



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118434446 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 02

(21) 申请号 202280076905.X
(22) 申请日 2022.09.30
(30) 优先权数据
63/251,383 2021.10.01 US
63/252,353 2021.10.05 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.20
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/077410 2022.09.30
(87) PCT国际申请的公布数据
W02023/056462 EN 2023.04.06
(71) 申请人 犹他大学研究基金会
地址 美国
(72) 发明人 毛秦雯
(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219
专利代理师 辛怡 杨青
(51) Int.Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
权利要求书6页 说明书31页
序列表 (电子公布) 附图11页

(54) 发明名称

病理性TDP-43作为诊断TDP-43蛋白病的生物标志物

(57) 摘要

本文公开了抗体或其抗原结合片段以及包含它们的组合物。还公开了使用本文描述的抗体或其抗原结合片段检测生物样品中的TAR DNA结合蛋白43 (TDP-43)、在受试者中诊断神经变性疾病以及选择是否将受试者纳入具有TDP-43包含物的额颞叶变性 (FTLD-TDP) 的临床试验的方法。此外,本文公开了用于选择性检测生物样品中的TDP-43的免疫测定试剂盒。



1. 一种抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:

- (a) 所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含
 - (i) HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,
 - (ii) HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和
 - (iii) HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且
- (b) 所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含
 - (i) LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,
 - (ii) LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和
 - (iii) LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且

所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

3. 一种抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:

- (a) 所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含
 - (i) HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,
 - (ii) HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和
 - (iii) HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且
- (b) 所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含
 - (i) LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,
 - (ii) LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和
 - (iii) LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

4. 根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;并且

所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

5. 一种抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:

- (a) 所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含
 - (i) HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,
 - (ii) HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和
 - (iii) HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且
- (b) 所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含
 - (i) LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,
 - (ii) LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和
 - (iii) LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

6. 根据权利要求5所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;并且

所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区和所述免疫球蛋白轻链可变区一起结合TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的至少一部分。

8. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区和所述免疫球蛋白轻链可变区一起结合SEQ ID NO:2的至少一部分。

9. 一种分离的核酸,其包含编码根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

10. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段中的一者或多者的用途,其用于预筛选临床试验的受试者。

11. 一种免疫测定法,其包含根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段中的一者或多者。

12. 一种检测生物样品中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的方法,所述方法包括:

将所述样品与抗体或其抗原结合片段接触,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:

(a) 所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含

(i) HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,

(ii) HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和

(iii) HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且

(b) 所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含

(i) LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,

(ii) LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和

(iii) LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:

(a) 所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含

(i) HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,

(ii) HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和

(iii) HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且

(b) 所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含

(i) LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,

(ii) LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和

(iii) LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

14. 根据权利要求12所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:

(a) 所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含

(i) HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,

- (ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和
- (iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且
- (b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含
 - (i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,
 - (ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和
 - (iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。
- 15.根据权利要求12所述的方法,其中所述TDP-43是错误折叠的。
- 16.根据权利要求12所述的方法,其中所述样品包括细胞或组织样品。
- 17.根据权利要求12所述的方法,其中所述样品包括血浆、血清或脑脊液(CSF)。
- 18.根据权利要求12所述的方法,其中所述样品从被诊断为患有、疑似患有神经变性疾病或具有患有或发生神经变性疾病的风险的受试者获得。
- 19.根据权利要求18所述的方法,其中所述神经变性疾病是额颞叶变性(FTLD)。
- 20.根据权利要求12所述的方法,其中所述检测包括免疫组织化学(IHC)、中尺度发现(MSD)生物标志物测定、Western印迹、流式细胞术、放射免疫测定(RIA)、计数免疫测定(CIA)、酶免疫测定(EIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)、荧光免疫测定(FIA)或化学发光免疫测定(CLIA)中的一者或多者。
- 21.一种在受试者中诊断神经变性疾病的方法,所述方法包括检测来自所述受试者的生物样品中TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的存在,所述方法包括:
 - 将所述样品与抗体或其抗原结合片段接触,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:
 - (a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含
 - (i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,
 - (ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和
 - (iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且
 - (b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含
 - (i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,
 - (ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和
 - (iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;
 - 其中TDP-43的存在指示所述受试者患有神经变性疾病。
- 22.根据权利要求21所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:
 - (a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含
 - (i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,
 - (ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和
 - (iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且
 - (b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含
 - (i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,
 - (ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和

(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

23.根据权利要求21所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:

(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含

(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,

(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和

(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且

(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含

(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,

(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和

(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

24.根据权利要求21所述的方法,其中所述神经变性疾病是额颞叶变性(FTLD)。

25.一种免疫测定试剂盒,其用于选择性检测生物样品中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1),所述试剂盒包含:

抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:

(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含

(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,

(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和

(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且

(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含

(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,

(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和

(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及

检测试剂。

26.根据权利要求25所述的试剂盒,其进一步包含用于所述抗体或其抗原结合片段的固相支持物。

27.根据权利要求25所述的试剂盒,其进一步包含检测工具。

28.根据权利要求27所述的试剂盒,其中所述检测工具是荧光、发光、放射活性和比色中的一者或多者。

29.根据权利要求25所述的试剂盒,其中所述检测试剂是比色底物、化学发光底物和荧光底物中的一者或多者。

30.根据权利要求25所述的试剂盒,其进一步包含第二抗体或其抗原结合片段,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:

(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含

(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,

(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和

- (iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且
- (b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含
 - (i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,
 - (ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和
 - (iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

31.根据权利要求25所述的试剂盒,其进一步包含第二抗体或其抗原结合片段,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:

- (a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含
 - (i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,
 - (ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和
 - (iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且
- (b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含
 - (i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,
 - (ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和
 - (iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

32.一种选择是否将受试者纳入具有TAR DNA结合蛋白43包含物的额颞叶变性 (FTLD-TDP)的临床试验的方法,所述方法包括:

(a)测量来自所述受试者的样品中TAR DNA结合蛋白43 (TDP-43;SEQ ID NO:1)的表达水平,其中所述测量包括将所述样品与抗体或其抗原结合片段接触,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链 (HC) 可变结构域序列和免疫球蛋白轻链 (LC) 可变结构域序列,其中:

- (a1)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含
 - (a1a)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,
 - (a1b)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和
 - (a1c)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且
- (a2)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含
 - (a2a)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,
 - (a2b)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和
 - (a2c)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;
- (b)将所述TDP-43的表达水平与阈值表达水平进行比较;并且其中:

(b1)如果所述TDP-43的表达水平高于所述阈值表达水平,则选择所述受试者进行所述临床试验;或者

(b2)如果所述TDP-43的表达水平低于所述阈值表达水平,则不选择所述受试者进行所述临床试验。

33.根据权利要求32所述的方法,其中所述测量进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:

- (a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含

- (i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,
- (ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和
- (iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且

(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含

- (i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,
- (ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和
- (iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

34.根据权利要求32所述的方法,其中所述测量进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:

(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含

- (i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,
- (ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和
- (iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且

(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含

- (i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,
- (ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和
- (iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

病理性TDP-43作为诊断TDP-43蛋白病的生物标志物

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年10月1日提交的美国临时专利申请第63/251,383号和2021年10月5日提交的美国临时专利申请第63/252,353号的优先权,所述临时专利申请整体通过引用并入本文。

[0003] 序列表引用

[0004] 根据37C.F.R. §1.821,本申请与采用ST.26XML格式的序列表XML一起提交。所述在USPTO专利中心提交的序列表XML文件“026389-9326-W001.xml”创建于2022年9月29日,含有26个序列,文件大小为24.1KB,并整体通过引用并入本说明书。

技术领域

[0005] 本公开涉及抗体或其抗原结合片段以及包含它们的组合物。本公开还涉及使用本文描述的抗体或其抗原结合片段检测生物样品中的TAR DNA结合蛋白43 (TDP-43)、在受试者中诊断神经变性疾病以及选择是否将受试者纳入具有TDP-43包含物的额颞叶变性(FTLD-TDP)的临床试验的方法。此外,本公开涉及用于选择性检测生物样品中的TDP-43的免疫测定试剂盒。

背景技术

[0006] 人口正在老龄化,并且神经变性疾病正在成为一个日益增长和棘手的健康挑战。尽管阿兹海默氏病(AD)是痴呆症的最常见病因,但额颞叶痴呆症(FTD)在65岁以下人群中第二常见。FTD是一种非均质性神经变性疾病,其特征在于进行性行为 and/或语言障碍,包括一系列临床亚型,例如行为变异性FTD、进行性非流利性失语症和语义性痴呆。在病理学上,大多数患者具有额颞叶变性(FTLD)。这些患者中约有一半显示出过度磷酸化的tau蛋白的积累(在一种被称为FTLD-tau的亚型中),而大多数其他患者表现出反式激活DNA结合蛋白TDP-43的积累(FTLD-TDP亚型)。然而,这些临床病症也可能由AD的异常表现引起。由于不同的潜在病理需要特定的治疗干预,因此迫切需要稳健的生物标志物以根据个体患者的特定潜在分子病理(即FTLD-tau、FTLD-TDP或AD)为其正确选择适合的药物。尽管AD存在标志性脑脊液(CSF)标志物(低A β 42以及高T-tau和P-tau),但目前既没有可靠的结构/功能成像方法,也没有基于CSF/血清液体生物标志物的方法可用于诊断FTLD-tau或FTLD-TDP。

[0007] 因此,对鉴定用于诊断FTLD-TDP的稳健血浆生物标志物以及用于检测和定量所述生物标志物的高度灵敏和特异的免疫测定法,存在着需求。

发明内容

[0008] 一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且(b)所述免疫

球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;并且所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0009] 另一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;并且所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0010] 本公开的另一方面提供了一种抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;并且所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在另一个实施方式中,所述免疫球蛋白重链可变区和所述免疫球蛋白轻链可变区一起结合TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的至少一部分。在另一个实施方式中,所述免疫球蛋白重链可变区和所述免疫球蛋白轻链可变区一起结合SEQ ID NO:2的至少一部分。

[0011] 本公开的另一方面提供了一种分离的核酸,其包含编码本文所描述的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

[0012] 本公开的另一方面提供了本文所描述的抗体或其抗原结合片段中的一者或多者的用途,其用于预筛选临床试验的受试者。

[0013] 本公开的另一方面提供了一种免疫测定法,其包含本文所描述的抗体或其抗原结合片段中的一者或多者。

[0014] 本公开的另一方面提供了一种检测生物样品中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的方法,所述方法包括:将所述样品与抗体或其抗原结合片段接触,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包

含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在另一个实施方式中,所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在另一个实施方式中,所述TDP-43是错误的折叠。在另一个实施方式中,所述样品包括细胞或组织样品。在另一个实施方式中,所述样品包括血浆、血清或脑脊液(CSF)。在另一个实施方式中,所述样品从被诊断为患有、疑似患有神经变性疾病或具有患有或发生神经变性疾病的风险的受试者获得。在另一个实施方式中,所述神经变性疾病是额颞叶变性(FTLD)。在另一个实施方式中,所述检测包括免疫组织化学(IHC)、中尺度发现(MSD)生物标志物测定、Western印迹、流式细胞术、放射免疫测定(RIA)、计数免疫测定(CIA)、酶免疫测定(EIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)、荧光免疫测定(FIA)或化学发光免疫测定(CLIA)中的一者或多者。

[0015] 本公开的另一方面提供了一种在受试者中诊断神经变性疾病的方法,所述方法包括检测来自所述受试者的生物样品中TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的存在,所述方法包括:将所述样品与抗体或其抗原结合片段接触,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;其中TDP-43的存在指示所述受试者患有神经变性疾病。在一个实施方式中,所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在另一个实施方式中,所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,

(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在另一个实施方式中,所述神经变性疾病是额颞叶变性(FTLD)。

[0016] 本公开的另一方面提供了一种用于选择性检测生物样品中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的免疫测定试剂盒,所述试剂盒包含:抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及检测试剂。在一个实施方式中,所述试剂盒进一步包含用于所述抗体或其抗原结合片段的固相支持物。在另一个实施方式中,所述试剂盒进一步包含检测工具。在另一个实施方式中,所述检测工具是荧光、发光、放射活性和比色中的一者或多者。在另一个实施方式中,所述检测试剂是比色底物、化学发光底物和荧光底物中的一者或多者。在另一个实施方式中,包含第二抗体或其抗原结合片段,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在另一个实施方式中,所述试剂盒进一步包含第二抗体或其抗原结合片段,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0017] 本公开的另一方面提供了一种选择是否将受试者纳入具有TAR DNA结合蛋白43包含物的额颞叶变性(FTLD-TDP)的临床试验的方法,所述方法包括:(a)测量来自所述受试者的样品中TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的表达水平,其中所述测量包括将所述样品与抗体或其抗原结合片段接触,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a1)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(a1a)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(a1b)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(a1c)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且(a2)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(a2a)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,(a2b)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和(a2c)LC CDR3,其包含SEQ ID

NO:10的氨基酸序列; (b) 将所述TDP-43的表达水平与阈值表达水平进行比较; 并且其中: (b1) 如果所述TDP-43的表达水平高于所述阈值表达水平, 则选择所述受试者进行所述临床试验; 或者 (b2) 如果所述TDP-43的表达水平低于所述阈值表达水平, 则不选择所述受试者进行所述临床试验。在一个实施方式中, 所述测量进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触, 其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列, 其中: (a) 所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含 (i) HC CDR1, 其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列, (ii) HC CDR2, 其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列, 和 (iii) HC CDR3, 其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列; 并且 (b) 所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含 (i) LC CDR1, 其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列, (ii) LC CDR2, 其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列, 和 (iii) LC CDR3, 其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在另一个实施方式中, 所述测量进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触, 其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列, 其中: (a) 所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含 (i) HC CDR1, 其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列, (ii) HC CDR2, 其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列, 和 (iii) HC CDR3, 其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列; 并且 (b) 所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含 (i) LC CDR1, 其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列, (ii) LC CDR2, 其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列, 和 (iii) LC CDR3, 其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0018] 本公开提供了根据下面的详细描述和附图将显而易见的其他方面和实施方式。

附图说明

[0019] 图1是示出了TDP-43中被单克隆抗体 (MAb) #3、#4、#9和#6识别的表位的示意图。

[0020] 图2是示出了MAb#9优先识别病理性TDP-43的免疫染色图像。在患有FTLD的个体的额叶皮层中, MAb#9稳健地检测由箭号所示的病理性TDP-43包含物, 而核染色没有或极少。这与特异性针对磷酸化TDP-43的已知抗体 (aa 409/410) 类似。相反, 在患有FTLD的个体的额叶皮层中, MAb#6识别病理性TDP-43包含物 (箭号) 和正常核TDP-43 (星号) 两者。比例尺为20 μ m。

[0021] 图3是使用MAb#9和409/410抗体对来自患有FTLD-TDP和FTLD-tau的受试者的CSF样品进行免疫印迹的图像。在FTLD-TDP受试者中MAb#9揭示出强烈的20kDa和30-35kDa片段 (用星号显示), 其在使用409/410抗体时没有看到。

[0022] 图4是使用MAb#9从患有FTLD-TDP的受试者的CSF中免疫沉淀病理性TDP-43的图像。

[0023] 图5A-5B示出了用于分析MAb#9的特异性的免疫荧光和免疫染色图像。图5A是用MAb#9进行免疫荧光染色的图像。所述免疫荧光染色图像揭示出在用表达TDP-43的质粒转染的HEK293细胞中的免疫阳性 (箭号)。p409/410MAb是阳性对照, 小鼠IgG是阴性对照。图5B示出了MAb#9免疫染色的图像。在患有ALS的受试者的前角运动神经元 (箭号) 中, 通过与带有被MAb#9识别的表位的肽的竞争, MAb#9的免疫反应性被消融。比例尺为50 μ m。

[0024] 图6A-6B示出了MAb#9检测血浆中的病理性TDP-43。图6A是条形图, 示出了对于来自被诊断为各种病理的受试者的血浆样品, 使用MAb#9的ELISA的吸光度值。图6B是使用p409/410MAb和MAb#9对血浆样品进行免疫印迹的图像。A1型是FTLD-TDP A型样品1; AD+TDP

是具有TDP-43病理的AD;AD-TDP是没有TDP-43病理的AD;PSP是进行性核上性麻痹;CBD是皮质基底节变性。

[0025] 图7A-7C示出了MAb#9检测新的TDP-43病理。图7A是使用MAb#9和p409/410MAb进行免疫染色的图像。MAb#9检测到与使用p409/410MAb时观察到的相似的病理性TDP-43包含物(箭号),区别在于在患有FTLD-TDP A型的受试者的额叶皮层中更多的细神经突(箭头),在B型受试者的额叶皮层中新的细神经突(箭头),以及在患有具有TDP病理的AD的受试者的海马中新的包含物(箭头)。在A型中,MAb#9阳性包含物的密度在第2层中最高(苏木精和曙红[H&E]图像的插图),所述第2层是所有层中神经元损失最严重的。比例尺为50 μ m。图7B是MAb#9免疫染色的免疫荧光图像,其揭示出在患有具有C9突变的ALS的受试者的前角运动神经元中更多的TDP-43病理(箭头)。箭号示出了对p409/410MAb和MAb#9两者呈阳性的唯一包含物。比例尺为50 μ m。图7C是示出了TDP-43病理的半定量的条形图。**, $p < 0.01$; $n = 5$ 。

[0026] 图8是免疫荧光染色的图像,显示了在具有TDP病理脑的患有AD的受试者的杏仁核中,MAb#9免疫阳性(cy3,橙色)与 β -淀粉样蛋白(FITC,绿色)(以前没有报道过)和tau(FITC,绿色)共定位(箭号)。比例尺为50 μ m。

[0027] 图9是示出了来自患有FTLD-TDP ($n = 35$)、FTLD-Tau ($n = 34$) 和AD ($n = 22$) 的受试者的血浆中的TDP-43水平的散点图。TDP-43浓度分布之间的比较通过Mann-Whitney U检验来计算。在AD、FTLD-TDP和FTLD-Tau受试者中血浆TDP-43浓度的中位数分别是5.8、5.4和4.0ng/mL。

具体实施方式

[0028] 本公开的主题内容以足够的细节进行介绍,以提供对更广泛的本发明主题内容的一个或多个特定实施方式的理解。所述描述阐述并举例说明了那些实施方式的特点,而不将本发明主题内容局限于明确描述的实施方案和特点。在不脱离本公开主题内容的范围的情况下,根据这些描述的考虑可能会产生额外和类似的实施方案和特点。

[0029] 1. 定义

[0030] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。在有冲突的情况下,以本文件(包括定义)为准。下文描述了优选的方法和材料,尽管在本发明的实践或测试中可以使用与本文所述的方法和材料相似或等效的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献整体通过引用并入本文。本文公开的材料、方法和实例仅为说明性的,而非限制性的。

[0031] 本文所使用的术语“包含”、“包括”、“具有”、“有”、“可以”、“含有”及其变化形式旨在作为开放式过渡性短语、术语或词语,其不排除额外行为或结构的可能性。没有具体数目的指称包括复数形式,除非上下文另有明确规定。本公开还设想了“包含”本文所呈现的实施方式或要素、“由它们组成”和“基本上由它们组成”的其他实施例,无论是否明确阐述。

[0032] 对于本文中数值范围的叙述而言,明确考虑了其具有相同精度的每个居间数字。例如,对于6-9的范围而言,除了6和9之外还考虑了数字7和8,并且对于6.0-7.0的范围而言,明确考虑了数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0033] 本文所使用的术语“约”或“近似”适用于一个或多个感兴趣的值,是指与所陈述的参考值相近或在由本领域普通技术人员确定的所述特定值的可接受误差范围内的值,所

述可接受误差范围将部分取决于所述值如何测量或确定,包括测量系统的限制。在某些方面,术语“约”是指在所陈述的参考值的任一方向(大于或小于)上落于20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小以内的值的范围,除非另有陈述或从上下文明显可见(除非该数字将超过可能值的100%)。或者,根据本领域的实践,“约”可以是指3个或3个以上的标准偏差以内。或者,例如对于生物系统或过程而言,术语“约”可以是指值的一个数量级以内,优选地在5倍以内,更优选地在2倍以内。

[0034] 本文所使用的“氨基酸”是指天然存在的和非天然合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸。在本文中,氨基酸可以用其通常已知的三字母符号或IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来指称。氨基酸包括侧链和多肽骨架部分。

[0035] 本文所使用的术语“抗体”统称免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子,包括例如但不限于IgA、IgD、IgE、IgG和IgM及其组合,以及在任何脊椎动物中(例如在哺乳动物如人、山羊、兔和小鼠中)和非哺乳动物物种中(例如鲨鱼免疫球蛋白)在免疫应答期间产生的类似分子。术语“抗体”包括完整免疫球蛋白和“抗体片段”或“抗原结合片段”,它们与感兴趣的分子(或一组高度相似的感兴趣分子)特异性结合,基本上排除了与其他分子的结合(例如,对感兴趣分子的结合常数比对生物样品中其他分子的结合常数大至少 10^3M^{-1} 、 10^4M^{-1} 或至少 10^5M^{-1} 的抗体和抗体片段)。术语“抗体”还包括遗传工程改造的形式,例如嵌合抗体(例如人源化鼠类抗体)、异源偶联抗体(例如双特异性抗体)。也参见Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.);Kuby,J.,Immunology,第3版,W.H.Freeman&Co.,New York,1997。更具体而言,“抗体”是指多肽配体,其至少包含特异性识别并结合抗原表位的轻链或重链免疫球蛋白可变区。抗体由重链和轻链组成,每条链都具有可变区,被称为重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区。所述VH区和VL区共同负责结合被所述抗体识别的抗原。

[0036] 通常,免疫球蛋白具有通过二硫键相连的重(H)链和轻(L)链。轻链有两种类型,lambda(λ)和kappa(κ)。重链有五种主要类别(或同种型),它们决定了抗体分子的功能活性:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每条重链和轻链都含有恒定区和可变区(所述区也被称为“结构域”)。在组合时,所述重链和轻链可变区特异性结合抗原。轻链和重链可变区含有被三个高变区(也被称为“互补决定区”或“CDR”)中断的“构架”区。构架区和CDR的范围已经被定义(参见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,1991,其通过引用并入本文)。Kabat数据库现在保持在线。在一个物种内不同轻链或重链的构架区序列是相对保守的。抗体的构架区(即组成的轻链和重链的组合构架区)在很大程度上采用 β -折叠构象,并且CDR形成连接所述 β -折叠结构的环,在某些情况下形成所述 β -折叠结构的一部分。因此,构架区起到形成支架的作用,所述支架通过链间非共价相互作用将CDR定位在正确方向上。CDR主要负责与抗原的表位结合。每条链的CDR通常被称为CDR1、CDR2和CDR3,从N-端开始按顺序编号,并且通常还由特定CDR所位于的链来识别。因此,VH CDR3位于它存在于其中的抗体的重链的可变结构域中,而VL CDR1是来自它存在于其中的抗体的轻链的可变结构域的CDR1。结合病理性TDP-43的抗体将具有特定VH区和VL区序列,从而具有特定CDR序列。具有不同特异性(即不同抗原的不

同结合部位)的抗体具有不同的CDR。尽管CDR因抗体而异,但CDR内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。CDR内的这些位置被称为特异性决定残基(SDR)。

[0037] 术语“抗体”还打算涵盖其消化片段、指定部分、衍生物和变体,包括抗体模拟物或包含模拟抗体或其指定片段或部分的结构和/或功能的抗体部分,包括单链抗体及其片段。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括Fab片段,其是由VL、VH、CL和CH结构域组成的单价片段;F(ab')₂片段,其是包含在铰链区处通过二硫键相连的两个Fab片段的二价片段;F_d片段,其由VH和CH结构域组成;F_v片段,其由抗体的单臂的VL和VH结构域组成;dAb片段(Ward等,(1989)Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;和分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管F_v片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但它们可以使用重组方法通过合成接头联结,从而使它们能够被制造成单个蛋白链,其中VL和VH区配对形成单价分子(被称为单链F_v(scF_v))。Bird等,(1988)Science 242:423-426和Huston等,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883。单链抗体也打算被涵盖在术语“抗体片段”中。任何上述抗体片段均使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且以与完整抗体相同的方式筛选所述片段的结合特异性和中和活性。

[0038] “抗体片段”或“抗原结合片段”包括蛋白水解抗体片段(例如本领域中已知的F(ab')₂片段、Fab'片段、Fab'-SH片段和Fab片段)、重组抗体片段(例如本领域中已知的sF_v片段、dsF_v片段、双特异性sF_v片段、双特异性dsF_v片段、F(ab')₂片段、单链F_v蛋白(“scF_v”)、二硫键稳定的F_v蛋白质(“dsF_v”)、双体抗体和三体抗体)和骆驼抗体(参见例如美国专利第6,015,695、6,005,079、5,874,541、5,840,526、5,800,988和5,759,808号)。scF_v蛋白是一种融合蛋白,其中将免疫球蛋白的轻链可变区和免疫球蛋白的重链可变区通过接头相连,而在dsF_v中,所述链已被突变以引入二硫键来稳定链的结合。

[0039] 本文所使用的术语“抗体衍生物”旨在涵盖结合本文所定义的表位,并且是本公开的分离的病理性TDP-43结合抗体的修饰或衍生物分子。衍生物包括但不限于例如双特异性、异特异性、三特异性、四特异性、多特异性抗体、双体抗体、嵌合抗体、重组抗体和人源化抗体。本文所使用的术语“双特异性分子”旨在包括具有两种不同结合特异性的任何试剂,例如蛋白质、肽或蛋白质或肽复合物。本文所使用的术语“多特异性分子”或“异特异性分子”旨在包括具有超过两种不同结合特异性的任何试剂,例如蛋白质、肽或蛋白质或肽复合物。本文所使用的术语“异抗体”是指连接在一起的两种或更多种抗体、抗体结合片段(例如Fab)、其衍生物或抗原结合区,其中至少两种具有不同的特异性。

[0040] 术语“抗体变体”旨在包括在兔以外的物种中产生的抗体。它还包括含有对抗体或片段的线性多肽序列的翻译后修饰的抗体。它进一步涵盖全人抗体。

[0041] 本文所使用的术语“抗原”是指可以被特异性体液或细胞免疫的产物(例如抗体分子或T细胞受体)特异性结合的化合物、组合物或物质。抗原可以是任何类型的分子,包括例如半抗原、简单中间代谢产物、糖(例如寡糖)、脂质和激素,以及大分子例如复杂碳水化合物(例如多糖)、磷脂、肽、寡肽、多肽和蛋白质。常见的抗原类别包括但不限于病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物和其他寄生虫抗原、参与神经疾病的抗原、肿瘤抗原、参与自身免疫性疾病、过敏和移植物排斥的抗原、毒素和其他各种各样的抗原。

[0042] 本文所使用的“测定法”或“诊断测定法”可以是应用于诊断领域的任何类型的测定法。此类测定法可以基于待检测的分析物与具有一定亲和力的一个或多个捕获探针的结

合。

[0043] 本文所使用的“结合亲和力”是指一个分子与另一个分子结合(通常是非共价结合)的倾向性,例如特定结合对的一个成员对特定结合对的另一个成员的倾向性。结合亲和力可以被测量为结合常数,其中特定结合对(例如抗体/抗原对)的结合亲和力可以是至少 1×10^{-5} M、至少 1×10^{-6} M、至少 1×10^{-7} M、至少 1×10^{-8} M、至少 1×10^{-9} M、至少 1×10^{-10} M、至少 1×10^{-11} M或至少 1×10^{-12} M。结合亲和力可以通过由Frankel等,Mol. Immunol., 16:101-106, 1979描述的Scatchard方法的改良或通过抗原/抗体解离速率来计算。高结合亲和力可以通过竞争放射免疫测定法来测量。抗体/抗原对的高结合亲和力可以是至少约 1×10^{-8} M、至少约 1.5×10^{-8} M、至少约 2.0×10^{-8} M、至少约 2.5×10^{-8} M、至少约 3.0×10^{-8} M、至少约 3.5×10^{-8} M、至少约 4.0×10^{-8} M、至少约 4.5×10^{-8} M或至少约 5.0×10^{-8} M。

[0044] 本文所使用的“结合区”是指抗原、特别是抗原性蛋白(例如TDP-43)的靶区域内被本文描述的抗体识别和结合的区域。

[0045] 本文所使用的术语“其生物等效物”当指称参比蛋白质、抗体、多肽、多核苷酸或核酸时,旨在与“其等效物”同义,并且意指具有最小同源性同时仍保持所需结构或功能的那些等效物。除非本文特别叙述,否则设想了本文提及的任何核酸、多核苷酸、多肽、蛋白质或抗体也包括其等效物。例如,等效物意指具有至少约80%的同源性或同一性、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或98%的百分同源性或同一性,并且表现出与参比蛋白质、多肽、抗体或核酸基本上等同的生物活性。在一个方面,术语抗体的“等效物”或“生物等效物”是指通过ELISA、IHC或其他适合的方法测量的抗体选择性结合其表位蛋白或其片段的能力。生物等效抗体包括但不限于与参比抗体结合相同表位的那些抗体、肽、抗体片段、抗体变体、抗体衍生物和抗体模拟物。本领域技术人员可以通过使用定点突变将适合的突变引入到抗体中来制备功能上等效于本公开的抗体的抗体(Hashimoto-Gotoh, T.等, Gene 152, 271-275(1995); Zoller&Smith, Methods Enzymol. 100, 468-500(1983); Kramer, W.等, Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456(1984); Kramer W. & Fritz H J., Methods. Enzymol. 154, 350-367(1987); Kunkel, T A., Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492(1985); 和Kunkel, Methods Enzymol. 85, 2763-2766(1988))。在功能上等效于本公开的抗体并且包含在本公开的抗体的氨基酸序列中包含一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列的抗体,也包括在本公开的抗体中。在此类突变体中,突变的氨基酸的数量通常可以是50个氨基酸或更少,优选为30个或更少,更优选为10个或更少(例如5个氨基酸或更少)。氨基酸残基可以被突变成保留氨基酸侧链性质的残基。例如,根据其侧链性质,氨基酸被分类为:疏水性氨基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y和V);亲水性氨基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S和T);具有脂族侧链的氨基酸(G、A、V、L、I和P);具有含羟基侧链的氨基酸(S、T和Y);具有含硫原子侧链的氨基酸(C和M);具有含羧酸和酰胺侧链的氨基酸(D、N、E和Q);含有碱的侧链(R、K和H);和具有含芳香族侧链的氨基酸(H、F、Y和W)。

[0046] 本文所使用的术语“嵌合抗体”是指一种抗体,其中使用重组DNA技术将来自一个物种的单克隆抗体的Fc恒定区(例如小鼠Fc恒定区)替换为来自另一物种的抗体的Fc恒定区(例如人Fc恒定区)。总的来说参见Robinson等,PCT/US86/02269; Akira等,欧洲专利申请184,187; Taniguchi, 欧洲专利申请171,496; Morrison等,欧洲专利申请173,494; Neuberger等,WO 86/01533; Cabilly等,美国专利第4,816,567号; Cabilly等,欧洲专利申

请125,023;Better等,Science 240:1041-1043,1988;Liu等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:3439-3443,1987;Liu等,J.Immunol.139:3521-3526,1987;Sun等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:214-218,1987;Nishimura等,Cancer Res 47:999-1005,1987;Wood等,Nature 314:446-449,1985;和Shaw等,J.Natl.Cancer Inst.80:1553-1559,1988。例如,靶结合区或位点可以来自非人来源(例如小鼠或灵长类动物),并且恒定区可以是人类的。

[0047] 术语“对照”、“参比水平”和“参比”在本文中可互换使用。参比水平可以是预定的值或范围,其被用作评估测量结果的基准。本文所使用的“对照组”是指一组对照受试者或细胞。对照可以是没有本文详述的合成肽模拟物的受试者或细胞。对照可以是疾病状态已知的受试者或来自其的样品。受试者或来自其的样品可能是健康的、患病的、在治疗前患病的、在治疗期间患病的或在治疗后患病的,或其组合。

[0048] 本文所使用的术语“可检测标记物”是指可以产生可检测(例如视觉、电子或其他)信号的分子或材料,所述信号指示样品中所述标记物的存在和/或浓度。当与特异性结合分子偶联时,所述可检测标记物可用于定位和/或量化所述特异性结合分子被导向的靶。由此,可以通过检测由所述可检测标记物产生的信号来检测样品中所述靶的存在和/或浓度。可检测标记物可以被直接或间接检测,并且与不同的特异性结合分子偶联的几种不同的可检测标记物可以被组合用于检测一个或多个靶。例如,与特异性针对靶的抗体偶联的第一可检测标记物可以通过使用与特异性结合所述第一可检测标记物的分子偶联的第二可检测标记物来间接检测。可以将多个可以单独检测的可检测标记物与特异性结合不同靶的不同特异性结合分子偶联,以提供可以同时检测样品中的多个靶的多重测定法。可检测信号可以通过任何机制产生,包括光子的吸收、发射和/或散射(包括射频、微波频率、红外频率、可见光频率和紫外频率光子)。可检测标记物包括有色、荧光、磷光和发光分子和材料,将一种物质转化为另一种物质以提供可检测差异(例如通过将无色物质转变成成为有色物质或正好相反,或通过产生沉淀物或增加样品浊度)的催化剂(例如酶),可以使用额外的可检测标记的抗体偶联物通过抗体-半抗原结合相互作用检测的半抗原,以及顺磁性和磁性分子或材料。可检测标记物的具体实例包括酶,例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶或 β -葡萄糖醛酸酶;荧光团例如荧光素、发光体、香豆素、BODIPY染料、试卤灵和罗丹明(荧光分子的许多附加实例可以在《手册——荧光探针和标记技术指南》(The Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies), Molecular Probes, Eugene, Oreg. 中找到);纳米粒子,例如量子点(例如从QuantumDot Corp、Invitrogen Nanocrystal Technologies, Hayward, Calif. 获得;也参见美国专利第6,815,064、6,682,596和6,649,138号,每个所述专利通过引用并入本文);金属螯合物,例如放射活性或顺磁性金属离子如 Gd^{3+} 的DOTA和DPTA螯合物;以及脂质体,例如含有捕获的荧光分子的脂质体。在可检测标记物包括酶的情况下,可检测底物例如色原、产荧光化合物或发光化合物可以与所述酶组合使用以产生可检测信号(多种此类化合物是可商购的,例如从Invitrogen Corporation, Eugene, Oreg.)。生色化合物的具体实例包括二氨基联苯胺(DAB)、4-硝基苯基磷酸酯(pNPP)、固红、溴代氯代吲哚基磷酸酯(BCIP)、硝基蓝四氮唑(NBT)、BCIP/NBT、固红、AP橙、AP蓝、四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-连氨基-二-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸酯](ABTS)、邻联茴香胺、4-氯萘酚(4-CN)、硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)、

邻苯二胺(OPD)、5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -吡喃半乳糖苷(X-Gal)、甲基伞形基- β -D-吡喃半乳糖苷(MU-Gal)、对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷(PNP)、5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -D-葡萄糖醛酸苷(X-Gluc)、3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)、品红、碘硝基四唑(INT)、四唑蓝和四唑紫。或者,可以在金相检测方案中使用酶。金相检测方法包括使用酶例如碱性磷酸酶与水溶性金属离子和所述酶的氧化还原非活性底物的组合。所述底物被所述酶转化为氧化还原活性试剂,并且所述氧化还原活性试剂还原所述金属离子,使其形成可检测的沉淀物(参见例如美国专利第7,642,064号、PCT公开第2005/003777号和美国专利申请公开第2004/0265922号;其每一者都通过引用并入本文)。金相检测方法包括使用氧化还原酶(例如辣根过氧化物酶)以及水溶性金属离子、氧化剂和还原剂,同样形成可检测的沉淀物(参见例如美国专利第6,670,113号,其通过引用并入本文)。

[0049] 本文所使用的“表位”或“抗原决定簇”是指分子上与抗体结合的特定化学基团或连续或不连续的肽序列。抗体可以与特定的抗原性表位结合。表位通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或糖侧链组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于,在变性溶剂存在下,与前者而不是后者的结合丧失。表位可能是错误折叠的蛋白质所特有的。表位可能存在于错误折叠的蛋白质中,而不存在于所述蛋白质的天然或正常构象中。在一个实施方式中,本文所描述的抗体或其片段可以识别错误折叠的或病理性TDP-43中的表位,而不识别天然或正常或非病理性TDP-43中的表位。

[0050] 本文所使用的“同源性”或“相同的”、百分“同一性”或“相似性”,当在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中使用时,是指两个或更多个序列或子序列(例如编码本文描述的抗体的核苷酸序列或本文描述的抗体的氨基酸序列)在特定区域内是相同的,或具有指定百分率的相同的核苷酸或氨基酸残基,例如至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性。同源性可以通过比较每个序列中可以为比较目的而对齐的位置来确定。当所比较的序列中的一个位置被相同的碱基或氨基酸占据时,所述分子在该位置处是同源的。序列之间的同源性程度是序列共享的匹配或同源位置的数量的函数。比对和百分同源性或序列同一性可以使用本领域中已知的软件程序来确定,例如在《分子生物学现代方法》(Current Protocols in Molecular Biology)(Ausubel等主编,1987),附录30,第7.7.18节,表7.7.1中描述的那些程序。可以使用默认参数进行比对。例如,比对程序是BLAST,使用默认参数。具体而言,优选的程序是BLASTN和BLASTP。术语“同源性”、“相同的”、百分“同一性”或“相似性”也指称或者可以应用于测试序列的互补体。所述术语还包括具有缺失和/或添加的序列,以及具有替换的序列。正如本文所描述的,所述优选算法可以考虑空位等。优选地,同一性存在于长度为至少约25个氨基酸或核苷酸的区域上,或存在于长度为至少50-100个氨基酸或核苷酸的区域上。“不相关”或“非同源”序列与本公开的序列之一具有小于40%的同一性或小于25%的同一性。

[0051] 本文所使用的术语“单克隆抗体”或“MAb”是指由B淋巴细胞的单个克隆或由其中已转染有单个抗体的轻链和重链基因的细胞产生的抗体。单克隆抗体通过本领域技术人员已知的方法来产生,例如通过从骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合体(即“杂交瘤”)制备形成杂交抗体的细胞。单克隆抗体包括人源化单克隆抗体。

[0052] 本文所使用的“神经变性疾病”是指由对活动性、协调性、力量、感觉和认知至关重要的神经元和神经系统连接的渐进性损伤引起的一组病症。具体而言,所述神经变性疾病可以是额颞叶变性(FTLD)。“FTLD”是指一组基于神经病理学的障碍,这些障碍导致大脑额叶和颞叶的损伤和功能障碍。FTLD可以导致许多可能的症状,包括但不限于异常行为、情绪问题、沟通困难、工作困难、行走困难或其组合。阿兹海默氏病(AD)是另一种神经变性障碍,是一种影响记忆、思维和语言的大脑渐进性退化的病症。阿兹海默氏病的退行性变化导致大脑中的斑块或斑以及神经纤维的缠结(神经原纤维缠结)。记忆丧失和行为改变作为大脑组织的这些变化的结果而发生。与FTLD相反,AD通常是一种进展缓慢的疾病,在中年发生,但在65岁以上的年龄变得越来越常见。短期记忆困难通常是AD的第一症状,早期行为变化可能不会被注意到。随着疾病的发展,记忆丧失增加,性格、情绪和行为也会发生变化。判断力和注意力的紊乱以及混乱和躁动都会发生。精神变化的类型、严重程度、顺序和进展各不相同。尽管偶尔疾病会迅速发展,但长时间几乎没有变化是很常见的。阿兹海默氏病通常影响大脑的大部分,而FTLD主要影响大脑的额叶和颞叶。

[0053] 本文所使用的“病理性”或“病理的”属于疾病或由疾病引起。病理性蛋白例如病理性TDP-43可以被磷酸化,对磷酸酶敏感,具有与正常或非病理性或健康蛋白不同的构象,被错误折叠,积累并形成核内和细胞质聚集体。

[0054] “肽”或“多肽”是通过肽键相连的两个或更多个氨基酸的连接序列。多肽可以是天然的、合成的多肽,或者天然和合成多肽的修饰或组合。肽和多肽包括蛋白质,例如结合蛋白、受体和抗体。术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”在本文中可互换使用。“一级结构”是指特定肽的氨基酸序列。“二级结构”是指多肽内局部有序的三维结构。蛋白质中的某些结构通常被称为结构域,例如酶结构域、细胞外结构域、跨膜结构域、孔结构域和胞质尾部结构域。“结构域”是多肽的形成所述多肽的紧凑单元的部分,通常长为15至350个氨基酸。示例性结构域包括具有酶活性或配体结合活性的结构域。典型的结构域由组织化程度较低的部分例如 β -折叠和 α -螺旋的区段组成。“三级结构”是指多肽单体的完整三维结构。“四级结构”是指由独立的三级单元的非共价缔合形成的三维结构。“基序”是多肽序列的一部分,并包括至少两个氨基酸。基序的长度可以是2至20个、2至15个或2至10个氨基酸。基序可以包括3、4、5、6或7个连续的氨基酸。结构域可以由一系列相同类型的基序组成。

[0055] “蛋白质病”是指例如由细胞或组织中蛋白质的异常合成、折叠、翻译后修饰或沉积引起的任何疾病或病症。本文所使用的蛋白质病包括病理性蛋白质例如病理性TDP-43,其可以呈现TDP-43蛋白在其天然构象下不存在的表位。

[0056] 本文所使用的“样品”或“测试样品”可以是指将要在其中检测或测定靶的存在和/或水平的任何样品,或包含本文详述的抗体或其组分的任何样品。样品可以包括液体、溶液、乳液或悬液。样品可以包括医学样品。样品可以包括任何生物流体或组织,例如血液、全血、血液级分例如血浆和血清、肌肉、间质液、汗液、唾液、尿液、泪液、滑液、骨髓、脑脊液、鼻腔分泌物、痰液、羊水、支气管肺泡灌洗液、胃灌洗液、呕吐物、粪便、肺组织、外周血单核细胞、总白细胞、淋巴结细胞、脾细胞、扁桃体细胞、癌细胞、肿瘤细胞、胆汁、消化液、皮肤或其组合。在某些实施方式中,样品包括较大样品的等分试样。在其他实施方式中,样品包括生物流体。样品可以通过本领域中已知的任何手段获得。样品可以在从患者获得后直接使用,也可以进行预处理,例如通过过滤、蒸馏、提取、浓缩、离心、灭活干扰组分、添加试剂等,以

本文讨论的或本领域中已知的某些方式改变所述样品的特性。

[0057] 对于诊断和/或预后测试而言,本文中使用的“灵敏度”和“特异性”不仅依赖于所述测试的分析“质量”,还依赖于构成异常结果的定义。在实践中,通常通过将变量的值针对其在“正常”(即没有特定障碍或病症的表观健康个体)和“疾病”群体中的相对频率作图,来计算受试者工作特征曲线(ROC曲线)。对于任何特定标志物而言,患有和不患有疾病的受试者的标志物水平的分布都可能重叠。在此类情况下,测试不能100%准确地绝对区分正常情况和疾病情况,并且重叠区域指示测试无法区分正常与疾病的部分。选择一个阈值,低于所述阈值测试被认为是异常的,高于所述阈值测试被认为是正常的,反之亦然。ROC曲线下面积是感知到的测量允许正确鉴定病症的概率的度量。即使在测试结果不一定给出准确数字时,也可以使用ROC曲线。只要能够对结果进行排序,就可以创建ROC曲线。例如,对“疾病”样品的测试结果可以根据程度进行排序(例如1=低,2=正常,3=高)。可以将这个排序与“正常”群体中的结果相关联,并创建ROC曲线。这些方法在本领域中是公知的。参见例如Hanley等,1982,Radiology143:29-36。例如,可以选择阈值以提供大于约0.5、约0.7、约0.8、约0.85或约0.9的ROC曲线面积。

[0058] 在本文中可互换使用的“受试者”和“患者”是指任何脊椎动物,包括但不限于想要或需要本文描述的组合物或方法的哺乳动物。受试者可以是人类或非人类。受试者可以是脊椎动物。受试者可以是哺乳动物。哺乳动物可以是灵长类动物或非灵长类动物。哺乳动物可以是非灵长类动物,例如奶牛、猪、骆驼、美洲驼、刺猬、食蚁兽、鸭嘴兽、象、羊驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠和小鼠。哺乳动物可以是灵长类动物,例如人类。哺乳动物可以是非人灵长类动物,例如猴、食蟹猴、恒河猴、黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩和长臂猿。受试者可以是任何年龄或发育阶段,例如成年、青少年或婴儿。受试者可以是雄性或雌性。在某些实施方式中,受试者具有特定的遗传标志物。受试者可能正在接受正在诊断的疾病或病症或另一种疾病或病症的治疗或其他形式的治疗。

[0059] “治疗”当指称保护受试者免受疾病侵袭时,是指抑制、阻遏、逆转、减轻、改善或抑制疾病进展,或完全消除疾病。治疗可以以急性或慢性方式进行。所述术语还指在患病之前降低疾病或与该疾病相关的症状的严重程度。预防疾病可以包括诊断疾病并在疾病发作之前向受试者给药治疗组合物。抑制疾病包括在疾病诱导后但在其临床出现之前向受试者给药治疗组合物。阻遏或改善疾病包括在疾病临床出现后向受试者给药治疗组合物。

[0060] “变体”是指氨基酸序列因氨基酸的插入、缺失或保守替换而不同,但至少保留一种生物活性的肽或多肽。变体也可以是指氨基酸序列与具有保留至少一种生物活性的氨基酸序列的参比蛋白质基本上相同的蛋白质。“生物活性”的代表性实例包括与特异性抗体或多肽结合或促进特定反应的能力。变体可以是指其功能片段。变体也可以是指多肽的多个拷贝。所述多个拷贝可以串联,也可以被接头分隔。氨基酸的保守替换例如将氨基酸用具有相似性质(例如亲水性、带电荷区域的程度和分布)的不同氨基酸取代,在本领域中被认为通常涉及微小的变化。如本领域中所理解的,这些微小的变化可以部分地通过考虑氨基酸的亲水指数来识别(Kyte等,J.Mol.Biol.1982,157,105-132)。氨基酸的亲水指数是基于其疏水性和电荷的考虑。本领域中已知具有相似亲水指数的氨基酸可以被替换并仍保留蛋白质功能。在一个方面,具有 ± 2 的亲水指数的氨基酸被替换。氨基酸的亲水性也可用于揭示将导致蛋白质保留生物功能的替换。在肽的背景下考虑氨基酸的亲水性允许计算该肽的最

大局部平均亲水性。可以使用亲水性值在彼此的 ± 2 以内的氨基酸进行替换。氨基酸的疏水性指数和亲水性值两者都受到该氨基酸的特定侧链的影响。与该观察结果相一致,与生物功能相容的氨基酸替换被理解为取决于氨基酸、特别是那些氨基酸的侧链的相对相似性,正如由疏水性、亲水性、电荷、大小和其他性质所揭示的。

[0061] 除非在本文中另有定义,否则与本公开相关联使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。例如,与诊断相关联使用的任何命名法和诊断技术,包括本文所描述的医学或临床诊断、细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交,均为本领域中公知和常用的命名法和技术。术语的含义和范围应当是清晰的;然而,在存在任何潜在歧义的情况下,本文提供的定义优先于任何词典或外在定义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。

[0062] 2. 抗体及其抗原结合片段

[0063] 本文提供了抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中所述重链和轻链免疫球蛋白可变结构域序列形成与TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的至少一部分结合的抗原结合位点。

[0064] 本文还提供了抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中所述重链和轻链免疫球蛋白可变结构域序列形成与SEQ ID NO:2的氨基酸序列的至少一部分结合的抗原结合位点。

[0065] 本文还提供了抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列。所述免疫球蛋白HC可变结构域序列可以包含:HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:20的氨基酸序列;HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:21的氨基酸序列;和HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:22的氨基酸序列。所述免疫球蛋白LC可变结构域序列可以包含:LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:24的氨基酸序列;LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:25的氨基酸序列;和LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:26的氨基酸序列。所述免疫球蛋白HC可变结构域序列可以包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:19的氨基酸序列。所述免疫球蛋白LC可变结构域序列可以包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:23的氨基酸序列。

[0066] 本文所描述的抗体可以是全长抗体。本文所描述的抗体可以是单克隆抗体。本文描述的抗体可以包含Fc结构域。本文描述的抗体可以是兔抗体、人抗体或人源化抗体,或者在人类中是非免疫原性的。本文所描述的抗体可以是Fab、F(ab)'₂、Fab'、scF_v或F_v。本文描述的抗体或其片段的CDR中的一个或多个氨基酸残基可以用另一个氨基酸替换。在作为同一氨基酸家族内的替换的意义上,所述替换可以是保守的。

[0067] 3. 免疫测定法

[0068] 本文还提供了免疫测定法,其包含上述抗体或其抗原结合片段中的一者或多者。在某些实施方式中,所述免疫测定法可以包含本文所描述的抗体或其抗原结合片段中的一者或多者。所述免疫测定法可以是夹心免疫测定法,其中所述免疫测定法包含两种本文所描述的抗体或其抗原结合片段,其中一种抗体或其抗原结合片段是捕获抗体并且第二种抗

体或其抗原结合片段是检测抗体,以形成免疫复合物。本文所描述的免疫测定法可以是放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)、酶联免疫测定(ELISA)、免疫组织化学(IHC)、中尺度发现(MSD)生物标志物测定(MesoScale, Inc., Rockville, Maryland)、Western印迹、流式细胞术、计数免疫测定(CIA)、荧光免疫测定(FIA)、化学发光免疫测定(CLIA)、基于Luminex的珠子阵列(Luminex, Corp., Austin, TX)、蛋白质微阵列测定或快速测试格式例如免疫层析试条测试。

[0069] 所述免疫测定法可以是均质或非均质测定法、竞争性和非竞争性测定法。具体而言,所述免疫测定法可以采取夹心测定法的形式,其是一种非竞争性免疫测定法,其中将待检测和/或定量的分子与第一抗体和第二抗体结合。所述第一抗体可以被结合到固相,例如珠子、孔或其他容器的表面、片或条,并且所述第二抗体是例如用染料、放射性同位素或反应性或催化性活性部分标记的抗体,反之亦然。然后通过适合的方法测量与所述分析物结合的标记的抗体的量。与“夹心测定法”相关的通用组合物和程序是确立已久的,并且是专业技术人员已知的(《免疫测定法手册》(The Immunoassay Handbook), David Wild主编, Elsevier LTD, Oxford; 第3版(May 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C等, Curr Opin Chem Biol. 2006 February; 10(1): 4-10. PMID: 16376134, 通过引用并入本文)。

[0070] 例如,所述免疫测定法可以包含两种本文所描述的抗体,两者均作为分散体存在于液体反应混合物中,或者其中一种抗体(例如所述第一抗体)可以被标记,另一种抗体(例如所述第二抗体)可以被结合到固相或可以被选择性结合到固相,其中第一标记组分被附连到所述第一抗体,其中所述第一标记组分是基于荧光-或化学发光-猝灭或扩增的标记系统的一部分,并且所述标记系统的第二标记组分被附连到第二抗体,使得在两种捕获分子与分析物结合后产生可测量的信号,其允许检测在包含所述样品的溶液中形成的夹心复合物。

[0071] 基于荧光的测定法可以包括染料的使用,所述染料可以选自FAM(5-或6-羧基荧光素)、VIC、NED、荧光素、荧光素异硫氰酸酯(FITC)、IRD-700/800、花青染料例如CY3、CYS、CY3.5、CY5.5、Cy7、咕吨、6-羧基-2',4',7',4,7-六氯荧光素(HEX)、TET、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(JOE)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、5-羧基罗丹明-6G(R6G5)、6-羧基罗丹明6G(RG6)、罗丹明、罗丹明绿、罗丹明红、罗丹明110、BODIPY染料例如BODIPY TMR、俄勒冈绿、香豆素类例如伞形酮、苯甲酰亚胺类例如Hoechst 33258; 菲啶类,例如德克萨斯红、Yakima黄、Alexa Fluor、PET、溴化乙锭、吖啶染料、吡啶染料、吩噻嗪染料、卟啉染料、聚甲川染料等。

[0072] 基于化学发光的测定法可以包括染料的使用,所述染料基于在通过引用并入本文的Kirk Othmer,《化学技术百科全书》(Encyclopedia of chemical technology),第4版, J.I. Kroschwitz执行主编, M Howe-Grant主编, John Wiley & Sons, 1993, vol. 15, p. 518-562 (包括第551-562页上的引用)中为化学发光材料描述的物理原理。化学发光染料可以包括吖啶酯、二氧杂环丁烷或鲁米诺。

[0073] 4. 方法

[0074] a. 检测生物样品中的TDP-43的方法

[0075] TDP-43由414个氨基酸组成,并作为一种非均质细胞核核糖核蛋白发挥作用。TDP-43的识别结构域包括两个高度保守的RNA识别基序和一个富含甘氨酸的C-端结构域。在正

常条件下,TDP-43主要定位于细胞核,并具有调控基因转录和mRNA剪接的功能。在FTLD-TDP病例中,TDP-43改变构象,错误折叠,并在核内和细胞质聚集体中积累。这些聚集体导致细胞核TDP-43功能的丧失,并且本身是有毒的。根据这些TDP-43聚集体的分布和相对丰度,FTLD-TDP可以被进一步分为四种不同的组织病理学类型,即A-D。TDP-43聚集体主要由病理性TDP-43蛋白组成:主要是45kDa的磷酸化全长TDP-43和25kDa的C-端片段。值得注意的是,TDP-43的全长和C-端片段两者都对磷酸酶敏感,表明与疾病相关的过度磷酸化。TDP-43的磷酸化位点主要位于所述蛋白的富含甘氨酸的C-端结构域中。

[0076] 血浆中的病理性TDP-43可用作FTLD的生物标志物。开发FTLD的生物标志物的一种有前途的方法是量化患者的生物流体例如CSF和血浆中存在的疾病特异性生物化学标志物。脑源性病理性TDP-43是FTLD的生物标志物的最佳候选物之一。然而,使病理性TDP-43成为稳健的生物标志物必须克服几个障碍,包括:测量脑脊液(CSF)和血浆样品中的病理性TDP-43是一项挑战,因为它们也含有正常的TDP-43;血浆中的脑源性病理性TDP-43水平低,因为脑与血液之间的蛋白质交换通过血脑屏障受到高度调节;由于CSF区室与脑直接接触,CSF中的病理性TDP-43水平可能略高;目前没有特异性针对病理形式的TDP-43的抗体;为了测量患者生物流体中的病理性TDP-43,几乎所有报道的研究都使用了与TDP-43的C-端处的磷酸化表位结合的抗体,而此类抗体可能通过磷酸化表位的非特异性结合而检测病理性TDP-43的两种形式(即全长和C-端片段)以及非病理性核TDP-43。为了解决这些障碍,本文描述的抗体对病理形式的TDP-43高度灵敏且特异,并且本文描述的免疫测定法对检测脑源性病理性TDP-43高度灵敏且定量,同时限制了从受试者获得的生物流体中正常TDP-43信号的贡献。

[0077] 本文提供了检测生物样品中的TDP-43的方法。所述方法可以包括将样品与本文所描述的抗体或其抗原结合片段接触。所述方法可以进一步包括将所述生物样品与本文所描述的第二抗体或其抗原结合片段接触。所述TDP-43可以是病理性TDP-43、错误折叠的TDP-43或其组合。所述样品可以包括细胞、组织样品或生物流体。所述样品可以是血浆、血清或CSF样品。所述样品可以从被诊断为患有、疑似患有神经变性疾病或具有患有或发生神经变性疾病的风险的受试者获得。所述神经变性疾病可以是额颞叶变性(FTLD)或额颞叶痴呆(FTD)。检测TDP-43可以包括本文所描述的免疫测定法。

[0078] b. 诊断神经变性疾病的方法

[0079] 本文提供了在受试者中诊断神经变性疾病的方法。所述方法可以包括如本文所述检测来自所述受试者的生物样品中TDP-43的存在。所述神经变性疾病可以是额颞叶变性(FTLD)或额颞叶痴呆(FTD)。c. 选择是否将受试者纳入具有TAR DNA结合蛋白43包含物的额颞叶变性(FTLD-TDP)的临床试验的方法

[0080] 本文提供了选择是否将受试者纳入FTLD-TDP的临床试验的方法。所述方法可以包括测量来自所述受试者的样品中TDP-43的表达水平,其中所述测量可以包括将所述样品与一种或多种本文所描述的抗体或其抗原结合片段接触。所述方法可以进一步包括将所述TDP-43的表达水平与阈值表达水平进行比较。如果所述TDP-43的表达水平高于所述阈值表达水平,则可以选择所述受试者进行所述临床试验。如果所述TDP-43的表达水平低于所述阈值表达水平,则不选择所述受试者进行所述临床试验。

[0081] 5. 试剂盒

[0082] 本文提供了一种免疫测定试剂盒,其可用于选择性检测生物样品中的TDP-43。所述试剂盒可以包含用于本文所描述的任何方法的本文所描述的一种或多种抗体或其片段或本文所描述的包含它们的免疫测定法、检测试剂和使用所述试剂盒的说明书。所述试剂盒可以进一步包含用于所述抗体或其抗原结合片段的固相支持物。所述试剂盒还可以包含检测工具。

[0083] 试剂盒中包含的说明书可以贴在包装材料上,也可以作为包装内页包含。尽管说明书通常写在印刷材料上,但它们不限于此。本公开设想了能够存储此类说明书并将它们传达给最终用户的任何介质。此类介质包括但不限于电子存储介质(例如磁盘、磁带、盒式磁带、芯片)、光学介质(例如CD ROM)等。本文所使用的术语“说明书”还可以包括提供所述说明书的互联网站点的地址。

[0084] 6. 实施例

[0085] 通过参考下述实施例可以更好地理解上述内容,呈现这些实施例仅用于说明的目的,并不旨在限制本发明的范围。正如下面的非限制性实施例所示,本公开具有多个方面和实施方式。

[0086] 实施例1

[0087] 材料和方法

[0088] 受试者。本研究将包括来自神经病理学证实的FTLD-TDP、FTLD-tau和AD患者以及正常老年个体的血浆(每组n=50)和CSF(每组n=30)样品。所述血浆和CSF样品来自西北大学、匹兹堡大学和宾夕法尼亚大学的阿兹海默氏病中心(ADC)的大脑库。表1中列出了入选和排除标准。

[0089] 表1. 入选和排除标准

[0090]

组	入选标准	排除标准
FTLD-TDP	受试者符合 FTLD-TDP 的病理学诊断指南（Mackenzie 等， <i>Acta Neuropathol.</i> 2009;117(1):15-8；Cairns 等， <i>Acta Neuropathol.</i> 2007;114(1):5-22；Mackenzie 等， <i>Acta Neuropathol.</i> 2010;119(1):1-4；McKhann 等， <i>Arch Neurol.</i> 2001;58(11):1803-9）。	下述任一项： 1. 受试者符合 2012 年美国国家老龄化和阿兹海默氏病协会（NIA-AA）关于中度或高度 AD 神经病理学变化的诊断指南（Hyman 等， <i>Alzheimers Dement.</i> 2012;8(1):1-13；Montine 等， <i>Acta Neuropathol.</i> 2012;123(1):1-11）。 2. 受试者符合 FTLD-tau 的病理学诊断指南（Mackenzie 等， <i>Acta Neuropathol.</i> 2009;117(1):15-8；Cairns 等， <i>Acta Neuropathol.</i> 2007;114(1):5-22；Mackenzie 等， <i>Acta Neuropathol.</i> 2010;119(1):1-4；McKhann 等， <i>Arch Neurol.</i> 2001;58(11):1803-9）。 3. 受试者具有病理学证实的中风史。
FTLD-tau	受试者符合 FTLD-tau 的病理学诊断指南（Mackenzie 等， <i>Acta Neuropathol.</i> 2009;117(1):15-8；Cairns 等， <i>Acta Neuropathol.</i> 2007;114(1):5-22；Mackenzie 等， <i>Acta Neuropathol.</i> 2010;119(1):1-4；McKhann	下述任一项： 1. 受试者符合 2012 NIA-AA 关于中度或高度 AD 神经病理学变化的诊断指南。 2. 受试者符合 FTLD-TDP 的病理学诊断指南（Mackenzie 等， <i>Acta Neuropathol.</i> 2009;117(1):15-8；Cairns 等， <i>Acta Neuropathol.</i>

[0091]

	等, <i>Arch Neurol.</i> 2001;58(11):1803-9)。	2007;114(1):5-22; Mackenzie 等, <i>Acta Neuropathol.</i> 2010;119(1):1-4; McKhann 等, <i>Arch Neurol.</i> 2001;58(11):1803-9)。 3. 受试者具有病理学证实的中风史。
AD	受试者符合 2012 NIA-AA 关于中度或高度 AD 神经病理学变化的诊断指南 (Hyman 等, <i>Alzheimers Dement.</i> 2012;8(1):1-13; Montine 等, <i>Acta Neuropathol.</i> 2012;123(1):1-11)。	下述任一项: 1. 受试者符合 FTLD-TDP 和 FTLD-tau 的病理学诊断指南 (Mackenzie 等, <i>Acta Neuropathol.</i> 2009;117(1):15-8; Cairns 等, <i>Acta Neuropathol.</i> 2007;114(1):5-22; Mackenzie 等, <i>Acta Neuropathol.</i> 2010;119(1):1-4; McKhann 等, <i>Arch Neurol.</i> 2001;58(11):1803-9)。 2. 受试者具有病理学证实的中风史。
对照	年龄>40 岁。 接受腰椎穿刺排除诊断, 结果为阴性的受试者。	1. 任何患有梗死性、出血性、癫痫性、肿瘤性、创伤性脑损伤或其他神经变性疾病的受试者。

[0092] 用于病理性TDP-43水平的ELISA,以及统计分析计划和样本量考虑。血浆/CSF病理性TDP-43水平通过本文描述的ELISA系统测量,在每个板上具有严格的性能验收标准和质量控制样品。每次测定时,将临床样品与空白溶液(样品稀释剂)和(制备的)校准溶液一起处理。在每个测定板上运行低、中和高TDP-43浓度质量控制样品,接受变异系数(CV)截止值 $\leq 20\%$ 。所有样品运行一式三份。CV $>20\%$ 的TDP-43平行样被排除在分析之外。所有报告的浓度均应落于测定法的合格范围之内。TDP-43浓度在标准曲线上确定,所述标准曲线通过使用四参数逻辑曲线拟合将光密度对浓度作图来获得。血浆/CSF数据使用箱线图呈现,并且在必要时仔细检查并除去潜在的异常值。FTLD-TDP患者与每个其他组(即FTLD-tau患者、AD患者和对照个体)的血浆/CSF TDP-43水平之间的差异通过双样本t-检验进行评估。尽管结果可能不遵循正态分布,但基于中心极限定理和提出的样本量(对于血浆而言 $n=50$,对于CSF而言 $n=30$),预计t-检验仍然是合适的。为了解决多重检验问题,应用Bonferroni调

整。使用血浆/CSF TDP-43水平绘制受试者工作特征(ROC)曲线以诊断FTLD-TDP,但使用不同的阈值标准。比较血浆和CSF TDP-43水平的曲线下面积(AUC)。假设实际AUC为0.86,50名受试者在单侧 $p < 0.05$ 时检测到0.68的AUC的统计功效为80%。还在FTLD-TDP、FTLD-tau、AD和老年对照组之间进行类似的ROC分析,以显示患者与对照之间的TDP-43水平的差异。统计分析使用SAS 9.4进行。CSF和血浆TDP-43水平之间的Pearson相关性及其95%置信区间被直接估计。

[0093] 实施例2

[0094] 针对TDP-43的新型MAb的生产

[0095] 为了开发FTLD-TDP的疾病特异性生物标志物,产生了新的TDP-43MAb。通过间接ELISA筛选了超过3,000个MAb克隆,并鉴定到13个有希望的MAb,然后通过Western印迹对其进行进一步表位作图。图1中示出的那些抗体中的四个抗体的表位区域是MAb#3(AA 25-50)和#4(AA 98-120)的N-端,以及MAb#6(AA 390-410)和#9(AA 280-300)的富含甘氨酸的C-端结构域。

[0096] 实施例3

[0097] MAb在人类组织中的免疫反应性

[0098] 在从FTLD-TDP患者获得的脑组织切片中测试上述抗体。MAb#3和#4对正常核TDP-43表现出稳健的免疫反应性,而对病理性包含物表现出极小到弱的反应性。MAb#6对正常核TDP-43和病理性包含物均有免疫反应性。MAb#9对所有形式的病理性TDP-43包含物都具有强烈的免疫反应性,而对正常TDP-43具有极小的反应性(图2)。来自人FTLD-TDP脑组织的尿素可溶性提取物的免疫印迹分析显示,MAb#3和#4识别全长TDP-43,但不识别TDP-43的C-端片段,而MAb#6识别两者。此外,MAb#3和#4既不检测病理性过度磷酸化的45kDa条带,也不检测被MAb#6检测到的高分子量成片条带。值得注意的是,MAb#9仅对病理性TDP-43物质表现出反应性,对正常全长TDP-43的反应性极小,表明它特异性针对病理性TDP-43。使用MAb#9对来自FTLD-TDP患者的CSF的免疫印迹分析显示出相似的结果(图3)。

[0099] 实施例4

[0100] MAb#9特异性针对病理性TDP-43

[0101] 在所有报道的对C-端TDP-43特异的MAb中MAb#9是独特的。到目前为止,研究一致表明,所有C-端TDP-43特异性抗体不仅对病理性TDP-43,而且对正常核TDP-43具有免疫反应性(Feneberg等, Mol Neurobiol. 2018; 55(10): 7789-801)。然而,本文所描述的MAb#9在对正常核TDP-43没有显著反应性的情况下显示出对病理性TDP-43包含物的高反应性(图2)。这种现象的根本原因尚不清楚,但可能是由于MAb#9识别的表位仅在病理性TDP-43中选择性暴露这一事实。MAb#9的这种优先检测病理性TDP-43包含物而具有极小或没有正常核TDP-43免疫组织化学染色的能力,与使用病理性磷酸化-TDP-43特异性MAb(例如p409/410MAb)时所见的染色模式相似。然而,与p409/410MAb相比,MAb#9显得甚至更加灵敏,并且能够在FTLD-TDP患者的不同脑区域中揭示更大程度的病理学(图2)。此外,由MAb#9揭示的TDP-43病理负荷与局部神经元丧失的严重程度密切相关,这在使用p409/410MAb的研究中不能可靠地看到。有趣的是,使用MAb#9对来自FTLD-TDP患者的CSF样品进行的免疫印迹分析,除了也被p409/410MAb揭示的45kDa和25kDa片段之外还揭示出强烈的20kDa和30-35kDa片段,其在人类FTLD-TDP患者的脑组织中很少观察到(图3)。

[0102] 实施例5

[0103] ELISA研究

[0104] 建立了ELISA系统,以使用本文描述的MAb检测正常和病理性TDP-43。对于正常全长TDP-43而言,首先筛选最佳配对的抗体,然后分别使用MAb#3和#4作为捕获和检测抗体建立夹心ELISA。该平台显示对人重组rTDP-43 (OriGene Technologies, Rockville, MD) 的检测下限为25pg/mL。使用这种灵敏的ELISA,能够定量HEK293细胞裂解物和上清液中TDP-43的量。然后,分别使用MAb#9和#6作为捕获和检测抗体建立夹心ELISA,用于检测病理性TDP-43。使用这种灵敏的ELISA对来自人类FTLD-TDP患者的CSF样品中TDP-43的量进行了定量,检测下限为60pg/mL。因此,这些ELISA系统,尤其是用于检测病理性TDP-43的ELISA,代表了用于生物标志物发现和研究的新的、有价值的工具,可以加速FTLD-TDP的诊断的工具,并且可用于筛选和选择纳入临床试验的FTLD-TDP患者。

[0105] 实施例6

[0106] 使用串联质谱术验证TDP-43ELISA系统

[0107] 进行基于串联质谱 (MS) 的蛋白质组学分析,以确定MAb#9检测到的病理性形式的TDP-43的氨基酸序列;在来自FTLD-Tau、FTLD-TDP-43、AD和年龄匹配对照的所有50个血浆和30个CSF样品中对病理性TDP-43进行大规模相对定量蛋白质组学分析;并对血浆和CSF样品的子集中病理性TDP-43的绝对水平进行定量。对于旨在确定血浆和CSF TDP-43的相对定量的实验而言,预计将获得令人信服的基于发现的定量结果,其显示所有或几乎所有的FTLD-TDP-43病例具有显著升高的病理性TDP-43水平。

[0108] 初步数据显示MAb#9可用于病理性TDP-43的免疫沉淀 (IP) (图4)。使用MAb#9进一步优化TDP-43IP。TDP-43的回收用Western印迹 (WB) 进行评估,纯度将用银染色进行评估。将大批量MAb#9与Dynabeads M-270环氧珠 (即具有表面暴露的环氧基团的2.8 μ m超顺磁珠) 偶联。通过将抗体中的伯氨基和巯基共价偶联到珠子,纯化的材料中存在的IgG蛋白的量将受到限制。抗体/珠偶联的效率将通过使用银染色的SDS-PAGE和WB进行评估。在这些初始实验中,用于病理性TDP-43的稳健纯化的抗体和输入血浆/CSF的量也被优化。掌握了这些知识后,使用MAb#9从血浆和CSF中免疫沉淀病理性TDP-43,并使用SDS-PAGE分离纯化的蛋白质。接下来,切除30-45kDa处的凝胶切片,以降低样品复杂性并提高质谱法能够表征病理性TDP-43的完整氨基酸组成的可能性。为了提高TDP-43的序列覆盖率,用几种蛋白酶 (包括胰蛋白酶、Lys-C、Glu-C、Asp-N和Lys-N) 进行平行凝胶内消化。

[0109] 将所述肽分离、分析、鉴定并映射到来自Uniprot或NCBI的参比TDP-43氨基酸序列 (Savas等, Science. 2012; 335 (6071) : 942; Jha等, Nature. 2017; 546 (7660) : 651-5)。简而言之,使用自动进样器将所述肽装载到C18通气阱/分析柱组件上,并用快速分离液相色谱 (RSLC) 超高压纳米流液相色谱系统 (Thermo Fisher, Waltham, MA) 分离。通过向不锈钢发射头施加电压,将完整的肽电喷雾成气相,直接进入Orbitrap Fusion Tribrid质谱仪中。为了分析蛋白质组学数据,使用IP2环境 (integratedproteomics.com) 中的ProLuCID (Xu等, J Proteomics. 2015 Nov 3; 129: 16-24)、DTASelect (Tabb等, Journal of Proteome Research, 2002, 1 (1), pp 21-26) 和Census (Park等, 2014. Bioinformatics. 30 (15) : 2208-9; Park等, 2008. Nature methods 5, 319-322) 生物信息学分析软件。为了进一步查询数据,使用Skyline (MacCoss Lab, University of Washington)。这些软件包被使用,并允许鉴定

肽和蛋白质,并基于目标诱饵策略控制1%的错误发现率。这些软件包还允许基于来自重建色谱图的曲线下面积来量化肽相对于重标记内标的丰度。

[0110] 在下一个实验中,使用无偏MS分析测试ELISA结果的可靠性。在这些实验中,使用基于等压串联质量标签(TMT)和多缺口MS3分析的领先分析工作流程(He等,Mol Psychiatry.2019;24(11):1732-47)。具体而言,在来自FTLD-Tau、FTLD-TDP-43、AD和年龄匹配的对照的所有50个血浆和30个CSF样品中对病理性TDP-43水平进行大规模相对定量蛋白质组学分析。这里的目标是确认基于ELISA的明确结果,所述结果可以基于病理性TDP-43水平的升高而容易地将FTLD-TDP样品与其他样品区分开。

[0111] 将使用上文确定的条件,将每个患者来源的样品(血浆或CSF)用Mab#9进行IP。将所述纯化的材料用6M盐酸胍变性,还原,烷基化,并用胰蛋白酶和LysC蛋白酶消化成肽。将所述肽用反相树脂纯化,并用一个TMT标签化学标记。使用16plex TMT试剂(Thermo Fisher,Waltham,MA),并在每次MS分析运行中,将4个FTLD-Tau、4个FTLD-TDP、4个AD和4个年龄匹配的对照合并。总共将进行至少13x 16plex实验(对于血浆而言)和8x 16plex实验(对于CSF而言)。使用上述生物信息学分析软件鉴定所述肽并进行相对定量。

[0112] 在最后的实验中,在一部分血浆和CSF样品中测量病理性TDP-43的绝对丰度。在这里,目标是获得基于MS的正交测量结果,以比较和确认使用ELISA获得的测量结果。尽管使用MS获得的精确测量结果可能与来自ELISA的测量结果不高度相关,但预计所述测量结果和趋势相似。

[0113] 第一步是用Mab#9亲和纯化病理性TDP-43,并用胰蛋白酶消化所述纯化的材料。接下来,掺入至少3种化学合成的含有单个重C-端精氨酸残基的SpikeTide TQL肽(JPT Peptide Technologies GmbH,Berlin,Germany)。SpikeTide TQL肽是策略性的,因为它们使用专有的Quanti-Tag进行定量。通过胰蛋白酶消化从标签中释放肽,并以0.5nM分成等分试样。将这些肽以5种不同浓度掺入到肽混合物中,并用C18 Ziptips进行纯化以获得标准曲线。使用SpeedVac真空浓缩仪(Labconco Corporation,Kansas City,MO)浓缩所述纯化的肽,并使用Orbitrap Fusion MS进行2或4小时的分析运行,通过LC-MS/MS进行分析。提取、搜索得到的谱,并使用ProLucid/Sequest DTASelect和Census进行量化。使用重建的MS1色谱图(相对于掺入到样品中的已知量的重肽的曲线下面积)来确定肽的绝对量。

[0114] 预计所提出的研究将客观地交叉验证来自ELISA的数据。CSF/血浆样品的质量可能因患者的终末期状况而异;因此,CSF/血浆样品通过使用针对病理性TDP-43的特异性Mab的免疫沉淀来净化。

[0115] 本文描述的ELISA系统将被转化成多重、基于中尺度发现(MSD)的免疫测定法(Meso Scale Diagnostics,LLC,Rockville,MD),其还包括其他主要的痴呆症生物标志物例如AD特征标志物(A β 42、T-tau和P-tau181P)、PGRN和神经微丝轻链(NfL)亚基,用于痴呆症相关疾病的诊断和随访。使用基于MSD的免疫测定法,以前的PGRN ELISA的灵敏度从60ng/ml提高到9pg/ml。除了更高的灵敏度之外(Constantine等,J Virol Methods.1994;47(1-2):153-64;Kuhle等,Clin Chem Lab Med.2016;54(10):1655-61;Tatebe等,Mol Neurodegener.2017;12(1):63;Kuhle等,Mult Scler.2016;22(12):1550-9),基于MSD的免疫测定法还具有更快、运行所需样品体积更小以及具有更好的可重复性和精度的优点。

[0116] 实施例7

[0117] 确定血浆病理性TDP-43水平是否反映出FTLD-TDP脑中的病理严重程度

[0118] 通过测量神经元丧失、神经胶质增生和TDP-43病理负荷来量化脑病理,这将阐明FTLD-TDP患者中脑病理严重程度与血浆病理性TDP-43水平之间的相关性。除了上述实施例的血浆和CSF样本外,从脑库获得来自FTLD-TDP患者的不同脑区域的脑组织的苏木精和曙红(H&E)载片和石蜡块,并进行分析。

[0119] 确定在FTLD-TDP中血浆和CSF病理性TDP-43是否是疾病进展的灵敏和特异的生物标志物。使用本文描述的新型ELISA,测量早期、中期和晚期FTLD-TDP患者的血浆/CSF中病理性TDP-43的水平,并且确定所述血浆/CSF病理性TDP-43水平是否随着疾病进展而提高。如果这是真的,血浆/CSF病理TDP-43水平可能对监测疾病进展和评估治疗效果有价值。

[0120] 如果血浆病理性TDP-43水平反映了FTLD-TDP脑中的病理严重程度,则血浆病理性TDP-43水平可以被进一步用作监测FTLD-TDP疾病进展和监测该疾病治疗有效性的生物标志物。假设将在FTLD-TDP脑中观察到更严重的神经元丧失和神经胶质增生和/或TDP-43病理负荷,并且将在来自患有最严重疾病的患者的血浆中观察到较高的病理性TDP-43水平。

[0121] 这项研究包括FTLD-TDP患者的一个子集(n=30),所述患者同时具有可用的血浆/CSF和脑组织(不同脑区的H&E载片和石蜡块)。为了半量化脑病理,检查FTLD-TDP病例的额叶皮层和海马的神经元丧失和神经胶质增生以及TDP-43负荷。神经元丧失和神经胶质增生在H&E染色的载片上进行评估,并将分级为0=无、1=轻度、2=中度或3=重度。从两个脑区域获得神经元丧失/神经胶质增生的平均评分。TDP-43负荷在用MAb#9免疫染色的额叶皮层和海马切片上进行评估。总TDP-43负荷在与用于神经元丧失和神经胶质增生的标度相同的标度上进行分级,即0=无、1=轻度、2=中度或3=重度。类似地,从两个脑区域获得TDP-43负荷的平均评分。取决于结果的分布,使用线性模型和广义线性模型,将血浆TDP-43水平作为协变量,并将神经元丧失/神经胶质增生或TDP-43病理负荷作为结果。使用CSF TDP-43水平作为协变量进行类似的分析。还比较使用血浆或CSF TDP-43水平的回归参数。

[0122] 预计血浆病理性TDP-43水平反映FTLD-TDP脑的病理严重程度。血浆病理性TDP-43水平可能与神经元丧失和神经胶质增生的严重程度或TDP-43病理负荷或两者密切相关。与血浆病理性TDP-43水平相比,CSF病理性TDP-43水平可能与脑病理表现出更密切的相关性,这将是令人安心的,并将有助于验证血浆病理性TDP-43作为生物标志物。脑病理和血浆病理性TDP-43水平有可能不显示出明显相关性。如果是这种情况,FTLD-TDP大脑将根据其组织病理学类型A、B和C分为三组,并将脑病理分别与每个组的血浆病理性TDP-43水平相关联(FTLD-TDP D型非常罕见,可供评估的病例太少)。

[0123] 实施例8

[0124] 针对人病理性TDP-43的新型MAb

[0125] 产生了新的TDP-43MAb,以开发TDP-43病理学的疾病特异性生物标志物。针对人重组TDP-43产生鼠类MAb。通过间接酶联免疫吸附测定法(ELISA)筛选了5000多个MAb克隆。然后使用来自FTLD-TDP患者的脑样品,通过免疫组织化学测试有前景的MAb。除了MAb#9之外,这些抗体中的大多数对正常核TDP-43显示出稳健的免疫反应性,并对病理性包含物表现出弱到强的反应性。表位区域位于C-端处aa280-300的MAb#9,对所有形式的病理性TDP-43包含物都具有强烈的免疫反应性,对正常TDP-43的反应性极小。使用表达TDP-43的质粒转染的HEK293细胞和吸收试验,进一步证实了MAb#9的特异性(图5A-5B)。

[0126] 有趣的是,使用MAb#9和另一种针对TDP-43的C-端的MAb(MAb#4)的夹心ELISA,对检测FTLD-TDP和具有TDP病理的AD患者的血浆(图6A)和CSF中的病理性TDP-43水平显示出前景。因此,这种ELISA系统代表了用于生物标志物研究和发现的新的且有价值的工具,并且可能被证明在加速TDP-43蛋白病诊断和/或选择TDP-43患者进行新治疗剂的临床试验方面是有用的。与使用对照抗体p409/410MAb(Cosmo Bio USA, Inc., Carlsbad, CA; 图6B)相比,使用MAb#9对某些血浆样品(图6A中的FTLD-A1型、-A2型和-B1型和CBD(皮质基底变性))进行的Western印迹揭示出不同的条带模式。具体而言,MAb#9揭示出比p409/410MAb更强的35kDa条带,尽管两种抗体都揭示出典型的病理性TDP-43的45kDa和25kDa条带。值得注意的是,35kDa的TDP-43片段尽管在ALS中已有报道,但在人体组织中很少见到。

[0127] MAb#9的这种优先检测病理性TDP-43包含物的能力与使用磷酸化-TDP-43特异性MAb例如p409/410MAb所见的的能力相似,正如相似的染色模式所证明的(图7A-7B)。然而,MAb#9比p409/410MAb更灵敏,并且可以揭示总体上更大程度的TDP-43病理(图7C)。具体而言,MAb#9可以在FTLD-TDP A型脑的额叶皮层中揭示出更多的细神经突,并且可以在B型脑的额叶皮层中揭示出p409/410MAb很少揭示的致密细神经突(图7A)。此外,由MAb#9揭示的TDP-43阳性细神经突的密度与局部神经元丧失的严重程度密切相关(图7A),这在使用p409/410MAb的研究中不能被可靠地观察到(Feneberg等, Mol Neurobiol. 2018; 55 (10) : 7789-801; Goossens等, Acta Neuropathol Commun. 2015; 3: 15; Kawles等, Brain. 2021)。有趣的是,具有内侧颞叶TDP-43病理的AD病例中,MAb#9还揭示出新的TDP-43包含物(图7A和图8)。

[0128] 实施例9

[0129] 用于定量TDP-43的新的ELISA

[0130] 通过使用最佳抗体对MAb#9和MAb#4,开发了一种用于定量TDP-43水平的ELISA。MAb#4被用作捕获抗体,MAb#9被用作检测抗体。在通过方格板滴定和随后的ELISA进行筛选后,捕获MAb#4的最佳浓度为0.5μg/mL,检测MAb#9的最佳浓度是1:2000。然后,通过使用两倍连续稀释的重组rTDP-43蛋白(OriGene Technologies, Rockville, MD)来建立TDP-43的标准剂量响应曲线。使用BSA来建立基线。使用所建立的ELISA系统,使用来自35名FTLD-TDP、34名FTLD-Tau和22名AD患者的人血浆样品来量化TDP-43水平(图9)。

[0131] 上面对特定方面的描述充分地揭示了本发明的一般性质,使得其他人可以通过应用本领域技术范围内的知识,在不偏离本公开的一般概念的情况下,不需过度实验即可容易地修改和/或改编这些特定方面以适应于各种应用。因此,基于本文所呈现的教导和指导,此类改编和修改旨在落于所公开的方面的含义和等效性范围之内。应当理解,本文的短语或术语是出于描述而非限制的目的,使得本说明书的术语或短语应由专业技术人员根据所述教导和指导来解释。

[0132] 本公开的广度和范围不应受到上述任何示例性方面的限制,而应仅根据权利要求及其等效物进行定义。

[0133] 本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请书和/或其他文件均为所有目的整体通过引用并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请书和/或其他文件被单独地指明为所有目的通过引用并入本文。

[0134] 出于完整性原因,本发明的各个方面被阐述在下面的编号条款中:

[0135] 条款1.一种抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0136] 条款2.根据条款1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;并且所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0137] 条款3.一种抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0138] 条款4.根据条款3所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;并且所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0139] 条款5.一种抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0140] 条款6.根据条款5所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;并且所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。

[0141] 条款7.根据条款1-6中任一条所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区和所述免疫球蛋白轻链可变区一起结合TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的至少一部分。

[0142] 条款8.根据条款1-7中任一条所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区和所述免疫球蛋白轻链可变区一起结合SEQ ID NO:2的至少一部分。

[0143] 条款9.一种分离的核酸,其包含编码根据条款1-8中任一条所述的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

[0144] 条款10.根据条款1-8中任一条所述的抗体或其抗原结合片段中的一者或多者的用途,其用于预筛选临床试验的受试者。

[0145] 条款11.一种免疫测定法,其包含根据条款1-8中任一条所述的抗体或其抗原结合片段中的一者或多者。

[0146] 条款12.一种检测生物样品中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的方

法,所述方法包括:将所述样品与抗体或其抗原结合片段接触,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0147] 条款13.根据条款12所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0148] 条款14.根据条款12所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0149] 条款15.根据条款12-14中任一条所述的方法,其中所述TDP-43是错误折叠的。

[0150] 条款16.根据条款12-15中任一条所述的方法,其中所述样品包括细胞或组织样品。

[0151] 条款17.根据条款12-16中任一条所述的方法,其中所述样品包括血浆、血清或脑脊液(CSF)。

[0152] 条款18.根据条款12-17中任一条所述的方法,其中所述样品从被诊断为患有、疑似患有神经变性疾病或具有患有或发生神经变性疾病的风险的受试者获得。

[0153] 条款19.根据条款18所述的方法,其中所述神经变性疾病是额颞叶变性(FTLD)。

[0154] 条款20.根据条款12-19中任一条所述的方法,其中所述检测包括免疫组织化学(IHC)、中尺度发现(MSD)生物标志物测定、Western印迹、流式细胞术、放射免疫测定(RIA)、计数免疫测定(CIA)、酶免疫测定(EIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)、荧光免疫测定(FIA)或化学发光免疫测定(CLIA)中的一者或多者。

[0155] 条款21.一种在受试者中诊断神经变性疾病的方法,所述方法包括检测来自所述受试者的生物样品中TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的存在,所述方法包括:将所述样品与抗体或其抗原结合片段接触,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且

(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;其中TDP-43的存在指示所述受试者患有神经变性疾病。

[0156] 条款22.根据条款21所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0157] 条款23.根据条款21所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0158] 条款24.根据条款21-23中任一条所述的方法,其中所述神经变性疾病是额颞叶变性(FTLD)。

[0159] 条款25.一种免疫测定试剂盒,其用于选择性检测生物样品中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1),所述试剂盒包含:抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及检测试剂。

[0160] 条款26.根据条款25所述的试剂盒,其进一步包含用于所述抗体或其抗原结合片段的固相支持物。

[0161] 条款27.根据条款25或条款26所述的试剂盒,其进一步包含检测工具。

[0162] 条款28.根据条款27所述的试剂盒,其中所述检测工具是荧光、发光、放射活性和比色中的一者或多者。

[0163] 条款29.根据条款25-28中任一条所述的试剂盒,其中所述检测试剂是比色底物、化学发光底物和荧光底物中的一者或多者。

[0164] 条款30.根据条款25-29中任一条所述的试剂盒,其进一步包含第二抗体或其抗原结合片段,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域

序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0165] 条款31.根据条款25-29中任一条所述的试剂盒,其进一步包含第二抗体或其抗原结合片段,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0166] 条款32.一种选择是否将受试者纳入具有TAR DNA结合蛋白43包含物的额颞叶变性(FTLD-TDP)的临床试验的方法,所述方法包括:(a)测量来自所述受试者的样品中TAR DNA结合蛋白43(TDP-43;SEQ ID NO:1)的表达水平,其中所述测量包括将所述样品与抗体或其抗原结合片段接触,其中所述抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白重链(HC)可变结构域序列和免疫球蛋白轻链(LC)可变结构域序列,其中:(a1)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(a1a)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(a1b)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(a1c)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且(a2)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(a2a)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,(a2b)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和(a2c)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;(b)将所述TDP-43的表达水平与阈值表达水平进行比较;并且其中:(b1)如果所述TDP-43的表达水平高于所述阈值表达水平,则选择所述受试者进行所述临床试验;或者(b2)如果所述TDP-43的表达水平低于所述阈值表达水平,则不选择所述受试者进行所述临床试验。

[0167] 条款33.根据条款32所述的方法,其中所述测量进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0168] 条款34.根据条款32所述的方法,其中所述测量进一步包括将所述样品与第二抗体或其抗原结合片段接触,其中所述第二抗体或抗原结合片段包含免疫球蛋白HC可变结构域序列和免疫球蛋白LC可变结构域序列,其中:(a)所述免疫球蛋白HC可变结构域序列包含(i)HC CDR1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,(ii)HC CDR2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,和(iii)HC CDR3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且(b)所述免疫球蛋白LC可变结构域序列包含(i)LC CDR1,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,(ii)LC CDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,和(iii)LC CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0169] 序列

[0170] SEQ ID NO:1

[0171] TDP-43全长

[0172] MSEYIRVTEDENDEPIEIPSEDDGTVLLSTVTAQFPGACGLRYRNPVSQCMRGVRLVEGILHAPDAGWG
NLVYVVNYPKDNKRKMDDETDASSAVKVKRAVQKTSDLIVLGLPWKTTEQDLKEYFSTFGEVLMVQVKKDLKTGHSGK
FGFVRFTEYETQVKVMSQRHMIDGRWCCKLPNSKQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTEDELREFFSQYGDVMDVFI
KPFRAFAFVTFADDQIAQSLCGEDLI IKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGGFGNSRGGGAGLG
NNQGSNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQAALQSSWGMMGLASQQNQSGPSGNNQNGNMQREPNQAFGSGNNSYSGS
NSGAAIGWGSASNAGSGSGFNNGFGSSMDSKSSGWMNH

[0173] SEQ ID NO:2

[0174] TDP-43的260AA-360AA

[0175] AEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGGFGNSRGGGAGLGNNQGSNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQA
ALQSSWGMMGLASQQNQSGPSGNNQNGNMQ

[0176] SEQ ID NO:3

[0177] 抗TDP-43抗体MAb#9的重链可变结构域 (VH) 氨基酸序列

[0178] QVQLGESGPCLKPKGETVKISCKASGDTFTANTMHWKQSPGRGFKSLEWIDTSYSGETRAHDFGGRFA
FSLETSQSTAYLQMQLKTEDTAIYFCVRGLADYWGQGTKVTVSS

[0179] SEQ ID NO:4

[0180] 抗TDP-43抗体MAb#9的VH互补决定区 (CDR) 1氨基酸序列

[0181] VHANTMH

[0182] SEQ ID NO:5

[0183] 抗TDP-43抗体MAb#9的VH CDR2氨基酸序列

[0184] VHWIDTSYSGETRAHDFGG

[0185] SEQ ID NO:6

[0186] 抗TDP-43抗体MAb#9的VH CDR3氨基酸序列

[0187] VHGLADY

[0188] SEQ ID NO:7

[0189] 抗TDP-43抗体MAb#9的轻链可变结构域 (VL) 氨基酸序列

[0190] DIELTQSPLTSLVSAGQSVTISCRTSQSIVHSNGATYLEWYLQRPGYSPKLLIYLVSNDFSGVPHRFTG
TGSGTDFTLQISRVEARDLGIYYCFQASYFPYTFGGGTRLEIKR

[0191] SEQ ID NO:8

[0192] 抗TDP-43抗体MAb#9的VL CDR1氨基酸序列

[0193] VLRTSQSIVHSNGATYLE

[0194] SEQ ID NO:9

[0195] 抗TDP-43抗体MAb#9的VL CDR2氨基酸序列

[0196] VLLVSNDFS

[0197] SEQ ID NO:10

[0198] 抗TDP-43抗体MAb#9的VL CDR3氨基酸序列

[0199] VLFQASYFPYT

[0200] SEQ ID NO:11

[0201] 抗TDP-43抗体MAb#4的重链可变结构域 (VH) 氨基酸序列

[0202] QVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCATSGFTFTAYETMWVRQPPGKALEWIDFISYSRNETGETRAIEFGGR

FTISRDSQSILYLQMNTLRGEDSATYYCARDRLSAEDIYWGQGTKVTVSS

[0203] SEQ ID NO:12

[0204] 抗TDP-43抗体MAb#4的VH CDR1氨基酸序列

[0205] AYETM

[0206] SEQ ID NO:13

[0207] 抗TDP-43抗体MAb#4的VH CDR2氨基酸序列

[0208] WIDFISYSRNETGETRAIEFGG

[0209] SEQ ID NO:14

[0210] 抗TDP-43抗体MAb#4的VH CDR3氨基酸序列

[0211] GLSAEDIY

[0212] SEQ ID NO:15

[0213] 抗TDP-43抗体MAb#4的轻链可变结构域 (VL) 氨基酸序列

[0214] DIELTQSPLTSLVTIGQSASISCKSTNSHLRTEGILYLRWLLQRPQQSPKRLIYLVSIADSGVPDRFTG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCAQSTRFPYTFGGGTRLEIKR

[0215] SEQ ID NO:16

[0216] 抗TDP-43抗体MAb#4的VL CDR1氨基酸序列

[0217] KSTNSHLRTEGILYLR

[0218] SEQ ID NO:17

[0219] 抗TDP-43抗体MAb#4的VL CDR2氨基酸序列

[0220] LVSIADS

[0221] SEQ ID NO:18

[0222] 抗TDP-43抗体MAb#4的VL CDR3氨基酸序列

[0223] AQSTRFPYT

[0224] SEQ ID NO:19

[0225] 抗TDP-43抗体MAb#5的重链可变结构域 (VH) 氨基酸序列

[0226] QVQLEQSGPELVQPGASVKISCKASGDSFTAQYMHVWKQSHVKSLEWTGHIGPYEGSTPYNGNFKDKGS
LTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARSSGLEIFKSWGQGPVTVSS

[0227] SEQ ID NO:20

[0228] 抗TDP-43抗体MAb#5的VH CDR1氨基酸序列

[0229] AQYMH

[0230] SEQ ID NO:21

[0231] 抗TDP-43抗体MAb#5的VH CDR2氨基酸序列

[0232] WTHIGPYEGSTPYNG

[0233] SEQ ID NO:22

[0234] 抗TDP-43抗体MAb#5的VH CDR3氨基酸序列

[0235] GLEIFKS

[0236] SEQ ID NO:23

[0237] 抗TDP-43抗体MAb#5的轻链可变结构域 (VL) 氨基酸序列

[0238] DILMTQSPASLAVSLGQRATISCRESSQIVESKGNITYLEWYLQKPGKAPKLLIYEVTNHFSGVPSRFSG

SRS GTDFTLTISSLQPEDFGIYYCFQESNTPYTFGQGTKLEIKR

[0239] SEQ ID NO:24

[0240] 抗TDP-43抗体MAb#5的VL CDR1氨基酸序列

[0241] RESQSIVESKGNTYLE

[0242] SEQ ID NO:25

[0243] 抗TDP-43抗体MAb#5的VL CDR2氨基酸序列

[0244] EVTNHFS

[0245] SEQ ID NO:26

[0246] 抗TDP-43抗体MAb#5的VL CDR3氨基酸序列

[0247] FQESNTPYT

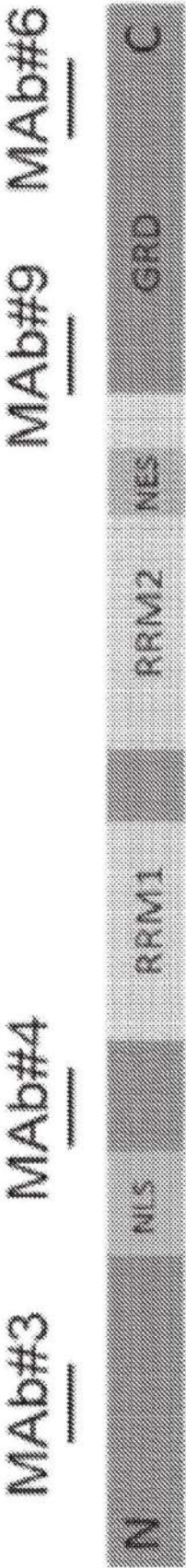


图1

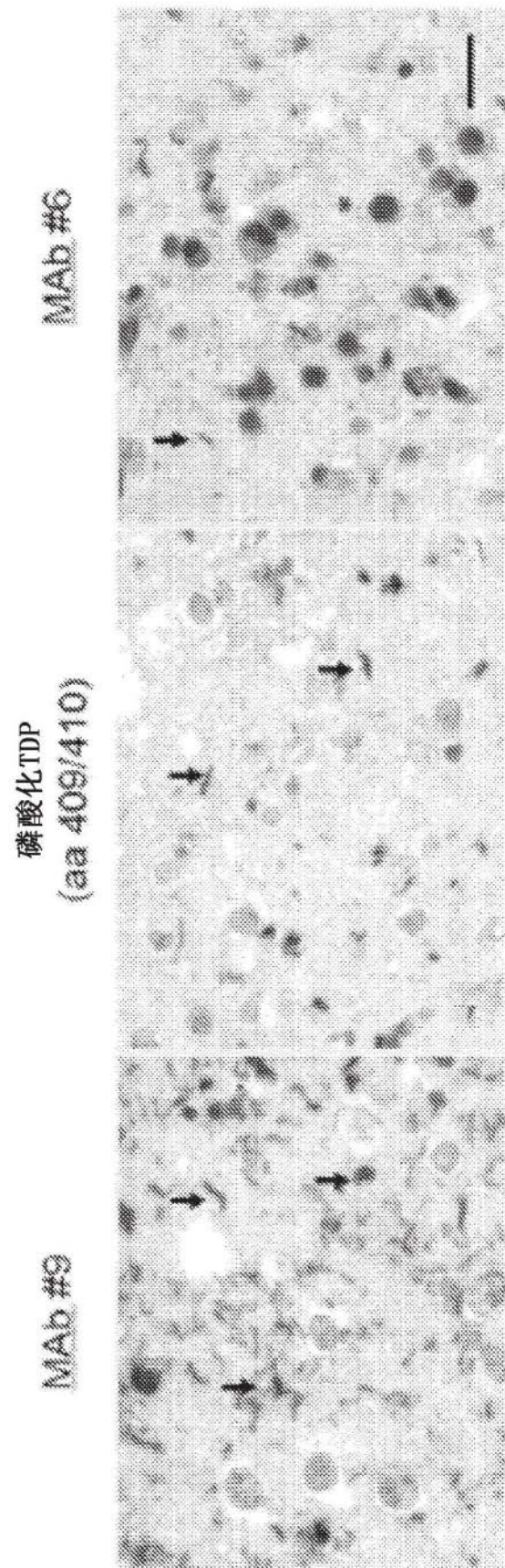


图2

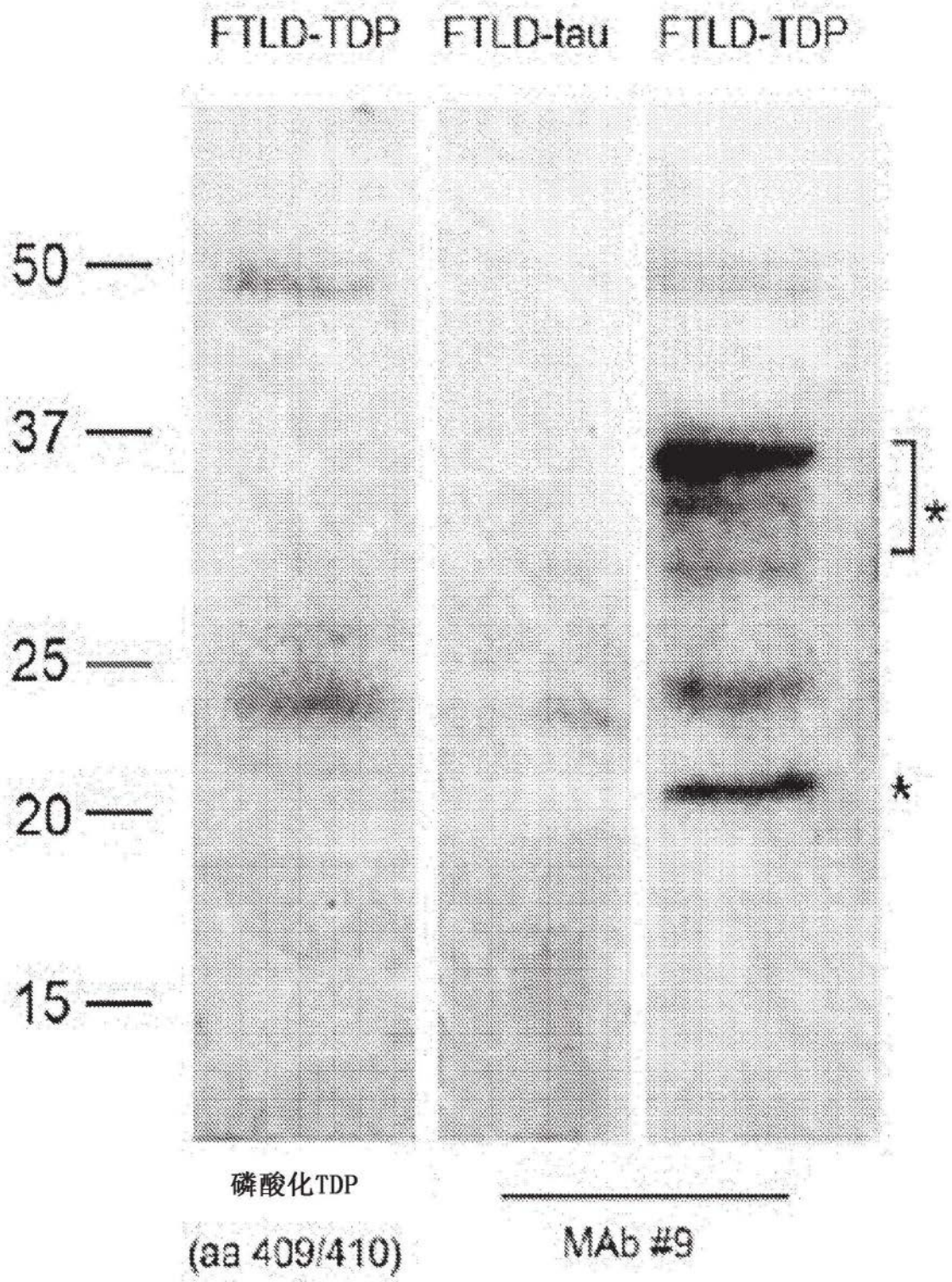


图3

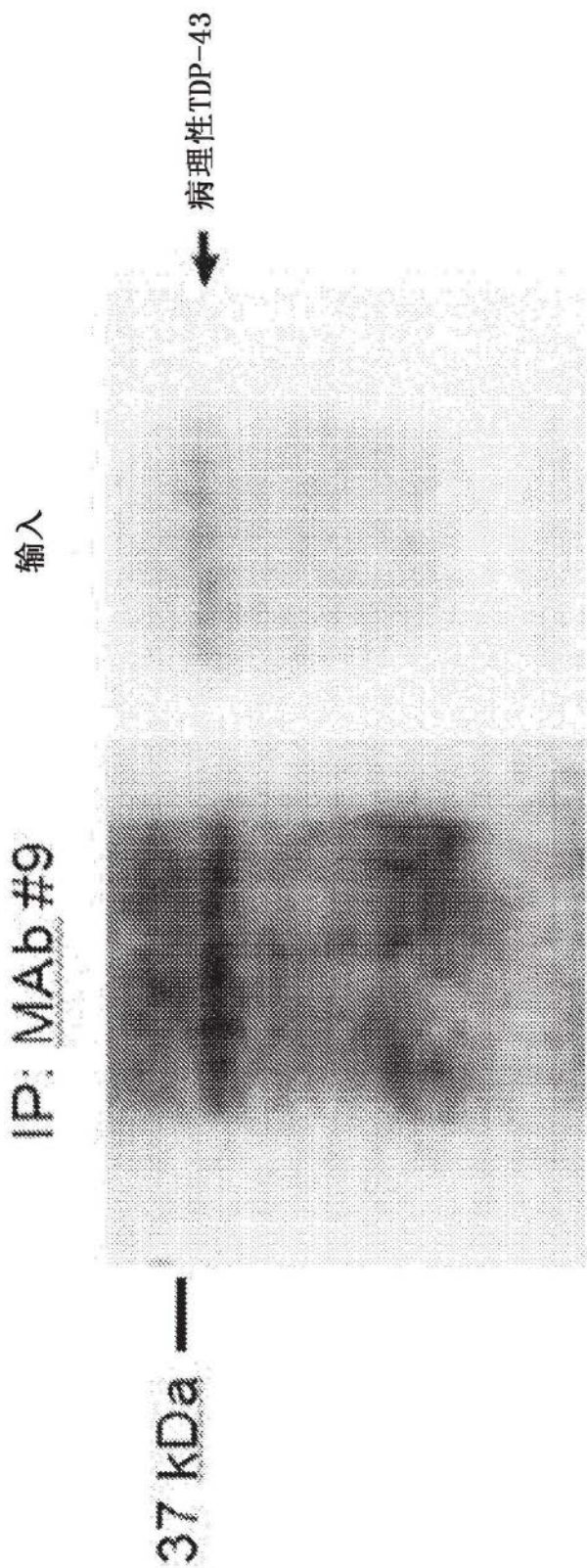


图4

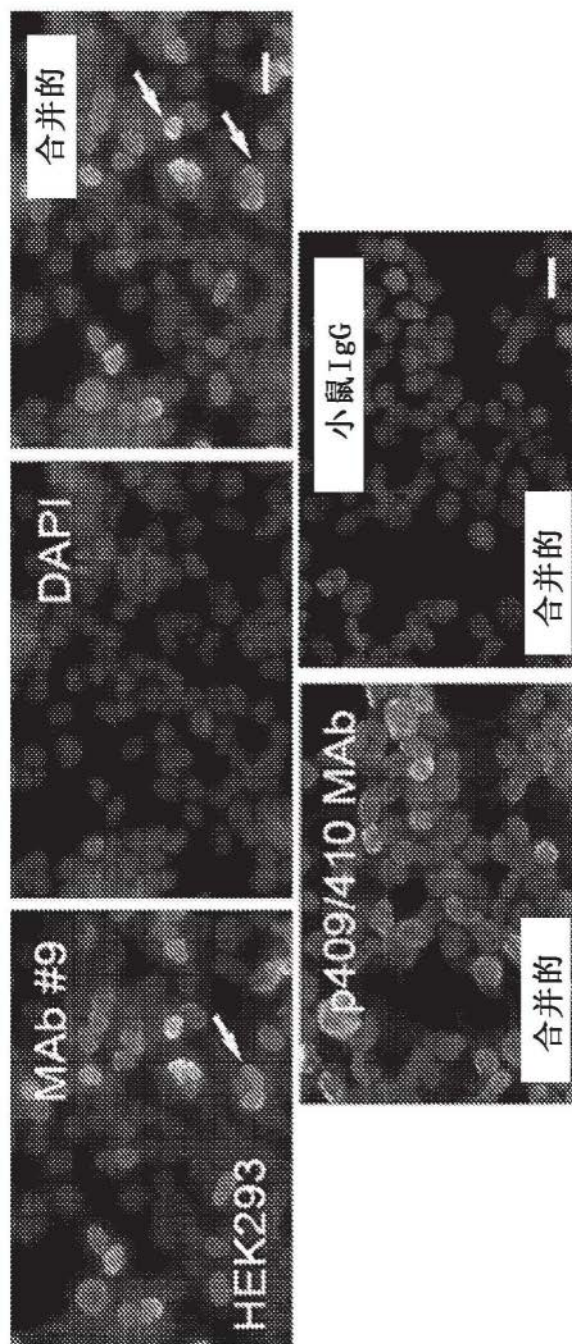


图5A

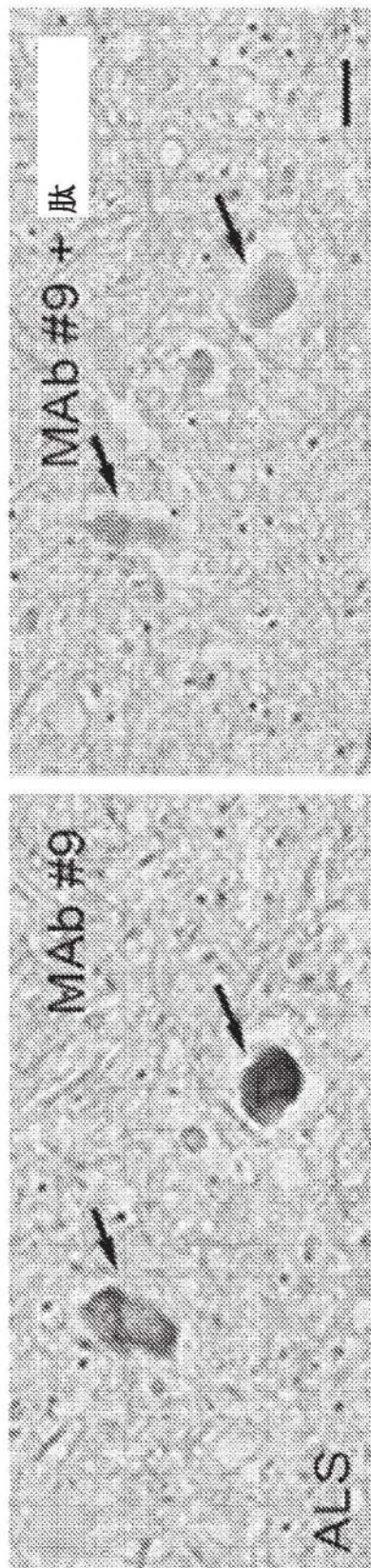


图5B

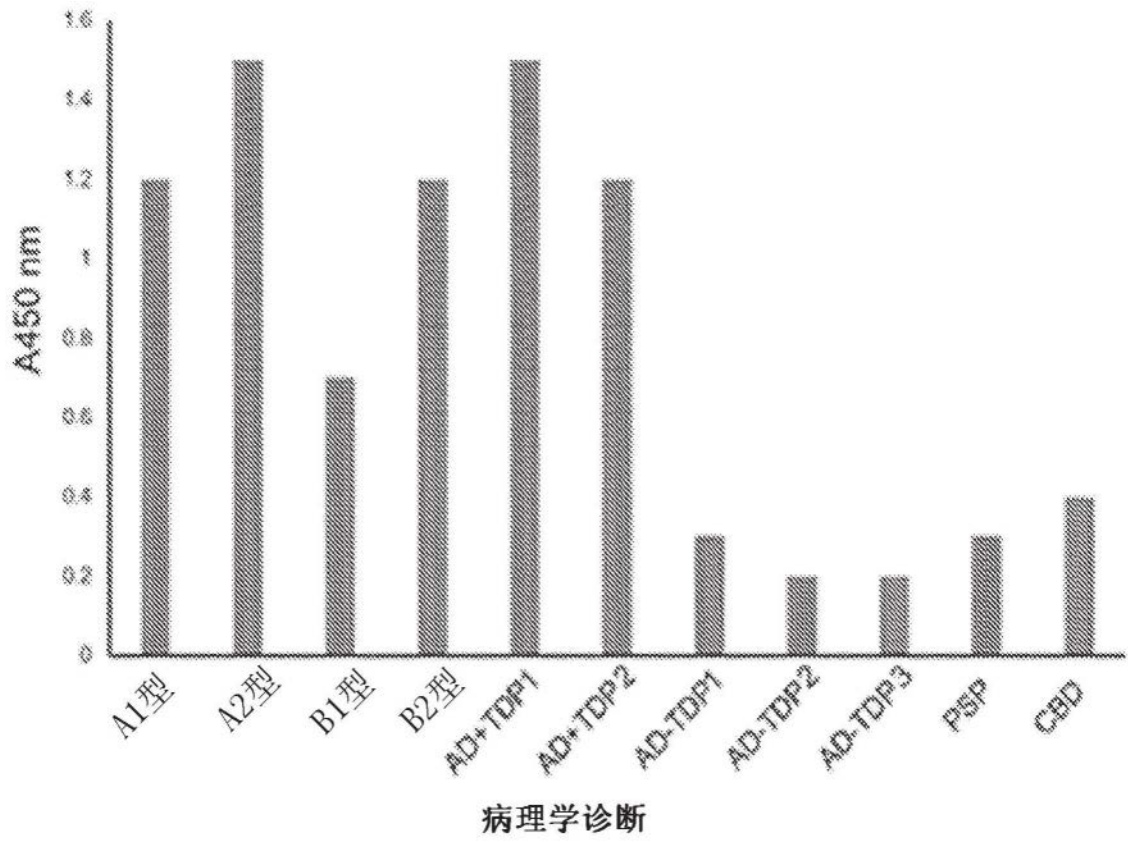


图6A

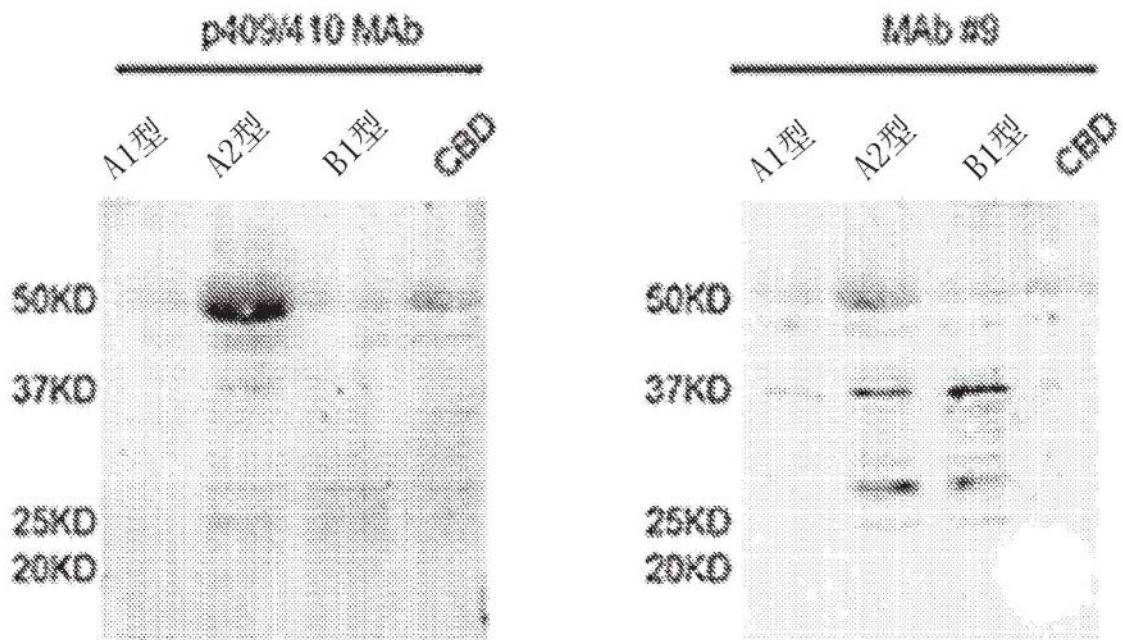


图6B

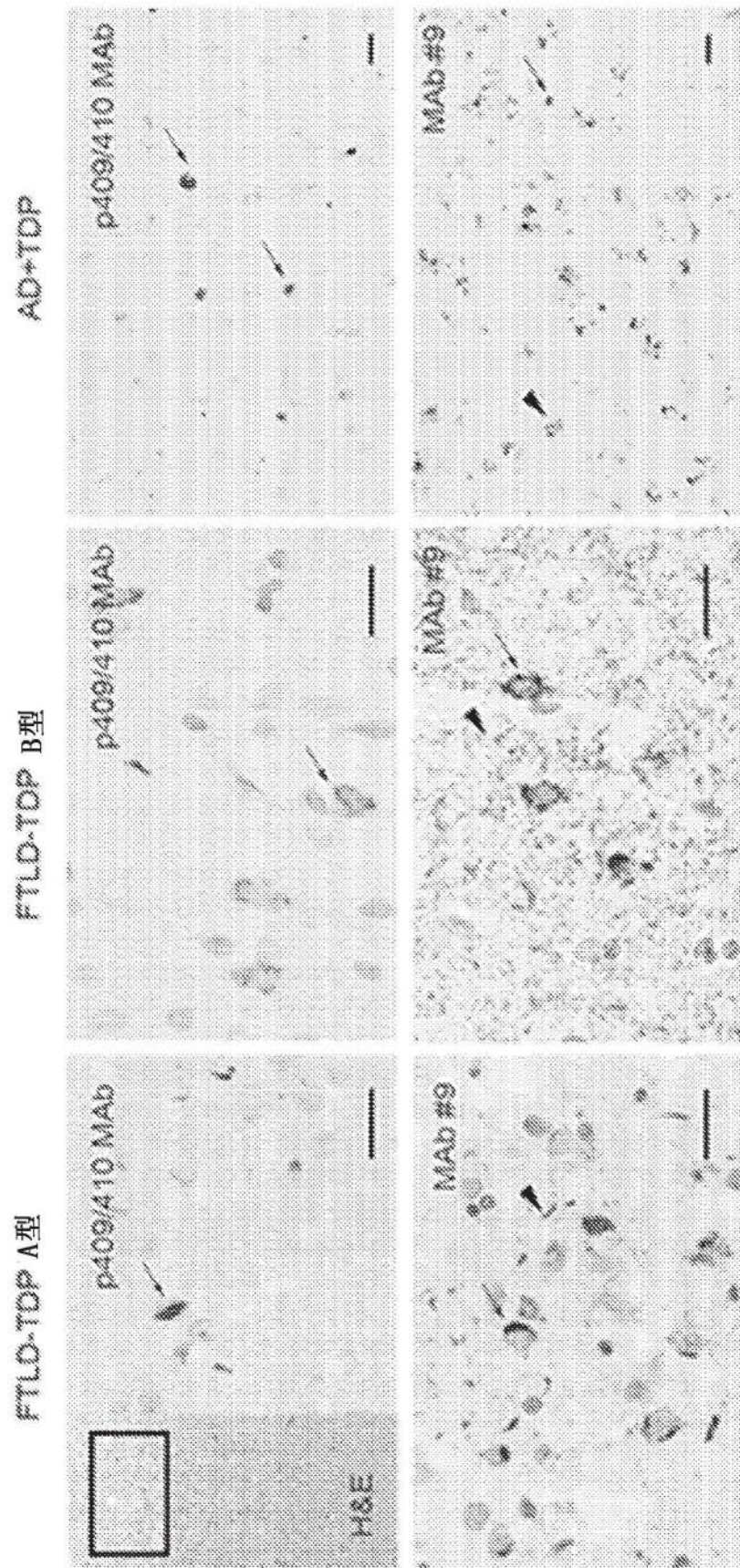


图7A

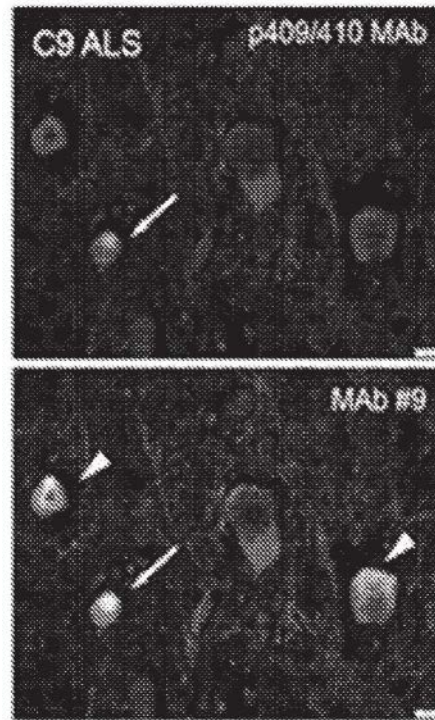


图7B

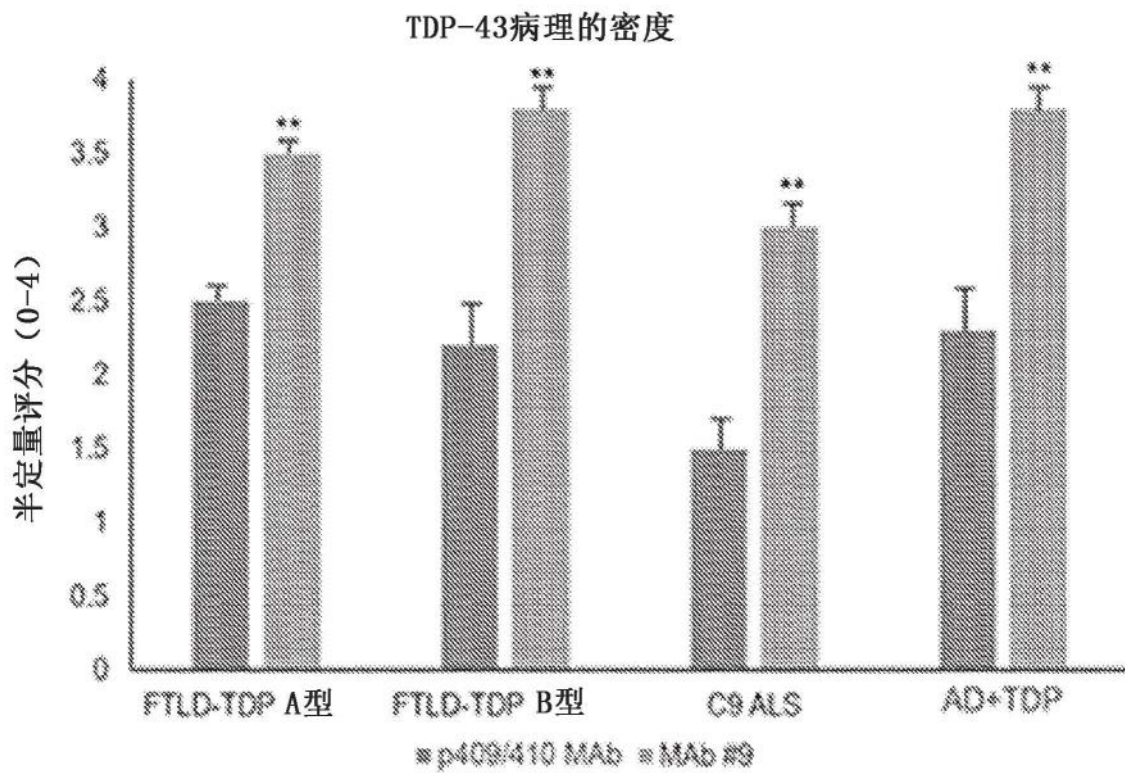


图7C

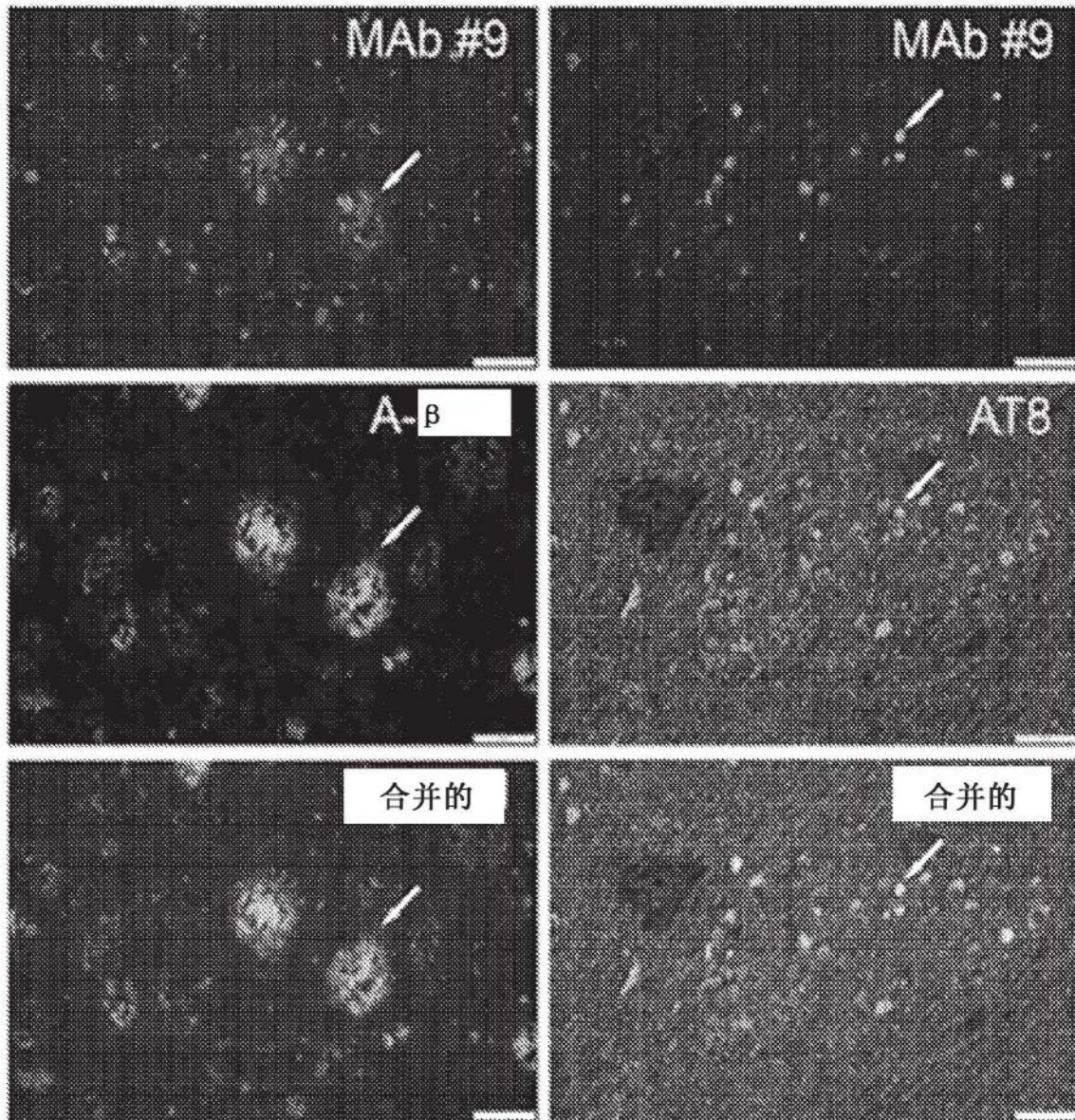


图8

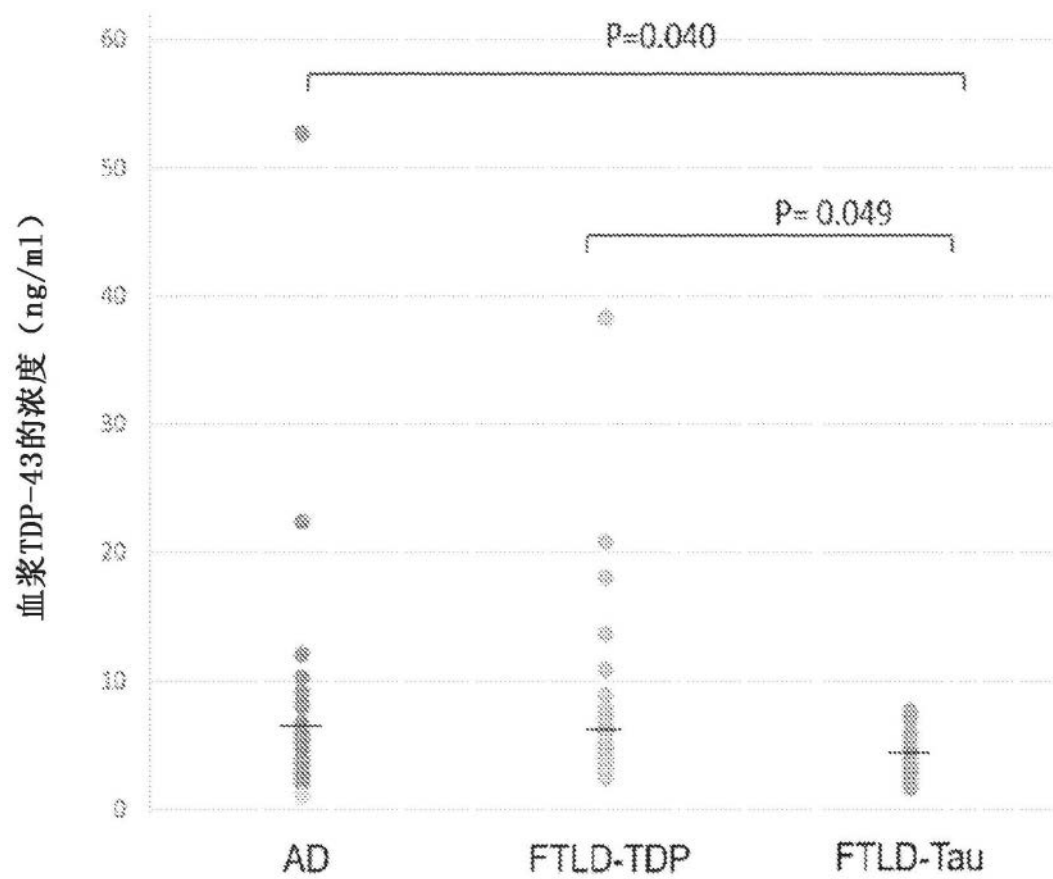


图9