(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110799531 B
(45)授权公告日 2023.08.04

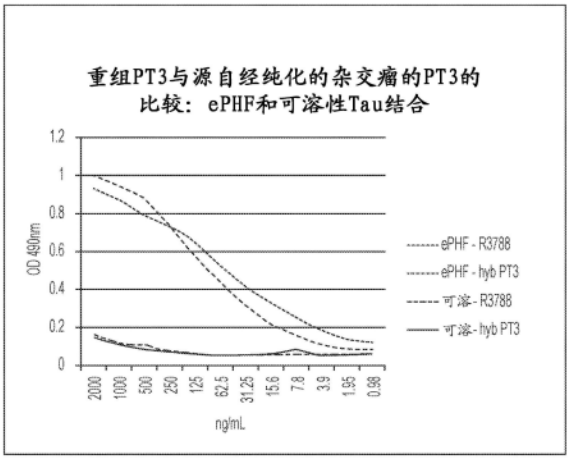
(21)申请号 201880018431.7
(22)申请日 2018.03.16
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110799531 A
(43)申请公布日 2020.02.14
(30)优先权数据
62/472214 2017.03.16 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/022782 2018.03.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/170351 EN 2018.09.20
(73)专利权人 詹森生物科技公司
地址 美国宾夕法尼亚州
(72)发明人 M.默肯 T.马利亚 M.博格斯 K.范科伦
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李进 黄希贵
(51)Int.Cl.
C07K 16/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 103339146 A,2013.10.02
CN 104024274 A,2014.09.03
US 6008024 A,1999.12.28
US 2011318339 A1,2011.12.29
Johan Fransson等.Human framework adaptation of a mouse anti-human IL-13 antibody.《J Mol Biol.》.2010,第398卷(第2期),214-231.
审查员 杨啸天
权利要求书2页 说明书49页
序列表33页 附图20页

(54)发明名称

抗PHF-tau抗体及其用途

(57)摘要

本发明描述了单克隆抗PHF-tau抗体及其抗原结合片段。还描述了编码抗体的核酸、包含抗体的组合物、产生抗体以及使用抗体治疗或预防病症诸如tau蛋白病变的方法。



CN 110799531 B

1.一种结合至磷酸化tau蛋白的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的单克隆抗体或抗原结合片段包含:

分别为SEQ ID NO:7、8和9的免疫球蛋白重链互补决定区(HCDR)HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别为SEQ ID NO:19、20和21的免疫球蛋白轻链互补决定区(LCDR)LCDR1、LCDR2和LCDR3;其中

所述抗体或其抗原结合片段结合PHF-tau。

2.根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:27有至少95%同一性的多肽序列的重链可变区,以及具有与SEQ ID NO:31有至少95%同一性的多肽序列的轻链可变区。

3.根据权利要求2所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段,其包含具有SEQ ID NO:27的多肽序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:31的多肽序列的轻链可变区。

4.根据权利要求3所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:45有至少95%同一性的多肽序列的重链,以及具有与SEQ ID NO:46有至少95%同一性的多肽序列的轻链。

5.根据权利要求4所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段,其包含具有SEQ ID NO:45的多肽序列的重链,以及具有SEQ ID NO:46的多肽序列的轻链。

6.根据权利要求5所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:45的重链和SEQ ID NO:46的轻链。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段,其包含人重链IgG1恒定区和人轻链κ恒定区。

8.一种分离的核酸,所述分离的核酸编码根据权利要求1至7中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段。

9.一种载体,所述载体包含根据权利要求8所述的分离的核酸。

10.一种非植物宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求9所述的核酸。

11.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至7中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

12.权利要求11所述的药物组合物在制备用于在对其有需要的受治疗者中减少病理性tau聚集或tau蛋白病变蔓延的药物中的用途。

13.权利要求11所述的药物组合物在制备用于在对其有需要的受治疗者中治疗tau蛋白病变的药物中的用途。

14.根据权利要求13所述的用途,其中所述tau蛋白病变选自家族性阿尔茨海默病、散发性阿尔茨海默病、与染色体17相关的额颞痴呆及帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克氏病、进行性皮质下胶质增生、仅缠结痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森综合征-痴呆复合征、唐氏综合症、格-施-沙氏病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克-雅病、多系统萎缩、尼曼-皮克病C型、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元病、脑炎后帕金森综合征、慢性创伤性脑病、以及拳击员痴呆症。

15.一种产生根据权利要求1至7中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段的方法,所述方法包括在产生所述抗体或抗原结合片段的条件下培养包含编码所述抗体或抗原结

合片段的核酸的细胞，以及从所述细胞或细胞培养物回收所述抗体或抗原结合片段。

16.根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或抗原结合片段在制备用于在来自受治疗者的生物样品中检测PHF-tau存在的试剂盒中的用途，包括使所述生物样品与根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或抗原结合片段接触，以及检测所述抗体或抗原结合片段与来自所述受治疗者的所述样品中PHF-tau的结合。

17.根据权利要求16所述的用途，其中所述生物样品是血液、血清、血浆、间质液、或脑脊髓液样品。

抗PHF-tau抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及抗PHF-tau抗体、编码抗体的核酸和表达载体、含有载体的重组细胞、以及包含抗体的组合物。还提供了制备抗体的方法、使用抗体治疗包括tau蛋白病变的病症的方法、以及使用抗体诊断疾病诸如tau蛋白病变的方法。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病(AD)是退行性脑障碍,其特征在于渐进性的记忆、认知、推理、判断和情感稳定性的丧失,该丧失逐渐导致极度精神衰退和最终的死亡。AD是老年人中进行性精神障碍(痴呆)的非常常见的病因,并且被认为是美国第四大最常见的医学死因。AD已在全世界的种族群体中观察到,并且代表目前和未来的主要公共健康问题。

[0003] 患有AD的个体的脑表现出称作老年(或淀粉样蛋白)斑块、淀粉样蛋白血管病(淀粉样蛋白在血管中沉积)和神经原纤维缠结的特征性病变。一般在患有AD的患者中对于记忆和认知功能重要的人脑几个区域中发现大量的这些病变,特别是淀粉样斑块和成对螺旋细丝的神经原纤维缠结。

[0004] 当前的AD治疗方案仅包括被批准用于治疗患有痴呆的患者的认知症状的疗法。尚无改变或减缓AD的发展的批准疗法。潜在的疾病调节剂包括用于患有轻度AD的患者的Eli Lilly的人源化抗A_{β}单克隆索拉珠单抗,以及用于患有轻度至中度AD的患者的Merck的小分子BACE抑制剂Verubecestat。这些疗法以及可能在未来十年上市的大多数其他潜在疾病调节剂靶向A_{β}(淀粉样斑块的主要组分,即AD的两种“标志”病理征之一)。

[0005] 神经原纤维缠结即AD的第二标志病理征,主要由超磷酸化tau蛋白的聚集体构成。tau的主要生理功能为微管聚合和稳定。tau与微管的结合通过tau的微管结合区的正电荷与微管网架上的负电荷之间的离子相互作用发生(Butner和Kirschner,J Cell Biol.115(3):717-30,1991)。tau蛋白含有85个可能的磷酸化位点,并且这些位点中的许多位点处的磷酸化干扰tau的主要功能。结合至轴突微管网架的tau处于低磷酸化状态,而AD中的聚集的tau是超磷酸化的,从而提供不同于tau的生理活性库的独特表位。

[0006] tau蛋白病变(tauopathy)传播和蔓延假设已得到描述,并且基于人脑中的tau蛋白病变发展的Braak阶段和在临床前tau模型中的tau聚集体注射后的tau蛋白病变蔓延(Frost等人,J Biol Chem.284:12845-52,2009;Clavaguera等人,Nat Cell Biol.11:909-13,2009)。

[0007] 开发预防或清除tau聚集的治疗剂一直关注多年,并且候选药物(包括抗聚集化合物和激酶抑制剂)已进入临床测试(Brunden等人,Nat Rev Drug Discov.8:783-93,2009)。已经公布了多项研究,示出转基因小鼠模型中主动tau免疫和被动tau免疫两者的有益治疗效果(Chai等人,J Biol Chem.286:34457-67,2011;Boutajangout等人,J Neurochem.118:658-67,2011;Boutajangout等人,J Neurosci.30:16559-66,2010;Asuni等人,J Neurosci.27:9115-29,2007)。已经报告了磷酸定向抗体和非磷酸定向抗体两者的活性(Schroeder等人,J Neuroimmune Pharmacol.11(1):9-25,2016)。

[0008] 尽管在本领域中取得发展，仍然需要预防tau聚集和tau蛋白病变发展以治疗tau蛋白病变诸如AD及其他神经退化性疾病的有效治疗剂。

发明内容

[0009] 本发明通过提供对成对螺旋细丝(PHF)-tau具有高结合亲和力且对磷酸化tau具有选择性的抗PHF-tau抗体或其抗原结合片段来满足该需要。本发明的抗体通过小鼠PHF-tau特异性抗体的人框架适应(HFA)而产生。认为抗体对磷酸化tau的选择性允许针对抗病原性tau的功效而不干扰正常tau功能。本发明还提供了编码抗体的核酸、包含抗体的组合物、以及制备和使用抗体的方法。本发明的抗PHF-tau抗体或其抗原结合片段抑制tau种子，如通过使用源自突变tau转基因小鼠的HEK细胞裂解物或脊髓裂解物的tau种子的细胞测定法测量的。此外，具有本发明的抗PHF-tau抗体的可变区和小鼠Ig恒定区(诸如小鼠IgG2a恒定区)的嵌合抗体在体内突变tau转基因小鼠模型中阻断播种活性。

[0010] AD脑中tau蛋白病变的发展遵循明显特有的蔓延模式。临床前模型已示出，细胞外磷酸tau种子可在神经元中诱导tau蛋白病变(Clavaguera等人，PNAS 110(23):9535-40，2013)。因此，据信tau蛋白病变能够以类似朊病毒的方式从一个脑区蔓延到下一脑区。该蔓延过程将涉及tau种子的外化，该tau种子可被附近神经元吸收并且诱导进一步的tau蛋白病变。不受理论的束缚，认为本发明的抗PHF-tau抗体或其抗原结合片段通过与磷酸tau种子相互作用来预防脑中的tau聚集或tau蛋白病变蔓延。

[0011] 在一个总的方面，本发明涉及结合PHF-tau的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段。在一个具体实施方案中，抗体是人源化单克隆抗体。

[0012] 根据一个具体方面，本发明涉及在tau蛋白的富脯氨酸结构域的磷酸化表位处结合至磷酸化tau蛋白的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段。在一个更具体方面，磷酸化表位包含tau蛋白的磷酸化T212和/或磷酸化T217，并且该磷酸化表位具有SEQ ID NO:48、52和54的氨基酸序列中的任一者或处于SEQ ID NO:48、52和54的氨基酸序列中的任一者之内。在一些实施方案中，本发明的抗体结合至磷酸化表位，该磷酸化表位包含tau蛋白的磷酸化T212和磷酸化T217。

[0013] 根据一个具体方面，本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含：

[0014] (1)分别具有SEQ ID NO:4、5和6的多肽序列的免疫球蛋白重链互补决定区(HCDR)HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:16、17和18的多肽序列的免疫球蛋白轻链互补决定区(LCDR)LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0015] (2)分别具有SEQ ID NO:1、2和3的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:13、14和15的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0016] (3)分别具有SEQ ID NO:7、8和9的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:19、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0017] (4)分别具有SEQ ID NO:10、11和12的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:22、23和24的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0018] (5)分别具有SEQ ID NO:80、81和9的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:70、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0019] (6)分别具有SEQ ID NO:71、72、73的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具

有SEQ ID NO:70、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0020] (7)分别具有SEQ ID NO:71、72和73的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:19、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0021] (8)具有SEQ ID NO:26的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:31的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0022] (9)具有SEQ ID NO:28的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:34的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0023] (10)具有SEQ ID NO:26的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:34的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或

[0024] (11)具有SEQ ID NO:28的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:31的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0025] 其中抗体或其抗原结合片段结合PHF-tau，优选地人PHF-tau。

[0026] 在一个更具体方面，重链可变区结构域以及轻链可变区结构域中的框架区包含人免疫球蛋白的氨基酸序列。

[0027] 根据另一个具体方面，本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含具有与SEQ ID NO:26、27、28和29中的任一者或SEQ ID NO:74、76和78中的任一者的任何重链的V_H区有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区，或者具有与SEQ ID NO:31、32、33和34中的任一者或SEQ ID NO:75、77和79的轻链中的任一者的V_L区有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0028] 根据另一个具体方面，本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含具有与SEQ ID NO:45、74、76和78中的任一者有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％，并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链；以及具有与SEQ ID NO:46、75、77和79中的任一者有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％，并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链。

[0029] 根据另一个具体方面，本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段还包含恒定区，诸如人或小鼠重链IgG恒定区，以及人或小鼠抗体轻链κ或λ恒定区。

[0030] 在另一个总的方面，本发明涉及编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的分离的核酸。

[0031] 在另一个总的方面，本发明涉及包含编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的分离的核酸的载体。

[0032] 在另一个总的方面，本发明涉及包含编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的分离的核酸的宿主细胞。

[0033] 在另一个总的方面，本发明涉及药物组合物，该药物组合物包含本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

[0034] 在另一个总的方面，本发明涉及减少对其有需要的受治疗者中病理性tau聚集或tau蛋白病变蔓延的方法，包括向受治疗者施用本发明的药物组合物。

[0035] 在另一个总的方面，本发明涉及在对其有需要的受治疗者中治疗tau蛋白病变的方法，包括向受治疗者施用本发明的药物组合物。tau蛋白病变包括但不限于选自以下中的一种或多种：家族性阿尔茨海默病、散发性阿尔茨海默病、与染色体17相关的额颞痴呆及帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克氏病、进行性皮质下胶质增生、仅缠结痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森综合征-痴呆复合征、唐氏综合症、格-施-沙氏病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克-雅病、多系统萎缩、尼曼-皮克病C型、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元病、脑炎后帕金森综合征、慢性创伤性脑病、以及拳击员痴呆症(拳击疾病)。

[0036] 在另一个总的方面，本发明涉及产生本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的方法，包括在产生单克隆抗体或其抗原结合片段的条件下培养包含编码单克隆抗体或抗原结合片段的核酸的细胞，以及从细胞或细胞培养物回收单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0037] 在另一个总的方面，本发明涉及产生包含本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的药物组合物的方法，包括将单克隆抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体组合，以获得药物组合物。

[0038] 在另一个总的方面，本发明涉及检测受治疗者中磷酸化PHF-tau存在的方法或诊断受治疗者中tau蛋白病变的方法，其通过使用本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段来检测受治疗者中PHF-tau的存在。

[0039] 根据以下的公开，包括本发明的详细描述和其优选的实施方案以及所附权利要求书，本发明的其它方面、特征和优点将显而易见。

附图说明

[0040] 当结合附图阅读时，将更好地理解上述发明内容以及下文本发明的详细描述。应当理解，本发明不限于附图中示出的精确实施方案。

[0041] 图1示出重组表达的PT3(“R3788”)和杂交瘤表达的PT3(“hyb”)与PHF-tau和可溶性tau的结合。

[0042] 图2示出在重组正常人tau(“NT”)和十二烷基肌氨酸钠不溶性PHF-tau(“PT”)的SDS-PAGE之后小鼠抗tau单克隆抗体的蛋白质印迹分析。

[0043] 图3A-3E示出AD海马组织上PT3的免疫组织化学分析，其为抗淀粉样蛋白4G8阳性。所用单克隆抗体为(A)PT1，(B)PT2，(C)PT3，(D)AT8和(E)HT7。

[0044] 图4A-4E示出对照海马组织上PT3的免疫组织化学分析，其为抗淀粉样蛋白4G8阴性。所用单克隆抗体为(A)PT1，(B)PT2，(C)PT3，(D)AT8和(E)HT7。

[0045] 图5A-5B示出(A)tau敲除或(B)野生型小鼠脑中PT3的磷酸-tau特异性染色模式。

[0046] 图6A-6B示出(A)tau敲除或(B)野生型小鼠脑中tau-1的非磷酸-tau特异性染色模式。

[0047] 图7示出PT3 Fab+pT212/pT217-tau肽复合物的晶体结构，其中PT3 Fab以空间填充表示(浅灰色)示出，并且tau肽以棒状物表示(黑色)示出。

[0048] 图8示出PT3 Fab+pT212/pT217-tau肽复合物的晶体结构，其中PT3以带状物(浅灰色)示出且其互补位残基以棒状物表示示出，并且tau肽以棒状物表示(黑色)示出。

[0049] 图9示出PT3 Fab+pT212/pT217-tau肽结构的相互作用图,其中肽残基以带有白色文字的黑框示出,VH残基以深灰色示出,VL残基以浅灰色示出,并且其中虚线表示氢键并且实线表示范德瓦尔斯接触。

[0050] 图10示出HFA PT3重链和轻链可变区的序列,其中HFA变体与PT3小鼠亲本V区比对(VH10和VL7),转移至人FR的亲本CDR用下划线标出,并且残基编号是顺序的。

[0051] 图11示出B324+pT212/pT217-tau肽复合物的晶体结构,其中B324以空间填充表示(浅灰色)示出,并且tau肽以棒状物表示(黑色)示出。

[0052] 图12示出B324+pT212/pT217tau肽复合物的晶体结构,其中B324以带状物(浅灰色)示出且其互补位残基以棒状物表示示出,并且tau肽以棒状物表示(黑色)示出,需注意D92(L)和E93(L)就Cγ和侧链羧化物原子而言不具有电子密度。

[0053] 图13示出B324+pT212/pT217 tau肽结构的相互作用图,其中肽残基以带有白色文字的黑框示出,VH残基以深灰色示出,VL残基以浅灰色示出,并且其中虚线表示氢键并且实线表示范德瓦尔斯接触。

[0054] 图14示出FRET生物传感器细胞模型的示意图。

[0055] 图15示出PT3对含有GFP-tauP301L聚集体的HEK细胞匀浆播种的K18聚集体诱导的抑制,如使用BRET测定法确定的。

[0056] 图16示出PT3对TgP301S脊髓匀浆播种的K18聚集体诱导的抑制,如使用FRET测定法确定的。

[0057] 图17示出小鼠TgP301S脊髓提取物免疫耗竭测定的结果,其中数据来自2个独立实验。

[0058] 图18示出人AD脑提取物免疫耗竭测定的结果,其中数据来自2个实验(例外情况是HT7和AT8,n=1)。PT3抑制tau播种,如使用FRET测定法确定的。

[0059] 图19A-19G示出表达突变人P301L tau的转基因小鼠中注射模型的示意图。IHC图像示出来自注射有(A-B)注射之后3个月的对照提取物(C-D)注射之后1个月的源自AD脑的ePHF-tau以及(E-F)注射之后3个月的源自AD脑的ePHF-tau的小鼠的注射的半球的代表性AT8染色。(G)柱状图示出经增大量的ePHF处理的小鼠的代表性生物化学数据。

[0060] 图20示出在表达突变人P301L tau的转基因小鼠中外周施用(IP)PT3,随后用源自AD脑的PHF-tau播种对于tau聚集的效应。

[0061] 图21示出在表达突变人P301L tau的转基因小鼠中共注射减小剂量的PT3,随后用源自AD脑的PHF-tau播种对于tau聚集的效应。

[0062] 图22A-22C示出在表达突变人P301L tau的转基因小鼠中联合共注射即IP外周施用PT3同种型,随后用源自AD脑的PHF-tau播种对于tau聚集的效应。根据(A)处理的小鼠在(B)注射的半球和(C)未注射的半球中示出效应。

[0063] 图23A-23B示出相比于源自AD患者的脑匀浆的水平,源自PSP患者的脑匀浆中聚集tau的水平。所用的单克隆抗体为(A)AT8和(B)PT3。

[0064] 图24A-24J示出在来自(A,D)AD患者或(B,C,E,F)PSP患者的脑组织的冷冻切片上用(A-C)AT8或(D-F)PT3抗体染色,在PSP中感染的解剖区中显示出染色。(G-J)对照并未示出染色。

[0065] 图25A-2525H示出亲和力成熟的mAb及其Fab与PHF-tau的SPR结合传感图。实线(灰

色)指示使用二价结合模型(mAb)或1:1朗格缪尔模型(Fab)的动力学拟合。(A)B296 mAb(B)B711 mAb(C)B809 mAb(D)B333 mAb(E)B296的B324 Fab(F)B711的B330 Fab(G)B809的B332 Fab(H)B333的B331 Fab。

[0066] 图26A-26B示出使用(A)mAb或(B)Fab在直接ELISA实验中PT3-HFA和亲和力成熟的变体与pT212/pT217肽的结合。

具体实施方式

[0067] 背景以及说明书全篇中引用或描述了各种出版物、文章和专利;这些参考文献中的每一者全文均以引用方式并入本文。本说明书中包括的对文件、行为、材料、设备、文章等的讨论旨在为本发明提供上下文。此类讨论并不是承认这些事项中的任一事项或全部事项均相对于所公开或受权利要求书保护的任何发明形成现有技术的一部分。

[0068] 定义

[0069] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。否则,本文所用的某些术语具有本说明书中所述的含义。本文引用的所有专利、公布的专利申请和出版物均以引用方式并入本文,如同在本文中进行了充分阐述。应该注意的是,除非上下文清楚地指明,否则本文和所附权利要求中所用的单数形式“一个/一种”和“所述/该”包括复数引用物。

[0070] 除非另行指出,否则任何数值,诸如本文所述的浓度或浓度范围被理解为在所有情况下用术语“约”修饰。因此,数值通常包括所述值±10%。例如,1mg/mL的浓度包括0.9mg/mL至1.1mg/mL。同样,1%至10%(w/v)的浓度范围包括0.9%(w/v)至11%(w/v)。除非上下文另有明确指示,否则如本文所用,使用的数值范围明确地包括所有可能的子范围、该范围之内的所有单个数值,包括此类范围之内的整数和该范围之内的分数。

[0071] 如本文所用,术语“分离的”意指生物组分(诸如核酸、肽或蛋白质)已经与组分天然存在的生物体的其他生物组分(即其他染色体和染色体外的DNA和RNA以及蛋白质)基本上分离、分开得到或从其中纯化出来。因此,已经“分离的”核酸、肽和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。“分离的”核酸、肽和蛋白质可为组合物的一部分,并且如果这样的组合物不是核酸、肽或蛋白质自身环境的一部分,则仍然是分离的。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸、肽和蛋白质以及化学合成的核酸。

[0072] 如本文所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”广义地使用并且包括免疫球蛋白或抗体分子(包括多克隆抗体)、单克隆抗体(包括鼠科动物、人、人适应的(human-adapted)、人源化和嵌合单克隆抗体和抗体片段)。

[0073] 一般来讲,抗体是蛋白质或肽链,其对于特定抗原表现出结合特异性。抗体结构是众所周知的。根据重链恒定结构域氨基酸序列,可将免疫球蛋白指定为五种主要种类,即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。IgA和IgG进一步亚分类为同种型IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。因此,本发明的抗体可为五种主要种类或对应的亚类中的任一种。优选地,本发明的抗体为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。本发明的抗体包括在其Fc区具有变异的那些,使得其相比于野生型Fc区具有变更的特性,包括但不限于半衰期延长、ADCC或CDC减小或增大以及沉默Fc效应子功能。基于其恒定结构域的氨基酸序列,可将任何脊椎物种的抗体轻链指定为两种完全不同的类型即κ和λ中的一种。因此,本发明的抗体可含有κ或λ轻链恒定结构域。根据

具体实施方案,本发明的抗体包括来自小鼠抗体或人抗体的重链和/或轻链恒定区。

[0074] 除重链和轻链恒定结构域之外,抗体还含有轻链和重链可变区。免疫球蛋白轻或重链可变区由被“抗原结合位点”间断的“框架”区组成。抗原结合位点用如下各种术语和编号方案定义:

[0075] (i)Kabat:“互补决定区”或“CDR”基于序列可变性(Wu和Kabat,J Exp Med.132:211-50,1970)。一般来讲,抗原结合位点在每个可变区具有三个CDR(例如重链可变区(VH)中的HCDR1、HCDR2和HCDR3,以及轻链可变区(VL)中的LCDR1、LCDR2和LCDR3);

[0076] (ii)Chothia:术语“高变区”、“HVR”或“HV”是指抗体可变结构域的区,这些区是结构高变的,如由Chothia和Lesk(Chothia和Lesk,J Mol Biol.196:901-17,1987)所定义。一般地,抗原结合位点具有在每个VH(H1、H2、H3)和VL(L1、L2、L3)中的三个高变区。CDR和HV的编号系统以及注释已由Abhinandan和Martin(Abhinandan和Martin,Mol Immunol.45:3832-9,2008)修订;

[0077] (iii)IMGT:形成抗原结合位点的区的另一定义已通过Lefranc(Lefranc等人,Dev Comp Immunol.27:55-77,2003)基于免疫球蛋白和T细胞受体的V结构域的比较提出。International ImMunoGeneTics(IMGT)数据库提供了这些区的标准化编号和定义。CDR、HV和IMGT描绘(delineation)之间的对应性在Lefranc等人,2003(同上)中有所描述;

[0078] (iv)AbM:Kabat和Chothia编号方案之间的折衷是Martin(Martin ACR(2010)Antibody Engineering,编辑Kontermann R,Dubel S(Springer-Verlag,Berlin),第2卷,第33-51页)所述的AbM编号规定。

[0079] (v)也可基于“使用的特异性决定残基”(SDRU)(Almagro,Mol Recognit.17:132-43,2004)来描述抗原结合位点,其中SDR是指直接参与抗原接触的免疫球蛋白的氨基酸残基。

[0080] “框架”或“框架序列”是在抗体的可变区之内除限定为抗原结合位点序列的那些之外的剩余序列。因为抗原结合位点的确切定义可通过如上所述的多种划分来确定,所以确切的构架序列取决于抗原结合位点的定义。框架区(FR)是可变结构域的更高度保守的部分。天然重链和轻链的可变结构域各自包括四个FR(分别为FR1、FR2、FR3和FR4),其通常采取β片层构型,通过三个高变环连接。每个链中的高变环通过FR并与另一个链的高变环紧密结合在一起,并且有助于形成抗体的抗原结合位点。抗体的结构分析显示出互补决定区所形成的结合位点的序列和形状之间的关系(Chothia等人,J.Mol.Biol.227:799-817,1992;Tramontano等人,J.Mol.Biol.215:175-182,1990)。尽管其序列变异性较高,六个环中的五个仅采取小规模主链构象,称为“典范结构”。这些构象首先由环的长度确定,其次由通过其包装、氢键合或呈现独特主链构象的能力决定构象的环和框架区中特定位置处关键残基的存在而确定。

[0081] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指抗体片段,诸如例如,双抗体、Fab、Fab′、F(ab′)2、Fv片段、二硫键稳定Fv片段(dsFv)、$(dsFv)_2$、双特异性dsFv(dsFv-dsFv′)、二硫键稳定双抗体(ds双抗体)、单链抗体分子(scFv)、单结构域抗体(sdab)、scFv二聚体(二价双抗体)、由包含一个或多个CDR的抗体的一部分形成的多特异性抗体、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、结构域抗体、二价结构域抗体或结合至抗原但不包含完整抗体结构的任何其他抗体片段。抗原结合片段能够结合至与亲本抗体或亲本抗体片段结合的抗原相同的抗原。

根据具体实施方案，抗原结合片段包含轻链可变区、轻链恒定区、以及重链恒定区的Fd区段。根据其他具体实施方案，抗原结合片段包含Fab和F(ab′)。

[0082] 如本文所用，术语“人源化抗体”是指被修饰成提高与人抗体的序列同源性的非人抗体，使得抗体的抗原结合特性得以保留，但其在人体内的抗原性下降。

[0083] 如本文所用，术语“表位”是指免疫球蛋白、抗体或其抗原结合片段特异性结合至其的抗原上的位点。表位可由连续氨基酸或由通过蛋白质的三级折叠并置的不连续氨基酸两者形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留，而三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丧失。表位通常在独特空间构象中包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括例如x射线晶体学和2维核磁共振。参见例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology，第66卷，G.E.Morris编辑(1996)。

[0084] 如本文所用，术语“tau”或“tau蛋白”是指具有多种同种型的丰富的中枢和周围神经系统蛋白质。在人中枢神经系统(CNS)中，由于可变剪接，存在大小范围为352至441氨基酸长度的六种主要tau同种型(Hanger等人，Trends Mol Med.15:112-9，2009)。同种型通过0-2个N末端插入片段的调节内含物和3或4个串联排列的微管结合重复序列而彼此不同，并且被称为0N3R(SEQ ID NO:64)、1N3R(SEQ ID NO:65)、2N3R(SEQ ID NO:66)、0N4R(SEQ ID NO:67)、1N4R(SEQ ID NO:68)和2N4R(SEQ ID NO:69)。如本文所用，术语“对照tau”是指SEQ ID NO:69的tau同种型，其缺乏磷酸化及其他翻译后修饰。如本文所用，术语“tau”包括包含全长野生型tau的突变，例如点突变、片段、插入、缺失和剪接变体的蛋白质。术语“tau”还涵盖tau氨基酸序列的翻译后修饰。翻译后修饰包括但不限于磷酸化。

[0085] tau结合微管且调节货物通过细胞的转运，该转运是可通过tau磷酸化调节的过程。在AD和相关障碍中，tau的异常磷酸化是普遍的，并且被认为领先于和/或触发tau聚集成称为成对螺旋细丝(PHF)的原纤维。PHF的主要组分是高度磷酸化tau。如本文所用，术语“成对螺旋细丝-tau”或“PHF-tau”是指成对螺旋细丝中的tau聚集体。PHF结构中的两个主要区在电子显微镜中较为明显，即绒毛状外壳和芯细丝；绒毛状外壳对蛋白水解作用敏感并且位于细丝外部，并且细丝的耐蛋白酶芯形成PHF的主链(Wischik等人，Proc Natl Acad Sci USA.85:4884-8，1988)。

[0086] 如本文所用，“结合PHF-tau的分离的人源化抗体”或“分离的人源化抗PHF-tau抗体”旨在指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的人源化抗PHF-tau抗体(例如，分离的人源化抗PHF-tau抗体基本上不含特异性地结合除PHF-tau之外的抗原的抗体)。然而，分离的人源化抗PHF-tau抗体可与例如来自其他物种(诸如PHF-tau物种同源物)的其他相关抗原具有交叉反应性。

[0087] 如本文所用，术语“特异性结合”或“特异结合”是指本发明的抗PHF-tau抗体以约1×10^{-6}M或更低(例如，约1×10^{-7}M或更低、约1×10^{-8}M或更低、约1×10^{-9}M或更低、约1×10^{-10}M或更低、约1×10^{-11}M或更低、约1×10^{-12}M或更低、或者约1×10^{-13}M或更低)的离解常数(K_D)与预定靶标结合的能力。KD获自Kd与Ka的比率(即Kd/Ka)并且表示为摩尔浓度(M)。根据本公开，抗体的KD值可以使用本领域中的方法确定。例如，抗PHF-tau抗体的KD值可通过使用表面等离振子共振，诸如通过使用生物传感器系统，例如Biacore®系统、Proteon仪器(BioRad)、KinExA仪器(Sapidyne)、ELISA或本领域的技术人员已知的竞争性结合测定法来

确定。通常，抗PHF-tau抗体与预定靶标(即，PHF-tau)结合的K_D比其对于非特异性靶标的K_D小至少十倍，如通过使用例如ProteOn仪器(BioRad)的表面等离振子共振测量的。然而，特异性结合至PHF-tau的抗PHF-tau抗体可与其他相关靶标，例如与来自其他物种(同源物)的相同预定靶标具有交叉反应性。

[0088] 如本文所用，同义地称为“核酸分子”、“核苷酸”或“核酸”的术语“多核苷酸”是指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸，其可为未修饰的RNA或DNA或者修饰的RNA或DNA。“多核苷酸”包括但不限于单链和双链的DNA、为单链区和双链区的混合物的DNA、单链和双链的RNA以及为单链区和双链区的混合物的RNA、包含可为单链或更典型地为双链或者为单链区和双链区的混合物的DNA和RNA的杂合分子。此外，“多核苷酸”是指包含RNA或DNA或RNA和DNA两者的三链区。术语多核苷酸还包括含有一个或多个修饰的碱基的DNA或RNA，以及具有出于稳定性或其它原因而被修饰的主链的DNA或RNA。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化的碱基和稀有碱基诸如肌苷。可以对DNA和RNA进行多种修饰；因此，“多核苷酸”包括通常天然存在的多核苷酸的化学修饰、酶修饰或代谢修饰形式，以及病毒和细胞特有的DNA和RNA的化学形式。“多核苷酸”也包括相对短的核酸链，通常被称为寡核苷酸。

[0089] 如本文所用，术语“载体”是复制子，其中可以可操作地插入另一核酸区段以引起该区段的复制或表达。

[0090] 如本文所用，术语“宿主细胞”是指包含本发明的核酸分子的细胞。“宿主细胞”可为任何类型的细胞，例如，原代细胞、培养中的细胞或来自细胞系的细胞。在一个实施方案中，“宿主细胞”是用本发明的核酸分子转染的细胞。在另一个实施方案中，“宿主细胞”是此类经转染细胞的后代或潜在后代。细胞的后代可以或不可与亲本细胞相同，例如，由于可在后代中发生的突变或环境影响或者由于核酸分子整合到宿主细胞基因组中。

[0091] 如本文所用，术语“表达”是指基因产物的生物合成。该术语涵盖基因到RNA的转录。该术语还涵盖RNA到一个或多个多肽的翻译，并且还涵盖所有天然存在的转录后和翻译后修饰。表达的结合PHF-tau的人源化抗体或其抗原结合片段可处于宿主细胞的细胞质之内，处于细胞外环境诸如细胞培养物的生长培养基中，或锚定至细胞膜。

[0092] 如本文所用，术语“载体”是指任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、油、类脂、含脂质囊泡、微球体、脂质体包囊、或本领域公知的用于药物制剂的其他材料。应当理解，载体、赋形剂或稀释剂的特征将取决于具体应用的施用途径。如本文所用，术语“药学上可接受的载体”是指不干扰根据本发明的组合物的效果或根据本发明的组合物的生物活性的非毒性材料。根据本公开，根据具体实施方案，适用于抗体药物组合物的任何药学上可接受的载体均可用于本发明。

[0093] 如本文所用，术语“受治疗者”是指动物，并且优选地指哺乳动物。根据具体实施方案，受治疗者是哺乳动物，包括非灵长类(例如骆驼、驴、斑马、牛、猪、马、山羊、绵羊、猫、犬、大鼠、兔子、豚鼠或小鼠)或灵长类(例如猴、黑猩猩或人)。在具体实施方案中，受治疗者是人。

[0094] 如本文所用，术语“治疗有效量”是指在受治疗者中引起期望的生物学或药物学响应的活性成分或组分的量。治疗有效量可相对于指定目的根据经验以常规方式进行确定。例如，可任选地采用体外测定来帮助确定最佳剂量范围。基于若干因素的考虑，包括要治疗或预防的疾病、所涉及的症状、患者的体重、患者的免疫状态以及技术人员已知的其他因

素，本领域的技术人员可确定具体有效剂量的选择(例如，经由临床试验)。在制剂中待采用的精确剂量也将取决于施用途径以及疾病的严重程度，并且应该根据医生的判断和每个患者的情况来决定。有效剂量可通过源自体外或动物模型测试体系的剂量响应曲线来推导。

[0095] 如本文所用，术语“处理”和“治疗”(“treat”、“treating”和“treatment”)均旨在是指与tau蛋白病变有关的至少一种可测量物理参数的改善或逆转，其不一定是受治疗者中可识别的，但能够在受治疗者中识别。术语“处理”和“治疗”也可指导致消退，预防发展，或至少延缓疾病、障碍或病症的发展。在一个具体实施方案中，“处理”和“治疗”是指减轻、预防发展或发作，或缩短与tau蛋白病变相关联的一种或多种症状的持续时间。在一个具体实施方案中，“处理”和“治疗”是指预防疾病、障碍或病症的复发。在一个具体实施方案中，“处理”和“治疗”是指患有疾病、障碍或病症的受治疗者的存活提高。在一个具体实施方案中，“处理”和“治疗”是指受治疗者中疾病、障碍或病症的消除。

[0096] 如本文使用，“tau蛋白病变”涵盖涉及脑之内的tau病理性聚集的任何神经退化性疾病。除家族性和散发性AD之外，其他示例性tau蛋白病变是与染色体17相关的额颞痴呆及帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克氏病、进行性皮质下胶质增生、仅缠结痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森综合征-痴呆复合征、唐氏综合症、格-施-沙氏病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克-雅病、多系统萎缩、尼曼-皮克病C型、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元病、脑炎后帕金森综合征、以及慢性创伤性脑病诸如拳击员痴呆症(拳击疾病)(Morris等人，Neuron，70:410-26，2011)。

[0097] 如本文所用，在将两种或更多种疗法施用于受治疗者的上下文中，术语“联合”是指使用多于一种疗法。术语“联合”的使用并不限制疗法施用于受治疗者的次序。例如，第一疗法(例如，本文所述的组合物)可在第二疗法施用于受治疗者之前(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、或12周以前)，与此同时，或之后(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、或12周以后)施用。

[0098] 抗PHF-tau抗体

[0099] 在一个总的方面，本发明涉及结合PHF-tau的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段。此类抗PHF-tau抗体可具有结合PHF-tau上的磷酸化表位或结合至PHF-tau上的非磷酸化表位的特性。抗PHF-tau抗体可用作治疗剂，以及用作研究或诊断试剂，以检测生物样品例如组织或细胞中的PHF-tau。

[0100] 根据一个具体方面，本发明涉及在tau蛋白的富脯氨酸结构域的表位处结合至磷酸化tau蛋白的分离的人源化抗体或其抗原结合片段。在一个更具体方面，本发明涉及在包含磷酸化T212和/或T217残基的表位处结合至磷酸化tau蛋白的分离的人源化抗体或其抗原结合片段。在一个更具体方面，本发明涉及结合至SEQ ID NO:48、52和54中的任一者的磷酸化表位的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段。在一个甚至更具体方面，本发明涉及结合至SEQ ID NO:48的磷酸化表位的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段。本发明的抗体可为人源化抗体。

[0101] 表1由SEQ ID NO示出结合至磷酸tau的5种人源化mAb的重链和轻链可变区。也示出人源化mAb B296的重链和轻链序列。该mAb是亲和力成熟的(参见表3)。

[0102] 表2示出根据Chothia、ABM、Kabat和IMGT编号方案定义的本发明示例性抗体的抗原结合位点残基(即CDR区)。示例性重链可变区的氨基酸序列以SEQ ID NO:26-29示出,并且示例性轻链可变区的氨基酸序列以SEQ ID NO:31-34示出。

[0103] 表3示出由B296(即B333、B711和B809)生成的亲和力成熟的单克隆抗体的序列。可变区序列在重链和轻链序列中用下划线标出。亲和力成熟的单克隆抗体的CDR中的粗体氨基酸指示相比于B296 CDR序列的替换。CDR序列通过Kabat编号方案确定。

[0104] 表1:人源化磷酸tau mAb

[0105]

mAb	V_H	V_L	重链	轻链
B235	26	31		
B252	28	34		
B280	26	34		
B282	28	31		
B296	27	31	45	46

[0106] 表2:人源化抗PHF-tau抗体B296的VH(VH10)和VL(VL7)结构域的CDR序列

[0107]

	Chothia 编号方案		
V 区 ID	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSY (SEQ ID NO: 1)	SKGGN (SEQ ID NO: 2)	GWGDYGWFAY (SEQ ID NO: 3)
VL7	KASQDINRYLN (SEQ ID NO: 13)	RANRLLD (SEQ ID NO: 14)	LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 15)
	ABM 编号方案		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 4)	SISKGGNTY (SEQ ID NO: 5)	GWGDYGWFAY (SEQ ID NO: 6)
VL7	KASQDINRYLN (SEQ ID NO: 16)	RANRLLD (SEQ ID NO: 17)	LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 18)
	Kabat 编号方案		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	SYAMS (SEQ ID NO: 7)	SISKGGNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 8)	GWGDYGWFAY (SEQ ID NO: 9)
VL7	KASQDINRYLN (SEQ ID NO: 19)	RANRLLD (SEQ ID NO: 20)	LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 21)
	IMGT 编号方案		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 10)	ISKGGNT (SEQ ID NO: 11)	ARGWGDYGWFAYW (SEQ ID NO: 12)
VL7	QDINRY (SEQ ID NO: 22)	RAN (SEQ ID NO: 23)	LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 24)

[0108] 表3:亲和力成熟的B296

[0109]

mAb	名称		SEQ ID NO	序列
PT1B333				
	V_H	CDR1	80	SSYAMS
		CDR2	81	SISKGGNTYYADSVKG
		CDR3	9	GWGDYGWFAY
		重链	74	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVASISKGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGWGDYGWFAYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	V_L	CDR1	70	KASQDINRWLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		轻链	75	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRWLNWFQQKPGKAPK SLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQ YDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PT1B711				
	V_H	CDR1	71	TSYAMS
		CDR2	72	SITKGGNTYYADSVKG
		CDR3	73	GWGIYGWFAY
		重链	76	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGK

[0110]

mAb	名称		SEQ ID NO	序列
				GLEWVASITKGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLR AEDTAVYYCARGWGIYGWFAYWGQVTLVTVSSASTK GPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
	V_L	CDR1	70	KASQDINRWLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		轻链	77	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRWLNWFQQ KPGKAP KSLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC LQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PT1B809				
	V_H	CDR1	71	TSYAMS
		CDR2	72	SITKGGNTYYADSVKG
		CDR3	73	GWGIYGWFAY
		重链	78	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTSYAMSWV RQAPG KGLEWVASITKGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNS LRAEDTAVYYCARGWGIYGWFAYWGQVTLVTVSSAST KGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVD

[0111]

mAb	名称		SEQ ID NO	序列
				KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	V_L	CDR1	19	KASQDINRYLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		轻链	79	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQQKPG KAPKSLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC

[0112] 人源化抗体具有基本上来自人抗体(称作受体抗体)的可变区框架残基以及基本上来自非人抗体(即小鼠抗体)(称为供体免疫球蛋白)的互补决定区。参见Queen等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA.86:10029-10033,1989、WO 90/07861、US5693762、US5693761、US5585089、US5530101和US5225539。一个或多个恒定区(如果存在)也基本上或完全来自人免疫球蛋白。人可变区通常选自人抗体，该人抗体的框架序列与CDR源自的鼠科动物可变区结构域表现出高度的序列同一性。重链和轻链可变区框架残基可源自相同或不同的人抗体序列。人抗体序列可为天然存在的人抗体序列，或者可为几个人抗体的共有序列。参见WO 92/22653。基于其对CDR构象和/或与抗原结合的可能影响，选择人可变区框架残基的特定氨基酸用于替换。通过建模、检查具体位置处的氨基酸的特征或实验观察具体氨基酸替换或诱变的效果来对此类可能的影响进行研究。

[0113] 例如，当氨基酸在鼠科动物可变区框架残基与所选择的人可变区框架残基之间有差异时，当合理预期该氨基酸：(1)直接非共价结合抗原，(2)邻近CDR区，(3)另外与CDR区相互作用(例如在CDR区约6埃之内)，或者(4)参与VL-VH界面时，人框架氨基酸应当通常用小鼠抗体的等同框架氨基酸替换。

[0114] 用于替换的其他候选是受体人框架氨基酸，其在该位置处对于人免疫球蛋较罕见。这些氨基酸可用来自小鼠供体抗体的等同位置或更典型人免疫球蛋白的等同位置的氨基酸替换。用于替换的其他候选是受体人框架氨基酸，其在该位置处对于人免疫球蛋较罕见。人源化免疫球蛋白的可变区框架通常示出与人可变区框架序列至少85％的序列同一性

或共有此类序列。

[0115] 抗体人源化可使用众所周知的方法来完成，该方法诸如特异性决定残基表面重建(SDRR)(US2010/0261620)、表面重修(Padlan等人，Mol.Immunol.28:489-98,1991)、超人源化(WO 04/006955)和人体串内容优化(US7657380)。可用于人移植或人源化的人框架序列可由本领域的技术人员从有关数据库中选择。还可通过诸如Queen等人，1989(同上)所公开的那些的技术，将所选择的框架修饰成保留或增强结合亲和力。根据具体实施方案，用于由小鼠亲本抗体人源化抗PHF-tau抗体的方法包括以下实施例4所述的那些。

[0116] 本发明的抗体可通过多种技术产生，例如杂交瘤法(Kohler和Milstein，Nature.256:495-7,1975)。可用US4816567中所公开的方法制备这样的嵌合单克隆抗体，其含有源自供体抗体(通常为鼠科动物)的轻链和重链可变区和与之相结合的源自受体抗体(通常为另一种哺乳类物种，诸如人)的轻链和重链恒定区。可以通过本领域的技术人员已知的技术(诸如US5225539中所公开的技术)来制备这样的CDR接枝单克隆抗体，其具有源自非人供体免疫球蛋白(通常为鼠科动物)的CDR和其分子的源自一种或多种人免疫球蛋白的源自剩余免疫球蛋白的部分。缺乏任何非人序列的完全人单克隆抗体可通过以下文献中提及的技术从人免疫球蛋白转基因小鼠制备(Lonberg等人，Nature.368:856-9,1994;Fishwild等人，Nat Biotechnol.14:845-51,1996;Mendez等人，Nat Genet.15:146-56,1997)。还可从噬菌体展示文库制备和优化人单克隆抗体(Knappik等人，J Mol Biol.296:57-86,2000;Krebs等人，J Immunol Methods.254:67-84,2001;Shi等人，J Mol Biol.397:385-96,2010)。

[0117] 本发明的单克隆抗体所包括的抗体具有SEQ ID NO:1、4、7、10、71、80中的任一者的HCDR1;SEQ ID NO:2、5、8、11、72、81中的任一者的HCDR2;SEQ ID NO:3、6、9、12、73中的任一者的HCDR3;SEQ ID NO:13、16、19、22、70中的任一者的LCDR1;SEQ ID NO:14、17、20、23中的任一者的LCDR2;SEQ ID NO:15、18、21、24中的任一者的LCDR3。本发明还涵盖的单克隆抗体具有与以下有至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，更优选地至少99％同一性的CDR序列:SEQ ID NO:1、4、7、10、71、80中的任一者的HCDR1;SEQ ID NO:2、5、8、11、72、81中的任一者的HCDR2;SEQ ID NO:3、6、9、12、73中的任一者的HCDR3;SEQ ID NO:13、16、19、22、70中的任一者的LCDR1;SEQ ID NO:14、17、20、23中的任一者的LCDR2;SEQ ID NO:15、18、21、24中的任一者的LCDR3。

[0118] 根据一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含：

[0119] (1)分别具有SEQ ID NO:4、5和6的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3，分别具有SEQ ID NO:16、17和18的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3;

[0120] (2)分别具有SEQ ID NO:1、2和3的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:13、14和15的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3;

[0121] (3)分别具有SEQ ID NO:7、8和9的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:19、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3;

[0122] (4)分别具有SEQ ID NO:10、11和12的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:22、23和24的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3;

[0123] (5)分别具有SEQ ID NO:80、81和9的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:70、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3;

[0124] (6)分别具有SEQ ID NO:71、72、73的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:70、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0125] (7)分别具有SEQ ID NO:71、72和73的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:19、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0126] (8)具有SEQ ID NO:26的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:31的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0127] (9)具有SEQ ID NO:28的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:34的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0128] (10)具有SEQ ID NO:26的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:34的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或

[0129] (11)具有SEQ ID NO:28的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:31的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0130] 其中抗体或其抗原结合片段结合PHF-tau，优选地人PHF-tau，并且其中重链可变区结构域以及轻链可变区结构域中的框架区包含人免疫球蛋白的氨基酸序列。

[0131] 根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含具有与SEQ ID NO:26、27、28或29有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区，或具有与SEQ ID NO:31、32、33或34有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0132] 根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含具有与SEQ ID NO:74、76和78中的任一者的重链中的可变区有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区，或具有与SEQ ID NO:75、77和79中的任一者的轻链中的可变区有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0133] 根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含具有与SEQ ID NO:26有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区，以及具有与SEQ ID NO:31有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0134] 根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含具有与SEQ ID NO:28有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区，以及具有与SEQ ID NO:34有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0135] 根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含具有与SEQ ID NO:26有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区，以及具有

与SEQ ID NO:34有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0136] 根据另一个具体方面,本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:28有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区,以及具有与SEQ ID NO:31有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0137] 根据另一个具体方面,本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:27有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区,以及具有与SEQ ID NO:31有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0138] 根据另一个具体方面,本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:74的重链中的可变区有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区,以及具有与SEQ ID NO:75的轻链中的可变区有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0139] 根据另一个具体方面,本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:76的重链中的可变区有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区,以及具有与SEQ ID NO:77的轻链中的可变区有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0140] 根据另一个具体方面,本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:78的重链中的可变区有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区,以及具有与SEQ ID NO:79的轻链中的可变区有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0141] 根据另一个具体方面,本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:45有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链,以及具有与SEQ ID NO:46有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,更优选地至少98％同一性,并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链。根据另一个具体方面,本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有SEQ ID NO:45的多肽序列的重链以及具有SEQ ID NO:46的多肽序列的轻链。

[0142] 根据另一个具体方面,本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:74有至少80％,优选地至少85％,优选地至少90％,更优选地至少95％,

更优选地至少98%同一性，并且最优选地100%同一性的多肽序列的重链，以及具有与SEQ ID NO:75有至少80%，优选地至少85%，优选地至少90%，更优选地至少95%，更优选地至少98%同一性，并且最优选地100%同一性的多肽序列的轻链。根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含具有SEQ ID NO:74的多肽序列的重链以及具有SEQ ID NO:75的多肽序列的轻链。

[0143] 根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含具有与SEQ ID NO:76有至少80%，优选地至少85%，优选地至少90%，更优选地至少95%，更优选地至少98%同一性，并且最优选地100%同一性的多肽序列的重链，以及具有与SEQ ID NO:77有至少80%，优选地至少85%，优选地至少90%，更优选地至少95%，更优选地至少98%同一性，并且最优选地100%同一性的多肽序列的轻链。根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含具有SEQ ID NO:76的多肽序列的重链以及具有SEQ ID NO:77的多肽序列的轻链。

[0144] 根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含具有与SEQ ID NO:78有至少80%，优选地至少85%，优选地至少90%，更优选地至少95%，更优选地至少98%同一性，并且最优选地100%同一性的多肽序列的重链，以及具有与SEQ ID NO:79有至少80%，优选地至少85%，优选地至少90%，更优选地至少95%，更优选地至少98%同一性，并且最优选地100%同一性的多肽序列的轻链。根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含具有SEQ ID NO:78的多肽序列的重链以及具有SEQ ID NO:79的多肽序列的轻链。

[0145] 根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含人重链IgG1恒定区和人轻链κ恒定区。

[0146] 根据另一个具体方面，本发明涉及分离的人源化抗体或其抗原结合片段，其中该抗体或抗原结合片段以5×10^{-9}M或更小的离解常数(K_D)，优选地1×10^{-9}M或更小、或者1×10^{-10}M或更小的K_D结合至人PHF-tau，其中K_D通过表面等离振子共振分析，诸如通过使用Biacore或ProteOn系统测量。

[0147] 结合PHF-tau的人源化抗体及其抗原结合片段的功能活性可通过本领域已知及如本文所述的方法进行表征。用于表征结合PHF-tau的抗体及其抗原结合片段的方法包括但不限于亲和力和特异性测定，包括Biacore、ELISA和FACS分析；免疫组织化学分析；体外细胞测定和体内注射测定，以确定抗体抑制tau播种的功效；细胞毒性测定，以检测抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)活性的存在；等。根据具体实施方案，用于表征结合PHF-tau的抗体及其抗原结合片段的方法包括以下实施例5、6、8和9所述的那些。结合PHF-tau而非对照tau的人源化抗体的示例性小鼠亲本抗体为抗体PT3，其具有SEQ ID NO:25的重链可变区和SEQ ID NO:30的轻链可变区(参见例如美国专利9,371,376，其全文以引用方式并入)。

[0148] 可以采用若干公知的方法来确定本发明的抗体的结合表位。例如，当两种个体组分的结构已知时，可以进行硅片蛋白-蛋白对接以鉴定相容的相互作用位点。可以用抗原和抗体复合物进行氢-氘(H/D)交换，以对抗原上被抗体结合的区进行定位。抗原的区段诱变和点诱变可以用来定位对抗体结合重要的氨基酸。使用抗体-抗原复合物的共晶体结构来鉴定对表位和互补位有贡献的残基。根据具体实施方案，用于确定本发明的抗体的结合表

位的方法包括以下实施例2、3和7所述的那些。

[0149] 本发明的抗体可为双特异性或多特异性的。示例性双特异性抗体可结合在PHF-tau上的两个不同表位，或可结合PHF-tau和β淀粉样蛋白(Aβ)。另一种示例性双特异性抗体可结合PHF-tau和内源血脑屏障胞转作用受体，诸如胰岛素受体、转移受体、胰岛素样生长因子-1受体和脂蛋白受体。示例性抗体具有IgG1类型。

[0150] 本发明的抗体的免疫效应子特性可通过本领域的技术人员已知的技术通过Fc修饰得到增强或沉默。例如，Fc效应子功能诸如C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等，可通过修饰促成这些活性的Fc中的残基来提供和/或控制。药代动力学特性还可通过使Fc结构域中延长抗体半衰期的残基突变得到增强(Strohl，Curr Opin Biotechnol.20:685-91，2009)。

[0151] 另外，本发明的抗体可通过诸如糖基化、异构化、去糖基化或非天然存在的共价修饰(诸如添加聚乙二醇部分和脂质化)的过程进行翻译后修饰。此类修饰可在体内或体外进行。例如，本发明的抗体可以与聚乙二醇缀合(聚乙二醇化)以改善其药代动力学性质。缀合可通过本领域的技术人员已知的技术来进行。已经证实治疗性抗体与PEG的共轭增强药效学而不干扰功能(Knight等人，Platelets.15:409-18，2004;Leong等人，Cytokine.16:106-19，2001;Yang等人，Protein Eng.16:761-70，2003)。

[0152] 在另一个总的方面，本发明涉及编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的分离的多核苷酸。本领域的技术人员将理解，可以改变(例如置换、缺失、插入等)蛋白质的编码序列而不改变蛋白质的氨基酸序列。因此，本领域的技术人员将理解，可变更编码本发明的人源化抗体或其抗原结合片段的核酸序列而不改变蛋白质的氨基酸序列。示例性分离的多核苷酸是编码包含分别在SEQ ID NO:4、5和6中所示的免疫球蛋白重链CDR HCDR1、HCDR2和HCDR3的多肽，或包含分别在SEQ ID NO:16、17和18中所示的免疫球蛋白轻链CDR LCDR1、LCDR2和LCDR3的多肽的多核苷酸。其他示例性分离的多核苷酸是编码本发明的抗体可变区的具有SEQ ID NO:36-39或41-44中所示序列的多核苷酸。鉴于在给定表达系统中的遗传密码简并性或密码子优先性而编码本发明的抗体的其他多核苷酸也在本发明的范围之内。本发明的分离的核酸可使用众所周知的重组技术或合成技术进行制备。使用本领域已知的方法，容易分离且测序编码单克隆抗体的DNA。在杂交瘤生成的情况下，此类细胞可用作此类DNA的来源。作为另外一种选择，可使用其中编码序列和翻译产物相关的展示技术，诸如噬菌体或核糖体展示文库。

[0153] 在另一个总的方面，本发明涉及包含编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的分离的多核苷酸的载体。根据本公开，可使用本领域的技术人员已知的任何载体，诸如质粒、粘端质粒、噬菌体载体或病毒载体。在一些实施方案中，载体是重组表达载体，诸如质粒。载体可包括建立表达载体的常规功能的任何元件，例如启动子、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择标记和复制起点。启动子可为组成型、诱导型或阻抑型启动子。能够向细胞递送核酸的多种表达载体在本领域中是已知的，并且在本文可用于在细胞中产生抗体或其抗原结合片段。常规克隆技术或人工基因合成可用于根据本发明的实施方案生成重组表达载体。

[0154] 在另一个总的方面，本发明涉及包含编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段

的分离的多核苷酸的宿主细胞。鉴于本公开，本领域的技术人员已知的任何宿主细胞可用于重组表达本发明的抗体或其抗原结合片段。此类宿主细胞可为真核细胞、细菌细胞、植物细胞或古菌细胞。示例性真核细胞可为哺乳动物、昆虫、禽类或其他动物来源。哺乳动物真核细胞包括永生细胞系，诸如杂交瘤或骨髓瘤细胞系，诸如SP2/0(美国典型培养物保藏中心(ATCC)，Manassas，Va.，CRL-1581)、NS0(欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)，Salisbury，Wiltshire，UK，ECACC号85110503)、FO(ATCC CRL-1646)和Ag653(ATCC CRL-1580)鼠科动物细胞系。一种示例性人骨髓瘤细胞系是U266(ATTC CRL-TIB-196)。其他可用的细胞系包括源自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的细胞系，诸如CHO-K1 SV(Lonza Biologics)、CHO-K1(ATCC CRL-61，Invitrogen)或DG44。

[0155] 在另一个总的方面，本发明涉及产生本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的方法，包括在产生本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的条件下培养包含编码单克隆抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的细胞，以及从细胞或细胞培养物(例如，来自上清液)回收抗体或其抗原结合片段。表达的抗体或其抗原结合片段可从细胞收获得到并且根据本领域已知的常规技术进行纯化。

[0156] 药物组合物及治疗方法

[0157] 本发明的抗PHF-tau抗体或本发明的其片段可用于治疗、减轻或预防患有神经退化性疾病的患者的症状，该神经退化性疾病涉及脑之内tau的病理性聚集，或诸如患有AD的患者的tau蛋白病变。

[0158] 因此，在另一个总的方面，本发明涉及药物组合物，该药物组合物包含本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

[0159] 在另一个总的方面，本发明涉及在对其有需要的受治疗者中治疗或减轻疾病、障碍或病症诸如tau蛋白病变的症状的方法，包括向受治疗者施用本发明的药物组合物。

[0160] 在另一个总的方面，本发明涉及减少对其有需要的受治疗者中病理性tau聚集或tau蛋白病变蔓延的方法，包括向受治疗者施用本发明的药物组合物。

[0161] 根据本发明的实施方案，药物组合物包含治疗有效量的单克隆抗PHF-tau抗体或其抗原结合片段。如本文所用，提及到人源化抗PHF-tau抗体或其抗原结合片段，治疗有效的量意指单克隆抗PHF-tau抗体或其抗原结合片段的量导致治疗疾病、障碍或病症；预防或减缓疾病、障碍或病症的发展；或者减轻或完全缓解与免疫疾病、障碍或病症相关联的症状。

[0162] 根据具体实施方案，治疗有效量是指足以实现以下作用中的一者、两者、三者、四者、或更多者的治疗量：(i)减小或改善所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状的严重性；(ii)减少所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状的持续时间；(iii)预防所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状发展；(iv)引起所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状消退；(v)预防所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状发展或发作；(vi)预防所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状复发；(vii)减少患有所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状的受治疗者的住院治疗；(viii)减少患有所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状的受治疗者的住院时间；(ix)提高患有所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状的受治疗者的存活；(xi)抑制或减少受治疗者中所治疗疾病、障碍或病症或与之相关联的症状；和/或(xii)增强或改善另一种疗法的预防或治疗效果。

[0163] 根据具体实施方案，所治疗的疾病、障碍或病症是tau蛋白病变。根据更具体实施方案，所治疗的疾病、障碍或病症包括但不限于家族性阿尔茨海默病、散发性阿尔茨海默病、与染色体17相关的额颞痴呆及帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克氏病、进行性皮质下胶质增生、仅缠结痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森综合征-痴呆复合征、唐氏综合症、格-施-沙氏病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克-雅病、多系统萎缩、尼曼-皮克病C型、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元病、脑炎后帕金森综合征、慢性创伤性脑病、或拳击员痴呆症(拳击疾病)。

[0164] tau蛋白病变相关的行为表型包括但不限于认知损害、早期人格改变和失控、冷漠、意志缺乏、缄默症、失用症、持续言语、刻板的动作/行为、性欲亢进、混乱、无法计划或组织顺序任务、自私/无情、反社会特性、缺乏换位思考、踌躇、无语法的讲话伴频繁语义错误但相对保存完好的理解、受损的理解和选词障碍、缓慢渐进的步态不稳、反步症、不动、经常跌倒、非左旋多巴响应的轴向僵化、核上性凝视麻痹、方波抽搐、缓慢垂直扫视、假性延髓麻痹、肢体失用症、肌张力障碍、皮质感觉丧失和震颤。

[0165] 顺应治疗的患者包括但不限于处于AD或其他tau蛋白病变危险中的无症状个体，以及目前示出症状的患者。顺应治疗的患者包括具有已知AD遗传危险诸如AD家族史或基因组中存在遗传危险因素的个体。示例性危险因素是淀粉样前体蛋白(APP)中的突变，尤其是在第717位以及第670和671位处的突变(分别为哈迪和瑞典型突变)。其他危险因素是在早老蛋白基因、PS1和PS2以及ApoE4中的突变、高胆固醇血症或动脉粥样硬化的家族史。目前患有AD的个体可通过上述危险因素的存在的特征性痴呆进行识别。此外，多个诊断测试可用于鉴定患有AD的个体。这些包括测量脑脊液tau和Aβ 42水平。升高的tau和减小的Aβ 42水平预示AD存在。患有AD的个体也可通过AD和相关障碍协会(Related Disorders Association)标准来诊断。

[0166] 本发明的抗PHF-tau抗体适合作为用于治疗或预防神经退化性疾病的治疗剂和预防剂两者，该神经退化性疾病涉及tau的病理性聚集，诸如AD或其他tau蛋白病变。在无症状患者中，治疗可在任何年龄(例如在约10、15、20、25、30岁)时开始。然而，通常，直到患者达到约40、50、60或70岁时才需要开始治疗。治疗通常需要经过一段时间的多个剂量。治疗可通过随着时间过去测定针对治疗剂的抗体、或活化T细胞或B细胞响应进行监控。如果响应下降，则可指示加强剂量。

[0167] 在预防应用中，将药物组合物或药剂施用于对AD敏感或另外处于AD危险中的患者，其量足以消除或减少危险，减轻严重性，或延迟疾病的发作，包括疾病的生物化学、组织学和/或行为症状，其并发症和在疾病发展过程中存在的中间病理学表型。在治疗应用中，将组合物或药剂施用于怀疑患有或已患有此类疾病的患者，其量足以减少、阻止或延迟疾病的症状中的任一种(生物化学、组织学和/或行为)。治疗剂的施用可减少或消除患者中的轻度认知损害，该患者仍未发展特征性阿尔茨海默病的病理学。

[0168] 治疗有效量或剂量可根据各种因素，诸如欲被治疗的疾病、障碍、或病症、施用方式、目标部位、受治疗者的生理状态(包括例如年龄、体重、健康)而变化，不论受治疗者是人或动物、施用的其他药物，以及是否为预防性或治疗性治疗。最佳地滴定治疗剂量以优化安全性和功效。

[0169] 本发明的抗体可被制备为药物组合物，该药物组合物含有治疗有效量的抗体作为药学上可接受的载体中的活性成分。载体可为液体，诸如水和油，包括那些来源于石油、动物、植物的油或合成的油，诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。例如，可使用0.4％盐水和0.3％甘氨酸。这些溶液是无菌的，并且通常不含颗粒物。它们可通过常规的已知的灭菌技术(例如过滤)进行灭菌。组合物可根据需要含有药学上可接受的辅助物质，以接近生理条件，诸如pH调节剂和缓冲剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂等。在此类药物制剂中本发明的抗体的浓度可广泛改变，即从按重量计小于约0.5％，通常为或至少约1％到多达15％或20％，并且将根据所选择的具体施用方式，主要基于所需剂量、流体体积、粘度等进行选择。

[0170] 本发明的抗体的治疗用途的施用模式可以是将该试剂递送至宿主的任何合适途径。例如，本文所述的组合物可被配制成适用于肠胃外施用，例如真皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内或颅内施用，或它们可施用到脑或脊柱的脑脊髓液中。

[0171] 治疗可在单剂量时间表或作为多剂量时间表给予，在该多剂量时间表中，初步治疗过程可使用1-10个分离的剂量，随后为维持和/或增强响应所需的在后续时间间隔给予的其他剂量，例如对于第二剂量在1-4个月时，并且如果需要，在几个月之后的一个或多个后续剂量。合适的疗程的示例包括：(i)0、1个月和6个月，(ii)0、7天和1个月，(iii)0和1个月，(iv)0和6个月，或其他足以引起预期会减轻疾病症状或减轻疾病严重程度的期望响应的疗程。

[0172] 可将本发明的抗体低压冻干用于储存，并在使用之前在合适的载体中复原。该技术已示出对抗体及其他蛋白质制剂有效，并且可采用本领域已知的冻干和重构技术。

[0173] 根据具体实施方案，治疗tau蛋白病变中所用的组合物能够与有效治疗相关神经退化性疾病的其他试剂联合使用。在AD的情况下，本发明的抗体可与减少或预防β淀粉样蛋白(Aβ)沉积的试剂联合施用。PHF-tau和Aβ病理学协同作用是可能的。因此，同时靶向PHF-tau和Aβ以及Aβ相关病理学两者的联合治疗可能比个别靶向各自更有效。在帕金森氏病和有关神经退化性疾病的情况下，清除聚集形式的α-突触核蛋白的免疫调节也是新出现的治疗。同时靶向tau和α-突触核蛋白两者的清除的联合治疗可能比个别靶向任一蛋白质更有效。

[0174] 在另一个总的方面，本发明涉及产生包含本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的药物组合物的方法，包括将单克隆抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体组合，以获得药物组合物。

[0175] 诊断方法和试剂盒

[0176] 本发明的单克隆抗PHF-tau抗体可用于诊断受治疗者中的AD或其他tau蛋白病变的方法中。

[0177] 因此，在另一个总的方面，本发明涉及检测受治疗者中PHF-tau存在的方法以及诊断受治疗者中tau蛋白病变的方法，其通过使用本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段来检测受治疗者中PHF-tau的存在。

[0178] 通过使生物样品与诊断抗体试剂接触，并且检测诊断抗体试剂与来自受治疗者的样品中的磷酸化tau的结合，可在来自受治疗者的生物样品(例如血液、血清、血浆、间质液或脑脊髓液样品)中检测磷酸化tau。用于进行检测的测定包括众所周知的方法，诸如

ELISA、免疫组织化学、蛋白质印迹或体内成像。示例性诊断抗体为本发明的抗体PT3。

[0179] 诊断抗体或类似试剂可通过静脉内注射到患者体内，或通过任何合适途径直接注射到脑中进行施用，所述任何合适途径将该试剂递送至宿主。抗体的剂量应在与治疗方法相同的范围之内。通常，将抗体标记，尽管在一些方法中，对磷酸化tau具有亲和力的一抗是未标记的，并且第二标记抗体用于结合至一抗。标记的选择取决于检测方法。例如，荧光标记适用于光学检测。顺磁性标记的使用适用于无需手术干预的断层摄影检测。放射性标记也可使用PET或SPECT进行检测。

[0180] 诊断通过比较来自受治疗者的样品或受治疗者中的标记PHF-tau、tau聚集体和/或神经原纤维缠结的数目、大小和/或强度与对应基线值来执行。基线值可代表健康个体群体中的平均水平。基线值还可代表在相同受治疗者中确定的先前水平。

[0181] 通过在治疗之前、在治疗过程中或在治疗之后检测受治疗者中磷酸化tau的存在，上文描述的诊断方法也可用于监控受治疗者对治疗的响应。相对于基线值的降低发出针对治疗的正响应的信号。随着病理性tau从脑中清除，值还可在生物学流体中瞬时增加。

[0182] 本发明还涉及用于执行上述诊断和监控方法的试剂盒。通常，此类试剂盒含有诊断试剂诸如本发明的抗体和任选的可检测标记。诊断抗体自身可含有可检测标记(例如荧光分子、生物素等)，其可直接检测或可经由次级反应(例如与链霉抗生物素蛋白反应)检测。作为另外一种选择，可使用含有可检测标记的第二试剂，其中该第二试剂对一抗具有结合特异性。在适用于测量生物样品中的PHF-tau的诊断试剂盒中，该试剂盒的抗体可与固相诸如与微量滴定皿的孔预结合提供。

[0183] 本专利申请中所有引用的参考文献的内容(包括参考文献、公布的专利、公布的专利申请以及共同未决的专利申请)在此明确地以引用方式并入。

[0184] 实施方案

[0185] 本发明还提供一些非限制性实施方案。

[0186] 实施方案1是一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其在tau蛋白的富脯氨酸结构域的磷酸化表位处结合至磷酸化tau蛋白。

[0187] 实施方案2是一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其在包含tau蛋白的磷酸化T212的磷酸化表位处结合至磷酸化tau蛋白，优选地分离的单克隆抗体或其抗原结合片段结合至具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列或处于SEQ ID NO:54的氨基酸序列之内的磷酸化表位。

[0188] 实施方案3是一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其在包含tau蛋白的磷酸化T217的磷酸化表位处结合至磷酸化tau蛋白，优选地分离的单克隆抗体或其抗原结合片段结合至具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列或处于SEQ ID NO:52的氨基酸序列之内的磷酸化表位。

[0189] 实施方案4是一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其在包含tau蛋白的磷酸化T212和磷酸化T217的磷酸化表位处结合至磷酸化tau蛋白，优选地分离的单克隆抗体或其抗原结合片段结合至具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列或处于SEQ ID NO:48的氨基酸序列之内的磷酸化表位。

[0190] 实施方案5是一种分离的单克隆抗体或抗原结合片段，其包含：

[0191] (1)分别具有SEQ ID NO:4、5和6的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3，分别具有SEQ

ID NO:16、17和18的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0192] (2)分别具有SEQ ID NO:1、2和3的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:13、14和15的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0193] (3)分别具有SEQ ID NO:7、8和9的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:19、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0194] (4)分别具有SEQ ID NO:10、11和12的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:22、23和24的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0195] (5)分别具有SEQ ID NO:80、81和9的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:70、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0196] (6)分别具有SEQ ID NO:71、72、73的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:70、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0197] (7)分别具有SEQ ID NO:71、72和73的多肽序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及分别具有SEQ ID NO:19、20和21的多肽序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0198] (8)具有SEQ ID NO:26的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:31的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0199] (9)具有SEQ ID NO:28的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:34的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0200] (10)具有SEQ ID NO:26的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:34的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或

[0201] (11)具有SEQ ID NO:28的多肽序列的V_H区的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:31的多肽序列的V_L区的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0202] 其中抗体或其抗原结合片段结合PHF-tau，并且

[0203] 其中重链可变区结构域以及轻链可变区结构域中的框架区包含人免疫球蛋白的氨基酸序列。

[0204] 实施方案6是一种分离的单克隆抗体或抗原结合片段，其包含具有与SEQ ID NO:26、27、28或29有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区，或具有与SEQ ID NO:31、32、33或34有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0205] 实施方案7是一种分离的单克隆抗体或抗原结合片段，其包含具有与SEQ ID NO:74、76和78中的任一者的重链中的可变区有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的重链可变区，或具有与SEQ ID NO:75、77和79中的任一者的轻链中的可变区有至少80％，优选地至少85％，优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％同一性，并且最优选地100％同一性的多肽序列的轻链可变区。

[0206] 实施方案8是一种分离的单克隆抗体或抗原结合片段，其包含：

[0207] (1)具有SEQ ID NO:26的多肽序列的V_H以及具有SEQ ID NO:31的多肽序列的VL；

[0208] (2)具有SEQ ID NO:28的多肽序列的V_H以及具有SEQ ID NO:34的多肽序列的VL；

[0209] (3)具有SEQ ID NO:26的多肽序列的V_H以及具有SEQ ID NO:34的多肽序列的VL；

[0210] (4)具有SEQ ID NO:28的多肽序列的V_H以及具有SEQ ID NO:31的多肽序列的VL;

[0211] (5)具有SEQ ID NO:27的多肽序列的V_H以及具有SEQ ID NO:31的多肽序列的VL;

[0212] (6)具有SEQ ID NO:74的重链的多肽序列的V_H以及具有SEQ ID NO:75的轻链的多肽序列的VL;

[0213] (7)具有SEQ ID NO:76的重链的多肽序列的V_H以及具有SEQ ID NO:77的轻链的多肽序列的VL;或

[0214] (8)具有SEQ ID NO:78的重链的多肽序列的V_H以及具有SEQ ID NO:79的轻链的多肽序列的VL。

[0215] 实施方案9是一种分离的单克隆抗体或抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:45有至少80%,优选地至少85%,优选地至少90%,更优选地至少95%,更优选地至少98%同一性,并且最优选地100%同一性的多肽序列的重链,以及具有与SEQ ID NO:46有至少80%,优选地至少85%,优选地至少90%,更优选地至少95%,更优选地至少98%同一性,并且最优选地100%同一性的多肽序列的轻链。

[0216] 实施方案10是根据实施方案1至9中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段,其包含人重链IgG1恒定区和人轻链κ恒定区。

[0217] 实施方案11是根据实施方案1至10中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段以5×10^{-9}M或更小的K_D,优选地1×10^{-9}M或更小、或者1×10^{-10}M或更小的K_D结合至人PHF-tau,其中K_D通过表面等离振子共振分析,诸如通过使用Biacore系统测量。

[0218] 实施方案12是一种分离的核酸,该分离的核酸编码根据实施方案1至12中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段。

[0219] 实施方案13是一种载体,该载体包含根据实施方案12所述的分离的核酸。

[0220] 实施方案14是一种宿主细胞,该宿主细胞包含根据实施方案13所述的核酸。

[0221] 实施方案15是一种药物组合物,该药物组合物包含根据实施方案1至11中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

[0222] 实施方案16是一种在对其有需要的受治疗者中减少病理性tau聚集或tau蛋白病变蔓延的方法,该方法包括向受治疗者施用根据实施方案15所述的药物组合物。

[0223] 实施方案17是一种在对其有需要的受治疗者中治疗tau蛋白病变的方法,该方法包括向受治疗者施用根据实施方案15所述的药物组合物。

[0224] 实施方案18是根据实施方案17所述的方法,该方法还包括向受治疗者施用用于在对其有需要的受治疗者中治疗tau蛋白病变的附加试剂。

[0225] 实施方案19是一种在对其有需要的受治疗者中治疗tau蛋白病变的方法,该方法包括向受治疗者施用根据实施方案15所述的药物组合物,其中tau蛋白病变选自家族性阿尔茨海默病、散发性阿尔茨海默病、与染色体17相关的额颞痴呆及帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克氏病、进行性皮质下胶质增生、仅缠结痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森综合征-痴呆复合征、唐氏综合症、格-施-沙氏病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克-雅病、多系统萎缩、尼曼-皮克病C型、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元病、脑炎后帕金森综合征、慢性创伤性脑病、以及拳

击员痴呆症(拳击疾病)。

[0226] 实施方案20是根据实施方案19所述的方法,该方法还包括向受治疗者施用用于在对其有需要的受治疗者中治疗tau蛋白病变的附加试剂。

[0227] 实施方案21是一种产生根据实施方案1至11中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段的方法,该方法包括在产生抗体或抗原结合片段的条件下培养包含编码抗体或抗原结合片段的核酸的细胞,以及从细胞或细胞培养物回收抗体或抗原结合片段。

[0228] 实施方案22是一种制备包含根据实施方案1至11中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合片段的药物组合物的方法,该方法包括将抗体或抗原结合片段与药学上可接受的载体组合,以获得药物组合物。

[0229] 实施方案23是根据实施方案1至11中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段,其用于在对其有需要的受治疗者中治疗tau蛋白病变。

[0230] 实施方案24是根据实施方案1至11中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段或根据实施方案15所述的药物组合物,其用于在对其有需要的受治疗者中治疗tau蛋白病变,诸如家族性阿尔茨海默病、散发性阿尔茨海默病、与染色体17相关的额颞痴呆及帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克氏病、进行性皮质下胶质增生、仅缠结痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森综合征-痴呆复合征、唐氏综合症、格-施-沙氏病、哈勒沃登-施帕茨病病、包涵体肌炎、克-雅病、多系统萎缩、尼曼-皮克病C型、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元病、脑炎后帕金森综合征、慢性创伤性脑病、或拳击员痴呆症(拳击疾病)。

[0231] 实施方案25是根据实施方案1至11中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段用于制备在对其有需要的受治疗者中治疗tau蛋白病变的药物的用途。

[0232] 实施方案26是根据实施方案1至11中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段用于制备在对其有需要的受治疗者中治疗tau蛋白病变的药物的用途,该tau蛋白病变诸如家族性阿尔茨海默病、散发性阿尔茨海默病、与染色体17相关的额颞痴呆及帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克氏病、进行性皮质下胶质增生、仅缠结痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森综合征-痴呆复合征、唐氏综合症、格-施-沙氏病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克-雅病、多系统萎缩、尼曼-皮克病C型、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元病、脑炎后帕金森综合征、慢性创伤性脑病、或拳击员痴呆症(拳击疾病)。

[0233] 实施方案27是一种在来自受治疗者的生物样品中检测磷酸化tau存在的方法,该方法包括使生物样品与根据实施方案1至11中任一项所述的抗体或抗原结合片段接触,以及检测抗体或抗原结合片段与来自受治疗者的样品中PHF-tau的结合。

[0234] 实施方案28是根据实施方案27所述的方法,其中生物样品是血液、血清、血浆、间质液、或脑脊髓液样品。

[0235] 实施方案29是一种通过检测来自受治疗者的生物样品中磷酸化tau的存在来诊断受治疗者中tau蛋白病变的方法,该方法包括使生物样品与根据实施方案1至11中任一项所述的抗体或抗原结合片段接触,以及检测抗体或抗原结合片段与来自受治疗者的样品中

PHF-tau的结合。

[0236] 实施例

[0237] 本发明的以下实施例旨在进一步说明本发明的性质。应当理解,以下实施例不限制本发明,并且本发明的范围由所附权利要求书确定。

[0238] 实施例1-抗体表征

[0239] 在直接酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹和免疫组织化学(IHC)中,测试PT3以及源自用AD脑的富集PHF-tau(ePHF-tau)免疫Balb/c小鼠的一组抗体对磷酸tau与非磷酸tau的靶选择性。PT3是具有SEQ ID NO:25的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:30的轻链可变区氨基酸序列的源自小鼠杂交瘤的抗体。PT3的VH和VL结构域的CDR序列在美国专利9,371,376中示出。将PT3用人框架适应(HFA)方法(参见实施例4)人源化,以生成本发明的人源化抗磷酸tau抗体(参见表1和2)。人源化B296具有与PT3相同的CDR序列。使人源化mAb B296亲和力成熟,以生成本发明的附加抗体(参见表3)。

[0240] ELISA

[0241] 以ELISA形式评价重组PT3作为小鼠IgG1(mIgG1)与富集PHF-tau和重组人野生型tau的结合。将该源自重组的PT3与源自杂交瘤的经纯化的PT3进行比较。结果展示源自经纯化的杂交瘤和源自重组的PT3抗体批次两者之间可比较的结合滴定曲线(图1)。在较高浓度下,在PHF-tau上存在较强结合,并且在可溶性tau上存在最小结合。

[0242] 蛋白质印迹

[0243] 用PT3针对由AD脑制备的经纯化的非磷酸化重组人tau和十二烷基肌氨酸钠不溶性PHF-tau来执行蛋白质印迹分析。PT3示出与PHF-tau的选择反应性,类似于磷酸选择性参考抗体AT8 pS202/pT205/pS208(Mercken等人,Acta Neuropathol.84(3):265-72,1992;Malia等人,Proteins.84:427-434,2016)和AT100 pT212/pS214(Mercken等人,1992,同上;Hoffmann等人,Biochemistry.36(26):8114-24,1997)(图2)。磷酸非依赖性参考抗体HT7(Mercken,博士论文:University of Antwerp,Wilrijk-Antwerp,1991)与重组tau和PHF-tau两者反应。涉及磷酸敏感性表位的BT2仅与未磷酸化的重组tau在S199/S202反应(Mercken,1991,同上)。在其他蛋白质印迹实验中,甚至当在较高浓度下印迹时,PT3示出与重组tau的反应性较弱。

[0244] 人脑的免疫组织化学

[0245] 免疫组织化学分析在AD和对照脑的福尔马林固定的石蜡包埋部分上来执行,以原位证实与tau蛋白病变的反应性。PT3示出与参考tau蛋白病变特异性诊断抗体阳性对照AT8类似但更强的反应性模式(图3)。在这些实验条件下检测到与对照脑中的正常tau不显著反应(图4)。

[0246] 野生型和tau敲除小鼠的免疫组织化学

[0247] IHC分析在野生型和tau敲除小鼠脑中用PT3来执行。在野生型小鼠脑中用PT3进行IHC分析指示,可在最佳表位保存条件下观察到与所选择的野生型tau库的反应性。PT3的染色模式显示出树突(somatodentritic)定位(图5,箭头),使人想起在文献中对源自大鼠和人活体组织切片的组织中的抗磷酸tau抗体所述的染色(Matsuo等人,Neuron.13(4):989-1002,1994)。如用tau-1抗体所观察的对tau的典型非磷酸轴突染色模式(图6,箭头)是不存在的,这指示PT3与生理上重要的微管结合tau库的反应性有限。tau敲除动物中反应性的缺

乏证实了PT3染色模式的tau特异性。

[0248] 野生型小鼠脑中PT3表位处磷酸化(pT212/pT217,参见实施例2)的存在由Morris等人(Nat Neurosci.18(8):1183-9,2015)的质谱分析中T212和T217的小鼠同系物处磷酸化的检测加以支持。这表明PT3表位将在tau磷酸化和聚集体形成的早期存在,这对于治疗性抗体表位将是优选的。

[0249] 表面等离振子共振(SPR)的结合评估

[0250] PT1和PT3抗PHF-tau抗体与PHF-tau和重组tau的相互作用通过SPR在ProteOn(Bio-Rad,Hercules,CA)和Biacore(Biacore,Uppsala,Sweden)仪器上进行评估。总tau抗体HT7作为阳性对照测试,并且AT8作为参考抗PHF-tau抗体测试。

[0251] 表4和5示出抗体与PHF-tau和重组tau的亲和力评估的代表性结果。PT3单克隆抗体示出与PHF-tau极紧密的结合(表4)。

[0252] 表4:杂交瘤和重组mAb以及Fab与PHF-tau的ProteOn SPR亲和力

[0253]

mAb/Fab名称	k_{on}(1/Ms)	k_{off}(1/s)	K_D(pM)[a]
HT7 mAb	(7.06±0.62)×10^5	(9.26±2.77)×10^{-5}	131±41
PT1 mAb(hyb)	2.01×10^5	6.47×10^{-5}	322
PT3 mAb(rec mG2a)	(3.12±0.40)×10^6	<5.0×10^{-5}	≤16
PT3 Fab	(1.83±0.08)×10^6	(1.15±0.02)×10^{-4}	63±3
AT8 mAb(hyb)	(2.30±0.19)×10^6	(2.11±0.07)×10^{-4}	92±8
AT8 Fab	(8.89±0.87)×10^5	(2.30±0.14)×10^{-2}	25,844±2,995

[0254] 对于n≥3平行测定,报告标准偏差;

[0255] hyb,杂交瘤表达的mAb;rec,重组mAb;

[0256] [a]括号中的K_D值通过排除75nM注射的mAb浓度获得。

[0257] 重组PT3-mG2a的表观结合亲和力(K_D)等于或小于16pM,具有极慢的解离率。在四次平行测定中的一次中观察到杂交瘤表达的PT3仅极弱的结合至重组tau(表5)。

[0258] 表5:杂交瘤和重组mAb以及Fab与重组tau的Biacore SPR亲和力

[0259]

mAb/Fab 名称	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)
HT7 mAb	(3.86±2.00)×10^6	(1.18±0.54)×10^2	3,050±2,110
PT1 mAb (hyb)		无显著结合[a]	
PT3 mAb (hyb)		仅在4次平行测定中的1次中观察到较低结合[a]	
PT3 mAb (rec mG2a)		未结合	
PT3 Fab		未结合	
AT8 mAb (hyb)		未结合[a]	

[0260] hyb,杂交瘤表达的mAb;rec,重组;

[0261] [a]在ProteOn上用来自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO)的重组tau(0.12-75nM,5倍稀释液)测试,其随后被确定为聚集。对于所有其他测试的样品,在Biacore上使用自身生成的重组tau。

[0262] 因为具有多个表位拷贝的PHF-tau的多聚/聚集性质以及IgG的二价性质,单克隆抗体亲和力在该研究形式中受亲合力影响。Fab亲和力提供关于抗体的固有亲和力的信息。PT3 Fab示出与PHF-tau的较强固有结合亲和力(K_D=63pM)和缓慢的解离率(表4)。Biacore

SPR中Fab与重组tau的反应性在分析条件下低于检测限(表5)。

[0263] 表征研究展示,PT3选择性地结合PHF-tau并且其针对源自AD脑的PHF-tau具有较高亲和力。

[0264] 实施例2-PT3的表位作图

[0265] PT3的表位通过表面等离振子共振(ProteOn)用表6所示的一组磷酸肽进行确定。

[0266] 材料和方法:PT3 Fab(B187)产生为具有小鼠可变区和人IgG1/κ恒定区的嵌合形式,在重链的C端处具有6xHis标记(VH10,SEQ ID NO:25,以及VL7,SEQ ID NO:30)。Fab通过以下产生:在HEK 293细胞中瞬时表达,通过Ni亲和层析纯化,并且在20mM Tris(pH 7.4)、50mM NaCl(Sino Biologicals)中透析。

[0267] PT3 Fab对表6所示的十四种tau磷酸肽中的每一种的结合亲和力使用Bio-Rad ProteOn XPR36通过表面等离振子共振(SPR)进行评估。通过标准化学方法(New England Peptide)合成在N端处具有短链生物素和PEG4部分的肽。使生物素酰化肽捕集在中和亲和素包被的NLC生物传感器芯片上,并使PT3 Fab在表面上流动,以测量动力学参数。

[0268] 使用磷酸盐缓冲盐水(pH 7.4)、0.005%Tween 20(PBST)作为运行缓冲剂和样品稀释缓冲剂两者,在25℃下执行所有实验。在运行样品之前,通过使PBST在芯片表面上运行1h来调节NLC芯片。通过将肽用PBST稀释至10ng/mL并在流动通道上方以30μL/min注射100s,大约5-10RU的肽捕集在芯片表面上。分析系列稀释的PT3 Fab(1.1-90nM),并且除肽-8之外,一式二份测量每个浓度。在捕集肽之后,抗体滴定以60μL/min注射3分钟(结合相),随后仅仅注射缓冲剂300s(离解相)。

[0269] 数据通过减去间隙(interspot)响应和仅注射缓冲剂所生成的曲线而双重指称。芯片表面如下再生:使用0.85%磷酸以30μL/min单一注射100s接触时间,随后注射四次运行缓冲剂,继之以下一抗体滴定注射。数据处理和动力学分析使用仪器软件进行。数据使用简单的朗格缪尔1:1结合模型进行分析。

[0270] 结果:PT3 Fab的动力学速率常数和平衡结合亲和力示于表6中。

[0271]

表 6: PT3 Fab 与肽结合的 ProteOn SPR 亲和力数据

肽名称	磷酸化位点	序列****	平均 KD (nM)	KD 范围或 STDEV (nM)	平均 ka (1/Ms)	ka 范围或 STDEV (1/Ms)	平均 kd (1/s)	kd 范围或 STDEV (1/s)	平行测定 #
肽-1	212/214/217	GTPGSRSR(pT)P(pS)LP(pT)PPTREPKK (SEQ ID NO: 47)	0.26	0.14 - 0.38	1.27 E+06	(0.87 - 1.67) E+06	2.80 E-04	(2.36 - 3.24) E-04	2
肽-2	212/217	GTPGSRSR(pT)PSLP(pT)PPTREPKK (SEQ ID NO: 48)	0.27	0.09 - 0.45	7.64 E+05	(5.46 - 9.82) E+05	1.68 E-04	(0.91 - 2.45) E-04	2
肽-3*	214/217	GTPGSRSRTP(pS)LP(pT)PPTREPKK (SEQ ID NO: 49)	5.57	1.64	1.04 E+06	2.83 E+06	5.47 E-03	1.77 E-04	3
肽-4	210/217	GTPGSR(pS)RTPSLP(pT)PPTREPKK (SEQ ID NO: 50)	6.60	6.48 - 6.71	9.68 E+05	(9.22 - 9.68) E+05	6.27 E-03	(6.19 - 6.27) E-03	2
肽-5	210/214/217	GTPGSR(pS)RTP(pS)LP(pT)PPTREPKK (SEQ ID NO: 51)	8.70	6.6 - 10.8	7.04 E+05	(5.45 - 8.63) E+05	5.84 E-03	(5.69 - 5.98) E-03	2
肽-6	217	GTPGSRSRTPSLP(pT)PPTREPKK (SEQ ID NO: 52)	11.4	10.9 - 11.9	5.41 E+05	(5.24 - 5.58) E+05	6.16 E-03	(6.06 - 6.25) E-03	2
肽-7	212/214	GTPGSRSR(pT)P(pS)LPTPPTREPKK (SEQ ID NO: 53)	13.5	11.3 - 15.7	4.22 E+05	(3.57 - 4.87) E+05	5.55 E-03	(5.49 - 5.60) E-03	2
肽-8**	212	GTPGSRSR(pT)PSLPTPPTREPKK (SEQ ID NO: 54)	23	n/a	2.81 E+05	n/a	6.46 E-03	n/a	1
肽-9	214	GTPGSRSRTP(pS)LPTPPTREPKK (SEQ ID NO: 55)	> 500	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1
肽-10	210/214	GTPGSR(pS)RTP(pS)LPTPPTREPKK (SEQ ID NO: 56)	>500	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	2
肽-11#	208/212/214	SPGTPG(pS)RSR(pT)P(pS)LPTPPT (SEQ ID NO: 57)	未结合	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1
肽-12	210	GTPGSR(pS)RTPSLPTPPTREPKK (SEQ ID NO: 58)	未结合	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	2

[0272]

肽名称	磷酸化位点	序列***	平均 KD (nM)	KD 范围或 STDEV (nM)	平均 ka (1/Ms)	ka 范围或 STDEV (1/Ms)	平均 kd (1/s)	kd 范围或 STDEV (1/s)	平行测定 #
肽-13	214/220	GTPGSRSRTP(pS)LPTPP(pT) REPKK (SEQ ID NO: 59)	未结合	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	2
肽-C	无	GTPGSRSRTPSLPTPPTREP KK (SEQ ID NO: 60)	未结合	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	4

对于 n=2，报告范围；

*对于肽-3，n=3，报告标准偏差；

**对于肽-8，n=1，不报告平均值或范围；

***除非所指出，否则所有肽包含 tau 残基 204-225（同种型 2N4R）并且在 N 端处含有短链生物素部分(SCBiot)和 dPEG4 并在 C 端处含有酰胺；

#肽-11 包含 tau 残基 202-220（同种型 2N4R）。

[0273] PT3 Fab示出与磷酸化肽在T212或T217处纳摩尔结合，并且当T212和T217两者被磷酸化时PT3 Fab的结合有所增强。PT3 Fab与含有pT212和/或pT217的肽结合最佳。PT3

Fab以类似的亲和力与T212/T217处磷酸化的tau肽(肽-2)结合,并且与T212/S214/T217处磷酸化的tau肽(肽-1)结合,这展示S214的附加磷酸化并未增强PT3Fab的结合。PT3 Fab与pS214-tau肽(肽-9)仅具有极弱的结合。当S210单独地或与其他磷酸化残基组合地磷酸化时,观察到很小乃至没有结合效应。T220处的磷酸化似乎对PT3 Fab活性结合的丧失作出贡献(肽-9相较于肽-13)。并未检测到PT3 Fab针对非磷酸化tau肽(肽-C)的结合活性。PT3结合至tau的富脯氨酸结构域之内的磷酸表位。

[0274] 结合研究表明,PT3表位包括pT212和pT217,并且PT3的最大结合表位包括双重磷酸化pT212/pT217-tau。PT3的表位不同于其他报告的磷酸依赖性抗tau抗体的表位,诸如AT8(pS202/pT205/pS208;Malia等人,2016,同上)、AT180(pT231;Goedert等人,Biochemical J.301(Pt3):871-877)、AT270(pT181;Goedert等人,同上)、PHF1(pS396/pS404;Otvos等人,J Neurosci Res.39(6):669-73,1994)、12E8(pS262;Seubert等人,J Biol Chem.270(32):18917-22,1995)、抗tau pS422抗体(Collin等人,Brain.137(Pt 10):2834-46,2014)、以及抗tau pS409抗体(Lee等人,Cell Rep.16(6):1690-700,2016)。

[0275] 实施例3-PT3 Fab+pT212/pT217-tau肽复合物的晶体结构

[0276] 通过导致鉴定tau表位和PT3互补位的X射线晶体学,确定PT3 Fab(B187)与两个tau磷酸肽的共结构。

[0277] 样品制备和结晶:用于结晶的肽由New England Peptides合成并且具有以下序列:Ac-GSRSR(pT)P(pS)LP(pT)PPT-OH(SEQ ID NO:61),对应于在残基T212、S214和T217处磷酸化(pT212/pS214/pT217-tau肽)的tau-441(2N4R同种型)的残基207-220;以及Ac-SR(pT)PSLP(pT)PPTRE-OH(SEQ ID NO:62),对应于在T212和T217处磷酸化(pT212/pT217-tau肽)的残基210-222。将冻干肽溶解于100mM Tris(pH 8.5)中至大约55mg/mL。

[0278] 使PT3 Fab浓缩至19.64mg/mL或17.76mg/mL并与10.7-或9.3-倍摩尔过量的pT212/pS214/pT217-tau肽或pT212/pT217-tau肽混合,以分别在20mM Tris(pH 7.5)、100mM或50mM NaCl中达至16.9mg/mL和16.7mg/mL的最终复合物浓度。使用Mosquito结晶机器人,使150nL复合物与150nL贮存溶液混合,用内部筛网和PEG(Qiagen)来执行结晶。在以下条件下获得用于衍射的晶体:PT3 Fab+pT212/pS214/pT217-tau肽复合物溶于0.1M乙酸盐(pH 4.5)、18%PEG 3350、0.2$MgCl_2$,以及PT3 Fab+pT212/pT217-tau肽复合物溶于20%PEG 3350、0.2M磷酸铵(单碱性)。

[0279] 数据收集和结构确定:从0.1M乙酸盐(pH 4.5)、18%PEG 3350、0.2M $MgCl_2$(母液)收获得到PT3 Fab+pT212/pS214/pT217-tau肽复合物的晶体,并将该晶体与由补充有20%甘油的母液构成的冷冻保护剂溶液混合。使晶体在液氮中快速冷却,并且在配备有OsmicTM VariMax™共焦光学器件、Saturn 944 CCD检测器和X-stream™ 2000深低温冷却系统(Rigaku)的Rigaku MicroMaxTM-007HF微聚焦X射线发生器上收集数据。

[0280] 将数据用XDS(Kabsch,Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.66(2):125-32,2010)进行处理。用Phaser(McCoy等人,J Appl Crystallogr.40(Pt 4):658-674,2007)在PHENIX程序套件中(Adams等人,Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.66(Pt 2):213-21,2010),使用Fab H3-23:L1-39(PDB ID:5I19)Fab作为检索模型来执行分子置换。Phenix.xtriage在具有7%双晶级分的晶体中鉴定假缺面象双晶形成。对于大部分模型构建,使用双晶精修来执行精修。模型构建用Coot(Emsley和Cowtan,Acta Crystallogr D

Biol Crystallogr.60(Pt 12 Pt 1):2126-32,2004)并且精修用phenix.refine(Adams等人,2010,同上)。精修的最终阶段不用双晶精修,因为后来确定双晶精修并未改善图谱。表7中示出数据和精修统计。

[0281] 表7:X射线数据和精修统计

[0282]

	PT3 Fab+pT212/pS214/pT217- tau肽复合物	PT3 Fab+ pT212/pT217-tau肽复合物
光束线/检测器	Rigaku MicroMax- 007HF / Saturn 944	APS IMCA-CAT/ Pilatus 6M
数据		
波长(Å)	1.5418	1.000
分辨率范围(Å)	30-2.5 (2.6-2.5)	8.94-2.0 (2.05-2.00)
空间群	C2	C2
晶胞轴(Å)	125.21, 83.50, 167.41	126.24, 83.66, 166.87
晶胞角(°)	90.00, 91.71, 90.00	90.00, 92.50, 90.00
分子/不对称单元	3	3
V_m (Å^3/Da)/solv.(%)	2.92 / 58	3.08 / 60

[0283]

完整度(%)	97.0 (89.3)	99.2 (99.6)
R_{merge}	0.108 (0.318)	0.053 (0.555)
平均 $I/\sigma(I)$	4.9 (1.7)	13.09 (2.49)
测量反射数	177373 (11739)	384718 (27833)
独立反射数	57942 (3878)	116430 (8607)
B-因子(Wilson) (Å^2)	29.1	36.49
精修统计		
原子数	11165	10968
水分子数	961	779
R_{work}/R_{free}(%)	19.4/23.1	18.6 / 21.3
理想几何结构的R.m.s.d.		
键长(Å)	0.005	0.008
键角(°)	1.005	1.215
平均 B 因子(Å^2)	26.87	41.2
拉氏图		
有利区的残基(%)	97.23	98.31
允许区的残基(%)	2.47	1.62
异常值(%)	0.31	0.08

[0284] 括号中指示最高分辨率壳的值。

[0285] 从结晶滴中提取PT3 Fab+pT212/pT217-tau肽复合物单晶,浸入补充有20%甘油的贮存溶液(20%PEG 33500,.2M磷酸铵(单碱性))中数秒,并在液氮中快速冷却。在先进光子源(Argonne,IL)IMCA-CAT光束线17-ID-B上在100K下收集数据。衍射强度在Pilatus 6M检测器上以180°旋转收集,其中暴露时间为每半度图像0.5s。将数据用XDS(Kabsch,2010,同上)处理至2.0Å的最大分辨率。使用PT3 Fab+pT212/pS214/pT217-tau肽结构作为检索模型,用程序Phaser(McCoy等人,2007,同上)通过分子置换来确定结构。结构精修使用NCS(Adams等人,2010,同上)用phenix.refine来执行。模型调整使用程序Coot(Emsley和

Cowtan,2004,同上)来进行。表7中示出X射线数据收集和精修统计。使用4.0Å截断距离,用CONTACT(Collaborative Computational Project,Number 4,Acra Crystallogr D Biol Crystallogr.50(Pt 5):760-3,1994)计算分子间接触距离,并且周Pymol视觉检测。

[0286] 结构分析:PT3 Fab与pT212/pS214/pT217-tau肽的结构被确定为2.5Å分辨率。如下对PT3 Fab+pT212/pT217-tau肽结构所述,每个不对称单元存在三个复合物拷贝。结构示出当T212和T217也被磷酸化时(数据未示出),PT3不与pS214的磷酸盐相互作用,其由ProteOn的磷酸肽作图加以支持(实施例2)。

[0287] 通过X射线晶体学以2.0Å分辨率确定PT3 Fab与pT212/pT217-tau肽的结构(图7)。在不对称单元中存在三个复合物拷贝(拷贝1:链A,C,E;拷贝2:链B,D,F;拷贝3:链H,L,P),由重链A、C和H,轻链B、D和L,以及肽链E、F和P组成。三个拷贝高度类似-可变区在0.3Å rmsd之内。图7-8为拷贝3(链H,L,P)。如图7所示,Fab重链和轻链形成浅结合袋,并且肽跨越Fab。tau磷酸肽为特征符合聚脯氨酸-II螺旋二级结构的伸展构象。

[0288] 包括相互作用界面的PT3 Fab互补位和pT212/pT217-tau肽表位残基示于图8和9,以及表8中。PT3及其表位肽之间的界面由范德瓦尔斯和静电相互作用组成,其从肽残基211延伸至221。与pT212/pT217-tau肽复合的PT3 Fab的结构示出表位包括pT212和pT217的磷酸盐。重链Y32羟基基团与pT212的磷酸氧形成重要的氢键。T28(VH)的侧链羟基基团也与pT212的磷酸氧形成氢键。重链K53与pT217形成关键盐桥相互作用。重链W99与肽的L215和P216的侧链残基形成疏水相互作用。重链残基W104与肽具有广泛相互作用并且也形成VH/VL界面的一部分。轻链Y32与P219形成疏水相互作用。与pT212和pT217的磷酸盐的静电相互作用就PT3对磷酸-tau的选择性而言至关重要,并且疏水相互作用还有助于PT3对pT212/pT217-tau(实施例5)和PHF-tau(实施例1和6)的较高亲和力。

[0289] 表8:PT3 Fab+pT212/pT217-tau肽的表位和互补位:指示与pT212/pT217-tau肽残基相互作用的PT3 Fab VH或VL的残基。氢键相互作用以粗体指示。

[0290]

V_H	肽	V_L
T28	R211	
F27、**T28**、**S31**、**Y32**	pT212	
S31	P213	
S31、K53	S214	

[0291]

S31、Y32、**K53**、W99	L215	
W99、G100	P216	
S52、K53、W104	pT217	
W99、G100、G103、W104	P218	
G100、D101	P219	Y32
W104	T220	**Y91**、D92、E93、F94、L96
	R221	**D92**、E93、**F94**

[0292] 实施例4-PT3的人框架适应

[0293] 抗tau小鼠抗体PT3使用人框架适应(HFA)方法进行人源化(Fransson等人,J Mol Biol.398(2):214-31,2010)。对于人框架适应,CDR根据Martin(Martin和Thomton,J Mol

Biol.263(5):800-15,1996)进行定义。为了寻找人源化HC和LC的最佳组合,选择几种人重链和轻链V区序列进行测试。设计出四种人框架适应PT3重链可变区和四种人框架适应PT3轻链可变区,并且作为全长人重链IgG1和人轻链κ分子产生(图10)。基于与仅框架区(FR)中小鼠PT3 VH和VL的序列相似性,选择人种系V基因(对于VH有4种:IGHV3-23*01,IGHV3-33*01,IGHV3-11*01和IGHV1-3*01;对于VL有4种:IGVK1-16*01,IGVK1-16*01+,IGKV1-39*01和IGKV2-24*01)以用于产生人框架适应VH和VL变体。VL78(IGVK1-16*01+)是单点突变的VL77(IGVK1-16*01),并且含有D56S突变以消除潜在的异构化风险。组合四种HFA HC与四种HFA LC分子所得的16种HFA变体单克隆抗体的名称示于表9中。

[0294] 表9:HFA-PT3变体:B234含有小鼠亲本可变区并且作为阳性对照包括在内。对应的人种系基因在括号中指示。VL78(IGVK1-16*01+)含有VL77(IGVK1-16*01)的单点突变。

[0295]

	VH10 (PT3) (SEQ ID NO:35)	VH91 (IGHV3-23*01) (SEQ ID NO:36)	VH92 (IGHV3-33*01) (SEQ ID NO:37)	VH93 (IGHV3-11*01) (SEQ ID NO:38)	VH94 (IGHV1-3*01) (SEQ ID NO:39)
VL7 (PT3) (SEQ ID NO:40)	B234				

[0296]

VL77 (IGVK1-16*01) (SEQ ID NO:41)		B235	B296	B282	B268
VL78 (IGVK1-16*01+) (SEQ ID NO:42)		B250	B236	B297	B283
VL79 (IGKV1-39*01) (SEQ ID NO:43)		B265	B251	B237	B298
VL80 (IGKV2-24*01) (SEQ ID NO:44)		B280	B266	B252	B238

[0297] 16种HFA-PT3(hIgG1/κ)变体组的克隆和DNA合成通过标准方法来执行。将DNA通过标准方案转染到HEK(Expi293)细胞中,并在培养5天之后收集细胞上清液。通过使IgG捕集在经1×dPBS(pH 7.2)预平衡的MabSelectSure Protein A树脂上,使用用于高通量平行纯化的Protein BioSolutions ProteinMaker(Gaithersburg,MD)对澄清上清液进行纯化。在用1×dPBS(pH 7.2)洗涤柱之后,用0.1M乙酸钠(pH 3.5)洗脱单克隆抗体。洗脱级分通过添加2.5M Tris-HCl(pH 7.2)至20体积%进行中和,并且最终蛋白质制剂为0.08M乙酸钠、0.5M Tris-HCl(pH 7.1)。

[0298] HFA组的初始评估基于纯化收率、体积排阻高效液相色谱(SE-HPLC)特征、ELISA结合测定中与PHF-tau的结合、以及生物物理表征。

[0299] B296的Fab(B324)和B252的Fab(B326)也通过使对应单克隆抗体的HC和LC可变区与人IgG1/κ恒定区和重链C端的6xHis标记配对而生成。使B324和B326在HEK(Expi293)细胞中表达并且通过如(Zhao等人,Protein Expr Purif.67(2):182-9,2009)所述的类似方法进行纯化。

[0300] 实施例5-通过SPR关于磷酸肽表征HFA-PT3抗体

[0301] 用ProteOn XPR36,通过表面等离振子共振(SPR)来分析基于生物物理表征和ELISA所选择的结合至PHF的HFA-PT3单克隆抗体变体亚组对以下磷酸肽的结合:pT212/pT217-tau肽(肽-2,SEQ ID NO:48)和pT212-tau肽(肽-8,SEQ ID NO:54)。所有实验在25℃下使用PBST(pH 7.4)(Bio-Rad,目录号176-2720)作为运行缓冲剂和样品稀释缓冲剂两者来执行。

[0302] 单克隆抗体/肽结合:在用PBST预调节之后,用抗人Fc(Jackson 109-005-098)涂覆Biorad GLC芯片至大约6500RU的密度来制备生物传感器表面。使用EDC/NHS,使抗人IgG胺偶联至芯片表面,然后用乙醇胺洗涤。将抗体用PBST稀释至2μg/mL,并且在表面以30μL/min注射5min,以实现900-1000RU的最大密度。肽作为分析物以60μL/min注射3min,随后进行5min离解。将肽-2用PBST稀释,以生成三倍浓度系列(0-30nM)并且一式两份测量。在浓度范围0-100nM内记录结合至肽-8的单克隆抗体的单一测量。

[0303] Fab/胎结合:使生物素酰化肽捕集在用PBST预调节的中和亲和素包被的NLC生物传感器芯片上,并使Fab在表面上流动,以测量动力学参数。通过将肽用PBST稀释至10ng/mL并在流动通道上方以30μL/min注射100s,大约5-10RU的肽捕集在芯片表面上。将系列稀释的PT3 Fab(1.1nM至90nM)以60μL/min注射3分钟(结合相),随后仅仅注射缓冲剂300s(离解相)。

[0304] 数据通过减去间隙响应和仅注射缓冲剂所生成的曲线而双重指称。芯片表面如下再生:用0.85%磷酸,随后注射PBST,继之以下一抗体滴定注射。数据处理和分析使用仪器软件来执行。数据使用简单的朗格缪尔1:1结合模型进行拟合。

[0305] HFA-PT3 IgG针对肽-8的动力学速率常数和平衡结合亲和力示于表10中。B234含有小鼠PT3可变区和人IgG1/κ恒定区。在人源化变体中,B296示出与肽-8(pT212-tau)的结合最强。

[0306] 表10:HFA-PT3 mAb组与肽-8结合的ProteOn SPR亲和力数据

[0307]

样品	蛋白质描述	平均 k_a, (1/Ms)	平均 k_d, (1/s)	平均 K_D, nM
B234	小鼠 PT3, hIgG1	2.31E+06	8.02E-03	3.48
B235	VH91 / VL77	未结合		
B252	VH93 / VL80	7.42E+05	2.42E-02	32.6
B280	VH91 / VL80	2.18E+05	7.57E-03	34.7 (差的数据拟合)
B282	VH93 / VL77	4.42E+05	3.82E-02	86.5
B296	VH92 / VL77	8.56E+05	2.30E-02	26.8

[0308] 对于所有抗体,n=2

[0309] HFA-PT3 IgG针对肽-2的动力学速率常数和平衡结合亲和力示于表11中。B252和B296示出与肽-2(pT212/pT217-tau)的结合最强,并且平均K_D值分别为172pM和190pM。

[0310] 表11:HFA-PT3 mAb组与肽-2结合的ProteOn SPR亲和力数据

[0311]

样品	蛋白质描述	平均 k_a, (1/Ms)	k_a 范围	平均 k_d, (1/s)	kd 范围	平均 K_D, pM	K_D 范围 (pM)
B234	小鼠 PT3, hIgG1	9.35 E+06	(8.7-10) E+06	3.25 E-04	(2.42-4.08) E-04	29.2	(27.8-30.6)
B235	VH91 / VL77	3.21 E+06	(2.84-3.58) E+06	5.69 E-03	(5.28-6.10) E-03	1790	(1710-1860)
B252	VH93 / VL80	5.75 E+06	(3.95-7.54) E+06	9.01 E-04	(8.56-9.46) E-04	172	(126-217)
B280	VH91 / VL80	4.71 E+06	(2.21-7.20) E+06	2.74 E-03	(2.46-3.01) E-03	769	(418-1120)
B282	VH93 / VL77	3.12 E+06	(2.34-3.89) E+06	1.32 E-03	(1.24-1.40) E-03	445	(360-529)
B296	VH92 / VL77	5.00 E+06	(3.10-6.90) E+06	8.26 E-04	(7.88-8.63) E-04	190	(125-255)

[0312] 对于所有抗体,n＝2

[0313] 通过ProteOn测量B296和B252的Fab对pT212/pT217-tau肽(肽-2)的亲和力并且与小鼠亲本Fab B187进行比较(表12)。相比于亲本小鼠Fab,HFA Fab的解离率提高2.7-5.1倍并且K_D值提高3.5-5.6倍。相比于B252的Fab(B326),B296的Fab(B324)示出对pT212/pT217-tau肽的亲和力较强,并且解离率较慢。

[0314] 表12:HFA-PT3 Fab与肽-2结合的ProteOn SPR亲和力数据

[0315]

样品	描述	平均 k_a (1/Ms)	k_a 范围 (1/Ms)	平均 k_d (1/s)	k_d 范围 (1/s)	平均 K_D (pM)	K_D 范围 (pM)
B187	PT3 的小鼠亲本 Fab	7.76 E+05	(4.91-10.6) E+05	6.39 E-05	(4.93-7.84) E-05	87.4	(73.8-101)
B324	B296 的 Fab	6.10 E+05	(4.27-7.93) E+05	1.74 E-04	(1.61-1.86) E-04	305	(234-376)
B326	B252 的 Fab	7.10 E+05	(5.07-9.12) E+05	3.29 E-04	(3.04-3.53) E-04	493	(387-599)

[0316] 对于所有Fab,n＝2

[0317] 实施例6-通过SPR关于PHF-tau和重组tau表征HFA-PT3抗体

[0318] 测试HFA-PT3单克隆抗体亚组对从阿尔茨海默病脑中分离的PHF-tau的结合。所有相互作用均在25℃下进行研究,使用补充有3mM EDTA和0.005％Tween20的PBS(pH 7.4)作为运行或系统缓冲剂。HT7(Pierce,目录号MN1000),小鼠抗tau抗体用作阳性对照。

[0319] 使用通过用HT7作为捕集试剂捕集偶联PHF-tau所制备的生物传感器表面,利用ProteOn分析抗tau单克隆抗体与PHF-tau的相互作用。PHF-tau通过以5000×g在5℃下离心2次,每次10min进行制备;然后,将来自第二离心的上清液用运行缓冲剂稀释1/40。为了制备芯片,使用制造商的胺偶联化学说明书,使HT7共价地固定至GLC(ProteOn)传感器芯片的表面(约5000响应单位(RU))。偶联缓冲剂是10mM乙酸钠(pH 4.5)。在HT7固定之后,注射PHF-tau并由HT7捕集(约300RU)。在捕集之后,使用制造商的胺偶联化学说明书,通过活化芯片使PHF-tau共价固定至传感器芯片。通过注射乙醇胺封闭剩余的反应位点。在PHF-tau修饰的表面和参考表面(不含抗原)的制备和稳定之后,将抗tau抗体在运行缓冲剂中稀释,并且在溶液中(0.12-75nM,5倍稀释液中)注射。监控结合3分钟(以40μL/分钟注射的120μ

L)。监控离解15分钟。使用10mM Gly(pH 2.0)来执行传感器表面的再生。单克隆抗体的数据使用二价结合模型进行拟合,其中表观亲和力(K_D)报告为k_{off}/k_{on}的比率。使用朗格缪尔1:1结合模型来动力学分析Fab。

[0320] 大部分HFA单克隆抗体保留与小鼠亲本PT3单克隆抗体类似的紧密结合,范围为27-165pM(表13)。B252和B296-前两名HFA单克隆抗体分别具有32pM和27pM的亲和力。B235示出该组的最弱单克隆抗体亲和力(165pM)。评估B324(B296的Fab)和B326(B252的Fab)的PHF-tau结合,并且相比于小鼠PT3亲本Fab B187而言分别示出K_D弱2.5倍和3.3倍。B324示出比B326强1.3倍的亲和力(K_D)以及慢1.7倍的解离率。Fab亲和力比其对应的单克隆抗体弱,暗示单克隆抗体针对PHF-tau的亲合力。还测试了B352即具有相同可变区的B296的IgG4变体与PHF-tau的结合,并且亲和力(43pM)在B296的2倍之内(表11)。

[0321] 表13:PT3 HFA mAb和Fab与PHF-tau的ProteOn SPR亲和力

[0322]

样品	描述	k_{on}(1/Ms)	k_{off}(1/s)	K_D(pM)
HT7	小鼠(+对照)	(5.69±0.99)E+05	(1.10±0.18)E-04	193±46
B17(mAb)	小鼠PT3,muG2a	(2.48±0.20)E+06	(2.68±0.43)E-05	11±1.9
B234(mAb)	小鼠PT3,hIgG1	(2.23±0.13)E+06	(2.71±0.17)E-05	12±1.0
B235(mAb)	VH91/VL77	(4.90±0.34)E+05	(8.06±0.24)E-05	165±12
B252(mAb)	VH93/VL80	(1.32±0.09)E+06	(4.28±0.19)E-05	32±2.6
B280(mAb)	VH91/VL80	(1.02±0.03)E+06	(5.63±0.28)E-05	55±3.3
B282(mAb)	VH93/VL77	(6.65±0.09)E+05	(4.08±0.25)E-05	61±3.9
B296(mAb)	VH92/VL77	(1.07±0.02)E+06	(2.93±0.19)E-05	27±1.8
B297(mAb)	VH93/VL78	(1.44±0.07)E+06	(6.03±0.32)E-05	42±3.0
B187(Fab)	PT3 Fab	(1.67±0.05)E+06	(1.13±0.04)E-05	68±3
B326(Fab)	B252 Fab	(1.02±0.05)E+06	(2.30±0.04)E-04	224±12
B324(Fab)	B296 Fab	(8.16±0.45)E+05	(1.36±0.06)E-04	167±12
B352(IgG4 mAb)	B296作为hIgG4	(2.55±0.56)E+05	(1.11±0.54)E-05	43±23

[0323] mAb:n=2,其中每个实验之内3次平行测定

[0324] Fab:n=2,其中每个实验之内2次平行测定

[0325] B352:n=2,其中每个实验中4次平行测定

[0326] 用Biacore T200来研究抗tau单克隆抗体和Fab与重组表达的对照tau(人tau同种型2N4R 441aa,N端6xHis-标记,SEQ ID NO:63)的相互作用。按照用于胺基偶联化学的制造商说明书,通过使抗人IgG Fc特异性抗体(Ab)或抗Fd偶联至CM5传感器芯片的表面来制备生物传感器表面(约6500响应单位(RU))。偶联缓冲剂是10mM乙酸钠(pH 4.5)。将抗tau抗体在运行缓冲剂中稀释并注射,以获得至少5RU的捕集。在抗tau单克隆抗体或Fab的捕集之后注射重组表达的对照tau的溶液(0.12nM至75nM,5倍稀释液中)。监控结合3分钟(以50μL/分钟注射的150μL)。监控离解,直至就适当的解离率确定而言观察到信号减小至少5%。用0.85%磷酸,随后为50mM NaOH获得传感器表面的再生。如果观察到结合,单克隆抗体和Fab两者的数据均使用1:1朗格缪尔结合模型进行拟合。

[0327] B324或B326均未示出与对照的显著结合。B296也未示出与对照tau结合。

[0328] 实施例7-B324+pT212/pT217-tau肽复合物的晶体结构

[0329] 通过导致鉴定tau表位和B324(和B296)互补位的X射线晶体学,确定B324与pT212/pT217-tau肽(SEQ ID NO:62)的共结构。

[0330] 样品制备和结晶:B324即具有VH92和VL77的B296的Fab通过以下制备:在HEK 293细胞中瞬时表达,通过Ni亲和层析、SEC纯化,并且在20mM MES(pH 6.0)、0.2M NaCl的最终缓冲剂中离子交换。实施例3所述的pT212/pT217-tau肽(SEQ ID NO:62)用于共结晶。对于B324Fab+pT212/pT217-tau肽复合物的制备,添加10倍摩尔过量的肽。

[0331] B324 Fab+pT212/pT217-tau肽的结晶在20mM MES(pH 6.0)、0.2M NaCl中以9-18mg/mL执行。使用两个内部筛网和PEG(Qiagen),在20℃下通过坐滴蒸气扩散方法用Mosquito结晶机器人来执行初始结晶筛选。晶体从0.1M乙酸钠(pH 4.6)、20%PEG 10K中显现,并且用用于进一步优化筛选的Seed Bead试剂盒(Hampton Research),通过机械均化制备种子。

[0332] 数据收集和结构确定:晶体从0.1M乙酸钠(pH 5.5)、37%PEG200中显现,并且将其收获并在无冷冻保护的情况下在液氮中快速冷却,以用于X射线衍射数据收集。在IMCA-CAT光束线17-ID-B上以先进光子源(Argonne,IL)在100K下收集数据。衍射强度在Pilatus 6M检测器上以180°旋转收集,其中暴露为每半度图像0.5s。将数据用XDS(Kabsch,2010,同上)处理至2.6Å的最大分辨率。使用相关的Fab结构作为检索模型,用Phaser(McCoy等人,2007,同上)通过分子置换来处理与pT212/pT217-tau肽复合的B324的X射线晶体结构,并且用Refmac(Murshudov等人,Acta Crystallogr D BiolCrystallogr.,53(Pt 3):240-55,1997)精修(表14)。使用4.0Å截断距离,用CONTACT(Collaborative Computational Project,1994,同上)计算分子间接触距离并且用Pymol视觉检测。

[0333] 表14:X射线数据

[0334]

数据收集	
内容物	B324 + pT212/pT217-tau 肽
母液	0.1M NaAct 5.5, 37% PEG 200
冷冻	无
源/检测器	APS IMCA-CAT 17ID-B/Pilatus 6M
波长(Å)	1.000

[0335]

温度(K)	100	
距离(mm)	450	
总旋度(°)	180 **	
暴露（秒）/0.5°	0.5	
空间群	I222	
晶胞轴(Å)	97.60, 104.43, 133.35	
晶胞角(°)	90, 90, 90	
分子/不对称单元	1	
V_m (Å^3/Da)/solv.(%)	3.43 / 64	
分辨率(Å)	30-2.6	(2.67-2.60)
测量反射数	113,798	(6,597)
独立反射数	21,019	(1,367)
完整度(%)	98.6	(87.6)
冗余度	5.4	(4.8)
R-merge	0.040	(0.417)
<I/σ>（突出值）	10.8	(1.1)
<I/σ>（平均值）	24.5	(3.5)
B-因子(Wilson) (Å^2)	69.4	
精修统计		
原子数	3331	
R_{work}/R_{free}	0.230/0.265	
理想几何结构		
的 r.m.s.d.		
键长(Å)	0.005	
键角(°)	1.027	
平均 B 因子(Å^2)	96.2	
拉氏图		
有利		
区的残基(%)	95.14%	
允许		
区的残基(%)	3.94%	
异常值(%)	0.93%	
括号中指示最高分辨率壳的值。		

[0336] 结构分析:B324+pT212/pT217 tau肽相互作用的总体结构示于图11中。pT212/pT217-tau肽配合在B324 VH和VL的界面处形成的沟中。B324与pT212/pT217tau肽之间的界面由范德瓦尔斯和静电相互作用组成,其从肽残基211延伸至221(图12)。以下CDR涉及直接结合至pT212/pT217-tau肽:CDR-H1,CDR-H2,CDR-H3,CDR-L1,CDR-L3。与pT212/pT217 tau肽复合的B324的结构示出表位包括pT212和pT217的磷酸盐。B324 Fab残基与pT212/pT217-tau肽残基相互作用的示意图示于图13中。一些关键相互作用如下:VH Y32羟基基团和VH T28羟基基团各自与pT212的不同磷酸氧形成氢键;VH Y32和VH W99的侧链与tau肽的L215

的甲基基团存在疏水相互作用;VH K53与tau肽残基pT217形成盐桥相互作用;VH W104的侧链与pT217甲基基团形成疏水相互作用,并与P218形成CH-π堆积作用,并且其形成VH/VL界面的一部分;VH W104的吲哚酰胺与T220的侧链羟基形成氢键;VL Y32的侧链与P219之间存在疏水相互作用;VL L96与T220的甲基基团之间存在疏水相互作用;并且VL F94侧链与T220甲基基团形成疏水相互作用。与pT212和pT217的磷酸盐的静电相互作用就B324对磷酸-tau的选择性而言至关重要,并且疏水相互作用还有助于B324对pT212/pT217-tau肽(实施例5)和PHF-tau(实施例6)的较高亲和力。小鼠PT3和B324的表位和互补位极为类似,这指示表位或互补位均不在人源化之后显著变更(图9和13,表8和15)。

[0337] 表15:B324+pT212/pT217-tau肽的表位和互补位:指示与pT212/pT217-tau肽残基相互作用的B324 VH或VL的残基。氢键相互作用以粗体指示。

[0338]

VH	肽	VL
G26、T28	R211	
F27、T28、S31、Y32	pT212	
S31	P213	
S31	S214	
S31、Y32、K53、W99	L215	
K53、W99、G100	P216	
S52、K53、W104	pT217	
G100、W104	P218	
G100、D101	P219	Y32
W104	T220	Y91、D92、E93、F94、L96
	R221	D92、E93、F94

[0339] 实施例8-细胞测定中的功能测试

[0340] 在两种类型的细胞测定中,测试PT3对tau播种的抑制:共温育测定和耗竭测定。两种测定类型利用表达两种发色团标记的K18tau片段的HEK细胞,该细胞在例如由于聚集而靠近时产生信号。当细胞用源自不同来源的聚集和磷酸化全长tau的种子处理时,K18聚集体被诱导成能够通过生物发光共振能量转移(BRET)比率(即BRET测定)的变化或通过使用荧光激活细胞分选术(FACS)计数荧光共振能量转移(FRET)-阳性细胞(即FRET测定;图14)进行定量(Holmes等人,2014,PNAS 111(41):E4376-85)。

[0341] HEK细胞匀浆共温育测定(BRET测定)

[0342] 由含有K18诱导的聚集GFP标记的全长tau的稳定GFP-tauP301L-过表达HEK细胞系生成用于共温育的含有tau种子的匀浆。受体细胞为稳定表达K18/P301L-NanoLuc和K18/P301L-HaloTag的HEK细胞。将tau种子与测试抗体和受体含发色团-K18的HEK细胞共温育72h。K18聚集体的形成通过BRET比率(590nm/450nm)的变化来测量。PT3在300nM下阻断聚集体诱导46.97%,在30nM下阻断聚集体诱导18.02%,并且在3nM下阻断聚集体诱导12.57%(图15)。

[0343] 脊髓共温育测定(FRET测定)

[0344] 由含有聚集转基因人tau的22至23周龄P301S转基因动物的脊髓生成用于共温育的含有tau种子的匀浆。对于提高的敏感性,测定中所用的受体细胞为稳定表达K18/P301S-

YFP和K18/P301S-CFP的HEK细胞。将tau种子与测试抗体和受体含发色团-K18的HEK细胞共温育72h。K18聚集体的形成通过FACS计数FRET阳性细胞进行测量。PT3在300nM下阻断聚集体诱导34.03％，在30nM下37.02％，并且在3nM下30.68％(图16)。

[0345] 免疫耗竭细胞测定

[0346] 为了研究最大百分比抑制值是否与种子上表位的密度或含有PT3表位的种子数相关，执行免疫耗竭测定。在免疫耗竭测定中，将tau种子与测试抗体一起温育并且用蛋白G珠从溶液中移除。在含发色团-K18的HEK细胞中测试耗竭上清液的残余播种能力，并且如前所述通过FACS进行分析(Holmes等人，Proc Natl Acad Sci USA.111(41):E4376-85,2014)。

[0347] 由22至23周龄P301S转基因动物的脊髓(图17)或冷冻保存的人AD脑组织(图18)生成用于免疫耗竭的含有tau种子的匀浆。在人AD脑免疫耗竭测定中，在转染试剂Lipofectamine2000的存在下测试耗竭之后的上清液，以获得可接受的测定窗口。在脊髓提取物和人AD脑的总匀浆两者中，tau播种可几乎被PT3完全(＞90％)耗竭(图17和18)。

[0348] 结果

[0349] PT3抑制源自HEK细胞裂解物和TgP301S脊髓裂解物两者的tau种子。测定中获得的最大抑制对于不同的抗磷酸tau抗体和不同的种子有所不同(表16)。所观察PT3在300nM下的抑制值对于HEK细胞种子为46.97％±5.87％，并且对于TgP301S脊髓提取物为34.03％±2.05％。不同细胞测定中磷酸tau抗体的不同最大抑制值可表明所用tau种子的磷酸化状态有差异。TgP301S脊髓中生成的tau种子为神经元起源，并且预期相比于HEK细胞起源的tau种子而言与PHF-tau更具相似性，这可解释相对于HEK细胞裂解物，观察到磷酸tau抗体针对脊髓提取物的功效通常更高。

[0350] 在脊髓提取物和人AD脑的总匀浆两者中，tau播种可几乎被PT3完全耗竭，该结果表明，在共温育实验中脊髓播种材料的完全抑制的缺乏并不由缺乏PT3表位的种子的存在，而是由种子上有限的表位密度引起。

[0351] 表16:细胞测定中功能测试结果汇总

[0352]

MAb	BRET/GFP-tauP301L共温育测定	FRET/P301S脊髓共温育测定	FRET/P301S脊髓免疫耗竭测定	FRET/人AD脑匀浆免疫耗竭测定
PT3	46.97±5.87	34.03 ±2.05	96.24± 0.43	92.24±2.30
AT8	10.52±9.48	26.4±1.74	96.71±0.42	80.69±5.79
HT7	65.44±1.08[a]	73.51 ±1.78[b]	99.16±0.21	82.99± 0.68

[0353] 单位为％阴性对照，不同实验的平均值;所有测定中的抗体浓度为300nM，不同的是[a]抑制为166.67nM并且[b]抑制为89.99nM。

[0354] tau抗体治疗的作用机制仍为一个有争议的问题，并且已经提出多种机制。近来提出抗体介导的小胶质细胞的细胞外种子的清除为一个主要作用机制(Funk等人，J Biol Chem.290(35):21652-62,2015以及McEwan等人，2017，PNAS 114:574-9)。在该上下文中，源自人脑的播种材料的免疫耗竭可被视为最具转化性细胞结果，并且亲本小鼠抗体PT3在该类细胞测定中的较高功效表明PT3的HFA形式将为有效的疗法。

[0355] 实施例9-鼠科动物PT3在ePHF注射模型中的体内功效

[0356] 为了评价体内tau抗体功效，显示出脑tau病变的小鼠是基本模型系统(Julien等人，Methods Mol Biol.849:473-91,2012)。已经描述了若干这些模型，并且其通常可分为三组:1)过表达野生型或突变(例如P301L或P301S)tau的tau转基因小鼠，且突变体在5-9个

月之后示出严重病变,这依赖于品系(Allen等人,J Neurosci.22(21):9340-51,2002;Scattoni等人,Behav Brain Res.208(1):250-7,2010;Terwel等人,J Biol Chem.280(5):3963-73,2005;Yoshiyama等人,Neuron.53(3):337-51,2007);2)时空调节的表达突变tau(例如P301L)(Liu等人,Brain Imaging Behav.6(4):610-20,2012)或前聚集片段(例如K18)的小鼠(Mocanu等人,J Neurosci.28(3):737-48,2008);以及3)表达突变tau和APP两者的小鼠,显示出斑块和tau病理学两者(Oddo等人,JNeurochem.102(4):1053-63,2007)。

[0357] 虽然表达突变tau的小鼠发展出强病变,但病变的发作可在动物之间变化,从而导致研究波动,并且尚不清楚细胞自主性tau聚集的相对贡献和总体tau聚集信号的蔓延。因此,可用于有效研究tau播种和蔓延的模型(例如de Calignon等人,2012,Neuron.73(4):685-97,2012;Liu等人,同上)有较高的价值。通过以下发现进一步增强了此类模型的转化价值:用源自不同tau蛋白病变的脑匀浆注射ALZ17小鼠(表达正常人tau的品系)诱导了tau内含物的形成,其具有类似于人脑tau蛋白病变的形态。例如,用来自嗜银颗粒痴呆样品的材料注射小鼠导致了具有疾病本身的球状体或弧形样结构特征的沉积物,并且在经AD材料注射的小鼠中观察到AD样tau病变(Clavaguera等人,2013,PNAS 110(23):9535-40)。

[0358] 因此,已经建立了转基因P301L小鼠注射模型,其中将tau的前聚集片段,诸如合成K18原纤(Li和Lee,Biochemistry.45(51):15692-701,2006)或源自人AD脑的PFH-tau种子在细胞自主性聚集尚未开始的年龄的P301L转基因小鼠模型的皮层区或海马区中进行注射。注射模型旨在模拟tau蔓延的关键细胞外播种组分。注射的K18或PHF-tau种子在注射部位,且在较小程度上在连接的对侧区诱导tau蛋白病变(Peeraer等人,Neurobiol Dis.73:83-95,2015)。当与源自AD脑的PHF-tau种子或K18原纤共注射时,模型允许能测试抗体(诸如本发明的抗tau抗体)的抗播种潜能(Iba等人,2015,J Neurosci.33(3):1024-37,2013;Iba等人,Acta Neuropathol.130(3):349-62)。

[0359] 转基因P301L小鼠注射模型的示意图在图19中示出。简而言之,皮层注射的解剖AD脑的十二烷基肌氨酸钠不溶性级分引起tau聚集的缓慢逐步增加。在注射的半球中,第一信号在注射之后1个月测量,并且在注射之后3个月进一步发展。在注射之后五个月,一些动物开始形成P301L突变所驱动的缠结(Terwel等人,2005,同上)。AT8染色水平在1和3个月之间提高(图19C-D和19E-F),因此在共注射之后2个月分析抗体功效实验。此外,海马注射的解剖AD脑的十二烷基肌氨酸钠不溶性级分引起tau聚集的剂量依赖性逐步增加,如通过注射的半球的十二烷基肌氨酸钠不溶性级分的MesoScale Discoveries(MSD)分析测量的(图19G)。

[0360] 动物处理和颅内注射

[0361] 对于注射研究,3个月龄的表达具有P301L突变的最长人tau同种型(tau-4R/2N-P301L)的转基因tau-P301L小鼠(Terwel等人,2005,同上)用于外科手术。所有实验按照医院伦理委员会所批准的方案来执行。对于立体定向手术,在存在或不存在单克隆抗体的情况下,小鼠在皮层(AP+2.0,ML+2.0(来自前囟),DV 2.7mm(来自硬脑膜))或海马体(AP-2.0,ML+2.0(来自前囟),DV 1.8mm(来自硬脑膜))中接收单侧(右半球)注射3μl(速度0.25μl/min)解剖AD组织的十二烷基肌氨酸钠不溶性制剂(富集成对螺旋细丝,ePHF)。就腹膜内(IP)注射抗体或盐水而言,处理(20mg/kg,2×/周)在颅内注射之前1周开始,并且继续直至处死小鼠进行解剖(颅内注射之后2个月)。

[0362] 提取程序

[0363] 对来自注射的半球的小鼠组织称重并且在6体积的均化缓冲剂(10mM Tris HCl(pH7.6))中均化。使匀浆以27000×g离心20分钟,并在从所得上清液(总匀浆)获取等分试样之后,添加1%N-月桂酰肌氨酸。在90分钟(900rpm,37℃)之后,将溶液以184000×g再次离心1小时。上清液保持为十二烷基肌氨酸钠可溶性级分,而含有十二烷基肌氨酸钠不溶性材料的沉淀物重悬于均化缓冲剂中。

[0364] 生物化学分析

[0365] 将包被抗体(抗AT8或总tau抗体)用PBS(1μg/ml)稀释并且等分到MSD板(每孔30uL)(L15XA,Mesoscale Discoveries)中,将其在4℃下温育过夜。在用5×200μl的PBS/0.5%Tween-20洗涤之后,将板用含0.1%酪蛋白的PBS封闭并用5×200μl的PBS/0.5%Tween-20再次洗涤。在添加样品和标准物(两者用含0.1%酪蛋白的PBS稀释)之后,将板在4℃下温育过夜。随后,将板用5×200μl的PBS/0.5%Tween-20洗涤,并且添加溶于含0.1%酪蛋白的PBS的SULFO-TAG™缀合的检测抗体,并且在室温下温育2小时,同时在600rpm下震荡。在最终洗涤之后(5×200μl的PBS/0.5%Tween-20),添加150μl的2×缓冲剂T,并且用MSD成像器读取板。原始信号针对由解剖AD脑的十二烷基肌氨酸钠不溶性制剂(ePHF)的16个稀释液组成的标准曲线进行规一化,并且表示为任意单位(AU)ePHF。统计分析(ANOVA,用Bonferroni事后测试)用GraphPad prism软件来执行。

[0366] 结果

[0367] 小鼠PT3在皮层共注射模型(图19)下的活性在四个独立研究中进行确认。小鼠根据表17外周给予并且结果示于图20中。模型的进一步改善(图19D)允许降低ePHF-tau的剂量和共注射抗体的剂量(如表18所示),并且结果示于图21中。当外周施用时,使用该降低剂量的ePHF-tau,PT3还被发现具有降低聚集tau的显著效应(P<0.0001;图21)。

[0368] 表17:外周给予

[0369]

组	ePHF的皮摩尔量	Ab共注射的皮摩尔量	抗体IP	n
IgG	0.2	5	20mg/kg(2×/周)	12
PT3	0.2	-	20mg/kg(2×/周)	13
PT3	0.2	5		5

[0370] 表18:共注射给予

[0371]

组	ePHF的皮摩尔量	Ab共注射的皮摩尔量	n
IgG	0.2	5	14
PT3	0.2	5	15
PT3	0.2	0.5	15
PT3	0.2	0.05	15

[0372] 根据图19A的布局,共注射ePHF和PT3同种型,包括PT3-HFA IgG2a变体(其含有可变区VH92(SEQ ID NO:27)以及VL77(SEQ ID NO:31),在mIgG2a/κ恒定区上)使P301L小鼠中ePHF诱导的tau聚集减弱(图22)。注射在皮层(非海马体)中进行。注射的半球(生物化学数据,图22B)和未注射的半球(IHCAT100染色,图22C)中观察效应。当与源自AD脑的PHF-tau共注射时,IgG2a同种型和IgG1同种型两者使tau蛋白病变的诱导显著下降(p<0.0001)。结果在对侧半球中以IHC加以证实。

[0373] 尽管本发明结合其具体实施方案进行了详细描述,但对于本领域的普通技术人员来说将显而易见的是,可以在不脱离本发明的实质和范围的情况下进行各种变化和修改。

[0374] 实施例10-PSP tau与AD tau的比较

[0375] 进行性核上性麻痹(PSP)是罕见而致命的神经退行性障碍,其特征在于帕金森综合征、姿势保持反射障碍和摔倒、进行性核上凝视麻痹和痴呆(Steele等人,1964,Archives of Neurology 10:333-359)。病理上,在脑干和基底核以及其他脑区中优先的积聚4个重复(4R)tau(Dickson DW.Handbook of Clinical Neurology 2008;89:487-491;Williams& Lees,2009,The Lancet Neurology 8:270-279)。考虑到不存在其他病理学诸如淀粉样,PSP被视为主要tau蛋白病变,并且动物模型数据表明PSP tau可经历类似于假定在AD中所发生的播种(Clavaguera等人,2013,PNAS 110:9535-9540;Sanders等人,2014,Neuron 82:1271-1288)。这样,PSP可用本发明的抗体治疗。开始进行一系列实验以表征PSP tau和AD PHF tau的类似性。

[0376] 方法

[0377] 人脑组织:来自临床诊断的PSP(n=5)患者的两个通常高度感染的脑区(尾状核=CAU,且硬膜=PUT)和较小感染的脑区(额上回=GFS)以及两名对照(=无tau蛋白病变)患者的相同脑区的冷冻保存的组织获自Netherland Brain Bank。用以下所述的聚集测定和免疫组织化学染色两者,使用组织进行分析。9名散发性AD患者的冷冻保存组织获自宾夕法尼亚大学(University of Pennsylvania)并且用于聚集测定分析。1名AD患者的冷冻保存组织获自纽卡斯尔大学(University of Newcastle)并且用于免疫组织化学染色。

[0378] 脑组织均化:在10mM Tris、150mM NaCl(pH 7.4)、过滤器:0,22μm+Complete mini不含EDTA的蛋白酶抑制剂(Roche,目录号11 836 170 001)中,将冷冻保存的组织用杜恩斯匀浆器以1000rpm均化10个冲程,以获得10%w/v匀浆。将匀浆在4℃下以27.000×g离心10min,并使上清液储存于-80℃等分试样中直至使用。

[0379] 聚集测定:执行聚集特异性夹心MSD免疫测定法,其中磷酸tau抗体AT8和PT3用作捕集和检测抗体。将包被抗体用PBS(1μg/ml)稀释并且等分到MSD板(每孔30uL)(L15XA,Mesoscale Discoveries)中,在4℃下温育。在用5×200μl的PBS/0.5%Tween-20洗涤之后,将板用含0.1%酪蛋白的PBS封闭并且用5×200μl的PBS/0.5%Tween-20再次洗涤。在添加样品和标准物(两者周含0.1%酪蛋白的PBS稀释)之后,将板在4℃下温育。随后,将板用5×200μl的PBS/0.5%Tween-20洗涤,并且添加溶于含0.1%酪蛋白的PBS的SULFO-TAGTM缀合的检测抗体,并且在室温下温育2小时,同时在600rpm下震荡。在最终洗涤之后(5×200μl的PBS/0.5%Tween-20),添加150μl的2×缓冲剂T,并且用MSD成像器读取板。原始信号针对由一种AD总脑匀浆的7个稀释液组成的标准曲线进行归一化,并且作为内插值表示为该标准百分比。

[0380] 免疫组织化学:将冷冻保存的人脑组织用恒冷箱切片(20μm厚度)并在使用之前保存于-80℃。将各部分干燥,随后进行福尔马林固定,用含3%过氧化氢的内源性过氧化物酶(DAKO,Glostrup,Denmark,S2023)封闭,并在1小时期间在PBS1x+0.3%Triton X-100中透化。将一抗(PT3 0.4μg/ml;AT8 0.4μg/ml)用含有背景减小组分的抗体稀释液(DAKO,S3022)进行稀释,并且施加于各部分1小时。在彻底洗涤之后,将玻片与HRP缀合的抗小鼠二抗(Envision,DAKO,K4000)一起温育,随后进行显色DAB标记(DAKO,K4368)。将玻片用苏木

精复染,脱水并且用有机封片剂(Vectamount,Vector labs,Burlingame,CA,USA,H-5000)固定。用Hamamatsu NanoZoomer 2.0rs(Hamamatsu Photonics,Shizuoka,Japan)来执行成像。

[0381] 结果

[0382] 聚集测定:实施聚集测定以表征PSP tau的磷酸化程度。PT3反应性聚集体存在于PSP脑中,但聚集水平低于AD脑中(图23)。用参考抗体AT8获得的结果类似于PT3所观察的那些。这些结果表明,用各种磷酸tau抗体评价的所有磷酸化位点存在于PSP tau上,但相比于AD而言PSP中的tau聚集体较少。

[0383] 免疫组织化学:在AD或PSP脑的冷冻切片上用PT3抗体染色展示出PSP中感染的解剖区(即尾核和硬膜)内的染色(图24)。PSP的神经病理标志,包括tau+神经元和簇状星形细胞斑通过磷酸tau抗体PT3来检测。用AT8获得的结果类似于PT3所观察的那些。

[0384] 结论

[0385] 可用数据表明PT3结合至PSP的tau。

[0386] 实施例11-PT3-HFA的亲和力成熟

[0387] 亲和力成熟的抗体与PHF-tau的SPR结合表征

[0388] 测试亲和力成熟的单克隆抗体对从阿尔茨海默病脑中分离的PHF-tau的结合。结合动力学和亲和力研究使用ProteOn XPR36系统(Bio Rad,Hercules,CA)在25℃下用补充有3mM EDTA和0.005%Tween20的PBS(pH 7.4)作为运行或系统缓冲剂来执行。

[0389] 使用供应商推荐的胺偶联化学方案,将GLC传感器芯片用小鼠抗tau抗体HT7(ThermoFisher,目录号MN1000)共价地固定(约5000响应单位,RU)。偶联缓冲剂为10mM,pH 4.5乙酸钠。PHF-tau通过以5000×g在5℃下离心2次,每次10min进行制备。将来自第二离心的上清液用运行缓冲剂稀释(1/125)并且捕集偶联至HT7固定的表面(约300RU)。在捕集偶联之后,使表面活化和去活化,从而生成均化PHF-tau表面以用于抗体结合研究。将抗tau抗体及其Fab(以运行缓冲剂制备,0.024-75nM,5倍稀释液)以50μL/min在PHF-tau表面上注射,以测量结合。将结合和离解特征分别监控4分钟和2小时。在离解之后,利用多次注射10mM甘氨酸(pH 2.0)和运行缓冲剂,使传感器芯片再生。基准表面(无任何PHF-tau)用于监控注射mAb或Fab的非特异性结合。将HT7抗体用作阳性对照。使用二价结合模型拟合mAb的结合传感图,其中表观亲和力或亲合力驱动结合(K_D)报告为解离率与结合率的比率(k_{off}/k_{on})。使用1:1朗格缪尔结合模型来动力学分析Fab。

[0390] 亲本人抗体(B296)示出紧密结合至PHF-tau(K_D=6.2pM)并且受控于极慢的解离率,其中在2小时内观察到mAb不超过5%的离解(表19,图25)。亲和力成熟的抗体示出改善的结合至PHF-tau,并且亲和力在1.8-2.5pM范围内。B711和B809示出相比于亲本抗体而言结合率改善了3倍,然而,解离率在所有抗体之间实际上不能区分(图25)。相比于其对应mAb,Fab总体示出结合至PHF-tau的较弱数量级,表明亲合力驱动mAb结合至PHF-tau。B324(亲本mAb的Fab,B296)以63.2pM的内在亲和力结合至PHF-tau。亲和力成熟的mAb的Fab示出类似改善的亲和力,并且值在15.6-31pM范围内。此外,两种Fab即B330(B711的Fab)和B332(809的Fab)示出与其对应mAb类似的3-4倍结合率改善。

[0391] 表19:亲和力成熟的mAb及其Fab与PHF-tau的ProteOn SPR结合动力学和亲和力

[0392]

样品	描述	k_{on} ($\times 10^6$ 1/Ms)	k_{off} ($\times 10^{-5}$ 1/s)	K_D (pM)
B296 (mAb)	人源化亲本 mAb	1.89 ± 0.09	1.17 ± 0.09	6.2 ± 0.5
B711 (mAb)	亲和力成熟的 B296	6.17 (5.72 - 6.61)	1.13 (1.08 - 1.17)	1.8 (1.6 - 2.1)
B809 (mAb)	亲和力成熟的 B296	6.45 ± 1.18	1.27 ± 0.15	2.0 ± 0.5
B333 (mAb)	亲和力成熟的 B296	2.68 ± 0.23	0.68 ± 0.08	2.5 ± 0.4
B324 (Fab)	B296 的 Fab	1.43 ± 0.06	9.03 ± 0.08	63.2 ± 2.8
B330 (Fab)	B711 的 Fab	4.60 (4.53 - 4.66)	7.15 (6.94 - 7.36)	15.6 (15.3 - 15.8)
B332 (Fab)	B809 的 Fab	4.64 ± 0.29	12.0 ± 0.12	25.8 ± 1.7
B331 (Fab)	B333 的 Fab	1.72 ± 0.07	5.31 ± 0.10	31.0 ± 1.5

[0393] N=2-3平行测定,在一个实验之内。值报告为平均值±标准差(或范围)

[0394] 通过ELISA测定与磷酸肽的结合

[0395] 通过ELISA分析与tau磷酸肽的结合,其中将肽(10ng/mL)直接涂覆到板上过夜。在洗涤板并用含0.1%酪蛋白的PBS封闭之后,将板用不同浓度的HFA-PT3(B296)和HFA-PT3(B809,B333和B711)mAb的亲和力成熟的变体温育(图26A)。在用抗体温育之后,将板洗涤并用每孔50μL的HRP0标记抗Fab抗体(Jackson Immunoresearch laboratories)(用封闭缓冲剂1:10000稀释)。在另一洗涤步骤之后,根据制造商的说明书,用“一步”TMB(Thermo Scientific)来执行检测。在EnVision®2102 Multilabel读取器(Perkin Elmer,Waltham,MA,USA)中分析板。结合曲线使用GraphPad Prism7.0软件生成。从图26A的结合曲线可以看出,B296示出最低亲和力,而相比于B296以及B333和B809,B711示出最有效的结合。这表明B711是对pT217肽具有最强亲和力的人源化PT3抗体。Fab的类似实验(图26B)展示相比于B187即亲本PT3分子的Fab,M333(B711的Fab)具有类似的肽结合。同样,相比于亲本Fab和PT3-HFA的亲和力成熟的变体,M324(B296的Fab,HFA-PT3)显示出较弱结合。

[0396] 表20:用ELISA测定pT217结合的结果汇总

[0397]

	EC_{50} (pM)	
Fab	平均值	标准差
B187	109.82	73.70037
M324	340.8333	121.6609
M330	106.5133	62.22259
mAb	平均值	标准差
B296	433.425	139.2647
B809	91.6675	59.01867
B333	164.345	92.99161
B711	70.745	48.86815

[0398] N=2平行测定,在至少2个实验之内。值报告为平均值±标准差。

[0399] 参考文献

[0400] Abhinandan和Martin,Mol Immunol.45:3832-9,2008

[0401] Adams等人,Acta Crystallogr DBiol Crystallogr.66(Pt 2):213-21,2010

[0402] Allen等人,J Neurosci.22(21):9340-51,2002

[0403] Almagro,Mol Recognit.17:132-43,2004

[0404] Asuni等人,J Neurosci.27:9115-29,2007

[0405] Boutajangout等人,J Neurochem.118:658-67,2011

[0406] Boutaiangout等人,J Neurosci.30:16559-66,2010

[0407] Brunden等人,Nat Rev Drug Discov.8:783-93,2009

[0408] Butner和Kirschner,J Cell Biol.115(3):717-30,1991

[0409] Chai等人,J Biol Chem.286:34457-67,2011

[0410] Chothia和Lesk,J Mol Biol.196:901-17,1987

[0411] Clavaguera等人,Nat Cell Biol.11:909-13,2009

[0412] Clavaguera等人,Proc Natl Acad Sci USA.110(23):9535-40,2013

[0413] Clavaguera等人,Proc Natl Acad Sci USA.110(23):9535-40,2013

[0414] Collaborative Computational Project,Number 4,Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.50(Pt 5):760-3,1994

[0415] Collin等人,Brain.137(Pt 10):2834-46,2014

[0416] de Calignon等人,Neuron.73(4):685-97,2012

[0417] Emsley和Cowtan,Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.60(Pt 12 Pt 1):2126-32,2004

[0418] Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris编辑(1996)

[0419] Fishwild等人,Nat Biotechnol.14:845-51,1996

[0420] Fransson等人,J Mol Biol.398(2):214-31,2010

[0421] Frost等人,J Biol Chem.284:12845-52,2009

[0422] Funk等人,J Biol Chem.290(35):21652-62,2015

[0423] Goedert等人,Biochemical J.301(Pt3):871-877

[0424] Hanger等人,Trends Mol Med.15:112-9,2009

[0425] Hoffmann等人,Biochemistry.36(26):8114-24,1997

[0426] Holmes等人,Proc Natl Acad Sci USA.111(41):E4376-85,2014

[0427] Iba等人,Acta Neuropathol.130(3):349-62,2015

[0428] Iba等人,J Neurosci.33(3):1024-37,2013

[0429] Julien等人,Methods Mol Biol.849:473-91,2012

[0430] Kabsch,Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.66(Pt2):125-32,2010

[0431] Knappik等人,J Mol Biol.296:57-86,2000

[0432] Knight等人,Platelets.15:409-18,2004

[0433] Kohler和Milstein,Nature.256:495-7.1975

[0434] Krebs等人,J Immunol Methods.254:67-84,2001

[0435] Lee等人,Cell Rep.16(6):1690-700,2016

[0436] Lefranc等人,Dev Comp Immunol.27:55-77,2003

[0437] Leong等人,Cytokine.16:106-19,2001

[0438] Li和Lee,Biochemistry.45(51):15692-701,2006

[0439] Liu等人,Brain Imaging Behav.6(4):610-20,2012

[0440] Lonberg等人,Nature.368:856-9,1994

[0441] Malia等人,Proteins.84:427-434,2016

[0442] Martin和Thornton,J Mol Biol.263(5):800-15,1996

[0443] Matsuo等人,Neuron.13(4):989-1002,1994

[0444] McCoy等人,J Appl Crystallogr.40(Pt 4):658-674,2007

[0445] McEwan等人,2017,PNAS 114(3):574-9

[0446] Mendez等人,Nat Genet.15:146-56,1997

[0447] Mercken等人,Acta Neuropathol.84(3):265-72,1992

[0448] Mercken,博士论文:University of AntWerp,Wilrijk-Antwerp,1991

[0449] Mocanu等人,J Neurosci.28(3):737-48,2008

[0450] Morris等人,Nat Neurosci.18(8):1183-9,2015

[0451] Morris等人,Neuron,70:410-26,2011

[0452] Murshudov等人,Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.53(Pt 3):240-55,1997

[0453] Oddo等人,J Neurochem.102(4):1053-63,2007

[0454] Otvos等人,J Neurosci Res.39(6):669-73,1994

[0455] Padlan等人,Mol.Immunol.28:489-98,1991

[0456] Peeraer等人,Neurobiol Dis.73:83-95,2015

[0457] Queen等人,Proc Natl Acad Sci USA.86:10029-33,1989

[0458] Scattoni等人,Behav Brain Res.208(1):250-7,2010

[0459] Schroeder等人,J Neuroimmune Pharmacol.11(1):9-25,2016

[0460] Seubert等人,J Biol Chem.270(32):18917-22,1995

[0461] Shi等人,J Mol Biol.397:385-96,2010

[0462] Strohl,Curr Opin Biotechnol.20:685-91,2009

[0463] Terwel等人,J Biol Chem.280(5):3963-73,2005

[0464] Wischik等人,Proc Natl Acad Sci USA.85:4884-8,1988

[0465] Wu和Kabat,J Exp Med.132:211-50,1970

[0466] Yang等人,Protein Eng.16:761-70,2003

[0467] Yoshiyama等人,Neuron.53(3):337-51,2007

[0468] Zhao等人,Protein Expr Purif.67(2):182-9,2009

<110> Janssen Biotech, Inc.
<120> 人源化抗 PHF-tau 抗体及其用途
<130> 688097.0127
<150> 62/472214
<151> 2017-03-16
<160> 81
<170> PatentIn 版本 3.5
<210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5
<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 2
Ser Lys Gly Gly Asn
1 5
<210> 3
<211> 10
[0001] <212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 3
Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 4
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10
<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 5
Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr
1 5
<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 6

Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 7
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5
<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 8
Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15
<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 9
Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 10
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5
<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 11
Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr
1 5
<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 12
Ala Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp
1 5 10
<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 13
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn

[0002]

[0003]

1 5 10
<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 14
Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp
1 5
<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 15
Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5
<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 16
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 17
Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp
1 5
<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 18
Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5
<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 19
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 20
Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp
1 5

[0004]

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 21
Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5
<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 22
Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
1 5
<210> 23
<211> 3
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 23
Arg Ala Asn
1
<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 24
Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5
<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 25
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asn Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ala
115
<210> 26

<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VH91 序列
<400> 26

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VH92 序列
<400> 27

[0005]

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> VH93 序列
<400> 28
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 29
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VH94 序列
<400> 29

[0006]

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
50 55 60
Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80
Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 30
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp Tyr
65 70 75 80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VL77 序列
<400> 31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

[0007]

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VL78 序列
<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VL79 序列
<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VL80 序列
<400> 34

[0008]

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 35
<211> 354
<212> DNA
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 35

gaagtgaagc tggtggaatc tggcggcgac ctcgtgaagc ctggcggctc tctgaagctg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gcgccagaac 120
cccgagaagc ggctggaatg ggtggccagc atcagcaagg gcggcaacac ctactacccc 180
aacagcgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaacg cccggaacat cctgtacctg 240
cagatgagca gcctgcggag cgaggacacc gccctgtact attgtgccag aggctggggc 300
gactacggat ggttcgccta ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc cgct 354

<210> 36
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> VH91 序列
<400> 36

gaagtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaaag gcctggaatg ggtgtccagc atcagcaagg gcggcaacac ctactacgcc 180
gacagcgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 240
cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgccaa gggctggggc 300
gactacggat ggttcgccta ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc ctct 354

<210> 37
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> VH92 序列
<400> 37

[0009]

caggtgcagc tggtggaatc tggcggcgga gtggtgcagc ctggcagaag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaaag gcctggaatg ggtggccagc atcagcaagg gcggcaacac ctactacgcc 180
gacagcgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 240
cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgccag aggctggggc 300
gactacggat ggttcgccta ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc ctct 354

<210> 38
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> VH93 序列
<400> 38

caggtgcagc tggtggagtc cggaggaggc ctggtgaaac ctggcggctc cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctggat caggcaggcc 120
cctggcaagg gactggagtg ggtgagcagc atcagcaagg gcggcaacac ctactacgcc 180
gacagcgtga agggcaggtt cacaatcagc agggacaacg ccaagaacag cctgtacctg 240
cagatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgctag gggctggggc 300
gattacggct ggttcgccta ctggggccag gtgaccctgg tgaccgtgag cagc 354

<210> 39
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> VH94 序列

<400> 39
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 60
tcctgcaagg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gcgccaggct 120
cctggccaga gactggaatg gatgggcagc atcagcaagg gcggcaacac ctactacagc 180
cagaaattcc agggcagagt gaccatcacc cgggacacct ctgccagcac cgcctacatg 240
gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact attgtgccag aggctggggc 300
gactacggat ggttcgccta ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc ctct 354
<210> 40
<211> 321
<212> DNA
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 40
gacatcaaga tgacccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
atcacttgca aggcgagtca ggacattaat aggtatttaa actggttcca gcagaaacca 120
gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tgctagatgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tactctctca ccatcagcag cctggattat 240
gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gttcggtgat 300
gggaccaagc tggagctgaa a 321
<210> 41
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> VL77 序列
<400> 41
[0010]
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agatacctga actggttcca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagagcct gatctacaga gccaacagac tgctggacgg cgtgcccagc 180
agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagctc cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgagt tccccctgac ctttggccag 300
ggcaccaagc tggaaatcaa g 321
<210> 42
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> VL78 序列
<400> 42
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agatacctga actggttcca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagagcct gatctacaga gccaacagac tgctgagcgg cgtgcccagc 180
agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagctc cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgagt tccccctgac ctttggccag 300
ggcaccaagc tggaaatcaa g 321
<210> 43
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> VL79 序列

<400> 43
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agatacctga actggtatca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaga gccaacagac tgctggacgg cgtgcccagc 180
agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagctc cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgagt tccccctgac ctttggccag 300
ggcaccaagc tggaaatcaa g 321
<210> 44
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> VL80 序列
<400> 44
gacatcgtga tgacccagac ccccctgagc agccctgtga ccctgggaca gcctgccagc 60
atcagctgca aggccagcca ggacatcaac agatacctga actggctgca gcagagaccc 120
ggccagcctc ctaggctgct gatctacagg gccaacagac tgctggacgg cgtgcccgac 180
agattctccg gcagcggagc tggcaccgac ttcaccctga agatcagcag ggtggaggcc 240
gaggacgtgg gcgtgtacta ctgcctgcag tacgacgagt tccccctgac cttcggccag 300
ggcaccaagc tggagatcaa g 321
<210> 45
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

[0011]

<223> HFA PT3 的重链序列
<400> 45

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
```

[0012]

180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 46
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HFA PT3 的轻链序列
<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 47
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>

[0013]

<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 磷酸化
<400> 47
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20

<210> 48
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)

<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 磷酸化
<400> 48
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 49
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 磷酸化
<400> 49

[0014]

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 50
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 磷酸化
<400> 50
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 51
<211> 22

[0015]

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 磷酸化
<400> 51
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 52
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 磷酸化
<400> 52
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 53
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 磷酸化

[0016]

<400> 53
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 54
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> 磷酸化
<400> 54
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 55
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> 磷酸化
<400> 55
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 56
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> 磷酸化
<400> 56

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 57
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> 磷酸化
<400> 57
Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr
1 5 10 15
[0017] Pro Pro Thr

<210> 58
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 磷酸化
<400> 58
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 59
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 磷酸 tau 肽
<220>
<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> 磷酸化
<400> 59
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 60
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 对照 tau 肽
<400> 60
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15
Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20
<210> 61
<211> 14
<212> PRT
[0018] <213> 人工序列
<220>
<223> pT212/pS214/pT217-tau 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> 磷酸化
<400> 61
Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr
1 5 10
<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> pT212/pT217-tau 肽
<220>

<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 磷酸化
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 磷酸化
<400> 62
Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu
1 5 10
<210> 63
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 对照 tau（人 tau 同种型 2N4R 441 aa，N-末端 6xHis-标签）
<400> 63

[0019]

Met His His His His His His Gly Ser Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu
1 5 10 15
Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg
20 25 30
Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr
35 40 45
Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly
50 55 60
Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr
65 70 75 80
Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys
85 90 95
Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala
100 105 110
Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala
115 120 125
Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr
130 135 140
Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile
145 150 155 160
Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn
165 170 175
Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro
180 185 190
Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser
195 200 205
Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu
210 215 220
Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr
225 230 235 240
Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro
245 250 255
Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr

260 265 270

Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn
275 280 285

Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp
290 295 300

Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
305 310 315 320

Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn
325 330 335

Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
340 345 350

Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn
355 360 365

Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
370 375 380

Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu
385 390 395 400

Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His
405 410 415

Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro
420 425 430

Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln
435 440 445

Gly Leu
450

[0020]

<210> 64
<211> 352
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 64

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
35 40 45

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175
Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190
Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205
Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
210 215 220
Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
225 230 235 240
His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
245 250 255
Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
260 265 270
His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
275 280 285
Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
290 295 300
Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
305 310 315 320
Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
325 330 335
Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
340 345 350

[0021]
<210> 65
<211> 381
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 65
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
65 70 75 80
Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
85 90 95
Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
100 105 110
Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
115 120 125
Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
130 135 140
Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
145 150 155 160
Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr

165 170 175
Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
180 185 190
Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
195 200 205
Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
210 215 220
Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225 230 235 240
Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
245 250 255
Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
260 265 270
Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
275 280 285
Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
290 295 300
Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
305 310 315 320
Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
325 330 335
Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser
340 345 350
Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu
355 360 365
[0022] Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380
<210> 66
<211> 410
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 66
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

[0023]

```
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145                 150                 155                 160
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
                165                 170                 175
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
            180                 185                 190
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
        195                 200                 205
Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
    210                 215                 220
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225                 230                 235                 240
Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
                245                 250                 255
Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
            260                 265                 270
Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
        275                 280                 285
Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly
    290                 295                 300
Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln
305                 310                 315                 320
Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly
                325                 330                 335
Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
            340                 345                 350
Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
        355                 360                 365
Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
    370                 375                 380
Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
385                 390                 395                 400
Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
                405                 410
<210> 67
<211> 383
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 67
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1               5                   10                  15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
            20                  25                  30
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
        35                  40                  45
Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
    50                  55                  60
Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65                  70                  75                  80
Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
```

[0024]

85 90 95
Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
100 105 110
Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
115 120 125
Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140
Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145 150 155 160
Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175
Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190
Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205
Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
210 215 220
Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
225 230 235 240
His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
245 250 255
Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
260 265 270
Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
275 280 285
Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
290 295 300
Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
305 310 315 320
Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
325 330 335
Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
340 345 350
Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala
355 360 365
Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 68
<211> 441
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 68

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

[0025]

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205
Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240
Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255
Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270
Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285
Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300
Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320
Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335
Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350
Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365
Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380
Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400
Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415
Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430
Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

<210> 69
<211> 441

<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 69

[0026]

```
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1               5                  10                  15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
            20                  25                  30
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
        35                  40                  45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
    50                  55                  60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65                  70                  75                  80
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
                85                  90                  95
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
            100                 105                 110
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
        115                 120                 125
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
    130                 135                 140
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145                 150                 155                 160
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
                165                 170                 175
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
            180                 185                 190
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
        195                 200                 205
Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
    210                 215                 220
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225                 230                 235                 240
Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
                245                 250                 255
Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
            260                 265                 270
Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
        275                 280                 285
Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
    290                 295                 300
Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305                 310                 315                 320
Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
                325                 330                 335
Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
            340                 345                 350
Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
        355                 360                 365
Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
```

370 375 380
Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400
Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415
Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430
Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440
<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 70
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Trp Leu Asn
1 5 10
<210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 71
Thr Ser Tyr Ala Met Ser
1 5
<210> 72
<211> 16
[0027] <212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 72
Ser Ile Thr Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15
<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 73
Gly Trp Gly Ile Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 74
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 重链序列
<400> 74
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0028]

```
Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290                 295                 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305                 310                 315                 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                325                 330                 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            340                 345                 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
        355                 360                 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
    370                 375                 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385                 390                 395                 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                405                 410                 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
            420                 425                 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 75
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 轻链序列
<400> 75

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Trp
20 25 30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
[0029]
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 76
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 重链序列
<400> 76

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Thr Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

[0030]

```
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
Arg Gly Trp Gly Ile Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290                 295                 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305                 310                 315                 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                325                 330                 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            340                 345                 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
        355                 360                 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
    370                 375                 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385                 390                 395                 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                405                 410                 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
            420                 425                 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
<210>  77
<211>  214
```

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 轻链序列
<400> 77

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Trp
20 25 30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

[0031]

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 78
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 重链序列
<400> 78

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Thr Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

[0032]

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gly Trp Gly Ile Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 79
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 轻链序列
<400> 79
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[0033] 145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 80
Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5
<210> 81
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 81
Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

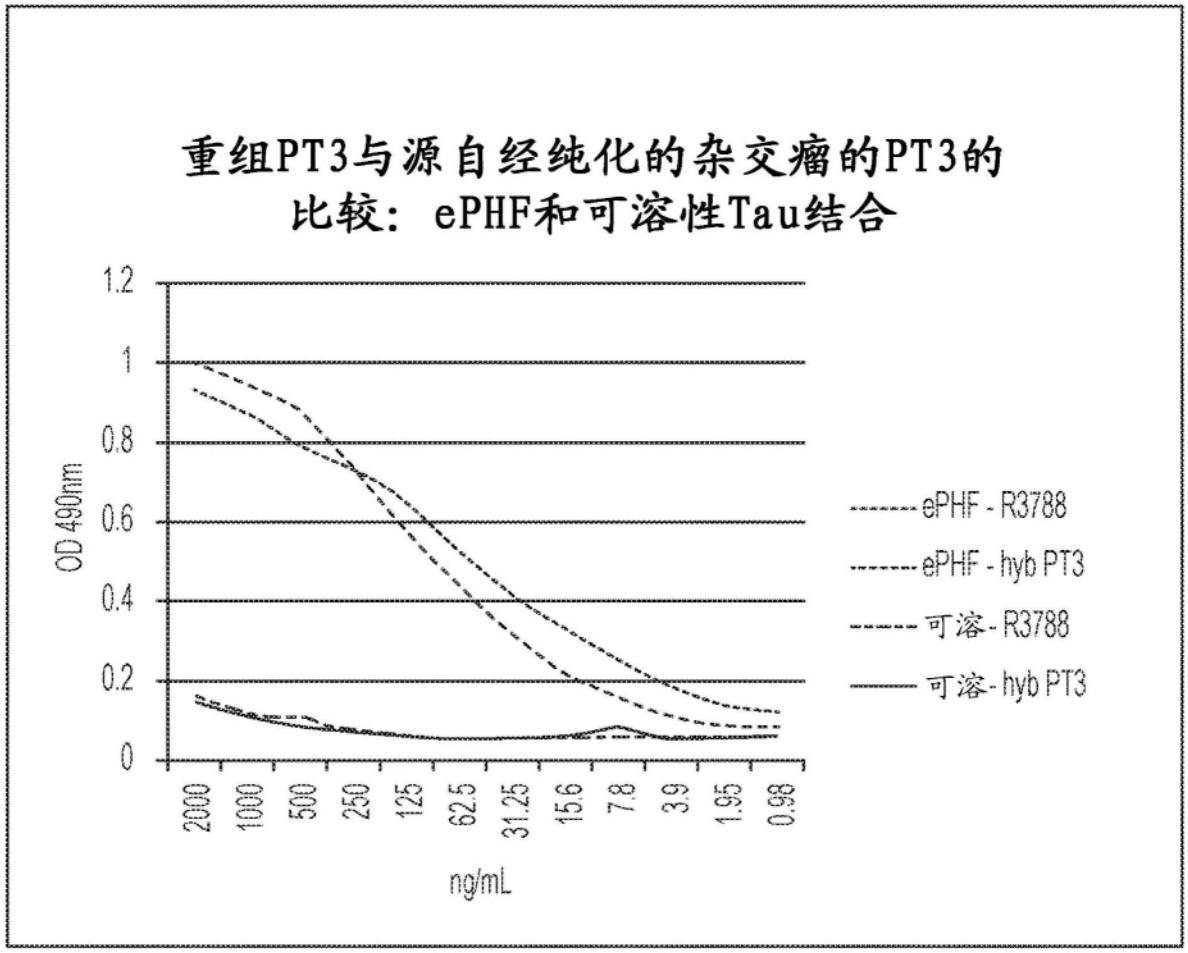

重组PT3与源自经纯化的杂交瘤的PT3的
比较：ePHF和可溶性Tau结合
OD 490nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2000
1000
500
250
125
62.5
31.25
15.6
7.8
3.9
1.95
0.98
ng/mL
ePHF - R3788
ePHF - hyb PT3
可溶 - R3788
可溶 - hyb PT3

图1

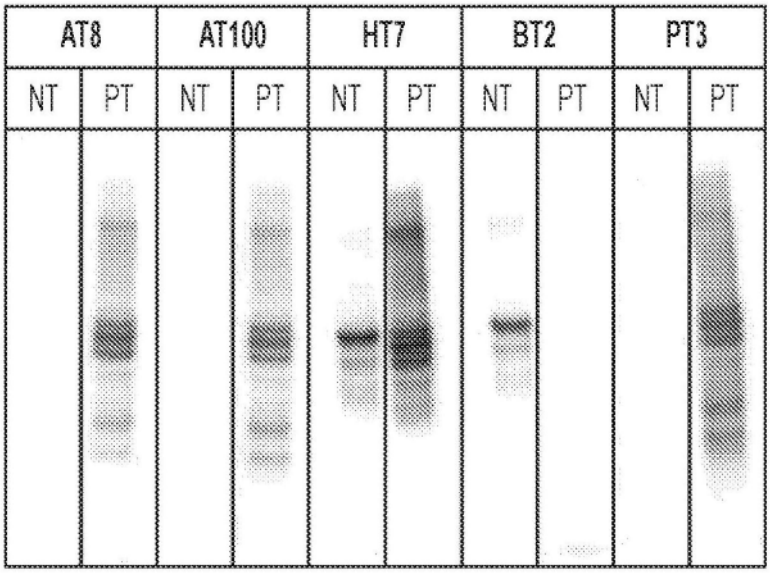

AT8
AT100
HT7
BT2
PT3
NT
PT
NT
PT
NT
PT
NT
PT
NT
PT

图2

图3A

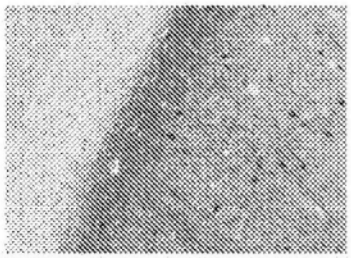


图3D

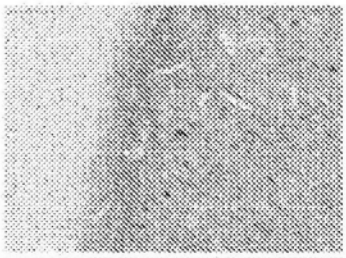


图3B



图3E

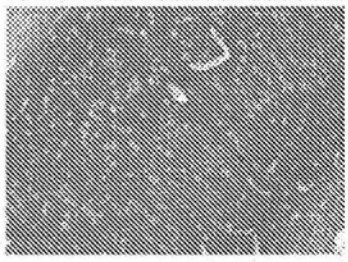


图3C

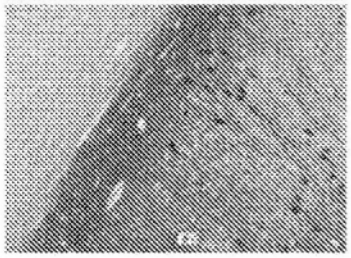


图3

图4A

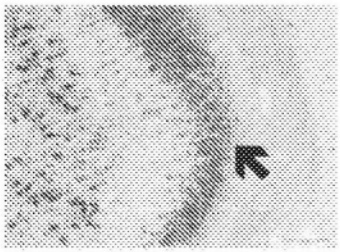


图4D

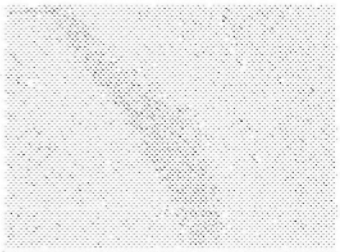


图4B

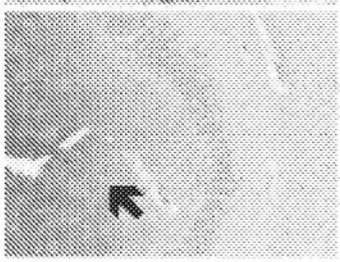


图4E

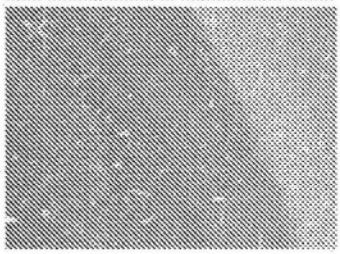


图4C

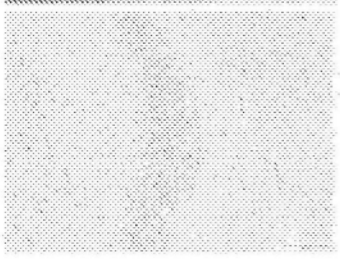


图4

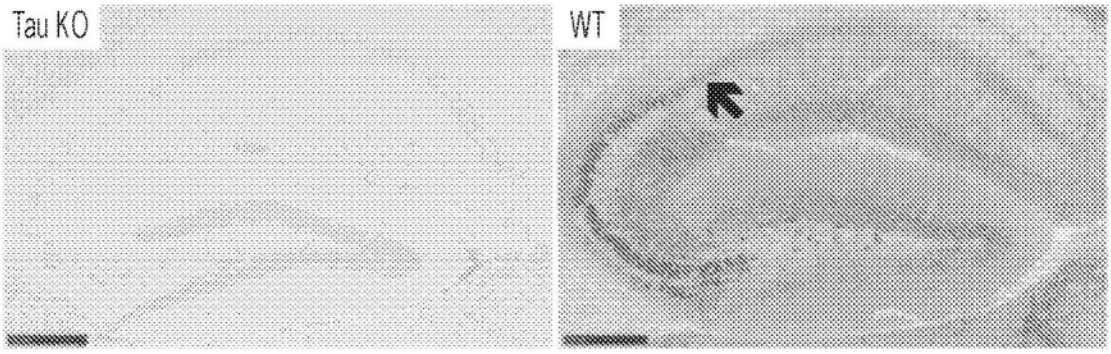


图5A 图5B

图5

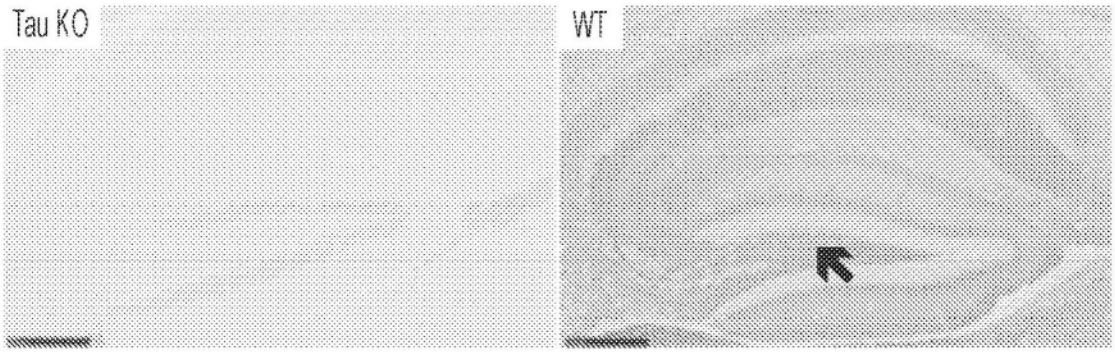


图6A 图6B

图6

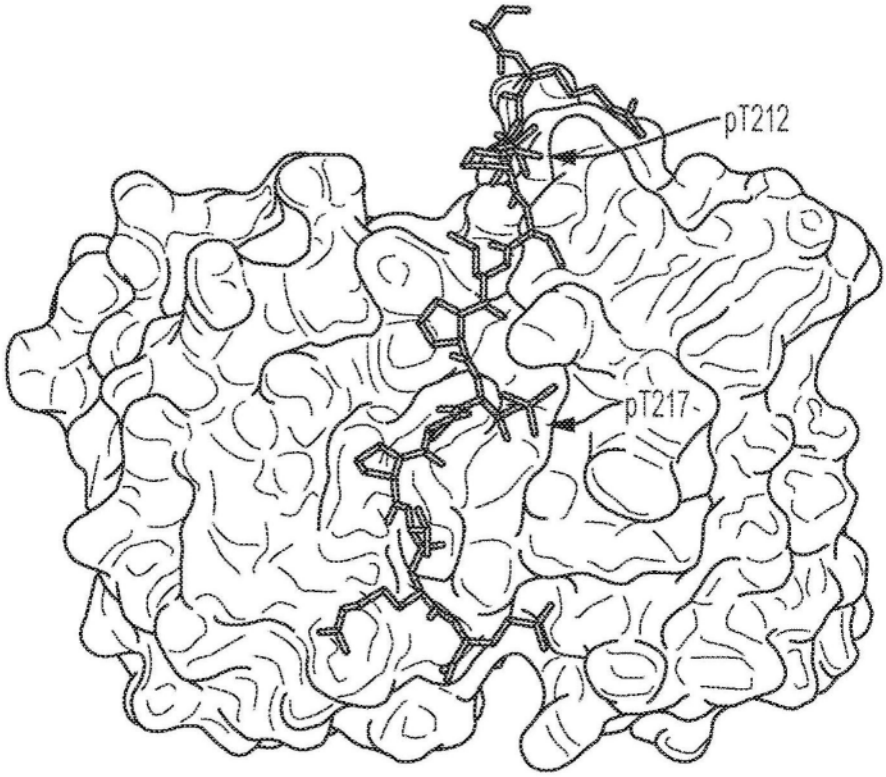


图7


T28(H)
R211
S210
P213
S214
K53(H)
S52(H)
pT212
S31(H)
L215
F27(H)
P216
pT217
Y32(H)
W99(H)
P218
P219
F94(L)
E220
G100(H)
W104(H)
G103(H)
T220
R221
L96(L)
D101(H)
Y91(L)
Y32(L)
E93(L)
D92(L)

图8

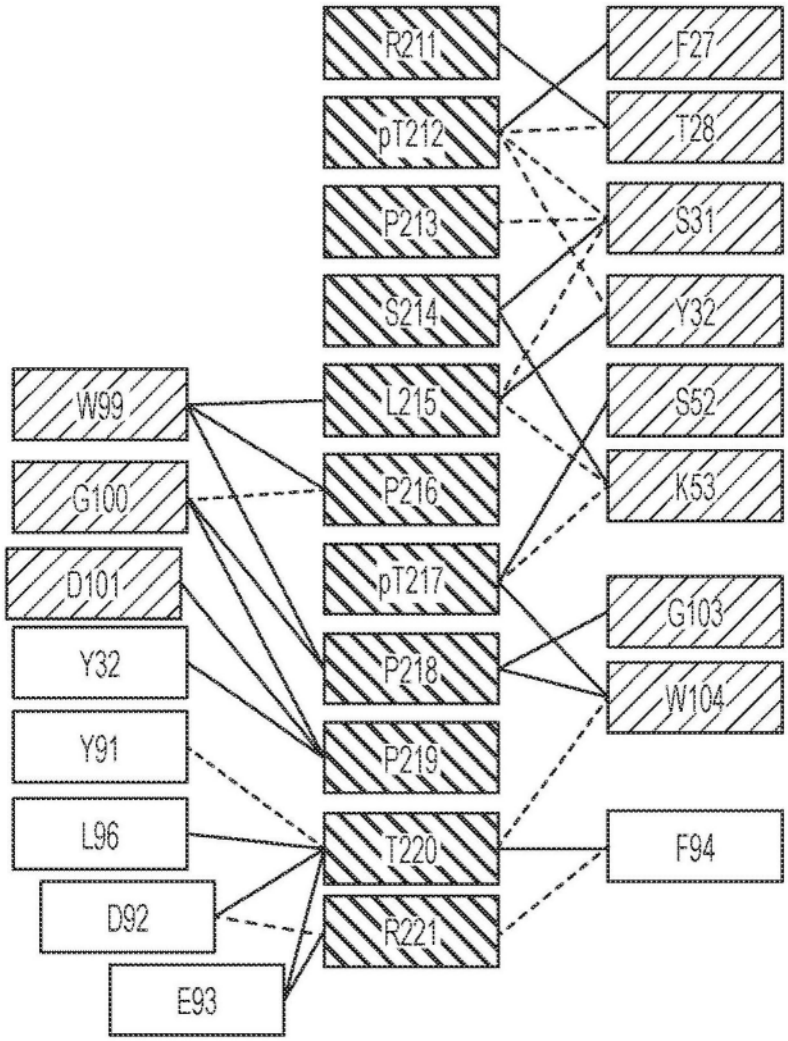

R211
pT212
P213
S214
L215
P216
pT217
P218
P219
T220
R221
F27
T28
S31
Y32
S52
K53
G103
W104
F94
W99
G100
D101
Y32
Y91
L96
D92
E93

图9

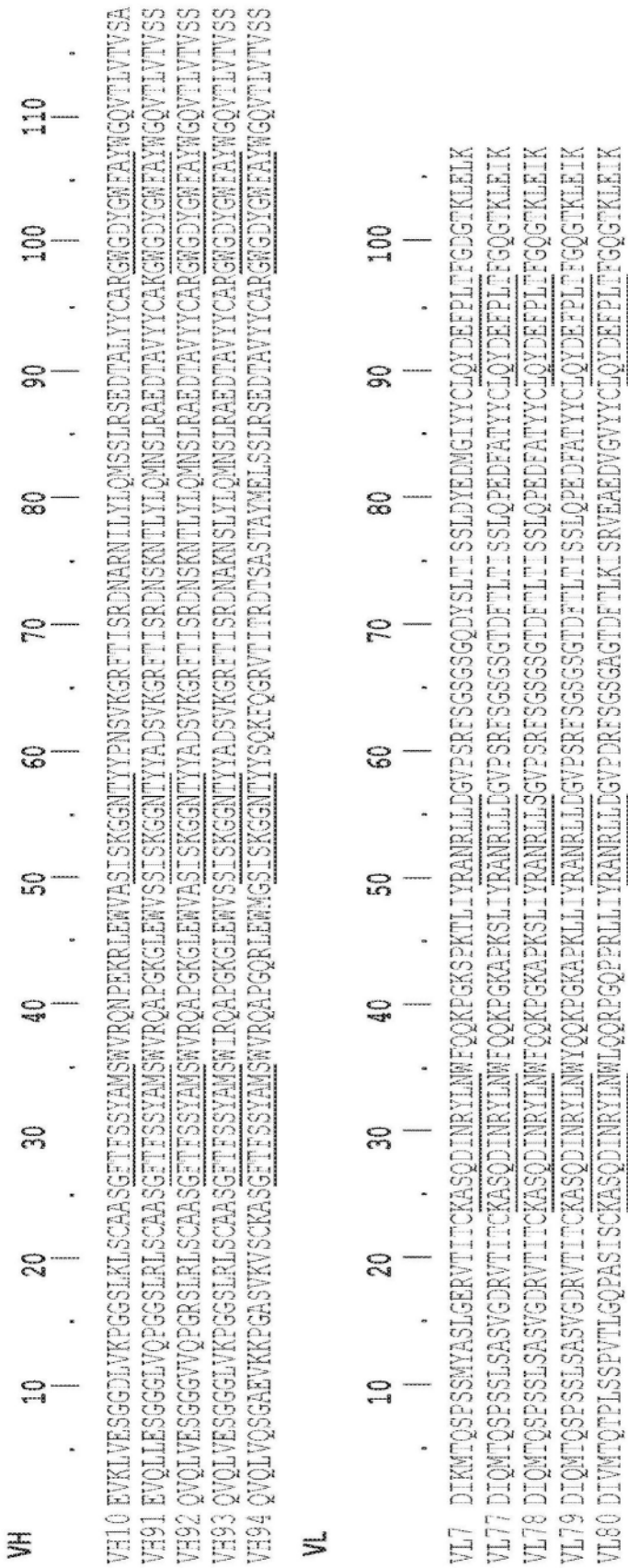

VH
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
VE10 EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQNPEKRLEWVASISKGGNTYYPNSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTALYYCARGWGDYGMEAYWGQVTLVTVSA
VE91 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISKGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWGDYGMEAYWGQVTLVTVSS
VE92 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISKGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGMEAYWGQVTLVTVSS
VE93 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIRQAPGKGLEWVSSISKGGNTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGMEAYWGQVTLVTVSS
VE94 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSSYAMSWVRQAPGQRLEWMGSISKGGNTYYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGWGDYGMEAYWGQVTLVTVSS
VL
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
VL7 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINRYLNWFQQKPGKSPKTLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLDYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGDGTKLELK
VL77 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQQKPGKAPKSLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK
VL78 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQQKPGKAPKSLIYRANRLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK
VL79 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWYQQKPGKAPKLLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK
VL80 DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCKASQDINRYLNWLQQRPGQPPRLLIYRANRLLDGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK

图10



图11

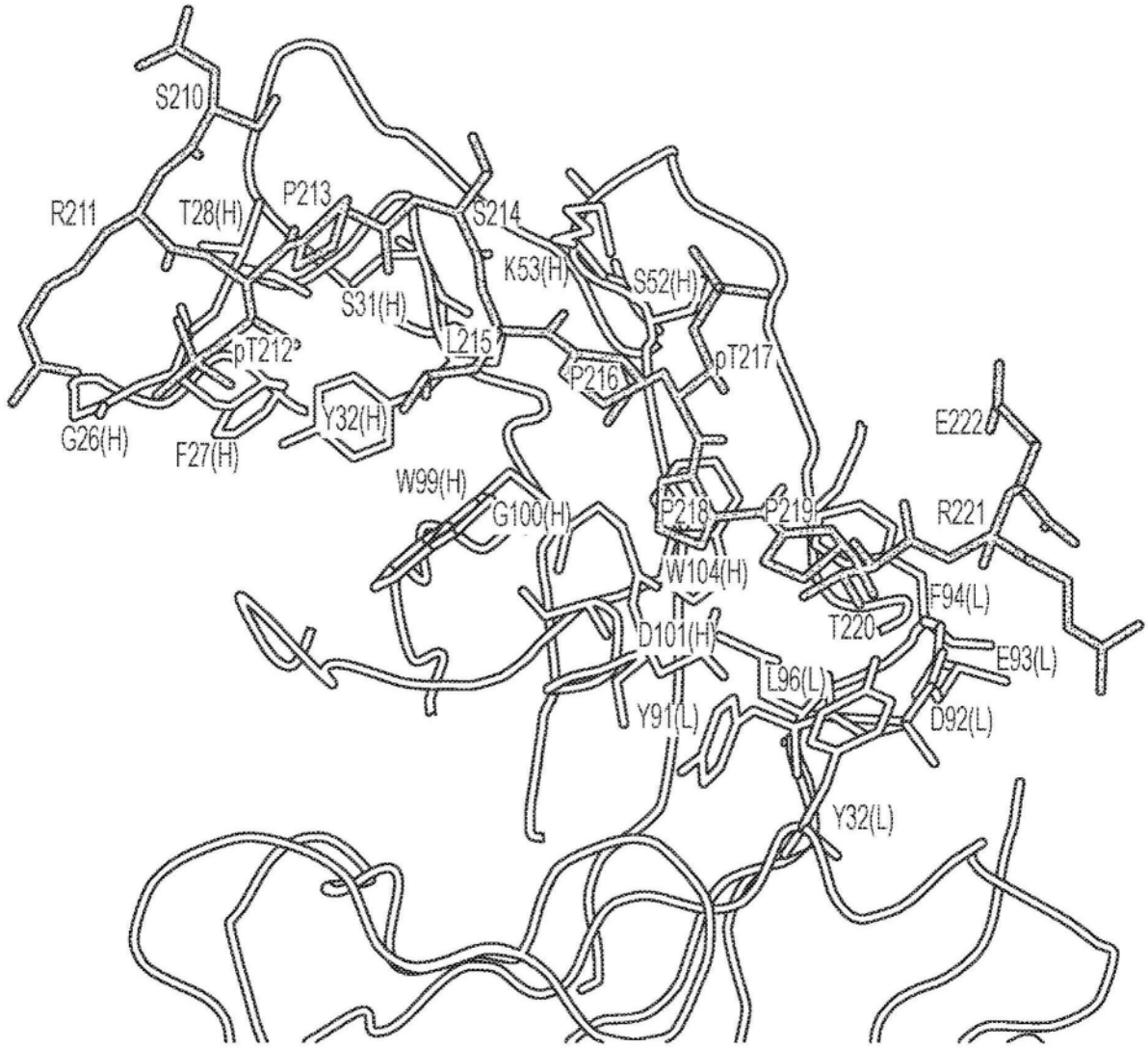

S210
R211
T28(H)
P213
S214
K53(H)
S52(H)
S31(H)
L215
pT212
P216
pT217
Y32(H)
G26(H)
F27(H)
W99(H)
G100(H)
P218
P219
E222
R221
W104(H)
F94(L)
T220
D101(H)
E93(L)
L96(L)
Y91(L)
D92(L)
Y32(L)

图12

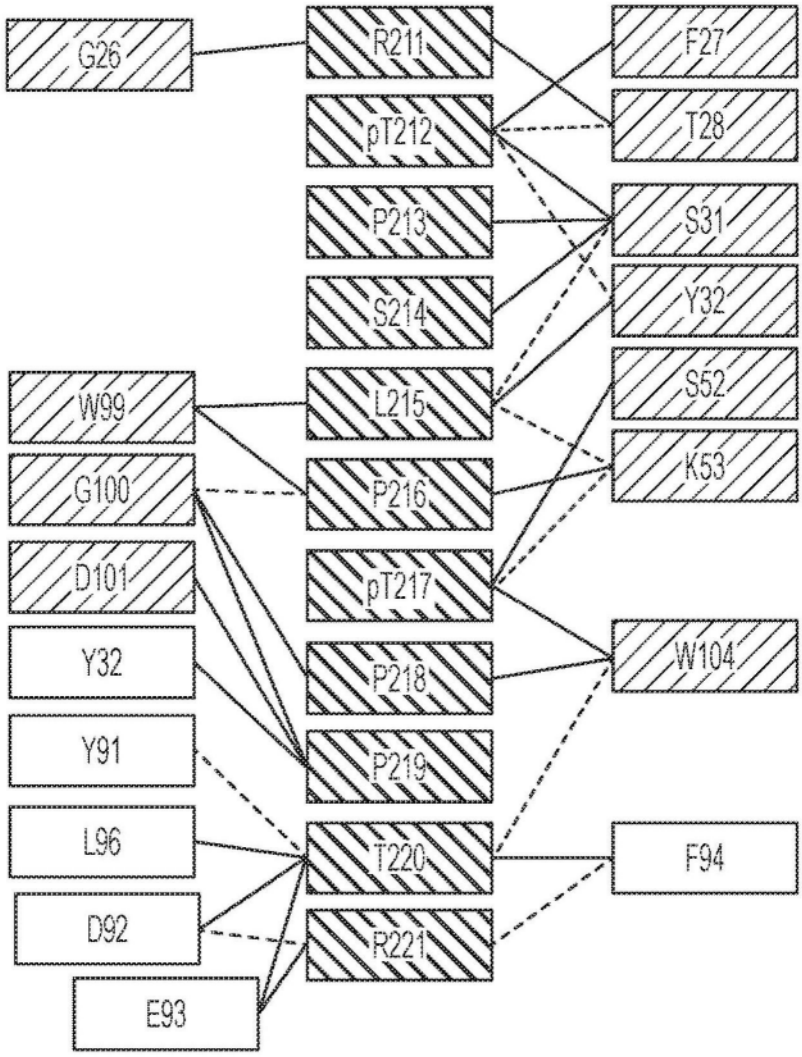

G26
R211
pT212
P213
S214
L215
P216
pT217
P218
P219
T220
R221
F27
T28
S31
Y32
S52
K53
W104
F94
W99
G100
D101
Y32
Y91
L96
D92
E93

图13

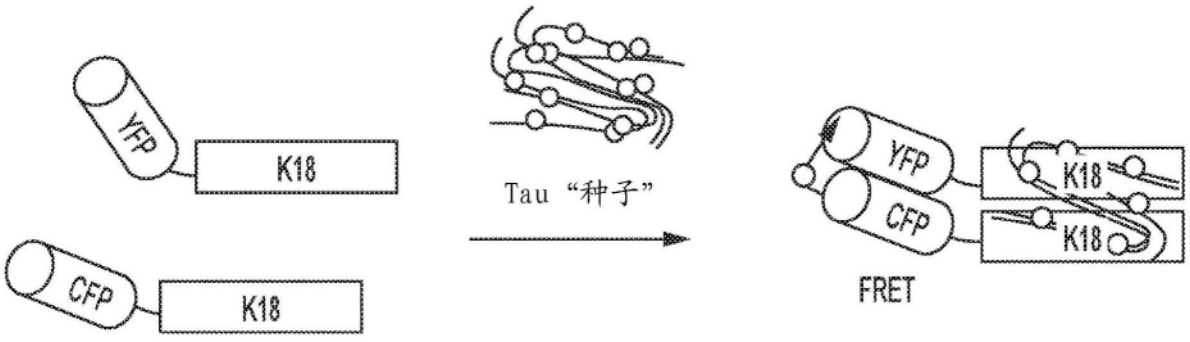

YFP
K18
CFP
K18
Tau “种子”
YFP
CFP
K18
K18
FRET

图14

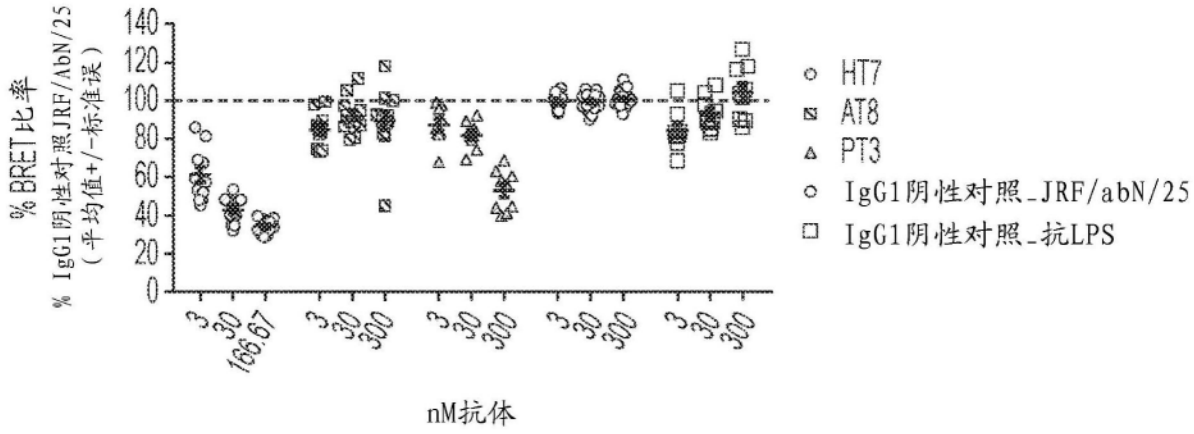

% BRET比率
% IgG1阴性对照JRF/AbN/25
(平均值+/-标准误)
140
120
100
80
60
40
20
0
3
30
166.67
3
30
300
3
30
300
3
30
300
3
30
300
nM抗体
HT7
AT8
PT3
IgG1阴性对照_JRF/abN/25
IgG1阴性对照_抗LPS

图15

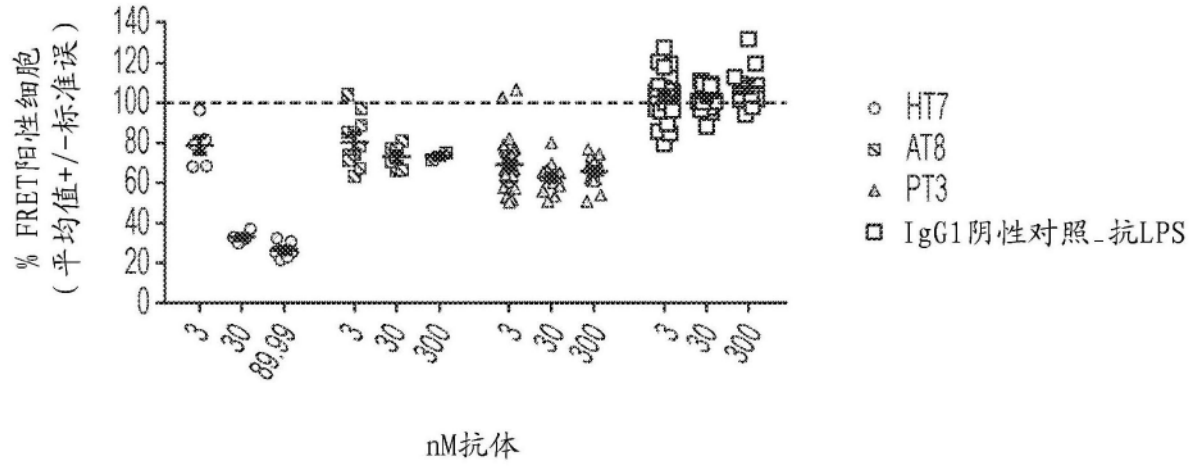

% FRET阳性细胞
(平均值+/-标准误)
140
120
100
80
60
40
20
0
3
30
89.99
3
30
300
3
30
300
3
30
300
nM抗体
HT7
AT8
PT3
IgG1阴性对照_抗LPS

图16

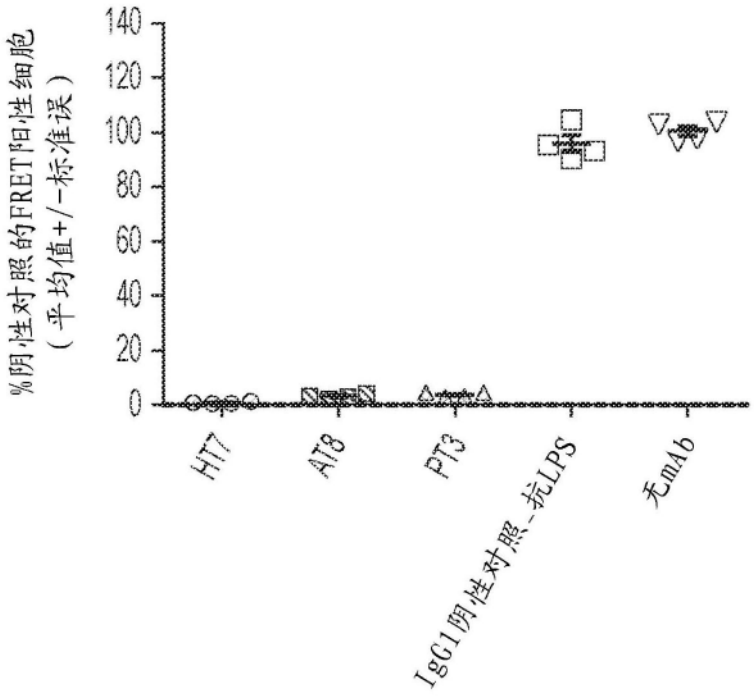

%阴性对照的FRET阳性细胞
（平均值+/-标准误）
140
120
100
80
60
40
20
0
HT7
AT8
PT3
IgG1阴性对照-抗LPS
无mAb

图17

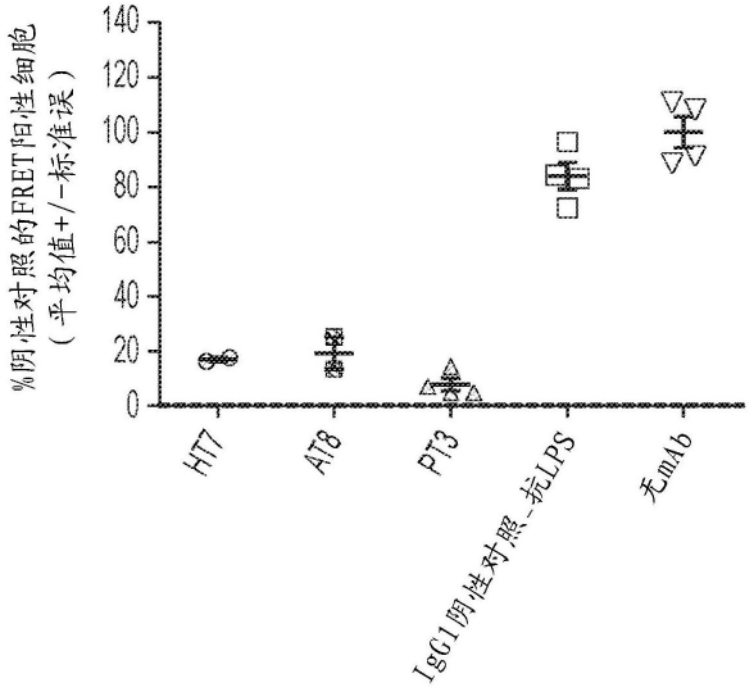

%阴性对照的FRET阳性细胞
（平均值+/-标准误）
140
120
100
80
60
40
20
0
HT7
AT8
PT3
IgG1阴性对照-抗LPS
无mAb

图18

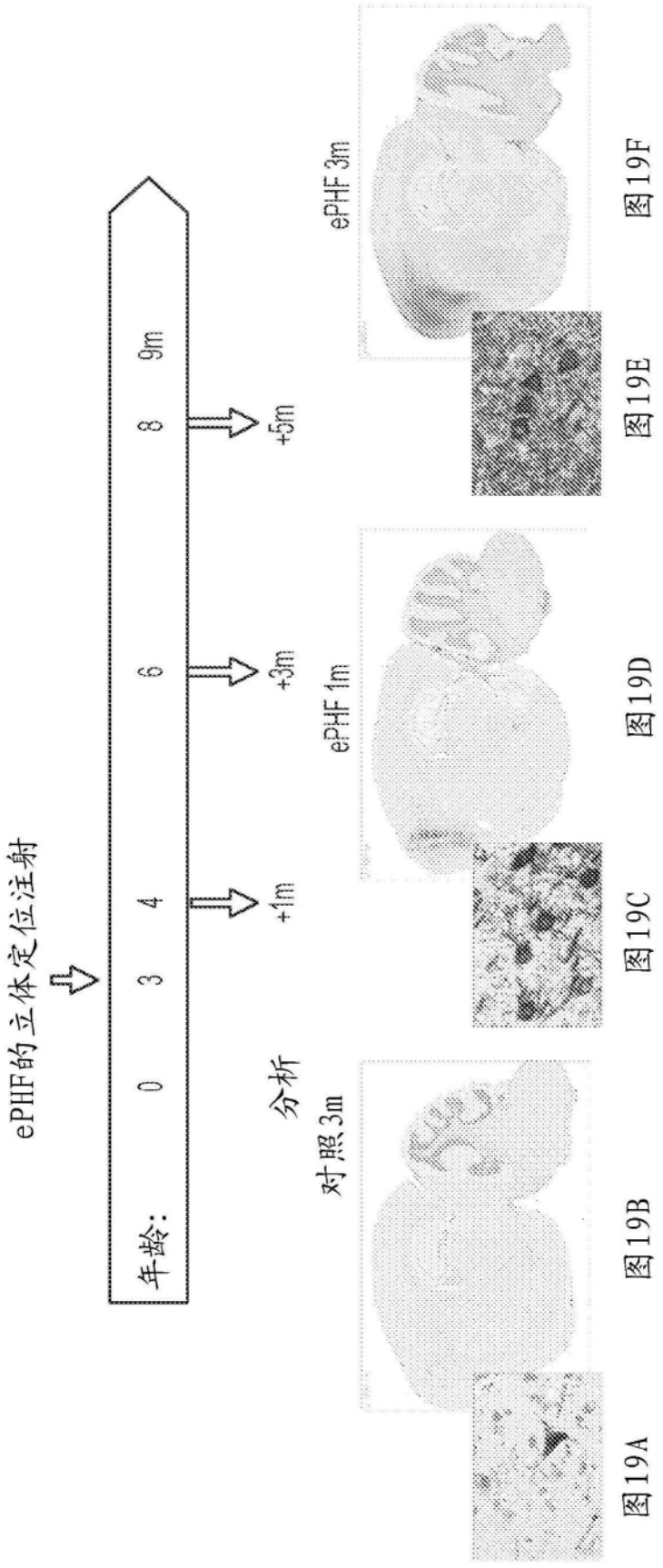

ePHF的立体定位注射
年龄：
0
3
4
6
8
9m
+1m
+3m
+5m
分析
对照3m
ePHF 1m
ePHF 3m
图19A
图19B
图19C
图19D
图19E
图19F

图19

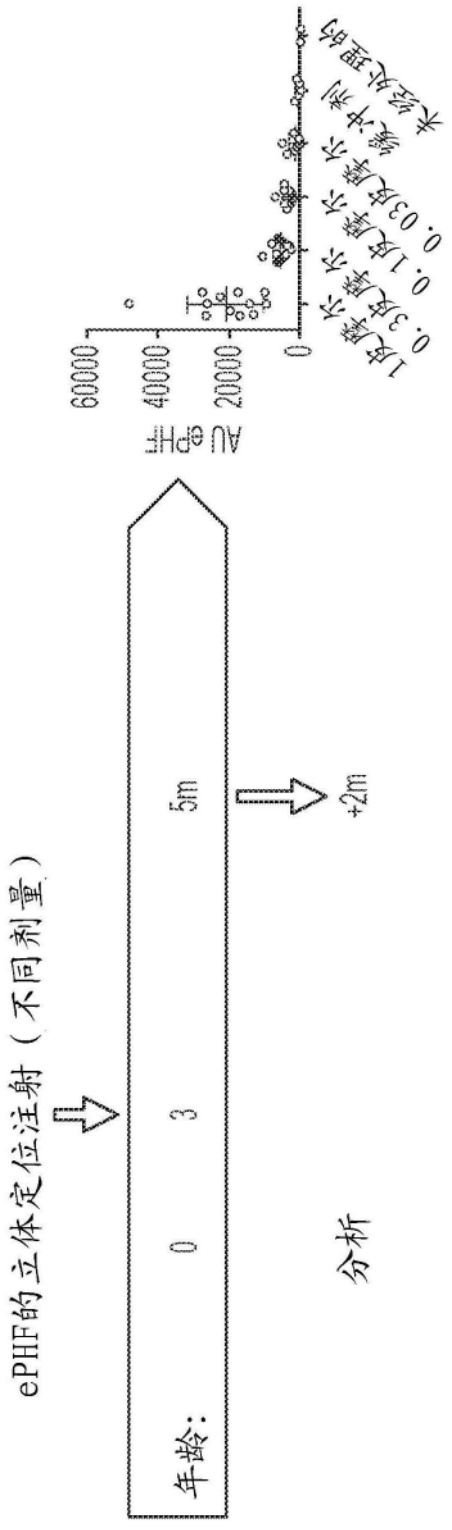

ePHF的立体定位注射（不同剂量）
年龄：
0
3
5m
+2m
分析
AU ePHF
60000
40000
20000
0
1.0mg/kg
0.3mg/kg
0.1mg/kg
0.03mg/kg
未处理的

图19G

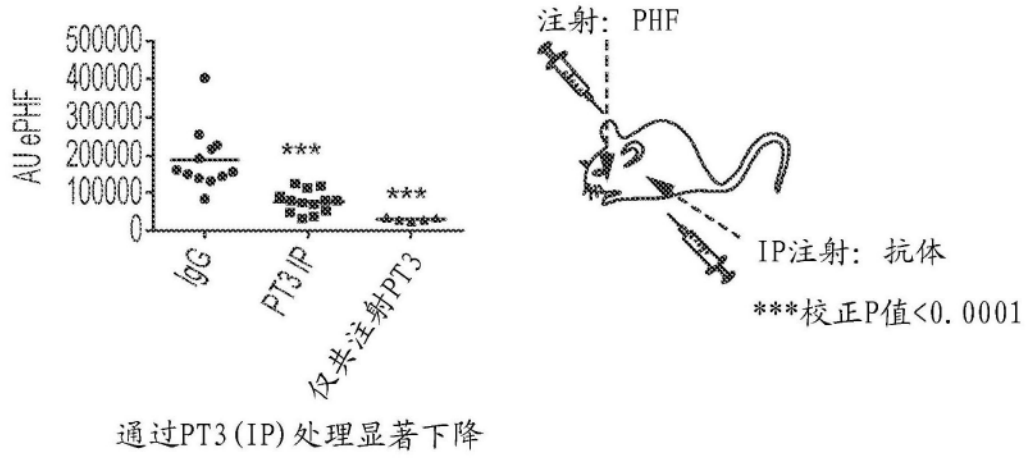

十二烷基肌氨酸钠不溶性级分的PT51/PT51 tau聚集体免疫测定
AU ePHF
500000
400000
300000
200000
100000
0
***
***
IgG
PT3 IP
仅共注射PT3
通过PT3(IP)处理显著下降
注射: PHF
IP注射: 抗体
***校正P值<0.0001

图20

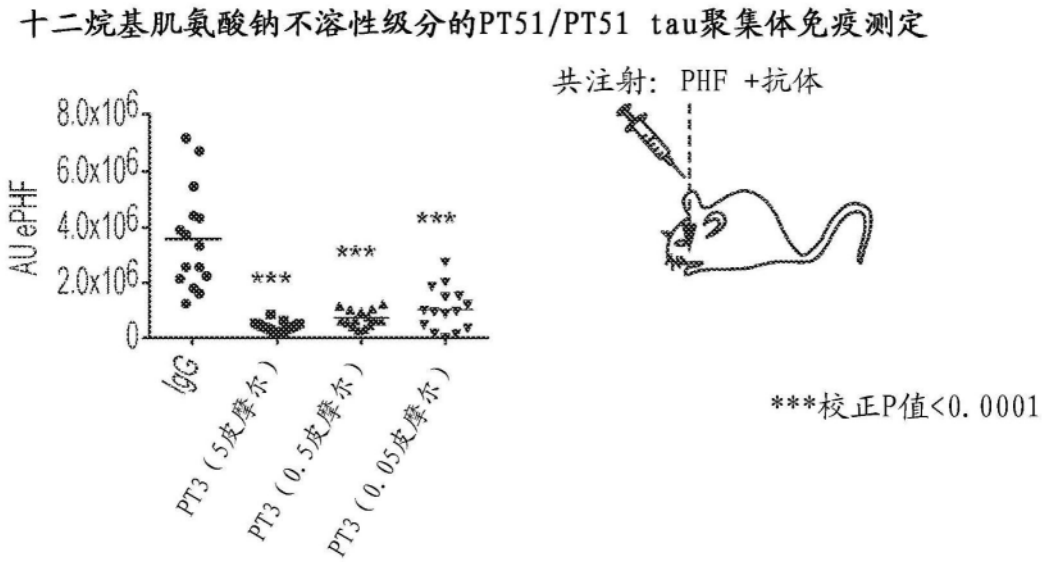

十二烷基肌氨酸钠不溶性级分的PT51/PT51 tau聚集体免疫测定
AU ePHF
8.0x10^6
6.0x10^6
4.0x10^6
2.0x10^6
0
***
***
***
IgG
PT3 (5皮摩尔)
PT3 (0.5皮摩尔)
PT3 (0.05皮摩尔)
共注射: PHF +抗体
***校正P值<0.0001

图21

图22A

组	共注射	IP (20 mg/kg, 2x/周)	n
1	IgG1	IgG1	19
2	PT3(G1)	PT3(G1)	16
3	PT3(G2a)	PT3(G2a)	18
4	PT3(G2a-HFA)	PT3(G2a-HFA)	15

注射	量	总体积(μL)	浓度(μM)
2.5 μL ePHF	1皮摩尔Tau	5	0.2
2.5mL抗体	25皮摩尔抗体	5	5

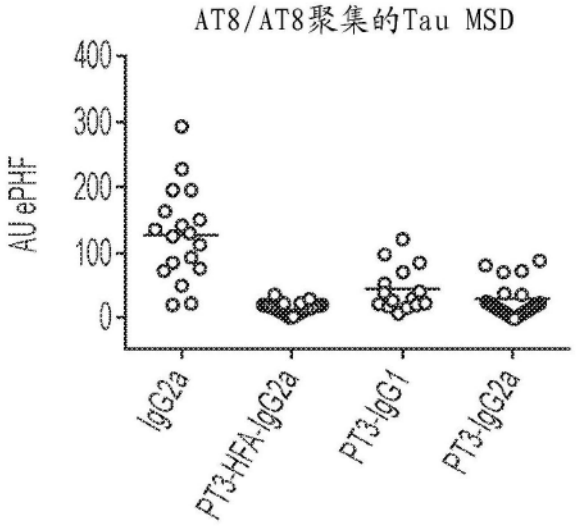


图22B

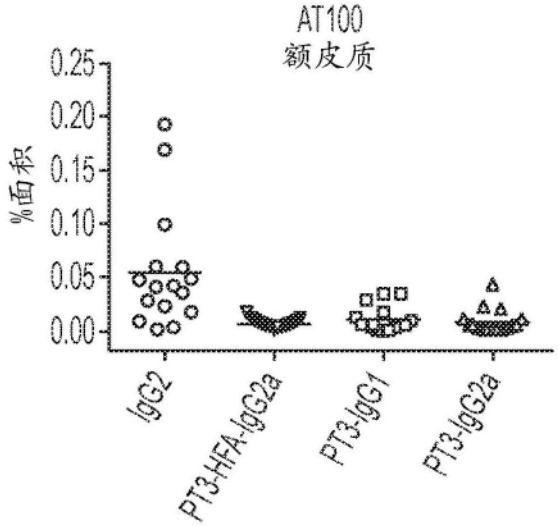


图22C

图22

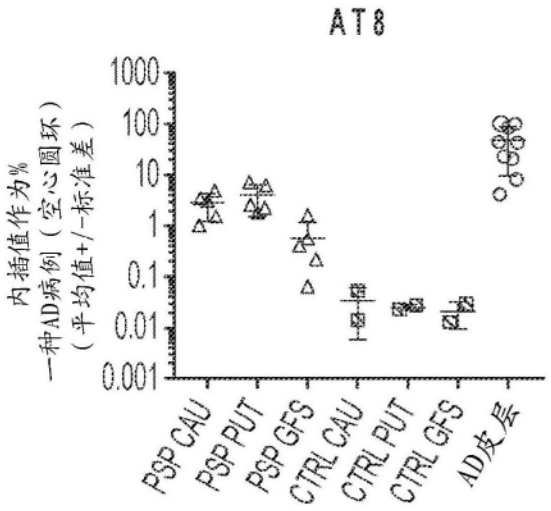


图23A

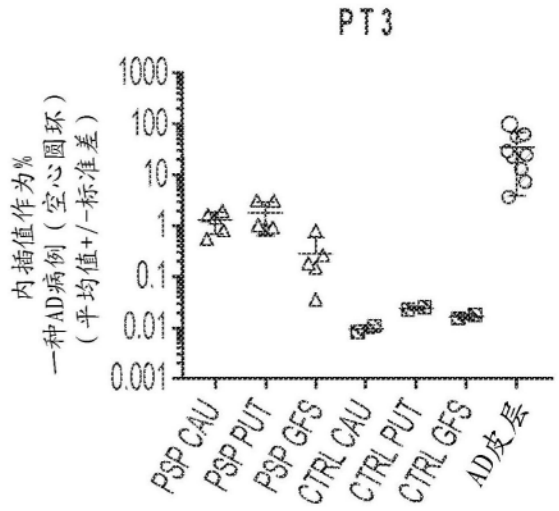


图23B

图23

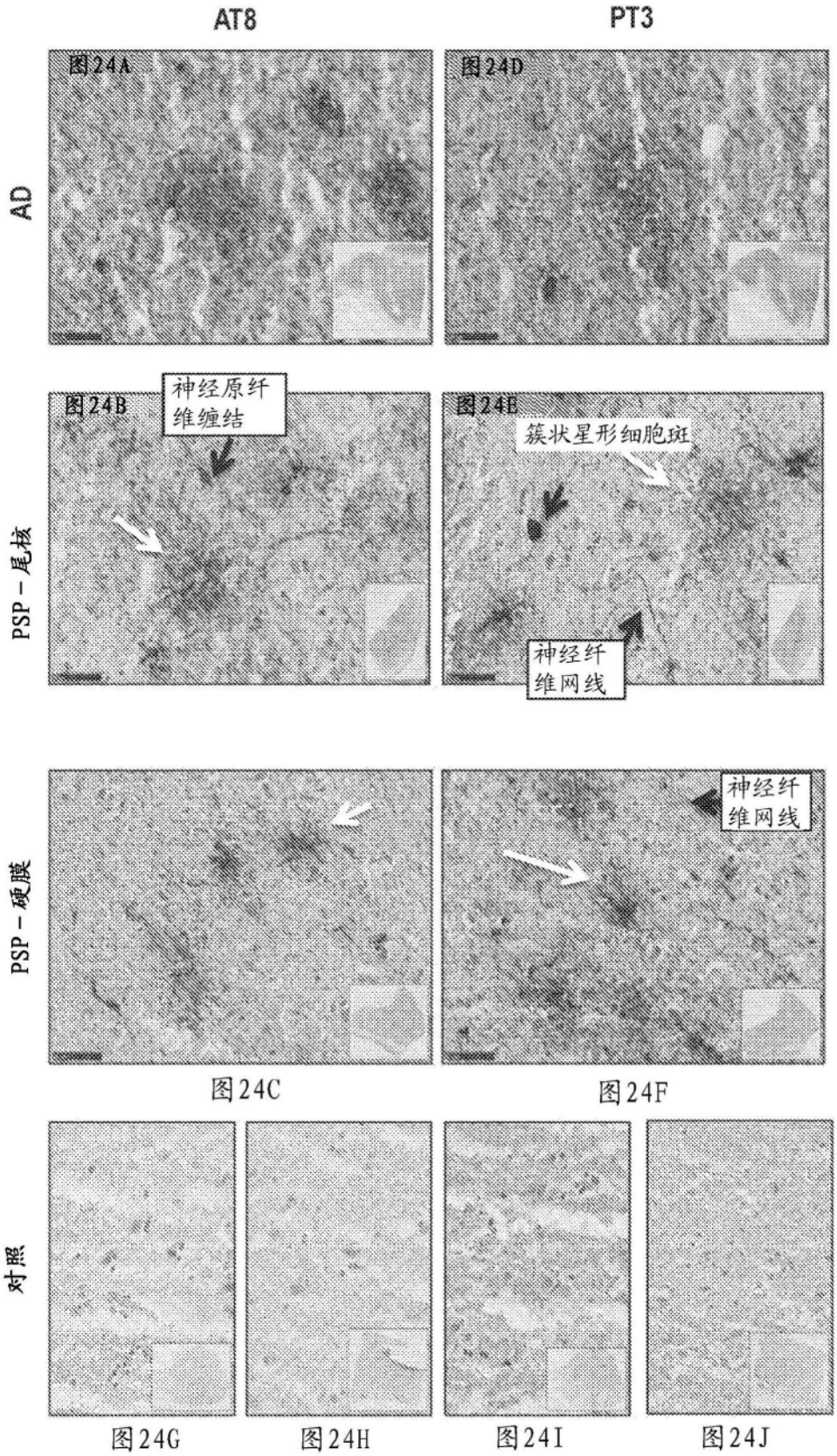

AT8
PT3
AD
图24A
图24D
PSP－尾核
图24B
神经原纤维缠结
图24E
簇状星形细胞斑
神经纤维网线
PSP－硬膜
神经纤维网线
图24C
图24F
对照
图24G
图24H
图24I
图24J

图24

图25A 图25B 图25C 图25D

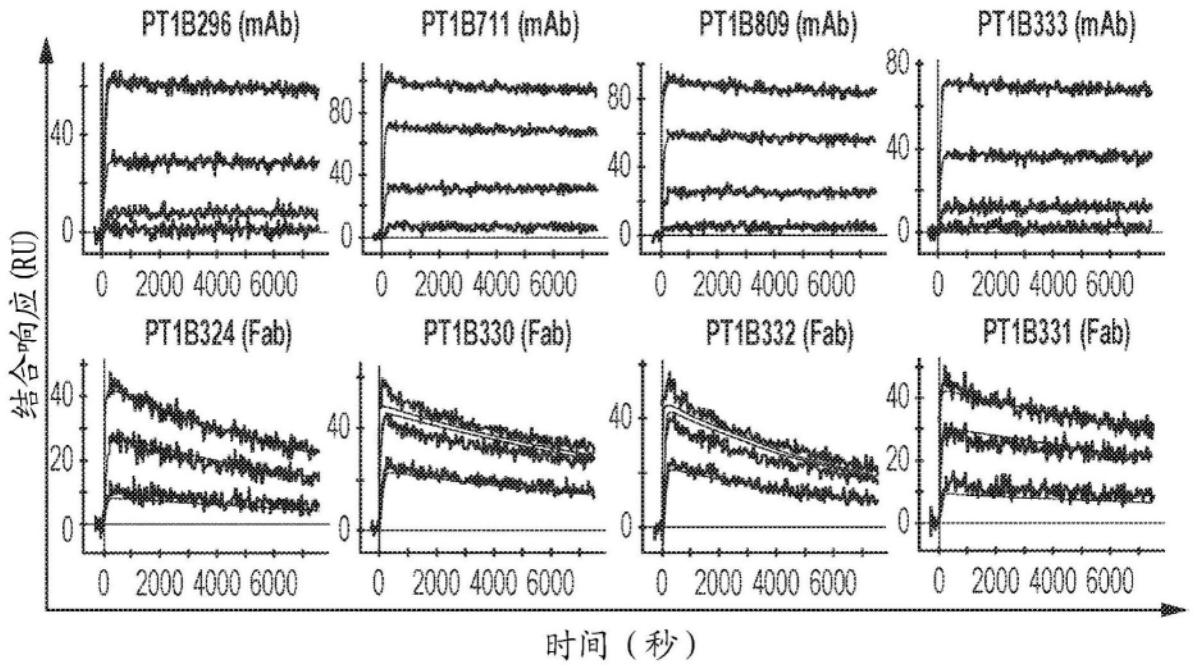


图25E 图25F 图25G 图25H

图25

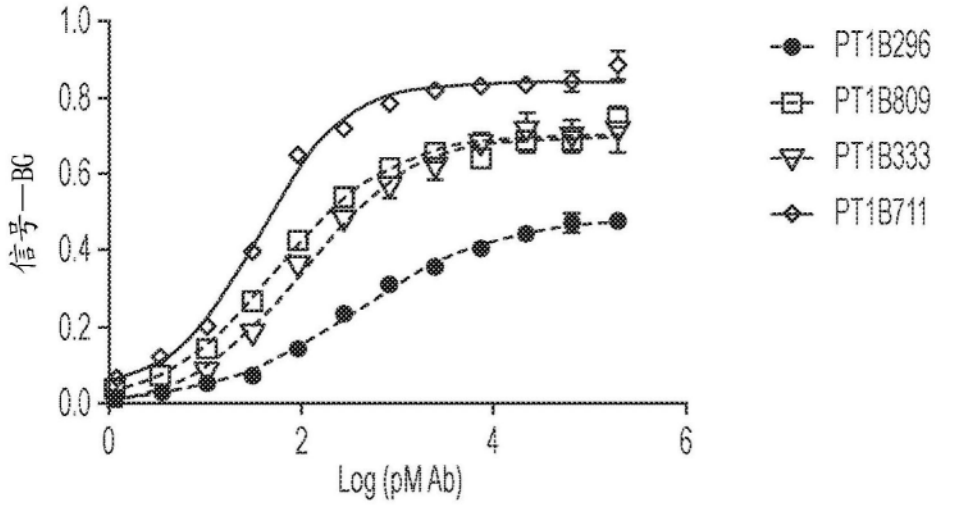


图26A

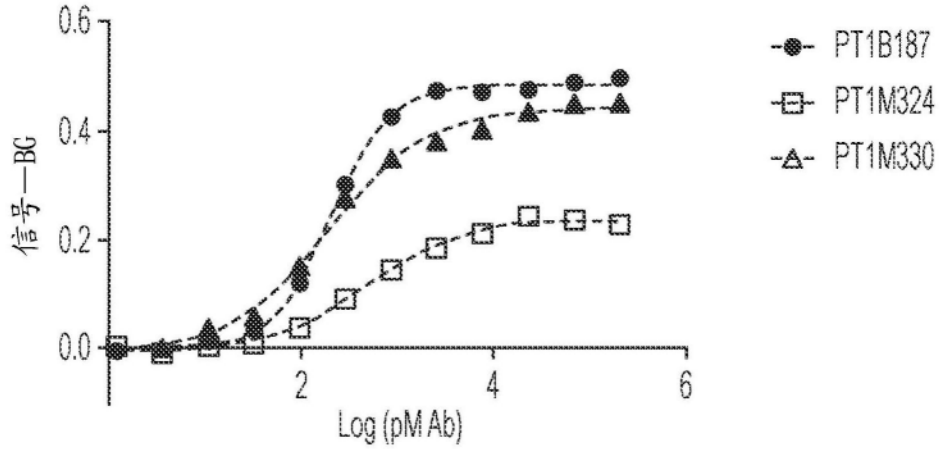


图26B

图26