(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-93470
(P2017-93470A)
(43)公開日　平成29年6月1日(2017.6.1)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B065
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	ZNA	4C076
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47		4C084
C07K 7/06	(2006.01)	C07K	7/06		4C085
C07K 7/08	(2006.01)	C07K	7/08		4H045

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 203 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-33138(P2017-33138)
(22)出願日　平成29年2月24日(2017.2.24)
(62)分割の表示　特願2016-230258(P2016-230258)の分割
原出願日　平成24年9月14日(2012.9.14)
(31)優先権主張番号　61/536,339
(32)優先日　平成23年9月19日(2011.9.19)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/653,115
(32)優先日　平成24年5月30日(2012.5.30)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　514064992
アクソン　ニューロサイエンス　エスエー
スロバキア　８１１　０２　ブラチスラヴァ，　ドヴォジコヴォ　ナブルジエ　１０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本　健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アルツハイマー病におけるタウ媒介性病理のタンパク質ベースの治療および診断

(57)【要約】
【課題】病理学的タウ－タウ相互作用の開始および伝播に寄与するタウタンパク質の領域に結合する独特の治療抗体および診断抗体、ならびにそれらのフラグメント、部分、誘導体およびバリアント、ならびにそれらを作製する方法を提供すること。
【解決手段】本発明は、アルツハイマー病および関連タウオパチーの診断、予防および処置のためにそれらの抗体を使用する方法にも関する。本発明は、アルツハイマー病および他の神経変性タウオパチーの予防的および治療的な処置のための方法も提供する。この方法は、患者の脳における病理学的タウタンパク質およびタウ沈着物に対する免疫応答を誘発する抗体および／またはペプチドワクチンの注射を含む。好適なワクチンは、本明細書中に提供されるタウ治療用エピトープの１つもしくは複数を有するタウペプチドを表わす。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
本明細書に記載の発明。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本出願は、２０１１年９月１９日に出願された米国仮特許出願第６１／５３６，３３９号および２０１２年５月３０日に出願された米国仮特許出願第６１／６５３，１１５号の利益を主張し、これらの両出願の内容は本明細書において参照として援用される。
【０００２】
配列表
本願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介してＡＳＣＩＩ形式で提出された配列表を含み、その全体が本明細書によって参照により援用される。２０１２年９月１３日に作成された前記ＡＳＣＩＩコピーは、ＳＥＱＵＥＮＣＥ＿ＬＩＳＴＩＮＧ．ｔｘｔという名称であり、１５５，４００バイトのサイズである。
【０００３】
分野
本発明は、アルツハイマー病における病理学的タウ－タウ凝集体の促進および／または発生に関わるある特定の形態のタウの生成およびクリアランスを干渉するためのタンパク質ベースの（例えば、抗体、ペプチド）方法および手段、ならびにアルツハイマー病の診断および処置に有用な抗タウ抗体を作製するための方法を特徴とする。本発明はさらに、アルツハイマー病を診断するための方法（処置の進行を段階付ける（ｓｔａｇｉｎｇ）ためおよび評価するための方法を含む）および手段に関する。
【背景技術】
【０００４】
背景
アルツハイマー病（ＡＤ）は、高次脳構造（例えば、記憶および認知に関わる構造）を破壊する進行性の神経変性障害である。この疾患は、認知機能の障害、ならびに記憶力、学習、言語の低下、ならびに計画的および意図的動作を行う能力の低下に至る。ＡＤは、同時に、行動上の、感情的な、対人性のおよび社会的な変質も伴う。これらの認知性および行動性の障害は、生存を困難にする（Ｂｕｒｎｓら、２００２）。後期ＡＤの患者は、話すこと、言語を理解することおよび自分自身の基本的な身の回りの世話を行うことができないことが多く、最終的には、かかりっきりの世話および監視が必要となり、家族のメンバーおよびナーシングホームに頼ることが多い。ＡＤは、老年痴呆の主な原因であり、人口における高齢者の割合が伸びるにつれて有病率が高まると予想される。ＡＤを有する人の総数は、２０００年から２０５０年の間だけで少なくとも３倍増加すると予想されており、ＡＤは、世界的な公衆衛生問題になっている（Ｓｌｏａｎｅら、２００２）。ＡＤの臨床管理は、たいてい支持的なままである。つまり、患者は、ＡＤからの合併症および副作用の予防、制御または軽減を目的とした処置、ならびに彼らの快適さおよび生活の質を改善するための処置を受けている。その疾患プロセスを直接標的とする処置および疾患を改変する効果を有する処置に対するニーズは満たされていないままである。
【０００５】
ＡＤは、脳における神経以外の斑（ｅｘｔｒａｎｅｕｒｏｎａｌ　ｐｌａｑｕｅｓ）ならびに細胞内および細胞外の神経原線維変化（ｎｅｕｒｏｆｉｂｒｉｌｌａｒｙ　ｔａｎｇｌｅｓ）の存在によって組織学的に特徴付けられる。斑は、主にβアミロイド（Ａβ）から構成されているのに対し、濃縮体は、病理学的形態のタウ（例えば、病理学的タウの配座異性体）およびそれらの凝集体を含む。斑および濃縮体と疾患プロセスとの関係は不明なままであるが、研究によって、アミロイドとタウの病原論との関連性が示唆されている（Ｈａｒｄｙら、１９９８；Ｏｄｄｏら、２００４；Ｒａｐｏｐｏｒｔら、２００２；

Ｒｏｂｅｒｓｏｎら、２００７；Ｓｈｉｐｔｏｎら、２０１１）。ＡＤの病理においてＡβが果たす中心的役割は、Ａβの沈着の後に、タウのリン酸化および濃縮体の形成、次いで、神経細胞死が続く「Ａβカスケード」と呼ばれる仮説において初めに提唱された（Ｈａｒｄｙ ａｎｄ Ａｌｌｓｏｐ，１９９１；Ｈａｒｄｙ ａｎｄ Ｓｅｌｋｏｅ，２００２；概説として、Ｗａｌｓｈ ａｎｄ Ｓｅｌｋｏｅ，２００４を参照のこと；Ｓｅａｂｒｏｏｋら、２００７も参照のこと）。したがって、ＡＤに対する最初の治療的アプローチは、第一に、Ａβの標的化に焦点が当てられた。しかしながら、ＡＤ患者における脳Ａβ病理の程度とその疾患の臨床的進行との間に相関が無いことが実証されている（Ｂｒａａｋ ａｎｄ Ｂｒａａｋ，１９９１）。さらに、無症候の個体は、剖検時に広範な（しばしば散在性の）アミロイド沈着を示し（Ｂｒａａｋ ａｎｄ Ｂｒａａｋ，１９９１）、少なくとも初期のＡＤでは、神経細胞脱落およびアミロイド沈着は、脳の種々の領域で生じる（Ｃａｒｔｅｒ ａｎｄ Ｌｉｐｐａ，２００１）。ゆえに、Ａβだけの標的化は、任意のまたはすべての患者における疾患プロセスを変更させるには足りない。それにもかかわらず、ＡＤ患者において臨床試験を経ている最も進歩した疾患標的化治療は、Ａβの産生およびクリアランスを狙った治療のままである。これらの治療には、受動免疫療法、例えば、ＢＡＰＩＮＥＵＺＵＭＡＢ、ＳＯＬＡＮＥＵＺＵＭＡＢおよびＰＯＮＥＺＵＭＡＢ、ならびに小分子ガンマ－セクレターゼ阻害剤ＳＥＭＡＧＡＣＥＳＴＡＴが含まれる（概説としてＣｉｔｒｏｎら、２０１０を参照のこと）。

【０００６】

ＡＤの病理においてタウが果たす認識されている役割は、数多くの研究において証明されている。例えば、Ｂｒａａｋは、ＡＤの神経変性に対して最も密接な相互関係のあるものは、タウ濃縮体が存在することおよびアミロイド斑が存在しないことであることを示した（Ｂｒａａｋ ａｎｄ Ｂｒａａｋ，１９９１）。別の研究では、培養されたニューロンにおけるＡβの神経毒性は、タウに依存するとみられた（Ｒａｐｏｐｏｒｔら、２００２）。最近、内在性タウが減少することにより、高いＡβレベルが変更することなく、ヒトアミロイド前駆体タンパク質を発現するトランスジェニックマウスにおいて行動上の障害が妨げられた（Ｒｏｂｅｒｓｏｎら、２００７）。タウの減少は、トランスジェニックマウスと非トランスジェニックマウスの両方を興奮毒性から保護した。同上。Ｓａｎｔａｃｒｕｚらは、タウの量の減少が、タウオパチーのモデルにおいて記憶機能を回復させることを証明した（Ｓａｎｔａｃｒｕｚら、２００５）。したがって、タウを減少させることを狙った治療は、ＡＤおよび他のタウ関連疾患状態を処置するための有効なストラテジーであり得る。

【０００７】

タウは、それらの生理学的環境において厳密な３次元構造が存在しないことを特徴とする天然無秩序（ｉｎｔｒｉｎｓｉｃａｌｌｙ ｄｉｓｏｒｄｅｒｅｄ）タンパク質のファミリーに属する（Ｚｉｌｋａら、２００８）。しかしながら、タウの切断および過剰リン酸化は、天然無秩序状態から、複数の可溶性および不溶性の誤無秩序（ｍｉｓｄｉｓｏｒｄｅｒｅｄ）構造（対らせん状細線維（ＰＨＦ）および他の凝集体を含む）への病理学的変換を引き起こし得る（Ｗｉｓｃｈｉｋら、１９８８ａ；Ｗｉｓｃｈｉｋら、１９８８ｂ；Ｎｏｖａｋら、１９９３；Ｓｋｒａｂａｎａら、２００６；Ｚｉｌｋａら、２００８；Ｋｏｖａｃｅｃｈら、２０１０）。これらの構造的変化は、毒性の機能獲得、天然タンパク質の生理学的機能の喪失、またはその両方をもたらす（Ｚｉｌｋａら、２００８；Ｋｏｖａｃｅｃｈら、２０１０）。

【０００８】

タウの生理学的機能は、神経細胞の微小管ネットワークを構成する微小管へのチューブリン単量体の集合を媒介する際の機能である（Ｂｕｅｅら、２０００）。タウは、そのタンパク質のＣ末端部分に位置する反復領域を通じて微小管に結合する。同上。これらのリピートドメイン（Ｒ１～Ｒ４）は、互いに同一ではないが、高度に保存された３１～３２アミノ酸を含む（Ｔａｎｉｇｕｃｈｉら、２００５ｂ）。ヒトの脳には、タウの６つの独特のアイソフォームが存在し、それらは、そのタンパク質のＣ末端における３つ（Ｒ１、

Ｒ３およびＲ４）または４つ（Ｒ１～Ｒ４）のリピートドメインとともに、ある特定のアミノ酸がタウのＮ末端部分に存在する点または存在しない点において互いに異なる。６つのヒトアイソフォーム（２Ｎ４Ｒ、１Ｎ４Ｒ、２Ｎ３Ｒ、０Ｎ４Ｒ、１Ｎ３Ｒおよび０Ｎ３Ｒ）を示している図１もまた参照のこと。微小管重合を誘導するタウの最も強力な部分は、Ｒ１～Ｒ２と一部重複する２７４－ＫＶＱＩＩＮＫＫ－２８１領域（配列番号１１３）であることが提唱されている。同上。さらに、タウの病理学的機能および生理学的機能は、完全長タンパク質アイソフォームおよびそれらのフラグメントがとる、特定の構造的コンフォーメーションおよび天然無秩序構造に影響されるとみられる。例えば、Ｋｏｎｔｓｅｋｏｖａらは、微小管の構築においてある特定の切断型タウ分子の機能に対して重要な関係性を有するそれらの切断型タウ分子内のコンフォーメーションの領域（残基２９７－ＩＫＨＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶＤＬＳＫＶＴＳＫＣＧＳＬ－３２５（配列番号１１４）を含む）を記載した（ＷＯ２００４／００７５４７）。

【０００９】

タウリピートは、その生理学的役割に加えて、病理学的タウ凝集体および他の構造の形成に関与すると考えられている。したがって、生理学的なリピート媒介性活性と病理学的なリピート媒介性活性とを区別することができる、タウを標的にした治療および診断アプローチが必要とされている。例えば、病理学的な対らせん状細線維（ＰＨＦ）のプロナーゼ耐性コアは、３－および４－リピートタウアイソフォームの微小管結合領域からなる（Ｊａｋｅｓら、１９９１；Ｗｉｓｃｈｉｋら、１９８８ａ；Ｗｉｓｃｈｉｋら、１９８８ｂ）。さらに、Ｎｏｖａｋらは、９３～９５アミノ酸長であるＰＨＦのプロテアーゼ耐性コアが３つのタンデムリピートに限定されることを示した（Ｎｏｖａｋら、１９９３）。Ｖｏｎ　Ｂｅｒｇｅｎらは、最小のタウペプチド／相互作用モチーフ（３０６－ＶＱＩＶＹＫ－３１１；配列番号１１５）、ならびにベータシートを形成し、かつ病理学的タウ凝集体であるＰＨＦの形成の開始に潜在的に関与すると記載されている、タウ上の第２の部位（２７５－ＶＱＩＩＮＫ－２８０）（配列番号１１６）を決定した（Ｖｏｎ　Ｂｅｒｇｅｎら、２０００；ＥＰ１２１４５９８；ＷＯ２００１／１８５４６）。タウの機能マップについては図２を参照のこと。その結果として、現在のストラテジーは、微小管の安定化におけるタウの細胞内の役割を妨害しない抗凝集薬を作製することを目指している。

【００１０】

さらに、生理学的状況において、タウは、細胞内の細胞質タンパク質であると考えられているが、細胞内のタウは、細胞外の空間に放出され得、神経変性に寄与し得る（Ｇｏｍｅｚ－Ｒａｍｏｓら、２００６）。実際に、神経細胞の脱落は、ＡＤ脳において神経原線維変化（タウタンパク質で構成されている）のトポグラフィック分布に関連している（Ｗｅｓｔら、１９９４；Ｇｏｍｅｚ－Ｉｓｌａら、１９９６，１９９７）。さらに、総タウおよびリン酸化タウのレベルは、ＡＤを有する患者の脳脊髄液（ＣＳＦ）中で上昇しており（Ｈａｍｐｅｌら、２０１０）、細胞外のタウは、脳において「ゴースト濃縮体」と記載されており（Ｆｒｏｓｔ　ａｎｄ　Ｄｉａｍｏｎｄ，２００９）、それは、細胞内のタウが細胞外の空間に放出されることを示唆している。さらに、細胞外のタウ凝集体は、細胞に侵入し得、細胞内のタウの線維化を刺激し得、さらに、病理学的タウ凝集体を生成するためのタウ単量体を播種する（Ｆｒｏｓｔら、２００９）。そのような研究は、細胞外の不溶性タウが、プリオン様の様式で脳全体にタウの病理を広げる伝播性の物質として作用し得ることを強調した（Ｆｒｏｓｔら、２００９；Ｆｒｏｓｔ　ａｎｄ　Ｄｉａｍｏｎｄ，２００９）。細胞外のタウ濃縮体のクリアランスは、タウに関連した細胞外および細胞内の病理を減少させ得る。例えば、Ａｓｕｎｉら、２００７を参照のこと。ゆえに、その形成を妨害すること、そのクリアランスを促進すること、またはその両方によって細胞外のタウを減少させることができる処置、ならびに細胞内の疾患タウ（ｄｉｓｅａｓｅ　ｔａｕ）を減少させる処置が必要とされている。

【００１１】

概して言えば、タウは、ＡＤの臨床症状において病理学的な役割を果たすとみられるが、タウに対して作用する薬物の開発は、生理学的な微小管の動態におけるタウの重要性お

よびその複合体の生物学的機能に部分的に起因して、手間取っている（Ｄｉｃｋｅｙ ａｎｄ Ｐｅｔｒｕｃｅｌｌｉ，２００６）。しかしながら、タウの病理学的変換の基礎をなす分子機序の理解の高まりは、治療目的のためにタウの病理学的改変を特異的に標的化する可能性を開いた。結果として、タウカスケードを直接または間接的に標的化するいくつかの治療的アプローチ（タウ凝集を妨げるかまたは逆転させる化合物（Ｗｉｓｃｈｉｋら、１９９６；Ｎｅｃｕｌａら、２００５；Ｐｉｃｋｈａｒｄｔら、２００５；Ｔａｎｉｇｕｃｈｉら、２００５ａ；Ｌａｒｂｉｇら、２００７）、タウキナーゼを阻害するかまたはタウホスファターゼを活性化する小分子タイプの薬物（Ｉｑｂａｌ ａｎｄ Ｇｒｕｎｄｋｅ－Ｉｑｂａｌ，２００４；Ｎｏｂｌｅら、２００５；Ｉｑｂａｌ ａｎｄ Ｇｒｕｎｄｋｅ－Ｉｑｂａｌ，２００７）、微小管安定化薬（Ｚｈａｎｇら、２００５）、ミスフォールドされたタウタンパク質のタンパク分解性の分解を促す薬物（Ｄｉｃｋｅｙら、２００５，Ｄｉｃｋｅｙら、２００６；Ｄｉｃｋｅｙ ａｎｄ Ｐｅｔｒｕｃｅｌｌｉ，２００６）および免疫抑制（ｉｍｍｕｎｏｓｕｐｐｒｅｓｉｖｅ）薬（Ｚｉｌｋａら、２００８）、ならびに能動免疫および受動免疫を含む免疫療法ストラテジー（Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ ａｎｄ Ｍａｎｄｅｌｋｏｗら、２００８；Ｚｉｌｋａら、２００８：Ｔａｂｉｒａ，Ｔ．Ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ Ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ ｄｉｓｅａｓｅ：Ａ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ａｃｔｉｖｅ Ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ．Ｔｏｈｏｋｕ Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，２２０：９５－１０６（２０１０）を含む）が出現した（総論として、例えば、Ｄｉｃｋｅｙ ａｎｄ Ｐｅｔｒｕｃｅｌｌｉ，２００６；Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ ａｎｄ Ｍａｎｄｅｌｋｏｗ，２００８；Ｚｉｌｋａら、２００８を参照のこと）。

【００１２】

より一般的には、新規モノクローナル抗体（ｍＡｂ）が、２００７年以来、１年あたり４０を超える割合で臨床研究に入っている。２０１０年の終わりには、少なくとも２５個のｍＡｂおよび５つのＦｃ融合タンパク質が、米国において第２／３相または第３相臨床研究中だった（Ｒｅｉｃｈｅｒｔ，２０１１）。この傾向は、受動免疫療法が、ＡＤを含むヒト障害の処置において高まりつつあるアプローチであることを証明している。例えば、Ｃｉｔｒｏｎら、２０１０を参照のこと。実際には、ＡＤの処置は、血液脳関門（ＢＢＢ）の克服の点でハードルに直面しているが、ますます多くの前臨床および臨床研究が、抗体媒介性治療によってＡＤ凝集体が脳から取り除かれ得ることを報告しており、複数の作用機序（例えば、（ｉ）ＡＤにおける変更されたＢＢＢ透過性、またはＢＢＢ漏出による脳への抗体の取り込み；（ｉｉ）可溶性の斑形成アミロイド種に対して「末梢シンク（ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ ｓｉｎｋ）」として作用する抗体；（ｉｉｉ）末梢から脳に抗体を局所的に送達する抗体分泌細胞の進入；ならびに（ｉｖ）細胞内のおよび細胞を越えたＩｇＧの輸送）を提唱している。例えば、概説として、Ｃｉｔｒｏｎら、２０１０およびＡｓｕｎｉら、２００７を参照のこと。したがって、疾患形態のタウを標的化する治療用抗体は、ＡＤおよび他のタウオパチーの処置および／または診断に対して見込みのあるアプローチである（ＷＯ２００４／００７５４７、ＵＳ２００８／００５０３８３）。

【００１３】

タウの病理を標的化する免疫療法アプローチのうちの１つは、抗タウ抗体が、タウ凝集を妨げ得ること、タウ凝集体を取り除き得ること、またはその両方の概念に基づく。研究によって、タウ配列に結合する抗体が報告されており、それらの抗体のいくつかが、タウの凝集およびクリアランスを干渉すると報告されているが（Ａｓｕｎｉら、２００７）、未だに、ＡＤにおけるインビボの前臨床または臨床試験を行っているモノクローナル抗タウ抗体は、報告されていない。実際は、１つのｍＡｂが、マウスのタウの微小管結合ドメインに（すなわち、Ｒ３、Ｒ４およびおそらくＲ１に）３つの結合部位を有すると予想されたが、それは、微小管結合を阻止しなかった（Ｄｉｎｇｕｓら、１９９１）。Ｄｉｎｇｕｓは、タウ凝集におけるこの抗体が果たす役割を記載しなかったので、そのＤｉｎｇｕｓの抗体がタウ凝集を阻止すると考える理由はない。他の報告では、タウアイソフォームを区別するｍＡｂが作製されたが、再度、これらは、タウ凝集に対していかなる影響も有

しないと示唆されている（ＤｅＳｉｌｖａら、２００３；Ｕｅｎｏら、２００７）。Ｔａｎｉｇｕｃｈｉらは、Ｒ１またはＲ２に対するある特定の抗タウｍＡｂが、タウによって誘導されるチューブリンの集合を促進しつつ、インビトロにおいてＰＨＦへのタウ凝集を阻害することを証明した（Ｔａｎｉｇｕｃｈｉら、２００５ｂ）。ＴａｎｉｇｕｃｈｉのＲＴＡ－１およびＲＴＡ－２抗体は、それぞれＲ１およびＲ２に特異的に結合した。どちらの抗体も２つもしくはそれより多くのタウリピートには結合せず、タウの凝集またはクリアランスに対するインビボにおける効果が試験されたとは報告されなかった。ＡＤの受動免疫ベースの治療（すなわち、患者に抗体を投与する治療）のための臨床試験において少なくとも３つの抗アミロイド抗体が存在したにもかかわらず、ＡＤに対するタウベースの受動免疫療法に関する臨床試験の報告は未だ入手可能でない。

【００１４】

能動免疫アプローチ（すなわち、患者の身体自体が、標的に対する免疫を起こすアプローチ）が、ＡＤのいくつかのＡＰＰトランスジェニックマウス研究においてＡβ沈着物を取り除く際および神経病理学的病変を逆転させる際に有効であると見出された（例えば、Ｓｃｈｅｎｋら、１９９９；Ｊａｎｕｓら、２０００；Ｍｏｒｇａｎら、２０００；Ｓｉｇｕｒｄｓｓｏｎら、２００１を参照のこと）。最近、リン酸化タウエピトープ（Ｔａｕ３７９－４０８［Ｐ－Ｓｅｒ３９６、４０４］）を用いた能動免疫療法は、脳における凝集されるタウの程度を低下させ、タウ濃縮体病理のマウスモデルにおいて行動上の表現型の進行を遅らせた（Ａｓｕｎｉら、２００７；Ｂｏｕｔａｊａｎｇｏｕｔら、２０１０；ＵＳ２００８／００５０３８３；ＵＳ／２０１０／００３１６５６４）。処置された動物は、抗タウ抗体を産生し、その抗体は、脳において検出され、病理学的タウを認識する抗体と共局在した（Ａｓｕｎｉら、２００７）。この免疫療法アプローチは、その動物において後期（８ヶ月）よりも初期（５ヶ月）の機能障害において実質的に有効だったことから、初期の病理学的タウのクリアランスが治療的に有益であり得ることが示唆される（Ａｓｕｎｉら、２００７；Ｚｉｌｋａら、２００８）。実際に、すべてのタウが、破壊およびクリアランスに感受性であるわけではないか、またはおそらくそれらに適してさえいないという認識が存在する。一部では、タウ凝集体の破壊によって、毒性の中間体種の存在量が増加し得ると示唆されているが、他では、検出可能なタウ凝集体が、必ずしも毒性でなく、保護的な役割をも果たし得ることが示唆されている（Ｌｅｅら、２００５）。したがって、タウを標的化する免疫療法アプローチが、前臨床の裏付けを示したが、なおも、初期の異常型のタウ（その消失は、永続する改善される利点をもたらす）を特異的に標的化する治療法が必要とされている。それでもなお、免疫療法のための好適な標的であるタウ種を同定することもまた必要とされている。

【００１５】

この目的を達成するために、タウに対するｍＡｂを開発するために考慮すべき別の点は、標的化される、様々な構造形態のタウ（生理学的、初期疾患、後期疾患）およびタウの病理のステージの同定および特徴付けである。Ｏｄｄｏらは、Ａβ免疫療法が、ＡＤのトランスジェニックマウスモデルにおけるアミロイド斑および初期タウ病理を取り除くが、成熟タウ凝集体はインタクトなままであることを観察した（Ｏｄｄｏら、２００４）。同様に、神経原線維変化が蓄積し続けていたとしても、タウオパチーのＰ３０１Ｌタウモデルにおけるタウ発現の遺伝的な（免疫療法によるものではない）減少が記憶を改善した（Ｓａｎｔａｃｒｕｚら、２００５）。

その有病率にもかかわらず、ＡＤには、神経学の最も大きい満たされていない医学的ニーズが残っている（Ｃｉｔｒｏｎ，２０１０；非特許文献１）。最も広く行われている医学的アプローチは、処置の数年後には効果的でなくなる対症療法を提供することである。ＡＤに対する新しい治療的アプローチおよびストラテジーは、認知低下を防ぎ、かつその疾患の基本的な病理学的プロセスを抑制するために、症状の処置を上回る必要がある。特に、単独でまたはＡＤを標的とする他の薬物と併用して、その疾患の最も早いステージの少なくともいくつかを干渉する分子を開発する必要がある。そのような分子は、ＡＤの早期診断（それ自体が処置の成果を改善し得る）、予防および処置において新しい有利な選

択肢を提供するだろう。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【００１６】
【非特許文献１】Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. Nature Rev Drug Discovery 9, 387-398.
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１７】
発明の要旨
１つの実施形態において、本発明は、単離された抗体を提供し、ここで、その抗体は、１つもしくは複数のタウエピトープに結合し、以下：
ａ）生理学的タウよりも病理学的タウに対してより高い親和性を示すこと；
ｂ）タウ－タウ凝集を阻害すること；ならびに
ｃ）ミクログリアによる病理学的タウタンパク質の取り込みおよび分解を媒介すること
のうちの２つもしくはそれより多くが可能であり；
各タウエピトープは、タウの凝集促進領域を含む。
【００１８】
ある実施形態において、この単離された抗体は、１つもしくは複数のエピトープの各々が、独立して、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６７～２７３位または残基ＫＨＱＰＧＧＧ（配列番号９８）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９８～３０４位または残基ＫＨＶＰＧＧＧ（配列番号９９）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３２９～３３５位または残基ＨＨＫＰＧＧＧ（配列番号１００）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６１～３６７位または残基ＴＨＶＰＧＧＧ（配列番号１０１）
内のエピトープから選択されるような抗体である。
【００１９】
ある特定の実施形態において、先のパラグラフの実施形態に記載された特性を有する単離された抗体は、ヒトアルツハイマー病患者の脳生検材料、アルツハイマー病の動物モデル由来の脳サンプル、またはその両方における、誤秩序（ｍｉｓｏｒｄｅｒｅｄ）タウ、誤無秩序タウ、サルコシル不溶性タウ、神経原線維変化、糸屑状構造物（ｎｅｕｒｏｐｉｌ　ｔｈｒｅａｄｓ）および老人斑から選択される病理学的タウの１つもしくは複数の形態に結合することができる。ある特定の実施形態において、単離された抗体は、それが認識するエピトープの少なくとも１つがコンフォーメーションエピトープであるような抗体である。
【００２０】
１つの実施形態において、本発明は、単離された抗体を提供し、ここで、その抗体は、１つもしくは複数のタウエピトープに結合し、以下：
ａ）生理学的タウよりも病理学的タウに対してより高い親和性を示すこと；
ｂ）タウ－タウ凝集を阻害すること；ならびに
ｃ）ミクログリアによる病理学的タウタンパク質の取り込みおよび分解を媒介すること
のうちの２つもしくはそれより多くが可能であり；
各タウエピトープは、タウの凝集促進領域を含む。
【００２１】
ある実施形態において、この単離された抗体は、１つもしくは複数のエピトープの各々が、独立して、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）

；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
内のエピトープから選択されるような抗体である。
【００２２】
ある実施形態において、この単離された抗体は、それが結合する１つもしくは複数のエピトープの各々が、独立して、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
内のエピトープから選択されるような抗体であり；その抗体は：
ａ）
ｉ．ＣＤＲ１に対してＱＳＬＬＮＳＲＴＲＫＮＹ（配列番号１１７）または配列番号２４７；
ｉｉ．ＣＤＲ２に対してＷＡＳ（配列番号１１８）または配列番号２５３；および
ｉｉｉ．ＣＤＲ３に対してＫＱＳＦＹＬＲＴ（配列番号１１９）または配列番号２５５、２５７、２５８、２５９および２６０のうちのいずれか１つ
を含む抗体軽鎖可変領域；ならびに
ｂ）
ｉｖ．ＣＤＲ１に対してＧＹＩＦＴＤＹＶＩＳ（配列番号１２０）、配列番号２６１または配列番号２６２；
ｖ．ＣＤＲ２に対してＩＦＰＲＳＧＳＴ（配列番号１２１）、配列番号２６４または配列番号２６５；および
ｖｉ．ＣＤＲ３に対してＡＲＤＹＹＧＴＳＦＡＭＤＹ（配列番号１２２）、配列番号２６６、配列番号２６７または配列番号２６９
を含む抗体重鎖可変領域
を含む。
【００２３】
本発明は、コンフォーメーションに特異的な様式でタウ上の１つもしくは複数のエピトープに結合する単離された抗体も提供し、ここで：
ａ）その１つもしくは複数のエピトープの各々は、独立して、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６７～２７３位または残基ＫＨＱＰＧＧＧ（配列番号９８）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９８～３０４位または残基ＫＨＶＰＧＧＧ（配列番号９９）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３２９～３３５位または残基ＨＨＫＰＧＧＧ（配列番号１００）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６１～３６７位または残基ＴＨＶＰＧＧＧ（配列番号１０１）
内のエピトープから選択され；
ｂ）それらのエピトープの０、１、２または３個は、線状エピトープであり；

ｃ）それらのエピトープの１、２、３または４個は、コンフォーメーションエピトープである。
【００２４】
本発明は、コンフォーメーションに特異的な様式でタウ上の１つもしくは複数のエピトープに結合する単離された抗体も提供し、ここで：
ａ）その１つもしくは複数のエピトープの各々は、独立して、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
内のエピトープから選択され、
ｂ）それらのエピトープの０、１、２または３個は、線状エピトープであり；
ｃ）それらのエピトープの１、２、３または４個は、コンフォーメーションエピトープである。
【００２５】
１つの実施形態において、この抗体は、ＤＣ８Ｅ８であり、ここで、ＤＣ８Ｅ８は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ Ｐａｔｅｎｔ Ｄｅｐｏｓｉｔ ｎｏ．ＰＴＡ－１１９９４として寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体である。
【００２６】
ある特定の実施形態において、単離された抗体は、ＤＣ８Ｅ８によって結合されるエピトープと同じタウ上のエピトープの１つもしくは複数に結合する。ある実施形態において、単離された抗体は、タウへの結合についてモノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８と競合する。
【００２７】
本発明は、単離された抗体であって、
ｉ．ＱＳＬＬＮＳＲＴＲＫＮＹ（配列番号１１７）
ｉｉ．ＷＡＳ（配列番号１１８）
ｉｉｉ．ＫＱＳＦＹＬＲＴ（配列番号１１９）
ｉｖ．ＧＹＩＦＴＤＹＶＩＳ（配列番号１２０）
ｖ．ＩＦＰＲＳＧＳＴ（配列番号１２１）；および
ｖｉ．ＡＲＤＹＹＧＴＳＦＡＭＤＹ（配列番号１２２）
から選択される１つもしくは複数の相補性決定領域（ＣＤＲ）配列を該抗体のエピトープ結合ドメインに含む単離された抗体も提供する。
【００２８】
本発明は、前述のパラグラフに記載されたいずれかの実施形態に記載されたいずれの抗体も、単離された抗体が、
ａ）
ｉ．ＣＤＲ１に対してＱＳＬＬＮＳＲＴＲＫＮＹ（配列番号１１７）；
ｉｉ．ＣＤＲ２に対してＷＡＳ（配列番号１１８）；および
ｉｉｉ．ＣＤＲ３に対してＫＱＳＦＹＬＲＴ（配列番号１１９）
を含む抗体軽鎖可変領域；ならびに
ｂ）
ｉｖ．ＣＤＲ１に対してＧＹＩＦＴＤＹＶＩＳ（配列番号１２０）
ｖ．ＣＤＲ２に対してＩＦＰＲＳＧＳＴ（配列番号１２１）；および
ｖｉ．ＣＤＲ３に対してＡＲＤＹＹＧＴＳＦＡＭＤＹ（配列番号１２２）
を含む抗体重鎖可変領域

を含むような抗体であり得ることも提供する。
【００２９】
本発明は、先の実施形態に記載されたいずれの抗体も、単離された抗体が
ａ）モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８由来の軽鎖ＣＤＲの１つもしくは複数の配列、またはこれらの軽鎖ＣＤＲのうちの１つとの最適なアラインメントの後に少なくとも８０％、９０％または９５％の同一性を有する１つもしくは複数の配列；および
ｂ）モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８由来の重鎖ＣＤＲの１つもしくは複数の配列、またはこれらの重鎖ＣＤＲのうちの１つとの最適なアラインメントの後に少なくとも８０％、９０％または９５％の同一性を有する１つもしくは複数の配列
を含み；
ｉ．その軽鎖ＣＤＲは、ＱＳＬＬＮＳＲＴＲＫＮＹ（配列番号１１７）、ＷＡＳ（配列番号１１８）およびＫＱＳＦＹＬＲＴ（配列番号１１９）から選択される配列を含み；
ｉｉ．その重鎖ＣＤＲは、ＧＹＩＦＴＤＹＶＩＳ（配列番号１２０）、ＩＦＰＲＳＧＳＴ（配列番号１２１）およびＡＲＤＹＹＧＴＳＦＡＭＤＹ（配列番号１２２）から選択される配列を含む
ような抗体であり得ることも提供する。
【００３０】
本発明は、先の実施形態に記載されたいずれの抗体も、以下の免疫学的結合特性：
１．その抗体は、コンフォーメーションに特異的な様式で１つもしくは複数のタウエピトープに結合する（ここで：
ａ）その１つもしくは複数のタウエピトープの各々は、独立して、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６７～２７３位または残基ＫＨＱＰＧＧＧ（配列番号９８）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９８～３０４位または残基ＫＨＶＰＧＧＧ（配列番号９９）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３２９～３３５位または残基ＨＨＫＰＧＧＧ（配列番号１００）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６１～３６７位または残基ＴＨＶＰＧＧＧ（配列番号１０１）
内のエピトープから選択され；
ｂ）それらのエピトープの０、１、２または３個は、線状エピトープであり；
ｃ）それらのエピトープの１、２、３または４個は、コンフォーメーションエピトープである）；
２．その抗体は、２つもしくはそれより多くのタウエピトープに結合し、生理学的タウよりも病理学的タウに対してより高い親和性を示すことができる（ここで、その２つのタウエピトープは、
ｖ．ｔａｕ４４１に対して２６７～２７３位または残基ＫＨＱＰＧＧＧ（配列番号９８）；
ｖｉ．ｔａｕ４４１に対して２９８～３０４位または残基ＫＨＶＰＧＧＧ（配列番号９９）
ｖｉｉ．ｔａｕ４４１に対して３２９～３３５位または残基ＨＨＫＰＧＧＧ（配列番号１００）；および
ｖｉｉｉ．ｔａｕ４４１に対して３６１～３６７位または残基ＴＨＶＰＧＧＧ（配列番号１０１）
内のエピトープから選択される）
のうちの１つもしくは複数を有する、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂｃ、Ｆｖフラグメント、他の任意の抗原結合フラグメント；またはその抗原結合抗体部分からなり得るかまたはそれらを含み得ることも提供する。
【００３１】
本発明は、先の実施形態に記載されたいずれの抗体も、以下の免疫学的結合特性：

１．その抗体は、コンフォーメーションに特異的な様式で１つもしくは複数のタウエピトープに結合する（ここで：
ａ）その１つもしくは複数のタウエピトープの各々は、独立して、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
内のエピトープから選択され、
ｂ）それらのエピトープの０、１、２または３個は、線状エピトープであり；
ｃ）それらのエピトープの１、２、３または４個は、コンフォーメーションエピトープである）；
２．その抗体は、２つもしくはそれより多くのタウエピトープに結合し、生理学的タウよりも病理学的タウに対してより高い親和性を示すことができる（ここで、その２つのタウエピトープは、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
内のエピトープから選択される）
のうちの１つもしくは複数を有する、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂｃ、Ｆｖフラグメント、他の任意の抗原結合フラグメント；またはその抗原結合抗体部分からなり得るかまたはそれらを含み得ることも提供する。

【００３２】
本発明は、先の実施形態に記載された任意の単離された抗体に対して競合してタウに結合する任意の単離された抗体にも関する。１つの実施形態において、その単離された抗体は、タウへの結合について単離されたＤＣ８Ｅ８に対して試験されたとき、競合してタウに結合する。

【００３３】
いくつかの実施形態において、上記抗体は、配列番号１４１を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、上記抗体は、配列番号１３８を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、上記抗体は、配列番号１４１を含む軽鎖および配列番号１３８を含む軽鎖を含む。

【００３４】
本発明は、本発明によって提供される抗体が、
ａ）モノクローナル抗体；
ｂ）ポリクローナル抗体；
ｃ）組換え抗体；
ｄ）キメラ抗体；
ｅ）ヒト化抗体；
ｆ）ヒト抗体；および
ｇ）（ａ）から（ｆ）のいずれか１つの抗原結合フラグメントまたは抗原結合部分
から選択され得ることを提供する。

【００３５】
本発明によって提供される任意の単離された抗体は、哺乳動物において産生され得る。ある特定の実施形態において、単離された抗体は、組換え動物または組換え宿主細胞によって産生される。
【００３６】
本発明は、本明細書中に提供される任意の単離された抗タウ抗体が、それらが１つもしくは複数の標識剤で検出可能に標識されるような抗体であり得ることを提供する。ある特定の実施形態において、少なくとも１つの標識剤は、酵素、放射性同位体、フルオロフォア、核磁気共鳴マーカーおよび重金属から選択される。
【００３７】
いくつかの実施形態において、上記抗体は、その抗体分子に結合された少なくとも１つの薬物（併用剤（ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ　ａｇｅｎｔ））を含む。
【００３８】
本発明は、少なくとも１つのＣＤＲ、または少なくとも、先の実施形態に記載された任意の抗タウ抗体の免疫グロブリン鎖の結合ドメインもしくは可変領域をコードする単離された核酸も提供する。それらの任意の核酸を含む単離されたベクターも提供される。いくつかの実施形態において、本発明は、これらの単離された核酸およびベクターの１つもしくは複数を含む単離された宿主細胞を提供する。
【００３９】
ある特定の実施形態において、本発明は、先の実施形態に記載された任意の抗タウ抗体を発現する単離された細胞系を提供する。１つの実施形態において、単離された細胞系は、ハイブリドーマである。１つの実施形態において、単離された細胞系は、モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８を産生するハイブリドーマであり、その細胞系は、２０１１年７月１３日にＡＴＣＣ　Ｐａｔｅｎｔ　Ｄｅｐｏｓｉｔ　Ｄｅｓｉｇｎａｔｉｏｎ　ＰＴＡ－１１９９４としてＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ，ＵＳＡに寄託されている。
【００４０】
本発明は、薬物としての、またはアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの診断、予防もしくは処置のための医薬の製造における、本明細書中に提供される任意の抗タウ抗体、核酸および細胞の使用を提供する。
【００４１】
いくつかの実施形態において、上記抗体は、薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤をさらに含む薬学的組成物中に含められる。１つの実施形態において、その薬学的組成物は、抗体の組み合わせ、ならびに薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤を含み、ここで、その組み合わせは、少なくとも２つの異なる抗体を含み、それらの抗体の各々は、独立して、先の実施形態に記載された抗体から選択される。１つの実施形態において、上記抗体の少なくとも１つは、ＤＣ８Ｅ８またはＤＣ８Ｅ８のヒトバージョンまたはＤＣ８Ｅ８のヒト化バージョンである。
【００４２】
いくつかの実施形態において、上記抗体は、希釈剤および／またはキャリアをさらに含む組成物中に含められる。その組成物は、薬学的組成物、診断用組成物または他の任意の組成物であり得る。いくつかの実施形態において、その組成物は、検出可能な標識、キーホールリンペットヘモシアニン、破傷風トキソイドまたは他の病原菌に由来するトキソイド、血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、免疫グロブリン分子またはそのフラグメント、チログロブリン、オボグロブリン、ユニバーサルＴ細胞エピトープ、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン１－アルファ（ＩＬ－１α）、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－１０、インターフェロン－ガンマ（ＩＦＮ－γ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、マクロファージ炎症性タンパク質１アルファ（ＭＩＰ１α）、ＭＩＰ１βおよびＲＡＮＴＥＳ（ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ｕｐｏｎ　ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ，ｎｏｒｍａｌ　Ｔ－ｃｅｌｌ　ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ　ａｎｄ　ｓｅｃｒｅｔｅｄ）から選

択される少なくとも１つの化合物または剤（ａｇｅｎｔ）をさらに含み得る。
【００４３】
本発明は、包装材料、および凍結乾燥された形態の本明細書中に提供される抗タウ抗体のいずれか１つもしくは複数の溶液を含む容器を備える、薬学的にまたは診断に使用するための製造品（例えば、キット）も提供する。ある特定の実施形態において、その容器は、被験体にその抗体を送達するためのデバイスまたはシステムの構成要素である。
【００４４】
いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書中に提供されるような抗タウ抗体（上記を参照のこと）を備える医療用デバイスを提供し、ここで、そのデバイスは、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内（ｉｎｔｒａｒｔｉｃｕｌａｒ）、気管支内、腹腔内（ｉｎｔｒａａｂｄｏｍｉｎａｌ）、嚢内、軟骨内、腔内（ｉｎｔｒａｃａｖｉｔａｒｙ）、体腔内（ｉｎｔｒａｃｅｌｉａｌ）、小脳内、脳室内、髄腔内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内（ｉｎｔｒａｐｅｒｉｔｏｎｅａｌ）、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、病巣内、ボーラス、膣、直腸、頬側、舌下、鼻腔内および経皮から選択される少なくとも１つの様式によるその抗体の接触または投与に適している。
【００４５】
１つの実施形態において、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーの進行を処置するまたは予防する方法に関し、その方法は、有効量の本明細書中に提供される抗タウ抗体の少なくとも１つを前記被験体に投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、その方法は、運動障害（ｍｏｔｏｒ　ｉｍｐａｉｒｍｅｎｔ）を減少させることができる、運動機能を改善することができる、認知障害を減少させることができる、認知機能を改善することができる、またはそれらの組み合わせが可能である。
【００４６】
ある特定の実施形態において、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを回復させる方法に関し、その方法は、有効量の本明細書中に提供される抗タウ抗体の少なくとも１つを前記被験体に投与する工程を包含する。
【００４７】
なおも別の実施形態において、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの存在について被験体を診断するもしくはスクリーニングする方法、またはアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの発症についての被験体のリスクを測定するための方法を提供し、その方法は：
ａ）その被験体、またはその被験体の細胞、組織、器官、体液もしくは他の任意のサンプルを、有効量の本明細書中に提供されるような少なくとも１つの抗タウ抗体と接触させる工程；および
ｂ）病理学的タウおよびその抗体を含む複合体の存在を判定する工程（ここで、その複合体の存在は、病理学的タウの存在に関連するアルツハイマー病または関連タウオパチーの診断となる）
を包含する。
【００４８】
関連する実施形態において、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの存在、進行、後退もしくは安定化について被験体をモニターする方法、または被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーのステージを判定するための方法を提供し、その方法は：
ａ）その被験体、またはその被験体の細胞、組織、器官、体液もしくは他の任意のサンプルを、有効量の本明細書中に提供される抗タウ抗体の少なくとも１つと接触させる工程；および
ｂ）病理学的タウおよびその抗体を含む複合体の存在および／または特徴を判定する工程

（ここで、その複合体の存在は、病理学的タウの存在に関連するアルツハイマー病または関連タウオパチーの診断となる）
を包含する。
【００４９】
いくつかの実施形態において、上記抗体は、静脈内に、筋肉内に、皮下に、腹腔内に、鼻腔内に、脳室内に、髄腔内に、またはエアロゾルとして、投与される。
【００５０】
被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーの進行を処置するまたは予防する方法、および被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを回復させる方法のいくつかの実施形態において、各抗体の有効量は、１投薬あたり被験体の体重１ｋｇあたり少なくとも１ｍｇである。いくつかの実施形態において、各抗体の有効量は、１投薬あたり被験体の体重１ｋｇあたり少なくとも１０ｍｇである。いくつかの実施形態において、上記抗体の少なくとも１つは、少なくとも６ヶ月間にわたって複数の投薬量（ｍｕｌｔｉｐｌｅ　ｄｏｓａｇｅｓ）で投与される。いくつかの実施形態において、上記抗体は、その有益な効果を発揮するためにヒト被験体の末梢に投与される。いくつかの実施形態において、上記抗体は、ヒト被験体の末梢に投与されたとき、可溶性タウ、サルコシル不溶性タウまたはその両方に結合する。いくつかの実施形態において、上記抗体は、ヒト被験体の末梢に投与されたとき、タウに結合し、ここで、タウは、ヒトアルツハイマー病患者の脳生検材料おける、アルツハイマー病の動物モデル由来の脳サンプルおける、誤秩序タウ、誤無秩序タウ、サルコシル不溶性タウ、神経原線維変化、糸屑状構造物および老人斑から選択される１つもしくは複数の病理学的形態である。いくつかの実施形態において、上記抗体は、ヒト被験体の末梢に投与されたとき、その被験体に対して１つもしくは複数の、エフェクター機能によって媒介される有益な効果を発揮する。いくつかの実施形態において、上記抗体は、被験体の脳への抗体発現細胞の注射／埋め込みによって末梢に送達される。いくつかの実施形態において、その抗体発現細胞は、ハイブリドーマ細胞である。いくつかの実施形態において、そのハイブリドーマ細胞は、ＤＣ８Ｅ８を発現するハイブリドーマである。
【００５１】
ある特定の関連する実施形態において、本発明は、単離されたペプチドを提供し、ここで：
ａ）その単離されたペプチドは、少なくとも６アミノ酸残基長、少なくとも７アミノ酸残基長、少なくとも９アミノ酸残基長、少なくとも１０アミノ酸残基長、少なくとも１２アミノ酸残基長または３０アミノ酸残基長であるタウのフラグメントであり；
ｂ）その単離されたペプチドは、タウ治療用エピトープを含む。
【００５２】
いくつかの関連する実施形態において、上記治療用エピトープは、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６７～２７３位または残基ＫＨＱＰＧＧＧ（配列番号９８）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９８～３０４位または残基ＫＨＶＰＧＧＧ（配列番号９９）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３２９～３３５位または残基ＨＨＫＰＧＧＧ（配列番号１００）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６１～３６７位または残基ＴＨＶＰＧＧＧ（配列番号１０１）
内のエピトープから選択される治療用エピトープを含む。
【００５３】
ある特定の関連する実施形態において、本発明は、単離されたペプチドを提供し、ここで：
ａ）その単離されたペプチドは、少なくとも６アミノ酸残基長、少なくとも７アミノ酸残基長、少なくとも９アミノ酸残基長、少なくとも１０アミノ酸残基長、少なくとも１２ア

ミノ酸残基長または３０アミノ酸残基長であるタウのフラグメントであり；
ｂ）その単離されたペプチドは、タウ治療用エピトープを含む。
【００５４】
いくつかの関連する実施形態において、上記治療用エピトープは、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
内のエピトープから選択される治療用エピトープを含む。
【００５５】
いくつかの関連する実施形態において、上記治療用エピトープは、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
から選択される。
【００５６】
他の実施形態において、単離されたペプチドは、配列番号１～４、配列番号９～１０１および配列番号１０８～１１２、ＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ（配列番号２００）、ＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０１）、ＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０２）、ＫＨＶＰＧＧＧＳＶ（配列番号２０３）、ＨＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０４）、ＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０５）、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）、ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＳＣ（配列番号２５１）、ＡＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４４）、ＤＡＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４６）、ＤＮＡＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４９）、ＤＮＩＡＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５１）、ＤＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５９）、ＤＮＩＫＨＡＰＧＧＧＳ（配列番号１６１）およびＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１７１）から選択される配列である。
【００５７】
他の実施形態において、単離されたペプチドは、配列番号２７０（ＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫ）；配列番号２７１（ＫＨＱＰＧＧＧ）、配列番号２７２（ＨＱＰＧＧＧ）；配列番号２７５（ＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ）、配列番号２７６（ＫＨＶＰＧＧＧ）、配列番号２７７（ＨＶＰＧＧＧ）、配列番号２８０（ＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶ）、配列番号２８１（ＨＨＫＰＧＧＧ）、配列番号２８２（ＨＫＰＧＧＧ）および配列番号２８３（ＴＨＶＰＧＧＧ）から選択される配列である。
【００５８】
他の実施形態において、単離されたペプチドは、配列番号２７０（ＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫ）；配列番号２７１（ＫＨＱＰＧＧＧ）、配列番号２７２（ＨＱＰＧＧＧ）；配列番号２７５（ＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ）、配列番号２７６（ＫＨＶＰＧＧＧ）、配列番号２７７（ＨＶＰＧＧＧ）、配列番号２８０（ＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶ）、配列番号２８１（ＨＨＫＰＧＧＧ）、配列番号２８２（ＨＫＰＧＧＧ）および配列番号２８３（ＴＨＶＰＧ

ＧＧ）から選択される配列であり；上記治療用エピトープは、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
から選択される。

【００５９】
他の実施形態において、単離されたペプチドは、配列番号２７２（ＨＱＰＧＧＧ）および配列番号２７７（ＨＶＰＧＧＧ）から選択される配列である。

【００６０】
ある特定の実施形態において、単離されたペプチドは、そのペプチドの：
ａ）モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウと競合する能力；
ｂ）インビボにおいてサルコシル不溶性タウのレベルを減少させる能力；
ｃ）インビボにおいて脳からのタウのクリアランスを促進する能力；
ｄ）インビボにおいてＡＤの少なくとも１つの生化学的マーカーのレベルを減少させる能力；
ｅ）インビボにおいて神経原線維変化（ＮＦＴ）の量（ｌｏａｄ）を減少させる能力；
ｆ）インビボにおいて少なくとも１つの神経行動学的パラメータを改善する能力；
ｇ）被験体におけるＡＤの経過を有利に改変する能力；
ｈ）脳、脳脊髄液もしくはその両方におけるタウのレベルを減少させる能力；および／または
ｉ）タウへの結合についてモノクローナルＤＣ８Ｅ８と競合することができる抗体の作製において免疫原として働く能力
を測定するアッセイから選択される少なくとも１つのアッセイにおいて活性である。

【００６１】
本発明は、本明細書中に提供される任意の単離されたペプチドおよびある部分を含む化合物にも関する。ある特定の実施形態において、その部分は、上記ペプチドのＮ末端であるか、Ｃ末端であるか、または該ペプチドの内部のアミノ酸に連結されており、その部分は、システイン残基、ホスホ基、キーホールリンペットヘモシアニン、破傷風トキソイドまたは他の病原菌に由来するトキソイド、血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、免疫グロブリン分子またはそのフラグメント、チログロブリン、オボグロブリン、ユニバーサルＴ細胞エピトープ、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン１－アルファ（ＩＬ－１α）、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－１０、インターフェロン－ガンマ（ＩＦＮ－γ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、マクロファージ炎症性タンパク質１アルファ（ＭＩＰ１α）、ＭＩＰ１βおよびＲＡＮＴＥＳ（ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｕｐｏｎ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ，ｎｏｒｍａｌ Ｔ－ｃｅｌｌ ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ ａｎｄ ｓｅｃｒｅｔｅｄ）のうちの１つもしくは複数から選択される。

【００６２】
本発明によって提供される単離されたペプチドおよび／または化合物の１つもしくは複数、ならびに薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤および／またはアジュバントを含む薬学的組成物も提供される。いくつかの実施形態において、その薬学的組成物は、１ｎｇ～１０ｍｇの投与量のペプチドまたは化合物を提供するように適合されている。ある特定の実施形態において、その薬学的組成物は、１０マイクログラムより多い投与量のペプチドまたは化合物を提供するように適合されている。

【００６３】
本発明は、包装材料、ならびに凍結乾燥された形態の本発明によって提供されるペプチ

ドおよび／または化合物の溶液を含む容器を備える、薬学的にまたは診断に使用するための製造品（例えば、キット）にも関する。いくつかの実施形態において、その容器は、被験体にそのペプチドまたは化合物を送達するためのデバイスまたはシステムの構成要素である。

【００６４】

本発明によって提供されるようなペプチド、化合物および／またはペプチド／化合物組成物を備える医療用デバイスも提供され、ここで、そのデバイスは、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内、体腔内、小脳内、脳室内、髄腔内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、病巣内、ボーラス、膣、直腸、頬側、舌下、鼻腔内および経皮から選択される少なくとも１つの様式によるその抗体の接触または投与に適している。

【００６５】

関連する実施形態において、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーの進行を処置するまたは予防する方法を提供し、その方法は、有効量の本発明によって提供されるような少なくとも１つのペプチドおよび／または少なくとも１つの化合物を前記被験体に投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、その方法は、運動障害を減少させることができる、運動機能を改善することができる、認知障害を減少させることができる、認知機能を改善することができる、またはそれらの組み合わせが可能である。

【００６６】

関連する実施形態において、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを回復させる方法を提供し、その方法は、有効量の本発明によって提供されるような少なくとも１つのペプチドおよび／または少なくとも１つの化合物を前記被験体に投与する工程を包含する。

【００６７】

被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを回復させる方法に関連する症状の少なくとも１つの処置、予防または回復のこれらの方法のいくつかにおいて、その方法は、本発明によって提供されるようなペプチドおよび／または化合物、および／または免疫応答を増強するアジュバントをヒト患者に投与する工程を包含し、その方法は、病理学的タウに対する抗体を含む免疫応答をもたらし、それにより、そのヒト患者におけるＡＤに関連する症状の少なくとも１つを処置するか、その進行を予防するか、または回復させる。

【００６８】

本発明は、タウへの結合についてＤＣ８Ｅ８と競合することができる抗体を作製する方法も提供し、その方法は、本発明によって提供されるような少なくとも１つのペプチドおよび／または少なくとも１つの化合物で被験体を免疫する工程を包含する。いくつかの実施形態において、少なくとも１つのペプチドは、配列番号１～４、配列番号９～１０１および配列番号１０８～１１２、ＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０１）、ＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０２）、ＫＨＶＰＧＧＧＳＶ（配列番号２０３）、ＨＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０４）、ＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０５）、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）、ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）、ＡＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４４）、ＤＡＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４６）、ＤＮＡＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４９）、ＤＮＩＡＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５１）、ＤＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５９）、ＤＮＩＫＨＡＰＧＧＧＳ（配列番号１６１）およびＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１７１）のうちのいずれか１つから選択されるペプチドである。１つの実施形態において、そのペプチドは、配列番号１～４から選択される。別の実施形態において、そのペプチドは、配列番号１０８である。１つの実施形態において、そのペプチドは、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）である。ある特定の実施形態において、そのペプチドは、ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）で

ある。ある特定の実施形態において、そのペプチドは、配列番号２７０（ＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫ）；配列番号２７１（ＫＨＱＰＧＧＧ）、配列番号２７２（ＨＱＰＧＧＧ）；配列番号２７５（ＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ）、配列番号２７６（ＫＨＶＰＧＧＧ）、配列番号２７７（ＨＶＰＧＧＧ）、配列番号２８０（ＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶ）、配列番号２８１（ＨＨＫＰＧＧＧ）、配列番号２８２（ＨＫＰＧＧＧ）および配列番号２８３（ＴＨＶＰＧＧＧ）から選択される。他の実施形態において、そのペプチドは、配列番号２７２（ＨＱＰＧＧＧ）および配列番号２７７（ＨＶＰＧＧＧ）から選択される。

【００６９】

ＤＣ８Ｅ８を単離する方法またはタウへの結合についてＤＣ８Ｅ８と競合することができる抗体を単離する方法も提供され、その方法は、ＤＣ８Ｅ８またはその抗体を本発明によって提供されるようなペプチドおよび／または化合物と接触させる工程を包含する。

【００７０】

関連する実施形態において、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの存在について被験体を診断するもしくはスクリーニングする方法、またはアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの発症についての被験体のリスクを測定するための方法を提供し、その方法は、

ａ）その被験体、またはその被験体の細胞、組織、器官、体液もしくは他の任意のサンプルを、有効量の本発明によって提供されるような少なくとも１つの抗体と接触させる工程；および

ｂ）病理学的タウおよびその抗体を含む複合体の存在を判定する工程（ここで、その複合体の存在は、病理学的タウの存在に関連するアルツハイマー病または関連タウオパチーの診断となる）

を包含する。

【００７１】

ある特定の実施形態において、本発明は、アルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの存在、進行、後退もしくは安定化について被験体をモニターする方法、または被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーのステージを判定するための方法を提供し、その方法は、

ａ）その被験体、またはその被験体の細胞、組織、器官、体液もしくは他の任意のサンプルを、有効量の本発明の少なくとも１つの実施形態によって提供されるような少なくとも１つの抗体と接触させる（例えば、投与する）工程；および

ｂ）病理学的タウおよびその抗体を含む複合体の存在および／または特徴を判定する工程（ここで、その複合体の存在は、病理学的タウの存在に関連するアルツハイマー病または関連タウオパチーの診断となる）

を包含する。

【００７２】

アルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの存在、進行、後退もしくは安定化について被験体をモニターする方法、または被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーのステージを判定するための方法のいくつかの実施形態において、その抗体、ペプチドおよび／または化合物は、静脈内に、筋肉内に、皮下に、腹腔内に、鼻腔内に、脳室内に、髄腔内に、またはエアロゾルとして、投与される。いくつかの実施形態において、各ペプチドおよび／または化合物の有効量は、１投薬あたり少なくとも１μｇ、１投薬あたり少なくとも１０μｇ、１投薬あたり少なくとも１００μｇである。いくつかの実施形態において、各ペプチドおよび／または化合物の有効量は、アジュバントの存在下において１投薬あたり少なくとも１０μｇ、およびアジュバントの非存在下において１投薬あたり少なくとも１００μｇである。いくつかの実施形態において、少なくとも１つのペプチドまたは化合物は、少なくとも６ヶ月間にわたって複数の投薬量で投与される。

【００７３】

関連する実施形態によると、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病または関連タ

ウオパチーの進行を処置するまたは予防する方法を提供し、その方法は、有効量の本発明によって提供されるような少なくとも１つの抗体および／または少なくとも１つのペプチドおよび／または少なくとも１つの化合物を、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、Ｎ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸（ＮＭＤＡ）レセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせて該被験体に投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、その方法は、運動障害を減少させることができる、運動機能を改善することができる、認知障害を減少させることができる、認知機能を改善することができる、またはそれらの組み合わせが可能である。

【００７４】

関連する実施形態において、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを回復させる方法を提供し、その方法は、有効量の本発明によって提供されるような少なくとも１つの抗体、少なくとも１つのペプチドおよび／または少なくとも１つの化合物を、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫試薬、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせて該被験体に投与する工程を包含する。

【００７５】

被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つの処置、予防または回復の方法のいくつかの実施形態において、その方法は、有効量の本発明によって提供されるような少なくとも１つの抗体、少なくとも１つのペプチドおよび／または少なくとも１つの化合物、および／または免疫応答を増強するアジュバントを；アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせてヒト患者に投与する工程を包含し；ここで、その方法は、病理学的タウに対する抗体を含む免疫応答をもたらし、それにより、そのヒト患者におけるＡＤに関連する症状の少なくとも１つを処置するか、その進行を予防するか、または回復させる。

【００７６】

被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つの処置、予防または回復の方法のいくつかの実施形態において、上記併用剤は、本発明によって提供されるような抗体、ペプチドおよび／または化合物の投与の前、その投与と同時、またはその投与の後に投与される。

【００７７】

関連する実施形態において、本発明は、薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤；ならびに

ａ）本発明によって提供されるような抗体；および／または

ｂ）本発明によって提供されるようなペプチド；および／または

ｃ）本発明によって提供されるような化合物；

を、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナ

ーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫試薬、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせて含む薬学的組成物も提供する。いくつかの実施形態において、上記抗体は、ＤＣ８Ｅ８である。ある特定の実施形態において、上記抗体は、ＤＣ８Ｅ８由来の少なくとも１つのＣＤＲを含む。いくつかの実施形態において、上記抗体は、ＤＣ８Ｅ８由来の少なくとも１つの可変鎖（軽鎖または重鎖）を含む。ある特定の実施形態において、ＤＣ８Ｅ８のヒト化バージョンまたはヒトバージョンが使用され得る。いくつかの実施形態において、少なくとも１つのペプチドは、配列番号１～４、配列番号９～１０１および配列番号１０８～１１２、ＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０１）、ＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０２）、ＫＨＶＰＧＧＧＳＶ（配列番号２０３）、ＨＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０４）、ＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０５）、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）、ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）、ＡＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４４）、ＤＡＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４６）、ＤＮＡＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４９）、ＤＮＩＡＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５１）、ＤＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５９）、ＤＮＩＫＨＡＰＧＧＧＳ（配列番号１６１）ならびにＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１７１）のいずれか１つから選択される。１つの実施形態において、上記ペプチドは、配列番号１～４から選択される。別の実施形態において、上記ペプチドは、配列番号１０８である。１つの実施形態において、上記ペプチドは、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）である。ある特定の実施形態において、上記ペプチドは、ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）である。ある特定の実施形態において、上記ペプチドは、配列番号２７０（ＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫ）；配列番号２７１（ＫＨＱＰＧＧＧ）、配列番号２７２（ＨＱＰＧＧＧ）；配列番号２７５（ＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ）、配列番号２７６（ＫＨＶＰＧＧＧ）、配列番号２７７（ＨＶＰＧＧＧ）、配列番号２８０（ＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶ）、配列番号２８１（ＨＨＫＰＧＧＧ）、配列番号２８２（ＨＫＰＧＧＧ）および配列番号２８３（ＴＨＶＰＧＧＧ）から選択される。他の実施形態において、上記ペプチドは、配列番号２７２（ＨＱＰＧＧＧ）および配列番号２７７（ＨＶＰＧＧＧ）から選択される。

【００７８】

実施形態のさらなる目的および利点は、以下の説明に部分的に示され、部分的にその説明から明らかであるか、または実施形態の実施によって知ることができる。実施形態の目的および利点は、添付の請求項において特段指摘されるエレメントおよび組み合わせを用いて実現され、達成されるだろう。

本発明は、例えば、以下を提供する。

（項目１）

単離された抗体であって、該抗体は、１つもしくは複数のタウエピトープに結合し、以下：

ａ）生理学的タウよりも病理学的タウに対してより高い親和性を示すこと；

ｂ）タウ－タウ凝集を阻害すること；ならびに

ｃ）ミクログリアによる病理学的タウタンパク質の取り込みおよび分解を媒介すること

のうちの２つもしくはそれより多くが可能であり；各タウエピトープは、タウの凝集促進領域を含む、単離された抗体。

（項目２）

前記１つもしくは複数のエピトープの各々が、独立して、

ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６７～２７３位または残基ＫＨＱＰＧＧＧ（配列番号９８）；

ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９８～３０４位または残基ＫＨＶＰＧＧＧ（配列番号９９）

ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３２９～３３５位または残基ＨＨＫＰＧＧＧ（配列番号１００）；および

ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６１～３６７位または残基ＴＨＶＰＧＧＧ（配列番号１０１）
内のエピトープから選択される、項目１に記載の単離された抗体。
（項目３）
前記１つもしくは複数のエピトープの各々が、独立して、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）内のエピトープから選択される、項目２に記載の単離された抗体。
（項目４）
前記抗体が、ヒトアルツハイマー病患者の脳生検材料、アルツハイマー病の動物モデル由来の脳サンプル、またはその両方における、誤秩序タウ、誤無秩序タウ、サルコシル不溶性タウ、神経原線維変化、糸屑状構造物および老人斑から選択される病理学的タウの１つもしくは複数の形態に結合することができる、項目１～３の１項に記載の単離された抗体。
（項目５）
前記エピトープの少なくとも１つが、コンフォーメーションによるものである、項目１～４の１項に記載の単離された抗体。
（項目６）
コンフォーメーションに特異的な様式でタウ上の１つもしくは複数のエピトープに結合する、単離された抗体であって、ここで：
ａ）該１つもしくは複数のエピトープの各々は、独立して、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６７～２７３位または残基ＫＨＱＰＧＧＧ（配列番号９８）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９８～３０４位または残基ＫＨＶＰＧＧＧ（配列番号９９）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３２９～３３５位または残基ＨＨＫＰＧＧＧ（配列番号１００）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６１～３６７位または残基ＴＨＶＰＧＧＧ（配列番号１０１）
内のエピトープから選択され；
ｂ）該エピトープの０、１、２または３個は、線状エピトープであり；
ｃ）該エピトープの１、２、３または４個は、コンフォーメーションエピトープである、単離された抗体。
（項目７）
コンフォーメーションに特異的な様式でタウ上の１つもしくは複数のエピトープに結合する、単離された抗体であって、ここで：
ａ）該１つもしくは複数のエピトープの各々は、独立して、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）

内のエピトープから選択され、
ｂ）該エピトープの０、１、２または３個は、線状エピトープであり；
ｃ）該エピトープの１、２、３または４個は、コンフォーメーションエピトープである、単離された抗体。
（項目８）
前記抗体が、ＤＣ８Ｅ８であり、ＤＣ８Ｅ８が、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ Ｐａｔｅｎｔ Ｄｅｐｏｓｉｔ ｎｏ．ＰＴＡ－１１９９４として寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体である、項目１および６のうちの１項に記載の単離された抗体。
（項目９）
前記抗体が、ＤＣ８Ｅ８によって結合されるエピトープと同じタウ上のエピトープの１つもしくは複数に結合する、項目１～７の１項に記載の単離された抗体。
（項目１０）
前記抗体が、タウへの結合についてモノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８と競合する、項目１～７の１項に記載の単離された抗体。
（項目１１）
単離された抗体であって、
ｉ．ＱＳＬＬＮＳＲＴＲＫＮＹ（配列番号１１７）
ｉｉ．ＷＡＳ（配列番号１１８）
ｉｉｉ．ＫＱＳＦＹＬＲＴ（配列番号１１９）
ｉｖ．ＧＹＩＦＴＤＹＶＩＳ（配列番号１２０）
ｖ．ＩＦＰＲＳＧＳＴ（配列番号１２１）；および
ｖｉ．ＡＲＤＹＹＧＴＳＦＡＭＤＹ（配列番号１２２）
から選択される１つもしくは複数の相補性決定領域（ＣＤＲ）配列を該抗体のエピトープ結合ドメインに含む、単離された抗体。
（項目１２）
単離された抗体であって、
ｉ．ＱＳＬＬＮＳＲＴＲＫＮＹ（配列番号１１７）
ｉｉ．ＷＡＳ（配列番号１１８）
ｉｉｉ．ＫＱＳＦＹＬＲＴ（配列番号１１９）
ｉｖ．ＧＹＩＦＴＤＹＶＩＳ（配列番号１２０）
ｖ．ＩＦＰＲＳＧＳＴ（配列番号１２１）；および
ｖｉ．ＡＲＤＹＹＧＴＳＦＡＭＤＹ（配列番号１２２）
から選択される１つもしくは複数のＣＤＲ配列を該抗体のエピトープ結合ドメインに含む、項目１～７の１項に記載の単離された抗体。
（項目１３）
前記抗体が、
ａ）ｉ．ＣＤＲ１に対してＱＳＬＬＮＳＲＴＲＫＮＹ（配列番号１１７）または配列番号２４７；
ｉｉ．ＣＤＲ２に対してＷＡＳ（配列番号１１８）または配列番号２５３；および
ｉｉｉ．ＣＤＲ３に対してＫＱＳＦＹＬＲＴ（配列番号１１９）または配列番号２５５、２５７、２５８、２５９および２６０のうちのいずれか１つ
を含む抗体軽鎖可変領域；ならびに
ｂ）ｉ．ＣＤＲ１に対してＧＹＩＦＴＤＹＶＩＳ（配列番号１２０）、配列番号２６１または配列番号２６２；
ｉｉ．ＣＤＲ２に対してＩＦＰＲＳＧＳＴ（配列番号１２１）、配列番号２６４または配列番号２６５；および
ｉｉｉ．ＣＤＲ３に対してＡＲＤＹＹＧＴＳＦＡＭＤＹ（配列番号１２２）、配列番号２６６、配列番号２６７または配列番号２６９
を含む抗体重鎖可変領域

を含む、項目１１および１２のうちのいずれか１項に記載の単離された抗体。
（項目１４）
前記抗体が：
ａ）ｉ．ＣＤＲ１に対してＱＳＬＬＮＳＲＴＲＫＮＹ（配列番号１１７）；
ｉｉ．ＣＤＲ２に対してＷＡＳ（配列番号１１８）；および
ｉｉｉ．ＣＤＲ３に対してＫＱＳＦＹＬＲＴ（配列番号１１９）
を含む抗体軽鎖可変領域；ならびに
ｂ）ｉｖ．ＣＤＲ１に対してＧＹＩＦＴＤＹＶＩＳ（配列番号１２０）
ｖ．ＣＤＲ２に対してＩＦＰＲＳＧＳＴ（配列番号１２１）；および
ｖｉ．ＣＤＲ１に対してＡＲＤＹＹＧＴＳＦＡＭＤＹ（配列番号１２２）
を含む抗体重鎖可変領域
を含む、項目１１および１２のうちのいずれか１項に記載の単離された抗体。
（項目１５）
前記抗体が：
ａ）前記モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８由来の軽鎖ＣＤＲの１つもしくは複数の配列、またはこれらの軽鎖ＣＤＲのうちの１つとの最適なアラインメントの後に少なくとも８０％の同一性を有する１つもしくは複数の配列；および
ｂ）該モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８由来の重鎖ＣＤＲの１つもしくは複数の配列、またはこれらの重鎖ＣＤＲのうちの１つとの最適なアラインメントの後に少なくとも８０％の同一性を有する１つもしくは複数の配列
を含み；
ｉ．該軽鎖ＣＤＲは、ＱＳＬＬＮＳＲＴＲＫＮＹ（配列番号１１７）、ＷＡＳ（配列番号１１８）およびＫＱＳＦＹＬＲＴ（配列番号１１９）から選択される配列を含み；
ｉｉ．該重鎖ＣＤＲは、ＧＹＩＦＴＤＹＶＩＳ（配列番号１２０）、ＩＦＰＲＳＧＳＴ（配列番号１２１）およびＡＲＤＹＹＧＴＳＦＡＭＤＹ（配列番号１２２）から選択される配列を含む、
項目１～７の１項に記載の単離された抗体。
（項目１６）
前記抗体が：
ａ）前記モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８由来の軽鎖ＣＤＲの１つもしくは複数の配列、またはこれらの軽鎖ＣＤＲのうちの１つとの最適なアラインメントの後に少なくとも８０％の同一性を有する１つもしくは複数の配列；および
ｂ）該モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８由来の重鎖ＣＤＲの１つもしくは複数の配列、またはこれらの重鎖ＣＤＲのうちの１つとの最適なアラインメントの後に少なくとも８０％の同一性を有する１つもしくは複数の配列
を含み；
ｉ．該軽鎖ＣＤＲは、ＱＳＬＬＮＳＲＴＲＫＮＹ（配列番号１１７）、ＷＡＳ（配列番号１１８）、ＫＱＳＦＹＬＲＴ（配列番号１１９）、配列番号２４７、配列番号２５３、配列番号２５５、配列番号２５７、配列番号２５８、配列番号２５９および配列番号２６０から選択される配列を含み；
ｉｉ．該重鎖ＣＤＲは、ＧＹＩＦＴＤＹＶＩＳ（配列番号１２０）、ＩＦＰＲＳＧＳＴ（配列番号１２１）、ＡＲＤＹＹＧＴＳＦＡＭＤＹ（配列番号１２２）；配列番号２６１、配列番号２６２、配列番号２６４、配列番号２６５、配列番号２６６、配列番号２６７および配列番号２６９から選択される配列を含む、
項目１～７の１項に記載の単離された抗体。
（項目１７）
単離された抗体であって、ここで、該抗体は、
Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂｃ、Ｆｖフラグメントもしくは他の任意の抗原結合フラグメント；または抗原結合抗体部分であり；
該抗体は、項目１～７の１項に記載の抗体の免疫学的結合特性のうちの１つもしくは複数

を有する、単離された抗体。
（項目１８）
項目１～１７の１項に記載の単離された抗体と競合してタウに結合する、単離された抗体。
（項目１９）
単離された前記ＤＣ８Ｅ８抗体と競合してタウに結合する、項目６に記載の単離された抗体。
（項目２０）
前記抗体が：
ａ）モノクローナル抗体；
ｂ）ポリクローナル抗体；
ｃ）組換え抗体；
ｄ）キメラ抗体；
ｅ）ヒト化抗体；
ｆ）ヒト抗体；および
ｇ）（ａ）から（ｆ）のいずれか１つの抗原結合フラグメントまたは抗原結合部分
から選択される、項目１～７および１０～１９の１項に記載の単離された抗体。
（項目２１）
前記抗体が、哺乳動物において産生される、項目１～７および９～２０の１項に記載の単離された抗体。
（項目２２）
前記抗体が、組換え動物または組換え宿主細胞によって産生される、項目１～７および９～２０の１項に記載の単離された抗体。
（項目２３）
前記抗体が、１つもしくは複数の標識剤で検出可能に標識される、項目１～２２の１項に記載の単離された抗体。
（項目２４）
少なくとも１つの標識剤が、酵素、放射性同位体、フルオロフォア、核磁気共鳴マーカーおよび重金属から選択される、項目２３に記載の単離された抗体。
（項目２５）
前記抗体に結合された少なくとも１つの薬物をさらに含む、項目１～２４の１項に記載の抗体。
（項目２６）
項目項目１～７および９～２０の１項に記載の抗体の免疫グロブリン鎖の少なくとも結合ドメインまたは可変領域をコードする、単離された核酸。
（項目２７）
項目２１に記載の核酸を含む、単離されたベクター。
（項目２８）
項目２６に記載の単離された核酸および／または項目２７に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。
（項目２９）
項目１～７および９～２０の１項に記載の単離された抗体を発現する、単離された細胞系。
（項目３０）
前記細胞系が、ハイブリドーマである、項目２９に記載の単離された細胞系。
（項目３１）
前記細胞系が、前記モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８を産生するハイブリドーマである、項目３０に記載の単離された細胞系。
（項目３２）
薬物として使用するための、またはアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの診断、

予防もしくは処置のための医薬の製造において使用するための、項目１～７および９～２０の１項に記載の単離された抗体。
（項目３３）
薬物として使用するための、またはアルツハイマー病または関連タウオパチーの処置のための医薬の製造において使用するための、項目２６に記載の単離された核酸。
（項目３４）
項目１～２５の１項に記載の抗体、ならびに薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤を含む、薬学的組成物。
（項目３５）
抗体の組み合わせ、ならびに薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤を含む薬学的組成物であって、ここで、該組み合わせは、少なくとも２つの異なる抗体を含み、前記抗体の各々は、独立して、項目１～２５の１項に記載の抗体から選択される、薬学的組成物。
（項目３６）
項目１～２５に記載の少なくとも１つの抗体および希釈剤またはキャリアを含む、組成物。
（項目３７）
検出可能な標識、キーホールリンペットヘモシアニン、破傷風トキソイドまたは他の病原菌に由来するトキソイド、血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、免疫グロブリン分子またはそのフラグメント、チログロブリン、オボグロブリン、ユニバーサルＴ細胞エピトープ、サイトカイン、ケモカイン、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－１０、ＩＦＮ－γ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ１βおよびＲＡＮＴＥＳから選択される少なくとも１つの化合物または剤をさらに含む、項目３６に記載の組成物。
（項目３８）
包装材料、および凍結乾燥された形態の項目１～２５の１項に記載の抗体の溶液を含む容器を備える、薬学的にまたは診断に使用するための製造品。
（項目３９）
前記容器が、被験体に前記抗体を送達するためのデバイスまたはシステムの構成要素である、項目３９に記載の製造品。
（項目４０）
項目１～２５の１項に記載の抗体を備える医療用デバイスであって、該デバイスは、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内、体腔内、小脳内、脳室内、髄腔内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、病巣内、ボーラス、膣、直腸、頬側、舌下、鼻腔内および経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｒｎａｌ）から選択される少なくとも１つの様式による前記抗体の接触または投与に適している、医療用デバイス。
（項目４１）
被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーの進行を処置するまたは予防する方法であって、該方法は、有効量の項目１～２５の１項に記載の少なくとも１つの抗体を該被験体に投与する工程を包含する、方法。
（項目４２）
前記方法は、運動障害を減少させることができる、運動機能を改善することができる、認知障害を減少させることができる、認知機能を改善することができる、またはそれらの組み合わせが可能である、項目４１に記載の方法。
（項目４３）
被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを回復させる方法であって、該方法は、有効量の項目１～２５の１項に記載の少なくとも１つの抗体を該被験体に投与する工程を包含する、方法。
（項目４４）

被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの存在について被験体を診断するもしくはスクリーニングする方法、またはアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの発症についての被験体のリスクを測定するための方法であって、該方法は：
ａ）該被験体、または該被験体の細胞、組織、器官、体液もしくは他の任意のサンプルを、有効量の項目１～２５の１項に記載の少なくとも１つの抗体と接触させる工程；およびｂ）病理学的タウおよび該抗体を含む複合体の存在を判定する工程であって、ここで、該複合体の存在は、病理学的タウの存在に関連するアルツハイマー病または関連タウオパチーの診断となる、工程
を包含する、方法。
（項目４５）
被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの存在、進行、後退もしくは安定化について被験体をモニターする方法、または被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーのステージを判定するための方法であって、該方法は：
ａ）該被験体、または該被験体の細胞、組織、器官、体液もしくは他の任意のサンプルを、有効量の項目１～２５の１項に記載の少なくとも１つの抗体と接触させる工程；およびｂ）病理学的タウおよび該抗体を含む複合体の存在を判定する工程であって、ここで、該複合体の存在は、病理学的タウの存在に関連するアルツハイマー病または関連タウオパチーの診断となる、工程
を包含する、方法。
（項目４６）
前記抗体が、静脈内に、筋肉内に、皮下に、腹腔内に、鼻腔内に、脳室内に、髄腔内に、またはエアロゾルとして、投与される、項目４１～４５の１項に記載の方法。
（項目４７）
各抗体の前記有効量が、１投薬あたり前記被験体の体重１ｋｇあたり少なくとも１ｍｇである、項目４１～４５の１項に記載の方法。
（項目４８）
各抗体の前記有効量が、１投薬あたり前記被験体の体重１ｋｇあたり少なくとも１０ｍｇである、項目４１～４５の１項に記載の方法。
（項目４９）
前記抗体の少なくとも１つが、少なくとも６ヶ月間にわたって複数の投薬量で投与される、項目４１～４８の１項に記載の方法。
（項目５０）
前記抗体が、その有益な効果を発揮するためにヒト被験体の末梢に投与される、項目４１～４９の１項に記載の方法。
（項目５１）
前記抗体が、ヒト被験体の末梢に投与されたとき、可溶性タウ、サルコシル不溶性タウまたはその両方に結合する、項目５０に記載の方法。
（項目５２）
前記抗体が、ヒト被験体の末梢に投与されたとき、タウに結合し、ここで、タウは、ヒトアルツハイマー病患者の脳生検材料おける、アルツハイマー病の動物モデル由来の脳サンプルにおける、誤秩序タウ、誤無秩序タウ、サルコシル不溶性タウ、神経原線維変化、糸屑状構造物および老人斑から選択される１つもしくは複数の病理学的形態である、項目５０に記載の方法。
（項目５３）
前記抗体が、ヒト被験体の末梢に投与されたとき、該被験体に対して１つもしくは複数の、エフェクター機能によって媒介される有益な効果を発揮する、項目５０～５２の１項に記載の方法。
（項目５４）
アルツハイマー病および関連タウオパチーから選択される疾患の処置または診断において使用するための、項目１～２５のいずれか１項に記載の抗体または項目２６に記載の核酸

。
（項目５５）
アルツハイマー病および関連タウオパチーから選択される疾患の処置または診断において使用するための、項目１～２５のいずれか１項に記載の抗体または項目２６に記載の核酸を含む、組成物。
（項目５６）
単離されたペプチドであって、ここで：
ａ）該単離されたペプチドは、少なくとも６アミノ酸残基長、少なくとも７アミノ酸残基長、少なくとも９アミノ酸残基長、少なくとも１０アミノ酸残基長、少なくとも１２アミノ酸残基長または３０アミノ酸残基長であるタウのフラグメントであり；
ｂ）該単離されたペプチドは、少なくとも１つのタウ治療用エピトープを含む、
単離されたペプチド。
（項目５７）
前記治療用エピトープが、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６７～２７３位または残基ＫＨＱＰＧＧＧ（配列番号９８）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９８～３０４位または残基ＫＨＶＰＧＧＧ（配列番号９９）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３２９～３３５位または残基ＨＨＫＰＧＧＧ（配列番号１００）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６１～３６７位または残基ＴＨＶＰＧＧＧ（配列番号１０１）；
内のエピトープから選択される治療用エピトープを含む、項目５６に記載の単離されたペプチド。
（項目５８）
前記治療用エピトープが、
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
内のエピトープから選択される治療用エピトープを含む、項目５６に記載の単離されたペプチド。
（項目５９）
前記ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号１～４、配列番号９～１０１、配列番号１０８～１１２、配列番号１５４、配列番号２２３～２２４、ＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ（配列番号２００）、ＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０１）、ＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０２）、ＫＨＶＰＧＧＧＳＶ（配列番号２０３）、ＨＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０４）、ＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０５）、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）、ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）、ＡＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４４）、ＤＡＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４６）、ＤＮＡＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４９）、ＤＮＩＡＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５１）、ＤＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５９）、ＤＮＩＫＨＡＰＧＧＧＳ（配列番号１６１）およびＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１７１）から選択される配列である、項目５６～５８の１項に記載の単離されたペプチド。
（項目６０）
前記ペプチドが、該ペプチドの：

ａ）前記モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウと競合する能力；
ｂ）インビボにおいてサルコシル不溶性タウのレベルを減少させる能力；
ｃ）インビボにおいて脳からのタウのクリアランスを促進する能力；
ｄ）インビボにおいてＡＤの少なくとも１つの生化学的マーカーのレベルを減少させる能力；
ｅ）インビボにおいて神経原線維変化（ＮＦＴ）の量を減少させる能力；
ｆ）インビボにおいて少なくとも１つの神経行動学的パラメータを改善する能力；
ｇ）被験体におけるＡＤの経過を有利に改変する能力；
ｈ）脳、脳脊髄液またはその両方におけるタウのレベルを減少させる能力；
ｉ）タウへの結合についてモノクローナルＤＣ８Ｅ８と競合することができる抗体の作製において免疫原として働く能力
を測定するアッセイから選択される少なくとも１つのアッセイにおいて活性である、項目５６～５９の１項に記載の単離されたペプチド。
（項目６１）
項目５６～６０の１項に記載の単離されたペプチドおよびある部分を含む化合物。
（項目６２）
前記部分が、前記ペプチドのＮ末端であるか、Ｃ末端であるか、または該ペプチドの内部のアミノ酸に連結されており、該部分は、システイン残基、ホスホ基、キーホールリンペットヘモシアニン、破傷風トキソイドまたは他の病原菌に由来するトキソイド、血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、免疫グロブリン分子またはそのフラグメント、チログロブリン、オボグロブリン、ユニバーサルＴ細胞エピトープ、サイトカイン、ケモカイン、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－１０、ＩＦＮ－γ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ１βおよびＲＡＮＴＥＳのうちの１つもしくは複数から選択される、項目６１に記載の化合物。
（項目６３）
項目５６～６０の１項に記載の単離されたペプチド、ならびに薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤および／またはアジュバントを含む、薬学的組成物。
（項目６４）
項目６１～６２の１項に記載の化合物、ならびに薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤および／またはアジュバントを含む、薬学的組成物。
（項目６５）
１投薬あたり１ｎｇ～１０ｍｇの投与量の前記ペプチドまたは前記化合物を提供するように適合させた、項目６３および６４のうちの１項に記載の薬学的組成物。
（項目６６）
１投薬あたり１０マイクログラムより多い投与量の前記ペプチドまたは前記化合物を提供するように適合させた、項目６３および６４のうちの１項に記載の薬学的組成物。
（項目６７）
包装材料、および凍結乾燥された形態の項目５６～６０の１項に記載のペプチドの溶液または項目６１～６２の１項に記載の化合物の溶液を含む容器を備える、薬学的にまたは診断に使用するための製造品。
（項目６８）
前記容器が、被験体に前記ペプチドまたは前記化合物を送達するためのデバイスまたはシステムの構成要素である、項目６７に記載の製造品。
（項目６９）
項目５６～６０の１項に記載のペプチドまたは項目６１～６２の１項に記載の化合物を備える医療用デバイスであって、ここで、該デバイスは、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内、体腔内、小脳内、脳室内、髄腔内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、病巣内、ボーラス、膣、直腸、頬側、舌下、鼻腔内および経皮から選択される少なくとも１つの

様式による前記抗体の接触または投与に適している、医療用デバイス。
（項目７０）
被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーの進行を処置するまたは予防する方法であって、該方法は、有効量の項目５６～６０の１項に記載の少なくとも１つのペプチドおよび／または項目６１～６２の１項に記載の少なくとも１つの化合物を該被験体に投与する工程を包含する、方法。
（項目７１）
前記方法は、運動障害を減少させることができる、運動機能を改善することができる、認知障害を減少させることができる、認知機能を改善することができる、またはそれらの組み合わせが可能である、項目７０に記載の方法。
（項目７２）
被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを回復させる方法であって、該方法は、有効量の項目５６～６０の１項に記載の少なくとも１つのペプチドおよび／または項目６１～６２の１項に記載の少なくとも１つの化合物を該被験体に投与する工程を包含する、方法。
（項目７３）
項目７０～７２の１項に記載の方法であって、該方法は、項目５６～６０の１項に記載のペプチドおよび／または項目６１～６２の１項に記載の化合物および／または免疫応答を増強するアジュバントをヒト患者に投与する工程を包含し、該方法は、病理学的タウに対する抗体を含む免疫応答をもたらし、それにより、該ヒト患者におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを処置する、その進行を予防する、または回復させる、方法。
（項目７４）
タウへの結合についてＤＣ８Ｅ８と競合することができる抗体を作製する方法であって、該方法は、項目５６～６０の１項に記載のペプチドおよび／または項目６１～６２の１項に記載の化合物で被験体を免疫する工程を包含する、方法。
（項目７５）
ＤＣ８Ｅ８を単離する方法、またはタウへの結合についてＤＣ８Ｅ８と競合することができる抗体を単離する方法であって、該方法は、ＤＣ８Ｅ８または前記抗体を項目５６～６０の１項に記載のペプチドおよび／または項目６１～６２の１項に記載の化合物と接触させる工程を包含する、方法。
（項目７６）
被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの存在について被験体を診断するもしくはスクリーニングする方法、またはアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの発症についての被験体のリスクを測定するための方法であって、該方法は：
ａ）該被験体、または該被験体の細胞、組織、器官、体液もしくは他の任意のサンプルを、有効量の項目７４に記載の少なくとも１つの抗体と接触させる工程；および
ｂ）病理学的タウおよび該抗体を含む複合体の存在を判定する工程であって、ここで、該複合体の存在は、病理学的タウの存在に関連するアルツハイマー病または関連タウオパチーの診断となる、工程
を包含する、方法。
（項目７７）
被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーの存在、進行、後退もしくは安定化について被験体をモニターする方法、または被験体におけるアルツハイマー病もしくは関連タウオパチーのステージを判定するための方法であって、該方法は：
ａ）該被験体、または該被験体の細胞、組織、器官、体液もしくは他の任意のサンプルを、有効量の項目７４に記載の少なくとも１つの抗体と接触させる工程；および
ｂ）病理学的タウおよび該抗体を含む複合体の存在を判定する工程であって、ここで、該複合体の存在は、病理学的タウの存在に関連するアルツハイマー病または関連タウオパチーの診断となる、工程

を包含する、方法。
（項目７８）
前記ペプチドおよび／または化合物が、静脈内に、筋肉内に、皮下に、腹腔内に、鼻腔内に、脳室内に、髄腔内に、またはエアロゾルとして、投与される、項目７６～７７の１項に記載の方法。
（項目７９）
各ペプチドおよび／または化合物の前記有効量が、１投薬あたり少なくとも１μｇ、１投薬あたり少なくとも１０μｇ、１投薬あたり少なくとも１００μｇである、項目７６～７８の１項に記載の方法。
（項目８０）
各ペプチドおよび／または化合物の前記有効量が、アジュバントの存在下において１投薬あたり少なくとも１０μｇ、およびアジュバントの非存在下において１投薬あたり少なくとも少なくとも１００μｇである、項目７９に記載の方法。
（項目８１）
少なくとも１つのペプチドまたは化合物が、少なくとも６ヶ月間にわたって複数の投薬量で投与される、項目７０～７３および７６～８０の１項に記載の方法。
（項目８２）
被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーの進行を処置するまたは予防する方法であって、該方法は、有効量の項目１～２５の１項に記載の少なくとも１つの抗体および／または項目５６～６０の１項に記載の少なくとも１つのペプチドおよび／または項目６１～６２の１項に記載の少なくとも１つの化合物を、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせて該被験体に投与する工程を包含する、方法。
（項目８３）
前記方法は、運動障害を減少させることができる、運動機能を改善することができる、認知障害を減少させることができる、認知機能を改善することができる、またはそれらの組み合わせが可能である、項目８２に記載の方法。
（項目８４）
被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを回復させる方法であって、該方法は、有効量の項目１～２５の１項に記載の少なくとも１つの抗体および／または項目５６～６０の１項に記載の少なくとも１つのペプチドおよび／または項目６１～６２の１項に記載の少なくとも１つの化合物を、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫試薬、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせて該被験体に投与する工程を包含する、方法。
（項目８５）
項目８３～８４の１項に記載の方法であって、該方法は、有効量の項目１～２５の１項に記載の少なくとも１つの抗体、項目５６～６０の１項に記載の１つのペプチドおよび／または項目６１～６２の１項に記載の少なくとも１つの化合物および／または免疫応答を増強するアジュバントを；アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動お

よび能動免疫、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせてヒト患者に投与する工程を包含し；該方法は、病理学的タウに対する抗体を含む免疫応答をもたらし、それにより、該ヒト患者におけるＡＤに関連する症状の少なくとも１つを処置する、その進行を予防する、または回復させる、方法。

（項目８６）

前記併用剤が、項目１～２５の１項に記載の抗体、項目５６～６０の１項に記載のペプチドおよび／または項目６１～６２の１項に記載の化合物の投与の前、該投与と同時、または該投与の後に投与される、項目８３～８５の１項に記載の方法。

（項目８７）

薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤；ならびに
ａ）項目１～２５の１項に記載の抗体；および／または
ｂ）項目５６～６０の１項に記載のペプチド；および／または
ｃ）項目６１～６２の１項に記載の化合物；
を、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫試薬、抗アミロイド凝集阻害剤ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせて含む、薬学的組成物。

（項目８８）

単離されたペプチドであって、ここで：
ａ）該単離されたペプチドは、６アミノ酸残基長であるタウのフラグメントであり、
ｂ）該単離されたペプチドは、少なくとも１つのタウ治療用エピトープを含む、
単離されたペプチド。

（項目８９）

前記治療用エピトープが：
ｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２６８～２７３位または残基ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）；
ｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して２９９～３０４位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
ｉｉｉ．ｔａｕ$_{441}$に対して３３０～３３５位または残基ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）；および
ｉｖ．ｔａｕ$_{441}$に対して３６２～３６７位または残基ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）
から選択される治療用エピトープを含む、項目８８に記載の単離されたペプチド。

（項目９０）

前記単離されたペプチドが、ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２２３）、ＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）、ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２２４）およびＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）から選択される、項目８８～８９の１項に記載の単離されたペプチド。

（項目９１）

前記ペプチドが、該ペプチドの：
ｊ）前記モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウと競合する能力；
ｋ）インビボにおいてサルコシル不溶性タウのレベルを減少させる能力；
ｌ）インビボにおいて脳からのタウのクリアランスを促進する能力；
ｍ）インビボにおいてＡＤの少なくとも１つの生化学的マーカーのレベルを減少させる能力；
ｎ）インビボにおいて神経原線維変化（ＮＦＴ）の量を減少させる能力；
ｏ）インビボにおいて少なくとも１つの神経行動学的パラメータを改善する能力；
ｐ）被験体におけるＡＤの経過を有利に改変する能力；

ｑ）脳、脳脊髄液またはその両方におけるタウのレベルを減少させる能力；
ｒ）タウへの結合についてモノクローナルＤＣ８Ｅ８と競合することができる抗体の作製において免疫原として働く能力
を測定するアッセイから選択される少なくとも１つのアッセイにおいて活性である、項目８８～９０の１項に記載の単離されたペプチド。
（項目９２）
項目８８～９１の１項に記載の単離されたペプチドおよびある部分を含む、化合物。
（項目９３）
前記部分が、前記ペプチドのＮ末端であるか、Ｃ末端であるか、または該ペプチドの内部のアミノ酸に連結されており、該部分は、システイン残基、ホスホ基、キーホールリンペットヘモシアニン、破傷風トキソイドまたは他の病原菌に由来するトキソイド、血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、免疫グロブリン分子またはそのフラグメント、チログロブリン、オボグロブリン、ユニバーサルＴ細胞エピトープ、サイトカイン、ケモカイン、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－１０、ＩＦＮ－γ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＭＩＰ１α、ＭＩＰ１βおよびＲＡＮＴＥＳのうちの１つもしくは複数から選択される、項目９２に記載の化合物。
（項目９４）
項目８８～９１の１項に記載の単離されたペプチド、ならびに薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤および／またはアジュバントを含む、薬学的組成物。
（項目９５）
項目９２～９３の１項に記載の化合物、ならびに薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤および／またはアジュバントを含む、薬学的組成物。
（項目９６）
１投薬あたり１ｎｇ～１０ｍｇの投与量の前記ペプチドまたは前記化合物を提供するように適合させた、項目９４および９５のうちの１項に記載の薬学的組成物。
（項目９７）
１投薬あたり１０マイクログラムより多い投与量の前記ペプチドまたは前記化合物を提供するように適合させた、項目９４および９５のうちの１項に記載の薬学的組成物。
（項目９８）
包装材料、および凍結乾燥された形態の項目８８～９１の１項に記載のペプチドの溶液または項目９２～９３の１項に記載の化合物の溶液を含む容器を備える、薬学的にまたは診断に使用するための製造品。
（項目９９）
前記容器が、被験体に前記ペプチドまたは前記化合物を送達するためのデバイスまたはシステムの構成要素である、項目９８に記載の製造品。
（項目１００）
項目８８～９１の１項に記載のペプチドまたは項目９２～９３の１項に記載の化合物を備える医療用デバイスであって、ここで、該デバイスは、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内、体腔内、小脳内、脳室内、髄腔内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、病巣内、ボーラス、膣、直腸、頬側、舌下、鼻腔内および経皮から選択される少なくとも１つの様式による前記ペプチドおよび／または前記化合物の接触または投与に適している、医療用デバイス。
（項目１０１）
被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーの進行を処置するまたは予防する方法であって、該方法は、有効量の項目８８～９１の１項に記載の少なくとも１つのペプチドおよび／または項目９２～９３の１項に記載の少なくとも１つの化合物を該被験体に投与する工程を包含する、方法。
（項目１０２）

項目１０１に記載の方法であって、該方法は、運動障害を減少させることができる、運動機能を改善することができる、認知障害を減少させることができる、認知機能を改善することができる、またはそれらの組み合わせが可能である、方法。
（項目１０３）
被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを回復させる方法であって、該方法は、項目８８～９１の１項に記載の有効量の少なくとも１つのペプチドおよび／または項目９２～９３の１項に記載の少なくとも１つの化合物を該被験体に投与する工程を包含する、方法。
（項目１０４）
項目１０１～１０３の１項に記載の方法であって、該方法は、項目８８～９１の１項に記載のペプチドおよび／または項目９２～９３の１項に記載の化合物および／または免疫応答を増強するアジュバントをヒト患者に投与する工程を包含し、該方法は、病理学的タウに対する抗体を含む免疫応答をもたらし、それにより、該ヒト患者におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを処置する、その進行を予防する、または回復させる、方法。
（項目１０５）
タウへの結合についてＤＣ８Ｅ８と競合することができる抗体を作製する方法であって、該方法は、項目８８～９１の１項に記載のペプチドおよび／または項目９２～９３の１項に記載の化合物で被験体を免疫する工程を包含する、方法。
（項目１０６）
ＤＣ８Ｅ８を単離する方法、またはタウへの結合についてＤＣ８Ｅ８と競合することができる抗体を単離する方法であって、該方法は、ＤＣ８Ｅ８または該抗体を、項目８８～９１の１項に記載のペプチドおよび／または項目９２～９３の１項に記載の化合物と接触させる工程を包含する、方法。
（項目１０７）
前記ペプチドおよび／または化合物が、静脈内に、筋肉内に、皮下に、腹腔内に、鼻腔内に、脳室内に、髄腔内に、またはエアロゾルとして、投与される、項目１０１～１０４の１項に記載の方法。
（項目１０８）
各ペプチドおよび／または化合物の前記有効量が、１投薬あたり少なくとも１μｇ、１投薬あたり少なくとも１０μｇ、１投薬あたり少なくとも１００μｇである、項目１０１～１０４および１０７の１項に記載の方法。
（項目１０９）
各ペプチドおよび／または化合物の前記有効量が、アジュバントの存在下において１投薬あたり少なくとも１０μｇ、およびアジュバントの非存在下において１投薬あたり少なくとも少なくとも１００μｇである、項目１０８に記載の方法。
（項目１１０）
少なくとも１つのペプチドまたは化合物が、少なくとも６ヶ月間にわたって複数の投薬量で投与される、項目１０１～１０４および１０７～１０９の１項に記載の方法。
（項目１１１）
被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーの進行を処置するまたは予防する方法であって、該方法は、有効量の項目１～２５の１項に記載の少なくとも１つの抗体および／または項目８８～９１の１項に記載の少なくとも１つのペプチドおよび／または項目９２～９３の１項に記載の少なくとも１つの化合物を、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせて該被験体に投与する工程を包含する、方法。

（項目１１２）
前記方法は、運動障害を減少させることができる、運動機能を改善することができる、認知障害を減少させることができる、認知機能を改善することができる、またはそれらの組み合わせが可能である、項目１１１に記載の方法。
（項目１１３）
被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状の少なくとも１つを回復させる方法であって、該方法は、有効量の項目１～２５の１項に記載の少なくとも１つの抗体および／または項目８８～９１の１項に記載の少なくとも１つのペプチドおよび／または項目９２～９３の１項に記載の少なくとも１つの化合物を、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫試薬、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせて該被験体に投与する工程を包含する、方法。
（項目１１４）
項目１１１～１１３の１項に記載の方法であって、該方法は、有効量の項目１～２５の１項に記載の少なくとも１つの抗体、項目８８～９１の１項に記載の１つのペプチドおよび／または項目９２～９３の１項に記載の少なくとも１つの化合物および／または免疫応答を増強するアジュバントを；アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせてヒト患者に投与する工程を包含し；該方法は、病理学的タウに対する抗体を含む免疫応答をもたらし、それにより、該ヒト患者におけるＡＤに関連する症状の少なくとも１つを処置する、その進行を予防する、または回復させる、方法。
（項目１１５）
前記併用剤が、項目１～２５の１項に記載の抗体、項目８８～９１の１項に記載のペプチドおよび／または項目９２～９３の１項に記載の化合物の投与の前、該投与と同時、または該投与の後に投与される、項目１１１～１１４の１項に記載の方法。
（項目１１６）
薬学的に許容され得るキャリアおよび／もしくは希釈剤；ならびに
ｄ）項目１～２５の１項に記載の抗体；および／または
ｅ）項目８８～９１の１項に記載のペプチド；および／または
ｆ）項目９２～９３の１項に記載の化合物；
を、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫試薬、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤から選択される少なくとも１つの併用剤と組み合わせて含む、薬学的組成物。
【００７９】
前述の全般的な説明と以下の詳細な説明の両方が単に例示的および説明的であって、主張されるように実施形態を限定しないことも理解されるべきである。
【００８０】
添付の図面は、本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を構成するものであって、いくつかの実施形態を図示し、その説明とともに、実施形態の原理を説明するように働く。本明細書中で論じられる刊行物は、単に、本願の出願日より前のそれらの開示を提供してい

るだけである。それらはすべて、それらの全体がすべての目的のために参照により援用される。先行発明を理由に本発明がそのような刊行物に先行する権利がないことを自認するものとして、本明細書中のいかなる記載も解釈されるべきでない。さらに、提供される刊行物の日付は、実際の刊行日と異なることがあり、それは独立して確認される必要があり得る。

【図面の簡単な説明】

【００８１】

【図１】ヒトタウの６つのアイソフォームの概略図。

【００８２】

【図２】ヒトタウ（２Ｎ４Ｒ）の概略の機能マップ。図２は、配列番号１１６および１１５としてそれぞれ「ＶＱＩＩＮＫ」および「ＶＱＩＶＹＫ」を開示している。

【００８３】

【図３－１】ＤＣ８Ｅ８可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列、ならびに最も近いマウス生殖細胞系列配列に対するそれらのアラインメント。この図は、ＤＣ８Ｅ８の可変軽鎖（ＶＬ）領域のヌクレオチド配列（配列番号１６５）（Ａ）およびアミノ酸配列（Ｂ）（掲載順にそれぞれ、配列番号１４１（可変軽鎖に対して）および１１７～１１９（ＩＭＧＴに従ってそのＣＤＲの各々に対して））；（アラインメントは、掲載順にそれぞれ配列番号１６６および１６８を開示している）；および（Ｃ）ＤＣ８Ｅ８の可変軽鎖Ｖ遺伝子と最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＫＶ８－２１＊０１とのアラインメント（アラインメントは、掲載順にそれぞれ配列番号１６６および１６７を開示している）に続いてＤＣ８Ｅ８のＶＬ　Ｊ遺伝子（配列番号１６８）と最も近いマウスＪ遺伝子ＩＧＫＪ１＊０１（配列番号１６９）とのアラインメントを示している。この図は、ＤＣ８Ｅ８の可変重鎖配列およびその３つのＣＲＤ配列のヌクレオチド配列（配列番号１７０）（Ｄにおいて）ならびにアミノ酸配列（掲載順にそれぞれ配列番号１７１および１２０～１２２）を示している。（Ｆ）には、ＤＣ８Ｅ８に対する以下のアラインメントが示されている：第１に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＶ１－８１＊０１（配列番号１７２）とのＤＣ８Ｅ８の可変重（ＶＨ）鎖Ｖ遺伝子（配列番号１７２）；第２に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＤ２－１４＊０１（配列番号１７５）とのＤＣ８Ｅ８の可変重（ＶＨ）鎖Ｄ遺伝子（配列番号１７４）；および最後に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＪ４＊０１（配列番号１７７）とのＤＣ８Ｅ８の可変重（ＶＨ）鎖Ｊ遺伝子（配列番号１７６）。ＤＣ８Ｅ８カッパー軽鎖定常領域の配列（配列番号１７８）（Ｇ）および重鎖定常領域の配列（配列番号１７９）（Ｈ）も示されている。タンパク質配列（Ｂ）および（Ｅ）では相補性決定領域（ＣＤＲ）に下線が引かれており、それは、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って特定された。

【図３－２】ＤＣ８Ｅ８可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列、ならびに最も近いマウス生殖細胞系列配列に対するそれらのアラインメント。この図は、ＤＣ８Ｅ８の可変軽鎖（ＶＬ）領域のヌクレオチド配列（配列番号１６５）（Ａ）およびアミノ酸配列（Ｂ）（掲載順にそれぞれ、配列番号１４１（可変軽鎖に対して）および１１７～１１９（ＩＭＧＴに従ってそのＣＤＲの各々に対して））；（アラインメントは、掲載順にそれぞれ配列番号１６６および１６８を開示している）；および（Ｃ）ＤＣ８Ｅ８の可変軽鎖Ｖ遺伝子と最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＫＶ８－２１＊０１とのアラインメント（アラインメントは、掲載順にそれぞれ配列番号１６６および１６７を開示している）に続いてＤＣ８Ｅ８のＶＬ　Ｊ遺伝子（配列番号１６８）と最も近いマウスＪ遺伝子ＩＧＫＪ１＊０１（配列番号１６９）とのアラインメントを示している。この図は、ＤＣ８Ｅ８の可変重鎖配列およびその３つのＣＲＤ配列のヌクレオチド配列（配列番号１７０）（Ｄにおいて）ならびにアミノ酸配列（掲載順にそれぞれ配列番号１７１および１２０～１２２）を示している。（Ｆ）には、ＤＣ８Ｅ８に対する以下のアラインメントが示されている：第１に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＶ１－８１＊０１（配列番号１７２）とのＤＣ８Ｅ８の可変重（ＶＨ）鎖Ｖ遺伝子（配列番号１７２）；第２に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＤ２－１４＊０１（配列番号１７５）とのＤＣ８Ｅ８の可変

重（ＶＨ）鎖Ｄ遺伝子（配列番号１７４）；および最後に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＪ４＊０１（配列番号１７７）とのＤＣ８Ｅ８の可変重（ＶＨ）鎖Ｊ遺伝子（配列番号１７６）。ＤＣ８Ｅ８カッパー軽鎖定常領域の配列（配列番号１７８）（Ｇ）および重鎖定常領域の配列（配列番号１７９）（Ｈ）も示されている。タンパク質配列（Ｂ）および（Ｅ）では相補性決定領域（ＣＤＲ）に下線が引かれており、それは、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って特定された。

【図３－３】ＤＣ８Ｅ８可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列、ならびに最も近いマウス生殖細胞系列配列に対するそれらのアラインメント。この図は、ＤＣ８Ｅ８の可変軽鎖（ＶＬ）領域のヌクレオチド配列（配列番号１６５）（Ａ）およびアミノ酸配列（Ｂ）（掲載順にそれぞれ、配列番号１４１（可変軽鎖に対して）および１１７～１１９（ＩＭＧＴに従ってそのＣＤＲの各々に対して））；（アラインメントは、掲載順にそれぞれ配列番号１６６および１６８を開示している）；および（Ｃ）ＤＣ８Ｅ８の可変軽鎖Ｖ遺伝子と最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＫＶ８－２１＊０１とのアラインメント（アラインメントは、掲載順にそれぞれ配列番号１６６および１６７を開示している）に続いてＤＣ８Ｅ８のＶＬ　Ｊ遺伝子（配列番号１６８）と最も近いマウスＪ遺伝子ＩＧＫＪ１＊０１（配列番号１６９）とのアラインメントを示している。この図は、ＤＣ８Ｅ８の可変重鎖配列およびその３つのＣＲＤ配列のヌクレオチド配列（配列番号１７０）（Ｄにおいて）ならびにアミノ酸配列（掲載順にそれぞれ配列番号１７１および１２０～１２２）を示している。（Ｆ）には、ＤＣ８Ｅ８に対する以下のアラインメントが示されている：第１に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＶ１－８１＊０１（配列番号１７２）とのＤＣ８Ｅ８の可変重（ＶＨ）鎖Ｖ遺伝子（配列番号１７２）；第２に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＤ２－１４＊０１（配列番号１７５）とのＤＣ８Ｅ８の可変重（ＶＨ）鎖Ｄ遺伝子（配列番号１７４）；および最後に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＪ４＊０１（配列番号１７７）とのＤＣ８Ｅ８の可変重（ＶＨ）鎖Ｊ遺伝子（配列番号１７６）。ＤＣ８Ｅ８カッパー軽鎖定常領域の配列（配列番号１７８）（Ｇ）および重鎖定常領域の配列（配列番号１７９）（Ｈ）も示されている。タンパク質配列（Ｂ）および（Ｅ）では相補性決定領域（ＣＤＲ）に下線が引かれており、それは、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って特定された。

【図３－４】ＤＣ８Ｅ８可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列、ならびに最も近いマウス生殖細胞系列配列に対するそれらのアラインメント。この図は、ＤＣ８Ｅ８の可変軽鎖（ＶＬ）領域のヌクレオチド配列（配列番号１６５）（Ａ）およびアミノ酸配列（Ｂ）（掲載順にそれぞれ、配列番号１４１（可変軽鎖に対して）および１１７～１１９（ＩＭＧＴに従ってそのＣＤＲの各々に対して））；（アラインメントは、掲載順にそれぞれ配列番号１６６および１６８を開示している）；および（Ｃ）ＤＣ８Ｅ８の可変軽鎖Ｖ遺伝子と最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＫＶ８－２１＊０１とのアラインメント（アラインメントは、掲載順にそれぞれ配列番号１６６および１６７を開示している）に続いてＤＣ８Ｅ８のＶＬ　Ｊ遺伝子（配列番号１６８）と最も近いマウスＪ遺伝子ＩＧＫＪ１＊０１（配列番号１６９）とのアラインメントを示している。この図は、ＤＣ８Ｅ８の可変重鎖配列およびその３つのＣＲＤ配列のヌクレオチド配列（配列番号１７０）（Ｄにおいて）ならびにアミノ酸配列（掲載順にそれぞれ配列番号１７１および１２０～１２２）を示している。（Ｆ）には、ＤＣ８Ｅ８に対する以下のアラインメントが示されている：第１に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＶ１－８１＊０１（配列番号１７２）とのＤＣ８Ｅ８の可変重（ＶＨ）鎖Ｖ遺伝子（配列番号１７２）；第２に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＤ２－１４＊０１（配列番号１７５）とのＤＣ８Ｅ８の可変重（ＶＨ）鎖Ｄ遺伝子（配列番号１７４）；および最後に、最も近いマウス生殖細胞系列配列ＩＧＨＪ４＊０１（配列番号１７７）とのＤＣ８Ｅ８の可変重（ＶＨ）鎖Ｊ遺伝子（配列番号１７６）。ＤＣ８Ｅ８カッパー軽鎖定常領域の配列（配列番号１７８）（Ｇ）および重鎖定常領域の配列（配列番号１７９）（Ｈ）も示されている。タンパク質配列（Ｂ）および（Ｅ）では相補性決定領域（ＣＤＲ）に下線が引かれており、それは、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って特定された。

【００８４】
【図４】ＤＣ８Ｅ８可変軽（ＶＬ）鎖配列（それぞれ配列番号１６６（Ｖ遺伝子）および１６８（Ｊ遺伝子））と最も近いヒト生殖細胞系列ＶＬ遺伝子（掲載順にそれぞれ配列番号１８０～１８１）とのアラインメント。
【００８５】
【図５－１】ＤＣ８Ｅ８可変重（ＶＨ）鎖配列（Ｖ、ＤおよびＪ遺伝子に対してそれぞれ配列番号１７２、１７４および１７６）と最も近いヒト生殖細胞系列ＶＨ遺伝子（掲載順にそれぞれ配列番号１８２～１８３および１８５）とのアラインメント。
【図５－２】ＤＣ８Ｅ８可変重（ＶＨ）鎖配列（Ｖ、ＤおよびＪ遺伝子に対してそれぞれ配列番号１７２、１７４および１７６）と最も近いヒト生殖細胞系列ＶＨ遺伝子（掲載順にそれぞれ配列番号１８２～１８３および１８５）とのアラインメント。
【００８６】
【図６Ａ】ＥＬＩＳＡを使用したタウ欠失変異体によるＤＣ８Ｅ８のエピトープマッピング。（Ａ）ＤＣ８Ｅ８エピトープマッピングのために使用されたタウタンパク質の概略図および（Ｂ）それらのアミノ酸配列（掲載順にそれぞれ配列番号１８６～１９７、１０２、１０４および１９８～１９９）。（Ｃ）ＥＬＩＳＡの読取値。ＤＣ８Ｅ８は、以下のタウタンパク質を認識する：Δ３５８－４４１、Δ４２１－４４１、Δ１３４－１６８、Δ１－２２０、Δ１－１２６、２Ｎ４Ｒ、２Ｎ３Ｒ、Δ（１－２９６；３９２－４４１）およびΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ。ＤＣ８Ｅ８は、以下のタウタンパク質を認識しない：Δ２２２－４２７、Δ３０６－４００、Δ２２８－４４１、Δ３００－３１２、Δ２５７－４００、Δ１３７－４４１、Δ２８３－４４１。
【図６Ｂ－１】ＥＬＩＳＡを使用したタウ欠失変異体によるＤＣ８Ｅ８のエピトープマッピング。（Ａ）ＤＣ８Ｅ８エピトープマッピングのために使用されたタウタンパク質の概略図および（Ｂ）それらのアミノ酸配列（掲載順にそれぞれ配列番号１８６～１９７、１０２、１０４および１９８～１９９）。（Ｃ）ＥＬＩＳＡの読取値。ＤＣ８Ｅ８は、以下のタウタンパク質を認識する：Δ３５８－４４１、Δ４２１－４４１、Δ１３４－１６８、Δ１－２２０、Δ１－１２６、２Ｎ４Ｒ、２Ｎ３Ｒ、Δ（１－２９６；３９２－４４１）およびΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ。ＤＣ８Ｅ８は、以下のタウタンパク質を認識しない：Δ２２２－４２７、Δ３０６－４００、Δ２２８－４４１、Δ３００－３１２、Δ２５７－４００、Δ１３７－４４１、Δ２８３－４４１。
【図６Ｂ－２】ＥＬＩＳＡを使用したタウ欠失変異体によるＤＣ８Ｅ８のエピトープマッピング。（Ａ）ＤＣ８Ｅ８エピトープマッピングのために使用されたタウタンパク質の概略図および（Ｂ）それらのアミノ酸配列（掲載順にそれぞれ配列番号１８６～１９７、１０２、１０４および１９８～１９９）。（Ｃ）ＥＬＩＳＡの読取値。ＤＣ８Ｅ８は、以下のタウタンパク質を認識する：Δ３５８－４４１、Δ４２１－４４１、Δ１３４－１６８、Δ１－２２０、Δ１－１２６、２Ｎ４Ｒ、２Ｎ３Ｒ、Δ（１－２９６；３９２－４４１）およびΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ。ＤＣ８Ｅ８は、以下のタウタンパク質を認識しない：Δ２２２－４２７、Δ３０６－４００、Δ２２８－４４１、Δ３００－３１２、Δ２５７－４００、Δ１３７－４４１、Δ２８３－４４１。
【図６Ｂ－３】ＥＬＩＳＡを使用したタウ欠失変異体によるＤＣ８Ｅ８のエピトープマッピング。（Ａ）ＤＣ８Ｅ８エピトープマッピングのために使用されたタウタンパク質の概略図および（Ｂ）それらのアミノ酸配列（掲載順にそれぞれ配列番号１８６～１９７、１０２、１０４および１９８～１９９）。（Ｃ）ＥＬＩＳＡの読取値。ＤＣ８Ｅ８は、以下のタウタンパク質を認識する：Δ３５８－４４１、Δ４２１－４４１、Δ１３４－１６８、Δ１－２２０、Δ１－１２６、２Ｎ４Ｒ、２Ｎ３Ｒ、Δ（１－２９６；３９２－４４１）およびΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ。ＤＣ８Ｅ８は、以下のタウタンパク質を認識しない：Δ２２２－４２７、Δ３０６－４００、Δ２２８－４４１、Δ３００－３１２、Δ２５７－４００、Δ１３７－４４１、Δ２８３－４４１。
【図６Ｃ】ＥＬＩＳＡを使用したタウ欠失変異体によるＤＣ８Ｅ８のエピトープマッピング。（Ａ）ＤＣ８Ｅ８エピトープマッピングのために使用されたタウタンパク質の概略図

および（Ｂ）それらのアミノ酸配列（掲載順にそれぞれ配列番号１８６～１９７、１０２、１０４および１９８～１９９）。（Ｃ）ＥＬＩＳＡの読取値。ＤＣ８Ｅ８は、以下のタウタンパク質を認識する：Δ３５８－４４１、Δ４２１－４４１、Δ１３４－１６８、Δ１－２２０、Δ１－１２６、２Ｎ４Ｒ、２Ｎ３Ｒ、Δ（１－２９６；３９２－４４１）およびΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ。ＤＣ８Ｅ８は、以下のタウタンパク質を認識しない：Δ２２２－４２７、Δ３０６－４００、Δ２２８－４４１、Δ３００－３１２、Δ２５７－４００、Δ１３７－４４１、Δ２８３－４４１。

【００８７】

【図７Ａ】（Ａ）および（Ｂ）それぞれ、エピトープマッピング用の合成ペプチド（掲載順にそれぞれ配列番号２０６、２０７、２０８、２、２１０、２１１、２１２、３、２１４、２１５、４、２１７、２６、２１９、３６、２２１、２２２、１０９および８８）の概略図およびそれらの配列。（Ｃ）合成ペプチドを用いたＥＬＩＳＡによるＤＣ８Ｅ８のエピトープマッピング。（Ｄ）ＤＣ８Ｅ８が結合することができる、タウ内のエピトープの概略図。ＤＣ８Ｅ８は、４つの別個の結合領域（それらの各々は、エピトープ１から４という名称の別個のエピトープである）のいずれか１つに結合することができる。その４つのエピトープの各々は、タンパク質タウの第１（エピトープ＃１）、第２（エピトープ＃２）、第３（エピトープ＃３）および第４（エピトープ＃４）リピートドメイン内に別々に位置する。示されているように、その４つのＤＣ８Ｅ８エピトープの各々は、それぞれ以下のアミノ酸配列の各々の１つの中に包含される：それぞれ、２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号９８）（タウタンパク質の第１リピートドメイン内）、２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号９９）（タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号１００）（タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１０１）（タウタンパク質の第４リピートドメイン内）。

【図７Ｂ】（Ａ）および（Ｂ）それぞれ、エピトープマッピング用の合成ペプチド（掲載順にそれぞれ配列番号２０６、２０７、２０８、２、２１０、２１１、２１２、３、２１４、２１５、４、２１７、２６、２１９、３６、２２１、２２２、１０９および８８）の概略図およびそれらの配列。（Ｃ）合成ペプチドを用いたＥＬＩＳＡによるＤＣ８Ｅ８のエピトープマッピング。（Ｄ）ＤＣ８Ｅ８が結合することができる、タウ内のエピトープの概略図。ＤＣ８Ｅ８は、４つの別個の結合領域（それらの各々は、エピトープ１から４という名称の別個のエピトープである）のいずれか１つに結合することができる。その４つのエピトープの各々は、タンパク質タウの第１（エピトープ＃１）、第２（エピトープ＃２）、第３（エピトープ＃３）および第４（エピトープ＃４）リピートドメイン内に別々に位置する。示されているように、その４つのＤＣ８Ｅ８エピトープの各々は、それぞれ以下のアミノ酸配列の各々の１つの中に包含される：それぞれ、２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号９８）（タウタンパク質の第１リピートドメイン内）、２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号９９）（タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号１００）（タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１０１）（タウタンパク質の第４リピートドメイン内）。

【図７Ｃ】（Ａ）および（Ｂ）それぞれ、エピトープマッピング用の合成ペプチド（掲載順にそれぞれ配列番号２０６、２０７、２０８、２、２１０、２１１、２１２、３、２１４、２１５、４、２１７、２６、２１９、３６、２２１、２２２、１０９および８８）の概略図およびそれらの配列。（Ｃ）合成ペプチドを用いたＥＬＩＳＡによるＤＣ８Ｅ８のエピトープマッピング。（Ｄ）ＤＣ８Ｅ８が結合することができる、タウ内のエピトープの概略図。ＤＣ８Ｅ８は、４つの別個の結合領域（それらの各々は、エピトープ１から４という名称の別個のエピトープである）のいずれか１つに結合することができる。その４つのエピトープの各々は、タンパク質タウの第１（エピトープ＃１）、第２（エピトープ＃２）、第３（エピトープ＃３）および第４（エピトープ＃４）リピートドメイン内に別々に位置する。示されているように、その４つのＤＣ８Ｅ８エピトープの各々は、それぞ

れ以下のアミノ酸配列の各々の１つの中に包含される：それぞれ、２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号９８）（タウタンパク質の第１リピートドメイン内）、２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号９９）（タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号１００）（タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１０１）（タウタンパク質の第４リピートドメイン内）。

【図７Ｄ】（Ａ）および（Ｂ）それぞれ、エピトープマッピング用の合成ペプチド（掲載順にそれぞれ配列番号２０６、２０７、２０８、２、２１０、２１１、２１２、３、２１４、２１５、４、２１７、２６、２１９、３６、２２１、２２２、１０９および８８）の概略図およびそれらの配列。（Ｃ）合成ペプチドを用いたＥＬＩＳＡによるＤＣ８Ｅ８のエピトープマッピング。（Ｄ）ＤＣ８Ｅ８が結合することができる、タウ内のエピトープの概略図。ＤＣ８Ｅ８は、４つの別個の結合領域（それらの各々は、エピトープ１から４という名称の別個のエピトープである）のいずれか１つに結合することができる。その４つのエピトープの各々は、タンパク質タウの第１（エピトープ＃１）、第２（エピトープ＃２）、第３（エピトープ＃３）および第４（エピトープ＃４）リピートドメイン内に別々に位置する。示されているように、その４つのＤＣ８Ｅ８エピトープの各々は、それぞれ以下のアミノ酸配列の各々の１つの中に包含される：それぞれ、２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号９８）（タウタンパク質の第１リピートドメイン内）、２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号９９）（タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号１００）（タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１０１）（タウタンパク質の第４リピートドメイン内）。

【００８８】

【図８Ａ】（Ａ）ヒトタウアミノ酸配列（配列番号２２５）と他の種由来のタウタンパク質配列（掲載順にそれぞれ配列番号２２６～２４５）とのアラインメント。完全長のヒトタウタンパク質をアラインメントのために使用した；そのアラインメントからヒトタウのアミノ酸２６５～３６８だけが示されている。ヒトタウ上の４つの別個のＤＣ８Ｅ８エピトープを含む領域およびアラインメントされた配列を四角で囲んでおり、太字で示している。（Ｂ）６つのタウペプチド（掲載順にそれぞれ配列番号２０１～２０５および２００）が抗体ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ（配列番号１９９）と競合する能力を示している競合ＥＬＩＳＡ。（Ｃ）７つのタウペプチド（配列番号１４４、１４６、１４９、１５１、１５９、１６１および１７１）が、タウ－タウ凝集に関わるタウエピトープの少なくとも１つを認識するタウ－タウ凝集に関わるタウエピトープの少なくとも１つを認識することができる抗体ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと競合する能力を示している競合ＥＬＩＳＡ。

【図８Ｂ】（Ａ）ヒトタウアミノ酸配列（配列番号２２５）と他の種由来のタウタンパク質配列（掲載順にそれぞれ配列番号２２６～２４５）とのアラインメント。完全長のヒトタウタンパク質をアラインメントのために使用した；そのアラインメントからヒトタウのアミノ酸２６５～３６８だけが示されている。ヒトタウ上の４つの別個のＤＣ８Ｅ８エピトープを含む領域およびアラインメントされた配列を四角で囲んでおり、太字で示している。（Ｂ）６つのタウペプチド（掲載順にそれぞれ配列番号２０１～２０５および２００）が抗体ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ（配列番号１９９）と競合する能力を示している競合ＥＬＩＳＡ。（Ｃ）７つのタウペプチド（配列番号１４４、１４６、１４９、１５１、１５９、１６１および１７１）が、タウ－タウ凝集に関わるタウエピトープの少なくとも１つを認識するタウ－タウ凝集に関わるタウエピトープの少なくとも１つを認識することができる抗体ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと競合する能力を示している競合ＥＬＩＳＡ。

【図８Ｃ】（Ａ）ヒトタウアミノ酸配列（配列番号２２５）と他の種由来のタウタンパク

質配列（掲載順にそれぞれ配列番号２２６～２４５）とのアラインメント。完全長のヒトタウタンパク質をアラインメントのために使用した；そのアラインメントからヒトタウのアミノ酸２６５～３６８だけが示されている。ヒトタウ上の４つの別個のＤＣ８Ｅ８エピトープを含む領域およびアラインメントされた配列を四角で囲んでおり、太字で示している。（Ｂ）６つのタウペプチド（掲載順にそれぞれ配列番号２０１～２０５および２００）が抗体ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ（配列番号１９９）と競合する能力を示している競合ＥＬＩＳＡ。（Ｃ）７つのタウペプチド（配列番号１４４、１４６、１４９、１５１、１５９、１６１および１７１）が、タウ－タウ凝集に関わるタウエピトープの少なくとも１つを認識するタウ－タウ凝集に関わるタウエピトープの少なくとも１つを認識することができる抗体ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと競合する能力を示している競合ＥＬＩＳＡ。

【００８９】

【図９Ａ】（Ａ）タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよび２Ｎ４ＲへのＤＣ８Ｅ８の結合を特徴付ける表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）。（Ｂ）タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒおよび２Ｎ３ＲへのＤＣ８Ｅ８の結合を特徴付ける表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）。

【図９Ｂ】（Ａ）タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよび２Ｎ４ＲへのＤＣ８Ｅ８の結合を特徴付ける表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）。（Ｂ）タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒおよび２Ｎ３ＲへのＤＣ８Ｅ８の結合を特徴付ける表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）。

【００９０】

【図１０Ａ】（Ａ）ＳＰＲによって測定された、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよびタウ２Ｎ４ＲへのＤＣ８Ｅ８の結合の会合速度および解離速度。（Ｂ）ＳＰＲによって測定された、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒおよびタウ２Ｎ３ＲへのＤＣ８Ｅ８の結合の会合速度および解離速度。その測定において使用された濃度は、プロットに示されており、動態パラメータの計算のために、測定されたデータからコンピュータプログラムＢＩＡ評価ソフトウェア４．１（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ）によって破線が内挿された。

【図１０Ｂ】（Ａ）ＳＰＲによって測定された、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよびタウ２Ｎ４ＲへのＤＣ８Ｅ８の結合の会合速度および解離速度。（Ｂ）ＳＰＲによって測定された、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒおよびタウ２Ｎ３ＲへのＤＣ８Ｅ８の結合の会合速度および解離速度。その測定において使用された濃度は、プロットに示されており、動態パラメータの計算のために、測定されたデータからコンピュータプログラムＢＩＡ評価ソフトウェア４．１（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ）によって破線が内挿された。

【００９１】

【図１１－１】モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８は、前臨床ＡＤと臨床的に初発のＡＤと完全に発症した最終段階のＡＤとを区別することができる。ＤＣ８Ｅ８は、ヒト前臨床ＡＤ－ＢｒａａｋステージＩにおける初期の段階（タウ単量体、二量体）の病理学的タウの染色を示す（Ａ）。その抗体は、病理学的タウオリゴマーの段階（矢印）および病理学的タウポリマー（濃縮体）の段階（矢頭）を認識する（Ｂ）。完全に発症したアルツハイマー病（最終段階－ＢｒａａｋステージＶＩ）において、ＤＣ８Ｅ８は、主に、神経原線維変化の形態の病理学的タウポリマー（矢頭）、老人斑（円の中）および糸屑状構造物（ｎｅｕｒｉｔｉｃ　ｔｈｒｅａｄｓ）（五角形の中）を認識する（Ｃ）。スケールバー：１００μｍ。モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８は、アルツハイマー病におけるすべての発症段階の濃縮体形成を認識する（Ｄ）。ＤＣ８Ｅ８は、初期発症段階の濃縮体形成－単量体、二量体および初期オリゴマー段階（Ｄ１）ならびに後期オリゴマープレ濃縮体段階（Ｄ２）、ならびに後期発症段階の病理学的タウポリマー－細胞内の神経原線維変化（Ｄ３）および細胞外の神経原線維変化（Ｄ４）を認識する。矢頭は、錐体海馬（ｐｙｒａｍｉｄａｌ

ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ）ニューロンの内部の小さいオリゴマータウ凝集体を指し示している（Ｄ１）。スケールバー：１０μｍ
【図１１－２】モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８は、前臨床ＡＤと臨床的に初発のＡＤと完全に発症した最終段階のＡＤとを区別することができる。ＤＣ８Ｅ８は、ヒト前臨床ＡＤ－ＢｒａａｋステージＩにおける初期の段階（タウ単量体、二量体）の病理学的タウの染色を示す（Ａ）。その抗体は、病理学的タウオリゴマーの段階（矢印）および病理学的タウポリマー（濃縮体）の段階（矢頭）を認識する（Ｂ）。完全に発症したアルツハイマー病（最終段階－ＢｒａａｋステージＶＩ）において、ＤＣ８Ｅ８は、主に、神経原線維変化の形態の病理学的タウポリマー（矢頭）、老人斑（円の中）および糸屑状構造物（ｎｅｕｒｉｔｉｃ　ｔｈｒｅａｄｓ）（五角形の中）を認識する（Ｃ）。スケールバー：１００μｍ。モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８は、アルツハイマー病におけるすべての発症段階の濃縮体形成を認識する（Ｄ）。ＤＣ８Ｅ８は、初期発症段階の濃縮体形成－単量体、二量体および初期オリゴマー段階（Ｄ１）ならびに後期オリゴマープレ濃縮体段階（Ｄ２）、ならびに後期発症段階の病理学的タウポリマー－細胞内の神経原線維変化（Ｄ３）および細胞外の神経原線維変化（Ｄ４）を認識する。矢頭は、錐体海馬（ｐｙｒａｍｉｄａｌ　ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ）ニューロンの内部の小さいオリゴマータウ凝集体を指し示している（Ｄ１）。スケールバー：１０μｍ
【００９２】
【図１２－１】（Ａ）モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８は、トランスジェニックラットＳＨＲ７２において神経原線維変性を認識する。ＤＣ８Ｅ８は、タウオリゴマー段階（矢印）および濃縮体段階（矢頭）のタウ神経変性を認識する。さらに、その抗体は、軸索線維（長方形の内部）に位置するミスフォールドされたタウと反応する。（Ｂ）同齢のコントロールラット脳において、その抗体は、神経細胞内染色を示さない。スケールバー：２０μｍ。ＤＣ８Ｅ８は、ヒトアルツハイマー病におけるように、トランスジェニックラット脳（ＳＨＲ７２）において、すべての発症段階の濃縮体形成も認識する。ＤＣ８Ｅ８は、初期発症段階の濃縮体形成－単量体、二量体および初期オリゴマー段階（Ｃ）ならびに後期オリゴマープレ濃縮体段階（Ｄ）、ならびに後期発症段階の病理学的タウポリマー－細胞内の神経原線維変化（Ｅ）および細胞外の神経原線維変化（核を欠損）（Ｆ）を認識する。（Ｃ）における矢頭は、ニューロン（Ａ）内の小さなオリゴマータウ凝集体を指し示している。スケールバー：１０μｍ
【図１２－２】（Ａ）モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８は、トランスジェニックラットＳＨＲ７２において神経原線維変性を認識する。ＤＣ８Ｅ８は、タウオリゴマー段階（矢印）および濃縮体段階（矢頭）のタウ神経変性を認識する。さらに、その抗体は、軸索線維（長方形の内部）に位置するミスフォールドされたタウと反応する。（Ｂ）同齢のコントロールラット脳において、その抗体は、神経細胞内染色を示さない。スケールバー：２０μｍ。ＤＣ８Ｅ８は、ヒトアルツハイマー病におけるように、トランスジェニックラット脳（ＳＨＲ７２）において、すべての発症段階の濃縮体形成も認識する。ＤＣ８Ｅ８は、初期発症段階の濃縮体形成－単量体、二量体および初期オリゴマー段階（Ｃ）ならびに後期オリゴマープレ濃縮体段階（Ｄ）、ならびに後期発症段階の病理学的タウポリマー－細胞内の神経原線維変化（Ｅ）および細胞外の神経原線維変化（核を欠損）（Ｆ）を認識する。（Ｃ）における矢頭は、ニューロン（Ａ）内の小さなオリゴマータウ凝集体を指し示している。スケールバー：１０μｍ
【００９３】
【図１３】（Ａ）タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒを発現するＳＨＲ２４トランスジェニックラットの皮質における神経原線維変化のＤＣ８Ｅ８染色。（Ｂ）ＤＣ８Ｅ８は、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを発現するトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳幹における神経原線維変化を認識した。組織切片をメチルグリーンで対比染色した。矢印－神経原線維変化。スケールバー：５０μｍ
【００９４】
【図１４－１】モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８は、トランスジェニックラットモデルＳＨ

Ｒ２４（等皮質）およびアルツハイマー病患者（海馬、嗅内および側頭皮質を含む不等皮質組織）から単離された脳サンプル中の可溶性タウタンパク質（Ａ）と不溶性タウタンパク質（Ｂ）の両方を認識する。矢頭－ヒト切断型タウ、矢印－ラット内在性タウ。可溶性タウ画分の場合、１レーンあたり１５μｇのタンパク質を充填した。不溶性タウ画分の場合、ペレットを、１Ｓの１／５０体積の１×ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）サンプルローディング緩衝液に溶解し、可溶性画分の場合と同じ体積を充填した。モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８は、アルツハイマー病患者（海馬、嗅内皮質および側頭皮質を含む不等皮質組織）（Ｃ）およびトランスジェニックラットモデルＳＨＲ７２（脳幹）（Ｄ）から単離された脳サンプル中の可溶性タウタンパク質と不溶性タウタンパク質の両方を認識する。矢印－生理学的ヒトタウタンパク質（Ａ）およびラット内在性タウ（Ｂ）、矢頭－ＳＨＲ７２ラットのニューロンにおいて導入遺伝子として発現されたヒト切断型タウ（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）（Ｄ）。可溶性タウ画分の場合、１レーンあたり１５μｇの総タンパク質を充填した。不溶性タウ画分の場合、ペレットを、１Ｓの１／５０体積の１×ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）サンプルローディング緩衝液に溶解し、可溶性画分の場合と同じ体積を充填した。

【図１４－２】モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８は、トランスジェニックラットモデルＳＨＲ２４（等皮質）およびアルツハイマー病患者（海馬、嗅内および側頭皮質を含む不等皮質組織）から単離された脳サンプル中の可溶性タウタンパク質（Ａ）と不溶性タウタンパク質（Ｂ）の両方を認識する。矢頭－ヒト切断型タウ、矢印－ラット内在性タウ。可溶性タウ画分の場合、１レーンあたり１５μｇのタンパク質を充填した。不溶性タウ画分の場合、ペレットを、１Ｓの１／５０体積の１×ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）サンプルローディング緩衝液に溶解し、可溶性画分の場合と同じ体積を充填した。モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８は、アルツハイマー病患者（海馬、嗅内皮質および側頭皮質を含む不等皮質組織）（Ｃ）およびトランスジェニックラットモデルＳＨＲ７２（脳幹）（Ｄ）から単離された脳サンプル中の可溶性タウタンパク質と不溶性タウタンパク質の両方を認識する。矢印－生理学的ヒトタウタンパク質（Ａ）およびラット内在性タウ（Ｂ）、矢頭－ＳＨＲ７２ラットのニューロンにおいて導入遺伝子として発現されたヒト切断型タウ（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）（Ｄ）。可溶性タウ画分の場合、１レーンあたり１５μｇの総タンパク質を充填した。不溶性タウ画分の場合、ペレットを、１Ｓの１／５０体積の１×ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）サンプルローディング緩衝液に溶解し、可溶性画分の場合と同じ体積を充填した。

【００９５】

【図１５】ＤＣ８Ｅ８は、蛍光ベースのタウ線維化アッセイにおいて病理学的タウ－タウ相互作用を阻害する。チオフラビンＴ蛍光によって測定されるとき、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ（図１５Ａ）またはタウΔ（１－２９６；３９２－４４１）／４Ｒ（図１５Ｂ）を、コンフォーメーション変化を起こすようにおよび線維化する（ｆｉｂｒｉｌｉｚｅ）ようにヘパリンによって誘導した；病理学的なコンフォーメーションの変化を妨げる能力についてｍＡｂ　ＤＣ８Ｅ８、Ｒａｂ５０およびＤＣ１１を試験した。

【００９６】

【図１６】ＨＲＰ結合体化ｍＡｂ　ＤＣ２５を使用した免疫ブロット法による、切断型タウタンパク質タウΔ（１－２９６；３９２－４４１）／４Ｒによるタウ二量体、三量体およびオリゴマーの形成を妨げるＤＣ８Ｅ８の阻害性の能力の解析。

【００９７】

【図１７Ａ】ミクログリアＢＶ２細胞によるタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒの取り込みおよび分解。タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを、マウスＢＶ２細胞に単独で（１μＭ）またはモノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８と組み合わせて（１μＭタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ＋１μＭ　ＤＣ８Ｅ８）加えた。様々な長さの時間（２、４、６および１２時間）にわたるインキュベーションの後、ＢＶ２細胞を酸洗浄し、細胞タンパク質を抽出し、内部移行されたタウのレベルを、ｐａｎ－タウ抗体ＤＣ２５を用いたウエスタンブロッティングによって解析した。タウΔ（１－１５０；３

９２－４４１）／４Ｒを、細胞溶解産物（細胞内タウ）（Ａ）および細胞培養培地（細胞外タウ）（Ｂ）において免疫標識した。ＤＣ８Ｅ８抗体を、抗マウスＨＲＰ結合体化抗体を用いて可視化した。１レーンあたり２０μｇのタンパク質を充填した。
【図１７Ｂ】ミクログリアＢＶ２細胞によるタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒの取り込みおよび分解。タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを、マウスＢＶ２細胞に単独で（１μＭ）またはモノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８と組み合わせて（１μＭタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ＋１μＭ　ＤＣ８Ｅ８）加えた。様々な長さの時間（２、４、６および１２時間）にわたるインキュベーションの後、ＢＶ２細胞を酸洗浄し、細胞タンパク質を抽出し、内部移行されたタウのレベルを、ｐａｎ－タウ抗体ＤＣ２５を用いたウエスタンブロッティングによって解析した。タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを、細胞溶解産物（細胞内タウ）（Ａ）および細胞培養培地（細胞外タウ）（Ｂ）において免疫標識した。ＤＣ８Ｅ８抗体を、抗マウスＨＲＰ結合体化抗体を用いて可視化した。１レーンあたり２０μｇのタンパク質を充填した。
【００９８】
【図１８】ＥＬＩＳＡによって試験されたときの、３７℃におけるＤＣ８Ｅ８の安定性（保管寿命）。その抗体は、数ヶ月（１、２、３および４ヶ月）の保管の後に、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを認識した。バーは、記載のとおりの抗体の段階希釈を表している。測定は、３つ組で行われた。
【００９９】
【図１９】ＤＣ８Ｅ８は、ヒトアルツハイマー病の脳組織におけるミスフォールドされた（疾患）タウを認識し、標的化する。（Ａ）ｐａｎ－タウＤＣ２５抗体を用いたウエスタンブロット解析：１）ヒトアルツハイマー病の脳組織からの病理学的タウの生化学的抽出（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇ　ａｎｄ　Ｄａｖｉｅｓ，１９８９）；２）Ｍｏｃｋ抗体（Ｒａｂ５０）は、タウを認識しない；３）ＤＣ８Ｅ８は、ヒトアルツハイマー病の脳組織におけるミスフォールドされた（疾患）タウを認識し、標的化する；および（Ｂ）ポンソーＳ染色：２）、３）実験において使用された抗体量のコントロール（Ｒａｂ５０およびＤＣ８Ｅ８）。
【０１００】
【図２０】ＤＣ８Ｅ８は、ＡＤのＳＨＲ７２ラットモデルの脳組織におけるミスフォールドされた（疾患）タウを認識し、標的化する。（Ａ）ｐａｎ－タウＤＣ２５抗体を用いたウエスタンブロット解析：４）ヒトアルツハイマー病の脳組織からの病理学的タウの生化学的抽出（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇ　ａｎｄ　Ｄａｖｉｅｓ，１９８９）；５）Ｍｏｃｋ抗体（Ｒａｂ５０）は、タウを認識しない；６）ＤＣ８Ｅ８は、ヒトアルツハイマー病の脳組織におけるミスフォールドされた（疾患）タウを認識し、標的化する；および（Ｂ）ポンソーＳ染色：２）、３）実験において使用された抗体量のコントロール（Ｒａｂ５０およびＤＣ８Ｅ８）。
【０１０１】
【図２１】インビボにおいて、ＤＣ８Ｅ８は、トランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）の脳における病理学的形態のタウを標的化し、脳から末梢血に病理学的タウを運搬する。（Ａ）ＤＣ８Ｅ８で処置された動物の血清中のＤＣ８Ｅ８抗体の濃度は、それぞれ４６６、２００および２７３μｇ／ｍｌに達した。（Ｂ）脳から末梢血へのＤＣ８Ｅ８－タウ複合体のインビボでの運搬が観察された。病理学的タウは、３５０ｐｇ／ｍｌ血清という平均濃度に達した。ＤＣ８Ｅ８によるタウの能動輸送は、脳から病理学的タウタンパク質を排除する。他方で、狂犬病ウイルスを認識する（Ｍａｃｉｋｏｖａら、１９９２）ｍｏｃｋ抗体（Ｒａｂ５０）で処置された動物の血清中においてタウタンパク質は検出されなかった。処置動物の血清中のタウの濃度は、Ｉｎｎｏｔｅｓｔ　ｈＴＡＵ　ＥＬＩＳＡ（Ｉｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）によって測定された。このグラフは、平均値の標準誤差（ＳＥＭ）とともに平均値を示している。ラットＡ～Ｃに対する８本のバーの各々は、異なる連続血清希釈（左から右へ１００倍から１２，８００倍）を示している。
【０１０２】

【図２２Ａ】ＤＣ８Ｅ８モノクローナル抗体は、トランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）の脳から病理学的タウを除去する。（Ａ）ＤＣ８Ｅ８の脳内適用（左パネル）は、ｍｏｃｋ処置動物（右パネル）と比較して、ニューロンから（矢印）病理学的タウを除去する。（Ｂ）ｍｏｃｋ処置動物およびＤＣ８Ｅ８処置動物のニューロンにおける病理学的タウの量の定量は、ＤＣ８Ｅ８で処置された動物における病理学的タウの量の激減を示した（ｐ＜０．０００１）。

【図２２Ｂ】ＤＣ８Ｅ８モノクローナル抗体は、トランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）の脳から病理学的タウを除去する。（Ａ）ＤＣ８Ｅ８の脳内適用（左パネル）は、ｍｏｃｋ処置動物（右パネル）と比較して、ニューロンから（矢印）病理学的タウを除去する。（Ｂ）ｍｏｃｋ処置動物およびＤＣ８Ｅ８処置動物のニューロンにおける病理学的タウの量の定量は、ＤＣ８Ｅ８で処置された動物における病理学的タウの量の激減を示した（ｐ＜０．０００１）。

【０１０３】

【図２３－１】細菌において発現されたモノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８の組換えｓｃＦｖフラグメント（ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ）は、病理学的な誤無秩序タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを認識する。（Ａ）１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離された、コントロールＢＬ２１細菌およびｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ発現プラスミドを内部に有する細菌の粗溶解産物のクマシーブリリアントブルー染色：レーン１、コントロールＢＬ２１細菌の粗溶解産物；レーン２、ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖを発現しているＢＬ２１細菌の粗溶解産物；およびレーンＭ、タンパク質分子量マーカー（Ｐａｇｅ　Ｒｕｌｌｅｒ　Ｐｒｅｓｔａｉｎｅｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｌａｄｄｅｒ＃ＳＭ０６７２，Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ。（Ｂ）タウタンパク質を含む、ポンソーＳで染色されたニトロセルロース膜：レーン１、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ、５００ｎｇ；レーン２、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ、２５０ｎｇ；レーン３、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ、１２５ｎｇ；レーン４、タウΔ２２８－４４１、５０ｎｇ；およびレーンＭ、タンパク質分子量マーカー。（Ｃ）ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖを発現している細菌由来の溶解産物を用いて検出された、Ｂ）におけるように充填されたタウタンパク質を含むウエスタンブロット／ニトロセルロース膜。（Ｄ）ネガティブコントロール細菌溶解産物を用いて像を得た、Ｂ）におけるように充填されたタウタンパク質を含むウエスタンブロット／ニトロセルロース膜。

【図２３－２】細菌において発現されたモノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８の組換えｓｃＦｖフラグメント（ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ）は、病理学的な誤無秩序タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを認識する。（Ａ）１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離された、コントロールＢＬ２１細菌およびｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ発現プラスミドを内部に有する細菌の粗溶解産物のクマシーブリリアントブルー染色：レーン１、コントロールＢＬ２１細菌の粗溶解産物；レーン２、ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖを発現しているＢＬ２１細菌の粗溶解産物；およびレーンＭ、タンパク質分子量マーカー（Ｐａｇｅ　Ｒｕｌｌｅｒ　Ｐｒｅｓｔａｉｎｅｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｌａｄｄｅｒ＃ＳＭ０６７２，Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ。（Ｂ）タウタンパク質を含む、ポンソーＳで染色されたニトロセルロース膜：レーン１、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ、５００ｎｇ；レーン２、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ、２５０ｎｇ；レーン３、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ、１２５ｎｇ；レーン４、タウΔ２２８－４４１、５０ｎｇ；およびレーンＭ、タンパク質分子量マーカー。（Ｃ）ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖを発現している細菌由来の溶解産物を用いて検出された、Ｂ）におけるように充填されたタウタンパク質を含むウエスタンブロット／ニトロセルロース膜。（Ｄ）ネガティブコントロール細菌溶解産物を用いて像を得た、Ｂ）におけるように充填されたタウタンパク質を含むウエスタンブロット／ニトロセルロース膜。

【０１０４】

【図２４】モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８の組換えｓｃＦｖフラグメント（ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ）は、ＤＣ８Ｅ８抗体（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを選択的に認

識する）に類似のタウ結合特性を示す。（Ａ）ＳＰＲによる、ＡＤタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒへのｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖの結合の動態親和性の測定。（Ｂ）ＳＰＲによる、タウ２Ｎ４Ｒへのｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖの結合の動態親和性の測定。（Ｃ）ｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖの結合についての速度定数（k_{ON}およびk_{OFF}）および会合平衡定数。

【０１０５】

【図２５Ａ】誤無秩序タウのｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ／ＤＣ８Ｅ８の認識に影響する、ｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ結合部位における残基の同定。（Ａ）ｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ発現プラスミド（ｗｔ）およびその変異体型を内部に有するＢＬ２１細菌の粗溶解産物由来のタンパク質の分離後のポリアクリルアミドゲルのクマシーブリリアントブルー染色。ナンバリングされた各レーンは、それぞれのクローン番号に対応する（例えば、レーン２は、２－ＶＬ－Ｒ３３Ａに対応する）。発現された一本鎖タンパク質が、星印によって指し示されている。コントロール細菌培養物は、一本鎖タンパク質を発現しない。（Ｂ）タウタンパク質を含む、ポンソーＳ染色されたニトロセルロース膜：レーン１、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ，５００ｎｇ；レーン２、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ，２５０ｎｇ；レーン３、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ，１２５ｎｇ。（Ｃ）ｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ（ｗｔゲル）またはその変異体型の１つ（ブロット１－ＶＬ－Ｎ３１Ａから２２－ＶＨ－Ｇ１０２Ａ）を発現している細菌由来の溶解産物を用いて検出された、Ｂ）におけるように充填されたタウタンパク質を含むニトロセルロース膜におけるウエスタンブロット。

【図２５Ｂ】誤無秩序タウのｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ／ＤＣ８Ｅ８の認識に影響する、ｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ結合部位における残基の同定。（Ａ）ｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ発現プラスミド（ｗｔ）およびその変異体型を内部に有するＢＬ２１細菌の粗溶解産物由来のタンパク質の分離後のポリアクリルアミドゲルのクマシーブリリアントブルー染色。ナンバリングされた各レーンは、それぞれのクローン番号に対応する（例えば、レーン２は、２－ＶＬ－Ｒ３３Ａに対応する）。発現された一本鎖タンパク質が、星印によって指し示されている。コントロール細菌培養物は、一本鎖タンパク質を発現しない。（Ｂ）タウタンパク質を含む、ポンソーＳ染色されたニトロセルロース膜：レーン１、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ，５００ｎｇ；レーン２、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ，２５０ｎｇ；レーン３、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ，１２５ｎｇ。（Ｃ）ｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ（ｗｔゲル）またはその変異体型の１つ（ブロット１－ＶＬ－Ｎ３１Ａから２２－ＶＨ－Ｇ１０２Ａ）を発現している細菌由来の溶解産物を用いて検出された、Ｂ）におけるように充填されたタウタンパク質を含むニトロセルロース膜におけるウエスタンブロット。

【図２５Ｃ】誤無秩序タウのｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ／ＤＣ８Ｅ８の認識に影響する、ｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ結合部位における残基の同定。（Ａ）ｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ発現プラスミド（ｗｔ）およびその変異体型を内部に有するＢＬ２１細菌の粗溶解産物由来のタンパク質の分離後のポリアクリルアミドゲルのクマシーブリリアントブルー染色。ナンバリングされた各レーンは、それぞれのクローン番号に対応する（例えば、レーン２は、２－ＶＬ－Ｒ３３Ａに対応する）。発現された一本鎖タンパク質が、星印によって指し示されている。コントロール細菌培養物は、一本鎖タンパク質を発現しない。（Ｂ）タウタンパク質を含む、ポンソーＳ染色されたニトロセルロース膜：レーン１、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ，５００ｎｇ；レーン２、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ，２５０ｎｇ；レーン３、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ，１２５ｎｇ。（Ｃ）ｓｃ ＤＣ８Ｅ８ｖ（ｗｔゲル）またはその変異体型の１つ（ブロット１－ＶＬ－Ｎ３１Ａから２２－ＶＨ－Ｇ１０２Ａ）を発現している細菌由来の溶解産物を用いて検出された、Ｂ）におけるように充填されたタウタンパク質を含むニトロセルロース膜におけるウエスタンブロット。

【０１０６】

【図２６Ａ】（Ａ）残基２６１～３７３（配列番号２４６）の拡大領域内の斜線の四角形に示されている４つのＤＣ８Ｅ８エピトープ：それぞれ配列番号９８～１０１を含むタウ

２Ｎ４Ｒ（配列番号１０２）の概略図。（１）能動ワクチンとして使用するためのまたはＤＣ８Ｅ８抗体などを精製するための、ＤＣ８Ｅ８抗体によって認識されるタウの４つの領域の少なくとも１つを含む一部重複しているタウ由来ペプチド免疫原の概略図；（２）自由選択の部分を含む、他の改変されたペプチドおよび化合物ならびにデザイナーペプチドおよび化合物に対する一般的な可能性。（Ｂ）ペプチド配列番号１～８および１０８で処置されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを発現する）の脳幹から調製された不溶性タウの免疫ブロット解析の要約。以下のＡＤ関連エピトープの不溶性タウの減少を測定するために、様々なｍＡｂを用いて免疫ブロット解析を行った：ｍＡｂ　ＤＣ２５（タウ３４７－３５３）、ｍＡｂ　ＤＣ２１７（タウｐＴｈｒ２１７）、ｍＡｂ　ＤＣ２０９（タウｐＴｈｒ２３１）、ｍＡｂ　ＡＴ８（タウｐＳｅｒ２０２／ｐＴｈｒ２０５）およびｍＡｂ　ＡＴ２７０（タウｐＴｈｒ１８１）。（Ｃ）アジュバントと組み合わせてタウ２５１－ＰＤＬＫＮＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫ－２８０（配列番号１）で処置されたラットの脳幹およびアジュバントだけで処置されたコントロールラットから調製された不溶性タウのデンシトメトリーによる免疫ブロット解析。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【図２６Ｂ】（Ａ）残基２６１～３７３（配列番号２４６）の拡大領域内の斜線の四角形に示されている４つのＤＣ８Ｅ８エピトープ：それぞれ配列番号９８～１０１を含むタウ２Ｎ４Ｒ（配列番号１０２）の概略図。（１）能動ワクチンとして使用するためのまたはＤＣ８Ｅ８抗体などを精製するための、ＤＣ８Ｅ８抗体によって認識されるタウの４つの領域の少なくとも１つを含む一部重複しているタウ由来ペプチド免疫原の概略図；（２）自由選択の部分を含む、他の改変されたペプチドおよび化合物ならびにデザイナーペプチドおよび化合物に対する一般的な可能性。（Ｂ）ペプチド配列番号１～８および１０８で処置されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを発現する）の脳幹から調製された不溶性タウの免疫ブロット解析の要約。以下のＡＤ関連エピトープの不溶性タウの減少を測定するために、様々なｍＡｂを用いて免疫ブロット解析を行った：ｍＡｂ　ＤＣ２５（タウ３４７－３５３）、ｍＡｂ　ＤＣ２１７（タウｐＴｈｒ２１７）、ｍＡｂ　ＤＣ２０９（タウｐＴｈｒ２３１）、ｍＡｂ　ＡＴ８（タウｐＳｅｒ２０２／ｐＴｈｒ２０５）およびｍＡｂ　ＡＴ２７０（タウｐＴｈｒ１８１）。（Ｃ）アジュバントと組み合わせてタウ２５１－ＰＤＬＫＮＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫ－２８０（配列番号１）で処置されたラットの脳幹およびアジュバントだけで処置されたコントロールラットから調製された不溶性タウのデンシトメトリーによる免疫ブロット解析。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【図２６Ｃ】（Ａ）残基２６１～３７３（配列番号２４６）の拡大領域内の斜線の四角形に示されている４つのＤＣ８Ｅ８エピトープ：それぞれ配列番号９８～１０１を含むタウ２Ｎ４Ｒ（配列番号１０２）の概略図。（１）能動ワクチンとして使用するためのまたはＤＣ８Ｅ８抗体などを精製するための、ＤＣ８Ｅ８抗体によって認識されるタウの４つの領域の少なくとも１つを含む一部重複しているタウ由来ペプチド免疫原の概略図；（２）自由選択の部分を含む、他の改変されたペプチドおよび化合物ならびにデザイナーペプチドおよび化合物に対する一般的な可能性。（Ｂ）ペプチド配列番号１～８および１０８で処置されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを発現する）の脳幹から調製された不溶性タウの免疫ブロット解析の要約。以下のＡＤ関連エピトープの不溶性タウの減少を測定するために、様々なｍＡｂを用いて免疫ブロット解析を行った：ｍＡｂ　ＤＣ２５（タウ３４７－３５３）、ｍＡｂ　ＤＣ２１７（タウｐＴｈｒ２１７）、ｍＡｂ　ＤＣ２０９（タウｐＴｈｒ２３１）、ｍＡｂ　ＡＴ８（タウｐＳｅｒ２０２／ｐＴｈｒ２０５）およびｍＡｂ　ＡＴ２７０（タウｐＴｈｒ１８１）。（Ｃ）アジュバントと組み合わせてタウ２５１－ＰＤＬＫＮＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫ－２８０（配列番号１）で処置されたラットの脳幹およびアジュバントだけで処置されたコントロールラットから調製された不溶性タウのデン

シトメトリーによる免疫ブロット解析。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【０１０７】

【図２７】タウ２５１－ＰＤＬＫＮＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫ－２８０（配列番号１）で処置された、ＡＤをモデル化しているトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）の神経行動学的評価。免疫原の５回目の投与の１０日後に、トランスジェニックラットを行動試験のために使用した。図は、平均値±ＳＥＭを表している。すべての統計データは、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーＵ検定を用いて得られた。（Ａ）梁歩行試験（３．５梁）。（Ｂ）後肢のスリップ回数（３．５梁）。（Ｃ）Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ。

【０１０８】

【図２８】タウペプチド配列番号１をトランスジェニックラットＳＨＲ７２にワクチン接種することによって、神経原線維変化（ＮＦＴ）の量が４９％減少した。抗体ＡＴ８を、トランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳組織におけるＮＦＴの評価のために使用した。

【０１０９】

【図２９】アジュバントとともにタウ２５６－ＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳ－２８５（配列番号２）で処置されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）またはアジュバントだけで処置されたコントロールラットの脳幹から調製された不溶性タウの定量的免疫ブロット解析。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【０１１０】

【図３０】タウ２５６－ＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳ－２８５（配列番号２）で処置されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）の神経行動学的評価。すべての統計データは、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーＵ検定を用いて得られた。（Ａ）梁歩行試験（３．５梁）。（Ｂ）後肢のスリップ回数（３．５梁）。（Ｃ）Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ。

【０１１１】

【図３１】タウペプチド配列番号２をトランスジェニックラットＳＨＲ７２にワクチン接種することによって、神経原線維変化（ＮＦＴ）の量が６０％減少した。抗体ＡＴ８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳組織におけるＮＦＴの評価のために使用した。

【０１１２】

【図３２】アジュバントとともにリン酸化Ｓｅｒ２６２を有するタウ２５６－ＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳ－２８５（配列番号２）で処置されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）またはアジュバントだけで処置されたコントロールラットの脳幹から調製された不溶性タウの定量的免疫ブロット解析。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【０１１３】

【図３３】タウペプチド配列番号２／ホスホをトランスジェニックラットＳＨＲ７２にワクチン接種することによって、神経原線維変化（ＮＦＴ）の量が７７％減少した。抗体ＡＴ８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳組織におけるＮＦＴの評価のために使用した。

【０１１４】

【図３４】アジュバントとともにタウ２５９－ＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱ－２８８（配列番号３）で処置されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）またはアジュバントだけで処置されたコントロールラットの脳幹から調製された不溶性タウの定量的免疫ブロット解析。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【０１１５】

【図３５】タウ２５９－ＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱ－２８８（配列番号３）で処置されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）の神経

行動学的評価。すべての統計データは、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーU検定を用いて得られた。（Ａ）梁歩行試験（３．５梁）。（Ｂ）後肢のスリップ回数（３．５梁）。（Ｃ）Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ。

【０１１６】

【図３６】タウペプチド配列番号３をトランスジェニックラットＳＨＲ７２にワクチン接種することによって、神経原線維変化（ＮＦＴ）の量が５８％減少した。抗体ＡＴ８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳組織におけるＮＦＴの評価のために使用した。

【０１１７】

【図３７】タウ２７５－ＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号４）で処置されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）またはアジュバントだけで処置されたコントロールラットの脳幹から調製された不溶性タウの定量的免疫ブロット解析。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【０１１８】

【図３８】タウペプチド配列番号４によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種は、神経行動学的パラメータの中程度の改善を示した。（Ａ）梁歩行試験（３．５ｃｍ梁）。（Ｂ）後肢のスリップ回数（３．５ｃｍ梁）。（Ｃ）Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ。データは、平均値の標準誤差を伴う平均値として提示されている。

【０１１９】

【図３９】タウペプチド配列番号４をトランスジェニックラットＳＨＲ７２にワクチン接種することによって、神経原線維変化（ＮＦＴ）の量が６６％減少した。抗体ＡＴ８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳組織におけるＮＦＴの評価のために使用した。

【０１２０】

【図４０】アジュバントとともに、２１７位にリン酸化トレオニンを有するタウ２０１－ＧＳＰＧＴＰＧＳＲＳＲＴＰＳＬＰＴＰＰＴ　ＲＥＰＫＫＶＡＶＶＲ－２３０（配列番号５）で免疫されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）、またはアジュバントだけで処置されたコントロールラットの脳幹から調製された不溶性タウの免疫ブロット解析。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【０１２１】

【図４１】２１７位にリン酸化トレオニンを有するタウ２０１－ＧＳＰＧＴＰＧＳＲＳＲＴＰＳＬＰＴＰＰＴＲＥＰＫＫＶＡＶＶＲ－２３０（配列番号５）で処置されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）の神経行動学的評価。すべての統計データは、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーU検定を用いて得られた。（Ａ）梁歩行試験（３．５梁）。（Ｂ）後肢のスリップ回数（３．５梁）。（Ｃ）Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ。

【０１２２】

【図４２】タウペプチド配列番号５によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種は、神経原線維変化（ＮＦＴ）の量に対する効果を示さなかった。抗体ＡＴ８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳組織におけるＮＦＴの評価のために使用した。

【０１２３】

【図４３】３９６位および４０４位にリン酸化セリン残基を有するタウ３７９－ＲＥＮＡＫＡＫＴＤＨＧＡＥＩＶＹＫＳＰＶＶ　ＳＧＤＴＳＰＲＨＬ－４０８（配列番号６）およびアジュバントで免疫されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）またはアジュバントだけで処置されたコントロールラットの脳幹から調製された不溶性タウの免疫ブロット解析。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【０１２４】

【図４４】Ｓｅｒ３９６／Ｓｅｒ４０４においてリン酸化されているタウ配列番号６で処置されたトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）の神経行動学的評価。すべての統計データは、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーU検定を用いて得られた。（Ａ）梁歩行試験（３．５梁）。（Ｂ）後肢のスリップ回数（３．５梁）。（Ｃ）Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ。

【０１２５】

【図４５】タウペプチド配列番号６によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種は、神経原線維変化（ＮＦＴ）の量の減少を示さなかった。抗体ＡＴ８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳組織におけるＮＦＴの評価のために使用した。

【０１２６】

【図４６】アジュバントとともに２０２位にリン酸化セリン残基および２０５位にトレオニン残基を有するタウ１８１－ＴＰＰＳＳＧＥＰＰＫＳＧＤＲＳＧＹＳＳＰＧＳＰＧＴＰＧＳＲＳ－２１０（配列番号７）で免疫されたラット（ＳＨＲ７２）またはアジュバントだけで処置されたコントロールラットの脳幹から調製された不溶性タウの免疫ブロット解析。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【０１２７】

【図４７】２０２位にリン酸化セリン残基および２０５位にトレオニン残基を有するタウ１８１－ＴＰＰＳＳＧＥＰＰＫＳＧＤＲＳＧＹＳＳＰＧＳＰＧＴＰＧＳＲＳ－２１０（配列番号７）で処置されたＳＨＲ７２ラットの神経行動学的評価。すべての統計データは、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーＵ検定を用いて得られた。（Ａ）梁歩行試験（３．５梁）。（Ｂ）後肢のスリップ回数（３．５梁）。（Ｃ）Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ。

【０１２８】

【図４８】タウペプチド配列番号７によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種は、神経原線維変化（ＮＦＴ）の量に対して効果を示さなかった。抗体ＡＴ８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳組織におけるＮＦＴの評価のために使用した。

【０１２９】

【図４９】アジュバントとともにタウ３００－ＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶＤＬＳＫ－３１７（配列番号８）で免疫されたラット（ＳＨＲ７２）またはアジュバントだけで処置されたコントロールラットの脳幹から調製された不溶性タウの免疫ブロット解析。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【０１３０】

【図５０】タウ３００－ＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶＤＬＳＫ－３１７（配列番号８）で処置されたトランスジェニックＡＤラット（ＳＨＲ７２）の神経行動学的評価。すべての統計データは、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーＵ検定を用いて得られた。（Ａ）梁歩行試験（３．５梁）。（Ｂ）後肢のスリップ回数（３．５梁）。（Ｃ）Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ。

【０１３１】

【図５１】タウペプチド配列番号８によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種は、神経原線維変化（ＮＦＴ）の量の減少を示さなかった。抗体ＡＴ８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳組織におけるＮＦＴの評価のために使用した。

【０１３２】

【図５２】タウペプチド（配列番号１０８）によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種は、不溶性の病理学的タウを統計学的に有意に減少させた（ｐ＜０．００１）。病理学的不溶性タウを、タウペプチドで免疫されたトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳から抽出し、免疫ブロット法によって解析した。平均値は、平均値の標準誤差とともに提示されている。

【０１３３】

【図５３】タウペプチド（配列番号１０８）によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種は、神経行動学的パラメータを統計学的に有意に改善した（ｐ＜０．０５）。（Ａ）梁歩行試験（３．５ｃｍ梁）。（Ｂ）後肢のスリップ回数（３．５ｃｍ梁）。（Ｃ）Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ。データは、平均値の標準誤差を伴う平均値として提示されている。

【０１３４】

【図５４】タウペプチド（配列番号１０８）をトランスジェニックラットＳＨＲ７２にワクチン接種することによって、神経原線維変化（ＮＦＴ）の量が６０％減少した。抗体ＡＴ８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳組織におけるＮＦＴの評価のために使用

した。
【０１３５】
【図５５】ペプチドタウ２７５－ＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号４）によるトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）の免疫から産生された抗血清のＥＬＩＳＡは、ヒト病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよびヒト生理学的タウ２Ｎ４Ｒに対する抗血清の結合の差を示す。
【０１３６】
【図５６】タウペプチド配列番号１０８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２にワクチン接種することによって、病理学的タウタンパク質に優先的に結合する抗体の形成が誘導された。ＥＬＩＳＡを用いて測定された幾何平均抗体価は、タウペプチド配列番号１０８のワクチン接種によって誘発された抗体が、免疫原（配列番号１０８ペプチド）および病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して最も高い結合活性を示したことを示している。コントロールとして使用された生理学的タウ（タウ２Ｎ４Ｒ）は、より弱く認識された。
【０１３７】
【図５７】タウペプチド配列番号１０８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２にワクチン接種することによって、病理学的タウに特異的なＩｇＧ抗体アイソタイプの形成が優先的に誘導された。タウペプチド配列番号１０８によって誘導された抗体のアイソタイププロファイルが示されている。個々のラット由来の血清を１：８００希釈し、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対する結合活性をＥＬＩＳＡによって解析した。
【０１３８】
【図５８】ヒトタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよびヒトタウ２Ｎ４Ｒへの結合についての、ペプチドタウ２７５－ＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号４）によるＳＨＲ７２ラットの免疫から産生された抗血清のＳＰＲ親和性測定。
【０１３９】
【図５９】タウ２７５－ＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号４）によるトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）の免疫から産生されたラット抗体を用いた、ヒトＡＤ患者由来の脳の免疫組織化学的染色。（Ａ）抗血清は、アルツハイマー病脳の海馬における神経原線維病変を認識した。（Ｂ）より高い拡大率は神経原線維変化を示した。スケールバー：１００μｍ（Ａ）、１０μｍ（Ｂ）。
【０１４０】
【図６０】タウペプチド配列番号１０８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２にワクチン接種することによって、ヒトアルツハイマー病脳組織由来の切片において病理学的タウタンパク質を認識する抗体が誘導された。ラット血清Ｎｏ．３（Ａ）、５（Ｂ）、６（Ｃ）、７（Ｄ）および８（Ｅ）の代表的な免疫染色は、試験されたすべてのラット血清抗体が、アルツハイマー病患者の嗅内皮質のＰｒｅ－α層における神経原線維変化を認識したことを示している。アジュバントのみで免疫されたラット由来のプールされた血清を、ネガティブコントロールとして使用した（Ｆ）。嗅内皮質由来の連続脳組織切片を使用した。スケールバー：５０μｍ。
【０１４１】
【図６１】タウペプチド配列番号１０８をトランスジェニックラットＳＨＲ７２にワクチン接種することによって、ヒトアルツハイマー病脳ならびにトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳における病理学的タウタンパク質を認識する特異的抗体が誘導された。病理学的タウを、ヒトおよびラット脳組織から抽出し、ペプチド配列番号１０８で免疫されたトランスジェニックラットＳＨＲ７２由来のプールされた血清を用いる免疫ブロット法によって解析した。その血清抗体は、ＡＤに特徴的なＡ６８病理学的タウを含む、単量体（レーンＮｏ．１、２およびＮｏ．３）およびオリゴマー（レーンＮｏ．２およびＮｏ．３）病理学的タウを認識した。

【０１４２】
【図６２】タウペプチド配列番号１０９でマウスを免疫することによって、生理学的タウ２Ｎ４Ｒよりも病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して統計学的に有意に高い結合活性を有する抗体が誘導された（ｐ＝０．０１１５）。このグラフは、１：８００希釈された個々の血清に対するＥＬＩＳＡの結果の統計学的評価を表している。平均値は、平均値の標準誤差とともに示されている。
【０１４３】
【図６３】タウペプチド配列番号１１０でマウスを免疫することによって、生理学的タウ２Ｎ４Ｒよりも病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して統計学的に有意に高い結合活性を示す抗体が誘導された（ｐ＝０．００２９）。このグラフは、１：８００希釈された個々の血清に対するＥＬＩＳＡの結果の統計学的評価を表している。平均値は、平均値の標準誤差とともに示されている。
【０１４４】
【図６４】タウペプチド配列番号１１１でマウスを免疫することによって、生理学的タウ２Ｎ４Ｒよりも病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して統計学的に有意に高い結合活性を示す抗体が誘導された（ｐ＝０．０００７）。このグラフは、１：８００希釈された個々の血清に対するＥＬＩＳＡの結果の統計学的評価を表している。平均値は、平均値の標準誤差とともに示されている。
【０１４５】
【図６５】タウペプチド配列番号１１２でマウスを免疫することによって、生理学的タウ２Ｎ４Ｒよりも病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して統計学的に有意に高い結合活性を示す抗体が誘導された（ｐ＜０．００１）。このグラフは、１：８００希釈された個々の血清に対するＥＬＩＳＡの結果の統計学的評価を表している。平均値は、平均値の標準誤差とともに示されている。
【０１４６】
【図６６】デザイナー治療用エピトープＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）およびＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）は、抗体ＤＣ８Ｅ８への結合について病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４Ｒと競合した。
【０１４７】
【図６７】デザイナー治療用エピトープＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）およびＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）は、ＥＬＩＳＡによってアッセイされたとき、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４Ｒと生理学的タウ２Ｎ４Ｒとを統計学的に有意に区別する抗体の産生を誘導した。ペプチド２５０および２５１の一方で免疫されたマウス由来の血清（１：３２００希釈）を、タウタンパク質：病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４Ｒおよび生理学的タウ２Ｎ４Ｒに特異的な抗体についてＥＬＩＳＡによって試験した。
【０１４８】
【図６８】デザイナー治療用エピトープＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）およびＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）で免疫することによって、ＩｇＧ１アイソタイプ抗体の最も堅調な産生が誘導された。
【０１４９】
【図６９Ａ】定量的ＳＰＲ（表面プラズモン共鳴）測定は、デザイナー治療用エピトープ１（ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５０）（図６９Ａ）およびデザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）（図６９Ｂ）によって誘導された抗体が、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと生理学的２Ｎ４Ｒタウとを統計学的に有意に（それぞれｐ＜０．００１およびｐ＜０．０１）区別したことを示している。
【図６９Ｂ】定量的ＳＰＲ（表面プラズモン共鳴）測定は、デザイナー治療用エピトープ１（ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５０）（図６９Ａ）およびデザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）（図６９Ｂ）によって誘導

された抗体が、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと生理学的２Ｎ４Ｒタウとを統計学的に有意に（それぞれｐ＜０．００１およびｐ＜０．０１）区別したことを示している。

【０１５０】

【図７０－１】デザイナー治療用エピトープ１（ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５０）およびデザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）に対して産生された血清を用いたヒトＡＤ病脳組織の免疫組織化学的染色。（Ａ）デザイナー治療用エピトープ１に対する抗血清は、ＡＤ患者の脳における神経原線維病理を認識した。（Ｃ）高拡大率の神経原線維変化および糸屑状構造物（矢印）。（Ｂ）デザイナー治療用エピトープ２に対する抗血清は、ＡＤ患者の脳における神経原線維病理を認識した。（Ｄ）高拡大率の染色された神経原線維変化および糸屑状構造物（矢印）。デザイナー治療用エピトープ１およびデザイナー治療用エピトープ２に対する抗血清は、コントロールヒト脳における正常タウを認識しなかった（Ｅ、Ｆ）。スケールバー：５０μｍ（Ａ、Ｂ、Ｅ、Ｆ）、２０μｍ（Ｃ、Ｄ）。（Ｇ）デザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）に対して産生された血清は、トランスジェニックラットＳＨＲ７２における神経原線維病変を認識する。（Ｈ）同齢のコントロールラット脳において、その抗体は、神経細胞内染色を示さない。その血清は、オリゴマープレ濃縮体段階（Ｉ）ならびに細胞内（Ｊ）を認識する。スケールバー：２０μｍ（Ａ、Ｂ）、１０μｍ（Ｃ、Ｄ）。

【図７０－２】デザイナー治療用エピトープ１（ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５０）およびデザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）に対して産生された血清を用いたヒトＡＤ病脳組織の免疫組織化学的染色。（Ａ）デザイナー治療用エピトープ１に対する抗血清は、ＡＤ患者の脳における神経原線維病理を認識した。（Ｃ）高拡大率の神経原線維変化および糸屑状構造物（矢印）。（Ｂ）デザイナー治療用エピトープ２に対する抗血清は、ＡＤ患者の脳における神経原線維病理を認識した。（Ｄ）高拡大率の染色された神経原線維変化および糸屑状構造物（矢印）。デザイナー治療用エピトープ１およびデザイナー治療用エピトープ２に対する抗血清は、コントロールヒト脳における正常タウを認識しなかった（Ｅ、Ｆ）。スケールバー：５０μｍ（Ａ、Ｂ、Ｅ、Ｆ）、２０μｍ（Ｃ、Ｄ）。（Ｇ）デザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）に対して産生された血清は、トランスジェニックラットＳＨＲ７２における神経原線維病変を認識する。（Ｈ）同齢のコントロールラット脳において、その抗体は、神経細胞内染色を示さない。その血清は、オリゴマープレ濃縮体段階（Ｉ）ならびに細胞内（Ｊ）を認識する。スケールバー：２０μｍ（Ａ、Ｂ）、１０μｍ（Ｃ、Ｄ）。

【０１５１】

【図７１】デザイナー治療用エピトープ１（ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５０）およびデザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）によって誘導された抗体は、ヒトアルツハイマー病脳組織から単離された可溶性およびサルコシル不溶性の病理学的タウを認識した。

【０１５２】

【図７２】デザイナー治療用エピトープ１（ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５０）およびデザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）によって誘導された抗体は、アルツハイマー病ラットモデル（ＳＨＲ７２）の脳から単離された可溶性（レーン１、３、５）および不溶性（レーン２、４、６）病理学的タウを認識した。

【０１５３】

【図７３】デザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）による免疫療法は、処置されたＳＨＲ７２ラットの神経行動学的パラメータ（Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ）の有意な改善を示した。（Ａ）梁歩行試験。（Ｂ）後肢のスリップ回数（ｐ＜０．０５）。（Ｃ）Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ。デザイナー治療用エピトープ２（配列番

号２５１）で処置されたラットは、アジュバントだけを投与されたトランスジェニックコントロールラットよりも、ａ）梁歩行試験における逃避潜時の２７％減少、ｂ）後肢のスリップ回数の４４％減少（ｐ＜０．０５）、およびｃ）Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアの２６％減少を示した。すべての統計データは、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーＵ検定を用いて得られた。

【０１５４】

【図７４】デザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）による免疫療法は、免疫されたアルツハイマートランスジェニックＳＨＲ７２ラットの脳における病理学的タウの統計学的に有意な減少を示した。免疫療法は、アジュバントだけを投与されたコントロールトランスジェニックラットと比べて、免疫された動物における病理学的不溶性タウの量を統計学的に有意に（ｐ＜０．０５）減少させた。病理学的不溶性タウの減少は、解析されたすべてのタウエピトープにおいて観察された（Ｐ＜０．０５）。

【０１５５】

【図７５Ａ】（Ａ）ＤＣ８Ｅ８の最小エピトープ（治療用コアユニット）のさらなる評価および免疫原性の効力の測定のために使用された合成ペプチドの概略図、ならびに（Ｂ）それらのアミノ酸配列。

【図７５Ｂ】（Ａ）ＤＣ８Ｅ８の最小エピトープ（治療用コアユニット）のさらなる評価および免疫原性の効力の測定のために使用された合成ペプチドの概略図、ならびに（Ｂ）それらのアミノ酸配列。

【０１５６】

【図７６】競合ＥＬＩＳＡによる、合成ペプチドを使用したＤＣ８Ｅ８最小エピトープ（治療用コアユニット）の測定。ＤＣ８Ｅ８認識配列の少なくとも６アミノ酸を含む１０個のタウペプチド（配列番号２７０、２７１、２７２、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１、２８２および２８３）は、抗体ＤＣ８Ｅ８への結合について病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと競合することができる。ＤＣ８Ｅ８認識配列の５アミノ酸のみを含むタウペプチド（配列番号２７３、２７４、２７８および２７９）は、抗体ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ（配列番号１９９）と競合しない。

【０１５７】

【図７７Ａ】タウペプチドでＣ５７ＢＬマウスを免疫した後の、タウ特異的抗体の誘導。（Ａ）１２－ｍｅｒ、７－ｍｅｒおよび６－ｍｅｒペプチド（それぞれ配列番号２７０、２７１および２７２）は免疫原性である。免疫によって誘導された抗体は、生理学的タウ２Ｎ４Ｒよりも病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して統計学的に有意に高い結合活性を示す（それぞれｐ＜０．００７９；ｐ＜０．００５２；ｐ＜０．００７９）。５－ｍｅｒペプチド配列番号２７３および２７４は、免疫原性でない。（Ｂ）４２－ｍｅｒ、１９－ｍｅｒ、７－ｍｅｒおよび６－ｍｅｒペプチド（それぞれ配列番号２７５、２８０、２７６および２７７）は、免疫原性である。これらのペプチドによって誘導された抗体は、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと生理学的タウ２Ｎ４Ｒとを統計学的に有意に（それぞれｐ＜０．００７９，ｐ＜０．０１５９，ｐ＜０．００７９およびｐ＜０．０３７９）区別した。５－ｍｅｒペプチド配列番号２７８および２７９は、免疫原性でない。（Ｃ）７－ｍｅｒペプチド（配列番号２８１および２８３）は、免疫原性である。これらのペプチドに対する抗血清は、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと生理学的タウ２Ｎ４Ｒとを統計学的に有意に（それぞれｐ＜０．０３７９およびｐ＜０．０２８６）区別した。６－ｍｅｒペプチド配列番号２８２によって誘導された、病理学的タウおよび生理学的タウに対する抗体のレベルは、非常に低かった。これらのグラフは、１：８００希釈された個々の血清に対するＥＬＩＳＡの結果の統計学的評価を表している。平均値は、平均値の標準誤差とともに示されている。

【図７７Ｂ】タウペプチドでＣ５７ＢＬマウスを免疫した後の、タウ特異的抗体の誘導。

（Ａ）１２－ｍｅｒ、７－ｍｅｒおよび６－ｍｅｒペプチド（それぞれ配列番号２７０、２７１および２７２）は免疫原性である。免疫によって誘導された抗体は、生理学的タウ２Ｎ４Ｒよりも病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して統計学的に有意に高い結合活性を示す（それぞれｐ＜０．００７９；ｐ＜０．００５２；ｐ＜０．００７９）。５－ｍｅｒペプチド配列番号２７３および２７４は、免疫原性でない。（Ｂ）４２－ｍｅｒ、１９－ｍｅｒ、７－ｍｅｒおよび６－ｍｅｒペプチド（それぞれ配列番号２７５、２８０、２７６および２７７）は、免疫原性である。これらのペプチドによって誘導された抗体は、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと生理学的タウ２Ｎ４Ｒとを統計学的に有意に（それぞれｐ＜０．００７９，ｐ＜０．０１５９，ｐ＜０．００７９およびｐ＜０．０３７９）区別した。５－ｍｅｒペプチド配列番号２７８および２７９は、免疫原性でない。（Ｃ）７－ｍｅｒペプチド（配列番号２８１および２８３）は、免疫原性である。これらのペプチドに対する抗血清は、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと生理学的タウ２Ｎ４Ｒとを統計学的に有意に（それぞれｐ＜０．０３７９およびｐ＜０．０２８６）区別した。６－ｍｅｒペプチド配列番号２８２によって誘導された、病理学的タウおよび生理学的タウに対する抗体のレベルは、非常に低かった。これらのグラフは、１：８００希釈された個々の血清に対するＥＬＩＳＡの結果の統計学的評価を表している。平均値は、平均値の標準誤差とともに示されている。

【図７７Ｃ】タウペプチドでＣ５７ＢＬマウスを免疫した後の、タウ特異的抗体の誘導。（Ａ）１２－ｍｅｒ、７－ｍｅｒおよび６－ｍｅｒペプチド（それぞれ配列番号２７０、２７１および２７２）は免疫原性である。免疫によって誘導された抗体は、生理学的タウ２Ｎ４Ｒよりも病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して統計学的に有意に高い結合活性を示す（それぞれｐ＜０．００７９；ｐ＜０．００５２；ｐ＜０．００７９）。５－ｍｅｒペプチド配列番号２７３および２７４は、免疫原性でない。（Ｂ）４２－ｍｅｒ、１９－ｍｅｒ、７－ｍｅｒおよび６－ｍｅｒペプチド（それぞれ配列番号２７５、２８０、２７６および２７７）は、免疫原性である。これらのペプチドによって誘導された抗体は、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと生理学的タウ２Ｎ４Ｒとを統計学的に有意に（それぞれｐ＜０．００７９，ｐ＜０．０１５９，ｐ＜０．００７９およびｐ＜０．０３７９）区別した。５－ｍｅｒペプチド配列番号２７８および２７９は、免疫原性でない。（Ｃ）７－ｍｅｒペプチド（配列番号２８１および２８３）は、免疫原性である。これらのペプチドに対する抗血清は、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと生理学的タウ２Ｎ４Ｒとを統計学的に有意に（それぞれｐ＜０．０３７９およびｐ＜０．０２８６）区別した。６－ｍｅｒペプチド配列番号２８２によって誘導された、病理学的タウおよび生理学的タウに対する抗体のレベルは、非常に低かった。これらのグラフは、１：８００希釈された個々の血清に対するＥＬＩＳＡの結果の統計学的評価を表している。平均値は、平均値の標準誤差とともに示されている。

【０１５８】

【図７８】タウペプチドでＣ５７ＢＬマウスを免疫した後のタウ特異的抗体の幾何平均抗体価。タウペプチド配列番号２７０、２７１、２７２、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１および２８３によるＣ５７ＢＬマウスのワクチン接種は、タウ特異的抗体の形成を誘導した。ＥＬＩＳＡを用いて測定された幾何平均抗体価は、タウペプチド配列番号２７０、２７１、２７２、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１および２８３によるワクチン接種によって誘発された抗体が、生理学的タウ（タウ２Ｎ４Ｒ）よりも病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対してより高い結合活性を示したことを示す。タウペプチド配列番号２７３、２７４、２７８、２７９および２８２でマウスを免疫した後に、タウ特異的抗体のより低い力価が検出された。

【０１５９】

【図７９Ａ】タウペプチドによって誘導された抗体のアイソタイププロファイルが示されている。最小ＤＣ８Ｅ８エピトープを有するタウペプチドによるＣ５７／ＢＬマウスの免

疫は、病理学的タウに特異的なＩｇＧ１およびＩｇＧ２ｂ抗体アイソタイプの形成を優先的に誘導した。個々のマウス由来のプールされた血清を１：８００希釈し、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対する結合活性をＥＬＩＳＡによって解析した。

【図７９Ｂ】タウペプチドによって誘導された抗体のアイソタイププロファイルが示されている。最小ＤＣ８Ｅ８エピトープを有するタウペプチドによるＣ５７／ＢＬマウスの免疫は、病理学的タウに特異的なＩｇＧ１およびＩｇＧ２ｂ抗体アイソタイプの形成を優先的に誘導した。個々のマウス由来のプールされた血清を１：８００希釈し、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対する結合活性をＥＬＩＳＡによって解析した。

【０１６０】

【図８０】タウペプチドで免疫されたマウスＣ７５ＢＬにおいて誘導された抗体の、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよび２Ｎ４Ｒに対する結合能の定量的評価。表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）測定は、タウペプチド配列番号２７０、２７１、２７２、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１および２８３に対する抗体が、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと生理学的２Ｎ４Ｒタウとを統計学的に有意に（＊＊．．．ｐ＜０．００１および＊．．．ｐ＜０．０１）区別することを示した。ＫＡ－会合平衡結合定数。

【０１６１】

【図８１】タウペプチドで免疫されたマウスにおいて誘導された抗体は、ウエスタンブロッティングにおいて病理学的形態のタウを認識する。タウペプチド配列番号２７０、２７１、２７２、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１および２８３によるＣ５７ＢＬマウスのワクチン接種は、ヒトアルツハイマー病脳組織ならびにトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳幹から単離された病理学的タウタンパク質を認識する特異的抗体を誘導した。ペプチド配列番号２７３、２７４、２７８、２７９および２８２でマウスを免疫した後の抗血清は、病理学的タウ型を認識しなかった。

【０１６２】

【図８２Ａ】ヒトＡＤ脳組織における、タウペプチドによって誘導された抗体によって認識された神経原線維変化。タウペプチド配列番号２７０、２７１、２７２、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１および２８３によるＣ５７ＢＬマウスのワクチン接種は、アルツハイマー病脳の海馬における神経原線維病変を認識する抗体を誘導した。アジュバントのみで免疫されたマウス由来の血清をネガティブコントロールとして使用した。海馬ＣＡ１由来の脳組織切片を使用した。スケールバー：１００μｍ。

【図８２Ｂ】ヒトＡＤ脳組織における、タウペプチドによって誘導された抗体によって認識された神経原線維変化。タウペプチド配列番号２７０、２７１、２７２、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１および２８３によるＣ５７ＢＬマウスのワクチン接種は、アルツハイマー病脳の海馬における神経原線維病変を認識する抗体を誘導した。アジュバントのみで免疫されたマウス由来の血清をネガティブコントロールとして使用した。海馬ＣＡ１由来の脳組織切片を使用した。スケールバー：１００μｍ。

【図８２Ｃ】ヒトＡＤ脳組織における、タウペプチドによって誘導された抗体によって認識された神経原線維変化。タウペプチド配列番号２７０、２７１、２７２、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１および２８３によるＣ５７ＢＬマウスのワクチン接種は、アルツハイマー病脳の海馬における神経原線維病変を認識する抗体を誘導した。アジュバントのみで免疫されたマウス由来の血清をネガティブコントロールとして使用した。海馬ＣＡ１由来の脳組織切片を使用した。スケールバー：１００μｍ。

【０１６３】

【図８３】タウペプチド配列番号２７０、２７１、２７２、２７３、２７４、２７５、２７６、２７７、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２および２８３によるＣ５７ＢＬマウスの免疫から産生された血清抗体を用いた、ヒトＡＤ患者由来の脳組織の免疫組織化学的染色（およびそれぞれの相対強度）の要約。

【発明を実施するための形態】
【０１６４】
発明の詳細な説明
用語「抗体」とは、遺伝的に操作されているか、天然であるか、または完全にもしくは部分的に合成的にもしくは組換え的に生成されているかに関係なく、免疫グロブリンのことを指す。抗原結合特性および本発明に係るタウに関連する特徴的な特性の少なくとも１つを維持しているすべてのその誘導体、一部およびフラグメントもまた、この用語に含められる。この用語は、免疫グロブリン結合ドメインと相同または広く相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質も包含する。これらのタンパク質は、天然の起源に由来し得るか、または部分的にもしくは完全に合成的にもしくは組換え的に生成され得る。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。抗体は、任意のヒトクラス：ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤおよびＩｇＥを含む任意の免疫グロブリンクラスのメンバーであり得る。ＩｇＧクラスの誘導体が、本発明のいくつかの実施形態において好ましい。
【０１６５】
用語「単離された抗体」および「単離されたペプチド」とは、ｃＤＮＡ、組換えＲＮＡもしくは他の任意の合成起源またはそれらのいくつかの組み合わせから生成されたタンパク質またはペプチド；ならびにそれらの起源または誘導の起源を理由に、（１）天然に見られるタンパク質と関連しないか、（２）同じ起源由来の他のタンパク質を含まない、例えば、マウスタンパク質を含まないか、（３）異なる種由来の細胞によって発現されているか、または（４）天然には存在しない、タンパク質およびペプチドのことを指す。
【０１６６】
本発明に係る抗体は、さらに、本発明に係る抗体の上述の特徴に影響しないかまたは上述の特徴を変更しないヌクレオチド配列改変およびアミノ酸配列改変である「保存的な配列改変」を有するような抗体を含む。改変は、当該分野で公知の標準的な手法（例えば、部位特異的突然変異誘発およびＰＣＲ媒介性突然変異誘発）によって導入され得る。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換を含む。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。したがって、抗タウ抗体内の予測される可欠アミノ酸残基は、例えば、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基で置き換えられ得る。
【０１６７】
「抗体フラグメント」および「抗体部分」は、完全長抗体の一部、通常、少なくとも抗原結合部分／ドメインまたはその可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、抗体フラグメントから形成される、ダイアボディ、一本鎖抗体分子、免疫毒素および多重特異性抗体が挙げられる。さらに、抗体フラグメントは、病理学的タウに結合する（すなわち、ＶＬ鎖と集合することができる）ＶＨ鎖、または病理学的タウに結合する（すなわち、ＶＨ鎖と集合することができることにより、機能的な抗原結合ポケットを形成し、それにより、病理学的タウに結合する特性を提供する）ＶＬ鎖の特徴を有する一本鎖ポリペプチドを含む。これらの用語は、それ自体はエフェクター機能（例えば、ＡＤＣＣ／ＣＤＣ）を提供することができないが、適切な抗体定常ドメインと組み合わされた後にこの機能を提供することができるフラグメントも包含する。
【０１６８】
用語「キメラ抗体」とは、通常、組換えＤＮＡ手法によって調製される、１つの起源または種由来の可変領域、すなわち結合領域、および異なる起源または種に由来する定常領

域の少なくとも一部を含むモノクローナル抗体のことを指す。マウス可変領域およびヒト定常領域を含むキメラ抗体が、特に好ましい。そのようなマウス／ヒトキメラ抗体は、マウス免疫グロブリン可変領域をコードするＤＮＡセグメントおよびヒト免疫グロブリン定常領域をコードするＤＮＡセグメントを含む発現された免疫グロブリン遺伝子の産物である。本発明によって包含される「キメラ抗体」の他の形態は、そのクラスまたはサブクラスが、改変されているか、または元の抗体のクラスもしくはサブクラスから変更されている形態である。そのような「キメラ」抗体は、「クラススイッチ抗体」とも称される。キメラ抗体を作製するための方法は、当該分野で現在公知である従来の組換えＤＮＡ法および遺伝子トランスフェクション法を含む。例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓ．Ｌ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１（１９８４）６８５１－６８５５；米国特許第５，２０２，２３８号および同第５，２０４，２４４号を参照のこと。

【０１６９】

用語「ヒト化抗体」とは、フレームワーク領域（ＦＲ）および／または相補性決定領域（ＣＤＲ）が、親免疫グロブリンの特異性と比べて異なる特異性の免疫グロブリンのＣＤＲを含むように改変された抗体のことを指す。１つの実施形態において、マウスＣＤＲが、ヒト抗体のフレームワーク領域に移植されることにより「ヒト化抗体」が調製される。例えば、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，Ｌ．ら、Ｎａｔｕｒｅ ３３２（１９８８）３２３－３２７；およびＮｅｕｂｅｒｇｅｒ，Ｍ．Ｓ．ら、Ｎａｔｕｒｅ ３１４（１９８５）２６８－２７０を参照のこと。特に好ましいＣＤＲは、タウ上の「治療用エピトープ」として本明細書中に記載される抗原およびエピトープを認識する配列に相当するＣＤＲに対応する。

【０１７０】

用語「ヒト抗体」は、本明細書中で使用されるとき、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むと意図されている。その抗体の定常領域は、例えば、ヒトＩｇＧ１型の定常領域であり得る。そのような領域は、アロタイプであり得、例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ，Ｇ．，ａｎｄ Ｗｕ，Ｔ．Ｔ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８（２０００）２１４－２１８およびその中で参照されているデータベースに記載されており、本発明に係るＡＤＣＣおよび例えばＣＤＣの誘導の特性が保持されている限り、それらはいくつかの実施形態にとって優先的に有用である。

【０１７１】

用語「組換えヒト抗体」は、本明細書中で使用されるとき、組換え手段によって調製された、発現された、作製されたまたは単離されたすべてのヒト抗体（例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである宿主細胞（例えば、ＮＳＯまたはＣＨＯ細胞）もしくは動物（例えば、マウス、例えば、ヒト抗体のアミノ酸配列、例えば、ヒトフレームワーク（ＦＲ）およびヒト定常領域アミノ酸配列を有する抗体を産生する遺伝的に改変されたマウスであるＸＥＮＯＭＯＵＳＥ）から単離された抗体または宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現された抗体）を含むと意図されている。そのような組換えヒト抗体は、再配列された形態において、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。本発明に係る組換えヒト抗体は、インビボ体細胞超変異を受けたことがある。したがって、その組換え抗体のＶＨおよびＶＬ領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列ＶＨおよびＶＬ配列に由来し、それらに関係するが、インビボにおいてヒト抗体生殖細胞系列レパートリー内に天然には存在し得ない、配列である。

【０１７２】

用語「エフェクター機能」は、Ｃ１ｑ結合；補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）；Ｆｃレセプター結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）；ファゴサイトーシス；および細胞表面レセプター（例えば、Ｂ細胞レセプター；ＢＣＲ）のダウンレギュレーションを含むが、これらに限定されない。

【０１７３】

用語「エピトープ」は、結合タンパク質または抗体によって認識される結合部位のこと

を指すために本明細書中で使用される。エピトープは、任意の分子またはそのグループ（アミノ酸、アミノ酸側鎖、糖および脂質を含むがこれらに限定されない）であり得、特定の３次元構造またはコンフォーメーションを有し得る。したがって、エピトープは、それらの用語が当該分野で広く公知であるように、一次、二次、三次または四次構造を含むタウペプチド／タンパク質分子の任意の部分を含み得る。「線状エピトープ」は、アミノ酸残基の連続した配列で構成されている。線状エピトープは、生理学的タウ上に存在する（例えば、タウ２Ｎ／４Ｒに存在する）エピトープである。「コンフォーメーションエピトープ」は、抗体または結合タンパク質がコンフォーメーション特異的様式で結合するエピトープである。タンパク質ベースのエピトープの場合、その結合は、そのエピトープを有するタンパク質の二次、三次または四次構造に依存し得る。換言すれば、その抗体は、構造特異的様式、三次構造特異的様式または四次構造特異的様式で結合する。コンフォーメーションエピトープは、病理学的タウに存在する（例えば、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）に存在する）エピトープである。

【０１７４】

用語「治療用エピトープ」とは、本明細書中で特定され、ある特定のコンフォーメーション（ＤＣ８Ｅ８抗体によって認識される）であるときタウ－タウ凝集を促進すると見出されたタウ内の領域のことを指す。これらの領域の１つもしくは複数に結合する抗体（および他の結合タンパク質）は、初期および後期のタウ凝集（タウ単量体から二量体への変換およびより高次の凝集体の形態への変換を含む）を阻害する；すなわち、それらの抗体は、生理学的タウから病理学的タウへの変換を阻害する。タウ内のこれらの領域は、タウの隣接領域内でベータシートの形成を促進することによって対らせん状細線維（ＰＨＦ）へのタウの線維化の促進に関わり得る。治療用エピトープは、２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３（タウタンパク質の第１リピートドメイン内）、２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５（タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（タウタンパク質の第４リピートドメイン内）内に含まれる。いくつかの実施形態において、治療用エピトープは各々、それぞれ２６８－ＨＱＰＧＧＧ－２７３（タウタンパク質の第１リピートドメイン内）、２９９－ＨＶＰＧＧＧ－３０４（タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３３０－ＨＫＰＧＧＧ－３３５（タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６２－ＨＶＰＧＧＧ－３６７内に含まれる。

【０１７５】

用語「生理学的タウよりも病理学的タウに対してより高い親和性を示す」とは、抗体と生理学的タウの少なくとも１つの形態との相互作用よりも抗体と病理学的タウの少なくとも１つの形態との相互作用のより高い程度のことを指す。その相互作用は、下記の実施例に記載されるような、例えば、ＥＬＩＳＡまたは表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって測定され得る。

【０１７６】

用語「特異的に結合する（ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ　ｂｉｎｄｓ）」、「特異的に結合する（ｂｉｎｄｓ　ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ）」、および「～に特異的な」は、相互交換可能であり、抗体またはその抗原結合フラグメント（または他の結合タンパク質）が、抗原またはエピトープと、生理学的条件下において比較的安定である複合体を形成することを意味する。特異的結合は、約１×１０$^{-6}$Ｍまたはそれ以下、例えば、約１００ｎＭ未満、最たる例として、１０ｎＭ未満の解離定数によって特徴付けられ得る。２つの分子が特異的に結合するかを判定するための方法は、当該分野で公知であり、その方法としては、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴などが挙げられ得る。代表的には、本発明によって提供される抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくとも約１×１０$^{-6}$Ｍまたはそれ以下のような解離定数で抗原またはエピトープに結合するがそのような解離定数で他の分子には結合しない分子である。

【０１７７】

「優先的に結合する」とは、生理学的タウよりも病理学的タウに対するより高い親和性

での結合、例えば、２Ｎ４Ｒよりもタウ Δ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対するより高い親和性での結合のことを指す。

【０１７８】

「ユニバーサルＴ細胞エピトープ」は、インフルエンザ赤血球凝集素（Ｈｅｍａｇｌｕｔｔｉｎｉｎ）：ＨＡ３０７－３１９（ＰＫＹＶＫＱＮＴＬＫＬＡＴ）（配列番号１２３）；ＰＡＤＲＥ（ＡＫＸＶＡＡＷＴＬＫＡＡＡ）（配列番号１２４）；マラリアＣＳ：Ｔ３エピトープ（ＥＫＫＩＡＫＭＥＫＡＳＳＶＦＮＶ）（配列番号１２５）；Ｂ型肝炎表面抗原：ＨＢｓＡ９１９＿２８（ＦＦＬＬＴＲＩＬＴＩ）（配列番号１２６）；熱ショックタンパク質６５：ｈｓｐ６５１５３＿１７１（ＤＱＳＩＧＤＬｌＡＥＡＭＤＫＶＧＮＥＧ）（配列番号１２７）；Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ桿菌（ＱＶＨＦＱＰＬＰＰＡＶＶＫＬ）（配列番号１２８）；破傷風トキソイド：ＴＩ８３０－８４４（ＱＹＩＫＡＮＳＫＦＩＧＩＴＥＬ）（配列番号１２９）；破傷風トキソイド：ＴＩ９４７－９６７（ＦＮＮＦＴＶＳＦＷＬＲＶＰＫＶＳＡＳＨＬＥ）（配列番号１３０）；およびＨＩＶ　ｇｐ１２０　Ｔ１（ＫＱＩＩＮＭＷＱＥＶＧＫＡＭＹＡ）（配列番号１３１）から選択される配列である。

【０１７９】

用語「天然無秩序タウ」とは、任意の明確な３Ｄ構造を欠く正常な／生理学的な形態のタウタンパク質のことを指す。それは、健常な脳に存在する（Ｋｏｖａｃｅｃｈら、２０１０）。

【０１８０】

「誤無秩序タウ」とは、正常な／生理学的な天然無秩序タウとコンフォーメーションで異なりかつ確固たる／明確な３Ｄ構造を有しない形態のタウのことを指す。誤無秩序切断型タウは、インビボにおいて神経原線維変性を誘導することができる。それは、健常な脳には存在しない（Ｋｏｖａｃｅｃｈら、２０１０）。「誤秩序タウ」とは、ＰＨＦのポリマーに組み立てられ、ＮＦＴを形成する、構築された病理学的形態のタウのことを指す。誤秩序タウは、健常な脳には存在しない（Ｋｏｖａｃｅｃｈら、２０１０）。

【０１８１】

「ＳＨＲ２４」とは、タウタイプＩＩＢ（１５１－３９１／Ｒ３）を発現するトランスジェニックラットの系統のことを指す。そのトランスジェニックラットは、皮質脳領域において進行性の加齢依存的な神経原線維変性を発症した。ＳＨＲ２４ラットにおける神経原線維変化（ＮＦＴ）は、ヒトアルツハイマー病における神経原線維変性を識別するために使用されるいくつかの重要な組織学的基準（銀親和性、コンゴーレッド複屈折およびチオフラビンＳ反応性を含む）を満たす。これらの基準は、本発明の任意の実施形態を受けている被験体における神経原線維変性の解析のために使用され得る。神経原線維変化は、異常なタウコンフォーメーションを認識してヒト脳における病理的タウを検出するために使用される抗体（ＤＣ１１を含む）、および過剰リン酸化型のタウタンパク質に特異的な抗体を用いても識別された。さらに、神経原線維変性は、ラット内在性および切断型タウ種からなるサルコシル不溶性タウタンパク質複合体の広範な形成によって特徴付けられた（Ｆｉｌｉｐｃｉｋら、２０１０）。

【０１８２】

「ＳＨＲ７２」とは、いくつかの脳領域および脊髄において、国際特許出願ＰＣＴ　ＷＯ２００４／００７５４７）に係るヒト切断型タウ Δ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを発現するトランスジェニックラットのことを指す。このラット系統の作出は、Ｚｉｌｋａら、２００６によって記載され、タウの病理は、Ｋｏｓｏｎら、２００８に記載された。

【０１８３】

「タウタイプＩＡ」とは、４リピート含有タウ４３の少なくとも最初の２３６個のＮ末端アミノ酸および少なくとも最後の４５個のＣ末端アミノ酸が切断された、ＮおよびＣ末端二重切断型タウタンパク質のことを指す。これらの分子は、アルツハイマー病の脳組織において検出可能であるのに対し、これらの分子は、正常な健常な脳組織では検出可能で

ない（ＷＯ２００４／００７５４７Ａ２）。
【０１８４】
「タウタイプＩＢ」とは、３リピート含有タウ４４の少なくとも最初の２３６個のＮ末端アミノ酸および少なくとも最後の４５個のＣ末端アミノ酸が切断された、ＮおよびＣ末端二重切断型タウタンパク質のことを指す。これらの分子は、アルツハイマー病の脳組織において検出可能であるのに対し、これらの分子は、正常な健常な脳組織では検出可能でない（ＷＯ２００４／００７５４７Ａ２）。
【０１８５】
「タウタイプＩＩＡ」とは、４リピート含有タウ４３の少なくとも最初の６８個のＮ末端アミノ酸および少なくとも最後の４０個のＣ末端アミノ酸が切断された、ＮおよびＣ末端二重切断型タウタンパク質のことを指す。これらの分子は、アルツハイマー病の脳組織において検出可能であるのに対し、これらの分子は、正常な健常な脳組織では検出可能でない（ＷＯ２００４／００７５４７Ａ２）。
【０１８６】
「タウタイプＩＩＢ」とは、３リピート含有タウ４４の少なくとも最初の６８個のＮ末端アミノ酸および少なくとも最後の２０個のＣ末端アミノ酸が切断された、ＮおよびＣ末端二重切断型タウタンパク質のことを指す。これらの分子は、アルツハイマー病の脳組織において検出可能であるのに対し、これらの分子は、正常な健常な脳組織では検出可能でない（ＷＯ２００４／００７５４７Ａ２）。
【０１８７】
本明細書中で使用されるとき、用語「処置」、「処置する」などは、所望の薬理学的および／または生理学的な効果を得ることを指す。その効果は、疾患もしくはその症状を完全にもしくは部分的に予防することに関して予防的であり得、かつ／または疾患および／もしくはその疾患に起因する悪影響の部分的もしくは完全な治癒に関して治療的であり得る。「処置」は、本明細書中で使用されるとき、哺乳動物、特に、ヒトにおけるＡＤまたは関連タウオパチーの任意の処置も網羅し、（ａ）疾患にかかりやすいまたは疾患にかかるリスクがある可能性があるがそれを有するとまだ診断されていない被験体にその疾患が生じるのを防ぐこと；（ｂ）疾患を阻害すること、すなわち、その発症を停止すること；および（ｃ）疾患を軽減すること、すなわち、その疾患の後退を引き起こすことを包含する。「処置」の好ましい実施形態は、下記でさらに論じられる。いくつかの実施形態において、「処置する」とは、ＡＤまたは別のタウオパチーに罹患していると疑われるまたはすでに罹患している患者に治療薬を投与することを指す。それは、疾患の１つもしくは複数の症状ならびに／またはその疾患および／もしくはその合併症に関連する１つもしくは複数の症状を減少させること、排除すること、または少なくとも部分的に停止すること、ならびにそれらに対して任意の有益な効果を発揮することも指し得る。
【０１８８】
「予防」とは、特定の疾患にかかりやすい患者または別途そのリスクのある患者への投与のことを指す。一般集団の誰もがＡＤのリスクがある。一部の個体は、ＡＤに対して高い遺伝的リスクを有する。予防は、疾患のリスクを排除し得るかもしくは低下させ得るか、またはその疾患の発生を遅延させ得る。発生または進行の遅延は、類似の集団または個体における疾患進行の標準的な時間に基づいて測定され得る。
【０１８９】
「タウオパチー」とは、病理学的タウの形成に関連する疾患のことを指す。
【０１９０】
「生理学的タウ」とは、正常なヒトタウの６つのアイソフォーム、すなわち：
２Ｎ４Ｒ（配列番号１０２）
１Ｎ４Ｒ（配列番号１０３）
２Ｎ３Ｒ（配列番号１０４）
０Ｎ４Ｒ（配列番号１０５）
１Ｎ３Ｒ（配列番号１０６）

０Ｎ３Ｒ（配列番号１０７）のうちのいずれか１つのことを指す。アルツハイマー病および他のタウオパチーに関連するリン酸化のいずれか１つを有するものは、この定義から除外される。

【０１９１】

「病理学的タウ」には、病理学的タウの配座異性体および構造が含まれ、以下のすべてが包含される：タウタイプＩＡ、ＩＢ、ＩＩＡおよびＩＩＢ、誤秩序、誤無秩序タウ（単量体、二量体、三量体、オリゴマー）、誤無秩序可溶性タウ、サルコシル不溶性タウ、細胞外タウ沈着物、タウ凝集体、対らせん状細線維、神経原線維の病理（神経原線維の病変、濃縮体、糸状構造、原線維、軸索球状物（ａｘｏｎａｌ　ｓｐｈｅｒｉｏｄｓ）、切断型タウおよび完全長タウの高度にリン酸化された形態を含む）、またはＡＤもしくは別のタウオパチーに関連する他の任意の形態のタウ。

【０１９２】

「連結された」とは、ペプチド、抗体または化合物に対するある部分の結合のことを指す。その部分は、結合され得るか、または複合体化され得るか、または共有結合的にもしくは非共有結合的に結合され得る。その部分は、ペプチドまたは抗体との融合物として、化学的に架橋され得るか、または発現され得るか、または合成され得る。

【０１９３】

「部分」とは、ペプチド、抗体または結合タンパク質に結合され得るが、主張されるペプチド、抗体または結合タンパク質自体ではない、任意の化合物、有機物、ペプチド、タンパク質、核酸、キャリア、アジュバントのことを指す。

【０１９４】

「免疫原性」とは、免疫応答を誘発し得るもののことを指す。その免疫応答は、抗体媒介性もしくは細胞媒介性、またはその両方であり得る。

【０１９５】

「アジュバント」とは、付随のペプチドに対する免疫応答を増加させること、増幅すること、または調節することができる物質のことを指す。

【０１９６】

「他の治療」とは、被験体患者が受け得るさらなる治療のことを指す。

【０１９７】

「クリアランス」とは、病理学的タウおよび／または病理学的タウ構造のレベルまたは検出の減少のことを指す。クリアランスは、病理学的タウの完全な消失である必要はなく、すなわち、クリアランスは、部分的な消失であり得る。

【０１９８】

用語「促進する」は、誘導すること、改善することまたは増加することを包含する。

【０１９９】

「脳組織」とは、例えば、脳、脳幹および脊髄由来の、任意の神経組織のことを指す。

【０２００】

用語「特異的結合」および「高親和性」はそれぞれ、所定の抗原、すなわち、上で定義されたタウエピトープへの抗体の結合のことを指す。代表的には、抗体は、10^{-6}Ｍ以下の解離定数（ＫＤ）で結合し、所定の抗原以外の非特異的な抗原（例えば、ＢＳＡ、カゼインまたは他の任意の特定のポリペプチド）に対する結合に対するＫＤより少なくとも２倍低いＫＤで所定の抗原に結合する。句「抗原を認識する抗体」および「抗原に特異的な抗体」は、本明細書中において用語「抗原に特異的に結合する抗体」と交換可能に使用される。本明細書中で使用されるとき、「高度に特異的な」結合は、誤無秩序タウに対する抗体の相対的なK_Dが、他のリガンドまたは正常な完全長タウへのその抗体の結合のK_Dよりも少なくとも４倍低いことを意味する。

【０２０１】

用語「原核生物」は、本発明の抗体または対応する免疫グロブリン鎖の１つもしくは複数の発現のためにＤＮＡまたはＲＮＡ分子で形質転換され得るかまたはトランスフェクトされ得るすべての細菌を含むように意味される。原核生物宿主は、グラム陰性菌ならびに

グラム陽性菌、例えば、大腸菌、ネズミチフス菌、霊菌および枯草菌を含み得る。用語「真核生物」は、酵母、高等植物、昆虫、ならびに例えば哺乳動物細胞、最たる例として、ＨＥＫ２９３、ＮＳＯおよびＣＨＯ細胞を含むように意味される。

【０２０２】

用語「化学的誘導体」は、通常、基礎分子（ｂａｓｅ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）の一部ではないさらなる化学的部分を含む分子のことを記載する。そのような部分は、基礎分子の溶解性、半減期、吸収などを改善し得る。あるいは、それらの部分は、その基礎分子の望ましくない副作用を弱め得るか、またはその基礎分子の毒性を低減させ得る。

【０２０３】

用語「核酸」、「核配列（ｎｕｃｌｅｉｃ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」は、本記載において交換可能に使用され、それらは、改変されているかまたはされておらず、核酸のフラグメントまたは領域を定義し、非天然ヌクレオチドを含むかまたは含まず、かつ二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡまたは前記ＤＮＡの転写産物である、ヌクレオチドの正確な配列のことを指す。

【０２０４】

本明細書中で使用される用語「単離されたポリヌクレオチド」または「単離された核酸」は、その起源を理由に、（１）「単離されたポリヌクレオチド」が天然に見られるポリヌクレオチドの全部または一部に関連しない、（２）それが天然では連結されていないポリヌクレオチドに作動可能に連結されている、または（３）天然ではそれより大きい配列の一部として存在しない、ゲノム、ｃＤＮＡもしくは合成起源のポリヌクレオチドまたはそれらのいくつかの組み合わせのことを意味するものとする。

診断、受動免疫、薬物送達およびＡＤ治療のための抗体

【０２０５】

病理学的形態のタウによって提示される１つもしくは複数のタウエピトープに特異的な新規の単離された抗体が本明細書中に記載される。これらのエピトープは、病理学的タウの凝集における役割を初めて割り当てられたタウの領域内、すなわち、２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号９８）（すなわち、エピトープ＃１は、タウタンパク質の第１リピートドメインに含まれる２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３内に位置する）、２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号９９）（エピトープ＃２，タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号１００）（エピトープ＃３，タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１０１）（エピトープ＃４，タウタンパク質の第４リピートドメイン内）内に位置する。これらの抗体は、誤無秩序切断型ヒトタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３ＲまたはタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを発現している、ヒトＡＤ脳ならびにＡＤおよび関連タウオパチーのトランスジェニックラットモデルにおいて、誤秩序および誤無秩序タウを認識することができる。その単離された抗体は、（ｉ）誤秩序タウまたは生理学的タウから誤無秩序タウへの移行；（ｉｉ）「病理学的タウ」の単量体、二量体、三量体および他のタウ多量体の形成；（ｉｉｉ）不溶性タウ凝集体の形成；ならびに（ｉｖ）細胞外タウのクリアランスの促進を含むＡＤの病理に寄与する複数のタウ媒介性活性の１つまたはいくつかを干渉することもできる。

【０２０６】

開示される本発明は、２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号９８）（タウタンパク質の第１リピートドメイン内）、２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号９９）（タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号１００）（タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１０１）（タウタンパク質の第４リピートドメイン内）から選択されるタウのこれまで同定されていなかった４つの機能的領域のうちの１つに特異的に結合する抗体が、病理学的タウ凝集体の形成を阻害することおよび様々な病理学的形態のタウ（そのうちのいくつかは、その疾患において最も早期に形成される（例えば、病理学的単量

体））を検出することができるという発見に部分的に基づく。本願においてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒとも称される、誤無秩序ヒトタウＩＩ（１５１－３９１／４Ｒ）に対して作製されるハイブリドーマを、免疫組織化学（ＩＨＣ）と酵素結合イムノアッセイ（ＥＬＩＳＡ）の両方によって、ヒトＰＨＦに特異的なモノクローナル抗体の産生についてスクリーニングした。得られたセットは、ＩｇＧ１サブクラスであるマウスモノクローナル抗体（ｍＡｂ）ＤＣ８Ｅ８を含んだ。ＤＣ８Ｅ８のエピトープマッピングから、それが、ヒトタウ上のこれまで同定されていなかった４つのエピトープに結合することが明らかになった。さらに、ＤＣ８Ｅ８のさらなる機能解析から、各エピトープがタウ内の異なる機能的領域に相当することが明らかになった。本明細書中でＡＤの診断および治療に対する新規標的と記載され得、ゆえに「治療用エピトープ」と称されるこれらの領域は、２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号９８）（タウタンパク質の第１リピートドメイン内）、２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号９９）（タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号１００）（タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１０１）（タウタンパク質の第４リピートドメイン内）内に含まれている。いくつかの実施形態において、それらの治療用エピトープのうちの１つもしくは複数は、２６８－ＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号２２３）（タウタンパク質の第１リピートドメイン内）、２９９－ＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号１５４）（タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３３０－ＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号２２４）（タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６２－ＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１５４）（タウタンパク質の第４リピートドメイン内）内に含まれている。いくつかの実施形態において、治療用エピトープのうちの少なくとも１つは、２９９－ＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号１５４）（タウタンパク質の第２リピートドメイン内）内に含まれている。いくつかの実施形態において、それらの治療用エピトープのうちの１つもしくは複数は、２９９－ＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号１５４）である。

【０２０７】

実際に、ＤＣ８Ｅ８は、病理学的タウタンパク質と正常タウタンパク質とを区別することができることから、これらの４つのエピトープの少なくとも１つがコンフォーメーションによるものであることが示唆される。換言すれば、ＤＣ８Ｅ８は、その４つの治療用エピトープの各々によって包含される領域のうちの少なくとも１つが、天然無秩序タウ（正常タウ）において想定される形状と異なるコンフォーメーションを病理学的タウにおいて示すことが明らかになった。ＤＣ８Ｅ８は、それが生理学的タウに結合するよりも高い親和性でそれが病理学的タウに結合するという変化を検知することまたは検出することができる。さらに、タウへのＤＣ８Ｅ８の結合は、インビトロにおいて不溶性タウ凝集体の形成を阻害するＤＣ８Ｅ８の能力によって測定されるとき、病理学的タウ凝集体の形成に至るタウ－タウ相互作用を阻害することができる。例えば、正常タウへのＤＣ８Ｅ８の結合は、治療用エピトープを包含する領域について上で論じたコンフォーメーション／形状の変化のうちの１つもしくは複数を妨げることができる。

【０２０８】

さらに、これらの領域または治療用エピトープの１つもしくは複数における正常タウへのＤＣ８Ｅ８の結合は、病理学的タウの生成に必要なその分子内のいずれか箇所におけるある特定の他のコンフォーメーション変化を妨害する。いかなる特定の機序にも拘束されるものではないが、ＤＣ８Ｅ８によって認識されるタウ内のこれらのエピトープ／領域の１つもしくは複数が、タウ－タウ凝集の促進物質としてタウ内で機能することが企図される。例えば、これらのエピトープのうちの１つもしくは複数の構造／形状／コンフォーメーションは、それへのＤＣ８Ｅ８の結合によってタウ分子内のその形状が固定されることにより、ベータシートを形成するという隣接領域（例えば、２７４－２８１）の能力または傾向が干渉されるように、隣接領域の構造に影響する（ここで、ベータシートの形成は、タウ－タウ凝集に必要である）。したがって、正常タウ内のこれらの４つの領域のうちの１つへのＤＣ８Ｅ８の結合が、これまでに同定されたタウにおける最も早い病理学的変

化の１つ：タウ内でのベータシートの形成を促進するために必要な変化またはそれ自体がその形成を促進するもしくは可能にする変化を妨げることができると企図される。さらに、誤無秩序／病理学的タウ内の（すなわち、既にそれらの４つのうちの１つもしくは複数が病理学的なコンフォーメーションへと変化した後の）これらの４つの領域のうちの１つへのＤＣ８Ｅ８の結合でさえも、病理学的タウ－タウ凝集を阻害することができることも企図される。その理由は、少なくとも、そのような結合がなおもベータシートの形成を阻害するから、タウ－タウ物理的相互作用を阻止するから、またはその両方であるからである。

【０２０９】

したがって、タウ内の新規の標的または機能的領域を同定するツールとしてＤＣ８Ｅ８を使用して、タウ上の４つの特異的なＤＣ８Ｅ８結合部位にアルツハイマー病における役割が割り当てられた。これは、これらのタウ部位の１つもしくは複数が病理学的タウ単量体および多量体の形成に関わるという認識によって行われた。その理由は、少なくとも、それらのうちの１つもしくは複数へのＤＣ８Ｅ８の結合がそれらのプロセスを阻害することができるからである。さらに、これらの治療用エピトープの１つもしくは複数に結合する抗体（例えば、ＤＣ８Ｅ８）は、細胞外の環境からの病理学的タウのクリアランスを促進することができる。その理由は、少なくとも、それらの抗体がインビトロではミクログリアによる病理学的タウの取り込みおよび分解；インビボでは脳における細胞外および細胞内のタウの減少；またはその両方を媒介することができるからである。換言すれば、これらの抗体は、そのような病理学的形態のタウが脳に対して引き起こす損傷を減少させることを助ける能力を有する。

【０２１０】

したがって、タウ上の１つもしくは複数の治療用エピトープに特異的に結合する抗体が本明細書中に記載され、ここで、それらの治療用エピトープの各々は、アミノ酸残基２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号９８）（エピトープ＃１，タウタンパク質の第１リピートドメイン内）、２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号９９）（エピトープ＃２，タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号１００）（エピトープ＃３，タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１０１）（エピトープ＃４，タウタンパク質の第４リピートドメイン内）内に別々に位置する。いくつかの実施形態において、治療用エピトープ＃１～４は、２６８－ＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号２２３）（タウタンパク質の第１リピートドメイン内）、２９９－ＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号１５４）（タウタンパク質の第２リピートドメイン内）、３３０－ＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号２２４）（タウタンパク質の第３リピートドメイン内）および３６２－ＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１５４）（タウタンパク質の第４リピートドメイン内）内に含まれる。上記抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。抗原結合抗体部分、抗体フラグメント、抗体バリアント、操作されたタンパク質およびポリマー骨格も含まれる。これらは、免疫グロブリン分子の少なくとも一部（例えば、重鎖もしくは軽鎖の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）またはそれらのリガンド結合部分、重鎖もしくは軽鎖可変領域、重鎖もしくは軽鎖定常領域、フレームワーク領域、あるいはそれらの任意の部分であるがこれらに限定されない）を含む任意のタンパク質またはペプチド含有分子を含む。

【０２１１】

非限定的な例として、本発明によって提供されるような好適な抗体、抗体部分、フラグメントまたはバリアントは、記載される治療用エピトープのうちの少なくとも１つに結合し得る。用語「抗体」は、抗体消化フラグメント、特定の抗体部分およびそれらのバリアント（抗体またはその特定のフラグメントもしくは一部（一本鎖抗体およびそのフラグメントを含む）の構造および／または機能を模倣する抗体模倣物または抗体の一部を含む）も含む。機能的フラグメントには、１つもしくは複数の治療用エピトープに結合する抗原結合フラグメントが含まれる。例えば、治療用エピトープに結合することができる抗体フ

ラグメントとしては、Ｆａｂ（例えば、パパイン消化によるもの）、Ｆａｂ’（例えば、ペプシン消化および部分的還元によるもの）およびＦ（ａｂ’）$_2$（例えば、ペプシン消化によるもの）、ｆａｃｂ（例えば、プラスミン消化によるもの）、ｐＦｃ’（例えば、ペプシンまたはプラスミン消化によるもの）、Ｆｄ（例えば、ペプシン消化、部分的還元および再凝集によるもの）、ＦｖまたはｓｃＦｖ（例えば、分子生物学的手法によるもの）フラグメントが挙げられるが、これらに限定されず、それらは本発明によって提供される。Ｗｉｌｌｉａｍ Ｅ．Ｐａｕｌ（ｅｄ．）Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６^{ｔｈ} Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，ＮＹ，Ｎ．Ｙ．（２００８）（その全体が本明細書に援用される）も参照のこと。ある特定のフラグメントは、当該分野で日常的に公知であるようなまたは本明細書中に提供されるような、酵素的切断、合成または組換えの手法によって生成され得る。抗体は、１つもしくは複数の終止コドンが天然の停止部位の上流に導入された抗体遺伝子を使用して、種々の切断型としても作製され得る。例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$重鎖部分をコードする組み合わせ遺伝子は、ＣＨ１ドメインおよび／または重鎖のヒンジ領域をコードするＤＮＡ配列を含むようにデザインされ得る。抗体の様々な部分は、従来の手法によって化学的に互いに結合され得るか、または日常的な遺伝子操作法を使用して連続したタンパク質として調製され得る。

【０２１２】

基本的な抗体の構造単位は、四量体を構成すると知られている。各四量体は、ポリペプチド鎖の２つの同一の対から構成される（各対が、１本の「軽」鎖（約２５ｋＤａ）および１本の「重」鎖（約５０～７０ｋＤａ）を有する）。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に関与する約１００～１１０またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシル末端部分は、主にエフェクター機能に関与する定常領域を定義する。ヒト軽鎖は、カッパーおよびラムダ軽鎖として分類される。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファまたはイプシロンとして分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＥと定義する。軽鎖および重鎖の中で、可変領域および定常領域は、約１２またはそれ以上のアミノ酸の「Ｊ」領域によって連結され、重鎖は、さらに約１０アミノ酸の「Ｄ」領域も含む。Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｃｈ．７（Ｐａｕｌ，Ｗ．，ｅｄ．，２ｎｄ ｅｄ．Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８９））（その全体がすべての目的のために参照により援用される）を広く参照のこと。各軽鎖／重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。したがって、インタクトな抗体は、２つの結合部位を有する。二機能性または二重特異性の抗体を除いては、その２つの結合部位は、同じである。それらの鎖はすべて、相補性決定領域またはＣＤＲとも呼ばれる３つの超可変領域に連結された比較的保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）という同じ一般構造を示す。各対の２本の鎖のＣＤＲは、フレームワーク領域によって整列されることにより、特定のエピトープへの結合が可能になる。軽鎖と重鎖の両方が、Ｎ末端からＣ末端に向かって、ドメインＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３およびＦＲ４を含む。各ドメインに対するアミノ酸の割当は、ＩＭＧＴの定義に従う。代替の定義もまた当業者に公知である。例えば、Ｋａｂａｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９８７および１９９１））またはＣｈｏｔｈｉａ ＆ Ｌｅｓｋ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）；Ｃｈｏｔｈｉａら、Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７８－８８３（１９８９）を参照のこと。

【０２１３】

いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１４１、１４３、１５２および１５３のいずれか１つに対して少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１４１、１４３、１５２および１５３のいずれか１つとわずか１、２

、３、４、５、６、７、８、９または１０アミノ酸だけ異なるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。当業者は、軽鎖可変領域内のどのアミノ酸が変更され得るかを決定できる。例えば、同じ特異性を有する抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を比較することによって、当業者は、どのアミノ酸がその特異性を変化させずに変更され得るかを決定できる。例示的なＤＣ８Ｅ８抗体軽鎖のＣＤＲアミノ酸配列の比較についての実施例を参照のこと。さらに、特異性が変更されているか否かは、抗原結合アッセイを使用して判定され得る。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１４１、１４３、１５２および１５３のいずれか１つに示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【０２１４】

いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１３８、１４０、１４７および１４８のいずれか１つに対して少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１３８、１４０、１４７および１４８のいずれか１つとわずか１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０アミノ酸だけ異なるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。当業者は、重鎖可変領域内のどのアミノ酸が変更され得るかを決定できる。例えば、同じ特異性を有する抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を比較することによって、当業者は、どのアミノ酸がその特異性を変化させずに変更され得るかを決定できる。例えば、例示的なＤＣ８Ｅ８抗体重鎖のＣＤＲアミノ酸配列の比較についての図３Ｅおよび２５Ｂを参照のこと。さらに、特異性が変更されているか否かは、抗原結合アッセイを使用して判定され得る。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１３８、１４０、１４７および１４８のいずれか１つに示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【０２１５】

いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１４１に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１３８に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１４１に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１４０に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１４１に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１４７に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１４１に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１４８に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１４３に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１３８に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１４３に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１４０に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１４３に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１４７に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１４３に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１４８に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１５２に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１３８に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１５２に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１４０に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１５２に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１４７に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１５２に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１４８に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１５３に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１３８に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１５３に示されるようなアミノ

酸配列を含む軽鎖および配列番号１４０に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１５３に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１４７に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１５３に示されるようなアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号１４８に示されるようなアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【０２１６】

いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１１７～１１９から選択される少なくとも１つ、少なくとも２つまたは３つのＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、主題の抗体は、配列番号１２０～１２２から選択される少なくとも１つ、少なくとも２つまたは３つのＣＤＲを含む重鎖可変領域を含む。これらの６つのＣＤＲのうちのいずれか１つが実施例１４に記載されるように変更される実施形態も提供される。いくつかの実施形態において、軽鎖中の変更されるＣＤＲのうちの少なくとも１つは、ＣＤＲ１に対して配列番号２４７、ＣＤＲ２に対して配列番号２５３、ならびにＣＤＲ３に対して配列番号２５５、２５７、２５８、２５９および２６０のうちのいずれか１つから選択される。いくつかの実施形態において、重鎖中の変更されるＣＤＲのうちの少なくとも１つは、ＣＤＲ１に対して配列番号２６１または配列番号２６２、ＣＤＲ２に対して配列番号２６４または配列番号２６５、およびＣＤＲ３に対して配列番号２６６、配列番号２６７または配列番号２６９から選択される。

【０２１７】

二重特異性または二機能性の抗体は、２つの異なる重鎖／軽鎖対および２つの異なる結合部位を有する人工的なハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはＦａｂ’フラグメントの連結を含む種々の方法によって作製され得る。例えば、Ｓｏｎｇｓｉｖｉｌａｉ　＆　Ｌａｃｈｍａｎｎ　Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．７９：３１５－３２１（１９９０）、Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７－１５５３（１９９２）を参照のこと。二重特異性抗体の作製は、従来の抗体の作製と比べて比較的大きな労働力を要するプロセスであり得、収率および純度は、通常、二重特異性抗体の場合、より低い。二重特異性抗体は、単一の結合部位を有するフラグメントの形態（例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦｖ）では存在しない。

【０２１８】

本発明は、天然の形態の抗体に関するものではなく、すなわち、それらの抗体は、それらの天然の環境から得られず、天然の起源からの精製によって単離されて得られるか、または遺伝的組換えもしくは化学合成によって得られ、ゆえに、それらは、非天然のアミノ酸を保有し得る。したがって、本明細書中で使用されるとき、２０種の従来のアミノ酸およびそれらの省略形は、従来の使用法に従う。Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ－Ａ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（２ｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｅ．Ｓ．Ｇｏｌｕｂ　ａｎｄ　Ｄ．Ｒ．Ｇｒｅｎ，Ｅｄｓ．，Ｓｉｎａｕｅｒ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，Ｍａｓｓ．（１９９１））（参照により本明細書に援用される）を参照のこと。２０種の従来のアミノ酸の立体異性体（例えば、Ｄ－アミノ酸、Ｎｌｅ、Ｎｖａ、Ｃｈａ、Ｏｒｎ、Ｈｌｅ、Ｃｈｇ、ＨｃｈまたはＨａｒ）、非天然のアミノ酸（例えば、．アルファ．－，．アルファ．－二置換アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸、乳酸および他の非従来のアミノ酸）もまた、本発明のポリペプチドに適した構成要素であり得る。非従来のアミノ酸の例としては（すなわち、以下に限定されない）：４－ヒドロキシプロリン、ガンマ．－カルボキシグルタメート、イプシロン．－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルリシン、．イプシロン．－Ｎ－アセチルリシン、Ｏ－ホスホセリン、Ｎ－アセチルセリン、Ｎ－ホルミルメチオニン、３－メチルヒスチジン、５－ヒドロキシリジン、．シグマ．－Ｎ－メチルアルギニンならびに他の同様のアミノ酸およびイミノ酸（例えば、４－ヒドロキシプロリン）が挙げられる。本明細書中で使用されるポリペプチドの表記では、標準的な使用法および慣習に従って、左側の方向は、アミノ末端の方向であり、右側の方向は、カルボキシ末端の方向である。

【０２１９】

同様に、本開示は、それらの天然の染色体の環境の、すなわち、天然の状態のヌクレオチド配列に関するものではない。本発明の配列は、単離および精製されており、すなわち、それらは、直接または間接的に、例えば、複製によってサンプリングされたものであり、それらの環境は、少なくとも部分的に改変されている。組換え遺伝学によって（例えば、宿主細胞を用いて）得られたまたは化学合成によって得られた、単離された核酸も提供される。

【０２２０】

本開示に関して、核酸またはアミノ酸の２つの配列間の「パーセンテージ同一性」は、最適なアラインメントの後に得られる、比較される２つの配列の間で同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージを意味し、このパーセンテージは、純粋に統計学的なものであり、その２つの配列間の差は、それらの長さにわたってランダムに分布されている。２つの核酸配列またはアミノ酸配列の比較は、従来より、それらを最適にアラインメントした後にそれらの配列を比較することによって行われており、前記比較は、セグメントによってまたは「アラインメント範囲」を使用することによって、行うことができる。比較のための配列の最適なアラインメントは、手作業による比較に加えて、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ（１９８１）［Ａｄ．Ａｐｐ．Ｍａｔｈ．２：４８２］のローカルホモロジーアルゴリズムを用いて、Ｎｅｄｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ（１９７０）［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３］のローカルホモロジーアルゴリズムを用いて、Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ（１９８８）［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：２４４４］の類似性検索法を用いて、またはこれらのアルゴリズムを使用するコンピュータソフトウェア（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩにおけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡおよびＴＦＡＳＴＡ、または比較ソフトウェアＢＬＡＳＴ ＮＲもしくはＢＬＡＳＴ Ｐによって）を用いて、行われ得る。

【０２２１】

２つの核酸配列またはアミノ酸配列の間のパーセンテージ同一性は、２つの最適にアラインメントされた配列を比較することによって測定され、ここで、比較する核酸配列またはアミノ酸配列は、それらの２つの配列間の最適なアラインメントのために参照配列と比べて付加または欠失を有し得る。パーセンテージ同一性は、アミノ酸、ヌクレオチドまたは残基が２つの配列の間（例えば、２つの完全な配列の間）で同一である位置の数を測定し、その同一の位置の数をアラインメント範囲内の位置の総数で除算し、その結果に１００を乗算することによって計算され、それにより、それらの２つの配列間のパーセンテージ同一性が得られる。

【０２２２】

例えば、サイトｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｏｒｆ／ｂｌ２．ｈｔｍｌにおいて利用可能なＢＬＡＳＴプログラムである「ＢＬＡＳＴ２配列」（Ｔａｔｕｓｏｖａら、“Ｂｌａｓｔ ２ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ－ａ ｎｅｗ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｃｏｍｐａｒｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ ａｎｄ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ”，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１９９９，Ｌｅｔｔ．１７４：２４７－２５０）が、デフォルトのパラメータ（とりわけ、パラメータ「オープンギャップペナルティ」：５および「伸長ギャップペナルティ」：２；選択される行列は、例えば、そのプログラムが提案する「ＢＬＯＳＵＭ６２」行列である）を用いて使用され得る；比較する２つの配列間のパーセンテージ同一性は、そのプログラムによって直接計算される。

【０２２３】

参照アミノ酸配列に対して少なくとも８０％、例えば、８５％、９０％、９５％および９８％の同一性を示すアミノ酸配列の場合、好ましい例としては、その参照配列、ある特定の改変、とりわけ、少なくとも１つのアミノ酸の欠失、付加もしくは置換、切断または伸長を含むものが挙げられる。１つもしくは複数の連続したまたは連続していないアミノ

酸の置換の場合、置換されるアミノ酸が「等価な」アミノ酸によって置き換えられる置換が好ましい。本明細書において、表現「等価なアミノ酸」は、構造的なアミノ酸のうちの１つの代わりに用いられる可能性があるがしかしながら対応する抗体および下記で定義される特定の例の生物学的活性を改変しない、任意のアミノ酸のことを示すと意味される。

【０２２４】

等価なアミノ酸は、置換するアミノ酸との構造的相同性、または作製される可能性がある様々な抗体間の生物学的活性の比較試験の結果に対して決定され得る。非限定的な例として、下記の表は、対応する改変された抗体の生物学的活性の重大な改変をもたらさずに行われる可能性がある可能な置換を要約している；逆の置換も当然、同じ条件下で可能である。

【表１Ａ】

元の残基	置換
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

【０２２５】

本発明は、実施例１～２に記載されるようにＡＴＣＣ Ｐａｔｅｎｔ Ｄｅｐｏｓｉｔ Ｄｅｓｉｇｎａｔｉｏｎ ＰＴＡ－１１９９４（２０１１年7月２９日発行）として２０１１年7月１３日にＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ，１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ，ＵＳＡ）に寄託されたマウスハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体を提供する。他の好適な抗体は、当該分野で公知であるような細胞系、混合細胞系、不死化細胞または不死化細胞のクローン集団によって産生され得る。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（Ｅｄ．），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９８７－２００１））；Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９））およびＳａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（３ｒｄ Ｅｄ．），Ｖｏｌ．１－３，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，２０００（ひとまとめにして「Ｓａｍｂｒｏｏｋ」）；Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９））；Ｃｏｌｌｉｇａｎら（Ｅｄｓ．），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．（１９９４－２００１））；Ｃｏｌｌｉｇａｎら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏ

ｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ，Ｎ．Ｙ．，（１９９７－２００１））（各々その全体が参照により本明細書に援用される）を参照のこと。

【０２２６】

本発明によって提供される抗体を作製するための１つのアプローチにおいて、ハイブリドーマは、好適な不死細胞系（例えば、ミエローマ細胞系）を種々の抗体産生細胞のうちの１つと融合することによって作製される。好適な不死細胞系としては、Ｓｐ２／０、Ｓｐ２／０－ＡＧ１４、Ｐ３／ＮＳ１／Ａｇ４－１、ＮＳＯ、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３、ＭＣＰ－１１、Ｓ－１９４、ヘテロミエローマ、その融合産物またはそれらから得られる任意の細胞もしくは融合細胞、あるいはこの目的のために当該分野で公知および／または商業的に入手可能（例えば、ＡＴＣＣ）であるような他の任意の好適な細胞系が挙げられるがこれらに限定されない。好適な抗体産生細胞としては、単離されたもしくはクローン化された脾臓、末梢血、リンパ、扁桃または他の免疫細胞もしくはＢ細胞を含む細胞、あるいは内在性核酸もしくは異種核酸として、組換えもしくは内在性、ウイルス、細菌、藻類、原核生物、両生類、昆虫、爬虫類、魚類、哺乳動物、げっ歯類、ウマ、ヒツジ（ｏｖｉｎｅ）、ヤギ、ヒツジ（ｓｈｅｅｐ）、霊長類、真核生物の、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡもしくはＲＮＡ、葉緑体ＤＮＡもしくはＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、一本鎖、二本鎖もしくは三本鎖、ハイブリダイズしたものなどとして、またはそれらの任意の組み合わせとして、重鎖または軽鎖の定常または可変またはフレームワークまたはＣＤＲ配列を発現している他の任意の細胞が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ，前出およびＣｏｌｌｉｇａｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，前出，Ｃｈａｐｔｅｒ ２（それらの全体が参照により本明細書に援用される）を参照のこと。

【０２２７】

上に記載された様々な実施形態の抗体を作製するための他のアプローチとしては、ペプチドライブラリーまたはタンパク質ライブラリー（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅｓｈｉｒｅ，ＵＫ；ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ，Ｍａｒｔｉｎｓｒｅｉｄ／Ｐｌａｎｅｇｇ，Ｄｅｌ．；Ｂｉｏｖａｔｉｏｎ，Ａｂｅｒｄｅｅｎ，Ｓｃｏｔｌａｎｄ，ＵＫ；ＢｉｏＩｎｖｅｎｔ，Ｌｕｎｄ，Ｓｗｅｄｅｎ；Ｄｙａｘ Ｃｏｒｐ．，Ｅｎｚｏｎ，Ａｆｆｙｍａｘ／Ｂｉｏｓｉｔｅ；Ｘｏｍａ，Ｂｅｒｋｅｌｅｙ，Ｃａｌｉｆ．；Ｉｘｓｙｓ；Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ；などから商業的に入手可能なライブラリーを含む）から組換え抗体を選択する方法；選択可能なヒト抗体セットを産生することができるトランスジェニック動物の免疫に依存する方法（一般に、これらのマウスは、機能的に再配列されるかまたは機能的な再配列を起こし得る少なくとも１つのヒト免疫グロブリン遺伝子座由来のＤＮＡを含む少なくとも１つの導入遺伝子を含み；そのようなマウスは、内在性遺伝子によってコードされる抗体を産生する能力を削除するためにその動物における内在性の免疫グロブリン遺伝子座が破壊され得るかまたは欠失され得る）；リボソームディスプレイ、単一細胞抗体産生技術（例えば、選択リンパ球抗体法（ｓｅｌｅｃｔｅｄ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｍｅｔｈｏｄ）（「ＳＬＡＭ」））およびＢ細胞選択を含む選択方法；シクロホスファミド（ｃｙｃｌｏｐｈｏｓａｍｉｄｅ）処理を用いるサブトラクティブ免疫法；ならびに当該分野において日常的な他の任意の方法（米国出願公開番号２００５／０１４２６０９に記載されている方法を含むがこれらに限定されない）（これらの方法は、その全体が参照により本明細書に援用される）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２８】

いくつかの実施形態において、上記抗体は、最適化された、キメラまたはヒト化完全長抗体であり、それらは、例えば、“Ｂｕｓｉｎｅｓｓ Ｉｎｓｉｇｈｔｓ，Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｒｅｌａｔｅｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ－Ｅｍｅｒｇｉｎｇ ｔｅｃｈ

nologies and new therapeutic candidates, by James Shirvill, 2010”のChapter 3、4および5（この全体の内容が参照により援用される）に列挙されているおよび例証されているような公知の手法（例えば：CDR移植、例えば、UBCのSLAM技術、PDLのSMART技術、Arana Therapeutics plcの超ヒト化（Superhumanization）、フレームワークパッチ、混成の（composit）ヒト抗体を作製するための手法、BioAtla LLCのATLAbプラットフォーム、ヒューマニアリング（humaneering）、Mutational Lineage Guided（MLG）ストラテジー、脱免疫（deimmunisation）ストラテジー、ヒューマネーション（humanation）ストラテジー、ヒト操作（human engineering）（例えば、XOMAのHE技術）、FcX、Biolex Therapeutics Inc（Pittsboro, NC, US）LEXシステム、Potelligentアプローチ（例えば、BioWa）、Complegent技術、BestMAb、ImmunoBody、EB66、Synageva Expression Platforms、Xencor Inc. XmAb、糖操作抗体（Sugar Engineered Antibodies）（例えば、Seattle Genetics Inc（Bothell, WA, US））、「Wox」（トリプトファンが酸化された）抗体（例えば、InNexus Biotechnology Inc（Vancouver, BC, Canada））；などのいずれか１つまたは組み合わせによって作製され得る。いくつかの実施形態において、上記抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体であり、例えば、“Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals－Emerging technologies and new therapeutic candidates, by James Shirvill, 2010”のChapter 4に列挙されているおよび例証されているような、ならびに：ファージディスプレイ（例えば、PDL, Dyax Corp；Cambridge, MA, US）；分子ベースの抗体スクリーニング（MBAS）（例えば、EP0547201およびUS6, 730, 483に記載されている、例えば、Affitech A／S）；細胞ベースの抗体選択（CBAS）プラットフォーム；ヒトコンビナトリアル抗体ライブラリー（HuCAL；例えば、MorphoSys AG）；MAbstractプラットフォーム（例えば、Crucell NV）（PER.C6細胞系を用いるものを含む）；Adimabプラットフォーム；XenoMouse；UltiMAbプラットフォーム；SEBVIプラットフォーム；VelocImmuneプラットフォーム、Open Monoclonal Technologyプラットフォーム、Xenerexプラットフォーム；Cloning the Human Responseプラットフォーム（例えば、IQ Therapeutics）および「Instant Immunity抗体」；Viventiaプラットフォーム（例えば、Fusogenics, UnLock, ImmunoMine）；「Natural Human Antibodies」プラットフォーム（例えば、OncoMab, Patrys, Acceptys）；MabIgX（例えば、Kenta Biotech）；Reverse Translational Medicineプラットフォーム（例えば、Neuimmune Therapeutics）；I－STAR（例えば、Theraclone Sciences）；CellSpot（例えば、Trellis Bioscience）；iBioLaunch（例えば、iBio Inc.）；などを含むがこれらに限定されない、プラットフォーム技術のうちの１つまたは組み合わせによって作製され得る。

【０２２９】

いくつかの実施形態において、上記抗体は、“Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals－Emergin

ｇ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ａｎｄ ｎｅｗ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｃａｎｄｉｄａｔｅｓ，ｂｙ Ｊａｍｅｓ Ｓｈｉｒｖｉｌｌ，２０１０”のＣｈａｐｔｅｒ ５に記載されているようなプラットフォーム技術および方法（抗体薬結合体（例えば、ＡＤＣ，Ｓｅａｔｔｌｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ）；標的化抗体ペイロード（ｔａｒｇｅｔｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｐａｙｌｏａｄ）（ＴＡＰ；Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎ Ｉｎｃ）；プロボディ（Ｐｒｏｂｏｄｉｅｓ）（例えば、ＣｙｔｏｍＸ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）；抗体クローキング（ａｎｔｉｂｏｄｙ ｃｌｏａｋｉｎｇ）（例えば、ＢｉｏＴｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎｓ）；標的化光線力学的療法（例えば、ＰｈｏｔｏＢｉｏｔｉｃｓ；ＡｌｂｕｄＡｂ（例えば、ＧＳＫ）；ｈｙＦｃ（例えば、Ｇｅｎｅｘｉｎｅ）；リガンド捕捉（例えば、ＢｉｏＬｏｇｉｘ）；ＣｏｖＸ－Ｂｏｄｙ（例えば、ＣｏｖＸ）；Ｄｙｎａｍｉｃ Ｃｒｏｓｓ－Ｌｉｎｋｉｎｇ（例えば、ＩｎＮｅｘｕｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）；ＬＥＣ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（例えば、Ｐｉｖｏｔａｌ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍｏｒｐｈｏｔｅｋ）；などを含む）のうちの１つもしくは複数を使用して、それらを非抗体物質に連結することによって改変される。

【０２３０】

いくつかの実施形態において、上記抗体またはそのコードｃＤＮＡは、さらに改変され得る。したがって、さらなる実施形態において、本発明は、様々な実施形態の抗体を作製する方法を提供し、ここで、その方法は、キメラ抗体、ヒト化抗体またはそれらのいずれか１つのアナログを作製する工程のうちのいずれか１つを包含する。いくつかの実施形態において、キメラ抗体の作製は、国際出願ＷＯ８９／０９６２２に記載されているとおりである。ヒト化抗体を作製するための方法は、例えば、米国特許第６，５４８，６４０号またはカナダ特許第１３４０８７９号（ＣＤＲ移植）に記載されている。

【０２３１】

さらに、上記抗体またはそのコードｃＤＮＡは、さらに改変され得る。したがって、さらなる実施形態において、本発明は、一本鎖抗体、Ｆａｂフラグメント、二重特異的抗体、融合抗体、標識抗体またはそれらのいずれか１つのアナログを作製する工程のうちのいずれか１つを包含する方法を提供する。上で論じたように、本発明の抗体は、完全な抗体に加えて、例えば、Ｆｖ、ＦａｂおよびＦ（ａｂ）２ならびに一本鎖を含む種々の形態で存在し得る。例えば、国際出願ＷＯ８８／０９３４４を参照のこと。さらに、ダイアボディおよびＶ様ドメイン結合分子も当業者に周知である；例えば、米国特許第７，１６６，６９７号を参照のこと。

【０２３２】

いくつかの実施形態において、上記抗体（例えば、ＤＣ８Ｅ８）は、改変されるか、またはＤＣ８Ｅ８抗体に対して記載された抗原結合特性の１つもしくは複数を有する結合分子を作製するための根拠となる。これらの結合タンパク質は、例えば、“Ｂｕｓｉｎｅｓｓ Ｉｎｓｉｇｈｔｓ，Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｒｅｌａｔｅｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ－Ｅｍｅｒｇｉｎｇ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ａｎｄ ｎｅｗ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｃａｎｄｉｄａｔｅｓ，ｂｙ Ｊａｍｅｓ Ｓｈｉｒｖｉｌｌ，２０１０”のＣｈａｐｔｅｒ ６に列挙されているおよび例証されている手法の１つもしくは複数によって作製され得、その結合タンパク質には、Ｆａｂ，ＴｅｔｒａＭＡＢ（例えば、Ｇａｌｉｌｅｏ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃｓ）；ｓｃＦｖ；Ｉｍｍｕｎａ（例えば、ＥＳＢＡ Ｔｅｃｈ ＡＧ）；［ｓｃＦｖ］２（ＤＣ８Ｅ８の４つの治療用エピトープのうちの任意の２つに結合する結合分子を含む）；ＢｉＴＥ（Ａｆｆｉｔｅｃｈ，Ｍｉｃｒｏｍｅｔ ＡＧ）；アビボディ（Ａｖｉｂｏｄｉｅｓ）（例えば、Ａｖｉｐｅｐ Ｐｔｙ）；ＴａｎｄＡｂ（例えば、Ａｆｆｉｍｅｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）；フレキシボディ（Ｆｌｅｘｉｂｏｄｙ）（例えば、Ａｆｆｉｍｅｄ）；Ｖ－ＮＡＲ（例えば、ＡｄＡｌｔａ）；ナノボディ（Ｎａｎｏｂｏｄｙ）（Ａｂｌｙｎｘ ＮＶ）；ドメイン抗体（Ｄｏｍａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）（例えば、Ｄｉｖｅｒｓｙｓ Ｌｔｄ．ＧＳＫ，米国特許第６，２４８，５１６号および欧州特許第０３６８６８４号）；ヘテロポリマー（Ｈｅｔｅｒｏ

ｐｏｌｙｍｅｒ）（例えば、Ｅｌｕｓｙｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ Ｉｎｃ.）；ユニボディ（Ｕｎｉｂｏｄｙ）（例えば、ＧｅｎＭａｂ Ａ／Ｓ）；ドメイン交換抗体（Ｄｏｍａｉｎ Ｅｘｃｈａｎｇｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）（例えば、Ｃａｌｍｕｎｅ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００３ Ｊｕｎ ２７；３００（５６２８）：２０６５－７１）；小モジュール免疫薬（Ｓｍａｌｌ Ｍｏｄｕｌａｒ ＩｍｍｕｎｏＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）（ＳＭＩＰ）およびＳＣＯＲＰＩＯＮ分子（例えば、Ｔｒｕｂｉｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）；二重可変ドメイン免疫グロブリン（Ｄｕａｌ Ｖａｒｉａｂｌｅ Ｄｏｍａｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ，ＤＶＤ－Ｉｇ）（Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）；などが含まれる。

【０２３３】

本発明の抗体またはそれらの対応する免疫グロブリン鎖は、例えば、アミノ酸の欠失、挿入、置換、付加および／もしくは組換えならびに／または当該分野で公知の他の任意の改変を単独でまたは組み合わせて使用することによって、当該分野で公知の従来の手法を使用してさらに改変され得る。例えば、下記にさらに提供される実施例を参照のこと。そのような改変を、免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列の基礎をなすＤＮＡ配列に導入するための方法は、当業者に公知である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ（前出）およびＡｕｓｕｂｅｌ（前出）を参照のこと。本発明の抗体の改変は、１つもしくは複数の構成アミノ酸における化学的および／または酵素的な誘導体化（側鎖の改変、骨格の改変、ならびにＮおよびＣ末端の改変（アセチル化、ヒドロキシル化、メチル化、アミド化および炭水化物または脂質部分、コファクターの結合または除去を含む）を含む）などを含む。同様に、本発明は、カルボキシル末端において異種分子（例えば、免疫賦活性リガンド）に融合された、記載される抗体またはいくつかのそのフラグメントをアミノ末端に含むキメラタンパク質の作製を包含する。対応する技術的詳細については、例えば、国際出願ＷＯ００／３０６８０（その全体が参照により本明細書に援用される）を参照のこと。

【０２３４】

１つの実施形態において、本発明は、抗体またはその結合フラグメントもしくは免疫グロブリン鎖を作製するための方法に関し、その方法は、

（ａ）上に記載されたような細胞を培養する工程；および

（ｂ）その培養物から前記抗体またはその結合フラグメントもしくは免疫グロブリン鎖を単離する工程

を包含する。いくつかの実施形態において、上記単離は、抗体を含むサンプルを、本発明によって提供される、その抗体が結合するペプチドのうちの１つと接触させることを包含する。

【０２３５】

形質転換された宿主は、当該分野で公知の手法に従って、発酵槽において生育され、培養されることにより、最適な細胞の成長を達成することができる。いったん発現されたら、本発明のホール抗体、その二量体、個別の軽鎖および重鎖または他の免疫グロブリン形態は、当該分野の標準的な手順（硫安塩析、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む）に従って精製され得る；Ｓｃｏｐｅｓ，“Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ”，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，Ｎ．Ｙ．（１９８２）を参照のこと。次いで、その抗体またはその対応する免疫グロブリン鎖は、成長培地、細胞溶解産物または細胞膜画分から単離され得る。例えば、本発明によって提供される組換え的に発現された抗体または免疫グロブリン鎖の単離および精製は、任意の従来の手段（例えば、本発明の抗体の定常領域に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用を含むもののような、分取クロマトグラフィー分離および免疫学的分離）によって行われ得る。

【０２３６】

少なくとも約９０～９５％の均一性という実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、９８～９９％またはそれ以上の均一性が、薬学的用途にとって最も好ましい。部分的にまたは所望のとおりの均一性に精製されたら、次いで、その抗体は、治療的に（体外的（ｅ

ｘｔｒａｃｏｒｐｏｒａｌｌｙ）を含む）、またはアッセイ手順を開発するおよび実施する際に、使用され得る。

【０２３７】

本発明は、薬物標的化およびイメージングの用途などの目的のために他の部分に結合された抗体も提供する。そのような結合は、その抗体を発現させた後に結合部位に対して化学的に行われ得るか、または本発明の抗体になるようにＤＮＡレベルで結合産物が操作され得る。次いで、そのＤＮＡが、好適な宿主系において発現され、発現されたタンパク質が、回収され、必要であれば再生される。

【０２３８】

本発明は、本発明の抗体またはその対応する免疫グロブリン鎖を発現することができる細胞を作製するための方法も含み、その方法は、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターで細胞を遺伝的に操作する工程を包含する。本発明の方法によって入手可能な細胞は、例えば、本発明の抗体とその抗原との相互作用を試験するために使用され得る。

【０２３９】

本発明は、本発明によって提供される抗体の供給源として、抗体を産生する細胞系および組換え細胞も提供する。本発明はさらに、本発明によって提供される抗体または等価な結合分子を含む診断アッセイおよびキット、ならびにそれらに基づく治療方法に関する。

【０２４０】

本発明は、ＤＣ８Ｅ８と競合することができ、病理学的タウ－タウ相互作用を阻害することもできる抗体を作製するための方法も提供する。それらの抗体は、タウへの結合および本明細書中で同定される「治療用エピトープ」の１、２、３つまたは４つすべてへの結合についてＤＣ８Ｅ８と十分に競合する能力によってスクリーニングされ得る。

【０２４１】

本発明は、本発明によって提供される抗体ベースの物質の１つもしくは複数をコードするポリヌクレオチドにも関する。ある特定の場合において、そのヌクレオチドは、例えば、少なくとも、上に記載された抗体の免疫グロブリン鎖の結合ドメインまたは可変領域をコードする。代表的には、ポリヌクレオチドによってコードされる前記可変領域は、前記抗体の可変領域のＶＨおよび／またはＶＬの少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。当業者は、抗体の各可変ドメイン（重鎖ＶＨおよび軽鎖ＶＬ）が、４つの比較的保存されたフレームワーク領域または「ＦＲ」に隣接される３つの超可変領域（時折、相補性決定領域または「ＣＤＲ」と呼ばれる）を含み、それが抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基のことを指すことを承知している。Ｋａｂａｔのナンバリングシステムによると、ヒトＩｇＧサブタイプの抗体の超可変領域またはＣＤＲは、Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１）によって記載されているように、軽鎖可変ドメインに残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）および８９～９７（Ｌ３）ならびに重鎖可変ドメインに３１～３５（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）および９５～１０２（Ｈ３）のアミノ酸残基、ならびに／またはＣｈｏｔｈｉａら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６（１９８７），９０１－９１７によって記載されているように、超可変ループの残基、すなわち、軽鎖可変ドメインに残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）および９１～９６（Ｌ３）ならびに重鎖可変ドメインに２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）および９６～１０１（Ｈ３）を含む。ＩＭＧＴユニークナンバリングシステムでは、保存されたアミノ酸は常に、同じ位置、例えば、システイン２３（第１ＣＹＳ）、トリプトファン４１（保存ＴＲＰ）、疎水性アミノ酸８９、システイン（ｃｙｓｔｅｉｎ）１０４（第２ＣＹＳ）、フェニルアラニンまたはトリプトファン１１８（Ｊ－ＰＨＥまたはＪ－ＴＲＰ）を有する。例えば、Ｌｅｆｒａｎｃ Ｍ．－Ｐ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ １８，５０９（１９９７）；Ｌｅｆｒａｎｃ Ｍ．－Ｐ．，Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｓｔ，７，１３２－１３６（１９９９）；Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．－Ｐ．，Ｐｏｍｍｉｅ，Ｃ．，Ｒｕｉｚ，Ｍ．，Ｇｉｕｄｉ

ｃｅｌｌｉ，Ｖ．，Ｆｏｕｌｑｕｉｅｒ，Ｅ．，Ｔｒｕｏｎｇ，Ｌ．，Ｔｈｏｕｖｅｎｉｎ－Ｃｏｎｔｅｔ，Ｖ．ａｎｄ Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｄｅｖ．Ｃｏｍｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２７，５５－７７（２００３）を参照のこと。ＩＭＧＴユニークナンバリングは、フレームワーク領域（ＦＲ１－ＩＭＧＴ：１～２６位、ＦＲ２－ＩＭＧＴ：３９～５５位、ＦＲ３－ＩＭＧＴ：６６～１０４位およびＦＲ４－ＩＭＧＴ：１１８～１２８位）および相補性決定領域：ＣＤＲ１－ＩＭＧＴ：２７～３８位、ＣＤＲ２－ＩＭＧＴ：５６～６５位およびＣＤＲ３－ＩＭＧＴ：１０５～１１７位の標準化された境界を提供する。ＩＭＧＴユニークナンバリングは、ＩＭＧＴ Ｃｏｌｌｉｅｒｓ ｄｅ Ｐｅｒｌｅｓと命名された２Ｄグラフ表示において使用される。例えば、Ｒｕｉｚ，Ｍ．ａｎｄ Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．－Ｐ．，Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ，５３，８５７－８８３（２００２）；Ｋａａｓ，Ｑ．ａｎｄ Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．－Ｐ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，２，２１－３０（２００７）を参照のこと。それは、３Ｄ構造を表示するためにも使用される。例えば、ＩＭＧＴ／３Ｄｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－ＤＢ Ｋａａｓ，Ｑ．，Ｒｕｉｚ，Ｍ．ａｎｄ Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．－Ｐ．，Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｎｄ ＭＨＣ ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｄａｔａ．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．，３２，Ｄ２０８－Ｄ２１０（２００４）を参照のこと。フレームワークまたはＦＲ残基は、超可変領域以外の、および超可変領域を考慮の対象外に置いた、可変ドメイン残基である。

【０２４２】

したがって、本発明は、以下の核酸（任意の縮重遺伝暗号を含む）：

ａ）本発明に係る抗体をコードする核酸、ＤＮＡまたはＲＮＡ；

ｂ）ａ）において定義されたような核酸に相補的な核酸；

ｃ）配列番号１１７～１２２ならびに配列番号２４７、２５３、２５５、２５７～２５９、１２２、２６１、２６２、２６４、２６５～２６７および２６９から選択されるＣＤＲの少なくとも１つと高度にストリンジェントな条件下においてハイブリダイズすることができる少なくとも１８ヌクレオチドの核酸；および

ｄ）少なくとも配列番号１６５の核酸配列の軽鎖および／もしくは配列番号１７０の核酸配列の重鎖、または配列番号１６５および／もしくは配列番号１７０の配列との最適なアラインメントの後に少なくとも８０％、例えば、８５％、９０％、９５％および９８％の同一性を有する配列、例えば、ＩＭＧＴナンバリングに従うそれらからのＣＤＲの少なくとも１つと高度にストリンジェントな条件下においてハイブリダイズすることができる少なくとも１８ヌクレオチドの核酸

から選択されることを特徴とする単離された核酸にも関する。

【０２４３】

好ましい配列との最適なアラインメントの後に少なくとも８０％、例えば、８５％、９０％、９５％および９８％のパーセンテージ同一性を示す核配列は、参照核配列に関して、とりわけ規則的な、ある特定の改変（例えば、特に、欠失、切断、伸長、キメラ融合および／または置換）を示す核配列のことを意味する。いくつかの実施形態において、これらは、参照配列と同じアミノ酸配列をコードする配列（これは、遺伝暗号の縮重に関する）、または例えば、高度にストリンジェントな条件（とりわけ下記で定義される条件）下において、参照配列と特異的にハイブリダイズする可能性がある相補性配列である。

【０２４４】

高度にストリンジェントな条件下におけるハイブリダイゼーションは、温度およびイオン強度に関する条件が、２つの相補性ＤＮＡフラグメント間でのハイブリダイゼーションの維持を可能にするような方法で選択されることを意味する。純粋に例証的に、上に記載されたポリヌクレオチドフラグメントを定義する目的のハイブリダイゼーション工程の高度にストリンジェントな条件は、以下のとおりの条件であることが好都合である。

【０２４５】

ＤＮＡ－ＤＮＡまたはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリダイゼーションは、２つの工程において行われる：（１）５×ＳＳＣ（１×ＳＳＣは、０．１５Ｍ ＮａＣｌ＋０．０１５Ｍクエ

ン酸ナトリウムの溶液に対応する）、５０％ホルムアミド、７％ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、１０×Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ、５％デキストラン硫酸および１％サケ精子ＤＮＡを含むリン酸緩衝液（２０ｍＭ，ｐＨ７．５）中、４２℃での３時間にわたるプレハイブリダイゼーション；（２）プローブの長さに応じた温度（すなわち：＞１００ヌクレオチド長のプローブの場合、４２℃）における２０時間にわたる第１のハイブリダイゼーションに続く、２×ＳＳＣ＋２％ＳＤＳ中、２０℃での２回の２０分間の洗浄、０．１×ＳＳＣ＋０．１％ＳＤＳ中、２０℃での１回の２０分間の洗浄。最後の洗浄は、＞１００ヌクレオチド長のプローブの場合、０．１×ＳＳＣ＋０．１％ＳＤＳ中、６０℃において３０分間行われる。規定のサイズのポリヌクレオチドに対する上に記載された高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、それよりも長いまたは短いオリゴヌクレオチドに対して、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ：ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ；３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００１）に記載されている手順に従って、当業者によって適合され得る。

【０２４６】

抗原に対する抗体の親和性またはアビディティーは、任意の好適な方法；例えば、Ｐｏｐｅ ＭＥ，Ｓｏｓｔｅ ＭＶ，Ｅｙｆｏｒｄ ＢＡ，Ａｎｄｅｒｓｏｎ ＮＬ，Ｐｅａｒｓｏｎ ＴＷ．（２００９）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．３４１（１－２）：８６－９６を参照のことおよび本明細書中に記載される方法を使用して実験的に測定され得る。特定の抗体抗原相互作用の測定された親和性は、異なる条件下、例えば、塩濃度、ｐＨにおいて測定された場合、変動し得る。したがって、親和性および他の抗原結合パラメータ、例えば、Ｋ ｓｕｂ Ｄ、ＩＣ５０の測定は、例えば、抗体および抗原の標準液ならびに標準化された緩衝液を用いて行われる。

【０２４７】

本発明は、上に記載された可変ドメインを有する抗体の可変ドメインが、所望の特異性および生物学的機能の他のポリペプチドまたは抗体の構築のために使用され得ることも提供する。したがって、本発明は、上に記載された可変ドメインの少なくとも１つのＣＤＲを含み、添付の実施例に記載される抗体と実質的に同じまたは類似の結合特性を有利に有する、ポリペプチドおよび抗体も包含する。当業者は、本明細書中に記載される可変ドメインまたはＣＤＲを使用して、当該分野で公知の方法に従って、例えば、欧州特許出願ＥＰ０４５１２１６Ａ１およびＥＰ０５４９５８１Ａ１に記載されているように抗体が構築され得ることを認識するだろう。さらに、当業者は、結合親和性が、Ｋａｂａｔによって定義されたようなＣＤＲと部分的に一部重複する、ＣＤＲ内または超可変ループ内（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６（１９８７），９０１－９１７）でアミノ酸置換を行うことによって高められ得ることを承知している。したがって、本発明は、言及されたＣＤＲの１つもしくは複数が、１つもしくは複数の（例えば、多くとも２つの）アミノ酸置換を含む抗体にも関する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、図３Ｂおよび３Ｅに示されるような可変領域の２つまたは３つすべてのＣＤＲをその免疫グロブリン鎖の一方または両方に含む。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、図２５Ｂに示されるような２つまたは３つすべてのＣＤＲをその免疫グロブリン鎖の一方または両方に含む。

【０２４８】

上に記載された抗体をコードするポリヌクレオチドまたは核酸は、例えば、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＲＮＡ、または合成的に生成されたＤＮＡもしくはＲＮＡ、あるいは任意のそれらのポリヌクレオチドを単独でまたは組み合わせて含む組換え的に生成されたキメラ核酸分子であり得る。いくつかの実施形態において、そのポリヌクレオチドは、ベクターの一部である。そのようなベクターは、さらなる遺伝子（例えば、好適な宿主細胞においておよび好適な条件下において前記ベクターの選択を可能にするマーカー遺伝子）を含み得る。

【０２４９】

いくつかの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、原核細胞または真核細胞内での発現を可能にする１つもしくは複数の発現調節配列に作動可能に連結される。前記ポリヌクレオチドの発現は、ポリヌクレオチドから翻訳可能なｍＲＮＡへの転写を含む。真核細胞、例えば、哺乳動物細胞内での発現を確実にする調節エレメントは、当業者に公知である。それらは通常、転写の開始を確実にする制御配列、ならびに必要に応じて、転写の終結および転写物の安定化を確実にするポリ－Ａシグナルを含む。さらなる調節エレメントは、転写エンハンサーならびに翻訳エンハンサー、および／または天然に関連するもしくは異種のプロモーター領域を含み得る。

【０２５０】

この点において、当業者は、少なくとも軽鎖および／または重鎖の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドが、両方の免疫グロブリン鎖または一方だけの可変ドメインをコードし得ることを認識するだろう。同様に、前記ポリヌクレオチドは、同じプロモーターの支配下であり得るか、または発現について別々に制御され得る。原核生物宿主細胞内での発現を可能にする可能性のある調節エレメントは、例えば、大腸菌におけるＰＬ、ｌａｃ、ｔｒｐまたはｔａｃプロモーターを含み、真核生物宿主細胞内での発現を可能にする調節エレメントに対する例は、酵母におけるＡＯＸ１もしくはＧＡＬ１プロモーター、または哺乳動物細胞および他の動物細胞におけるＣＭＶ－、ＳＶ４０－、ＲＳＶ－プロモーター、ＣＭＶ－エンハンサー、ＳＶ４０－エンハンサーもしくはグロビンイントロンである。

【０２５１】

転写の開始に関与するエレメントに加えて、そのような調節エレメントは、そのポリヌクレオチドの下流に転写終結シグナル（例えば、ＳＶ４０－ポリ－Ａ部位またはｔｋ－ポリ－Ａ部位）も含み得る。さらに、使用される発現系に応じて、ポリペプチドを細胞内コンパートメントに向かわせることができるかまたはそれを培地に分泌することができるリーダー配列が、そのポリヌクレオチドのコード配列に付加され得、そのリーダー配列は、当該分野で公知である。そのリーダー配列は、適切な段階において、翻訳開始配列および翻訳終結配列、ならびに必要に応じて、翻訳されたタンパク質またはその一部を細胞周辺腔または細胞外の培地に分泌することを指示することができるリーダー配列とともに、構築される。いくつかの実施形態において、異種配列が、所望の特徴、例えば、発現された組換え産物の安定化または簡易化された精製を付与する、ＣまたはＮ末端の識別ペプチドを含む融合タンパク質をコードし得る。この文脈において、好適な発現ベクターは、当該分野で公知であり、それらとしては、Ｏｋａｙａｍａ－Ｂｅｒｇ　ｃＤＮＡ発現ベクターｐｃＤＶ１（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）、ｐＣＤＭ８、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐｃＤＮＡ１、ｐｃＤＮＡ３（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）およびｐＳＰＯＲＴ１（ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ）が挙げられるがこれらに限定されない。

【０２５２】

いくつかの実施形態において、発現調節配列は、真核生物宿主細胞を形質転換することまたはトランスフェクトすることができるベクター内の真核生物のプロモーター系であり得るが、原核生物宿主に対する調節配列も使用できる。いったん、ベクターが適切な宿主に組み込まれると、その宿主は、そのヌクレオチド配列の高レベルの発現に適した条件下で維持され、所望であれば、免疫グロブリン軽鎖、重鎖、軽鎖／重鎖二量体またはインタクトな抗体、結合フラグメントまたは他の免疫グロブリンの形態の回収および精製がその後に続き得る。例えば、Ｂｅｙｃｈｏｋ，Ｃｅｌｌｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．，（１９７９）を参照のこと。

【０２５３】

さらに、本発明は、本発明の抗体の免疫グロブリン鎖の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドを；必要に応じて、本発明の抗体の他方の免疫グロブリン鎖の可変ドメインをコードする本発明のポリヌクレオチドと組み合わせて含む、遺伝子操作において従来使用されている、ベクター、特に、プラスミド、コスミド、ウイルスおよびバクテリオファ

ージを提供する。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、発現ベクターおよび／または遺伝子導入ベクターもしくはターゲティングベクターである。ウイルス（例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスまたはウシパピローマウイルス）に由来する発現ベクターは、標的化された細胞集団への本発明のポリヌクレオチドまたはベクターの送達のために使用され得る。当業者に公知の任意の方法が、組換えウイルスベクターを構築するために使用され得る。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ（前出）およびＡｕｓｕｂｅｌ（前出）に記載されている手法を参照のこと。あるいは、本発明によって提供されるポリヌクレオチドおよびベクターは、標的細胞への送達用のリポソームに再構成され得る。本発明によって提供されるポリヌクレオチド（例えば、配列および発現調節配列をコードする免疫グロブリン鎖の重鎖および／または軽鎖可変ドメイン）を含むベクターは、細胞宿主のタイプに応じて変化する公知の方法によって宿主細胞に移され得る。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションが、原核細胞に対して通常利用されるのに対し、リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが、他の細胞宿主に対して使用され得る。

【０２５４】

本発明はさらに、本発明によって提供されるポリヌクレオチドまたはベクターで形質転換された宿主細胞に関する。その宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。その宿主細胞内に存在するポリヌクレオチドまたはベクターは、宿主細胞のゲノムにインテグレートされ得るか、または染色体外に維持され得る。宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞（例えば、細菌、昆虫、真菌、植物、動物またはヒト細胞）であり得る。好ましい真菌細胞は、例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属の細胞、特に、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ種の細胞である。組換え作製手順において使用される宿主に応じて、本発明のポリヌクレオチドによってコードされる抗体または免疫グロブリン鎖は、グリコシル化され得るか、またはグリコシル化され得ない。本発明によって提供されるある特定の抗体、または対応する免疫グロブリン鎖は、最初のメチオニンアミノ酸残基も含み得る。本発明のポリヌクレオチドは、当業者に一般に公知の任意の手法を使用して宿主を形質転換するためまたはトランスフェクトするために使用され得る。さらに、融合された作動可能に連結された遺伝子を調製するための方法、ならびにそれらを例えば哺乳動物細胞および細菌において発現させるための方法は、当該分野で周知である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋを参照のこと。それに記載されている遺伝的コンストラクトおよび方法は、本発明によって提供される抗体またはそれらの対応する免疫グロブリン鎖を真核生物または原核生物の宿主において発現させるために利用され得る。通常、挿入されたポリヌクレオチドの効率的な転写を促すプロモーター配列を含む発現ベクターが、宿主とともに使用される。その発現ベクターは、代表的には、複製起点、プロモーターおよびターミネーター、ならびに形質転換された細胞の表現型選択を提供することができる特定の遺伝子を含む。ＤＮＡ配列に対する好適な起源細胞ならびに免疫グロブリンの発現および分泌のための宿主細胞は、いくつかの供給源（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（“Ｃａｔａｌｏｇｕｅ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅｓ ａｎｄ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ”, Ｆｉｆｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８５）Ｍａｎａｓｓａｓ, ＶＡ, Ｕ．Ｓ．Ａ．および参照により本明細書に援用される他の入手可能なバージョン）から得ることができる。さらに、本発明の細胞を含むトランスジェニック動物、例えば、哺乳動物が、本発明の抗体の大規模作製のために使用され得る。

【０２５５】

さらに、ある特定の抗体について、重鎖ＣＤＲ３（ＨＣＤＲ３）が、より高い程度の可変性を有する領域であり、抗原抗体相互作用において主に関与することが頻繁に観察されているので、本発明は、小ペプチド（上に記載されたような結合分子を含む小ペプチド、例えば、言及された抗体のいずれか１つの可変領域のＣＤＲ３領域、特に、重鎖のＣＤＲ３を含む小ペプチドを含む）を包含する。そのようなペプチドは、合成されるかまたは組換え手段によって生成されることにより、本発明に係る有用な結合物質を生成し得る。そのような方法は、当業者に公知である。ペプチドは、例えば、商業的に入手可能な自動ペ

プチド合成装置を使用して、合成され得る。それらのペプチドは、そのペプチドを発現するＤＮＡを発現ベクターに組み込み、その発現ベクターで細胞を形質転換してそのペプチドを産生させることによる組換え手法によっても生成され得る。

【０２５６】

上に記載された融合タンパク質はさらに、スペーサー部分と呼ばれ得る、切断可能なリンカーまたはプロテイナーゼに対する切断部位を含み得る。これらのスペーサー部分はさらに、不溶性または可溶性であり得（Ｄｉｅｎｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３１（１９８６），１４８）、標的部位においてその抗体からの薬物の放出を可能にするように選択され得る。免疫療法のために本発明の抗体に結合され得る治療薬の例は、薬物、放射性同位体、レクチンおよびトキシンである。本発明の抗体および抗原に結合体化され得る薬物には、古典的に薬物と称される化合物（例えば、マイトマイシンＣ、ダウノルビシンおよびビンブラスチン）が含まれる。例えば、免疫療法のための放射性同位体的に結合体化された本発明の抗体または抗原を使用する際、ある特定の同位体が、白血球分布ならびにアイソタイプの安定性および放射のような因子に応じて他のものよりも好ましい場合がある。自己免疫性応答に応じて、いくつかの放射体が他のものよりも好ましい場合がある。通常、アルファおよびベータ粒子を放射する放射性同位体が、免疫療法において好ましい。ある特定の好ましい場合において、放射性同位体は、^{212}Ｂｉなどの短距離高エネルギーアルファ放射体である。治療目的のために本発明の抗体または抗原に結合され得る放射性同位体の例は、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{90}Ｙ、^{67}Ｃｕ、^{212}Ｂｉ、^{211}Ａｔ、^{211}Ｐｂ、^{47}Ｓｃ、^{109}Ｐｄおよび^{188}Ｒｅである。ある特定の場合において、放射標識は、^{64}Ｃｕである。本発明の抗体または抗原に結合され得る他の治療薬、ならびにエキソビボおよびインビボにおける治療的プロトコルは、公知であるか、または当業者によって確かめられ得る。適切な場合には必ず、当業者は、タンパク質性材料自体の代わりに、上に記載された抗体、抗原のいずれか１つをコードする本発明のポリヌクレオチド（およびそれに対する供給源として）または対応するベクターを使用し得る。

【０２５７】

本発明は、被験体内での誤無秩序タウおよび／もしくは誤秩序タウの形成を抑制するため、またはそれらのタウのレベルを別途低下させるためにインビボにおいて使用するための組成物の調製のため；あるいは体液からの病理学的タウ化合物またはそれらの前駆体を体外抽出するための、本明細書中に提供されるような結合分子または抗体の使用にも関する。これらの方法は、認知を改善するため、または疾患に関連する認知低下を遅らせるかもしくは逆転させるために使用され得る。本発明によって提供される抗体もしくは結合分子またはそれらの化学的誘導体は、血液またはＣＳＦに直接投与され、その後の工程において、親和性捕捉によってその血液またはＣＳＦから隔離され得る（それにより、誤秩序タウおよび誤無秩序タウは、上述の結合分子とともに隔離される）。それゆえ、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病または関連タウオパチーの発生または進行を処置するまたは予防する方法にも関し、その方法は、血液またはＣＳＦを被験体の身体から取り出す工程、その血液およびＣＳＦを曝す工程、およびそのように得られた血液およびＣＳＦをそれぞれその被験体に戻す工程を包含する。

【０２５８】

本発明の抗体、ペプチドまたは結合分子／タンパク質を含む分子および粒子は、診断的有用性も有する。本発明は、異なる段階のアルツハイマー病に存在する異なる形態のタウタンパク質を認識するおよび区別する抗体を提供する。これらの抗体は、インビトロとインビボの両方において、タウ（およびその様々なコンフォーメーション変化）を検出することができる。それらの抗体は、生化学的、免疫沈降、ＥＬＩＳＡ、ウエスタンブロッティングおよび免疫組織化学アッセイ（例えば、新鮮、固定、凍結、パラフィン包埋）をはじめとした種々のアッセイ、ならびに例えば、生理学的タウを病理学的タウと区別する放射性標識されたＤＣ８Ｅ８（一本鎖ＤＣ８Ｅ８などのＤＣ８Ｅ８のフラグメントを含む）を使用するインビボイメージングにおいて生理学的タウと病理学的タウとを区別し得る（実施例を参照のこと）。それらは、固体と流体の両方（例えば、血液、血漿、ＣＳＦ、ホ

モジネート）、動物（例えば、げっ歯類、ヒト）サンプルおよび生検材料において、そのように行うことができる。これらの検出アッセイのいくつかは、下記の実施例に記載される。タンパク質を検出するための他の日常的な方法は、当業者に公知であり、ゆえに、本発明によって提供される抗体、ペプチドおよびタウ結合分子に対して通例のとおり適合され得る。本発明の抗体は、標識され得（例えば、蛍光、放射性、酵素、核磁気、重金属）、インビトロにおける免疫化学様アッセイを含むインビボまたはインビトロにおいて、特定の標的を検出するために使用され得る（例えば、下に記載される実施例を参照のこと）。また、インビボにおいて、それらは、誤無秩序タウおよびその沈着物を有する組織、細胞または他の材料を検出する核医学イメージング法に類似の様式で使用され得る。ＭＲＩまたはＰＥＴによって検出可能な診断的イメージングプローブを用いた細胞内および細胞外の誤無秩序タウおよび神経原線維病変の標的化は、ＡＤのより決定的な死前（ｐｒｅｍｏｒｔｅｍ）診断のための生物学的マーカー、ならびにタウタンパク質を標的化する治療の有効性をモニターするための手段を提供し得る。したがって、本発明は、タウ検出のための組成物を調製するための、およびタウ検出の方法における、ならびに／またはＡＤ診断のために脳の病理学的タウおよび神経原線維病変に診断用薬剤を標的化するための、本明細書中に記載される抗体の使用を提供する。これらの組成物および方法は、ＡＤおよび関連タウオパチーに対する処置プロトコルの一部として使用され得る。

【０２５９】

本発明は、抗体が液相において利用可能であり得るかまたは固相キャリアに結合され得るイムノアッセイにおける使用に適した抗体を提供する。本発明の抗体を利用し得るイムノアッセイの例は、直接的または間接的な形式での競合および非競合イムノアッセイである。そのようなイムノアッセイの例は、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、サンドイッチ（イムノメトリックアッセイ）、フローサイトメトリーおよびウエスタンブロットアッセイである。本発明の抗体は、多くの種々のキャリアのうちの１つに結合され得、それに特異的に結合する細胞を単離するために使用され得る。公知のキャリアの例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースならびに磁鉄鉱が挙げられる。そのキャリアは、本発明の目的のために可溶性または不溶性であり得る。当業者に公知の多くの種々の標識および標識方法が存在する。

【０２６０】

本発明において使用され得る標識のタイプの例としては、酵素、放射性同位体および放射性核種、コロイド金属、蛍光化合物、化学発光化合物、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）、ならびに化学発光／電気化学発光／生物発光化合物が挙げられる。それらの酵素には、ペルオキシダーゼ（例えば、ＨＲＰ）、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、α－Ｄ－ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースアミラーゼ、炭酸脱水酵素、アセチル－コリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼまたはグルコース－６リン酸デヒドロゲナーゼが含まれる。あるいは、その標識は、ビオチン、ジゴキシゲニンまたは５－ブロモ－デスオキシウリジンである。蛍光標識（ローダミン、ランタニド発光体、フルオレセインおよびその誘導体、蛍光色素、ローダミンおよびその誘導体、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）ならびにその他、ダンシル、ウンベリフェロンを含む）は、本発明によって提供される抗体およびタウ結合タンパク質とも組み合わされ得る。そのような結合体において、本発明の抗体／結合タンパク質は、当業者に公知の方法によって調製され得る。次いで、それらは、直接；スペーサー基もしくは連結基（例えば、ポリアルデヒド、グルタルアルデヒド、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）またはジエチレントリアミン五酢酸（ＤＰＴＡ））を介して；または他の結合物質（例えば、当該分野で日常的に公知のもの）の存在下において、酵素または蛍光標識と結合され得る。フルオレセイン標識を有する結合体は、例えば、イソチオシアネートとの反応によって

調製され得る。ある特定の状況において、その標識またはマーカーも、治療的であり得る。

【０２６１】

他の結合体としては、化学発光標識（例えば、ルミノールおよびジオキセタン）、生物発光標識（例えば、ルシフェラーゼおよびルシフェリン）または放射性標識（例えば、ヨウ素^{123}、ヨウ素^{125}、ヨウ素^{126}、ヨウ素^{133}、^{131}、臭素^{77}、テクネチウム^{99m}、インジウム^{111}、インジウム^{113m}、ガリウム^{67}、ガリウム^{68}、ルテニウム^{95}、ルテニウム^{97}、ルテニウム^{103}、ルテニウム^{105}、水銀^{107}、水銀^{203}、レニウム^{99m}、レニウム^{101}、レニウム^{105}、スカンジウム^{47}、テルル^{121m}、テルル^{122m}、テルル^{125m}、ツリウム^{165}、ツリウム^{167}、ツリウム^{168}、フッ素^{18}、イットリウム^{199}およびヨウ素^{131}）が挙げられ得る。直接、または上で言及されたキレート剤（例えば、ＥＤＴＡまたはＤＴＰＡ）を介して、放射性同位体（ｒａｄｉｏｉｓｏｔｙｐｅｓ）で抗体を標識するための当業者に公知の既存の方法は、診断用の放射性同位体に対して使用され得る。例えば、クロラミン－Ｔ法による［Ｉ^{125}］Ｎａでの標識［Ｈｕｎｔｅｒ Ｗ．Ｍ．ａｎｄ Ｇｒｅｅｎｗｏｏｄ Ｆ．Ｃ．（１９６２）Ｎａｔｕｒｅ １９４：４９５］；Ｃｒｏｃｋｆｏｒｄらによって記載されているようなテクネチウム^{99m}での標識（米国特許第４，４２４，２００号）；およびＨｎａｔｏｗｉｃｈによって記載されているようなＤＴＰＡを介した結合（米国特許第４，４７９，９３０号）を参照のこと。

【０２６２】

本発明は、ある個体から血液サンプル、リンパサンプルまたは他の任意の体液サンプルであり得る体液サンプルを得て、抗体抗原複合体の形成を可能にする条件下においてその体液サンプルを本発明の抗体と接触させることによって、その個体における障害を診断するための方法においても使用され得る抗体および他のタウ結合分子も提供する。次いで、そのような複合体の存在および／または量が、当該分野で公知の方法によって測定され、コントロールサンプルにおいて形成されたレベルよりも有意に高いレベルは、試験された個体における疾患の存在を示唆する。したがって、本発明は、本発明の抗体を含むインビトロイムノアッセイに関する。

【０２６３】

さらに、本発明は、本発明のタウ結合分子のいずれか１つを使用するインビボイメージング法に関する。例えば、身体の一部の３次元像を生成する医用画像法ポジトロン放出断層撮影法（ＰＥＴ）は、陽電子放射による放射線の検出に基づく。代表的には、生体分子を放射性標識し、例えば、生体分子に、放射性トレーサー同位体を組み込ませる。代表的には血液循環に注入することによって被験体に標識された生体分子を投与すると、放射性標識された生体分子は、目的の組織に集中する。次いで、陽電子放出を検出するイメージングスキャナーに被験体を入れる。１つの実施形態において、標識された（例えば、^{64}Ｃｕ標識された）結合分子（例えば、抗体）が被験体に投与され、その被験体をイメージングスキャナーに入れて、陽電子放射を検出することによって、その結合分子およびひいては誤無秩序タウまたは誤秩序タウの検出が行われる（それにより、放出が検出された場合、神経障害が示唆される）。したがって、本発明は、ＰＥＴイメージングのための方法を包含し、その方法は、^{64}Ｃｕで標識されたまたは等価物で標識された本発明の結合分子を被験体に投与する工程を包含する。

【０２６４】

本発明は、上に記載された成分、すなわち、本発明によって提供されるような、結合分子、抗体もしくはその結合フラグメント、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞のうちの１つもしくは複数で満たされた１つもしくは複数の容器を備える製造品（例えば、薬学的および診断的パックまたはキット）も提供する。医薬品または生物製品の製造、使用または販売を規制する行政機関が指示する形態での警告が、そのような容器に付随され得、その警告は、その機関による、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売の承認を反映するものである。さらにまたはあるいは、そのキットは、適切な診断アッセイにおける使

用のための試薬および／または指示書を備える。本発明の組成物またはキットは、アルツハイマー病および関連タウオパチーの診断、予防および処置に適している。

【０２６５】

本発明によって提供される結合分子、例えば、抗体の生物学的活性は、それらが、それらを細胞または組織への薬物の局在化／薬物の送達のための候補にするのに十分な親和性を有することを示唆する。誤無秩序タウ沈着物への標的化および結合は、治療的または診断的に活性な物質の送達および遺伝子治療／遺伝子送達に有用であり得る。したがって、本発明は、脳の病理学的タウおよび神経原線維病変の検出ならびに／またはそれらへの治療用物質もしくは診断用物質の標的化のための組成物を調製するための、ならびにその検出および／または標的化の方法における、本明細書中に記載される抗体の使用を提供する。これらの組成物および方法は、ＡＤおよび関連タウオパチーに対する処置プロトコルの一部として使用され得る。

【０２６６】

したがって、本発明は、結合分子、抗体、結合フラグメント；それらの化学的誘導体；ポリヌクレオチド、ベクターおよび細胞を含む上述の化合物の１つもしくは複数を含む組成物に関する。ある特定の組成物はさらに、１つもしくは複数の薬学的に許容され得るキャリアおよび１つもしくは複数の薬学的に許容され得る希釈剤を含み得る。ある特定の化学的誘導体は、通常、基礎分子または細胞（例えば、抗体、結合分子、ポリヌクレオチド、ベクターおよび細胞）の一部ではないが、日常的な方法によってそれらに連結された、化学部分を含む。そのような部分は、例えば、基礎分子または細胞の溶解性、半減期、可視化、検出性および／または吸収を改善するように機能し得る。あるいは、それらの部分は、基礎分子の望ましくない副作用を減弱し得るか、または基礎分子の毒性を減少させ得る。

【０２６７】

本発明は、薬学的組成物の意図される使用に応じて、本明細書中に提供される抗体とさらなる物質（例えば、インターロイキンまたはインターフェロン）との組み合わせを含む薬学的組成物も提供する。例えば、アルツハイマー病の処置において使用する場合、そのさらなる物質は、有機小分子、抗タウ抗体、抗ベーターアミロイド（ａｍｌｙｏｉｄ）抗体およびそれらの組み合わせからなる群から選択され得る。他の物質としては、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、ＮＭＤＡレセプターアンタゴニスト、遷移金属キレート剤、成長因子、ホルモン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、酸化防止剤、脂質低下剤、選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤、タウ凝集の阻害剤、タンパク質キナーゼの阻害剤、熱ショックタンパク質の阻害剤、抗アミロイド受動および能動免疫試薬、抗アミロイド凝集阻害剤、ならびにセクレターゼ阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。それゆえ、ある実施形態において、本発明は、アルツハイマー病または関連タウオパチーの進行を処置するためまたは予防するための薬学的組成物または診断用組成物を調製するため；アルツハイマー病または関連タウオパチーに関連する症状を回復させるため；アルツハイマー病または関連タウオパチーの発症についての被験体のリスクを測定するためにアルツハイマー病または関連タウオパチーの存在について被験体を診断するためまたはスクリーニングするための、本発明の結合分子、抗体もしくは結合フラグメント、またはそれらのいずれか１つの実質的に同じ結合特異性を有する結合分子、本発明のポリヌクレオチド、ベクターあるいは細胞の使用に関する。

診断、能動免疫およびＡＤ治療のためのペプチド

【０２６８】

本発明は、タウのある特定のフラグメントが、ＡＤのラットモデルに注射されたときの病理学的タウに対する免疫応答の誘導において活性であるという発見に部分的に基づき、ヒトにおいてもそうであると予想され得る。これらの免疫原性タウフラグメント（ＤＣ８Ｅ８を通じて、ＡＤの発症および進行における促進物質または少なくとも関与物質と上で同定されたタウの領域の１つもしくは複数を含む）は、（ｉ）ＡＤ脳内の細胞外タウ沈着物のクリアランスを促進することができる（ラットモデル）；（ｉｉ）動物モデルにおい

てＡＤに対する防御抗体の産生を誘導することができる；ならびに／または（ｉｉｉ）動物モデルにおいて１つもしくは複数の生化学的アッセイおよび神経学的アッセイによって測定されたとき、レシピエント被験体においてＡＤの進行を遅らせることができると見出された。それらはまた、タウがこれらの領域に沿って病理学的タウ－タウ相互作用を形成する能力を物理的に直接干渉し得る。

【０２６９】

本発明は、ＰＨＦのコアの形成にとって重要でありかつインビトロにおけるＰＨＦの構築を促進する、タウタンパク質の新規に同定された領域に由来する免疫原または免疫原性ペプチドを提供する。これらの領域（「治療用エピトープ」）を戦略的に標的化することによって、ＡＤおよび関連タウオパチーの処置が成功し得る。免疫原は、動物モデル（例えば、下に記載されるトランスジェニックラットモデル）において治療効果についてスクリーニングされ得る。

【０２７０】

本発明のある実施形態において、タウペプチドは、例えば、以下のアミノ酸配列（その中に４つの治療用エピトープの各々を別々に含む）のうちの１つを含む：ａ）配列番号９８タウ２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３、ｂ）配列番号９９タウ２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４、ｃ）配列番号１００タウ３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５およびｄ）配列番号１０１タウ３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（４４１残基長である最も長いヒトタウアイソフォームタウ２Ｎ４Ｒに従ってナンバリングされた。配列番号１０２を参照のこと）。別の実施形態において、タウペプチドは、少なくとも１つの治療用エピトープを含み、ここで、その治療用エピトープは、配列番号２２３タウ２６８－ＨＱＰＧＧＧ－２７３、配列番号１５４タウ２９９－ＨＶＰＧＧＧ－３０４、配列番号２２４タウ３３０－ＨＫＰＧＧＧ－３３５および配列番号１５４タウ３６２－ＨＶＰＧＧＧ－３６７から選択される。

【０２７１】

本発明は、表１に示される配列番号のいずれか１つなどの３０アミノ酸長の免疫原を提供する。表１に含まれる免疫原の各１つは、配列番号９８、配列番号９９、配列番号１００および配列番号１０１の中に位置する治療用エピトープのうちの１つを含むタウの単離されたフラグメントである。

【０２７２】

【表１－１】

表1:各々が1つの治療用エピトープを有するタウ30merペプチド

配列番号	免疫原	配列
配列番号1	タウ251-280	PDLKNVKSKIGS TENLKHQPGGGKVQIINK
配列番号2	タウ256-285	VKSKIGSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLS
配列番号3	タウ259-288	KIGSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQ
配列番号4	タウ275-304	VQIINKKLDL SNVQSKCGSK DNIKHVPGGG
配列番号9	タウ244-273	QTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGG
配列番号10	タウ245-274	TAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGK
配列番号11	タウ246-275	APVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKV
配列番号12	タウ247-276	PVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQ
配列番号13	タウ248-277	VPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQI

【表１－２】

配列番号14	タウ249-278	PMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQII
配列番号15	タウ250-279	MPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIIN
配列番号16	タウ252-281	DLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKK
配列番号17	タウ253-282	LKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL
配列番号18	タウ254-283	KNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLD
配列番号19	タウ255-284	NVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDL
配列番号20	タウ257-286	KSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSN
配列番号21	タウ258-287	SKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNV
配列番号22	タウ260-289	IGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQS
配列番号23	タウ261-290	GSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSK
配列番号24	タウ262-291	STENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKC
配列番号25	タウ263-292	TENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCG
配列番号26	タウ264-293	ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS
配列番号27	タウ265-294	NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSK
配列番号28	タウ266-295	LKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD
配列番号29	タウ267-296	KHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDN
配列番号30	タウ 276-305	QIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS
配列番号31	タウ 277-306	IINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSV
配列番号32	タウ 278-307	INKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQ
配列番号33	タウ 279-308	NKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQI
配列番号34	タウ 280-309	KKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIV
配列番号35	タウ 281-310	KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVY
配列番号36	タウ 282-311	LDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK
配列番号37	タウ 283-312	DLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKP
配列番号38	タウ 284-313	LSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
配列番号39	タウ 285-314	SNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
配列番号40	タウ 286-315	NVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDL
配列番号41	タウ 287-316	VQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLS
配列番号42	タウ 288-317	QSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSK
配列番号43	タウ 289-318	SKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKV
配列番号44	タウ 290-319	KCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVT
配列番号45	タウ 292-321	GSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSK

【表１－３】

配列番号46	タウ 293-322	SKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKC
配列番号47	タウ 294-323	KDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCG
配列番号48	タウ 295-324	DNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGS
配列番号49	タウ 296-325	NIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSL
配列番号50	タウ 297-326	IKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLG
配列番号51	タウ 298-327	KHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGN
配列番号52	タウ 307-336	QIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQ
配列番号53	タウ 308-337	IVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQV
配列番号54	タウ 309-338	VYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVE
配列番号55	タウ 310-339	YKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEV
配列番号56	タウ 311-340	KPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVK
配列番号57	タウ 312-341	PVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKS
配列番号58	タウ 313-342	VDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE
配列番号59	タウ 314-343	DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEK
配列番号60	タウ 315-344	LSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKL
配列番号61	タウ 316-345	SKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD
配列番号62	タウ 317-346	KVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDF
配列番号63	タウ 318-347	VTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFK
配列番号64	タウ 319-348	TSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKD
配列番号65	タウ 320-349	SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDR
配列番号66	タウ 321-350	KCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRV
配列番号67	タウ 322-351	CGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQ
配列番号68	タウ 323-352	GSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQS
配列番号69	タウ 324-353	SLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSK
配列番号70	タウ 325-354	LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKI
配列番号71	タウ 326-355	GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIG
配列番号72	タウ 327-356	NIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGS
配列番号73	タウ 328-357	IHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSL
配列番号74	タウ 329-358	HHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLD
配列番号75	タウ339-368	VKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN
配列番号76	タウ340-369	KSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNK
配列番号77	タウ341-370	SEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKK

【表１－４】

配列番号78	タウ342-371	EKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKI
配列番号79	タウ343-372	KLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIE
配列番号80	タウ344-373	LDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIET
配列番号81	タウ345-374	DFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETH
配列番号82	タウ346-375	FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK
配列番号83	タウ 347-376	KDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKL
配列番号84	タウ 348-377	DRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT
配列番号85	タウ 349-378	RVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTF
配列番号86	タウ 350-379	VQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFR
配列番号87	タウ351-380	QSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRE
配列番号110	タウ352-381	SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFREN
配列番号89	タウ353-382	KIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENA
配列番号90	タウ354-383	IGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
配列番号91	タウ355-384	GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKA
配列番号92	タウ356-385	SLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK
配列番号93	タウ357-386	LDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKT
配列番号94	タウ358-387	DNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTD
配列番号95	タウ359-388	NITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDH
配列番号96	タウ360-389	ITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHG
配列番号97	タウ361-390	THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGA

【０２７３】

いくつかの実施形態において、免疫原性ペプチドは、配列番号１タウ２５１－ＰＤＬＫＮＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫ－２８０；配列番号２タウ２５６－ＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳ－２８５；配列番号３タウ２５９－ＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱ－２８８；および配列番号４タウ２７５－ＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧ－３０４から選択される。

【０２７４】

本発明は、ヒトタウタンパク質の６つのアイソフォームのうちのいずれか１つに由来し得る、アミノ酸配列配列番号９８　２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３またはアミノ酸配列番号９９　２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４またはアミノ酸配列番号１００　３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５またはアミノ酸配列番号１０１　３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７の１つもしくは複数を含む、本発明において使用するための、それより短いおよび長い免疫原性ペプチドも提供する。１つの実施形態において、免疫原性ペプチドは、少なくとも１つの治療用エピトープを含み、ここで、その治療用エピトープは、配列番号２２３タウ２６８－ＨＱＰＧＧＧ－２７３、配列番号１５４タウ２９９－ＨＶＰＧＧＧ－３０４、配列番号２２４タウ３３０－ＨＫＰＧＧＧ－３３５および配列番号１５４タウ３６２－ＨＶＰＧＧＧ－３６７から選択される。１つの実施形態において、免疫原性ペプチドは、配列番号１０９タウ３１４－ＤＬＳＫＶＴＳＫＣＧＳＬＧＮＩＨＨＫＰＧＧＧＱＶＥＶＫＳＥ－３４２；配列番号１１０タウ３５２－ＳＫＩＧＳＬＤＮＩＴＨＶＰＧＧＧＮＫＫＩＥＴＨＫＬＴＦＲＥＮ－３８０；配列番号１１１タウ３２５－ＬＧＮＩＨＨＫＰＧＧＧＱ－３３６；配列番号１１２タウ３５７－ＬＤＮＩＴＨＶＰＧＧＧＮ－３６８；配列番号１０８タウ２９４－３０５ＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも１つの免疫原性ペプチドは、配列番号１～４、配列番号９～１０１および配列番号１０８～１１２、ＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ（配列番号２００）、ＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０１）、ＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０２）、ＫＨＶ

ＰＧＧＧＳＶ（配列番号２０３）、ＨＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０４）、ＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０５）、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）およびＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）、ＡＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４４）、ＤＡＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４６）、ＤＮＡＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４９）、ＤＮＩＡＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５１）、ＤＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５９）、ＤＮＩＫＨＡＰＧＧＧＳ（配列番号１６１）およびＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１７１）のうちのいずれか１つから選択される。

【０２７５】

ヒトタウアイソフォームに対応するアミノ酸配列は、配列番号１０２～１０７に与えられている。

【０２７６】

配列番号１０２（２Ｎ４Ｒ）：

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKS TP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDG TGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKH QP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV PGGGSVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGG GQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

【０２７７】

配列番号１０３（１Ｎ４Ｒ）：

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKS TP TAEAEEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT KIATPRGAAP PGQK GQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKSK IGSTENLKHQ PGGGKVQIIN KKLDLSNVQS KCGSKDNI KH VPGGGSVQIV YKPVDLSKVT SKCGSLGNIH HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHV PGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

【０２７８】

配列番号１０４（２Ｎ３Ｒ）：

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKS TP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDG TGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKH QP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK CGSLGNIHHK PGGGQVEVKS EKLDFKDRVQ SKIGSLDNIT HVPG GGNKKI ETHKLTFREN AKAKTDHGAE IVYKSPVVSG DTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

【０２７９】

配列番号１０５（０Ｎ４Ｒ）：

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEEAGI GDTPSLEDEA AGHVTQAR MV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA PKTPPSSGEP PKSG DRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ SKCGSKDNIK HVPGGGSVQI VYKPVDLSKV TSKCGSLG NI HHKPGGGQVE VKSEKLDFKD RVQSKIGSLD NITHVPGGGN KKIETHKLTF RENAKAKTDH GAEI VYKSPV VSGDTSPRHL SNVSSTGSID MVDSPQLATL ADEVSASLAK QGL

【０２８０】

配列番号１０６（１Ｎ３Ｒ）：

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKS TP TAEAEEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT KIATPRGAAP PGQK GQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR SRTPSLPTPP TREPKKVAVV

RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKSK IGSTENLKHQ PGGGKVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNI HH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVY KSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

【０２８１】

配列番号１０７（０Ｎ３Ｒ）：

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEEAGI GDTPSLEDEA AGHVTQAR MV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA PKTPPSSGEP PKSG DRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDLSKVT SKCGSLGNIH HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSL DN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSP QLATLA DEVSASLAKQ GL

【０２８２】

従来のワクチンがまだ利用可能でない疾患において免疫応答を誘発するためにペプチドベースのワクチンを使用することは、魅力的である（Ｂｒｏｗｎ，１９９４；ＢｅｎＹｅｄｉａら、１９９７）。しかしながら、多くの場合、小ペプチドは、必要なＴｈ細胞エピトープを欠くかつ／または抗原提示細胞（ＡＰＣ）によって低効率で捕捉されるハプテンとして作用するので、それらは、不十分な免疫原である。本発明の１つの実施形態において、免疫原性エピトープは、他のアミノ酸とともにタウペプチドの防御的エピトープを含むより長いポリペプチドまたはアナログであり得る。

【０２８３】

免疫応答を誘導するための本明細書中に記載される物質のいくつかは、病理学的タウおよびタウ沈着物に対する免疫応答を誘導するために適切なエピトープを含むが、免疫原性であるには小さすぎる。この場合、ペプチド免疫原は、免疫応答の誘発を助ける好適なキャリアに連結され得る。ある特定の実施形態において、好適なキャリアとしては、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、オバルブミン、破傷風トキソイドもしくは他の病原菌（例えば、ジフテリア、大腸菌、コレラまたはピロリ菌）由来のトキソイド、または弱毒化トキシン誘導体が挙げられる。免疫応答を刺激するためまたは増強するための他のキャリアとしては、サイトカイン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－１αおよびβペプチド、ＩＬ－２、γＩＮＦ、ＩＬ－１０、ＧＭ－ＣＳＦ）およびケモカイン（例えば、Ｍ１Ｐ１αおよびβならびにＲＡＮＴＥＳ）が挙げられる。免疫原性物質は、Ｏ’Ｍａｈｏｎｙ，ＷＯ９７／１７６１３およびＷＯ９７／１７６１４に記載されているように、組織を横断した輸送を増強するペプチドにも連結され得る。

【０２８４】

免疫原性物質は、化学的架橋によってキャリアに連結され得る。キャリアに免疫原を連結するための手法としては、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジル－チオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）およびスクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）を使用したジスルフィド結合の形成が挙げられる（そのペプチドが、スルフヒドリル基を欠く場合、これは、システイン残基の付加によって提供され得る）。これらの試薬は、それ自体と一方のタンパク質上のペプチドシステイン残基（ｒｅｓｉｄｅｓ）との間のジスルフィド結合、およびリジン上の．イプシロン．－アミノまたは他のアミノ酸における他の遊離アミノ基を介したアミド結合を作る。種々のそのようなジスルフィド／アミド形成物質は、Ｉｍｍｕｎ．Ｒｅｖ．６２，１８５（１９８２）によって記載されている。他の二機能性カップリング剤は、ジスルフィド結合ではなくチオエーテルを形成する。これらのチオエーテル形成物質の多くは、商業的に入手可能であり、それらとしては、６－マレイミドカプロン酸、２－ブロモ酢酸および２－ヨード酢酸、４－（Ｎ－マレイミド－メチル）シクロヘキサン－１－カルボン酸の反応性エステルが挙げられる。カルボキシル基をスクシンイミドまたは１－ヒドロキシル－２－ニトロ－４－スルホン酸，ナトリウム塩と結合することによって、それらのカルボキシル基は、活性化され得る。

【０２８５】
免疫原性ペプチドは、キャリアとの融合タンパク質としても発現され得る。免疫原性ペプチドは、アミノ末端、カルボキシル末端またはペプチド内のどこかの部位において（内部的に）キャリアに連結され得る。いくつかの実施形態において、免疫原性ペプチドの複数のリピートが、融合タンパク質に存在し得る。
【０２８６】
例えば、防御的エピトープに対するＢ細胞応答を誘導するプロミスカスな（ｐｒｏｍｉｓｃｕｏｕｓ）非天然Ｐａｎ　ＤＲ　Ｔｈ細胞エピトープに連結された防御的Ｂ細胞エピトープを有するタウペプチドを含む融合タンパク質を含む免疫原も提供される。さらなる代替物において、本発明は、ポリマー（Ｊａｃｋｓｏｎら、１９９７）、多重抗原ペプチドシステム（ＭＡＰ）（Ｔａｍ　ａｎｄ　Ｒｅｃｅｎｔ，１９９６）、免疫賦活複合体（ＩＳＣＯＭ）（Ｂａｒｒ，Ｉ．Ｇ．ａｎｄ　Ｍｉｔｃｈｅｌｌ，１９９６）および他の可能性のある分枝状の両性ポリペプチド（Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎら、１９９８）またはエピトープの共局在化によって生成されるキメラペプチド（Ｍａｒｕｓｓｉｇら、１９９７）としてデザインされ得る免疫原を提供する。
【０２８７】
ある特定の実施形態において、治療用ペプチドは、薬学的に許容され得るキャリア（ＫＬＨ、破傷風トキソイド、アルブミン結合タンパク質、ウシ血清アルブミン、デンドリマー（ＭＡＰ；Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．３５８：５８１）、ならびに例えば、Ｏ’Ｈａｇａｎら（２００３）に記載されているアジュバント物質（特に、それに記載されている内在性免疫増強化合物および分配システム）およびＷｉｌｓｏｎ－Ｗｅｌｄｅｒｅｒら（２００９）に記載されているアジュバント物質（特に、前記文書の表２および３に示されているもの）もしくはそれらの組み合わせ、またはそれらの混合物を含む）に結合されているかまたは結合されていない状態で、単独でまたは組み合わせて、適用され得る。
【０２８８】
ある特定の実施形態において、本発明の免疫原性物質は、化学的架橋によって好適なキャリアに結合されるかまたは連結されることにより、タウ沈着物を含む病理学的タウに対する免疫応答が増加し得る。ある特定の実施形態において、結合されるまたは連結される薬学的に許容され得るキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）、破傷風トキソイド、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、免疫グロブリン（Ｉｇ）分子、チログロブリンまたはオボグロブリンである。免疫応答を刺激するための他のキャリアとしては、サイトカイン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－１０、ＩＦＮγ、ＧＭ－ＣＳＦ）およびケモカイン（例えば、Ｍ１Ｐ１αおよびβ）が挙げられる。
【０２８９】
タウペプチドまたはアナログは、固相ペプチド合成もしくは組換え発現によって合成され得るか、または天然の起源から得ることができる。自動ペプチド合成装置が、数多くの供給業者（例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、ＥＺＢｉｏｌａｂまたはＡｎｔａｇｅｎｅ）から商業的に入手可能である。組換え発現系としては、大腸菌などの細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞が挙げられ得る。組換え発現のためのＤＮＡの操作および調製ＤＮＡコンストラクトのための手順は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）によって記載されており、組換えタンパク質を作製するための方法は、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｃｈａｐｔｅｒ　５“Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ”，ＵＮＩＴ５．１－５．２４，ＤＯＩ：１０．１００２／０４７１１４０８６４（ｏｎｌｉｎｅｌｉｂｒａｒｙ．ｗｉｌｅｙ．ｃｏｍ／ｂｏｏｋ／１０．１００２／０４７１１４０８６４／ｔｏｃにおいてオンラインで入手可能でもある））に詳細に記載されている。
【０２９０】
本発明の免疫原性物質は、ベクターまたは運搬体としてのウイルスまたは細菌によって発現され得る。免疫原性ペプチドをコードする核酸は、そのウイルスまたは細菌のゲノムまたはエピソームに組み込まれる。最終的には、その免疫原性ペプチドは、分泌タンパク

質としてもしくはウイルスの外表面タンパク質との融合タンパク質として発現され得るか、または細菌の膜貫通タンパク質として提示され得る。そのような方法において使用されるウイルスまたは細菌は、通常、非病原性であるか、または減弱されている。好適なウイルスとしては、アデノウイルス、ＨＳＶ、ベネズエラウマ脳炎ウイルスおよび他のアルファウイルス、水疱性口内炎ウイルスおよび他のラブドウイルス、ワクシニアならびに鶏痘ウイルスが挙げられる。好適な細菌としては、ＳａｌｍｏｎｅｌｌａおよびＳｈｉｇｅｌｌａが挙げられる。あるいは、ＨＢＶのＨＢｓＡｇへの免疫原性ペプチドの融合が好適である。

【０２９１】

本発明のさらなる態様は、様々な実施形態に記載される様々なペプチド（例えば、配列番号１～４；９～９７）またはそれらのフラグメントのアナログでもあり得る治療薬または免疫原に関する。

【０２９２】

本発明は、本願においてデザイナー治療用エピトープと命名される新規ペプチドの発見にも基づく。本発明は、タウおよびタウフラグメントの一次配列と異なる一次配列を有するにもかかわらず、上に記載されたタウ「治療用エピトープ」の１つもしくは複数の形状を模倣する形状（例えば、天然無秩序構造、三次構造、コンフォーメーション）を有することができるデザイナー治療用エピトープを特徴とする。これらの領域の１つもしくは複数を模倣することによって、これらのデザイナー治療用エピトープは、それらに対する抗体（例えば、ＤＣ８Ｅ８と競合する抗体）を作製するために有用であり得る。これらのペプチドは、上で開示されたＤＣ８Ｅ８抗体への結合についてタウまたはタウフラグメントと競合することができる。

【０２９３】

ＡＤのラットモデルに注射されたとき病理学的タウに対する免疫応答を誘導することができ、かつヒトにおいてもそうであると予想され得る、免疫原性のデザイナー治療用エピトープも含まれる。さらに、１つもしくは複数のデザイナー治療用エピトープによる免疫に応答して産生され、（ｉ）ＤＣ８Ｅ８のエピトープであるかもしくはＤＣ８Ｅ８のエピトープを模倣している１つもしくは複数のエピトープを認識することができる；（ｉｉ）病理学的タウと正常タウとを区別することができる；ならびに／または（ｉｉｉ）ヒトＡＤ脳および／もしくはＡＤのトランスジェニックラットモデルにおいて神経原線維病変を認識することができる、マウス抗体／抗血清も開示される。

【０２９４】

本発明は、アルツハイマー病の予防、処置および／または診断のための組成物も提供し、ここで、その組成物は、（ｉ）タウ－タウ凝集を阻害することによって被験体におけるアルツハイマー病を処置するための手段；ならびに（２）薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤を含む。本発明は、アルツハイマー病の予防、処置および／または診断のための組成物も提供し、ここで、その組成物は、（ｉ）病理学的タウにおける１つもしくは複数の「治療用エピトープ」に結合することによって被験体におけるアルツハイマー病を処置するための手段；ならびに（２）薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤を含む。本発明は、アルツハイマー病の予防、処置および／または診断のための組成物も提供し、ここで、その組成物は、（ｉ）病理学的タウにおける１つもしくは複数の「治療用エピトープ」に結合することによってタウ－タウ凝集を減少させるための手段；ならびに（２）薬学的に許容され得るキャリアおよび／または希釈剤を含む。

製剤

【０２９５】

本発明の物質は、治療薬（例えば、上に記載されたような抗体またはペプチド）および他の薬学的に許容され得る構成要素の１つもしくは複数を含む薬学的製剤として投与され得る。Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ（１５ｔｈ ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９８０）を参照のこと。これらの製剤には、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリ

ー、ろう、油、脂質、脂質（陽イオン性または陰イオン性）含有ベシクル（例えば、ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ）、ＤＮＡ結合体、無水吸収ペースト、水中油型および油中水型エマルション、エマルションカーボワックス（様々な分子量のポリエチレングリコール）、半固体ゲル、およびカーボワックスを含む半固体混合物が含まれる。その製剤中の活性成分が、その製剤によって不活性化されず、その製剤が、投与経路と生理的に適合性でありかつ許容できるならば、前述の混合物のいずれもが、本発明に係る処置および治療において適切であり得る。製薬化学者に公知の製剤、賦形剤およびキャリアに関連するさらなる情報について、Ｂａｌｄｒｉｃｋ Ｐ.“Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ ｅｘｃｉｐｉｅｎｔ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ：ｔｈｅ ｎｅｅｄ ｆｏｒ ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ ｇｕｉｄａｎｃｅ.”Ｒｅｇｕｌ.Ｔｏｘｉｃｏｌ.Ｐｈａｒｍａｃｏｌ.３２（２）：２１０－８（２０００）、Ｗａｎｇ Ｗ.“Ｌｙｏｐｈｉｌｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ｓｏｌｉｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ.”Ｉｎｔ.Ｊ.Ｐｈａｒｍ.２０３（１－２）：１－６０（２０００）、Ｃｈａｒｍａｎ Ｗ Ｎ“Ｌｉｐｉｄｓ，ｌｉｐｏｐｈｉｌｉｃ ｄｒｕｇｓ，ａｎｄ ｏｒａｌ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ－ｓｏｍｅ ｅｍｅｒｇｉｎｇ ｃｏｎｃｅｐｔｓ.”Ｊ.Ｐｈａｒｍ Ｓｃｉ.８９（８）：９６７－７８（２０００）、Ｐｏｗｅｌｌら、“Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ ｆｏｒ ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ”ＰＤＡ Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｓｃｉ Ｔｅｃｈｎｏｌ.５２：２３８－３１１（１９９８）およびそれらの引用もまた参照のこと。

【０２９６】

多種多様の薬学的に許容され得る賦形剤が、当該分野で公知であり、本明細書中で詳細に論じられる必要がない。薬学的に許容され得る賦形剤は、種々の刊行物（例えば、Ａ.Ｇｅｎｎａｒｏ（２０００）“Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，”２０ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ，＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ；Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ（１９９９）Ｈ.Ｃ.Ａｎｓｅｌら、ｅｄｓ.，７.ｓｕｐ.ｔｈ ｅｄ.，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ，＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ；およびＨａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ（２０００）Ａ.Ｈ.Ｋｉｂｂｅら、ｅｄｓ.，３ｅｄ.Ａｍｅｒ.Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ａｓｓｏｃ.が挙げられる）に詳しく記載されている。

【０２９７】

選択される製剤は、意図される投与様式および治療の用途に依存する。それらの製剤は、動物またはヒトへの投与用の薬学的組成物を製剤化するために通常使用されるビヒクルとして定義される、薬学的に許容可能な無毒性のキャリアまたは希釈剤も含み得る。希釈剤は、その組み合わせの生物学的活性に影響しないように選択される。そのような希釈剤の例は、蒸留水、生理学的リン酸緩衝食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液およびハンクス液である。その薬学的組成物または製剤は、他のキャリア、アジュバントまたは無毒性の非治療的な非免疫原性の安定剤なども含み得る。しかしながら、動物への投与に適したいくつかの試薬（例えば、フロイント完全アジュバント）は、代表的には、ヒトにおいて使用するための組成物に含められない。

【０２９８】

好適な薬学的キャリアの例は、当該分野で公知であり、その例としては、リン酸緩衝食塩水溶液、水、エマルション（例えば、油／水エマルション）、様々なタイプの湿潤剤、滅菌された溶液などが挙げられる。そのようなキャリアを含む組成物は、公知の従来の方法によって製剤化され得る。より多くのキャリアが、下記でさらに記載される。

アジュバント

【０２９９】

本発明の治療薬である免疫原は、アジュバント、すなわち、それ自体は獲得免疫応答を引き起こさないが付随の抗原に対する応答を増幅するかまたは調節する物質と組み合わせ

て投与され得る。種々のアジュバントが、免疫応答を誘発するために、本発明において治療用のペプチドおよび抗体と組み合わせて使用され得る。好ましいアジュバントは、応答の質的な形態に影響し得る免疫原のコンフォーメーション変化を引き起こさずに、その免疫原に対する固有の応答を増強する。

【０３００】

ある特定の実施形態において、アジュバントは、アルミニウム塩（ミョウバン）、例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムおよび硫酸アルミニウムである（Ｈｕｎｔｅｒ，２００２）。そのようなアジュバントは、他の特定の免疫賦活剤（例えば、３－Ｏ－脱アシル化モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）または３－ＤＭＰ）、重合体または単量体のアミノ酸（例えば、ポリグルタミン酸またはポリリジン）とともに、またはそれら無しで、使用され得る。そのようなアジュバントは、他の特定の免疫賦活剤（例えば、ムラミルペプチド（例えば、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－トレオニル－Ｄ－イソグルタミン（ｔｈｒ－ＭＤＰ）、Ｎ－アセチル－ノルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミン（ｎｏｒ－ＭＤＰ）、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’ジパルミトイル－ｓｎ－－グリセロ－３－ヒドロキシホスホリルオキシ）－エチルアミン（ＭＴＰ－ＰＥ）、Ｎ－アセチルグルコサミニル（ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｓａｍｉｎｙｌ）－Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－Ａｌ－Ｄ－イソｇｌｕ－Ｌ－Ａｌａ－ジパルミトオキシプロピルアミド（ＤＴＰ－ＤＰＰ）ｔｈｅｒａｍｉｄｅ（商標））または他の細菌の細胞壁の構成要素とともに、またはそれら無しで、使用され得る。他のアジュバントは、水中油型エマルションであり、それには、（ａ）Ｍｏｄｅｌ　１０Ｙマイクロフルダイザー（ｍｉｃｒｏｆｕｉｄｉｚｅｒ）（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ，Ｎｅｗｔｏｎ　Ｍａｓｓ．）などのマイクロフルダイザーを使用してサブミクロン粒子に製剤化された、５％スクアレン、０．５％Ｔｗｅｅｎ８０および０．５％Ｓｐａｎ８５を含むＭＦ５９（Ｖａｎ　Ｎｅｓｔらに対するＷＯ９０／１４８３７（その全体が参照により援用される））（必要に応じて様々な量のＭＴＰ－ＰＥを含む）、（ｂ）サブミクロンエマルションに顕微溶液化されたかまたはより大きな粒径のエマルションを生成するためにボルテックスされた、１０％スクアレン、０．４％Ｔｗｅｅｎ８０、５％プルロニックブロック（ｂｌｏｅｋｅｄ）ポリマーＬ１２１およびｔｈｒ－ＭＤＰを含むＳＡＦ、ならびに（ｃ）２％スクアレン、０．２％Ｔｗｅｅｎ８０、ならびにモノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）、トレハロースジミコール酸（ＴＤＭ）および細胞壁骨格（ＣＷＳ）からなる群からの１つもしくは複数の細菌の細胞壁の構成要素、例えば、ＭＰＬ＋ＣＷＳ（Ｄｅｔｏｘ．ＴＭ．）を含む、Ｒｉｂｉ．ＴＭ．アジュバントシステム（ＲＡＳ）（Ｒｉｂｉ　ＩｎｕｎｏＣｈｅｍ，Ｈａｍｉｌｔｏｎ，Ｍｏｎｔ．）が含まれる。いくつかの実施形態において、アジュバントは、サポニン（例えば、Ｓｔｉｍｕｌｏｎ（商標）（ＱＳ２１，Ａｑｕｉｌａ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，Ｍａｓｓ．）またはそれから生成された粒子、例えば、ＩＳＣＯＭ（免疫賦活性複合体）およびＩＳＣＯＭＡＴＲＩＸである。他のアジュバントとしては、フロイント完全アジュバント（ＣＦＡ）およびフロイント不完全アジュバント（ＩＦＡ）、サイトカイン、例えば、インターロイキン（ＩＬ－１、ＩＬ－２およびＩＬ－１２）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）および腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）が挙げられる。

【０３０１】

あるいは、タウペプチドおよびそれらの免疫原性アナログは、アジュバントに結合され得る。例えば、リポペプチドバージョンのタウペプチド「Ａ」は、Ｂ型肝炎抗原のワクチン接種について記載されているように（Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５９，１３８３－１３９２（１９９７））、パルミチン酸または他の脂質を、「Ａ」のＮ末端に直接結合することによって調製され得る。しかしながら、そのような結合は、それに対する免疫応答の性質に影響するようなタウペプチド「Ａ」のコンフォーメーションを実質的に変化させるべきでない。

【０３０２】

アジュバントは、単一組成物として免疫原とともに投与され得るか、または免疫原の投

与の前、その投与と同時、もしくはその投与の後に投与され得る。免疫原およびアジュバントは、同じバイアルに包装されて供給され得るか、または別個のバイアルに包装されて使用前に混合され得る。免疫原およびアジュバントは、代表的には、意図される治療用途を示す表示とともに包装される。免疫原およびアジュバントが、別個に包装される場合、その包装は、代表的には、使用前に混合するための指示書を含む。アジュバントおよび／またはキャリアの選択は、アジュバントを含む免疫原性製剤の安定性、投与経路、投薬スケジュール、ワクチン接種される種に対するそのアジュバントの有効性に依存し、ヒトにおいては、薬学的に許容され得るアジュバントは、承認されているか、または妥当な規制機関によってヒトへの投与について承認可能であるアジュバントである。例えば、フロイント完全アジュバントは、ヒトへの投与に適していない。しかしながら、ミョウバン、ＭＰＬまたはフロイント不完全アジュバント（Ｃｈａｎｇら、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ ３２：１７３－１８６（１９９８）（その全体が参照により本明細書に援用される）は、単独でまたは必要に応じてミョウバン、ＱＳ２１およびＭＰＬのいずれかならびにそれらのすべての組み合わせと組み合わせて、ヒトへの投与に適している。

【０３０３】

薬学的組成物は、ゆっくり代謝される大きな高分子（例えば、タンパク質、キトサンのような多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および共重合体（例えば、ラテックス官能化セファロース、アガロース、セルロースなど））、アミノ酸の重合体、アミノ酸の共重合体および脂質凝集体（例えば、油滴またはリポソーム）も含み得る。さらに、これらのキャリアは、免疫賦活剤（すなわち、アジュバント）としても機能し得る。

併用

【０３０４】

本発明は、本明細書中に記載される抗体およびペプチドを、ＡＤおよび関連タウオパチーのための他の処置と組み合わせる組成物および処置方法を提供する。例えば、現在、タウに関連する治療ストラテジーは、主に、タウキナーゼを阻害するかもしくはホスファターゼを活性化する薬物（Ｉｑｂａｌ ａｎｄ Ｇｒｕｎｄｋｅ－Ｉｑｂａｌ，２００４，２００５，２００７；Ｎｏｂｌｅら、２００５）、微小管を安定化する薬物（Ｚｈａｎｇら、２００５）、ミスフォールドされたタウタンパク質のタンパク分解性の分解を促す薬物（Ｄｉｃｋｅｙら、２００５；Ｄｉｃｋｅｙ ａｎｄ Ｐｅｔｒｕｃｅｌｌｉ，２００６；Ｄｉｃｋｅｙら、２００６）、タウ凝集を妨げるかもしくは逆転させる化合物（Ｗｉｓｃｈｉｋら、１９９６；Ｐｉｃｋｈａｒｄｔら、２００５；Ｔａｎｉｇｕｃｈｉら、２００５；Ｎｅｃｕｌａら、２００５；Ｌａｒｂｉｇら、２００７）または凝集したタウのワクチン媒介性のクリアランス（Ａｓｕｎｉら、２００７）に焦点が当てられている。ゆえに、本発明は、多重標的化（例えば、タウとベーターアミロイドの両方の標的化）が、処置の効率を実質的に高め得ることを提供する。

【０３０５】

病理学的な可溶性タウおよび不溶性タウ（タウ沈着物）が脳に存在するアルツハイマー病および関連タウオパチーの場合、本発明の物質は、本発明の物質の血液脳関門を越えた通過を増加させる他の物質とともに投与され得る。

投与方法

【０３０６】

タウのレベルを低下させるためまたは本明細書中に記載される予防、処置もしくは診断の任意の方法（インビボ）のための、免疫応答（受動または能動）を誘導するための物質は、予防的および／または治療的な処置のために、非経口、局所的、皮内、静脈内、経口、皮下、腹腔内、鼻腔内または筋肉内の手段によって投与され得る。代表的な投与経路は、皮下であるが、その他のものも等しく有効であり得る。別の代表的な経路は、筋肉内注射である。このタイプの注射は、最も代表的には、腕または脚の筋肉において行われる。静脈内注射、ならびに腹腔内注射、動脈内、頭蓋内または皮内注射もまた、免疫応答を生じさせる際に有効である。いくつかの方法では、沈着物が蓄積している特定の組織に物質

が直接注射される。

【０３０７】

点鼻製剤などのエアロゾル製剤は、保存剤および等張剤とともに活性な物質の精製された水溶液または他の溶液を含む。そのような製剤は、例えば、鼻の粘膜と適合性のｐＨおよび等張状態に調整される。直腸または膣への投与用の製剤は、好適なキャリアを用いて坐剤としてもたらされ得る。

【０３０８】

非経口投与の場合、本発明の治療用ペプチドは、滅菌された液体（例えば、水、油、食塩水、グリセロールまたはエタノール）であり得る薬学的キャリアとともに、生理的に許容され得る希釈剤中の注射可能な投与量の上記物質の溶液または懸濁液として、投与され得る。さらに、補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、界面活性物質、ｐＨ緩衝物質など）が組成物中に存在し得る。薬学的組成物の他の構成要素は、石油、動物、植物または合成起源の構成要素である。落花生油、ダイズ油および鉱油はすべて、有用な材料の例である。一般に、グリコール（例えば、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール）は、特に、注射可能な溶液にとって好ましい液体キャリアである。本発明の物質は、活性成分の徐放を可能にするような様式で製剤化され得る蓄積注射または埋没調製物の形態でも投与され得る。例示的な組成物は、ＨＣｌでｐＨ６．０に調整された、５０ｍＭ　Ｌ－ヒスチジン、１５０ｍＭ　ＮａＣｌからなる水性緩衝液中に製剤化されたモノクローナル抗体を５ｍｇ／ｍＬで含む。

【０３０９】

非経口投与用の調製物には、滅菌された水性または非水性の溶液、懸濁液およびエマルションが含まれる。非水性溶媒の例は、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エステルである。水性キャリアには、食塩水および緩衝媒質を含む、水、アルコール溶液／水溶液、エマルションまたは懸濁液が含まれる。非経口ビヒクルには、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、または固定油が含まれる。静脈内ビヒクルには、流体および栄養補給剤、電解質補給剤（例えば、リンゲルデキストロースに基づく補給剤）などが含まれる。保存剤および他の添加物、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスなどもまた、存在し得る。

【０３１０】

代表的には、組成物は、液体の溶液または懸濁液のいずれかとしての注射可能物として調製され；注射前の液体ビヒクルにおける溶解または懸濁に適した固体の形態もまた調製され得る。その調製物は、乳化され得るか、またはリポソームもしくはマイクロ粒子（例えば、上で論じたような、アジュバント効果の増強のためのポリラクチド、ポリグリコリドまたは共重合体）に被包され得る（Ｌａｎｇｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４９，１５２７（１９９０）およびＨａｎｅｓ，Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　２８，９７－１１９（１９９７）を参照のこと）。本発明の物質は、活性成分の徐放もしくはパルス放出を可能にするような様式で製剤化され得る蓄積注射または埋没調製物の形態で投与され得る。

【０３１１】

他の投与様式に適したさらなる製剤としては、経口製剤、鼻腔内製剤および肺製剤、坐剤ならびに経皮適用物が挙げられる。

【０３１２】

坐剤の場合、結合剤およびキャリアとしては、例えば、ポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドが挙げられ；そのような坐剤は、０．５％～１０％、例えば、１％～２％の範囲で活性成分を含む混合物から形成され得る。経口製剤は、賦形剤（例えば、薬学的グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロースおよび炭酸マグネシウム）を含む。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、徐放製剤または散剤の形態をとり、１０％～９５％、例えば、２５％～７０％の活性成分を含む。

【０３１３】
局所的適用は、経皮または皮内送達をもたらし得る。局所的投与は、上記物質と、コレラ毒素またはそれらの解毒された誘導体もしくはサブユニットあるいは他の類似の細菌毒素との同時投与によって促進され得る（Ｇｌｅｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ　３９１，８５１（１９９８）を参照のこと）。同時投与は、その構成要素を、混合物として、または化学的架橋もしくは融合タンパク質としての発現によって得られる連結された分子として使用することによって達成され得る。
【０３１４】
あるいは、経皮送達は、皮膚パッチを使用してまたはトランスファーソーム（ｔｒａｎｓｆｅｒｏｓｏｍｅｓ）を使用して達成され得る（Ｐａｕｌら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２５，３５２１－２４（１９９５）；Ｃｅｖｃら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ　１３６８，２０１－１５（１９９８））。主題の抗体、ペプチドまたは化合物の皮下投与は、標準的な方法およびデバイス、例えば、針および注射器、皮下注射口送達系などを使用して達成される。筋肉内投与は、標準的な手段、例えば、針および注射器、持続的送達系などによって達成される。いくつかの実施形態において、主題の抗体、ペプチドおよび／または化合物は、持続的送達系によって送達される。用語「持続的送達系」は、本明細書中において、「制御送達系」と交換可能に使用され、カテーテル、注射デバイスなどと組み合わせた持続的（例えば、制御）送達医療用デバイス（例えば、ポンプ）を包含する（多種多様のそれらが当該分野で公知である）。機械的または電気機械的な注入ポンプもまた、本発明とともに使用するのに適し得る。そのようなデバイスの例としては、例えば、米国特許第４，６９２，１４７号；同第４，３６０，０１９号；同第４，４８７，６０３号；同第４，３６０，０１９号；同第４，７２５，８５２号；同第５，８２０，５８９号；同第５，６４３，２０７号；同第６，１９８，９６６号；などに記載されているものが挙げられる。通常、薬物送達の現在の方法は、種々の詰め替え可能なポンプシステムのいずれかを使用して達成され得る。ポンプは、一貫した放出制御を長い時間をかけて提供する。
【０３１５】
上記物質は、薬物を投与するために頭蓋に小さな穴を開けるという現在の標準的な手順によっても投与され得る。好ましい態様において、本発明の結合分子、特に抗体または抗体ベースの薬物は、血液脳関門を通過することができ、それにより、静脈内または経口投与が可能である。
【０３１６】
薬学的剤形において、上記物質（本発明によって提供される抗体、ペプチド、化合物）はまた、それらの薬学的に許容され得る塩の形態で投与され得るか、または単独で、もしくは他の薬学的に活性な化合物との適切な会合において、ならびに他の薬学的に活性な化合物と組み合わせて、使用され得る。本明細書中に記載される方法および賦形剤は、単に例示的であって、決して限定でない。主題の抗体、ペプチドまたは化合物は、それらを水性溶媒または非水性溶媒（例えば、植物油または他の類似の油、合成脂肪族系酸グリセリド、高次脂肪族系酸のエステルまたはプロピレングリコール）に；および所望であれば、従来の添加物（例えば、可溶化剤、等張剤、懸濁剤、乳化剤、安定剤および保存剤）とともに、溶解するか、懸濁するか、または乳化することによって、注射用の調製物に製剤化され得る。注射用または静脈内投与用の単位剤形は、滅菌水、通常の食塩水または別の薬学的に許容され得るキャリアにおける溶液としての組成物中に活性な物質を含み得る。用語「単位剤形」または「用量」は、本明細書中で使用されるとき、ヒトおよび動物被験体に対する単位投与量として適した物理的に別々の単位のことを指し、各単位は、薬学的に許容され得る希釈剤、キャリアまたはビヒクルとともに所望の効果をもたらすのに十分な量と計算された所定の量の主題の抗体を含む。本発明の単位剤形に対する詳述は、使用される特定の化合物および達成される効果ならびに宿主における各化合物に関連する薬力学に依存する。
【０３１７】

病理学的タウタンパク質およびタウ沈着物に対する免疫応答は、治療用タウペプチドをコードする核酸の投与によっても誘導され得る。そのような核酸は、ＤＮＡまたはＲＮＡであり得る。免疫原をコードする核酸セグメントは、患者の意図される標的細胞内でのそのようなＤＮＡセグメントの発現を可能にする調節エレメント（例えば、プロモーターおよびエンハンサー）に連結される。通常、免疫グロブリン遺伝子（軽鎖または重鎖）由来のプロモーターおよびエンハンサーエレメントまたはＣＭＶ主要中間初期（ｍａｊｏｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａｔｅ ｅａｒｌｙ）プロモーターおよびエンハンサーが、免疫応答の誘導にとって望ましい標的である血液細胞内での発現を指示するのに適している。連結された調節エレメントおよびコード配列は、ベクターにクローニングされることが多い。

【０３１８】

レトロウイルス系（例えば、Ｌａｗｒｉｅら、Ｃｕｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖｅｌｏｐ．３：１０２－１０９（１９９３）（その全体が参照により本明細書に援用される）を参照のこと）；アデノウイルスベクター（Ｂｅｔｔら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６７：５９１１（１９９３）（その全体が参照により本明細書に援用される））；アデノ随伴ウイルスベクター（Ｚｈｏｕら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７９：１８６７（１９９４）（その全体が参照により本明細書に援用される））、ワクシニアウイルスおよびトリポックスウイルスを含むポックスファミリー由来のウイルスベクター、アルファウイルス属由来のウイルスベクター（例えば、シンドビスおよびセムリキ森林ウイルス由来のベクター）（Ｄｕｂｅｎｓｋｙら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ ７０：５０８－５１９（１９９６）（その全体が参照により本明細書に援用される））、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（Ｊｏｈｎｓｔｏｎらに対する米国特許第５，６４３，５７６号（その全体が参照により本明細書に援用される）を参照のこと）およびラブドウイルス（例えば、水疱性口内炎ウイルス（Ｒｏｓｅに対するＷＯ９６／３４６２５（その全体が参照により本明細書に援用される）を参照のこと）およびパピローマウイルス（Ｏｈｅら、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６：３２５－３３３（１９９５）；Ｗｏｏらに対するＷＯ９４／１２６２９；およびＸｉａｏ ＆ Ｂｒａｎｄｓｍａ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．２４：２６３０－２６２２（１９９６）（それらの全体が参照により本明細書に援用される）を含むいくつかのウイルスベクター系が、利用可能である。

【０３１９】

免疫原をコードするＤＮＡまたはそれを含むベクターは、リポソームに詰め込まれ得る。好適な脂質および関連アナログは、米国特許第５，２０８，０３６号、同第５，２６４，６１８号、同第５，２７９，８３３号および同第５，２８３，１８５号によって記載されている。免疫原をコードするベクターおよびＤＮＡはまた、粒状キャリアに吸着され得るか、またはそれに会合され得る（それらの例としては、ポリメタクリル酸メチルポリマーおよびポリラクチドおよびポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）が挙げられ、例えば、ＭｃＧｅｅら、Ｊ．Ｍｉｃｒｏ Ｅｎｃａｐ．（１９９６）を参照のこと）。

【０３２０】

遺伝子治療ベクターまたは裸のＤＮＡが、個々の患者への投与によって、代表的には、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、経鼻、胃、皮内、筋肉内、皮下または頭蓋内注入）または局所的適用（例えば、米国特許第５，３９９，３４６号を参照のこと）によって、インビボにおいて送達され得る。ＤＮＡは、遺伝子銃を使用しても投与され得る（米国特許第６，４３６，７０９号を参照のこと）。本願において、免疫原をコードするＤＮＡは、微視的金属ビーズの表面上に沈殿される。衝撃波または膨張ヘリウムガスを用いて微小発射体（ｍｉｃｒｏｐｒｏｊｅｃｔｉｌｅ）を加速させ、数細胞層の深さまで組織に透通させる（Ｈａｙｎｅｓら、１９９６に概説されている）。例えば、Ａｇａｃｅｔｕｓ，Ｉｎｃ．（Ｍｉｄｄｌｅｔｏｎ，ＷＩ）によって製造されたＡｃｃｅｌ（商標）Ｇｅｎｅ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ＤｅｖｉｃｅまたはＢｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）によって製造されたＨｅｌｉｏｓ Ｇｅｎｅ Ｇｕｎが好適である。治療目的の場合、ＤＮＡは、エレクトロポレーション（例えば、Ｔｒｏｌｌｅｔら、２００８およびその中の参考文献に記載されているような）によっても送達さ

れ得る。あるいは、裸のＤＮＡは、単純に、化学的もしくは機械的刺激とともにそのＤＮＡを皮膚上に配置することによって（ＷＯ９５／０５８５３を参照のこと）または入れ墨をすることによって（例えば、ｖａｎ　ｄｅｎ　Ｂｅｒｇら、２００９によって記載されているように）、皮膚を通過して血流に達し得る。

【０３２１】

異なるバリエーションでは、免疫原をコードするＤＮＡまたはベクターを細胞（例えば、個々の患者から外植された細胞（例えば、リンパ球、骨髄穿刺液、組織生検材料）または万能なドナー造血幹細胞）にエキソビボで送達し、それに続いて、例えば、免疫原の発現を確認した後および通常、ベクターを組み込んだ細胞について選択した後に、その細胞を患者に再移植し得る。

【０３２２】

ヒトを処置するための別の有望であるが潜在的により危険なアプローチは、抗原自体を産生するように樹状（ｄｅｎｔｒｉｔｉｃ）細胞（ＤＣ，直接のＤＮＡ送達を介して、またはウイルスストラテジーを使用して）をトランスフェクトすることであり（Ｘｉｎｇら、２００５）、それにより、ＭＨＣ　Ｉを通じて提示されるインタクトな抗原の連続した供給が提供される。

【０３２３】

処置の対象となる被験体

処置の対象となる被験体には、アルツハイマー病または関連タウオパチーのリスクがあるが症状を示していない個体、ならびにすでに症状を示している患者が含まれる。アルツハイマー病の場合、長生きする場合、実質的に誰もがアルツハイマー病に罹患するリスクがある。ゆえに、本処置または治療は、被験体患者のリスクのいかなる評価もなしに、一般集団に予防的にも投与され得る。本特許においてもたらされるワクチンは、アルツハイマー病の公知の遺伝的リスクを有する個体に対して特に有用であり得る。そのような個体には、この疾患に罹患した親類を有する個体および遺伝的または生化学的マーカーの存在によってリスクを判定された個体が含まれる。早期発症型の家族性アルツハイマー病のリスクの遺伝的マーカーには、ＡＰＰ遺伝子、プレセニリン遺伝子ＰＳ１およびＰＳ２における変異が含まれ、遅発型アルツハイマー病に対するマーカーには、ＡｐｏＥ４遺伝子における変異が含まれる（最近、Ｂｅｒｔｒａｍ　ａｎｄ　Ｔａｎｚｉ，２００８によって概説された）。さらなる危険因子には、ＡＤの家族歴、高コレステロール血症またはアテローム性動脈硬化症が含まれる。現在アルツハイマー病に罹患している個体は、特徴的な痴呆ならびに上に記載された危険因子の存在から認識され得る。さらに、ＡＤを有する個体を識別するためのいくつかの診断テストが利用可能である。これらには、ＣＳＦ中の総タウ、ホスホ－タウおよびアミロイドβ（１－４２）のレベルの測定が含まれる。上昇したタウおよび／またはホスホ－タウのレベルならびに減少したアミロイドβ（１－４２）のレベルは、ＡＤの存在を示唆する。アルツハイマー病に罹患している個体は、ＭＭＳＥ、ＡＤＲＤＡまたは他の基準によっても診断され得る。

【０３２４】

無症候の患者では、任意の年齢において処置を開始することができる（例えば、１０、２０、３０歳）。しかしながら、患者が４０、５０、６０または７０歳に達するまで処置を開始する必要がないかもしれない。処置は、ある期間にわたって複数の投薬量の投薬を必要とし得る。処置は、治療薬（例えば、タウペプチド）に対する抗体または活性化Ｔ細胞もしくはＢ細胞の応答を経時的にアッセイすることによって、モニターされ得る。その応答が低下したら、追加免疫の投与の必要が示される。ＡＤまたは関連タウオパチーのリスクがより高い潜在的なダウン症候群患者の場合、母体に治療薬を投与することによって出生前にまたは生後まもなく処置を開始することができる。

【０３２５】

いくつかの実施形態において、ＤＣ８Ｅ８（またはキメラ、ヒト化、ヒトまたはその他の誘導体／一部／フラグメント）は、Ｔ細胞上の共刺激分子ＣＤ２８のレベルの有意な低下を示す高齢の免疫老化アルツハイマー病（ＡＤ）患者における使用が意図された抗体ま

たは受動ワクチンである。共刺激分子ＣＤ２８の減少は、損なわれた免疫応答を示唆する（Ｓａｕｒｗｅｉｎ－Ｔｅｉｓｓｌら、２００２）。ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$であることが多いＣＤ８$^{+}$ＣＤ２８$^{-}$Ｔ細胞クローン（免疫表現型：ＣＤ８$^{+}$ＣＤ２８$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$）は、大量の炎症性サイトカインＩＦＮ－γおよびわずかな量のＩＬ－５を産生する。これらのクローンは、正常な加齢の間は蓄積し、Th_1およびTh_2サイトカインの産生の不均衡を誘導する。したがって、ナイーブＢ細胞の減少する集団とともに蓄積するＣＤ８$^{+}$ＣＤ２８$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$Ｔ細胞クローン（Ｓｉｅｇｒｉｓｔ ａｎｄ Ａｓｐｉｎａｌｌ，２００９）は、高齢者人口の約３分の１に影響する免疫機能の低下に対する主要な寄与物質である（Ｗｅｎｇら、２００９，Ｓａｕｒｗｅｉｎ－Ｔｅｉｓｓｌら、２００２）。

【０３２６】

したがって、受動免疫療法（例えば、ＤＣ８Ｅ８（またはキメラ、ヒト化、ヒトもしくはその他の誘導体／一部／フラグメントを用いたもの）は、大集団のＡＤ患者の免疫系の不全を回避する手段および神経原線維変性を引き起こす病理学的タウタンパク質を標的化する手段を提供する。

【０３２７】

いくつかの実施形態において、タウ治療用エピトープの１つ（または本明細書中に記載されるタウ治療用エピトープの１つを含むペプチド）が、高齢の免疫適格性のアルツハイマー病患者における使用が意図された能動ワクチンとして使用される。免疫適格性患者の免疫表現型は、ＣＤ８$^{+}$ＣＤ２８$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$である。ゆえに、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞上の共刺激分子ＣＤ２８のレベルが測定され、能動ワクチン接種のための患者の選択マーカーとして使用される。

【０３２８】

さらに、処置の前に、患者から採取されたＣＳＦおよび血液を、ボレリア属、トレポネーマ属、クラミジア属、ヘルペスウイルスおよび他の脳病原体に対する抗体について試験することにより、ＡＤの症状を模倣し得るかまたは悪化させ得る慢性の感染性および炎症性のＣＮＳ障害を有する個体が除外されるだろう（Ｂａｌｉｎら、２００８；Ｉｔｚｈａｋｉ ａｎｄ Ｗｏｚｎｉａｋ，２００８；Ｍｉｋｌｏｓｓｙ，２００８；Ａｎｄｒｅａｓｅｎ，２０１０）。ＣＮＳ感染症、特に、脳内皮細胞のクラミジア属感染は、血液脳関門（ＢＢＢ）の機能を損なうことが多く、それにより、脳実質への単球の流入が増加し得、ゆえに、局所的な免疫応答に影響し得る（Ｂａｌｉｎら、２００８）。サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）に対するより高いレベルのＩｇＧを有する高齢の被験体が、より速い速度の認知低下に苦しむことも示されている（Ｉｔｚｈａｋｉ ａｎｄ Ｗｏｚｎｉａｋ，２００８）。ゆえに、本発明によって提供される物質の１つによる免疫の後の有害作用（例えば、正常タウに対する制御されない免疫反応）を防ぐために、ＣＮＳ感染症を有するアルツハイマー病患者または上述の病原体に対する抗体について陽性と試験された患者は、高度に選択的なワクチンで処置されることになる。

【０３２９】

処置の前に、患者から採取されたＣＳＦおよび血液を、ボレリア属、トレポネーマ属、クラミジア属、ヘルペスウイルスおよび他の脳病原体に対する抗体について試験することにより、ＡＤの症状を模倣し得るかまたは悪化させ得る慢性の感染性および炎症性のＣＮＳ障害を有する個体が除外され得る（Ｂａｌｉｎら、２００８；Ｉｔｚｈａｋｉ ａｎｄ Ｗｏｚｎｉａｋ，２００８；Ｍｉｋｌｏｓｓｙ，２００８；Ａｎｄｒｅａｓｅｎ，２０１０）。様々な慢性感染症によって促進される可能性のある有害作用を防ぐために、この群の患者は、より選択的な、抗体または治療用エピトープを含むワクチンで処置されることになる。場合によっては、能動ワクチンは、病理学的タウタンパク質上の治療用エピトープを標的化する厳密に選択的な抗体の産生を誘導するデザイナーエピトープである（例えば、実施例を参照のこと）。いくつかの実施形態において、そのワクチンは、正常／生理学的タウタンパク質と共有されるいかなるアミノ酸配列も含まない。

処置レジメン

【０３３０】

予防的な適用において、薬学的組成物または医薬は、特定の疾患に感受性であるかまたは別途そのリスクがある患者に、その疾患を排除するまたはその疾患のリスクを低下させるまたはその疾患の発生を遅延させるのに十分な量で投与される。治療的な適用において、組成物または医薬は、そのような疾患に罹患していると疑われる患者またはすでに罹患している患者に、その疾患およびその合併症を治癒するまたはそれらの症状を少なくとも部分的に停止するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適した量は、治療有効量または薬剤的有効量と定義される。予防的レジメンと治療的レジメンの両方において、物質は通常、十分な免疫応答が達成されるまで、数回において投与される。代表的には、免疫応答をモニターし、その免疫応答が衰弱し始めたら、反復投与を行う。

【０３３１】

上に記載された状態の処置のための本発明の組成物の有効量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるかまたは動物であるか、投与される他の薬剤、および処置が予防的であるかまたは治療的であるかをはじめとした多くの因子に応じて変動する。通常、患者は、ヒトである。安全性および有効性を最適化するために、処置投与量は滴定される必要がある。したがって、抗体またはタウ結合タンパク質による処置は、代表的には、ある期間にわたる複数の投薬量の投与を必要とし得る。抗体による受動免疫の場合、投与量は、約０．０００１～１００ｍｇ／ｋｇ、より一般的には、０．０１～５ｍｇ／ｋｇ宿主体重の範囲である。いくつかの適用において、抗体またはタウ結合タンパク質の量は、少なくとも０．１ｍｇ／ｋｇ体重の投与量、少なくとも０．５ｍｇ／ｋｇ体重、１ｍｇ／ｋｇ体重の投与量、または０．１～１０ｍｇ／ｋｇ体重の投与量の任意の組み合わせで投与され得る。いくつかの方法において、抗体またはタウ結合タンパク質は、少なくとも１ヶ月間、少なくとも３ヶ月間または少なくとも６ヶ月間の期間にわたる複数の投薬量の投与（同じものまたは異なるもの）において投与され得る。任意の１つの処置期間にわたる投与の総数は、例えば、４～６回であり得るが、上で論じられた因子に応じて他の回数も使用できる。処置は、下でさらに記載される任意の方法によってモニターされ得る。

【０３３２】

免疫原の量は、アジュバントも投与されるか否かに依存し、アジュバントの非存在下では、より多い投与量が必要とされる。投与するための免疫原の量は、時折、ヒトへの投与の場合、患者１人あたり１μｇ～５００μｇ、より一般的には、注射１回あたり５～５００μｇで変動する。ときとして、注射１回あたり１～２ｍｇというより多い用量が使用される。代表的には、約１０、２０、５０または１００μｇが、各ヒト注射のために使用される。注射のタイミングは、１日に１回から１年に１回まで、１０年に１回まで、著しく変動し得る。ある投与量の免疫原が与えられる任意の所与の日において、その投与量は、アジュバントも投与される場合、１μｇ／患者より多く、通常、１０μｇ／患者より多く、アジュバントの非存在下では、１０μｇ／患者より多く、通常、１００μｇ／患者より多い。代表的なレジメンは、免疫の後の、６回の毎週の間隔での追加免疫注射からなる。別のレジメンは、免疫の後の、１、２および１２ヶ月間後の追加免疫注射からなる。別のレジメンは、死ぬまで２ヶ月ごとの注射を必要とする。あるいは、追加免疫注射は、免疫応答をモニターすることによって示されるとき、不規則に行われ得る。いくつかの実施形態において、能動ワクチンは、アジュバントとして、好適なキャリア、優先的にはＫＬＨおよび水酸化アルミニウムとともに製剤化され得る。優先的には、１００μｇのペプチド／回／患者（しかし、１μｇ、１０μｇ　１００μｇおよび１ｍｇも前臨床段階では適用され得、第Ｉ相毒性研究では１０μｇ　１００μｇ　２００μｇも適用され得る）が、４週間に１回、合計で５回適用され得る。

【０３３３】

免疫原をコードする核酸に対する用量は、患者１人あたり約１０ｎｇ～１ｇ、１００ｎｇ～１００ｍｇ、１μｇ～１０ｍｇまたは３０～３００μｇのＤＮＡの範囲である。感染性ウイルスベクターに対する用量は、１投薬あたり１０～10^{9}またはそれ以上のビリオンで変動する。処置は、治療薬に対する抗体または活性化Ｔ細胞もしくはＢ細胞応答を経

時的にアッセイすることによってモニターされ得る。その応答が低下する場合、追加免疫の投与の必要が示され得る。

【０３３４】

最終的には、投与レジメンは、主治医および臨床上の因子によって決定されることになる。医学分野において公知であるように、任意の１人の患者に対する投与量は、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与の時間および経路、全般的な健康状態、ならびに同時に投与される他の薬物をはじめとした多くの因子に依存する。代表的な用量は、例えば、０．００１～１０００ｍｇの範囲内であり得るが；しかしながら、特に、上述の因子を考慮して、この例示的な範囲よりも低いまたは高い用量も考えられる。一般に、薬学的組成物の規則的な投与としてのレジメンは、１ｍｇ～１０ｍｇの単位／日の範囲内であるべきである。レジメンが持続注入である場合、それは、それぞれ１ｍｇ～１０ｍｇ／１キログラム体重／分の範囲内でもあるべきである。定期的な評価によって進捗がモニターされ得る。

【０３３５】

さらに、他の物質の同時投与または連続投与が望ましい場合がある。いくつかの実施形態において、治療的に有効な用量または量とは、症状または状態を回復させるのに十分な活性成分の量のことを指す。そのような化合物の治療効果および毒性は、細胞培養物または実験動物において標準的な薬学的手順によって測定され得る（例えば、ＥＤ５０（集団の５０％において治療的に有効な用量）およびＬＤ５０（集団の５０％に対して致死性の用量））。治療効果と毒性効果との用量比は、治療指数であり、それは、ＬＤ５０／ＥＤ５０比として表現され得る。いくつかの実施形態において、組成物中の治療薬は、アルツハイマー病および関連タウオパチーの場合、正常な行動特性および／または認知特性を回復させるのに十分な量で存在する。

【０３３６】

本発明は、本発明によって提供される任意の物質による処置の有効性の評価のために信頼され得る種々の基準を提供する。例としては、１つもしくは複数の病理学的タウ形態のレベルの低下（例えば、脳内）、脳および／またはＣＳＦからの病理学的タウのクリアランスの増加；認知能力の尺度の改善（例えば、認知機能（例えば、臨床認知症評価法（Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｄｅｍｅｎｔｉａ Ｒａｔｉｎｇ）－ＣＤＲ、アルツハイマー病評価スケール－認知サブスケール－ＡＤＡＳ－Ｃｏｇミニメンタルステート検査－ＭＭＳＥによって検査される）；運動機能検査（例えば、握力検査、タイムアップアンドゴー（Ｔｉｍｅｄ Ｕｐ ＆ Ｇｏ）（ＴＵＧ）検査、ＴＵＧマニュアル、歩きながらの会話の検査（Ｔａｌｋｉｎｇ ｗｈｉｌｅ Ｗａｌｋｉｎｇ ｔｅｓｔ）、パーキンソン病統一スケール－ＵＰＤＲＳ）の改善；基本的な日常生活動作（ＡＤＬ）検査の成績の改善（例えば、衛生、更衣動作、節制、摂食、食事の支度、電話、遠出、会計および対応）；痴呆における障害評価試験（Ｄｉｓａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ ｉｎ Ｄｅｍｅｎｔｉａ ｔｅｓｔｓ）；ならびにＡＤによって損なわれた握力、歩行運動および失行（下記の実施例において記載される動物モデルおよびアッセイとの直接的な相関関係を有する）、記憶力低下、失語、失認、時間および空間の失見当識、ならびに抑うつの重症度／格付けの降格が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３３７】

処置の有効性を評価する目的で、タウのレベルおよび分布（脳内および体液中）が、本明細書中に記載される任意の方法および／またはタウを検出するために利用可能な他の任意の方法によってアッセイされ得る。例えば、タウのレベルは、インビトロ、エキソビボ（組織切片）およびインビボ（トランスジェニックマウス）において選択的にタウおよびタウ病理に結合する新規イメージング放射性トレーサー１８Ｆ－ＴＨＫ５２３を使用してインビボで測定され得る（ポジトロン放出断層撮影法）（Ｆｏｄｅｒｏ－Ｔａｖｏｌｅｔｔｉら、２０１１，Ｂｒａｉｎ）。タウは、総タウまたはホスホ－タウのいずれかを認識するＥＬＩＳＡキットを使用して、脳脊髄液および血液においても同様に同定され得る。

【０３３８】

実際に、トランスジェニックラットにおける神経行動障害は、アルツハイマー病患者における運動障害と似ており、それは、本明細書中に提供される任意の治療薬（能動ワクチン接種のための物質を含むがこれに限定されない）を用いた臨床試験および処置プロトコルに対して意義がある。ヒトにおいて、アルツハイマー病は、臨床的には、進行性の記憶障害および認知低下、行動変化および心理学的症状（気分の撹乱、情動、食欲、覚醒睡眠サイクル、錯乱、激越および抑うつ）ならびに損なわれた運動機能（失行、ミオクローヌス、歩行障害、筋力低下、錐体外路の特徴、例えば、運動緩徐、硬直および静止時振戦）を特徴とする（Ｇｏｌｄｍａｎら、１９９９；Ｂｏｙｌｅら、２００９）。多くの研究が、アルツハイマー病（ＡＤ）では運動徴候がよく観察され、疾患が進行するにつれてその徴候が顕著になることを報告している（Ｇｏｌｄｍａｎら、１９９９；Ｗｉｌｓｏｎら、２００３；Ｌｏｕｉｓら、２００４；Ｐｅｔｔｅｒｓｓｏｎら、２００５；Ｓｃａｒｍｅａｓら、２００４；Ｓｃａｒｍｅａｓら、２００５；Ｗａｉｔｅら、２００５；Ａｌｆａｒｏ－Ａｃｈａら、２００６；Ｗａｎｇら、２００６；Ｂｕｃｈｍａｎら、２００７ａ；Ｂｏｙｌｅら、２００９）。とりわけ、運動徴候は、認知障害より先に起き得、アルツハイマー病における認知および機能の低下、施設への収容（ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌｉｚａｔｉｏｎ）および死亡率を予測し得る（Ｍｏｒｒｉｓら、１９８９；Ｓｏｉｎｉｎｅｎら、１９９２；Ｋｒａｅｍｅｒら、１９９４；Ｃｈｕｉら、１９９４；Ｓｃａｒｍｅａｓら、２００４；Ｓｃａｒｍｅａｓら、２００５）。筋力の低下は、認知障害の発症より先に起きることが示されている（Ｂｕｃｈｍａｎら、２００７ｂ；Ｂｏｙｌｅら、２００９）。

【０３３９】

ＡＤにおける運動徴候の発症は、脳幹における神経変性および神経細胞脱落に関連している（Ｚａｒｏｗら、２００３；Ｂｕｒｎｓら、２００５；Ｇｒｕｄｚｉｅｎら、２００７；Ｓｉｍｉｃら、２００９；Ｗａｉら、２００９；Ｂｒａａｋ ａｎｄ ＤｅｌＴｒｅｄｉｃｉ，２０１１）。さらに、いくつかの研究は、神経原線維変性が、脳幹に由来し、皮質の神経変性より先に起きることを示唆した（Ｈｅｒｔｚ，１９８９；Ｓｉｍｉｃら、２００９；Ｂｒａａｋ ａｎｄ ＤｅｌＴｒｅｄｉｃｉ，２０１１）。

【０３４０】

これらの知見は、運動障害が、ＡＤの病原論において重要な特徴であることを示している。さらに、いくつかの運動領域の機能障害は、痴呆より先に起き得、認知低下を予測し得る。本明細書中に記載されるペプチド（治療用エピトープを含む）による能動免疫療法は、ヒト病理学的タウを発現するトランスジェニックラットの運動障害を改善し得る。したがって、能動免疫療法による脳幹の病理の直接的な標的化は、ヒトＡＤ患者における運動障害ならびに認知障害を予防し得るか、遅らせ得るか、または遅延させ得る。したがって、運動機能の試験は、本明細書中に記載される物質（例えば、タウクリアランス剤、能動および受動ワクチン）の臨床的有効性の評価のために使用され得る一連の試験に含まれ得る。

【０３４１】

また、当業者は、病理学的タウ（例えば、皮質／海馬におけるＮＦＴ）のレベルおよび分布と疾患進行との間の十分に確立した相関関係を承知している。病理学的タウ（ＮＦＴ病理）の密度は、認知の障害およびアルツハイマー病の重症度と相関している（Ｂｒａａｋ ａｎｄ Ｂｒａａｋ，１９９１；Ｂｉｅｒｅｒら、１９９５；Ｂｅｒｇら、１９９８；Ｄｕｙｃｋａｅｒｔｓら、１９９８；Ｇｉａｎｎａｋｏｐｏｕｌｏｓら、１９９８，２００３）。嗅内皮質および海馬における病理学的タウ（例えば、ＮＦＴ、糸屑状構造物）は、反対に、記憶の長期的変化に関連する（Ｒｅｉｔｚら、２００９）。同様に、脳幹では、病理学的タウ（ＮＦＴ）は、非常に早い段階において背側縫線核に生じ；他方の縫線核は、その後、影響される。これらの病変は、ＡＤに見られるセロトニン作動性の障害を説明する（Ｄｕｙｋａｅｒｔｓら、２００９）。錐体外路の症状は、黒質タウ病理と相関している（Ｌｉｕら、１９９７）。したがって、これらのＡＤ分布パターンの１つもしくは複数に影響し得る処置剤は、おそらく、ＡＤにおいて有益な効果を有するだろう。

【実施例】
【０３４２】
実施例１：組換えヒトタウタンパク質の調製
ヒト完全長タウ（２Ｎ４Ｒ、２Ｎ３Ｒ）およびタウ欠失変異体：タウ組換えタンパク質（図１および６）をクローンτ４０（Ｇｏｅｄｅｒｔ，１９８９）から生成した（そのクローンを発現プラスミドｐＥＴ－１７ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ）にサブクローニングし、細菌において発現させた）。各タウ欠失変異体を、ＤＮＡ配列決定によって確かめた。すべてのタウ欠失変異体およびタウペプチドは、４４１アミノ酸長であるがゆえにタウ$_{441}$とも呼ばれる（Ｄ’Ｓｏｕｚａ，２００５）最も長いヒトタウアイソフォーム２Ｎ４Ｒに従ってナンバリングされる。アイソフォーム２Ｎ３Ｒに由来するタウ欠失変異体およびペプチドは、第２の微小管結合リピート（２Ｎ４Ｒのアミノ酸２７５～３０５）が欠失していることを示唆する「３Ｒ」によって記される。タウタンパク質の生成は、以下の工程を含んだ：ａ）細菌におけるタウの発現；ｂ）イオン交換クロマトグラフィーによるタウの精製；ｃ）ゲル濾過によるタウの精製；ｄ）単離されたタウの濃縮および保管；ならびにｅ）免疫親和性精製（これは、ミクログリア取り込み実験において使用されたタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対してのみ採用される例外であり、実施例１０、図１７を参照のこと）。
【０３４３】
ａ）ヒト完全長タウ（２Ｎ４Ｒまたは２Ｎ３Ｒ）および組換えタウ欠失変異体の細菌発現：ヒトタウ（上記）発現プラスミドを、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ（大腸菌）の産生株ＢＬ２１（ＤＥ３）に形質転換した。適切な発現プラスミドを含む細菌細胞を、ＳａｍｂｒｏｏｋおよびＲｕｓｓｅｌｌによる“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”（２００１）に記載されているように培養し、誘導した。タウタンパク質またはそのフラグメントの発現を駆動するｐＥＴ－１７ｂプラスミドで形質転換されたＢＬ２１（ＤＥ３）細菌のシングルコロニーを、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む５００ｍｌのＬｕｒｉａ ｂｒｏｔｈ培地中、３００ｒｐｍ、３７℃において生育し、イソプロピル－β－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を０．４ｍＭの最終濃度まで加えることによって誘導した。３７℃での３時間のさらなるインキュベーションの後、３，０００×ｇ、４℃における１５分間の遠心分離によって細菌を回収した。
【０３４４】
ｂ）塩基性および中性タウタンパク質（完全長タウアイソフォーム、タウΔ３５８－４４１、タウΔ３０６－４００、タウΔ４２１－４４１、タウΔ３００－３１２、タウΔ１３４－１６８、タウΔ１－２２０、タウΔ１－１２６、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３ＲおよびタウΔ（１－２９６；３９２－４４１）／４Ｒ）の陽イオン交換クロマトグラフィー精製を、本質的に先に記載されたように（Ｋｒａｊｃｉｏｖａら、２００８）行った。発現後、細菌のペレットを、１０ｍｌの溶解緩衝液（５０ｍＭ １，４－ピペラジンジエタンスルホン酸（ＰＩＰＥＳ）ｐＨ６．９、５０ｍＭ塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）、１ｍＭエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、５ｍＭジチオトレイトール（ＤＴＴ）、０．１ｍＭフッ化フェニルメチルスルホニル（ＰＭＳＦ）、５％（ｖ／ｖ）グリセロール）に再懸濁し、液体窒素中で急速凍結し、タウタンパク質の精製のために使用するまで－８０℃において保管した。タウタンパク質の精製のために、凍結された細菌懸濁液を急速解凍し、氷上に置いた。細菌細胞壁を、５０％デューティサイクル、５０Ｗ電力出力に設定されたＳｏｎｏｐｕｌｓ ＨＤ ２２００，ｔｉｐ ＴＴ－１３（Ｂａｎｄｅｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用することによって、３０秒間作動３０秒間休止を６回行う氷上での超音波処理によって破壊した。その溶解産物を遠心分離（２１，０００×ｇ、１５分間、４℃）によって浄化し、上清を０．４５μｍメンブランフィルターで濾過した。組換えタウタンパク質の大規模精製を、ＡＫＴＡ－ＦＰＬＣワークステーション（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓｗｅｄｅｎ）を使用して、６℃において行った。濾過された溶解産物を、溶解緩衝液で

平衡化された５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）に３ｍｌ／分の流速で充填し、２８０ｎｍにおけるベースラインが安定するまで、６０ｍｌの溶解緩衝液で徹底的に洗浄した。結合したタウタンパク質を、緩衝液Ｂ（１Ｍ　ＮａＣｌが補充された溶解緩衝液）のグラジエント（１５ｍｌ以内で０～３０％）によって溶出した。個々の１ｍｌ画分を回収し、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）によって解析した。正に帯電したタウタンパク質と同時精製する核酸を除去するために、タウタンパク質を含む画分をプールし、緩衝液Ｂのそれほど急勾配でないグラジエント（４５ｍｌにおける０～３０％）とともに５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）を使用する第２の陽イオン交換クロマトグラフィー工程によって精製した。

【０３４５】

ｃ）酸性タウタンパク質（タウΔ２２２－４２７、タウΔ２２８－４４１、タウΔ２５７－４００、タウΔ１３７－４４１、タウΔ２８３－４４１）の陰イオン交換クロマトグラフィー精製を、先に記載されたように（Ｃｓｏｋｏｖａら、２００４）行った。発現後、細菌のペレットを、１０ｍｌのヒスチジン溶解緩衝液（２０ｍＭヒスチジン，ｐＨ６．０、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、５ｍＭ　ＤＴＴ、０．１ｍＭ　ＰＭＳＦおよび５％（ｖ／ｖ）グリセロール）に再懸濁した。細菌細胞壁を、５０％デューティサイクル、５０Ｗ電力出力に設定されたＳｏｎｏｐｕｌｓ　ＨＤ　２２００，ｔｉｐ　ＴＴ－１３（Ｂａｎｄｅｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用することによって、３０秒間作動３０秒間休止を６回行う氷上での超音波処理によって破壊した。その溶解産物を遠心分離（２１，０００×ｇ、１５分間、４℃）によって浄化した。細菌溶解産物を、１％硫酸ストレプトマイシン（Ｍｅｄｅｘｐｏｒｔ，Ｒｕｓｓｉａ）によって沈殿させ、氷上で５分間インキュベートし、遠心分離（２１，０００×ｇ、１５分間、４℃）によって浄化し、０．４５μｍメンブランフィルターで濾過した。濾過されたストレプトマイシン沈殿溶解産物を、５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ　ＱＳｅｐｈａｒｏｓｅ　ＨＰカラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓｗｅｄｅｎ）に３ｍｌ／分の流速で充填し、Ａ２８０ベースラインが安定するまで、３０～５０ｍｌのヒスチジン溶解緩衝液で徹底的に洗浄した。タウタンパク質を、ヒスチジン溶解緩衝液における２工程の塩グラジエント（４０ｍｌにおける０．０５～０．５Ｍ　ＮａＣｌの後の、２０ｍｌにおける０．５～１Ｍ　ＮａＣｌ）で溶出した。

【０３４６】

ｄ）精製の最後のゲル濾過工程（すべてのタウタンパク質について同じ）では、イオン交換クロマトグラフィーによって得られたプールされたタウタンパク質画分を、塩基性／中性または酸性タウタンパク質に対してそれぞれＰＩＰＥＳまたはヒスチジン溶解緩衝液（１００ｍＭ　ＮａＣｌが補充されたもの）において、３ｍｌ／分でゲル濾過カラム（ＨｉＬｏａｄ　２６／６０　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００ｐｒｅｐグレードカラム，ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に注入した。溶出したタウタンパク質をプールした。

【０３４７】

ｅ）ゲル濾過精製後のタウタンパク質の濃縮のために、プールされた画分を、１．５体積の２．５％グリセロールで希釈し、ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ　ＨＰカラム（塩基性および中性タウタンパク質）またはＨｉＴｒａｐ　Ｑ　ＨＰカラム（酸性タウタンパク質）に再度充填した。次いで、濃縮された組換えタウタンパク質を、１Ｍ　ＮａＣｌのステップグラジエントを用いてカラムから溶出した。最後に、緩衝液を、５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、アルゴンで飽和されたリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ，８．０９ｍＭリン酸二ナトリウム（Na_2HPO_4）、１．４７ｍＭリン酸二水素カリウム（KH_2PO_4）、１３６．８９ｍＭ　ＮａＣｌ、２．７ｍＭ塩化カリウム（ＫＣｌ））に交換した。精製されたサンプルのタンパク質定量を、標準物質としてのウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）とともに、ビシンコニン酸（ＢＣＡ）定量キット（Ｐｉｅｒｃｅ，ＵＳＡ）を使用して行った。タウタンパク質を使用アリコート

に等分し、液体窒素中で急凍し、－７０℃において保管した。
【０３４８】
ｆ）ミクログリアによるタウ取り込みを測定するために使用される組換えタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒから、存在し得る細菌夾雑物を除去するために（実施例１０，図１７）、組換えタウタンパク質を以下のとおり、改変された方法によって精製した。第１の陽イオン交換クロマトグラフィー工程の後、タウを含む画分をプールし、撹拌しながら、１／２０体積の氷冷５％ポリエチレンイミンを加えた。撹拌をさらに３０分間、氷上で続けた。そのサンプルを２０，０００×ｇ、４℃で１５分間遠心した。上清を回収し、１００ｍＭ　ＮａＣｌが補充されているがＤＴＴまたは他の任意の還元剤を欠くＰＩＰＥＳ溶解緩衝液において、３ｍｌ／分でＨｉＬｏａｄ　２６／６０　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００ｐｒｅｐグレードカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に充填した。ゲル濾過の後、タウタンパク質を含む画分をプールし、ＣＮＢｒ活性化Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ上に固定化されたＤＣ２５抗体（２Ｎ４Ｒタウのエピトープ３４７－３５３，Ａｘｏｎ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｖｉｅｎｎａ，Ａｕｓｔｒｉａ）を含むイムノアフィニティーカラムに充填した（０．５ｍｌ／分の流速で）。そのカラムは、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ　２０（ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎ）で予め平衡化しておいた。結合の後、そのカラムを５カラム体積のＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎで洗浄し、結合したタウタンパク質を０．１Ｍグリシン，ｐＨ２．７で溶出した。回収された画分を、１／３０体積の１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．８を加えることによって中和し、プールした。最後に、ＨｉＴｒａｐ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム，５ｍｌ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して緩衝液をＰＢＳ（アルゴンで飽和されたもの）に交換した。精製されたサンプルのタンパク質定量を、標準物質としてのＢＳＡとともにビシンコニン酸（ＢＣＡ）定量キット（Ｐｉｅｒｃｅ，ＵＳＡ）を使用して行った。そのタンパク質を使用アリコートに等分し、液体窒素中で急凍し、－７０℃において保管した。
【０３４９】
ＤＣ２５アフィニティーカラム（前出）のために使用された、精製されたＤＣ２５抗体（Ａｘｏｎ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｖｉｅｎｎａ，Ａｕｓｔｒｉａ）を、以下のとおり調製した。無血清ＤＣ２５ハイブリドーマ培養上清を、０．２体積のＰＢＳを加えることによってｐＨ７．５に調整し、２０，０００×ｇ、４℃での１０分間の遠心分離によって予め浄化し、上清を０．２μｍフィルターで濾過した。予め浄化されたＤＣ２５ハイブリドーマ培養上清を、ＰＢＳで平衡化されたＨｉＴｒａｐ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇ　ＨＰカラム（５ｍｌ，ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に１ｍｌ／分で充填した。充填が完了した後、そのカラムを４カラム体積のＰＢＳで洗浄し、結合した抗体を、１００ｍＭグリシンｐＨ２．７を用いて溶出した。溶出した画分を、１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ９で中和し、プールし、ＨｉＴｒａｐ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム（５ｍｌ，ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して緩衝液をＰＢＳに交換した。精製されたＤＣ２５抗体を、小アリコートとして－７０℃において保管した。
【０３５０】
実施例２：ヒトタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系の調製、ＥＬＩＳＡによるモノクローナル抗体のスクリーニング、およびモノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８の最初の特徴付け
６週齢Ｂａｌｂ／ｃマウスの皮下に、フロイント完全アジュバント（ＳＩＧＭＡ）中の５０μｇの組換えタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ（実施例１に記載されたように調製されたもの）で初回刺激し、フロイント不完全アジュバント中の５０μｇの同じ抗原を用いて５週間間隔で５回追加免疫した。融合の３日前に、ＰＢＳ中の５０μｇの同じ抗原をマウスの静脈内に注射した。免疫されたマウスの脾臓細胞を、Ｋｏｎｔｓｅｋｏｖａら（１９８８）の方法に従ってＮＳ／０ミエローマ細胞と融合した。脾細胞（10^8個）を、１０％ジメチルスルホキシドが補充された無血清ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中の１ｍｌの５０％ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）１５５０（Ｓｅｒｖａ）において、2×10^7個のＮＳ／０ミエローマ細胞と混合し（５：１比）、１分間融

合させた。融合された細胞を、２０％ウマ血清、Ｌ－グルタミン（２ｍＭ）、ヒポキサンチン（０．１ｍＭ）、アミノプテリン（０．００４ｍＭ）、チミジン（０．０１６ｍＭ）およびゲンタマイシン（４０Ｕ／ｍｌ）を含むＤＭＥＭに、９６ウェルプレートにおいて２．５×10^5脾臓細胞／ウェルの密度で再懸濁した。それらの細胞を、３７℃で１０日間インキュベートし、成長中のハイブリドーマを、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）によって抗タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ特異的モノクローナル抗体の産生についてスクリーニングした。

【０３５１】

ＥＬＩＳＡを使用することにより、ハイブリドーマ培養上清中の、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ（誤無秩序型のタウ）に対するモノクローナル抗体を検出した。マイクロタイタープレートを、ＰＢＳ中、３７℃においてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ（５μｇ／ｍｌ，５０μｌ／ウェル）で一晩コーティングした。非特異的結合を減少させるために１％脱脂粉乳でブロッキングした後、プレートをＰＢＳ－０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０で洗浄し、５０μｌ／ウェルのハイブリドーマ培養上清とともに３７℃で１時間インキュベートした。結合したモノクローナル抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ，ＤＡＫＯ）と結合体化されたヒツジ抗マウス免疫グロブリン（Ｉｇ）を用いて検出した。その反応物を、ペルオキシダーゼ基質としてオルトフェニレンジアミン溶液を用いて発色させ、５０μｌの２Ｍ H_2SO_4 で停止させた。４９２ｎｍにおける吸光度を、Ｍｕｌｔｉｓｃａｎ ＭＣＣ／３４０ ＥＬＩＳＡリーダー（Ｌａｂｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して測定した。ネガティブコントロール（ＰＢＳ）の吸光度の値の少なくとも２倍の値を有する読取値を、ポジティブと考えた。ポジティブハイブリドーマ培養物をさらに、免疫組織化学によって（Ｚｉｌｋａら、２００３の方法に従って）試験し、Ｋｏｎｔｓｅｋｏｖａら（１９９１）に記載されている手順に従って軟寒天においてサブクローン化した。

【０３５２】

そのように作製され、選択されたポジティブハイブリドーマ培養物から、モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８（ＡＴＣＣ Ｐａｔｅｎｔ Ｄｅｐｏｓｉｔ Ｄｅｓｉｇｎａｔｉｏｎ ＰＴＡ－１１９９４として２０１１年７月１３日にＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎに寄託されたマウスハイブリドーマ細胞系によって産生されるもの）を同定した。ＤＣ８Ｅ８を、下に記載されるようにさらに特徴付けた。マウスＩｇアイソタイピングキット（ＩＳＯ－２，ＳＩＧＭＡ）を使用するＥＬＩＳＡによって、抗体アイソタイプはマウスＩｇＧ１であると判定された。

【０３５３】

実施例３：ＤＣ８Ｅ８の可変領域の配列決定およびＣＤＲ移植によるそのヒト化

ａ）ＤＣ８Ｅ８の軽鎖可変領域および重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の決定（図３）。ＤＣ８Ｅ８の可変領域のヌクレオチド配列（図３Ａおよび３Ｄ）を、ＤＣ８Ｅ８モノクローナル抗体を発現するマウスハイブリドーマ細胞系ＰＴＡ－１１９９４（ＡＴＣＣ）から抽出された全ＲＮＡを使用して合成されたｃＤＮＡのＤＮＡ配列決定によって決定した。全ＲＮＡを、ＴＲＩＺＯＬ（登録商標）Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ＵＳＡ）を使用して抽出した。第１鎖（ｆｉｒｓｔ ｓｔｒａｎｄ）ｃＤＮＡの合成を、「大容量ｃＤＮＡ逆転写」キットを製造者のプロトコル（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，ＵＳＡ）に従って使用して行った。２×逆転写マスターミックス用の試薬の組成は、以下のとおりだった（２０μＬ反応物あたりの量）：２μＬの１０×ＲＴ緩衝液；０．８μＬの２５×ｄＮＴＰミックス（１００ｍＭ）；２μｌの１０×ＲＴランダムプライマー（５０μＭ）；１μＬのＭｕｌｔｉＳｃｒｉｂｅ（商標）逆転写酵素（５０Ｕ／μＬ）；４．２μＬのヌクレアーゼ非含有 H_2O。逆転写のために、１０μＬの２×逆転写マスターミックスをＲＮＡサンプルと混合し（２μｇ／１０μｌ）、以下の条件下においてｃＤＮＡを合成した：２５℃で１０分、３７℃で１２０分、８５℃で５分および最後に４℃に冷却。軽鎖および重鎖の可変領域をコードする遺伝子の増幅を、Ｐｈｕｓｉｏｎ（登録商標）Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ ＤＮＡ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ

（Ｆｉｎｎｚｙｍｅｓ，Ｆｉｎｌａｎｄ）を使用するポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって行った。順方向プライマー（８Ｅ８Ｌ－センス５’－ＡＣＡＴＴＧＴＧＡＴＧＴＣＡＣＡＧＴＣＴＣＣＡＴＣＣＴＣＣ－３’（配列番号１３２）および８Ｅ８Ｈ－センス５‘－ＣＴＣＣＴＣＣＡＡＴＴＧＣＡＧＣＡＧＴＣＴＧＧ－３‘（配列番号１３３））を、ＤＣ８Ｅ８軽鎖（ＤＩＶＭＳＱＳＰＳＳ）（配列番号１３４）および重鎖（ＱＶＱＬＱＱＳＧＰＥ）（配列番号１３５）のＮ末端のタンパク質配列に従ってデザインした。そのＮ末端のタンパク質配列は、エドマン分解（軽鎖）およびＭＡＬＤＩインソース崩壊（重鎖）を使用して決定された。この情報を使用して、軽鎖および重鎖と最も似ているタンパク質を、それらの対応するヌクレオチド配列とともに、Ｇｅｎｅｂａｎｋにおいて同定した。次いで、マウスＶ遺伝子（軽鎖および重鎖）の最も有望なヌクレオチド配列を、ＩＭＧＴ／ＬＩＧＭ－ＤＢデータベース（ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ）において同定した。これらの遺伝子を、順方向プライマーのデザインのために使用した（ＤＣ８Ｅ８のＮ末端のタンパク質配列を使用して修正を行った）。軽鎖および重鎖に対する逆方向プライマー（カッパー－アンチセンス５’－ＧＧＡＡＴＴＣＧＴＴＧＡＡＧＣＴＣＴＴＧＡＣＡＡＴＧＧＧＴＧ－３’（配列番号１３６）およびＧ１－アンチセンス５’－ＧＧＡＡＴＴＣＡＣＡＴＡＴＧＣＡＡＧＧＣＴＴＡＣＡＡＣＣＡＣ－３（配列番号１３７））を、それぞれカッパーおよびＩｇＧ１鎖の定常領域から得た。

【０３５４】

ＰＣＲ産物を配列決定し、ＤＣ８Ｅ８の軽鎖および重鎖の可変領域の得られたＤＮＡ配列を、それぞれ図３Ａおよび３Ｄに示す。最も近いマウス生殖細胞系列軽鎖ＩＧＫＶ８－２１＊０１および重鎖ＩＧＨＶ１－８１＊０１に対するＤＣ８Ｅ８のアラインメントを、それぞれ図３Ｃおよび３Ｆに示す。ＤＣ８Ｅ８軽鎖および重鎖タンパク質配列における相補性決定領域（ＣＤＲ）に下線を引いている（それぞれ図３Ｂおよび３Ｅ）。ＣＤＲおよびフレームワーク領域（ＦＲ）を、ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ（ＩＭＧＴ）ナンバリングシステムに従って特定した（例えば、Ｌｅｆｒａｎｃ Ｍ．Ｐ．Ｔｈｅ ＩＭＧＴ ｕｎｉｑｕｅ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎｓ，Ｔ－ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ，ａｎｄ Ｉｇ－ｌｉｋｅ ｄｏｍａｉｎｓ．Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｓｔ ７，１３２－１３６，１９９９（１９９９）を参照のこと）。

【０３５５】

ｂ）ＤＣ８Ｅ８のヒト化。マウスＤＣ８Ｅ８相補性決定領域（ＣＤＲ）の移植によってヒト化ＤＣ８Ｅ８を作製するための好適な候補ヒト免疫グロブリンを特定するために、ＤＣ８Ｅ８に対して最も高い配列同一性を有するヒト生殖細胞系列遺伝子を、ＩＭＧＴ／ＬＩＧＭ－ＤＢフラットファイルリリース（ｆｌａｔ ｆｉｌｅ ｒｅｌｅａｓｅ）２０１１１２－６（ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ）から抽出されたヒト免疫グロブリン遺伝子の選択されたセットに対するＤＣ８Ｅ８ヌクレオチド配列のＣｌｕｓｔａｌＸ２ペアワイズアラインメントを使用して決定した。ＩｇＫｖ４－１＊０１を、ＤＣ８Ｅ８軽鎖に対して最も近いヒト生殖細胞系列遺伝子として特定し（図４）、ＩｇＨＶ１－６９＊１０を、ＤＣ８Ｅ８重鎖に対して最も近い生殖細胞系列遺伝子として特定した（図５）。以下のアプローチ（方法１および方法２）をデザインし、それを使用することにより、ＤＣ８Ｅ８抗体の１つもしくは複数のヒト化バージョンを調製することができる。適切な抗体発現系（例えば、インビトロ（例えば、ＨＥＫ２９３細胞）またはインビボ（トランスジェニック動物）での抗体発現のために使用される哺乳動物発現ベクター）における発現の後、得られたヒト化組換え抗体は、ＤＣ８Ｅ８の活性の特徴付けのために使用された任意の方法に従って、活性（例えば、生化学的活性および治療活性）について試験され得る。

【０３５６】

方法１：ＣＤＲ移植、および必要であればフレームワーク領域（ＦＲ）における変異（ＣＤＲは、下線が引かれた太字であり、ＦＲの変異は、太字である）：

重鎖可変領域（掲載順にそれぞれ配列番号１３８～１４０）：

【化１】

```
DC8E8_重鎖          QVQLQQSGPELVKPGTSVKMPCKASGYIFTDYVISWVKQRTGQGLEWIGEIFPRSGSTYY
ヒト_胚_重鎖        QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGIANY
                    **** ***.*: ***:***:.*****  *:.*.****:* .******:* *:*  * : *

  配列番号 140      QVQLVQSGPEVKKPGSSVKVPCKASGYIFTDYVISWVRQATGQGLEWMGEIFPRSGSTNY

DC8E8_重鎖          NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSVTSEDSAVYFCARDYYGTSFAMDYWGQGTSVTVSS
ヒト_胚_重鎖        AQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARENHCYYYGMDVWGQGTTVTVSS
                     :**:*:.*:*****:.****:***: ***:***:***: :   :.** *****:*****

  配列番号 140      AQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYYGTSFAMDYWGQGTTVTVSS
```

軽鎖可変領域（掲載順にそれぞれ配列番号１４１～１４３）：

【化２】

```
DC8E8_軽鎖          DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR
ヒト_胚_軽鎖        DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
                    ****:***.***** **:.*:.******:* * ..**************.***********

  配列番号 143      DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR

DC8E8_軽鎖          ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSFYLRTFGGGTKLDIK
ヒト_胚_軽鎖        ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTLTFGGGTKVEIK
                    ********:***************:****:*****:* :   *******::**

  配列番号 143      ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSFYLRTFGGGTKVEIK
```

【０３５７】

方法２：ＤＣ８Ｅ８に対して最も高い配列同一性を有するマウス生殖細胞系列免疫グロブリン（図３）およびヒト生殖細胞系列免疫グロブリン（図４および５）を見つけ出し、ＤＣ８Ｅ８タンパク質配列とアラインメントした。ＣＤＲ領域を、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って特定した。ＤＣ８Ｅ８結合部位内の最も有望な抗原接触残基を、ＭａｃＣａｌｌｕｍら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６の成果に基づいて特定した。

【０３５８】

ＤＣ８Ｅ８のヒト化バージョンにおける変異に対する様々なアミノ酸候補を、以下の複合基準に基づいて特定した：

ｉ．ＣＤＲにおける存在および抗原との接触の確率

ｉｉ．バーニヤゾーン（Ｖｅｒｎｉｅｒ　ｚｏｎｅ）における存在

ｉｉｉ．それらがマウス生殖細胞系列において変異しているか否か

【０３５９】

２つのレベルの変異候補が、上記基準に従って特定された：

Ｘタイプ残基（太字）：

－ＤＣ８Ｅ８と最も近いマウス生殖細胞系列との間で異なる残基、非類似アミノ酸

－ＣＤＲおよび接触抗原における残基。ＣＤＲは、下記のＤＣ８Ｅ８配列において太字の小文字の斜体である。

Ｙタイプ残基（下線が引かれた太字）：

－ＤＣ８Ｅ８と最も近いマウス生殖細胞系列との間で同一であるが最も近いヒト生殖細胞系列において異なり、バーニヤゾーンに位置する残基（非類似アミノ酸）

－ＤＣ８Ｅ８と最も近いマウス生殖細胞系列との間で異なる残基（類似の／保存されたアミノ酸）

【０３６０】

各鎖に対する２つのヒト化配列を、ＤＣ８Ｅ８の活性に影響すると予測される変異とともに特定した：

配列番号１４７、１５２：Ｘタイプの残基だけが変異され得る

配列番号１４８、１５３：ＸとＹの両方のタイプの残基が変異され得る重鎖可変領域（掲載順にそれぞれ配列番号１３８、１４５、１３９）：

【化３】

```
DC8E8_重鎖          QVQLQQSGPELVKPGTSVKMPCKAS*gyiftdyvis*WVKQRTGQGLEWIGE*ifprsgst*YY
マウス_胚_重鎖      QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYY
ヒト_胚_重鎖        QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGIANY
                    **** ***.*: :**:***:.***** *:.* ****:* .******:* * *  * : *

 配列番号 147       QVQLVQSGPEVVKPGSSVKMPCKASGYIFSDYAISWVRQRTGQGLEWMGEIFPRSGSTNY
 配列番号 148       QVQLVQSGPEVVKPGSSVKMPCKASGYIFSDYAISWVRQRTGQGLEWMGEIFPRSGSTYY

DC8E8_重鎖          NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSVTSEDSAVYFC*ardyygtsfamdy*WGQGTSVTVSS
マウス_胚_重鎖      NEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARDYYGTYYAMDYWGQGTSVTVSS
ヒト_胚_重鎖        AQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARENHCYYYGMDVWGQGTTVTVSS
                     :**:*:.*:*****:.****:* *: ***:***:***: :   :.** *****:*****

 配列番号 147        AQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYYGTSYGMDVWGQGTTVTVSS
 配列番号 148        NQKFQGRVTITADKSTNTAYMQLSSLTSEDTAVYYCARDYYGTSYGMDVWGQGTTVTVSS
```

軽鎖可変領域（掲載順にそれぞれ配列番号１４１、１５０、１４２）：

【化４】

```
DC8E8_軽鎖          DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS*qsllnsrtrkny*LAWYQQKPGQSPKLLIY*was*TR
マウス_胚_軽鎖      DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR
ヒト_胚_軽鎖        DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
                    ****:***.***** **:.*:.******:* * ..**************.***********

 配列番号 152       DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLNSRNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
 配列番号 153       DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSVLNSRNNKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR

DC8E8_軽鎖          ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC*kqsfylrt*FGGGTKLDIK
マウス_胚_軽鎖      ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLRTFGGGTKLEIK
ヒト_胚_軽鎖        ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTLTFGGGTKVEIK
                    ********:***************:****:*****:* :   *******::**

 配列番号 152       ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSFYLRTFGGGTKVEIK
 配列番号 153       ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSFYLRTFGGGTKVEIK
```

【０３６１】

実施例４：組換えタウ欠失変異体およびタウ由来ペプチドを使用したＤＣ８Ｅ８エピトープのマッピング

ヒトタウタンパク質２Ｎ４Ｒの欠失変異体ならびにタウ由来ペプチド（Ａｎｔａｇｅｎｅ，Ｉｎｃ．（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）およびＥＺＢｉｏｌａｂ，（ＵＳＡ））を、ＥＬＩＳＡを使用するＤＣ８Ｅ８のエピトープマッピングのために使用した（図６、７および８）。組換えヒトタウアイソフォーム（２Ｎ４Ｒ；２Ｎ３Ｒ）およびタウ欠失変異体（図６Ａ、６Ｂ）を、実施例１に記載したように調製した。ペプチド（図７Ａ、７Ｂ）は、ＥＺＢｉｏｌａｂｓ（ＵＳＡ）によって８５％より高い純度で合成された。

【０３６２】

マイクロタイタープレートを、３７℃において組換えタウタンパク質またはタウペプチドで一晩コーティングした（ＰＢＳ中５μｇ／ｍｌ、５０μｌ／ウェル）。非特異的結合を減少させるために１％脱脂粉乳でブロッキングした後、プレートをＰＢＳ－０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０で洗浄し、５０μｌ／ウェルのＤＣ８Ｅ８ハイブリドーマ培養上清とともに３７℃で１時間インキュベートした。結合したモノクローナル抗体を、ヒツジ抗マウスＩｇ　ＨＲＰ結合体（ＤＡＫＯ）を用いて検出した。その反応物を、ペルオキシダーゼ基質としてオルトフェニレンジアミン溶液を用いて発色させ、５０μｌの２Ｍ H_2SO_4 で停止させた。吸光度を、Ｍｕｌｔｉｓｃａｎ　ＭＣＣ／３４０　ＥＬＩＳＡリーダー（Ｌａｂｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して４９２ｎｍにおいて測定した。ネガティブコントロール（ＰＢＳ）の吸光度の値の少なくとも２倍の値を有する読取値を、ポジティブと考えた。

【０３６３】

ＤＣ８Ｅ８は、以下のヒトタウタンパク質：Δ３５８－４４１、Δ４２１－４４１、Δ

１３４－１６８、Δ１－２２０、Δ１－１２６、Δ（１－２９６；３９２－４４１）／４ＲおよびΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを認識したが、欠失Δ２２２－４２７、Δ３０６－４００、Δ２２８－４４１、Δ３００－３１２、Δ２５７－４００、Δ１３７－４４１およびΔ２８３－４４１を有するタウタンパク質を認識しなかった（図６Ｂ、６Ｃ）。ＤＣ８Ｅ８は、タウ２Ｎ４Ｒの病理学的／誤無秩序タウΔ（１－２９６；３９２－４４１）／４Ｒ、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよびタウ欠失変異体（Δ３５８－４４１、Δ４２１－４４１、Δ１３４－１６８、Δ１－２２０、Δ１－１２６）を認識するよりも低い程度で生理学的タウアイソフォーム２Ｎ４Ｒおよび２Ｎ３Ｒを認識した（図６Ｃ）。タウペプチドを使用したより詳細なエピトープマッピングから、ＤＣ８Ｅ８が、タウペプチド２４０－２７０、２７０－３００および３０１－３３０を認識しないことが明らかになった（図７Ａ、７Ｂ、７Ｃ）。同時に、これらの知見は、ＤＣ８Ｅ８が、ヒトタウ上に４つの結合部位またはエピトープを有することを示唆する（その各々は、タウタンパク質の微小管結合リピートドメイン領域内に位置し、そのエピトープの各々は、以下のタウ配列：２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号９８）（タウタンパク質の第１リピートドメイン）、２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号９９）（タウタンパク質の第２リピートドメイン）、３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号１００）（タウタンパク質の第３リピートドメイン）および３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１０１）（タウタンパク質の第４リピートドメイン）（図７Ｄ）のうちの１つの中に別々に位置する）。さらに、ＤＣ８Ｅ８は、完全長３リピートおよび４リピートタウよりも良好に切断型のタウに結合するので、これらの結果は、ＤＣ８Ｅ８が、生理学的タウ（タウ３９（２Ｎ３Ｒ）およびタウ４０（２Ｎ４Ｒ））よりも疾患型のタウにより良く結合することも示唆する。また、タウは、生理学的タウ（天然無秩序タウ）から疾患タウ（誤無秩序および誤秩序タウ，Ｋｏｖａｃｅｃｈら、２０１０）にコンフォーメーションを変化させると考えられるので、これらの結果は、ＤＣ８Ｅ８に対する結合部位（ＤＣ８Ｅ８エピトープ）の１つもしくは複数が、疾患タウと生理学的タウとで異なるコンフォーメーションを有すること、およびＤＣ８Ｅ８がコンフォーメーション変化を検出できることを示唆する。

【０３６４】

これらのタウリピートドメインは、種間で保存されているので（図８Ａ）、ＤＣ８Ｅ８は、ラット、マウス、ウシ、チンパンジー（ｃｈｉｐａｎｚｅｅ）、カエルなどのような多種多様な種由来のタウタンパク質と反応する可能性がある。様々な動物種のタウタンパク質のアラインメントを、ソフトウェアＣｌｕｓｔａｌＷ２（例えば、ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｍｓａ／ｃｌｕｓｔａｌｗ２／において入手可能）を使用して行った。ヒトタウは、ヒト脳ニューロンにおいて発現される最も長いタウアイソフォーム（２Ｎ４Ｒ，４４１アミノ酸）によって代表される。他の種のタウタンパク質は、公的データベースから選択された。ＤＣ８Ｅ８抗体によって認識される４つのエピトープの各々が位置する配列は四角で囲まれている。

【０３６５】

さらなる点変異および欠失を、ある特定のタウ由来ペプチド（８－ｍｅｒ、９－ｍｅｒおよび１０－ｍｅｒ）に対して行うことにより、各ペプチドがＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）と競合する能力によって評価される、ＤＣ８Ｅ８エピトープをさらに定義した。ペプチドは、ＥＺＢｉｏｌａｂｓ（ＵＳＡ）によって８５％より高い純度で合成された。競合ＥＬＩＳＡを、以下の標準的なプロトコルに従って行った。ＥＬＩＳＡプレート（ＩＷＡＫＩ高結合プレート，＃３８０１－０９６，Ｂｅｒｔｏｎｉ　ＧｍｂＨ，Ａｕｓｔｒｉａ）を、１００μｌ／ウェルの、ＰＢＳ中の５μｇ／ｍｌの組換え精製タウΔ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）で４℃において一晩コーティングした。そのＩＷＡＫＩ高結合プレートを、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０（０．０５％ｖ／ｖ）で４回洗浄し、２５℃において２時間、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０でブロッキングした。上記ペプチドの各々を別々に５ｍＭの最終濃度でＰＢＳに溶解した。ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０中のそれらのペプチドの段階希釈物（２倍）を、コニカルウェル底を有

するポリプロピレンプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ，＃６５１２０１）において調製した（濃度範囲８０μＭ、４０μＭ、２０μＭ、１０μＭ、５μＭおよび２．５μＭ）。１ウェルあたり１００μｌの各希釈物を加えた。精製されたＤＣ８Ｅ８モノクローナル抗体（精製は、下記の実施例５に記載されるように行った）を、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０中、２μｇ／ｍｌの濃度に希釈し、１００μｌのこの希釈された抗体を、ペプチドの各段階希釈物と混合して、４０μＭ、２０μＭ、１０μＭ、５μＭ、２．５μＭおよび１．２５μＭの濃度でそれぞれの各試験ペプチドを含む１００μｌあたり１００ｎｇの抗体を含む２００μｌの混合物を得た。その抗体／ペプチド混合物を、２５０ｒｐｍに設定された回転プラットフォーム上で２５℃において１時間インキュベートした。１００マイクロリットル（１００μｌ）の抗体／ペプチド混合物を、上記ポリプロピレンプレートから、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）でコーティングされ、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０でブロッキングされたＩＷＡＫＩ高結合プレートに移し、２５０ｒｐｍに設定された回転プラットフォーム上で２５℃において１時間インキュベートした。そのプレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０で４回洗浄した。それらのサンプル（プレート中）を、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０において１：４，０００希釈された１００μｌのポリクローナルヤギ抗マウス免疫グロブリン／ＨＲＰ（Ｄａｋｏ，＃Ｐ０４４７）とともに、回転プラットフォーム（２５０ｒｐｍに設定）上で２５℃において１時間インキュベートした。そのプレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎで４回洗浄した。次いで、サンプル／プレートを、１．５μｌ／２ｍｌの３０％H_2O_2（ＳＩＧＭＡ，Ｈ－０９０４）が補充された０．１Ｍ酢酸Ｎａ　ｐＨ６．０（Ｒｏｔｈ，＃６７７９）中の、１００μｌの１．５ｍｇ／２ｍｌ　ｏ－ＰＤＡ溶液（ｏ－フェニレンジアミン，ＳＩＧＭＡ，Ｐ１５２６）とともに２５℃において１０分間、暗所においてインキュベートした。１００μｌの２Ｍ　H_2SO_4（Ｍｅｒｃｋ，１．００７３１．１０００）を加えることによって反応を停止した。その反応の程度を、サンプル／プレートの４９０ｎｍにおける吸光度を読むことによって追跡した（例えば、Ｖｉｃｔｏｒ　Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒ（Ｗａｌｌａｃ）を使用して）。

【０３６６】

図８Ｂは、以下の６つのペプチドを用いて行われた競合ＥＬＩＳＡの結果を示している：ＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ（配列番号２００）、ＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０１）、ＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０２）、ＫＨＶＰＧＧＧＳＶ（配列番号２０３）、ＨＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０４）およびＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０５）。タウ治療用エピトープ＃２を含む、ペプチドＫＨＶＰＧＧＧＳＶ（配列番号２０３）およびＨＶＰＧＧＧＳＶＱ（配列番号２０４）は、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）上に存在する元の治療用エピトープの少なくとも１つと競合した。配列番号２０４のエピトープから、下線が引かれたヒスチジンが除去されることにより、競合活性が失われる（ペプチドＶＰＧＧＧＳＶＱ，配列番号２０５を参照のこと）。ヒスチジンからアラニンに変化させる点変異（「エピトープ＃２」中の、対応するタウの２９９位におけるもの）は、競合活性を失わせる（ペプチドＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ，配列番号２００）。「ヒスチジン２９９」の前に（Ｎ末端に向かって）２または３個のアミノ酸を含むペプチドも、元のエピトープと競合した（それぞれペプチドＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０２）およびＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２０１））。これらの結果から、第２のタウリピート内に含まれるＤＣ８Ｅ８の最小エピトープ（エピトープ＃２）が、６－ｍｅｒ配列、すなわちＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）内に存在することが示唆される。

【０３６７】

上述のマッピング実験から、ＤＣ８Ｅ８抗体のエピトープの１つもしくは複数（ｏｎｅ　ｏｒｅ　ｍｏｒｅ）の中のアミノ酸配列ＰＧＧＧの存在が示唆された。さらに、このアミノ酸配列は、ＤＣ８Ｅ８によって結合されるタウタンパク質上の４つすべてのエピトープに存在する（配列番号９８、９９、１００、１０１を参照のこと）。ＤＣ８Ｅ８エピトープのＮ末端領域における残基を決定するために、アラニンスキャニング実験を、タウの第２リピートドメイン内に含まれるＤＣ８Ｅ８エピトープ（２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４内，配列番号９９）を含むタウペプチド２９５－ＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ－３０５に

おいて行った。

【０３６８】

ＤＣ８Ｅ８に対する変異体ペプチドの結合能を、各ペプチドがＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）と競合する能力によって評価した。７つのペプチドが、ＥＺＢｉｏｌａｂｓ（ＵＳＡ）によって８５％より高い純度で合成された：ＡＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４４）、ＤＡＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４６）、ＤＮＡＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４９）、ＤＮＩＡＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５１）、ＤＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５９）、ＤＮＩＫＨＡＰＧＧＧＳ（配列番号１６１）、および元の配列ＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１７１）を有するペプチド。競合ＥＬＩＳＡを、以下の標準的なプロトコルに従って行った。ＥＬＩＳＡプレート（ＩＷＡＫＩ高結合プレート，＃３８０１－０９６，Ｂｅｒｔｏｎｉ　ＧｍｂＨ，Ａｕｓｔｒｉａ）を、１００μｌ／ウェルの、ＰＢＳ中の５μｇ／ｍｌの組換え精製タウΔ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）で４℃において一晩コーティングした。そのＩＷＡＫＩ高結合プレートを、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０（０．０５％ｖ／ｖ）で４回洗浄し、２５℃において２時間、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０でブロッキングした。上記ペプチドの各々を別々に５ｍＭの最終濃度でＰＢＳに溶解した。ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０中のそれらのペプチドの段階希釈物（２倍）を、コニカルウェル底を有するポリプロピレンプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ，＃６５１２０１）において調製した（濃度範囲３２０μＭ、１６０μＭ、８０μＭ、４０μＭ、２０μＭ、１０μＭ、５μＭおよび２．５μＭ）。１ウェルあたり１００μｌの各希釈物を加えた。精製されたＤＣ８Ｅ８モノクローナル抗体（精製は、下記の実施例５に記載されるように行った）を、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０中、２μｇ／ｍｌの濃度に希釈し、１００μｌのこの希釈された抗体を、ペプチドの各段階希釈物と混合して、１６０μＭ、８０μＭ、４０μＭ、２０μＭ、１０μＭ、５μＭ、２．５μＭおよび１．２５μＭの濃度でそれぞれの各試験ペプチドを含む１００μｌあたり１００ｎｇの抗体を含む２００μｌの混合物を得た。その抗体／ペプチド混合物を、２５０ｒｐｍに設定された回転プラットフォーム上で２５℃において１時間インキュベートした。１００マイクロリットル（１００μｌ）の抗体／ペプチド混合物を、上記ポリプロピレンプレートから、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）でコーティングされ、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０でブロッキングされたＩＷＡＫＩ高結合プレートに移し、２５０ｒｐｍに設定された回転プラットフォーム上で２５℃において１時間インキュベートした。そのプレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０で４回洗浄した。それらのサンプル（プレート中）を、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０において１：４，０００希釈された１００μｌのポリクローナルヤギ抗マウス免疫グロブリン／ＨＲＰ（Ｄａｋｏ，＃Ｐ０４４７）とともに、回転プラットフォーム（２５０ｒｐｍに設定）上で２５℃において１時間インキュベートした。そのプレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎで４回洗浄した。次いで、サンプル／プレートを、１．５μｌ／２ｍｌの３０％H_2O_2（ＳＩＧＭＡ，Ｈ－０９０４）が補充された０．１Ｍ酢酸Ｎａ　ｐＨ６．０（Ｒｏｔｈ，＃６７７９）中の、１００μｌの１．５ｍｇ／２ｍｌ　ｏ－ＰＤＡ溶液（ｏ－フェニレンジアミン，ＳＩＧＭＡ，Ｐ１５２６）とともに２５℃において１０分間、暗所においてインキュベートした。１００μｌの２Ｍ H_2SO_4（Ｍｅｒｃｋ，１．００７３１．１０００）を加えることによって反応を停止した。その反応の程度を、サンプル／プレートの４９０ｎｍにおける吸光度を読むことによって追跡した（例えば、Ｖｉｃｔｏｒ　Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒ（Ｗａｌｌａｃ）を使用して）。

【０３６９】

図８Ｃは、以下の７つのペプチド：ＡＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４４）、ＤＡＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４６）、ＤＮＡＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４９）、ＤＮＩＡＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５１）、ＤＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５９）、ＤＮＩＫＨＡＰＧＧＧＳ（配列番号１６１）およびＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１７１）を用いて行われた競合ＥＬＩＳＡの結果を示している。ヒスチジンをアラニンに変化させる点変異（「エピトープ＃２」内の対応するタウ２９９位におけるもの）は、

ＤＣ８Ｅ８への結合についてのタウΔ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）との競合活性を完全に失わせる（ペプチドＤＮＩＫＡＶＰＧＧＧＳ、配列番号１５９）。アミノ酸Ｄ、Ｎ、Ｉ、ＫおよびＶをアラニンに変化させた変異は、それぞれの変異体ペプチド（ペプチドＡＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４４）、ＤＡＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４６）、ＤＮＡＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１４９）、ＤＮＩＡＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号１５１）、ＤＮＩＫＨＡＰＧＧＧＳ（配列番号１６１）の競合活性を無効にしなかった。これらの結果は、第２のタウリピート内に含まれるＤＣ８Ｅ８の最小エピトープ（エピトープ＃２）が、６－ｍｅｒ配列、すなわちＨＶＰＧＧＧ（配列番号１５４）内に存在し、ＤＣ８Ｅ８が、ＨＸＰＧＧＧ（配列番号１６４）に結合することを示唆している。

【０３７０】

実施例５：ＤＣ８Ｅ８は、表面プラズモン共鳴によって評価されるとき、誤無秩序タウΔ（１－１５０；１５１－３９１）／４Ｒを認識する

表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）は、結合事象をリアルタイムで直接モニタリングすることによって、タンパク質結合を検出するため、およびタンパク質複合体（例えば、抗体抗原複合体）の熱力学的パラメータを測定するために使用され得る。この技術は、診断用抗体と治療用抗体の両方を特徴付けるために日常的に使用されている（例えば、Ｋａｒｌｓｓｏｎ ａｎｄ Ｌａｒｓｓｏｎ，Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ Ｕｓｉｎｇ Ｓｕｒｆａｃｅ Ｐｌａｓｍｏｎ Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ，ｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２４８：Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．Ｂ．Ｋ．Ｃ．Ｌｏ編（著作権）Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ．，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ，（２００８）を参照のこと）。

【０３７１】

ＳＰＲ実験のために、ＤＣ８Ｅ８モノクローナル抗体（ｍＡｂ）を、以下のとおり、プロテインＧアフィニティーカラム上で無血清ハイブリドーマ上清から精製した。ハイブリドーマ上清を、ｐＨ７．５に調整し、その溶液を遠心分離によって予め浄化し、０．４５μｍメンブランフィルターで濾過し、５ｍｌのＰｒｏｔｅｉｎ Ｇ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラムに充填した。ＤＣ８Ｅ８ ｍＡｂを、０．１Ｍグリシン－ＨＣｌ，ｐＨ２．７を用いてそのカラムから溶出した。溶出された画分を、直ちに１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ９．０で中和した。プールされた画分を、ＰＢＳに対して透析し、限外濾過によって濃縮し、－７０℃で保管した。２８０ｎｍにおける吸光度を測定することによって、式ｃ（ｍｇ／ｍｌ）＝A_{280nm}／１．４３を使用して、抗体の濃度を決定した。

【０３７２】

ＣＭ５センサーチップを備えたＢＩＡＣＯＲＥ３０００装置（Ｂｉａｃｏｒｅ ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ）を、ＳＰＲアッセイのために使用した。アミンカップリング試薬（ＥＤＣ、ＮＨＳ、エタノールアミンｐＨ８．５）、Ｐ２０界面活性剤および１０ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ５．０を、Ｂｉａｃｏｒｅ ＡＢから入手した。これらの実験を、ランニング緩衝液として、０．００５％のＰ２０を含むＰＢＳ ｐＨ７．４（ＰＢＳ－Ｐ）中、２５℃において行った。代表的には、５，０００ＲＵ（応答単位）のポリクローナル抗マウス抗体（Ｎｏ．Ｚ０４２０；ＤａｋｏＣｙｔｏｍａｔｉｏｎ，Ｇｌｏｓｔｒｕｐ，Ｄｅｎｍａｒｋ）を、ｐＨ５．０において１級アミンを介して、２つのフローセル（その一方を基準測定として使用した）において同時に結合させた。

【０３７３】

各解析サイクルにおいて、２３０～２５０ＲＵの固定化レベルに達するように、精製されたＤＣ８Ｅ８を分析フローセルに捕捉した。K_A測定のために、ならびに動態速度定数（k_{ON}およびk_{OFF}）の測定のために、タウタンパク質（それに対するＤＣ８Ｅ８親和性が試験された）またはコントロールとしてＰＢＳ－Ｐの２倍段階希釈物を、５０μｌ／分の流速でセンサーチップの上に注入した。動態結合データを、Ｍｙｓｚｋａ，１９９９に従って二重参照（ｄｏｕｂｌｅ ｒｅｆｅｒｅｎｃｅｄ）し、ＢＩＡ評価ソフトウェア４．１（Ｂｉａｃｏｒｅ ＡＢ）によって２相反応モデルに当てはめた。動態速度定数

を全体的に近似させ、最大レスポンスを局所的に当てはめ、バルクレスポンスを０に設定した。

【０３７４】

試験されたタウタンパク質の各々に対してＤＣ８Ｅ８の親和性を定量するために、会合平衡結合定数（K_A）を、４リピートタウタンパク質アイソフォーム２Ｎ４Ｒ、３リピートタウタンパク質アイソフォーム２Ｎ３Ｒならびに誤無秩序タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよび誤無秩序タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒに対するＤＣ８Ｅ８結合について測定した。ＳＰＲのために使用されたすべてのタウタンパク質は、実施例１に従って調製された。ＤＣ８Ｅ８の親和性は、４リピートタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに続いて、完全長４リピートタウアイソフォーム２Ｎ４Ｒ、次いで、３リピートタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒ、そして最後に３リピート完全長タウアイソフォーム２Ｎ３Ｒに対して高かった（図９Ａ、Ｂ）。これらの結果は、（１）誤無秩序形態のタウに対するＤＣ８Ｅ８の特異性、および（２）完全長タウ（すなわち、正常または生理学的タウ）に優先して誤無秩序タウ（すなわち、疾患または病理学的タウ）に対するＤＣ８Ｅ８の選択性を確証させた。

【０３７５】

ＳＰＲを使用した結合事象のリアルタイムモニタリングは、ＤＣ８Ｅ８といくつかのタウタンパク質との間の会合（ｋＯＮ）および解離（ｋＯＦＦ）の動態速度の測定を可能にした。ＤＣ８Ｅ８の結合動態は、生理学的２Ｎ４Ｒタウと比べて、誤無秩序タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４ＲおよびタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒの変更されたコンフォーメーションを明らかにした（これは、誤無秩序（ｍｉｓｄｉｓｏｒｄｅｒｄ）タウタンパク質におけるより容易に到達可能なＤＣ８Ｅ８エピトープによって示唆される）。これは、完全長の対応物と比べて誤無秩序タウタンパク質へのより速い結合およびより高いｋＯＮによって反映される。さらに、４リピートタウタンパク質種上の、ＤＣ８Ｅ８に対する余分な結合部位の存在によって、ＤＣ８Ｅ８との複合体からの４Ｒタウ種の１０倍遅い解離およびそれに対応する１０倍低いｋＯＦＦがもたらされた（図１０Ａ、Ｂ；コンピュータプログラムＢＩＡＥｖａｌｕａｔｉｏｎ　ｖ４．１を使用した動態パラメータ計算によって、測定されたデータから破線が内挿された）。

【０３７６】

実施例６：ＤＣ８Ｅ８は、ヒトアルツハイマー病脳におけるすべての発症段階の神経原線維変性を認識する

ヒト脳組織（パラフィンブロック）を、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ　ｂｒａｉｎ　ｂａｎｋから入手した。そのブロックをミクロトームにおいて切断した。アルツハイマー病脳（ＢｒａａｋステージＶＩ）および非痴呆コントロール（ＢｒａａｋステージＩおよびＩＩＩ）の海馬嗅内皮質のパラフィン切片（８μｍ）を、室温（２５℃）において冷（＋４℃）９９％ギ酸で１分間処理した。その組織切片をブロッキング溶液（５０ｎＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ中の、５％ＢＳＡ、０．３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００）中でインキュベートし、次いで、ブロッキング溶液で１：２，０００希釈された、精製された１次抗体ＤＣ８Ｅ８（７．８ｍｇ／ｍｌ；実施例５に記載されたように調製された）とともに一晩インキュベートした。続いて、それらの切片を、ビオチン化二次抗体（Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ　Ｅｌｉｔｅ　ＡＢＣ　Ｋｉｔ，Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）とともに室温において１時間インキュベートし、次いで、アビジン－ビオチンペルオキシダーゼ複合体と両方とも室温（２５℃）において６０分間反応させた（Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ　Ｅｌｉｔｅ　ＡＢＣ　Ｋｉｔ，Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）。免疫反応を、ペルオキシダーゼ基質キット（Ｖｅｃｔｏｒ　ＶＩＰ，Ｖｅｃｔｏｒ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｃａ，ＵＳＡ）を用いて可視化し、メチルグリーン（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で対比染色した。それらの切片をＯｌｙｍｐｕｓ　ＢＸ７１顕微鏡で検鏡した。

【０３７７】

モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８は、前臨床ＡＤと、臨床的に初発のＡＤと、完全に発症

した最終段階のＡＤとを区別した。免疫組織化学的研究は、ＤＣ８Ｅ８が、ヒト前臨床ＡＤ－Ｂｒａａｋステージ Ｉにおける初期の段階（タウ単量体、二量体）の病理学的タウを検出することを示した（図１１Ａ）。その脳は、限られた数の神経原線維変化（ＮＦＴ）だけを嗅内皮質に含むが、海馬にはＮＦＴを含まない（Ｂｒａａｋステージ Ｉ）。海馬にいくつかのＮＦＴが見られた臨床的に初発のＡＤ脳では（Ｂｒａａｋステージ ＩＩＩ）、ＤＣ８Ｅ８　ｍＡｂは、病理学的タウオリゴマーの段階（矢印）と病理学的タウポリマー（濃縮体）の段階の両方を認識した（図１１Ｂ）。広範な神経原線維変性が存在する完全に発症したアルツハイマー病脳では、ＤＣ８Ｅ８は、主に病理学的タウポリマーを神経原線維変化、老人斑および糸屑状構造物（ｎｅｕｒｏｔｉｃ　ｔｈｒｅａｄｓ）の形態で認識する（図１１Ｃ）。したがって、ｍＡｂ　ＤＣ８Ｅ８は、単量体、二量体、初期オリゴマー段階（図１１Ｄ１）および後期オリゴマープレ濃縮体段階（図１１Ｄ２）、ならびに後期の発症段階の病理学的タウポリマー－細胞内（図１１Ｄ３）および細胞外の神経原線維変化（図１１Ｄ４）を含む、ヒトアルツハイマー病脳組織におけるすべての発症段階の神経原線維病変を認識する。ゆえに、このｍＡｂ　ＤＣ８Ｅ８の反応性は、この抗体の診断用途と治療用途の両方のために有用である。

【０３７８】

実施例７：ＤＣ８Ｅ８は、ヒトアルツハイマー病で見られたように、トランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳におけるすべての発症段階の神経原線維変性を認識する

ＳＨＲ２４トランスジェニックラット系統：この系統は、国際特許出願ＰＣＴ　ＷＯ２００４／００７５４７に記載されているタンパク質であるタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒを発現する。このトランスジェニック系統の作出および特徴付けは、Ｆｉｌｉｐｃｉｋら、２０１０に記載されている。これらのトランスジェニックラットは、皮質脳の領域において進行性の加齢依存的な神経原線維変性を発症する。神経原線維変化（ＮＦＴ）は、ヒトアルツハイマー病における神経原線維変性を識別するために使用されるいくつかの重要な組織学的基準（銀親和性、コンゴーレッド複屈折およびチオフラビンＳ反応性を含む）を満たした。神経原線維変化は、ヒト脳における病理的タウを検出するために使用される抗体（疾患タウコンフォーメーションを認識する（Ｖｅｃｈｔｅｒｏｖａら、２００３；Ｋｏｖａｃｅｃｈら、２０１０）ＤＣ１１を含む）、および過剰リン酸化型のタウタンパク質に特異的な抗体を用いても識別された。さらに、神経原線維変性は、ラット内在性およびトランスジェニック切断型タウ種からなるサルコシル不溶性タウタンパク質複合体の広範な形成によって特徴付けられた（Ｆｉｌｉｐｃｉｋら、２０１０）。これらのトランスジェニックラットの最も顕著な病理組織学的特徴は、皮質における広範な神経原線維病理（神経原線維変化）である。トランスジェニックラットの生存時間の中央値は、２２２．５日（ＳＤ＝４３．５６）であり、最も長い生存期間は、４７５日に達する（Ｆｉｌｉｐｃｉｋら、２０１０）。

【０３７９】

ＳＨＲ７２トランスジェニックラット系統：これらのトランスジェニックラットは、いくつかの脳領域および脊髄において、国際特許出願ＰＣＴ　ＷＯ２００４／００７５４７）に係るヒト切断型タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを発現する。このラット系統の作出は、Ｚｉｌｋａら、２００６に記載され、タウ病理は、Ｋｏｓｏｎら、２００８に記載された。これらのトランスジェニックラットの最も顕著な病理組織学的特徴は、広範な神経原線維病理、例えば、神経原線維変化である。ＮＦＴの外観は、ヒトＡＤにおける神経原線維変性を識別するために使用されるいくつかの組織学的基準（銀親和性、コンゴーレッド複屈折およびチオフラビンＳ反応性を含む）を満たした。ＮＦＴは、異常なタウコンフォーメーションを認識してヒト脳において病理的タウを検出するために使用される抗体（ＤＣ１１を含む）（米国特許第７，４４６，１８０号を参照のこと）および過剰リン酸化型のタウタンパク質に特異的な抗体を用いても識別された。さらに、神経原線維変性は、ラット内在性およびヒト切断型タウ種からなるサルコシル不溶性タウタンパク質複合体の広範な形成によって特徴付けられた。このモデルのヘテロ接合体系統では、最も広範な神経原線維病理が、脳幹および脊髄において観察された（Ｚｉｌｋａら、２０

０６）。導入遺伝子発現のレベル、ＮＦＴの量、およびラットの寿命が、予め測定された。このトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２系統）に対する生存時間の中央値は、２２２．５日だった（ＳＤ＝２４．４８）（Ｋｏｓｏｎら、２００８）。

【０３８０】

トランスジェニックラット系統ＳＨＲ２４（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒを発現する）およびＳＨＲ７２（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを発現する）は、脳および脊髄において広範な神経原線維変性を生じさせた。トランスジェニックラット系統ＳＨＲ２４は、等皮質、脳幹および脊髄において重篤な神経変性を示す一方で、ＳＨＲ７２トランスジェニックラットは、ＮＦＴを主に脳幹および脊髄において生じさせるが皮質では生じさせない。感覚運動および神経の障害の進行は、両方のトランスジェニック系統において似ている；しかしながらＳＨＲ７２トランスジェニックラットは、より短い寿命を示す。

【０３８１】

本願に提示されるトランスジェニックラット研究では、ヘミ接合トランスジェニックラットを使用した（ＳＨＲ２４およびＳＨＲ７２）。すべてのラットを、自由に水および食糧を摂取できる標準的な実験室条件下で収容し、日周期性の照明条件（７：００ａ．ｍ．に明期を開始する１２時間明／暗サイクル）下で維持した。使用されるラットの数を最小限にするように、ならびに不快、疼痛および苦痛を限定するように努力した。

【０３８２】

ＤＣ８Ｅ８を用いたラット脳組織の免疫組織化学的検査：トランスジェニックラット（７ヶ月齢）に、深麻酔下において１分間、ＰＢＳを経心的に灌流した後、１００ｍｌの４％パラホルムアルデヒド（ｐＨ７．４）を灌流した。灌流後、頭部を切断し、すみやかに脳を取り出した。使い捨てメス刃を使用して、脳を矢状方向に２つの同じサイズの半球に切断した。その脳組織を４％パラホルムアルデヒド中で後固定し、パラフィンに包埋し、ミクロトームにおいて切片に切断した。８μｍパラフィン包埋組織切片において免疫組織化学的検査および組織病理学的検査を行った。組織切片を、室温（２５℃）において、抗原アンマスキング溶液（Ｖｅｃｔｏｒ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，ＣＡ，ＵＳＡ）で２０分間前処理し、冷（＋４℃）９０％ギ酸（Ａｐｐｌｉｃｈｅｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ）で１分間前処理した。ブロッキングの後、切片を、ブロッキング溶液（５０ｎＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ中の５％ウシ血清アルブミン、０．３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ１００）で１：２０００希釈された精製されたモノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８（７．８ｍｇ／ｍｌ）とともに一晩インキュベートした。洗浄した後、切片を室温において１時間、ビオチン化二次抗体（Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ　Ｅｌｉｔｅ　ＡＢＣ　Ｋｉｔ，Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）とともにインキュベートし、次いで、室温（２５℃）において、アビジン－ビオチンペルオキシダーゼ－複合体溶液と６０分間反応させた（Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ　Ｅｌｉｔｅ　ＡＢＣ　Ｋｉｔ，Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）。免疫反応を、ペルオキシダーゼ基質キット（Ｖｅｃｔｏｒ　ＶＩＰ，Ｖｅｃｔｏｒ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｃａ，ＵＳＡ）を用いて可視化し、切片をメチルグリーン（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で対比染色した。切片をＯｌｙｍｐｕｓ　ＢＸ７１顕微鏡で検鏡した。

【０３８３】

トランスジェニックラット脳（ＳＨＲ７２）において、ｍＡｂ　ＤＣ８Ｅ８は、疾患段階の病理学的タウオリゴマー（矢印）および疾患段階の病理学的タウポリマー（濃縮体）を認識した（図１２Ａ）。さらに、ＤＣ８Ｅ８は、軸索線維に位置するミスフォールドされたタウと反応した。同齢のコントロールラット脳では、その抗体は、神経細胞体または軸索突起を染色しなかった（図１２Ｂ）。

【０３８４】

ヒトアルツハイマー病脳におけるように（前出を参照のこと）、ｍＡｂ　ＤＣ８Ｅ８は、ＳＨＲ７２トランスジェニックラットの脳において、疾患の単量体、二量体および初期オリゴマー段階（図１２Ｃ）ならびに後期オリゴマーのプレ濃縮体段階のタウ（図１２Ｄ

）、ならびに後期発症段階の病理学的タウポリマー（細胞内（図１２Ｅ）および細胞外の神経原線維変化（図１２Ｆ））を含むすべての発症段階の神経原線維病変を認識した。

【０３８５】

ＤＣ８Ｅ８は、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒ）を発現しているトランスジェニックラットの脳における神経原線維変化も認識した（ＳＨＲ２４、図１３Ａ；ＳＨＲ７２、図１３Ｂ）。

【０３８６】

実施例８：ＤＣ８Ｅ８は、ヒトアルツハイマー病およびタウトランスジェニックラットの脳において、可溶性の誤無秩序タウと不溶性のタウ種の両方を認識する

可溶性タウおよび不溶性タウ複合体を、サルコシル法（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｄａｖｉｅｓ，１９９０）を使用して、ヒトＡＤ脳または疾患タウトランスジェニックラット脳（実施例７に記載されたＳＨＲ２４およびＳＨＲ７２系統）から単離した。タンパク質抽出のために、凍結されたヒトＡＤ脳組織（不等皮質，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ ｂｒａｉｎ ｂａｎｋから入手したＢｒａａｋステージ ＶおよびＶＩのサンプル）ならびにトランスジェニックＳＨＲ２４ラット（等皮質、１０、１２および１４ヶ月齢）およびトランスジェニックＳＨＲ７２ラット（脳幹、７．５ヶ月齢）由来の組織を、１０体積の冷抽出緩衝液（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ７．４、０．８Ｍ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＥＧＴＡおよび１０％スクロース）中でホモジナイズした。そのホモジネートを２０，０００×ｇで２０分間遠心し、５０μｌの上清を可溶性タウの解析のために使用した。

【０３８７】

サルコシル不溶性タウを調製するために、残りの上清に、Ｎ－ラウロイルサルコシン（ＳＩＧＭＡ）を１％の最終濃度になるように補充し、振盪しながら室温において１時間インキュベートした。１時間にわたる１００，０００×ｇでの遠心分離の後、得られた上清を廃棄した（ペレットが、サルコシル不溶性タウ画分を含む）。

【０３８８】

可溶性タウ画分およびサルコシル不溶性タウ画分を、免疫ブロット法によって解析した。可溶性タウ画分を、等体積の２×ＳＤＳ－サンプルローディング緩衝液（β－メルカプトエタノールを含む）（Ｌａｅｍｍｌｉ，１９７０）で希釈し、１レーンあたり１５μｇのタンパク質を充填した。サルコシル不溶性タウ画分に対しては、ペレットを、不溶性タウ画分の調製のために使用された可溶性画分の１／５０体積の１×ＳＤＳ－サンプルローディング緩衝液に溶解した。次いで、等体積の可溶性タウ画分およびサルコシル不溶性タウ画分を免疫ブロット解析のために使用した（それらは、可溶性画分中の１５μｇの総タンパク質に対応した）（Ｆｉｌｉｐｃｉｋら、２０１０を参照のこと）。サンプルを９５℃で５分間加熱し、５～２０％のグラジエントＳＤＳポリアクリルアミドゲルに充填し、Ｔｒｉｓ－グリシン－ＳＤＳ緩衝液系において、２５ｍＡで４０分間、電気泳動した。タンパク質をポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）膜に移動させた（１０ｍＭ ＣＡＰＳ，ｐＨ１２において、１５０ｍＡで１時間）。その移動の後、その膜をリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ；１３６．８９ｍＭ ＮａＣｌ、２．７ｍＭ ＫＣｌ、８．０９ｍＭ Na_2HPO_4、１．４７ｍＭ KH_2PO_4）中の５％脱脂粉乳において室温で１時間ブロッキングし、次いで、ＴＢＳＴ－乳（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０、５％脱脂粉乳）で１：１希釈されたＤＣ８Ｅ８ハイブリドーマ培養上清とともに１時間インキュベートした後、大量のＰＢＳで３回洗浄した。その膜を、二次抗体として、ＰＢＳで１：４，０００希釈されたＨＲＰ結合体化ヤギ抗マウスＩｇ（ＤＡＫＯ，Ｄｅｎｍａｒｋ）とともにインキュベートした（室温において１時間）。このインキュベーションの後、ＰＢＳ中の０．２％Ｉｇｅｐａｌ ＣＡ－６３０（ＳＩＧＭＡ）で洗浄した（３回）。ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｐｉｃｏ Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｕ．Ｓ．Ａ）を用いてそのブロットの像を得て、ＬＡＳ３０００イメージングシステム（ＦＵＪＩ Ｐｈｏｔｏ Ｆｉｌｍ Ｃｏ．，Ｊａｐａｎ）を使用してタンパク質シグナルを検出した。化学発光シグナル強度を、ＡＩＤＡ（Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｉｍａｇｅ Ｄａｔａ Ａｎａｌｙ

ｚｅｒ，Ｒａｙｔｅｓｔ，Ｓｔｒａｕｂｅｎｈａｒｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）ソフトウェアを使用して定量した。

【０３８９】

ＤＣ８Ｅ８は、ＳＨＲ２４トランスジェニックラットにおける可溶性ヒトタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒと生理学的ラットタウアイソフォームの両方を認識した（図１４Ａ）。さらに、ＤＣ８Ｅ８は、ＳＨＲ２４ラット脳由来のサルコシル不溶性タウ画分中のタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／３Ｒおよび病理学的ラットタウタンパク質を認識した（図１４Ｂ）。重要なことには、ＤＣ８Ｅ８は、ヒトＡＤ脳におけるサルコシル不溶性タウ画分中の病理学的ヒトタウタンパク質を強く認識した（Ｂｒａａｋステージ５およびＶＩ、図１４Ｂおよび１４Ｃ）。ＤＣ８Ｅ８は、ＳＨＲ７２トランスジェニックラットにおける可溶性ヒトタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと完全長（生理学的）ラットタウアイソフォームの両方を認識した（図１４Ｄ）。重大なことに、ＤＣ８Ｅ８は、ＳＨＲ７２ラット脳由来のサルコシル不溶性タウ画分中の病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよび病理学的形態のラットタウを特異的に認識した（図１４Ｄ）。

【０３９０】

実施例９：ＤＣ８Ｅ８は、病理学的タウ－タウ相互作用を阻害する

タウ線維化アッセイ。ＤＣ８Ｅ８が病理学的タウ－タウ相互作用に対して阻害効果を有するか否かを判定するために、インビトロタウ線維化アッセイを使用した。このアッセイは、タウタンパク質の固有の特性、すなわち、硫酸グリコサミノグリカンヘパリンなどのポリアニオンとの相互作用においてコンフォーメーション変化を起こす能力に基づく。１つのタウ分子におけるこの変化したコンフォーメーションは、別のタウ分子とそれとの病理学的な相互作用をさらにもたらし、その相互作用しているタウ分子の微小管結合領域におけるクロスβシート構造の形成を介したタウ－タウ複合体の安定化をもたらし、そして最後に、アルツハイマー病様対らせん状細線維（ＰＨＦ）の形成をもたらす（Ｓｋｒａｂａｎａら、２００６）。ベータシートリッチ構造の形成は、チオフラビンＴなどの蛍光色素によって検出され得る。

【０３９１】

病理学的タウ－タウ相互作用に対するＤＣ８Ｅ８の効果を測定するアッセイを、２０μＭ（最終濃度）の、実施例１に記載されたように精製された、試験される組換えタウタンパク質（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４ＲまたはタウΔ（１－２９６；３９２－４４１）／４Ｒ）のうちのいずれか１つ；５μＭヘパリン（ブタ腸管粘膜由来のヘパリンナトリウム塩，≧１５０ＩＵ／ｍｇ，乾燥量基準，ＳＩＧＭＡ製）；および１２．５μＭ（最終濃度）チオフラビンＴを含むＰＢＳ（０．２μｍフィルターで濾過されたもの）において設定した。各反応物（８０μｌの最終体積）を、密閉された黒色固体ポリスチレンプレート（３８４ウェル，Ｇｒｅｉｎｅｒ　ＢｉｏＯｎｅ）において、３７℃で２０時間インキュベートした。４５０ｎｍの励起波長、５１０ｎｍの発光および２００ｍｓの測定時間とともに、蛍光リーダー（Ｆｌｕｏｒｏｓｋａｎ　Ａｓｃｅｎｔ　ＦＬ（Ｌａｂｓｙｓｔｅｍｓ））を使用して、チオフラビンＴの蛍光を測定した。病理学的タウ－タウ相互作用に対するｍＡｂ　ＤＣ８Ｅ８の阻害活性を測定するために、精製されたＤＣ８Ｅ８（実施例５）を、上記反応混合物に２０μＭの最終濃度で加えた後、３７℃でインキュベーションした。２つの抗体をコントロールとして使用した：ＤＣ５１（狂犬病ウイルスのエンベロープタンパク質を認識する；Ｍａｃｉｋｏｖａら、１９９２）およびＤＣ１１（ある特定の切断型のコンフォーメーションに変化した形態のタウを認識する、米国特許第７，４４６，１８０号）。

【０３９２】

コンフォーメーションに変化し、原線維化した（ｆｉｂｒｉｌｉｚｅｄ）タウの量を、ＤＣ８Ｅ８の非存在下（「Ｃｔｒｌ」）および存在下（「ＤＣ８Ｅ８」）におけるチオフラビンＴの蛍光によって測定した（図１５Ａおよび１５Ｂ）。２０μＭの最終濃度で加えられたｍＡｂ　ＤＣ８Ｅ８は、両方の誤無秩序タウタンパク質の病理学的なコンフォーメ

ーション変化および線維化を妨げ、線維化した病理学的タウの形態の量を、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４ＲおよびタウΔ（１－２９６；３９２－４４１）／４Ｒについてそれぞれ５％未満および１６％未満に減少させた。このＤＣ８Ｅ８の阻害活性は、ノンパラメトリックｔ検定によって解析されたとき、統計学的に有意だった（「ＤＣ８Ｅ８」、それぞれ図１５Ａおよび１５Ｂにおいてｐ＜０．００１およびｐｐ＜０．０１）。タウに結合しない無関係な抗体であるＲａｂ５０（Ｍａｃｉｋｏｖａら、１９９２）は、タウのコンフォーメーション変化を妨げず、チオフラビンＴの蛍光を変化させなかった（「Ｒａｂ５０」）。ある特定の病理学的に変化したコンフォーメーションのタウを認識する抗体ＤＣ１１（Ｖｅｃｈｔｅｒｏｖａら、２００３および米国特許第７，４４６，１８０号）は、原線維化したタウの形成をさらに促進した；この効果は、ＤＣ１１による異常なタウ－タウ相互作用および原線維形成に必要とされる病理学的なコンフォーメーションのタウの安定化を反映し得る。

【０３９３】

ＤＣ８Ｅ８は、誤無秩序タウΔ（１－２９６；３９２－４４１／４Ｒ）によるタウ二量体、三量体およびオリゴマーの形成も阻害した（図１６）。組換えタウΔ（１－２９６；３９２－４４１）／４Ｒを、線維化アッセイについて上に記載されたようにＤＣ８Ｅ８の存在下または非存在下において１、４および２０時間インキュベートした。記載の時点において、ＳＤＳ－サンプルローディング緩衝液を加えることによって、反応を停止させた。タンパク質の解析のために、１０μｌの各線維化反応物を５～２０％グラジエントＳＤＳポリアクリルアミドゲルに充填し、Ｔｒｉｓ－グリシン－ＳＤＳ緩衝液系において、２５ｍＡで４０分間、電気泳動した。タンパク質をＰＶＤＦ膜に移動させた後（１０ｍＭ ＣＡＰＳ，ｐＨ１２において１５０ｍＡで１時間）、その膜を、ＰＢＳ中の５％脱脂粉乳において室温で１時間ブロッキングし、次いで、ＰＢＳで１：１，０００希釈されたＨＲＰ結合体化ＤＣ２５（Ｓｋｒａｂａｎａら（２００６）とともに１時間インキュベートした後、大量のＰＢＳで３回洗浄した。ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｐｉｃｏ Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｕ．Ｓ．Ａ）を用いてそのブロットの像を得て、ＬＡＳ３０００イメージングシステム（ＦＵＪＩ Ｐｈｏｔｏ Ｆｉｌｍ Ｃｏ．，Ｊａｐａｎ）を使用して化学発光シグナルを検出した。化学発光シグナル強度を、ＡＩＤＡ（Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｉｍａｇｅ Ｄａｔａ Ａｎａｌｙｚｅｒ，Ｒａｙｔｅｓｔ，Ｓｔｒａｕｂｅｎｈａｒｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）ソフトウェアを使用して定量した。

【０３９４】

これらの結果は、ＤＣ８Ｅ８がヒトタウにおいて認識する／結合する４つの結合部位の１つもしくは複数が、単量体タウのコンフォーメーション変化、タウの線維化およびタウ凝集体（二量体、三量体および他のオリゴマー）の形成に関わることを明らかにしている。換言すれば、残基２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３（配列番号９８）（タウタンパク質の第１リピートドメイン）、２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号９９）（タウタンパク質の第２リピートドメイン）、３２９－ＨＨＫＰＧＧＧ－３３５（配列番号１００）（タウタンパク質の第３リピートドメイン）および３６１－ＴＨＶＰＧＧＧ－３６７（配列番号１０１）（タウタンパク質の第４リピートドメイン）によって包含されるタウの４つの領域の１つもしくは複数が、タウの線維化およびタウ凝集体（二量体、三量体および他のオリゴマー）の形成を促進するおよび／またはそれに関わる。

【０３９５】

実施例１０：ＤＣ８Ｅ８は、誤無秩序タウの取り込みおよび分解を媒介する

マウスＢＶ２ミクログリア細胞を、１μＭ組換えタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ単独またはタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４ＲとＤＣ８Ｅ８との混合物／複合体とともに、種々の時間にわたって６ウェルプレートにおいて処理した。培地を回収し、細胞を最初にＰＢＳで洗浄し、次いで、弱酸洗浄液（０．５Ｍ ＮａＣｌ、０．２Ｍ酢酸，ｐＨ３）で１分間洗浄した。次いで、洗浄された細胞をＴＴＬ緩衝液（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ７．４、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、１ｍＭ ＤＴＴ

、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、５０ｍＭ ＮａＦ、１ｍＭ Na_3VO_4，Ｒｏｃｈｅ－完全プロテアーゼ阻害剤）中で溶解し、すみやかに液体窒素中で凍結した。得られた細胞抽出物を、先に記載されているように（Ｋｏｓｏｎら、２００８）１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルおよびウエスタンブロットにおいて解析した。簡潔には、タンパク質をニトロセルロース膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ，ＵＳＡ）上に移動させ、ポンソーＳで染色することにより、均一なタンパク質の移動を確かめ、次いで、その膜を、タウ残基３４７～３５３を認識する、ｐａｎ－タウ抗体と称される（Ａｘｏｎ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｖｉｅｎｎａ，Ａｕｓｔｒｉａ）ＤＣ２５ハイブリドーマ培養上清でプロービングした。抗ＧＡＤＰＨ抗体（１：１，０００，Ａｂｃａｍ）を用いたウエスタンブロッティングをタンパク質充填コントロールとして使用した。ＤＣ２５ １次抗体とのインキュベーションに続いて、洗浄、およびＨＲＰに結合体化されたポリクローナルヤギ抗マウスＩｇＧ二次抗体（１：３，０００；Ｄａｋｏ，Ｇｌｏｓｔｒｕｐ，Ｄｅｎｍａｒｋ）とのインキュベーションを行った。ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｐｉｃｏ Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｕ．Ｓ．Ａ）を用いてそのブロットの像を得て、ＬＡＳ３０００イメージングシステム（ＦＵＪＩ Ｐｈｏｔｏ Ｆｉｌｍ Ｃｏ．，Ｊａｐａｎ）を使用して化学発光シグナルを検出した。

【０３９６】

タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを、先のパラグラフに記載されたように単独でまたは１μＭ ｍＡｂ ＤＣ８Ｅ８とともにマウスＢＶ２細胞の培養物に１μＭの濃度で加えた。２、４、６および１２時間にわたるインキュベーションの後、細胞タンパク質を抽出し、内部移行したタウのレベルをウエスタンブロッティングによって解析した。Ｐａｎ－タウ抗体ＤＣ２５は、ミクログリア細胞内の誤無秩序タウの存在を示した。ウエスタンブロットプロファイルは、誤無秩序タウの分解がＤＣ８Ｅ８の存在下においてより速いことを明らかにした（図１７Ａ）。

【０３９７】

ＤＣ８Ｅ８抗体自体もまた、ＢＶ２細胞内に存在することが見出された。図１７Ａ。さらに、ＤＣ８Ｅ８は、細胞培地中の可溶性の誤無秩序タウの量を減少させた（これは、細胞外のタンパク分解の機構の活性化を反映し得る）（図１７Ｂ）。

【０３９８】

実施例１１：ＤＣ８Ｅ８は、３７℃において安定である

ＤＣ８Ｅ８（実施例５に記載されたように精製された）をＰＢＳで２ｍｇ／ｍｌの濃度に希釈し、アリコート（１００μｌ）を３７℃においてインキュベートした。様々な１ヶ月間隔で、アリコートを－２０℃において凍結した。実験の期間全体にわたって－２０℃で維持して保管されたＤＣ８Ｅ８のアリコート（２ｍｇ／ｍｌ）を「コントロール」として使用した。４ヶ月後（すべてのサンプルが回収されたとき）、ＤＣ８Ｅ８活性（固相としての組換えタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対する結合）、ゆえに３７℃での保管寿命の安定性の解析を、実施例２に記載されたようにＥＬＩＳＡによって行った。各ＤＣ８Ｅ８アリコートを、２，０００倍（すなわち、２，０００×または１：２，０００）、４，０００×、８，０００×，１６，０００×、３２，０００×、６４，０００×，１２８，０００×、２５６，０００×および５１２，０００×希釈した。ＤＣ８Ｅ８は、活性であり（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに結合する能力によって測定されたとき）、ゆえに、「コントロール」と比べて、３７℃での４ヶ月間のインキュベーションの後でさえ安定だった（図１８）。

【０３９９】

実施例１２：ＤＣ８Ｅ８は、天然のエキソビボ様の条件下において、ヒトＡＤ脳由来およびＳＨＲ７２ラットの脳由来の可溶性タウと不溶性タウの両方に結合することおよびそれらを免疫沈降させることができる

サルコシル不溶性のミスフォールドされたタウタンパク質を、サルコシル法（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｄａｖｉｅｓ，１９９０）を用いて、ヒトＡＤ脳またはタウトラン

スジェニックラット脳（実施例７に記載された系統ＳＨＲ７２）から生化学的に単離した。タンパク質抽出のために、未固定の凍結ヒトＡＤ脳（移行嗅内皮質（ｔｒａｎｓｅｎｔｏｒｈｉｎａｌ　ｃｏｒｔｅｘ），ＢｒａａｋステージＶ，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ　Ｂｒａｉｎ　Ｂａｎｋ，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓから入手したもの）およびＳＨＲ７２トランスジェニックラット（等皮質，７．５ヶ月齢動物）組織を、１０体積の氷冷抽出緩衝液［１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．４、０．８Ｍ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＧＴＡおよび１０％スクロース（５０ｍＭ　ＮａＦ、１ｍＭ　Na_3VO_4、およびＥＤＴＡを含まないプロテアーゼ阻害剤のカクテルＣｏｍｐｌｅｔｅ（登録商標）（Ｒｏｃｈｅ製）が補充されたもの］中でホモジナイズした。そのホモジネートを２０，０００×ｇで２０分間遠心することにより、膜材料を除去した。サルコシル不溶性タウ画分を調製するために、上清にＮ－ラウロイルサルコシン（ＳＩＧＭＡ）を１％の最終濃度になるように補充し、振盪しながら室温において１時間インキュベートした。１時間にわたる１００，０００×ｇでの遠心分離の後、得られた上清を廃棄し、ペレットを、３ｍｌのリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ、８．０９ｍＭ　Na_2HPO_4、１．４７ｍＭ　KH_2PO_4、１３６．８９ｍＭ　ＮａＣｌ、２．７ｍＭ（ＫＣｌ））中で１回洗浄した。次いで、オリゴマーおよびポリマーのミスフォールドされたタウ種（すなわち、疾患タウタンパク質）に濃縮された脳タンパク質画分に相当するそのペレットを、２０％に設定された出力での２０％デューティサイクルにおける、ＭＳ７２プローブを備えたＢａｎｄｅｌｉｎ　Ｓｏｎｏｐｕｌｓ　ＨＤ２２００／ＵＷ２２００（Ｂａｎｄｅｌｉｎ　Ｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用した、氷上での２分間の超音波処理によって、１ｍｌのＰＢＳ（５０ｍＭ　ＮａＦ、１ｍＭ　Na_3VO_4、およびＥＤＴＡを含まないプロテアーゼ阻害剤のカクテルＣｏｍｐｌｅｔｅ（登録商標）（Ｒｏｃｈｅ）が補充されたもの）に再懸濁した。

【０４００】

疾患タウタンパク質が濃縮された得られた懸濁液（ヒトＡＤ脳とラットＡＤモデルの脳の両方に由来）を２つの５００μｌの部分に分割し、各部分に、２５μｇの２つの精製された抗体：ＤＣ８Ｅ８またはコントロール抗体Ｒａｂ５０（狂犬病ウイルスのエンベロープタンパク質を認識する；Ｍａｃｉｋｏｖａら、１９９２）のうちの一方を加えた。その懸濁液を、３６０度回転させながら（ｗｉｔｈ　ｈｅａｄ－ｏｖｅｒ－ｔａｉｌ　ｒｏｔａｔｉｏｎ）６℃において２時間、その抗体とともにインキュベートした。形成された抗体－疾患タウ複合体を単離するために、ＰＢＳ中で平衡化された５０μｌのＰｒｏｔｅｉｎ　Ｇ　Ｍａｇ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅビーズ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）の５０％懸濁液を、各懸濁反応物に加え、それをさらに６℃において１時間インキュベートした。結合した抗体－タウ複合体を有するビーズを回収し、ＰＢＳ（５０ｍＭ　ＮａＦ、１ｍＭ　Na_3VO_4、０．０２％ＩＧＥＰＡＬ　ＣＡ－６３０（ＳＩＧＭＡ）、およびＥＤＴＡを含まないプロテアーゼ阻害剤のカクテルＣｏｍｐｌｅｔｅ（登録商標）（Ｒｏｃｈｅ）が補充されたもの）で３回洗浄した。結合した抗体複合体を、１００μｌの２００ｍＭギ酸ｐＨ２．７中での３回の別個の５分間のインキュベーションによってビーズから溶出した。１００μｌの溶出液をプールし、凍結乾燥し、タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥサンプルローディング緩衝液（Ｌａｅｍｍｌｉ，１９７０）に溶解し、１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルにおいて分離し、ニトロセルロース膜上に移動させ、上記のようにＨＲＰ結合体化された（Ｋｅｍｅｎｔｅｃ，Ｄｅｎｍａｒｋ）ｐａｎ－タウ抗体ＤＣ２５（２Ｎ４Ｒタウのエピトープ３４７－３５３，Ａｘｏｎ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｖｉｅｎｎａ，Ａｕｓｔｒｉａ）とのインキュベーションによってタウタンパク質を検出した。インキュベーション（室温での１時間）の後、ＰＢＳ中の０．２％Ｉｇｅｐａｌ　ＣＡ－６３０（ＳＩＧＭＡ）で洗浄した（３回）。ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｗｅｓｔ　Ｐｉｃｏ　Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅシステム（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｕ．Ｓ．Ａ）を用いてそのブロットの像を得て、ＬＡＳ３０００イメージングシステム（ＦＵＪＩ　Ｐｈｏｔｏ　Ｆｉｌｍ　Ｃｏ．，Ｊａｐａｎ）を使用してシグナルを検出した。

【０４０１】

ＤＣ８Ｅ８は、すべての形態の疾患タウタンパク質：アルツハイマー病を有する患者の

脳に存在するオリゴマーおよびポリマーのミスフォールドされたタウ種を認識し、標的化し、それに結合する（図１９Ａ）。図１９Ａにおけるレーン１は、ヒトＡＤ脳から生化学的に抽出された病理学的タウ種を示している。レーン３は、ＤＣ８Ｅ８との免疫沈降によって認識され、結合され、単離されたタウ種を示している。ＤＣ８Ｅ８に結合された／免疫沈降された疾患タウ種のパターンは、生化学的に抽出されたタウタンパク質のパターンだった。これらの結果は、ヒト脳における、ＤＣ８Ｅ８による病理学的タウ種の効率的なエキソビボ認識を示しており、すなわち、それらのタンパク質がインビボ様の未改変の形態である抽出物において、ＤＣ８Ｅ８がインビボにおいて疾患タウ種を標的化することができるという有用な治療特性を有することを示している。コントロール抗体Ｒａｂ５０（「Ｍｏｃｋ抗体」、レーン２）は、脳抽出物中に存在するいずれのタウタンパク質も認識しないことから、タウタンパク質へのＤＣ８Ｅ８の結合が特異的であることが確かめられる。

【０４０２】

図１９Ｂは、タウタンパク質の免疫精製のために使用されたｍｏｃｋ抗体（Ｒａｂ５０）およびＤＣ８Ｅ８（それぞれレーン２および３）の量を示している。ＤＣ８Ｅ８の重鎖および軽鎖の位置もまた、図１９Ａのレーン３に表示されている。より多い量の抗体鎖の存在は、疾患タウのパターンを歪める。

【０４０３】

ＤＣ８Ｅ８は、アルツハイマー病のＳＨＲ７２ラットモデルの脳において、すべての形態のミスフォールドされた（疾患の）タウも認識し、標的化する。図２０Ａのレーン１は、トランスジェニックラットの脳から生化学的に抽出された疾患タウ種を示している。トランスジェニックラット脳抽出物とのＤＣ８Ｅ８抗体のインキュベーションによって、その脳に存在する疾患タウ種の免疫精製が可能になった（図２０Ａ、レーン３）。ＤＣ８Ｅ８によって精製されたタウ種は、生化学的に単離されたタウタンパク質（図２０Ａ、レーン１）のパターンと同一のパターンを示し、それは、ＤＣ８Ｅ８が、そのトランスジェニックラット脳に存在するすべての病理学的タウ種を認識し、それに結合することを確証させる。タウタンパク質のバンドパターンのわずかな歪みは、ＤＣ８Ｅ８抗体の重鎖および軽鎖の存在によって引き起こされる（図２０Ａ、レーン３に表示されている）。Ｍｏｃｋ抗体Ｒａｂ５０（図２０Ａ、レーン２）は、いずれのタウタンパク質にも結合しなかった。

【０４０４】

図２０Ｂは、ｍｏｃｋ抗体（Ｒａｂ５０）、およびアルツハイマー病のトランスジェニックモデルのラットの脳抽出物からのタウタンパク質の免疫精製のために使用されたＤＣ８Ｅ８（それぞれレーン２および３）の量を示している。ＤＣ８Ｅ８の重鎖および軽鎖の位置は、図２０Ａのレーン３にも表示されている。より多い量の抗体鎖の存在は、疾患タウのパターンをわずかに歪めた。

【０４０５】

実施例１３：ＤＣ８Ｅ８モノクローナル抗体は、トランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳から病理学的タウを除去する

ＤＣ８Ｅ８またはＲａｂ５０（狂犬病ウイルス（ｖｉｒｕｓ　ｒａｂｂｉｅｓ）を認識するネガティブコントロール抗体）を産生するハイブリドーマ細胞を、１０％ＮＨＳおよび１％グルタミンを含むＤＭＥＭ中で培養した。それらの細胞をＢｕｅｒｋｅｒカウントチャンバーにおいて計数した。１ミリリットルあたり５００，０００個の細胞を含む細胞懸濁液を１００×ｇで５分間遠沈し、ペレットを１ｍｌのＰＢＳに再懸濁した。その細胞懸濁液を再度、１００×ｇで５分間遠沈し、ペレットを５μｌのＰＢＳに再懸濁した。

【０４０６】

トランスジェニックラットＳＨＲ７２（６ヶ月齢）をこれらの実験のために使用した（１群あたり３匹のラット）。手術の少なくとも１時間前に、免疫抑制薬Ｓａｎｄｉｍｍｕｎ（１５ｍｇ／ｋｇ）をラットの皮下に適用した。トランスジェニックラットを、Ｔｉｌｅｔａｍｉｎｅ－Ｚｏｌａｚｅｐａｍ（１００ｍｇ／ｍｌ）／Ｘｙｌａｚｉｎｅ（２０ｍ

ｇ／ｍｌ）の３：５比での混合物の腹腔内注射によって麻酔した。麻酔薬の投与は、以下のとおりだった：Ｚｏｌｅｔｉｌ（３０ｍｇ／ｋｇ）およびＸｙｌａｒｉｅｍ（１０ｍｇ／ｋｇ）。麻酔されたラットの頭部を、各動物の外耳道に固定アームを留置することによって定位装置（Ｄａｖｉｄ Ｋｏｐｆ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｔｕｊｕｎｇａ，ＣＡ，ＵＳＡ）に固定した。選択された定位座標（ブレグマに対して、外側５ｍｍ；前後４ｍｍ；背腹側－５ｍｍ）に従って、手術用ドリルを使用して各動物の頭に穴を開けた。ＤＣ８Ｅ８（10^5細胞）またはＲａｂ５０（10^5細胞）を産生するハイブリドーマ細胞懸濁液を、ラットの脳の海馬の海馬采に両側注射した。手術の直後に、Ｋｅｔｏｎａｌ（５ｍｇ／ｋｇ）を筋肉内投与した。Ｓａｎｄｉｍｍｕｎ（１５ｍｇ／ｋｇ）を、適用後８日間、皮下に適用した。Ｅｎｒｏｘｉｌ（２０ｍｇ／ｋｇ／２４時間）を１０日間にわたって飲料水において投与した。

【０４０７】

外科手技の２週間後、ラットをＺｏｌｅｔｉｌ（３０ｍｇ／ｋｇ）およびＸｙｌａｒｉｅｍ（１０ｍｇ／ｋｇ）との混合物によって麻酔した。２～５分後、ラットを解剖用ステージに載せ、開腹した。灌流の前に、血液血清中のタウおよび抗体のレベルの解析のために血液を回収した。灌流針を左心室に留置し、蠕動ポンプ（Ｔｙｐｅ ｐｐ１－０５、Ｚａｌｉｍｐ、速度－１０×、程度７－２２ｍｌ／１分という灌流液体）を使用してＰＢＳをラットに２分間灌流した。各ラットを断頭し、その頭蓋をピーアンによって（ｂｙ ｐａｅａｎ）開け、脳（脊髄の一部とともに）を慎重に取り出した。脳を矢状方向に（ｓａｇｉｔａｌｌｙ）２つの部分に切断した；右側を４％ＰＦＡ（４℃）で一晩固定した。左側を切断し、脳幹および２つの皮質領をすみやかに液体窒素中で凍結した。

【０４０８】

処置された動物の血清中のＤＣ８Ｅ８抗体の量を、固相としてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４Ｒを使用する、下記の実施例１９に記載されるようなＥＬＩＳＡによって測定した。各動物の血清（Ａ、Ｂ、Ｃ）を、１００×から１２，８００×まで段階希釈した（図２１Ａ）。ＤＣ８Ｅ８抗体の血清濃度を、標準物質として、精製されたＤＣ８Ｅ８を使用して測定した。ＤＣ８Ｅ８は、処置動物において４６６、２００および２７３ｎｇ／ｍｌの濃度に達した（それぞれＤＣ８Ｅ８処置群のＡ、Ｂ、Ｃ）。

【０４０９】

各処置動物の血清中のタウの濃度も測定した。これは、Ｉｎｎｏｔｅｓｔ ｈＴＡＵ ＥＬＩＳＡキット（Ｉｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）を製造者のプロトコルに従って使用して行った。ＤＣ８Ｅ８による処置は、血液中への抗体－タウ複合体の運搬を引き起こし、タウは、３５０ｐｇ／ｍｌの平均濃度に達した。このＤＣ８Ｅ８の効果は、脳から病理学的タウタンパク質を排除するのを助ける。他方で、狂犬病ウイルスのエンベロープタンパク質を認識する（Ｍａｃｉｋｏｖａら、１９９２）ｍｏｃｋ抗体（Ｒａｂ５０）で処置された動物の血清中においてタウタンパク質は検出されなかった。グラフは、平均値の標準誤差（ＳＥＭ）とともに平均値を示している（図２１Ｂ）。

【０４１０】

固定した脳組織をパラフィンに包埋し、ミクロトームにおいて切断した。８μｍパラフィン包埋切片において免疫組織化学検査を行った。組織切片を、沸騰している抗原アンマスキング溶液（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ，ＵＳＡ）で２０分間前処理し、８５％ギ酸（Ａｐｐｌｉｃｈｅｍ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）で１分間処理した。ブロッキングした後、組織切片をｍＡｂ ＤＣ８Ｅ８とともに一晩インキュベートした後、洗浄し、ビオチン化二次抗体（Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ Ｅｌｉｔｅ ＡＢＣ Ｋｉｔ，Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）とともにインキュベーションした（１時間、室温）。洗浄した後、切片を室温において６０分間、アビジン－ビオチンペルオキシダーゼ複合体（Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ Ｅｌｉｔｅ ＡＢＣ Ｋｉｔ，Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）と反応させた。免疫反応を、ペルオキシダーゼ基質キットＶＩＰ（Ｖｅｃｔｏｒ ＶＩＰ，Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ，ＵＳＡ）を用いて可視化した。上オリ

ーブ複合体を、ＤＣ８Ｅ８神経細胞内シグナルの定量のために使用した。総シグナルを個々の運動ニューロン（１切片あたり少なくとも１５個のニューロン）において定量した。ＡＩＤＡ（Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｉｍａｇｅ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｚｅｒ，Ｒａｙｔｅｓｔ，Ｓｔｒａｕｂｅｎｈａｒｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）ソフトウェアを使用して画像解析を行った。すべての処置動物の切片においてカウントを行い、次いで、ノンパラメトリックなマン・ホイットニー検定を用いて統計学的に評価した。

【０４１１】

ｍｏｃｋで処置された（図２２Ａ，右パネル）およびＤＣ８Ｅ８で処置された（図２２Ａ，左パネル）動物由来の切片の上オリーブ複合体における病理学的タウの量の定量（図２２Ｂ）は、ｍｏｃｋで処置された動物と比べて、ＤＣ８Ｅ８で処置された３匹すべての動物において、試験された脳領域における病理学的タウの量の減少を示した（ｐ＜０．０００１）（図２２Ａおよび２２Ｂ）。

【０４１２】

実施例１４：タウの治療用エピトープのＤＣ８Ｅ８の認識に影響するＤＣ８Ｅ８結合部位内の残基のマッピング

ａ）一本鎖ＤＣ８Ｅ８抗体のクローニングおよび抗体結合部位の突然変異誘発。タウタンパク質の認識に必須のｍＡｂ　ＤＣ８Ｅ８のアミノ酸残基のマッピングを助けるために、完全長ＤＣ８Ｅ８　ｍＡｂの機能的な一本鎖バージョン（ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ）を調製した。これは、実施例３に記載されたように調製されたＤＣ８Ｅ８の軽鎖および重鎖のｃＤＮＡを用いて行われた。

【０４１３】

ＤＣ８Ｅ８の可変領域を、ＮｃｏＩ（順方向プライマー：５’－ＡＴＡＴＴＡＣＣＡＴＧＧＡＣＡＴＴＧＴＧＡＴＧＴＣＡＣＡＧ－３’（配列番号１５５））およびＸｈｏＩ（逆方向プライマー：５’－ＡＴＡＴＴＡＴＴＣＴＣＧＡＧＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＴＧＡＧＧＴ－３’（配列番号１５６））制限酵素に対する制限酵素認識部位を有するクローニングプライマー、ならびに重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを連結するために使用されたオリゴヌクレオチドリンカー配列（ＶＨ－ＬＩＮＫ－Ｆ：５’－ＧＧＣＧＧＣＧＧＧＣＧＧＣＴＣＣＧＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＴＴＣＣＡＴＧＣＡＧＧＴＣＣＡＡＴＴＧＣＡＧＣＡＧ－３’（配列番号１５７）；ＶＬ－ＬＩＮＫ－Ｒ：５’－ＧＧＡＧＣＣＧＣＣＧＣＣＧＣＣＡＧＡＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＧＡＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＣＣＧＴＴＴＧＡＴＧＴＣＣＡＧＣＴＴＧＧＴＧＣＣ－３’（配列番号１５８））を使用するＰＣＲによってさらに増幅した（このリンカー配列は、Ｋｒｅｂｂｅｒら、１９９７に従ってデザインされた）。単離されたＰＣＲ産物の消化（ＮｃｏＩおよびＸｈｏＩ酵素を使用する）およびアガロースゲル電気泳動を介した精製の後、フラグメントを、Ｔ４－ＤＮＡ－リガーゼ（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、ＮｃｏＩおよびＸｈｏＩで消化したｐＥＴ２２ｂプラスミドにクローニングした。細菌株ＤＨ５αを、得られたプラスミドの増幅のために使用し、選択されたクローンにおける正確な挿入位置を制限酵素解析によって確かめた。得られた一本鎖ＤＣ８Ｅ８コンストラクト（ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ）の配列の正確さを、３１３０Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，ＵＳＡ）を使用するＤＮＡ配列決定によって確かめた。

【０４１４】

ｂ）アラニンスキャニング突然変異誘発による、病理学的タウのＤＣ８Ｅ８の認識に影響するＤＣ８Ｅ８結合部位における残基の同定。タウへのＤＣ８Ｅ８の結合に影響する残基を同定するために、ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの選択された部位（太字かつ下線、下記を参照のこと）においてＡｌａスキャニング突然変異誘発を行った。Ａｌａ置換のために選択されたアミノ酸は、ＭａｃＣａｌｌｕｍら（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６）の成果に基づいて特定された。ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの突然変異誘発を、ＳａｍｂｒｏｏｋおよびＲｕｓｓｅｌｌによる“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　ｍａｎｕａｌ”（２００１）に記載されている標準的な手順によるＰＣＲにおいて変異体オリゴヌクレオチドを使用するオーバーラップ伸長法によって行った。

【０４１５】
変異体一本鎖を、元の各ＤＣ８Ｅ８配列に対して下記に列挙する。変異された残基は、太字かつ下線が引かれている。変異体一本鎖の名称は、コンストラクトの番号、可変重鎖または軽鎖の頭字語（ＶＨまたはＶＬ）、ＤＣ８Ｅ８における元のアミノ酸の一文字コードに続いて、軽鎖および重鎖配列のそれぞれ配列番号１４１および配列番号１３８におけるその位置、次いで、置換アラニンに対するＡからなる。例えば、変異体１－ＶＬ－Ｎ３１Ａは、一本鎖変異体番号１に対応し、ここで、その可変軽鎖は、アスパラギン３１（Ｎ３１）をアラニン（Ａ））で置き換えることによって、３１位（ＤＣ８Ｅ８に対して）において変異された：

【０４１６】
ＤＣ８Ｅ８軽鎖可変領域（ＣＤＲに下線が引かれている）：
［配列番号１４１］：
【化５】

1 10 20 30 40 50
DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLL

60 70 80 90 100
IYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSFYLRTFGGG

110
TKLDIK

ＣＤＲ１［配列番号１１７］（変異された残基は太字かつ下線が引かれている）：
【化６】

QSLLNSRTRKNY (配列番号 117)

（ＣＤＲ１の元のＤＣ８Ｅ８配列）における変異
１－ＶＬ－Ｎ３１Ａ［配列番号２４７］
２－ＶＬ－Ｒ３３Ａ［配列番号２４８］
３－ＶＬ－Ｙ３８Ａ［配列番号２４９］
ＣＤＲ２の前にあるフレームワーク領域ＦＲ２：
【化７】

LAWYQQKPGQSPKLLIY

(配列番号 160)

（フレームワーク領域ＦＲ２の元のＤＣ８Ｅ８配列）における変異。
４－ＶＬ－Ｙ５５Ａ［配列番号２５２］
ＣＤＲ２［配列番号１１８］：
【化８】

WAS

（配列番号１１８）（ＣＤＲ２の元のＤＣ８Ｅ８配列）における変異
５－ＶＬ－Ｗ５６Ａ［配列番号２５３］
ＣＤＲ３［配列番号１１９］：
【化９】

KQSFYLRT

（配列番号１１９）（ＣＤＲ３の元のＤＣ８Ｅ８配列）における変異
６－ＶＬ－Ｋ９５Ａ［配列番号２５４］
７－ＶＬ－Ｑ９６Ａ［配列番号２５５］
８－ＶＬ－Ｓ９７Ａ［配列番号２５６］
９－ＶＬ－Ｆ９８Ａ［配列番号２５７］
１０－ＶＬ－Ｙ９９Ａ［配列番号２５８］
１１－ＶＬ－Ｌ１００Ａ［配列番号２５９］
１２－ＶＬ－Ｒ１０１Ａ［配列番号２６０］
【０４１７】
ＤＣ８Ｅ８重鎖可変領域（ＣＤＲに下線が引かれている）：
［配列番号１３８］：
【化１０】

```
1         10         20         30         40         50
QVQLQQSGPELVKPGTSVKMPCKASGYIFTDYVISWVKQRTGQGLEWIGEIFP
       60         70         80         90         100
RSGSTYYNEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSVTSEDSAVYFCARDYYGTSFA
 110
MDYWGQGTSVTVSS
```

ＣＤＲ１［配列番号１２０］（変異された残基は太字かつ下線が引かれている）：
【化１１】

GYIFTD**YV**IS

（配列番号１２０）（ＣＤＲ１の元のＤＣ８Ｅ８配列）における変異
１４－ＶＨ－Ｙ３２Ａ［配列番号２６１］
１５－ＶＨ－Ｖ３３Ａ［配列番号２６２］
ＣＤＲ２の前にあるフレームワーク領域ＦＲ２：
【化１２】

WVKQRTGQGLEWIG**E**

（配列番号１６２）（フレームワーク領域ＦＲ２の元のＤＣ８Ｅ８配列）における変異
１６－ＶＨ－Ｅ５０Ａ［配列番号２６３］
ＣＤＲ２［配列番号１２１］：
【化１３】

I**F**PRSG**S**T

（配列番号１２１）（ＣＤＲ２の元のＤＣ８Ｅ８配列）における変異
１７－ＶＨ－Ｆ５２Ａ［配列番号２６４］
１８－ＶＨ－Ｓ５７Ａ［配列番号２６５］
ＣＤＲ３［配列番号１２２］：
【化１４】

AR**DYYG**TSFAMDY

（配列番号１２２）（ＣＤＲ３の元のＤＣ８Ｅ８配列）における変異
１９－ＶＨ－Ｄ９９Ａ［配列番号２６６］
２０－ＶＨ－Ｙ１００Ａ［配列番号２６７］
２１－ＶＨ－Ｙ１０１Ａ［配列番号２６８］
２２－ＶＨ－Ｇ１０２Ａ［配列番号２６９］

【０４１８】
組換えＤＣ８Ｅ８抗体バリアントの解析用発現および予備発現：野生型抗体およびその変異体（それらのすべてがＨｉｓタグ化されている）のｐＥＴ２２ｂ－ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖＤＮＡコンストラクトを、産生株ＢＬ２１（ＤＥ３）の大腸菌細胞に形質転換した。得られたクローンを、まず、組換えｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの産生について確かめた。形質転換後に得られた個々のコロニーを、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンが補充された２ｍｌのＬＢ培地に接種し、絶えず撹拌しながら３７℃で５時間生育した（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ａｎｄ　Ｒｕｓｓｅｌｌ　２００１）。各培養物の１００μｌアリコートを取り出し、その体積の２／３の１００％グリセロールと混合し、後の使用のために－８０℃で凍結保存した。イソプロピル－β－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を１ｍＭの最終濃度まで加え、さらに３時間インキュベーションを続けることによって、組換えタンパク質の発現を誘導した。卓上遠心機における４℃、１０，０００×ｇでの１分間の遠心分離によって細胞を回収し、上清を廃棄し、細胞ペレットを１×ＳＤＳ－サンプル緩衝液（Ｌａｅｍｍｌｉ　１９７０）に再懸濁し、５分間煮沸した。そのサンプルを１０，０００×ｇで５分間遠心し、上清（細菌溶解産物）をＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）によって解析した。分離されたタンパク質を、Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ　Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　Ｂｌｕｅ　Ｒ２５０（ＳＩＧＭＡ）で染色することによって可視化した。

【０４１９】
各ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ抗体（天然および変異体）の予備発現のために、それぞれの発現プラスミドを含む細菌細胞を培養し、ＳａｍｂｒｏｏｋおよびＲｕｓｓｅｌｌによる“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　ｍａｎｕａｌ”（２００１）に記載されているように誘導した。形質転換された細胞を、１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含む１００～５００ｍｌのＬＢ培地中で３７℃、２３０ｒｐｍにおいて生育した。その培養物の６００ｎｍにおける吸光度が０．８～１．０に達したら、ＩＰＴＧを１ｍＭの最終濃度まで加えて、ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの発現を誘導した。３７℃での３時間にわたるさらなるインキュベーションの後、３，０００ｇ、４℃での１５分間の遠心分離によって細胞を回収した。細胞ペレットを１０ｍｌの溶解緩衝液（５０ｍＭ　ＰＩＰＥＳ　ｐＨ６．９、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．１ｍＭ　ＰＭＳＦ）に再懸濁し、ＴＴ－１３チップ（５０％デューティサイクル，５０Ｗ電力出力，Ｓｏｎｏｐｕｌｓ　ＨＤ　２２００，Ｂａｎｄｅｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、３０秒間作動３０秒間休止を６回行う氷上での超音波処理を行った。溶解産物を遠心分離（２１，０００×ｇ、１５分間、４℃）によって浄化した。溶解産物を０．４５μｍメンブランフィルターで濾過し、使用するまで－８０℃において保管した。誘導の成功および発現のレベルを調べるために、１ｍｌの誘導された培養物を回収し、細胞を上記のように遠心分離によって回収し、１００μｌの１×ＳＤＳサンプル緩衝液に再懸濁し、９５℃において５分間煮沸し、次いで、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって解析した（図２３Ａ）。細胞質溶解産物をタウタンパク質の結合／検出（ウエスタンブロット解析によるもの）およびタウに対する組換え抗体の親和性のＳＰＲ測定のために使用した（これらの両方ともが、天然および変異体ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ抗体の活性の尺度である）。

【０４２０】
実施例１５：モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８の組換えｓｃＦＶフラグメント（ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ）は病理学的タウ（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）を認識する
病理学的形態のタウへのｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの結合特性を測定するために、ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖを発現している細菌由来のタンパク質溶解産物をＴＢＳ－Ｔ緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０）に１６倍希釈し、それを使用して、５００、２５０および１２５ｎｇの組換え切断型タウタンパク質（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）および組換えＣ末端切断型タウタンパク質（タウΔ２２８－４４１）を含むニトロセルロース膜の上にのせた（タンパク質のポンソーＳ染色、図２３Ｂ）。結合したｓｃＤＣ８Ｅ８ｖを、抗６ｘｈｉｓＴａｇ（配列番号１６

３）抗体（Ｎｏ．Ａ００１７４；ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ，ＵＳＡ）を用いた免疫ブロット法によって検出し、抗ウサギＨＲＰ結合体化抗体（ＤＡＫＯ　Ｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）を用いて可視化した（図２３Ｃ）。ＬＡＳ３０００イメージングシステム（ＦＵＪＩ　Ｐｈｏｔｏ　Ｆｉｌｍ　Ｃｏ．，Ｊａｐａｎ）を使用して検出されるＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｗｅｓｔ　Ｐｉｃｏ　Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｕ．Ｓ．Ａ）を用いて、そのブロットの像を得た。

【０４２１】

ウエスタンブロット解析は、組換え一本鎖抗体（ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ）が切断型タウ［タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ］を検出することを示した。ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖは、インタクトなＤＣ８Ｅ８によって認識される４つの治療用エピトープのいずれも含まないコントロール切断型タウタンパク質タウΔ２２８－４４１を認識しないので、その結合は、特異的である（図２３Ｃ　レーン４）。タウタンパク質を含むニトロセルロース膜（図２３Ｂに示されるように充填されたもの）を、ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖを発現しないコントロール細菌由来の溶解産物でプロービングしても、いかなるシグナルも生成されなかった（図２３Ｄ）。

【０４２２】

実施例１６：モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８の組換えＳＣＦＶフラグメント（ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ）は、ＤＣ８Ｅ８抗体に類似のタウ結合特性を示し、病理学的タウ（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）を選択的に認識し、それを生理学的な天然のタウ（タウ２Ｎ４Ｒ）と有意に区別する

組換え一本鎖抗体ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖのタウ結合特性を定量するために、病理学的な切断型タウ（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）（図２４Ａ）および正常なヒト４リピートタウアイソフォーム２Ｎ４Ｒ（図２４Ｂ）に対するｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの結合を測定するＳＰＲ（Ｂｉａｃｏｒｅ　３０００，Ｂｉａｃｏｒｅ，Ｓｗｅｄｅｎ）によって動態親和性の測定を行った。この目的を達成するために，１１，０００ＲＵのウサギポリクローナル抗Ｈｉｓタグ抗体（Ｎｏ．Ａ００１７４；ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ，ＵＳＡ）をＣＭ５センサーチップ上に固定化した。すべての実験を、ランニング緩衝液として、０．００５％のＰ２０を含むＰＢＳ　ｐＨ７．４（ＰＢＳ－Ｐ）中、２５℃において行った。組換えＨｉｓタグ化ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖを、６０ＲＵの固定化レベルに達するように分析用フローセルにおいて捕捉し、既知濃度の各タウタンパク質またはＰＢＳ－Ｐコントロールサンプルを、１００μｌ／分の流速でセンサーチップの上に注入した。動態結合データを二重参照し、ＢＩＡ評価ソフトウェア４．１（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ）によって１：１相互作用モデルに当てはめた。動態速度定数を全体的に近似させ、最大レスポンスを局所的に当てはめ、バルクレスポンスを０に設定した。

【０４２３】

動態測定は、正常タウ２Ｎ４Ｒよりも病理学的なＡＤタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対するｓｃＤＣ８Ｅ８ｖのより高い会合速度定数およびより低い解離速度定数を示した（図２４Ｃ）。その結果として、切断型ＡＤタウに対するｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの親和性は、完全長タウアイソフォーム２Ｎ４Ｒよりも高い（平衡結合定数K_Aのより高い値）。これらの測定から、ＤＣ８Ｅ８抗体の一本鎖バージョン（ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ）が、親の完全長ＤＣ８Ｅ８抗体と同様に、コンフォーメーションが変化した病理学的タウタンパク質に対して結合優先性を示すことが確かめられた。したがって、組換えｓｃＤＣ８Ｅ８ｖは、その結合特性に関与するＤＣ８Ｅ８抗体結合部位内のアミノ酸残基の同定に適している。

【０４２４】

実施例１７：病理学的タウエピトープのｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ／ＤＣ８Ｅ８の認識に影響するｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ結合部位における残基の同定

ＤＣ８Ｅ８－抗原相互作用に影響するいくつかのアミノ酸残基は、ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖ結合部位の残基のアラニンスキャニング突然変異誘発によって決定された。軽鎖および重鎖

における潜在的な抗原接触残基を、ＭａｃＣａｌｌｕｍら（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６）の成果に基づいて特定し、実施例１４に記載されたようにアラニンに突然変異させた。続いて、ｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの変異体バージョンをＢＬ２１大腸菌株において発現させた（図２５Ａ，一本鎖タンパク質は星印によって示されている）。変異されたｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの結合特性を、ウエスタンブロッティングによって解析した（図２５Ｂ～Ｃ）。図２５Ｂは、様々な量の切断型タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒタンパク質を含むニトロセルロース膜のポンソーＳ染色を示している。同一の膜を、様々な変異体一本鎖抗体による切断型タウの検出のために使用した（図２５Ｃ）。

【０４２５】

これらの結果に基づいて、ＤＣ８Ｅ８の可変領域におけるアミノ酸残基を以下のとおり３つの主要なカテゴリーに分類した：

【０４２６】

カテゴリー１：このカテゴリーに列挙される残基（太字）は、病理学的な切断型ＡＤタウ（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）へのｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの結合に最も寄与した。これらの残基のいずれか１つのアラニンへの変異は、タウタンパク質上のＤＣ８Ｅ８エピトープの認識を最も妨げた。

ＤＣ８Ｅ８軽鎖におけるカテゴリー１残基：
ＣＤＲＬ１［配列番号１１７］における３１位のアスパラギン
ＣＤＲＬ１［配列番号１１７］における３８位のチロシン
ＣＤＲＬ３［配列番号１１９］における９７位のセリン
ＤＣ８Ｅ８重鎖におけるカテゴリー１残基：
ＣＤＲＨ２［配列番号１２１］の前にあるＦＲＨ２における５０位のグルタミン酸
ＣＤＲＨ３［配列番号１２２］における１０１位のチロシン

【０４２７】

カテゴリー２：このカテゴリーに列挙される残基は、病理学的タウ（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）へのｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの結合に寄与する。これらの残基のいずれか１つのアラニンへの変異は、切断型ＡＤタウ（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）に対するｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの反応性を低下させるが、その反応性をカテゴリー１残基に対する変異よりも低い程度にまで妨げる：
ＤＣ８Ｅ８軽鎖におけるカテゴリー２残基：
ＣＤＲＬ２［配列番号１１８］の前にあるフレームワーク領域ＦＲＬ２における５５位のチロシン
ＣＤＲＬ３［配列番号１１９］における９５位のリジン
ＤＣ８Ｅ８重鎖におけるカテゴリー２残基：
ＣＤＲＨ２［配列番号１２１］における５７位のセリン
ＣＤＲＨ３［配列番号１２２］における１００位のチロシン
ＣＤＲＨ３［配列番号１２２］における１０２位のグリシン

【０４２８】

カテゴリー３：この最後のカテゴリーに列挙される残基は、病理学的なＡＤタウ（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）へのｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの結合に最も寄与しない。これらの残基のアラニンへの変異は、切断型タウ（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）に対するｓｃＤＣ８Ｅ８ｖの反応性を変化させない：
軽鎖におけるカテゴリー３残基：
ＣＤＲＬ１［配列番号１１７］における３３位のアルギニン
ＣＤＲＬ２［配列番号１１８］における５６位のトリプトファン
ＣＤＲＬ３［配列番号１１９］における９６位のグルタミン
ＣＤＲＬ３［配列番号１１９］における９８位のフェニルアラニン
ＣＤＲＬ３［配列番号１１９］における９９位のチロシン
ＣＤＲＬ３［配列番号１１９］における１００位のロイシン
ＣＤＲＬ３［配列番号１１９］における１０１位のアルギニン

重鎖におけるカテゴリー３残基：
ＣＤＲＨ１［配列番号１２０］における３２位のチロシン
ＣＤＲＨ１［配列番号１２１］における３３位のバリン
ＣＤＲＨ２［配列番号１２１］における５２位のフェニルアラニン
ＣＤＲＨ３［配列番号１２２］における９９位のアスパラギン酸
【０４２９】
実施例１８：治療用タウエピトープによる能動ワクチン接種：タウ上のＤＣ８Ｅ８結合エピトープの１つに基づくワクチン用の免疫原の調製およびワクチン投与
ａ．ペプチド：ヒトタウタンパク質２Ｎ４Ｒの合成フラグメントからなるペプチド免疫原を、Ａｎｔａｇｅｎｅ，Ｉｎｃ．（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）およびＥＺＢｉｏｌａｂ，ＵＳＡが９５％より高い純度で合成した。各ペプチド配列を、タウ線維化／凝集に関わるおよび／またはそれを促進すると考えられている配列の少なくとも１つを含むようにデザインした（新規標的「治療用エピトープ」）（そのエピトープは、実施例１～１１に記載されたアッセイによって、ＤＣ８Ｅ８への結合部位として上記で同定された）。図２６Ａを参照のこと。これらの４つの配列は、本明細書中で「治療用エピトープ」とも称される（下記を参照のこと）。これらのエピトープは、タウ線維化／ＰＨＦ構築にとって重要なタウ－タウ相互作用モチーフ（凝集エピトープ）に相当する。ゆえに、これらの戦略的に重要な治療用エピトープの標的化は、ＡＤおよび関連タウオパチーの処置を成功させ得る。さらに、いくつかのタウエピトープの標的化は、自己免疫性応答を誘発し、その疾患を潜在的に悪化させると考えられているので（Ｆｕｒｌａｎら、２００３；Ｇｒｕｄｅｎら、２００４）、上記のような特異的な抗タウ治療の使用は、ランダムに選択されたタウエピトープに依存する、目標が広範な治療よりも安全であることを証明するだろう。
【０４３０】
したがって、タウベースの免疫療法の治療的な可能性をさらに測定するために、タウペプチドのいくつかのセットを免疫原として使用するために指定した。それらの残基のすべてが、４４１アミノ酸残基を有する完全長タウ２Ｎ４Ｒの残基を参照する。免疫原の第１セットは、配列番号１タウ２５１－ＰＤＬＫＮＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫ－２８０；配列番号２タウ２５６－ＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳ－２８５；配列番号３タウ２５９－ＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱ－２８８；配列番号４タウ２７５－ＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧ－３０４；配列番号５タウ２０１－ＧＳＰＧＴＰＧＳＲＳＲＴＰＳＬＰＴＰＰＴＲＥＰＫＫＶＡＶＶＲ－２３０；配列番号６タウ３７９－ＲＥＮＡＫＡＫＴＤＨＧＡＥＩＶＹＫＳＰＶＶＳＧＤＴＳＰＲＨＬ－４０８；配列番号７タウ１８１－ＴＰＰＳＳＧＥＰＰＫＳＧＤＲＳＧＹＳＳＰＧＳＰＧＴＰＧＳＲＳ－２１０；配列番号８タウ３００－ＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶＤＬＳＫ－３１７；および配列番号１０８タウ２９４－ＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ－３０５で構成された。これらの配列のうちのいくつかは、以前にＡＤタウ病理に見られたリン酸化（ｐｈｏｓｈｏｒｙｌａｔｅｄ）エピトープを有する。したがって、タウペプチド配列番号５は、２１７位にリン酸化トレオニンを含み、タウペプチド配列番号６は、３９６位および４０４位にリン酸化セリン残基を含み、タウペプチド配列番号７は、２０２位にリン酸化セリンおよび２０５位にトレオニンを含む。タウペプチド配列番号２を非リン酸化型およびリン酸化型で合成した。そのリン酸化型は、２６２位にリン酸化セリン残基を含む。
【０４３１】
このセットのうち、免疫原の１つのサブセット（タウペプチド配列番号１～４および１０８）は、配列番号９８（タウ２６７－ＫＨＱＰＧＧＧ－２７３）または配列番号９９（タウ２９８－ＫＨＶＰＧＧＧ－３０４）のいずれかによって表される治療用エピトープのうちの１つを含む。タウペプチドの別のサブセット（配列番号５～７）は、アルツハイマー病および他のタウオパチーに見られるリン酸化部位を含む。タウペプチド配列番号８は、述べられたエピトープのいずれも有さず、コントロールとして使用された（図２６）。
【０４３２】

ペプチドの第２のセットは、配列番号９から９７で構成され、それらは、ヒトタウ２Ｎ４Ｒの残基２４４～３９０にわたって一部重複する配列である。これらのペプチドの各々は、異なるタウベースの環境においてタウ治療用エピトープ配列のうちの１つを含む。換言すれば、各サブセットにおいて、エピトープ＃１から＃４の各々は、そのＮ末端とＣ末端の両方において異なるタウ残基によって囲まれている（図２６）。

【０４３３】

ｂ．ワクチンとして使用するための結合体化：タウペプチド配列番号２、４、７および１０８を、システイン結合を介してキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）に結合体化した。

【０４３４】

この目的を達成するために、タウペプチド配列番号２、４、７および１０８を、ＫＬＨタンパク質の表面上にペプチドの配向結合を得る目的で、Ｎ末端に位置する余分なシステイン残基を有するシステイン付加（ｃｙｓｔｅｉｎａｔｅｄ）ペプチドとして合成した。ペプチドを、二機能性架橋剤Ｎ－［γ－マレイミドブチリルオキシ］スクシンイミドエステル（ＧＭＢＳ）を介してＫＬＨキャリアに結合させた。結合体化反応物を調製するために、２０ｍｇのＫＬＨ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）を、１０分間静かに混合することによって結合体化緩衝液（０．９Ｍ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡを含むＰＢＳ）に溶解して、１０ｍｇ／ｍｌの濃度にした。マレイミド活性化ＫＬＨを調製するために、２ｍｇの活性な二機能性架橋剤ＧＭＢＳを５０μｌの無水ジメチルホルムアミドに溶解し、２ｍｌのＫＬＨ溶液と室温において１時間混合した。続いて、結合体化緩衝液において平衡化された５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）において、未反応のＧＭＢＳを除去した。ペプチドとマレイミド活性化ＫＬＨとの１：１比（ｗ／ｗ、２０ｍｇのペプチド）で室温（２５℃）において２時間、結合体化を行った。得られた結合体を１００倍過剰のＰＢＳに対して透析し、４回の透析緩衝液の交換により、未結合体化ペプチドを除去した。透析の後、結合体を２℃、２１，０００×ｇで１５分間遠心した。ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを使用して測定されるとき、透析緩衝液中に遊離ペプチドが存在しないことによって、結合体化の完成度を確かめた。その結合体を等分し、使用するまで－２０℃で保管した。

【０４３５】

ｃ．ワクチンの調製：アルミニウム／ミョウバンアジュバントＡｄｊｕＰｈｏｓ（Ｂｒｅｎｎｔａｇ　Ｂｉｏｓｅｃｔｏｒ，Ｄｅｎｍａｒｋ）を含む免疫用量を調製するために、２００μｇの各それぞれのタウペプチド結合体（１５０μｌのＰＢＳに溶解されたもの）を、３００μｌという最終的な投与体積において１：１（ｖｏｌ／ｖｏｌ）比においてＡｄｊｕＰｈｏｓアジュバントで乳化した。各懸濁液／エマルションを、回転させながら４℃で一晩インキュベートすることにより、ペプチドをリン酸アルミニウム粒子に吸着させた。

【０４３６】

フロイント完全アジュバントを含む免疫用量を調製するために、２００μｇの各それぞれのタウペプチド結合体（１５０μｌのＰＢＳに溶解されたもの）を、３００μｌという最終的な投与体積においてフロイント完全アジュバントで１：１（ｖｏｌ／ｖｏｌ）乳化した。その後の追加免疫の投与のために、免疫原を同様に調製したが、フロイント不完全アジュバントで乳化した。

【０４３７】

ｄ．ワクチン投与：調製されたワクチン用量を、ヒト切断型タウ導入遺伝子を有するタウトランスジェニックラット（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒを発現する、上記の実施例７に記載されたＳＨＲ７２系統（Ｚｉｌｋａら、２００６）に注射した。それらの２ヶ月齢のラットに、３００μｌという最終体積において２００μｇの免疫原の最初の皮下注射を投与した後、３週間後に２回目の注射を行い、その後、毎月のスケジュールで注射した。コントロールトランスジェニックラットには、ＰＢＳと１：１混合されたアジュバントを投与した。この免疫療法の有効性の評価は、実施例１９に記載される。

【０４３８】
ワクチン処置ラットにおける不溶性タウの定量的解析における内標準として使用するための、胎仔ラットタウの単離および精製：胎仔ラットタウ精製を、１％過塩素酸を使用して、本質的にはＩｖａｎｏｖｏｖａら、２００８に記載されているように行った。１～７日齢のラット仔から得られた脳組織を氷冷１％過塩素酸中でホモジナイズし（５ｍｌの過塩素酸，ＰＣＡあたり１．５ｇ組織）、氷上で２０分間静置した。そのホモジネートを１５，０００×ｇで２０分間遠沈し、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ Ｆｉｌｔｅｒデバイス（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して、透明な上清を濃縮し、同時に緩衝液を洗浄緩衝液（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０）に交換した。約１０ｍｇの総タンパク質を含む濾過されたＰＣＡ脳抽出物を、固定化されたｐａｎ－タウｍＡｂ ＤＣ２５（上記を参照のこと）を有するＳｅｐｈａｒｏｓｅが詰められたＰｏｌｙ－ＰｒｅｐカラムＣ１０／１０（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に０．２ｍｌ／分の流速で充填した。溶出画分の吸光度（２８０ｎｍ）が安定になるまで、未結合のタンパク質を１０～１５ｍｌの洗浄緩衝液で洗い流した。ｍＡｂ ＤＣ２５に結合した胎仔タウを、０．１Ｍグリシン，ｐＨ２．６で溶出した。溶出された０．５ｍｌ画分を直ちに５０μｌの１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ９で中和し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによってアッセイした。胎仔タウを含む画分を、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ Ｆｉｌｔｅｒデバイス（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して濃縮し、同時にＰＢＳに緩衝液交換した。アフィニティークロマトグラフィーによって精製された胎仔タウを、Ｃｈｅｎら（２００５）に従って、１０％トリクロロ酢酸を含む４体積の氷冷アセトンを加えることによって、沈殿させた。その混合物を－２０℃で２時間インキュベートし、２℃、１５，０００×ｇで２０分間遠心した。上清を廃棄し、沈殿物を１ｍｌの氷冷アセトンに再懸濁し、氷上で２０分間静置し、再度、上記のとおり遠心した。得られたペレットを室温において乾燥し、沈殿前の体積と等しい体積のＰＢＳに溶解した。

【０４３９】
実施例１９：アルツハイマー病のトランスジェニックラットモデルにおいてタウペプチドワクチンを評価する一般的な方法
能動ワクチンを以下のアプローチによって評価した：（ａ）リン酸化特異的モノクローナル抗体ＡＴ２７０、ＤＣ２０９、ＤＣ２１７およびＡＴ８を用いるラット脳サンプルの免疫ブロット解析を使用してリン酸化型の不溶性タウのレベルならびにｐａｎ－タウモノクローナル抗体ＤＣ２５を使用して不溶性タウの総量に対するその投与の効果を評価することによって生化学的に；（ｂ）ＮｅｕｒｏＳｃａｌｅ評価を使用して神経行動学的に；（ｃ）ＮＦＴの定量を含む免疫組織化学的に；および（ｄ）誘導された抗体応答の解析によって。受動ワクチンもまた、とりわけこれらのアプローチの１つもしくは複数によって前臨床的に評価され得る。

【０４４０】
（ａ）生化学的解析：サルコシル法（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｄａｖｉｅｓ，１９９０）を用いて、試験ペプチドで免疫されたトランスジェニック（ＳＨＲ７２）ラットの脳幹、ならびに実施例８に記載されたような、ｍｏｃｋで処置されたＳＨＲ７２ラット（アジュバントのみを注射された（コントロール））から、不溶性タウ画分を調製した。サルコシル不溶性タウサンプルを、下に記載されるように、様々なモノクローナル抗体を使用する免疫ブロット法によって解析した。免疫原性ペプチド配列番号１～８および１０８に対するこの解析の結果を図２６Ｂに要約する。不溶性タウのレベルは、ＳＨＲ７２トランスジェニックラットにおいてタウ病理の進行と相関すると示されている。Ｋｏｓｏｎら、２００８。

【０４４１】
免疫ブロット解析：サルコシル不溶性タウ画分のサンプルを、可溶性画分の１／５０体積の１×ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）サンプルローディング緩衝液（Ｌａｅｍｍｌｉ，１９７０）に溶解し（Ｆｉｌｉｐｃｉｋら、２０１０を参照のこと）、９５℃で５分

間加熱した。次いで、６μｌの各々を５～２０％グラジエントＳＤＳポリアクリルアミドゲルに充填し、Ｔｒｉｓ－グリシン－ＳＤＳ緩衝液系において、２５ｍＡで４０分間、電気泳動した。タンパク質をＰＶＤＦ膜に移動させた（１０ｍＭ　ＣＡＰＳ，ｐＨ１２において１５０ｍＡで１時間）。その移動の後、その膜をＰＢＳ中の５％脱脂粉乳において室温で１時間ブロッキングし、次いで、１次（タウ特異的）モノクローナル抗体（各抗体のより詳細な記載については下記を参照のこと）とともに１時間インキュベートした後、大量のＰＢＳで３回洗浄した。洗浄後、ＰＢＳで１：４０００希釈されたＨＲＰ結合体化ヤギ抗マウスＩｇ（ＤＡＫＯ，Ｄｅｎｍａｒｋ）を二次抗体として使用した。インキュベーション（室温において１時間）の後、ＰＢＳ中の０．２％Ｉｇｅｐａｌで洗浄した（３回）。ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｗｅｓｔ　Ｐｉｃｏ　Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｕ．Ｓ．Ａ）を用いてそのブロットの像を得て、ＬＡＳ３０００イメージングシステム（ＦＵＪＩ　Ｐｈｏｔｏ　Ｆｉｌｍ　Ｃｏ．，Ｊａｐａｎ）を使用してシグナルを検出した。シグナル強度を、ＡＩＤＡソフトウェア（Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｉｍａｇｅ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｚｅｒ，Ｒａｙｔｅｓｔ，Ｓｔｒａｕｂｅｎｈａｒｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して定量した。胎仔タウ（０．６μｇ／レーン）を、定量解析のための内標準として使用した。

【０４４２】

モノクローナル抗体ＡＴ８およびＡＴ２７０は、Ｉｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ（Ｂｅｌｇｉｕｍ）から購入し、その両方を免疫ブロット解析のために使用した。ＡＴ８は、免疫組織化学的検査にも使用した。ＡＴ８は、タウの微小管結合親和性の大部分に寄与する、タウのプロリンリッチドメインに位置するリン酸化セリン２０２およびトレオニン２０５を認識する。ＡＴ２７０は、プロリンリッチドメインに位置するリン酸化トレオニン１８１を認識する。両方の抗体が、可溶性タウおよび不溶性タウに結合する。本研究において使用されたリン酸化特異的モノクローナル抗体ＤＣ２０９（ｐＴ２３１を認識する）、ＤＣ２１７（ｐＴ２１７を認識する）は、Ａｘｏｎ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，ＧｍｂＨ（Ｖｉｅｎｎａ，Ａｕｓｔｒｉａ）によって調製された。Ｐａｎ－タウ抗体ＤＣ２５（Ａｘｏｎ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，ＧｍｂＨ）は、すべての形態の可溶性および不溶性タウにおける、タウタンパク質のＣ末端における第４の微小管結合リピートリピートにおけるエピトープ（３４７－３５３）を認識する。ＤＣ２５抗体は、そのリン酸化レベルとは無関係なタウタンパク質を認識する。

【０４４３】

（ｂ）神経行動学的評価：最後のワクチン投与の１０日後にラットの神経行動学的反応を、ＮｅｕｒｏＳｃａｌｅ（ヒト切断型タウタンパク質を発現するトランスジェニックラットに対して当初はデザインされた一連の行動試験である）（Ｋｏｒｅｎｏｖａら、２００９）を用いて評価した。そのＮｅｕｒｏＳｃａｌｅは、感覚運動の課題（梁歩行試験）、神経筋の課題（握力牽引力試験（ｐｒｅｈｅｎｓｉｌｅ　ｔｒａｃｔｉｏｎ　ｔｅｓｔ））および神経学的課題（踏み直り反射、立ち直り反射、姿勢反射、耳介反射、驚愕反射および後肢逃避伸展反射）から構成され、基本的な観測的評価によって強化される。

【０４４４】

全般的な観察は、姿勢および肢の機能の評価を含み；神経学的検査は、基本的な反射応答を含んだ（すべてが、１点のスケールで点数をつけられた（正常反応は０点；遅延したまたは不完全な反応は１点））。後肢逃避伸展反射の評価は、３点のスケールで点数をつけた（正常反応は０～１点；障害は２～３点）。

【０４４５】

梁歩行試験の場合、３種類の横断セグメントを使用した（３×３ｃｍ、４×２ｃｍおよび直径３．５ｃｍの丸い梁）。最高点は１０点だった（潜時に対する５点＋１つの梁のタイプにおける後肢のスリップに対する５点）。梁歩行試験から得られるスコアが低いほど、試験された動物の感覚運動協調性の能力が良い。達成し得る点数の合計は、３０点だった。

【０４４６】

握力牽引力試験の場合、ラットに、パッド入りの表面の７６ｃｍ上に吊るされた水平方向のスチールワイヤ（直径３ｍｍ）を前肢で掴ませた。ワイヤから落ちるまでの潜時を測定した。与えることのできる最高点は、５点だった（それは、神経筋の機能性の重篤な障害および筋力低下を反映する）。落ちるまでの潜時が長いほど、この課題から得られるスコアが低く、そのスコアは、試験された動物の前肢の筋力および敏捷性を反映する。

【０４４７】

個々の試験において得られたスコアからＮｅｕｒｏＳｃａｌｅスコアを計算した。観測的評価、神経学的検査、３種類の梁歩行試験および握力牽引力試験の寄与を加えることによって、４９点という最高総スコアが可能だった。神経行動学的障害が重篤になるほど、ＮｅｕｒｏＳｃａｌｅスコアは高くなる。

【０４４８】

（ｃ）免疫組織化学的検査：脳サンプルを回収するために、深麻酔下において２分間、ラットにＰＢＳを経心的に灌流した。灌流後、そのラットの脳を取り出し、矢状方向に２つの同じサイズの半球に切断した。右半球の脳幹および小脳を生化学的解析のために回収した。左半球を、４℃において４％パラホルムアルデヒドで一晩固定した後、凍結保護を提供するために２５％スクロースで４８時間処理した。次いで、その材料を冷２－メチルブタン（－４２℃）中で３０秒間凍結し、クライオミクロトームにおいて薄片に切断した。矢状切片（４０μｍ）を－１８℃においてクライオスタットで切断した。浮遊切片を免疫組織化学的研究のために使用した。

【０４４９】

処置ラットおよびコントロールラットの凍結脳切片において免疫組織化学的染色を行った。Ｋｏｓｏｎら、２００８は、ＳＨＲ７２トランスジェニックラットの脳におけるＮＦＴの数が、それらの動物の死去の時間と相関することを示した（すなわち、ＮＦＴが多いほど、動物の死去は早い）。ラット脳における神経原線維の変化を解析するために、その脳の矢状切片を調製した。浮遊組織切片を、室温（２５℃）において３０秒間、冷（＋４℃）８０％ギ酸で処理した。脳切片を、０．３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００および１％H_2O_2を含むＰＢＳ中で室温において２０分間インキュベートした後、ブロッキング溶液（０．３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、１％ウマ血清を含むＰＢＳ）中で３０分間インキュベーションし、その後、精製されたＡＴ８抗体（ブロッキング緩衝液において０．２μｇ／ｍｌ）またはハイブリドーマ培養上清ＤＣ２１７（ブロッキング緩衝液において１：１００）とともに４℃において一晩インキュベーションした。両方の抗体が、トランスジェニックラットの脳幹において類似の免疫染色パターンを示した。洗浄後、それらの切片を、標準的なアビジンビオチンペルオキシダーゼ法（ＡＢＣ　Ｅｌｉｔｅ，Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）を用いて免疫染色した。反応産物を、アビジン－ビオチン系および色素原としてＶｅｃｔｏｒ　ＶＩＰ（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用して可視化した。次いで、切片をＯｌｙｍｐｕｓ　ＢＸ５１顕微鏡で検鏡した。

【０４５０】

（ｄ）抗体応答：研究の開始前（すなわち、最初の注射の前）および最後の注射の２週間後にトランスジェニックラットから採血した。投与された免疫原／ワクチンに対する抗体応答を、段階希釈された血漿サンプルを使用するＥＬＩＳＡによって測定した。ペプチド免疫原、組換えタウタンパク質タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよび組換え完全長タウアイソフォーム２Ｎ４Ｒを、３７℃において一晩、ＰＢＳ中の１０μｇ／ｍｌの濃度で９６ウェルプレート（ＩＷＡＫＩ，Ｊａｐａｎ）上に別個にコーティングした。ＰＢＳ中の１％脱脂粉乳でブロッキングした後、そのプレートをＰＢＳ－０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０で洗浄し、５０μｌ／ウェルの血漿段階希釈物（ブロッキング緩衝液において１：２００～１：１２８，０００）とともに３７℃において１時間インキュベートした。インキュベーションおよび洗浄の後、ペルオキシダーゼ結合体化二次抗体（ウサギ抗ラットＩｇ，ＤＡＫＯ，Ｄｅｎｍａｒｋ）を１：１０００希釈し、３７℃において１時間、ウェルに適用した（５０μｌ／ウェル）。その反応物を、ペルオキシダーゼ基質溶液（０

．１Ｍリン酸緩衝液）中のｏ－フェニレンジアミンを用いて発色させ、５０μｌの２ＭH_2SO_4で停止させた。４９２ｎｍにおける吸光度を、Ｍｕｌｔｉｓｃａｎ　ＭＣＣ／３４０　ＥＬＩＳＡリーダー（Ｌａｂｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して測定した。ネガティブコントロールの吸光度の値の少なくとも２倍の値を有する読取値を、ポジティブと考えた。

【０４５１】

上記の実施例５に記載されたようにＳＰＲを使用して親和性測定を行った。簡潔には、ランニング緩衝液として０．００５％のＰ２０を含むリン酸緩衝食塩水ｐＨ７．４（ＰＢＳ－Ｐ）中、２５℃において実験を行った。３０００ＲＵ（応答単位）のポリクローナル抗マウス抗体（Ｎｏ．Ｚ０４２０；ＤａｋｏＣｙｔｏｍａｔｉｏｎ，Ｇｌｏｓｔｒｕｐ，Ｄｅｎｍａｒｋ）を、５μｇ／ｍｌ（１０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液ｐＨ４．５における２００μｇ／ｍｌの０．５×ＰＢＳ原液の４０倍希釈によって調製される）の濃度において１級アミンを介して、２つのフローセル（その一方を測定の基準として使用した）において同時に結合させた。各解析サイクルにおいて、ほぼ飽和に等しい約８５０ＲＵの固定化レベルに達するように、１０００倍希釈された血清を分析フローセルに捕捉した。K_A測定のために、ならびに動態速度定数の測定のために、タウ免疫原性ペプチドまたはタウタンパク質の１００ｎＭ溶液を１００μｌ／分の流速でセンサーチップの上に注入した。ＰＢＳ－Ｐ注射を、二重参照手順（Ｍｙｓｚｋａ　Ｊ　Ｍｏｌ　Ｒｅｃ　１９９９）におけるバックグラウンドシグナル減算のために使用した。動態データをＢＩＡ評価ソフトウェア４．１（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ）によって１：１反応モデルに当てはめた。動態速度定数を全体的に近似させ、最大レスポンスを局所的に当てはめ、バルクレスポンスを０に設定した。

【０４５２】

実施例２０：４つの治療用エピトープ配列の少なくとも１つを含むタウペプチドワクチンは、ヒトアルツハイマー病をモデル化するトランスジェニックラットにおいて有益である

ａ．配列番号１タウ２５１－ＰＤＬＫＮＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫ－２８０。トランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）を、Ａｄｊｕ－ｐｈｏｓアジュバントとともに製剤化されたタウペプチド配列番号１で免疫した。

【０４５３】

可溶性型からサルコシル不溶性病理型へのタウの変換は、タウ病理の発生における重要な工程として理解され、いくつかの因子（例えば、タウの濃度、タウの切断およびタウリン酸化の程度）に依存するとみられる（Ａｌｏｎｓｏら、２００１；Ｋｏｓｏｎら、２００８；Ｋｏｖａｃｅｃｈ　ａｎｄ　Ｎｏｖａｋ　２０１０）。タウペプチド配列番号１で免疫されたラットの群およびコントロール群から回収されたサルコシル不溶性脳画分中の不溶性タウの免疫ブロット定量的解析の結果を、図２６Ｃに示す。そのワクチン接種によって、アジュバント単独を投与されたコントロールラットよりも、タウ２５１－２８０（配列番号１）で免疫されたラットにおいて不溶性タウの量が減少した（図２６Ｃ）。この減少は、全レベルの不溶性タウ（残基３４７－３５３を認識するＤＣ２５ｐａｎ－タウ抗体によって評価されるとき）、ならびに図２６Ｂおよび２６Ｃに記載されている、サルコシル不溶性画分中に存在すると知られている他のすべての試験されたＡＤ関連タウエピトープ（ＡＤの代用マーカー）の両方について観察された。実際に、タウペプチド配列番号１による免疫は、不溶性タウの統計学的に有意な（ｐ＜０．００１）減少を誘導し、これは、ｐａｎ－タウモノクローナル抗体ＤＣ２５を使用して、全不溶性タウレベルにおいて観察された（７１％）（図２６Ｂ、Ｃ）。ＤＣ２１７（ｐＴｈｒ２１７）、ＡＴ２７０（ｐＴｈｒ１８１）を用いた解析から、コントロールラットと比べて免疫されたラットにおいて不溶性タウのＴｈｒ２１７（４２％）およびｐＴｈｒ１８１（５８％）においてリン酸化のレベルが低下する傾向が明らかになった。より弱い処置効果（１１％）が、不溶性タウタンパク質ホスホエピトープｐＴｈｒ２３１において観察された（図２６Ｂ）。これらの結果から、上記ワクチンが、タウ凝集の阻害に関与する機序および／またはタウ－タ

ウ相互作用を起こしやすいタウタンパク質のレベルの低下に関わる機序を活性化させたと示唆される。

【０４５４】

タウペプチド免疫原配列番号１で処置されたラットは、コントロールラットと比べて、梁歩行試験において統計学的に有意に減少した逃避潜時を示した（＊ｐ＝０．０４５）（図２７Ａ）。同様に、後肢のスリップ回数は、コントロールと比べてワクチン接種群において減少した；しかしながら、この差は、わずかに統計学的に有意なだけだった（ｐ＝０．０５９，図２７Ｂ）。ＮｅｕｒｏＳｃａｌｅスコア（上記の実施例１９に記載された）を、梁歩行試験、握力牽引力試験および神経学的検査（基本的な反射、後肢逃避伸展反射）において得られた値から計算した。上記免疫は、コントロール群と比べて、ペプチド配列番号１で処置されたラットのＮｅｕｒｏＳｃａｌｅスコアを改善したが、この改善は、統計学的に有意でなかった（ｐ＝０．０６５，図２７Ｃ）。全ＮｅｕｒｏＳｃａｌｅスコアから、未処置ラットと比べて処置ラットの神経行動学的改善が確かめられた。すべての統計データは、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーＵ検定を用いて得られた。

【０４５５】

神経行動学的パラメータは、脳幹における不溶性タウのレベルと相関した。低レベルの不溶性タウを有する処置ラットは、コントロールと比べて、より短い逃避潜時およびより少ない後肢のスリップを示した。これらの知見は、高度に不溶性のミスフォールドされたタウの減少によって、免疫されたラットにおいて機能的改善がもたらされること（これは、治療的な価値があり得る）を示唆している。タウペプチド配列番号１を用いた免疫療法は、処置ラットの神経行動学的パラメータの改善をもたらした。この効果に続いて、免疫されたラットの脳における不溶性タウレベルが減少した。これらの知見は、不溶性タウレベルの低下が治療的利点を有することを示唆している。

【０４５６】

タウペプチド配列番号１を用いた免疫療法の有効性を免疫組織化学的レベルでさらに試験した（図２８）。処置されたラットおよびｍｏｃｋで処置された（アジュバント／ＰＢＳだけを投与された）コントロールトランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳幹において、神経原線維変化（ＮＦＴ）を、抗タウ抗体ＡＴ８、ＤＣ２１７（病理学的タウ上のリン酸化エピトープを認識する）を使用して解析した。半定量的方法を用いてＮＦＴの数を測定した。３つの定量的レベルを割り当てた：１）神経原線維変化が無いまたはほとんど無い（脳幹において最大３つ）；２）中程度（主に脳幹の網様体における多くのＮＦＴ）；および３）重篤（脳幹の全領域における多くのＮＦＴ）。「広範」は、神経原線維の神経変性の中程度から重篤な段階を意味する。免疫組織化学的解析は、トランスジェニック動物のワクチン処置群における神経原線維変化の量の５０％減少を示した。

【０４５７】

生化学的に測定された不溶性タウレベルの減少は、免疫組織化学的解析の結果と相関した。配列番号１による免疫からのデータは、ＤＣ８Ｅ８エピトープＮｏ．１を含むこのペプチドの処置能力を示している。

【０４５８】

ｂ．配列番号２タウ２５６－ＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳ－２８５。トランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）を、キャリアＫＬＨに結合体化されたタウペプチド配列番号２で免疫した（上に記載されたように）。

【０４５９】

免疫ブロット解析は、上記ワクチンが、アジュバント単独を投与されたコントロールラットと比べて、免疫されたラットにおける不溶性タウの量を減少させることを明らかにした。図２９は、不溶性／凝集タウに存在するモニターされたすべてのエピトープの減少を示している。ｐａｎ－タウＤＣ２５免疫反応性の定量的解析は、アジュバントだけを投与されたコントロールラットと比べて、免疫されたラットにおける不溶性タウの４１％減少を明らかにした（統計学的に有意、ｐ＜０．００１）（図２６Ｂ）。同様に、不溶性タウ上のリン酸化されたＡＤ特異的エピトープを認識する他の抗体の免疫反応性も低下した（

図２６Ｂおよび図２９）。さらに、その処置は、別のタウホスホエピトープ（これは、２つのホスホ残基Ｓｅｒ２０２／Ｔｈｒ２０５によって作り出され、ＡＤの病理のマーカーとして公知である）のレベルにも影響を与えた。そのワクチンは、非処置動物と比較して、免疫されたトランスジェニックラットにおいて、このエピトープの８０％減少を誘導した。同様に、リン酸化されたタウエピトープＴｈｒ２１７、Ｔｈｒ２３１およびＴｈｒ１８１のレベルは、それぞれ７２％（ｐ＜０．００１）、６４％および７４％（ｐ＜０．０１）低下した。これらの結果は、そのワクチンが、タウ凝集の阻害に関与する機序および／または病理学的タウ－タウ相互作用を起こしやすいタウ種を減少させる機序を誘導したことを示唆している。

【０４６０】

上記ラットを行動解析に供し、図３０は、梁歩行試験（図３０Ａ）、後肢スリップ試験（図３０Ｂ）およびｎｅｕｒｏｓｃａｌｅ解析（図３０Ｃ，＊ｐ，０．０５）において得られた結果を示している。タウペプチド配列番号２で処置されたラットの群では、梁歩行逃避潜時（ｂｅａｍ　ｗａｌｋｉｎｇ　ｅｓｃａｐｅ　ｌａｔｅｎｃｙ）の正の傾向が観察された（ｐ＝０．０９６）。その免疫は、横断梁試験において後肢のスリップ回数を減少させた；しかしながら、コントロール群と比較して、差は統計学的に有意でなかった（ｐ＝０．２５）。握力牽引力試験および神経学的検査とともに運動障害試験をＮｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアに要約した。図３０は、コントロール群と比べて、タウペプチド配列番号２で処置されたラットのＮｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアの統計学的に有意な改善を示している（＊ｐ＝０．０３６）。概して、タウペプチド配列番号２による免疫は、全体的な運動能力を改善した。神経行動学的レベルの改善は、コントロールと比べて、免疫された動物における不溶性タウ（ＡＤ鋳型タウ）の量の減少と相関した。これらの知見は、より低い不溶性タウレベルが、治療的な利点を有し得ることを示唆している。

【０４６１】

タウペプチド配列番号２による免疫療法の有効性を免疫組織化学的レベルにおいてさらに試験した（図３１）。この目的のために、リン酸化された可溶性タウと不溶性タウの両方を認識する２つの異なる抗タウ抗体を使用した（ＡＴ８、ＤＣ２１７）。これらのラット（ＳＨＲ７２）における神経原線維病理は、主に、脳幹および脊髄、ならびに部分的に小脳に局在する（データ示さず）。半定量的方法を用いてＮＦＴの数を測定した。３つの定量的レベルを割り当てた：１）神経原線維変化が無いまたはほとんど無い（脳幹において最大３つ）；２）中程度（主に脳幹の網様体における多くのＮＦＴ）；および３）重篤（脳幹の全領域における多くのＮＦＴ）。「広範」は、神経原線維の神経変性の中程度から重篤な段階を意味する。ペプチド配列番号２による免疫療法は、脳幹に広範なＮＦＴを有するトランスジェニックラットの数をほぼ６０％減少させた（図３１）。

【０４６２】

これらの結果は、タウペプチド配列番号２によるワクチン接種が、いくつかの望ましいワクチンの結果：１）生化学的レベルでの、免疫されたトランスジェニックラットの脳における不溶性タウの減少；２）行動レベルでの、免疫されたトランスジェニック（ｔｒａｎｇｅｎｉｃ）ラットにおける感覚運動障害の軽減；および３）免疫組織化学的レベルでの、神経原線維病変の数の減少を示すことを証明する。

【０４６３】

リン酸化Ｓｅｒ２６２を有する配列番号２タウ２５６－ＶＫＳＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳ－２８５。２６２位にリン酸化セリンを含む配列番号２をＫＬＨに結合体化した。

【０４６４】

ＤＣ２５抗体による、ラット脳サルコシル不溶性タウ画分の免疫ブロットは、そのワクチンが、アジュバントだけを投与されたコントロールトランスジェニックラットと比べて、免疫された動物において不溶性タウの総量を統計学的に有意に４６％減少させることを明らかにした（ｐ＜０．０１）（図３２および図２６Ｂ、ＤＣ２５ベースの測定（「３４７－３５３」データ）。同様に、ＤＣ２０９（ｐＴｈｒ２３１）、ＤＣ２１７（ｐＴｈｒ

２１７）、ＡＴ８（ｐＳｅｒ２０２、ｐＴｈｒ２０５）およびＡＴ２７０（ｐＴ１８１）のシグナルの定量は、コントロールと比べて、免疫された動物群においてより低いレベルの不溶性リン酸化タウを示した（図２６Ｂ）。しかしながら、ｐＴｈｒ２１７（ｐ＜０．００１；７３％）、ｐＴｈｒ２３１（８４％）、ｐＳｅｒ２０２／ｐＴｈｒ２０５（８２％）およびｐＴｈｒ１８１（ｐ＜０．０１；８２％）におけるリン酸化された不溶性タウのレベルの低下は、不溶性タウ全体において観察された低下よりも顕著だった。ＡＤタウのミスフォールディングカスケードに関わるホスホエピトープのレベルのこれらの変化は、処置の効果の有用な指標である。ＡＤに関連するタウエピトープの減少は、そのワクチンが、タウ凝集の阻害に関与する機序および／または内在性タウと病理学的な相互作用を起こしやすいタウのレベルを低下させる機序を活性化したことを示す。

【０４６５】

免疫組織化学的プロファイル（図３３）は、ホスホペプチド配列番号２による免疫療法が、脳幹に広範なＮＦＴを有するトランスジェニックラットの数を減少させたことを示す。コントロール非免疫群と比べて広範なＮＦＴを有するトランスジェニックラットの数の７８％の減少が、免疫された群において観察された。その免疫は、免疫された動物において脳タウ病理の発生を停止した。生化学的レベルにおいても解析されたＡＤに関連するエピトープに対して類似の効果が得られ、不溶性タウが減少した（図２６Ｂおよび３２）。

【０４６６】

これらの結果は、タウホスホペプチド配列番号２／ｐＳｅｒ２６２によるワクチン接種が、１）生化学的レベルでの、免疫されたトランスジェニックラットの脳における不溶性タウの減少；および２）免疫組織化学的レベルでの、神経原線維病変の数に対する正の処置効果を誘発したことを証明する。

【０４６７】

ｄ．配列番号３タウ２５９－ＫＩＧＳＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱ－２８８。トランスジェニックラット（ＳＨＲ７２系統）を、ミョウバンアジュバント（ＡｄｊｕＰｈｏｓ）とともに製剤化されたタウペプチド配列番号３で免疫した。

【０４６８】

図３４は、免疫療法が、アジュバントだけを投与されたコントロールラットと比べて、免疫されたラットにおいて不溶性タウを減少させることを証明している。不溶性タウレベルの低下は、解析されたすべてのタウエピトープについて（すなわち、３４７－３５３／ＤＣ２５抗体、ｐＴ２１７／ＤＣ２１７抗体、ｐＴ２３１／ＤＣ２０９抗体、ｐＳ２０２／ｐＴ２０５／ＡＴ８抗体およびｐＴ１８１／ＡＴ２７０抗体について）検出された。不溶性タウ全体のレベルは、ｐａｎ－タウ抗体ＤＣ２５を用いた免疫検出によって明らかにされたとき、４０％減少した。同様に、ワクチンは、図２６Ｂおよび図３４に示されるように、ｐＴ２１７においてリン酸化されたタウタンパク質の３０％減少を誘導した。処置は、非免疫ラットと比べて、免疫されたラットにおいて、Ｔｈｒ２３１（６３％）、Ｔｈｒ１８１（７４％）およびＳｅｒ２０２／Ｔｈｒ２０５（６１％）においてリン酸化された不溶性タウ型のレベルに対してより高い効果を有した（図２６Ｂおよび図３４）。これらの知見は、不溶性タウの減少が、病理をもたらすタウタンパク質のレベルをさらに変化させ得ること、およびゆえに、治療的有意性を有し得ることを示す。ＡＤに関連するタウエピトープの減少は、上記ワクチンが、タウ凝集の阻害に関与する機序および／または内在性タウとの病理学的な相互作用を起こしやすいタウのレベルを低下させる機序を活性化したことを示す。

【０４６９】

図３５Ａ～Ｃは、神経行動学的評価によって得られた結果を示している。ペプチド配列番号３で処置されたラットの群において、梁歩行逃避潜時の正の傾向が観察された；しかしながら、ペプチド処置ラットと非処置／コントロールラットとの間に統計学的に有意な差はなかった（図３５Ａ；ｐ＝０．２１）。同様に、処置は、非処置ラットと比べて、免疫されたラットの群において後肢のスリップ回数を減少させたが、この効果は、統計学的に有意でなかった（図３５Ｂ，ｐ＝０．１５）。総Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアによって

、非処置ラットと比べてタウペプチド配列番号３で処置されたラットにおいて神経行動学的改善が確かめられた（両方の場合においてｐ＝０．１１）。しかしながら、Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアの差は、統計学的に有意でなかった（ｐ＝０．１９）。タウペプチド配列番号３による免疫療法は、梁歩行試験ならびに後肢スリップ試験において、コントロールラットと比べて処置ラットのより良好な感覚運動協調性をもたらした；これらの結果は、Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアによって確かめられた。

【０４７０】

さらに、免疫組織化学的プロファイルは、ホスホペプチド配列番号３による免疫療法が、ワクチン処置動物の脳幹においてＮＦＴを５８％減少させることを明らかにした（図３６）。これらの結果は、ＤＣ８Ｅ８エピトープＮｏ．１を含む配列番号３による免疫が、ＮＦＴに構築された病理的ポリマーのタウを有意に減少させたことを示している。さらに、この正の処置効果は、不溶性の病理学的タウの統計学的に有意な減少によって表される、生化学的レベルでも示された。

【０４７１】

ｅ．配列番号４タウ２７５－ＶＱＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧ－３０４。タウペプチド配列番号４を、ＫＬＨに結合体化し、ミョウバンアジュバント（ＡｄｊｕＰｈｏｓ）とともに免疫のために使用した。

【０４７２】

図３７および図２６Ｂは、配列番号４による免疫療法が、アジュバントだけを投与されたコントロールラットと比べて、免疫されたラットにおける不溶性タウの量を減少させることを示している。そのデータは、不溶性タウのレベルの低下が、解析されたすべてのタウエピトープについて検出されたことを示す。不溶性タウ全体のレベルは、ｐａｎ－タウ抗体ＤＣ２５との免疫反応性によって明らかにされたとき、６３％減少した。同様に、そのワクチンは、図２６Ｂに示されるように、ｐＴｈｒ２１７（９２％）、Ｔｈｒ２３１（９５％）、Ｔｈｒ１８１（８７％）およびＳｅｒ２０２／Ｔｈｒ２０５（９５％）においてリン酸化されたタウタンパク質の減少を誘導した。不溶性タウのレベルがタウ病理の進行と相関することは以前に示されている（Ｚｉｌｋａら、２００６）。本結果は、配列番号９９の中に含まれる治療用タウエピトープに対する免疫療法が、不溶性タウのレベルを低下させ得ることおよびタウ病理の進行を遅くすることを示している。

【０４７３】

複合スコアであるＮｅｕｒｏｓｃａｌｅでの神経学的検査と組み合わされた標準的な運動試験のセットによって、複合運動障害を測定した。この免疫療法の効果を測定する目的で、６．５ヶ月齢において、タウペプチド配列番号４で処置されたトランスジェニックラットＳＨＲ７２を行動試験に供した。タウペプチド免疫原配列番号４で処置されたラットは、梁歩行試験において、アジュバントだけを投与されたトランスジェニックラット（コントロール）と比べて逃避潜時の短縮を示した（図３８Ａ）。同様に、後肢のスリップ回数の正の結果が、トランスジェニック処置コントロールと比較してワクチン接種群において観察された（図３８Ｂ）。梁歩行試験、握力牽引力試験および神経学的検査（基本的な反射、後肢逃避伸展反射）において得られたデータから、総Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアを計算した。その免疫は、コントロール処置群と比べて、ペプチド配列番号４で処置されたラットのＮｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアを改善した（図３８Ｃ）。総Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアは、非処置トランスジェニックラットと比べて、処置されたトランスジェニックラットの神経行動学的改善を確証させた。

【０４７４】

タウペプチド配列番号４による免疫療法の有効性を、免疫組織化学的レベルにおいてさらに試験した（図３９）。神経原線維変化（ＮＦＴ）を、ワクチンで処置されたおよびアジュバントで処置された（コントロール）ＳＨＲ７２ラットの脳幹における病理学的タウ上のリン酸化エピトープを認識する抗タウ抗体ＡＴ８およびＤＣ２１７を使用して解析した。アジュバントのみを投与された動物由来の脳組織は、脳幹の全領域に、主に脳幹の網様体に、ＡＴ８陽性およびＤＣ２１７陽性のＮＦＴを含んだ。免疫組織化学的解析は、ワ

クチンで処置されたトランスジェニックラットＳＨＲ７２における神経原線維病理の６６％減少を示した（図３９）。

【０４７５】

トランスジェニックラット系統ＳＨＲ７２の脳幹における不溶性タウレベルの変化は、処置効果の高感度の指標である。総不溶性タウレベルならびにリン酸化タウレベル（病理学的な単量体、二量体、オリゴマーおよびポリマー）は両方とも、タウペプチド配列番号４での処置によって、脳幹において効果的に減少した（６３～９５％減少；図２６Ｂ）。測定された不溶性タウレベルの低下は、免疫組織化学的解析から得られた結果と生化学的に相関した。この解析は、ワクチンを注射されたトランスジェニックラットの脳幹における神経原線維病理の６０％超の減少を示した（図３８）。配列番号４による免疫からのデータは、ＤＣ８Ｅ８エピトープＮｏ．２を含むこのペプチドの処置の能力を示す。

【０４７６】

ｆ．２１７位にリン酸化トレオニンを有する配列番号５タウ２０１－ＧＳＰＧＴＰＧＳＲＳＲＴＰＳＬＰＴＰＰＴＲＥＰＫＫＶＡＶＶＲ－２３０。トレオニン２１７の位置においてリン酸化されたタウペプチド配列番号５を、ミョウバンアジュバント（ＡｄｊｕＰｈｏｓ）を使用してＳＨＲ７２トランスジェニックラットに投与した。

【０４７７】

免疫ブロット解析は、ホスホペプチド配列番号５による免疫が、アジュバントだけを投与されたコントロールＴｇラットと比べて、総不溶性タウ（ＤＣ２５抗体で検出される）の量に影響しないことを示した（図４０および図２６Ｂ）。しかしながら、抗体ＤＣ２０９およびＡＴ２７０を用いた解析は、不溶性タウ画分中のホスホ－タウｐＴｈｒ２３１およびｐＴｈｒ１８１のレベルの約３０％減少を明らかにした（図２６Ｂ）。他方で、処置は、コントロールトランスジェニックラットと比べて、トレオニン２１７においてリン酸化された不溶性タウ（１１％増加）およびホスホ部位（ｐｈｏｓｐｈｏｓｉｔｅｓ）Ｓｅｒ２０２／Ｔｈｒ２０５を有するタウ（３１％増加）の中程度の増加を誘導した。この知見は、評価されているＡＤに関連するマーカーに対する、ホスホペプチド配列番号５による免疫のあいまいなまたは中立のワクチン効果を示唆し得る（そのペプチドは、治療用エピトープとして上（実施例１から１１）で同定されたタウ凝集エピトープ＃１から＃４のいずれも含まない）。

【０４７８】

リン酸化されたタウペプチド配列番号５で処置されたラットの神経行動学的解析は、コントロール群と比べて、梁歩行試験での処置群における神経行動学的機能（図４１Ａ，ｐ＝０．１９）または後肢のスリップ回数（図４１Ｂ）に有意な改善がないことを示した。総ＮｅｕｒｏＳｃａｌｅスコア（図４１Ｃ）は、ｍｏｃｋで免疫されたラットと比べて、処置ラットの神経行動学的改善を確証させなかった（ｐ＝０．２８）。

【０４７９】

タウホスホペプチド配列番号５による免疫療法は、免疫組織化学的検査によってコントロールトランスジェニックラットと比べたとき、脳幹に広範なＮＦＴを有するトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２）の数を減少させなかった（図４２）。

【０４８０】

これらの結果は、タウペプチド配列番号５　ｐＴ２１７（すべての治療用エピトープ（配列番号９８～１０１）を欠く）によるワクチン接種が、神経行動学的機能を統計学的に有意に改善しないこと、および免疫組織化学的レベルにおいて神経原線維病変の数をわずかおよそ１１％しか減少させないことを示している。ＤＣ２５抗体によって評価したとき、不溶性タウの減少に関しては、生化学的レベルに対する効果は観察されなかった。

【０４８１】

ｇ．３９６位および４０４位にリン酸化セリン残基を有する配列番号６タウ３７９－ＲＥＮＡＫＡＫＴＤＨＧＡＥＩＶＹＫＳＰＶＶＳＧＤＴＳＰＲＨＬ－４０８。３９６位および４０４の位置においてリン酸化されたタウペプチドを、ミョウバンアジュバント（ＡｄｊｕＰｈｏｓ）を使用してＳＨＲ７２に投与した。配列番号６／ｐＳ３９６／ｐＳ４０４

は、配列番号９８～１０１によって表される治療用エピトープのいずれも欠くが、ＡＤ脳タウタンパク質において大きな比率を占めるホスホエピトープを含む（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇら、１９９２；Ｏｔｖｏｓら、１９９４）。

【０４８２】

ペプチド配列番号１～４を用いて観察されたサルコシル不溶性タウの量の減少とは対照的に、リン酸化されたペプチド配列番号６による免疫は、アジュバントだけを投与されたコントロールラットと比べて、免疫されたラットにおいて不溶性タウの量を増加させた。免疫ブロット解析は、不溶性ホスホ－タウレベルの全体的な増加の傾向を明らかにした（図４３および図２６Ｂ）。免疫は、ｐａｎ－タウｍＡｂ　ＤＣ２５によって明らかにされたように、不溶性タウ画分中の総タウレベルを増加させた。タウエピトープｐＴ２１７（３３％増加）、Ｔｈｒ２３１（４４％増加）およびＴｈｒ１８１（７％増加）においても増加が観察された。しかしながら、ＡＤに関連するエピトープｐＳ２０２／ｐＴ２０５は、例外だった（図２６Ｂ）。このホスホエピトープを有するタウタンパク質のレベルは、コントロールラットと比べて１９％減少した。複数の疾患に関連する病理学的不溶性タウタンパク質のレベルの上昇は、上記ラットに対するこのワクチンの望ましくない負の効果を示唆する。

【０４８３】

タウペプチド配列番号６／ｐＳ３９６／ｐＳ４０４で処置されたラットおよびコントロールの神経行動学的反応を評価した（図４４Ａ、ＢおよびＣ）。免疫療法は、梁歩行逃避潜時（ｐ＝０．８２）または後肢のスリップ回数（ｐ＝０．７５）において、処置ラットとコントロールラットとの間に統計学的有意差を示さなかった。これらの結果を、Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアによって確かめたところ（ｐ＝０．９６）、免疫されたラットとコントロールラットとの間に全体的な神経行動学的能力に統計学的有意差は観察されなかった。したがって、ペプチド配列番号６／ｐＳ３９６／ｐＳ４０４による処置は、梁歩行試験逃避潜時、後肢のスリップ回数（ｎｕｍｂｅｒ　ｏｒ　ｈｉｎｄ－ｌｉｍｂ　ｓｌｉｐｓ）、または試験されたラットの全体的な運動能力に対して統計学的に有意な影響を有しなかった。

【０４８４】

図４５は、ＡＴ８を用いた免疫組織化学によって評価したときの、広範なタウ病理を有するトランスジェニックラットのパーセンテージを示している。タウペプチド配列番号６／ｐＳ３９６／ｐＳ４０４による免疫療法は、コントロール群と比べて濃縮体の量を９％増加させた。したがって、免疫組織化学的レベルでの配列番号６／ｐＳ３９６／ｐＳ４０４の負の効果が、生化学的レベルおよび神経行動学的レベルにおいて確かめられた。

【０４８５】

これらの結果は、タウホスホペプチド配列番号６／ｐＳ３９６／ｐＳ４０４（配列番号９８～１０１に表されている治療用タウエピトープのいずれも有しない）によるワクチン接種が、１）免疫されたラットの脳における不溶性タウに対して治療効果が無いこと；２）行動レベルにおいて効果が無いこと；および３）濃縮体の量の減少が無く、むしろ９％増加することを示すことを証明する。ゆえに、ＡＤ特異的であると報告されている（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇら、１９９２；Ｏｔｖｏｓら、１９９４）このホスホエピトープは、治療効果を誘導しなかった。

【０４８６】

ｈ．２０２位にリン酸化セリン残基および２０５位にリン酸化トレオニン残基を有する配列番号７タウ１８１－ＴＰＰＳＳＧＥＰＰＫＳＧＤＲＳＧＹＳＳＰＧＳＰＧＴＰＧＳＲＳ－２１０。得られたタウペプチド配列番号７／ｐＳ２０２／ｐＴ２０５は、配列番号９８～１０１に表されている治療用エピトープのいずれも有しない。そのホスホペプチドをＫＬＨに結合体化し、フロイントアジュバント中においてトランスジェニックラット（ＳＨＲ７２系統）に投与した。

【０４８７】

免疫ブロットによる脳幹におけるタウ免疫反応性の定量的解析は、いかなる治療効果も

示さなかった（図４６）。総タウのレベル（ＤＣ２５エピトープ、６％増加）、ならびに疾患に関連するタウエピトープｐＴ２１７（３％増加）、Ｔｈｒ２３１（１１％増加）およびＴｈｒ１８１（７％増加）上でリン酸化されたタウタンパク質のレベルは、コントロールと比べて、免疫されたラットにおいてわずかに増加した（図４６および２６Ｂ）。免疫は、Ｓｅｒ２０２／Ｔｈｒ２０５においてリン酸化された不溶性タウタンパク質のより大きな増加を誘導した（４１％増加）。

【０４８８】

リン酸化されたペプチド配列番号７による免疫療法は、ラットの感覚運動機能に有意に影響しなかった（図４７）。免疫されたラットは、コントロールと比べて、神経行動学的パラメータの明らかな改善を示した。しかしながら、処置ラットとコントロールとの間で、梁歩行逃避潜時（ｐ＝０．４７、図４７Ａ）ならびに後肢のスリップ回数（ｐ＝０．５４、図４７Ｂ）およびＮｅｕｒｏＳｃａｌｅスコア（ｐ＝０．３、図４７Ｃ）に統計学的有意差が観察されなかったので、それらの群は、統計学的に異ならなかった。

【０４８９】

ペプチド配列番号７は、いずれのＤＣ８Ｅ８エピトープも含まないリン酸化タウエピトープを有する。処置されたＳＨＲ７２ラットの脳幹の検査は、タウペプチド配列番号７による免疫療法が、神経原線維変化の量を減少させることができないことを明らかにした（図４８）。ワクチン接種された動物由来およびコントロール動物由来の脳組織は、脳幹の全領域、主に、網様体に、ほぼ同一の数のＡＴ８およびＤＣ２１７陽性のＮＦＴを含んだ。ＤＣ８Ｅ８エピトープを有しない配列番号７を含むワクチンは、処置動物においていかなる有益な効果も示さなかった。

【０４９０】

これらの結果は、タウホスホペプチド配列番号７／ｐＳ２０２／ｐＴ２０５によるワクチン接種が、１）生化学的レベルでは、免疫されたラットの脳における不溶性タウのレベルを変化させないこと；および２）行動レベルでは効果をもたらないことを証明する。このホスホペプチドは、ｐＳ２０２／ｐＴｈｒ２０５によって表されるホスホ部位が、病理学的タウタンパク質を排除する免疫反応および／またはラットの神経行動学的状態に正に影響する免疫反応を誘発するのに十分でないというさらなる証拠を提供する。対照的に、治療用タウエピトープ（配列番号９８～１０１）は、この効果を達成する。

【０４９１】

ｉ．配列番号８タウ３００－ＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶＤＬＳＫ－３１７。より短いタウペプチド（４つのタウ「治療用エピトープ」のうちの１つが存在し得る完全なタウ６－ｍｅｒもリン酸化エピトープも有しないので、コントロールとして使用された）による免疫療法を、脳における病理学的不溶性タウおよび神経原線維の沈着物のレベルに影響する能力を測定するために、行った。ｐａｎ－タウｍＡｂ　ＤＣ２５によって検出される総不溶性タウのレベルは、アジュバントだけを投与されたコントロールと比べて、免疫されたラットにおいて有意に上昇した（８２％）（図４９および図２６Ｂ）。同様に、免疫療法は、Ｔ２３１においてリン酸化された不溶性タウのレベルの増加（６０％）およびＴ１８１の位置においてリン酸化された不溶性タウのより小さい増加（１０％）を誘導した。異なる抗体セットであるＤＣ２１７（ｐＴ２１７）およびＡＴ８（ｐＳ２０２／ｐＴ２０５）を用いた定量的解析は、不溶性タウにおけるこれらのエピトープに対していかなる効果も明らかにしなかった（図２６Ｂ）。

【０４９２】

動物を行動解析に供した（図５０Ａ、Ｂ、Ｃ）。ペプチド配列番号８で処置されたラットは、コントロールと比べて、梁歩行試験における逃避潜時に統計学的有意差を示さなかった（ｐ＝０．６）。後肢のスリップ回数の差も、コントロールと比べて統計学的に有意でなかった（ｐ＝０．４９）。同様に、ＮｅｕｒｏＳｃａｌｅスコアに統計学的有意差はなかった（ｐ＝０．９）。したがって、ペプチド配列番号８の投与は、ラットの運動能力に統計学的に有意に影響しなかった。

【０４９３】

これらの結果は、タウペプチド配列番号８（上記治療用エピトープ（配列番号９８～１０１の中）のすべてを有しない）によるワクチン接種が、１）生化学的レベルにおいて、免疫されたラットの脳における不溶性タウに変化をもたらさなかったこと；および２）神経行動学的レベルにおいて効果をもたらさなかったことを証明する。

【０４９４】

処置動物およびｍｏｃｋコントロール動物（アジュバントのみを投与された）の脳幹におけるＮＦＴの量に対するペプチドワクチンの効果を、免疫組織化学的検査（ｉｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）によって評価した。その結果は、タウペプチド配列番号８による免疫療法が、神経原線維変化の量を減少させないことを示した（図５１）。処置動物およびｍｏｃｋコントロール動物は、ＡＴ８およびＤＣ２１７染色によって明らかにされるとき、脳幹の全領域、主に、脳幹の網様体においてほぼ同一の数の神経変性の変化をもたらした。

【０４９５】

配列番号８（いかなる完全な治療用エピトープ（配列番号９８～１０１）も含まない）によるワクチン接種は、処置動物においていかなる有益な効果も示さなかった。したがって、ペプチド配列番号５～８による免疫の結果は、少なくとも１つの完全な治療用エピトープ（配列番号９８～１０１の中に位置する）の存在が、ワクチンの所望の正の効果（タウ病理の減少および少なくとも１つの神経行動学的パラメータの改善）のために必要であることを示す。

【０４９６】

ｊ．配列番号１０８タウ２９４－ＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ－３０５。ミョウバンアジュバントとともに製剤化され、動物１匹あたり１００μｇの用量で投与される、キャリアＫＬＨに結合体化されたタウペプチド配列番号１０８でＳＨＲ７２ラットを免疫した。

【０４９７】

トランスジェニックラットＳＨＲ７２にタウペプチド配列番号１０８をワクチン接種することにより、不溶性の病理学的タウが統計学的に有意に減少した（ｐ＜０．００１）。ＳＨＲ７２におけるアルツハイマー病の病理は、病理学的不溶性タウ型（病理学的タウの単量体、二量体、オリゴマーおよびポリマーによって表される）によって引き起こされるので、１２－ｍｅｒの受動ワクチン配列番号１０８による処置の不溶性タウレベルに対する影響を解析した。それぞれの免疫原で免疫したトランスジェニック動物およびアジュバントだけで免疫したコントロール群の脳幹を、サルコシル不溶性の病理学的タウの抽出のために使用した（上に記載されたように）。タウペプチド配列番号１０８で免疫されたトランスジェニックラットの群およびコントロール群からの定量的免疫ブロット解析の結果を図５２および２６Ｂに示す。ワクチン接種は、アジュバントだけを投与されたコントロールトランスジェニックラットと比べて、免疫された動物において病理学的不溶性タウを統計学的に有意に減少させた（図５２）。この減少は、解析されたすべてのＡＤに関連するタウエピトープにおいて観察された。タウペプチド配列番号１０８による免疫は、ｐａｎ－タウモノクローナル抗体ＤＣ２５を用いた測定によって明らかにされた、不溶性の病理学的タウの有意な減少を誘導した（ｐ＜０．００１；７０％）（図５２）。さらに、ホスホ依存性ｍＡｂ　ＤＣ２１７（ｐＴｈｒ２１７）およびＡＴ８（ｐＳｅｒ２０２／ｐＴｈｒ２０５）を用いた解析は、コントロールと比べて、免疫されたラットの不溶性タウにおけるＴｈｒ２１７（ｐ＜０．００１；９６％）およびＳｅｒ２０２／ｐＴｈｒ２０５（ｐ＜０．０５；９８％）においてリン酸化された病理学的タウ種のレベルの有意な低下を明らかにした（図５２）。統計学的に有意な低下は、ｐＴｈｒ２３１（ｐ＜０．０５；９７％）およびｐＴｈｒ１８１（ｐ＜０．０５；９４％）を有する不溶性の病理学的タウのレベルにおいても観察された。これらの結果は、このワクチンによって誘導される免疫応答が、初期の形態の病理学的タウ（単量体、二量体、オリゴマーによって代表される）および後期の形態の病理学的タウポリマー（ＰＨＦによって代表される）の統計学的に有意な減少をもたらすことを示している。

【０４９８】

タウペプチド配列番号１０８によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種は、神経行動学的パラメータを統計学的に有意に改善した（ｐ＜０．０５）。複合スコアであるＮｅｕｒｏｓｃａｌｅでの神経学的検査と組み合わされた標準的な運動試験のセットによって、運動障害を測定した。免疫療法の効果を測定する目的で、６．５ヶ月齢において、タウペプチド配列番号１０８で処置されたトランスジェニックラットＳＨＲ７２を行動試験に供した。タウペプチド免疫原配列番号１０８で処置されたラットは、梁歩行試験において、アジュバントだけを投与されたトランスジェニックラット（コントロール）と比べて逃避潜時の有意な短縮を示した（＊ｐ＝０．０４）（図５３）。同様に、後肢のスリップ回数の正の傾向が、トランスジェニック処置コントロールと比較してワクチン接種群において観察され、この差は有意だった（＊ｐ＝０．０４５、図５３）。梁歩行試験、握力牽引力試験および神経学的検査（基本的な反射、後肢逃避伸展反射）において得られたデータから、総Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアを計算した。その免疫は、コントロール処置群と比べて、ペプチド配列番号１０８で処置されたラットのＮｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアを有意に改善した（＊ｐ＝０．０４７）（図５３Ｃ）。総Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアは、非処置トランスジェニックラットと比べて、処置されたトランスジェニックラットの神経行動学的改善を確証させた。すべての統計データは、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーＵ検定を用いて得られた。

【０４９９】

神経行動学的パラメータは、処置されたトランスジェニック動物の脳幹における不溶性の病理学的タウレベルと相関した。ワクチンペプチド配列番号１０８で処置された動物は、コントロール処置動物と比較して、より短い逃避潜時およびより少ない後肢のスリップ回数に関連する、低レベルの不溶性の病理学的タウを示した。これらの知見は、不溶性の病理学的タウの減少が、１２－ｍｅｒペプチド（配列番号１０８）ワクチンで免疫されたトランスジェニック動物の群において、神経行動学的障害の統計学的に有意な改善をもたらすことを示し、その治療的な価値を示す。

【０５００】

タウペプチド配列番号１０８によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種は、神経原線維変化（ＮＦＴ）の量を６０％減少させた。脳幹における神経原線維のタウ病理（神経原線維変化，ＮＦＴ）の免疫組織化学的解析は、ワクチンで処置されたＳＨＲ７２ラットにおいて達成されたＮＦＴの減少を示した（図５４）。脳幹に広範なＮＦＴを有する免疫されたトランスジェニックラットの数は、アジュバントで処置された動物と比べて、６０％超減少した。その免疫は、配列番号１０８ペプチドワクチンで免疫されたトランスジェニック動物の脳におけるタウ病理（病理学的タウポリマー，ＰＨＦ）を減少させた。

【０５０１】

上記の結果は、タウペプチド配列番号１０８による免疫療法が、ＳＨＲ７２ラットにおいてタウ病理を効果的に減少させたことを示している。ワクチン接種が、免疫された動物の脳における不溶性の病理学的タウのレベルを統計学的に有意に減少させ、ならびに神経原線維変化の量（ＰＨＦ）を減少させた。病理学的タウタンパク質の量の減少は、処置されたトランスジェニックラットの神経行動学的パラメータの統計学的に有意な改善をもたらした。したがって、タウペプチド配列番号１０８の投与は、ＡＤを処置するための能力を有する。

【０５０２】

実施例２１：ＡＤ治療ペプチドによる免疫療法は、免疫原性であり、トランスジェニックラットにおいて疾患タウ特異的抗体の産生を誘導する

ａ．タウペプチドワクチンを５回投与した後、処置ラットにおけるそのペプチドの免疫原性の解析を行った。免疫されたラット由来の血清を抗体価の測定のために使用した。アジュバントだけで免疫されたラット由来の血清をコントロールとして使用した。特異的な抗タウ抗体の力価を、実施例１９に記載されたようにＥＬＩＳＡによって測定した。各血清の段階希釈物を、予めマイクロタイターウェルプレート上にコーティングしておいたＡ

Ｄタウ Δ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよび組換え完全長タウ２Ｎ４Ｒに対して試験した。アッセイされた免疫原は、特異的な抗タウ抗体の産生を誘導した。

【０５０３】

例えば、２７５－ＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号４）による免疫の後、抗タウ特異的抗体が産生された。タウペプチド配列番号４によって誘導された抗体は、タウ２Ｎ４Ｒよりも誤無秩序タウ Δ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対しておよそ３倍高い結合活性を示した（図５５；１：３，２００希釈）。これらの結果はさらに、このワクチンが、アルツハイマー病における病理学的タウタンパク質を認識するおよび排除する／中和する治療的可能性を有する抗体を誘導したことを示唆する。

【０５０４】

また、タウペプチド配列番号１０８によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種は、生理学的タウにまさって病理学的タウタンパク質に優先的に結合する抗体の形成を誘導した。ワクチンを５回投与した後、ワクチン接種された各ラットにおいて免疫原性の解析を行った。最後の追加免疫の投与の２週間後に動物から採血し、回収された血清を幾何平均抗体価（ＧＭＴ）の測定のために使用した。特異的な抗タウ抗体の力価を、実施例１９に記載されたようにＥＬＩＳＡによって測定した。各血清の段階希釈物（１：１００から１：５１，２００）を、固相として使用される病理学的タウ Δ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよび生理学的タウ２Ｎ４Ｒに対して試験した。力価は、最大光学濃度（吸光度）の半分をもたらす血清の希釈度の逆数と定義された。幾何平均抗体価を計算するために、１００より小さい力価の読取値を、１０という値として割り当てた。図５６に示されるように、病理学的タウ Δ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対する抗体価（ＧＭＴ１２８００）は、完全長タウ２Ｎ４Ｒに対する抗体価（ＧＭＴ４２００）よりも３倍高かった。抗体価は、実施例１９に記載された同じ方法を使用して、非結合体化ペプチド配列番号１０８に対しても測定された。図５６は、タウペプチド配列番号１０８に対して最も高い抗体価（ＧＭＴ２０８００）がもたらされたことを示している。アジュバントのみで免疫されたトランスジェニックラットでは抗体応答は観察されなかった（ＧＭＴ１０；データ示さず）。ＤＣ８Ｅ８エピトープＮｏ．２（配列番号９９の中）を有するペプチド配列番号１０８のワクチン接種は、病理学的タウタンパク質を優先的に認識するがゆえに病理学的タウ Δ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）と生理学的タウ２Ｎ４Ｒとを区別する抗体を誘導した。さらに、結果は、配列番号１０８が、免疫原性であり、ゆえに、アルツハイマー病における病理学的タウタンパク質を排除する治療的可能性を有することを示した。

【０５０５】

さらに、タウペプチド配列番号１０８によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種が、病理学的タウに特異的なＩｇＧ抗体アイソタイプの形成を優先的に誘導した。ペプチド配列番号１０８に応答して産生される抗体の特異的なアイソタイプを判定するために、免疫群およびコントロール群のラット由来の血清を、１：１００から１：１２，８００まで段階希釈し、病理学的なタウ Δ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対するＥＬＩＳＡ（実施例１９に記載されたように）によって２つ組で試験した。ラットＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ２ｃおよびＩｇＭアイソタイプを検出するために、抗ラットサブクラス特異的ＨＲＰ結合体化二次抗体を、ＰＢＳにおいて１：５，０００希釈した（Ｐｉｅｒｃｅ，抗ＩｇＧ１－ＰＡ１－８４７０８、抗ＩｇＧ２ａ－ＰＡ１－８４７０９、抗ＩｇＧ２ｂ－ＰＡ１－８４７１０、抗ＩｇＧ２ｃ－ＰＡ１－８４７１１および抗ＩｇＭ－ＰＡ１－８４７１２）。図５７は、代表的な１：８００希釈に対する結果を示している。データは、ＫＬＨに結合体化されたペプチド配列番号１０８が、広範囲の抗タウ抗体アイソタイプを誘導したことを証明する。そのワクチンは、高レベルの抗体アイソタイプ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂおよびＩｇＧ２ｃ）（これらは高親和性抗体であると考えられている）を産生させた。対照的に、アイソタイププロファイルは、非常に低いレベルのＩｇＭ抗体を示した。これらは、抗原に対して低い親和性を有すると

考えられる。病理学的タウに対して優先的な親和性を有する高力価のＩｇＧ抗体の存在は、ワクチンによって誘導される免疫応答が病理学的タウ種に特異的であることを示唆した。ｍｏｃｋで免疫された（アジュバント単独を投与された）ラットから得られたコントロール血清は、陰性だった。

【０５０６】

これらのデータを、免疫応答の偏り（Ｔｈ１／Ｔｈ２表現型）の測定のためにさらに使用した。免疫によって誘導されるＩｇＧ１およびＩｇＧ２ａアイソタイプのレベルは、Ｔｈ２サイトカインと比べてＴｈ１サイトカインの免疫応答への寄与を間接的に示唆する。一般に、ＩｇＧ１抗体の産生は、Ｔｈ２サイトカインによって誘導され、ＩｇＧ２ａ抗体の産生は、Ｔｈ１サイトカインによって誘導される。ゆえに、ＩｇＧ１アイソタイプとＩｇＧ２ａアイソタイプとの比を、ＩｇＧ１に対するＯＤ値をＩｇＧ２ａに対するＯＤ値で除算することによって計算した。これらのデータは、免疫応答がＴｈ１表現型にわずか転じたこと示唆する（上記比＝０．６２５）。

【０５０７】

ｂ．表面プラズモン共鳴を使用した結合事象のリアルタイムモニタリングによって、タウペプチド２７５－ＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧ－３０４（配列番号４）で免疫されたラットのプールされた血清由来の抗体の会合（k_{ON}）および解離（k_{OFF}）の動態速度の測定が可能だった。その解析は、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒの認識と生理学的タウアイソフォーム２Ｎ４Ｒの認識との違いを示した（図５８）。免疫によって誘導された抗体は、対応する完全長アイソフォーム２Ｎ４Ｒに対する親和性と比べて、切断型ＡＤタウに対して３倍高い親和性でこのタウタンパク質に結合するタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して優先的な親和性を示した。この結合の差は、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対するおよそ５倍大きいk_{ON}速度に部分的に起因すると判定された（データ示さず）。

【０５０８】

ｃ．治療用タウペプチドで免疫されたラットにおいて誘導された抗体の特異性をさらに測定するために、ヒトＡＤ脳由来の海馬の凍結切片の免疫組織化学的染色のために抗血清を使用することができる。例えば、配列番号４による免疫の後に誘導された抗体をこのアッセイによって評価した。ヒトＡＤ脳由来の海馬を、４℃において２日間、４％パラホルムアルデヒドで固定した後、凍結保護を提供するために２５％スクロースで７２時間処理した。次いで、その材料を冷２－メチルブタン（－４２℃）中で３０秒間凍結し、クライオミクロトームにおいて薄片に切断した。冠状切片（４０μｍ）をクライオスタットにおいて－１８℃で切断した。免疫組織化学的研究のために浮遊切片を使用した。浮遊組織切片を室温（２５℃）において冷（＋４℃）９９％ギ酸で１分間処理した。脳切片を室温において、０．３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００および１％H_2O_2を含む０．０１ＭのＰＢＳ，ｐＨ７．４中で２０分間インキュベートした後、ブロッキング溶液（０．３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、１％ウマ血清を含む０．０１Ｍ　ＰＢＳ）中で３０分間インキュベーションし、その後、ペプチド配列番号４を含むワクチンで免疫されたトランスジェニックラット由来の血清（１：１０００希釈されたもの）とともに４℃において一晩インキュベーションした。洗浄した後、切片を、標準的なアビジンビオチンペルオキシダーゼ法（ＡＢＣ　Ｅｌｉｔｅ，Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）を使用して免疫染色した。反応産物を、アビジン－ビオチンおよび色素原としてＶｅｃｔｏｒ　ＶＩＰ（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用して可視化した。次いで、切片をＯｌｙｍｐｕｓ　ＢＸ５１顕微鏡で検鏡した。免疫組織化学的染色は、ペプチド配列番号４による免疫によって誘導された抗体が、アルツハイマー病脳の海馬において、病理学的タウ構造、すなわち、神経原線維病変を特異的に認識することを示した（図５９Ａ、Ｂ）。アジュバントだけを投与されたコントロールラット由来の血清をネガティブコントロールとして使用したところ、それは、いかなる神経細胞の病理も認識しなかった（データ示さず）。

【０５０９】

タウペプチド配列番号１０８によるトランスジェニックラットＳＨＲ７２のワクチン接種は、ヒトアルツハイマー病脳組織由来の切片において病理学的タウタンパク質を認識する抗体を誘導した。治療用タウペプチド配列番号１０８で免疫されたラットにおいて誘導された抗体の特異性をさらに判定するために、それらの血清を、ヒトＡＤ脳（Ｂｒａａｋステージ ＶＩ）の凍結切片を使用する嗅内皮質の免疫組織化学的染色のために使用した。浮遊組織切片を、免疫されたトランスジェニックラット由来の血清（１：１０００希釈されたもの）とともに４℃においてインキュベートした。配列番号１０８でワクチン接種された動物由来の個々の血清を別々に使用したが、アジュバントのみでワクチン接種された動物由来の血清は、プールした。標準的なアビジン－ビオチンペルオキシダーゼ法（ＡＢＣ Ｅｌｉｔｅ，Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）を使用して免疫染色した後、切片をＯｌｙｍｐｕｓ ＢＸ５１顕微鏡で検鏡した。免疫組織化学的染色は、ペプチド配列番号１０８での免疫によって誘導された抗体が、アルツハイマー病脳の嗅内皮質において病理学的タウ構造、すなわち、神経原線維病変を特異的に認識することを示した。図６０（Ａ～Ｅ）は、ワクチン接種された５匹のトランスジェニックラットＳＨＲ７２から回収されたラット血清による代表的な免疫染色を示している。配列番号１０８でワクチン接種された動物の血清は、神経原線維病理を非常に強くデコレートした（ｄｅｃｏｒａｔｅｄ）ことから、その抗体が病理学的タウタンパク質を効率的に標的化することが確かめられた。アジュバントだけを投与されたコントロールラット由来の血清をネガティブコントロールとして使用した。それらは、いかなる神経原線維病理も認識しなかった（図６０Ｆ）。

【０５１０】

配列番号１０８ワクチンによって誘導された抗体は、ＳＨＲ７２の脳およびヒトＡＤ脳から抽出された病理学的タウタンパク質を認識する。タウペプチド配列番号１０８で免疫されたラット由来の血清の特異性を、免疫ブロット法を使用して、可溶性および不溶性の病理学的タウの病理学的形態についてさらに調べた（実施例１９に記載されたように）。その病理の後期におけるＳＨＲ７２ラットの脳幹を可溶性不溶性の病理学的タウタンパク質の抽出のために使用した。ヒトＡＤ脳（ＢｒａａｋステージＶＩ；Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ Ｂｒａｉｎ Ｂａｎｋ，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓから入手したもの）の側頭皮質をヒト病理学的ＡＤタウの抽出のために使用した。可溶性および不溶性の病理学的タウタンパク質を、実施例８に記載された方法と同じ方法を使用して調製した。可溶性タウ画分の場合、１レーンあたり１５μｇの総タンパク質を充填した。不溶性タウ画分の場合、ペレットを、不溶性タウ画分の調製のために使用された可溶性画分の１／５０体積の１×ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）サンプルローディング緩衝液（Ｌａｅｍｍｌｉ，１９７０）に溶解し、等体積をＳＤＳ－ＰＡＧＥに充填した。免疫された動物由来のプールされた血清をＰＢＳにおいて１：１０００希釈し、１次抗体として使用した。１次抗体とのインキュベーションの後、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化されたポリクローナルウサギ抗ラット免疫グロブリン（１：３０００；Ｄａｋｏ，Ｇｌｏｓｔｒｕｐ，Ｄｅｎｍａｒｋ）とインキュベーションした。ウエスタンブロットシグナルを、ＬＡＳ３０００ ＣＣＤイメージングシステム（Ｆｕｊｉｆｉｌｍ，Ｊａｐａｎ）を用いてデジタル化した。この免疫ブロット解析の結果を図６１に示す。

【０５１１】

結果（図６１）は、ＤＣ８Ｅ８エピトープ２（配列番号９９）を有するペプチドに対して産生された抗体が、ＳＨＲ７２およびＡＤ脳組織から抽出された病理学的タウタンパク質を認識することを示している。誘導された抗体は、単量体型の病理学的タウ（レーンＮｏ．１、２およびＮｏ．３）、ならびにＡＤに特徴的なＡ６８タウトリプレットを含むオリゴマー型の病理学的タウ（レーンＮｏ．２およびＮｏ．３）を認識した。これらの知見は、アルツハイマー病のこのラットモデルを使用する免疫療法に対して重要な影響を有する。ワクチンによって産生された高親和性抗体は、すべての形態の病理学的タウタンパク質を標的化する。それらは、単量体型の病理学的タウタンパク質を標的化するので、病理学的タウ－タウ相互作用（オリゴマー化）を妨げ、ワクチン接種されたラットにおいて不

溶性タウレベルを低下させ、その結果として、神経行動学的パラメータを改善する。産生された抗体は、オリゴマー型の病理学的タウにも結合し、ｍＡｂ　ＤＣ８Ｅ８について実施例１０に記載されたように、それらを分解、例えば、ミクログリアによる分解に標的化する。

【０５１２】

実施例２２：ＡＤ治療用ペプチドによる免疫療法は、マウスにおいて疾患タウ特異的抗体の産生を誘導する

配列番号１００または１０１のいずれかの中に上記治療用エピトープのうちの１つを有する、ペプチド配列番号１０９、配列番号１１０（配列番号８８は配列番号１１０＋結合体化のためのさらなるＮ末端Ｃｙｓに対応する）、配列番号１１１および配列番号１１２は、免疫されたマウスにおいて抗体の産生を誘導した。得られた抗体は、生理学的タウ２Ｎ４Ｒよりも病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して統計学的に有意に高い結合活性を示す。

【化１５】

配列番号 109　タウ 314-DLSKVTSKCGSLGNI**HHKPGGG**QVEVKSE-342

配列番号 110　タウ 352-SKIGSLDNI**THVPGGG**NKKIETHKLTFREN-381

配列番号 111　タウ 325-LGNI**HHKPGGG**Q-336

配列番号 112　タウ 357-LDNI**THVPGGG**N-368

配列番号 100　タウ 329-**HHKPGGG**-335

配列番号 101　タウ 361-**THVPGGG**-367

【０５１３】

実際には、１つもしくは複数の治療用ＤＣ８Ｅ８エピトープを有するペプチド（例えば、７－ｍｅｒ：配列番号１００および配列番号１０１の中に）の免疫原性の可能性をさらに判定するために、ＤＣ８Ｅ８治療用エピトープの１つを有する１２および３０アミノ酸長のペプチド（配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１および配列番号１１２）をデザインした。タウペプチド配列番号１０９（３０アミノ酸）および配列番号１１１（１２アミノ酸）は、配列番号１００における治療用エピトープをそれらの中に含む。タウペプチド配列番号１１０（３０アミノ酸）および配列番号１１２（１２アミノ酸）は、配列番号１０１における治療用エピトープをそれらの中に含む。実施例１８～１９に記載されたようにＮ末端のＣｙｓ残基を介してペプチドをＫＬＨに結合体化した。免疫のためのワクチンを、１００μｌのＰＢＳ中に１００μｇの結合体化されたペプチドを含むペプチド－ＫＬＨ結合体を用いて調製し、最終投与体積の２００μｌにおいてフロイントアジュバントと１：１（ｖｏｌ／ｖｏｌ）で乳化した。１処置群あたり５匹のＢａｌｂ／ｃマウスを使用した。最初の免疫を、フロイント完全アジュバントとともに製剤化されたＰＢＳ中のペプチド結合体を使用して行った。２週間間隔での次の２回の免疫を、フロイント不完全アジュバントとともに製剤化されたＰＢＳ中のペプチド結合体を使用して行った。コントロールとして、アジュバントのみを含むワクチンを使用した。最後の免疫の１０日後に血清を回収し、実施例１９に記載されたようにＥＬＩＳＡによって抗体応答を測定した。個々のマウス由来の血清を１：１００から１：１２，８００まで段階希釈し、２つ組で試験した。血清の特異性を判定するために、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）および生理学的タウ２Ｎ４Ｒを固相として使用した。図６２から６５は、１：８００希釈の血清に対する結果の要約を示している。ＥＬＩＳＡの結果を、ノンパラメトリックなマン・ホイットニー検定を使用して統計学的に評価した。

【０５１４】

試験されたすべてのペプチドが、免疫されたマウスにおいてタウ特異的抗体を産生させた。タウペプチド配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１および配列番号１１２によるワクチン接種によって誘導された抗体は、生理学的タウ２Ｎ４Ｒよりも病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して統計学的に有意に高い結合活性を示した（図６２～６５）。さらに、ペプチドを３０アミノ酸（配列番号１０９、配列番号

１１０）から１２アミノ酸（配列番号１１１および配列番号１１２）まで短縮することにより、病理学的タウを優先的に認識する特異的抗体の有意に多い産生がもたらされた（配列番号１０９，ｐ＝０．０１１５；配列番号１１０，ｐ＝０．００２９；配列番号１１１，ｐ＝０．０００７；配列番号１１２，ｐ＜０．００１）。全体的にみて、これらの結果は、ペプチド配列番号１０９および配列番号１１１（配列番号１００の中に治療用エピトープを有する）ならびにペプチド配列番号１１０および配列番号１１２（配列番号１０１の中に治療用エピトープを有する）が免疫原性であり、アルツハイマー病に罹患している患者の脳に存在する病理学的タウタンパク質を標的化する治療活性を有することを示した。

【０５１５】

実施例２３：少なくとも１つのＤＣ８Ｅ８エピトープへの結合について病理学的タウと競合することができるデザイナーペプチド（デザイナー治療用エピトープ）の同定

エピトープ＃１（ＫＨＱＰＧＧＧの中、配列番号９８）と＃２（ＫＨＶＰＧＧＧの中、配列番号９９）と＃３（ＨＨＫＰＧＧＧの中、配列番号１００）と＃４（ＴＨＶＰＧＧＧの中、配列番号１０１）との間で保存されたアミノ酸残基に基づいて、２つのさらなるペプチド（１１－ｍｅｒ）をデザインした。それらのデザインにおいて、これらのエピトープへのＤＣ８Ｅ８の結合に寄与する５残基：配列ＨｘＰＧＧＧ（配列番号１６４）の中のヒスチジン、プロリンおよび３つのグリシン残基を固定して維持した。ペプチドは、ＥＺＢｉｏｌａｂｓ（ＵＳＡ）によって８５％より高い純度で合成された。２つのデザイナー治療用エピトープは、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）およびＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）である。

【０５１６】

これらのペプチドを競合ＥＬＩＳＡによって病理学的タウと競合する能力について解析した。ＥＬＩＳＡプレート（ＩＷＡＫＩ高結合プレート，＃３８０１－０９６，Ｂｅｒｔｏｎｉ　ＧｍｂＨ，Ａｕｓｔｒｉａ）を、１００μｌ／ウェルの、ＰＢＳ中の５μｇ／ｍｌの精製された組換えタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４Ｒで、４℃において一晩コーティングした。コーティングされたＥＬＩＳＡプレートを、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０（０．０５％ｖ／ｖ　Ｔｗｅｅｎ２０が補充されたリン酸緩衝食塩水）で４回洗浄し、２５℃において２時間、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０でブロッキングした。各ペプチドを別々に５ｍＭの最終濃度でＰＢＳに溶解した。ポリプロピレンプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ，＃６５１２０１）においてＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０中のペプチドの２倍段階希釈物を調製した（濃度範囲８０μＭ、４０μＭ、２０μＭ、１０μＭ、５μＭおよび２．５μＭ）。１００μｌの各ペプチド希釈物を１００μｌの２μｇ／ｍｌの精製されたＤＣ８Ｅ８モノクローナル抗体と混合した（精製は、実施例５に記載されたように行った）。次いで、得られた２００μｌの混合物は、１μｇ／ｍｌのＤＣ８Ｅ８抗体、ならびに４０μＭ、２０μＭ、１０μＭ、５μＭ、２．５μＭおよび１．２５μＭのペプチドを含んだ。ポジティブコントロールとしてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４Ｒを含めた。抗体／ペプチド混合物を、２５０ｒｐｍに設定された回転プラットフォーム上において２５℃で１時間インキュベートした。次いで、１００マイクロリットルの抗体／ペプチド混合物を、調製されたＥＬＩＳＡプレートに移し、２５０ｒｐｍに設定された回転プラットフォーム上において２５℃で１時間インキュベートした。そのＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０で４回洗浄した。次いで、そのＥＬＩＳＡプレートを、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０で１：４０００希釈された１００μｌのポリクローナルヤギ抗マウス免疫グロブリン／ＨＲＰ（Ｄａｋｏ，＃Ｐ０４４７）とともにインキュベートし、２５０ｒｐｍに設定された回転プラットフォーム上において２５℃で１時間インキュベートした。そのＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０で４回洗浄した。次いで、そのＥＬＩＳＡプレートを、１．５μｌ／２ｍｌの３０％H_2O_2（ＳＩＧＭＡ，Ｈ－０９０４）が補充された０．１Ｍ酢酸Ｎａ　ｐＨ＝６．０（Ｒｏｔｈ，＃６７７９）中の１００μｌの１．５ｍｇ／２ｍｌのｏ－ＰＤＡ（ｏ－フェニレンジアミン，ＳＩＧＭＡ，Ｐ１５２６）とともに２５℃で１０分間、暗所においてインキュベートした。１００μｌの２Ｍ　H_2SO_4（Ｍｅｒｃｋ

，１．００７３１．１０００）を加えることによって反応を停止した。発色されたシグナルを、４９０ｎｍにおいて読むことによって測定した（例えば、Ｖｉｃｔｏｒ　Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒ（Ｗａｌｌａｃ）を使用して）。

【０５１７】

２つのデザイナーペプチド、すなわち、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）およびＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）の両方ともが、ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４）４Ｒと競合することができた（図６６）。デザイナー治療用エピトープ１と呼ばれるペプチドＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）は、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４ＲとＤＣ８Ｅ８に対して最もよく似た親和性を示した。デザイナー治療用エピトープ２と呼ばれるペプチドＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）のＤＣ８Ｅ８に対する親和性は、この抗体に対する疾患タウ（タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４Ｒの親和性よりも１桁超高かった。

【０５１８】

実施例２４：デザイナー治療用エピトープ１および２の免疫原性および免疫応答の特異性についてのインビボ試験

デザイナー治療用エピトープ１（ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ，配列番号２５０）およびデザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ，配列番号２５１）を、Ｃ末端Ｃｙｓ残基を介してＫＬＨに結合体化し（実施例１８に記載されたように）、Ｂａｌｂ／ｃマウスを免疫するために使用した。各デザイナー治療用エピトープに対して３匹のマウスを使用した。免疫は、以下のとおり行った。免疫用のワクチンを、１００μｌのＰＢＳ中に１００μｇの結合体化ペプチドを含むデザイナー治療用エピトープ－ＫＬＨ結合体を用いて調製し、最終投与体積の２００μｌにおいてフロイントアジュバントと１：１（ｖｏｌ／ｖｏｌ）で乳化した。最初の免疫を、フロイント完全アジュバントとともに製剤化されたＰＢＳ中のデザイナー治療用エピトープ－ＫＬＨ結合体を使用して行った。４週間間隔での次の４回の免疫を、フロイント不完全アジュバントとともに製剤化されたＰＢＳ中のデザイナー治療用エピトープ－ＫＬＨ結合体を使用して行った。コントロール免疫のために、デザイナー治療用エピトープ－結合体の代わりにＰＢＳを使用した。最後の免疫の１４日後に血清を調製した。

【０５１９】

１．抗体は病理学的タウを区別する。血清の特異性を判定するために、２つのタウタンパク質を使用した：組換え病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４Ｒおよび生理学的タウ２Ｎ４Ｒ。各マウス由来の血清を、１：１００から１：１２，８００まで段階希釈し、３つ組で試験した。１：４，０００希釈されたポリクローナルヤギ抗マウス免疫グロブリン／ＨＲＰ（Ｄａｋｏ，＃Ｐ０４４７）を使用して、抗体価を測定した。図６７は、１：３２００希釈に対する代表的な結果を示している。

【０５２０】

両方のデザイナー治療用エピトープが、免疫されたマウスにおいて高い免疫応答をもたらした。さらに、試験された両方のデザイナー治療用エピトープが、生理学的タウ２Ｎ４Ｒと比べてより高い親和性で病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４Ｒを認識する抗体を誘導した（図６７）。この区別は、免疫されたすべての動物由来の血清について統計学的に有意である。全体的にみて、ＤＣ８Ｅ８を用いて観察された活性を用いて得られた結果と組み合わせて、これらの結果は、デザイナー治療用エピトープ１および２の両方が免疫原性であり、アルツハイマー病患者の脳における病理学的タウタンパク質を標的化する治療的可能性を有する抗体応答を誘導することを示している。

【０５２１】

２．抗体アイソタイプ：これらのデザイナー治療用エピトープ１および２に応答して産生される抗体の特定のアイソタイプを判定するために、同じ群のマウス由来の血清をプールし、１：１００から１：１２，８００まで段階希釈し、抗体アイソタイプＥＬＩＳＡによって３つ組で試験した。マウスＩｇＭ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂおよびＩｇＧ３アイソタイプを検出するために、抗マウスサブクラス特異的ＨＲＰ結合体化二次抗体

を使用した（Ｌｉｆｅｓｐａｎ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入した抗体，抗ＩｇＧ１－＃ＬＳ－Ｃ５９１０７、抗ＩｇＧ２ａ－＃ＬＳ－Ｃ５９１１２、抗ＩｇＧ２ｂ－＃ＬＳ－Ｃ５９１１７、抗ＩｇＧ３－＃ＬＳ－Ｃ５９１２５および抗ＩｇＭ－＃ＬＳ－Ｃ５５８７５）。コントロールマウスから得られた抗血清は、陰性だった。図６８は、１：８００希釈に対する代表的な結果を示している。プールされた血清を用いて得られたデータは、試験された両方のデザイナー治療用エピトープによる免疫が広範囲の抗タウ抗体アイソタイプを誘導することおよびアイソタイププロファイルがすべての試験において非常によく似ていることを証明した。両方のデザイナー治療用エピトープが、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂおよびＩｇＧ３応答と比較して、主にＩｇＧ１抗体を産生させた（図６８）。

【０５２２】

３．デザイナー治療用エピトープは、病理学的タウと生理学的タウとを統計学的に非常に有意に区別する抗体応答を誘導する。デザイナー治療用エピトープに対して産生された抗体の親和性の解析を、実施例５および１９に記載されたように、ＣＭ５センサーチップを使用したＢＩＡＣＯＲＥ３０００（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ）における表面プラズモン共鳴によって行った。各解析サイクルにおいて、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）であるデザイナー治療用エピトープ１（１００倍希釈されたもの）またはＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）であるデザイナー治療用エピトープ２（１００倍希釈されたもの）に対するマウス抗血清（３匹のマウス由来のプールされた抗血清）を、ほぼ飽和に等しい約９５０ＲＵの固定化レベルに達するように、分析フローセルに捕捉した。基準として、タウに結合しない無関係の抗体Ｒａｂ５０（Ｍａｃｉｋｏｖａら、１９９２）を基準フローセルに捕捉した。K_A測定のために、ならびに動態速度定数k_{ON}およびk_{OFF}の測定のために、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４Ｒまたは生理学的タウ２Ｎ４Ｒの１００ｎＭ溶液を１００μｌ／分の流速でセンサーチップの上に注入した。

【０５２３】

デザイナー治療用エピトープ１および２によるワクチン接種によって誘導された抗体は、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）４Ｒと生理学的タウ２Ｎ４Ｒとを区別した（図６９Ａおよび６９Ｂ）。表面プラズモン共鳴によって測定された、デザイナー治療用エピトープ１（ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５０）に対する抗血清中に存在する抗体の親和性は、生理学的タウと比べて、病理学的タウに対してほぼ５０倍高い親和性を示した（これは、非常に統計学的に有意である（ｐ＜０．００１））。表面プラズモン共鳴によって測定された、デザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）に対する抗血清中に存在する抗体の親和性は、生理学的タウと比べて、病理学的タウに対してほぼ１５倍高い親和性を示した（これは、非常に統計学的に有意である（ｐ＜０．０１））。

【０５２４】

４．デザイナー治療用エピトープは、ヒトＡＤ脳における病理学的タウ種を認識する抗体応答を誘導する。デザイナー治療用エピトープで免疫されたマウスにおいて産生される抗体の特異性を判定するために、ヒトＡＤ脳の凍結切片において免疫組織化学的染色を行った。

【０５２５】

ヒトＡＤ脳組織サンプル（嗅内皮質，ＡＤ　Ｂｒａａｋ　ＶＩ，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ　Ｂｒａｉｎ　Ｂａｎｋによって提供されたもの）を、４℃において２日間、ＰＢＳ中の４％パラホルムアルデヒドで固定し、次いで、凍結保護し（２５％スクロース）、冷２－メチルブタン（－４２℃）中で凍結し、クライオトームにおいて薄片に切断した。浮遊組織切片（４０μｍ）を、室温（２５℃）において１分間、冷（４℃）９９％ギ酸で処理した。その切片を、標準的なアビジン－ビオチンペルオキシダーゼ法（ＡＢＣ　Ｅｌｉｔｅ，Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）を使用して免疫染色した。デザイナー治療用エピトープ１（配列番号２５０）およびデザイナー治療用エピトープ２（配列番号２５１）に対するマウス抗血清（各々、３匹の免疫マウスか

らプールされたもの）を、ブロッキング溶液（ＰＢＳ中の、５％ウシ血清アルブミン、０．３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００）で１：２０００希釈した。次いで、切片をＯｌｙｍｐｕｓ　ＢＸ５１顕微鏡で検鏡した。

【０５２６】

免疫組織化学的染色は、両方のデザイナー治療用エピトープＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）およびＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）に対して産生されたマウス免疫血清（ｉｍｍｕｎｏｓｅｒａ）が、アルツハイマー病脳の嗅内皮質における病理学的タウ構造、すなわち、神経原線維変化および糸屑状構造物を特異的に認識することを示した（図７０Ａ～Ｄ）。デザイナー治療用エピトープ１およびデザイナー治療用エピトープ２に対する抗血清は、コントロールヒト脳における正常タウを認識しなかった（図７０Ｅ、Ｆ）。

【０５２７】

５．デザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）は、アルツハイマー病のトランスジェニックラットモデルの脳における病理学的タウ種を認識する抗体応答を誘導する。デザイナー治療用エピトープで免疫されたマウスにおいて産生される抗体の特異性を判定するために、トランスジェニックラットＳＨＲ７２の脳のパラフィン包埋切片において免疫組織化学的染色を行った。

【０５２８】

ＳＨＲ７２系統のトランスジェニックラット（７ヶ月齢）に、深麻酔下において１分間、ＰＢＳを経心的に灌流した後、１００ｍｌの４％パラホルムアルデヒド（ｐＨ７．４）を灌流した。灌流後、頭部を切断し、すみやかに脳を取り出した。使い捨てメス刃を使用して、脳を矢状方向に２つの同じサイズの半球に切断した。その脳組織を４％パラホルムアルデヒド中で後固定し、パラフィンに包埋し、ミクロトームにおいて切片に切断した。８μｍパラフィン包埋組織切片において免疫組織化学的検査および組織病理学的検査を行った。組織切片を、室温（２５℃）において、抗原アンマスキング溶液（Ｖｅｃｔｏｒ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，ＣＡ，ＵＳＡ）で２０分間前処理し、冷（＋４℃）９０％ギ酸（Ａｐｐｌｉｃｈｅｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ）で１分間前処理した。ブロッキングの後、切片を、ブロッキング溶液（５０ｎＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ中の５％ウシ血清アルブミン、０．３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ１００）で１：１０００希釈されたデザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）に対して産生された血清とともに一晩インキュベートした。洗浄した後、切片を室温において１時間、ビオチン化二次抗体（Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ　Ｅｌｉｔｅ　ＡＢＣ　Ｋｉｔ，Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）とともにインキュベートし、次いで、室温（２５℃）において、アビジン－ビオチンペルオキシダーゼ－複合体溶液と６０分間反応させた（Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ　Ｅｌｉｔｅ　ＡＢＣ　Ｋｉｔ，Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）。免疫反応を、ペルオキシダーゼ基質キット（Ｖｅｃｔｏｒ　ＶＩＰ，Ｖｅｃｔｏｒ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｃａ，ＵＳＡ）を用いて可視化した。切片をＯｌｙｍｐｕｓ　ＢＸ７１顕微鏡で検鏡した。

【０５２９】

トランスジェニックラット脳（ＳＨＲ７２）において、デザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）に対して産生された血清は、神経原線維変化を認識した（図７０Ｇ）。同齢のコントロールラット脳において、その抗体は、神経細胞を染色しなかった（図７０Ｈ）。

【０５３０】

デザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）に対して産生された血清は、オリゴマーのプレ濃縮体段階のタウ（図７０Ｉ）、ならびに細胞内の神経原線維変化（図７０Ｊ）を認識した。

【０５３１】

６．デザイナー治療用エピトープ１および２によって誘導された抗体は、ヒトＡＤ脳における可溶性および不溶性の病理学的タウを認識する：サルコシル可溶性および不溶性の

病理学的タウをヒトアルツハイマー病の側頭皮質（Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ Ｂｒａｉｎ Ｂａｎｋから入手したもの）から単離し、実施例８に記載されたように免疫ブロット法によって解析した。

【０５３２】

可溶性および不溶性の病理学的タウタンパク質画分を含む膜を、ＰＢＳＴ中の５％脱脂粉乳で１：１希釈されたＤＣ８Ｅ８ハイブリドーマ上清またはデザイナー治療用エピトープ１（配列番号２５０、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ）に対して産生されたプールされたマウス抗血清またはデザイナー治療用エピトープ２（ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ、配列番号２５１）に対して産生されたプールされたマウス抗血清とともにインキュベートした（ここで、両方のプールされた抗血清が、ＰＢＳＴ中の５％脱脂粉乳において１：１００希釈された）。膜を洗浄し、次いで、１：４０００希釈されたペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウスＩｇＧ（ＤＡＫＯ，Ｄｅｎｍａｒｋ）とともにインキュベートした。ＬＡＳ３０００イメージングシステム（ＦＵＪＩ Ｐｈｏｔｏ Ｆｉｌｍ Ｃｏ．，Ｊａｐａｎ）を使用して検出されるＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｐｉｃｏ Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｕ．Ｓ．Ａ）を用いて、そのブロットの像を得た。シグナル強度を、ＡＩＤＡソフトウェア（Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｉｍａｇｅ Ｄａｔａ Ａｎａｌｙｚｅｒ，Ｒａｙｔｅｓｔ，Ｓｔｒａｕｂｅｎｈａｒｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して定量した。

【０５３３】

この免疫ブロット解析の結果を図７１に示す。これらの結果は、デザイナー治療用エピトープ１（すなわち、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ）（配列番号２５０）と２（すなわちＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ）（配列番号２５１）の両方に対して産生された抗体が、ＤＣ８Ｅ８と同じ病理学的タウタンパク質を認識することを示している。ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５０）抗血清、ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ（配列番号２５１）抗血清およびＤＣ８Ｅ８抗体のすべてが、ＡＤ脳組織から単離されたサルコシル可溶性および不溶性タウ画分中に存在する病理学的タウタンパク質を特異的に認識した（図７１）。

【０５３４】

７．デザイナー治療用エピトープ１および２によって誘導された抗体は、タウトランスジェニックラットの脳における可溶性および不溶性の病理学的タウを認識する。サルコシル可溶性および不溶性の病理学的タウを、実施例８に記載されたように、タウトランスジェニックラット脳（実施例７に記載されたＳＨＲ７２系統）の脳から単離した。

【０５３５】

免疫ブロット解析（実施例８に記載された）の結果を図７２に示す。これらの結果は、デザイナー治療用エピトープ１（すなわち、ＧＷＳＩＨＳＰＧＧＧＳＣ）（配列番号２５０）および２（すなわち、ＳＶＦＱＨＬＰＧＧＧＳＣ）（配列番号２５１）によって誘導された抗体が、ＤＣ８Ｅ８と同じ病理学的タウタンパク質を認識することを示している（図７２）。単量体およびオリゴマーの病理学的タウタンパク質を標的化することによって、病理学的タウ凝集体の生成が妨げられ、タウ病理が減少し、ヒトにおける治療効果およびＡＤの処置がもたらされる。

【０５３６】

実施例２５：ＡＤをモデル化するトランスジェニックラットにおけるデザイナー治療用エピトープのインビボ有効性

デザイナー治療用エピトープによる免疫療法は、処置されたラットの神経行動学的パラメータの改善を示した。トランスジェニックラットＳＨＲ７２における免疫療法のために、デザイナー治療用エピトープ２（配列番号２５１）を選択した。Ａｄｊｕ－ｐｈｏｓアジュバントと組み合わされた、ＫＬＨに結合体化されたデザイナー治療用エピトープ２（配列番号２５１）を含むワクチン用量を、ラットの皮下に免疫した。実施例１８に記載されたようにワクチンを調製した。１用量は、１００μｇの結合体化されたデザイナー治療用エピトープ２を含んだ。複合スコアであるＮｅｕｒｏｓｃａｌｅでの神経学的検査と組み合わされた標準的な運動試験のセットによって、複合運動障害を測定した。免疫療法の

効果を測定する目的で、６．５ヶ月齢において、デザイナー治療用エピトープ２（配列番号２５１）を含むワクチンで処置されたトランスジェニックラットＳＨＲ７２を行動試験に供した。

【０５３７】

デザイナー治療用エピトープ２（配列番号２５１）で処置されたラットは、梁歩行試験において、アジュバントだけを投与されたトランスジェニックコントロールラットよりも２７％の逃避潜時の短縮を示した（図７３Ａ）。後肢のスリップ回数は、トランスジェニックコントロールと比較して、ワクチン接種群において統計学的に有意に４４％減少した（ｐ＜０．０５）（図７３Ｂ）。梁歩行試験、握力牽引力試験および神経学的検査（基本的な反射、後肢逃避伸展反射）において得られた値から、Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアを計算した。その免疫は、コントロール群と比べて、ペプチド配列番号２５１で処置されたラットのＮｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアを有意に２６％改善した（図７３Ｃ）。総Ｎｅｕｒｏｓｃａｌｅスコアは、非処置トランスジェニックラットと比べて、処置されたトランスジェニックラットの神経行動学的改善を確証させた。すべての統計データは、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーＵ検定を用いて得られた。

【０５３８】

デザイナー治療用エピトープ２による免疫療法は、処置されたアルツハイマートランスジェニックラットの脳における病理学的タウの統計学的に有意な減少を示した（ｐ＜０．０５）。不溶性の病理学的タウのレベルに対する、デザイナー治療用エピトープ２（配列番号２５１）による免疫の効果を確かめるために、本発明者らは、ラット脳サンプルの免疫ブロット解析を使用した。デザイナー治療用エピトープ２（配列番号２５１）で免疫されたトランスジェニック動物およびアジュバントだけで免疫されたトランスジェニック動物のコントロール群の脳組織（脳幹）を、実施例８に記載されたように、サルコシル不溶性タウ画分の調製のために使用した。実施例１９に記載されたように、免疫ブロット解析を行った。Ｔ検定によって統計解析を行った。リン酸化依存的モノクローナル抗体ＡＴ８、ＤＣ２０９、ＤＣ２１７およびｐａｎ－タウモノクローナル抗体ＤＣ２５を、この研究において使用した。

【０５３９】

デザイナー治療用エピトープ２（配列番号２５１）で免疫されたたトランスジェニックラットの群およびコントロール群の不溶性タウレベルの免疫ブロットの定量的解析の結果を図７４に示す。免疫療法は、アジュバントだけを投与されたコントロールトランスジェニックラットと比べて、免疫された動物において不溶性タウの量を統計学的に有意に減少させた。不溶性タウの減少は、解析されたすべてのタウエピトープにおいて観察された。３４７－３５３エピトープおよびホスホ－タウエピトープにおける減少は、統計学的に有意だった（Ｐ＜０．０５）。観察された減少は、以下のとおりだった：３４７－３５３タウエピトープにおいて、４６％（Ｐ＜０．０５）、ｐＴ２１７タウエピトープにおいて、５７％（Ｐ＜０．０５）、ｐ２３１－タウエピトープにおいて、５５％（Ｐ＜０．０５）、ｐＳ２０２／ｐＴ２０５タウエピトープにおいて、４７％（Ｐ＜０．０５）。

【０５４０】

これらの結果は、そのワクチンが、病理学的タウを減少させる病理学的タウ特異的抗体を誘導したことを示している。処置されたアルツハイマー病ラットモデルの脳における病理学的タウレベルの低下は、神経行動学的パラメータと相関した。低レベルの不溶性タウを有する処置された動物は、コントロール動物と比較して、より短い逃避潜時および統計学的に有意に減少した後肢のスリップ回数を示した（ｐ＜０．０５）。これらの知見は、デザイナー治療用エピトープによる免疫が、処置された動物において不溶性の病理学的タウの減少および神経行動学的改善をもたらすことを示し、これは、ヒトアルツハイマー病および関連タウオパチーを処置するためのそのワクチンの治療的可能性を強調する。

【０５４１】

実施例２６：ＤＣ８Ｅ８最小エピトープ（治療用コアユニット用）のさらなる特徴付け

ＤＣ８Ｅ８の最小エピトープをさらに特徴付けるために、ヒトタウタンパク質２Ｎ４Ｒ

の微小管結合リピート領域（ＭＴＢＲ１、ＭＴＢＲ２、ＭＴＢＲ３、ＭＴＢＲ４）に由来する、種々の長さ（４２－ｍｅｒ、１９－ｍｅｒ、１２－ｍｅｒ、７－ｍｅｒ、６－ｍｅｒおよび５－ｍｅｒ）を有するタウペプチドのパネルをデザインした（図７５Ａ、Ｂ）。ペプチドは、ＥＺＢｉｏｌａｂｓ（ＵＳＡ）によって９５％より高い純度で合成された。すべてのペプチドを、ＤＣ８Ｅ８への結合について病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと競合する能力について競合ＥＬＩＳＡによって解析した。ＥＬＩＳＡプレート（Ｓａｒｓｔｅｄｔ，＃８２１５８１００１）を５０μｌ／ウェルの、ＰＢＳ中の５μｇ／ｍｌの精製された組換えタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒ）で、３７℃において一晩コーティングした。コーティングされたプレートを、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０（０．０５％ｖ／ｖ）で５回洗浄し、２５℃において１時間、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０（０．０５％ｖ／ｖ）でブロッキングした。各ペプチドを別々に１ｍＭの最終濃度でＰＢＳに溶解した。コニカルウェル底を有するポリプロピレンマイクロタイタープレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ，＃６５１２０１）においてＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０中のペプチドの段階希釈物（２．５×）を、２００μＭ；８０μＭ；３２μＭ；１２．８μＭ；５．１２μＭ；２．０４８μＭ；０．８１９２μＭ；０．３２７６８μＭの濃度範囲内で調製した。確認用モノクローナル抗体ＤＣ８Ｅ８を、ＰＢＳにおいて０．６μｇ／ｍｌの濃度に希釈し、６０μｌのこの希釈された抗体を、１２０μｌ／ウェルの混合物をもたらすペプチドの段階希釈となるように各ウェルに加えた。その抗体／ペプチド混合物を、２３０ｒｐｍに設定された回転プラットフォーム上で２５℃において１時間インキュベートした。５０μｌ／ウェルの抗体／ペプチド混合物を、ポリプロピレンプレートから、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒでコーティングされ ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０でブロッキングされたＥＬＩＳＡプレートに移し（２つ組で）、２５℃において１時間インキュベートした。そのプレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄し、５０μｌ／ウェルの、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０で１：１０００希釈されたポリクローナルヤギ抗マウス免疫グロブリン／ＨＲＰ（Ｄａｋｏ，＃Ｐ０４４７）とともに２５℃において１時間インキュベートした。洗浄した後、次にプレートを、５０μｌ／ウェルの、１．５μｌ／２ｍｌの３０％ H_2O_2（Ｓｉｇｍａ，Ｈ－０９０４）が補充された０．１Ｍ酢酸Ｎａ ｐＨ＝６．０（Ｒｏｔｈ，＃６７７９）中の１ｍｇ／２ｍｌのｏ－ＰＤＡ（ｏ－フェニレンジアミン，Ｓｉｇｍａ，Ｐ１５２６）とともに暗所において２５℃で２０分間インキュベートした。５０μｌ／ウェルの２Ｍ H_2SO_4（Ｍｅｒｃｋ，１．００７３１．１０００）を加えることによって反応を停止した後、プレートを４９２ｎｍにおいて読んだ（例えば、Ｐｏｗｅｒｗａｖｅ ＨＴ，Ｂｉｏ－Ｔｅｋ）。

【０５４２】

図７６は、以下のペプチドを用いて行われた競合ＥＬＩＳＡの結果を示している：ＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫ（配列番号２７０）、ＫＨＱＰＧＧＧ（配列番号２７１）、ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２７２）、ＨＱＰＧＧ（配列番号２７３）、ＱＰＧＧＧ（配列番号２７４）、ＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２７５）、ＫＨＶＰＧＧＧ（配列番号２７６）、ＨＶＰＧＧＧ（配列番号２７７）、ＨＶＰＧＧ（配列番号２７８）、ＶＰＧＧＧ（配列番号２７９）、ＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶ（配列番号２８０）、ＨＨＫＰＧＧＧ（配列番号２８１）、ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２８２）およびＴＨＶＰＧＧＧ（配列番号２８３）。タウ治療用エピトープを含む解析されたすべてのペプチドが、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）と競合した。図７６に示されるように、６－ｍｅｒペプチド（配列番号２７２、配列番号２７７および配列番号２８２）でさえ、ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと競合することができた。しかしながら、ヒスチジンの除去（５－ｍｅｒペプチド配列番号２７４、２７９）または最後のグリシンの除去（５－ｍｅｒペプチド配列番号２７３、２７８）によって、ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１／４Ｒ）との競合活性が失われた（それらの５－ｍｅｒペプチドは、下線が引かれた除去されたアミノ酸ＨｉｓおよびＧｌｙを有する配列番号２７２および配列番号２７７に由来した。上記を参照のこと）。これらの

結果は、それらの５－ｍｅｒペプチドが、病理学的タウ上にＤＣ８Ｅ８によって認識される治療的な３Ｄ構造をもたらさなかったことを示唆する。他方で、６つのアミノ酸残基を含むペプチドは、競合ＥＬＩＳＡによって測定される生物学的活性に関与する治療的な３Ｄ構造を作り出し、ＤＣ８Ｅ８の最小エピトープ（治療用コアユニット）を形成する。それらのデザインにおいて、保存されている５つのアミノ酸残基が、ＤＣ８Ｅ８認識にとって重要である（配列ＨｘＰＧＧＧにおけるヒスチジン、プロリンおよび３つのグリシン残基）。

【０５４３】

結論：上記データは、ヒトタウ上の最小ＤＣ８Ｅ８エピトープが、残基ＨＱＰＧＧＧ（ＭＴＢＲ１の中に位置する）、ＨＶＰＧＧＧ（ＭＴＢＲ２の中）、ＨＫＰＧＧＧ（ＭＴＢＲ３の中）およびＨＶＰＧＧＧ（ＭＴＢＲ４の中）を含む６アミノ酸からなることを示唆する。したがって、ＤＣ８Ｅ８結合部位（＝エピトープ）は、２Ｎ４Ｒタウにおいて４回および２Ｎ３Ｒタウにおいて３回、登場する。これは、その６－ｍｅｒ配列の中で必須のアミノ酸が、ヒスチジンおよび３つすべてのグリシンであることを示唆する。

【０５４４】

実施例２７：ＤＣ８Ｅ８最小エピトープを有するペプチドの免疫原性の測定

ａ）ＤＣ８Ｅ８の最小エピトープを有するペプチドは、免疫原性である：個々のタウペプチドの免疫原性の潜在能力を測定する目的で、ペプチドを、そのＮ末端のＣｙｓ残基を介してＫＬＨに結合体化した。

【０５４５】

この目的のために、ＫＬＨタンパク質の表面上にペプチドの配向結合を得る目的で、Ｎ末端に位置する余分なシステイン残基を有するシステイン付加ペプチドとしてタウペプチドを合成した。ペプチドを、二機能性架橋剤Ｎ－［γ－マレイミドブチリルオキシ］スクシンイミドエステル（ＧＭＢＳ）を介してＫＬＨキャリアに結合させた。結合体化反応物を調製するために、２０ｍｇのＫＬＨ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）を、１０分間静かに混合することによって結合体化緩衝液（０．９Ｍ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡを含むＰＢＳ）に溶解して、１０ｍｇ／ｍｌの濃度にした。マレイミド活性化ＫＬＨを調製するために、２ｍｇの活性な二機能性架橋剤ＧＭＢＳを５０μｌの無水ジメチルホルムアミドに溶解し、２ｍｌのＫＬＨ溶液と室温において１時間混合した。続いて、結合体化緩衝液において平衡化された５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）において、未反応のＧＭＢＳを除去した。ペプチドとマレイミド活性化ＫＬＨとの１：１比（ｗ／ｗ、２０ｍｇのペプチド）で室温（２５℃）において２時間、結合体化を行った。得られた結合体を１００倍過剰のＰＢＳに対して透析し、４回の透析緩衝液の交換により、未結合体化ペプチドを除去した。透析の後、結合体を２℃、２１，０００×ｇで１５分間遠心した。その結合体を等分し、使用するまで－２０℃で保管した。

【０５４６】

免疫のためのワクチンを、１００μｌのＰＢＳ中に１００μｇの結合体化ペプチドを含むペプチド－ＫＬＨ結合体を用いて調製し、最終投与体積の２００μｌにおいてフロイントアジュバントと１：１（ｖｏｌ／ｖｏｌ）で乳化した。１処置群あたり５匹のＣ５７／ＢＬマウスを使用した。最初の免疫を、フロイント完全アジュバントとともに製剤化されたＰＢＳ中のペプチド結合体を使用して行った。１週間間隔での次の２回の免疫を、フロイント不完全アジュバントとともに製剤化されたＰＢＳ中のペプチド結合体を使用して行った。最後の追加免疫の投与の１週間後に動物から採血し、回収された血清を抗体価の測定のために使用した。特異的な抗タウ抗体の力価を、実施例１９に記載されたようにＥＬＩＳＡによって測定した。各血清の段階希釈物（１：１００から１：１０２４００）を、固相として使用される病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよび生理学的タウ２Ｎ４Ｒに対して試験した。図７７Ａ～Ｃは、１：８００希釈の血清に対する結果の要約を示している。ＥＬＩＳＡの結果を、ノンパラメトリックなマン・ホイットニー検定を使用して統計学的に評価した。力価は、最大ＯＤの２分の１をもたらす血清の希釈度の逆数と定義され、それを図７８に要約した。

【０５４７】
タウペプチドＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫ（配列番号２７０）、ＫＨＱＰＧＧＧ（配列番号２７１）、ＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２７５）、ＫＨＶＰＧＧＧ（配列番号２７６）、ＨＶＰＧＧＧ（配列番号２７７）、ＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶ（配列番号２８０）、ＨＨＫＰＧＧＧ（配列番号２８１）およびＴＨＶＰＧＧＧ（配列番号２８３）でマウスを免疫することにより、免疫されたマウスにおいて、高レベルのタウ特異的抗体が誘導された。さらに、誘導された抗体は、生理学的タウ２Ｎ４Ｒよりも病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対してより高い親和性を示した（図７７Ａ～Ｃ）。この区別は、免疫されたすべての動物由来の血清について統計学的に有意だった（配列番号２７０，ｐ＜０．００７９；配列番号２７１，ｐ＜０．００５２；配列番号２７５，ｐ＜０．００７９；配列番号２７６，ｐ＜０．００７９；配列番号２７７，ｐ＜０．０３７９；配列番号２８０，ｐ＜０．０１５９；配列番号２８１，ｐ＜０．０３７９および配列番号２８３，ｐ＜０．０２８６）。概して、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対する幾何平均抗体価は、生理学的タウ２Ｎ４Ｒに対するそれよりも３～５倍高かった（図７８）。図７８に示されるように、病理学的タウに対する最も高い抗体価は、タウペプチド配列番号２７５（ＧＭＴ５１２００）、配列番号２８０（ＧＭＴ５１２００）、配列番号２７０（ＧＭＴ２２２８６）および配列番号２７６（ＧＭＴ２２２８６）によって誘導された。治療的な３Ｄ構造を欠くとみられる５－ｍｅｒペプチド（配列番号２７３、２７４、２７８、２７９）は、免疫された動物においてタウ特異的抗体を誘導することができなかった。全体的に見て、これらの結果は、最小の治療用エピトープ（治療用コアユニット）を有するペプチド（配列番号２７０、２７１、２７２、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１および２８３）が免疫原性であり、アルツハイマー病患者の脳における病理学的タウタンパク質を標的化する治療的な潜在能力を有する抗体を誘導することを示した。上述のエピトープマッピング実験は、ペプチド配列番号２８２が治療的な３Ｄ構造を作り出す（例えば、最小ＤＣ８Ｅ８エピトープを少なくとも部分的に模倣する）が、それにもかかわらず、免疫されたマウスにおいて特異的抗体応答を誘導しない（病理学的タウに対するＧＭＴは１７４だった。図７８）ことを示した。

【０５４８】
ｂ）アイソタイププロファイル：Ｃ５７／ＢＬマウスにタウペプチド配列番号２７０、２７１、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１および２８３をワクチン接種することにより、病理学的タウに特異的なＩｇＧ１およびＩｇＧ２ｂ抗体アイソタイプの形成が優先的に誘導された。ペプチドに応答して産生された抗体の特異的アイソタイプを判定するために、マウス由来の血清をプールし、１：１００から１：１２，８００まで希釈し、病理学的タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対するＥＬＩＳＡによって２つ組で試験した（実施例１９に記載されたように）。マウスＩｇＧ１、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ２ｃ、ＩｇＧ３およびＩｇＭアイソタイプを検出するために、抗マウスサブクラスに特異的なＨＲＰ結合体化二次抗体を、ＰＢＳにおいて１：５，０００希釈した（抗体はＬｉｆｅｓｐａｎ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入した）。図７９は、代表的な１：８００希釈に対する結果を示している。そのデータは、ＫＬＨに結合体化されたペプチドが、広範囲の抗タウ抗体アイソタイプを誘導したことを示唆している。概して、ペプチドのワクチン接種によって、高親和性抗体であると考えられている抗体アイソタイプ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ｂ）が最も高いレベルで産生された。病理学的タウに対して優先的な親和性を有する高力価のＩｇＧ１およびＩｇＧ２ｂ抗体の存在は、ワクチンによって誘導された免疫応答が病理学的タウ種に対するものであることを示唆した。ｍｏｃｋで免疫されたマウス（アジュバントだけを投与された）から得られたコントロール血清は、陰性だった（データ示さず）。

【０５４９】
ｃ）治療用エピトープを有するペプチドは、病理学的タウと生理学的タウとを区別する抗体を誘導する：表面プラズモン共鳴を使用した結合事象のリアルタイムモニタリングに

よって、個々のタウペプチドＴＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫ（配列番号２７０）、ＫＨＱＰＧＧＧ（配列番号２７１）、ＨＱＰＧＧＧ（配列番号２７２）、ＨＱＰＧＧ（配列番号２７３）、ＱＰＧＧＧ（配列番号２７４）、ＥＮＬＫＨＱＰＧＧＧＫＶＱＩＩＮＫＫＬＤＬＳＮＶＱＳＫＣＧＳＫＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳ（配列番号２７５）、ＫＨＶＰＧＧＧ（配列番号２７６）、ＨＶＰＧＧＧ（配列番号２７７）、ＨＶＰＧＧ（配列番号２７８）、ＶＰＧＧＧ（配列番号２７９）、ＤＮＩＫＨＶＰＧＧＧＳＶＱＩＶＹＫＰＶ（配列番号２８０）、ＨＨＫＰＧＧＧ（配列番号２８１）、ＨＫＰＧＧＧ（配列番号２８２）およびＴＨＶＰＧＧＧ（配列番号２８３）で免疫されたマウスＣ５７／ＢＬのプールされた血清由来の抗体の会合（ｋＯＮ）および解離（ｋＯＦＦ）の動態速度の測定が可能だった。実施例５および１９に記載されたようにＣＭ５センサーチップを使用するＢＩＡＣＯＲＥ３０００（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ）における表面プラズモン共鳴によって解析を行った。その解析は、上記ペプチドによる免疫によって誘導された抗体がタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒおよび生理学的タウアイソフォーム２Ｎ４Ｒの認識を区別することができることを示した（図８０）。最小の治療用エピトープを有する、ペプチド配列番号２７０、２７１、２７２、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１および２８３による免疫によって誘導された抗体は、対応する生理学的タウ２Ｎ４Ｒに対する親和性と比べて、タウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒに対して優先的な親和性を示した。この区別は、ペプチド：配列番号２７０（ｐ＝０．０３９２）、配列番号２７１（ｐ＝０．０３６３）、配列番号２７２（ｐ＝０．００２２）、配列番号２７６（ｐ＝０．００１３）、配列番号２７７（ｐ＝０．００２３）、配列番号２８０（ｐ＝０．０１０４）、配列番号２８１（ｐ＝０．０１２３）および配列番号２８３（ｐ＝０．００１１）からの血清に対して統計学的に有意だった。得られた結果は、図７７Ａ～Ｃおよび図７８に要約されている以前の免疫原性実験と一致する。

【０５５０】

ｄ）ペプチドによって誘導された抗体は、ウエスタンブロットによって病理学的形態のタウを認識する：マウスＣ５７／ＢＬを個々のタウペプチドで免疫することによって誘導された抗体を、免疫ブロット法（実施例１９に記載されたように）を使用して病理学的形態のタウに対して調べた。神経原線維病理の後期におけるＳＨＲ７２ラットの脳幹を、不溶性の病理学的タウタンパク質の抽出のために使用した。ヒトＡＤ脳の側頭皮質（ＢｒａａｋステージＶＩ；Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ　Ｂｒａｉｎ　Ｂａｎｋ，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓから入手したもの）を、ヒト病理学的ＡＤタウの抽出のために使用した。サルコシル法（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇ　ａｎｄ　Ｄａｖｉｅｓ　１９９０）に従って、抽出されたタウタンパク質を調製した。免疫された動物由来のプールされた血清を、ＰＢＳで１：１０００希釈し、１次抗体として使用した。１次抗体とのインキュベーションの後、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化されたポリクローナルウサギ抗ラット免疫グロブリン（１：３０００；Ｄａｋｏ，Ｇｌｏｓｔｒｕｐ，Ｄｅｎｍａｒｋ）とインキュベーションした。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化抗体を、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｗｅｓｔ　Ｐｉｃｏ　Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）を使用して化学発光によって可視化した。そのシグナルを、ＬＡＳ３０００　ＣＣＤイメージングシステム（Ｆｕｊｉｆｉｌｍ，Ｊａｐａｎ）を用いてデジタル化した。要約された結果を図８１に提供する。ＤＣ８Ｅ８エピトープの治療的な３Ｄ構造をおそらく作り出すペプチド（配列番号２７０、２７１、２７２、２７５、２７６、２７７、２８０、２８１および２８３）のワクチン接種によって誘発された抗体は、ＳＨＲ７２およびＡＤ脳組織から抽出されたすべての病理学的形態のタウタンパク質（ＡＤに特徴的なＡ６８タウトリプレットを含む）を認識した。それにもかかわらず、治療的な３Ｄ構造を作り出すとみられるペプチド配列番号２８２（ＤＣ８Ｅ８への結合についてタウΔ（１－１５０；３９２－４４１）／４Ｒと競合する）は、この免疫されたマウスにおいて特異的抗体応答を誘導せず、ゆえに、反応性は陰性だった。同様に、タウ特異的抗体応答を誘導することができなかった５－ｍｅｒペプチドも、この解析において陰性だった。

【０５５１】
ｅ）ペプチドによって誘導された抗体は、ヒトアルツハイマー病脳組織由来の切片において病理学的タウタンパク質を認識する：マウスＣ５７／ＢＬを個々のペプチドでワクチン接種するによって誘発されたタウ特異的抗体を、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ ｂｒａｉｎ ｂａｎｋから入手したヒト脳組織（パラフィンブロック）において試験した。そのブロックをミクロトームにおいて切断した。アルツハイマー病脳（ＢｒａａｋステージＶ）由来の海馬－ＣＡ１区域のパラフィン切片（８μｍ）を、室温（２５℃）において冷（＋４℃）９９％ギ酸で１分間処理した。その組織切片をブロッキング溶液（５０ｎＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ中の、５％ＢＳＡ、０．３％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００）中でインキュベートし、次いで、ブロッキング溶液で１：１０００希釈された血清とともに一晩インキュベートした。続いて、それらの切片を、ビオチン化二次抗体（Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ Ｅｌｉｔｅ ＡＢＣ Ｋｉｔ，Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）とともに室温において１時間インキュベートし、次いで、アビジン－ビオチンペルオキシダーゼ複合体と両方とも２５℃においてさらに１時間反応させた（Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ Ｅｌｉｔｅ ＡＢＣ Ｋｉｔ，Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）。免疫反応を、ペルオキシダーゼ基質キット（Ｖｅｃｔｏｒ ＶＩＰ，Ｖｅｃｔｏｒ ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｃａ，ＵＳＡ）を用いて可視化し、メチルグリーン（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で対比染色した。それらの切片をＯｌｙｍｐｕｓ ＢＸ７１顕微鏡で検鏡した。免疫組織化学的染色（図８２Ａ～Ｃ、図８３）は、ペプチド配列番号２７０、２７１、２７５、２７６、２８０、２８１および２８３による免疫によって誘導された抗体が、アルツハイマー病脳組織の海馬における病理学的タウ構造、すなわち、神経原線維変化を特異的に認識したことを示唆している。上述のペプチドをワクチン接種された動物の血清は、神経原線維病理を強くデコレートしたことから、それらの抗体が、病理学的タウタンパク質を標的化したことが確かめられた。ペプチド配列番号２７２および２７７のワクチン接種によって誘導された抗体は、脳組織において病理学的タウ構造のより弱い強度の染色を示す。より低いレベルのタウ特異的抗体応答を誘導したペプチドまたはタウ特異的抗体応答を誘導しなかったペプチド（配列番号２７３、２７４、２７８、２７９および２８２）は、この解析において陰性だった。アジュバントだけを投与されたマウス由来の血清を、ネガティブコントロールとして使用した。それらは、神経原線維の病理を認識しなかった（図８２Ｃ）。

【０５５２】
本明細書に引用されたすべての参考文献（特許、特許出願、論文、教科書などを含む）およびそれらの中で引用された参考文献は、それらがすでに引用されていない範囲まで、それらの全体が参照により本明細書に援用される。さらに、先のパラグラフにおいてより省略された形態で引用された以下の参考文献もまた、そのような参考文献において引用された参考文献を含んで、それらの全体が参照により本明細書に援用される。

【０５５３】
Alfaro-Acha et al. Handgrip Strength and Cognitive Decline in Older Mexican Americans. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. (2006); 61(8): 859-865.

【０５５４】
Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2001. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. Proc Natl Acad Sci USA 98: 6923-6928.

【０５５５】
Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (1997). Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. Journal of molecular biology 273, 927-948.

【０５５６】

Andreasen N, Blennow K, Zetterberg H. 2010. Neuroinflammation Screening in Immunotherapy Trials against Alzheimer's disease. Int J Alzheimers Dis. 2010:638379.

【0557】

Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. J Neurosci 27:9115-9129 (2007).

【0558】

Balin BJ, Little CS, Hammond CJ, Appelt DM, Whittum-Hudsond JA, Gerard HC, Hudson AP. 2008. Chlamydophila Pneumoniae and the Etiology of Late-Onset Alzheimer's disease. J Alzheimer's Dis 13:371-380.

【0559】

Berg, L., et al. Clinicopathologic Studies in Cognitively Healthy Aging and Alzheimer disease. ARCH NEUROL/VOL 55, MAR 1998.

【0560】

Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. Nat Rev Neurosci 9:768-778 (2008).

【0561】

Bierer, L.M., et al. Neocortical Neurofibrillary Tangles Correlate With Dementia Severity in Alzheimer's disease. Arch Neuro/Vol. 52, Jan 1995.

【0562】

Boyle, P., et al. Association of Muscle Strength With the Risk of Alzheimer disease and the Rate of Cognitive Decline in Community-Dwelling Older Persons. (REPRINTED) ARCH NEUROL/VOL 66 (NO. 11), NOV 2009.

【0563】

Braak H, Braak E (1999) Temporal sequence of Alzheimer's disease-related pathology. In: Neurodegenerative and age-related changes in structure and function of the cerebral cortex, vol. 14 (Peters, A. and Morrison, J. H., eds), pp 475-512 New York: Kluwer Academic/Plenum Publications.

【0564】

Braak, H., et al. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 82:239 - 259 (1991).

【0565】

Braak, H., et al. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. Acta Neuropathol (2011) 121:171-181.

【0566】

Buchman, A., et al., Frailty is Associated With Incident Alzheimer's disease and Cognitive Decline in the Elderly. Psychosomatic Medicine 69:483-489 (2007).

【0567】

Buchman, A., et al., Grip Strength and the Risk of Incident Alzheimer's disease. Neuroepidemiology;29:66-73 (2007)

【0568】

Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. Brain Research. Brain Research Reviews. 33, 95-130.

【０５６９】
Burns, A., Zaudig, M. 2002. Mild cognitive impairment in older people. Lancet. 360(9349),1963-5.
【０５７０】
Burns, J.M., et al. The pathology of the substantia nigra in Alzheimer disease with extrapyramidal signs. Neurology 2005;64;1397.
【０５７１】
Carter J, Lippa CF. Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. Curr Mol Med 1:733-737 (2001).
【０５７２】
Cevc G, Gebauer D, Stieber J, Schatzlein A, Blume G (1998) Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15.
【０５７３】
Chui, H.C., et al. Extrapyramidal Signs and Psychiatric Symptoms Predict Faster Cognitive Decline in Alzheimer's disease. Arch Neurol/Vol 51, July 1994.
【０５７４】
Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. Nature Rev Drug Discovery 9, 387-398.
【０５７５】
Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., Tolnay, M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. Nat Cell Biol 11(7), 909-13.
【０５７６】
Csokova N, Skrabana R, Liebig HD, Mederlyova A, Kontsek P, Novak M. Rapid purification of truncated tau proteins: model approach to purification of functionally active fragments of disordered proteins, implication for neurodegenerative diseases. Protein Expr Purif 35:366-372 (2004).
【０５７７】
Current Protocols in Protein Science 2001 May;Chapter 5
【０５７８】
Dickey CA, Ash P, Klosak N, Lee WC, Petrucelli L, Hutton M, Eckman CB (Pharmacologic reductions of total tau levels; implications for the role of microtubule dynamics in regulating tau expression. Mol Neurodegener 1:6.2006).
【０５７９】
Dickey CA, Eriksen J, Kamal A, Burrows F, Kasibhatla S, Eckman CB, Hutton M, Petrucelli L (Development of a high throughput drug screening assay for the detection of changes in tau levels -- proof of concept with HSP90 inhibitors. Curr Alzheimer Res 2:231-238.2005).
【０５８０】
Dickey CA, Petrucelli L. Current strategies for the treatment of Alzheimer's disease and other tauopathies. Expert Opin Ther Targets 10:665-676 (2006).
【０５８１】
Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C,

DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM (Immunization reverses m emory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disea se model. Nat Neurosci 5:452-457 (2002).

【０５８２】

Duyckaerts, C., et al. Classification and basic pathology of Alzheime r disease. Acta Neuropathol (2009) 118:5-36.

【０５８３】

Duyckaerts, C., et al. Diagnosis and Staging of Alzheimer disease. N eurobiology of Aging, Vol. 18, No. S4, pp. S33-S42 (1997)

【０５８４】

Duyckaerts, C., et al. The progression of the lesions in Alzheimer disease: insights from a prospective clinicopathological study. J. N eural Transm (1998) [Suppl] 53:119-126.

【０５８５】

D'Souza, I., and Schellenberg, G.D. (2005). Regulation of tau isoform expression and dementia. Biochimica et biophysica acta 1739, 104-115.

【０５８６】

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M (Global prevalence of dementia: a Delphi c onsensus study. Lancet 366:2112-2117(2005).

【０５８７】

Filipcik P, Zilka N, Bugos O, Kucerak J, Koson P, Novak P, Novak M. (2010) First transgenic rat model developing progressive cortical ne urofibrillary tangles. Neurobiol Aging. 2010 Dec 31. [Epub ahead of pr int]

【０５８８】

Fodero-Tavoletti , M.T., et al. F-THK523: a novel in vivo tau imagi ng ligand for Alzheimer’s disease. Brain 134; 1089-1100 (2011)

【０５８９】

Frenkel D, Dewachter I, Van Leuven F, Solomon B (Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of Alzheimer's dise ase by EFRH-phage immunization. Vaccine 21:1060-1065 (2003).

【０５９０】

Frost, B., Diamond, M.I. (2009). The expanding realm of prion phenom ena in neurodegenerative disease. Prion 3(2):74-7.

【０５９１】

Frost, B., Jacks, R.L., Diamond, M.I. (2009). Propagation of tau mis folding from the outside to the inside of a cell. J Biol Chem 284(1 9),12845-52

【０５９２】

Furlan R, Brambilla E, Sanvito F, Roccatagliata L, Olivieri S, Berga mi A, Pluchino S, Uccelli A, Comi G, Martino G (Vaccination with amy loid-beta peptide induces autoimmune encephalomyelitis in C57/BL6 mice. Brain 126:285-291 (2003).

【０５９３】

Gelinas DS, DaSilva K, Fenili D, St George-Hyslop P, McLaurin J (Im munotherapy for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 101 Su ppl 2:14657-14662 (2004).

【０５９４】

Giannakopoulos, P., et al. Pathologic Correlates of Apraxia in Alzheimer disease. ARCH NEUROL/VOL 55, MAY 1998.

【0595】

Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussiere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G., Hof, P.R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. Neurology 60,1495-500.

【0596】

Glenn GM, Rao M, Matyas GR, Alving CR. (1998). Skin immunization made possible by cholera toxin. Nature 391:851.

【0597】

Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A. (1989a). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron. 3, 519-526.

【0598】

Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., Crowther, R.A. (1989b.) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. EMBO J. 8,393-399.

【0599】

Goldman, W.P., et al., Motor dysfunction in mildly demented AD individuals without extrapyramidal signs. Neurology (1999);53;956.

【0600】

Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Ann Neurol 41:17-24 (1997).

【0601】

Gomez-Isla, T., Price, J.L., McKeel Jr, D.W., Morris, J.C., Growdon, J.H., Hyman, B.T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. J Neurosci 16(14),4491-500.

【0602】

Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Cuadros, R., Hernandez, F., and Avila, J. (2006). Extracellular tau is toxic to neuronal cells. FEBS Lett 580(20), 4842-50.

【0603】

Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Rubio, A., Diaz-Hernandez, J.I., Miras-Portugal, M.T., Avila, J. (2009). Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. Eur Neuropsychopharmacol 19(10):708-17.

【0604】

Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M.T., Avila, J. (2008). Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. Mol Cell Neurosci 37(4), 673-81.

【0605】

Goode, B.L., Chau, M., Denis, P.E., Feinstein, S.C. 2000. Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms.

Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease. J Biol Chem 275, 38182-38189.

【０６０６】

Goode, B.L., Feinstein, S.C. (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. J Cell Biol. 124, 769-782.

【０６０７】

Greenberg SG, Davies P. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci USA 87:5827-5831 (1990).

【０６０８】

Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI. (1992). Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. The Journal of Biological Chemistry 267: 564-569.

【０６０９】

Gruden MA, Davudova TB, Malisauskas M, Zamotin VV, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Kostanyan IA, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. Autoimmune responses to amyloid structures of Abeta(25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord 18:165-171 (2004).

【０６１０】

Grudzien, A., et al. Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer’s disease. Neurobiology of Aging 28 (2007) 327-335.

【０６１１】

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proc Natl Acad Sci U S A 83:4913-4917 (1986).

【０６１２】

Hampel, H., Blennow, K., Shaw, L.M., Hoessler, Y.C., Zetterberg, H., Trojanowski, J.Q. (2010). Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. Exp Gerontol 45(1), 30-40.

【０６１３】

Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends Pharmacol Sci 12:383-388 (1991).

【０６１４】

Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. Nat Neurosci 1:355-358 (1998).

【０６１５】

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science 297:353-356 (2002).

【０６１６】

Haynes JR, McCabe DE, Swain WF, Widera G, Fuller JT. Particle-mediated nucleic acid immunization. J Biotechnol 44:37-42.1996).

【０６１７】

Hertz, L. Is Alzheimer’s disease an anterograde degeneration, origina

ting in the brainstem, and disrupting metabolic and functional interactions between neurons and glial cells? Brain Research Reviews, 14 (1989) 335-353.

【０６１８】

Hunter RL. Overview of vaccine adjuvants: present and future. Vaccine 2002;20 Suppl. 3:S7-12.

【０６１９】

Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Developing pharmacological therapies for Alzheimer disease. Cell Mol Life Sci 64:2234-2244 (2007).

【０６２０】

Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Inhibition of neurofibrillary degeneration: a promising approach to Alzheimer's disease and other tauopathies. Curr Drug Targets 5:495-502 (2004).

【０６２１】

Ivanovova N, Handzusova M, Hanes J, Kontsekova E, Novak M. High-yield purification of fetal tau preserving its structure and phosphorylation pattern. J Immunol Methods 339:17-22 (2008).

【０６２２】

Itzhaki RF, Wozniak MA. 2008. Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer’s disease: The Enemy Within. J Alzheimers Dis. 13:393-405.

【０６２３】

Jacobsen JS, Reinhart P, Pangalos MN. Current concepts in therapeutic strategies targeting cognitive decline and disease modification in Alzheimer's disease. NeuroRx 2:612-626 (2005).

【０６２４】

Jakes, R., Novak, M., Davison, M., Wischik, C.M. (1991). Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. EMBO J 10, 2725-2729.

【０６２５】

Jansen FK, Blythman HE, Carriere D, Casellas P, Gros O, Gros P, Laurent JC, Paolucci F, Pau B, Poncelet P, Richer G, Vidal H, Voisin GA. (1982). Immunotoxins: hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity. Immun. Rev. 62, 185-216

【０６２６】

Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D (A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. Nature 408:979-982.2000).

【０６２７】

Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC (1998). Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant,Advanced Drug Delivery Reviews, 32:173-186.

【０６２８】

Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, Pluckthun A. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reenginered phage display system. J Immunol Methods. 1997 Feb 14;201(1): 35-55

【０６２９】

Kawasaki G (1991). International Patent Application Publication No. WO

91/05058.
【０６３０】
Kontsekova, E. (2002) International Patent Application Publication No. WO/2004/007547.
【０６３１】
Korenova M, Zilka N, Stozicka Z, Bugos O, Vanicky I, Novak M (NeuroScale, the battery of behavioural tests with novel scoring system for phenotyping of transgenic rat model of tauopathy. J Neurosci Methods 177:108-114.2009).
【０６３２】
Kosik, K.S., Kowall, N.W., McKee, A. (1989a). Along the way to a neurofibrillary tangle: a look at the structure of tau. Ann Med. 21,109-112.
【０６３３】
Koson P, Zilka N, Kovac A, Kovacech B, Korenova M, Filipcik P, Novak M. Truncated tau expression levels determine life span of a rat model of tauopathy without causing neuronal loss or correlating with terminal neurofibrillary tangle load. Eur J Neurosci 28:239-246 (2008).
【０６３４】
Kovac, A., Zilkova, M., Deli, M.A., Zilka, N., Novak, M. (2009). Human truncated tau is using a different mechanism from amyloid-beta to damage the blood-brain barrier. J Alzheimers Dis 18(4), 897-906.
【０６３５】
Kovacech B, Novak M. (2010). Tau truncation is a productive posttranslational modification of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 7: in press.
【０６３６】
Kovacech B, Skrabana R, Novak M. (2010). Transition of tau protein from disordered to misordered in Alzheimer's disease. Neurodegener Dis 7: 24-27.
【０６３７】
Kraemer, H.C., et al. 'How Far' vs 'How Fast' in Alzheimer's disease. Arch Neurol/Vol 51, Mar (1994).
【０６３８】
Krajciova, G., Skrabana, R., Filipcik, P., and Novak, M. (2008). Preserving free thiols of intrinsically disordered tau protein without the use of a reducing agent. Anal Biochem 383, 343-345.
【０６３９】
Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970).
【０６４０】
Langer R, Cleland JL, Hanes J. (1997). New advances in microsphere-based single-dose vaccines. Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119.
【０６４１】
Langer R. New methods of drug delivery. (1990) Science 249:1527-33.
【０６４２】
Larbig G, Pickhardt M, Lloyd DG, Schmidt B, Mandelkow E. Screening for inhibitors of tau protein aggregation into Alzheimer paired helical filaments: a ligand based approach results in successful scaffold hopping. Curr Alzheimer Res 4:315-323 (2007).

【０６４３】
Lee HG, Perry G, Moreira PI, Garrett MR, Liu Q, Zhu X, Takeda A, Nunomura A, Smith MA Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? Trends Mol Med 11:164-169 (2005).
【０６４４】
Liu, Y., et al. Pathological Correlates of Extrapyramidal Signs in Alzheimer’s disease. Ann Neurol (1997);41:368-374.
【０６４５】
Livingston, B.D., Crimi, C., Grey, H., Ishioka, G., Chisari, F.V., Fikes, J., Grey, H., Chesnut, R.W., and Sette, A. The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. J. Immunol. 159:1383-1392 (1997).
【０６４６】
Louis, E.D., et al. Parkinsonian Signs in Older People in a Community-Based Study. (REPRINTED) ARCH NEUROL/VOL 61, (AUG 2004).
【０６４７】
MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. J Mol Biol. (1996) Oct 11;262(5):732-45.
【０６４８】
Macikova I., Dedek L., Kontsekova E., Kontsek P., Ciampor F, Novak M., Vrzal V. (1992) Common and different antigenic properties of the rabies virus glycoprotein between strains SAD-Vnukovo and Pitman-Moore. Acta virol. 36, 541-55.
【０６４９】
Marz W, Scharnagl H, Kirca M, Bohl J, Gross W, Ohm TG. 1996. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both senile plaque load and Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. Ann N Y Acad Sci. 777:276-80.
【０６５０】
Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VM Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. Neuron 13:989-1002 (1994).
【０６５１】
Miklossy J. 2008. Chronic Inflammation and Amyloidogenesis in Alzheimer’s disease - Role of Spirochetes. J Alzheimer’s Dis 13:381-391 381
【０６５２】
Moe, J.G., Chatterjee, I., Davidowitz, E.J., Arancio, O. (2009). Modulation of synaptic function by extracellular tau enriched in oligomers. Alzheimer Dem 5 (4), P499
【０６５３】
Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. Nature 408:982-985 (2000).
【０６５４】
Morgan D. 2011. Immunotherapy for Alzheimer's disease. J Intern Med.

269(1):54-63.
【0655】
Morris, J.C., et al. Clinical and Pathological Aspects of Parkinsonism in Alzheimer's disease. Arch Neurol-Vol 46 (June 1989).
【0656】
Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi H, Tabira T, Nabeshima T. Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. FASEB J 21:2135-2148 (2007).
【0657】
Myszka, D.G. (1999) Improving biosensor analysis. J. Mol. Recognit. 12, 279-84.
【0658】
Necula M, Chirita CN, Kuret J Cyanine dye N744 inhibits tau fibrillization by blocking filament extension: implications for the treatment of tauopathic neurodegenerative diseases. Biochemistry 44:10227-10237 (2005).
【0659】
Nicolau C, Greferath R, Balaban TS, Lazarte JE, Hopkins RJ A liposome-based therapeutic vaccine against beta -amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice. Proc Natl Acad Sci U S A 99:2332-2337 (2002).
【0660】
Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K (Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 102:6990-6995 (2005).
【0661】
Novak, M., Kabat, J., Wischik, C.M. (1993). Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. EMBO J 12, 365-70.
【0662】
Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM. Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. Neuron 43:321-332 (2004).
【0663】
Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron 39:409-421 (2003).
【0664】
O'Hagan DT, Valiante NM (Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. Nat Rev Drug Discov 2:727-735 (2003).
【0665】
O'Mahony, DJ. (1995) International Patent Application Publication No. WO9717613
【0666】
Otvos L, Jr., Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM. (1994). Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated a

t serine residues 396 and 404. Journal of neuroscience research 39: 669-673.

【0667】

Paul A, Cevc G, Bachhawat BK. (1995). Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. Eur J Immunol. Dec;25(12):3521-4.

【0668】

Pettersson, A.F., et al. Motor Function in Subjects with Mild Cognitive Impairment and Early Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord (2005);19:299-304.

【0669】

Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, Hascher A, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E Screening for inhibitors of tau polymerization. Curr Alzheimer Res 2:219-226 (2005).

【0670】

Price JL, Morris JC Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. Ann Neurol 45:358-368 (1999).

【0671】

Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 99:6364-6369 (2002).

【0672】

Reichert, J.M. (2011). Antibody-based therapeutics to watch in 2011. mAbs 3(1),76-99.

【0673】

Reitz, C., et al. Memory performance is related to amyloid and tau pathology in the hippocampus. (Mar 2009); J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2009;80;715-721; originally published online.

【0674】

Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. Science 316:750-754 (2007).

【0675】

Sambrook J, Russell D (2001) Moleclular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

【0676】

Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. Science 309:476-481 (2005).

【0677】

Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschosser C, Asch E, Blasko I, Parson W, Bock G, Schonitzer D, Trannoy E, Grubeck-Loebenstein B. 2002. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. J Immunol. 168(11):5893-9.

【0678】

Scarmeas, N., et al. Motor signs during the course of Alzheimer dis

ease. Neurology. (2004); 63(6): 975-982.
【０６７９】
Scarmeas, N., et al. Motor signs predict poor outcomes in Alzheimer disease. Neurology. (2005); 64(10): 1696-1703. doi:10.1212/01.WNL.0000162054.15428.E9.
【０６８０】
Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandevert C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. Nature 400:173-177 (1999).
【０６８１】
Schenk D, Hagen M, Seubert P Current progress in beta-amyloid immunotherapy. Curr Opin Immunol 16:599-606 (2004).
【０６８２】
Schneider, A., Mandelkow, E., (2008). Tau-based treatment strategies in neurodegenerative diseases. Neurotherapeutics 5(3), 443-57.
【０６８３】
Seabrook GR, Ray WJ, Shearman M, Hutton M Beyond amyloid: the next generation of Alzheimer's disease therapeutics. Mol Interv 7:261-270 (2007).
【０６８４】
Selkoe DJ Alzheimer's disease: a central role for amyloid. J Neuropathol Exp Neurol 53:438-447 (1994).
【０６８５】
Shipton OA, Leitz JR, Dworzak J, Acton CE, Tunbridge EM, Denk F, Dawson HN, Vitek MP, Wade-Martins R, Paulsen O, Vargas-Caballero M (Tau Protein Is Required for Amyloid {beta}-Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation. J Neurosci 31:1688-1692 (2011).
【０６８６】
Siegrist CA, Aspinall R. (2009). B-cell responses to vaccination at the extremes of age. Nat Rev Immunol. 9(3):185-94
【０６８７】
Sigurdsson EM, Knudsen E, Asuni A, Fitzer-Attas C, Sage D, Quartermain D, Goni F, Frangione B, Wisniewski T (An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid-beta derivatives. J Neurosci 24:6277-6282 (2004).
【０６８８】
Sigurdsson EM, Scholtzova H, Mehta PD, Frangione B, Wisniewski T Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid-beta homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. Am J Pathol 159:439-447 (2001).
【０６８９】
Simic, G., et al. Annotation - Does Alzheimer's disease begin in the brainstem? Neuropathol Appl Neurobiol. 2009 December ; 35(6): 532-554. doi:10.1111/j.1365-2990.2009.01038.x.
【０６９０】
Skrabana, R., Sevcik, l., Novak, M. (2006). Intrinsically disordered

proteins in the neurodegenerative processes: formation of tau protein paired helical filaments and their analysis. Cell Mol Neurobiol 26, 1085-1097.

【0691】

Skrabana, R., M. Skrabanova-Khuebachova, et al. (2006). "Alzheimer's-disease-associated conformation of intrinsically disordered tau protein studied by intrinsically disordered protein liquid-phase competitive enzyme-linked immunosorbent assay." Anal Biochem 359(2): 230-7.

【0692】

Sloane PD, Zimmerman S, Suchindran C, Reed P, Wang L, Boustani M, Sudha S The public health impact of Alzheimer's disease, 2000-2050: potential implication of treatment advances. Annu Rev Public Health 23:213-231 (2002).

【0693】

Soininen, H., et al. Extrapyramidal signs in Alzheimer's disease: a 3-year follow-up study. J Neural Transm [P-D Sect] (1992) 4:107-119.

【0694】

Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Fulga TA, Felch DL, Feany MB (Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. Mol Biol Cell 18:5060-5068 (2007a).

【0695】

Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Mulkearns EE, Shulman JM, Biernat J, Mandelkow EM, Feany MB. S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in Drosophila. J Neurosci Res 85:1271-1278 (2007b).

【0696】

Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, Goedert M, Hasegawa M. Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. J Biol Chem 280:7614-7623 (2005a).

【0697】

Taniguchi T, Sumida M, Hiraoka S, Tomoo K, Kakehi T, Minoura K, Sugiyama S, Inaka K, Ishida T, Saito N, Tanaka C (Effects of different anti-tau antibodies on tau fibrillogenesis: RTA-1 and RTA-2 counteract tau aggregation. FEBS Lett 579:1399-1404 (2005b).

【0698】

Trollet C, Scherman D, Bigey P Delivery of DNA into muscle for treating systemic diseases: advantages and challenges. Methods Mol Biol 423:199-214 (2008).

【0699】

van den Berg JH, Nujien B, Beijnen JH, Vincent A, van Tinteren H, Kluge J, Woerdeman LA, Hennink WE, Storm G, Schumacher TN, Haanen JB. Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. Hum Gene Ther 20:181-189 (2009).

【0700】

Van Nest G., Ott G., Barchweld G. (1990) Patent Application Publication No. WO9014837

【0701】

Vechterova L, Kontsekova E, Zilka N, Ferencik M, Ravid R, Novak M. (2003). DC11: a novel monoclonal antibody revealing Alzheimer's disease-specific tau epitope. Neuroreport 14: 87-91.

【０７０２】
Wai, M., et al. Co-localization of hyperphosphorylated tau and caspases in the brainstem of Alzheimer’s disease patients. Biogerontology (2009) 10:457-469.
【０７０３】
Waite, L.M., et al. Gait slowing as a predictor of incident dementia: 6-year longitudinal data from the Sydney Older Persons Study. Journal of the Neurological Sciences 229- 230 (2005) 89-93
【０７０４】
Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. Neuron 44:181-193 (2004).
【０７０５】
Wang, Li, et al. Performance-Based Physical Function and Future Dementia in Older People. (REPRINTED) ARCH INTERN MED/VOL 166 (MAY 22, 2006).
【０７０６】
Weiner HL, Lemere CA, Maron R, Spooner ET, Grenfell TJ, Mori C, Issazadeh S, Hancock WW, Selkoe DJ (Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. Ann Neurol 48:567-579 (2000).
【０７０７】
Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. 2009. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. Trends Immunol. 30(7):306-12.
【０７０８】
West, M.J., Coleman, P.D., Flood, D.G., Troncoso, J.C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. Lancet 344,769-72.
【０７０９】
Wilson, R.S., et al. Parkinsonian-like Signs and Risk of Incident Alzheimer disease in Older Persons. (REPRINTED) ARCH NEUROL/VOL 60 (APR 2003).
【０７１０】
Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. J Pharm Sci 98:1278-1316 (2009).
【０７１１】
Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR (Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. Proc Natl Acad Sci U S A 93:11213-11218 (1996).
【０７１２】
Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W., Crowther, R.A. (1988a). Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, Proc Natl Acad Sci USA 85,4884-8.
【０７１３】
Wischik, C.M., Novak, M.. Thogersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., Klug, A. (1988b). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, Proc Natl Acad Sci USA 85

, 4506-10.
【０７１４】
Xing Z, Santosuosso M, McCormick S, Yang TC, Millar J, Hitt M, Wan Y, Bramson J, Vordermeier HM. Recent advances in the development of adenovirus- and poxvirus-vectored tuberculosis vaccines. Curr Gene Ther 5:485-492 (2005).
【０７１５】
Zarow, C., et al. Neuronal Loss Is Greater in the Locus Coeruleus Than Nucleus Basalis and Substantia Nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. (REPRINTED) ARCH NEUROL/VOL 60, MAR 2003.
【０７１６】
Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM, Trojanowski JQ. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. Proc Natl Acad Sci U S A 102:227-231 (2005).
【０７１７】
Zhang J, Wu X, Qin C, Qi J, Ma S, Zhang H, Kong Q, Chen D, Ba D, He W (A novel recombinant adeno-associated virus vaccine reduces behavioural impairment and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis 14:365-379 (2003).
【０７１８】
Zielinski C, Scheiner O, Jensen-Jarolim E, Breiteneder H, Pehamberger H. (2003). Patent Application Publication No. WO03/020750
【０７１９】
Zilka N, Vechterova L, Kontsekova E, Novak M. (2003) A rapid immunohistochemical primary screening assay for hybridomas. J Immunol Methods. 272(1-2):49-53.
【０７２０】
Zilka N, Filipcik P, Koson P, Fialova L, Skrabana R, Zilkova M, Rolkova G, Kontsekova E, Novak M. Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. FEBS Lett 580:3582-3588 (2006).
【０７２１】
Zilka, N., et al. Chaperone-like Antibodies Targeting Misfolded Tau Protein: New Vistas in the Immunotherapy of Neurodegenerative Foldopathies. Journal of Alzheimer’s disease 15 (2008) 169-179.
【０７２２】
Zilkova, M., Koson, P., Zilka, N. 2006. The hunt for dying neurons: insight into the neuronal loss in Alzheimer's disease. Bratisl Lek Listy 107(9-10), 366-73.

【図１】

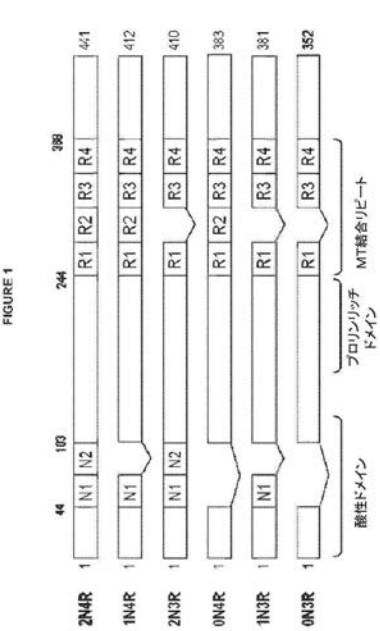


FIGURE 1
44
100
244
380
2N4R
1N4R
2N3R
0N4R
1N3R
0N3R
N1
N2
R1
R2
R3
R4
441
412
410
383
381
352
酸性ドメイン
プロリンリッチドメイン
MT結合リピート

【図２】

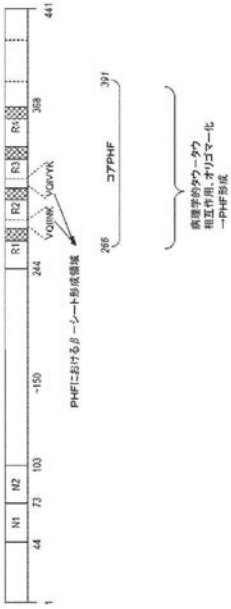


FIGURE 2
N1
N2
R1
R2
R3
R4
44
73
103
150
244
368
441
VQIINK
VQIVYK
PHFにおけるβ－シート形成領域
266
291
コアPHF
病理学的タウ－タウ
相互作用，オリゴマー化
→PHF形成

【図３－１】

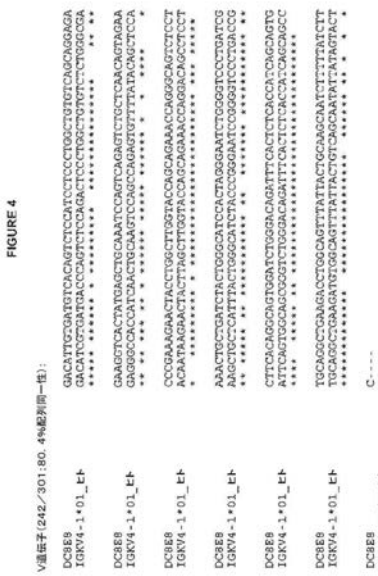
FIGURE 3
A. DC8E8可変軽鎖(VL)のヌクレオチド配列:
B. DC8E8可変軽鎖(VL)のアミノ酸配列:
CDR1: QSLLNSRTRKNY
CDR2: WAS
CDR3: KQSFYLRT
C. DC8E8(VL)配列と最も近いマウス生殖細胞系列配列IGKV8－21*01とのアラインメント:
V遺伝子(298／301:99.0%配列同一性):
DC8E8 軽鎖
IGKV8-21*01
DC8E8 軽鎖
IGKV8-21*01
DC8E8 軽鎖
IGKV8-21*01
DC8E8 軽鎖
IGKV8-21*01
J遺伝子(35／36:97.2%配列同一性):
DC8E8 軽鎖
IGKJ1*01
DC8E8 軽鎖
IGKV8-21*01
D. DC8E8重鎖可変領域(VH)のヌクレオチド配列:
E. DC8E8重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列:
CDR1: GYIFTDYVIS
CDR2: IFPRSGST
CDR3: ARDYYGTSFAMDY
F. DC8E8(VH)配列と最も近いマウス生殖細胞系列配列IGKV8－81*01とのアラインメント:
V遺伝子(269／294:91.5%配列同一性):
DC8E8 重鎖
IGHV1-81*01

【図３－２】

【図３－３】

【図３－４】

【図４】



【図５－１】

【図５－２】

【図６Ａ】

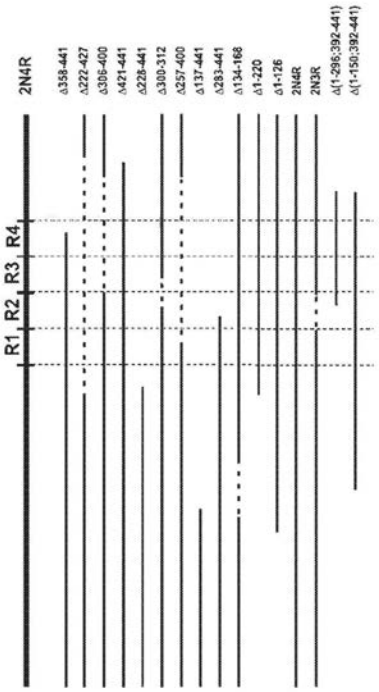


FIGURE 6A

【図６Ｂ－１】

FIGURE 6B

Δ358-441
1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
301 PGGGSVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSL

Δ222-427
1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT RLADEVSASL AKQGL

Δ306-400
1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
301 PGGGSGDTSP RMLSNVSSTG SIDMVDSPQL ATLADEVSAS LAKQGL

Δ421-441
1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
301 PGGGSVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSLDNI
361 THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV

Δ228-441
1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVA

【図６Ｂ－２】

Δ300-312
1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
301 DLSKVTSKCG SLGNIHHKPG GGQVEVKSEK LDFKDRVQSK IGSLDNITHV PGGGNKKIET
361 HKLTFRENAK AKTDHGAEIV YKSPVVSGDT SPRHLSNVSS TGSIDMVDSP QLATLADEVS
421 ASLAKQGL

Δ257-400
1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVGDTS PRHLSNVSST GSIDMVDSPQ LATLADEVSA SLAKQGL

Δ137-441
1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTG

Δ283-441
1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KL

Δ134-168
1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDTRIPAKT PPAPKTPPSS GEPPKSGDRS GYSSPGSPGT PGSRSRTPSL
181 PTPPTREPKK VAVVRTPPKS PSSAKSRLQT APVPMPDLKN VKSKIGSTEN LKHQPGGGKV
241 QIINKKLDLS NVQSKCGSKD NIKHVPGGGS VQIVYKPVDL SKVTSKCGSL GNIHHKPGGG
301 QVEVKSEKLD FKDRVQSKIG SLDNITHVPG GGNKKIETHK LTFRENAKAK TDHGAEIVYK
361 SPVVSGDTSP RHLSNVSSTG SIDMVDSPQL ATLADEVSAS LAKQGL

Δ1-220
1 MREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKSK IGSTENLKHQ PGGGKVQIIN
61 KKLDLSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV YKPVDLSKVT SKCGSLGNIH HKPGGGQVEV
121 KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG AEIVYKSPVV
181 SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

【図６Ｂ－３】

Δ1-126
1 MVSKSKDGTG SDDKKAKGAD GKTKIATPRG AAPPGQKGQA NATRIPAKTP PAPKTPPSSG
61 EPPKSGDRSG YSSPGSPGTP GSRSRTPSLP TPPTREPKKV AVVRTPPKSP SSAKSRLQTA
121 PVPMPDLKNV KSKIGSTENL KHQPGGGKVQ IINKKLDLSN VQSKCGSKDN IKHVPGGGSV
181 QIVYKPVDLS KVTSKCGSLG NIHHKPGGGQ VEVKSEKLDF KDRVQSKIGS LDNITHVPGG
241 GNKKIETHKL TFRENAKAKT DHGAEIVYKS PVVSGDTSPR HLSNVSSTGS IDMVDSPQLA
301 TLADEVSASL AKQGL

4R2N
1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK CGSLGNIHHK
301 PGGGQVEVKS EKLDFKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFREN AKAKTDHGAE
361 IVYKSPVVSG DTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

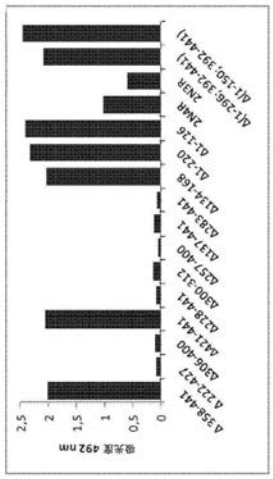
Δ(1-296;392-441)
1 MIKHVPGGGS VQIVYKPVDL SKVTSKCGSL GNIHHKPGGG QVEVKSEKLD FKDRVQSKIG
61 SLDNITHVPG GGNKKIETHK LTFRENAKAK TDHGAE

Δ(1-150;392-441)
1 MIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
61 SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKSK IGSTENLKHQ
121 PGGGKVQIIN KKLDLSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV YKPVDLSKVT SKCGSLGNIH
181 HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG
241 AE

注意
タウ欠失コンストラクトΔ1－220、Δ(1－296;392－441)およびΔ(1－150;392－441)における1位のメチオニン(M)は、天然のヒトタウ配列の一部ではない。
それは、細菌の翻訳機構に開始コドンを提供するために付加された。

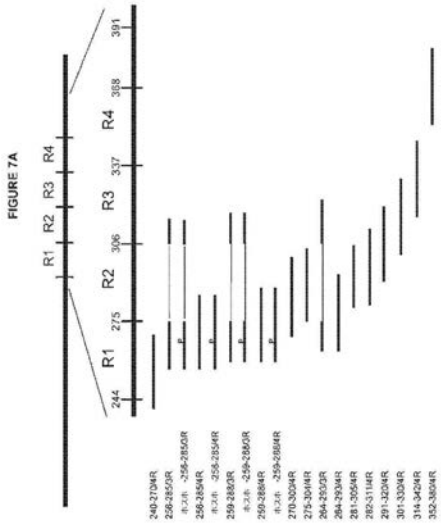
【図６Ｃ】

FIGURE 6C



【図７Ａ】

FIGURE 7A

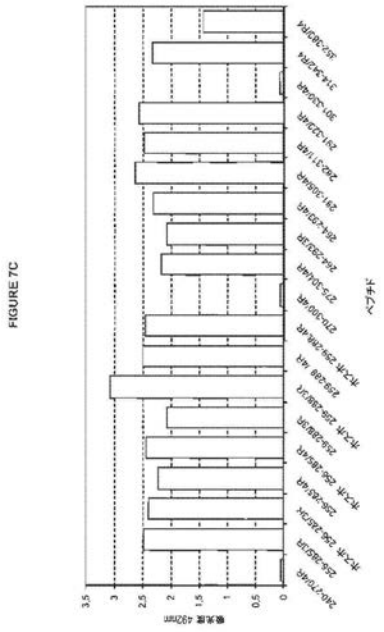


【図７Ｂ】

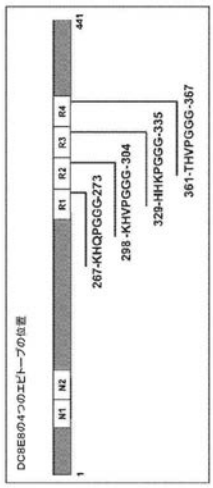
FIGURE 7B

合成ペプチド	配列
240-270/4R	KSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQP
256-285/3R	VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDLS
共通 256-285/3R (pSer262)	VKSKIGpSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDLS
256-285/4R	VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS
共通 256-285/4R (pSer262)	VKSKIGpSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS
259-288/3R	KIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDLSKVT
共通 259-288/3R (pSer262)	KIGpSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDLSKVT
259-288/4R	KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ
共通 259-288/4R (pSer262)	KIGpSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ
270-300/4R	PGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV
275-304/4R	VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG
264-293/3R	ENLKHQPGGGKVQIVYKPVDLSKVTSKCGS
264-293/4R	ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS
281-305/4R	KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS
282-311/4R	LDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK
291-320/4R	CGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTS
301-330/4R	PGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHH
314-342/4R	DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE
352-380/4R	SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFREN

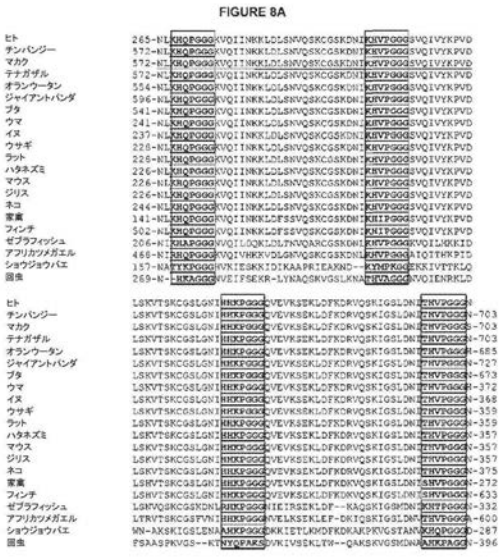
【図７Ｃ】



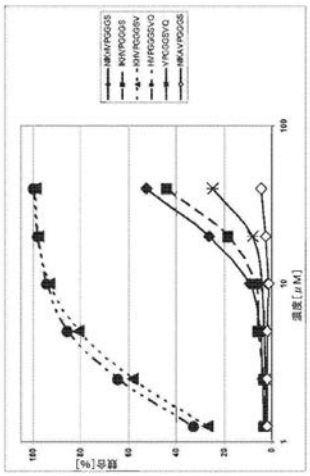
【図７Ｄ】



【図８Ａ】

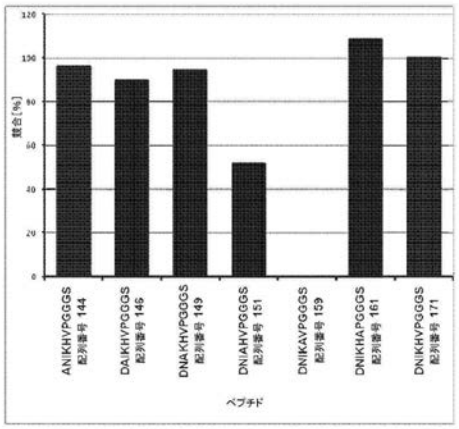


【図８Ｂ】



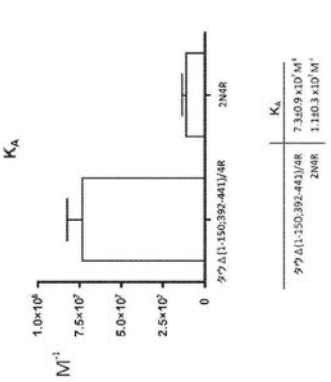
【図８Ｃ】

FIGURE 8C



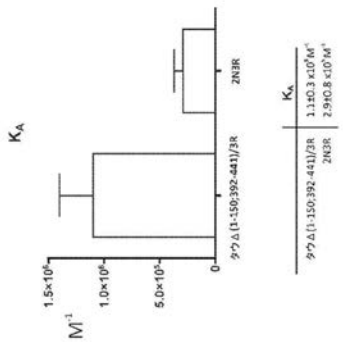
【図９Ａ】

FIGURE 9A



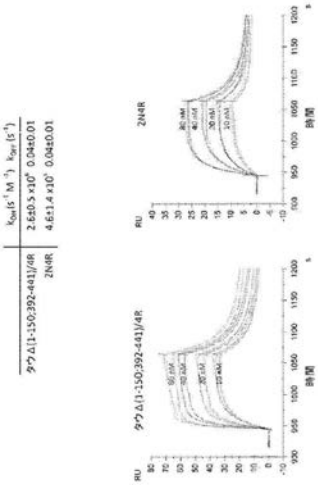
【図９Ｂ】

FIGURE 9B

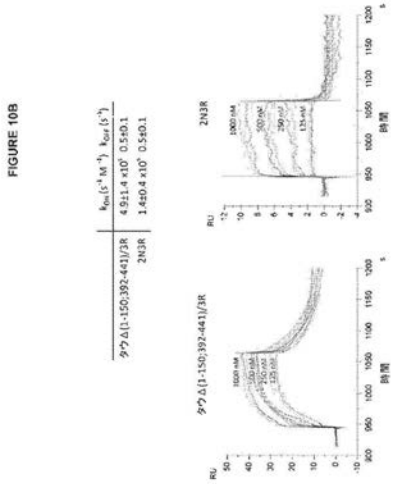


【図１０Ａ】

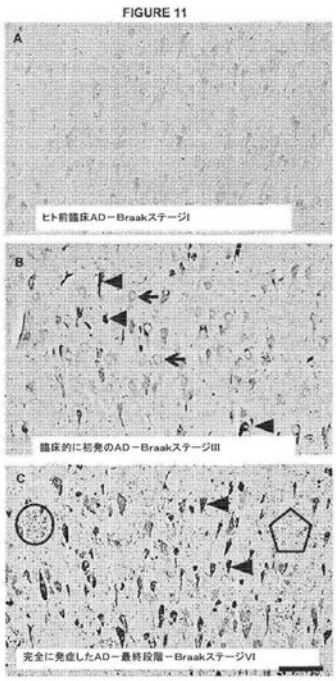
FIGURE 10A



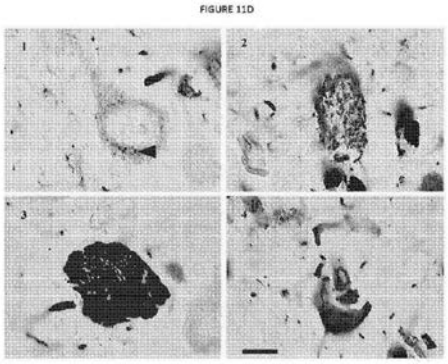
【図１０Ｂ】



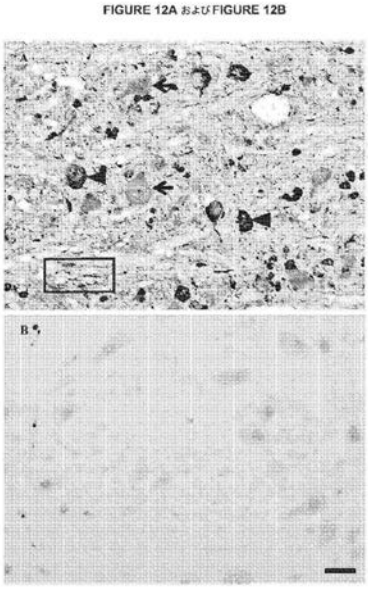
【図１１－１】



【図１１－２】

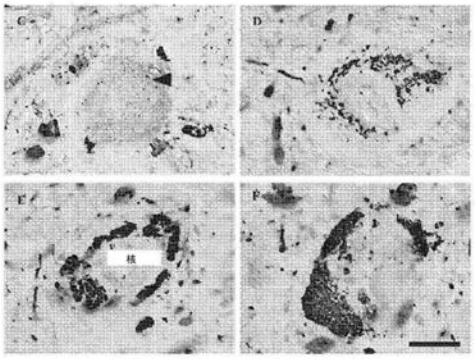


【図１２－１】



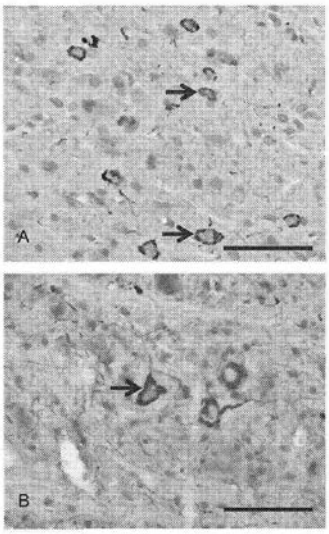
【図１２－２】

FIGURE 12C から FIGURE 12F



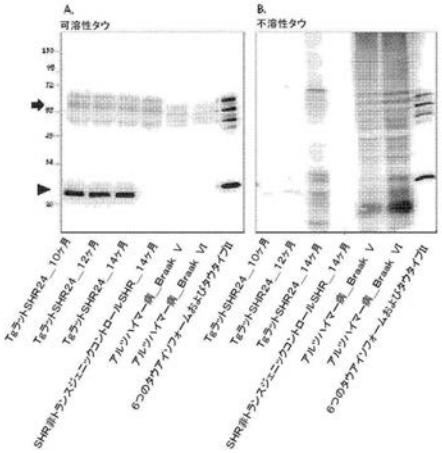
【図１３】

FIGURE 13



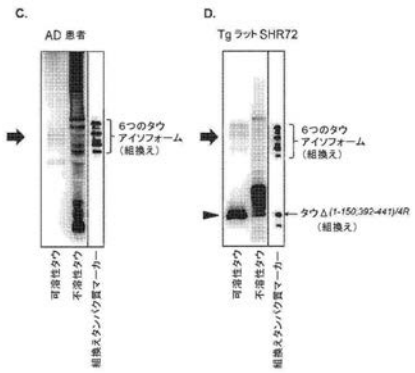
【図１４－１】

FIGURE 14A および 14B



【図１４－２】

FIGURE 14CおよびD



【図１５】

FIGURE 15A

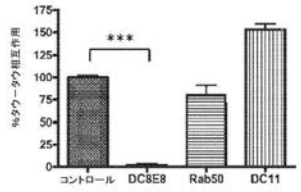
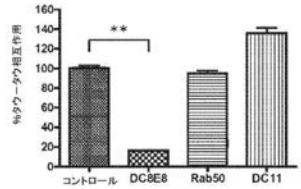
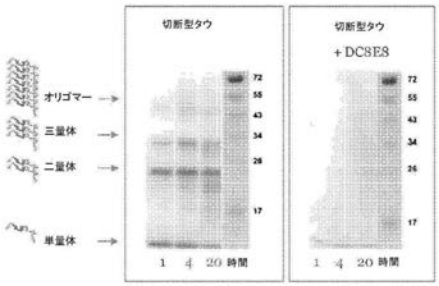


FIGURE 15B



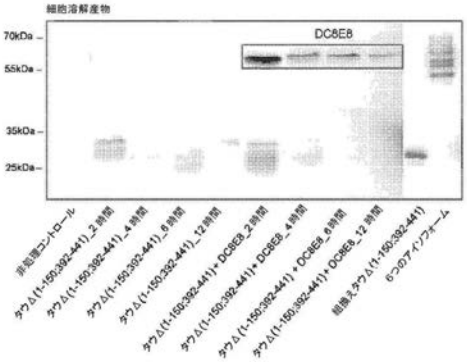
【図１６】

FIGURE 16



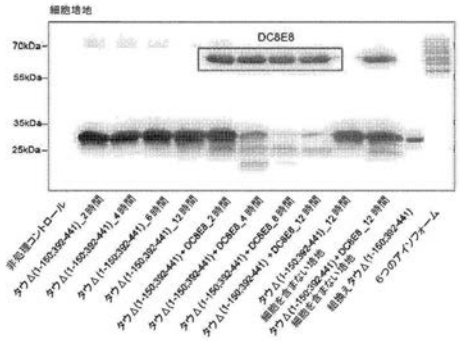
【図１７Ａ】

FIGURE17A

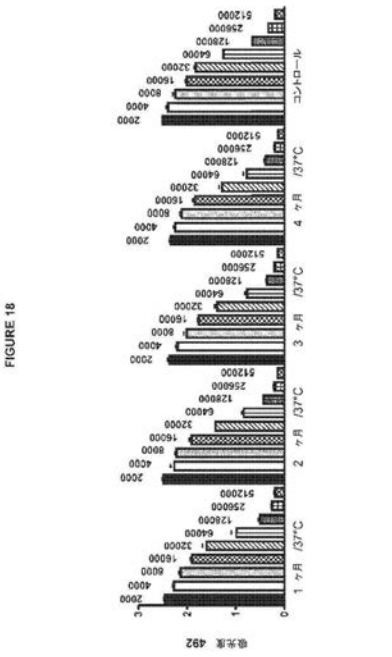


【図１７Ｂ】

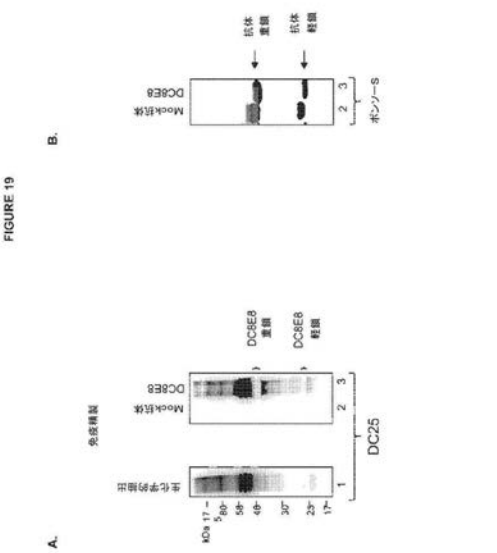
FIGURE 17B



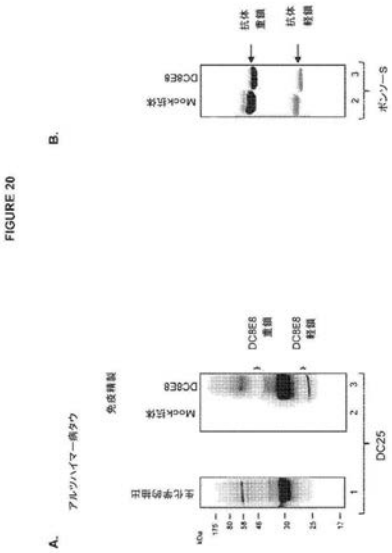
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【図２１】

FIGURE 21A

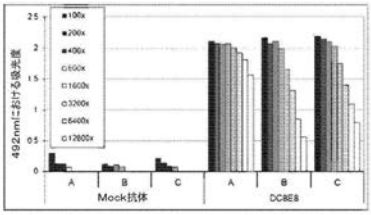
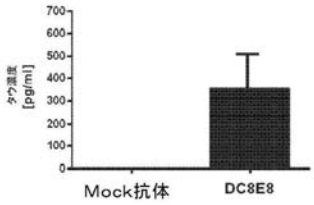
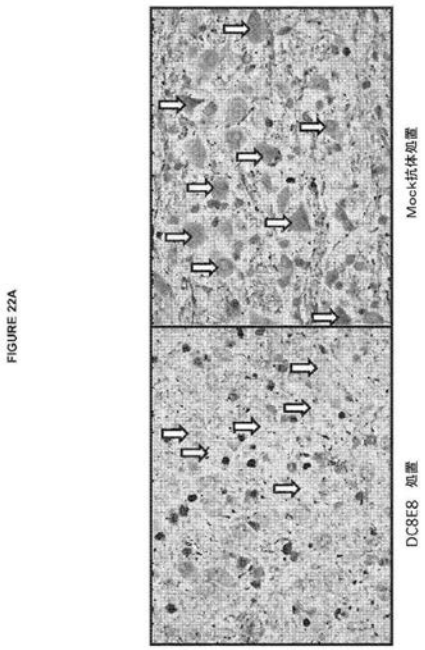


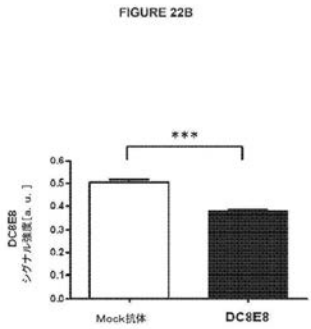
FIGURE 21B



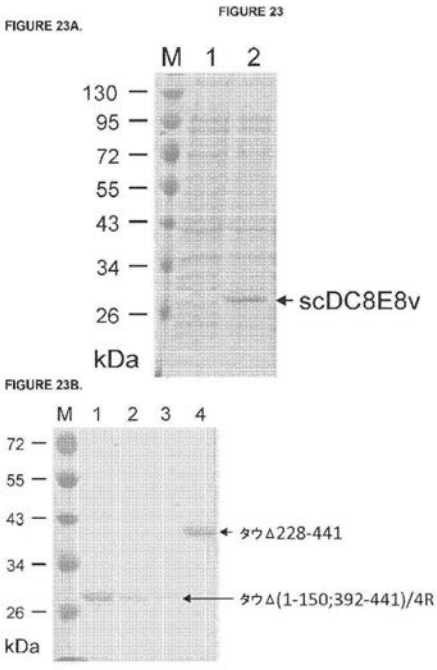
【図２２Ａ】



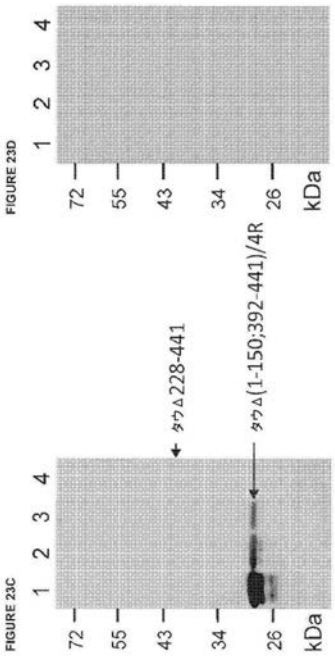
【図２２Ｂ】



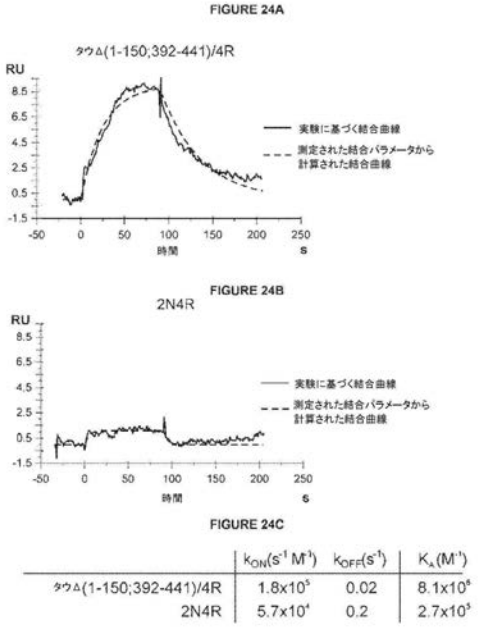
【図２３－１】



【図２３－２】

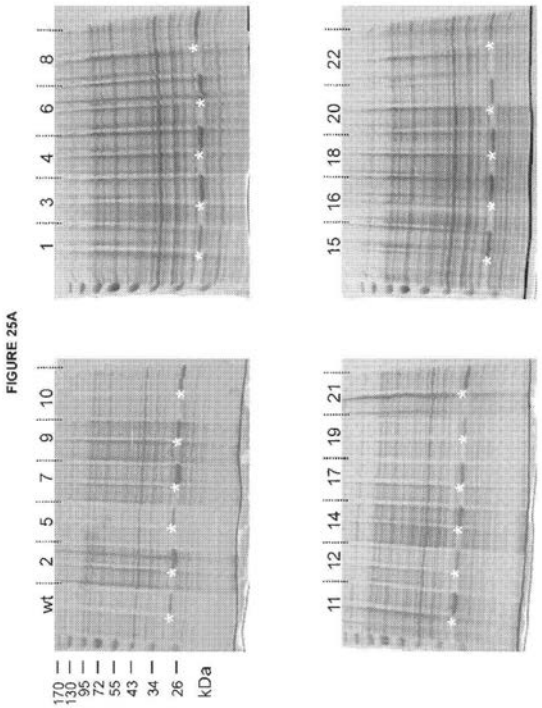


【図２４】

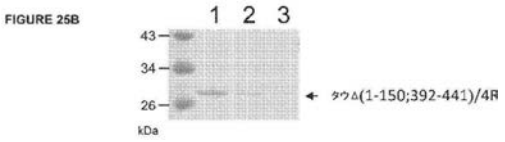


	$k_{ON}(s^{-1}M^{-1})$	$k_{OFF}(s^{-1})$	$K_A(M^{-1})$
タウΔ(1-150;392-441)/4R	$1.8x10^5$	0.02	$8.1x10^6$
2N4R	$5.7x10^4$	0.2	$2.7x10^5$

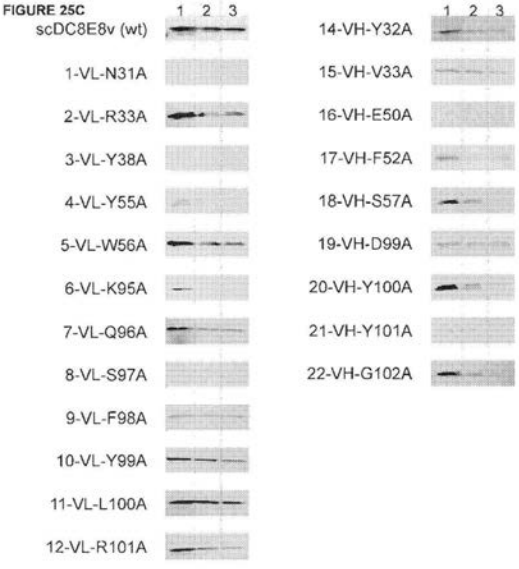
【図２５Ａ】



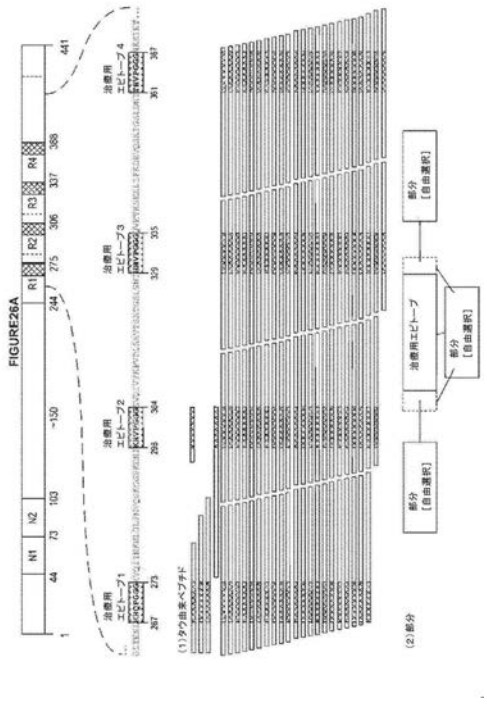
【図２５Ｂ】



【図２５Ｃ】



【図２６Ａ】



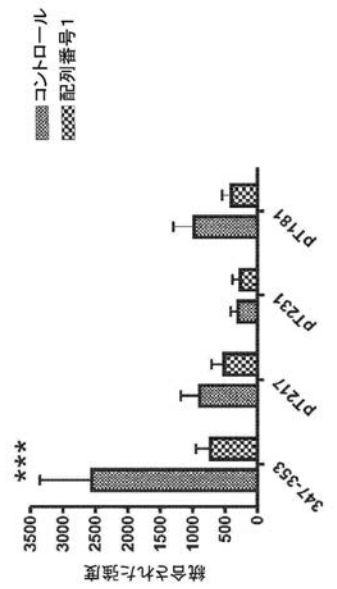
【図２６Ｂ】

FIGURE 26B

配列番号		免疫原	不溶性タウの減少(%) AD脳連エピトープ				
			347-353	pT217	pT231	pS202/pT205	pT181
配列番号	1	タウ 251-280	71	42	11	ND	58
配列番号	2	タウ 256-285	41	72	64	80	74
配列番号	2	タウ 256-285/pS262	46	73	85	82	82
配列番号	3	タウ 259-288	40	30	63	61	74
配列番号	4	タウ 275-304	63	92	95	95	87
配列番号	108	タウ 294-305	70	96	97	98	94
配列番号	5	タウ 201-230/pT217	1	-11	33	-31	30
配列番号	6	タウ 379-408/pS396/pS404	-87	-33	-44	19	-7
配列番号	7	タウ 181-210/pS202/pT205	-6	-3	-11	-41	-7
配列番号	8	タウ 300-317	-82	9	-60	17	-10

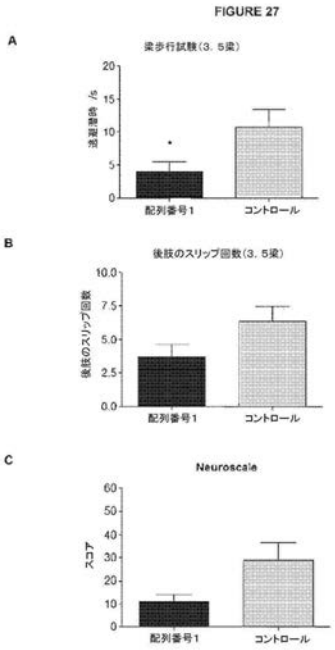
【図２６Ｃ】

FIGURE 26C



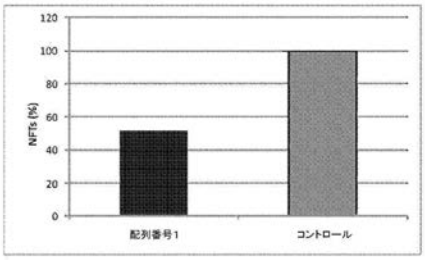
【図２７】

FIGURE 27

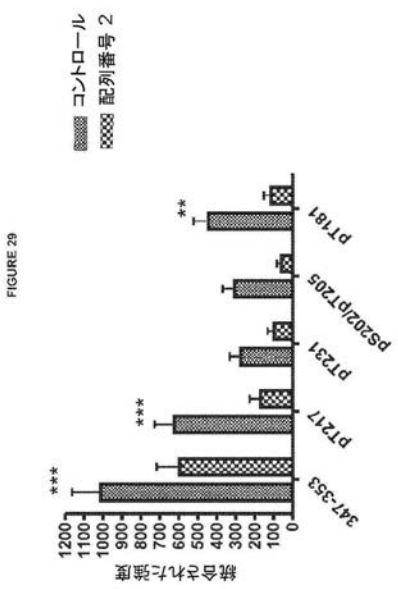


【図２８】

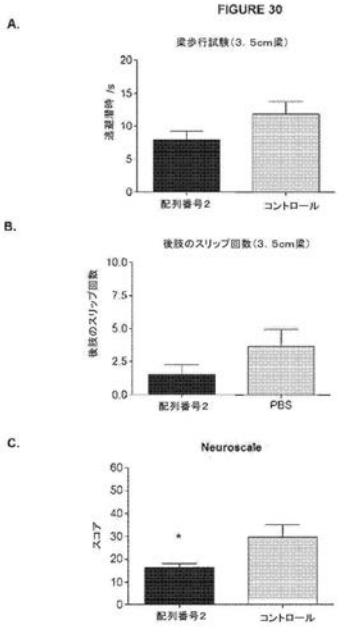
FIGURE 28



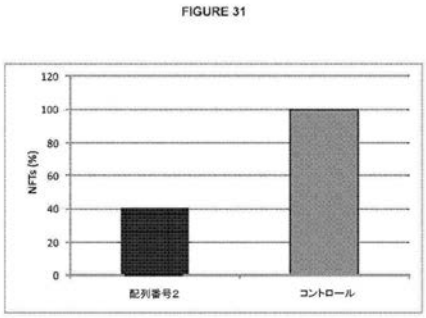
【図２９】



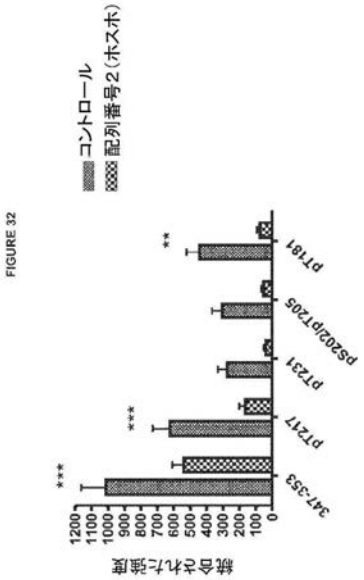
【図３０】



【図３１】

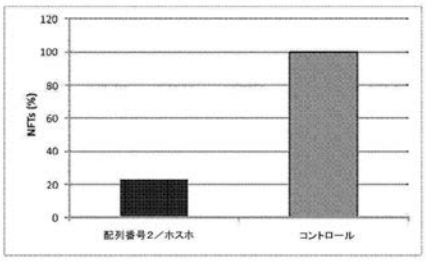


【図３２】

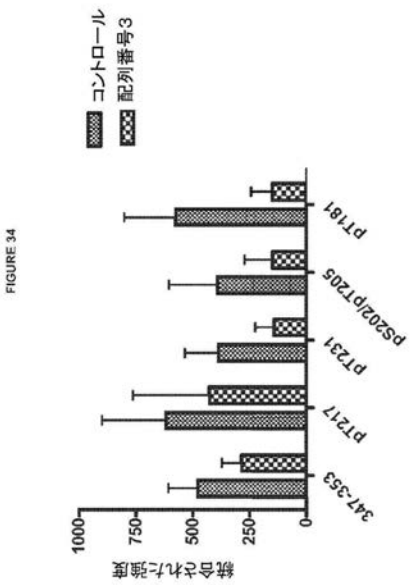


【図３３】

FIGURE 33

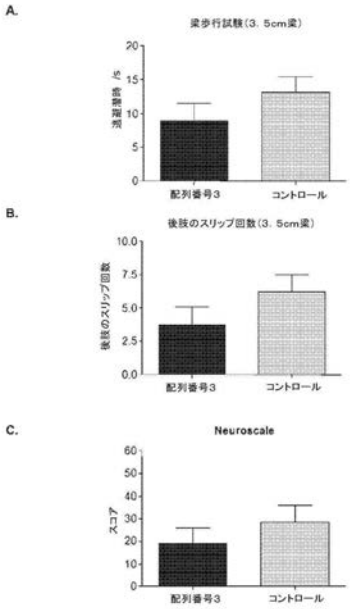


【図３４】



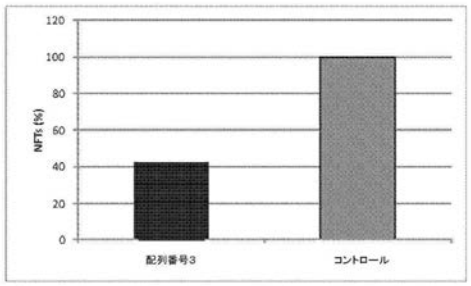
【図３５】

FIGURE 35

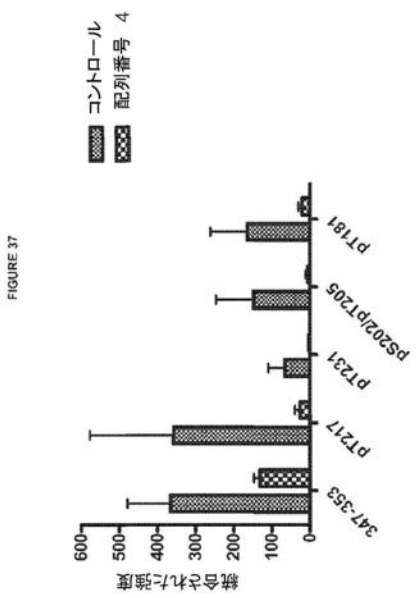


【図３６】

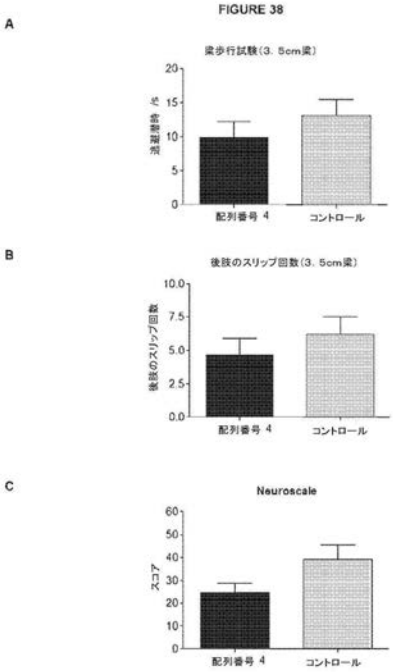
FIGURE 36



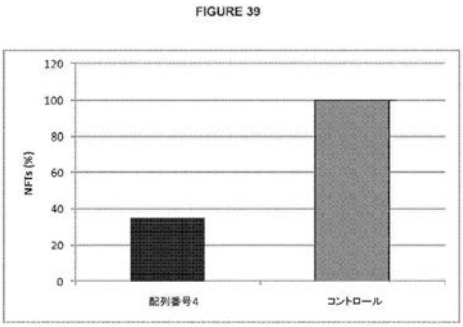
【図３７】



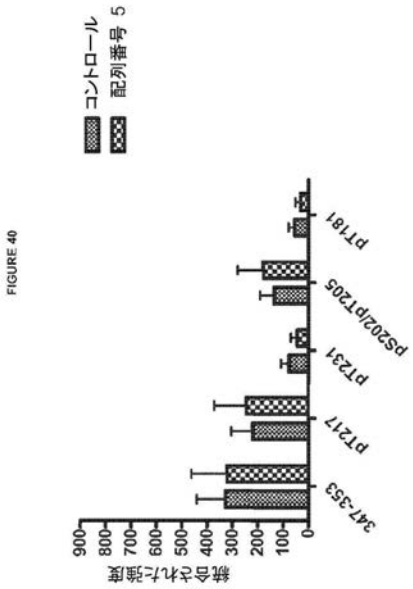
【図３８】



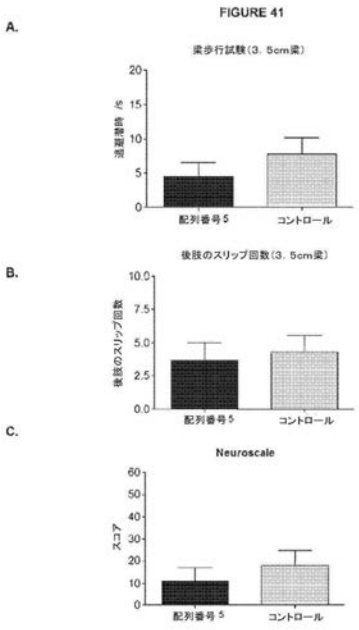
【図３９】



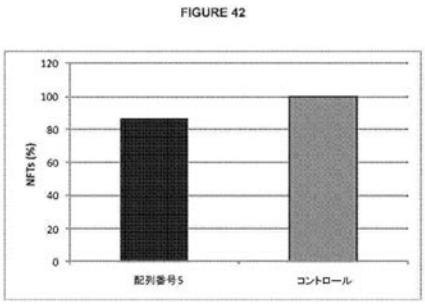
【図４０】



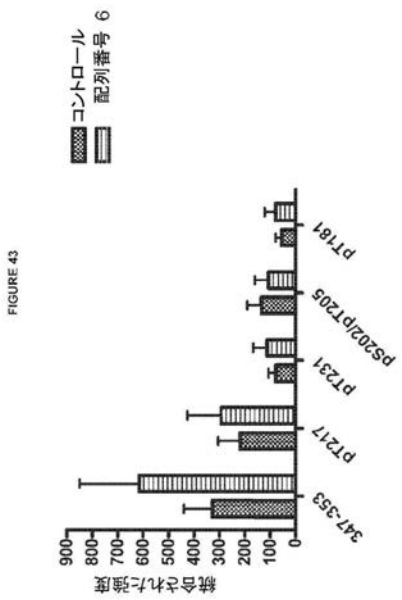
【図４１】



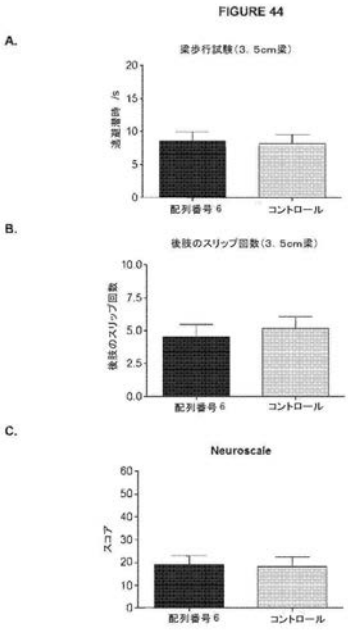
【図４２】



【図４３】

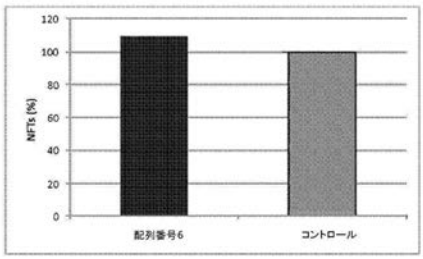


【図４４】



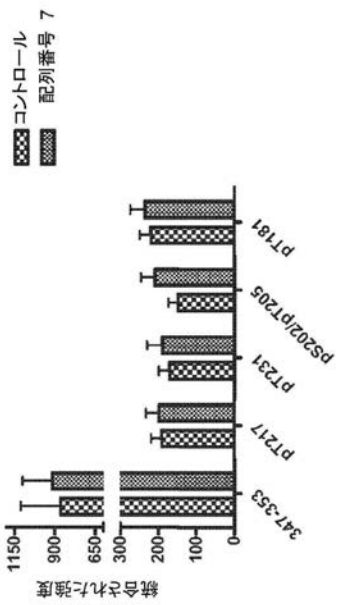
【図４５】

FIGURE 45



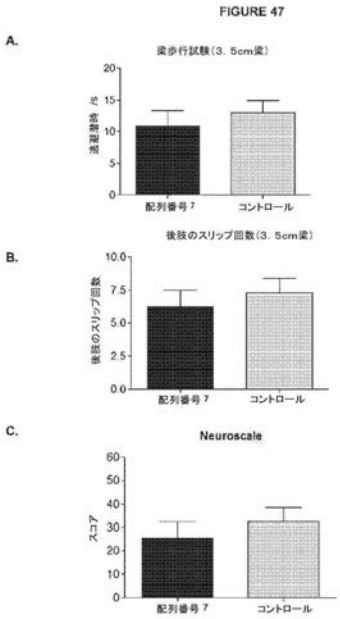
【図４６】

FIGURE 46



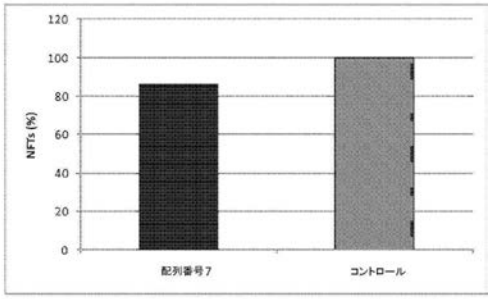
【図４７】

FIGURE 47

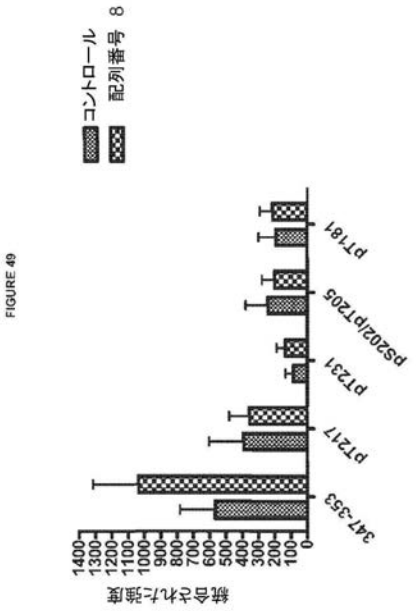


【図４８】

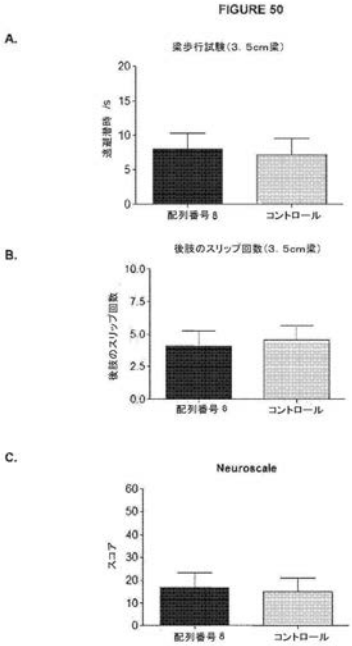
FIGURE 48



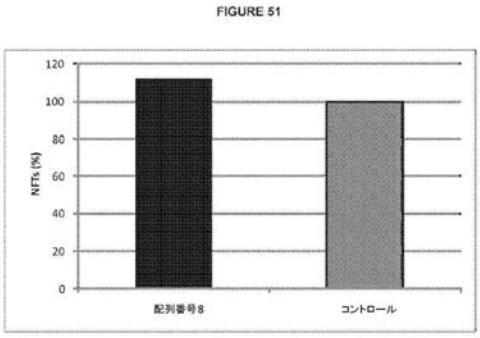
【図４９】



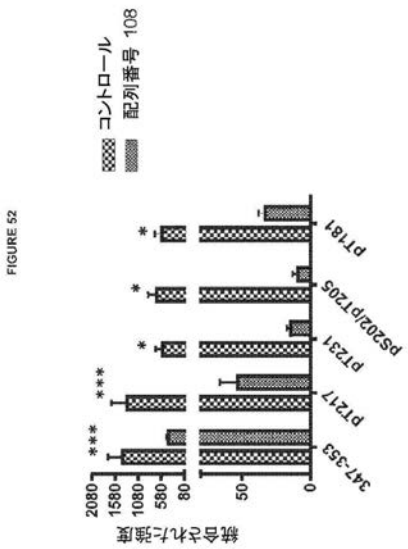
【図５０】



【図５１】

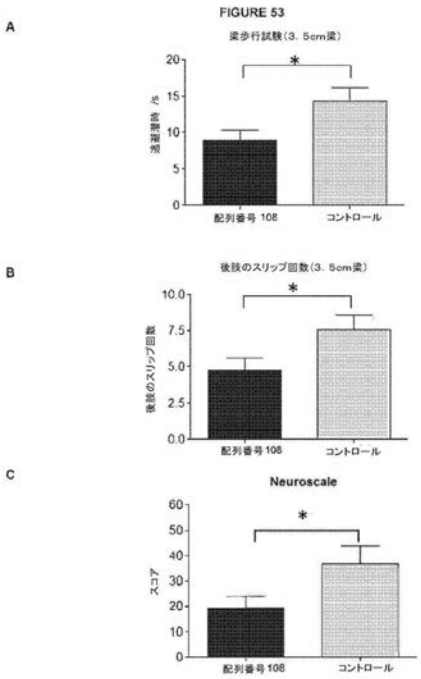


【図５２】



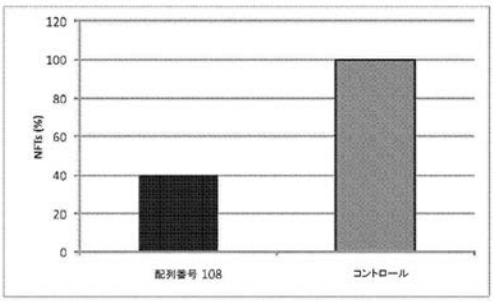
【図５３】

FIGURE 53



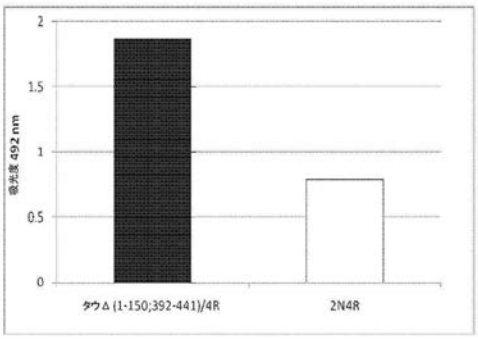
【図５４】

FIGURE 54



【図５５】

FIGURE 55



【図５６】

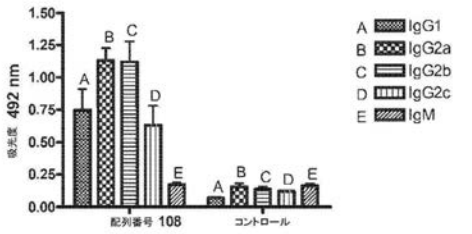
FIGURE 56

	幾何平均抗体価		
	固相		
血清希釈度	ペプチド配列番号108	タウΔ(1-150;392-441)/4R	タウ 2N4R
100	0[a]	0	0
200	0	0	0
400	0	0	0
800	0	0	2
1 600	0	0	1
3 200	1	0	3
6 400	0	4	1
12 800	2	2	1
25 600	5	4	2
51 200	2	0	0
GMT[b]	20800	12800	4200

脚注:
[a]レスポンダーの数
[b]幾何平均力価

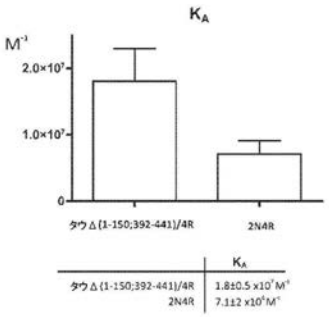
【図５７】

FIGURE 57



【図５８】

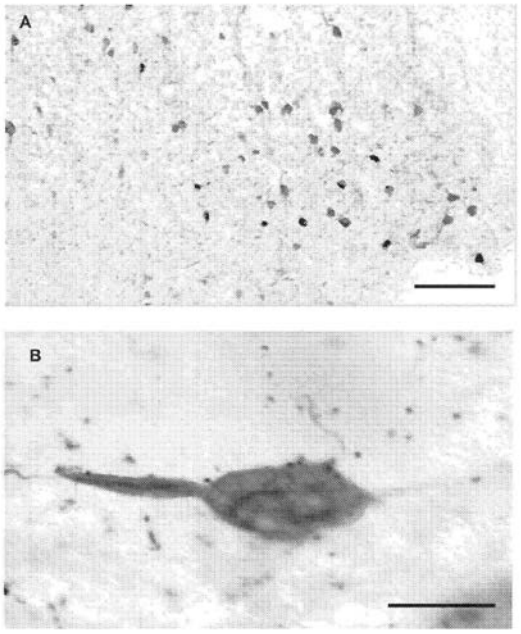
FIGURE 58



	K_A
タウΔ(1-150;392-441)/4R	$1.8\pm0.5\times10^7\,M^{-1}$
2N4R	$7.1\pm2\times10^6\,M^{-1}$

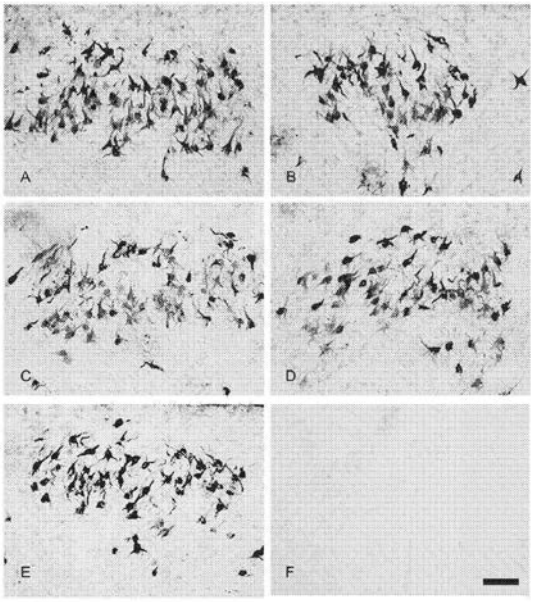
【図５９】

FIGURE 59



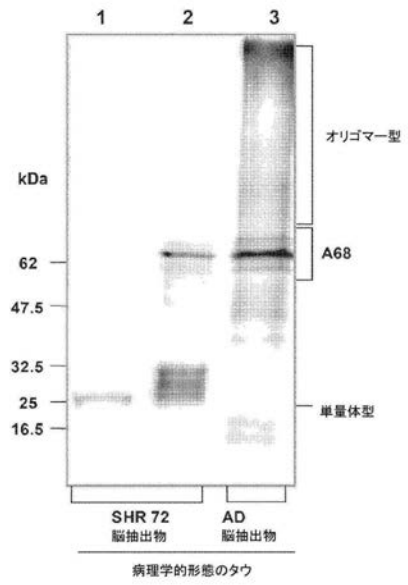
【図６０】

FIGURE 60



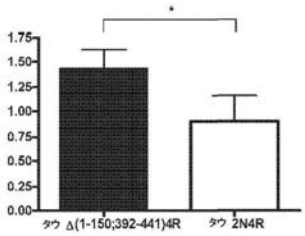
【図６１】

FIGURE 61



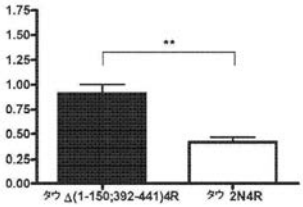
【図６２】

FIGURE 62



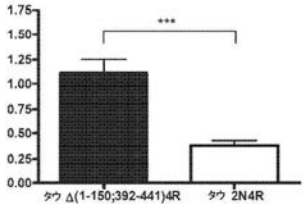
【図６３】

FIGURE 63



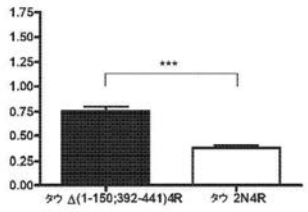
【図６４】

FIGURE 64



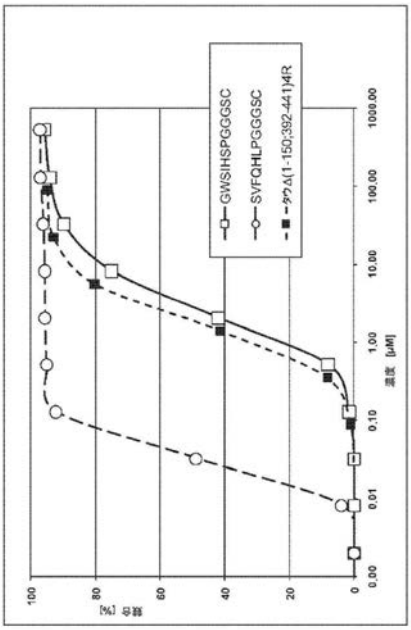
【図６５】

FIGURE 65



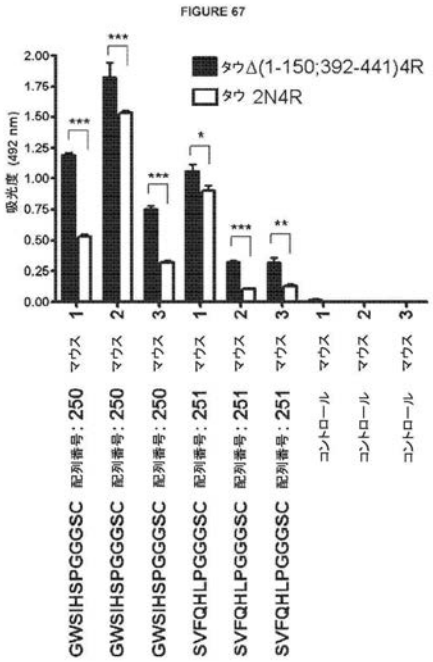
【図６６】

FIGURE 66



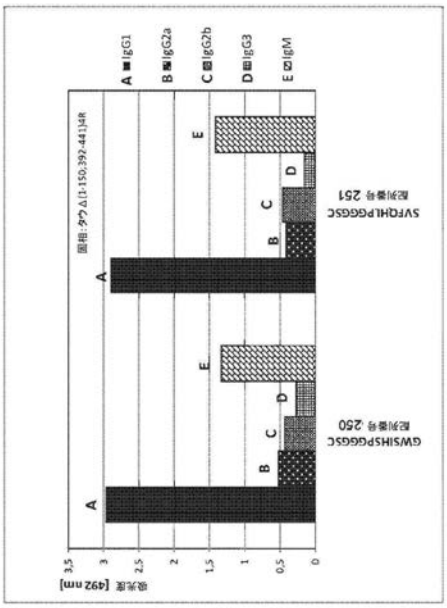
【図６７】

FIGURE 67

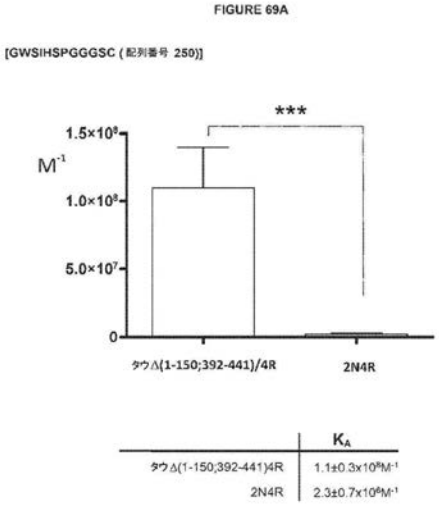


【図６８】

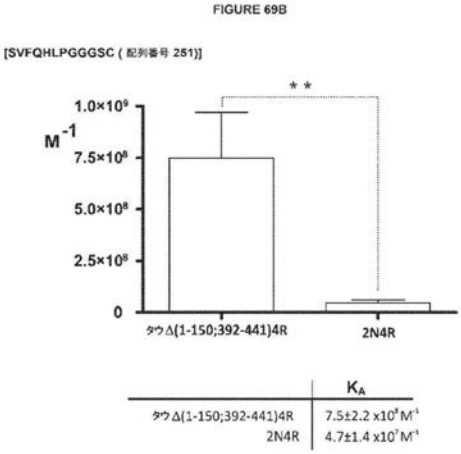
FIGURE 68



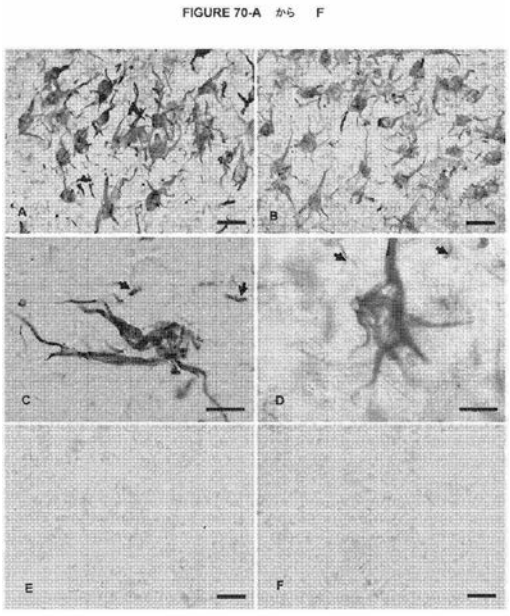
【図６９Ａ】



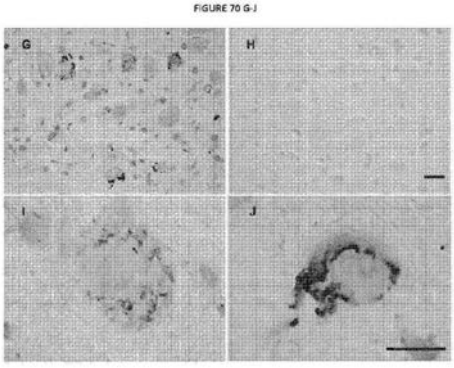
【図６９Ｂ】



【図７０－１】

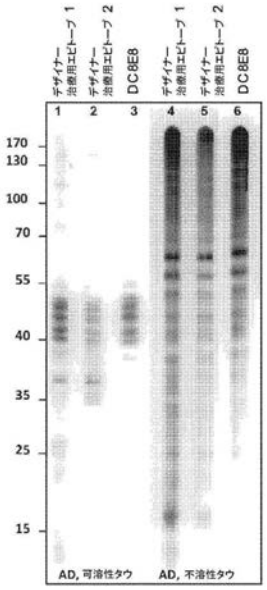


【図７０－２】



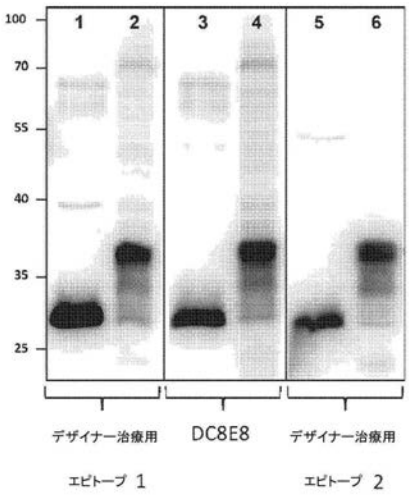
【図７１】

FIGURE 71



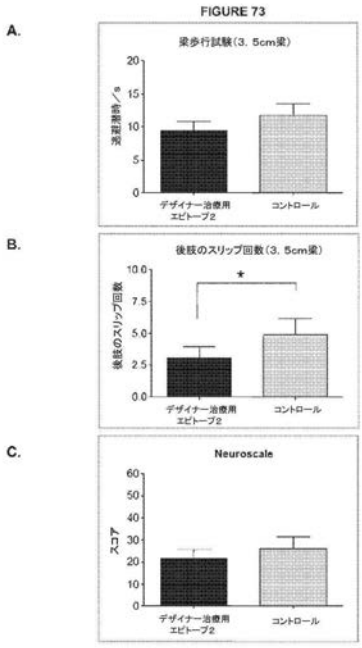
【図７２】

FIGURE 72



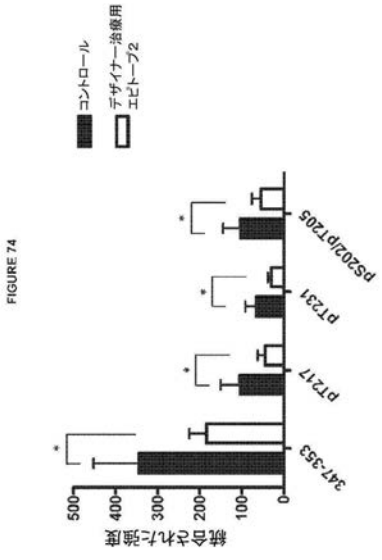
【図７３】

FIGURE 73

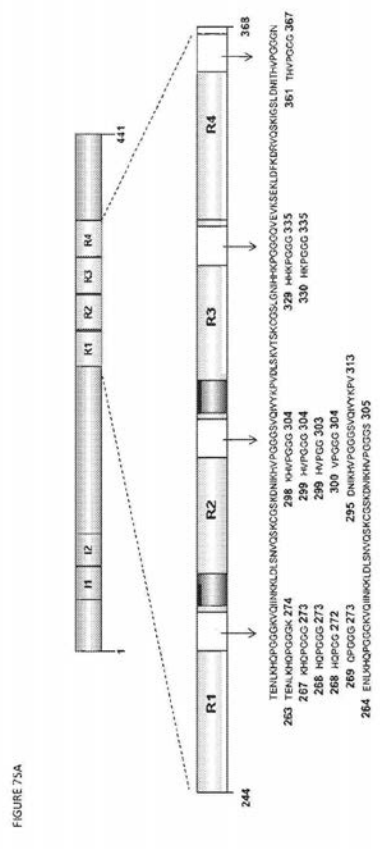


【図７４】

FIGURE 74



【図７５Ａ】

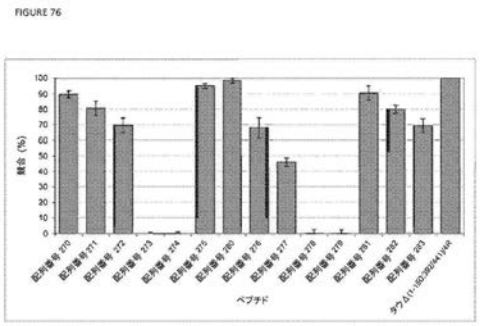


【図７５Ｂ】

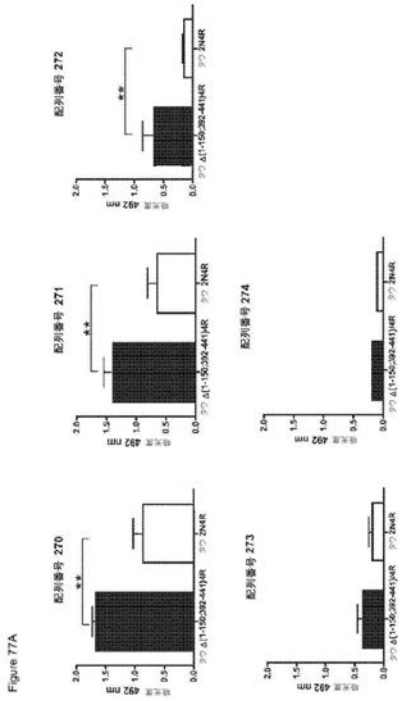
FIGURE 75B

合成ペプチド	配列番号	配列
ペプチド263-274	配列番号 270	TENLKHQPGGGK
ペプチド267-273	配列番号 271	KHQPGGG
ペプチド268-273	配列番号 272	HQPGGG
ペプチド268-272	配列番号 273	HQPGG
ペプチド269-273	配列番号 274	QPGGG
ペプチド264-305	配列番号 275	ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS
ペプチド298-304	配列番号 276	KHVPGGG
ペプチド299-304	配列番号 277	HVPGGG
ペプチド299-303	配列番号 278	HVPGG
ペプチド300-304	配列番号 279	VPGGG
ペプチド295-313	配列番号 280	DNIKHVPGGGSVQIVYKPV
ペプチド329-335	配列番号 281	HHKPGGG
ペプチド330-335	配列番号 282	HKPGGG
ペプチド361-367	配列番号 283	THVPGGG

【図７６】



【図７７Ａ】



【図７７Ｂ】

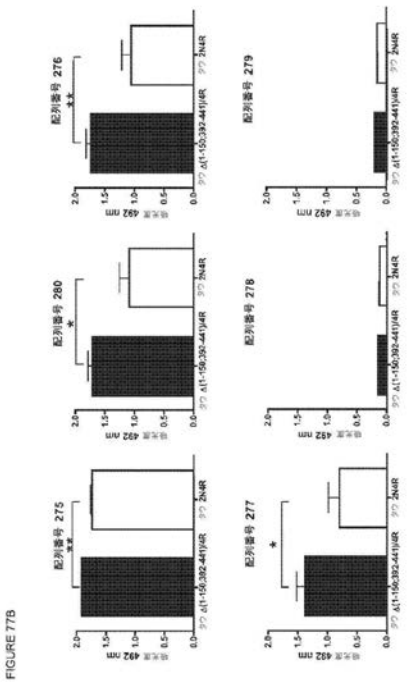


FIGURE 77B

【図７７Ｃ】

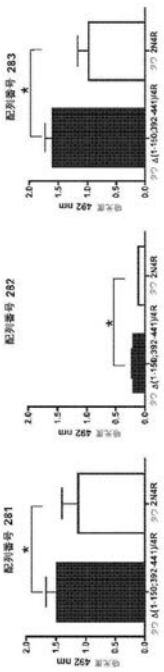


FIGURE 77C

【図７８】

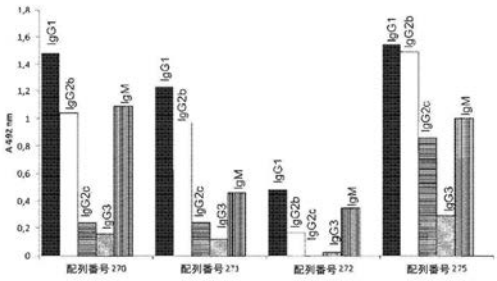
FIGURE 78

幾何平均抗体価

	固相	
ペプチド	タウ Δ(1-150; 392-441)/4R	タウ 2N4R
配列番号 270	22286	4222
配列番号 271	12800	3200
配列番号 272	2786	264
配列番号 273	400	<100
配列番号 274	152	0
配列番号 275	>51200	16890
配列番号 280	51200	12800
配列番号 276	22286	4038
配列番号 277	12800	3805
配列番号 278	277	383
配列番号 279	<100	<100
配列番号 281	8445	2425
配列番号 282	174	<100
配列番号 283	14703	4222

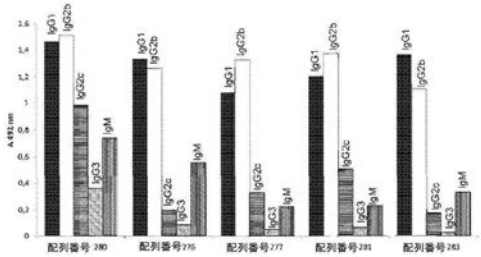
【図７９Ａ】

FIGURE 79A



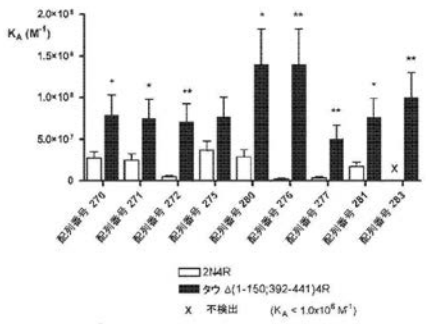
【図７９Ｂ】

FIGURE 79B



【図８０】

FIGURE 80



【図８１】

FIGURE 81

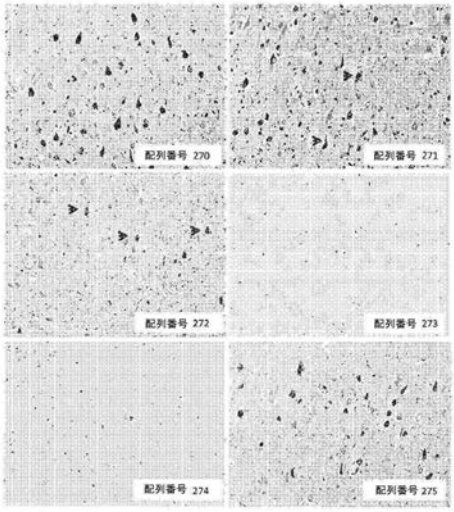
ウエスタンブロッティングにおいて、タウペプチドで誘導された抗体によって認識された病理学的形態のタウ

ペプチド	SHR 72 脳抽出物	AD 脳抽出物
配列番号 270	-	+
配列番号 271	-	+
配列番号 272	-	+
配列番号 273	-	-
配列番号 274	-	-
配列番号 275	-	+
配列番号 276	-	+
配列番号 277	-	+
配列番号 278	-	-
配列番号 279	-	-
配列番号 280	-	+
配列番号 281	-	+
配列番号 282	-	-
配列番号 283	-	+

+陽性
－陰性

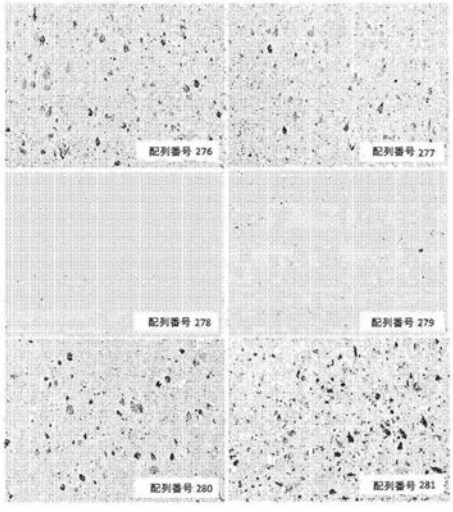
【図８２Ａ】

FIGURE 82A



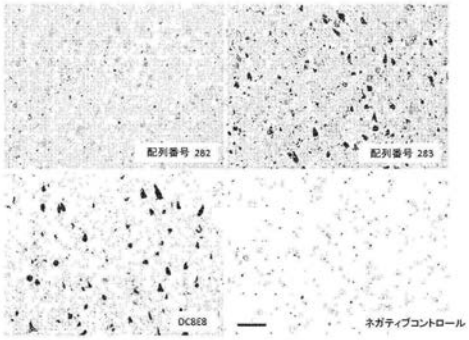
【図８２Ｂ】

FIGURE 82B



【図８２Ｃ】

FIGURE 82C



【図８３】

FIGURE 83

ヒトAD脳組織における、タウペプチドで誘導された抗体によって認識された神経原線維変化

ペプチド	染色の強度	NFTの数
配列番号 270	NFTの非常に強い染色	+++
配列番号 271	NFTの強い染色	++
配列番号 272	わずかなNFTの弱い染色	+
配列番号 273	NFT染色なし	-
配列番号 274	NFT染色なし	-
配列番号 275	NFTの非常に強い染色	+++
配列番号 280	NFTの強い染色	+++
配列番号 276	NFTの強い染色	+++
配列番号 277	わずかなNFTの弱い染色	++
配列番号 278	NFT染色なし	-
配列番号 279	NFT染色なし	-
配列番号 281	NFTの強い染色	++
配列番号 282	NFT染色なし	-
配列番号 283	NFTの非常に強い染色	+++

【配列表】
2017093470000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	D	
A61P	*25/28*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	A61P	25/28		
A61K	*38/00*	*(2006.01)*	A61K	45/00		
A61K	*47/50*	*(2017.01)*	A61K	37/02		
A61K	*9/19*	*(2006.01)*	A61K	47/48		
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61K	9/19		
			G01N	33/53	D	

(72)発明者 ミハル ノヴェク
スロバキア ８１１ ０４ ブラチスラヴァ, ノヴォスヴェツカ ２７
(72)発明者 エヴァ コンツェコヴェ
スロバキア ９０３ ０１ セネチ, リフネロヴァ ４１
(72)発明者 ブラニスラフ コヴァチェク
スロバキア ０１７ ０１ ポヴァツスカ ビュストリカ, エスエヌペ １４６１
(72)発明者 ノルベルト ジルカ
スロバキア ８２１ ０５ ブラチスラヴァ, プリェヴォツスカ ３７

Fターム(参考) 4B065 AA01 AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA45
4C076 AA12 AA29 AA95 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 CC07 EE59 GG06
4C084 AA01 AA02 AA07 AA19 AA22 BA01 BA17 BA18 BA19 MA02 MA44 MA55 MA66 NA13 NA14 ZA151 ZA161
4C085 AA13 AA14 EE01 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA14 BA15 BA16 BA18 CA45 DA76 DA86 EA21 FA74

【外国語明細書】
2017093470000001.pdf

专利名称(译)	基于蛋白质的治疗和诊断阿尔茨海默病中的tau介导的病理学		
公开(公告)号	JP2017093470A	公开(公告)日	2017-06-01
申请号	JP2017033138	申请日	2017-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	阿克松神經系統科學公司		
申请(专利权)人(译)	神经轴突SA		
[标]发明人	ミハルノヴェク エヴァコンツェコヴェ ブラニスラフコヴァチェク ノルベルトジルカ		
发明人	ミハル ノヴェク エヴァ コンツェコヴェ ブラニスラフ コヴァチェク ノルベルト ジルカ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K14/47 C07K7/06 C07K7/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P25/28 A61K45/00 A61K38/00 A61K47/50 A61K9/19 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K39/0007 A61K2039/505 A61K2039/55505 A61K2039/55566 A61K2039/6081 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/28 A61P43/00 A61K47/6843 C07K14/4711 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2317/70 G01N33/6896 G01N2800/2821 A61K39/3955 A61K45/06 G01N33/53 G01N2800/52 A61K39/39533 A61K47/6849 A61K49/0004 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/565		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/18.ZNA C07K14/47 C07K7/06 C07K7/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/28 A61K45/00 A61K37/02 A61K47/48 A61K9/19 G01N33/53.D A61K38/00 A61K38/10 A61K38/16 A61K47/68 A61K49/16 A61K51/10 C12N15/13		
F-TERM分类号	4B065/AA01 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA45 4C076/AA12 4C076/AA29 4C076/AA95 4C076/BB11 4C076/BB13 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/BB21 4C076/CC07 4C076/EE59 4C076/GG06 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA19 4C084/AA22 4C084/BA01 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/MA02 4C084/MA44 4C084/MA55 4C084/MA66 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA18 4H045/CA45 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA21 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/536339 2011-09-19 US 61/653115 2012-05-30 US		
其他公开文献	JP2017093470A5 JP6286590B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供有助于病理性tau-tau相互作用的起始和传播的tau蛋白质蛋白质 独特的治疗性抗体和与蛋白质结合的诊断抗体，以及片段，部分，衍生物 身体和变体，以及制作它们的方法。 本发明涉及阿尔茨海默病的诊断，预防和治疗以及相关的τ蛋白病 以及使用这些抗体进行放置的方法。本发明涉及阿尔茨海默病和阿尔茨海默病 还提供了预防和治疗其他神经退行性τ蛋白病的方法。这个 方法诱导对患者脑中病理性tau蛋白和tau沉积物的免疫应答 包括注射抗体和/或肽疫苗。合适的疫苗描述于本说明书中 表示具有一个或多个tau治疗表位的tau肽 。 系统技术领域

(19)日本国特許庁(JP)　(12)公 開 特 許 公 報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-93470
(P2017-93470A)
(43)公開日　平成29年6月1日(2017.6.1)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B065
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	ZNA	4C076
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47		4C084
C07K 7/06	(2006.01)	C07K	7/06		4C085
C07K 7/08	(2006.01)	C07K	7/08		4H045

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 203 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-33138(P2017-33138)
(22)出願日　平成29年2月24日(2017.2.24)
(62)分割の表示　特願2016-230258(P2016-230258)の分割
原出願日　平成24年9月14日(2012.9.14)
(31)優先権主張番号　61/536,339
(32)優先日　平成23年9月19日(2011.9.19)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/653,115
(32)優先日　平成24年5月30日(2012.5.30)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　514064992
アクソン　ニューロサイエンス　エスエースロバキア　８１１　０２　ブラチスラヴァ，　ドヴォジコヴォ　ナブルジエ　１０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本　健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アルツハイマー病におけるタウ媒介性病理のタンパク質ベースの治療および診断