

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3909084号

(P3909084)

(45) 発行日 平成19年4月25日(2007.4.25)

(24) 登録日 平成19年1月26日(2007.1.26)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	Z N A C
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/577 (2006.01)	G O 1 N 33/577	B
C 1 2 R 1/91 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

請求項の数 10 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-507438	(73) 特許権者	596178419
(86) (22) 出願日	平成4年10月17日(1992.10.17)		エヌ・ブイ・インノジェネティクス・ソシ
(65) 公表番号	特表平7-502888		エテ・アノニム
(43) 公表日	平成7年3月30日(1995.3.30)		N. V. INNOGENETICS S.
(86) 国際出願番号	PCT/EP1992/002392		A.
(87) 国際公開番号	W01993/008302		ベルギー国、ビー-9710 ゲント、ボ
(87) 国際公開日	平成5年4月29日(1993.4.29)		ックス 4、インダストリーパーク・ツウ
審査請求日	平成11年10月14日(1999.10.14)	(74) 代理人	100078662
審判番号	不服2003-13920(P2003-13920/J1)		弁理士 津国 肇
審判請求日	平成15年7月22日(2003.7.22)	(74) 代理人	100075225
(31) 優先権主張番号	91402871.7		弁理士 篠田 文雄
(32) 優先日	平成3年10月25日(1991.10.25)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)		
微生物の受託番号	ECACC 91100806		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微小管結合タンパク質タウに対するモノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- 印でマークされた位置でリン酸化された、ゲデルトラ 1989年(Goedert et al. 1989)によるヒトタウ40のアミノ酸197~205位にわたるペプチド

【化 1】

$$Y \overset{\star}{S} \overset{\star}{S} P G \overset{\star}{S} P G T \text{ 又は } Y \overset{\star}{S} \overset{\star}{S} P G \overset{\star}{S} P G T$$

と、

免疫複合体を形成することを特徴とする、アルツハイマー病を有するか又はアルツハイマー病で死亡した患者の大脳皮質から分離された脳ホモジネートから得られる、ヒトの異常にリン酸化されたタウタンパク質中に存在し、ヒト正常タウタンパク質中に存在しない、リン酸化されたエピトープと免疫複合体を形成するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

- 正常タウタンパク質と免疫複合体を形成せず、
 - ヒトの脳から誘導された脳ホモジネートの中に存在するタウタンパク質であって該ホモジネートが非神経系障害で死亡した患者から分離されたものであるタウタンパク質と、免疫複合体を形成せず、

- 脱リン剤で予め処理されたリン酸化エピトープと免疫複合体を形成しない、
 請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

10

20

- アルツハイマー病で死亡した患者から得たヒトの脳のホモジネートの中に存在するタウタンパク質の異常にリン酸化された形態と免疫複合体を形成することを特徴とし、
 - ここで、該異常にリン酸化されたタンパク質は、非神経系障害で死亡した患者から分離された脳ホモジネートから誘導される正常なタウタンパク質のものよりも高い見かけの分子量を呈し、
 - ここで、該見かけの分子量は、脱リン剤でこの異常にリン酸化されたタウタンパク質を処理した時点で正常なタウタンパク質の見かけの分子量まで減少されうることを特徴とする、
- 請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

第 9 1 1 0 0 8 0 6 号という番号で 1 9 9 1 年 1 0 月 8 日に E C A C C に寄託されたハイブリドーマにより分泌される請求の範囲第 1 項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

請求の範囲第 1 項乃至第 4 項のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ。

【請求項 6】

- 第 9 1 1 0 0 8 0 6 号という番号で 1 9 9 1 年 1 0 月 8 日に E C A C C に寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体により認識される抗原を用いてインビボで予め免疫化されたマウス又はラットといったヒト以外の動物の脾細胞から開始する段階；

- ハイブリドーマ形成条件下で骨髓腫細胞と前記免疫化した細胞を融合させる段階；を含むことを特徴とする、請求の範囲第 1 項乃至第 4 項のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの獲得及び分離方法。

【請求項 7】

- 適切な培地中で請求の範囲第 5 項に記載の選択されたハイブリドーマを培養する段階；及び

- 前記選択されたハイブリドーマにより分泌されたモノクローナル抗体を回収する段階；又は代替的に

- マウスの腹膜内に請求の範囲第 5 項の選択されたハイブリドーマを移植し、動物が腹水を産生した時点で、このときこの腹水から形成されたモノクローナル抗体を回収する段階、

を含む請求の範囲第 1 項乃至第 4 項のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体の調製方法。

【請求項 8】

- 抗原 - 抗体複合体を産生するのに適した条件下で、アルツハイマー病を患った患者から分離された洗浄剤抽出された脳ホモジネート又は N F T の調製物と、請求の範囲第 1 項乃至第 4 項のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を接触させる段階；及び

- 前記複合体から抗原を分離し、精製された形で求められた抗原を検出する段階（ここで、コントロールよりも多い量の抗原の存在は、異常リン酸化タウが該脳疾患に関与したことを示す）、

を含む、異常リン酸化タウタンパク質が関与する脳疾患のインビトロ検出のための方法。

【請求項 9】

- 異常リン酸化タウタンパク質が関与する神経系障害を患っていると疑われている患者からの脳ホモジネート又は脳脊髄液又は血清の試料を、抗原 - 抗体複合体を産生するのに適した条件下で、請求の範囲第 1 項乃至第 4 項のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体とインビトロ条件下で接触させる段階；

- 脳ホモジネート又は脳脊髄液又は血清の前記試料に対する前記抗体の免疫学的結合を検出する段階、

を含む、異常リン酸化タウタンパク質が関与する脳疾患のインビトロ検出のための方法。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

異常にリン酸化されたタウタンパク質が関与しているアルツハイマー病、ダウン症候群、ピック病、SSPE及びその他の神経系障害のうちの1つのインビトロ診断のためのキットにおいて、

- 請求の範囲第1項乃至第4項のいずれか1項に記載の第1のモノクローナル抗体、
- 該モノクローナル抗体とテスト用試料の間の免疫反応を実施するための適切な緩衝液；

を含むことを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

本発明は、ヒトの微小管結合タンパク質タウ上に存在する特定のエピトープに対する新規なモノクローナル抗体、これらのモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ、タウタンパク質の特定のエピトープが関与する脳疾患の診断方法及びこのエピトープを認識するモノクローナル抗体に関する。

タウは、ヒトをはじめとするいくつかの種のニューロン内で合成され (Kosik, K.S. et al., 1989)、かつ、これらのニューロンの軸索区画内に豊富に存在する (Birder, L.I. et al., 1985) 微小管結合タンパク質である。機能的には、このタウタンパク質は、チューブリンの重合に関与し (Weingarten, M.D. et al., 1975)、また、おそらくは微小管の不安定性を低減することにも関与している (Bre. M.H.及びKarsenti, E. 1990)。

タウタンパク質は同様に、アルツハイマー病患者の脳の組織切片内に神経原繊維のもつれとして見られる特徴的構造である対らせんフィラメント (PHF) の主要成分である (Greenberg, S.及びDavies, P., 1990; Lee, V.M. -Y. et al., 1991)。このタンパク質は異なるイソ型タンパク質の一群として存在し、そのうち4~6種のイソ型タンパク質は正常な成人の脳内に発見されるが胎児の脳にはわずか1種のイソ型タンパク質しか検出されない (Goedert, M. et al., 1989)。交互のmRNAスプライシングにより、単一の遺伝子から多様なイソ型タンパク質が生成される (Himmler, A., 1989)。分子クローニングから予想されるようなタウタンパク質の最も著しい特徴は、3回又は4回反復される分子のカルボキシ末端部分で起こる31個又は32個のアミノ酸の伸張である。分子のNH₂末端部分内へ29個又は58個長のアミノ酸を挿入することによって、さらなる多様性が生み出される (Goedert, M. et al., 1989)。

アルカリ性ホスファターゼ処理の後に観察されたその分子質量の減少によって明らかにされるように、異常にリン酸化されている64及び69kDaのタウ変異体が、神経原繊維のもつれ及び老人斑を示す脳の部域内に限定して検出された (Flament, S. et al., 1989及び1990)。4つの異なるキナーゼによるリン酸化の部位は、タウのC末端から半分の微小管結合部分内にマッピングされており、細菌により発現されるタウ上のカルシウムカルモジュリン依存性キナーゼの作用が、より低い電気泳動移動度を誘発するSer (405) のリン酸化をもたらすということが示された (Steiner, B. et al., 1990)。

神経フィラメント上に存在する非特異的リン酸化エピトープに対するものであって、その結果、正常なタウ及び異常にリン酸化されたタウと交叉反応することが示されている (Nukina, N. et al., 1987; Ksiezak-Reding et al., 1987) か、又は、正常な及び異常にリン酸化されたタウ上の特異的エピトープを認識したために、ヒトのタウに対する反応性を示すいくつかの抗体が報告されている。

ウシ由来の及びヒトからの正常なタウ及び異常にリン酸化されたタウ (Ksiezak-Reding, H. et al., 1988, Flament, S.及びDelacourte, A. 1990) のタウ変異体上に存在するリン酸塩依存性エピトープを認識するA1z50モノクローナル抗体 (Wolozin, B.L. et al., 1986; Nukina et al., 1988) は、後者の抗体クラスに属する。このモノクローナルにより認識されるエピトープは、アルツハイマー病の間に変質しつつある皮質ニュートロンの細胞体樹状突起ドメイン内で特異的に発現される (Delacourte, A et al., 1990)。A1z50エピトープは近年、タウ分子のNH₂-末端部分にマッピングされた (Ksiezak-Reding, H. et al., 1990; Goedert, M. et al., 1991)。正常なタウとのその交叉反応性のため、この抗体は、脳ホモジネートのウエスタンブロット検出の使用もしくは硫酸アンモニウム濃縮CSFにより、又は脳ホモジネットに対するサンドイッチ免疫検定法を用

10

20

30

40

50

いて、正常なタウを異常にリン酸化されたタウから識別することしかできない (Ghanbari et al., 1990; Wolozin, B及びDauiies, P. 1987; 欧州特許公報 (「EP」444856))。PHFに対する抗体を用いたCSFベースの検定が、Mehta et al 1985によって初めて記述されたが、対照からのCSFとアルツハイマーCSFの間に著しい重複を示している。この抗体によって認識されたエピトープは、ユビキチンの一部として同定された (Perry et al., 1989)。

その他のモノクローナル抗体が、タウタンパク質を認識するために開発されてきた。例えば、モノクローナル抗体5E2は、ヒトの胎児熱安定性微小管結合タンパク質での免疫化により生み出されたものであり、正常な及び異常にリン酸化されたタウの中に存在するアミノ酸156～175にわたるエピトープを認識する (Kosik, K. et al., 1988)。

10

タウ1及びその他のいくつかのような他の抗体が、ウシのタウ、ウシの熱安定性微小管結合タンパク質又はラットの脳抽出物での免疫化によって生み出され (Binder, L.I. et al., 1985; Kosik, K.S. et al., 1988)、大部分の抗体は、正常な及び異常にリン酸化されたタウを認識する (Ksiezak-Reding, H. et al., 1990)。

PHFのコアに対して誘起された「423」という名称の抗体は、タウの反復要素内に局在化されたタウタンパク質の9.5及び12-kDaのフラグメントと特異的に反応したが、アルツハイマーの脳中の異常にリン酸化されたタウも正常なヒトのタウも認識しなかった (Wischik, C.H. et al., 1988)。

この抗体は、脳ホモジネート内の正常な対照から、アルツハイマーPHF病理を区別するのに用いられてきた (Harrington, G.R. et al., 1990; 特許WO089/03993)。

これまで、以上に記されてきた全ての抗体のいずれも、免疫組織学、ウエスタンブロット又はELISAのどれによっても、異常にリン酸化されたタウに対する絶対的な特異性を有していなかった。正常な及び異常にリン酸化されたタウの定量的測定は、これまで、ウエスタンブロットティングの後の濃縮CSF試料中、又はPHFを含む脳の抽出物、又は脳ホモジネート中で、タウを検出することしかできなかった (Ghanbari H. A. et al., 1990; Harrington C.R. et al., 1990, Wisniewski, H.M. et al., 1989; Wolozin, B.及びDauiies, P. 1987)。

20

従って、本発明の目的は、脳の組織切片、脳抽出物又は脳脊髄液といった体液内に存在する異常リン酸化タウのみを特異的に検出することのできるモノクローナル抗体を提供することにある。

30

本発明は同様に、このようなモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマも提供する。本発明はさらに、脳の組織切片又は脳のホモジネート又は脳脊髄液といった体液内の異常リン酸化タウの中で発現され、このようなモノクローナル抗体により認識されるタウタンパク質のエピトープをも提供する。

本発明はさらに、アルツハイマー病及びダウン症候群といった神経系障害を患う患者の脳の中で発現されるタウタンパク質のエピトープを提供する。

本発明はさらに、タウタンパク質が関与する脳疾患のインビトロ検出及び診断のための方法をも提供する。

本発明のモノクローナル抗体は、異常にリン酸化されたヒトのタウの中に存在するエピトープと反応することを特徴とする。モノクローナル抗体はさらに、異常にリン酸化されたヒトのタウ、より具体的には、異常にリン酸化されたヒトのタウ内に存在する非構造的エピトープと免疫複合体を形成することを特徴とする。

40

「非構造的」エピトープというのは、その抗体認識に関して、その一次構造ならびに翻訳後修飾及びコンフォメーションに依存し、特定の処理 (例えばホルマリン固定、洗浄剤処理、脱リン) によって変更又は破壊され得るようなエピトープのことを言う。

「～と免疫複合体を形成する」という表現は、本発明のモノクローナル抗体が、以下の技術のうちのいずれか1つの中で用いられる条件の下で前述の抗原に結合することを意味する。

光学免疫顕微鏡検査法

外科手術又は剖検で得た脳の組織試料を、4%のホルマリン又はブアン固定液の中に浸漬

50

することによって固定し、パラフィン内に包埋させる。厚み 4 mm の切片を調製する。顕色のため 3, 3'-ジアミノベンチジンテトラヒドロ塩化物を用いたアビジン-ビオチニル化ペルオキシダーゼ複合体技術 (Hsu, S.M. et al., 1981) といった、形成された免疫複合体を視覚化するための技術と合わせて、本発明のモノクローナル抗体を応用する。切片をハリスのヘマトキシリン染色で対比染色する。

組織切片中の免疫電子顕微鏡検査法

外科手術又は剖検で得た脳の組織試料を、包埋無しで厚み 60 μm に薄切りする前にブアン固定液又は 10% の緩衝ホルマリンのいずれかの中で固定させる (Vibratome)。間接イムノゴールド法により免疫染色するため本発明のモノクローナル抗体を用い、その後切片を固定し、包埋し、切断して電子顕微鏡検査に付す。なお全て、当業者にとっては既知の標準的プロトコルに従って行なう (Brion, J.P. et al., 1985)。

10

免疫プロット法手順

免疫プロット法のためには、Igbal, K. et al. (1984) 又は Greenberg, S. 及び Davies, P. (1990) によって記述されているように、PHF が富化された分画を調製する。第 2 の方法のためには、組織学的に確認されたアルツハイマー病患者から得られた前頭及び側頭皮質からの灰白質で大部分が構成されている死後組織が使用される。このアルツハイマー灰白質脳試料 (5 ~ 10 g) を、テフロン/ガラスポッター S (Braun, ドイツ) ホモジナイザー内で 10 体積の低温緩衝液 H (10 mM のトリス / 1 mM EGTA / 0.8 M の NaCl / 10% のショ糖、pH 7.4) で均質化させる。4℃ で 20 分間 27,000 × g で 60 秒离心分離した後、ペレットを除去し、上清を 1% (重量 / 体積) N-ラウロシルサルコシンと 1% (体積 / 体積) 2-メルカプトエタノールに調整し、37℃ で 2.5 時間ミキサー 820 (Swelab, スウェーデン) で回転させながらインキュベートさせる。上清混合物を 20℃ で 35 分間 108,000 × g で遠心分離する。PBS で、PHF-タウ含有ペレットを穏やかに洗浄し、同じ緩衝液 1 ml 中で最終的に懸濁させる。

20

12% のゲル上で、還元性条件下で、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を実施する (Laemmli U.K., 1970)。電気泳動後、タンパク質は、クマシーブリリアントブルーで固定、染色されるか、或は又、ニトロセルロースシート (Hybond-C, Amersham) 又は Immobilon フィルター (Millipore) にトランスファーされる (Towbin H. et al., 1979)。

トランスファー後フィルターを、0.05% (v/v) の Tween 20 (Tween-PBS) を含む PBS 内に予め浸し、次に 5% (w/v) の乾燥スキムミルク及び 10% (v/v) の新生仔牛血清を含む Tween-PBS (ブロッキング緩衝液) 内で 1 時間インキュベートする。次に、フィルターを、ブロッキング緩衝液内で適切に希釈された本発明のモノクローナル抗体を用いて 4℃ で一晩処理する。

30

次に、Tween-PBS 内で三回フィルターを洗浄し、ブロッキング緩衝液中で 1/3, 000 に希釈されたホースラディッシュペルオキシダーゼで標識づけされたウサギ抗マウス IgG (Dakopatts, デンマーク) を用いて室温で 1.5 時間処理する。Tween-PBS 中で 3 回洗浄した後、ブロッキング緩衝液内で 1/250 に希釈されたストレプトアビジンでビオチニル化されたホースラディッシュ (西洋わさび) ペルオキシダーゼ複合体 (Amersham) を 1.5 時間室温で適用する。その後フィルターを、0.05% (w/v) のジアミノベンチジン及び 0.03% (v/v) の過酸化水素を含む PBS 内でバックグラウンド染色が顕色するまでインキュベートする。

40

モノクローナル抗体と抗原の間の免疫複合体の形成は、上述した厳密な条件に制限されず、抗体及び抗原結合の免疫化学特性に係るあらゆる技術が、同様な免疫複合体の形成をもたらすことは明らかである。

ヒトの異常リン酸化タウは、その低い電気泳動移動度を異常なリン酸化に帰せしめることができ、かつ、アルツハイマー病の間の変質しつつある皮質ニューロンの細胞体樹状突起ドメイン内で特異的に発現される 64 及び 68 kDa の少なくとも 2 つのタウタンパク質を含む一群のものである (Flament, S. et al., 1989 及び Delacourte, A. et al., 1990)。電気泳動移動度における付随するシフトを有する正常なタウの付加的リン酸化を誘発す

50

ることができるキナーゼ活性について記述されてきたが、これらのリン酸化のいずれも、本発明のエピトープの形成を誘発することができない (Ishiguro, K. et al., 1988, Steiner, B et al., 1990)。

本発明の有利な一実施態様に従うと、モノクローナル抗体は、アルツハイマー病を有するか又はアルツハイマー病で死亡した患者から得た大脳皮質からそれ自体が分離された脳ホモジネートから得られる、ヒトの異常リン酸化タウタンパク質に属する抗原のリン酸化されたエピトープと免疫複合体を形成する。

「リン酸化されたエピトープ」という表現は、アルカリ性ホスファターゼといったようなホスファターゼ酵素で処理された場合に破壊されるエピトープのことを意味する。リン酸化されたエピトープの中で、セリンはホスホセリンの形をしている。

「脳ホモジネート」及び異常にリン酸化されたタウタンパク質は、Iqbal, K. et al (1984)の方法又はGreenberg, P.G及びDavies, P. (1990)の方法といったような標準的方法に従って、当業者が得ることのできるものである。

本発明のモノクローナル抗体は、それらが

一 ☆印でマークされた位置でリン酸化されたペプチド Y S S ☆
 P G S ☆ P G T 又は Y S S P G S ☆ P G T、好ましくは Y S S P G S ☆
 P G T と、又は、

- それ自体前記ペプチドと複合体を形成するモノクローナル抗体と免疫複合体を形成することのできる他のいかなるペプチドとも、免疫複合体を形成することを特徴とする。

ペプチド Y S S ☆ P G S ☆ P G T 又は Y S S P G S ☆ P G T、好ましくは Y S S P G S ☆ P G T を、以下、本発明の「エピトープ」と呼ぶ。

ヒトのタウ40の番号付けを用いると199及び202に位置するセリン (Goedert, M. et al., 1989) は、ホスホセリンの形をしている。このエピトープは、上述の番号付けを用いるとアミノ酸197~205にわたっている。

それ自体前述のペプチドと複合体を形成する傾向をもつモノクローナル抗体と免疫複合体を形成することのできるペプチドを、「変異体ペプチド」と定義づけする。

一定の位置でリン酸化されたペプチドは、セリンがホスホセリンの形をしていることを意味する。

本発明は同様に、正常なタウタンパク質と免疫複合体を形成する傾向をもたないモノクローナル抗体にも関する。

本発明のモノクローナル抗体は、非神経系障害で死亡した患者から分離されたヒトの脳から誘導された脳ホモジネートの中に存在するタウタンパク質と免疫複合体を形成することができない。

本発明のモノクローナル抗体は同様に、アルカリ性ホスファターゼといったような脱リン剤で予め処理された上述のエピトープと免疫複合体を形成することができない。

本発明のモノクローナル抗体はさらに、上述の予め脱リン剤で処理されたあらゆる変異体ペプチドと免疫複合体を形成することができない。

有利にも、本発明のモノクローナル抗体は、

- アルツハイマー病で死亡した患者から得たヒトの脳のホモジネートの中に存在するタウタンパク質の異常にリン酸化された形態と免疫複合体を形成すること、及び

- これらの異常リン酸化タンパク質が、非神経系障害で死亡した患者から分離された脳ホモジネートから誘導される正常なタウタンパク質のものよりも高い見かけの分子量を呈していること、及び

10

20

30

40

50

- これらの異常リン酸化タウタンパク質の見かけの分子量は、脱リン剤でこの異常にリン酸化されたタウタンパク質を処理することにより、正常なタウタンパク質の見かけの分子量まで減少されうること、
を特徴とする。

本発明は同様に、上述のような脳のホモジネート内に存在するタウタンパク質の異常にリン酸化された64 kDa及び68 kDaの形態と免疫複合体を形成するモノクローナル抗体にも関する。

本発明の好ましいモノクローナル抗体は、91100806という番号で1991年10月8日にE C A C C (ヨーロッパ動物細胞培養収集所、ワクチン研究・生産研究所、公共保健・研究所サービス(P H L S)、応用微生物・研究センター、Porton Down, GB-Salisbury Wiltshire SP4. 0JG)に寄託されたハイブリドーマによって分泌される。このハイブリドーマを、以下「ハイブリドーマAT8」と呼び、分泌されるモノクローナル抗体を、「モノクローナル抗体AT8」と呼ぶことにする。

本発明は同様に、本発明に従ったモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ、特に1991年10月8日に91100806という番号でE C A C Cに寄託されたハイブリドーマにも関する。

本発明のモノクローナル抗体は、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの取得し単分離する方法により得られる。

このようなハイブリドーマを獲得するための方法には、

- No. 91100806という番号で10月8日にE C A C Cに寄託されたハイブリドーマによって分泌されたモノクローナル抗体のような、本発明のモノクローナル抗体により認識される抗原を用いてインビボで予め免疫化された例えばマウス又はラットといった動物の脾細胞から、または、この抗原を用いてインビトロで予め免疫化されたこのような動物の脾細胞から開始する段階；

- ハイブリドーマ形成条件下で骨髄腫細胞とこのような免疫化した細胞を融合させる段階；及び

- 上述の抗原のエピトープを特異的に認識し、タウタンパク質の異常にリン酸化された形態と、又はタウタンパク質のエピトープを含むリン酸化されたペプチドと、免疫複合体を形成するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを選択する段階、
が関与している。

相応するモノクローナル抗体を産生するための方法には、

- 適切な培地内で上述のような選択されたハイブリドーマを培養する段階；及び

- 選択されたハイブリドーマにより排出されたモノクローナル抗体を回収する段階、
又は代替的に、

- マウスの腹膜内に選択されたハイブリドーマを移植し、動物の体内で腹水が産生された時点で、そのときこのような腹水から形成されたモノクローナル抗体を回収する段階、
が関与している。

本発明のモノクローナル抗体は、例えばホローファイバー又はマイクロカプセルを用いた固定化された細胞の培養、又は例えばエアリフト型反応装置又は攪拌型バイオリアクタを用いた均質な懸濁液中での細胞の培養のような従来のインビトロ技術により調製され得る。

本発明は同様に、アルツハイマー病を患う患者から得た大脳皮質から分離された脳ホモジネートから得ることができしかも本発明のモノクローナル抗体と免疫複合体を形成するペプチド(抗原)にも関する。

本発明はさらに、本発明のモノクローナル抗体のいずれか1つと免疫複合体を形成する傾向をもち、しかも

10

20

30

40

一 ☆印でマークされた位置でリン酸化された配列 $Y S \overset{\star}{S} P G \overset{\star}{S}$
 $P G T$ 又は $Y S S P G \overset{\star}{S} P G T$ を含むか又はこれにより構成され
 ているか、又は

一 それ自体ペプチド $Y S \overset{\star}{S} P G \overset{\star}{S} P G T$ 又は $Y S S P G \overset{\star}{S} P G T$
 を複合体を形成する傾向をもつモノクローナル抗体と、免疫複合
 体を形成することのできるペプチドのような上述の変異体ペプチ
 ドの配列を含むか又はこれにより構成されている、

ペプチド（抗原）にも関する。

本発明は同様に、

一 ☆印のついた位置でリン酸化された配列 $Y S \overset{\star}{S} P G \overset{\star}{S} P G T$ 又
 は $Y S S P G \overset{\star}{S} P G T$ を含むか又は

一 上述の変異体ペプチドの配列を含む、

約 100 個のアミノ酸のペプチド（抗原）にも関する。

本発明は又、本発明のモノクローナル抗体と免疫複合体を形成できることを条件として、
 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 を 20 個のアミノ酸のいずれか 1 つとし、 p 、 q 、 r 、 s が 0
 又は 1 であるモノクローナルとして、☆印のついた場所でリン酸化された配列、

$(X_1)_p (X_2)_q \overset{\star}{S} P X_3 \overset{\star}{S} P (X_4)_r (X_5)_s$ 又は

$(X_1)_p (X_2)_q S P X_3 \overset{\star}{S} P (X_4)_r (X_5)_s$

好ましくは $(X_1)_p (X_2)_q S P X_3 \overset{\star}{S} P (X_4)_r (X_5)_s$ 、

を含むペプチド（抗原）にも関する。

本発明は同様に、本発明のモノクローナル抗体を生成する傾向をもつ上述のペプチドにも
 関する。

本発明は同様に、アルツハイマー病又は P H F 又はタウタンパク質が関与するあらゆる脳
 疾患を有する患者の脳、脳脊髄液又は血清中に含まれ、本発明のモノクローナル抗体と免
 疫複合体を形成するペプチド（抗原）にも関する。

本発明のペプチドを調製するための方法は、好ましくは、C 末端アミノ酸から始めて、必
 須順序の連続的アミノアシル、又は予め形成されすでに適切な順序でいくつかのアミノ
 アシル残基を含んでいるアミノアシル及びフラグメント又は代替的にはこの要領で予め調製
 されたいくつかのフラグメントが連続的に対をなしてカップリングされること、ここで、
 ペプチド合成等において既知の方法に従って、特にカルボキシル基の活性化後ペプチド結
 合の形成に通常関与する一方のアミノ基と他方のカルボキシル基を除くこれらのアミノア
 シル又はフラグメントによって支持される全ての反応性基を保護するよう注意が払われる
 こと、そして N 末端アミノ酸に至るまで段階的に進行させること、を含んでいる。

この方法においては、予めリン酸化されたアミノ酸を使用することが可能であり (De Bon
 t H.B.A. et al., 1990)、又以下に説明するように、非リン酸化配列の合成の後、リン
 酸化を実施することも可能である。

本発明は同様に、非リン酸化形態での本発明に従った抗原から出発して、

一 リン酸化されていないこの抗原を、抗原の非リン酸化エピトープを認識し本発明のモ

10

20

30

40

50

ノクローナル抗体によって認識されたリン酸化エピトープへと、このエピトープを修飾することのできるキナーゼ酵素と反応させること、を含む、この抗原の調製方法にも関する。

使用されるキナーゼは、当業者にとって既知の方法に従って、有利にも脳から抽出され (Ishiguro K. et al., 1988; Baudier, J. 及び Cole, R.D., 1987; Vallee, R.B., 1980), Steiner et al. (1990) 内に言及されているキナーゼとは異なるものである。

非リン酸化抗原は、例えば、上述のキナーゼでのリン酸化によって、本発明のモノクローナル抗体により認識される異常リン酸化タウタンパク質を生み出す正常なヒトタウタンパク質である。このような異常リン酸化タウタンパク質は、新しいものである。

アルツハイマー病を患うか又はアルツハイマー病で死亡した患者から得た大脳皮質から当業者にとって既知の方法により調製されうる本発明の抗原 (Iqbal, K, et al., 1984; Greenberg S.G 及び Davies, P., 1990) は、本発明のモノクローナル抗体、特に、9 1 1 0 0 8 0 6 号という番号で E C A C C に寄託されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体と免疫複合体を形成するその能力によって特徴づけられる。

本発明の抗原は、有利にも、アルツハイマー病、ダウン症候群、ピック病、SSPE 又はその他の PHF 及び異常リン酸化タウタンパク質の発生が関与する神経疾患を患う患者の脳、脳脊髄液又は血清中に含まれており、この抗原は、本発明のモノクローナル抗体との免疫学的反応を誘発する。

本発明は同様に、

- 抗原 - 抗体複合体を産生するのに適した条件下で、アルツハイマー病を患う患者又好ましくはアルツハイマー病を患っていた死亡患者から分離された PHF の調製物と本発明のモノクローナル抗体のうちの 1 つを接触させる段階；

- 前記複合体から抗原を分離し精製された形で求められる抗原を回収する段階、が関与する、PHF 及びタウタンパク質が関与する脳疾患すなわちアルツハイマー病のインビトロ検出又は診断のための方法にも関する。

PHF の調製は、Iqbal K et al. (1984) 又は Greenberg et al. (1990) に従って行なうことができる。

有利にも、使用されるモノクローナル抗体は、樹脂といった適切な支持体上に固定化された状態にある。このとき抗原の検出のための方法は、以下のように実施される：

- 既知の要領で脳組織から抽出されたタンパク質及びポリペプチドを含む上清 (Iqbal, K. et al., 1989; Greenberg S.S. 及び Davies, P., 1990) を、免疫複合体の形成を可能にする条件下でモノクローナル抗体と接触させる；

- このように形成された固定化された抗体 - 抗原複合体を洗浄する；

- 抗原 - 抗体複合体の解離を生み出すことのできる溶液 (例えば、3 M のチオシアン酸カリウム、2 . 5 M の塩化マグネシウム、0 . 2 M のクエン酸塩 - クエン酸、pH 3 . 5 又は 0 . 1 M の酢酸) を用いて複合体を処理する；

- 精製された形態で抗原を回収する。

タウタンパク質及び PHF が関与する脳疾患例えばアルツハイマー病のインビトロ検査又は診断のための本発明の方法は、

- タウタンパク質及び PHF が関与する脳疾患、より特定的にはアルツハイマー病を患っている疑いのある患者からの脳ホモジネート又は脳脊髄液又は血清の試料を、抗原 - 抗体複合体を産生するのに適した条件下で、本発明のモノクローナル抗体とインビトロ条件で接触させる段階；及び

- 前記脳ホモジネート又は脳脊髄液又は血清の試料に対する前記抗体の免疫学的結合を検出する段階；

を含んでいる。

免疫学的に結合したモノクローナル抗体の検出は、従来の要領で達成することができる。

有利には、本発明のモノクローナル抗体はそれ自体、以下で例示するように標識又は標識と直接又は間接的にカップリングするための基を有している。同様に、動物、好ましくはウサギの体内に本発明の抗原を注射し、抗原が結合したカラム上にポリクローナル抗体を

10

20

30

40

50

通過させるイムノアフィニティ精製により抗血清を回収し、そして従来の要領でポリクローナル抗体を溶離させることによって生成されたポリクローナル抗血清も使用することができる。検出は、本発明のエピトープを含む標識づけされたペプチドと抗原を競争的に結合させることによって達成できる。

本発明の方法の特に有利な実施態様は、診断すべき患者から得た（相応する抗原を含む）脳脊髄液の試料と、本発明のモノクローナル抗体を接触させる段階を含んでいる。

本発明は同様に、異常リン酸化タウタンパク質又は対らせんフィラメント（PHF）が関与している、アルツハイマー病、ダウン症候群、ピック病、SSPE、その他の神経系障害のうちの1つのインビトロ診断用のキットにも関する。このようなキットには、

- 本発明のいずれかのモノクローナル抗体を上被着させるための少なくとも1つのマイクロプレート；

- 本発明のエピトープを含む標識づけされたペプチド及び好まし

くは☆印のついた位置でリン酸化されたペプチド Y S [☆] S [☆] P G S P

G T 又は Y S S P G [☆] S P G T を伴っていてもよい、インビトロで

診断すべき試料を含む調製物；

- 本発明のエピトープとは異なる、正常なタウ又は異常リン酸化されたタウタンパク質又は本発明のいずれかのペプチドのエピトープを認識するモノクローナル抗体であってよく、

- 全て本発明のエピトープと異なるエピトープと免疫複合体を形成する傾向をもち、好ましくは固定化されたタウタンパク質を用いてイムノアフィニティクロマトグラフィにより精製された、正常なタウ又は異常リン酸化タウ又は本発明のペプチドのポリクローナル抗体でありうる、第2の抗体、又は、

- 前記第2の抗体と、特異的標識づけ（タギング）又はカップリングのいずれかをするための標識；

- 1) 本発明のモノクローナル抗体及びテスト用試料と、2) 結合された第2の抗体及び標識、との免疫反応を達成するための適切な緩衝液、が含まれる。

上述の標識づけされたペプチドは、当業者にとって既知のあらゆる手段により標識づけされたペプチドであってよい。同様にして、標識づけ（タギング）及びカップリングのための特異的な標識は、当業者にとって既知のあらゆる標識であってよい。

本発明はまた、対象となる抗原に関して標準（対象となる抗原の定量的測定のための）又は競合物質のいずれかである本発明の抗原をも含む上述のキットに関し、かくしてこのキットは競合的用量プロセスで使用することができる。

Figure (図)

図1：検出のためホースラディッシュペルオキシダーゼが結合したロバ抗ウサギ抗血清と共にウサギ抗タウポリクローナル抗体及び結合抗体としてのAT8モノクローナル抗体を用いた、アルツハイマー病又は正常な対照の脳ホモジネートに対するAT8の反応性。

AD₁ ~ AD₄：1 / 200（中実棒）又は1 / 1,000（斑点入り棒）に希釈された4人の異なるアルツハイマー患者からの脳ホモジネート。

C₁ ~ C₄：1 / 200（中実棒）又は1 / 1,000（斑点入り棒）に希釈された4人の異なる対照からの脳ホモジネート。

縦座標は、450 nmでの光学密度を、また、横座標は異なる試料を表わす。

図2：モノクローナル抗体Tau-1又はAT8のいずれかを用いた正常なタウ又はPHF-タウのウエスタンブロット検出。レーン1及び2：PHF-タウ（レーン1）、または正常なタウ（レーン2）のクマシーブリリアントブルー染色。レーン3~6：Tau-1モノクローナル抗体（レーン3及び4）又はAT8モノクローナル抗体（レーン5及び6）のいずれかを用いたPHF-タウ（レーン3及び5）又は正常なタウ（レーン4及び6

10

20

30

40

50

) のウエスタブロットニング。

図 3 A、3 B、3 C 及び 3 D :

免疫化学によるタウタンパク質の検出。

図 3 A : アルツハイマー病を患う患者の海馬からの切片、倍率 : 78 ×

図 3 B : 非神経系の原因により死亡した高齢の対照患者の海馬からの切片、倍率 : 78 ×

図 3 C : アルツハイマー病を患う患者の海馬からの切片、倍率 : 245 ×

図 3 D : 非神経系の原因で死亡した高齢対照患者の海馬からの切片、倍率 245 ×

図 4 : ラットの脳からのタンパク質キナーゼ活性を用いてリン酸化され、変化した変異組換え型タウ (クローン ht a u 2 4) の例 5 の免疫プロット分析。免疫プロットは、抗タウ抗体 134 及び AT 8 を用いて行なわれた。レーン : 1、タウ 24 ; 2、タウ 24 + 脳抽出物 ; 3、タウ 24 S 199 A ; 4、タウ 24 S 199 A + 脳抽出物 ; 5、タウ 24 S 202 A ; 6、タウ 24 S 202 A + 脳抽出物 ; 7、タウ 24 S 199 A、S 202 A ; 8、タウ 24 S 199 A、S 202 A + 脳抽出物。

例 I : モノクローナル抗体 AT 8 の調製物 (I g G 1、)

1 . 免疫化用抗原の調製 :

大部分が前頭及び側頭皮質からの灰白質から成る死後組織を、組織学的に確認されたアルツハイマー患者から得た。このアルツハイマー灰白脳試料 (5 ~ 10 g) を、テフロン / ガラス Potter S (ドイツ、Braun社) ホモジナイザーの中で、10 体積の低温緩衝液 H (10 mM の トリス / 1 mM E G T A / 0 . 8 M N a C l / 10 % の ショ糖、pH 7 . 4) で均質化した。4 で 20 分間 27,000 × g で 60 T i M S E ローター内で遠心分離した後、ペレットを除去し、上清を 1 % (重量 / 体積) の N - ラウロシルサルコシン及び 1 % (体積 / 体積) の 2 - メルカプトエタノールに調整し、37 で 2 . 5 時間、ミキサー 820 (Swelab, スウェーデン) 上で回転させながらインキュベートした。上清混合物を 20 で 35 分間 108,000 × g で遠心分離した。ペレットを含む P H F - タウを P B S で穏やかに洗浄し、同じ緩衝液 1 ml 中で最終的に懸濁させた。

抗原調製物を、10 % のドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲルの電気泳動法により評価し、続いてポリクローナルウサギ抗ヒト正常タウ抗血清を用いて、ウエスタンブロットニングによって、免疫プロットを行った。

2 . 免疫プロトコル及び融合手順 :

B a l b / c マウスに対し、完全フロイントアジュバンドの中で 100 μg の部分的に精製された P H F - タウを用いて初回感作 (プライミング) し、その後 3 回 3 週間の間隔をおいて、不完全フロイントの中で同じ抗原 100 μg を用いて追加感作した。融合の 3 日前及び 2 日前に、マウスを 100 μg の P H F - タウ食塩水で追加感作した。

マウスの脾細胞を、P E G 4000 で、Kohler 及び Milstein の改良法 (Kohler, G 及び Milstein, C., 1975) を用いて、S P 2 / 0 細胞と融合させた。

細胞の半分を、30 枚の 96 - ウェルの腹腔内マクロファージ支持プレート上に 1 ウェルあたり 4 . 5 × 10⁴ 脾細胞の密度で懸濁させた。正常なタウ又は P H F - タウに対して特異的なサンドイッチ E L I S A で抗タウ抗体の産生に関して、12 日後にこれらのウェルをスクリーニングした。融合のもう一方の半分を組織培養フラスコ内で 3 日間成長させ、液体窒素内に凍結状態で保存した。20 % のウシ胎児血清、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、L - グルタミン (2 mM)、ペニシリン (100 U / ml)、ストレプトマイシン (100 mg / ml) 及び可欠アミノ酸で補足したダルベッコ修正イーグル培地 (D M E M) により、ハイブリドーマを成長させた。全ての製品は、Gibco, Paisley, U.K. から購入した。細胞を、加湿した 8 % の C O₂ 空気インキュベータ内でインキュベートした。

3 . 抗体スクリーニングのためのサンドイッチ E L I S A :

抗タウモノクローナル抗体の検出のために用いられるスクリーニング E L I S A は、コーティング相にポリクローナルウサギ抗 - ヒトタウ抗体を有するサンドイッチ E L I S A システムであった。この目的のため、ポリクローナルウサギ抗 - ヒトタウ血清を、アフィニティ精製した (例 IV において「ポリクローナルウサギ抗 - タウ抗血清の産生」という題の説明内で記述されている通り)。 (例 IV で「アフィニティ精製されたヒトのタウ」という

10

20

30

40

50

題で記述されている通りに調製された)精製されたヒトの正常なタウを、臭化シアン活性化セファロース(Pharmacia, LKBスウェーデン)を用いたイムノアフィニティカラムの調製のために使用した。このカラムから、pH2.5のクエン酸緩衝液を用いて、親和性結合された抗-タウ分画を溶出させた。中和した後、抗-タウ含有分画をプールし、コーティング緩衝液(10mMのトリス、10mMのNaCl、10mMのNaN₃、pH8.5)を用いて、高結合性マイクロタイタープレート(Nunc, Gibco, Paisley, UK)上で、4で一晚コーティングした(1µg/ml)。非特異的結合を減少させるためPBS中で125µlの10%飽和カゼインで30分間オーバーコーティングさせた後、プレートを100µlの適切に希釈させたPHF-タウ調製物と共に、60分間37でインキュベートした。プレートを3回、PBS-0.05%のTween 20(v/v)で洗浄し、100µlのハイブリドーマ上清を加え、インキュベーションを1時間37で続行した。洗浄の後、ペルオキシダーゼ結合したウサギ抗マウス血清(Dakopatts, Glostrup, デンマーク)を用いて、結合したモノクローナル抗体を検出した。全ての試薬は、10%のカゼインを伴うPBS内で希釈した。最後の洗浄の後、ペルオキシダーゼ基質として、100mMのクエン酸、100mMのリン酸水素二ナトリウム、pH4.3中の100µlの0.42mMの3,5,3,5-テトラメチルベンチジン、0.003%のH₂O₂v/vを加えた。2MのH₂SO₄溶液50µlを用いて反応を停止させた。

450nmでTitertek Multiscan(Flow Laboratories, Eflab, Oy, フィンランド)内で吸光度を読み取った。

ELISAでの、正常なタウとモノクローナル抗体との交差反応性は、PHF-タウの代わりにアフィニティ精製された正常なタウを使用するという点を除いて、スクリーニング検定と同じサンドイッチELISAでテストされた。PHF-タウを特異的に認識するハイブリドーマ分泌抗体を、限界希釈法によってサブクローニングした。AT8抗体を分泌する前記ハイブリドーマを、AT8と呼称する。

例II: ウェスタンブロットティングによるELISAでの、病的タウの検出及び正常なタウの非検出

1. ELISAでの、異常リン酸化タウの検出及びELISA内の正常なタウの非検出; 例Iの第3項において概略的に示したプロトコルに従って、ELISAプレート上でアフィニティ精製されたポリクローナル抗タウ抗体をコーティングし、各々PBSと10%カゼインの溶液中で調製された「アフィニティ精製されたヒトのタウの産生」という題の説明において記述されているようなアフィニティ精製された正常なタウか又はPHF-タウのいずれかの異なる希釈液と反応させた。洗浄の後、一定の濃度のAT8モノクローナル抗体でプレートをインキュベートさせた。これ以降の手順は全て、記述のとおりであった(例I、第3項)。表Iに記す結果は、AT8モノクローナル抗体がPHF-タウのみと反応することを明らかに示している。

10

20

30

表 I . 検出のため A T 8 モノクローナル抗体を用いた E L I S A
での P H F - タウ又は正常なタウの検出

P H F - タウ	A _{150 nm}
1/ 20	1, 459
1/ 200	1, 179
1/2, 000	0. 565
正常なタウ	
1 μ g/ml	0. 021
100ng/ml	0. 005
10ng/ml	0. 001
ブランク	0. 000

検定は、例 I 第 3 項に概略的に記されている通りに行なわれた。表に記されている通り P H F - タウ又は正常なタウのさまざまな希釈液が使用された。

脳ホモジネート内で、A T 8 モノクローナル抗体の反応性パターンも同じく研究された。この目的のため、コーティング緩衝液 (1 0 mM の トリス、1 0 mM の N a C l、1 0 mM の N a N₃、pH 8 . 5) 内の精製された A T 8 モノクローナル抗体 2 μ g/ml を用いて 4 で一晩、高結合性マイクロタイタープレート (Nunc, Gibco, Paisley, UK) をコーティングした。

非特異的結合を減少させるためのオーバーコーティングを、1 2 0 μ l のプロット緩衝液 (5 % w / v の乾燥スキムミルク及び 1 0 % v / v のウシ新生児血清) を用いて行なった。P B S - 0 . 0 5 % Tween 2 0 (v / v) で 3 回洗浄した後、1 0 0 μ l の試料を付加し、3 7 で一時間インキュベーションを行なった。プレートを再度 3 回洗浄し、ウサギ抗 - タウ血清の 1 / 2 , 0 0 0 希釈液 1 0 0 μ l を用いてインキュベートした。次に、プレートを再び三度洗浄した後、プロット緩衝液中で 1 / 2 , 0 0 0 に希釈した 1 0 0 μ l のホースラディッシュペルオキシダーゼが結合したロバの抗ウサギ血清を付加し、インキュベーションを 3 0 分間続行した。プレートを洗浄し、0 . 4 2 mM の 3 , 5 , 3 , 5 - テトラメチルベンチジン、1 0 0 mM のクエン酸中の 0 . 0 0 3 % の H₂O₂ v / v、1 0 0 mM のリン酸水素二ナトリウム、pH 4 . 3 から成る溶液 1 0 0 μ l を基質として付加した。

2 M の H₂S O₄ 溶液 5 0 μ l で反応を停止させた。4 5 0 nm で Titertek Multiscan (Flow Laboratories, Eflab, Oy, フィンランド) 内で吸光度を読み取った。

図 1 から分かるように、4 人のアルツハイマー患者 (A D₁ ~ A D₄) の脳ホモジネートは、2 つの異なる希釈度で陽性反応したのに対し、非神経系疾患で死亡した患者 (C₁ ~ C₄) に由来する脳から調製された抽出物は全て、両方の希釈度で明らかに陰性であった。

2 . ウエスタンブロッティングでの病的タウの検出及び、ウエスタンブロッティングにおける正常なタウの非検出 ;

1 0 % の S D S - ポリアクリルアミドゲルに対して精製された正常なヒトのタウ及び P H F - タウを適用し、Laemmli (1970) に従って変性条件下で行った。

S D S - P A G E の後、冷却しながら、5 5 V で 1 2 0 分間、1 0 mM の N a H C O₃、3 m

10

20

30

40

50

MのNa₂CO₃、pH9.9の中でニトロセルロース(Hybond-C、Amersham、ブリュッセル、ベルギー)へのトランスファーを行なった。プロットイングの後、ニトロセルロースをリン酸緩衝溶液(PBS)と平衡化させ、プロット緩衝液(5%w/vの乾燥スキムミルクおよび10%v/vのウシ新生児血清で補足されたPBS)でタンパク質結合部位をブロックした。プロットイングを受けたタンパク質を、一次抗体としてAT8を用いて4で一晩インキュベートした。PBS-0.05%Tween 20(v/v)で三度洗浄した後、1/3,000の希釈度でホースラディッシュペルオキシダーゼ標識づけされたウサギ抗マウス免疫グロブリン(Dakopatts, Glostrup, デンマーク)を使用し、室温で90分間インキュベートした。全ての抗血清をプロット緩衝液中で希釈した。次にプロットを三回PBS/Tween内で洗浄し、基質溶液(PBS、0.58%w/vの3,3'-ジアミノベンチジン、0.03%v/vのH₂O₂)で発色させ、その後、H₂O中で反応を停止させた。図2に示されている結果は、AT8抗体が64及び68kDaのタウイソ型タンパク質を認識することを示しているものの、正常なタウバンドが染色されない状態にとどまっていることも示している。

10

例III：免疫細胞化学によるタウの検出

数人のアルツハイマー病患者及び年齢を一致させた対照の新皮質、海馬、小脳、橋及び脊髄からのホルマリン定着させた脳組織のパラフィン切片を、1人の対照患者からの抹消神経の切片と共に調製した。

アルツハイマー病患者及び年齢を一致させた対照の脳からのクリオスタット切片も調製した。それぞれDakopatts(デンマーク)及びAmersham(英国)試薬を用いて、ペルオキシダーゼ-抗ペルオキシダーゼ(PAP)技術(Steinberger, L.A. et al., 1970)又はアビジン-ビオチン複合体(ABC)技術(Hsu, S.M. et al., 1981)のいずれかにより、組織を免疫学的に染色した。簡単に言うと、1%のウシ血清アルブミン(BSA)を含むトリス緩衝食塩水(TBS)中で、1:25に希釈された正常なブタの血清(Dakopatts X901)との非特異的相互作用をブロックした後、切片を、TBS/BSAで適切に希釈されたAT8一次抗体を用いて一晩インキュベートした。次に各々30分間ずつ、TBS中での中間水洗を伴って、二次抗体及びペルオキシダーゼ複合体を適用した。色は3,3'-ジアミノベンチジントラヒドロ塩化物(Sigma)で発色した。切片をハリスのヘマトキシリンで対比染色し、脱水しカバーガラスをつけて、光学顕微鏡の下で観察した。

20

図3(A~D)は、AT8が正常な構造を全く装飾せず、NFTの豊富な染色、プラーク内での異栄養性神経突起及び神経網の分散した染色(神経網糸状構造)をもたらすにすぎないということを明確に示している。いくつかの明らかにもつれの無い神経細胞は、拡散した形で染色され、往々にして強い核周囲染色を示していた。

30

例IV：本発明の抗体を用いた既知の抗体のエピトープを特徴づけするための競争的ELISA

ウエル内で4で一晩、アフィニティ精製したウサギの抗ヒトタウポリクローナル抗体をコーティングした。プレートを洗浄し、アフィニティ精製された正常なタウと混合させた100µlの精製された異常にリン酸化されたタウを37で一時間、1ウエル毎に加えた。洗浄後、テストすべき標識付けされていない異ったモノクローナル抗体を50µl、いくつかの希釈度で添加した。その後、「モノクローナル抗体BT2の産生」という題の箇所で記述する通りに得た50µlのビオチニル化されたAT8抗体又はビオチニル化されたBT2抗体を、最大結合の50%を誘発するように予め定められた量で付加した。37で一時間の後、プレートを洗浄し、3,5,3',5'-テトラメチルベンチジンと共に、ELISAの検出を可能にするよう30分間、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ複合体を付加した。2MのH₂SO₄で反応を停止した後、450nmでTitertek Multiscanプレート読取り装置(Flow)内で読みとった。

40

表IIの結果が示すように、BT2抗体は、ビオチニル化されたBT2の結合を阻害し、一方カゼイン又はAT8はこの結合に影響を及ぼさない。逆に言うと、AT8抗体はビオチニル化されたAT8の結合をブロックするが、カゼインもBT2もこの反応を阻害しない。

50

表 II . 既知の抗体のエピトープを特徴づけするための競合的
E L I S A

濃度	BT2-bio			AT8-bio		
	カゼイン	BT2	AT8	カゼイン	BT2	AT8
9 μ g/ml	0.369	0.071	0.369	0.578	0.548	0.056
3 μ g/ml	0.390	0.088	0.375	0.573	0.557	0.054
1 μ g/ml	0.375	0.122	0.368	0.548	0.550	0.059
333ng/ml	0.381	0.179	0.369	0.564	0.556	0.093
111ng/ml	0.385	0.245	0.381	0.576	0.573	0.155
37ng/ml	0.395	0.318	0.360	0.568	0.549	0.282

B T 2 又は A T 8 は、左欄の示された濃度にて使用した。全ての抗体の希釈は、同様にカゼイン対照内でも同じ濃度で用いられたカゼイン内で行なわれた（カゼインと記された欄）。

- ポリクローナルウサギ抗 - タウ抗血清の産生 :

ニュージーランド産白ウサギを、アフィニティ精製したヒトのタウで免疫化した。ウサギに対し、完全フロインドアジュバンド内で乳化した 1 0 0 μ g のアフィニティ精製したヒトのタウを用いて皮内注射をほどこした。2 週間後、不完全フロインド内の 2 0 0 μ g のアフィニティ精製したヒトのタウを用いてこれを筋内に繰返し行ない、1 週間後に 1 0 0 μ g のアフィニティ精製したヒトのタウを用いて3 度目の筋内注射を行なった。ウサギを 3 回目の注射の後 1 週間出血させ、評価をし、さらに一週間の間隔をおいて 2 度、3 回目の注射のために使用したものと同量のタウを用いて注射した。コーティング相にアフィニティ精製したヒトのタウを用いた固相 E L I S A により、及びアフィニティ精製したヒトのタウに対するウエスタンブロットにより、血清を評価した。

- アフィニティ精製したヒトのタウの産生 :

標準的には、5 0 g のヒトの死後の脳をハサミで小片に切断し、テフロンプランジャを備えた Potter ホモジナイザーを用いて緩衝液 A (2 0 mM の (2 - (N - モルフォリノ) エタンサルホン酸)、8 0 mM の N a C l、2 mM の E D T A、0 . 1 mM の E G T A、1 mM の M g C l₂、1 mM のメルカプトエタノール、pH 6 . 7 5) 内で 1 / 1 (w / v) に均質化した。ホモジネートを 1 時間 4 0 0 0 g で遠心分離させ、沸とう水中で上清を 5 分間加熱した後、氷上で 1 0 分間再度冷却した。4 0 0 0 g で 2 時間スラリーを遠心分離し、その後上清を収集した。これを「熱安定性細胞質ゾル抽出物」と呼ぶ。プロテイン G 上で腹水から精製した 1 0 mg の B T 2 抗タウモノクローナル抗体 (Pharmacia, Uppsala, スウェーデン) を、メーカーにより提案された方法に従ってセファロース (Pharmacia) により活性化された 1 グラムの臭化シアンに結合させた。熱安定性細胞質ゾル抽出物 5 0 ml を 0 . 1 M のリン酸緩衝液 pH 8 . 5 の中で 1/2 に希釈し、カラムに適用した。カラムを 0 . 1 M のリン酸塩で洗浄し、t a u を 0 . 1 M のクエン酸 pH 2 . 5 で希釈し、1 M の N a O H で直ちに中和させた。抗タウ抗体を用いた免疫プロットングにおいて 1 0 % の S D S - P A G E 内での分画を評価した。

10

20

30

40

50

- モノクローナル抗体 B T 2 の産生 :
- ・ 抗原の精製 :

ウシのタウ : Lindwall et al. (1984) の過塩素酸法の改良によりウシの脳からタウを精製した。標準的には、50グラムの新鮮な脳をハサミで小片に切断し、テフロンプランジヤを備えた Potter ホモジナイザを用いて緩衝液 A (20 mM の (2 - (N - モルフォリノ) エタンスルホン酸)、80 mM の NaCl、2 mM の EDTA、0.1 M の EGTA、1 mM MgCl₂、1 mM のメルカプトエタノール、pH 6.75) の中で 1 / 1 (w / v) に均質化した。4、150、000 g で 1 時間 ホモジネートを遠心分離させ、上清を沸とう水中で 5 分間加熱し、氷上で 10 分間再度冷却した。スラリーを 4、150、000 g 2 時間遠心分離し、その後上清を収集した。熱安定性細胞質ゾル抽出物を 2.5% の過塩素酸になるようにし、4、150、000 g で 1 時間遠心分離した後、上清を 3 M のトリスで中和させた。次に上清を透析し、centriprep 濃縮器 (Amicon, ローザンヌ、スイス) 内で水中において濃縮させた。以下「ウシ・タウ」と呼ぶ最終産物を、Laemmli の方法 (1970) に従って行なったドデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動法 (SDS - PAGE) において評価した。

- ・ モノクローナル抗ウシタウ抗体の産生 :

完全フロインドアジュバンドの中で精製された 100 μg ウシタウを用いて Balb / c マウスを初回抗原刺激し、2 週間毎に完全フロインドの中で 100 μg のウシタウを用いて 3 回追加抗原投与した。融合の 3 日前と 2 日前に、マウスに、食塩水中の 100 μg のウシタウを用いて再度追加抗原投与した。融合パートナーとして SP2 / 0 骨髄腫細胞を用い、マウスの腹腔内マクロファージ支持細胞上に融合した細胞を播種した。ハイブリドーマの半分を 96 ウェルの場所に播種し、抗タウ抗体産生についてウシタウ上の固相 ELISA により、10 日間スクリーニングした。融合のもう一方の半分は組織プラスチック内で 1 日成長させ、これらの細胞を液体室素内で凍結させて保存した。全てのハイブリドーマは、10% のウシ胎児血清、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、L - グルタミン (2 mM)、ペニシリン (100 U / ml)、ストレプトマイシン (100 μg / ml) 及び可欠アミノ酸で補足したダルベッコの修正イーグル培地 (DMEM) の中で成長させた。製剤は全て、イギリス、Paisley の Gibco 社から購入した。加湿した 8% の CO₂ エアインキュベータ内で 37 で細胞をインキュベートした。ELISA 内での陽性シグナルは、ウシの脳からの熱安定性細胞質ゾルに関して、対照として抗タウ抗体タウ - 2 (Sigma, St. Louis, MO) を用いて、ウエスタンブロットによりテストした。陽性ウェルはサブクロニングし、クローンを液体室素内で凍結した。

例 V : A T 8 エピトープの必須リン酸化部位を決定するための変異組換え型タウタンパク質の発現とリン酸化

タウの 4 反復イソ型タンパク質に相応し、また、イニシエータコドンに関連する N d e I 部位を伴う全長 c D N A クローン (h t a u 2 4) を、M 1 3 m p 1 8 の E c o R I 部位内へサブクロニングした。最長のヒト脳タウイソ型タンパク質の番号づけ (Goedert, M. et al., 1989) (Goedert, M. et al., 1989) されたコドン 199 (S ~ A) 又はコドン 202 (S ~ A) を変更するために部特異的変異誘発を使用した 2 つの構成体を作製し、コドン 199 及び 202 が両方共 A に変更された 3 番目の構成体を作製した。N d e I 及び E c o R I での開裂の後、結果として得られたフラグメントを発現プラスミド p R K 1 7 2 内で T 7 R N A ポリメラーゼプロモータの下流でサブクロニングし、組換え型プラスミドを E. coli B L 2 1 (D E 3) 細胞に形質転換した。記述されている通り (Goedert, M. et al., 1989)、細胞培養を成長させ、誘発させ、収穫した。

500 ml の培養からのペレットを 20 ml の抽出緩衝液 (50 mM の P I P E S、pH 6.8、1 mM の D T T、1 mM の E D T A、0.2 mM の P M S F、0.5 μg / ml のロイペプチン、0.5 μg / ml のペプスタチン) 中で再懸濁させ、Kontes マイクロ超音波細胞破壊機を用いて 2 x 3 分間超音波処理した。遠心分離 (15 分間 15,000 rpm) した後、上清を DE - 5 2 セルロースカラム内に通過させた。抽出緩衝液内で均衡化したホスホセルロースカラム (ベッド体積 3 ml) 上に、流動物を装荷した。抽出緩衝液で徹底的に洗浄した

10

20

30

40

50

後、タンパク質を、0.5 MのNaClを含む抽出緩衝液の3 mlアリコートで1回分ずつ溶離させた。組換え型タウイソ型タンパク質を含む分画をブールし、50 mMのMES、1 mMのDTT、pH6.25に対し一晩透析した。遠心分離の後、高速流カルボキシメチルセファロースHR5/5カラム上に透析物を装荷した。カラムを50 mMのMES、1 mMのDTT、50 mMのNaCl、pH6.25で洗浄し、50 mMのMES、1 mMのDTT、pH6.25中100~300 mM NaClの勾配を用いてタンパク質を溶離した。カラム分画をゲル電気泳動によりスクリーニングし、ピークタウ分画をブールして、40 mMのHEPES、1 mMのDTT、0.2 mMのPMSF、pH7.2において透析した。タンパク質濃度をアミノ酸化合物により決定した。

得られた組換え型タウタンパク質を、脳タンパク質キナーゼ活性を用いて、以下のよう
リン酸化した： 10

成熟したラットの脳を10 mMのトリス/HCl、pH7.4、5 mMのEGTA、2 mMのDTT、1 μ MのOkadaic酸、1 mMのPMSF、20 μ g/mlのロイペプチン、20 μ g/mlのアプロチニン及び20 μ g/mlのペプスタチンの中で均質化し(1 g/2.5 ml)、4で一時間40,000 rpmで遠心分離した。リン酸化のために直接上清を使用した。24時間、37で、40 mMのHEPES、pH7.2、2 mMのAtp、2 mMのMgCl₂、組換え型タウタンパク質(1 μ M)、及びラットの脳抽出物(0.05 ml)を用いてインキュベーションを行ない、次に免疫プロットングのためアリコートを採用した。脳抽出物を削除した点を除いて同一条件下で対照をインキュベートした。

リン酸化した組換え型タウタンパク質のAT8エピトープを免疫プロットにより分析した
。10%又は10~20%のグラジェントミニゲルを用いてSDS-PAGEを行なった 20
。免疫プロットングのため、リン酸化された及びリン酸化されていない組換え型タウタンパク質を、二弗化ポリビニリデン(PVDF)膜にトランスファーし、残留タンパク質結合部位をリン酸緩衝溶液内の1%のゼラチンを用いてブロックした。次に、抗タウ抗血清134(希釈度1:250)(Goedert, M. et al., 1989)及び抗体AT8(希釈度1:500)を用いて室温で5時間、プロットをインキュベートした。結合した抗体を、ピオチン/ペルオキシダーゼシステム(Vectastain)により検出した。

免疫プロットの結果は、少なくともAT8エピトープのSer 202のリン酸化が抗体認識のために必要とされることを示している。

参考文献

30

1. Baudier, J. and Cole, R.D., *J. Biol. Chem.* 262, 17577-17583.
2. Binder, L.I., Frankfurter, A. and Rebhun, L.I., *J. Cell Biol.* 101, 1371-1378 (1985).
3. Bre, M.N. and Karsenti, E., *Cell Motil. Cytoskeleton* 15, 88-98 (1990).
4. Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, H. and Flament-Durand, J., *J. Submicrosc. Cytol.*, 17, 89-96 (1985). 10
5. De Bont, H.B.A., Van Boom, J.H. and Liskamp, R.M.J., *Tetrahedron Lett.* 31, 2497-2500 (1990).
6. Delacourte, A., Flament, S., Dibe, E.M., Hublau, P., Sablonnière, B., Himon, B., Sherrer, V. and Defossez, A., *Acta Neuropathol.* 80, 111- 117 (1990).
7. Flament, S., Delacourte, A., Hémon, B. and Defossez, A., *J. Neurol. Sci.* 92, 133-141 (1989). 20
8. Flament, S., Delacourte, A. and Mann, D.M.A., *Brain Res.* 516, 15-19 (1990).
9. Flament, S. and Delacourte, A., *Nature* 346, 6279 (1990).
10. Ghanbari, H.A., Kozuk, T., Miller, B.E. and Riesing, S., *J. Clin. Laboratory Anal.* 4, 189-192 (1990). 30
11. Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D. and Crowther, R.A., *Neuron* 3, 519-526 (1989).
12. Goedert, M., Spillantini, M.G. and Jakes, R., *Neurosci. Lett.*, 126, 149-154 (1991).
13. Greenberg, S.G. and Davies, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5827-5831 (1990).
14. Harrington, C.R., Edwards, P.C. and Wischik, C.M., *J. Immunol. Methods* 134, 261-271 (1990). 40
15. Himmler, A., *Mol. Cell. Biol.*, 9, 1389-1396 (1989).

16. Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger. H., J. Histochem. Cytochem. 29, 577-580 (1981).
17. Iqbal, K., Zaidi, T., Thompson, C.H., Merz, P.A. and Wisniewski, H.M., Acta Neuropathol. 62, 167-177 (1984).
18. Ishiguro, K., Y. Ihara, T. Uchida and K. Imahori, J. Biochem. 104, 319-321 (1988).
19. Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Binder, L., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y. and Lee, G., Neuron., 1, 817-825 (1988). 10
20. Kosik, K.S., Crandall, J.E., Mufson, E. and Neve, R.L., Ann. Neurol. 26, 352-361 (1989).
21. Ksiezak-Reding, H., Dickson, D.W., Davies, P. and Yen, S.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3410-3414 (1987).
22. Ksiezak-Reding, H., Davies, P. and Yen, S.H., J. Biol. Chem., 263, 7943-7947 (1988). 20
23. Ksiezak-Reding, H., Chien, C.H., Lee, V.M.Y. and Yen, S.H., J. Neurosci. Res., 25, 412-419 (1990).
24. Köhler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497 (1975).
25. Laemmli, U.K. Nature 227, 680-685 (1970).
26. Lee, G., Cowan, N. and Kirschner, M., Science, 239, 285-288 (1988). 30
27. Lee, V.M.Y., Balin, B.J., Otvos, L. and Trojanowski, J.Q., Science, 251, 675-678 (1991).
28. Mehta, P.D., Thal, L., Wisniewski, H.M., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K., The Lancet, July, 35-(1985).
29. Mercken, M., Vandermeeren, M., Lübke, U., Six, J. Boons, J., Vanmechelen, E., Van de Voorde A. and Gheuens, J., J. Neurochem., in press. 40
30. Nukina, N., Kosik K.S. and Selkoe, D.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3415-3419 (1987).
31. Nukina, N., Kosik K.S. and Selkoe, D.J., Neurosci. Lett 87, 240-246 (1988).

32. Perry, G., Mulvihill, P., Fried, V.A., Smith, H.T., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K., J. Neurochem. 52, 1523-1528 (1989).
33. Steinberger, L.A., Hardy, P.H., Cuculis, J.J. and Meyer, H.G., J. Histochem. Cytochem. 18, 315-333 (1970).
34. Steiner, B., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Gustke, N., Meyer, H.E., Schmidt, B., Mieskes, G., Soling, H.D., Drechsel, D., Kirschner, M.W., Goedert, M. and Mandelkow, E., The EMBO Journal 9, 3539-3544 (1990). 10
35. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979).
36. Vallee, R.B., J. Cell Biol., 92, 435-442 (1986).
37. Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y. and Kirschner, M.W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1868-1862 (1975). 20
38. Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W. and Crowther, R.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4884-4888 (1988).
39. Wisniewski, H.M., Mehta, P.D., Kim, K.S. and Merz, G.S., Biological Markers of Alzheimer's Disease., Boller, Katzman, Rascol, Signoret & Christian eds., 23-29 (1989). 30
40. Wolozin, B. and Davies, P., Ann. Neurol. 22, 521-526 (1987).
41. Wolozin, B.L., Pruchnicki, A., Dickson, D.W. and Davies, P., Science 232, 648-650 (1986).
42. Lindwall, G. and Cole, R.D. (1984). The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. J. Biol. Chem. 259, 12241-12245. 40

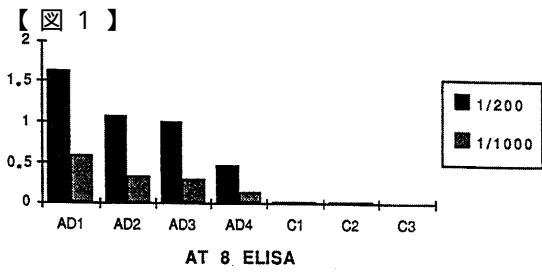


Figure 1

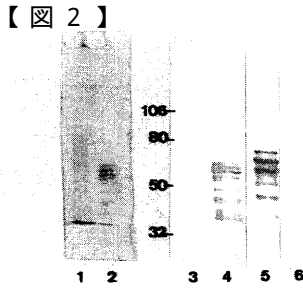


Figure 2

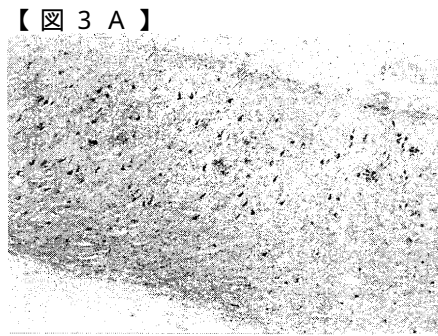


Figure 3A

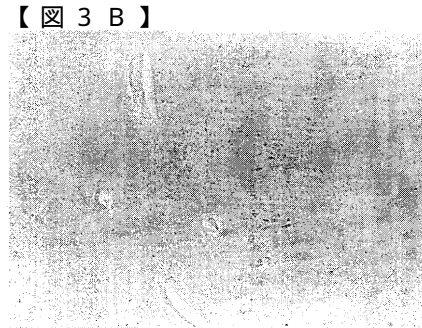


Figure 3B

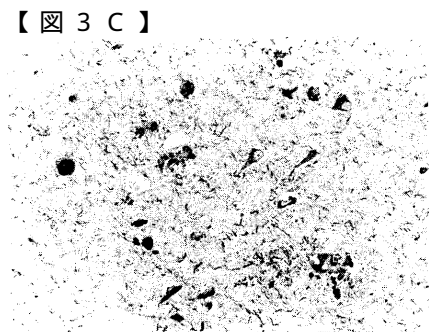


Figure 3C

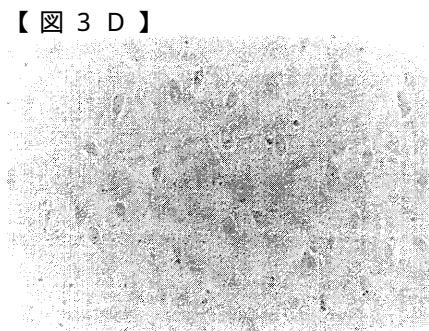


Figure 3D

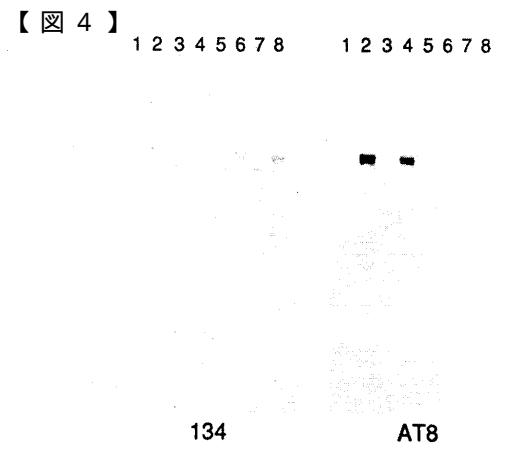


Figure 4

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 R 1:91

早期審査対象出願

- (72)発明者 マーケン, マーク
アメリカ合衆国、0 2 1 4 3 マサチューセッツ、サマービル、ダーラムストリート 5エー
- (72)発明者 マンデルコウ, エヴァ - マリア
ドイツ連邦共和国、デー - 2 0 0 0 ハンブルグ 5 2、パロン - フォークト - シュトラッセ
2 1 2 アー
- (72)発明者 ファンデルメーレン, マルク
ベルギー国、ベ - 2 4 4 0 ヘール、アルマン・ブルードム・ストラート 1 0
- (72)発明者 ファンメヘレン, エーヘーン
ベルギー国、ベ - 9 8 1 0 ナザレット - エケ、テン・エデストラート 1 0 1
- (72)発明者 ファン・デ・フォールデ, アンドレ
ベルギー国、ベ - 9 1 6 0 ローケレン、フレンストラート 2 2

合議体

審判長 種村 慈樹

審判官 鈴木 恵理子

審判官 高堀 栄二

- (56)参考文献 Science (1991) Vol. 251, No. 4994, p. 675 - 678
Journal of Neuroscience (1990) Vol. 25, No. 3, p.
420 - 430
FEBS Letters (1990) Vol. 272, No. 1 - 2, p. 65 - 68
EMBO Journal (1989) Vol. 8, No. 2, p. 393 - 399