

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-522754

(P2012-522754A)

(43) 公表日 平成24年9月27日 (2012.9.27)

|                                     |                     |             |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                       | F I                 | テーマコード (参考) |
| <b>C 0 7 K 14/47 (2006.01)</b>      | C 0 7 K 14/47 Z N A | 4 B 0 2 4   |
| <b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>      | A 6 1 K 39/00 H     | 4 B 0 6 4   |
| <b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>     | A 6 1 K 39/395 N    | 4 B 0 6 5   |
| <b>A 6 1 K 39/385 (2006.01)</b>     | A 6 1 K 39/385      | 4 C 0 7 6   |
| <b>A 6 1 K 9/127 (2006.01)</b>      | A 6 1 K 9/127       | 4 C 0 8 4   |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁) 最終頁に続く |                     |             |

(21) 出願番号 特願2012-502694 (P2012-502694)  
 (86) (22) 出願日 平成22年4月1日 (2010.4.1)  
 (85) 翻訳文提出日 平成23年11月7日 (2011.11.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/054418  
 (87) 国際公開番号 W02010/115843  
 (87) 国際公開日 平成22年10月14日 (2010.10.14)  
 (31) 優先権主張番号 09157303.0  
 (32) 優先日 平成21年4月3日 (2009.4.3)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 506027491  
 エーシー イミューン ソシエテ アノニ  
 ム  
 スイス連邦共和国 ローザンヌ イーピー  
 エフエルピーエスイー ビルディング  
 ビー  
 (71) 出願人 511237014  
 カトリック ユニバーシテイト ルーベン  
 ケイユー ルーベン リサーチ アンド  
 ディベロップメント  
 ベルギー王国 ルーベン ワーイストラ  
 ト 6ボックス 5105  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬学的組成物

## (57) 【要約】

本発明は、神経原線維変化によって引き起こされるまたは神経原線維変化に関連する疾患および障害の処置における治療的および診断的使用のための方法および薬学的組成物に関する。特に、本発明は、アルツハイマー病が含まれるタウオパチーの処置における治療的および診断的使用のための、タウタンパク質の主要な病理学的リン酸化エピトープを模倣する抗原性ペプチド、特に抗原性リン酸化ペプチドを含む薬学的組成物に関する。

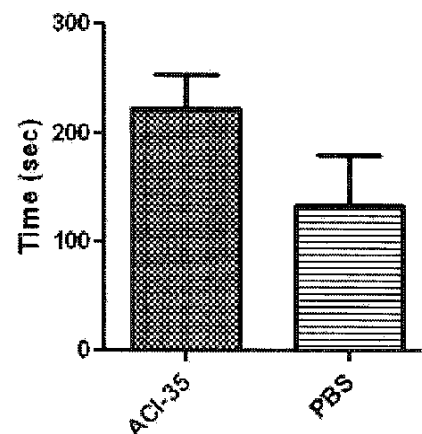


FIGURE: 33

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

タウタンパク質から得ることができ、かつ担体への付着を通しておよび／または担体への再構成を通して改変された、抗原性ペプチドまたはその機能的断片。

## 【請求項 2】

タウタンパク質の主要な病理学的リン酸化エピトープを模倣するリン酸化ペプチドである、請求項1記載の抗原性ペプチドまたは断片。

## 【請求項 3】

担体がアジュバントとしての機能性も有する、請求項1または2記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 4】

担体がリポソームである、前記請求項のいずれか一項記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 5】

リポソーム担体の脂質二重層への挿入を容易にする親油性または疎水性部分との連結を介してさらに改変される、前記請求項のいずれか一項記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 6】

親油性または疎水性部分が、脂肪酸、トリグリセリド、ジグリセリド、ステロイド、スフィンゴリピド、糖脂質、またはリン脂質である、前記請求項のいずれか一項記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 7】

親油性または疎水性部分が脂肪酸、特に炭素原子少なくとも10個、特に炭素原子少なくとも12個、特に炭素原子少なくとも16個の炭素骨格を有する脂肪酸である、前記請求項のいずれか一項記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 8】

疎水性部分がパルミチン酸である、前記請求項のいずれか一項記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 9】

親水性または疎水性部分が、たとえばリジン、グルタミン酸、およびシステインなどのアミノ酸少なくとも1個、特に1個または2個を介してペプチドまたはペプチド断片の末端の各々に共有結合される、前記請求項のいずれか一項記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 10】

親水性部分との連結を介してさらに改変される、前記請求項のいずれか一項記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 11】

親水性部分がポリエチレングリコールである、請求項10記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 12】

タウタンパク質がヒトタンパク質である、前記請求項のいずれか一項記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 13】

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有する、またはアミノ酸少なくとも1個、しかし多くてアミノ酸5個の保存的置換、欠失、もしくは挿入を通して改変されたSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有し、かつなお非改変配列と同じもしくは本質的に同じ抗原能を有する、請求項12記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 14】

SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を有する、またはアミノ酸少なくとも1個、しかし多くてアミノ酸5個の保存的置換、欠失、もしくは挿入を通して改変されたSEQ ID NO:3のアミノ酸配列を有し、かつなお非改変配列と同じもしくは本質的に同じ抗原能を有する、請求項12記載のペプチドまたは断片。

## 【請求項 15】

SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を有する、またはアミノ酸少なくとも1個、しかし多くてア

10

20

30

40

50

ミノ酸5個の保存的置換、欠失、もしくは挿入を通して改変されたSEQ ID NO:4のアミノ酸配列を有し、かつなお非改変配列と同じもしくは本質的に同じ抗原能を有する、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項16】

SEQ ID NO:5のアミノ酸配列を有する、またはアミノ酸少なくとも1個、しかし多くてアミノ酸5個の保存的置換、欠失、もしくは挿入を通して改変されたSEQ ID NO:5のアミノ酸配列を有し、かつなお非改変配列と同じもしくは本質的に同じ抗原能を有する、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項17】

SEQ ID NO:6のアミノ酸配列を有する、またはアミノ酸少なくとも1個、しかし多くてアミノ酸5個の保存的置換、欠失、もしくは挿入を通して改変されたSEQ ID NO:6のアミノ酸配列を有し、かつなお非改変配列と同じもしくは本質的に同じ抗原能を有する、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項18】

SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を有する、またはアミノ酸少なくとも1個、しかし多くてアミノ酸5個の保存的置換、欠失、もしくは挿入を通して改変されたSEQ ID NO:7のアミノ酸配列を有し、かつなお非改変配列と同じもしくは本質的に同じ抗原能を有する、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項19】

SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を有する、またはアミノ酸少なくとも1個、しかし多くてアミノ酸5個の保存的置換、欠失、もしくは挿入を通して改変されたSEQ ID NO:8のアミノ酸配列を有し、かつなお非改変配列と同じもしくは本質的に同じ抗原能を有する、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項20】

SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を有する、またはアミノ酸少なくとも1個、しかし多くてアミノ酸5個の保存的置換、欠失、もしくは挿入を通して改変されたSEQ ID NO:9のアミノ酸配列を有し、かつなお非改変配列と同じもしくは本質的に同じ抗原能を有する、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項21】

ヒトタウタンパク質の5位～20位から得ることができるペプチドまたは断片であって、18位のチロシンがリン酸化されている、請求項13記載のペプチドまたは断片。

【請求項22】

ヒトタウタンパク質の196～221位から得ることができるペプチドまたは断片であって、202、205、212、214位の少なくとも1個、特に少なくとも2個、特に少なくとも3個、しかしとりわけ4個全てのアミノ酸がリン酸化されている、請求項14または15記載のペプチドまたは断片。

【請求項23】

ヒトタウタンパク質の393～408位から得ることができるペプチドまたは断片であって、396、404位のアミノ酸の少なくとも1個、しかしとりわけ全てのアミノ酸がリン酸化されている、請求項16記載のペプチドまたは断片。

【請求項24】

ヒトタウタンパク質の401～418位から得ることができるペプチドまたは断片であって、404位および409位のアミノ酸の少なくとも1個、しかしとりわけ全てのアミノ酸がリン酸化されている、請求項17記載のペプチドまたは断片。

【請求項25】

ヒトタウタンパク質の200～216位から得ることができるペプチドまたは断片であって、202位および205位ならびに／または212位および214位のアミノ酸の少なくとも1個、しかしとりわけ全てのアミノ酸がリン酸化されている、請求項18記載のペプチドまたは断片。

【請求項26】

ヒトタウタンパク質の407～418位から得ることができ、かつ409位のセリンがリン酸化

10

20

30

40

50

されている、請求項19記載のペプチドまたは断片。

【請求項 27】

ヒトタウタンパク質の399～408位から得ることができるペプチドまたは断片であって、404位のセリンがリン酸化されている、請求項20記載のペプチドまたは断片。

【請求項 28】

タウタンパク質がSEQ ID NO:2と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有し、かつSEQ ID NO:2の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:2のアミノ酸残基18位 (P-Tyr<sub>18</sub>) に対応するアミノ酸残基がリン酸化されている (T1)、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項 29】

タウタンパク質がSEQ ID NO:3と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有し、かつSEQ ID NO:3の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:3のアミノ酸残基212位 (P-Thr<sub>212</sub>) および214位 (P-Ser<sub>214</sub>) に対応するアミノ酸残基の少なくとも1個、特に少なくとも2個がリン酸化されている、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項 30】

タウタンパク質がSEQ ID NO:4と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有し、かつSEQ ID NO:4の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:4のアミノ酸残基202位 (P-Ser<sub>202</sub>) および205位 (P-Thr<sub>205</sub>) に対応するアミノ酸残基の少なくとも1個、特に少なくとも2個がリン酸化されている、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項 31】

タウタンパク質がSEQ ID NO:5と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有し、かつSEQ ID NO:5の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:5のアミノ酸残基396位 (P-Ser<sub>396</sub>) および404位 (P-Ser<sub>404</sub>) に対応するアミノ酸残基の少なくとも1個、しかしとりわけ全てがリン酸化されている、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項 32】

タウタンパク質がSEQ ID NO:6と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有し、かつSEQ ID NO:6の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:6のアミノ酸残基404位 (P-Ser<sub>404</sub>) および409位 (P-Ser<sub>409</sub>) に対応するアミノ酸残基の少なくとも1個、しかしとりわけ全てがリン酸化されている、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項 33】

タウタンパク質がSEQ ID NO:7と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有し、かつSEQ ID NO:7の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:7のアミノ酸残基202位 (P-Ser<sub>202</sub>)、205位 (P-Thr<sub>205</sub>)、212位 (P-Thr<sub>212</sub>)、および214位 (P-Ser<sub>214</sub>) に対応するアミノ酸残基の少なくとも1個、特に少なくとも2個、特に少なくとも3個、しかしとりわけ全てがリン酸化されている、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項 34】

タウタンパク質がSEQ ID NO:8と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有し、かつSEQ ID NO:8の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:8のアミノ酸残基409位 (P-Ser<sub>409</sub>) に対応するアミノ酸残基がリン酸化されている、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項 35】

タウタンパク質がSEQ ID NO:9と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有し、かつSEQ ID NO:9の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:9のアミノ酸残基404位 (P-Ser<sub>404</sub>) に対応するアミノ酸残基がリン酸化されている、請求項12記載のペプチドまたは断片。

【請求項 36】

タウタンパク質がSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有する、請求項28記載のペプチド。

【請求項 37】

タウタンパク質がSEQ ID NO:3のアミノ酸配列を有する、請求項29記載のペプチド。

【請求項 38】

10

20

30

40

50

- タウタンパク質がSEQ ID NO:4のアミノ酸配列を有する、請求項30記載のペプチド。
- 【請求項 3 9】
- タウタンパク質がSEQ ID NO:5のアミノ酸配列を有する、請求項31記載のペプチド。
- 【請求項 4 0】
- タウタンパク質がSEQ ID NO:6のアミノ酸配列を有する、請求項32記載のペプチド。
- 【請求項 4 1】
- タウタンパク質がSEQ ID NO:7のアミノ酸配列を有する、請求項33記載のペプチド。
- 【請求項 4 2】
- タウタンパク質がSEQ ID NO:8のアミノ酸配列を有する、請求項34記載のペプチド。
- 【請求項 4 3】
- タウタンパク質がSEQ ID NO:9のアミノ酸配列を有する、請求項35記載のペプチド。
- 【請求項 4 4】
- タウオパチーなどの神経変性障害の処置において用いるための、前記請求項のいずれか一項記載のペプチドもしくは断片、またはその組み合わせ。
- 【請求項 4 5】
- アルツハイマー病の処置において用いるための、請求項44記載のペプチドまたは断片。
- 【請求項 4 6】
- 前記請求項のいずれか一項記載のペプチドもしくは断片、またはその組み合わせを含む、薬学的組成物。
- 【請求項 4 7】
- 薬学的に許容されるアジュバントおよび／または免疫調節剤を含有する、請求項46記載の薬学的組成物。
- 【請求項 4 8】
- 免疫調節剤が、モノホスホリルまたはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドAである、請求項47記載の薬学的組成物。
- 【請求項 4 9】
- タウオパチーなどの神経変性障害の処置において用いるための、前記請求項のいずれか一項記載の薬学的組成物。
- 【請求項 5 0】
- アルツハイマー病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病、封入体筋炎、およびプリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷が含まれるがこれらに限定されるわけではない、タウとアミロイド病態の同時存在を示す疾患または障害、ならびに筋萎縮性側索硬化症／グアムのパーキンソニズム-認知症複合、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、第17染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン-スパッツ病、多系統萎縮症、C型ニーマン-ピック病、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型老年認知症（tangle only dementia）、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィーが含まれるがこれらに限定されるわけではない明確なアミロイド病態を示さないさらなる疾患または障害が含まれる、神経変性疾患または障害の不均一な群を含むタウオパチーにおける主な脳の病態である神経原線維病変の形成によって引き起こされるまたは神経原線維病変の形成に関連する疾患および障害を処置するための、請求項49記載の薬学的組成物。
- 【請求項 5 1】
- アルツハイマー病の処置において用いるための、請求項50記載の薬学的組成物。
- 【請求項 5 2】
- タウオパチーなどの神経変性疾患または障害を処置するための方法であって、前記請求項のいずれか一項記載の治療的薬学的組成物を、そのような疾患または障害に罹患している動物、特に哺乳動物、しかしとりわけヒトに投与する段階を含む、方法。
- 【請求項 5 3】

アルツハイマー病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病、封入体筋炎、およびプリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷が含まれるがこれらに限定されるわけではない、タウとアミロイド病態の同時存在を示す疾患または障害、ならびに筋萎縮性側索硬化症／グアムのパーキンソニズム-認知症複合、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、第17染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン-スパッツ病、多系統萎縮症、C型ニーマン-ピック病、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型老年認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィーが含まれるがこれらに限定されるわけではない明確なアミロイド病態を示さないさらなる疾患または障害が含まれる、神経変性疾患または障害の不均一な群を含むタウオパチーにおける主な脳の病態である神経原線維病変の形成によって引き起こされるまたは神経原線維病変の形成に関連する疾患および障害を処置するための、請求項52記載の方法。

10

【請求項54】

前記請求項のいずれか一項記載の抗原性ペプチドまたは治療組成物を動物またはヒトに投与することによって、タウオパチーなどの神経変性障害に罹患している動物、特に哺乳動物またはヒトにおいて免疫応答を誘導するための方法。

【請求項55】

インビトロおよび／またはインビボでタウタンパク質を認識してこれに結合することができる、抗体、特にモノクローナル抗体またはその機能的部分。

20

【請求項56】

タウタンパク質がリン酸化されている、請求項47記載の抗体、特にモノクローナル抗体またはその機能的部分。

【請求項57】

前記請求項のいずれか一項記載のペプチド断片を認識してこれに結合することができる、請求項48記載の抗体、特にモノクローナル抗体またはその機能的部分。

【請求項58】

リン酸化された病理学的タウタンパク質コンフォーマー、または該コンフォーマーの病理学的特性を引き起こすコンフォーマーのこれらの部分、特にタウタンパク質の病理的リン酸化エピトープを認識してこれに結合する、前記請求項のいずれか一項記載の抗体、特にモノクローナル抗体またはその機能的部分。

30

【請求項59】

前記請求項のいずれか一項記載の抗原性ペプチド、特にその機能的断片またはその変種断片を含むSEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、およびSEQ ID NO:9に与えられるアミノ酸配列を含む抗原性ペプチドによって、適した動物を免疫することによって得ることができる、前記請求項のいずれか一項記載の抗体、特にモノクローナル抗体またはその機能的部分。

【請求項60】

2010年3月3日にDSM ACC3043として寄託されたハイブリドーマ細胞株ACI-41-Ab1によって産生された抗体の特徴的特性を有する、前記請求項のいずれか一項記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

40

【請求項61】

2010年3月3日にDSM ACC3043として寄託されたハイブリドーマ細胞株ACI-41-Ab1によって産生された、請求項60記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

【請求項62】

2010年3月10日にDSM ACC3044として寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6によって産生された抗体の特徴的特性を有する、前記請求項のいずれか一項記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

50

## 【請求項 6 3】

2010年3月10日にDSM ACC3044として寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6によって産生された、請求項62記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

## 【請求項 6 4】

2010年3月10日にDSM ACC3045として寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8によって産生された抗体の特徴的特性を有する、前記請求項のいずれか一項記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

## 【請求項 6 5】

2010年3月10日にDSM ACC3045として寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8によって産生された、請求項64記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

10

## 【請求項 6 6】

2010年3月10日にDSM ACC3046として寄託されたハイブリドーマ細胞株4C1によって産生された抗体の特徴的特性を有する、前記請求項のいずれか一項記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

## 【請求項 6 7】

2010年3月10日にDSM ACC3046として寄託されたハイブリドーマ細胞株4C1によって産生された、請求項66記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

20

## 【請求項 6 8】

2010年3月10日にDSM ACC3047として寄託されたハイブリドーマ細胞株5D10A3によって産生された抗体の特徴的特性を有する、前記請求項のいずれか一項記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

## 【請求項 6 9】

2010年3月10日にDSM ACC3047として寄託されたハイブリドーマ細胞株5D10A3によって産生された、請求項68記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

## 【請求項 7 0】

2010年3月10日にDSM ACC3048として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10によって産生された抗体の特徴的特性を有する、前記請求項のいずれか一項記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

30

## 【請求項 7 1】

2010年3月10日にDSM ACC3048として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10によって産生された、請求項70記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

## 【請求項 7 2】

2010年3月10日にDSM ACC3049として寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1によって産生された抗体の特徴的特性を有する、前記請求項のいずれか一項記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

40

## 【請求項 7 3】

2010年3月10日にDSM ACC3049として寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1によって産生された、請求項72記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

## 【請求項 7 4】

2010年3月10日にDSM ACC3050として寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2によって産生された抗体の特徴的特性を有する、前記請求項のいずれか一項記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

## 【請求項 7 5】

2010年3月10日にDSM ACC3050として寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2によって産生

50

された、請求項74記載の抗体、特に任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体。

【請求項76】

ポリクローナル抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。

【請求項77】

モノクローナル抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。

【請求項78】

タウタンパク質上のエピトープ、特にリン酸化された病理的タウタンパク質コンフォーマーのエピトープ、特にSEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、およびSEQ ID NO:9に与えられる配列の群から選択されるペプチド配列ならびにその変種断片によって表されるまたはそれらに含まれるエピトープに、直接かつ特異的に結合する、前記請求項のいずれか一項記載の抗体、特にモノクローナル抗体またはその機能的部分。 10

【請求項79】

前記請求項のいずれか一項記載の抗体を薬学的に許容される担体と共に含む、薬学的組成物。

【請求項80】

アルツハイマー病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病、封入体筋炎、およびプリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷が含まれるがこれらに限定されるわけではない、タウとアミロイド病態の同時存在を示す疾患または障害、ならびに筋萎縮性側索硬化症／グアムのパーキンソニズム-認知症複合、神経原線維変化Xを伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、第17染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン-スパッツ病、多系統萎縮症、C型ニーマン-ピック病、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型老年認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィーが含まれるがこれらに限定されるわけではない明確なアミロイド病態を示さないさらなる疾患または障害が含まれる、神経変性疾患または障害の不均一な群を含むタウオパチーにおける主な脳の病態である神経原線維病変の形成によって引き起こされるまたは神経原線維病変の形成に関連する疾患および障害を処置するための、請求項79記載の薬学的組成物。 20 30

【請求項81】

タウオパチーなどの神経変性疾患または障害を処置するための方法であって、前記請求項のいずれか一項に記載される抗体または抗体を含む薬学的組成物を、そのような疾患または障害に罹患している動物、特に哺乳動物、しかしとりわけヒトに投与する段階を含む、方法。

【請求項82】

以下の工程が含まれる、試料中またはインサイチューでタウタンパク質のエピトープに対する抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を検出する段階を含む、患者におけるタウタンパク質関連疾患、障害、または状態を診断する方法： 40

(a) タウタンパク質を含有することが疑われる試料または特定の体の部分もしくは体の領域を、タウタンパク質のエピトープに結合する抗体に接触させる工程；

(b) 抗体をタウタンパク質に結合させて、免疫複合体を形成させる工程；

(c) 免疫複合体の形成を検出する工程；および

(d) 免疫複合体の有無を、試料または特定の体の部分もしくは領域におけるタウタンパク質の有無と関連させる工程。

【請求項83】

以下の工程が含まれる、試料中またはインサイチューでタウタンパク質のエピトープに対するモノクローナル抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を検出する段階を含む、患者におけるタウタンパク質関連疾患、障害、または状態に対する素因を診断するための 50



方法：

(a) タウ抗原を含有することが疑われる試料または特定の体の部分もしくは体の領域を、タウタンパク質のエピトープに結合する本発明に従いかつ本明細書で先に記載した抗体に接触させる工程；

(b) 抗体をタウ抗原に結合させて、免疫複合体を形成させる工程；

(c) 免疫複合体の形成を検出する工程；および

(d) 免疫複合体の有無を、試料または特定の体の部分もしくは領域におけるタウ抗原の有無と関連させる工程；

(e) 正常対照値と比較して凝集体の量が増加していれば、患者がタウタンパク質関連疾患または状態に罹患しているまたは発症するリスクを有することが示される、免疫複合体の量を正常対照値と比較する工程。

10

【請求項 8 4】

以下の段階を含む、前記請求項のいずれか一項記載の抗体または薬学的組成物による処置後に患者における微小残存疾患をモニターするための方法：

(a) タウ抗原を含有することが疑われる試料、または特定の体の部分もしくは体の領域を、タウタンパク質のエピトープに結合する本発明に従いかつ本明細書で先に記載した抗体に接触させる段階；

(b) 抗体をタウ抗原に結合させて、免疫複合体を形成させる段階；

(c) 免疫複合体の形成を検出する段階；および

(d) 免疫複合体の有無を、試料または特定の体の部分もしくは領域におけるタウ抗原の有無と関連させる段階；

20

(e) 正常対照値と比較して凝集体の量が増加していれば、患者が微小残存疾患になおも罹患していることが示される、免疫複合体の量を正常対照値と比較する段階。

【請求項 8 5】

以下の段階を含む、前記請求項のいずれか一項記載の抗体または薬学的組成物によって処置される患者の応答性を予測するための方法：

(a) タウ抗原を含有することが疑われる試料または特定の体の部分もしくは体の領域を、タウタンパク質のエピトープに結合する本発明に従いかつ本明細書で先に記載した抗体に接触させる段階；

(b) 抗体をタウ抗原に結合させて、免疫複合体を形成させる段階；

(c) 免疫複合体の形成を検出する段階；および

(d) 免疫複合体の有無を、試料または特定の体の部分もしくは領域におけるタウ抗原の有無と関連させる段階、

30

(e) 凝集体の量が減少すれば、患者が処置に応答する高い潜在性を有することが示される、処置の開始の前後で免疫複合体の量を比較する段階。

【請求項 8 6】

前記請求項のいずれか一項記載の抗体を含むタウタンパク質関連疾患、障害、または状態を検出および診断するための、試験キット。

【請求項 8 7】

本発明に従う1つまたは複数の抗体を保持する容器と、タウ抗原に結合させて免疫複合体を形成させる目的で抗体を用いるため、および免疫複合体の有無がタウ抗原の有無に相關するように、免疫複合体の形成を検出するための説明書とを含む、請求項86記載の試験キット。

40

【請求項 8 8】

SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、およびSEQ ID NO:9に与えられる配列の群から選択されるペプチド配列、ならびにその変種断片によって表されるまたはそれらに含まれる、エピトープ。

【請求項 8 9】

前記請求項のいずれか一項記載の抗体を産生する細胞株。

【請求項 9 0】

50

2010年3月3日に、DSM ACC3043として寄託されたハイブリドーマ細胞株ACI-41-Ab1である、請求項89記載の細胞株。

【請求項 9 1】

2010年3月10日に、DSM ACC3044として寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6である、請求項89記載の細胞株。

【請求項 9 2】

2010年3月10日に、DSM ACC3045として寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8である、請求項89記載の細胞株。

【請求項 9 3】

2010年3月10日に、DSM ACC3046として寄託されたハイブリドーマ細胞株4C1である、請求項89記載の細胞株。

【請求項 9 4】

2010年3月10日に、DSM ACC3047として寄託されたハイブリドーマ細胞株5D10A3である、請求項89記載の細胞株。

【請求項 9 5】

2010年3月10日に、DSM ACC3048として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10である、請求項89記載の細胞株。

【請求項 9 6】

2010年3月10日に、DSM ACC3049として寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1である、請求項89記載の細胞株。

【請求項 9 7】

2010年3月10日に、DSM ACC3050として寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2である、請求項89記載の細胞株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経原線維変化によって引き起こされるまたは神経原線維変化に関連する疾患および障害の処置において治療的および診断的使用のための方法および組成物に関する。具体的には、本発明は、アルツハイマー病（AD）が含まれるタウオパチーの処置において治療的および診断的使用のための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

神経原線維変化は、ADにおける主要な神経病理学的特徴である。それらは、過剰リン酸化タウタンパク質およびそのコンフォーマーの凝集を起源とする。ADは、この病態を多くの神経変性タウオパチーと、具体的には明記されたタイプの前頭側頭型認知症（FTD）と共有する。

【0003】

タウタンパク質は、その集合および安定性を促進するために微小管（MT）に強く結合する非常に可溶性の「天然のアンフォールド」タンパク質である。MTは、ニューロンの細胞骨格完全性にとって非常に重要であり、したがって神経回路の適切な形成および機能にとって重要であり、よって学習および記憶にとって重要である。MTに対するタウの結合は、主にインビトロおよび非ニューロン細胞において証明されているように、動的リン酸化および脱リン酸化によって制御される。起こりうるリン酸化部位が多数（>80個）であるために、各々の正確な関与および原因となるキナーゼがなんであるかはインビボにおいてなおほとんど定義されないままである。

【0004】

ADの脳において、タウの病態はアミロイドの病態より遅れ、ゆえにおそらくアミロイドの病態に反応して発生するが、これはアミロイドカスケード仮説の本質を構成する。このことは、ADおよびダウン症候群患者での研究に基づき、それによって示されており、アミロイドとタウの病態を組み合わせたトランスジェニックマウスでの研究によって確認され

10

20

30

40

50

ている (Lewis et al., 2001; Oddo et al., 2004; Ribe et al., 2005; Muylleert et al., 2006; 2008; Terwel et al., 2008)。

#### 【0005】

ヒトAD患者における双方の病態の正確な時期のみならず、アミロイドをタウの病態に結びつける機構は、ほとんどが不明のままであるが、主要な「タウキナーゼ」としてGSK3およびcdk5に作用する、またはそれらによって作用するニューロンのシグナル伝達経路の活性化を伴うと提唱されている (Muylleert et al., 2006, 2008による論評)。

#### 【0006】

タウオパチーが、無害な副作用ではなく、ADにおける主要な病理学的実行犯であるという仮説は、互いを十分に裏付ける妥当な遺伝的、病理学的、および実験的知見に基づいている：

- ・ アミロイドタンパク質前駆体 (APP) またはプレセニリンの変異が原因である早期発症型家族性ADにおいて、絶対的な発病原因はアミロイドの蓄積であるが、病態は必ず二次性タウオパチーを含み、これは晩期発症型孤発性AD症例の場合と同一である。

- ・ 認識機能障害および認知症の重症度はタウオパチーと相関するが、アミロイドの病態とは相関しないことが、アミロイドに関するPIB-PETイメージングが含まれるいくつかの臨床フェーズ1&2試験によってごく最近例証されており、脳のアミロイド負荷が高いが認知機能が正常な個体の多くが「疑陽性」として同定されている。

- ・ 家族性FTDにおいて、タウオパチーは、変異体タウによって誘発されて神経変性を直接引き起こすが、アミロイド病態を引き起こさない。

- ・ 実験的マウスモデルにおいて、アミロイド病態によって引き起こされる認知欠損は、タウタンパク質が存在しなければほぼ完全に軽減される (Roberson et al., 2007)。

#### 【0007】

これらを合わせた議論は、ADおよび関連する神経変性タウオパチーにおける認知喪失において、タウタンパク質が主要な役割を果たすという仮説を支持する。

#### 【0008】

ADの優れた新しい処置は、神経毒性またはシナプス毒性であると想定されるアミロイドペプチドおよびその凝集体を除去するための特異的mAbによる受動免疫療法である。

#### 【0009】

本明細書において提唱されるタウ病態を標的とする免疫療法は、神経変性を引き起こすことが知られているまたは仮定されている病理学的なタウタンパク質コンフォーマーを中和すると予想される。ADにおけるアミロイド病態および過剰リン酸化タウタンパク質のニューロン内凝集体は、軽度の認知障害 (MCI) からADの重度の認知症に至る病理学的事象の認知および変性カスケードにおいて相乗的に作用すると提唱されている。ゆえに、タウを標的とした投薬とアミロイドを標的とした投薬 (または他の任意の投薬) の併用は、好ましく、実質的により有効なADの処置となるであろう。

#### 【0010】

タウタンパク質を標的とする他の治療アプローチは少なく、主に以下を含む：

- ・ タウのリン酸化を病理学的レベルまで増加させると考えられるキナーゼの阻害剤：
- ・ 過剰リン酸化されたタウタンパク質の細胞質凝集を遮断する化合物。

#### 【0011】

これらのアプローチは、特異性および効能に関して様々な欠点を有し、それらのアプローチが共有する問題は、APPおよびアミロイドの代謝を改変しようと試みる点であり、このことは全て、タウに対する免疫療法を含む追加の処置選択肢を絶えず検索する重要性を強調する。

#### 【0012】

実際のところ、標的は言うまでもなく、インビボでの病理学的なタウコンフォーマーを定義するためにほとんど努力が行われていない。A $\beta$ 42のフェーズII臨床試験において、原線維変性の病態は、十分に検討されず、それほど深く分析されていないように思われた (Nicoll et al., 2003; Masliah et al., 2005)。一方、複合AD様病態を有する前臨床

10

20

30

40

50

マウスモデルにおいてアミロイドを標的とする実験的免疫療法は、タウの病態に対して効果を有することを証明したが、タウ凝集体は持続した (Oddo et al., 2004)。

#### 【0013】

免疫療法によって細胞内タウタンパク質に近づくことが実現可能であるか否かに関して、いくつかの疑問が投げかけられている。これらの疑問は、Asuniおよび共同研究者 (Asuni et al., 2007) によるタウオパチーのマウスモデルにおけるごく最近の実験的試験によって反論されている。彼らは、タウタンパク質由来リン酸化ペプチドのワクチン接種によって、原線維変化の病態が低減されて、機能的に改善されることを示した。これらのデータは、パーキンソン病 (PD) モデル (Masliah et al., 2005) における $\alpha$ シヌクレインを標的とする免疫療法、および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデル (Urushitani et al., 2007) におけるスーパーオキシドジスムターゼに関するこれまでの報告を確認する。これらの2つの疾患は、未だ完全には理解されていない機構によって神経変性が起こる細胞内タンパク質の例である。一方、細菌において産生されて単離された完全長の組み換え型タウタンパク質は、ワクチンとして適していないように思われるが、用いたアジュバント、すなわちフロイントの完全アジュバントおよび百日咳毒素が、その試験の負の転帰に関与した可能性がある (Rosenmann et al., 2006)。

10

#### 【0014】

たとえばアミロイドとしてADにとって典型である過剰リン酸化タウタンパク質のニューロン内凝集体によって引き起こされるADにおけるアミロイド病態などの、神経変性障害を引き起こすことが知られているまたは引き起こすと仮定される病理学的タンパク質コンフォーマーを中和するように作用する受動的および／または能動的免疫療法が必要であるが、未だ対処されていない。

20

#### 【0015】

この対処されていない必要性は、本発明の範囲において、リボソームに基づくワクチン (Nicolau et al., 2002; Muhs et al., 2007) と、タウタンパク質の主要な病理学的リン酸化エピトープを模倣するリン酸化ペプチドに基づくmAbとを用いる受動および能動免疫法を提供することによって対処されうるのであろう。これらの併用作用によって、ADが含まれるタウオパチーにおけるシナプス毒性および神経毒性の原因であると考えられるタウタンパク質上の直線状かつコンフォメーションで、単純および複雑なリン酸化エピトープに対する新規特異的mAbが生成される。

30

#### 【発明の概要】

#### 【0016】

本発明は、生物において、具体的には動物、具体的には哺乳動物、またはヒトにおいて、非常に有効であり、この群の神経変性障害における主要な脳の病態である神経原線維変の形成に関連する疾患および障害の群であるタウオパチーまたはタウオパチーに関連する症状を予防または軽減することができる、非常に特異的な、具体的にはコンフォメーション特異的な免疫応答を誘発するための、抗原性ペプチドまたはその断片を含む組成物が含まれる、新規方法、ならびに本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドおよびその機能的断片を提供する。

#### 【0017】

本発明はまた、この群の神経変性障害における主要な脳の病態である神経原線維変の形成に関連する疾患および障害の群であるタウオパチーまたはタウオパチー関連症状を予防または軽減するために、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドまたはその機能的断片、ならびに抗原性ペプチドまたはその断片を含む薬学的組成物の投与によって、生物における非常に特異的な、具体的にはコンフォメーション特異的な免疫応答によって生じる抗体、具体的には、その機能的部分が含まれるモノクローナル抗体、および抗体を含む薬学的組成物にも関する。

40

#### 【0018】

この群の神経変性障害は、2つの小分類にさらに細分されることがある。第一の分類には、アルツハイマー病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ボクサー認知症、ダウン症候群、

50

ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病、封入体筋炎、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、および外傷性脳損傷が含まれるがこれらに限定されるわけではない、タウとアミロイド病態の同時存在を示す疾患または障害が含まれる。

#### 【0019】

第二の分類には、筋萎縮性側索硬化症／パーキンソニズム-認知症複合、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、第17染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン-スパッツ病、多系統萎縮症、C型ニーマン-ピック病、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上全脳炎が含まれるがこれらに限定されるわけではない、明確なアミロイド病態を有しない疾患または障害が含まれる。

10

#### 【0020】

具体的には、本発明は、神経原線維病変の形成に関連する疾患または障害に罹患している哺乳動物、具体的にはヒトにおける認知記憶能を保持または改善するため、具体的には回復するため、より具体的には完全に回復するために、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドまたはその機能的断片と、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドまたはその機能的断片を宿主動物に投与することによって得ることができるその機能的部分が含まれる抗体、具体的にはモノクローナル抗体とを含む、新規方法および薬学的組成物を提供する。

#### 【0021】

本発明の目的は、タウタンパク質から得ることができる抗原性ペプチド、具体的には改変抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物を提供することである。具体的には、本発明は、アルツハイマー病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病、封入体筋炎、およびプリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷が含まれるがこれらに限定されるわけではない、タウとアミロイド病態の同時存在を示す疾患または障害、ならびに筋萎縮性側索硬化症／グアムのパーキンソニズム-認知症複合、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、第17染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン-スパッツ病、多系統萎縮症、C型ニーマン-ピック病、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型老年認知症 (tangle only dementia)、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィーが含まれるがこれらに限定されるわけではない明確なアミロイド病態を示さないさらなる疾患または障害が含まれる、神経変性疾患または障害の不均一な群を含むタウオパチーにおける主要な脳の病態である、神経原線維病変の形成によって引き起こされるまたは神経原線維病変の形成に関連する疾患および障害を処置するために、担体との付着を通してまたは担体への再構築を通してさらに改変される、タウタンパク質の主要な病理学的リン酸化エピトープを模倣する抗原性ペプチド、具体的には抗原性リン酸化ペプチドまたはその機能的断片、抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物、ならびにそのようなペプチドまたはその機能的断片および薬学的組成物をそれぞれ産生する方法に関する。

20

30

40

#### 【0022】

一つの態様において、本発明は、抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関し、ペプチドまたは断片は、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、およびSEQ ID NO: 9に示される配列の群から選択されるアミノ酸配列のそれぞれ、アミノ酸残基5個～アミノ酸残基30個、具体的にはアミノ酸残基10個～アミノ酸残基25個、具体的にはアミノ酸残基12個～アミノ酸残基22個、具体的にはアミノ酸残基14個～アミノ酸残基20個、具体的にはアミノ酸残基16個～アミノ酸残基18個を含み、配列は、病理学的状態または障害、具体的には神経原線維病変の形成に関連する状態または障害に関連する特徴的なリン酸化パターンを特色とする。

50

## 【0023】

一つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、およびSEQ ID NO: 9に示される配列の群から選択される抗原性ペプチドまたはその機能的断片をコードする核酸分子またはその断片に関する。

## 【0024】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 2に示される配列と少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を示し、SEQ ID NO:2の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:2のアミノ酸残基18位 (P-Tyr<sub>18</sub>) に対応するアミノ酸残基がリン酸化されている (T1)、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

10

## 【0025】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基18位 (P-Tyr<sub>18</sub>) がリン酸化されている (T1)、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

## 【0026】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 3およびSEQ ID NO:4に示される配列と少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を示し、SEQ ID NO:3の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:3および4のアミノ酸残基202位 (P-Ser<sub>202</sub>)、205位 (P-Thr<sub>205</sub>)、212位 (P-Thr<sub>212</sub>)、および214位 (P-Ser<sub>214</sub>) に対応するアミノ酸残基の少なくとも1個、具体的には少なくとも2個、具体的には少なくとも3個、特に全てがそれぞれリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

20

30

## 【0027】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片がそれぞれ、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO: 4に示されるアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基202位 (P-Ser<sub>202</sub>)、205位 (P-Thr<sub>205</sub>)、212位 (P-Thr<sub>212</sub>)、および214位 (P-Ser<sub>214</sub>) の少なくとも1個、具体的には少なくとも2個、具体的には少なくとも3個、特に全てがリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

## 【0028】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO:4に示される配列と少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を示し、SEQ ID NO:4の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:4のアミノ酸残基202位 (P-Ser<sub>202</sub>)、および205位 (P-Thr<sub>205</sub>) に対応するアミノ酸残基の少なくとも1個、具体的には少なくとも2個がリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

40

## 【0029】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基202位 (P-Ser<sub>202</sub>) および205位 (P-Thr<sub>205</sub>) の少なくとも1個、具体的には少なくとも2個がリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発

50

明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

【0030】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 3に示される配列と少なくとも8%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を示し、SEQ ID NO:3の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:3のアミノ酸残基212位 (P-Thr<sub>212</sub>) および214位 (P-Ser<sub>214</sub>) に対応するアミノ酸残基の少なくとも1個、具体的には少なくとも2個がリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

10

【0031】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 3に示されるアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基212位 (P-Thr<sub>212</sub>) および214位 (P-Ser<sub>214</sub>) の少なくとも1個、具体的には少なくとも2個がリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

【0032】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 5に示される配列と少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を示し、SEQ ID NO:5の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:5のアミノ酸残基396位 (P-Ser<sub>396</sub>) および404位 (P-Ser<sub>404</sub>) に対応するアミノ酸残基の少なくとも1個、特に全てがリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

20

【0033】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 5に示されるアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基396位 (P-Ser<sub>396</sub>) および404位 (P-Ser<sub>404</sub>) の少なくとも1個、特に全てがリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

30

【0034】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 6に示される配列と少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を示し、SEQ ID NO:6の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:6のアミノ酸残基404位 (P-Ser<sub>404</sub>) および409位 (P-Ser<sub>409</sub>) に対応するアミノ酸残基の少なくとも1個、特に全てがリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

40

【0035】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 6に示されるアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基404位 (P-Ser<sub>404</sub>) および409位 (P-Ser<sub>409</sub>) の少なくとも1個、特に全てがリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

【0036】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 7に示される配列と少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、具体的には

50

少なくとも95%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を示し、SEQ ID NO:7の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:7のアミノ酸残基202位 (P-Ser<sub>202</sub>)、205位 (P-Thr<sub>205</sub>)、212位 (P-Thr<sub>212</sub>)、および214位 (P-Ser<sub>214</sub>) に対応するアミノ酸残基の少なくとも1個、具体的には少なくとも2個、具体的には少なくとも3個、特に全てがリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

#### 【0037】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 7に示されるアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基202位 (P-Ser<sub>202</sub>)、205位 (P-Thr<sub>205</sub>)、212位 (P-Thr<sub>212</sub>)、および214位 (P-Ser<sub>214</sub>) の少なくとも1個、具体的には少なくとも2個、具体的には少なくとも3個、特に全てがリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

#### 【0038】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 8に示される配列と少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を示し、SEQ ID NO:8の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:8のアミノ酸残基409位 (P-Ser<sub>409</sub>) に対応するアミノ酸残基がリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

#### 【0039】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸配列を示し、SEQ ID NO:8のアミノ酸残基409位 (P-Ser<sub>409</sub>) に対応するアミノ酸残基がリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

#### 【0040】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 9に示される配列と少なくとも80%、具体的には少なくとも85%、具体的には少なくとも90%、具体的には少なくとも95%、具体的には少なくとも98%、具体的には少なくとも99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を示し、SEQ ID NO:9の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有し、SEQ ID NO:9のアミノ酸残基404位 (P-Ser<sub>404</sub>) に対応するアミノ酸残基がリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

#### 【0041】

一つの態様において、本発明は、ペプチドまたは断片が、SEQ ID NO: 9に示されるアミノ酸配列を示し、SEQ ID NO:9のアミノ酸残基404位 (P-Ser<sub>404</sub>) に対応するアミノ酸残基がリン酸化されている、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物に関する。

#### 【0042】

同様に、ペプチドが、SEQ ID NO:2~9に示される上記の抗原性ペプチドと本質的に同一であり、SEQ ID NO:2~9の抗原性ペプチドと実質的に同じ免疫原活性を有する、本発明に従って改変された抗原性ペプチドまたはその機能的断片、および抗原性ペプチドまたはその機能的断片を含む薬学的組成物、具体的には変更によってアミノ酸1~10個、より具体的にはアミノ酸1~6個、さらにより具体的にはアミノ酸1~4個、特にアミノ酸1~3個が化

10

20

30

40

50



学的に類似のアミノ酸に置換された、断片の保存的改変変種である変種ペプチド断片が本発明に含まれる。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は当技術分野において周知であり、本明細書において以下に開示される。保存的置換は、好ましくはペプチドの総有効電荷およびペプチド分子全体に対する電荷分布が本質的に同じままであるようになされる。

#### 【0043】

ペプチドが、上記で同定された本発明の断片と本質的に同一であり、該断片と実質的に同じ生物活性を有し、1つまたは複数のアミノ酸残基が欠失している、変種ペプチド断片、具体的には本発明に従って改変された変種抗原性ペプチド、および変種ペプチド断片を含む薬学的組成物も、同様に本発明に含まれる。

10

#### 【0044】

さらなる態様において、本発明に従うペプチドまたはその機能的断片は、2量体、3量体、4量体、5量体、6量体、7量体、8量体、9量体、10量体、11量体、12量体、13量体、14量体、15量体、16量体、20量体、30量体、および50量体からなる群より選択される重合体の形で提供され、重合体を構成する単量体単位は常に同一であるか、または異なる単量体単位であり、本発明に従いかつ本明細書に記載されるペプチド、具体的にはSEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、およびSEQ ID NO:9に示されるペプチドまたはその機能的断片、ならびに変種ペプチドからなる群より選択される。

#### 【0045】

一つの態様において、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドまたはその機能的断片は、担体、具体的にはアジュバントとしての機能性も有する担体との付着を通して、または担体への再構築を通して改変され、それによって超分子抗原性構築物が得られる。特異的態様において、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドまたはその機能的断片は、例えばその記載の全内容が参照により本明細書に包含される、WO公報WO2005/081872に記載される「超分子抗原性構築物」を産生するために、リボソームとの付着を通して、またはリボソームへの再構築を通して改変される。抗原性ペプチドまたはその機能的断片は、それが担体表面上で抗原性ペプチドの独自の提示を示すようさらに改変され、それによって抗原の曝露が増加し、かつ最終的に高い程度のコンフォメーション感受性を示す抗体が生成される。具体的には、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドは、リボソーム担体の脂質二重層／免疫アジュバントへの挿入を容易にする親油性または疎水性部分との会合を通して、具体的にはリボソーム二重層でのペプチドのアンカーとして機能し、かつペプチドをリボソーム表面の非常に近位に配置して安定化するが寸法を有する親油性または疎水性部分によって改変される。

20

30

#### 【0046】

本発明のさらなる態様において、親油性または疎水性部分は、脂肪酸、トリグリセリド、またはリン脂質、具体的にはC12～C24の炭素鎖を含有する脂肪酸、トリグリセリド、またはリン脂質、特にパルミチン酸である。

#### 【0047】

本発明の特異的態様において、抗原性ペプチドまたはその機能的断片のN-およびC-末端端部に共有結合したパルミチン酸少なくとも2分子によって改変されて、なおかつリボソーム担体への再構築によって改変された、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドまたはその機能的断片が提供される。

40

#### 【0048】

本発明の一つの態様において、コンジュゲートにおけるペプチドまたは断片は、各々がパルミチン酸4分子にカップリングされて、ゆえにそれらはテトラパルミトイル化されている。

#### 【0049】

本発明の一つの態様において、パルミチン酸2分子がペプチドまたは断片のN-末端端部にカップリングされて、パルミチン酸2分子がペプチドまたは断片のC-末端端部にカップ

50

リングされる。

【0050】

なおさらなる態様において、本発明は、たとえばパルミチン酸などの親油性または疎水性部分との会合を通して改変され、なおかつリポソームに再構成された、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドまたはその機能的断片を提供し、リポソーム調製物は、さらにたとえばリピドA、ミョウバン、リン酸カルシウム、インターロイキン1、および／または多糖類およびタンパク質のマイクロカプセル、具体的にはモノホスホリルもしくはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドA、またはミョウバンなどのアジュバントを含有してもよく、それによって超分子抗原構築物が得られる。

【0051】

一つの態様において、本発明は、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドまたはその機能的断片を、担体分子1分子あたり、1つまたは複数、具体的には2つまたはそれより多くを含む、本発明のおよび本明細書に記載する超分子構築物に関する。

【0052】

本発明の一つの態様において、担体分子はリポソームである。

【0053】

本発明の一つの態様において、2つまたはそれより多くの抗原性ペプチドは、同じまたは異なるペプチドであり、具体的には、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8およびSEQ ID NO:9またはその機能的断片および変種ペプチドからなる群より選択されるペプチドである。

【0054】

一つの態様において、本発明は、担体分子1分子あたり、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4の2つもしくはそれより多くの抗原性ペプチド、またはその抗原性断片の組み合わせを含む、本発明のおよび本明細書に記載する超分子構築物に関する。

【0055】

一つの態様において、本発明は、リン酸化された病理学的タウタンパク質コンフォーマー、またはコンフォーマーの病理学的特性を引き起こすコンフォーマーの部分、具体的にはタウタンパク質の病理学的リン酸化エピトープを認識してこれに結合する抗体、具体的には、任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

【0056】

具体的には、本発明は、リン酸化された病理学的タウタンパク質コンフォーマー、またはコンフォーマーの病理学的特性を引き起こすコンフォーマーの部分、具体的にはタウタンパク質の病理学的リン酸化エピトープを高い特異性で認識してこれに結合する抗体、具体的には、任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体を提供する。

【0057】

特異的態様において、抗体、具体的には本発明に従う任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体は、病理学的タウタンパク質コンフォーマーまたはコンフォーマーの病理学的特性を引き起こすコンフォーマーの部分に、非リン酸化非病理学的タウコンフォーマーに関する結合親和性より、少なくとも40%、具体的には少なくとも50%、具体的には少なくとも60%、具体的には少なくとも70%、具体的には少なくとも80%、具体的には少なくとも90%、具体的には少なくとも95%、および100%まで高い親和性で結合する。

【0058】

特異的態様において、ヒトアルツハイマー病の脳において神経原線維変化(NFT)および糸屑状構造物(neuropil threads)に特異的に結合する抗体、具体的には本発明に従う任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体が提供される。

【0059】

本発明の別の目的は、タウタンパク質上のエピトープ、またはエピトープの組み合わせ、具体的にはリン酸化された病理学的タウタンパク質コンフォーマーに対して特異的なエピトープ、具体的にはSEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、およびSEQ ID NO:9に与えられる配列群から選択されるペプチド配列、ならびにその変種断片によって表されるまたはそれらに含まれるエピトープなどのタウタンパク質の病理学的リン酸化エピトープに直接かつ特異的に結合する抗体、具体的にはモノクローナル抗体またはその機能的部分を提供することである。

#### 【0060】

具体的には、本発明は、抗原性ペプチド、具体的には本発明に従いかつ本明細書で先に記載したペプチド組成物、具体的には機能的断片またはその変種断片が含まれるSEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、およびSEQ ID NO:9に与えられるアミノ酸配列を含む抗原性ペプチドを含む組成物で適した動物を免疫する段階によって得ることができる、任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれる抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体を提供する。

#### 【0061】

一つの態様において、本発明は、2010年3月3日にDSM ACC3043として寄託されたハイブリドーマ細胞株ACI-41-Ab1によって産生された抗体の特徴的特性を有する抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

#### 【0062】

より具体的には、本発明は、2010年3月3日にDSM ACC3043として寄託されたハイブリドーマ細胞株ACI-41-Ab1によって産生された抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

#### 【0063】

一つの態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3044として寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6によって産生された抗体の特徴的特性を有する抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

#### 【0064】

より具体的には、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3044として寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6によって産生された抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

#### 【0065】

一つの態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3045として寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8によって産生された抗体の特徴的特性を有する抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

#### 【0066】

より具体的には、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3045として寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8によって産生された抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

#### 【0067】

一つの態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3046として寄託されたハイブリドーマ細胞株4C1によって産生された抗体の特徴的特性を有する抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

#### 【0068】

より具体的には、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3046として寄託されたハイブリドーマ細胞株4C1によって産生された抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

#### 【0069】

一つの態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3047として寄託されたハイブ

10

20

30

40

50

リドーマ細胞株5D10A3によって産生された抗体の特徴的特性を有する抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

【0070】

より具体的には、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3047として寄託されたハイブリドーマ細胞株5D10A3によって産生された抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

【0071】

一つの態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3048として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10によって産生された抗体の特徴的特性を有する抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

10

【0072】

より具体的には、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3048として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10によって産生された抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

【0073】

一つの態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3049として寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1によって産生された抗体の特徴的特性を有する抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

【0074】

より具体的には、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3049として寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1によって産生された抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

20

【0075】

一つの態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3050として寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2によって産生された抗体の特徴的特性を有する抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

【0076】

より具体的には、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3050として寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2によって産生された抗体、具体的には任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体に関する。

30

【0077】

抗体は、先に開示された特異的結合特徴をなおも示すキメラ抗体またはヒト化抗体の形で提供されてもよい。

【0078】

一つの態様において、本発明は、本明細書に記載する本発明の抗体を産生する細胞株に関する。

【0079】

特異的態様において、本発明は、2010年3月3日にDSM ACC3043として寄託されたハイブリドーマ細胞株ACI-41-Ab1に関する。

【0080】

別の特異的態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3044として寄託されたハイブリドーマ細胞株2B6に関する。

40

【0081】

別の特異的態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3045として寄託されたハイブリドーマ細胞株3A8に関する。

【0082】

別の特異的態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3046として寄託されたハイブリドーマ細胞株4C1に関する。

【0083】

別の特異的態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3047として寄託されたハ

50

イブリドーマ細胞株5D10A3に関する。

【0084】

別の特異的態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3048として寄託されたハイブリドーマ細胞株6C10に関する。

【0085】

別の特異的態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3049として寄託されたハイブリドーマ細胞株6H1に関する。

【0086】

別の特異的態様において、本発明は、2010年3月10日にDSM ACC3050として寄託されたハイブリドーマ細胞株7C2に関する。

【0087】

本発明の特異的タウ結合特性を有する抗体をなおも産生する、上記の一覧の特異的ハイブリドーマ細胞株のサブクローンおよび変種クローンも同様に本明細書に含まれる。

【0088】

特異的態様において、本発明は、記憶障害に罹患している動物、具体的には哺乳動物またはヒトの認知記憶能を保持または改善するために、具体的には完全に回復するために、抗原性ペプチド断片、具体的には本発明に従いかつ本明細書に記載する担体、具体的にはリポソーム担体との付着を通して、および／またはリポソーム担体への再構成を通して改変された抗原性ペプチド断片、またはその機能的断片を、薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤と共に含む薬学的組成物、および薬学的組成物を産生する方法を提供する。

【0089】

一つの態様において、任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれる抗体、具体的には、本発明に従う任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分が含まれるモノクローナル抗体の治療的有効量を、薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤と共に含む薬学的組成物が提供される。

【0090】

同様に本発明の目的は、アルツハイマー病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ボクサー認知症、ダウン症候群、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病、封入体筋炎、およびプリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷が含まれるがこれらに限定されるわけではない、タウとアミロイド病態の同時存在を示す疾患または障害、ならびに筋萎縮性側索硬化症／グアムのパーキンソニズム-認知症複合、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、第17染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン-スパッツ病、多系統萎縮症、C型ニーマン-ピック病、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型老年認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィーが含まれるがこれらに限定されるわけではない明確なアミロイド病理を示さないさらなる疾患または障害が含まれる神経変性疾患または障害の不均一な群を含むタウオパチーにおける主な脳の病態である神経原線維病変の形成によって引き起こされるまたはそれに関連する疾患および障害を処置するために、本発明に従いかつ本明細書に記載する薬学的組成物を提供すること、および／または本発明に従いかつ本明細書に記載する薬学的組成物の治療的有効量を薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤と共に、動物、具体的には哺乳動物またはヒトに投与する段階を含む方法を提供することである。

【0091】

特異的態様において、本発明は記憶障害に罹患している動物、具体的には哺乳動物またはヒトの認知記憶能を保持または増加させるために、具体的には認知記憶能を完全に回復させるために、本発明に従いかつ本明細書に記載する薬学的組成物を提供し、および／または本発明に従いかつ本明細書に記載する薬学的組成物の治療的有効量を薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤と共に、動物、具体的には哺乳動物

10

20

30

40

50

またはヒトに投与する段階を含む方法を提供する。

【0092】

本発明の別の目的は、薬学的組成物、およびそのような組成物を産生する方法のみならず、本発明に従う薬学的組成物の治療的有効量を薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤と共に動物またはヒトに投与することによって、神経原線維病変の形成によって引き起こされるまたは神経原線維病変の形成に関連する疾患および状態に罹患している動物、具体的には哺乳動物またはヒトにおける免疫応答を誘導する方法を提供することである。

【0093】

本発明の一つの態様において、タウオパチーに至る神経原線維病変に罹患している動物、具体的には哺乳動物またはヒトにおいて、たとえば記憶障害などのこの疾患または状態に関連する症状の保持または改善、具体的には当初の状態の完全な回復を得ることができる程度に免疫応答を誘導する方法が提供される。

【0094】

本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドを含む薬学的組成物を、動物、具体的には哺乳動物、特にヒトに投与すると、たとえばアイソタイプIgG1およびIgG2bなどの非炎症性Th2サブタイプの抗体、および／またはたとえばIgG3などのT細胞非依存的IgGサブクラスの抗体の生成が主に起こり、および／または脳における炎症性マーカー、具体的にはIL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ からなる群より選択される炎症性マーカーの有意な増加は起こらない。

【0095】

本発明のさらなる局面において、抗原性ペプチドが、担体、具体的にはリボソームの表面上に抗原が提示されるように、担体、具体的にはリボソーム担体との付着を通して、および／またはリボソーム担体への再構築を通して改変される、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドを含む薬学的組成物を、患者、具体的には動物またはヒト患者、具体的にはたとえば免疫寛容患者またはT細胞活性化患者などのそのようなT細胞非依存的応答を必要とする患者において、疾患、状態、または障害を処置する際にT細胞非依存的免疫応答を誘導するために用いてもよい。

【0096】

一つの態様において、本明細書に記載する本発明の抗原性組成物は、免疫刺激剤として有効である。

【0097】

本発明の特異的態様において、ペプチド抗原は、リボソーム表面上に高度に反復性のアレイで提示される。さらに特異的な態様において、抗原はT細胞エピトープを含有しない。

【0098】

本発明の一つの態様において、本明細書に記載する本発明の抗原性組成物は、免疫寛容患者またはT細胞活性化患者、具体的には免疫不全患者、具体的には自己免疫疾患に罹患している患者、具体的にはT細胞欠損、具体的には患者におけるCD4 T細胞の枯渇および／またはCD4 T細胞上でのCD14および／またはCD40Lの発現の低減によって引き起こされるT細胞欠損に罹患している患者を処置するために用いられる。

【0099】

本発明に従う抗体は、以下の工程が含まれる、試料中またはインサイチューでタウタンパク質のエピトープに対する抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を検出する段階を含む、患者におけるタウタンパク質関連疾患または状態を診断する方法において用いられるもよい：

- (a) タウタンパク質を含有することが疑われる試料または特定の体の部分もしくは体の領域を、タウタンパク質のエピトープに結合する抗体に接触させる工程；
- (b) 抗体をタウタンパク質に結合させて、免疫複合体を形成させる工程；
- (c) 免疫複合体の形成を検出する工程；および

10

20

30

40

50

(d) 免疫複合体の有無を、試料または特定の体の部分もしくは領域におけるタウタンパク質の有無と相関させる工程。

【0100】

一つの態様において、以下の工程が含まれる試料中またはインサイチューでタウタンパク質のエピトープに対するモノクローナル抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を検出する段階を含む、患者におけるタウタンパク質関連疾患または状態に対する素因を診断する方法が提供される：

(a) タウ抗原を含有することが疑われる試料または特定の体の部分もしくは体の領域を、タウタンパク質のエピトープに結合する、本発明に従いかつ本明細書で先に記載した抗体に接触させる工程；

(b) 抗体をタウ抗原に結合させて、免疫複合体を形成させる工程；

(c) 免疫複合体の形成を検出する工程；および

(d) 免疫複合体の有無を、試料または特定の体の部分もしくは領域におけるタウ抗原の有無と相関させる工程；

(e) 正常対照値と比較して凝集体の量が増加していれば、患者がタウタンパク質関連疾患または状態に罹患しているまたは発症のリスクを有することが示される、免疫複合体の量を正常対照値と比較する工程。

【0101】

別の態様において、本発明は、以下の段階を含む、前記請求項のいずれか一項記載の抗体または薬学的組成物による処置後の患者における微小残存疾患をモニターする方法に関する：

(a) タウ抗原を含有することが疑われる試料または特定の体の部分もしくは体の領域を、タウタンパク質のエピトープに結合する、本発明に従いかつ本明細書で先に記載した抗体に接触させる段階；

(b) 抗体をタウ抗原に結合させて、免疫複合体を形成させる段階；

(c) 免疫複合体の形成を検出する段階；および

(d) 免疫複合体の有無を、試料または特定の体の部分もしくは領域におけるタウ抗原の有無と相関させる段階；

(e) 正常対照値と比較して凝集体の量が増加していれば、患者が微小残存疾患になおも罹患していることが示される、免疫複合体の量を正常対照値と比較する段階。

【0102】

なお別の態様において、本発明は、以下の段階を含む前記請求項のいずれか一項記載の抗体または薬学的組成物によって処置される患者の応答性を予測する方法を提供する：

(a) タウ抗原を含有することが疑われる試料または特定の体の部分もしくは体の領域を、タウタンパク質のエピトープに結合する、本発明に従いかつ本明細書で先に記載した抗体に接触させる段階；

(b) 抗体をタウ抗原に結合させて、免疫複合体を形成させる段階；

(c) 免疫複合体の形成を検出する段階；および

(d) 免疫複合体の有無を、試料または特定の体の部分もしくは領域におけるタウ抗原の有無と相関させる段階；

(e) 凝集体の量が減少すれば、患者が処置に応答する高い潜在性を有することが示される、処置の開始の前後で免疫複合体の量を比較する段階。

【0103】

本発明の別の態様において、本発明に従う抗体は、タウ関連疾患および状態の検出および診断のための試験キットにおいて用いられてもよい。

【0104】

具体的には、本発明に従う抗体を含む、タウタンパク質関連疾患および状態を検出および診断するための試験キット、具体的には免疫複合体の有無がタウ抗原の有無に相関するように、タウ抗原に結合して免疫複合体を形成させ、かつ免疫複合体の形成を検出する目的のために、本発明に従う1つまたは複数の抗体を保持する容器と、抗体を用いるための

10

20

30

40

50

説明書とを含む試験キットが提供される。

【0105】

本発明のこれらおよび他の目的、特色および長所は、開示の態様の以下の詳細な説明および添付の特許請求の範囲を参照した後に明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0106】

図面および配列の簡単な説明

【図1】図1aは、ACI-33によって免疫したWTマウスにおける抗Tau5-20[pY18]IgG抗体を示す。0日目、13日目および28日目にACI-33を3回注射して-1日目、27日目および47日目に採血したC57BL/6野生型マウスの血清中の抗Tau5-20[pY18]IgG抗体の分析。結果を、マウス6匹の群において得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。図1bは、ACI-33によって免疫したTKOマウスにおける抗Tau5-20[pY18]IgG抗体を示す。0日目、13日目、および28日目にACI-33を3回注射して-1日目、27日目および47日目に採血したC57BL/6野生型マウスの血清中の抗Tau5-20[pY18]IgG抗体の分析。結果を、マウス6匹の群において得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。

【図2】図2aは、ACI-35によって免疫したWTマウスにおける抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG抗体を示す。0日目、16日目、30日目、99日目、および113日目にACI-35を5回注射して-1日目、28日目、42日目、98日目、および126日目に採血したC57BL/6野生型マウスの血清中の抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG抗体の分析。結果をマウス6匹の群において得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。図2bは、ACI-35によって免疫したTKOマウスにおける抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG抗体を示す。0日目、16日目、30日目、99日目、および113日目にACI-35を5回注射して-1日目、28日目、42日目、98日目、および126日目に採血したTKOマウスの血清中の抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG抗体の分析。結果をマウス6匹の群において得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。

【図3】図3aは、ACI-36によって免疫したWTマウスにおける抗Tau401-418[pS404/S409]IgG抗体を示す。0日目、13日目、および28日目にACI-36を3回注射して-1日目、27日目、および47日目に採血したC57BL/6野生型マウスの血清中の抗Tau401-418[pS404/S409]IgG抗体の分析。結果をマウス6匹の群において得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。図3bは、ACI-36によって免疫したTKOマウスにおける抗Tau401-418[pS404/S409]IgG抗体を示す。0日目、13日目、および28日目にACI-36を3回注射して-1日目、27日目、および47日目に採血したTKOマウスの血清中の抗Tau401-418[pS404/S409]IgG抗体の分析。結果を、-1日目/27日目に関してはマウス6匹の群において、および47日目に関してはマウス5匹の群について得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。

【図4a】図4aおよびbは、ACI-41によって免疫したWTマウスにおける抗Tau206-221[pT212/pS214]および抗Tau196-211[pS202/pT205]IgG抗体を示す。0日目、20日目、35日目にACI-41を3回注射して-1日目、34日目、48日目に採血したC57BL/6野生型マウスの血清中の抗Tau206-221[pT212/pS214]および抗Tau196-211[pS202/pT205]IgG抗体の分析。結果をマウス6匹の群において得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。双方のpTauペプチドに関して同じ血清を試験した。

【図4b】図4aおよびbは、ACI-41によって免疫したWTマウスにおける抗Tau206-221[pT212/pS214]および抗Tau196-211[pS202/pT205]IgG抗体を示す。0日目、20日目、35日目にACI-41を3回注射して-1日目、34日目、48日目に採血したC57BL/6野生型マウスの血清中の抗Tau206-221[pT212/pS214]および抗Tau196-211[pS202/pT205]IgG抗体の分析。結果をマウス6匹の群において得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。双方のpTauペプチドに関して同じ血清を試験した。

【図4c】図4cおよびdは、ACI-41によって免疫したTKOマウスにおける抗Tau206-221[pT212/pS214]および抗Tau196-211[pS202/pT205]IgG抗体を示す。0日目、20日目、35日目にACI-41を3回注射して-1日目、34日目、48日目に採血したTKOマウスの血清中の抗Tau206-221[pT212/pS214]および抗Tau196-211[pS202/pT205]IgG抗体の分析。結果をマウス6匹の群において得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。双方のpTauペプチドに関して同

10

20

30

40

50



じ血清を試験した。

【図4d】図4cおよびdは、ACI-41によって免疫したTK0マウスにおける抗Tau206-221[pT212/pS214]および抗Tau196-211[pS202/pT205]IgG抗体を示す。0日目、20日目、35日目にACI-41を3回注射して-1日目、34日目、48日目に採血したTK0マウスの血清中の抗Tau206-221[pT212/pS214]および抗Tau196-211[pS202/pT205]IgG抗体の分析。結果をマウス6匹の群において得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。双方のpTauペプチドに関して同じ血清を試験した。

【図5】図5aは、ACI-33によって免疫したWTマウスにおける抗Tau5-20[pY18]IgGアイソタイプおよびIgM抗体を示す。。最初のACI-33免疫後47日目でのC57BL/6マウスの血清中の抗Tau5-20[pY18]IgG1、2a、2b、3およびIgM抗体の分析。結果を、1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3)、および1/3200 (IgM) 倍希釈でのO.D.として表記し、マウス6匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。図5bは、ACI-33によって免疫したTK0マウスにおける抗Tau5-20[pY18]IgGアイソタイプおよびIgM抗体を示す。。最初のACI-33免疫後47日目のTK0マウスの血清中の抗Tau5-20[pY18]IgG1、2a、2b、3およびIgM抗体の分析。結果を、1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3)、および1/3200 (IgM) 倍希釈でのO.D.として表記し、マウス6匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図6】図6aは、ACI-35によって免疫したWTマウスにおける抗Tau393-408[pS396/pS404]IgGアイソタイプおよびIgM抗体を示す。最初のACI-35免疫後42日目でのC57BL/6マウスの血清中の抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG1、2a、2b、3およびIgM抗体の分析。結果を、1/100 (IgG1)、1/1600 (IgG2a)、1/1600 (IgG2b)、1/800 (IgG3)、および1/1600 (IgM) 倍希釈でのO.D.として表記し、マウス6匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。図6bは、ACI-35によって免疫したTK0マウスにおける抗Tau393-408[pS396/pS404]IgGアイソタイプおよびIgM抗体を示す。最初のACI-35免疫後42日目でのTK0マウスの血清中の抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG1、2a、2b、3およびIgM抗体の分析。結果を、1/100 (IgG1)、1/1600 (IgG2a)、1/1600 (IgG2b)、1/800 (IgG3)、および1/1600 (IgM) 倍希釈でのO.D.として表記し、マウス6匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図7】図7aは、ACI-36によって免疫したWTマウスにおける抗Tau401-418[pS404/S409]IgGアイソタイプおよびIgM抗体を示す。最初のACI-36免疫後47日目のC57BL/6マウスの血清中の抗Tau401-418[pS404/S409]IgG1、2a、2b、3およびIgM抗体の分析。結果を、1/100 (IgG1)、1/400 (IgG2a)、1/400 (IgG2b)、1/100 (IgG3)、および1/400 (IgM) 倍希釈でのO.D.として表記し、マウス6匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。図7bは、ACI-36によって免疫したTK0マウスにおける抗Tau401-418[pS404/S409]IgGアイソタイプおよびIgM抗体を示す。最初のACI-36免疫後47日目でのTK0マウスの血清中の抗Tau401-418[pS404/S409]IgG1、2a、2b、3およびIgM抗体の分析。結果を、1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3)、および1/400 (IgM) 倍希釈でのO.D.として表記し、マウス5匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図8】図8aは、ACI-41によって免疫したWTマウスにおける抗Tau196-211[pS202/pT205]IgGアイソタイプおよびIgM抗体を示す。最初のACI-41免疫後48日目でのC57BL/6マウスの血清中の抗Tau196-211[pS202/pT205]IgG1、2a、2b、3およびIgM抗体の分析。結果を、1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/3200 (IgG2b)、1/1600 (IgG3)、および1/3200 (IgM) 倍希釈でのO.D.として表記し、マウス6匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。図8bは、ACI-41によって免疫したTK0マウスにおける抗Tau196-211[pS202/pT205]IgGアイソタイプおよびIgM抗体を示す。最初のACI-41免疫後48日目のTK0マウスの血清中の抗Tau196-211[pS202/pT205]IgG1、2a、2b、3およびIgM抗体の分析。結果を、1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/3200 (IgG2b)、1/1600 (IgG3)、および1/3200 (IgM) 倍希釈でのO.D.として表記し、マウス6匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図9】T25フラスコからのACI-36ハイブリドーマ上清：TAUPIRおよびタウELISAスクリーニングを示す。9a. 非希釈上清を用いた老齢biGTマウスのTAUPIR染色。9b. 非希釈クローン上清試料の抗pTauペプチドT4.5、抗タウペプチドT4.6、抗pTauタンパク質、および抗タ

ウタンパク質力価の分析。結果をO.D.として表記する。

【図10a】25フラスコからのACI-41ハイブリドーマ上清：TAUPIRおよびタウELISAスクリーニング。10a. 非希釈上清を用いた老齢biGTマウスのTAUPIR染色。

【図10b】25フラスコからのACI-41ハイブリドーマ上清：TAUPIRおよびタウELISAスクリーニング。10b. 非希釈クローン上清試料の抗pTauペプチドT8.5、抗タウペプチドT8.6、抗pTauタンパク質、および抗タウタンパク質力価の分析。結果をO.D.として表記する。

【図10c】25フラスコからのACI-41ハイブリドーマ上清：TAUPIRおよびタウELISAスクリーニング。10c. 非希釈クローン上清試料の抗pTauペプチドT9.5、抗タウペプチドT9.6、抗pTauタンパク質、および抗タウタンパク質力価の分析。結果をO.D.として表記する。

【図11】T8：Tau206-221[pT212/pS214]、T9：Tau196-211[pS202/pT205]、およびhP-Tauによってコーティングしたプレート上のハイブリドーマ上清。ハイブリドーマクローン上清からの抗Tau206-221[pT212/pS214]、抗Tau196-211[pS202/pT205]および抗hP-Tau抗体の分析。結果をO.D.として表記する。同じ上清をpTauペプチドおよびhP-Tauの双方について希釈せずに試験した。 10

【図12】抗体クローンACI-41-Ab1(T89-F4)はヒトAD脳におけるNFTを染色する。AD (a、b、およびc)、PSP (進行性核上麻痺) (d、e、およびf)、および健康な対照 (g、h、およびi) 被験者から得た脳切片をAT100 (a、d、およびg)、またはACI-41-Ab1(T89-F4)の1/1 (b、e、およびh)、または1/30 (c、f、およびi) 倍希釈を用いて染色した。

【図13】抗体5D10はヒトAD脳におけるNFTを染色する。AD被験者からの皮質脳切片を5D10 (a) またはAT100 (b) 抗体を用いて染色した。 20

【図14】ACI-35によって免疫したマウスにおける抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG抗体。0日目、14日目および28日目にACI-35を3回注射して、-7日目、7日目、21日目、35日目、および56日目に採血したC57BL/6マウスの血漿中の抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG抗体の分析。結果を、マウス10匹の群において得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。

【図15】ACI-35によって免疫したマウスにおける抗Tau393-408[pS396/pS404]IgGアイソタイプ抗体。最初のACI-35免疫後35日目でのC57BL/6マウスの血漿中の抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG1、2a、2b、および3抗体の分析。結果を1/1600 (IgG1)、1/3200 (IgG2a)、1/3200 (IgG2b)、および1/800 (IgG3) 倍の非飽和希釈でのO.D.として表記し、マウス10匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。 30

【図16】図16aは、ACI-35によって免疫したマウスにおける抗Tau393-408[pS396/pS404]IgM抗体。最初のACI-35免疫後35日目でのC57BL/6マウスの血漿中の抗Tau393-408[pS396/pS404]IgM抗体の分析。結果を1/6400倍希釈でのO.D.として表記し、マウス10匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。図16bは、ACI-35によって免疫したマウスにおける抗Tau393-408 IgG抗体。最初のACI-35免疫後35日でのC57BL/6マウスの血漿中でのTau393-408 IgG抗体の分析。結果を、1/100倍希釈でのO.D.として表記し、マウス10匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図17】Con AまたはpTau/タウペプチドによって再刺激した脾臓からの細胞の増殖。56日目でのMTTによるタウ特異的T細胞増殖の分析。脾細胞を各群10匹のマウスからプールして、ConA、Tau393-408[pS396/S404]、またはTau393-408ペプチドによって再刺激した。 40

【図18】Tau393-408[pS396/S404]およびTau393-408ペプチドによって再刺激した脾細胞のELISPOTによるサイトカイン産生。P-Tau/タウ特異的T細胞によるサイトカイン産生のELISPOT分析。脾細胞を各群10匹のマウスからプールして、Tau393-408[pS396/S404]およびTau393-408ペプチドによって再刺激した。

【図19】ACI-33によって免疫したマウスにおける抗Tau5-20[pY18]IgG抗体。0日目、13日目、28日目、91日目および133日目にACI-33を5回注射した後、-1日目、27日目、41日目、76日目、104日目、および135日目に採血したTPLHマウスの血清中の抗Tau5-20[pY18]IgG抗体の分析。結果を、群のマウスにおいて得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。-1日目ではマウスn=10匹、27日目、41日目、および76日目ではマウスn=9匹、マウス1匹はけんかのために死亡、104日目ではマウスn=6匹、マウス3匹は病態のために死亡 50

、ならびに135日目ではマウスn=2匹、マウス4匹は病態のために死亡した。

【図 2 0】ACI-35によって免疫したマウスにおける抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG抗体。0日目、13日目、27日目、91日目および133日目にACI-35を5回注射した後、-1日目、26日目、40日目、75日目、103日目、145日、および155日目に採血したTPLHマウスの血清中の抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG抗体の分析。結果を、群のマウスにおいて得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。-1日目、26日目ではマウスn=10匹、40日目ではマウスn=9匹、75日目ではマウスn=6匹、103日目および145日目ではマウスn=4匹、155日目ではマウスn=3匹。マウスは全て病態のために死亡した。

【図 2 1】ACI-39によって免疫したマウスにおける抗Tau206-221[pT212, pS214]IgG抗体。ACI-39を0日目、13日目、28日目、91日目および133日目に5回注射して、-1日目、27日目、41日目、76日目、104日目、および135日目に採血したTPLHマウスの血清中の抗Tau206-221[pT212, pS214]IgG抗体の分析。結果を、群のマウスにおいて得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。-1日目、27日目、および41日目ではマウスn=10匹、76日目ではマウスn=7匹、104日目ではn=6匹、135日目ではn=2匹。マウスは全て病態のために死亡した。

【図 2 2】ACI-40によって免疫したマウスにおける抗Tau196-211[pS202, pT205]IgG抗体。ACI-40を0日目、13日目、28日目、91日目および133日目に5回注射して、-1日目、27日目、41日目、76日目、104日目、および135日目に採血したTPLHマウスの血清中の抗Tau196-211[pS202, pT205]IgG抗体の分析。結果を、群のマウスにおいて得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。1日目、27日目、および41日目ではマウスn=10匹、76日目ではマウスn=8匹、104日目ではn=6、135日目ではマウスn=5匹。マウスは全て、病態のために死亡した。

【図 2 3】ACI-33によって免疫したマウスにおける抗Tau5-20[pY18]IgGアイソタイプおよびIgM抗体。ACI-33の3回の免疫後41日目でのTPLHマウスの血清中の抗Tau5-20[pY18]IgG1、2a、2b、3およびIgM抗体の分析。結果を、1/100 (IgG1)、1/200 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3)、および1/100 (IgM) 倍希釈での非飽和O.D.として表記し、マウス9匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図 2 4】ACI-35によって免疫したマウスにおける抗Tau393-408[pS396/pS404]IgGアイソタイプおよびIgM抗体。ACI-35の3回の免疫後40日目でのTPLHマウスの血清中の抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG1、2a、2b、3、およびIgM抗体の分析。結果を1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3)、および1/100 (IgM) 倍希釈での非飽和O.D.として表記し、マウス9匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図 2 5】ACI-39によって免疫したマウスにおける抗Tau206-221[pT212, pS214]IgGアイソタイプおよびIgM抗体。ACI-39の3回の免疫後41日目でのTPLHマウスの血清中での抗Tau206-221[pT212, pS214]IgG1、2a、2b、3、およびIGM抗体の分析。結果を1/100 (IgG1)、1/200 (IgG2a)、1/200 (IgG2b)、1/100 (IgG3)、および1/100 (IgM) 倍希釈で非飽和O.D.として表記し、マウス10匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図 2 6】ACI-40によって免疫したマウスにおける抗Tau196-211[pS202, pT205]IgGアイソタイプおよびIgM抗体。3回のACI-40免疫後41日目でのTPLHマウス血清中の抗Tau196-211[pS202, pT205]IgG1、2a、2b、3、およびIgM抗体の分析。結果を1/100 (IgG1)、1/400 (IgG2a)、1/200 (IgG2b)、1/800 (IgG3)、および1/100 (IgM) 倍希釈で非飽和O.D.として表記し、マウス10匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図 2 7】ACI-33によって免疫したマウスにおける異なるタウペプチドおよびタンパク質に対するIgG抗体力価。ACI-33を3回注射後-1日目および41日目でのTPLHマウスの血清中のIgG抗体力価の分析結果をO.D.として表記し、マウス9匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図 2 8】ACI-35によって免疫したマウスにおける異なるタウペプチドおよびタンパク質に対するIgG抗体力価。ACI-35を3回注射後の-1日目および40日目でのTPLHマウスの血清中のIgG抗体力価の分析。結果をO.D.として表記し、マウス9匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

10

20

30

40

50

【図 2 9】ACI-39によって免疫したマウスにおける異なるタウペプチドおよびタンパク質に対するIgG抗体力価。ACI-39を3回注射後の-1日目および41日目でのTPLHマウスの血清中のIgG抗体力価の分析。結果をO.D.として表記し、マウス10匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図 3 0】ACI-40によって免疫したマウスにおける異なるタウペプチドおよびタンパク質に対するIgG抗体力価。ACI-40を3回注射後-1日目および41日目でのTPLHマウスの血清中のIgG抗体力価の分析。結果をO.D.として表記し、マウス10匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図 3 1】ACI-33によって免疫したマウス対PBS注射マウスのロータロッド。ロータロッド試行をTPLHマウスの月齢によって参照される異なる5回の時期に行った。

【図 3 2】抗Tau5-20[pY18]抗体力価とロータロッド試験との相関。7.8か月齢でのACI-33注射TPLHマウスに関して相関を測定した。マウス血清中の抗体力価をELISA (O.D.) によって測定して、ロータロッド試験は、動物が装置に留まった時間を測定した (時間)。

【図 3 3】ACI-35によって免疫したマウス対PBS注射マウスのロータロッド。ACI-35によって免疫した9.5か月齢のTPLHマウス対PBS対照群のロータロッド結果。ACI-35はn=5で、PBSはn=4であり、他のマウスはモデルによって示される病態のために死亡した。

【図 3 4】ACI-33によって処置されたヌードマウスおよび野生型マウスにおけるFACSによるCD3+CD4+の定量。ACI-33を投与されたヌードマウスまたは野生型マウスの、CD3およびCD4に関して染色陽性のゲート通過細胞の百分率。左のパネル；ヌードマウスおよび野生型群のマウス2匹におけるFACS分析の概略図。右のパネル：各縦列は、マウス6匹の群に関する平均値およびSDを表す。マウス#5および6：ヌードマウス；マウス#7および8：野生型マウス。

【図 3 5】ACI-33によって免疫したヌードマウスおよび野生型マウスにおける抗Tau5-20[pY18]IgG抗体。ACI-33を0日目、14日目および28日目に3回注射して、2日目、7日目、21日目、35日目および56日目に採血したヌードマウスおよび野生型マウスの血清中の抗Tau5-20[pY18]IgG抗体の分析。結果をマウス6匹の群において得られたO.D.の平均値+標準偏差として表記する。

【図 3 6】ACI-33によって免疫したヌードマウスおよび野生型マウスにおける抗Tau5-20[pY18]IgGアイソタイプ抗体およびIgM抗体。3回のACI-33による免疫後35日目のヌードマウスおよび野生型マウスの血清中の抗Tau5-20[pY18]IgG1、2a、2b、3、およびIgM抗体の分析。結果を、1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3)、および1/100 (IgM) 倍希釈での非飽和O.D.として表記し、マウス6匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

【図 3 7】ACI-33によって免疫したヌードマウスおよび野生型マウスにおける異なるタウペプチドおよびタンパク質に対するIgG抗体力価。ACI-33を3回注射後の35日目でのヌードマウスおよび野生型マウスの血清中のIgG抗体力価の分析。結果をO.D.として表記し、マウス6匹の群において得られた平均値+標準偏差を示す。

#### 【0107】

SEQ ID NO:1 対照配列T5：Tau379-408[pS396, pS404]のアミノ酸配列

SEQ ID NO:2 配列1 (T1) Tau5-20[pY18]のアミノ酸配列

SEQ ID NO:3 配列8 (T8)：Tau206-221[pT212, pS214]のアミノ酸配列

SEQ ID NO:4 配列9 (T9)：Tau196-211[pS202, pT205]のアミノ酸配列

SEQ ID NO:5 配列3 (T3)：Tau393-408[pS396, pS404]のアミノ酸配列

SEQ ID NO:6 配列4 (T4)：Tau401-418[pS404, pS409]のアミノ酸配列

SEQ ID NO:7 配列2 (T2)：Tau200-216[pS202+ pT205 & pT212+pS214]のアミノ酸配列

SEQ ID NO:8 配列10 (T10)：Tau407-418[pS409]のアミノ酸配列

SEQ ID NO:9 配列11 (T11)：Tau399-408[pS404]のアミノ酸配列

【発明を実施するための形態】

#### 【0108】

用語の定義

10

20

30

40

50

本明細書において用いられる「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は互換的であり、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸で構成される生体分子を意味すると定義される。

#### 【0109】

「ペプチド」という用語は、その $\alpha$ 炭素が、1つのアミノ酸の $\alpha$ 炭素のカルボキシル基と別のアミノ酸の $\alpha$ 炭素のアミノ基とのあいだの縮合反応によって形成されるペプチド結合を通して連結されるアミノ酸（典型的にL-アミノ酸）の鎖である。鎖の1つの端部（すなわち、アミノ末端）での末端アミノ酸は、遊離のアミノ基を有し、鎖の他の端部（すなわち、カルボキシ末端）の末端アミノ酸は、遊離のカルボキシル基を有する。そのため、「アミノ末端」（N-末端と省略される）という用語は、ペプチドのアミノ末端のアミノ酸上の遊離の $\alpha$ アミノ基、またはペプチド内の他の任意の位置でのアミノ酸の $\alpha$ アミノ基（ペプチド結合に関与する場合にはイミノ基）を指す。同様に、「カルボキシ末端」（C-末端と省略される）という用語は、ペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸上の遊離のカルボキシル基、またはペプチド内の他の任意の位置でのアミノ酸のカルボキシル基を指す。

#### 【0110】

本明細書において用いられる「その断片」または「断片」という用語は、本明細書において定義されるペプチド（たとえばそれぞれ、SEQ ID NO:2~9に示されるように）と本質的に同じ（生物）活性を有する機能的ペプチド断片を指し、すなわち断片は、生物において、具体的には動物において、具体的には哺乳動物またはヒトにおいて、非常に有効で、タウオパチーまたはタウオパチーに関連する症状を予防または軽減することができる、非常に特異的で、具体的にはコンフォメーション特異的免疫応答をなおも誘発することができる。具体的には、断片は本明細書において用いられ、定義されるタウペプチドの特異的病理学的リン酸化エピトープまたは複数のエピトープをなおも含有する。

#### 【0111】

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

#### 【0112】

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

#### 【0113】

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

#### 【0114】

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

- 1) アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T) ；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E) ；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q) ；

10

20

30

40

50

- 4) アルギニン (R)、リジン (K) ;
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V) ; および
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W) 。

**【0115】**

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

10

**【0116】**

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

**【0117】**

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

**【0118】**

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

20

**【0119】**

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

**【0120】**

発現された後、組み換え型ペプチドを、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等が含まれる標準的な技法に従って精製することができる。約50%~95%均一性の実質的に純粋な組成物が好ましく、治療物質として用いるためには80%~95%またはそれより高い均一性が最も好ましい。

30

**【0121】**

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

40

**【0122】**

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

**【0123】**

本明細書において用いられる「ある (a)」、「ある (an)」、および「その (the)」という用語は、「1つまたは複数」を意味すると定義され、文脈が不适当である場合を除き、複数形が含まれる。

**【0124】**

本明細書において用いられる「検出する」または「検出された」という用語は、免疫化

50

学または組織学的方法などの生物学的分子を検出するための公知の技術を用いることを意味し、試験中の生体分子の存在または濃度を定性的または定量的に決定することを指す。

#### 【0125】

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

#### 【0126】

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

#### 【0127】

「抗体」は、本発明の範囲内において、モノクローナル抗体、ポリクローナル、キメラ、一本鎖、二重特異性、サル化、ヒト、およびヒト化抗体のみならず、その活性断片が含まれると意図される。公知の抗原に結合する分子の活性断片の例には、Fab免疫グロブリン発現ライブラリならびに先に言及した抗体および断片のいずれかのエピトープ結合断片の生成物が含まれる、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片が含まれる。これらの活性断片は、多数の技術によって本発明の抗体から誘導されうる。たとえば、精製モノクローナル抗体を、ペプシンなどの酵素によって切断して、HPLCゲル濾過に供することができる。次に、Fab断片を含有する適当な画分を収集してメンブレン濾過等によって濃縮することができる。抗体の活性断片を単離するための全般的技術のさらなる説明に関しては、たとえばKhaw, B. A, et al., J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al., Methods Enzymology, 121 :663-69, Academic Press, 1986を参照されたい。

#### 【0128】

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

#### 【0129】

ヒト化抗体はさらに、そのフレームワーク領域の1つまたは複数がヒトまたは霊長類アミノ酸を有する可変領域を有する抗体を指してもよい。その上、フレームワーク支持体残基を、結合親和性を保存するように変更してもよい。「ヒト化抗体」を得る方法は、当業者に周知である（たとえば、Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)を参照されたい）。

#### 【0130】

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

#### 【0131】

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

#### 【0132】

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

## 【0133】

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

## 【0134】

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

## 【0135】

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

## 【0136】

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

## 【0137】

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

## 【0138】

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

## 【0139】

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

## 【0140】

本発明に従う「超分子抗原性構築物」において、リポソームは、その中でそれが本明細書で先に記載した超分子構築物を含む担体として用いることができると同時に、本発明に従う治療ワクチンによって処置される標的動物またはヒトにおける免疫応答を増加させるまたは刺激するためのアジュバントとして機能するという点において、二重の機能を有する可能性がある。同様に、本発明の超分子抗原性構築組成物は、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、ウシ血清アルブミン（BSA）、ならびに例えばリピドA、ミョウバン、リン酸カルシウム、インターロイキン1、および／または多糖類およびタンパク質のマイクロカプセル、具体的にはモノホスホリルまたはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドA、またはミョウバンなどの他のアジュバント、他の保存剤、希釈剤、乳化剤、安定化剤、および先行技術分野のワクチンにおいて公知で用いられる他の成分が含まれるがこれらに限定されるわけではない追加のアジュバントをさらに含むことができると理解される。その上、当技術分野において公知の任意のアジュバント系を本発明の組成物において用いることができる。そのようなアジュバントには、フロイントの不完全アジュバント、フロイントの完全アジュバント、多分散 $\beta$ -(1,4)結合アセチル化マンナン（「アセマンナン」）、TITERMAX（登録商標）（CytRx Corporationのポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーアジュバント）、Chiron Corporationの改変脂質アジュバント、Camb

10

20

30

40

50



ridge Biotechのサポニン誘導体アジュバント、死菌百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、グラム陰性細菌のリポ多糖類 (LPS)、硫酸デキストランなどの大きいポリマー陰イオン、およびミョウバン、水酸化アルミニウム、またはリン酸アルミニウムなどの無機ゲルが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

#### 【0141】

さらに、「有効量」という用語は、ヒトまたは動物に投与した場合に、免疫応答を誘発する抗原性／免疫原性組成物の量を指す。有効量は、ルーチン技法に従って当業者によって容易に決定される。

#### 【0142】

本明細書において用いられる「免疫寛容患者」は、抗原に対して、具体的には非自己抗原に対して、特にたとえば新たに出現しつつある疾患に存在する新規抗原などの新規抗原に対して、限られた応答能を示す動物またはヒト患者を指す。この制限は、少なくとも部分的に、CD4+ T細胞の暦年齢による可能性がある。さらに、「免疫寛容患者」は、想起応答の際のメモリーT細胞の増殖およびサイトカイン分泌の欠如により、抗原曝露に対して長期のCD4+ T細胞免疫応答障害を示す可能性がある。

#### 【0143】

本明細書において用いられる「T細胞活性化患者」とは、T細胞活性化を示し、T細胞応答のさらなる刺激が医学的リスクを引き起こすであろう動物またはヒト患者を指す。

#### 【0144】

本明細書において用いられる「免疫不全患者」は、年齢、HIVなどの疾患、もしくは癌、またはたとえばリウマチ性関節炎、乾癬、全身性紅斑性狼瘡、ヴェーゲナー肉芽腫症等が含まれるがこれらに限定されるわけではない炎症疾患に対する処置などの処置によって損なわれている免疫系を有する動物またはヒト患者を指す。

#### 【0145】

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

#### 【0146】

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

#### 【0147】

特異的態様において、本発明は、具体的にはリボソームなどの担体分子の表面上での抗原提示を利用して、それによって曝露の増強および好ましい抗原コンフォメーションの安定化が得られ、最終的に非常に特異的な免疫応答、具体的にはT細胞非依存的免疫応答が起こり、それによって独自の特性を有する抗体が生成される。

#### 【0148】

具体的には、抗原性ペプチドは高度に反復的なアレイで、具体的には少なくとも10反復抗原性単位／担体分子、具体的には少なくとも50反復抗原性単位／担体分子、具体的には少なくとも100反復抗原性単位／担体分子、具体的には少なくとも200反復抗原性単位／担体分子、具体的には少なくとも300反復抗原性単位／担体分子、具体的には少なくとも400反復抗原性単位／担体分子、具体的には少なくとも500反復抗原性単位／担体分子を含む反復アレイで、担体分子の表面上に提示される。

#### 【0149】

本発明に従いかつ本明細書に記載する改変されたリン酸化ペプチド抗原、具体的にはタンパク質の主要な病理学的リン酸化エピトープを模倣するリン酸化ペプチド抗原を、Nicolau et. al., (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337において報告される

10

20

30

40

50

改変法に従って合成してもよい。このアプローチは、標準的なFmoc/tBuケミストリーを用いて、アミド樹脂上での固相ペプチド合成によって、構築物を段階的に組み立てる段階を伴う。次いで、末端のリジンの直交性保護基を除去して、遊離のアミノ基をパルミチン酸によってアシル化した。

#### 【0150】

側鎖保護基の脱保護および樹脂からのペプチドの同時放出は、酸性条件下で行われ、粗生成物として所望のテトラパルミトイル化リン酸化ペプチドを提供した。

#### 【0151】

最終生成物を高純度で得ることができ、その同一性および純度を、たとえばエレクトロスプレー質量分析法および／またはHPLC分析などの当技術分野において公知の方法によって確認することができる。

10

#### 【0152】

一つの態様において、本発明は、タウタンパク質の主要な病理学的リン酸化エпитープを模倣する、本発明に従いかつ本明細書に記載するリン酸化ペプチド抗原を含む免疫原性組成物を提供し、このペプチド抗原は、それが抗原の望ましいコンフォメーションを維持および安定化させることができるように改変される。この定義されたコンフォメーションによって、動物またはヒトに導入されると強く非常に特異的な免疫応答が誘導される。

#### 【0153】

抗原性ペプチドの所望のコンフォメーションの形成および安定化を達成する1つの様式は、担体、具体的にはアジュバントとしても機能することができる担体に部分的にまたは完全に、付着させた、組み入れた、または再構成させた抗原性ペプチドを提示することによって行われる。

20

#### 【0154】

本発明の範囲内で企図される可能性がある担体は、たとえば小胞、微粒子体または分子；細菌の膜タンパク質；腸内細菌Ompタンパク質、ナノ粒子、ミセル、金粒子、マイクロビーズ、および／またはヴィロソームまたは抗原性ペプチドのための担体／アジュバントとして適切に役立ちうる他の任意の手段、具体的にはリボソームである。

#### 【0155】

本発明の特異的態様において、抗原性ペプチドは、たとえばファンデルワールス、疎水性、もしくは静電的相互作用などの弱い相互作用を通して、または該相互作用の2つもしくはそれより多くの組み合わせによって、コンフォメーションの変化が防止されるまたは重度に制限されるように、抗原性ペプチドの3次元での運動自由度を制限することによって維持および安定化される特異的コンフォメーションでペプチドが提示されるように、担体に付着する、組み入れられる、または再構成される。

30

#### 【0156】

小胞、粒子、または微粒子体を、たとえばリボソームなどの担体／アジュバントとして用いる場合、その総有効電荷が、ペプチドが付着する担体／アジュバント表面の総有効電荷と同一であるように抗原性ペプチド組成物を選んでもよい。同一に帯電した担体／アジュバント表面と抗原性ペプチド、具体的には同一に荷電した担体表面と抗原性ペプチドを構成するアミノ酸残基、およびより具体的には同一に帯電した担体表面と抗原性ペプチドに含まれる同一に帯電したアミノ酸残基のあいだで有効である静電気反発力によって、高い生物活性を保証する、明確で非常に特異的で安定化されたコンフォメーションをとる抗原性ペプチドが得られる可能性がある。その結果、標的生物の免疫系が、抗原性構築物に含有される抗原性決定基と、生物活性コンフォメーションで、自由に相互作用することを可能にする点において非常に生物活性であるコンフォメーションで、抗原性ペプチドは曝露および提示され、動物またはヒトに投与されると、強いコンフォメーション特異的免疫応答を生じ、それによってたとえば標的生物において高い抗体力価が得られる。

40

#### 【0157】

免疫原性応答は、担体としてリボソームを用いることによってさらに増加する可能性があるあり、リボソームは、本発明に従う薬学的組成物によって処置される標的生物またはヒト

50

において免疫応答を増加または刺激するためのアジュバントとして機能する可能性がある。任意で、リポソームは、さらにたとえばリピドA、ミョウバン、リン酸カルシウム、インターロイキン1、および／または多糖類およびタンパク質のマイクロカプセル、具体的にはモノホスホリルもしくはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドA、またはミョウバンなどのさらなるアジュバントを含有してもよい。

#### 【0158】

本発明の特異的態様において、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチド、具体的にはその総有効電荷が陰性である抗原性ペプチドは、リポソームに再構成され、具体的にはリポソームは、ヘッドグループの正味の総荷が陰性であるようにその構成成分が選ばれる。具体的には、リポソームは、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン (DMPEA)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、およびコレステロールからなる群より選択される構成成分で構成され、任意でさらにモノホスホリルリピドA、またはたとえばミョウバン、リン酸カルシウム、インターロイキン1、および／または多糖類およびタンパク質のマイクロカプセルなどの本発明の範囲内で適切に用いることができる他の任意のアジュバントを含有する。

10

#### 【0159】

本発明の別の特異的態様において、本発明に従いかつ本明細書において先に記載される改変ペプチド抗原は、アンカー型分子に共有結合して提供され、該アンカー型分は、担体／アジュバントの中に挿入することによってペプチドを担体／アジュバントに固定することができ、本明細書において先に記載したように静電気力が有効になりうるように、担体／アジュバント分子の表面上でまたは表面の近位でペプチド抗原を提示することができる。

20

#### 【0160】

担体／アジュバントとしてリポソームを用いる場合、抗原性ペプチド構築物は一般的に、それが形成される際にリポソーム膜の中に挿入する疎水性のテールを有する。その上、抗原性ペプチドをリポソームに挿入することができるように、疎水性テールを含有するように抗原性ペプチドを改変することができる。

#### 【0161】

本発明の抗原性組成物は、具体的には抗原性効果を増強するように改変されたペプチドを含み、そのようなペプチドはPEG化 (ポリエチレングリコールまたは改変ポリエチレングリコールを用いて) によって改変されてもよく、または本明細書で先に記載したパルミチン酸、ポリアミノ酸 (たとえば、ポリグリシン、ポリヒスチジン)、多糖類 (たとえば、ポリガラクトロン酸、ポリ乳酸、ポリグリコリド、キチン、キトサン)、合成ポリマー (ポリアミド、ポリウレタン、ポリエステル) またはコポリマー (たとえば、ポリ(メタクリル酸)およびN-(2-ヒドロキシ)プロピルメタクリルアミド) 等による方法などの他の方法によって改変されてもよい。

30

#### 【0162】

本発明の特異的態様において、ペプチドがリポソームの中に挿入されうるように疎水性テールを含有するように改変された、本発明に従いかつ本明細書において先に記載した抗原性ペプチドが提供される。具体的にはタウタンパク質の主要な病理学的リン酸化エピトープを模倣する本発明に従いかつ本明細書に記載するリン酸化ペプチド抗原は、担体の脂質二重層／アジュバントの中への挿入を容易にする親油性または疎水性部分によって改変されてもよい。本発明の親油性または疎水性部分は、脂肪酸、トリグリセリド、およびリン脂質、具体的には脂肪酸炭素骨格が炭素原子少なくとも10個を有する脂肪酸、トリグリセリドおよびリン脂質であってもよく、具体的には、親油性部分は炭素原子少なくとも約14個および炭素原子およそ24個までの炭素骨格を有する脂肪酸を有し、この範囲内に入る炭素原子の各々の個々の数が本発明の一部である。具体的には、本発明は、疎水性テール、具体的には炭素原子少なくとも14個、特に炭素原子16個の炭素骨格を有する疎水性部分を含む疎水性テールを含有するように改変された、本発明に従いかつ本明細書において先に記載した抗原性ペプチドに関する。疎水性部分の例には、パルミチン酸、ステアリン酸

40

50

、ミリスチン酸、ラウリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、およびコレステロールまたは1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン（DSPE）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。本発明の特異的態様において、疎水性部分はパルミチン酸である。

#### 【0163】

一つの態様において、本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドは親油性または疎水性部分に共有的に付着する。本発明の文脈において、抗原性ペプチドの共有的付着はアミノ酸残基によって媒介されてもよく、該アミノ酸残基は、本発明に従う抗原性ペプチドの配列に対応するアミノ酸配列を、具体的にはその端部で、具体的にはそのN-およびC-末端端部で伸長させ、かつ脂肪酸残基は該アミノ酸残基にカップリングする。

10

#### 【0164】

具体的には各コンジュゲートは、脂肪酸分子が抗原性ペプチドのN-およびC-末端端部に共有的に付着する、C12～C24の炭素鎖、具体的にはC16の炭素鎖を含有する脂肪酸少なくとも4分子を含む。アミノ酸配列内に含まれる他の分布も同様に想定されてもよい。これらのペプチドはまた、脂肪酸分子に共有的にカップリングされる。

#### 【0165】

このように、本発明の薬学的組成物は、本発明に従いかつ本明細書に記載する、精製もしくは部分精製されたまたは改変された抗原性ペプチドの存在下で、リボソームを再構成することによって作製されたリボソームを含んでもよい。その上、ペプチド断片をリボソームに再構成してもよい。本発明にはまた、その抗原性を増加させるように改変された抗原性ペプチド断片が含まれる。たとえば、抗原性部分およびアジュバントを、ペプチドに付着させてもよく、または混合してもよい。抗原性部分およびアジュバントの例には、親油性ムラミルジペプチド誘導体、非イオン性ブロックポリマー、水酸化アルミニウム、またはリン酸アルミニウムアジュバント、およびその混合物が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

20

#### 【0166】

本発明の組成物において用いられうるリボソームには、当業者に公知のリボソームが含まれる。リボソームを作製するために有用な標準的ないかなる脂質を用いてもよい。標準的な二重層および多層リボソームを用いて本発明の組成物を作製してもよい。当業者に公知であるリボソームを作製するいかなる方法を用いてもよいが、最も好ましいリボソームは、参照により本明細書に組み入れられるAlving et al., Infect. Immun, 60:2438-2444, 1992の方法に従って作製される。リボソームは、任意でアジュバントまたはおよび免疫調節剤または双方を含有することができる。好ましい免疫調節剤は、リピドA、具体的にはたとえばモノホスホリルまたはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドAである。

30

#### 【0167】

リボソームは、たとえばWagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259-270において記載されるクロスフロー注入技術によって調製されてもよい。脂質溶液を水性緩衝液系に注入する際、脂質は、「沈殿物」を形成して、その後小胞内で自己整列する傾向がある。得られた小胞の大きさは、脂質濃度、攪拌速度、注入速度、および脂質の選択などの要因に依存する。調製系は、クロスフロー注入モジュール、極性相（たとえば、PBS緩衝液）のための容器、エタノール／脂質溶液容器、および圧力装置、具体的には窒素圧力装置からなってもよい。水溶液または極性溶液をクロスフロー注入モジュールを通してポンプで送るあいだに、印加する圧力を変化させながら、エタノール／脂質溶液を極性相に注入する。

40

#### 【0168】

一つの態様において、このように、本発明に従いかつ本明細書に記載する改変抗原性ペプチドは、多様なモル比のリン脂質とコレステロール（ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、コレステロール）からなるリボソームに再構成することによってさらに改変されてもよい。他のリン脂質を用いることができる。リピドAは、リン脂質1ピコモルあたりおよそ40 μgの濃度で用いられる。

50

## 【0169】

リポソームは、本明細書において先に記載した超分子構築物を含む担体として用いることができ、同時に本発明に従う治療ワクチンによって処置される標的動物またはヒトにおける免疫応答を増加または刺激するためのアジュバントとして機能するという点において、二重の機能を有する可能性がある。任意で、リポソームは、そのほかにたとえばリピドA、ミョウバン、リン酸カルシウム、インターロイキン1、および／または多糖類およびタンパク質のマイクロカプセル、具体的にはリピドA、より具体的にはモノホスホリルもしくはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドA、またはミョウバンなどの、さらなるアジュバントおよび／または免疫調節剤、または双方を含有してもよい。

## 【0170】

本発明の特異的態様において、リピドAによるリポソームは、本発明の薬学的組成物を調製するためのアジュバントとして用いられる。ジミリストイルホスファチジルコリン、-グリセロール、および-コレステロールを、具体的には9:1:7のモル比で混合する。次に、たとえばモノホスホリルリピドAなどの強い免疫調節剤に適した濃度で、具体的にはリン脂質1 mmolあたり20 mg~50 mgの濃度で、より具体的にはリン脂質1 mmolあたり30 mg~40 mgの濃度で添加する。次に、改変抗原性ペプチドを、ペプチド対リン脂質1:30~1:200のモル比で、具体的には1:50~1:120のモル比、より具体的には1:100のモル比で添加する。たとえば、蒸発によって溶媒を除去して、得られた被膜を、たとえばPBSなどの滅菌緩衝液によって水和させる。

## 【0171】

本発明の特異的態様において、提供される本発明に従いかつ本明細書に記載する抗原性ペプチドは、抗原性ペプチドのN-およびC-末端端部に共有結合したパルミチン酸少なくとも2分子によって改変され、かつリポソーム担体への再構成によって改変される。

## 【0172】

パルミトイル化は、リポソーム二重層におけるペプチドのアンカーを提供するが、 $C_{16}$ 脂肪酸部分の長さが比較的低減されているために、提示されるペプチドはリポソーム表面上でまたはその近位で曝露される。

## 【0173】

本発明に従いかつ本明細書に記載するペプチド抗原、具体的にはタウタンパク質の主要な病理学的リン酸化エピトープを模倣するリン酸化ペプチドを、具体的には薬学的有効量で含む本発明の薬学的組成物は、液体溶液もしくは注射可能な懸濁液の剤形で調製されてもよく、またはそうでなければたとえば以下に記載される本発明の組成物を利用するキットの状況で注射前に溶解するために適した固体剤形で調製されてもよい。

## 【0174】

適した薬学的担体、希釈剤、および／または賦形剤は当技術分野において周知であり、これにはたとえばリン酸緩衝生理食塩液、水、油／水乳剤などの乳剤、様々なタイプの湿潤剤、滅菌溶液等が含まれる。

## 【0175】

本発明に従う薬学的組成物の製剤は、当業者に公知の標準的な方法論に従って達成される。

## 【0176】

本発明に従いかつ本明細書に記載するペプチド抗原、具体的にはタウタンパク質の主要な病理学的リン酸化エピトープを模倣するリン酸化ペプチドを、具体的には薬学的有効量で含む本発明の薬学的組成物は、疾患に関連する症状を軽減するために、または疾患に罹患していない健康な個体において見いだされる状態を回復するために、ヒトまたは動物において免疫応答を誘導するために、タウオパチーを有するまたはタウオパチーに関連する症状を有するヒトまたは動物に投与されてもよい。

## 【0177】

本発明の組成物は、適した薬学的有効量で固体、液体、またはエアロゾルの剤形で任意の適当な標準的な投与経路によってヒトまたは動物に投与される。一般的に、組成物は、

10

20

30

40

50

局所適用、経口、直腸内、鼻腔内、または非経口（たとえば、静脈内、皮下、または筋肉内）経路によって投与されてもよい。その上、組成物は、生体分解性ポリマーなどの徐放性マトリクスに組み入れられてもよく、ポリマーは、送達が望ましい箇所の近位に、たとえば腫瘍部位に埋め込まれる。方法には、1回用量の投与、既定の期間の反復用量の投与、および既定の期間の持続的投与が含まれる。

#### 【0178】

本発明の特異的態様において、本発明に従う抗原性構築物、具体的には、薬学的に許容される剤形の抗原性構築物を含むワクチン組成物は、反復用量、具体的には1~15回の用量で、より具体的には2~10回の用量で、より具体的には3~5回の用量で、さらにより具体的には3回の用量で、1週間~20週間の間隔で、具体的には1~10週間の間隔で、具体的には1~6週間の間隔で、より具体的には1~4週間の間隔で、およびさらにより具体的には2~3週間の間隔で投与される。追加免疫後の適した時間に、具体的には追加免疫後3~10日目に、より具体的には追加免疫後4~8日後に、およびより具体的には追加免疫後7日後に、血清／血漿試料を採取することによって、ならびに公知の方法論、具体的にはたとえばELISAアッセイなどの一般的に用いられるイムノアッセイの1つを用いて、抗原性構築物の免疫原性を決定することによって、免疫応答をモニターしてもよい。

10

#### 【0179】

具体的には、本発明に従う抗原性ペプチド組成物は、非経口、具体的には腹腔内、静脈内、皮下、および筋肉内注射によって投与される。

#### 【0180】

非経口投与のための調製物には、滅菌の水性または非水性の、溶液、懸濁液、および乳剤が含まれる。非水性溶媒には、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が含まれるがこれらに限定されるわけではない。水性溶媒は、生理食塩液および緩衝培地が含まれる、水、アルコール／水溶液、乳剤、または懸濁剤からなる群より選択されてもよい。非経口媒体には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース、および塩化ナトリウム、乳酸加リンゲルまたは固定油が含まれる。静脈内媒体には、液体および栄養剤補充剤、電解質補充剤（リンゲルデキストロースに基づく補充剤などの）およびその他が含まれる。たとえば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス等などの保存剤も同様に存在してもよい。

20

30

#### 【0181】

組成物の用量は、処置される状態、用いられる特定の組成物、ならびに患者の体重、体格、および状態、体表面積、投与される特定の化合物または組成物、同時投与される他の薬物、および投与経路などの他の臨床要因に依存するであろう。

#### 【0182】

本発明に従う薬学的組成物は、疾患、具体的には神経変性疾患を処置するために他の生物活性物質および技法と共に投与されてもよい。他の生物活性物質は、混合物の形態で本発明に従う薬学的組成物を既に含む同じ組成物の一部であってもよく、本発明の薬学的組成物および他の生物活性物質は、同じ薬学的に許容される溶媒および／または担体の中でまたはそれらと共に互いに混合されるか、または異なる組成物の一部として個別に提供されてもよく、これはパーツのキットの形態で個別にもしくは共に提供されてもよい。

40

#### 【0183】

本発明に従う薬学的組成物は、他の生物活性物質または複数の物質と同時に、間欠的にまたは連続的に投与されてもよい。たとえば、本発明に従う薬学的組成物は、第一の追加の生物活性物質と同時に、または薬学的組成物の投与後もしくは投与前に連続的に投与されてもよい。複数の追加の生物活性物質を、本発明に従う少なくとも1つの薬学的組成物と共に投与する適用スキームを選択する場合、化合物または物質は、部分的に同時に、様々な組み合わせで部分的に連続的に投与されてもよい。

#### 【0184】

本発明の別の目的は、アルツハイマー病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ボクサー認知

50

症、ダウン症候群、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病、封入体筋炎、およびプリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷、ならびにさらに筋萎縮性側索硬化症／グアムのパーキンソニズム-認知症複合、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、皮質基底核変性、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、第17染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハレルフォルデン-スパッツ病、多系統萎縮症、C型ニーマン-ピック病、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型老年認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィーが含まれるがこれらに限定されるわけではない、この群の神経変性障害における主要な脳の病態である神経原線維病変の形成に関連する疾患または障害の群であるタウオパチーの予防および／または治療的処置および／またはタウオパチーの影響を軽減するために、本発明に従う薬学的組成物と、任意で1つまたは複数のさらなる生物活性物質との混合物を提供することであるのみならず、本発明に従う薬学的組成物、または薬学的組成物もしくは薬学的組成物の混合物を含む組成物が含まれるその混合物を用いる方法を提供することである。

10

**【0185】**

本発明に従う混合物は、本発明に従う薬学的組成物の他に、生物活性物質、たとえばアルツハイマー病に関係するアミロイドβタンパク質などのアミロイドまたはアミロイド様タンパク質に関係する疾患および障害の群である、タウオパチーおよび／またはアミロイドーシスの投薬において用いられる公知の化合物を含んでもよい。

**【0186】**

本発明の別の態様において、他の生物活性物質または化合物はまた、アミロイドβによって引き起こされるアミロイドーシスが含まれるアミロイドもしくはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるもしくはそれに関連する疾患および障害の処置において用いられ得るか、または他の神経障害の投薬において用いられ得る治療物質であってもよい。

20

**【0187】**

他の生物活性物質または化合物は、本発明に従う治療ワクチンと同じもしくは類似の作用機序によって、無関係な作用機序によって、または関係するおよび／または無関係な複数の作用機序によって、その生物効果を発揮してもよい。

**【0188】**

一般的に、他の生物活性化合物には、神経伝達増強剤、精神治療剤、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、カルシウムチャンネル遮断剤、生体アミン、ベンゾジアゼピン精神安定剤、アセチルコリン合成、貯蔵または放出増強剤、アセチルコリンシナプス後受容体アゴニスト、モノアミンオキシダーゼ-Aまたは-B阻害剤、N-メチル-D-アスパラギン酸グルタミン酸受容体アンタゴニスト、非ステロイド性抗炎症剤、抗酸化剤、およびセロトニン受容体アンタゴニストが含まれてもよい。

30

**【0189】**

具体的には、本発明に従う混合物は、本発明に従う治療ワクチンと共に、酸化的ストレスに対する化合物、抗アポトーシス化合物、金属キレート剤、ピレンゼピンおよび代謝物などのDNA修復阻害剤、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸（3APS）、1,3-プロパンジスルホネート（1,3 PDS）、セクレターゼ活性化剤、βおよびγセクレターゼ阻害剤、タウタンパク質、神経伝達物質、βシート切断剤、抗炎症分子、またはタクリン、リバスチグミン、ドネペジルおよび／またはガラントミンなどのコリンエステラーゼ阻害剤（ChEI）、および他の薬物からなる群より選択される少なくとも1つの他の生物活性化合物、および栄養補助剤、ならびに任意で薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤を含んでもよい。

40

**【0190】**

さらなる態様において、本発明に従う混合物は、本発明に従う治療ワクチンと共に、ナイアシンまたはメマンチン、ならびに任意で薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤を含んでもよい。

**【0191】**

50

本発明のなおさらなる態様において、幻覚、妄想、思考障害（顕著な支離滅裂、脱線、脱線思考によって表される）、および奇怪な行動または異常行動のみならず、快感消失、平坦な情動、無関心、および社会的引きこもりが含まれる正および負の精神病症状を処置するために、本発明に従う治療ワクチンと共に、たとえばクロザピン、ジプラシドン、リスペリドン、アリピプラゾール、またはオランザピンなどの「非典型向精神病薬」と、任意で薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤とを含む混合物が提供される。

#### 【0192】

本発明の特異的態様において、本発明に従いかつ本明細書で先に記載した組成物および混合物は、本発明に従う薬学的組成物と生物活性物質とをそれぞれ、治療的または予防的有効量で含む。

10

#### 【0193】

本発明に従う薬学的組成物と併用して混合物において適切に用いることができる他の化合物は、WO 2004/058258（具体的には16および17頁を参照されたい）に記載され、たとえば治療薬標的（36～39頁）、アルカンスルホン酸およびアルカノール硫酸（39～51頁）、コリンエステラーゼ阻害剤（51～56頁）、NMDA受容体アンタゴニスト（56～58頁）、エストロゲン（58～59頁）、非ステロイド性抗炎症剤（60～61頁）、抗酸化剤（61～62頁）、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体（PPAR）アゴニスト（63～67頁）、コレステロール低下剤（68～75頁）、アミロイド阻害剤（75～77頁）、アミロイド形成阻害剤（77～78頁）、金属キレート剤（78～79頁）、抗精神病薬および抗うつ剤（80～82頁）、栄養補助剤（83～89頁）、および脳における生物活性物質の利用率を増加させる化合物（89～93頁を参照されたい）、ならびにプロドラッグ（93および94頁）が含まれ、本文書は参照により本明細書に組み入れられ、具体的には化合物は先に記載した頁において言及される。

20

#### 【実施例】

#### 【0194】

##### 実施例1：ワクチン

リン酸化タウタンパク質に由来する8個の配列をワクチン開発のための抗原として設計した。これまでに用いられた免疫原性ペプチドを対照として用いた（Asuni et al., 2007）。

#### 【0195】

（表1）タウ配列の説明

30



| 説明                                                              | ワクチン          | 配列                                                               |
|-----------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>T5:</b> 対照配列:<br>Tau 379-408 [pS396,<br>pS404]               | <b>ACI-37</b> | RENAKAKTDHGAEIVYKS(p)PVVSGDTS(p)PRH<br>L (n = 30) (SEQ ID NO: 1) |
| <b>T1:</b> 配列 1: Tau 5-<br>20 [pY18]                            | <b>ACI-33</b> | RQEFVEMEDHAGTY(p)GL (n = 16) (SEQ ID<br>NO : 2)                  |
| <b>T8:</b> 配列 8: Tau<br>206-221 [pT212,<br>pS214]               | <b>ACI-39</b> | PGSRRT(p)PS(p)LPTPPTR (n = 16) (SEQ ID<br>NO : 3)                |
| <b>T9:</b> 配列 9: Tau<br>196-211 [pS202, pT205]                  | <b>ACI-40</b> | GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRRT (n = 16) (SEQ ID<br>NO 4)                 |
| <b>T3:</b> 配列 3: Tau<br>393-408 [pS396, pS404]                  | <b>ACI-35</b> | VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n = 16) (SEQ ID<br>NO : 5)               |
| <b>T4:</b> 配列 4: Tau<br>401-418 [pS404, pS409]                  | <b>ACI-36</b> | GDTS(p)PRHLS(p)NVSSTGSID (n = 18) (SEQ<br>ID NO : 6)             |
| <b>T2:</b> 配列 2: Tau<br>200-216 [pS202+<br>pT205 & pT212+pS214] | <b>ACI-34</b> | PGS(p)PGT(p)PGSRRT(p)PS(p)LP (n = 17)<br>(SEQ ID NO : 7)         |
| <b>T10:</b> 配列 10: Tau<br>407-418 [pS409]                       | <b>ACI-42</b> | HLS(p)NVSSTGSID (n = 12) (SEQ ID NO :<br>8)                      |
| <b>T11:</b> 配列 11: Tau<br>399-408 [pS404]                       | <b>ACI-43</b> | VSGDTS(p)PRHL (n = 10) (SEQ ID NO : 9)                           |

10

20

30

## 【0196】

実施例2：タウ由来テトラパルミトイル化リン酸化ペプチドの調製

リジン2対が隣接する抗原性ペプチド配列を、標準的なFmoc/tBuケミストリーを用いてアミド樹脂上での固相ペプチド合成によって段階的にアセンブルした。次に、末端リジンの直交性保護基を選択的に除去して、遊離のアミノ基をパルミチン酸によってアシル化した。側鎖保護基の脱保護および樹脂からペプチドの同時放出を酸性条件下で行うと、所望のテトラパルミトイル化リン酸化ペプチドが粗生成物として提供された。同一性および純度を、MALDI-TOF質量分析およびHPLC分析によってさらに確認した。

## 【0197】

タウ由来テトラパルミトイル化リン酸化ペプチドの配列

**T1:** H-K(Pal)-K(Pal)- RQEFVMEHDHAGTY(P)GL-K(Pal)-K(Pal)-NH<sub>2</sub>

**T2:** H-K(Pal)-K(Pal)-PGS(p)PGT(p)PGSRRT(p)PS(p)LP-K(Pal)-K(Pal)-NH<sub>2</sub>

**T3:** H-K(Pal)-K(Pal)-VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-K(Pal)-K(Pal)-NH<sub>2</sub>

**T4:** H-K(Pal)-K(Pal)-GDTS(p)PRHLS(p)NVSSTGSID-K(Pal)-K(Pal)-NH<sub>2</sub>

**T8 :** H-K(Pal)-K(Pal)- PGSRSRT(p)PS(p)LPTPPTR-K(Pal)-K(Pal)-NH<sub>2</sub>

**T9 :** H-K(Pal)-K(Pal)- GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRSR-K(Pal)-K(Pal)-NH<sub>2</sub>

**T10:** H-K(Pal)-K(Pal)-HLS(p)NVSSTGSID-K(Pal)-K(Pal)-NH<sub>2</sub>

10

**T11:** H-K(Pal)-K(Pal)-VSGDTS(p)PRHL-K(Pal)-K(Pal)-NH<sub>2</sub>

【0198】

## 2.1: ペプチド抗原T1の合成

直交的に保護されたアミノ酸Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3当量) を、DMF中でDIC/HOBt 2当量の存在下でアミド樹脂 (RinkアミドMBHA樹脂、1当量、0.26 mmol) に手動でロードした。樹脂をDMF (3×1分) によって洗浄した。25%ピペリジンのDMF溶液によってN-末端Fmoc基を除去した後 (1×1分、および2×15分)、Fmoc-Lys(Mtt)-OHの第二の残基 (3当量) を、PyBOP/HOBt/DIEAのDMF溶液5当量 (2×15分) を用いて自動的にカップリングさせた。Fmoc標準側鎖保護基を有する続く16個のアミノ酸を、既に記載されたカップリングプロトコルを応用して自動的に組み入れた。リン酸化アミノ酸を、リン酸基でモノベンジルエステルとして導入した。各カップリング段階の後にDMF (3×30秒) による洗浄段階を行い、25%ピペリジンのDMF溶液 (3×3分) によってFmoc除去段階を行い、2回目の洗浄段階をDMF (6×30秒) によって行った。Tyr(PO(Obzl)2)のカップリング後、0.5%DBUのDMF溶液をFmoc保護段階のために用いた。ペプチド配列のアセンブリは、PyBOP/HOBt/DIEA 2当量のDMF溶液を用いて最後の2個のFmoc-Lys(Mtt)-OHの付加によって終了した。

20

【0199】

次に、末端リジン残基のMtt基を、窒素下で樹脂 (1当量、600 mg、0.092 mmol) をTIPS/TFA/DCM (1:1:98) の脱気混合物10 mLによる10分間の数回のサイクルの処置によって選択的に切断した。樹脂をDCM (×3) およびDMF (×3) によって洗浄した。次に、TBTU (20当量、593 mg、1.85 mmol)、およびDIEA (40当量、643 μl、3.70 mmol) のDCM/DMF (1:1) 溶液 (6 mL) を用いて、パルミチン酸 (20当量、473 mg、1.85 mmol) をこれらの脱保護アミノ基にカップリングさせた。樹脂をDCM (×5) およびDMF (×5) によって洗浄した。次に、脱気した20%ピペリジンのDMF溶液 (3×10分間) によってN-末端Fmoc基を除去して、樹脂をDMF (×3) およびDCM (×5) によって洗浄した。最後に、TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O/EDT (95:1:2.5:2.5) (4 mL) の脱気混合物によって、樹脂の切断および側鎖脱保護を同時に窒素下で4.5時間行った。冷ジエチルエーテルによって粉碎すると、粗生成物T1が白色固体 (189 mg、収率60%) として得られ、純度は56% (HPLC分析によって) であった。MALDI-TOF質量分析によって、主生成物の同一性を確認した (m/z予測: 3427.12[MH<sup>+</sup>]、実測: 3426.87)。

30

【0200】

## 2.2: ペプチド抗原T3の合成

直交的に保護されたアミノ酸Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3当量) を、PyBOP/HOBt/DIEAのDMF溶液の存在下でアミド樹脂 (RinkアミドMBHA樹脂、1当量、0.4 mmol) に手動でロードした。樹脂をDMF (3×1分) によって洗浄した。25%ピペリジンのDMF溶液 (1×1分および2×15分) によってN-末端のFmoc基を除去した後、Fmoc-Lys(Mtt)-OHの第二の残基 (3当量) を同じローディング条件を用いてカップリングした。Fmoc標準側鎖保護基を有する続く16個のアミノ酸を、既に記載されたカップリングプロトコルを応用して手動で組み入れた。リン酸化アミノ酸を、リン酸基でモノベンジルエステルとして導入した。カップリング時間をTNBT試験によってまたはプロリン後のクロラニル試験によって決定した。必要であれ

50

ば、DIC/HOBtまたはHATU/DIEAの存在下でFmocアミノ酸2当量によって第二のカップリングを行った。各カップリング段階の後にDMF (3×1分) による洗浄段階を行い、Fmoc除去段階を25%ピペリジンのDMF溶液 (1×1分および2×15分) によって行い、DMF (7×1分) によって2回目の洗浄段階を行った。第一のSer(PO(OBzl)OH)のカップリング後、0.5%DBUのDMF溶液をFmoc脱保護段階のために用いた。ペプチド配列のアセンブリは、最後の2つのFmoc-Lys-(Mtt)-OHの付加によって終了した。

#### 【0201】

次に、末端リジン残基のMtt基を、10分間の数回のサイクルのあいだに樹脂 (1当量、195 mg、0.01 mmol) をTIPS/TFA/DCM (1:1:98) 10 mLによって処置することによって選択的に切断した。樹脂をDCM (×3) およびDMF (×3) によって洗浄した。次に、TBTU (20当量、64 mg、0.2 mmol) およびDIEA (40当量、70 μl、0.4 mmol) のDCM/DMF (1:1) 溶液 (2 mL) を用いて、パルミチン酸 (20当量、51 mg、0.2 mmol) をこれらの脱保護アミノ基にカップリングさせた。樹脂をDCM (×5) およびDMF (×5) によって洗浄した。次に、N-末端Fmoc基を、20%ピペリジンのDMF溶液 (3×10分間) によって除去して、樹脂をDMF (×3) およびDCM (×5) によって洗浄した。最後に、TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) (2 mL) の混合物を用いて、樹脂の切断および側鎖の脱保護を同時に2時間行った。冷ジエチルエーテルによって粉砕すると、粗生成物T3が白色固体 (34 mg、収率100%) として得られ、純度は67% (HPLC分析から) であった。MALDI-TOF質量分析によって、主生成物の同一性を確認した (m/z予測: 3365.15[MH<sup>+</sup>]、実測: 3369.66)。

#### 【0202】

### 2.3: ペプチド抗原T4の合成

直交的に保護されたアミノ酸Fmoc-Lys(Mtt)-OH (5倍過剰量) を、DMF中で活性化物質としてDCClおよびHOBtを用いて、Tentagel R RAMアミド樹脂 (0.19 mm/g、750 mg、0.1425 mmol) に自動的に付着させた。N-末端Fmoc基を除去した後、Fmoc-Lys(Mtt)-OHの第二の残基 (5倍過剰量) をDCClおよびHOBtの存在下でカップリングさせた。標準側鎖保護基を有する続く16個のアミノ酸を、類似のカップリング/脱保護プロトコールを応用して自動的に組み入れた。リン酸化アミノ酸を、リン酸基でモノベンジルエステルとして導入した。全ての残基について60分間の二重カップリングを行った後、無水酢酸によるキャッピング段階を行った。ペプチド配列のアセンブリは、最後の2つのFmoc-Lys-(Mtt)-OHの付加によって終了した。

#### 【0203】

次に、末端リジン残基のMtt基を、10分間の数回のサイクルのあいだに樹脂 (1当量、750 mg、0.075 mmol) をTIPS/TFA/DCM (1:1:98) 10 mLによって処置することによって選択的に切断した。樹脂をDCM (×3) およびDMF (×3) によって洗浄した。次に、TBTU (20当量、482 mg、1.5 mmol) およびDIEA (40当量、536 μl、3.0 mmol) のDCM/DMF (1:1) 溶液 (7 mL) を用いて、パルミチン酸 (20当量、51 mg、0.2 mmol) をこれらの脱保護アミノ基にカップリングさせた。樹脂をDCM (×5) およびDMF (×5) によって洗浄した。次に、N-末端Fmoc基を、20%ピペリジンのDMF溶液 (3×10分間) によって除去して、樹脂をDMF (×3) およびDCM (×5) によって洗浄した。最後に、TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) (6 mL) の混合物を用いて、樹脂の切断および側鎖の脱保護を同時に3.5時間行った。冷ジエチルエーテルによって粉砕すると、粗生成物T4が白色固体 (96 mg、収率37%) として得られ、純度は50% (HPLC分析から) であった。MALDI-TOF質量分析によって、主生成物の同一性を確認した (m/z予測: 3455.10[MH<sup>+</sup>]、実測: 3456.13)。

#### 【0204】

### 2.4: ペプチド抗原T8の合成

直交的に保護されたアミノ酸Fmoc-Lys(Mtt)-OH (5当量、781 mg、1.25 mmol) を、8時間のカップリング2回のために、DIPCDI (5当量、196 mL、1.25 mmol) およびHOBt (5当量、169 mg、1.25 mmol) のDMF溶液 (5 mL) を用いてRinkアミドPEGA樹脂 (1当量、0.33 mmol/g、758 g) に手動で付着させた。樹脂をDMF (×5) によって洗浄した。20%ピペリジンのDMF溶液 (7 mL×3×5分) によってN-末端Fmoc基を除去した後、Fmoc-Lys(Mtt)-OHの

第二の残基（10当量、1.56 g、2.5 mmol）をTBTU（10当量、803 mg、2.5 mmol）、HOBt（10当量、338 mg、2.5 mmol）、およびDIEA（20当量、871 mL、5.0 mmol）の存在下でカップリングした。標準側鎖保護基を有する続く16個のアミノ酸を、類似のカップリング／脱保護／洗浄サイクルを通して手動で組み入れた。例外的に、リン酸化アミノ酸を、TBTU（10当量）、HOBt（5当量）およびDIEA（15当量）のDMF溶液により、リン酸基（10当量）でモノベンジルエステルとして導入した。合成全体で1時間のカップリング時間を用いた。ペプチド配列のアセンブリは、最後の2つのFmoc-Lys-(Mtt)-OHの付加によって終了した。

#### 【0205】

次に、末端リジン残基のMtt基を、10分間の数回のサイクルのあいだにペプチジル樹脂（1当量、385 mg、0.019 mmol）をTIPS/TFA/DCM（1：1：98）10 mLによって処置することによって選択的に切断した。樹脂をDCM（×3）およびDMF（×3）によって洗浄した。次に、TBTU（20当量、1.21 g、3.8 mmol）およびDIEA（40当量、1.31 mL、7.6 mmol）のDCM/DMF（1：1）溶液（4 mL）を用いて、パルミチン酸（20当量、968 mg、3.8 mmol）をこれらの脱保護アミノ基にカップリングさせた。樹脂をDCM（×5）およびDMF（×5）によって洗浄した。次に、N-末端Fmoc基を、20%ピペリジンのDMF溶液（3×10分間）によって除去して、樹脂をDMF（×3）およびDCM（×5）によって洗浄した。最後に、TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O（95：2.5：2.5）（4 mL）の混合物を用いて、樹脂の切断および側鎖の脱保護を同時に3.5時間行った。冷ジエチルエーテルによって粉砕すると、粗生成物T8が白色固体（50.2 mg、収率10%）として得られ、純度は55%（HPLC分析から）であった。MALDI-TOF質量分析によって、主生成物の同一性を確認した（m/z予測：3331.17[MH<sup>+</sup>]、実測：3335.19）。

#### 【0206】

##### 2.5：ペプチド抗原T9の合成

直交的に保護されたアミノ酸Fmoc-Lys(Mtt)-OH（3当量）をPyBOP/HOBt/DIEAのDMF溶液の存在下でアミド樹脂（RinkアミドMBHA樹脂、1当量、0.4 mmol）に手動でロードした。樹脂をDMF（3×1分）によって洗浄した。25%ピペリジンのDMF溶液（1×1分および2×15分）によってN-末端のFmoc基を除去した後、Fmoc-Lys(Mtt)-OHの第二の残基（3当量）を同じローディング条件を用いてカップリングした。Fmoc標準側鎖保護基を有する続く16個のアミノ酸を、既に記載されたカップリングプロトコルを応用して組み入れた。リン酸化アミノ酸を、リン酸基でモノベンジルエステルとして導入した。カップリング時間をTNBT試験によってまたはプロリン後のクロラニル試験によって決定した。必要であれば、DIC/HOBtまたはHATU/DIEAの存在下でFmocアミノ酸2当量によって第二のカップリングを行った。各カップリング段階の後にDMF（3×1分）による洗浄段階を行い、Fmoc除去段階を25%ピペリジンのDMF溶液（1×1分および2×15分）によって行い、DMF（7×1分）によって2回目の洗浄段階を行った。Thr(PO(OBzl)OH)のカップリング後、0.5%DBUのDMF溶液をFmoc脱保護段階のために用いた。ペプチド配列のアセンブリは、最後の2つのFmoc-Lys-(Mtt)-OHの付加によって終了した。

#### 【0207】

次に、末端リジン残基のMtt基を、10分間の数回のサイクルのあいだにTIPS/TFA/DCM（1：1：98）10 mLによる樹脂（1当量、650 mg、0.156 mmol）の処置によって選択的に切断した。樹脂をDCM（×3）およびDMF（×3）によって洗浄後、TBTU（20当量、814 mg、3.15 mmol）、およびDIEA（40当量、1.1 mL、6.30 mmol）のDCM/DMF（1：1）溶液（6 mL）を用いて、パルミチン酸（20当量、1.01 g、3.15 mmol）をこれらの脱保護アミノ基にカップリングさせた。樹脂をDCM（×5）およびDMF（×5）によって十分に洗浄した。次に、N-末端Fmoc基を、20%ピペリジンのDMF溶液（3×10分間）によって除去して、樹脂をDMF（×3）およびDCM（×5）によって洗浄した。最後に、TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O（95：2.5：2.5）（9 mL）の混合物を用いて、樹脂の切断および側鎖の脱保護を同時に3時間行った。冷ジエチルエーテルによって粉砕すると、粗生成物T9が白色固体（291 mg、収率59%）として得られ、純度は69%（HPLC分析から）であった。MALDI-TOF質量分析によって、主生成物の同一性を確認した（m/z予測：3172.98[MH<sup>+</sup>]、実測：3172.90）。

#### 【0208】

## 2.6: ペプチド抗原T10の合成

テトラパルミトイル化ペプチドT10を、T9と類似のプロトコールに従って調製した（ペプチド合成スケール：0.25 mmol）。その上、シュードプロリン[psi(Gly-Ser)]を、対象の配列Asn-Val-Ser-Serの前にビルディングブロックとして用いた。粗生成物T10が、白色固体（809 mg、定量的収率）として得られ、純度は56%（HPLC分析から）であった。MALDI I-TOF質量分析によって、主生成物の同一性を確認した（m/z予測：2761.9[MH<sup>+</sup>]、実測：2759.2）

【0209】

## 2.7: ペプチド抗原T11の合成

テトラパルミトイル化ペプチドT11を、T9と類似のプロトコールに従って調製した（ペプチド合成スケール：0.25 mmol）。粗生成物T11が白色固体（495 mg、収率76%）として得られ、純度は80%（HPLC分析から）であった。MALDI-TOF質量分析によって、主生成物の同一性を確認した（m/z予測：2613.8[MH<sup>+</sup>]、実測：2612.2）

【0210】

## 実施例3: ワクチンの調製（プロセスA）

タウ由来テトラパルミトイル化リン酸化ペプチドの重量を測定して（量に関しては表2を参照されたい）、250 ml丸底ガラスフラスコに入れた。次に、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（DMPG）、コレステロール、およびアジュバントであるモノホスホリルリピドA（MPLA）（全てAvanti Polar Lipids inc. AL, USA）の重量を測定して、それぞれ、9:1:7:0.2のモル比で添加した。次に、クロロホルムを添加すると、細かい粒子を有するきれいな溶液が得られた。15分間軽く攪拌した後、40℃での減圧下の後に高真空下で3時間蒸発させることによって有機溶媒を除去した。得られた薄膜を、層流フードの中で滅菌PBSに再水和させて、RTで18時間軽く攪拌した。最終のペプチド/リン脂質モル比は1:100であった。次にリボソーム懸濁液を、滅菌の15 ml Falconチューブ（5 ml生成物/チューブ）に等分した後、2~8℃で保存した。ペプチドの終濃度は40 μMであった。

【0211】

## 実施例4: タウリボソームワクチンの特徴付け

### 4.1. 方法

#### 4.1.1. HPLCによるペプチド、DMPC、およびコレステロールの定量

リボソームタウワクチン（全て実施例3に記載されるプロセスAに従って調製されたACI-33、ACI-35、ACI-36、ACI-39、ACI-40、およびACI-41）の分析に関して、HPLCガラスバイアルにおいてワクチン試料（20 μl）に水（20 μl）を添加した後、イソプロパノール（140 μl）およびTFA（20 μl）を添加することによって試料を調製した。5倍希釈試料を手短に攪拌した後、注入した（20 μl）。75℃の定温にしたC3-逆相Zorbax 300SB-B3カラム（250×4.6 mm、5 μm、300 Å、Agilent）を用いて、207および214 nmでの検出によって分析を行った。溶出溶媒は以下のとおりであった：溶媒B、95%イソプロパノール、5%水、0.1%TFA；溶媒A、10%アセトニトリル、90%水、0.1%TFA。40%B~60%Bの勾配を流速1 ml/分で20分間適用した。タウペプチド標準物質（T1、T3、T4、T8、およびT9）およびDMPC/コレステロールを、校正目的のために異なる濃度で個別に用いた。タウペプチドに関して、TFA/iPrOH/H<sub>2</sub>O（1:7:2）中で1 mg/ml保存溶液を調製して、400 μg/mlから12.5 μg/mlまで1:1の連続希釈を行った。脂質に関して、70%イソプロパノールおよび30%水中での8.0 mg/ml DMPCおよび3.5 mg/mlコレステロールの保存溶液を、同じ混合物によって（1:5）、（1:10）、および（1:50）に希釈した。

【0212】

#### 4.1.2. HPLCによるMPLAの定量

タウリボソームワクチン内のMPLAを、UV検出を備えたHPLCによって定量した後、UV活性発色団3,5-ジニトロベンジルオキシアミン（DNBA）によってアジュバントを誘導体化した。簡単に説明すると、リボソームタウ構築物20 μlをDNBAのピリジン溶液（10 mg/ml、全量100 μl）に加えて、60℃で3時間加熱した後、ピリジンを蒸発によって除去した。得ら

れた沈降物を、HPLC分析のためにクロロホルム／メタノール（2：1、v/v）に溶解した。MPLA（Avanti Polar Lipids）を較正目的のために異なる4つの濃度で用いて、リボソームタウ構築物に関して誘導体化して分析した。HPLC分析を、50℃の定温にしたAgilent XDB-C18逆相カラム（250×4.6 mm、120 Å、5 μm）を用いて、254 nmでの検出によって行った。溶出溶媒は以下のとおりであった：溶媒A、95%アセトニトリル、5%水、4.8 mMリン酸；溶媒B、95%イソプロパノール、5%水、4.8 mMリン酸。10%B～70%Bまでの勾配を流速1 ml/分で30分間適用した。

#### 【0213】

##### 4.1.3. リボソーム表面電位

タウリボソーム構築物試料をPBSによって100倍希釈した。Zetasizer Nano（Malvern, USA）を用いて分析を25℃で行った。測定の実行および電圧の選択を自動モードで行い、典型的な印加電圧は50 mVであった。DTS 5.0（Malvern）ソフトウェアを用いて自動的にスモルコフスキー方程式を用いてデータを変換し、 $\zeta$ 電位を算出した。タウリボソーム構築物は、DMPC/DMPG/コレステロール/MPLAのモル比9：1：7：0.2の混合物で構成されることから、予想される有効電荷は陰性であろう。

#### 【0214】

##### 4.1.4. 円偏光二色性によるコンフォメーション分析

タウリボソーム構築物をPBSによって希釈して（1：1）、ペプチドの終濃度18 μMを得た。同一の組成であるがタウペプチドを欠如するリボソームを、ベースラインから差し引くためのブランク溶液として用いた。Jasco-815分光偏光計において光路長0.1 cmの石英キュベット（Hellma, Germany）を用いて、23℃でCDスペクトルを獲得した。測定を波長195～250 nmで帯域幅1.0 nmで解像度0.5 nmで行った。レスポンス時間1秒でスキャン速度50 nm/分を利用した。ブランクスペクトル（8回のスキャンから）を平均して、各試料スペクトルの8回のスキャンの平均値から差し引いた。以下の等式によって平均残基モル楕円率（ $[\theta]$ 、度 $\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$ ）に変換した後、得られたスペクトル（ $[\theta]_{\text{obs}}$ 、度）は平坦になった：等式 $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}} \times (\text{MRW}/10lc)$ 、式中MRWは平均残基モル重量（MW/残基数）であり、 $l$ は光路長（cm）であり、および $c$ は濃度（ $\text{g}/\text{cm}^3$ ）である。

#### 【0215】

##### 4.1.5 ThT蛍光アッセイ

ThT蛍光測定を、マイクロプレートリーダーInfinite M200（Tecan Group Ltd, Switzerland）において獲得した。全般的技法として、Tauリボソーム構築物をPBSによって異なる濃度に希釈した（表2）。同じ組成であるがタウペプチドを欠如するリボソームを同様に希釈して陰性対照（バッチACI-35-G81015-B）として用いた。各ワクチンまたはブランク溶液98 μlに、ThT（2 μl、1.2 mM水溶液）を添加して終濃度24 μMを得た。手短に攪拌した後、各試料からのアリコート（70 μl）を黒い不透明な384ウェルPerkin Elmerマイクロタイタープレートに添加して、440 nmで励起した30分後に蛍光の放射を485 nmで測定した。励起帯域幅は9 nmであり、放射帯域幅は20 nmであった。γ-シクロデキストリンを内部対照として用いた。PBSでの640 mM保存溶液からPBS中で連続2倍希釈を行って、320、160、80 mM γ-シクロデキストリン対照溶液を得た。

#### 【0216】

（表2）ThTアッセイのために調製した試料

| ペプチド     | ワクチン     | バッチ             | 希釈   | ペプチドの濃度<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|----------|----------|-----------------|------|---------------------------------|
| T1       | ACI-33   | ACI-33-081031-A | 2-倍  | 23                              |
|          |          | ACI-33-081031-A | 3-倍  | 15                              |
|          |          | ACI-33-081031-A | 4-倍  | 7.7                             |
|          |          | ACI-33-081031-A | 12-倍 | 3.8                             |
| T3       | ACI-35   | ACI-35-081015-A | 2-倍  | 39                              |
|          |          | ACI-35-081015-A | 3-倍  | 26                              |
|          |          | ACI-35-081015-A | 4-倍  | 20                              |
|          |          | ACI-35-081015-A | 12-倍 | 5                               |
| T4       | ACI-36   | ACI-36-081110-A | 2-倍  | 16.5                            |
|          |          | ACI-36-081110-A | 3-倍  | 11                              |
|          |          | ACI-36-081110-A | 4-倍  | 8.3                             |
|          |          | ACI-36-081110-A | 12-倍 | 2.1                             |
| T8       | ACI-39   | ACI-39-090202-A | 2-倍  | 24                              |
|          |          | ACI-39-090202-A | 3-倍  | 16                              |
|          |          | ACI-39-090202-A | 4-倍  | 12                              |
|          |          | ACI-39-090202-A | 12-倍 | 4                               |
| T9       | ACI-40   | ACI-40-090202-A | 2-倍  | 30                              |
|          |          | ACI-40-090202-A | 3-倍  | 20                              |
|          |          | ACI-40-090202-A | 4-倍  | 15                              |
|          |          | ACI-40-090202-A | 12-倍 | 5                               |
| T8+T9    | ACI-41   | ACI-41-081204-A | 2-倍  | 11.5                            |
|          |          | ACI-41-081204-A | 3-倍  | 7.7                             |
|          |          | ACI-41-081204-A | 4-倍  | 5.8                             |
|          |          | ACI-41-081204-A | 12-倍 | 1.9                             |
| 陰性<br>対照 | 陰性<br>対照 | ACI-35-081015-B | 2-倍  | n/a                             |
|          |          | ACI-35-081015-B | 3-倍  | n/a                             |
|          |          | ACI-35-081015-B | 4-倍  | n/a                             |
|          |          | ACI-35-081015-B | 12-倍 | n/a                             |

10

20

30

40

50

## 【0217】

## 4.2. 結果

## 4.2.1. HPLCによるペプチド、DMPC、およびコレステロールの定量

ワクチン試料の注入によって得られた検出波長207 nmでのHPLCクロマトグラムは、タウペプチド、DMPC、およびコレステロールの存在を示した（表4を参照されたい）。標準物質によって決定した検量線から、ワクチン中の各成分の量を算出した。タウリポソーム懸濁液中で検出されたタウペプチド、DMPC、およびコレステロール含有量は、目標値に近かった。

## 【0218】

## 4.2.2. HPLCによるMPLAの定量

DNBA誘導体化タウワクチン試料の注入によって得られた検出波長254 nmでのHPLCクロマトグラムは、標識されたMPLAの存在を示した（表4を参照されたい）。標準物質について得られた検量線を用いて、タウリポソームワクチン中のMPLAの量を算出した、タウリポソーム懸濁液において検出されたMPLA含有量は、目標値に近かった。

## 【0219】

## 4.2.3. リポソーム表面の電位

測定されたタウリポソームワクチンの $\zeta$ 電位を表4に示す。

## 【0220】

## 4.2.4. CDによるリポソームワクチン内のタウペプチドのコンフォメーション分析

先の記載に従って調製されたタウリポソームワクチンのコンフォメーションを円偏光二色性によって決定した。結果を表3に示す。

## 【0221】

## 4.2.5. リポソームワクチン内のタウペプチドのThTアッセイ

ThT蛍光測定アッセイによって決定したリポソームワクチン（上記のプロセスAによって調製した）のタウペプチドの凝集状態を表4に示す。

## 【0222】

（表3）ワクチン特徴の要約

| ワクチン   | 成分            | 保持時間      | 目標値<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | 結果<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | リポ<br>ソーム<br>表面<br>電位<br><br>(mV) | コンフォメー<br>ション<br>円偏光<br>二色性                               | ThT<br>アッセイ<br>(ペプチド<br>の凝集)<br>蛍光<br>シグナル |
|--------|---------------|-----------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| ACI-33 | ペプチドT1        | 19.3 min  | 130                         | 46                         | -18.7                             | $\beta$ シートと<br>$\beta$ ターンの<br>混合コンフォ<br>メーション           | 凝集                                         |
|        | コレステロール       | 11.2 min  | 1027                        | 923                        |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPC          | 10.0 min  | 2314                        | 2463                       |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPG          | Nd        | 261                         | nd                         |                                   |                                                           |                                            |
|        | MPLA          | 39.8 min  | 135                         | 62                         |                                   |                                                           |                                            |
| ACI-35 | ペプチドT3        | 19.5 min  | 130                         | 78                         | -19.2                             | ランダムコイル<br>コンフォメー<br>ション                                  | 凝集なし                                       |
|        | コレステロール       | 11.6 min  | 1046                        | 1438                       |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPC          | 10.3 min  | 2357                        | nd                         |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPG          | nd        | 266                         | nd                         |                                   |                                                           |                                            |
|        | MPLA          | 29.7 min  | 135                         | 124                        |                                   |                                                           |                                            |
| ACI-36 | ペプチドT4        | 20.3 min  | 130                         | 33                         | -17.8                             | いくつかの<br>$\beta$ シートが<br>関与する<br>ランダムコイル<br>コンフォメー<br>ション | 凝集                                         |
|        | コレステロール       | 11.2 min  | 1018                        | 1387                       |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPC          | 10.0 min  | 2296                        | nd                         |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPG          | nd        | 259                         | nd                         |                                   |                                                           |                                            |
|        | MPLA          | 29.7 min  | 135                         | 83                         |                                   |                                                           |                                            |
| ACI-39 | ペプチドT8        | 19.3 min  | 130                         | 48                         | -16.8                             | $\beta$ シート<br>コンフォ<br>メーション                              | 凝集なし                                       |
|        | コレステロール       | 11.8 min  | 1056                        | 1906                       |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPC          | 10.5 min  | 2381                        | 4316                       |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPG          | nd        | 269                         | nd                         |                                   |                                                           |                                            |
|        | MPLA          | 30.9 min  | 135                         | 144                        |                                   |                                                           |                                            |
| ACI-40 | ペプチドT9        | 21.0 min  | 130                         | 60                         | -14.7                             | ランダムコイル<br>コンフォメー<br>ション                                  | 凝集なし                                       |
|        | コレステロール       | 11.8 min  | 1109                        | 1655                       |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPC          | 10.5 min  | 2500                        | 2894                       |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPG          | nd        | 269                         | nd                         |                                   |                                                           |                                            |
|        | MPLA          | 30.9 min  | 135                         | 122                        |                                   |                                                           |                                            |
| ACI-41 | ペプチド<br>T8+T9 | 18.3 min+ | 65+65                       | 23+34                      | -17.3                             | ランダムコイル<br>と $\beta$ シート<br>コンフォメー<br>ションの混合              | 凝集なし                                       |
|        |               | 19.9 min  |                             |                            |                                   |                                                           |                                            |
|        | コレステロール       | 11.2min   | 1109                        | 34                         |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPC          | 9.9 min   | 2500                        | 1574                       |                                   |                                                           |                                            |
|        | DMPG          | nd        | 282                         | 3829                       |                                   |                                                           |                                            |
|        | MPLA          | 30.9 min  | 135                         | 80                         |                                   |                                                           |                                            |

## 【0223】

実施例5：野生型およびTau-/-K0マウスにおけるタウパルミトイル化抗原の免疫原性

## 5.1. 方法

10

20

30

40

50



#### 5.1.1. タウノックアウトマウス (TKO)

タウ遺伝子のノックアウトは、EGFP (強化緑色蛍光タンパク質) cDNAを、内因性の開始コドンとインフレームで遺伝子のエキソン1に挿入したターゲティングベクターを用いて得られた。これによって、タウの最初のアミノ酸31個の後にEGFPが続く融合タンパク質が産生された (Tucker KL. et al., Nature Neuroscience, 2001によって記載される)。遺伝子の欠失を、全脳溶解物のウェスタンブロットによって確認した。いくつかの抗タウ抗体を用いたタウタンパク質レベルは、全てのタウイソ型が、ホモ接合変異体では存在しないが、ヘテロ接合変異体では50%低減されることを示した。変異は、C57BL/6バックグラウンドで維持された。

【0224】

10

#### 5.1.2. ワクチンの調製

ワクチンを実施例3に記載されるプロセスAによって調製した。

【0225】

#### 5.1.3. 免疫

C57BL/6またはTau-/- KOマウス (TKO) にワクチン (ACI-33、ACI-35、ACI-36、およびACI-41) のi.p.注射を3回に分けて行った (スキーム1) (表4)。

【0226】

ACI-33、ACI-35、ACI-36、およびACI-41の免疫に関して、スキーム1に従って3回の免疫を各投与のあいだに2週間の間隔をあけて行った (0日目、13日目、28日目)。初回免疫の1日前 (d-1)、2回目 (d27)、および3回目 (d47) の免疫後に血液試料を採取して血清を調製した。血清は、血液試料を終夜凝固させた後、遠心分離後の上清を得ることによって調製した。タウリン酸化ペプチド特異的IgGおよびIgM抗体力価およびIgGアイソタイプパターンをELISAによって決定した。対照として、非pTauペプチド特異的IgG抗体力価も同様にELISAによって決定した。

20

【0227】

(表4) マウスの免疫

| 群                             | マウス | 月齢  | 動物数<br>および<br>性別 | 処置<br>／<br>容量 <sup>a</sup> | ワクチン<br>バッチ             | 投与<br>経路 <sup>b</sup> | 用量レベル<br>ペプチド<br>の量<br>$\mu\text{g}/\text{用量}^c$ | MPLAの量<br>$\mu\text{g}/\text{用量}^c$ |
|-------------------------------|-----|-----|------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|
| ACI-33<br>(T1<br>ペプチド)        | WT  | 6   | 3 ♀<br>3 ♂       | ACI-<br>33<br>0.2 ml       | ACI-33-<br>081031-<br>A | i.p.                  | 9                                                | 12                                  |
|                               | KO  | 4-5 | 3 ♀<br>3 ♂       | ACI-<br>33<br>0.2 ml       | ACI-33-<br>081031-<br>A | i.p.                  | 9                                                | 12                                  |
| ACI-35<br>(T3<br>ペプチド)        | WT  | 6   | 3 ♀<br>3 ♂       | ACI-<br>35<br>0.2 ml       | ACI-35-<br>081015-<br>A | i.p.                  | 16                                               | 23                                  |
|                               | KO  | 6-8 | 3 ♀<br>3 ♂       | ACI-<br>35<br>0.2 ml       | ACI-35-<br>081015-<br>A | i.p.                  | 16                                               | 23                                  |
| ACI-36<br>(T4<br>ペプチド)        | WT  | 6   | 3 ♀<br>3 ♂       | ACI-<br>36<br>0.2 ml       | ACI-36-<br>081110-<br>A | i.p.                  | 7                                                | 13                                  |
|                               | KO  | 4   | 3 ♀<br>3 ♂       | ACI-<br>36<br>0.2 ml       | ACI-36-<br>081110-<br>A | i.p.                  | 7                                                | 13                                  |
| ACI-41<br>(T8+T<br>9<br>ペプチド) | WT  | 7   | 3 ♀<br>3 ♂       | ACI-<br>41<br>0.2 ml       | ACI-41-<br>081204-<br>A | i.p.                  | 5                                                | 7                                   |
|                               | KO  | 4   | 3 ♀<br>3 ♂       | ACI-<br>41<br>0.2 ml       | ACI-41-<br>081204-<br>A | i.p.                  | 5                                                | 7                                   |

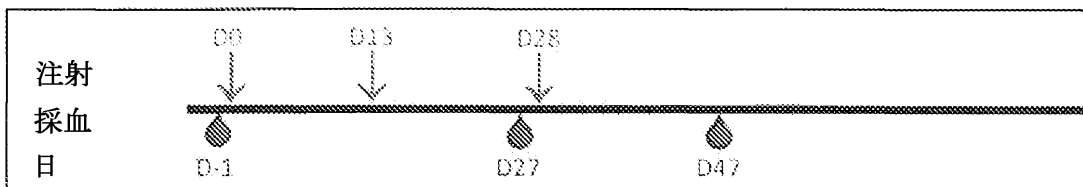
a ; 理論的体積

b ; i.p. ; 腹腔内

c ; 分析後に決定された測定量

【0228】

スキーム1：ACI-33、ACI-35、ACI-36、およびACI-41に関する免疫および採血のスケジュール



【0229】

#### 5.1.4. タウペプチド特異的抗体の定量

pTauペプチドの特異的IgG抗体を3つの血清採取試料においてELISAによって決定した。タウペプチド特異的IgGを、-1日目および47日目の血清において決定した。ペプチドpTau特異的IgMおよびIgGアイソタイプ抗体を47日目の血清採取試料においてELISAによって決定した。プレートを10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の対応するタウペプチドによって4°Cで終夜コーティングし

10

20

30

40

50

た。各ウェルをPBS-0.05%Tween 20によって洗浄して、1%BSAのPBS-0.05%Tween 20溶液によってブロックした後、血清の連続希釈液をプレートに加えて37℃で2時間インキュベートした。洗浄後、プレートをアルカリホスファターゼ (AP) コンジュゲート抗マウスIgG総抗体 (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA)、またはアイソタイプ特異的抗体 (Pharmingen BD, San Diego, CA, USAから購入した、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) -コンジュゲート抗マウスIgM、AP-コンジュゲート抗マウスIgG1、ビオチンコンジュゲート抗マウスIgG2aおよびIgG3、ならびにZymed Laboratories, San Francisco, CAから購入したHRP-コンジュゲート抗マウスIgG2b) と共に37℃で2時間インキュベートした。洗浄後、プレートをAPのホスファターゼ基質であるpNPP (パラニトロフェニルリン酸)、またはHRPの基質であるABTS (2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)) と共にインキュベートして、ELISAプレートリーダーを用いて405 nmで読み取った。ビオチンコンジュゲート抗体に関しては、プレートをストレプトアビジン-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) において45分間インキュベートした後、ABTSを用いて検出する補助段階を行った。結果を、IgGに関して最初の希釈および非飽和希釈でのO.D. (吸光度) として、ならびにIgGアイソタイプおよびIgMに関して非飽和O.D.として表記する。

10

#### 【0230】

#### 5.1.5. トランスジェニック動物由来の脳スライスにおけるタウ原線維変化に対する抗タウ抗体の結合 (TAUPIR)

脳スライス上の原線維変化に対するワクチン接種動物の血清中に存在する抗体の結合を、TAUPIR免疫組織化学によって行った。

20

#### 【0231】

用いた脳スライスは、末期段階のTauP301L (TPLH; P301L変異を有するヒトタウの最も長いイソ型 (アミノ酸441個)) トランスジェニック動物および老齢の (>15ヶ月齢) 二重トランスジェニックbiGTマウス (TPLHマウスとのGSK-3トランスジェニックマウスの交配) の切片であった。

#### 【0232】

脳切片をPBS中で5分間洗浄した後、内因性のペルオキシダーゼを遮断するために、1.5% $H_2O_2$ のPBS:MeOH (1:1) 溶液中でRTで15分間インキュベートした。切片をPBST (PBS/0.1%Triton X100) 中で3回洗浄後、切片をPBST+10%FCS (仔ウシ胎児血清) ブロッキング溶液中でRTで30分間インキュベートした。抗タウ抗体を含有する血清とのインキュベーションを4℃で終夜行った。血清をPBST/10%FCS中で、1/2500~1/10000のいくつかの異なる希釈を用いて希釈した。切片をPBST中で3回洗浄した後、HRP-コンジュゲートヤギ抗マウス (Dako, Glostrup, Denmarkから購入) 二次抗体と共にPBST/10%FCS中でRTで1時間インキュベートした。検出前に切片をPBSTによって3回洗浄して、50 mM Tris/HCl, pH 7.6 中で5分間インキュベートした。ジアミノベンジジン (DAB: 50 mM TrisHCl 10 ml+30% $H_2O_2$  3  $\mu$ l中で1錠) (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) 中で切片を3分間インキュベートする段階を用いて検出を行った。切片をPBST中で3回洗浄することによって反応を停止させた。切片をシラン処理ガラスプレートに移して、暖かいプレート上で50℃で2時間空気乾燥させた。Mayersヘマトキシリン (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland) と共に1分間インキュベートした後水道水で4分間洗浄段階を行うことを用いて対比染色を行った。切片を50%、70%、90%および100%エタノール浴に2回通過させた後、キシロール中に1分間を2回通過させることによって脱水した。最終切片を DePeX (BDH Chemicals Ltd., Poole, England) によってマウントしカバーガラスを載せた。

30

40

#### 【0233】

#### 5.1.6. ウェスタンブロット (WB)

トランスジェニック動物由来の脳抽出物における、pTauに対するワクチン接種動物の血清中に存在する抗体の結合を、WBによって行った。

#### 【0234】

野生型FVB、TPLH、biGT、およびタウノックアウト (TKO) マウスの脳ホモジネーションを以下の緩衝液において行った; 全量12 ml中に、25 mM Tris/HCl pH7.6、150 mM NaCl、

50

1 mM EDTA、1 mM EGTA、30 mM NaF、0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1 nMオカダ酸、1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、5 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、コンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテル (CPIC) 1錠。総脳ホモジネートを得るために、脳を、水中で脳半球の重量あたり1容積 (ml/g) の割合でモーター駆動陶製 (ガラスチューブ/テフロン乳棒) を700 rpmで用いてホモジナイズした。

#### 【0235】

総脳ホモジネートを試料緩衝液 (125 mM Tris/HCl、pH 6.8、4% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、20%グリセロール、0.01%プロモフェノールブルー) +5%  $\beta$ -メルカプトエタノール中で半分に希釈した後、95°Cに急速に加熱した。試料を5分間維持して、試料緩衝液中で1/4に希釈して、再度95°Cまで加熱した後冷却して14000 rpmで5分間スピ 10  
ンして、溶解していない破片を除去した。上清を収集してSDS-PAGEゲルにロードした。ニトロセルロースメンブレン (Hybond-ECL) への転写は、転写緩衝液 (25 mM Tris、pH 8.6、190 mMグリシン、20%メタノール) 中で行った。メンブレンをブロッキング溶液 (0.1%TweenのTBS (50 mM Tris/HCl、pH 7.6、150 mM NaCl) 溶液+5%粉乳) に移して、ブロッキング溶液中で希釈したマウス血清と共に4°Cで終夜インキュベートした。ブロッキング溶液中で1:10,000倍希釈したHRP-コンジュゲートヤギ抗マウス二次抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) とのインキュベーションを、RTで1時間行った。検出は、GE HealthcareのECLウェスタンブロットティング検出試薬を用いて行った。

#### 【0236】

### 5.2. 結果

#### 5.2.1. ワクチン接種マウスの血清からの抗体の特異性

ワクチン接種マウスからの血清を、ELISAアッセイにおいてpTauおよびタウペプチドの双方に対するその抗体の特異性に関して、TAUPIRにおいてタウ原線維変化に関して、およびウェスタンブロットにおいてpTauに関して試験した。

#### 【0237】

ACI-33ワクチンは、腹腔内注射後に抗Tau5-20[pY18]IgG応答を誘導した。2回免疫後 (27日目)、IgG応答は、安定なままであり、3回目の免疫 (47日目) によって増加しなかった (図1a: WTマウス、一元配置Anova  $P < 0.05$  d-1対d27、 $p < 0.001$  d-1対d47、および図1b: TKOマウス、一元配置Anova  $P < 0.001$  d-1対d27/47)。

#### 【0238】

ACI-35ワクチンは、腹腔内注射後、強い抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG応答を誘導した。2回の免疫後 (28日目)、IgG応答は安定なままであり (42日、98日、および126日目)、3回目の免疫 (42日目) によって増加せずおよび追加免疫の前、あいだ、および後での採血において減少しなかった (図2a: WTマウス、一元配置Anova  $P < 0.0001$  d-1対d28/42/98/126、および図2b: TKOマウス、一元配置Anova  $P < 0.0001$  d-1対d28/42/98/126)。

#### 【0239】

ACI-36ワクチンは、腹腔内注射後、Tau401-418[pS404/S409]IgG応答を誘導した。2回の免疫後 (27日目)、IgG応答は安定なままであり、3回目の免疫 (47日目) によって増加しなかった (図3a: WTマウス、一元配置Anova  $P < 0.001$  d-1対d27、 $P < 0.0001$  d-1対d47、および図3b: TKOマウス、一元配置Anova  $P < 0.0001$  d-1対d27/47)。

#### 【0240】

ACI-41ワクチンは、腹腔内注射後、Tau206-221[pT212/pS214]およびTau196-211 [pS202/pT205]ペプチドの双方に対して強いIgG応答を誘導した。2回目の免疫後 (34日目)、IgG 40  
応答は安定なままであり (48日目)、3回目の免疫後 (48日目) に増加しなかった (図4a: WTマウス、抗Tau206-221[pT212/pS214]-IgG、一元配置Anova  $P < 0.0001$  d-1対d34/48) (図4b: WTマウス、抗Tau196-211[pS202/pT205]-IgG、一元配置Anova  $P < 0.0001$  d-1対d34/48) (図4c: TKOマウス、抗Tau206-221[pT212/pS214]-IgG、一元配置Anova  $P < 0.0001$  d-1対d34/48) (図4d: TKOマウス、抗Tau196-211[pS202/pT205]-IgG、一元配置Anova  $P < 0.0001$  d-1対d34/48)。

#### 【0241】

10

20

30

40

50

ワクチン接種マウスからの血清を、TAUPIR免疫組織化学およびウェスタンブロットにおいて抗タウ抗体の特異性に関してさらに試験した。全てのリポソーム構築物からのデータおよび各マウスモデルに関するデータを以下の表5に要約する。

【0242】

(表5) ワクチン接種マウスの血清からの抗体特異性の概要

| ワクチン   | マウス | ELISA<br>(陽性/マウス全体) | TAUPIR<br>(陽性/マウス全体) | ウェスタンブロット<br>(陽性/マウス全体) |
|--------|-----|---------------------|----------------------|-------------------------|
| ACI-33 | WT  | 4/6                 | 2/6                  | 1/6                     |
|        | KO  | 5/6                 | 2/6                  | 2/6                     |
| ACI-35 | WT  | 5/6 ; 1†            | 5/6 ; 1†             | 5/6 ; 1†                |
|        | KO  | 6/6                 | 3/6                  | 6/6                     |
| ACI-36 | WT  | 5/6                 | 4/6                  | 1/6                     |
|        | KO  | 5/6 ; 1†            | 3/6 ; 1†             | 1/6 ; 1†                |
| ACI-41 | WT  | 6/6                 | 4/6                  | 4/6                     |
|        | KO  | 6/6                 | 1/6                  | 3/6                     |

【0243】

#### 5.2.2. 野生型C57BL/6およびTau<sup>-/-</sup> KO (TKO) 免疫マウスからのアイソタイプ応答の分析

##### ACI-33

ACI-33ワクチンは、WTマウスにおいて、3回の腹腔内免疫後に全てのIgG2a、2b、および3アイソタイプのみならずIgMに関する抗体力価を誘導した(図5a; WTマウス)。IgG1はほとんど存在せず、IgG1とIgG2bおよび3のあいだに有意差が認められる(図5a; WTマウス; 一元配置Anova  $P < 0.05$  IgG1対IgG3、 $P < 0.001$  IgG1対IgG2b)。

【0244】

ACI-33ワクチンは、TKOマウスにおいて、3回の腹腔内免疫後に全てのIgG2a、2b、および3アイソタイプのみならずIgMに関する抗体力価を誘導した(図5b; TKOマウス)。IgG1はほとんど存在せず、このサブクラスと他のIgGアイソタイプとのあいだに有意差が認められた(図5b; 一元配置Anova  $P < 0.05$  IgG1対IgG2a/IgG3、 $P < 0.001$  IgG1対IgG2b)。

【0245】

##### ACI-35

ACI-35ワクチンは、WTマウスにおいて3回の腹腔内免疫後に全てのIgGアイソタイプのみならずIgMに関して高い抗体力価を誘導した(図6a; WTマウス)。唯一の有意差は、IgG3と比較して高いIgM応答である(図6a; WTマウス、一元配置Anova  $P < 0.05$  IgM対IgG3)。

【0246】

ACI-35ワクチンは、TKOマウスにおいて、3回の腹腔内免疫後に全てのIgGアイソタイプのみならずIgMに関して高い抗体力価を誘導した(図6b; TKOマウス)。

【0247】

##### ACI-36

ACI-36ワクチンは、WTマウスにおいて、3回の腹腔内免疫後に全てのIgGアイソタイプのみならずIgMに関して抗体力価を誘導した(図7a; WTマウス)。

【0248】

ACI-36ワクチンは、TKOマウスにおいて、3回の腹腔内免疫後に全てのIgGアイソタイプのみならずIgMに関する抗体力価を誘導した(図7b; TKOマウス)。IgG1と比較してIgG2bは統計学的に有意なより高いレベルで存在した(図7b; TKOマウス、一元配置Anova  $P < 0.05$ )。

05 IgG2b対IgG1)。

【0249】

#### ACI-41

ACI-41ワクチンは、WTマウスにおいて、3回の腹腔内免疫後に全てのIgGアイソタイプのみならずIgMに関して高い抗Tau196-211[pS202/pT205]抗体力価を誘導した(図8a; WTマウス)。

【0250】

ACI-41ワクチンは、TKOマウスにおいて、3回の腹腔内免疫後に全てのIgGアイソタイプのみならずIgMに関して高い抗Tau196-211[pS202/pT205]抗体力価を誘導した(図8b; TKOマウス)。

【0251】

#### 5.3. 結論

タウワクチンは、全てのマウスにおいてIgG力価を誘導した。ACI-33免疫マウスではIgG2bおよびIgG3と比較して低いIgG1抗体応答が認められた。他の全てのタウワクチン接種マウスにおいて、全てのIgG2a、2b、および3アイソタイプのみならずIgMに関して誘導された抗体力価は同等であった。

【0252】

タウワクチン免疫マウスから生成された抗体は、pTauに特異的に結合して、タウペプチドにわずかに結合した。生成された抗体はまた、タウトランスジェニックマウス脳における原線維変化、およびWBによってタウトランスジェニックマウス脳抽出物からのpTauを認識することが可能であった。

【0253】

#### 実施例6：ハイブリドーマおよび抗体の生成およびスクリーニング

本試験の目的は、抗タウmAb(モノクローナル抗体)を生成してスクリーニングすることであった。タウワクチン免疫マウス脾臓と骨髓腫細胞株との融合によってハイブリドーマを生成した。リン酸化および非リン酸化の完全長タウタンパク質のみならず、ワクチン調製のために用いられたリン酸化および非リン酸化タウ抗原性ペプチドに対する反応性に関して、ハイブリドーマを評価した。ハイブリドーマのスクリーニングはまた、タウトランスジェニックマウス脳スライスでの免疫組織化学を用いてタウ原線維変化に関するハイブリドーマ上清の反応性に関しても行った。

【0254】

#### 6.1. 方法

##### 6.1.1. 融合

ACI-33(Tau5-20[pY18])およびACI-35をワクチン接種した野生型C57BL/6マウスをハイブリドーマ産生のために用いた。マウスをACI-33ワクチンによって0日目に免疫した後、4日目に追加免疫し、7日目に融合を行った。免疫したマウスからの脾細胞 $173 \times 10^6$ 個(ACI-33)をSP2-0-Ag14骨髓腫細胞株に、脾細胞5個/骨髓腫細胞1個の割合で融合させた。

【0255】

ACI-36(Tau401-418[pS404/S409])をワクチン接種した野生型C57BL/6マウスを、ハイブリドーマ産生のために用いた。マウスをACI-36ワクチンによって0日目に免疫した後、4日目に追加免疫し、7日目に融合を行った。免疫したマウスからの脾細胞 $84 \times 10^6$ 個をSP2-0-Ag14骨髓腫細胞株に、脾細胞5個/骨髓腫細胞1個の割合で融合させた。

【0256】

ACI-41(Tau206-221[pT212/pS214])とTau196-211[pS202/pT205]の混合物)をワクチン接種した野生型C57BL/6マウスを、ハイブリドーマ産生のために用いた。マウスをACI-41ワクチンによって0日目に免疫した後、4日目に追加免疫し、8日目に融合を行った。免疫したマウスからの脾細胞 $162 \times 10^6$ 個をSP2-0-Ag14骨髓腫細胞株に、脾細胞5個/骨髓腫細胞1個の割合で融合させた。

【0257】

3つの融合によって、 $8 \times 96$ ウェルプレートが得られ、クローンをプレート(1-8)の次

10

20

30

40

50

に行 (A-G)、最後に列 (1-12) に従って命名した。

【0258】

#### 6.1.2. クローンを選択するためのスクリーニング法

8×96ウェルプレートにIgG発現に関して最初に2回スクリーニングした。陽性発現クローンを24ウェルプレートに移して、生育中の細胞の細胞上清 (= クローン) を、タウELISAスクリーニングおよび免疫組織化学TAUPIRスクリーニングにおいて試験した。ELISAおよび/またはTAUPIRにおける陽性上清をT25フラスコに移して、クローンを、IgG発現、タウELISAスクリーニング、およびTAUPIRに関して再度スクリーニングした。

【0259】

#### 6.1.3. IgGスクリーニング

ELISAプレートを、抗マウスIgG抗体 (CER Groupe, Marloie, Belgium) のコーティング緩衝液溶液50 μl/ウェルによって4°Cで16時間コーティングした。PBS/Tweenによってプレートを洗浄した後、ブロッキング溶液100 μl/ウェルをRTで1時間適用した。非希釈ハイブリドーマ上清50 μlをRTで1時間インキュベートした。洗浄段階の後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) -コンジュゲート抗マウスIgG1、IgG2a、IgG2b、およびIgG3 (Ab Serotec, Raleigh, NC, USA) をRTで1時間プレートに適用した。最後の洗浄後、HRPのホスファターゼ基質であるTMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) によって検出を行い、プレートをELISAプレートリーダーにおいて405 nmで読み取った。結果をO.D. (吸光度) として表記する。

【0260】

#### 6.1.4. ハイブリドーマタウELISAスクリーニング

ハイブリドーマELISAスクリーニングを、pTauペプチド (ACI-33、T1.5 : Tau5-20[pY18] ; ACI-36、T4.5 : Tau401-418[pS404/S409] ; ACI-41、T8.5 : Tau206-221[pT212/pS214]、およびT9.5 : Tau196-211[pS202/pT205]、PolyPeptide Laboratories, Hillerod, Denmark)、対応するタウペプチド (ACI-33、T1.6 : Tau5-20 ; ACI-36、T4.6 : Tau401-4 ; ACI-41、T8.6 : Tau206-221、およびT9.6 : Tau196-211、PolyPeptide Laboratories, Hillerod, Denmark)、リン酸化完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質 (pTauタンパク質、Vandebroek et al., 2005)、および完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質 (タウタンパク質、SignalChem, Richmond, Canada) について行った。最後に、ウシ血清アルブミン (BSA) を陰性対照として用いた。

【0261】

プレートに、10 μg/mlの対応するタウペプチド、および1 μg/mlの対応するタウタンパク質を4°Cで終夜をコーティングした。各ウェルをPBS-0.05%Tween 20によって洗浄して、1%BSAのPBS-0.05%Tween 20溶液によってブロックした後、非希釈ハイブリドーマ上清または培地陰性対照をプレートに加えて、37°Cで2時間インキュベートした。洗浄後、プレートをアルカリホスファターゼ (AP) -コンジュゲート抗マウスIgG総抗体 (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA) と共に37°Cで2時間インキュベートした。洗浄後、プレートをAPのホスファターゼ基質であるpNPP (パラニトロフェニルリン酸) と共にインキュベートして、ELISAプレートリーダーを用いて405 nmで読み取った。結果をO.D. (吸光度) として表記する。

【0262】

#### 6.1.5. ハイブリドーマIHCスクリーニング：トランスジェニックマウスの脳切片における原線維変化に対する抗タウ抗体の結合 (TAUPIR)

TAUPIR実験を実施例5.1.5のプロトコールに従って行った。

【0263】

#### 6.1.6. T25フラスコIgGスクリーニング

ELISAプレートを、5 μg/ml抗マウスIgG F(ab')<sub>2</sub>断片特異的抗体 (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA) の炭酸塩-重炭酸塩コーティング緩衝液溶液pH 9.6 (Sigma, Buchs, Switzerland) によって4°Cで終夜コーティングした。プレートを洗浄後、非希釈ハイブリドーマ上清、陽性対照IgG1抗体 (6E10、1 μg/ml : Covance, Emeryville, CA, USA)

、または陰性対照（培養培地単独）を、RTで1時間インキュベートした。洗浄段階の後、二次AP-コンジュゲートヤギ抗マウスIgG（サブクラス1+2a+2b+3）Fc- $\gamma$ 断片特異的抗体（Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA）を、プレート上で37℃で2時間インキュベートした。最後の洗浄後、APのホスファターゼ基質であるpNPP（パラニトロフェニルリン酸）によって検出を行い、プレートをELISAプレートリーダーを用いて405 nmで読み取った。結果をO.D.（吸光度）として表記する。

【0264】

## 6.2. 結果

### ACI-33ハイブリドーマ

融合によって生じた8×96ウェルプレートからの細胞上清を、IgGの産生に関してスクリーニングした。768ウェル（8×96ウェル）中、試験したウェル277個がIgG発現に関して陽性であり、これらを24ウェルプレートに移した。24ウェルプレートにおいてクローン79個が生育して、これらの細胞からの上清を分析した。陽性クローンをさらにT25フラスコに移して、上清をIgG産生、ELISA、およびTAUPIRに関してスクリーニングした（表6）。

【0265】

（表6）

| 24ウェルプレートスクリーニング |              | T25フラスコスクリーニング       |             |              |
|------------------|--------------|----------------------|-------------|--------------|
| ELISA<br>陽性      | TAUPIR<br>陽性 | IgGスク<br>リーニング<br>陽性 | ELISA<br>陽性 | TAUPIR<br>陽性 |
| 1A7              |              | 1A7                  |             |              |
|                  | 1A11         |                      |             |              |
|                  | 1C11         | 1C11                 |             |              |
| 2C9              |              | 2C9                  |             |              |
| 3C3              |              | 3C3                  | 3C3         |              |
| 3C5              |              | 3C5                  |             |              |
| 3E8              |              | 3E8                  |             |              |
| 3G10             | 3G10         | 3G10                 | 3G10        |              |
| 6C10             | 6C10         | 6C10                 | 6C10        | 6C10         |
| 6F3              |              | 6F3                  |             |              |
| 6F8              |              | 6F8                  |             |              |

クローン6C10は、3回のスクリーニングにおいて唯一陽性であり、これをサブクローニングのために選択した。

【0266】

### ACI-36ハイブリドーマ

融合により生じた8×96ウェルプレートからの細胞上清を、IgGの産生に関してスクリーニングした。768ウェル（8×96ウェル）中、試験したウェル333個がIgG発現に関して陽性であり、これらを24ウェルプレートに移した。24ウェルプレートにおいてクローン75個が生育して、これらの細胞からの上清を分析した。陽性クローンをさらにT25フラスコに移して、上清をIgG産生、ELISA、およびTAUPIRに関してスクリーニングした（表7）。

【0267】

（表7）



| 24ウェルプレートスクリーニング |              | T25フラスコスクリーニング       |             |              |
|------------------|--------------|----------------------|-------------|--------------|
| ELISA<br>陽性      | TAUPIR<br>陽性 | IgGスク<br>リーニング<br>陽性 | ELISA<br>陽性 | TAUPIR<br>陽性 |
| 2B6              | 2B6          | 2B6                  | 2B6         | 2B6          |
| 2F9              | 2F9          | 2F9                  | 2F9         | 2F9          |
| 2G1              |              | 2G1                  | 2G1         | 2G1          |
| 3A8              | 3A8          | 3A8                  | 3A8         | 3A8          |
| 3B9              |              | 3B9                  | 3B9         | 3B9          |
| 3F11             | 3F11         | 3F11                 |             | 3F11         |
|                  | 4A3          |                      |             | 4A3          |
| 4C1              |              | 4C1                  | 4C1         | 4C1          |
| 4C12             |              | 4C12                 | 4C12        | 4C12         |
| 4E12             |              | 4E12                 | 4E12        | 4E12         |
| 5E10             |              | 5E10                 | 5E10        |              |
| 5F5              |              | 5F5                  | 5F5         |              |
| 7D6              | 7D6          | 7D6                  | 7D6         | 7D6          |
| 6H1              |              | 6H1                  | 6H1         | 6H1          |

次の段階のためのクローンを選択するために、IgG/ELISA/TAUPIRスクリーニングに関して陽性である上清全ての順位付けをELISAおよびTAUPIRの結果に基づいて行った。ELISAおよびTAUPIRの結果の順位付けは、方法の章に説明したとおりに行った。TAUPIR染色は最初の5個のクローンに関してほとんど同一であり、これはELISA結果に対応した。4C12は、4C1と同じプレートにおいて見いだされ、2つのクローンが同じである（同じエピトープを認識する）可能性が高まったことから廃棄した。選択された最もよいクローン4個は、3A8、2B6、4C1、および6H1であった。他のクローン（4C12、2G1、2F9、7D6、3B9、4E12）6個をバックアップとして維持した。

#### 【0268】

最善の1つを選択するために、ELISAスクリーニングおよびTAUPIRスクリーニングにおいて陽性を示すクローン10個の順位付けを行った（表8）。灰色で強調したクローンが最善の5個のクローンである。

#### 【0269】

（表8）ELISAおよびTAUPIRにおける陽性クローンの順位付け

| ELISAでの順位 | TAUPIRでの順位 |
|-----------|------------|
| 3A8       | 6H1        |
| 2B6       | 4C1        |
| 4C1       | 3A8        |
| 6H1       | 4C12       |
| 4C12      | 2B6        |
| 2G1       | 2F9        |
| 2F9       | 3B9        |
| 7D6       | 2G1        |
| 3B9       | 7D6        |
| 4E12      | 4E12       |

## 【0270】

## ACI-41ハイブリドーマ

融合により生じた8×96ウェルプレートからの細胞上清を、IgGの産生に関してスクリーニングした。768ウェル（8×96ウェル）中、試験したウェル215個がIgG発現に関して陽性であり、これらを24ウェルプレートに移した。24ウェルプレートにおいてクローン81個が生育して、これらの細胞からの上清を分析した。陽性クローンをさらにT25フラスコに移して、上清をIgG産生、ELISA、およびTAUPIRに関してスクリーニングした（表9）。

## 【0271】

（表9）

| 24ウェルプレートスクリーニング |              | T25フラスコスクリーニング   |             |              |
|------------------|--------------|------------------|-------------|--------------|
| ELISA<br>陽性      | TAUPIR<br>陽性 | IgGスクリー<br>ニング陽性 | ELISA<br>陽性 | TAUPIR<br>陽性 |
|                  | 3D11         | 3D11             |             | 3D11         |
| 4H6              |              | 4H6              |             | 4H6          |
| 5D10             | 5D10         | 5D10             | 5D10        | 5D10         |
| 5E6              | 5E6          |                  |             |              |
| 5F10             |              | 5F10             |             |              |
| 6B7              |              | 6B7              | 6B7         |              |
| 7C2              | 7C2          | 7C2              | 7C2         | 7C2          |
|                  | 8G8          |                  |             | 8G8          |
|                  | 8H8          | 8H8              |             | 8H8          |

クローン5D10および7C2は3回のスクリーニングにおいて唯一陽性であり、これをサブクローニングのために選択した。クローン5D10はペプチドT8.5のみに結合するが、クローン7C2は、ACI-41ワクチンの2つのペプチド（T8.5およびT9.5）に結合する（図10）。5D10を起源とするサブクローン5D10A4はpTauペプチドに対して特異的であった。

## 【0272】

## 8.3. 結論

生成された抗体は、pTauペプチドに対して高い特異性を示しているが、非リン酸化ペプチドに対してごくわずかに結合する。

## 【0273】

3つの融合（ACI-33、ACI-36、およびACI-41）から、全体でクローン7個をDSMZに寄託して（表10）、これらをさらなるサブクローニングのために選択した。

## 【0274】

（表10）寄託されたハイブリドーマの一覧

10

20

30

| 抗原                                                                      | ワクチン   | ハイブリドーマ<br>の名称 | 寄託<br>番号       | 寄託日        |
|-------------------------------------------------------------------------|--------|----------------|----------------|------------|
| T8 :Tau206-221<br>[pT212/pS214]<br>+<br>T9: Tau196-211<br>[pS202/pT205] | ACI-41 | ACI-41-Ab1     | DSM ACC3043    | 2010年3月3日  |
| T4: Tau 401-<br>418 [pS404,<br>pS409]                                   | ACI-36 | 2B6            | DSM<br>ACC3044 | 2010年3月10日 |
| T4: Tau 401-<br>418 [pS404,<br>pS409]                                   | ACI-36 | 3A8            | DSM<br>ACC3045 | 2010年3月10日 |
| T4: Tau 401-<br>418 [pS404,<br>pS409]                                   | ACI-36 | 4C1            | DSM<br>ACC3046 | 2010年3月10日 |
| T8 :Tau206-221<br>[pT212/pS214]<br>+<br>T9: Tau196-211<br>[pS202/pT205] | ACI-41 | 5D10A3         | DSM<br>ACC3047 | 2010年3月10日 |
| T1: Tau 5-20<br>[pY18]                                                  | ACI-33 | 6C10           | DSM<br>ACC3048 | 2010年3月10日 |
| T4: Tau 401-<br>418 [pS404,<br>pS409]                                   | ACI-36 | 6H1            | DSM<br>ACC3049 | 2010年3月10日 |
| T8 :Tau206-221<br>[pT212/pS214]<br>+<br>T9: Tau196-211<br>[pS202/pT205] | ACI-41 | 7C2            | DSM<br>ACC3050 | 2010年3月10日 |

10

20

30

## 【 0 2 7 5 】

実施例7：ACI-41ワクチン接種マウスに由来する2つの抗体（ACI-41-Ab1および5D10）によるヒトAD脳スライス特異的染色

本試験の目的は、ACI-41ワクチンを免疫したマウスからの2つの異なる融合により生成された抗体ACI-41-Ab1（9H3サブクローンT89-F4）および5D10を用いて、ヒトアルツハイマー病（AD）脳における神経原線維変化（NFT）を染色することであった。これを試験するために、ヒトAD脳切片を用いたリン酸化-タウタンパク質免疫反応性染色アッセイ（TAU-PIR）を使用した。

40

## 【 0 2 7 6 】

## 7.1. 方法

## 7.1.1. 5D10抗体生成

5D10は実施例9に記載するように生成した。

## 【 0 2 7 7 】

## 7.1.2. ACI-41-Ab1の生成

50

#### 7.1.2.1. 融合

ACI-41 (ACI-41ワクチンは2つのリン酸化タウペプチド、Tau206-221[pT212/pS214]およびTau196-211[pS202/pT205]を含有する)をワクチン接種した野生型C57BL/6マウスを、ハイブリドーマ産生のために用いた。融合の5日前にマウスにACI-41ペプチドを追加免疫した。免疫したマウスからの脾細胞 $58 \times 10^6$ 個を、脾細胞5個/骨髓腫細胞1個の割合で、SP2/0-0-Ag14骨髓腫細胞に融合させた。融合によって $10 \times 96$ ウェルプレートが得られ、これを次にスクリーニングして興味深いクローンを決定した。

【0278】

#### 7.1.2.2. ハイブリドーマELISAスクリーニング

ハイブリドーマELISAスクリーニングを、T8: Tau206-221[pT212/pS214]、T9: Tau196-211[pS202/pT205]、または超リン酸化(hP)-Tau (ウェスタンブロットの章で説明) コーティングプレートにおいて行った。

【0279】

プレートを $2 \mu\text{g/ml}$ のhP-Tauによって室温(RT)で終夜コーティングした。各ウェルをPBSによって洗浄して、2%FCSのPBS溶液によってブロックした後、ハイブリドーマ上清をプレートに添加してRTで1時間インキュベートした。洗浄段階後、プレートをペルオキシダーゼコンジュゲートAffiniPure Goat Anti-Mouse 総Ig (IgG+IgMの検出、Dako Glostrup, Denmark) の1%FCS PBS溶液と共にRTで1時間インキュベートした。プレートをTMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) によって顕色した。反応を $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ によって停止させて、ELISAプレートリーダーを用いて450 nmで読み取った。結果を各ハイブリドーマクローンに関して吸光度(O.D.)で表記した。

【0280】

ペプチドに関して、プレートを $10 \mu\text{g/ml}$ のTau206-221[pT212/pS214]またはTau196-211[pS202/pT205]によって4°Cで終夜コーティングした。PBSによって洗浄して2%NHSのPBS溶液によってブロックした後、ハイブリドーマ上清をプレートに添加して、室温(RT)で1時間インキュベートした。洗浄段階の後、プレートをビオチニル化抗マウスIgG (Vector Labsから購入) の1%NHS PBS溶液と共に、RTで1時間インキュベートした。ビオチンコンジュゲート抗体に関しては補助段階を行い、検出前にプレートを、ストレプトアビジン-HRP (ABC kit, Vector labs) 中で30分間インキュベートした。洗浄段階の後、プレートをTMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) によって顕色した。反応を $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ によって停止させて、ELISAプレートリーダーを用いて450 nmで読み取った。結果を各ハイブリドーマクローンに関して吸光度(O.D.)で表記した。

【0281】

#### 7.1.2.3. ハイブリドーマIHCスクリーニング: トランスジェニックマウスからの脳切片における原線維変化に対する抗タウ抗体の結合 (TAUPIR)

ハイブリドーマ細胞によって産生された原線維変化に対する抗体の結合を、タウトランスジェニックマウスの脳切片における免疫組織化学(IHC)によって行った。

【0282】

老齢の(>20ヶ月齢)二重トランスジェニックbiGTマウス(TPLH (P301L変異を有するヒトタウの最も長いイソ型(アミノ酸441個))発現マウスと交配したGSK-3トランスジェニックマウス)および陰性対照としてのタウノックアウト(TKO)マウスから脳切片を得た。

【0283】

TAUPIR染色は、実施例5.1.5のプロトコールに従って行った。

【0284】

#### 7.1.2.4. ハイブリドーマのウェスタンブロットスクリーニング(WB)

トランスジェニック動物の脳抽出物および/またはhP-Tau抽出物中のpTauに対する、ハイブリドーマ細胞によって産生された抗体の結合を、WBによって行った。

【0285】

野生型FVB、TPLH、biGT、およびタウノックアウト(TKO)マウスの脳ホモジネーション

10

20

30

40

50

を以下の緩衝液において行った；全量12 ml中に、25 mM Tris/HCl pH7.6、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、30 mM NaF、0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1 nMオカダ酸、1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）、5 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、コンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテル（CPIC）1錠。全脳ホモジネートを得るために、脳を、水中で脳半球の重量あたり10容積（ml/g）の割合でモーター駆動陶製（ガラスチューブ／テフロン乳棒）を700 rpmで用いてホモジナイズした。

#### 【0286】

hP-Tau抽出に関して、TPLHおよびTKOマウスの脳を以下の緩衝液によってホモジナイズした：全量12 ml中に100 mM MES pH 6.8、1 mM  $\beta$ メルカプトエタノール、5 mM EDTA、2.5 mM PMSF、5  $\mu\text{g/ml}$  トシル-L-リジン、クロロメチルケトン（TLCK）、100 mM NaF、1 nMオカダ酸、0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ およびコンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテル（CPIC）1錠。脳を、水中で脳半球の重量あたり6容積（ml/g）の割合でモーター駆動陶製（ガラスチューブ／テフロン乳棒）を700 rpmで用いてホモジナイズした。ホモジネートを20000×gで4℃で30分間遠心分離させて、上清を移し、95℃まで急速に加熱して10分間維持した後、融解した水中で冷却した。遠心分離段階の後に上清を等分して、「hP-Tau」として-20℃で保存した。

#### 【0287】

全脳ホモジネートを試料緩衝液（125 mM Tris/HCl pH6.8、4% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、20%グリセロール、0.01%プロモフェノールブルー）+5%  $\beta$ メルカプトエタノール中で半分に希釈した後、95℃まで急速に加熱した。試料を5分間維持した後、試料緩衝液において1/4に希釈して、再度95℃まで加熱した後冷却し、14000 rpmで5分間スピンさせて、溶解しない破片を除去した。上清を収集して、SDS-PAGEゲルにロードした。ニトロセルロースメンブレン（Hybond-ECL）への転写は、転写緩衝液（25 mM Tris、pH 8.6、190 mMグリシン、20%メタノール）中で行った。メンブレンをブロッキング溶液（0.1%TweenのTBS（50 mM Tris/HCl、pH 7.6、150 mM NaCl）溶液+5%粉乳）に移して、4℃で非希釈ハイブリドーマ上清と共に終夜インキュベートした。ブロッキング溶液中で1：10,000希釈したHRP-コンジュゲートヤギ抗マウス二次抗体（Dako, Glostrup, Denmark）とのインキュベーションは、RTで1時間行った。検出は、GE HealthcareのECIウェスタンブロットティング検出試薬を用いて行った。

#### 【0288】

##### 7.1.3. ヒトAD脳におけるタウ原線維変化に対する抗リン酸化タウ抗体の結合

抗リン酸化タウ抗体クローンACI-41-Ab1（9H3 T89-F4サブクローン）（マウスIgMアイソタイプ）および5D10（マウスIgGアイソタイプ）を、ACI-41ワクチン接種マウスの異なる2つの融合から生成した。ACI-41ワクチンは、2つのリン酸化タウペプチドTau206-221[pT212/pS214]およびTau196-211[pS202/pT205]の混合物を含有する。ヒトAD脳の脳スライス上の原線維変化に対する抗体クローンT89-F4の結合を、TAUPIR免疫組織化学によって行った。AD、進行性核上麻痺（PSP）を有する個体、および健康な対照からの皮質脳切片を用いた。脳切片をPBS中で5分間洗浄した後、1.5% $\text{H}_2\text{O}_2$ のPBS：メタノール（1：1）溶液中でRTで15分間インキュベートして、内因性のペルオキシダーゼを遮断した。切片をPBST（PBS/0.1%TritonX100）中で3回洗浄後、PBST+10%FCS（仔ウシ胎児血清）ブロッキング溶液中でRTで30分間インキュベートした。一次抗体（クローン9H3 T89-F4、5D10、および陽性対照としてのAT100）と共に4℃で終夜インキュベーションを行った。切片をPBSTによって3回洗浄した後、HRP-コンジュゲートヤギ抗マウス（Dako, Glostrup, Denmarkから購入した）二次抗体のPBST/10%FCS溶液と共にRTで1時間インキュベートした。検出前に、切片をPBSTによって3回洗浄した後、50 mM Tris/HCl pH 7.6中で5分間インキュベートした。切片をジアミノベンジジン（DAB；50 mM Tris/HCl 10 ml+ $\text{H}_2\text{O}_2$  3  $\mu\text{l}$ ）中で1錠；MP Biochemicals, Solon, OH, USA）中で3分間インキュベートすることによって検出を行った。切片をPBST中で3回洗浄することによって、反応を停止させた。次に、切片をシラン処理ガラスプレート上に移して、暖かいプレート上で50℃で2時間空気乾燥させた。Mayersヘマトキシリン（Fluka Chemie, Buchs, Switzerland）と共に1分間インキュベートした後、

水道水で4分間洗浄段階を行うことによって対比染色を行った。切片を、キシロール中に5分間2回および100%EtOH中で1分間2回通過させた後、90%、70%、50%EtOH、および蒸留水中で1分間洗浄することによって、脱パラフィン化した。抗原を回収するために、切片を0.01 Mクエン酸溶液 (pH 6.0) 中で10分間沸騰した後、20分間冷却した。最後に、切片をDePeX (BDH Chemicals Ltd., Poole, England) によってマウントしカバーガラスを載せた。染色した切片を落射蛍光光学装置および3CCDカメラ (Leica, Wetzlar, Germany) を備えた顕微鏡によって調べた。画像を獲得して専用のソフトウェア (IM500, Leica) を用いて分析した。

【0289】

## 7.2. 結果

### 7.2.1. ハイブリドーマのスクリーニング

ELISAスクリーニングを上記の方法に記載するように行って、ハイブリドーマクローン172個を選択して、12ウェルプレートに移した。次にELISAを行って、pTauペプチドTau206-221[pT212/pS214]、Tau196-211[pS202/pT205]、および／またはhP-Tau抽出物に対して産生された抗体の特異性を評価した。これによって、pTauペプチドに関して25個の陽性クローンが得られ、およびクローン21個がhP-Tauに関して特異性を示した (図11)。

【0290】

免疫組織化学試験をELISA分析と平行して行った。12ウェルプレートに移されたクローンにおいて異なる染色パターンが見いだされた。非特異的なグリア、核および細胞質染色が、選択されたクローンからの非希釈上清と共にインキュベートしたいくつかのbiGT切片について観察された。

【0291】

クローン9H3 (ACI-41-Ab1) からの上清は、高い特異性で細胞質原線維変化構造を染色した。

【0292】

異なるマウスの脳およびhP-Tau抽出物におけるWBスクリーニングを、選択されたハイブリドーマの非希釈上清を用いて行った。試験したハイブリドーマ上清のいずれについてもタウとの反応が観察されなかった。

【0293】

### 7.2.2. ヒトアルツハイマー病脳切片における神経原線維変化の染色

抗体クローンACI-41-Ab1 (9H3サブクローンT89-F4) および5D10がヒトAD脳においてNFTに結合するか否かを、TAUPIR免疫組織化学によって調べた。抗リン酸化タウ抗体クローンT89-F4は、ヒトAD脳においてリン酸化タウ含有NFTに結合した (図12)。

【0294】

抗体5D10がヒトAD皮質脳切片においてNFTに結合するか否かを、TAUPIR免疫組織化学によって調べた。抗リン酸化タウ抗体クローン5D10は、ヒトAD脳皮質切片においてリン酸化タウ含有NFTおよび糸屑状構造物に結合した (図13)。

【0295】

## 7.3. 結論

ACI-41生成ハイブリドーマクローンのELISAによるスクリーニングによって、リン酸化ペプチドおよび／または完全長のhP-Tau抽出物に結合するクローン36個が得られた。これらのクローン36個のTAUPIRによるスクリーニングにより、1つのクローン (9H3)、ACI-41-Ab1による細胞質原線維変化構造の染色が確認された。

【0296】

2つの抗体ACI-41-Ab1 (9H3-F4) および5D10が、ヒトAD脳切片においてNFTおよび糸屑状構造物に特異的に結合することを実証された。

【0297】

実施例8：2つの異なるプロセスによって産生されたACI-35が野生型マウス (C57BL/6) において腹腔内または皮下免疫後にpTau特異的IgG応答を誘導する可能性

本試験の目的は、2つの異なるプロセス、すなわちプロセスA ACIまたはプロセスL3 ACI

10

20

30

40

50

によって産生されたACI-35 (Tau393-408[pS396/pS404]) の、野生型C57BL/6マウスにおける皮下 (s.c.) または腹腔内 (i.p.) 注射後の抗体力価の誘導能を評価することであった。マウスを2週間間隔で3回免疫して、最初の注射の1週間前およびその後各免疫後1週間目に採血した。総抗pTau (Tau393-408[pS396/pS404]) IgG応答をELISAによって測定した。その上、抗体応答のアイソタイプパターンを3回の免疫後に分析して、IgGの異なるサブクラスのみならず、IgMの分布を評価した。対応する非pTau (Tau393-408) ペプチドに対する抗体力価を分析した。ACI-35によって誘導されたT細胞応答を、ELISPOT技術を用いて分析した。

#### 【0298】

##### 8.1. 方法

##### 8.1.1. ワクチンACI-35の調製：プロセスA ACI

ACI-35ワクチンを実施例3のプロトコールに従って調製した。リボソーム懸濁液 (バッチACI-35-081103-B) を等分して2~8℃で保存した。最終ペプチド/リン脂質モル比は1:100であった。

#### 【0299】

##### 8.1.2. ワクチンACI-35の調製：プロセスL3 ACI

タウ由来テトラパルミトイル化リン酸化ペプチドTau393-408[pS396/pS404] (S396およびS404上にリン酸基を有するヒトTau393-408) (4.0 mg) の重量を測定して、25 mlガラスバイアルに入れ、これにヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) (5 ml) を添加した。次に、この透明な溶液をジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、コレステロール、およびアジュバントであるモノホスホリルリピドA (MPLA) のクロロホルム溶液 (35 ml) の攪拌溶液に添加した (モル比、それぞれ9:1:7:0.2)。得られた溶液を、0.2 μmの疎水性PTFEフィルターメンブレンを通して、250 ml丸底ガラスフラスコに濾過した。有機溶媒を、40℃の減圧下の後に高真空下で3時間蒸発させることによって除去した。得られた薄膜を、PBS (40 ml) を添加して、RTで18時間軽く攪拌することによって再水和させた。リボソーム懸濁液 (バッチACI-35-081103-A) を等分して、2~8℃で保存した。最終ペプチド/リン脂質モル比は1:100であった。

#### 【0300】

##### 8.1.3. 免疫

13週齢のC57BL/6マウス (1群マウス10匹) に、表11に従ってワクチンを、各投与のあいだに2週間の間隔をあけて (0日目、14日目、28日目) 3回皮下または腹腔内注射を行った。最初の免疫の1週間前 (-7日目) および注射の7日後 (すなわち7日目、21日目、35日目) および屠殺時 (56日目) に血液試料を採取して、血漿を調製した。Tau393-408[pS396/pS404]特異的IgGおよびIgM抗体力価、ならびにIgGアイソタイプパターンを、ELISAによって決定した。対照として、非pTau393-408特異的IgG抗体力価をELISAによって決定した。

#### 【0301】

(表11) マウスの免疫

10

20

30

| 群 | 動物数<br>および<br>性別 | 処置/<br>容量 <sup>a</sup> | ワクチンの<br>バッチ        | プロ<br>セス | 投与<br>経路 <sup>b</sup> | 用量<br>レベル<br>タウペプ<br>チドの量<br>$\mu$ g/用量 <sup>c</sup> | MPLAの量<br>$\mu$ g/用量 <sup>c</sup> |
|---|------------------|------------------------|---------------------|----------|-----------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 10<br>雌性         | ACI-35<br>0.2 ml       | ACI-35-<br>081103-A | L3 ACI   | i.p.                  | 10                                                   | 16                                |
| 2 | 10<br>雌性         | ACI-35<br>0.2 ml       | ACI-35-<br>081103-A | L3 ACI   | s.c.                  | 10                                                   | 16                                |
| 3 | 10<br>雌性         | ACI-35<br>0.2 ml       | ACI-35-<br>081103-B | A ACI    | i.p.                  | 13                                                   | 19                                |
| 4 | 10<br>雌性         | ACI-35<br>0.2 ml       | ACI-35-<br>081103-B | A ACI    | s.c.                  | 13                                                   | 19                                |

a ; 理論的容量

b ; s.c. 皮下

c ; 分析後に決定した測定量

【0302】

#### 8.1.4. タウペプチド特異的抗体の定量

Tau393-408[pS396/pS404]に対する特異的IgG抗体を、5つの血漿採取試料においてELISAによって決定した。特異的Tau393-408 IgG抗体、Tau393-408[pS396/pS404]特異的IgMおよびIgGアイソタイプ抗体を、35日目の血漿採取試料においてELISAによって決定した。プレートを10  $\mu$ g/mlの対応するタウペプチドによって4°Cで終夜コーティングした。各ウェルをPBS-0.05%Tween 20によって洗浄して、1%BSAのPBS-0.05%Tween 20溶液によってブロック後、血漿の連続希釈液をプレートに加えて、37°Cで2時間インキュベートした。洗浄後、プレートをアルカリホスファターゼ (AP) コンジュゲート抗マウスIgG抗体 (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA) またはアイソタイプ特異的抗体 (Pharmlingen BD, San Diego, CA, USAから購入した、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート抗マウスIgM、APコンジュゲート抗マウスIgG1、ビオチンコンジュゲート抗マウスIgG2aおよびIgG3、ならびにZymed Laboratories, San Francisco, CAから購入したHRPコンジュゲート抗マウスIgG2b) と共に37°Cで2時間インキュベートした。洗浄後、プレートを、APのホスファターゼ基質であるpNPP (パラニトロフェニルリン酸)、またはHRPの基質であるABTS (2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)) と共にインキュベートして、ELISAプレートリーダーを用いて405 nmで読み取った。ビオチンコンジュゲート抗体に関しては、プレートをストレプトアビジン-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 中で45分間インキュベートした後、ABTSを用いて検出する補助段階を行った。結果を、IgGに関して最初の希釈および非飽和希釈でのO.D. (吸光度) として、ならびにIgGアイソタイプおよびIgMに関して非飽和O.D.として表記する。

【0303】

#### 8.1.5. ELISPOTによるタウペプチド特異的サイトカイン産生T細胞の定量

Tau393-408[pS396/pS404]およびTau393-408特異的T細胞のサイトカイン産生をELISPOTによって評価した。マルチスクリーン96ウェルニトロセルロースプレート (Millipore, Molsheim, France) を、製造元の説明書 (Pharmlingen BD, San Diego, CA, USA) に従って、抗マウスIFN- $\gamma$ およびIL-4モノクローナル抗体によって終夜コーティングした。免疫したマウスの脾臓から単細胞懸濁液を調製して、Tau393-408[pS396/pS404]およびTau393-408 (10および1  $\mu$ g/ml) の連続希釈液ならびにコンカナバリンA (5  $\mu$ g/ml, Amersham) と共に、37°Cで5%CO<sub>2</sub>下で72時間インキュベートした。プレートを洗浄して、ビオチニル化抗

10

20

30

40

50



マウスIFN- $\gamma$ およびIL-4モノクローナル抗体と共に、37℃で1時間インキュベートした。洗浄後、プレートをストレプトアビジン-HRPと共に37℃で1時間インキュベートして、洗浄後、基質（AEC、3-アミノ-9-エチルカルバゾール）を添加することによって、スポットを顕色した。ウェルあたりのスポット数を、立体顕微鏡において肉眼で計数して、結果を細胞 $10^6$ 個あたりのスポットとして表記した。ナイーブマウスの脾臓を陰性対照として用いた。

#### 【0304】

##### 8.1.6. 非放射活性細胞増殖アッセイ

単細胞懸濁液を免疫マウスの脾臓から調製して、Tau393-408[pS396/pS404]およびTau393-408（10および1 $\mu$ g/ml）の連続希釈液およびコンカナバリンA（5 $\mu$ g/ml、Amersham）と共に、37℃で5%CO<sub>2</sub>下で72時間インキュベートした。増殖を測定するために、製造元の説明書に従って非放射活性細胞増殖アッセイ（MTT）キットを用いた（Promega, Dubendorf, Switzerland）。簡単に説明すると、色素溶液15 $\mu$ lを各ウェルに添加して、プレートを37℃で4時間インキュベートした。次に、ウェルあたり可溶化／停止溶液100 $\mu$ lを添加して、プレートを4℃で少なくともさらに1時間インキュベートした。O.D.を570 nmおよび690 nmの波長で測定した。

#### 【0305】

##### 8.2. 結果

##### 8.2.1. 異なるワクチンによって誘導された抗体応答の評価

ACI-35ワクチンを用いたプロセスによらず、腹腔内または皮下注射後に強い抗pTau393-408[pS396/pS404]IgG応答を誘導した。一般的に、強い抗体力価は最初のワクチン免疫後7日目で既に存在した。プロセスが同じ場合、プロセスL3 ACIワクチン接種動物（図14、二元配置Anova  $P < 0.001$  d21/d35）では21日目および35日目で、プロセスA ACI注射動物（図14、二元配置Anova  $P < 0.001$  d21/d35、 $p < 0.01$  d56）では21日目、35日目、および56日目で、腹腔内注射と比較して皮下注射ではより高い応答が存在した。腹腔内注射動物の場合、L3 ACIプロセスではA ACIプロセスと比較して、初期の7日目および21日目での採血において応答が高かったが（図14、二元配置Anova、 $P < 0.001$  d7/d21）、皮下注射動物では差はなかった。要約すると、2つのプロセスは皮下に注射した場合に同等であるように思われた。

#### 【0306】

非飽和O.D.希釈での結果の分析により、異なるACI-35ワクチンプロセスの腹腔内注射と皮下注射に差があることが確認された。要約すると、結果は同じであり、皮下注射は腹腔内注射より高いAb力価を生じること、および皮下注射に関して2つのプロセスのあいだで有意差はないことを示している。

#### 【0307】

ワクチン誘発抗体のアイソタイプを決定するために、35日目の血漿をアイソタイプ特異的IgG ELISAによって分析した。ACI-35は、全ての群において、IgG1、IgG2a、IgG2b、およびIgG3アイソタイプの抗pTau393-408[pS396/pS404]IgGを誘導した。IgG2bは、1/3200倍希釈であっても高いO.D.を有する優勢なアイソタイプであった。IgG1サブクラスについては、双方のプロセスに関して腹腔内注射と比較して皮下注射に関して高い応答が存在した（図15、一元配置Anova  $P < 0.05$ ）。同じ差がIgG3サブクラスに関しても観察された。IgG2aおよび2bサブクラスでは、調べた2つのプロセスのあいだにも、またはワクチンの腹腔内注射と皮下注射のあいだにも差を認めなかった。

#### 【0308】

抗pTau393-408[pS396/pS404]IgM抗体応答に関して試験した2つのプロセスのあいだには差が認められなかったが、皮下注射と比較して腹腔内注射では有意に高いIgM力価が存在した（図16a、一元配置Anova、 $P < 0.001$ ）。

#### 【0309】

非リン酸化Tau393-408に対する抗体力価も同様に、全ての群に関して分析した。抗Tau393-408特異的IgG抗体は全ての群に関して検出されたが、その力価は、抗pTau393-408[pS3

96/pS404]より低かった。2つのプロセスまたは注射様式のあいだで抗Tau393-408 IgG力価に差はなかった（図16b、一元配置Anova、 $P>0.05$ ）。

#### 【0310】

異なるタウペプチドに関して最初の3つのIgG力価の平均値を表12に示す。

#### 【0311】

（表12）最初の3つの抗Tau393-408[pS396/S404] IgG力価の平均値（1/100倍希釈でのOD。）

| ワクチンpTau<br>ペプチド            | ワクチンを<br>生成する<br>プロセス | 注射<br>様式 | d7    | d21   | d35   | 平均値   |
|-----------------------------|-----------------------|----------|-------|-------|-------|-------|
| Tau393-408<br>[pS396/pS404] | L3 ACI                | i.p.     | 1.899 | 2.284 | 1.825 | 2.003 |
|                             |                       | s.c.     | 1.485 | 2.956 | 2.444 | 2.295 |
|                             | A ACI                 | i.p.     | 0.902 | 1.467 | 1.708 | 1.359 |
|                             |                       | s.c.     | 1.276 | 2.964 | 2.426 | 2.222 |

10

#### 【0312】

#### 8.2.2. ACI-35によって誘導されたT細胞応答の評価

ConA、pTau393-408[pS396/pS404]、またはTau393-408ペプチドによる脾細胞のインビトロ再刺激によって、試験群のあいだで増殖の差が起こらなかったが（図17）、ConAに関して陽性であった。

20

#### 【0313】

10  $\mu$ g/mlのTau393-408[pS396/pS404]を用いて再刺激すると、サイトカイン分泌を誘導し、これはナイーブマウスと比較してワクチン接種マウスの脾細胞では高かった（図18）。皮下注射したプロセスL3 ACIは、分析した双方のサイトカインのより高いレベルを誘導し、IFN- $\gamma$ とIL-4のあいだで明確な差を示さなかった。プロセスA ACIの腹腔内または皮下注射は、主にIL-4であるサイトカイン分泌を誘導し、レベルは腹腔内注射ではより高い。1  $\mu$ g/mlのTau393-408[pS396/S404]を用いて再刺激すると、10  $\mu$ g/mlのTau393-408[pS396/S404]を用いた再刺激と同等の結果を誘導した。

30

#### 【0314】

非pTau393-408ペプチドを用いた再刺激は、pTauペプチド相対物と同等の結果を誘導した（図18）。この場合も、プロセスA ACIを用いると、主にIL-4であるサイトカイン分泌を誘導する。

#### 【0315】

#### 8.3. 結論

ACI-35ワクチンは、プロセスまたは試験した注射様式とは無関係に、1回の免疫後に強いIgG力価を誘導した。比較すると、ワクチンの皮下注射は、用いたプロセスとは無関係に、より高いIgG抗体力価を生じた。ACI-35プロセスA ACIの腹腔内注射によって、他の群と比較してより低いIgG1およびIgG3力価が得られた。ACI-35の腹腔内注射によって、皮下注射より有意に高いIgM力価が得られた。最後に、全ての群は、非pTau393-408ペプチドに対してIgG力価を有する。

40

#### 【0316】

pTauまたはタウペプチドを用いて再刺激すると、ELISPOT試験においてプロセスA ACIワクチン接種マウスに関して主にIL-4であるサイトカイン産生を誘導した。

#### 【0317】

#### 実施例9：Tau P301Lトランスジェニックマウス（TPLH）におけるタウワクチンの免疫原性

本試験の目的は、TauP301Lトランスジェニックマウスにおいてタウリボソームワクチン（ACI-33、ACI-35、ACI-39およびACI-40）の皮下注射（s.c.）を用いて抗タウワクチン接種の免疫原性を分析することであった。

50

## 【0318】

## 9.1. 方法

9.1.1. TauP301Lトランスジェニックマウス (TPLH)

FVB/Nバックグラウンドを有するホモ接合TauP301Lトランスジェニックマウス (TPLH) を用いて、ACI-33またはACI-35の皮下でのワクチン接種の効能を試験した。これらのマウスは、マウスthy1プロモーターの制御下でP301L変異を有する最も長いヒトタウイソ型を発現する。臨床症状は6~7ヶ月齢で始まり、加齢TPLHマウスは、進行性の神経障害および神経原線維変化 (NFT) の形成を伴う瀕死のタウオパチーを発症する。末期段階では、マウスは体重が減少して、突然死する (おそらく呼吸の問題 (窒息) による、マウスのほとんどは9~11ヶ月齢であり、例外なく12ヶ月齢より前であった)。

10

## 【0319】

9.1.2. ワクチンACI-33およびACI-35の調製

ワクチンを、実施例3に記載されるプロセスAに従って調製した。

## 【0320】

リポソーム懸濁液 (バッチACI-33-081031-AおよびバッチACI-35-081015-A+ACI-35-090402-A) を等分した後、2~8℃で保存した。最終ペプチド/リン脂質のモル比は1:100であった。

## 【0321】

9.1.3. 免疫ACI-33、ACI-39およびACI-40

20

21~31週齢のTPLHマウス (1群8~10匹; 雌性マウス (♀) と雄性マウス (♂) の混合) にワクチンの皮下注射を5回行った (表14)。最初の3回の免疫を、スキーム1に従って各投与 (0日目、13日目、28日目) のあいだを2週間あけて行った。次に動物を1ヶ月に1回、2ヶ月間追加免疫した (91日目および133日目)。初回免疫の1日前 (-1日目)、その後2回目 (27日目) および3回目 (41日目) の免疫後に血液試料を採取した。採血はまた、追加免疫の前、あいだ、および後にも行った (76日目、104日目、135日目)。血清は、試料を一晩凝固させて遠心分離後に、上清を採取することによって調製した。リン酸化タウペプチド特異的IgGおよびIgM抗体力価ならびにIgGアイソタイプパターンを、ELISAによって決定した。非pTau、完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質、およびリン酸化完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質の特異的IgG抗体力価も同様に、ELISAによって決定した。

30

## 【0322】

ACI-35

22~31週齢のTPLHマウス (1群マウス10匹; 雌性マウス (♀) と雄性マウス (♂) の混合) にワクチンの皮下注射を5回行った (表13)。最初の3回の免疫を、スキーム1に従って各投与 (0日目、13日目、27日目) のあいだを2週間あけて行った。次に動物を1ヶ月に1回、2ヶ月間追加免疫した (91日目および133日目)。初回免疫の1日前 (-1日目)、その後2回目 (26日目) および3回目 (40日目) の免疫後に血液試料を採取した。採血はまた、追加免疫の前、あいだ、および後にも行った (75日目、103日目、145日目、155日目)。血清は、試料を一晩凝固させて、遠心分離後に上清を採取することによって調製した。Tau393-408[pS396/pS404]特異的IgGおよびIgM抗体力価ならびにIgGアイソタイプパターンを、ELISAによって決定した。非pTau393-408、完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質、およびリン酸化完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質の特異的IgG抗体力価も同様に、ELISAによって決定した。

40

## 【0323】

(表13) マウスの免疫

| 群 | 動物数<br>および<br>性別 | 処置／<br>容量 <sup>a</sup> | ワクチンのバッチ        | 投与<br>経路 <sup>b</sup> | 用量<br>レベル<br>タウペプ<br>チドの量<br>$\mu\text{g}/\text{用量}^c$ | MPLAの量<br>$\mu\text{g}/\text{用量}^c$ |
|---|------------------|------------------------|-----------------|-----------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 5 ♀              | ACI-33                 | ACI-33-081031-A | s.c.                  | 9                                                      | 12                                  |
|   | 5 ♂              | 0.2 ml                 |                 |                       |                                                        |                                     |
|   | 5 ♀              | PBS                    | N.A.            | s.c.                  | N.A.                                                   | N.A.                                |
|   | 3 ♂              | 0.2ml                  |                 |                       |                                                        |                                     |
| 2 | 5 ♀              | ACI-35                 | ACI-35-081015-A | s.c.                  | 16                                                     | 23                                  |
|   | 5 ♂              | 0.2 ml                 | ACI-35-090402-A |                       | 8                                                      | 27                                  |
|   | 5 ♀              | PBS                    | N.A.            | s.c.                  | N.A.                                                   | N.A.                                |
|   | 5 ♂              | 0.2ml                  |                 |                       |                                                        |                                     |
| 3 | 5 ♀              | ACI-39                 | ACI-39-090202-A | s.c.                  | 9.6                                                    | 28.8                                |
|   | 5 ♂              | 0.2 ml                 |                 |                       |                                                        |                                     |
|   | 5 ♀              | PBS                    | N.A.            | s.c.                  | N.A.                                                   | N.A.                                |
|   | 3 ♂              | 0.2ml                  |                 |                       |                                                        |                                     |
| 4 | 5 ♀              | ACI-40                 | ACI-40-090202-A | s.c.                  | 12                                                     | 24.4                                |
|   | 5 ♂              | 0.2 ml                 |                 |                       |                                                        |                                     |
|   | 5 ♀              | PBS                    | N.A.            | s.c.                  | N.A.                                                   | N.A.                                |
|   | 3 ♂              | 0.2ml                  |                 |                       |                                                        |                                     |

N.A. = 適用していない

a ; 理論的容量

b ; s.c. : 皮下

c ; 分析後に決定した測定量

#### 【0324】

##### 9.1.4. タウペプチド特異的抗体の定量

ACI-33、ACI-39、およびACI-40処置マウスに関して、それぞれ、Tau5-20[pY18]、Tau206-221[pT212, pS214]、およびTau196-211[pS202, pT205]に対する特異的IgG抗体を、血清採取試料6例においてELISAによって決定した。Tau5-20、完全長（アミノ酸441個）タウタンパク質およびリン酸化完全長（アミノ酸441個）タウタンパク質特異的IgGを、-1日目および41日目の血清において決定した。リン酸化タウペプチド特異的IgMおよびIgGアイソタイプ抗体を、41日目の血清採取試料においてELISAによって決定した。

#### 【0325】

ACI-35処置マウスに関して、Tau393-408[pS396/pS404]に対する特異的IgG抗体を、血清採取試料7例においてELISAによって決定した。Tau393-408、完全長（アミノ酸441個）タウタンパク質およびリン酸化完全長（アミノ酸441個）タウタンパク質特異的IgGを、-1日目および40日目の血清において決定した。Tau393-408[pS396/pS404]特異的IgMおよびIgGアイソタイプ抗体を、40日目の血清採取試料においてELISAによって決定した。

#### 【0326】

プレート、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の対応するタウペプチドおよび1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の対応するタウタンパク質によって4°Cで終夜コーティングした。各ウェルを、PBS-0.05%Tween 20によって洗浄して、1%BSAのPBS-0.05%Tween 20溶液によってブロックした後、血清の連続希釈液をプレートに加えて、37°Cで2時間インキュベートした。洗浄後、プレートをアルカリホスファターゼ（AP）コンジュゲート抗マウスIgG総抗体（Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA）、またはアイソタイプ特異的抗体（Pharmingen BD, San Diego, CA, USAから購入した、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）-コンジュゲート抗マウスIgM、AP-コンジュゲート抗マウスIgG1、ビオチンコンジュゲート抗マウスIgG3、Invitrogen CA, USAから購入

10

20

30

40

50

したビオチンコンジュゲート抗マウスIgG2a、ならびにZymed Laboratories, San Francisco, CAから購入したHRP-コンジュゲート抗マウスIgG2b)と共に37℃で2時間インキュベートした。洗浄後、プレートにAPのホスファターゼ基質であるpNPP (パラニトロフェニルリン酸)、またはHRPの基質であるABTS (2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))と共にインキュベートして、ELISAプレートリーダーを用いて405 nmで読み取った。ビオチンコンジュゲート抗体に関しては、プレートをストレプトアビジン-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 中で45分間インキュベートした後、ABTSを用いて検出する補助段階を行った。結果を、IgG、IgGアイソタイプ、およびIgMに関して、非飽和O.D.でのO.D. (吸光度)として表記する。

【0327】

10

#### 9.1.5. トランスジェニック動物からの脳スライスにおけるタウ原線維変化に対する抗タウ抗体の結合 (TAUPIR)

脳スライスにおける原線維変化に対する、ACI-33、ACI-35、ACI-39、およびACI-40ワクチン接種動物の血清中に存在する抗体の結合を、TAUPIR免疫組織化学によって行った。

【0328】

TAUPIR染色は実施例5.1.5のプロトコールに従って行った。

【0329】

#### 9.1.6. ウェスタンブロット (WB)

ウェスタンブロットは、RTで30~60分間のQdot 625ストレプトアビジンコンジュゲート溶液 (Invitrogen, CA, USA) による検出の前に洗浄段階を行ったことを除き、実施例5.1

20

【0330】

#### 9.2. 結果

##### 9.2.1. IgG抗体応答

全てのワクチン構築物は特異的IgG抗体力価を生じる。

【0331】

ACI-33ワクチンは、皮下注射後に特異的IgG応答を誘導した。2回の免疫後(27日目)、IgG応答は安定なままであり、3回目の免疫(41日目)によって増加しなかった(図19、一元配置Anova  $P < 0.001$  d-1対d27、 $P > 0.05$  d27対d41)。抗体力価の減少は76日目で観察され(図19、一元配置Anova  $P < 0.001$  d41対d76)、動物を追加免疫すると再度、104日目で力価はわずかに増加した。

30

【0332】

ACI-35ワクチンは、皮下注射後に抗Tau393-408[pS396/pS404]IgG応答を誘導した。2回の免疫後(26日目)、IgG応答は3回目の免疫によって増加しなかった(40日目)(図20、一元配置Anova  $P < 0.001$  d-1対d26およびd40)。動物を追加免疫すると、103日目で再度力価が増加した(図20、一元配置Anova  $P < 0.05$  d-1対d104および $P < 0.001$  d-1対d145)。

【0333】

ACI-39ワクチンは、皮下注射後に抗Tau206-221[pT212, pS214]IgG応答を誘導した。2回の免疫後(27日目)、IgG応答は安定なままであり、3回目の免疫によって増加しなかった(41日目)(図21、一元配置Anova  $P < 0.001$  d-1対d27/d41)。76日目で力価が低下して、動物を追加免疫すると、力価は3回免疫後と同じレベルに回復した(図21、一元配置Anova  $P < 0.05$  d-1対d76および $P > 0.05$  d41対d104)。

40

【0334】

非飽和O.D.希釈での結果の分析は、飽和1/100倍希釈と同じ結論を示した(一元配置Anova  $P < 0.05$  d-1対d27/d41/d104および $P < 0.05$  d-1対d76)。

【0335】

ACI-40ワクチンは、皮下注射後に抗Tau196-211[pS202, pT205]IgG応答を誘導した。2回の免疫後(27日目)、IgG応答は安定なままであり、3回目の免疫によって増加しなかった(41日目)(図22、一元配置Anova  $P < 0.001$  d-1対d27、 $P > 0.05$  d27対d41)。抗体力価

50

の減少は76日目で観察され（図22、一元配置Anova  $P < 0.001$  d41対d76）、動物を追加免疫すると、104日目で力価は再度わずかに増加した。

#### 【0336】

非飽和0.D.希釈での結果の分析は、飽和1/100倍希釈と同じ結論を示した（一元配置Anova  $P < 0.001$  d-1対d27、 $P > 0.05$  d27対d41および $P < 0.01$  d41対d76）。

#### 【0337】

#### 9.2.2. アイソタイプ分析

ACI-33ワクチン接種は、3回の皮下免疫後、主にIgG2aおよび2bサブクラスの抗体である抗体力価を誘導した（図23）。IgG1、IgG3、およびIgMレベルは低く、IgG2a/2bレベルとIgG1/IgMレベルのあいだに有意差が認められた（図23、一元配置Anova  $P < 0.05$  IgG1対IgG2a/2b、 $P < 0.001$  IgM対IgG2a/2b）。

#### 【0338】

ACI-35ワクチン接種は、3回の皮下免疫後に、主にIgG2aおよび2bサブクラスである抗体力価を誘導した（図24）。IgG1レベルは低く、IgG1とIgG2aのあいだで有意差を示した（図24、一元配置Anova  $P < 0.05$  IgG1対IgG2a）。IgG3およびIgMレベルは低く、IgG2a/2bレベルとIgG3/IgMレベルのあいだで有意差を示した（図24、一元配置Anova  $P < 0.05$  IgG3/IgM対IgG2b、 $P < 0.0001$  IgG3/IgM対IgG2a）。

#### 【0339】

ACI-39ワクチン接種は、3回の皮下免疫後に主にIgG2aおよび2bサブクラスである抗体力価を誘導した（図25）。IgG1、IgG3、およびIgMレベルは、IgG2a/2b力価より有意に低かった（図25、一元配置Anova  $P < 0.05$  IgG2b対IgG1/IgG3、 $P < 0.01$  IgG2a対IgG1/IgG3、 $P < 0.001$  IgG2a/2b対IgM）。

#### 【0340】

ACI-40ワクチン接種は、3回の皮下免疫後に主にIgG2bサブクラスである抗体力価を誘導した（図26、一元配置Anova  $P < 0.05$  IgG2b対IgG2aおよび $P < 0.001$  IgG2b対IgG1/IgG3/IgM）。IgG2a力価はまたIgMより高かった（図26、一元配置Anova  $P < 0.01$  IgG2a対IgM）。

#### 【0341】

#### 9.2.3. 抗体特異性

タウワクチンの3回の皮下注射後に誘導されたIgG力価をまた、異なるタウペプチド（pTauペプチドおよびタウペプチド）、およびタンパク質（抗リン酸化完全長（アミノ酸441個）タウタンパク質＝抗pTauタンパク質および抗完全長（アミノ酸441個）タウタンパク質＝抗タウタンパク質）についても分析した。

#### 【0342】

ACI-33ワクチン接種マウスにおいて、-1日目での採血を対照として用い、各々の異なるコーティングに関して採血前と、Tau5-20[pY18]およびタウタンパク質コーティングに関して3回免疫後に採取した血清とのあいだで差が認められた（図27、一元配置Anova Tau5-20[pY18]に関して $P < 0.001$  d-1対d41、およびタウタンパク質に関して $P < 0.05$  d-1対d41）。

#### 【0343】

ACI-35ワクチン接種マウスにおいて、-1日目の採血を対照として用い、-1日目と40日目のあいだでは、抗Tau393-408[pS396/pS404]力価に限って有意差が認められた（図28、抗Tau393-408[pS396/pS404]力価に関して一元配置Anova  $P < 0.0001$  d-1対d40）。Tau393-408[pS396/pS404]ペプチドに関して得られた40日目の抗体レベルもまた、他の全てのコーティングについて得られたレベルとは有意に異なった（図28、一元配置Anova  $P < 0.0001$  d40 抗Tau393-408[pS396/pS404]対d40 抗Tau393-408/pTauタンパク質/タウタンパク質）。

#### 【0344】

ACI-39ワクチン接種マウスでは、-1日目の採血を対照として用いると、Tau206-221[pT212, pS214]コーティングに限って、免疫前採血と3回の免疫後に採取した血清とのあいだで差が認められた（図29、一元配置Anova Tau206-221[pT212, pS214]に関して $P < 0.001$  d-1対d41）。

10

20

30

40

50

## 【0345】

ACI-40ワクチン接種マウスにおいて、d-1での採血を対照として用いると、Tau196-211[pS202, pT205]およびTau196-211コーティングに関して採血前と3回の免疫後に採取した血清とのあいだで差が認められた（図30、一元配置Anova、Tau196-211[pS202, pT205]に関して $P<0.001$  d-1対d41、Tau196-211に関して $P<0.05$  d-1対d41）。

## 【0346】

マウス血清をTAUPIR実験においてさらに用いて、血清中に存在する抗タウ抗体がタウトランスジェニック動物からの脳スライスにおいて原線維変化を認識できるか否かを決定した。

## 【0347】

異なるマウスからの脳抽出物に関するWBも同様に、マウス血清または全ての型（pTauおよびタウ）のタウの対照抗体Tau-5検出を用いて行った。

## 【0348】

データを以下の表14に要約する。

## 【0349】

（表14）TPLHワクチン接種マウスに関するTAUPIRおよびWB実験の要約

| ワクチン   | TAUPIR<br>(陽性/マウス全体) | ウェスタンブロット<br>(陽性/マウス全体) |
|--------|----------------------|-------------------------|
| ACI-33 | 6/10                 | 3/9                     |
| ACI-35 | 4/10                 | 0/4                     |
| ACI-39 | 7/10                 | 1/5                     |
| ACI-40 | 10/10                | 3/7                     |

## 【0350】

## 9.3. 結論

抗タウ抗体力価を、異なるタウおよびpTauペプチドのみならず、完全長のpTauまたはタウタンパク質に対するその結合に関して分析した。タウリボソーム免疫により、pTauペプチドおよびリン酸化タウタンパク質に特異的に結合するIgG抗体を生じたが、非リン酸化ペプチドおよびタンパク質に対する結合は弱かった。

## 【0351】

IgGアイソタイプに関して、IgG2bおよびIgG3と比較して低いIgG1抗体応答が認められた。低いIgM応答が観察されたが、これは免疫の様式（皮下）に一致する。

## 【0352】

タウワクチン免疫マウスによって生成された抗体の特異性を、TAUPIRにおいて試験した。ほぼ全てのマウス血清が、変異体タウ動物の脳スライスに存在するタウ原線維変化への強い結合を示す。

## 【0353】

実施例10：ACI-33またはACI-35ワクチン接種後のTau P301Lトランスジェニックマウスモデルの効能

本試験の目的は、Tau P301Lトランスジェニックマウスにおいて、ACI-33（Tau5-20[pY18]）またはACI-35（Tau393-408[pS396/pS404]）ワクチンの皮下注射を用いて、抗タウワクチン接種の効能を分析することであった。マウスを5回免疫して、動物が生きているあいだに行ったロータロッド分析によって、行動の変化を分析した。

## 【0354】

## 10.1. 方法

## 10.1.1. ワクチンの調製

ACI-33およびACI-35ワクチンを実施例3のプロトコールに従って調製した。

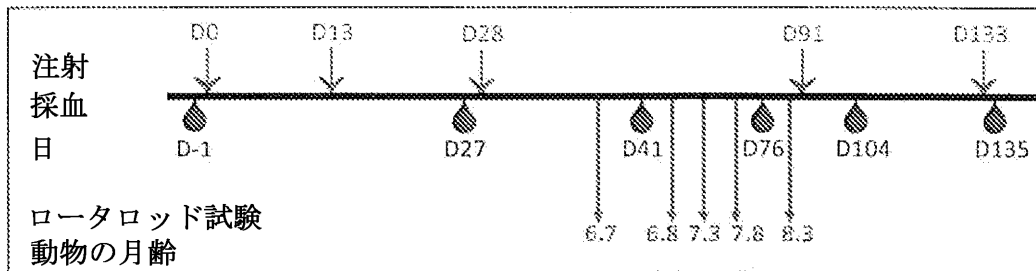
## 【0355】

## 10.1.2. 免疫

動物を、実施例9に記載するプロトコルに従って、ACI-33またはACI-35のいずれかによって免疫した（ACI-33に関してスキーム2およびACI-35に関してスキーム3）。

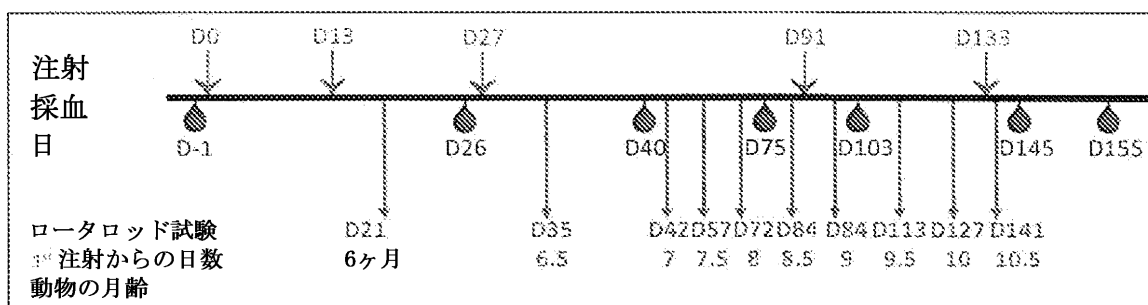
## 【0356】

スキーム2：ACI-33に関する免疫、採血およびロータロッド試験のスケジュール



10

スキーム3：ACI-35に関する免疫、採血およびロータロッド試験のスケジュール



20

## 【0357】

## 10.1.3. 行動（ロータロッド）

動物の運動状態を観察するために、自動ロータロッド試験を行った。マウス5匹を、不透明な仕切りによって隔てられた回転するロータロッド（直径3 cm）上で同時に試験した。試験のあいだ、ロッドは5分間で4~40 rpmに加速する。各マウスに関して、マウスが回転するロッド上に残っている時間を、最大5分として記録した。

## 【0358】

## 10.2. 結果

ACI-33またはPBS処置後のTPLHの運動状態を評価するために、マウスを異なる5回の時期にロータロッド試験に供した（図31）。7.3か月齢でACI-33とPBS注射動物のあいだに有意差が観察された（図31、二元配置Anova 7.3ヶ月齢に関して $P < 0.001$ ）。マウス運動行動に及ぼすACI-33のこの効果は、7.8ヶ月目でのマウス血清中の抗Tau5-20[pY18]抗体力価と相関した（図32、Spearman  $r$   $P < 0.001$ ）。

## 【0359】

ACI-35またはPBS処置後のTPLHの運動状態を評価するために、マウスをロータロッド試験に供した（図33）。処置群と対照群のあいだで有意差は認められなかったが、マウスが9.5か月齢になった際に行ったロータロッド試験において、ACI-35の効能に関する傾向を観察することができた（図33、Mann-Whitney検定、9.5か月齢で $P = 0.1905$ ）。

## 【0360】

## 10.3. 結論

TPLHマウスにACI-33ワクチンを接種すると、PBS注射動物と比較してロータロッド試験の際のマウス運動欠損に対して有益な効果を示した。この正の効果は、マウス血清中の抗Tau抗体力価と相関した。

## 【0361】

TPLHマウスにACI-35ワクチンを接種すると、PBS注射動物と比較して9.5ヶ月でロータロッド試験の際のマウス運動欠損に対して効能の傾向を示した。

## 【0362】

実施例11：雌性ヌードマウスにおける抗pTau抗体応答

30

40

50



本試験の目的は、雌性ヌードマウスにおける、ACI-33 (Tau5-20[pY18]) ワクチンの注射によって誘導された抗pTau抗体応答を評価することであった。ヌードマウスは、Foxn1<sup>u</sup>変異を有し、適切に機能する胸腺を欠如することにより、T細胞機能が低減している。このように、本発明の目的は、ACI-33によって誘導された抗体応答が、T細胞非依存的であるか否かを分析することであった。

#### 【0363】

11または13週齢のC57BL/6バックグラウンドのヌードマウスおよび対応する野生型の同腹子に皮下注射した。マウスを2週間の間隔をあけて3回免疫して、各免疫の1週間後に採血を行った。総抗pTau (Tau5-20[pY18]) ペプチドIgG応答を、ELISAによって測定した。その上、抗体応答のアイソタイプパターンを3回の免疫後に分析して、IgGの異なるサブクラスの分布のみならずIgMの分布を評価した。対応する非pTau(Tau5-20)、完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質およびリン酸化完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質に対する抗体力価も同様に分析した。

#### 【0364】

ヌードマウスにTヘルパー細胞が存在しないことを確認するために、CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>細胞の百分率を蛍光活性化セルソーター (FACS) によって評価した。

#### 【0365】

### 11.1. 方法

#### 11.1.1. ワクチンACI-33の調製

ACI-33ワクチンを実施例3に従って調製した。

#### 【0366】

リポソーム懸濁液 (バッチACI-33-090818-A) を等分した後2~8℃で保存した。最終のペプチド/リン脂質モル比は1:100であった。ワクチンをJSW Life Sciences GmbH (Austria) に送付した。

#### 【0367】

#### 11.1.2. 免疫

C57BL/6バックグラウンドを有するJSW Life Sciences GmbHヌードマウス (B6.Cg-Foxn1nu/J) および対応する同腹子 (♀マウス6匹/群) に、表15に従って各投与のあいだを2週間あけて、ACI-33の皮下注射を3回行った (0日目、14日目、28日目)。顔面静脈/動脈から血漿試料を、最初の注射の7日前および2、4、7、21、35、および56日後に採取した。Tau5-20[pY18]特異的IgGおよびIgM抗体力価ならびにIgGアイソタイプパターンを、ELISAによって決定した。非pTau5-20、完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質、およびリン酸化完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質に関する特異的IgG抗体力価も同様に、ELISAによって決定した。血液試料をまたFACS分析のために-7日目に採取して、CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>細胞の百分率を決定した。

#### 【0368】

#### 11.1.3. タウペプチド特異的抗体の定量

5つの血清採取試料 (2日目、7日目、21日目、35日目、および56日目) 中のTau5-20[pY18]に関する特異的IgG抗体を、ELISAによって測定した。Tau5-20、完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質およびリン酸化完全長 (アミノ酸441個) タウタンパク質特異的IgGを、35日目の血清において決定した。Tau5-20[pY18]特異的IgMおよびIgGアイソタイプ抗体を、35日目の血清採取試料においてELISAによって決定した。プレートに、10 μg/mlの対応するタウペプチドおよび1 μg/mlの対応するタウタンパク質によって、4℃で終夜コーティングした。各ウェルをPBS-0.05%Tween 20によって洗浄して、1%BSAのPBS-0.05%Tween 20溶液によってブロックした後、血清の連続希釈液をプレートに加えて、37℃で2時間インキュベートした。洗浄後、プレートをアルカリホスファターゼ (AP) コンジュゲート抗マウスIgG総抗体 (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA)、またはアイソタイプ特異的抗体 (Pharmingen BD, San Diego, CA, USAから購入した、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) -コンジュゲート抗マウスIgM、AP-コンジュゲート抗マウスIgG1、ビオチンコンジュゲート抗マウスIgG3、Invitrogen CA, USAから購入したビオチンコンジュゲート抗

マウスIgG2a、ならびにZymed Laboratories, San Francisco, CAから購入したHRP-コンジュゲート抗マウスIgG2b)と共に37℃で2時間インキュベートした。洗浄後、プレートにAPのホスファターゼ基質であるpNPP (パラニトロフェニルリン酸)、またはHRPの基質であるABTS (2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))と共にインキュベートして、ELISAプレートリーダーを用いて405 nmで読み取った。ビオチンコンジュゲート抗体に関しては、プレートをストレプトアビジン-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 中で45分間インキュベートした後、ABTSを用いて検出する補助段階を行った。結果を、IgG、IgGアイソタイプ、およびIgMに関して非飽和O.D.でのO.D. (吸光度)として表記する。

【0369】

10

#### 11.1.4. CD3+/CD4+細胞の定量

マウス血液試料を塩化アンモニウムによって透明になるまで溶解した後、400×gで7分間遠心分離させ、EDTAを含有するPBS中に沈殿物を再懸濁した。細胞をCD16/CD32ブロッキング試薬によってブロックした後、CD4 (PEコンジュゲート) およびCD3 (PE-Cy5) 抗体によって4℃で30分間染色した。試料は、PBSによって洗浄し、固定液 (BD FACS Flow中で1:40に希釈したDB Cellfix) に再懸濁させた後、BD FACS Caliburサイトメーターにおいて獲得した。CD3+およびCD4+ (T-ヘルパー細胞) に関して染色陽性であるゲート通過細胞の百分率を評価した。

【0370】

(表15) マウスの免疫

20

| 群 | 動物数<br>および<br>性別 | 処置/<br>容量 <sup>a</sup> | ワクチン<br>のバッチ            | プロセス  | 投与経路 <sup>b</sup> | 用量<br>レベル<br>T1の量<br>μg/<br>用量 <sup>c</sup> | MPLAの量<br>μg/用量 <sup>c</sup> |
|---|------------------|------------------------|-------------------------|-------|-------------------|---------------------------------------------|------------------------------|
| 1 | 6 ♀<br>ヌードマウス    | ACI-33<br>0.2 ml       | ACI-33-<br>090818<br>-  | ACI-A | s.c.              | 12.6                                        | 15.8                         |
|   |                  |                        | A                       |       |                   |                                             |                              |
| 2 | 6 ♀<br>野生型マウス    | ACI-33<br>0.2ml        | ACI-33-<br>090818<br>-A | ACI-A | s.c.              | 12.6                                        | 15.8                         |

30

a; 理論的容量

b; s.c.: 皮下

c; 分析後に決定した測定量

40

【0371】

#### 11.2. 結果

##### 11.2.1. 全般的観察

動物のいずれも試験中に死亡せず、処置による副作用は報告されなかった。全てのB6.Cg-Foxn1nu/J動物に関して、典型的なヌード表現型が存在したが、野生型 (wt) 同腹子は正常な毛を有した。

【0372】

##### 11.2.2. CD3+/CD4+細胞の定量

CD3+/CD4+染色後のFACS分析によって、野生型動物と比較してヌードマウスにおいてTヘルパー細胞 (CD3+/CD4+細胞) 数が有意に低減していることが明らかとなった (図34)。

50

## 【0373】

## 11.2.3. 免疫応答の分析

ACI-33ワクチン接種によって生成された抗Tau5-20[pY18]IgG力価を分析して、野生型およびヌードマウスにおいてワクチンの免疫原性を調べた。ヌードマウスの抗Tau5-20[pY18]IgG力価を分析して、ACI-33によって誘導された応答がT細胞機能とは無関係であるか否かを調べた。ワクチンは、ヌードマウスにおいて抗Tau5-20[pY18]IgG応答を誘導して、調べた全ての時点で、野生型またはヌードマウスにおいてACI-33によって誘導された抗体応答に有意差は認められなかった（図35；二元配置ANOVA、ヌードマウスおよび野生型マウスのあいだで全ての採血に関して $P < 0.05$ ）。

## 【0374】

ACI-33ワクチンは、双方のタイプのマウスにおいて、皮下注射後に2回免疫後をピークとする（27日目）抗Tau5-20[pY18]IgG応答を誘導した（図35）。

## 【0375】

ワクチンの3回皮下免疫後に2つのタイプのマウスのあいだで有意差がなかったことから、ACI-33ワクチン接種は、ヌードマウスと野生型マウスのあいだで、異なるIgGサブクラスおよびIgMに関して同じプロファイルの抗体力価を誘導した（図36、一元配置ANOVA  $P > 0.05$  IgG1ヌード対IgG1野生型、IgG2a/2bヌード対IgG2a/2b野生型、IgG3ヌード対IgG3野生型、IgMヌード対IgM野生型）。いずれのマウスタイプにおいても、IgG2bおよびIgMと比較してIgG1レベルは有意に低かった（図36、一元配置ANOVA、ヌードマウス： $P < 0.01$  IgG1対IgG2bまたはIgM；野生型マウス： $P < 0.05$  IgG1対IgG2bまたはIgM）。さらに、ヌードマウスは、IgG3と比較してIgG1の有意により低いレベルを示し（図36、一元配置ANOVA、ヌードマウス： $P < 0.05$  IgG1対IgG3）、IgG2aレベルもまた、IgG2b、IgG3、およびIgMと比較して低かった（図36、一元配置ANOVA、ヌードマウス： $P < 0.05$  IgG2a対IgG2b、IgG3またはIgM）。

## 【0376】

ACI-33の3回皮下注射後に誘導されたIgG力価をまた、異なるタウペプチド（抗Tau5-20[pY18]および抗Tau5-20）およびタンパク質（抗リン酸化完全長（アミノ酸441個）タウタンパク質＝抗pTauタンパク質および抗完全長（アミノ酸441個）タウタンパク質＝抗タウタンパク質）についても分析した（図37）。野生型マウスとヌードマウスのあいだで、異なるペプチドおよびタンパク質に関して力価の差は認められなかった。ヌードマウス群において、抗Tau5-20[pY18]は抗Tau5-20力価より高く、有意差が認められた（図37、一元配置ANOVA、 $P < 0.05$  抗Tau5-20[pY18]力価対抗Tau5-20力価）。

## 【0377】

## 11.3. 結論

ヌードマウスにおけるCD3+およびCD4+細胞の低い百分率にもかかわらず、ACI-33ワクチンは、強い抗Tau5-20[pY18]IgG応答を誘導した。抗体応答の持続およびIgGアイソタイプ分布は、野生型およびヌードマウスにおいて類似しており、これらのパラメータがACI-33ワクチン接種の状況においてT細胞に依存しないことを示唆している。免疫コンピテントマウスと比較すると、ACI-33免疫は、T細胞欠損マウスにおいて類似のIgGプロファイルを有する同一の抗体力価および動態を誘導した。さらに、異なるタウペプチドおよびタンパク質に対する抗体力価は、免疫コンピテントマウスとT細胞欠損マウスのあいだで類似していた。これらのデータは、ACI-33がヌードマウスと野生型マウスの双方において、T細胞非依存的抗体応答を誘導することを示した。

## 【0378】

参考文献

10

20

30

40

- Alving et al.,(1992) Infect. Immun. 60:2438-2444
- Asuni et al., (2007) J Neurosc. 27 (34), 9115-29
- Hodgson et al.,(1991) Bio/Technology, 9:421
- Khaw, B. A. et al. (1982) J. Nucl. Med. 23:1011-1019
- Lewis et al., (2000) Nature Genetics, 25 :402-405
- Masliah et al., (2005) Neuron, 46(6), 857-68
- Muhs et al., (2007) Proc Natl Acad Sci USA, 104(23), 9810-5
- Muyllaert et al, (2006) Rev Neurol, 162(10), 903-907
- Muyllaert et al, (2008) Genes Brain Behav., Suppl. 1, 57-66
- Nicolau et. al. (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337
- Nicoll et al., (2003) Nature Med, 9, 448-452
- Oddo et al., (2004) Neuron, 43, 321-332
- Queen et al.,(1989) Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032
- Ribe et al., (2005) Neurobiol Dis, 20(3), 814-22
- Roberson et al, (2007) Science, 316 (5825), 750-4
- Rosenmann et al., (2006) Arch Neurol, 63(10), 1459-67
- Rousseaux et al. Methods Enzymology, (1986) , Academic Press 121:663-69
- Terwel et al., (2006) J Biol Chem, 280, 3963-3973
- Terwel et al, (2008) Am J pathol., 172(3), 786-98
- Urushitani et al., (2007) Proc. Natl Acad Sci USA, 104(79), 2495-500
- Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259 – 270

10

20

30

## 【 0 3 7 9 】

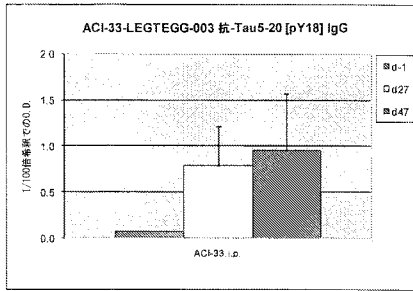
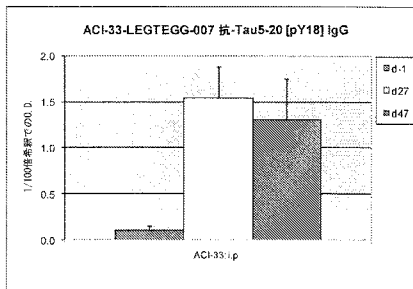
## 寄託

以下のハイブリドーマ細胞株を、ブダペスト条約の規定に基づいて"Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, Inhoffenstr. 7B, D-28124 BraunschweigにAC IMMUNE S.A.の名称で寄託した。

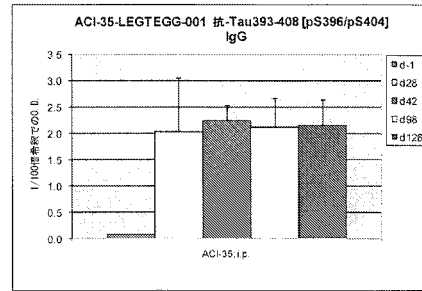
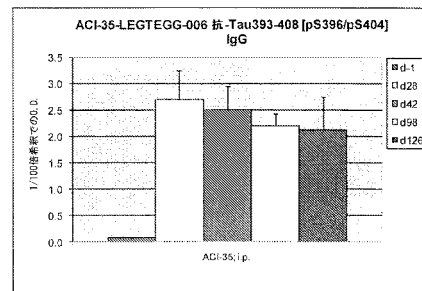
| ハイブリドーマの名称 | アクセッション番号   | 寄託日        |
|------------|-------------|------------|
| ACI-41-Ab1 | DSM ACC3043 | 2010年3月3日  |
| 2B6        | DSM ACC3044 | 2010年3月10日 |
| 3A8        | DSM ACC3045 | 2010年3月10日 |
| 4C1        | DSM ACC3046 | 2010年3月10日 |
| 5D10A3     | DSM ACC3047 | 2010年3月10日 |
| 6C10       | DSM ACC3048 | 2010年3月10日 |
| 6H1        | DSM ACC3049 | 2010年3月10日 |
| 7C2        | DSM ACC3050 | 2010年3月10日 |

40

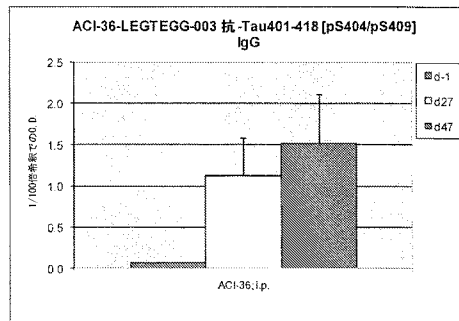
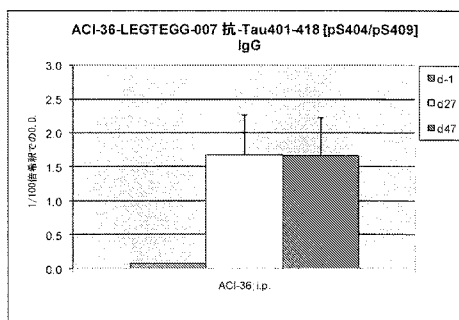
【図 1】

**a****b**

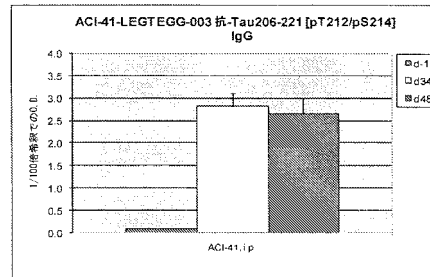
【図 2】

**a****b**

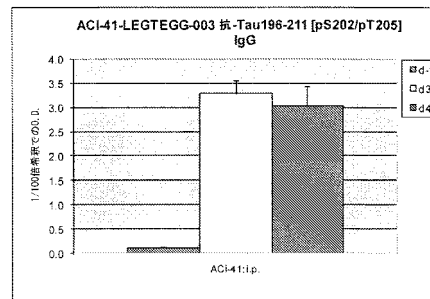
【図 3】

**a****b**

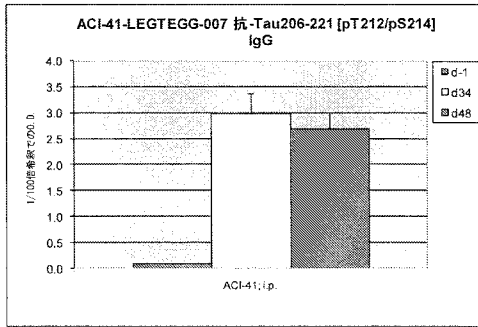
【図 4 a】



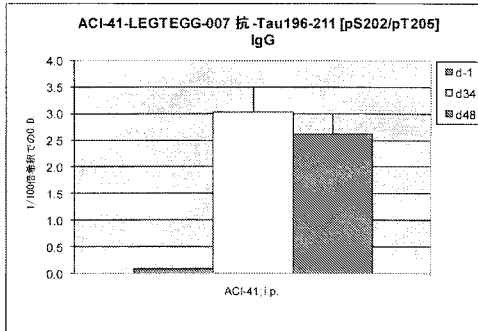
【図 4 b】



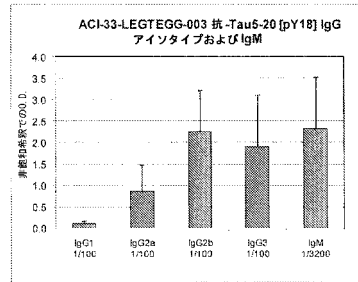
【図 4 c】



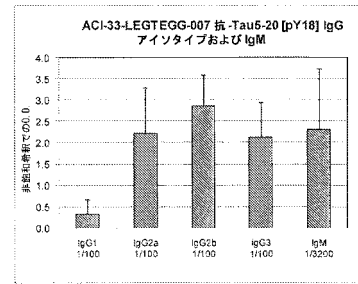
【図 4 d】



【図 5】

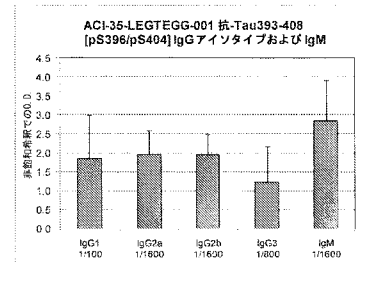


a

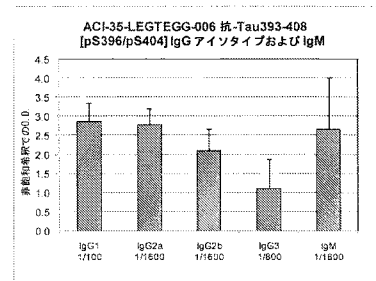


b

【図 6】

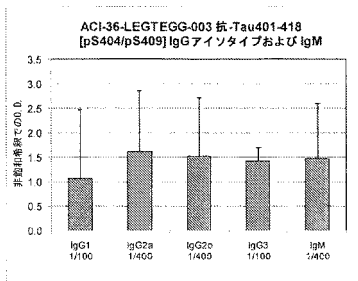


a

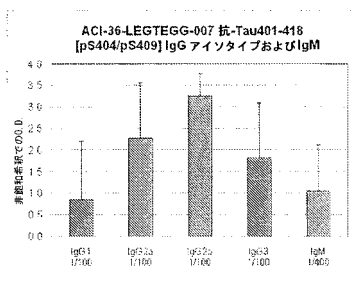


b

【図 7】

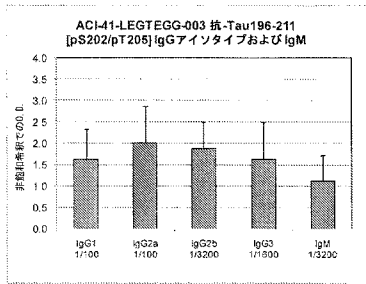


a

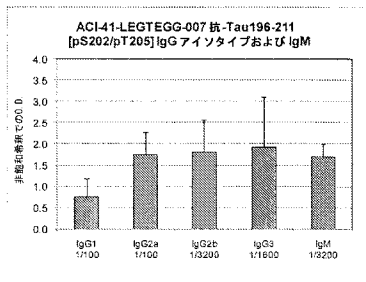


b

【図 8】

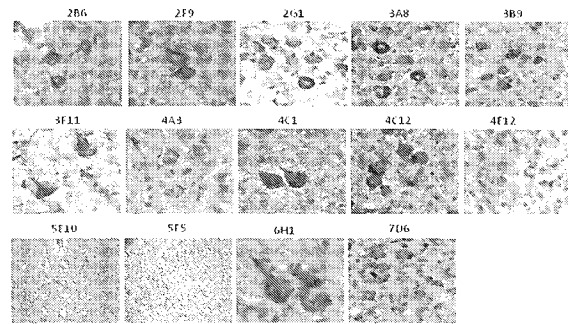


a

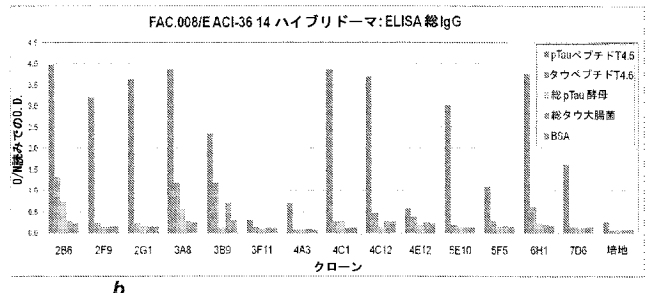


b

【図 9】

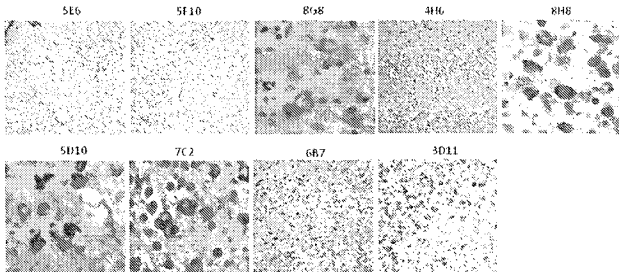


a

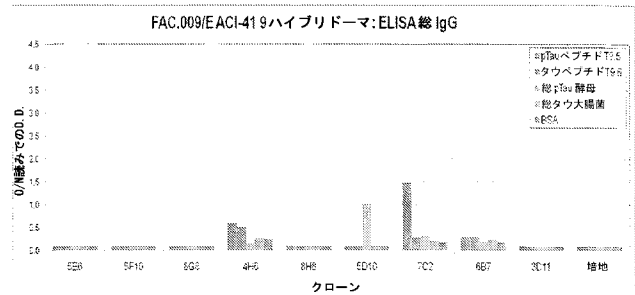


h

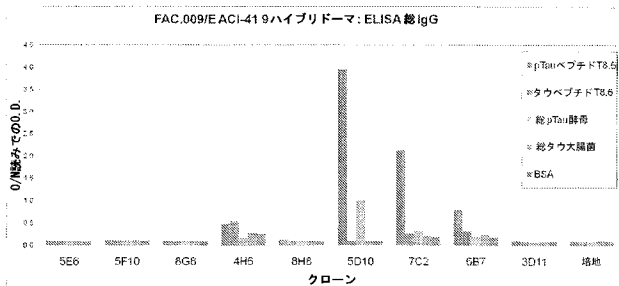
【図 10 a】



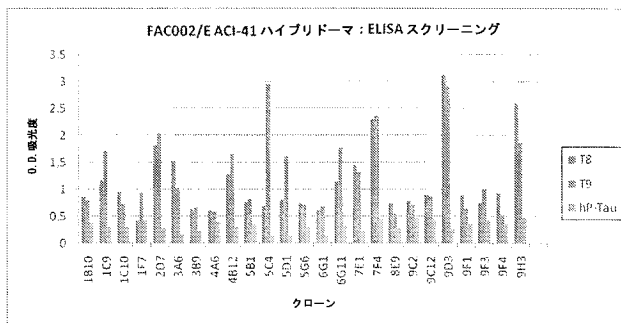
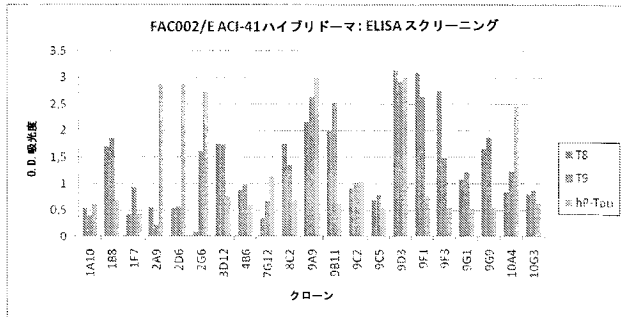
【図 10 c】



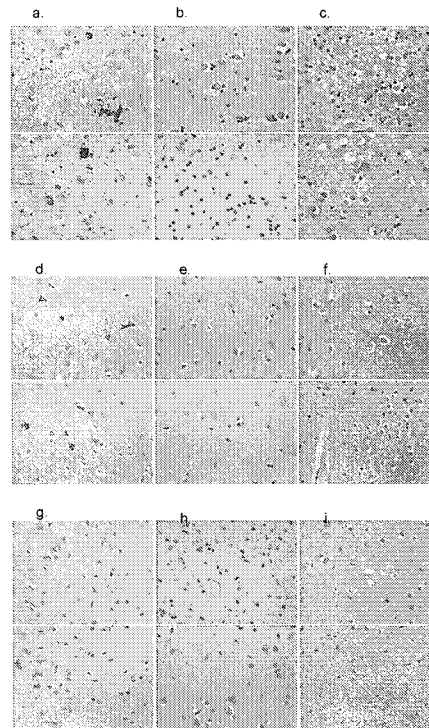
【図 10 b】



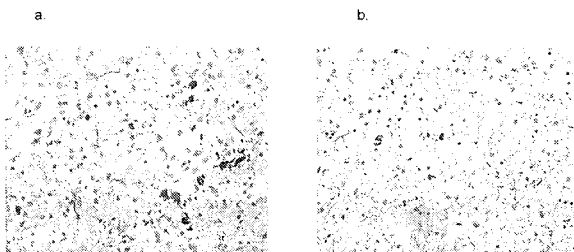
【図 1 1】



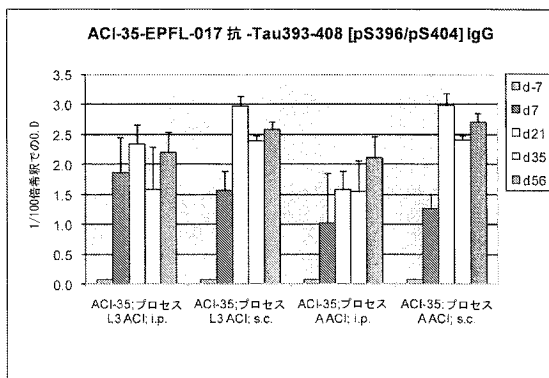
【図 1 2】



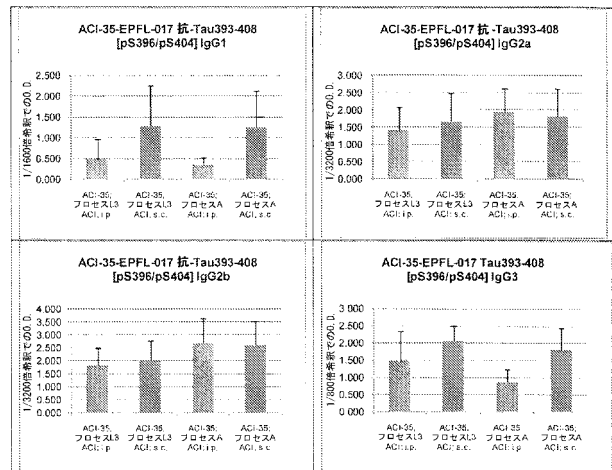
【図 1 3】



【図 1 4】

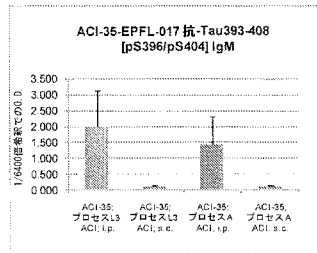


【図 1 5】

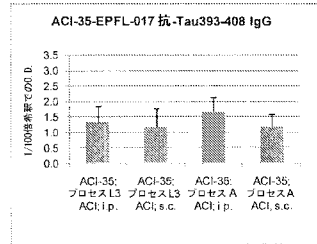




【図 16】

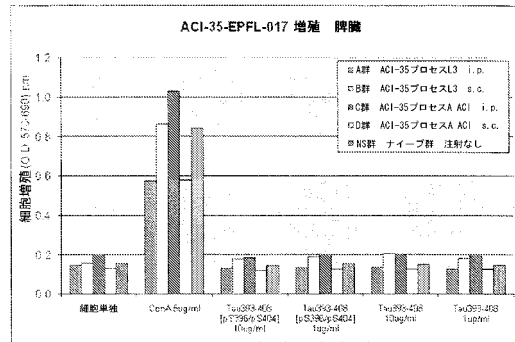


a

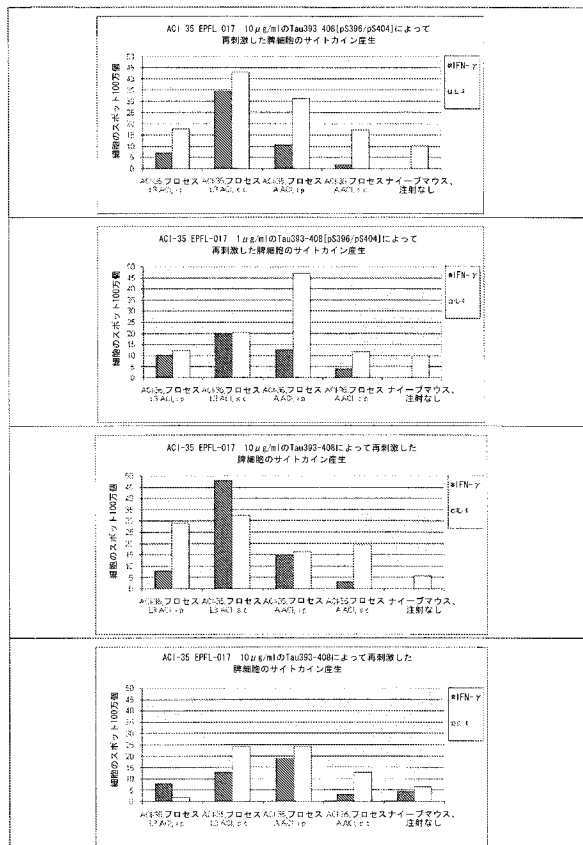


b

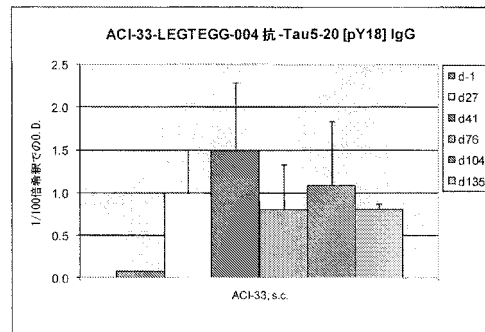
【図 17】



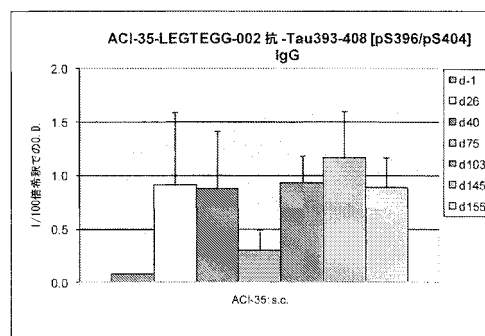
【図 18】



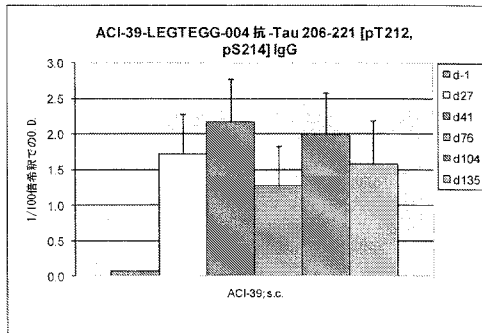
【図 19】



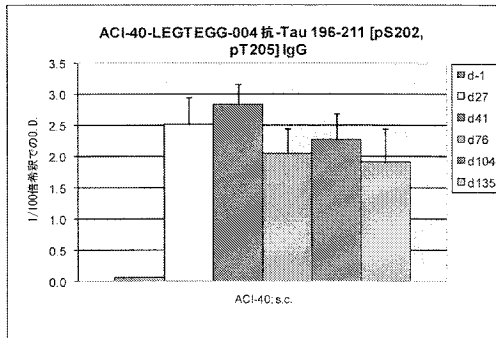
【図 20】



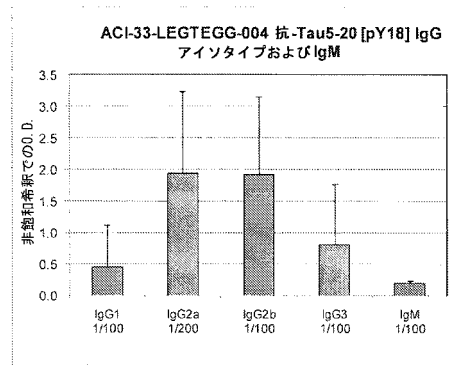
【図 2 1】



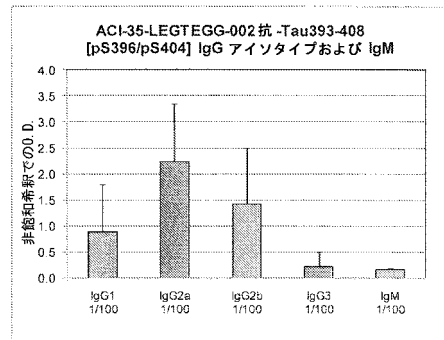
【図 2 2】



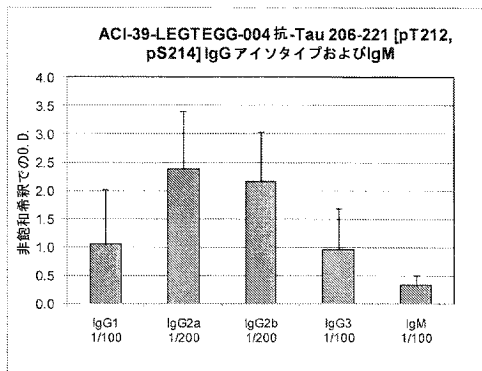
【図 2 3】



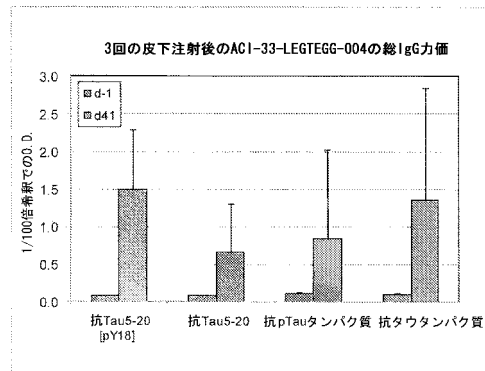
【図 2 4】



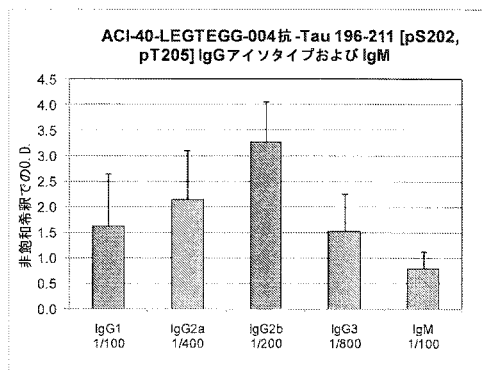
【図 2 5】



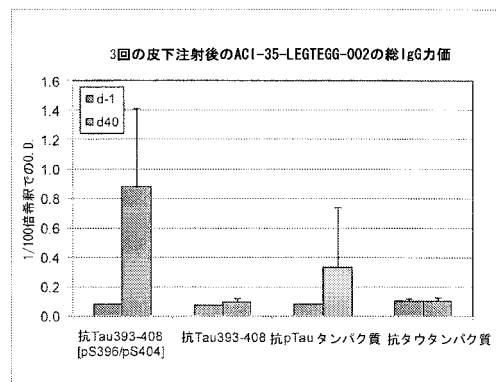
【図 2 7】



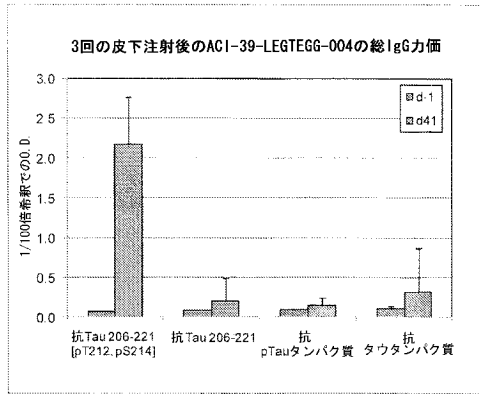
【図 2 6】



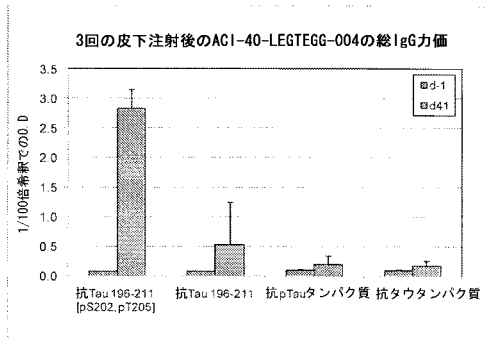
【図 2 8】



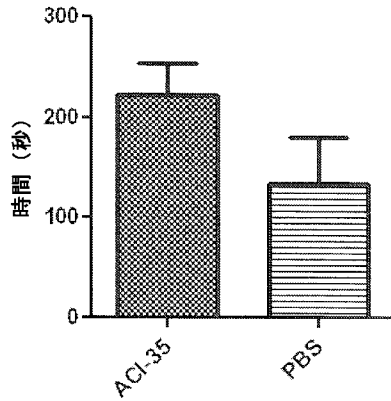
【図 29】



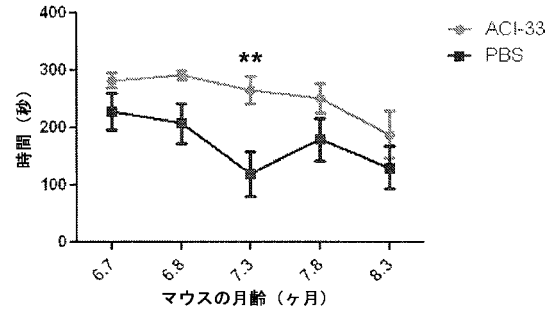
【図 30】



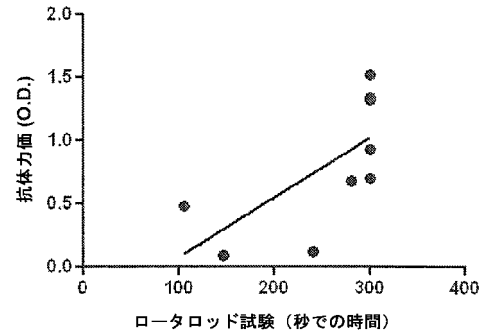
【図 33】



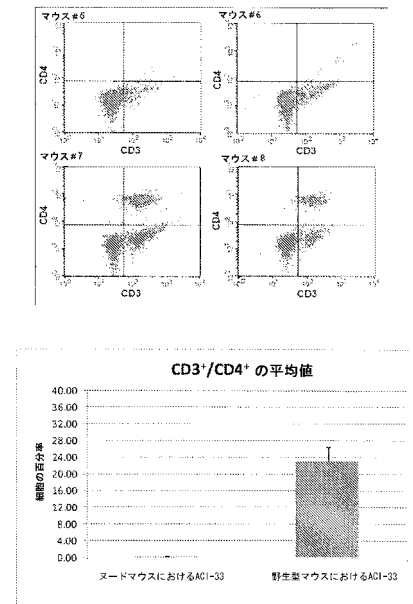
【図 31】



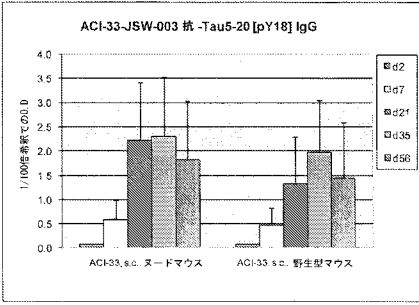
【図 32】



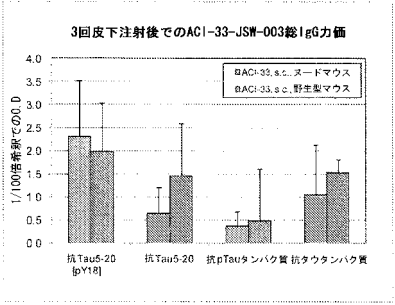
【図 34】



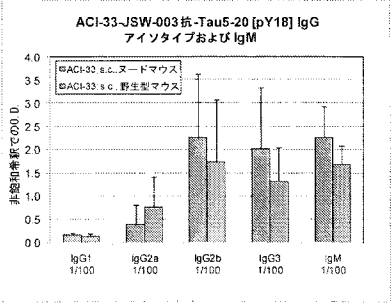
【図 3 5】



【図 3 7】



【図 3 6】



【配列表】

2012522754000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/054418

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/00 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/53  
ADD.

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No.                                                              |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| X         | US 2008/050383 A1 (SIGURDSSON EINAR [US]<br>ET AL) 28 February 2008 (2008-02-28)                                                                                                                                                                                                                                         | 1-14, 21,<br>22, 28,<br>29, 36,<br>37,<br>44-61,<br>68-71,<br>74-90,<br>94, 95, 97 |
| Y         | page 1, paragraph 7 - paragraph 10<br>page 4, paragraph 23 - paragraph 26<br>page 11, paragraph 33<br>page 11, paragraph 36 - paragraph 37;<br>table I<br>page 12, paragraph 39<br>page 13, paragraph 49 - page 14, paragraph<br>57<br>page 15, paragraph 63 - page 16, paragraph<br>65; sequences 3, 6<br>-----<br>-/-- | 44-54,<br>79-87                                                                    |

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

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 2010

Date of mailing of the international search report

01/10/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/054418

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                      |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                | Relevant to claim No.                                                                                |
| X                                                    | WO 96/20218 A1 (EINSTEIN COLL MED [US]; GHANBARI HOSSEIN A [US]; DAVIES PETER [US]; WO) 4 July 1996 (1996-07-04)                                                                                                  | 55,57,<br>59,70,<br>71,77,<br>78,<br>82-87,<br>89,95<br>82-87                                        |
| Y                                                    | page 7, line 30 - page 9, line 5<br>page 13, line 4 - line 36; table A<br>page 16, line 19 - line 22<br>-----                                                                                                     |                                                                                                      |
| X                                                    | WO 2005/080986 A1 (UNIV IOWA RES FOUND [US]; LEE GLORIA [US])<br>1 September 2005 (2005-09-01)                                                                                                                    | 55-59,<br>70,71,<br>76-78,<br>82-87,<br>89,95<br>82-87                                               |
| Y                                                    | page 2, line 10 - page 3, line 7<br>page 4, line 11 - page 6, line 6; examples 3, 9, 11<br>-----                                                                                                                  |                                                                                                      |
| X                                                    | US 2005/261475 A1 (TSENG HUANG-CHUN [US] ET AL) 24 November 2005 (2005-11-24)<br>page 10, paragraph 84 - page 11, paragraph 86; table 1; sequence 28<br>-----                                                     | 88                                                                                                   |
| X                                                    | WO 2007/068105 A1 (ROBARTS RES INST [CA]; STRONG MICHAEL [CA])<br>21 June 2007 (2007-06-21)                                                                                                                       | 1-12,15,<br>19,<br>22-24,<br>26,30,<br>34,38,<br>42,<br>55-61,<br>68,69,<br>74-90,<br>94,97<br>44-54 |
| Y                                                    | page 15, paragraph 46 - page 23, paragraph 52; example 2; table 1; sequence 2<br>-----                                                                                                                            |                                                                                                      |
| X                                                    | WO 98/22120 A1 (WISTAR INST [US]; UNIV PENNSYLVANIA [US]; OTVOS LASZLO [US]; HOFFMANN) 28 May 1998 (1998-05-28)<br><br>page 4, line 1 - line 24<br>page 9, line 1 - page 14, line 23;<br>sequences 12-22<br>----- | 1-12,16,<br>23,31,<br>39,<br>44-59,<br>76-89                                                         |
| X                                                    | US 2002/086009 A1 (ISHIGURO KOICHI [JP] ET AL) 4 July 2002 (2002-07-04)                                                                                                                                           | 1-12,20,<br>23,27,<br>35,43,<br>55-59,<br>76-89<br>44-54                                             |
| Y                                                    | page 1, paragraph 8 - page 3, paragraph 32; examples 8-10; sequence 12<br>-----<br>-/--                                                                                                                           |                                                                                                      |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/054418

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                              |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No.                                        |
|                                                      | & WO 97/34145 A1 (MITSUBISHI CHEM CORP [JP]; ISHIGURO KOICHI [JP]; SATO KAZUKI [JP]; PAR) 18 September 1997 (1997-09-18)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                              |
| X                                                    | US 7 408 027 B1 (MANDELKOW EVA-MARIA [DE] ET AL) 5 August 2008 (2008-08-05)<br><br>column 1, line 6 - line 19<br>column 3, line 44 - column 4, line 34<br>column 7, line 13 - line 44<br>column 7, line 55 - column 8, line 47<br>column 9, line 39 - line 55<br>column 12, line 37 - line 50; figure 3; sequence 28                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1,2,12,<br>18,22,<br>25,33,<br>41,<br>44-59,<br>76-89        |
| X                                                    | US 5 843 779 A (VANDERMEEREN MARC [BE] ET AL) 1 December 1998 (1998-12-01)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1-12,18,<br>22,25,<br>33,41,<br>55-59,<br>76-78,<br>82,86-89 |
| Y                                                    | column 4, line 57 - column 6, line 61<br>column 7, line 45 - column 9, line 36<br>column 18, line 50 - column 19, line 21; sequence 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 44-54,<br>79-81                                              |
| A                                                    | ASUNI AYODEJI A ET AL: "Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 27, no. 34, August 2007 (2007-08), pages 9115-9129, XP002589887 ISSN: 0270-6474 cited in the application<br>* abstract<br>page 9116, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3<br>page 9116, right-hand column, paragraph 5<br>page 9118, left-hand column, paragraph 3<br>page 9119, right-hand column, paragraph 2 - page 9120, right-hand column, paragraph 3<br>page 9122, right-hand column, paragraph 1 - paragraph 2<br>page 9123, right-hand column, last paragraph - page 9127, right-hand column, last paragraph<br><br>-----<br>-/-- | 1-13,21,<br>28,36,<br>44-59,<br>70,71,<br>76-89,95           |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/054418

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Relevant to claim No.                                         |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| A         | <p>MUHS ANDREAS ET AL: "Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice"<br/>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 104, no. 23, June 2007 (2007-06), pages 9810-9815, XP002542049<br/>ISSN: 0027-8424<br/>cited in the application<br/>* abstract<br/>page 9810, right-hand column, paragraph 2<br/>- page 9811, left-hand column, paragraph 1<br/>page 9811, right-hand column, paragraph 2<br/>- page 9813, right-hand column, paragraph 2<br/>page 9814, left-hand column, paragraph 3</p> | <p>1-13,21,<br/>28,36,<br/>44-59,<br/>70,71,<br/>76-89,95</p> |



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2010/054418**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2010 /054418

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 13, 21, 28, 36, 70, 71, 95(completely); 1-12, 44-59, 76-89(partially)

Tau antigenic peptide of SEQ ID NO:2 (tau residues 5-20) and the peptide bound to a carrier; fragments and analogues thereof; antibodies recognizing the same; medical and diagnostic uses thereof; hybridoma 6C10 DSM ACC3048

---

2. claims: 14, 29, 37(completely); 1-12, 22, 44-61, 68, 69, 74-90, 94, 97(partially)

Tau antigenic peptide of SEQ ID NO:3 (tau residues 206-221) and the peptide bound to a carrier; fragments and analogues thereof; antibodies recognizing the same; medical and diagnostic uses thereof; hybridomas ACI-41-Abl DSM ACC3043, 5D10A3 DSM ACC3047, 7C2 DSM ACC3050

---

3. claims: 15, 30, 38(completely); 1-12, 22, 44-61, 68, 69, 74-90, 94, 97(partially)

Tau antigenic peptide of SEQ ID NO:4 (tau residues 196-211) and the peptide bound to a carrier; fragments and analogues thereof; antibodies recognizing the same; medical and diagnostic uses thereof; hybridomas ACI-41-Abl DSM ACC3043, 5D10A3 DSM ACC3047, 7C2 DSM ACC3050

---

4. claims: 16, 31, 39(completely); 1-12, 23, 44-59, 76-89(partially)

Tau antigenic peptide of SEQ ID NO:5 (tau residues 393-408) and the peptide bound to a carrier; fragments and analogues thereof; antibody recognizing the same; medical and diagnostic uses thereof; cell line producing such antibody

---

5. claims: 17, 32, 40, 62-67, 72, 73, 91-93, 96(completely); 1-12, 24, 44-59, 76-89(partially)

Tau antigenic peptide of SEQ ID NO:6 (tau residues 401-418) and the peptide bound to a carrier; fragments and analogues thereof; antibody recognizing the same; medical and diagnostic uses thereof; hybridomas 2B6 DSM ACC3044, 3A8 DSM ACC3045, 4C1 DSM ACC3046, 6H1 DSM ACC3050

---

6. claims: 18, 25, 33, 41(completely); 1-12, 22, 44-59, 76-89(partially)

Tau antigenic peptide of SEQ ID NO:7 (tau residues 200-216)

International Application No. PCT/EP2010 /054418

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

and the peptide bound to a carrier; fragments and analogues thereof; antibody recognizing the same; medical and diagnostic uses thereof; cell line producing such antibody  
---

7. claims: 19, 26, 34, 42(completely); 1-12, 24, 44-59, 76-89(partially)

Tau antigenic peptide of SEQ ID NO:8 (tau residues 407-418) and the peptide bound to a carrier; fragments and analogues thereof; antibody recognizing the same; medical and diagnostic uses thereof; cell line producing such antibody  
---

8. claims: 20, 27, 35, 43(completely); 1-12, 23, 44-59, 76-89(partially)

Tau antigenic peptide of SEQ ID NO:9 (tau residues 399-408) and the peptide bound to a carrier; fragments and analogues thereof; antibody recognizing the same; medical and diagnostic uses thereof; cell line producing such antibody  
---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/054418

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2008050383 A1                          | 28-02-2008          | NONE                       |                     |
| WO 9620218 A1                             | 04-07-1996          | NONE                       |                     |
| WO 2005080986 A1                          | 01-09-2005          | NONE                       |                     |
| US 2005261475 A1                          | 24-11-2005          | NONE                       |                     |
| WO 2007068105 A1                          | 21-06-2007          | NONE                       |                     |
| WO 9822120 A1                             | 28-05-1998          | AU 5508798 A               | 10-06-1998          |
| US 2002086009 A1                          | 04-07-2002          | WO 9734145 A1              | 18-09-1997          |
| US 7408027 B1                             | 05-08-2008          | US 2002188106 A1           | 12-12-2002          |
| US 5843779 A                              | 01-12-1998          | AT 165866 T                | 15-05-1998          |
|                                           |                     | AU 690092 B2               | 23-04-1998          |
|                                           |                     | AU 5809794 A               | 04-07-1994          |
|                                           |                     | DE 69318420 D1             | 10-06-1998          |
|                                           |                     | DE 69318420 T2             | 28-01-1999          |
|                                           |                     | DK 673418 T3               | 01-03-1999          |
|                                           |                     | WO 9413795 A1              | 23-06-1994          |
|                                           |                     | ES 2118373 T3              | 16-09-1998          |
|                                           |                     | JP 2879975 B2              | 05-04-1999          |
|                                           |                     | JP 8502898 T               | 02-04-1996          |

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. |       |           | F I           | テーマコード (参考) |   |
|-------------|-------|-----------|---------------|-------------|---|
| A 6 1 K     | 47/12 | (2006.01) | A 6 1 K 47/12 | 4 C 0 8 5   |   |
| A 6 1 K     | 47/34 | (2006.01) | A 6 1 K 47/34 | 4 H 0 4 5   |   |
| A 6 1 K     | 47/48 | (2006.01) | A 6 1 K 47/48 |             |   |
| A 6 1 K     | 47/14 | (2006.01) | A 6 1 K 47/14 |             |   |
| A 6 1 K     | 47/28 | (2006.01) | A 6 1 K 47/28 |             |   |
| A 6 1 K     | 47/24 | (2006.01) | A 6 1 K 47/24 |             |   |
| A 6 1 K     | 47/26 | (2006.01) | A 6 1 K 47/26 |             |   |
| A 6 1 K     | 45/00 | (2006.01) | A 6 1 K 45/00 |             |   |
| A 6 1 P     | 25/00 | (2006.01) | A 6 1 P 25/00 |             |   |
| A 6 1 P     | 25/08 | (2006.01) | A 6 1 P 25/08 |             |   |
| A 6 1 P     | 25/14 | (2006.01) | A 6 1 P 25/14 |             |   |
| A 6 1 P     | 25/16 | (2006.01) | A 6 1 P 25/16 |             |   |
| A 6 1 P     | 25/28 | (2006.01) | A 6 1 P 25/28 |             |   |
| A 6 1 P     | 21/02 | (2006.01) | A 6 1 P 21/02 |             |   |
| A 6 1 P     | 21/04 | (2006.01) | A 6 1 P 21/04 |             |   |
| A 6 1 P     | 37/04 | (2006.01) | A 6 1 P 37/04 |             |   |
| A 6 1 P     | 43/00 | (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 2 1       |   |
| C 0 7 K     | 16/18 | (2006.01) | C 0 7 K 16/18 |             |   |
| C 1 2 N     | 5/10  | (2006.01) | C 1 2 N 5/00  | 1 0 2       |   |
| G 0 1 N     | 33/53 | (2006.01) | G 0 1 N 33/53 |             | D |
| C 1 2 N     | 15/02 | (2006.01) | C 1 2 N 15/00 |             | C |
| C 1 2 P     | 21/08 | (2006.01) | C 1 2 P 21/08 |             |   |

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

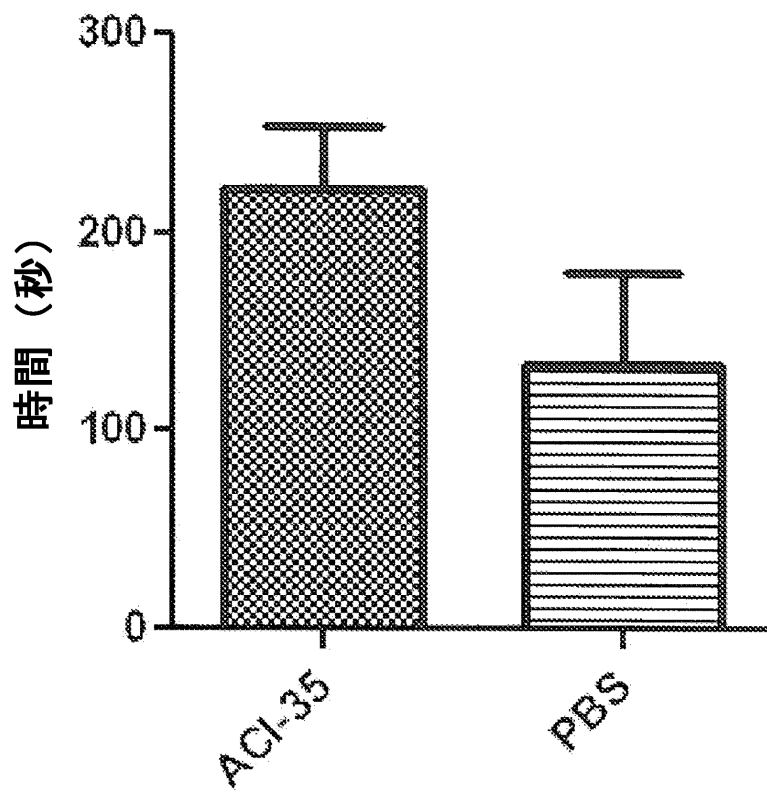
(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. テフロン

- (74)代理人 100102118  
弁理士 春名 雅夫
- (74)代理人 100160923  
弁理士 山口 裕孝
- (74)代理人 100119507  
弁理士 刑部 俊
- (74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦  
 (74)代理人 100130845  
 弁理士 渡邊 伸一  
 (74)代理人 100114340  
 弁理士 大関 雅人  
 (74)代理人 100114889  
 弁理士 五十嵐 義弘  
 (74)代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥  
 (72)発明者 フェイファー アンドリア  
 スイス連邦共和国 サン レジエ ルート ド フェニル 16エイ  
 (72)発明者 ムース アンドレアス  
 スイス連邦共和国 ピュリー アヴェニユ デ セリシエール 39ビー  
 (72)発明者 ヴァン ルーバン フレッド  
 ベルギー王国 リンデン ヘルトーヘンラーン 18  
 (72)発明者 ピールグレン マリア  
 スイス連邦共和国 モンスルーローザンヌ シュマン デュ テッシン 6ビー  
 Fターム(参考) 4B024 AA01 BA53 GA03  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01  
 4B065 AA92X AB01 AC14 BA08 CA25 CA44 CA46  
 4C076 AA12 AA17 AA19 AA22 AA24 AA95 BB01 BB13 BB15 BB16  
 BB25 BB29 BB32 CC01 DD63 DD70 EE59 FF70 GG27  
 4C084 AA19 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA52 MA59 MA60  
 MA66 MA67 NA05 NA13 NA14 ZA01 ZA02 ZA06 ZA15 ZA16  
 ZA94  
 4C085 AA03 AA14 CC02 CC32 DD63 EE01 EE06 FF17 GG02 GG03  
 GG04 GG06 GG08 GG10  
 4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 EA50 FA33 FA61 FA74

【要約の続き】



|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 薬学的組成物                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2012522754A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 公开(公告)日 | 2012-09-27 |
| 申请号            | JP2012502694                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 申请日     | 2010-04-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | AC免疫有限公司<br>天主教大学DF真正的红豆谷如铤研究与发展                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 应用细胞免疫兴业ANONYME<br>天主教大学DF为鲁Keiyu勒芬研究与发展                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| [标]发明人         | フェイファーアンドリア<br>ムースアンドレアス<br>ヴァンルーバンフレッド<br>ピールグレンマリア                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| 发明人            | フェイファー アンドリア<br>ムース アンドレアス<br>ヴァン ルーバン フレッド<br>ピールグレン マリア                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |         |            |
| IPC分类号         | C07K14/47 A61K39/00 A61K39/395 A61K39/385 A61K9/127 A61K47/12 A61K47/34 A61K47/48<br>A61K47/14 A61K47/28 A61K47/24 A61K47/26 A61K45/00 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/<br>/16 A61P25/28 A61P21/02 A61P21/04 A61P37/04 A61P43/00 C07K16/18 C12N5/10 G01N33/53<br>C12N15/02 C12P21/08                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |         |            |
| CPC分类号         | A61K39/0005 A61K2039/55572 A61K2039/6087 C07K14/4711 G01N33/6896 G01N2333/47 G01N2800/<br>/2821 G01N2800/52 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28<br>A61P29/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 A61K9/127 A61K39/00 A61K39/39 A61K2039/505<br>C07K14/47 C07K16/00 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2317/565 C12N5/12 G01N33/53                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| FI分类号          | C07K14/47.ZNA A61K39/00.H A61K39/395.N A61K39/385 A61K9/127 A61K47/12 A61K47/34 A61K47/<br>/48 A61K47/14 A61K47/28 A61K47/24 A61K47/26 A61K45/00 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/14<br>A61P25/16 A61P25/28 A61P21/02 A61P21/04 A61P37/04 A61P43/00.121 C07K16/18 C12N5/00.102<br>G01N33/53.D C12N15/00.C C12P21/08                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/BA53 4B024/GA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/<br>/DA01 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46<br>4C076/AA12 4C076/AA17 4C076/AA19 4C076/AA22 4C076/AA24 4C076/AA95 4C076/BB01 4C076/<br>/BB13 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/BB25 4C076/BB29 4C076/BB32 4C076/CC01 4C076/DD63<br>4C076/DD70 4C076/EE59 4C076/FF70 4C076/GG27 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/MA13 4C084/<br>/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA52 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA66<br>4C084/MA67 4C084/NA05 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA02 4C084/ZA06 4C084/<br>/ZA15 4C084/ZA16 4C084/ZA94 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/CC02 4C085/CC32 4C085/DD63<br>4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF17 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/<br>/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA33<br>4H045/FA61 4H045/FA74 |         |            |
| 代理人(译)         | 清水初衷<br>井上隆一<br>佐藤俊光<br>小林智彦<br>渡边真一<br>正人大关<br>五十嵐弘                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |



|        |                               |
|--------|-------------------------------|
| 优先权    | 2009157303 2009-04-03 EP      |
| 其他公开文献 | JP5810076B2<br>JP2012522754A5 |
| 外部链接   | <a href="#">Espacenet</a>     |

摘要(译)

本发明涉及用于治疗 and 诊断用于治疗由神经原纤维缠结引起或与神经原纤维缠结有关的疾病和病症的方法和药物组合物。特别地，本发明涉及药物组合物，其包含抗原肽，特别是模拟蛋白质tau的主要病理性磷酸表位的抗原性磷酸肽，用于治疗 and 诊断用于治疗包括阿尔茨海默病在内的tau蛋白病。

