

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 503314

(P2003 - 503314A)

(43)公表日 平成15年1月28日 (2003.1.28)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 4
1/113		1/113	4 H 0 4 5
1/22		1/22	
16/42		16/42	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 61数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 505565(P2001 - 505565)

(86) (22)出願日 平成12年6月16日 (2000.6.16)

(85) 翻訳文提出日 平成13年12月17日 (2001.12.17)

(86) 国際出願番号 PCT/US00/16593

(87) 国際公開番号 W000/078807

(87) 国際公開日 平成12年12月28日 (2000.12.28)

(31) 優先権主張番号 09/334,582

(32) 優先日 平成11年6月16日 (1999.6.16)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 モレキュウラー ジェリアトリクス コーポレイション
アメリカ合衆国 イリノイ州 60061 ヴァーノン ヒルズ スイート 111 レイクビュー パークウェイ 50

(72)発明者 ジンコウスキー、 レイモンド ピー .
アメリカ合衆国 イリノイ州 60062 ノースブルック チェスナット ロード 101

(72)発明者 カークマン、 ダニエル ジョセフ
アメリカ合衆国 イリノイ州 60046 レイク ヴィラ クレミン ドライブ 21

(74)代理人 弁理士 三好 秀和 (外 1 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の精製抗原およびそれを獲得および使用する方法

(57) 【要約】

アルツハイマー病抗原 (A 6 8) を含む調製物、この精製抗原を獲得する方法、および、この精製抗原を、例えば、アルツハイマー病の診断に、およびアルツハイマー病抗原に対するヒト自己抗体の検出に使用する方法を開示する。本発明に記載の抗原調製物は、それが実質的に免疫グロブリン G を含まないという点で精製されている。本発明はさらに、組換えヒトタウ、ヒトを含む様々な種から単離されたタウ、およびリン酸化組換えヒトタウまたは単離タウ、並びに、A 6 8 抗イディオタイプ抗体などの、A 6 8 抗原調製物の代わりにまたはそれと共に (例えばアルツハイマー病の診断に) 使用できる、アルツハイマー病抗原を製造する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ATCC番号HB9205として同定されたハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と免疫的に反応性である抗原から実質的になるタンパク質調製物であって、前記調製物は実質的に免疫グロブリンGを含まない、前記タンパク質調製物。

【請求項2】 前記調製物は、前記調製物の総タンパク質の約0.05%以下の量の免疫グロブリンGを有する、請求項1に記載のタンパク質調製物。

【請求項3】 前記調製物は、前記調製物の総タンパク質の約0.0015%以下の量の免疫グロブリンGを有する、請求項1に記載のタンパク質調製物。

【請求項4】 前記調製物は、前記抗原1 μ gあたり、約500pg未満の免疫グロブリンGを有する、請求項1に記載のタンパク質調製物。

【請求項5】 前記調製物は、前記抗原1 μ gあたり、約15pg未満の免疫グロブリンGを有する、請求項1に記載のタンパク質調製物。

【請求項6】 抗原から実質的になるタンパク質調製物であって、前記調製物は、アルツハイマー病の診断マーカーであり、前記抗原は、

(a)還元形または非還元形で約6の等電点を有し；

(b)affi-Blueカラムに結合し；

(c)pH6.8の0.01Mリン酸ナトリウム、0.14M塩化ナトリウムおよび1mMフェニルメチルスルホニルフルオリドの溶液に少なくとも50%可溶性であり、4の50%飽和硫酸アンモニウムに沈降し；

(d)ATCC番号HB9205として同定されたハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と免疫的に反応性であり；そして

(e)実質的に免疫グロブリンGを含まない、

主要なペプチド種を含む、前記タンパク質調製物。

【請求項7】 前記調製物は、前記調製物の総タンパク質の約0.05%以下の量の免疫グロブリンGを有する、請求項6に記載のタンパク質調製物。

【請求項8】 前記調製物は、前記調製物の総タンパク質の0.0015%以下の量の免疫グロブリンGを有する、請求項6に記載のタンパク質調製物。

【請求項9】 前記調製物は、前記抗原1 μ gあたり、500pg未満の免

疫グロブリンGを有する、請求項6に記載のタンパク質調製物。

【請求項10】 前記調製物は、前記抗原1 μ gあたり、15pg未満の免疫グロブリンGを有する、請求項6に記載のタンパク質調製物。

【請求項11】 請求項1に記載のタンパク質調製物を獲得するプロセスであって、前記プロセスは、

- (a) 前記抗原を含む皮質脳組織の試料を獲得し；
- (b) 前記試料を緩衝液中でホモジナイズして、ホモジネートを得；
- (c) 前記ホモジネートから粒状物質を取り出し；
- (d) 前記抗原と抗体が抗原 - 抗体複合体を形成する条件下で、前記ホモジネートを前記抗体と接触させることにより、前記ホモジネートから前記抗原を取り出し；
- (e) 前記抗原 - 抗体複合体から前記抗原を溶出し；そして
- (f) 溶出液から免疫グロブリンGを除去して、前記タンパク質調製物を獲得することを含む、前記プロセス。

【請求項12】 前記免疫グロブリンGは、前記タンパク質調製物を、(a) プロテインA；(b) プロテインG；(c) プロテインAおよびプロテインGの両方；または(d) 実質的に(c)に等価である免疫グロブリンG除去法を用いて、インキュベートすることにより除去する、請求項11に記載のプロセス。

【請求項13】 ATCC番号HB9205として同定されたハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と免疫的に反応性である抗原から実質的になる調製物を獲得するプロセスにおいて、改良は、抗原調製物から免疫グロブリンGを除去して、実質的に免疫グロブリンGを含まない調製物を獲得することを含む、前記プロセス。

【請求項14】 アルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する方法であって、

- (a) 請求項1に記載のタンパク質調製物および前記自己抗体の存在について試験する試料を獲得し；
- (b) ゲル上で前記タンパク質調製物を電気泳動し；
- (c) 前記タンパク質調製物を膜に転写し；

(d) 前記膜を、自己抗体の存在について試験する試料と接触させ、よって抗原 - 自己抗体複合体が形成でき；そして

(e) 前記複合体の形成により前記自己抗体を検出することを含む、前記方法。

【請求項15】 前記試料は、脳脊髄液、脳組織ホモジネート / 抽出物、尿、および血液からなる群から選択する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 アルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する方法であって、

(a) 請求項1に記載のタンパク質調製物を獲得し；

(b) 前記タンパク質調製物を、前記自己抗体の存在について試験する試料と接触させ、よって、抗原 - 自己抗体複合体が形成でき；そして

(c) 前記複合体の形成により前記自己抗体を検出することを含む、前記方法。

【請求項17】 前記自己抗体の存在は、前記複合体の存在により決定する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 前記複合体の量を測定し、前記自己抗体の量は、前記複合体の量により決定する、請求項16に記載の方法。

【請求項19】 前記試料は、脳脊髄液、脳組織ホモジネート / 抽出物、尿および血液からなる群から選択する、請求項16に記載の方法。

【請求項20】 前記自己抗体は、固体マトリックスに付着している、請求項16に記載の方法。

【請求項21】 前記複合体を、自己抗体またはタンパク質調製物上に見出される抗原性決定基と免疫的に反応性である抗体と接触させ、よって、抗原 - 抗体または抗体 - 自己抗体複合体を形成する段階をさらに含む、請求項16に記載の方法。

【請求項22】 アルツハイマー病罹患患者に存在する自己抗体に結合できるタンパク質を製造する方法であって、前記方法は、組換えタウまたはその誘導体をリン酸化することを含む、前記方法。

【請求項23】 前記リン酸化は、所望によりホスファターゼ阻害剤で処理しておいた中枢神経系細胞から調製した細胞抽出物を使用して実施する、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記リン酸化は、PKA、GSK、cdc2、cdc25、カゼインキナーゼIおよびII、MAPキナーゼおよびPHFキナーゼからなる群から選択する、精製または部分精製キナーゼを使用して実施する、請求項22に記載の方法。

【請求項25】 アルツハイマー病罹患患者に存在する自己抗体に結合できるタンパク質を製造する方法であって、前記方法は、

(a) 前記自己抗体に結合できないタンパク質を、ヒペリシン、カルフォスチンCまたは類似物で処理するか；または

(b) 前記自己抗体に結合できないタンパク質を、遊離脂肪酸で処理するか；または

(c) 前記自己抗体に結合できないタンパク質を、ヒドロキシノネナルまたは他の進んだ糖化最終生成物で処理するか；または

(d) 上記の組合せを含む、前記方法。

【請求項26】 処理は、不飽和遊離脂肪酸を用いる、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 処理は、進んだ糖化最終生成物を用い、前記の進んだ糖化最終生成物は脂質過酸化生成物4-ヒドロキシ-2-ノネナルである、請求項25に記載の方法。

【請求項28】 A68抗原に対して指向された抗体と免疫的に反応性である、モノクローナル抗体。

【請求項29】 A68抗原に対して指向された抗体と免疫的に反応性である抗体を獲得する方法であって、前記方法は、

(a) 高力価の抗A68自己抗体を有する個体から血清を獲得し、合わせてプールを創製し；前記プールから抗体を単離するか、

または、A68抗原に対する単離モノクローナル抗体を得；

(b) マウスを、前記単離抗体で免疫化し；

(c) 前記マウスから血清を獲得し；そして

(d) 前記血清を試験して、A68抗原に対して指向されたモノクローナル抗体または血清自己抗体と免疫的に反応性である、高レベルの抗体を有するマウスを

同定することを含む、前記方法。

【請求項30】 (a) A68抗原に対して指向されたモノクローナル抗体または血清自己抗体と免疫的に反応性である、高レベルの抗体を有する前記マウスの脾臓を獲得し；

(b) 前記脾臓を骨髓細胞と融合し、組織培養プレートにプレATINGし；

(c) HAT耐性により融合細胞を選択し；そして

(d) 前記融合細胞を、A68抗原に対して指向されたモノクローナル抗体または血清自己抗体と免疫的に反応性である抗体の産生について試験することをさらに含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 前記融合細胞を、A68抗原と反応しないモノクローナル抗体または血清自己抗体と免疫的に反応性ではない抗体の産生について試験することをさらに含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】 アルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する方法であって、

(a) 請求項1に記載のタンパク質調製物、ウシ微小管結合タンパク質調製物、および前記自己抗体の存在について試験する試料を獲得し；

(b) 前記タンパク質調製物および前記ウシ微小管結合タンパク質調製物を、ゲル上の別々のレーンで電気泳動し；

(c) 前記の電気泳動したタンパク質調製物および前記ウシ微小管結合タンパク質調製物を、膜に転写し；

(d) 前記膜を、前記自己抗体の存在について試験する試料と接触させ、よって、自己抗体複合体は、前記タンパク質調製物中に存在する抗原および/または前記ウシ微小管結合タンパク質調製物中に存在する抗原を用いて形成でき；そして

(e) 前記自己抗体を、前記複合体(群)の形成により検出することを含む、前記方法。

【請求項33】 アルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する方法であって、

(a) 請求項1に記載のタンパク質調製物およびウシ微小管結合タンパク質調製物を獲得し；

(b) 前記タンパク質調製物または前記ウシ微小管結合タンパク質調製物を、自己抗体の存在について試験する試料と接触させ、よって抗原 - 自己抗体複合体を形成でき；そして

(c) 前記自己抗体を、前記複合体の形成により検出することを含む、前記方法。

【請求項34】 前記自己抗体の存在は、前記複合体の存在により決定する、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 前記複合体の量を測定し、前記自己抗体の量は、前記複合体の量により決定する、請求項33に記載の方法。

【請求項36】 前記試料は、脳脊髄液、脳組織ホモジネート / 抽出物、尿および血液からなる群から選択する、請求項33に記載の方法。

【請求項37】 前記タンパク質調製物またはウシ微小管結合タンパク質調製物は、固体マトリックスに付着している、請求項33に記載の方法。

【請求項38】 患者の生体試料からアルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する方法であって、

(a) 数個のタンパク質の凝集物から実質的になるタンパク質調製物を電気泳動し、ここで、前記凝集物の主な種は、還元SDSゲル上で約68,000ダルトンの分子量を有するリン酸化タンパク質であり、前記凝集物は、ATCC番号HB9205として同定されたハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と免疫的に反応性であり、前記調製物は、ゲル上で実質的に免疫グロブリンGを含まず；

(b) 前記の電気泳動したタンパク質調製物を膜に転写し；

(c) 前記の膜を、前記自己抗体の存在について試験する生体試料と接触させ、よって抗原 - 自己抗体複合体を形成でき；そして

(d) 前記自己抗体を、前記複合体の形成により検出することを含む、前記方法。

【請求項39】 患者の生体試料からアルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する方法であって、

(a) 数個のタンパク質の凝集物から実質的になる第一タンパク質調製物、ここ

で、前記凝集物の主な種は、還元SDSゲル上で約68,000ダルトンの分子量を有するリン酸化タンパク質であり、前記凝集物は、ATCC番号HB9205として同定されたハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と免疫的に反応性であり、前記調製物は、実質的に免疫グロブリンGを含まない、並びに、ウシ微小管結合タンパク質調製物を含む第二タンパク質調製物を、ゲル上の別々のレーンで電気泳動し；

(b) 電気泳動した第一および第二タンパク質調製物を、膜に転写し；

(c) 前記の膜を、前記自己抗体の存在について試験する試料と接触させ、よって、自己抗体複合体が、前記の第一および/または第二タンパク質調製物に存在する抗原を用いて形成でき；そして

(d) 前記自己抗体複合体を検出することを含み、ここで、第一タンパク質調製物の自己抗体複合体は、第二タンパク質調製物の自己抗体複合体のものとは異なり、その差異により患者のアルツハイマー病の存在が示唆される、前記方法。

【請求項40】 患者の生体試料からアルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する方法であって、

(a) 数個のタンパク質の凝集物から実質的になる第一タンパク質調製物、ここでの前記凝集物の主な種は、還元SDSゲル上で約68,000ダルトンの分子量を有するリン酸化タンパク質であり、前記凝集物は、ATCC番号HB9205として同定されたハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と免疫的に反応性であり、前記調製物は、実質的に免疫グロブリンGを含まない、または、ウシ微小管結合タンパク質調製物を含む第二タンパク質調製物を、生体試料と接触させ、よって抗原-自己抗体複合体を形成でき；そして

(b) 前記自己抗体を、前記複合体の形成により検出することを含み；

ここで、自己抗体と第一タンパク質調製物の間に形成された複合体は、自己抗体と第二タンパク質調製物の間に形成された複合体とは異なり、その差異により患者のアルツハイマー病の存在が示唆される、前記方法。

【請求項41】 タンパク質は、所望によりリン酸化された正常タウまたは所望によりリン酸化された組換えヒトタウである、請求項25に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、アルツハイマー病抗原(A68)を含む調製物、この精製抗原を得る方法、および、この精製抗原調製物を、例えばアルツハイマー病の診断に使用する方法に関する。本発明に記載の抗原調製物は、実質的に免疫グロブリンGを含まないという点で精製されている。本発明はさらに、組換えヒトタウ、ヒトを含む様々な種から単離されたタウ、およびリン酸化組換えヒトタウまたは単離タウ、並びに、A68抗イディオタイプ抗体などの、A68抗原調製物の代わりにまたはそれと共に(例えばアルツハイマー病の診断に)使用できる、アルツハイマー病抗原を製造する方法に関する。

【0002】

(関連分野の記載)

アルツハイマー病(AD)は、65歳以上の人口の7%が罹患している進行的な神経変性疾患であり、知的機能の進行的な消失により臨床的に、大脳皮質からのニューロンの連続的な消失により病理学的に特徴づけられる。この病理学的機能障害は、通常、新皮質中の神経突起斑の数の増加、および、コリン作動性ニューロンのシナプス前部のマーカーの減少に関連している。神経突起斑は、変性した軸索および神経終末、並びに、可能性あるアストロサイト様の要素からなり、これらの斑は、中心にアミロイド・コアを示すことが多い。

【0003】

アルツハイマー病の別の特徴的な病理特性は、神経原線維濃縮体の発達である。神経原線維濃縮体は、正常な中間フィラメントおよび異常な特性を有する二重らせん状フィラメント(これがねじれて濃縮体を形成する)からなる神経細胞内の塊である。神経原線維濃縮体は、数個の異なるタンパク質からなる。

【0004】

神経化学的研究により、神経伝達系が、アルツハイマー病により有害な影響を受けることが確認された。最も一貫的かつ重度に影響を受ける系は、マイネルト

の基底核に位置するコリン作動性ニューロンの神経伝達系である。さらに、ソマトスタチン、サブスタンスP、および副腎皮質ホルモン放出因子の減少も観察される。

【0005】

神経化学的变化、神経突起斑または神経原線維濃縮体などの上記の病状はいずれもアルツハイマー病に独特なものではない。これらの機能障害は、正常な高齢の個体の脳にも生じ、グアム・パーキンソン病、拳闘家痴呆、進行性核上麻痺などの他の疾病にも関連している。例えば、濃縮体を形成し神経突起斑を充填する、ねじれたフィラメントである二重らせん状フィラメントは、特定の他の疾病でも生じる。事実、免疫学的研究により、二重らせん状フィラメントのADエピトープが、ピック病に罹患した脳の側頭皮質の罹患ニューロンに見られる球状構造であるピック小体に存在することが示された。さらに、アルツハイマー病患者の脳皮質内の神経原線維濃縮体および神経突起斑の密度は、病気の段階と弱くしか関連していない。

【0006】

従って、アルツハイマー病の診断は、極めて難しい。この疾病の存命中の診断は、主に、他の疾病の排除により実施される。Medical Research Reviews、第3巻、第3号、221~236項(1983)のPeter Daviesによる「アルツハイマー病および老年性痴呆の神経化学」と題した文献は、アルツハイマー病を考察し、223項で以下のように述べている：

アルツハイマー病の診断における問題は、確信的な試験が全くないことである：臨床医は、卒中、微小血管疾患、脳腫瘍、甲状腺機能不全、薬物反応、重度のうつ病、および、高齢の人々の知的欠陥を引き起こし得る多くの他の容態といった痴呆の他の原因を除外しなければならない。これらの全ての問題が症状の原因として消去された場合にのみ、アルツハイマー病という診断が許可されるべきである。

【0007】

アルツハイマー病の存命中の診断は、特殊な染色技術を使用した、脳組織中の

神経突起斑および濃縮体の数の決定に基づいている。しかし、神経組織病理学的研究に基づいたこのような診断法には、数個の脳切片の徹底的な染色および顕微鏡検査が必要である。さらに、斑および濃縮体は、アルツハイマー病を有する個体に限定されず、正常な高齢の個体または他の疾病に罹患した個体の脳にも存在し得る。従って、診断を実施するための決定的かつ信頼性のある方法が必要である。

【0008】

Glennerrらに発行された米国特許第4,666,829号は、アルツハイマー病に特異的な抗原を同定する試みを開示している。しかし、Glennerrらにより記載された抗原は、アルツハイマー病を有さない高齢の成人にも存在する(Ghanbariら、Journal of the American Medical Association、263、2907~2910項(1990)参照)。それ故、他の疾病または加齢の徴候とは異なるとして、アルツハイマー病を診断する方法が依然として必要である。

【0009】

同様に、Voorheisらに発行された米国特許第5,492,812号は、患者の血液中のタウペプチドをスクリーニングすることにより実施される、アルツハイマー病の診断法を開示している。この方法は、タウタンパク質のアミノ末端の200アミノ酸またはカルボキシ末端の50アミノ酸から得られた、タウペプチドに特異的に結合する、抗体またはFab断片の使用を必要とする。この方法は、「様々なタウタンパク質の200アミノ酸N末端残基の全部、並びに、50アミノ酸の大半のC末端残基のいくつかの部分が、罹患ニューロンの変性および破壊中にユビキチン認識プロテアーゼまたは他のプロテアーゼによりフィラメントから切断されると、遊離されるであろう」ことを必要とする(5列、12~19行)。この方法はさらに、切断されたセグメントが、脳外の体液に入ることを必要とする(5列、19~22行)。従ってこの方法は、タウタンパク質複合体のタンパク質分解的断片化に依存し、それが行なわれなければ無効である。この方法はさらに、その後タンパク質分解断片が体液に放出されることに依存し、それが行なわれなければ無効である。従って、アルツハイマー病関連抗原を

直接的にアッセイする手段、特に、タンパク質分解的断片化およびその後の血流への断片の放出を必要としない手段が同定されることが望ましい。

【0010】

これらの方針に沿って、GhanbariらのPCT国際特許出願WO96/20218号は、アルツハイマー病関連抗原、および、この抗原に対して指向されるモノクローナル抗体の単離を記載している。この抗原は、アルツハイマー病に特異的であり、アルツハイマー病患者に大量に存在し、アルツハイマー病でない患者にはほとんど検出されない。しかし、この抗原は、Ghanbariらの調製において単に「部分的に精製」されており、主要タンパク質が約68,000ダルトンの分子量を有するタンパク質凝集物からなり、タウおよび超リン酸化タウを含むものとして記載されている（例えば、Ghanbariらの実施例2参照）。従って、いくつかの適用において、より精製されたこのアルツハイマー病抗原の調製物が望ましいおよび/または必要であり得る。

【0011】

それ故、本発明は、とりわけ、アルツハイマー病抗原の精製調製物を提供する。それはまた、とりわけ、精製調製物を使用してアルツハイマー病を診断する方法も提供する。それはさらに、アルツハイマー病抗原の精製調製物を得る方法も提供する。本発明のこれらおよび他の態様および利点、並びに、追加の本発明の特徴は、本明細書に提供した本発明の記載から明らかであろう。

【0012】

（発明の概要）

本発明は、とりわけ、アルツハイマー病抗原（A68）を含む調製物、並びに、この精製抗原（Ag）を獲得する方法、および、精製Agを、例えば、アルツハイマー病（AD）の診断に使用する方法を提供する。このAgは、実質的に免疫グロブリン（IgG）を含まない点で精製されている。本発明は、さらに、組換えヒトタウ、ヒトを含む様々な種から単離されたタウ、およびリン酸化組換えヒトタウまたは単離タウ、並びに、A68抗イディオタイプ抗体（Ab）などの、A68の代わりにまたはそれと共に（例えばAD自己抗体の結合に）使用できるAD抗原を製造する方法も提供する。本発明はさらに、A68に対して指向さ

れる自己抗体とのその反応性を増強する、これらの抗原の処置も記載する。これらの処置は、ヒペリシン、遊離脂肪酸および/またはヒドロキシノネナルまたは他の進行した糖化最終生成物での処理を含む。

【0013】

本発明はまた、ADを診断するために、ウシ微小管結合タンパク質調製物(MAPf)を使用する方法を記載する。本発明は、A68およびMAPfの両方との自己抗体の反応性の解析を記載し、これらの反応性の定量的または定性的解析により、ADの診断が提供される。

【0014】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

「アルツハイマー病を有する個体」により、この疾病に罹患している、またはこの疾病により影響を受けている、またはこの疾病の臨床症状を顕現している、個体または患者を意味する。本発明によると、「アルツハイマー病」の診断は、許容された臨床診断標準に基づく。好ましくは、本発明に従ってアルツハイマー病と診断された個体は、一般的に許容されているアルツハイマー病診断基準のほとんど(すなわち大半)に合致する個体である。望ましくは、特定の非定型的な特徴のために、かかる個体は、「アルツハイマー病の可能性」と医師は記載し得、これらの個体の少なくとも75%から85%が、検死解剖でアルツハイマー病に罹患していることが判明するだろう。さらにより好ましくは、本発明に従ってアルツハイマー病と診断された個体は、利用可能なアルツハイマー病診断の最善の臨床基準に合致する個体であり、医師は「推定アルツハイマー病」と記載し得る。かかる診断が当業者によりなされる場合、最適にはこれらの患者の約90%が、検死解剖でアルツハイマー病であることが判明するだろう。

【0015】

アルツハイマー病抗原調製

本発明は、とりわけ、A68と称されるアルツハイマー病抗原に関する。この抗原は、アルツハイマー病患者の脳および脳脊髄液(CSF)から得られると記載されてきたが、本明細書では、抗原が本明細書に示した特性を有するならば、ヒトのどの部位で見出されるかに関わらず、「アルツハイマー病抗原」と称する

。1つのかかるアルツハイマー病抗原はタンパク質であり、よって、アルツハイマー病抗原は、タンパク質特性が考察において顕著な因子である場合には、「アルツハイマータンパク質」と本明細書で称する。アルツハイマー抗原と免疫的に反応性である自己抗体は、本明細書では、「アルツハイマー抗体」と称する。アルツハイマー病抗原はまた、以下にさらに記載したような、抗原に対して指向された抗体との反応性を増加するように修飾された、この抗原を含む調製物の成分も意味する。

【0016】

「A68抗原の部分精製調製物」としてのアルツハイマー病抗原の同定、単離および特徴づけは、PCT国際特許出願番号WO96/20218号に記載されている（例えば、特に実施例2並びにこの文書の残り、これ全体を本明細書に参考として援用する）。特に、PCT国際特許出願番号WO96/20218号は、正常個体および他の障害を有する個体と比較して、アルツハイマー病患者（実施例2A、実施例8参照）にこの抗原が限定されていることを記載する。一般に、アルツハイマー抗原は、アルツハイマー患者に見出されるが、他の神経疾患に罹患している患者を含む、アルツハイマーではない患者にも、はるかに低い（または測定不可能な）量で存在する。

【0017】

本明細書に記載した抗原は、アルツハイマー病（すなわちアルツハイマー病抗原）に関連し、数個のタンパク質を含み、主要タンパク質種は、還元SDSゲル上で約68,000ダルトンの見かけの分子量を有する。抗原は、約60から約70kDaの見かけの M_r で、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル上でバンドまたはバンド群として電気泳動で移動する。抗原は、望ましくは、ヒト脳（典型的には凍結）から調製され、アルツハイマー病患者の脳皮質から調製されることが最も多い。抗原の他の特徴は、PCT国際特許出願番号WO96/20218号に示され、以下の特徴を含むがこれに限定されない：ATCC番号HB9205として同定されたハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体（すなわちALZ-50、以下にさらに記載）と免疫的に反応性である；還元または非還元形で約6の等電点を有する：0.01Mリン酸ナトリウ

ム溶液に少なくとも50%可溶性である；pH6.8の0.01Mリン酸ナトリウム、0.14M塩化ナトリウムおよび1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド溶液に少なくとも50%可溶性で、4の50%飽和硫酸アンモニウムに沈降する。

【0018】

それが最初に記載されて以来、アルツハイマー病抗原は、さらに、A68、超リン酸化タウ(Leeら、Science 251:675~678、1991)、異常リン酸化タウ(Grundke-Iqbalら、Proc.Natl.Acad.Sci.83:4913~4917、1986)、可溶性PHF(GreenbergおよびDavies、Proc.Natl.Acad.Sci.87:5827~5831、1990)、PHFタウ(Greenbergら、J.Biol.Chem.267:564~569、1992)およびアルツハイマー病関連タンパク質(ADAP)(Ghanbariら、JAMA 263:2907~2910、1990)と称されている。

【0019】

本発明は、A68などのアルツハイマー抗原を含むタンパク質調製物に関する。正常タウに比べて、アルツハイマー抗原、例えばA68は、超リン酸化されており、変化したコンフォメーションを示す。

【0020】

本発明の目的のために、A68は、一般に、超リン酸化形のタウを含むタンパク質調製物を意味し、これは、アルツハイマー病において、二重らせん状フィラメントの主なタンパク質構成成分である。より特定すると、A68、「A68抗原」および「A68タンパク質調製物」は、少なくとも超リン酸化された形のタウを含み、特記しない限り、実質的にIgGを含まない、タンパク質調製物を意味する。Voohesis(米国特許第5,492,812号)により記載され使用された正常なタウと異なり、アルツハイマー抗原であるA68および超リン酸化タウは、正常個体、すなわち、アルツハイマー病を有さない個体では測定できない。

【0021】

PCT国際特許出願WO96/20218号の実施例1は、A68の「部分精製」形を記載する(すなわち「WO96/20218 A68」)。驚くべきことに、WO96/20218号の部分精製A68は、かなりの量の免疫グロブリンG(IgG)を含むことが発見された。続いて、かかるIgGの除去により、かなりかつ驚くべきことに、前記したA68タンパク質調製物の効力、および、アッセイでの使用における効力は増加することが判明した。

【0022】

本発明は、ATCC番号HB9205として同定されたハイブリドーマ細胞系により産生されたモノクローナル抗体(すなわちAlz-50)と免疫的に反応性である、抗原(すなわちA68)から実質的になる、タンパク質調製物を提供し、ここでの調製物は、実質的に免疫グロブリンGを含まない。本明細書に使用したような「実質的に免疫グロブリンGを含まない」は、好ましくは調製物に存在する総タンパク質の約0.05%以下である、さらにより好ましくは調製物に存在する総タンパク質の約0.0015%以下である量の免疫グロブリンG、および/または、望ましくは抗原1 μ gあたり約500pg未満の免疫グロブリンG(すなわち、A68の量を、Alz-50抗体を使用してウェスタン解析により、または他の適切な手段により評価する)、最適には抗原1 μ gあたり約15pg未満の免疫グロブリンGである総免疫グロブリン量を有する調製物を意味する。特に、実質的に免疫グロブリンGを含まないにより、望ましくは、本発明のアッセイに干渉しない免疫グロブリンレベルを意味する。

【0023】

さらに、本発明は、望ましくは、免疫グロブリンGを実質的に含まない、精製抗原調製物を提供し、この調製物は、アルツハイマー病の診断マーカーであり、ここでの抗原は、好ましくは、

- (a) 還元形または非還元形で約6の等電点を有し；
- (b) affi-Blueカラムに結合し；
- (c) pH6.8の0.01Mリン酸ナトリウム、0.14M塩化ナトリウムおよび1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)溶液に少なくとも50%可溶性であり、4の50%飽和硫酸アンモニウムに沈降し；

(d) ATCC 番号 HB9205 として同定されたハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体 (すなわち A1z-50) と免疫的に反応性である、
主要ペプチド種を含む。

【0024】

好ましい実施形態において、精製抗原調製物は、上記したような A68 タンパク質調製物である。

【0025】

アルツハイマー抗原タンパク質調製物を獲得するプロセス

従って、本発明は、アルツハイマー抗原タンパク質調製物を獲得するプロセスを提供する。第一段階として、望ましくは、部分精製調製物を得る。好ましい実施形態において、部分精製 A68 調製物は、望ましくは、

- (a) 前記抗原を含む皮質脳組織の試料を獲得し；
- (b) 前記試料を緩衝液中でホモジナイズして、ホモジネートを獲得し；
- (c) 前記ホモジネートから粒状物質を取り出し；
- (d) 前記抗原と抗体が結合して抗原 - 抗体複合体を形成する条件下でホモジネートを前記抗体 (すなわちアフィニティー精製のような、固定 AD 抗体) と接触させることにより、前記ホモジネートから前記抗原を取り出し；
- (e) 前記抗原 - 抗体複合体から前記抗原を溶出し、部分精製タンパク質調製物を獲得することを含む方法により獲得する。

【0026】

より特定すると、この調製法は、望ましくは、トリス緩衝食塩水 (TBS) などの約 5 容量の緩衝水に組織をホモジナイズすることにより実施し、ここでの緩衝液はさらに、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤を含む。ホモジネートは、最適には、例えば、約 4 で約 60 分間約 27,000 × g で遠心分離することにより分画する。望ましくは、上清を収集し、好ましくは約 4 で約 16 時間繰返しアフィニティカラムを通過させる。最適には、アフィニティカラムは MC1 カラムであり、望ましくは、これは、A68 と特異的に反応する精製マウスモノクローナル抗体 (例えば、実施例に記載したような MC1 抗体) を使用し、

製造業者の指示に従って抗体をAffigel-10にカップリングすることにより調製する。好ましくは、A68抗原は、MC1カラムマトリックスに付着することにより、上清から特異的に取り出される。TBSで徹底的に洗浄した後、A68を、最適には、例えば3MのKSCNを使用して、MC1カラムから溶出し、よって、A68タンパク質調製物が提供される。A68タンパク質調製物は、次いで、好ましくは、緩衝液（例えばTBS）に対して透析し、-80で保存する。

【0027】

部分精製A68調製物を獲得する別の手段が、例えば、PCT国際特許出願番号WO96/20218号に示されている。WO96/20218号のプロセスは、A68の部分精製（すなわち「濃縮」）調製物を提供するが、かなりの量のタンパク質が調製物に残っている。特に、WO96/20218号のA68タンパク質調製物は、総タンパク質の約1から約5%を含む、内因性ヒト免疫グロブリンを含む。これらの免疫グロブリンは、ウェスタン解析（例えば、図2、実施例）またはELISA（例えば、表2、実施例）による、アルツハイマー抗原に対する血清自己抗体を検出する能力に干渉する。従って、WO96/20218号のA68タンパク質調製物は、本発明によると実質的に純粋ではなく、単に部分的に精製されている。

【0028】

従って、血清自己抗体を解析する前に、または、WO96/20218号のA68タンパク質調製物を使用する前に、混入している免疫グロブリンを除去することが本発明によると必要である。本発明は、従って、上記のプロセスに追加の段階（f）を提供し、この段階は、溶出液から免疫グロブリンGを除去し、実質的に免疫グロブリンGを含まない抗原調製物を得ることを含む。これは、例えば、WO96/20218号のA68調製物を、最適にはアガロースビーズに最初に固定されている、望ましくはプロテインAまたはプロテインG、好ましくはプロテインAおよびプロテインGの両方と共にインキュベートすることにより実施される。望ましくは、約1mlの部分的に純粋なA68調製物を、プロテインA充填ビーズ（一般には約75 μ l）およびプロテインG充填ビーズ（一般には約

75 μ l)に加える。試料は、好ましくは、最適には約8時間4 で、回転器に入れる。インキュベート後、望ましくは、ビーズを、約14,000 \times gで微量遠心機を約3分間使用して回転して溶液から出す。次いで、上清を好ましくは、プロテインAおよびプロテインG充填ビーズ(一般には各々約75 μ l)を含む新しい管に移し、最適には16時間まで4 で回転器でインキュベートする。続いて、プロテインAおよびプロテインGビーズを、所望により、約3分間約14,000 \times gで微量遠心機を使用してペレット化する。前記A68タンパク質調製物を含む上清を次いで保存する(例えば、-80 で250 μ lのアリコートで)。

【0029】

別に、免疫グロブリンGは、望ましくはプロテインAおよびプロテインGの両方の使用、例えば固定細菌またはパンソルビンの使用などに実質的に等価な免疫グロブリンG除去法を用いて、タンパク質調製物をインキュベートすることにより除去する。

【0030】

精製A68抗原調製物の総タンパク質濃度は、望ましくは、例えばクーマシーとタンパク質アッセイ試薬(ピアスカタログ番号23236)を使用したクーマシーブルータンパク質アッセイにより、および標準物質として既知濃度のBSAを用いた製造業者により記載のマイクロアッセイにより決定する。続いて、抗原調製物の、A68特異的モノクローナル抗体MC15との反応性は、望ましくは、化学発光による間接的なELISAにより決定し、活性は、相対的な光単位(rlu)/ng(タンパク質)として表現する。その後のA68抗原調製物のタンパク質濃度は、望ましくは、最初のロットのMC15反応性に対して、その後の抗原調製物のMC15反応性を比較することにより推定できる。この方法は、A68タンパク質濃度を、クーマシーブルータンパク質アッセイを使用して測定する場合に典型的に遭遇するばらつきの問題を回避する。

【0031】

プロテインA/Gで処理したA68(または部分精製A68調製物)の免疫グロブリンG含量の決定は、望ましくは、精製ヒトIgG(MO州セントルイス所

在シグマ社)を標準物質として使用して、化学発光による間接的なELISAにより、または、他の適切な手段(すなわち、特に実施例に記載の手段)により実施できる。

【0032】

本発明のこれらの方法を使用して、実質的に免疫グロブリンGを含まず、すなわち、調製物の総タンパク質の約0.05%以下(さらにより好ましくは約0.0015%以下)の量の免疫グロブリンGを有する、および/または、望ましくは1 μ gのA68あたり約500pg未満の免疫グロブリンGを有する(さらにより好ましくは、約15pg未満の免疫グロブリンGを有する)、A68タンパク質調製物を得ることができる。抗原をウェスタンブロット解析に使用する場合、精製A68抗原は、1つのゲルレーンあたりに添加された抗原の量あたり、好ましくは約500pg未満のIgG、より望ましくは約15pg未満のIgGを含む。実質的に免疫グロブリンGを含まない抗原調製物は、存在する全てのIgGを「遮断」または「縛る」方法、または他の適切なIgG除去手段を使用しても、達成できることがさらに考えられる。かかる方法は、A68のカプリル酸沈降;抗ヒトIgGレジンを使用した吸着;およびパンソルビンの使用を含むがこれに限定されない。

【0033】

アルツハイマー抗原タンパク質調製物を利用するアッセイ

本発明は、とりわけ、アルツハイマー病関連抗原に特異的な抗体(自己抗体)の検出に関し、この抗原は、アルツハイマー病の個体に存在し、アルツハイマー病を有さない個体には実質的に存在しない。本発明は、アルツハイマー病を診断(すなわち、AD抗原に対する自己抗体の存在を検出)する特異的かつ感度の高いアッセイを提供する。本発明の方法は、他の疾患の排除プロセスに基づいた診断を必要とする従来技術の決定を克服し、従って、処置選択肢の評価に対する明瞭さを提供する。

【0034】

従って、本発明は、望ましくは、アルツハイマー病を有する個体に存在し、アルツハイマー病を有さない個体には実質的に存在しない、アルツハイマー病関連

抗原に対する抗体（すなわち自己抗体）の検出に関する。本発明はまた、ヒト、並びに、ウシタウなどの他の種（すなわち望ましくは哺乳動物種）由来のタウタンパク質に特異的な自己抗体の検出にも関する。かかるタウタンパク質抗体は、ADを有さない個体に存在し、ADを有する個体には実質的に存在しない。本発明は、ADを診断する特異的かつ感度の高いアッセイを提供する。診断は、血清、血漿、および脳脊髄液などの体液に存在するアルツハイマー抗体およびMAPf自己抗体の相対レベルに基づいて実施され、よって、かなりのアルツハイマー抗体レベルを有し、MAPfに対する実質的なレベルの自己抗体は有さない個体は、ADと診断される。

【0035】

この方法は、従って、プロテインA/Gで処理したA68（すなわち、実質的に免疫グロブリンGを含まないA68調製物）を、アルツハイマー病の診断である自己抗体の検出のための抗原として使用することを提供する。部分精製A68調製物ではなく、本発明により実質的にIgGを含まないように精製されたA68は、様々な方法（例えば、ウェスタンブロット解析、化学発光サンドイッチELISAアッセイ、化学発光による間接的なELISAアッセイ、直接的なELISAアッセイ、免疫沈降アッセイ、およびその他）に使用して、アルツハイマー病に特異的な自己抗体を検出できることは本発明の新しくかつ意外な発見である。これらのアッセイは、直接のおよび/または間接的ELISA、サンドイッチELISA、ウェスタンブロット解析等を含む多くの方法で実施し得ることは当業者に明らかであろう。さらに、様々なアルツハイマー病抗原および/またはその前駆体または関連タンパク質のいずれかを、単独でまたは組合せて用いる競合アッセイは、アルツハイマー病の診断となる自己抗体の検出を補助し得ることが理解されるだろう。

【0036】

本発明に記載のこれらのアッセイで、望ましくは、アルツハイマー病抗原に対して指向された抗体を使用できる。これらの抗体は、モノクローナル抗体（例えば、PCT国際特許出願番号WO96/20218号に記載のような）並びに血清自己抗体を含む。特定の好ましいモノクローナル抗体は、以下の実施例に記載

する。しかし、1つの特に好ましい抗体は、VA州20110-2209マナッ
サス、ユニバーシティ通り10801所在のアメリカン・タイプ・カルチャー・
コレクションに1986年9月17日にブダペスト条約の下で寄託された、ハイ
ブリドーマ番号HB9205により分泌されるALZ-50である。ALZ-5
0は、この分野でアルツハイマー病の存在を検出する標準的な試薬となった(例
えば、Woodら、Histochemical Journal、21、第1
1号、659~662項(1989); Itagakiら、Annals of
Neurology、26、第5号、685~689項(1989); Bea
chら、Brain Research、501、第1号、171~175項(
1989); Loveら、Journal of Neuropatholog
y and Experimental Neurology、47、第4号、
393~405項(1988); Nukinaら、Neuroscience
Letters、87、第3号、240~246項(1988); およびHym
anら、Brain Research、450、392~397項(1988
)参照)。

【0037】

本明細書に記載のアッセイ法において、本発明のアッセイに使用した試料は、
好ましくは、存命中または死亡後の脳組織、脳脊髄液、尿および血液からなる群
から選択する。好ましい実施形態において、試料は血清を含む。血清を使用する
本明細書に記載の方法は、CSFおよび尿にも適用できる。以下の別の試験手順
は、アルツハイマー病を有するヒトの血液または他の体液中の、アルツハイマー
抗原に対する自己抗体の存在を検出するのに適切であると考えられる。手順は、
Journal of Immunological Methods、76、
171~183項(1985)にJ.S.McDougalらによる、「感染性
ヒトレトロウイルスのリンパ節腫脹関連ウイルス(LAV)の検出および定量の
ためのイムノアッセイ」に開示されたようなHTLV-IIIの検出に使用され
た手順に類似している。好ましくは、約0.1 μ lから約100 μ lの血清を使
用し、より好ましくは0.25 μ lから10 μ lの血清を使用する。

【0038】

従って、アルツハイマー病に存在する自己抗体の検出のためのウェスタンブロットに関連して、本発明は、最適には、

(a) 本発明に記載のA68精製タンパク質調製物および前記自己抗体の存在について試験する試料を得；

(b) ゲル上で前記タンパク質調製物を電気泳動し；

(c) 前記タンパク質調製物を膜（例えばニトロセルロース）に転写し；

(d) 前記の電気泳動した膜を、自己抗体の存在について試験する試料と接触させ、よって抗原 - 自己抗体複合体が形成でき；そして

(e) 前記複合体の形成により前記自己抗体を検出することを含む、方法を提供する。

【0039】

同様に、本発明において、試料中の、アルツハイマー病に特異的な自己抗体の存在を決定し、よって、アルツハイマー病を診断する方法を提供する。この方法は、所望により、アルツハイマー病を有することが疑われる個体からの試料を、本発明に記載の精製A68抗原調製物と接触させることを含む。サンドイッチELISAアッセイ（例えば実施例に記載）に関連して、この接触は、最適には、サンプルをプロテインA/G（これは好ましくはビーズ、プレート、ニトロセルロース、固定細菌、パンソルビン等に固定されている）に結合させた後に実施する。この接触は、最適には、自己抗体が、溶液中で遊離し、抗原に接触した後に固定されるように実施する。その後（例えば洗浄後）、混合物を、望ましくは、アルツハイマー抗原上の抗原性決定基に特異的で（例えばALZ-50またはA68に特異的なモノクローナルTG5）、結合して複合体を産生できる抗体と接触させる。本発明により、「抗体」は、抗体の一部でもよい（例えば、Fab断片等）。次いで、得られた複合体は、所望により、試料から分離し回収するが、好ましくは、適切な手段、例えば化学発光手段等により検出する。

【0040】

所望により、A68を、ビオチンまたは放射性マーカで、標準的なプロトコルにより標識し、複合体を、望ましくは、その標識の検出により測定する。これは、例えば、ビオチン標識A68の場合、セイヨウワサビペルオキシダーゼにコ

ンジュゲートしたストレプトアビジンなどの試薬を用いて、または、複合体の捕獲およびその複合体の放射能の検出により実行される。標識手段および標識を検出する手段は、当業者には公知である。

【0041】

従って、本発明はさらに、アルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する方法を提供し、これは

- (a) 本発明に記載の精製A68タンパク質調製物を獲得し；
- (b) 前記タンパク質調製物を、自己抗体の存在について試験する試料と接触させ、よって、抗原-自己抗体複合体が形成でき；そして
- (c) 前記複合体の形成により前記自己抗体を検出することを含む。

【0042】

以前に記載のように、この方法は、望ましくは、自己抗体の存在が複合体の存在により決定される（すなわち定量試験）場合に実施できる。所望により、この方法は、複合体の量が測定され、自己抗体の量が、複合体の量により決定される（すなわち定量試験）場合に実施できる。

【0043】

さらに、この方法は、所望により、複合体を、自己抗体またはタンパク質調製物上に見出される抗原性決定基と免疫的に反応性である抗体と接触させ、よって、抗原-抗体または抗体-自己抗体複合体が形成されるさらなる段階を含むことができる。

【0044】

本発明の方法に使用した抗体は、最適には、同定可能な標識をその抗体に付着することにより検出可能とできる。抗体は、好ましくは、適切な基質にコンジュゲートした酵素（これは次いで検出可能な反応を触媒する）に付着させることにより検出可能となる。酵素は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはアルカリホスファターゼであり得る。抗体を検出する他の手段は、蛍光物質、化学発光物質または放射標識を抗体に付着することを含む。別に、抗体は、抗体に指向する別の抗体の使用により検出でき、他の抗体は標識されているか、または抗体に結合した酵素基質を有する。検出可能な抗体の存在（例え

ば、複合体の指示薬として)は、公知の技術を使用して容易に検出し得る。従って、検出可能な抗体を酵素に連結し、適切な基質に導入する場合、検出可能な結合抗体の光学密度は、量子分光計を使用して決定する。検出可能な抗体が蛍光標識されている場合、蛍光発光を、蛍光光度計技術を使用して測定または検出し得る。同じように、検出可能な抗体が放射標識されている場合、結合抗体は、放射能検出技術を使用して検出し得る。試験試料について上記の方法を使用して得られた結果を、対照試料について前記方法を使用して得られた結果と比較することにより、アルツハイマー病に特異的な精製A68タンパク質調製物/自己抗体の存在を決定し得る。アルツハイマー病に特異的な精製A68タンパク質調製物/自己抗体の量の増加が、それによって検出され、所望により定量し得る。

【0045】

アルツハイマー病の抗原/自己抗体複合体を定性的または定量的に決定する方法を、アルツハイマー病の診断に使用し得る。本発明の方法の使用は、本発明が、アルツハイマーの抗原/自己抗体複合体を検出する簡単で、感度の高く、非常に特異的な方法を提供するために、従来技術より利点がある。アルツハイマーの抗原は、サンドイッチイムノアッセイ複合体形成によく適している。なぜなら、それは凝集形で存在し、よって多エピトープ性であるからである。これは、可溶性で、通常1つのタンパク質に1つのエピトープを含む、交差反応性タンパク質とは対照的である。

【0046】

自己抗体および自己抗原の検出におけるこれらおよび他の標準的な方法の変形が当業者には明らかであり、本発明により考えられる。

【0047】

自己抗体を検出するためにアルツハイマー病抗原を製造する方法

本発明はまた、アルツハイマー病に罹患している患者に存在する自己抗体に結合できるタンパク質を製造する方法を提供する。これらの方法は、リン酸化組換えタウまたはその誘導体を含み得る。典型的には、これらの方法は、アルツハイマー病のアッセイに使用するに十分な程度では、かかる自己抗体に結合できない、タウまたは組換えタウなどのタンパク質を使用するがこれに限定されない。従

って、これらの方法に使用できるタウまたはその誘導体は、所望によりリン酸化されている。通常、これらのリン酸化タンパク質は、最小限にしかリン酸化されておらず、アルツハイマー病に罹患している患者に存在する自己抗体に結合できない。しかし、かかる自己抗体にすでに結合できるリン酸化タンパク質は、これらの方法に使用できる。リン酸化タンパク質のリン酸化を含むこの方法は、一般に、タンパク質が自己抗体に結合する能力を増加させ、自己抗体を検出する能力を増加させるだろう。

【0048】

アルツハイマー病に罹患している患者に存在する自己抗体に結合できるタンパク質を製造する方法は、

(a) タンパク質(群)、好ましくは所望の自己抗体(群)に結合できないタンパク質を、ヒペリシン、またはカルフォスチンCまたは類似物で処理するか；

(b) タンパク質(群)、好ましくは所望の自己抗体(群)に結合できないタンパク質を、遊離脂肪酸で処理するか；

(c) タンパク質(群)、好ましくは所望の自己抗体(群)に結合できないタンパク質を、ヒドロキシノネナルまたは他の進んだ糖化最終生成物で処理するか；または

(d) 上記の組合せを含む。

【0049】

得られた抗原調製物は、所望により、本発明の実質的に純粋なA68調製物の代わりに(またはそれに加えて)使用できる。

【0050】

1つのかかる方法は、抗原をリン酸化することを含む。好ましくは、リン酸化は、所望によりオカダ酸などのホスファターゼ阻害剤で処理しておいた、中枢神経系(CNS)細胞系、例えば神経芽細胞(特にMSN神経芽細胞)から調製した細胞抽出物を使用して実施する。また、望ましくは、リン酸化は、文献でタウリン酸化に関連している、精製または部分精製キナーゼを使用して実施する。本発明の内容で使用できるキナーゼは、PKA、GSK、cdc2、cdc25、カゼインキナーゼIおよびII、MAPキナーゼ、およびPHFキナーゼを含む

がこれに限定されない。

【0051】

本発明はさらに、アルツハイマー病抗原が、アルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する能力を増加させる方法を提供し、好ましくはここでの抗原は、ヒトを含む様々な種から単離されたタウ、または組換えヒトタウ、またはリン酸化組換えヒトタウ（Pタウ）またはリン酸化単離タウであり、前記方法は、所望により、ヒペリシンで抗原を処理することを含む。

【0052】

同様に、本発明は、望ましくは、アルツハイマー病抗原が、アルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する能力を増加させる方法を提供し、ここでの抗原は、ヒトを含む様々な種から単離されたタウ、または組換えヒトタウ（r h t）、またはリン酸化組換えヒトタウ（ホスホ - r h t）またはリン酸化単離タウであり、前記方法は、遊離脂肪酸で抗原を処理することを含む。好ましくは、脂肪酸は、不飽和脂肪酸、特にオレイン酸またはリノール酸、最も好ましくはアラキドン酸である。

【0053】

さらに、本発明はまた、アルツハイマー病抗原が、アルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する能力を増加させる方法を提供し、ここでの抗原は、ヒトを含む様々な種から単離されたタウ、または組換えヒトタウ、またはリン酸化組換えヒトタウ（ホスホ - r h t）またはリン酸化単離タウであり、前記方法は、所望により、進行した糖化最終生成物で抗原を処理することを含み、特にここで進行した糖化最終生成物は、脂質過酸化生成物の4 - ヒドロキシ - 2 - ノネナル（HNE）である。

【0054】

抗イディオタイプ抗体

本発明はさらに、アミノ酸差異を認識する抗体であり、従って、特定の免疫グロブリンに特異的に指向される、いわゆる「抗イディオタイプ抗体」を獲得する手段を提供する。特に、本発明は、好ましくは、A68に対するモノクローナル抗体またはA68に対するヒト血清自己抗体から出発して、A68アルツハイマ

一病抗原反応性免疫グロブリンに対する抗イディオタイプ抗体を同定する手段を提供する。これらの抗イディオタイプ抗体は、望ましくは、アルツハイマー病をアッセイするための、本発明の方法に使用される。

【0055】

従って、本発明は、望ましくは、A68抗原に対して指向される抗体（例えば、特にモノクローナル抗体、またはヒト血清自己抗体）と免疫的に反応性である、抗体（例えば特にモノクローナル抗体）を提供する。かかる抗イディオタイプ抗体、特にA68抗原に対して指向されるモノクローナル抗体またはヒト血清自己抗体と免疫的に反応性である抗体は、望ましくは、

(a) 高力価の抗A68自己抗体を有する個体から血清を獲得し、合わせてプールを創製し、前記プールから抗体を単離するか、

または、A68抗原に対する単離モノクローナル抗体を獲得し；

(b) マウスを、前記単離抗体で免疫化し；

(c) 前記マウスから血清を獲得し（すなわち、抗体が産生されるのに十分な時間の後および十分な条件下で）；そして

(d) 前記血清を試験して、A68抗原に対して指向された抗体（例えば、モノクローナル抗体またはヒト血清自己抗体）と免疫的に反応性である、高レベルの抗体を有するマウスを同定することを含む。

【0056】

以下のさらなる段階を含む方法を、所望により、実施できる：

(a) A68抗原に対して指向されたモノクローナル抗体またはヒト血清自己抗体と免疫的に反応性である、高レベルの抗体を有する前記マウスの脾臓を獲得し；

(b) 前記脾臓を骨髓細胞と融合し、組織培養プレートにプレーティングし；

(c) HAT耐性により融合細胞を選択し；そして

(d) 前記融合細胞を、A68抗原に対して指向された抗体（例えば、モノクローナル抗体またはヒト血清自己抗体）と免疫的に反応性である、抗体の産生について試験する。最適には、この方法はさらに、A68抗原に対して指向されていない抗体と免疫的に反応性ではない、抗体の産生について、融合細胞を試験する

ことを含む。適切なこれらの方法の変形は当業者には明らかであろう。

【0057】

ウシタウ(MAPf)調製物およびアッセイ

本発明はさらに、望ましくは、例えば血清のウェスタンブロット解析において、A68と共に、ウシ微小管結合タンパク質調製物(すなわちMAPf)を使用することを提供する。ウシMAPfは、とりわけ、70%のMAP1&2、20%の他のMAP、および10%のタウMAPアイソフォームを含む。本明細書に記載したような本発明は、10%SDSポリアクリルアミドゲル上で40~65kDの範囲に移動する、6つのタウMAPアイソフォームを使用する。結合した自己抗体の電気泳動、ウェスタン転写、血清インキュベート、および検出の方法は、当業者には公知である。

【0058】

従って、望ましくは本発明により、個々を、A68とMAPfのレーンを交互にして電気泳動に使用できる。MAPfは、好ましくは、1.5 μ gの総タンパク質/レーンの濃度で使用する。電気泳動後、タンパク質を、適切な支持体、例えばニトロセルロースまたは他の膜に転写する。望ましくは、患者の血清を、精製A68タンパク質調製物を含むニトロセルロース片およびMAPfを含むニトロセルロース片と共にインキュベートし、次いで、結合した自己抗体を以前に記載したように可視化する。これらの条件下で、精製A68タンパク質調製物およびMAPf中のタウアイソフォームに結合した自己抗体が得られる。

【0059】

従って、本発明はまた、望ましくは、アルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する方法を提供し、これは、

- (a) 以前に記載したような精製A68タンパク質調製物、ウシ微小管結合タンパク質調製物、および前記自己抗体の存在について試験する試料を獲得し；
- (b) 前記精製A68タンパク質調製物および前記ウシ微小管結合タンパク質調製物を、ゲル上の別々のレーンで電気泳動し；
- (c) 前記の電気泳動した精製A68タンパク質調製物および前記ウシ微小管結合タンパク質調製物を、膜に転写し；

(d) 前記膜を、前記自己抗体の存在について試験する試料と接触させ、よって、自己抗体複合体は、前記精製A68タンパク質調製物中に存在する抗原および/または前記ウシ微小管結合タンパク質調製物中に存在する抗原を用いて形成でき；そして

(e) 前記自己抗体を、前記複合体(群)の形成により検出する段階を含む。

【0060】

2つの解析法を好ましくは使用して、診断を、試験した各血清に割当てる。第一の方法では、精製A68タンパク質調製物の総光学密度(OD)×mmシグナルを、タウアイソフォームの総OD×mmシグナルで割る。一般に、試料に、この比に基づいて、ADまたは非ADの診断を割当てる。光学密度は、例えば、実施例11に記載したように計算できる。

【0061】

第二の方法は、最適には、光学密度測定だけでなく、特定の血清により同定されたMAPfタウアイソフォームの数も考慮する。この解析法では、ウシMAPfタウシグナルが、精製A68タンパク質調製物と共に存在する場合、望ましくは、タウシグナルが3つ未満のアイソフォームを含む場合にはADの診断を割当て、サンプルが3つ以上のタウのアイソフォームを同定する場合には非ADの診断を割当てる。さらに、好ましくは、試料は、タウバンドの数に関わらず、それが精製A68タンパク質調製物シグナルを欠失している場合には、非ADとして分類する。この場合のMAPfタウシグナルの定量は式(合計OD×(n-2))を用いる。この式で、「合計OD」は、全てのタウアイソフォームのODの合計×mm測定値であり、「n」は、6つのタウMAPfアイソフォームを示すバンドの総数である。従って、この方法により、精製A68タンパク質調製物シグナルを与え、実質的にタウシグナルのない試料をADと称し、他の全ての組合せ(A68シグナル+タウシグナル、タウシグナルのみ、または両方のシグナルが存在しない)は、非ADと診断する。

【0062】

好ましくは、タウアイソフォームの使用は、MAPfに見出されるウシタウアイソフォームの使用に限定されない。単一分子としてまたはタウアイソフォーム

の混合物としての、脳から精製したタウおよび組換えタウを含むがこれに限定されない、他の形のタウタンパク質も望ましくは使用する。さらに、本発明は、ウシ種のタウに限定されない。ヒト、げっ歯類、または他の哺乳動物源などの、他の種の脳または培養細胞由来の精製タウまたはMAP、並びに、トリおよび爬虫類由来の調製物も使用し得る。

【0063】

同様に、精製A68タンパク質調製物およびウシタウと反応性を示す自己抗体も、間接的ELISAアッセイで検出し得、ここでの抗原は、マイクロタイタープレートに固定され、各ウェルの底にはニトロセルロースがある。この支持体により、抗原を、ポリスチレン支持体よりもウェスタンブロットに近似した様式で提示することが可能となる。ミリポアMHABプレートを、1分間BBSで予め湿らせ、次いで緩衝液を真空下でフィルターを通して吸引する。抗原を、1ウェルあたりBBS中0.01から10 μ l(0.3から300ng)でウェルに適用し、3時間24で結合させる。これらの実験では、抗原は、精製A68タンパク質調製物、ウシタウ(MAPf)、または精製A68タンパク質調製物類似体、例えばリン酸化rhtであり得る。抗原溶液を、真空下でフィルターを通して吸引し、フィルターを、1.5時間24で、BBS中5%無脂肪乾燥ミルクで遮断する。続いて、全てのインキュベート溶液を、プレート洗浄器(Nunc)により除去し、真空下で膜を吸引することによるのではなく、TBS(前記に定義)中0.1% tween 20で洗浄する。1%血清を、ウェルの100 μ lの1%無脂肪乾燥ミルク、5%の正常ヤギ血清、BBS中に加え、16時間4でインキュベートする。結合したヒトIgを、2時間24で、1%カゼイン/TBS中のHRPコンジュゲートヤギ抗ヒトIgを添加し、次いで90 μ lのLumiGlo(Kirkegaard and Perry社)化学発光基質を添加して検出する。化学発光は、実施例5に記載のように測定する。

【0064】

(実施例)

本発明は、以下の実施例によりさらに説明され、これは、実施例に記載した特定の化合物または手順に、本発明の範囲または精神を限定するものとは、または

、いかなる場合にも本発明の範囲を限定するものとは捉えない。

【0065】

実施例1：部分精製A68抗原調製物の単離

本実施例は、部分精製A68抗原調製物の単離を記載する。

【0066】

A68抗原は、凍結したヒト脳試料（典型的にはアルツハイマー病患者の大脳皮質）から、標準的なプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤を含む、トリス緩衝食塩水（TBS）などの5容量の緩衝水中でホモジナイズすることにより単離した。ホモジネートは、27,000×gで60分間4で遠心分離することにより分画し、上清を収集し、16時間4でMC1アフィニティーカラムに繰返し通した。MC1カラムは、製造業者の指示に従って、A68と特異的に反応する精製マウスモノクローナル抗体を（MC1、PCT国際特許出願番号WO96/20218号に記載され、その源としての、分泌ハイブリドーマATCC番号11736が、1994年10月26日にメリーランド州ロックビル所在のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託された）、Affigel-10（バイオラッド・ラボラトリーズ）にカップリングすることにより調製した。A68は、MC1カラムマトリックスにより、上清から特異的に取り出される。TBSで徹底的に洗浄した後、A68を、MC1カラムから、3M KSCNを使用して溶出した。続いて、TBSに対して透析し、-80で保存した。部分精製A68抗原調製物を単離する他の手段は（これは、いくつかの場合において、上記と同一ではなくても類似している）、PCT国際特許出願番号WO96/20218号に記載されている。

【0067】

得られた調製物は、A68が高度に濃縮されているが、他のタンパク質の量も含む。A68中のヒトIgの量が、間接的ELISAにより確認され、ここでのA68は、ELISAプレート上に覆膜され、ヒトIgと特異的に反応性を示すセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）にコンジュゲートしたヤギ抗体でプローブされている。他のウェル中の精製ヒトIgの標準的な量を覆膜し、標準として使用する。結合HRPコンジュゲート抗体を、化学発光HRP基質を使用し

て定量し、標準的なヒトIgとA68調製物の間の量を比較する。驚くべきことに、A68濃縮調製物は、総タンパク質の約1~5%を含む内因性ヒト免疫グロブリンを含むことが判明した。これは、驚くべきことである。なぜなら、かかる免疫グロブリンは、アフィニティークロマトグラフィー中に除去されると期待されたからである。以下の実施例により確認されたように、この意外に高いレベルの免疫グロブリンは、調製物が、ウェスタンブロットまたはELISAにより、A68に対する血清自己抗体を検出する能力に干渉する。

【0068】

実施例2：精製A68調製物のプロテインA/G処理

本実施例は、例えば、実施例1に記載したように得られたA68抗原調製物のプロテインA/Gを使用した、さらなる精製を記載する。特記しない限り、この研究の全ての化学物質および以下の実施例の化学物質は、シグマ社(MO州セントルイス)から購入した。

【0069】

血清自己抗体を解析する前に、混入Igを除去するために、A68調製物を、アガロースビーズ上に固定した、プロテインAおよびプロテインGの両方と共に(イミュノピュア・イモビライズド・プロテインA、イミュノピュア・イモビライズド・プロテインG; IL州ロックフォード所在ピアス社)インキュベートした。簡潔には、1mlのA68を、75 μ lのプロテインA充填ビーズおよび75 μ lのプロテインG充填ビーズに加えた。試料を、8時間4の回転器に入れた。インキュベート後、ビーズを、14,000 \times gで微量遠心機で3分間回転して溶液を出した。次いで、A68上清を、各プロテインAおよびプロテインG充填ビーズ75 μ lを含む新しい管に移し、さらに16時間4の回転器でインキュベートした。続いて、プロテインAおよびGビーズを、14,000 \times gで微量遠心機を3分間使用してペレット化し、次いで、A68上清を、-80で250 μ lのアリコートで保存した。プロテインA/Gで処理したA68のIgG含量の決定は、実施例1に記載のように、精製ヒトIgG(MO州セントルイス所在シグマ社)を、標準として使用して、化学発光による間接的なELISAにより実施した。調製物は、内因性IgGを実質的に含まず、試料の総タンパク

質の0.05%以下の量のIgGを有することが判明した。

【0070】

実施例3：ウェスタンブロット解析

本実施例は、先行実施例に記載したような、プロテインA/Gでの処理により実質的に免疫グロブリンを含まないまで精製しておいた、精製A68抗原調製物（すなわち「プロテインA/G処理A68」）のウェスタンブロット解析を記載する。

【0071】

ゲル電気泳動を、Laemmli (Nature, 227, 680~685項 (1970))の方法を使用して、約1.5mmの厚さの10%SDS-ポリアクリルアミドニゲルを使用して実施した。試料緩衝液中、約100~1000ngの総タンパク質/レーンのプロテインA/G処理A68をのせた。

【0072】

ウェスタン転写は、Towbinら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350~4354項 (1979))の方法に従って、0.45µmまたは0.2µmのニトロセルロース (MA州ウェストボロ所在Micron Separations社)を使用して実施した。転写後、ニトロセルロースブロットを取り出し、ホウ酸緩衝食塩水 (BBS, 75mM NaCl, 100mM H₃BO₃, 25mM B₄Na₂O₇:10H₂O)中5%無脂肪乾燥ミルクからなる遮断緩衝液に約2時間室温で入れた。次いで、ニトロセルロースを、タンパク質の個々のレーンを分離するように切断した。ニトロセルロース片を、BBS中1%無脂肪乾燥ミルク+5%正常ヤギ血清中、約16時間4で、1:100から1:1200の希釈度の患者の血清と共に、振盪器でインキュベートした。続いて、片を2回、各回5分間、BBS+0.5%Tween-20で洗浄し、次いで、BBS+Tween-20で最後に45分間洗浄した。洗浄は、周囲温度で振盪器で実施した。

【0073】

次いで、ヤギ抗ヒトIgG-HRP抗体 (AL州バーミングハム所在Southern Biotechnology Associates、製造番号204

0 - 50) を、BBS中1%無脂肪乾燥ミルク中、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で片に加え、片を、約1.5時間、振盪器で周囲温度でインキュベートした。次いで、ニトロセルロース片を、4回、各回5分間、BBS+0.05% Tween-20で洗浄した。次いで、片を5分間、ECL (LumiGLO、MA州ゲーサーズバーグ所在Kirkegaard and Perry社、製造番号50-59-00) に浸漬した。過剰のLumiGLOを片から流し、これを次いでプラスチックのページホルダーに置いた。次いで、片を、予めフラッシング処理したX線フィルム (Hyperfilm、IL州アーリントンハイト所在アマシャム社) にのせた。X線フィルムの予めのフラッシング処理は、製造業者により規定されるようなアマシャム・センシタイズ・ユニットを使用して実施した。次いで、X線フィルムを、標準的な方法により現像して、A68シグナルを可視化した。

【0074】

ウェスタン解析の陽性および陰性対照に関して、血清を、1:100から1:1200の範囲の数個の希釈度で実施した。血清を、サンプル緩衝液にプロテインA/G処理A68を、または試料緩衝液のみを含む、ニトロセルロース片 (すなわちゲルレーンに対応する) と共にインキュベートした。さらに、プロテインA/G A68のレーンは、記載のように加工し、ただし、ヒト血清は、第一インキュベート段階で除外した (すなわちレーンを、ヤギ抗血清IgG-HRP抗体のみでプローブした)。これらの両方の測定値は陰性対照として作用する。陽性対照として、プロテインA/G処理A68の1つのレーンを、A68に対するモノクローナル抗体、例えばA1z50またはTG5でプローブした (すなわち、PCT国際特許出願番号WO96/20218号、およびTG5は、以下でさらに考察する)。血清が、ウェスタンプロットで約60~70kDの範囲にA68バンドの陽性染色を示した場合、陽性と評価したが、その他では、試料緩衝液のみを含むレーンでは陰性であった。血清は、約60~70kDの範囲に可視バンドがなければ、陰性として評価した。

【0075】

これらの研究の結果は図1および2に示す。図1から分かるように、A68に対する自己抗体は、アルツハイマー病の個体には存在したが (レーン2および4

)、正常対照にはA68タンパク質との反応性はなかった(レーン3および5)。

【0076】

次に、ウェスタンブロットにより、アルツハイマー病の血清自己抗体を検出するためにn、A68調製物のプロテインA/Gによる処理の必要性が確認され、図2に提示する。2ロットの処理していない、すなわち部分精製した、実施例1に記載のように調製したA68(ロットA、レーン1~3およびロットB、レーン4~6)および実施例2に記載したような1ロットのプロテインA/G処理A68(レーン7~9)を、10%ポリアクリルアミドゲル上に流し、ニトロセルロース膜に転写した。のせた総タンパク質は約175ng/レーンであった。片を、2名のアルツハイマー病患者由来の血清(患者1、レーン2、5、8または患者2、レーン3、6、9)、次いでヤギ抗ヒトIgG-HRPでプローブするか、または片を、ヤギ抗ヒトIgGHRP抗体のみを使用して(レーン1、4、7)A68調製物に内因性のIgGについてプローブした。結果により、IgGの重鎖を示す55kDバンドが判明する(図2に矢印で示す)。さらに、部分精製A68は、ヒト血清中の自己抗体と弱く反応したかまたは全く反応しなかった。プロテインA/G処理A68は、内因性IgG反応性がないが、顕著なA68バンドにより証明されるように、A68に対する血清自己抗体により強く認識された(図2の矢印頭部で示す)。プロテインA/G処理は、内因性IgGを消失しただけでなく、A68を濃縮し、その結果、自己抗体反応性は増強した。

【0077】

本実施例は、プロテインA/Gでの処理(実施例2に記載のように)により実質的に免疫グロブリンを含まないまでに精製しておいたA68抗原調製物(この追加の精製レベルを受けていないA68調製物ではなく)を使用した、ウェスタンブロットアッセイを、アルツハイマー病自己抗体の検出に使用できる。

【0078】

実施例4：化学発光サンドイッチELISAアッセイ

本実施例は、A68に対する自己抗体の検出のための、化学発光サンドイッチELISAアッセイを記載する。

【0079】

これらの研究のために、Dy nexマイクロタイタープレートMic r o l i t e 1型を、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のピアスプロテインA/Gで、3時間24で、 25mM NaPO_4 (pH7.2)、 125mM NaCl 、 2mM EDTA 、 2mM NaN_3 (覆膜緩衝液) 中で覆膜し、続いて、1%カゼイン、 10mM トリス - Cl (pH7.4)、 140mM NaCl 、および 1mM NaN_3 からなる希釈剤 (カゼイン/TBS) で1時間24で遮断した。標準的な慣例に従って収集および調製したヒト血清または血漿を、カゼイン/TBS中1%溶液としてウェル中でインキュベートし、約3時間24で結合させた。プロテインA/G精製A68を、次いで、カゼイン/TBS中 $70\text{ng}/\text{ml}$ で加え、ウェル中で90時間4でインキュベートした。

【0080】

A68に高度に選択的であるマウスモノクローナルIgGであるTG5 (PCT国際特許出願番号WO96/20218号に記載され、その源としての、分泌ハイブリドーマATCC番号11746が、1994年10月26日にメリーランド州ロックビル所在のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託された) を加工して、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP、下記参照) とコンジュゲートしたF(ab')₂断片を生成した。このコンジュゲートを、カゼイン/TBS中 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ の24のヒト血清または血漿で3時間、前処理して、自己抗体により捕獲されていたA68と反応させた、同じプレートのウェル中でインキュベートした。次いで、結合したTG5 - HRPを、ルミノールをベースとした化学発光基質 (すなわち、Limiglo、Kirkegaard and Perry社) を使用して検出した。発光を、5秒/ウェルの解読時間を使用して高速に、Labsystemsルミノメーターで定量した。全てのインキュベート液は、 $288\mu\text{l}$ である遮断段階および $88\mu\text{l}$ であるルミノールを除き、 $100\mu\text{l}$ であった。各段階の間に、マイクロタイターウェルを、5回、 10mM トリス - Cl (pH7.4)、 140mM NaCl 、 1mM NaN_3 (TBS) 中0.1% Tween - 20の溶液で洗浄して、非結合物質を除去した。

【0081】

TG5を、以下のようにこれらの研究のために調製した。TG5は、固定したプロテインA上の組織培養上清から精製した。それを、5mg/ml以上の濃度で、50mM NaPO₄(pH8.1)に透析した。製造業者の指示に従って(ピアス)固定フィシンを用いてF(ab')₂に消化した。F(ab')₂断片を、消化物をプロテインAカラムに通すことにより、Fc断片および残りの無傷IgGから取り出した。Fab'を作成するために、TG5を、0.1M NaPO₄(pH6.0)、5mM EDTAに対して透析し、6mg/mlのメルカプト-エチルアミンで90分間37℃で還元した。緩衝液は、セファデックスカラムG25カラム上で脱塩することにより、0.1M NaPO₄(pH7.0)、5mM EDTAに変化し、Fab'含有画分をプールし、1mg/ml以上濃縮した。TG5:HRPが1:2の質量比のピアス社マレイミド-HRPを加え、1時間24℃で反応させ、次いでさらに16時間4℃で反応させた。得られたコンジュゲートをさらに加工することなく使用した。

【0082】

NINCDS-ADRDA基準によりアルツハイマー病を有すると臨床的に診断された患者から得られた3つの血清試料を、上記のプロトコルを使用して解析した。これらの試験の結果を表1に示す。

【0083】

【表1】

表1 臨床標本中の自己抗体の検出

試料番号#	臨床診断	ブランクを差し引いた相対的光単位
DT	AD	9.01
836	AD	2.04
5114	AD	1.21

3つの各試料について、表1の相対的光単位で表現したシグナルから分かるように、自己抗体が検出された。

【0084】

本実施例により、A68抗原調製物を使用した化学発光サンドイッチELISAアッセイを使用して、アルツハイマー病自己抗体を検出できることが確認される。

【0085】

実施例5：化学発光による間接的ELISA

本実施例は、A68に対する自己抗体を検出するための、化学発光による間接的ELISAアッセイを記載する。

【0086】

これらの研究のために、プロテインA/G処理A68を、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、重炭酸覆膜緩衝液(35mM NaHCO_3 、 $15\text{mM Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{pH}9.65$ 、 $0.2\mu\text{m}$ 滅菌ろ過)に加え、 $100\mu\text{l}$ /ウェルを、MICROLITE 2マイクロタイタープレート(VA州シャンティイー所在Dyneex Technologies社)に加えた。A68を、2時間25℃で、または16時間4℃でウェルに吸着させた。バックグラウンドを決定するために、対応するウェルを、重炭酸緩衝液のみで覆膜した。次いで、ウェルを、3回、洗浄緩衝液(10mM トリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン、 150mM NaCl 、 0.1% Tween-20、 $\text{pH}7.4$)で、12ウェル洗浄器(デンマークNunc所在Immuno Wash 12)を使用して洗浄した。続いて、ウェルを、2時間25℃で、 $300\mu\text{l}$ /ウェルの1%カゼイン/TBS(1%カゼイン(ナトリウム塩)、 25mM トリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン、 145mM NaCl 、 0.01% チメロサル、 $\text{pH}7.5$ で遮断し、6時間10ワットでVibrioセル・ソニケーター(CT州ダンベリー所在Sonic Materials社)を用いて25℃で超音波処理し、次いで $0.45\mu\text{m}$ のSFCA膜を通してろ過した。次いで、ウェルを3回洗浄緩衝液で洗浄した。

【0087】

5%正常ヤギ血清を含む1%カゼイン/TBS中1:500から1:1000に希釈した血清を、ウェル(100 μ l/ウェル)に加え、25 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。次いで、ウェルを8回、洗浄緩衝液で洗浄した。続いて、100 μ lの0.1 μ g/mlのヤギ抗ヒトIgG-HRP(AL州バーミンガム所在Southern Biotechnology Associates)の1%カゼイン/TBS溶液をウェルに加え、1.5時間25 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。このインキュベート後、ウェルをさらに8回、洗浄緩衝液で洗浄した。88 μ lのECL(LumiGLO、MA州ゲーサースバーグ所在Kirkegaard and Perry社)をウェルに加え、ウェルを各2秒間21 $^{\circ}$ Cで積分モードで、Lumionskan RSルミノメーター(Labsystems、フィンランド)を使用して計測した。特記しない限り、全ての化学物質はシグマ(MO州セントルイス所在)から購入した。

【0088】

血清試料の絶対値を決定するために、重炭酸緩衝液のみのウェル中の血清由来の相対的な光単位(RLU)シグナルを、A68覆膜ウェル中の血清由来のRLUシグナルから差し引いた。プレート毎および日にち毎の変動を、25ng/ウェルから倍化希釈して0.1ng/ウェルまでの範囲の、A68標準曲線を使用することにより修正した。標準曲線におけるA68の検出は、A68特異的モノクローナル抗体MC15(1 μ g/ml、PCT国際特許出願番号WO96/20218号に記載され、その源としての、分泌ハイブリドーマATCC番号11739が、1994年10月26日にメリーランド州ロックビル所在のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託された)および二次ヤギ抗マウスIgM-HRP(0.1 μ g/ml、Southern Biotechnology Associates)(両方共、1%カゼイン/TBSで希釈している)を使用することにより行なわれた。

【0089】

このアッセイの結果を表2に示す。

【0090】

【表2】

表2 自己抗体の検出のための間接的E L I S A

試料番号#	臨床診断	相対的光単位 (バックグラウンドは差し引いている)
5186	AD	898.8
8131	AD	432.9
5178	AD	267.1
5188	AD	150.5
6010	AD	95.8

表2から分かるように、自己抗体が、5名全員のAD患者の間接的E L I S Aにより検出され、これは、相対的光単位として表現されたシグナルにより確認された。

【0091】

本実施例により、本発明に従って精製されたA68抗原調製物を使用した化学発光による間接的なE L I S Aアッセイを使用して、アルツハイマー病自己抗体を検出できることが確認される。

【0092】

実施例6：ADの自己抗体の検出

本実施例は、アルツハイマー病の自己抗体を検出するための、抗イディオタイプ抗体の産生および使用を記載する。

【0093】

A68に対するモノクローナル抗体および/またはA68に対するヒト血清抗体を使用して、モノクローナル抗イディオタイプ抗体を産生する。次いで、抗イディオタイプ抗体を、抗原として、間接的E L I S Aに使用して、アルツハイマー病を有することが疑われる個体由来の血清中の抗A68自己抗体についてスクリーニングする。かかる抗イディオタイプ抗体の使用は、アルツハイマー病の血清試験の基礎を形成する。

【0094】

アルツハイマー病を有する個体由来のヒト血清を、A68に対してウェスタン

プロットすることによりスクリーニングする。高力価の抗A68自己抗体を有することが示された個体由来の血清をプールする。ヒト抗体を、アガロースビーズ上に固定したプロテインA/Gと主にバッチインキュベートすることにより、プールした血清から単離する。別に、A68を使用したイムノアフィニティーカラムを使用して、A68自己抗体を濃縮でき、これを続いてカラムから溶出する。次いで、溶出した抗体を上記のように、プロテインA/Gビーズを使用して捕獲する。典型的には、1mlのプロテインA/Gが6~8mgのIgGに結合する。血清からヒトIgGを単離するために、血清を、10mMトリス(pH7.5)で1:1に希釈し、2時間4℃で1mlのプロテインA/Gビーズと共にインキュベートする。組織培養液中のイムノアフィニティー精製A68自己抗体またはモノクローナル抗体のために、プロテインA/Gビーズを、IgG含量に比例する濃度で抗体溶液に直接加える(すなわち、6~8mgのIgGあたり、約1mlのプロテインA/Gビーズ)。

【0095】

抗イディオタイプモノクローナル抗体は標準的な方法(Harlow, EおよびLane, D、抗体:実験マニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス(1988)参照)を使用して産生する。簡潔には、Balb/cマウスを、フロイント完全アジュバント中の上記したような血清由来の抗A68自己抗体を添加した、10~15µlのプロテインA/Gビーズ(A/GA68抗体/ビーズ)からなる腹腔内注射液により免疫化する。その後のブースター投与を、フロイント不完全アジュバント中の抗A68自己抗体を添加したプロテインA/Gビーズ(A/G-A68-抗体-ビーズ)を用いて、14および21日目に実施する。31日目に、マウスの尾を出血させ、血清を、A68(下記)を使用した競合ELISAにより、抗イディオタイプ抗体の存在について試験する。高力価の抗イディオタイプ抗体を示すマウスの脾臓を、SP2/0-Ag8骨髓腫細胞と融合し、96ウェル組織培養プレートにプレーティングする。融合細胞を、HAT耐性により選択し、得られたクローン調製物を、A68自己抗体に対する抗イディオタイプ抗体の存在について、間接的ELISAによりスクリーニングする。抗イディオタイプ抗体について試験で陽性のクローン調製物を、さら

に、標準的な技術によりサブクローニングし、モノクローナルハイブリドーマ調製物を産生する。

【0096】

A68自己抗体に対する抗イディオタイプ抗体について初期およびその後のクローンを、間接的ELISAを使用して同定する。以下のプロトコルを使用して、A68に対して生じた抗イディオタイプ抗体を同定し；96ウェルELISAプレートを、重炭酸緩衝液中(35mM NaHCO₃、15mM Na₂CO₃、pH9.65、0.2µm滅菌ろ過)1µg/mlのヤギ抗マウスIgG Fc特異的抗体100µl/ウェルで2時間25℃で覆膜する。ウェルを、3回、洗浄緩衝液(10mMトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン、150mM NaCl、0.1%Tween-20、pH7.4)で洗浄し、続いて2時間25℃で300µl/ウェルの1%カゼイン/TBSで遮断する。

【0097】

ウェルを、3回、洗浄緩衝液で洗浄する。次いで、試験するハイブリドーマウェルからの組織培養培地を、1%カゼイン/TBS中、1:100の希釈度で、マイクロタイタープレートに加え、2時間25℃でインキュベートする。ウェルを、3回、洗浄緩衝液で洗浄し、次いで、最初の免疫原として使用したアルツハイマー病患者からプールしたヒト血清を、1%カゼイン/TBS中、1:100の希釈度で、ウェルに加える。2時間25℃でインキュベートした後、ウェルを、8回、洗浄緩衝液で洗浄する。続いて、1%カゼイン/TBS中の、100µlの0.1µg/mlのヤギ抗ヒトIgG-HRP(AL州バーミングサム所在Southern Biotechnology Associates)をウェルに加え、1.5時間25℃でインキュベートする。このインキュベート後、ウェルを、さらに8回、洗浄緩衝液で洗浄する。88µlのECL(LumiGLO、MA州ゲーサースバーグ所在Kirkegaard and Perry社)をウェルに加え、相対的光単位(RLU)を、各1秒間21℃で積分モードで個々のウェルを、LumionskanRSルミノメーター(Labsystems、フィンランド)を使用して計測することにより記録する。

【0098】

2通りのプレートを、平行して組立て、この場合、血清を、A68に対する自己抗体を欠失している正常個体から得ることを除いて同じように処理する。目的の抗イディオタイプ抗体のみを含む、陽性クローンは、A68に対する自己抗体を含む血清と反応するが、これらの自己抗体を欠失した正常個体由来の血清とは反応しないだろう。最初の抗原としてモノクローナル抗体を使用して産生したクローンをスクリーニングするために、直接的ELISAを使用する以外は実質的に同じ戦略を使用する。この場合、免疫原として使用したモノクローナル抗体を修飾してF(ab')₂断片とし、HRPにコンジュゲートする。この方法は、抗イディオタイプ抗体の検出に使用したモノクローナル抗体が、プレート上の抗マウスFc抗体により捕獲されないのが必要である。

【0099】

抗イディオタイプモノクローナル抗体のさらなる特徴づけは、A68を用いた競合アッセイの使用により達成される。これらのアッセイは、抗イディオタイプ抗体を、上記したようなプレートに加えることにより実施する。次いで、検出抗体（ヒト血清抗体またはモノクローナルF(ab')₂HRPコンジュゲート抗体）を、様々な濃度のA68と共に加える。A68は、検出抗体上の抗原認識部位について、抗イディオタイプ抗体と競合し、よって、シグナルは減弱する。

【0100】

上記のアッセイのいくつかの変形があり、これも抗イディオタイプ抗体のスクリーニングに使用できることを注記すべきである。これらのアッセイは、当業者には明らかである。

【0101】

実施例7：リン酸化組換えタウおよびヒペリシンでの処理

本実施例は、組換えヒトタウ(rht)をリン酸化し、所望によりヒペリシンで処理して、アルツハイマー病自己抗体との反応性を増加することのできる手段を記載する。

【0102】

これらの研究で、MSN抽出物を、5%CO₂雰囲気加湿インキュベーター中、T225フラスコで、(15%胎児ウシ血清、100U/mlペニシリン、

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを補充した) RPMI 1640 中で、MSN 細胞 (Reynolds ら、J. Natl. Cancer Inst. 76 : 375 ~ 387 項、1986) を培養することにより調製した。細胞を、80% の集密度となったらかき取って、50 ml の円錐試験管に移した。細胞を、2,000 $\times G$ で5分間21 で遠心分離することによりペレット化し、細胞ペレットをTBSで洗浄した。次いで、2容量のP2緩衝液(20mM HEPES、pH7.2、20mM KCl、1mMジチオトレイトール、各2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のロイペプチン、ペプスタチン、アプロチニン、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のaPMSF、0.5mM EDTA)を加え、細胞ペレットを氷上でガラス-テフロン(登録商標)ダウンスホモジナイザーを使用してホモジナイズした。ホモジネートを、8,000 $\times g$ で10分間4 で沈降させ、上清を、100,000 $\times g$ で60分間4 で再沈降させた。得られたペレットを再懸濁して、P2緩衝液中5mg/mlとした。

【0103】

rht は、そのまま使用したか、または所望によりリン酸化してホスホ-rht を得た。ホスホ-rht は、rht を、20mMの4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエチレンスルホン酸(HEPES)、pH7.2、4mM KCl、5mM MgCl_2 、1mMジチオトレイトール、0.5mMエチレンジアミノテトラ酢酸(EDTA)、各2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアプロチニン、ロイペプチン、およびペプスタチン、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の4-アミジノ-フェニルメチルスルホニルフルオリド(aPMSF)、1 μM オカダ酸、2mM ATP、1mMエチレングリコールビス(b-アミノエチルエーテル)N,N,N,N'-テトラ酢酸(EGTA)、10mMホスホクレアチン、および20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ クレアチンホスホキナーゼ中、各150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、MSN抽出物(上記のように調製)と合わせるにより得られた。サイクリックAMP依存性キナーゼ触媒サブユニット(ピラス)を、10 μl あたり、1.67単位で含め得る。反応は、ATPの添加により開始し、30 で16時間攪拌しながら進行する。反応は、2容量の5mM EDTA、20mM 2-グリセロールホスフェート、BBS中20%グリセロール、pH8.3の添加により停止する。リン酸化r

h tは、そのまま使用しても、10分間煮沸し、15,000×gで10分間4で遠心分離し、上記のようなNi-ニトリル酢酸アガロースカラムでクロマトグラフィーにかけることにより再精製してもよい。

【0104】

ヒペリシン原液は、DMSO中20mMで調製し、-20で保存した。処理するr h tまたはホスホ-r h t調製物を、20mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 、100mM H_3BO_3 、75mM NaCl 、pH8.3(BBS)中で、所望のアッセイ濃度の2倍に希釈し、BBS中6μMヒペリシンと1:1で1時間以上、21で光の下で(ヒペリシンは光感受性である)混合した。2から5μMのカルフォスチンCで置換しても、r h tおよびホスホ-r h t免疫反応性に対して類似の効果が示される。

【0105】

r h tおよびホスホ-r h tの両方を、ヒペリシンで処理し、前記のサンドイッチアッセイでヒト自己抗体との反応性について解析した。r h tおよびホスホ-r h tの両方が、ヒペリシン処理をしなくても、アルツハイマー病および対照血清と反応性を示したが、ヒペリシンは、r h tについては2から4倍、ホスホ-r h tについては約100倍シグナル強度を増加させた(表3参照)。このシグナル増幅により、ヒト自己抗体の特徴づけおよび定量のために、十分に定義された抗原として、これらの精製タンパク質を使用することができる。A68はまた、これらの同じ血清と反応性を示した。

【0106】

【表3】

表3 rht及びホスホ-rhtとのヒト血清自己抗体の反応に対するヒペリシンの効果

抗原	AD血清 (相対的光単位)	対照血清 (相対的光単位)
rht	70.8	72.4
rht + ヒペリシン	317.6	170.6
A68	58.9	4.6
抗原なし	1.9	1.7
ホスホ-rht	4.3	2.4
ホスホ-rht + ヒペリシン	366.1	227.0

表3に示した結果により、rhtまたはリン酸化rhtの、A68自己抗体とのそのそれぞれの反応性の増加を引き起こす、物質の発見が確認される。これらは、ADのヒト自己抗体の検出を増強するための有用な抗原である。

【0107】

実施例8：アルツハイマー病抗原の成分の反応性の増加

本実施例は、物質（すなわち、これはアルツハイマー病抗原の成分を構成する、例えばタウ、リン酸化タウ等）を処理する方法を記載し、よって、かかる処理後のその状態は、最適には、実質的に免疫グロブリンGを含まない本発明に記載のA68抗原調製物に存在している状態を反映する。従って、かかる処理は、これらの物質が、アルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する能力を増加する方法を提供する。

【0108】

例えば、好ましくは本発明により、アルツハイマー病抗原と同じように機能するように処理しておいた、アルツハイマー病自己抗体組換えヒトタウ(rht)の検出のために使用することが可能である。1つのかかる方法は、望ましくは、細胞の抽出物がrhtを超リン酸化する能力を増加させる、オカダ酸(OKA)で所望により処理しておいた、神経芽細胞(例えばMSN神経芽細胞)から調製した細胞抽出物を使用することによる、rhtのリン酸化を含む。超リン酸化タ

ウは、プロテインA/G処理A68の主な成分である。かかる処理により産生された超リン酸化rhtはまた、アルツハイマー病抗原として使用して、血清中のヒト自己抗体を検出することができる。

【0109】

同様に、rhtおよび/またはリン酸化rht(上に詳述)は、最適には、ヒペリシン(またはカルフォスチンC)で処理して、アルツハイマー病の診断となる自己抗体を検出するのに適したアルツハイマー病抗原を産生できる。従って、ヒペリシン(またはカルフォスチンC)処理rhtは、望ましくは、アルツハイマー病の診断となる自己抗体の検出に使用できる、適切なアルツハイマー病抗原として、本発明に従って使用できる。

【0110】

また、rhtは、所望により、WilsonおよびBinder(Am. J. Path. 150、(6)、2181~95項(1997); J. Biol. Chem. 270、(41)、24306~14項、(1995))に従って、遊離脂肪酸(FFA)で処理できる。好ましくは不飽和脂肪酸(例えば、オレイン酸またはリノール酸、最も好ましくはアラキドン酸を含むがこれに限定されない)を使用したかかる処理により、rhtは重合し、この重合も、プロテインA/G処理A68の特徴である。従って、FFA処理rhtは、アルツハイマー病の診断となる自己抗体の検出に使用できる、適切なアルツハイマー病抗原である。

【0111】

さらに、文献でタウリン酸化に関連していた、精製または部分精製キナーゼを単独または組合せて使用することにより、アルツハイマー病の診断となる自己抗体を検出するためのアルツハイマー病抗原として適切な、超リン酸化rhtまたは超リン酸化単離正常タウを産生できることは当業者には明らかであろう。かかるキナーゼは、PKA、GSK、cdc2、cdc25、カゼインキナーゼIおよびII、MAPキナーゼ、およびPHFキナーゼを含むがこれに限定されない。

【0112】

本発明のさらに別の表明において、Smith、Sayer、Monnier

、Perryら(Trends in Neuroscience、18、(4)、172~6項(1995); Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91、5710~14(1994); Ann. NY Acad. Sci. 738、447~54項(1994))により、進んだ糖化最終生成物(AGE)により、メイラード反応およびアマドリ転位によるタウの架橋が生じることが記載されている。神経原線維濃縮体に、この架橋したタウが存在する証拠があり、これは、以前に指摘されたように、A68/超リン酸化タウからなる。従って、好ましくは脂質過酸化生成物の4-ヒドロキシ-2-ノネナル(HNE)または他のAGEを、単独でまたは組合せて使用して、rhtを処理することにより、アルツハイマー病の診断となる自己抗体の検出に適したアルツハイマー病抗原が産生される。

【0113】

従って、これらの方法を使用して、アルツハイマー病抗原(すなわち、抗原の単離成分)が、アルツハイマー病に存在する自己抗体を検出する能力を増加できる。

【0114】

実施例9：ウシタウの精製

本実施例は、ウシタウの精製を記載する。

【0115】

ウシ脳は、屠殺後できるだけ直ちに得、氷水に入れる。全てのその後の段階は、特記しない限り4で実施する。大きな血塊を、600gの大脳皮質から除去する。重層している髄膜も同様に除去し得る。2-メルカプトエタノールおよびPMSFを、900mlの0.1Mの1,4-ピペラジンジエタンスルホン酸(PIPES)-NaOH、pH6.6、1mM EGTA、1mM MgSO₄(PEM)に、最終濃度が各1mMとなるまで加え、脳をそれに入れる。脳を、低速で4秒間、次いで中程度の速度で4秒間、ワーリングブレンダーを使用してホモジナイズする。ホモジネートを、23,000×gで90分間2で遠心分離にかけ、上清を注意して収集する。GTPを、最終濃度が1.0mMとなるまで上清に加える。別に、GTPを0.1mMとなるまで加えることができ、AT

Pを2.5mMとなるまで加えることができる。穏やかに回旋しながら37℃でインキュベートを、30分間、大きなフラスコで実施し、微小管を会合する。次いで、上清を、1mMのGTPを含むPEM中10%スクロース20mlを底に敷いた遠心瓶に移し、37℃で45分間23,000×gでの遠心分離にかける。上清を廃棄し、ペレットを、0.1mM GTPを含む75ml PEMに再懸濁し、テフロン/ガラスホモジナイザー(2000rpmで2回)でホモジナイズし、氷上で30分間インキュベートし、微小管を解離する。次いで、混合物を38,000×gで30分間2℃で遠心分離にかける。上清を、予め秤量した遠心管にデカントし、37℃で15分間インキュベートし、微小管を再重合する。次いで、管を、38,000×gで37℃で30分間遠心分離にかける。このペレットは、精製形のMAPおよびチューブリンを含む。MAPをチューブリンから分離するために、ペレットを、0.1mM GTP、1M NaClを含む1/3容量のPEMに再懸濁し、液化したペレットを、1mM GTP、0.25M NaClを含むPEM中で平衡化しておいた、ペレット1mlあたり1ml床容量の、DEAE-セファデックス(A-50、ファルマシア)に、0.5ml/分で添加する。非結合画分中のMAP溶出液をMAPfと称する。続いて、ウシタウを、ホスホセルロース上でMAPfからさらに精製する。

【0116】

タウタンパク質の別の調製法は、上記した最初の上清を使用するが、微小管を会合する代わりに、上清を、5分間90℃まで加熱する。次いで、23,000×gで90分間4℃で遠心分離にかける。タウタンパク質を続いて濃縮し、PEM中で平衡化したDEAE-セルロース(ホワットマンDE52)上のアニオン交換クロマトグラフィーにより部分精製する。タウタンパク質を、線形0~1M NaCl塩勾配で溶出し、-80℃で保存する。

【0117】

実施例10：A68およびウシタウの逆ELISAサンドイッチ法

本実施例は、A68およびウシタウの逆サンドイッチ法を記載する。

【0118】

A68およびウシタウに反応性を示す自己抗体はまた、抗原が固定されたサン

ドイツ方でも検出できる。これは、Dy nex Microlite 1 プレートを、覆膜緩衝液中 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ のヤギ抗マウスIg (Fc)で3時間24で覆膜し、続いて、BBS中5%無脂肪乾燥ミルク $288\mu\text{l}$ で1時間24で遮断することにより達成される。A68捕獲のために、カゼイン/TBS中 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のモノクローナル抗体PHF1を加える。ウシタウ捕獲のために、カゼイン/TBS中 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のタウ1 (Roche)を加える。両方を2時間24でインキュベートする。 $1\mu\text{l}$ のA68 (約 30ng)または $1\mu\text{l}$ のMAPf (約 100ng のウシタウ)を、BBS中5%胎児ウシ血清 (Hyclone)に20時間4で加える。別の抗原 (例えばリン酸化rht+/-ヒペリシン)も使用し得る。自己抗体について試験すべき血清を、1%無脂肪乾燥ミルク、5%正常ヤギ血清 (シグマ)、BBS中で1:100の希釈度でウェルに加え、16時間4でインキュベートする。結合した自己抗体を、カゼイン/TBS中 $0.27\mu\text{g}/\text{ml}$ のセイヨウワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgを用いて、2時間24で、次いで、 $90\mu\text{l}$ のLumiGlo (Kirkegaard and Perry社)化学発光基質の添加により検出する。

【0119】

化学発光は、上記のように測定する。各段階の間に、ウェルを、0.1% Tween-20、tbsで洗浄する。全てのインキュベート液は、指摘されない限り $100\mu\text{l}$ である。

【0120】

実施例11：ウェスタンブロット解析においてA68と共にウシMAPfおよびタウを使用

本実施例は、血清のウェスタンブロット解析において、A68と共にウシMAPfを使用することを記載する。

【0121】

ウシMAPfは、とりわけ、70%MAP1&2、20%の他のMAP、および10%のタウMAPアイソフォームを含む。本明細書に記載したような本発明は、10%SDSポリアクリルアミドゲル上で40~65kDの範囲に移動する

、6つのタウMAPアイソフォームを使用する。電気泳動、ウェスタン転写、血清インキュベート、および結合した自己抗体の検出の方法は、実施例3で前記した方法と同じである。本実施例における例外は、電気泳動にA68とMAPfが交互であるレーンを使用することである。MAPfは、1.5 μgの総タンパク質/レーンの濃度を使用する。患者の血清を、精製A68タンパク質調製物を含むニトロセルロース片およびMAPfを含むニトロセルロース片と共にインキュベートし、次いで、結合した自己抗体を、前記したように可視化する。次いで、精製A68タンパク質調製物およびMAPf中のタウアイソフォームに結合した自己抗体を、透過デンストメーター（バイオラッドGS-670）およびモレキュラー・アナリスト・イメージ・アナリシス・ソフトウェア（バイオラッドバージョン1.1.1）を使用して定量する。デンストメーターを使用してウェスタンプロットの像を獲得した後、ソフトウェアプログラムを使用して、精製A68タンパク質調製物およびMAPfのタウアイソフォーム上の血清により生じたバンドパターンの1次元プロファイルを創製する。次いで、プロファイルからバックグラウンドを差し引く。得られたプロファイルは、バンドの幅、並びに、結合自己抗体の光学密度（OD）の両方を示すピークを含む。ピーク下の面積の積分により、OD × mmの単位で、結合自己抗体の数字による測定値が提供される。

【0122】

2つの解析法が現在、試験する各血清に診断を割当てするのに使用されている。第一の方法では、精製A68タンパク質調製物からのOD × mmシグナルを、タウアイソフォームの総OD × mmシグナルで割る。試料に、この比に基づいて、ADまたは非ADの診断を割当てて。

【0123】

第二の方法は、光学密度測定値だけではなく、特定の血清により同定されたMAPfタウアイソフォームの数も考慮する。この解析法では、ウシMAPfタウシグナルが、精製A68タンパク質調製物と共に存在する場合、タウシグナルが3つ未満のアイソフォームを含む場合には試料にADの診断を割当て、3つ以上のタウのアイソフォームを同定する場合には、試料に非ADの診断を割当てて。同様に、試料は、タウバンドの数に関わらず、それが精製A68タンパク質調製物

シグナルを欠失している場合には、非ADとして分類する。この場合のMAPf タウシグナルの定量は、式(合計OD × (n - 2))を用いる。この式で、「合計OD」は、全タウアイソフォームのODの合計 × mm測定値であり、「n」は、6つのタウMAPfアイソフォームを示すバンドの総数である。従って、精製A68タンパク質調製物シグナルを与え、実質的にタウシグナルを欠失した試料はADと称し、全ての他の組合せ(A68シグナル + タウシグナル、タウシグナルのみ、または両方のシグナルが存在しない)は、非ADと診断する。

【0124】

タウアイソフォームの使用は、ここでは、MAPfに見出されるウシタウアイソフォームの使用に限定されない。単一分子としてまたはタウアイソフォームの混合物としての、脳から精製したタウ、組換えタウなどの、他の形のタウタンパク質も使用し得る。さらに、本発明は、ウシタウに限定されない。ヒト、げっ歯類、または他の哺乳動物源などの、他の種の脳または培養細胞由来の精製タウまたはMAP、並びに、トリおよび爬虫類由来の調製物も使用し得る。

【0125】

実施例12：ニトロセルロースプレート上での間接的ELISA

本実施例は、ニトロセルロース上での間接的ELISAを記載する。

【0126】

精製A68タンパク質調製物およびウシタウと反応性を示す自己抗体は、間接的ELISAアッセイでも検出され得、ここでの抗原は、マイクロタイタープレートに固定され、各ウェルの底にはニトロセルロースがある。この支持体により、抗原を、ポリスチレン支持体よりもウェスタンブロットに近似した様式で提示することが可能となる。ミリポアMHA Bプレートを、1分間BBSで予め湿らせ、次いで緩衝液を真空下でフィルターを通して吸引する。抗原を、1ウェルあたりBBS中0.01から10 μl (0.3から300 ng)でウェルに適用し、3時間24で結合させる。これらの実験では、抗原は、精製A68タンパク質調製物、ウシタウ(MAPf)、または精製A68タンパク質調製物類似体、例えばリン酸化rhtであり得る。抗原溶液を、真空下でフィルターを通して吸引し、フィルターを、1.5時間24で、BBS中5%無脂肪乾燥ミルクで遮

断する。続いて、全てのインキュベート溶液を、プレート洗浄器(Nunc)により除去し、真空下で膜を吸引することによるのではなく、TBS中0.1% Tween 20で洗浄する。1%血清を、ウェルの100 μ lの1%無脂肪乾燥ミルク、5%の正常ヤギ血清、BBS中に加え、16時間4℃でインキュベートする。結合したヒトIgを、2時間24℃で、1%カゼイン/TBS中のHRPにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgを添加し、次いで90 μ lのLumiGlo(Kirkegaard and Perry社)化学発光基質を添加することにより検出する。化学発光は、上記のように測定する。

【0127】

本明細書に引用した全ての参考文献は、これにより全体を参考として援用する。特に、PCT国際特許出願番号WO96/20218号の全文書および教義を、これにより参考として援用する。

【0128】

本発明は、好ましい実施形態に関して強調して記載したが、好ましい組成物および方法の変形も使用し得、本発明は、本明細書に明記した以外の方法でも実施し得ることは、当業者には明らかであろう。従って、本発明は、以下の特許請求の範囲により規定される本発明の精神および範囲内に包含される全ての修飾形を含む。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、アルツハイマー病患者の抗A68自己抗体の検出のための、ウェスタンブロットの写真の再現であり、ここで、片を、2名のアルツハイマー病患者(患者1、レーン2;患者2、レーン4)および2名の正常対照(患者3、レーン3;患者4、レーン5)由来の血清でプローブした。相対的な分子量を、ブロットの左に列挙する。レーン1により、抗A68モノクローナル抗体により産生されたA68バンドパターンが実証される。

【図2】

図2は、2ロットの部分精製されたA68調製物(「ロットA」、レーン1~3、および「ロットB」、レーン4~6)および1ロットのプロテインA/G処

理A68調製物(レーン7~9)を使用して、アルツハイマー病患者の抗A68自己抗体を検出するための、ウェスタンブロットの写真の再現である。片を、2名のアルツハイマー病患者(患者1、レーン2、5、8または患者2、レーン3、6、9)由来の血清、次いでヤギ抗ヒトIgG-HRPでプローブするか、または片を、ヤギ抗ヒトHRP抗体のみを使用して(レーン1、4、7)A68調製物に内因性のIgGについてプローブした。記号:約55kDの矢印は、IgGの重鎖を示す;矢印の頭部は、顕著なA68バンドを示す。

【図1】

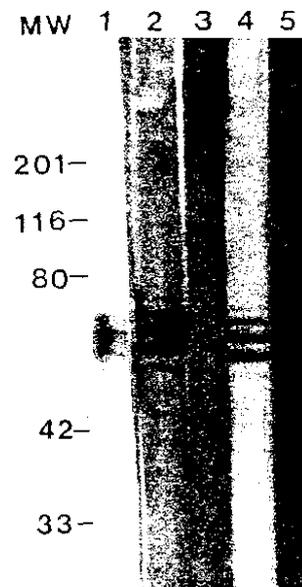


FIGURE 1

【図2】

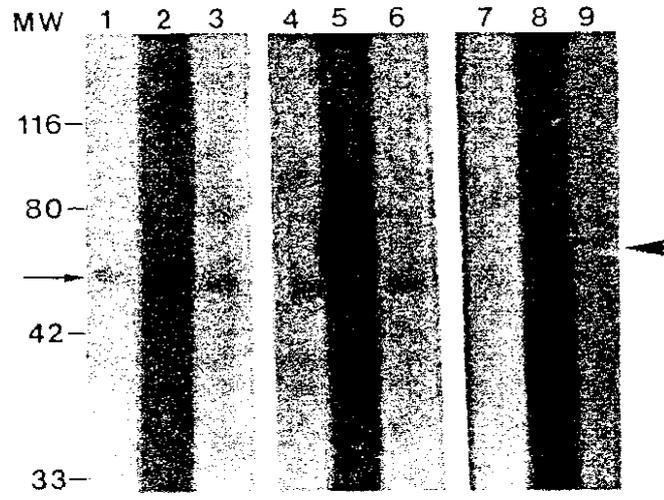


FIGURE 2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 00/16593
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 G01N33/68 C07K16/42 C12P21/08		
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) IPC 7 C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, LIFESCIENCES, CANCERLIT, AIDSLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, SCISEARCH, BIOSIS, WPI Data, EPO-Internal, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 909 814 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 21 April 1999 (1999-04-21) example 1 example 2 line 4-8	1-10, 13, 22-24
X	US 5 492 812 A (VOOHEIS H PAUL) 20 February 1996 (1996-02-20) column 5, line 35-50 column 9, line 48-62 column 15, line 64 -column 16, line 8 example 6.1	1, 6, 33-37, 40, 41
A	---	14-20, 28-32, 38, 39
---	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 30 October 2000		Date of mailing of the international search report 10/11/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Covone, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No PCT/US 00/16593
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 96 20218 A (EINSTEIN COLL MED ;GHANBARI HOSSEIN A (US); DAVIES PETER (US); WOL) 4 July 1996 (1996-07-04) cited in the application page 4, line 1-17 page 13, line 23-27 page 19, line 28,29 claims 15,16</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,6
X	<p>WILSON DAVID M ET AL: "Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides: In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 150, no. 6, 1997, pages 2181-2195, XP000952986 ISSN: 0002-9440 abstract page 2182, right-hand column, paragraphs 2,3 figures 5,7</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,6,25, 26
X	<p>SHI DU YAN ET AL: "Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide." NATURE MEDICINE, (1995) 1/7 (693-699). , XP002151418 page 693, left-hand column, line 16-20 page 698, left-hand column, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,6,25, 27
X	<p>MATTSON MARK P ET AL: "4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, inhibits dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau." NEUROREPORT, vol. 8, no. 9-10, 1997, pages 2275-2281, XP000953016 ISSN: 0959-4965 abstract figure 3 page 2279, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	25,27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/16593

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1990 KSIEZAK-REDING H ET AL: "MAPPING OF THE ALZ 50 EPI TOPE IN MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEINS TAU" Database accession no. PREV199089120028 XPO02151419 abstract & JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol. 25, no. 3, 1990, pages 412-419, ISSN: 0360-4012</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: ai Application No
PCT/US 00/16593

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0909814 A	21-04-1999	EP 0618968 A	12-10-1994
		EP 0544942 A	09-06-1993
		EP 0911398 A	28-04-1999
		EP 0911390 A	28-04-1999
		AT 185599 T	15-10-1999
		AU 707736 B	15-07-1999
		AU 2865697 A	04-12-1997
		AU 681071 B	21-08-1997
		AU 3256093 A	28-06-1993
		CA 2125298 A	10-06-1993
		DE 69230148 D	18-11-1999
		DE 69230148 T	04-05-2000
		WO 9311231 A	10-06-1993
		ES 2136654 T	01-12-1999
		JP 2000026498 A	25-01-2000
		JP 2000037188 A	08-02-2000
JP 2000032983 A	02-02-2000		
JP 7507044 T	03-08-1995		
US 5492812 A	20-02-1996	AU 2414092 A	02-03-1993
		EP 0600951 A	15-06-1994
		WO 9303369 A	18-02-1993
WO 9620218 A	04-07-1996	US 5811310 A	22-09-1998
		AU 711140 B	07-10-1999
		AU 4523596 A	19-07-1996
		CA 2208329 A	04-07-1996
		EP 0796279 A	24-09-1997
		JP 10511943 T	17-11-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 33/53	N
	33/53	27/26	3 1 5 J
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	コーンケン、 ラッセル エドウィン アメリカ合衆国 イリノイ州 60076 ス コーキー イー . プロルー ロー 8724		
(72)発明者	デベルナルディス、 ジョン フランシス アメリカ合衆国 イリノイ州 60046 リ ンデンハースト コロニー アヴェニュー 2100		
Fターム(参考)	4B064 AG01 AG27 CA10 CA20 CA21 CB27 CC01 CC24 CD07 CD14 CD30 DA01 DA13 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA50 CA40 DA75 DA76 DA86 EA20 EA50 FA52 FA71 FA72 GA01 GA10 GA15 GA26		

专利名称(译)	阿尔茨海默病的纯化抗原及其获得和使用方法		
公开(公告)号	JP2003503314A	公开(公告)日	2003-01-28
申请号	JP2001505565	申请日	2000-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	泄漏圭错误杰里阿特里箱公司		
[标]发明人	ジンコウスキーレイモンドピー カークマンダニエルジョゼフ コーンケンラッセルエドウィン デベルナルディスジョンフランシス		
发明人	ジンコウスキー、レイモンド ピー. カークマン、ダニエル ジョゼフ コーンケン、ラッセル エドウィン デベルナルディス、ジョン フランシス		
IPC分类号	G01N33/53 C07K1/113 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/42 C12P21/02 C12P21/08 G01N27/447 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	A61P25/28 C07K14/4711 C07K16/4241 G01N33/564 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821		
FI分类号	C07K14/47 C07K1/113 C07K1/22 C07K16/42 C12P21/02.Z C12P21/08 G01N33/53.N G01N27/26.315.J		
F-TERM分类号	4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CA21 4B064/CB27 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CD07 4B064/CD14 4B064/CD30 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA52 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/GA01 4H045/GA10 4H045/GA15 4H045/GA26		
优先权	09/334582 1999-06-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种包含阿尔茨海默氏病抗原 (A68) 的制剂, 获得纯化的抗原的方法以及使用纯化的抗原的方法, 例如, 用于诊断阿尔茨海默氏病和检测针对阿尔茨海默氏病抗原的人自身抗体。要做。纯化根据本发明的抗原制剂, 因为其基本上不含免疫球蛋白G。本发明进一步提供了A68抗原制剂的替代, 例如重组人tau, 从包括人在内的各种物种分离的tau和磷酸化的重组人tau或分离的tau, 以及A68抗独特型抗体。备选地, 其涉及产生可与之一起使用的阿尔茨海默氏病抗原的方法 (例如, 用于诊断阿尔茨海默氏病)。

試料番号#	臨床診断	ブランクを差し引いた相対的光単位
DT	AD	9.01
836	AD	2.04
5114	AD	1.21