 5' プライマー及び配列番号 51 の 3' プライマーを含むプライマーの混合 ; 及び / 又は

b . 第二結合ドメインの増幅のために配列番号 124、127、及び 150 - 158 からなる群から選択される 5' プライマーと配列番号 130、及び 159 - 168 からなる

50



群から選択される3'プライマーを含むプライマーの混合  
を用いて、

2011年8月30日にDSM ACC 3137として寄託されたハイブリドーマ細胞株A6-2G5-30のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項101】

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号178、179及び180からなる群から選択される5'プライマー及び配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号121、127、139、154、155、及び175からなる群から選択される5'プライマーと配列番号128、129、147、176、及び177からなる群から選択される3'プライマーを含むプライマーの混合

を用いて、

2011年8月30日にDSM ACC 3140として寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-2A1-40のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項102】

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号51及び188-192からなる群から選択される5'プライマー及び配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号120、124、126、181、182及び183からなる群から選択される5'プライマーと配列番号144、145及び184-187からなる群から選択される3'プライマーを含むプライマーの混合

を用いて、

2011年8月30日にDSM ACC 3138として寄託されたハイブリドーマ細胞株A6-2G5-41のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項103】

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号50及び201-204からなる群から選択される5'プライマー及び配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号121、137、151及び193-197からなる群から選択される5'プライマーと配列番号131、141、144、166、198、199及び200からなる群から選択される3'プライマーを含むプライマーの混合

を用いて、

2011年8月30日にDSM ACC 3136として寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-4A6-48のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項104】

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号209-214、及び219-221からなる群から選択される5'プライマー及び配列番号215の3'プライマーを含むプライマーの混合；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号216、217及び218からなる群から選択される5'プライマー及び配列番号208の3'プライマーを含むプライマーの

10

20

30

40

50

混合

を用いて、

2011年9月6日にDSM ACC3141として寄託されたハイブリドーマ細胞株 A6-1D2-12のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項1に記載の抗体又はその機能性断片。

【請求項105】

前記抗体が、IgG2a、IgG2b又はIgG3アイソタイプの抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は完全ヒト抗体である、請求項1から104の何れか一項に記載の抗体又はその機能性断片。

10

【請求項106】

請求項1から105の何れか一項に記載の結合ペプチド又はタンパク質又は抗体。

【請求項107】

請求項1から54、56の何れか一項に記載又は請求項89から105の何れか一項に記載の抗体を産生する細胞株。

【請求項108】

請求項57又は58のポリヌクレオチドを含有する細胞株。

【請求項109】

適切な培養培地中で請求項106に記載の細胞株を培養する工程を含む、請求項1から54、56の何れか一項に記載又は請求項89から105の何れか一項に記載の抗体を産生する方法。

20

【請求項110】

適切な培養培地中で請求項78から88の何れか一項に記載の細胞株を培養する工程を含む、請求項1から54、56の何れか一項に記載又は請求項89から105の何れか一項に記載の抗体を産生する方法。

【請求項111】

細胞株又は培養培地から抗体を精製する工程を更に含む、請求項109又は110に記載の方法。

【請求項112】

タウタンパク質に関連した疾患又は障害の群であるタウオパチーの治療において使用のための医薬の調製における、請求項1から54、56の何れか一項に記載又は請求項89から105の何れか一項に記載の、任意の機能性部分を含む抗体の使用。

30

【請求項113】

タウタンパク質に関連した疾患又は障害の群であるタウオパチーに関連した症状の治療又は緩和において使用のための医薬の調製における、請求項1から54、56の何れか一項に記載又は請求項89から105の何れか一項に記載の、任意の機能性部分を含む抗体の使用。

【請求項114】

タウオパチーに罹患した哺乳動物における認知記憶容量を保持する又は増加させることに使用のための医薬の調製における、請求項1から54、56の何れか一項に記載又は請求項89から105の何れか一項に記載の、任意の機能性部分を含む抗体の使用。

40

【請求項115】

2010年8月30日にDSM ACC3136として寄託されたハイブリドーマ細胞株 A4-4A6-48である、請求項78に記載の細胞株。

【請求項116】

2010年8月30日にDSM ACC3137として寄託されたハイブリドーマ細胞株 A6-2G5-30である、請求項78に記載の細胞株。

【請求項117】

2010年8月30日にDSM ACC3138として寄託されたハイブリドーマ細胞株 A6-2G5-41である、請求項78に記載の細胞株。

50

## 【請求項 118】

2010年8月30日にDSM ACC3139として寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-2A1-18である、請求項78に記載の細胞株。

## 【請求項 119】

2010年8月30日にDSM ACC3140として寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-2A1-40である、請求項78に記載の細胞株。

## 【請求項 120】

2010年9月6日にDSM ACC3141として寄託されたハイブリドーマ細胞株A6-1D2-12である、請求項78に記載の細胞株。

## 【発明の詳細な説明】

10

## 【発明の開示】

## 【0001】

本発明は、神経原線維変化によって引き起こされるか又は関連付けられる疾患及び障害の治療における治療的及び診断用途のための方法及び組成物に関する。特に、本発明は、リン酸化された病理学的タンパク質タウコンフォーマーを特異的に認識し結合する抗体、及びアルツハイマー病（AD）を含むタウオパチーの治療における治療的及び診断用途のための前記抗体を含有する組成物及び方法に関する。

## 【0002】

神経原線維変化と経粘膜送達（NTS）は、アルツハイマー病の主要な神経病理学的特徴（AD）である。それらは、アスパラギン又はアスパラギン酸残基のリン酸化、脱アミド化及び異性化を含む翻訳後修飾を受けた微小管結合タンパク質タウから構成されている。それらは高リン酸化タンパク質のタウとそのコンフォーマーの凝集により由来する。ADは、多くの神経変性タウオパチーと、特に前頭側頭型認知症（FTD）の指定された型とこの病理を共有する。

20

## 【0003】

タンパク質タウは、微小管（MT）に貪欲に結合する「天然にアンフォールドした」自在に可溶性タンパク質であり、それらの会合と安定を促進する。MTは、ニューロンの細胞骨格の完全性のために - それにより、神経回路の適切な形成と機能のために、それゆえ学習と記憶のために、主として重要である。タウのMTに対する結合は、主にインビトロで非神経細胞において実証されるように、動的リン酸化及び脱リン酸化によって制御される。可能なリン酸化部位が多数であるゆえ（>80）、各々の正確な寄与と関与するキナーゼはインビボにおいて多くが不明確なままである。

30

## 【0004】

ADの脳において、タウ病理は、アミロイド病理より後で、そして恐らくアミロイド病理に応答して発展し、これは、アミロイドカスケードという仮説の本質を構成している。このことはADとダウン症の患者における研究に基づいて示され、アミロイドとタウ病理学の併用によるトランスジェニックマウスの研究により実証されている(Lewis et al., 2001; Oddo et al., 2004; Ribe et al., 2005; Muyliaert et al., 2006; 2008; Terwel et al., 2008)。

## 【0005】

40

ヒトのAD患者における両方の病理の正確なタイミング並びにアミロイドをタウ病理学にリンクするメカニズムはほとんどわかっていないが、しかし作用する神経シグナル伝達経路の活性化又は主要な「タウキナーゼ」としてGSK3とcdk5による活性化が関与することが提唱されている。

## 【0006】

タウオパチーは無害な副作用ではなくADにおける主要な病理学的実行者であるという仮説は完全にお互いを実証する健全な遺伝的、病理学的及び実験的な観察に基づいている：

- ・アミロイドタンパク質前駆体（APP）又はプレセニリンにおける変異に起因する早期発症型家族性ADの症例において、絶対的病原性の原因はアミロイドの蓄積であるが、

50

常にその病理学は、遅発性散発性 A D 症例の場合と同一の副次的タウオパチーを含み；

- ・認知機能障害と認知症の重症度は、アミロイドに対する P I B - P E T イメージングを含み多くの「偽陽性」：高い脳アミロイド負荷を持つ認知的健常者を同定するいくつかの臨床フェーズ 1 & 2 研究によってごく最近例示されるように、アミロイド病理ではなく、タウオパチーと関連しており；

- ・家族制 F T D において、タウオパチーは、変異体タウによって引き起こされ、アミロイド病理無しに直接神経変性を引き起こし；

実験マウスモデルにおいて、アミロイド病理によって引き起こされる認知障害がタンパク質タウ（ロパーソンら、2007）の欠損によってほぼ完全に緩和される (Roberson et al., 2007)。

【0007】

議論の併用により、タンパク質タウが A D 及び関連する神経変性タウオパチーにおける認知機能消滅の主要なプレーヤーであるとする仮説を支持している。

【0008】

A D の卓越した新たな治療法は、特定のモノクローナル抗体による受動免疫療法により、神経毒性又はシナプス毒性であると推定されるアミロイドペプチドとその凝集体を除去することである。

【0009】

本明細書に提案されるように、タウ病理を標的とする免疫療法は、既知の病理学的タンパク質タウ、コンフォーマーに対抗することが予想され、又はシナプス機能障害及び神経変性を引き起こすことが仮定される。生じたアミロイド病理及び高リン酸化タンパク質タウのニューロン内の凝集体が、軽度認知障害 (M C I) から A D の重度認知症につながる、病理学的事象の認知機能及び変性カスケードに相乗的に作用することが提案されている。従って、現在の単一治療法とは対照的に、アミロイド指向（又は他の）薬とタウ指向の薬の組み合わせが、好ましくかつ実質的により有効な A D の治療法を構成するであろう。

【0010】

タンパク質タウを標的にする他の治療的アプローチは不足しており主に以下を含む：

- ・タウのリン酸化を病的レベルにまで増加させると考えられているキナーゼの阻害剤
- ・高リン酸化タンパク質タウの細胞質凝集を阻止する化合物。

【0011】

これらのアプローチは特異性及び有効性の様々な欠点、A P P 及びアミロイドの代謝を改変する試みを共有する問題を負い、全てはタウに対する免疫療法を含む追加治療の選択肢の継続的な探索の重要性を強調している。

【0012】

実際には、- ターゲットはおるか - インビトロでの病理学的タウのコンフォーマーを定義するために、全く努力が捧げられされていない。A 42 のフェーズ I I 臨床試験では、もつれた病理学が十分に考慮されるようには見えず、徹底的に分析されるようにも見えなかった (Nicoll et al., 2003; Masliah et al., 2005)。一方、A D 様病理が混合した前臨床マウスモデルにおいてアミロイドを標的とする実験的免疫療法は、タウ凝集体が持続するものの、タウ病理における影響も実証した (Oddo et al., 2004)。

【0013】

免疫療法によって細胞内タンパク質タウに接近する実現可能性において幾つかの疑問が投げかけられた。これらはタウオパチーのマウスモデルの最も最近の実験研究によって反論されている (Asuni et al., 2007)。それらは、タンパク質タウ由来リン酸化ペプチドのワクチン接種により、もつれ病理の減少及び機能の改善を示した。これらのデータは、パーキンソン病 (P D) 及びレビー小体病モデルにおける - シヌクレインを標的免疫療法の以前の報告 (Masliah et al., 2005, 2011)、及び筋萎縮性側索硬化症 (A L S) モデルにおけるスーパーオキシドジスムターゼの以前の報告 (Urushitiani et al., 2007) を実証している。これらの疾患は、細胞内タンパク質が、まだ十分に理解されていないメカニズムによってシナプスの欠陥と神経変性へと導く実施例である。一方、使用されたアジュバ

10

20

30

40

50

ント、すなわち完全フロイントと百日咳毒素が、その研究の否定的な結果に貢献したかもしれないが、細菌で生産され分離された完全長組換えタンパク質のタウはワクチンとしては適していないように見える(Rosenmann et al., 2006)。

【0014】

例えば、アミロイドと同じくらいADにおいて典型的な高リン酸化タンパク質タウのニューロン内凝集体によって生じるADにおいて、アミロイド病理などの神経変性疾患を引き起こすことが知られているか - 又は推定される病的タンパク質コンフォーマーに対抗するように作用する受動及び/又は能動免疫療法について、未だ対処されていない必要性が存在する。

【0015】

この未だ対処されていない必要性が、タウタンパク質の主要な病的リン酸化エピトープを認識し結合する結合タンパク質を提供することによって本発明の範囲内で満たされる可能性がある。特に、本発明は、ADを含むタウオパチーにおいてシナプス及び神経毒性に關与すると考えられている、タンパク質のタウにおいて、特に凝集したタウタンパク質上の線状及び立体構造的、単一及び複合体のリン酸化エピトープを提供する。

【0016】

従って、本発明は、一実施態様において、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に關し、その結合ペプチド又はタンパク質又は抗体は、哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に凝集したタウ蛋白質のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は關連しないエピトープに結合せず、ここで、前記結合ペプチド又は抗体は可溶性及び不溶性タウ蛋白質に対して高い結合親和性を有し、特に脳において、可溶性及び不溶性タウのレベルを、特に解離定数が少なくとも10 nM、特に少なくとも8 nM、特に少なくとも5 nM、特に少なくとも2 nM、特に少なくとも1 nM、特に少なくとも500 pM、特に少なくとも400 pM、特に少なくとも300 pM、特に少なくとも200 pM、特に少なくとも100 pM、特に少なくとも50 pMで調節する。第二の実施態様において、本発明は結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に關し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は關連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、特に $3 - 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、特に $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上；特に $2 - 9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、特に $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、特に $1 - 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、特に $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上の会合定数を有する。

【0017】

第三の実施態様において、本発明は結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に關し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は關連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、解離定数が少なくとも4 nM及び会合定数が $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、特に解離定数が少なくとも3 nM及び会合定数が $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、特に解離定数が少なくとも2 nM及び会合定数が $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、特に解離定数が少なくとも1 nM及び会合定数が $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、特に解離定数が少なくとも200 pM及び会合定数が $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、特に解離定数が少なくとも100 pM及び会合定数が $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上を持つ高い結合親和性を有する。

【0018】

10

20

30

40

50

本発明の一実施態様(4)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかの結合ペプチド又はタンパク質又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、特にリン酸化Ty rを位置18(Y18)に含むタウのaa15-20、リン酸化Serを位置409(pS409)に含むタウのaa405-411;及びリン酸化Thrを位置212(pT212)に及びリン酸化Serを位置214(pS214)タウのaa208-218からなる群から選択される、配列番号67に示されるヒトタンパク質のエピトープに結合する。

10

## 【0019】

一実施態様(5)は、前述の実施態様の何れかの結合ペプチド又は抗体に関し、ここで前記ペプチドは、哺乳動物、特にヒトタンパク質、しかし具体的には、リン酸化Ty rを位置18(Y18)に持つタウのaa15-20を含む、配列番号67に示されるヒトタンパク質のエピトープに結合する。

## 【0020】

一実施態様(6)は、前述の実施態様の何れかの結合ペプチド又は抗体に関し、ここで前記ペプチドは、哺乳動物、特にヒトタンパク質、しかし具体的には、リン酸化Serを位置409(pS409)に持つタウのaa405-412を含む、配列番号67に示されるヒトタンパク質のエピトープに結合する。

20

## 【0021】

一実施態様(7)は、前述の実施態様の何れかの結合ペプチド又は抗体に関し、ここで前記ペプチドは、哺乳動物、特にヒトタンパク質、しかし具体的には、リン酸化Serを位置409(pS409)に持つタウのaa405-411を含む、配列番号67に示されるヒトタンパク質のエピトープに結合する。

## 【0022】

一実施態様(8)は、前述の実施態様の何れかの結合ペプチド又は抗体に関し、ここで前記ペプチドは、哺乳動物、特にヒトタンパク質、しかし具体的には、リン酸化Thrを位置212(pT212)及びリン酸化Serを位置214(pS214)に持つタウのaa208-218を含む、配列番号67に示されるヒトタンパク質のエピトープに結合する。

30

## 【0023】

その他の実施態様(9)において、本発明は結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号21、24、27、28、29、32、73、81、93、101、106に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも70%、特に少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1;配列番号22、25、30、33、74、82、94、102、107に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2;及び配列番号23、26、31、34、75、83、95、103、108に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少な

40

50

くとも60%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号12、15、18、70、78、89、98に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号13、16、19、71、79、90、99、115に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つ配列CDR2；及び配列番号14、17、20、72、80、91、100に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つ配列CDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む。

10

**【0024】**

20

本発明の一実施態様(10)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号21、24、27、28、29、32、73、81に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号22、25、30、33、74、82に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号23、26、31、34、75、83に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号12、15、18、70、78に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号13、16、19、71、79に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号14、17、20、72、80に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を含む抗体ドメインを含む。

30

**【0025】**

本発明の一実施態様(11)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号21、24、27、28、29、32、73、81に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号22、25、30、33、74、82に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号23、26、31、34、75、83に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号12、15、18、70、

40

50

78に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号13、16、19、71、79に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号14、17、20、72、80に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3をその配列に含む第二結合ドメインを含む。

【0026】

本発明の一実施態様(12)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号21、24、27、28、29、32、73、81に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号22、25、30、33、74、82に示されるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号23、26、31、34、75、83に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン(抗体ドメイン)；及び/又は配列番号12、15、18、70、78に示されるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号13、16、19、71、79に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号14、17、20、72、80に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3をその配列に含む第二結合ドメインを含む。

10

20

【0027】

本発明の一実施態様(13)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号21、24、27、28、29、32に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号22、25、30、33に示されるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号23、26、31、34に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号12、15、18に示されるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号13、16、19に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号14、17、20に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3をその配列に含む第二結合ドメインを含む。

30

【0028】

本発明の一実施態様(14)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号21、24、27、28、29、32に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号22、25、30、33に示されるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号23、26、31、34に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号12、15、18に示されるアミノ酸

40

50



配列を持つCDR1；配列番号13、16、19に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号14、17、20に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3をその配列に含む第二結合ドメインを含む。

【0029】

本発明の一実施態様(15)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号21、24、27、28、29、32、73、81、93、101又は106に示されるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号22、25、30、33、74、82、94、102、又は107に示されるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号23、26、31、34、75、83、95、103、又は108に示されるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号12、15、18、70、78、89、又は98に示されるアミノ酸配列を持つCDR1；配列番号13、16、19、71、79、90、99、又は115に示されるアミノ酸配列を持つCDR2；及び配列番号14、17、20、72、80、91、又は100に示されるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む。

10

20

【0030】

本発明の一実施態様(16)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号21に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも76%、特に少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号22に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%、特に98%、特に99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号21に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも66%、特に少なくとも70%、特に少なくとも75%、特に少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号12に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%、特に98%、特に99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号13に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも88%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号14に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも66%、特に少なくとも70%、特に少なくとも75%、特に少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む。

30

40

【0031】

本発明の一実施態様(17)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピト-

50

ブ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号24, 又は配列番号27、又は配列番号28に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも88%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号25に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%、特に98%、特に99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号26に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも66%、特に少なくとも70%、特に少なくとも75%、特に少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号12に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%、特に98%、特に99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号13に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも88%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号14に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも66%、特に少なくとも70%、特に少なくとも75%、特に少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む。

10

20

30

40

50

**【0032】**

本発明の一実施態様(18)は、第一結合ドメインを含む実施態様(15)に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここでCDR1は配列番号27に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも88%同一であるアミノ酸配列を有する。

**【0033】**

本発明の一実施態様(19)は、第一結合ドメインを含む実施態様(15)に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここでCDR1は配列番号28に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも88%同一であるアミノ酸配列を有する。

**【0034】**

本発明の一実施態様(20)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号29に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号30に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号31に示されるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号15に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%、特に98%、特に99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号16に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも94%、特に少なくとも98%、特に少なくとも95%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号17に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、特に少なくとも70%、特に少なくとも75%、特に少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む。

**【0035】**

本発明の一実施態様(21)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウ

タンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号32に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号33に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号34に示されるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号18に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%、特に98%、特に99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号19に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号20に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも63%、特に少なくとも70%、特に少なくとも75%、特に少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む。

10

20

30

40

50

**【0036】**

本発明の一実施態様(22)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号73に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号74に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号75に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号70に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも95%、特に98%、特に99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号71に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号72に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む。

**【0037】**

本発明の一実施態様(23)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号81に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号82に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号83に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号78に示されるアミノ酸配列を持つCD

R 1、配列番号 79 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 80 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、特に少なくとも 85%、特に少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、特に少なくとも 95%、特に少なくとも 96%、特に少なくとも 97%、特に少なくとも 98%、特に少なくとも 99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む。

【0038】

本発明の一実施態様(24)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号 93 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 1、配列番号 94 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 95 に示されるアミノ酸配列又は上の C D R の何れか一に対して少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、特に少なくとも 85%、特に少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、特に少なくとも 95%、特に少なくとも 96%、特に少なくとも 97%、特に少なくとも 98%、特に少なくとも 99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号 89 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 1、配列番号 90 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 91 に示されるアミノ酸配列又は上の C D R の何れか一に対して少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、特に少なくとも 85%、特に少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、特に少なくとも 95%、特に少なくとも 96%、特に少なくとも 97%、特に少なくとも 98%、特に少なくとも 99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む。

【0039】

本発明の一実施態様(25)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号 101 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 1、配列番号 102 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 103 に示されるアミノ酸配列又は上の C D R の何れか一に対して少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、特に少なくとも 85%、特に少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、特に少なくとも 95%、特に少なくとも 96%、特に少なくとも 97%、特に少なくとも 98%、特に少なくとも 99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号 98 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 1、配列番号 99 に示されるアミノ酸配列を持つ C D R 2、及び配列番号 100 に示されるアミノ酸配列又は上の C D R の何れか一に対して少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、特に少なくとも 85%、特に少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、特に少なくとも 95%、特に少なくとも 96%、特に少なくとも 97%、特に少なくとも 98%、特に少なくとも 99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を持つ C D R 3 を配列に含む第二結合ドメインを含む。

【0040】

本発明の一実施態様(26)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特

10

20

30

40

50

に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号106に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号107に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号108に示されるアミノ酸配列又は上のCDRの何れか一に対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号89に示されるアミノ酸配列を持つCDR1、配列番号115に示されるアミノ酸配列を持つCDR2、及び配列番号91に示されるアミノ酸配列又は上のCDRの何れか一に対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を持つCDR3を配列に含む第二結合ドメインを含む。

10

**【0041】**

20

その他の実施態様(27)において、本発明は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号6、7、8、9、10、11に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号1、2、3、4、5に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

30

一実施態様(28)において、本発明は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号6、7、8、9、10、11に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号1、2、3、4、5に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

40

**【0042】**

本発明の一実施態様(29)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号6、7、8、9、10、11に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン(抗体ドメイン)、及び/又は配列番号1、2、3、4、5に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも85%

50

同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

【0043】

その他の実施態様(30)において、本発明は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号69、77、116/92、97、105に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも85%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号68、76、88、96、104に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも80%、特に少なくとも85%、特に少なくとも86%、特に少なくとも87%、特に少なくとも88%、特に少なくとも89%、特に少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、特に少なくとも95%、特に少なくとも96%、特に少なくとも97%、特に少なくとも98%、特に少なくとも99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

10

【0044】

本発明の一実施態様(31)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号6又は配列番号7に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも90%及び94%それぞれ同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号1に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも91%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

20

30

【0045】

本発明の一実施態様(32)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号8に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号2に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

40

本発明の一実施態様(33)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号9に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号3に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

【0046】

50

本発明の一実施態様(34)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号10に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号4に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも89%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

本発明の一実施態様(35)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号11に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン、及び/又は配列番号5に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも87%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

本発明の一実施態様(36)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号69に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも98%又は99%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号68に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%、91%、92%又は93%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

#### 【0047】

本発明の一実施態様(37)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号77に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも93%、94%又は95%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号76に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも88%、89%、又は90%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

#### 【0048】

本発明の一実施態様(38)は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号116、92、又は118に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも93%、94%又は95%同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号88に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも90%、91%、92%又は93%同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 9 】

本発明の一実施態様（ 3 9 ）は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号 9 7 に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号 9 6 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 8 6 %、8 7 %、8 8 % 又は 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

10

## 【 0 0 5 0 】

本発明の一実施態様（ 4 0 ）は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、配列番号 1 0 5 に示されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 9 8 % 又は 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン；及び/又は配列番号 1 0 4 に示されるアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 8 8 %、8 9 %、又は 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

20

## 【 0 0 5 1 】

その他の実施態様（ 4 1 ）において、本発明は、実施態様（ 2 2 ） - （ 2 4 ）に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここで前記第一結合ドメインは配列番号 2 1 - 3 4 に示される C D R を含み、前記第二結合ドメインは配列番号 1 2 - 2 0 に示される C D R を含む。

## 【 0 0 5 2 】

本発明の一実施態様（ 4 2 ）は、実施態様（ 3 1 ）に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここで前記第一結合ドメインは配列番号 2 1 - 2 3 及び配列番号 2 4 - 2 6 にそれぞれ示される C D R を含み、前記第二結合ドメインは配列番号 1 2 - 1 4 に示される C D R を含む。

30

## 【 0 0 5 3 】

本発明の一実施態様（ 4 3 ）は、実施態様（ 3 2 ）に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここで前記第一結合ドメインは配列番号 2 7、2 5、2 6 に示される C D R を含み、前記第二結合ドメインは配列番号 1 2 - 1 4 に示される C D R を含む。

40

## 【 0 0 5 4 】

本発明の一実施態様（ 4 4 ）は、実施態様（ 3 3 ）に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここで前記第一結合ドメインは配列番号 2 8、2 5、2 6 に示される C D R を含み、前記第二結合ドメインは配列番号 1 2 - 1 4 に示される C D R を含む。

## 【 0 0 5 5 】

本発明の一実施態様（ 4 5 ）は、実施態様（ 3 4 ）に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここで前記第一結合ドメインは配列番号 2 9 - 3 1 に示される C D R を含み、前記第二結合ドメインは配列番号 1 5 - 1 7 に示される C D R を含む。

50

## 【 0 0 5 6 】



本発明の一実施態様(46)は、実施態様(35)に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここで前記第一結合ドメインは配列番号32-34に示されるCDRを含み、前記第二結合ドメインは配列番号18-20に示されるCDRを含む。

【0057】

本発明の一実施態様(47)は、実施態様(27)に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここで前記第一結合ドメインは配列番号73-75に示されるCDRを含み、前記第二結合ドメインは配列番号70-72に示されるCDRを含む。

【0058】

本発明の一実施態様(48)は、実施態様(27)に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここで前記第一結合ドメインは配列番号81-83に示されるCDRを含み、前記第二結合ドメインは配列番号78-80に示されるCDRを含む。

【0059】

本発明の一実施態様(49)は、実施態様(27)に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここで前記第一結合ドメインは配列番号101-103に示されるCDRを含み、前記第二結合ドメインは配列番号98-100に示されるCDRを含む。

【0060】

本発明の一実施態様(50)は、実施態様(27)に記載される、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、ここで前記第一結合ドメインは配列番号89、115、及び91に示されるCDRを含み、前記第二結合ドメインは配列番号106-108に示されるCDRを含む。

【0061】

更に別の実施態様(51)において、本発明は、結合ペプチド又はタンパク質又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、特に前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチド又は抗体に関し、その結合ペプチド又は抗体は哺乳動物、特にヒトタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで前記結合ペプチド又は抗体は、

a. 配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

b. 配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

c. 配列番号8に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

d. 配列番号9に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

e. 配列番号10に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

f. 配列番号11に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

g. 配列番号69に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号68に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

h. 配列番号77に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号76に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

i. 配列番号116に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び/又は配列番号88に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン；又は

10

20

30

40

50

- j . 配列番号 9 2 に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び / 又は配列番号 8 8 に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン ; 又は
- k . 配列番号 9 7 に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び / 又は配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメイン ; 又は
- l . 配列番号 1 0 5 に示されるアミノ酸配列を含む第一結合ドメイン及び / 又は配列番号 1 0 4 に示されるアミノ酸配列を含む第二結合ドメインを含む。

【 0 0 6 2 】

本発明の一実施態様 ( 5 2 ) において、前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチドは、抗体、特に I g G 2 a、I g G 2 b 又は I g G 3 アイソタイプの抗体、特にポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は完全ヒト抗体である。本発明の一実施態様 ( 4 8 ) は、前述の実施態様の何れかに記載の結合ペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。

10

【 0 0 6 3 】

一実施態様 ( 5 3 ) において、前記ポリヌクレオチドは、

a . 配列番号 3 1 - 4 5、配列番号 8 4 - 8 7、配列番号 1 0 9 - 1 1 2 及び 1 1 7 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子

b . 配列番号 3 1 - 4 5、配列番号 8 4 - 8 7、配列番号 1 0 9 - 1 1 2 及び 1 1 7 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子

20

c . 配列番号 3 1 - 4 5、配列番号 8 4 - 8 7、配列番号 1 0 9 - 1 1 2 及び 1 1 7 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子

d . 配列番号 3 5 - 4 5、配列番号 8 4 - 8 7、配列番号 1 0 9 - 1 1 2 及び 1 1 7 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子

e . 配列番号 3 5 - 4 5、配列番号 8 4 - 8 7、配列番号 1 0 9 - 1 1 2 及び 1 1 7 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 8 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子

f . 配列番号 3 5 - 4 5、配列番号 8 4 - 8 7、配列番号 1 0 9 - 1 1 2 及び 1 1 7 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子

30

g . a ) - f ) の何れかに記載の核酸分子にハイブリダイズする相補鎖の核酸配列を含む核酸分子 ;

h . 遺伝コードの縮重によって、a ) - g ) の何れかに定められた核酸配列から逸脱するヌクレオチド配列を含む核酸分子からなる群から選択される核酸分子を含む。

【 0 0 6 4 】

ここで、a ) - h ) の何れかに定められた前記核酸分子は、哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片、特に配列番号 6 7 に示され、リン酸化 T y r を位置 1 8 に含む ( Y 1 8 ) タウの a a 1 5 - 2 0、リン酸化 S e r を位置 4 0 9 に含む ( p S 4 0 9 ) タウの a a 4 0 5 - 4 1 2、リン酸化 S e r を位置 4 0 9 に含む ( p S 4 0 9 ) タウの a a 4 0 5 - 4 1 1、リン酸化 T h r を位置 2 1 2 ( p T 2 1 2 ) 及びリン酸化 S e r を位置 2 1 4 ( p S 2 1 4 ) に含むタウの a a 2 0 8 - 2 1 8、リン酸化 S e r を位置 3 9 6 ( p S 3 9 6 ) に含むタウの a a 3 9 3 - 4 0 1、リン酸化 S e r を位置 3 9 6 ( p S 3 9 6 ) に含むタウの a a 3 9 6 - 4 0 1、リン酸化 S e r を位置 3 9 6 ( p S 3 9 6 ) に含むタウの a a 3 9 4 - 4 0 0、リン酸化 S e r を位置 4 0 4 ( p S 4 0 4 ) に含むタウの a a 4 0 2 - 4 0 6、及びリン酸化 S e r を位置 3 9 6 ( p S 3 9 6 ) に含むタウの a a 3 9 3 - 4 0 0 から選択される、ヒトタウタンパク質上のリン酸化エピトープを認識し、特異的に結合し、ここで、一実施態様において、前記結合ペプチドは少なくとも 1 0 n M、

40

50

特に少なくとも 8 nM、特に少なくとも 5 nM、特に少なくとも 2 nM、特に少なくとも 1 nM、特に少なくとも 500 pM、特に少なくとも 400 pM、特に少なくとも 300 pM、特に少なくとも 200 pM、特に少なくとも 100 pM、特に少なくとも 50 pM の解離定数を持つ高い結合親和性を有し、及び/又は  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上、特に  $3 - 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  の間又はそれ以上、特に  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上；特に  $6 - 9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上；特に  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上、特に  $1 - 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上、特に  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の会合定数を有するが、一実施態様において、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合しない。

**【0065】**

本発明の様々な実施態様(54)において、哺乳動物、例えば、神経原線維変化及び変性神経突起における主要構造である対らせん状細線維(PHF)に存在する、特にヒトタウタンパク質、特に微小管結合タンパク質タウ、特に凝集微小管結合型かつ高リン酸化タンパク質タウのリン酸化エピトープを特異的に認識しかつ結合することができるが、一実施態様においては、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合しない、前述の実施態様の何れか一又はその組み合わせに記載される結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又はポリヌクレオチドが与えられる。

10

**【0066】**

本発明の特定の実施態様(55)において、ヒトタウタンパク質は、配列番号67に示されるヒトタウタンパク質である。

20

**【0067】**

従って、前述の実施態様の何れか一に記載の結合ペプチド又は抗体は、可溶性タウタンパク質及び/又は可溶性リン酸化タウタンパク質の増加したレベルを含む、哺乳動物又はヒトの脳、大脳皮質及び/又は海馬において、全可溶性タウタンパク質、特に可溶性リン酸化タウタンパク質のレベルを下げるために用いることができる(56)。

**【0068】**

前述の実施態様の何れか一に記載の結合ペプチド又は抗体はまた、前記 p T a u 対らせん状細線維(p T a u P H F)の増加したレベルを含む、哺乳動物又はヒトの脳、大脳皮質及び/又は海馬において、高リン酸化タウタンパク質を含む対らせん状細線維(p T a u P H F)のレベルを下げるために用いることができる(57)。

30

**【0069】**

前記哺乳動物又はヒトのタウタンパク質関連の疾患、障害又は病態の一因である、前記タウタンパク質変異体の増加したレベルを含む哺乳動物又はヒトの脳、特に大脳皮質及び/又は海馬において、全可溶性タウタンパク質及び/又は可能性リン酸化タウタンパク質及び/又は p T a u 対らせん状細線維(p T a u P H F)のレベルの減少は、そうしたタウタンパク質関連の疾患、障害又は病態に関連した症状の改善及び/又は緩和へと導き得る(58)。

**【0070】**

従って、前述の実施態様の何れか一に記載の結合ペプチド又は抗体は、タウタンパク質関連の疾患、障害又は病態の進行を遅らせるか、又は停止するために、治療、特にヒトの治療において用いることができる(59)。

40

**【0071】**

更に、前述の実施態様の何れか一に記載の結合ペプチド又は抗体は、タウタンパク質関連の疾患、障害又は病態に関連した症状、例えば、推論、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーションなどを含む認知機能の障害又は喪失の改善又は緩和のために、治療、特にヒトの治療において用いることができる(60)。

**【0072】**

一実施態様(61)において、本発明は、治療における使用のための、特にタウタンパク質関連疾患又は障害の群であるタウオパチーの治療における使用のための、又はタウオパチーに関連した症状を緩和するための、前述の実施態様の何れか一に記載される結合ペ

50

プチド又は抗体に関する。

【0073】

一実施態様(62)において、本発明は、タウオパチーに罹患する哺乳動物における認知的記憶容量を維持または増加させるために、前述の実施態様の何れか一に記載される結合ペプチド又は抗体に関する。

【0074】

本発明の特定の実施態様(63)において、配列番号25、26、27、及び配列番号21、22、23にそれぞれ与えられる抗体ACI-36-2B6-Ab1、ACI-36-2B6-Ab2、ACI-36-3A8-Ab1、及びACI-36-3A8-Ab2の軽鎖CDRの少なくとも一又は全て、及び/又は配列番号12、13、14に与えられる抗体ACI-36-2B6-Ab1、ACI-36-2B6-Ab2、ACI-36-3A8-Ab1、及びACI-36-3A8-Ab2の重鎖CDRの少なくとも一又は全てを含む結合ペプチド又は抗体が、タウタンパク質関連の疾患、障害又は病態に関連した症状、例えば、推論、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーションなどを含む認知機能の障害又は喪失の改善又は緩和のために、治療、特にヒトの治療において用いることができる。

10

【0075】

本発明の別の実施態様(64)において、配列番号8、及び配列番号6、7にそれぞれ与えられる抗体ACI-36-2B6-Ab1、ACI-36-2B6-Ab2、ACI-36-3A8-Ab1、及びACI-36-3A8-Ab2の軽鎖、及び/又は配列番号1及び配列番号2に与えられる抗体ACI-36-2B6-Ab1、ACI-36-2B6-Ab12、ACI-36-3A8-Ab1、及びACI-36-3A8-Ab2の重鎖を含む抗体が、タウタンパク質関連の疾患、障害又は病態に関連した症状、例えば、推論、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーションなどを含む認知機能の障害又は喪失の改善又は緩和のために、治療、特にヒトの治療において用いることができる。

20

【0076】

本発明の別の実施態様(65)において、配列番号29、30、31に与えられる抗体ACI-33-6C10-Ab1及びACI-33-6C10-Ab2の軽鎖CDRの少なくとも一又は全て、及び/又は配列番号15、16、17に与えられる抗体ACI-33-6C10-Ab1及びACI-33-6C10-Ab2の重鎖CDRの少なくとも一又は全てを含む結合ペプチド又は抗体が、タウタンパク質関連の疾患、障害又は病態に関連した症状、例えば、推論、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーションなどを含む認知機能の障害又は喪失の改善又は緩和のために、治療、特にヒトの治療において用いることができる。

30

【0077】

本発明の別の実施態様(66)において、配列番号32、33、34に与えられる抗体ACI-41-7C2-Ab1及びACI-41-7C2-Ab2の軽鎖CDRの少なくとも一又は全て、及び/又は配列番号18、19、20に与えられる抗体ACI-41-7C2-Ab1及びACI-41-7C2-Ab2の重鎖CDRの少なくとも一又は全てを含む結合ペプチド又は抗体が、タウタンパク質関連の疾患、障害又は病態に関連した症状、例えば、推論、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーションなどを含む認知機能の障害又は喪失の改善又は緩和のために、治療、特にヒトの治療において用いることができる。

40

【0078】

本発明の特定の実施態様(67)において、配列番号73-75、81-83、93-95、101-103、106-108に与えられる抗体ACI-35-2A1-Ab1; ACI-35-2A1-Ab2; ACI-35-4A6-Ab1; ACI-35-4A6-Ab2; ACI-35-1D2-Ab1; ACI-35-2G5-Ab1の軽鎖CDRの少なくとも一又は全て、及び/又は配列番号70-72、78-80、89-91、98-100に与えられる抗体ACI-35-2A1-Ab1; ACI-35-2A1-

50

A b 2 ; A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 1 ; A C I - 3 5 - 4 A 6 - A b 2 ; A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 ; A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 1 の重鎖 C D R の少なくとも一又は全てを含む結合ペプチド又は抗体が、タウタンパク質関連の疾患、障害又は病態に関連した症状、例えば、推論、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーションなどを含む認知機能の障害又は喪失の改善又は緩和のために、治療、特にヒトの治療において用いることができる。

【 0 0 7 9 】

本発明の別の実施態様 ( 6 8 ) において、配列番号 1 0 6 - 1 0 8 に与えられる抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 2 ; A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 の軽鎖 C D R の少なくとも一又は全て、及び / 又は配列番号 8 9 、 1 1 5 、 9 1 に与えられる抗体 A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 2 ; A C I - 3 5 - 2 G 5 - A b 3 の重鎖 C D R の少なくとも一又は全てを含む結合ペプチド又は抗体が、タウタンパク質関連の疾患、障害又は病態に関連した症状、例えば、推論、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーションなどを含む認知機能の障害又は喪失の改善又は緩和のために、治療、特にヒトの治療において用いることができる。脳のタウ濃縮体又は p T a u に対する前述の実施態様に記載のペプチド又は抗体の結合は、選択された脳切片のタンパク質免疫反応性試験を適用することにより及び脳ホモジネートのウエスタンブロッティングにより、それぞれ実施例に記載されるように決定され得る。

10

【 0 0 8 0 】

その他の実施態様 ( 6 9 ) において、本発明は、前述の実施態様の何れか一に記載される、結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又はポリヌクレオチド、又はそれらの組み合わせを、薬学的に許容される担体と一緒に治療的有効量含有する薬学的組成物を提供する。

20

【 0 0 8 1 】

一実施態様 ( 7 0 ) において、前述の実施態様の何れか一に記載される、結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又はポリヌクレオチド、又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせは、タウオパチーなどの神経変性疾患を含むタウタンパク質関連の疾患又は障害の症状の治療又は緩和のために、治療、特にヒトの治療において用いられる。

【 0 0 8 2 】

従って、前述の実施態様の何れか一に記載される結合ペプチド、抗体及び / 又は薬学的組成物は、前記結合ペプチド、抗体及び / 又は薬学的組成物を、そうした疾患又は状態に罹患した動物、特に哺乳動物、特にヒトに対して投与して、タウタンパク質関連疾患、障害又は病態の進行を遅らせるか又は停止させるために用いられ得る ( 7 1 ) 。

30

【 0 0 8 3 】

更に、前述の実施態様の何れか一に記載される結合ペプチド、抗体及び / 又は薬学的組成物は、前記結合ペプチド、抗体及び / 又は薬学的組成物を、そうした疾患又は状態に罹患した動物、特に哺乳動物、特にヒトに対して投与して、タウタンパク質関連の疾患、障害又は病態に関連した症状、例えば、推論、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーションなどを含む認知機能の障害又は喪失を改善し又は緩和するために用いられ得る ( 7 2 ) 。

40

【 0 0 8 4 】

一実施態様 ( 7 3 ) において、前述の実施態様の何れか一に記載される結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又はポリヌクレオチド又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせは、アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクサー痴呆、ダウン症候群、ゲルストマン - シュトロイスラー - シャインカー病、封入体筋炎、およびプリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、外傷性脳損傷を含むがこれらに限定されないタウ及びアミロイド病理の共存を示す疾患又は障害、及び、筋萎縮性側索硬化症 / グアムのパーキンソニズム - 認知症複合、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性症、石灰化を

50

伴うびまん性神経原線維変化、第17染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン-スパッツ病、多系統萎縮症、C型ニーマン-ピック病、淡蒼球-橋-黒質変性(Pallido-ponto-nigral degeneration)、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィーを含むがこれらに限定されない、明確なアミロイド病理を示さない更なる疾患又は障害を含む神経変性疾患又は障害の不均一な群を含む、タウオパチーにおける優勢な脳病理である神経原線維の形成によって引き起こされる又は関連する疾患及び障害の治療に使用される。

【0085】

一実施態様(74)において、前述の実施態様の何れか一に記載される、結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又はポリヌクレオチド、又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせは、アルツハイマー病の治療において治療において用いられる。

10

【0086】

本発明の一実施態様(75)において、前述の実施態様の何れか一に記載される結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又はポリヌクレオチド又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせを前記動物、特に前記哺乳動物又はヒトに投与することを含み、特に、動物、特に哺乳動物又はヒトの脳、特に大脳皮質及び/又は海馬において、可溶性及び/又は不溶性Tauレベルを調節するための方法が提供される。

20

【0087】

一態様において、調節は、可溶性タウタンパク質及び/又は可溶性リン酸化タウタンパク質の増加したレベルを含む、哺乳動物又はヒトの脳、大脳皮質及び/又は海馬において、可溶性タウタンパク質、特に可溶性リン酸化タウタンパク質のレベルを下げることに関する。

【0088】

本発明の一実施態様(76)において、前述の実施態様の何れか一に記載される結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又はポリヌクレオチド又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせを前記動物、特に前記哺乳動物又はヒトに投与することを含み、不溶性タウタンパク質、特にpTau対らせん状細線維(pTauPHF)の増加したレベルを含む、動物、特に哺乳動物又はヒトの脳、特に大脳皮質及び/又は海馬において、不溶性タウタンパク質、特に高リン酸化タウタンパク質を含む対らせん状細線維(pTauPHF)のレベルを下げるための方法が提供される。

30

【0089】

一実施態様(77)において、本発明は、そうした疾患又は状態に罹患した前記動物、特に前記哺乳動物又はヒトに対して、前述の実施態様の何れか一に記載される、結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、ポリヌクレオチド又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせを投与することを含み、動物、特に哺乳動物又はヒトにおいてタウタンパク質関連疾患、障害又は病態の進行を遅らせ又は停止させるための方法に関する。

40

【0090】

一実施態様(78)において、本発明は、そうした疾患又は状態に罹患した前記動物、特に前記哺乳動物又はヒトに対して、前述の実施態様の何れか一に記載される、結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、ポリヌクレオチド又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせを投与することを含み、動物、特に哺乳動物又はヒトにおける、例えば、推論、状況判断、記憶容量、学習、特別なナビゲーションなどを含む認知機能の障害又は喪失などのタウタンパク質関連疾患、障害又は病態に関連した症状を改善し又は緩和するための方法に関する。

【0091】

50

一実施態様(79)において、本発明はタウオパチーに罹患した哺乳動物において認知記憶容量を保持するか又は増加させるための方法に関する。

【0092】

更に別の実施態様(80)において、本発明は、そうした疾患又は状態に罹患した動物、特に哺乳動物、しかし特にヒトに対して、前述の実施態様の何れかーに記載される、結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、ポリヌクレオチド又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせを投与することを含む、タウオパチーなどの神経変性疾患又は障害を含む、タウタンパク質に関連する疾患又は障害の治療のための方法が与えられる。

【0093】

本発明の一実施態様(81)において、アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクサー痴呆、ダウン症候群、ゲルストマン-シュトロイスラー-シャインカー病、封入体筋炎、およびプリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、外傷性脳損傷を含むがこれらに限定されないタウ及びアミロイド病理の共存を示す疾患又は障害、及び、筋萎縮性側索硬化症/グアムのパーキンソニズム-認知症複合、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、第17染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン-スパッツ病、多系統萎縮症、C型ニーマン-ピック病、淡蒼球-橋-黒質変性(Pallido-ponto-nigral degeneration)、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィーを含むがこれらに限定されない、明確なアミロイド病理を示さない更なる疾患又は障害を含む神経変性疾患又は障害の不均一な群を含む、タウオパチーにおける優勢な脳病理である神経原線維の形成によって引き起こされる又は関連する疾患及び障害の治療のための方法が提供され、その方法は、そうした疾患又は障害に罹患した、動物、特に哺乳動物、しかし特にヒトに対して、前述の実施態様の何れかーに記載される結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又はポリヌクレオチド又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせを投与することを含む。

【0094】

本発明の別の実施態様(82)において、前述の実施態様の何れかーに記載される結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又はポリヌクレオチド又は薬学的組成物、又はそれらの組み合わせを前記動物又はヒトに投与することにより、タウオパチーなどの神経変性疾患に罹患した動物、特に哺乳動物又はヒトにおいて受動免疫応答を誘導するための方法が提供される。

【0095】

本発明の更に別の実施態様(83)において、前述の実施態様の何れかーに記載の結合ペプチド又はその活性断片、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分の、サンプル中で又はインサイツでタウタンパク質のエピトープへの免疫特異的結合を検出することを含む、患者のタウタンパク質関連疾患、障害又は病態を診断する方法が提供され、

a. タウタンパク質を含有すると疑われるサンプル又は特定の体の部分又は体の領域を、前述の実施態様の何れかーに記載される結合ペプチド又は又はその断片、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分と接触させ、ここで前記結合ペプチド又は抗体又はその断片はタウタンパク質のエピトープに結合し；

b. 前記結合ペプチド、特に前記抗体、特に前記モノクローナル抗体又はその機能性部分をタウタンパク質に結合させ、免疫複合体を形成させ；

c. 免疫複合体の形成を検出し；そして

d. サンプル中又は特定の体の部分又は領域において、免疫複合体の存在又は欠損をタウタンパク質の存在又は欠損と関連させる

工程を含む。

10

20

30

40

50

## 【0096】

本発明の更に別の実施態様(84)において、前述の実施態様の何れかーに記載の結合ペプチド又はその活性断片、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分の、サンプル中で又はインサイトでタウタンパク質のエピトープへの免疫特異的結合を検出することを含む、患者のタウタンパク質関連疾患、障害又は病態に対する素因を診断するための方法が提供され、

a. タウ抗原含有すると疑われるサンプル又は特定の体の部分又は体の領域を、前述の実施態様の何れかーに記載される結合ペプチド又は又はその活性断片、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分と接触させ、そのペプチド又はその断片はタウタンパク質のエピトープに結合し；

b. 前記結合ペプチド、特に前記抗体、特に前記モノクローナル抗体又はその機能性部分をタウ抗原に結合させ、免疫複合体を形成させ；

c. 免疫複合体の形成を検出し；そして

d. サンプル中又は特定の体の部分又は領域において、免疫複合体の存在又は欠損をタウ抗原の存在又は欠損と相関させ；

e. 前記免疫複合体の量を正常コントロール値と比較する；

工程を含み、

ここで、正常コントロール値と比較して前記凝集体の量の増加は、前記患者が、タウタンパク質関連疾患又は状態に罹患しているか又は発症するリスクであることを示している。

## 【0097】

本発明の一実施態様(85)において、前述の実施態様の何れかーに記載される、結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又はポリヌクレオチド、又は薬学的組成物による治療の後で患者の微小残存病変(minimal residual disease)を監視するための方法が提供され、ここで前記方法は、

a. タウ抗原含有すると疑われるサンプル又は特定の体の部分又は体の領域を、前述の実施態様の何れかーに記載される結合ペプチド又は又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分と接触させ、そのペプチド又はその断片はタウタンパク質のエピトープに結合し；

b. 前記結合ペプチド、特に前記抗体、特に前記モノクローナル抗体又はその機能性部分をタウ抗原に結合させ、免疫複合体を形成させ；

c. 免疫複合体の形成を検出し；そして

d. サンプル中又は特定の体の部分又は領域において、免疫複合体の存在又は欠損をタウ抗原の存在又は欠損と相関させ、

e. 前記免疫複合体の量を正常コントロール値と比較する、

工程を含み、

ここで、正常コントロール値と比較して前記凝集体の量の増加は、前記患者が、微小残存病変(minimal residual disease)になお罹患していることを示している。

## 【0098】

一実施態様(86)において、前述の実施態様の何れかーに記載される、結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又はポリヌクレオチド、又は薬学的組成物による治療される患者の応答性を予測するための方法が提供され、

a. タウ抗原含有すると疑われるサンプル又は特定の体の部分又は体の領域を、前述の実施態様の何れかーに記載される結合ペプチド又は又はその活性断片、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分と接触させ、そのペプチド又はその断片はタウタンパク質のエピトープに結合し；

b. 前記結合ペプチド、特に前記抗体、特に前記モノクローナル抗体又はその機能性部分をタウ抗原に結合させ、免疫複合体を形成させ；

10

20

30

40

50



- c . 免疫複合体の形成を検出し ; そして
  - d . サンプル中又は特定の体の部分又は領域において、免疫複合体の存在又は欠損をタウ抗原の存在又は欠損と関連させ、
  - e . 治療開始前と後で前記免疫複合体の量を比較する、
- ことを含み、  
ここで、前記凝集体の量の減少は、前記患者が治療に対して応答する高い可能性を有していることを示す。

## 【0099】

その他の実施態様(87)において、本発明は、前述の実施態様の何れかに記載される結合ペプチド又はその活性断片、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分を含む、タウタンパク質関連疾患、障害又は病態の検出及び診断のための試験キットに関する。

10

## 【0100】

一実施態様(88)において、前記キットは、前述の実施態様の何れかに記載される一以上の結合ペプチド又はその活性断片、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、及び結合ペプチド又は抗体を、タウ抗原に対して結合させ、免疫複合体の存在又は欠損がタウ抗原の存在又は欠損に関連するようにその免疫複合体を形成させるために使用するための説明書を入れる容器を含む。

## 【0101】

更に別の実施態様(89)において、本発明は、位置18にリン酸化Ty r ( Y 1 8 ) を含む配列番号67に示されるヒトタウタンパク質のタウa a 1 5 - 2 0、位置409にリン酸化Ser ( p S 4 0 9 ) を含むタウa a 4 0 5 - 4 1 2、位置409にリン酸化Ser ( p S 4 0 9 ) を含むタウa a 4 0 5 - 4 1 1 ; 及び位置212にリン酸化Thr ( p T 2 1 2 ) 及び位置214にリン酸化Ser ( p S 2 1 4 ) を含むタウa a 2 0 8 - 2 1 8 からなる群から選択されるエピトープに関する。

20

## 【0102】

一実施態様(90)において、前記エピトープはリン酸化Ty r を位置18 ( Y 1 8 ) に持つタウa a 1 5 - 2 0 からなる。

## 【0103】

一実施態様(91)において、前記エピトープはリン酸化Ser を位置409 ( p S 4 0 9 ) に持つタウa a 4 0 5 - 4 1 2 からなる。

30

## 【0104】

一実施態様(92)において、前記エピトープはリン酸化Ser を位置409 ( p S 4 0 9 ) に持つタウa a 4 0 5 - 4 1 1 からなる。

## 【0105】

その他の実施態様(93)において、本発明は、前述の実施態様の何れかに記載される結合ペプチド又はその活性断片、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分を生産する細胞株に関する。

## 【0106】

一実施態様(94)において、本発明は、DSM ACC 3079として2010年8月25日に寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10F9C12A11である細胞株に関する。

40

## 【0107】

一実施態様(95)において、本発明は、DSM ACC 3081として2010年8月25日に寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10E5E9C12である細胞株に関する。

## 【0108】

一実施態様(96)において、本発明は、DSM ACC 3080として2010年8月25日に寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1A11C11である細胞株に関する。

## 【0109】

50

一実施態様(97)において、本発明は、DSM ACC3088として2010年8月25日に寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1G6E6である細胞株に関する。

【0110】

一実施態様(98)において、本発明は、DSM ACC3084として2010年8月25日に寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6A10C11である細胞株に関する。

【0111】

一実施態様(99)において、本発明は、DSM ACC3087として2010年8月25日に寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6G7A12である細胞株に関する。

【0112】

一実施態様(100)において、本発明は、DSM ACC3086として2010年8月25日に寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8A12G7である細胞株に関する。

10

【0113】

一実施態様(101)において、本発明は、DSM ACC3085として2010年8月25日に寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8E12H8である細胞株に関する。

【0114】

一実施態様(102)において、本発明は、DSM ACC3082として2010年8月25日に寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2(1)F10C10D3である細胞株に関する。

【0115】

一実施態様(103)において、本発明は、DSM ACC3083として2010年8月25日に寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2(2)B9F11D5である細胞株に関する。

20

【0116】

一実施態様(103a)において、本発明は、DSM ACC3136として2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-4A6-48である細胞株に関する。

【0117】

一実施態様(103b)において、本発明は、DSM ACC3137として2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A6-2G5-30である細胞株に関する。

30

【0118】

一実施態様(103c)において、本発明は、DSM ACC3138として2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A6-2G5-41である細胞株に関する。

【0119】

一実施態様(103d)において、本発明は、DSM ACC3139として2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-2A1-18である細胞株に関する。

【0120】

一実施態様(103e)において、本発明は、DSM ACC3140として2011年8月30日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-2A1-40である細胞株に関する。

40

【0121】

一実施態様(103e)において、本発明は、DSM ACC3141として2011年9月6日に寄託されたハイブリドーマ細胞株A6-1D2-12である細胞株に関する。

【0122】

一実施態様(104)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号54の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマー対；及び/又は

50

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号53及び配列番号54の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマーの混合を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3079として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10F9C12A11のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

【0123】

一実施態様(105)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号48及び配列番号49の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号53及び配列番号54の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマーの混合；

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3081として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10E5E9C12のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

【0124】

一実施態様(106)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号50の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマー対；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号46の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマー対；

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3080として寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1A11C11のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

【0125】

一実施態様(107)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号50の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマー対；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号46の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマー対；

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3088として寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1G6E6のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

【0126】

一実施態様(108)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号50の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマー対；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号46及び配列番号52の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマーの混合；

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3084として寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6A10C11のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメ

10

20

30

40

50

インを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

【0127】

一実施態様(109)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号50の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマー対；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号46及び配列番号52の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマーの混合；

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3087として寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6G7A12のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

10

【0128】

一実施態様(110)において、本発明は、

a<sub>1</sub>. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号48及び配列番号49の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；又は

a<sub>2</sub>. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号50の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマー対；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号46の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマー対；

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3086として寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8A12G7のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

20

【0129】

一実施態様(111)において、本発明は、

a<sub>1</sub>. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号48及び配列番号49の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；又は

a<sub>2</sub>. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号50の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマー対；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号46の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマー対；

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3085として寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8E12H8のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

30

【0130】

一実施態様(112)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号49；配列番号56及び配列番号57の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号53及び配列番号55の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマーの混合；

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3082として寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2(1)F10C10D3のPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

40

【0131】

50

一実施態様(113)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号57の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの対；

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号53及び配列番号55の5'プライマーと配列番号47の3'プライマーを含むプライマーの混合；

を用いて、

2010年8月25日にDSM ACC3083として寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2(2)B9F11D5のPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

10

【0132】

一実施態様(114)において、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号149の5'プライマーと配列番号51の3'プライマーを含むプライマー対；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号120、123、124、136、137、138、139、及び140からなる群から選択される5'プライマーと配列番号131、134、及び141-148からなる群から選択される3'プライマーを含むプライマーの混合；

を用いて、

本発明は、2011年8月30日にDSM ACC3139として寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-2A1-18のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

20

【0133】

一実施態様(115)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号51及び169-174からなる群から選択される5'プライマー及び配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号124、127、及び150-158からなる群から選択される5'プライマーと配列番号130、及び159-168からなる群から選択される3'プライマーを含むプライマーの混合；

30

を用いて、

2011年8月30日にDSM ACC3137として寄託されたハイブリドーマ細胞株A6-2G5-30のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

【0134】

一実施態様(116)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号178、179及び180からなる群から選択される5'プライマー及び配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号121、127、139、154、155、及び175からなる群から選択される5'プライマーと配列番号128、129、147、176、及び177からなる群から選択される3'プライマーを含むプライマーの混合；

40

を用いて、

2011年8月30日にDSM ACC3140として寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-2A1-40のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

50

## 【0135】

一実施態様(117)において、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号51及び188-192からなる群から選択される5'プライマー及び配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号120、124、126、181、182及び183からなる群から選択される5'プライマーと配列番号144、145及び184-187からなる群から選択される3'プライマーを含むプライマーの混合；を用いて、

本発明は、2011年8月30日にDSM ACC 3138として寄託されたハイブリドーマ細胞株A6-2G5-41のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

10

## 【0136】

一実施態様(118)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号50及び201-204からなる群から選択される5'プライマー及び配列番号51の3'プライマーを含むプライマーの混合；及び/又は

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号121、137、151及び193-197からなる群から選択される5'プライマーと配列番号131、141、144、166、198、199及び200からなる群から選択される3'プライマーを含むプライマーの混合；を用いて、

20

2011年8月30日にDSM ACC 3136として寄託されたハイブリドーマ細胞株A4-4A6-48のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

## 【0137】

一実施態様(119)において、本発明は、

a. 第一結合ドメインの増幅のために配列番号209-214、及び219-221からなる群から選択される5'プライマー及び配列番号215の3'プライマーを含むプライマーの混合；及び/又は

30

b. 第二結合ドメインの増幅のために配列番号216、217及び218からなる群から選択される5'プライマー及び配列番号208の3'プライマーを含むプライマーの混合；

を用いて、

2011年9月6日にDSM ACC 3141として寄託されたハイブリドーマ細胞株A6-1D2-12のDNAのPCR増幅により得ることができるヌクレオチド断片に位置するポリヌクレオチドによりコードされる、軽鎖(VL)及び/又は重鎖(VH)ドメインを含むモノクローナル抗体又はその機能性部分に関する。

40

## 【0138】

一実施態様(120)において、前述の実施態様の何れか一に記載される抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ラクダ科動物抗体、ダイアボディ、又は修飾又は操作された抗体であり得る。

## 【0139】

一実施態様(121)において、結合ペプチド又はその機能性部分は、重鎖及び/又は軽鎖を含む断片、特に配列番号1-5に示される重鎖及び/又は配列番号6-11に示される軽鎖、特にFab又はF(ab')<sub>2</sub>断片であり得る。

## 【0140】

特定の実施態様(122)において、本発明は配列番号1-5に示される重鎖に関する

50

。

## 【0141】

別の実施態様(123)において、本発明は配列番号1-11に示される軽鎖に関する

。

## 【0142】

一実施態様(124)において、本発明は、前述の実施態様の何れか細胞株を適切な培養培地中で培養し、任意で細胞株又は培養培地から結合ペプチド又は抗体を精製する工程を含む、前述の実施態様の何れか一に記載される結合ペプチド又は抗体を産生するための方法を提供する。

## 【0143】

図と配列の簡潔な説明

## 【図面の簡単な説明】

## 【0144】

【図1】図1は、TAUP1Rを用いるbiGT(タウバイジェニック)マウスからの脳切片におけるリン酸化タウに対する抗体結合を示す。

【図2】図2は、ACI-36-3A8-Ab1抗体を用いた、TAUP1Rを用いるAD及びタウオパチー患者からの脳切片におけるリン酸化タウに対する抗体結合を示す。

【図3】図3は、MSDを用いた、pTauエピトープpT231のインビボでの試験における1週間後の抗タウ抗体治療の作用を示す。

【図4】図4は、いかにして脳が可溶性およびサルコシル不溶性(SinT)タウ蛋白分画のために調製されたかを示す図を示す。

【図5】図5は、1ヶ月(図5A、5B、5C、5G、5H、5I)又は3ヶ月間のインビボ研究について、抗タウ抗体治療後のpTauエピトープウエスタンプロットを示す(図5D、5E、5F)。

【図6】図6は、biGTバイジェニックマウスを用いた、3ヶ月間のインビボ研究について、抗タウ抗体治療後のpTauエピトープウエスタンプロットを示す。

【図7】図7は、3ヶ月のインビボ研究におけるACI-36-2B6-Ab1による抗タウ抗体治療後のIHCを示す。

【図8】図8は、3ヶ月のインビボ研究におけるACI-36-3A8-Ab1による抗タウ抗体治療後のIHCを示す。

【図9】図9は、3ヶ月のインビボ研究におけるACI-36-2B6-Ab1による抗タウ抗体治療後のモーリス水迷路の結果を示す。

【図10】図10は、3ヶ月のインビボ研究におけるACI-36-3A8-Ab1による抗タウ抗体治療後のモーリス水迷路の結果を示す。

## 【0145】

配列

配列番号1は、ハイブリドーマ細胞株3A8A12G7により産生されるモノクローナル抗体ACI-36-3A8-Ab1の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列を示す。

配列番号2は、ハイブリドーマ細胞株2B6A10C11により産生されるモノクローナル抗体ACI-36-2B6-Ab1の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列を示す。

配列番号3は、ハイブリドーマ細胞株6H1A11C11及び6H1G6E6によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体ACI-36-6H1-Ab1及びACI-36-6H1-Ab2の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列を示す。

配列番号4は、ハイブリドーマ細胞株6C10E5E9C12及び6C10F9C12A11によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体ACI-33-6C10-Ab2及びACI-33-6C10-Ab1の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列を示す。

配列番号5は、ハイブリドーマ細胞株7C2(1)F10C10D3及び7C2(2)B9F11D5によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体ACI-41-7C2-Ab1及びACI-41-7C2-Ab2の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列を示す。

配列番号6は、ハイブリドーマ細胞株3A8A12G7及び3A8E12H8によりそ

10

20

30

40

50

れぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1<sub>V K</sub> - A<sub>D</sub> 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2<sub>V K</sub> - A<sub>D</sub> の軽鎖可変領域 ( V K ) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 7 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7 及び 3 A 8 E 1 2 H 8 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1<sub>V K</sub> - G 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2<sub>V K</sub> - G の軽鎖可変領域 ( V K ) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 8 は、ハイブリドーマ細胞株 2 B 6 A 1 0 C 1 1 及び 2 B 6 G 7 A 1 2 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 9 は、ハイブリドーマ細胞株 6 H 1 A 1 1 C 1 1 及び 6 H 1 G 6 E 6 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 10 は、ハイブリドーマ細胞株 6 C 1 0 E 5 E 9 C 1 2 及び 6 C 1 0 F 9 C 1 2 A 1 1 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 2 及び A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 11 は、ハイブリドーマ細胞株 7 C 2 ( 1 ) F 1 0 C 1 0 D 3 及び 7 C 2 ( 2 ) B 9 F 1 1 D 5 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 1 及び A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 12 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7、3 A 8 E 1 2 H 8、2 B 6 A 1 0 C 1 1、2 B 6 G 7 A 1 2、6 H 1 A 1 1 C 1 1 及び 6 H 1 G 6 E 6 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1、A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2、A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 1 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 13 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7、3 A 8 E 1 2 H 8、2 B 6 A 1 0 C 1 1、2 B 6 G 7 A 1 2、6 H 1 A 1 1 C 1 1 及び 6 H 1 G 6 E 6 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1、A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2、A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 2 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 14 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7、3 A 8 E 1 2 H 8、2 B 6 A 1 0 C 1 1、2 B 6 G 7 A 1 2、6 H 1 A 1 1 C 1 1 及び 6 H 1 G 6 E 6 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1、A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2、A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 3 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 15 は、ハイブリドーマ細胞株 6 C 1 0 E 5 E 9 C 1 2 及び 6 C 1 0 F 9 C 1 2 A 1 1 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 2 及び A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 1 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 16 は、ハイブリドーマ細胞株 6 C 1 0 E 5 E 9 C 1 2 及び 6 C 1 0 F 9 C 1 2 A 1 1 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 2 及び A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 2 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 17 は、ハイブリドーマ細胞株 6 C 1 0 E 5 E 9 C 1 2 及び 6 C 1 0 F 9 C 1 2 A 1 1 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 2 及び A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 1 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 3 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 18 は、ハイブリドーマ細胞株 7 C 2 ( 1 ) F 1 0 C 1 0 D 3 及び 7 C 2 ( 2 ) B 9 F 1 1 D 5 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 1 及び A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 2 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 1 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 19 は、ハイブリドーマ細胞株 7 C 2 ( 1 ) F 1 0 C 1 0 D 3 及び 7 C 2 ( 2

10

20

30

40

50



) B 9 F 1 1 D 5 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 1 及び A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 2 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 2 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 2 0 は、ハイブリドーマ細胞株 7 C 2 ( 1 ) F 1 0 C 1 0 D 3 及び 7 C 2 ( 2 ) B 9 F 1 1 D 5 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 1 及び A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 2 の重鎖可変領域 ( V H ) の C D R 3 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 2 1 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7 及び 3 A 8 E 1 2 H 8 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1 <sub>V K - A D</sub> 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 <sub>V K - A D</sub> の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 1 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 2 2 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7 及び 3 A 8 E 1 2 H 8 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1 <sub>V K - A D</sub> 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 <sub>V K - A D</sub> の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 2 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 2 3 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7 及び 3 A 8 E 1 2 H 8 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1 <sub>V K - A D</sub> 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 <sub>V K - A D</sub> の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 3 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 2 4 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7 及び 3 A 8 E 1 2 H 8 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1 <sub>V K - G</sub> 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 <sub>V K - G</sub> の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 1 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 2 5 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7、3 A 8 E 1 2 H 8、2 B 6 A 1 0 C 1 1、2 B 6 G 7 A 1 2、6 H 1 A 1 1 C 1 1 及び 6 H 1 G 6 E 6 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1 <sub>V K - G</sub>、A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 <sub>V K - G</sub>、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2、A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 2 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 2 6 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7、3 A 8 E 1 2 H 8、2 B 6 A 1 0 C 1 1、2 B 6 G 7 A 1 2、6 H 1 A 1 1 C 1 1 及び 6 H 1 G 6 E 6 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1 <sub>V K - G</sub>、A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 <sub>V K - G</sub>、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2、A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 3 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 2 7 は、ハイブリドーマ細胞株 2 B 6 A 1 0 C 1 1 及び 2 B 6 G 7 A 1 2 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 1 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 2 8 は、ハイブリドーマ細胞株 6 H 1 A 1 1 C 1 1 及び 6 H 1 G 6 E 6 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 1 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 2 9 は、ハイブリドーマ細胞株 6 C 1 0 E 5 E 9 C 1 2 及び 6 C 1 0 F 9 C 1 2 A 1 1 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 2 及び A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 1 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 3 0 は、ハイブリドーマ細胞株 6 C 1 0 E 5 E 9 C 1 2 及び 6 C 1 0 F 9 C 1 2 A 1 1 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 2 及び A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 2 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 3 1 は、ハイブリドーマ細胞株 6 C 1 0 E 5 E 9 C 1 2 及び 6 C 1 0 F 9 C 1

10

20

30

40

50

2 A 1 1 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 2 及び A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 3 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 3 2 は、ハイブリドーマ細胞株 7 C 2 ( 1 ) F 1 0 C 1 0 D 3 及び 7 C 2 ( 2 ) B 9 F 1 1 D 5 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 1 及び A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 1 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 3 3 は、ハイブリドーマ細胞株 7 C 2 ( 1 ) F 1 0 C 1 0 D 3 及び 7 C 2 ( 2 ) B 9 F 1 1 D 5 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 1 及び A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 2 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 3 4 は、ハイブリドーマ細胞株 7 C 2 ( 1 ) F 1 0 C 1 0 D 3 及び 7 C 2 ( 2 ) B 9 F 1 1 D 5 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 1 及び A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) の C D R 3 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 3 5 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7 及び 3 A 8 E 1 2 H 8 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 の重鎖可変領域 ( V H ) のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 3 6 は、ハイブリドーマ細胞株 2 B 6 A 1 0 C 1 1 及び 2 B 6 G 7 A 1 2 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2 の重鎖可変領域 ( V H ) のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 3 7 は、ハイブリドーマ細胞株 6 H 1 A 1 1 C 1 1 及び 6 H 1 G 6 E 6 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 2 の重鎖可変領域 ( V H ) のヌクレオチド配列を示す。

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

配列番号 3 9 は、ハイブリドーマ細胞株 7 C 2 ( 1 ) F 1 0 C 1 0 D 3 及び 7 C 2 ( 2 ) B 9 F 1 1 D 5 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 1 及び A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 2 の重鎖可変領域 ( V H ) のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 4 0 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7 及び 3 A 8 E 1 2 H 8 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 4 1 は、ハイブリドーマ細胞株 3 A 8 A 1 2 G 7 及び 3 A 8 E 1 2 H 8 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 4 2 は、ハイブリドーマ細胞株 2 B 6 A 1 0 C 1 1 及び 2 B 6 G 7 A 1 2 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 4 3 は、ハイブリドーマ細胞株 6 H 1 A 1 1 C 1 1 及び 6 H 1 G 6 E 6 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 1 及び A C I - 3 6 - 6 H 1 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 4 4 は、ハイブリドーマ細胞株 6 C 1 0 E 5 E 9 C 1 2 及び 6 C 1 0 F 9 C 1 2 A 1 1 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 2 及び A C I - 3 3 - 6 C 1 0 - A b 1 の軽鎖可変領域 ( V K ) のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 4 5 は、ハイブリドーマ細胞株 7 C 2 ( 1 ) F 1 0 C 1 0 D 3 及び 7 C 2 ( 2 ) B 9 F 1 1 D 5 によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体 A C I - 4 1 - 7 C 2 -

10

20

30

40

50

A b 1 及び A C I - 4 1 - 7 C 2 - A b 2 の軽鎖可変領域 ( V K ) のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 4 6 - 5 7 は、V H / V K フォワード及びリバースプライマーのヌクレオチド配列を示す。

配列番号 5 8 は、タウ 3 7 9 - 4 0 8 [ p S 3 9 6、p S 4 0 4 ] のアミノ酸配列を示す。

配列番号 5 9 は、タウ 5 - 2 0 [ p Y 1 8 ] のアミノ酸配列を示す。

配列番号 6 0 は、タウ 2 0 6 - 2 2 1 [ p T 2 1 2、p S 2 1 4 ] のアミノ酸配列を示す。

配列番号 6 1 は、タウ 1 9 6 - 2 1 1 [ p S 2 0 2、p T 2 0 5 ] のアミノ酸配列を示す。

配列番号 6 2 は、タウ 3 9 3 - 4 0 8 [ p S 3 9 6、p S 4 0 4 ] のアミノ酸配列を示す。

配列番号 6 3 は、タウ 4 0 1 - 4 1 8 [ p S 4 0 4、p S 4 0 9 ] のアミノ酸配列を示す。

配列番号 6 4 は、タウ 2 0 0 - 2 1 6 [ p S 2 0 2 + p T 2 0 5 & p T 2 1 2 + p S 2 1 4 ] のアミノ酸配列を示す。

配列番号 6 5 は、タウ 4 0 7 - 4 1 8 [ p S 4 0 9 ] のアミノ酸配列を示す。

配列番号 6 6 は、タウ 3 9 9 - 4 0 8 [ p S 4 0 4 ] のアミノ酸配列を示す。

配列番号 6 7 は、タウ 4 0 と呼ばれるヒトタウの最長アイソフォームのアミノ酸配列 ( 4 4 1 a a ) を示す。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

配列番号 8 0 は、モノクローナル抗体 A C I - 3 5 - 1 D 2 - A b 1 の重鎖可変領域 (

10

20

30

40

50

VH)のCDR3のアミノ酸配列を示す。

配列番号81は、モノクローナル抗体ACI-35-1D2-Ab1の軽鎖可変領域(VK)のCDR1のアミノ酸配列を示す。

配列番号82は、モノクローナル抗体ACI-35-1D2-Ab1の軽鎖可変領域(VK)のCDR2のアミノ酸配列を示す。

配列番号83は、モノクローナル抗体ACI-35-1D2-Ab1の軽鎖可変領域(VK)のCDR3のアミノ酸配列を示す。

配列番号84は、ハイブリドーマ細胞株A4-4A6-18により産生されるモノクローナル抗体ACI-35-4A6-Ab1の重鎖可変領域(VH)のヌクレオチド配列を示す。

10

配列番号85は、ハイブリドーマ細胞株A4-4A6-18により産生されるモノクローナル抗体ACI-35-4A6-Ab1の軽鎖可変領域(VK)のヌクレオチド配列を示す。

配列番号86は、ハイブリドーマ細胞株A6-1D2-12により産生されるモノクローナル抗体ACI-35-1D2-Ab1の重鎖可変領域(VH)のヌクレオチド配列を示す。

配列番号87は、ハイブリドーマ細胞株A6-1D2-12により産生されるモノクローナル抗体ACI-35-1D2-Ab1の軽鎖可変領域(VK)のヌクレオチド配列を示す。

配列番号88は、ハイブリドーマ細胞株A4-2A1-18、A4-2A1-40及びA4-4A6-48によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-2A1-Ab2、及びACI-35-4A6-Ab2のそれぞれの重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列を示す。

20

配列番号89は、モノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-2A1-Ab2、ACI-35-4A6-Ab2、ACI-35-2G5-AB2及びACI-35-2G5-AB3のそれぞれの重鎖可変領域(VH)のCDR1のアミノ酸配列を示す。

配列番号90は、モノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-2A1-Ab2、及びACI-35-4A6-Ab2のそれぞれの重鎖可変領域(VH)のCDR2のアミノ酸配列を示す。

30

配列番号91は、モノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-2A1-Ab2、ACI-35-4A6-Ab2、ACI-35-2G5-AB2及びACI-35-2G5-AB3のそれぞれの重鎖可変領域(VH)のCDR3のアミノ酸配列を示す。

配列番号92は、ハイブリドーマ細胞株A4-2A1-40により産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab2の軽鎖可変領域(VK)のアミノ酸配列を示す。

配列番号93は、モノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab2の軽鎖可変領域(VK)のCDR1のアミノ酸配列を示す。

配列番号94は、モノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab2の軽鎖可変領域(VK)のCDR2のアミノ酸配列を示す。

40

配列番号95は、モノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab2の軽鎖可変領域(VK)のCDR3のアミノ酸配列を示す。

配列番号96は、ハイブリドーマ細胞株A6-2G5-08により産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2G5-Ab1の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列を示す。

配列番号97は、ハイブリドーマ細胞株A6-2G5-08により産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab2の軽鎖可変領域(VK)のアミノ酸配列を示す。

配列番号98は、モノクローナル抗体ACI-35-2G5-Ab1の重鎖可変領域(VH)の

50

VH)のCDR1のアミノ酸配列を示す。

配列番号99は、モノクローナル抗体ACI-35-2G5-Ab1の重鎖可変領域(VH)のCDR2のアミノ酸配列を示す。

配列番号100は、モノクローナル抗体ACI-35-2G5-Ab1の重鎖可変領域(VH)のCDR3のアミノ酸配列を示す。

配列番号101は、モノクローナル抗体ACI-35-2G5-Ab1の軽鎖可変領域(VK)のCDR1のアミノ酸配列を示す。

配列番号102は、モノクローナル抗体ACI-35-2G5-Ab1の軽鎖可変領域(VK)のCDR2のアミノ酸配列を示す。

配列番号103は、モノクローナル抗体ACI-35-2G5-Ab1の軽鎖可変領域(VK)のCDR3のアミノ酸配列を示す。

配列番号104は、ハイブリドーマ細胞株A6-2G5-30及びA6-2G5-41によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2G5-AB2及びACI-35-2G5-AB3のそれぞれの重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列を示す。

配列番号105は、ハイブリドーマ細胞株A6-2G5-30及びA6-2G5-41によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2G5-AB2及びACI-35-2G5-AB3のそれぞれの軽鎖可変領域(VK)のアミノ酸配列を示す。

配列番号106は、モノクローナル抗体ACI-35-2G5-AB2及びACI-35-2G5-AB3のそれぞれの軽鎖可変領域(VK)のCDR1のアミノ酸配列を示す。

配列番号107は、モノクローナル抗体ACI-35-2G5-AB2及びACI-35-2G5-AB3のそれぞれの軽鎖可変領域(VK)のCDR2のアミノ酸配列を示す。

配列番号108は、モノクローナル抗体ACI-35-2G5-AB2及びACI-35-2G5-AB3のそれぞれの軽鎖可変領域(VK)のCDR3のアミノ酸配列を示す。

配列番号109は、ハイブリドーマ細胞株A4-2A1-18、A4-2A1-40及びA4-4A6-48によりそれぞれ産生されたモノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab1、ACI-35-2A1-Ab2、及びACI-35-4A6-Ab2の重鎖可変領域(VH)のヌクレオチド配列を示す。

配列番号110は、ハイブリドーマ細胞株A4-2A1-40により産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab2の軽鎖可変領域(VK)のヌクレオチド配列を示す。

配列番号111は、ハイブリドーマ細胞株A6-2G5-08により産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2G5-AB1の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列を示す。

配列番号112は、ハイブリドーマ細胞株A6-2G5-08により産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2G5-AB1の軽鎖可変領域(VK)のヌクレオチド配列を示す。

配列番号113は、ハイブリドーマ細胞株A6-2G5-30及びA6-2G5-41によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2G5-AB2及びACI-35-2G5-AB3のそれぞれの重鎖可変領域(VH)のヌクレオチド配列を示す。

配列番号114は、ハイブリドーマ細胞株A6-2G5-30及びA6-2G5-41によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2G5-AB2及びACI-35-2G5-AB3のそれぞれの軽鎖可変領域(VK)のヌクレオチド配列を示す。

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

配列番号116は、ハイブリドーマ細胞株A4-2A1-18により産生されるモノクローナル抗体ACI-35-2A1-Ab1の軽鎖可変領域(VK)のアミノ酸配列を示す。

10

20

30

40

50

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

配列番号 118 は、ハイブリドーマ細胞株 A4 - 4A6 - 48 により産生されるモノクローナル抗体 ACI - 35 - 4A6 - Ab2 の軽鎖可変領域 (VK) のアミノ酸配列を示す。

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

配列番号 120 - 221 は、VH/VK フォワード及びリバースプライマーのヌクレオチド配列を示す。

【0146】

用語の定義

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書で用いる場合、互換的であり、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸で構成される生体分子を意味するものと定義される。

【0147】

「ペプチド」又は「結合ペプチド」という用語は、本明細書中で互換的に使用され、その炭素が、1つのアミノ酸の炭素のカルボキシル基と別のアミノ酸の炭素のアミノ基とのあいだの縮合反応によって形成されるペプチド結合を通して連結されるアミノ酸 (典型的に L - アミノ酸) の鎖を指す。鎖の1つの端部 (すなわち、アミノ末端) での末端アミノ酸は、遊離のアミノ基を有し、鎖の他の端部 (すなわち、カルボキシ末端) の末端アミノ酸は、遊離のカルボキシル基を有する。そのため、「アミノ末端」(N - 末端と省略される) という用語は、ペプチドのアミノ末端のアミノ酸上の遊離のアミノ基、またはペプチド内の他の任意の位置でのアミノ酸のアミノ基 (ペプチド結合に関与する場合にはイミノ基) を指す。同様に、「カルボキシ末端」(C - 末端と省略される) という用語は、ペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸上の遊離のカルボキシル基、またはペプチド内の他の任意の位置でのアミノ酸のカルボキシル基を指す。結合ペプチドは、本明細書に定義されるような、例えば、ポリクローナル又はモノクローナル抗体、ヒト又はヒト化抗体、ダイアボディー、ラクダ科動物抗体などの抗体、又はそれらの機能性部分を構成し得る。

【0148】

本明細書において用いられる「その断片」または「断片」という用語は、本明細書において定義されるペプチド (たとえばそれぞれ、表1の配列番号59 - 66に示されるように) と本質的に同じ (生物学的) 活性を有する機能的ペプチド断片を指し、すなわち該断片は、生物において、具体的には動物において、具体的には哺乳動物またはヒトにおいて、非常に有効で、タウオパチーまたはタウオパチーに関連する症状を予防または緩和することができる、非常に特異的で、具体的にはコンフォメーション特異的免疫応答をなおも誘発することができる。特に、前記断片は本明細書において用いられ、定義されるタウペプチドの特異的病理学的リン酸化エピトープまたは複数のエピトープをなおも含有する。

【0149】

典型的に、ペプチドを構成するアミノ酸は、アミノ末端から開始してペプチドのカルボキシ末端に向かう方向に増加する番号が順につけられる。このように、1つのアミノ酸が別のアミノ酸の「次である」と言われる場合、そのアミノ酸は、先行アミノ酸よりペプチドのカルボキシ末端により近くに位置する。

【0150】

「残基」という用語は、本明細書においてアミド結合によってペプチドに組み入れられるアミノ酸を指すために用いられる。そのため、アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸であってもよく、またはそれ以外で限定される場合を除き、天然に存在するアミノ酸と類似のように機能する天然のアミノ酸の公知のアナログ (すなわち、アミノ酸模倣体) を包含

10

20

30

40

50

してもよい。更に、アミド結合模倣体には、当業者に周知のペプチド骨格改変が含まれる。

【0151】

「本質的にからなる」という語句は、本明細書において、その句が指すペプチドの本質的な特性を実質的に変化させるであろういかなるエレメントも除外するために用いられる。このように、「～から本質的になる」ペプチドという記載は、そのペプチドの生物学的活性を実質的に変化させるであろういかなるアミノ酸置換、付加、又は欠失も除外する。

【0152】

更に、当業者は、先に言及したように、コードされる配列における1つのアミノ酸又は小さい割合のアミノ酸（典型的に5%未満、より典型的に1%未満）を変化、付加、又は欠失させる個々の置換、欠失、又は付加が、その変化によってあるアミノ酸が化学的に類似のアミノ酸へ置換される保存的に改変された変異体であると認識するであろう。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換の表が、当技術分野において周知である。以下の6つの群は、各々が互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する：

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

【0153】

「単離された」又は「生物学的に純粋な」という語句は、その天然の状態で見いだされる場合にそれが通常伴う成分を実質的に又は本質的に含まない材料を指す。このように、本明細書に記載するペプチドは、そのインサイツ環境に通常会合する材料を含有しない。典型的に、本明細書に記載する単離された免疫原性ペプチドは、銀染色ゲル上でのバンド強度によって測定した場合に、少なくとも約80%純粋、通常、少なくとも約90%、及び好ましくは少なくとも約95%純粋である。

【0154】

タンパク質の純度または均一性は、タンパク質試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動の後に染色による可視化などの当技術分野において周知の多数の方法によって示される可能性がある。目的によっては、高い解像度が必要であり、精製のためにHPLCまたは類似の手段が利用されるであろう。

【0155】

免疫原性ペプチドの長さが比較的短い場合（すなわち、アミノ酸約50個未満）、それらはしばしば、標準的な化学的ペプチド合成技術を用いて合成される。

【0156】

配列のC-末端アミノ酸を不溶性の支持体に付着させた後、配列における残りのアミノ酸を連続的に付加する固相合成は、本明細書に記載する免疫原性ペプチドを化学合成するために好ましい方法である。固相合成技術は当業者に公知である。

【0157】

または、本明細書に記載する免疫原性ペプチドは、組み換え型核酸方法論を用いて合成される。一般的に、これは、ペプチドをコードする核酸配列を作製すること、特定の 프로모ーターの制御下で発現カセットの中に核酸を入れること、宿主においてペプチドを発現させること、発現されたペプチドまたはポリペプチドを単離すること、及び必要であればペプチドを再生することを伴う。そのような手順を通して当業者を誘導するために十分な技術が文献において見いだされる。

【0158】

発現された後、組み換え型ペプチドを、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等が含まれる標準的な手順に従って精製することができる。約50%～95%均一性の実質的に純粋な組成物が好ましく、治療薬として

10

20

30

40

50

用いるためには80%~95%又はそれより高い均一性が最も好ましい。

【0159】

当業者は、化学合成、生物学的発現または精製後、免疫原性ペプチドが構成成分ペプチドの本来のコンフォメーションとは実質的に異なるコンフォメーションを有する可能性があることを認識するであろう。この場合、抗増殖性ペプチドを変性させて還元し、その後ペプチドを好ましいコンフォメーションにリフォールドさせることがしばしば必要である。タンパク質を還元および変性させて、リフォールディングを誘導する方法は、当業者に周知である。

【0160】

精製タンパク質の抗原性は、たとえば免疫血清との反応、またはタンパク質そのものに対して産生された抗血清との反応を実証することによって確認してもよい。

10

【0161】

本明細書で用いる「1つ(a)」、「1つ(an)」、および「その(the)」という用語は、「1つまたは複数の」を意味し、文脈が不適切である場合を除き、複数を含むものと定義される。

【0162】

本明細書で用いる「検出すること」又は「検出された」という用語は、免疫化学的方法または組織学的方法といった生体分子の検出のための公知の方法を用いることを意味し、調査中の生体分子の存在又は濃度を質的又は量的に決定することを指す。

20

【0163】

「単離された」とは、それが天然に起こる成分の少なくとも幾つかを含まない生物学的分子を意味する。

【0164】

本明細書において用いられる「抗体」、「複数の抗体」、又は「その機能性部分」という用語は、当技術分野において認識される用語であり、公知の抗原に、具体的には免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分に結合する分子または分子の活性断片、すなわち抗原に免疫特異的に結合する結合部位を含有する分子を指すと理解される。本発明に従う免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子の任意のタイプ(IgG、IgM、IgD、IgE、IgAおよびIgY)またはクラス(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2)もしくはサブクラスの免疫グロブリン分子でありうる。

30

【0165】

「抗体」は、本発明の範囲内において、モノクローナル抗体、ポリクローナル、キメラ、一本鎖、二重特異性、サル化、ヒト、及びヒト化抗体、並びにその活性断片が含まれると意図される。公知の抗原に結合する分子の活性断片の例には、Fab免疫グロブリン発現ライブラリ及び先に言及した抗体および断片のいずれかのエピトープ結合断片の生成物が含まれる、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片が含まれる。

【0166】

これらの活性断片は、多数の技術によって本発明の抗体から誘導されうる。たとえば、精製モノクローナル抗体を、ペプシンなどの酵素によって切断して、HPLCゲル濾過に供することができる。続いて、Fab断片を含む適切な画分を収集して、膜濾過などによって濃縮することができる。抗体の活性断片の単離についての一般的な手法に関する更なる記述については、例えば、Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986を参照のこと。

40

【0167】

「ヒト化抗体」は、非ヒトドナー免疫グロブリンに由来するそのCDRと、1つ(または複数)のヒト免疫グロブリンに由来する分子の残りの免疫グロブリン由来部分とを有する操作抗体のタイプを指す。

【0168】

ヒト化抗体はさらに、そのフレームワーク領域の1つまたは複数がヒトまたは霊長類ア

50



ミノ酸を有する可変領域を有する抗体を指してもよい。その上、フレームワーク支持体残基を、結合親和性を保存するように変更してもよい。「ヒト化抗体」を得る方法は、当業者に周知である（たとえば、Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991) を参照されたい）。

【0169】

「ヒト化抗体」はまた、たとえばウサギなどの大きい動物における親和性成熟ヒト様ポリクローナル抗体の産生を可能にする新規遺伝子工学アプローチによって得てもよい (<http://www.rcitech.com/bioventures/therapeutic.php>)。

【0170】

「完全ヒト抗体」又は「ヒト抗体」なる用語は、ヒト抗体遺伝子を運ぶトランスジェニックマウス由来又はヒト細胞由来の抗体を指すことを意味する。しかし、ヒト免疫系に対しては、「完全ヒト」、「ヒト」、及び「ヒト化」抗体の間の相違は無視し得るかあるいは存在せず、そういうわけで3つ全でが等しい有効性と安全性であり得る。

10

【0171】

「モノクローナル抗体」という用語はまた、当技術分野において十分に認識されており、1つのクローンから実験室において大量に産生され、かつ1つの抗原のみを認識する抗体を指す。モノクローナル抗体は、典型的に、通常の短命な抗体産生B細胞を、癌細胞（時に「不死化」細胞と呼ばれる）などの急速に生育する細胞に融合させることによって作製される。得られたハイブリッド細胞またはハイブリドーマは、迅速に増倍して、大量の抗体を産生するクローンを作製する。

20

【0172】

「抗原」という用語は、生物、具体的には動物、より具体的にはヒトが含まれる哺乳動物において免疫応答を誘導することができる実体またはその断片を指す。この用語には、免疫源及び抗原性の原因である領域または抗原決定基が含まれる。

【0173】

本明細書で用いる場合、「可溶性」という用語は、水溶液に部分的または完全に溶解することを意味する。

【0174】

また本明細書で用いるように、「免疫原性」という用語は、免疫原に対する抗体、T細胞、および他の反応性免疫細胞の産生を誘発または増強し、かつヒトまたは動物における免疫応答に關与する物質を指す。

30

【0175】

免疫応答は、処置すべき障害を和らげるまたは緩和するために、投与された本発明の免疫原性組成物に対して、個体が十分な抗体、T細胞、および他の反応性免疫細胞を産生する場合に起こる。

【0176】

「ハイブリドーマ」という用語は、抗体産生細胞と不死化細胞、たとえば多発性骨髄腫細胞との融合によって産生された細胞を指すと、当技術分野において認識され、当業者によって理解される。このハイブリッド細胞は、抗体を連続的に供給することができる。融合法のより詳細な説明に関しては、先の「モノクローナル抗体」の定義および以下の実施例を参照されたい。

40

【0177】

本明細書において用いられる「担体」という用語は、抗原性ペプチドまたは超分子構築物が組み入れられるかまたは会合し、それによってヒトまたは動物の免疫系に抗原性ペプチドまたはペプチドの一部を提示または曝露する構造を意味する。たとえば小胞、粒子、または微粒子体などの、動物またはヒトの治療において適切に用いることができるいかなる粒子も、本発明の文脈において担体として用いてもよい。

【0178】

「担体」という用語はさらに、抗原性ペプチドを含む超分子抗原性構築組成物が送達機序によって所望の部位に輸送され得る送達法を含む。そのような送達系の一例は、金コロ

50

イドなどのコロイド金属を利用する。

【0179】

本発明の超分子抗原性構築組成物において用いることができる担体タンパク質には、マルトース結合タンパク質「MBP」；ウシ血清アルブミン「BSA」；キーホールリンペットヘモシアニン「KLH」；卵アルブミン；フラゲリン；サイログロブリン；任意の種の血清アルブミン；任意の種のグロブリン；同系細胞；Ia抗原を有する同系細胞；およびD-および/またはL-アミノ酸のポリマーが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0180】

更に、用語「治療的に機能的な量 (therapeutically functional amount)」又は「薬学的有効量」とは、ヒトまたは動物に投与された場合に、ヒトまたは動物で治療的效果をもたらすのに十分である、結合ペプチドの量を指す。有効量は、日常的な手順に従って当業者により容易に決定される。

【0181】

「pTau PHF」、「PHF」、「対らせん状細線維」は本明細書中で同義的に使用され、電子顕微鏡で見える160nmでの周期でらせん状に巻かれた約10nmのフィラメントのペアを指す。幅は10~22nmの間で異なる。PHFは、アルツハイマー病(AD)及び神経網スレッドの神経原線維変化において優勢な構造である。PHFはまた、老人斑に関連付けられた幾つかの、すべてではないが、ジストロフィー神経突起に見られる場合がある。PHFの主要成分は、微小管結合タンパク質タウの高リン酸化型である。PHFは、ジスルフィド結合した反平行過リン酸化タウ蛋白質で構成されている。PHFタウは、そのC-末端20アミノ酸残基について切断されうる。PHF形成に潜在するメカニズムは不明であるが、タウの過リン酸化がそれを微小管から解放し、タウの可溶性プールを増やす可能性がある。

【0182】

本発明の範囲において、本発明に従う抗原性組成物に対する抗体誘導応答は大半がT細胞非依存的であることが証明された。この点に関してヌードマウスモデルを用いて、ヌードマウスにワクチンを接種して、免疫したヌードマウスにおいて本発明に従う抗原性組成物によって誘導されたA 特異的抗体応答を評価するために抗体応答を測定した。ヌードマウスはFoxn1nu変異を有し、その結果適した胸腺の欠如によりT細胞機能が低減されている。

【0183】

本明細書において用いられる「薬学的有効量」は、処置される疾患、障害、もしくは状態、またはそれに関連する任意の合併症の症状を治癒する、または少なくとも部分的に停止させるために適切な薬学的組成物中の活性成分の用量を指す。

【0184】

本発明は、タウタンパク質の主要な病理学的リン酸化エピトープを認識して結合する結合ペプチドを提供する。特に、本発明は、ADを含むタウオパチーにおいてシナプス及び神経毒性に関与すると考えられている、タンパク質タウにおいて、線状及び立体構造的、単一及び複合体のリン酸化エピトープを提供する。

【0185】

従って、本発明は、一実施態様において、結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分に関し、その結合ペプチド又は抗体は、哺乳動物、特にヒトタウタンパク質又はその断片のリン酸化エピトープ、特に病的タンパク質タウのコンフォーマーを認識し、特異的に結合するが、しかし一実施態様では、対応する非リン酸化エピトープ及び/又は関連しないエピトープに結合せず、ここで、前記結合ペプチド又は抗体は、少なくとも10nM、特に少なくとも8nM、特に少なくとも5nM、特に少なくとも2nM、特に少なくとも1nM、特に少なくとも500pM、特に少なくとも400pM、特に少なくとも300pM、特に少なくとも200pM、特に少なくとも100pM、特に少なくとも50pMの解離定数を持ち、高い結合親和性を有する

10

20

30

40

50

。

本明細書で用いられる場合「可溶性タウ」タンパク質は、完全可溶化タウタンパク質/ペプチドのモノマーの両方、又はタウ様ペプチド/タンパク質、又は修飾型又は切断型タウペプチド/タンパク質、又はタウペプチド/タンパク質のモノマーの別の誘導体、及びタウタンパク質オリゴマーからなるタンパク質を指す。「可溶性タウ」は、特に神経原線維変化(NFT)を除外する。

【0186】

本明細書で使用される「不溶性タウ」は、インビトロで水溶性培地及びインビボで哺乳動物又はヒトの体の両方で、特に具体的には脳で不溶性であるオリゴマー又はポリマー構造を形成する、タウペプチド又はタンパク質、又はタウ様ペプチド/タンパク質、又は修飾又は切断されたタウペプチド/タンパク質、又はタウペプチド/タンパク質の別の誘導体の複数の凝集モノマーを指すが、具体的には、哺乳動物又はヒトの体で、特に具体的には脳で不溶性である、タウ、又は修飾又は切断されたタウペプチド/タンパク質、又はそれらの誘導体の複数の凝集モノマーをそれぞれ指す。

10

【0187】

「不溶性タウ」は、特に神経原線維変化(NFT)を含む。

【0188】

本明細書で使用される「モノマーのタウ」又は「タウモノマー」は、水溶性培地で凝集複合体無しに完全に可溶化したタウタンパク質を指す。

【0189】

「凝集タウ」、「オリゴマータウ」及び「タウオリゴマー」は、インビトロで水溶性培地及びインビボで哺乳動物又はヒトの体の両方で、特に具体的には脳で不溶性又は可溶性であるオリゴマー又はポリマー構造を形成する、タウペプチド又はタンパク質、又はタウ様ペプチド/タンパク質、又は修飾又は切断されたタウペプチド/タンパク質、又はタウペプチド/タンパク質の別の誘導体の複数の凝集モノマーを指すが、具体的には、哺乳動物又はヒトの体で、特に具体的には脳で不溶性又は可溶性である、タウ、又は修飾又は切断されたタウペプチド/タンパク質、又はそれらの誘導体の複数の凝集モノマーをそれぞれ指す。

20

【0190】

一実施態様において、本発明は、記載された実施態様の何れか一及び本明細書の請求項に記載される、結合ペプチド又はその機能性部分、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分、又は前記結合ペプチド又は抗体をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド、又はそれらの組み合わせを、薬学的に許容される担体と一緒に治療的有効量含有する薬学的組成物を提供する。

30

【0191】

適した薬学的担体、希釈剤および/または賦形剤は当技術分野で周知であり、これには例えば、リン酸緩衝食塩水、水、水中油型エマルジョンなどのエマルジョン、様々な種類の湿潤剤、滅菌溶液などが含まれる。

【0192】

抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分を含む本発明による結合ペプチドは、生理的に許容される製剤として調製することができ、かつ薬学的に許容される、担体、希釈剤、および/または賦形剤を公知の手法を用いて含んでもよい。例えば、任意の機能的に等価な結合ペプチドまたはその機能性部分を含む、本発明によるおよび本明細書に前述した通りの結合ペプチド、特に任意の機能的に等価な抗体またはその機能性部分を含むモノクローナル抗体を、薬学的に許容される、担体、希釈剤および/または賦形剤と混ぜ合わせて、治療用組成物を形成させる。適した薬学的担体、希釈剤および/または賦形剤は当技術分野で周知であり、これには例えば、リン酸緩衝食塩水、水、水中油型エマルジョンなどのエマルジョン、様々な種類の湿潤剤、滅菌溶液などが含まれる。

40

【0193】

本発明による薬学的組成物の製剤化は、当技術分野で公知の標準的な方法に従って達成

50

することができる。

【0194】

本発明の組成物を、適した薬学的有効量で固体、液体、またはエアロゾルの形態で被験体に投与することができる。固体組成物の例には、丸剤、クリーム、および埋め込み型の投薬単位が含まれる。丸剤は経口的に投与することができる。治療用のクリームは局所的に投与することができる。埋め込み型の投薬単位は、局所的に、例えば腫瘍部位に投与することもでき、または治療用組成物の全身的な放出を目的として、例えば皮下に埋め込むことができる。液体組成物の例には、筋肉内、皮下、静脈内、動脈内への注射に適した製剤、及び局所投与用および眼内投与用の製剤が含まれる。エアロゾル製剤の例には、肺への投与を目的とした吸入用製剤が含まれる。

10

【0195】

組成物を、標準的な投与経路によって投与することができる。一般に、組成物は、局所経路、経口経路、直腸内経路、鼻内経路、皮内経路、腹腔内経路、または非経口的な（例えば、静脈内、皮下もしくは筋肉内）経路で投与することができる。

【0196】

加えて、組成物を、送達が望まれる部位、例えば腫瘍部位の近傍に埋め込まれる重合体である生分解性重合体などの徐放性マトリックス中に組み入れることもできる。本方法は、単回投与、所定の間隔での反復投与、および所定の期間にわたる持続的投与を含む。本明細書で用いる場合、徐放性マトリックスは、酵素もしくは酸/塩基による加水分解によってまたは溶解によって分解する材料、通常は重合体でできたマトリックスである。このようなマトリックスは、身体内に挿入されると、酵素および体液の働きによる作用を受ける。徐放性マトリックスは望ましくは、リポソーム、ポリラクチド（ポリ乳酸）、ポリグリコリド（グリコール酸の重合体）、ポリラクチドコ-グリコリド（乳酸とグリコール酸の共重合体）、ポリ無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、硫酸コンドロイチン、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、多糖、核酸、ポリアミノ酸、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシンなどのアミノ酸、ポリヌクレオチド、ポリビニルプロピレン、ポリビニルピロリドン、およびシリコーンなどの、生体適合性を有する材料から選択される。好ましい生分解性マトリックスは、ポリラクチド、ポリグリコリド、またはポリラクチドコ-グリコリド（乳酸とグリコール酸の共重合体）のうちいずれか1つのマトリックスである組成物の用量が、例えば、処置される状態、用いる特定の組成物といった様々な要因、ならびに、患者の体重、サイズ、性別および全般的健康状態、体表面積、投与しようとする特定の化合物または組成物、同時に投与する他の薬剤および投与の経路といった他の臨床的因子に依存すると考えられることは、当業者には周知である。

20

30

【0197】

本発明による組成物は、例えば、アルツハイマー病に關与するアミロイド タンパク質などのアミロイドタンパク質またはアミロイド様タンパク質と関連のある一群の疾患および障害であるタウオパチー及び/又はアミロイドーシスの薬物療法に用いられる公知の化合物などの生物活性物質又は化合物を含む他の組成物と併用して投与され得る。

【0198】

他の生物活性物質または化合物は、その生物学的効果を、本発明による治療ワクチンと同じもしくは類似の機序によって発揮してもよく、または関係のない作用機序によって、または複数の関係のあるおよび/もしくは関係のない作用機序によって発揮してもよい。

40

【0199】

一般に、他の生物活性化合物には、ニューロン伝達賦活薬、精神治療薬、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬、カルシウムチャネル拮抗薬、生体アミン、ベンゾジアゼピン系精神安定剤、アセチルコリンの合成、貯蔵または放出の賦活薬、アセチルコリンシナプス後受容体アゴニスト、モノアミンオキシダーゼ-Aまたは-Bの阻害薬、N-メチル-D-アスパラギン酸グルタミン酸受容体アンタゴニスト、非ステロイド性抗炎症薬、抗酸化剤、およびセロトニン作動性受容体アンタゴニストが含まれる。

50

## 【0200】

酸化ストレスに対する化合物、抗アポトーシス化合物、金属キレート剤、ピレンゼピンおよび代謝産物などのDNA修復の阻害薬、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸(3APS)、1,3-プロパンジスルホナート(1,3PDS)、セクレターゼ活性化剤、  
- および - セクレターゼ阻害薬、タウタンパク質、神経伝達物質、ノ3-シート破壊物質(breaker)、抗炎症性分子、クロザピン、ジブラシドン、リスペリドン、アリピプラゾール又はオランザピンなどの「非定型抗精神病薬」、またはタクリン、リバスチグミン、ドネペジル、及びノ又はガランタミンなどのコリンエステラーゼ阻害薬(ChEI)、および他の薬物ならびに栄養補給剤、例えば、ビタミンB12、システイン、アセチルコリンの前駆体、レシチン、コリン、イチョウ、アセチル-L-カルニチン、イデベ

10

## 【0201】

更なる実施態様において、本発明による組成物は、抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明による結合ペプチドと共にナイアシンまたはメマンチンを、ならびに任意で、薬学的に許容される担体およびノまたは希釈剤およびノまたは賦形剤を含みうる。

20

## 【0202】

本発明のさらに別の実施態様においては、抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明による抗体とともに、幻覚、妄想、思考障害(顕著な思考散乱、脱線、脱線思考が認められる)および奇態または混乱した行動、ならびに快感消失、感情鈍麻、無気力および社会的引きこもりを含む陽性および陰性の精神病症状の治療のための、例えばクロザピン、ジブラシドン、リスペリドン、アリピプラゾール、またはオランザピンなどの「非定型抗精神病薬」を、ならびに任意で、薬学的に許容される担体及びノ又は希釈剤及びノ又は賦形剤を含む、混合物が提供される。

30

## 【0203】

本発明による結合ペプチドに加えて混合物中で好適に用いることができるその他の化合物は、例えば、国際公開第2004/058258号(特に頁16-17を参照)に記載されており、これには治療薬標的(頁36-39)、アルカンサルホン酸およびアルカノール硫酸(頁39-51)、コリンエステラーゼ阻害薬(頁51-56)、NMDA受容体アンタゴニスト(頁56-58)、エストロゲン(頁58-59)、非ステロイド性抗炎症薬(頁60-61)、抗酸化剤(頁61-62)、ペルオキシソーム増殖活性化受容体(PPAR)アゴニスト(頁63-67)、コレステロール低下薬(頁68-75);アミロイド阻害薬(頁75-77)、アミロイド形成阻害薬(頁77-78)、金属キレート剤(頁78-79)、抗精神病薬および抗鬱薬(頁80-82)、栄養補給物質(頁83-89)ならびに脳内での生物活性物質の生物学的利用能を高める化合物(頁89-93参照)およびプロドラッグ(頁93および94)が含まれ、この文書は参照により、特に上記の頁に述べられた化合物が本明細書に組み入れられる。

40

## 【0204】

タンパク質性の薬学的活性物質は、1回の用量当たり1ng~10mgの量で存在してよい。一般に、投与レジメンは、本発明による抗体が、0.1μg~10mgの範囲、特に1.0μg~1.0mgの範囲、より特に1.0μg~100μgの範囲にあるべきであり、これらの範囲内にあるすべての個々の数も同じく本発明の一部である。投与が連続注入によって行われる場合には、より適切な用量は、体重1kgおよび1時間当たり0.01μg~10mgの範囲にあってよく、これらの範囲内にあるすべての個々の数も同じく本発明の一部である。

## 【0205】

投与は一般に非経口的、例えば静脈内であると考えられる。非経口的投与のための製剤

50

には、滅菌された水性または非水性溶液、懸濁液およびエマルジョンが含まれる。非水性溶媒には、限定されないが、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機酸エステルが含まれる。水性溶媒には、食塩液および緩衝媒質を含む、水、アルコール性/水性溶液、エマルジョンまたは懸濁液が含まれる。非経口用媒体には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース、および塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、または固定油が含まれる。静脈内用媒体には、液体および栄養分の補充液、電解質補充液（リンゲルデキストロース液を基にしたものなど）などが含まれる。例えば、抗菌薬、抗酸化物質、キレート剤および不活性ガスなどの、保存料もまた存在してもよい。

#### 【0206】

薬学的組成物はさらに、例えば、血清アルブミンまたは免疫グロブリン、特にヒト由来のものなどのタンパク質性担体を含んでもよい。本発明の薬学的組成物中に、さらなる生物活性物質が、その意図した用途に応じて存在してもよい。

#### 【0207】

結合標的が脳に位置しているとき、本発明の特定の実施態様では、血液脳関門を通過するための抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明による結合ペプチドを提供する。特定の神経変性疾患は、抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明による結合ペプチドが容易に脳に導入することができるような、血液脳関門の透過性の増加と関連している。血液脳関門が無傷のままの場合、それを通過して分子を輸送するために、幾つかの当該技術分野で知られたアプローチが存在し、限定されないが、物理的方法、脂質に基づく方法、及び受容体及びチャネルに基づく方法を含む。

#### 【0208】

血液脳関門を通過して、抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明による結合ペプチドを輸送する物理的方法として、限定されないが、完全に血液脳関門を迂回するか、又は血液脳関門の開口部を作成することを含む。迂回方法としては、限定されないが、脳内に直接注射（例えば、Papanastassiou et al., Gene Therapy 9:398-406 (2002)を参照）、及び脳内送達装置の移植（例えば、Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003); 及び Gliadel Wafers(TM), Guildford Pharmaceuticalを参照）を含む。関門の開口部を作成するための方法としては、限定されないが、超音波（例えば、米国特許出願公開第2002/0038086号）、浸透圧（高張性マンニトールの投与による（Neuwelt, E.A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, vols. 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)））、例えば、プラジキニン又は透過処理装置 A - 7 による透過処理（例えば、米国特許第5,112,596号、第5,268,164号、第5,506,206号、及び第5,686,416号）、及び結合ペプチドはその抗原結合断片をコードする遺伝子を含むベクターを用いた、血液脳関門をまたぐ神経細胞のトランスフェクション（例えば、米国特許出願公開第2003/0083299号）を含む。

#### 【0209】

血液脳関門を通過して、抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明による結合ペプチドを輸送する脂質に基づく方法として、血液脳関門の血管内皮上の受容体に結合する抗体結合断片と共役しているリポソームの中に抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明による結合ペプチドをカプセル化すること（例えば、米国特許出願公開第20020025313号参照）、および低密度リポタンパク質粒子（例えば、米国特許出願公開第20040204354号参照）またはアポリポタンパク質 E（例えば、米国特許出願公開第20040131692号参照）の中に抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明による結合ペプチドをコーティングすることが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0210】

血液脳関門を通過して、抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性部分を含む本発明に記載される結合ペプチドを輸送する受容体及びチャネルに基づく方法としては、限定

10

20

30

40

50

されないが、血液脳関門の透過性を高めるためにグルココルチコイドブロッカーを使用すること（例えば、米国特許出願公開第2002/0065259号、第2003/0162695号及び第2005/0124533号）、カリウムチャネルを活性化すること（例えば、米国特許出願公開第2005/0089473号を参照）、トランスフェリンで抗体をコーティングし、一以上のトランスフェリン受容体の活性を調節すること（例えば、米国特許出願公開第2003/0129186号参照）、及び抗体をカチオン化すること（例えば、米国特許第5,004,697号参照）を含む。

#### 【0211】

抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明による結合ペプチドの単回又は反復投与、又は本発明による薬学的組成物は被験体に長期間にわたって与えられ得る。投与期間は1週間と最大12ヶ月以上の間であってもよい。この期間、結合ペプチド、抗体又は薬学的組成物は、週1回、2週間毎、3週間毎、4週間毎など、又は治療される被験体の要求に依存して、より高頻度もしくは低頻度で投与され得る。

10

#### 【0212】

更なる実施態様において、本発明は、アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクサー痴呆、ダウン症候群、ゲルストマン-シュトロイスラー-シャインカー病、封入体筋炎、およびプリオンタンパク質脳アミロイド血管障害、外傷性脳損傷を含むがこれらに限定されないタウとアミロイド病理の共存を示す疾患又は障害、及び更に、筋萎縮性側索硬化症/グアムのパーキンソニズム-認知症複合、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、第17染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン-スパッツ病、多系統萎縮症、C型ニーマン-ピック病、淡蒼球-橋-黒質変性(Pallido-ponto-nigral degeneration)、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィーを含むがこれらに限定されない、明確なアミロイド病理を示さない更なる疾患又は障害を含む神経変性疾患又は障害の不均一な群を含む、タウタンパク質関連疾患、障害又は病態の検出及び診断のための方法とキットを提供する。病理学的な異常は、タウオパチーで脳における優勢な病理である神経原線維の形成によって引き起こされる又は関連付けることができる。

20

#### 【0213】

更に、本発明は、タウとアミロイド病理の共存を示す疾患または障害を含む、神経変性疾患または障害の不均一な群を含むタウオパチーなどの神経変性疾患または障害を含むタウタンパク質に関連した疾患、障害、又は状態の素因を診断するための、又は患者の微小残存疾患(minimal residual disease)を監視するため、又は本発明に記載されるような本発明による抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片、又は組成物を含む本発明に係る結合ペプチドによる治療に対する患者の応答を予測するための方法とキットを提供する。これらの方法には、生物試料中の、またはインサイツ条件における物質を検出または定量するために一般に用いられる公知の免疫学的方法が含まれる。

30

#### 【0214】

タウおよびアミロイド病理の共存を示す疾患または障害を含む神経変性疾患または障害の不均一な群を含む、タウオパチーなどの神経変性疾患又は障害を含み、タウタンパク質に関連した疾患又は状態の診断、又はそれを必要としている被験体、特に哺乳動物、より具体的にはヒトにおけるタウタンパク質に関連した疾患又は状態の素因の診断は、本発明の結合ペプチド、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片の、サンプル中又はインサイツにおいてタウタンパク質に対する免疫特異的結合を検出することによって達成されてもよく、タウタンパク質を含むことが疑われるサンプル又は特定の身体部分もしくは身体部位を、タウタンパク質のエピトープと結合する抗体と接触させる段階、抗体をアミロイド抗原と結合させて免疫複合体を形成させる段階、免疫複合体の形成を検出する段階、および、試料または特定の身体部分もしくは部位における、免疫複合体の有無とタ

40

50

ウタンパク質の有無とを相関づける段階、任意で前記免疫複合体の量を正常対照値と比較する段階が含まれ、該免疫複合体の量が正常対照値と比較して多いことにより、該患者がタウタンパク質に関連した疾患または状態に罹患していること、またはそれを発症するリスクを有することが示される。

【0215】

抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明による結合ペプチド又は本発明による組成物による治療後の、被験体、特に哺乳動物、より具体的にはヒトにおける微小残存病変の監視は、本発明の結合ペプチド、特に抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片の、試料中の又はインサイツでのタウタンパク質のエピトープに対する免疫特異的結合を検出することにより達成されても良く、これにはタウタンパク質を含むことが疑われる試料または特定の身体部分もしくは身体部位を、抗体、特にモノクローナル抗体及びその断片を含み、タウタンパク質のエピトープに結合する本発明による結合ペプチドと接触させる段階、抗体、特にモノクローナル抗体及びその活性断片を含む本発明による結合ペプチドをタウタンパク質と結合させて免疫複合体を形成する段階、免疫複合体の形成を検出する段階、及び免疫複合体の有無を試料中又は特定の身体部分もしくは部位におけるタウタンパク質の有無と相関づける段階、任意で免疫複合体の量を正常対照値と比較する段階が含まれ、該免疫複合体の量が正常対照値と比較して多いことにより、該患者がなお微小残存病変に罹患していることが示される。

10

【0216】

抗体、特にモノクローナル抗体又はその活性断片を含む本発明による結合ペプチド又は本発明による組成物による治療後の、被験体、特に哺乳動物、より具体的にはヒトの応答性を予測することは、結合ペプチド、特にモノクローナル抗体又はその活性断片の、試料中の又はインサイツでのタウタンパク質のエピトープに対する免疫特異的結合を検出することにより達成されても良く、これにはタウタンパク質を含むことが疑われる試料または特定の身体部分もしくは身体部位を、抗体、特にモノクローナル抗体及びその断片を含み、タウタンパク質のエピトープに結合する本発明による結合ペプチドと接触させる段階、抗体、特にモノクローナル抗体及びその活性断片を含む本発明による結合ペプチドをタウタンパク質と結合させて免疫複合体を形成する段階、免疫複合体の形成を検出する段階、及び免疫複合体の有無を試料中又は特定の身体部分もしくは部位におけるタウタンパク質の有無と相関づける段階、任意で該免疫複合体の量を治療開始の前後で比較する段階が含まれ、該免疫複合体の量の減少は、該患者が治療に対して応答する可能性が高いことを示している。

20

30

【0217】

タウタンパク質に関連した疾患又は状態の診断において、タウ及びアミロイド病理の共存を示す疾患又は障害を含む神経変性疾患又は障害の不均一群を含むタウオパチーなどの神経変性疾患又は障害を含む、タウタンパク質に関連した疾患又は状態に対する素因を診断するため、又は患者における微小残存病変を監視するため、又は、抗体、特にモノクローナル抗体及びその活性断片を含む本発明による結合ペプチド又は本発明による組成物による本明細書に記載されるような治療に対する患者の応答性を予測するために使用され得る生物学的試料は、例えば、血清、血漿、唾液、胃液分泌物、粘液、脳脊髄液、リンパ液などの体液、又は、神経、脳、心臓又は血管組織などの生体から得られた組織又は細胞のサンプルである。

40

【0218】

試料中のタウタンパク質の有無を決定するためには、当業者に公知の任意のイムノアッセイ法、例えば、検出用の二次試薬を用いる間接的検出法を利用するアッセイ法、ELISAおよび免疫沈降および凝集アッセイ法を用いることができる。これらのアッセイ法の詳細な記述は、例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612、MaertensとStuyverに対する国際公開第96/13590号、Zrein et al. (1998)及び国際公開第96/29605号に与えられている。

50



## 【0219】

インサイツ診断のために、本発明による抗体、特にモノクローナル抗体及びその活性断片、又はその任意の活性および機能性部分が、当技術分野で公知の方法、例えば、静脈内、鼻腔内、腹腔内、大脳内、動脈内注射によって、本発明による抗体のアミロイドタンパク質のエピトープとの特異的結合が起こりうるように、診断しようとする生物に対して投与することができる。結合ペプチド/抗原複合体は、抗体、特にモノクローナル抗体又はその機能性断片を含む本発明による結合ペプチドに付着した標識を介して、又は任意の公知の検出方法によって好都合に検出することができる。

## 【0220】

診断用途において、又はタウ及びアミロイド病理の共存を示す疾患又は障害を含む神経変性疾患又は障害の不均一群を含むタウオパチーなどの神経変性疾患又は障害を含むタウタンパク質に関連した疾患又は状態の素因を診断するため、又は患者の微小残存病変を監視するため、又は、抗体、特にモノクローナル抗体及びその活性断片を含む本発明による結合ペプチド又は本発明による組成物による本明細書に記載されるような治療に対する患者の応答性を予測するための用途に用いられるイムノアッセイは、典型的には標識化抗原、結合ペプチド、又は検出用二次試薬に依存する。

10

## 【0221】

これらのタンパク質または試薬は、酵素、放射性同位体、ならびにコロイド金およびラテックスビーズなどの着色粒子を含むがこれらに限定されない蛍光性、発光性および発色性物質を含む、当業者に一般に知られた化合物で標識することができる。これらのうち、放射性同位体標識は、ほぼすべての種類のアッセイに用いることができ、バリエーションも非常に多い。酵素結合による標識は、放射能を避けなければならない場合または迅速な結果が求められる場合に特に有用である。蛍光色素は、用いるために高価な装置を必要とするが、極めて感度の高い検出方法を提供する。これらのアッセイにおいて有用な結合ペプチドは本明細書に開示され請求されるものであり、抗体、特にモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびアフィニティー精製されたポリクローナル抗体が含まれる。

20

## 【0222】

または、プロテインAもしくはGまたは第2の抗体などの、免疫グロブリンに対する親和性のある標識物質との反応によって、抗体、特にモノクローナル抗体及びその活性部分を含む本発明に記載される結合ペプチドを間接的に標識してもよい。抗体、特にモノクローナル抗体及びその活性部分を含む本発明に記載される結合ペプチドを第2の物質と結合させ、抗体と結合した第2の物質に対する親和性のある標識した第3の物質を用いて検出してもよい。例えば、抗体、特にモノクローナル抗体及びその活性部分を含む本発明に記載される結合ペプチドをビオチンと結合させ、標識したアビジンまたはストレプトアビジンを用いて結合ペプチド/ビオチンコンジュゲートを検出することができる。同様に、結合ペプチドをハプテンと結合させ、標識した抗ハプテン結合ペプチドを用いて結合ペプチド/ハプテンコンジュゲートを検出することもできる。

30

## 【0223】

当業者は、本発明に従って用いる上記および他の適した標識を把握していると考えられる。結合ペプチドまたはその断片に対するこれらの標識の結合は、当業者に公知の標準的な手法を用いて行うことができる。典型的な手法は、Kennedy, J. H., et al., 1976(Clin. Chim. Acta 70:1-31)およびSchurs, A. H. W. M., et al. 1977(Clin. Chim Acta 81:1-40)に記載されている。後者に言及されているカップリング法には、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、ジマレイミド法、および他のものがあり、これらはすべて参照により本明細書に組み入れられる。

40

## 【0224】

現行のイムノアッセイは、分析物の存在を決定するために、検出可能な標識で標識された第2の抗体との反応によって抗体を間接的に標識する、二重抗体法を利用している。第2の抗体は、好ましくは、モノクローナル抗体の由来となった動物の抗体と結合するものである。言い換えると、モノクローナル抗体がマウス抗体である場合には、標識された第

50

2の抗体は抗マウス抗体である。本明細書に記載されるアッセイに用いられるべき抗体について、この標識は好ましくは抗体でコーティングされたビーズ、特に磁性ビーズである。本明細書に記載のイムノアッセイに用いられる抗体について、標識は好ましくは、放射性、蛍光性または電気化学発光性の物質などの検出可能な分子である。

#### 【0225】

分析物の存在の迅速判定用に適合化されているために迅速フォーマットシステムとしばしば呼ばれる、代替的な二重抗体システムを、本発明の範囲において用いることもできる。本システムは、抗体と分析物との間の高い親和性を必要とする。本発明の一実施態様によれば、アミロイドタンパク質の存在は、それぞれがアミロイドタンパク質に対して特異的である一対の抗体を用いて決定される。前記抗体対の一方は本明細書で「検出用抗体」と呼ばれ、前記抗体対のもう一方は本明細書で「捕捉用抗体」と呼ばれる。本発明のモノクローナル抗体は、捕捉用抗体または検出用抗体のいずれとしても用いることができる。また、本発明のモノクローナル抗体を、単一のアッセイで捕捉用抗体および検出用抗体の両方として用いることもできる。従って、本発明の1つの実施態様は、生体液の試料中のアミロイドタンパク質を検出するために二重抗体サンドイッチ法を用いる。この方法では、分析物(アミロイドタンパク質)を検出用抗体と捕捉用抗体との間にサンドイッチ状に挟み、捕捉用抗体は固体支持体に不可逆的に固定化しておく。検出用抗体は、抗体-分析物サンドイッチの存在を同定するため、およびしたがって分析物の存在を同定するために、検出可能な標識を含む。

10

#### 【0226】

例示的な固相物質には、ラジオイムノアッセイおよび酵素イムノアッセイの分野で周知であるマイクロタイタープレート、ポリスチレン製試験管、磁性ビーズ、プラスチックビーズ、またはガラス製ビーズおよびスライドが非限定的に含まれる。抗体を固相に対してカップリングさせるための方法も当業者に周知である。さらに最近では、ナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、グラスファイバーおよび他の多孔性ポリマーなどのさまざまな多孔性材料が固体支持体として用いられている。

20

#### 【0227】

本発明はまた、上記に定義した組成物を含む、生物試料中のタウタンパク質の存在を検出するための診断キットにも関する。さらに、本発明は、上記に定義した組成物に加えて、上記に定義した検出試薬も含む、後者の診断キットにも関する。「診断キット」という用語は一般に、当技術分野で公知の任意の診断キットのことを指す。より具体的には、後者の用語は、Zreinら(1998)に記載された診断キットのことを指す。

30

#### 【0228】

本発明による結合ペプチドを含む、タウタンパク質に関連した疾患および状態の検出および診断のための新規な免疫プローブおよび検査キットを提供することは、本発明のさらにもう1つの目的である。免疫プローブに関しては、結合ペプチドを、適したレポーター分子、例えば酵素または放射性核種に対して直接的または間接的に結合させる。検査キットは、本発明による1つまたは複数の結合ペプチドと、結合ペプチドをタウ抗原と結合させて免疫複合体を形成させ、かつ免疫複合体の有無がタウタンパク質の有無と相関するように免疫複合体の形成を検出する目的で結合ペプチドを用いるための説明書とを収容できる容器を含む。

40

#### 【実施例】

#### 【0229】

##### 実施例1：ハイブリドーマと抗体の産生及びスクリーニング

本研究の目的は、抗タウモノクローナル抗体(抗Tau-mAb)(モノクローナル抗体)を産生させてスクリーニングすることであった。ハイブリドーマは骨髓腫細胞株とタウワクチン免疫マウス脾臓の融合により産生した。ハイブリドーマは、リン酸化及び非リン酸化全長タウ蛋白質並びにワクチン製剤に使用されるリン酸化及び非リン酸化タウの抗原性ペプチドの両方に対する反応性について評価した。ハイブリドーマのスクリーニングはまた、タウトランスジェニックマウスの脳切片上の免疫化学を用いて、タウ濃縮体につ

50

いてハイブリドーマ上清の反応性について行った。

【0230】

1.1 方法

1.1.1 融合

ACI-33 (タウ5-20 [pY18]) でワクチン接種された野生型C57BL/6マウスをハイブリドーマの生産に用いた。マウスは第0日目と次いで第4日目に再びACI-33ワクチンで追加免疫され、融合は第7日目に行った。173 × 10<sup>6</sup> (ACI-33)、免疫化マウス由来の脾細胞；を、5脾細胞 / 1骨髄腫細胞の割合でSP2-O-Ag14骨髄腫細胞と融合させた。

【0231】

ACI-35 (タウ393-408 [pS396、pS404]) でワクチン接種された野生型C57BL/6マウスをハイブリドーマの生産に用いた。マウスは第0日目と次いで第4日目にACI-35ワクチンで追加免疫し、融合が第6日目に行われた。x10<sup>7</sup> (ACI-35)、免疫化マウス由来の脾細胞を3脾細胞 / 1骨髄腫細胞の割合で2 × 10<sup>7</sup> SP2-O-Ag143骨髄腫細胞と融合した。

【0232】

ACI-36 (タウ401-418 [pS404 / S409]) でワクチン接種された野生型C57BL/6マウスをハイブリドーマの生産に用いた。マウスは第0日目と次いで第4日目に再びACI-36ワクチンで追加免疫され、融合は第7日目に行った。免疫化マウス由来の84 × 10<sup>6</sup>脾細胞；を、5脾細胞 / 1骨髄腫細胞の割合でSP2-O-Ag14骨髄腫細胞と融合させた。

【0233】

ACI-41 (タウ206-221 [pT212 / pS214] とタウ196-211 [pS202 / pT205] の混合) でワクチン接種された野生型C57BL/6マウスをハイブリドーマの産生に用いた。マウスは第0日目と次いで第4日目に再びACI-41ワクチンで追加免疫され、融合は第8日目に行った。免疫化マウス由来の162 × 10<sup>6</sup>脾細胞；を、5脾細胞 / 1骨髄腫細胞の割合でSP2-O-Ag14骨髄腫細胞と融合させた。

【0234】

8 × 96 ウェルプレートに結果として得られた4つの融合物及びクローンはプレート (1-8)、次いで行 (A-G)、そして最後に列 (1-12) に従って命名された。

【0235】

1.1.2 クローンを選択するためのスクリーニング法

8 × 96 ウェルプレートを、IgG発現について二回最初にスクリーニングした。陽性発現するクローンを24ウェルプレートに移し、増殖細胞の細胞上清 (=クローン) をタウELISAスクリーニング及び免疫組織化学TAUPIRスクリーニングで検査した。

【0236】

ELISA及び / 又はTAUPIRの陽性上清をT25フラスコに移し、クローンをタウELISAスクリーニングとTAUPIRスクリーニングにおいてIgG発現について再びスクリーニングした。

【0237】

1.1.3 IgGスクリーニング

ELISAプレートをコーティング緩衝液中4 で16時間、50 μl / ウェルの抗マウスIgG抗体 (CER Groupe、Marloie、Belgium) でコーティングした。PBS / Tweenでプレート洗浄後、100 ul / ウェルのブロッキング溶液を室温で1時間塗布した。希釈していないハイブリドーマ上清の50 μlを室温で1時間インキュベートした。洗浄工程後に、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗マウスIgG1、IgG2a、IgG2b及びIgG3の混合物 (Ab Serotec、Raleigh、NC、USA) を室温で1時間プレートに塗布した。最終洗浄後に、検出が、TMB (3-3'、5,5'-テトラメチルベンジジン)、HRP用ホスファター

10

20

30

40

50

ゼ基質を用いて実施され、プレートをELISAプレートリーダーを用いて405nmで読み取った。結果はO.D.として表される。(光学濃度)。

【0238】

1.1.4 ハイブリドーマのTau ELISAスクリーニング

ハイブリドーマのELISAスクリーニングを、pTauペプチド(ACI-33、T1.5:タウ5-20[pY18];ACI-35、T3.5:タウ393-408[pS396/pS404];ACI-36、T4.5:タウ401-418[pS404/S409];ACI-41、T8.5:タウ206-221[pT212/pS214]及びT9.5:タウ196-211[pS202/pT205]PolyPeptide Laboratories、Hillerod、Denmark)、対応するタウペプチド(ACI-33、T1.6:タウ5-20;ACI-36、T4.6:タウ401-4、ACI-41、T8.6:タウ206-221とT9.6:タウ196-211、PolyPeptide Laboratories、Hillerod、Denmark)、リン酸化された完全長(441aa)タウタンパク質(pTauタンパク質、Vandebroekら、2005)及び完全長(441aa)タウ蛋白(タウタンパク質、SignalChem、Richmond、Canada)で行った。最後に、ウシ血清アルブミン(BSA)を陰性コントロールとして用いた。

10

【0239】

プレートを10µg/mlの対応タウペプチド及び1µg/mlの対応するタウタンパク質で4で一晚コーティングした。PBS-0.05%Tween 20で各ウェルを洗浄し、PBS-0.05%のTween 20中の1%BSAでブロッキングした後、希釈していないハイブリドーマ上清又は培地陰性コントロールをプレートに添加し、2時間37でインキュベートした。洗浄後に、プレートを、アルカリホスファターゼ(AP)結合抗マウスIgG全抗体(Jackson Laboratories、Baltimore、PA、USA)と共に2時間37でインキュベートした。プレートを、アルカリホスファターゼ(AP)結合抗マウスIgG抗体合計(ジャクソン研究所、ボルチモア、PA、USA)を2時間37でインキュベートした。洗浄後、プレートをpNPP(パラ-ニトロフェニル-ホスフェート)、AP用ホスファターゼ基質と共にインキュベートし、ELISAプレートリーダーを用いて405nmで読み取った。結果はO.D.として表される。(光学濃度)。

20

30

【0240】

1.1.5 ハイブリドーマのIHCスクリーニング:トランスジェニックマウスからの脳切片における濃縮体の対する抗タウ抗体の結合(TAUIR)

TAUIR実験は実施例3.1.2からのプロトコルに従って行った。

【0241】

1.1.6 T25フラスコのIgGスクリーニング

ELISAプレートを炭酸塩-重炭酸塩コーティング緩衝液pH9.6(Sigma、Buchs、Switzerland)に溶解した5µg/mlの抗マウスIgGF(ab')<sub>2</sub>断片特異的抗体(Jackson Laboratories、Baltimore、PA、USA)で一晩4でコーティングした。プレートを洗浄した後、希釈していないハイブリドーマ上清、陽性コントロールIgG1抗体(1µg/mlの6E10:Covance、Emeryville、CA、USA)又は陰性コントロール(培地のみ)を室温で1時間インキュベートした。洗浄工程後、二次AP結合ヤギ抗マウスIgG(サブクラス1+2a+2b+3)のFc断片特異的抗体(Jackson Laboratories、Baltimore、PA、USA)を37で2時間プレート上でインキュベートした。最終洗浄後、pNPP(パラ-ニトロフェニル-ホスフェート)、AP用ホスファターゼ基質を行いて検出が行われ、プレートをELISAプレートリーダーを用いて405nmで読み取った。結果はO.D.として表される。(光学濃度)。

40

【0242】

1.2 結果

50

### 1.2.1 ACI-33ハイブリドーマ

融合物から生じる8×96ウェルプレートからの細胞上清を、IgGの産生についてスクリーニングした。検査した768ウェル(8×96ウェル)において、277ウェルが、IgG発現について陽性であり、24ウェルプレートに移した。24ウェルプレートで、79クローンが生育しており、これらの細胞からの上清を分析した。陽性クローンを更にT25フラスコに移し、上清をIgGの産生、ELISAおよびTAUPIRについてスクリーニングした(表2)。

#### 【0243】

クローン6C10は3つのスクリーニングで唯一陽性であり、サブクロニング用に選択した。

#### 【0244】

### 1.2.2 ACI-36ハイブリドーマ

融合物から生じる8×96ウェルプレートからの細胞上清を、IgGの産生についてスクリーニングした。検査した768ウェル(8×96ウェル)において、333ウェルが、IgG発現について陽性であり、24ウェルプレートに移した。24ウェルプレートで、75クローンが生育しており、これらの細胞からの上清を分析した。陽性クローンを更にT25フラスコに移し、上清をIgGの産生、ELISAおよびTAUPIRについてスクリーニングした(表3)。

#### 【0245】

次の工程のためのクローンを選択するため、IgG/ELISA/TAUPIRスクリーニングに対して陽性の全ての上清のランキングがELISAとTAUPIRの結果に基づいて行われた。ELISA及びTAUPIRの結果のランキングは方法の項で説明したように行った。TAUPIR染色は、最初の5つのクローンについてほとんど同じであり、これはELISAの結果に対応する。4C12はそれが4C1と同じプレートで見いだされたため廃棄され、2つのクローンが同一である(同じエピトープを認識する)可能性が増大した。最良の4つのクローンは3A8、2B6、4C1及び6H1であった。他の6クローン(4C12、2G1、2F9、7D6、3B9、4E12)はバックアップとして保存された。

#### 【0246】

ELISAスクリーニング及びTAUPIRスクリーニングで陽性を示した10クローンのランキングが最高のものを選択するために行われた(表4)。グレーで強調表示されたのは、最高の5クローンである。

#### 【0247】

### 1.2.3 ACI-41ハイブリドーマ

融合物から生じる8×96ウェルプレートからの細胞上清を、IgGの産生についてスクリーニングした。検査した768ウェル(8×96ウェル)において、215ウェルが、IgG発現について陽性であり、24ウェルプレートに移した。24ウェルプレートで、81クローンが生育しており、これらの細胞からの上清を分析した。陽性クローンを更にT25フラスコに移し、上清をIgGの産生、ELISAおよびTAUPIRについてスクリーニングした(表5)。

#### 【0248】

クローン5D10及び7C2は3つのスクリーニングで陽性であり、サブクロニング用に選択した。クローン5D10はペプチドT8.5にのみ結合し、一方クローン7C2は、ACI-41ワクチン(T8.5とT9.5)の2つのペプチドに結合する(PCT出願PCT/EP2010/054418の図10を参照)。

#### 【0249】

5D10から派生するサブクローン5D10A4はpTauペプチドに特異的であった。

#### 【0250】

### 1.3. 結果

10

20

30

40

50

生成された抗体は、非リン酸化ペプチドに対してごくわずかに結合し、p T a u ペプチドに高い特異性を示している。

【0251】

4つの融合物（A C I - 33、A C I - 36、A C I - 35及びA C I - 41）から、全16クローンがD S M Zに寄託され（表1）、更なるサブクロニング用に選択された。

【0252】

上記の陽性母クローンはさらに96ウェルプレートで、その後24ウェルプレートで、最終的にT25フラスコで培養した。各段階で、ハイブリドーマクローンの上清をE L I S A、T a u p i r及びウェスタンブロットによりスクリーニングした。

10

【0253】

実施例2：抗体軽鎖及び重鎖可変領域のクローニング

ハイブリドーマ細胞からの抗体重鎖と軽鎖の可変領域がクローニングされ、相補性決定領域（C D R）のD N A配列とその位置並びに抗体結合の特徴が決定された。

【0254】

全R N Aが、Q i a g e n R N e a s yミニキット（カタログ番号74104）を用いて $3 \times 10^6$ ハイブリドーマ細胞から調製された。R N Aを50mLの水で溶出し、1.2%アガロースゲル上で確認した。

【0255】

V<sub>H</sub>及びV<sub>K</sub> c D N Aは、I g Gとカップ定常領域プライマーにより逆転写酵素を用いて調製された。第一鎖c D N Aは、シグナル配列プライマーの大きいセットを用いてP C Rにより増幅した。増幅されたD N Aはゲル精製され、ベクターp G e m（登録商標）T E a s y（P r o m e g a）へクローニングした。得られたV<sub>H</sub>及びV<sub>K</sub>クローンは、予想された大きさの挿入のためスクリーニングされた。選択されたクローンのD N A配列は自動化D N Aシーケンシングにより両方向で決定された。その配列の相補性決定領域（C D R）の位置は他の抗体配列を参照して決定された（Kabat EA et al., 1991）。

20

【0256】

実施例3：結合研究I

目的は、タウリポソームワクチンで免疫したマウス由来のサブクロニングしたハイブリドーマから産生された抗体のリン酸化タウ（p T a u）結合を測定することであった。これをテストするため、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）は、リン酸化及び非リン酸化完全長タウタンパク質ならびにリポソームワクチン製剤に使用されるリン酸化及び非リン酸化タウ抗原性ペプチドの両方に対する精製された抗体の結合を測定するために用いられた。

30

【0257】

スクリーニングは、他の二つの方法で完了した。一次抗体として抗タウ抗体を用いたタウトランスジェニック動物（T A U P I R）からの脳切片上の免疫組織化学（I H C）が行われた。更に、タウトランスジェニックマウスからの脳タンパク質ホモジネートのウェスタンブロット（W B）は、プロット抗体として抗タウ抗体を用いて実施された。

40

【0258】

3.1 方法

3.1.1 リン酸化タウ結合アッセイ

抗リン酸化タウ抗体（マウスI g G 3アイソタイプ）はリポソームタウワクチン接種マウスから産生された。リポソームワクチンはリン酸化タウ（p T a u）ペプチドのリン酸化製剤である。抗タウ抗体を産生するハイブリドーマのサブクローンは母クローンから限界希釈によって選択した。アイソタイピングを、単一のアイソタイプクローンの存在を示すために行った。抗体は、ローラーボトル中で産生され、アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、滅菌0.22µmろ過を行い、定量した。タウ及びp T a uへの抗体の結合を試験するためにE L I S Aアッセイを使用した。簡潔には、N u n c M a x i S o r p 96ウェルプレート（N u n c, R o s k i l d e, D e n m a r k）が、1µ

50

g/mLの完全長(441aa)タウ蛋白質(SignalChem, Richmond, Canada)又はリン酸化完全長(441aa)タウ蛋白質(Vandebroek et al., 2005)でコーティングした。加えて、プレートを10 µg/mLのタウ由来ペプチドでコーティングした。ワクチン製剤で使用されていなかったタウ配列及びpTau配列に対する交差反応性を試験するために、プレートは以下のペプチドを10 µg/mLでコーティングした: Tau5-20(Y18はリン酸化されるか又はされない)、Tau393-408(S396及びS404はリン酸化されるか又はされない)、Tau401-418(S404及びS409はリン酸化されるか又はされない)、Tau206-221(T212及びS214はリン酸化されるか又はされない)及びTau196-211(S202及びS205はリン酸化されるか又はされない)。コーティングは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で4℃で一晩行われた。プレートを0.05% Tween 20/PBSで十分に洗浄し、次いで37℃で1時間、0.05% Tween 20/PBS中、1%ウシ血清アルブミン(BSA)でブロックした。試験される抗体を8回又は16回の20~0 µg/mLの間の2倍希釈系列に添加し、37℃で2時間インキュベートさせた。プレートは、その後、前述のように洗浄し、AP-結合抗マウスIgG二次抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, England)を37℃で2時間、0.05% Tween 20/PBSの6000分の1希釈で加えた。洗浄後、プレートを、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物(pNPP; Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)ホスファターゼ基質溶液と共にインキュベートし、ELISAプレートリーダーを用いて2又は16時間のインキュベーション後に405 nmで読み取った。結果は光学濃度(OD)として表される。

#### 【0259】

3.1.2 タウトランスジェニック動物からの脳切片におけるタウ濃縮体に対する抗タウ抗体の結合(TAUIR)

使用した脳スライスは、TPLHマウスと交配した老齢(>18ヶ月)のダブルトランスジェニックbiGT(P301L変異を有するヒトタウの最長のアイソフォーム(441aa)を含有する、GSK-3トランスジェニックマウス)からのものであった。さらにタウノックアウトマウス(TKO、6ヶ月)由来の切片も使用した。脳の切片はPBSで5分間洗浄し、次に、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックするために、室温で15分間、PBS:MeOH(1:1)中で1.5%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>でインキュベートした。切片をPBST(PBS/0.1% Triton X100)で3回洗浄後、それらはPBST+10% FCS(ウシ胎児血清)ブロッキング溶液中で室温で30分間インキュベートした。試験された抗タウ抗体とのインキュベーションは、PBST/10% FCSでの示された希釈で4℃で一晩行われた。次に、切片を室温で1時間PBST/10% FCSでHRP結合ヤギ抗マウス(ダコ、グロストラップ、デンマークから購入した)二次抗体とのインキュベーションの前にPBSTで3回洗浄した。検出前に、切片をPBSTで3回洗浄し、5分間、50 mMのトリス/HCl pH7.6中でインキュベートした。検出は、ジアミノベンジジン(DAB:150 mMのトリスHCl+3 µlのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%を10 ml中に一錠;MP Biomedicals, Solon, OH, USA)で3分間切片をインキュベートすることにより行われた。反応はPBSTで切片を3回洗浄することにより停止させた。次いで、切片をシラン化ガラスプレート上に移し、温プレート上で2時間50℃で空気乾燥した。対比染色は、1分間、メイヤーヘマトキシリン(Fluka Chemie, Buchs, Switzerland)とのインキュベーションを用いて行われ、その後流れる水道水による4分間の洗浄工程が続いた。切片は50%、70%、90%、及び2回の100%エタノール槽を通過させ、次いでキシロール中を2回1分間通過させることにより脱水した。最終的に、切片をDepex(BDH Chemicals Ltd., Poole, England)でガラスカバー下にマウントした。

#### 【0260】

更に、1 / 10 希釈でのハイブリドーマ上清が、タウトランスジェニックマウス、野生型マウス又はノックアウトマウスから SDS - PAGE で分離された脳ホモジネートタンパク質を含有する膜をプロットするために使用された。

【0261】

3.1.3. AD 及びタウオパチー患者からの脳切片におけるタウ濃縮体に対する抗タウ抗体の結合 (TAUPIR)

ヒトの脳内における pTau に対する抗 pTau 抗体 ACI - 36 - 3A8 - AB1 の免疫反応のアッセイは TAUPIR によって行われた。脳のパラフィン切片をキシロール中に5分間に2回、及び100% EtOH 中に1分間に2回通すことにより脱パラフィンし、その後90%、70%、50% EtOH、及び蒸留水中で1分間洗浄し、その後 PBS 中で5分間に2回洗浄した。抗原回復のため、切片は0.01Mのクエン酸溶液水溶液 (pH 6.0) で10分間加熱することにより処置し、20分間冷却した。切片は、内因性ペルオキシダーゼ活性を遮断するために、室温で15分間 PBS : MeOH (1 : 1) 中の1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> でインキュベートした。切片を PBST (PBS / 0.05% Tween - 20) で3回洗浄後、それらはブロッキング溶液として PBST + 10% のウシ胎仔血清 (FCS) 中で室温で30分間インキュベートした。一次抗 pTau 抗体 ACI - 36 - 3A8 - AB1 (ブロッキングバッファー中に410 ng / mL) によるインキュベーションを4 で一晩行った。次いで切片を PBST で3回洗浄し、PBST / 10% FCS で1 / 500 希釈した HRP 結合ヤギ抗マウス二次抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) で室温で1時間インキュベートした。検出前に、切片を PBST で3回洗浄し、5分間、50 mM のトリス / HCl pH 7.6 中でインキュベートした。検出は、ジアミノベンジジン (DAB : 150 mM のトリス HCl + 3 ul の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% を 10 mL 中に一錠 ; MP Biomedicals, Solon, OH, USA) で3分間切片をインキュベートすることにより行われた。反応は PBS で切片を3回洗浄することにより停止させた。対比染色はマイヤーのヘマトキシリン (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland) で1分間インキュベートすることにより行い、次いで水道水中で4分間洗浄した。切片は、50%、70%、90% のエタノール槽を通し、100% のエタノール槽に2回通し、その後キシロールに1分間に2回通して脱水した。

10

20

【0262】

最終的に、切片を DePex (BDH Chemicals Ltd., Poole, England) でガラスカバー下にマウントした。染色した切片は白色光顕微鏡と3CCDカメラ (Leica, Wetzlar, Germany) で撮影したデジタル画像で調べた。画像が捕捉され、専用のソフトウェア (IM500, Leica) を用いて分析した画像は20 x 1.6の倍率で示される。

30

【0263】

3.1.4. ウエスタンプロット (WB)

トランスジェニック動物からの脳抽出物における試験抗体の pTau に対する結合は WB によって行われた。野生型 FVB、TPLH、biGT 及び TKO マウスから脳のホモジナイズは、次のバッファーで行われた : 25 mM Tris / HCl pH 7.6、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、30 mM NaF、0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1 nM オカダ酸、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF)、5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、総12ミリリットルあたり1錠の完全プロテアーゼ阻害剤カクテル (CPI C)。全脳ホモジネートを得るために、脳は1容量 / 重量の半球 (ml / g) が氷上でモーター駆動ポッター様ガラスチューブ / テフロン乳棒により700 rpm でホモジナイズされた。全脳ホモジネートは半分がサンプルバッファー (25 mM のトリス / HCl pH 6.8、4% (w / v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、20% グリセロール、0.01% プロモフェノールブルーおよび5% -メルカプトエタノール) で希釈し、次いで95 まで急速に加熱した。サンプルは5分間保持され、サンプルバッファーで1 / 4 希釈され、再び95 に加熱し、次いで冷却し、可溶化されていなかった

40

50



破片を除去するために5分間14,000rpmで回転させた。上清を回収し、SDS-PAGEゲル上にロードした。ニトロセルロース膜(Hybond-ECL)への転写はトランスファーバッファー(25mMトリスpHが8.6、190mMのグリシン、20%メタノール)中で行った。膜を、ブロッキング溶液(TBS中0.1%Tween(50mMのトリスHCl、pH7.6、150mMのNaCl、及び5%乾燥ミルクパウダー)に移し、ブロッキング溶液で希釈した試験抗体と4で一晩インキュベートした。ブロッキング溶液で1/10,000に希釈した二次抗体HRP結合ヤギ抗マウス(Dako, Glostrup, Denmark)とのとのインキュベーションを室温で1時間行った。検出は、GEヘルスケアからのECLウェスタンブロッティング検出試薬を用いて行った。

10

## 【0264】

## 3.2 結果

## 3.2.1 濃縮体陽性タウトランスジェニックマウスからの脳切片を用いたELISAアッセイおよびTAUPIR

抗体の結合を、免疫原として使用されるリン酸化タウペプチドに対して、及びリン酸化全長ヒトタウタンパク質に対して測定した。これは、441個のアミノ酸からなるヒトタウタンパク質の最も長いアイソフォームである。対応する非リン酸化ペプチド及び全長ヒトタウタンパク質も含まれていた。表6に示すように、6つの抗体がリン酸化タウペプチドに対して高い結合を示し、リン酸化全長ヒトタウタンパク質に対してはごく限定された結合ないしは全く結合を示さなかった。結合は、対応する非リン酸化タウペプチドまたは非リン酸化全長ヒトタウタンパク質に対しては観察されなかった。これは、リン酸化ヒトタウペプチドに対する抗タウ抗体の高い結合を示している。

20

## 【0265】

他のリン酸化および非リン酸化タウ配列に対する非特異的結合を試験するため、抗体は、5つのリン酸化タウペプチド及び非リン酸化タウペプチドへの結合について試験され、その一つが抗原ペプチド配列として用いられた。ワクチンに使用されるペプチド以外で、リン酸化または非リン酸化タウペプチドに対する交差反応は、ペプチドが高濃度であっても観察されなかった。

## 【0266】

タウトランスジェニックマウスの脳におけるpTauに対する抗タウ抗体の結合は、TAUPIR染色(図1)及びWB(図1)によって評価した。抗体は、タウトランスジェニック(biGT)マウスの脳における皮質と海馬に存在する神経網スレッドとタウ濃縮体への結合を実証した。TAUPIRに使用される抗体の希釈は、0.05から0.0033ug/mLの範囲であった。抗タウ抗体は、野生型FVB、TPLH、biGT及びTKOマウスからの全脳ホモジネートを用いるWBにおいて一次抗体として使用し、SDS-PAGEで分離された。2種の市販の抗pTau抗体をコントロールのMC1とTau5として使用した。全ての抗タウ抗体はタウトランスジェニックマウスの脳内に存在するpTauに結合した。ブロッティング

30

## 【0267】

タウトランスジェニックマウス、野生型マウスおよびタウノックアウトマウスからSDS-PAGE分離したタンパク質ホモジネートを含む膜上で、全ACI-35抗体(表1に開示)が、タウ及びpTauと同じ46kDaの移動様式を持つタンパク質のバンドに結合した(データ非公開)。

40

## 【0268】

## 3.2.2 ADとタウオパチー患者からの脳切片におけるTAUPIR研究

AD、FAD、AGD、FTDP-17、CBDとPSP含む診断タウオパチーに罹患した被験体からのヒト脳切片に宿ったタウ凝集体に結合する抗体ACI-36-3A8-AB1の能力を、TAUPIR免疫組織化学により調べた(図2)。抗pTau抗体ACI-36-3A8-AB1は、ヒトの脳切片における糸屑状構造物、神経原線維変化(NFTは)を含むpTau、及びニューロン及びグリア細胞型に存在するpTauの蓄積物

50

の他の形態に結合した。より具体的には、A C I - 3 6 - 3 A 8 - A B 1 は、A D 脳における N F T、糸屑状構造物、及びアミロイド斑を取り巻く変性神経突起を顕著に染色し、それは A D 及び F A D と診断された被験体で容易に明らかであった。A G D からの脳切片において、A C I - 3 6 - 3 A 8 - A B 1 は、複数の好銀性粒子 / 顆粒が明らかに見え、N F T と糸屑状構造物の両方を染色した ( 図 2 )。P S P からの脳切片の A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1 による染色は N F T、糸屑状構造物、及び変性神経突起を示した。更に、ピック体様封入及び房状 p T a u 陽性星状細胞が明らかに示され、P S P での豊富な特徴であり、そこでは p T a u 染色が、遠位の突起を含む細胞全体に広がっている。F T D P - 1 7 において、染色パターンはまた、N F T だけでなく検出された無色の「膨らんだ」ニューロンを持ち、疾患の既知の不均一性を示した。A C I - 3 6 - 3 A 8 - A B 1 抗体はまた、C B D の主な特徴であるかすかにタウ陽性である腫れた無彩色のニューロンを染色した。C B D のその他の顕著な病理学的特徴、すなわち、コイル体と呼ばれるオリゴデンドログリア封入もまた、A C I - 3 6 - 3 A 8 - A B 1 抗体によって良好に検出された。染色は A T 8 陰性コントロール被験体において検出されなかったが、弱い染色が A T 8 陽性のコントロール被験体で同定された。

#### 【 0 2 6 9 】

以前にタウオパチーの異なる形態に罹患と診断された被験体からのヒト脳切片上で T A U P I R を使用して、抗 p T a u の抗体 A C I - 3 6 - 3 A 8 - A B 1 は、これらの被験体の脳に存在する様々な既知の p T a u に豊かな病理学的特徴に対する良好な結合を実証した。

#### 【 0 2 7 0 】

##### 実施例 4 : 結合研究 I I

本研究の目的は、表面プラズモン共鳴 ( S P R ) を用いて抗タウ抗体とリン酸化タウペプチドとの間の結合親和性を決定することであった。リン酸化タウペプチドは、抗タウ抗体を産生するためのワクチン製剤に使用されるペプチド配列に相当する。この相互作用を研究するために、リン酸化ペプチドをセンサチップの表面に固定化し、その結合は、チップ上に抗体を通過させる際に S P R を使用してリアルタイムでモニターした。

#### 【 0 2 7 1 】

##### 4 . 1 方法

##### 4 . 1 . 1 S P R 結合アッセイ

全ての実験は、S P R ビアコア X 機器 ( G E H e a l t h c a r e ) で行った。固定化の試薬 ( E D C、N H S およびエタノールアミン)、センサーチップ C M 5 ( カルボキシメチルデキストラン)、並びにバッファ H B S - E P は、G E H e a l t h c a r e から購入した。リン酸化タウペプチドは 1 : 1 ( v / v ) の比で P B S / 酢酸ナトリウム緩衝液 ( 1 0 m M の、p H 値 5 . 0 ) に可溶化し、2 5 0 μ g の / m l の最終ペプチド濃度を得た。このペプチド溶液を、次いで、E D C / N H S を用いて予備活性化した C M 5 センサーチップのフローセル ( f c ) 2 を介して結合させた。結合後、エタノールアミンをその表面に通し、2 1 8 R U の最終的な固定化レベルを与えていた。抗タウ抗体の 5 つの濃度は、泳動バッファーを用いた段階希釈によってアッセイした。注入は、最も低い濃度から出発して行われ、1 8 0 秒間、3 0 μ L / 分の流速で f c 1 と 2 の両方に通した。フローセル 1 を非誘導体化し、機器ノイズとバルク屈折率の変化を補正するために反応を f c 2 から差し引いた。注入が終了した後、表面を 3 0 0 秒間ランニングバッファーで直ちに洗浄した。残った結合抗体をチップから除去するために、表面の再生を、1 M N a C l を含む 8 m M の N a O H の水溶液のパルス ( 典型的には 3 μ l ) を注入することによって実施した。動態解析は、B I A e v a l u a t i o n 3 . 0 を使用して数値積分およびグローバル解析のためのアルゴリズムを用いて行った。異なる濃度の抗体の注射について得られたセンソグラムを重ね、ベースラインをゼロに調整した。カーブフィッティングのために、全てのデータを 1 : 1 均質 ( ラングミュア ) モデルに対して同時に適合させた。

#### 【 0 2 7 2 】

あるいは、固定化ビオチン化 T3 ペプチド (T3.30) を、ピアコア X 機器を用いてストレプトアビジンピアコア SA チップ (GEヘルスケア) に固定化した。抗体は、HBS-EPRランニングバッファ (GEヘルスケア) で希釈し、50  $\mu$ l / 分で120秒間注入し、続いて100秒間解離させた。表面再生を16 mMのNaOHのパルス (1-3  $\mu$ l) を用いて行った。フィッティングはBIAevaluationを用いて、1:1のラングミュア結合相互作用を想定して行った。

## 【0273】

使用されたペプチド

T1.5	H-K(Ac)K(Ac)-RQEFVMDHAGTY[PO3H2]GL-K(Ac)K(Ac)-NH2	ロット AW11309D
T4.5	H-K(Ac)K(Ac)-GDTS[PO3H2]PRHLS[PO3H2]NVSSTGSID-K(Ac)K(Ac)-NH2	ロット CF09168
T3.30	ビオチン-LC リンカー- GVYKS[PO3H2]PVVSGDTS[PO3H2]PRHL-NH2	ロット MI89P9-P12-2

10

## 4.2 結果

リン酸化タウペプチドに対する抗タウ抗体の結合を、SPRを用いてリアルタイムで監視した。抗体結合の会合相及び解離相の分析は、会合速度定数 ( $k_a$ )、解離速度定数 ( $k_d$ ) 並びに解離定数  $K_D$  を決定するために使用することができる。抗体ACI-33-6C10-AB1は、抗体の3.7-367 nMの範囲で、非誘導体化カルボキシメチルデキストラン表面でペプチドT1.5に特異的に結合する。センソグラムの速度論的分析は、 $9.46 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の速い会合速度定数と $3.27 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数を示した (表7)。従って、解離定数  $K_D$  は3.46 nMであることが決定され、抗体が非常に高い親和性でリン酸化ペプチドT1.5を認識していることを示している。全ての試験抗体は、免疫化とハイブリドーマ生成のために使用されたそれぞれのリン酸化ペプチドに高い親和性を示したが、それらは非リン酸化ペプチドにはほとんど親和性を示さなかった。

20

## 【0274】

実施例5: 抗pTau抗体のエピトープマッピング

30

## 5.1 方法

抗リン酸化タウのマウスモノクローナル抗体のエピトープマッピングは、異なるリン酸化および非リン酸化ペプチドライブラリーを用いてELISAによって行った。使用されるペプチドライブラリーのアミノ酸配列を表8に示す。各ライブラリーは、ペプチドワクチンに存在するリン酸化及び非リン酸化配列にまたがる短いビオチン化ペプチドから成っていた。ペプチドライブラリーはANAWA取引SAから購入した。エピトープマッピングは、製造業者 (Mimotopes) の指示に従って行った。簡潔には、ストレプトアビジンコーティングプレート (NUNC) は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の0.1% BSAで、4で一晚ブロックされた。PBS-0.05% Tween 20による洗浄後、プレートは各ライブラリーからの異なるペプチドにより室温で1時間コーティングされ、0.1% BSA、0.1% アジ化ナトリウムのPBS溶液で最終濃度10  $\mu$ Mに希釈された。洗浄後、プレートは、2%のBSAと0.1%のアジ化ナトリウムのPBS溶液で40 ng/mlに希釈された試験抗体とともに室温で1時間インキュベートした。プレートは、再び洗浄され、1/6000希釈でAP結合抗マウスIgG二次抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, England) とともに室温で1時間インキュベートした。最終洗浄後、プレートは、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 (pNPP; Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) ホスファターゼ基質溶液とともにインキュベートし、2時間のインキュベーション後にELISAプレートリーダーを用いて405 nmで読み取られた。結合は、光学濃度 (O.D.) がバックグラウンドのO.D.の少なくとも

40

50

も2倍である場合、陽性と考えられた。

【0275】

5.2 結果

エピトープマッピング実験の結果として、エピトープは、本明細書に開示されている抗体が特異的に結合する必要なリン酸化アミノ酸残基(表9参照)を含め識別され得る。

・タウ a a 15 - 20 , p Y 18 を要件とする ( 6 C 1 0 F 9 C 1 2 A 1 1 ; 6 C 1 0 E 5 E 9 C 1 2 )

・タウ a a 405 - 412 , p S 409 を要件とする ( 6 H 1 A 1 1 C 1 1 ; 6 H 1 G 6 E 6 )

・タウ a a 405 - 411 , p S 409 を要件とする ( 2 B 6 A 1 0 C 1 1 ; 2 B 6 G 7 A 1 2 ; 3 A 8 A 1 2 G 7 ; 3 A 8 E 1 2 H 8 )

・タウ a a 208 - 218 , p T 212 と p S 214 を要件とする ( 7 C 2 ( 1 ) F 1 0 C 1 0 D 3 )

・タウ a a 393 - 401 , p S 396 を要件とする ( A 4 - 2 A 1 - 1 8 ; A 4 - 2 A 1 - 4 0 )

・タウ a a 396 - 401 , p S 396 を要件とする ( A 4 - 4 A 6 - 1 8 )

・タウ a a 394 - 400 , p S 396 を要件とする ( A 6 - 1 D 2 - 1 2 )

・タウ a a 402 - 406 , p S 404 を要件とする ( A 6 - 2 G 5 - 0 8 )

・タウ a a 393 - 400 , p S 396 を要件とする ( A 6 - 2 G 5 - 3 0 ; A 6 - 2 G 5 - 4 1 )

【0276】

実施例6：タウトランスジェニックマウスの1週間受動免疫化

6.1. 方法

全てのインビボ試験について、タウトランスジェニックマウスが用いられ、下記の表に示すように、治療抗体を投与した。

インビボでの研究のために用いられたトランスジェニックマウスと抗体

研究番号.	タウトランスジェニックモデル	研究開始時点のマウスの年齢(月)	研究期間(週)	投与された抗体	用量(mg/kg)	腹腔内投与の回数	読み取り
1	TMHT (hTau <sup>V337M/R406</sup> <sub>w</sub> )	6.3	1	ACI-36-2B6-Ab1	0*, 3 又は 10	2	MSD, IHC, WB
				ACI-36-3A8-Ab1	0 又は 3		
2	TMHT (hTau <sup>V337M/R406</sup> <sub>w</sub> )	4.2	4	ACI-36-2B6-Ab1 又は ACI-36-3A8-Ab1	0, 1 又は 3	4	MSD, IHC, WB, MWM
3	TMHT (hTau <sup>V337M/R406</sup> <sub>w</sub> )	3.0	12	ACI-36-2B6-Ab1 又は ACI-36-3A8-Ab1	0, 1 又は 3	13	MSD, IHC, WB, MWM
4	biGT (hTau <sup>P301L</sup> x hGSK3β)	4.5	12	ACI-36-2B6-Ab1 又は ACI-36-3A8-Ab1	0, 1 又は 3	13	WB

\*全ての研究のためのビヒクルコントロール;腹腔内 (i.p.)

【0277】

10

20

30

40

50

## 6.1.1. マウス及び処置

全長ヒトT A UアイソフォームT A U 4 4 1を過剰発現し、マウスThy - 1プロモーターの制御下でミスセンス変異V 3 3 7 MとR 4 0 6 Wを担持する雌と雄の6.3月齢(±3日)のTgマウス(T M H Tマウス)が研究番号1で用いられた(上の表参照)マウスは、脳内のT A U病理を決定するために、最後の投与後1日に安楽死させた。

【0278】

## 6.1.2 動物の同定と住居

遺伝子型のテールティッピングの過程で、動物は古典的な耳標装着により、連続的に番号付けられた。全ての動物は、試験開始前に再度遺伝子型を決定した。マウスは、国際基準に基づいてJ S W標準操作手順に従って維持した。動物はR e t t e n m a i e r (登録商標)によって提供される標準化されたげっ歯類の寝具の個々の換気ケージに収容した。温度を約24に維持し、相対湿度を40から70%に維持した。動物は、一定の光サイクル(12時間の明るい/暗い)下で飼育した。乾燥され、ペレット化した標準的なげっ歯類の餌(A l t r o m i n (登録商標))と、通常の水道水は動物に対して自由に利用可能であった。個々の動物を、個々の動物のデータシートに記載された任意の臨床徴候について定期的にチェックした。

【0279】

## 6.1.3. インビボでの出血

最初の免疫化の前七日は、インビボでの出血は顔の静脈/動脈からの下顎のサンプリングにより行った。血液サンプルは、静脈および動脈の血液の混合物である。血漿を得るために、血液をヘパリンチューブに回収し、遠心分離した(1,000×gで、10分間、室温)。血漿は使用するまで2つのアリコートに凍結された。

【0280】

## 6.1.4. 免疫組織化学的(IHC)定量

全てのクライオ凍結脳の半球を分析した。レベル(全部で5つのレベル)あたり15クライオ切片、それぞれ10µmの厚(Leica CM 3050S)を矢状に切断した。脳レベルは形態学アトラス“The Mouse Brain” from Paxinos and Franklin(第2版)に従って選択された。5つのレベルの切断はランダムスライスで開始し、次いでサンプリングが均一かつ体系的に継続し、常に連続してレベルごとに15スライスを保持し、レベル間では150µmを廃棄した。脳領域あたり海馬と扁桃体の5つのスライス(各レベルから1)のT A U病理を決定するために、動物はA T 1 8 0 (# M N 1 0 4 0、T h e r m o S c i e n t i f i c)抗体とH T 7 (# M N 1 0 0 0、T h e r m o S c i e n t i f i c)抗体を用いて染色された。一次抗体はCy - 3 - 結合2次抗体により可視化され、続いて、免疫反応性領域がイメージプロブラス(v6.2の)ソフトウェアを用いて評価した。

【0281】

免疫反応性の対象物はサイズ制限(扁桃体で30µm<sup>2</sup>、海馬で7µm<sup>2</sup>)以上と動的強度閾値以上で測定された。対象物の全領域と強度及び個々の閾値は自動的に提出された。使用される場合、動的な閾値は「A O I内の平均強度プラスA O I内のピクセル強度の標準偏差の因子倍」と定義した。いずれの場合においても、値は、最低限の設定閾値を超えなければならなかった。正確な閾値レベルを以下の表に示す。

閾値	最小	動的因子
AT180扁桃体	25	2
AT180海馬	28	-
HT7扁桃体	35	2
HT7海馬	25	0.5

【0282】

10

20

30

40

50

領域サイズは、海馬と扁桃体の手動での線引きにより測定した。HT7及びAT180IR領域データは、領域サイズに正規化した。

#### 【0283】

n > 4の全てのIHC関連データは、コルモゴロフスミルノフ正規試験に従ってガウス分布に従い、平均±SEMとして表される。従って4匹の動物からのみからなるピヒクル群に対しては、正規性試験には少なすぎるので、ガウス分布を仮定した。群の違いは、パラメトリックな一方向性ANOVAを用いて計算し、続いてGraphPadPrismソフトウェアで計算されるニューマンクールズ事後試験を行った。 - エラーレベルを0.05に設定した。

#### 【0284】

脳のTAU病理は、AT180(抗pTAU)抗体及びHT7(抗TAU)抗体を用いて免疫組織化学的(IHC)定量によって海馬と扁桃体で決定された。更に、メソスケールディスクバリー(MSD)デュプレックス技術を使用して、可溶性ホモジネート画分で皮質と海馬の可溶性pTAUとTAUの治療効果を測定し、pTAUと総TAUを探索した。

#### 【0285】

IHCアッセイ又はMSDアッセイの何れかで使用される抗体は、この研究で使用される2つの治療抗体と重複するエピトープを持っていない。

#### 【0286】

6.1.5. Tgマウスの可溶性脳画分中の可溶性タウタンパク質のレベルの定量化のための画分の生成

方法6.1.1に従って処置されたマウスは、脳内のタウ病理を決定するために、2回目の投与後1日に安楽死させた。簡潔には、一つの脳半球からの可溶性皮質サンプルを100から200µLの冷たい抽出緩衝液(25mMのトリス-HCl pH=7.4、150mMのNaCl、1mMのEDTA、1mMのEGTA、10mMの - グリセロリン酸、30mMのNaF、2mMのNa<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテル)でホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離し(4 で15分間、74, 200×g)、上清を可溶性タウの分析に用いた。皮質サンプルの可溶性画分中の総タンパク質濃度は、BCAタンパク質定量アッセイ(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)によって決定した。

#### 【0287】

6.1.6. ウェスタンブロットによるpTauの存在の分析

ACI-36-2B6-AB2とACI-36-3A8-AB2を投与したマウスの脳における免疫反応を探るために、pTau PHFエピトープに結合することが報告された2つの抗体(Greenberg et al., 1992; Reig et al., 1995; Hoffmann et al., 1997)を、ウェスタンブロット(WB)アッセイで用いた。皮質からの可溶性画分を等容量のサンプルバッファ-A(125mMのトリス-HCl pH6.8、4% [w/v]の]ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、20%グリセロール、0.01%プロモフェノールブルー、5% -メルカプトエタノール)を添加することによって希釈し、そしてサンプルを、10分間95 に加熱した。30µgのサンプルを4-12%のBis-Trisゲル(Invitrogen, Basel, Switzerland)上にロードし、MOPSSDSバッファ(Invitrogen)で泳動した。タンパク質はトランスファーバッファ(25mMトリス pH8.6、190mMのグリシン、20%メタノール)中で0.45µmPVDFに転写した。タンパク質の転写を確認するため、膜をPonceau Sで5分間染色し、ブロッキングバッファ(TBS [50mMトリス-HCl、pHが7.6、150mMのNaCl]中に5%のBSA)で1時間ブロックした。ブロッキングバッファおよび0.1%Tween中で、膜を一次抗体で4 で一晚ブロットした。WBで使用された2つのpTau PHF特異的の一次抗体は以下である: 抗pS396(PHF-13エピトープ; AbCam, Cambridge, UK; 3µg/mLで使用)、ヒト又はマウスpTauのリン酸化Ser396に特異的(Hoffmann et

10

20

30

40

50

al., 1997)、及びAD2 (PHF-1エピトープ; BioRad, Reinach, Switzerland; 0.4 µg/mLで使用)、ヒト及びマウスのpS396及びリン酸化Ser404に特異的 (pS404; Reig et al., 1995)。全タウWBのために、タウ5 (0.5 µg/mL)、ヒト及びマウスのタウの両方に結合する抗体 (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland) を用いた。一次抗体とのインキュベーション後に、膜をTBS中0.1%のTweenで洗浄し、二次抗体: ヤギ抗マウスIRDye 800またはヤギ抗ウサギIRDye 680 (両方ともLi-Cor Biosciences, NE, USAから) とインキュベートし、両方ともBBと0.1%のTweenで1:15000希釈した。次いで、膜を、室温で1時間光から保護してインキュベートし、TBS中の0.1%のTweenで15分間3回洗浄し、TBSで5分間2回洗浄し、バンドをLi-Corオデッセイ近赤外イメージング・システム (Li-Cor) を使用して定量化した。バンドは  $\alpha$ -アクチンの発現に対して正規化した (AbCam; 0.4 µg/mLで使用)。ヒトトランスジェニックタウのバンド対マウス内在性のタウのバンドの同定を確認するために、プロットをヒト完全タウに特異的抗体 (Tau13、AbCam; 表示せず) で探索した。加えて、治療抗体ACI-36-2B6-Ab2及びACI-36-3A8-Ab2が、抗pS396又はAD2の結合に干渉するのに十分な量で変性した試験サンプルに存在していないことを確認するために、膜を抗マウス一次抗体で探索した。この研究で使用したサンプルではインタクト又は変性した治療抗体は検出されなかつた (結果は非表示)。

10

20

【0288】

## 6.1.7. 統計的分析

データは、ノンパラメトリックなクラスカル-ワリス順位和統計を用いて分析し、 $P < 0.05$  レベルで有意であれば、ダンの事後テストを全群の比較に用いた (Graph Pad Prism, Graph Padソフトウェア, CA, USA)。結果は平均 ± 平均値の標準誤差 (SEM) を示す個別のデータ点として示される。 $P < 0.05$  を持つ差は統計的に有意とみなした。

【0289】

## 6.2 結果

## 6.2.1. 免疫組織化学的 (IHC) 定量による脳のTAU病理

本研究期間中、ACI-36-2B6-Ab2とACI-36-3A8-Ab2の2回の腹腔内注射は、いかなる著しい悪影響をも示さなかつた。IHCによるAT180を使用するpT231とpS235の染色は、ACI-36-3A8-Ab2の処置後に、扁桃体で免疫反応領域 (IR) の増大を示した。3 mg/kg ACI-36-2B6-Ab2で処置されたマウスは、海馬において著しく小さいAT180 IR領域を持っていた。

30

【0290】

扁桃体において、ACI-36-3A8-AB2処置は、PBS群に比べて、AT180 IR pTAUを増加させた。海馬において、ACI-36-2B6-AB2処置はpTAUを減少させた。AT180は特異的にpTAUを標識する。AT180 IR細胞の発生頻度は、ACI-36-2B6-AB2処置マウスで減少した。この作用は、低用量 (3 mg/kg) 群 (ACI-36-2B6-AB2 LD) でより強かつた。細胞体の染色パターンは、群間で違いはない。

40

【0291】

ACI-36-2B6-Ab2及びACI-36-3A8-Ab2の両方について、より高い10 mg/kgの容量において、海馬において小さなAT180 IRの有意でない傾向が見られた。定性的には、ACI-36-2B6-AB2で処置した動物は、非常に強いAT180標識を持った海馬ニューロン数の減少を示した。

【0292】

## 6.2.2. 受動免疫後の脳画分中の総タウ濃度の低下

可溶性タンパク質を含む脳画分中のpTAUとTAUに関する治療の効果は、MSDデ

50

ユプレックスアッセイを用いて測定した。皮質の全可溶性T A Uのレベルは、A C I - 36 - 2 B 6 - A b 2とA C I - 36 - 3 A 8 - A b 2で処置されたマウスで著しく減少した ( $P < 0.01$ 、図3の上の段)。A C I - 36 - 2 B 6 - A b 2の3 mg / kgの用量により、可溶性p T A Uのレベルもまた著しく減少し ( $P < 0.01$ 、図3の下段)、最大の減少を実証している ( $p < 0.01$ )。全T A Uに対するp T A Uの比率は変わらなかった。可溶性のT A Uとp T A Uのレベルは海馬からのサンプルでは変化しなかった (ここでは非表示)。

#### 【0293】

6.2.3. 対らせん状細線維 (P H F) に存在するリン酸化タウエピトープの存在におけるA C I - 36 - 2 B 6 - A b 2及びA C I - 36 - 3 A 8 - A b 2の投与の影響

構造的には、神経原線維変化 (N F T) は、高リン酸化された状態で主に見られる、微小管結合タンパク質タウからなる対らせん状細線維 (P H F) からなる (Alonso et al., 1997)。この研究の目的は、A C I - 36 - 2 B 6 - A b 2とA C I - 36 - 3 A 8 - A b 2の投与後に、タウトランスジェニックマウスの脳内でp T a u P H Fを探索し定量化するためにp T a u P H Fを認識する抗体を使用することであった。

#### 【0294】

文書で十分に立証されたタウP H Fリン酸化エピトープの量に関して、2つのA C I - 36 - 2 B 6 - A b 2又はA C I - 36 - 3 A 8 - A b 2の投与の効果を測定するために、処置されたタウT gマウスからの大脳皮質可溶性画分が、W Bを用いた抗p S 396抗体 (P H F - 13エピトープ、p S 396) 及びA D 2 (P H F - 1エピトープ、p S 396 / p S 404) で探索された。免疫反応性は、赤外線イメージングシステムを用いて定量した。タウT gマウスにおけるA D 2 P H F免疫反応性におけるA C I - 36 - 3 A 8 - A B 2とA C I - 36 - 2 B 6 - A B 2の作用をA D 2を用いて決定し、p S 396とp S 404、タウの2つの以前に文書化されたP H Fリン酸化残基を探索する (Greenberg et al., 1992; Reig et al., 1995)。

#### 【0295】

A D 2 (P H F - 1) 抗体を用いたS 396とS 404がリン酸化されたヒト及びマウスp T a uを示すバンドがL i - C o r赤外線イメージング・システムを用いて定量化された。個別のマウスに対する値ならびに平均 ± 平均値の標準誤差が決定された。

#### 【0296】

トランスジェニックヒトp T a uのバンドについて観察された、A D - 2陽性p T a u免疫反応性の減少について、有意ではない傾向が観察された。しかしながら、3 mg / kgのA C I - 36 - 2 B 6 - A b 2で処置されたマウスA D 2陽性p T a uの量の有意な減少が、マウスに観察され、10 mg / kgのA C I - 36 - 2 B 6 - A b 2又はA C I - 36 - 3 A 8 - A b 2の何れかで処置された場合には有意でない傾向が観察された。

#### 【0297】

p T a u p S 396を特異的に認識する異なる抗体が染色に用いられた場合 (Hoffman et al., 1997)、更に大きな効果が観察された。10 mg / kgのA C I - 36 - 2 B 6 - A b 2又はA C I - 36 - 3 A 8 - A b 2で処置されるときに、減少する傾向を持ち、3 mg / kgのA C I - 36 - 2 B 6 - A b 2で処置されたマウスは、p S 396陽性ヒトトランスジェニック及びマウス内因性p T a uが著しく少なかった。非リン酸化及び全p T a uの両方を含む全ヒト及びマウスのタウにおける作用を評価するために、プロットをT a u 5抗体で探索した。ピヒクルコントロールと比較して、10 mg / kgで投与されたA C I - 36 - 2 B 6 - A b 2又はA C I - 36 - 3 A 8 - A b 2によって、全タウは調節されなかったが、しかし、全タウについて減少する傾向がA C I - 36 - 2 B 6 - A b 2を3 mg / kgで投与されたマウスで観察された。

#### 【0298】

#### 6.2.4 要約

抗p T A U抗体A C I - 36 - 3 A 8 - A b 2によるタウT gマウスの2回の末梢性投与は、大脳皮質において可溶性のT A Uと可溶性のp T A Uを著しく減少させた。抗p T

10

20

30

40

50



A U抗体 A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2 によるタウ T g マウスの 2 回の末梢性投与は、大脳皮質において可溶性の T A U と可溶性の p T A U を著しく減少させた。更に、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2 は大幅に海馬の p T A U 免疫反応性を減少させた。これらの結果は、タウオパチーの低減における、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 抗体を用いた受動抗 p T A U 免疫化の能力を実証している。

#### 【 0 2 9 9 】

タウ T g マウスに対する A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2 の 3 m g / k g での 2 回の末梢性投与は、ウェスタンブロット法により測定される皮質における p T a u P H F エピトープの存在を減少させた。より高用量の 1 0 m g / k g では、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 の両方とも p T a u P H F エピトープ免疫反応性の減少傾向を示した。これらの結果は A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2 及び A C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2 抗体は、アルツハイマー病などのタウオパチーに対する受動免疫治療に適切に用いられ得る。

10

#### 【 0 3 0 0 】

実施例 7：ヒトタウ過剰発現マウスの 1 ヶ月の処置

##### 7.1 方法

##### 7.1.1 マウス及び処置

タウトランスジェニックマウスが用いられ、方法 6.1 の表に示すように、治療抗体を投与した。(研究番号 2)

20

#### 【 0 3 0 1 】

##### 7.1.2. 行動実験 - モリス水迷路 (MWM) タスク

最後の投与後に、6.1.1 に従って処置されたマウスの空間記憶能力について試験するために水迷路 (MWM) タスクが実行された。MWM 実験は開始後第 4 週に全ての囲い込まれた動物で実施された。MWM は 21 ± 2 の温度での水道水で満たされた 100 センチメートルの直径を持つ白い円形プールで構成されている。プールは実質的に 4 つのセクターに分割される。透明なプラットフォーム (直径 8 cm) が水面下約 0.5 cm に配置される。全ての試験セッションの最中にて、プラットフォームは、プールの南西の四分円に位置している。各マウスは、連続 4 日間の各々で 3 つの試験を実行しなければならなかった。1 回の試験は、最大で 1 分間続いた。この期間、マウスは隠された半透明の標的を見つける機会があった。各試行後に、マウスは環境に適用させるためにプラットフォーム上で 10 ~ 15 秒間休ませた。第 4 日の最後の試行後に少なくとも 1 時間、マウスはいわゆるプローブ試験 (PT) を履行する必要がある。PT の最中、プラットフォームはプールから除去され、旧標的位置上の交差の数が、この四分円における滞在とともに、実験者によって記録された。PT において、逃避潜時 (マウスが隠されたプラットフォームを見つけて水から脱出するのに必要な時間 [秒])、経路 (標的に到達する軌跡の長さ [メートル])、標的ゾーンの交差、及び標的四分円における滞在の定量化のために、コンピュータ化されたトラッキングシステム (Bioobserve ソフトウェア) を用いた。全ての動物は、行動の結果における不十分な視覚能力の影響を排除するために、最後の日の PT 後に視覚検査を行う必要がある。

30

#### 【 0 3 0 2 】

##### 7.1.3. 免疫組織化学的 (IHC) 定量による脳のタウ病理

マウスは、脳内のタウ病理を決定するために MWM の後 1 日で (最後の投与後 1 週間で) 安楽死させた。脳のタウ病理は、A T 1 8 0 (抗 p T a u、p T 2 3 1 / p S 2 3 5) 抗体及び H T 7 (ヒト特異的抗タウ) 抗体を用いて免疫組織化学的 (IHC) 定量によって海馬と扁桃体で決定された。更に、メソスケールディスクバリー (MSD) デュプレックス技術を使用して、ホモジネート画分で皮質と海馬の可溶性 p T a u と可溶性 T a u の治療効果を測定し、p T a u (p T 2 3 1) と総 T A U を探索した。IHC アッセイ又は MSD アッセイの何れかで使用される抗体は、この研究で使用される治療抗体と重複するエピトープを持っていない。

40

#### 【 0 3 0 3 】

50

#### 7.1.4. 皮質と海馬における可溶性タウの分析のためのサンプル調製

マウスは、最後の治療投与後一週間で、組織の収集のために安楽死させた。皮質と海馬を100から200  $\mu$ Lの冷たい抽出緩衝液(25 mMのトリス-HCl pH=7.4、150 mMのNaCl、1 mMのEDTA、1 mMのEGTA、10 mMの  $\beta$ -グリセロリン酸、30 mMのNaF、2 mMのNa<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテル)でホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離し(4 で15分間、74, 200  $\times$  g)、皮質と海馬における可溶性タウの分析のために上清を用いた(図4)。ペレットを100-200  $\mu$ Lの抽出バッファー2(10 mMトリスHCl pH=7.4、800 mMのNaCl、300 mMのスクロース、1 mMのEGTA、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤カクテル)に再懸濁する。溶液は遠心分離され(4 で20分間、4000 g)、上清を超遠心チューブに移した。次にサルコシル(30%水溶液)を1%の最終濃度まで添加し、室温で1.5時間インキュベートした。遠心分離後(4 で30分間、74200 g)、上清をを廃棄し、ペレットを100  $\mu$ Lの緩衝液3(50 mMのトリス-HCl、pH=7.4)に再懸濁した。再懸濁したペレットは皮質と海馬でサルコシル不溶性(SinT)タウとして使用された。可溶性画分及びSinT画分のサンプル中の総タンパク質濃度は、BCAタンパク質定量アッセイ(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)によって決定した。

10

#### 【0304】

#### 7.1.5. pTau PHF及びタウのウェスタンブロット

大脳皮質と海馬におけるpTau PHFの存在下でのACI-36-2B6-Ab1の作用を評価するために、pTau PHFエピトープに結合すると報告された2つの抗体が(Greenberg et al., 1992; Reig et al., 1995; Hoffmann et al., 1997)ウェスタンブロット(WB)アッセイに用いられた。皮質と海馬からの可溶性画分とSinT画分を等容量のサンプルバッファーA(125 mMのトリス-HCl pH6.8、4% [w/v]ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、20%グリセロール、0.01%プロモフェノールブルー、5%  $\beta$ -メルカプトエタノール)を添加することによって希釈し、そしてサンプルを、10分間95 に加熱した。30  $\mu$ gのサンプルを4-12%のBis-Trisゲル(Invitrogen, Basel, Switzerland)上にロードし、MOPS SDS バッファー(Invitrogen)で泳動した。タンパク質はトランスファーバッファー(25 mMトリス pH8.6、190 mMのグリシン、20%メタノール)中で0.45  $\mu$ m PVDFに転写した。タンパク質の転写を確認するため、膜をPonceau Sで5分間染色した。膜は次いで洗浄し、ブロッキングバッファー(TBS [50 mMトリス-HCl、pHが7.6、150 mMのNaCl]中に5%のBSA)で1時間ブロックした。ブロッキングバッファーおよび0.1% Tween中で、膜を一次抗体で4 で一晩ブロットした。

20

30

#### 【0305】

WBで使用された2つのpTau PHF特異的の一次抗体は以下である: 抗pS396 (PHF-13エピトープ; AbCam, Cambridge, UK; 3  $\mu$ g/mLで使用)、ヒト又はマウスpTauのリン酸化Ser396に特異的(Hoffmann et al., 1997)、及びAD2 (PHF-1エピトープ; BioRad, Reinach, Switzerland; 0.4  $\mu$ g/mLで使用)、ヒト及びマウスのpS396及びリン酸化Ser404に特異的(pS404; Reig et al., 1995)。ターゲット効果を検出するため、ACI-36-2B6-Ab1を、1.6  $\mu$ g/mLでプロットングのために使用した。全タウWBのために、タウ5、ヒト及びマウスのタウの両方に結合する抗体(BD Biosciences, Allschwil, Switzerland)を0.5  $\mu$ g/mLで用いた。タンパク質負荷のために正規化するため、全ての膜が  $\alpha$ -アクチン(AbCam: 0.4  $\mu$ g/mLで使用)について更にブロットされた。

40

#### 【0306】

一次抗体とのインキュベーション後に、膜をTBS中0.1%のTweenで洗浄し、

50

二次抗体：ヤギ抗マウスIRDye 800またはヤギ抗ウサギIRDye 680（両方ともLi-Cor Biosciences、NE、USAから）とインキュベートし、両方ともBBと0.1%のTweenで1:15000希釈した。次いで、膜を、室温で1時間光から保護してインキュベートし、TBS中の0.1%のTweenで15分間3回洗浄し、TBSで5分間2回洗浄し、バンドをLi-Corオデッセイ近赤外イメージング・システム（Li-Cor）を使用して定量化した。目的のバンドは - アクチンの発現に対して正規化した。ヒトトランスジェニックタウのバンド対マウス内在性のタウのバンドの同定を確認するために、プロットをヒト完全タウに特異的でマウスと交差反応しない抗体（Tau13、AbCam；表示せず）で探索した。加えて、治療抗体が、一次プロテイング抗体の結合に干渉するのに十分な量で変性した試験サンプルに存在していないことを確認するために、膜を抗マウス一次抗体で探索した。この研究で使用したサンプルではインタクト又は変性した治療抗体は検出されなかつた（結果は非表示）。値は、任意の - アクチン補正免疫反応性（IR）として表される。

#### 【0307】

##### 7.1.6. 統計的分析

データは一方向性ANOVAを用いて解析され、続いて、ダネットの多重比較事後試験（GraphPad Prism, GraphPad Software, CA, USA）を行、各処置をTgコントロール処置マウスと比較した。結果は平均±平均値の標準誤差（SEM）を示す個別のデータ点として示される。P < 0.05を持つ差は統計的に有意とみなした。グラブの極端なスチューデント逸脱試験により有意な（p < 0.05）異常値として同定された単一の値は除外された。

#### 【0308】

##### 7.2 結果

##### 7.2.1. 行動実験 - 受動免疫後のモリス水迷路（MWM）タスク

毎週3mg/kgで又は4週間の期間に1mg/kgで投与されたACI-36-2B6-Ab1の4回の腹腔内注射は、いかなる著しい悪影響をも示さなかつた。

#### 【0309】

処置の最終週の期間、動物の空間ナビゲーションの学習及び記憶を評価した。動物は1日あたり3回試行で4日間のトレーニングを行う必要があり、その後1回のプローブ試験と視覚検査を行った。逃避潜時（マウスが隠されたプラットフォームを見つけて水から脱出するのに必要な時間[秒]）、経路（標的に到達する軌跡の長さ[メートル]）、泳ぐ速度（経路と逃避潜時の計算商）、標的交差の数及び標的四分円における滞在が評価された。

#### 【0310】

4日間の試験にわたって、プラットフォームへ到達するために水泳経路の長さ及び逃避潜時が評価されると、Tg（群A）並びにヒヒクルで処置されたnTg（F）コントロールの動物は期待された学習曲線を示した。Tgコントロール（A）の動物は、nTgコントロールの動物（F）に比較して、逃避潜時と水泳経路において、平坦な学習曲線で示されるように、著しい学習障害を持っていた。逃避潜時と水泳経路は、トレーニングの3日及び4日で著しく（双方向ANOVA）長かつた（P < 0.001；ボンフェローニの事後試験）。ACI-36-2B6-Ab1とACI-36-3A8-Ab1による処置は、低又は高投与量（それぞれ群B及びC及びD及びE）で、Tgコントロールの動物に比較して空間学習能の著しい改善には至らず、似たような学習曲線を示した。各群の第一日の成績を100%に適合し、かつ全ての以後の日を第一日の割合とすると、ACI-36-3A8-Ab1で処置されたマウスに改善を見ることが出来る（両方の用量）。効果は、第3日（p < 0.01群D及びp < 0.05群E）と第4日（p < 0.05群D）の水泳経路長に関して統計的有意性に達した。

#### 【0311】

ACI-36-2B6-Ab1で処置されたマウス（両方の用量）について、統計的有意性は無いもの、水泳経路長にわずかな改善を見ることが出来る。

10

20

30

40

50

## 【0312】

処置群間での違いは、全4日間のトレーニングで水泳速度の観点では検出されなかった。

MWM試験の結果は、ACI-36-2B6-Ab1とACI-36-3A8-Ab1で処置されたマウスに関して空間学習が改善される傾向を実証した。

## 【0313】

7.2.2. 免疫組織化学的(IHC)定量による脳のTAU病理

AT180抗体は内因性及びヒトpTAU(Thr231及びSer235で2重リン酸化)を染色する。

## 【0314】

ACI-36-2B6-AB1及びACI-36-3A8-AB1での免疫化後の扁桃体と海馬におけるAT180 IRを測定した。扁桃体と海馬のAT180 IR面積百分率を測定した。

## 【0315】

nTgコントロールにおける細胞体内のpTAUの量は、Tg群と比較して有意に低かった( $p < 0.001$ )。扁桃体において、細胞体pTAUを増加させる傾向が、3mg/kgのACI-36-2B6-Ab1処置で観察された。これに対し、ACI-36-2B6-Ab1の両方の投薬量は、海馬におけるビヒクル処置動物と比較してpTAUを低下させる傾向があった。平均染色強度は、全てのトランスジェニック群で同等であった。

## 【0316】

ACI-36-3A8-Ab1の処置は海馬と扁桃体における細胞体pTAUを変化させず、扁桃体と海馬の神経細胞のpTAUレベルは扱われたトランスジェニック群間で有意な違いは無かった。染色強度の平均及び総計は、全てのトランスジェニック群で同等であった。

## 【0317】

HT7抗体は、ヒトTAUに特異的であるので、サイズが7ピクセル以上のリポフスチンドットの自家蛍光に由来する、僅かな信号のみが、nTGコントロールで測定された。ビヒクルコントロール(PBS)に比べて、ACI-36-2B6-Ab1処置は海馬の細胞体HT7陽性IR面積を変えなかった。IR領域の観点において、扁桃体では、ACI-36-2B6-Ab1の低用量を投与したマウスは、全ヒトTAUの高いレベル(T検定: $P = 0.0954$ )を有する傾向にあった。この増加はまた、染色の領域の増大及び個々の神経細胞の細胞体における染色強度の増大として定性的に可視的であった。統計的に有意な処置誘導型の相違点は、海馬ニューロンで観察されなかった。

## 【0318】

ビヒクルコントロール(PBS)に比べて、ACI-36-3A8-Ab1処置は扁桃体の細胞体HT7陽性IR面積を有意には変えなかった。染色強度の平均及び総計は、全てのトランスジェニック群で同等であった(データ非表示)。

## 【0319】

脳のタウ病理は脳の可溶性画分で全タウ又はpTauのレベルに変化を示さなかったが、脳切片の免疫染色は、ACI-36-2B6-Ab1で処置したマウスにおける海馬のpTauの減少を示した。

## 【0320】

7.2.3. 対らせん状細線維(PHF)に存在するリン酸化タウエピトープにおける抗タウ抗体の投与の影響

アルツハイマー病(AD)は、神経原線維変化によって神経病理学的に特徴付けられる(NFTs; Braak, Braak, & Bohl, 1993)。構造的には、NFTは、高リン酸化された状態で主に見られる、微小管結合タンパク質タウからなる対らせん状細線維(PHF)からなる(Alonso et al., 1997)。本研究の目的は、抗pTau抗体ACI-36-2B6-Ab1とACI-36-3A8-Ab1の4回の投与によって、タ

10

20

30

40

50

ウトランスジェニックマウスの脳におけるこれらの p T a u P H F エピトープを減らすことだった。

【0321】

文書で十分に立証されたタウ P H F リン酸化エピトープの量に関して、4回の A C I - 36 - 2 B 6 - A b 1 の投与の効果測定のために、処置されたタウ T g マウスからの大脳皮質及び海馬の可溶性画分及び S i n T 画分が、W B を用いた抗 p S 3 9 6 抗体 ( P H F - 1 3 エピトープ、p S 3 9 6 ) 及び A D 2 ( P H F - 1 エピトープ、p S 3 9 6 / p S 4 0 4 ) で探索された。タウ P H F のマーカーとして、p S 3 9 6 / p S 4 0 4 の存在 ( Greenberg et al., 1992; Reig et al., 1995 )、より具体的には p S 3 9 6 位置 ( Hoffmann et al., 1997 ) が以前に文書化されている。タウ T g マウスにおいて、タウは内因性マウスタウとして及びヒトタウ導入遺伝子として、両方の種由来のタウと2つの異なる転写産物由来のタウに結合するプロットティング抗体が十分な量で発現されるときに、明らかに W B で識別することができる分子量の違いを有して、発現される。従って、可能な場合、内因性マウスのバンド及びヒトトランスジェニックタウのバンドは各プロットティング抗体に対して識別され別々に定量した。我々の W B アッセイでこれらのタウバンドの移行パターンを検証するために、ヒト特異的 ( タウ 1 3 ) であってタウ T g 脳でヒトの導入遺伝子を示すのみであるが、全タウに結合する抗タウ抗体が、タウトランスジェニックマウスにおいてヒト及びマウスのタウの移行パターンを検証するためにタウ T g コントロールサンプルに用いられた。さらに、全ての定量化されたバンドは アクチンに規格化された。

10

20

【0322】

大脳皮質からの可溶性画分で探索される P H F エピトープの存在は、A C I - 36 - 2 B 6 - A b 1 及び A C I - 36 - 3 A 8 - A b 1 で処置されたマウスで減少した。これは、W B で p S 3 9 6 ( P H F - 1 3 ) 抗体を用いて、マウスとヒトのバンドの両方で有意であった ( 図 5 A 及び B ) 。

【0323】

A D 2 ( P H F - 1、p S 3 9 6 / p S 4 0 4 ) 抗体が、A C I - 36 - 2 B 6 - A b 1 及び A C I - 36 - 3 A 8 - A b 1 処置マウスからの抽出物の W B で用いられるとき、有意な減少が観察された ( 図 5 C ) 。

【0324】

これらの W B で使用された2つの P H F - 特異的抗体は類似のエピトープ及びリン酸化ターゲットに対する良好な特異性を持っているにもかかわらず、p S 3 9 6 ( P H F - 1 3 ) 抗体はより良いシグナル対ノイズ比を有するように見え、かつこれらの W B についてより良好な全体的抗体であったことは記録されるべきである。

30

【0325】

治療抗体の直接的な標的効果は、プロットティング抗体として A C I - 36 - 2 B 6 - A b 1 と A C I - 36 - 2 B 6 - A b 1 をそれぞれ使用して大脳皮質において探索された。この抗 p T a u 抗体は、本研究で用いた治療抗体と同じリン酸化タウのエピトープに結合する。プロットは、以前は二次抗マウス I g G 抗体で探索された。

【0326】

バンドは、赤外線イメージングシステムを用いて定量した。個別のマウスに対する値ならびに平均 ± 平均値の標準誤差が決定された。

40

【0327】

バックグランド以上のシグナルは検出されず、これらのサンプルにおいて治療抗体によって遮断効果又は干渉がないことを実証している ( データ非表示 ) 。

【0328】

A C I - 36 - 2 B 6 - A b 1 で処置したマウスでは、コントロールで処置された n T G マウスのレベルまで下がってシグナルが低減する傾向が観察され、直接的な標的効果を示している ( 図 5 G ) 。 A C I - 36 - 3 A 8 - A b 1 で処置したマウスでは、処置の有意な影響は観察されなかった ( 図 5 G ) 。

50

## 【0329】

タウTgマウスの可溶性皮質における総タウにおいて、内因性マウスタウ及びトランスジェニックヒトタウの両方に結合するプロットイング用Tau5抗体を用いて、ACI-36-2B6-Ab1処置の有意な効果が観察された。

## 【0330】

全タウの有意な減少は、大脳皮質の可溶性画分における内因性マウスのタウおよびトランスジェニックヒトタウの両方について観察された。

## 【0331】

マウスA)及びヒトB)の全タウ(タウ5)を示すバンドは、赤外線イメージングシステムを用いて定量した。個別のマウスに対する値ならびに平均±平均値の標準誤差が決定された。

10

## 【0332】

界面活性剤不溶性タウ画分中のPHFエピトープの存在は、サルコシル不溶性(SinT)脳画分を調製することによって行われた。

## 【0333】

バンドは、赤外線イメージングシステムを用いて定量した。個別のマウスに対する値ならびに平均±平均値の標準誤差が決定された。

## 【0334】

皮質と海馬の両方で、可溶性タウ画分と比較したとき、この画分でタウはほとんど存在していなかった。これは、4ヶ月で海馬及び皮質に不溶性で凝集したタウの有意な量を蓄積していない可能性がある本研究で用いたタウTgマウスの年齢に起因する可能性がある。従って、SinT画分でPHFエピトープを探索するとき、AD2(PHF-1、pS396/pS404)抗体のみが、バンドの信頼性のある量子化のために十分であったシグナルを提供した。

20

## 【0335】

1mg/kgのACI-36-2B6-Ab1及び1mg/kgのACI-36-3A8-Ab1でそれぞれ処置されたマウスは、内因性マウスタウを表すバンドでPHF-1エピトープの有意な減少があった(図5C)トランスジェニックヒトバンドで観測されたシグナルは確実に定量するのに十分な強さではなかった。

## 【0336】

海馬はまた、皮質に対するものと同じ抗体および画分を用いて探索された。全プロットイングの抗体についてより低シグナルが、皮質のそれと比べて海馬由来画分において検出された。

30

## 【0337】

タウTgマウスの可溶性海馬におけるpS396(PHF-13)免疫反応において、ACI-36-2B6-AB1及びACI-36-3A8-AB1処置の効果を決定した。マウスA)及びヒトB)のpTau pS396(PHF-13)エピトープを示すバンドは、赤外線イメージングシステムを用いて定量した。個別のマウスに対する値ならびに平均±平均値の標準誤差が決定された。

## 【0338】

ACI-36-2B6-Ab1処置は、ヒトの導入遺伝子バンドにおいて減少するわずかな傾向を伴っており、マウスタウ溶性海馬画分中でpS396(PHF-13)エピトープの存在を有意には変えなかった。

40

## 【0339】

ACI-36-3A8-Ab1処置は、pS396(PHF-13)エピトープの存在下で、マウスタウ可溶性海馬画分及びヒト導入遺伝子のバンドで、減少傾向を示した。

## 【0340】

pS396(PHF-13)WBで観察されたものと類似して、ACI-36-2B6-Ab1及びACI-36-3A8-Ab1で処置されたマウスの抽出物の両方で、ヒトタウ可溶性海馬画分における全タウについて、シグナルの減少する傾向が検出された。

50

## 【0341】

皮質S i n Tサンプルに似て、海馬からのS i n T画分はp T a uのレベルが非常に低かった。A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1及びA C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1のそれぞれで処置されたマウスは、内因性マウスタウを表すバンドにおいて、P H F - 1 ( p S 3 9 6 / p S 4 0 4 ) エピトープに変化は無かった。トランスジェニックヒトバンドで観測されたシグナルは確実に定量するのに十分に強くはなかった。

## 【0342】

## 7.2.4 要約

本研究は、リン酸化部位特異的抗p T a u抗体A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1抗体及びA C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1抗体の4回の投与を用いる受免疫化は、空間学習を改善し、

10

## 【0343】

タウT gマウスに対する抗p T a u抗体A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1の1及び3 m g / k gでの4回の末梢性投与は、ウェスタンブロット法により測定される皮質におけるp T a u P H Fエピトープの存在を減少させた。減少の傾向は海馬で観察された。同様に、全タウの低下も観察された。p T a u P H F - 1免疫反応性の有意な減少が、不溶性皮質画分で観察され、抗体治療の直接的な標的効果を示す傾向もまた観察された。これらの結果は、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 2及びA C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 2抗体は、アルツハイマー病などのタウオパチーに対する受動免疫治療における、抗p T a u抗体A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1及びA C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1についての更なる支持を与えている。

20

## 【0344】

実施例8：ヒトタウ過剰発現マウスの3ヶ月の処置

## 8.1 方法

## 8.1.1 マウス及び処置

タウトランスジェニックマウスが用いられ、方法6.1の表に示すように、治療抗体を投与し(研究番号3)、下記の表に記載のようにマウスは4つの異なる処置群に割り当てられた。

群	マウス株	遺伝子型	開始時年齢	性	n	処置		
A	TMHT	Tg	3月(±2週)	混合	15+1	PBS (コントロール)	i.p. 10 µl/g b.w.	毎週
B	TMHT	Tg	3月(±2週)	混合	15+1	ACI-36-2B6-Ab1 (1 mg/kg)	i.p. 10 µl/g b.w.	毎週
C	TMHT	Tg	3月(±2週)	混合	15+1	ACI-36-2B6-Ab1 (3 mg/kg)	i.p. 10 µl/g b.w.	毎週
F	TMHT	nTg	3月(±2週)	混合	15+1	PBS (コントロール)	i.p. 10 µl/g b.w.	毎週

30

## 【0345】

全45匹のT gマウスプラス3匹の予備は、処置群AからCに割り当てられ、15匹のn T gマウスプラス1匹の予備(群G)は、P B S (ビヒクルコントロール)又は抗p T A U抗体のA C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1又はA C I - 3 6 - 3 A 8 - A b 1の何れかを腹腔内注射により、第0日目、7日目、14日目、21日目、28日目、35日目、42日目、49日目、56日目、63日目、70日目、77日目、および84日目に処置された。動物を全ての処置群の動物を含む5つの異なる出発群(階級)に無作為に囲い込んだ。一階級における動物の数は同じ年齢で均一な取扱いを確保するように限定された。第12回目の投与後に、水迷路(M W M)タスクを、空間記憶の成績を試験するために行った。M W Mの後で、マウスに被験物質を更に1回追加投与し(第13回目の注射)、24時間後安楽死させてタウ病理を決定した。脳のタウ病理は、A T 1 8 0 (抗p T a u、p T

40

50

231 / pS235) 抗体を用いて免疫組織化学的 (IHC) 定量によって海馬と扁桃体で決定された。更に、皮質と海馬において、可溶性及びサルコシル不溶性タウ及び pTau に関する処置の効果を、メソスケールディスクバリー (MSD) 技術を用いて測定し、pTau (pT231 と pS396) 及び全タウを探索した。

【0346】

#### 8.1.2. 行動実験 - モリス水迷路 (MWM) タスク

この実験は、実施例 7.1.2 に記載のプロトコルに従って行った。第 12 週に、学習および記憶を評価するために、空間的ナビゲーションをモリス水迷路 (MWM) で試験した。

【0347】

#### 8.1.3. 分子生物学

全TAU及びThr231及びpS396をリン酸化したタウは、メソスケールディスクバリー (MSD) から免疫測定法を用いて、Tg動物の脳ホモジネートで定量した。

【0348】

#### 8.1.4. 免疫組織化学的 (IHC) 定量による脳のタウ病理

この実験は、実施例 7.1.3 に記載のプロトコルに従って行った。TAU病理は、群あたり 8 匹の海馬及び扁桃体における AT180 免疫反応によって決定された。

【0349】

#### 8.1.5. 対らせん状細線維 (PHF) に存在するリン酸化タウエピトープにおける 3 ヶ月抗タウ抗体の投与の影響

この実験は、実施例 7.1.4、7.1.5 と 7.1.6 に記載のプロトコルに従って行った。文書で十分に立証されたタウ PHF リン酸化エピトープの量に関して、4 回の ACI-36-2B6-Ab1 及び ACI-36-3A8-Ab1 の投与の効果を測定するために、処置されたタウ Tg マウスからの大脳皮質及び海馬の可溶性画分及び SinT 画分が、WB を用いて、AD2 (PHF-1 エピトープ、pS396 / pS404)、抗 pS396 抗体 (PHF-13 エピトープ、pS396) 及び AT180 (pT231 / pS235) で探索された。

【0350】

#### 8.1.6. biGT タウバイジェニックマウスを用いた、リン酸化タウエピトープに対する 3 ヶ月抗タウ抗体投与の影響

研究番号 4 は方法 6.1 に示したようにバイジェニックタウマウスを用いて行った。ウェスタンブロットティングの総ホモジネート (TH) または可溶性画分 (S1) を使用して、下図に示すように、大脳皮質サンプルを調製した。膜は pTau または全タウに対して次のブロットティング抗体を用いて探索した：

HT-7 (26 ng / ml)、全ヒトタウに対して特異的

PHF-13 (pS396) 1 / 7500 希釈

AT180 (pT231) 2.47 ug / ml

AT8 (pS202) 3 ug / ml

pS404 1 : 5000 希釈

pS400 1 : 5000 希釈

【0351】

すべての定量化は、-アクチンに対して規格化した。

【0352】

#### 8.2 ACI-36-2B6-Ab1 抗体の結果

12 週間の研究期間中毎週 1 又は 3 mg / kg で投与された ACI-36-2B6-Ab1 の 13 回の腹腔内注射は、いかなる著しい悪影響をも示さなかった。

【0353】

#### 8.2.1 行動結果 - モリス水迷路

MWM 試験の結果は、ACI-36-2B6-Ab1 で処置されたマウスに関して空間学習が改善される強い傾向を実証した (図 9)。

10

20

30

40

50



## 【0354】

処置の最終週の期間、動物の空間ナビゲーションの学習及び記憶を評価した。動物は1日あたり3回試行で4日間のトレーニングを行う必要があり、その後1回のプローブ試験と視覚検査を行った。逃避潜時（マウスが隠されたプラットフォームを見つけて水から脱出するのに必要な時間[秒]）、経路（標的に到達する軌跡の長さ[メートル]）、泳ぐ速度（経路と逃避潜時の計算商）、標的交差の数及び標的四分円における滞在が評価された。4日間の試験にわたるプラットフォームへ到達するために水泳経路の長さ及び逃避潜時の観点から、ビヒクルで処置されたTg（群A）及びnTg（F）コントロールの動物は期待された学習曲線を示した。Tgコントロール（A）の動物は、nTgコントロールの動物（群F）に比較して、逃避潜時と水泳経路の平坦な学習曲線で示される、著しい学習能力の障害を示した。逃避潜時と水泳経路は、トレーニングの3日（ $P < 0.01$ 、潜時； $p < 0.001$ 、長さ；ボンフェローニの事後試験）及び4日（ $P < 0.01$ ；ボンフェローニの事後試験）で著しく（双方向ANOVA）異なっていた。ACI-36-2B6-A b 1による処置は、Tgコントロールの動物（A）と比較して、低又は高用量（BとC）で、空間学習能を著しくは改善しなかった。各群の成績をトレーニング第1日における100%に適合させ、以後の全ての日を第一日の割合とすると、ACI-36-2B6-A b 1で処置されたマウスにおいて（低及び高用量）、統計的有意性は無いが、遊泳経路長にわずかな改善を見ることができる。処置群間での違いは、全4日間のトレーニングで水泳速度を計算すると検出されなかった。プローブ試験（PT）において、標的四分円（西南象限）における滞在並びに標的ゾーンの交差が記録された。nTgコントロール（群F）は、統計的有意性は無いが、標的四分円でより長時間を過ごし、Tgコントロール（群A）に比べて非常にしばしば標的ゾーンを交差した。

10

20

## 【0355】

低容量又は高用量の何れの処置も、PTにより評価されるように、Tgコントロールに比較して、空間学習能の改善には至らなかった。

## 【0356】

## 8.2.2 分子生物学

## 8.2.2.1 皮質ホモジネートの可溶性画分におけるTAU

全TAU、p231TAU、p396TAU、及びpTAUの全TAUに対する比率は、群A（Tgビヒクル群；PBS）、群B（Tg、ACI-36-2B6-A b 1 1mg/kg）、及び群C（Tg、ACI-36-2B6-A b 1 3mg/kg）に由来するn=16匹の動物の皮質ホモジネートの可溶性画分で評価された。ACI-36-2B6-A b 1による処置は可溶性皮質ホモジネートにおいて全TAU及びpTAUに有意には影響を与えなかった。しかし、ACI-36-2B6-A b 1の処置の際、全TAU、p231TAU、及びp396TAUの平均に（有意性は無いが）わずかな増加が観察された。全TAUに対するpTAUの比率として評価されるTAUリン酸化は影響を受けなかった。

30

## 【0357】

## 8.2.2.2 皮質ホモジネートのサルコシル不溶性画分におけるTAU

全TAU、p231TAU、p396TAU、及びpTAUの全TAUに対する比率は、群A（Tgビヒクル群；PBS）、群B（Tg、ACI-36-2B6-A b 1 1mg/kg）、及び群C（Tg、ACI-36-2B6-A b 1 3mg/kg）に由来するn=16匹の動物の皮質ホモジネートのサルコシル不溶性画分で評価された。ACI-36-2B6-A b 1による処置はサルコシル不溶性皮質ホモジネートにおいて全TAU及びpTAUに有意には影響を与えなかった。しかし、ACI-36-2B6-A b 1の処置の際、全TAU及びp231TAUの平均に（有意性は無いが）わずかな増加が観察された。全TAUに対するpTAUの比率として評価されるTAUリン酸化は影響を受けなかった。

40

## 【0358】

## 8.2.2.3 海馬ホモジネートの可溶性画分におけるTAU

50

全T A U、p 2 3 1 T A U、p 3 9 6 T A U、及びp T A Uの全T A Uに対する比率は、群A ( T g ビヒクル群 ; P B S )、群B ( T g、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 1 m g / k g )、及び群C ( T g、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 3 m g / k g ) に由来するn = 1 6 匹の動物の海馬ホモジネートの可溶性画分で評価された。A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 による処置は可溶性海馬ホモジネートにおいて全T A U及びp T A Uに有意には影響を与えなかった。A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 の処置の際、全T A Uに対するp T A Uの比率として評価されるT A Uのリン酸化のわずかな増加が ( 有意性はないが ) 観察された。

#### 【 0 3 5 9 】

##### 8 . 2 . 2 . 4 海馬ホモジネートのサルコシル不溶性画分におけるT A U

全T A U、p 2 3 1 T A U、p 3 9 6 T A U、及びp T A Uの全T A Uに対する比率は、群A ( T g ビヒクル群 ; P B S )、群B ( T g、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 1 m g / k g )、及び群C ( T g、A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 3 m g / k g ) に由来するn = 1 6 匹の動物の海馬ホモジネートのサルコシル不溶性画分で評価された。A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 による処置はサルコシル不溶性海馬ホモジネートにおいて全T A U及びp T A Uに有意には影響を与えなかった。3 m g / k g による処置は全T A U、p 2 3 1 T A U並びにp 3 9 6 T A Uの平均を、有意性に到達することは無いものの増加させたが、1 m g / k g で処置すると、全T A U、p 2 3 1 T A U並びにp 3 9 6 T A Uの平均のわずかな減少が観察された。全T A Uに対するp T A Uの比率として評価されるT A Uリン酸化は、3 m g / k g のA C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 処置によりわずかに増加した。

#### 【 0 3 6 0 】

##### 8 . 2 . 2 . 5 . 水溶性の皮質のウェスタンブロット

A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 の用量依存性による処置は、大脳皮質の可溶性画分において、p S 3 9 6 / p S 4 0 4 ( 図 5 D ) 及びp T 1 8 1 ( 図 F 5 E 及び 5 F ) p T a u エピトープの両方の存在を減少させ、3 m g / k g 用量で有意な作用を示した。

#### 【 0 3 6 1 】

##### 8 . 2 . 2 . 6 b i G T タウバイジェニックマウスのT A U

3ヶ月間A C I - 3 6 - 2 B 6 - A b 1 で処置したb i G T マウスは、大脳皮質可溶性画分で総タウを有意に減少させた ( 図 6 A および 6 B )。p T a u エピトープのp T 2 3 1 / A T 1 8 0 ( 図 6 C 及び 6 D )、p S 2 0 2 / A T 8 ( 図 6 E )、及びp S 3 9 6 ( 図 6 F 及び 6 G ) で有意な減少が観察された。有意な減少もまたp T a u エピトープp S 4 0 0 ( 図 6 H 及び 6 I ) 及びp S 4 0 4 ( 図 6 L 及び 6 M ) の両方の総ホモジネート ( T H ) の両方で観察された。更に、p T a u エピトープp S 4 0 0 の可溶性画分で有意な減少も観察され ( 図 6 J 及び 6 K )、p T a u エピトープp S 4 0 4 について減少傾向がみられた ( 図 6 N 及び 6 O )。

#### 【 0 3 6 2 】

##### 8 . 2 . 3 組織学

##### 8 . 2 . 3 . 1 形態計測 - 領域面積の決定

解剖及びI H C 又は染色の最中で組織に対する負の影響 ( 例えば明確な収縮、異なる切片 ) と、ある程度、処置が誘発した萎縮を除外し、海馬及び扁桃体の測定された領域面積は、調査された脳の全てを通して有意差は認められなかった。個々の切片は、例えば、標識化プロトコルの実行の最中での切片部分の喪失又は組織の折れたたみのために、個体及び群の平均から逸脱する場合がある。従って、任意の標識の全免疫反応性面積 [  $\mu m^2$  単位 ] は、領域面積内の標識面積の割合 [ 標識面積 / ( 領域面積 \* 1 0 . 0 0 0 ) ] を計算することにより、切片の個々の領域面積 [  $mm^2$  単位 ] に対して規格化した。

#### 【 0 3 6 3 】

##### 8 . 2 . 3 . 2 A T 1 8 0 I H の結果

A T 1 8 0 抗体は内因性及びヒトp T A U ( T h r 2 3 1 及び S e r 2 3 5 で 2 重リン酸化 ) を検出する。n T g コントロールにおける細胞体内のp T A U の量は、T g 群と比

10

20

30

40

50

較して有意に低かった ( $p < 0.01$  並びに  $p < 0.001$ )。扁桃体では、ACI-36-2B6-Ab1の高用量 (3 mg/kg 群C) は、ビヒクル処置動物に比べて細胞体 pTAU を有意に減少させた (図7、左)。低用量 (1 mg/kg 群C) は同様の傾向を示したが有意性には至らなかった。同じ効果は、海馬で検出可能であった。ACI-36-2B6-Ab1は用量依存的に pTAU を減少させ、高用量で有意であり低用量でその傾向がみられた (図7、右)。この減少はまた、染色の領域の減少及び個々の神経細胞の細胞体における染色強度の減少として定性的に可視的であった。ニューロンの細胞体で測定された AT180 IR の AOI のサイズに規格化された染色強度の総和の結果は、扁桃体における高用量の大きな効果の有意な用量依存性を含み、測定された AT180 IR 面積割合が同程度であった。海馬では、事後の比較は有意な水準には達しなかった。

10

## 【0364】

## 8.2.4 要約

MSDで測定した脳のタウ病理には、有意な変化を示さなかったが、脳切片の免疫染色は、神経細胞体で AT180 (pT231 / pS235) 免疫染色の最大60%の減少を伴う用量依存性を示した。

## 【0365】

本研究は、リン酸化部位特異的抗 pTau 抗体 ACI-36-2B6-Ab1 抗体の13回の投与を用いる受免疫化は、空間学習を改善し、脳の pTau 病理を著しく減少させることを示している。

20

## 【0366】

## 8.3 ACI-36-3A8-Ab1 抗体の結果

12週間の研究期間中毎週1又は3 mg/kg で投与された ACI-36-3A8-Ab1 の13回の腹腔内注射は、いかなる著しい悪影響をも示さなかった。

## 【0367】

## 8.3.1 行動結果 - モリス水迷路

MWM試験の結果は、3 mg/kg の ACI-36-3A8-Ab1 で処置されたマウスに関して空間学習が改善される有意な効果を実証した (図10)。

## 【0368】

4日間の試験にわたるプラットフォームへ到達するために水泳経路の長さ及び逃避潜時の観点から、ビヒクルで処置された Tg (群A) 及び nTg (F) コントロールの動物は期待された学習曲線を示した。Tg コントロール (A) の動物は、nTg コントロールの動物 (群F) に比較して、逃避潜時と水泳経路の平坦な学習曲線で示される、著しい学習能力の障害を示した。逃避潜時と水泳経路は、トレーニングの3日 ( $P < 0.01$ 、潜時;  $p < 0.001$ 、長さ; ボンフェローニの事後試験) 及び4日 ( $P < 0.01$ ; ボンフェローニの事後試験) で著しく (双方向 ANOVA) 異なっていた。ACI-36-3A8-Ab1 による処置は、Tg コントロールの動物 (A) と比較して、低又は高用量 (D と E) で、絶対値が解析されるとき、空間学習能を著しくは改善しなかった。各群の成績をトレーニング第1日における100%に適合させ、以後の全ての日を第一日の割合とすると、ACI-36-3A8-Ab1 処置 (低及び高用量) の際に学習及び記憶能力の改善の可能性がある。ACI-36-3A8-Ab1 (群D) の低用量で処置された動物は、Tg コントロール (群A) に比べて、MWMでごくわずかに良好に機能した。3 mg/kg の ACI-36-3A8-Ab1 による毎週の処置の効果は (群E) はるかに顕著であり、nTg 動物のパフォーマンスをほとんど回復した。Tg コントロール (A) に比べて、3 mg/kg の ACI-36-3A8-Ab1 の作用は第3日と第4日で遊泳経路長について統計的に有意であった。処置群間での違いは、全4日間のトレーニングで水泳速度を計算すると検出されなかった。

30

40

## 【0369】

プローブ試験 (PT) において、標的四分円 (西南象限) における滞在並びに標的ゾーンの交差が記録された。nTg コントロール (群F) は、統計的有意性はないが、標的四

50

分円でより長時間を過ごし、Tgコントロール(群A)に比べて非常にしばしば標的ゾーンを交差した。低容量又は高用量の何れの処置も、PTにより評価されるように、Tgコントロールに比較して、統計的に有意な改善には至らなかった。しかし、ACI-36-3A8-Ab1処置動物は-統計的には有意でないものの-、Tgコントロールに比較して、標的ゾーンをより交差し、それは4日間にわたるトレーニングの遊泳距離の結果と一致する。

【0370】

8.3.2 分子生物学

8.3.2.1 皮質ホモジネートの可溶性画分におけるTAU

全TAU、p231TAU、p396TAU、及びpTAUの全TAUに対する比率は、群A(Tgビヒクル群;PBS)及び群D(Tg、ACI-36-3A8-Ab1、1mg/kg)に由来するn=16匹の動物、及び群E(Tg、ACI-36-3A8-Ab1、3mg/kg)に由来するn=15匹の動物の皮質ホモジネートの可溶性画分で評価された。ACI-36-3A8-Ab1による処置は可溶性皮質ホモジネートにおいて全TAU及びpTAUに有意には影響を与えなかった。しかし、ACI-36-3A8-Ab1の処置の際、全TAU、p231TAU、及びp396TAUの平均に(有意性は無いが)わずかな増加が観察された。全TAUに対するp231TAUの比率として評価される231でのTAUリン酸化は、3mg/kgのACI-36-3A8-AB1による処置後にわずかに減少した。

【0371】

8.2.2.2 皮質ホモジネートのサルコシル不溶性画分におけるTAU

全TAU、p231TAU、p396TAU、及びpTAUの全TAUに対する比率は、群A(Tgビヒクル群;PBS)及び群D(Tg、ACI-36-3A8-Ab1、1mg/kg)に由来するn=16匹の動物、及び群E(Tg、ACI-36-3A8-Ab1、3mg/kg)に由来するn=15匹の動物の皮質ホモジネートのサルコシル不溶性画分で評価された。ACI-36-3A8-AB1による処置はサルコシル不溶性皮質ホモジネートにおいて全TAU及びpTAUに有意には影響を与えなかった。1mg/ACI-36-3A8-Ab1の処置の際、全TAU、p231TAU、及びp396TAUの平均に(有意性は無いが)わずかな減少が観察された。更に、1mg/kgのACI-36-3A8-Ab1で処置された動物の全TAUに対するp231TAUは、ヒヒクルで処置された動物に比べて、2つの群の全TAUに対するp231TAUの平均を変化させることなく、わずかに低くつきを(Fテスト:p=0.184において有意性を欠いてはいるが)示した。1mg/kg及び3mg/kgでのACI-36-3A8-Ab1処置群において、p396TAUリン酸化のわずかな増加が観察された。

【0372】

8.3.2.3 海馬ホモジネートの可溶性画分におけるTAU

全TAU、p231TAU、p396TAU、及びpTAUの全TAUに対する比率は、群A(Tgビヒクル群;PBS)及び群D(Tg、ACI-36-3A8-Ab1、1mg/kg)に由来するn=16匹の動物、及び群E(Tg、ACI-36-3A8-Ab1、3mg/kg)に由来するn=15匹の動物の海馬ホモジネートの可溶性画分で評価された。IRN6301(群D)の可溶性海馬画分におけるTAU及びpTAUのレベルは異常値であり除外された。ACI-36-3A8-Ab1による処置は可溶性海馬ホモジネートにおいて全TAU及びpTAUに有意には影響を与えなかった。ACI-36-3A8-Ab1の処置の際、全TAUに対するpTAUの比率として評価される、231でのTAUのリン酸化のわずかな増加が(有意性は無いが)観察された。

【0373】

8.2.2.4 海馬ホモジネートのサルコシル不溶性画分におけるTAU

全TAU、p231TAU、p396TAU、及びpTAUの全TAUに対する比率は群A(Tgビヒクル群;PBS)、群B(Tg、ACI-36-3A8-Ab1、1mg/kg)、及び群C(Tg、ACI-36-3A8-Ab1、3mg/kg)に由来する

n = 16匹の動物の海馬ホモジネートのサルコシル不溶性画分で評価された。ACI-36-3A8-Ab1による処置はサルコシル不溶性海馬ホモジネートにおいて全TAU及びpTAUに有意には影響を与えなかった。ACI-36-3A8-Ab1の処置の際、全TAU、p231TAU、並びにp396TAUの平均に（有意性は無いが）わずかな増加が観察された。全TAUに対するp231TAUの比率として評価されるTAUのリン酸化は影響されず、1mg/kgのACI-36-3A8-Ab1による処置は、全TAUに対するp396TAUの比率をわずかに減少させた。

#### 【0374】

##### 8.3.2.5 水溶性の皮質のウェスタンブロット

1又は3mg/kgのACI-36-3A8-Ab1で処置されたマウスの可溶性大脳皮質において、pS396/pS404 pTauエピトープの有意な減少（図5D）。ヒト/トランスジェニックpT181 pTauエピトープの存在は、可溶性皮質画分で減少し、1mg/kgで処置されたマウスで有意な作用と3mg/kgで処置されたマウスで傾向を示した。減少傾向は内因性pT181 pTauの量で観察された（図5F）。

#### 【0375】

##### 8.3.2.6 biGTタウバイジェニックマウスのTAU

3ヶ月間ACI-36-3A8-Ab1で処置したbiGTマウスは、大脳皮質可溶性画分で総タウを有意に減少させた（図6Aおよび6B）。pTauエピトープのpT231/AT180（図6C及び6D）、pS202/AT8（図6E）、及びpS396（図6F及び6G）で有意な減少が観察された。有意な減少もまたpTauエピトープpS400（図6H及び6I）及びpS404（図6L及び6M）の両方の総ホモジネート（TH）の両方で観察された。更に、pTauエピトープpS400の可溶性画分で有意な減少も観察され（図6J及び6K）、pTauエピトープpS404について減少傾向がみられた（図6N及び6O）。

#### 【0376】

##### 8.3.3 組織学

##### 8.3.3.1 形態計測 - 領域面積の決定

実施例8.2.3.1を参照。

#### 【0377】

##### 8.3.3.2 AT180 IHの結果

AT180抗体は内因性及びヒトpTAU（Thr231及びSer235で2重リン酸化）を検出する。nTgコントロールにおける細胞体内のpTAUの量は、Tg群と比較して有意に低かった（ $p < 0.001$ ）。扁桃体では、ACI-36-3A8-Ab1 [1mg/kg（群D）及び3mg/kg（群E）]の両方の用量が、ビヒクル処置動物に比べて細胞体pTAUを有意に減少させた（図8、左）。類似の効果が海馬で観察可能であり、低用量のACI-36-3A8-Ab1はpTAUを減少させたが、しかしこの場合、高用量では有効性は少なく、減少傾向へと導くのみであった。この減少はまた、染色の領域の減少及び個々の神経細胞の細胞体における染色強度の減少として定性的に可視的であった。ニューロンの細胞体で測定されたAT180 IR強度の規格化された合計の結果は、扁桃体において、AT180 IR面積の割合に匹敵したが、高用量においてのみ有意性に到達した。海馬では結果は、IR面積百分率に全く同等であった。

#### 【0378】

##### 8.3.4 要約

MSDで測定した脳のタウ病理には、有意な変化を示さなかったが、脳切片の免疫染色は、神経細胞体でAT180（pT231/pS235）免疫染色の最大40%の減少を伴う用量依存性を示した。

#### 【0379】

本研究は、リン酸化部位特異的抗pTau抗体ACI-36-3A8-Ab1の13回の投与を用いる受免疫化は、空間学習を改善し、脳のpTau病理を著しく減少させるこ

10

20

30

40

50

とを示している。

【 0 3 8 0 】

寄託

以下のハイブリドーマ細胞株がブダペスト条約の規定により、ブラウンシュワイクの微生物及び細胞培養のドイツコレクション有限責任会社 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig)、Inhoffenstrasse 7 B、381 24 Braunschweigとともにエーシーイミュン (AC Immune) SA、PSE-EPFL Building B、1015 Lausanne、Switzerland 及びルーヴェン・カトリック大学 (Katholieke Universiteit Leuven)、Minderbroedersstraat 8a - Box 5105、B-3000 Leuvenの名目で寄託された:

ハイブリドーマ名	寄託番号	寄託日
6C10F9C12A11	DSM ACC3079	2010年8月25日
6C10E5E9C12	DSM ACC3081	2010年8月25日
6H1A11C11	DSM ACC3080	2010年8月25日
6H1G6E6	DSM ACC3088	2010年8月25日
2B6A10C11	DSM ACC3084	2010年8月25日
2B6G7A12	DSM ACC3087	2010年8月25日
3A8A12G7	DSM ACC3086	2010年8月25日
3A8E12H8	DSM ACC3085	2010年8月25日
7C2(1)F10C10D3	DSM ACC3082	2010年8月25日
7C2(2)B9F11D5	DSM ACC3083	2010年8月25日
A4-4A6-48	DSM ACC3136	2010年8月30日
A6-2G5-30	DSM ACC3137	2010年8月30日
A6-2G5-41	DSM ACC3138	2010年8月30日
A4-2A1-18	DSM ACC3139	2010年8月30日
A4-2A1-40	DSM ACC3140	2010年8月30日
A6-1D2-12	DSM ACC3141	2011年9月6日

10

20

30

表 1. タウ配列、ワクチン及び抗体の記述

記述	ワクチン	配列*, 長さ (n), 配列 ID 番号	ハイブリドーマ	抗体
I1: タウ 5-20 [pY18]	ACI-33	RQFEVMEHDHAGTY(p)GL (n = 16) (配列番号: 59)	6C10F9C12A11 6C10E5E9C12	ACI-33-6C10-Ab1 ACI-33-6C10-Ab2
I8: タウ 206-221 [pT212, pS214] I9: タウ 196-211 [pS202, pT205]	ACI-41	PGRSRRT(p)PS(p)LPTPPTR (n = 16) (配列番号: 60) GYSSPGS(p)PGT(p)PGRSR (n = 16) (配列番号: 61)	7C2(1)F10C10D3 7C2(2)B9F11D5	ACI-41-7C2-Ab1 ACI-41-7C2-Ab1
I4: タウ 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	GDTs(p)PRHLS(p)NVSSSTGSID (n = 18) (配列番号: 63)	6H1A11C11 6H1G6E6 2B6A10C11 2B6G7A12 3A8A12G7 3A8E12H8 A4-4A6-48 A6-2G5-30 A6-2G5-41 A4-2A1-18 A4-2A1-40 A6-1D2-12	ACI-36-6H1-Ab1 ACI-36-6H1-Ab2 ACI-36-2B6-Ab1 ACI-36-2B6-Ab2 ACI-36-3A8-Ab1 ACI-36-3A8-Ab2 ACI-35-4A6-Ab2 ACI-35-2G5-Ab2 ACI-35-2G5-Ab3 ACI-35-2A1-Ab1 ACI-35-2A1-Ab2 ACI-35-1D2-Ab1
I3: タウ 393-408 [pS396, pS404]	ACI-35	VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n = 16) (配列番号: 62)		
I5: Control sequence: タウ 379-408 [pS396, pS404] I8: タウ 206-221 [pT212, pS214] I9: タウ 196-211 [pS202, pT205] I2: タウ 200-216 [pS202+ pT205 & pT212+pS214] I10: タウ 407-418 [pS409] I11: タウ 399-408 [pS404]	ACI-37 ACI-39 ACI-40 ACI-34 ACI-42 ACI-43	RENAKAKTDHGAEIVYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n = 30) (配列番号: 58) PGRSRRT(p)PS(p)LPTPPTR (n = 16) (配列番号: 60) GYSSPGS(p)PGT(p)PGRSR (n = 16) (配列番号: 61) PGS(p)PGT(p)PGRSRRT(p)PS(p)LP (n = 17) (配列番号: 64) HLS(p)NVSSSTGSID (n = 12) (配列番号: 65) VSGDTS(p)PRHL (n = 10) (配列番号: 66)		

\*タウヒト (タウ 441) の最長のアイソフォームに基づく。p はリン酸化残基を示す。

表 2. ACI-33 ハイブリドーマスクリーニングの結果

24 ウェルプレート スクリーニング		T25 フラスコスクリーニング		
ELISA で 陽性	TAUPIR で 陽性	IgG スク リーニン グで陽性	ELISA で 陽性	TAUPIR で 陽性
1A7		1A7		
	1A11			
	1C11	1C11		
2C9		2C9		
3C3		3C3	3C3	
3C5		3C5		
3E8		3E8		
3G10	3G10	3G10	3G10	
6C10	6C10	6C10	6C10	6C10
6F3		6F3		
6F8		6F8		

10

20



表 3. ACI-36 ハイブリドーマスクリーニングの結果

24 ウェルプレート スクリーニング		T25 フラスコスクリーニング		
ELISA で 陽性	TAUPIR で 陽性	IgG スク リーニン グで陽性	ELISA で 陽性	TAUPIR で 陽性
2B6	2B6	2B6	2B6	2B6
2F9	2F9	2F9	2F9	2F9
2G1		2G1	2G1	2G1
3A8	3A8	3A8	3A8	3A8
3B9		3B9	3B9	3B9
3F11	3F11	3F11		3F11
	4A3			4A3
4C1		4C1	4C1	4C1
4C12		4C12	4C12	4C12
4E12		4E12	4E12	4E12
5E10		5E10	5E10	
5F5		5F5	5F5	
7D6	7D6	7D6	7D6	7D6
6H1		6H1	6H1	6H1

10

20

表 4. ACI-36 の ELISA 及び TAUPIR における陽性クローンのランキング

ELISAのランキング	TAUPIRのランキング
3A8	6H1
2B6	4C1
4C1	3A8
6H1	4C12
4C12	2B6
2G1	2F9
2F9	3B9
7D6	2G1
3B9	7D6
4E12	4E12

30

40

表 5. ACI-41 ハイブリドーマスクリーニングの結果

24 ウェルプレート スクリーニング		T25 フラスコスクリーニング		
ELISA で 陽性	TAUPIR で 陽性	IgG スク リーニン グで陽性	ELISA で 陽性	TAUPIR で陽性
	3D11	3D11		3D11
4H6		4H6		4H6
5D10	5D10	5D10	5D10	5D10
5E6	5E6			
5F10		5F10		
6B7		6B7	6B7	
7C2	7C2	7C2	7C2	7C2
	8G8			8G8
	8H8	8H8		8H8

10

20

表 6. 標的に対する結合についてハイブリドーマのスクリーニング

ハイブリドーマ	抗体	ELISA				TAUPIR	ウエスタン ブロット
		タウ p-peptide	タウ peptide	全長 pTau	全長 Tau		
6C10F9C12A11	ACI-33-6C10-Ab1	+	-	+/-	-	+	-
6C10E5E9C12	ACI-33-6C10-Ab2	+	-	+/-	-	+	-
6H1A11C11	ACI-36-6H1-Ab1	+	-	+	-	+	+
6H1G6E6	ACI-36-6H1-Ab2	+	-	+	-	+	+
2B6A10C11	ACI-36-2B6-Ab1	+	-	+	-	+	+
2B6G7A12	ACI-36-2B6-Ab2	+	-	+	-	+	+
3A8A12G7	ACI-36-3A8-Ab1	+	-	+	-	+	+
3A8E12H8	ACI-36-3A8-Ab2	+	-	+	-/+	+	+
7C2(1)F10C10D3	ACI-41-7C2-Ab1	+	-	+	-	+	-
7C2(2)B9F11D5	ACI-41-7C2-Ab2	+	-	+	-	+	-
A4-2A1-18	ACI-35-2A1-Ab1	+	-	+	-		
A4-2A1-40	ACI-35-2A1-Ab2	+	-	+	-		
A4-4A6-18	ACI-35-4A6-Ab1	+	-	-	+		
A4-4A6-48	ACI-35-4A6-Ab2						
A6-1D2-12	ACI-35-1D2-Ab1	+	-	+	-		
A6-2G5-08	ACI-35-2G5-Ab1	+	-	-	-		
A6-2G5-30	ACI-35-2G5-Ab2	+	-	+	-		
A6-2G5-41	ACI-35-2G5-Ab3	+	-	+	-		

10

20

30

40

表 7. 抗タウ抗体の結合親和性

ハイブリドーマ	抗体	会合速度定数( $k_d$ ) (1/Ms)	解離速度定数 ( $k_a$ ) (1/s)	解離定数( $K_D$ ) (nM)
6C10F9C12A 11	ACI-33-6C10-Ab1	$9.46 \times 10^5$	$3.27 \times 10^{-3}$	3.46
6H1A11C11	ACI-36-6H1-Ab1	$3.53 \times 10^4$	$6.80 \times 10^{-5}$	1.93
6H1G6E6	ACI-36-6H1-Ab2	$9.99 \times 10^4$	$9.58 \times 10^{-5}$	0.96
2B6A10C11	ACI-36-2B6-Ab1	$6.90 \times 10^5$	$1.63 \times 10^{-4}$	0.24
2B6G7A12	ACI-36-2B6-Ab2	$9.11 \times 10^5$	$1.11 \times 10^{-4}$	0.12
3A8A12G7	ACI-36-3A8-Ab1	$1.01 \times 10^6$	$1.09 \times 10^{-4}$	0.11
3A8E12H8	ACI-36-3A8-Ab2	$8.43 \times 10^5$	$1.43 \times 10^{-4}$	0.17
A4-4A6-18	ACI-35-4A6-Ab1	$2.00 \times 10^5$	$3.10 \times 10^{-3}$	16
A6-1D2-12	ACI-35-1D2-Ab1	$1.60 \times 10^3$	$9.30 \times 10^{-6}$	$\leq 6$
A6-2G5-08	ACI-35-2G5-Ab1	$4.80 \times 10^5$	$5.30 \times 10^{-3}$	10

表 8. エピトープマッピングに使用されたペプチドライブラリー T1についてのペプチドライブラリー

タウ(441)アミノ酸番号	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
アミノ酸	R	Q	E	F	E	V	M	E	D	H	A	G	T	Y(P)	G	L
ペプチド番号																
T1.18											A	G	T	Y(P)	G	L
T1.17										H	A	G	T	Y(P)	G	L
T1.16									D	H	A	G	T	Y(P)	G	L
T1.15					E				D	H	A	G	T	Y(P)	G	L
T1.14							M	E	D	H	A	G	T	Y(P)	G	L
T1.13							M	E	D	H	A	G	T	Y(P)	G	L
T1.12						V	M	E	D	H	A	G	T	Y(P)	G	L
T1.11				F	E	V	M	E	D	H	A	G	T	Y(P)	G	L
T1.10			E	F	E	V	M	E	D	H	A	G	T	Y(P)	G	L
T1.9		Q	E	F	E	V	M	E	D	H	A	G	T	Y(P)	G	L
T1.7	R	Q	E	F	E	V	M	E	D	H	A	G	T	Y(P)	G	L

リン酸化ペプチド

アミノ酸	R	Q	E	F	E	V	M	E	D	H	A	G	T	Y	G	L
ペプチド番号																
T1.28											A	G	T	Y	G	L
T1.27										H	A	G	T	Y	G	L
T1.26									D	H	A	G	T	Y	G	L
T1.25								E	D	H	A	G	T	Y	G	L
T1.24							M	E	D	H	A	G	T	Y	G	L
T1.23						V	M	E	D	H	A	G	T	Y	G	L
T1.22					E	V	M	E	D	H	A	G	T	Y	G	L
T1.21				F	E	V	M	E	D	H	A	G	T	Y	G	L
T1.20			E	F	E	V	M	E	D	H	A	G	T	Y	G	L
T1.19		Q	E	F	E	V	M	E	D	H	A	G	T	Y	G	L
T1.8	R	Q	E	F	E	V	M	E	D	H	A	G	T	Y	G	L

非リン酸化ペプチド

表8. 続き  
T4についてのペプチドライブラリー

タウ(441)アミノ酸番号	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	
アミノ酸	G	D	T	S(p)	P	R	H	L	S(p)	N	V	S	S	T	G	S	I	D	
ペプチド番号																			
T3.17	G	D	T	S(p)	P	R	H	L											
T4.11		D	T	S(p)	P	R	H	L	S(p)										
T4.12			T	S(p)	P	R	H	L	S(p)	N									
T4.13				S(p)	P	R	H	L	S(p)	N	V								
T4.14					P	R	H	L	S(p)	N	V	S							
T4.15						R	H	L	S(p)	N	V	S	S						
T4.16							H	L	S(p)	N	V	S	S	T					
T4.17							H	L	S(p)	N	V	S	S	T	G				
T4.18									S(p)	N	V	S	S	T	G	S			
T4.19										N	V	S	S	T	G	S	I		
T4.20											V	S	S	T	G	S	I	D	
アミノ酸																			
ペプチド番号																			
T3.26	G	D	T	S	P	R	H	L	S	N	V	S	S	T	G	S	I	D	
T4.21		D	T	S	P	R	H	L	S										
T4.22			T	S	P	R	H	L	S	N									
T4.23				S	P	R	H	L	S	N	V								
T4.24					P	R	H	L	S	N	V	S							
T4.25						R	H	L	S	N	V	S	S						
T4.26							H	L	S	N	V	S	S	T	G				
T4.27								L	S	N	V	S	S	T	G	S			
T4.28									S	N	V	S	S	T	G	S	I		
T4.19										N	V	S	S	T	G	S	I		
T4.20											V	S	S	T	G	S	I	D	

シロイソチロシン

非リジン化ペプチド

10

20

30

40

表8. 続き  
T8についてのペプチドライブラリー

タウ(441)アミノ酸番号	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221
アミノ酸	P	G	S	R	S	R	T(p)	P	S(p)	L	P	T	P	P	T	R
ペプチド番号																
T8.7	P	G	S	R	S	R	T(p)	P								
T8.8		G	S	R	S	R	T(p)	P	S(p)							
T8.9			S	R	S	R	T(p)	P	S(p)	L						
T8.10				R	S	R	T(p)	P	S(p)	L	P					
T8.11					S	R	T(p)	P	S(p)	L	P	T				
T8.12						R	T(p)	P	S(p)	L	P	T	P			
T8.13							T(p)	P	S(p)	L	P	T	P	P		
T8.14								P	S(p)	L	P	T	P	P	T	
T8.15									S(p)	L	P	T	P	P	T	R

リン酸化ペプチド

アミノ酸	P	G	S	R	S	R	T	P	S	L	P	T	P	P	T	R
ペプチド番号																
T8.16	P	G	S	R	S	R	T	P								
T8.17		G	S	R	S	R	T	P	S							
T8.18			S	R	S	R	T	P	S	L						
T8.19				R	S	R	T	P	S	L	P					
T8.20					S	R	T	P	S	L	P	T				
T8.21						R	T	P	S	L	P	T	P			
T8.22							T	P	S	L	P	T	P	P		
T8.23								P	S	L	P	T	P	P	T	
T8.24									S	L	P	T	P	P	T	R

非リン酸化ペプチド

表8. 続き  
T9についてのペプチドライブラリー

タウ(441)アミノ酸番号 アミノ酸	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211
	G	Y	S	S	P	G	S(p)	P	G	T(p)	P	G	S	R	S	R
ペプチド番号 T9.7	G	Y	S	S	P	G	S(p)	P								
T9.8		Y	S	S	P	G	S(p)	P	G							
T9.9			S	S	P	G	S(p)	P	G	T(p)						
T9.10			S	S	P	G	S(p)	P	G	T(p)	P					
T9.11					P	G	S(p)	P	G	T(p)	P	G				
T9.12						G	S(p)	P	G	T(p)	P	G	S			
T9.13							S(p)	P	G	T(p)	P	G	S	R		
T9.14								P	G	T(p)	P	G	S	R	S	
T9.15									G	T(p)	P	G	S	R	S	R

アミノ酸  
ペプチド番号

アミノ酸	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211
	G	Y	S	S	P	G	S	P	G	T	P	G	S	R	S	R
T9.16	G	Y	S	S	P	G	S	P								
T9.17		Y	S	S	P	G	S	P	G							
T9.18			S	S	P	G	S	P	G	T						
T9.19			S	S	P	G	S	P	G	T	P					
T9.20					P	G	S	P	G	T	P	G	S			
T9.21						G	S	P	G	T	P	G	S	R		
T9.22							S	P	G	T	P	G	S	R	S	
T9.23								P	G	T	P	G	S	R	S	
T9.24									G	T	P	G	S	R	S	R

非リソシテペプチド



表8. 続き  
T3についてのペプチドライブラリー

タウ(441)アミノ酸番号	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408
アミノ酸	V	Y	K	S(p)	P	V	V	S	G	D	T	S(p)	P	R	H	L
ペプチド番号																
T3.9	V	Y	K	S(p)	P	V	V	S								
T3.10		Y	K	S(p)	P	V	V	S	G							
T3.11			K	S(p)	P	V	V	S	G	D						
T3.12				S(p)	P	V	V	S	G	D	T					
T3.13					P	V	V	S	G	D	T	S(p)				
T3.14						V	V	S	G	D	T	S(p)	P			
T3.15						V	V	S	G	D	T	S(p)	P	R		
T3.16								S	G	D	T	S(p)	P	R	H	
T3.17									G	D	T	S(p)	P	R	H	L

ニシキペプチド

アミノ酸	V	Y	K	S	P	V	V	S	G	D	T	S	P	R	H	L
ペプチド番号																
T3.18	V	Y	K	S	P	V	V	S								
T3.19		Y	K	S	P	V	V	S	G							
T3.20			K	S	P	V	V	S	G	D						
T3.21				S	P	V	V	S	G	D	T					
T3.22					P	V	V	S	G	D	T	S				
T3.23						V	V	S	G	D	T	S	P			
T3.24							V	S	G	D	T	S	P	R		
T3.25								S	G	D	T	S	P	R	H	
T3.26									G	D	T	S	P	R	H	L

非リソシペプチド

表 9. 抗体結合に要求されるタウアミノ酸及びリン酸化残基

ワクチン	ハイブリドーマ	エピトープ*
ACI-33	6C10F9C12A11	タウ aa 15-20, pY18 を必要条件
ACI-33	6C10E5E9C12	タウ aa 15-20, pY18 を必要条件
ACI-36	6H1A11C11	タウ aa 405-412, pS409 を必要条件
ACI-36	6H1G6E6	タウ aa 405-412, pS409 を必要条件
ACI-36	2B6A10C11	タウ aa 405-411, pS409 を必要条件
ACI-36	2B6G7A12	タウ aa 405-411, pS409 を必要条件
ACI-36	3A8A12G7	タウ aa 405-411, pS409 を必要条件
ACI-36	3A8E12H8	タウ aa 405-411, pS409 を必要条件
ACI-41	7C2(1)F10C10D3	タウ aa 208-218, pT212 と pS214 を必要条件
ACI-35	A4-2A1-18	タウ aa 393-401, pS396 を必要条件
ACI-35	A4-2A1-40	タウ aa 393-401, pS396 を必要条件
ACI-35	A4-4A6-18	タウ aa 396-401, pS396 を必要条件
ACI-35	A6-1D2-12	タウ aa 394-400, pS396 を必要条件
ACI-35	A6-2G5-08	タウ aa 402-406, pS404 を必要条件
ACI-35	A6-2G5-30	タウ aa 393-400, pS396 を必要条件
ACI-35	A6-2G5-41	タウ aa 393-400, pS396 を必要条件

\* ヒトタウ (タウ4441) の最長アイソフォームに基づく。

表 10. 重鎖と軽鎖の可変領域(VH 及び VK)及び CDR のアミノ酸配列

ワクチン	ハイブリド イマー (ミックス)	VH プライマ ー(ミックス)	VH	VK	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VK CDR1	VK CDR2	VK CDR3
ACI-36	配列番 号: 46 及び配 列番号: 47	VK_AD (配列 番号: 48/ 配列番号: 49/ 及び配列番 号: 51)	EVQLQQSGPELVKPGAS VKISCKASGYTFTDYYMN WVKQSHGKSLWIGDIN PNRGGTTYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCASYAVGY WGQGTTLVSS (配列番 号: 1)	DIVMTQSPSSLAIVSNGQ KVTMCKSSQSVFNSGN QKNSLAWYQQKPGQSP KLLVYFASSTRESGVDRF IGSGGTDVSLTISSVQA EDLADYFCQEHYTPPTF GTGKLEIK (配列番号: 6)	GYTFTDY YMN (配 列番号: 12)	DINPNRG GTTYNQ KFKG (配 列番号: 13)	YYAVG Y (配列 番号: 14)	KSSQSVF NSGNQK NSLA (配 列番号: 21)	FASTRES (配列番号: 22)	QEHYTTP PT (配列 番号: 23)
ACI-36	配列番 号: 46 及び配 列番号: 47	VK_G (配列番号: 50 及び配 列番号: 51)	EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGYTFTDYYM NWVKQSHGKSLWIGDI NPNRGGTTYNQKFKGKA LTVDKSSSTAYMELRSL TSEDSAVYYCASYAVG YWGQTTLVSS (配列 番号: 1)	DVVMQTPLSLPVSLGD QASISCRSSQRLVHSHG KTYLHWYLRKPGQSPKL LIYKYSNRFSGVDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQTAFHPTFG GGTKLEIK (配列番号: 7)	GYTFTDY YMN (配 列番号: 12)	DINPNRG GTTYNQ KFKG (配 列番号: 13)	YYAVG Y (配列 番号: 14)	RSSQRLV HSHGKTY LH (配列番 号: 24)	KVSNRF S (配列番 号: 25)	SQTAHFP YT (配列 番号: 26)
ACI-36	配列番 号: 46 及び配 列番号: 47	VK_AD (配列 番号: 48/ 配列番号: 49 及び配列番 号: 51)	EVQLQQSGPELVKPGAS VKISCKASGYTFTDYYMN WVKQSHGKSLWIGDIN PNRGGTTYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCASYAVGY WGQGTTLVSS (配列番 号: 1)	DIVMTQSPSSLAIVSNGQ KVTMCKSSQSVFNSGN QKNSLAWYQQKPGQSP KLLVYFASSTRESGVDRF IGSGGTDVSLTISSVQA EDLADYFCQEHYTPPTF GTGKLEIK (配列番号: 6)	GYTFTDY YMN (配 列番号: 12)	DINPNRG GTTYNQ KFKG (配 列番号: 13)	YYAVG Y (配列 番号: 14)	KSSQSVF NSGNQK NSLA (配 列番号: 21)	FASTRES (配列番号: 22)	QEHYTTP PT (配列 番号: 23)
ACI-36	配列番 号: 46 及び配 列番号: 47	VK_G (配列番号: 50 及び配 列番号: 51)	EVQLQQSGPELVKPGAS VKISCKASGYTFTDYYMN WVKQSHGKSLWIGDIN PNRGGTTYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCASYAVGY WGQGTTLVSS (配列番 号: 1)	DVVMQTPLSLPVSLGD QASISCRSSQRLVHSHG KTYLHWYLRKPGQSPKL LIYKYSNRFSGVDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQTAFHPTFG GGTKLEIK (配列番号: 7)	GYTFTDY YMN (配 列番号: 12)	DINPNRG GTTYNQ KFKG (配 列番号: 13)	YYAVG Y (配列 番号: 14)	RSSQRLV HSHGKTY LH (配列番 号: 24)	KVSNRF S (配列番 号: 25)	SQTAHFP YT (配列 番号: 26)

アクション	ハイブリッド ーマ	VH プラ イマー (ミックス)	VK プライマ ー(ミックス)	VH	VK	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VK CDR1	VK CDR2	VK CDR3
ACI-36	2B6A10C11	配列番 号: 46/ 配列番 号: 52 及び配 列番号: 47	配列番号: 50 及び配列番 号: 51	EVQLQQSGPELVKPGKGS VKISCKASGYTFDDYYMN WVKQSHGKSLSEWIGDIN PNRGGTTYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCASYAVGY WGQGTLLTVSS (配列番 号: 2)	DVVMTQTPLSLPVS LGD QASISCRSSQSLVHSHG KTYLHWYLQKPGQSPK L LIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAE D LGYYFCSTAHFPYTFG GGTKLEIK (配列番号: 8)	GYTFTDY YMN (配 列番号: 12)	DINPNRG GTTYNQ KFKG (配 列番号: 13)	YYAVG Y (配列 番号: 14)	RSSQSLV HSHGKTY LH (配列番 号: 27)	KVSNRF S (配列番 号: 25)	SQTAHFP YT (配列 番号: 26)
ACI-36	2B6G7A12	配列番 号: 46/ 配列番 号: 52 及び配 列番号: 47	配列番号: 50 及び配列番 号: 51	EVQLQQSGPELVKPGKGS VKISCKASGYTFDDYYMN WVKQSHGKSLSEWIGDIN PNRGGTTYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCASYAVGY WGQGTLLTVSS (配列番 号: 2)	DVVMTQTPLSLPVS LGD QASISCRSSQSLVHSHG KTYLHWYLQKPGQSPK L LIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAE D LGYYFCSTAHFPYTFG GGTKLEIK (配列番号: 8)	GYTFTDY YMN (配 列番号: 12)	DINPNRG GTTYNQ KFKG (配 列番号: 13)	YYAVG Y (配列 番号: 14)	RSSQSLV HSHGKTY LH (配列番 号: 27)	KVSNRF S (配列番 号: 25)	SQTAHFP YT (配列 番号: 26)
ACI-36	6H1A11C11	配列番 号: 46 及び配 列番号: 47	配列番号: 50 及び配列番 号: 51	EVQLQQSGPELVKPGAS VKISCKASGYTFDDYYMN WVKQSHGKSLSEWIGDIN PNRGGTTYNQKFKGKAT LTVDTSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCASYAVGY WGQGTLLTVSS (配列番 号: 3)	DVVMTQTPLSLPVS LGD QASISCRSSQSLVHSHG NTYLHWYLQKPGQSPK L LIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAE D LGYYFCSTAHFPYTFG GGTKLEIK (配列番号: 9)	GYTFTDY YMN (配 列番号: 12)	DINPNRG GTTYNQ KFKG (配 列番号: 13)	YYAVG Y (配列 番号: 14)	RSSQSLV HSHGNTY LH (配列番 号: 28)	KVSNRF S (配列番 号: 25)	SQTAHFP YT (配列 番号: 26))
ACI-36	6H1G6E6	配列番 号: 46 及び配 列番号: 47	配列番号: 50 及び配列番 号: 51	EVQLQQSGPELVKPGAS VKISCKASGYTFDDYYMN WVKQSHGKSLSEWIGDIN PNRGGTTYNQKFKGKAT LTVDTSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCASYAVGY WGQGTLLTVSS (配列番 号: 3)	DVVMTQTPLSLPVS LGD QASISCRSSQSLVHSHG NTYLHWYLQKPGQSPK L LIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAE D LGYYFCSTAHFPYTFG GGTKLEIK (配列番号: 9)	GYTFTDY YMN (配 列番号: 12)	DINPNRG GTTYNQ KFKG (配 列番号: 13)	YYAVG Y (配列 番号: 14)	RSSQSLV HSHGNTY LH (配列番 号: 28)	KVSNRF (配列番号: 25)	SQTAHFP YT (配列 番号: 26)

10

20

30

40

ワクチン	ハイブリッド ーム	VHプライマ イマー (ミックス)	VKプライマ ー(ミックス)	VH	VK	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VK CDR1	VK CDR2	VK CDR3
ACI-33	6C10E5E9C 12	配列番 号: 53/ 配列番 号: 54 及 び配列 番号: 47	配列番号: 48/ 配列番号: 49 及び配列番 号: 51	EVQLVESGGGLVKPGGGS LKSCAPSGFTFSDYGM HWVRAPEKGLWVAYI SSGSSTIYYGDTVKGRFT ISRDNAKNTLFLQ MTELRSEDTAMYYCARR GQLRLRFAYWGQGLV TVSA (配列番号: 4)	DIVMTQSHKFMSTSVGD RVISITCKASQDVSTAVA WYQQKPGQSPKLLIYSA SYRYTGVDPDRFTGSGG TDFTFTISSVQAEGLAVY YCQQHYTTPLTFGAGTK LELK (配列番号: 10)	GFTFSDY GMH (配 列番号: 15)	YISSGSS TIYYGDT VKG (配 列番号: 16)	RGQLR LRLFAY (配列番 号: 17)	KASQDVS TAVA (配 列番号: 29)	SASYRYT (配列番号: 30)	QQHYTT PLT (配列 番号: 31)
ACI-33	6C10F9C12 A11	配列番 号: 53/ 配列番 号: 54 及 び配列 番号: 47	配列番号: 54 及び配列番 号: 51	EVQLVESGGGLVKPGGGS LKSCAPSGFTFSDYGM HWVRAPEKGLWVAYI SSGSSTIYYGDTVKGRFT ISRDNAKNTLFLQMTSLR SEDTAMYYCARRGQLRL RLFAYWGQGLVTVSA (配列番号: 4)	DIVMTQSHKFMSTSVGD RVISITCKASQDVSTAVA WYQQKPGQSPKLLIYSA SYRYTGVDPDRFTGSGG TDFTFTISSVQAEGLAVY YCQQHYTTPLTFGAGTK LELK (配列番号: 10)	GFTFSDY GMH (配 列番号: 15)	YISSGSS TIYYGDT VKG (配 列番号: 16)	RGQLR LRLFAY (配列番 号: 17)	KASQDVS TAVA (配 列番号: 29)	SASYRYT (配列番号: 30)	QQHYTT PLT (配列 番号: 31)
ACI-41	7C2(1)F10C 10D3	配列番 号: 53/ 配列番 号: 55 及 び配列 番号: 47	配列番号: 49/ 配列番号: 56/ 配列番号: 57 及び配列番 号: 51	EVKLMESGGGLVHPGAS LRLYCAASGFTFTDYGM SWVRQPPGKAPKPEWLALI RNKANGYTYEYTSVKG RFTISRDNISQNILYLQMN TLRAEDSATYYCVKALG RYFDVWGTGTTVTVSS( 配列番号: 5)	DIVMSQSPSSLAVSVGE KVTMSCKSSQSLLYSSN QKNYLAWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRF TSGSGGTDFTLTISVKA EDLAVYYCQQYYPFT FGSGTKLEIK (配列番号: 11)	GFTFTDY YMS (配列 番号: 18)	LIRNKAN GYTTEYT ASVKG (配列番号: 19)	ALGRYF DV (配列 番号: 20)	KSSQSL YSSNQKN YLA (配列 番号: 32)	WASTRE S (配列番 号: 33)	QQYYSY PFT (配列 番号: 34)
ACI-41	7C2(2)B9F1 1D5	配列番 号: 53/ 配列番 号: 55 及 び配列 番号: 47	配列番号: 57 及び配列番 号: 51	EVKLMESGGGLVHPGAS LRLYCAASGFTFTDYGM SWVRQPPGKAPKPEWLALI RNKANGYTYEYTSVKG RFTISRDNISQNILYLQMN TLRAEDSATYYCVKALG RYFDVWGTGTTVTVSS (配列番号: 5)	DIVMSQSPSSLAVSVGE KVTMSCKSSQSLLYSSN QKNYLAWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRF TSGSGGTDFTLTISVKA EDLAVYYCQQYYPFT FGSGTKLEIK (配列番号: 11)	GFTFTDY YMS (配列 番号: 18)	LIRNKAN GYTTEYT ASVKG (配列番号: 19)	ALGRYF DV (配列 番号: 20)	KSSQSL YSSNQKN YLA (配列 番号: 32)	WASTRE S (配列番 号: 33)	QQYYSY PFT (配列 番号: 34)

10

20

30

40

ワクチン	ハイブリッド ーマ	VH プライ イマー (ミツク ス)	VK プライ マ (ミツクス)	VH	VK	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VK CDR1	VK CDR2	VK CDR3
ACI-35	A4-4A6-18			QVQLQQPGAEELKPGAS VKLSCKASGYFTSYMM HWVKQRPGRGLEWIGRI DPNSDRTKYNEKFKRKA TLTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCARDYYAW FAYWGGTGLVTVSA (配 列番号: 68)	DVLMTQTPLSLPVS LGD QASISCRSSQSIHNSGN TYLEWYLGKPGQSPKLLI YKLSNRFSGVPDRFSGS GSGTDFLTKISRVEAEDL GVYYCFQGSHPPTFGG GTKLEIK (配列番号: 69)	GYFTSY WMH (配列番号: 70)	RIDPNSD RTKYNE KFKR (配列番号: 71)	DDYAW FAY (配列番 号: 72)	RSSQSIH SNGNTYL E (配列番号: 73)	KLSNRF S (配列番号: 74)	FQGSHP PT (配列番号: 75)
ACI-35	A6-1D2-12			QVTLKESGPGILQSSQTL SLTCSFSGFSLSTSGMG VSWIRQPSGKLEWLAH IYDDEKRYNASLKSRL TISKDTSRNQVFLKTCV DTADTATYYCARLLRPPYA LDYWGQTSVTSS (配 列番号: 76)	NILMTQSPSSLAVSAGEK VTMSCKSSQSVLYSSNQ KNYLAWYQQKPGQSPK LIYWASTRESGVPDRFT GSGGTDFTLTISSVQAE DLAVYYCLQYLSLTFGA GTKLEIK (配列番号: 77)	GFSLST GMGVS (配列番号: 78)	HIWDD DKRYNA SLKS (配列番号: 79)	LLRPYA LDY (配列番 号: 80)	KSSQSVL YSSNQKN YLA (配列番号: 81)	WASTRE S (配列番号: 82)	LQYLSL T (配列番号: 83)
ACI-35	A4-2A1-18			EVQLQQSGPELVKPGAS VKISCKASGYFTDYMMN WVKQSHGKSLWIGDIN PNNGGTSYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCVREGRFAY WGHGTLVTVSA (配列番 号: 88)	DIVMTQAAPSPVTPGE SVSISCRSSKSLHNSGN TYLYWFLQRPQSPQLLI HRMSNLAGVPPDRFSGS GSGTAFTRISRVEAEDV GVYYCMQHLKSPYTFGG GTKLEIK (配列番号: 116)	GYFTDY YMN (配 列番号: 89)	DINPNEG GTSYNG KFKG (配 列番号: 90)	EGRFA Y (配列番 号: 91)	RSSKSL HSNGNTY LY (配列番号: 93)	RMSNLA S (配列番号: 94)	MQHLKS PYT (配列番号: 95)
ACI-35	A4-2A1-40			EVQLQQSGPELVKPGAS VKISCKASGYFTDYMMN WVKQSHGKSLWIGDIN PNNGGTSYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCVREGRFAY WGHGTLVTVSA (配列番 号: 88)	DIX*MTQAAPSPVTPGE SVSISCRSSKSLHNSGN TYLYWFLQRPQSPQLLI YRMSNLAGVPPDRFSGS GSGTAFTRISRVEAEDV GVYYCMQHLKSPYTFGG GTKLEIK (配列番号: 92) *X = M or V	GYFTDY YMN (配列番号: 89)	DINPNEG GTSYNG KFKG (配列番号: 90)	EGRFA Y (配列番 号: 91)	RSSKSL HSNGNTY LY (配列番号: 93)	RMSNLA S (配列番号: 94)	MQHLKS PYT (配列番号: 95)

10

20

30

40

ワクチン	ハイブリド イマ	VHブ ラ イマ ー (ミ ック ス)	VKブ ラ イ マ ー (ミ ック ス)	VH	VK	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VK CDR1	VK CDR2	VK CDR3
ACI-35	A4-4A6-48			EVQLQQSGPELVKPGAS VKISCKASGFTFTDYIMN WVKQSHGKSLWIGDIN PNNGGTSYHQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCVREGRFAY WGQGTLLVTVSA (配列番 号: 88)	DIVMTQAAPSVPVTPGE SVSISCRSSKSLHSNGN TYLYWFLQRPQGSPQLLI YRMSNLAGVPDRFSGS GSGTFTLRISRVEAEDV GVYYCMQHLKSPYTFGG GTKLEIK (配列番号: 118)	GYFTFDY YMN (配 列番号: 89)	DINPNNG GTSYHQ KFKG (配列番号: 90)	EGRFA Y (配列番 号: 91)	RSSKSL HSNGNTY LY (配列番号: 93)	RMSNLA S (配列番号: 94)	MQHLKS PYT (配列番号: 95)
ACI-35	A6-2G5-08			QVQLKQSGAELVPRGAS VKLSCKASGFTFTDYIMN WVKQRPQGQLEWIARIY PGRGNIYYNEKFKGKATL TAEKSSSTAYMQLSLSLTS EDSAVYFCARFWDVTY WGQGTLLVTVSA (配列番号: 96)	DVLMTQTPLSLPVSIGD QASISCRSSQSIHSNGN TYLEWFLQKPGQSPKLLI YKVSNRFGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDL GVYYCFQGGSHVPYTFGG GTKLEIK (配列番号: 97)	GYFTFDY YIN (配 列番号: 98)	RIYPGRG NIYYNEK FKG (配列番号: 99)	FWDVT Y (配列番 号: 100)	RSSQSI HSNGNTY LE (配列番号: 101)	KVSNRF S (配列番号: 102)	FQGSVH PYT (配列番号: 103)
ACI-35	A6-2G5-30			EVQLQQSGPELVKPGAS VKISCKASGFTFTDYIMN WVKQSHGKSLWIGDIN PNNGGTSYHQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCVREGRFAY WGQGTLLVTVSA (配列番 号: 104)	DIVMTQSQKFMSTSVGD RVSVTCKASQNVGTNVA WYQQKPGQSPKALIYSA SYRYSQVDRFRTGSGSG TDFLTISNVQSEDLAEY FCQQYNSYPYTFGGGTK LEIK (配列番号: 105)	GFTFTDY YMN (配 列番号: 89)	DINPNNG GTSYHQ KFKG (配列番号: 115)	EGRFA Y (配列番 号: 91)	KASQNVG TNVA (配列番号: 106)	SASRY S (配列番号: 107)	QQNSY PYT (配列番号: 108)
ACI-35	A6-2G5-41			EVQLQQSGPELVKPGAS VKISCKASGFTFTDYIMN WVKQSHGKSLWIGDIN PNNGGTSYHQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCVREGRFAY WGQGTLLVTVSA (配列番 号: 104)	DIVMTQSQKFMSTSVGD RVSVTCKASQNVGTNVA WYQQKPGQSPKALIYSA SYRYSQVDRFRTGSGSG TDFLTISNVQSEDLAEY FCQQYNSYPYTFGGGTK LEIK (配列番号: 105)	GFTFTDY YMN (配 列番号: 89)	DINPNNG GTSYHQ KFKG (配列番号: 115)	EGRFA Y (配列番 号: 91)	KASQNVG TNVA (配列番号: 106)	SASRY S (配列番号: 107)	QQNSY PYT (配列番号: 108)

\*2つの生産Vk配列 (表10の配列6及び7; 表11の配列40及び41) が細胞株3A8A12G7と3A8E12H8から単離された; "Vk\_G"配列は"G"ブライマーミックスを使用して作成されたクローンから調製された。クローンから調製され、"Vk\_AD"配列は"A"と"D"ブライマーミックスを使用して作成されたクローンから調製された。従って、異なるカッパ配列を持つ2つの抗体がこれらのハイブリドイマにより産生される。

表 11. 重鎖及び軽鎖可変領域(VH 及び VK)のヌクレオチド配列

クローン	ハイブリドーム	VH プライマー (ミックス)	VK プライマー (ミックス)	VH	VK
ACI-36	3A8A12G7*	配列番号: 46 及び配列番号: 47	VK_AD (配列番号: 48/ 配列番号: 49/ 及び配列番号: 51)	GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACCTGGTG AAGCCTGGGGCTTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATATACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTGAGTGGATTG GAGATATTAATCTAACCGTGGTGAACACTACTTACAA CCAGAAGTTCGAAGGGCAAGGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGGCTACTGGGGCCCAAGGCCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (配列番号: 35)	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGT CAGTAGGACAGAAGGTCACATGAGCTGCAAGTCCAGTC AGAGTGTTTTTAATAGTGGCAATCAAAAGAAGCTGTTTGGC CTGGTACCAGCAGAAACCCAGGACAGTCTCCTAAACTTCT GGTATACTTTGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGA TCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCCAGTCT ACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAGGACCTGGCAGATTAC TTCTGTCCAGGAACATTAACCACTCTCCACCGTTCCGGTA CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (配列番号: 40)
ACI-36	3A8A12G7*	配列番号: 46 及び配列番号: 47	VK_G (配列番号: 50 及び配列番号: 51)	GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACCTGGTG AAGCCTGGGGCTTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATATACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTGAGTGGATTG GAGATATTAATCTAACCGTGGTGAACACTACTTACAA CCAGAAGTTCGAAGGGCAAGGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGGCTACTGGGGCCCAAGGCCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (配列番号: 35)	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGTCA GAGGCTGTACACAGTCTGGAANAACCTATTTACATTGG TACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCCTGATC TACAAAAGTTTTCCAACCGTTTTCTGGGGTCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCCACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTT TGTTCTCAAACCTGCACATTTTCCGTACACGTTCCGGAGGG GGGACCAAGCTGGAAAATAAAA (配列番号: 41)
ACI-36	3A8E12H8*	配列番号: 46 及び配列番号: 47	VK_AD (配列番号: 48/ 配列番号: 49 及び配列番号: 51)	GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACCTGGTG AAGCCTGGGGCTTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATATACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTGAGTGGATTG GAGATATTAATCTAACCGTGGTGAACACTACTTACAA CCAGAAGTTCGAAGGGCAAGGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGGCTACTGGGGCCCAAGGCCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (配列番号: 35)	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGT CAGTAGGACAGAAGGTCACATGAGCTGCAAGTCCAGTC AGAGTGTTTTTAATAGTGGCAATCAAAAGAAGCTGTTTGGC CTGGTACCAGCAGAAACCCAGGACAGTCTCCTAAACTTCT GGTATACTTTGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGA TCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCCAGTCT ACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAGGACCTGGCAGATTAC TTCTGTCCAGGAACATTAACCACTCTCCACCGTTCCGGTA CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (配列番号: 40)

10

20

30

40



ワクチン	ハイブリドーム	VH プライマー (ミックス)	VK プライマー (ミックス)	VH	VK
ACI-36	3A8E12H8*	配列番号: 46 及び配列番号: 47	VK_G (配列番号: 50 及び配列番号: 51)	GAGGTCCAGCTGCAACAAATCTGGACCTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGG TGAAGCAGAGCCATGAAAGAGCCCTTGAGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACCGTGGTGGAACTACTTACAA CCAGAAGTTCAAGGCAAGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGCTACTGGGGCCCAAGGCCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (配列番号: 35)	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCCTTGACACAGTCAAGGAAACCTATTTACATTGG TACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC TACAAAGTTTCCAACCGGTTTTCTGGGGTCCAGACAGG TTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTTTATTTCC TGTTCTCAAACCTGCACATTTTCCGTACACAGTTCGGAGGG GGGACCAAAGCTGGAATAAAAA (配列番号: 41)
ACI-36	2B6A10C11	配列番号: 46/ 配列番号: 52 及び配列番号: 47	配列番号: 50 及び配列番号: 51	GAGGTCCAGCTGCAACAAATCTGGACCTGAACTGGTG AAGCCTGGGACTTCAAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGG TGAAGCAGAGCCATGAAAGAGCCCTTGAGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACCGTGGTGGAACTACTTACAA CCAGAAGTTTAAAGGCAAGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGCTACTGGGGCCCAAGGCCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (配列番号: 36)	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCCTTGACACAGTCAAGGAAACCTATTTACATTGG TACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC TACAAAGTTTCCAACCGGTTTTCTGGGGTCCAGACAGG TTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTTTATTTCC TGTTCTCAAACCTGCACATTTTCCGTACACAGTTCGGAGGG GGGACCAAAGCTGGAATAAAAA (配列番号: 42)
ACI-36	2B6G7A12	配列番号: 46/ 配列番号: 52 及び配列番号: 47	配列番号: 50 及び配列番号: 51	GAGGTCCAGCTGCAACAAATCTGGACCTGAACTGGTG AAGCCTGGGACTTCAAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGG TGAAGCAGAGCCATGAAAGAGCCCTTGAGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACCGTGGTGGAACTACTTACAA CCAGAAGTTTAAAGGCAAGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGCTACTGGGGCCCAAGGCCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (配列番号: 36)	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCCTTGACACAGTCAAGGAAACCTATTTACATTGG TACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC TACAAAGTTTCCAACCGGTTTTCTGGGGTCCAGACAGG TTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTTTATTTCC TGTTCTCAAACCTGCACATTTTCCGTACACAGTTCGGAGGG GGGACCAAAGCTGGAATAAAAA (配列番号: 42)

10

20

30

40

ワケチ	ハイブリッド ーマ	VH プラ イマー (ミックス)	VK プラ イマー (ミックス)	VH	VK
ACI-36	6H1A11C11	配列番号:46 及び配列番号: 47	配列番号:50 及び配列番号: 51	GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATACTCTGTAAGGCT TCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGG TGAAGCAGAGCCATGAAAGAGCCTTGAGTGGATTG GAGATAATTAATCCTAACCGTGGTGAAGTACTTACAA CCAGAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACGTTGACTGTAGA CAGTCCCTCCAGCACAGCTACATGGAGCTCCGCGAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCA AGTTACTACGCGTGGGCTACTGGGGCCAAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (配列番号:37)	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCA GAGCCTTCTACACAGTCAATGAAACACCTATTTACATTGG TACCTGCAGAAAGCCAGGCGAGTCTCCAAGCTCCTGATC TACAAAGTTTCCAACCGGTTTTCTGGGTCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGCTGAGGATCTGGGAGTTATTTTC TGCTCTCAAAGTGCACATTTTCCGTACACGTTCCGGAGGG GGGACCAAAGCTGGAAATAAAA (配列番号:43)
ACI-36	6H1G6E6	配列番号:46 及び配列番号: 47	配列番号:50 及び配列番号: 51	GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATACTCTGTAAGGCT TCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGG TGAAGCAGAGCCATGAAAGAGCCTTGAGTGGATTG GAGATAATTAATCCTAACCGTGGTGAAGTACTTACAA CCAGAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACGTTGACTGTAGA CAGTCCCTCCAGCACAGCTACATGGAGCTCCGCGAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCA AGTTACTACGCGTGGGCTACTGGGGCCAAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (配列番号:37)	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCA GAGCCTTCTACACAGTCAATGAAACACCTATTTACATTGG TACCTGCAGAAAGCCAGGCGAGTCTCCAAGCTCCTGATC TACAAAGTTTCCAACCGGTTTTCTGGGTCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGCTGAGGATCTGGGAGTTATTTTC TGCTCTCAAAGTGCACATTTTCCGTACACGTTCCGGAGGG GGGACCAAAGCTGGAAATAAAA (配列番号:43)
ACI-33	6C10E5E9C 12	配列番号:53/ 配列番号:54 及び配列番号: 47	配列番号:48/ 配列番号:49 及び配列番号: 51	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCACC CTCTGGATTCACTTTCAGTGACTATGGAATGCACTGG GTTCTCAGGCTCCAGAGAGGAGCTGGAGTGGGT TGATACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTAT GGAGACACAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA GACAAATGCCAAGAACACCCCTGTTCCCTGCAAAATGACC AGTCTGAGGCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGT GCAAGAGGGGACAGCTCAGGCTACGCTGTTTGTCT TACTGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (配列番号:38)	GACATTTGTGATGACCCAGTCTCACAAAATTCATGTCCACAT CAGTAGGAGACAGGGTCCAGCATCACCTGCAAGGCCAGT CAGGATGTGAGTACTGCTGAGCCTGGTATCAACAGAAA CCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTCGGCATCCT ACCCGTTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTG GATCTGGACGGATTTCACTTTTCCATCAGCAGTGTGC AGGCTGAAGAGACCTGGCAGTTTTTACTGTCAAGCAACATTA TACTACTCCGCTCAAGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGA GCTGAAA (配列番号:44)

10

20

30

40

ワクチン	ハイブリッド ーマ	VH プライマー (ミックス)	VK プライマー (ミックス)	VH	VK
ACI-33	6C10F9C12 A11	配列番号:53/ 配列番号:54 及び配列番号: 47	配列番号:54 及び配列番号: 51	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCACC CTTGGATTCACTTTTCAGTACTGAAATGCACTGG GTTTCAGGGTCCAGAGAAGGACTGGAGTGGGT TGATACATTTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTAT GGAGACACAGTGAAGGGCCGATCCACATCTCCAGA GACAATGCCAAGAACACCCTGTTCCCTGCAAAATGACC AGTCTGAGGTTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGT GCAAGAAGGGACAGCTCAGGCTACGCCCTGTTTGTCT TACTGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (配列番号:38)	GACATTTGTGATGACCCAGTCTCACAAAATTCATGTCCACAT CAGTAGGAGACAGGGTCTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGT CAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCCTGGTATCAACAGAAA CCAGGACAATCTCCTAACTACTGATTTACTCGGCATCCT ACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTG GATCTGGACCGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGC AGGCTGAAGACCTGGCAGTATTACTGTCAAGCAACATTA TACTACTCCGCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGA GCTGAAA (配列番号:44)
ACI-41	7C2(1)F10C 10D3	配列番号:53/ 配列番号:55 及び配列番号: 47	配列番号:49/ 配列番号:56/ 配列番号:57 及び配列番号: 51	GAGGTGAAGCTGATGGAATCTGGAGGAGGCTTGGTA CACCTGGGGCTTCTGAGACTCTACTGTGCAGCT TCTGGATTCACCTTACTGATTACTACATGAGCTGG TCCGCCAGCTCCAGGGAAGCCACTGAGTGGTTG GCTTTGATTAGAAACAAAGCTAATGGTTACACAACAG AGTATACTGCATCTGTTAAGGGTGGTTACCCATCTC CAGAGATAATCCCAAAACATCCTCTATCTTCAAATG AACACCTGAGGGCTGAGGACAGTGCACCTATTAC TGTGTAAGGCTCTGGACGTTACTTCGATGCTGG GGCACAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA (配列番 号:39)	GACATTTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGT CAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTC AGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAAGAAGTACTTTGGC CTGGTACCAGCAGAAAACAGGGCAGTCTCTAAACTGCT GATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGA TCGCTTACAGGAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTACTGTCAAGCAATATTATAGCTATCCATTCACGTTCCGGC TCGGGGACAAAAGTTGGAAAATAAAA (配列番号:45)
ACI-41	7C2(2)B9F1 1D5	配列番号:53/ 配列番号:55 及び配列番号: 47	配列番号:57 及び配列番号: 51	GAGGTGAAGCTGATGGAATCTGGAGGAGGCTTGGTA CACCTGGGGCTTCTGAGACTCTACTGTGCAGCT TCTGGATTCACCTTACTGATTACTACATGAGCTGG TCCGCCAGCTCCAGGGAAGCCACTGAGTGGTTG GCTTTGATTAGAAACAAAGCTAATGGTTACACAACAG AGTATACTGCATCTGTTAAGGGTGGTTACCCATCTC CAGAGATAATCCCAAAACATCCTCTATCTTCAAATG AACACCTGAGGGCTGAGGACAGTGCACCTATTAC TGTGTAAGGCTCTGGACGTTACTTCGATGCTGG GGCACAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA (配列番 号:39)	GACATTTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGT CAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTC AGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAAGAAGTACTTTGGC CTGGTACCAGCAGAAAACAGGGCAGTCTCTAAACTGCT GATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGA TCGCTTACAGGAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTACTGTCAAGCAATATTATAGCTATCCATTCACGTTCCGGC TCGGGGACAAAAGTTGGAAAATAAAA (配列番号:45)

10

20

30

40

ククチ	ハイブリド	VH プライマー (ミックス)	VK プライマー (ミックス)	VH	VK
ACI-35	A4-4A6-18			CAGGTCCTCAACTGCAGCAGCCCTGGGGCTGAGCTTCT GAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGC TTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACCTG GGTGAAGCAGAGCCCTGGACGAGCCCTTGGTGGG TTGGAAGGATTGATCCTAAATAGTGTACTAAGTA CAATGAGAAGTCAAGGCAAGCCACACACTGACTGT AGACAAATCCTCCAGCACAGCTACATGCAGCTCAG CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGCTATTATTGT GCAAGGGATGATTACGCCTGGTTGCTTACTGGGGC CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (配列番号: 84)	GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCGTGCA GTCCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCATTGTACATAGTAATGAAACACCTATTTAGAATGG TACCTGCAGAAACCAGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC TACAAACTTCCAAACCATTCTGGGTCCAGACAGGT TCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACACTCAAGA TCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACT GCTTTCAAGGTTACATGTTCTCCGACGTTCCGGTGGAG GCACCAAGCTGGAAATCAAA (配列番号: 85)
ACI-35	A6-1D2-12			CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTG CAGTCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTCTTTCT CTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTA GCTGGATTGTCAGCCCTCAGGAAAGGCTCTGGAGT GGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCCCT ATAAGCATCCCTGAAAGAGCCGGCTCACAACTCTCCA AGGATACCTCCAGAAACCAGGTATTCCTCAAGATCA CCTGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACT GTGCTCGGTTACTGCCCTCTTATGCTTTGGACTACTG GGGTCAAGGAAACCTCAGTCAACCCTCTCTCA (配列番号: 86)	AACATTTTGTGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGT CTGAGGAGAAAGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTC AAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAAGACTACTTTGGC CTGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCTAAACTGCT GATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGA TCGCTTACACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTTACTCTT ACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCTGGCAGTTTATT ACTGTCTTCAATACCTCTCTCCGTCACCGTTCCGGTGTGG GACCAAGCTGGAGCTGAAA (配列番号: 87)
ACI-35	A4-2A1-18			GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGGCTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGG TGAAGCAGAGCCATGAAAGAGCCCTTGGTGGATTG GAGATATTAATCTAACAATGGTGGTACTAGCTACAA CCAGAAGTCAAGGGCAAGCCACATTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCATACATGGAGCTCCGCAG TCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGTA AGAGGGGGCGGTTTGGCTTACTGGGGTCAATGGGAC TCTGGTCACTGTCTCTGCA (配列番号: 109)	GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCA CTCCTGGAGAGTCAAGTATCCATCTCCTGCAGGCTAGTA AGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTACTTGTATTG GTTCCGCAGAGGCGCAGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGAT ACATCGGATGTCCAACCTTGGCCTCAGGAGTCCAGACAG GTTCAGTGGCAGTGGGTGAGGAACTGCTTCCACACTGAG AATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTA CTGTATGCAACATCTAAAATCTCCGTACACGTTCCGGAGG GGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (配列番号: 117)

10

20

30

40

クオン	ハイブリド ーマ	VH プラ イマー (ミックス)	VK プ ライマ ー(ミッ クス)	VH	VK
ACI-35	A4-2A1-40			GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTTGAAGGATTG GAGATATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTAGCTACAA CCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCTACATGGAGCTCCGCAG TCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGA AGAGAGGGGGGTTTGGCTTACTGGGTCTATGGGAC TCTGGTCACTGCTCTGCA (配列番号: 109)	GATATTR*TGATGACTCAGGCTGCACCCCTCTGTACCTGTC ACTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTGCAGGCTAGT AAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTATT GGTTCTCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGA TATATCGGATGTCCAAACCTTGGCTCAGGAGTCCCAGACA GGTTCAGTGGCAGTGGTCCAGGAACCTTTCACACTGA GAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATT ACTGTATGCAACATCTAAAATCTCCGTACACGTTCCGGAGG GGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (配列番号: 110) R* = A or G
ACI-35	A4-4A6-48			GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTTGAAGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTAGCTACAA CCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCTACATGGAGCTCCGCAG TCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGA AGAGAGGGGGGTTTGGCTTACTGGGTCTATGGGAC TCTGGTCACTGCTCTGCA (配列番号: 109)	GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCCTCTGTACCTGTCA CTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTGCAGGCTAGTA AGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTATTG GTTCTCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGAT ATATCGGATGTCCAACCTTGGCTCAGGAGTCCCAGACAG GTTCAGTGGCAGTGGTCCAGGAACCTTTCACACTGAG AATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTA CTGTATGCAACATCTAAAATCTCCGTACACGTTCCGGAGG GGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (配列番号: 119)
ACI-35	A6-2G5-08			CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGT GAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGCTCCTGCAAGG CTTCTGGCTACACTTTCAGTGAAGCTGCTCCTGCAAGG GGTGAAGCAGAGCCCTGGACAGGACTTGAAGTGA TTGCAAGGATTTATCCTGGAAGAGGTAATTTACTA CAATGAGAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGC AGAAAAATCCTCCAGCACTGCTACATGCAGCTCAG CAGCCTGACATCTGAGGACTGCTGCTGCTATTTCTGT GCAAGATCTGGGACGTGACTTACTGGGGCCCAAGG GACTCTGGTCACTGCTCTGCA (配列番号: 111)	GATGTTTTGATGACCCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCATTTACATAGTAATGGAAACACTTATTTAGAATGG TTCCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC TACAAAAGTTTCCAACCGATTTCTGGGTCCCAGACAGGT TCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACACTCAAGA TCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACT GCTTTCAAGGTTTCAACATGTTCCGTACACGTTCCGGAGG GGACCAAGCTGGAAATAAAA (配列番号: 112)

10

20

30

40

ククチ	ハイブリド ーム	VH イマー (ミツ ス)	VK ライマ (ミツ クス)	VH	VK
ACI-35	A6-2G5-30			GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATTCACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTTGAGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTAGCTACCA CCAGAAGTTCGAAGGCAAGGCCACATTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCGAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGTA AGAGAGGGAAGATTTGCTTACTGGGCCCCAAGGGACT CTGGTCACTGCTCTGCA (配列番号: 113)	GACATTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAAATTCATGTCCACAT CAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGT CAGAAATGTTGGTACTAAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAA CCAGGGCAATCTCCTAAAGCACATGATTTACTCGGCATCCT ACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAATGTGCA GTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTGAGCAATATAAC AGCTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGA AATAAAA (配列番号: 114)
ACI-35	A6-2G5-41			GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATTCACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTTGAGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTAGCTACCA CCAGAAGTTCGAAGGCAAGGCCACATTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCGAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGTA AGAGAGGGAAGATTTGCTTACTGGGCCCCAAGGGACT CTGGTCACTGCTCTGCA (配列番号: 113)	GACATTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAAATTCATGTCCACAT CAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGT CAGAAATGTTGGTACTAAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAA CCAGGGCAATCTCCTAAAGCACATGATTTACTCGGCATCCT ACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAATGTGCA GTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTGAGCAATATAAC AGCTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGA AATAAAA (配列番号: 114)

\*2つの牛痘 V<sub>k</sub>配列 (表10の配列6及び7; 表11の配列40及び41) が細胞株 3A8A12G7 と 3A8E12H8 から単離された; "V<sub>k</sub>G"配列は"G"プライマーミックスを使用して作成されたクローンから調製され、"V<sub>k</sub>AD"配列は"A"と"D"プライマーミックスを使用して作成されたクローンから調製された。  
従って、異なるカッパ配列を持つ2つの抗体がこれらのハイブリドームにより産生される。

10

20

30

40

表 12. 抗体可変領域の CDR 配列に対して使用されるプライマー

サブクローン	Ab アイソタイプ	プライマー配列	配列番号
3A8A 12G7	IgG2b	VH プライマー 5' GGAATTCATGRAATGSASCTGGGYWYTCCTT	46
		VK プライマー 3' CCCAAGCTTCCAGGRCCKARKGGATARACIGRTGG	47
3A8E 12H8	IgG2b	5' GGAATTCATGRAGWCACAKWCYCAGGTCCTT	48
		AD ACTAGTCGACATGGGCWTC AAGATGRAGTCACAKWYCWGG	49
		5' G ACTAGTCGACATGAAGTTCGCCTGTTAGGCTGTGGTGCT	50
		3' CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	51
		VH プライマー 5' GGAATTCATGRAATGSASCTGGGYWYTCCTT	46
		VK プライマー 3' CCCAAGCTTCCAGGRCCKARKGGATARACIGRTGG	47
2B6A 10C11	IgG2b	5' GGAATTCATGRAGWCACAKWCYCAGGTCCTT	48
		AD ACTAGTCGACATGGGCWTC AAGATGRAGTCACAKWYCWGG	49
		5' G ACTAGTCGACATGAAGTTCGCCTGTTAGGCTGTGGTGCT	50
		3' CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	51
		VH プライマー 5' GGAATTCATGRAATGSASCTGGGYWYTCCTT	46
		VK プライマー 3' ACTAGTCGACATGGATGGAGCTRTATCATSYCTT	52
2B6G 7A12	IgG2b	3' CCCAAGCTTCCAGGRCCKARKGGATARACIGRTGG	47
		5' ACTAGTCGACATGAAGTTCGCCTGTTAGGCTGTGGTGCT	50
		3' CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	51
		VH プライマー 5' GGAATTCATGRAATGSASCTGGGYWYTCCTT	46
		VK プライマー 3' ACTAGTCGACATGGATGGAGCTRTATCATSYCTT	52
		5' CCCAAGCTTCCAGGRCCKARKGGATARACIGRTGG	47
6H1A11C11	IgG2b	5' ACTAGTCGACATGAAGTTCGCCTGTTAGGCTGTGGTGCT	50
		3' CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	51
		VH プライマー 5' GGAATTCATGRAATGSASCTGGGYWYTCCTT	46
		VK プライマー 3' ACTAGTCGACATGAAGTTCGCCTGTTAGGCTGTGGTGCT	50
		5' CCCAAGCTTCCAGGRCCKARKGGATARACIGRTGG	47
		3' ACTAGTCGACATGGATGGAGCTRTATCATSYCTT	52
6H1G 6E6	IgG2b	VH プライマー 5' GGAATTCATGRAATGSASCTGGGYWYTCCTT	46
		VK プライマー 3' ACTAGTCGACATGGATGGAGCTRTATCATSYCTT	52

サブクローン	Ab アイソタイプ	プライマー配列		配列番号
			3' CCCAAGCTTCCAGGRRCCARKGGATARACIGRTGG	47
		VK プライマー	5' ACTAGTCGACATGAAGTTGCCCTGTAGGCTGTGGTGCT	50
			3' CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	51
6C10F9	IgG3	VH プライマー	5' GGGAAATTCATGRASSTTSKGGYTMARCTKGRITTT	53
C12A11			3' ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCCT	54
			3' CCCAAGCTTCCAGGRRCCARKGGATARACIGRTGG	47
		VK プライマー	5' ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCCT	54
			3' CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	51
6C10E5E	IgG3	VH プライマー	5' GGGAAATTCATGRASSTTSKGGYTMARCTKGRITTT	53
9C12			3' ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCCT	54
			3' CCCAAGCTTCCAGGRRCCARKGGATARACIGRTGG	47
		VK プライマー	5' GGGAAATTCATGRAGWCACAKWCYCAGGTCITTT	48
			3' ACTAGTCGACATGGGCWTCGAAGATGRAGTCACAKWYYCWGG	49
			3' CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	51
7C2(1)F10C	IgG2b	VH プライマー	5' GGGAAATTCATGRASSTTSKGGYTMARCTKGRITTT	53
10D3			3' ACTAGTCGACATGAAGWTGTGGBTRAACTGGRT	55
			3' CCCAAGCTTCCAGGRRCCARKGGATARACIGRTGG	47
		VK プライマー	5' ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACACISCTGYTATGGGT	56
			3' ACTAGTCGACATGGGCWTCGAAGATGRAGTCACAKWYYCWGG	49
			3' ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG	57
			3' CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	51
7C2(2)B9F	IgG2b	VH プライマー	5' GGGAAATTCATGRASSTTSKGGYTMARCTKGRITTT	53
11D5			3' ACTAGTCGACATGAAGWTGTGGBTRAACTGGRT	55
			3' CCCAAGCTTCCAGGRRCCARKGGATARACIGRTGG	47
		VK プライマー	5' ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG	57
			3' CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	51



サブクローン	Ab アイソタイプ	プライマー配列	配列番号
A6-2G5-08	IgG2a	VH プライマー	120
		5'	GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTTCTCTT
			GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTT
			GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCAATCTCTT
			GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTTCTCTT
			GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTAATCTCTT
			GGGAATTCATGAAATGGAGCTGGGTCTTTTTCTT
			GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCTTCTCTT
			GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTCTCTTC
		3'	CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAACGGGTGG
			CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACCGATGG
			CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGTGG
			CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGATGG
			CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGGTGG
	CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGTGG		
	CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACCGATGG		
	ACTAGTCGACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTTGGTGCT		
	50		
	3'	51	
A4-2A1-18	IgG2b	VH プライマー	136
		5'	GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCAATCTCTT
			GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTTCTCTT
			GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTTCTCTT
			GGGAATTCATGGAATGCACCTGGGTTTTCTCTT
			GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCTTCTCTT
			GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCAATCTCTT
			GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTAATCTCTT
			ACTAGTCGACATGGGATGAGCTTATCATCTCTT
			3'
		142	
		134	
		143	

サブクローン	Ab アイソタイプ	プライマー配列		配列番号
A6-2G5-30	IgG2b	VK プライマー	5'	144
			3'	145
			5'	131
			5'	146
			5'	147
			5'	148
			5'	149
			3'	51
			5'	150
			5'	151
			5'	152
			5'	127
			5'	153
			5'	124
5'	154			
5'	155			
5'	156			
5'	157			
5'	158			
		VH プライマー	3'	159
			3'	160
			3'	161
			3'	162
			3'	163
			3'	164
			3'	165
			3'	130
			3'	166
			3'	167
			3'	168
			3'	159
			3'	160
			3'	161
3'	162			
3'	163			
3'	164			
3'	165			
3'	130			
3'	166			
3'	167			
3'	168			

サブクローン	Ab アイソタイプ	プライマー配列	配列番号
A4-2A1-40	IgG2b	VK プライマー 5'	169 170 171 172 173 174 51
		3'	51
		VH プライマー 5'	139 154 155 127 121 175
		3'	176 147 129 177 128
		VK プライマー 5'	178 179 180
		3'	51
		VH プライマー 5'	181 120 182 124 126 183
		3'	

サブクローン	Ab アイソタイプ	プライマー配列		配列番号
		3'	CCCAAGCTTCCAGGGACCCAGGGGATAAACGGGTGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGACGGGTGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACAGATGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGATGG CCCAAGCTTCCAGGGACCCAGGGGATAAACGGATGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGGTGG	184 185 186 144 145 187
	VK プライマー	5'	GGGAAATTCATGGAGACACATCCCAGGTCTTT GGGAAATTCATGGAGTCACAGTCTCAGGTCTTT ACTAGTCGACATGGGCTTCAAGATGGAGTCACATTTTCAGG ACTAGTCGACATGGGCATCAAGATGAAGTCACATATTCAGG ACTAGTCGACATGGGCTTCAAGATGAAGTCACATTTCTCAGG CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	188 189 190 191 192 51
		3'	CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	51
A4-4A6-48	IgG2b	5'	ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTTATCATGTTCTT ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTTATCATGCTCTT GGGAAATTCATGGAATGCACCTGGGTTTCCCTCTT GGGAAATTCATGGAATGGACCTGGGTTTCCCTCTT GGGAAATTCATGGAATGGACCTGGGCTTTCTCTT GGGAAATTCATGAAATGGAGCTGGGTTATTCCTT GGGAAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTATTCCTT GGGAAATTCATGGAATGGAGCTGGGCTTTCTCTT	193 194 137 195 196 197 151 121
		3'	CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAGACGATGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAGACGGATGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAGACGATGG CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAACGGTGG CCCAAGCTTCCAGGGACCCAGTGGATAAACGATGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGATGG CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGATGG	198 199 200 141 166 131 144

サブクローン	Ab アイソタイプ	プライマー配列	配列番号
		VK プライマー	201
			202
			203
			204
			50
A4-4A6-18	IgG2b	3'	51
		VH プライマー	205
			206
			207
			208
A6-1D2-12	IgG2a	VK プライマー	209
			210
			211
			212
			213
	214		
	215		
	216		
	217		
	218		
	208		

10

20

30

40

サブクローン	Ab アイソタイプ	プライマー配列	配列番号
		5' VKプライマー	219
		ATGRAGWCACAKWVCYAGGTCITT	209
		ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT	210
		ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT	220
		ATGAGGRCCCTGCTCAGWTTYTTGGWTCCTT	221
		ATGGGCWTC AAGATGRAGTCACAKWYCWGG	211
		ATGAAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	212
		ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT	213
		ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG	214
		ATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG	
		3' ACTGGATGGTGGGAGATGGA	215

縮重コドン:

R = A又はG  
 Y = C又はT  
 K = G又はT

S = C又はG  
 M = A又はC  
 W = A又はT

D = A又はG又はT  
 H = A又はC又はT  
 V = A又はG又はC

B = C又はG又はT

10

20

30

40

表 13. ヒトタウの最長アイソフォーム (441a)、タウ40とも称する。

<p>ヒトタウの最長アイソフォーム (441a)、タウ40とも称する (配列番号: 67)</p> <p>微小管結合タンパク質タウアイソフォーム 2 [ホモサピエンス]</p> <p>NCBI 参照配列: NP_005901.2</p>	<p>MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT  MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG  SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA  AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG  HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK  IATPRGAAPP GQKQGQANATR IPAKTTPAPK  TPPSSGEPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR  RTPSLPTPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK  SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP  GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV  PGGGSVQIVY KPVDSLKVT S KCGSLGNIHH  KPGGGQVEVK SEKLDKDRV QSKIGSLDNI  THVPGGGNKK IETHKLFRE NAKAKTDHGA  EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV  DSPQLATLAD EVSASLAKQGL (配列番号: 67)</p>	<p>10</p> <p>20</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------

## 【 0 3 8 1 】

## 参考文献リスト

- Alonso A.D., et al. (1997), Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 94, 298-303
- Alving et al.,(1992) Infect. Immun. 60:2438-2444
- Asuni et al., (2007) J Neurosc. 27 (34), 9115-29
- Braak H., et al. (1993), Eur.Neurol., 33, 403-408
- Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003)
- Greenberg S.G., et al. (1992), J Biol.Chem., 267, 564-569.
- Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612
- Hodgson et al.,(1991) Bio/Technology, 9:421
- Hoffmann R., et al (1997), Biochemistry, 36, 8114-8124.
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991
- Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31)
- Khaw, B. A. et al. (1982) J. Nucl. Med. 23:1011-1019
- Lewis et al., (2000) Nature Genetics, 25:402-405
- Masliah et al., (2005) Neuron, 46(6), 857-68
- Masliah et al., (2011) PLoS ONE, Volume 6(4), e19338, pp- 1-17
- Muhs et al., (2007) Proc Natl Acad Sci USA, 104(23), 9810-5
- Muyllaert et al, (2006) Rev Neurol, 162(10), 903-907
- Muyllaert et al, (2008) Genes Brain Behav., Suppl. 1, 57-66
- Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vol s 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989))
- Nicolau et. al. (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337
- Nicoll et al., (2003) Nature Med, 9, 448-452
- Oddo et al., (2004) Neuron, 43, 321-332
- Queen et al.,(1989) Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032
- Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)
- Reig S., et al. (1995), Acta Neuropathol., 90, 441-447

Ribe et al., (2005) *Neurobiol Dis*, 20(3), 814-22  
Roberson et al, (2007) *Science*, 316 (5825), 750-4  
Rosenmann et al., (2006) *Arch Neurol*, 63(10), 1459-67  
Rousseaux et al. *Methods Enzymology*, (1986) , Academic Press 121:663-69  
Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 {*Clin. Chim Acta* 57:1-40  
Terwel et al., (2006) *J Biol Chem*, 280, 3963-3973  
Terwel et al, (2008) *Am J pathol.*, 172(3), 786-98  
Urushitani et al., (2007) *Proc. Natl Acad Sci USA*, 104(79), 2495-500  
Vandebroek et al., " Phosphorylation and Aggregation of Protein Tau in Humanized Yeast Cells and in Transgenic Mouse Brain " ; 7th International Conference on Alzheimer ' s and Parkinson ' s Disease, Sorrento, Italy, March 9-13, 2005, pp 15-19  
Wagner et al (2002) *Journal of Liposome Research* Vol 12(3), pp 259 - 270

10

- 国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 8 2 5 8 号
- 国際公開第 9 6 / 1 3 5 9 0 号
- 国際公開第 9 6 / 2 9 6 0 5 号
- 米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 3 8 0 8 6 号
- 米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 0 8 3 2 9 9 号
- 米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 2 5 3 1 3 号
- 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 2 0 4 3 5 4 号
- 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 1 3 1 6 9 2 号
- 米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 6 5 2 5 9 号
- 米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 6 2 6 9 5 号
- 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 2 4 5 3 3 号
- 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 8 9 4 7 3 号
- 米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 0 7 3 7 1 3 号
- 米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 2 9 1 8 6 号
- 米国特許第 5 1 1 2 5 9 6 号
- 米国特許第 5 2 6 8 1 6 4 号
- 米国特許第 5 5 0 6 2 0 6 号
- 米国特許第 5 6 8 6 4 1 6 号
- 米国特許第 5 0 0 4 6 9 7 号

20

30



【 図 3 】

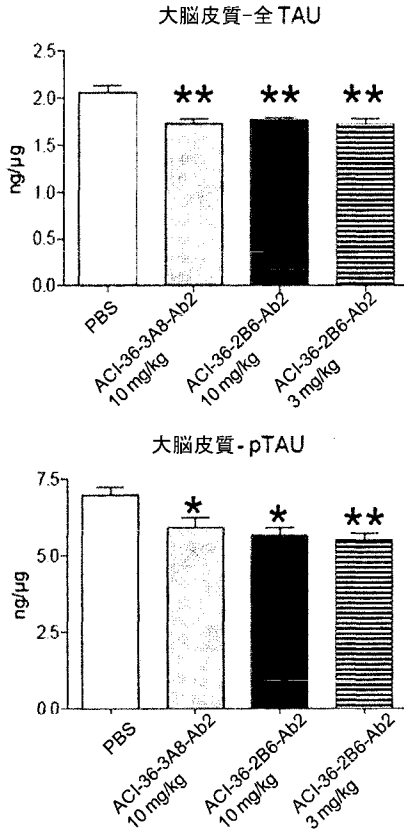


図 3

【 図 4 - 2 】

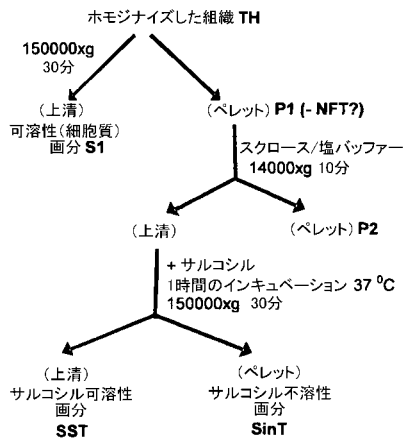


図 4-2

【 図 4 - 1 】

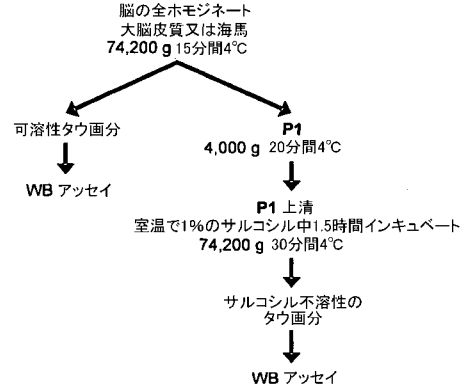


図 4-1

【 図 5 - 1 】

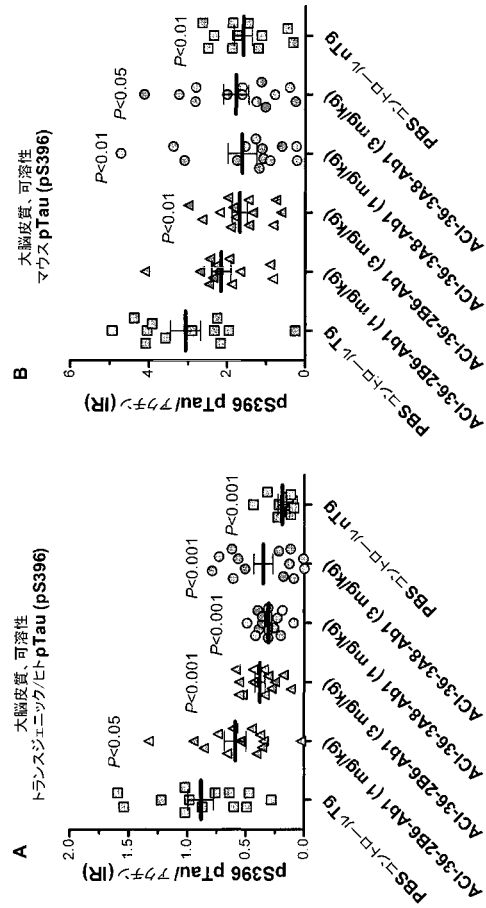
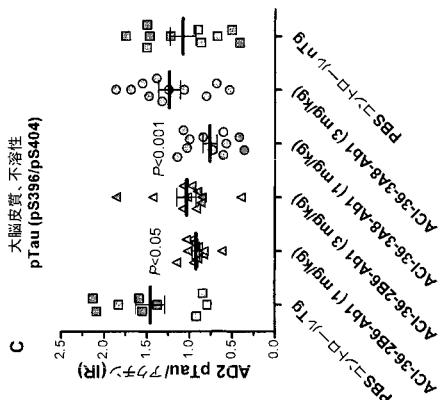
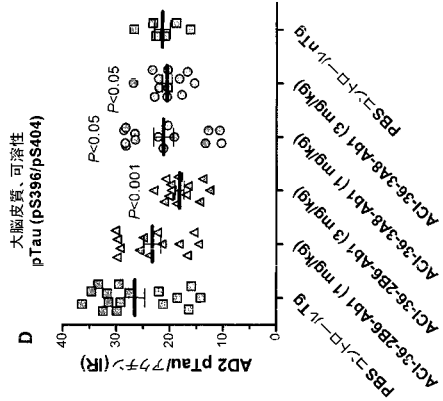
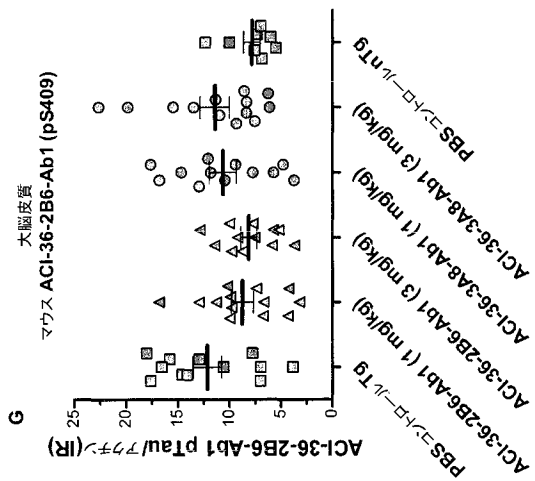


図 5-1

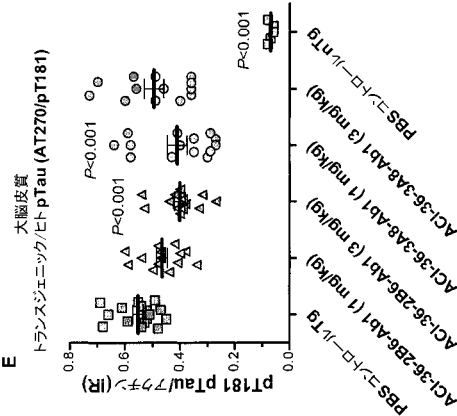
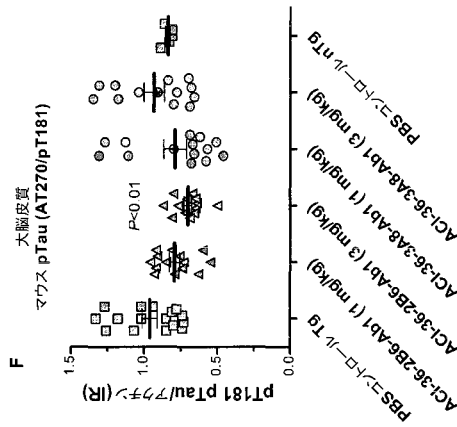
【 図 5 - 2 】



【 図 5 - 4 】



【 図 5 - 3 】



【 図 5 - 5 】

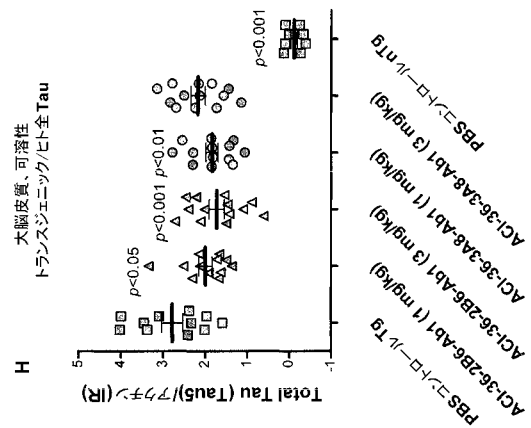
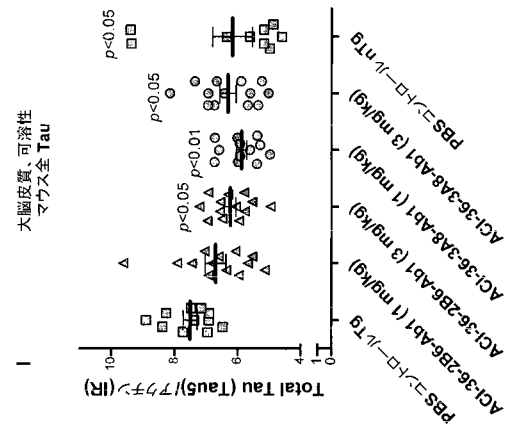


図 5-2

図 5-4

図 5-3

図 5-5

【 図 6 - 1 】

大脳皮質、可溶性画分 (S1)  
トランスジェニック/ヒト全 Tau (HT7)

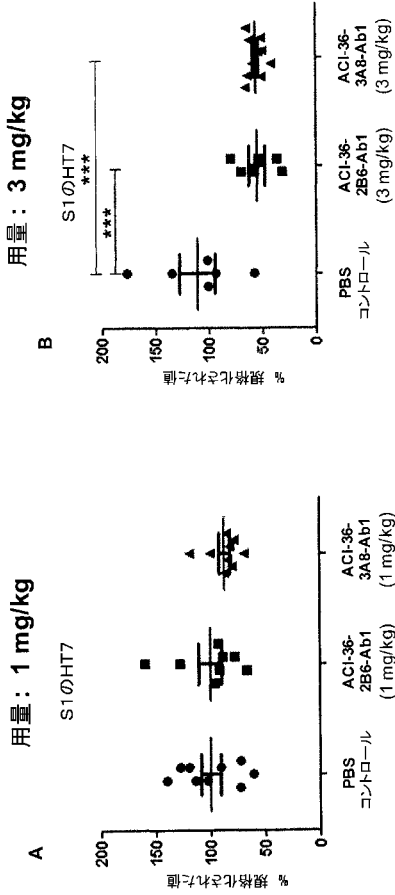


図 6-1

【 図 6 - 2 】

大脳皮質、可溶性画分 (S1)  
トランスジェニック/ヒト pTau (pT231/AT180)

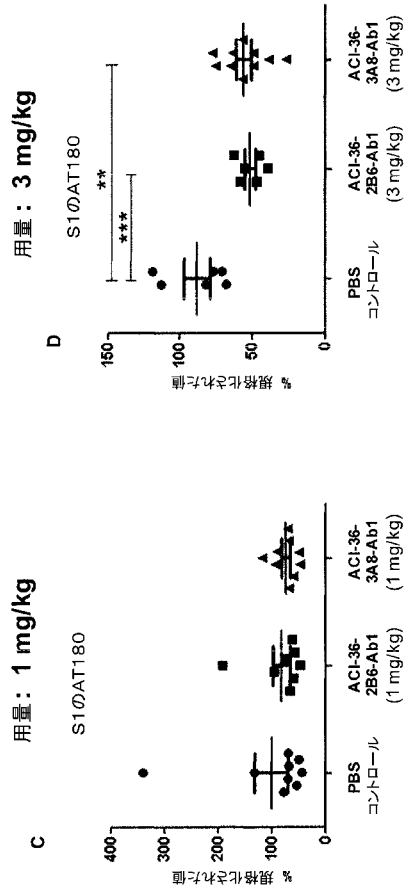


図 6-2

【 図 6 - 3 】

大脳皮質、可溶性画分 (S1)  
トランスジェニック/ヒト pTau (pS202/AT8)

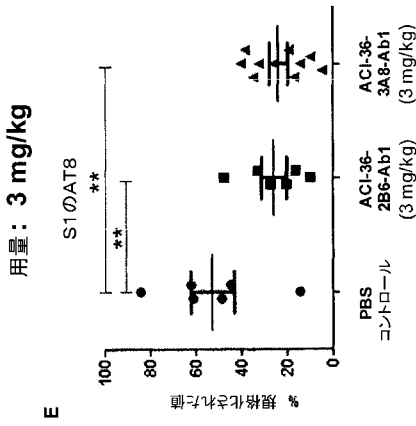


図 6-3

【 図 6 - 4 】

大脳皮質、可溶性画分 (S1)  
トランスジェニック/ヒト pTau (pS396)

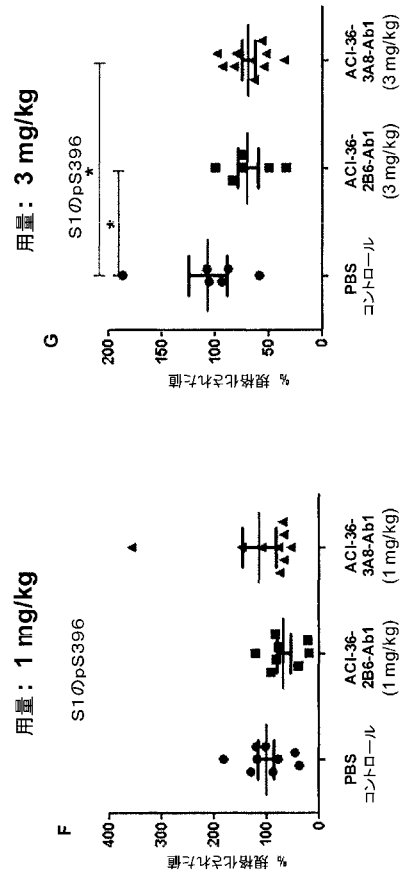


図 6-4

【 図 6 - 5 】

大脳皮質、全ホモジネート  
トランスジェニク/ヒト pTau (pS400)

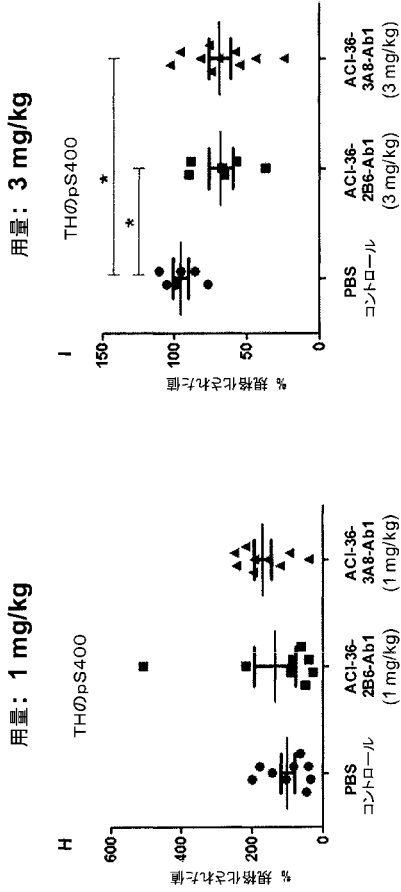


図 6-5

【 図 6 - 6 】

大脳皮質、可溶性画分 (S1)  
トランスジェニク/ヒト pTau (pS400)

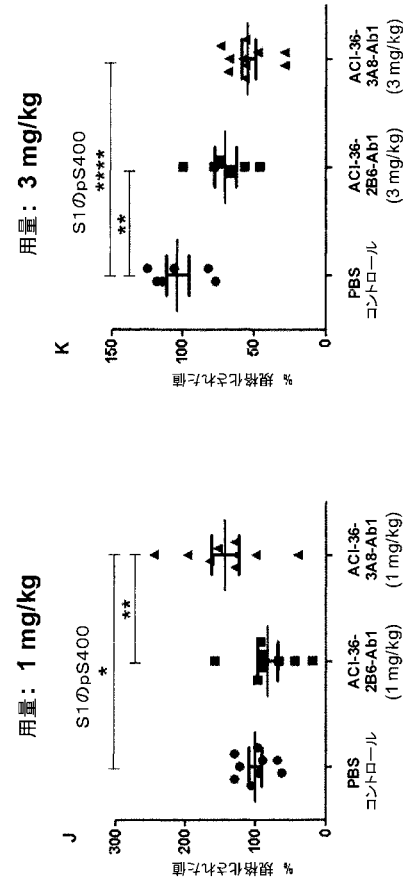


図 6-6

【 図 6 - 7 】

大脳皮質、全ホモジネート  
トランスジェニク/ヒト pTau (pS404)

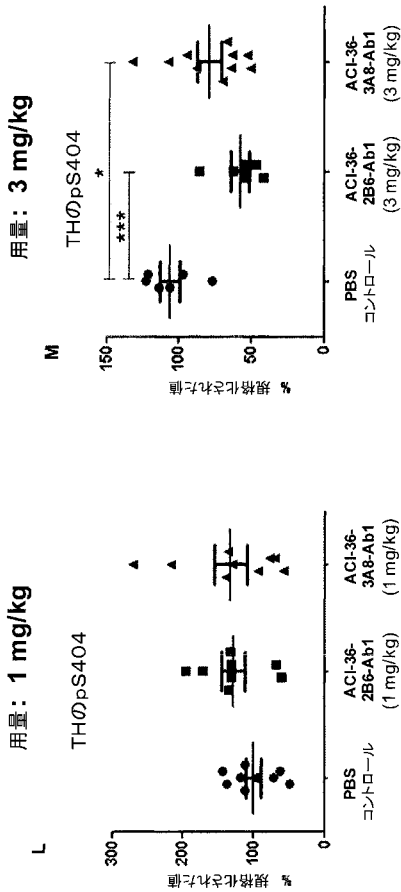


図 6-7

【 図 6 - 8 】

大脳皮質、可溶性画分 (S1)  
トランスジェニク/ヒト pTau (pS404)

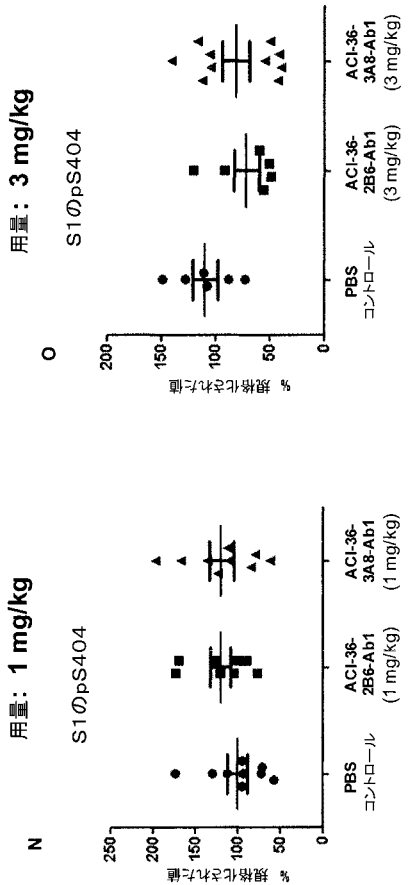


図 6-8

【 図 7 】

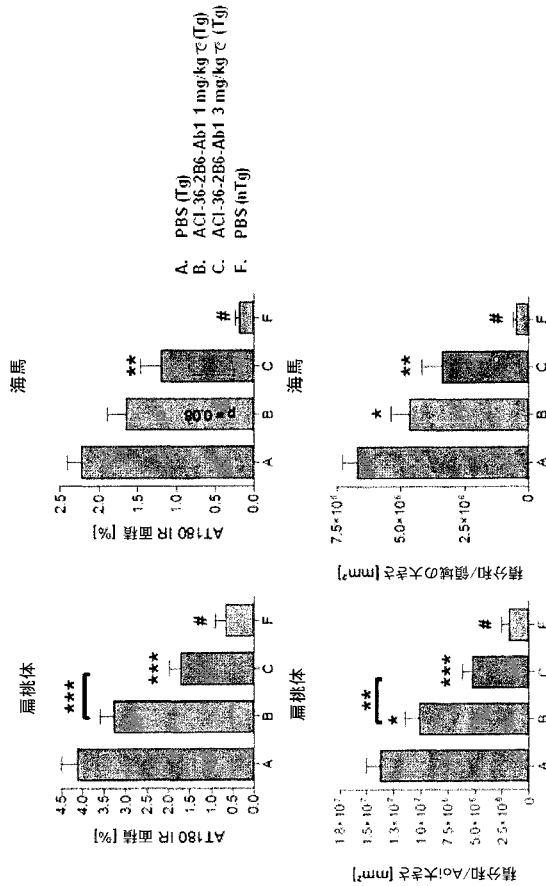


図 7

【 図 8 】

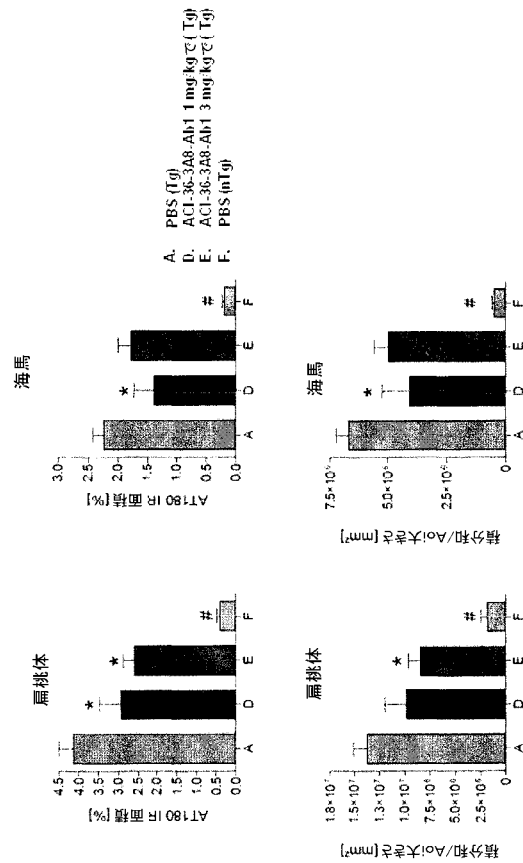
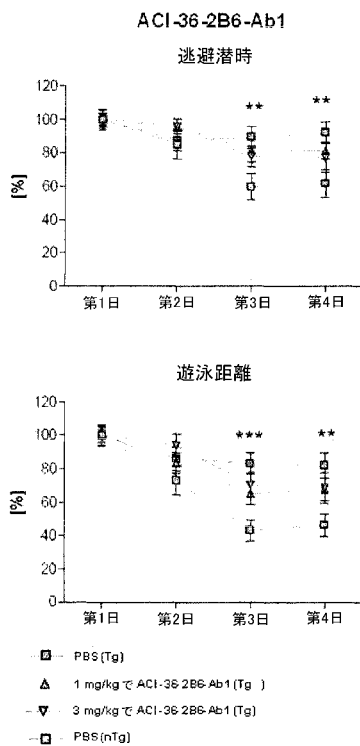


図 8

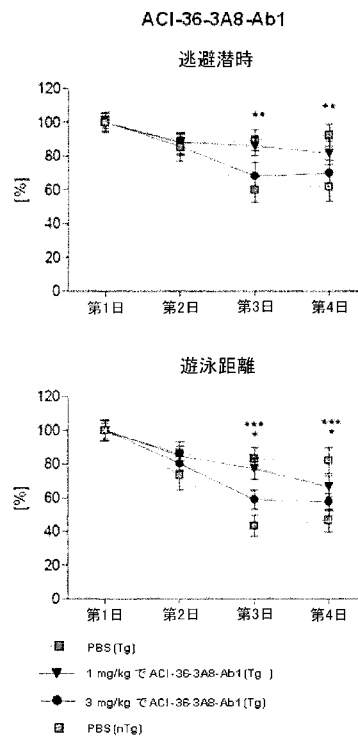
【 図 9 】



	逃避潜時			遊泳距離		
	第2日	第3日	第4日	第2日	第3日	第4日
A対B	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
A対C	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
A対F	P>0.05	P<0.01	P<0.01	P>0.05	P<0.001	P<0.01

図 9

【 図 10 】



	逃避潜時			遊泳距離		
	第2日	第3日	第4日	第2日	第3日	第4日
A対D	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
A対E	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P<0.05	P<0.05
A対F	P>0.05	P<0.01	P<0.01	P>0.05	P<0.001	P<0.001

図 10

【 図 1 - 1 】

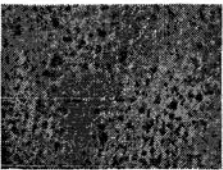
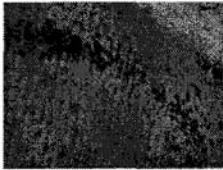
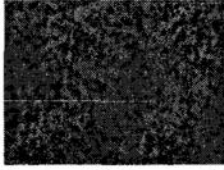
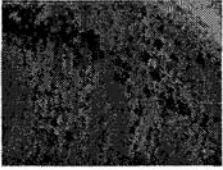
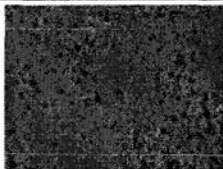
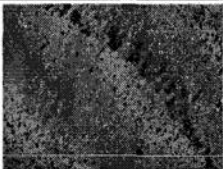
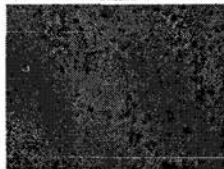
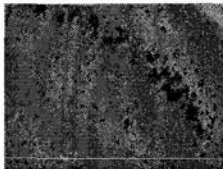
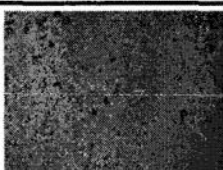
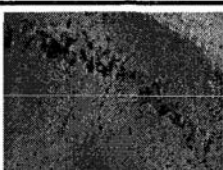
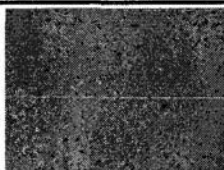
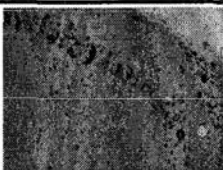
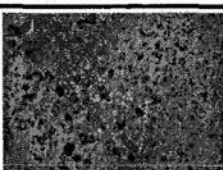
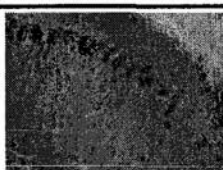
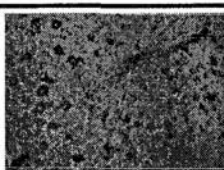
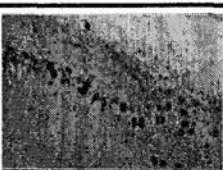
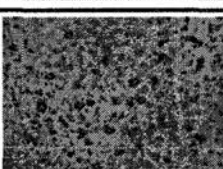
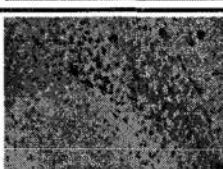
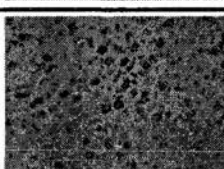
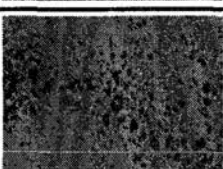
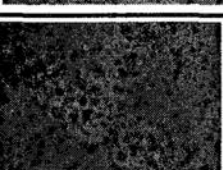
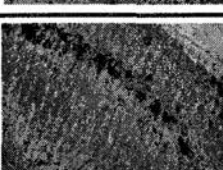
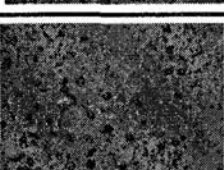
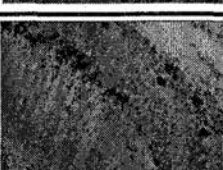
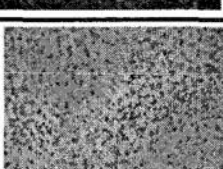
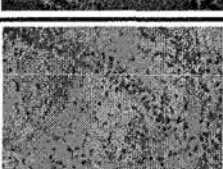
クローン	大脳皮質	海馬 (CA1)	クローン	大脳皮質	海馬 (CA1)
6C10F9 C12A11			6C10E5 E9C12		
6H1A11 C11			6H1G6E 6		
2B6A10 C11			2B6G7A 12		
3A8A12 G7			3A8E12 H8		
7C2(1) F10C10 D3			7C2(2) B9F11D 5		
<b>Control</b> AT100 抗体			<b>Control</b> PG5 抗体		
<b>Control</b> 一次抗体 なし					

図 1-1

【 図 1 - 2 】

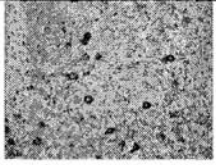
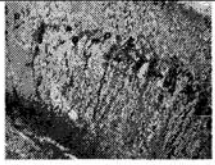
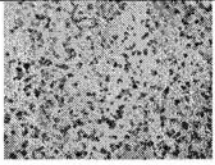
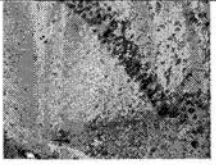

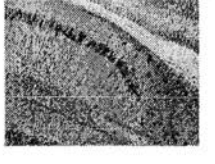
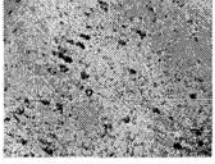
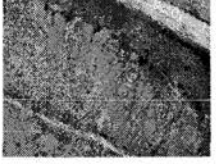
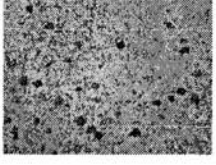
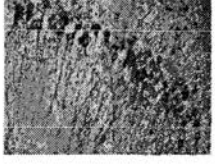
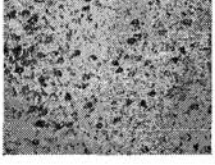
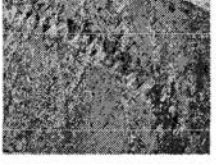
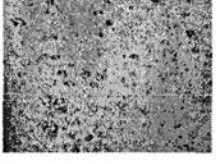
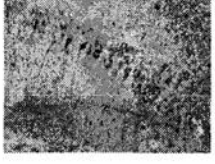
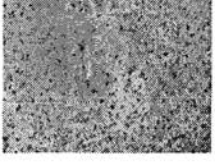

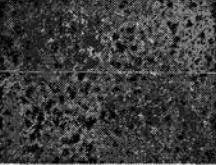
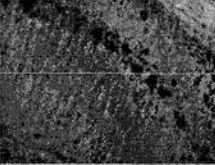
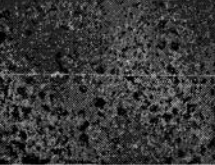
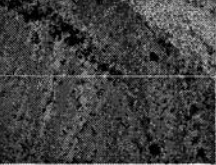
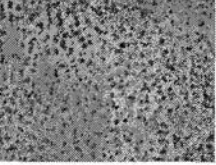
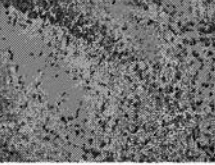
クローン	大脳皮質	海馬 (CA1)	クローン	大脳皮質	海馬 (CA1)
A4-2A1-18			A6-2G5-08		
A4-4A6-48			A6-2G5-30		
A4-2A1-40			A6-2G5-41		
A6-1D2-12			A4-4A6-18		
<b>Control</b> AT100 抗体			<b>Control</b> PG5 抗体		
<b>Control</b> 一次抗体 なし					

図 1-2

【 図 2 】

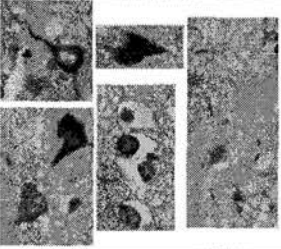
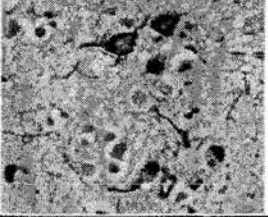

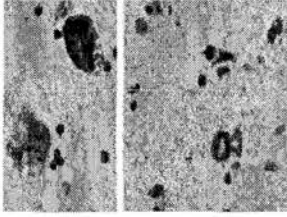
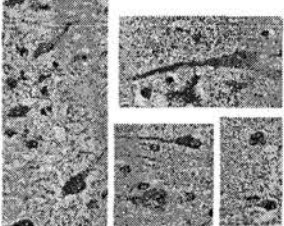
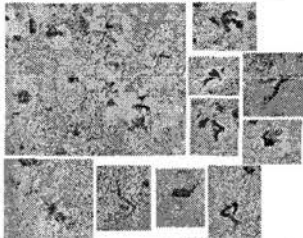
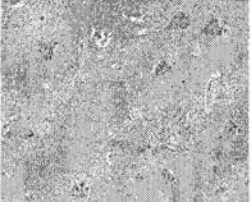
診断	領域	ACI-3A8-Ab1 TAUPIR 染色
AD	海馬	
FAD	前海馬	
AGD	前海馬	
PSP	淡蒼球	
FTDP-17	前頭皮質	
CBD	前頭皮質	
健常者 コントロール	海馬	

図 2

【 配列表 】



2014502141000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/067604
---------------------------------------------------

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/18 G01N33/68 A61K39/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE G ET AL: "Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, THE SOCIETY, WASHINGTON, DC, US, vol. 24, no. 9, 3 March 2004 (2004-03-03), pages 2304-2312, XP002350398, ISSN: 1529-2401, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4162-03.2004 the whole document page 2305, column 1 - column 2 figures 1-2,5-7 ----- -/--	1-120
<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 document 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
26 March 2012		03/04/2012
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
		Jenkins, Gareth

3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/067604

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. BHASKAR ET AL: "Tyrosine phosphorylation of tau accompanies disease progression in transgenic mouse models of tauopathy", NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY, vol. 36, no. 6, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 462-477, XP55016663, ISSN: 0305-1846, DOI: 10.1111/j.1365-2990.2010.01103.x the whole document page 475, column 1, paragraph 1 -----	1-120
X	US 2008/050383 A1 (SIGURDSSON EINAR [US] ET AL) 28 February 2008 (2008-02-28) the whole document claims 1,6,31,37,38 page 11; sequence 6 -----	1-120
X	WO 2010/106127 A2 (AC IMMUNE SA [CH]; PFEIFER ANDREA [CH]; MUHS ANDREAS [CH]; PIHLGREN MA) 23 September 2010 (2010-09-23) the whole document claims 1-62 pages 44,67 sequence 2 -----	1-120
X,P	WO 2010/115843 A2 (AC IMMUNE SA [CH]; LEUVEN K U RES & DEV [BE]; PFEIFER ANDREA [CH]; MUH) 14 October 2010 (2010-10-14) the whole document page 52; table 1 page 77; table 10 claims 1-97 -----	1-120
X	US 2005/221391 A1 (DAVIES PETER [US]) 6 October 2005 (2005-10-06) the whole document paragraph [0081] -----	1-120
X	US 2002/086009 A1 (ISHIGURO KOICHI [JP] ET AL) 4 July 2002 (2002-07-04) the whole document claims 1,2,7 -----	1-120
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/067604
---------------------------------------------------

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JICHA: "cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 19, no. 17, 1 January 1999 (1999-01-01), page 7486, XP55022354, ISSN: 0270-6474 the whole document abstract table 1 figure 1	1-120
X,P	----- THOMAS VANHELMONT ET AL: "Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast", FEMS YEAST RESEARCH, vol. 10, no. 8, 1 December 2010 (2010-12-01), pages 992-1005, XP55022356, ISSN: 1567-1356, DOI: 10.1111/j.1567-1364.2010.00662.x the whole document abstract table 1	1-120
X	----- WO 98/22120 A1 (WISTAR INST [US]; UNIV PENNSYLVANIA [US]; OTVOS LASZLO [US]; HOFFMANN) 28 May 1998 (1998-05-28) the whole document claims 1,7,8,18,26	1-120
X	----- EP 2 210 901 A1 (IMMUNAS PHARMA INC [JP]; NAT CT FOR GERIATRICS AND GERO [JP]) 28 July 2010 (2010-07-28) the whole document claims 2,9 sequences 3,15,17,19	1-120
X,P	----- WO 2010/144711 A2 (UNIV NEW YORK [US]; SIGURDSSON EINAR M [US]) 16 December 2010 (2010-12-16) the whole document claim 1 table 1	1-120
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/067604

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HOFFMANN R ET AL: "Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites",            BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US,            vol. 36, no. 26, 1 July 1997 (1997-07-01),            pages 8114-8124, XP002625812,            ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/BI970380+            the whole document            abstract            tables 1,2</p> <p>-----</p>	1-120
X	<p>LICHTENBERG-KRAAG B ET AL:            "'Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau",            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US,            vol. 89, no. 12, 1 June 1992 (1992-06-01),            pages 5384-5388, XP002226003,            ISSN: 0027-8424, DOI:            10.1073/PNAS.89.12.5384            the whole document            figure 7</p> <p>-----</p>	1-120
X	<p>FRANCOIS TORREILLES ET AL: "Binding specificity of monoclonal antibody AD2: influence of the phosphorylation state of tau",            MOLECULAR BRAIN RESEARCH,            vol. 78, 1 January 2000 (2000-01-01),            pages 181-185, XP55022594,            the whole document            figure 2B</p> <p>-----</p>	1-120
X	<p>L OTVOS ET AL: "Monoclonal Antibody PHF4 Recognizes Tau Protein Phosphorylated at Serine Residues 396 and 404",            JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH,            vol. 39, 1 January 1994 (1994-01-01),            pages 669-673, XP55022593,            the whole document            table 1            figure 1</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-120

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/067604
---------------------------------------------------

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DAVID SINGER ET AL: "Immuno-PCR-based quantification of multiple phosphorylated tau-epitopes linked to Alzheimer's disease", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 395, no. 7, 11 October 2009 (2009-10-11), pages 2263-2267, XP019756726, ISSN: 1618-2650, DOI: 10.1007/S00216-009-3208-8 the whole document table 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-120
X	<p>DAVID SINGER ET AL: "Characterization of Phosphorylation Dependent Antibodies To Study the Phosphorylation Status of the Tau Protein", INTERNATIONAL JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH AND THERAPEUTICS ; FORMERLY KNOWN AS LETTERS IN PEPTIDE SCIENCE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 11, no. 4, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 279-289, XP019287635, ISSN: 1573-3904 the whole document table 1 figure 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-120
X	<p>ZHENG-FISCHHOEFER QINGYI ET AL: "Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BLACKWELL PUBLISHING, BERLIN, DE, vol. 252, no. 3, 1 March 1998 (1998-03-01), pages 542-552, XP002202096, ISSN: 0014-2956, DOI: 10.1046/J.1432-1327.1998.2520542.X the whole document figure 10</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-120
X,P	<p>WO 2011/013034 A1 (PFIZER VACCINES LLC [US]; SMITH III GEORGE JOSEPH [US]; WILLS KENNETH) 3 February 2011 (2011-02-03) the whole document claim 1 page 8 pages 18-20 page 82; table 5</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-120
	-----	-/--

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/067604

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZELAN F P ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODY PHF-9 RECOGNIZES PHOSPHORYLATED SERINE 404 OF TAU PROTEIN AND LABELS PAIRED HELICAL FILAMENTS", JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, WILEY-LISS, US, vol. 46, no. 1, 1 October 1996 (1996-10-01), pages 90-97, XP000646724, ISSN: 0360-4012, DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19961001)46:1<90::AID-JNR11>3.0.CO;2-G the whole document table 1 figure 3	1-120
X	----- RODER H M ET AL: "PHOSPHORYLATION-DEPENDENT MONOCLONAL TAU ANTIBODIES DO NOT RELIABLY REPORT PHOSPHORYLATION BY EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE 2 AT SPECIFIC SITES", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC, US, vol. 272, no. 7, 14 February 1997 (1997-02-14), pages 4509-4515, XP000979104, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.272.34.21616 the whole document tables 1,2	1-120
X	----- HIRATA-FUKAE C ET AL: "Levels of soluble and insoluble tau reflect overall status of tau phosphorylation in vivo", NEUROSCIENCE LETTERS, LIMERICK, IE, vol. 450, no. 1, 23 January 2009 (2009-01-23), pages 51-55, XP025800599, ISSN: 0304-3940, DOI: 10.1016/J.NEULET.2008.11.023 [retrieved on 2008-11-13] the whole document figure 1	1-120
X	----- US 2008/220449 A1 (VASAN SARA [US] ET AL) 11 September 2008 (2008-09-11) the whole document paragraph [0071] example 6	1-120
	----- -/--	

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/067604

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>S. ODDO ET AL: "Reduction of Soluble Abeta and Tau, but Not Soluble Abeta Alone, Ameliorates Cognitive Decline in Transgenic Mice with Plaques and Tangles", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 51, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 39413-39423, XP55022863, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M608485200 the whole document page 39417</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-120



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2011/067604**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.:
  
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/ EP2011/ 067604

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 19, 36, 50, 79, 80, 89, 90(completely); 1-18, 24-31, 43-45, 53-78, 105-114(partially)

The claims in so far as they relate to the epitope comprising Tau 15-20, pY18.

---

- 2-5. claims: 1-18, 20-35, 37-49, 51-78, 81-88, 91-114(all partially)

The claims in so far as they relate to the epitopes comprising residue pS409, pT212+pS214, pS396, pS404, respectively.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/067604

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 2008050383	A1	28-02-2008	US 2008050383 A1	28-02-2008
			US 2011318358 A1	29-12-2011
WO 2010106127	A2	23-09-2010	AU 2010224824 A1	22-09-2011
			CA 2755683 A1	23-09-2010
			EP 2408807 A2	25-01-2012
			KR 20120004994 A	13-01-2012
			SG 174871 A1	28-11-2011
			US 2010285108 A1	11-11-2010
			WO 2010106127 A2	23-09-2010
WO 2010115843	A2	14-10-2010	AU 2010233856 A1	27-10-2011
			CA 2757345 A1	14-10-2010
			CO 6390113 A2	29-02-2012
			CR 20110509 A	09-02-2012
			EP 2413957 A2	08-02-2012
			SG 175037 A1	28-11-2011
			WO 2010115843 A2	14-10-2010
US 2005221391	A1	06-10-2005	NONE	
US 2002086009	A1	04-07-2002	US 2002086009 A1	04-07-2002
			WO 9734145 A1	18-09-1997
WO 9822120	A1	28-05-1998	AU 5508798 A	10-06-1998
			WO 9822120 A1	28-05-1998
EP 2210901	A1	28-07-2010	AU 2008312802 A1	23-04-2009
			CA 2702880 A1	23-04-2009
			CN 101965365 A	02-02-2011
			EP 2210901 A1	28-07-2010
			KR 20100115340 A	27-10-2010
			US 2010260783 A1	14-10-2010
			WO 2009051220 A1	23-04-2009
WO 2010144711	A2	16-12-2010	CA 2765099 A1	16-12-2010
			EP 2440234 A2	18-04-2012
			US 2010316564 A1	16-12-2010
			WO 2010144711 A2	16-12-2010
WO 2011013034	A1	03-02-2011	AR 078085 A1	12-10-2011
			AU 2010277254 A1	09-02-2012
			CA 2768346 A1	03-02-2011
			TW 201106968 A	01-03-2011
			US 2011177109 A1	21-07-2011
			WO 2011013034 A1	03-02-2011
US 2008220449	A1	11-09-2008	US 2008220449 A1	11-09-2008
			WO 2008140639 A2	20-11-2008

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H 0 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
	G 0 1 N 33/53 D	

(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, MD, RU, T J, 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, R O, 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, H U, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. テフロン

- (74) 代理人 100101199  
弁理士 小林 義教
- (72) 発明者 ファイファー, アンドレア  
スイス国 ツェーハー - 1 8 0 6 サン - レジエ, ルート ドゥ フニル 1 6 アー
- (72) 発明者 ムース, アンドレアス  
スイス国 ツェーハー - 1 0 0 9 ピュリー, アベニュー デ セリジエ 3 9 ベー
- (72) 発明者 ヴァン ルーヴェン, フレッド  
ベルギー国 ベー - 3 2 1 0 リンデン, ヘルトゲンラーン 1 8
- (72) 発明者 ビルグレン, マリア  
スイス国 ツェーハー - 1 0 5 2 モン - シュル - ローザンヌ, シュマン デュ テサン 6 ベー
- (72) 発明者 アドルフソン, オスカル  
スイス国 ツェーハー - 1 0 3 8 ベルシェ, シュマン ドゥ ラリー 1 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 BA61 CA01 GA11 HA01 HA17  
4B064 AG26 AG27 BJ12 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA90Y AA93X AB04 AC14 BA08 CA24 CA25 CA45  
4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA21 CA28 NA14 ZA011 ZA021 ZA151  
ZA161 ZA941  
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 EE01  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA15 ZA16  
ZA94  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA45 DA75 DA76 DA86 EA21 EA31  
FA74

专利名称(译)	识别tau的磷酸化位点特异性抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014502141A</a>	公开(公告)日	2014-01-30
申请号	JP2013532226	申请日	2011-10-07
[标]申请(专利权)人(译)	应用细胞μ利SA下跌 香取慎柯统一威赛引用了真正埃因霍温		
申请(专利权)人(译)	应用细胞免疫ES呢. Katorike统一威赛施塌忒鲁汶		
[标]发明人	ファイファーアンドレア ムースアンドレアス ヴァンルーヴェンフレッド ピルグレンマリア アドルフソンオスカル		
发明人	ファイファー, アンドレア ムース, アンドレアス ヴァンルーヴェン, フレッド ピルグレン, マリア アドルフソン, オスカル		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K14/47 C12N5/10 C12P21/02 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61K31/7088 A61P25/00 A61P25/28 A61P21/02 A61P25/16 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/0005 A61K2039/505 A61P21/02 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 C07K16/18 C07K2317/34 C07K2317/76 G01N33/6896 G01N2800/2821 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/92 G01N2800/52		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C07K14/47 C12N5/00.102 C12P21/02.C A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61K31/7088 A61P25/00 A61P25/28 A61P21/02 A61P25/16 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA17 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90Y 4B065/AA93X 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA21 4C084/CA28 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA941 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA02 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4C086/ZA94 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA21 4H045/EA31 4H045/FA74		
优先权	2011174248 2011-07-15 EP 2010186810 2010-10-07 EP		
其他公开文献	JP6371526B2 JP2014502141A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及用于治疗 and 诊断用于治疗由神经原纤维缠结引起或与神经原纤维缠结有关的疾病和病症的方法和组合物。特别地，本发明涉及特异性识别并结合磷酸化病理性蛋白质tau构象异构体的抗体，以及涉及所述抗体的方法和组合物，其用于治疗包括阿尔茨海默氏病 (AD) 在内的tau蛋白病的治疗和诊断用途。

Clone	Cortex	Hippocampus (CA1)	Clone	Cortex	Hippocampus (CA1)
6C10FD G12A17			3C10E5 E8D12		
81TA11 C11			81TG8E 5		
288A10 C11			288G7A 12		
348A12 G7			348E12 H0		
702M1 F10E10 D5			702G5 BEF13D 5		
Control AT140 antibody			Control PC5 antibody		
Control No primary antibody					

FIGURE 1-7