



(45)授权公告日 2018.03.20

地址 美国加利福尼亚州

N.E.斯塔格利阿诺 V.丹格

C07K 16/18(2006.01)

审查员 程婷

序列表39页 附图66页

治疗Tau病变的方法

024 (91)001 13200

1
0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

69
0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

137
0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

165
0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

243
0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

321
0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

888 10001 888 8888 000 888 888 888 888 888

023 636 86 023 6536 3536 8036 9036 4 8 6 4 5 036

1. 特异性结合Tau的抗体,其中所述抗体包含:

a) 由SEQ ID NO:37中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

b) 由SEQ ID NO:36中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

c) 由SEQ ID NO:36中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

d) 由SEQ ID NO:36中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

e) 由SEQ ID NO:36中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

f) 由SEQ ID NO:37中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

g) 由SEQ ID NO:37中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

h) 由SEQ ID NO:37中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

i) 由SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

j) 由SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

k) 由SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

l) 由SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

m) 由SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

n) 由SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

o) 由SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;或

p) 由SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

2. 特异性结合Tau的抗体,其中所述抗体包含:由SEQ ID NO:37中所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

3. 权利要求1或2的抗体,其中所述抗体包含同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区。

4. 权利要求1或2的抗体,其中所述抗体包含重链,所述重链包含重链可变区和人IgG4重链恒定区。

5. 权利要求1或2的抗体,其中所述抗体包含重链,所述重链包含重链可变区和人IgG4重链恒定区,其中所述重链包含铰链区,所述铰链区包含根据Kabat编号的S241P取代。

6. 权利要求1或2的抗体,其中所述抗体包含(i)重链,所述重链包含重链可变区和人IgG4重链恒定区,和(ii)轻链,所述轻链包含轻链可变区和人 κ 轻链恒定区。

7. 权利要求1或2的抗体,其中所述抗体包含(i)重链,所述重链包含重链可变区和人IgG4重链恒定区,其中所述重链包含铰链区,所述铰链区包含根据Kabat编号的S241P取代,和(ii)轻链,所述轻链包含轻链可变区和人 κ 轻链恒定区。

8. 权利要求1或2的抗体,其中所述抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab'。

9. 权利要求1或2的抗体,其中所述抗体包含共价连接的非肽合成聚合物。

10. 权利要求9的抗体,其中所述合成聚合物是聚乙二醇聚合物。

11. 权利要求1至2和10中任一项的抗体,其中所述抗体直接或经由接头与促进穿过血脑屏障的载体分子、肽或蛋白质融合。

12. 药物组合物,其包含:

a) 根据权利要求1-11中任一项的抗体;和

b) 药学可接受赋形剂。

13. 权利要求12的药物组合物,其中所述抗体在脂质体中包囊。

14. 权利要求12或13的药物组合物,其中所述抗体用促进穿过血脑屏障的药剂配制。

15. 重组表达载体,其包含编码权利要求1至11中任一项的抗体的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列与在真核细胞中有活性的转录控制元件可操作连接。

16. 体外宿主细胞,其经过权利要求15的重组表达载体遗传修饰。

17. 无菌容器,其包含权利要求12至14中任一项的药物组合物。

18. 根据权利要求1至11中任一项的抗体或根据权利要求12至14中任一项的药物组合物在制备用于治疗人受试者中的tau病变的药物中的用途。

19. 权利要求18的用途,其中所述tau病变是进行性核上性麻痹。

20. 权利要求18的用途,其中所述tau病变是额颞叶痴呆。

21. 权利要求18的用途,其中所述tau病变是阿尔茨海默氏病。

22. 权利要求18的用途,其中所述tau病变是皮质基底变性。

23. 权利要求18的用途,其中所述tau病变是阿尔茨海默氏病、额颞叶痴呆、匹克(Pick)氏病、与染色体17有关的额颞叶痴呆伴帕金森病、进行性核上性麻痹、皮质基底变性、亚急性硬化性全脑炎、肌萎缩性侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis)/帕金森病-痴呆综合征(parkinsonism-dementia complex)、嗜银颗粒性痴呆(argyrophilic grain dementia)、英国型淀粉样血管病(British type amyloid angiopathy)、脑淀粉样血管病(cerebral amyloid angiopathy)、皮质基底变性、克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、拳击员痴呆(dementia pugilistica)、弥散性神经原纤维缠结伴有钙化、唐氏综合征(Down's syndrome)、额颞叶变性、格斯特曼-施特劳斯纳-杉克病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、哈勒沃登-施帕茨病(Hallervorden-Spatz disease)、包涵体肌炎(inclusion body myositis)、多系统萎缩(multiple system atrophy)、肌强直性营养不良(myotonic dystrophy)、尼曼-匹克病(Niemann-Pick disease) C型、非关岛运动神经元病(non-Guamanian motor neuron disease)伴神经原纤维缠结、脑炎后帕金森

病(postencephalitic parkinsonism)、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病(prion protein cerebral amyloid angiopathy)、进行性皮质下神经胶质增生(progressive subcortical gliosis)、仅缠结痴呆(Tangle only dementia)、多发性梗死性痴呆(multi-infarct dementia)、缺血性中风(ischemic stroke)、慢性创伤性脑病(chronic traumatic encephalopathy)、创伤性脑损伤(traumatic brain injury)、中风、共核蛋白病、帕金森氏病、和帕金森氏病伴痴呆、路易体痴呆、和多系统萎缩。

24. 权利要求18的用途,其中所述tau病变是散发性额颞叶痴呆。

25. 权利要求1至11中任一项的抗体在制备用于监测人受试者中的tau病变进展的方法的试剂盒中的用途,所述方法包括:

- a) 测定在第一时间点时从所述人受试者获得的生物样品中的Tau多肽的第一水平;
- b) 测定在第二时间点时从所述人受试者获得的生物样品中的Tau多肽的第二水平;并
- c) 比较Tau的所述第二水平与Tau的所述第一水平,其中所述测定包括:
 - i) 使所述生物样品与权利要求1至11中任一项的抗体接触;并
 - ii) 定量所述抗体对所述样品中存在的Tau多肽的结合。

26. 权利要求1至11中任一项的抗体在制备用于在体内检测活人受试者中的Tau多肽的方法的试剂盒中的用途,所述方法包括:

- a) 对所述人受试者施用权利要求1至11中任一项的抗体;并
- b) 使用成像方法检测所述抗体对所述人受试者的脑组织中tau多肽的结合。

治疗Tau病变的方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2012年8月16日提交的美国临时专利申请No.61/683,902,2013年1月18日提交的61/754,085,2013年3月14日提交的61/781,823,2013年4月19日提交的61/813,797,和2013年6月10日提交的61/833,355的权益,每项申请通过提及完整并入。

[0003] 通过提及并入作为文本文件提供的序列表

[0004] 序列表与本文一起以文本文件提供,“IPRN-745WO SeqList_ST25.txt”,其在2013年8月15日创建,并且具有69KB的大小。文本文件的内容通过提及完整并入本文。

[0005] 发明背景

[0006] 微管相关蛋白tau是中枢神经系统中丰富的,并且由神经元生成。tau的主要功能是稳定微管。成年人脑中存在6种tau同种型;tau同种型是单一基因的可变剪接的产物。

[0007] tau病变(Tauopathy)是一类源自tau蛋白在脑的所谓神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle,NFT)中的病理聚集的神经变性性疾病。tau病变的一些例子包括额颞叶痴呆(frontotemporal dementia,FTD)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、进行性核上性麻痹(progressive supranuclear palsy)、皮质基底变性(corticobasal degeneration)、和额颞叶变性(frontotemporal lobar degeneration)。

[0008] 本领域中需要治疗tau病变的方法,及适合于在此类方法中使用的试剂。

[0009] 发明概述

[0010] 本公开内容提供了治疗tau病变的方法,其涉及施用抗Tau抗体。本公开内容还提供了在所述方法中使用的抗Tau抗体和包含其的配制剂。

[0011] 特征

[0012] 本公开内容提供了分离的人源化单克隆抗体,其特异性结合Tau多肽的氨基酸15-24内的表位。在一些情况中,表位不包含磷酸化的氨基酸。在一些情况中,表位不包含硝化的氨基酸。在一些情况中,表位包含磷酸化的氨基酸、硝化的氨基酸、或磷酸化的氨基酸和硝化的氨基酸两者。

[0013] 本公开内容提供了分离的抗体,其包含人源化轻链框架区;和人源化重链框架区,其中分离的抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合:a)轻链区,其包含:i)包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;和b)重链区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10氨基酸序列的V_H CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3。在一些情况中,轻链区和重链区存在于不同的多肽中。在一些情况中,轻链区和重链区存在于单一多肽中。在一些情况中,重链区是同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的。在一些情况中,重链区是同种型IgG4的。在这些中的一些实施方案中,铰链区包含S241P取代。参见例如Angal等(1993) Mol. Immunol. 30:105。在一些情况中,抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab'。在一些情况中,抗体包含共价连接的非肽合成聚合物,例如聚(乙二醇)聚合物。在每种情况中,所述抗体直接或经由接头与促进穿过血脑

屏障的载体分子、肽或蛋白质融合。在一些情况中,表位在Tau多肽的氨基酸15-24内。在一些情况中,人源化轻链框架区包含表3中描述的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10处氨基酸取代。在一些情况中,人源化重链框架区包含表2中描述的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12处氨基酸取代。

[0014] 本公开内容提供了分离的抗体,其中抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab',且其中抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合:a)轻链区,其包含:i)包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;和b)重链区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3。在一些情况中,分离的抗体包含人源化轻链框架区。在一些情况中,人源化轻链框架区包含表3中描述的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10处氨基酸取代。在一些情况中,分离的抗体包含人源化重链框架区。在一些情况中,人源化重链框架区包含表2中描述的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12处氨基酸取代。

[0015] 本公开内容提供了分离的抗体,其中分离的抗体包含人轻链恒定区和人重链恒定区,且其中分离的抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合:a)轻链区,其包含:i)包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;和b)重链区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3。

[0016] 本公开内容提供了药物配制剂,其包含:a)本公开内容的抗Tau抗体;和b)药学可接受赋形剂。

[0017] 本公开内容提供了药物配制剂,其包含:a)特异性结合Tau的N端部分内的表位的抗体,其中该抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;(iii)包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;(iv)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1;(v)包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;和(vi)包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3;和b)适合于对人施用的药学可接受赋形剂,其中配制剂不含内毒素。在一些情况中,抗体包含人源化轻链框架区。在一些情况中,人源化轻链框架区包含表3中描述的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10处氨基酸取代。在一些情况中,抗体包含人源化重链框架区。在一些情况中,人源化重链框架区包含表2中描述的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12处氨基酸取代。在一些情况中,抗体是在脂质体中包裹的。在一些情况中,抗体用促进穿过血脑屏障的药剂配制。在每种情况中,所述抗体直接或经由接头与促进穿过血脑屏障的载体分子、肽或蛋白质融合。在一些情况中,抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab'。

[0018] 本公开内容提供了重组表达载体,其包含编码本公开内容的抗Tau抗体的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列与在真核细胞中有活性的转录控制元件可操作连接。本公开内容提供了体外宿主细胞,其用本公开内容的重组表达载体遗传修饰。

[0019] 本公开内容提供了无菌容器,其包含本公开内容的药物配制剂。在一些情况中,容器是注射器。

[0020] 本公开内容提供了治疗个体中的tau病变的方法,该方法包括对个体施用本公开内容的抗Tau抗体,或本公开内容的药物组合物。

[0021] 本公开内容提供了治疗个体中的tau病变的方法,该方法包括对个体施用药物组合物,所述药物组合物包含:a)与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合的抗体:i)图1B中描绘的抗体的轻链互补决定区(CDR);和图1A中描绘的抗体的重链CDR;或ii)图2B中描绘的抗体的轻链CDR;和图2A中描绘的抗体的重链CDR;和b)适合于对人施用的药理学可接受赋形剂。在一些情况中,抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;(iii)包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;(iv)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1;(v)包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;和(vi)包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3。在一些情况中,抗体包含人源化轻链框架区。在一些情况中,抗体包含人源化重链框架区。在一些情况中,抗体是在脂质体中包裹的。在一些情况中,抗体用促进穿过血脑屏障的药剂配制。在每种情况中,所述抗体直接或经由接头与促进穿过血脑屏障的载体分子、肽或蛋白质融合。在一些情况中,抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab'。在一些情况中,施用是静脉内的。在一些情况中,施用是鞘内的。

[0022] 在一些情况中,主题抗Tau抗体的施用导致下列一项或多项的变化:a)脑组织中游离的胞外tau的量;b)间质液(ISF)中游离的胞外tau的量;c)脑脊液(CSF)中游离的胞外tau的量;d)tau的神经元至神经元扩散;e)神经元内tau聚集体的量;f)小胶质和/或星细胞活化的程度;g)磷酸化的或超磷酸化的Tau的量;h)ISF或CSF中总的Tau或游离的tau的量;i)胞内N端tau片段的量;j)神经元活动过度;k)CSF中Aβ40和/或Aβ42的量;l)Aβ斑负荷;m)Aβ40和/或Aβ42自神经元的分泌;n)淀粉样前体蛋白(APP)促进剂活性;o)APP mRNA和/或蛋白质水平;p)β-分泌酶和/或γ分泌酶的活性;q)Aβ诱导的信号传导途径的活化状态;r)胞内总的tau或游离的tau的量;s)ISF或CSF中抗Tau抗体结合的tau的量;和t)胞内抗Tau抗体结合的tau的量。

[0023] 在一些情况中,用于治疗个体中的tau病变的本公开内容的方法进一步包括施用至少一种治疗所述tau病变的额外的药剂。

[0024] 本公开内容提供了一种监测个体中的tau病变进展的方法,该方法包括:a)测定在第一时间点时从所述个体获得的生物样品中的Tau多肽的第一水平;b)测定在第二时间点时从所述个体获得的生物样品中的Tau多肽的第二水平;并c)比较Tau的所述第二水平与Tau的所述第一水平,其中所述测定包括:i)使所述生物样品与权利要求1、5、16和21中任一项的抗体接触;并ii)定量所述抗体对所述样品中存在的Tau多肽的结合。在一些情况中,生物样品是脑脊液、血液、血浆、血清、尿液或唾液。在一些情况中,定量的Tau多肽是总的Tau多肽。在一些情况中,定量的Tau多肽是全长Tau多肽的N端片段。在一些情况中,所述第一时间点是启动治疗方案前的时间点,且其中所述第二时间点是启动治疗方案后的时间点。

[0025] 本公开内容提供了在体内检测活个体中的Tau多肽的方法,该方法包括:a)对所述个体施用权利要求1、5、16和21中任一项的抗体;并b)使用成像方法检测所述抗体对所述个

体的脑组织中Tau多肽的结合。在一些情况中,抗体包含适合于在所述成像方法中使用的造影剂。在一些情况中,成像方法是磁共振成像或正电子发射断层摄影术。

[0026] 本公开内容提供了检测从个体获得的生物样品中的Tau多肽的体外方法,所述方法包括:a)使所述生物样品与抗体接触,所述抗体与包含以下的抗体竞争对Tau的N端区内的表位的结合:i)图1B中描绘的抗体的轻链互补决定区(CDR);和图1A中描绘的抗体的重链CDR;或ii)图2B中描绘的抗体的轻链CDR;和图2A中描绘的抗体的重链CDR;和b)检测所述抗体对所述样品中存在的Tau多肽的结合。在一些情况中,生物样品是血液、血清、血浆、尿液、唾液或脑脊液。在一些情况中,所述个体怀疑具有tau病变,已经诊断为具有tau病变,或具有形成tau病变的遗传素因。在一些情况中,所述方法是定量的。在一些情况中,检测的所述Tau多肽是总的Tau多肽。在一些情况中,检测的所述Tau多肽是全长Tau多肽的N端片段。

[0027] 附图简述

[0028] 图1A和1B提供了IPN001VH(图1A)和VL(图1B)的氨基酸序列。互补决定区(CDR)为粗体文本且加下划线。

[0029] 图2A和2B提供了IPN002VH(图2A)和VL(图2B)的氨基酸序列。互补决定区(CDR)为粗体文本且加下划线。

[0030] 图3A-D描绘了抗Tau抗体IPN002对皮质神经元中Tau介导的膜去极化的影响。

[0031] 图4A-C描绘了从脑脊液(CSF)亲和分离Tau。

[0032] 图5描绘了Tau亲和分离之前和之后CSF和条件化培养基(CM)样品的量化。

[0033] 图6A-D提供了全长人Tau的氨基酸序列。

[0034] 图7描绘了条件化培养基中、来自P301L tau小鼠的间质液(ISF)中、及来自PSP和AD患者的CSF中Tau片段的检测。

[0035] 图8A-D描绘了通过胞外tau(eTau)片段诱导皮质神经元活动过度(图8A-C);和通过抗Tau抗体IPN001降低eTau诱导的神经元活动过度。

[0036] 图9描绘了人源化IPN002VH变体1的氨基酸序列;和编码氨基酸序列的核苷酸序列。

[0037] 图10描绘了人源化IPN002VH变体2的氨基酸序列;和编码氨基酸序列的核苷酸序列。

[0038] 图11描绘了人源化IPN002VH变体3的氨基酸序列;和编码氨基酸序列的核苷酸序列。

[0039] 图12描绘了人源化IPN002VH变体4的氨基酸序列;和编码氨基酸序列的核苷酸序列。

[0040] 图13描绘了人源化IPN002Vκ变体1的氨基酸序列;和编码氨基酸序列的核苷酸序列。

[0041] 图14描绘了人源化IPN002Vκ变体2的氨基酸序列;和编码氨基酸序列的核苷酸序列。

[0042] 图15描绘了人源化IPN002Vκ变体3的氨基酸序列;和编码氨基酸序列的核苷酸序列。

[0043] 图16描绘了人源化IPN002Vκ变体4的氨基酸序列;和编码氨基酸序列的核苷酸序列。

- [0044] 图17提供了表4,其显示了人源化IPN-002变体对eTau蛋白的结合特性。
- [0045] 图18提供了表5,其显示了人源化IPN-002变体对Tau-383的结合特性。
- [0046] 图19A和19B描绘了人源化IPN002变体的特性。图19A描绘了人源化IPN-002变体对iPSC-CN条件化培养基;iPSC-CN裂解物;AD脑裂解物;和P301L tau小鼠脑皮质裂解物;和猕猴脑裂解物中存在的tau的结合。图19B描绘了人源化IPN002变体对eTau诱导的神经元活动过度的抑制。
- [0047] 图20描绘了与胎儿tau氨基酸序列比对的eTau片段的氨基酸序列。
- [0048] 图21A-C描绘了对人源化抗Tau抗体(图21A)、嵌合抗体(图21B)、和人源化A33(图21C)的增殖响应。
- [0049] 图22描绘了IPN002对磷酸化的Tau体内水平的影响。
- [0050] 图23描绘了用IPN002处理后间质液(ISF)中的游离tau水平和总的tau水平的降低。
- [0051] 图24描绘了用IPN002处理后脑脊液(CSF)中游离的tau水平的降低。
- [0052] 图25描绘了通过IPN002降低eTau诱导的神经元活动过度。
- [0053] 图26描绘了来自可能具有慢性创伤性脑病(chronic traumatic encephalopathy)的个体的CSF中Tau片段的存在。
- [0054] 图27描绘了使用固相测定法得到的IPN002人源化变体对合成的tau蛋白的结合。
- [0055] 图28描绘了使用溶液相测定法得到的IPN002人源化变体对合成的tau蛋白的结合。
- [0056] 图29描绘了IPN002人源化变体对重组Tau和对PAD肽的结合。
- [0057] 图30描绘了合成的tau蛋白的非生物素化形式与合成的tau蛋白的生物素化形式竞争对IPN002人源化变体的结合。
- [0058] 图31描绘了施用对照IgG、PHF1或IPN002对P310L小鼠模型中紧握得分(clasping score)的影响。
- [0059] 图32描绘了施用对照IgG、PHF1、或IPN002对P310L小鼠模型中横杆行走测试(beam walk test)中的平均等待时间(average latency)的影响。
- [0060] 图33描绘了施用对照IgG、PHF1、或IPN002对P310L小鼠模型中CSF样品中游离的tau(不与抗Tau抗体结合的tau)水平的影响。
- [0061] 图34描绘了抗体对eTau1a诱导的神经元超兴奋性的抑制。
- [0062] 图35描绘了全长PHF1反应性tau,或eTau1a在体外对皮质神经元中的神经元超兴奋性的影响。
- [0063] 图36用图描绘了全长PHF1反应性tau,或eTau1a在体外对皮质神经元中的神经元超兴奋性的影响。
- [0064] 图37描绘了对照IgG、BACE抑制剂、或IPN002对从皮质神经元分泌的A β 40(左侧小图)或A β 42(右侧小图)水平的影响。
- [0065] 图38描绘了对照IgG、BACE抑制剂、或抗Tau抗体对从初级皮质神经元分泌的A β 40水平的影响。
- [0066] 图39描绘了对照IgG、BACE抑制剂、或抗Tau抗体对从初级皮质神经元分泌的A β 42水平的影响。

[0067] 图40描绘了IPN002人源化变体(hu-IPN002)的表位定位的结果。

[0068] 图41描绘了用于检测CSF中的各个Tau多肽的测定法。

[0069] 图42描绘了IPN002、PHF1、或多克隆抗体对CSF中Tau的结合,所述多克隆抗体结合Tau的C端部分中的线性表位(pAb-tau线性表位)。

[0070] 图43描绘了用对照IgG、PHF1、或IPN002处理P301L小鼠对CSF中总的tau水平的影响。

[0071] 图44A-H描绘了用对照IgG、PHF1、或IPN002处理P301L小鼠对各个脑区和组织中AT8磷酸(phospho)Tau的影响。

[0072] 图45A-E描绘了用对照IgG、PHF1、或IPN002处理P301L小鼠对各个脑区和组织中磷酸化的Tau的影响。

[0073] 图46描绘了用对照IgG、PHF1、或IPN002处理P301L小鼠对后脑中AT8磷酸Tau组织学水平的影响。

[0074] 图47描绘了用对照IgG、PHF1、或IPN002处理P301L小鼠对后脑中AT100磷酸Tau组织学水平的影响。

[0075] 图48A和48B描绘了用对照IgG、PHF1、或IPN002处理P301L小鼠对海马均浆中和皮质均浆中的GFAP蛋白水平的影响。

[0076] 图49A和49B描绘了用对照IgG、PHF1、或IPN002处理P301L小鼠对海马均浆中和皮质均浆中的Iba1蛋白水平的影响。

[0077] 图50A和50B描绘了用对照IgG、PHF1、或IPN002处理P301L小鼠对皮质均浆中和皮质S1级分中Aβ40水平的影响。

[0078] 图51描绘了用对照IgG、PHF1、或IPN002处理P301L小鼠对能够在横杆行走测试中完成任务的小鼠的百分比的影响。

[0079] 图52描绘了hu-IPN002对各种Tau肽的结合。

[0080] 图53描绘了各种生物素化的Tau肽与hu-IPN002的结合。

[0081] 图54A和54B是针对不与IPN002结合的Tau(游离的Tau)(图54A);和与IPN002结合的Tau(结合的Tau)(图54B)的测定法的示意图。

[0082] 定义

[0083] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”包括任何同种型的抗体或免疫球蛋白,保留对抗原的特异性结合的抗体片段,包括但不限于Fab、Fv、scFv、和Fd片段、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、双特异性抗体、和包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白的融合蛋白。可以例如用放射性同位素、生成可检测产物的酶、荧光蛋白等可检测标记抗体。抗体可以进一步与其它模块,诸如特异性结合对的成员,诸如生物素(生物素-亲和素特异性结合对的成员)等级合。抗体也可以与固体支持物结合,所述固体支持物包括但不限于聚苯乙烯板或珠,等等。该术语还涵盖Fab'、Fv、F(ab')₂、和或保留对抗原的特异性结合的其他抗体片段,和单克隆抗体。抗体可以是单价的或二价的。

[0084] 如本文中使用的,术语“人源化免疫球蛋白”指包含不同起源的免疫球蛋白部分的免疫球蛋白,其中至少一个部分包含人起源的氨基酸序列。例如,人源化抗体可以包含从具有需要特异性的非人起源(诸如小鼠)的免疫球蛋白衍生的部分和从人起源的免疫球蛋白序列衍生的部分(例如嵌合免疫球蛋白),它们通过常规技术(例如合成)化学连接在一起或

者或者使用遗传工程技术以连续多肽制备(例如,可以表达编码嵌合蛋白的蛋白质部分的DNA以生成连续的多肽链)。人源化免疫球蛋白的另一个例子是含有一个或多个免疫球蛋白链的免疫球蛋白,所述免疫球蛋白链包含自非人起源的抗体衍生的CDR和自人起源的轻链和/或重链衍生的框架区(例如具有或没有框架变化的CDR嫁接抗体)。术语人源化免疫球蛋白也涵盖嵌合或CDR嫁接的单链抗体。参见例如Cabilly等,美国专利No.4,816,567;Cabilly等,欧洲专利No.0,125,023B1;Boss等,美国专利No.4,816,397;Boss等,欧洲专利No.0,120,694B1;Neuberger,M.S.等,WO 86/01533;Neuberger,M.S.等,欧洲专利No.0,194,276B1;Winter,美国专利No.5,225,539;Winter,欧洲专利No.0,239,400B1;Padlan,E.A.等,欧洲专利申请No.0,519,596A1。关于单链抗体,还可参见Ladner等,美国专利No.4,946,778;Huston,美国专利No.5,476,786;及Bird,R.E.等,Science,242:423-426(1988))。

[0085] 例如,可以使用合成和/或重组核酸制备编码期望的人源化链的基因(例如cDNA)来生成人源化免疫球蛋白。例如,可以使用PCR诱变法改变编码人的或人源化的链的DNA序列,诸如来自先前人源化的可变区的DNA模板来构建编码人源化可变区的核酸(例如DNA)序列(参见例如Kamman,M.,等,Nucl.Acids Res.,17:5404(1989));Sato,K.,等,Cancer Research,53:851-856(1993);Daugherty,B.L.等,Nucleic Acids Res.,19(9):2471-2476(1991);及Lewis,A.P.and J.S.Crowe,Gene,101:297-302(1991))。使用这些或其它合适的方法,也可以容易地生成变体。例如,可以诱变克隆的可变区,并且可以选择编码具有期望特异性的变体的序列(例如从噬菌体文库中;参见例如Krebber等,美国专利No.5,514,548;Hoogenboom等,WO 93/06213,1993年4月1日公布)。

[0086] “抗体片段”包含完整抗体的部分,例如,完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的例子包括Fab、Fab’、F(ab’)₂和Fv片段;双抗体(diabody);线性抗体(Zapata等,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子;和自抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶对抗体的消化生成两个各具有单个抗原结合位点的相同抗原结合片段(称作“Fab”片段)和残留的“Fc”片段(反映容易结晶的能力的名称)。胃蛋白酶处理生成F(ab’)₂片段,其具有两个抗原结合位点,并且仍能够交联抗原。

[0087] “Fv”是含有完整的抗原识别和结合位点的最小限度抗体片段。此区域由紧密的非共价连接的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。每个可变域的3个CDR正是在此构造中相互作用以限定V_H-V_L二聚体的表面上的抗原结合位点。6个CDR共同对抗体赋予抗原结合特异性。然而,即使单个可变域(或Fv的一半,其仅包含对抗原特异性的3个CDR)也具有识别并结合抗原的能力,尽管亲和力比完整的结合位点低。

[0088] “Fab”片段也含有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH₁)。Fab片段与Fab’片段的差异在于重链CH₁域的羧基端的几个残基的添加,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab’-SH是本文中Fab’的名称,其中恒定域的半胱氨酸残基携带游离的巯基。F(ab’)₂抗体片段最初以成对的Fab’片段生成,所述Fab’片段具有它们之间的铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0089] 来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”基于其恒定域的氨基酸序列可以归入两个明显不同的类型(称作kappa和lambda)之一。根据其重链的恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以归入不同的类别。存在有主要的5类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG、和IgM,并且这些中的几种可以进一步分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、

IgA和IgA2。

[0090] “单链Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L域,其中这些域存在于单一多肽链中。在一些实施方案中,Fv多肽进一步包含V_H和V_L域之间的多肽接头,其使sFv能够形成抗原结合的期望结构。关于sFv的综述,参见Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol.113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994)。

[0091] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含在同一多肽链(V_H-V_L)中相连的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)。通过使用太短以至于不能容许同一链上的两个域间配对的接头,迫使所述域与另一条链的互补域配对,并且创建两个抗原结合位点。双抗体更完整记载于例如EP404,097;WO 93/11161;及Hollinger等(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*90:6444-6448。

[0092] 如本文中使用的,术语“亲和力”指两种药剂(例如抗体和抗原)的可逆结合的平衡常数,并且表示为解离常数(K_d)。亲和力可以比抗体对无关氨基酸序列的亲和力大至少1倍,大至少2倍,大至少3倍,大至少4倍,大至少5倍,大至少6倍,大至少7倍,大至少8倍,大至少9倍,大至少10倍,大至少20倍,大至少30倍,大至少40倍,大至少50倍,大至少60倍,大至少70倍,大至少80倍,大至少90倍,大至少100倍,或大至少1000倍,或更多。抗体对靶蛋白的亲和力可以是例如约100纳摩尔(nM)至约0.1nM,约100nM至约1皮摩尔(pM),或约100nM至约1飞摩尔(fM)或更多。如本文中使用的,术语“亲合力”指两个或更多个药剂的复合物对稀释后解离的抗性。术语“免疫反应性”和“优先结合”就抗体和/或抗原结合片段而言在本文中可互换使用。

[0093] 术语“结合”指由于例如共价、静电、疏水、和离子和/或氢键相互作用,包括诸如盐桥和水桥等相互作用引起的两个分子间的直接联合。主题的抗Tau抗体特异性结合Tau多肽内的表位。非特异性结合会指以小于约10⁻⁷M的亲和力结合,例如以10⁻⁶M,10⁻⁵M,10⁻⁴M等的亲和力结合。

[0094] 如本文中使用的,术语“CDR”或“互补决定区”意图指重链和轻链多肽两者的可变区内找到的非连续的抗原结合位点。CDR已经由Kabat等,*J. Biol.Chem.*252:6609-6616 (1977);Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991);by Chothia等,*J.Mol.Biol.*196:901-917 (1987);及MacCallum等,*J.Mol.Biol.*262:732-745 (1996)描述,其中限定包括在彼此比较时氨基酸残基的重叠或子集。不过,任一限定指抗体或嫁接抗体或其变体的CDR的应用意图在本文中限定并使用的术语的范围内。涵盖如通过每篇上文引用的参考文献限定的CDR的氨基酸残基在下文表1中列出作为比较。

[0095] 表1:CDR限定

[0096]

	Kabat ¹ (序列表) ²	Chothia ³	MacCallum ⁴
V _H CDR1	31-35 (31-35)	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65 (50-66)	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102 (99-106)	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34 (24-39)	26-32	30-36

V _L CDR2	50-56 (55-61)	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97 (94-102)	91-96	89-96

[0097] ¹残基编号遵循Kabat等,见上文的命名法

[0098] ²依照序列表中提供的编号方式的相应残基

[0099] ³残基编号遵循Chothia等,见上文的命名法

[0100] ⁴残基编号遵循MacCallum等,见上文的命名法

[0101] 如本文中使用的,术语“框架”在提及抗体可变区使用时意图指抗体的可变区内的CDR区外部的所有氨基酸残基。可变区框架通常是长度为约100-120个氨基酸的不连续的氨基酸序列,但是意图仅指CDR外部的那些氨基酸。如本文中使用的,术语“框架区”意图指以CDR隔开的框架的每个域。

[0102] “分离的”抗体指已经从其天然环境的组分鉴定和分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染性组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的材料,并且可以包括酶、激素、和其他蛋白质性或非蛋白质性溶质。在一些实施方案中,抗体会纯化(1)至大于90%,大于95%,或大于98%(按抗体重量计),如通过Lowry法测定的,例如,超过99%(按重量计), (2)至足以通过使用旋转杯顺序分析仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)根据使用考马斯蓝或银染剂在还原性或非还原性条件下的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)至同质性。分离的抗体包括重组细胞内原位的抗体,

[0103] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指任何长度的氨基酸的聚合形式,其可以包括遗传编码的和非遗传编码的氨基酸,化学或生物化学修饰的或衍生化的氨基酸,和具有经修饰的肽主链的多肽。该术语包括融合蛋白,包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白,具有异源和同源前导序列(具有或没有N端甲硫氨酸残基)的融合物;免疫学标签化蛋白质(immunologically tagged protein);等等。

[0104] 如本文中使用的,术语“治疗”和“处理”指获得期望的药理和/或生理效果。效果就完全或部分预防疾病或其症状而言可以是防范性的和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于疾病的不利影响而言可以是治疗性的。如本文中使用的,“治疗/处理”涵盖哺乳动物中,特别是人中的疾病的任何治疗,并且包括:(a)预防疾病在受试者中发生,所述受试者可以具有疾病的素因,但是尚未诊断为具有疾病;(b)抑制疾病,即阻滞其形成;和(c)减轻疾病,即引起疾病消退。

[0105] 术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用,指哺乳动物,包括但不限于鼠(大鼠,小鼠)、非人灵长类、人、犬、猫、有蹄动物(例如马、牛、绵羊、猪、山羊)等。

[0106] “治疗有效量”或“有效量”指在对哺乳动物或其它受试者施用以治疗疾病时足以实现疾病的所述治疗的抗Tau抗体量。“治疗有效量”会抗Tau抗体、要治疗的受试者的疾病和其严重性和年龄、重量等而变化。

[0107] “生物样品”涵盖从个体获得的多种样品类型,并且可以在诊断或监测测定法中使用。该定义涵盖生物起源的血液和其它液体样品,实体组织样品,诸如活组织检查样本或组织培养物或自其衍生的细胞及其后代。该定义还包括在其获得后已经以任何方式操作,诸如通过用试剂处理,溶解,或富集某些组分,诸如多核苷酸的样品。术语“生物样品”涵盖临床样品,并且还包括培养的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物流体、和组织样品。术语“生物样品”包括尿液、唾液、脑脊液、血液级分,诸如血浆和血清,等等。

[0108] 在进一步描述本发明前,应当理解本发明不限于描述的具体实施方案,因此,其当然可以变化。还应当理解,本文中使用的术语仅为了描述具体的 实施方案,而并不意图为限制性的,因为本发明的范围仅会以所附权利要求书限定。

[0109] 在提供数值范围的情况下,应当理解所述范围的上限和下限和所述规定范围中的任何其他规定或居间数值之间的每个居间数值(除非上下文另有明确叙述,至下限单位的十分之一)涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立包括在较小的范围中,并且也涵盖在本发明内,服从规定范围中任何明确排除的限度。在规定的范围包含一个或两个限度的情况下,排除那些包括的限度之任一或两者的范围也包含在本发明中。

[0110] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料也可以在本发明的实施或测试中使用,但是现在描述了优选的方法和材料。本文中提及的所有出版物通过提及并入本文以公开并描述引用的出版物结合的方法和/或材料。

[0111] 应当注意到,如本文中和所附权利要求书中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“所述/该”包括复数指示物,除非上下文另有明确规定。因此,例如,提及“人源化抗Tau抗体”包括多个所述抗体,并且提及“tau病变”包括提及一种或多种tau病变及本领域技术人员已知的其等同物,等等。进一步注意到权利要求书可以以排除任何可选要素的方式撰写。因此,对于结合权利要求要素叙述使用诸如“单独”、“仅”等排除式术语,或使用“否定”限制,此叙述意图充当前项基础。

[0112] 应当领会,本发明的某些特征(为了清楚,其在不同实施方案的背景中使用)也可以与单个实施方案结合提供。相反,本发明的多个特征(为了简短,其在单个实施方案的背景中描述)也可以分开或在任何合适的亚组合中提供。属于本发明的实施方案的所有组合被本发明明确涵盖,并且在本文中公开,就像每一个组合单独且明确公开一样。另外,各个实施方案及其要素的所有亚组合也被本发明明确涵盖,并且在本文中公开,就像每一个此类亚组合单独且明确在本文中公开一样。

[0113] 本文中讨论的出版物仅提供其在本申请的提交日前的公开内容。凭借在先发明,本文中的任何内容不应解释为承认本发明没有资格早于此类出版物。此外,提供的出版物的日期可能不同于实际出版日,这可能需要独立确认。

[0114] 发明详述

[0115] 本公开内容提供了治疗tau病变的方法,其涉及施用抗Tau抗体。本公开内容还提供了在方法中使用的抗Tau抗体和包含其的配制剂。本公开内容进一步提供了使用本文中描述的抗Tau抗体的体外和体内检测方法。

[0116] 治疗Tau病变的方法

[0117] 本公开内容提供了治疗tau病变的方法。该方法一般涉及对此需要的个体施用有效量的本公开内容的抗Tau抗体。在一些情况中,主题抗Tau抗体的施用降低个体的细胞、组织、或流体中病理Tau多肽的水平,并治疗tau病变。

[0118] 例如,在一些实施方案中,主题方法可以包括施用有效量的分离的人源化单克隆抗体,其特异性结合Tau多肽的氨基酸15-24内的表位。在一些实施方案中,抗体存在于具有药学可接受赋形剂,例如适合于对人施用的药学可接受赋形剂的药物配制剂中。

[0119] 例如,在一些实施方案中,主题方法可以包括对此需要的个体使用有效量的分

离的抗体,所述分离的抗体包含人源化轻链框架区;和人源化重链框架区,其中分离的抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合:a)轻链区,其包含:i)包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;和b)重链区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12氨基酸序列的V_H CDR3。在一些实施方案中,抗体存在于具有药学可接受赋形剂,例如适合于对人施用的药学可接受赋形剂的药物配制剂中。

[0120] 例如,在一些实施方案中,主题方法可以包括对此需要的个体使用有效量的分离的抗体,其中抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab',且其中抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合:a)轻链区,其包含:i)包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;和b)重链区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3。在一些实施方案中,抗体存在于具有药学可接受赋形剂,例如适合于对人施用的药学可接受赋形剂的药物配制剂中。

[0121] 例如,在一些实施方案中,主题方法可以包括对此需要的个体使用有效量的分离的抗体,其中分离的抗体包含人轻链恒定区和人重链恒定区,且其中分离的抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合:a)轻链区,其包含:i)包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;和b)重链区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3。在一些实施方案中,抗体存在于具有药学可接受赋形剂,例如适合于对人施用的药学可接受赋形剂的药物配制剂中。

[0122] 本公开内容的抗Tau抗体结合胞外tau。如本文中使用的,“胞外tau”(“eTau”)涵盖可以在脑脊液(CSF)或间质液(ISF)中检出的任何Tau多肽。在一些实施方案中,eTau是具有175个氨基酸的长度并且包含全长tau的氨基酸2-176的多肽;例如,在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:45中所列的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,eTau是具有171个氨基酸的长度并且包含全长tau的氨基酸2-172(SEQ ID NO:44)的多肽;例如,在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:44中所列的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:46中所列的氨基酸序列的eTau-2多肽。在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:47中所列的氨基酸序列的eTau-3多肽。在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:48中所列的氨基酸序列的eTau-4多肽。

[0123] 在一些情况中,eTau多肽具有约50个氨基酸至约175个氨基酸,例如约50个氨基酸(aa)至约75个aa,约75个aa至约100个aa,约100个aa至约125个aa,约125个aa至约150个aa,或约150个aa至约175个aa的长度;并且可以包含全长tau的氨基酸2-176的50至约75,约75至约100,约100至约125,约125至约150,或约150至约175个连续氨基酸。图20中描绘了例示

性的eTau多肽。

[0124] 如下文更为详细描述,本公开内容的抗Tau抗体特异性结合Tau,其中被抗原结合的表位是线性表位,且包含Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内,Tau的氨基酸13-24内,Tau的氨基酸15-44内,或Tau的氨基酸15-24内的氨基酸残基。图6A-D中描绘了人Tau同种型的氨基酸序列。Tau的氨基酸1-18是:MAEPRQEFVMDHAGTY;SEQ ID NO:53)。参见例如Garcia-Sierra等(2003) *J. Alzheimer's Disease* 5:65;及Horowitz等(2004) *J. Neurosci.* 24:7895。Tau的氨基酸15-24是:AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)。

[0125] 在一些实施方案中,本公开内容的抗Tau抗体特异性结合Tau,其中被抗体结合的表位是线性表位,且包含Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内的氨基酸残基。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内的氨基酸残基的线性表位,其中表位不包含磷酸化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内的氨基酸残基的线性表位,其中表位包含磷酸化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内的氨基酸残基的线性表位,其中表位不包含硝化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内的氨基酸残基的线性表位,其中表位包含硝化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内的氨基酸残基的线性表位,其中表位包含硝化的氨基酸,并且不包含磷酸化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内的氨基酸残基的线性表位,其中表位包含磷酸化的氨基酸,并且不包含硝化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内的氨基酸残基的线性表位,其中表位包含硝化的氨基酸和磷酸化的氨基酸。

[0126] 例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗Tau抗体特异性结合包含Tau 的氨基酸AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) 内的氨基酸残基的线性表位。在一些实施方案中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) 内的氨基酸残基的线性表位。

[0127] 在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) 内的氨基酸残基的线性表位,其中表位不包含磷酸化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) 内的氨基酸残基的线性表位,其中表位包含磷酸化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) 内的氨基酸残基的线性表位,其中表位不包含硝化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) 内的氨基酸残基的线性表位,其中表位包含硝化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) 内的氨基酸

残基的线性表位,其中表位包含硝化的氨基酸,并且不包含磷酸化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51) 内的氨基酸残基的线性表位,其中表位包含磷酸化的氨基酸,并且不包含硝化的氨基酸。在一些情况中,本公开内容的人源化抗Tau抗体特异性结合包含Tau的氨基酸AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51) 内的氨基酸残基的线性表位,其中表位包含硝化的氨基酸和磷酸化的氨基酸。

[0128] 在一些情况中,用于治疗tau病变的本公开内容的方法包括对此需要的个体施用药物组合物,该药物组合物包含:a) 抗Tau抗体,其包含:i) 图1中描绘的抗体的1、2或3个轻链互补决定区(CDR);和图1中描绘的抗体的1、2或3个重链CDR;或ii) 图2中描绘的抗体的1、2或3个轻链CDR;和图2中描绘的抗体的1、2或3个重链CDR;和b) 适合于对人施用的药学可接受赋形剂。

[0129] 在一些情况中,用于治疗tau病变的本公开内容的方法包括对此需要的个体施用药物组合物,该药物组合物包含:a) 特异性结合人Tau多肽内的表位的抗体,其中抗体与包含以下的抗体竞争对表位的结合:i) 图1B中描绘的抗体的轻链互补决定区(CDR);和图1A中描绘的抗体的重链CDR;或ii) 图2B中描绘的抗体的轻链CDR;和图2A中描绘的抗体的重链CDR;和b) 适合于对人施用的药学可接受赋形剂。

[0130] 在一些情况中,用于治疗tau病变的本公开内容的方法包括对此需要的个体施用药物组合物,该药物组合物包含:a) 抗体,该抗体与人源化IPN002 (hu-IPN002) 竞争对Tau中被hu-IPN002识别的表位(例如Tau的N端部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内,Tau的氨基酸15-44内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内的线性表位)的结合;和b) 适合于对人施用的药学可接受赋形剂。

[0131] IPN001 (在本文中又称为“IPN1”或“IPN-1”)和IPN002 (在本文中又称为“IPN2”或“IPN-2”)特异性结合Tau。被IPN001结合的表位是线性表位,并且包含Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内的氨基酸残基。

[0132] 在一些情况中,适合于在治疗tau病变的方法中使用的本公开内容的抗Tau抗体包括:a) 轻链可变区,其包含:i) IPN001抗体的1、2或3个V_L CDR;和ii) 人源化轻链框架区;和b) 重链可变区,其包含:i) IPN001抗体的1、2或3个V_H CDR;和ii) 人源化重链框架区;其中V_H和V_L CDR如Kabat限定(参见例如表1,上文;及Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991))。

[0133] 在一些情况中,适合于在治疗tau病变的方法中使用的本公开内容的抗Tau抗体包括:a) 轻链区,其包含:i) IPN001抗体的1、2或3个V_L CDR;和ii) 人源化轻链框架区;和b) 重链区,其包含:i) IPN001抗体的1、2或3个V_H CDR;和ii) 人源化重链框架区;其中V_H和V_L CDR如Chothia限定(参见例如表1,上文;及Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917 (1987))。

[0134] 在其他例子中,适合于在治疗tau病变的方法中使用的本公开内容的抗Tau抗体包含:a) 轻链区,其包含:i) IPN002抗体的1、2或3个V_L CDR;和ii) 人源化轻链框架区;和b) 重链区,其包含:i) IPN002抗体的1、2或3个V_H CDR;和ii) 人源化重链框架区;其中V_H和V_L CDR如Kabat限定(参见例如表1,上文;及Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991))。

[0135] 在其他例子中,本公开内容的抗Tau抗体(例如特异性结合Tau多肽中的表位的主

题抗体,其中表位在Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内,Tau的氨基酸15-44内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内)包含:a)轻链区,其包含:i) IPN002抗体的1、2或3个V_L CDR;和ii)人源化轻链框架区;和b)重链区,其包含:i) IPN002抗体的1、2或3个V_H CDR;和ii)人源化重链框架区;其中V_H和V_L CDR如Chothia限定(参见例如表1,上文;及Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。

[0136] 在一些情况中,用于治疗tau病变的本公开内容的方法包括有此需要的个体施用有效量的药物组合物,该药物组合物包含:a)抗体,其特异性结合Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内(其中Tau的氨基酸1-18是:MAEPRQEFVMDHAGTY;SEQ ID NO:53),Tau的氨基酸15-44内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内(其中Tau的氨基酸15-24是:AGTYGLGDRK(SEQ ID NO:51))的线性表位,其中抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;(iii)包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;(iv)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1;(v)包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;和(vi)包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3;和b)适合于对人施用的药学可接受赋形剂。

[0137] 图1A和1B中描绘了IPN001的V_H和V_L氨基酸序列。CDR(如由Kabat限定)为粗体文本且加下划线。图2A和2B中描绘了IPN002的V_H和V_L氨基酸序列。CDR(如由Kabat限定)为粗体文本且加下划线。

[0138] SEQ ID NO:1-12如下:

[0139] RSSQTILHSNGNTYLE (SEQ ID NO:1);

[0140] KVSKRFS (SEQ ID NO:2);

[0141] FQGSLVPWA (SEQ ID NO:3);

[0142] SYGMS (SEQ ID NO:4);

[0143] TISSSGSRTYFPDSVKG (SEQ ID NO:5);

[0144] TWDGAMDY (SEQ ID NO:6);

[0145] KSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:7);

[0146] KVSNRFS (SEQ ID NO:8);

[0147] FQGSLVPWA (SEQ ID NO:9);

[0148] KYGMS (SEQ ID NO:10);

[0149] TISSSGSRTYYPPDSVKG (SEQ ID NO:11);

[0150] SWDGAMDY (SEQ ID NO:12)。

[0151] 在一些情况中,抗体包含人源化轻链框架区和/或人源化重链框架区。下文更为详细描述了人源化的抗Tau抗体。

[0152] tau病变是以个体的细胞、组织或流体中异常的tau水平为特征的病症。在一些情况中,tau病变以细胞、组织或流体中存在升高(高于正常)的tau或Tau多肽水平和/或tau的病理形式为特征。例如,在一些情况中,tau病变以脑组织和/或脑脊液中存在升高(高于正常)的tau或Tau多肽水平和/或tau的病理形式为特征。细胞、组织或流体中“高于正常”的tau水平指示组织或流体中的tau水平高于正常对照水平,例如高于相同年龄组的个体或个

体群体的正常对照水平。参见例如Blomberg等(2001)“Cerebrospinal fluid tau levels increase with age in healthy individuals”*Dement.Geriatr.Cogn.Disord.*12:127。在一些情况中,具有tau病变的个体展现出tau病变的一种或多种别的症状(例如认知下降)。

[0153] 在其他情况中,tau病变以细胞、组织或流体中存在低于正常的tau水平为特征。组织或流体中“低于正常”的tau水平指示细胞、组织或流体中的tau水平低于正常对照水平,例如低于相同年龄组的个体或个体群体的正常对照水平。

[0154] 阿尔茨海默氏病和额颞叶痴呆的某些形式(匹克(Pick)氏病、散发性额颞叶痴呆和与染色体17有关的额颞叶痴呆伴帕金森病(Parkinsonism))是tau病变的最常见形式。本公开内容提供了如上文描述的治疗方法,其中tau病变是阿尔茨海默氏、匹克氏病、散发性额颞叶痴呆和与染色体17有关的额颞叶痴呆伴帕金森病。其他tau病变包括但不限于进行性核上性麻痹(PSP)、皮质基底变性(CBD)和亚急性硬化性全脑炎(Subacute sclerosing panencephalitis)。

[0155] 神经变性性tau病变包括阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis)/帕金森病-痴呆综合症(parkinsonism-dementia complex)、嗜银颗粒性痴呆(argyrophilic grain dementia)、英国型淀粉样血管病(British type amyloid angiopathy)、脑淀粉样血管病(cerebral amyloid angiopathy)、皮质基底变性、克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、拳击员痴呆(dementia pugilistica)、弥散性神经原纤维缠结伴有钙化、唐氏综合征(Down's syndrome)、额颞叶痴呆(FTD)、与染色体17有关的额颞叶痴呆伴帕金森病、额颞叶变性、格斯特曼-施特劳斯纳-杉克病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、哈勒沃登-施帕茨病(Hallervorden-Spatz disease)、包涵体肌炎(inclusion body myositis)、多系统萎缩(multiple system atrophy)、肌强直性营养不良(myotonic dystrophy)、尼曼-匹克病(Niemann-Pick disease)C型、非关岛运动神经元病(non-Guamanian motor neuron disease)伴神经原纤维缠结、匹克氏病、脑炎后帕金森病(postencephalitic parkinsonism)、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病(prion protein cerebral amyloid angiopathy)、进行性皮质下神经胶质增生(progressive subcortical gliosis)、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎(subacute sclerosing panencephalitis)、仅缠结痴呆(Tangle only dementia)、多发性梗死性痴呆(multi-infarct dementia)、缺血性中风(ischemic stroke)、慢性创伤性脑病(chronic traumatic encephalopathy,CTE)、创伤性脑损伤(traumatic brain injury,TBI)和中风。

[0156] 本公开内容还提供了治疗共核蛋白病(synucleinopathy),例如帕金森氏病(Parkinson's disease,PD);路易体痴呆(dementia with Lewy Bodies,DLB);多器官萎缩(MSA)等的方法。例如,PD伴有痴呆(PDD)可以用主题方法治疗。

[0157] 在一个实施方案中,本公开内容的抗Tau抗体阻止或延迟受试者中神经变性性tau病变的至少一种症状的发作。在一个实施方案中,主题抗Tau抗体降低或消除受试者中神经变性性tau病变的至少一种症状。症状可以是在受试者的脑或脊髓中形成下列一项或多项:病理性tau沉积物;胞外可溶性Tau和/或Tau片段;超磷酸化的Tau沉积物;不溶性tau沉积物;神经原纤维缠结;神经原纤维纤维;前缠结磷酸-tau聚集体(pre-tangle phospho-tau aggregate);神经元内神经原纤维缠结;神经元活动过度;和神经元外神经原纤维缠结。症状可以是神经学症状,例如,受损的认知功能、记忆损伤、运动功能丧失,等等。在一些情况

中,本公开内容的抗Tau抗体可以改善认知功能。在一些情况中,本公开内容的抗Tau抗体可以降低认知功能的下降速率。在一些情况中,本公开内容的抗Tau抗体可以改善运动功能。在一些情况中,本公开内容的抗Tau抗体可以降低运动功能的下降速率。

[0158] 症状也可以是个体的CSF中的Tau多肽水平。例如,在一些实施方案中,与在用抗Tau抗体治疗前个体的CSF中的Tau多肽水平相比,主题抗Tau抗体在作为单一疗法或在联合疗法中以一剂或多剂对具有tau病变的个体施用时将 个体的CSF中的Tau多肽水平降低至少约10%,至少约15%,至少约20%,至少约25%,至少约30%,至少约40%,至少约50%,或超过50%。

[0159] 主题抗Tau抗体对个体的施用可以导致下列一项或多项:脑组织中游离的胞外tau量的减少;tau (例如Tau片段) 的神经元至神经元扩散的降低(例如神经元至神经元扩散);tau聚集体(例如胞内(例如神经元内) tau聚集体) 量的减少;脑组织中神经原纤维缠结量的减少;小胶质活化和/或星细胞活化水平的降低;磷酸化的Tau量的减少;超磷酸化的Tau量的减少;总的Tau(例如总胞内Tau;和/或总胞外Tau) 的减少;游离的Tau(例如不与主题抗Tau抗体结合的Tau) 减少;神经元活动过度的降低;和N端Tau片段量的减少。“总的Tau”可以包括任何同种型的全长Tau;和存在并且展示被主题抗Tau抗体识别的表位的任何N端Tau片段的总和。人全长Tau的氨基酸序列呈现于图6A-D。可以使用任何已知的方法,例如使用抗磷酸-Tau抗体的免疫学方法测定磷酸化的Tau的减少。

[0160] 主题抗Tau抗体对个体的施用可以导致下列一项或多项的变化:a) 脑组织中游离的胞外tau的量;b) 间质液(ISF) 中游离的胞外tau的量;c) 脑脊液(CSF) 中游离的胞外tau的量;d) tau的神经元至神经元扩散;e) 神经元内tau聚集体的量;f) 小胶质和/或星细胞活化的程度;g) 磷酸化的或超磷酸化的Tau的量;h) ISF或CSF中总的Tau或游离的tau的量;i) 胞内N端tau片段的量;j) 神经元活动过度;k) CSF中Aβ40和/或Aβ42的量;l) Aβ斑负荷;m) Aβ40和/或Aβ42自神经元的分泌;n) 淀粉样前体蛋白(APP) 促进剂活性;o) APP mRNA和/或蛋白质水平;p) beta-分泌酶和/或gamma分泌酶的活性;q) Aβ诱导的信号传导途径的活化状态;r) 胞内总的tau或游离的tau的量;s) ISF或CSF中抗Tau抗体结合的tau的量;和t) 胞内抗Tau抗体结合的tau的量。

[0161] 在一些情况中,主题抗Tau抗体对个体的施用可以改善个体的认知功能,或至少降低个体的认知功能的下降速率。

[0162] 在一些情况中,与用抗Tau抗体施用前个体中游离的胞外tau多肽量相比,主题抗Tau抗体对个体的施用将游离的胞外tau多肽量(例如脑组织中的游离的胞外tau多肽量) 减少至少约10%,至少约20%,至少约25%,至少约50%,或超过50%。

[0163] 在一些情况中,与用主题抗Tau抗体施用前细胞至细胞扩散相比,主题抗Tau抗体对个体的施用将Tau多肽(例如病理性Tau多肽) 的细胞至细胞(例如神经元至神经元) 扩散降低至少约10%,至少约20%,至少约25%,至少约50%,或超过50%。

[0164] 在一些情况中,与用抗Tau抗体施用前tau聚集体量相比,主题抗Tau抗体对个体的施用将tau聚集体(例如胞内(例如神经元内) tau聚集体) 量减少至少约10%,至少约20%,至少约25%,至少约50%,或超过50%。

[0165] 在一些情况中,主题抗Tau抗体对个体的施用降低个体中的神经毒性;和/或降低个体中的神经炎症;和/或降低星细胞和小神经胶质的活化;和/或降低病理性电生理效应

的诱导;和/或降低外来体中的tau量。

[0166] 在一些情况中,与用抗Tau抗体施用前神经元活动过度程度的水平相比,主题抗Tau抗体对个体的施用将神经元活动过度降低至少约10%,至少约20%,至少约25%,至少约50%,或超过50%。在一些情况中,主题抗Tau抗体对个体的施用将神经元活动过度降低至少约10%,至少约20%,至少约25%,至少约50%,或超过50%,如通过神经元的全细胞膜片钳记录;例如诱导性多能性干细胞衍生的皮质神经元(iPSC-CN)或人皮质神经元培养物(HCC)的全细胞膜片钳记录测定的。

[0167] 可以通过不同方式,例如通过静脉内,腹膜内,皮下,颅内,胸内,动脉内(例如经由颈动脉),肌肉内,鼻内,表面或皮内施用或脊髓或脑投递实现合适的组合物的施用。气溶胶配制剂诸如鼻喷雾配制剂包含活性剂的纯化的水性或其它溶液及防腐剂和等张剂。将此类配制剂调节至与鼻粘膜相容的pH和等张状态。

[0168] 在一些情况中,以如下的方式修饰或配制主题抗Tau抗体,从而提供抗体穿过血脑屏障的能力。可以通过各种肠和胃肠外施用路径,包括口服,静脉内等对具有tau病变的个体施用此类抗体或抗体组合物。

[0169] 用于胃肠外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳剂。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油诸如橄榄油,和可注射有机酯,诸如油酸乙酯。水性载体包括水、醇性(alcoholic)/水性溶液、乳剂或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。胃肠外媒介物包含氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸盐林格氏、或不挥发性油。静脉内媒介物包含液体和营养补充物、电解质补充物(诸如那些基于林格氏右旋糖的),等等。也可以存在防腐剂和/或其他添加剂,诸如例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、和惰性气体,等等。此外,根据药学组合物的意图用途,本公开内容的药物组合物可以包含其他药剂,诸如多巴胺或精神药理学药物。

[0170] 主治内科医师或其他医学人员会基于各种临床因素确定剂量方案。如医学领域中公知的,任一名患者的剂量取决于多种因素,包括患者的体格、体表面积、年龄、要施用的具体化合物、性别、施用次数和路径、一般健康、和同时施用的其它药物。主题抗Tau抗体的剂量可以例如在0.001 μ g至1000 μ g的范围中;然而,涵盖高于或低于此例示性范围的剂量,特别是考虑到上述的因素。一般地,剂量范围可以为例如约0.0001至100mg/kg,或约0.01至5mg/kg(例如0.02mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg,等等)宿主题重。例如,剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内,或至少1mg/kg。上述范围中的中间剂量也意图在本发明的范围内。受试者可以每天、隔天(on alternative days)、每周或根据通过经验分析确定的任何其它日程表施用此类剂量。一种例示性的治疗必需在例如至少6个月的延长时段里多剂施用。其它例示性的治疗方案必需每两周一次或一月一次或每3至6个月一次施用。例示性的剂量日程表包括连续几天1-10mg/kg或15mg/kg,隔天30mg/kg或每周60mg/kg。在一些方法中,同时施用两种或更多种具有不同结合特异性的单克隆抗体,在该情况中施用的每种抗体的剂量落入指定的范围内。可以通过定期评估监测进展。

[0171] 联合疗法

[0172] 可以单独(例如作为单一疗法);或在与一种或多种别的治疗剂的联合疗法中对有此需要的个体施用本公开内容的抗Tau抗体。

[0173] 为了治疗AD,合适的别的治疗剂包括但不限于乙酰胆碱酯酶抑制剂,包括但不限于Aricept(多奈哌齐(donepezil))、Exelon(利伐斯的明(rivastigmine))、美曲膦酯(metrifonate)、和他克林(tacrine)(Cognex);抗A β 抗体;非类固醇消炎药,包括但不限于布洛芬(ibuprofen)和茚甲新(indomethacin);环加氧酶-2(Cox2)抑制剂,诸如塞来考昔(Celebrex);和单胺氧化酶抑制剂,诸如Selegiline(Eldepryl或苄甲炔胺(Deprenyl))。每种上述药剂的剂量是本领域中已知的。

[0174] 在治疗AD中的另一种合适的别的治疗剂是抑制tau聚集的药剂,例如抑制tau聚集的萘醌衍生物,如记载于美国专利No.7,605,179的。另一种合适的别的治疗剂是抑制tau磷酸化的药剂,例如抑制tau蛋白激酶1的3-取代-4-嘧啶酮衍生物,如记载于美国专利No.7,572,793的。

[0175] 如本文中使用的,“与...组合”指如下的用途,其中例如第一化合物在第二化合物的整个施用过程期间施用;其中第一化合物施用的一段时间与第二化合物的施用重叠,例如其中第一化合物的施用在第二化合物的施用前开始,并且第一化合物的施用在第二化合物的施用结束前结束;其中第二化合物的施用在第一化合物的施用前开始,并且第二化合物的施用在第一化合物的施用结束前结束;其中第一化合物的施用在第二化合物的施用开始前开始,并且第二化合物的施用在第一化合物的施用结束前结束;其中第二化合物的施用在第一化合物的施用开始前开始,并且第一化合物的施用在第二化合物的施用结束前结束。因此,“与...组合”也可以指涉及两种或更多种化合物的施用的方案。如本文中使用的,“与...组合”也指可以在相同或不同配制剂中,通过相同或不同路径,及在相同或不同剂量形式类型中施用的两种或更多种化合物的施用。

[0176] 要治疗的个体

[0177] 适合于用主题抗Tau抗体治疗的个体包括已经诊断为具有tau病变的个体;在形成tau病变方面比一般人群具有更大风险的个体(例如具有形成tau病变的遗传素因的个体);具有PDD的个体;等等。在一些情况中,个体是成年人。在一些情况中,成年人是30岁龄或更年长;40岁龄或更年长,50岁龄或更年长,60岁龄或更年长,70岁龄或更年长,或80岁龄或更年长。例如,成年人可以是40岁至50岁,50岁至60岁,60岁至70岁,或年龄超过70岁。

[0178] 降低A β 40和A β 42水平的方法

[0179] 本公开内容提供了降低个体的神经元细胞和/或细胞外液中的A β 40和/或A β 42水平的方法。该方法一般牵涉对个体施用:a)有效量的结合Tau多肽的N端区的人源化抗体;或b)包含人源化抗体的药物组合物。

[0180] 结合Tau多肽的N端区并且适合于用于减少神经元细胞和/或细胞外液中的A β 40和A β 42的主题方法的人源化抗体是如下的人源化抗体,其结合Tau的氨基酸2-176内,例如Tau的氨基酸2-15,氨基酸15-24,氨基酸24-50,氨基酸2-25,氨基酸15至50,氨基酸50至75,氨基酸40至60,氨基酸75至100,氨基酸60至80,氨基酸100至125,氨基酸80-115,氨基酸125至150,氨基酸115至140,氨基酸150至176,或氨基酸140至160内的Tau表位。图20中描绘了例示性的Tau多肽;降低个体的神经元细胞和/或细胞外液中的A β 40和/或A β 42水平的抗体可以是特异性结合图20中描绘的Tau多肽中的表位的人源化抗体。

[0181] 在一些情况中,降低个体的神经元细胞和/或细胞外液中的A β 40和/或A β 42水平并且适合于用于主题方法的抗体是本公开内容的人源化抗Tau抗体。在一些情况中,抗体是结

合Tau的氨基酸15-24内的表位的人源化抗体。

[0182] 抗Tau抗体

[0183] 本公开内容提供了分离的抗Tau抗体和包含其的药物配制剂。

[0184] 本公开内容提供了分离的抗体,其特异性结合Tau多肽的N端区内的表位(例如Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内(其中Tau的氨基酸1-18是:MAEPRQEFVEMDHAGTY;SEQ ID NO:53),Tau的氨基酸15-44内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内(其中Tau的氨基酸15-24是:AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)的线性表位)。在一些情况中,抗体是人源化的,例如重链可变区和/或轻链可变区的一个或多个框架区包含从人免疫球蛋白框架衍生的序列。

[0185] 本公开内容提供了分离的人源化单克隆抗体,其特异性结合Tau多肽的氨基酸15-24内的表位。在一些情况中,表位不包含磷酸化的氨基酸。在一些情况中,表位不包含硝化的氨基酸。在一些情况中,表位包含磷酸化的氨基酸、硝化的氨基酸、或磷酸化的氨基酸和硝化的氨基酸两者。

[0186] 框架区的人源化降低抗体在人中引发人抗小鼠抗体(HAMA)应答的风险。可以实施本领域公认的测定免疫应答的方法以在特定患者中或在临床试验期间监测HAMA应答。可以在开始疗法施用时及贯穿疗法施用对施用人源化抗体的患者给予免疫原性评估。例如,使用本领域技术人员已知的方法,包括表面等离子共振技术(BIACORE)和/或固相酶联免疫吸附测定法(ELISA)分析通过检测来自患者的血清样品中的针对人源化治疗剂的抗体测量HAMA应答。在许多情况中,主题人源化抗Tau抗体基本上不引发人受试者中的HAMA应答。在一些情况中,主题人源化抗Tau抗体具有降低的免疫原性潜力,如通过使用CD8⁺消减的外周血单核细胞实施的EpiScreenTM测定法测定的。在一些情况中,主题人源化抗Tau抗体展现出小于2.0的刺激指数(Stimulation Index)。

[0187] 来自人可变区框架残基的某些氨基酸基于其对CDR构象和/或对抗原的结合的可能影响被选择用于取代。鼠CDR区与人可变框架区的非天然并置可 导致非天然的构象约束,其导致结合亲和力的丧失,除非通过取代某些氨基酸残基进行校正。

[0188] 可以部分通过计算机建模确定为了取代进行的氨基酸残基选择。用于产生免疫球蛋白分子的三维图像的计算机硬件和软件是本领域中已知的。一般地,从其免疫球蛋白链或域的解析结构开始产生分子模型。将要建模的链与解析的三维结构的链或域比较氨基酸序列相似性,并且选择显示最大序列相似性的链或域作为构建分子模型的起始点。选择共享至少50%序列同一性的链或域进行建模,例如选择那些共享至少60%、70%、80%、90%,或超过90%序列同一性或更多的链或域进行建模。将解析的起始结构修饰为容许所建模的免疫球蛋白链或域中的实际氨基酸和起始结构中的实际氨基酸之间的差异。然后,将经修饰的结构装配成组合的免疫球蛋白。最后,通过能量最小化及通过验证所有原子在彼此的合适距离内且键长和键角在化学可接受限度内改进模型。

[0189] CDR和框架区如Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991) 限定。备选结构限定已经由Chothia等, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Nature 342:878 (1989); 及 J. Mol. Biol. 186:651 (1989) (统称为“Chothia”) 提出。在如由Kabat (见上文) 限定的框架残基构成如由Chothia (见上文) 限定的结构环残基时,可以选择存在于小鼠抗体中的氨基酸以对人源化

抗体取代。“与CDR区相邻”的残基包括刚好与人源化免疫球蛋白链的一级结构中的一个或多个CDR相邻的位置中,例如在刚好与如Kabat限定的CDR,或如Chothia (参见例如Chothia and Lesk JMB 196:901 (1987))限定的CDR相邻的位置中的氨基酸残基。这些氨基酸特别可能与CDR中的氨基酸相互作用,并且若从接受体选择,则可能扭曲供体CDR并降低亲和力。此外,相邻的氨基酸可以与抗原直接相互作用 (Amit等, Science, 233:747 (1986)), 并且从供体选择这些氨基酸对于保持提供初始抗体亲和力的所有抗原接触而言可以是期望的。

[0190] 本公开内容提供了分离的抗体,其包含人源化轻链框架区;和人源化重链框架区,其中分离的抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合:a) 轻链区,其包含:i) 包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii) 包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;和(iii) 包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;和 b) 重链区,其包含:(i) 包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1;(ii) 包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;和(iii) 包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3。在一些情况中,轻链区和重链区存在于不同的多肽中。在其他情况中,轻链区和重链区存在于单一多肽中。分离的抗体可以包含重链,该重链包含同种型IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4的恒定区。在其他情况中,抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab'。抗体可以包含共价连接的非肽合成聚合物,例如其中合成聚合物是聚(乙二醇)聚合物。在一些情况中,分离的抗体直接或经由接头与促进穿过血脑屏障的载体分子、肽或蛋白质融合。在一些情况中,被分离的抗体结合的表位在Tau多肽的氨基酸15-24内。分离的抗体人源化轻链框架区可以包含表3中描述的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10处氨基酸取代。分离的抗体人源化重链框架区包含表2中描述的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12处氨基酸取代。

[0191] 在一些实施方案中,本公开内容的抗Tau抗体(例如主题抗体,其特异性结合Tau多肽中的表位,例如Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内(其中Tau的氨基酸1-18是:MAEPRQEFVEMEDHAGTY;SEQ ID NO:53),Tau的氨基酸15-44内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内(其中Tau的氨基酸15-24是:AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)的线性表位)包含:a) 轻链区,其包含:i) IPN001抗体的1、2或3个互补决定区(CDR),其中CDR如由Kabat (参见例如表1,上文;及Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest” (1991))限定。

[0192] 在一些实施方案中,本公开内容的抗Tau抗体(例如主题抗体,其特异性结合Tau多肽中的表位,例如Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内(其中Tau的氨基酸1-18是:MAEPRQEFVEMEDHAGTY;SEQ ID NO:53),Tau的氨基酸15-44内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内(其中Tau的氨基酸15-24是:AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)的线性表位)包含:a) 轻链区,其包含:i) IPN001抗体的1、2或3个V_L CDR;和ii) 人源化轻链框架区;和b) 重链区,其包含:i) IPN001抗体的1、2或3个V_H CDR;和ii) 人源化重链框架区;其中V_H和V_L CDR如由Kabat (参见例如表1,上文;及Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest” (1991))限定。在这些中的一些实施方案中,抗Tau抗体包含人源化V_H和/或V_L框架区。

[0193] 在一些实施方案中,本公开内容的抗Tau抗体(例如主题抗体,其特异性结合Tau多肽中的表位,例如Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内(其中Tau的氨基酸1-18是:MAEPRQEFVEMEDHAGTY;SEQ ID NO:53),Tau的氨基酸15-44内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内(其中Tau的氨基酸15-24是:AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)的线性表位)包含:a)轻链区,其包含:i) IPN001抗体的1、2或3个V_L CDR;和ii)人源化轻链框架区;和b)重链区,其包含:i) IPN001抗体的1、2或3个V_H CDR;和ii)人源化重链框架区;其中V_H和V_L CDR如由(参见例如表1,上文;及Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))限定。

[0194] 在一些实施方案中,本公开内容的抗Tau抗体(例如主题抗体,其特异性结合Tau多肽中的表位,例如Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内(其中Tau的氨基酸1-18是:MAEPRQEFVEMEDHAGTY;SEQ ID NO:53),Tau的氨基酸15-44内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内(其中Tau的氨基酸15-24是:AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)的线性表位)包含:a)轻链区,其包含:i) IPN002抗体的1、2或3个V_L CDR;和ii)人源化轻链框架区;和b)重链区,其包含:i) IPN002抗体的1、2或3个V_H CDR;和ii)人源化重链框架区;其中V_H和V_L CDR如由Kabat(参见例如表1,上文;及Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991))限定。

[0195] 在一些实施方案中,本公开内容的抗Tau抗体(例如主题抗体,其特异性结合Tau多肽中的表位,例如Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内(其中Tau的氨基酸1-18是:MAEPRQEFVEMEDHAGTY;SEQ ID NO:53),Tau的氨基酸15-44内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内(其中Tau的氨基酸15-24是:AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)的线性表位)包含:a)轻链区,其包含:i) IPN002抗体的1、2或3个V_L CDR;和ii)人源化轻链框架区;和b)重链区,其包含:i) IPN002抗体的1、2或3个V_H CDR;和ii)人源化重链框架区;其中V_H和V_L CDR如由Chothia(参见例如表1,上文;及Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))限定。

[0196] 在一些实施方案中,本公开内容的抗Tau抗体(例如主题抗体,其特异性结合Tau多肽中的表位,例如Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内(其中Tau的氨基酸1-18是:MAEPRQEFVEMEDHAGTY;SEQ ID NO:53),Tau的氨基酸15-44内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内(其中Tau的氨基酸15-24是:AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)的线性表位)包含:a)轻链区,其包含:i)选自下组的1、2或3个CDR:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,和SEQ ID NO:3;和ii)人源化轻链框架区;和b)重链区,其包含:i)选自下组的1、2或3个CDR:SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,和SEQ ID NO:6;和ii)人源化重链框架区。

[0197] 在一些实施方案中,本公开内容的抗Tau抗体(例如主题抗体,其特异性结合Tau多肽中的表位,例如Tau的氨基端(N端)部分内,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,Tau的氨基酸9至18内(其中Tau的氨基酸1-18是:MAEPRQEFVEMEDHAGTY;SEQ ID NO:53),Tau的氨基酸15-44内,Tau的氨基酸13-24内,或Tau的氨基酸15-24内(其中Tau的氨基酸15-24是:AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)的线性表位)包含:a)轻链区,其包含:i)选自下组的1、2或3个CDR:SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,和SEQ ID NO:9;和ii)人源化轻链框架区;和b)重链

区,其包含:i)选自下组的1、2或3个CDR:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、和SEQ ID NO:12;和ii)人源化重链框架区。

[0198] 在一些情况中,抗体包含:a)轻链区,该轻链区包含:i)包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;(iii)包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;和(iv)人源化轻链框架区;和b)重链区,该重链区包含:(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;(iii)包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3;和(iv)人源化重链框架区。

[0199] 在一些实施方案中,主题抗Tau抗体包含重链可变区,该重链可变区包含具有选自SEQ ID NO:4、5和6之一或多项的氨基酸序列的1、2或3个重链CDR;和人源化的1、2、3或4个FR区。例如,在一些实施方案中,主题抗体包含重链可变区,该重链可变区以N端至C端的次序包含:人源化重链FR1;包含SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列的CDR1;人源化重链FR2;包含SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的CDR2;人源化重链FR3;包含SEQ ID NO:6中所列的氨基酸序列的CDR3;和人源化重链FR4。

[0200] 在一些实施方案中,主题抗Tau抗体包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有选自SEQ ID NO:1、2、和3之一或多项的多肽序列的1、2或3个轻链CDR;和人源化的1、2、3或4个FR区。例如,在一些实施方案中,主题抗体包含轻链可变区,该轻链可变区以N端至C端的次序包含:人源化轻链FR1;包含SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的CDR1;人源化轻链FR2;包含SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列的CDR2;人源化轻链FR3;包含SEQ ID NO:3中所列的氨基酸序列的CDR3;和人源化轻链FR4。

[0201] 在一些实施方案中,主题抗Tau抗体包含重链可变区,该重链可变区包含具有选自SEQ ID NO:10、11和12之一或多项的氨基酸序列的1、2或3个重链CDR;和人源化的1、2、3或4个FR区。例如,在一些实施方案中,主题抗体包含重链可变区,该重链可变区以N端至C端的次序包含:人源化重链FR1;包含SEQ ID NO:10中所列的氨基酸序列的CDR1;人源化重链FR2;包含SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列的CDR2;人源化重链FR3;包含SEQ ID NO:12中所列的氨基酸序列的CDR3;和人源化重链FR4。

[0202] 在一些实施方案中,主题抗Tau抗体包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有选自SEQ ID NO:7、8、和9之一或多项的多肽序列的1、2或3个轻链CDR;和人源化的1、2、3或4个FR区。例如,在一些实施方案中,主题抗体包含轻链可变区,该轻链可变区以N端至C端的次序包含:人源化轻链FR1;包含SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序列的CDR1;人源化轻链FR2;包含SEQ ID NO:8中所列的氨基酸序列的CDR2;人源化轻链FR3;包含SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列的CDR3;和人源化轻链FR4。

[0203] 图1A和1B中描绘了IPN001的V_H和V_L氨基酸序列。CDR(如由Kabat限定)为粗体文本且加下划线。图2A和2B中描绘了IPN002的V_H和V_L氨基酸序列。CDR(如由Kabat限定)为粗体文本且加下划线。

[0204] SEQ ID NO:1-12如下:

[0205] RSSQTILHSNGNTYLE (SEQ ID NO:1);

[0206] KVSKRFS (SEQ ID NO:2);

[0207] FQGSLVPWA (SEQ ID NO:3);

- [0208] SYGMS (SEQ ID NO:4) ;
- [0209] TISSSGSRITYFPDSVKG (SEQ ID NO:5) ;
- [0210] TWDGAMDY (SEQ ID NO:6) ;
- [0211] KSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:7) ;
- [0212] KVSNRFS (SEQ ID NO:8) ;
- [0213] FQGSLVPA (SEQ ID NO:9) ;
- [0214] KYGMS (SEQ ID NO:10) ;
- [0215] TISSSGSRITYYPDSVKG (SEQ ID NO:11) ;
- [0216] SWDGAMDY (SEQ ID NO:12) 。
- [0217] 主题抗Tau抗体可以包含轻链可变区,该轻链可变区包含与图1B中描绘且SEQ ID NO:13中所列的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0218] 主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含与图1A中描绘且SEQ ID NO:14中所列的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0219] 主题抗Tau抗体可以包含轻链可变区,该轻链可变区包含与图2B中描绘且SEQ ID NO:15中所列的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0220] 主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含与图2A中描绘且SEQ ID NO:16中所列的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0221] 主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含与图9 (VH变体1) 中描绘的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0222] 主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含与图10 (VH变体2) 中描绘的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0223] 主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含与图11 (VH变体3) 中描绘的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0224] 体4) 中描绘的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0225] 主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含与图13 (Vk变体1) 中描绘的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0226] 主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含与图14 (Vk变体2) 中描绘的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0227] 主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含与图15 (Vk变体3) 中描绘

的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。

[0228] 主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含与图16(Vk变体4)中描绘的序列85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。

[0229] 主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含相对于表2中描述的IPN002亲本抗体FR氨基酸序列的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12处框架(FR)氨基酸取代。

[0230] 表2:VH变体

[0231]

氨基酸位置	IPN002 (亲本抗体)	VH变体1	VH变体2	VH变体3	VH变体4
FR1					
3	H	H	H	Q	Q
19	K	R	R	R	R
FR2					
40	T	A	A	A	A
42	D	G	G	G	G
44	R	G	G	G	G
FR3					
66	Q	R	R	R	R
83	S	S	N	N	N

[0232]

氨基酸位置	IPN002 (亲本抗体)	VH变体1	VH变体2	VH变体3	VH变体4
86	K	K	R	R	R
87	S	S	A	A	A
93	S	S	S	S	A
FR4					
108	S	S	T	T	T

[0233] 例如,主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含VH FR1中的氨基酸位置3处的H→Q取代和/或VH FR1中的氨基酸位置19处的K→R取代。

[0234] 作为另一个例子,主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含VH FR2中的氨基酸位置40处的T→A取代和/或VH FR2中的氨基酸位置42处的D→G取代和/或VH FR2中的位置44处的R→G取代。

[0235] 作为另一个例子,主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含VH FR3中的氨基酸位置66处的Q→R取代和/或VH FR3中的氨基酸位置83处的S→N取代和/或VH FR3中的氨基酸位置85处的L→S取代和/或FR3中的氨基酸位置86处的K→R取代和/或VH FR3中的氨基酸位置87处的S→A取代和/或VH FR3中的氨基酸位置93处的S→A取代。

[0236] 作为另一个例子,主题抗Tau抗体可以包含重链可变区,该重链可变区包含VH FR4中的氨基酸位置108处的S→T取代。

[0237] 在一些情况中,主题分离的抗Tau抗体可以以N端至C端的次序包含:VH区,其包含:EVX₁LVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFSFS (SEQ ID NO:83);如图2A中所示的VH CDR1;WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:84);如图2A中所示的VH CDR2;

[0238] RFTISRDNAKNTLYLQMX₂SX₃X₄X₅EDTAMYYCX₆I (SEQ ID NO:85);如图2A中所示的VH CDR3;WGQGT₇VT₈VSS (SEQ ID NO:86),其中X₁是H或Q;X₂是S或N;X₃是S或L;X₄是K或R;X₅是S或A;X₆是S或A;且X₇是S或T。

[0239] 主题抗Tau抗体可以包含轻链可变区,该轻链可变区包含相对于表3中描述的IPN002亲本抗体FR氨基酸序列的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10处框架(FR)氨基酸取代。

[0240] 表3:Vk变体

[0241]

氨基酸位置	IPN002 (亲本抗体)	Vk变体1	Vk变体2	Vk变体3	Vk变体4
FR1					
3	L	L	V	V	V
7	T	S	S	S	S
14	S	T	T	T	T
17	D	Q	Q	Q	Q
18	Q	P	P	P	P
FR2					
45	K	Q	Q	Q	Q
48	V	V	V	V	I
FR3					
83	L	V	V	V	V
85	T	T	T	V	V
FR4					
104	L	V	V	V	V

[0242] 例如,主题抗Tau抗体可以包含轻链可变区,该轻链可变区包含VL FR1中的氨基酸位置3处的L→V取代和/或VL FR1中的氨基酸位置7处的T→S取代和/或VL FR1中的氨基酸位置14处的S→T取代和/或VL FR1中的氨基酸位置17处的D→Q取代和/或VL FR1中的氨基

酸位置18处的Q→P取代。

[0243] 作为另一个例子,主题抗Tau抗体可以包含轻链可变区,该轻链可变区包含VL FR2的氨基酸位置45处的K→Q取代和/或VL FR2的氨基酸位置48处的V→I取代。

[0244] 作为另一个例子,主题抗Tau抗体可以包含轻链可变区,该轻链可变区包含VL FR3的氨基酸位置83处的L→V取代和/或VL FR3的氨基酸位置85处的T→V取代。

[0245] 作为另一个例子,主题抗Tau抗体可以包含轻链可变区,该轻链可变区包含VL FR4的氨基酸位置104处的L→V取代。

[0246] 在一些情况中,主题分离的抗Tau抗体可以以从N端至C端的次序包含VL区,其包含:DVX₁MTQSPLSLPVTLGQPASISC (SEQ ID NO:54);如图2B中所示的VL CDR1;WY L Q K P G Q S P Q L L X₂Y (SEQ ID NO:55);如图2B中所示的VL CDR2;GV P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G X₃Y Y C (SEQ ID NO:56);如图2B中所示的VL CDR3;F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:57);其中X₁是L或V;X₂是V或I;且X₃是T或V。

[0247] 在一些情况中,本公开内容的抗Tau抗体包含:

[0248] a) 包含图9中描绘的氨基酸序列的VH变体1;和包含图13中描绘的氨基酸序列的Vk变体1;

[0249] b) 包含图9中描绘的氨基酸序列的VH变体1;和包含图14中描绘的氨基酸序列的Vk变体2;

[0250] c) 包含图9中描绘的氨基酸序列的VH变体1;和包含图15中描绘的氨基酸序列的Vk变体3;

[0251] d) 包含图9中描绘的氨基酸序列的VH变体1;和包含图16中描绘的氨基酸序列的Vk变体4;

[0252] e) 包含图10中描绘的氨基酸序列的VH变体2;和包含图13中描绘的氨基酸序列的Vk变体1;

[0253] f) 包含图10中描绘的氨基酸序列的VH变体2;和包含图14中描绘的氨基酸序列的Vk变体2;

[0254] g) 包含图10中描绘的氨基酸序列的VH变体2;和包含图15中描绘的氨基酸序列的Vk变体3;

[0255] h) 包含图10中描绘的氨基酸序列的VH变体2;和包含图16中描绘的氨基酸序列的Vk变体4;

[0256] i) 包含图11中描绘的氨基酸序列的VH变体3;和包含图13中描绘的氨基酸序列的Vk变体1;

[0257] j) 包含图11中描绘的氨基酸序列的VH变体3;和包含图14中描绘的氨基酸序列的Vk变体2;

[0258] k) 包含图11中描绘的氨基酸序列的VH变体3;和包含图15中描绘的氨基酸序列的Vk变体3;

[0259] l) 包含图11中描绘的氨基酸序列的VH变体3;和包含图16中描绘的氨基酸序列的Vk变体4;

[0260] m) 包含图12中描绘的氨基酸序列的VH变体4;和包含图13中描绘的氨基酸序列的Vk变体1;

[0261] n) 包含图12中描绘的氨基酸序列的VH变体4;和包含图14中描绘的氨基酸序列的Vk变体2;

[0262] o) 包含图12中描绘的氨基酸序列的VH变体4;和包含图15中描绘的氨基酸序列的Vk变体3;或

[0263] p) 包含图12中描绘的氨基酸序列的VH变体4;和包含图16中描绘的氨基酸序列的Vk变体4。

[0264] 在一些实施方案中,主题抗体包含单一多肽链中的抗Tau重链CDR和抗Tau轻链CDR,例如在一些实施方案中,主题抗体是scFv。在一些实施方案中,主题抗体以N端至C端的次序包含:长度约5个氨基酸至约25个氨基酸的第一氨基酸序列;包含SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的CDR1;长度约5个氨基酸至约25个氨基酸的第二氨基酸序列;包含SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列的CDR2;长度约5个氨基酸至约25个氨基酸的第三氨基酸序列;包含SEQ ID NO:3中所列的氨基酸序列的CDR3;长度约5个氨基酸至约25个氨基酸的第四氨基酸序列;包含SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列的CDR1;长度约5个氨基酸至约25个氨基酸的第五氨基酸序列;包含SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的CDR2;长度约5个氨基酸至约25个氨基酸的第六氨基酸序列;包含SEQ ID NO:6中所列的氨基酸序列的CDR3;和长度约5个氨基酸至约25个氨基酸的第七氨基酸序列。

[0265] 在一些实施方案中,主题抗体以从N端至C端的次序包含:轻链FR1区;包含SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的CDR1;轻链FR2区;包含SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列的CDR2;轻链FR3区;包含SEQ ID NO:3中所列的氨基酸序列的CDR3;任选轻链FR4区;接头区;任选重链FR1区;包含SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列的CDR1;重链FR2区;包含SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的CDR2;重链FR3区;包含SEQ ID NO:6中所列的氨基酸序列的CDR3;和重链FR4区。在这些中的一些实施方案中,一个或多个FR区是人源化FR区。在这些中的一些实施方案中,每个FR区是人源化FR区。接头区的长度可以是约5个氨基酸至约50个氨基酸,例如长度为约5个aa至约10个aa,约10个aa至约15个aa,约15个aa至约20个aa,约20个aa至约25个aa,约25个aa至约30个aa,约30个aa至约35个aa,约35个aa至约40个aa,约40个aa至约45个aa,或约45个aa至约50个aa。

[0266] 在一些实施方案中,主题抗体以从N端至C端的次序包含:重链FR1区;包含SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列的CDR1;重链FR2区;包含SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的CDR2;重链FR3区;包含SEQ ID NO:6中所列的氨基酸序列的CDR3;任选重链FR4区;接头;任选轻链FR1区;包含SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的CDR1;轻链FR2区;包含SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列的CDR2;轻链FR3区;包含SEQ ID NO:3中所列的氨基酸序列的CDR3;和轻链FR4区。在这些中的一些实施方案中,一个或多个FR区是人源化FR区。在这些中的一些实施方案中,每个FR区是人源化FR区。接头区的长度可以是约5个氨基酸至约50个氨基酸,例如长度为约5个aa至约10个aa,约10个aa至约15个aa,约15个aa至约20个aa,约20个aa至约25个aa,约25个aa至约30个aa,约30个aa至约35个aa,约35个aa至约40个aa,约40个aa至约45个aa,或约45个aa至约50个aa。

[0267] 在一些实施方案中,主题抗体以从N端至C端的次序包含:轻链FR1区;包含SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序列的CDR1;轻链FR2区;包含SEQ ID NO:8中所列的氨基酸序列的CDR2;轻链FR3区;包含SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列的CDR3;任选轻链FR4区;接头区;

任选重链FR1区;包含SEQ ID NO:10中所列的氨基酸序列的CDR1;重链FR2区;包含SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列的CDR2;重链FR3区;包含SEQ ID NO:12中所列的氨基酸序列的CDR3;和重链FR4区。在这些中的一些实施方案中,一个或多个FR区是人源化FR区。在这些中的一些实施方案中,每个FR区是人源化FR区。接头区的长度可以是约5个氨基酸至约50个氨基酸,例如长度为约5个aa至约10个aa,约10个aa至约15个aa,约15个aa至约20个aa,约20个aa至约25个aa,约25个aa至约30个aa,约30个aa至约35个aa,约35个aa至约40个aa,约40个aa至约45个aa,或约45个aa至约50个aa。

[0268] 在一些实施方案中,主题抗体以从N端至C端的次序包含:重链FR1区;包含SEQ ID NO:10中所列的氨基酸序列的CDR1;重链FR2区;包含SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列的CDR2;重链FR3区;包含SEQ ID NO:12中所列的氨基酸序列的CDR3;任选重链FR4区;接头;任选轻链FR1区;包含SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序列的CDR1;轻链FR2区;包含SEQ ID NO:8中所列的氨基酸序列的CDR2;轻链FR3区;包含SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列的CDR3;和轻链FR4区。在这些中的一些实施方案中,一个或多个FR区是人源化FR区。在这些中的一些实施方案中,每个FR区是人源化FR区。接头区的长度可以是约5个氨基酸至约50个氨基酸,例如长度为约5个aa至约10个aa,约10个aa至约15个aa,约15个aa至约20个aa,约20个aa至约25个aa,约25个aa至约30个aa,约30个aa至约35个aa,约35个aa至约40个aa,约40个aa至约45个aa,或约45个aa至约50个aa。

[0269] 适合于主题抗体使用的接头包括“柔性接头”。若存在的话,接头分子一般具有足够的长度,从而容许连接区域之间的一些灵活运动。接头分子一般长约6-50个原子。例如,接头分子也可以是芳基乙炔、含有2-10个单体单元的乙二醇寡聚物、二胺(diamines)、二酸(diacids)、氨基酸、或其组合。根据本公开内容可以使用能结合多肽的其他接头分子。

[0270] 合适的接头可以容易地选择,并且可以具有任何合适的不同长度,诸如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸,2个氨基酸至15个氨基酸,3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸,5个氨基酸至9个氨基酸,6个氨基酸至8个氨基酸,或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0271] 例示性的柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)_n、GSGGS_n(SEQ ID NO:58)和GGGS_n(SEQ ID NO:59),其中n是至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物、和本领域中已知的其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是感兴趣的,因为这两种氨基酸都是相对无结构的,因此可以充当组分间的中性系绳。甘氨酸聚合物是特别感兴趣的,因为甘氨酸甚至比丙氨酸得到显著更多的phi-psi空间,并且比具有更长侧链的残基具有小得多的约束性(参见Scheraga, Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。例示性的柔性接头包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:60)、GGSGG(SEQ ID NO:61)、GSGSG(SEQ ID NO:62)、GSGGG(SEQ ID NO:63)、GGGSG(SEQ ID NO:64)、GSSSG(SEQ ID NO:65)等。本领域技术人员会认可与上文描述的任何元件缀合的肽的设计可以包含接头,该接头是完全或部分柔性的,从而接头可以包含柔性接头及赋予柔性较小的结构的一个或多个部分。

[0272] 在一些情况中,主题分离的抗体是抗体片段、Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab'。因此,本公开内容提供了分离的抗体,其中抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab',且其中抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合:a)轻链区,其包含:i)包含SEQ ID

NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2; 和(iii) 包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3; 和b) 重链区, 其包含: (i) 包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2; 和(iii) 包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3。在这些中的一些实施方案中, 分离的抗体包含1、2、3或4个人源化VL框架区, 如上文描述的。在这些中的一些实施方案中, 分离的抗体1、2、3或4个人源化VH框架区, 如上文描述的。

[0273] 在一些实施方案中, 本公开内容的抗Tau抗体是scFv抗体。在一些实施方案中, 本公开内容的抗Tau抗体包含scFv多聚体。例如, 在一些实施方案中, 主题抗体是scFv二聚体(例如包含2个串联scFv(scFv₂))、scFv三聚体(例如包含3个串联scFv(scFv₃))、scFv四聚体(例如包含4个串联scFv(scFv₄)), 或者是超过4个scFv(例如串联)的多聚体。scFv单体可以经由长度约2个氨基酸至约10个氨基酸(aa), 例如长度2个aa、3个aa、4个aa、5个aa、6个aa、7个aa、8个aa、9个aa、或10个aa的接头串联连接。合适的接头包括例如(Gly)_x, 其中x是2至10的整数。其他合适的接头是上文讨论的那些接头。在一些实施方案中, 主题scFv多聚体中的每个scFv单体是人源化的, 如上文描述的。

[0274] 在一些情况中, 主题抗体包含免疫球蛋白的恒定区(例如Fc区)。Fc区(若存在的话)可以是人Fc区。若存在恒定区, 则抗体可以含有轻链和重链恒定区两者。合适的重链恒定区包含CH1、铰链、CH2、CH3、和CH4区。本文中描述的抗体包含具有所有类型的恒定区(包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE), 和任何同种型(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)的抗体。合适的重链Fc区的例子是人同种型IgG1Fc。在一些情况中, 重链区是同种型IgG4的。在这些中的一些实施方案中, 铰链区包含S241P取代。参见例如Angal等(1993) Mol. Immunol. 30:105。轻链恒定区可以是lambda或kappa。主题抗体(例如主题人源化抗体)可以包含来自超过一个类或同种型的序列。抗体可以作为含有两个轻链和两个重链的四聚体, 作为分开的重链、轻链, 作为Fab、Fab'、F(ab')₂、和Fv, 或作为重链和轻链可变域经由间隔物连接的单链抗体表达。

[0275] 在一些实施方案中, 本公开内容提供了分离的抗体, 其中分离的抗体包含人轻链恒定区和人重链恒定区, 且其中分离的抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合: a) 轻链区, 其包含: (i) 包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2; 和(iii) 包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3; 和b) 重链区, 其包含: (i) 包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2; 和(iii) 包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3。在这些中的一些实施方案中, 分离的抗体包含1、2、3、或4个人源化VL框架区, 如上文描述的。在这些中的一些实施方案中, 分离的抗体包含1、2、3、或4个人源化VH框架区, 如上文描述的。

[0276] 主题抗体可以包含羧基端的游离硫醇(-SH)基团, 其中游离硫醇基团可以用于将抗体附接于第二多肽(例如另一种抗体, 包括主题抗体)、支架、载体, 等等。

[0277] 在一些实施方案中, 主题抗体包含一个或多个非天然存在的氨基酸。在一些实施方案中, 非天然编码的氨基酸包含羰基基团、乙酰基基团、氨氧基基团、胍基团、酰胍基团、氨基脒基团、叠氮化物基团、或炔基团。关于合适的非天然存在的氨基酸, 参见例如美国专利No. 7,632,924。非天然存在的氨基酸的纳入可以提供与聚合物、第二多肽、支架等的连

接。例如,可以通过使包含羰基基团的水溶性聚合物(例如PEG)与抗体起反应生成与水溶性聚合物连接的主题抗体,其中抗体包含含有氨基、胍、胍或氨基胍基团的非天然编码的氨基酸。作为另一个例子,可以通过使包含含有炔的氨基酸的主题抗体与包含叠氮化物模块的水溶性聚合物(例如PEG)起反应生成与水溶性聚合物连接的主题抗体;在一些实施方案中,叠氮化物或炔基团经由酰胺连接与PEG分子连接。“非天然编码的氨基酸”指不是20个常见的氨基酸或吡咯赖氨酸或硒代半胱氨酸之一的氨基酸。可以与术语“非天然编码的氨基酸”同义使用的其他术语是“非天然氨基酸”、“非自然氨基酸”、“非天然存在的氨基酸”和其各种以连字符号连接和非以连字符号连接的形式。术语“非天然编码的氨基酸”还包括但不限于如下的氨基酸,其通过修饰(例如翻译后修饰)天然编码的氨基酸(包括但不限于20个常见的氨基酸或吡咯赖氨酸或硒代半胱氨酸)而存在,但是它们自身不被翻译复合物天然掺入生长的多肽链中。此类非天然存在的氨基酸的例子包括但不限于N-乙酰基葡萄糖胺基-L-丝氨酸、N-乙酰基葡萄糖胺基-L-苏氨酸、和O-磷酸酪氨酸。

[0278] 在一些实施方案中,主题抗体与聚合物(例如与多肽不同的聚合物)连接(例如共价连接)。合适的聚合物包括例如生物相容性聚合物和水溶性生物相容性聚合物。合适的聚合物包括合成聚合物和天然存在的聚合物。合适的聚合物包括例如取代或未取代的直链或支链聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧亚烷基聚合物或分支或未分支的多糖,例如同多糖或杂多糖。合适的聚合物包括例如乙烯乙烯醇共聚物(以通用名称EVOH或商品名EVAL公知);聚甲基丙烯酸丁酯;聚(羟基戊酸酯);聚(L-乳酸);聚己酸内酯;聚(丙交酯-共-乙交酯);聚(羟基丁酸酯);聚(羟基丁酸酯-共-戊酸酯);聚二恶烷酮(polydioxanone);聚原酸酯(polyorthoester);聚酞;聚(乙醇酸);聚(D,L-乳酸);聚(乙醇酸-共-三亚甲基碳酸酯(trimethylene carbonate));聚磷酸酯(polyphosphoester);聚磷酸酯尿烷(polyphosphoester urethane);聚(氨基酸);氰基丙烯酸酯(cyanoacrylates);聚(三亚甲基碳酸酯);聚(亚氨基碳酸酯);共聚(醚-酯)(例如聚(环氧乙烷)-聚(乳酸)(PEO/PLA)共聚物);聚亚烷基草酸酯(polyalkylene oxalates);聚磷腈(polyphosphazenes);生物分子,诸如纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维素、淀粉、胶原和透明质酸;聚氨酯(polyurethanes);硅酮;聚酯;聚烯烃;聚异丁烯和乙烯- α 烯烃(alphaolefin)共聚物;丙烯酸聚合物和共聚物;酰基卤化物(vinyl halide)聚合物和共聚物,诸如聚氯乙烯;聚乙烯醚,诸如聚乙烯甲醚;聚偏二乙烯卤化物(polyvinylidene halides),诸如聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride)和聚偏二氯乙烯(polyvinylidene chloride);聚丙烯腈;聚乙烯酮(polyvinyl ketones);聚乙烯芳香烃(polyvinyl aromatics),诸如聚苯乙烯;聚乙烯酯,诸如聚乙酸乙烯酯;乙烯基单体彼此的共聚物和乙烯基单体与烯烃的共聚物(copolymers of vinyl monomers with each other and olefins),诸如乙烯-甲基丙烯酸甲酯共聚物,丙烯腈-苯乙烯共聚物,ABS树脂,和乙烯-乙酸乙烯酯共聚物;聚酰胺,诸如Nylon 66和聚己内酰胺;醇酸树脂;聚碳酸酯;聚氧甲撑(polyoxymethylenes);聚酰亚胺(polyimides);聚醚;环氧树脂;聚氨酯;人造丝(rayon);人造丝-三乙酸酯;纤维素;乙酸纤维素;丁酸纤维素;乙酸丁酸纤维素;赛璐珞(cellophane);硝酸纤维素;丙酸纤维素;纤维素醚;无定形Teflon;聚(乙二醇);和羧甲基纤维素。

[0279] 合适的合成聚合物包括未取代的和取代的直链或支链聚(乙二醇)、聚(丙二醇)、聚(乙醇醇)、及其衍生物,例如取代的聚(乙二醇),诸如甲氧基聚(丙二醇)、及其衍生物。

合适的天然存在的聚合物包括例如清蛋白、直链淀粉 (amylose)、右旋糖苷、糖原、及其衍生物。

[0280] 合适的聚合物可以具有500Da至50000Da,例如5000Da至40000Da,或25000至40000Da范围中的平均分子量。例如,在一些实施方案中,其中主题抗体包含聚(乙二醇)(PEG)或甲氧基聚(乙二醇)聚合物,PEG或甲氧基聚(乙二醇)聚合物可以具有约0.5千道尔顿(kDa)至1kDa,约1kDa至5kDa,5kDa至10kDa,10kDa至25kDa,25kDa至40kDa,或40kDa至60kDa范围中的分子量。

[0281] 如上文记录,在一些实施方案中,主题抗体与PEG聚合物共价连接。在一些实施方案中,主题 scFv 多聚体与PEG聚合物共价连接。参见例如Albrecht等(2006) J.Immunol.Methods 310:100。适合于蛋白质的PEG化的方法和试剂是本领域中公知的,并且可以参见例如美国专利No.5,849,860。适合于与蛋白质缀合的PEG于室温一般在水中可溶,并且具有通式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$,其中R是氢或保护基,诸如羟基或烷醇基团,且其中n是1至1000的整数。在R是保护基的情况下,其一般具有1至8个碳。

[0282] 与主题抗体缀合的PEG可以是线性的。与主题蛋白缀合的PEG也可以是分支的。分支的PEG衍生物诸如那些记载于美国专利No.5,643,575的PEG衍生物,“星-PEG”和多臂PEG,诸如那些记载于Shearwater Polymers, Inc. 产品目录编码“聚乙二醇衍生物1997-1998”的。星PEG在本领域中记载,包括例如记载于美国专利No.6,046,305。

[0283] 主题抗体可以是糖基化的,例如主题抗体可以包含共价连接的碳水化合物或多糖模块。抗体的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接的指碳水化合物模块附接于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除了脯氨酸外的任何氨基酸)是用于将碳水化合物模块酶促附接于天冬酰胺侧链的识别序列。因此,这些三肽序列中的任一种存在于多肽中创建潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指将糖类N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖、或木糖之一附接于羟基氨基酸,最常见是丝氨酸或苏氨酸,尽管也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0284] 通过改变氨基酸序列,使得其含有一个或多个上文描述的三肽序列(用于N-连接的糖基化位点)方便实现糖基化位点对抗体的添加。也可以通过用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基对初始抗体的序列(用于O-连接的糖基化位点)的添加或取代进行改变。类似地,可以通过抗体的天然糖基化位点内的氨基酸改变实现糖基化位点的消除。

[0285] 在一些实施方案中,主题抗体会包含“不透射线的”标记物,例如可以使用例如x-射线容易显现的标记物。不透射线的材料是本领域技术人员公知的。最常见的不透射线的材料包括碘化物、溴化物或钡盐。其他不透射线的材料也是已知的,并且包括但不限于有机铋衍生物(参见例如美国专利No.5,939,045)、不透射线的多尿烷(multiurethanes)(参见美国专利No.5,346,981)、有机铋(organobismuth)合成物(参见例如美国专利No.5,256,334)、不透射线的钡多聚体复合物(参见例如美国专利No.4,866,132),等等。

[0286] 可以使用例如,戊二醛、同双功能性交联剂、或异双功能性交联剂将主题抗体与第二模块(例如脂质、与主题抗体不同的多肽、合成聚合物、碳水化合物,等等)共价连接。戊二醛与多肽经由其氨基模块交联。同双功能性交联剂(例如同双功能性亚氨酸酯(imidoester)、同双功能性N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯,或同双功能性硫氢基反应性交联剂)含有两个或更多个相同的反应性模块,并且可以用于一步反应规程,其中将交联剂添加

至含有要连接的多肽的混合物的溶液。同双功能性NHS酯和亚氨酸酯交联含有氨基的多肽。在轻度碱性pH中,亚氨酸酯仅与伯胺起反应以形成亚氨酰氨(imidoamides),并且交联多肽的总体电荷不受影响。同双功能性硫氢基反应性交联剂包括二马来酰亚胺己烷(bismaleimidhexane, BMH)、1,5-二氟-2,4-二硝基苯(DFDNB)、和1,4-二-(3',2'-吡啶二硫代)丙酰胺丁烷(1,4-di-(3',2'-pyridyldithio)propinoamido butane, DPDPB)。

[0287] 异双功能性交联剂具有两个或更多个不同的反应性模块(例如胺反应性模块和硫氢基反应性模块),并且经由胺或硫氢基反应性模块与多肽之一交联,然后经由未反应的模块与另一个多肽起反应。多种异双功能性卤乙酰基(haloacetyl)交联剂是可用的,吡啶基二硫化物交联剂亦然。碳化二亚胺(carbodiimides)是用于偶联羧基与胺,产生酰胺键的异双功能性交联剂的一个经典的例子。

[0288] 可以将主题抗体在固体支持物上固定化。合适的支持物是本领域中公知的,并且特别包括商品化的柱材料,聚苯乙烯珠、胶乳珠、磁珠、胶体金属颗粒、玻璃和/或硅芯片和表面、硝化纤维素条、尼龙膜、片、Duracytes、反应盘(例如多孔板)的孔、塑料管,等等。固体支持物可以包括多种物质之任一,包括例如玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、右旋糖苷、尼龙、直链淀粉、天然的和经修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖、和磁铁矿(magnetite)。适合于将主题抗体固定于固体支持物上的方法是公知的,并且包括但不限于离子、疏水性、共价相互作用,等等。例如在水性溶液中,固体支持物可以是可溶的或不溶的。在一些实施方案中,合适的固体支持物在水性溶液中一般是不溶的。

[0289] 在一些实施方案中,主题抗体会包含可检测标记物。合适的可检测标记物包括通过分光术、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段可检测的任何成分。合适物包括但不限于磁珠(例如Dynabeads™)、荧光染料(例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红(texas red)、罗丹明(rhodamine)、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白,等等)、放射性标记物(例如³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、或³²P)、酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、萤光素酶、和在酶联免疫吸附测定法(ELISA)中通常使用的其他物质),和比色标记物,诸如胶体金或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶,等等)珠。

[0290] 在一些实施方案中,主题抗体包含造影剂或放射性同位素,其中造影剂或放射性同位素是适合于用于成像,例如对人实施的成像规程的。标记物的非限制性例子包括放射性同位素,诸如¹²³I(碘)、¹⁸F(氟)、⁹⁹Tc(锝)、¹¹¹In(铟)、和⁶⁷Ga(镓),和造影剂诸如钆(Gd)、镧、和铁。放射性Gd同位素(¹⁵³Gd)也是可用的,并且适合于非人哺乳动物中的成像规程。可以使用标准的技术标记主题抗体。例如,可以使用氯胺T或1,3,4,6-四氯-3α,6α-二苯基甘脲碘化主题抗体。对于氟化,通过氟化物离子置换反应在合成期间对主题抗体添加氟。关于具有此类放射性同位素的蛋白质合成的综述,参见Muller-Gartner, H., TIB Tech., 16: 122-130 (1998) 和Saji, H., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 16 (2): 209-244 (1999)。也可以经由标准技术用造影剂标记主题抗体。例如,可以通过缀合低分子Gd螯合物,诸如Gd二乙烯三胺五乙酸(GdDTPA)或Gd四氮杂环十二烷四乙酸(GdDOTA)与抗体用Gd标记主题抗体。参见Caravan等, Chem. Rev. 99: 2293-2352 (1999) 和Lauffer等, J. Magn. Reson. Imaging, 3: 11-16 (1985)。例如,可以通过缀合多赖氨酸-Gd螯合物与抗体用Gd标记主题抗体。参见例如Curtet等, Invest. Radiol., 33 (10): 752-761 (1998)。或者,可以通过使包含Gd螯合剂脂质的顺磁性聚合脂质体与亲合素和生物素化的抗体用Gd标记主题抗体。参见例如Sipkins

等, *Nature Med.*, 4:623-626 (1998)。

[0291] 可以与主题蛋白连接的合适的荧光蛋白包括但不限于来自维多利亚多管水母 (*Aequoria victoria*) 的绿色荧光蛋白或其突变体或衍生物, 例如记载于美国专利 No. 6, 066, 476; 6, 020, 192; 5, 985, 577; 5, 976, 796; 5, 968, 750; 5, 968, 738; 5, 958, 713; 5, 919, 445; 5, 874, 304; 例如增强的 GFP, 可购自例如 Clontech, Inc. 的许多此类 GFP; 红色荧光蛋白; 黄色荧光蛋白; 来自珊瑚虫 (Anthozoan) 物种的多种荧光蛋白和有色蛋白之任一, 如记载于例如 Matz 等 (1999) *Nature Biotechnol.* 17:969-973; 等等。

[0292] 在一些实施方案中, 主题抗体会与融合配偶体, 例如配体; 表位标签; 肽; 与抗体不同的蛋白质; 等等连接 (例如共价或非共价连接)。合适的融合配偶体包括肽和多肽, 其赋予增强的体内稳定性 (例如增强的血清半衰期); 提供纯化便利, 例如 (His)_n, 例如 6His, 等等; 提供融合蛋白自细胞的分泌; 提供表位标签, 例如 GST、凝集素 (HA; 例如 YPYDVPDYA; SEQ ID NO:71)、FLAG (例如 DYKDDDDK; SEQ ID NO:69)、c-myc (例如 EQKLISEEDL; SEQ ID NO:68), 等等; 提供可检测信号, 例如生成可检测产物的酶 (例如 β -半乳糖苷酶、萤光素酶), 或自身可检测的蛋白质, 例如绿色荧光蛋白, 红色荧光蛋白, 黄色荧光蛋白, 等等; 提供多聚化, 例如多聚化域, 诸如免疫球蛋白的 Fc 部分; 等等。

[0293] 融合物还可以包含亲和域, 包括可以与结合配偶体相互作用的肽序列, 例如诸如固体支持物上固定化的肽序列, 其可用于鉴定或纯化。连续的单一氨基酸 (诸如组氨酸) 在与蛋白质融合时可以用于通过对树脂柱, 诸如镍 Sepharose 的高亲和力结合进行的融合蛋白的一步纯化。例示性的亲和域包括 His5 (HHHHH) (SEQ ID NO:66), HisX6 (HHHHHH) (SEQ ID NO:67), C-myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO:68), Flag (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:69), StrepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO:70), 凝集素, 例如 HA 标签 (YPYDVPDYA; SEQ ID NO:71), 谷胱甘肽-S-转移酶 (GST), 硫氧还蛋白, 纤维素结合域, RYIRS (SEQ ID NO:72), Phe-His-His-Thr (SEQ ID NO:73), 几丁质 (chitin) 结合域, S-肽, T7 肽, SH2 域, C 端 RNA 标签, WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO:74), 金属结合域, 例如锌结合域或钙结合域诸如来自钙结合蛋白的, 例如钙调蛋白、肌钙蛋白 C、钙依赖性磷酸酶 B、肌球蛋白轻链、恢复蛋白、S-调制蛋白 (modulin)、视锥蛋白、VILIP、神经钙蛋白、海马钙蛋白 (hippocalcin)、frequenin、钙牵蛋白、钙激活中性蛋白酶大亚基、S100 蛋白、小清蛋白 (parvalbumin)、钙结合蛋白 D9K、钙结合蛋白 D28K、和钙视网膜蛋白、内含肽、生物素、链霉亲和素、MyoD、亮氨酸拉链序列、和麦芽糖结合蛋白。

[0294] 在一些实施方案中, 主题抗体会与结合内源血脑屏障 (BBB) 受体的多肽融合。连接主题抗体与结合内源 BBB 受体的多肽促进穿过 BBB, 例如在主题治疗方法 (参见下文) 中, 所述主题治疗方法牵涉对有此需要的个体施用主题抗体。结合内源 BBB 受体的合适的多肽包括抗体, 例如单克隆抗体, 或其抗原结合片段, 其特异性结合内源 BBB 受体。合适的内源 BBB 受体包括但不限于胰岛素受体、转铁蛋白受体、瘦蛋白受体、脂蛋白受体、和胰岛素样生长因子受体。参见例如美国专利公开文本 No. 2009/0156498。

[0295] 作为一个例子, 主题抗 Tau 抗体可以是包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分的双特异性抗体, 所述第一抗原结合部分特异性结合 Tau 多肽中的表位 (例如 Tau 的氨基端 (N 端) 部分, 例如 Tau 的氨基酸 1-25 内, Tau 的氨基酸 1-18 内, 或 Tau 的氨基酸 9 至 18 内的线性表位), 所述第二抗原结合部分结合内源 BBB 受体。例如, 在一些情况中, 主题抗 Tau 抗体是包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分的双特异性抗体, 所述第一抗原结合部分特异

性结合Tau多肽中的表位(例如Tau的氨基端(N端)部分,例如Tau的氨基酸1-25内,Tau的氨基酸1-18内,或Tau的氨基酸9至18内的线性表位),所述第二抗原结合部分结合转铁蛋白受体。

[0296] 例如,本公开内容的抗Tau抗体可以与促进穿过BBB的肽融合,所述肽具有约15个氨基酸至约25个氨基酸的长度,并且包含与下列肽之一具有至少约85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:Angiopep-1(TFFYGGCRGKRNNFKTEEY;SEQ ID NO:75);Angiopep-2(TFFYGGSRGKRNNFKTEEY;SEQ ID NO:76);cys-Angiopep-2(CTFFYGGSRGKRNNFKTEEY;SEQ ID NO:77);Angiopep-2-cys(TFFYGGSRGKRNNFKTEEYC;SEQ ID NO:78);和抑肽酶片段(TFFYGGCRAKRNNFKS;SEQ ID NO:79)。参见例如美国专利公开文本No.2011/0288011;和2009/0016959。促进穿过BBB的肽可以与抗Tau轻链区的N端,抗Tau轻链区的C端,抗Tau重链区的N端,抗Tau重链区的C端,主题抗Tau单链抗体的N端,主题抗Tau单链抗体的C端等融合。

[0297] 在一些实施方案中,主题抗体包含聚胺修饰。主题抗体的聚胺修饰增强经修饰的抗体在BBB处的通透性。可以用天然存在的或合成的聚胺修饰主题抗体。参见例如美国专利No.5,670,477。有用的天然存在的聚胺包括腐胺,亚精胺,精胺,1,3-二氨基丙烷、降亚精胺(norspermidine)、突触-高亚精胺(syn-homospermidine)、热胺、热精胺(thermospermine)、嗜热性五胺(caldopentamine)、高嗜热性五胺(homocaldopentamine)、和刀豆四胺(canavalmine)。腐胺、亚精胺和精胺是特别有用的。合成的聚胺由经验式 $C_xH_yN_z$ 构成,可以是环状或无环的,分支或无分支的3-12碳原子的烃链,其进一步包含1-6个NR或N(R)₂模块,其中R是H、(C₁-C₄)烷基、苯基或苯甲基。可以使用标准的交联方法将聚胺与抗体连接。

[0298] 在一些实施方案中,主题抗体修饰为包含碳水化合物模块,其中碳水化合物模块可以与抗体共价连接。在一些实施方案中,主题抗体修饰为包含脂质模块,其中脂质模块可以与抗体共价连接。合适的脂质模块包括例如N-脂肪酰基基团,诸如N-月桂酰、N-油酰,等等;脂肪胺诸如十二烷基胺,油酰胺,等等;C3-C16长链脂肪族脂质;等等。参见例如美国专利No.6,638,513)。在一些实施方案中,将主题抗体掺入脂质体中。

[0299] 生成主题抗体的方法

[0300] 可以通过任何已知的方法,例如用于蛋白质合成的常规合成方法;重组DNA方法等等生成主题抗体。

[0301] 在主题抗体是单链多肽的情况中,其可以使用标准的化学肽合成技术合成。在化学合成多肽的情况中,可以经由液相或固相进行合成。固相多肽合成(SPPS)(其中将序列的C端氨基酸附接于不溶性支持物,接着序贯添加序列中剩余的氨基酸)是适合于主题抗体的化学合成的方法的例子。SPPS的各种形式,诸如Fmoc和Boc可用于合成主题抗体。用于固相合成的技术由Barany和Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis;第3-284页于The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. 第2卷: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield等J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963); Stewart等, Solid Phase Peptide Synthesis, 第2版Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); 及 Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med Chem. 6: 3-10 和 Camarero JA 等 2005 Protein Pept Lett. 12: 723-8 描述。简言之,用其上构建有肽链的功能性单元处理小的不溶性多孔珠。在偶联/脱保护的重复循环后,将附接的固相的游离N端胺与单一经N保护的氨基酸单元偶

联。然后,将此单元脱保护,显露可以与别的氨基酸附接的新的N端胺。肽在固相上保持固定化,并且经历过滤过程,之后被切出。

[0302] 可以使用标准重组方法生成主题抗体。例如,将编码轻链和重链可变区(其与恒定区可操作连接)的核酸插入表达载体中。可以将轻链和重链在相同或不同表达载体中克隆。将编码免疫球蛋白链的DNA区段与确保免疫球蛋白多肽表达的表达载体中的控制序列可操作连接。表达控制序列包括但不限于启动子(例如天然关联的或异源的启动子)、信号序列、增强子元件、和转录终止序列。表达控制序列可以是载体中的真核启动子系统,其能够转化或转染真核宿主细胞(例如COS或CHO细胞)。一旦将载体掺入合适的宿主中,在适合于核苷酸序列的高水平表达及抗体的收集和纯化的条件下维持宿主。

[0303] 由于代码的简并性,多种核酸序列可以编码每种免疫球蛋白氨基酸序列。可以通过从头固相DNA合成或者通过期望多核苷酸的早期制备变体的聚合酶链式反应(PCR)诱变生成期望的核酸序列。寡核苷酸介导的诱变是适合于制备靶多肽DNA的取代、缺失和插入突变的方法的例子。参见Adelman等,DNA 2:183(1983)。简言之,通过将编码期望突变的寡核苷酸与单链DNA模板杂交改变靶多肽DNA。在杂交后,使用DNA聚合酶合成模板的完整第二互补链,其掺入寡核苷酸引物,并且编码靶多肽DNA中的选定变化。

[0304] 合适的表达载体通常在宿主生物体中作为附加体或作为宿主染色体DNA的整合部分可复制。通常,表达载体含有选择标志物(例如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性 or 新霉素抗性)以容许用期望的DNA序列转化的那些细胞的检测。

[0305] 大肠杆菌(*Escherichia coli*)是可以用于克隆主题抗体编码多核苷酸的原核宿主细胞的例子。适合于使用的其它微生物宿主包括杆菌,诸如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和其他肠杆菌科(*enterobacteriaceae*),诸如沙门氏菌属(*Salmonella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、和各种假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种。在这些原核宿主中,也可以生成表达载体,其通常会含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如复制起点)。另外,会存在许多公知的启动子,诸如乳糖启动子系统,色氨酸(*trp*)启动子系统,beta-内酰胺酶启动子系统,或来自噬菌体lambda的启动子系统。启动子通常会控制表达,任选在操纵基因序列的情况下,并且具有核糖体结合位点序列等,以启动并完成转录和翻译。

[0306] 其他微生物,诸如酵母也可用于表达。酵母(例如酿酒酵母(*S.cerevisiae*))和毕赤酵母(*Pichia*)是合适的酵母宿主细胞的例子,其中合适的载体根据需要具有表达控制序列(例如启动子)、复制起点、终止序列等。典型的启动子包含3-磷酸甘油酸激酶和其它糖分分解酶。诱导型酵母启动子特别包括来自醇脱氢酶、异细胞色素(*isocytochrome*) C、和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0307] 在微生物外,哺乳动物细胞(例如在体外细胞培养物中培养的哺乳动物细胞)也可以用于表达并生成本公开内容的抗Tau抗体(例如编码主题抗Tau抗体的多核苷酸)。参见Winnacker,From Genes to Clones,VCH Publishers,N.Y.,N.Y.(1987)。合适的哺乳动物宿主细胞包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、和仅转化的B细胞或杂交瘤。用于这些细胞的表达载体可以包含表达控制序列,诸如复制起点,启动子和增强子(Queen等,Immunol.Rev.89:49(1986)),以及必需的加工信息位点,诸如核糖体结合位点,RNA剪接位点,多聚腺苷酸化位点,和转录终止子序列。合适的表达控制序列的例子是自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等衍生的启动子。参见Co等,

J. Immunol. 148:1149 (1992)。

[0308] 一旦合成(化学或重组方式),可以依照本领域的标准规程,包括硫酸铵沉淀,亲和柱,柱层析,高效液相层析(HPLC),凝胶电泳等纯化主题抗体的全抗体、其二聚体、个别的轻链和重链、或其它形式(例如scFv等)(一般参见Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982))。主题抗体可以是基本上纯的,例如至少约80%至85%纯的,至少约85%至90%纯的,至少约90%至95%纯的,或98%至99%纯的或更多,例如不含污染物,诸如细胞碎片,与主题抗体不同的大分子,等等。

[0309] 组合物

[0310] 本公开内容提供了包含主题抗体的组合物。在主题抗体外,主题抗体组合物可以包含下列一项或多项:盐,例如NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄,等等;缓冲剂,例如Tris缓冲剂,N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙烷磺酸)(HEPES),2-(N-吗啉代)乙烷磺酸(MES),2-(N-吗啉代)乙烷磺酸钠盐(MES),3-(N-吗啉代)丙烷磺酸(MOPS),N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙烷磺酸(TAPS),等等;加溶剂;去污剂,例如非离子型去污剂诸如Tween-20,等等;蛋白酶抑制剂;甘油;等等。

[0311] 核酸、表达载体和宿主细胞

[0312] 本公开内容提供了包含编码主题抗Tau抗体的核苷酸序列的核酸。

[0313] 编码主题抗Tau抗体的核苷酸序列可以包含如下的核苷酸序列,其编码轻链可变区并且与图1B中描述且SEQ ID NO:17中所列的核苷酸序列具有至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%核苷酸序列同一性。

[0314] 编码主题抗Tau抗体的核苷酸序列可以包含如下的核苷酸序列,其编码重链可变区并且与图1A中描述且SEQ ID NO:18中所列的核苷酸序列具有至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%核苷酸序列同一性。

[0315] 编码主题抗Tau抗体的核苷酸序列可以包含如下的核苷酸序列,其编码轻链可变区并且与图2B中描述且SEQ ID NO:19中所列的核苷酸序列具有至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%核苷酸序列同一性。

[0316] 编码主题抗Tau抗体的核苷酸序列可以包含如下的核苷酸序列,其编码重链可变区并且与图2A中描述且SEQ ID NO:20中所列的核苷酸序列具有至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%核苷酸序列同一性。

[0317] 可以将编码主题抗体的核苷酸序列与一种或多种容许核苷酸序列在意图的靶细胞(例如遗传修饰为合成编码的抗体的细胞)中表达的调节元件,诸如启动子和增强子可操作连接。

[0318] 合适的启动子和增强子元件是本领域中已知的。对于在细菌细胞中表达,合适的启动子包括但不限于lacI、lacZ、T3、T7、gpt、lambda P和trc。对于在真核细胞中表达,合适的启动子包括但不限于轻链和/或重链免疫球蛋白基因启动子和增强子元件;巨细胞病毒立即早期启动子;单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子;早期和晚期SV40启动子;存在于来自逆转录病毒的长末端重复中的启动子;小鼠金属硫蛋白-I启动子;和各种本领域已知的组织特异性启动子。

[0319] 在一些实施方案中,例如对于在酵母细胞中的表达,合适的启动子是组成性启动子诸如ADHI启动子,PGK1启动子,ENO启动子,PKY1启动子等;或可调节启动子诸如GAL1启动

子,GAL10启动子,ADH2启动子,PH05启动子,CUP1启动子,GAL7启动子,MET25启动子,MET3启动子,CYC1 启动子,HIS3启动子,ADH1启动子,PGK启动子,GAPDH启动子,ADC1启动子,TRP1启动子,URA3启动子,LEU2启动子,ENO启动子,TP1启动子,和AOX1(例如用于毕赤酵母)。合适的载体和启动子的选择完全在本领域普通技术人员的水平内。

[0320] 在原核宿主细胞中使用的合适启动子包括但不限于噬菌体T7RNA聚合酶启动子;trp启动子;lac操纵子启动子;杂合启动子,例如lac/tac杂合启动子,tac/trc杂合启动子, trp/lac启动子,T7/lac启动子;trc启动子;tac启动子,等等;araBAD启动子;体内调节启动子,诸如ssaG启动子或相关启动子(参见例如美国专利公开文本No.20040131637),pagC启动子(Pulkkinen and Miller,J.Bacteriol.,1991:173(1):86-93;Alpuche-Aranda等,PNAS,1992;89(21):10079-83),nirB启动子(Harborne等(1992)Mol.Micro.6:2805-2813),等等(参见例如Dunstan等(1999)Infect.Immun.67:5133-5141;McKelvie等(2004)Vaccine 22:3243-3255;及Chatfield等(1992)Biotechnol.10:888-892);sigma70启动子,例如共有sigma70启动子(参见例如GenBank登录号AX798980,AX798961和AX798183);稳定期启动子,例如dps启动子,spv启动子,等等;自病原性岛SPI-2衍生的启动子(参见例如W096/17951);actA启动子(参见例如Shetron-Rama等(2002)Infect.Immun.70:1087-1096);rpsM启动子(参见例如Valdivia and Falkow(1996).Mol.Microbiol.22:367);tet启动子(参见例如Hillen,W.and Wissmann,A.(1989)In Saenger,W.and Heinemann,U.(编),Topics in Molecular and Structural Biology,Protein-Nucleic Acid Interaction.Macmillan, London,UK,Vol.10,pp.143-162);SP6启动子(参见例如Melton等(1984)Nucl.Acids Res.12:7035);等等。适合于在原核生物诸如大肠杆菌中使用的强启动子包括但不限于Trc、Tac、T5、T7、和P_{Lambda}。在细菌宿主细胞中使用的操纵基因的非限制性例子包括乳糖启动子操纵基因(LacI阻抑蛋白在与乳糖接触时改变构象,由此阻止LacI阻抑蛋白结合操纵基因),色氨酸启动子操纵基因(在与色氨酸复合时,TrpR阻抑蛋白具有结合操纵基因的构象;在缺乏色氨酸的情况中,TrpR阻抑蛋白具有不结合操纵基因的构象),和tac启动子操纵基因(参见例如deBoer等(1983)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.80:21-25)。

[0321] 编码主题抗体的核苷酸序列可以存在于表达载体和/或克隆载体中。在主题抗体包含两个分开的多肽的情况中,可以将编码两个多肽的核苷酸序列在 相同或分开的载体中克隆。表达载体可以包含选择标志物、复制起点、和提供载体复制和/或维持的其它特征。

[0322] 大量合适的载体和启动子是本领域技术人员已知的;许多是商品化的,用于生成主题重组构建体。下列载体作为例子提供。细菌:pBs,phagescript,PsiX174,pBluescript SK,pBs KS,pNH8a,pNH16a,pNH18a,pNH46a(Stratagene,La Jolla,Calif.,USA);pTrc99A,pKK223-3,pKK233-3,pDR540,和pRIT5(Pharmacia,Uppsala,Sweden)。真核:pWLneo,pSV2cat,pOG44,PXR1,pSG(Stratagene)pSVK3,pBPV,pMSG和pSVL(Pharmacia)。

[0323] 表达载体一般具有位于启动子序列附近的方便的限制性位点以提供编码异源蛋白质的核酸序列的插入。可以存在在表达宿主中起作用的选择标志物。合适的表达载体包括但不限于病毒载体(例如基于痘病毒;脊髓灰质炎病毒;腺病毒(参见例如Li等,Invest Ophthalmol Vis Sci 35:25432549,1994;Borras等,Gene Ther 6:515524,1999;Li and Davidson,PNAS 92:77007704,1995;Sakamoto等,H Gene Ther 5:10881097,1999;W0 94/12649,W093/03769;W0 93/19191;W0 94/28938;W0 95/11984and W0 95/00655);腺伴随病

毒(参见例如Ali等, Hum Gene Ther 9:8186, 1998, Flannery等, PNAS 94:69166921, 1997; Bennett等, Invest Ophthalmol Vis Sci 38:28572863, 1997; Jomary等, Gene Ther 4: 683690, 1997, Rolling等, Hum Gene Ther 10:641648, 1999; Ali等, Hum Mol Genet 5: 591594, 1996; Srivastava in WO 93/09239, Samulski等, J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson等, Virol. (1988) 166:154-165; and Flotte等, PNAS (1993) 90:10613-10617); SV40; 单纯疱疹病毒; 人免疫缺陷病毒(参见例如Miyoshi等, PNAS 94:1031923, 1997; Takahashi等, J Virol 73:78127816, 1999)的载体; 逆转录病毒载体(例如鼠白血病病毒、脾坏死病毒, 和vectors derived自逆转录病毒诸如劳氏肉瘤病毒、哈维(Harvey)肉瘤病毒、禽类白血病病毒(avian leukosis virus)、人免疫缺陷病毒、骨髓增殖性肉瘤病毒、和乳房肿瘤病毒); 等等。

[0324] 如上文所述, 主题核酸包含编码主题抗体的核苷酸序列。主题核酸可以包含编码IPN001的重链和轻链CDR的核苷酸序列。在一些实施方案中, 主题核酸包含编码IPN002的重链和轻链CDR的核苷酸序列, 其中CDR编码序列散布有FR编码核苷酸序列。在一些实施方案中, FR编码核苷酸序列是人FR编码核苷酸序列。

[0325] 宿主细胞

[0326] 本公开内容提供了分离的经遗传修饰的宿主细胞(例如体外细胞), 其用主题核酸遗传修饰。在一些实施方案中, 主题分离的经遗传修饰的宿主细胞可以生成主题抗体。

[0327] 合适的宿主细胞包括真核宿主细胞, 诸如哺乳动物细胞, 昆虫宿主细胞, 酵母细胞; 和原核细胞, 诸如细菌细胞。例如, 可以通过磷酸钙沉淀、DEAE右旋糖苷介导的转染、脂质体介导的转染、电穿孔、或其它已知的方法实现主题核酸对宿主细胞的导入。

[0328] 合适的哺乳动物细胞包括原代细胞和永生化细胞系。合适的哺乳动物细胞系包括人细胞系, 非人灵长类细胞系, 啮齿类(例如小鼠, 大鼠)细胞系, 等等。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如美国典型培养物保藏中心(ATCC) No. CCL-2), CHO细胞(例如ATCC No. CRL9618, CCL61, CRL9096), 293细胞(例如ATCC No. CRL-1573), Vero细胞, NIH 3T3细胞(例如ATCC No. CRL-1658), Huh-7细胞, BHK细胞(例如ATCC No. CCL10), PC12细胞(ATCC No. CRL1721), COS细胞, COS-7细胞(ATCC No. CRL1651), RAT1细胞, 小鼠L细胞(ATCC No. CCLI.3), 人胚肾(HEK)细胞(ATCC No. CRL1573), HLHepG2细胞, 等等。在一些情况中, 细胞是HEK细胞。在一些情况中, 细胞是CHO细胞, 例如CHO-K1细胞(ATCC No. CCL-61), CHO-M细胞, CHO-DG44细胞(ATCC No. PTA-3356), 等等。

[0329] 合适的酵母细胞包括但不限于巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、芬兰毕赤酵母(*Pichia finlandica*)、*Pichia trehalophila*、*Pichia koclamae*、膜醭毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens*)、*Pichia opuntiae*、耐热毕赤酵母(*Pichia thermotolerans*)、*Pichia salictaria*、*Pichia guercuum*、*Pichia pipperi*、树干毕赤酵母(*Pichia stiptis*)、甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)、毕赤酵母物种(*Pichia sp.*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、酵母物种(*Saccharomyces sp.*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、克鲁维酵母(*Kluyveromyces sp.*)、乳糖克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、白念珠菌(*Candida albicans*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、*Chrysosporium lucknowense*、镰孢菌物种(*Fusarium sp.*)、禾谷镰孢菌(*Fusarium gramineum*)、*Fusarium*

venenatum、粗糙链孢菌 (*Neurospora crassa*)、莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)，等等。

[0330] 合适的原核细胞包括但不限于大肠杆菌、乳杆菌物种 (*Lactobacillus* sp.) 等的多种实验室菌株之任一。参见例如Carrier等 (1992) *J. Immunol.* 148:1176-1181; 美国专利 No. 6,447,784; 及Sizemore等 (1995) *Science* 270:299-302。典型地, 实验室菌株是非病原性的。其它合适的细菌的非限制性例子包括但不限于枯草芽孢杆菌等。在一些实施方案中, 宿主细胞是大肠杆菌。

[0331] 药物配制剂

[0332] 本公开内容提供了包含主题抗体的组合物, 包括药物组合物。一般地, 配制剂包含有效量的主题抗体。“有效量”意指足以产生期望的结果, 例如与tau病变有关的不利症状的减少, 改善tau病变的症状, 减缓tau病变的进展, 等等的剂量。一般地, 期望的结果是与对照相比至少tau病变的症状减少。可以以如下的方式投递主题抗体, 从而避免血脑屏障, 如下文更为详细描述。可以配制和/或修饰主题抗体以使抗体能够穿过血脑屏障。

[0333] 本公开内容提供了药物配制剂, 其包含: a) 特异性结合Tau的N端部分内的表位的抗体, 其中抗体包含: (i) 包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2; (iii) 包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3; (iv) 包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1; (v) 包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2; 和 (vi) 包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3; 和b) 适合于对人施用的药学可接受赋形剂, 其中配制剂不含内毒素。

[0334] 本公开内容提供了药物配制剂, 其包含: a) 分离的人源化单克隆抗体, 其特异性结合Tau多肽的氨基酸15-24内的表位; 和b) 药学可接受赋形剂, 其中在一些实施方案中, 药学可接受赋形剂适合于对人施用。

[0335] 本公开内容提供了药物配制剂, 其包含: A) 分离的抗体, 其包含人源化轻链框架区; 和人源化重链框架区, 其中分离的抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合: a) 轻链区, 其包含: (i) 包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2; 和 (iii) 包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3; 和b) 重链区, 其包含: (i) 包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2; 和 (iii) 包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3; 和B) 药学可接受赋形剂, 其中在一些实施方案中, 药学可接受赋形剂适合于对人施用。

[0336] 本公开内容提供了药物配制剂, 其包含: A) 分离的抗体, 其中抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab', 且其中抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合: a) 轻链区, 其包含: (i) 包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2; 和 (iii) 包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3; 和b) 重链区, 其包含: (i) 包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2; 和 (iii) 包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3; 和B) 药学可接受赋形剂, 其中在一些实施方案中, 药学可接受赋形剂适合于对人施用。

[0337] 本公开内容提供了药物配制剂,其包含:A)分离的抗体,其中分离的抗体包含人轻链恒定区和人重链恒定区,且其中分离的抗体与包含以下的抗体竞争对Tau多肽的N端区中的表位的结合:a)轻链区,其包含:i)包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_L CDR3;和b)重链区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H CDR2;和(iii)包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H CDR3;和B)药学可接受赋形剂,其中在一些实施方案中,药学可接受赋形剂适合于对人施用。

[0338] 配制剂

[0339] 在主题方法中,可以使用能够产生期望的治疗效果或诊断效果的任何方便的手段对宿主施用主题抗体。如此,可以将药剂掺入多种配制剂中以进行治疗性施用。更具体地,可以通过与合适的药学可接受的载体或稀释剂组合将主题抗体配制成药物组合物,并且可以配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,诸如片剂、胶囊、粉末、颗粒剂、软膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂和气雾剂。

[0340] 在药用剂量形式中,主题抗体可以以其药学可接受盐的形式施用,或者它们也可以单独或与其它药学活性化合物适当联合及组合使用。以下方法和赋形剂仅仅是例示性的,而绝不是限制性的。

[0341] 对于口服制剂,主题抗体可以单独使用或与合适的添加剂组合使用以生成片剂、粉末、颗粒剂或胶囊,例如与常规的添加剂,诸如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉;粘合剂,诸如结晶纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯树胶(acacia)、玉米淀粉或明胶;崩解剂,诸如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠;润滑剂,诸如滑石或硬脂酸镁;且若想要的话,稀释剂,缓冲剂,湿润剂,防腐剂和增味剂(flavoring agent)组合使用。

[0342] 可以如下将主题抗体配制成注射制剂,即将它们在水性或非水性溶剂,诸如植物油或其它类似的油,合成脂肪酸甘油酯,高级脂肪酸或丙二醇的酯中溶解,悬浮或乳化;且若想要的话具有常规的添加剂,诸如增溶剂,等张剂,悬浮剂,乳化剂,稳定剂和防腐剂。

[0343] 通过混合具有期望纯度的抗体与任选的生理学可接受载体、赋形剂、稳定剂、表面活性剂、缓冲剂和/或张力剂制备包含主题抗体的药物组合物。可接受的载体、赋形剂和/或稳定剂在采用的剂量和浓度对于接受体是无毒的,并且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、甲硫氨酸和柠檬酸;防腐剂(诸如乙醇、苯甲醇、酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟苯甲酸甲酯或丙酯、苯扎氯铵或其组合);氨基酸诸如精氨酸,甘氨酸,鸟氨酸,赖氨酸,组氨酸,谷氨酸,天冬氨酸,异亮氨酸,亮氨酸,丙氨酸,苯丙氨酸,酪氨酸,色氨酸,甲硫氨酸,丝氨酸,脯氨酸及其组合;单糖,二糖和其它碳水化合物;低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如明胶或血清清蛋白;螯合剂诸如EDTA;糖类诸如海藻糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、葡糖胺、N-甲基葡糖胺、半乳糖胺、和神经氨酸;和/或非离子型表面活性剂诸如Tween、Brij Pluronic、Triton-X、或聚乙二醇(PEG)。

[0344] 药物组合物可以为液体形式,冻干形式或自冻干形式重建的液体形式,其中冻干制剂在施用前要用无菌溶液重建。用于重建冻干的组合物的标准规程是反向添加一定体积的纯水(通常等于冻干期间除去的体积);然而,可以使用包含抗菌剂的溶液生成供胃肠

外施用的药物组合物;还可见Chen(1992)Drug Dev Ind Pharm 18,1311-54。

[0345] 主题药物组合物中的例示性抗体浓度范围可以为约1mg/mL至约200 mg/mL或约50mg/mL至约200mg/mL,或约150mg/mL至约200mg/mL。

[0346] 可以将抗体的水性配制剂在pH缓冲溶液,例如范围为约4.0至约7.0,或约5.0至约6.0,或备选约5.5的pH中制备。适合于此范围内的pH的缓冲剂的例子包括磷酸盐、组氨酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、乙酸盐缓冲剂和其它有机缓冲剂。缓冲剂浓度可以是约1mM至约100mM,或约5mM至约50mM,这取决于例如缓冲剂和配制剂的期望张力。

[0347] 抗体配制剂中可以包含张力剂以调控配制剂的张力。例示性的张力剂包括氯化钠、氯化钾、甘油和来自氨基酸组的任何组分,糖类及其组合。在一些实施方案中,水性配制剂是等张的,尽管高张的或低张的溶液可以是合适的。术语“等张的”意指与同其比较的一些其它溶液具有相同张力的溶液,诸如生理盐溶液或血清。张力剂可以以约5mM至约350mM,例如以100mM至350mM的量使用。

[0348] 也可以将表面活性剂添加至抗体配制剂以降低配制抗体的聚集和/或最小化配制剂中颗粒的形成和/或降低吸附。例示性的表面活性剂包括聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯(polyoxyethylenesorbitan fatty acid ester,Tween),聚氧乙烯烷基醚(polyoxyethylene alkyl ether)(Brij),烷基苯基聚氧乙烯醚(alkylphenylpolyoxyethylene ether)(Triton-X),聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer)(Poloxamer,Pluronic),和十二烷基硫酸钠(SDS)。可溶性聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯的例子是聚山梨醇酯20(在商标Tween 20TM下出售)和聚山梨醇酯80(在商标Tween 80TM下出售)。合适的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的例子是那些在名称Pluronic®F68或Poloxamer188TM下出售的。合适的聚氧乙烯烷基醚的例子是那些在商标BrijTM下出售的。表面活性剂的例示性浓度的范围可以是约0.001%至约1% w/v。

[0349] 也可以添加冻干保护剂(lyoprotectant)以在冻干过程期间针对脱稳定化(destabilizing)条件保护不稳定的活性成分(例如蛋白质)。例如,已知的冻干保护剂包括糖类(包括葡萄糖和蔗糖);多元醇(包括甘露醇、山梨糖醇和甘油);和氨基酸(包括丙氨酸、甘氨酸和谷氨酸)。冻干保护剂可以以约10mM至500mM的量包括。

[0350] 在一些实施方案中,主题配制剂包含主题抗体,和一种或多种上文鉴定的药剂(例如表面活性剂、缓冲剂、稳定剂、张力剂),并且基本上不含一种或多种防腐剂,诸如乙醇、苯甲醇、酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸 甲酯或丙酯、苯扎氯铵及其组合。在其它实施方案中,防腐剂以流入范围为约0.001至约2% (w/v)的浓度包含在配制剂中。

[0351] 例如,主题配制剂可以是适合于胃肠外施用的液体或冻干配制剂,并且可以包含:约1mg/mL至约200mg/mL主题抗体;约0.001%至约1%至少一种表面活性剂;约1mM至约100mM缓冲剂;任选约10mM至约500mM稳定剂;和约5mM至约305mM张力剂;并且具有约4.0至约7.0的pH。

[0352] 作为另一个例子,主题胃肠外配制剂是液体或冻干配制剂,其包含:约1mg/mL至约200mg/mL主题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;并且具有5.5的pH。

[0353] 作为另一个例子,主题胃肠外配制剂包含冻干配制剂,其包含:1) 15mg/mL主题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或2) 75mg/mL主

题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或3) 75mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或4) 75mg/mL主题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;并且具有5.5的pH;或6) 75mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;并且具有5.5的pH。

[0354] 作为另一个例子,主题胃肠外配制剂包含液体配制剂,其包含:1) 7.5mg/mL主题抗体;0.022%Tween 20w/v;120mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或2) 37.5mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或3) 37.5mg/mL主题抗体;0.01%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或4) 37.5mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;125mM海藻糖;并且具有5.5的pH;或5) 37.5mg/mL主题抗体;0.01%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM海藻糖;并且具有5.5的pH;或6) 5mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;并且具有5.5的pH;或7) 75mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM甘露醇;并且具有5.5的pH;或8) 75mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和140mM氯化钠;并且具有5.5的pH;或9) 150mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;并且具有5.5的pH;或10) 150mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM甘露醇;并且具有5.5的pH;或11) 150mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和140mM氯化钠;并且具有5.5的pH;或12) 10mg/mL主题抗体;0.01%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和40mM氯化钠;并且具有5.5的pH。

[0355] 可以在要经由吸入施用的气雾剂配制剂中利用主题抗体。可以将主题抗体配制入加压的可接受推进物诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等中。

[0356] 此外,可以通过与多种基质诸如乳化基质或水溶性基质混合将主题抗体制成栓剂。可以经由栓剂直肠施用主题抗体。栓剂可以包含媒介物诸如可可油、Carbowaxes和聚乙二醇,其在体温熔解,但在室温固化。

[0357] 可以提供用于口服或直肠施用的单位剂量形式,诸如糖浆剂、酏剂、和悬浮液,其中每个剂量单位,例如,匙(teaspoonful)、汤匙(tablespoonful)、片剂(tablet)或栓剂(suppository)含有预先确定量的含有一种或多种抑制剂的组合物。类似地,用于注射或静脉内施用的单位剂量形式可以包含在作为无菌水、正常盐水或另一种药学可接受载体中的溶液的组合物中的主题抗体。

[0358] 如本文中使用的,术语“单位剂量形式”指适合作为人和动物受试者的单一剂量的物理离散单位,每个单位含有预先确定量的本公开内容的抗Tau抗体,其以足以与药学可接受的稀释剂、载体或媒介物结合产生期望效果的量计算。主题抗体的规格可以取决于采用的特定抗体和要实现的效果,以及宿主中与每种抗体有关的药效学。

[0359] 其它施用模式也会在本发明的方法中得到应用。例如,可以将主题抗体配制成栓剂及在一些情况中为气雾剂和鼻内组合物。对于栓剂,媒介物组合物会包含传统的粘合剂和载体,诸如聚亚烷基二醇或甘油三酸酯。此类栓剂可以自含有范围为约0.5%至约10%(w/w),例如约1%至约2%的活性成分的混合物形成。

[0360] 鼻内配制剂通常会包含既不引起鼻粘膜的刺激也不显著扰乱纤毛功能的媒介物。可以采用稀释剂,诸如水、水性盐水或其他已知的物质。鼻配制剂也可以含有防腐剂,诸如

但不限于氯丁醇和苯扎氯铵。可以存在表面活性剂以增强主题抗体被鼻粘附的吸附。

[0361] 主题抗体可以以可注射配制剂施用。通常,可注射组合物制备为液体溶液或悬浮液;也可以制备适合于在注射前在液体媒介物中的溶液或悬浮液的固体形式。也可以将制剂乳化或者将抗体在脂质体媒介物中包裹。

[0362] 合适的赋形剂媒介物是例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等,及其组合。另外,若想要的话,媒介物可以含有少量的辅助物质,诸如湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。制备此类剂量形式的实际方法是已知的,或者对于本领域技术人员会是显而易见的。参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 第17版, 1985。要施用的组合物或配制剂无论如何会含有足以实现所治疗受试者中期望的状态的主题抗体量。

[0363] 药学可接受赋形剂,诸如媒介物、佐剂、载体或稀释剂是公众容易可获得的。此外,药学可接受辅助物质,诸如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、湿润剂等是公众容易可获得的。

[0364] 在一些实施方案中,将主题抗体配制成受控释放配制剂。可以使用本领域中公知的方法制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适的例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,其中所述基质为定形制品形式,例如膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、L-谷氨酸和乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、水凝胶、聚交酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。可以通过使用合适的添加剂,通过控制湿度含量及通过开发特定的聚合物基质组成阻止持续释放制剂中包含的抗体的生物学活性的可能丧失和免疫原性的可能变化。

[0365] 在本公开内容的范围内的受控释放可以理解为意指多种延长释放剂量形式之任一种。出于本公开内容的目的,可以认为以下术语基本上等同于受控释放:连续释放、受控释放、延迟释放、贮积(depot)、逐渐释放、长期释放、程序化释放(programmed release)、延长释放、成比例释放、拖延释放、储库(repository)、延迟、缓慢释放、间隔释放、持续释放、时间涂层(time coat)、时控释放(timed release)、延迟作用、延长作用、分层时间作用(layered-time action)、长效、延长作用、重复作用、减缓起作用、持续作用、持续作用药物、和延长的释放。这些术语的其它讨论可以参见Lesczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms, 1987 (CRC Press, Inc.)。

[0366] 各种受控释放技术涵盖非常宽的一批药物剂量形式。受控释放技术包括但不限于物理系统和化学系统。

[0367] 物理系统包括但不限于具有速率控制膜的贮存库(reservoir)系统,诸如微囊化、宏囊化(macroencapsulation),和膜系统;没有速率控制膜的贮存库系统,诸如中空纤维、超微孔三乙酸纤维素、和多孔聚合基底和泡沫;单片系统,包括在非多孔、聚合、或弹性体基质(例如非可侵蚀的、可侵蚀的、环境因素进入(environmental agent ingress))、和可降解的)中物理溶解的那些系统,和在非多孔、聚合、或弹性体基质(例如非可侵蚀的、可侵蚀的、环境因素进入、和可降解的)中物理分散的材料;层状结构,包括与外部控制层化学相似或不相似的贮存库层;和其它物理方法,诸如渗透泵或吸附到离子交换树脂上。

[0368] 化学系统包括但不限于聚合物基质的化学侵蚀(例如异质或同质侵蚀),或聚合物基质的生物侵蚀(例如异质或同质的)。关于受控释放的系统的类别的其它讨论可以参见

Agis F.Kydonieus, Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications, 1980 (CRC Press, Inc.)。

[0369] 存在有开发用于口服施用的许多受控释放药物配制剂。这些包括但不限于渗透压控制的胃肠外投递系统;流体动力学压力控制的胃肠外投递系统;膜渗入控制胃肠外投递系统,其包括微孔膜渗入控制胃肠外投递系统;胃液抗性肠靶向控制释放胃肠外投递装置;凝胶扩散控制胃肠外投递系统;和离子交换控制胃肠外投递系统,其包含阳离子和阴离子药物。关于受控释放药物投递系统的其它信息可以参见Yie W.Chien, Novel Drug Delivery Systems, 1992 (Marcel Dekker, Inc.)。

[0370] 剂量

[0371] 主治内科医生或其他有资格的医学人员基于各种临床因素可以确定合适的剂量。如医学领域中公知的,用于任一名患者的剂量取决于许多因素,包括患者的体格、体表面积、年龄、要施用的具体化合物、患者的性别、时间、和施用路径、一般健康、和同时施用的其它药物。主题抗体可以以每剂1ng/kg体重-20mg/kg体重,例如0.1mg/kg体重至10mg/kg体重,例如0.5mg/kg体重至5mg/kg体重的量施用;然而,涵盖低于或高于此例示性范围的剂量,特别是考虑前述因素。如果方案是连续输注,那么其范围也可以为每千克体重每分钟1 μ g至10mg。

[0372] 本领域技术人员会容易领会剂量水平可以作为特定抗体、症状的严重性和受试者对副作用的易感性的函数变化。本领域技术人员通过多种手段容易确定给定化合物的优选剂量。

[0373] 施用路径

[0374] 使用适合于药物投递的任何可用方法和路径,包括体内和离体方法及系统和局部施用路径对个体施用主题抗体。

[0375] 常规且药学可接受的施用路径包括鼻内、肌肉内、气管内、鞘内、皮下、皮内、表面应用、静脉内、动脉内、直肠、鼻、口服、和其他肠和胃肠外施用路径。若想要的话,可以将施用路径组合,或者根据抗体和/或期望的效果调整。主题抗体组合物可以在单剂或多剂中施用。在一些实施方案中,口服施用主题抗体。在一些实施方案中,经由吸入路径施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,鼻内施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,局部施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,颅内施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,静脉内施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,鞘内施用主题抗体组合物。

[0376] 可以使用任何可用的常规方法和适合于投递常规药物的路径,包括系统或局部路径对宿主施用本公开内容的抗体。一般地,本发明涵盖的施用路径包括但不必然限于肠、胃肠外、或吸入路径。

[0377] 与吸入施用不同的胃肠外施用路径包括但不必然限于表面、经皮、皮下、肌肉内、框内、囊内、脊柱内、胸骨内、鞘内、和静脉内路径,即与经由消化道不同的任何施用路径。可以实施胃肠外施用以实现系统性或局部投递主题抗体。在期望系统性投递的情况中,施用通常牵涉药物制剂的侵入或系统吸收的表面或粘膜施用。

[0378] 也可以通过肠施用对受试者投递主题抗体。肠施用路径包括但不必然限于口服和肠(例如使用栓剂)投递。

[0379] 治疗/处理意指至少改善与使宿主痛苦的病理学状况有关的症状,其中改善以最

广义用于至少指与治疗的病理学状况,诸如tau病变有关的参数(例如症状)幅度的降低。因此,治疗/处理还包括将病理学状况,或至少与其有关的症状完全抑制,例如阻止发生,或停止(例如终止),使得宿主不再患有病理学状况,或至少表征病理学状况的症状的情况。

[0380] 在一些实施方案中,例如,通过注射和/或投递至脑动脉中的位置或直接到脑组织中施用主题抗体。例如,也可以通过生物射弹投递至靶部位直接对靶部位施用主题抗体。

[0381] 多种宿主(其中术语“宿主”在本文中与术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用)根据主题方法可治疗。一般地,此类宿主是“哺乳动物”,其中这些术语广泛用于描述哺乳动物类,包括食肉动物目(carnivore)(例如犬和猫)、啮齿目(rodentia)(例如小鼠、豚鼠、和大鼠)、和灵长目(primates)(例如人、黑猩猩和猴)内的生物体。在一些实施方案中,宿主会是人。

[0382] 提供了具有单位剂量的主题抗体(例如为口服或可注射剂量)的试剂盒。在此类试剂盒中,在含有单位剂量的容器外会是信息包装插页,其描述了抗体在治疗感兴趣的病理学状况中的用途和伴随益处。优选的化合物和单位剂量是上文描述的那些。

[0383] 检测方法

[0384] 本公开内容提供了检测自个体获得的生物样品中Tau多肽的体外方法;及体内检测活个体中Tau多肽的方法。主题体外检测方法可以是定量的。如此,Tau可以充当用于tau病变进展,或对tau病变治疗的响应的生物标志物。

[0385] 检测/定量的Tau多肽可以是:a)全长Tau;b)全长Tau的N端片段;c)总的Tau,其中“总的Tau”可以包括任何同种型的全长Tau;d)游离的Tau,例如不与主题抗Tau抗体结合的Tau;和e)存在于生物样品中并且展现被主题抗Tau抗体识别的表位的任何N端Tau片段。图6A-D中呈现了人全长Tau的氨基酸序列。

[0386] 在一些情况中,主题检测方法可以进一步包括测定生物样品中的AB40和/或AB42水平。可以使用免疫学测定法(例如ELISA),例如使用结合AB40和/或AB42的抗体实施测定生物样品中的AB40和/或AB42水平。

[0387] 合适的生物样品包括例如脑脊液、血液、血浆、血清、尿液和唾液。

[0388] 检测自个体获得的生物样品中Tau多肽的本公开内容的体外方法一般牵涉:a)使生物样品与如本文中描述的抗Tau抗体接触;并b)检测抗体对样品中存在的Tau多肽的结合。在一些情况中,抗Tau抗体包含图1A和1B中描绘的VH和/或VL CDR。在一些情况中,抗Tau抗体包含图2A和2B的VH和/或VL CDR。

[0389] 可以使用本公开内容的检测方法测定个体是否具有或有风险形成tau病变。可以使用本公开内容的检测方法测定tau病变的阶段(严重性)。可以使用本公开内容的检测方法测定患者对治疗tau病变的治疗方案的响应。可以使用主题检测方法测试生物样品,其中生物样品获自怀疑具有tau病变的个体,已经诊断为具有tau病变的个体,具有形成tau病变的遗传素因的个体,等等。

[0390] 本公开内容提供了诊断个体中的神经变性性tau病变的方法。该方法一般牵涉(a)评估自个体获得的生物样品中Tau多肽的水平;并(b)将Tau多肽水平与指示正常对照受试者中Tau水平的参照、标准、或正常对照数值比较。生物样品中的Tau多肽水平和正常对照数值之间的显著差异指示个体具有神经变性性tau病变。

[0391] 本公开内容提供了监测个体中神经变性性tau病变的进展,或监测对个体中神经

变性性tau病变的治疗的响应的方法。方法一般牵涉比较在第一时间点时自个体获得的生物样品中的Tau多肽水平与在第二时间点时自个体获得的生物样品中的Tau多肽水平。与在第一时间点时自个体获得的生物样品中的Tau多肽水平相比在第二时间点时自个体获得的生物样品中的Tau多肽水平的差异可以提供关于以下的指示：i) tau病变是否在进展或疾病的进展是否已经停止；和/或ii) tau病变多么快速地在进展；和/或iii) 个体是否在展现对用药物或用于治疗tau病变的其它治疗方案治疗的有益临床响应。

[0392] 本公开内容提供了对tau病变分期的方法。例如，主题方法可以提供对阿尔茨海默氏病分期。例如，来自活个体的生物样品（例如CSF或其它液体生物样品）中的Tau多肽水平可以提供关于AD、Braak和Braak (1995) *Neurobiol. Aging* 16:271的Braak阶段的指示。例如，来自活个体的生物样品中的Tau多肽水平可以提供关于个体是否为AD的跨内嗅带（transentorhinal）I-II期；AD的边缘III-IV期；或AD的新皮质V-VI期的指示。

[0393] 可以通过本领域中已知的任何合适的方法评估生物样品中的Tau多肽水平。合适的方法包括但不限于蛋白质（“Western”）印迹、免疫沉淀、酶联免疫吸附测定法（ELISA）、放射性免疫测定法（RIA）、荧光活化细胞分选（FACS）、二维凝胶电泳、质谱术（MS）、基质辅助激光解吸/离子化飞行时间-MS（MALDI-TOF）、表面增强激光解吸离子化-飞行时间（SELDI-TOF）、高效液相层析（HPLC）、快速蛋白质液相层析（FPLC）、多维液相层析（LC）及接着的串联质谱术（MS/MS）、和激光密度计量术。

[0394] 本公开内容提供了监测个体中的tau病变进展的方法，其中方法一般牵涉：a) 测定在第一时间点时自个体获得的生物样品中Tau多肽的第一水平；b) 测定在第二时间点时自个体获得的生物样品中Tau多肽的第二水平；并c) 比较Tau的第二水平与Tau的第一水平。测定步骤可以包括：i) 使生物样品与主题抗Tau抗体接触；并ii) 定量抗体对样品中存在的Tau多肽的结合。

[0395] 在一些情况中，第一时间点是启动治疗方案前的时间点，而第二时间点是启动治疗方案后的时间点。如此，本公开内容提供了监测对用于治疗tau病变的药剂治疗的响应的方法，其中方法牵涉：a) 测定在第一时间点时自个体获得的生物样品中Tau多肽的第一水平，所述第一时间点在启动用治疗tau病变的药剂治疗前；b) 测定在第二时间点时自个体获得的生物样品中Tau多肽的第二水平，所述第二时间点在启动用治疗tau病变的药剂治疗后；并c) 比较Tau的第二水平与Tau的第一水平。

[0396] 也可以将监测tau病变进展的主题方法应用于监测共核蛋白病，例如帕金森氏病（PD）；路易体痴呆（DLB）；多器官萎缩（MSA）等的进展的方法。例如，可以用主题方法监测PD伴痴呆（PDD）的进展。

[0397] 在一些tau病变中，Tau的水平随疾病进展而升高。在其它tau病变中，Tau的水平随疾病进展而降低。如此，例如Tau的水平随AD进展而升高；并且随FTD进展而降低。

[0398] 主题方法可以牵涉包含主题抗Tau抗体的试剂盒或测定装置的用途。本公开内容提供了用于实施如本文中描述的方法的试剂盒和测定装置。主题试剂盒包含本公开内容的抗Tau抗体。

[0399] 可以将抗Tau抗体在不溶性支持物（例如测试条，多孔板的孔，珠（例如磁珠）等）上固定化。合适的支持物是本领域中公知的，并且特别包括商品化的柱材料、聚苯乙烯珠、胶乳珠、磁珠、胶体金属颗粒、玻璃和/或硅芯片和表面、硝酸纤维素条、尼龙膜、薄片、反应盘

(例如多孔板)的孔、塑料管,等等。固体支持物可以包含多种物质之任一,包括例如玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、右旋糖苷、尼龙、直链淀粉、天然的和经修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖、和磁铁矿(magnetite)。适合于将主题抗体固定于固体支持物上的方法是公知的,并且包括但不限于离子、疏水性、共价相互作用等。固体支持物可以是可溶的或不可溶的,例如在水性溶液中。在一些实施方案中,合适的固体支持物一般在水性溶液中是不可溶的。

[0400] 本公开内容的抗Tau抗体可以包含可检测标记物。在抗体包含可检测标记物的情况下,主题试剂盒可以包含一种或多种用于显现可检测标记物的试剂。经标记的抗体可以包含标记物,诸如化学发光剂、颗粒标记物、比色剂、能量转移剂、酶、荧光剂、或放射性同位素。合适的可检测标记物包括通过分光、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学、或化学手段可检测的任何组合物。合适的可检测标记物包括但不限于荧光标记物(例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白,等等);放射性标记物(例如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、或 ^{32}P);和酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、萤光素酶、和对底物起作用以生成可以通过荧光、比色、或分光光度手段检测的产物的其它酶)。

[0401] 主题试剂盒可以进一步包含一种或多种别的组分,其中合适的别的组分包括:1) 阳性对照;2) 缓冲液(例如结合缓冲液;清洗缓冲液;等等);3) 在产生可检测信号中使用的试剂;等等。试剂盒的其它任选组分包含:蛋白酶抑制剂;可检测标记物;等等。根据期望,试剂盒的各种组分可以存在于不同的容器中或者某些相容的组分可以预先组合到单一容器中。

[0402] 在上文提及的组分外,主题试剂盒可以包括使用试剂盒的组分实施主题方法的使用法说明。一般在合适的记录介质上记录用于实施主题方法的使用法说明。例如,可以在基底,诸如纸或塑料等上印刷用法说明。因此,用法说明可以以包装插页存在于试剂盒中,在试剂盒或其组分(即与包装或分包有关)的容器的标签等中。在其它实施方案中,用法说明以合适的计算机可读存储介质,例如压缩盘只读存储器(CD-ROM)、数字通用盘(DVD)、磁盘等上存在的电子存储数据文件存在。在又一些实施方案中,试剂盒中不存在真正的用法说明,但是提供了用于从远端来源获得用法说明的手段,例如经由因特网。此实施方案的一个例子是包含可以查看用法说明和/或可以下载用法说明的网址的试剂盒。就用法说明而言,在合适的基底上记录这种用于获得用法说明的手段。

[0403] 测定装置可以包含固体基片上固定的主题抗Tau抗体。测定装置可以为多种形式之任一,例如测试条,浸渍条等。

[0404] 体内成像

[0405] 如上文讨论的,本公开内容提供了检测活个体中的Tau多肽的方法,例如通过体内成像技术进行。例如,在一个实施方案中,可以通过正电子发射断层摄影术(PET)、单光子发射断层摄影术(SPECT)、近红外(NIR)光学成像、或磁共振成像(MRI)实现Tau多肽的体内成像。对个体施用主题抗Tau抗体,并且检测Tau多肽的存在和/或水平。抗Tau抗体可以包含适合于在PET、SPECT、NIR或MRI中使用的标记物。此类标记物包括造影剂或放射性同位素,其中造影剂或放射性同位素是适合于在成像,例如对人实施的成像规程中使用的造影剂或放射性同位素,如上文描述的。在一些情况中,抗Tau抗体包含IPN001的VH和/或VL CDR。在一些情况中,抗Tau抗体包含IPN002的VH和/或VL CDR。抗Tau抗体可以包含一个或多个个人源化

框架区,如上文描述的。

[0406] 产生报告

[0407] 在一些情况中,主题检测方法包括检测自个体获得的生物样品中的Tau多肽;并且基于检测的Tau多肽的水平,产生报告和/或指导获得生物样品的个体的疗法或管理。

[0408] 报告可以包括下列一项或多项:关于个体是否可能具有tau病变的指示;tau病变严重性的指示;关于个体是否展现出对tau病变治疗的有益临床响应的指示;等等。

[0409] 如此,报告可以包括信息,诸如个体具有或会形成tau病变的预测的可能性;关于进一步评估的推荐;关于治疗药物和/或其它健康管理干预的推荐,等等。

[0410] 例如,本文中公开的方法可以进一步包括产生或输出提供受试者评估的结果的报告步骤,所述报告可以以电子介质(例如计算机监视器上的电子显示器)形式,或以有形介质(例如纸或其它有形介质上印刷的报告)形式提供。关于个人具有或有风险形成tau病变的可能性的评估可以称为“风险报告”、“风险得分”、或“可能性得分”。准备报告的个人或组织(“报告产生者”)也可以实施诸如样品聚集、样品加工等步骤。或者,报告产生者外的组织可以实施诸如样品聚集、样品加工等步骤。可以给用户提供风险评估报告。“用户”可以是健康专家专业人员(例如临床医生、实验室技术人员或内科医生)。

[0411] 指导健康管理

[0412] 在一些情况中,主题检测方法包括检测自个体获得的生物样品中的Tau多肽;并且基于检测的Tau多肽的水平,产生报告和/或指导获得生物样品的个体的疗法或管理。

[0413] 如此,例如根据主题检测方法的结果,可以产生个体经历tau病变的治疗性干预(治疗)和/或认为个体进行特殊健康管理的推荐。

[0414] 治疗性干预可以包括例如用于治疗阿尔茨海默氏病的药物疗法。用于治疗阿尔茨海默氏病的药物疗法的例子包括但不限于乙酰胆碱酯酶抑制剂,包括但不限于Aricept(多奈哌齐(donepezil))、Exelon(利凡斯的明(rivastigmine))、美曲膦酯(metrifonate)、和他克林(tacrine)(Cognex);抗AB抗体(例如Solanezumab);抗Tau抗体;非类固醇消炎药,包括但不限于布洛芬(ibuprofen)和吲哚美辛(indomethacin);环加氧酶-2(Cox2)抑制剂诸如Celebrex;和单胺氧化酶抑制剂,诸如Selegiline(Eldepryl或Deprenyl)。每种上述药剂的剂量是本领域中已知的。例如,Aricept可以以每天50mg口服施用6周,并且若个体耐受良好的话,此后每天以10mg施用。

[0415] 测定游离的和结合的胞外Tau的量

[0416] 在对个体施用抗eTau抗体后,可以有兴趣测定没有与抗eTau抗体结合的CSF或ISF中剩余的eTau量。本公开内容提供了用于测定此类游离的eTau量的方法。图54A中描绘了用于测定没有与抗eTau抗体结合的CSF或ISF中剩余的eTau量的方法的示意图。在对个体施用抗eTau抗体后,也可以有兴趣测定与抗eTau抗体结合的CSF或ISF中的eTau量。图54B中描绘了用于测定与抗eTau抗体结合的CSF或ISF中的eTau量的方法的示意图。

[0417] 测定游离的胞外tau的量

[0418] 本公开内容提供了在自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中测定与抗eTau抗体未结合的胞外Tau(eTau)的量的方法。方法一般牵涉:a)使固定化抗体与自受试者获得的CSF或ISF样品接触,其中固定化抗体与对受试者施用的抗eTau抗体竞争对eTau的结合,且其中在适合于未结合的eTau与固定化抗体结合的条件下接触;并b)测定与

固定化抗体结合的eTau的量。与固定化抗体结合的eTau的量指示样品中与抗Tau抗体未结合的eTau的量。在一些情况中,使用可检测标记的不与固定化抗体竞争对eTau的结合的第三抗体测定与固定化抗体结合的eTau的量。

[0419] 如上文所述,测定法测量自经历用抗eTau抗体治疗的个体获得的CSF或ISF样品中的eTau量。在一些情况中,抗eTau抗体是治疗性人源化抗eTau抗体。在一些情况中,抗eTau抗体是本公开内容的人源化抗eTau抗体。在一些情况中,抗eTau抗体是hu-IPN002。

[0420] 在一些情况中,主题方法会包括:a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中的eTau量,如上文描述的;并b)测定样品中总的tau的水平。

[0421] 在一些情况中,主题方法会包括:a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体未结合的eTau量,如上文描述的;并b)比较样品中未结合的Tau的水平与在用抗eTau抗体治疗前自个体获得的CSF或ISF样品中总tau的水平。

[0422] 主题检测方法适合于测定胞外tau的水平。如本文中使用的,“胞外tau”(“eTau”)涵盖可以在脑脊液(CSF)或间质液(ISF)中检出的任何Tau多肽。在一些实施方案中,eTau是具有175个氨基酸的长度并且包含全长tau的氨基酸2-176的多肽;例如,在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:45中所列的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,eTau是具有171个氨基酸的长度并且包含全长tau的氨基酸2-172的多肽;例如,在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:44中所列的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:46中所列的氨基酸序列的eTau-2多肽。在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:47中所列的氨基酸序列的eTau-3多肽。在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:48中所列的氨基酸序列的eTau-4多肽。

[0423] 在一些情况中,eTau多肽具有约50个氨基酸至约175个氨基酸,例如约50个氨基酸(aa)至约75个aa,约75个aa至约100个aa,约100个aa至约125个aa,约125个aa至约150个aa,或约150个aa至约175个aa的长度;并且可以包含全长tau的氨基酸2-176的50至约75个,约75至约100个,约100至约125个,约125至约150个,或约150至约175个连续氨基酸。图20中描绘了例示性的eTau多肽。

[0424] 测定与抗eTau抗体结合的胞外Tau的量

[0425] 本公开内容提供了在自经历用治疗性抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中测定与治疗性抗eTau抗体结合的eTau量的方法。方法一般牵涉:a)使固定化抗体与自受试者获得的CSF或ISF样品接触,其中固定化抗体不与对受试者施用的抗eTau抗体竞争对eTau的结合,所述接触在适合于治疗性抗体结合的eTau与固定化抗体结合的条件下;并b)测定与固定化抗体结合的治疗性抗eTau/eTau复合物的量,其中与固定化抗体结合的治疗性抗eTau抗体/eTau复合物的量指示样品中存在的治疗性抗体结合的eTau的量。通过检测抗eTau抗体/eTau复合物中存在的抗eTau抗体测定与固定化抗体结合的治疗性抗eTau抗体/eTau复合物的量。通过检测抗eTau抗体/eTau复合物中存在的抗eTau抗体测定与固定化抗体结合的治疗性抗eTau抗体/eTau复合物的量,提供CSF或ISF样品中与治疗性抗体结合的Tau量的指示。

[0426] 如上文所述,测定法测量自经历用抗eTau抗体治疗的个体获得的CSF或ISF样品中的治疗性抗体结合的eTau量。在一些情况中,抗eTau抗体是治疗性人源化抗eTau抗体。在一些情况中,抗eTau抗体是本公开内容的人源化抗eTau抗体。在一些情况中,抗eTau抗体是

hu-IPN002。

[0427] 在一些情况中,主题方法会包括:a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体结合的eTau量,如上文描述的;并b)测定样品中总的tau的水平。在一些情况中,主题方法会包括:a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体结合的eTau量,如上文描述的;并b)测定不与治疗性抗eTau抗体结合的CSF或ISF样品中的eTau量。在一些情况中,主题方法会包括:a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体结合的eTau量,如上文描述的;b)测定样品中总的tau的水平;并c)测定不与治疗性抗eTau抗体结合的CSF或ISF样品中的eTau量。

[0428] 在一些情况中,主题方法会包括:a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体结合的eTau量,如上文描述的;并b)比较样品中抗e-Tau抗体结合的Tau的水平与在用抗eTau抗体治疗前自个体获得的CSF或ISF样品中总的tau的水平。

[0429] 在一些情况中,主题方法会包括:a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体未结合的eTau量,如上文描述的;b)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体结合的eTau量,如上文描述的;并c)比较样品中未结合的Tau的水平与抗e-Tau抗体结合的Tau的水平与在用抗eTau抗体治疗前自个体获得的CSF或ISF样品中总的tau的水平。

[0430] 主题检测方法适合于测定与治疗性抗体结合的胞外tau的水平。如本文中使用的,“胞外tau”(“eTau”)涵盖可以在脑脊液(CSF)或间质液(ISF)中检出的任何Tau多肽。在一些实施方案中,eTau是具有175个氨基酸的长度并且包含全长tau的氨基酸2-176的多肽;例如,在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:45中所列的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,eTau是具有171个氨基酸的长度并且包含全长tau的氨基酸2-172的多肽;例如,在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:44中所列的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:46中所列的氨基酸序列的eTau-2多肽。在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:47中所列的氨基酸序列的eTau-3多肽。在一些实施方案中,eTau是包含SEQ ID NO:48中所列的氨基酸序列的eTau-4多肽。

[0431] 在一些情况中,eTau多肽具有约50个氨基酸至约175个氨基酸,例如约50个氨基酸(aa)至约75个aa,约75个aa至约100个aa,约100个aa至约125个aa,约125个aa至约150个aa,或约150个aa至约175个aa的长度;并且可以包含全长tau的氨基酸2-176的50至约75个,约75至约100个,约100至约125个,约125至约150个,或约150至约175个连续氨基酸。图20中描绘了例示性的eTau多肽。

[0432] 产生报告

[0433] 在一些情况中,主题方法会包括:a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体未结合的eTau量,如上文描述的;并b)产生报告和/或指导获得生物样品的个体的疗法或管理。在一些情况中,主题方法会包括:a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体未结合的eTau量,如上文描述的;b)比较样品中未结合的Tau的水平与在用抗eTau抗体治疗前自个体获得的CSF或ISF样品中总的tau的水平;并c)产生报告和/或指导获得生物样品的个体的疗法或管理。

[0434] 在一些情况中,主题方法会包括:a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体结合的eTau量,如上文描述的;并b)产生具有测定结果的报告。报告可以进一步包括下列一项或两项:在用抗Tau抗体治疗后样品中未结合的Tau量与CSF或ISF样品中总的tau的水平;和在用抗eTau抗体治疗前自个体获得的CSF或ISF样品中总的tau的量。

[0435] 报告可以包括例如关于个体是否展现出对tau病变治疗的有益临床响应的指示;关于是否应当维持、提高或降低抗eTau抗体剂量的指示;等等。

[0436] 如此,报告可以包括信息,诸如关于进一步评估的推荐;关于治疗药物和/或其它健康管理干预的推荐;提高抗eTau抗体剂量的推荐;维持抗eTau抗体剂量的推荐;降低抗eTau抗体剂量的推荐;等等。

[0437] 例如,本文中公开的方法可以进一步包括产生或输出提供受试者评估的结果的报告步骤,所述报告可以以电子介质(例如计算机监视器上的电子显示器)形式,或以有形介质(例如纸或其它有形介质上印刷的报告)形式提供。准备报告的个人或组织(“报告产生者”)也可以实施诸如样品聚集、样品加工等步骤。或者,报告产生者外的组织可以实施诸如样品聚集、样品加工等步骤。可以给用户提供风险评估报告。“用户”可以是健康专家专业人员(例如临床医生、实验室技术人员或内科医生)。

[0438] 指导健康管理

[0439] 在一些情况中,主题方法包括a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体未结合的eTau量,如上文描述的;并且基于与抗eTau抗体未结合的eTau的测定量,产生报告和/或指导获得生物样品的个体的疗法或管理。

[0440] 在一些情况中,主题方法包括a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体未结合的eTau量,如上文描述的;并且基于与抗eTau抗体未结合的eTau的测定量,维持对受试者施用的抗eTau抗体的剂量。在一些情况中,主题方法包括a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体未结合的eTau量,如上文描述的;并且基于与抗eTau抗体未结合的eTau的测定量,提高对受试者施用的抗eTau抗体的剂量。在一些情况中,主题方法包括a)测定自经历用抗eTau抗体治疗的受试者获得的CSF或ISF样品中与抗eTau抗体未结合的eTau量,如上文描述的;并且基于与抗eTau抗体未结合的eTau的测定量,降低对受试者施用的抗eTau抗体的剂量。

实施例

[0441] 提出以下实施例,从而给本领域普通技术人员提供如何产生和使用本发明的完全公开和描述,而并不意图限制发明人视为其发明的事物的范围,它们也不意图表示下文的实验是实施的所有或唯一实验。就使用的数字(例如量、温度等)而言已经努力确保精确性,但是应当考虑一些实验误差和偏差。除非另有指示,份数是重量份,分子量是重量平均分子量,温度以摄氏度计,而压力为或接近大气压。可以使用标准缩写,例如bp,碱基对;kb,千碱基;pl,皮升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌肉内;i.p.,腹膜内;s.c.,皮下;等等。

[0442] 实施例1:IPN001和IPN002VH和VL区的克隆和测序

[0443] 确定IPN001(在本文中又称为“IPN1”或“IPN-1”)和IPN002(在本文中又称为

“IPN2”或“IPN-2”)抗体的VH和VL区的氨基酸序列。图1A和1B中分别描绘了IPN001的VH和VL区的氨基酸序列。图2A和2B中分别描绘了IPN002的VH和VL区的氨基酸序列。CDR为粗体文本且加下划线。使用Kabat等的方法(参见表1;及J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977);及Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991))确定CDR。

[0444] 实施例2:对抗Tau抗体效果的电生理学分析

[0445] 材料和方法

[0446] 使用填充溶液的玻璃片移液管(2-5MΩ)实施在正常人星细胞的单层上培养的诱导的多能干细胞(iPSC)衍生的皮质神经元的全细胞膜片钳记录,所述溶液含有(mM):K-甲基-硫酸盐(140)、NaCl(10)、CaCl₂(1)、Mg-ATP(3);Na-GTP(0.4)、EGTA(0.2)、HEPES(10)、磷酸肌酸,具有调节的pH=7.3和mOsm=300。用含有(mM):NaCl(140),KCl(2.5),MgCl₂(2),CaCl₂(2),Hepes(10),D-葡萄糖(10),蔗糖(20)的人工脑脊髓液灌注(2ml/min)神经元。调节pH=7.4mOsm=310。使用pClamp-10.3数据获得软件(Molecular Devices)和MultiClamp 700B放大器(Axon Instrument;Foster City CA)完成记录。经由MiniQuirt微输注系统(AutoMate,Berkeley,CA)应用AD tau和与IPN001或IPN002预温育的AD Tau(以10:1重量比于室温2-hr或4摄氏度24-hr)。使用Clampfit 10.2分析软件(Molecular Devices)离线完成数据分析。于室温完成所有记录。

[0447] 结果

[0448] 图3A-D中描绘了数据。

[0449] AD-Tau(6μg/ml)的应用引起皮质神经元膜去极化(A、B、和C)。将AD-Tau(6μg/ml)与IPN001(60μg/ml)(A)或IPN002(60μg/ml)(B)预温育大于2hr降低AD-Tau介导的膜去极化。C.将AD-Tau(6μg/ml)与小鼠IgG(60μg/ml)的预温育没有降低皮质神经元中的AD-Tau介导的膜去极化。D.数据汇总,其显示了IPN001和IPN002显著降低AD-Tau介导的膜去极化(配对t-检验*p<0.037;**p<0.009,p<0.003)。

[0450] 实施例3:IPN001和IPN002与来自AD患者的CSF中的Tau的免疫反应性

[0451] 自10名健康供体(每名1ml)合并脑脊液(CSF)。还从10名阿尔茨海默氏病(AD)患者(每名1ml)合并CSF。保存CSF合并物的等份试样以进行ELISA分析。使用10ml来自皮质神经元的条件化培养基作为CSF亲和分离的对照,所述皮质神经元从唐氏(Down's)诱导的多能干细胞(iPSC)系(8941.1)分化315天,并且还保存等份试样以进行ELISA分析。为了测定CSF是否含有IPN002反应性Tau,将CSF合并样品和条件化培养基之每种在IgG1偶联树脂上预先澄清,随后将流过物应用于IPN001偶联树脂。将IPN001树脂用磷酸盐缓冲盐水(PBS)彻底清洗,并用50mM甘氨酸、150mM NaCl,pH 2.3洗脱结合的蛋白质,并在洗脱后用1M Tris,pH 8.3中和。将洗脱的蛋白质在YM10浓缩仪上浓缩,并添加至样品缓冲液以进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳和Western印迹分析。

[0452] 为了测定IPN002是否与CSF中的任何Tau形式起反应,用IPN001、Santa Cruz Tau H-150(aa1-150)和用Dako的Tau#A0024抗体探查IPN002洗脱蛋白质的Western印迹,所述Tau#A0024抗体与Tau的C端(aa#243-441)起反应。图4A-C中描绘了数据。

[0453] Western印迹显示了来自健康和AD CSF两者的经IPN002亲和纯化的蛋白质中存在的IPN001(图4a)和Tau H-150(图4b)免疫反应性条带,其分子量范围为约25kd至37kd。这些

Tau片段与唐氏系条件化培养基分离的eTau片段在其大小上相似,但在其相对丰度上不相似。Dako C端tau抗体(图4c)没有检出来自从CSF或条件化培养基的IPN002亲和分离的任何反应性种类。全长Tau没有被来自IPN002亲和分离的任何Tau抗体检出。由于IPN002亲和分离的蛋白质与Western印迹上的IPN001和IPN002是反应性的,推断CSF中的Tau也是IPN001反应性的。

[0454] 然后,将来自IPN002亲和树脂的CSF和条件化培养基流过物序贯应用于T46 (Tau#428-441) 和HT7 (Tau#159-163) 并自T46 (Tau#428-441) 和HT7 (Tau#159-163) 洗脱以测定是否存在不被IPN002分离的任何C端或中间区tau片段。用Dako C端抗体探查洗脱液(图4c),并且没有检出免疫反应性。这些数据提示了IPN001和IPN002免疫反应性tau比全长、仅中间区或C端tau片段更丰富。

[0455] 保存来自CSF和条件化培养基中每种流过物的等份试样以进行分离前对分离后比较,从而使用商品化试剂盒测定在分离期间是否除去了全部可检出的tau,所述商品化试剂盒通常用于测定CSF中的Tau水平。图5中显示了数据。此分析证明了全部可检出的tau在亲和分离过程期间从CSF后样品除去。

[0456] 这些数据提供强烈的证据,即IPN001和IPN002两者与来自健康人和AD患者两者的CSF中存在的主要tau种类起反应。

[0457] 实施例4:患者样品中eTau的检测

[0458] 材料和方法

[0459] 自iPSC衍生的皮质神经元的条件化培养基收集

[0460] 使用Yamanaka法(Takahashi等(2007) Cell 131 (5), 861) 从健康年龄匹配对照和阿尔茨海默氏病患者生成iPSC(诱导的多能干细胞),如记载于Dimos等(2008) Science 321:1218的。大体上符合使用双重SMAD单层法的发表方案(Chambers等(2009) Nat.Biotechnol.27:275) 将iPSC分化成皮质神经元,接着进行皮质神经元分化,其类似于记载于Shi等(2012) Nat.Neurosci.15:477) 的。将培养108天的iPSC衍生的皮质神经元(iPSC-CN) 清洗,添加新鲜的培养基,并在3天后收集条件化培养基,除非另外指明。进行自品系的多次分化以确保eTau水平的再现性。将条件化培养基以15,000rpm旋转15分钟,之后加工以进行Western印迹或tau ELISA。对于布雷菲尔德菌素(brefeldin) A实验,将iPSC-CN培养物用PBS清洗,之后添加具有和没有1 μ M布雷菲尔德菌素A的新鲜培养基,并将培养基条件化1小时,之后收集。

[0461] 自人初级皮质神经元的条件化培养基收集

[0462] 制备人皮质神经元培养物(HCC),如记载于Wright等(2007) Neurobiol.Aging 28:226的。简言之,通过Advanced Bioscience Resources (Alameda,CA) 并且遵守联邦胎儿研究指南(federal guidelines for fetal research) 和统一解剖捐赠法案(Uniformed Anatomical Gift Act) 获得人胎儿脑皮质组织。将组织在汉克氏缓冲盐水溶液(Cellgro) 中漂洗,并且在存在1 μ g/ml DNA酶(EMD) 的情况下磨碎,并通过100 μ m细胞过滤器。在离心后,将沉淀物在0.05%胰蛋白酶/EDTA (Invitrogen) 中于37 $^{\circ}$ C重悬20min。通过添加等体积的含有10%胎牛血清(FBS) 的培养基灭活胰蛋白酶,并在存在DNA酶的情况下再次温和磨碎样品。在离心后,将细胞在铺板培养基(含有B27的Neurobasal,Invitrogen) 中重悬,并计数。将细胞在用多聚-d-赖氨酸及层粘连蛋白包被的盖玻片上或板中铺开。将3周龄HCC清

洗,添加新鲜培养基,并在条件化3天后收集培养基。将条件化培养基以15,000rpm旋转15分钟,之后加工以进行Western印迹。

[0463] P301L小鼠 ISF 和人 CSF 收集

[0464] 使用异氟烷(2%,800mL/min O₂)使小鼠麻醉。使用布比卡因(Bupivacain)/肾上腺素进行局部止痛法,并使用fynadine或carprophen进行手术期间/术后止痛法。将动物置于立体定位架(Kopf instruments,USA)中。将推拉式微透析探头(磷脂酰乙醇胺(PEE)膜,Brainlink,the Netherlands)插入海马中(3mm暴露表面)。手术后24和48小时实施微透析取样。在取样当天,将动物的探头用氟化乙烯丙烯(FEP)管道与微灌注泵(Harvard PHD 2000注射器泵,Holliston,MA等等)连接。用含有147mM NaCl,3.0mM KCl,1.2mM CaCl₂和1.2mM MgCl₂,和0.15%牛血清清蛋白(BSA)的人工CSF(aCSF)以0.75μL/min的流速灌注微透析探头。将微透析样品收集60分钟时段。在稳定期后,收集基底样品。在取样的第二天,重复上述规程(Brains Online)。将间质液(ISF)以15,000rpm旋转15分钟,并使用经澄清的上清液进行eTau Western印迹。

[0465] 将来自10名健康者(Precision Med)、10名AD患者(Precision Med)和10名PSP患者的集合的10ml CSF(Precision Med)收集,以15,000rpm旋转15分钟,将上清液在IgG亲和树脂上预先澄清,接着在IPN002抗tau亲和树脂上进行tau分离,清洗,用50mM甘氨酸,pH 2.3及150mM NaCl洗脱到含有1M TBS,pH 8.3的管中以中和pH,在YM10过滤器上浓缩,并制备用于tau Western印迹。与阳性对照类似地分离来自fAD PSEN1患者的iPSC-CN条件化培养基以比较显带式样。

[0466] Western印迹

[0467] 将条件化培养基在Laemmli缓冲液(Sigma)中稀释。将培养的神经元用PBS漂洗,之后在DMEM(Invitrogen)中的0.05%胰蛋白酶中温育,漂洗,并在Laemmli缓冲液中裂解。将所有样品煮沸,在tris-甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶(Invitrogen)上分开,并使用iBlot(Invitrogen)转移至硝化纤维素。将膜在封闭缓冲液(LiCor)中温育,用含有0.1%Tween-20的封闭缓冲液中0.5μg/ml针对tau的IPN001抗体和针对β-肌动蛋白的抗体(1:2000; Abcam)、和抗小鼠680和抗兔800二抗(LiCor)探查。用Odyssey SA红外成像系统扫描印迹,并使用Odyssey SA软件(LiCor)分析。

[0468] Tau ELISA

[0469] 在3天条件化期后从iPSC衍生的皮质神经元培养物收集培养基,并使用Alphascreen同质测定法测定以测量tau。将10μg/ml抗-tau AlphaLISA接受珠和1nM生物素化的抗Tau抗体与条件化培养基于室温混合过夜。将40μg/ml链霉亲和素-供体珠(Perkin Elmer)于室温添加30分钟,并在Envision读板仪上读板。

[0470] eTau纯化

[0471] 将来自AD患者的iPSC-CN收集的条件化培养基以15,000rpm旋转15分钟,收集上清液,并在IgG亲和树脂上预先澄清。将预先澄清的上清液通过IPN002抗Tau抗体树脂,清洗,并用50mM柠檬酸钠,pH 2.3及150mM NaCl将eTau洗脱到含有1M TBS,pH 8.3的管中以中和pH。将洗脱液浓缩,并将缓冲液交换成PBS。

[0472] 免疫荧光

[0473] 将MCC用PBS漂洗,在4%低聚甲醛中固定,用PBS中的10%正常猴血清(Jackson

ImmunoResearch) 封闭,用PBS中的0.2%Triton-x-100透化(除非另有规定)15分钟,并使用针对tau的IPN001抗体及驴抗小鼠-A488二抗(Molecular Probes)和DAPI(Invitrogen)染色。使用40倍的Leica DMI 600B显微镜使用LAS AF软件(Leica)获得图像。使用Nikon Eclipse Ti共焦显微镜(Nikon)获得共焦图像。

[0474] 结果

[0475] 进行测定法以检测各种流体中的eTau片段。图7中描绘了结果。如图7,左侧小图中显示的,内源tau从源自人诱导的多能干细胞(人iPSC-皮质神经元;iPSC-CN)的皮质神经元分泌,其中分泌性Tau称为胞外Tau或“eTau”。如图7,来自左侧的第二个小图中显示的,eTau也存在于来自人初级神经元(人皮质细胞;“HCC”)的条件化培养基中,这确认了eTau不是iPSC分化的人为因素。在神经元裂解物中也检出这些eTau片段,提示了tau在eTau分泌前在神经元内部被切割。

[0476] 如图7,中间小图中显示的,在来自P301L tau小鼠的间质液(ISF)中检出类似的tau片段,其中在任一系统中没有检出全长tau。P301L小鼠对于具有P301L突变的人tau形式而言是转基因的;P301L小鼠是人tau病变模型。参见例如Götz等(2001) J.Biol.Chem.276:529;及Lewis等(2000) Nature Genetics25:402。

[0477] 如图7,右侧小图中显示的,与来自健康患者的系相比,eTau水平在来自AD患者的CSF中及来自家族性AD(fAD)患者的多个系中是升高的。如图7,右侧小图中显示的,在来自PSP患者的CSF中也检出eTau。

[0478] 实施例5:eTau诱导神经元活动过度

[0479] 方法

[0480] 使用填充溶液的微移液管(2-5MΩ)在正常人星细胞的单层上培养的 iPSC-CN的全细胞膜片钳记录,所述溶液含有(mM):K-甲基-硫酸盐(140)、NaCl(10)、CaCl₂(1)、Mg-ATP(3);Na-GTP(0.4)、EGTA(0.2)、HEPES(10)、磷酸肌酸,具有调节的pH=7.3和mOsm=305。用含有(mM):NaCl(140)、KCl(2.5)、MgCl₂(2)、CaCl₂(2)、Hepes(10)、D-葡萄糖(10)、蔗糖(20)的人工脑脊髓液灌注(2ml/min)神经元,调节pH=7.4mOsm=310。使用pClamp-10.3数据获得软件(Molecular Devices)和MultiClamp 700B放大器(Axon Instrument;Foster City CA)完成记录。使用MiniSquirt微灌注系统(AutoMate,Berkeley,CA)实施eTau,或eTau与抑制剂河豚毒素(TTX)(Tocris)、MK801(Sigma)、NBQX(Tocris)或抗Tau抗体IPN001的喷出(puff)应用。离线数据分析使用Clampfit 10.2分析软件(Molecular Devices)。于34-37℃进行记录。

[0481] 结果

[0482] 为了测定eTau是否可以改变神经元功能,将纯化的eTau片段eTau应用于iPSC-CN或HCC。结果显示于图8A-C。

[0483] 如图8A中显示的,将纯化的eTau片段混合物添加到这些神经元上促进活动过度。如图8B中显示的,由eTau混合物诱导的活动过度被河豚毒素(TTX)及被NMDA和AMPA谷氨酸受体拮抗剂(分别为MK801和NBQX)抑制。TTX通过结合神经细胞膜中电压门控的快速钠通道阻断神经中的作用电位。这些数据提示了eTau诱导的神经元活动过度依赖于作用电位介导的谷氨酸释放。比较而言,如图8A的中间小图中显示的,全长tau的应用即使在是实际上更高的浓度也不产生神经元活性的可检测变化,显示了eTau诱导的活动过度依赖于tau片段。

这些eTau诱导的活动过度结果强烈提示了在神经元中可发生钙动员(mobilization)。为了测定钙动员是否在神经元中发生,测试eTau对钙动员的影响。如图8C中显示的,eTau-1a稳健动员钙。若在慢性背景诸如AD中维持,则此类神经元活动过度可以经由改变的突触触发和异常的神经元刺激导致神经元功能障碍。eTau-1a包括胎儿tau的氨基酸2-166,即SEQ ID NO:27的氨基酸2-166。

[0484] 实施例6:抗Tau抗体降低eTau介导的神经元活动过度

[0485] 如实施例5中描述的,实施电生理学分析。评估IPN001和IPN002对e-Tau介导的神经元活动过度的影响。

[0486] 如图8D中显示的,IPN001降低eTau介导的神经元活动过度。如图19B中显示的,IPN002降低eTau介导的神经元活动过度。

[0487] 实施例7:人源化抗Tau抗体

[0488] 生成IPN002的人源化变体。人源化变体1-4的重链VH域的氨基酸序列,和编码人源化变体的重链VH域的核苷酸序列显示于图9-12。人源化变体1-4的轻链VH域的氨基酸序列,和编码人源化变体的轻链VH域的核苷酸序列显示于图13-16。表4和5中汇总了相对于IPN002的氨基酸序列的氨基酸差异。

[0489] 表4:VH变体

[0490]

氨基酸位置	IPN002 (亲本抗体)	VH变体1	VH变体2	VH变体3	VH变体4
3	H	H	H	Q	Q
19	K	R	R	R	R
40	T	A	A	A	A
42	D	G	G	G	G
44	R	G	G	G	G
66	Q	R	R	R	R
83	S	S	N	N	N
86	K	K	R	R	R
87	S	S	A	A	A
93	S	S	S	S	A
108	S	S	T	T	T

[0491] 表5:Vk变体

[0492]

氨基酸位置	IPN002 (亲本抗体)	Vk变体1	Vk变体2	Vk变体3	Vk变体4
3	L	L	V	V	V
7	T	S	S	S	S
14	S	T	T	T	T
17	D	Q	Q	Q	Q
18	Q	P	P	P	P
45	K	Q	Q	Q	Q
48	V	V	V	V	I
83	L	V	V	V	V
85	T	T	T	V	V
104	L	V	V	V	V

[0493] 单字母氨基酸代码如下：

[0494] G-甘氨酸 (Gly)

[0495] P-脯氨酸 (Pro)

[0496] A-丙氨酸 (Ala)

[0497] V-缬氨酸 (Val)

[0498] L-亮氨酸 (Leu)

[0499] I-异亮氨酸 (Ile)

[0500] M-甲硫氨酸 (Met)

[0501] C-半胱氨酸 (Cys)

[0502] F-苯丙氨酸 (Phe)

[0503] Y-酪氨酸 (Tyr)

[0504] W-色氨酸 (Trp)

[0505] H-组氨酸 (His)

[0506] K-赖氨酸 (Lys)

[0507] R-精氨酸 (Arg)

[0508] Q-谷氨酰胺 (Gln)

[0509] N-天冬酰胺 (Asn)

[0510] E-谷氨酸 (Glu)

[0511] D-天冬氨酸 (Asp)

[0512] S-丝氨酸 (Ser)

[0513] T-苏氨酸 (Thr)

[0514] 实施例8：人源化IPN002变体的表征

[0515] 表4(其呈现于图17)中显示了VH#1-4与Vk#1-4的16个抗体组合之每种结合重组tau (383个氨基酸的重组tau) 及eTau 1a、eTau1b、eTau2、eTau3和eTau4之每种的相对tau结合亲和力。针对每种tau和eTau种类的相对结合亲和力的范围对于每种VH/Vk抗体组合为121pM至1030pM。eTau 1a包括胎儿tau的氨基酸2-166,即SEQ ID NO:27的氨基酸2-166;而eTau 1b包括胎儿tau的氨基酸2-196和217-228,即SEQ ID NO:27的氨基酸2-196和217-

228。图20中描绘了eTau3和eTau 4的氨基酸序列。

[0516] 为了获得这些VH/Vk人抗体的绝对亲和力及 K_{on} 和 K_{dis} ,使用tau (383个氨基酸的重组tau) 进行Octet分析。 K_D 的范围为42.6pM至2120pM。对于所有VH/Vk变体, K_{on} 值较高,而 K_{dis} 值较低(对于Tau及对于每种eTau种类)。表5(其呈现于图18)中提供了数据。

[0517] 在别的分析中测试上文描述的人源化IPN002变体的亚组。如图19A中显示的,在多种含有tau的样品的情况中在Western印迹测定法中使用三种变体 VH2/Vk1、VH2/Vk2、和VH2/Vk3。含有tau的样品包括iPSC-CN条件化培养基;iPSC-CN裂解物;AD脑裂解物;和P301L tau小鼠脑皮质裂解物;和猕猴脑裂解物。数据显示了上文描述的人源化IPN002变体与多种样品中的tau是反应性的。

[0518] 对上文描述的人源化IPN002变体的亚组测试降低eTau诱导的神经元活动过度的能力。如图19B中显示的,亲本IPN002和变体VH2/Vk1、VH2/Vk2和VH2/Vk3阻断eTau诱导的活动过度。

[0519] **实施例9:测试人源化IPN002变体的免疫原性**

[0520] 对人源化抗Tau抗体评估免疫原性潜力。使用EpiScreen™测定法。参见例如Jones等(2004) J. Interferon Cytokine Res. 24:560;及Jones等(2005) J. Thromb. Haemost. 3:991。使用CD8⁺消减的外周血单核细胞(PBMC) 实施时间过程T细胞测定法;并且通过在添加测试抗体样品后的多个时间点时掺入[³H]-胸苷测量T细胞增殖。

[0521] 自健康团体供体血沉棕黄层(例如来自测试的14小时内抽出的血液) 分离PBMC。与临床标准抗体比较T细胞对测试抗体(例如人源化IPN002变体) 的响应。

[0522] 将纯化的测试抗体(人源化IPN002变体) 添加至PBMC体外培养物至在培养基中50μg/ml的终浓度,从而生成测试样品。包括临床抗体对照(阳性对照),和仅含培养基的对照(未刺激的对照) 作为对照样品。将测试样品(加有测试抗体的PBMC) 和对照样品于37℃在5%CO₂的情况下温育8天。在第5天、第6天、第7天、和第7天,将测试和对照样品中的细胞悬浮,并转移至多孔培养板的孔。将测试和对照样品用0.75μCi [³H]-胸苷脉冲,并再温育18小时,之后收获到滤器垫上。使用闪烁计数测定每孔的每分钟计数(cpm)。

[0523] 对于增殖测定法,使用等于或大于2的SI阈值,其中认为诱导高于此阈值的增殖响应的样品是阳性。SI(刺激指数) 是用均值测试样品计数除以未刺激对照的均值。

[0524] 图21A-C中显示了数据。健康供体T细胞增殖响应人源化IPN002测试抗体。将来自大批培养物的PBMC取样,并在与测试样品一起温育后第5天、第6天、第7天和第8天评估增殖。认为以水平虚线标示的具有SI ≥ 2.0 (p < 0.05) 的增殖响应(其使用未配对两样品 student t 检验是显著的 (p < 0.05)) 是阳性。

[0525] 如图21A中显示的,测试完全人源化IPN002抗体具有低免疫原性潜力(低于2.0的SI阈值)。图21B显示了用参照嵌合抗体得到的结果,其中参照嵌合抗体具有IPN002鼠重和轻链可变区和人IgG4恒定区;并且图21C显示了用免疫原性临床对照人源化A33抗体得到的结果。

[0526] **实施例10:IPN002在体内降低磷酸化的Tau的水平**

[0527] 评估IPN002施用对氨基酸202和205处磷酸化的Tau水平的影响。

[0528] 使用P301L小鼠模型。P301L小鼠对于含有P301L突变的人tau形式而言是转基因的;P301L小鼠是人tau病变的模型。参见例如Götz等(2001) J. Biol. Chem. 276:529。

[0529] 用下列各项处理P301L小鼠(3-4个月龄):1)对照IgG;2)PHF1抗磷酸化的Tau抗体;或3)IPN002。将IgG对照和IPN002抗体以10mg/kg的浓度腹膜内注射4周;然后以20mg/kg再注射4周。将PHF1以10mg/kg施用整个8周过程。在开始抗体治疗方案后第60天,在海马中测量磷酸化的Tau的水平。图22中描绘了数据。

[0530] 在氨基酸202和205处磷酸化的Tau称为“AT8”。如图22中显示的,与IgG对照处理相比,用IPN002的处理导致不溶性磷酸-Tau(AT8)的统计学显著降低,如通过ELISA评估(左侧小图),和降低的趋势,如通过Western印迹分析评估(右侧小图)。PHF1处理显示了不溶性AT8的降低的趋势,这支持Chai等((2011) J. Biol. Chem. 286:34457)及Boutajangout等((2011) J. Neurochem. 118:658)的发现。

[0531] 实施例11:IPN002降低ISF和CSF两者中的游离tau水平

[0532] 测定IPN002施用对CSF和间质液(ISF)中游离的tau的水平的影响。如实施例10中描述的,处理P301L小鼠。使用IPN001测定不与IPN002结合的存在于ISF中的游离tau的水平。如图23中显示的,IPN002处理降低用IPN002处理的P301L小鼠中ISF中的游离的Tau水平(不与IPN002结合)(左侧小图)。

[0533] 为了测定IPN002是否与其在ISF中那样以相同的程度降低CSF中的游离Tau水平,如实施例10中描述的那样处理P301L小鼠,并且测定IPN002处理对经处理小鼠的CSF中游离tau(不与IPN002结合)水平的影响。图24中显示了结果。

[0534] 在图24的左侧小图中,显示了未处理的,仅对照IgG处理的,经PHF1处理的,和经IPN002处理的小鼠的CSF中游离的tau(与IPN002未结合;称为“(IPN002的)游离的tau”)的水平。如图24的右侧小图中显示的,CSF中游离的tau水平与经IPN002处理的小鼠的ISF中游离的tau水平相当,这证明了ISF tau分析与更为临床相关的物质CSF完全相关联。

[0535] 实施例12:抗Tau抗体降低eTau介导的神经元活动过度

[0536] 如实施例5中描述的那样实施电生理学分析。评估IPN002对e-Tau诱导的神经元活动过度的影响。

[0537] 如图25中显示的,IPN002降低eTau介导的神经元活动过度。

[0538] 实施例13:Tau片段存在于从可能具有慢性创伤性脑病(CTE)的个体获得的CSF中

[0539] 自前国家足球联赛(National Football League)前锋(linemen)(其展现出行为/认知缺陷,并且其被认为可能具有CTE)获得CSF样品。对CSF样品测定eTau片段的存在。来自健康个体和可能具有CTE的个体的合并CSF亲和分离eTau片段。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分开分离的eTau片段;并且将分开的片段转移至膜。用IPN001探查膜。图26中呈现的结果显示了Tau片段存在于从可能具有CTE的个体获得的CSF中。

[0540] 实施例14:IPN002的人源化变体对合成的Tau肽的结合

[0541] 在固相和溶液相测定法两者中测试IPN002的人源化变体(“hu-IPN002”)对合成的生物素化的Tau肽1和2的结合。

[0542] 肽1和肽2的氨基酸序列如下:

[0543] 肽1(Tau氨基酸13-24):DHAGTYGLGDRK(SEQ ID NO:49);

[0544] 肽2(Tau氨基酸15-44):

[0545] AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK(SEQ ID NO:50)。

[0546] 将抗体或生物素化的肽在磷酸盐缓冲盐水中稀释。终浓度如下:1μg/ml hu-

IPN002; 1 μ g/ml rTau383 (全长重组Tau); 5 μ g/ml (生物素化的肽1); 和5 μ g/ml (生物素化的肽2)。将PBS中的100 μ l 0.1%酪蛋白添加至多孔板的孔。添加150 μ l 1 μ g/ml hu-IPN002溶液。进行连续稀释。将100 μ l生物素-肽添加至含有连续稀释的抗体的孔。将多孔板于室温温育1小时。在温育期后,将孔用PBS中的0.05%Tween 20溶液清洗5次;接着用PBS清洗2次。

[0547] 将缀合有链霉亲合素-辣根过氧化物酶 (HRP) 的二抗添加至孔,并将板于室温温育1小时。在温育期后,将孔用PBS中的0.05%Tween 20溶液清洗5次;接着用PBS清洗2次。

[0548] 添加HRP底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB),并温育1-15分钟。通过添加100 μ l 1N硫酸停止反应。读出450nm的吸光度。

[0549] 结果显示于图27和28,并且汇总于表6。

[0550] 表6

[0551]

	Hu-IPN002 kD [M] w/ 生物素-rTau383	Hu-IPN002 kD [M] w/ 生物素-肽1	Hu-IPN002 kD [M] w/生物素-肽2
固相	1.071E-10	1.062E-10	2.777E-10
溶液相	1.135E-10	1.364E-10	3.698E-10

[0552] 图29描绘了hu-IPN002对全长重组Tau (rTau-383) 和磷酸酶活化域 (PAD) 肽 (tau氨基酸2-28;AEPRQEFVEMDHAGTY;SEQ ID NO:80) 的结合。如图29中显示的,hu-IPN002不结合PAD肽。

[0553] 图30显示了非生物素化的Tau肽1 (Tau氨基酸13-24) 和非生物素化的肽2 (Tau氨基酸15-44) 与Tau肽1和Tau肽2的生物素化形式竞争与hu-IPN002的结合。这些数据显示了Tau肽1和Tau肽2与hu-IPN002的结合是特异性的,而不是由于生物素的添加。

[0554] 实施例15: IPN002对病理学的体内影响

[0555] 在此研究中,研究治疗性干预对tau病变转基因小鼠模型 (hTau.P301L-Tg) 中降低的活动性和Tau病理学的影响。在这些小鼠中,在鼠Thy1启动子的控制下表达人Tau的临床突变体 (P301L) (神经元特异性表达)。在7、8、8.5和9个月龄及终止日前一天测量行为 (横杆行走)。研究的终点包括: (1) 存活; (2) 行为: 横杆行走表现和紧握得分; (3) 生物化学: 总均浆、可溶性和不溶性脑干级分中的泛-Tau; 和 (4) 生物标志物: 总均浆和不溶性脑干级分中的AT8。

[0556] 材料和方法

[0557] 用下列各项处理P301L小鼠 (3-4个月龄): 1) 对照IgG; 2) PHF1抗-磷酸化的Tau抗体; 或3) IPN002。IgG对照和IPN002抗体以20mg/kg的浓度一周一次腹膜内注射6个月。以10mg/kg施用PHF1达6个月。PHF1是一种小鼠单克隆抗体,其识别包含磷酸-Ser³⁹⁶和磷酸-Ser⁴⁰⁴的表位。Santacruz等 (2005) Science309:476。

[0558] 体重和紧握行为

[0559] 在处理期间每周和在处死时测定体重。研究开始直到7个月龄每周记录体重和紧握得分。从7个月龄起,一周两次对小鼠监测在家笼中的活动性,重量减轻和后肢和前肢的第一紧握体征。在存在紧握体征后,每天测定体重,并且对紧握行为评分,直到“过早处死”

时刻。为了对紧握行为评分,将小鼠在其尾巴基本上约1.5cm保持约10秒。使用4点分级量表分别对每个肢评分紧握。将初步处死小鼠归于最大得分。前肢得分主要用作处死决定的支持证据。后一种对紧握、体重减轻和家笼中的活动性的组合观察并且依照预定的标准进行。使用统一为1个紧握得分的左和右后肢得分评估整个治疗的紧握演变及在研究终止时评估组差异。从分析排除过早死于癫痫的小鼠。分别使用2因素ANOVA用重复测量,接着是Bonferroni事后检验和对处死前最后一次紧握得分的组平均值使用Student T检验实施统计学分析。

[0560] 横杆行走

[0561] 用基线组及在7、8、8.5、和9个月龄,以及研究终止前一天用处理组实施横杆行走测试以测定运动功能障碍和运动学习。给定小鼠在横杆上平衡的能力和在1米的距离里行走需要的时间是其平衡、协调、身体状况和运动计划的测量。在30°的角度下放置具有12mm的圆形直径的铜横杆。横杆的开始区用台灯照明,而在末端放置室内逃生平台。对于初始的训练试验,使用较宽的横杆训练小鼠平衡和行走至平台。在训练试验后,在1m的距离里对小鼠的反应时间计时。另外,通过步态观察,测定运动功能障碍的第一个症状(脚滑移和腹部拖动)。使用2因素ANOVA,接着是Bonferroni事后检验实施反应时间得分的统计学分析。

[0562] 结果

[0563] 紧握行为和横杆行走

[0564] 图31中描绘了IPN002对紧握行为的影响。如图31中显示的,与对照IgG相比,IPN002处理降低紧握得分。图32中描述了IPN002对运动功能的影响,如通过横杆行走评估的。如图32中显示的,与对照IgG相比,IPN002处理显著降低平均等待时间(及如此改善运动功能)。如此,IPN002处理显著降低P301L tau转基因小鼠中的运动缺陷。使用相同的统计学方法,用PHF1处理得到的结果没有达到显著性。

[0565] Tau水平

[0566] 评估在对照IgG、PHF1或IPN002处理后P301L小鼠的CSF中游离的tau(与IPN002未结合的tau)的水平。使用IPN001测定不与IPN002结合的CSF中存在的游离的tau的水平。图33中显示了数据。如图33中显示的,与用对照IgG处理的小鼠中的水平相比,IPN002处理降低游离的tau(与IPN002未结合)水平 达96%。

[0567] 实施例16: IPN002对eTau诱导的神经元超兴奋性的影响

[0568] 材料和方法

[0569] 对人原代皮质培养物进行全细胞膜片钳记录。用人工脑脊液灌注(2ml/min)神经元,所述人工脑脊液含有(mM):NaCl(140)、KCl(2.5)、MgCl₂(2)、CaCl₂(2)、Hepes(10)、D-葡萄糖(10)、蔗糖(20),调节pH=7.4mOsm=310。使用pClamp-10.3数据获得软件(Molecular Devices)和MultiClamp 700B放大器(Axon Instrument;Foster City CA)进行记录。使用MiniSquirt微灌注系统(AutoMate,Berkeley,CA)实施1) eTau1a(氨基酸2-166);2) 磷酸化的Tau或eTau及抑制剂;3) 对照IgG;或4) 抗Tau抗体PHF1、IPN001、或Dako(多克隆抗C端tau)的喷出应用。离线数据分析使用Clampfit 10.2分析软件(Molecular Devices)。于34-37℃进行记录。

[0570] 结果

[0571] 数据显示于图34和35。如图34中显示的,IPN002降低eTau1a诱导的神经元活动过

度。对照IgG和“Dako”(抗C端多克隆Ab)都不实现神经元活动过度的显著降低。PHF1不降低eTau1a诱导的神经元活动过度。

[0572] 比较eTau1a对神经元活动过度的影响与全长PHF1反应性磷酸化的Tau(磷酸-Tau)对神经元活动过度的影响。如图35,中间小图中显示的,与基线(顶部小图)相比,全长PHF1反应性磷酸-Tau在测试的3个细胞中的2个中没有诱导神经元活动过度,测试的第三个细胞仅显示较小程度的神经元活动过度。比较而言,eTau1a在测试的所有3个细胞中诱导神经元活动过度(底部小图)。图36中以图形描绘了这些数据。

[0573] 实施例17:IPN002对A β 水平的影响

[0574] 材料和方法

[0575] 自iPSC衍生的皮质神经元的A β 分泌

[0576] 将iPSC衍生的皮质神经元(iPSC-CN)体外培养。从健康个体;具有在早老蛋白蛋白质(PSEN1)中具有突变的家族性AD的个体;具有在早老蛋白蛋白质(PSEN2)中具有突变的家族性AD的个体;和具有散发性AD(sAD)的个体生成iPSC。在培养大致约55-60天后,基于L1-CAM(CD171)表达对iPSC-CN评分以富集成熟的皮质神经元;将分选的细胞在与正常的人星细胞的共培养物中培养30天。在共培养30天后,用多个浓度的beta位点淀粉样前体蛋白切割酶(BACE)抑制剂、对照IgG、或IPN002将iPSC-CN再处理25天,其中2次/周培养基变化。将条件化培养基收集,并在Millipore高灵敏性人淀粉样蛋白-beta40和淀粉样蛋白-beta42ELISA中测试,以检测A β ₁₋₄₀(“A β 40”)和A β ₁₋₄₂(“A β 42”)。A β 40和A β 42是淀粉样前体蛋白的切割产物;老年斑含有A β 42和A β 40两者。

[0577] 自初级人皮质神经元的A β 分泌

[0578] 人胎儿脑皮质组织通过Advanced Bioscience Resources(Alameda,CA)获得,并且遵守联邦胎儿研究指南和统一解剖捐赠法案。将组织在汉克氏缓冲盐水溶液(Cellgro)中漂洗,并且在存在1 μ g/ml DNA酶(EMD)的情况下磨碎,并通过100 μ m细胞过滤器。在离心后,将沉淀物在0.05%胰蛋白酶/EDTA(Invitrogen)中于37℃重悬20min。通过添加等体积的含有10%胎牛血清(FBS)的培养基灭活胰蛋白酶,并在存在DNA酶的情况下再次温和磨碎样品。在离心后,将细胞在铺板培养基(含有B27的Neurobasal,Invitrogen)中重悬,并计数。将细胞铺开,培养5周,并在每3-4天改变培养基的情况下添加含有所述浓度的抗体的新鲜培养基达10天,在处理10天后收集条件化培养基。将条件化培养基以15,000rpm旋转15分钟,之后加工以进行A β 40和A β 42ELISA分析,如上文描述的。

[0579] 结果

[0580] 结果显示于图37-39。

[0581] 如图37中显示的,用IPN002处理iPSC-CN降低由所有iPSC-CN分泌的A β 40和A β 42的水平,而对照IgG不降低A β 40或A β 42分泌。

[0582] 图38显示了各种抗体对由初级人皮质神经元分泌的A β 40量的剂量依赖性影响。如图38中显示的,初级人皮质神经元与10 μ g/ml或30 μ g/ml IPN001、IPN002或hu-IPN002(IPN002的人源化变体)的温育减少分泌的A β 40的量。对照IgG和PHF1对分泌的A β 40的量都没有任何显著影响。

[0583] 图39显示了各种抗体对由初级人皮质神经元分泌的A β 42量的剂量依赖性影响。如图39中显示的,初级人皮质神经元与10 μ g/ml或30 μ g/ml IPN001、IPN002或hu-IPN002的温

育降低分泌的Aβ42的量。Neither对照IgG和PHF1对分泌的Aβ42量都没有任何显著的影响。

[0584] 实施例18: IPN002的人源化变体的表位定位

[0585] 材料和方法

[0586] 将抗体或生物素化的肽在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中稀释。终浓度如下: 1μg/ml IPN002的人源化变体 (hu-IPN002); 1μg/ml rTau383 (全长重组Tau); 5μg/ml生物素化的肽。将PBS中的100μl 0.1%酪蛋白添加至多孔板的孔。添加150μl 1μg/ml hu-IPN002溶液。将hu-IPN002的连续稀释物生成, 并包被至多孔板的孔上。将100μl生物素-肽或生物素-全长Tau添加至含有连续稀释的抗体的孔。将多孔板于室温温育1小时。在温育期后, 将孔用PBS中的0.05% Tween 20溶液清洗5次; 接着用PBS清洗2次。

[0587] 将缀合有链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (HRP) 的二抗添加至孔, 并将板于室温温育1小时。在温育期后, 将孔用PBS中的0.05% Tween 20溶液清洗5次; 接着用PBS清洗2次。

[0588] 添加HRP底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB), 并温育1-15分钟。通过添加100μl 1N硫酸停止反应。读出450nm的吸光度。

[0589] 结果

[0590] 数据显示于图40。图40中呈现的数据显示生物素-Tau 13-24、生物素-Tau 15-24、生物素-Tau15-44、和生物素-磷酸Tau 15-24 (具有与全长Tau的氨基酸18对应的磷酸化的Tyr), 和全长Tau (rTau383) 均有效结合hu-IPN002。如此, hu-IPN002结合Tau氨基酸15-24内的表位, 不管Tyr-18的磷酸化状态如何。

[0591] 实施例19: 抗体对CSF中的tau的结合

[0592] 评估IPN002、PHF1 (一种对线性磷酸化表位特异性的抗体)、和对照抗体对CSF中存在的tau的结合。

[0593] 开发鉴定结合CSF中存在的tau的抗体的结合测定法。图41中示意性描绘了测定法。将对照IgG (对线性磷酸化表位特异性的多克隆抗体 (“多Ab-C端tau”)、PHF1或IPN002在多孔板的孔上包被。将抗体在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中稀释。终浓度如下: 5μg/ml IPN002、IgG、PHF1、或多Ab-C端tau。将PBS中的100μl 0.1%酪蛋白添加至多孔板的孔。将100μl人CSF添加, 并于RT温育1小时。将100μl生物素-BT2+生物素-HT7添加至孔。BT2是一种结合人tau的氨基酸194-198内的表位的小鼠单克隆抗体。HT7是一种结合人tau的氨基酸159-163内的表位的小鼠单克隆抗体。将多孔板于室温温育1小时。在温育期后, 将孔用PBS中的0.05% Tween 20溶液清洗5次; 接着用PBS清洗2次。

[0594] 将缀合有链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (HRP) 的二抗添加至孔, 并将板于室温温育1小时。在温育期后, 将孔用PBS中的0.05% Tween 20溶液清洗5次; 接着用PBS清洗2次。添加HRP底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB), 并温育1-15分钟。通过添加100μl 1N硫酸停止反应。读出450nm的吸光度。

[0595] 使用已知量的全长磷酸-tau或已知量的eTau1a (tau的氨基酸2-166) 定量测定法。如图41, 下部小图中显示的, 以0ng/ml、0.16ng/ml、0.8ng/ml、4ng/ml、20ng/ml和100ng/ml的浓度使用全长tau (下左小图) 或eTau-1a (下右小图) 实施测定法。如图41, 下左小图中显示的, IPN002、多Ab-C端tau、和PHF1结合全长tau。如图41, 下右小图中显示的, 仅IPN002结合eTau1a。

[0596] 实施上文描述的测定法以测试多Ab-C端tau、PHF1和IPN002对来自以下的人CSF中

存在的tau的结合:1)对照(健康)患者;2)MCI患者;3)具有轻度AD的患者(“轻度”);4)具有中等AD的患者(“中等”);和具有重度AD的患者。结果显示于图42。如图42中显示的,CSF中存在的tau被IPN002结合,而不被pAb-tau线性表位或PHF1结合。数据显示了:1)N端Tau片段存在于CSF中;2)在CSF中检出全长tau;并且3)在CSF中没有检出包含BT2和HT7表位的C端tau片段。

[0597] 实施例20: IPN002的体内效果

[0598] 自P301L tau转基因小鼠中6个月tau抗体功效研究获得结果。发现了IPN002全面降低疾病进展,如以CSF中显著降低的游离tau水平,星形胶质增生(astrogliosis)的降低的蛋白质标志物水平,多个脑区间的tau病理学和磷酸tau表位的改善,和改善的行为/功能读出例示的。IPN002与抗Tau抗体PHF1表现得一样好或更好。最终,对新的分泌性tau作用机制获得体内确认:淀粉样蛋白-beta水平的正反馈调节。此研究清楚区别与PHF1相比eTau抗IPN002调控淀粉样蛋白beta水平的能力。

[0599] 材料和方法

[0600] 动物研究

[0601] 使用P301L转基因小鼠模型。P301L转基因小鼠包括鼠Thy1启动子(神经元特异性表达)表达驱动的作为转基因的在P301L处突变的4R2N人tau。P301L转基因模型在脊髓、脑干、中脑和皮质中展现出tau(AT8和AT100)的年龄依赖性超磷酸化。超磷酸化的Tau显示导致tau聚集的构象变化,并且小鼠从6个月龄起形成神经原纤维缠结,尽管以较高的发作变化性形成。与病理学伴随,这些小鼠进行性形成肌肉运动缺陷,诸如后肢紧握、横杆行走上降低的活动性,并且需要在8-11个月的龄期范围时过早处死。Terwel等(2005)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 280:3963。

[0602] 从3.5个月龄持续6个月到9.5个月龄用抗体每周i.p.给药100个随机化的小鼠。比较20mg/kg (mpk) IPN002处理与阴性对照抗体20mpk IgG1及抗Tau抗体10mpk PHF1。PHF1是一种识别包含磷酸-Ser³⁹⁶和磷酸-Ser⁴⁰⁴的表位的小鼠单克隆抗体。Santacruz等(2005)Science 309:476。对活的小鼠检查紧握缺陷,并且在横杆行走表现上进行。使用预先确定的标准过早处死(9.5个月龄前)快速进展到末期疾病的小鼠。获得血清、CSF、海马、皮质、中脑和后脑;并且将半脑径向切成切片以用于组织学。在血清和CSF中测量抗体水平;在CSF中测量总的tau和游离的tau(不与IPN002结合的tau;“不含IPN002”的tau);进行对人和小鼠tau的生物化学/组织学分析;并且分析小鼠淀粉样蛋白-beta、炎性和突触蛋白标志物和炎性、突触和神经元活性标志物的基因表达变化。以盲的方式进行所有分析。

[0603] 专用于此研究的小鼠的数目是每个研究臂(arm)的25-33只小鼠和用于基线的10只。保留用于此研究的所有小鼠由计算机给予随机数字,并且随机分配到治疗。表7中显示了小鼠组。

[0604] 表7

[0605]

组	N	品系	处理
1	10	hTau.P301L-Tg	无一(基线组)
2	32	hTau.P301L-Tg	媒介物中的20mpk mIgG1
3	25	hTau.P301L-Tg	媒介物中的10mpk PHF1
4	33	hTau.P301L-Tg	媒介物中的20mpk IPN002

[0606] 依照完全遵从国际公认的实验动物护理和使用原则的生物伦理指南进行所有动物实验。表8提供了处理参数

[0607] 表8

[0608]

施用路径	i.p.
给药体积,浓度	10ml/kg;1mg/ml;10mpk/天
处理频率	每周一次
处理持续时间	根据存在,直到6个月
分配到处理组	随机化

[0609] 在处理期间和在处死时每周测定体重。从7个月龄起每周记录紧握得分。从7个月龄起,一周两次对小鼠监测笼中的运动性、重量减轻和后肢紧握的第一个体征。

[0610] 紧握行为:为了评分紧握行为,将小鼠通过其尾基部保持10秒。使用3点分级量表对后肢紧握评分:0.后肢伸展并且脚趾展开。1.一条后肢部分缩回>50%的时间。2.两条后肢都部分缩回>50%的时间。3.两条后肢在>50%的时间期间都完全缩回。根据以下对前肢紧握评分:0.前肢向前且远离身体伸展。1.一条前肢部分缩回>50%的时间。2.两条前肢都部分缩回>50%的时间。3.两条前肢完全缩回,不能移动,肌肉损失,小鼠是“祈祷的”。将显示重度紧握表型的小鼠早期处死。

[0611] 横杆行走。在7个月、8个月、8.5个月、9个月、和8.5个月龄时实施横杆行走以测定运动功能障碍和运动学习。小鼠在横杆上平衡的能力和行走1米需要的时间是其平衡、协调、身体状况和运动计划的测量。在30°的角度下放置具有12mm的圆形直径的铜横杆。照明开始区,而在远端放置室内逃生平台。在训练试验后,对小鼠的反应时间计时。另外,对脚滑移和腹部拖动计数。

[0612] 在研究开始前处死基线组。将展现重度紧握、降低的体重和/或变得垂死的研究臂中的小鼠过早处死(早期处死)。在处理6个月后处死剩余的小鼠(后期处死)。

[0613] 表9

[0614]

麻醉	氯胺酮(ketamine)、甲苯噻嗪(xylazine) 2%、阿托品(atropine)和盐水/异氟烷的混合物。
灌注	进入胸腔以通过经由左心室穿心灌注冰冷的盐水3分钟进行灌注。切割右心房作为流出路径。
左半脑	切出海马、皮质、中脑、小脑和脑干，并静止，在液氮中冷冻。
右半脑	在具有4%低聚甲醛的PBS中后固定过夜，并且在具有0.1%叠氮化钠的PBS中于4°C贮存。
CSF	经由颅骨和第一颈椎之间的颈肌肉中切开收集。用26号针刺入小脑延髓池，并收集10-20ul CSF，以10,000 x g于4°C离心，并于-80°C贮存。
血液/血浆	经由心脏穿刺收集入EDTA-管中，以2000 x g于4°C离心15分钟，并于-70°C贮存。
体重	处死时测量

[0615] 通过添加适当稀释的血浆至经tau包被的板，并使用ELISA用HRP-抗小鼠IgG抗体和TMB检测测量血浆中游离的PHF1。游离的PHF1测定法的灵敏性不足以测量CSF中游离的PHF1水平。

[0616] 通过添加适当稀释的血浆或CSF至经tau包被的板并使用ELISA用HRP-抗小鼠IgG抗体和TMB检测测量血浆和CSF中游离的IPN002。

[0617] 使用证明为不与IPN002或PHF1竞争的包被抗Tau抗体和检测抗Tau抗体两者使用三明治式ELISA测量CSF中的总tau。

[0618] 使用两种抗Tau抗体捕捉CSF中的tau使用同质ELISA测量CSF中游离的tau (IPN002的)。这些抗体之一与IPN002竞争，因此不会与CSF中的先前与IPN002结合的tau相互作用。

[0619] 通过在10个重量体积的冷TBS/Roche蛋白酶/磷酸酶抑制剂混合物中均质化分级海马和皮质。通过以10,000x g离心出碎片达15分钟生成匀浆。对匀浆进行BCA蛋白质含量；将所有匀浆稀释至1mg/ml，并且等同稀释相应的级分。将匀浆的一部分以100,000x g于4°C旋转1小时以生成可溶性级分(S1)和不溶性沉淀物。将不溶性沉淀物在1% Sarkosyl/Roche蛋白酶/磷酸酶抑制剂混合物中重悬，并以100,000x g再旋转1小时。Sarkosyl溶解的上清液标记(P1)；将Sarkosyl不溶性沉淀物重悬，并标记(P2)。将后脑类似分级，除了高盐(0.85M NaCl)外，接着使用1% Sarkosyl溶解P1沉淀物。

[0620] 人tau同质ELISA特异性报告人tau，并且用于测定海马、皮质和后脑中的匀浆、S1、P1和P2级分中的人tau水平。

[0621] 人AT8同质ELISA特异性报告人p202/205tau，并且用于测定海马、皮质和后脑中的匀浆、S1、P1和P2级分中的人AT8水平。

[0622] 对海马、皮质和/或后脑级分(匀浆、S1、P1和/或P2)进行HT7、IPN001、Dako多克隆-

tau、AT8、AT100、抗p262、抗p396和AD2、GFAP、Iba1、突触蛋白SDS-PAGE Western印迹。在每个凝胶上运行一个或多个裂解物对照以确保凝胶间的正确标准化。相对于相应的匀浆样品中的 β -肌动蛋白标准化所有分析的条带。抗体及其靶物显示于表10。

[0623] 表10

[0624]

抗体	靶物
IPN001	Tau和eTau

[0625]

HT7	人tau
Dako多克隆tau	人和小鼠tau
AT8	人和小鼠p202/205 (在Ser202和Thr205处磷酸化) tau
AT100	人和小鼠p212 (在Ser212处磷酸化) tau
抗p262	人p262 (在Ser262处磷酸化) tau
AD2	人和小鼠p396 (在Ser396处磷酸化) tau
p396	人和小鼠p396 (在Ser396处磷酸化) tau
胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP)	星细胞上的小鼠GFAP
离子化钙结合接头分子1 (Iba1)	小神经胶质上的小鼠Iba1
突触蛋白	小鼠突触蛋白(突触蛋白)

[0626] 对于组织病理学,在AT8和AT100方面对6/32个随机化的径向切成切片的半脑染色;用DAB形成信号。将丘脑下核附加未定带 (Subthalamic nucleus annex zona incerta) (前囟2.08-1.12) 和小脑 (前端和后端部分) 附加外侧小脑核 (annex lateral cerebellar nucleus) 的中间核 (IntA/P/LAT; 前囟2.28-1.32) 两者量化 (盲的)。

[0627] 进行小鼠淀粉样蛋白 β -ELISA (A β 40和A β 42两者) 以特异性检测小鼠脑匀浆中的A β 40和A β 42。小鼠A β 42ELISA对于可靠检测小鼠脑匀浆中的水平是不够灵敏的。小鼠A β 40ELISA检出完全在测定法的线性范围内的小鼠A β 40水平。使用小鼠A β 40ELISA测定所有分组匀浆和可溶性 (S1) 级分中的A β 40水平。

[0628] 对炎症标志物、突触标志物和神经元活性标志物进行Taqman分析。表11列出标志物。

[0629] 表11

[0630]

基因	功能
APP	淀粉样前体蛋白：一些fAD患者中突变/致因的
人Tau	MTB蛋白；AD中的聚集体
Arc	神经元活性

[0631]

突触蛋白	突触蛋白
突触泡蛋白	突触蛋白
钙结合蛋白	突触蛋白
神经肽Y	神经元活性
Cox2	炎症
GFAP	炎症-星细胞
Iba1	炎症-小胶质
IL-1b	炎症
P67phox	炎症
Pg91phox	炎症
PBR1	炎症
TNFa	炎症

[0632] 统计学

[0633] 紧握和横杆行走纵向统计学分析由独立的统计学家进行。简言之，对每只小鼠在紧握缺陷和横杆行走这两方面测定下降曲线的斜率，并且使用这些系数测定在组间是否存在显著差异。使用多种方法测定曲线的斜率和显著性。对于紧握，这些包括纵向完整情况分析 (Longitudinal Complete Case Analysis)、调整丢失数据的联合模型 (Joint Model Adjusting for Missing Data) 和贝叶斯有序纵向分析 (Bayesian Ordered Longitudinal Analysis)。对于横杆行走，这些包括纵向完整情况分析、调整丢失数据的联合模型、使用30个第二值 (Second Values) 的纵向分析、具有丢失数值的贝叶斯纵向分析和有效但非交叉分析 (Alive but Non-cross Analysis)。

[0634] 使用单因素ANOVA，接着是Dunnett事后分析对整个分组、早期处死和晚期处死分组进行对生物化学、组织学和基因表达测定显著性的统计学分析。还对疾病进展 (3.5个月基线对9.5个月IgG处理臂) 进行t检验作为自单因素ANOVA分析得到的显著性的比较者。在通过单因素ANOVA分析，PHF1或IPN002表现为大大趋向变化而不反映这点时，仅进行比较

IgG与PHF1或IPN002的t检验以测定趋向方式在不达到单因素ANOVA显著性的情况下对于所述终点是否出现。

[0635] 为了测定116个终点中的哪些彼此最佳关联,进行矩阵关联;并且最高的关联者基于其 r^2 值和p值的组合秩排序。

[0636] 结果

[0637] 抗体水平和靶物结合

[0638] 在处死前获得血浆和CSF。测定血浆中游离的IPN002和游离的PHF1,及CSF中游离的IPN002的水平。游离的PHF1测定法对于测量CSF中游离的PHF1水平不够灵敏。还获得足够的CSF以测定总的Tau和游离的Tau (不含IPN002) 两者的水平。

[0639] 血浆游离的IPN002和游离的PHF1水平

[0640] 用20mpk IgG、20mpk IPN002或10mpk PHF1处理P301L Tau转基因小鼠。这些剂量基于来自靶物结合#1研究的结果选择。汇总数据显示于表12。

[0641] 表12

[0642]

抗体	靶物结合研究#1		功效研究	
	施用的剂量	平均游离抗体水平 (血浆)	施用的剂量	平均游离抗体水平 (血浆)
IPN002	10 mpk 持续 4 wk-> 20 mpk持续 4 wk	0.65 μ M	20 mpk持续26周	0.9 +/- 0.26 μ M
PHF1	10 mpk持续8 wk	0.65 μ M	10 mpk持续26周	0.55 +/- 0.05 μ M

[0643] 在靶物结合#1中发现了10mpk IPN002持续4周,接着20mpk IPN002再持续4周平均产生血浆中的0.65 μ M游离的IPN002。贯穿8周用恒定的10mpk PHF1获得相同浓度0.65 μ M游离的PHF1。在目前的研究中,如表12中显示的,平均血浆浓度是0.55 μ M游离的PHF1和0.9 μ M IPN002。如此,游离的IPN002的平均水平高于血浆中的游离PHF1。

[0644] CSF游离的IPN002水平平均而言,0.9nM游离的IPN002存在于经IPN002处理的P301L tau小鼠的CSF中,如表13中显示的。这转化成CSF:血浆中0.1%游离的IPN002;即CSF中的IPN002浓度是血浆中浓度0.1%的IPN002 (CSF中0.9nM;血浆中0.9 μ M)。CSF中的0.1%抗体与对在外周施用后进入脑并排入CSF中的其它抗体测定的百分比一致。然而,游离IPN002测定法仅报告不与tau结合的IPN002。Tau与CSF中的IPN002结合;如此,0.1%数值低度呈现 (underrepresent) CSF中的总IPN002。将游离的IPN002水平添加至与tau结合的IPN002水平的计算提示了CSF中的总IPN002水平是约0.2%的血浆水平。如方法中所述,游离PHF1测定法对于测量游离的PHF1的CSF水平是不足够灵敏的。

[0645] 表13

[0646]	抗体	功效研究	
		平均游离抗体(血浆)	平均游离抗体(CSF)
	游离的IPN002	0.9 +/- 0.26 μ M	0.9 +/- 0.28 nM

[0647] CSF中的总tau测量CSF中的总Tau水平以确定PHF1或IPN002是否改变这些水平。如图43中显示的,通过PHF1或IPN002处理没有显著改变CSF中的总Tau水平。从靶物结合研究中获得的数据预期此结果。

[0648] 图43:使用tau抗体三明治式ELISA测定法测量P301L tau转基因小鼠CSF中的总tau水平。如图43中显示的,CSF中的tau水平随龄期而显著升高(比较3个月基线与小鼠IgG)。PHF1和IPN002都不改变总的tau水平。

[0649] CSF中游离的Tau (IPN002的) 如方法中描述的CSF测定法中的游离Tau (IPN002的) 是两种tau抗体之一与IPN002竞争的ELISA;因此,该测定法不会检测与IPN002结合的tau。此测定法指示IPN002是否已经进入脑和CSF及是否已经结合其靶物(即已经与tau结合)。若IPN002已经结合其靶物,测定法中的信号会是降低的。此测定法对IPN002的游离tau是特异性的,因此没有检出游离的Tau (PHF1的)。如图33中显示的,游离的Tau (IPN002的) 水平随疾病进展而升高,这与上文显示的数据一致。PHF1不影响游离的Tau水平。比较而言,IPN002处理导致游离Tau (IPN002的) 信号水平的96%降低。这些数据显示了IPN002已经完全结合其靶物CSF tau。

[0650] Tau和磷酸Tau生物化学和组织学

[0651] 如方法中描述的,将海马、皮质、和后脑分级成匀浆、可溶性(Sarkosyl溶解的)和不溶性(Sarkosyl不溶性)级分。对级分分析人和小鼠tau两者,及阿尔茨海默氏病脑中超磷酸化的多种磷酸tau表位(AT8、AT100、p262、p396和AD2)。如图44A-H中显示的,与用小鼠IgG对照抗体处理相比,IPN002处理降低海马均浆(图44A)、海马S1级分(图44B)、海马P1级分(图44C)、海马P2级分(图44D)、皮质匀浆(图44E)、和皮质P1级分(图44G)中的AT8水平。图44A-H中的数据显示了IPN002处理与PHF1处理相比以相似或更大的程度降低AT8水平。相对于BCA标准化图44A-H中描绘的数据。

[0652] 如图45A中显示的,与用小鼠IgG对照抗体处理相比,IPN002处理降低皮质S1级分中的人p396-tau水平。如图45B和45C中显示的,与用小鼠IgG对照抗体处理相比,IPN002处理降低皮质均浆(图45B)和皮质S1级分(图45C)中的磷酸-tau S262水平。如图45D和45E中显示的,与用小鼠IgG对照抗体处理相比,用IPN002处理降低皮质S1级分中的小鼠p396-tau水平(图45D),并且降低皮质S1级分中的小鼠AT100水平(图45E)。

[0653] 在后脑内的两个不同核,即丘脑下核附加未定带(STH)和小脑(前端和后端部分)附加外侧小脑核的中间核(IntA/P/LAT)中分析Tau组织病理学(AT8和AT100)。如图46中显示的,IPN002(在后期处死的小鼠中)显著改善AT8疾病病理学。PHF1趋于降低,但是不显著改善tau组织病理学。如图47中显示的,与用对照IgG处理相比,IPN002处理改善AT100和MC1疾病病理学。

[0654] 炎症

[0655] 星形胶质增生和小胶质细胞增生(microgliosis)两者在AD和tau病变的模型中形

成。然而,活化的星细胞或小胶质细胞在疾病中发挥的作用不是完全清楚的。若星细胞或小胶质细胞在P301L tau转基因模型中是活化的,则此类活化会源自突变tau过表达。假设分泌性tau诱导AD病理学。若分泌性tau诱导AD病理学,则它也可以诱导神经胶质活化。因此,测定星形胶质增生(GFAP)或小胶质细胞增生(Iba1)中增加的蛋白质在P301L转基因小鼠模型中是否增加。

[0656] 如图48A和48B中显示的,GFAP蛋白质水平在海马和皮质两者中随疾病进展而增加。这些数据指示星细胞在海马和皮质中是活化的或者它们已经浸润这些脑区。IPN002处理显著降低海马和皮质两者中的GFAP蛋白质水平,显示了IPN002处理降低疾病相关的星形胶质增生升高。PHF1显著降低海马而非皮质中的GFAP。

[0657] 在海马和皮质两者中测量Iba1蛋白质水平(小胶质细胞的一种标志物)。如图49A和49B中显示的,Iba1在海马中不随疾病进展而增加,而是在皮质中增加。IPN002处理对Iba1蛋白质水平的疾病进展没有影响。比较而言,PHF1处理确实显著降低Iba1蛋白质水平。数据提示了IPN002和PHF1的不同作用机制。

[0658] 淀粉样蛋白-beta水平的调控

[0659] 如实施例17中显示的,用IPN002处理iPSC-CN降低由所有iPSC-CN分泌的A β 40和A β 42水平,而对照IgG不降低A β 40或A β 42分泌。然后,测定IPN002是否也调控A β 体内水平。在P301L小鼠模型中,没有人APP的过表达;因此,测量小鼠A β 水平。小鼠A β 42ELISA的灵敏性对于测量这些匀浆中的A β 42水平是不足够的。然而,小鼠A β 40ELISA是足够灵敏的,因此用于测定匀浆和上清液级分中的小鼠A β 40水平。小鼠A β 40水平随疾病进展而升高。观察到的A β 40水平升高可以是tau依赖性的和/或年龄依赖性的。如图50A和50B中显示的,IPN002处理降低匀浆(图50A)和可溶性级分(图50B)两者中的A β 40水平。

[0660] 图50A和50B中的数据显示了tau过表达(可能与变老结合)驱动疾病进展相关的水平升高。数据提示分泌性tau是驱动A β 水平升高的致因因素,IPN002继而通过阻断eTau功能抑制。比较而言,PHF1(一种非eTau结合抗体)对A β 水平没有影响。

[0661] 运动功能

[0662] 测定IPN002处理对运动功能的影响,如通过紧握和横杆行走测试评估的。图31、32、51和52中显示了数据。

[0663] 如图31中显示的,与用小鼠IgG对照处理相比IPN002处理改善紧握得分。

[0664] 如图32和51中显示的,与用小鼠IgG对照处理相比IPN002处理改善横杆行走测试中的平均等待时间(图32),并且降低不能走横杆的小鼠的百分比(图51)。

[0665] 实施例21:表位定位

[0666] 如上文实施例18中描述的,实施肽结合和竞争测定法。

[0667] 使用下列肽:

[0668] IPIG-1:EVMEDHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO:81;tau的氨基酸9-24);

[0669] IPIG-2:DHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO:49;tau的氨基酸13-24);

[0670] IPIG-3:AGTYGLGD (SEQ ID NO:82;tau的氨基酸15-22);

[0671] IPIG-4:AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK (SEQ ID NO:50;tau的氨基酸15-44);

[0672] PAD肽:AEPRQEFVEMEDHAGTY (SEQ ID NO:80;tau的氨基酸2-18)。

[0673] 结果显示于图53-55。

[0674] 图30显示了未生物素化的tau肽与tau的生物素化形式竞争。上部小图显示了生物素化的Tau 13-24肽 (IPIG-2; SEQ ID NO:49) 与未生物素化的Tau13-24竞争对hu-IPN002的结合。

[0675] 图52显示了全长tau、IPIG-1、IPIG-2和IPIG-4被hu-IPN002结合。IPIG-3 (其缺乏残基23和24) 不被hu-IPN002结合, PAD亦不然。如此, 残基23和24表现为是hu-IPN002结合需要的。

[0676] 图53显示了eTau-4肽结合hu-IPN002; 然而, PAD (tau 2-18)、Tau 15-22、Tau 19-28和Tau 21-31肽不结合hu-IPN002。

[0677] 数据指示残基15-24表现为是hu-IPN002结合必需的。

[0678] 虽然本发明已经参考其具体的实施方案进行了描述, 但是本领域技术人员应当理解, 可以在不偏离本发明的真正精神和范围的前提下进行各种变化及可以替代等同方案。另外, 可以进行许多修改以使具体的情况、材料、物质组成、方法、一个或多个方法步骤适合于本发明的目的、精神和范围。所有此类修改意图在所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> Griswold-Premier, Irene
Stagliano, Nancy E.
Dang, Vu

<120> 治疗 Tau 病变的方法

<130> IPRN-745W0

<150> US 61/833,355

<151> 2013-06-10

<150> US 61/833,355

<151> 2013-04-19

<150> US 61/833,355

<151> 2013-03-14

<150> US 61/754,085

<151> 2013-01-18

<150> US 61/683,902

<151> 2012-08-16

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 1

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 2

Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 3

Phe Gln Gly Ser Leu Val Pro Trp Ala
1 5

<210> 4

[0001]

[0002]

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 4

Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 5

Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Phe Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 6

Thr Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 7

Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 8

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 9

Phe Gln Gly Ser Leu Val Pro Trp Ala
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 10

Lys Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 11

Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 12

Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 13

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ala Val Asn Leu Gly

[0003]

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

<210> 14
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

[0004]

<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Glu Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Phe Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Ile Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Thr Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Ile Ser
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 112
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 15

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Val Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Val Pro Trp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

[0005]

<210> 16

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 16

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Ile Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核酸序列

<400> 17
gatgttttga tgacccaanc tcegtctctc cttggcagtc atcttggaga tcaagctctc 60
ctctcttgcg gatcgagtcg gactatitta catagtaatg gaaatacctt tttagaatgg 120
taattgcaga aaccaggcca gctccaaga cttctggtct acaaagttc taacgattt 180
tcctgggttc cagacagggt cagttggcgt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagttg aggtctgacg tctgggaatt tattactgct ttcaaggttc acttgttctt 300
tgggcgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 18
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核酸序列

[0006]

<400> 18
gaggtgcagt tgggtggagt tggggaagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tctctgtctg cttctggatt cgttttcagt agctatggca tctcttgggt tctccagact 120
ccagacatga ggtctggagt ggtcgcaaca atagtagca gtgttagtcg cacttacttt 180
ccagacagtg tgaagggcgc actcaccatc tccagagaca atgacaagaa catcttatac 240
ctacaaatga gcagctgtag gctcaggcac acagccaagt actatgtfac gattaccitg 300
gacgtgtcta tggactactg ggtctgtgga atatcagtc cgtctctctc a 351

<210> 19
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核酸序列

<400> 19
gatgttttga tgacccaanc tccactctcc ctgccgtcgt gctctggaga tcaagctctc 60
atctcttgcg aatctagtcg gagcattgta catagtaatg gaaacacctt tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gctccaaag cttctggtct acaaagttc caatcgattt 180
tcctgggttc cagacagggt cagttggcgt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagttg aggtctgagga tctgggaact taattactgt ttcaaggttc acttgttctt 300
tgggcgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 20

<211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成核酸序列

 <400> 20
 gaggttcac tggtaggagc tgggggagcc ttatgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tccigtgcag cctctggatt cagtttcagt aaatatgcca tgccttgggt tgcctcagact 120
 ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagta gttggagtcg caccctactat 180
 ccagacagtg tgaagggcc aaccaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtcgtaa gtcgaggac acagccaagt attactgttc attagctgg 300
 gacgggtgcta tggactacig gggtaaggg acctcagica ccgtctctc a 351

<210> 21
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成氨基酸序列

<400> 21

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

[0007]

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
	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
[0008]	Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser		
	305	310	315
	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
	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>	22	

<211> 383
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成氨基酸序列

<400> 22

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

[0009]

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> 23
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 23

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

[0010]

	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
[0011]	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
	<210> 24		
	<211> 412		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成氨基酸序列		
	<400> 24		
	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 Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 245 250 255
 Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
 275 280 285
 Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
 290 295 300

[0012]

Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 305 310 315 320
 Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
 325 330 335
 Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
 340 345 350
 Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
 355 360 365
 Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
 370 375 380
 Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala
 385 390 395 400
 Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 405 410

<210> 25
 <211> 776
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成氨基酸序列

[0013]

<400> 25
 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 Glu Pro Glu Ser
 115 120 125
 Gly Lys Val Val Gln Glu Gly Phe Leu Arg Glu Pro Gly Pro Pro Gly

	130	135	140
	Leu Ser His Gln Leu Met Ser Gly Met Pro Gly Ala Pro Leu Leu Pro		
	145	150	155 160
	Glu Gly Pro Arg Glu Ala Thr Arg Gln Pro Ser Gly Thr Gly Pro Glu		
		165	170 175
	Asp Thr Glu Gly Gly Arg His Ala Pro Glu Leu Leu Lys His Gln Leu		
		180	185 190
	Leu Gly Asp Leu His Gln Glu Gly Pro Pro Leu Lys Gly Ala Gly Gly		
		195	200 205
	Lys Glu Arg Pro Gly Ser Lys Glu Glu Val Asp Glu Asp Arg Asp Val		
		210	215 220
	Asp Glu Ser Ser Pro Gln Asp Ser Pro Pro Ser Lys Ala Ser Pro Ala		
		225	230 235 240
	Gln Asp Gly Arg Pro Pro Gln Thr Ala Ala Arg Glu Ala Thr Ser Ile		
		245	250 255
	Pro Gly Phe Pro Ala Glu Gly Ala Ile Pro Leu Pro Val Asp Phe Leu		
		260	265 270
[0014]	Ser Lys Val Ser Thr Glu Ile Pro Ala Ser Glu Pro Asp Gly Pro Ser		
		275	280 285
	Val Gly Arg Ala Lys Gly Gln Asp Ala Pro Leu Glu Phe Thr Phe His		
		290	295 300
	Val Glu Ile Thr Pro Asn Val Gln Lys Glu Gln Ala His Ser Glu Glu		
		305	310 315 320
	His Leu Gly Arg Ala Ala Phe Pro Gly Ala Pro Gly Glu Gly Pro Glu		
		325	330 335
	Ala Arg Gly Pro Ser Leu Gly Glu Asp Thr Lys Glu Ala Asp Leu Pro		
		340	345 350
	Glu Pro Ser Glu Lys Gln Pro Ala Ala Ala Pro Arg Gly Lys Pro Val		
		355	360 365
	Ser Arg Val Pro Gln Leu Lys Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp		
		370	375 380
	Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Thr Ser Thr Arg Ser Ser		
		385	390 395 400
	Ala Lys Thr Leu Lys Asn Arg Pro Cys Leu Ser Pro Lys His Pro Thr		
		405	410 415
	Pro Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ile Gln Pro Ser Ser Pro Ala Val Cys		

	420		425		430										
Pro	Glu	Pro	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	His	Val	Ser	Ser	Val	Thr	Ser	Arg
	435						440					445			
Thr	Gly	Ser	Ser	Gly	Ala	Lys	Glu	Met	Lys	Leu	Lys	Gly	Ala	Asp	Gly
	450					455						460			
Lys	Thr	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	Gly	Gln	Lys
	465				470					475					480
Gly	Gln	Ala	Asn	Ala	Thr	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro
			485						490					495	
Lys	Thr	Pro	Pro	Ser	Ser	Ala	Thr	Lys	Gln	Val	Gln	Arg	Arg	Pro	Pro
			500					505					510		
Pro	Ala	Gly	Pro	Arg	Ser	Glu	Arg	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp
		515					520					525			
Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg
	530					535					540				
Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys
	545				550					555					560
Val	Ala	Val	Val	Arg	Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys	Ser
				565					570					575	
Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Lys
			580					585					590		
Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Glu	Asn	Leu	Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly	Gly
	595						600					605			
Lys	Val	Gln	Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn	Val	Gln	Ser
	610					615					620				
Lys	Cys	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Ile	Lys	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser
	625				630					635					640
Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	Lys
			645					650					655		
Cys	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	His	His	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Val
			660					665					670		
Glu	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Gln	Ser	Lys
		675					680					685			
Ile	Gly	Ser	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Lys
	690					695					700				
Lys	Ile	Glu	Thr	His	Lys	Leu	Thr	Phe	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Ala	Lys

```

705              710              715              720

Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly
      725              730              735

Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile
      740              745              750

Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser
      755              760              765

Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
      770              775

<210> 26
<211> 758
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 26

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 Glu Pro Glu Ser
      115             120             125

Gly Lys Val Val Gln Glu Gly Phe Leu Arg Glu Pro Gly Pro Pro Gly
      130             135             140

Leu Ser His Gln Leu Met Ser Gly Met Pro Gly Ala Pro Leu Leu Pro
145             150             155             160

Glu Gly Pro Arg Glu Ala Thr Arg Gln Pro Ser Gly Thr Gly Pro Glu
      165             170             175

```

[0016]

```

Asp Thr Glu Gly Gly Arg His Ala Pro Glu Leu Leu Lys His Gln Leu
    180                      185                      190

Leu Gly Asp Leu His Gln Glu Gly Pro Pro Leu Lys Gly Ala Gly Gly
    195                      200                      205

Lys Glu Arg Pro Gly Ser Lys Glu Glu Val Asp Glu Asp Arg Asp Val
    210                      215                      220

Asp Glu Ser Ser Pro Gln Asp Ser Pro Pro Ser Lys Ala Ser Pro Ala
    225                      230                      235                      240

Gln Asp Gly Arg Pro Pro Gln Thr Ala Ala Arg Glu Ala Thr Ser Ile
    245                      250                      255

Pro Gly Phe Pro Ala Glu Gly Ala Ile Pro Leu Pro Val Asp Phe Leu
    260                      265                      270

Ser Lys Val Ser Thr Glu Ile Pro Ala Ser Glu Pro Asp Gly Pro Ser
    275                      280                      285

Val Gly Arg Ala Lys Gly Gln Asp Ala Pro Leu Glu Phe Thr Phe His
    290                      295                      300

Val Glu Ile Thr Pro Asn Val Gln Lys Glu Gln Ala His Ser Glu Glu
    305                      310                      315                      320

His Leu Gly Arg Ala Ala Phe Pro Gly Ala Pro Gly Glu Gly Pro Glu
    325                      330                      335

Ala Arg Gly Pro Ser Leu Gly Glu Asp Thr Lys Glu Ala Asp Leu Pro
    340                      345                      350

Glu Pro Ser Glu Lys Gln Pro Ala Ala Ala Pro Arg Gly Lys Pro Val
    355                      360                      365

Ser Arg Val Pro Gln Leu Lys Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp
    370                      375                      380

Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Thr Ser Thr Arg Ser Ser
    385                      390                      395                      400

Ala Lys Thr Leu Lys Asn Arg Pro Cys Leu Ser Pro Lys His Pro Thr
    405                      410                      415

Pro Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ile Gln Pro Ser Ser Pro Ala Val Cys
    420                      425                      430

Pro Glu Pro Pro Ser Ser Pro Lys His Val Ser Ser Val Thr Ser Arg
    435                      440                      445

Thr Gly Ser Ser Gly Ala Lys Glu Met Lys Leu Lys Gly Ala Asp Gly
    450                      455                      460

```

[0017]

Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys
 465 470 475 480
 Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro
 485 490 495
 Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser
 500 505 510
 Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
 515 520 525
 Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala
 530 535 540
 Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu
 545 550 555 560
 Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys
 565 570 575
 Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val
 580 585 590
 Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys
 595 600 605
 Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
 610 615 620
 Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly
 625 630 635 640
 Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val
 645 650 655
 Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly
 660 665 670
 Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile
 675 680 685
 Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp
 690 695 700
 His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr
 705 710 715 720
 Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met
 725 730 735
 Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser
 740 745 750

[0018]

Leu Ala Lys Gln Gly Leu
755

<210> 27

<211> 352

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 27

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

[0019]

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 Gln Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu			
340	345	350	

<210> 28

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

[0020]

<220>

<223> 合成核酸序列

<400> 28

gaggttcatc tggtaggagc tgggggagcc ttagtgaagc ctggagggtc cctgagactc 60

tctgtgicag cctctggatt cagtttcagt aaataaggca tgtcttgggt tcgccaggcc 120

ccaggcaagg gccctggagt ggtcgcaacc attagtagta gttggagtgc cacttactat 180

ccagacagtg tgaaggccag attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagctcaga gtctgaggac acagccatgt attactgttc aattagctgg 300

gacgggtcta tggactacig gggtaagggt acctcagtca cegtctcttc a 351

<210> 29

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核酸序列

<400> 29

gaggttcatc tggtaggagc tgggggagcc ttagtgaagc ctggagggtc cctgagactc 60

tctgtgicag cctctggatt cagtttcagt aaataaggca tgtcttgggt tcgccaggcc 120

ccaggcaagg gccctggagt ggtcgcaacc attagtagta gttggagtgc cacttactat 180

ccagacagtg tgaaggccag attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga acagctcag agccgaggac acagccatgt attactgttc aattagctgg 300

	gacgggtgcta tggacttacig gggicaaggg accacccgta ccgctcctc a	351
<210>	30	
<211>	351	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成核酸序列	
<400>	30	
	gaggttcagc tgggtggagtc tgggggagcc ttagtgaagc ctggagggtc cctgagactc	60
	tccctgtcag cctctggatt cagtttcagc aaatattgca tgtcttgggt tcgccaggcc	120
	ccaggcaagg gccctggagtc ggtcgcaacc attagtagta gttggagtcg caccctactat	180
	ccagacagtc tgaagggcag atcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
	ctgcaaatga acagctctgag agccgaggac acagccatgt attactgttc attagctgg	300
	gacgggtgcta tggacttacig gggicaaggg accacccgta ccgctcctc a	351
<210>	31	
<211>	351	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成核酸序列	
<400>	31	
	gaggttcagc tgggtggagtc tgggggagcc ttagtgaagc ctggagggtc cctgagactc	60
	tccctgtcag cctctggatt cagtttcagc aaatattgca tgtcttgggt tcgccaggcc	120
	ccaggcaagg gccctggagtc ggtcgcaacc attagtagta gttggagtcg caccctactat	180
	ccagacagtc tgaagggcag atcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
	ctgcaaatga acagctctgag agccgaggac acagccatgt attactgttc cattagctgg	300
	gacgggtgcta tggacttacig gggicaaggg accacccgta ccgctcctc a	351
<210>	32	
<211>	336	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成核酸序列	
<400>	32	
	gatgtrtga tgaacccaag cccctctccc ctgccctgca cctctggaca gcccgctcc	60
	atctctgca aatctagta gagcatgta catagtaatg gaaacacctt ttiagaatgg	120
	tacctgcaga aaccaggcca gtctccacag ctcttggctt acaaagtttc caatcgattt	180
	tcctgggttc cagacagatt cagtgccagc ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
	agcagagttg aggtctagga tctgggaact tattiactgt ticaaggctc acttggtcc	300
	tggcggttcg gtggaggcac caaggtggaa atcaaa	336
<210>	33	
<211>	336	
<212>	DNA	

[0021]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核酸序列

<400> 33

```
gaigtgtga tgacccaag cccactctcc ctgccctgca cccctggaca gcccgcctcc 60
atctcttga aatctagta gagcatigta catagtaatg gaaacacctt tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccacag ctccctggtct acaaagtctt caatcgattt 180
tcgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggcctagga ttggggaact tattactgct ttcaaggctc acttggtcct 300
tgggcggttc gttgaggcac caaggtggaa atcaaa 336
```

<210> 34

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核酸序列

<400> 34

```
gaigtgtga tgacccaag cccactctcc ctgccctgca cccctggaca gcccgcctcc 60
atctcttga aatctagta gagcatigta catagtaatg gaaacacctt tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccacag ctccctggtct acaaagtctt caatcgattt 180
tcgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggcctagga ttggggaact tattactgct ttcaaggctc acttggtcct 300
tgggcggttc gttgaggcac caaggtggaa atcaaa 336
```

[0022]

<210> 35

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核酸序列

<400> 35

```
gaigtgtga tgacccaag cccactctcc ctgccctgca cccctggaca gcccgcctcc 60
atctcttga aatctagta gagcatigta catagtaatg gaaacacctt tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccacag ctccctggtct acaaagtctt caatcgattt 180
tcgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggcctagga ttggggaact tattactgct ttcaaggctc acttggtcct 300
tgggcggttc gttgaggcac caaggtggaa atcaaa 336
```

<210> 36

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 36

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Ile Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

[0023]

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 37

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Ile Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 38
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0024]

Ser Ile Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ile Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 40

Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

[0025]

Pro Gln Leu Leu Val Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Val Pro Trp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 41

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Val Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Val Pro Trp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 42
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 42

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Val Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Val Pro Trp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 43
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 43

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

[0026]

	20	25	30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	65	70	75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly	85	90	95
Ser Leu Val Pro Trp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105	110
<210> 44			
<211> 171			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成氨基酸序列			
<400> 44			
Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr	1	5	10 15
Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln	20	25	30
Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala Gly	35	40	45
Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr	50	55	60
Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp	65	70	75 80
Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg	85	90	95
Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile	100	105	110
Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu	115	120	125
Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro	130	135	140
Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro	145	150	155 160

[0027]

Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg
165 170

<210> 45

<211> 175

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 45

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

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

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

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

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

[0028]

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

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

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

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

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

Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175

<210> 46

<211> 150

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Pro Gly Ser Arg
145 150

[0029]

<210> 47
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 47

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile

100 105 110

Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys
115 120

<210> 48
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 48

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

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

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

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

Gln Ala Arg
65

[0030]

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 49

Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys
1 5 10

<210> 50
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 50

Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr
1 5 10 15

Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys
20 25 30

<210> 51
<211> 10
<212> PRT

[0031]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 51

Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys
1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> 该位置处的氨基酸是磷酸化的

<400> 52

Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys
1 5 10

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 53

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

Thr Tyr

<210> 54

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> 该位置处的X是L或V

<400> 54

Asp Val Xaa Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 55
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)...(14)
<223> 该位置处的X是V或I

<400> 55

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Xaa Tyr
1 5 10 15

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)...(29)
<223> 该位置处的X是T或V

[0032]

<400> 56

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Xaa Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 57

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 58

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

[0033]

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 59

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 60
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 60

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 61

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 62

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 63

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 64

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 64

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 65

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 66

[0034]

His His His His His
1 5

<210> 67
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 67

His His His His His His
1 5

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 68

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 69
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 69

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 70

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 71

[0035]

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 72

Arg Tyr Ile Arg Ser
1 5

<210> 73

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 73

Phe His His Thr
1

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 74
Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg
1 5 10 15

Ala

<210> 75
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 75

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 76
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

[0036]

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 76

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 77
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 77

Cys Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys
1 5 10 15

Thr Glu Glu Tyr
20

<210> 78
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 78

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr Cys
20

<210> 79

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 79

Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser
1 5 10 15

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

[0037]

<400> 80

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

Tyr

<210> 81

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 81

Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys
1 5 10 15

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 82

Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp
1 5

<210> 83
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 该位置处的X是H或Q

<400> 83

Gln Val Xaa Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
20 25 30

<210> 84
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 84

[0038]

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 85
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> 该位置处的X是S或N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> 该位置处的X是S或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> 该位置处的X是K或R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> 该位置处的X是S或A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> 该位置处的X是S或A

<400> 85

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Xaa Ile
20 25 30

<210> 86

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

[0039]

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> 该位置处的X是S或T

<400> 86

Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

杂文瘤 IPN001 重链序列

```

E V Q L V E S G E D L V K P G G S L K L
1  GAGGTGCAGT TGGTGCAGTC TGGGGAAGAC TTAGTGAAGC CTGGAGGGTC CCTGAAGATC
2
S C V A S G F A F S S Y G M S W V R Q T
61  TCCTGTGTGC CTTCCTGGATT CGCTTTCAGT AGCTATGGCA TGCTTTGGGT TCGCCAGACT

P D M R L E W V A T I S S S G S R T Y F
121  CCAGACAATGA GGCTGGAGTC GGTCGGCAACA ATTAGTAGCA GTGGTAGTCG CACCTACTTT

P D S V K G R L T I S R D N D K N I L Y
181  CCAGACAGTG TGAAGGGCG ACTCACCATC TCCAGACACA ATCACAAGAA CATCCTATAC

L Q M S S L R S E D T A M Y Y C T I T W
241  CTACAAATGA GCAGTCTGAG GTCTGAGGAC ACAGCCATGT ACTATTGTAC GATTACCTGG

D G A M D Y W G R G I S V T V S S (SEQ ID NO:14)
301  GACGGTGCTA TGGACTACTG GGCTCCTGCA ATATCAGTCA CCGTCTCCTC A (SEQ ID NO:18)

```

依照 Kabat 编号系统的 CDR 定义和蛋白质序列编号

CDR 和编码 CDR 的核苷酸序列为粗体文本且加下划线。

图1A

杂交链 IPN001 轻链序列

```

D V L M T Q T P L S L A V N L G D Q A S
GATGTTTGA TGACCAAAAC TCCGCTCTCC CTGCAGTCA ATCTTGGAGA TCAAGCCCTCC
1
L S C R S S Q T I L H S N G N T Y L E W
CTCTCTTTCCA GATCGAGTCA GACTATTTTA CATAGTAATG GAAATACCTA TTTAGAAATGG
61
Y L Q K P G Q S P R L L I Y K V S K R F
TATTTCGAGA AACCAGGCCA GTCTCCAAGA CTCTGATCT ACAAGTTTC TAAACGATT
121
S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
TCTGGGCTCC CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GCATCAGGA CAGATTTCAC ACTCAGATC
181
S R V E A D D L G I Y Y C F Q G S L V P
AGCAGAGTGG AGGCTGACGA TCTGGGAATT TATTACTGCT TTCAAGTTTC ACTTGTTCCT
241
W A F G C G T K L E I K (SEQ ID NO:13)
TGGGCGTTTCG GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAA (SEQ ID NO:17)
301

```

依照 Kabat 编号系统的 CDR 定义和蛋白质序列编号

CDR 和编码 CDR 的核苷酸序列为粗体文本且加下划线。

图1B

杂交瘤 IPN002 重链序列

```

      E V H L V E S G G A L V K P G G S L K L
1  GAGGTCATC TGGTGGAGTC TGGGGAGCC TTAGTGAAGC CTGAGGGTC CCTGAAGTC

      S C A A S G F S F S K Y G M S W V R Q T
61 TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CAGTTTCAGT AAATATGGCA TGTCTTGGGT TCGCCAGACT

      P D K R L E W V A T I S S S G S R T Y Y
121 CCAGACAAGA GCCTGGAGTG GGTCGCAACC ATTAGTAGTA GTGGGAGTCG CACCTACTAT

      P D S V K G Q F T I S R D N A K N T L Y
181 CCAGACAGTG TGAAGGGCCA ATTCAACCATC TCCAGAGACA ATGCCAAGAA CACCCGTGTAC

      L Q M S S L K S E D T A M Y Y C S I S W
241 CTGCAAAATGA GCAGTCGTGAA GTCTGAGGAC ACAGCCATGT ATTACTGTTC AATTAGCTGG

      D G A M D Y W G Q G T S V T V S S (SEQ ID NO:16)
301 GACGGTGCTA TGGACTACTG GGSTCAAGCG ACCTCAGTCA CCGTCTCCCTC A (SEQ ID NO:20)

```

依照 Kabat 编号系统的 CDR 定义和蛋白质序列编号

CDR 和编码 CDR 的核苷酸序列为粗体文本且加下划线。

图2A

杂交瘤 **IPN002** 轻链序列

```

1   D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S
   GATGTTTGA TGACCCAAAC TCCACTCTCC CTGCTGTCA GTCTGGAGA TCAAGCCTCC

61  I S C K S S Q S I V H S N G N T Y L E W
   ATCTCTTGA AATCTAGTCA GAGCATTTGA CATAGTAATG GAACACCTA TTAGAAATGG

121 Y L Q K P G Q S P K L L V Y K V S N R F
   TACCTGCAGA AACGAGGCCA GTCTCCAAAG CTCTGGTCT ACAAGTTTC CAATCGATTT

181 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
   TCTGGGGTCC CAGACAGCTT CAGTGGCAGT GCATCAGGGA CAGATTTCAC ACTCAAGATC

241 S R V E A E D L G T Y Y C F Q G S L V P
   ACCACAGTGG AGGCTGAGGA TCTGGGAACT TATTACTGCT TTCAAGGTTT ACTTGTTCTT

301 W A F C G G T K L E I K (SEQ ID NO:15)
   TGGGGTTCC GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAA (SEQ ID NO:19)

```

依照 Kabat 编号系统的 CDR 定义和蛋白质序列编号

CDR 和编码 CDR 的核苷酸序列为粗体文本且加下划线。

图2B

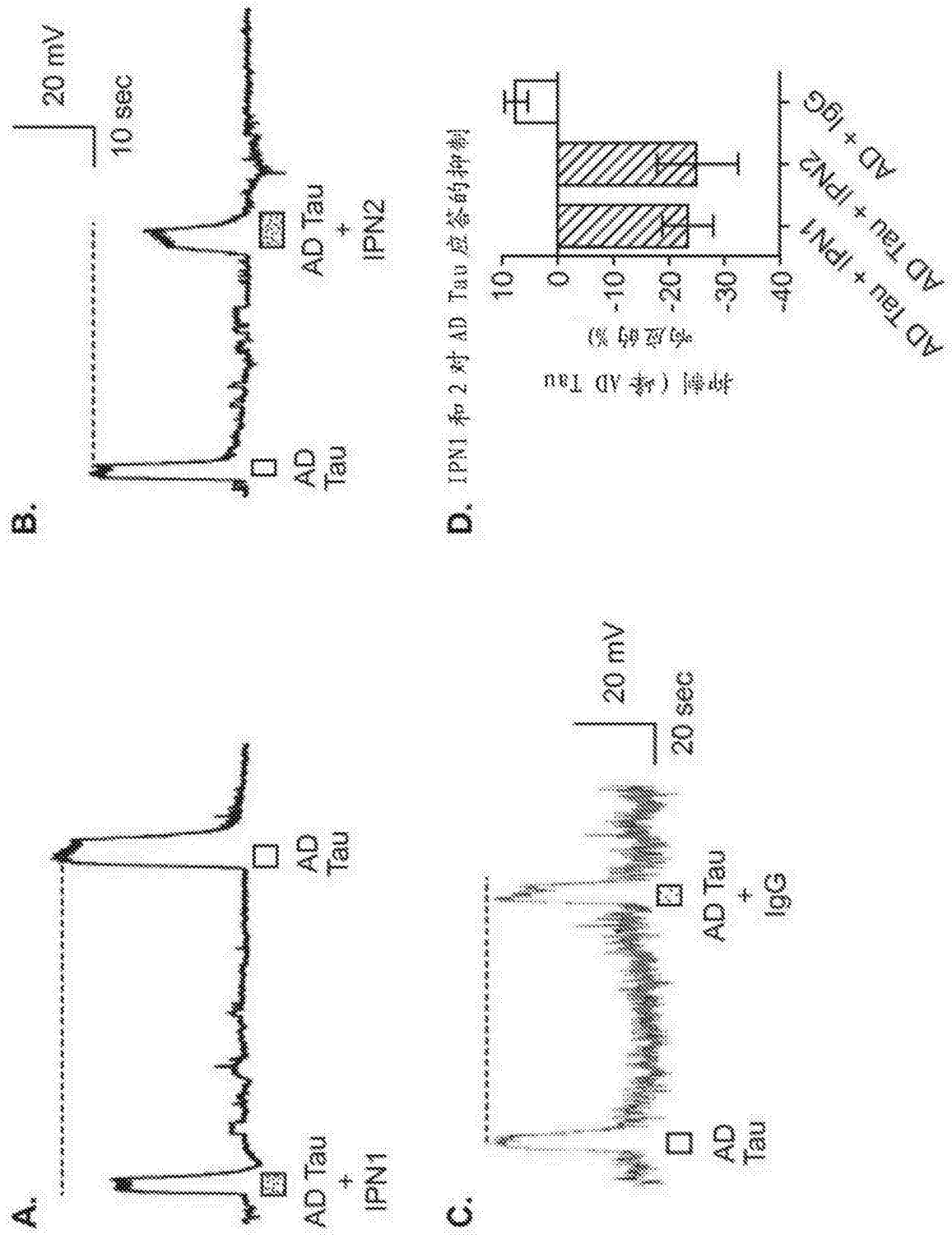


图3

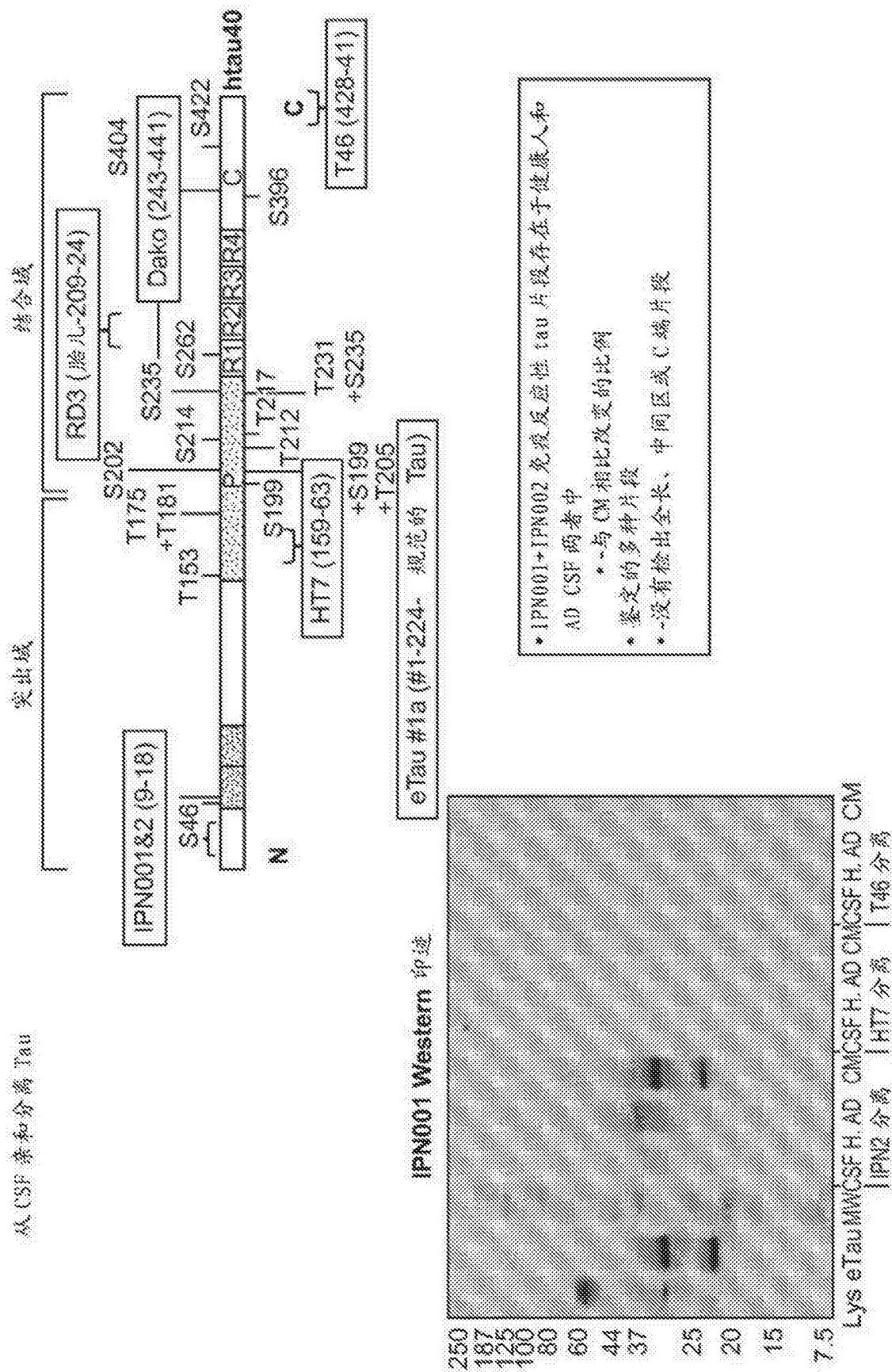


图4a

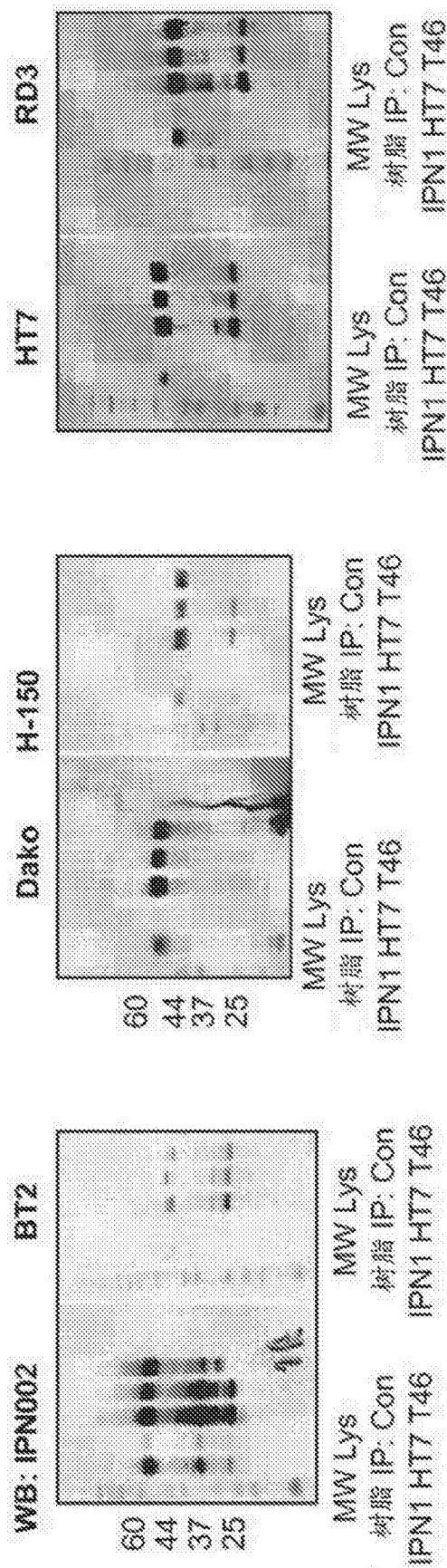


图4a (续)

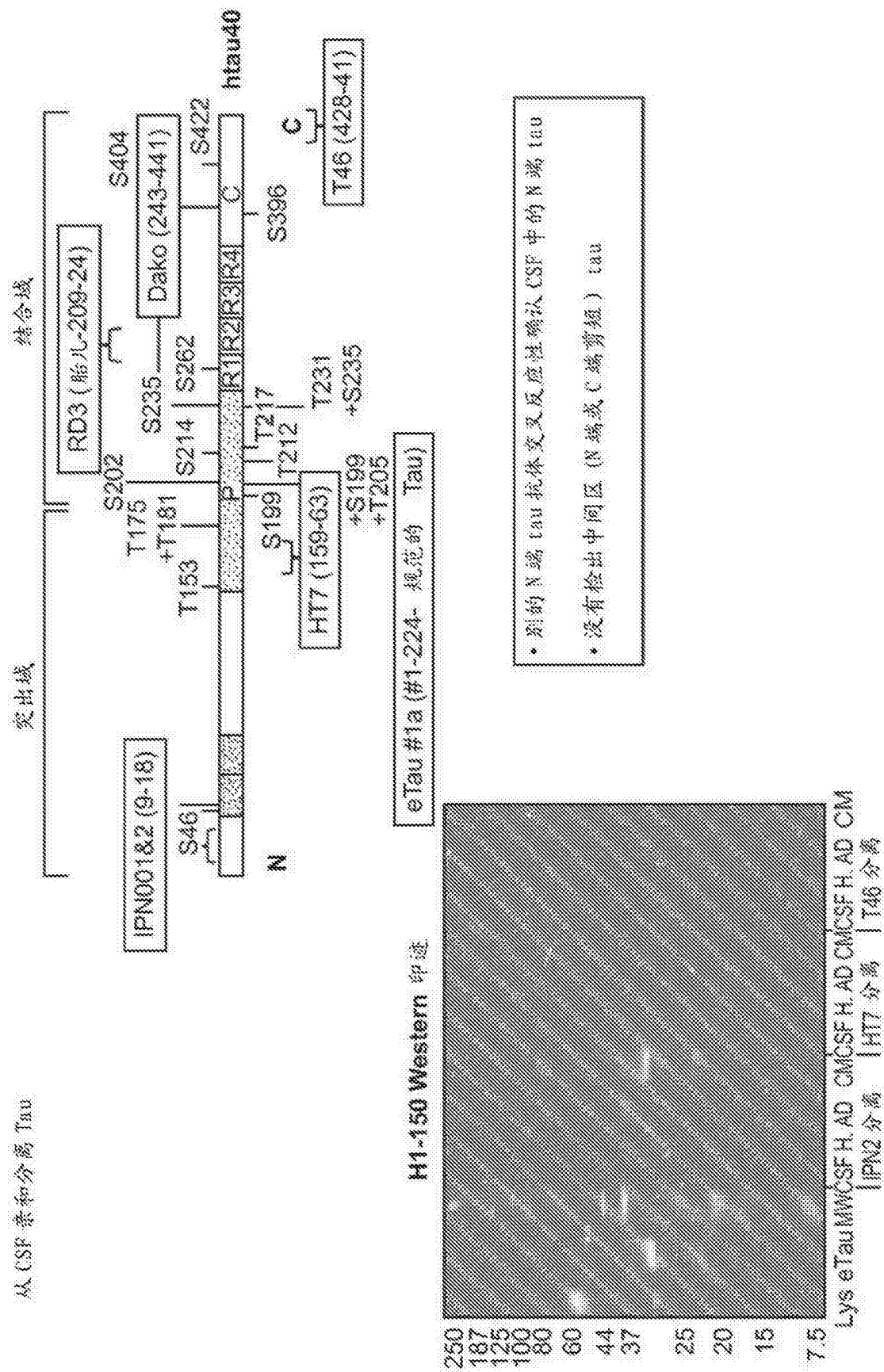


图4b

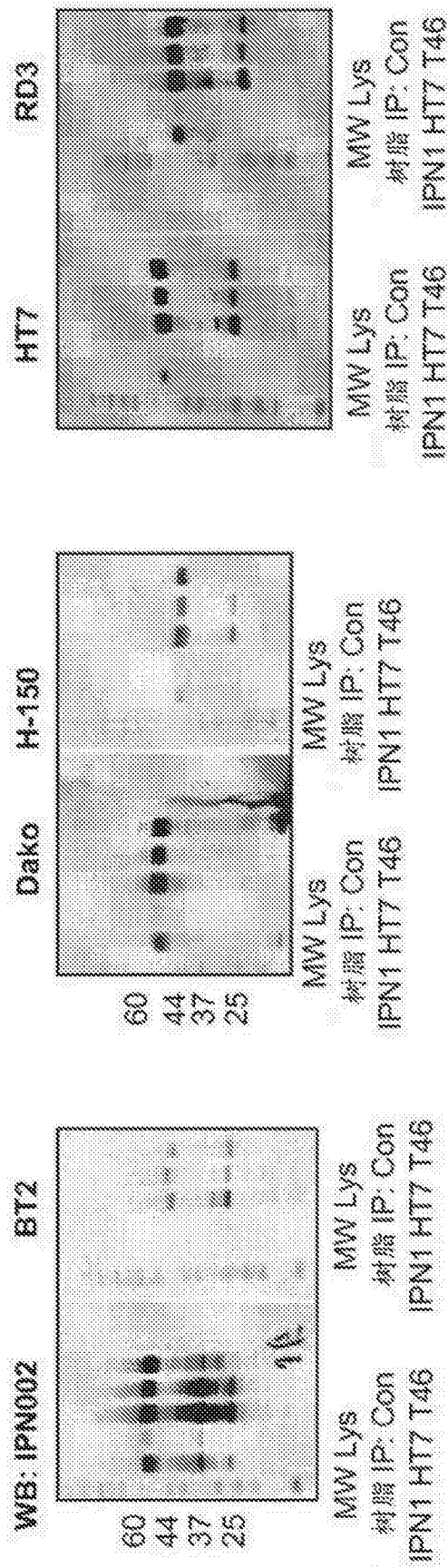


图4b (续)

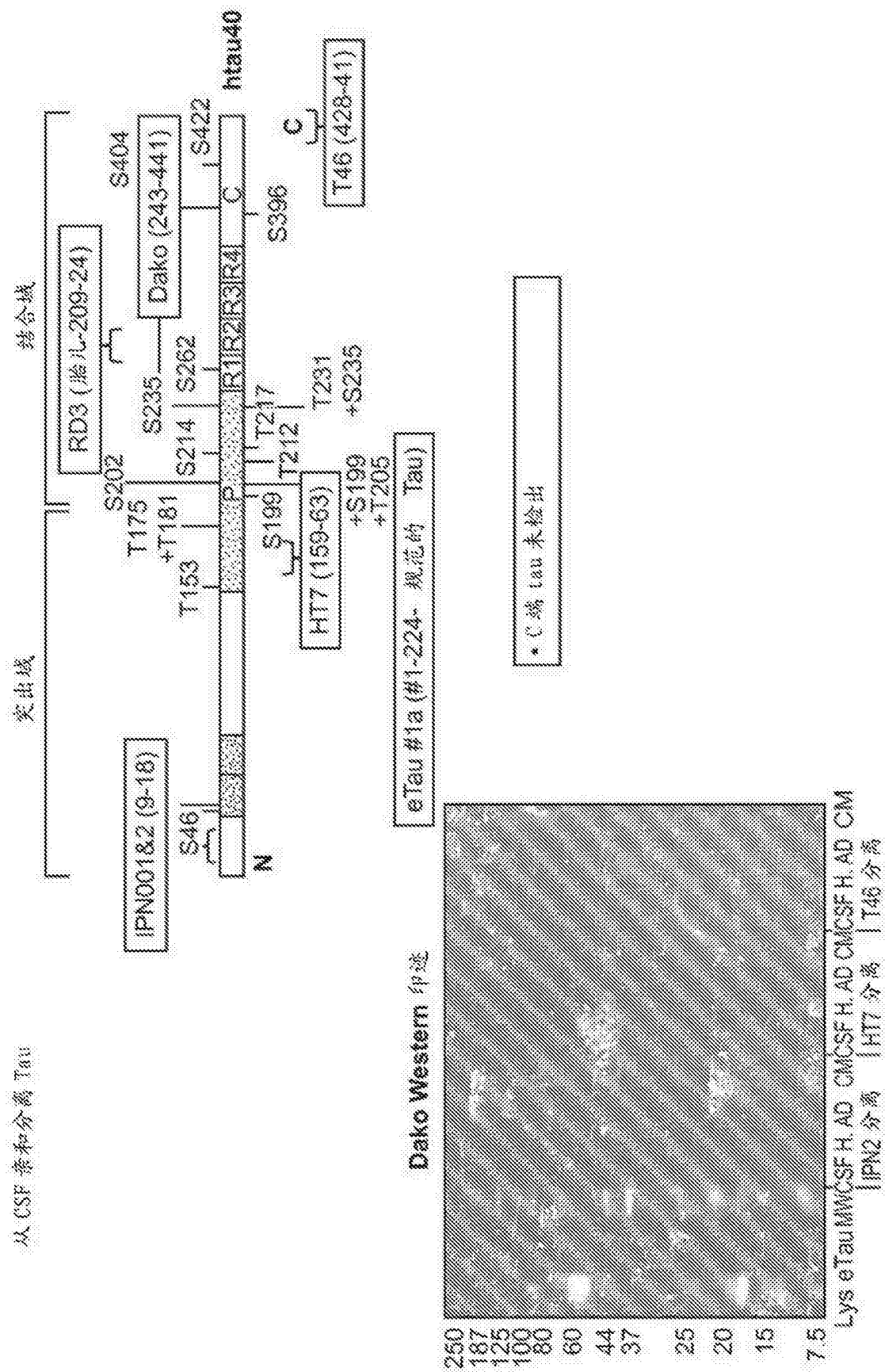


图4c

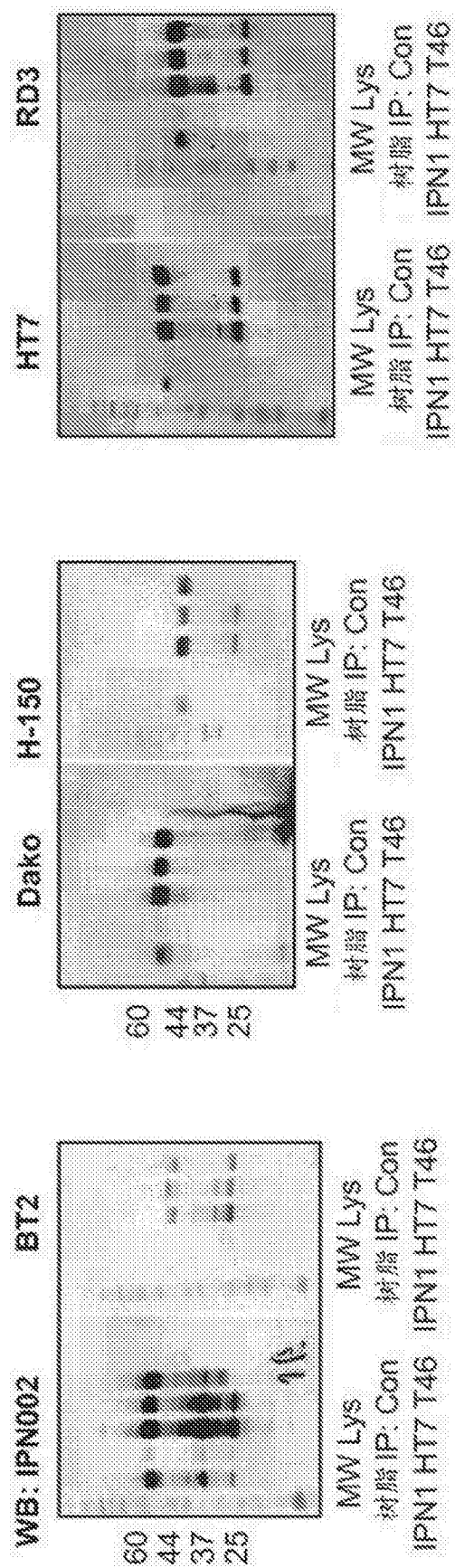
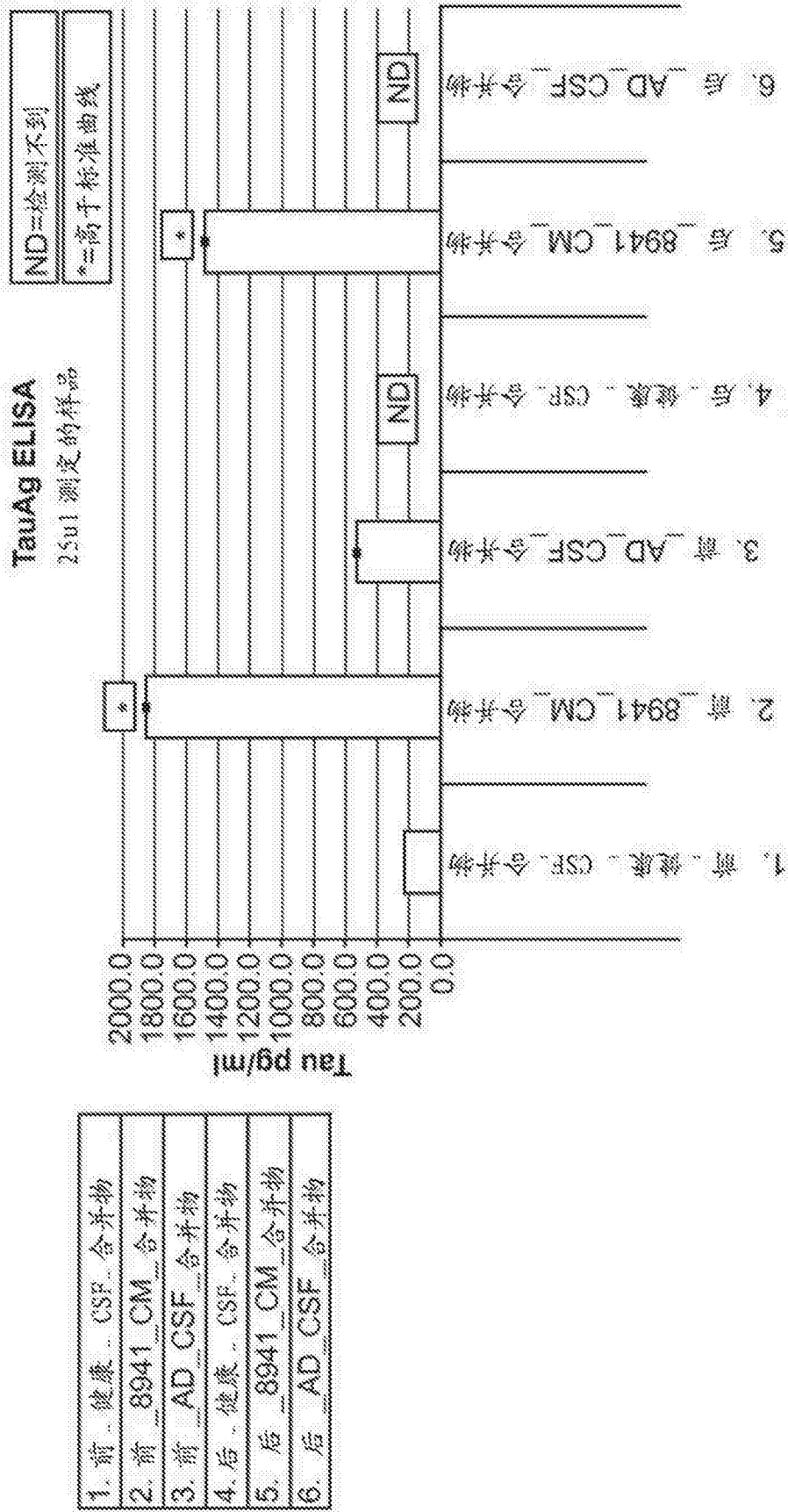


图4c (续)

Tau 亲和分离之前和之后 CSF 和 CM 样品的量化



1. 前, 健康 - CSF, 合并物
2. 前, 8941_CM, 合并物
3. 前, AD_CSF, 合并物
4. 后, 健康 - CSF, 合并物
5. 后, 8941_CM, 合并物
6. 后, AD_CSF, 合并物

图5

人 tau 同种型

同种型 2	MAEPRQEFVMEFHAGTYGLCDRDKDQGGYTMHODQEGDTDAGLKESPLQTPPTEDGSEEPG	60
同种型 3	MAEPRQEFVMEFHAGTYGLCDRDKDQGGYTMHODQEGDTDAGLK-----	44
同种型 4	MAEPRQEFVMEFHAGTYGLCDRDKDQGGYTMHODQEGDTDAGLK-----	44
同种型 5	MAEPRQEFVMEFHAGTYGLCDRDKDQGGYTMHODQEGDTDAGLKESPLQTPPTEDGSEEPG	60
同种型 6	MAEPRQEFVMEFHAGTYGLCDRDKDQGGYTMHODQEGDTDAGLKESPLQTPPTEDGSEEPG	60
同种型 1	MAEPRQEFVMEFHAGTYGLCDRDKDQGGYTMHODQEGDTDAGLKESPLQTPPTEDGSEEPG	60
胎儿	MAEPRQEFVMEFHAGTYGLCDRDKDQGGYTMHODQEGDTDAGLK-----	

同种型 2	SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPECTTAEAGIGDTPSLEDEAAG	120
同种型 3	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	62
同种型 4	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	62
同种型 5	SETSDAKSTP-----TAAEEAGIGDTPSLEDEAAG	91
同种型 6	SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPECTTAEAGIGDTPSLEDEAAG	120
同种型 1	SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPECTTAEAGIGDTPSLEDEAAG	120
胎儿	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	

同种型 2	HVTQ-----	124
同种型 3	HVTQ-----	66
同种型 4	HVTQ-----	66
同种型 5	HVTQ-----	95
同种型 6	HVTQEPESGKVVQEGFLRECPGGLSHQLMSGMPGAPLLPECPREATRQPSGTCPEDETEG	180
同种型 1	HVTQEPESGKVVQEGFLRECPGGLSHQLMSGMPGAPLLPECPREATRQPSGTCPEDETEG	180
胎儿	HVTQ-----	

图6A

同种型 2	-----	
同种型 3	-----	
同种型 4	-----	
同种型 5	-----	
同种型 6	GRHAPELLKHQLLDLHQEGPPLKGAGCKERPCKSEEVDEDRDVEDSSPDSPPSKASPA	240
同种型 1	GRHAPELLKHQLLDLHQEGPPLKGAGCKERPCKSEEVDEDRDVEDSSPDSPPSKASPA	240
胎儿	-----	
同种型 2	-----	
同种型 3	-----	
同种型 4	-----	
同种型 5	-----	
同种型 6	QDGRPPQTAAREATSIKCFPAEGAIPLFVDFLSKVSTEIPASEPDGPSVGRAKGQDAPLE	300
同种型 1	QDGRPPQTAAREATSIKCFPAEGAIPLFVDFLSKVSTEIPASEPDGPSVGRAKGQDAPLE	300
胎儿	-----	
同种型 2	-----	
同种型 3	-----	
同种型 4	-----	
同种型 5	-----	
同种型 6	FTFHVEITPNVQKEQAHSEEHLLGRAAFPGAPGEGPEARGPSLGEDTKEADLPEPSENQPA	360
同种型 1	FTFHVEITPNVQKEQAHSEEHLLGRAAFPGAPGEGPEARGPSLGEDTKEADLPEPSENQPA	360
胎儿	-----	
同种型 2	-----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK-----	143
同种型 3	-----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK-----	85
同种型 4	-----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK-----	85
同种型 5	-----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK-----	114
同种型 6	AAPRGKPVSRVPOLKARMVSKSKDGTGSDDKKAKTSTRSSAKTLKNRPCLSPKHPTPGSS	420
同种型 1	AAPRGKPVSRVPOLKARMVSKSKDGTGSDDKKAKTSTRSSAKTLKNRPCLSPKHPTPGSS	420
胎儿	-----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK-----	

图6B

同种型 2	-----GADGCKTKIATPRCAAPPCCQK	163
同种型 3	-----GADGCKTKIATPRCAAPPCCQK	105
同种型 4	-----GADGCKTKIATPRCAAPPCCQK	105
同种型 5	-----GADGCKTKIATPRCAAPPCCQK	134
同种型 6	DELIQSPSPAVCPPEPPSPKHHVSSVTSGSSGAKEMKLGADGCKTKIATPRCAAPPCCQK	480
同种型 1	DELIQSPSPAVCPPEPPSPKHHVSSVTSGSSGAKEMKLGADGCKTKIATPRCAAPPCCQK	480
胎儿	-----GADGCKTKIATPRCAAPPCCQK	*****
同种型 2	COANATRIPAKTPPAKTPPSS-----GEPPKSGDRSCYSSPGSPGT	205
同种型 3	COANATRIPAKTPPAKTPPSS-----GEPPKSGDRSCYSSPGSPGT	147
同种型 4	COANATRIPAKTPPAKTPPSS-----GEPPKSGDRSCYSSPGSPGT	147
同种型 5	COANATRIPAKTPPAKTPPSS-----GEPPKSGDRSCYSSPGSPGT	176
同种型 6	COANATRIPAKTPPAKTPPSSATKQVQRRPPACPRSERGEPPKSGDRSCYSSPGSPGT	540
同种型 1	COANATRIPAKTPPAKTPPSS-----GEPPKSGDRSCYSSPGSPGT	522
胎儿	COANATRIPAKTPPAKTPPSS-----GEPPKSGDRSCYSSPGSPGT	*****
同种型 2	PGSRSRTPPSLPTPTTREPKKVAVVRTPEPKSPSSAKSRLQTAPVEMPD LKNVKS KIGSTEN	265
同种型 3	PGSRSRTPPSLPTPTTREPKKVAVVRTPEPKSPSSAKSRLQTAPVEMPD LKNVKS KIGSTEN	207
同种型 4	PGSRSRTPPSLPTPTTREPKKVAVVRTPEPKSPSSAKSRLQTAPVEMPD LKNVKS KIGSTEN	207
同种型 5	PGSRSRTPPSLPTPTTREPKKVAVVRTPEPKSPSSAKSRLQTAPVEMPD LKNVKS KIGSTEN	236
同种型 6	PGSRSRTPPSLPTPTTREPKKVAVVRTPEPKSPSSAKSRLQTAPVEMPD LKNVKS KIGSTEN	600
同种型 1	PGSRSRTPPSLPTPTTREPKKVAVVRTPEPKSPSSAKSRLQTAPVEMPD LKNVKS KIGSTEN	582
胎儿	PGSRSRTPPSLPTPTTREPKKVAVVRTPEPKSPSSAKSRLQTAPVEMPD LKNVKS KIGSTEN	*****

图6C

同种型 2	LKHQPCGCKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDN IKHVPCCGSVQIVYKPPVDLSKVTSCGSL	325
同种型 3	LKHQPCGCKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDN IKHVPCCGSVQIVYKPPVDLSKVTSCGSL	267
同种型 4	LKHQPCGCK-----VQIVYKPPVDLSKVTSCGSL	236
同种型 5	LKHQPCGCKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDN IKHVPCCGSVQIVYKPPVDLSKVTSCGSL	296
同种型 6	LKHQPCGCKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDN IKHVPCCGSVQIVYKPPVDLSKVTSCGSL	660
同种型 1	LKHQPCGCKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDN IKHVPCCGSVQIVYKPPVDLSKVTSCGSL	642
胎儿	LKHQPCGCK-----VQIVYKPPVDLSKVTSCGSL *****	
同种型 2	GNIHKKPGCGQVEVKSEKIDFKDRVQSKIGSLDNI THVPGCGNKKIETHKLTFFRENAKAK	385
同种型 3	GNIHKKPGCGQVEVKSEKIDFKDRVQSKIGSLDNI THVPGCGNKKIETHKLTFFRENAKAK	327
同种型 4	GNIHKKPGCGQVEVKSEKIDFKDRVQSKIGSLDNI THVPGCGNKKIETHKLTFFRENAKAK	296
同种型 5	GNIHKKPGCGQVEVKSEKIDFKDRVQSKIGSLDNI THVPGCGNKKIETHKLTFFRENAKAK	356
同种型 6	GNIHKKPGCGQVEVKSEKIDFKDRVQSKIGSLDNI THVPGCGNKKIETHKLTFFRENAKAK	720
同种型 1	GNIHKKPGCGQVEVKSEKIDFKDRVQSKIGSLDNI THVPGCGNKKIETHKLTFFRENAKAK	702
胎儿	GNIHKKPGCGQVEVKSEKIDFKDRVQSKIGSLDNI THVPGCGNKKIETHKLTFFRENAKAK *****	
同种型 2	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSPRHLSNVSSSTGSDMVDSPOLATLADEVSSASLAKQGL	441 (SEQ ID NO:21)
同种型 3	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSPRHLSNVSSSTGSDMVDSPOLATLADEVSSASLAKQGL	393 (SEQ ID NO:22)
同种型 4	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSPRHLSNVSSSTGSDMVDSPOLATLADEVSSASLAKQGL	352 (SEQ ID NO:23)
同种型 5	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSPRHLSNVSSSTGSDMVDSPOLATLADEVSSASLAKQGL	412 (SEQ ID NO:24)
同种型 6	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSPRHLSNVSSSTGSDMVDSPOLATLADEVSSASLAKQGL	776 (SEQ ID NO:25)
同种型 1	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSPRHLSNVSSSTGSDMVDSPOLATLADEVSSASLAKQGL	758 (SEQ ID NO:26)
胎儿	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSPRHLSNVSSSTGSDMVDSPOLATLADEVSSASLAKQGL {SEQ ID NO:27} *****	

图6D

条件化培养基、P301L tau小鼠 ISF 和 AD 及 PSP CSF 中的 Tau 片段

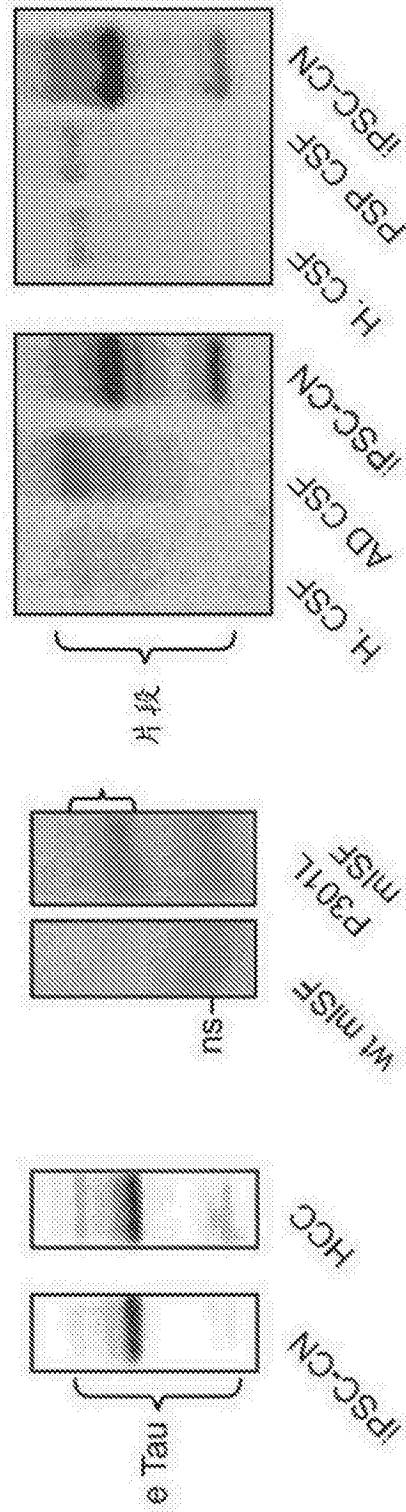


图7

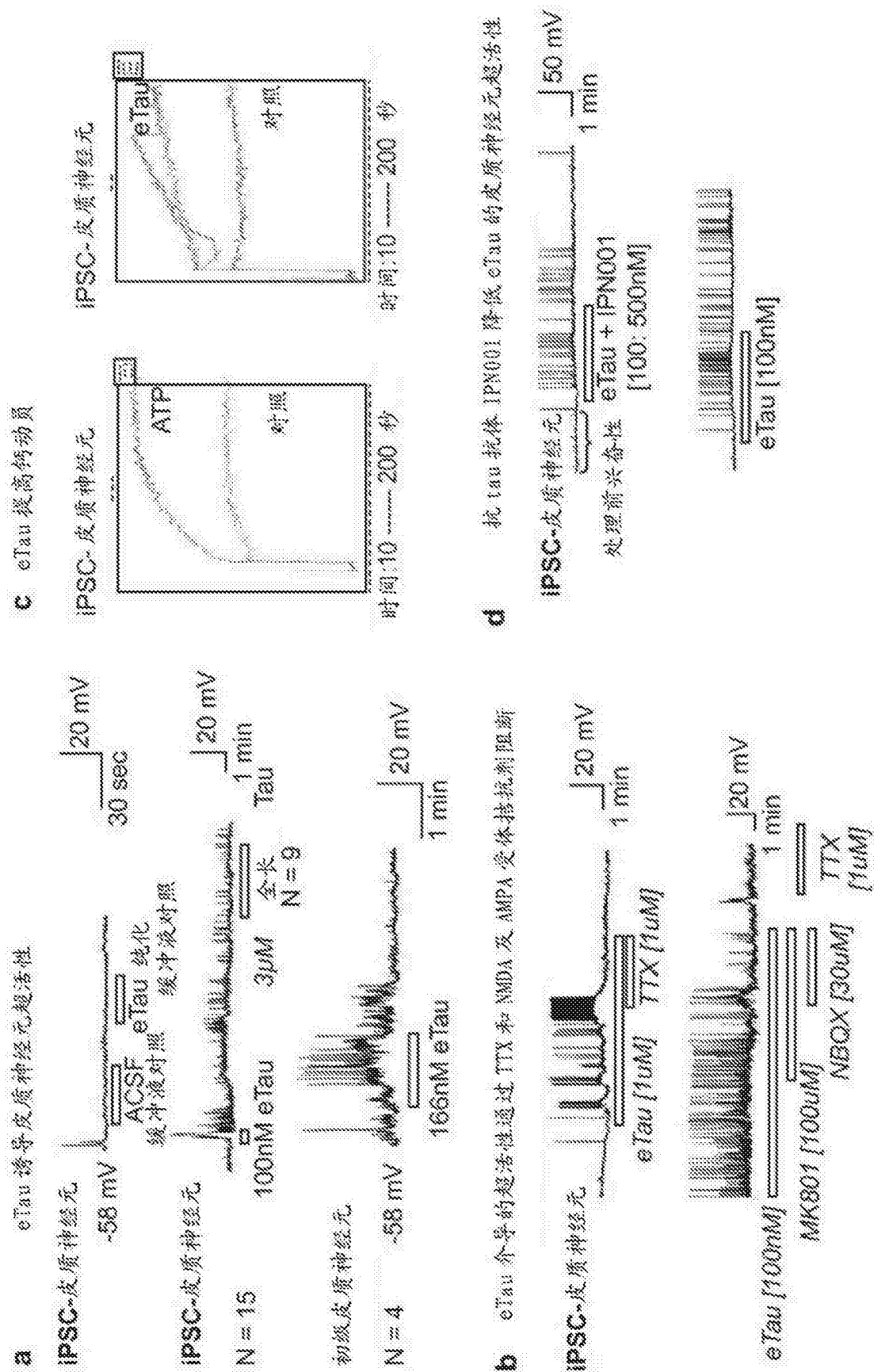


图8

IPN002 VH 变体 1

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTCACTGGTGGAGTCTGGGGCAGCCTTAGTGAAGCTGGAGGTCCTGAGACTCTCCGTCGACGCTCTGCAATTCAGTTCACTAAATATGSCA
E V H L V E S G G A L V K F G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
10      20      30
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGTCCTGGCTTCGCCAGGCCCAAGCCCAAGGCGCTGGAGTGGCTGCAACCATTAGTACTAGTGGAGTCCGACCTACTATCCACAGTGTGCAAGGSCAG
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
40      50      60
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCAACATCTCCAGAGACAATGCCAAGACACACCCCTGTACCTGCAATGAGCCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTTCAATTAGCTGG
F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D T A M Y Y C S I S W
70      80      90
310     320     330     340     350
GACGGTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCTCAAGTCACTGCTCTCTCA (SEQ ID NO:28)
P G A M D Y W G Q G T S V T V S S (SEQ ID NO:36)
100     110     113

```

依照 Kabat 的 CDR 定义和蛋白质序列编号。CDR 核苷酸和氨基酸序列如下划线。

图9

IPN002 VH 变体 2

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTCACTGGGTGGAGTCTGGGCGAGCCCTTAGTCAGCCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTCTGTGGACCCCTCGGATTCAGTTTCAGTAAATATGGCA
E V H L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
10      20      30
TGTCTTGGGTTCGGCCAGGCCCGAGGCGGCTGAGTGGGTCGCAACCATTTAGTAGTAGTGGAGTCCGACCTACTATCCACAGCTGTGAAAGGCAG
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
40      50      60
ATTACCTATCTCCAGAGACATGCCAAGACACCCCTGTACTCTGCAAAATGAACAGTCTCAGAGCCGAGGACACAGCCATGTATTACTTCTTCAATTAGCTGG
F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A M Y Y C S I S W
70      80      90
GACGGTCTATGGACTACTGGGTCAAGGACACCGTACCGTCTCTCA (SEQ ID NO:29)
D G A M D Y W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO:37)
100      110      113

```

依照 Kabat 的 CDR 定义和蛋白质序列编号。CDR 核苷酸和氨基酸序列加下划线。

图10

IPN002 VH 变体 3

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAGGTCAGCTGGTGGAGTCTGCGGGAGCCCTTAGTGAAGCCTCGAGGGTCCCTGAGACTCTCCCTGTGGAGCCCTCTGSAATTCAGTTTCAGTAAATATGGCA
E V Q L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
10      20      30
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGTCTTGGGTTCCAGCCGCCAGGCAAGCGCTGTGAGTGGCTCCCAACCAATTAGTACTAGTGGAGTGGCACTACTATCCAGACAGTCTGAAAGGCGAG
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
40      50      60
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCAACATCTCCAGAGACATGCCCCAGAGACACCCCTGTACCTGCAAATGAAACAGTCTGACAGCCGAGGACACAGCCATGTATTACTTTTCAATTAGCTGG
E T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A M Y Y C S I S W
70      80      90
310     320     330     340     350
GACGGTGTATGGACTACTCGGGGTCAAGGAGCACACCGTCACCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO:30)
D G A M D Y W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO:38)
100     110     113
```

依照 Kabat 的 CDR 定义和蛋白质序列编号，CDR 核苷酸和氨基酸序列加下划线。

图11

IPN002 VH 变体 4

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTGAGTGTGTCAGTCTGGGGAGCCCTTAGTGAAGCCCTGAGGTCCTGTCGAGACTCTCTGTCGAGCCCTCTGGAATTCAGTTTCAGTAAATATGCGA
E V Q L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
10
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGTCTTGGTTCCAGCCCGCCAGCCAGGGCTGAGTGGCTGCGAACCATTAAGTAGTAGTGGGAGTCGCACTACTATCCAGACAGTGTCAAGGCGAG
M S W V R Q A E Q K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
40      50      60
50      52 A

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCAACCATCCACAGACAATGCCAAGACACACCCCTGTACCTGCAATGACACAGTCTGACAGCCCGGACACACAGCCCATGTATTACTGTCCTTAGCTGG
F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A M Y Y C A I S W
70      80      90
80      82 A B C

310     320     330     340     350
GAGGGTGTACTGACTACTGGGTCAAGGACCCAGTCCGCTCTCTCA (SEQ ID NO:31)
D G A M D Y W G Q C T T V T V S S (SEQ ID NO:39)
100     110     113

```

依照 Kabat 的 CDR 定义和蛋白质序列编号，CDR 核苷酸和氨基酸序列加下划线。

图12

IPN002 Vk 变体 I

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTTGATCAACCAAGCCCACTCTCCCTGGCCCTGTCACAGCCCGCTCCATCTCTGCAATCTAGTCACAGCAATCTACAGTAATG
D V L M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S I V H S N
10
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CAACACCTATTAGCAATGCTACCTGCAGAAACCCAGGCCAGCTCTCCACAGCTTCCTGGCTTACAAAGTTCCCAATTCGATTTCTGGGTCCACACACATT
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L V Y K V S N R F S C V P D R F
30      40      50
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGCTGAGGCTCAGGATGTGGAACTTATTACTGCTTTCAGGCTCAGCTGTCTCT
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G T Y Y C F Q G S L V F
70      80      90
310     320
TGGGCGTTGGTGGAGCCACCAGGTGGAAATCATA (SEQ ID NO:32)
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:40)
100     106 A

```

依照 Kabat 的 CDR 定义和蛋白质序列编号，CDR 核苷酸和氨基酸序列加下划线。

图13

IPN002 Vk 变体 2

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGTGTGATGACCCAAAGCCGACCTCTCCCTGGCCGTGACCCGCTCCATCTCTGCAAAATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATG
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S I V H S N
10
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAACACCTATTACAGTGTACCTCCAGAAACAGGCCAGCTCCGCTCTACAAAGTTCCAAATCCATTCTCGGGTCCACACAGATG
G N T Y L E W Y L Q K K P G Q S P Q L L V Y K V S N R F S G V P D R F
30      40      50      60
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTTCACATCAAGATCAGCAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGCACTTATTACTGCTTTCAAGGCTCACTTGTCTCT
S C S C S G T D F T L K I S R V E A E D V G T Y Y C F Q G S L V P
70      80      90
310     320
TGSGCCTTCGCTGGAGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:33)
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:41)
100     106 A

```

依照 Kabat 的 CDR 定义和蛋白质序列编号，CDR 核苷酸和氨基酸序列加下划线。

图14

IPN002 Vk 变体 3

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTGGGATGACCCAAAGCCGACCTCTCCCTGGCTGTGCACCTTGACAGCCGCCGCTCATCTGCTGTCGAAATCTAGTCAGAGCATCTACATAGTAATG
D V V M T Q S E L S L P V T L G Q F A S I S C K S S Q S I V H S N
10
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAACACTATTAGATGCTACCTTCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCCTGGTCTACAAAGTTCCTCAATCCATTCTGGGGTCCGACACAGATT
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L V Y K V S N R F S G V F D R F
30      40      50
CAGTGGCAGTGGATCAGCGACAGATTTCACACTCAACATCAACAGATGAGAGCTGAGGATGTGGCAGTGTATTACTGCTTTCAGAGCTCAGCTGTTGTCCT
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S L V F
70      80      90
310     320
TGGGCGTTCCGTGAGCCACCCAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:34)
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:42)
100     106 A

```

依照 Kabat 的 CDR 定义和蛋白质序列编号，CDR 核苷酸和氨基酸序列如下划线。

图15

IPN002 Vk 变体 4

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTGTGATGACCCCAAGCCCACTCTCCCTGTCACCCCTTGGACAGCCCGCCCTCCATCTCTTSCAAATCTACTCAGACCAATTGTACATAGTAATG
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S I V H S N
10
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAACACCTATTACAGATGGTAACCTGCACAAACCAAGCCAGCTCTGCACAGCTCTCTCATCTACAAAGCTTTCATTCGATTTTCTCCCGTCCACACACATTT
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F
30      40      50      60      70      80      90
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAGATCAGACAGAGTGGAGGCTGAGCATGTGGAGTGTATTACTGCTTTCAGAGCTCACTTGTTCCT
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S L V P
70      80      90
310     320
TCGGCGTTCGGTGGAGCCACCAAGCTGCAAATCAAA (SEQ ID NO:135)
W A F G G T K V E I K (SEQ ID NO:43)
100     106 A

```

依照 Kabat 的 CDR 定义和蛋白质序列编号。CDR 核苷酸和氨基酸序列加下划线。

图16

表 4: IPN002 变体对 Tau 蛋白的结合

	K _D 值 (M)						
抗体	rTau383	eTau 1a	eTau 1b	eTau 2	eTau 4	eTau 4	
VH1/Vk1	1.83E-10	2.94E-10	7.37E-10	4.65E-10	3.58E-10	5.77E-10	
VH1/Vk2	1.21E-10	2.12E-10	5.58E-10	3.61E-10	3.21E-10	6.33E-10	
VH1/Vk3	1.75E-10	2.91E-10	5.90E-10	4.44E-10	4.78E-10	7.61E-10	
VH1/Vk4	2.86E-10	2.52E-10	5.97E-10	4.27E-10	2.69E-10	8.69E-10	
VH2/Vk1	2.42E-10	2.81E-10	2.15E-10	2.25E-10	3.69E-10	3.21E-10	
VH2/Vk2	1.99E-10	3.27E-10	2.29E-10	2.83E-10	2.94E-10	3.94E-10	
VH2/Vk3	2.23E-10	3.27E-10	2.87E-10	2.61E-10	2.19E-10	4.11E-10	
VH2/Vk4	2.48E-10	3.43E-10	5.20E-10	3.54E-10	4.18E-10	6.71E-10	
VH3/Vk1	2.36E-10	2.41E-10	5.29E-10	7.05E-10	4.54E-10	9.21E-10	
VH3/Vk2	2.58E-10	2.82E-10	6.14E-10	4.08E-10	5.89E-10	7.01E-10	
VH3/Vk3	2.24E-10	2.20E-10	6.89E-10	4.71E-10	4.69E-10	6.65E-10	
VH3/Vk4	2.55E-10	2.16E-10	3.82E-10	4.47E-10	3.81E-10	5.86E-10	
VH4/Vk1	1.87E-10	1.98E-10	3.59E-10	4.05E-10	2.80E-10	4.98E-10	
VH4/Vk2	1.60E-10	1.91E-10	4.83E-10	4.51E-10	2.91E-10	4.67E-10	
VH4/Vk3	2.76E-10	1.78E-10	3.13E-10	4.73E-10	6.36E-10	6.29E-10	
VH4/Vk4	3.79E-10	3.25E-10	5.35E-10	5.64E-10	4.62E-10	1.03E-09	

图17

表 5: 人源化 INP002 变体对 Tau383 的结合

抗体	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
VH1/VK1	4.26E-11	2.06E+05	8.75E-06
VH1/VK2	4.46E-10	1.96E+05	8.74E-05
VH1/VK3	1.28E-09	1.82E+05	2.33E-04
VH1/VK4	5.71E-10	1.67E+05	9.52E-05
VH2/VK1	4.67E-10	2.14E+05	1.00E-05
VH2/VK2	2.32E-10	2.05E+05	4.75E-05
VH2/VK3	1.73E-09	1.34E+05	2.32E-04
VH2/VK4	1.66E-09	1.42E+05	2.36E-04
VH3/VK1	1.99E-09	1.29E+05	2.57E-04
VH3/VK2	5.77E-10	1.85E+05	1.07E-04
VH3/VK3	1.69E-10	1.87E+05	3.15E-05
VH3/VK4	4.75E-10	2.11E+05	1.00E-04
VH4/VK1	2.12E-09	1.40E+05	2.97E-04
VH4/VK2	1.88E-09	1.63E+05	3.07E-04
VH4/VK3	5.71E-10	1.64E+05	9.39E-05
VH4/VK4	8.12E-10	1.56E+05	1.26E-04
INP002	2.06E-10	2.33E+05	4.78E-05

图18

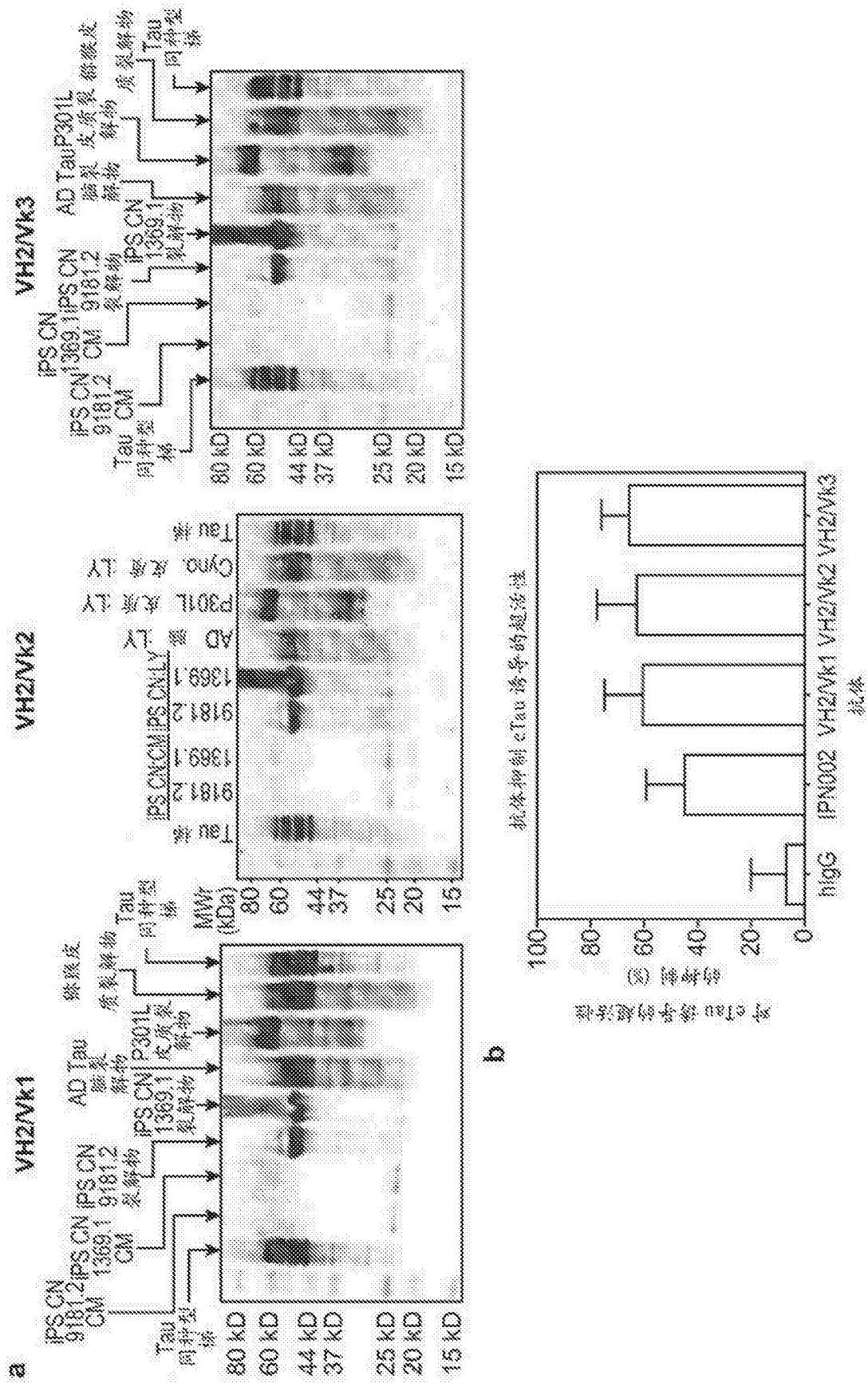


图19

胎儿	MAERQEFVME	DHAGTYGL	CDRKDQGGY	TMHQDQEG	TDAGLKAEE	AGICGDTPS	LEDEA
#2	AEPRQEFVME	DHAGTYGL	CDRKDQGGY	TMHQDQEG	TDAGLKAEE	AGICGDTPS	LEDEA
#3	AEPRQEFVME	DHAGTYGL	CDRKDQGGY	TMHQDQEG	TDAGLKAEE	AGICGDTPS	LEDEA
#4	AEPRQEFVME	DHAGTYGL	CDRKDQGGY	TMHQDQEG	TDAGLKAEE	AGICGDTPS	LEDEA
eTau 2-172	AEPRQEFVME	DHAGTYGL	CDRKDQGGY	TMHQDQEG	TDAGLKAEE	AGICGDTPS	LEDEA
eTau 2-176	AEPRQEFVME	DHAGTYGL	CDRKDQGGY	TMHQDQEG	TDAGLKAEE	AGICGDTPS	LEDEA
胎儿	ACHVTQARMV	SKSKDCTG	SDDKKAKG	ADGKTKIAT	PRGAAPPQ	CQKQCANAT	RIPAKTTPPA
#2	ACHVTQARMV	SKSKDCTG	SDDKKAKG	ADGKTKIAT	PRGAAPPQ	CQKQCANAT	RIPAKTTPPA
#3	ACHVTQARMV	SKSKDCTG	SDDKKAKG	ADGKTKIAT	PRGAAPPQ	CQKQCANAT	RIPAKTTPPA
#4	ACHVTQAR	(68)	(SEQ ID NO: 48)				
eTau 2-172	ACHVTQARMV	SKSKDCTG	SDDKKAKG	ADGKTKIAT	PRGAAPPQ	CQKQCANAT	RIPAKTTPPA
eTau 2-176	ACHVTQARMV	SKSKDCTG	SDDKKAKG	ADGKTKIAT	PRGAAPPQ	CQKQCANAT	RIPAKTTPPA
胎儿	PKTPSSCEPP	PKSGDRSGY	SSPGSPGT	PGSRSRTP	SLPTPTRE	PKKVAVVR	TPPKSPSSA
#2	PKTPSSCEPP	PKSGDRSGY	SSPGSPGT	PGSRSRTP	SLPTPTRE	PKKVAVVR	TPPKSPSSA
#3	PK	(122)	(SEQ ID NO: 47)				
eTau 2-172	PKTPSSCEPP	PKSGDRSGY	SSPGSPGT	PGSRSRTP	SLPTPTRE	PKKVAVVR	(SEQ ID NO: 44)
eTau 2-176	PKTPSSCEPP	PKSGDRSGY	SSPGSPGT	PGSRSRTP	SLPTPTRE	PKKVAVVR	TPPK (SEQ ID NO: 45)
胎儿	KSRLQTAPV	PMPDLKNV	SKSIGSTEN	LKHQPG	CGKVQIVY	KPVDLSK	VGSLGNIHHK
胎儿	PGGGQVEVK	SEKLD	FKDRVQSK	ICSLDNI	THVFGG	GNKKIETH	KLTFRENANAKTDHCABE
胎儿	VYKSPVVSG	DTSPRHLS	NVSSGTGS	IDMVDSP	OLATLA	DEVSA	SLAKQGL (SEQ ID NO: 27)

图20

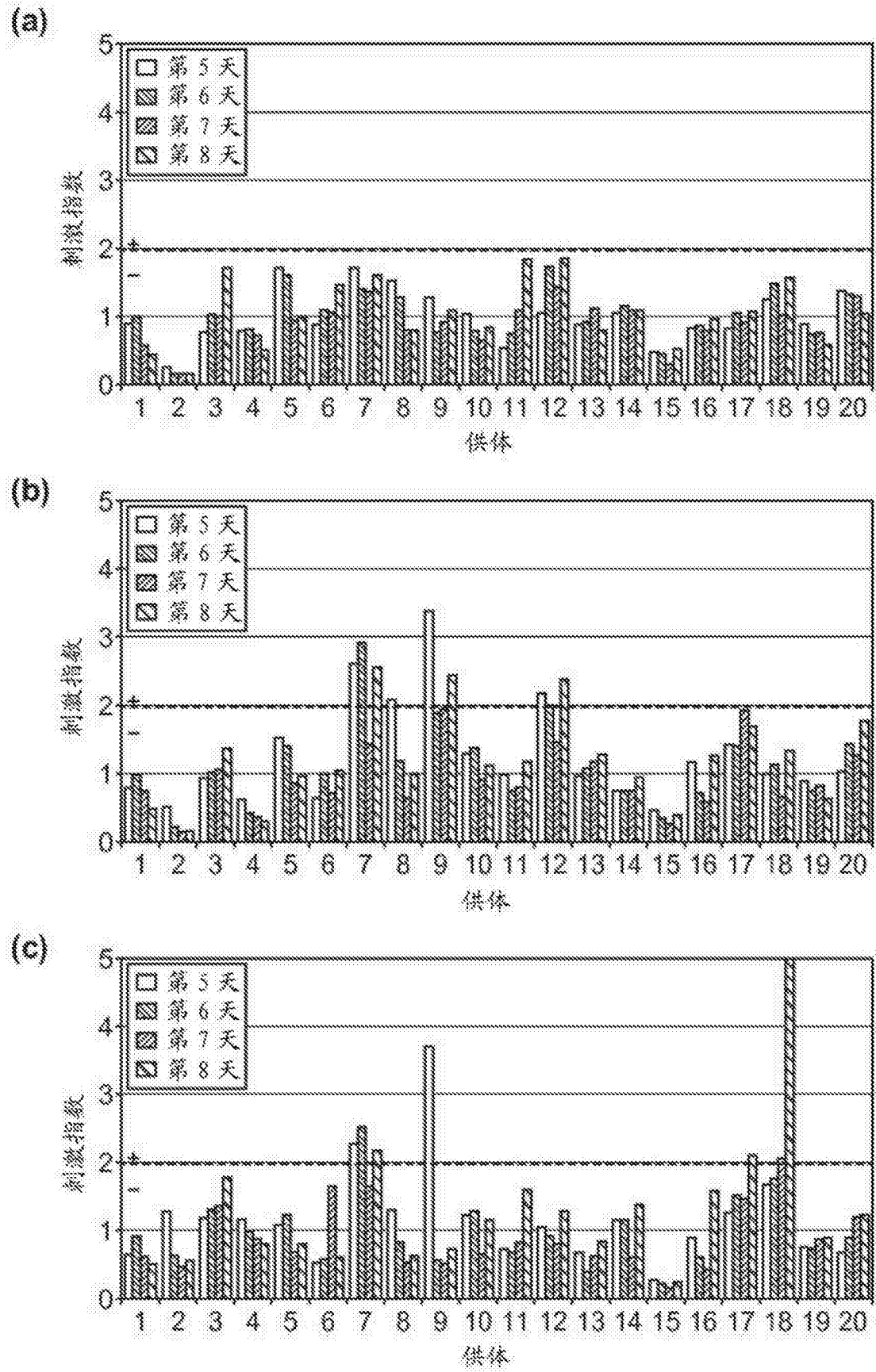


图21

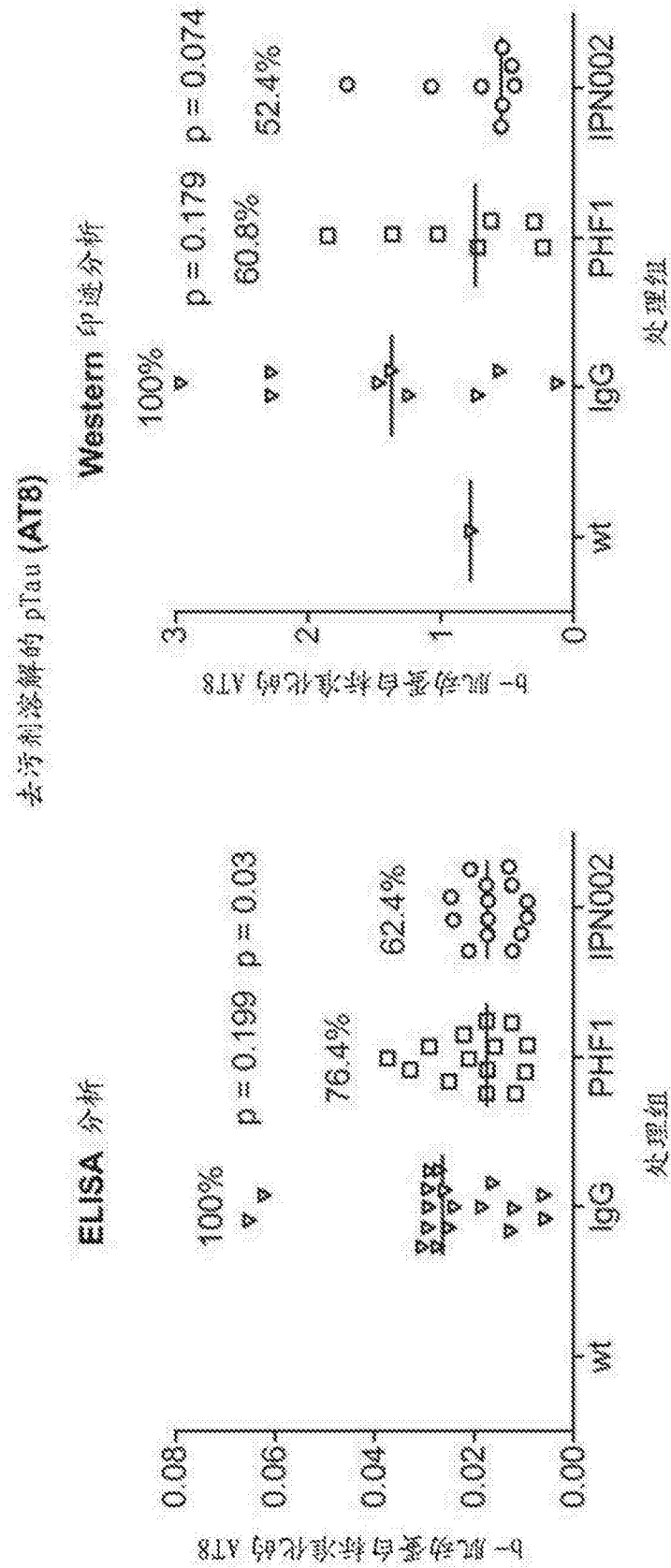


图22

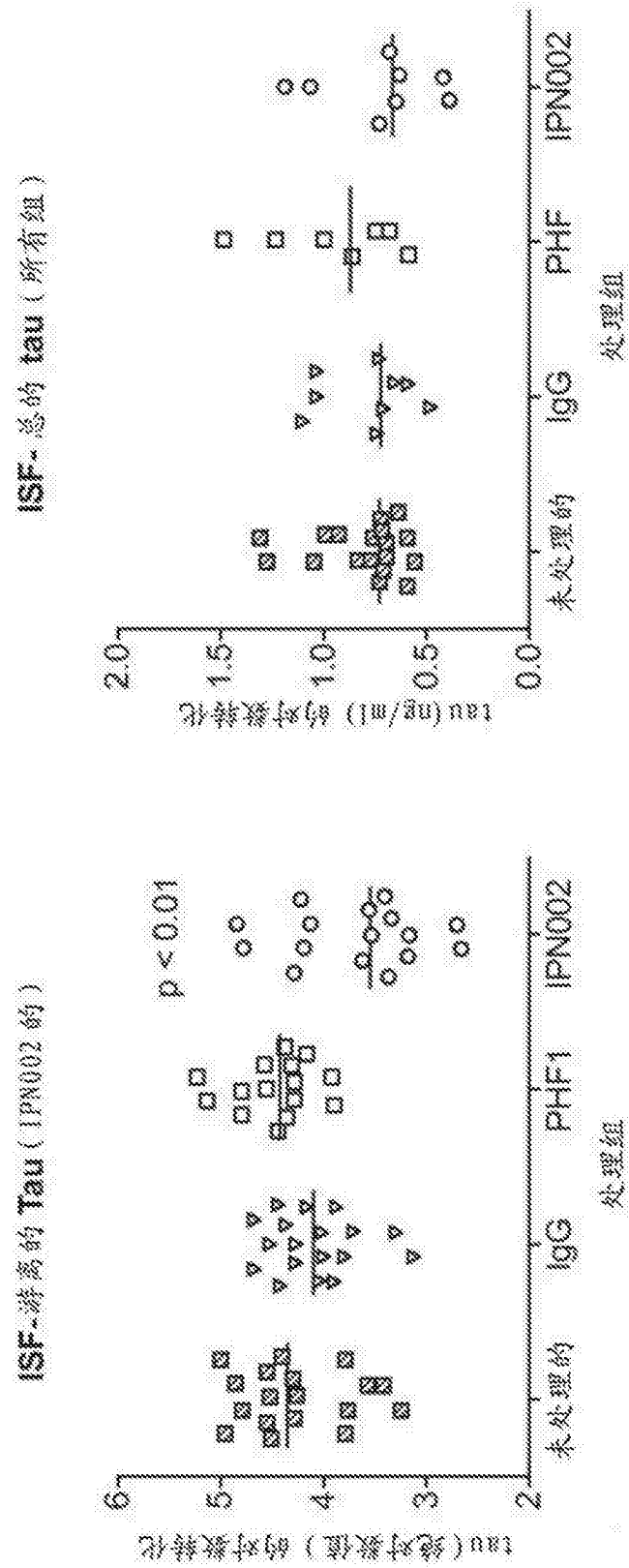


图23

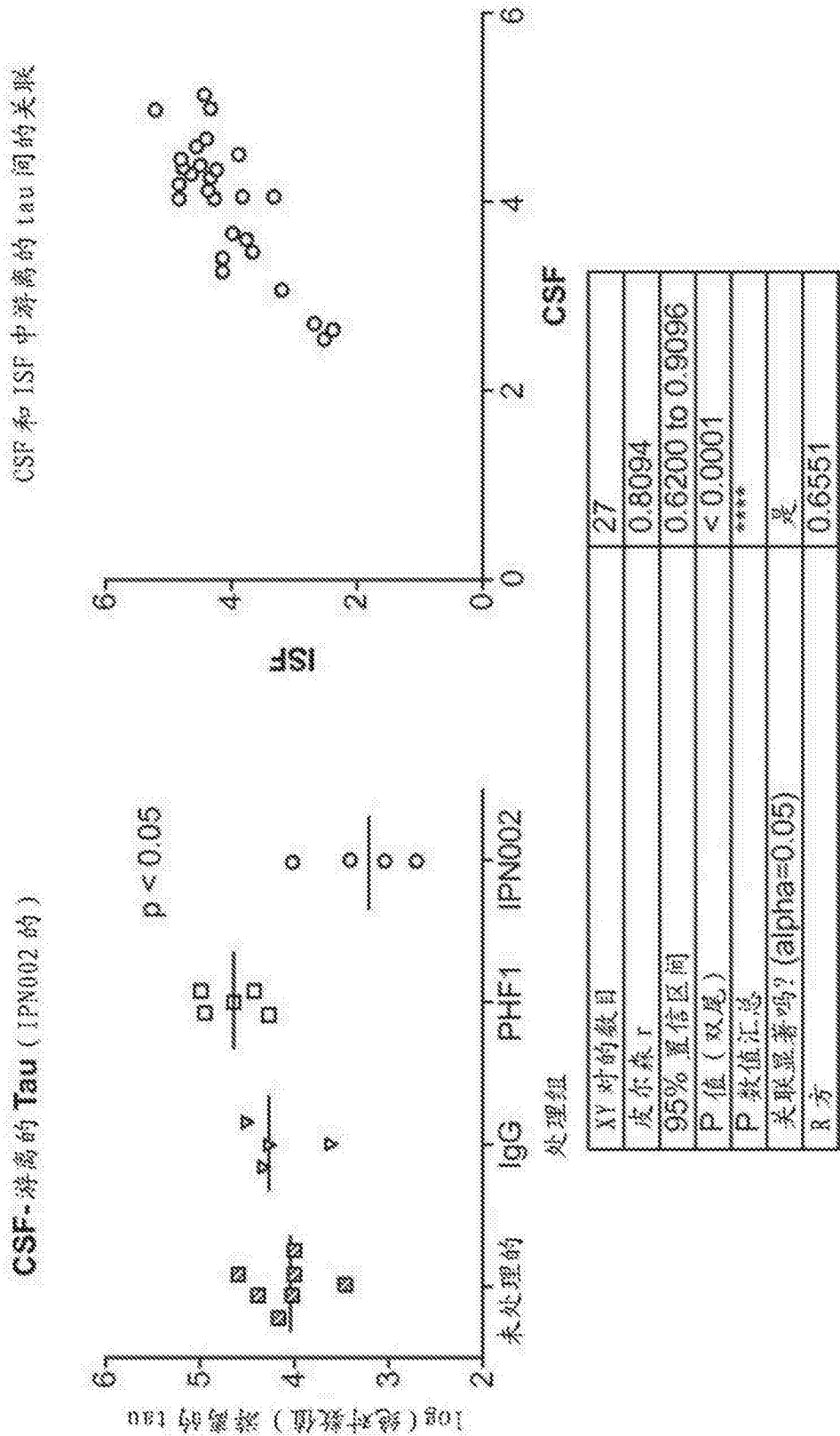


图24

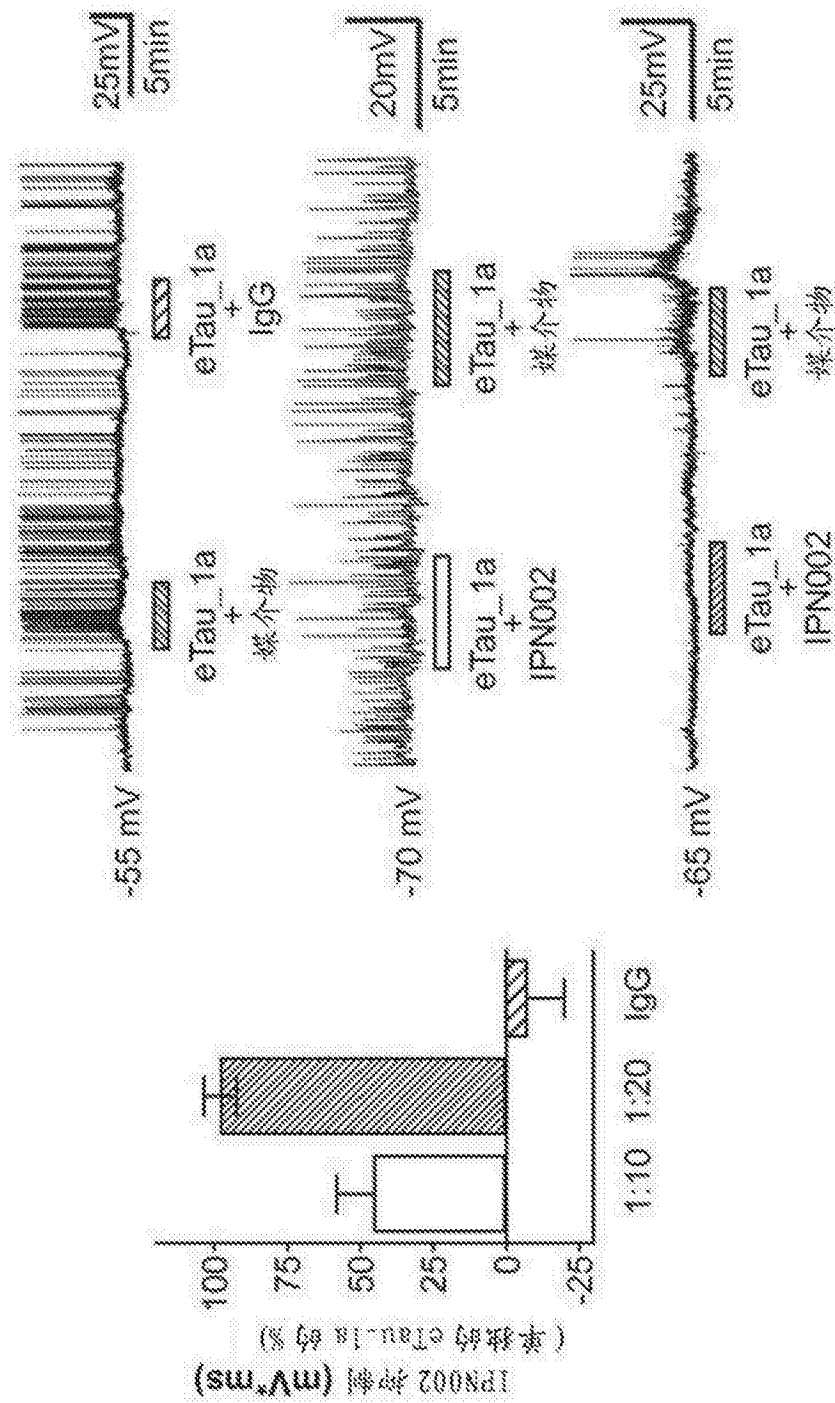


图25

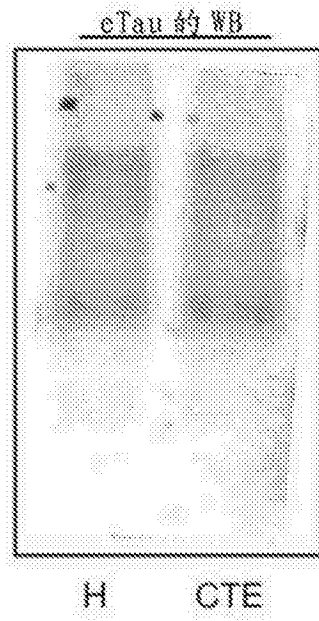


图26

合成的 Tau 肽：

肽 1: Biotin-ahx-¹EHACTYGLGDRK⁴⁸ (SEQ ID NO: 49)

肽 2: Biotin-ahx-¹AGTYGLGDRKDGCGXTMHODQEGDTDAGLK⁴⁸ (SEQ ID NO: 50)

图相 - Tau 肽与 hu-IPN002

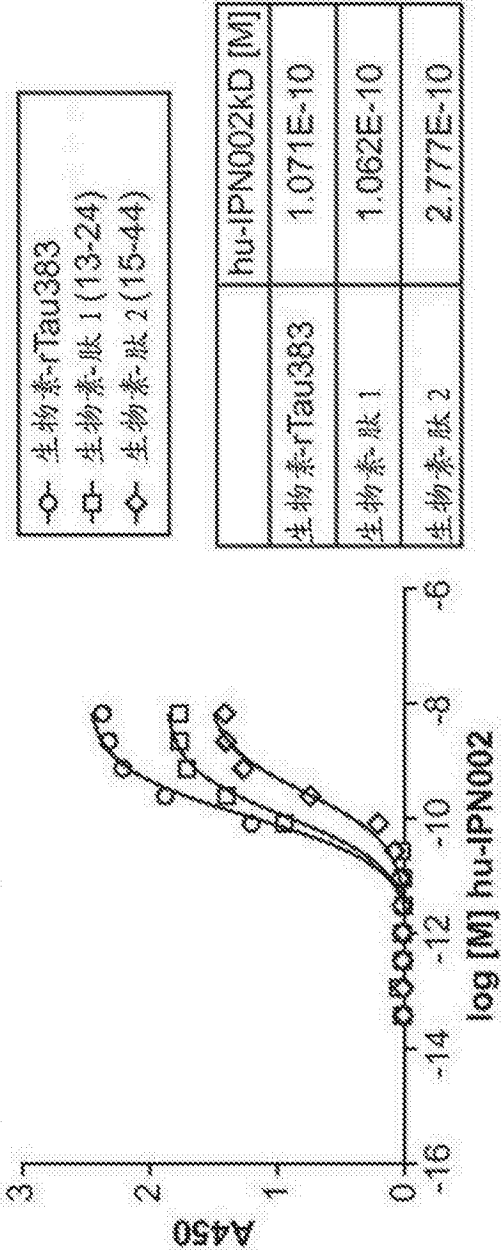


图27

合成的Tau肽:

肽 1: Biotin-ahx-¹³DEAGTYGLGDRK²⁴ (SEQ ID NO: 49)

肽 2: Biotin-ahx-¹⁵AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDDAGLK⁴⁴ (SEQ ID NO: 50)

图相 - Tau 肽与 hu-IPN002

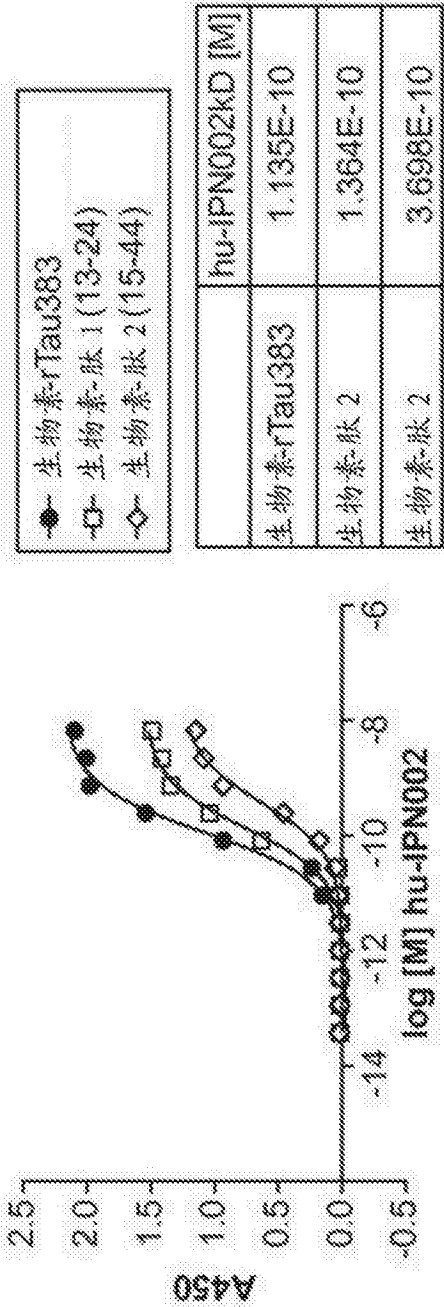


图28

用 hu-IPN002 的结合测定法

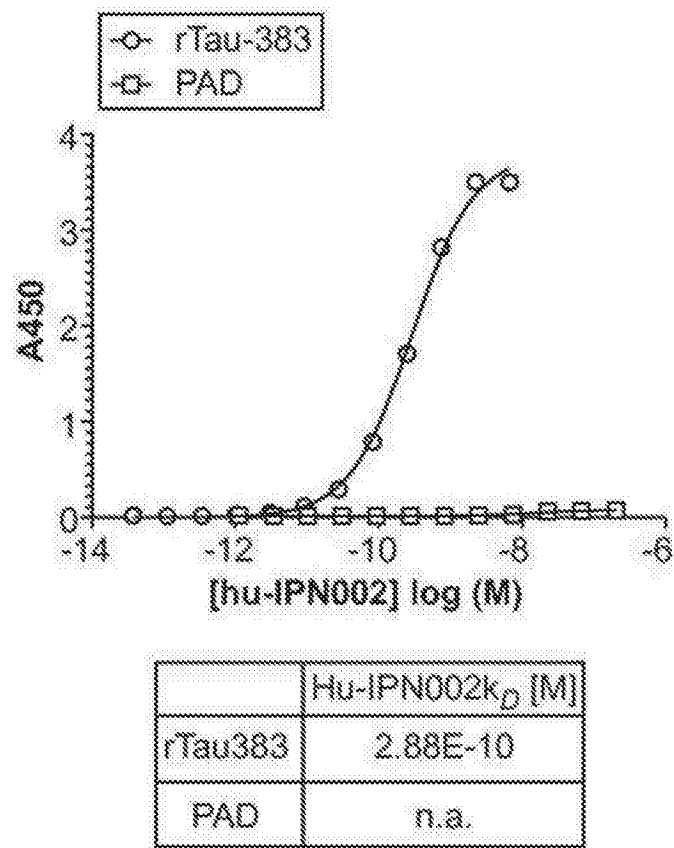
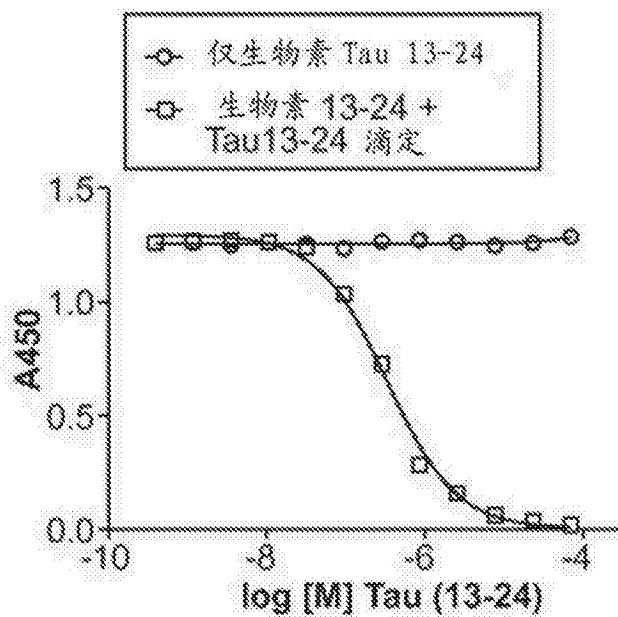


图29

生物素-Tau (13-24) 与 Tau (13-24) 对 hu-
IPN002 的竞争测定法



生物素-Tau (15-44) 与 Tau (15-44)
对 hu-IPN002 的竞争测定法

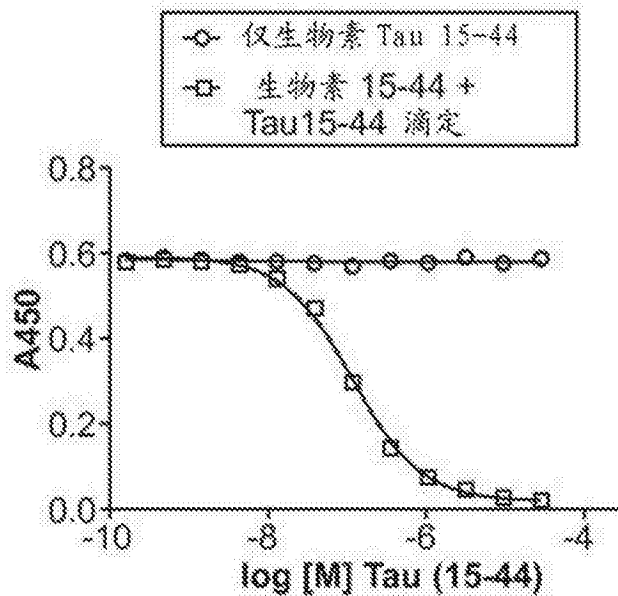


图30

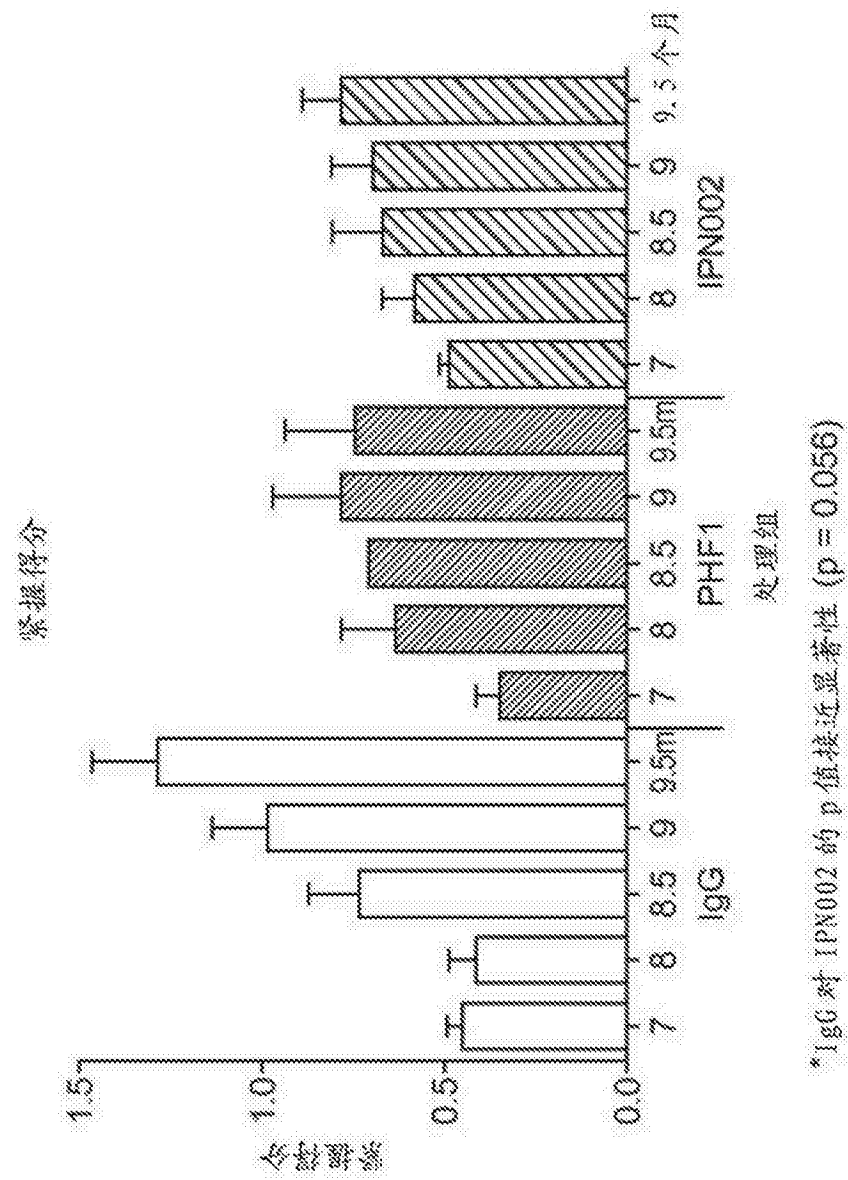


图31

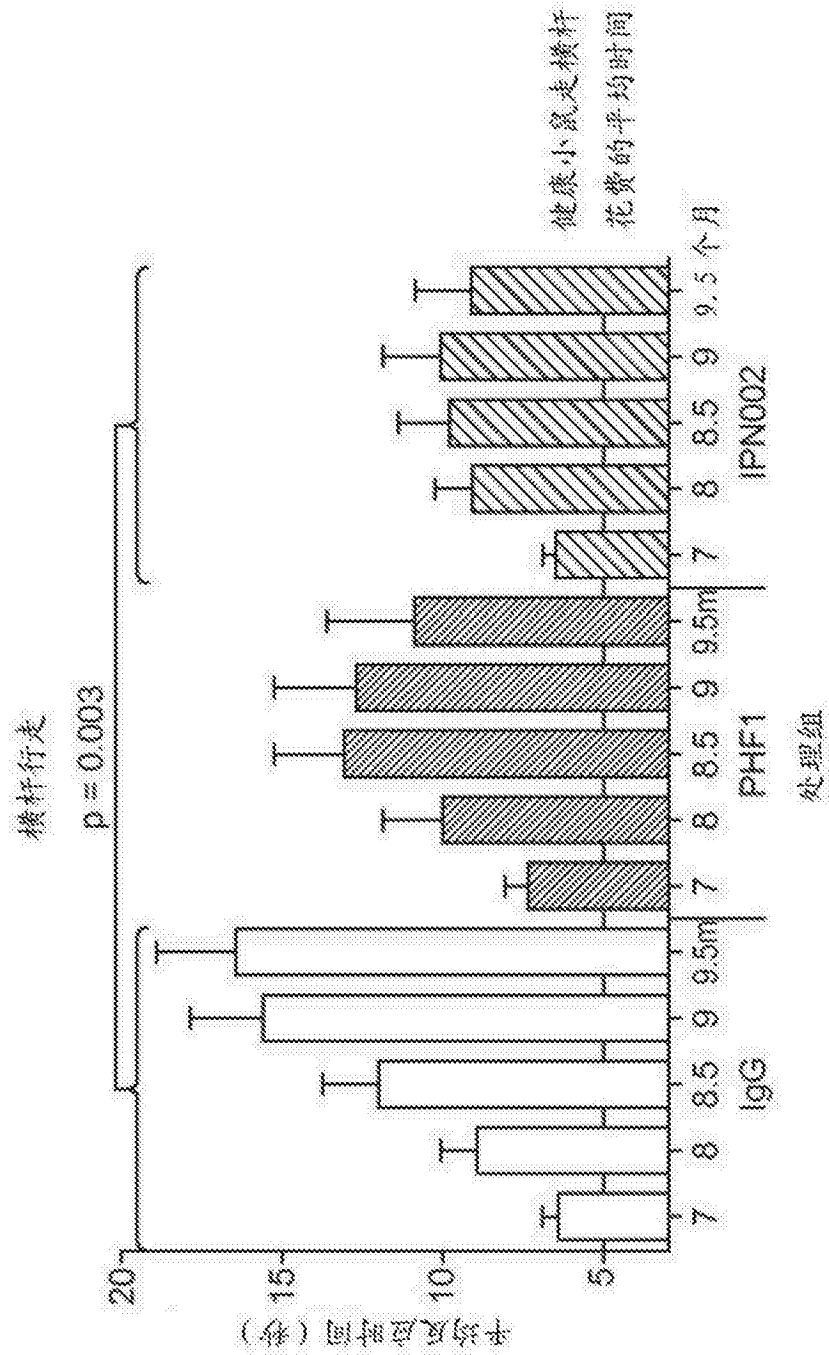


图32

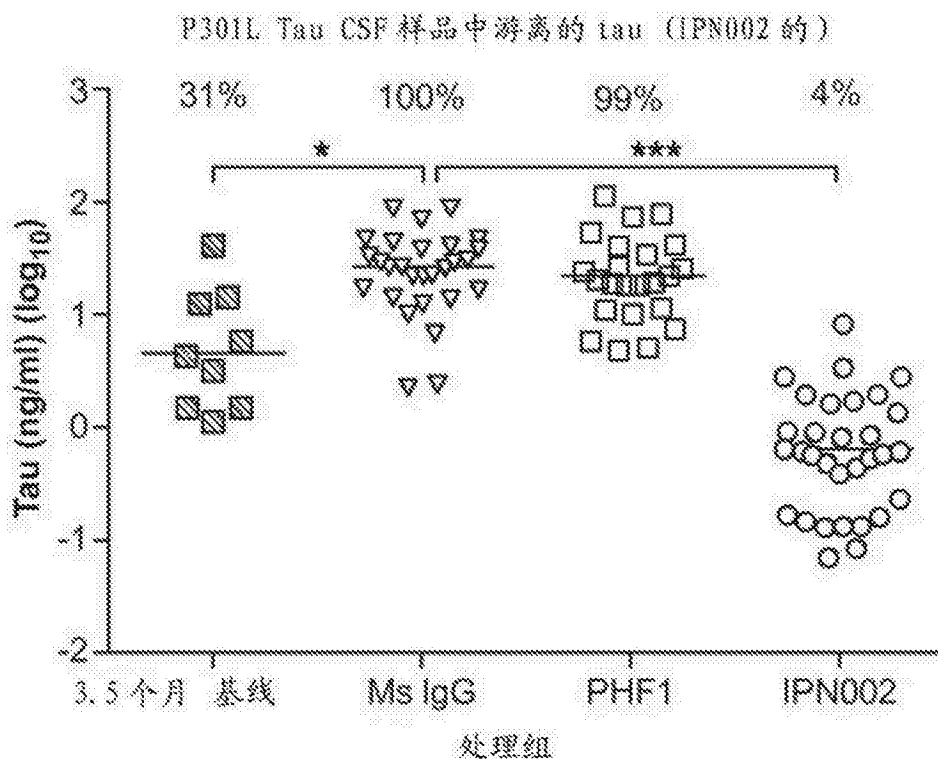
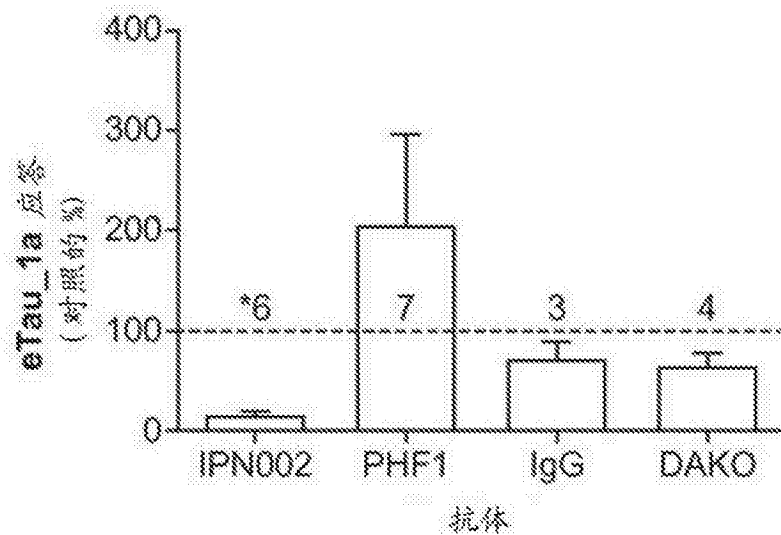


图33

抗体对 eTau 1a 应答的抑制



*图中的数值代表测试每种抗体的神经元的数目

图34

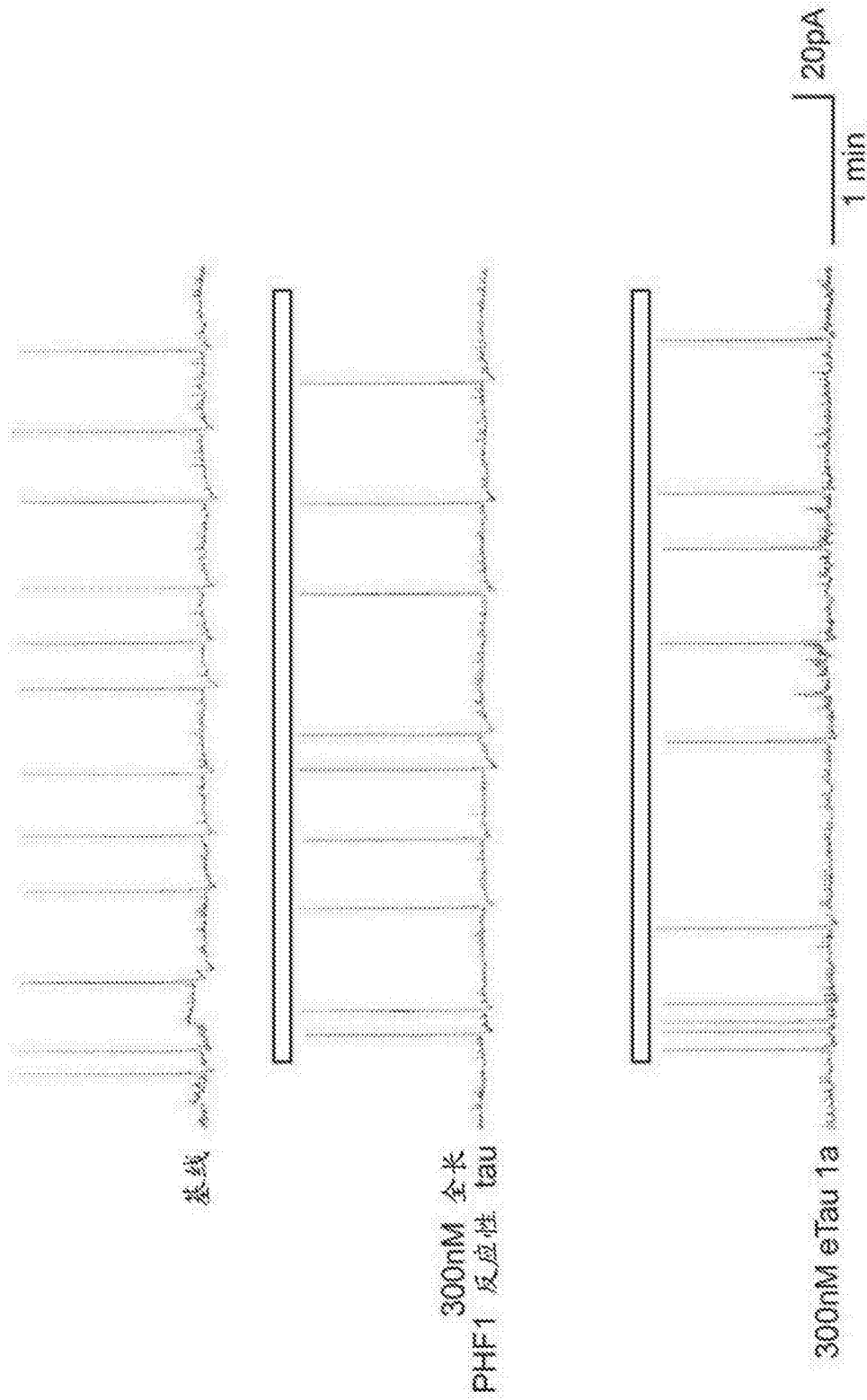


图35

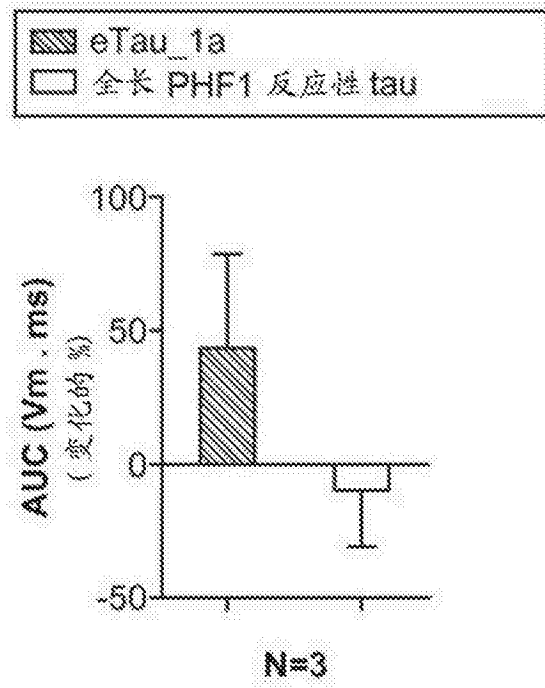


图36

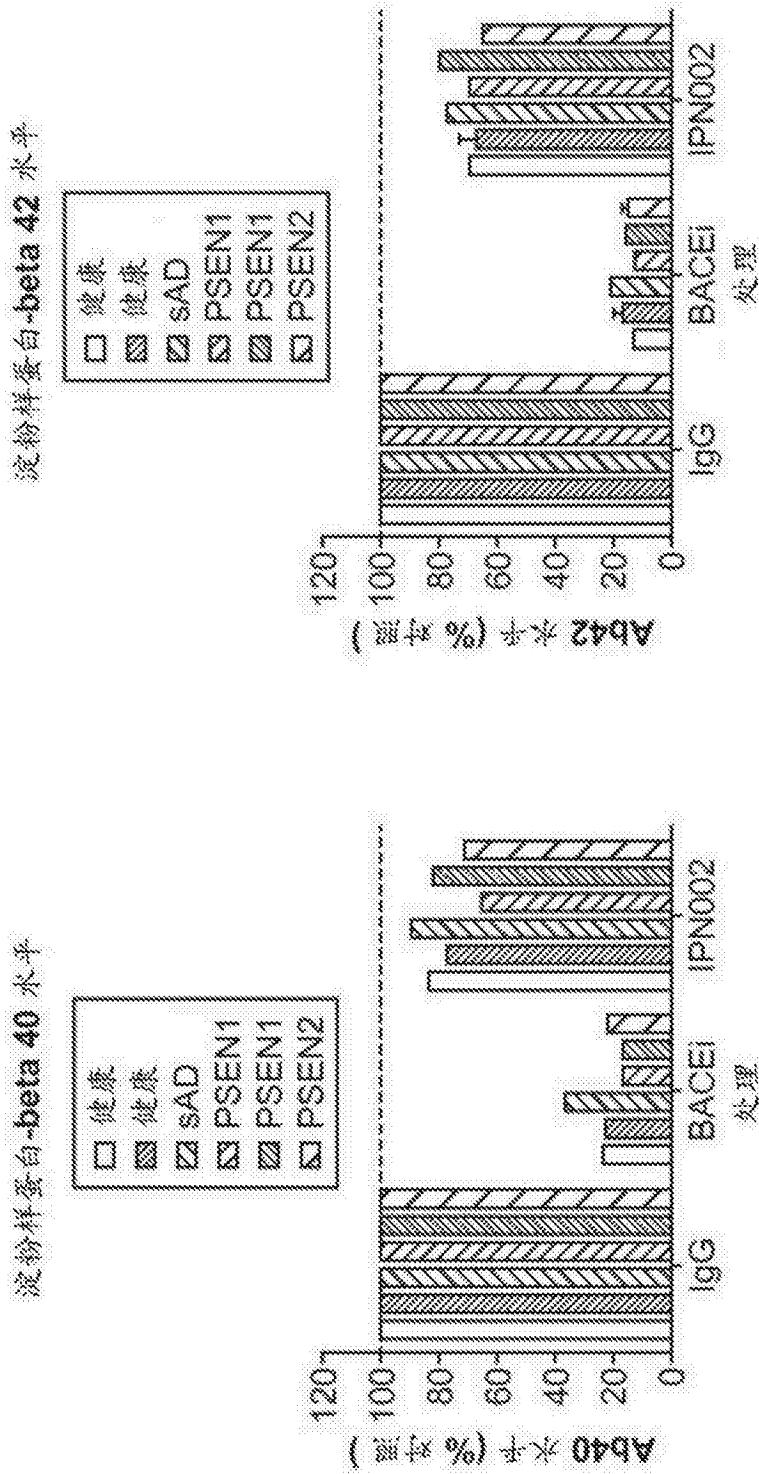


图37

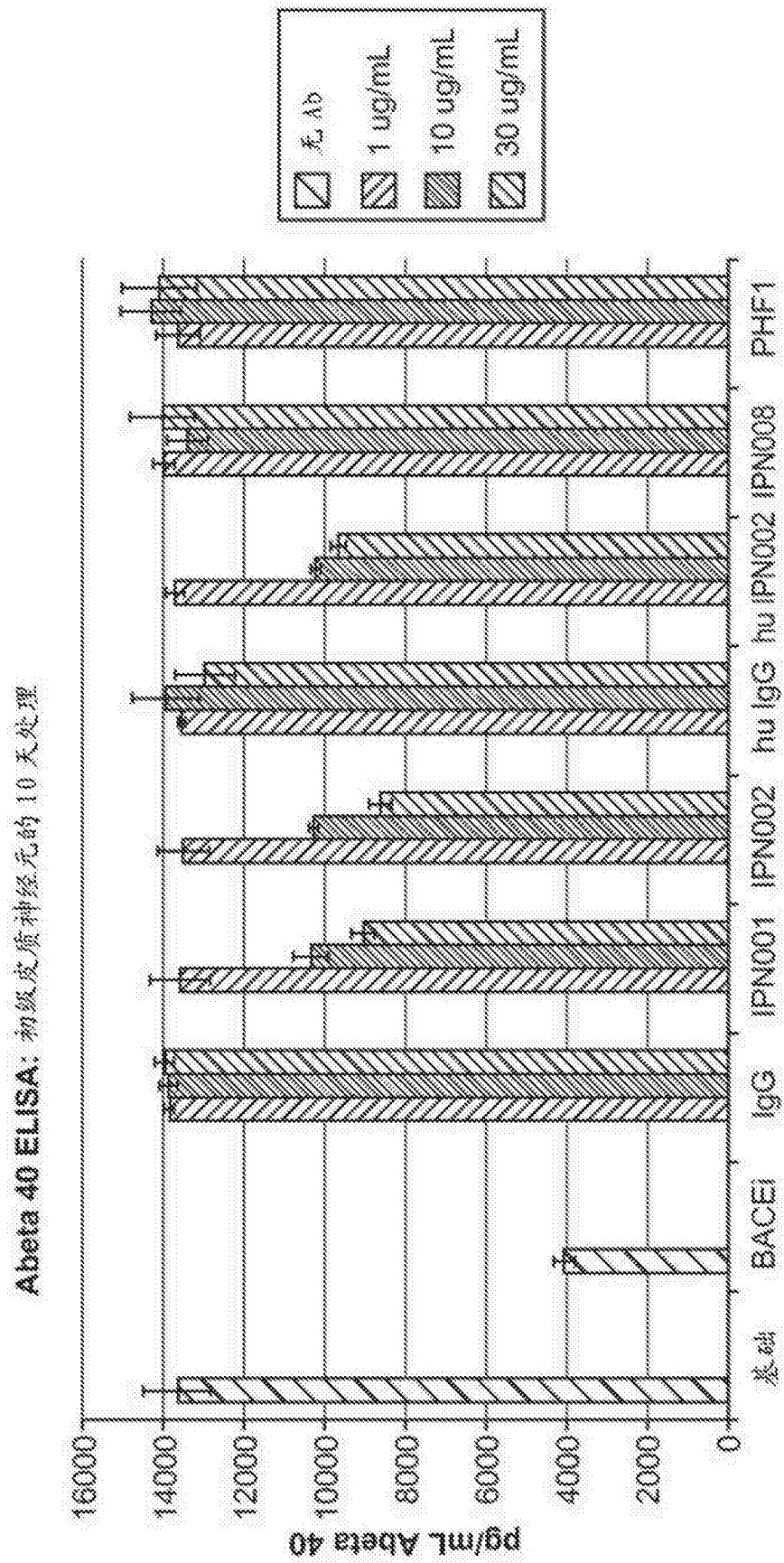


图38

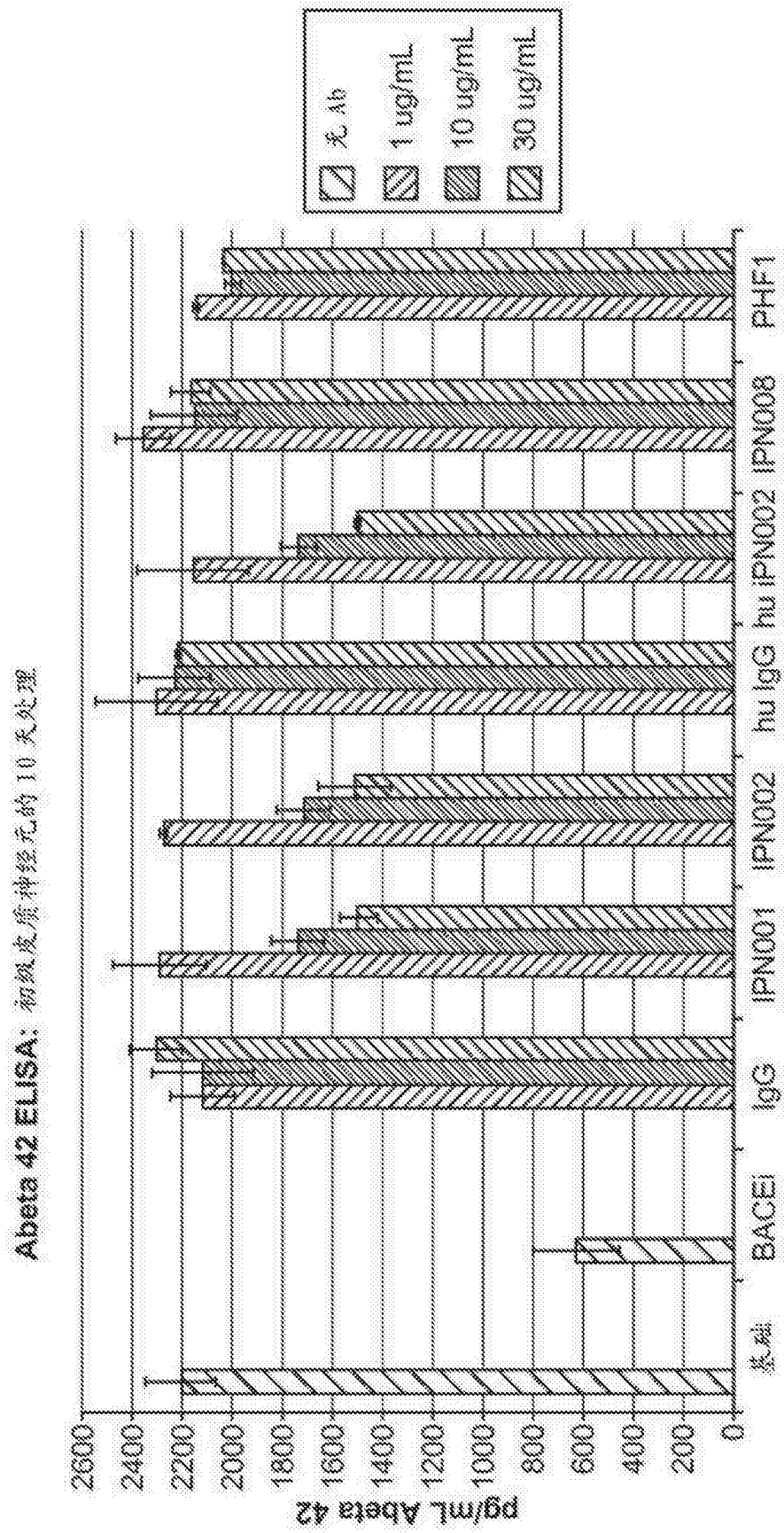


图39

生物素-ahx-¹³DHAGTYGLCDRK¹⁴ (SEQ ID NO: 49)
生物素-ahx-¹³AGTYGLCDRK¹⁴ (SEQ ID NO: 51)
生物素-ahx-¹³AGTYGLCDRKDQGGYTMHQDQEGTDAGLK¹⁴ (SEQ ID NO: 50)
生物素-ahx-¹³AGTY (磷酸) GLCDRK¹⁴ (SEQ ID NO: 52)

结合测定法: Tau 肽与 hu-IPN002

最大响应的 %

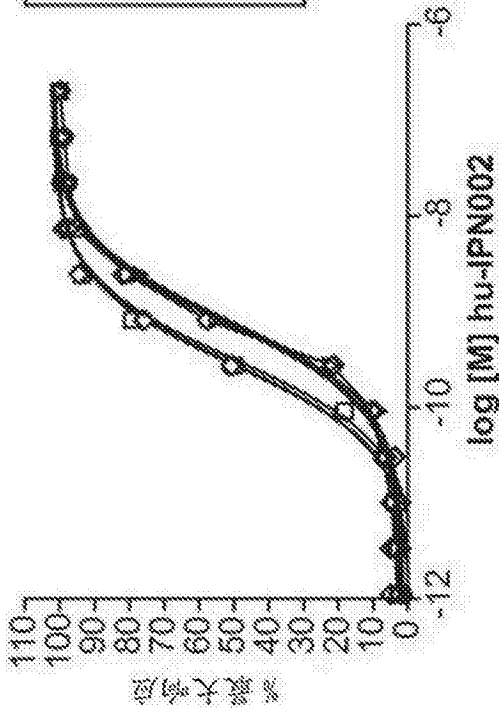


图40

样品	K _D [M]
生物素-rTau383	2.83E-10
生物素-eTau 4	2.89E-10
生物素-Tau 13-24	3.18E-10
生物素-Tau 15-24	7.54E-10
生物素-Tau 15-44	8.13E-10
生物素-Tau 15-24 磷酸	7.68E-10

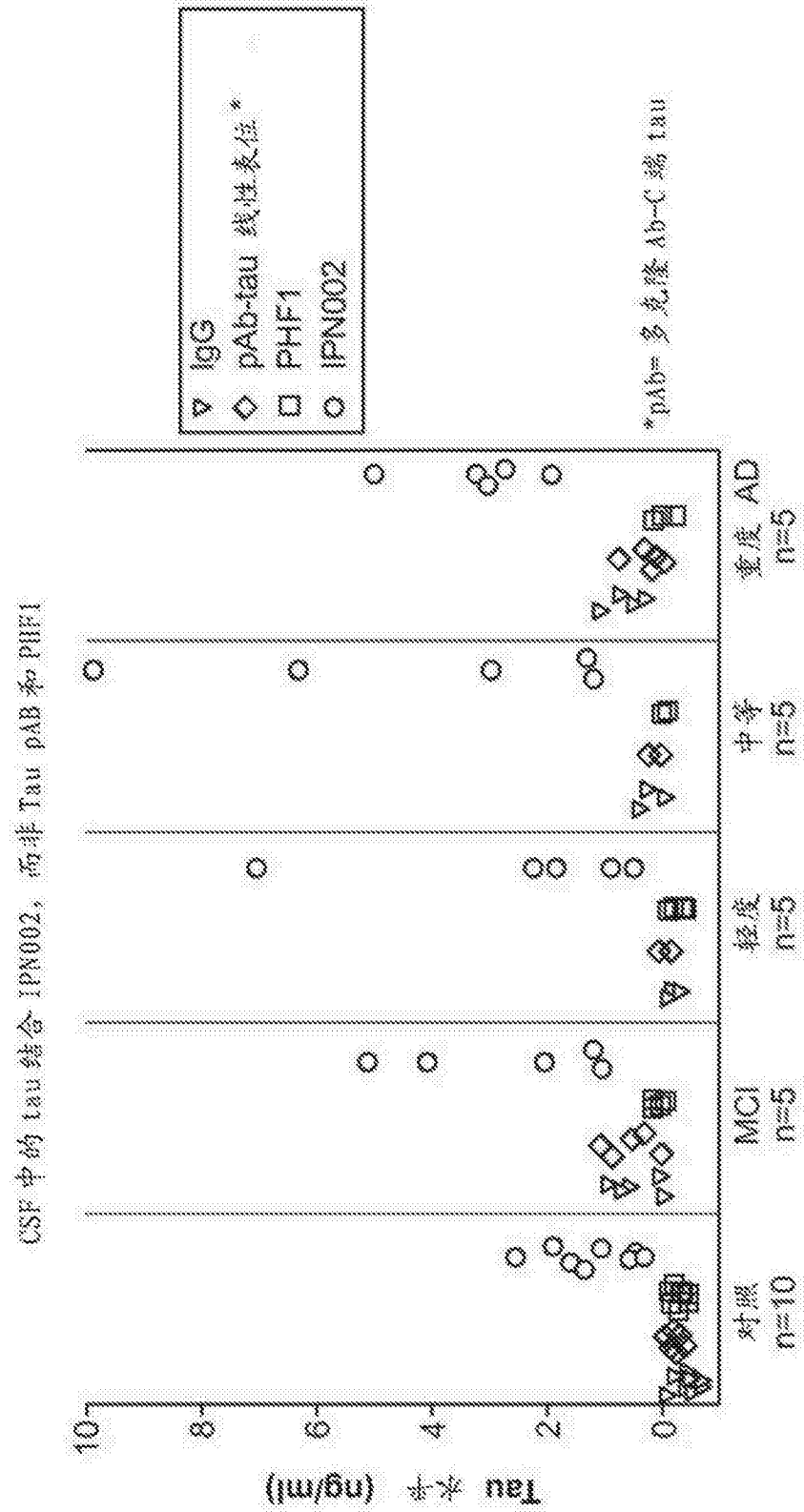


图42

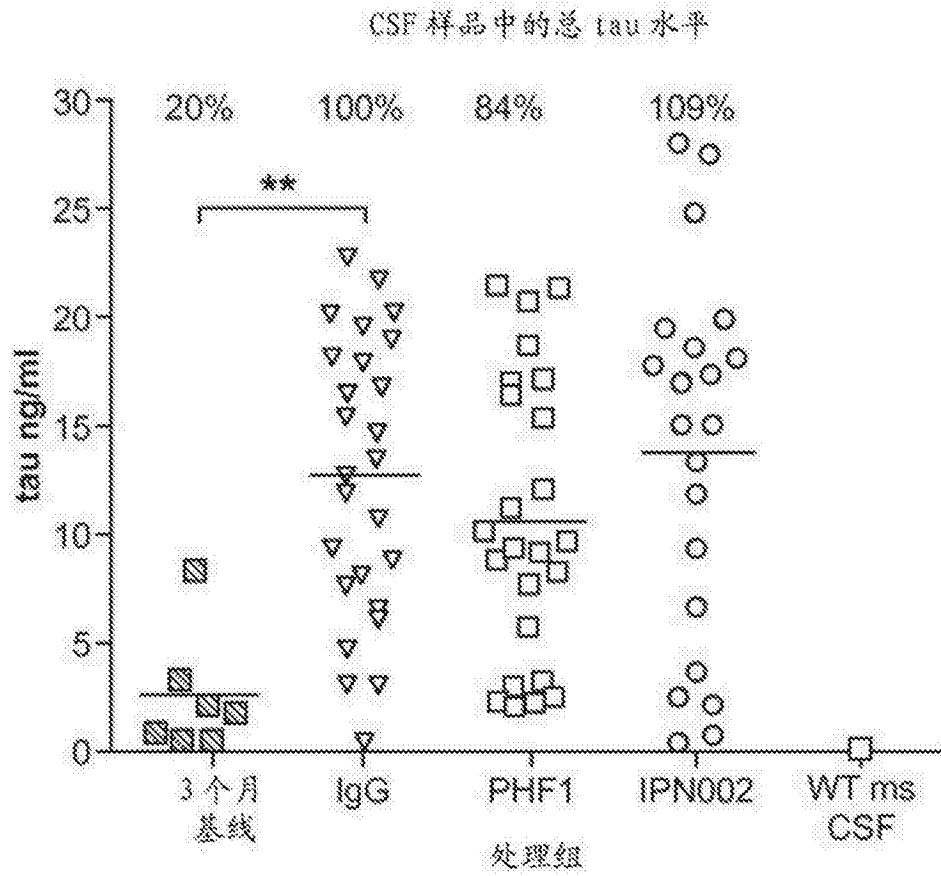


图43

* $p < 0.05$
 ** $p < 0.01$
 *** $p < 0.001$
 **** $p < 0.0001$

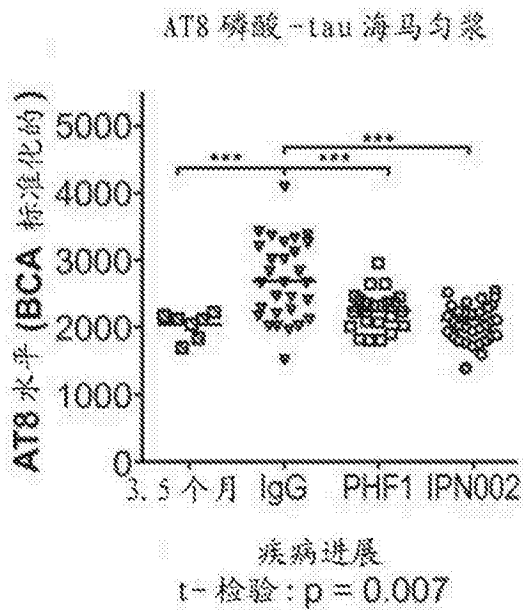


图 44A

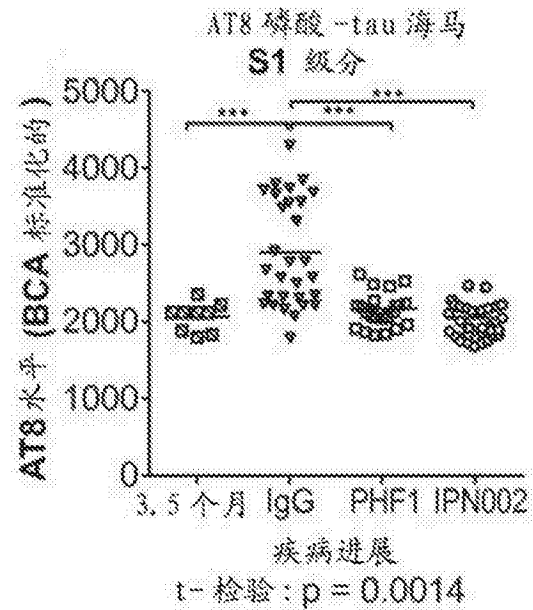


图 44B

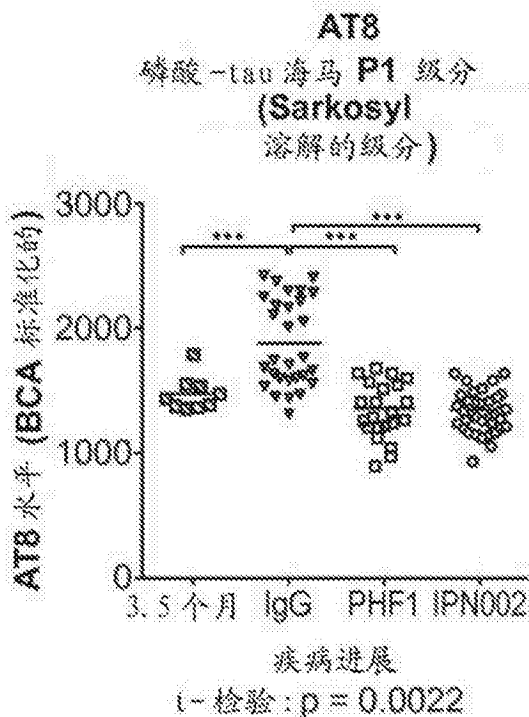


图 44C

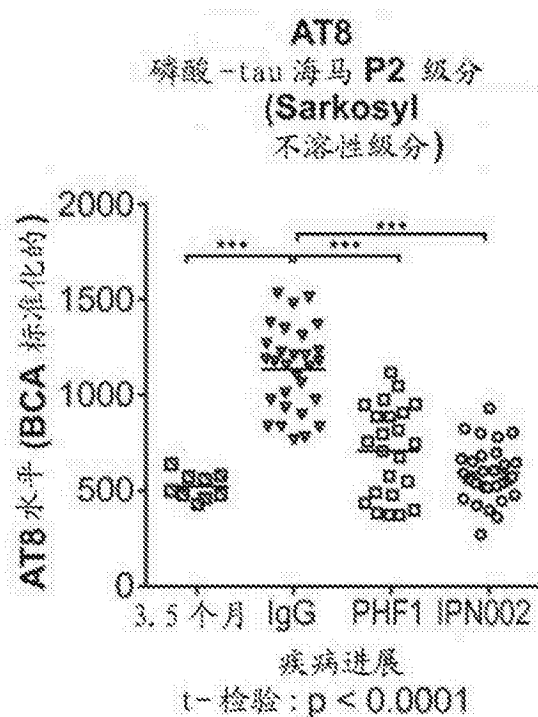


图 44D

单因素 ANOVA,

接着是 Dunnett 多重比较检验

*=p<.05

**=p<.01

***=p<.001

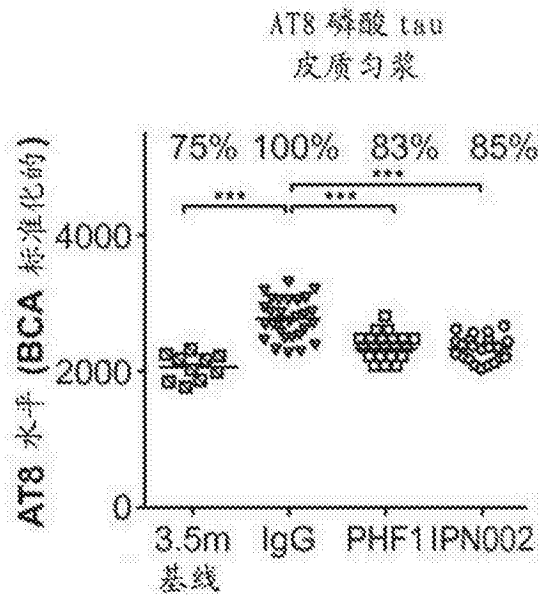


图 44E

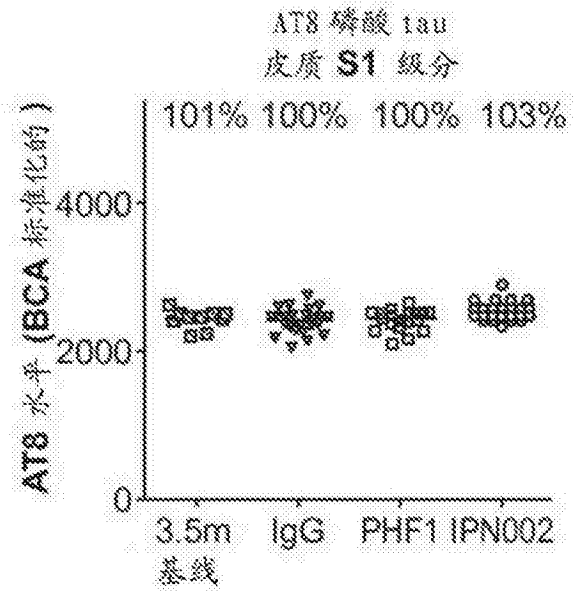


图 44F

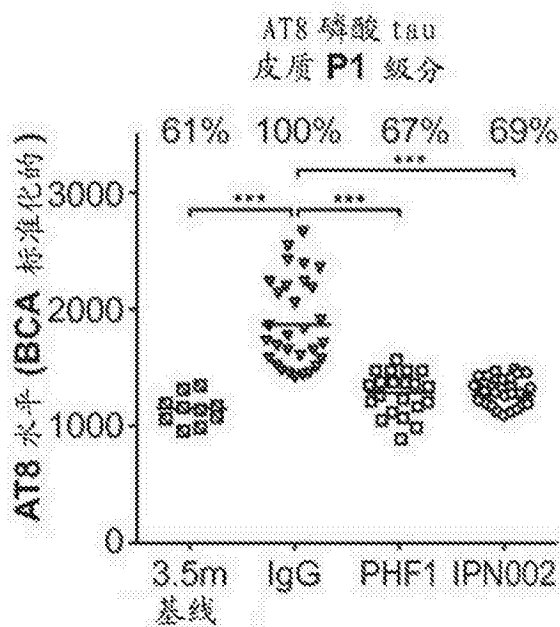


图 44G

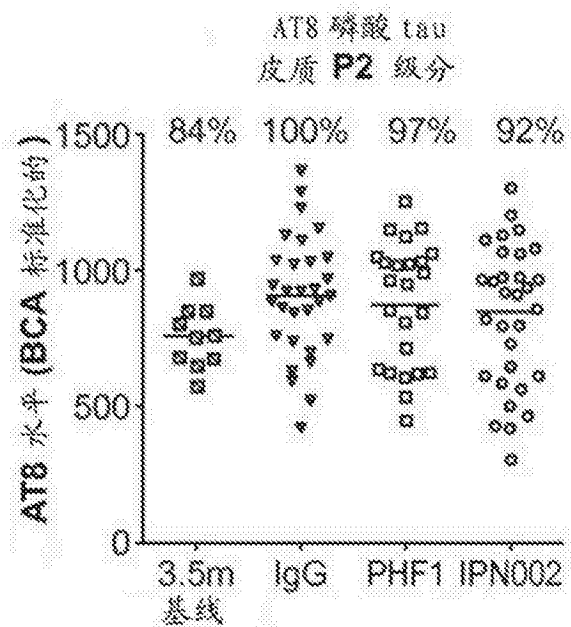


图 44H

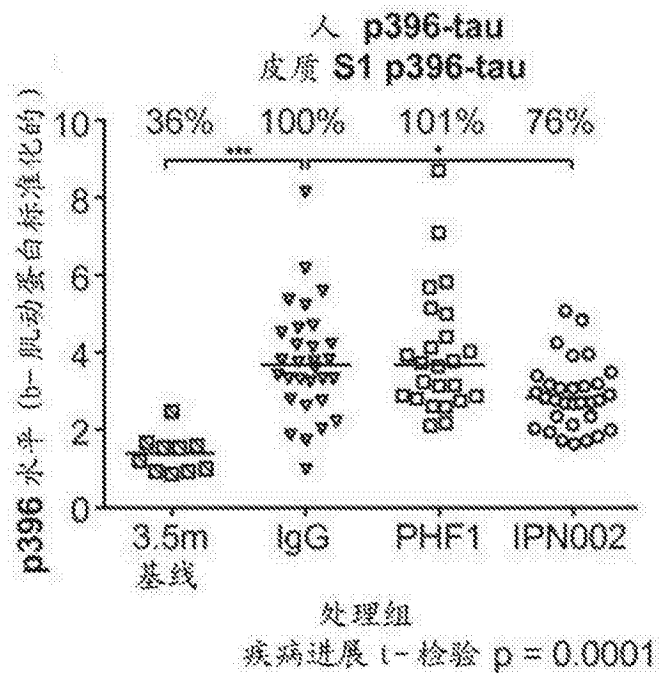


图45A

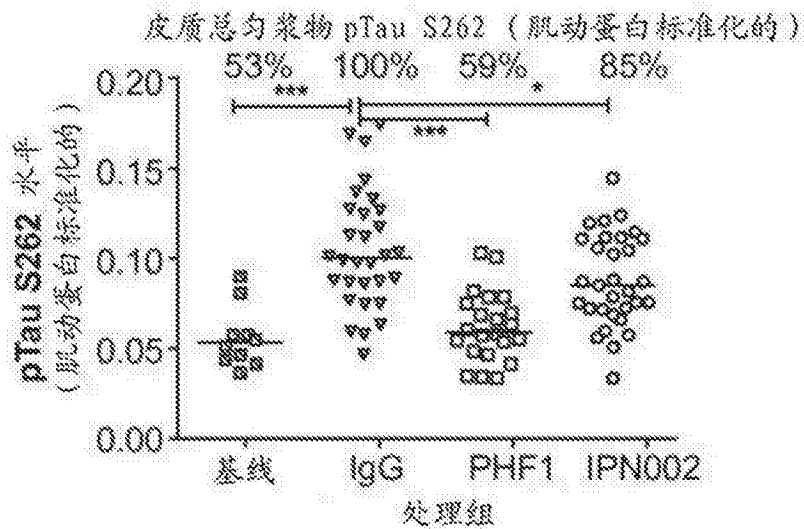


图45B

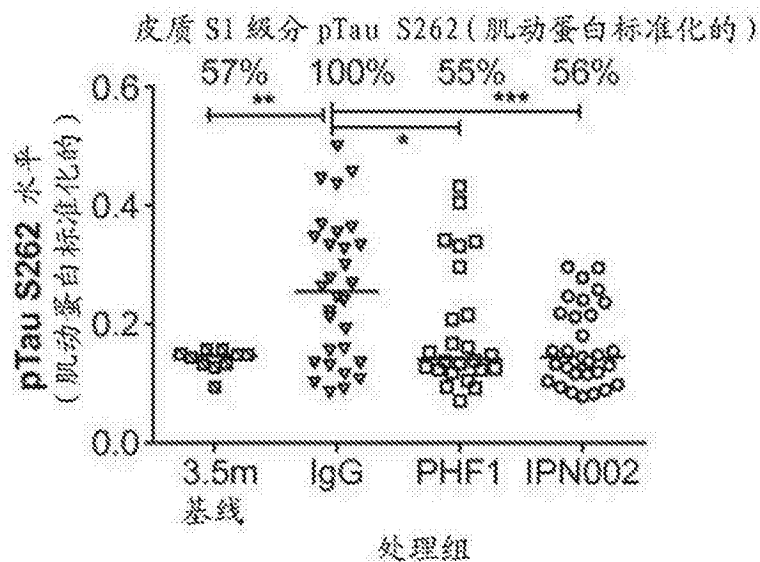


图45C

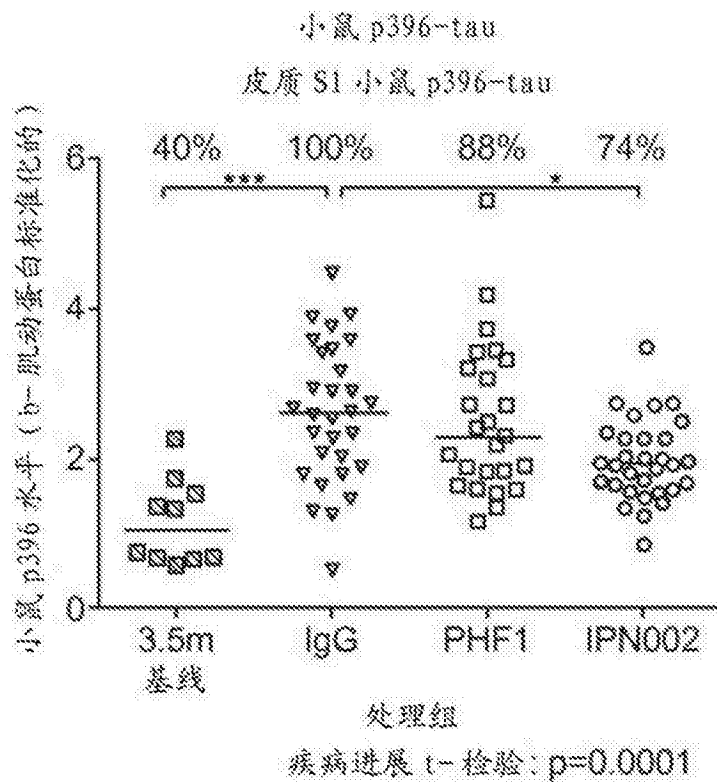


图45D

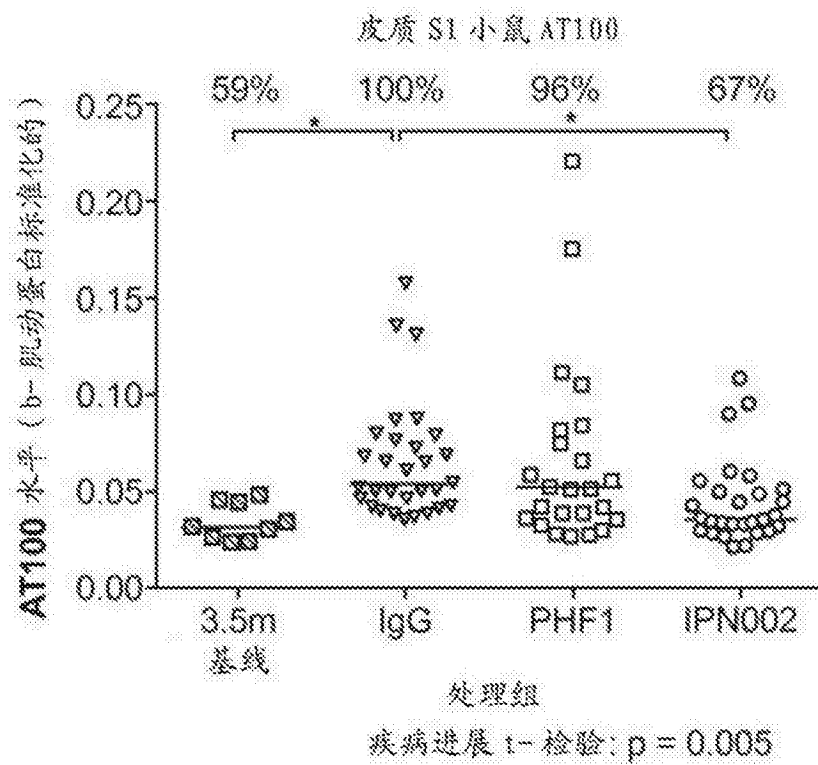


图45E

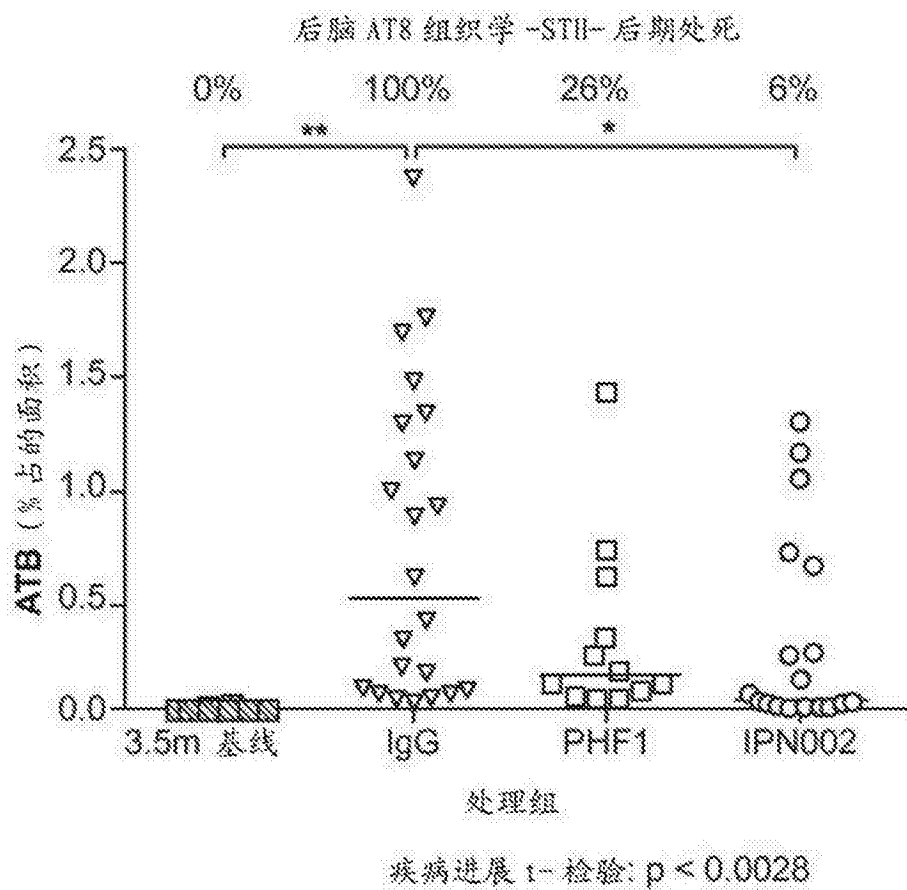


图46

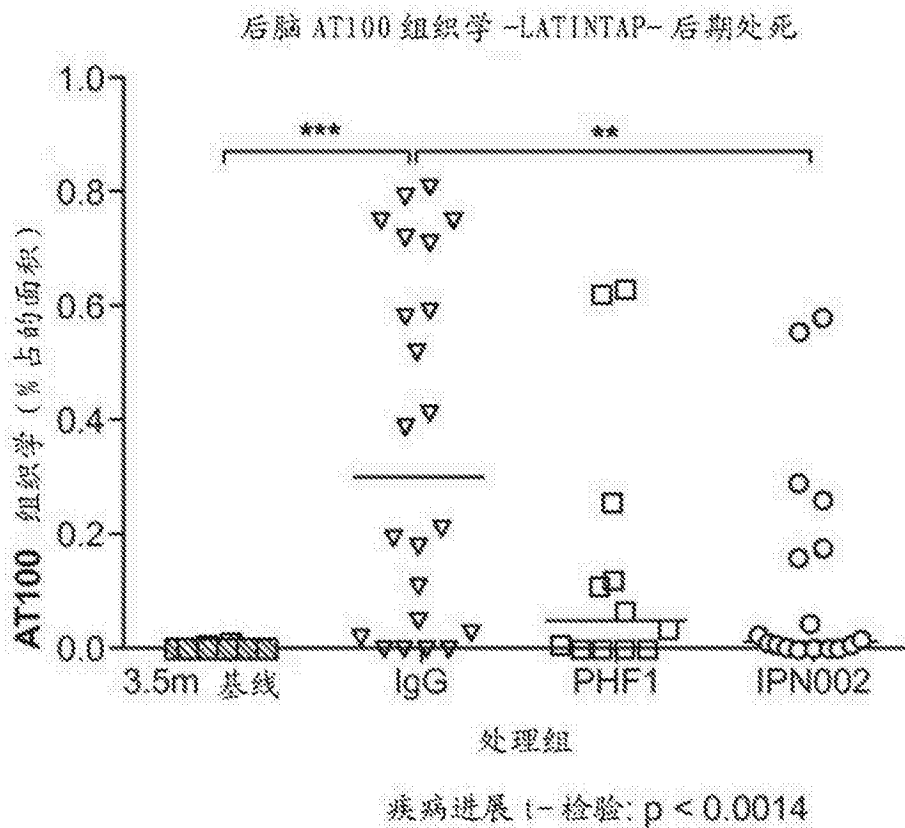


图47

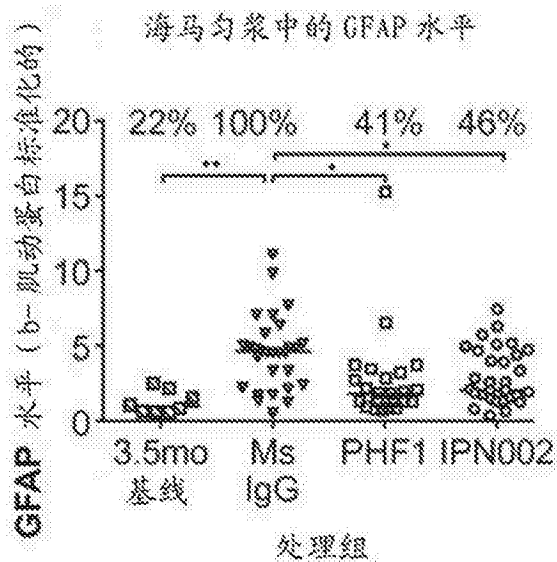


图48A

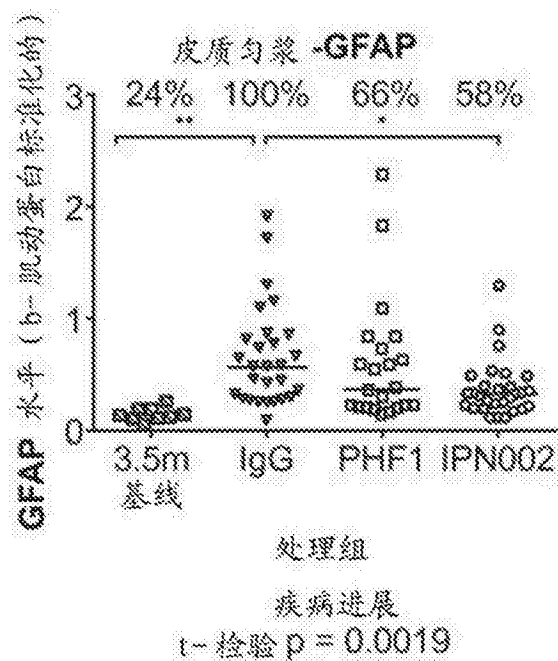


图48B

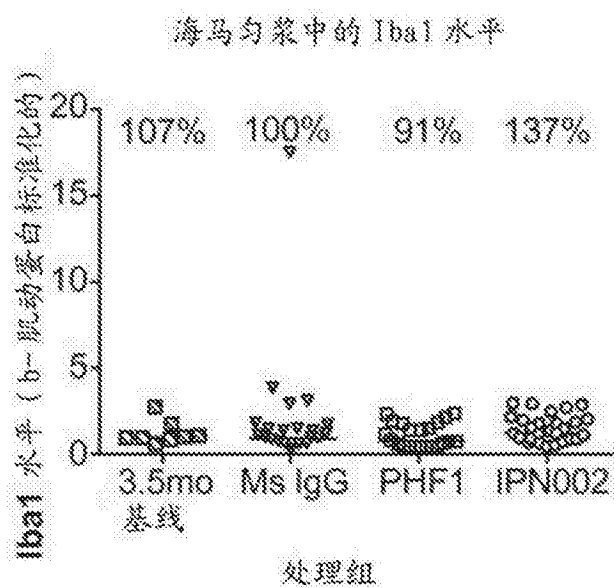


图49A

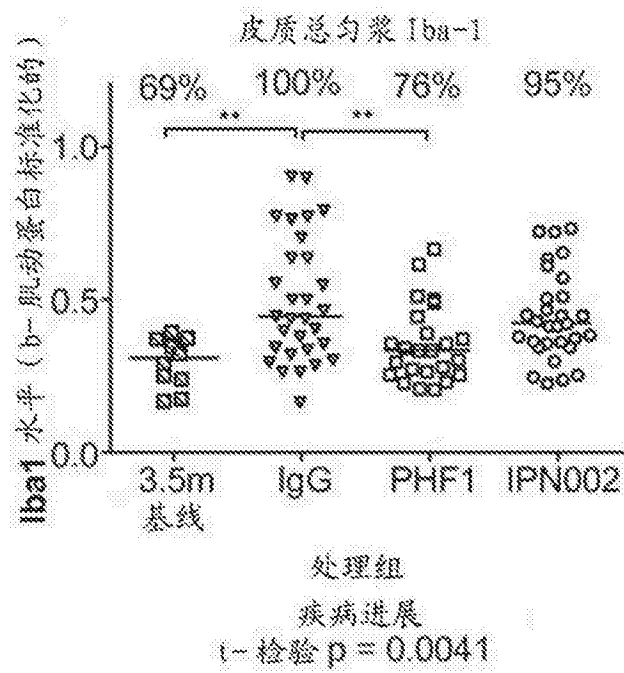


图49B

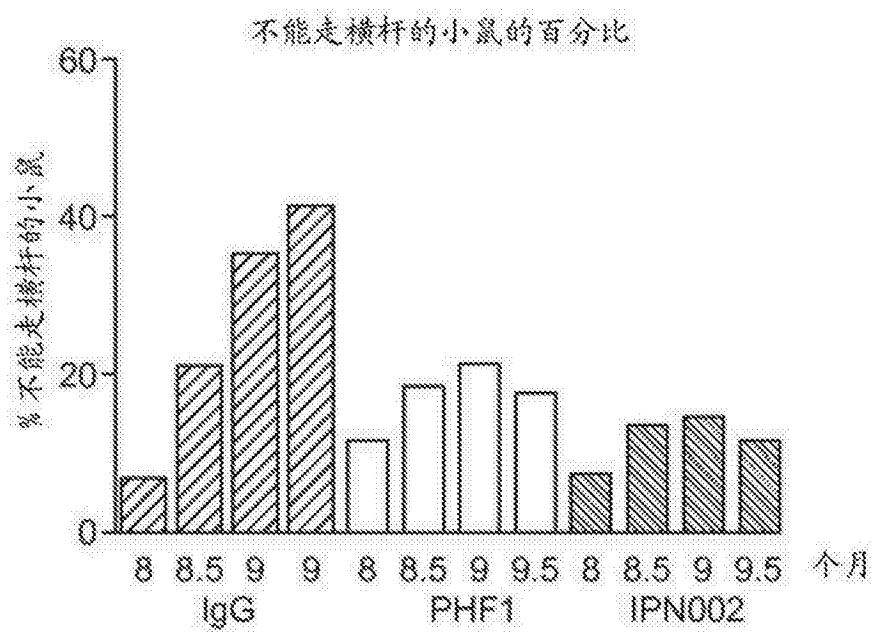
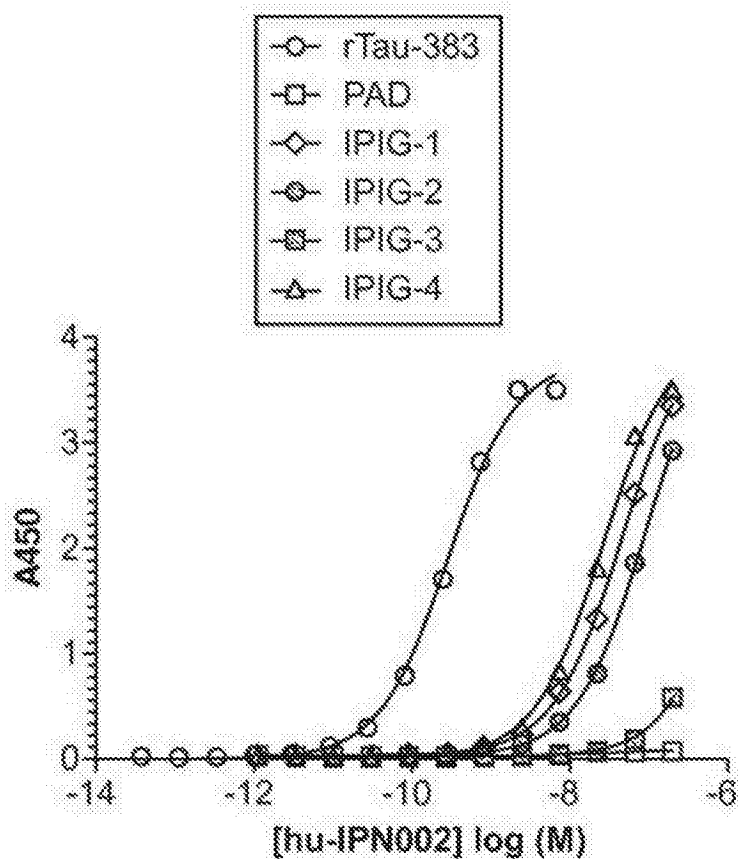


图51

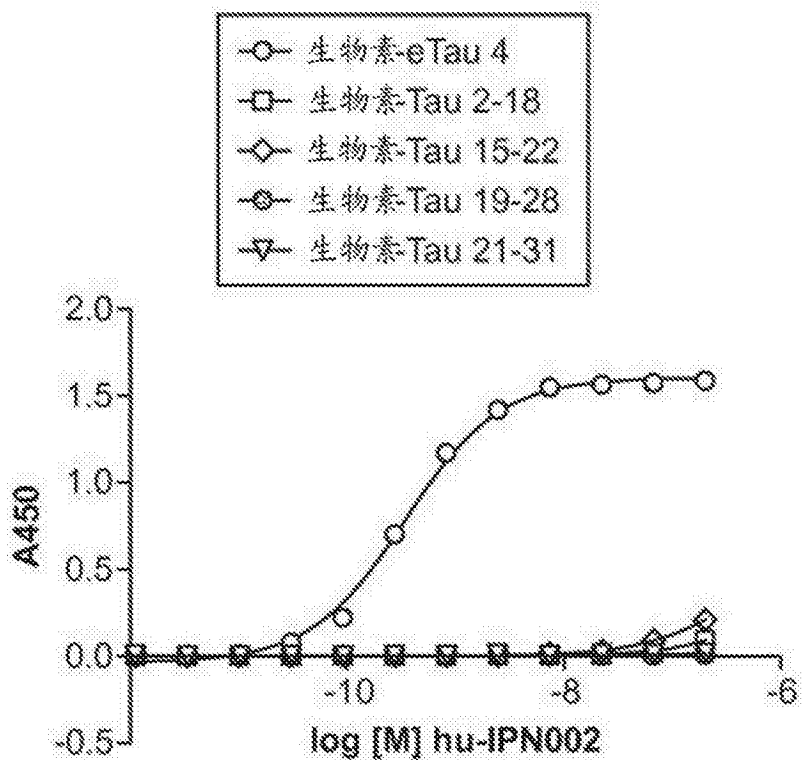
用 hu-IPN002 的结合测定法



	hu-IPN002 K_D [M]
rTau-383	2.88E-10
PAD (2-18)	n.a.
IPIG-1 (9-24)	4.52E-08
IPIG-2 (13-24)	9.03E-08
IPIG-3 (15-22)	n.a.
IPIG-4 (15-44)	2.65E-08

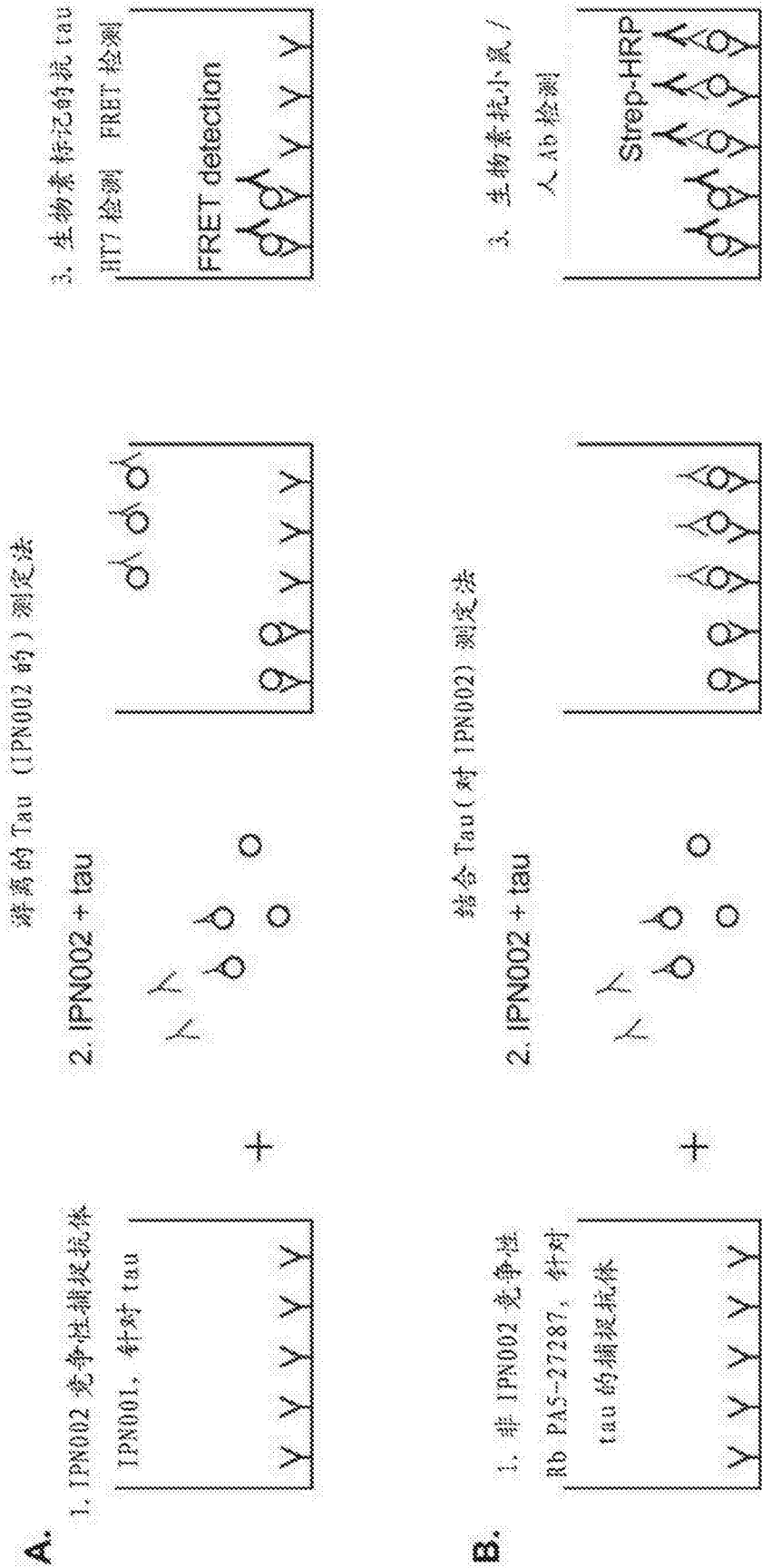
图52

结合测定法: Tau 肽与 hu-IPN002

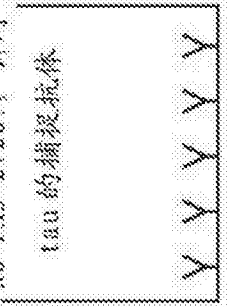


样品	K_D [M]
生物素-eTau 4	3.447E-10
生物素-Tau 2-18	n.a.
生物素-Tau 15-22	不完全
生物素-Tau 19-28	n.a.
生物素-Tau 21-31	n.a.

图53



1. 非 IPN002 竞争性
Rb PA5-27287, 针对
tau 的捕捉抗体



2. IPN002 + tau



3. 生物素抗小鼠 /
人 Ab 检测

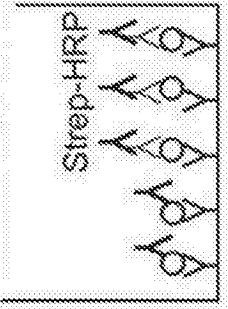


图54