

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-13566

(P2008-13566A)

(43) 公開日 平成20年1月24日(2008.1.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18 ZNA	4B064
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4B065
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4H045
GO1N 33/577 (2006.01)	GO1N 33/577 A	
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 有 請求項の数 24 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2007-174732 (P2007-174732)	(71) 出願人	591003013
(22) 出願日	平成19年7月3日(2007.7.3)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(31) 優先権主張番号	06116550.2		F. HOFFMANN-LA ROCH
(32) 優先日	平成18年7月4日(2006.7.4)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
			グレンツアーヘルストラッセ124
		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(72) 発明者	バーンド ボーマン
			スイス連邦 リーエン モールハルデンス
			トラッセ 166ビー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リン酸化ポリペプチドを認識する抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 リン酸化ポリペプチドを認識する抗体を提供する。

【解決手段】 A1がAspまたはAsnであって、A2がMetまたはLeuであって、A3がValまたはLeuであって、A4がAspまたはGluであって、およびA5がAspまたはGluである、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープを認識するが、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープには結合しない抗体、抗体を産生するハイブリドーマ、抗体を含むキット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

A1がAspまたはAsnであって、A2がMetまたはLeuであって、A3がValまたはLeuであって、A4がAspまたはGluであって、およびA5がAspまたはGluである、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープに結合するが、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープには結合しない、抗体またはその断片。

【請求項2】

A1がAsp、A2がMet、A3がVal、A4がAsp、およびA5がAspである、請求項1記載の抗体。

【請求項3】

A1がAsn、A2がLeu、A3がLeu、A4がGlu、およびA5がGluである、請求項1記載の抗体。

【請求項4】

ホスホSer422を含むタウに結合するが、非リン酸化Ser422を含むタウには結合しない、請求項1または2記載の抗体。

【請求項5】

ホスホ-Ser1808を含むMAP2に結合するが、非リン酸化Ser1808を含むMAP2には結合しない、請求項1～4のいずれか一項記載の抗体。

【請求項6】

Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Aspからなるペプチドに対するそのKdが100 nMより低い、請求項2記載の抗体。

【請求項7】

モノクローナル抗体である、請求項1～6のいずれか一項記載の抗体。

【請求項8】

ハイブリドーマDSM ACC2762またはDSM ACC2763によって産生される、請求項1～7のいずれか一項記載の抗体。

【請求項9】

以下の段階を含む、神経障害を診断するための方法：

- (a) 試料を請求項1～8のいずれか一項記載の抗体に接触させる段階；および
- (b) 抗体とタウまたはMAP2との間に形成された複合体を検出する段階。

【請求項10】

神経障害がアルツハイマー病である、請求項9記載の方法。

【請求項11】

以下の段階を含む、ホスホ-Ser422を含むタウを検出するための方法：

- (a) 試料を請求項1～8のいずれか一項記載の抗体に接触させる段階；および
- (b) 抗体とタウとの間に形成された複合体を検出する段階。

【請求項12】

以下の段階を含む、ホスホ-Ser1808を含むMAP2を検出するための方法：

- (a) 試料を請求項1～8のいずれか一項記載の抗体に接触させる段階；および
- (b) 抗体とMAP2との間に形成された複合体を検出する段階。

【請求項13】

複合体が、ウェスタンブロッティング、免疫組織化学、またはELISAによって検出される、請求項11または12記載の方法。

【請求項14】

神経障害の診断のための、請求項1～8のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項15】

神経障害がアルツハイマー病である、請求項14記載の使用。

【請求項16】

ホスホ-Ser422を含むタウを検出するための、請求項1～8のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項17】

10

20

30

40

50

ホスホ-Ser1808を含むMAP2を検出するための、請求項1～8のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項18】

請求項1～8のいずれか一項記載の抗体を含む、神経障害を診断するためのキット。

【請求項19】

神経障害がアルツハイマー病である、請求項18記載のキット。

【請求項20】

請求項1～8のいずれか一項記載の抗体を含む、ホスホ-Ser422を含むタウを検出するためのキット。

【請求項21】

請求項1～8のいずれか一項記載の抗体を含む、ホスホ-Ser1808を含むMAP2を検出するためのキット。

【請求項22】

請求項1～8のいずれか一項記載の抗体を産生する細胞。

【請求項23】

細胞がハイブリドーマである、請求項22記載の細胞。

【請求項24】

ハイブリドーマがDSM ACC2762またはDSM ACC2763である、請求項23記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、A1がAspまたはAsnであって、A2がMetまたはLeuであって、A3がValまたはLeuであって、A4がAspまたはGluであって、およびA5がAspまたはGluである、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(P03H2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープに結合するが、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープには結合しない抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病(AD)は、成人発症型の認知症の最も一般的な型である。現在のところ、ADの診断のために利用可能な信頼できる生化学試験またはバイオマーカーはなく、確定診断は死後に限ってなされる。

【0003】

死後の脳の神経病理学検査は、脳の特徴的な領域における大量の細胞外アミロイド斑および細胞内神経原線維変化(NFT)を示している。NFT沈着は、斑の蓄積より疾患の重症度に良好に相関する。

【0004】

NFTは、微小管関連タンパク質タウの対を形成したらせん状の線維(PHF)を含む(非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3)。インビボでのタウの機能は、ニューロンの軸索区画内での微小管の集合および安定性を促進することである(非特許文献4)。

【0005】

タウは、非常に可溶性のタンパク質であり、線維へ凝集する性向はない。しかし、ADにおいて、タウは過剰リン酸化されるようになる。この過剰リン酸化が凝集プロセスを開始し、ついにPHFとなり、最終的にNFTとなる。リン酸化は、タウの正常な特色であり、微小管に対する結合を調節する制御メカニズムの一部である(非特許文献5)。

【0006】

分子内には可能性があるリン酸化部位が多数存在し、これらは、タウの微小管結合ドメインに隣接する二つの領域内で起こる。これらの部位でのリン酸化は良性であり、タウの凝集に至らない。ADでは、さらなるホスホエピトープ(少なくとも一つのリン酸化アミノ酸を含むエピトープ)の数が散在的に見いだされ、原線維形成プロセスを開始させる可能性が最も高いのは、この過剰リン酸化または異常なリン酸化である。したがって、PHF-タ

10

20

30

40

50

ウ形成に至るメカニズムを理解するためには、これらのリン酸化部位に関する知識が必要である。

【0007】

AD脳からPHFが単離および特徴付けされたことにより、ADにおいて起こるタウの異常なホスホエピトープが同定されている（非特許文献6、非特許文献7）。これらのホスホエピトープの一つは、タウのC-末端に向かってSer422で起こる。Ser422のリン酸化は、NFT形成に密接に連結している（非特許文献8）。この研究グループは、細胞培養実験において、Ser422でのタウのリン酸化がタウの溶解度の減少を引き起こすことを示し、これは凝集プロセスの初期段階における役割を暗示している。Ser422のアラニンへの変異により、この効果は消失した（非特許文献9）。

10

【0008】

Ser422でのタウのリン酸化は、このホスホエピトープに対して向けられるポリクローナル抗体を用いた初期の研究によって示唆されているように、ADの感度のよいマーカーとなる可能性がある（非特許文献10）。しかし、このホスホエピトープに関する高親和性の非常に選択的なモノクローナル抗体は、現在まで利用できていない。そのような抗体は、非リン酸化タウ、ならびに他の病原性および非病原性エピトープでリン酸化されたタウのバックグラウンドが高い中で、Ser422でリン酸化されたタウを認識することができなければならぬ。ADにおいて病原性の事象を非病原性の事象と明確に区別するためには、高い程度の選択性が非常に重要である。

【0009】

多くの刊行物が、タウの病理の発達における単一のホスホエピトープ、すなわちホスホ-Ser422の重要性を指摘している。

20

【0010】

さらに、NFTまたは正常な脳に由来するタウの質量分析から、このホスホエピトープがPHF-タウにとって固有であることが示された（非特許文献6、非特許文献7）。

【0011】

PHF-タウ（対のらせん状線維-タウ）には多くのホスホエピトープが存在し、これらのホスホエピトープの一つまたは複数を認識するいくつかのモノクローナル抗体、例えばTG3（pThr231）、PHF-1（pSer396/pSer404）、12E8（pS262/pS356）、AT8（pSer202/pT205）、AT100（pSer212/pThr214）、AT180（pThr231）、およびAT270（p181）が公知である（非特許文献11、非特許文献12、非特許文献8、非特許文献13）。

30

【0012】

これらの抗体のいくつか、例えば12E8、AT180、およびAT270はまた、健康な脳由来のタウも認識し、真の疾患状態特異的ではない。これらの抗体は全て（12E8を除く）、免疫原として精製PHF-タウを用いて作製され、その結果これらの抗体によって認識される抗原性エピトープは複雑であり、二重/多重リン酸化、または配座およびホスホエピトープの組み合わせのいずれかを含む。したがって、これらの抗体は、タウの病理の発達に対する個々のホスホエピトープの寄与を分析する場合、その有用性は限定されている。

【0013】

多くのポリクローナル抗体が個々のホスホエピトープに対して作製されているが、これらの多くは正常なタウとある程度の交叉反応性を示す。ホスホ-Ser422を含むタウ由来ホスホペプチドに対して作製された一つのモノクローナル抗体、AP422が、これまでに記述されている。しかし、この抗体は正常なタウに対して弱い交叉反応性を示す（非特許文献14）。

40

【0014】

このホスホエピトープのタウ病理に対する寄与を評価するために、およびAD患者に由来する脳組織におけるこのホスホタウ変種のレベルを測定するためのイムノアッセイを開発するために、正常なタウと交叉反応性を示さない高親和性で、選択性の高いモノクローナル抗体が必要である。

【0015】

50

- 【非特許文献 1】Delacourte, A.J., *Neurol. Sci.* 76(1986)173-180
- 【非特許文献 2】Kosik, K., *PNAS* 83(1986)4044-4048
- 【非特許文献 3】Kondo, J., *Neuron* 1(1988)82, Wood, J. *PNAS* 83(1986)4040-4043
- 【非特許文献 4】Lewis, S., *Nature* 342(1989)498-505
- 【非特許文献 5】Lovestone, S., *Biol. Psychiatry* 45(1999)995-1003
- 【非特許文献 6】Hasegawa, M., *J. Biol. Chem.* 267(1992)17047-17054
- 【非特許文献 7】Cripps, D., *J. Biol. Chem.* 281(2006)10825-10838
- 【非特許文献 8】Jicha, G., *J. Neurochem* 69(1997)2087-2095
- 【非特許文献 9】Ferrari, A., *J. Biol. Chem.* 278(2003)40162-40168
- 【非特許文献 10】Bussiere, T., *Acta. Neuropathol.* 97(1999)221-230
- 【非特許文献 11】Seubert, P., *J. Biol. Chem.* 270(1995)18917-18922
- 【非特許文献 12】Greenberg, S., *J. Biol. Chem.* 267(1992)564-569
- 【非特許文献 13】Mercken, M., *Acta. Neuropathol.* 84(1992)265-272
- 【非特許文献 14】Hasegawa, M., *FEBS Letters* 384(1996)25-30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明は、リン酸化ポリペプチドを認識する抗体を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、A1がAspまたはAsnであって、A2がMetまたはLeuであって、A3がValまたはLeuであって、A4がAspまたはGluであって、およびA5がAspまたはGluである、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープに結合するが、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープには結合しない、抗体を提供する。さらに、本発明は、ホスホ-Ser422を含むタウに結合するが、非リン酸化Ser422を含むタウには結合しない抗体を提供する。さらに、本発明は、ホスホ-Ser422を含むタウを検出するための方法を提供する。さらに、本発明は、ホスホ-Ser422を含むタウを検出するために抗体を用いることを提供する。さらに、本発明は、ホスホ-Ser422を含むタウを検出するためのキットを提供する。さらに、本発明は、抗体を産生する細胞を提供する。

【0018】

より具体的には、本発明は以下の(1)~(24)を提供する。

本発明(1)は、A1がAspまたはAsnであって、A2がMetまたはLeuであって、A3がValまたはLeuであって、A4がAspまたはGluであって、およびA5がAspまたはGluである、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープに結合するが、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープには結合しない、抗体またはその断片である。

本発明(2)は、A1がAsp、A2がMet、A3がVal、A4がAsp、およびA5がAspである、本発明(1)の抗体である。

本発明(3)は、A1がAsn、A2がLeu、A3がLeu、A4がGlu、およびA5がGluである、本発明(1)の抗体である。

本発明(4)は、ホスホSer422を含むタウに結合するが、非リン酸化Ser422を含むタウには結合しない、本発明(1)または(2)の抗体である。

本発明(5)は、ホスホ-Ser1808を含むMAP2に結合するが、非リン酸化Ser1808を含むMAP2には結合しない、本発明(1)~(4)のいずれか一発明の抗体である。

本発明(6)は、Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Aspからなるペプチドに対するそのKdが100 nMより低い、本発明(2)の抗体である。

本発明(7)は、モノクローナル抗体である、本発明(1)~(6)のいずれか一発明の抗体である。

本発明(8)は、ハイブリドーマDSM ACC2762またはDSM ACC2763によって産生される、

10

20

30

40

50

本発明(1)～(7)のいずれか一発明の抗体である。

本発明(9)は、以下の段階を含む、神経障害を診断するための方法である：

- (a) 試料を本発明(1)～(8)のいずれか一発明の抗体に接触させる段階；および
- (b) 抗体とタウまたはMAP2との間に形成された複合体を検出する段階。

本発明(10)は、神経障害がアルツハイマー病である、本発明(9)の方法である。

本発明(11)は、以下の段階を含む、ホスホ-Ser422を含むタウを検出するための方法である：

- (a) 試料を本発明(1)～(8)のいずれか一発明の抗体に接触させる段階；および
- (b) 抗体とタウとの間に形成された複合体を検出する段階。

本発明(12)は、以下の段階を含む、ホスホ-Ser1808を含むMAP2を検出するための方法である：

- (a) 試料を本発明(1)～(8)のいずれか一発明の抗体に接触させる段階；および
- (b) 抗体とMAP2との間に形成された複合体を検出する段階。

本発明(13)は、複合体が、ウェスタンブロッティング、免疫組織化学、またはELISAによって検出される、本発明(11)または(12)の方法である。

本発明(14)は、神経障害の診断のための、本発明(1)～(8)のいずれか一発明の抗体の使用である。

本発明(15)は、神経障害がアルツハイマー病である、本発明(14)の使用である。

本発明(16)は、ホスホ-Ser422を含むタウを検出するための、本発明(1)～(8)のいずれか一発明の抗体の使用である。

本発明(17)は、ホスホ-Ser1808を含むMAP2を検出するための、本発明(1)～(8)のいずれか一発明の抗体の使用である。

本発明(18)は、本発明(1)～(8)のいずれか一発明の抗体を含む、神経障害を診断するためのキットである。

本発明(19)は、神経障害がアルツハイマー病である、本発明(18)のキットである。

本発明(20)は、本発明(1)～(8)のいずれか一発明の抗体を含む、ホスホ-Ser422を含むタウを検出するためのキットである。

本発明(21)は、本発明(1)～(8)のいずれか一発明の抗体を含む、ホスホ-Ser1808を含むMAP2を検出するためのキットである。

本発明(22)は、本発明(1)～(8)のいずれか一発明の抗体を産生する細胞である。

本発明(23)は、細胞がハイブリドーマである、本発明(22)の細胞である。

本発明(24)は、ハイブリドーマがDSM ACC2762またはDSM ACC2763である、本発明(23)の細胞である。

【発明の効果】

【0019】

本発明により、リン酸化ポリペプチドを認識する抗体が提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本発明は、A1がAspまたはAsnであって、A2がMetまたはLeuであって、A3がValまたはLeuであって、A4がAspまたはGluであって、およびA5がAspまたはGluである、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 (SEQ ID NO: 9)からなるエピトープに結合するが、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 (SEQ ID NO: 8)からなるエピトープには結合しない、抗体を提供する。本発明において、「Ser(PO_3H_2)」は、リン酸化セリンを意味する。

【0021】

一つの態様において、本発明の抗体は、Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp (SEQ ID NO: 6)からなるエピトープに結合するが、Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp (SEQ ID NO: 4)からなるエピト

10

20

30

40

50

ープには結合しない。

【0022】

好ましい態様において、本発明は、ホスホSer442を含むリン酸化タウに結合するが、非リン酸化Ser422を含むタウには結合しない、抗体を提供する。

【0023】

タウには、胎児性-タウ、タウ-A、タウ-B、タウ-C、タウD、タウ-E、タウ-F (Swiss-Prot; 登録名: TAU_HUMAN、プライマリアクセション番号: P10636) のような、いくつかのサブライシングイソ型が存在する。本発明において、好ましくはタウは、SEQ ID NO: 1の配列を有するポリペプチドである。「タウ」という用語はまた、SEQ ID NO: 1の配列を有するポリペプチドのサブライシングイソ型、変種、誘導體、相同体、または断片を含む。タウが、SEQ ID NO: 1の配列を有するポリペプチドのサブライシングイソ型、変種、誘導體、相同体、または断片である場合、タウはSer-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Aspの配列を含むことが好ましい。

10

【0024】

「リン酸化タウ」という用語は、少なくとも一つのアミノ酸がリン酸化されているタウを指す。

【0025】

「ホスホ-Ser422」という用語は、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列における位置によって定義される422位でのリン酸化セリンを指す。「ホスホ-Ser422」という用語はまた、サブライシングイソ型、誘導體、変種、相同体、または断片でのリン酸化セリンを含み、これはSEQ ID NO: 1の配列を有するポリペプチドの422位でのリン酸化セリンに対応する。

20

【0026】

本発明の抗体は、ホスホ-Ser422を含むタウに対して高い結合親和性を有することが好ましい。本明細書において用いられるように、「高い結合親和性」という用語は、ホスホSer422を含むタウに対する抗体の解離定数 K_d が100 nMより低いことを意味する。抗体の K_d は、当業者に公知の方法によって決定することができる。例えば、 K_d は実施例4において記述される条件下でBiacoreによる表面プラズモン共鳴を用いて決定される。 K_d を決定するためには、Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Aspからなるペプチドを用いることが好ましい。

【0027】

一つの態様において、本発明の抗体は、Ser-Ile-Asn-Leu-Leu-Glu-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Glu (SEQ ID NO: 7)からなるエピトープに結合するが、Ser-Ile-Asn-Leu-Leu-Glu-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Glu (SEQ ID NO: 5)からなるエピトープには結合しない。

30

【0028】

好ましい態様において、本発明の抗体は、ホスホ-Ser1808を含むMAP2 (微小管関連タンパク質2) に結合するが、非リン酸化Ser1808を含むMAP2には結合しない。

【0029】

MAP2には、イソ型1、イソ型2、またはイソ型3のようないくつかのイソ型が存在する (Swiss-Prot; 登録名: MAP2_HUMAN、プライマリアクセション番号: P11137)。本発明において、好ましくは、MAP2は、SEQ ID NO: 2の配列を有するポリペプチドである。「MAP2」という用語はまた、SEQ ID NO: 2の配列を有するポリペプチドのサブライシングイソ型、誘導體、変種、相同体、または断片を含む。MAP2がSEQ ID NO: 2の配列を有するポリペプチドのサブライシングイソ型、誘導體、変種、相同体、または断片である場合、MAP2はSer-Ile-Asn-Leu-Leu-Glu-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Gluの配列を有することが好ましい。

40

【0030】

「リン酸化MAP2」という用語は、少なくとも一つのアミノ酸がリン酸化されているMAP2を指す。

【0031】

50

「ホスホ-Ser1808」という用語は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列における位置によって定義されるように、1808位でのリン酸化セリンを指す。「ホスホ-Ser1808」という用語はまた、SEQ ID NO: 2の配列を有するポリペプチドの1808位でのリン酸化セリンに対応する、スプライシングイソ型、誘導體、変種、相同体、または断片のリン酸化セリンを含む。

【0032】

抗体がエピトープに結合するか否かは、ウェスタンブロット、酵素免疫アッセイ、または表面プラズモン共鳴のような、周知の方法によって決定することができる。エピトープの配列からなるポリペプチド、エピトープの配列を含むタンパク質全体、またはタンパク質の断片を、結合を検出するために用いることができる。

【0033】

本発明の抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよい。好ましい態様において、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。

【0034】

「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の群、すなわち少量存在する天然の変異体を除き、群を構成する抗体が均一である抗体群から得られた抗体を指す。

【0035】

好ましい態様において、本発明の抗体は、ハイブリドーマMAK<pTAU>M.2.5.2またはMAK<pTAU>M.2.20.4によって産生された抗体である。ハイブリドーマMAK<pTAU>M.2.5.2は、2006年3月15日にDSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託番号DSM ACC2762として寄託された。ハイブリドーマMAK<pTAU>M.2.20.4は、2006年3月15日にDSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託番号DSM ACC2763として寄託された。

【0036】

ハイブリドーマDSM ACC2762 (MAK<pTAU>M.2.5.2) またはDSM ACC2763 (MAK<pTAU>M.2.20.4) によって産生された抗体は、ホスホ-Ser422を含むタウに対して高い親和性および高い選択性を有し、非リン酸化Ser422を含むタウに対して交叉反応性を有しない。さらに、ハイブリドーマによって産生された抗体は、ホスホ-Ser1808を含むMAP2に結合するが、非リン酸化Ser1808を含むMAP2には結合しない。これらの抗体は、ホスホ-Ser422を含むタウ、またはホスホ-Ser1808を含むMAP2を検出するために用いることができる。ハイブリドーマDSM ACC2762またはDSM ACC2763によって産生された抗体は、アルツハイマー病のような神経疾患の診断にとって適している。ハイブリドーマDSM ACC2762またはDSM ACC2763によって産生された抗体はまた、ホスホ-Ser422を含むタウ、またはホスホSer1808を含むMAP2の検出にも適している。

【0037】

本発明の抗体は、公知の技術を用いてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。例えば、モノクローナル抗体はハイブリドーマ法 (Kohler G. and Milstein C., Nature 256(1975)495-497) または組換え法 (米国特許第4,816,567号) によって産生されうる。モノクローナル抗体はまた、ファージ抗体ライブラリ (Clackson T., Nature 352(1991)624-628) から単離することができる。

【0038】

抗体を産生するハイブリドーマは、本質的に公知の技術を用いて調製されうる。例えば、以下の方法を用いることができる。感作抗原を用いて通常の免疫法によって動物を免疫し、免疫細胞を得て、次いで通常の細胞融合法によって免疫細胞を公知の親細胞に融合させる。融合した細胞を通常のスクリーニング法によって、モノクローナル抗体産生細胞に関してスクリーニングする。より具体的には、モノクローナル抗体は以下のように得ることができる。

【0039】

第一に、感作抗原として用いるために、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 (A1はAspまたはAsn、A2はMetまたはLeu、A3はValまたはLeu、A4はAspまた

10

20

30

40

50

はGlu、およびA5はAspまたはGluである)の配列を有する断片を調製する。断片は、化学合成によってまたは断片をコードする遺伝子を含む宿主細胞を培養することによって調製することができる。次に、断片をキナーゼ、例えばERK2キナーゼによってリン酸化する。断片を含む全てのタンパク質をまた感作抗原として用いてもよい。本発明において、好ましい感作抗原は、Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Aspの配列を有する、タウのリン酸化断片である。

【0040】

感作抗原によって免疫される哺乳動物種のタイプに制限はない。しかし、哺乳動物は好ましくは、細胞融合に用いられた親細胞とのその適合性に基づいて選択される。一般的に、例えばマウス、ラット、ハムスターのような齧歯類、またはウサギ、およびサルを用いることができる。

10

【0041】

動物を感作抗原によって免疫するために、公知の方法を用いてもよい。哺乳動物に感作抗原を腹腔内または皮下に注射する日常的な方法のような、周知の方法によって、動物を感作抗原によって免疫することができる。具体的には、感作抗原をリン酸緩衝食塩液(PBS)、生理食塩液等によって適切に希釈した後、懸濁させる。通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントの適当量を必要に応じて懸濁液と混合する。次に、乳剤を4~21日間隔で哺乳動物に数回投与するために調製する。免疫の際に、感作抗原に関して適当な担体を用いてもよい。

【0042】

哺乳動物を先に記述したように免疫する。血清中の標的抗体の力価の増加が確認された後、免疫細胞を哺乳動物から採取し、細胞融合に供する。脾細胞が好ましい免疫細胞である。

20

【0043】

哺乳動物の骨髓腫細胞を、上記の免疫細胞と融合させるための親細胞として用いる。用いられる好ましい骨髓腫細胞には、様々な公知の細胞株、例えばP3(P3x63Ag8.653)(Kearney JF, et al., J. Immunol. 123, 1548-1550(1979))、P3x63Ag8U.1(Yelton DE., et al., Current Topics in Microbiology and Immunology 81, 1-7(1978))、NS-1(Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. 6, 511-519(1976))、MPC-11(Margulies, D.H. et al., Cell 8, 405-415(1976))、SP2/0(Shulman, M. et al., Nature 276, 269-270(1978))、FO(deSt. Groth, S.F. et al., J. Immunol. Methods 35, 1-21(1980))、S194(Trowbridge, I. S., J. Exp. Med 148, 313-323(1978))、およびR210(Galfre, G. et al., Nature 277, 131-133(1979))が含まれる。

30

【0044】

先に記述したように、免疫細胞と骨髓腫細胞の間の細胞融合は、本質的に、当業者に公知の方法、例えばKohler and Milsteinの方法(Kohler, G. and Milstein, C. Methods Enzymol. 73:3-46(1981))を用いて行うことができる。

【0045】

より具体的には、上記の細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の培養培地において行ってもよい。融合促進剤には、ポリエチレングリコール(PEG)およびセンダイウイルス(HVJ)が含まれるがそれらに限定されるわけではない。必要であれば、融合効率を改善するために、ジメチルスルホキシドのような補助物質を加えてもよい。

40

【0046】

免疫細胞対骨髓細胞の比は、自身の裁量で決定してもよく、好ましくは骨髓腫細胞1個に対して免疫細胞1個~10個である。上記の細胞融合のために用いられる培養培地には、例えばRPMI 1640培地およびMEM培地のような上記の骨髓腫細胞株の増殖にとって適した培地、ならびにこのタイプの細胞培養のために用いられる他の通常の培養培地が含まれる。さらに、ウシ胎児血清(FCS)のような血清添加剤もまた組み合わせて用いてもよい。

【0047】

細胞融合は以下のように行われる。先に記述したように、既定量の免疫細胞および骨髓

50

腫細胞を培養培地において十分に混合する。予め37 に加熱したPEG溶液（例えば、平均分子量約1,000～6,000）を、典型的に30%～60%（w/v）の濃度で細胞懸濁液に加えて混合し、融合細胞（ハイブリドーマ）を産生する。次に、適当な培養培地を混合物に連続的に加え、試料を遠心して上清を除去する。この処理を数回繰り返して、望ましくない細胞融合促進剤およびハイブリドーマの増殖にとって好ましくない他の物質を除去する。

【0048】

得られたハイブリドーマのスクリーニングを、通常の選択培地、例えば、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（HAT）培地においてそれらを培養することによって行うことができる。上記のHAT培地における培養は、望ましいハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）を殺すために十分に長い期間（典型的に、数日から数週間）継続される。次に、ハイブリドーマを、通常の限界希釈法によって、標的抗体を産生することができる単細胞クローンに関してスクリーニングする。

10

【0049】

非ヒト動物を抗原によって免疫することによって上記のハイブリドーマを調製するための方法の他に、ヒト抗体はまた、ヒトリンパ球を感作抗原によってインビトロで感作すること；および永続的に分裂することができるヒト骨髄腫細胞に感作されたリンパ球を融合させることによって得ることができる（例えば、日本国特許出願番号（JP-B）Hei 1-59878を参照されたい）。

【0050】

または、抗体を産生する不死化細胞から、ヒト抗体を得ることが可能である。この方法では、ヒト抗体遺伝子全体のレポーターを含むトランスジェニック動物に、感作された抗原を投与することによって、抗体を産生する細胞を調製する（例えば、WO 94/25585、WO 93/12227、WO 92/03918、およびWO 94/02602を参照されたい）。

20

【0051】

このように調製されたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを通常の培養培地において継代し、液体窒素中で長期間保存することができる。

【0052】

例えば、ハイブリドーマを培養して培養上清から抗体を得る、という日常的な技法によって、上記のハイブリドーマからモノクローナル抗体を調製することができる。

【0053】

モノクローナル抗体がハイブリドーマから得られた後、組換え型抗体もまた、通常の方法によって調製することができる。

30

【0054】

本発明の抗体は、標識された抗体であってもよい。抗体の標識に関して、放射活性物質（例えば、³²P、¹²⁵I、³H、¹³¹I、¹⁴C）、蛍光体（例えば、フルオレセイン、ローダミン、ウンベリフェロン）、酵素（例えばルシフェラーゼ、オキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ライソザイム、グルコアミラーゼ）、補酵素（例えばピオチン）、または化学発光基質のような公知の標識を用いることができる。抗体の標識は、例えばグルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法または過ヨウ素酸法のような周知の方法によって行うことができる。

40

【0055】

本発明の抗体はまた、断片が、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープに結合することができるが、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープには結合しない限り、抗体の断片であってもよい（A1はAspまたはAsn、A2はMetまたはLeu、A3はValまたはLeu、A4はAspまたはGlu、およびA5はAspまたはGluである）。抗体の断片は、Fab、Fab'、Fv、F(ab')₂、scFv、sc(Fv)₂、または二重特異性抗体であってもよいがこれらに限定されるわけではない。

【0056】

好ましくは、本発明の抗体は、SEQ ID NO: 1におけるアミノ酸の位置によって定義される422位でリン酸化セリンを含むタウまたはその断片と免疫複合体を形成する。より好ま

50

しくは、タウまたはその断片は、AD患者、またはNFTが存在する任意の他の神経障害を有する患者の剖検に由来する脳組織から単離される。好ましくは、本発明の抗体は、脳にNFTが発生していない他の疾患により死亡した、またはそのような疾患に苦しむ患者からの剖検由来脳材料とは、そのような免疫複合体を形成しない。

【0057】

本発明の抗体は、リン酸化ポリペプチドを検出することによって、アルツハイマー病のような神経障害を診断するために用いることができる。本発明の抗体はまた、ホスホ-Ser422を含むリン酸化タウ、またはホスホ-Ser1808を含むリン酸化MAP2のような、A1がAspまたはAsnであって、A2がMetまたはLeuであって、A3がValまたはLeuであって、A4がAspまたはGluであって、およびA5がAspまたはGluである、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5の配列を含むリン酸化ポリペプチドを検出するために用いることができる。

10

【0058】

その上、本発明は、本発明の抗体を産生する細胞を提供する。本発明の細胞はハイブリドーマまたは組換え型細胞であってもよい。

【0059】

本発明の抗体を産生するハイブリドーマは、先に記述した通常の方法によって得ることができる。好ましい態様において、本発明のハイブリドーマは、ハイブリドーマDSM ACC2762またはDSM ACC2763である。ハイブリドーマDSM ACC2762は、2006年3月15日にDSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託番号DSM ACC2762として寄託された。ハイブリドーマDSM ACC2763は、2006年3月15日にDSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託番号DSM ACC2763として寄託された。

20

【0060】

本発明の組換え型細胞は、周知の方法によって得ることができる。具体的には、そのような組換え型細胞は以下のように得ることができる。

【0061】

A1がAspまたはAsnであって、A2がMetまたはLeuであって、A3がValまたはLeuであって、A4がAspまたはGluであって、およびA5がAspまたはGluである、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープに結合するが、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープには結合しない抗体の可変(V)領域をコードするmRNAを、そのような抗体を産生するハイブリドーマから単離する。

30

【0062】

mRNAを単離するために、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry 18, 5294-5299(1979))または酸グアニジニウムチオシアネート-フェノール-クロロホルム(AGPC)法(Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 162, 156-159(1987))のような通常の方法によって、総RNAを最初に調製した後、mRNA精製キット(Pharmacia)等を用いて標的mRNAを調製する。または、mRNAはQuickPrep mRNA精製キット(Pharmacia)を用いて直接調製することができる。

40

【0063】

得られたmRNAから、逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNA合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesisキット(Seikagaku Co.)等を用いて行う。または、cDNAは、5'-Ampli FINDER RACEキット(Clontech)およびPCRを用いる5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002(1988); Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932(1989))によって合成および増幅することができる。

【0064】

得られたPCR産物から標的DNA断片を精製した後、ベクターDNAにライゲーションして組

50

換え型ベクターを調製する。ベクターを大腸菌 (*E. coli*) 等に導入し、関心対象となる組換え型ベクターを調製するためにコロニーを選択する。次に、標的DNAヌクレオチド配列を、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法のような通常の方法によって確認する。

【0065】

標的抗体のV領域をコードするDNAが得られた後、DNAを、所望の抗体の定常領域 (C領域) をコードするDNAを含む発現ベクターに挿入する。

【0066】

抗体を産生する細胞を得るための方法は典型的に、遺伝子がエンハンサーおよびプロモーターのような発現調節領域の調節下で発現されるように、抗体遺伝子を発現ベクターに挿入する段階、および得られたベクターによって宿主細胞を形質転換することによって抗体を発現させる段階を含む。H鎖およびL鎖をそれぞれコードするポリヌクレオチドを、異なる発現ベクターに挿入し、宿主細胞に同時トランスフェクトすることができる。または、H鎖およびL鎖の双方をコードするポリヌクレオチドを単一の発現ベクターに挿入し、宿主細胞にトランスフェクトすることができる (例えば、WO 94/11523を参照されたい)。宿主細胞は、それらが抗体を産生することができる限り、限定されない。例えば、細胞はCHO、COS、NIH3T3、骨髄腫、BHK、HeLa、Vero、両生類細胞、昆虫細胞、植物細胞、または大腸菌のような細菌細胞であってもよい。

【0067】

さらに、本発明は、神経障害を診断するための方法を提供する。神経障害を診断するための方法は、以下の段階を含む：(a) 試料を本発明の抗体に接触させる段階、および(b) 抗体とタウまたはMAP2との間に形成された複合体を検出する段階。

【0068】

本発明はさらに、ホスホ-Ser422を含むタウを検出するための方法を提供する。ホスホ-Ser422を含むタウを検出するための方法は、(a) 試料を本発明の抗体に接触させる段階、および(b) 抗体とタウとの間に形成された複合体を検出する段階を含む。

【0069】

本発明はさらに、ホスホ-Ser1808を含むMAP2を検出するための方法を提供する。ホスホ-Ser1808を含むMAP2を検出するための方法は、(a) 試料を本発明の抗体に接触させる段階、および(b) 抗体とMAP2との間に形成された複合体を検出する段階を含む。

【0070】

本明細書において用いられるように、「神経障害」という用語は、ホスホ-Ser422を含むタウもしくはホスホ-Ser1808を含むMAP2によって引き起こされる疾患、またはホスホ-Ser422を含むタウもしくはホスホ-Ser1808を含むMAP2が患者から検出される疾患のような、ホスホ-Ser422を含むタウもしくはホスホ-Ser1808を含むMAP2に関連する疾患を指す。「神経障害」という用語には、アルツハイマー病、ダウン症候群、ピック病、進行性核上麻痺、および皮質基底核変性症が含まれるがそれらに限定されるわけではない。

【0071】

本発明の方法において用いられる試料は、試料がタウまたはMAP2を含む可能性が存在する限り、限定されないが、ヒトから得られた生物試料が好ましい。生物試料には、脳脊髄液、血清、血液、組織、(例えば、脳組織) および細胞 (例えば、脳細胞) が含まれるがそれらに限定されるわけではない。

【0072】

試料と本発明の抗体との接触は、抗体とタウの間に複合体を形成させる、または抗体とMAP2との間に複合体を形成させる条件下で達成することができる。そのような条件は当業者に周知である。

【0073】

抗体とタウの間に形成された複合体、または抗体とMAP2との間に形成された複合体の検出は、ウェスタンブロット、酵素免疫測定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、免疫沈降、免疫染色、免疫拡散、および表面プラズ

10

20

30

40

50

モン共鳴バイオセンサー（BIAコアのような）などの酵素イムノアッセイのような、通常の方法で行うことができる。

【0074】

本発明の方法は、インビトロまたはインビボで行ってもよいが、インビトロ法が好ましい。

【0075】

本発明はまた、アルツハイマー病のような神経障害を診断するために本発明の抗体を用いることを提供する。本発明はまた、ホスホ-Ser422を含むタウ、またはホスホ-Ser1808を含むMAP2のようなリン酸化ポリペプチドを検出するために本発明の抗体を用いることを提供する。

10

【0076】

本発明の抗体は、インビボまたはインビトロで用いてもよい。好ましい態様において、本発明の抗体はインビトロで用いられる。

【0077】

本発明は、A1がAspまたはAsnであって、A2がMetまたはLeuであって、A3がValまたはLeuであって、A4がAspまたはGluであって、およびA5がAspまたはGluである、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープに結合するが、Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5からなるエピトープには結合しない抗体を含むキットを提供する。キットは、例えば、神経障害を診断するため、ホスホ-Ser422を含むタウを検出するため、またはホスホ-Ser1808を含むMAP2を検出するため

20

【0078】

キットは、不溶性の多糖類（例えばアガロースまたはセルロース）、合成樹脂（例えば、ポリスチレン樹脂、シリコン樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、ポリカーボネート樹脂、またはナイロン樹脂）、または不溶性の支持体（例えば、ガラス）のような担体を含んでもよい。抗体は担体に固定してもよい。

【0079】

キットは、反応液、ブロッキング溶液、またはイムノアッセイにおいて用いられる他の試薬のような試薬を含んでもよい。

【0080】

本発明を一般的に記述したが、特定の実施例を以下の図面と結びつけて参照することによって、本発明はより良好に理解されるようになるであろうが、これらの実施例は説明する目的のみのために本発明に含まれ、特に明記していなければ制限を意図しない。

30

【実施例】

【0081】

以下の実施例は、本発明の特定の局面を単に説明するために役立つのであって、本発明の範囲を制限すると見なすべきではない。

【0082】

実施例1：モノクローナル抗体の生成

A. マウスの免疫

40

マウスを、ヒトタウの最も長いイソ型のアミノ酸415～430位に対応する以下のアミノ酸配列、Cys-Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Aspを含むホスホペプチドによって免疫した（ペプチドはNeoMPS、Strasbourgによって合成した）。天然のAsp415をCysに置換し、チオールによってKLHに定方向に共役させた。

【0083】

10～12週齢の雌性Balb/c（Jackson Laboratory, stock#001026）およびNMRIマウス（Jackson Laboratory, stock#003076）に、フロイント完全アジュバントにおいてホスホペプチド100 μg を腹腔内注射した。マウスには、1ヶ月間隔でフロイント不完全アジュバントにおいてペプチド100 μg の腹腔内注射をさらに3回行った。PBSにおけるペプチド50 μg の静脈内注射による最後の免疫を行って、3、2および1日後に脾臓を採取した。

50

【 0 0 8 4 】

B. 融合およびクローニング

免疫したマウス由来の脾細胞の融合は、Galfre and Milstein, Methods in Enzymology, 73(1981)3-46に従って実施した。このように、各免疫マウス由来の脾細胞 1×10^8 個を骨髓腫細胞 (P3X63-Ag8-653, ATCC CRL 1580) 2×10^7 個と混合し、 $300 \times g$ で室温で10分間遠心した。次に、細胞をRPMI-1640培地 (FCSを含まない) によって1回洗浄し、遠心管において $300 \times g$ で10分間もう1回遠心した。遠心管を軽くたたいて、細胞をほぐし、予め加熱した水浴中で 37°C に加熱した。1分間放置した後、PEG (分子量1500のポリエチレングリコール、Roche Diagnostics) 1 mlを加えた。次に、RPMI-1640培地 (FCSを含まない) 5 mlを、軽く攪拌しながら滴下して加えて、10% FCSを含むRPMI-1640培地を加えることによって最終的に容量を50 mlに調節した。次に、細胞懸濁液を $300 \times g$ で10分間遠心した。細胞沈降物を、10% FCSを含むRPMI-1640培地に再懸濁し、ヒポキサンチン-アザセリン選択培地 (RPMI-1640 + 10% FCSにおいて、100 mMヒポキサンチン [Sigma]、 $1 \mu\text{g/ml}$ アザセリン [Sigma]) に播種した。培地には、50 U/mlインターロイキン-6 (Roche Applied Science) を添加した。

10

【 0 0 8 5 】

10日後、初代培養物を特異的抗体産生に関して試験した (実施例2を参照されたい)。ホスホペプチドと正の反応を示し、非リン酸化ペプチドと反応を示さない初代培養物を、96ウェル細胞培養プレートにおいて蛍光活性化細胞ソーティングによってクローニングした。ここで使用した培地は、10% FCSおよび25 U/mlインターロイキン-6を添加したRPMI-1640培地であった。

20

【 0 0 8 6 】

このようにして得られたハイブリドーマ細胞株/クローン2種を、DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) に寄託した。

【 0 0 8 7 】

表1はハイブリドーマの詳細を示す

【 0 0 8 8 】

【表 1】

クローン	2006年3月15日にDSMZに以下の番号で寄託	IgGサブクラス
2.5.2	DSM ACC2762	Ig G2a; κ 軽鎖
2.20.4	DSM ACC2763	Ig G2a; κ 軽鎖

30

【 0 0 8 9 】

C. 細胞培養上清からの抗体精製

このようにして得られたハイブリドーマ細胞を、10% FCSおよび25 U/mlインターロイキン-6を添加したRPMI-1640培地において密度 1×10^5 個/mlで播種し、細胞密度約 3×10^5 個/mlまで増殖させた。細胞を最終容積250 mlで 1×10^6 個/mlに希釈し、最大細胞密度まで増殖させた。次に、細胞を遠心によって除去した。ハイブリドーマ培養上清は典型的に、約40 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ 抗体を含んだ。

【 0 0 9 0 】

それぞれの抗体を以下のように精製した。無細胞ハイブリドーマ培養上清 (250 ~ 300 ml) を、50 mM TrisCl pH 8.0によって平衡化したMEP HyperCelカラム (Pall Biosciences

40

50

) 25 mlにローディングした。平衡緩衝液による洗浄後、抗体を30 mMクエン酸ナトリウム/100 mM NaCl pH 4.1によって溶出した。抗体を含む分画をプールした後、4 でSourceQ緩衝液A 5 Lに対して終夜透析した (Spectra/Por 6-8000)。透析したMEPプールを、10 mM TrisCl pH 8.0 (緩衝液A) によって平衡化した10 mlのSource 15Qカラム (GEヘルスケア) にローディングした。緩衝液Aによって洗浄した後、抗体をカラム容積の10倍量の0~25%の緩衝液Bの勾配によって溶出した。緩衝液Bは10 mM TrisCl/1 M NaCl pH 8.0を含んだ。抗体は約200 mM NaClで溶出した。個々の分画の純度をSDS-PAGEによってチェックし、最も純粋な分画をプールした。このようにして精製された抗体の収量は約10 mg/ハイブリドーマ培養上清250 mlであった。

【0091】

実施例2: 抗-タウ/pSer-422特異的抗体に関するスクリーニング

A. ホスホペプチド (タウ416-430/pSer-422) に対する抗体の特異性の決定

細胞培養上清における抗体の特異性を測定するために、ストレプトアビジンコーティングマイクロタイタープレート (MicroCoat, Bernried, DE) を、PBS、0.5% Byco C (100 µg/ウェル、振とうさせながら室温で1時間インキュベーション) 中で、0.1 µg/mlビオチン化ホスホペプチド (タウ416-430/pSer-422) でコーティングした。次に、プレートを洗浄緩衝液 (0.9% NaCl/0.05% Tween 20) によって3回洗浄した。次に、抗体含有培養上清100 µlを各ウェルに添加し、プレートを振とうさせながら室温で1時間インキュベートした。次に、プレートを洗浄緩衝液によって3回洗浄した。結合抗体を検出するために、ポリクローナル抗マウス抗体/ペルオキシダーゼ共役体 (Dianova) 100 µl/ウェルを室温で1時間インキュベートした。プレートをその後再度洗浄した。最後に、ABTS溶液 (Roche Diagnostics) 100 µl/ウェルを添加し、プレートを室温で20分間インキュベートした。プレートをX Read Plusマイクロプレートリーダー (Tecan) で405 nmで読み取った。

【0092】

B. 非リン酸化ペプチド (タウ416-430) との抗体交叉反応性の測定

マイクロタイタープレートを非リン酸化ペプチド (タウ416-430) によってコーティングしたことを除き、上記と同じ技法を用いた。

【0093】

C. 遊離のホスホペプチド (タウ416-430/pSer-422) に対する結合の測定

各細胞培養上清100 µl/ウェルを、抗マウスFc 抗体 (MicroCoat, Bernried, DE) によって予めコーティングしておいたマイクロタイタープレートにピペットで分注した。プレートを、振とうさせながら室温で1時間インキュベートし、その後洗浄緩衝液によって3回洗浄した。次に、50 nMビオチン化ホスホペプチド (タウ416-430/pSer-422) を100 µl/ウェルで添加し、プレートを振とうさせながら室温で1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄した後、50 U/mlストレプトアビジン/ペルオキシダーゼ共役体 (Dianova) 100 µl/ウェルと共に室温で1時間インキュベートした。プレートをもう一度洗浄した後、100 µl/ウェルABTS溶液 (Roche Applied Science) によって室温で20分間顕色させた。次にプレートを、X Read Plusマイクロプレートリーダーで405 nmで読み取った。

【0094】

D. 遊離の非リン酸化ペプチド (タウ416-430) に対する抗体結合の測定

マイクロタイタープレートを、非リン酸化ペプチド (タウ416-430) によってコーティングしたことを除き、上記と同じ手順を用いた。

【0095】

上記の方法を用いて、寄託された抗体はいずれも、固定および遊離のホスホペプチド (タウ416-430/pSer-422) に対して良好な結合を示した。非リン酸化ペプチド (タウ416-430) との交叉反応性は観察されなかった。

【0096】

実施例3: ウェスタンブロットによる、完全長のリン酸化タウタンパク質およびリン酸化変異体タウタンパク質 (S422A) に対する抗体特異性の決定

異なる4つのタウ種、すなわちタウ、タウS422A (422位でのSer Ala変異)、p-タウ (

10

20

30

40

50

リン酸化タウ)、およびp-タウS422A(422位でのSer→Ala変異を含むリン酸化タウ)のそれぞれの認識能に関して、抗体を試験した。タウおよびタウS422Aを大腸菌において発現させ、標準的な方法に従って精製した。次に、双方のタンパク質を、タウにおける他の多数の部位と同様にS422においてリン酸基を導入することが示されたERK2キナーゼによってリン酸化した。SDS-PAGEゲルに4つのタウ種各150 ngをローディングした;電気泳動後、タンパク質を標準的なウェスタンブロッティングプロトコールによってニトロセルロースに転写した。プロットを、StartingBlock(Perbio)によって2倍希釈しておいた個々のハイブリドーマ細胞培養上清と共に4℃で終夜インキュベートした。標準的な洗浄技法の後、プロットを2 ng/ml抗マウス抗体/西洋ワサビペルオキシダーゼ共役体(Perbio)と共に室温で1時間インキュベートした。次に、プロットを洗浄し、LumiLight ECL基質(Roche Applied Science)によって顕色した。図1Aにおいて示されるように、抗体2.5.2および2.20.4(表1)は、非リン酸化タウとも、Ser422以外のSer(またはThr)残基でリン酸化されたタウとも交叉反応性を示さなかった。このように、抗体は、標的ホスホエピトープに関して非常に選択的である。図1Bはモノクローナル抗体AP422の特異性を示す。モノクローナル抗体AP422は、Prof. M. Hasegawa(University of Tokyo, Japan)から得て、TBSt緩衝液において1%乳汁と共に1:2000倍希釈した。プロットを4℃で終夜インキュベートした。翌日、プロットを洗浄し、TBSt緩衝液において1%乳汁で1:5000倍希釈した抗マウス/西洋ワサビペルオキシダーゼ(Pierce)と共に室温で1時間インキュベートした。検出はRoche ECLシステムによって行った。抗体AP422は非リン酸化タウと交叉反応性を示した。

10

20

【0097】

実施例4: k_{on} 、 k_{off} 、 K_A 、および K_d の決定

速度定数 k_{on} および k_{off} ならびに得られた解離定数 K_d を、表面プラズモン共鳴(BIAcore ABのBIAcore 2000)を用いて決定した。

【0098】

NHS/EDC活性化センサーチップ(CM5, BIAcore AB)を、10 mM酢酸ナトリウム-酢酸pH 5.0中で、15 μ g/mlの濃度のウサギ抗マウスIgGによって、流速20 μ l/分で5分間コーティングした。細胞培養上清を、10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.05%ポリソルベート中で最終抗体濃度50 nMに希釈し、2分間にわたって流速10 μ l/分で注入した。10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.05%ポリソルベート中で、ホスホペプチドまたは非リン酸化ペプチド(0~1000 nM)を流速100 μ l/分で2分間注入した。この後、10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.05%ポリソルベート中で5分間解離させた。

30

【0099】

k_{on} および k_{off} は、BIAcore評価ソフトウェア(バージョン4.1, BIAcore AB)を用いて二重参照の後にセンサーグラム(sensogram)から算出した。モデルを1:1(ラングミュア)結合相互作用を用いてデータの組に対して包括的に適合させた。結合定数 K_A は k_{on}/k_{off} から算出した。

【0100】

得られた値を以下に要約する。いずれの抗体も低いナノモル範囲の K_d 値を有し、このように、高い親和性でpSer422に結合すると見なすことができる。いずれの抗体も非リン酸化ペプチドといかなる相互作用も示さず、それらがホスホエピトープに対して非常に選択的であることを示し、実施例3におけるウェスタンブロットの結果を裏付ける。

40

【0101】

表2は、抗体2.5.2および抗体2.20.4の k_{on} 、 k_{off} 、 K_A 、および K_d を示す。

【0102】

【表 2】

タウ 416-430/pSer422				
クローン	k_{on}	k_{off}	K_a	K_d
	1 / Ms	1 / s	1 / M	nM
2.5.2	8×10^5	8×10^{-3}	9×10^7	11
2.20.4	7×10^5	1×10^{-2}	7×10^7	14

10

【 0 1 0 3 】

実施例 5：AD脳抽出物のウェスタンブロット

Braak病期のAD脳および対照脳からマイクローム切片を調製した。各脳の組織約 50 mg 湿重量をエッペンドルフチューブに分注した。各組織を、手動のガラスホモジナイザーによって、10倍量の氷冷RAB-HS緩衝液中でホモジナイズした。次に、ホモジネートを $50000 \times g$ で 4 で 40分間遠心した。得られた沈降物を Tris-ショ糖-SDS においてホモジナイゼーションによって再懸濁し、 $50000 \times g$ で室温で 40分間遠心した。得られた上清を分析のために保持した。SDS-PAGEゲルに各上清 $4.5 \mu l$ をローディングした。ウェスタンブロットは、第一抗体 (2.5.2、上記のように精製) を StartingBlock において $1 \mu g/ml$ に希釈したことを除き、先に記述したとおりに行った。結果を図2に示す。抗体は、RAB-不溶性/SDS-可溶性脳抽出物中の Ser422 でリン酸化されたタウイソ型を特異的に検出した。過剰リン酸化タウは通常、抽出物のこの分画内で生じることから、これは予測どおりである。正常なタウは、RAB-可溶性分画内で生じ、明らかにいかなる試料においてもこの分画と抗体との交叉反応は見られない。染色強度は、疾患の重症度と相関し、対照脳抽出物では染色は明白ではない。

20

【 0 1 0 4 】

実施例 6：AD脳切片の免疫組織化学分析

アルツハイマー病、Braak病期 VI であると陽性診断を受けた患者から死後に得られたヒト脳の皮質領域由来の非固定脳組織の凍結切片を、抗-p-タウ S422A 抗体 (Wheatley S. and Wang Y., Methods Cell Bio 57(1998)313-332) による間接的免疫蛍光によって標識した。連続的な二段階インキュベーションを用いて、結合した抗-p-タウ S422A 抗体を検出し、これは Alexa 488 (Molecular Probes) に共役させたアフィニティ精製ヤギ抗マウス (GAM) IgG(H+L) によって明らかにされる。A ペプチドに対する対比染色を行って、アミロイド斑を明らかにした。

30

【 0 1 0 5 】

詳細には、低温層 (Leica, CM 3050 S) を用いて -18 で名目上の厚さ $10 \mu m$ の切片を切断した。予め冷却したスライドガラス (Super Frost Plus, Menzel, Germany) に接着させた後、切片を PBS によって水和し、予め冷却した 100% アセトンによって -20 で 2分間処理した。PBS による洗浄を 2分間、2回行った。非特異的結合部位のブロッキングは、1% ウシ血清アルブミン (BSA)、1% 卵白アルブミン (OVA)、および 1% 正常ヤギ血清を含む PBS 中で 20分間インキュベートすることによって行った。抗-p-タウ S422A 抗体を、1% BSA、1% OVA、および 1% 正常ヤギ血清を含む PBS 中で $10 \mu g/ml$ の濃度で 1時間用いた。PBS および 1% BSA による洗浄後、スライドガラスを、1% BSA を含む PBS 中で $15 \mu g/ml$ の Alexa 488 と共役するアフィニティ精製ヤギ抗マウス (GAM) IgG(H+L) (Molecular Probes) と共に 1時間インキュベートした。スライドガラスを PBS および 1% BSA によって 3×5 分間洗浄し、1% BSA を含む PBS 中で $5 \mu g/ml$ の、A に対するモノクローナルマウス抗体 (BAP-2, Dr. M. Brockhaus, F. Hoffmann La Roche, EP130424) によって 1時間対比染色した。スライドガラス

40

50

を3×5分間PBSによって洗浄し、水ですすぎ、リポフスチンの自己蛍光を低減させるために、70%水性エタノール中で0.3%スダンブラックに5分間浸した。70%エタノールで1回すすぎ、水で2回すすいだ後、スライドガラスをPBSによって2×3分間洗浄し、蛍光封入培地 (S3023 Dako) に包埋した。対照には、無関係なマウスIgG1抗体 (Sigma) および二次抗体単独が含まれ、全て陰性の結果を生じた。

【0106】

10x/0.3対物レンズを用いてZeiss Axioplan 2によって画像を記録した。双方の記録された蛍光チャンネルの画像を、Photoshopによって融合した。

【0107】

結果を図3に示す。抗体は、アルツハイマー病の病態に関連する典型的な構造を染色し、これらの最も顕著なものは神経原線維変化である。多数のニューロパイル系も同様に、斑を取り巻く異栄養神経炎と同様に明らかである (アミロイド特異的抗体による対比染色によって可視化される)。

10

【0108】

実施例7: 神経芽腫細胞抽出物中のタウおよびMAP2におけるpSer422を検出するためのウェスタンブロット

モノクローナル抗体を生成するために用いたペプチド免疫原は、タウにおけるS422のすぐ周囲のアミノ酸配列、すなわちS416-IDMVDSPQLATLA-D430に基づく。この配列は、タウにおいてそのC-末端に向かって起こる。タンパク質配列データベースの相同性検索により、高い相同性アミノ酸配列S1802-INLLESPQLATLA-E816が微小管関連タンパク質MAP2のC-末端に向かって生じることが明らかとなった。オカダ酸によって処理し、上記の抗体を用いるウェスタンブロットによって分析したLAN-5細胞は、実際に、抗体2.5.2および2.20.4と交叉反応する高分子量タンパク質を含む。このタンパク質の分子量はMAP2であることと一致する。

20

【0109】

細胞 (無血清培地において 1×10^7 個/ウェル) をDMSOまたは $10 \mu\text{M}$ K255a (Alexis) によって37 °Cで1時間処理した後、培地にDMSOまたは $2 \mu\text{M}$ オカダ酸を37 °Cでさらに1時間添加した。培地を除去し、細胞をCytobuster (Novagen) $100 \mu\text{l}$ 中に抽出し、 $25 \mu\text{l}$ をウェスタンブロット分析に用いた。ウェスタンブロットは実施例5で記述したとおりに行った。結果を図4に示す。抗体2.5.2は、リン酸化MAP2と交叉反応性を示した。

30

【0110】

実施例8: オカダ酸処理神経芽腫細胞におけるタウ/pSer422を検出するためのELISAアッセイ

LAN-5神経芽腫細胞はタウを内因性に発現する。Ser422での内因性タウのリン酸化は、細胞をオカダ酸によって処理した場合に起こる。

【0111】

LAN-5神経芽腫細胞を37 °Cで培地において培養し、96ウェルマイクロタイタープレートに、無血清培地 $100 \mu\text{l}$ において細胞密度 2.5×10^5 個/ウェルで播種する。24時間培養した後、細胞を $2.5 \mu\text{M}$ オカダ酸によって2時間処理する。その後、 1 mg/ml ジギトニン、 10 mM EDTAを含む溶液 $10 \mu\text{l}$ を添加し、細胞を4 °Cで30分間振とうさせる。この抽出物を、以下に記述するように、ELISAアッセイにおいて直接用いる。

40

【0112】

リン酸緩衝生理食塩液、pH 7.2においてビオチン-NHSを20:1の比で用いて、抗体2.5.2をビオチン化した。抗体5A6 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) を、BioVeris (BioVeris Corporation, Gaithersburg, Maryland) によって供給されたプロトコールに従って8:1の比でBV-TAG (商標) によって標識した。典型的なアッセイにおいて、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ (Dyna/Invitrogen Corporation) の1:50倍希釈液 $25 \mu\text{l}$ を、室温で $1 \mu\text{g/ml}$ ビオチン-抗体 $25 \mu\text{l}$ と共に30分間プレインキュベートした。この混合物に、細胞抽出物 $50 \mu\text{l}$ およびBV-タグ抗体2.5.2 (上記のように調製) $25 \mu\text{l}$ を加えた。次に、混合物を振とうさせながら4 °Cで3時間インキュベートし

50

た。試料は全て96ウェルマイクロタイタープレート中で調製した。その後、緩衝液125 μ lを各試料に添加し、プレートをBioVeris M384アナライザーにおいて測定した。タウ/pSer422標準曲線は、細胞抽出緩衝液中で、ERK2-またはP38-リン酸化タウを希釈することによって調製した；細胞中のタウ/pSer422レベルの計算は、ホスホ-タウ標準物質に関して1モルホスホ-Ser422ホスフェート/モルタウを仮定する。図5は、標準曲線およびオカダ酸処理の前後で得られた典型的な値（細胞 1×10^6 個に基づく）を示す。

【図面の簡単な説明】

【0113】

【図1】モノクローナル抗体の特異性を示す。モノクローナル抗体の特異性を、441aaによる様々なタウ種のウェスタンブロット分析によって試験した。A：汎-タウ（対照）、抗体2.5.2および2.20.4；B：モノクローナル抗体AP422。レーン1：422位で非リン酸化Serを含むタウ。レーン2：422位でリン酸化Serを含むリン酸化タウ。レーン3：422位でSer Ala変異を含むタウ。レーン4：422位でSer Ala変異を含むリン酸化タウ。

10

【図2】Braak病期のAD脳組織由来の可溶性および不溶性抽出物のウェスタンブロット分析の結果を示す。いくつかのタウのバンドは、ヒト脳がタウの多数のスプライシングイソ型を含むという事実により肉眼で見える。Braak病期II/対照脳も、可溶性分画もいずれもSer422でリン酸化されたタウを含まないことに注意されたい。M = マーカートンパク質（Novex）を含むレーン；I = 不溶性分画；S = 可溶性分画；II、IV、VI = 疾患の重症度（Braak病期）。

【図3】AD脳組織（Braak病期VI）の免疫組織化学分析の結果を示す。NFT = 神経原線維変化；NT = ニューロパイル系；DN = 異栄養性神経炎（アミロイド斑を取り囲む）。用いた抗体は2.5.2であった。対照脳は、染色を示さなかった。

20

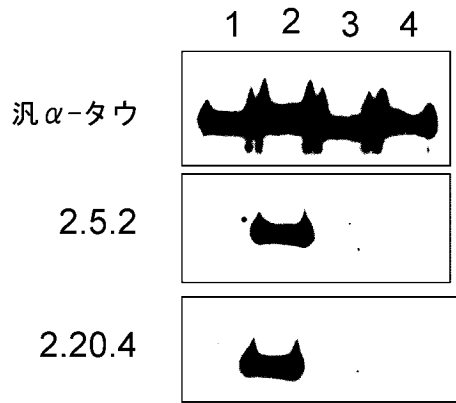
【図4】抗体2.5.2を用いたオカダ酸処理LAN-5細胞（OA）のウェスタンブロット分析結果を示す。抗体は、溶媒/DMSO抽出物と、または汎キナーゼ阻害剤K252aによって処理した細胞由来の抽出物との反応性がないことによって示されるように、全てリンタンパク質である三つのタンパク質と反応した。個々の分子量は、最大のタンパク質がMAP2 a/b（S1808でリン酸化）、二つのより小さいタンパク質がタウ（S422でリン酸化）の異なる二つのイソ型と一致した。レーン1 = 溶媒；レーン2 = OA、レーン3 = OA + K252a。

【図5】オカダ酸処理LAN-5細胞におけるタウ/pSer422レベルの定量に関するELISAの結果を示す。タウ/pSer422の量を細胞 1×10^6 個に基づいて算出した。

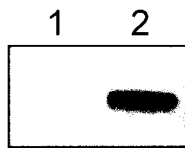
30

【図1】

A

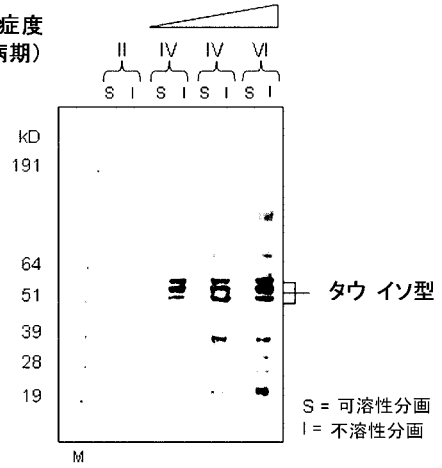


B

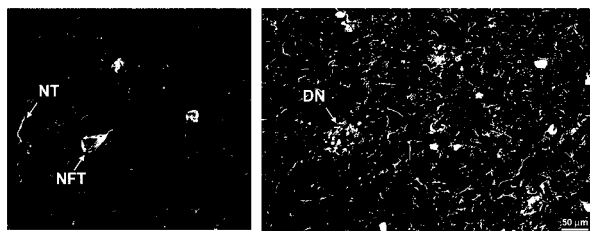


【図2】

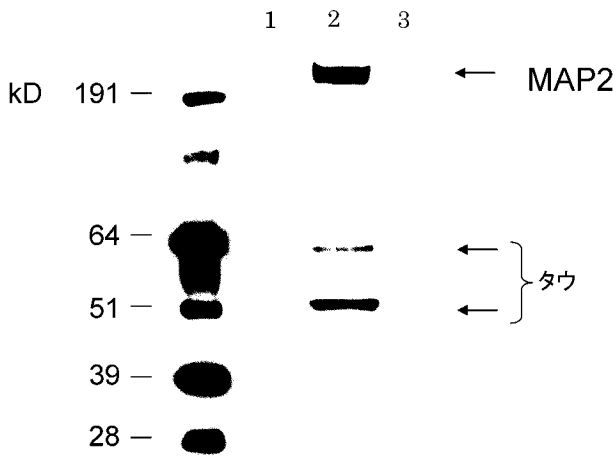
疾患の重症度 (Braak 病期)



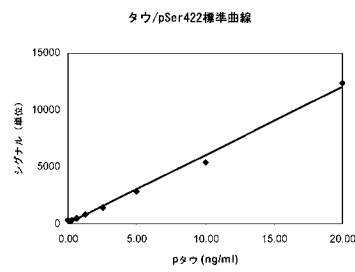
【図3】



【図4】



【図5】



DMSOおよびオカダ酸処理LAN-5細胞における tau/pSer422レベル		
処理	単位	[tau/pSer422] (ng/細胞 10^5 個)
DMSO	351±16	~0.5
オカダ酸	5991±1266	~40±8

【配列表】

2008013566000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 クリスチャン チェコ

ドイツ連邦共和国 グレンザッハ - ヴァイヘレン レブガッセ 4 4

(72)発明者 ジュディス ガーラック - ウェック

ドイツ連邦共和国 ゾーン Heim ハンハイマーストラッセ 2 1

(72)発明者 フィオナ グリュニンガー

スイス連邦 アーレスハイム ボーデンウエフ 4 9

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13

4B065 AA90X AA90Y AB01 AB02 AC14 BA01 BA08 CA24 CA25 CA44

CA46

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	一种识别磷酸化多肽的抗体		
公开(公告)号	JP2008013566A	公开(公告)日	2008-01-24
申请号	JP2007174732	申请日	2007-07-03
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	バーンドポーマン クリスチャンチェコ ジュディスガーラックウエック フィオナグリューニンガー		
发明人	バーンド ポーマン クリスチャン チェコ ジュディス ガーラック-ウエック フィオナ グリューニンガー		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/92 G01N33/6896		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N5/00.B G01N33/53.D G01N33/577.A C12P21/08 C12N5/00.102 C12N5/12		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2006116550 2006-07-04 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了识别磷酸化多肽的抗体。 A1是Asp或Asn , A2是Met或Leu , A3是Val或Leu , A4是Asp或Glu , A5是Asp或Glu , Ser -Ile-A1-A2-A3-A4-Ser (PO3H2) -Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5识别表位 , 但Ser-Ile- 不结合由A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5组成的表位的抗体 , 产生抗体的杂交瘤和包含该抗体的试剂盒。 [选择图]无

2006年3月15日にDSMZに以下の番号で寄託	IgGサブクラス
DSM ACC2762	Ig G2a; κ 軽鎖
DSM ACC2763	Ig G2a; κ 軽鎖