

(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2015-530971

(P2015-530971A)

(43) 公表日 平成27年10月29日(2015.10.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 ZNA	4B024
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B064
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 N	4C085
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 IO5	4H045
A61P 25/00 (2006.01)	A61P 25/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 96 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-520685 (P2015-520685)	(71) 出願人	597025806
(86) (22) 出願日	平成25年7月3日 (2013.7.3)		ワシントン・ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月25日 (2015.2.25)		Washington University
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/049333		アメリカ合衆国63130ミズーリ州セント
(87) 国際公開番号	W02014/008404		ト・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ
(87) 国際公開日	平成26年1月9日 (2014.1.9)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	61/667, 515		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成24年7月3日 (2012.7.3)	(74) 代理人	100084146
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	61/694, 989	(74) 代理人	100122301
(32) 優先日	平成24年8月30日 (2012.8.30)		弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100157956
			弁理士 稲井 史生
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 タウに対する抗体

(57) 【要約】

本発明はタウに対する抗体およびそれらの使用方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

タウに特異的に結合し、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、および配列番号 8 からなる群より選択されるアミノ酸配列内のエピトープを認識する、単離された抗体。

【請求項 2】

配列番号 1 4 および配列番号 1 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 3】

配列番号 1 2 および配列番号 1 3 からなる群より選択される核酸配列を含む核酸配列によってコードされる、請求項 1 に記載の単離された抗体。

10

【請求項 4】

タウに特異的に結合し、0～2個のアミノ酸置換を伴う配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含む、単離された抗体。

【請求項 5】

タウに特異的に結合し、0～2個のアミノ酸置換を伴う配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 を含む、単離された抗体。

【請求項 6】

一本鎖抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体、またはヒト化抗体からなる群より選択される、前記請求項のいずれかに記載の単離された抗体。

20

【請求項 7】

細胞タウ凝集アッセイにおいてタウシーディング活性を特異的に阻止することができる、前記請求項のいずれかに記載の単離された抗体。

【請求項 8】

対象の脳におけるタウ凝集の拡がりを低減するための方法であって、薬学的有効量の抗タウ抗体を対象に投与することを含み、ここで抗タウ抗体は前記請求項のいずれかに記載の単離された抗体である、方法。

【請求項 9】

対象においてタウ凝集に関連する少なくとも 1 つの症状を改善することをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

タウ凝集に関連する少なくとも 1 つの症状が、タウ病態、認知機能障害、行動変化、言語機能異常、情動失調、発作、神経系の構造または機能の障害、およびアルツハイマー病の発生リスクの増加からなる群より選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

投与が効果的な全身性投与経路を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

投与が、中枢神経系内への直接投与を含む効果的な局所投与経路を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記請求項 1～7 のいずれかに記載の少なくとも 2 つの単離された抗体を含む、イムノアッセイ。

40

【請求項 14】

少なくとも 2 つの捕捉抗体と検出抗体とを含み、各捕捉抗体が互いに異なるタウエピトープを認識する単離された抗タウ抗体である、請求項 13 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 15】

第 1 捕捉抗体が、タウに特異的に結合し配列番号 7 内のエピトープを認識する単離された抗体であり、第 2 捕捉抗体が、タウに特異的に結合し配列番号 8 内のエピトープを認識する単離された抗体であり、検出抗体が、タウに特異的に結合し配列番号 8 内のエピトープを認識する単離された抗体である、請求項 14 に記載のイムノアッセイ。

50

【請求項 16】

対象から得た生物学的液体の試料におけるタウ凝集体の量を測定する方法であって、請求項 13 ~ 15 のいずれかに記載のイムノアッセイを使ってタウ凝集体の量を測定することを含む、方法。

【請求項 17】

単離された抗タウ抗体を使ってタウ凝集体を試料から免疫沈降させ、次に、免疫沈降したタウ凝集体の量を測定する、請求項 16 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府の支援

本発明は、米国国立神経疾患・脳卒中研究所によって交付された 1 R 0 1 N S 0 7 1 8 3 5 の下で、政府の支援を受けてなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0002】

発明の分野

本発明は、タウに対する抗体およびそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

微小管結合タンパク質タウの凝集は、アルツハイマー病 (AD) や前頭側頭型認知症を含むいくつかの神経変性障害と関連している。AD では、病理学的タウ凝集が、おそらくは既存の神経ネットワークに沿って、脳全体に進行性に拡がる。AD は認知症の最も一般的な原因であり、深刻さを増しつつある公衆衛生上の問題である。これは現在、米国において 500 万人を苦しめていると推定され、それが 2050 年までに 1300 万人に増加すると予想されている。アルツハイマー病は、記憶や認知機能の喪失につながり、最終的には自立できなくなる。これは患者とその家族に大きな人的および経済的犠牲を強いる。AD や、タウの凝集に関連する他の神経変性疾患は、重症度が高く、人口に占める罹患率が増加しつつあることから、より良い処置および検出方法を開発することが急がれている。

【0004】

カラー図面への言及

本出願ファイルにはカラーで作成された写真が少なくとも 1 枚は含まれている。カラー写真を含めた本特許出願公報の写しは、請求と必要な手数料の支払いにより、特許庁から提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図 1】 N 末端 (A) および C 末端 (B) ヒトタウ (h t a u) のアミノ酸配列である。

【図 2】 ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 8 . 1 の K D を示すグラフである。

【図 3】 ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 8 . 2 の K D を示すグラフである。

【図 4】 ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 8 . 3 の K D を示すグラフである。

【図 5】 ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 8 . 4 の K D を示すグラフである。

【図 6】 ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 8 . 5 の K D を示すグラフである。

【図 7】 ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 8 . 7 の K D を示すグラフである。

【図 8】 ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 8 . 8 の K D を示すグラフ

10

20

30

40

50

である。

【図 9】ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 9 . 1 の K D を示すグラフである。

【図 10】ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 9 . 2 の K D を示すグラフである。

【図 11】ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 9 . 3 の K D を示すグラフである。

【図 12】ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 9 . 4 の K D を示すグラフである。

【図 13】ヒトタウ (A) およびマウスタウ (B) に対する H J 9 . 5 の K D を示すグラフである。

【図 14】野生型マウスおよび P 3 0 1 S t g マウスの I S F における完全長タウの存在を示す免疫プロットである。(A) タウ K O マウス (K O)、野生型マウス (W T) および P 3 0 1 S t g マウス (P 3 0 1 S t g) からの海馬溶解物を、抗タウ抗体 B T - 2 または抗アクチン抗体による免疫プロットで解析した。各ウェルに 13 マイクログラムのタンパク質をローディングした。内在性マウスタウに対応する 4 本のバンドとヒトタウに対応する 1 本のバンドを、それぞれ白丸および黒丸として示す。P 3 0 1 S t g 海馬溶解物にはヒトタウの 1 形態に相当する 39 k D a バンドも存在する。これはタウ分解産物に相当するのだろう。野生型マウス (W T) および P 3 0 1 S t g マウス (P 3 0 1 S t g) からの I S F タウを、抗タウモノクローナル抗体 H J 9 . 3 (B) または H J 8 . 1 (C) で免疫沈降させ、免疫プロットで解析した。ビオチン化 B T - 2 抗体でバンドを可視化した。灰色の矢印と黒い矢印は、それぞれ内在性マウスタウおよびヒトタウを示す。

【図 15】(A) はこの研究で使用した異なる変異体タウコンストラクトの概略図であり、(B ~ D) は、タウ R D タンパク質がトランスフェクト H E K 2 9 3 細胞中で原線維凝集体を形成することを示す画像である。(A) 実験計画に応じて、各形態の変異体タウを、シアン蛍光タンパク質もしくは黄色蛍光タンパク質 (C F P もしくは Y F P) またはヘマグルチニン (H A) タグのいずれかに、カルボキシル末端で融合した。(B) さまざまな形態の R D を一過性にトランスフェクトした H E K 2 9 3 細胞からの S D S 不溶物に対して行われた原子間力顕微鏡観察 (A F M) から、R D (K) - H A および R D (L M) - H A は明白な原線維種を生成することが明らかである。耐凝集性 R D (P P) - H A では原線維は検出されなかった。(n = 2)。スケールバー、1 μ m。(C) さまざまな形態の R D - Y F P および Y F P のみを一過性にトランスフェクトした H E K 2 9 3 細胞を、アミロイド特異的色素 X - 3 4 で染色した。共焦点顕微鏡法で可視化された、R D (w t) - Y F P、R D (K) - Y F P および R D (L M) - Y F P が形成する封入体は、X - 3 4 でも陽性に染色された。Y F P のみまたは R D (P P) - Y F P を発現させても X - 3 4 陽性細胞は検出されなかった。矢印は X - 3 4 で染色された封入体を示す。(n = 3)。(D) 非トランスフェクト細胞 (N T) と、さまざまな形態の R D - Y F P / C F P をトランスフェクトした H E K 2 9 3 細胞に、T r i t o n / S D S 抽出と、R D 領域に対する抗体を使ったウェスタンブロッティングとを行なった。単量体と高次分子量種がどちらも検出された (S = 可溶性タンパク質、P = ペレット不溶性タンパク質)。これを 3 回繰り返したが、同一の結果が得られた。

【図 16】H E K 2 9 3 細胞中のタウ R D 凝集体が、F R E T によって検出されることを示している。蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) によって細胞内の R D タンパク質凝集を定量するために、Y F P および C F P に融合されたさまざまな R D 変異体 (w t、K、P P、L M) を H E K 2 9 3 細胞にコトランスフェクトした。(A) R D (L M) - C F P / Y F P をコトランスフェクトした H E K 2 9 3 細胞を、F R E T アクセプターフォトブリーチング顕微鏡法を使って撮像し、細胞内凝集体形成を定量した。アクセプターフォトブリーチングの前 (P r e) および後 (P o s t) のドナーシグナルにより、R D (L M) - C F P / Y F P 封入体は 18 . 2 % ± 0 . 0 5 8 S D (n = 6) の平均 F R E T

10

20

30

40

50

効率をもたらすことが確認された。上側の図と下側の図は、それぞれ、フォトブリーチング前後のアクセプターチャンネルとドナーチャンネルを表している。右上の画像は、計算 FRET 効率の代表的ヒートマップである。ヒストグラムのスケールバーは、ピクセルごとの計算 FRET 効率を表す。タウ RD 凝集体の FRET 効率はこの細胞では ~ 34% であった。(B) FPR を使って、さまざまなコンストラクトからの相対的 FRET を決定した。RD (PP) - CFP / YFP からの有意な FRET は観察されなかった。しかし RD (K) - CFP / YFP と RD (LM) - CFP / YFP はそれぞれ強い FRET シグナルをもたらした (n = 3)。(C) RD (K) - CFP / YFP を発現する HEK 293 細胞を、さまざまな濃度の RD (wt) - HA 原線維 (単量体換算で 0.01、0.03、0.1 および 0.3 μ M) に 9 時間ばく露した。細胞外 RD (wt) - HA 原線維は、RD (K) - CFP / YFP の凝集を用量依存的に誘導した (n = 3)。(* は p 値 < 0.05 を示し、 * * は p 値 < 0.001 を示し、エラーバーは SEM を表す)。

【図 17】タウ - RD 凝集体が細胞間で伝達され、さらなる凝集を誘導することを示す画像およびグラフである。(A) RD (K) - YFP をトランスフェクトした HEK 293 細胞を、同数の RD (LM) - HA 発現細胞と共に、48 時間にわたって共培養した。細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、免疫蛍光 / X - 34 染色を行なった。複数の細胞が、封入体内での RD (LM) - HA と RD (K) - YFP の共局在を示した。これらの封入体は X - 34 でも陽性に染色され、これによりベータシート構造が示された (塗りつぶされた矢印)。加えて、一部の RD (LM) - HA 封入体は X - 34 で陽性に染色されたが、RD (K) - YFP 封入体とは共局在しなかった (中空の矢印)。(B) 一方が RD (K) - CFP / YFP を発現し、他方が RD (LM) - HA を発現する、2 つの細胞集団を、48 時間にわたって共培養した。RD (PP) - HA または非トランスフェクト細胞 (NT) を対照として使用した。FRET は、RD (LM) - HA との共培養では増加したが、RD (PP) - HA またはモックトランスフェクト細胞との共培養では増加しなかった (n = 3)。(C) タウ放出の機序としてタウ凝集体が誘導する細胞死について調べるために、HEK 293 細胞に RD - HA (PP、K、または LM) を 48 時間トランスフェクトするか、またはモックトランスフェクションを行なった。細胞死を誘導するために、モックトランスフェクト細胞を、37 °C において、さまざまな濃度のスタウロスポリン (1、2、4、20 μ M) で 30 分間処理した。次に、細胞を 5 μ g / ml のヨウ化プロピジウムにばく露し、プレートリーダーで蛍光を決定した。さまざまなトランスフェクト集団において細胞死の証拠は観察されなかった (* * は p 値 < 0.001 を示し、エラーバーは SEM を表す)。

【図 18】RD 凝集体が細胞間でミスフォールディングを伝播することを示す画像およびグラフである。HEK 293 細胞にさまざまな RD - CFP および RD - HA コンストラクトをコトランスフェクトした。15 時間後に、これらの細胞を、RD (K) - YFP または RD (PP) - YFP を発現する細胞と共に、48 時間にわたって共培養した。(A) 直接タンパク質接触によって共凝集が起こるかどうかを決定するために、FRET 顕微鏡観察を行なった。YFP のフォトブリーチングの前および後に CFP シグナルを測定した。RD (LM) - CFP および RD (LM) - YFP 凝集体は $14.2\% \pm 0.053$ SD (n = 11) の平均 FRET 効率を有したことから、RD (LM) - CFP と RD (LM) - YFP の直接的な接触が示された。上側の図と下側の図は、それぞれ、フォトブリーチング前 (Pre) および後 (Post) のアクセプターチャンネルとドナーチャンネルを表している。計算 FRET 効率の代表的ヒートマップを右上に示す。ヒストグラムはピクセルごとの計算 FRET 効率を表す。タウ RD 凝集体の FRET 効率はこの細胞では約 25% であった。負の値は対を形成していない CFP に由来する。(B) RD (K) - CFP / RD - HA 発現細胞を RD (K) - YFP 発現細胞と共培養したところ、FRET シグナルが観察された。易凝集型タウである K 変異体または LM 変異体のどちらかの共発現によって RD (K) - CFP の凝集を誘導すると、このシグナルは増加した。RD - CFP または RD - YFP のどちらかがシート形成を阻止する PP 変異を含有する場合は有意なシグナルは認められなかった (n = 3)。(C) ミスフォールディング

の増幅を調べるために、CFPのみまたはRD(LM)-CFPを発現する細胞の集団を、PP、K、LM変異のいずれかを伴うRD-HAを発現する細胞に48時間にわたって事前ばく露することにより、ミスフォールディングをさまざまな程度に促進した。次に、これらの共培養集団を分割し、48時間にわたってRD(K)-YFP発現細胞と共培養することで、細胞間伝達およびFRETによってレポートされる凝集の程度を決定した。RD(K)-CFP細胞集団へのRD(LM)-HA細胞の事前ばく露は、RD(PP)-HAへの事前ばく露と比較して、FRETシグナルを2.6倍増加させた。純粋なCFPを発現する細胞を第2細胞集団に介在させると、易凝集性RD-HA変異体への事前ばく露の効果は完全に阻止された($n=3$)。(*は p 値 <0.05 を示し、**は p 値 <0.001 を示し、エラーバーはSEMを表す)。

【図19】細胞外媒質を介したタウ凝集体の伝播を示すグラフおよび免疫プロットである。(A)RD(LM)-HAをトランスフェクトしたHEK293細胞を同数のRD(K)-CFP/YFP細胞と48時間にわたって共培養してからFRET解析を行なった。細胞培養培地の体積を増加させると、凝集体の経細胞移動(trans-cellular movement)の効率が低下した。(B)RD(LM)-HAを発現する細胞からRD(K)-CFP/YFPを発現する細胞へと条件培地を移すだけで、凝集が60%誘導された。(C)培地に加えたHJ9.3抗体はFRETを低減し、凝集の伝播の妨害と合致した。(D)非特異的IgGは伝播に影響しなかった。(E)HJ9.3は同じ細胞内で共発現したRD(K)-CFP/YFPの細胞内凝集には影響しなかった。(F)界面活性剤分画およびウェスタンプロットで決定したところ、HJ9.3は、共培養細胞中でRD(K)-YFPを誘導するRD(LM)-HAの効果阻止した(T=全タンパク質、S=可溶性タンパク質、およびP=ペレット不溶性タンパク質)、(G)3つの独立したウェスタンプロットの定量的解析により、HJ9.3へのばく露後に、全画分との比較で、ペレット画分の~60%の減少が明らかになった。(H)RD(LM)-YFPとmCherryを発現する細胞を共培養し、フローサイトメトリーで解析した。HJ9.3は二重陽性細胞のパーセンテージを2.07%から1.31%に減少させた。サイトメトリーの直前に混合した細胞をバックグランド対照とした(*は p 値 <0.05 を示し、**は p 値 <0.001 を示し、エラーバーはSEMを表す)。

【図20】RD(K)-YFPをトランスフェクトするか(上側の図)、またはモックトランスフェクトした(下側の図)、HEK293細胞の画像である。HJ9.3を48時間にわたって培養培地に加えた。実験終了時に細胞を固定し、透過処理し、抗マウス二次抗体(Alexa546で標識)で染色した。共焦点顕微鏡法を使って、HJ9.3/タウ複合体の局在を解析した。上側の図は、RD(K)-YFPを発現させると多くの複合体が同定されるが、それが存在しない場合は複合体が同定されない(下側の図)ことを示している。直交解析(右側の図)により、偶発的な細胞内複合体が観察されることはあったものの、大半の複合体は細胞表面に存在することが証明される。

【図21】タウ原線維が細胞間伝播を媒介することを示す画像とグラフである。(A)HJ9.3または対照IgG抗体(1:1000)と共に0時間または48時間にわたって共培養したトランスフェクト細胞集団から条件培地を収集し、次に免疫沈降およびウェスタンプロットを行なった。HJ9.3は細胞培地からタウRD種を特異的に捕捉したが、IgGはそうではなかった。RD(K)-YFPまたはRD(LM)-YFPが発現する場合は高次凝集種が存在したが、RD(PP)-YFPが発現してもそうはならなかった。(B)3つの独立したウェスタンプロットの定量的解析により、48時間のインキュベーション後にタウは~10倍増加することが示された。(C)細胞をさまざまな時間、HJ9.3に暴露した。(D)48時間にわたってHJ9.3にばく露した培地から精製した抗体/抗原複合体を、撮像のためにAFMチップに沈着させた。RD(K)-HAおよびRD(LM)-HAを発現する細胞の培地には明白な原線維種が観察されたが、RD(PP)-HAは不定形の凝集体しか生じなかった。スケールバー、 $1\mu\text{m}$ 。

【図22】組換えヒトタウに対するHJ8.5およびHJ9.4の活性を示す概略図とグラフである。(A)異なるモノクローナル完全長タウ抗体の存在下および非存在下でのR

10

20

30

40

50

D (L M) - C F P 細胞と R D (K 2 8 0) - Y F P 細胞の共培養を図解する概略図である。(B) H J 8 . 5、H J 9 . 3 および H J 9 . 4 がタウの伝播を阻止できることを示すグラフである。(C) H J 8 . 5、H J 9 . 3 および H J 9 . 4 が、E L I S A アッセイにおいて R D - タウ原線維を検出できることを示すグラフである。

【図 2 3】各マウスの (A) 脳室内注射および (B) 側脳室への浸透圧ポンプの埋め込みに関する実験計画を図解する概略図である。(C) はクレシルバイオレット染色によってカニューレの配置を検証する画像を示す。

【図 2 4】6 週間の注入の前後にポンプから採取した抗体を使った、(A) クーマシーブルー染色および (B) 組換え最長ヒトタウアイソフォーム h T a u 4 0 に対する免疫ブロッキングによる、P 3 0 1 S t g マウスへの 6 週間の注入後の抗タウ抗体の画像である。

10

【図 2 5】全タウに関する H J 8 . 7 - B T 2 B E L I S A において、注入されたタウ抗体の妨害がないことを示すグラフである。表示した濃度の抗体を、E L I S A に適用する前に、組換えヒトタウタンパク質と共にプレインキュベートした。

【図 2 6】媒体 / P B S (上側の図) または異なる抗タウモノクローナル抗体 (下側の図に記すとおり H J 8 . 5、H J 9 . 3) で処置された処置済 9 ヶ月齢 P 3 0 1 S t g マウスの梨状皮質の冠状切片の画像である。異常リン酸化型のタウを認識するビオチン化 A T 8 抗体で切片を染色した。

【図 2 7】(A) 海馬 C A 2 および C A 3、(B) 扁桃核、(C) 梨状皮質、および (D) 嗅内皮質における神経原線維変化の A T 8 染色によって覆われる面積のパーセントを示すグラフである。

20

【図 2 8】E L I S A によるタウ原線維および R D - タウ単量体の H J 9 . 3 抗体検出を示すグラフである。異なる濃度の R D - w t タウ単量体および原線維を E L I S A プレートにコーティングした。H J 9 . 3 を一次抗体として使用した。検出には、抗マウス H R P 連結抗体を使用した。

【図 2 9】細胞培地内を原線維が伝達されることによって起こるタウ凝集の経細胞伝播 (t r a n s - c e l l u l a r p r o p a g a t i o n) を図解する概略図である。ドナー細胞中のタンパク質凝集体が細胞から漏れ出し (A)、レシピエント細胞に進入し (B)、ネイティブフォールド (n a t i v e l y f o l d e d) タンパク質と直接接触することで (C)、ミスフォールド状態を増幅する (D)。この細胞間移動は培地中に直接放出される原線維によって媒介される。これらの原線維は、細胞間伝播を妨害する抗タウ抗体 (H J 9 . 3) により、細胞外間隙内でトラップすることができる (E)。

30

【図 3 0】表面プラズモン共鳴 (S P R) および免疫ブロッキングによる抗タウ抗体の特徴づけ。この図は、固定化組換えヒトタウ (最長アイソフォーム h T a u 4 0、4 4 1 a a) および固定化マウスタウ (最長アイソフォーム m T a u 4 0、4 3 2 a a) に対する各抗タウ抗体の結合を示す S P R センサーグラムである。各抗体をさまざまな濃度 (0 . 1 1、0 . 2 3、0 . 4 6、0 . 9 0、1 . 8、3 . 7、7 . 5 μ g / ml) で流した。プロットは対応する色で示されている。(A) 固定化ヒトタウおよび固定化マウスタウ (B) に結合する H J 9 . 3 抗体の S P R センサーグラム。(C) 固定化ヒトタウおよび固定化マウスタウ (D) に結合する H J 9 . 4 抗体の S P R センサーグラム。固定化 (E) ヒトおよび (F) マウスタウに結合する H J 8 . 5 抗体の S P R センサーグラム。(G) 表示した抗タウ抗体を使用することにより、3 ヶ月齢タウノックアウト (K O)、3 ヶ月齢野生型 (W T) マウス、3 ヶ月齢 P 3 0 1 S (3 m o) マウスおよび 9 ヶ月齢 P 3 0 1 S (9 m o) マウスの R A B 可溶性画分を免疫プロットで解析した。

40

【図 3 1】抗タウ抗体と固定化ヒトタウ原線維との間の相互作用の S P R センサーグラムである。固定化ヒトタウ原線維に対してさまざまな濃度で流した H J 9 . 3 (A)、H J 9 . 4 (B) および H J 8 . 5 (C) 抗タウ抗体の S P R センサーグラム。

【図 3 2】異なるアッセイにおける抗タウ抗体の特徴づけ。3 ヶ月齢タウノックアウト (K O) マウス、3 ヶ月齢野生型 (W T) マウス、3 ヶ月齢 P 3 0 1 S (3 m o) マウス、1 2 ヶ月齢 P 3 0 1 S (1 2 m o) マウスの梨状皮質の領域からの脳切片、およびアルツ

50

ハイマー病 (AD) 組織の前頭皮質からの脳切片の免疫染色を、ビオチン化 HJ 8.5 抗体による染色で行なった。12ヶ月齢 P301S 顕微鏡像中の挿入図は、びまん性ニューロピル染色に加えて細胞体染色を示している。黒い矢印は拡大された領域を示している。ヒト AD 脳皮質顕微鏡像中の挿入図は、神経原線維変化 (NFT) の染色を高倍率で示している。黒い矢印は拡大された領域を示している。タウ KO の図におけるスケールバーは $250 \mu\text{m}$ であり、各画像の倍率は同じである。P301S 12mo および AD の挿入図ではスケールバーは $50 \mu\text{m}$ である。

【図 33】タウ抗体は、FRET アッセイによって検出される P301S タウ凝集体の取り込みおよびシーディング活性を阻止する。RD (K280) - CFP / YFP を発現する HEK293 細胞を、 $1 \times \text{TBS}$ 脳溶解物の全タンパク質 $2.5 \mu\text{g}$ に、24 時間ばく露した。(A) 12ヶ月齢 P301S マウスから収集した脳溶解物 ($n = 5$) は、ノックアウト (KO) マウス ($n = 7$)、野生型 (WT) マウス ($n = 6$) または若い 3ヶ月齢 P301S マウス ($n = 2$) からの溶解物と比較して、はるかに高いシーディング活性を誘導した ($*** p < 0.0001$)。 (B) HEK293 細胞に RD (K280) - CFP と RD (K280) - YFP をコトランスフェクトした。18 時間後に、抗タウ抗体 (HJ 8.5、HJ 9.3 および HJ 9.4) または対照抗体 (HJ 3.4、抗 A 抗体) のインキュベーションありまたはなしでプレイクュベートした P301S 脳溶解物を、細胞に加えた。P301S 脳溶解物と共にインキュベートしたタウ抗体は全て、シーディング活性を有意に阻止した。統計的有意性は、GraphPad Prism 5.0 ソフトウェアを使って、一元配置 ANOVA とそれに続くダネットの事後多重比較検定によって決定した ($*** p > 0.001$)。 (C) 固定された量の P301S 脳溶解物を使って、これらの抗体の滴定を、さまざまな濃度 ($0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $2 \mu\text{g}/\text{ml}$) で行なった。24 時間後に FRET 解析を行なった。本発明者らが使用した全てのタウ抗体のなかでは、HJ 8.5 が、P301S 脳溶解物の取り込みおよびシーディング活性を最も強力に阻止した。統計的有意性は、二元配置 ANOVA とそれに続くボンフェローニ事後多重比較検定によって決定した ($** p < 0.0001$ 、 $* p < 0.01$ 、値は平均 \pm SEM を表す)。

【図 34】P301S タウ凝集体に結合したタウ抗体の細胞取り込みは検出されない。P301S 脳溶解物を HEK293 細胞に 3 時間加えた。タウを検出するために、3 つの異なる抗タウ抗体または対照抗体 (HJ 3.4、A 抗体) を使用し、次に、Alexa-fluor 546 抗マウス IgG 染色を行なった。加えて、3 つの異なる抗タウ抗体および HJ 3.4 抗体と共に、またはこれらの抗体なしで、P301S 脳溶解物をプレイクュベートしてから HEK293 細胞に加え、固定し、透過処理した。内部移行した抗体を同定するために、Alexa-fluor 546 抗マウス IgG を使用した。核染色には 4', 6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI; 青色で示される) を使用した。

【図 35】抗体の ICV 注入の実験概要および異なる処置方法による抗体の効力。(A) 脳の左側脳室への脳室内注射による抗体または媒体 (PBS) の注入に関する実験計画。(B) 左側脳室に外科的に埋め込まれたプローブの配置を検証するための冠状に切片化した脳領域の代表的なクレシルバイオレット染色。本発明者らは、プローブが左側脳室内に正しく配置されていたマウスを、この研究に含めた。

【図 36】抗タウ抗体は P301S マウス脳における AT8 染色を強く減少させる。梨状皮質および扁桃体を含む領域において、ビオチン化 AT8 抗体で染色した、PBS (A)、HJ 3.4 抗体 (B)、HJ 8.5 抗体 (C)、HJ 9.3 抗体 (D) および HJ 9.4 抗体 (E) で処置された 9ヶ月齢 P301S マウスの代表的な冠状切片。スケールバーは $250 \mu\text{m}$ である。A ~ E の挿入図は、リン酸化タウのビオチン化 AT8 抗体染色の高倍率像を示す。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ である。

【図 37】一定の抗タウ抗体は P301S マウス脳における AT8 染色を強く減少させる。9ヶ月齢 P301S マウスにおける、抗タウ抗体 HJ 8.5 ($N = 13$)、HJ 9.3

10

20

30

40

50

(N = 15)、HJ9.4 (N = 13)、抗A抗体HJ3.4 (N = 8)、またはPBS (N = 16)で処置されたマウスの梨状皮質(A)、嗅内皮質(B)、扁桃体(C)および海馬CA1領域(D)での、異常リン酸化タウのビオチン化AT8染色によって覆われる面積のパーセント。抗タウ抗体処置マウスでは、PBSまたはHJ3.4抗体処置マウスと比較して、いくつかの異なる脳領域においてAT8染色の低減があった。HJ8.5に最も大きな効果があった。* * p < 0.01、* p < 0.05。値は平均 ± SEMを表す。

【図38】雄および雌P301Sマウスにおけるビオチン化AT8抗体染色の定量。雄(A)および雌P301Sマウス(B)における、抗タウ抗体(HJ8.5、HJ9.3およびHJ9.4)、対照抗体(HJ3.4)およびPBSで処置されたマウスの梨状皮質(AおよびE)、嗅内皮質(BおよびF)、扁桃体(CおよびG)ならびに海馬CA1領域(DおよびH)での、異常リン酸化タウのビオチン化AT8染色によって覆われる面積のパーセント。

【図39】いくつかの抗タウ抗体はP301Sマウス脳における神経原線維変化のThioS染色を強く減少させる。(A)PBS、HJ3.4、HJ8.5、HJ9.3およびHJ9.4抗体で3ヶ月間処置した9ヶ月齢P301Sマウスの梨状皮質における神経原線維変化の代表的ThioS染色像。HJ8.5抗体処置マウスでは、PBSまたはHJ3.4抗体処置マウスと比較して、神経原線維変化のThioS染色が低減した。スケールバーは100 μmを表す。(B)全ての抗タウ抗体処置マウスおよび対照処置マウスにおいて、1(染色なし)から5(最大染色)までのスコアをつけることによる、ThioS染色の半定量的評価。HJ8.5抗体処置マウスは、PBSまたはHJ3.4抗体処置マウスと比較して、ThioS染色が有意に少なかった。* p < 0.05、* * p < 0.01。

【図40】ホスホ-タウ染色と活性化ミクログリア染色との間の相関関係。(A)HJ8.5 (N = 6)、HJ9.3 (N = 6)およびPBSで処置された9ヶ月齢P301Sマウス(各群N = 6)におけるホスホ-タウのビオチン化AT8染色は、もう一つのホスホ-タウ抗体であるPHF1染色との強い相関関係を示した。(B)活性化ミクログリアのCD68染色とホスホ-タウのビオチン化AT8染色の間には、すべての群において、強い相関関係が観察された(各群N = 6)。(C)代表的な70%FA画分試料(N = 4)の免疫プロットングをポリクローマルマウス抗タウ抗体(Abcam)で解析した。

【図41】活性化ミクログリアのCD68染色。マウスを、P301Sマウスにおけるミクログリア活性化について評価した。PBS(A)、HJ3.4抗体(B)、HJ8.5抗体(C)、HJ9.3抗体(D)およびHJ9.4抗体(E)で処置された9ヶ月齢P301Sマウスの梨状皮質における活性化ミクログリアの代表的CD68染色像。

【図42】P301Sマウスにおいて、不溶性タウのレベルは、抗体HJ8.5およびHJ9.3によって低減する。全ての処置マウス[PBS (N = 16)、HJ3.4抗体 (N = 8) HJ8.5 (N = 13)、HJ9.3 (N = 15)、HJ9.4 (N = 13)]の皮質を、RAB(A)、RIPA(B)および70%FA(C)で逐次的に抽出し、それぞれのタウレベルをELISAによって定量した。群間でRAB画分およびRIPA画分における可溶性タウレベルに統計的有意差はなかった。しかし、HJ8.5抗タウ抗体およびHJ9.3抗タウ抗体で処置されたマウスでは、PBSまたはHJ3.4抗体で処置された群と比較して、70%FA画分における不溶性タウのレベルに有意な減少があった。HJ9.4抗体処置マウスにおける不溶性タウのレベルは、対照群と相違しなかった(* * p < 0.01)。70%FA画分におけるヒトタウ(D)、マウスタウ(E)ならびにSer202およびThr205でのホスタウ(F)のレベルを、特異的抗ヒト、抗マウス、または抗ホスタウ抗体により、ELISAで評価した(各処置群につきn = 6匹のマウス)。全ての抗タウ抗体処置マウス群においてヒトタウレベルの減少があり、マウスタウレベルには変化がなかった。70%FA画分では、AT8反応性によって検出されるSer202およびThr205でのホスタウが、全ヒトタウと同様に、抗タウ抗体処置マウスでは、対照と比較して低減していることも、本発明者らは見出した。

10

20

30

40

50

【図43】抗タウ抗体処置P301Sマウスでは、FRETアッセイによって検出される皮質抽出物中のタウシーディング活性が減少している。(A)PBS(N=16)、HJ3.4(N=8)、HJ8.5(N=13)、HJ9.3(N=15)、およびHJ9.4(N=13)処置マウスの全てのRAB可溶性画分を使って、タウシーディング活性を、FRETアッセイにより、HEK293細胞で測定した。HEK293細胞にRD(K280)-CFPおよびRD(K280)-YFPをコトランスフェクトした。18時間後に、RAB可溶性画分を細胞に加えた。HJ8.5抗体処置マウスおよびHJ9.3抗体処置マウスでは、PBSまたはHJ3.4抗体で処置されたマウスと比較して、シーディング活性が有意に低減していた。HJ9.4抗体処置マウスからのRAB可溶性画分は、PBSまたはHJ3.4抗体RAB可溶性画分と比較して、シーディング活性が減少していなかった(* * * p < 0.001、値は平均 ± SEMを表す)。(B)RAB可溶性画分を、タウノックアウト、PBS、または抗タウ抗体処置マウスから免疫沈降させた。抗体/ビーズ複合体からのシーディング活性の溶出を、FRETアッセイによって測定した。HJ8.5抗体処置マウスおよびHJ9.3抗体処置マウスに観察されるシーディング活性は、PBS処置マウスと比較して、有意に少なかった(* * * * p < 0.0001、値は平均 ± SEMを表す)。(C)ELISAで解析した全ての処置群の9ヶ月齢P301S脳皮質領域の70%FA画分は、RAB可溶性画分で行なったFRET解析との強い相関関係を示した。(D)評価した全ての処置マウスの9ヶ月齢P301S脳皮質のRAB可溶性画分中に存在するタウレベル(X軸)とシーディング活性(Y軸)の比較。これら2つの尺度の間に有意な相関関係はなかった。(E)3ヶ月齢ノックアウト(KO)マウス、3ヶ月齢野生型(WT)マウス、3ヶ月齢P301Sマウス、および9ヶ月齢PBS処置P301SマウスのRAB可溶性画分中のタウ種をSDS-PAGEで分離してから、ウェスタンブロッティングを行なった。タウ種の検出にはポリクローナルマウス抗タウ抗体を使用した。3ヶ月齢P301Sマウスでは高分子量タウ種がRAB可溶性画分中に存在し、9ヶ月齢P301Sマウスではさらに大量に存在する。

【図44】群は、自発運動活性、感覚運動機能、または条件恐怖試験の聴覚キューコンボネントに関して、有意に相違しなかった。rmANOVAの結果は、ホールボード試験における全歩行運動(A)、レッジ(ledge)試験(B)および他のどの感覚運動尺度(図解なし)についても、または加速ロータロッド(C)に関して、処置に関わる主効果または交互作用効果を明らかにすることができなかった。条件恐怖試験の3日目における変更文脈(altered context)ベースラインからのデータは、有意な処置効果を与え(* p = 0.027)、続いて行なった比較により、この効果の大部分はHJ9.4マウス群とPBS+HJ3.4対照群の間の有意な相違によることが示された(p = 0.0007)。(D)しかし、聴覚キューデータ(3分~10分)に関するrmANOVA後に、処置の有意な主効果または交互作用効果は見出されず、この期間中に群間でフリージングレベルに有意差はないことが示唆された(E)。活性レベルが2日目の文脈的恐怖試験中のフリージングに影響を有しえたかどうかを評価するために、本発明者らは、ホールボード試験中に測定された全歩行運動と、文脈的恐怖試験中のフリージング時間%との間のピアソンの相関係数(r)を算出し、これらの間に有意な相関関係はない(p = 0.39)ことを見出した(F)。

【図45】P301Sタウトランスジェニックマウスにおける文脈的恐怖条件づけの欠損は、HJ8.5抗体処置およびHJ9.4抗体処置によって回復する。(A)条件恐怖試験の1日目には、2分間のベースライン条件中も、音/ショック(T/S)トレーニング中も、これらのデータに関するrmANOVA後に処置に関わる有意な主効果または交互作用効果がないことによって示されるとおり、群間にフリージングレベルの相違は観察されなかった。(B)対照的に、2日目の文脈的恐怖試験では、有意な処置の効果(* p = 0.019)および有意な処置 × 分数交互作用(* * p = 0.0001)が、フリージングレベルに関するrmANOVA後に観察された。HJ9.4群だけが、8分目との比較で、1分目からの有意な慣れを示した(# p = 0.002)。(C)続く計画的比較により、HJ8.5タウ抗体群およびHJ9.4タウ抗体群におけるフリージングは、8分間

10

20

30

40

50

のセッション全体を平均すると、PBS + HJ 3.4 対照群との比較で意に増加していることが示された（それぞれ $p = 0.006$ および $p = 0.022$ ）。しかし、データのさらなる解析により、「B」に図示されるとおり、HJ 9.4 群と PBS + HJ 3.4 対照との間の最も大きな相違は 2 分目において生じ（ $p = 0.004$ ）、一方、HJ 8.5 処置マウスと対照群との間の最も大きな相違は 4 ~ 7 分目に見出される（ $p < 0.004$ ）ことが示された。

【図 46】シーディング活性について陽性である血漿試料と、シーディング活性について陰性である血漿試料とを識別するために、サンドイッチタウ ELISA アッセイを使用できることを示すグラフである。シーディング活性は、Kfoury et al 2012 J Biol Chem 287 (23) に記載されているように決定した。タウ凝集体の量を、健常若年ヒトから収集した血漿からのシグナル（すなわちアッセイのバックグラウンドシグナル）に対する相対的誘導倍率変化として報告する。

【図 47】タウ細胞伝播アッセイに対する本発明の抗タウ抗体の効果を示すグラフである。各グラフにおいて、最初のバーは抗体が加えられていない培地を表し、伝播のベースライン効率に相当する。（A）HJ 8.1 および HJ 8.2；（B）HJ 8.3 および HJ 8.4；（C）HJ 8.5 および HJ 8.7；（D）HJ 8.8 および HJ 9.1；（E）HJ 9.2 および HJ 9.3；（F）HJ 9.4 および HJ 9.5。

【図 48】細胞ベースアッセイにおける個々の抗タウ抗体または抗タウ抗体の等モル混合物のタウ伝播に対する効果を示すグラフである。

【図 49】（A）は、RD (K) - CFP / YFP を同じ細胞内で共発現させた場合に、HJ 9.3 抗体が細胞内タウ凝集に影響しないことを示すグラフであり、（B）は、特異的 IgG がタウ凝集の経細胞伝播に影響しないことを示すグラフである。

【図 50】HJ 9.3 がフローサイトメトリーによって測定されるタウ凝集体の取り込みを阻害することを示すグラフである。細胞を、蛍光色素で化学的に標識した組換え RD 原線維にばく露した。トリプシン処理および分散後に、フローサイトメーターを使って、細胞をカウントした。HJ 9.3 は、蛍光標識細胞の数を用量依存的に低減したことから、凝集体取り込みの阻害が示された。

【発明を実施するための形態】

【0006】

詳細な説明

アルツハイマー病と全てのタウオパチーとの間の最低限のつながりは、タウの凝集状態である。これらの罹患状態のいずれにおいても、単量体型タウはポリマー状の規則的原線維に転化することが知られている。原線維性タウ凝集体から構成される神経原線維変化 (NFT) は、タウオパチーの神経病理学的特徴である。本出願人は、脳におけるタウ病態の拡がり「ドナー (donor)」細胞から放出されて第 2 の「レシピエント (recipient)」細胞に進入し、直接的なタンパク質 - タンパク質接触を介してレシピエント細胞におけるタウのさらなるミスフォールディングと凝集を誘導する、タウ凝集体の一形態によって引き起こされうることを発見した。この細胞から細胞へのタウ凝集体の拡がりを容易にする特別な形態のタウ凝集体を「タウシード (tau seed)」と呼び、その活性を本明細書では「シーディング活性」と呼ぶ場合がある。というのも、この形態のタウ凝集体は、それが進入した細胞（すなわち「レシピエント細胞」）におけるタウ凝集の種晶または核になるからである。

【0007】

タウは、単量体型でも、さまざまな凝集型でも、存在することができる。本明細書において使用する「タウ凝集体」という用語は、2 つ以上のタウ単量体を含む分子複合体を指す。理論に束縛されることは望まないが、タウ凝集体はほぼ無制限な数の単離体を一つに結合した状態で含みうる。例えばタウ凝集体は、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上のタウ単量体を含みうる。あるいは、タウ凝集体は、20、30、40、50、60、70、80、90、100 個またはそれ以上のタウ単量体を含みうる。タウ凝集体は、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、

10

20

30

40

50

4000、4500、5000個またはそれ以上のタウ単量体を含むこともできる。「原線維性タウ凝集体」および「タウ原線維」という用語はタウ凝集体の形態を指し、これらの用語は本明細書では互換的に使用される。原線維性タウ凝集体は、タウを含むポリマー状の規則的線維である。タウ原線維は一般的には可溶性でないが、短い集合体またはオリゴマーは可溶であることができる。タウ凝集体は、タウ凝集に際して中間体として作用しうる可溶性タウオリゴマーおよびプロトフィブリルも指す。タウ凝集体の定義には、細胞内部に取り込まれた時またはインビトロで単量体型タウに暴露された時に細胞内タウ凝集の核となるタウ凝集体、または細胞内タウ凝集を「シーディング」する能力を有するタウ凝集体を指す用語である「タウシード」も包含される。タウシーディング活性は本明細書に記載する細胞タウ凝集アッセイにおいて評価することができる。

10

【0008】

加えて、本出願人は、タウに特異的に結合する抗体およびそれらの使用方法も発見した。ある態様において、本発明はタウに特異的に結合する抗体を提供する。もう一つの態様において、本発明は、細胞から細胞へのタウ凝集の伝播を効果的に遅らせかつ/または低減するための手段を提供する。本発明の抗体は、タンパク質原線維の脱凝集を促進すること、細胞内で単量体型タウが凝集したタウに転化するのを阻止すること、タウ凝集体の細胞内分解を促進すること、隣接細胞へのタウ凝集体の進入を妨げること、またはそれらの組み合わせによって、タウ凝集の伝播を遅らせかつ/または低減しうる。もう一つの態様において、本発明は、対象から得た生物学的液体の試料中のタウ凝集体を検出するための手段を提供する。もう一つの態様において、本発明は、対象から得た生物学的液体の試料中のタウ凝集体の量を測定するための手段を提供する。もう一つの態様において、本発明は、対象から得た生物学的液体の試料において測定されたタウ凝集体の量に基づいて対象を分類するための手段を提供する。対象から得た生物学的液体の試料において測定されたタウ凝集体の量に基づく対象の分類は、タウ凝集に関連する症状および/または疾患をその生涯において発生させるであろう対象を同定するために使用しうる。

20

【0009】

本発明は、抗タウ抗体が、細胞から放出された細胞外タウに結合し、それによってタウ凝集体が隣接細胞に進入することを防止し、タウ凝集の拡がりを遅らせることにより、原線維性タウ凝集体の伝播を遅らせうるという発見を包含する。一態様において、本発明は、細胞へのタウ凝集体の進入を防止するための手段を提供する。もう一つの態様において、本発明は、細胞内タウ凝集を低減するための手段を提供する。もう一つの態様において、本発明は、タウシーディング活性を減少させるための手段を提供する。隣接細胞へのタウ凝集体の進入を防止するのに有用な本発明の抗体には、タウ内のエピトープに結合するものが含まれる。

30

【0010】**I. タウに結合する抗体**

ヒトでは、エクソン2、3、および10の選択的スプライシングによって生成するタウのアイソフォームが6種類存在する。これらのアイソフォームは352アミノ酸から441アミノ酸の範囲にある。エクソン2およびエクソン3はそれぞれN末端に29アミノ酸挿入をコードしている（これはNと呼ばれ、したがってタウアイソフォームは2N（両挿入）、1N（エクソン2のみ）、0N（どちらもなし）になりうる）。どのタウアイソフォームでも、微小管結合ドメインが3回繰り返されている。C末端にエクソン10を含めると、エクソン10によってコードされる4つ目の微小管結合ドメインが含まれることになる。したがってタウアイソフォームは、微小管結合ドメインが4回繰り返されている場合（エクソン10が含まれている場合）と、微小管結合ドメインが3回繰り返されている場合（エクソン10が排除されている場合）とがある。本発明の抗タウ抗体は、タウのアイソフォームのいずれかに結合する抗体を含みうる。例示的一実施形態において、本発明の抗タウ抗体は、エクソン10を含むタウのアイソフォームに結合する抗体を包含しうる。

40

【0011】

50

上述のようにタウは、可溶性コンパートメントおよび不溶性コンパートメントに、単量体の形態および凝集した形態で、規則的な構造または不規則な構造で、細胞内および細胞外に見出すことができ、他のタンパク質または分子との複合体を形成しうる。本発明の抗タウ抗体は、上述した1つまたはそれ以上の形態のタウに結合する抗体を含みうる。いくつかの実施形態では、抗タウ抗体がタウ単量体に結合する。別の実施形態では、抗タウ抗体がタウ凝集体に結合する。さらに別の実施形態では、抗タウ抗体がタウ原線維に結合する。異なる実施形態では、抗タウ抗体がタウ単量体とタウ凝集体に結合する。これに代わる実施形態では、抗タウ抗体がタウ凝集体とタウ原線維に結合する。異なる実施形態では、抗タウ抗体がタウ原線維とタウ単量体に結合する。

【0012】

ここで有用な抗タウ抗体には、生物学的試料中に存在するタウ凝集体に特異的に結合する抗体も全て含まれる。ここで有用な抗タウ抗体には、細胞から細胞へのタウ凝集の伝播を低減する抗体も全て含まれる。言い換えると、有用な抗体は、レシピエント細胞に進入するタウの量を、本発明の抗体の非存在下でレシピエント細胞に進入するであろう量と比較して、遅らせかつ/または減少させる。したがって有用な抗体は、レシピエント細胞中で起こるタウ凝集の量を減少させる。

【0013】

一態様において、ここで有用な抗体には、単離され、特徴づけられ、精製された、機能的な抗体であって、生きている対象に投与される機能的治療組成物において使用するために回収（取得）された抗体が含まれる。もう一つの態様において、ここで有用な抗体には、単離され、特徴づけられ、精製された、機能的な抗体であって、生きている対象から得られた生物学的試料中のタウ凝集体を検出し、その対象の生涯にわたるタウ凝集に関連する症状の発生を予測するためのアッセイにおいて使用するために回収（取得）された抗体が含まれる。もう一つの態様において、ここで有用な抗体には、単離され、特徴づけられ、精製された、機能的な抗体であって、生きている対象から得られた生物学的試料中のタウ凝集体を検出し、その対象の生涯にわたってタウ凝集に関連する症状が発生するリスクが増加していると対象を分類するためのアッセイにおいて使用するために回収（取得）された抗体が含まれる。もう一つの態様において、ここで有用な抗体には、単離され、特徴づけられ、精製された、機能的な抗体であって、使用のために回収（取得）された、表Aに列挙する抗体ならびにその変異型（例えばヒト化型、キメラ型、および免疫学的フラグメント）が含まれる。

表A．本発明の抗体

10

20

30

【表 1】

抗体名	タウエピトープ
HJ8.1.1	DRKDQGGYTMHQD (配列番号1)
HJ8.1.2	TDHGAE (配列番号10)
HJ8.2	PRHLSNV (配列番号3)
HJ8.3	PRHLSNV (配列番号3)
HJ8.4	KTDHGA (配列番号11)
HJ8.5	DRKDQGGYTMHQD (配列番号1)
HJ8.7	AAGHV (配列番号5)
HJ8.8	EPRQ (配列番号4)
HJ9.1	TDHGAEIVYKSPVVS (配列番号6)
HJ9.2	EFEVMED (配列番号7)
HJ9.3	GGKVQIINKK (配列番号8)
HJ9.4	EFEVMED (配列番号7)
HJ9.5	EFEVMED (配列番号7)

10

20

【0014】

用語「抗体」には、用語「モノクローナル抗体」が包含される。「モノクローナル抗体」とは、単一コピーまたは単一クローン、例えば任意の真核生物、原核生物またはファージクローンに由来する抗体を指す。「モノクローナル抗体」はハイブリドーマ技術によって生産された抗体に限定されない。モノクローナル抗体は、例えば当技術分野において周知のハイブリドーマ技法を使って生産することができるだけでなく、組換え技術、ファージディスプレイ技術、合成技術またはそのような技術と当技術分野ではすぐにわかる他の技術との組み合わせを使って生産することもできる。さらにまた、モノクローナル抗体は、当技術分野において知られている方法に従って、検出可能なラベルで標識し、固相に固定化し、かつ/または異種化合物（例えば酵素または毒素）とコンジュゲートすることもできる。

30

【0015】

さらに「抗体」は、機能的なモノクローナル抗体、または免疫学的に有効なそのフラグメント、例えばそのFab、Fab'、またはF(ab')₂フラグメントも意味する。本明細書ではいくつかの文脈において、強調のために特にフラグメントに言及する場合があるが、それでもなお、フラグメントと明記したかどうかにかかわらず、「抗体」という用語には、そのようなフラグメントならびに一本鎖型が包含されることは理解されるであろう。タンパク質がその意図するターゲットに特異的に結合する能力を保持している限り、それは「抗体」という用語に包含される。また、例えばこの特異性を伴う一本鎖型の抗体（一般にFv領域と呼ばれるもの）も、「抗体」の定義に包含される。適当な特異性を持つ、典型的にはマウス抗体または他の非ヒト抗体の操作が、それらをヒト化型に転化するために必要になるので、本開示において有用な抗体は好ましくは組換え的に生産されるが、必ずしもそうでなくてもよい。抗体はグリコシル化されていてもグリコシル化されていなくてもよい。抗体は、知られているとおり、ジスルフィド結合により、適正に架橋さ

40

50

れる。

【0016】

ここで有用な抗体の基本的抗体ユニットは四量体を含む。各四量体は、2つの同一なポリペプチド鎖ペアから構成され、各ペアは1本の「軽」鎖(約25kDa)と1本の「重」鎖(約50~70kDa)とを有する。各鎖のアミノ末端部分は、主として抗原認識を担う約100~110アミノ酸またはそれ以上の可変領域を含んでいる。各鎖のカルボキシ末端部分は主としてエフェクター機能を担う定常領域を規定している。

【0017】

ここで有用な抗タウ抗体には、単離され、特徴づけられ、精製され、機能的であって、それらを調製するためのプロセスから回収(取得)されたものであり、それゆえに、ここの使用に、有用な形態、かつ治療的、医学的、または診断的に十分な量で、利用することができるものが含まれる。

10

【0018】

軽鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、およびラムダと分類される。重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンと分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEと規定する。軽鎖および重鎖内では、可変領域と定常領域が約12アミノ酸以上の「J」領域で接合されており、重鎖は約10アミノ酸以上の「D」領域も含んでいる。

【0019】

各軽鎖/重鎖ペアの可変領域は抗体結合部位を形成する。したがって無傷の抗体は2つの結合部位を有する。鎖は、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)が相補性決定領域(以下「CDR」という)とも呼ばれる3つの超可変領域によって接合されている同じ一般構造を呈する。2つの鎖からのCDRは、フレームワーク領域によって整列されて、特異的エピトープに結合することが可能になる。N末端からC末端に向かって、軽鎖と重鎖はどちらも、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を、それぞれ含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、既知の慣例に従う(Kabat「Sequences of Proteins of Immunological Interest」米国国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダ、1987および1991; Chothia, et al., J. Mol. Bio. (1987) 196:901-917; Chothia, et al., Nature (1989) 342:878-883参照)。

20

30

【0020】

一態様では、哺乳動物を免疫化し、該哺乳動物の抗体産生細胞からハイブリドーマを形成させるか、他の方法でそれらを不死化し、そのハイブリドーマまたは不死化細胞を培養して適当な特異性についてそれらを評価する標準的技法により、適当な特異性を持つモノクローナル抗タウ抗体を生成させる。この場合、そのような抗体は、例えばヒト、ウサギ、ラットまたはマウスを、タウタンパク質コード配列の領域またはその適当な小領域を包含するエピトープに相当するペプチドで免疫化することによって、生成させることができるだろう。組換え操作のための材料は、所望の抗体をコードするヌクレオチド配列を、それを産生するハイブリドーマまたは他の細胞から回収することによって得ることができる。次に、これらのヌクレオチド配列を操作し、単離し、特徴づけ、精製し、回収することで、所望であればここで使用するために、それらをヒト化型で提供することができる。

40

【0021】

本明細書にいう「ヒト化抗体」には、非ヒト相補性決定領域(「CDR」)を有する抗体の配列を改変することによって一部または全部がヒト抗体生殖細胞系に由来するアミノ酸配列から構成されている抗タウ抗体が含まれる。そのような改変の最も簡単なものは、単にマウス定常領域をヒト抗体の定常領域で置換することで、医薬的使用にとって許容されうる十分に低い免疫原性を有しうるヒト/マウスキメラをもたらすことになりうる。しかし好ましくは、抗体の可変領域も、さらにはCDRも、現在では当技術分野において周知である技法によってヒト化される。可変領域のフレームワーク領域は、対応するヒト

50

フレームワーク領域で置換され、非ヒトCDRは実質的に無傷のままにしておくか、またはヒトゲノムに由来する配列でさえCDRで置き換えられる。CDRは、完全ヒト生殖細胞系フレームワーク領域または実質的にヒトであるフレームワーク領域を背景として、タウに対する結合活性およびアフィニティが維持されるか、または強化されるように、ランダムに変異させることもできる。実質的にヒトであるフレームワークは、既知のヒトフレームワーク配列に対して少なくとも90%、95%、または99%の配列同一性を有する。ヒト免疫系と一致するように改変された免疫系を有する遺伝子改変マウスにおいて、十分に有用なヒト抗体を生産することもできる。上述のように、本開示の方法における使用には、一本鎖型に相当するフラグメントなど、抗体の、免疫学的に特異的なフラグメントを使用すれば足りる。

10

【0022】

さらに、本明細書において使用する用語「ヒト化抗体」は、ヒトフレームワークと、非ヒト抗体からの少なくとも1つのCDRとを含み、存在する定常領域がいずれもヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一である（すなわち、少なくとも約85~90%、好ましくは少なくとも95%同一である）ような抗タウ抗体を指す。したがって、ヒト化抗体のパーツは、おそらくCDRを除いて全て、1つまたはそれ以上のネイティブヒト免疫グロブリン配列の対応するペアと、実質的に同一である。

【0023】

所望であれば、ヒト化免疫グロブリンの設計は、次のように行いうる。アミノ酸が以下のカテゴリーに属する場合は、使用されるヒト免疫グロブリン（アクセプター免疫グロブリン）のフレームワークアミノ酸を、CDRを提供する非ヒト免疫グロブリン（ドナー免疫グロブリン）からのフレームワークアミノ酸で置き換える：（a）アクセプター免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中のアミノ酸が、その位置において、ヒト免疫グロブリンにとって普通ではないのに対して、ドナー免疫グロブリン中の対応するアミノ酸がその位置においてヒト免疫グロブリンにとって典型的である；（b）アミノ酸の位置がCDRの1つのすぐ隣である；または（c）フレームワークアミノ酸のいずれかの側鎖原子が、三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRアミノ酸のいずれかの原子から約5~6オングストローム（中心間距離）以内にある（Queen, et al., 前掲書、およびCo, ct al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2869）。アクセプター免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域のアミノ酸のそれぞれと、ドナー免疫グロブリン中の対応するアミノ酸が、その位置において、ヒト免疫グロブリンにとって普通ではない場合、そのようなアミノ酸は、その位置においてヒト免疫グロブリンにとって典型的なアミノ酸で置き換えられる。

20

30

【0024】

いずれの場合も、本発明の抗体はタウに特異的に結合する。例示的实施形態では、本発明の抗体がヒトタウに特異的に結合する。本明細書における「特異的に結合する」という文言は、抗体が、0.1 pM ~ 10 nMの範囲のアフィニティ定数または相互作用のアフィニティ(KD)（好ましい範囲は0.1 pM ~ 1 nMである）で、タンパク質に結合することを意味する。さまざまな種からのタウの配列が当技術分野では知られており、抗体がタウに結合するかどうかを決定する方法が当技術分野では知られている。例えば実施例を参照されたい。

40

【0025】

本発明の抗体は、一本鎖可変フラグメント(scFv)として知られている融合タンパク質として使用することもできる。これらのscFvはリンカーによって接続された重鎖可変領域と軽鎖可変領域から構成される。全てではないが、ほとんどの例で、リンカーはペプチドであるだろう。リンカーペプチドは好ましくは約10~25アミノ酸長である。好ましくはリンカーペプチドはグリシンならびにセリンまたはスレオニンに富む。scFvはファージディスプレイを容易にするために使用することができ、フローサイトメトリー、免疫組織化学に使用するか、またはターゲティングドメインとして使用することもできる。scFvの作成および使用方法は、当技術分野では知られている。

50

【0026】

好ましい一実施形態では、本発明の s c F v がヒト定常ドメインにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、重鎖定常ドメインが I g G ドメイン、例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 に由来する。別の実施形態では、重鎖定常ドメインが I g A、I g M、または I g E に由来する。

【0027】

タウに結合する本発明の単離された抗体は、好ましくは、いくつかあるエピトープの1つを認識する。一実施形態では、タウに結合する本発明の単離された抗体が、表Aに列挙するエピトープを認識する。もう一つの実施形態では、タウに結合する本発明の単離された抗体が、配列番号1 (D R K D Q G G Y T M H Q D) のアミノ酸配列内のエピトープを認識する。好ましくは、単離された抗体が、配列番号1の少なくとも3個の連続するアミノ酸内、例えば配列番号1の少なくとも6個の連続するアミノ酸内、配列番号1の少なくとも7個の連続するアミノ酸内、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸内、配列番号1の少なくとも9個の連続するアミノ酸内、配列番号1の少なくとも10個の連続するアミノ酸内、配列番号1の少なくとも11個の連続するアミノ酸内、配列番号1の少なくとも12個の連続するアミノ酸内、および配列番号1の少なくとも13個の連続するアミノ酸内のエピトープを認識する。例示的一実施形態では、配列番号1内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体 H J 8 . 5 である。もう一つの実施形態では、配列番号1内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体 H J 8 . 1 . 1 である。

10

20

【0028】

もう一つの実施形態では、タウに結合する本発明の単離された抗体が、配列番号2のアミノ酸配列 (K T D H G A E) 内のエピトープを認識する。好ましくは、単離された抗体は、配列番号2の少なくとも3個の連続するアミノ酸内、例えば配列番号2の少なくとも4個の連続するアミノ酸内、配列番号2の少なくとも5個の連続するアミノ酸内、配列番号2の少なくとも6個の連続するアミノ酸内、および配列番号2の少なくとも7個の連続するアミノ酸内のエピトープを認識する。例示的一実施形態では、配列番号2内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体 H J 8 . 1 . 2 である。もう一つの実施形態では、配列番号2内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体 H J 8 . 4 である。

30

【0029】

もう一つの実施形態では、タウに結合する本発明の単離された抗体が、配列番号3のアミノ酸配列 (P R H L S N V) 内のエピトープを認識する。好ましくは、単離された抗体は、配列番号3の少なくとも3個の連続するアミノ酸内、例えば配列番号3の少なくとも4個の連続するアミノ酸内、配列番号3の少なくとも5個の連続するアミノ酸内、配列番号3の少なくとも6個の連続するアミノ酸内、および配列番号3の少なくとも7個の連続するアミノ酸内のエピトープを認識する。例示的一実施形態では、配列番号3内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体 H J 8 . 2 である。もう一つの実施形態では、配列番号3内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体 H J 8 . 3 である。

40

【0030】

さらにもう一つの実施形態では、タウに結合する本発明の単離された抗体が、配列番号4のアミノ酸配列 (E P R Q) 内のエピトープを認識する。好ましくは、単離された抗体が、配列番号4の少なくとも3個の連続するアミノ酸内、例えば配列番号4の少なくとも4個の連続するアミノ酸内のエピトープを認識する。例示的一実施形態では、配列番号4内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体 H J 8 . 8 である。

【0031】

さらにもう一つの実施形態では、タウに結合する本発明の単離された抗体が、配列番号5のアミノ酸配列 (A A G H V) 内のエピトープを認識する。好ましくは、単離された抗体は、配列番号5の少なくとも3個の連続するアミノ酸内、例えば配列番号5の少なくと

50

も4個の連続するアミノ酸内、および配列番号5の少なくとも5個の連続するアミノ酸内のエピトープを認識する。例示的一実施形態では、配列番号5内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体HJ8.7である。

【0032】

さらにもう一つの実施形態では、タウに結合する本発明の単離された抗体が、配列番号6のアミノ酸配列(TDHGA E I V Y K S P V V S G)内のエピトープを認識する。好ましくは、単離された抗体は、配列番号6の少なくとも5個の連続するアミノ酸内、例えば配列番号6の少なくとも6個の連続するアミノ酸内、配列番号6の少なくとも7個の連続するアミノ酸内、配列番号6の少なくとも8個の連続するアミノ酸内、配列番号5の少なくとも9個の連続するアミノ酸内、配列番号6の少なくとも9個の連続するアミノ酸内、配列番号6の少なくとも10個の連続するアミノ酸内、配列番号6の少なくとも11個の連続するアミノ酸内、配列番号6の少なくとも12個の連続するアミノ酸内、配列番号6の少なくとも13個の連続するアミノ酸内、配列番号6の少なくとも14個の連続するアミノ酸内、配列番号6の少なくとも15個の連続するアミノ酸内、および配列番号6の少なくとも16個の連続するアミノ酸内のエピトープを認識する。例示的一実施形態では、配列番号6内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体HJ9.1である。

10

【0033】

もう一つの実施形態では、タウに結合する本発明の単離された抗体が、配列番号7のアミノ酸配列(EFEVME D)内のエピトープを認識する。好ましくは、単離された抗体は、配列番号7の少なくとも3個の連続するアミノ酸内、例えば配列番号6の少なくとも4個の連続するアミノ酸内、配列番号7の少なくとも5個の連続するアミノ酸内、配列番号7の少なくとも6個の連続するアミノ酸内、および配列番号7の少なくとも7個の連続するアミノ酸内のエピトープを認識する。例示的一実施形態では、配列番号7内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体HJ9.2である。例示的一実施形態では、配列番号7内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体HJ9.4である。例示的一実施形態では、配列番号7内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体HJ9.5である。

20

【0034】

さらにもう一つの実施形態では、タウに結合する本発明の単離された抗体が、配列番号8のアミノ酸配列(GGKVQ I I N K K)内のエピトープを認識する。好ましくは、単離された抗体は、配列番号8の少なくとも3個の連続するアミノ酸内、例えば配列番号8の少なくとも4個の連続するアミノ酸内、配列番号8の少なくとも5個の連続するアミノ酸内、配列番号8の少なくとも6個の連続するアミノ酸内、配列番号8の少なくとも7個の連続するアミノ酸内、配列番号8の少なくとも8個の連続するアミノ酸内、配列番号8の少なくとも9個の連続するアミノ酸内、および配列番号8の少なくとも10個の連続するアミノ酸内のエピトープを認識する。例示的一実施形態では、配列番号8内のエピトープを認識する本発明の単離された抗体が、抗体HJ9.3である。

30

【0035】

好ましい抗体は、HJ8.5と呼ばれるハイブリドーマに由来するマウス抗体のヒト化型である。本明細書で使用する「に由来する(derived from)」という用語は、「誘導された(derived)」抗体が、ハイブリドーマHJ8.5によって生産される抗体からのCDR領域を少なくとも1つは含むことを意味する。別の言い方をすると、「誘導された抗体」は、配列番号16、17、18、19、20および21からなる群より選択されるアミノ酸配列から構成されるCDR領域を少なくとも1つは含む。

40

【0036】

一実施形態では、本発明の抗体が、ハイブリドーマHJ8.5に由来し、配列番号12の軽鎖可変領域に対して90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の同一性を含む核酸配列によってコードされるか、または配列番号13の重鎖可変領域に対して90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%

50

の同一性を含む核酸配列によってコードされうる。もう一つの実施形態では、本発明の抗体が、ハイブリドーマHJ8.5に由来し、配列番号14の軽鎖可変領域に対して90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、または配列番号15の重鎖可変領域に対して90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含みうる。上述した実施形態のそれぞれにおいて、抗体はヒト化されていてもよい。

【0037】

タウに結合する本発明の抗体の例示的一実施形態では、抗体が配列番号12の軽鎖核酸配列と配列番号13の重鎖核酸配列を含む[すなわち本明細書においてHJ8.5と呼ばれるモノクローナル抗体]。タウに結合する本発明の抗体のもう一つの実施形態では、抗体が配列番号14の軽鎖アミノ酸配列と配列番号15の重鎖アミノ酸配列を含む[すなわち本明細書においてHJ8.5と呼ぶモノクローナル抗体]。

10

【0038】

一実施形態では、本発明の抗体が軽鎖CDR1を含みうる(例えば表Bの抗体1)。もう一つの実施形態では、本発明の抗体が軽鎖CDR2を含みうる(例えば表Bの抗体4)。さらにもう一つの実施形態では、本発明の抗体が軽鎖CDR3を含みうる(例えば表Bの抗体6)。これに代わる一実施形態では、本発明の抗体が、2つまたは3つの軽鎖CDRの組み合わせを含みうる(例えば表Bの抗体2、3、および5)。

【0039】

同様に、一実施形態では、本発明の抗体が重鎖CDR1を含みうる(例えば表Bの抗体7)。もう一つの実施形態では、本発明の抗体が重鎖CDR2を含みうる(例えば表Bの抗体10)。さらにもう一つの実施形態では、本発明の抗体が重鎖CDR3を含みうる(例えば表Bの抗体12)。これに代わる一実施形態では、本発明の抗体が2つまたは3つの重鎖CDRの組み合わせを含みうる(例えば表Bの抗体8、9、11)。

20

【0040】

あるいは、本発明の抗体が、1つ以上の軽鎖CDRと1つ以上の重鎖CDRを含みうる(例えば表Bの抗体13~48)。

表B

【表 2 - 1】

抗体	軽鎖			重鎖		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
1	配列番号16					
2	配列番号16	配列番号17				
3	配列番号16	配列番号17	配列番号18			
4		配列番号17				
5		配列番号17	配列番号18			
6			配列番号18			
7				配列番号19		
8				配列番号19	配列番号20	
9				配列番号19	配列番号20	配列番号21
10					配列番号20	
11					配列番号20	配列番号21
12						配列番号21
13	配列番号16			配列番号19		
14	配列番号16			配列番号19	配列番号20	
15	配列番号16			配列番号19	配列番号20	配列番号21
16	配列番号16				配列番号20	
16	配列番号16				配列番号20	配列番号21
17	配列番号16					配列番号21
19	配列番号16	配列番号17		配列番号19		
20	配列番号16	配列番号17		配列番号19	配列番号20	
21	配列番号16	配列番号17		配列番号19	配列番号20	配列番号21
22	配列番号16	配列番号17			配列番号20	
23	配列番号16	配列番号17			配列番号20	配列番号21
24	配列番号16	配列番号17				配列番号21

10

20

30

40

【表 2 - 2】

25	配列番号16	配列番号17	配列番号18	配列番号19		
26	配列番号16	配列番号17	配列番号18	配列番号19	配列番号20	
27	配列番号16	配列番号17	配列番号18	配列番号19	配列番号20	配列番号21
28	配列番号16	配列番号17	配列番号18		配列番号20	
29	配列番号16	配列番号17	配列番号18		配列番号20	配列番号21
30	配列番号16	配列番号17	配列番号18			配列番号21
31		配列番号17		配列番号19		
32		配列番号17		配列番号19	配列番号20	
33		配列番号17		配列番号19	配列番号20	配列番号21
34		配列番号17			配列番号20	
35		配列番号17			配列番号20	配列番号21
36		配列番号17				配列番号21
37		配列番号17	配列番号18	配列番号19		
38		配列番号17	配列番号18	配列番号19	配列番号20	
39		配列番号17	配列番号18	配列番号19	配列番号20	配列番号21
40		配列番号17	配列番号18		配列番号20	
41		配列番号17	配列番号18		配列番号20	配列番号21
42		配列番号17	配列番号18			配列番号21
43			配列番号18	配列番号19		
44			配列番号18	配列番号19	配列番号20	
45			配列番号18	配列番号19	配列番号20	配列番号21
46			配列番号18		配列番号20	
47			配列番号18		配列番号20	配列番号21
48			配列番号18			配列番号21

10

20

30

40

50

【0041】

さまざまな実施形態において、本発明の抗体はヒト化される。例えば一実施形態では、本発明のヒト化抗体が0～2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号16のCDR1、0～2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号17のCDR2、および0～2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号18のCDR3を含む軽鎖可変領域を含むか、または0～2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号19のCDR1、0～2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号20のCDR2、および0～2

個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号21のCDR3を含む重鎖可変領域を含みうる。好ましい実施形態では、本発明のヒト化抗体が、0～2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号16のCDR1、0～2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号17のCDR2、0～2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列番号18のCDR3を含む軽鎖可変領域と、0～2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号19のCDR1、0～2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号20のCDR2、および0～2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号21のCDR3を含む重鎖可変領域を含む。例示的一実施形態では、本発明のヒト化抗体が、アミノ酸配列・配列番号16のCDR1、アミノ酸配列・配列番号17のCDR2、アミノ酸配列・配列番号18のCDR3を含む軽鎖可変領域と、アミノ酸配列・配列番号19のCDR1、アミノ酸配列・配列番号20のCDR2、およびアミノ酸配列・配列番号21のCDR3を含む重鎖可変領域とを含む。本発明は、対応する配列番号16、17、18、19、20、および21の核酸配列も包含し、これらは当業者には容易に決定することができ、本発明の抗体を発現させるために、ベクターまたは他の大きなDNA分子、例えば染色体に組み込まれていてもよい。

10

【0042】

II. 使用方法

一態様において、本発明は、生きている対象に投与される機能的治療組成物において使用するための抗体を提供する。もう一つの態様において、本発明は、生きている対象から得られた生物学的液体の試料中のタウ凝集体を検出するために、免疫アッセイにおいて使用するための抗体を提供する。もう一つの態様において、本発明は、生きている対象から得られた生物学的液体の試料中のタウ凝集体の量を測定する目的で、免疫アッセイにおいて使用するための抗体を提供する。対象から得た生物学的液体の試料中のタウ凝集体の量は、多量または少量のタウ凝集体を有すると対象を分類するために使用することができ、さらに、対象がその生涯にわたってタウ凝集に関連する症状および/または疾患を発症するリスクを予測するために使用することができる。

20

【0043】

適切な対象には、ヒト、家畜、伴侶動物、実験動物、および動物園動物が含まれるが、これらに限るわけではない。一実施形態において、対象はげっ歯類、例えばマウス、ラット、モルモットなどであることができる。もう一つの実施形態において、対象は家畜であることができる。適切な家畜の非限定的な例には、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ラマおよびアルパカを含めることができる。さらにもう一つの実施形態において、対象は伴侶動物であることができる。伴侶動物の非限定的な例には、イヌ、ネコ、ウサギ、および鳥などのペットを含めることができる。さらにもう一つの実施形態において、対象は動物園動物であることができる。本明細書にいう「動物園動物」とは、動物園に見出されうる動物を指す。そのような動物には、非ヒト霊長類、大型のネコ科動物、オオカミ、およびクマを含めることができる。好ましい実施形態では、動物が実験動物である。実験動物の非限定的な例には、げっ歯類、イヌ、ネコ、および非ヒト霊長類を含めることができる。一定の実施形態では、動物がげっ歯類である。げっ歯類の非限定的な例には、マウス、ラット、モルモットなどを含めることができる。動物がマウスである実施形態において、マウスはC57BL/6マウス、Balb/cマウス、129sv、または他の任意の実験室系統であることができる。例示的一実施形態では対象がC57BL/6Jマウスである。好ましい実施形態では対象がヒトである。

30

40

【0044】

A. 処置方法

一態様において、本発明は、対象の脳におけるタウ凝集の拡がりを低減する方法を含む。もう一つの態様において、本発明は、タウシードによって誘導されるタウの細胞内凝集を低減するための方法を含む。それぞれの態様において、本方法は、対象に薬学的有効量の抗タウ抗体を投与することを含む。適切な抗体は上記I項で述べた。好ましい一実施形態では、抗体が、表1の抗体および表2の抗体（そのヒト化抗体、キメラ抗体または免疫

50

学的フラグメントを含む)からなる群より選択される。

【0045】

対象は、薬学的有効量の抗タウ抗体の投与に先立って、タウ凝集に関連する症状を有しても有さなくてもよい。別の言い方をすると、対象はタウ凝集に関連する症状を体験していても体験していなくてもよい。タウ凝集に関連する症状の診断または発症に先立って病理学的タウ凝集がおそらく始まっていることは、当業者には理解されるであろう。いくつかの実施形態では、対象がタウ凝集に関連する症状を有している。別の実施形態では、対象がタウ凝集に関連する症状を有していない。さらに別の実施形態では、対象が検出可能なタウ病態を有するが、タウ凝集に関連する症状を他にはなにも有していない。患者の脳におけるタウ凝集の拡がりを低減することで、タウの病理学的凝集に関連する症状の発生および/または進行が低減されうる。

10

【0046】

原線維性タウ凝集体の伝播を防止することで、タウ凝集体の生成および拡がりに関連する病態を処置しうる。本明細書で使用する用語「処置する」または「処置」には、タウ凝集に関連する少なくとも1つの症状またはその症状の徴候の防止、減弱、反転、または改善が含まれる。タウ凝集に関連する症状の一つの定義は、一部がタウ原線維から構成されるタウ凝集体の形成によって引き起こされる任意の症状を指す。タウ凝集に関連する症状を有する例示的障害には、進行性核上性麻痺、ボクサー認知症(慢性外傷性脳症)、17番染色体に連鎖する前頭側頭型認知症およびパーキンソニズム、リティコ・ボーディグ(Lytic-Bodig)病(グアムのパーキンソン-認知症複合病)、神経原線維変化優位型(tangle-predominant)認知症、神経節膠腫および神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節性硬化症、ハーラーフォルデン・シュパッツ病、リポフスチン沈着症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、嗜銀顆粒病(AGD)、前頭側頭葉変性症、アルツハイマー病、および前頭側頭型認知症などがあるが、これらに限定されるわけではない。これらの障害を診断するための方法は、当技術分野では知られている。

20

【0047】

タウ凝集に関連する症状の典型例として、認知機能障害、行動変化、情動失調、発作、および神経系の構造または機能の障害を挙げることができる。認知機能障害には、記憶、注意、集中、言語、抽象的思考、創造性、実行機能、立案、および組織化に伴う困難などがあるが、これらに限定されるわけではない。行動変化には、身体的または言語的攻撃、衝動性、抑制の減少、無感情、発動性(initiation)の減少、人格の変化、アルコール、タバコまたは薬物の濫用、および他の嗜癖関連行動などがあるが、これらに限定されるわけではない。情動失調には、うつ病、不安、躁病、易怒性、および情動失禁などがあるが、これらに限定されるわけではない。発作には、全般性強直間代発作、複雑部分発作、および非てんかん性心因性発作などがあるが、これらに限定されるわけではない。神経系の構造または機能の障害には、水頭症、パーキンソニズム、睡眠障害、精神病、平衡失調および協調失調などがあるが、これらに限定されるわけではない。これには、不全単麻痺、不全片麻痺、四肢不全麻痺、運動失調、パリズムおよび振戦などの運動障害が含まれる。これには、例えば嗅覚、触覚、味覚、視覚および聴覚を含む感覚消失または感覚機能障害も含まれる。さらにまた、これには、腸および膀胱の機能障害、性機能障害、血圧および体温調節不全などの自律神経系障害も含まれる。最後に、これには、視床下部および下垂体の機能障害、例えば成長ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、ゴナドトロピン放出ホルモン、プロラクチン、ならびに数多くの他のホルモンおよび調節因子の欠乏および調節不全に帰することができる、ホルモン障害が含まれる。タウ凝集に関連する症状を検出し評価するための方法は、当技術分野では知られている。

30

40

【0048】

いくつかの実施形態では、タウ凝集に関連する症状が、認知症を指す。認知症それ自体は具体的な疾患ではなく、日々の活動を実施する人の能力を低減するほど重篤な、記憶そ

50

の他の思考技能の低下に関連する幅広い症状を表す包括的用語である。認知症は、タウ凝集に関連する多くの疾患に共通する臨床的特徴でもある。熟練した実務家は認知症の重症度を診断するために利用することができる数多くの方法を熟知しているだろう。例えば、当技術分野では、認知機能検査および認知症に関するスクリーニング質問票がいくつか知られており、いずれも感度と特異度はさまざまである。非限定的な例として、ミニメンタルステート検査 (mini mental state examination) (MMSE)、短縮されたメンタルテストの得点 (abbreviated mental test may score) (AMTS)、修正ミニメンタルステート検査 (modified mini mental state exam) (3MS)、認知能力スクリーニングインストルメント (cognitive abilities screening instrument) (CASI)、トレイルメイキング検査 (Trail-making test)、時計描画検査 (clock drawing test)、高齢者における認知機能低下に関する介護者への質問表 (Informant Questionnaire on cognitive decline in the elderly)、一般医向け認知機能評価 (General practitioner assessment of cognition)、臨床認知症評価 (Clinical Dementia Rating) (CDR)、加齢と認知症を鑑別するための8項目にわたる介護者面談 (Eight-item informant interview to differentiate aging and dementia) (AD8) などが挙げられる。

【0049】

いくつかの実施形態では、認知症の症状の重症度が、CDRを使って定量される。CDRを使用した場合、スコア0は症状がないことを示し、スコア0.5は極めて軽度な症状を示し、スコア1は軽度な症状を示し、スコア2は中等度の症状を示し、スコア3は重度な症状を示す。したがって、対象に関するCDRスコアが増えれば、それは、認知機能の悪化および認知症の増大を示す。また、0から0より高い値へのCDRの変化は、認知症の発生または発症を示す。

【0050】

いくつかの実施形態では、タウ凝集に関連する症状が、タウ病態を指す。「タウ病態」という用語は、タウの病理学的凝集を指す。いくつかの実施形態では、タウ病態が、神経原線維変化を指す。別の実施形態では、タウ病態が過剰リン酸化タウを指す。さらに別の実施形態では、タウ病態が、疾患を持たない個体に検出されるものより1.2~約40倍高い、血液、血漿、血清、CSF、またはISF中に検出されうる高レベルのタウ凝集体を指す。タウの病理学的凝集を検出するための方法は、当技術分野において知られており、実施例でも詳述する。

【0051】

例示的一実施形態では、対象の脳におけるタウ凝集の拡がりを低減する方法が、対象に薬学的有効量の抗タウ抗体を投与することを含み、ここでは抗体が、0~2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号16のCDR1を含む軽鎖可変領域を含む単離された抗体、0~2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号17のCDR2を含む軽鎖可変領域を含む単離された抗体、0~2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号18のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む単離された抗体、0~2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号19のCDR1を含む重鎖可変領域を含む単離された抗体、0~2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号20のCDR2を含む重鎖可変領域を含む単離された抗体、および0~2個のアミノ酸置換を持つアミノ酸配列・配列番号21のCDR3を含む重鎖可変領域を含む単離された抗体からなる群より選択される。

【0052】

もう一つの例示的实施形態では、対象の脳におけるタウ凝集の拡がりを低減する方法が、対象に薬学的有効量の抗タウ抗体を投与することを含み、ここでは抗体がタウに特異的に結合し、配列番号1 (DRKDQGGYTMHQD) を含むエピトープを認識する。

【 0 0 5 3 】

もう一つの例示的实施形態では、対象の脳におけるタウ凝集の拡がりを低減する方法が、対象に薬学的有効量の抗タウ抗体を投与することを含み、ここでは抗体がタウに特異的に結合し、配列番号 1 (D R K D Q G G Y T M H Q D) からなるエピトープを認識する。

【 0 0 5 4 】

薬学的有効量の、好ましくは医薬グレードの抗体（免疫学的に反応性のフラグメントを含む）を対象に投与することができる。投与は標準的な効果的技法を使って行われ、これには、末梢投与（すなわち中枢神経系への投与によらない技法）または中枢神経系への局所投与が含まれる。末梢投与には、静脈内、腹腔内、皮下、肺、経皮、筋肉内、鼻腔内、口腔粘膜、舌下、または坐剤投与などがあるが、これらに限定されるわけではない。中枢神経系（CNS）への直接的な投与を含む局所投与には、腰椎、脳室内または実質内カテーテルによるもの、または外科的に埋め込まれた放出制御製剤を使用するものなどがあるが、これらに限定されるわけではない。

10

【 0 0 5 5 】

効果的投与のための医薬組成物は、選択した投与様式に適するように計画的に設計され、医薬上許容される賦形剤、例えば適合する分散剤、緩衝剤、界面活性剤、保存剤、可溶化剤、等張化剤、安定剤などが適宜使用される。引用により本明細書にそのまま組み込まれる「Remington's Pharmaceutical Sciences」（Mack Publishing Co.、ペンシルバニア州イーストン、第16版、ISBN：0-912734-04-3、最新版）には、実務者には広く知られているように、製剤技法の大意が記載されている。本開示において有用な抗体の溶解度特徴を改変して、例えばそれらをリポソームに封入することにより、または極性基をブロックすることにより、それらの親油性を高めることは、特に有用でありうる。

20

【 0 0 5 6 】

静脈内または腹腔内または皮下注射による効果的な末梢全身性送達は、生きている患者への好ましい投与方法である。そのような注射のための適切な媒体は簡単である。しかし、他にも、鼻エアロゾルまたは坐剤を利用することで、粘膜を介して投与を達成することもできる。そのような投与のための適切な製剤はよく知られており、典型的には、膜越しの伝達を容易にする界面活性剤を含む。そのような界面活性剤は、ステロイドまたはカチオン性脂質、例えばN-[1-(2,3-ジオレオイル)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、またはコレステロールヘミスクシナート、ホスファチジルグリセロールなどのさまざまな化合物から誘導されることが多い。

30

【 0 0 5 7 】

投与される製剤中のヒト化抗体の濃度は有効量であり、下は約0.1重量%から上は約15重量%または約20重量%までの範囲にわたり、所望であれば選択された特定投与様式に応じて、主に液量、粘度などに基づいて選択されるであろう。生きている患者に注射するための典型的組成物は、1~5mLのリン酸緩衝食塩水の滅菌緩衝水1~5mLと、本開示のヒト化抗体のいずれか1つまたはその組み合わせ約1~5000mgとを含有するように構成させることができるだろう。製剤は、調剤後に滅菌濾過されるか、または他の方法で、微生物学的に許容されるものにされるだろう。静脈内注入用の典型的組成物は、液体、例えば滅菌リンゲル液の量が1~250mL、抗タウ抗体濃度が1mLあたり1~100mgまたはそれ以上であるだろう。本開示の治療剤は、貯蔵のために凍結または凍結乾燥し、使用前に適切な滅菌担体に再構成することができる。凍結乾燥と再構成は、さまざまな度合いの抗体活性喪失につながりうる（例えば従来型の免疫グロブリンの場合、IgM抗体はIgG抗体より活性喪失が大きくなりがちである）。投与される投薬量は有効な投薬量であり、補償のために調節する必要があるありうる。一般に医薬グレードの品質である製剤のpHは、抗体の安定性（化学的および物理的）と投与される時の患者にとっての快適さとのバランスをとるよう、選択されるであろう。一般的には4~8のpHが認められる。用量は、適切な投与を受ける個体の大きさ、体重、および他の物理生物学的特徴に基づいて、個体ごとに変動するだろう。

40

50

【 0 0 5 8 】

本明細書において使用する用語「有効量」は、化合物などの物質の量であって、その物質を投与された患者に測定可能で有益な効果、すなわち有意な効力をもたらすものを意味する。本開示に従って投与される化合物の有効量または用量は、例えば投与される化合物、投与経路、処置される症状の状態など、その症例を取り巻く状況に基いて、また同様の患者および投与状況その他を考慮して、決定されるであろう。一態様において、典型的用量は、約 0.01 mg/kg ~ 約 100 mg/kg の、本明細書に記載の抗タウ抗体を含有する。用量は、約 0.05 mg/kg ~ 約 100 mg/kg、より好ましくは約 0.1 mg/kg ~ 約 50 mg/kg、または 0.5 mg/kg ~ 約 50 mg/kg の範囲をとることができる。投薬の頻度は、症状が効果的に処置されるように必要に応じて、毎日、または週もしくは月に 1 回、2 回、3 回もしくはそれ以上であることができる。あるいは、投薬の頻度は、症状が効果的に処置されるように必要に応じて、3 ヶ月に少なくとも 1 回であってもよい。例えば投薬は、約 5 週間ごと、約 6 週間ごと、約 7 週間ごと、約 8 週間ごと、約 9 週間ごと、約 10 週間ごと、約 11 週間ごと、または約 12 週間ごとであってもよい。

10

【 0 0 5 9 】

疾患そのものに関する処置の施行のタイミングおよび処置の継続期間は、その症例を取り巻く状況によって決まるであろう。処置はタウ凝集に関連する疾患の診断後に開始することができるだろう。あるいは、処置は、タウ凝集に関連する症状の臨床的確認後に開始することができるだろう。さらにまた、処置はタウ病態の検出後に開始することもできるだろう。処置は、病院または診療所で直ちに開始するか、後日、病院からの退院後に開始するか、または外来診療所で受診した後に開始することができるだろう。処置の継続期間は、1 回で投与される単回投与から、一生続く治療的処置まで、さまざまでありうる。

20

【 0 0 6 0 】

前述の方法は、ヒト化抗体などのタンパク質の投与には、最も好都合で、最も適切かつ効果的であると思われるが、適切に適応させることにより、他の効果的な投与技法、例えば脳室内投与、経皮投与および経口投与なども、適正な製剤がここで利用されるのであれば、使用することができる。

【 0 0 6 1 】

加えて、生分解性フィルムおよびマトリックス、または浸透圧ミニポンプ、またはデキストランビーズ、アルギナートもしくはコラーゲンに基づく送達システムを使った放出制御剤を使用することが望ましい場合もありうる。

30

【 0 0 6 2 】

典型的投薬量レベルは、標準的な臨床技法を使って決定し、最適化することができ、投与様式に依存するであろう。

【 0 0 6 3 】

B. 生物学的液体中のタウ凝集体を検出する方法

一態様において、本発明は、対象から得た生物学的液体の試料中のタウ凝集体を検出するための手段を提供する。もう一つの態様において本発明は、対象から得た生物学的液体の試料中のタウ凝集体の量を測定するための手段を提供する。本方法は、一般に、(i) 対象から生物学的液体の試料を得ること、および (ii) タウに特異的に結合する抗体を使って、試料中のタウ凝集体の量を測定することを含む。適切な抗体は上記 I 項で述べた。適切な対象は上述した。

40

【 0 0 6 4 】

本明細書において使用する用語「生物学的液体」は、対象から得られる液体を指す。タウ凝集体を含む生物学的液体はいずれも適切である。非限定的な例として、血液、血漿、血清、尿、CSF および ISF が挙げられる。液体は「そのまま」使用してもよいし、標準的技法を使って、細胞コンポーネントを液体から単離してもよいし、タンパク質画分を液体から単離してもよい。

【 0 0 6 5 】

50

当業者には理解されるであろうが、生物学的液体の試料を収集する方法は、生物学的液体の性質および実行しようとする解析のタイプに応じて変わりうるし、さまざまであるだろう。当技術分野において広く知られているさまざまな方法はいずれも、生物学的液体の試料を収集するために利用することができる。一般論として、本発明に従ってタウ凝集体を正確に検出し、その量を測定することができるように、試料の完全性が保たれる方法であることが好ましい。

【0066】

試料が得られたら、抗タウ抗体を使ってタウ凝集体を検出し、その量を測定するために、試料をインピット口で加工する。いくつかの実施形態では、検出および測定に先立って、試料中のタウ凝集体の濃度を増加させる。いくつかの実施形態では、検出および測定に先立ち、少なくとも1つの単離された抗タウ抗体を使って、タウ凝集体を試料から免疫沈降させる。別の実施形態では、検出および測定に先立ち、少なくとも2つの単離された抗タウ抗体を使って、タウ凝集体を試料から免疫沈降させる。少なくとも2つの抗体を使ってタウ凝集体を免疫沈降させる実施形態では、好ましくは、第1抗体がタウの第1エピトープに結合し、第2抗体がタウの第2のオーバーラップしていないエピトープに結合する。タウの2つの異なるエピトープに結合する2つの抗体を使用することにより、考える全てのタウ凝集体コンフォーマーを捕捉する効率が向上しうる。免疫沈降用の適切な抗体ペアの非限定的な例を表Cに列挙する。好ましい一実施形態では、タウ凝集体を、検出および測定に先立ち、少なくとも2つの単離された抗タウ抗体を使って、試料から免疫沈降させ、ここでは、少なくとも第1抗体が配列番号1内のエピトープを認識し、少なくとも第2抗体が配列番号8内のエピトープを認識する。当業者は、検出および測定に先立って試料中のタウ凝集体を濃縮または免疫沈降する必要があるかどうかを、日常的な実験で決定することができるが、当技術分野で知られている方法を使ってそうすることができるであろう。

表C

【表3】

		第2抗体												
		HJ8.1.1	HJ8.1.2	HJ8.2	HJ8.3	HJ8.4	HJ8.5	HJ8.7	HJ8.8	HJ9.1	HJ9.2	HJ9.3	HJ9.4	HJ9.5
第1抗体	HJ8.1.1		×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×
	HJ8.1.2	×		×	×			×	×	×	×	×	×	×
	HJ8.2	×	×			×	×	×	×	×	×	×	×	×
	HJ8.3	×	×			×	×	×	×	×	×	×	×	×
	HJ8.4	×		×	×			×	×	×	×	×	×	×
	HJ8.5		×	×	×	×			×	×	×	×	×	×
	HJ8.7	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×
	HJ8.8	×	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×	×
	HJ9.1	×	×	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×
	HJ9.2	×	×	×	×	×	×	×	×	×		×		
	HJ9.3	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	HJ9.4	×	×	×	×	×	×	×	×	×		×		
HJ9.5	×	×	×	×	×	×	×	×	×		×			

【0067】

抗体を使ってタンパク質を検出しその量を測定するための方法は、当技術分野ではよく知られている。抗体を使ってタンパク質を検出しその量を測定するための方法であって、当業者に知られている適切な方法は全て本発明の範囲内で想定される。非限定的な例とし

て、ELISA、サンドイッチイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、免疫プロットまたはウェスタンプロット、フローサイトメトリー、免疫組織化学、およびアレイが挙げられる。

【0068】

一般に、タウ凝集体を検出しその量を測定する抗体ベースの方法は、タウ凝集体を含む試料の一部または全部を、抗体とタウ凝集体の間の複合体の形成を可能にするのに有効な条件下で、抗タウ抗体と接触させることを含む。典型的には、試料全体が必要というわけではないので、当業者は、試料中のタウ凝集体を、ある期間にわたって、繰り返し検出し、その量を測定することができる。この方法は溶解状態で行うことができ、抗体またはタウ凝集体を固体表面に固定化することもできる。適切な表面の非限定的な例として、マイクロータイタープレート、試験管、ビーズ、樹脂、および他のポリマーが挙げられる。当業者には理解されるであろうが、基材への取り付けは、幅広い多様な方法で行うことができる。例えば、基材と抗体とを化学官能基で誘導体化してから、それら2つを結合させてもよい。例えば基材は、限定するわけではないがアミノ基、カルボキシル基、オキシ基またはチオール基などの化学官能基で誘導体化することができる。これらの官能基を使用すれば、それらの官能基を使って直接的に、またはリンカーを使って間接的に、抗体を取り付けることができる。抗タウ抗体を基材に非共有結合的に取り付けてもよい。例えば、ストレプトアビジンで共有結合的にコーティングされた表面に結合して取り付けをもたらすビオチン化抗タウ抗体を、調製することができる。あるいは、光重合およびフォトリソグラフィなどの技法を使って、抗体を表面上に合成することもできる。

10

20

【0069】

複合体を形成させるのに有効な条件下で十分な時間、試料を抗体と接触させる際は、一般に、抗タウ抗体組成物を試料に（または免疫沈降もしくは濃縮したタウ凝集体に）加え、その混合物を、存在する抗原に抗タウ抗体が結合するのに十分な時間、インキュベートする。この時間の後、複合体を洗浄してもよく、次に、当技術分野においてよく知られている任意の方法によって、複合体が検出され、その量が測定される。抗体-ポリペプチド複合体を検出し測定する方法は、一般に、ラベルまたはマーカの検出に基づく。本明細書において使用する用語「ラベル」は、抗体に取り付けられた任意の物質または他の基質材料であって、ある検出方法によって検出することができるものを指す。適切なラベルの非限定的な例には、発光分子、化学発光分子、蛍光色素、蛍光消光剤、着色分子、放射性同位体、シンチラント、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、プロテインA、プロテインG、抗体またはそのフラグメント、ポリヒスチジン、 Ni^{2+} 、Flagタグ、mycタグ、重金属、および酵素（アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、およびルシフェラーゼなど）がある。ラベルまたはマーカの検出に基いて抗体-ポリペプチド複合体を検出しその量を測定する方法は、当技術分野ではよく知られている。

30

【0070】

好ましい一実施形態では、試料中のタウ凝集体の量を測定するための方法が、2つの捕捉抗体と検出抗体とを含むイムノアッセイであり、ここで、各捕捉抗体は互いに異なるタウエピトープを認識する単離された抗タウ抗体であり、検出抗体は、ラベルに取り付けられた単離抗タウ抗体である。検出抗体は2つの捕捉抗体の一方と同じ抗体であってもよいし、あるいは検出抗体は、どちらの捕捉抗体によっても認識されないタウエピトープを認識してもよい。典型的には、第1捕捉抗体と第2捕捉抗体が、約10:1~約1:10、約5:1~約1:5、約3:1~約1:3、または約2:1~約1:2の量で使用される。いくつかの実施形態では、第1捕捉抗体と第2捕捉抗体が、ほぼ等価な濃度で使用される。適切な捕捉抗体ペアの非限定的な例として、表Dおよび表Eに開示する抗体が挙げられる。適切な検出抗体の非限定的な例として、表Aに列挙する抗体、ならびにタウに特異的に結合しかつ配列番号1~11からなる群より選択されるアミノ酸配列内のエピトープを認識する抗体が挙げられる。例示的一実施形態では、第1捕捉抗体が、タウに特異的に結合し、配列番号7内のエピトープを認識する単離された抗体であり、第2捕捉抗体が、タウに特異的に結合し、配列番号8内のエピトープを認識する単離された抗体であり、検

40

50

出抗体が、タウに特異的に結合し、配列番号 8 内のエピトープを認識する単離された抗体である。

表 D 第 1 および第 2 捕捉抗体

【表 4】

		第2捕捉抗体												
		HJ8. 1. 1	HJ8. 1. 2	HJ8. 2	HJ8. 3	HJ8. 4	HJ8. 5	HJ8. 7	HJ8. 8	HJ9. 1	HJ9. 2	HJ9. 3	HJ9. 4	HJ9. 5
第1捕捉抗体	HJ8. 1. 1		×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×
	HJ8. 1. 2	×		×	×		×	×	×	×	×	×	×	×
	HJ8. 2	×	×			×	×	×	×	×	×	×	×	×
	HJ8. 3	×	×			×	×	×	×	×	×	×	×	×
	HJ8. 4	×		×	×		×	×	×	×	×	×	×	×
	HJ8. 5		×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×
	HJ8. 7	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×
	HJ8. 8	×	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×	×
	HJ9. 1	×	×	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×
	HJ9. 2	×	×	×	×	×	×	×	×	×		×		
	HJ9. 3	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	HJ9. 4	×	×	×	×	×	×	×	×	×		×		
HJ9. 5	×	×	×	×	×	×	×	×	×		×			

10

20

表 E 第 1 および第 2 捕捉抗体：各抗体はタウに特異的に結合し、表示した配列番号によって示されるアミノ酸配列内のエピトープを認識する。

【表 5】

		第2捕捉抗体							
		配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4	配列番号5	配列番号6	配列番号7	配列番号8
第1捕捉抗体	配列番号1		×	×	×	×	×	×	×
	配列番号2	×		×	×	×	×	×	×
	配列番号3	×	×		×	×	×	×	×
	配列番号4	×	×	×		×	×	×	×
	配列番号5	×	×	×	×		×	×	×
	配列番号6	×	×	×	×	×		×	×
	配列番号7	×	×	×	×	×	×		×
	配列番号8	×	×	×	×	×	×	×	

30

40

【0071】

もう一つの態様において、本発明は、対象から得た生物学的液体の試料において測定されるタウ凝集体の量に基いて対象を分類するための手段を提供する。本方法は一般に (i) 対象から生物学的液体の試料を得て、タウに特異的に結合する抗体を使って、試料中のタウ凝集体の量を測定すること、(ii) 試料中のタウ凝集体の量を参照値と比較すること、および (iii) 試料中に測定されるタウ凝集体の量に基いて多量または少量のタウ

50

凝集体を有すると対象を分類することを含む。対象から生物学的液体の試料を得て、タウに特異的に結合する抗体を使って、試料中のタウ凝集体の量を測定するための方法は、上に詳述しており、実施例でもさらに説明する。

【0072】

当技術分野において知られる任意の適切な参照値を使用することができる。例えば適切な参照値は、臨床的に検出可能なタウ凝集の症状を有さない同じ種の対象または対象の群から得られる生物学的液体の試料中のタウ凝集体の量でありうる。もう一つの例では、適切な参照値が、検出可能なタウ病態を有さない同じ種の対象または対象の群から得られる生物学的液体試料中のタウ凝集体の量でありうる。もう一つの例では、適切な参照値が、0の臨床認知症評価スコア(CDR=0)を有する同じ種の対象または対象の群から得られる生物学的液体試料中のタウ凝集体の量でありうる。もう一つの例では、適切な参照値が、当技術分野において知られている方法によって決定されるアッセイのバックグラウンドシグナルでありうる。もう一つの例では、適切な参照値が、同じ対象から得られる参照試料中のタウ凝集体の量の測定値でありうる。参照試料は試験試料と同じタイプの生物学的液体を含み、対象が臨床的に検出可能なタウ凝集の症状を有していなかった時に、その対象から得たものであることができる。対象が他の点では健常である場合に、その対象から参照試料を得ることが必ずしも可能ではなく、また必ずしも望ましいわけではないことは、当業者には理解されるであろう。例えば、治療の有効性のモニタリングを行う場合、参照試料は、治療開始前の対象から得られた試料でありうる。そのような例では、対象がタウ病態を有しうるが、タウ凝集の他の症状(例えば認知症、認知機能低下など)を有さないか、または対象がタウ病態を有し、かつタウ凝集の他の症状を1つ以上有しうる。さらにもう一つの例では、適切な参照試料が、タウ凝集体を有さないことが示された個体または個体の群からの生物学的液体でありうる。

10

20

30

40

【0073】

本発明によれば、試料中に測定されるタウ凝集体の量に基づいて、対象を分類することができる。対象から得た生物学的液体の試料中に測定されるタウ凝集体の量に基づく対象の分類は、対象の生涯においてタウ凝集に関連する疾患および/または症状を発生させるであろう対象を同定するために使用することができる。一般論として、対象は、参照値と比較して多量または少量のタウ凝集体を有すると分類することができ、ここで、多量のタウ凝集体とは参照値を上回る量であり、少量は参照値以下の量である。好ましい実施形態では、多量のタウ凝集体を有すると対象を分類するには、参照値と比較した生物学的液体の試料中のタウ凝集体の量が、少なくとも2倍は増加している。例えば、参照値と比較した試料中のタウ凝集体の量が、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも35倍、少なくとも40倍、少なくとも45倍、または少なくとも50倍は増加している。対象から得た生物学的液体の試料中のタウ凝集体の量が参照値と比較して少なくとも2倍は増加していて、参照値が、検出可能なタウ凝集の症状を持たない1人以上の無病個体から得られる同じタイプの生物学的液体の試料(またはそれと等価な試料)である場合、対象は、その生涯において、タウ凝集に関連する疾患および/または症状を発生させる可能性が高くなっている。

30

40

【0074】

定義

本明細書にいう「抗体」は、タウを特異的に認識する免疫グロブリン由来分子を指す。本発明の抗体は、完全長抗体(IgM、IgG、IgA、IgE)であるか、抗体フラグメント(Fab、F(ab')₂、scFv)であることができる。抗体はキメラ抗体であるか、ヒト化抗体でありうる。

【0075】

本明細書にいう「CDR」は、「相補性決定領域」を意味する。CDRを超可変領域ということもある。

【0076】

50

本明細書にいう「軽鎖」は抗体の小ポリペプチドサブユニットである。典型的抗体は2本の軽鎖および2本の重鎖を含む。

【0077】

本明細書にいう「重鎖」は抗体の大ポリペプチドサブユニットである。抗体の重鎖は一連の免疫グロブリンドメインを含有し、少なくとも1つは可変ドメイン、少なくとも1つは定常ドメインである。

【0078】

本明細書にいう「ヒト化」は、ヒト細胞培養中で発現する能力を有するコンストラクトを作製するために組換えDNAを使って、モノクローナル抗体を生産するプロセスを指す。これらのコンストラクトを製作するための既知の技法はいずれも、本発明の目的に役立つであろう。

【0079】

本明細書にいう「一本鎖可変フラグメント」または「scFv」または「scFvs」は、リンカーを介して接続された免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域の融合タンパク質を指す。いくつかの実施形態では、リンカーが約10~25アミノ酸のペプチドである。

【実施例】

【0080】

本発明の好ましい実施形態を例示するために、以下に実施例を挙げる。以下の実施例で開示する技法は、本発明の実施に際してよく機能することを本発明者らが見出した技法に相当し、したがってその実施の好ましい形態を構成するとみなしうることは、当業者には理解されるはずである。しかし、開示する具体的実施形態には多くの変更を加えることができ、それでもなお、本発明の本旨および範囲から逸脱することなく、ほぼ同じまたは類似する結果が得られることは、この開示に照らして、当業者には理解されるはずである。

【0081】

実施例1~8の序論

ニューロンおよびグリアにおける微小管結合タンパク・タウの凝集は、アルツハイマー病(AD)、進行性核上性麻痺、および前頭側頭型認知症を含む20を超える神経変性障害と関連している。ヒト研究から得られた最近の証拠は、タウ病態は脳中にランダムに分布するのではなく、ニューロン接続の既存のネットワークと関係していることを示唆している。ADの原線維性タウ病態は既知の解剖学的接続に沿って進行するが、ネットワークが変性する機序はわかっていない。重要なことに、最近の病理学的研究は、ヒト脳およびマウス脳ではタンパク凝集体がある細胞から別の細胞へと移動しうることを示唆している。さらにまた、タウ、SOD-1、 α -シヌクレインおよびポリグルタミン(polyglutamine)などの組換えヒト疾患関連タンパク質の原線維型は、細胞外間隙から容易に取り込まれて、細胞内ミスフォールディングを誘発する。これらの現象は、エキソソームおよびトンネリングナノチューブが経細胞的拡がり(trans-cellular spread)を媒介すると提唱されたプリオン伝播を連想させる。タウ凝集体が細胞から細胞へとタンパク質ミスフォールディングを拡げるのは、直接的な細胞間接触によるのか、それとも細胞外間隙を介して起こるのかは、未解決の問題である。さらにまた、病理学的タウ種が、凝集体が「ドナー」細胞から放出され、第2の「レシピエント」細胞に進入し、他の間接的な機序ではなくて直接的なタンパク質-タンパク質接触によって、さらなるミスフォールディングを誘導するという、凝集の真の経細胞伝播を媒介しうるのかどうかも、まだ決定されていない。ここでは、タウ原線維が細胞外間隙に直接放出されるかどうか、そしてこの機序によって凝集を伝播することができるかどうかを検証する。

【0082】

実施例1. 抗タウ抗体

標準的な技法を使って2系列の抗タウ抗体、すなわちHJ8系列(組換えヒトタウに対するマウスモノクローナル抗体)およびHJ9系列(組換えマウスタウに対するマウスモノクローナル抗体)を作製した(表1)。結合エピトープは多くの抗体についてマッピング

10

20

30

40

50

グされている（表 A）。

表 1 ヒトタウおよびマスタウに対する H J 8 系列および H J 9 系列

【表 6】

抗体	アイソタイプ	適用
HJ 8.1	IgG2b IgG1	IP WB IHC(hおよびm)
HJ 8.2	IgG2b	IP WB IHC(hおよびm)
HJ 8.3	IgG2b	IP WB IHC(hおよびm)
HJ 8.4	IgG1	IP WB IHC(hおよびm)
HJ 8.5	IgG2b	IP WB IHC(h) ELISA コーティング 染色 3ヶ月齢マウス用
HJ 8.7	IgG2b	IP WB IHC (hおよびm) HJ8.7B ELISA 検出 染色用
HJ 8.8	IgG2b	IP WB IHC(hおよびm) 染色
HJ 9.1	IgG2b	IP WB IHC ELISA
HJ 9.2	未知	IP WB IHC ELISA コーティング 染色用
HJ 9.3	IgG2b	IP WB IHC ELISA コーティング用
HJ 9.4	IgG2b	IP WB IHC
HJ 9.5	IgG2b	IP WB IHC

IP=免疫沈降；WB=ウェスタンブロット；ELISA=酵素結合免疫吸着アッセイ、IHC=免疫組織化学；h=ヒト；m=マウス

10

20

30

40

【0083】

マスタウおよびヒトタウに対する H J 8 および H J 9 系列抗体の結合アフィニティを特徴づけるために、Biacore の SPR 技術を使用した。EDC（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド）および NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）を 1：1 の比で使用することで、Biacore センサーチップ CM-5（カルボキシメチル化デキストランマトリックス）を活性化した。2）次にリガンド（マスタウまたはヒトタウ）を、5 μ l / 分の流速で、Biacore CM-5 センサーチップ上に固定化した（20 μ g / ml、10 mM 酢酸ナトリウム（pH 3.5）中）。1 M エタノールアミン（pH 8.5）を通過させることで、Biacore CM-5 センサーチップ上の残存未結合領域を失活させた。

【0084】

センサーチップ表面の調製後に、分析物（例えば抗体）を濾過脱気 0.01 M Hepes 緩衝液、0.15 M NaCl、0.005 % サーフアクタント P20、pH 7.4 中、異なる濃度（0.78 nM ~ 400 nM）で、10 μ l / 分の流速で注入した。全ての試料を 2 つ組（duplicate）にして実験した。単一の抗体濃度での各サイクル / 実験後に、10 mM グリシン（pH 1.7）を使って結合している抗体 / 分析物を除去し、表面に取り付けられた単量体 / 原線維 / リガンドを残すことにより、チップの表面を再生した。

【0085】

SPR センサーグラム（図 2 - 13）から、会合速度またはオン速度（ K_a ）、解離速度またはオフ速度（ K_d ）、およびアフィニティ定数または相互作用のアフィニティ（ K_D 、ここで $K_D = K_d / K_a$ ）を得た（表 2 および表 3）。

表 2 マスタウに対する H J 8 系列および H J 9 系列の結合データ

【表 7】

抗体	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
HJ 8.1	3.17×10^4	1.83×10^{-8}	0.578pM
HJ 8.2	2.25×10^5	3.45×10^{-7}	1.57pM
HJ 8.3	1.46×10^5	7.05×10^{-8}	0.48pM
HJ 8.4	2.78×10^5	1.03×10^{-7}	0.37pM
HJ 8.5	結合は検出されない		
HJ 8.7	7.03×10^5	2.41×10^{-8}	0.34pM
HJ 8.8	1.92×10^5	1.78×10^{-4}	0.926nM
HJ 9.1	3.52×10^5	7.61×10^{-9}	0.02pM
HJ 9.2	2.65×10^5	1.08×10^{-4}	0.4nM
HJ 9.3	8.61×10^4	9.16×10^{-6}	0.1nM
HJ 9.4	2.28×10^5	5.1×10^{-7}	2.24pM
HJ 9.5	3.4×10^5	5.37×10^{-7}	1.58pM

10

表 3 ヒトタウに対する H J 8 系列および H J 9 系列の結合データ

20

【表 8】

抗体	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
HJ 8.1	2.43×10^4	3.19×10^{-8}	1.32pM
HJ 8.2	1.98×10^5	8.95×10^{-7}	4.51pM
HJ 8.3	1.44×10^5	1.93×10^{-3}	0.07pM
HJ 8.4	2.46×10^5	3×10^{-8}	0.122pM
HJ 8.5	1.3×10^5	4.34×10^{-8}	0.336pM
HJ 8.7	6.8×10^4	2.33×10^{-8}	0.34pM
HJ 8.8	1.6×10^5	9.57×10^{-7}	5.95pM
HJ 9.1	3.1×10^5	1.84×10^{-3}	0.5pM
HJ 9.2	6.13×10^4	1.15×10^{-3}	24.6nM
HJ 9.3	7.55×10^4	7.51×10^{-6}	99pM
HJ 9.4	1.53×10^5	1.07×10^{-3}	6.9nM
HJ 9.5	5.14×10^5	1.97×10^{-3}	3.82nM

30

【0086】

実施例 2 . 完全長タウが I S F 中に存在する

40

マウスタウとヒトタウの両方を認識するタウ抗体を使って、野生型マウスと P 3 0 1 S ヒトタウトランスジェニックマウス (P 3 0 1 S t g マウス、方法の項に詳細) の両方の I S F 試料から、タウを免疫沈降させた。I S F 中の単量体型タウの量は比較的低いので、免疫沈降アッセイにおいてうまく作用する 2 つの抗タウモノクローナル抗体を使用した。免疫沈降後に、免疫プロットによってタウを解析した。内在性マウスタウアイソフォームは 4 8 ~ 6 2 k D a に泳動する。野生型脳溶解物では、タウが S D S - P A G E 上で 4 つの独立したバンドに現れた (図 1 4 A)。野生型マウスでは最も豊富な種が 4 8 k D a に泳動した。P 3 0 1 S t g マウス脳では、4 つの内在性マウスタウバンドに加えて、過剰発現したヒト 1 N 4 R タウが、5 5 k D a に泳動する強いバンドとして観察されると共に、タウ分解産物に相当すると思われる 3 9 k D a バンドとして観察された。

50

【0087】

全脳溶解物とは対照的に、免疫沈降後は、野生型マウスからのISF中に、タウの微小管結合領域(MTBR)を認識する抗体HJ9.3で、単一のタウバンドが検出された(図14B)。このバンドは、マウス脳溶解物に観察される最も大きいアイソフォーム2N4Rに対応した。P301S tgマウスのISFでは、ヒト特異的タウバンドが上述のマウスタウバンドと共沈し、その分子量はわずかに低かった(図14B)。これら2つのバンドは、タウHJ8.1に対して産生されたもう一つのマウスモノクローナル抗体でも沈降した(図14C)。これらのデータから、ELISAによって評価されるISF中の主要種はおそらく完全長単量体型タウであることが示唆された。

【0088】

実施例3. タウRDタンパク質はトランスフェクトHEK293細胞中で原線維凝集体を形成する

タウ遺伝子は6つのタンパク質アイソフォームをコードし、複数の変異が優性遺伝性神経変性疾患を引き起こす。スプライシングに依存して、タウタンパク質は、リピートドメイン(RD)と呼ばれる、タンパク質の易凝集性コアを構成する3つまたは4つのリピート領域を有する。タウRDの発現はトランスジェニックマウスにおける病態の原因となり、完全長タウの切断が患者において原線維を含むフラグメントを形成するという証拠がある。このコンストラクトは培養細胞中で確実に原線維を形成するので、完全長タウではなく、このコンストラクトを使用した。タウ凝集を増加させることが知られているさまざまな変異、すなわちK280(Kと呼ぶ)、P301L、およびV337Mを、4リピートRDタンパク質に工学的に組み入れた。P301L変異体とV337M変異体を合わせて一つのタンパク質(LMと呼ぶ)にすることにより、以前に記載したものと同様に凝集能が著しく増加しているRDの変異体型を作製した。この「非生理的」変異体は、細胞内凝集体の効率のよい形成に依存するミスフォールディングの伝達事象および経細胞伝播のアクセシビリティを容易にし、類似しているがより弱い(less robust)「生理的」

K変異体の凝集表現型を補う。シート形成および原線維化を阻害するが、不定形凝集体の形成は阻止しない2つのプロリン置換、I227PおよびI308P(PPと呼ぶ)も、K変異体に工学的に組み入れた。各形態の変異体タウを、カルボキシル末端で、シアン蛍光タンパク質もしくは黄色蛍光タンパク質(CFPまたはYFP)またはHAタグのいずれかに融合した。コンストラクトを図15Aに図解する。

【0089】

タウRD細胞内凝集体の特徴を評価するために、さまざまな形態のRDをHEK293細胞に一過性にトランスフェクトした。原子間力顕微鏡法(AFM)を使って、SDS不溶物を評価した。RD(K)-HAおよびRD(LM)-HAは明白な原線維種を生産した(図15B)。細胞内でのRD(K)-HAおよびRD(LM)-HA凝集体は、X-34(ベータシート原線維を標識し、青色スペクトルで放射する、チオフラビン誘導体)についても陽性に染色された(図15C)。さらに、光学顕微鏡で見える封入体が生化学的相関関係を有するかどうかを試験するために、界面活性剤分画を使用した。SDS不溶性ペレット(プロテアーゼ阻害剤を含む1xPBS中の1%Triton X-100で可溶性ペレットを単離した後、不溶性ペレットをSDS/RIPA抽出)では、単量体と、オリゴマーに合致する高分子量種とが検出された(図15D)。

【0090】

以前、本出願人は蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を使って、細胞内ハンチントンタンパク質凝集を定量した。この方法を使ってタウRD凝集を追跡することができるかどうかを調べるために、さまざまなRD変異体(wt、K、PP、LM)を黄色蛍光タンパク質(YFP:FRETアクセプター)およびシアン蛍光タンパク質(CFP:FRETドナー)に融合した。これらのコンストラクトをHEK293細胞にコトランスフェクトし(RD-CFP/RD-YFPと表記する)、FRETアクセプターフォトリチング共焦点顕微鏡法、および蛍光プレートリーダー(FPR)を使ったスペクトル放射FRET(spectral emission FRET)を用いて、細胞内凝集体形

10

20

30

40

50

成を定量した。共焦点顕微鏡法では、RD(LM) - CFP / RD(LM) - YFPを共発現する細胞を撮像し、部分的なおよび完全なアクセプターフォトリーチングの前後に、ドナーシグナルを測定した。フォトリーチング後のドナーシグナルの増加により、平均FRET効率は $18.2\% \pm 0.058$ ($n = 6$ 、データは \pm 標準偏差である)となり、FRETペア化したRD種間の分子間相互作用が確認された(図16A)。FRETを使ったスペクトルFRETによるRD - CFP / YFP凝集の測定には、確立された方法を使用した。これは、シグナル検出の限度内でドナー消光を最大化するために、3:1の比でのRD - YFPとRD - CFPのコトランスフェクションに基いた。RD(PP) - CFP / YFPからは有意なFRETが観察されなかった。しかし、RD(K) - CFP / YFPおよびRD(LM) - CFP / YFPはそれぞれが強いFRETシグナルを生じ(図16B)、顕微鏡法での知見が確認された。

10

【0091】

さまざまな細胞が組換えタウ原線維を細胞外培地から取り込むであろうということは、以前から観察されていた。これは、YFPに融合されたネイティブフォールドの完全長タウタンパク質の細胞内原線維化を誘発する。この現象を確かめるために、さまざまな量の組換えRD原線維によって誘導されるRD(K) - CFP / YFPの凝集を、FRETを使ってモニターした。HEK293細胞にRD(K) - CFP / YFPをコトランスフェクトし、15時間培養した。次に、さまざまな濃度のRD-HA原線維(単量体換算で 0.01 、 0.03 、 0.1 および $0.3 \mu\text{M}$)を、9時間、培地に加えた。次に、培地を変えることによって原線維を除去し、細胞を4時間回復させてから固定し、FRETを使って解析した。無処理のRD(K) - CFP / YFPと比較して、組換え原線維によって誘導されるFRETシグナルの用量依存的増加が観察された(図16C)。要約すると、細胞内でのタウRD凝集および原線維形成の顕微鏡的、分子的、生化学的、および生物物理学的尺度の間に相関関係が観察された。一定の限度内で、特にタンパク質発現レベルを制御すれば、プレートリーダーに基づくFRETアッセイは、このプロセスの手軽な尺度になる。

20

【0092】

実施例4. RD凝集の経細胞誘導(trans-cellular induction)

以前、本出願人は、ある細胞からのタウ封入体が共培養中のナイーブ細胞に伝達されるであろうことを決定した。しかし、これらの伝達された凝集体がレシピエント細胞中でさらなる凝集を誘導できるかどうか、凝集の誘導が直接的なタンパク質-タンパク質相互作用に基づくかどうかも証明されていなかった。まず、あるドナー細胞集団に由来するRD(LM) - HA凝集体が、共培養時に、異なるレシピエント集団中のRD(K) - YFPと共に封入体を形成するかどうかを調べた。一つの細胞群に易凝集性RD(LM) - HAをトランスフェクトし、別個の群にはRD(K) - YFPをトランスフェクトした。翌日、それらの細胞集団を一緒に再プレatingして、48時間、共培養した。固定後に、HA抗体を使ってそれらを免疫染色し、X-34で対比染色した。RD(LM) - HAとRD(K) - YFPが封入体中に共同在している細胞が数多く観察された(図17A)。これらの封入体はX-34についても陽性に染色されることが多く、これはベータシート構造を示している。FRETアッセイを使ってこれらの研究を拡張することにより、RD(LM) - HAを発現する細胞との共培養によって誘導されるRD(K) - CFP / YFPの凝集をモニターした。この例では2つの細胞集団を共培養した。ドナー集団はRD(LM) - HAを発現し、レシピエント集団はRD(K) - CFP / YFPを発現した。シート耐性型のタウRD(PP) - HAまたはモックトランスフェクト細胞を陰性対照として使用した。48時間後に、細胞単層からのFRETを測定した。RD(PP) - HAまたはモックトランスフェクト細胞との対比で、RD(LM) - HAとの共培養によって誘導されるFRETの著しい増加が観察された(図17B)。RD(LM) - HA細胞をRD(WT) - CFP / YFPレシピエント細胞と共培養すると、FRETシグナルの小さな増加が観察された(非掲載データ)。これらの結果から、一つの易凝

30

40

50

集性タウ種がある細胞から別の細胞へと移動して、ベータシートに富む封入体での共局在を誘発することが示唆された。凝集体の放出が細胞死後に起こる可能性はあるが、さまざまなトランスフェクト集団のヨウ化プロピジウム染色では、その証拠は観察されなかった(図17C)。

【0093】

実施例5．直接的なタンパク質接触によるミスフォールディングの伝播

これらの結果は、共凝集が、直接的なタンパク質接触により、レシピエント細胞中の対応タンパク質と接触するドナー由来のタウRD間の分子間会合を伴って起こったことを強く示唆するものの、その当否を正式に扱うことはできなかった。FRETを使ってこの問題に取り組んだ。まず、RD(LM)-CFPをドナー細胞集団内で発現させ、同時に、RD(LM)-YFPを第2のレシピエント集団内で発現させた。48後に、共焦点顕微鏡法とFPRの両方を使って、細胞単層からのFRETを測定した。共焦点顕微鏡法を使って、YFPのフォトリージングの前後で、CFPシグナルを測定した。~14.2%という平均FRET効率が記録されたことから、封入体は直接接触したRD(LM)-CFPとRD(LM)-YFPを含有することが示された(図18A)。次に、異なる形態の非標識RDを使ってRD-CFPの凝集を誘導することにより、相対的FRETシグナルをFPRで比較した。まず、RD(K)-CFPとRD(LM)-HAをドナー細胞集団内で共発現させ、第2のレシピエント細胞集団内でRD(K)-YFPを発現させた。RD(LM)-HAは、RD(K)-CFPの凝集および移動の強化因子として働き、続いてそれがRD(K)-YFPレシピエント細胞に伝達されるのを促進する。これにより、共培養細胞では、小さいが再現性のあるFRETシグナルの増加がもたらされた。このシグナルは、CFPタグ付きまたはYFPタグ付きのRDコンストラクトが、シート形成を阻止するPP変異を含有する場合には、消失したことから(図18B)、このペアのどちらのメンバーも、ベータシート構造を形成する能力を有さなければならないことが示された。これらの結果は、先の実験と合わせて考えると、直接接触によるミスフォールディングの伝播が起こること、すなわち凝集体はある細胞を出て、第2の細胞中でネイティブフォールドタンパク質のミスフォールディングを誘発することを示唆している。このデータから、ミスフォールディングの増幅は、逐次的細胞共培養(serial cell cultures)でも起こるかもしれないことが暗示された。「ドナー」細胞集団を凝集シードに事前ばく露することにより、レシピエント細胞集団中に検出される最終凝集は増加するだろうと予測された。3つの細胞集団を順次培養することによって、これを調べた。第1集団は、さまざまな形態の非蛍光性RD-HAを発現して、凝集「シード」を形成した。第2群はCFPまたはRD(K)-CFPを発現して、凝集体維持に関して非許容的(CFP)または許容的RD(K)-CFPである。ミスフォールディングを増幅させるために、これら2つの群を48時間、共培養した。次に、第1群と第2群の複合物の50%を、RD(K)-YFPを発現する第3の細胞群と共に、48時間、共培養した。この第3のレシピエント群は、RD(K)-CFP細胞内凝集および伝播の程度を示す「レポーター」として働いた。RD(K)-CFP集団へのRD(LM)-HAの事前ばく露により、易凝集性タウに事前ばく露しなかった細胞と比較して、最終FRETは2.6倍増加した。予想どおり、第2細胞集団における純粋なCFPを発現する細胞の介在は、タウRD「シード」への事前ばく露の効果を完全に阻止した(図18C)。これらのデータは全体として、逐次的に培養された細胞集団内でのタウ凝集の増幅を示している。

【0094】

実施例6．細胞外間隙への凝集体の放出によって媒介される細胞間伝播

タンパク質凝集体が細胞間を移動する機序はわかっていない。例えばトンネリングナノチューブを介したプリオンタンパク質伝播を推論するものもいたし、エキソソームを示唆するものもいた。タウタンパク質に対する抗体はインビボで病態を低減すると以前に報告されているので、タウ凝集体は細胞外間隙に直接放出されるのかもしれないという仮説を立てた。細胞-細胞接触に基づく経細胞移動が細胞外培地の体積には依存しないはずであ

10

20

30

40

50

るのに対して、タウの経細胞移動は、SOD1について述べられているように、細胞外体積に鋭敏であるかもしれないと予測した。手始めに、さまざまな培地体積の設定下で共培養の効果をまず調べた。細胞培養培地体積を増加させると、凝集体の経細胞移動の効率は低減することが観察された(図19A)。さらに、RD(LM)-HAを発現する細胞からの条件培地の導入は、RD-CFP/YFPを発現する細胞における凝集を誘発するのに十分であった(図19B)。これらの結果は、細胞外間隙を通る細胞間でのタウの移動と合致したが、タンパク質がエンドソームに封入されているかどうかは決定することができなかった。

【0095】

封入されたタウへのアクセスは脂質膜によって阻止されると思われるのに対し、遊離のタウであれば抗体にもアクセスできるであろうと推論した。そこで、タウを免疫沈降させることができるマウスモノクローナル抗体(HJ9.3)が経細胞伝播を阻止するかどうかを調べた。上述したタウRD伝播の細胞モデルの変法を使用し、ここでは、RD(LM)-HAおよびRD(K)-CFPを一つの細胞集団内で共発現させ、RD(K)-YFPを発現する細胞と共に48時間共培養してから、FRETによる解析を行なった。48時間の共培養期間にわたって、HJ9.3をプールマウスIgGとの対比で試験した。HJ9.3では経細胞伝播の用量依存的低減が観察され、一方、非特異的IgGには効果がなかった(図19CおよびD)。重要なことにHJ9.3は、RD(K)-CFPおよびRD(K)-YFPの細胞内凝集に対して、これら2つのタンパク質を同じ細胞内で共発現させた場合には効果がなかったことから(図19E)、抗体は細胞内凝集を直接阻害しているわけではないことが示された。タウミスフォールディングの誘導を生化学的に評価することにより、経細胞伝播における遊離タウの役割をさらに調べた。RD(LM)-HAとの共培養によって誘導される不溶性画分におけるRD(K)-YFPの増加を明らかにする界面活性剤分画とウェスタンブロットにより、凝集の誘導が確認された。HJ9.3は、共培養細胞におけるRD-YFPの不溶性を誘導するRD(LM)-HAの効果を阻止した(図19FおよびG)。

【0096】

抗体添加の有効性は遊離のタウが細胞間で直接伝達されることを示唆したが、抗体阻害の機序は不明なままだった。HJ9.3は細胞へのタウ原線維の取り込みを阻止しているという仮説を立てた。この考えを検定するために、フローサイトメトリーを使って、凝集体の経細胞移動に対する抗体の効果をモニターした。本出願人は、以前に、一方の細胞集団をmCherryで標識し、もう一つがタウ-YFP融合物を含有するサイトメトリーパラダイムを、確立している。共培養後は、二重陽性(YFP/mCherry)細胞の相対パーセンテージに基づいて、経細胞移動をモニターすることができる。HEK293細胞の集団にタウRD(LM)-YFPをトランスフェクトし、第2の集団をmCherryを発現するレンチウイルスで形質導入した。2つの集団を洗浄し、再懸濁してから、細胞を、培地中のHJ9.3の10倍希釈液の存在下または非存在下で、48時間、共培養した。細胞を回収(harvest)し、二重陽性細胞の相対数をフローサイトメトリーを使って測定した。陰性対照は、選別前に混合された同じ細胞集団からなった。各データポイントは生物学的三重試料からなった。共培養細胞では、RD(LM)-YFP/mCherry二重陽性細胞(2.07%)が、事前混合細胞(バックグラウンド)の0.142%と比較して有意に多かった。HJ9.3は二重陽性細胞のパーセンテージを2.07%から1.31%に減少させた(図19H)。これは、FRETによって測定される凝集の経細胞伝播に対するこの抗体の効果と類似している。FRETとフローサイトメトリーによって測定される伝播の阻止に関するこの抗体の効力の差は、おそらく、このイベントを測定するために使用した2つの技法の相違によるのだろう。

【0097】

凝集体の経細胞移動に対するHJ9.3抗体の効果をさらにモニターするために、HJ9.3/抗体複合体が沈着した場所を画定する試みとして、直接免疫蛍光法を使用した。RD(K)-YFP細胞または非トランスフェクト細胞をHJ9.3の存在下で48時

10

20

30

40

50

間培養した。細胞を4% PFAで固定し、0.25% Triton X-100で透過処理してから、ヤギ抗マウスAlexa546標識二次抗体にばく露した。ごく少数のHJ9.3/tau複合体が細胞内部に存在した。しかし大半の複合体は細胞の外に、主に細胞膜に結合した状態で見出された。この抗体デコレーションは、非トランスフェクト細胞には存在しなかったことから、シグナルはHJ9.3/tau複合体に特異的であることが示された(図20)。このようにHJ9.3は、細胞の外側で凝集体をトラップすることで、tau凝集体取り込みを阻止する。

【0098】

実施例7. tau原線維が細胞間伝播を媒介する

伝播アッセイにおけるHJ9.3の活性により、原因となるtau種を明確にする機会が得られた。HJ9.3を使って細胞培地からtauを抽出した。HJ9.3または対照IgGを、さまざまなRDコンストラクト(wt、PP、K、LM)を発現する細胞培地に加えた。抗体は、48時間の培養期間の最初または最後のどちらかに加えた。プロテインG-アガロースビーズを用いる抗体/抗原複合体のアフィニティ精製のために、培地を回収(harvest)した。複合体を洗浄してから、ウェスタンブロットによる解析のために、SDSローディング緩衝液中で煮沸した。HJ9.3は細胞培地からtau RD種を特異的に捕捉したが、IgGには感知しうる効果はなかった(図21A)。培養期間の終了時に添加するのではなく、HJ9.3が培養期間中ずっと存在する場合は、培地中に存在するtauタンパク質が~10倍増加することが観察された(図21B)。RD(K)-HAおよびRD(LM)-HAトランスフェクト細胞の培地には、RD凝集体と合致する高次分子量種も認められた。RD(PP)-HA tauは、培地中に存在する量が最も少ないタンパク質であり、ウェスタンブロットでは高次種は観察されなかった。先に述べた実験の時間経過(0時間、3時間、6時間、9時間、12時間、24時間および48時間)は、培地中のtauレベルの時間依存的な増加を示した。これは、HJ9.3インキュベーションが条件培地中に存在するtauタンパク質の定常状態レベルを実際に増加させていることを含意する(図21C)。これらのデータは全体として、HJ9.3が、細胞への凝集体の取り込みを妨害することによって、細胞から細胞への伝播を阻止することを示し、細胞の内外へのtau凝集体の定常状態フラックスと合致している。

【0099】

経細胞伝播を媒介するtau種の正確な性質はわかっていない。そこで、AFMによる撮像のためにHJ9.3を使ってこれらの種をトラップした。さまざまなtau変異体をトランスフェクトしたHEK293細胞を、HJ9.3の存在下で培養した。48時間後に抗体/抗原複合体をプロテインGアガロースビーズで精製した。次に複合体を高塩濃度緩衝液中でビーズから溶出し、撮像のためにAFMチップ上に沈着させた。RD(K)-HAおよびRD(LM)-HAを発現する細胞の培地には明白な原線維種が検出されたが、RD(PP)-HAは無定形の凝集体しか産生せず(図21D)、モックトランスフェクト細胞はシグナルを生じなかった(非掲載データ)。これらの知見は、遊離のtau原線維が、細胞外間隙へのそれらの放出によって、tau凝集の経細胞伝播を媒介することと、合致している。

【0100】

実施例8. インビボでのtau病態に対する抗tau抗体の効果

完全長組換えヒトtauに対するさらに2つの抗体の活性を伝播アッセイで調べた。RD(LM)-CFP細胞とRD(K)-YFP細胞を、異なるtauエピトープを標的とする異なるモノクローナル抗体(HJ8.5、HJ9.3およびHJ9.4)の存在下および非存在下で48時間、共培養した(図22A)。Aペプチドに対するHJ3.4抗体を陰性対照として使用した。3つの抗tau抗体はいずれも、RD-tauの凝集促進変異体の細胞間での経細胞伝播を阻止した(図22B)。陰性対照HJ3.4は経細胞伝播を阻止しなかった。HJ8.5、HJ9.3およびHJ9.4はELISAでもRD-tau原線維を検出した(図22C)。

【0101】

インビボで細胞から細胞へのタウ凝集体の伝播を阻止するために、タウ上の異なるエピトープを標的とする抗体による受動ワクチン接種アプローチを使用した。抗タウ抗体HJ 8.5およびHJ 9.3、または媒体を、それぞれ、Alzet浸透圧ポンプ(2006モデル、図23A)を使った脳室内注射により、6ヶ月齢P301Stgマウスの側脳室に注入した。Alzetポンプアセンブリに取り付けた脳カニューレを、プレグマから前後方向に0.4mm、正中から側方に1.0mm、および腹背方向に2.5mmの位置にある各マウスの左側脳室に、外科的に埋め込んだ(図23B)。処置後に、カニューレの配置をクレシルバイオレット染色で検証した(図23C)。Alzet浸透圧ポンプを6週間後に置き換え、84日目に実験を終了した。

【0102】

実験計画が抗体の分解および/または不活性をもたらさなかったことを確認するために、マウス脳への6週間の注入後にAlzetポンプから抗体を収集し、SDS-PAGEゲルにローディングした。ゲルをまずクーマシーブルー色素で染色し(図24A)、次に、6週間の注入の前と後にポンプから採取した抗体を用いるウェスタンブロッティングによって解析した(図24B)。抗体は、インビボで生理的温度のAlzetポンプに6週間入っていた後も、全て安定であり、活性であった。さらに、組換えヒトタウタンパク質に異なる注入抗体をスパイクしても、全タウを測定するためのHJ 8.7-BT2BELISAアッセイは妨害されないことも確認した(図25)。

【0103】

抗体処置が病理学的タウ染色を低減したかどうかを決定するために、媒体/PBSまたは抗タウモノクローナル抗体で処置された9ヶ月齢P301Stgマウスの組織切片におけるタウ染色を評価した。梨状皮質の冠状切片を、異常リン酸化型のタウを認識するピオチン化AT8抗体で染色した。予備的免疫組織化学データの定量的解析により、マウス脳では、HJ 8.5およびHJ 9.3の注入後に、異常リン酸化タウ負荷は著しく低減することが示された(図26および図27)。これらの効果の生化学的解析は進行中である。うまくいけば、タウ伝播およびタウ病態に対する受動免疫化が、アルツハイマー病、前頭側頭型(fronto-temporal)認知症または他のタウオパチーを処置するための治療的アプローチになりうる。

【0104】

実施例3~7に関する考察

鋳型を介したコンフォメーション変化(templated conformational change)と凝集の経細胞伝播とが関与するプリオン様の機序が、タウオパチーおよび他の神経変性疾患の容赦ない進行の説明になりうることは、以前に提唱されている。これは、ドナー細胞からのタンパク質凝集体の放出、レシピエント細胞への進入、およびネイティブフォールドタンパク質との直接的接触によるミスフォールド状態の増幅からなるだろう。しかし、タウオパチーのこのモデルを裏付ける機序的証拠は不完全であり、このようなタウミスフォールディングの経細胞伝播は今まで証明されたことがなかった。実施例3~7には、分泌されたタウ凝集体による培養細胞におけるタウ凝集の経細胞伝播が記載され、有望な機序が提案されている。まず、トランスフェクト細胞におけるRDタウ原線維の自発的形成が、抽出物のX-34染色およびAFMを使って実証された。次に、2つの別個の細胞に由来するタウが、細胞内封入体中で同所共在することが、共焦点顕微鏡法を使って観察された。これは、易凝集型のタンパク質RD(LM)-HAを発現する細胞と共培養した時の、タウRD(K)-YFPの界面活性剤不溶性の増加と関連した。また、この凝集の増加は、同じ細胞内で共発現したRD(LM)-CFP/YFP間でも、FRETを使って実証された。これは、アクセプターフォトリチング(顕微鏡法)とスペクトル法(FPR)によって検出された。次に、別々の細胞集団において発現したRD(LM)-CFPとRD(LM)-YFPの間のFRETを使って、伝播が直接的なタンパク質接触によって起こることを実証した。次に、この方法を拡張して、逐次的培養条件における細胞集団内でのタウタンパク質ミスフォールディングの増幅を実証した。タウ凝集の経細胞伝播は、細胞外間隙中に直接放出された原線維によって媒介され

10

20

30

40

50

る、なぜなら伝達は細胞外体積に鋭敏であり、条件培地は細胞内凝集を増加させることができ、抗タウ抗体（HJ9.3）が細胞間伝播を妨害し、細胞外タウ原線維をトラップしたからである。こうして、本出願人らは、さまざまな技法を使って、鋳型を介したコンフォメーション変化による経細胞凝集体伝播を実証した、また、本出願人らは、これらの現象の説明となる簡単なモデルを提案する（図29）。

【0105】

経細胞伝播 - 凝集したタウの細胞間での自発的移動は以前に記述されているが、タウタンパク質凝集体が、細胞への間接的効果ではなくタンパク質の直接接触によって、ミスフォールド状態を細胞間で伝播できるかどうかはわかっていなかった。シヌクレインの細胞培養研究でも伝播は示唆されているが、ドナー細胞に由来する種の性質（例えば凝集体が二量体か単量体か）や、レシピエント細胞中で形成されるものの性質は不明である。また、SOD1凝集体も培地を介して細胞間で伝達され、さらなる凝集を誘導することができるが、原因となるタンパク質コンフォーマーの正確な性質や、直接的なタンパク質 - タンパク質接触が起こるかどうかは不明である。精製A42およびタウ原線維をトランスジェニックマウス脳に注射すると内在性タウの凝集が誘導され、近傍でタウ原線維が発生するが、注入したタンパク質によるシーディングの可能性を排除することは難しい。本発明者らの研究室での研究と、それに続く他の研究者による研究で、細胞の外部から内部へのタウ凝集体の移動と組換えタンパク質による凝集の誘導が実証されている。しかし、タウタンパク質の先行研究では、真の伝播、すなわち、ある細胞から別の細胞への凝集体の移動、ネイティブタンパク質との直接的接触、レシピエント細胞中のタンパク質の原線維状態への転化、およびミスフォールド種の増幅は証明されていない。

10

20

【0106】

この研究ではこれらの現象をいくつかの方法で証明した。まず、易凝集型のタウRD(LM) - HAを、RD(K) - YFPを発現する細胞と共培養すると、シート陽性封入体での共局在が起こることを見出した。次に、RD(LM) - HAを発現する細胞を、RD(K) - CFPとRD(K) - YFPの両方を発現するもう一つの集団と共培養すると、FRETシグナルの増加が起こることが観察されたことから、FRETペアを発現する細胞へのRD(LM) - HAの移動がそれらの凝集を誘導していることが示唆された。細胞間を移動するタウ凝集体の直接的接触と共凝集を証明するために、RD(K) - CFPとRD(K) - YFPを別々の集団内で発現させた。これは、経細胞移動および共凝集に由来するFRETシグナルをもたらし、このシグナルは、どちらか一方のコンストラクトがシート形成を阻止する二重プロリン変異を含有する場合には消失した。RD - CFP凝集体の伝達による完全長タウ - YFP凝集の誘導も観察されたが、その効率は低い（非掲載データ）。最後に、タンパク質凝集体の経細胞移動によって誘導されるFRETの効率は、RD(LM) - HA発現細胞をRD(K) - CFPを発現する細胞と予備的に共培養することにより、有意に増加したことから、凝集状態は細胞の集団内で増幅されることが証明された。

30

【0107】

タウ凝集体伝播の抗体による調節 - 主に細胞外にあるA β ペプチドに対する抗体は、脳におけるA β 凝集を防止し、既存の凝集体を除去することができる。潜在的副作用はあるものの、このような抗体は処置薬として期待できる。しかし、タウオパチーおよびシヌクレイノパチーのマウスモデルにおけるワクチン接種の成功は、ターゲットタンパク質が主に細胞内にあるという事実を踏まえると、困惑するものであった。タウ - RDに対するマウスモノクローナル抗体であるHJ9.3はタウ凝集の経細胞伝播を阻害することが観察された。しかしこの抗体はタウの細胞内凝集には効果がなかった。この抗体への細胞培地の慢性的ばく露は、培地中の定常状態タウレベルを著しく増加させた。これは、HJ9.3がある細胞から別の細胞への凝集体の伝達を阻止することを示すフローサイトメトリーによって確認された。最後に、細胞表面にトラップされたHJ9.3/タウ複合体が観察された。この抗体の効果は、タウ原線維が細胞外間隙中に放出されること、そしてプリオンについて提唱されているように主にエキソソームやトンネリングナノチューブにおける

40

50

細胞間伝達によってミスフォールディングを伝播しているのではないことを、強く示唆した。さらに、細胞の外側に存在する凝集体は、HJ9.3によってトラップされなければ、細胞中に再び取り込まれると思われる。治療用抗体には、タンパク質原線維の脱凝集、細胞内での転化の阻止、および細胞内分解の促進など、複数の阻害様式が考えられる。HJ9.3での本発明者らの結果は、タウオパチーを阻止するために使用することができるであろう一つの機序として、細胞取り込みの妨害と最もよく合致し、神経変性疾患のための治療用抗体の開発と最適化を検討するための新しい方法を示唆している。

【0108】

原線維性タウによる経細胞伝播 - タウ凝集の伝播の阻止にHJ9.3が有効であることから、原因となる種をトラップするために、この抗体を使用することが可能になった。条件培地からのタウの免疫アフィニティ精製により、原線維性タウが明らかになった。対照細胞からの培地にも、無定形凝集体を生じるシート耐性RD(PP)-HAを発現する細胞からの培地にも、タウ原線維は観察されなかった。RD(K)-HAおよびRD(LM)-HA発現は、それぞれ、細胞外間隙への原線維分泌を引き起こした。ある細胞におけるタンパク質凝集が隣接細胞における凝集にどのように影響を及ぼすかは明確でなく、形式的には、サイトカイン、エキソソーム、または細胞間の直接的接続が、このプロセスを容易にするのかもしれないという可能性があった。これらの可能性を完全に排除することはできない。しかし、これらの結果は、遊離の原線維腫が細胞外間隙を通じた伝播の媒介物質であることと最もよく合致している。この研究は、タンパク質凝集体が培養中のある細胞から別の細胞へと伝播する機序に関する、そしてそれゆえに、それらがインビボでどのようにしてそれを行いうるのかに関する、いくつかの重要な疑問への解答を示唆している。経細胞伝播をモニターするためのここで述べた方法に関連して、タウオパチーおよび他の神経変性疾患をより効果的に処置するために、このプロセスを薬理的および生物学的薬剤の標的にすることも可能であるだろう。

【0109】

実施例1~8のための方法

抗体

最も長いマウス組換えタウアイソフォームmTau40(432aa)と最も長いヒトタウアイソフォームhTau40(441aa)はEva Mandelkewの研究室で生産され、タウELISAではそれらを標準として使用した。ヒトタウとマウスタウの両方(残基218~225にあるエピトープ)を認識するマウスモノクローナル抗体Tau-5は、L. Binderの研究室から得た(Lo Presti et al., 1995; Porzig et al., 2007)。モノクローナル抗体HJ8.1およびHJ9.3は、タウノックアウトマウス(The Jackson Laboratory)において、それぞれヒトタウおよびマウスタウに対して免疫化することによって生じさせたマウスモノクローナル抗体である。どちらの抗体も、ウェスタンブロット上で、免疫沈降によって、そしてELISAアッセイにおいて、マウスタウとヒトタウを認識する。HJ9.3はタウの微小管結合領域(MTBR)を認識する。同様にヒトタウおよびマウスタウ(残基194~198にあるエピトープ)を認識するマウスモノクローナル抗体BT-2は、Pierceから入手した。タウに対するウサギポリクローナル抗体(ab64193、リピートドメイン領域中にあるエピトープ)はAbcam(マサチューセッツ州ケンブリッジ)から購入した。ヘマグルチニンHAに対するマウスモノクローナル抗体(HA.11クローン16B12)はCovance(カリフォルニア州エメリービル)から購入した。ウサギポリクローナルGFP抗体(sc-8334)はSanta Cruz Biotechnologyから購入した。

【0110】

プラスミド

タンパク質発現には微小管結合タンパク質タウの4リピートドメイン(RD)をコードする配列を使用した。野生型に加えて、さまざまなタウ変異体を作製した: K280(K); P301L/V337M(LM); K280/I227P/I308P(P

10

20

30

40

50

P)。これらの配列を、C末端ヘマグルチニン(HA)タグと共にp cDNA 3.1 (Invitrogen)にサブクローニングするか、またはpEYFP-N1もしくはpECFP-N1 (Clontech)にサブクローニングして、C末端蛍光タンパク質融合物を作製した。

【0111】

動物

P301SヒトT34アイソフォームタウ(1N4R)を過剰発現するP301S t gマウス(PS19系統)は以前に作出し、特徴づけたもので、B6C3背景を持つ。P301S t gマウスはThe Jackson Laboratoryから入手した。タウノックアウトマウスはThe Jackson Laboratoryから入手した。同年齢および同遺伝的背景の非トランスジェニックマウス同腹仔を野生型マウスとして使用した。どの実験でも、本研究では雄と雌の両方を使用した。

10

【0112】

免疫沈降および免疫プロット解析

免疫沈降および免疫プロット解析。P301Sタウトランスジェニックマウスおよび野生型マウスから海馬微小透析試料を1.0 l/分の流量で15時間収集した。製造者の説明書に従ってHJ8.1またはHJ9.3タウ抗体でコーティングしたDynabeads (Invitrogen)により、ISFを免疫沈降した。沈降した画分を還元4-12%ビス-トリスマニゲル(Invitrogen)にローディングし、ニトロセルロース膜に転写した。沈降した抗体の妨害を排除するために、ビオチン化BT-2抗体(Pierce)およびポリHRPコンジュゲートストレプトアビジン(Thermo Scientific)を使用した。HEK293細胞は、10%ウシ胎児血清、100 μg/mLペニシリンおよび100 μg/mLストレプトマイシンを補足したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)で培養した。培養物は5%CO₂の湿潤雰囲気下、37 °Cで維持した。一過性トランスフェクションには、Lipofectamine/Plus試薬と600 ngの適当なDNAコンストラクトとを使用し(Invitrogen、米国カリフォルニア州カールズバッド)、製造者の推奨に従って、Optimem培地にプレATINGした細胞をトランスフェクトし、24時間後または48時間後に、さらなる解析のために回収(harvest)した。

20

【0113】

界面活性剤分画およびウェスタンプロット解析

HEK293細胞を12穴プレートに400,000細胞/ウェルでプレATINGした。翌日、細胞に600 ngのプラスミドをトランスフェクトした。48時間後に、37 °Cで3分間、0.05%トリプシンを使って、細胞を回収(harvest)し、7000 × gで手短かにペレット化し、プロテアーゼ阻害剤を含有するPBS中の1% Triton 100 μl中で溶解した。次に、14,000 × gで10分間の遠心分離によって可溶性サイトゾルタンパク質を収集した。ペレットをRIPA/SDS緩衝液に再懸濁し、20,000 × gで15分間の遠心分離後に、核酸のベンゾナーゼヌクレアーゼ消化を行うことにより、不溶性タンパク質を得た。共培養実験の場合は、RD(LM)-HAおよびRD(K)-YFPがトランスフェクトされた同数の細胞を48時間、共培養してから、回収(harvest)し、ウェスタンプロットティングを行なった。各フラクションから等量のHEK293細胞タンパク質抽出物を、4%-20%ポリアクリルアミドゲル(Biorad); 1:2000希釈のタウRDに対する抗体(RD領域中のエピトープを認識するもの)(ab64193、Abcam、マサチューセッツ州ケンブリッジ)および/または1:1000希釈のGFPに対する抗体(sc-8334、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)を使って解析した。化学発光に基づくペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体反応を行い、X線フィルムで検出した。定量はImage J解析ソフトウェアを使って行なった。

30

40

【0114】

共培養実験: FRETによるRD-CEFP/YFP共凝集の測定

50

HEK293細胞を12穴プレートに300,000細胞/ウェルでプレATINGした。翌日、上述のように、600ngのプラスミドを細胞にトランスフェクトした。コトランスフェクト細胞には、150ngのRD-CFPコンストラクトと450ngのRD-YFPコンストラクトの組み合わせを与えた。15時間後に、37℃で3分間、0.05%トリプシンを使って、細胞を回収(harvest)し、細胞の一部を96穴プレートに4つ一組にして再プレATINGするか、顕微鏡法による撮像のためにibidi μ -スライド(ibidi GmbH、ドイツ)に再プレATINGした。次に細胞をさらに48時間培養してから、4%パラホルムアルデヒドで固定し、解析した。

【0115】

共培養実験：RD-HAによるRD-YFP凝集の誘導の測定

10

12穴プレートにおいてHEK293細胞にRD(K)-YFPかRD(LM)-HAのどちらか一方をトランスフェクトした。15時間後に、細胞をibidi μ -スライド上に一緒に再プレATINGし、さらに48時間培養した。次に、それらを固定し、顕微鏡法による解析のために、抗HA抗体とX-34で染色した。

【0116】

共培養実験：共培養物における伝播アッセイ

12穴プレート中の2つのHEK293細胞集団に、300ngのRD(LM)-HAと300ngのRD(K)-CFPとを一緒にコトランスフェクトするか、またはRD(K)-YFPをトランスフェクトした。15時間後に、等パーセンテージのそれら2つの集団を、96穴プレートフォーマットで48時間、共培養した。次に、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、蛍光プレートリーダー(FPR)を使ってFRET解析を行なった。FRET顕微鏡解析の場合は、12穴プレート中の2つのHEK293細胞集団に、600ngのRD(LM)-CFPまたはRD(LM)-YFPをトランスフェクトした。15時間後に、等パーセンテージのそれら2つの集団を、ibidi μ -スライド上で48時間、共培養した。次に、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、FRETアクセプターフォトリチングを行なった。

20

【0117】

共培養実験：逐次的培養におけるタウ凝集の増幅

12穴プレートにおいてHEK293細胞に600ngのさまざまな形態の非蛍光RD-HAをトランスフェクトし、24時間培養した。第2の細胞群にはCFPまたはRD(K)-CFPをトランスフェクトした。次に、等パーセンテージの第1集団と第2集団を48時間、共培養した。この時点で、この集団の50%を、96穴プレートに、RD(K)-YFPをトランスフェクトした細胞の集団と共にプレATINGし、48時間培養した。次に、FPRを使ったFRET解析のために、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。

30

【0118】

培地移行(media transfer)および条件培地実験

12穴プレート中でHEK293細胞に600ngのRD(LM)-HAをトランスフェクトするか、または150ngのRD(K)-CFPコンストラクトと450ngのRD(K)-YFPコンストラクトの組み合わせをコトランスフェクトした。15時間後に、37℃で3分間、0.05%トリプシンを使って、細胞を回収(harvest)した。RD(K)-YFP/CFPを発現する細胞とRD(LM)-HAを発現する細胞を同数ずつ、さまざまな量の細胞培養培地中で、48時間、共培養した。次に、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、FRET解析を行なった。条件培地実験では、トランスフェクションの15時間後に、トランスフェクション複合体を含有するRD(LM)-HA細胞からの培地を新鮮な培地で置き換えた。37℃で3分間、0.05%トリプシンを使って、RD(K)-YFP/CFPを発現する細胞を回収(harvest)し、96穴プレートに再プレATINGした。24時間後に、RD(LM)-HAをトランスフェクトした細胞から条件培地を収集し、RD(K)-YFP/CFPを発現する細胞に加えた。48時間後に、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、FRET解析を

40

50

行なった。

【0119】

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) アッセイ：フォトブリーチングを使った顕微鏡法による FRET 測定

前述のようにコトランスフェクション実験および共培養実験用にトランスフェクトした HEK293 細胞を、FRET アクセプターフォトブリーチング顕微鏡法のために調製した。画像は全て、C-Apochromat 40x 1.2 NA レンズ (Carl Zeiss Advanced Imaging Microscopy、ドイツ 07740 イエーナ) を使って得た。100x (CFP)。デジタル画像は、Zeiss Axiovert 200M で Zeiss LSM510 Meta NLO 多光子/共焦点レーザー走査型顕微鏡システムを使って取得した。撮像に使用したチャンネルは次のとおりだった：ドナー CFP は 458 nm アルゴンレーザーを使って刺激し、480~520 nm 帯域フィルタで蛍光を収集した；アクセプター YFP は 514 nm アルゴンレーザーを使って刺激し、ロングパス 560 nm フィルタで蛍光を収集した。強度が FRET 効率の概算値を反映する画像を作成するために、初期 CFP 画像の値をフォトブリーチング後に得られる最終 CFP 画像からピクセルごとに差し引き、この相違に 100 を掛けて、最終 CFP 画像強度で割った： $100 \times (CFP_{最終} - CFP_{初期}) / CFP_{最終}$ 。部分アクセプターフォトブリーチングについて適正な調整を行なった。画像算術変換およびグレースケールからカラーへの画像変換は、NIH ImageJ 1.44 ソフトウェアを使って行なった。

10

20

【0120】

FRET アッセイ：蛍光プレートリーダー

スペクトル FRET 測定値 (FRET / ドナー) は、既述の方法に従い、Tecan M1000 蛍光プレートリーダーを使って得た。ドナーとアクセプターが同じタンパク質に融合されていない場合、スペクトル FRET 測定値は、細胞内で発現させるドナータンパク質とアクセプタータンパク質の相対量の注意深い制御に依存する。プレートリーダーでの値は全て、まず、モックトランスフェクト細胞に対して背景差分をとった。各ウェル中の YFP シグナル (Smp1485ex / 528em FRET) を使って RD-YFP 発現レベルを見積もり、実験条件下では、RD-CFP / YFP が独立して変動しないとも仮定した。これは、見かけの FRET の変化が単に RD 発現レベルの変動によるものである可能性を排除するのに役立つ。ドナー励起シグナル (435 nm) によるアクセプター活性化 (528 nm) の総 FRET 測定値に対する相対的寄与は、アクセプターの「クロスオーバー活性化」分率 X (ここで $X = 435ex / 528em$ で測定された RD-YFP シグナルを $485ex / 528em$ で測定されたシグナルで割ったもの) を決定することによって補正した。この「クロスオーバー活性化」は、実験中に直面する RD-YFP の発現レベルが異なっても、本質的に一定である。各試料の FRET 「実測」値を $435ex / 528em$ で記録し、「ドナー」値 (CFP) を $435ex / 485em$ で記録する。各ウェルの「実際の」FRET / ドナー値は、

30

$$FRET_{actual} = (Smp1435ex / 528em - X * (Smp1435ex / 528em)) / Smp1435ex / 528em$$

として反映される。

40

【0121】

FRET でタンパク質凝集を測定する方法により、視覚的解析および生化学的解析によって確認されたアンドロゲン受容体およびハンチントンタンパク質凝集の薬学的操作ならびに遺伝子操作に呼応して起こる微細な変化の検出が、確実に可能になった。測定されるスペクトル FRET の相対量はアクセプター：ドナーの比に依存するので、RD-CFP と RD-YFP を同じ細胞内で共発現させる場合は、3：1 という一定の比を使用した。これにより、ドナーシグナルの測定におけるシグナル：ノイズを許容できるものしつつ、最大に近い FRET 効率を得られる。

50

【0122】

原子間力顕微鏡法 (AFM)

RIPA不溶性タンパク質をトランスフェクトHEK293細胞から抽出し、マイカチップ (Ted Pella, Inc) 上で10分間インキュベートした。次に、試料を100 μ lのddH₂Oで2回すすぎ、室温で放置して乾燥させた。翌日、MFP-3D原子間力顕微鏡 (Asylum Research) を使って原子間力顕微鏡観察を行なった。

【0123】

免疫蛍光および共焦点顕微鏡法

前述のように共培養実験用にトランスフェクトされたHEK293細胞を、免疫蛍光およびX-34染色用に調製した。4%パラホルムアミド中、室温で15分間、固定した後、細胞を2回、室温 (RT) のPBSで5分間洗浄し、PBS中の0.25% Triton X-100中、室温で10分間、透過処理した。PBS中に1%正常ヤギ血清、20 mg/ml BSA、0.25% Triton X-100を含有するブロッキング溶液を使って、細胞を、室温で3時間、ブロッキングした。HAに対する一次マウスモノクローナル抗体 (Covance、カリフォルニア州エメリービル) をブロッキング溶液に1:2000希釈し、4 μ lで細胞に終夜、適用した。次に、0.1% Triton X-100を含有するPBSで細胞を5分ずつ3回洗浄し、ブロッキング溶液に1:400希釈した抗マウスAlexa546コンジュゲート二次抗体 (Invitrogen) と共にインキュベートした。次に、0.1% Triton X-100を含有するPBSで、5分ずつ3回、細胞を洗浄し、40%エタノール、60% PBS、および20 mM NaOHの溶液中に調製した1 μ M X-34に、室温で10分間ばく露した。次に、40% EtOH、60% PBS中で、2分ずつ3回、細胞を洗浄し、1x PBSで5分ずつ2回すすいだ。共焦点顕微鏡法 (405共焦点顕微鏡 - Zeiss) を使って画像をキャプチャした。HJ9.3抗体による伝播阻止の機序を特徴づけるために、HEK293細胞にRD(K)-YFPをトランスフェクトするか、モックトランスフェクションを行なった。RD(K)-YFP細胞またはモックトランスフェクト細胞をHJ9.3の存在下で48時間培養してから、細胞を4% PFAで固定し、0.25% Triton X-100で透過処理し、次にヤギ抗マウスAlexa546標識二次抗体にばく露した。共焦点顕微鏡法 (共焦点顕微鏡 - Zeiss) を使って画像をキャプチャした。

10

20

30

【0124】

ヨウ化プロピジウム (PI) 細胞死アッセイ

HEK293細胞を96穴プレートに75,000細胞/ウェルでプレーティングした。翌日、細胞に、100 ngのさまざまな形態の非蛍光性RD-HAプラスミドを、4つ一組にしてトランスフェクトするか、DNAなしのトランスフェクション複合体にばく露した。翌日、トランスフェクション複合体を含有する培地を取り除き、新鮮な培地で置き換えた。細胞死の陽性対照として、非トランスフェクト細胞を、37 $^{\circ}$ Cで30分間、さまざまな濃度のスタウロsporin (1、2、4、20 μ M) で処理した。次にスタウロsporin溶液を取り除き、全ての細胞を、37 $^{\circ}$ Cで10分間、5 μ g/mlのヨウ化プロピジウムにばく露した。次に、ヨウ化プロピジウム溶液をフェノール非含有培地で置き換え、励起波長535 nmおよび放射波長617 nmのプレートリーダーで蛍光を読み取った。

40

【0125】

免疫沈降

トランスフェクト細胞集団を、それだけで、またはマウスモノクローナル抗体HJ9.3 (2.5 ng/ μ lの抗体に相当する1:1000) もしくはプールマウスIgG抗体の存在下で、3時間、6時間、9時間、12時間、24時間または48時間、共培養した。条件培地を収集し、プロテインG-アガロースビーズ (Pierceの50%スラリービーズ100 μ l) を培地に加え、回転させながら4 μ lで終夜インキュベートした。18時間後に、500 μ lの結合緩衝液 (Pierce) を試料に加え、2000 x gで3分間遠心分離した。上清を捨て、この洗浄ステップを3回繰り返した。次に、ビーズに結合したタンパク質を、高塩濃度溶出緩衝液 (50 μ l) を使って、室温で5分間インキュベ

50

ートすることで溶出させた。次に試料を $2000 \times g$ で3分間遠心分離し、上清を収集した。この溶出ステップを1回繰り返し、溶出液を合計 $100 \mu l$ とした。最初に HJ 9.3 にも IgG にも暴露していない条件培地のもう一つの試料を、HJ 9.3 (1:1000) または IgG 抗体と共に、回転させながら4 で終夜インキュベートした後、上述と同じ免疫沈降プロトコールに付した。全ての条件からの試料を、4 - 20% ポリアクリルアミドゲル (BioRad) で解析し、TBS/Tween 中の5%粉乳に1:2000希釈したタウRDに対するウサギポリクローナル抗体 (ab64193、Abcam、マサチューセッツ州ケンブリッジ) で検出した。化学発光に基づくペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体反応を行い、X線フィルムで検出した。

【0126】

フローサイトメトリー

HEK293細胞を10cmプレートで~80%コンフルエントまで平板培養した。次に、細胞に $24 \mu g$ の RD(LM)-YFPコンストラクトをトランスフェクトするか、mCherryレンチウイルスで形質導入した。翌日、37 で3分間、0.05%トリプシンを使って処理することにより、細胞を回収 (harvest) し、ペレット化し、新鮮培地に再懸濁した。2つの細胞集団を、それらだけで、または1:1000希釈もしくは1:10,000希釈のタウ-RDに対するマウスモノクローナル抗体 HJ 9.3 (1:1000は $2.5 ng/\mu l$ の抗体に相当する) の存在下で、48時間、共培養した。その後、細胞を回収 (harvest) し、1% FBSおよび1mMのEDTAを含有するハンス平衡培地に再懸濁した。サイトメトリーの直前に事前混合した細胞を陰性対照として使用した。MoFlo高速セルソーター (Beckman Coulter) を使って細胞をカウントし、二重陽性細胞のパーセンテージを各条件について解析した。各条件につき3つの生物学的複製を用意し、各実験条件で50,000細胞を解析した。

【0127】

抗タウモノクローナル抗体の脳室内 (ICV) 注射

この研究ではP301SヒトT34アイソフォーム (1N4R) を発現するP301Sタウトランスジェニックマウスを使用した。これらのマウスは6ヶ月齢でタウ病態を発生させる。そこで、抗体を6ヶ月齢時に脳室注射によって左側脳室に注入し、これらの注入を12週間続けた。処置後に、免疫組織化学ならびにELISAおよび免疫ブロッティングによる生化学的解析のために、マウス脳を加工した。

【0128】

脳室内注射はAlzet浸透圧ポンプ2006モデルを使って行った。Alzetポンプアセンブリに取り付けた脳カニューレを、プレグマから前後方向に0.4mm、正中から側方に1.0mm、および腹背方向に2.5mmの位置にある各マウスの左側脳室に、外科的に埋め込んだ。処置後に、カニューレの配置をクレシルバイオレット染色で検証した。

【0129】

実施例9~15の序論

タウは、タウオパチーと総称されるいくつかの神経変性疾患において細胞内凝集体を形成する微小管結合タンパク質である。これらには、アルツハイマー病 (AD)、進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy) (PSP)、大脳皮質基底核変性症 (CBD)、および前頭側頭型認知症 (FTD) が含まれる。タウは、微小管に結合しその集合を促進する可溶性の高い天然解鎖 (natively unfolded) タンパク質である。タウオパチーでは、適切に染色した場合に変性神経突起および細胞体内に可視化される過剰リン酸化神経原線維変化 (NFT) 中に、タウが蓄積する。タウ病態の量は、進行性神経機能障害およびシナプシス消失、ならびにヒトおよびトランスジェニックマウスモデルにおける機能低下と相関する。

【0130】

ヒトタウオパチーでは、病態がある脳領域から別の脳領域へと疾患特異的パターンで進行するが、基礎となる機序はまだ明確でない。プリオン仮説では、タウ凝集体は元の細胞

10

20

30

40

50

から漏れだして隣接する細胞に進入し、そこで、さらなるタウ凝集をシーディングし、病態を伝播すると考える。本発明者らは、以前に、組換えタウ原線維が培養細胞中で完全長細胞内タウの凝集を誘導するであろうこと、および凝集した形態のタウが細胞間で伝達されることを観察していた (Frost et al., 2009; Nat Rev Neurosci 11, 155-159)。さらに、本発明者らは、細胞内タウ原線維が培地中に遊離状態で放出され、それらがレシピエント細胞中のネイティブタウとの直接相互作用によって凝集を伝播することを見出した。抗タウ抗体 (HJ9.3) は、レシピエント細胞へのタウ凝集体の取り込みを防止することによって、このプロセスを阻止する (Kfoury et al., 2012; J Biol Chem 287, 19440-19451)。組換えタウを使った類似の実験に加えて、AD脳からの対らせん状細線維が細胞質タウ凝集を誘導することが示されている。野生型ヒトタウを発現するマウスの脳にヒトP301Sタウトランスジェニックマウスからの脳抽出物を注射すると、細線維への野生型ヒトタウの集合と病態の拡がり誘導される。同様の効果は、組換え完全長タウ原線維または切断型タウ原線維の注入後にも起こり、それらは、注射部位から接続された脳領域へと時間依存的に伝播するNFT様封入体の迅速な誘導を引き起こした。最後に、嗅内皮質における選択的タウ発現は、歯状回および海馬中の細胞の軸索終末域において遅発型の病態を引き起こしたが、これは、凝集体の経シナプス移動と合致する。このように、現在も増えつつある多くの研究が、タウ凝集体は細胞間で伝達され、治療用抗体の標的となりうるという考えを支持している。

10

20

【0131】

ADおよびパーキンソン病 (PD) の諸相を模倣するマウスモデルにおいて、A およびアルファ-シヌクレインに対する抗体を使った受動免疫化は、脳におけるA およびアルファ-シヌクレイン沈着を低減し、行動欠陥を改善することができる。タウホスホペプチドを使ったタウオパチーマウスモデルにおける能動免疫化は、タウ病態を低減し、いくつかの研究では、行動欠陥を改善した。しかし、ある研究では、完全長組換えタウによるC57BL/6野生型マウスの能動的免疫化が、タウ病態および神経脱落を誘導した。2つの受動ワクチン接種研究では、病態の発症前に抗体を与えた場合には、タウ病態の低減と運動機能の改善があった。タウ免疫化研究のいくつかには多少の有益な効果があるようだが、病態の発症後に投与される抗タウ抗体に予想される最大効力、標的とするのに最適なタウ種、および治療効果の機序は、まだわかっていない。

30

【0132】

実施例9. 抗タウ抗体の特徴づけ

以前、本発明者らは、タウ凝集体は培養細胞によって取り込まれるが、単量体は取り込まれないこと、そして内部移行したタウ凝集体は、レシピエント細胞において細胞内タウ凝集を誘発することを観察した (Frost et al., 2009; Nat Rev Neurosci 11, 155-159; Kfoury et al., 2012; J Biol Chem 287, 19440-19451)。8つのマウスモノクローナル抗体のHJ8系列 (完全長ヒトタウに対して産生させたもの) および5つの抗体のHJ9系列 (完全長マウスタウに対して産生させたもの) を、タウ凝集体を含有する脳溶解物の添加によって誘導される細胞タウ凝集を測定するKfoury et al. (2012; J Biol Chem 287, 19440-19451) に既述の適合細胞バイオセンサー系で特徴づけた。どの抗体もタウ単量体に効率よく結合し、神経原線維変化を染色するという事実にもかかわらず、シーディングの阻止に関する抗体の効果は一様でなかった。ここに提示する研究には、シーディングを阻止する能力が異なる3つの抗体を選択した。

40

【0133】

インビボでの試験に先立って、いずれもIgG2bアイソタイプである抗体の結合アフィニティおよびエピトープを決定した。ヒトタウおよびマウスタウを表面プラズモン共鳴 (SPR) 用のセンサーチップCM5上に固定化した (図30)。マウスタウに対して産生されたHJ9.3抗体は、ヒトタウ (図30A) とマウスタウ (図30B) の両方を、

50

同じ結合定数 ($K_D = K_d / K_a = 100 \text{ pM}$) で認識する (図 30G)。会合 (K_a) と解離 (K_d) は、BIAevaluationソフトウェア (Biacore AB) を使用し、「Fit kinetics simultaneous K_a / K_d 」(グローバルフィッティング) を選択することにより、1:1 (ラングミュア) 相互作用モデルで計算した。ヒトタウ ($K_a = 7.5 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 、 $K_d = 7.5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) およびマウスタウ ($K_a = 8.6 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 、 $K_d = 9.1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) に対する HJ9.3 の K_a および K_d は、両者への強い結合を示す。HJ9.3 のエピトープは、アミノ酸 306 ~ 320 にあるリピードメイン (RD) 領域にマッピングされた。マウスタウに対して産生された HJ9.4 は、マウスタウに対して高いアフィニティ K_D (2.2 pM) を有し、会合速度定数が高く ($K_a = 2.28 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$)、解離定数は極めて低かった ($K_d = 5.1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) (図 30D および表 4)。しかし、同じ抗体のヒトタウに対するアフィニティ ($K_D = 6.9 \text{ nM}$) ははるかに低く (図 30C および表 4)、会合速度定数 ($K_a = 1.5 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$) はマウスタウの場合と同じぐらいだったが、解離がはるかに速かった ($K_d = 1.07 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)。このように、HJ9.4 とヒトタウとの相互作用は、マウスタウとの相互作用より安定性が低い。この抗体のエピトープはアミノ酸 7 ~ 13 である。HJ8.5 はヒトタウに対して産生させたものである。これはヒトタウに結合するが (図 30E)、マウスタウには結合しない (図 30F)。 K_D (0.3 pM) (図 30E および表 4) ならびに低い解離速度 ($K_d = 4.38 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$) は、HJ8.5 がヒトタウに極めて高いアフィニティで結合することを示している。HJ8.5 のエピトープは、アミノ酸 25 ~ 30 にマッピングされた。3つの抗タウ抗体はいずれも SPR においてヒトタウ原線維を強く認識した (図 31)。原線維は複数の同一エピトープを有するので、会合速度および解離速度を直接的に計算することはできなかった。

表 4 ヒトタウおよびマウスタウに対する各抗体の会合速度定数 (K_a)、解離速度定数 (K_d) および結合定数 (K_D)。BIAevaluationソフトウェア (Biacore AB) を使用し、「Fit kinetics simultaneous K_a / K_d 」(グローバルフィッティング) を選択することにより、1:1 (ラングミュア) 相互作用モデルで、 K_a および K_d を計算した。 Ms^{-1} = ミリ秒、M = モル濃度、s = 秒

【表 9】

		HJ9.3	HJ9.4	HJ8.5
ヒト タウ	K_a (Ms^{-1})	7.55×10^4	1.53×10^5	1.3×10^5
	K_d (s^{-1})	7.51×10^{-6}	1.07×10^{-3}	4.34×10^{-8}
	K_D (M)	99 pM	6.9 nM	0.336 pM
マウ スタウ	K_a (Ms^{-1})	8.61×10^4	2.28×10^5	-
	K_d (s^{-1})	9.16×10^{-6}	5.1×10^{-7}	-
	K_D (M)	100 pM	2.24 pM	-

【0134】

抗体を免疫プロットングおよび免疫染色でも評価した。ウェスタンプロットでは、3つの抗体がいずれもヒトタウに結合した (図 30H)。HJ9.3 および HJ9.4 はマウスタウに結合したが、HJ8.5 はマウスタウには結合しなかった (図 30H)。本発明者らの以前の知見と合致して (Yamada et al., 2011; J Neurosci 31, 13110-13117)、3ヶ月齢と比較して9ヶ月齢の P301S マウスでは、リアセンブリ (reassembly) 緩衝液 (RAB) 可溶性タウが

少ないようであった。3ヶ月齢および9～12ヶ月齢のトランスジェニックP301Sマウス脳においてHJ8.5がヒトタウを染色することも見出された。タウ免疫反応性は細胞体および細胞突起全体に存在した(図32)。タウ凝集体を持つ9～12ヶ月齢のP301Sマウスでは、HJ8.5が細胞体中のタウ凝集体を検出した(図32A)。他の抗体も同様の結果をもたらした(表5)。全ての抗体がAD脳内の神経原線維変化およびニューロピルスレッドに結合した(図32)。

表5 異なるアッセイにおける抗タウ抗体の相対的効力

【表10】

方法	HJ8.5		HJ9.3		HJ9.4	
	ヒト タウ	マウス タウ	ヒト タウ	マウス タウ	ヒト タウ	マウス タウ
ウェスタンブロット	++	-	+++	+++	++	++
免疫染色	+++	-	+	+	++	+++
ヒトAD脳NFT	+++	N/A	+	N/A	+	N/A

10

20

【0135】

実施例10. タウ抗体はP301Sタウ凝集体の取り込みおよびシーディング活性を阻止する

P301S脳溶解物中に存在するシーディング活性を評価するために、本発明者らが前に記載した細胞バイオセンサー系(Kfoury et al., 2012)を適合させた。これは、シアン蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質のいずれかに融合されたK280変異を含有するタウのリピードドメイン(aa243~375)(RD(K)-CFP/YFP)の発現に基づく。これらの細胞への外因性凝集体の取り込みは、RD(K)-CFP/YFPの細胞内凝集を誘発し、それは、蛍光プレートリーダーで記録される蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって検出される。バイオセンサー細胞系に添加された12ヶ月齢P301Sマウスからの清澄化脳溶解物は、RD(K)-CFP/YFPレポーターの強い凝集を誘導したことから、タウシーディング活性の存在が示された(図33A)。12ヶ月P301S脳ホモジネートマウスからのシーディング活性は、50nM(単量体換算)の組換え完全長原線維にほぼ匹敵する(非掲載データ)。

30

【0136】

タウノックアウトマウス、野生型マウス、またはタウ病態を欠く3ヶ月齢P301Sマウスからの溶解物によって誘導される凝集はほとんどまたは全くなかった(図33A)。抗タウ抗体(HJ8.5、HJ9.3およびHJ9.4)を、これらの溶解物の取り込みおよびシーディング活性を阻止するその能力について評価した。HJ3.4(マウスモノクローナル抗A抗体)を陰性対照とした。抗タウ抗体はシーディング活性を効果的に阻止した(図33B)。抗体の相対的効力を決定するために、抗体(0.125、0.25、0.5、1、2μg/ml)を、固定された量のP301S脳溶解物に対して滴定した(図33C)。HJ8.5抗体は、対照と比較して、わずか0.25μg/mlの濃度でシーディング活性を阻止した。0.5μg/mlでは、HJ8.5抗体とHJ9.3抗体の両方が、対照と比較して、取り込みおよびシーディング活性を有意に阻止した。HJ9.4は、取り込みおよびシーディング活性の阻止に関してもっとも弱く、このことはマウスタウに対するその高いアフィニティと合致した。3つの抗タウ抗体はいずれも、事後の細胞透過処理および染色によって検出されるとおり、HEK293細胞による取り込み後に、内部移行したタウ凝集体を検出した。しかし、これらの抗体をP301S脳溶解物と

40

50

共に、および P 3 0 1 S 脳溶解物なしで、プレインキュベートした場合、これらの抗体はいずれも、抗マウス二次抗体による染色時に細胞内部には検出されなかった（図 3 4）。他の阻害様式も考えられるものの、これらのデータは、タウ凝集体の細胞取り込みの阻止に基づく機序と合致している。

【 0 1 3 7 】

実施例 1 1 . 抗タウ抗体の脳室内注入

マウスコロニーにおいて、P 3 0 1 S マウスが最初に細胞内タウ病態を発生させるのは 5 ヶ月齢からである。慢性的脳室内 (I C V) 投与によって 3 つの抗体の効力を調べるために、6 ヶ月齢で各マウスの左側脳室にカテーテルを外科的に埋め込み、A l z e t 皮下浸透圧ミニポンプにより、3 ヶ月間にわたって抗タウ抗体を持続的に注入した（図 3 5 A）。抗 A 抗体 H J 3 . 4 およびリン酸緩衝食塩水 (P B S) を陰性対照として使用した。6 週間後に、各ポンプを、新鮮な抗体溶液または P B S を充填したものと置き換えた。脳切離時に、各マウスの左側脳室におけるカテーテルの配置をクレシルバイオレット染色によって検証した（図 3 5 B）。カテーテルが正しく設置されていたマウスだけを解析に含めた。インビボで 6 週間後の抗体の安定性を調べるために（図 3 5 A）、動物から取り出した時に、残存するポンプ内容物を収集し、S D S - P A G E およびクーマシーブルー染色を使って抗体を評価した。軽鎖および重鎖は無傷であって断片化しておらず、ウェスタンブロット上でタウ結合活性を保っていた（非掲載データ）。注入中の C S F および血清における抗タウ抗体の濃度を見積もるために、ピオチン化 H J 8 . 5 (H J 8 . 5 B) を 4 8 時間投与した（約 7 . 2 μ g / 日）（図 3 5 A）。遊離 H J 8 . 5 B の濃度は C S F 中では 7 . 3 μ g / m l、血清中では 6 . 2 μ g / m l であったことから、C N S から末梢への抗体の有意なクリアランスが示された（表 6）。ヒトタウに結合した H J 8 . 5 B も C S F と血清の両方に検出されたが、濃度は遊離抗体より低かった（表 6）。

表 6 I P 投与または I C V 投与の 4 8 時間後の血清および脳脊髄液 (C S F) における遊離の (タウに結合していない) ピオチン化 H J 8 . 5 抗体およびタウに結合している H J 8 . 5 抗体のレベル

【 表 1 1 】

処置	遊離HJ8.5Bの濃度 (μ g/ml)		
	CSF	血清	血清濃度の%と してのCSF濃度
HJ8.5B IP注射 (50mg/kg/48時間)	0.9 \pm 0.1	552 \pm 38.6	0.16 \pm 0.02
HJ8.5B ICV注射 (約14 μ g/48時間)	7.3 \pm 1.6	6.2 \pm 0.5	95.4 \pm 19.4
	タウに結合しているHJ8.5Bの濃度 (μ g/ml)		
HJ8.5B ICV注射 (約14 μ g/48時間)	0.10 \pm 0.02	0.04 \pm 0.03	53 \pm 4.6

【 0 1 3 8 】

実施例 1 2 . 抗タウ抗体処置は異常リン酸化タウを低減する

3 ヶ月間の処置後の P 3 0 1 S マウスにおけるタウ病態の程度を決定するために、タウ病態に関する多重染色を行なった。脳切片をまず抗ホスホタウ抗体 A T 8 による免疫染色によって評価した（図 3 6）。A T 8 は、マウスタウとヒトタウの両方のリン酸化残基 S

er 202 および Thr 205 に結合する (図 3 6)。PBS および HJ 3 . 4 で処置されたマウスでは、AT 8 が、複数の脳領域において、特に梨状皮質、嗅内皮質、扁桃体、および海馬において、ニューロン細胞体およびニューロピルを強く染色した (図 3 6 A および図 3 6 B)。HJ 8 . 5 処置は AT 8 染色を著しく低減し (図 3 6 C)、ニューロピルでは特にそうであった。HJ 9 . 3 および HJ 9 . 4 も AT 8 染色を減少させたが、その効果はわずかに低かった (図 3 6 D および 3 6 E)。梨状皮質 (図 3 7 A)、嗅内皮質 (図 3 7 B)、および扁桃体 (図 3 7 C) における AT 8 染色の定量的解析により、全ての抗タウ抗体処置マウスにおけるホスホ - タウの著しいが一様ではない低減が証明された。HJ 8 . 5 抗体は梨状皮質、嗅内皮質、および扁桃体における AT 8 染色を著しく低減した。HJ 9 . 3 は HJ 8 . 5 と比較して効果がわずかに減少しており、HJ 9 . 4 は嗅内皮質でも扁桃体でも有意な効果があったが、梨状皮質では効果がなかった (図 3 7)。海馬は、他の領域と比べてはるかに多様な AT 8 染色を主に細胞体において呈し、それゆえに処置群には対照群との対比で統計的有意差がなかった (図 3 7 D)。雄 P 3 0 1 S マウスは雌よりタウ病態が多いと報告されているので、両性別と処置の効果も評価した (図 3 8)。処置の効果に加えて、雄マウスで解析された全ての脳領域において AT 8 染色は有意に多かった (表 7)。しかし、性別に関する調整後も、抗体の効果は依然として著しく有意であり、事実上同一であった (表 8)。雄および雌における処置群と対照も別々に比較したところ、抗体 HJ 8 . 5 の効果は依然としてもっとも有意であった (図 3 8 A および図 3 8 B)。

表 7 処置 / 性別の p 値

【表 1 2】

	扁桃体	嗅内皮質	海馬	梨状皮質
処置	0.0107	0.0053	0.2917	0.0147
性別	0.0026	0.0027	0.0244	0.0067

処置および性別を要因とみなして二元配置ANOVAによって決定されたp値。扁桃体、嗅内皮質、および梨状皮質領域については、処置および性別はどちらもp値<0.05で有意な要因であるが、海馬CA1領域については、処置はp値=0.2917で有意な要因ではなく、一方、性別はp値=0.0244で有意な要因である。

表 8

【表 1 3】

	扁桃体		嗅内皮質		海馬 CA1		梨状皮質	
	p値-1	p値-2	p値-1	p値-2	p値-1	p値-2	p値-1	p値-2
対照対HJ8.5	0.0009	0.0009	0.0022	0.0022	0.0421	0.0526	0.011	0.0113
対照対HJ9.3	0.0956	0.1605	0.0335	0.0576	0.2486	0.3889	0.0566	0.0982
対照対HJ9.4	0.0106	0.0072	0.0077	0.005	0.2427	0.2427	0.1787	0.1569

p値を性別の調節前および調整後に計算した。p値-1：性別による調整なし；p値-2：性別による調整済。p値-1は一元配置ANOVAによって決定され、処置が独立変数である。p値-2は二元配置ANOVAによって決定され、処置および性別が独立変数である。

10

【0139】

実施例 1 3 . 複数の染色様式の相関関係

タウアミロイド沈着について調べるために、チオフラビン S (ThioS) を使って脳切片を染色した (図 3 9)。盲検評価者を使って ThioS 染色を半定量的に評価し、全ての対照および抗タウ抗体処置マウスにおいて、1 (染色なし) から 5 (最大染色) までのスコアを与えた。半定量的評価によれば、HJ 8.5 処置は、PBS および HJ 3.4 と比較して、ThioS 染色を有意に低減した (図 3 9 A および図 3 9 B)。PBS、HJ 8.5、および HJ 9.3 で処置されたマウス (各群から $n = 6$) を、タウホスホ残基 Ser 3 9 6 および Ser 4 0 4 を認識する PHF 1 モノクローナル抗体でも染色した。AT 8 染色と PHF 1 染色は有意に相関したことから ($r = 0.630$ 、 $p = 0.005$) (図 4 0 A)、異なるタウエピトープに対する 2 つの抗ホスホタウ抗体は類似する結果を与えることが示された。

20

【0140】

タウオパチーを含む多くの神経変性疾患は、タンパク質凝集および細胞傷害を取り囲む脳の領域にミクログリア活性化を呈する。抗 CD 6 8 抗体を使って処置群におけるミクログリア活性化を評価した (図 4 1)。HJ 8.5 処置および HJ 9.3 処置は、対照と比較して、梨状皮質、嗅内皮質、および扁桃体におけるミクログリア活性化を低減した (図 4 1 A ~ 4 1 D)。HJ 9.4 は HJ 8.5 および HJ 9.3 と比較して梨状皮質における効果が弱く (図 4 1 C ~ 4 1 E)、これは、AT 8 染色結果 (図 3 7 A) と合致した。ミクログリア活性化は全ての試料において AT 8 染色と強く相関した ($r = 0.511$ 、 $p = 0.0038$) (図 4 0 B)。

30

【0141】

実施例 1 4 . 抗タウ抗体は界面活性剤不溶性タウおよびシーディング活性を低減する

皮質における可溶性タウおよび不溶性タウのレベルを決定するために、RAB (水性緩衝液)、放射性免疫沈降アッセイ (RIPA) (界面活性剤緩衝液)、および 70% ギ酸 (FA) による逐次的な生化学的抽出を行うことで、最終ペレットを可溶化した。全タウは、ヒトタウとマウスタウの両方を同じ K_D (0.34 pM) で検出する抗タウ抗体 HJ 8.7 による ELISA で定量した。処置抗体が ELISA を妨害する可能性は、解析に先立って陽性対照試料にこれらの抗体をスパイクし、妨害がないことを観察することによって排除した (非掲載データ)。図 3 7 における病理学的解析で評価した全てのマウスを解析した。RAB 可溶性画分 (図 4 2 A) または RIPA 可溶性画分 (図 4 2 B) 中の全タウレベルは全ての群間で類似していた。界面活性剤不溶性 / 70% FA 可溶性画分は、ELISA およびウェスタンブロットに先立ち試料を中和することによって解析した。研

40

50

究された各動物を解析したところ、H J 8 . 5 および H J 9 . 3 は界面活性剤不溶性タウを対照との対比で > 50 % 減少させることがわかった (図 4 2 C) 。 代表的な試料 (各群から $n = 4$) は、H J 8 . 5 および H J 9 . 3 で処置されたマウスにおける不溶性タウレベルの減少を、ウェスタンブロットで例証している (図 4 0 C) 。 H J 9 . 4 処置群では P B S または H J 3 . 4 との対比で不溶性タウレベルに相違はなかった。平均 A T 8 染色が 図 3 7 における結果の平均値を反映している各群 $N = 6$ 匹のマウスにおいて、界面活性剤不溶性 / 70 % F A 可溶性画分中のヒトタウおよびマウスタウも特異的に評価した。70 % F A 可溶性画分にはマウスタウよりヒトタウの方が有意に多く存在し、抗体はこの画分におけるヒトタウを有意に低下させたが、マウスタウは有意に低下させなかった (図 4 2 D および 図 4 2 E) 。 これらと同じ試料において、A T 8 免疫反応性シグナルのレベルを E L I S A によって評価した。A T 8 シグナルは、この画分における全タウについてみられたものと同様に、抗体処置試料の方が低かった (図 4 2 F) 。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 2 】

脳におけるタウ凝集の低減はシーディング活性の低減と相関するであろうという仮説を立てた。そこで、細胞バイオセンサーアッセイを使って、異なる処置群からの皮質 R A B 可溶性画分中の P 3 0 1 S 脳シーディング活性を調べた。P 3 0 1 S マウスにおける I S F タウを評価した本発明者らによる以前のデータでは、タウの生化学的に可溶性プールと不溶性プールの両方と平衡状態にある細胞外タウ凝集体が存在する可能性が示唆された (Yamada et al. , 2011 ; J Neurosci 31 , 13110 - 13117) 。 まず、P B S または H J 3 . 4 で処置されたマウスからの溶解物で細胞を処理した後に、R D (K) - C F P / Y F P の細胞内凝集を評価した。これらの群からの溶解物は、F R E T シグナルを強く誘導した (図 4 3 A) 。 H J 8 . 5 および H J 9 . 3 で処置されたマウスの皮質組織からの溶解物には、著しく低いシーディング活性が観察された (図 4 3 A) 。 これは脳溶解物中の残存抗体によるものではなかった、なぜなら、脳溶解物の免疫沈降後に抗体 / ビーズ複合体からシーディング活性を溶出させた場合も、同じパターンが生じたからである (図 4 3 B) 。 このように、H J 8 . 5 および H J 9 . 3 は、P 3 0 1 S タウトランスジェニックマウス脳におけるシーディング活性を低減する。H J 9 . 4 はシーディング活性を有意に低減しなかった (図 4 3 A) 。 シーディング活性は、E L I S A によって検出される界面活性剤不溶性 / ギ酸可溶性タウの量と強く相関したが (ピアソンの $r = 0 . 5 2 9$ 、 $p = 0 . 0 0 0 1$) (図 4 3 C) 、 R A B 画分中の全タウとは相関しなかった (図 4 3 D) 。 シーディング活性は R A B 可溶性画分中に存在するタウ凝集体によるものであるという仮説を立てた。これを検証するために、半変性界面活性剤 - アガロースゲル電気泳動 (S D D - A G E) を行なってから、ウェスタンブロットを行なった。3ヶ月齢 P 3 0 1 S マウスには、タウ単量体に加えて、高分子量タウ種が存在し、9ヶ月齢 P 3 0 1 S マウスにはさらに多量に存在することが観察された (図 4 3 E) 。 これら高分子量種の構成要素は、おそらく、F R E T アッセイにおいて検出されるシーディング活性を構成すると思われる、界面活性剤不溶性 / ギ酸可溶性画分中に存在するタウと平衡状態にあるのだろう。

【 0 1 4 3 】

実施例 1 5 . 抗タウ抗体は文脈的恐怖消失を回復する

9ヶ月齢の P 3 0 1 S タウトランスジェニックマウスの研究において、対照群と抗タウ抗体処置群を、さまざまな行動について比較した。自発運動活性、探索行動、または感覚運動機能の尺度に、群間の相違はなかった (図 4 4) 。 P 3 0 1 S マウスにおける認知機能欠損を回復する抗タウ抗体処置の能力を、条件恐怖手法でマウスの成績を評価することによって、査定した。1日目には、マウスの4つの処置群の全てが、トレーニングチャンバにおける最初の2分間に、類似するレベルのベースラインフリージングを呈した。これは、 $r m A N O V A$ によって確認され、ここでは処置に関わる有意な全体的主効果または交互作用は何も明らかにならなかった (図 4 5 A) 。 加えて、4つの群の全てが音 - ショック (T / S) 条件刺激 - 無条件刺激 (C S - U S) ペアリング中に、類似するレベルのフリージングを示した (図 4 5 A) 。 3回の T / S ペアリングで群間にフリージングレベ

ルの相違が全般的に欠如していることは、有意でない処置の効果と、有意でない遺伝子型×分数交互作用によって実証された。

【0144】

1日目の試験中に群間で相違がなかったのとは対照的に、2日目に実施した文脈的恐怖試験（連合学習の一形態）からのフリージングレベルには、2つの抗タウ抗体群とPBS+HJ3.4対照マウスとの間で、強い（robust）相違があった（図45B）。続く計画的比較では、HJ8.5マウスが、PBS+HJ3.4対照群との比較で、8分間の試験セッション全体を平均して、有意に上昇したフリージングレベルを示した（図45C） $[F(1, 45) = 8.30, p = 0.006]$ 、またHJ9.4マウスも同様であったがその程度は低かったこと $[F(1, 45) = 5.60, p = 0.022]$ がわ

10

【0145】

実施例9～15に関する考察

タウオパチーの病理発生に関するモデルの一つでは、ある細胞中で生産された凝集体が細胞外間隙に漏れ出すか放出されて、隣接する細胞または接続された細胞における凝集を促進すると考えられている。脳溶解物からのタウシーディング活性を特異的に阻止する治療用抗体の選択により、以前になされた能動的または受動的タウワクチン接種の報告と比べて、それ以上ではないとしても、少なくとも同じ程度には強い、強力なインビボ応答が予測されることが観察された。細胞外タウ凝集体の存在に対して高感度な細胞バイオセンサーアッセイで実験を開始した。P301Sトランスジェニックマウスからの脳溶解物は、さらなる細胞内凝集を誘導することができるシーディング活性を含有することがわかった。一群の抗タウ抗体をスクリーニングした後、タウシーディング活性の阻止に関してさまざまな活性を持つ3つを選択した。これらの抗体を、P301Sタウオパチーマウスに、病態が始まった時点（6ヶ月）から開始して、3ヶ月にわたってICV注入した。抗体の注入により、CSFと血清の両方にかなりの濃度の抗体が存在する結果となり、CNSから末梢へと抗体が流出するという以前の報告と合致した。インビトロでもっとも強力な抗体であるHJ8.5による処置は、タウ病態を大きく低減し、ニューロピルからそれを著しく減少させた。この効果は、複数の独立した染色、不溶性タウの生化学的解析、および脳溶解物中に存在する残存タウシーディング活性の解析によって検出された。さらに、この処置は、このモデルにおいて検出される行動欠陥の一つを改善した。全ての抗体が、細胞へのタウ凝集体の取り込みを阻止し、このアッセイでは細胞外凝集体の存在下または非存在下で、どの抗体も細胞内には観察されなかった。これらの抗体の効力は、かつては細胞自律的であると考えられていた神経病態の病理発生における細胞外タウの明確な役割を暗示している。さらにまた、この研究は、細胞内病態の状況下で凝集体フラックスが起りうることを示唆する本発明者らの先の知見を拡張するものであり、細胞外種を標的とすることによって凝集体のクリアランスを補助することができる治療法の可溶性を高めるものである。最後に、この研究は治療用抗体の設計に関して重要な意味を有し、特にシーディング活性を標的とすることで最も効果的な薬剤が得られるであろうことを示唆している。

20

30

40

【0146】

機序に基づく抗体治療。タウに対する以前の能動的および受動的末梢免疫療法アプローチのいくつかもタウ病態を低減し、行動欠陥を改善したが、基礎にある抗体選択の論理的根拠は、ホスホ-エピトープ、神経原線維変化との反応性に基づくか、または明示されていなかった。マウスを完全長タウでワクチン接種することによって行われたタウ免疫化研究の一つは、野生型マウスにおいて、病態を誘導した。しかし、その後の、タウトランスジェニックモデルにおけるホスホ-タウペプチドによる能動免疫化アプローチは、タウ病態を低減し、行動改善を示した。ある受動免疫化研究では、JNPL3タウトランスジェニックマウスに、タウオパチーの発症に先立って、2～3ヶ月齢の時点でPHF1抗体が腹腔内投与された。PHF-1は病態型の異常リン酸化タウを標的とする。処置はタウ病

50

態を低減し、行動を改善した。しかし、これは不溶性リン酸化タウを減少させたものの、全不溶性タウは変化しなかった。もう一つの受動免疫化研究では、JNPL3マウスおよびP301Sマウス(2~3ヶ月齢時、タウオパチーの発症前)にPHF1抗体が末梢投与されるか、または凝集体関連エピトープを標的とするMC1抗体が末梢投与された。どちらの処置もタウ病態を改善し、運動機能障害の発症を遅延させた。これらの先行研究では、抗体の作用機序が明確でなく、いずれも明示的には検定されなかった。実際、細胞内機序を提案した者もあった。そのうえ、どの研究も、本明細書に掲載する実施例で述べる規模のタウ病態の低減をもたらすことはなかったようである。ただし、他の研究では末梢注入が利用されたのに対して、抗体はCNSに注入され、利用した動物モデルも異なっ

10

【0147】

この研究は、細胞外タウシードが病理発生の重要な構成要素であるという予測を検定するために、明示的に設計された。この研究は、予測される活性の範囲で薬剤を試験する目的で、インビトコでタウシーディングを阻止する能力を有する抗体を拾い上げるための選択プロセスから始めた。インビボで試験した抗体はすべて、凝集体の取り込みおよびシーディングを効果的に阻止し、観察されたそれらの活性の根拠となった。加えて、抗体アフィニティ、エピトープ、アイソタイプ、グリコシル化、およびリン酸化型のタウに結合する能力の相関関係も、将来の研究において評価することが重要であるだろう。これは、抗タウ抗体の直接的CNS内注入の効果を報告する初めての研究でもある。利用した抗体がそれぞれ異なるタウエピトープを標的とし、いずれもホスホ-タウを標的とはしなかったという事実にもかかわらず、3つのうち2つは、免疫組織学的にも生化学的にも異常タウ負荷を著しく低減し、2つは記憶を有意に改善し、そのうちの一方は他方よりその程度が大きかった。タウ病態に対する効果は、内在するシーディング活性の低減とも非常によく関連した。

20

【0148】

HJ8.5およびHJ9.3は、インビボで病理学的タウシードを著しく減少させた。タウ病態の著しい低減は、隣接細胞におけるタウ凝集の誘導を防止することによって起こったのかもしれない。HJ9.4は病態をそれほど強くは減少させなかったが、扁桃体におけるタウ病態は減少させた。抗体間での異なる脳領域における有効性のばらつきは、抗体が結合アフィニティに微細な相違を有する領域特異的凝集体コンフォーマーの形成によ

30

【0149】

細胞外タウ凝集体がインビボで抗タウ抗体によって隔離された場合のそれらの代謝運命はまだ明確でない。3ヶ月の抗体投与後に、ミクログリア活性化の低減が見出されたが、これはおそらく、タウ関連病態および神経変性の減少によるのであろう。しかしこれは、細胞外凝集体のクリアランスの効率が向上したことによるものであって、それが、関連するミクログリア活性化の低減を伴うのかもしれない。抗A抗体による数ヶ月間の受動免疫化も、ミクログリオシスを低減することが注目されている。抗体/タウ複合体がインビボで取り除かれる機序およびそれらがタウ病態を減少させる機序は、まだ決定的には解明されていない。抗-シヌクレイン抗体による免疫化は、リソソーム分解を促進することによって、-シヌクレイン凝集体を取り除くことが示唆されている。抗-シヌクレイン抗体を使った最近の研究では、抗体は、主としてミクログリアによる、おそらくはFc受容体を介した、-シヌクレインクリアランスを標的とすることが示された。ニューロンはFc受容体を発現するので、抗原との複合体を形成したIgGを、高アフィニティFcRI受容体によって内部移行させることができるだろう。内部移行したタウ抗体もエンドソーム中のタウと接触し、最終的には、エンドソーム/オートファジー-リソソーム系による細胞内タウ凝集体のクリアランスを誘導するかもしれない。この研究で使用した抗タウ抗体は、細胞外タウ集合体に結合することができるが、細胞内での有意な局在化の証拠は見つからなかった。ただし、だからといって、細胞がインビボで抗体/タウ複合体を取り込むことでタウ凝集体クリアランスおよび炎症に影響を及ぼすという可能性が

40

50

排除されることはない。例えば、ウイルスとの複合体を形成した抗体は、サイトゾルの I g G 受容体 T R I M 2 1 に結合して、抗体 / ウイルス複合体をプロテアソームにターゲティングすることが、最近になって示されている。加えて、T R I M 2 1 に結合した抗体は、免疫シグナリングを活性化することも示された。抗体 / 非感染性抗原複合体と T R I M 2 1 との相互作用はまだわかっていないが、そのような機序が抗タウ抗体と関連するかどうかを決定することは興味深いことであるだろう。興味深いことに、タウオパチーの P 3 0 1 S モデルでは、有意なタウ病態の発生に先立って先天免疫系が活性化され、早期の免疫抑制がタウ病態を減弱するという証拠もある。抗体が炎症によって誘導されるタウ凝集体を捕捉して、その後の凝集体誘導性の炎症および疾患進行を低減する可能性もありうる。

10

【 0 1 5 0 】

細胞外タウおよびタウ病態の拡がり。本明細書に記載する研究では、病理発生における細胞外タウの役割が、暗黙的に試験される。細胞外タウ凝集体が、その供給源が組換えタンパク質であるか哺乳動物細胞から抽出されたタウであるかを問わず、細胞の内部にあるネイティブタウの原線維形成を誘発できることは、現在では十分明確になっている。細胞培地に加えられた H J 9 . 3 が内部移行を阻止し、遊離の原線維を免疫沈降させた本発明者らの以前の研究に基いて、経細胞伝播の媒介物質としての遊離タウ凝集体の役割が、最初に仮定された（すなわち膜封入型でない）（K f o u r y e t a l . , 2 0 1 2 ; J B i o l C h e m 2 8 7 , 1 9 4 4 0 - 1 9 4 5 1 ）。

20

【 0 1 5 1 】

動物モデルにおいて、タウ凝集体は、ある領域から別の領域へ（例えば嗅内皮質から歯状回および海馬中の下流のニューロンへ）と、見かけ上、拡がることことができる。本発明者らは、単量体型タウが、インビボでは、非病理学的条件下でさえ、脳間質液中に絶えず放出されることを見出している（Y a m a d a e t a l . , 2 0 1 1 ; J N e u r o s c i 3 1 , 1 3 1 1 0 - 1 3 1 1 7 ）。本発明者らは、外因性凝集体が可溶性 I S F タウのレベルを低減することも見出し、この間隙においてシーディングおよび / または隔離現象が起こりうることを示唆した（Y a m a d a e t a l . , 2 0 1 1 ; J N e u r o s c i 3 1 , 1 3 1 1 0 - 1 3 1 1 7 ）。総合すると、細胞外タウ凝集体が形成され、隣接する細胞、接続された細胞によって取り込まれるか、場合によっては同じ細胞に再び取り込まれ、それによってタンパク質ミスフォールディングの負荷を増加させることができるという概念を、豊富な証拠が支持している。この証拠から、細胞外シーディング活性を捕捉する治療法は疾患を寛解させるはずであると、明確に予測される。本明細書に提示する実施例に記載する知見は、この考えに合致している。

30

【 0 1 5 2 】

病理発生におけるタウフラックスの役割。事実上全てのニューロンにおいてプリオンプロモーターによって変異体タウ発現を駆動する P 3 0 1 S などのマウスモデルは、凝集の経細胞伝播を阻止する抗体処置の恩恵を受けるはずであると、演繹的に予測されることはないであろう。理論上、病態は、この易凝集性タンパク質を発現する全てのニューロンにおいて独立して起こりうる。しかし本発明者らによる以前の研究では、タウ凝集体のフラックスの役割が示唆された、というのも、細胞培地に添加された H J 9 . 3 は、凝集体の定常状態レベルを、経時的に増加させたからである。凝集体フラックスのモデルにはさらなる検討が必要であるが、本明細書に提示する結果はこの考えと合致している、というのも抗体処置は、細胞内タウ病態を大きく低減させたからである。タウ取り込みを阻止する抗体は、もう一つの機序（おそらくミクログリアが関連するもの）によるクリアランスを促進しうる「シンク」を、細胞外間隙に作りうると予測される。

40

【 0 1 5 3 】

治療用抗体およびシーディング活性の標的化。医薬産業では、細胞内に蓄積する易凝集性タンパク質を標的とする治療用抗体を開発する努力がますます盛んになっている。最も重要な基準は、患部脳内に蓄積することが知られているエピトープに抗体が結合することであった。このアプローチはインビボで最適な活性を持つ抗体をもたらす場合もあるし、

50

もたらさない場合もある。本明細書の実施例は、脳内に存在するシーディング活性を阻止する効力を強調する治療用抗体開発の新しいモデルを支持するものである。このアプローチを使用することにより、今までに報告されたものより高い見かけの効力を有する抗体が同定された。プリオン仮説の拡張として、異なるタイプのタウオパチーを持つ患者では異なるタウ凝集体「株 (strain)」が優勢であり、それらは異なる抗体に対してユニークな感受性を有しうることを、さらに提唱する。いずれにせよ、本明細書に記載するような抗体効力の高感度インビトロアッセイを使用することにより、抗体に基づく治療法のはるかに効率のよい開発と最適化が可能になるであろう。

【0154】

抗タウ抗体の、特にHJ8.5抗体での、強い保護効果は、ヒトタウオパチーの処置戦略として、このタイプのアプローチを考慮すべきであることを示唆している。ICVアプローチでの抗体の慢性的投与も考えうるが、将来の研究では、予防的に与えられた場合と治療的に与えられた場合の両方で、これらの抗体の末梢投与でのPK/PD応答を決定することが重要であるだろう。加えて、タウシーディングアッセイは、抗体によるターゲット結合をモニターするのに役立つ。

【0155】

実施例9~15の実験手法

抗体、HJ9.3およびHJ9.4マウスモノクローナル抗体は、タウノックアウトマウス(The Jackson Laboratory)をマウスタウに対して免疫化することによって産生させ、HJ8.5およびHJ8.7はモノクローナル抗体は、タウノックアウトマウスをヒトタウに対して免疫化することによって産生させた。HJ9.3、HJ9.4およびHJ8.7モノクローナル抗体は、マウスタウとヒトタウをどちらも認識する。しかしHJ8.5モノクローナル抗体はヒトタウだけに結合する(エピトープは残基25~30にある[NCBIリファレンス配列: NP_005901])。HJ9.3抗体はタウのRD領域(残基306~320にあるエピトープ)を認識する。HJ9.4抗体はタウのN末端領域(残基7~13にあるエピトープ)を認識する。対照抗体として、ヒトA配列のN末端領域(残基1~16にあるエピトープ)を認識するHJ3.4マウスモノクローナル抗体を使用した。HJ8.5、9.3、および9.4モノクローナル抗体はIgG2bアイソタイプである。ウサギポリクローナルタウ抗体(ab64193、エピトープはリピートドメイン領域に位置する)はAbcamから購入した。マウスモノクローナルビオチン化BT-2抗体はヒトタウとマウスタウ(残基194~198にあるエピトープ)を認識する。これはPierceから購入した。ラット抗マウスモノクローナルCD68抗体はAbD Serotecから購入した。ビオチン化AT8抗体はThermo scientificから購入した。

【0156】

表面プラズモン共鳴、表面プラズモン共鳴実験はBiacore 2000表面プラズモン共鳴計測器(GE Healthcare-Biacore)で行なった。EDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド)およびNHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)を1:1の比で使用して、BiacoreセンサーチップCM-5を、7分間活性化した。10mM酢酸ナトリウム(pH3.5)中の5μg/mlの組換えヒトタウもしくはマウスタウまたはヒトタウ原線維を5μl/分の流速で固定化することにより、センサーチップ表面を飽和させた。残存する未結合領域を1Mエタノールアミン(pH8.5)でブロックした。参照用に、1つのフローセルをNHSおよびEDSで活性化した後、1Mエタノールアミンでブロックする。次に、全ての抗タウ抗体を、濾過脱気0.01M HEPES緩衝液、0.15M NaCl、0.005%サーファクタントP20、pH7.4中、異なる濃度(0.11、0.23、0.46、0.9、1.8、3.7、7.5μg/ml)で、流速を10μl/分にして注入した。全ての試料を2つ組にして実験した。一つの抗体濃度での実験が終わるごとに、10mMグリシン(pH1.7)を使って、チップ上の固定化タウを乱さずに、タウに結合した抗体を除去することにより、チップの表面を完全に再生した。データ解析はBIAeval

10

20

30

40

50

evaluationソフトウェア (GE healthcare - BiAcCore) を使って行なった。

【0157】

タウ線維化 . 8 μ M 組換え完全長ヒトタウを 2 mM ジチオスレイトールと共に室温で 45 分間ブレインキュベートしてから、10 mM HEPES および 100 mM NaCl および 8 μ M ヘパリンを 200 μ l の総体積になるように加え、次に、37 で 7 日間インキュベートすることにより、原線維を形成させた。原線維形成後に、100 kDa Microcon 遠心分離フィルタを製造者の説明書 (Millipore) に従って使用することにより、試料中の残存タウ単量体を分離した。

【0158】

ビオチン化 HJ8 . 5 抗体の IP 投与および ICV 投与 . マウスモノクローナル HJ8 . 5 抗体を製造者の説明書 (スルホ - NHS - LC - ビオチンキット、Pierce) に従ってビオチン化した。ビオチン化 HJ8 . 5 (HJ8 . 5 B) を 50 mg / kg で 5 ~ 6 ヶ月齢 P301S マウス (n = 3) に腹腔内 (interperitoneal) 注射 (IP) によって投与した。48 時間後にマウスを屠殺した。血清および CSF を収集し、使用時まで - 80 で保存した。HJ8 . 5 B は、5 ~ 6 ヶ月齢 P301S マウス (n = 3) の左側脳室中に、外科的に埋め込まれた浸透圧ポンプにより、脳室内注射 (ICV) でも投与した。抗体を 48 時間持続的に注入した。48 時間後にマウスを屠殺した。血清および CSF を収集し、使用時まで - 80 で保存した。

【0159】

脳室内 (ICV) 注射法 . ICV 注入は Alzet 浸透圧ポンプ 2006 モデル (Durorect) で行なった。マウスの齢は手術の時点で 6 ヶ月だった。手術の前に、L 字型カニューレを管 (3 cm 長) に取り付け、次にそれを、抗体または媒体 (リン酸緩衝食塩水 - PBS、pH 7 . 4) を保持する Alzet ポンプに取り付けた。側脳室への配置に先立ってポンプを活性化するために、このアセンブリを PBS 中、37 で 60 時間ブレインキュベートした。定位装置 (David Kopf Instruments) を使って、イソフルラン麻酔下に、プレグマから前後方向に 0 . 4 mm、正中から側方に 1 . 0 mm、および脳の表面から腹背方向に 2 . 5 mm の位置にある各マウスの左側脳室に、アセンブリを外科的に埋め込んだ。湾曲した鈍先仕上げの剪刀で皮下ポケットを作ることにより、Alzet 浸透圧ポンプを皮下に置いた。埋め込まれたカニューレのそれぞれを、アンカーステンレス鋼スクリューに沿って歯科用セメントで固定した。セメントの乾燥後に、皮膚を縫合した。ポンプ中の抗体 (2 mg / ml) または PBS は、脳の左側脳室中に継続的に注入された。これらの浸透圧ポンプは、最大 200 μ l の容量を保持し、3 . 6 μ l / 日の流速で送出することで、1 日あたり 7 . 2 μ g の抗体の注入をもたらす。各マウスにおいて、6 週間の注入後に、浸透圧ポンプを代えた。各マウスから Alzet ポンプを取り出した後に、ポンプ内に残っている溶液を収集し、- 80 で保存した。9 ヶ月齢の時点で、全てのマウスを屠殺した。外科的埋め込みを行なったマウスは全て個別に飼育した。

【0160】

組織学 . 12 週間の処置後に、P301S マウスをペントバルビタール 200 mg / kg で腹腔内麻酔した後、冷ダルベッコ PBS 中の 3 U / ml ヘパリンで灌流した。脳を取り出し、2 つの半球に切断した。脳の左側を 4 % パラホルムアルデヒド中で 24 時間固定し、PBS 中の 30 % スクロースに移し、4 で保存してから、ドライアイス粉末中で凍結し、- 80 で保存した。半分の脳を凍結滑走式マイクロトームで 50 μ m 切片に冠状切断し、全ての切片を凍結保護物質溶液 (0 . 2 M リン酸緩衝食塩水、30 % スクロース、30 % エチレングリコール) と共に 24 穴プレートに入れて、使用時まで - 20 で保存した。海馬と皮質を、各脳の灌流したばかりの右半球から、生化学的解析のために切離した。切離した組織は全て解析時まで - 80 で保存した。左側脳室中へのカニューレの配置は、既述のように (Holtzman et al . , 1996 ; Ann Neurol 39 , 114 - 122)、300 μ m 離れた脳切片をマウントし、クレシルバ

10

20

30

40

50

イオレットで染色することによって検証した。染色された組織は、NanoZoomer デジタル病理システム（浜松ホトニクス）を使ってスキャンした。

【0161】

細胞培養 / シーディングアッセイ : P301S 脳溶解物および抗体処置

10% ウシ胎児血清、100 μg/mL ペニシリンおよび 100 μg/mL ストレプトマイシンを補足したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中で HEK293 細胞を培養した。培養物を、37 °C、5% CO₂ の湿潤雰囲気中で維持した。一過性トランスフェクションのために、HEK293 細胞を、opti-mem 培地中、250,000 細胞/ウェルで、12 穴プレートにプレATINGし、Lipofectamine 2000 試薬と 600 ng の適当な DNA コンストラクト (Invitrogen) とを使用し、製造者の推奨に従って、トランスフェクトした。コトランスフェクト細胞には、150 ng の RD (K280) - CFP コンストラクトと 450 ng の RD (K280) - YFP コンストラクトの組み合わせを与えた。15 時間後に、37 °C で 3 分間、0.05% トリプシンを使って、細胞を回収 (harvest) し、次に 96 穴プレートに 4 つ一組にして再プレATINGし、15 時間培養した。次に、全ての抗タウモノクローナル抗体 (HJ8.5、9.3 および 9.4) または HJ3.4 抗体 (モノクローナル抗 A 抗体) と共にプレインキュベートした P301S 脳溶解物 [プロテアーゼ阻害剤 (Roche) およびホスファターゼ阻害剤 (Roche) を含む 1 × TBS 中に調製] を、回転させながら 4 °C で 16 時間、さまざまな濃度 (0.125 μg/mL、0.25 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL および 2 μg/mL) で加えた。異なる抗体で 3 ヶ月間処置した P301S マウスにおけるシーディング活性を決定するために、全ての処置マウスの RAB 可溶性画分も、さまざまな濃度で細胞に加えた。細胞をさらに 24 時間培養してから 4% パラホルムアルデヒドで固定し、FRET 解析を行なった。

10

20

30

40

50

【0162】

免疫沈降 . PBS 処置マウスまたは抗体処置マウスからの RAB 可溶性画分を、プロテイン G - アガロースビーズに架橋したマウスモノクローナル抗タウ抗体 HJ9.3 および HJ8.5 (キットの推奨に従った - Pierce Crosslink Immunoprecipitation キット) の存在下、4 °C で、エンドオーバーエンド (end-over-end) 回転させながら、24 時間インキュベートした。加えて、抗体処置マウスからの RAB 可溶性画分を、非コンジュゲートプロテイン G - アガロースビーズの存在下でも、4 °C で、エンドオーバーエンド回転させながら、24 時間インキュベートした。18 時間後に、500 μl の結合 / 洗浄緩衝液 (Pierce) を試料に加え、2000 × g で 3 分間遠心分離した。上清を捨て、この洗浄ステップを 3 回繰り返した。次に、ビーズに結合したタンパク質を、低 pH 溶出緩衝液 (25 μl) を使って、室温で 5 分間インキュベートすることで溶出させた。次に試料を 2000 × g で 3 分間遠心分離し、上清を収集した。この溶出ステップを 1 回繰り返し、溶出液を合計 50 μl とした。タウ凝集体を含有するタウ免疫沈降物 (IP) を、シーディングアッセイによるさらなる解析のために、最初の脳溶解物実験と等価な量でコトランスフェクト RD (K) - CFP / YFP 細胞に再び適用した。

【0163】

脳組織抽出 . 各脳の皮質を 30 μl / mg の RAB 緩衝液 [プロテアーゼ阻害剤 (Roche) およびホスファターゼ阻害剤 (Roche) を補足した 100 mM MES、1 mM EDTA、0.5 mM MgSO₄、750 mM NaCl、20 mM NaF、1 mM Na₃VO₄] 中でホモジナイズした。簡単に述べると、Optima MAX - TL 超遠心機 (Beckman) を使って、試料を 4 °C、50,000 g で 20 分間遠心分離した。上清を RAB 可溶性画分として収集し、ペレットを 30 μl / mg の RIPA 緩衝液 [プロテアーゼ阻害剤 (Roche) およびホスファターゼ阻害剤 (Roche) を補足した 150 mM NaCl、50 mM トリス、0.5% デオキシコール酸、1% Triton X-100、0.5% SDS - 25 mM EDTA、pH 8.0] に再懸濁し、4 °C、50,000 g で 20 分間遠心分離した。上清を RIPA 可溶性画分とし

て集めた。ペレットをさらに10 μ l/mgの70%ギ酸に再懸濁し、4、50,000gで、20分間遠心分離した。上清を70%ギ酸画分として収集した。全ての画分を解析時まで-80で保存した。

【0164】

電気泳動および免疫ブロッティング。ゲル電気泳動を、4-12%NuPAGEビス-トリスゲル(Invitrogen)により、還元条件下で行なった後、IBlot装置(Invitrogen)を使ってPVDF膜に転写した。70%ギ酸画分は、ローディングしてゲル電気泳動に付す前に、10N NaOHと中和緩衝液(1mol/Lトリス塩基;0.5mol/L NaH_2PO_4)の1:1混合物で1:3に希釈することによって中和した。染色済み分子量標準「SeeBlue」(Invitrogen)を各泳動に含めた。0.1%のTween 20を含有するトリス緩衝食塩水(TBS)中の5%ミルクで膜をブロッキングした。次に、膜を5分ずつ3回洗浄した。ウサギポリクローナルタウ抗体(Abcam、1:2000)をギ酸画分中のタウを検出するための一次抗体として使用した。浸透圧ポンプからその注入前と注入後に収集した処置マウス抗タウ抗体も、一次抗体として使用した。次に、膜をヤギ抗ウサギまたはヤギ抗マウス二次抗体(GE Healthcare、1:2000)と共にインキュベートした。全ての膜をECL prime基質(GE Healthcare)で発光させた。バンドをG:Box化学発光イメージャー(Syngene)で可視化した。

10

【0165】

脳ホモジネートからのタウに対する抗タウ抗体の免疫反応性を決定するために、9ヶ月齢P301Sマウス、3ヶ月齢P301Sマウス、3ヶ月齢野生型マウスおよび3ヶ月齢タウノックアウトマウス試料のRAB可溶性画分を、SDS-PAGEで分離した後、ウェスタンブロッティングを行なった。各RAB可溶性画分からの全タンパク質1 μ gを4-12%NuPAGEビス-トリスゲル(Invitrogen)に還元条件下でローディングした後、IBlot装置(Invitrogen)を使ってニトロセルロース膜に転写した。0.05%Tween 20を含むTBS(TBST)中の5%ミルクで膜をブロッキングした後、一次抗体(HJ8.5、HJ9.3およびHJ9.4)と共にインキュベートした。HRPコンジュゲートロバ抗マウスIgG(1:2000、Santa cruz)を二次抗体として使用し、Lumigen TMA6(GE Healthcare)を使って膜を発光させた。

20

30

【0166】

遊離HJ8.5Bとタウに結合したHJ8.5Bを検出するためのELISA。IP投与またはICV投与の48時間後にマウスの血清およびCSFにおける遊離HJ8.5Bの濃度を決定した。96穴ELISAプレートを4において50ng/mlの組換えヒトタウでコーティングした。ELISAプレートを37で1時間、4%BSAでブロッキングした。次にプレートを5回洗浄してから、試料緩衝液(プロテアーゼ阻害剤を補足したPBS、300nMトリス(pH7.4)中の0.25%BSA)に希釈し4で終夜インキュベートした血清試料およびCSF試料と共に、インキュベートした。翌日、プレートをPBSで8回洗浄し、次にストレプトアビジン-ポリ-セイヨウワサビペルオキシダーゼ-40(1:6000、Fitzgerald)を暗所、室温で、1.5時間加えた。次に、プレートをPBSで8回洗浄し、Super Slow ELISA TMB(Sigma)で発色させ、650nmで読み取った。標準曲線を作成するために異なる濃度のHJ8.5Bを使用し、これを、各プレートで、血清試料およびCSF試料と共に処理した。

40

【0167】

タウに結合したHJ8.5Bの濃度は、96穴ELISAプレートを4において20 μ g/mlのHJ8.7抗体でコーティングすることによって測定した。ELISAプレートを37で1時間、4%BSAでブロッキングした。次にプレートを5回洗浄してから、試料緩衝液に希釈し4で終夜インキュベートした血清試料およびCSF試料と共に、インキュベートした。翌日、プレートをPBSで8回洗浄し、ストレプトアビジン-ポ

50

リ - セイヨウワサビペルオキシダーゼ - 40 (1 : 6000、Fitzgerald) と共に、暗所、室温で、1.5時間インキュベートした。次に、プレートをPBSで8回洗浄し、Super Slow ELISA TMB (Sigma) で発色させ、650nmで読み取った。組換えタウとの複合体を形成した精製HJ8.5Bの異なる希釈液を使って、各プレートにおいて標準曲線を作成した。

【0168】

タウサンドイッチELISAアッセイ。全タウレベルを決定するために、ELISAハーフ96穴プレート (Costar) を、炭酸緩衝液 (pH9.6) 中のHJ8.7抗体 (20µg/ml) でコーティングし、振とう機上、4 で終夜インキュベートした。ELISAプレートをBioTek ELx405プレート洗浄機を使ってPBSで5回洗浄し、PBS中の4%BSAにより、37 で1時間、ブロッキングした。次に、プレートを5回洗浄してから、ウェルを、試料緩衝液 (プロテアーゼ阻害剤を補足したPBS、300nMトリス (pH7.4) 中の0.25%BSA) で希釈して4 でインキュベートしたRAB、RIPA、または70%FA生化学的抽出可溶性脳組織画分と共に、インキュベートした。70%FA画分は、1Mトリス (pH11) で1:20希釈してから試料緩衝液で希釈することにより、中和した。翌日、プレートをPBSで8回洗浄し、次に、PBS中の0.5%BSAに入っているビオチン化マウスモノクローナル抗タウ抗体BT-2抗体 (0.3µg/ml、Pierce) を、37 で1.5時間加えた。次にプレートをPBSで8回洗浄してから、ストレプトアビジン - ポリ - セイヨウワサビペルオキシダーゼ - 40 (1 : 4000) を暗所、室温で1.5時間加えた。次にプレートをPBS中で8回洗浄し、Super Slow ELISA TMB (Sigma) で発色させ、BioTek Synergy 2プレートリーダーにより、吸光度を650nmで読み取った。各プレートにおいて組換えヒトタウを使って標準を作成した。各プレートで、陰性対照ウェルでは一次抗体を省略した。Eva - Maria Mandelkowの研究室で生産された最も長い組換えヒトタウ (hTau40、441aa) およびマウスタウ (mTau40、432aa) アイソフォームを、ELISAアッセイにおける標準として使用した。

【0169】

70%FA画分中のヒトタウのレベルを決定するために、ELISA 96穴プレートを、マウスモノクローナル抗体Tau5 (20µg/ml) でコーティングし、検出にはマウスモノクローナル抗ヒトタウ特異的ビオチン化HT7抗体 (0.2µg/ml、Thermo Scientific) を使用した。70%FA画分中のマウスタウレベルについては、ELISA 96穴プレートをモノクローナル抗マウスタウ特異的HJ9.2抗体 (20µg/ml) でコーティングし、検出にはモノクローナルビオチン化HJ8.7を使用した。各プレート上で組換えヒトタウおよび組換えマウスタウを標準として使用した。位置Ser202およびThr205でのホスホタウレベルを決定するために、ELISAハーフ96穴プレートをマウスモノクローナルHJ8.7抗体 (20µg/ml) でコーティングし、ビオチン化AT8抗体 (0.2µg/ml、Thermo Scientific) を検出抗体として使用した。

【0170】

免疫組織化学。脳における異常リン酸化タウの存在を検出するために、全ての処置マウスから300µmの間隔で得た3つの50µm冠状脳切片を評価した。脳切片をトリス緩衝食塩水 (TBS) および0.25% (体積/体積) Triton - X中の3%ミルクでブロッキングした後、ser202およびthr205でリン酸化されたタウを認識するビオチン化AT8抗体 (Thermo Scientific、1:500) と共に、4 で終夜インキュベートした。残基ser396およびser404での異常リン酸化タウを認識するビオチン化PHF1抗体 (1:200) も使用して、AT8抗体染色とPHF1抗体染色の間の相関関係を決定した。相関関係研究のために、HJ8.5、HJ9.3、およびPBS処置群からマウス (N=6) をランダムに選択した。染色された組織を、NanoZoomerデジタル病理システムを使ってスキャンした。AT8染色と活性

10

20

30

40

50

化ミクログリア染色の間の相関関係を決定するために、全ての処置群の選ばれたマウス (N = 6) からの脳切片を、0.25% (体積/体積) Triton-Xを含むTBS中の10%正常ヤギ血清でブロッキングし、ラット抗マウスCD68抗体 (AbD Serotec、1:500) と共に4で終夜インキュベートした。次に、切片を、ビオチン化ヤギ抗ラットIgG抗体、マウス吸着処理済み (Vector、1:2000) と共にインキュベートした。全ての切片を、NanoZoomerスライドスキャナー (浜松ホトニクス) でスキャンした。すべての画像をNDPビューアソフトウェアを使ってエクスポートし、ImageJソフトウェア (米国国立衛生研究所) を使って定量した。AT8染色には、マウス脳アトラスにおいてプレグマ座標 - 1.4、- 1.7、および - 2.0 mmにある切片にほぼ対応する、300 μmずつ離れた、各マウスからの3つの脳切片を使用した。これらの切片を使って、異常リン酸化ビオチン化AT8抗体染色が占める面積のパーセンテージを決定した。全ての変換画像を一様にしきい値処理することでAT8染色を定量し、3つ全ての切片の平均を使って、異常リン酸化タウ染色で覆われた面積のパーセンテージを各マウスについて決定した。PHF-1染色とCD68染色には、300 μm離れた、各マウスからの2つの脳切片を使用した。これらは、マウス脳アトラスにおいてプレグマ座標 - 2.3および - 2.6 mmに対応する。ThioS染色を決定するために、全ての処置群から無作為に選択したマウス (N = 6) からの脳切片を、50%エタノール中のThioS (0.25 mg/ml) において染色した後、50%エタノールおよび蒸留水中で洗浄した。次に切片をマウントし、乾燥し、NanoZoomerを使った顕微鏡観察によって画像を評価した。PHF-1染色およびCD68染色に使用したものに隣接する各マウスからの2つの脳切片を、記載のとおり使用した。

【0171】

半変性アガロースゲル電気泳動 (SDD-AGE)

3ヶ月齢タウノックアウト (KO) マウス、3ヶ月齢野生型 (WT) マウス、3ヶ月齢P301Sマウスおよび9ヶ月齢PBS処置P301Sマウスの異なるRAB可溶性画分中に存在するタウ種を分離するために、既述の半変性界面活性剤アガロースゲル電気泳動 (SDD-AGE) 法にわずかな変更を加えて使用した。試料を、0.2% SDSを含む緩衝液G (20 mM トリス、200 mM グリシン) 中の水平1.5%アガロースゲルで泳動した。試料を、試料緩衝液 (60 mM トリス-HCl (pH 6.8)、0.2% SDS、5% グリセロール、および0.05% ブロモフェノールブルー (bromophenol blue)) 中、室温で7分間インキュベートした。電気泳動後に、レムリ (Laemmli) 緩衝液 (緩衝液G/0.1% SDS) 中、4で、タンパク質をゲルからImmobilon-P PVDFシート (Millipore) に転写した。抗タウ特異的ウサギポリクローナル抗体 (Abcam) を1:2000で使って、膜をプロットングした。GE ECL Plusシステムを使ってプロットを発光させた。

【0172】

免疫蛍光。ポリD-リジンでコーティングした24穴プレートに75,000細胞/ウェルでHEK293細胞をプレートングした。使用した抗タウ抗体がHEK293細胞によって取り込まれるタウ種を検出できるかどうかを決定するために、細胞をP301S脳溶解物で2時間処理し、次にPBSで3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを使って室温で15分間固定した後、室温のPBSで3回洗浄した。細胞を0.1% Triton X-100で10分間透過処理し、PBSで3回洗浄した後、10%正常ヤギ血清および20 mg/ml BSAを含有するPBS中の0.25% Triton X-100でブロッキングした。次に、細胞を、Alexa-fluor 546とコンジュゲートした抗マウス二次抗体と共にインキュベートした。抗体が細胞に進入することができるかどうかを決定するために、P301S脳溶解物を、異なる抗タウ抗体HJ8.5、HJ9.3、およびHJ9.4またはAに対するHJ3.4抗体と共に、およびこれらを伴わずに、プレインキュベートした。次に、溶解物をHEK293細胞に2時間加え、固定し、透過処理した。Alexa-fluor 546とコンジュゲートした二次抗体を使って抗体を同定した。核染色には4', 6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI)

I ; 青色で示す) を使用した。画像は全て、Zeiss LSM5 共焦点顕微鏡 (Zeiss) を使ってキャプチャした。

【0173】

病理学的データおよび生化学的データの統計解析。全てのデータを平均 ± SEM として表し、異なる条件を一次元配置 ANOVA とそれに続くダネットの事後検定を使って比較することにより、対照を処置群と比較した。統計的有意性を $P < 0.05$ と設定した。統計解析は GraphPad Prism 5.04 for Windows (GraphPad Software Inc.) を使って行なった。AT8 染色の定量的評価については、性別が有意要因であるので、SASバージョン9.2ソフトウェアを使って、結果を性別で調整した。

10

【0174】

処置および性別を要因として適用する統計解析。対照群 (PBS および HJ3.4) の平均を、各処置群と比較した。(PBSの平均 + HJ3.4の平均) / 2 と処置の平均との対比)。二元配置 ANOVA を使って、性別と処置が有意要因であるかどうかを検定した。これは SASバージョン9.2 中の PROC GLM によって行われ、それらの p 値を表7に示す。SASバージョン9.2の PROC GLM では、CONTRAST ステートメントを使って、全ての比較にアクセスした。二元配置 ANOVA において調整因子として性別を適用した。調整前/後の p 値を図38Dに示す。

【0175】

行動試験。認知機能を評価するために使用した条件恐怖試験の結果を解釈するための追加対照データを得るために、マウスを、自発運動活性および探索行動ならびに一連の感覚運動尺度およびロータロッドについて評価した。条件恐怖試験は、短時間フットショックが他の行動指標に及ぼす影響を排除するために、一連の試験の最後に行なった。

20

【0176】

ホールボード探索行動、感覚運動バッテリーおよびロータロッド。全てのマウスをホールボード探索行動試験で評価した。この試験では、全歩行運動 (全身運動) およびホールポーク (hole poke) を 30 分間にわたって定量し、それらを自発運動活性および探索行動の指標とした。このプロトコルでは、4つのコーナーホールと4つのサイドホールを含み、サイドホールがコーナーホールの間に等間隔に存在する、コンピュータ化ホールボード装置 (41 x 41 x 38.5 cm 高) を使用した (学習ホールボード (Learning Holeboard); Motor Monitor, Kinder Scientific, LLC、カリフォルニア州パウェイ)。フォトビーム計測を使って、試験セッション中の全歩行運動および探索ホールポークを定量した。この手法は、本発明者らの一般ホールボード探索行動 / 嗅覚選好試験の慣れコンポーネントとして役立った。マウスを、バランス (レッジ、プラットフォーム)、協調 (ポール、60° および 90° 傾斜スクリーン)、強さ (逆スクリーン)、および小さい区切られた領域の外への移動の開始 (歩行開始) を評価するために使用される一連の7つの感覚運動尺度についても試験した。このバッテリーは以前の刊行物において使用されたものであり、手順の詳細は (Wozniak et al. (2004; Neurobiol Dis 17, 403-414) に見出すことができる。ロータロッド試験は以前に公表した方法と同様であり、次の3タイプの試行が含まれた: 1) 静止ロッド (最大60秒; 2) 定速ロータロッド (2.5 rpm で最大60秒; および 3) 加速ロータロッド (0 ~ 180秒間で 2.5 ~ 10.5 rpm)。本発明者らのプロトコルは、運動学習を制限するために3日離れた3回の試験セッションのそれぞれについて、1回の静止ロッド試行、2回の定速ロータロッド試行、および2回の加速ロータロッド試行で、各マウスを試験することからな

30

40

【0177】

条件恐怖。マウスを条件恐怖試験で評価した。これが最後に実行した行動測定である。簡単に述べると、それぞれのチャンバが全く異なる視覚キュー、臭気キュー、および触覚キューを持つ2つの Plexiglas 条件づけチャンバ (26 cm x 18 cm、および

50

18 cm高さ) (Med - Associates、バーモント州セントオルバンズ)で、マウスをトレーニングし、試験した。各マウスを5分間の試行のために条件づけチャンバに入れ、2分間のベースライン期間中のフリージング行動を定量した。3分時点から開始して、その後60秒間隔で、マウスを3回の音 - ショックペアリングにさらした。この際、各ペアリングには、広帯域ホワイトノイズからなる80 dBの音(条件刺激; CS)の20秒間の提示と、それに続いて音の最後1秒間に提示される1.0 mAの連続的フットショック(無条件刺激; CS)とが含まれた。加齢によって起こりうる聴覚障害の可能性を避けるために、周波数特異的な音ではなく広帯域ホワイトノイズを使用した。翌日、マウスを条件づけチャンバに戻し、文脈的恐怖条件づけを評価するために8分間にわたって、フリージング行動を定量した。24時間後に、異なるキューを含む他方のチャンバにマウスを入れ、フリージング行動を2分間の「変更文脈」ベースライン中に定量し、その後、8分間は、聴覚キュー(音; CS)を提示しながら、定量した。フリージングは、各0.75秒の区間における行動をフリージングまたは非フリージングと類別する「フリージングしきい値」を調整しつつ行動の同時視覚化を可能にするFreezeFrame画像解析ソフトウェア(Actimetrics、イリノイ州エバンストン)を使って定量した。フリージングを通常の呼吸に伴うもの以外は運動がないことと定義し、フリージング時間のパーセントとしてデータを表した。文脈的恐怖条件づけの程度を評価するために、本発明者らは、1日目の2分間ベースラインにわたって平均したフリージング時間パーセントを、2日目の文脈的恐怖試験の最初の2分間での平均フリージング時間パーセントならびに8分間のセッション全体にわたって平均したフリージングレベルと比較する解析を、各処置群内で行なった。条件恐怖試験の完了後に、Khuchua et al. (2003; Neuroscience 119, 101-111)に既述の手法に従って、ショック感度を評価した。

10

20

30

40

50

【0178】

行動データの統計解析。行動データの解析には、通例、分散分析(ANOVA)モデルを使用した(Systat 12、Systat Software、イリノイ州シカゴ)。条件恐怖データは、1つの被験者間変数(処置)と1つの被験者内(反復測定)変数(分数)とを含む反復測定(rm)ANOVAモデルを使って解析した。rmANOVAモデルの基礎をなす球面性/複合対称性仮定の破綻を防ぐために、水準数が2を超える被験者内効果の全てに、アルファレベルのHuynh - Feldt調整を利用した。一定の重要な仮説を検定するために、PBS + HJ 3.4対照群と3つの他の抗体処置群(すなわちHJ 8.5、HJ 9.3、HJ 9.4)のそれぞれとの間の計画的比較を、ANOVAモデル内で行なった。別の例では、関連する有意な全体的ANOVA効果後にペアワイズ比較を行ない、これを適宜ボンフェローニ補正に付した。ホールボード試験中に記録された全歩行運動と2日目の文脈的恐怖試験中のフリージング時間パーセントとの間のピアソンの相関関係(r)も計算した。

【0179】

実施例16. タウELISAアッセイ

患者の血漿試料中の病理学的タウ凝集体を検出するためにELISAアッセイを開発した。このアッセイで使用される抗体には、マウスモノクローナル抗タウHJ 9.3およびHJ 9.2が含まれる。ワンステップ抗体ビオチン標識キット(One-step Antibody Biotinylation Kit)を使ってHJ 9.3をビオチン化する(HJ 9.3 - Bio)。このサンドイッチELISAではHJ 9.3とHJ 9.2を捕捉抗体として等濃度で利用する。96穴ハーフエリアプレート(Costar 3690)を、炭酸水素塩緩衝液(pH 9.6)中に調製した20 µg/mlのHJ 9.2/HJ 9.3(50 µl/ウェル)でコーティングし、4で終夜インキュベートする。4% BSA/PBSを使ったブロッキングステップ後に、血漿試料(試料緩衝液(0.25% BSA/PBS、300 nM トリス(PH 7.4 ~ 8.0)、1x プロテアーゼ阻害剤)中に1:4希釈)を3つ一組にしてウェルに適用する(50 µl/ウェル)。次に、プレートを4で終夜インキュベートする。検出のために、0.5% BSA/PBS中に0

・ $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ で調製した HJ9.3-Bio を、ウェルに、 37°C で 1.5 時間加えた。TMB super slow 基質を使った酵素反応による最終的検出には、 0.5% BSA/PBS 中に $1:4,000$ 希釈の二次ストレプトアビジン-ポリHRP40 抗体 ($50 \mu\text{l}$ /ウェルおよび室温で振とう機上、暗所で 1.5 時間) を使用する。本 ELISA は血漿中の希少種の検出を最適化するために設計された。初期の実施形態には、凝集体のトラッピングを最適化するために、ELISA プレートの表面を抗体ペアでコーティングすることが含まれた。ただし、アッセイの感度を増加させるために、より大量の液体試料から、抗体被覆ビーズを使用することも、同様に妥当であるだろう。健常若年参加者から収集した陰性血漿を使って、アッセイのバックグラウンドシグナルを計算した。実験試料におけるタウシードの存在は、陰性血漿からのシグナルに対する誘導倍率として報告される。

10

【0180】

開示したシーディングアッセイで予め試験された発症前患者およびアルツハイマー病 (AD) 患者からの一組の血漿試料を使って、サンドイッチタウ ELISA アッセイを検証した。シーディング活性を伴わない 12 人の対照患者 (CDR = 0) (陰性) と、シーディング活性を伴う 12 人の患者 (CDR > 0) (陽性) を、新しく開発した ELISA アッセイを使って試験した。これらの患者は、CSF および血漿におけるシーディング活性の有無が、バイオセンサー細胞アッセイに基いて、予め決定された。この細胞アッセイでは、K280 変異を含有するタウタンパク質の RD フラグメントが、シアン蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質に融合される。これは、FRET で蛍光共鳴エネルギー移動を測定することによる凝集の検出を可能にする。細胞外凝集体は細胞に入ると、タウ FRET レポータータンパク質の細胞内凝集を誘発する。

20

【0181】

図 45 に示すように、シーディング活性が陽性である AD 患者の血漿にはタウシードが明確に存在するのに対して、シーディング活性が陰性である患者の血漿にはタウ凝集体が検出されなかった。この無細胞ベースのアッセイは、アルツハイマー病を含む多くのタウオパチーのための非侵襲的診断ツールとして、臨床の場により近い環境で使用することができるだろう。さらに、これは、認知症を発症する運命にある初期病態を持つ人々の検出を可能にして、標本集団の質を高めることにより、臨床治験計画を容易にするであろう。最終的には、抗タウ治療法または他の抗認知症治療法の効力をモニターするために、これを使用することができるであろう。

30

【0182】

実施例 17

一つの集団からもう一つの集団へのタウ凝集体の伝播を測定するために細胞伝播アッセイを設定した。リピートドメイン (RD) から構成されるタウのフラグメントを、CFP タグ付き型の凝集を促進するための 2 つの疾患関連変異 (LM: P301L/V337M) を持つタグ無し型として、または 1 つの疾患関連変異 (K: K280) として使用した。一つの細胞群に、RD (LM) と RD (K280) - CFP をトランスフェクトし、もう一つには RD (K280) - YFP をトランスフェクトした。96 穴フォーマットで 4 つ一組にして成長させた細胞からの FRET を蛍光プレートリーダーで記録した。FRET シグナルは、RD - CFP 凝集体が RD - YFP を含有する細胞に移動するか、その逆の結果として生じる。複数の抗体を、表示したさまざまな希釈度で培地に加えた。抗体の出発濃度は約 $1 \text{ mg}/\text{ml}$ とした。例えば 10^{-3} 希釈とは約 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度を示す。24 時間後に細胞を固定し、FRET 測定値を記録した。個々の抗体に関するデータを図 47 に提示する。いくつかの抗体は凝集の経細胞伝播を極めて強力に防止した (例えば HJ8.2、HJ9.1)。別の抗体は、それよりは中間的に有効であり (例えば HJ9.3)、いくつかは本質的に有効でなかった (HJ8.7)。各グラフにおいて、最初のバーは、伝播のベースライン効率に相当する抗体が添加されていない培地を表す。

40

【0183】

50

抗体の相乗作用を試験するために、個々の抗体を表示の濃度範囲で希釈した状況で伝播の効果を決定するか、または抗体を等モル比で混合した後、同じ範囲にわたって滴定した。いくつかのペアは著しく相乗的であったが（例えばH J 9 . 3 / 9 . 4）、互いに妨害しあうものもあった（H J 8 . 5 / 9 . 1）（図 4 8）。

【 0 1 8 4 】

タウ凝集体取り込みに対する抗体の効果はフローサイトメリーで測定することもできる。蛍光色素で化学的に標識した組換え R D 原線維に細胞をばく露した。トリブシン処理と分散後に、フローサイトメーターを使って細胞をカウントした。H J 9 . 3 は蛍光標識細胞の数を用量依存的に低減することから、凝集体取り込みの障害が示された（図 5 0）

【 図 1 】

A

Htau N末端

MetAEPRQEFEEVMetEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMetHQDQEG
DTDAGLKESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEG
APGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAAGIGDTPSLEDEAAAGHVVTQAR
MetVSKSKDG

B

Htau C末端

MetPDLKNVKSIGSTENLKHQPPGGGKVIINKKLDLSNVQSKC
GSKDNIKHVPPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPPGGGQ
VEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPPGGGKKIETHKLTFRENA
KAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTS PRHLSNVSS TGSIDMetVDS PQLA
TLADEVSA SLGQAGL

FIG. 1

【 図 2 A 】

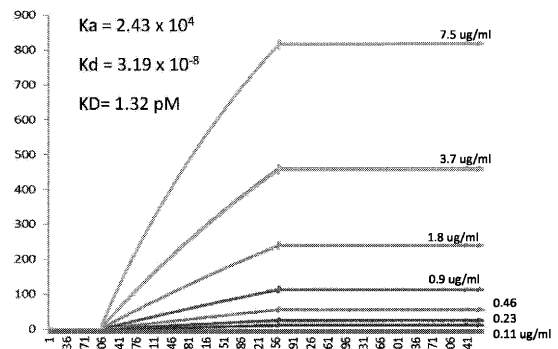


FIG. 2A

【 図 2 B 】

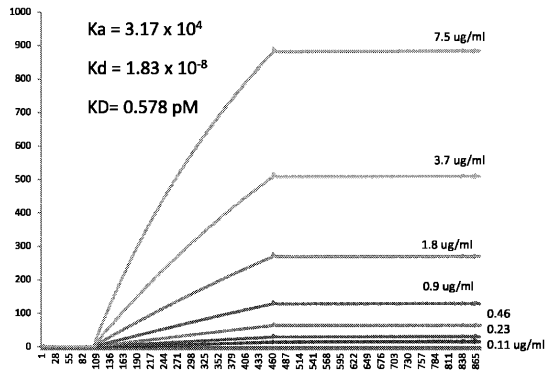


FIG. 2B

【 図 3 A 】

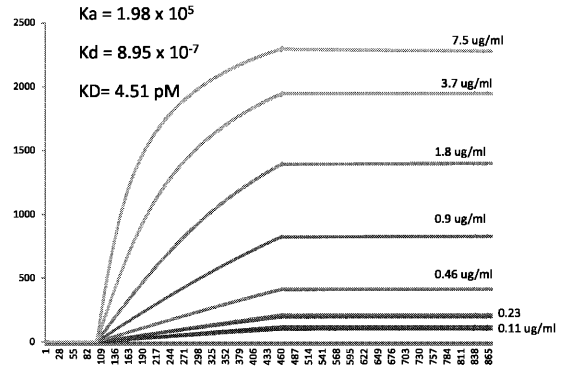


FIG. 3A

【 図 3 B 】

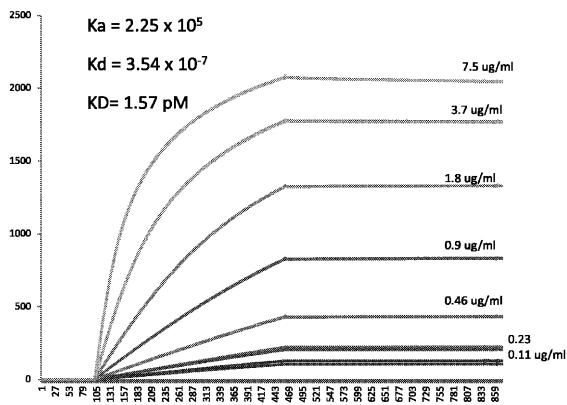


FIG. 3B

【 図 4 A 】

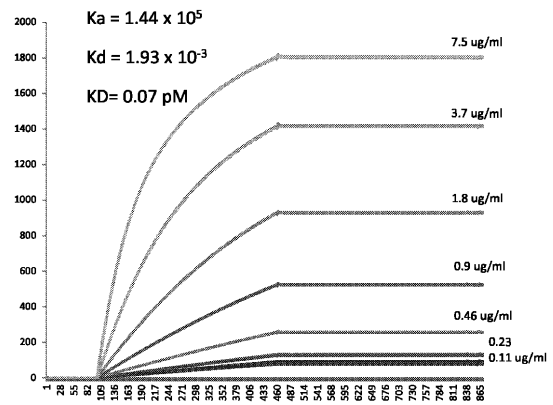


FIG. 4A

【 図 4 B 】

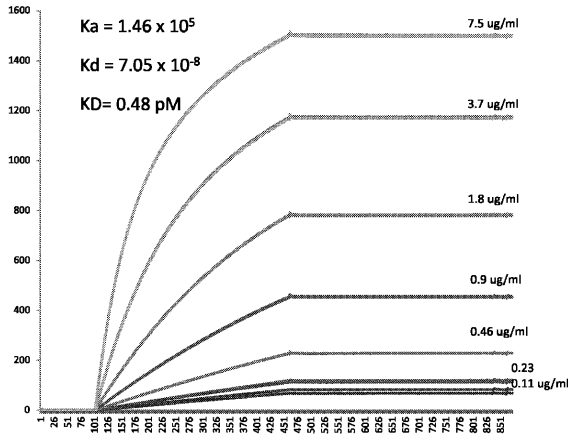


FIG. 4B

【 図 5 A 】

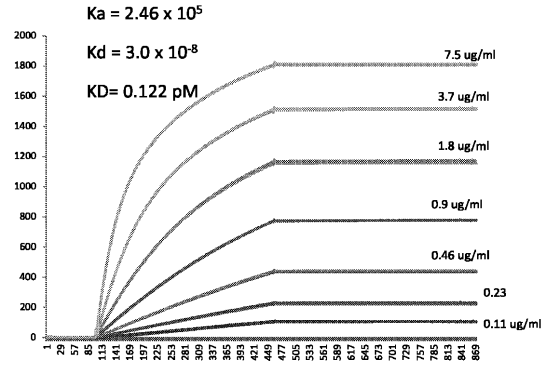


FIG. 5A

【 図 5 B 】

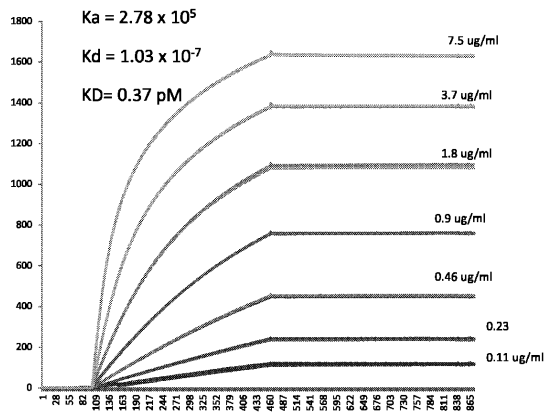


FIG. 5B

【 図 6 A 】

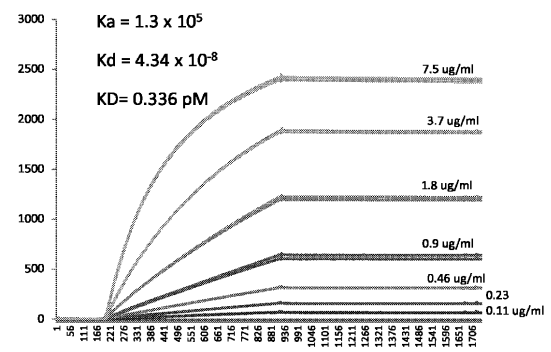


FIG. 6A

【 図 6 B 】

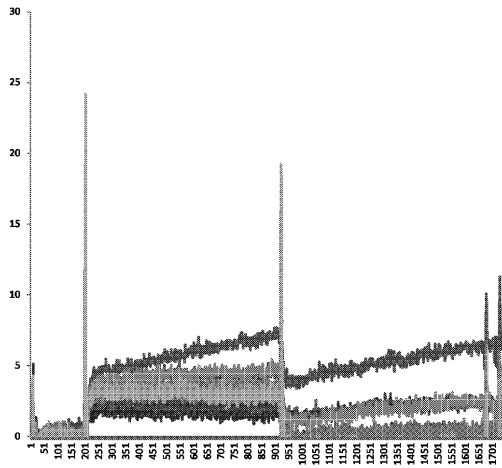


FIG. 6B

【 図 7 A 】

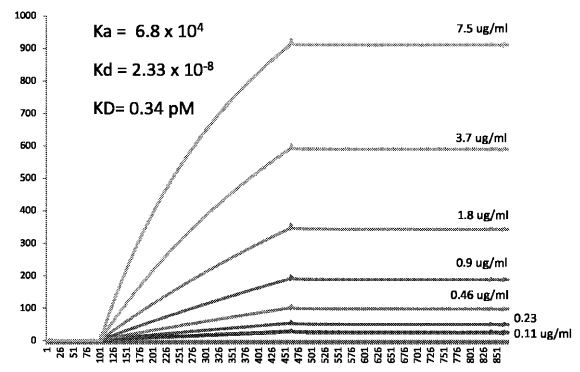


FIG. 7A

【 図 7 B 】

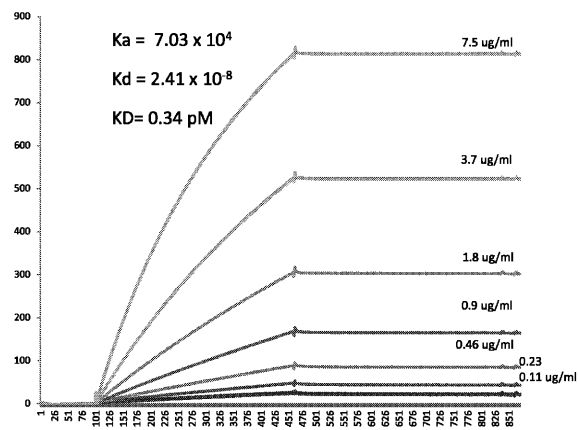


FIG. 7B

【 図 8 A 】

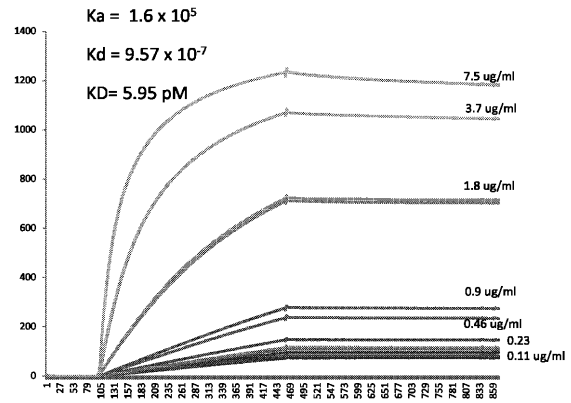


FIG. 8A

【 図 8 B 】

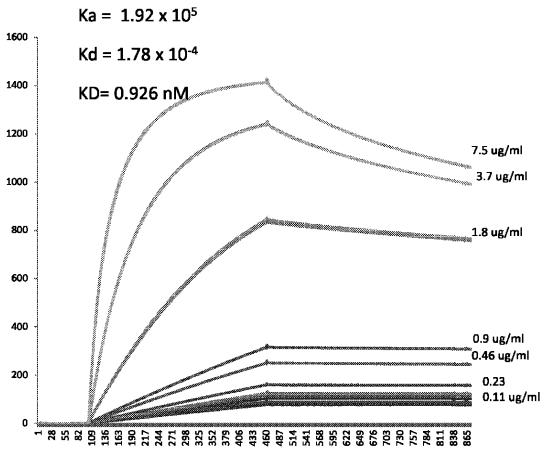


FIG. 8B

【 図 9 A 】

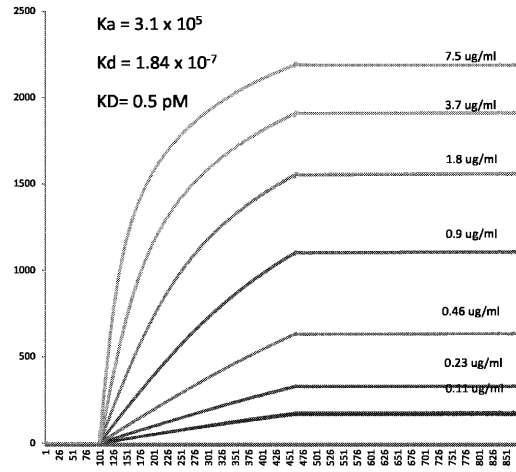


FIG. 9A

【 図 9 B 】

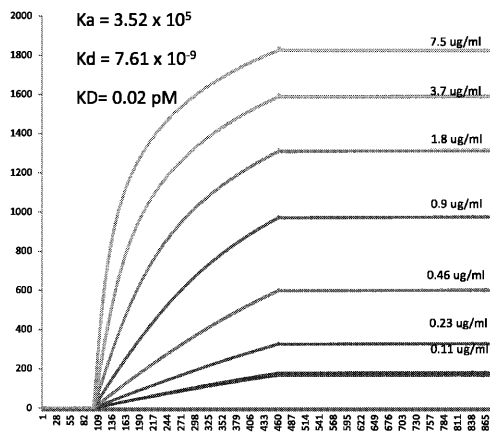


FIG. 9B

【 図 10 A 】

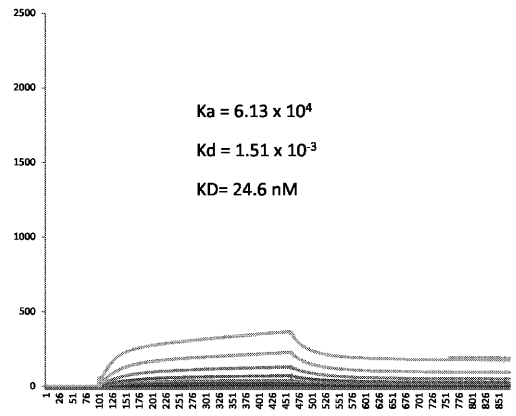


FIG. 10A

【 1 0 B 】

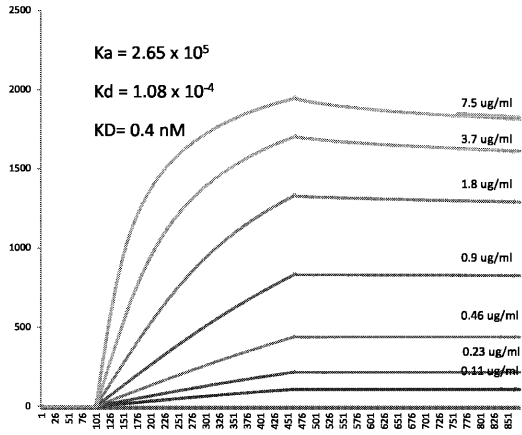


FIG. 10B

【 1 1 A 】

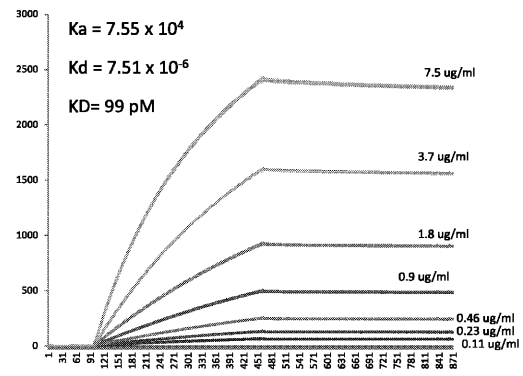


FIG. 11A

【 1 1 B 】

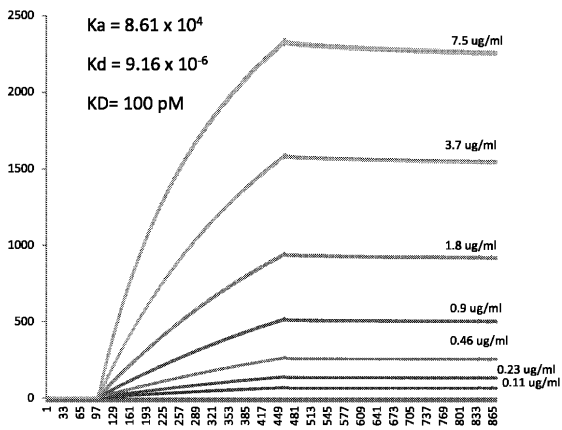


FIG. 11B

【 1 2 A 】

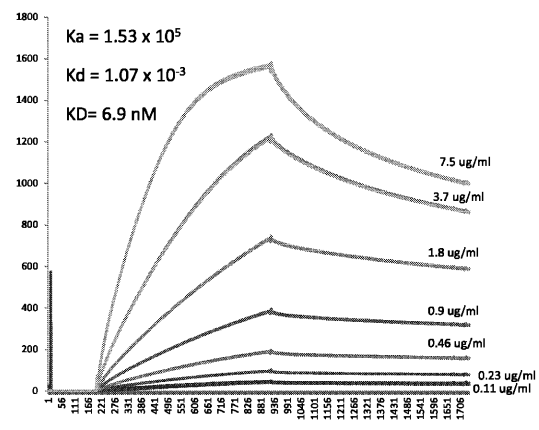


FIG. 12A

【 図 1 2 B 】

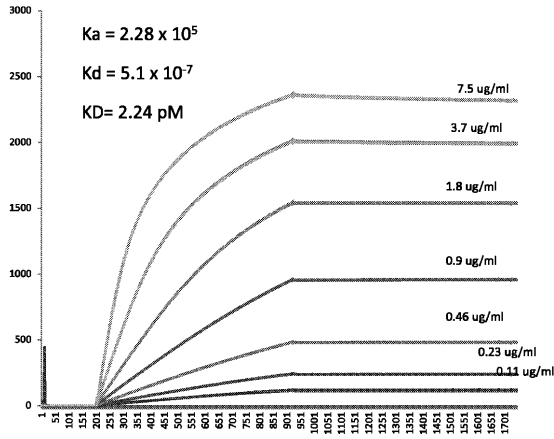


FIG. 12B

【 図 1 3 A 】

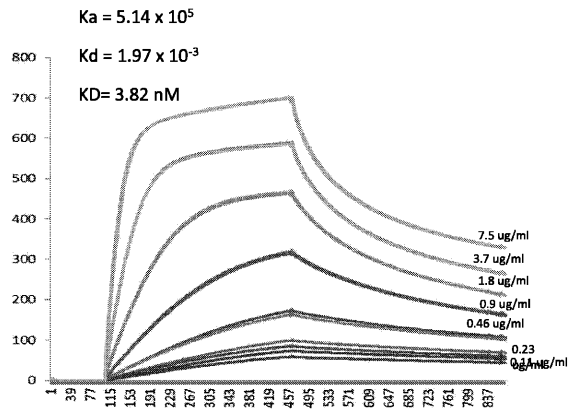


FIG. 13A

【 図 1 3 B 】

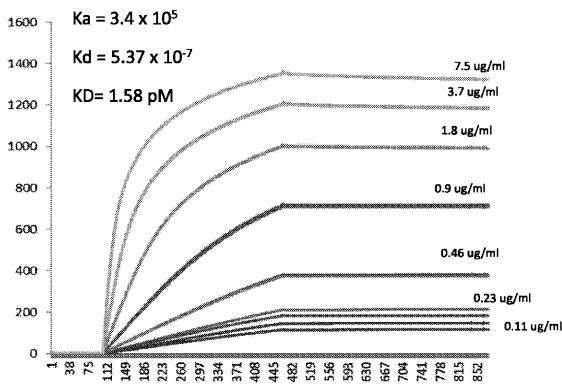


FIG. 13B

【 図 1 4 】

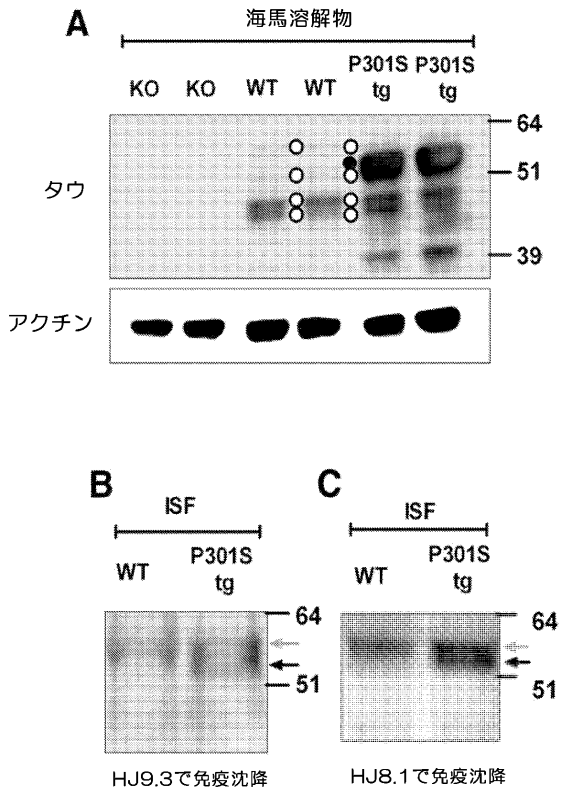


FIG. 14

【 15 A 】

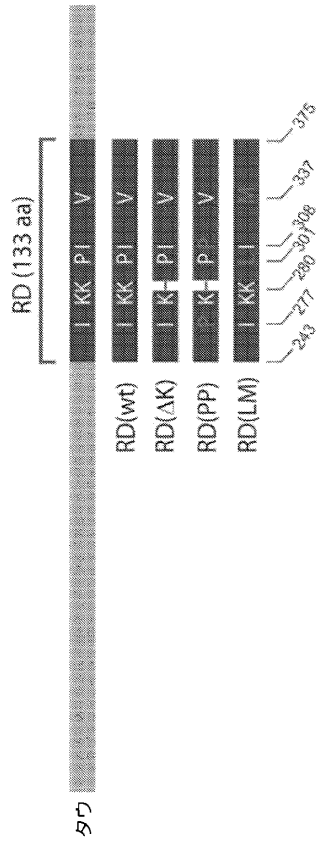


FIG. 15A

【 15 B 】

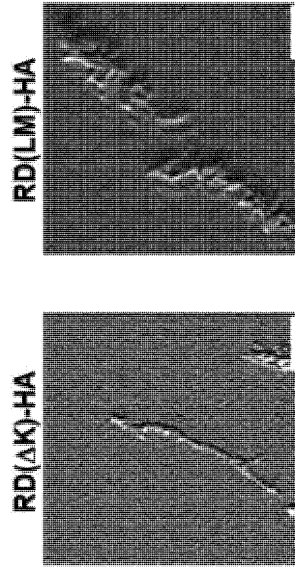


FIG. 15B

【 15 C 】

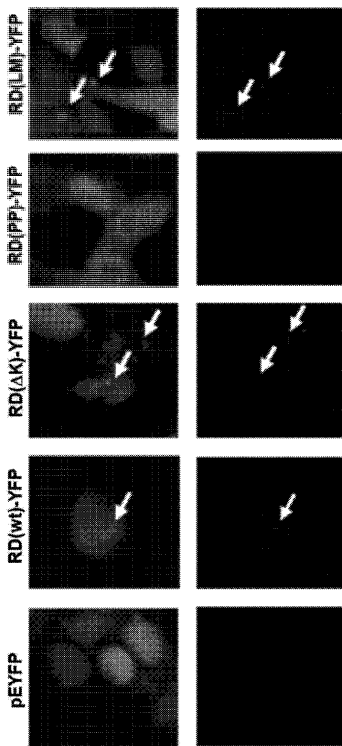


FIG. 15C

【 15 D 】

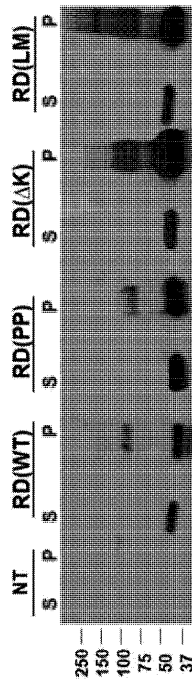


FIG. 15D

【 図 16 A 】

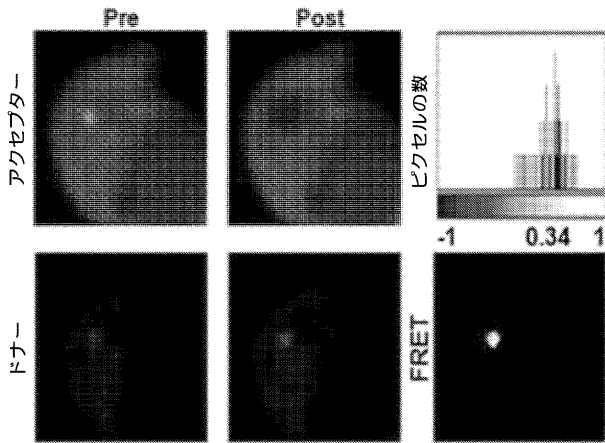
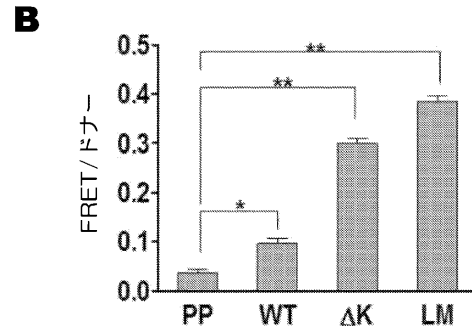


FIG. 16A

【 図 16 B 】



【 図 16 C 】

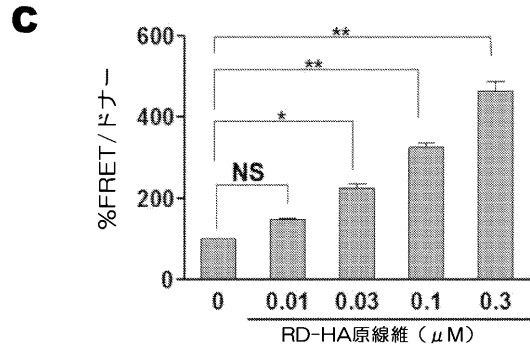


FIG. 16

【 図 17 A 】

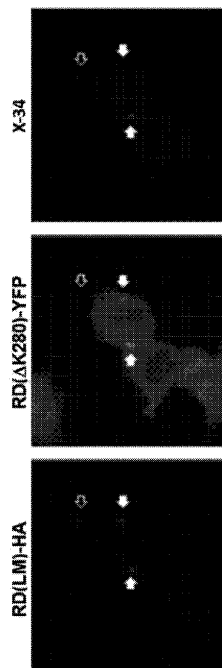
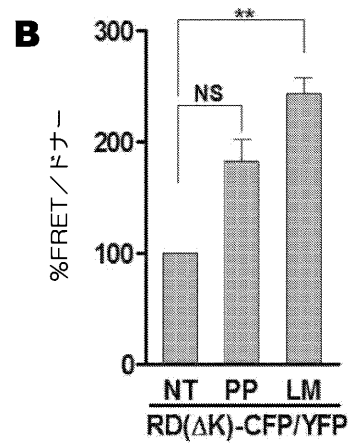


FIG. 17A

【 図 17 B 】



【 図 17 C 】

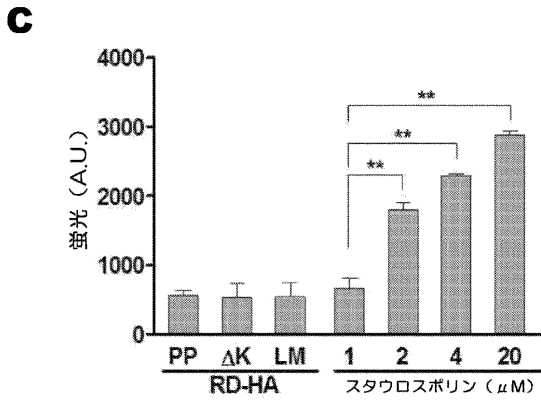


FIG. 17

【 図 18 A 】

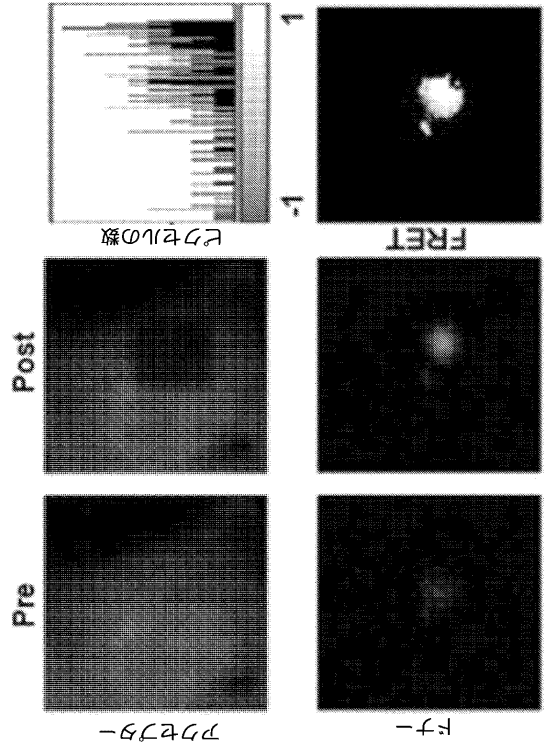


FIG. 18A

【 図 18 B 】

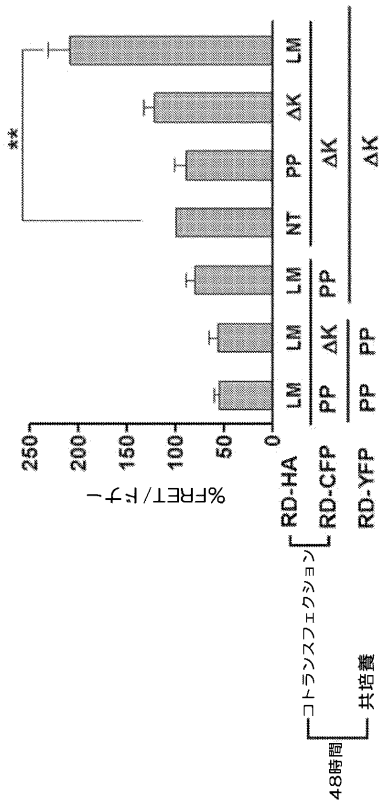


FIG. 18B

【 図 18 C 】

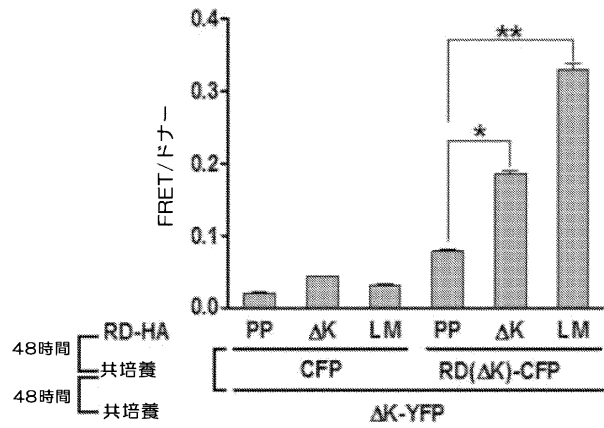
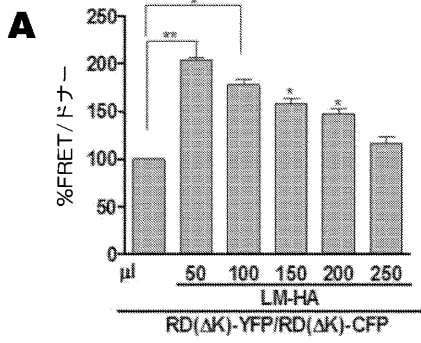
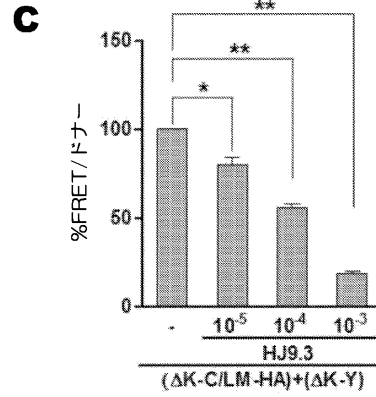


FIG. 18C

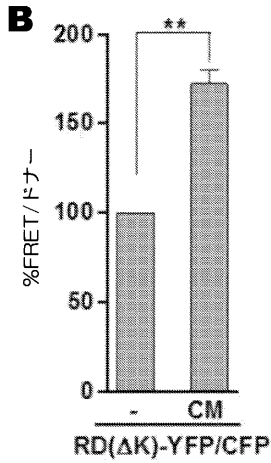
【 図 1 9 A 】



【 図 1 9 C 】



【 図 1 9 B 】



【 図 1 9 D 】

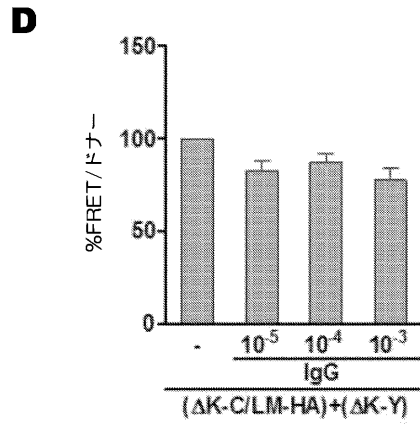
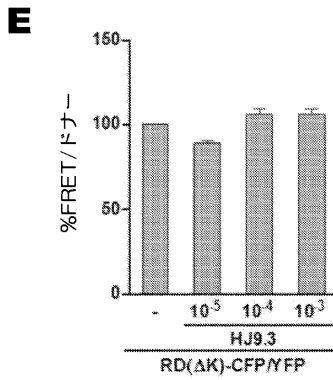


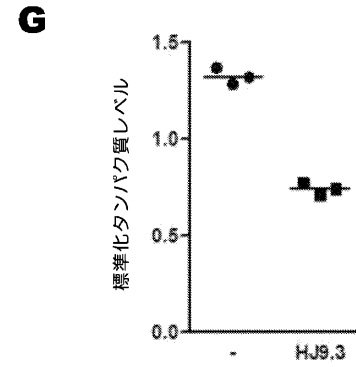
FIG. 19

FIG. 19

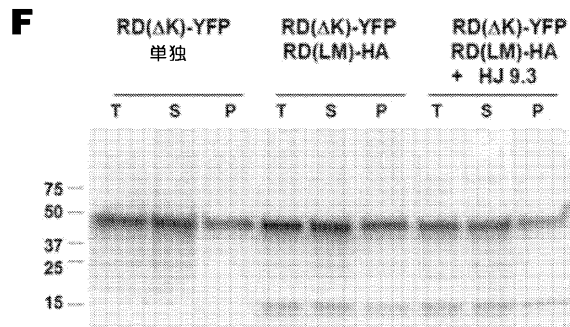
【 図 1 9 E 】



【 図 1 9 G 】



【 図 1 9 F 】



【 図 1 9 H 】

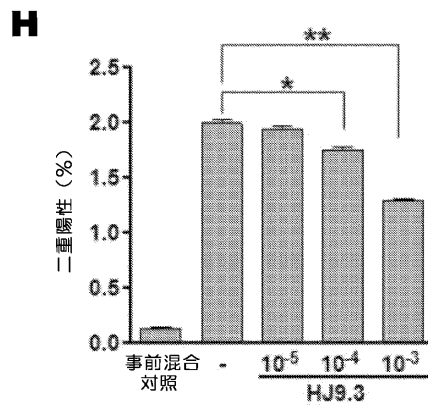


FIG. 19

FIG. 19

【 図 2 0 】

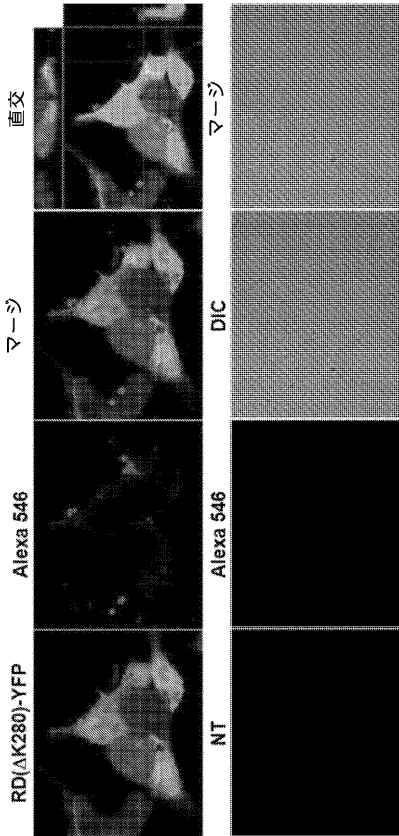


FIG. 20

【 図 2 1 A 】

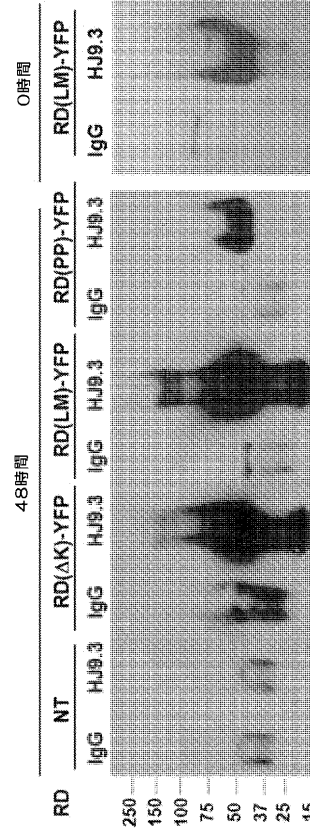
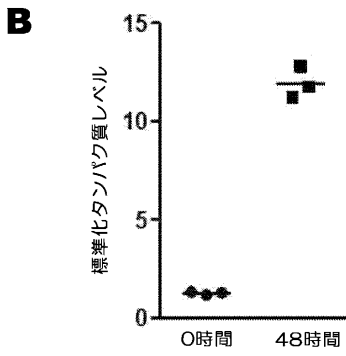


FIG. 21A

【 図 2 1 B 】



【 図 2 1 D 】

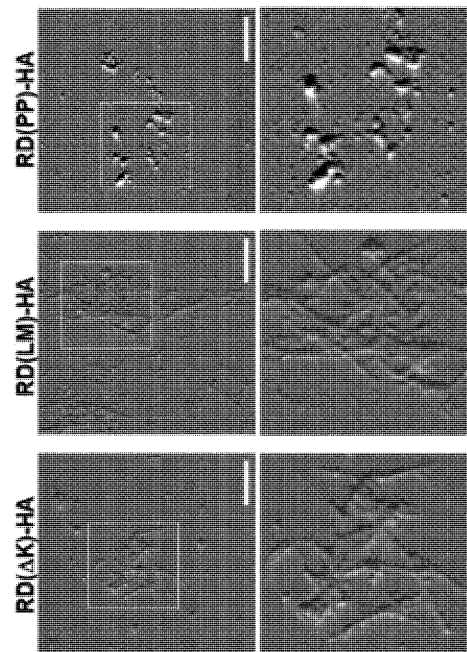


FIG. 21D

【 図 2 1 C 】

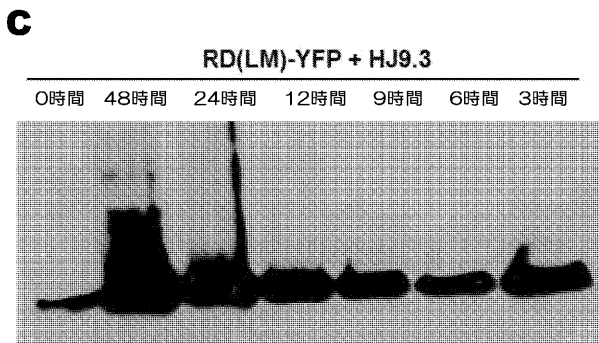
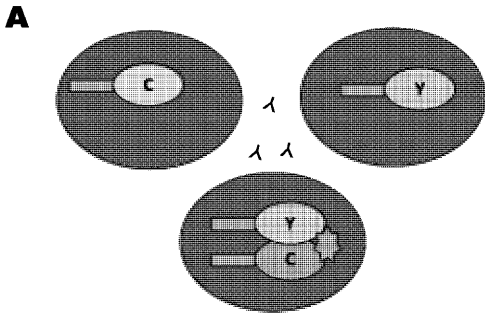


FIG. 21

【図 2 2 A】



【図 2 2 B】

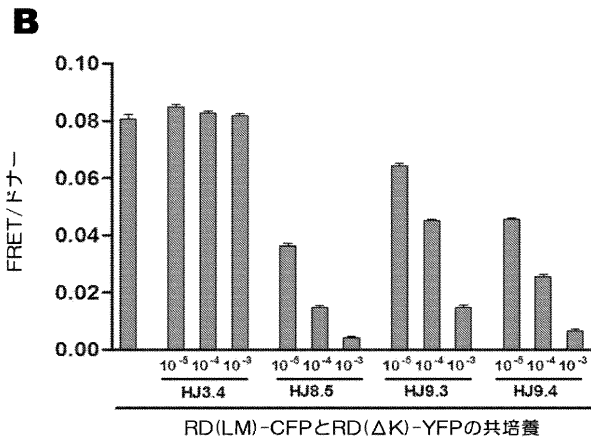


FIG. 22

【図 2 3 A】

抗体の濃度—2.0mg/ml
 [ICV注射]
 1日目 異なるモノクローナル抗体および媒体
 42日目 6週間後—Alzet浸透圧ポンプを置き換え
 ↓
 84日目 実験の全期間—12週間

FIG. 23A

【図 2 2 C】

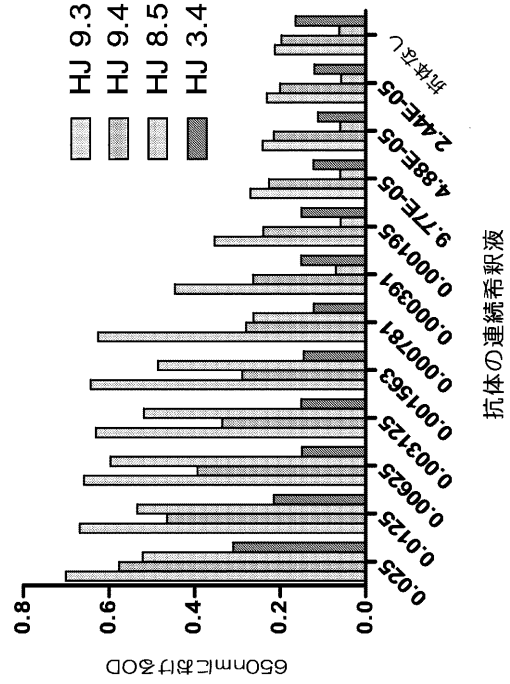


FIG. 22C

【図 2 3 B】

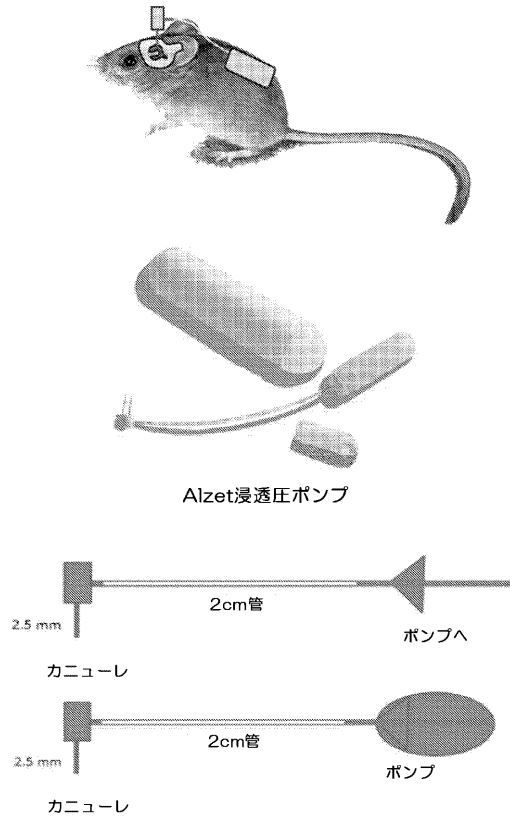


FIG. 23B

【 図 2 3 C 】



FIG. 23C

【 図 2 4 】

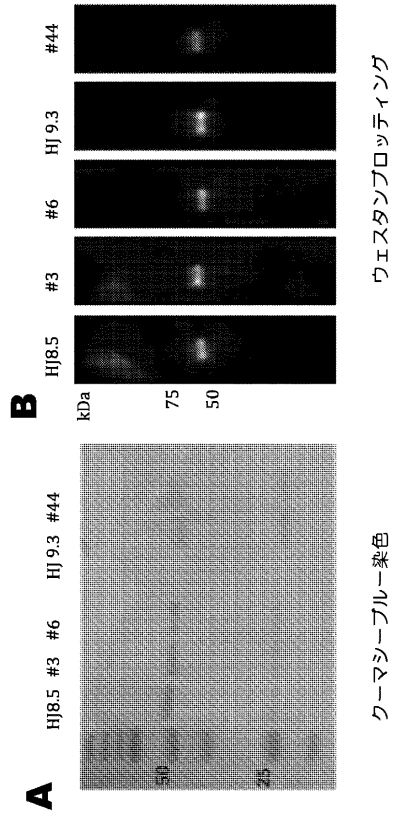


FIG. 24

【 図 2 5 】

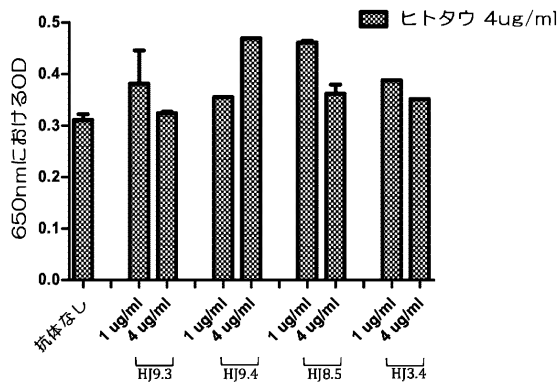


FIG. 25

【 図 2 6 】

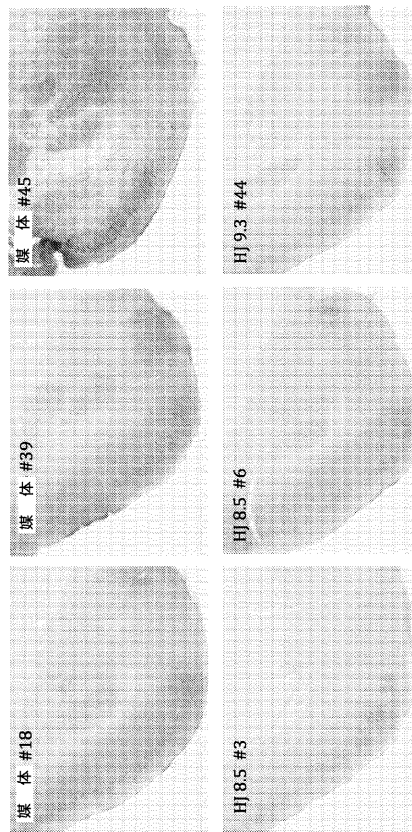
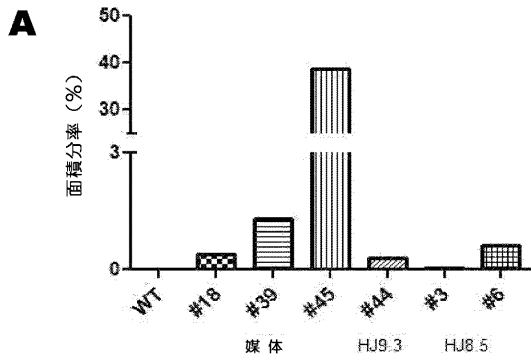
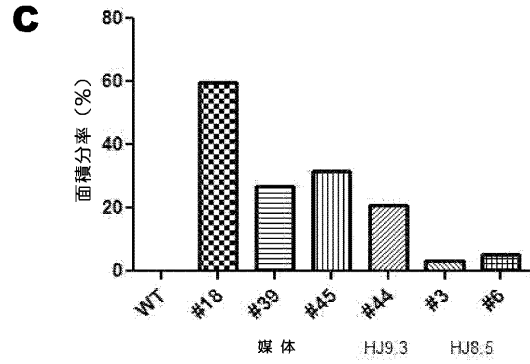


FIG. 26

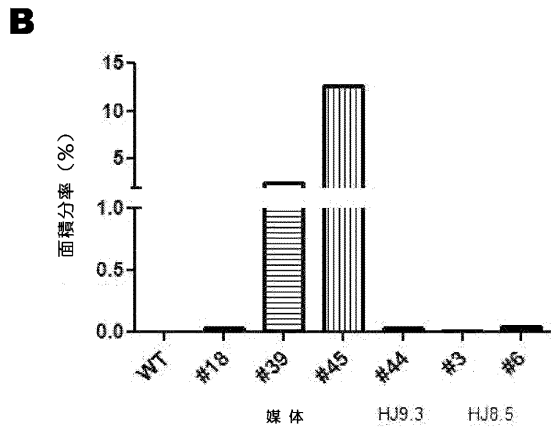
【 図 2 7 A 】



【 図 2 7 C 】



【 図 2 7 B 】



【 図 2 7 D 】

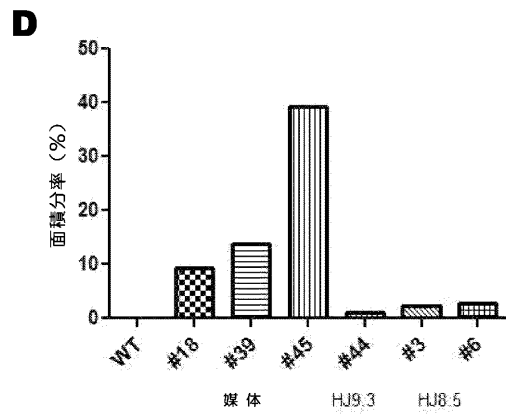


FIG. 27

FIG. 27

【 図 2 8 】

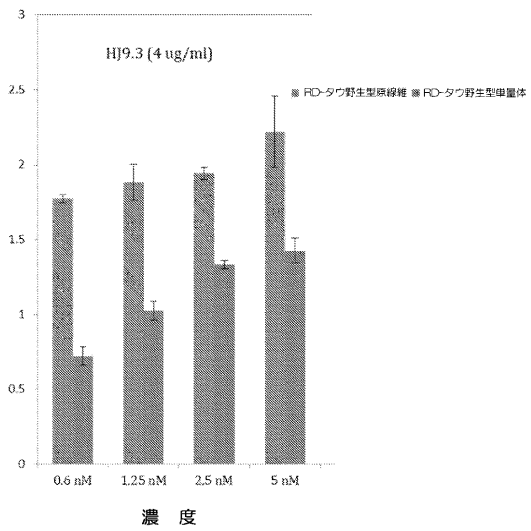


FIG. 28

【 図 2 9 】

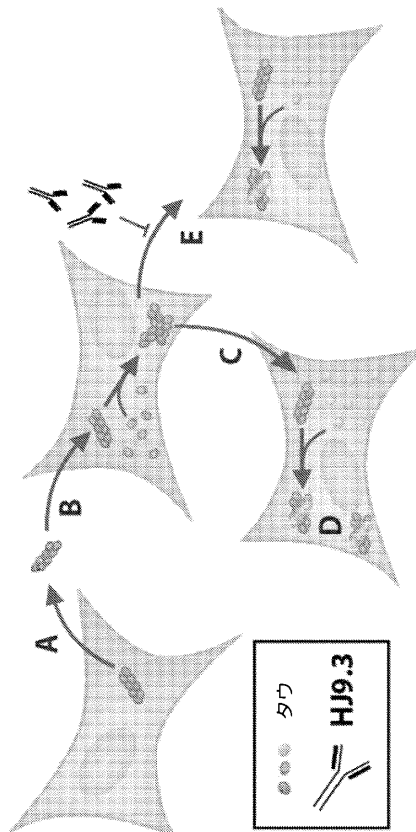
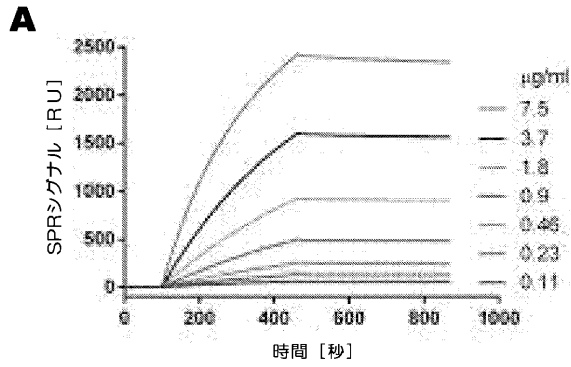


FIG. 29

【 図 3 0 A 】



【 図 3 0 B 】

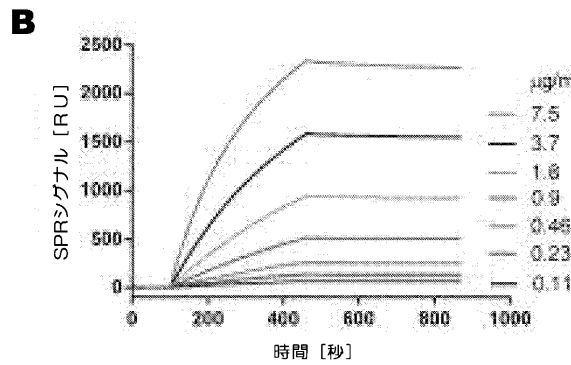
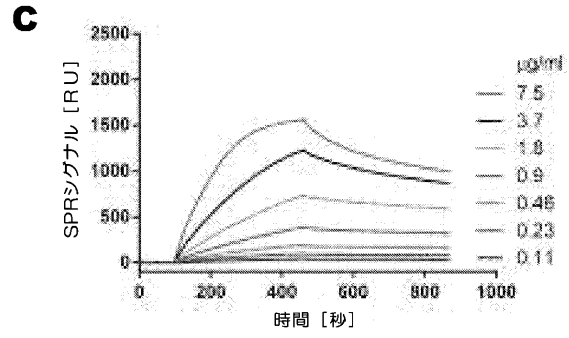


FIG. 30

【 図 3 0 C 】



【 図 3 0 D 】

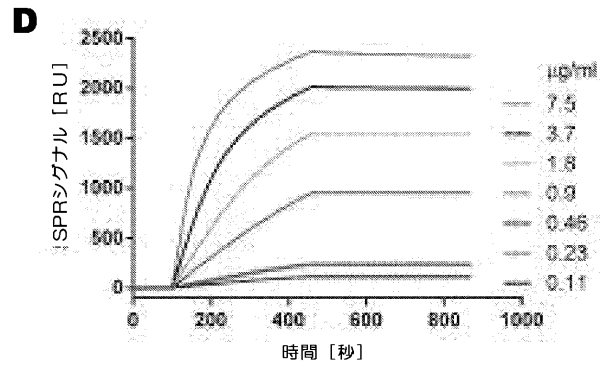
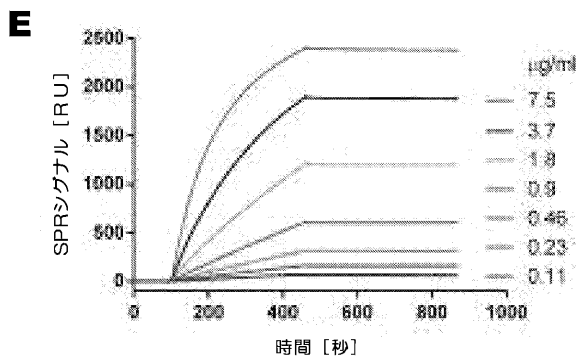


FIG. 30

【 図 3 0 E 】



【 図 3 0 G 】



FIG. 30G

【 図 3 0 F 】

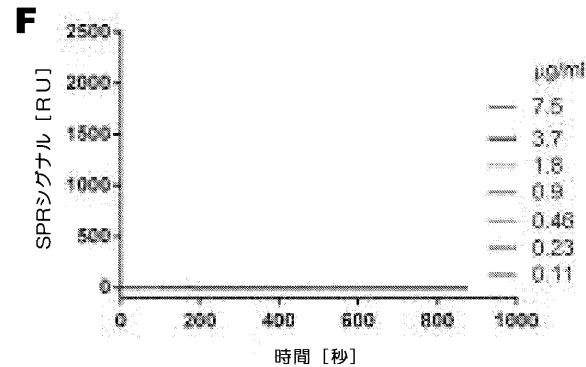
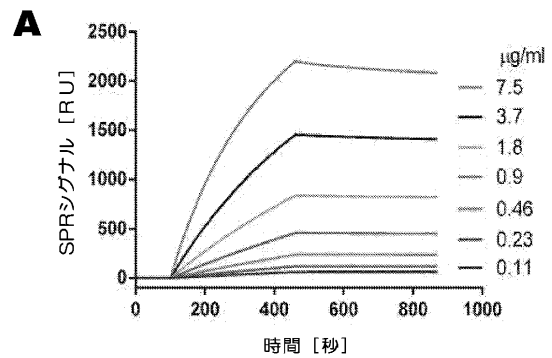


FIG. 30

【 図 3 1 A 】



【 図 3 1 B 】

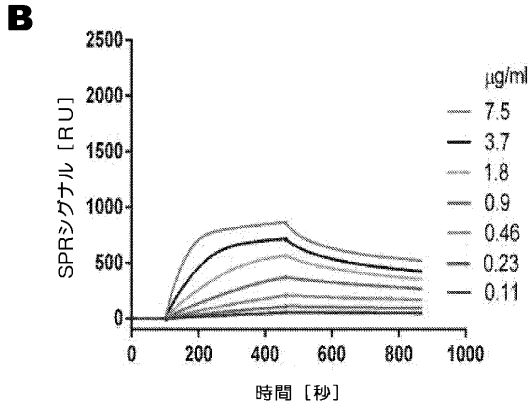


FIG. 31

【 図 3 1 C 】

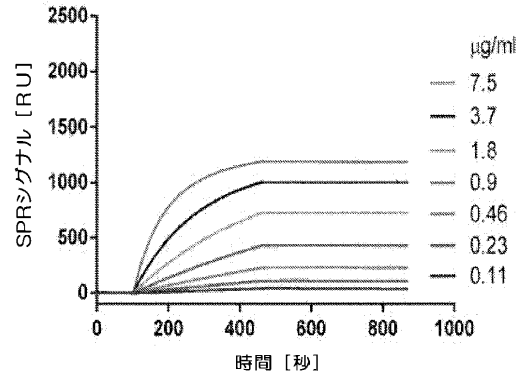


FIG. 31C

【 図 3 2 】

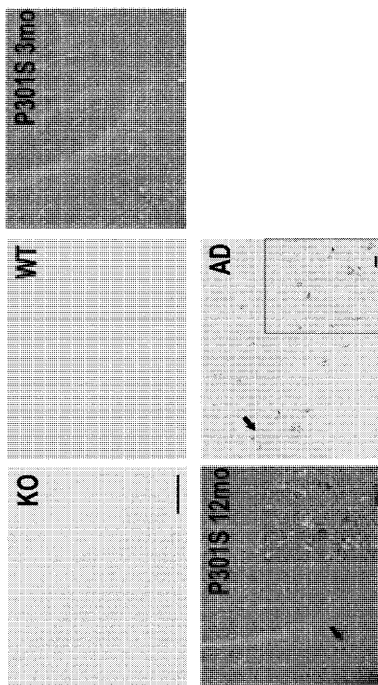
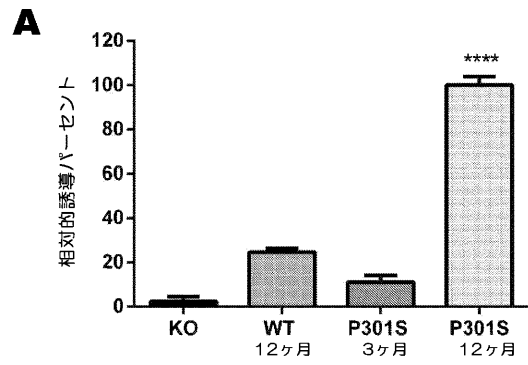


FIG. 32

【 図 3 3 A 】



【 図 3 3 B 】

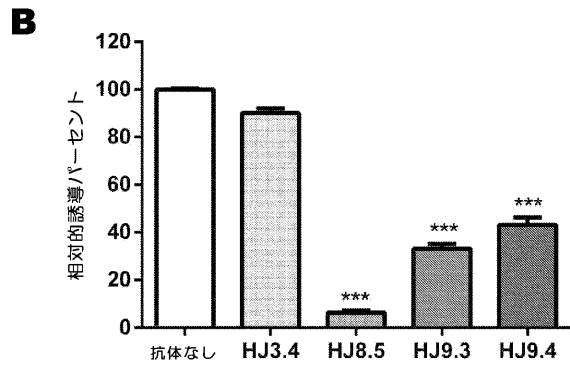


FIG. 33

【 図 3 3 C 】

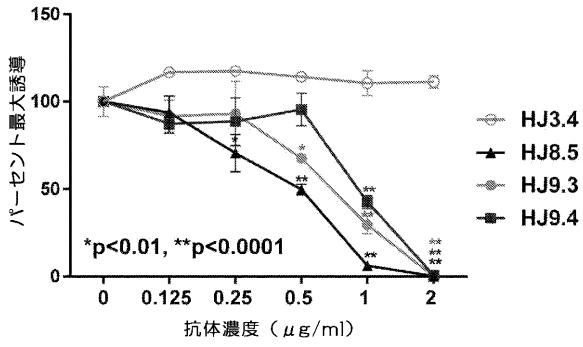


FIG. 33C

【 図 3 4 】

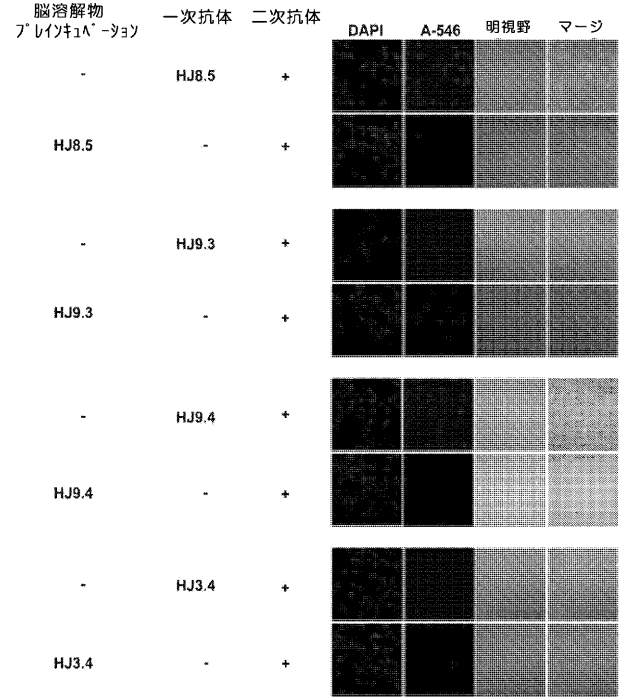
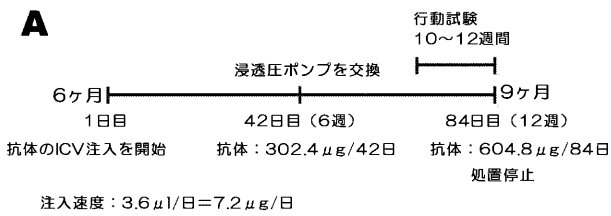
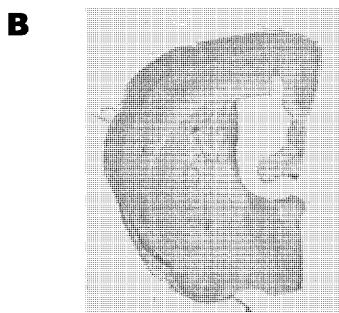


FIG. 34

【 図 3 5 A 】



【 図 3 5 B 】



【 図 3 6 】

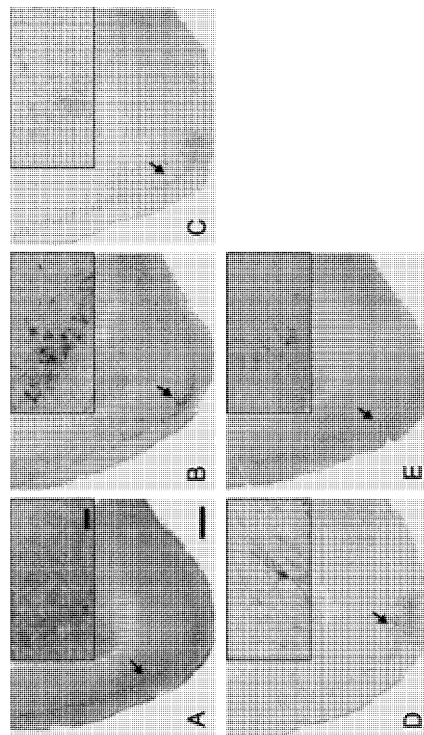
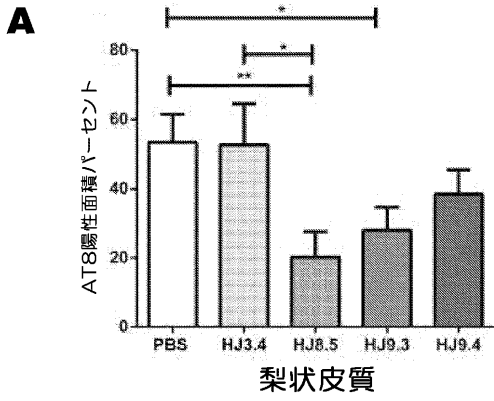


FIG. 36

【図37A】



【図37B】

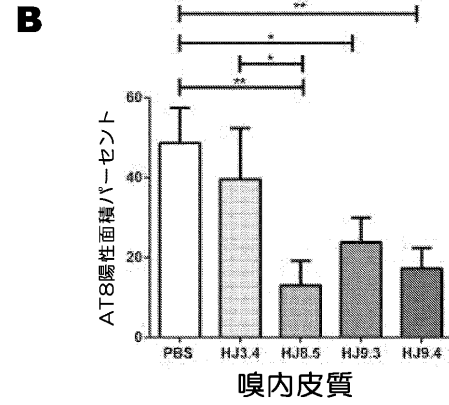
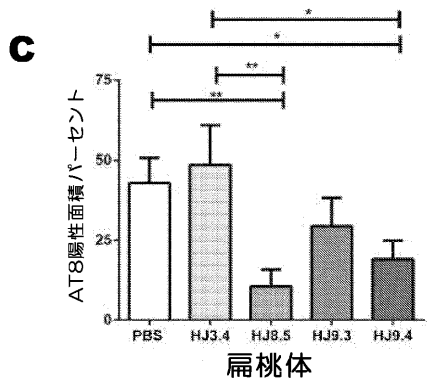
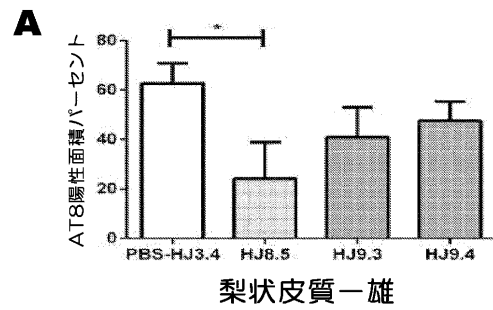


FIG. 37

【図37C】



【図38A】



【図38B】

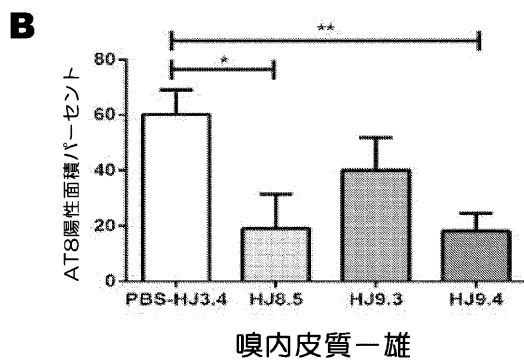


FIG. 38

【図37D】

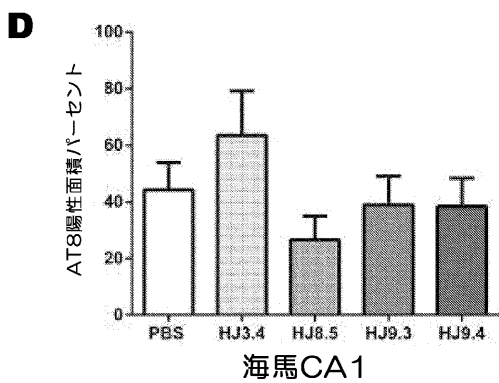
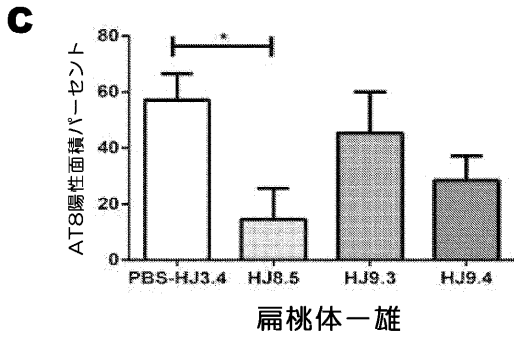


FIG. 37

【図 3 8 C】



【図 3 8 D】

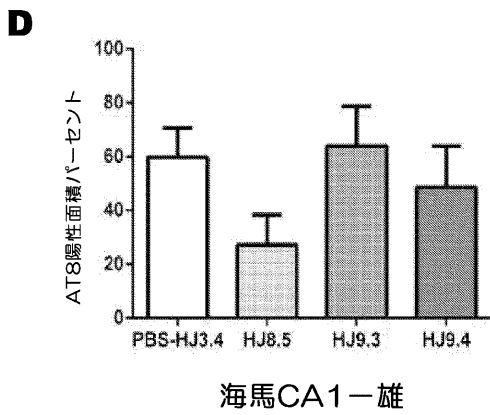
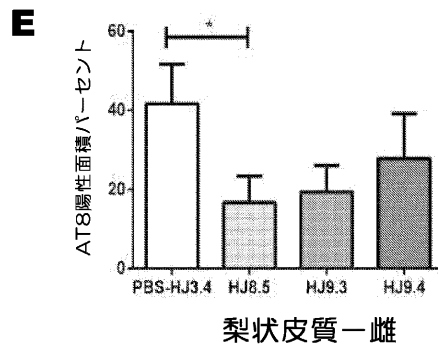


FIG. 38

【図 3 8 E】



【図 3 8 F】

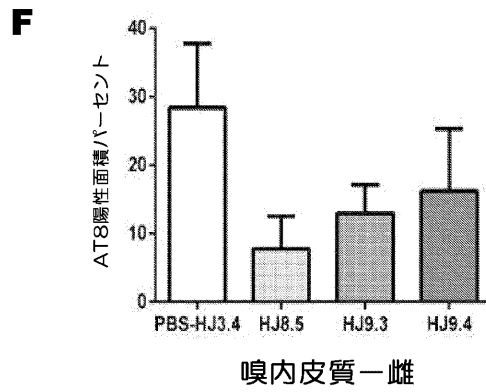
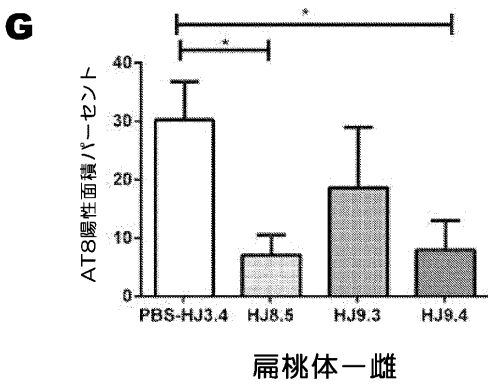


FIG. 38

【図 3 8 G】



【図 3 8 H】

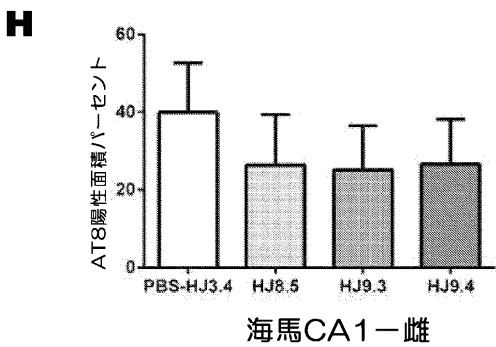


FIG. 38

【図 3 9 A】

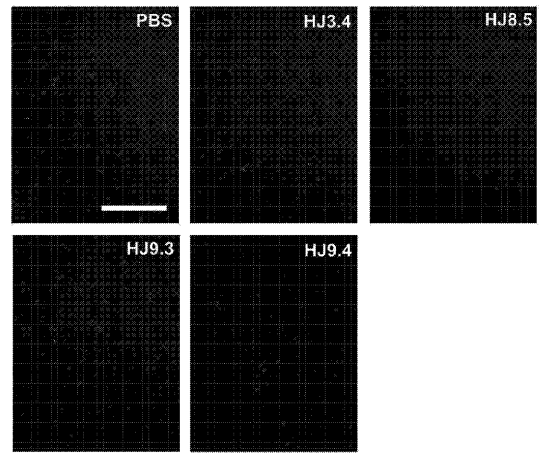


FIG. 39A

【 図 3 9 B 】

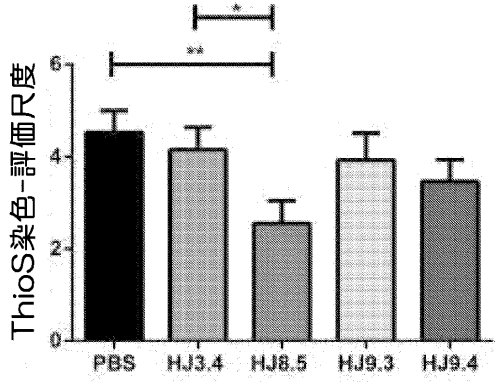
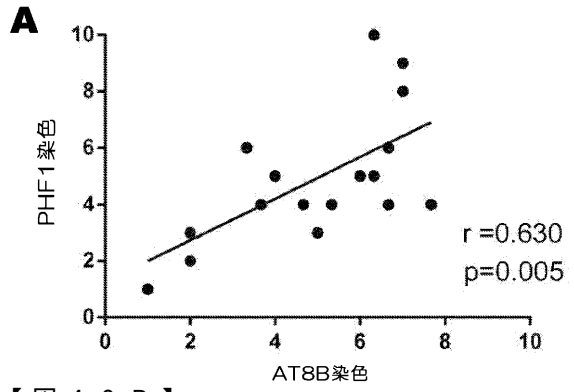


FIG. 39B

【 図 4 0 A 】



【 図 4 0 B 】

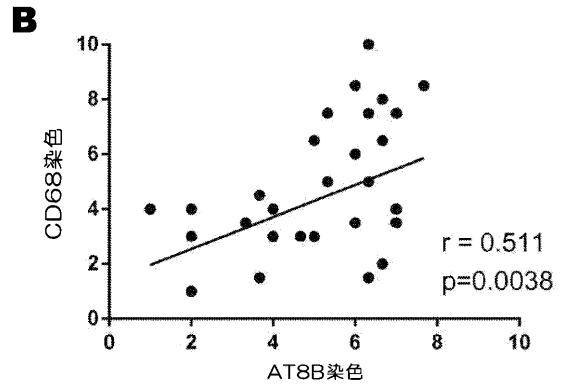


FIG. 40

【 図 4 0 C 】

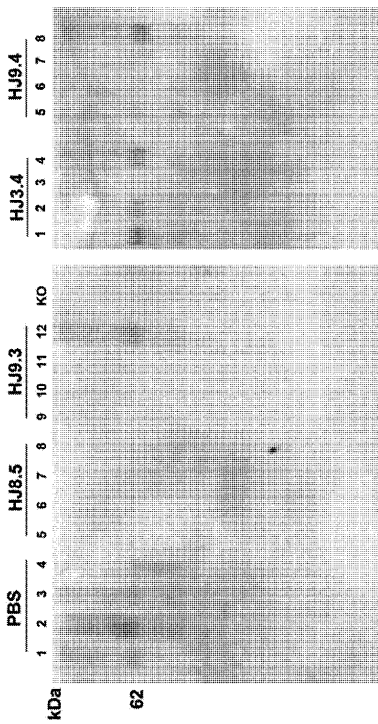


FIG. 40C

【 図 4 1 】

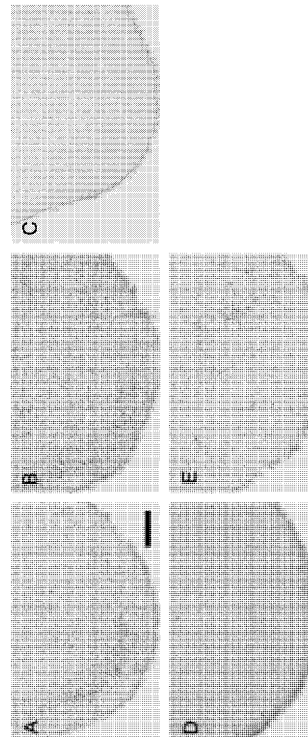
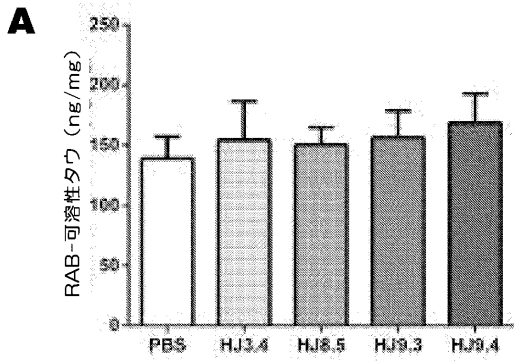


FIG. 41

【 図 4 2 A 】



【 図 4 2 B 】

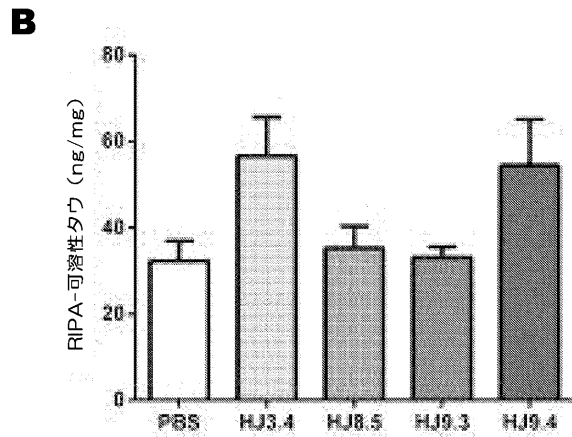
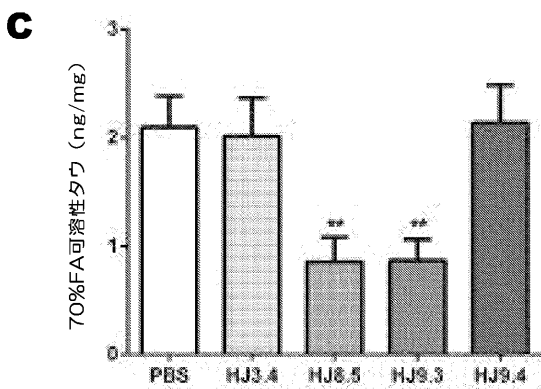
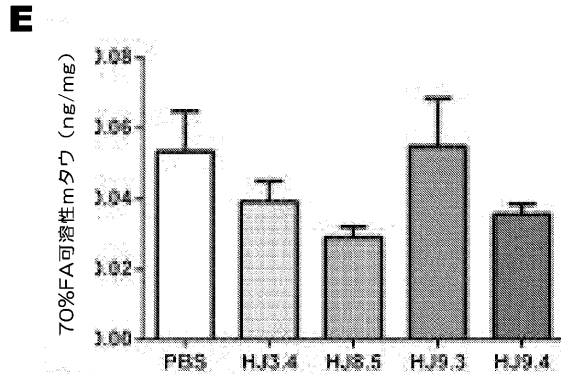


FIG. 42

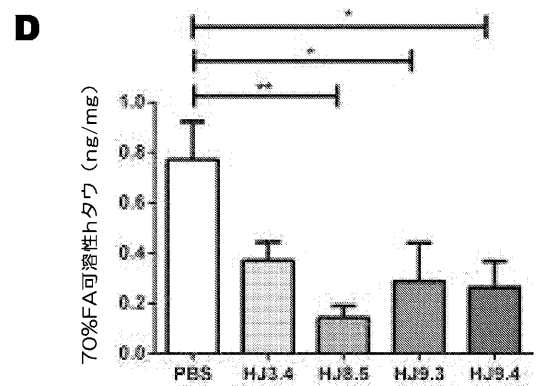
【 図 4 2 C 】



【 図 4 2 E 】



【 図 4 2 D 】



【 図 4 2 F 】

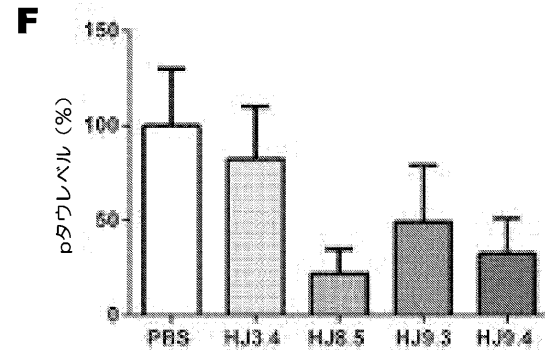
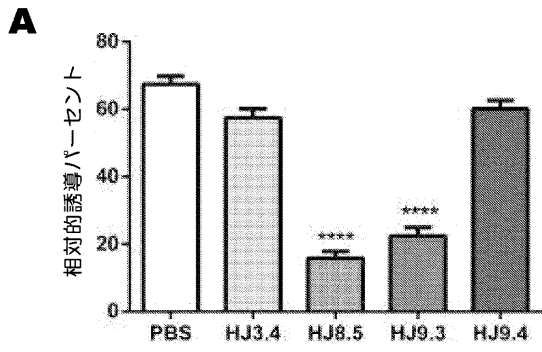


FIG. 42

FIG. 42

【 図 4 3 A 】



【 図 4 3 B 】

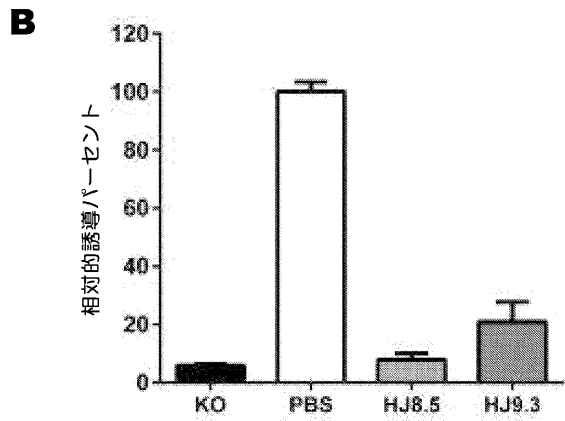


FIG. 43

【 図 4 3 E 】

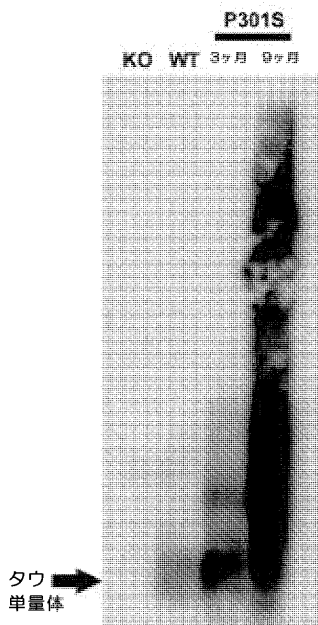
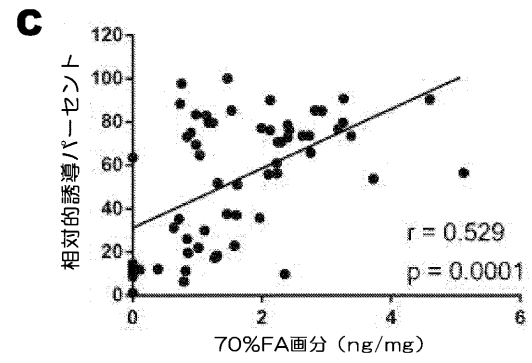


FIG. 43E

【 図 4 3 C 】



【 図 4 3 D 】

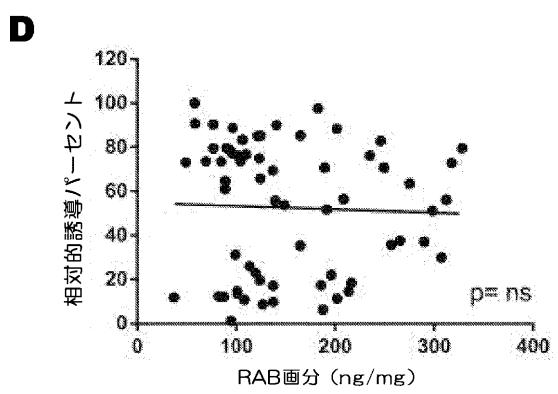
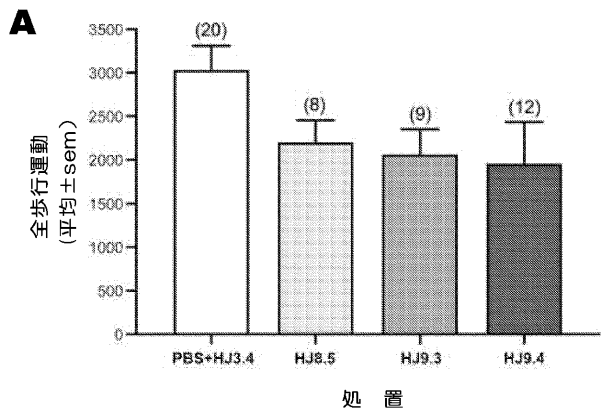


FIG. 43

【 図 4 4 A 】



【 図 4 4 B 】

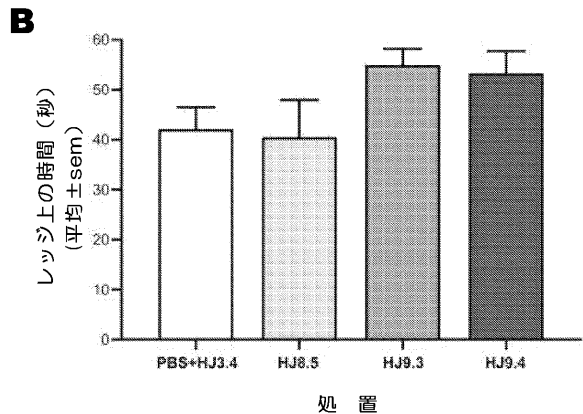
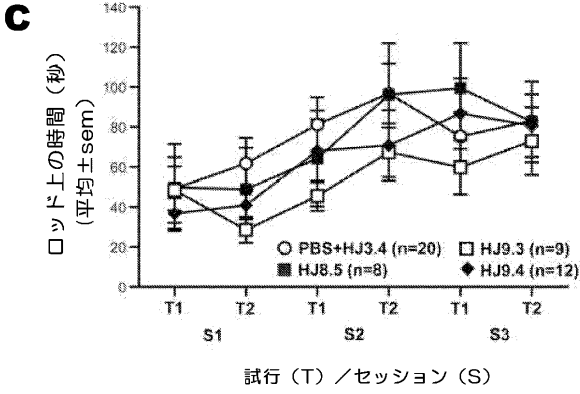


FIG. 44

【 図 4 4 C 】



【 図 4 4 D 】

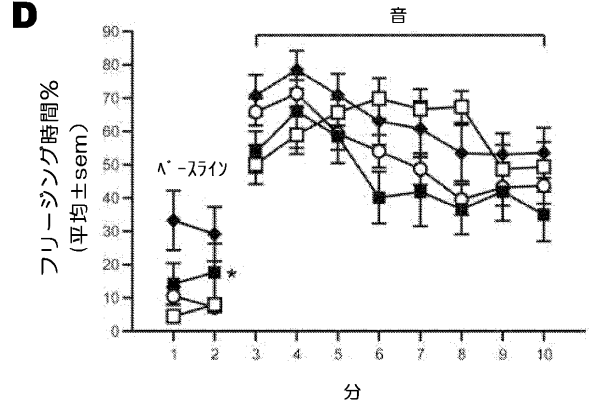
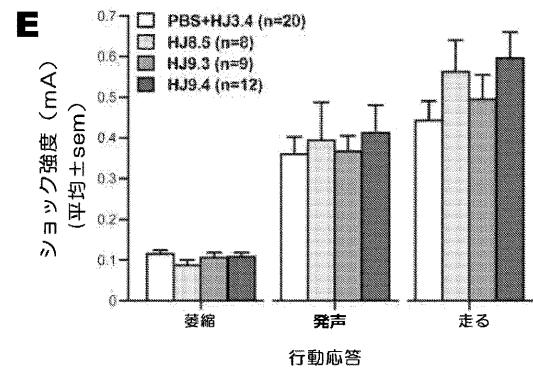


FIG. 44

【 図 4 4 E 】



【 図 4 4 F 】

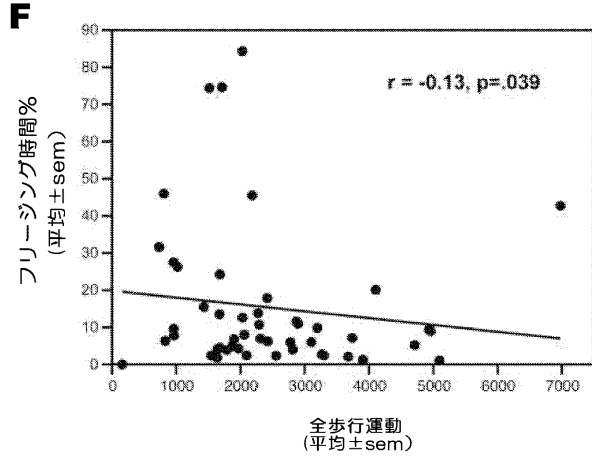
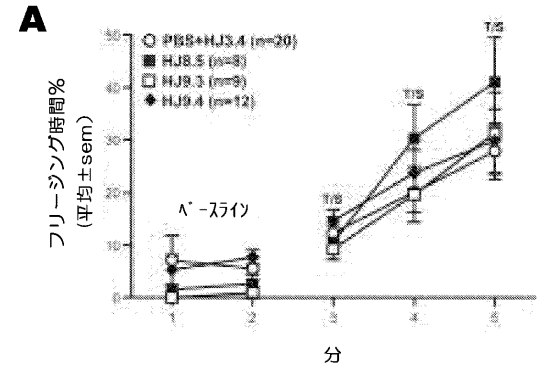


FIG. 44

【 図 4 5 A 】



【 図 4 5 B 】

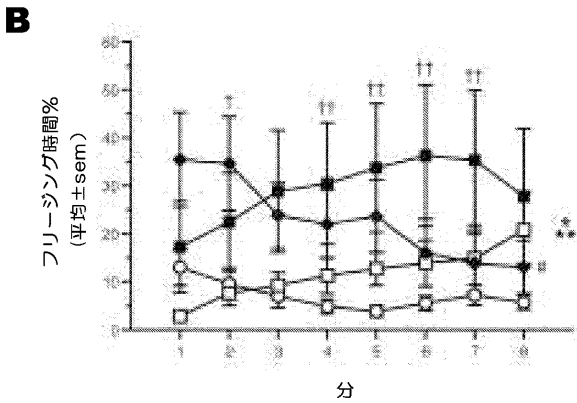


FIG. 45

【 図 4 5 C 】

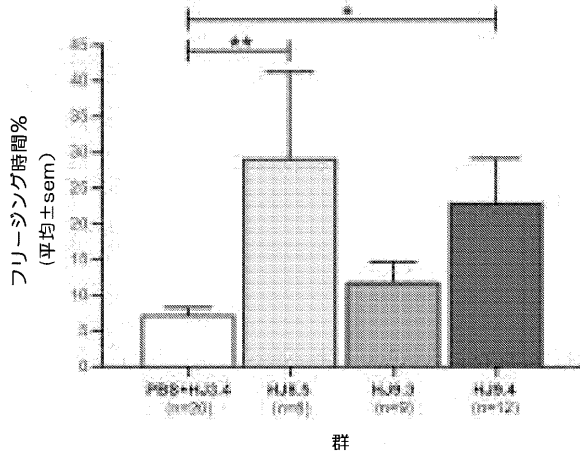


FIG. 45C

【 図 4 6 】

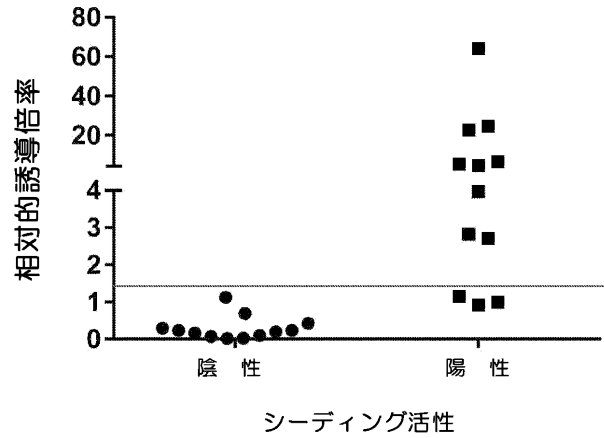
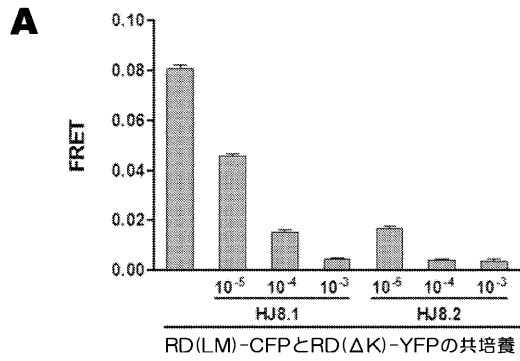


FIG. 46

【 図 4 7 A 】



【 図 4 7 B 】

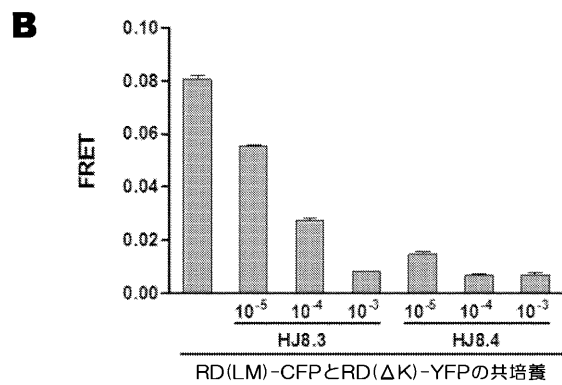
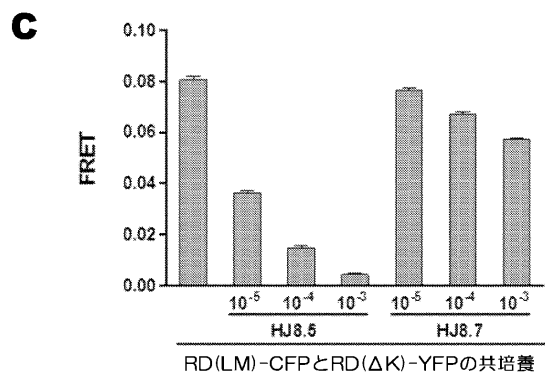


FIG. 47

【 図 4 7 C 】



【 図 4 7 D 】

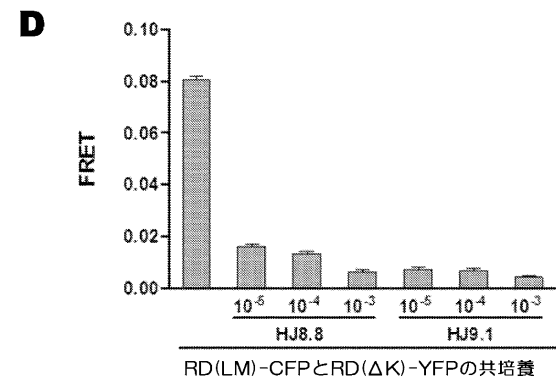
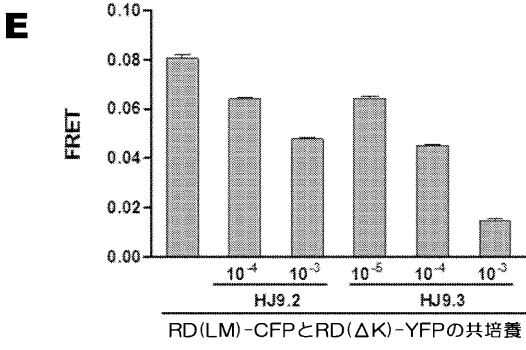


FIG. 47

【 図 4 7 E 】



【 図 4 7 F 】

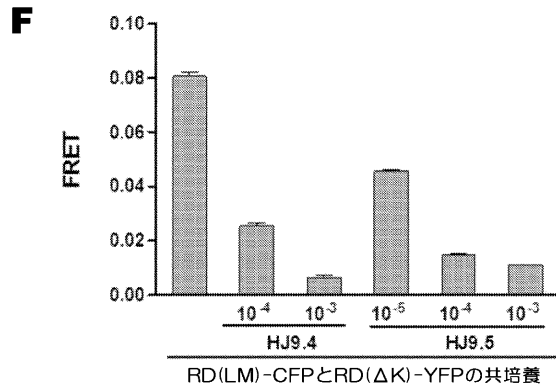


FIG. 47

【 図 4 8 】

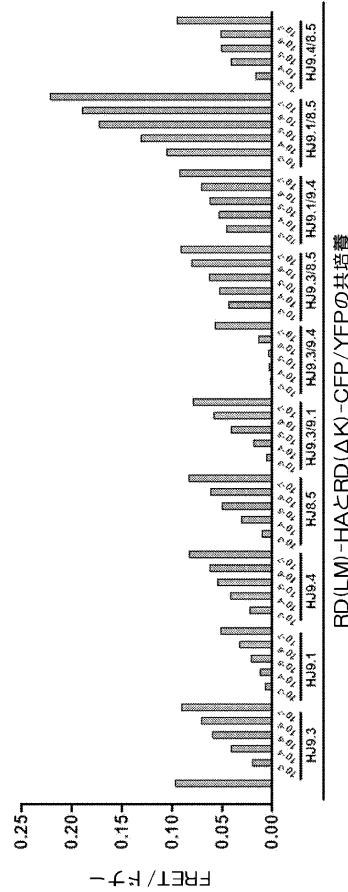
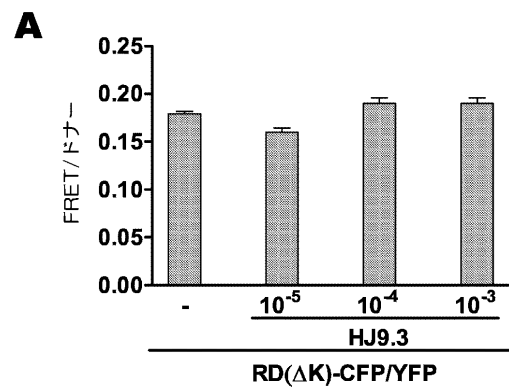


FIG. 48

【 図 4 9 A 】



【 図 4 9 B 】

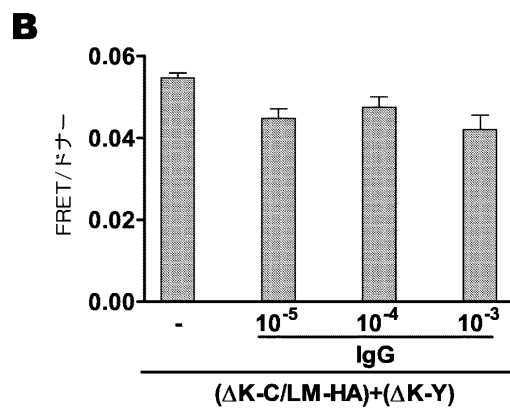


FIG. 49

【 図 5 0 】

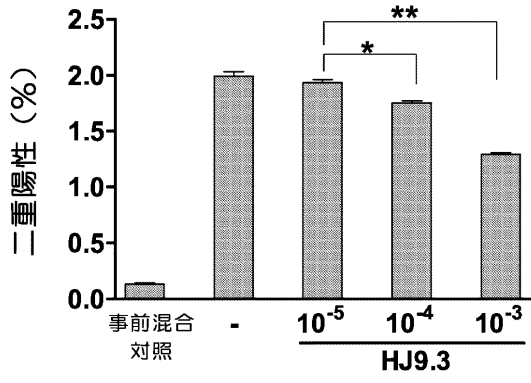


FIG. 50

【 配 列 表 】



2015530971000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/049333

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. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 8-12 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims 8-12 pertain to methods for treatment of the human body by therapy practiced on the human body, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 9-12,14,15,17 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: Claims 9-12, 14, 15 and 17 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).
3. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 7,8,13,16 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:	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/049333
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/18(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i		
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) C07K 16/18; A61K 39/395; A61K 39/00; G01N 33/68; A61P 25/28; G01N 33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: antibody, tau, epitope, CDR3		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010-0316664 A1 (SIGURDSSON, EINAR M. et al.) 16 December 2010 See claim 1; Table 1; and para. 0057.	1,6
A		2-5
A	NCBI, GenBank accession no. CA154295.1 (15 April 2005) See the whole document.	1-6
A	WO 2012-045882 A2 (AC IMMUNE S. A. et al.) 12 April 2012 See the whole document.	1-6
A	NCBI, GenBank accession no. NP_058525.1 (27 June 2012) See the whole document.	1-6
A	KFOURY, NAJLA et al., 'Trans-cellular propagation of tau aggregation by fibrillar species', The Journal of Biological Chemistry, Epub. 29 March 2012, Vol. 287, No. 23, pp. 19440-19451 See the whole document.	1-6
PX	WO 2012-106363 A2 (INTELLECT NEUROSCIENCES INC.) 09 August 2012 See claims 4 and 72; and para. 0099.	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 11 October 2013 (11.10.2013)		Date of mailing of the international search report 14 October 2013 (14.10.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer HEO Joo Hyung  Telephone No. +82-42-481-8150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2013/049333

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010-0316564 A1	16/12/2010	CA 2765099 A1	16/12/2010
		CN 102596221 A	18/07/2012
		EA 201171397 A1	30/05/2012
		EP 2440234 A2	18/04/2012
		JP 2012-530055 A	29/11/2012
		WO 2010-144711 A2	16/12/2010
		WO 2010-144711 A3	26/05/2011
		WO 2012-045882 A2	12/04/2012
CA 2812865 A1	12/04/2012		
EP 2625198 A2	14/08/2013		
IL 225568 D0	27/06/2013		
SG 189136 A1	31/05/2013		
TW 201216985 A	01/05/2012		
US 2012-0276009 A1	01/11/2012		
WO 2012-045882 A3	31/05/2012		
WO 2013-050567 A1	11/04/2013		
WO 2012-106363 A2	09/08/2012		
		US 2012-244174 A1	27/09/2012
		WO 2012-106363 A3	15/11/2012

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 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	25/18 (2006.01)	A 6 1 P	25/18	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	G 0 1 N	33/531	A
G 0 1 N	33/536 (2006.01)	G 0 1 N	33/536	Z
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. W I N D O W S
2. Z e i s s
3. M i l l i p o r e
4. A b c a m
5. T h e r m o S c i e n t i f i c
6. T r i t o n
7. A l e x a - f l u o r
8. A l z e t

(74)代理人 100183254

弁理士 森山 彩子

(72)発明者 デイビッド・ホルツマン

アメリカ合衆国 6 3 1 3 0 ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ

(72)発明者 ホン・ジャン

アメリカ合衆国 6 3 1 3 0 ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ

(72)発明者 マーク・ダイヤモンド

アメリカ合衆国 6 3 1 3 0 ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ

(72)発明者 ナジラ・クフォーリー

アメリカ合衆国 6 3 1 3 0 ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ

(72)発明者 ブランドン・ホームズ

アメリカ合衆国 6 3 1 3 0 ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 CA06 DA02 GA01 GA11 HA01

4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CE12 DA01 DA13

4C085 AA14 DD62 EE01 GG10

4H045 AA11 CA45 DA76 EA20 EA21 EA50 FA71 FA74

专利名称(译)	针对tau的抗体		
公开(公告)号	JP2015530971A	公开(公告)日	2015-10-29
申请号	JP2015520685	申请日	2013-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	华盛顿大学 圣路易斯华盛顿大学		
申请(专利权)人(译)	华盛顿大学		
[标]发明人	デイビッドホルツマン ホンジャン マークダイヤモンド ナジラクフォウリー ブランドンホームズ		
发明人	デイビッド・ホルツマン ホン・ジャン マーク・ダイヤモンド ナジラク・クフォウリー ブランドン・ホームズ		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 A61K39/395 A61P43/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P25/14 A61P25/18 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/536 C12N15/09		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/18 A61P25/28 A61P43/00 C07K16/18 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N2800/2821 C07K2317/565 G01N33/6896 G01N2333/47 G01N33/566		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 A61K39/395.N A61P43/00.105 A61P25/00 A61P25/28 A61P25/14 A61P25/18 G01N33/53.D G01N33/531.A G01N33/536.Z C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/DA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA14 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/CA45 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	61/667515 2012-07-03 US 61/694989 2012-08-30 US		
其他公开文献	JP2015530971A5 JP6345655B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及针对tau的抗体及其使用方法。

(21) 出願番号	特願2015-520685 (P2015-520685)	(71) 出願人	597025806
(86) (22) 出願日	平成25年7月3日 (2013. 7. 3)		ワシントン・ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月25日 (2015. 2. 25)		Washington University
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/049333		アメリカ合衆国63130ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ
(87) 国際公開番号	W02014/008404		
(87) 国際公開日	平成26年1月9日 (2014. 1. 9)		
(31) 優先権主張番号	61/667, 515	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成24年7月3日 (2012. 7. 3)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	61/694, 989		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成24年8月30日 (2012. 8. 30)	(74) 代理人	100122301
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 雷田 憲史
		(74) 代理人	100157956
			弁理士 稲井 史生

最終頁に続く