



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108137679 B

(45) 授权公告日 2022.07.19

(21) 申请号 201680057424.9

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

(22) 申请日 2016.08.11

专利代理人 张波 王建秀

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108137679 A

(51) Int.CI.

C07K 16/18 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.06.08

(56) 对比文件

CN 102596221 A, 2012.07.18

CN 104781278 A, 2015.07.15

CN 104736185 A, 2015.06.24

CN 204439640 U, 2015.07.01

CN 102459333 A, 2012.05.16

Jiaping Gu et al. Two Novel Tau

Antibodies Targeting the 396/404 Region
Are Primarily Taken Up by Neurons and
Reduce Tau Protein Pathology. 《THE JOURNAL
OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2013, 第288卷 (第
46期),

(30) 优先权数据

62/204,711 2015.08.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/046520 2016.08.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/027691 EN 2017.02.16

(73) 专利权人 纽约大学

地址 美国纽约

(72) 发明人 E·西古德松

审查员 杨添淇

权利要求书5页 说明书57页

序列表22页 附图18页

(54) 发明名称

对Tau的^{p}Ser404表位有选择性的基于抗体的分子和它们在诊断和治疗Tau疾病中的用途

(57) 摘要

本发明涉及基于抗体的分子(包括单结构域抗体片段、scFv分子、抗体、抗体片段、双抗体和其表位-结合结构域),其能够免疫特异性和选择性结合Tau的^{p}Ser404表位。这类基于抗体的分子可用于检测生物样品中的病理Tau蛋白质构象异构体(如果存在),特别是与阿尔茨海默病或其他tau疾病的诊断和/或治疗结合,从而提供对阿尔茨海默病和其他Tau病理的诊断。本发明基于抗体的分子尤其可用作阿尔茨海默病和相关Tau疾病的诊断标记物并且用作用于治疗这类病况的药物组合物。

B

CN 108137679

1. 一种分子, 其是抗体或其包含所述抗体的表位-结合片段, 其中所述分子包含:

(I) 抗体轻链可变结构域, 其包括:

- (a) 轻链CDR1, 其氨基酸序列是SEQ ID NO:10;
 - (b) 轻链CDR2, 其氨基酸序列是SEQ ID NO:11; 和
 - (c) 轻链CDR3, 其氨基酸序列是SEQ ID NO:12; 以及
- (II) 抗体重链可变结构域, 其包括
- (d) 重链CDR1, 其氨基酸序列是SEQ ID NO:14;
 - (e) 重链CDR2, 其氨基酸序列是SEQ ID NO:15; 和
 - (f) 重链CDR3, 其氨基酸序列是SEQ ID NO:16;

其中所述分子能够免疫特异性结合至Tau的^{p}Ser404表位, 其中所述表位存在于多肽的Tau肽部分上, 其中所述Tau肽包括Tau 386-408的氨基酸序列(^{p}Ser396/^{p}Ser404) (SEQ ID NO:8): TDHGAEIVYK^{p}SPVSGDT^{p}SPRHL,

其中在其11位和19位的残基是磷酸丝氨酸; 并且

其中所述分子另外能够以相较于结合至非磷酸化的Tau更高的亲和力结合至磷酸化的Tau。

2. 根据权利要求1所述的分子, 其中所述分子结合至溶解的PHF。

3. 根据权利要求1所述的分子, 其中所述分子是人源化抗体或包含人源化抗体的表位-结合片段。

4. 根据权利要求1所述的分子, 其中所述分子是scFv或双抗体。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的分子, 其中所述分子在外周注射至接受者中后与Tau聚集体共定位。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的分子, 其中所述表位-结合片段包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变结构域和/或具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的重链可变结构域。

7. 根据权利要求5所述的分子, 其中所述表位-结合片段包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变结构域和/或具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的重链可变结构域。

8. 根据权利要求6所述的分子, 其中所述分子是包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的scFv。

9. 根据权利要求7所述的分子, 其中所述分子是包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的scFv。

10. 根据权利要求1-4中任一项所述的分子, 其被可检测地标记。

11. 根据权利要求10所述的分子, 其中所述可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记。

12. 根据权利要求5所述的分子, 其被可检测地标记。

13. 根据权利要求12所述的分子, 其中所述可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记。

14. 根据权利要求6所述的分子, 其被可检测地标记。

15. 根据权利要求14所述的分子, 其中所述可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记。

16. 根据权利要求7所述的分子,其被可检测地标记。
17. 根据权利要求16所述的分子,其中所述可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记。
18. 根据权利要求10所述的分子在制备用于检测或测量接受受试者的脑、脑脊液、血液、血清或血浆中所述磷酸化的Tau蛋白质的存在或量的试剂中的用途。
19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述检测或测量包括与所述磷酸化的Tau蛋白质结合的所述分子的体内成像或离体成像。
20. 根据权利要求18所述的用途,其中所述检测或测量用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病。
21. 根据权利要求12所述的分子在制备用于检测或测量接受受试者的脑、脑脊液、血液、血清或血浆中所述磷酸化的Tau蛋白质的存在或量的试剂中的用途。
22. 根据权利要求21所述的用途,其中所述检测或测量包括与所述磷酸化的Tau蛋白质结合的所述分子的体内成像或离体成像。
23. 根据权利要求21所述的用途,其中所述检测或测量用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病。
24. 根据权利要求14所述的分子在制备用于检测或测量接受受试者的脑、脑脊液、血液、血清或血浆中所述磷酸化的Tau蛋白质的存在或量的试剂中的用途。
25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述检测或测量包括与所述磷酸化的Tau蛋白质结合的所述分子的体内成像或离体成像。
26. 根据权利要求24所述的用途,其中所述检测或测量用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病。
27. 根据权利要求16所述的分子在制备用于检测或测量接受受试者的脑、脑脊液、血液、血清或血浆中所述磷酸化的Tau蛋白质的存在或量的试剂中的用途。
28. 根据权利要求27所述的用途,其中所述检测或测量包括与所述磷酸化的Tau蛋白质结合的所述基于抗体的分子的体内成像或离体成像。
29. 根据权利要求27所述的用途,其中所述检测或测量用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病。
30. 一种用于治疗受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的体内药物,其中所述药物包含有效治疗所述阿尔茨海默病或其他Tau疾病的量的根据权利要求1-4中任一项所述的分子,以及一种或多种载体、稀释剂和/或稳定剂。
31. 根据权利要求30所述的体内药物在制备用于治疗所述受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的药物中的用途。
32. 根据权利要求31所述的用途,其中所述受试者是人。
33. 一种用于治疗受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的体内药物,其中所述药物包含有效治疗所述阿尔茨海默病或其他Tau疾病的量的根据权利要求5所述的分子,以及一种或多种载体、稀释剂和/或稳定剂。
34. 根据权利要求33所述的体内药物在制备用于治疗所述受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的药物中的用途。
35. 根据权利要求34所述的用途,其中所述受试者是人。

36. 一种用于治疗受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的体内药物,其中所述药物包含有效治疗所述阿尔茨海默病或其他Tau疾病的量的根据权利要求6所述的分子,以及一种或多种载体、稀释剂和/或稳定剂。

37. 根据权利要求36所述的体内药物在制备用于治疗所述受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的药物中的用途。

38. 根据权利要求37所述的用途,其中所述受试者是人。

39. 一种用于治疗受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的体内药物,其中所述药物包含有效治疗所述阿尔茨海默病或其他Tau疾病的量的根据权利要求7所述的分子,以及一种或多种载体、稀释剂和/或稳定剂。

40. 根据权利要求39所述的体内药物在制备用于治疗所述受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的药物中的用途。

41. 根据权利要求40所述的用途,其中所述受试者是人。

42. 一种试剂盒,其用于检测或测量受试者的脑中所述磷酸化的Tau蛋白质的存在或量,或用于诊断受试者中的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病,其中所述试剂盒包含根据权利要求1-4中任一项所述的分子。

43. 一种试剂盒,其用于检测或测量受试者的脑中所述磷酸化的Tau蛋白质的存在或量,或用于诊断受试者中的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病,其中所述试剂盒包含根据权利要求5所述的分子。

44. 一种试剂盒,其用于检测或测量受试者的脑中所述磷酸化的Tau蛋白质的存在或量,或用于诊断受试者中的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病,其中所述试剂盒包含根据权利要求6所述的分子。

45. 一种试剂盒,其用于检测或测量受试者的脑中所述磷酸化的Tau蛋白质的存在或量,或用于诊断受试者中的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病,其中所述试剂盒包含根据权利要求7所述的分子。

46. 根据权利要求20所述的用途,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

47. 根据权利要求23所述的用途,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

48. 根据权利要求26所述的用途,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17

号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

49. 根据权利要求29所述的用途,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

50. 根据权利要求30所述的药物,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

51. 根据权利要求33所述的药物,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

52. 根据权利要求36所述的药物,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

53. 根据权利要求39所述的药物,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白

白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

54. 根据权利要求42所述的试剂盒,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

55. 根据权利要求43所述的试剂盒,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

56. 根据权利要求44所述的试剂盒,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

57. 根据权利要求45所述的试剂盒,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

对Tau的^[p] Ser404表位有选择性的基于抗体的分子和它们在 诊断和治疗Tau疾病中的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求美国专利申请系列号62/204,711 (2015年8月13日提交;待决) 的优先权,该申请通过引用以其整体并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院 (NIH) 授予的根据批准号NS077239、AG032611和AG020197在政府的支持下进行的。政府享有本发明的某些权利。

[0005] 序列表的参考

[0006] 根据37C.F.R.1.821以及下面的条款,本申请包括一个或多个序列表,所述序列表以计算机可读介质公开(文件名:1400-0009PCT_ST25.txt,2016年8月6日创建,大小是38,518字节),该文件通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0007] 本发明涉及基于抗体的分子(包括单结构域抗体片段、scFv分子、抗体、抗体片段、双抗体和其表位-结合结构域),其能够免疫特异性和选择性结合Tau的^[p] Ser404表位。这类基于抗体的分子可用于检测生物样品中的病理Tau蛋白质构象异构体(如果存在),尤其与阿尔茨海默病或其他Tau疾病的诊断和/或治疗相结合,从而提供对阿尔茨海默病和其他Tau病理的诊断。本发明的基于抗体的分子(尤其地,scFv分子)可尤其用作阿尔茨海默病和相关Tau疾病的诊断标记物,以及用作用于治疗这类病况的药物组合物。

背景技术

[0008] 阿尔茨海默病是痴呆的最常见的形式,其影响着全世界两千多万人。该疾病的诊断,尤其是在早期的诊断,是麻烦和困难的,并且存在对tau疾病(比如阿尔茨海默病)的精确诊断的需求。在脑脊液中异常Tau的抗体检测已经显示出一些前景(Blennow, K.等,“Cerebrospinal Fluid And Plasma Biomarkers In Alzheimer Disease,”Nat.Rev.Neurol.6,131-144 (2010) 和Weiner等,“The Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative: A Review Of Papers Published Since Its Inception,”Alzheimers.Dement.9,e111-e194 (2013))。

[0009] 多年以来,在脑脊液中磷酸化-Tau蛋白(phospho-Tau protein)的抗体检测已经显示对于阿尔茨海默病的诊断的一些用途(Blennow, K.等,“Cerebrospinal Fluid And Plasma Biomarkers In Alzheimer Disease,”Nat.Rev.Neurol.6,131-144 (2010);Lewis, J.等,“Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein,”Nat.Genet.25,402-405;Weiner, M.W.等(2013)“The Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative: A Review Of Papers Published Since Its Inception,”Alzheimers.Dement.9:e111-e194),这意味着在该领域进一步开发是有保障的(见Congdon, E.E. (2014)“Harnessing The Immune System For

Treatment And Detection Of Tau Pathology," J. Alzheimers Dis. 40: S113-S121)。但是,在其他tau疾病中CSF Tau水平相较于对照通常是不改变的(Theunis,C.等“Efficacy And Safety Of A Liposome-Based Vaccine Against Protein Tau, Assessed In Tau.P301L Mice That Model Tauopathy,” PLoS. One. 8, e72301 (2013); Hales,C.M.等(2013)“From Frontotemporal Lobar Degeneration Pathology To Frontotemporal Lobar Degeneration Biomarkers,” Int. Rev. Psychiatry 25:210-220),且成像染料可能不能检测所有tau疾病中的病理Tau (Fodero-Tavoletti,M.T.等(2014)“Assessing THK523 Selectivity For Tau Deposits In Alzheimer's Disease And Non-Alzheimer's Disease Tauopathies,” Alzheimers. Res. Ther. 6:11)。使这些Tau病变(lesion)协同淀粉样 β (A β)成像是更可能获得精确诊断的,因为 Tau聚集体(Tau aggregate)的区域式样在不同tau疾病之间不同。更进一步,除了阿尔茨海默病,它们在某种程度上都通过缺少A β 沉积而被定义。使用良好结合至 β -折叠的化合物的A β 斑块的体内成像已经处于临床应用中(Mason,N.S.等(2013)“Positron Emission Tomography Radioligands For In Vivo Imaging Of ABeta Plaques,” J. Labelled Comp. Radiopharm. 56:89-95)。若干这样的基于染料的Tau结合配体最近已经在临床前研究中被鉴定,并且其中一些已经被评估(Fodero-Tavoletti,M.T.等(2014)“Assessing THK523 Selectivity For Tau Deposits In Alzheimer's Disease And Non-Alzheimer's Disease Tauopathies,” Alzheimers. Res. Ther. 6:11; Fodero-Tavoletti,M. T.等(2011)“¹⁸F-THK523: A Novel In Vivo Tau Imaging Ligand For Alzheimer's Disease,” Brain 134:1089-1100; Zhang, W.等(2012)“A Highly Selective And Specific PET Tracer For Imaging Of Tau Pathologies,” J. Alzheimers. Dis. 31:601-612; Chien,D.T.等(2013)“Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [F-18]-T807,” J. Alzheimers. Dis. 34:457-468; Maruyama,M.H.等(2013)“Imaging Of Tau Pathology In A Tauopathy Mouse Model And In Alzheimer patients Compared To Normal Controls,” Neuron 79:1094-1108; Okamura,N.等(2005)“Quinoline And Benzimidazole Derivatives: Candidate Probes For In Vivo Imaging Of Tau Pathology In Alzheimer's Disease,” J. Neurosci. 25:10857-10862; Harada,R.,等(2013)“Comparison Of The Binding Characteristics Of [18F]THK-523 And Other Amyloid Imaging Tracers To Alzheimer's Disease Pathology,” Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 40:125-132; Ono,M.等(2011)“Rhodanine And Thiohydantoin Derivatives For Detecting Tau Pathology In Alzheimer's Brains,” ACS Chem. Neurosci. 2:269-275; Xia,C.F.等(2013)“[(18)F]T807, A Novel Tau Positron Emission Tomography Imaging Agent For Alzheimer's Disease,” Alzheimers. Dement. 9:666-676; Chien,D.T. (2014)“Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [F18]-T808,” J. Alzheimers. Dis. 38:171-184; Villemagne, V.L.等(2014)“In Vivo Evaluation Of A Novel Tau Imaging Tracer For Alzheimer's Disease,” Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 41:816-826; Okamura,N.等(2014)“Non-Invasive Assessment Of Alzheimer's Disease Neurofibrillary Pathology Using ¹⁸F-THK5105 PET,” Brain 137:1762-1771)。基于Tau的配体的希望和前景是,它们比 A β 配体更好地监控神经变性的状态和发展。基于抗体的探

针可能提供对于检测Tau 病变更强的特异性。尤其地,结合至Tau的较小的抗体片段作为配体用于在体内成像以在阿尔茨海默病或其他tau疾病患者中检测Tau病变是引人注目的。

[0010] 在癌症领域,治疗用抗体已经常规地作为成像剂被共同开发,并且一些这样的抗体和Fab分子被FDA批准用于肿瘤成像 (Kaur, S. 等“Recent Trends In Antibody-Based Oncologic Imaging,”Cancer Lett.315, 97-111 (2012))。

[0011] 本申请发明人已经发现,为检测Tau病变提供优异特异性的抗体衍生的分子,尤其是较小的单链可变区抗体片段 (scFv分子),其对于Tau聚集体的体内成像是引人注目的。设想这些抗体衍生的成像配体可用于监控Tau病理的疾病发展、Tau靶向疗法的效力以及鉴定 A β 阴性tau疾病 (A β negative tauopathies)。另外,这类抗体衍生的分子可用作预防、治疗和管理阿尔茨海默病和其他Tau疾病的治疗剂 (therapeutics)。

发明内容

[0012] 本发明涉及基于抗体的分子 (包括单结构域抗体片段、scFv分子、抗体、抗体片段、双抗体和其表位-结合结构域),其能够免疫特异性和选择性结合Tau的 $^{(p)}$ Ser404表位。这类基于抗体的分子可用于检测生物样品中的病理Tau蛋白质构象异构体 (如果存在),尤其与阿尔茨海默病或其他Tau疾病的诊断和/或治疗相结合,从而提供对阿尔茨海默病和其他Tau疾病的诊断。本发明基于抗体的分子 (尤其地,scFv分子) 尤其可用作阿尔茨海默病和相关Tau疾病的诊断标记物,以及用作用于治疗这类病况的药物组合物。

[0013] 详细地,本发明涉及基于抗体的分子,其能够免疫特异性结合Tau的 $^{(p)}$ Ser404表位,其中所述表位存在于具有Tau 386-408序列 ($^{(p)}$ Ser396/ $^{(p)}$ Ser404) (SEQ ID NO:8) : TDHGAEIVYK $^{(p)}$ SPVVSGDT $^{(p)}$ SPRHL的肽上,

[0014] 其中在其11位和19位的残基是磷酸丝氨酸,并且其中基于抗体的分子另外能够以相较于结合至非磷酸化的Tau更大的选择性结合至磷酸化的Tau。

[0015] 本发明尤其涉及上述基于抗体的分子的实施方式,其中所述分子是抗体或包含抗体的表位-结合片段。

[0016] 本发明尤其涉及上述基于抗体的分子的实施方式,其中所述分子是人源化抗体或包含人源化抗体的表位-结合片段。

[0017] 本发明尤其涉及上述基于抗体的分子的实施方式,其中所述分子包含抗体的 $^{(p)}$ Ser404表位-结合片段并且是分离的CDR、单结构域抗体片段、免疫球蛋白轻链可变结构域、免疫球蛋白重链可变结构域、scFv或双抗体。

[0018] 本发明尤其涉及上述基于抗体的分子的实施方式,其中所述分子是抗体或其表位-结合片段,在外周注射至接受者后,所述抗体或其表位-结合片段基本上与Tau聚集体共定位。

[0019] 本发明尤其涉及上述基于抗体的分子的实施方式,其中所述表位-结合片段包含下述中的任何一个、任何两个、任何三个、任何四个、任何五个或所有六个:

[0020] (a) 轻链CDR1,其具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0021] (b) 轻链CDR2,其具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

[0022] (c) 轻链CDR3,其具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

[0023] (d) 重链CDR1,其具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

[0024] (e) 重链CDR2,其具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列;和/或

[0025] (f) 重链CDR3,其具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0026] 本发明尤其涉及上述基于抗体的分子的实施方式,其中所述表位-结合片段包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变结构域和/或具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的重链可变结构域。

[0027] 本发明尤其涉及上述基于抗体的分子的实施方式,其中所述分子是包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的scFv。

[0028] 本发明尤其涉及上述基于抗体的分子的实施方式,其中所述分子是抗体4E6G7。

[0029] 本发明尤其涉及任何上述基于抗体的分子的实施方式,其中所述分子被可检测地标记,尤其地,其中可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记。

[0030] 本发明尤其涉及任何上述基于抗体的分子用于检测或测量接受受试者的脑、脑脊液、血液、血清或血浆中磷酸化的Tau蛋白质的存在或量的用途。

[0031] 本发明尤其涉及任何上述基于抗体的分子的这样的用途,其中所述检测或测量包括与磷酸化的Tau蛋白质结合的基于抗体的分子的体内或离体成像。

[0032] 本发明尤其涉及任何上述基于抗体的分子的这样的用途,其中所述检测或测量用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病。

[0033] 本发明另外提供了用于治疗受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的体内药物,其中药物包含有效治疗阿尔茨海默病或其他Tau疾病的量的任何上述基于抗体的分子,以及一种或多种载体、稀释剂和/或稳定剂。

[0034] 本发明另外提供了这类体内药物用于治疗受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的用途。

[0035] 本发明尤其涉及其中受试者是人的任何这类用途。

[0036] 本发明另外提供了用于检测或测量磷酸化的Tau蛋白质在受试者的脑中的存在或量,或用于诊断受试者中的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的试剂盒,其中所述试剂盒包含任何上述基于抗体的分子。

[0037] 本发明尤其涉及任何上述用途、药物或试剂盒,其中所述Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆(frontotemporal dementia)、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病(Pick's disease)、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆(tangle only dementia)、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症(diffuse neurofibrillary tangles with calcification)、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、哈勒沃登-施帕茨病(Hallerworden-Spatz disease)、包涵体肌炎、克雅氏病(Creutzfeld-Jakob disease)、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型(Niemann-Pick disease type C)、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结(non-guanamian motor neuron disease with neurofibrillary tangles)、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

附图说明

[0038] 图1,小图A-B显示了抗体4E6G7(小图A;*p=0.05)和IgG对照(小图B)对于 10 μ g/mL PHF介导的细胞毒性的作用,如通过LDH释放测定的。

[0039] 图2,小图A-B显示了抗体4E6G7(小图A;*p=0.05)和IgG对照(小图B)对于1 μ g/mL PHF介导的细胞毒性的作用,如通过LDH释放测定的。

[0040] 图3,小图A-C显示了免疫印迹,其显示相对于用10 μ g/mL PHF和1 μ g/mL非特异性小鼠IgG(小图B)处理的细胞,抗体4E6G7(小图A;10 μ g/mL)防止NeuN信号损失的能力。小图C显示了用PHF单独处理或用PHF和抗体4E6G7的组合处理的样品中信号的量化。

[0041] 图4,小图A-C显示PHF在1 μ g/mL诱导NeuN的损失,并且该作用可通过抗体 4E6G7预防。显示了用1 μ g/mL PHF单独处理或用1 μ g/mL PHF和1 μ g/mL抗体4E6G7 处理(小图A)或用1 μ g/mL PHF和1 μ g/mL对照IgG处理(小图B)的样品的免疫印迹。小图C显示了用PHF单独处理或用PHF和抗体4E6G7的组合处理的样品中信号的量化。

[0042] 图5,小图A-D显示了抗体4E6G7可防止由于暴露于10 μ g/mL PHF材料而造成的细胞内Tau的增加。小图A显示了用PHF或用PHF联合抗体4E6G7温育的样品的免疫印迹,其用泛-Tau(pan-Tau)抗体探测。小图B显示了来自用对照小鼠IgG和PHF 温育的细胞的样品的免疫印迹。小图C显示了用PHF和抗体4E6G7温育的样品中总 Tau水平的量化。小图D显示了针对NeuN水平归一化的结果。

[0043] 图6,小图A-D显示了1mg/mL的PHF可促进细胞内Tau的增加,并且抗体4E6G7 可防止这些作用。小图A和小图B:暴露于PHF、PHF+抗体或PHF+IgG对照的样品的免疫印迹,其用泛-Tau多克隆抗体探测。小图C:总Tau水平的量化。小图D:归一化至NeuN的细胞内Tau产量。

[0044] 图7,小图A-D显示了抗体4E6G7防止由于暴露于10 μ g/mL的PHF而造成的磷酸化的Tau增加的能力。小图A-B显示了单独暴露于PHF或暴露于PHF与抗体4E6G7 的组合(小图A)或暴露于PHF与对照IgG的组合(小图B)的细胞的免疫印迹,其用识别^{p}Ser199磷酸化-Tau的多克隆抗体探测。小图C量化了^{p}Ser199磷酸化-Tau相对于未处理的细胞的水平。小图D将结果归一化至NeuN水平。

[0045] 图8(小图A-D)显示较低水平的PHF(1 μ g/mL)也可诱导磷酸化的Tau水平的增加,并且这样的增加可通过抗体4E6G7预防。小图A-B显示了单独暴露于PHF或暴露于 PHF与抗体4E6G7的组合(小图A)或暴露于PHF与对照IgG的组合(小图B)的细胞的免疫印迹,其用识别^{p}Ser199磷酸化-Tau的多克隆抗体探测。小图C量化了^{p}Ser199 磷酸化-Tau相对于未处理的细胞的水平。小图D将结果归一化至NeuN水平。

[0046] 图9,小图A-G显示了抗体4E6G7可减少病理Tau在细胞群体之间的扩散。图9,小图A显示了微流体室的示意图,显示了接收取样细胞的储器。图9,小图B是小图 A中的中央框的放大示意图,显示了连接两个储器的细微纹沟(microgroove)。图9,小图C是显示透过细微纹沟生长的轴突(用箭头标识)的共焦成像。用泛-Tau抗体将细胞染色。图9,小图D-F显示了添加至包含JNPL3细胞的微流体设备的室中的荧光标记的PHF材料(1 μ g/mL)。图9,小图D显示了Tau蛋白质的定位。图9,小图E显示了PHF的定位。图9,小图F是显示Tau蛋白质的定位和PHF的定位二者的合并图像。

[0047] 图10,小图A-L显示了给药方案对于PHF和抗体结合的作用。小图A-D显示了神经元容易从介质摄取PHF-Tau并且可在细胞体和神经元突起中看到PHF阳性色斑。小图E-H显示

了PHF→抗体给药方案对于PHF和抗体结合的作用。小图I-L显示了 PHF+抗体给药方案对于PHF和抗体结合的作用。当一起添加时,抗体4E6G7和PHF 材料形成大的细胞外聚集体。

[0048] 图11,小图A-B显示了抗体4E6G7的作用机制受到给药方案的影响。将10 μ g/mL PHF 添加至JNPL3神经元,同时或24小时后添加抗体4E6G7。小图A显示了Tau/NeuN 的比例随着使用PHF+抗体给药方案处理的细胞收集天数而变化。小图A显示 Tau/NeuN的比例随着使用PHF→抗体给药方案处理的细胞收集天数而变化。

[0049] 图12,小图A-B显示了用抗体4E6G7免疫的hTau小鼠在封闭场地对称迷宫 (Closed-Field Symmetrical Maze,CFSM) 测试中表现出显著改善 ($p<0.01$) (图12,小图A),而对照小鼠没有(图12,小图B)。

[0050] 图13,小图A-E显示了用抗体4E6G7免疫的hTau/PS1小鼠在八臂迷宫 (Radial Arm Maze) (小图A)、封闭场地对称迷宫(小图B(第1天)、小图C(第2天)和小图D(第3 天) 和物体识别测试(小图E) 中的表现基本上比对照小鼠更好。

[0051] 图14,小图A-C显示了对照小鼠(图14,小图A) 和用抗体4E6G7免疫的hTau/PS1 小鼠(图14,小图B) 的PHF-1染色的脑切片。图14,小图C显示了对照和免疫小鼠的脑细胞的PHF-1染色的定量分析。

[0052] 图15,小图A-B显示了抗体4E6G7免疫的小鼠(小图A) 在封闭场地对称(CFS) 迷宫中相比它们免疫前的表现,表现出显著改善(48%较少的错误, $p<0.01$),而对照IgG 处理的小鼠没有改善。当根据性别分组时,抗体4E6G7处理的雄性和雌性相比它们处理前的表现都显示了显著改善(分别为52%和44%较少的错误, $p<0.01$ 和 $p<0.05$,关于平均值和SEM见正文)。重复的测量、双因素方差分析揭示了处理 ($p=0.0018$) 而不是性别 ($p=0.5145$) 的显著作用,表明观察到的结果不归因于性别差异。相比之下,当一起考虑所有动物时,或根据性别分组时,用IgG处理的动物不显示改善。小图B显示了抗体6B2G12免疫的小鼠在相同的测试中没有改善。**: $p<0.01$ 。

[0053] 图16,小图A-F显示了抗体4E6G7和抗体6B2G12在与人衍生的PHF材料结合方面不同。小图A:将不同tau种类转印 (spotted) 在硝化纤维素上并且与作为一级抗体的抗体4E6G7或抗体6B2G12一起温育。抗体4E6G7更好地结合溶解的PHF,但是抗体6B2G12与十二烷基肌氨酸钠(sarkosyl)不溶性tau组分(fraction)更强烈地反应。两种抗体与十二烷基肌氨酸钠可溶性tau蛋白质具有有限的反应性。小图B:从对照脑制备相同的三个tau组分,并且转印在硝化纤维素上。抗体都不显示对十二烷基肌氨酸钠可溶性组分的结合,并且显示对溶解的PHF和十二烷基肌氨酸钠不溶性 tau仅仅有限的结合。(从相同的条带(strip) 获取抗体4E6G7和抗体6B2G12处理的对照脑的所有三个样品的图像,为了清楚,已经改变了顺序。) 小图C:用来自AD 和对照脑的溶解的PHF涂布板。相比对照,抗体6B2G12显示与AD显著更高的结合,以及相比抗体4E6G7在1/200-1/125的稀释度显示与AD或对照显著更高的结合 ($p< 0.0001-0.05$)。与对照相比,抗体4E6G7不显示与AD显著更高的结合。小图D:用来自AD 和对照脑的十二烷基肌氨酸钠可溶性tau涂布测定板,并且添加连续稀释的抗体4E6G7和抗体6B2G12。在1/200稀释度,相比对照,抗体6B2G12显示与AD显著更高的结合,并且相比抗体4E6G7显示与任一组分的更高的结合(分别为 $p<0.01$ 、 0.05 和 0.05)。小图E:用十二烷基肌氨酸钠不溶性tau涂布测定板。从稀释度 1/200-1/125k,抗体6B2G12相对于对照显示与AD显著更高的结合,并且相比抗体 4E6G7显示与AD或对照显著更高的结合 ($p<0.0001-0.05$)。

如前所述,在抗体4E6G7的情况下,在AD和对照样品之间没有观察到显著差异。小图F:通过预温育抗体与增加浓度的溶解的PHF材料(0.01-1 μ g/ml),进行竞争ELISA测定。在任何PHF浓度,抗体6B2G12结合都不受到抑制。但是,抗体4E6G7结合以剂量依赖方式受到抑制,其中IC50是71nM。所有的结果均显示,抗体4E6G7优先结合溶解的tau种类,而抗体6B2G12主要结合不溶性的、高度聚集的tau。每个图上的所有的柱或点均具有SEM 误差棒,但是其中的一些太小而看不到。

具体实施方式

[0054] 本发明涉及基于抗体的分子(包括单结构域抗体片段、scFv分子、抗体、抗体片段、双抗体和其表位-结合结构域),其能够免疫特异性和选择性结合Tau的^{p}Ser404表位。这类基于抗体的分子可用于检测生物样品中的病理Tau蛋白质构象异构体(如果存在),尤其与阿尔茨海默病或其他Tau疾病的诊断和/或治疗相结合,从而提供了用于阿尔茨海默病和其他Tau疾病的诊断。本发明基于抗体的分子(尤其地,scFv分子)尤其可用作用于Tau疾病(尤其用于阿尔茨海默病和相关Tau疾病)的诊断标记物以及用作用于治疗这类病况的药物组合物。

[0055] 如本文所使用的术语“Tau疾病”包括涉及微管蛋白Tau在脑中病理性聚集的任何神经变性疾病。因此,除了家族性和偶发性阿尔茨海默病之外,本发明的tau疾病还包括,但不限于:额颞痴呆、与17号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。

[0056] 本发明的基于抗体的分子对于检测患有AD或其他tau疾病患者中的Tau病变提供比 β 折叠染料更高的特异性。尤其地,结合至Tau的较小的抗体片段作为用于体内成像的配体是引人注目的。它们相比于抗体较小的尺寸导致其更好地接近Tau聚集体。另外的优点是,与具有较长半衰期的未修饰抗体相比,它们相对快速从循环中清除。在癌症领域里,治疗用抗体已经常规的作为成像剂被共同开发,并且若干这样的抗体和具有更好的药代动力学性质的Fab's或更小的双抗体和scFv分子作为肿瘤成像剂被批准或提出(见Kaur,S.等(2012)“Recent Trends In Antibody-Based Oncologic Imaging,” Cancer Lett.315: 97-111;Olafsen,T.等(2010)“Antibody Vectors For Imaging,” Semin. Nucl. Med.40: 167-181)。

[0057] I、Tau和本发明优选的免疫原性Tau肽

[0058] 如本文所使用,术语“Tau”与Tau蛋白质同义,其是指任何Tau蛋白质同等型(例如,在UniProt中鉴定为P10636,1-9)。Tau是可溶性微管相关蛋白质,其在细胞周期期间借助许多激酶而动态地磷酸化和去磷酸化。Tau稳定微管的能力取决于其磷酸化的程度。在其去磷酸化形式中,蛋白质能够与微管蛋白相互作用,以稳定微管并且促进微管蛋白组装成微管(其形成细胞的细胞骨架,并且,是有丝分裂中分开真核染色体的有丝分裂纺锤体的主要成

分)。在其磷酸化的形式中,Tau能够从微管分离,从而允许进行有丝分裂。因此,Tau的磷酸化用作神经元中直接的微管结合-分离(microtubule association-dissociation)开关(Pedersen,J.T.等(2015)“Tau Immunotherapy For Alzheimer’s Disease,”Trends Mol.Med.2015 Apr 3 pii:S1471-4914(15)00058-1;第1-9页,通过引用以其整体并入本文)。

[0059] 相对于下面显示的SEQ ID N0:1给出本文提供的Tau残基的氨基酸编号,其中甲硫氨酸是其第一个氨基酸残基。

[0060] SEQ ID N0:1:

[0061] MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGLTD AGLKESPLQT
 [0062] PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG
 [0063] TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK
 [0064] IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP
 [0065] GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM
 [0066] PDLKNVKSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIK KV
 [0067] PGGGSVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV
 [0068] QSKIGSLDNI THVPGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS
 [0069] GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

[0070] 术语“磷酸化-Tau”或“P-Tau”指在一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基处已经被磷酸化的Tau蛋白质或肽。如本文所使用,符号“^{p}Ser”或“^{p}S”表示氨基酸残基磷酸丝氨酸。例如,符号“^{p}Ser396/^{p}Ser404”指SEQ ID N0:1的多肽部分,其中对应SEQ ID N0:1的残基396和404(上面以下划线显示)的残基是磷酸丝氨酸残基。相反,符号“Ser396/Ser404”指SEQ ID N0:1的多肽部分,其中对应SEQ ID N0:1的残基396和404的残基都是丝氨酸残基。因此,例如,符号“^{p}Ser396/Ser404”指SEQ ID N0:1的多肽部分,其中对应SEQ ID N0:1的残基396的残基是磷酸丝氨酸残基,并且对应SEQ ID N0:1的残基404的残基是丝氨酸。

[0071] Tau的高度磷酸化(Hyperphosphorylation)可造成成对螺旋丝体和直丝体的不可溶的自组装“缠结体”(本文中称为“Tau聚集体”)的形成。这样的Tau聚集体可为细胞内的(例如神经元内的),但也可在细胞外形成。Tau聚集体的存在损害了Tau稳定微管的能力,因此引起微管解体、树突脊(dendritic spine)塌陷瓦解和轴突的降解。正常Tau平均包含两个磷酸化位点;高度磷酸化Tau丝体平均七到八个磷酸化位点。高度磷酸化Tau是细胞内的神经元纤维缠结的主要成分,细胞内的神经元纤维缠结是阿尔茨海默病和其他Tau疾病的主要标志。如本文所使用,术语“病理Tau(pathological Tau)”指作为阿尔茨海默病和其他Tau疾病特征的高度磷酸化的Tau。

[0072] II、本发明优选的基于抗体的分子

[0073] 本发明“基于抗体的分子”包括能够免疫特异性和选择性结合Tau的^{p}Ser404表位的抗体,以及其展示这类结合免疫特异性和选择性的片段和衍生物。如本文所使用,如果分子是通过实际片段化这类亲本分子获得的(例如,Fab或(Fab)₂片段),或如果分子包含的氨基酸序列含有这类亲本分子的一部分氨基酸序列,则认为该分子是另一分子的“片段”。如本文所使用,如果分子是通过实际化学修饰这类亲本分子或其部分获得的,或如果分子包含的氨基酸序列基本上与这类亲本分子或其相关部分的氨基酸序列类似(例如,与这类亲

本分子或其这类相关部分的差异小于30%、小于20%、小于10%或小于5%，或与这类亲本分子或其相关部分相差10个氨基酸残基，或相差小于10、9、8、7、6、5、4、3或2个氨基酸残基)，认为该分子是另一分子(或其相关部分)的“衍生物”。

[0074] 如本文所使用，术语“抗体”指完整的免疫球蛋白以及具有其表位结合片段的分子。如本文所使用，术语“片段”、“区域”和“结构域”一般旨在是同义的，除非它们使用的上下文另外指出。天然产生的抗体典型地包括四聚体，所述四聚体通常由至少两条重(H)链和至少两条轻(L)链组成。每条重链包括重链可变区(本文缩写为“VH区域”)和重链恒定区，重链恒定区通常包括三个结构域(CH1、CH2和CH3结构域)。重链可为任何同种型，包括IgG(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亚型)、IgA(IgA1和IgA2亚型)、IgM和IgE。每条轻链包括轻链可变区(本文缩写为“VL区域”)和轻链恒定区(CL)。轻链包括κ链和λ链。重链和轻链可变区通常负责抗原识别，而重链和轻链恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)，的结合。VH和VL区可进一步再划分成高变区，称为“互补决定区”或“CDR”，其中散布以具有更保守序列的区域，称为“构架区”(FR)。每个VH和VL区域均由三个CDR结构域和四个FR结构域组成，其从氨基-末端到羧基-末端以如下的顺序排列：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。尤其相关的是，已经被“分离”的抗体和它们的表位结合片段，以便其存在于与其天然产生的物理环境不同的物理环境中，或已经被修饰以便在氨基酸序列方面与天然产生的抗体不同。

[0075] 可获得展示表位-结合能力的抗体片段(包括Fab和(Fab)₂片段)，例如，通过完整抗体的蛋白酶切割获得。更优选的，这样的片段为单结构域抗体片段、scFv分子和抗体的表位结合结构域等，其使用重组技术形成。例如，虽然Fv片段的两个结构域，VL区域和VH区域，通过不同的基因编码，但是，可使用重组方法，通过柔性连接体(典型地具有大约10、12、15或更多氨基酸残基)将这样的基因序列或它们的编码cDNA连接，这使得它们被制成单蛋白链，在其中VL和VH区域缔合以形成单价表位-结合分子(被称为单链Fv(scFv)分子；见例如，Bird等(1988)“Single-Chain Antigen-Binding Proteins,”*Science* 242:423-426；和Huston等(1988)“Protein Engineering Of Antibody Binding Sites:Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In Escherichia coli,”*Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 85:5879-5883)。可选地，通过采用太短的(例如，少于大约9个残基)而不能使单多肽链的VL和VH区域结缔合在一起的柔性连接体，可形成双特异性抗体、双抗体或类似的分子(其中两个这样的多肽链缔合在一起，以形成二价表位-结合分子)(关于双抗体的描述，见例如，Holliger, P. 等(1993)“‘Diabodies’:Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,”*Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 90(14), 6444-8(1993))。单结构域抗体片段仅具有一个可变结构域(例如，VL或VH)。本发明包括的表位结合片段的实例包括(i)Fab'或Fab片段、由VL、VN、CL和CH1结构域组成的单价片段，或单价抗体如W02007059782中所描述的；(ii)F(ab')₂片段、包括通过二硫键在铰链区连接的两个Fab片段的二价片段；(iii)基本上由VH和CH1结构域组成的Fd片段；(iv)基本上由VL和VH结构域组成的Fv片段；(v)dAb片段(Ward, E. S. 等“Binding Activities Of A Repertoire Of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From Escherichia coli,”*Nature* 341:544-546 (1989))，其基本上由VH结构域

组成,因此也称为结构域抗体(domain antibodies) (Holt, L.J. 等(2003) “Domain Antibodies: Proteins For Therapy,” Trends Biotechnol. 21 (11) : 484-490) ; (vi) 骆驼科动物(camelid) 抗体或纳米抗体(Revets, H. 等(2005) “Nanobodies As Novel Agents For Cancer Therapy,” Expert Opin Biol Ther. 5 (1) : 111-24) ; 和(vii) 分离的互补决定区(CDR)。更进一步,虽然Fv片段的两个结构域,VL和VH,通过单独的基因编码,但可使用重组方法,通过合成连接体将他们连接,这使得它们可被制成单蛋白链,在其中VL和VH区配对以形成单价分子(称为单链抗体或单链Fv(scFv),见例如, Bird等(1988) “Single-Chain Antigen-Binding Proteins,” Science 242:423-426和Huston等 (1988) “Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In Escherichia coli,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883)。本文进一步讨论这些和本发明上下文中的其他有用的抗体片段。也应该理解,术语抗体,除非另外指出,否则也包括抗体样(antibody-like) 多肽,比如嵌合抗体和人源化抗体,以及由任何已知技术提供的保持与抗原特异性结合的能力的抗体片段(抗原-结合片段),所述已知技术比如酶法切割、肽合成和重组技术。产生的抗体可具有任何同种型。如本文所用,“同种型(isotype)”指免疫球蛋白类别(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM),其是通过重链恒定区基因编码的。同种型的选择通常通过期望的效应子功能(比如ADCC诱导)来引导。示例性的同种型是IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。可使用人轻链恒定区的任一个,κ或λ。如需要,本发明的抗-Tau抗体的类别可通过已知方法转换。例如,本发明的抗体初始为IgM,可被类别转换为本发明的IgG抗体。另外,类别转换技术可用于将一个IgG亚类转变为另外的亚类,例如从IgG1转换到IgG2。因此,本发明的抗体的效应子功能,可通过同种型转换成例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM抗体而被改变,用于各种治疗用途。在一个实施方式中,本发明的抗体是IgG1抗体,例如IgG1,κ。

[0076] 使用本领域技术人员已知的常规技术获得这样的抗体片段。例如,F(ab')2片段可通过用胃蛋白酶处理抗体而产生。得到的F(ab')2片段可被处理以减少二硫键,从而产生Fab'片段。Fab片段可通过用木瓜蛋白酶处理IgG抗体而获得;Fab'片段可通过胃蛋白酶消化IgG抗体而获得。F(ab')片段也可通过如下描述的经硫醚键或二硫键结合Fab'而产生。Fab'片段是通过切断F(ab')₂的铰链区的二硫键获得的抗体片段。Fab'片段可通过用还原剂,比如二硫苏糖醇处理F(ab')₂片段而获得。抗体片段也可通过编码这些片段的核酸在重组细胞中的表达而产生(见例如, Evans, M. J. 等(1995) “Rapid Expression Of An Anti-Human C5Chimeric Fab Utilizing A Vector That Replicates In COS And 293 Cells,” J. Immunol. Meth. 184:123-38)。例如,编码部分F(ab')₂片段的嵌合基因可包括编码CH1结构域和H链的铰链区的DNA序列,之后是翻译终止密码子,以产生截短的抗体片段分子。能够结合至期望的表位的合适的片段可容易地被筛选,用于以与完整的抗体同样的方式应用。

[0077] 在一个实施方式中,这样的抗体片段是单价抗体,优选如PCT公布号 WO2007/059782(其通过引用以其整体并入本文)中所描述的单价抗体,其具有铰链区的缺失。可通过包括以下步骤的方法构造这样的抗体:i) 提供编码所述单价抗体的轻链的核酸构建体,所述构建体包含编码选择的抗原特异性抗α-突触核蛋白抗体的VL区的核苷酸序列,以及

编码 Ig 的恒定 CL 区的核苷酸序列, 其中编码选择的抗原特异性抗体的 VL 区的所述核苷酸序列和编码 Ig 的 CL 区的所述核苷酸序列可操作地连接在一起, 并且其中, 在 IgG1 亚型的情况下, 编码 CL 区的核苷酸序列已经被修饰, 这样在存在多克隆人 IgG 或当施用于动物或人类时, CL 区不包含能够与包含同样的 CL 区的氨基酸序列的其他肽形成二硫键或共价键的任何氨基酸; ii) 提供编码所述单价抗体的重链的核酸构建体, 所述构建体包含编码选择的抗原特异性抗体的 VH 区的核苷酸序列和编码人 Ig 的恒定 CH 区的核苷酸序列, 其中编码 CH 区的所述核苷酸序列已经被修饰, 这样对应于铰链区的区域, 以及如 Ig 亚型、CH 区的其他区域 (比如 CH3 区) 所要求的, 不包括任何这样的氨基酸残基: 所述氨基酸残基, 在存在多克隆人 IgG 或当施用于动物或人类时, 参与与包含人 Ig 的 CH 区的同样的氨基酸序列的其他肽形成二硫键或共价的或稳定的非共价的重链间键, 其中编码选择的抗原特异性抗体的 VH 区的所述核苷酸序列和编码所述 Ig 的 CH 区的所述核苷酸序列可操作地连接在一起; iii) 提供细胞表达系统以产生所述单价抗体; iv) 通过在 (iii) 的细胞表达系统的细胞中共同表达 (i) 和 (ii) 的核酸构建体产生所述单价抗体。

[0078] 类似地, 在一个实施方式中, 抗体是单价抗体, 其包含:

[0079] (i) 如本文所描述的本发明的抗体的可变区或所述区的抗原结合部分, 和

[0080] (ii) 免疫球蛋白的 CH 区或其包含 CH2 和 CH3 区的片段, 其中 CH 区或其片段已经被修饰, 以便对应于铰链区的区域以及, 如果免疫球蛋白不是 IgG4 亚型, CH 区的其他区 (比如 CH3 区), 不包括任何这样的氨基酸残基: 所述氨基酸残基在多克隆的人 IgG 的存在下, 能够与相同的 CH 区形成二硫键或与相同的 CH 区形成其他共价的或稳定的非共价的重链间键。

[0081] 在进一步的实施方式中, 单价抗体的重链已经被修饰, 使得全部铰链缺失。

[0082] 在另外的进一步实施方式中, 所述单价抗体的序列已经被修饰, 从而其不包含针对 N- 连接糖基化的任何受体位点。

[0083] 如本文所使用, 如果抗体或其表位结合片段相对于可选的表位更经常、更快速、以更大的持久性和/或更大的亲和力或亲合力与另一分子的区域 (即, 表位) 反应或缔合, 则认为所述抗体或其表位结合片段“免疫特异性”结合该表位。通过阅读该定义, 也应理解, 例如, 免疫特异性结合第一靶标的抗体或其表位结合片段可能特异性或优先结合第二靶标或可能不特异性或不优先结合第二靶标。

[0084] 如本文所使用, 在抗体或其结合片段与预定抗原结合的背景中, 当通过例如表面等离子体共振 (SPR) 技术在 biacore 3000 仪器中测定时 (优选使用抗体作为配体以及抗原作为分析物), 术语“结合”通常指以对应于大约 10^{-7} M 或更少的, 比如大约 10^{-8} M 或更少的, 比如大约 10^{-9} 或更少的 K_D 的亲和力进行结合, 以及其以对应于 K_D 的亲和力与预定抗原结合, 相比于其与非特异性抗原 (例如, 牛血清白蛋白 (“BSA”)、酪蛋白等) 而不是预定抗原或密切相关的抗原结合的亲和力, 所述 K_D 为至多十分之一, 比如至多百分之一, 例如至多千分之一, 比如至多万分之一, 例如至多十万分之一。亲和力较低的量取决于抗体的 K_D , 这样当抗体的 K_D 非常低时 (也就是, 抗体是高度特异的), 那么针对抗原的亲和力比针对非特异性抗原的亲和力小的量是至少 10,000 倍。术语 “ k_d ” (秒⁻¹或 1/s), 如本文所用, 指特定抗体-抗原互相作用的解离速率常数。所述值也称为 k_{off} 值。术语 “ k_a ” (M⁻¹ x 秒⁻¹或 1/M), 如本文所用, 指特定抗体-抗原互相作用的缔合速率常数。术语 “ K_D ” (M), 如本文所用, 指特定抗体-抗原互相作用的解离平衡常数, 其通过用 k_d 除以 k_a 获得。术语 “ K_A ” (M⁻¹或 1/M), 如本文所用, 指特定

抗体-抗原互相作用的结合平衡常数,其通过 k_a 除以 k_d 获得。

[0085] 如本文所用,如果相对于其结合(如果其完全结合)至具有相同氨基酸序列的非-磷酸化肽表位,抗体或其表位结合片段以更高的亲合力免疫特异性结合磷酸化肽表位,则认为所述抗体或其表位结合片段“选择性”结合该表位。最优秀的,这样的较高的亲和力为至少10倍、至少30倍、至少100倍、至少300倍、至少1,000倍、至少3,000 倍或至少10,000倍。抗体或其表位结合片段对于磷酸化Tau的“选择性”的程度,通过经ELISA或biacore比较抗体或其表位-结合片段免疫特异性地结合至非-磷酸化靶 Tau肽的亲和力与结合至其磷酸化变体的亲和力而确定。

[0086] 术语“表位”指能够免疫特异性地结合至抗体的抗原决定簇。表位通常包含分子比如氨基酸或糖侧链的表面基团,且通常有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位区别在于在变性溶剂的存在下,与构象表位的结合消失,但与非构象表位的结合并不消失。表位可包含直接参与结合的氨基酸残基(也称为表位的免疫显性的组分)和并不直接参与结合的其他氨基酸残基,比如被特异性抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基(换言之,氨基酸残基在特异性抗原结合肽的足迹(footprint)内)。

[0087] 如本文所用,术语“抗体的表位-结合片段”意思是能够免疫特异性结合至表位的抗体的片段。表位结合片段可包含这样的抗体的CDR结构域中的1个、2个、3个、4 个、5个或全部6个,并且,虽然能够免疫特异性结合至这样的表位,但其对于与这样的抗体的表位不同的这类表位可展示免疫特异性、亲和性或选择性。然而,优选地,表位结合片段包含这样的抗体的全部6个CDR结构域。抗体的表位结合片段可为单多肽链(例如scFv)或可包含两条或更多条多肽链,每条多肽链各具有氨基-末端和羧基末端(例如,双抗体、Fab片段、(Fab)₂ 片段等)。

[0088] 本发明的基于抗体的分子和它们的Tau表位结合片段优选为“人源化”的,尤其在它们被采用用于治疗目的的情况下。术语“人源化的”指嵌合分子,通常使用重组技术制备,其具有衍生于来自非人类物种的免疫球蛋白的抗原结合位点和基于人免疫球蛋白的结构和/或序列的剩余的免疫球蛋白结构。抗原结合位点可包括融合至人恒定结构域的完整非人抗体可变结构域或仅仅包括移植到人可变结构域的适当的人框架区的这样的可变结构域的互补决定区(CDR)。这样的人源化分子的框架残基可为野生型的(例如全人的)或它们可被修饰以包含未在人抗体中发现的一个或多个氨基酸取代,所述人抗体的序列用作人源化的基础。人源化减少或消除分子的恒定区在人个体中作为免疫原的可能性,但是仍保留对外源可变区的免疫应答的可能性(LoBuglio, A.F. 等 (1989) “Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man:Kinetics And Immune Response,” Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224)。另外的方法不仅关注提供人衍生的恒定区,而且还修饰可变区,以尽可能接近人的形式来重塑(reshape)它们。已知重链和轻链的可变区都包含三个互补-决定区(CDR),侧翼是四个框架区(FR),所述 CDR对所讨论的抗原应答不同并且决定结合能力,所述框架区(FR)在给定物种中相对保守并且推定其为CDR提供支架。当针对特定抗原制备非人抗体时,可通过将源自非人抗体的CDR移植在待修饰的人抗体中存在的FR上而“重塑”或“人源化”可变区。已经报道了该方法应用于各种抗体:Sato, K. 等 (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. 等 (1988) “Reshaping Human Antibodies for Therapy,” Nature 332:323-327; Verhoeven, M. 等 (1988) “Reshaping Human Antibodies:Grafting

An Antilysozyme Activity," *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C.A. 等 (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. 等 (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S.D. 等 (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88: 4181-4185; Tempest, P.R. 等 (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M.S. 等 (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873; Carter, P. 等 (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2Antibody For Human Cancer Therapy," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289; and Co, M.S. 等 (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," *J. Immunol.* 148:1149-1154。在一些实施方式中,人源化抗体保存所有的CDR序列(例如,人源化的小鼠抗体,其包含来自小鼠抗体的所有六个CDR)。在其他实施方式中,人源化抗体具有相对于初始抗体被改变的一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个或六个),其也称为“源自”初始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。人源化抗原的能力是熟知的(例如,见美国专利号5,225,539;5,530,101;5,585,089; 5,859,205;6,407,213;6,881,557)。

[0089] 在一个实施方式中,本发明基于抗体的分子是人抗体。合适的人抗体可使用携带部分人免疫系统而非小鼠系统的转基因小鼠或转染色体小鼠产生。这样的转基因小鼠和转染色体小鼠包括在本文分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,其在本文统称为“转基因小鼠”。

[0090] HuMAb小鼠包含人免疫球蛋白基因微基因座(minilocus)和靶向突变,所述微基因座编码未重排的人重链可变和恒定(μ 和Y)以及轻链可变和恒定(K)链免疫球蛋白序列,所述靶向突变使内源 μ 和K链基因座失活(Lonberg, N. 等 (1994) "Antigen-Specific Human Antibodies From Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications," *Nature* 368:856-859)。因此,这样的小鼠展示小鼠IgM或IgK的减少的表达,以及响应免疫,引入的人重链和轻链转基因,经历类别转换和体细胞突变,以产生高亲和性人IgG, κ 单克隆抗体(Lonberg, N. 等 (1994) "Antigen-Specific Human Antibodies From Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications," *Nature* 368:856-859; Lonberg, N. (1994) "Human Monoclonal Antibodies from Transgenic Mice," 在以下中: *Handbook Experimental Pharmacology*, Volume 181 (Starke, K. 等编辑) Springer-Verlag Berlin Heidelberg; Lonberg, N. 等 (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," *Intern. Rev. Immunol.* 13 (1) :65-93; Harding, F. 等 (1995) "Class Switching In Human Immunoglobulin Transgenic Mice," *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546)。HuMAb小鼠的制备在以下文献中有详细描述: Taylor, L. 等 (1992) "A Transgenic Mouse That Expresses A Diversity Of Human Sequence Heavy And Light Chain Immunoglobulins," *Nucl. Acids Res.* 20 (23) :6287-6295; Chen, J. 等 (1993) "Immunoglobulin Gene Rearrangement In B Cell Deficient Mice Generated By Targeted Deletion Of The JH Locus," *Int'*

1. Immunol. 5:647-656; Tuailon, N. 等(1994) "Biased Utilization Of DHQ52 And JH4 Gene Segments In A Human Ig Transgenic Minilocus Is Independent Of Antigenic Selection," J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. 等(1994) "Human Immunoglobulin Transgenes Undergo Rearrangement, Somatic Mutation And Class Switching In Mice That Lack Endogenous IgM," Int'l. Immunol. 6:579-591; Fishwild, D. 等(1996) "High-Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," Nature Biotechnol. 14:845-851; 也见美国专利号5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,789,650、5,877,397、5,661,016、5,814,318、5,874,299、5,770,429、5,545,807、PCT 公开W0 98/24884、W0 94/25585、W0 93/1227、W0 92/22645、W0 92/03918和W0 01/09187)。

[0091] HCo7小鼠在它们的内源轻链(κ)基因中具有JKD扰乱(disruption) (如在Chen等(1993) "B Cell Development In Mice That Lack One Or Both Immunoglobulin Kappa Light Chain Genes," EMBO J. 12:821-830中描述)、在它们的内源重链基因中具有CMD扰乱(如在PCT公开W0 01/14424的实施例1中描述)、具有KCo5人κ轻链转基因(如在 Fishwild, D. 等(1996) "High-Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," Nature Biotechnol. 14:845-851中描述)、和具有HCo7人重链转基因(如在美国专利号5,770,429中描述)。

[0092] HCo12小鼠在它们的内源轻链(κ)基因中具有JKD扰乱(如在Chen等(1993) "B Cell Development In Mice That Lack One Or Both Immunoglobulin Kappa Light Chain Genes," EMBO J. 12:821-830中描述)、在它们的内源重链基因中具有CMD扰乱(如在PCT公开W0 01/14424的实施例1中描述)、具有KCo5人κ轻链转基因(如在Fishwild, D. 等 (1996) "High-Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," Nature Biotechnol. 14:845-851中描述)、和具有HCo12人重链转基因(如在PCT公开W0 01/14424的实施例2中描述)。

[0093] 在KM小鼠品系(strain)中, 内源小鼠κ轻链基因已经被同型结合地(homozygously) 扰乱, 如Chen等(1993) "B Cell Development In Mice That Lack One Or Both Immunoglobulin Kappa Light Chain Genes," EMBO J. 12:821-830中描述), 并且内源小鼠重链基因已经被同型结合地扰乱, 如PCT公开W0 01/09187的实施例1中描述。该小鼠品系携带人κ轻链转基因KCo5, 如Fishwild, D. 等(1996) "High-Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," Nature Biotechnol. 14:845-851描述)。该小鼠品系也携带包含染色体14片段hCF(SC20)的人重链转染色体, 如PCT公开W0 02/43478中描述。

[0094] 根据熟知的技术, 这些转基因小鼠的脾细胞可用于产生分泌人单克隆抗体的杂交瘤。本发明的人单克隆或多克隆抗体, 或本发明的来源于其他物种的抗体, 也可通过产生另一非人类哺乳动物或植物以及以可回收的方式从其产生抗体而经转基因产生, 所述非人类哺乳动物或植物针对感兴趣的免疫球蛋白重链和轻链序列是转基因的。就哺乳动物中的转基因产生而言, 抗体可自山羊、奶牛或其他哺乳动物的奶中产生并从其中回收。见例如, 美国专利号5,827,690、5,756,687、5,750,172和5,741,957。

[0095] 在一些抗体中, 仅需要部分的CDR(即, 结合所需要的CDR残基的子集(subset), 称

为“SDR”),以在人源化抗体中保持结合。未接触抗原的和不在SDR中的CDR 残基可基于之前的研究从位于Chothia高变环之外的Kabat CDR的区域中鉴定(例如, CDR H2中的残基H60-H65通常是不需要的) (见Kabat等 (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242; Chothia,C.等 (1987) “Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins,” J.Mol.Biol.196:901-917),其通过分子建模和/或经验进行,或如Gonzales,N.R.等(2004) “SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity,” Mol.Immunol.41:863-872中所描述地进行。在这样的人源化抗体中,在一个或更多个供体CDR残基不存在的位置或在整个供体CR被省略的位置,占据所述位置的氨基酸可为在受体抗体序列中占据相应位置(根据Kabat编号)的氨基酸。待包括的受体在CDR中对供体氨基酸的这样的取代的数目反映了竞争考虑 (competing consideration) 的平衡。这些取代潜在地有利于减小人源化抗体中的小鼠氨基酸数目,因此减小潜在的免疫原性。但是,取代也可引起亲和力的改变,优选避免亲和力的显著下降。在CDR内的取代位置和用以取代的氨基酸也可根据经验选择。

[0096] CDR残基的单氨基酸的改变可导致功能性结合的丧失这一事实 (Rudikoff,S.等 (1982) “Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity,” Proc.Natl. Acad.Sci. (USA) 79 (6) :1979-1983) 提供了系统地鉴定可选的功能性的CDR序列的方法。在用于获得这样的变异的CDR的一个优选的方法中,编码CDR的多核苷酸被诱变处理(例如,通过随机诱变或通过定点方法(例如,用编码突变基因座的引物进行聚合酶链介导的扩增)),以产生具有取代的氨基酸残基的CDR。通过比较在原始的(功能性的)CDR序列中的相关残基的身份与取代的(非功能性的)变异的CDR序列的身份,可以确定该取代的 BLOSUM62.ijj取代分数。BLOSUM系统提供通过分析序列数据库产生的氨基酸取代的矩阵,用于可靠地比对。(Eddy,S.R. (2004) “Where Did The BLOSUM62Alignment Score Matrix Come From?,” Nature Biotech.22 (8) :1035-1036; Henikoff,J.G. (1992) “Amino acid substitution matrices from protein blocks,” Proc.Natl. Acad.Sci. (USA) 89:10915-10919; Karlin,S.等 (1990) “Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes,” Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 87:2264-2268; Altschul,S.F. (1991) “Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective,” J.Mol.Biol.219, 555-565。目前,最先进的BLOSUM数据库是BLOSUM62数据库 (BLOSUM62.ijj)。表1示出了BLOSUM62.ijj取代分数(分数越高,取代越保守,因此取代将更可能不影响功能)。如果例如包含产生的CDR的抗原-结合片段不能结合至ROR1,则 BLOSUM62.ijj取代分数被视为不够保守,因此具有更高的取代分数的新的候选取代被选择和产生。因此,例如,如果原始残基是谷氨酸(E),以及非功能性取代残基是组氨酸(H),则 BLOSUM62.ijj取代分将为0,并且优选更保守的变化(比如,变成天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺或赖氨酸)。

	表 1																			
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3

H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

[0099] 因此,本发明考虑使用导向的诱变或随机诱变来鉴定改善的CDR。

[0100] 在本发明的上下文中,可通过在下面三个表中的一个或多个中反映的氨基酸的种类内的取代,来限定保守取代:

[0101] 保守取代的氨基酸残基种类:

	表 2																			
	酸性残基																			
	Asp (D)和 Glu (E)																			
	碱性残基																			
	Lys (K)、Arg (R)和 His (H)																			
[0102]	亲水性不带电的残基																			
	Ser (S)、Thr (T)、Asn (N)和 Gln (Q)																			
	脂肪族不带电的残基																			
	Gly (G)、Ala (A)、Val (V)、Leu (L)和 Ile (I)																			
	非极性不带电的残基																			
	Cys (C)、Met (M)和 Pro (P)																			
	Phe (F)、Tyr (Y)和 Trp (W)																			

[0103] 可选的保守氨基酸残基取代类别:

表 3			
1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

[0104] [0105] 氨基酸残基的可选的物理和功能分类:

表 4	
包含醇基的残基	S 和 T
脂肪族残基	I、L、V 和 M
结合环烯基的残基	F、H、W 和 Y
疏水性残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、
带负电的残基	W 和 Y
极性残基	D 和 E
带正电的残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S 和 T
小残基	H、K 和 R
非常小的残基	A、C、D、G、N、P、S、T 和 V
参与旋转形成 (turn formation) 的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P 和 T
柔性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E 和 R

[0106] [0107] [0108] [0109] [0110] 更保守的取代基团包括:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

另外的氨基酸基团也可使用例如Creighton (1984) PROTEINS:STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES (第二版,1993), W.H.Freeman and Company中描述的原则被配制。

噬菌体展示技术可以可选地用于增加(或减小)CDR亲和力。该技术称为亲和力成熟(affinity maturation),其采用诱变或“CDR步移”以及再选择,其使用靶抗原或其抗原片段以来鉴定这样的抗体:当与初始抗体或亲本抗体相比时,所述抗体具有以更高(或更低)亲和力结合抗原的CDR(见,例如Glaser等(1992)“Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System,”J.Immunology 149:3903-3913)。诱变处理整个密码子而非单核苷酸产生了氨基酸突变的半随机的库。可构建由变异的克隆池组成的文库,每个变异的克隆的差异在于单CDR中的单个氨基酸改变,并且克隆包括代表针对每个CDR残基的每个可能的氨基酸取代的变体。对于抗原具有增加的(或减小的)结合亲和力的突变体,可通过使固定的突变体与标记的抗原接触来筛选。任何本领域已知的筛选方法可用于鉴定对抗原具有增加或减小的亲和力的突变抗体(例如,ELISA)(见Wu,H.等(1998)“Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin,An Alphav Beta3-Specific Humanized mAb,”Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 95:6037-6042;Yelton等(1995)“Affinity Maturation Of The BR96Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis,”J.Immunology 155:1994)。可使用使轻链随机化的CDR步移(见,

Schier,R.等(1996)“Isolation Of Picomolar Affinity Anti-c-erbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site,”J.Mol.Biol.263:551-567)。

[0111] 用于实现这类亲和力成熟的方法描述在例如下述文献中:Krause,J.C.等(2011)“An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody,”MBio.2(1) pii:e00345-10.doi:10.1128/mBio.00345-10;Kuan,C.T. 等(2010)“Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas,”Int.J.Cancer 10.1002/ijc.25645;Hackel,B.J.等 (2010)“Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes,”J. Mol.Biol.401 (1) :84-96;Montgomery,D.L.等(2009)“Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1gp41,”MAbs 1 (5) :462-474;Gustchina,E. 等(2009)“Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic *Naïve* Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth,”Virology 393(1) : 112-119;Finlay,W.J.等(2009)“Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy:Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions,”J.Mol. Biol.388 (3) :541-558;Bostrom,J.等(2009)“Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development,”Methods Mol.Biol.525:353-376;Steidl,S.等 (2008)“In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification,”Mol.Immunol.46 (1) :135-144;和Barderas,R.等(2008)“Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling,”Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 105 (26) :9029-9034。

[0112] 术语“转基因的非人动物”指这样的非人类动物,其基因组包含一个或多人重链和/或轻链转基因或转染色体(整合或非整合到动物天然基因组DNA中),且其能够表达全人抗体。例如,转基因小鼠可具有人轻链转基因以及人重链转基因或人重链转染色体,以便当用Tau抗原和/或表达Tau的细胞对小鼠免疫时,小鼠产生人抗-Tau 抗体。人重链转基因可整合到小鼠的染色体DNA中,对于转基因小鼠也是如此,例如HuMAb小鼠,比如HCo7或HCo12小鼠,或者人重链转基因可保持在染色体外,对于PCT公开WO 02/43478中所描述的转染色体KM小鼠也是如此。这样的转基因的和转染色体的小鼠(本文统称为“转基因小鼠”),通过经历V-D-J重组和同种型转换,能够针对给定的抗原产生多种人单克隆抗体的同种型(比如IgG、IgA、IgM、IgD 和/或IgE)。

[0113] 由于它们的特异性,本发明的基于抗体的分子作为Tau成像探针的用途具有很大的潜能。由于血脑屏障的总体的不渗透性,已经发现较小的单链可变抗体片段(scFv 分子)作为体内成像配体以检测Tau病变是优选的。scFv分子作为抗体的重(H)链结构域和轻(L)链结构域的可变区(彼此通过大约10到大约25个氨基酸残基的短的连接体肽相连)的融合蛋白而形成。为了柔性,连接体通常富含甘氨酸(例如, GGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID N0:2)

(Fisher, A. 等 (2009) “Efficient Isolation Of Soluble Intracellular Single-Chain Antibodies Using The Twin-Arginine Translocation Machinery,” J. Nol. Biol. 385 (1) :299-311; Bird, R. E. 等 (1988) “Single-Chain Antigen-Binding Proteins,” Science 242:423-426; Huston, J. S. 等 (1988) “Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In Escherichia coli,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883), 以及为了溶解性, 连接体富含丝氨酸或苏氨酸, 且可将重链可变结构域的N-末端与轻链可变结构域的C-末端连接, 反之也可 (Huang, L. 等 (2013) “Single-Chain Fragment Variable Passive Immunotherapies For Neurodegenerative Diseases,” Int. J. Mol. Sci. 14 (9) :19109-19127; Ahmad, Z. A. 等 (2012) “scFv Antibody: Principles And Clinical Application,” Clin. Dev. Immunol. 2012:980250; Huhalov, A. 等 (2004) “Engineered Single Chain Antibody Fragments For Radioimmunotherapy,” Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 48 (4) :279-288)。这样的连接体的实例是 GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:3) (Whitlow, M. 等 (1993) “An Improved Linker For Single-Chain Fv With Reduced Aggregation And Enhanced Proteolytic Stability,” Protein Eng. 6:989-995)。本发明特别优选的连接体具有氨基酸序列 (SEQ ID NO:4) : SSGGGGSGGGGGSSRSS。

[0114] 为了有助于纯化和/或回收, scFv 可包括多组氨酸 (poly histidine) (“His-标签 (His-Tag)”) (例如 (SEQ ID NO:5) HHHHHH)。His-标签的组氨酸残基的咪唑侧链可以以可逆的配位键与某些过度金属离子, 比如 Co^{2+} 、 Zn^{2+} , 特别是 Ni^{2+} , 接合。因此, 当 His- 标识的 scFv 分子被应用至包含这样的金属离子的基质时, 它们特异性地结合至基质, 而大部分未标识的蛋白不这样做。scFv 可另外地或可选地包括“HA-标签”, 比如 (SEQ ID NO:6) GAYPYDVPDYAS。人流感血凝素 (HA) 是人病毒的感染性所需要的表面糖蛋白。HA-标签源于人流感血凝素 (HA) 表面糖蛋白, 并且允许使用抗HA-标签抗体 (微孔过滤器 (Millipore)) 检测 scFv。

[0115] scFv 分子可直接地被表达或作为连接至 N 末端前导肽的融合蛋白表达, 该前导肽可被切割以便产生 scFv (见, 例如, Huston, J. S. 等 (1988) “Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In Escherichia coli,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883)。例如, scFv 可与改性的 trp LE 前导肽 (MLE) 融合, 并且被 Asp-Pro 肽键的酸切割而切割开 (Piszkiiewicz, D. 等 (1970) “Anomalous Cleavage Of Aspartyl-Proline Peptide Bonds During Amino Acid Sequence Determinations,” Biochem. Biophys. Res. Commun. 40 (5) :1173-1178; Fraser, K. J. 等 (1972) “Specific Cleavage Between Variable And Constant Domains Of Rabbit Antibody Light Chains By Dilute Acid Hydrolysis,” Biochemistry 11 (26) :4974-4977; Poulsen, K. 等 (1972) “An Active Derivative Of Rabbit Antibody Light Chain Composed Of The Constant And The Variable Domains Held Together Only By A Native Disulfide Bond,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 69 (9) :2495-2499)。

[0116] 在进一步的实施方式中, scFv 可被连接至另外的 scFv (其可为相同的或不同的) 以形成二价分子。这可通过产生具有两个 VH 区和两个 VL 区的单肽链完成, 产生串联的 scFv 分

子(Xiong,C.-Y.等(2006)“Development Of Tumor Targeting Anti-MUC-1 Multimer: Effects Of di-scFv Unpaired Cysteine Location On PEGylation And Tumor Binding,”Protein Engineering Design and Selection 19(8):359-367;Kufer,P.等(2004)“A Revival Of Bispecific Antibodies,”Trends in Biotechnology 22(5):238-24)。可选地,通过形成重链可变结构域与其轻链可变结构域通过连接体而分开的scFv,所述连接体太短以至于不允许这样的结构域彼此复合(complex)以及形成表位-结合位点,可以使两个scFv分子作为双抗体二聚化(Hollinger,P.等(1993)“Diabodies”:Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,”Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)90(14):6444-6448)。已经证明双抗体的解离常数是相应的scFv分子的至多四十分之一,这意味着它们对其靶具有远远更高的亲和力。因此,双抗体药可以相比于其他治疗用抗体少得多的剂量被施用,并且能够在体内高特异地靶向肿瘤(Adams,G.P.等(1998)“Prolonged in vivo Tumour Retention Of A Human Diabody Targeting The Extracellular Domain Of Human HER2/neu,”Brit.J.Cancer 77(9):1405-1412)。仍较短的连接体(一个或两个氨基酸)导致三聚体的形成,即所谓的三抗体(triabodies)或三抗体(tribodies)。也已经产生四抗体。它们相比于双抗体,显示与其靶的甚至更高的亲和力(Le Gall,F.等(1999)“Di-,Tri- And Tetrameric Single Chain Fv Antibody Fragments Against Human CD19:Effect Of Valency On Cell Binding,”FEBS Letters 453(1):164-168)。所有这些形式均可包含可变scFv分子,以形成对两种或更多不同表位具有特异性的二聚体、三聚体等等(例如,双特异性双抗体等)(Dincq,S.等(2001)“Expression And Purification Of Monospecific And Bispecific Recombinant Antibody Fragments Derived From Antibodies That Block The CD80/CD86-CD28Costimulatory Pathway,”Protein Express.Purificat.22(1):11-24)。

[0117] A、“^{p}Ser404表位”

[0118] 本发明的基于抗体的分子展示对于Tau(SEQ ID NO:1)和其相关同等型的磷酸丝氨酸残基^{p}Ser404的免疫特异性,因此在本文称为对于“^{p}Ser404表位”展示免疫特异性。如本文所使用,如果相对于免疫原的^{p}Ser396或相对于免疫原的任何其他氨基酸残基,抗体展示对^{p}Ser404磷酸丝氨酸残基增强的结合,则认为抗体对于^{p}Ser404表位展示免疫特异性,使得用Ser404取代^{p}Ser404,相比这样的免疫原的任何其他残基的取代,以更大的程度减少这样的^{p}Ser404表位特异性抗体与这样的变异的免疫原的结合。尽管包含^{p}Ser404表位的任何免疫原可用于分离和表征这类抗体,但是优选使用具有已经在396和404位磷酸化的氨基酸序列(SEQ ID NO:7):TDHGAEIVYK^{p}SPVVSGDT^{p}SPRHL的肽(其对应Tau蛋白质(SEQ ID NO:1)的氨基酸残基386-408),以便优选免疫原的氨基酸序列具有氨基酸序列SEQ ID NO:8:TDHGAEIVYK^{p}SPVVSGDT^{p}SPRHL。在SEQ ID NO:7的11和19位加下划线的丝氨酸残基,和在SEQ ID NO:8的11和19位加下划线的磷酸丝氨酸残基,对应Tau(SEQ ID NO:1)的396和404位。使用的免疫原包含该肽,并且其优选地被修饰以包含与钥孔血蓝蛋白(KLH)缀合的N末端半胱氨酸残基。这类努力导致抗体4E6G7(也称为抗体4E6)的分离,其免疫特异性结合^{p}Ser404表位(Congdon,E.E.等(2013)“Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fc_{gamma} Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance,”J.Biol.Chem. 288:35452-35465;

Gu, J. 等 (2013) “Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology,” J. Biol. Chem. 288 (46) :33081-33095)。

[0119] 如下面讨论,抗体4E6G7展示期望范围的功能,尤其包括短期抗体介导的识别(cognition)的改善与可溶性磷酸化-Tau的清除和与溶解的PHF的高亲和性结合相关。本发明的一个方面涉及治疗Tau疾病的治疗效力与抗体对于溶解的PHF的亲和力正相关的认识。因此,除了提供抗体4E6G7,本发明还提供了用于分离另外的治疗有效的抗体种类的方法,其中这类抗体通过筛选抗Tau抗体中展示对于溶解的PHF高亲和力的那些而获得。

[0120] B、抗体4E6G7

[0121] 抗体4E6G7的轻链可变结构域具有氨基酸序列(SEQ ID NO:9; CDR加下划线显示):

DIQM**N**QSPSS LSASLGDTIT ISC**HASQ**NIN **VWLS**WYQQKP GNIPKLLIFE

[0122] **ASTLYT**GVPS RFSGSGSGTG FTLT**TISS**LQP EDIATYYC**QQ** **GQSYPWT**FGG
GTKLEIKR

[0123] 因此,抗体4E6G7的轻链可变结构域CDR1具有氨基酸序列(SEQ ID NO:10): HASQNIN**VWLS**

[0124] 因此,抗体4E6G7的轻链可变结构域CDR2具有氨基酸序列(SEQ ID NO:11): EASTLYT

[0125] 因此,抗体4E6G7的轻链可变结构域CDR3具有氨基酸序列(SEQ ID NO:12): QQGQSYPWT

[0126] 抗体4E6G7的重链可变结构域具有氨基酸序列(SEQ ID NO:13; CDR加下划线显示):

VQL**Q**SGAEL VQPGASVKLS CTAS**GFN**IKD **TSMH**WVRQRP EQGLEWIG**RI**

[0127] **APANG**NT**KYD** **PKFQG**KATIT TDTSSNTAYL QLSSLTSEDT AVYYCSG**SGN**
YDWGQGTTLT VS

[0128] 因此,抗体4E6G7的重链可变结构域CDR1具有氨基酸序列(SEQ ID NO:14): GFNIKDT**SMH**

[0129] 因此,抗体4E6G7的重链可变结构域CDR2具有氨基酸序列(SEQ ID NO:15): RIAPANGNT**KYD**PKFQG

[0130] 因此,抗体4E6G7的重链可变结构域CDR3具有氨基酸序列(SEQ ID NO:16): SGNYD

[0131] C、scFv分子

[0132] scFv分子可由抗体4E6G7产生,因此具有与抗体4E6G7相同的轻链和重链可变结构域CDR1、CDR2和CDR3。

[0133] 示例性scFv的完整序列是(SEQ ID NO:17) (CDR残基加下划线显示):

DIQM**N**QSPSS LSASLGDTIT ISC**HASQ**NIN **VWLS**WYQQKP GNIPKLLIFE

ASTLYTGVPS RFSGSGSGTG FTLT**TISS**LQP EDIATYYC**QQ** **GQSYPWT**FGG

[0134] GTKLEIKR**ss** **ggggsggggg** **gssrss**VQLQ QSGAELVQPG ASVKLSCTAS
GFNIKDT**SMH** WVRQRPEQGL EWIG**RIAPAN** **GNTKYDPKFQ** **GKATIT**TDTS
SNTAYLQLSS LTSEDTAVYY CSG**SGNYD**WG QGTTLTVS

[0135] 其中氨基酸残基1-108是抗体4E6G7的轻链可变结构域的氨基酸残基 (SEQ ID NO: 9), 氨基酸残基109-126是连接体的氨基酸残基 (SEQ ID NO:4) (以小写斜体显示), 并且氨基酸残基127-238是抗体4E6G7的重链可变结构域的氨基酸残基 (SEQ ID NO:13)。

[0136] 在优选的实施方式中,示例性scFv作为包含具有氨基酸序列 (SEQ ID NO:18) : **IQEEFKMKKTAIAIAVALAGFATVAQAA**的N末端前导肽部分和/或C末端肽部分的融合蛋白被制备。C末端肽部分可包含:抗体恒定结构域,比如 (SEQ ID NO:19) : **AKTPPSVTSGQAGQ** (Hussein, A.H. 等 (2007) “Construction and Characterization of Single-Chain Variable Fragment Antibodies Directed against the *Bordetella pertussis* Surface Adhesins Filamentous Hemagglutinin and Pertactin,” *Infect. Immun.* 75 (11) :5476-5482) 、His标签,比如 (SEQ ID NO:5) :**HHHHHH**、和/或HA标签比如 (SEQ ID NO: 6) :**GAYPYDVPDYAS**,或其以任何顺序的任何组合或亚组合。优选的 C末端肽部分具有氨基酸序列 (SEQ ID NO:20) : **AKTPPSVTSGQAGQHHHHHGAYPYDVPDYAS**,因此其包含 (在N末端至C末端方向上) SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0137] 因此,在优选的实施方式中,示例性scFv融合蛋白将包含SEQ ID NOs:21-29任何一条的氨基酸序列 (其中ScFv融合物的N末端和/或C末端肽部分加下划线显示) :

[0138] SEQ ID NO:21 (SEQ ID NOs:18和17的融合物) :

IQEEFKMKK	AIAIAVALAG	FATVAQAA	DI	QMNQSPSSLS	ASLGDTITIS
CHASQNIINVW	LSWYQQKPGN	IPKLLIFEAS		TLYTGVPSRF	SGSGSGTGFT
LTISLQPED	IATYYCQQGQ	SYPWTFGGGT		KLEIKRSSGG	GGSGGGGGGS
SRSSVQLQQS	GAEVQPGAS	VKLSCTASGF		NIKDTSMHWV	RQRPEQGLEW
IGRIAPANGN	TKYDPKFQGK	ATITTDTSSN		TAYLQLSSLT	SEDTAVYYCS
GSGNYDWGQG TTLTVS					

[0140] SEQ ID NO:22 (SEQ ID NOs:17和19的融合物) :

DIQMNQSPSS	LSASLGDTIT	ISCHASQNI	VWL	SWYQQKP	GNIPKLLIFE
ASTLYTGVPS	RFSGSGSGTG	FTLTISLQP	EDI	ATYYCQQ	GQSYWPWFEGG
GTKLEIKRss	ggggsggggg	gssrssVQLQ	QSGAELVQPG	ASV	KLSCTAS
GFNIKDTSMH	WVRQRPEQGL	EWIGRIAPAN	GNT	KYDPKFQ	GKATITTDTS
SNTAYLQLSS LTSEDTAVYY CSGSGNYDWG QGTTLTVS AK TPPSVTSGQ AGQ					

[0142] SEQ ID NO:23 (SEQ ID NOs:17和5的融合物) :

DIQMNQSPSS	LSASLGDTIT	ISCHASQNI	VWL	SWYQQKP	GNIPKLLIFE
ASTLYTGVPS	RFSGSGSGTG	FTLTISLQP	EDI	ATYYCQQ	GQSYWPWFEGG
GTKLEIKRss	ggggsggggg	gssrssVQLQ	QSGAELVQPG	ASV	KLSCTAS
GFNIKDTSMH	WVRQRPEQGL	EWIGRIAPAN	GNT	KYDPKFQ	GKATITTDTS
SNTAYLQLSS LTSEDTAVYY CSGSGNYDWG QGTTLTVS HH HHHH					

[0144] SEQ ID NO:24 (SEQ ID NOs:17和6的融合物) :

	DIQMNPSPSS	LSASLGDTIT	ISCHASQIN	VWLSWYQQKP	GNIPKLLIFE
	ASTLYTGVPSS	RFSGSGSGTG	FTLTISLQP	EDIATYYCQQ	GQSYPWTFGG
[0145]	GTKLEIKRss	ggggsggggg	gssrsssVQLQ	QSGAELVQPG	ASVKLSCTAS
	GFNIKDTSMH	WVRQRPEQGL	EWIGRIAPAN	GNTKYDPKFQ	GKATITTDTS
	SNTAYLQLSS	LTSEDTAVYY	CSGSGNYDWG	QGTTLTVS <u>GA</u>	<u>YPYDVPDYAS</u>
[0146]	SEQ ID NO:25 (SEQ ID N0s:17和20的融合物) :				
	DIQMNPSPSS	LSASLGDTIT	ISCHASQIN	VWLSWYQQKP	GNIPKLLIFE
	ASTLYTGVPSS	RFSGSGSGTG	FTLTISLQP	EDIATYYCQQ	GQSYPWTFGG
[0147]	GTKLEIKRss	ggggsggggg	gssrsssVQLQ	QSGAELVQPG	ASVKLSCTAS
	GFNIKDTSMH	WVRQRPEQGL	EWIGRIAPAN	GNTKYDPKFQ	GKATITTDTS
	SNTAYLQLSS	LTSEDTAVYY	CSGSGNYDWG	QGTTLTVS <u>AK</u>	<u>TPPSVTSGQ</u>
	<u>AGQHHHHHHG AYPYDVPDYA S</u>				
[0148]	SEQ ID NO:26 (SEQ ID N0s:18、17和19的融合物) :				
	<u>IQEEFKMKKT</u>	<u>AIAIAVALAG</u>	<u>FATVAQAA</u> DI	QMNQSPSSLS	ASLGDTITIS
	CHASQINNVW	LSWYQQKPGN	IPKLLIFEAS	TLYTGVPNSRF	SGSGSGTGFT
[0149]	LTISSLQPED	IATYYCQQGQ	SYPWTFGGGT	KLEIKRSSGG	GGSGGGGGGS
	SRSSVQLQQS	GAEVQPGAS	VKLSCTASGF	NIKDTSMHWV	RQRPEQGLEW
	IGRIAPANGN	TKYDPKFQGK	ATITTDTSSN	TAYLQLSSLT	SEDTAVYYCS
	CSGNYDWGQG	TTLTVS <u>AKTT PPSVTSGQAG Q</u>			
[0150]	SEQ ID NO:27 (SEQ ID N0s:18、17和5的融合物) :				
	<u>IQEEFKMKKT</u>	<u>AIAIAVALAG</u>	<u>FATVAQAA</u> DI	QMNQSPSSLS	ASLGDTITIS
[0151]	CHASQINNVW	LSWYQQKPGN	IPKLLIFEAS	TLYTGVPNSRF	SGSGSGTGFT
	LTISSLQPED	IATYYCQQGQ	SYPWTFGGGT	KLEIKRSSGG	GGSGGGGGGS
	SRSSVQLQQS	GAEVQPGAS	VKLSCTASGF	NIKDTSMHWV	RQRPEQGLEW
[0152]	IGRIAPANGN	TKYDPKFQGK	ATITTDTSSN	TAYLQLSSLT	SEDTAVYYCS
	CSGNYDWGQG	TTLTVS <u>HHHH HH</u>			
[0153]	SEQ ID NO:28 (SEQ ID N0s:18、17和6的融合物) :				
	<u>IQEEFKMKKT</u>	<u>AIAIAVALAG</u>	<u>FATVAQAA</u> DI	QMNQSPSSLS	ASLGDTITIS
	CHASQINNVW	LSWYQQKPGN	IPKLLIFEAS	TLYTGVPNSRF	SGSGSGTGFT
[0154]	LTISSLQPED	IATYYCQQGQ	SYPWTFGGGT	KLEIKRSSGG	GGSGGGGGGS
	SRSSVQLQQS	GAEVQPGAS	VKLSCTASGF	NIKDTSMHWV	RQRPEQGLEW
	IGRIAPANGN	TKYDPKFQGK	ATITTDTSSN	TAYLQLSSLT	SEDTAVYYCS
	CSGNYDWGQG	TTLTVS <u>GAYP YDVPDYAS</u>			
[0155]	SEQ ID NO:29 (SEQ ID N0s:18、17和20的融合物) :				

[0156]	IQEEFKMKKT	AIAIAVALAG	FATVAQAA	DI	QMNQSPSSLS	ASLGDTITIS
	CHASQNI NVW	LSWYQQKPGN	IPKLLIFEAS		TLYTGVPSRF	SGSGSGTGFT
	LTISSLQPED	IATYYCQQGQ	SYPWTFGGGT		KLEIKRSSGG	GGSGGGGGGS
	SRSSVQLQQS	GAEVQPGAS	VKLSCTASGF		NIKDTSMHWV	RQRPEQGLEW
	IGRIAPANGN	TKYDPKFQGK	ATITTDTSSN		TAYLQLSSLT	SEDTAVYYCS
	SGSNYDWGQG	TTLTVS	AKTT PPSVTSGQAG QHHHHHHGAY PYDVPDYAS			

[0157] 虽然scFv能够经过血脑屏障运输,但是可使用各种辅助的方法以进一步促进这样的运输(Huang, L. 等(2013) “Single-Chain Fragment Variable Passive Immunotherapies For Neurodegenerative Diseases,” Int. J. Mol. Sci. 14 (9) :19109-19127)。通过受体介导的胞吞转运使有限的蛋白和肽的组穿过血脑屏障运输(Hervé, F. 等(2008) “CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis,” AAPS J. 10 (3) :455-472),三个研究最透彻的配体是胰岛素、铁-转铁蛋白(iron-transferrin)和LDL-胆固醇(Bickel, U. 等(2001) “Delivery Of Peptides And Proteins Through The Blood-Brain Barrier,” Adv. Drug Deliv. Rev. 46:247-279; Tuma, P. L. 等(2003) “Transcytosis: Crossing Cellular Barriers,” Physiol. Rev. 83:871-932)。因此,穿过血脑屏障的scFv的运输可通过将scFv融合至抗体或其表位结合片段来促进,所述抗体或其表位结合片段对于这样的配体的受体(例如,人胰岛素受体(HIR)、转铁蛋白受体(TfR)、低密度脂蛋白受体-相关蛋白1(LRP1)和2(LRP2)、无毒白喉毒素受体/肝素结合表皮生长因子样生长因子等)是免疫特异性的。得到的融合蛋白可通过其与受体的结合而穿过血脑屏障被运输(Boado, R. J. 等(2010) “IgG-Single-Chain Fv Fusion Protein Therapeutic For Alzheimer’s Disease: Expression In CHO cells And Pharmacokinetics And Brain Delivery In The Rhesus Monkey,” Biotechnol. Bioeng. 105:627-635; Jones, A. R. 等(2007) “Blood-Brain Barrier Transport Of Therapeutics Via Receptor-Mediation,” Pharm. Res. 24 (9) :1759-1771; Wang, Y. Y. 等(2009) “Receptor-Mediated Therapeutic Transport Across The Blood-Brain Barrier,” Immunotherapy 1 (6) :983-993; Lajoie, J. M. 等(2015) “Targeting Receptor-Mediated Transport For Delivery Of Biologics Across The Blood-Brain Barrier,” Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 55:613-631; Pardridge, W. M. (2102) “Drug Transport Across The Blood-Brain Barrier,” J. Cereb. Blood Flow Metab. 32 (11) :1959-1972; Bhaskar, S. 等 (2010) “Multifunctional Nanocarriers For Diagnostics, Drug Delivery And Targeted Treatment Across Blood-Brain Barrier: Perspectives On Tracking And Neuroimaging,” Part. Fibre. Toxicol. 7:3pp.1-25)。

[0158] scFv可被扩大以包含多聚阳离子肽,所述多聚阳离子肽促进吸附介导的胞吞转运。合适的多聚阳离子肽包括六亚甲基二胺、腐胺、亚精胺和精胺(Hervé, F. 等(2008) “CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis,” AAPS J. 10 (3) :455-472; Kandimalla, K. K. 等(2006) “Physiological And Biophysical Factors That Influence Alzheimer’s Disease Amyloid Plaque Targeting Of Native And Putrescine Modified Human Amyloid Beta40,” J. Pharmacol. Exp. Ther. 318:17-25)。通过酰胺化其部分或全部羧基基团(例如,scFv的羧基-末端基团、或谷氨酸或天冬氨酸残基的羧基侧链)的处理,scFv可被

扩大,以包含多聚阳离子基团。

[0159] 可选地,scFv可被扩大,以包含穿透细胞的肽(“CPP”)(Rao, K.S.等(2009)“Targeting Anti-HIV Drugs To The CNS,”Expert Opin. Drug Deliv. 6(8):771-784; Mathupala, S.P.等(2009)“Delivery Of Small-Interfering RNA(siRNA) To The Brain,”Expert Opin. Ther. Pat. 19(2):137-140; Hervé, F.等(2008)“CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis,”AAPS J. 10(3):455-472)。这样的肽包括HIV-1反式激活转录活化因子(TAT)肽、单纯疱疹病毒1型转录因子(HSV VP-22)肽,触角足突变(antennapedia)和穿膜肽(penetratin)(Wadia, J.S.等(2004)“Transducible TAT-HA Fusogenic Peptide Enhances Escape Of TAT-Fusion Proteins After Lipid Raft Macropinocytosis,”Nat. Med. 10:310-315; Richard, J.P.等(2003)“Cell-Penetrating Peptides. A Reevaluation Of The Mechanism Of Cellular Uptake,”J. Biol. Chem. 278: 585-590; Temsamani, J.等(2004)“The Use Of Cell-Penetrating Peptides For Drug Delivery,”Drug Discov. Today 9:1012-1019)。

[0160] III、本发明的抗体和抗体片段的用途

[0161] 本发明涉及对于^{p}Ser404表位免疫特异性的、基于抗体的分子诊断和/或治疗受试者患者的阿尔茨海默病或Tau疾病的用途。就这类诊断用途而言,这类用途可涉及使用,例如抗体4E6G7或其^{p}Ser404表位-结合片段(尤其是其scFv片段),其优选地已经被可检测地标记(这类分子在本文统称为本发明的诊断分子),在受试者中(即,体内)检测病理Tau构象异构体的存在。可选地,这类用途可涉及使用本发明的诊断分子离体(例如,在活组织检查样品,或死后)检测病理Tau构象异构体的存在。

[0162] 在一个实施方式中,本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子可以是人源化抗体。

[0163] 就本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子的治疗用途而言,这类用途可涉及向患者施用治疗有效量的这类基于抗体的分子(例如,抗体4E6G7,更具体而言,其scFv片段),所述患者具有阿尔茨海默病或这类Tau疾病的一个或多个症状,因此需要这类疗法,或这类用途可涉及向患者施用预防有效量的这类基于抗体的分子,所述患者不展示这类症状,或展示指示初期阿尔茨海默病或Tau疾病的轻微痴呆或Tau 疾病前的症状,这类分子在本文统称为本发明的治疗分子。

[0164] 本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子可联合对于^{p}Ser404表位之外的表位具有免疫特异性的抗体和基于抗体的分子一起用于诊断和/或治疗目的。

[0165] IV、本发明的Tau-结合分子的产生

[0166] 本发明的Tau-结合分子优选地经编码其组成多肽链的核酸分子的重组表达而产生。因此,本发明因此也涉及编码本发明的抗体或其片段的这样的一条或多条多肽链的表达载体。

[0167] 在本发明的上下文中,表达载体可为任何合适的DNA或RNA载体,包括染色体的、非染色体的和合成核酸载体(包含合适的表达调控元件的组的核酸序列)。这样的载体的实例包括SV40的衍生物、细菌质粒、噬菌体DNA、杆状病毒、酵母质粒、衍生自质粒和噬菌体DNA的组合的载体和病毒核酸(RNA或DNA)载体。在一个实施方式中,编码抗-Tau抗体的核酸包含在含有例如线性表达元件的裸DNA或RNA载体(例如,如在Sykes和Johnston, Nat Biotech

12,355-59 (1997) 中所描述的)、压缩核酸载体(例如,如US 6,077,835和/或WO 00/70087中所描述的)、质粒载体,比如pBR322、pUC 19/18或pUC 118/119、“蠓(midge)”最小尺寸核酸载体(例如,如在Schakowski等, MoI Ther 3,793-800 (2001) 中所描述的)中,或作为沉淀(precipitated)核酸载体构建体,比如,CaPO4-沉淀构建体(例如,如下面文献中所描述的: WO 00/46147; Benvenisty 和Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986); Wigler等Cell 14, 725 (1978); 以及Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 2, 603 (1981))。这样的核酸载体和其用途是本领域所熟知的(见例如,US 5,589,466和US 55,973,972)。

[0168] 在一个实施方式中,载体适于在细菌细胞中表达本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子。这类载体的例子包括表达载体,比如BlueScript (Stratagene)、pIN载体 (Van Heeke&Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)、pET载体 (Novagen, Madison, WI) 等)。表达载体也可以是或可选地是适于在酵母系统中表达这类基于抗体的分子的载体。可使用适于在酵母系统中表达的任何载体。合适的载体包括,例如,包含组成型或诱导型启动子比如α因子、醇氧化酶和PGH的载体(在以下中评述:F. Ausubel等编辑, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987); 和Grant等, Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987))。

[0169] 在本发明的表达载体中,编码本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子的核酸分子可包含任何合适的启动子、增强子和其他促进表达的元件,或与任何合适的启动子、增强子和其他促进表达的元件连接。这样的元件的实例包括强表达启动子(例如,人CMV IE启动子/增强子以及RSV、SV40、SL3-3、MMTV和HIV LTR启动子),有效的多聚腺甘终止序列、在大肠埃希氏菌(E.coli)中的质粒产物的复制的起点、作为选择标记物的抗生素抗性基因和/或方便的克隆位点(例如,多连接体)。核酸也可包含与组成型启动子相对的诱导型启动子,比如CMV IE(技术人员将认识到,这类术语实际上是对某些条件下基因表达程度的描述符号)。

[0170] 在甚至进一步方面中,本发明涉及重组真核或原核宿主细胞,比如转染瘤,其产生本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子。宿主细胞的例子包括酵母、细菌和哺乳动物细胞,比如CHO或HEK细胞。例如,在一个实施方式中,本发明提供的细胞包含稳定整合至细胞基因组中的核酸,其包含用于编码表达本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子的序列。在另一实施方式中,本发明提供细胞包含非整合核酸,比如质粒、黏粒、噬菌粒,或线性表达元件,其包含编码用于表达本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子的序列。

[0171] 在进一步的方面中,本发明涉及产生本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子的方法,所述方法包括下述步骤:a) 培养如本文上述的本发明的杂交瘤或宿主细胞,和b) 从培养基纯化本发明的抗体。

[0172] 一般而言,可通过包含任何适当数量的修饰的氨基酸和/或与这类缀合的取代基结合来修饰本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子。在这样的情况下,通常通过至少实质上保持与非衍生化亲本抗Tau抗体相关的、对于^{p}Ser404表位的免疫特异性的能力来确定合适性。一个或多个修饰的氨基酸的存在在以下方面可以是有利的:例如延长多肽血清半衰期、降低多肽抗原性或提高多肽储存稳定性。氨基酸在重组产生过程中,经例如共翻译或后翻译被修饰(例如,在哺乳动物细胞中表达过程中,在 N-X-S/T基序的N-连接的

糖基化)或通过合成方法被修饰。修饰氨基酸的非限制性实例包括糖基化氨基酸、含硫氨基酸、异戊二烯化(例如,法尼化(farnesylated)、牻牛儿基牻牛儿基化(geranylgeranylated))氨基酸、乙酰化氨基酸、酰化氨基酸、PEG化(PEGylated)氨基酸、生物素化(biotinylated)氨基酸、羧化氨基酸、磷酸化氨基酸等等。适于指导本领域技术人员修饰氨基酸的参考文献遍布整个文献。示例性的方案可见于Walker (1998) *Protein Protocols On CD-Rom*, Humana Press, Totowa, NJ。修饰的氨基酸可选自,例如,糖基化氨基酸、PEG化氨基酸、法尼化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸或与有机衍生剂缀合的氨基酸。

[0173] 如上所述,当需要延长施用的本发明的治疗分子的半衰期时,可使这样的分子形成为包含碳水化合物部分,比如聚氧乙烯化多元醇或聚乙二醇(PEG)(例如,分子量在大约1,000和大约40,000之间,比如在大约2,000和大约20,000之间,例如,大约3,000-12,000g/mol之间的PEG)(Moosmann, A.等(2014)“Purification Of PEGylated Proteins, With The Example Of PEGylated Lysozyme and PEGylated scFv,”*Methods Mol. Biol.* 1129:527-538; Jevsevar, S.等(2010)“PEGylation Of Therapeutic Proteins,”*Biotechnol. J.* 5:113-228),或通过糖基化或通过添加或结合蛋白质,比如人血清白蛋白形成这样的分子(Müller, M.R.等(2012)“Improving The Pharmacokinetic Properties Of Biologics By Fusion To An Anti-HSA Shark VNAR Domain,”*MAbs*. 4 (6):673-685; Stork, R. 等(2008)“N-Glycosylation As Novel Strategy To Improve Pharmacokinetic Properties Of Bispecific Single-Chain Diabodies,”*J. Biol. Chem.* 283:7804-7812; Alt, M.等(1999)“Novel Tetravalent And Bispecific IgG-like Antibody Molecules Combining Single-Chain Diabodies With The Immunoglobulin Gamma1Fc or CH3Region,”*FEBS Lett.* 454:90-94; Peters T.等(1985)“Serum Albumin,”*Adv. Protein Chem.* 37:161-245)。示例性的聚合物和将其连接至多肽的方法是已知的(见,例如,美国专利号4,766,106、4,179,337、4,495,285和4,609,546)。

[0174] V、本发明的药物组合物

[0175] 本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子有利地作为药物组合物被施用,所述药物组合物包含活性治疗剂和各种其他药学上可接受的组分中的一种或多种。见Remington: The Science and Practice of Pharmacy(第21版)(2005)(Troy, D.B.等(编辑)Lippincott Williams&Wilkins(Publs.), Baltimore MD),其通过引用并以其整体入本文。优选的形式取决于意图的施用模式和治疗应用。取决于期望的制剂,组合物也可包括药学上可接受的、非毒性载体、赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、清洁剂(例如非离子清洁剂,比如Tween-20或Tween-80)、稳定剂(例如糖或无蛋白质的氨基酸(protein-free amino acids))、防腐剂、组织固定剂、增溶剂和/或其他材料,所述其他材料是适合包含到药物组合物中的,并且其为通常用于配制用于动物或人施用的药物组合物的媒介。选择稀释剂以不影响组合的生物活性。这样的稀释剂的实例是蒸馏水、磷酸盐-缓冲生理盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和Hank's溶液。另外,药物组合物或制剂也可包括其他载体、或非毒性、非治疗性、非免疫源性稳定剂等等。可在本发明的药物组合物中采用的合适的水性的和非水性的载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、乙醇、葡萄糖、多元醇(比如甘油、丙二醇、聚乙二醇等等)和其合适的混合物、植物油,比如橄榄油、玉米油、花生油、棉花籽油和芝

麻油、羧甲基纤维素胶体溶液、西黄芪胶和可注射的有机酯,比如油酸乙酯和/或各种缓冲剂。其他的载体在药物学领域是熟知的。

[0176] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体以及用于无菌可注射溶液或分散体的临时制备的无菌粉末。对于药学上的活性物质,这样的介质和药剂的用途在本领域是已知的。除了因为任何传统的介质或药剂与活性化合物不相容,考虑其在本发明药物组合物中的用途。

[0177] 组合物也可包括大的、缓慢代谢的大分子,比如蛋白质、多糖如壳聚糖、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物(例如,乳胶官能化的琼脂糖(sepharose)、琼脂糖(agarose)、纤维素等等)、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和脂质聚集体(例如,油滴或脂质体)。基于对本发明选择的化合物或药物组合物针对抗原结合的期望生物学性质没有显著消极影响(例如,少于实质影响(例如,10%或更少的相对抑制、5%或更少的相对抑制等等)),确定药物组合物的载体和其他组分的适合性。

[0178] 本发明的药物组合物也可包含药学上可接受的抗氧化剂,例如(1)水可溶性的抗氧化剂,比如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等等;(2)油-可溶性的抗氧化剂,比如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、棓酸丙酯、 α -生育酚等等;和(3)金属螯合剂,比如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等等。

[0179] 本发明的药物组合物也可在组合物中包含等渗剂(isotonicity agents),比如糖、多元醇,比如甘露醇、山梨醇、甘油或氯化钠。

[0180] 本发明的药物组合物也可包含一种或多种适于选择的施用途径的佐剂,比如防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、防腐剂或缓冲剂,其可提高药物组合物的保存期或有效性。本发明的化合物可与保护化合物避免快速释放的载体一起制备,比如控释制剂,包括植入物(implant)、透皮贴片和微胶囊化递送系统。这样的载体可包括明胶、单硬脂酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯、可生物降解的、生物相容的聚合物,比如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸,胶原、聚原酸酯和聚乳酸,单独地或同蜡或其他本领域熟知的材料一起。用于制备这样的制剂的方法通常是本领域技术人员所知悉的。见例如, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0181] 在一个实施方式中,本发明的化合物可被配制以保证在体内适当地分布。用于肠胃外施用的药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体以及用于无菌可注射溶液或分散体的临时制备的无菌粉末。对于药学上的活性物质,这样的介质和药剂的用途是本领域已知的。除非目前与活性化合物不相容的任何传统的介质或药剂,考虑其在本发明药物组合物中的用途。补充性的活性化合物也可包含在组合物中。

[0182] 用于注射的药物组合物通常在制造和储存条件下必须为无菌和稳定的。组合物可作为溶液、微乳剂、脂质体、或适合高药物浓度的其他有序结构(ordered structure)被配制。载体可为水性溶剂或非水性溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(比如甘油、丙二醇、聚乙二醇等等)和其合适的混合物、植物油,比如橄榄油和可注射的有机酯,比如油酸乙酯。例如,通过使用涂层比如卵磷脂,在分散体的情况下通过保持要求的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂,可保持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂(isotonic agents),例如,糖、多元醇,比如甘油、甘露醇、山梨醇或氯化钠。可通过在组合

物中包含延迟吸收的药剂来实现可注射的组合物的延长的吸收,所述延迟吸收的药剂例如,单硬脂酸盐和明胶。可通过在合适的溶剂中掺入需要量的活性化合物与一种例如如上面列举的成分或成分的组合(如需要),然后进行杀菌微滤,来制备无菌可注射溶液。通常,通过在无菌媒介中掺入活性化合物制备分散体,所述无菌媒介包含基本分散介质和需要的其他成分,比如来自上面列举的那些的成分。在无菌粉末用于制备无菌可注射溶液的情况下,制备方法的实例是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其产生活性成分加上来自其之前的无菌-过滤溶液的任何另外的期望成分的粉末。

[0183] 可通过在合适的溶剂中掺入需要量的活性化合物与一种如上面列举的成分或成分的组合(如需要),然后进行杀菌微滤,来制备无菌可注射溶液。通常,通过在无菌媒介中掺入活性化合物制备分散体,所述无菌媒介包含基本分散介质和来自上面列举的所需的其他成分。在无菌粉末用于制备无菌可注射溶液的情况下,制备方法的实例是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其产生活性成分加上来自其之前的无菌-过滤溶液的任何另外的期望成分的粉末。

[0184] 对于肠胃外施用,本发明的药剂通常与药物载体一起在生理学上可接受的稀释剂中被配制为物质的可注射剂量的溶液或悬夜,所述药物载体可为无菌液体,比如水、油、盐水、甘油或乙醇。另外,助剂(*auxiliary substances*),比如润湿或乳化剂、表面活性剂、pH缓冲物质等等可在组合物中存在。药物组合物的其他组分是石油来源,动物来源、植物来源或合成来源那些组分。花生油、大豆油和矿物油都是有用的材料的实例。一般而言,乙二醇,比如丙二醇或聚乙二醇,是优选的液体载体,尤其对于可注射溶液来说。本发明的药剂可以储库(depot)注射剂或植入物制剂的形式施用,所述注射剂或制剂可以以允许活性成分缓释的这样的方式被配制。示例性的组合物包括大约5mg/mL的scFv,其在水性缓冲溶液中被配制,所述缓冲溶液由50mM L-组氨酸、150mM NaCl组成,用HCl调节至pH 6.0。

[0185] 典型地,组合物因此被制备为可注射的,作为液体溶液或悬夜;也可制备在注射前适合溶解或悬浮在液体媒介中的固体形式。制剂也可在脂质体或微粒,比如聚交酯、聚乙醇酸交酯或共聚物,中被乳化或胶囊化,以增强佐剂效果(Langer, 等*Science* 249:1527 (1990); Hanes, 等*Advanced Drug Delivery Reviews* 28:97-119 (1997), 其通过引用以其整体并入本文)。适合其他施用模式的另外的制剂包括口服制剂、鼻内制剂和肺部制剂、栓剂和经皮肤应用。

[0186] VI、本发明的药物组合物的施用

[0187] 本发明的分子可经肠胃外、局部、口服或鼻内途径施用,用于预防性和/或治疗性治疗。肌肉注射(例如,注射到手臂或腿肌肉中)和静脉内输注是本发明的分子的优选的施用方法。在一些方法中,这样的分子作为缓释组合物或设备施用,所述设备比如 MedipadTM设备(Elan Pharm. Technologies, 都柏林, 爱尔兰)。在一些方法中,本发明的分子被直接注射到已经积累沉积物的特定的组织中,例如颅内注射。

[0188] 在一个实施方式中,本发明的药物组合物经肠胃外施用。如本文所用的短语“肠胃外施用”和“经肠胃外施用”表示肠和局部施用之外的施用模式,通常通过注射,包括表皮、静脉内、肌肉、动脉内、鞘内、囊内、颅内、眶内、心内、皮内、腹膜内、腱内(*intratendinous*)、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下的、蛛网膜下、脊柱内、颅内、胸内、硬膜外和胸骨内注射、皮下和输注。在一个实施方式中,药物组合物通过静脉内或皮下注射或输注来施用。

[0189] 在预防性应用中,药物组合物或药物被施用至易患阿尔茨海默病的患者,或有阿尔茨海默病风险的患者,施用的量足以消除或降低风险、减少严重性或延迟疾病发作,所述疾病包括疾病的生化症状,组织学症状和/或行为症状,在疾病的发展过程中存在的其并发症和中间的病理表型。

[0190] 在治疗应用中(例如,在涉及已经被诊断为患有阿尔茨海默病或其他tau疾病的患者的应用中),本发明的治疗分子被施用至这样的患者,施用的量足以治愈、治疗或至少部分抑制疾病的症状(如生化评估、组织学评估和/或行为评估所证明的),所述症状包括在疾病的发展过程中其并发症和中间的病理表型。在一些实施方式中,施用本发明的治疗分子降低或消除在还未发展特征性阿尔茨海默病理的患者中的轻微认知损伤。

[0191] 本发明提供的治疗分子用于治疗上述病况的有效剂量可随着许多不同的因素而变化,所述因素包括施用方法、靶位点、患者的生理状态、施用的其他药品以及治疗是预防性的还是治疗性的。治疗剂量通常被滴定(titrated)以最优化其安全和效力。在给予剂量的任何给定日,剂量范围可为约0.0001mg/kg至约100mg/kg(更通常约0.01mg/kg至约5mg/kg)宿主体重。例如,剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重,或在1mg/kg-10mg/kg体重的范围内。因此,示例性剂量包括约0.1mg/kg/体重至约10mg/kg/体重、约0.1mg/kg/体重至约5mg/kg/体重、约0.1mg/kg/体重至约2mg/kg/体重、约0.1mg/kg/体重至约1mg/kg/体重,例如约0.15mg/kg/体重、约0.2mg/kg/体重、约0.5mg/kg/体重、约1mg/kg/体重、约1.5mg/kg/体重、约2mg/kg/体重、约5mg/kg/体重,或约10mg/kg/体重。

[0192] 具有本领域普通技术的医生或兽医可容易地确定或指定需要的药物组合物的有效量。例如,医生或兽医可从在药物组合物中采用低于达到期望的治疗效果所需要的水平的抗-Tau抗体或片段的剂量开始,然后逐渐增加剂量,直到达到期望的效果。总的来说,本发明组合物的合适的每日剂量是有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。这样的有效剂量通常取决于上面描述的因素。施用可为例如静脉内、肌肉、腹膜内或皮下施用,例如靠近靶位点施用。如需要,药物组合物的有效的每日剂量可以两个、三个、四个、五个、六个或更多个的亚剂量(sub-doses)在全天以合适的间隔分别施用,任选地,以单位剂量形式施用。虽然单独施用本发明的化合物是可能的,但优选以上面所描述的药物组合物来施用化合物。

[0193] 示例的治疗方案需要每两周施用一次或每月施用一次或每3至6月施用一次。在一些方法中,一种、两种或更多种抗体(或其表位结合片段)将与本发明的治疗分子的施用结合施用,在这种情况下,每种这样的施用分子的剂量落入所描述的范围内。

[0194] 施用的剂量和频率,可根据治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,在长的时间段内,以相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些患者在其余生继续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对短的间隔的相对高的剂量,直到疾病的发展被减轻或终止为止,以及优选地,直到患者显示疾病症状的部分或完全改善。此后,可使用预防性给药方案向患者施用这样的治疗分子。

[0195] 为了治疗目的,本发明的分子通常在多个时机被施用。在单次剂量(例如,大丸药或输注)之间的间隔可为每周一次、每月一次或每年一次。在一些方法中,剂量被调整,以实现1-1000 μ g/mL的血浆浓度,以及在一些方法中,实现25-300 μ g/mL的血浆浓度。可选地,本发明的治疗分子可作为缓释制剂施用,在这种情况下,需要较不频繁的施用。剂量和频率根

据抗体在患者中的半衰期而变化。总的来说，人抗体显示最长的半衰期，接下来是人源化抗体、嵌合抗体和非人类抗体。scFv分子通常有短的血清半衰期。

[0196] 本发明的另一方面是联合疗法，其中识别Tau蛋白质或其免疫源性表位的另外的抗体或其表位结合片段，联合本发明的治疗分子被施用。在促淀粉样变性(amyloidogenic)疾病，比如阿尔茨海默病和唐氏综合症的情况下，清除淀粉状蛋白- β (A β)沉积的免疫调节是新兴疗法。靶向A β 的免疫疗法持续导致认知改善。很可能Tau和 A β 病理是协同作用的。因此，同时把两种病理的清除都作为目标的联合疗法，相较于把每种病理单独作为目标更有效。在帕金森疾病和相关神经变性疾病的情况下，清除 α -突触核蛋白蛋白质的聚集形式的免疫调节也是新兴疗法。同时把Tau和 α -突触核蛋白蛋白质的清除作为目标的联合疗法可以比把每个单独作为目标更有效。

[0197] VII、本发明的Tau-结合分子的用途

[0198] D、诊断用途

[0199] 使用本发明的基于^{p}Ser404表位特异性抗体的诊断分子检测受试者中病理Tau构象异构体的存在可通过如下方式实现：从受试者获得生物样品(例如，血液、尿、脑脊液)；使生物样品与所述诊断抗体接触；和检测诊断分子与来自受试者样品的病理Tau 蛋白质构象异构体的结合。用于在生物样品中进行病理Tau蛋白的检测的测定可容易地改造成检测本发明的诊断分子，这在本领域是熟知的，其包括但不限于，ELISA、免疫组织化学、蛋白质印迹等。

[0200] 可选地，使用本发明的基于^{p}Ser404表位特异性抗体的诊断分子检测受试者中病理Tau蛋白质构象异构体的存在，可使用体内成像技术实现。体内成像涉及向受试者施用具有对病理Tau肽的抗原特异性的诊断抗体，并且检测诊断抗体试剂在体内与病理Tau蛋白构象异构体的结合。

[0201] 本发明的基于^{p}Ser404表位特异性抗体的诊断分子可通过注射(例如，静脉内注射、颈动脉内注射等)施用至患者体内，或通过颅内注射直接施用至脑中。这类分子的剂量应为约0.0001mg/kg至约100mg/kg(更通常为约0.01mg/kg至约5mg/kg)的宿主体重。例如，剂量可以是约1mg/kg体重或约10mg/kg体重或在约1-10mg/kg的范围内。

[0202] 典型地，本发明的基于^{p}Ser404表位特异性抗体的诊断分子被标记，虽然在一些方法中，分子可为未标记的，并且二级标记剂被用于与这样的分子结合(使用在本领域已知的技术，与分子直接连接或缀合，或通过中间体(比如，例如，本领域已知的连接体)与分子间接连接或缀合)。标记的选择取决于检测的手段。例如，荧光标记(比如，稀土螯合物(例如铕螯合物)、荧光素(fluorescein)-型标记(例如，荧光素、异硫氰酸荧光素、5-羧基荧光素、6-羧基荧光素、二氯三嗪基胺荧光素)、若丹明型标记(例如ALEXA FLUOR® 568 (Invitrogen)、TAMRA®或丹磺酰氯(dansyl chloride))、VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™(Perkin Elmer)、藻红素、7-羟基香豆素、丽丝胺(Lissamine)、花菁、藻红素、德克萨斯红(Texas Red)、BODIPYFL-SE®(Invitrogen)或其类似物，是适合光学检测的。可采用化学发光标记(例如，鲁米诺(luminol)、荧光素酶、虫荧光素(luciferin)和水母发光蛋白)。这样的诊断和检测也可通过将本发明的诊断分子与可检测的物质连接来完成，所述可检测的物质包括但不限于：各种酶，酶包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶，或通过将其与辅基复合物(prosthetic group

complexes) 连接来完成, 所述辅基复合物比如, 但不限于: 链霉抗生物素/生物素和抗生物素蛋白/生物素。也可采用顺磁标记和放射性同位素标记, 其优选地使用正电子放射断层成像术(Positron Emission Tomography) (PET) 或单光子计算机断层成像术(Single-Photon Emission Computed Tomography) (SPECT) 被检测。放射性标记包括但不限于, 钋(²¹³Bi)、碳(¹¹C、¹³C、¹⁴C)、铬(⁵¹Cr)、钴(⁵⁷Co、⁶⁰Co)、铜(⁶⁴Cu)、镝(¹⁶⁵Dy)、铒(¹⁶⁹Er)、氟(¹⁸F)、钆(¹⁵³Gd)、¹⁵⁹Gd)、镓(⁶⁸Ga、⁶⁷Ga)、锗(⁶⁸Ge)、金(¹⁹⁸Au)、钬(¹⁶⁶Ho)、氢(³H)、铟(¹¹¹In、¹¹²In、¹¹³In、¹¹⁵In)、碘(¹²¹I、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I)、铱(¹⁹²Ir)、铁(⁵⁹Fe)、氪(^{81m}Kr)、镧(¹⁴⁰La)、镥(¹⁷⁷Lu)、锰(⁵⁴Mn)、钼(⁹⁹Mo)、氮(¹³N、¹⁵N)、氧(¹⁵O)、钯(¹⁰³Pd)、磷(³²P)、钾(⁴²K)、镨(¹⁴²Pr)、钷(¹⁴⁹Pm)、铼(¹⁸⁶Re)、¹⁸⁸Re)、铑(¹⁰⁵Rh)、铷(⁸¹Rb、⁸²Rb)、钌(⁸²Ru、⁹⁷Ru)、钐(¹⁵³Sm)、钪(⁴⁷Sc)、硒(⁷⁵Se)、钠(²⁴Na)、锶(⁸⁵Sr、⁸⁹Sr、⁹²Sr)、硫(³⁵S)、锝(⁹⁹Tc)、铊(²⁰¹Tl)、锡(¹¹³Sn、¹¹⁷Sn)、氙(¹³³Xe)、镱(¹⁶⁹Yb、¹⁷⁵Yb)、¹⁷⁷Yb)、钇(⁹⁰Y) 和锌(⁶⁵Zn); 使用各种正电子放射断层成像术的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子(比如, 顺磁性铝(Al)离子、钡(Ba)离子、钙(Ca)离子、铈(Ce)离子、镝(Dy)离子、铒(Er)离子、铕(Eu)离子、钆(Gd)离子、钬(Ho)离子、铱(Ir)离子、锂(Li)离子、镁(Mg)离子、锰(Mn)离子, 钇(M)离子、钕(Nd)离子、锇(0s)离子、氧(O)离子、钯(Pd)离子、铂(Pt)离子、铑(Rh)离子、钌(Ru)离子、钐(Sm)离子、钠(Na)离子、锶(Sr)离子、铽(Tb)离子、铥(Tm)离子、锡(Sn)离子、钛(Ti)离子、钨(W)离子和锆(Zi)离子, 尤其是Co⁺²、Cr⁺²、Cr⁺³、Cu⁺²、Fe⁺²、Fe⁺³、Ga⁺³、Mn⁺³、Ni⁺²、Ti⁺³、V⁺和V⁺⁴)。制备放射性标记的氨基酸和相关的肽衍生物的方法在本领域是已知的(见例如, Junghans等, 在以下中: Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686(第二版, Chafner和Longo, 编辑, Lippincott Raven (1996)) 和美国专利号4,681,581; 4,735,210; 5,101,827; 5,102,990; RE 35,500; 5,648,471和5,697,902。例如, 可通过氯胺T法缀合放射性同位素(Lindegren, S.等(1998)“Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl) Benzoate As An Intermediate,”Nucl. Med. Biol. 25 (7):659-665; Kurth, M.等(1993)“Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor,”J. Med. Chem. 36 (9):1255-1261; Rea, D. W.等 (1990)“Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors,”Cancer Res. 50 (3 Suppl):857s-861s)。

[0203] 通过将在受试者中或来自受试者的样品中的标记的病理Tau构象异构体、Tau聚集体和/或神经元纤维缠结的数目、大小和/或强度与相应的基线值比较, 来进行诊断。基线值可代表在非患病个体的群体中的平均水平。基线值也可代表相同受试者中测定的之前的水平。

[0204] 上面描述的诊断方法也可用于监控受试者对治疗的应答。在该实施方式中, 在治疗开始前, 确定病理Tau在受试者中的存在的检测。在该时间点, 病理Tau在受试者中的水平被用作基线值。在治疗过程中的各种时间点, 重复病理Tau蛋白构象异构体、Tau聚集体和/或神经元纤维缠结的检测, 然后, 将测量值与基线值比较。相对于基线的值的减小, 表示对治疗的积极应答。随着从脑中清除病理Tau, 值也可在生物流体中临时增加。

[0205] 本发明进一步涉及用于进行上述诊断和监控方法的试剂盒。典型地, 这样的试剂盒包含本发明的诊断抗体。试剂盒也可包含可检测标记。诊断抗体本身可包含可检测标记

(例如,荧光分子、生物素等等),其是直接可检测的或经二级反应(例如与链酶抗生物素的反应)可检测的。可选地,可应用包含可检测标记的第二剂,其中所述第二剂对于一级抗体有结合特异性。在适合用于测量生物样品中的病理Tau蛋白质诊断试剂盒中,试剂盒的抗体可以预结合(pre-bound)至固相,比如预结合至微量滴定盘(microtiter dish)的孔被提供。

[0206] 为诊断的目的,可体内检测标记的抗-Tau抗体或其Tau-结合片段的存在。在一个实施方式中,这样的诊断包括:a)向受试者施用有效量的这样的标记分子;b)在施用后等待一段时间间隔,以允许标记的分子集中在聚集的Tau的位点(如果有),并且允许未结合的标记分子被清除至背景水平;c)测定背景水平;和d)检测受试者中的这样的标记的分子,这样超过背景水平的标记的分子的检测指示受试者有tau疾病或指示这样的tau疾病的严重性。根据这样的实施方式,抗体被标记以适合使用本领域技术人员已知的具体成像系统检测的成像部分。背景水平可通过各种本领域已知的各种方法测定,所述方法包括比较检测的标记分子的量与之前针对特定成像系统确定的标准值。可用在本发明的诊断方法中的方法和系统包括但不限于:计算机断层成像术(CT)、全身扫描,比如正电子放射断层成像术(PET)、磁共振成像(MRI)和超声波扫描术。

[0207] E、治疗性用途

[0208] 如上所述,本发明的一个方面涉及预防或治疗受试者中的阿尔茨海默病或其他tau疾病的方法,其通过施用有效量的本发明的基于^{p}Ser404表位特异性的抗体的分子(尤其是抗体4E6G7或其scFv片段),以有效量预防或治疗这样的阿尔茨海默病或其他tau疾病。可提供这样的施用,以促进从受试者的脑清除Tau聚集体,或提供这样的施用,以减缓受试者中的缠结相关的行为表型。另外,这样的施用可预防性地提供,以延迟、阻碍、减弱或预防阿尔茨海默病或与神经元纤维缠结相关的其他tau疾病的发作。

[0209] 如本文所用的术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指改善、减缓或逆转疾病或病症的发展或严重性,或改善、减缓或逆转这样的疾病或病症的一种或多种症状或副作用。为本发明的目的,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”还指用于获得有益或期望的临床结果的方法,其中“有益或期望的临床结果”包括,但不限于:减轻症状、减小病症或疾病的程度、稳定(即,不恶化)疾病或病症状态、延迟或减缓疾病或病症状态的发展、改善或缓和疾病或病症状态、以及缓解疾病或病症,无论部分的还是全部的,可检测的还是不可检测的。

[0210] 当用于本发明的抗体时,“有效量”是指,以剂量和在需要的时间段足以实现预期的生物效果或期望的治疗结果的量,所述预期生物效果或期望的治疗结果包括但不限于临床结果。当用于本发明的抗体时,短语“治疗有效量”旨在表示这样的抗体的量:所述抗体的量足以改善、缓和、稳定、逆转、减缓或延迟病症或疾病状态的发展,或病症或疾病症状的发展。在实施方式中,本发明的方法使抗体与其他化合物联合施用。在这样的情况下,“有效量”是足以引起预期的生物效果的联合的量。

[0211] 足以实现治疗性治疗或预防性治疗的量分别被定义为治疗有效剂量或预防有效剂量。在预防性方案和治疗性方案两者中,通常以若干剂量施用药剂,直到实现充分的免疫应答。典型地,监控免疫应答,并且,如果免疫应答开始衰落,则给予重复剂量。这样的抗体或其表位结片段的治疗有效剂量或预防有效剂量可根据因素而变化,所述因素比如疾病状

态、年龄、性别和个体重量,以及分子在受试者中引发期望的应答的能力。治疗有效量也是这样的一种量:其中,有益治疗效果超过任何抗体或抗体部分的有毒的或有害的效果。

[0212] 服从治疗的患者包括患有阿尔茨海默病或患有这类其他tau疾病的个体,所述个体显示这类病况的公认的临床症状或适应症,以及包括目前没有显示这类病况的症状的患者。虽然阿尔茨海默病仅在死后活组织检查中被确认诊断,但临幊上使用“阿尔茨海默病和相关病症协会(“ADRDA”)标准诊断患有阿尔茨海默病的个体(Carrillo, M.C. 等(2013)“Revisiting The Framework Of The National Institute On Aging-Alzheimer’s Association Diagnostic Criteria,”Alzheimers Dement. 9(5):594-601; Budson, A.E. 等(2012)“New Criteria For Alzheimer Disease And Mild Cognitive Impairment: Implications For The Practicing Clinician,”Neurologist 18(6):356-363; Sarazin, M. 等(2012)“Clinical And Research Diagnostic Criteria For Alzheimer’s Disease,”Neuroimaging Clin. N. Amer. 22(1):23-32; Husain, M.M. (2005)“Clinical Diagnosis And Management Of Alzheimer’s Disease,”Neuroimaging Clin. N. Amer. 15(4):767-777; Small, G.W. 等(1997)“Diagnosis And Treatment Of Alzheimer Disease And Related Disorders. Consensus Statement Of The American Association For Geriatric Psychiatry, The Alzheimer’s Association, And The American Geriatrics Society,”JAMA 278(16):1363-1371)。可选地,可通过相关风险因素(例如,已经发现与阿尔茨海默病或这类其他tau疾病具有高于50%的并发率(coincidence)的一种或多种因素)的存在,将这类个体与患有与阿尔茨海默病或其他tau疾病无关的疾病或病况的那些个体区别开。这类相关风险因素包括这样的发现:患者的亲属经历过阿尔茨海默病或这类其他tau疾病,或存在高胆固醇血症或动脉粥样硬化的家族史。这类相关风险因素尤其包括这样的发现:患者具有与这类实际疾病的发生相关(例如,被发现与其具有高于50%的并发率)的一种或多种遗传或生化标记物。这样的倾向于阿尔茨海默病的风险的遗传标记物的实例包括在APP基因中的相关突变,例如,在APP基因的717位和670和671位的突变(分别指Hardy和Swedish突变)。已知的遗传风险的其他合适的标记物包括在早老素基因(PS1和PS2)和在ApoE4基因(Bekris, L.M. 等(2010)“Genetics of Alzheimer Disease,”J. Geriatr. Psychiatry Neurol. 23(4):213-227)中的相关突变。

[0213] 这类PS1突变包括取代:R35Q; A79V; V82L; L85P; V89L; V94M; V96F; V97L; F105I; F105L; F105V; L113P; L113Q; Y115C; Y115D; Y115H; T116I; T116N; P117A; P117L; P117R; P117S; E120D; E120D; E120G; E120K; E123K; N135D; N135S; A136G; M139I; M139I; M139K; M139T; M139V; I143F; I143M; I143N; I143T; I143V; M146I; M146I; M146I; M146L; M146L; M146V; T147I; L153V; Y154C; Y154N; H163R; H163Y; W165C; W165G; L166H; L166P; L166R; S169L; S169P; S170F; L171P; L173F; L173W; L174M; L174R; F175S; F177L; F177S; S178P; G183V; E184D; V191A; G206A; G206D; G206S; G206V; G209E; G209R; G209V; S212Y; I213F; I213L; I213T; H214D; H214Y; G217D; G217R; L219F; L219P; Q222H; Q222R; Q223R; L226F; L226R; I229F; A231T; A231V; M233I; M233L; M233L; M233T; M233V; L235P; L235V; F237I; F237L; K239N; T245P; A246E; L248R; L250S; L250V; Y256S; A260V; V261F; V261L; L262F; C263F; C263R; P264L; G266S; P267L; P267S; R269G; R269H; L271V; V272A; E273A; T274R; R278I; R278K; R278S; R278T; E280A; E280G; L282F; L282R; L282V; P284L; P284S; A285V;

L286P;L286V;T291P; E318G;R358Q;S365A;R377M;G378E;G378V;L381V;G384A;F386S; S390I;V391F;L392P;L392V;G394V;N405S;A409T;C410Y;V412I; L418F;L420R;L424F; L424H;L424R;L424V;A426P;A431E;A431V; A434C;L435F;P436Q;P436S;和I439S。

[0214] 这类PS2突变包括取代:R29H;G34S;R62C;R62H;R71W;A85V;T122P; T122R;S130L; V139M;N141I;L143H;V148I;R163H;M174V;S175C; Y231C;Q228L;M239V;M230I;A252T; P334R;T430M;和D439A。

[0215] 这类ApoE4等位基因包括 ϵ 4等位基因、 ϵ 3等位基因和 ϵ 2等位基因 (Verghese, P.B. 等 (2011) “Apolipoprotein E In Alzheimer’s Disease And Other Neurological Disorders,” Lancet Neurol. 10 (3) :241-252)。

[0216] 另外,许多诊断测试可用于鉴定患有阿尔茨海默病的个体。这些包括测量CSF Tau 和A β 42水平。升高的Tau和降低的A β 42水平预示着存在阿尔茨海默病。

[0217] 在阿尔茨海默病的情况下,事实上任何人都有患阿尔茨海默病的风险。因此,本发明的治疗分子可预防性地施用至普通人群,而不需要针对受试患者的风险的任何评估。本发明方法尤其可用于预防性治疗具有已知的阿尔茨海默病的遗传风险的个体。在无症状的患者中,治疗可开始于任何年龄(例如,10、20、30岁)。然而,通常,在患者达到40、50、60、70、80或90岁的年龄以前没有必要开始治疗。治疗典型地需要在一段时间内施用多个剂量。通过分析抗体或活化的T-细胞或B-细胞随时间对治疗剂的应答,治疗可被监控。如果应答失败,则指示加强剂量。在潜在唐氏综合症患者的情况下,治疗可在产前开始,这通过在妊娠期间向母亲施用治疗剂,或患者出生后立即开始治疗。

[0218] 本发明提供了:

[0219] 1、一种基于^{p}Ser404表位特异性抗体的分子。

[0220] 2、这类基于^{p}Ser404表位特异性抗体的分子的实施方式,其中所述分子是抗体。

[0221] 3、这类基于^{p}Ser404表位特异性抗体的分子的实施方式,其中所述分子是抗体4E6G7。

[0222] 4、这类基于^{p}Ser404表位特异性抗体的分子的实施方式,其中所述分子是scFv 或双抗体。

[0223] 5、任何上述结合分子的实施方式,其中所述分子免疫特异性结合至Tau 396/404 肽 (SEQ ID NO:8) :TDHGAEIVYK^{p}SPVSGDT^{p}SPRHL,其中其残基11和19是磷酸丝氨酸。

[0224] 6、任何上述结合分子的实施方式,其中所述表位-结合片段包含下述一个或多个:

[0225] (a) 轻链CDR1,其具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0226] (b) 轻链CDR2,其具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

[0227] (c) 轻链CDR3,其具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

[0228] (d) 重链CDR1,其具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

[0229] (e) 重链CDR2,其具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列;或

[0230] (f) 重链CDR3,其具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0231] 7、任何上述结合分子的实施方式,其中表位-结合片段包含:

[0232] (a) 轻链CDR1,其具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0233] (b) 轻链CDR2,其具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

[0234] (c) 轻链CDR3,其具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

- [0235] (d) 重链CDR1,其具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列;
- [0236] (e) 重链CDR2,其具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列;和
- [0237] (f) 重链CDR3,其具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。
- [0238] 8、上述结合分子的实施方式,其包含具有SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域和具有SEQ ID NO:13的序列的重链可变结构域。
- [0239] 9、上述结合分子的实施方式,其包含具有SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域和具有SEQ ID NO:13的序列的重链可变结构域,其中所述分子是抗体4E6G7。
- [0240] 10、上述结合分子的实施方式,其包含具有SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域和具有SEQ ID NO:13的序列的重链可变结构域,其中所述分子是scFv。
- [0241] 11、上述scFv的实施方式,其包含SEQ ID NO:17的序列。
- [0242] 12、任何上述结合分子的实施方式,其被可检测地标记。
- [0243] 13、任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式,其中可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记。
- [0244] 14、(A) 任何上述可检测地标记的结合分子用于制造用于检测或测量接受受试者的脑中或接受受试者的生物样品中磷酸化的Tau蛋白质的存在或量的药物的实施方式,或
- [0245] (B) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式用于检测或测量接受受试者的脑中或接受受试者的生物样品中磷酸化的Tau蛋白质的存在或量的用途。
- [0246] 15、(A) 任何上述可检测地标记的结合分子用于制造用于检测或测量接受受试者的脑中或接受受试者的生物样品中磷酸化的Tau蛋白质的存在或量的药物的实施方式,或
- [0247] (B) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式用于检测或测量接受受试者的脑中或接受受试者的生物样品中磷酸化的Tau蛋白质的存在或量的用途;
- [0248] 其中所述检测或测量包括使与磷酸化的Tau蛋白质结合的结合分子体内成像。
- [0249] 16、(A) 任何上述可检测地标记的结合分子用于制造用于检测或测量接受受试者的脑中或接受受试者的生物样品中磷酸化的Tau蛋白质的存在或量的药物的实施方式,或
- [0250] (B) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式用于检测或测量接受受试者的脑中或接受受试者的生物样品中磷酸化的Tau蛋白质的存在或量的用途;
- [0251] 其中所述检测或测量包括使与磷酸化的Tau蛋白质结合的结合分子离体成像。
- [0252] 17、(A) (1) 任何上述结合分子的实施方式,其被可检测地标记;或
- [0253] (2) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式,其中所述可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记;
- [0254] 其用于制造用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的药物;或
- [0255] (B) (1) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的用途;或
- [0256] (2) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的用途,其中所述可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记。
- [0257] 18、(A) (1) 任何上述结合分子的实施方式,其被可检测地标记;或
- [0258] (2) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式,其中所述可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记;

- [0259] 其用于制造用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的药物;或
- [0260] (B) (1) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的用途;或
- [0261] (2) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的用途,其中所述可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记;
- [0262] 其中所述药物是施用至受试者的体内药物。
- [0263] 19、(A) (1) 任何上述结合分子的实施方式,其被可检测地标记;或
- [0264] (2) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式,其中所述可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记;
- [0265] 其用于制造用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的药物;或
- [0266] (B) (1) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的用途;或
- [0267] (2) 任何上述可检测地标记的结合分子的实施方式用于诊断受试者的阿尔茨海默病或另外的Tau疾病的用途,其中所述可检测的标记是荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、放射性同位素标记或酶标记;
- [0268] 其中所述药物与受试者的活组织检查样品一起离体温育。
- [0269] 20、任何这类用途的实施方式,其中Tau疾病选自包括以下的组:额颞痴呆、与 17 号染色体连锁的帕金森症(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、皮克氏病、进行性皮质下神经胶质增生症、单纯缠结性痴呆、弥漫性神经元纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森症-痴呆综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、吉斯特曼-施特劳斯病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克雅氏病、多系统萎缩症、尼曼匹克症C型、朊蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、肌强直性营养不良、非-guanamian运动神经元疾病伴随神经元纤维缠结、脑炎后帕金森综合征、急性创伤性脑损伤和慢性创伤性脑病。
- [0270] 21、一种用于分离抗体的方法,所述抗体治疗有效地治疗实施方式20中所述的Tau疾病,其中筛选抗Tau抗体中对于溶解的PHF展示高亲和性的抗Tau抗体种类。
- [0271] 本发明反映了这样的发现:针对Tau的相同表位区域产生的两个抗体(抗体4E6G7 和抗体6B2G12)在早期Tau疾病的小鼠模型中对认知具有非常不同的作用。两个抗体均具有针对免疫原的磷-选择性,但是在许多方面有差异。较低亲和性的抗体4E6G7 对于快速改善空间学习和记忆以及减少可溶性磷酸化-Tau是有效的,而较高亲和性的抗体6B2G12是无效的。重要地,数据进一步证明在用分离自阿尔茨海默病的脑的成对螺旋丝体(PHF)处理的原代神经元Tau疾病培养模型中的一致的效力差异。这表明离体培养模型与小鼠模型具有类似的预测有效性,尽管测量参数有所不同。抗体4E6G7 而不是抗体6B2G12预防了毒性和tau散播(seeding)二者。此外,抗体4E6G7减少了神经元之间的PHF散布。因此,抗体4E6G7的效力与其与溶解的PHF高亲和性的结合相关,但是发现无效的抗体6B2G12主要结合聚集的PHF。如果在PHF已经内化之后施用抗体,则阻断抗体4E6G7向神经元中的摄入防止其保护作用。因此,在这些条件下,抗体在细胞内工作。当同时施用抗体4E6G7和PHF时,抗体在细胞外是保护性的。因为这类方案模拟了Tau疾病中观察到的生理学,因此数据表明细胞外施用抗体4E6G7将是治疗有效的。

[0272] 如下面讨论,通过hTau小鼠的脑的免疫组织化学来检测中等Tau疾病,并且治疗组和对照组没有出现差别。在早期Tau病理的这类情况下,根据蛋白质印迹比通过免疫组织化学更容易量化早期Tau病理,并且在这类印迹中,不溶性tau蛋白质清楚地存在于12-13月龄的hTau小鼠中。如通过人特异性tau抗体(CP27)测量的,tau抗体都没有诱导不溶性tau水平的改变,尽管抗体4E6G7明显改善了空间学习和记忆。可溶性tau组分的分析揭示,这些认知益处与降低水平的磷酸化-Tau蛋白质(PHF-1活性)相关。在这样的短期治疗条件下,不溶性tau水平的总体改变很可能不容易实现,而可溶性病理Tau蛋白质应更容易清除。事实上,PHF-1抗体与抗体4E6G7识别相同区域中的磷酸化-Tau表位,这可解释为什么该tau组分被优先清除。但是,其似乎不是低聚物特异性清除,因为在抗体4E6G7和IgG处理小鼠的T22免疫印迹中没有观察到差别。

[0273] 在用抗体4E6G7或抗体6B2G12进行短期治疗后都没有观察到联想恐惧记忆的功能性恢复。对此有许多可能的解释。首先,使用的训练方案可能太‘强’而不能检测轻微的记忆缺乏。这可能是尤其重要的,因为观察到的总体Tau疾病,尽管存在,但是是轻微的。在之前的研究中,仅仅在具有更高水平Tau病理的老年小鼠中观察到了联想记忆缺乏(Levenga, J.等,(2013)“Tau Pathology Induces Loss Of Gabaergic Interneurons Leading To Altered Synaptic Plasticity And Behavioral Impairments,”*Acta Neuropathol. Commun.*1:34)。

[0274] 尽管使用了不同的模型系统,但是从离体和体内实验获得的发现是一致的,而不是模型依赖性的,这支持了它们的有效性。在两种情况下,抗体4E6G7显示了预防Tau病理和相关毒性/认知损伤的效力,而抗体6B2G12并没有该效力。

[0275] 对相关tau种类的见解获得自对结合至可溶性、溶解的或聚集的人tau种类的抗体的ELISA和斑点印迹研究。在ELISA和斑点印迹测定中,抗体4E6G7主要识别溶解的PHF,这可解释在这样的短期条件下动物中缺少更全面的tau变化。在该年龄患有中等Tau病理的小鼠对于评估疗法的短期作用可能是理想的,尤其在如本文所使用的成对认知比较下,其改善了检测有益作用的灵敏度。在htau小鼠中,由于抗体4E6G7导致的这类体内学习和记忆益处以及对于抗体6B2G12缺少这些益处,与体内和在Tau疾病培养模型中的效力结果一致。有趣地是,在htau小鼠中,可溶性tau种类最近已经与LTP和记忆相关联(Fa, M.等(2016)“Extracellular tau oligomers produce an immediate impairment of LTP and memory,”*Sci. Rep.*6:19393)。

[0276] 尽管ELISA和斑点印迹测定提供了有关抗体4E6G7和抗体6B2G12的tau结合特性的有用的信息,但是获得自共焦成像的数据经判断在确定效力差异的机制和可能的解释方面更有价值。通过培养测定中的共温育,随着抗体4E6G7结合至可溶性PHF,形成外源PHF和抗体4E6G7的细胞外复合物。该复合物形成中和PHF并且防止其摄入。但是,利用抗体6B2G12,不形成这类复合物,因为抗体6B2G12与溶解的PHF很好地结合,并且在神经元内检测到了PHF。这表明抗体6B2G12可能不预防PHF摄入和毒性。这些结果支持了这样的结论:当在细胞之间的间隙中发挥作用时,抗体可能是有益。在活脑中,这些tau-抗体复合物可然后被小神经胶质细胞摄取并且清除(Gu, J.等(2013)“Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology,”*J. Biol. Chem.* 288 (46):33081-33095; Funk, K.E.等,(2015)“Distinct

Therapeutic Mechanisms of Tau Antibodies:Promoting Microglial Clearance Versus Blocking Neuronal Uptake,"J.Biol. Chem.290 (35) :21652-21662;Luo,W.等, (2015) "Microglial Internalization And Degradation Of Pathological Tau Is Enhanced By An Anti-Tau Monoclonal Antibody,"Sci. Rep.5:11161)。

[0277] 如下面讨论,添加10或1 μ g/mL PHF剂量依赖性诱导细胞损失(如使用LDH和 NeuN 水平测量的),以及在剩余神经元中增加总tau和磷酸化的tau。其通过释放和随后被其他神经元摄入而在细胞群体之间散布。为了测试本发明分子的效力,使用三种不同的给药方法(差别在于tau和抗体施用的时机)。对于抗体中的一种——抗体 4E6G7,这些方法中的两种(同时添加PHF和抗体,以及在PHF后24小时添加抗体 4E6G7) 预防了PHF毒性、散播和散布。有趣地,尽管同样地有效,但是给药策略之间发生预防的机制不同。

[0278] 当抗体4E6G7或抗体6B2G12在PHF后24小时添加时,这些抗体与PHF在细胞内共定位,但是仅仅抗体4E6G7预防PHF毒性。基于来自共温育实验的共焦数据,以及斑点印迹和 ELISA数据,发现抗体4E6G7比抗体6B2G12(其与聚集的PHF和不溶性tau更好地反应) 更好地结合溶解的PHF。认为该特征解释了抗体4E6G7的细胞内效力,即,通过结合至溶解的PHF,抗体4E6G7用于预防PHF聚合,因此利于接近溶酶体酶而清除PHF和/或直接中和可溶性PHF,从而预防毒性。但是,抗体 6B2G12-PHF结合可能是惰性的,而不促进分解。此外,由于差的结合,可能无法预防PHF纤丝形成和/或可溶性PHF的毒性。

[0279] 因此,下面提供的发现解释了抗体4E6G7的治疗性效力。抗体4E6G7能够细胞外阻断并且细胞内清除PHF。之前的数据表明,抗体4E6G7进入Tau疾病神经元中的内体/溶酶体系统并且促进天然tau的清除,这可能是通过预防聚集进行的(Congdon, E.E.等(2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcgamma Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance," J. Biol.Chem.288:35452-35465;Gu,J.等(2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," J. Biol.Chem.288 (46) :33081-33095;Krishnamurthy,P.K.等, (2011) "Mechanistic Studies of Antibody-Mediated Clearance of Tau Aggregates Using an ex vivo Brain Slice Model," Front.Psychiatry 2:59)。其他团队已经观察到了tau抗体的内化(Collin,L.等, (2014) "Neuronal Uptake Of Tau/Ps422Antibody And Reduced Progression Of Tau Pathology In A Mouse Model Of Alzheimer's Disease," Brain 137 (Pt 10) :2834-2846;Kondo,A.等(2015) "Antibody Against Early Driver Of Neurodegeneration Cis P-Tau Blocks Brain Injury And Tauopathy," Nature 523 (7561) :431-436),和溶酶体共定位(Collin,L.等, (2014) "Neuronal Uptake Of Tau/Ps422Antibody And Reduced Progression Of Tau Pathology In A Mouse Model Of Alzheimer's Disease," Brain 137 (Pt 10) :2834-2846)。此外,在PD小鼠模型中,针对 α -突触核蛋白抗体,已经观察到抗体、靶标和内体/溶酶体标记物之间的神经元共定位(Masliah,E.等, (2011) "Passive Immunization Reduces Behavioral And Neuropathological Deficits In An Alpha-Synuclein Transgenic Model Of Lewy Body Disease," PloS One 6 (4) :e19338)。在其他实验中,tau抗体能够阻断病理Tau的摄入或改善实验结果,而不明显进入神经元(Castillo-Carranza,D.L.等, (2014) "Passive

Immunization With Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes Without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles,” J.Neurosci. 34(12):4260-4272; d’Abramo, C. 等 (2013) “Tau Passive Immunotherapy In Mutant P301L Mice: Antibody Affinity Versus Specificity,” PLoS One 8(4):e62402; Yanamandra, K. 等 (2013) “Anti-Tau Antibodies That Block Tau Aggregate Seeding in vitro Markedly Decrease Pathology And Improve Cognition in vivo,” Neuron 80 (2):402-414)。抗体是否被摄入到神经元中可能受若干因素的影响,包括电荷、靶标和Fc受体亲和性,以及如本文提供的数据所提示的,靶标的位置和抗体添加的时机。

[0280] 相比之下,用抗体4E6G7的预温育(即,在没有PHF的情况下)在降低Tau疾病的毒性或散播方面是无效的,而一旦添加PHF则发生Tau疾病的毒性或散播降低。可能的原因是在这些条件下靶表位的相对缺乏。先前,已经证明神经元抗体4E6G7摄入与病理学细胞内tau水平高度相关(Congdon, E.E. 等 (2013) “Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcgamma Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance,” J.Biol.Chem. 288:35452-35465)。当首先添加抗体时,需要在神经元中保持效力直到24小时后添加PHF。但是,靶标的缺乏意味着抗体仍是未结合的,并且更容易被降解或从细胞再循环,如经共焦成像观察到的。尽管抗体4E6G7在这些条件下是无效的,但是不排除预防性施用tau抗体,因为循环抗体可通过清除早期tau聚集体而防止疾病发生。事实上,本发明的发现支持了下述结论:向处在Tau疾病风险中但是还未实际患Tau疾病的受试者进行治疗有效的tau 抗体(例如,抗体4E6G7或其表位-结合片段)的这样的预防性施用没有副作用,并且在实际确诊了Tau疾病后,这样的施用是有效的。外源抗体具有一周至三周的半衰期,并且,更低的剂量可用于处在风险中的症状发生前的个体。

[0281] 值得注意的是,使用微流体室,在散布测定 (spreading assay) 中也观察到了给药方法之间不同的效力。在两个模型系统中,仅仅共温育给药或PHF→Ab是有效的,而 Ab→HF是无效的。

[0282] 在先前公开的发现中(Gu, J. 等 (2013) “Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology,” J. Biol.Chem. 288(46):33081-33095),抗体4E6G7和抗体6B2G12二者都显示在脑切片模型中预防增加的磷酸化-Tau水平的效力,与目前的研究中抗体6B2G12在原代神经元中的无效形成对比。可能存在促进这些差异的多种因素。在切片培养系统中,用抗体的处理持续多达六周并且在该系统中没有引入外源tau。在下面示出的结果中,使用了更短的时间范围(七天相对六周),并且,使用的PHF tau是从人AD脑分离的。在PHF 组分中发现的tau也代表了缠结形成的不同阶段。此外,从AD脑分离的PHF可能具有在切片的内源tau中不存在的另外的翻译后修饰。在实验过程期间,细胞健康的差异也可能受到培养模型的影响。在原代培养物中,神经元缺少脑切片中存在的神经胶质细胞提供的营养支持。

[0283] 向神经元中的摄入可被针对FcII/III受体的抗体或阻断受体介导的内吞作用的丹酰尸胺阻断(Congdon, E.E. 等 (2013) “Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcgamma Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance,” J.Biol.Chem. 288:35452-35465)。在

共温育条件下,阻断抗体摄入对于结果没有影响。但是,在PHF添加后24小时添加抗体4E6G7时,阻断其摄入妨碍了其有益的作用。这些发现确认了在共温育条件下,抗体在细胞外发挥作用,但是当其在PHF后24小时添加时,其作用是细胞内的。

[0284] 在脑切片培养物和原代培养物中,抗体4E6G7和抗体6B2G12二者都被摄入到Tau疾病神经元中,其中它们与tau聚集体共定位在内体-溶酶体系统中(Congdon, E.E. 等 (2013) “Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fc gamma Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance,” J. Biol. Chem. 288:35452-35465; Gu, J. 等 (2013) “Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology,” J. Biol. Chem. 288 (46):33081-33095)。此外,抗体6B2G12和其单链可变片段衍生物可用于使体内Tau病变成像并且在外周注射后在相同神经元隔室中消失(Krishnaswamy, S. 等 (2014) “Antibody-Derived in vivo Imaging of Tau Pathology,” J. Neurosci. 34 (50):16835-16850)。这样的摄入和共定位本身不指示效力,但是我们已经证明了防止抗体4E6G7神经元摄入阻断了短期抗体介导的tau清除(Congdon, E.E. 等 (2013) “Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fc gamma Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance,” J. Biol. Chem. 288:35452-35465)。培养数据确认了这类细胞内清除,并另外在不同的培养模型中证明了抗体4E6G7对神经毒性的预防,所述不同的培养模型与人疾病更相关,因为使用了AD衍生的PHF材料。此外,在PHF处理的原代培养物中,使用多种结果度量法,抗体6B2G12在多种实验条件下均无效。因此,总体上,发现抗体4E6G7更适合作为靶向可溶性tau种类的治疗性抗体,而抗体6B2G12或理想地其更容易接近靶标的更小的衍生物作为不溶性Tau病变的成像探针更有用。

[0285] 具体而言,离体培养模型证明了抗体4E6G7(靶向磷酸化-丝氨酸396/404区域的单克隆tau抗体)预防毒性和降低由于添加阿尔茨海默氏脑衍生的PHF材料而诱导的tau水平。重要地是,另外的Tau单克隆抗体6B2G12(其对于tau肽免疫原和聚集的PHF tau具有比抗体4E6G7实质上更高的亲和力)在这些实验条件下是无效的。进一步地分析揭示,对于用于促进培养神经元中的毒性的溶解的PHF,抗体4E6G7比抗体6B2G12具有更高的亲和力。这可能解释前一抗体的效力以及解释后一抗体的效力的缺失。这些发现对于开发被动tau免疫疗法具有重要启示。通过仅仅对于免疫原的亲和力或对聚集的tau的亲和力不能预测效力,但是,在Tau病理的生物模型中必须测定效力。结合成像数据,这些结果提供了亲和力和效力如何相关的信息。

[0286] 其他tau免疫疗法研究已经报道了识别不同tau序列的表位的抗体之间的效力差异,并且,一个研究在针对相同表位的具有类似亲和力的两种抗体的不同的同种型之间(见下面的综述:Pedersen, J.T. 等 (2015) “Tau Immunotherapy for Alzheimer’s Disease,” Trends Mol. Med. 21 (6):394-402)。抗体4E6G7和抗体6B2G12属于相同的同种型IgG1,并且,本文提供的发现首次表明,表位识别的微小差异可显著影响效力。重要地是,这类发现确认了疾病相关的离体神经元培养模型中的这些体内差异,并为这些体内差异提供了机制方面的认识,在所述培养模型中,在表达家族tau突变的原代神经元中, Tau病理受到阿尔茨海默氏脑衍生的PHF的促进。因此,在有tau突变或没有tau突变的不同模型中都一致地观察到

了形成鲜明对比的效力,其对于家族性Tau疾病和散发性Tau疾病二者可具有重要的治疗性启示。采用的模型具有强的构造和表面效度,因为它们是基于如正常的或家族性(突变的)人tau被表达的合理的有效理论,并且在动物中具有与Tau疾病相关的关键特征,即tau聚集、毒性和相关的认知损伤。人PHF培养模型对于动物模型中的结果具有强的预测效力。

[0287] 实施例

[0288] 下述实施例阐释了组合物在本发明的诊断或治疗方法中的各种方法。实施例旨在是阐释性的而绝不限制本发明的范围。

[0289] 实施例1

[0290] 材料和方法

[0291] 材料-对应残基243-441的泛-Tau兔多克隆抗体购买自Dako (Carpinteria, CA)。对于^{p} Ser199Tau特异性的多克隆兔抗体购买自Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)。

[0292] 小鼠-在出生后第零天收集来自JNPL3小鼠品系的小鼠幼崽,用于原代培养。这些动物表达包含天然存在的P301L突变的ON4R人Tau等同型,以及天然小鼠Tau (Lewis, J.等, (2000) "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein," *Nature Genetics* 25 (4) :402-405)。对于检验细胞群体之间Tau的散布的实验,也使用与转基因动物相同品种背景的野生型("WT") 幼崽。

[0293] 成对螺旋丝体 (PHF) 材料的分离-从人AD患者的脑中提取PHF-Tau。在包含0.75M NaCl、1mM EGTA、0.5mM MgSO₄、100mM 2- (N-吗啉基) 乙磺酸和Roche蛋白酶抑制剂混合物的缓冲液(1mL/g的组织) 中将组织匀化。然后,在4°C,以11,000g使样品离心20分钟,并且丢弃小球。在4°C,以100,000g使剩余的上清液进一步离心60分钟。将小球重新悬浮在PHF提取缓冲液(10mM Tris、10% 蔗糖、0.85M NaCl和1mM EGTA, pH 7.4) 中,并且,在4°C,以15,000g离心20分钟。重复该相同的重新悬浮和离心,并且将最终的小球溶于50mM Tris-HCl (pH 7.4) 中以及在磷酸缓冲盐水 (PBS) 中透析6小时。

[0294] 荧光标记-使用Alexa Fluor 488和647标记试剂盒分别标记抗体4E6G7和人衍生的PHF材料。将抗体或PHF与活性染料一起温育,同时在室温搅拌1小时。根据说明书,制备洗脱柱并且添加染料/底物混合物。收集材料并且确认标记。

[0295] 原代神经元培养-如在下述文献中描述地制备原代神经元培养物:Congdon, E.E. 等 (2013) "Antibody Uptake Into Neurons Occurs Primarily Via Clathrin-Dependent Fc γ Receptor Endocytosis And Is A Prerequisite For Acute Tau Protein Clearance," *J. Biol. Chem.* 288 (49) :35452-35465。简言之,用聚-L-赖氨酸涂布平板3小时,然后添加细胞。从出生后第零天的小鼠幼崽收获脑,并且丢弃脑干。从皮质和海马去除脑膜。大致切碎组织并且在HBSS+++ (Hank平衡盐溶液,10mL 1M HEPES、5mL青霉素/链霉素、10mL 100mM丙酮酸钠) 中洗涤五次。洗涤之后,用200μl的0.5%胰蛋白酶温育组织20分钟。用5mL的铺板培养基 (plating media) (最低Eagle培养基,15mL GlutaMAX、50mL FBS、4mL B27补充物、2.5mL青霉素/链霉素) 中和胰蛋白酶,并且进一步在 HBSS+++中洗涤三次。此后,手动分离细胞并且以0.5x g离心1分钟。然后,将细胞重新悬浮在铺板培养基中并且在孔之间均匀分布。培养24小时之后,去除铺板培养基并且添加神经元培养基 (Neurobasal A,1mL B27、17μL基础Eagle培养基)。对于在微流体室中生长的培养物,使用

相同的程序。将来自JNPL3小鼠的细胞涂覆在轴突分离设备的一侧。使细胞温育72小时。该时间段之后,收获来自WT动物的脑并且将细胞涂覆在对侧。

[0296] LDH测定-在培养七天之后,从所有处理组收集培养基。使用Roche细胞毒性检测试剂盒测定培养基中的LDH(乳酸脱氢酶)水平。比较从处理样品获得的值与从在第零天收集的培养基获得的值,以便确定毒性的程度。也收集来自一组未处理的细胞的培养基,以检验在培养期间内细胞健康的正常改变。将处理的样品、对照和空白添加至96孔板,并且,根据说明添加检测剂。在37°C,将平板温育20分钟,并且,使用 BioTek Synergy 2板读取仪读数。

[0297] 微流体室和Tau散布-收获细胞并且如上所述铺板。在添加WT细胞之后,为了稳定,将培养物培养一周。使用相同的三种处理方法。将PHF和抗体4E6G7(各自1 μ g/mL)添加至包含JNPL3细胞的室中,而不处理包含WT细胞的相对室。作为阴性对照,将一组细胞与1 μ g/mL的PHF材料和50nM的肉毒杆菌毒素一起温育。选择毒素是由于其防止膜融合和膜结合囊泡的释放的能力,从而防止将PHF-Tau释放至相对室中。在神经元培养物中,还已经证明肉毒杆菌毒素通过阻断突触囊泡释放而防止突变亨廷顿蛋白的散布(Pecho-Vrieseling,E.等,(2014) "Transneuronal Propagation Of Mutant Huntingtin Contributes To Non-Cell Autonomous Pathology In Neurons," Nat.Neurosci. 17 (8) :1064-1072)。在所有的组中,在最后的处理之后,再继续培养细胞72小时。然后,固定盖玻片,并针对识别总Tau的抗体将样本染色。测定每个处理组的包含标记的PHF材料的对侧室中细胞的百分数。

[0298] 免疫组织化学-去除培养基并且在PBS中将细胞洗涤三次。在37°C,在包含0.5%蔗糖的4%甲醛中固定盖玻片20分钟。在室温,使细胞透性化并且使用包含3%BSA和0.1%皂素的PBS封闭20分钟,Pecho-Vrieseling,E.等,Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non-cell autonomous pathology in neurons.Nat Neurosci, 2014.17 (8) :p.1064-72。以1:200稀释度使用一级抗体1小时,其后将细胞用PBS洗涤三次,每次洗涤五分钟。以1:400稀释度应用二级抗体30分钟,并且将细胞另外洗涤三次,然后使用Dako荧光封片剂加载盖玻片。使用Nikon Eclipse Ti共焦显微镜收集图像,并且使用Image J处理图像。

[0299] 免疫印迹-将细胞在PBS中洗涤三次,然后在改良的RIPA缓冲液(50mM Tris-HCl, pH 7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM NaF、1mM Na₃VO₄、1 μ g/mL完全的蛋白酶抑制剂混合物(Roche Applied Science))中裂解。将样品简单超声处理,并且针对总蛋白质浓度调整体积。添加上样缓冲液(62.5mM Tris-HCl pH 6.8、5%甘油、2-巯基乙醇、2.3%SDS、1mM EDTA、1mM甲苯基磺酰氟、1mM Na₃VO₄、1 μ g/mL Roche Applied Science完全的蛋白酶抑制剂)并且将样品煮沸5分钟。将所有样品加载到12%聚丙烯酰胺凝胶中,然后以100V转印1小时。使用Tris-缓冲盐水和包含5%脱脂奶的Tween 20(TBST)将膜封闭30分钟,其后在4°C使它们在一级抗体中温育过夜。洗涤印迹并且用过氧化物酶标记的二级抗体温育1小时。使用Fuji LAS-4000使条带可视化并且使用Multigauge量化化学发光信号。

[0300] 实施例2

[0301] 抗体4E6G7的scFv片段的分离

[0302] 可从杂交瘤克隆抗体4E6G7(针对具有下述氨基酸序列的优选免疫原产生:SEQ ID NO:8:TDHGAEIVYK^{p}SPVVSGDT^{p}SPRHL)产生scFv分子(Congdon,E.E.等 (2013) "Antibody

Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fc gamma Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance,” J. Biol. Chem. 288:35452-35465; Gu, J. 等(2013) “Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology,” J. Biol. Chem. 288 (46) :33081-33095)。简言之,在37℃,5%CO₂,可使杂交瘤细胞系抗体 4E6G7在包含链霉素(50μg/mL)和青霉素G(50U/mL)的RPMI培养基中生长,并且根据RNA分离试剂盒(Promega)的方案分离和纯化其mRNA,随后储存在-80℃。可根据第一链cDNA合成试剂盒(Takara试剂盒(TAK6115A))的方案构建第一链cDNA。

- [0303] 然后,可使用具有Tau 379-408 (^{p}Ser396/^{p}Ser404) (SEQ ID NO:30) :
- [0304] RENAKAKTDH GAEIVYK^{p}SPV VSGDT^{p}SPRHL
- [0305] 和Tau 379-408 (Ser396/Ser404) (SEQ ID NO:31) :
- [0306] RENAKAKTDH GAEIVYK^{p}SPV VSGDT^{p}SPRHL
- [0307] 的序列的肽(Keck Foundation, 耶鲁大学),针对克隆表达对于^{p}Ser404表位免疫特异性的scFv分子的能力来筛选克隆。
- [0308] 这些肽也可用于淘选、ELISA和用于Biacore,从而用于结合研究。
- [0309] 实施例3
- [0310] 抗体4E6G7:
- [0311] Tau抗体介导的对Tau疾病的散播和相关毒性的预防
- [0312] Tau疾病在培养的神经元和体内神经元之间散布,并且,可以被抗体细胞内和细胞外靶向。评估免疫特异性结合^{p}Ser404表位的抗体4E6G7预防由来自阿尔茨海默氏受试者的成对螺旋丝体(PHF)制品介导的Tau疾病的毒性和散布的能力。为了该目的,如所描述地制备原代JNPL3 (P301L) 神经元培养物并且在处理之前,允许其在培养中恢复一周。用1μg/mL或10μg/mL的人衍生的PHF材料温育细胞,在第1、2、3、5 和7天收集细胞和培养基。单独用PHF(1μg/mL或10μg/mL)处理对照培养物七天(“单独的PHF”处理的细胞)。对于用PHF(1μg/mL或10μg/mL)和抗体4E6G7(10μg/mL) 联合处理的培养物,使用三种不同的处理策略。在第一种处理策略中,添加PHF材料并且允许其与培养物一起育24小时。该时间段之后,用神经元培养基洗涤细胞,并添加包含1μg/mL抗体4E6G7的新鲜培养基(“PHF→抗体”处理的细胞)。在第二种处理策略中,将PHF材料和抗体4E6G7同时添加至培养基(“PHF+抗体”处理的细胞)。第三种给药策略与第一种处理策略相反,抗体4E6G7添加24小时后添加PHF(“抗体→PHF”处理的细胞)。作为对照,使用非特异性小鼠IgG代替Tau抗体。在使用丹酰尸胺(dansylcadaverine) (DC)的实验中,采用相同的方法,其中添加1μg/mL的DC以及抗体。
- [0313] 图1,小图A-B显示了(如通过LDH释放测定的)抗体4E6G7(小图A)和IgG1 对照(小图B)对于由10μg/mL PHF介导的细胞毒性的作用。如图1,小图A中显示,在用10μg/mL PHF处理的细胞中,LDH信号平均比未处理的对照平均高67% (p= 0.001)。与单独的PHF相比,PHF+抗体和PHF→抗体策略中的抗体4E6G7(1μg/mL) 显著降低了LDH(比对照高11%,p=0.02,和比对照高15%,p=0.03),并且与未处理的样品相当,表明抗体可预防毒性。但是,抗体→PHF未有效降低LDH信号(比对照高53%,p=0.009),并且,在测试的1μg/mL浓度,相对于PHF单独处理的样品未显示显著改善。如图1,小图B中显示,IgG1也未有效预防由于添加PHF而引起的增加的LDH水平。PHF+抗体、PHF→抗体和抗体→PHF组中的LDH比对照值增加80%、

43% 和 61% (分别为 $p=0.004$ 、 0.03 和 0.01)。这些组与单独的 PHF 的组没有显著不同。(* $p=0.05$)。

[0314] 图 2, 小图 A-B 显示了 (如通过 LDH 释放测定的) 抗体 4E6G7 (小图 A) 和 IgG1 对照 (小图 B) 对于由 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ PHF 介导的细胞毒性的作用。如图 2, 小图 A 中显示, 用 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ PHF 温育相对于未处理的对照细胞, LDH 信号增加了 35% ($p=0.04$)。与 PHF 单独处理的样品相比, PHF+ 抗体或 PHF → 抗体条件下的 Tau 单克隆抗体 4E6G7 显著降低了 LDH (分别为, $p=0.04$ 和 0.03), 并且与未处理的细胞没有显著不同。与仅接受 PHF 的神经元相比, 抗体 → PHF 组未显示降低的 LDH (比对照高 11%)。如图 2, 小图 B 中显示, 在 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ PHF 剂量, 用 IgG1 处理的样品与对照细胞相比未显示显著更高的 LDH 水平, 表明其可提供一些非特异性保护 (PHF+ 抗体、PHF → 抗体和抗体 → PHF 组分别比对照高 6%、与对照相等和比对照高 67%)。但是, IgG1 处理的样品与 PHF 单独处理的样品也没有显著不同 ($*p=0.05$), 再次确认了抗体 4E6G7 预防 PHF 毒性的作用的特异性。

[0315] 通过用识别神经元标记物 NeuN 的抗体进行免疫印迹而另外检验毒性。NeuN 是在成年小鼠的整个神经系统的大部分神经元细胞类型中观察到的神经元特异性核蛋白质 (Mullen, R. J. 等 (1992) "NeuN, A Neuronal Specific Nuclear Protein In Vertebrates," *Development* 116 (1): 201-211)。该蛋白质在中枢神经系统的透明细胞瘤的鉴别诊断中用作神经元标记物 (Soylemezoglu, F. 等 (2003) "Neuronal Nuclear Antigen (NeuN) : A New Tool In The Diagnosis Of Central Neurocytoma," *Pathol. Res. Pract.* 199 (7): 463-468)。

[0316] 当在存在 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ PHF 的情况下温育时, NeuN 信号稳定下降并且到第 7 天相对于未处理的对照样品降低了 94% (图 3, 小图 A-B)。正如 LDH 样品的情况, PHF+ 抗体和 PHF → 抗体策略导致 NeuN 水平比仅仅用 PHF 温育的样品的 NeuN 水平显著更高 (样品在第 7 天比未处理的对照高 16% 和 24%, $p=0.000003$ 和 0.00002)。也如上所述, 抗体 → PHF 给药方法在处理期间未有效预防 NeuN 的损失 (相对于对照, 93% 的损失, $p=0.0008$), 并且, 相对于 PHF 单独处理的样品没有显示改善 (图 3, 小图 C)。如在 LDH 测定中, IgG1 对于 PHF 诱导的毒性没有作用。

[0317] 将另外组的神经元与 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PHF 和 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗体 4E6G7 或对照 IgG 一起温育 (图 4, 小图 A-B)。在培养 7 天之后, 相对于未处理的对照细胞, 在 PHF 单独处理的组中观察到 NeuN 信号 30% 的损失 ($p=0.03$) (小图 C)。如在 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 实验中, PHF+ 抗体和 PHF → 抗体组显示了预防 NeuN 损失的效力, 并且, 在第 7 天与未处理的对照相当并比 PHF 单独处理的样品显著更高 ($p=0.03$)。抗体 → PHF 组也显示了 NeuN 水平的下降 (相对于未处理的对照下降了 36%), 与用 PHF 单独处理的样品温育的神经元的 NeuN 水平相当, 确认了该方法在采用的剂量是无效的。如在更高 PHF 剂量样品中, 对照小鼠 IgG1 在任何给药条件下都不能预防毒性并且与通过单独的 PHF 观察到的结果没有显著不同。

[0318] 这些数据证明, Tau 抗体可有效介导通过暴露与错误折叠的 Tau 聚集体而引起的毒性。抗体 4E6G7 预防毒性, 然后仅仅在某些条件下。当在 PHF 之前添加抗体 4E6G7 时, 神经元的天然 Tau 的相对低水平可能无法提供足够的靶来促进对于充分保护细胞而言必要的抗体保留 (retention)。

[0319] 实施例 4

[0320] 抗体 4E6G7:

[0321] Tau抗体介导的对Tau水平的改变的预防

[0322] 除了对毒性的度量,也研究了PHF和抗体处理对Tau水平的作用。在10 μ g/mL 浓度, PHF单独处理的组中的总Tau水平显示初始下降,随后恢复(图5,小图A-D)。但是,到第7天,总Tau水平相对于对照细胞显著降低(下降29%, $p=0.002$) (图C)。但是,抗体4E6G7PHF+抗体和PHF→抗体比仅用PHF温育的细胞具有显著更高的Tau 水平(比对照高48%和51%) (小图C)。再一次,抗体→PHF组和IgG1组与PHF单独处理的细胞相比不能预防Tau水平的改变。

[0323] 当针对NeuN水平将这些结果归一化时,观察到PHF组中的剩余细胞具有比对照细胞显著更多的Tau (为5.6倍, $p=0.0005$ 和0.04) (图5,小图D)。在PHF+抗体和PHF→抗体组中,调整的Tau水平与对照相当,并且,比仅接受PHF的细胞显著更低(分别为 $p=0.01$ 和0.001)。对照IgG1处理的细胞的结果与仅接受PHF的细胞的结果没有显著不同。NeuN的控制未改变这类对照细胞的结果的模式。

[0324] 在1 μ g/mL剂量,增加的Tau水平是明显的,即使在用NeuN水平归一化之前(图 6,小图A-D)。图6,小图A-D显示了在1mg/mL的PHF可促进细胞内Tau的增加,并且抗体4E6G7可防止这些作用。小图A-B显示了用泛-Tau多克隆抗体探测的、暴露于单独的PHF、PHF+抗体、PHF →抗体和抗体→PHF的样品对于抗体4E6G7 (小图 A) 或对照IgG (小图B) 的免疫印迹。小图C显示了总Tau水平的定量。在1 μ g/mL, PHF促进了细胞内Tau的显著增加(比对照高95%, $p=0.001$)。对于抗体4E6G7,PHF+ 抗体和PHF→抗体比PHF单独处理的样品显著更低(都是 $p=0.001$)。用抗体→PHF处理的细胞相对于用PHF单独处理的细胞没有下降。针对NeuN水平进行调整,再一次, PHF单独处理相对于对照细胞显著增加了细胞内Tau (1.6倍, $p=0.02$)。对于抗体 4E6G7,PHF+抗体和PHF→抗体处理的细胞,而不是抗体→PHF处理的细胞,展示了与PHF单独处理的组相比显著更低的校正Tau水平(都是 $p=0.03$),并且,与未处理的对照没有差别(小图D)。在控制或不控制NeuN水平的情况下,在暴露于PHF之后, IgG1不防止总Tau的显著增加。

[0325] 除了总Tau水平,还研究了在^{p}Ser199处磷酸化的Tau的水平。Tau在丝氨酸199 的磷酸化 (^{p}Ser199) 似乎涉及阿尔茨海默病和其他神经学病况(Biernat, J. 等(1992) "The Switch Of Tau Protein To An Alzheimer-Like State Includes The Phosphorylation Of Two Serine-Proline Motifs Upstream Of The Microtubule Binding Region,"EMBO J. 11(4) :1593-1597; Takamatsu, J. (1998) "Selective Expression Of Ser 199/202 Phosphorylated Tau In A Case Of Frontotemporal Dementia," Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 9(2) :82-89; Itoh, N. 等(2001) "Large-Scale, Multicenter Study Of Cerebrospinal Fluid Tau Protein Phosphorylated At Serine 199For The Antemortem Diagnosis Of Alzheimer's Disease," Ann. Neurol. 50(2) :150-156; Maurage, C.A. 等(2003) "Phosphorylated Serine 199of Microtubule-Associated Protein Tau Is A Neuronal Epitope Abundantly Expressed In Youth And An Early Marker Of Tau Pathology," Acta Neuropathol. 105(2) :89-97; Hampel, H. 等(2004) "Measurement Of Phosphorylated Tau Epitopes In The Differential Diagnosis Of Alzheimer Disease:A Comparative Cerebrospinal Fluid Study," Arch. Gen. Psychiatry 61(1) :95-102; Morioka, M. 等(2006) "Hyperphosphorylation At Serine 199/202 Of Tau Factor In The Gerbil Hippocampus After Transient

Forebrain Ischemia," Biochem.Biophys.Res.Commun. 347 (1) :273-278; Loeffler, D.A. 等 (2015) "Effects Of Antibodies To Phosphorylated And Non-Phosphorylated Tau On In Vitro Tau Phosphorylation At Serine-199: Preliminary Report," Exp.Gerontol. 67:15-18)。因此,结合^{p} Ser199的抗体(比如抗体AT8)可用于评估阿尔茨海默病的存在。

[0326] 在10 μ g/mL PHF条件下,PHF单独处理的样品和抗体→PHF处理的样品相对于未处理的细胞具有显著降低的磷酸化-Tau水平(下降34%、7%和54%, $p=0.00004$ 、0.01和0.01,图7)。但是,PHF+抗体和PHF→抗体处理组都比PHF单独处理的组具有显著更高的磷酸化-Tau水平($p=0.00001$ 和0.00007)。IgG1剂量组与单独PHF都没有显著差异。

[0327] 针对NeuN水平进行校正,PHF单独处理的样品显示更高水平的^{p} Ser199Tau(4.1倍, $p=0.00004$)。在PHF+抗体和PHF→抗体处理的细胞中的磷酸化-Tau水平比已经用PHF单独处理的细胞的磷酸化-Tau水平显著更低($p=0.000001$ 和0.000007),并且与未处理的对照相当。正如未校正的值,另外用对照IgG1处理的细胞的结果与已经接受单独PHF的细胞的结果没有差异,与抗体→PHF处理的组也没有差异。

[0328] 在1 μ g/mL给药条件下与单独的PHF一起温育的细胞比未处理的对照细胞具有显著更高的磷酸化-Tau水平(比对照高65%, $p=0.001$,图8,小图A-D)。图8,小图 A-D显示,较低水平的PHF(1 μ g/mL)也可诱导磷酸化的Tau水平的增加,并且这样的增加可通过抗体4E6G7预防。小图A-B显示了用识别^{p} Ser199磷酸化-Tau的多克隆抗体探测的、暴露于单独的PHF或暴露于PHF和抗体4E6G7的组合(小图A)或暴露于对照IgG1(小图B)的细胞的免疫印迹。小图C定量相对于未处理的细胞的^{p} Ser199 磷酸化-Tau水平。小图D将结果归一化至NeuN水平。

[0329] 在用1 μ g/mL PHF和抗体4E6G7处理的细胞中,当在PHF+抗体和PHF→抗体给药条件下时,抗体有效预防PHF诱导的病理学改变。在与未处理的对照相当的水平,两个组都比单独的PHF具有显著更低的磷酸化-Tau水平($p=0.01$ 和0.006)。但是,在抗体→PHF给药条件下,抗体4E6G7不能降低磷酸化-Tau水平。与PHF单独处理的样品相比,IgG组都没有差异。针对NeuN水平进行控制,这些差异仍存在。PHF单独处理的样品中的磷酸化-Tau水平是未处理的对照细胞的磷酸化-Tau水平的1.5倍($p=0.01$)。在4E6G7给药策略中,PHF+Ab和PHF→Ab组的tau水平与未处理的对照的 tau水平相当,并且,比在PHF单独处理的样品中观察到的tau水平显著更低(都是 $p=0.03$)。如上所述,IgG1组与PHF单独处理的样品都没有差异。

[0330] 实施例5

[0331] 抗体4E6G7可减少病理Tau在细胞群体之间的散布

[0332] 为了评估用抗体4E6G7处理是否可减缓病理Tau在细胞之间的散布,将JNPL3 和WT 神经元涂覆在微流体轴突分离室的对侧上。图9,小图A显示了微流体室的示意图,其显示接收取样细胞的储器。图9,小图B是小图A中的中央框的放大示意图,其显示连接两个储器的细微纹沟。为了确保来自JNPL3细胞的轴突,而不是WT细胞的轴突,跨过细微纹沟,在WT神经元之前72小时涂覆来自JNPL3小鼠的神经元。在细胞培养物已经稳定之后,将1 μ g/mL的荧光标记的PHF材料添加至包含JNPL3神经元的室中。以相同方式制备另外的培养物,并且用PHF 和抗体4E6G7的组合使用上述PHF+抗体、PHF→抗体和抗体→PHF给药策略处理。作为阴性对照,用PHF和 50nM肉毒杆菌毒素A温育另外的细胞组。该毒素降解SNAP-25/23,其是突触传

递以及多囊泡体 (MVB) 与质膜融合的组分。72小时后,固定盖玻片并且如上所述用识别总Tau的抗体染色,以及测定包含标记的PHF材料的WT细胞的数量(计数n=969个细胞)。图9,小图C是显示透过细微纹沟生长的轴突(用箭头标识)的共焦成像。用泛-Tau 抗体对细胞染色。图9,小图D-F显示了荧光标记的PHF材料(1 μ g/mL),其被添加至微流体设备的包含JNPL3细胞的室。图9,小图D显示了Tau蛋白质的定位。图9,小图E显示了PHF的定位。图9,小图F是显示Tau蛋白质的定位和PHF的定位的合并图像。

[0333] 在PHF单独处理的培养物中,24±3%的细胞包含荧光标记的PHF材料。当50nM 的肉毒杆菌毒素添加至PHF处理的培养物时,这下降至4±0.2% (p=0.0004),表明 WT细胞中的PHF经突触释放而到达那里。PHF+抗体和PHF→抗体处理组也展示了降低数量的PHF阳性细胞(分别为15±2% (p=0.01) 和18±4% (p=0.05))。但是,如基于其他结果预期的,在抗体→PHF条件下,PHF阳性细胞的百分数没有显著变化(图9,小图G)。

[0334] 实施例6

[0335] 给药方法对于PHF的模式和抗体结合的影响

[0336] 使用荧光标记的PHF材料和抗体4E6G7,以检验使用的处理方法是否影响PHF 的模式和抗体结合。如下用10 μ g/mL PHF或1 μ g/mL抗体4E6G7温育原代神经元:如上所述,单独的PHF、PHF+抗体、PHF→抗体或抗体→PHF。在应用了最后一次处理之后24小时收集共焦成像。用Dako泛-Tau多克隆抗体对所有的盖玻片染色。发现PHF 容易被摄入到神经元中,并且在培养24小时之后的全部细胞中可以看到(图10,小图 A-D)。在来自PHF→抗体处理方案的细胞中,可看到PHF材料的摄入和广泛的细胞内分布。在该给药方案下,抗体4E6G7也被内化并且与先前添加的PHF共定位(图10,小图E-H)。但是,在PHF+Ab组中观察到了不同的模式。在这些条件下,也观察到 PHF和抗体4E6G7的共定位,但是PHF-抗体复合物是细胞外的(图10,小图I-L)。这些结果表明,尽管这两种给药方法有效降低与PHF添加相关的病理学改变,但是作用机制不同。

[0337] 为了进一步研究时机以及抗体和PHF施用的相对顺序是否影响作用机制,如上所述涂覆另外的细胞组并给药。将10 μ g/mL的PHF添加至JNPL3神经元,同时或24小时后添加4E6G7。在另外的培养物中,也添加1 μ g/mL的丹酰尸胺(DC)——一种网格蛋白介导内吞作用的抑制剂——(Congdon, E.E. 等 (2013) “Antibody Uptake Into Neurons Occurs Primarily Via Clathrin-Dependent Fcgamma Receptor Endocytosis And Is A Prerequisite For Acute Tau Protein Clearance,” J.Biol.Chem. 288 (49) :35452-35465) 以及 4E6G7,以便确定抗体内化对于4E6G7发挥其作用是否是必要的。因此,这些实验允许确认内化对于防止PHF诱导的病理是否是必要的。

[0338] 当通过免疫印迹检验总Tau水平时,在两种给药条件的任一给药条件下,在用DC温育或不用DC温育的样品之间都没有观察到显著的差异。在已经用PHF+抗体方案处理的细胞中,DC的添加不改变相对于Tau/NeuN比(图11,小图A)或对照的NeuN水平。但是,当已经用PHF→抗体方案处理的细胞与1 μ g/mL的DC一起温育时,观察到了NeuN的显著下降(与没有DC的细胞相比,下降至对照的32%,p=0.00005)。此外,在已经用PHF→抗体方案处理的、其中已经添加DC的细胞中,Tau/NeuN比显著变化(对于没有DC的细胞是1.18,对于DC处理的细胞是2.95,p=0.008;图11,小图B)。这些结果表明,在抗体4E6G7和PHF被一起添加的条件下,经Fc受体的内化对于抗体防止PHF诱导的病理学改变不是必要的。相比之下,一旦PHF材料

已经被神经元摄取,防止抗体内化阻碍了其预防PHF毒性的效力。

[0339] 实施例7

[0340] 抗体4E6G7和其Tau-结合片段对毒性的预防和Tau水平的降低

[0341] 数据显示,靶向Tau蛋白质的^{p} Ser396和^{p} Ser404区域的单克隆Tau抗体(抗体4E6G7)预防由于添加患者衍生的PHF材料而诱导的毒性和降低Tau水平。这些发现支持了抗体4E6G7和其Tau-结合片段,比如其scFv片段,在在被动Tau免疫疗法中的用途。

[0342] 如使用LDH和NeuN免疫印迹测定测量的,单独添加10 μ g/mL或1 μ g/mL的PHF 诱导细胞损失,以及在剩余神经元中增加总Tau和磷酸化的Tau。其通过释放和随后被其他神经元摄入而在细胞群体之间散布。为了测试抗体4E6G7的效力,使用三种不同的给药方法,所述给药方法中Tau和抗体施用的时机不同。这些方法中的两种(一起添加PHF和抗体,和PHF后24小时添加抗体)预防PHF毒性和Tau散播散布。有趣地是,尽管类似地有效,但是发生保护的机制不同。在共温育的情况下,形成外源 PHF和抗体4E6G7的细胞外复合物,其中和PHF并且防止其摄入。这些结果支持了这样的结论:在细胞之间的胞间隙中起作用时抗体可以是有益的。在活的脑中,这些 Tau-抗体复合物可然后被神经胶质细胞摄取和清除。当抗体4E6G7在PHF之后24小时添加时,两个分子在细胞内共定位。抗体4E6G7进入内体/溶酶体系统并且促进天然Tau的清除,这可能是通过促进聚集体的分解实现的(Congdon, E. E. 等(2013) “Antibody Uptake Into Neurons Occurs Primarily Via Clathrin-Dependent Fc γ Receptor Endocytosis And Is A Prerequisite For Acute Tau Protein Clearance,” J. Biol. Chem. 288 (49) :35452-35465; Gu, J. 等(2013) “Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology,” J. Biol. Chem. 288 (46) :33081-33095; Krishnamurthy, P. K. 等(2011) “Mechanistic Studies of Antibody-Mediated Clearance of Tau Aggregates Using an ex vivo Brain Slice Model,” Frontiers in Psychiatry/ Frontiers Research Foundation 2:59, 第1-6页)。抗体、靶和内体 /溶酶体标记物之间的这种神经元共定位也可在帕金森病的动物模型中使用被动免疫疗法的研究中看到。这些发现统一阐释了抗体4E6G7的治疗效力;其能够细胞外阻断 PHF摄取和其细胞内清除。

[0343] 相比之下,以采用的给药方案,与抗体4E6G7一起预温育对于降低毒性和Tau疾病的散播都明显效力更小。对此的可能原因是在这些条件下相对缺少靶表位。神经元中抗体4E6G7的水平与病理学细胞内Tau的数量相关。当首先添加抗体时,为了有效,其必须保留在细胞中,直到24小时后添加PHF。但是,如果缺少靶标,抗体将仍是未结合的,并且更容易降解或再循环离开细胞。尽管抗体4E6G7在这些条件下是无效的,但是上面呈现的结果并不表明其不可以用于Tau疾病的预防性疗法中,因为循环抗体可通过清除早期Tau聚集体而防止疾病发生。外源抗体具有一周至三周的半衰期,并且较低剂量可用于处在风险中的症状发生前个体。

[0344] 实施例8

[0345] 抗体4E6G7和其Tau-结合片段的效力的短期和长期研究

[0346] 使用两个不同的小鼠模型,在短期和长期处理条件下评估抗体4E6G7的治疗效力。如下面描述,这种相当低亲和性的抗体在短期和长期治疗(都与病理Tau蛋白质的清除相关)后提供了认知益处。使用两个模型, hTau 和 hTau/PS1 小鼠 : hTau 小鼠 (Jackson

Laboratories, 货号004808; Andorfer, C. 等(2003) "Hyperphosphorylation And Aggregation Of Tau In Mice Expressing Normal Human Tau Isoforms," J.Neurochem. 86:582-590, 在裸鼠(null murine) Tau背景上表达未突变的人Tau蛋白质并且随着年龄增长发展Tau 疾病和缠结。该模型用于评估抗体4E6G7相对于IgG对照的短期被动免疫疗法的治疗益处。通过交配hTau小鼠和表达PS1突变的小鼠而获得hTau/PS1小鼠 (M146L; Duff, K. 等(1996) "Increased Amyloid-Beta 42 (43) In Brains Of Mice Expressing Mutant Presenilin 1," Nature 383:710-713) 并且在鼠Tau K0背景上维持该杂交。后一种模型具有加速的Tau疾病 (Boutajangout, A. 等(2010) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model," J.Neurosci. 30:16559-16566)。该模型用于评估用相同抗体的长期被动免疫的益处。

[0347] A、行为/认知评估方法

[0348] 旋转法 (Rotarod) : 该测试用于测量前肢和后肢运动协调和平衡。该程序被设计为评估运动行为,而没有练习混淆。首先,在四个实验中驯化小鼠,以达到第一天中表现的基线水平,然后,第二天在四个跟踪实验中测试小鼠,实验之间为15分钟 (SDI Rotor-Rod System, 来自San Diego Instruments)。将动物放置在杆上(直径3.6cm),初始速度设置为1.5rpm,该速度然后每30秒增加0.5rpm。将具有塑料盖的软泡沫垫放置在杆下方,以防止跌落损伤。在每个阶段(session)之后,用70%乙醇然后用水清洁杆。为了评估表现,当小鼠从旋转桶的顶部跌落或翻转(通过贴紧)时,记录杆的速度。

[0349] 自发活动 (Locomotor Activity) : 首先,在圆形开放场地活动室(直径55.8cm)中成群/成笼驯化小鼠15分钟,然后,在第二天,在相同室中逐只测试每只小鼠15分钟。在每个阶段之后,用70%乙醇然后用水清洁场地。室上方的照相机通过测量动物的运动自动记录每个维度上的水平运动(即,x,y) (来自Noldus Information Technology的 EthoVision Video Tracking系统)。结果报告为小鼠移动的距离(cm)、平均休息时间和速度(平均值和最大值)。

[0350] 封闭场地对称迷宫 (CFSM) : 该装置是矩形场地,65cm正方形,具有10cm高的墙壁,其被分成36cm正方形,并被透明 Plexiglas®顶盖覆盖。两个盒子,每个16 x 23 x 10cm,在其对角处与正方形连接。对称迷宫是Hebb-Williams和Rabinovitch-Rosvold 型测试的改良 (Pritchett, K. 等(2004) "Hebb-Williams Mazes," Contemp.Top.Lab.Anim. Sci. 43 (5) : 44-45; Meunier, M. 等(1986) "The Hebb-Williams Test To Assess Recovery Of Learning After Limbic Lesions In Mice," Physiol.Behav. 37 (6) : 909-913; Rabinovitch, M.S. 等(1951) "A Closed-Field Intelligence Test For Rats," Can.J.Psychol. 5 (3) : 122-128)。简言之,主要差异是每个末端盒子同时用作启动盒和目标盒。在交替测定中小鼠在相反方向上跑动,从而消除了应使应力最小化的实验间处理。障碍物以对称的模式放置在场地中,从而在给定的问题下,在任一方向行进的小鼠面向相同的转角。在第0天,小鼠适应限水方案(每天2小时饮水),并且,在与用于测试的相同环境中驯化小鼠。在第1天,每个盒子中的所有小鼠均被给予用绿色食品染料着色10分钟的、糖精风味的水。在第2天,将它们放置在启动盒中,并且允许它们探索场地以及进入目标盒,在所述目标盒中它们可得到糖精风味的水奖励(0.05mL)。手动打开和关闭每个盒的门,以允许进

入和离开。当小鼠可靠地从启动盒跑至目标盒时,在相同条件下,它们接受四个练习实验。在第3天,它们针对简单的问题接受一个练习阶段,其中两个障碍物以不同的对称位置放置在场地中,以便阻碍直接进入目标盒。针对4个实验重复该练习测试。在第4天,正式的测试由级别为最困难的三个障碍物组成(Bouta jangout, A. 等 (2010) “Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model,” J.Neurosci. 30:16559-16566; Asuni, A.A. 等 (2006) “Vaccination Of Alzheimer’s Model Mice With Abeta Derivative In Alum Adjuvant Reduces A β Burden Without Microhemorrhages,” Eur.J.Neurosci. 24:2530-2542)。以2分钟的实验间的间隔对小鼠进行五次实验。由同一观察员根据错误(即,进入和再进入指定的错误区域)和完成每个实验的时间,对表现手动打分。

[0351] 在短期研究中,也考虑它们在感觉运动测试中的表现,然后将小鼠分成具有类似的平均测试分数和组方差的对照组和处理组。在没有处理后的练习阶段的情况下重新测试小鼠。

[0352] 对于长期研究,仅仅在处理阶段结束时测试小鼠,并且,对小鼠进行三个级别为困难的不同测试(Bouta jangout, A. 等 (2010) “Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model,” J.Neurosci. 30:16559-16566; Asuni, A.A. 等 (2006) “Vaccination Of Alzheimer’s Model Mice With Abeta Derivative In Alum Adjuvant Reduces A β Burden Without Microhemorrhages,” Eur.J.Neurosci. 24:2530-2542)。

[0353] 八臂迷宫:如Bouta jangout, A. 等 (2012) “Cognitive And Sensorimotor Tasks For Assessing Functional Impairments In Mouse Models Of Alzheimer’s Disease And Related Disorders,” Methods Mol.Biol. 849:529-540描述地进行该测试。简言之,装置是由Plexiglas®构建的8臂高放射状迷宫。每条臂是35cm长和7cm宽,水杯(直径1cm)放置在每条臂的末端。15cm高的侧壁伸入到每条臂中12cm,以防止动物在臂之间横跨。中心区域是直径14cm的八角形轮毂(hub)。通过滑轮系统远程操作的透明Plexiglas®闸门控制进入臂。迷宫高于地面水平75cm并且位于房间中,在所述房间中若干位置固定的不同物体用作额外的迷宫线索。在测试之前,使小鼠适应5天。在该时间段内,小鼠每天接受0.1%的糖精水1小时,然后适应16小时,以从放置在每条臂末端处的杯子获取糖溶液。前两天的适应在Y-迷宫中进行,其允许小鼠自由探索。随后三天的适应在八臂迷宫进行,其中门周期性升起和落下,以使动物习惯于与它们操作相关的声音。在9天测试时间段内保持相同的限水方案。在该方案中,小鼠保持良好的健康。每个测试实验开始于将小鼠放置在中心区域并且升起所有的门。当进入臂时,落下所有的门。在小鼠消费糖精水之后,升起进入该臂的门,允许小鼠返回中心区域。在5秒钟的间隔之后,通过再次同时升起所有的门而启动下一实验。持续该程序,直到动物已经进入所有8个臂或直到10分钟过后。每日采集阶段持续9天。记录错误的数量(进入先前到访过的臂)和完成每个阶段的时间。

[0354] 对象识别测试:如Bouta jangout, A. 等 (2012) “Cognitive And Sensorimotor Tasks For Assessing Functional Impairments In Mouse Models Of Alzheimer’s Disease And Related Disorders,” Methods Mol.Biol. 849:529-540描述地进行该测试。简言之,采用的自发对象识别测试测量短期记忆的欠缺,其在正方形开放场地盒(48cm正方

形,具有由黑色 Plexiglas® 构建的18cm高的壁) 中进行,所述盒比地面高50cm。光强度设置为30lx。在测试的前一天,在允许小鼠探索空盒子15分钟的阶段中逐只驯化小鼠。在训练阶段期间,将两个新的对象放置在开放场地中的对角处并且允许动物探索15分钟。对于任何给定的实验,成对的对象是10cm高且由相同的材料组成,从而它们可能不容易通过嗅觉线索而区分开。通过追踪系统(San Diego Instruments)记录探索每个对象花费的时间,并且在训练期结束时,在保留延迟(RD=3小时)持续期间从盒子中移出小鼠。在保留测定期间,正常的小鼠在3小时的延迟后记得特定对象,并且在保留实验期间,它们花费大部分时间研究新对象。在保留测试期间,将动物放回相同的盒子,其中将之前在训练期间使用的熟悉对象中的一个换成新的对象,并且允许自由探索6分钟。对于给定的动物,不同的对象对用于每个测定,并且,暴露与对象对的顺序以及每对的指定样品和新对象在组内和组之间被平衡。探索新的对象和熟悉对象花费的时间记录为6分钟。短期记忆分数的百分数是相比探索新对象花费的时间(保留阶段),探索两个对象中任何一个花费的时间(训练阶段)。

[0355] 恐惧条件反射(Fear Conditioning): 测试室(26cm x 22cm x 18cm高)具有透明 Plexiglas® 侧面和用于递送轻微足底电击的格子地板。室放置在减噪室 (sound-attenuated chamber) 内部(内部尺寸:56cm x 38cm x 36cm),其具有可观察小鼠而不受到打扰的窗户(来自Coulbourn Instrument的Coulbourn Habitest)。在训练天,将小鼠放置在测试室中并且允许其探索2分钟。提供条件性刺激(CS;白噪声80dB噪音)30秒,随后立即进行轻微足底电击(2秒,0.7mA),其用作非条件性刺激(US)。2分钟之后,小鼠接受第二CS-US配对。Freeze Frame监测系统(San Diego Instruments, San Diego CA)用于控制CS和US出现的时机并且记录僵直行为(freezing behavior)。在条件反射程序中,也记录对于足底电击的应答(通常为跑动、跳跃或发声)。针对短期记忆,测试小鼠在3小时内的场景性恐惧,并且,针对长期记忆,在24小时内测试小鼠的场景性恐惧,在此期间,在没有CS和噪声的情况下将小鼠放置在初始测试室中5分钟,并记录僵直行为。

[0356] B、使用hTau小鼠对抗体4E6G7的短期效力研究

[0357] 在hTau短期效力研究开始时,hTau小鼠是11-12月龄,其被分成具有类似的认知和运动状态的两组,然后,其接受三次抗体注射,并且,除了恐惧条件反射测试之外,其还经历相同行为测试的重新测试,随后进行脑提取,用于组织分析。在第1-10天,小鼠经历适应和预测试,其使用旋转杆、开放场地和封闭场地对称测试(Boutajangout, A. 等(2012)“Cognitive And Sensorimotor Tasks For Assessing Functional Impairments In Mouse Models Of Alzheimer’s Disease And Related Disorders,”Methods Mol.Biol. 849:529-540),随后在第11和14天进行抗体注射,并且在第15-18天重新测试。第三次注射在第24天递送,随后在第27-28天进行恐惧条件反射测试,并且在第30天进行灌注。

[0358] 对于组织分析,将小鼠用氯胺酮/甲苯噻嗪(250mg/50mg每kg体重,i.p.)麻醉,并且如下述文献描述地被处理:Rajamohamedsait, H.B. 等(2012)“Histological Staining of Amyloid and Pre-amyloid Peptides and Proteins in Mouse Tissue,”Methods Mol.Biol. 849:411-424。简言之,小鼠被灌注25mL PBS,10分钟。然后,小心地去除脑,并且将左半球冷冻和储存在-80°C,直到进行蛋白质印迹。将右半球保持在2%高碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛(PLP)中24小时,然后放置在DMSO/甘油缓冲溶液中,达至少另外的24小时或直

到进行切片。在冷冻恒冷切片机上获得冠部切片(40 μ m厚),并且以五个系列(200 μ m间隔)放置在乙二醇冷冻保护溶液中并储存在-30℃直到用于免疫组织化学。用对病理Tau、针对^{p}Ser396/^{p}404表位的PHF-1(1:1000)和识别构象表位的MC1(1:100)染色的小鼠单克隆Tau抗体进行免疫染色。

[0359] 称重左半球脑组织并且在(5x v/w)改良的RIPA缓冲液(50mM Tris-HCl, pH 7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM NaF、1mM Na₃VO₄、1 μ g/mL完全的蛋白酶抑制剂混合物(Roche Applied Science))中匀化。然后,在20℃将匀浆离心(20,000xg)20分钟,并且收集上清液作为低速上清液(LSS)。在蛋白质量化之后,针对相同的蛋白质浓度,在改良的0+缓冲液(62.5mM Tris-HCl, pH 6.8、5%甘油, 2-巯基乙醇、2.3%SDS、1mM EGTA、1mM甲苯基磺酰氟、1mM Na₃VO₄、1 μ g/mL完全的蛋白酶抑制剂)稀释的情况下调整体积,煮沸5分钟,并且加载到12%聚丙烯酰胺凝胶中。对于十二烷基肌氨酸钠不溶性组分,将10%的十二烷基肌氨酸钠溶液添加至LSS,并且在室温混合样品30分钟,然后在20℃,在100,000x g离心1小时。然后,在1%十二烷基肌氨酸钠溶液中洗涤小球,并且在20℃,在100,000x g再次离心1小时。接着,风干小球30分钟,将其与50 μ l改良的0+缓冲液混合,漩涡1分钟,然后煮沸5分钟并且标注“十二烷基肌氨酸钠小球(SP)组分”。

[0360] 如实验错误显示的,已经用抗体4E6G7免疫的hTau小鼠在CFSM测试中展示显著的改善($p<0.01$)(图12,小图A),而对照小鼠则没有(图12,小图B)。在运动功能测试(旋转杆和开放场地测试)中两个组的小鼠表现类似,表明认知功能的改善是免疫的直接结果,而不是由于运动功能改变而导致的二级结果。但是,免疫的小鼠和对照小鼠在处理之后在恐惧条件反射测试中均未显示任何改善。

[0361] C. 使用hTau/PS1小鼠对抗体4E6G7的长期效力研究

[0362] 当小鼠8-9月龄时开始免疫,并且每周继续免疫,达十三周。在处死之前的月中,小鼠进行一连串的认知测试(如上所述,八臂迷宫、不同难度的封闭场地对称测试和对象识别测试)以及感觉运动测试(如上所述,旋转杆和开放场地),以验证这类缺陷不是认知评估中的混淆变量。

[0363] 相比对照小鼠,发现免疫的小鼠在以下测试中的表现实质上更好:八臂迷宫($p<0.0001$;事后比较, $p<0.01-0.001$,在第2、3、5-9天)(图13,小图A);CFSM,在简单、中等和复杂任务中的错误少35-69%($p<0.05-0.003$)(图13,小图B-D);和对象识别任务(63%的时间花费在新的对象上对比46%的时间花费在对照上, $p<0.05$;图13,小图E)。组在各种感觉运动任务中没有差异,表明强健的认知改善不能通过感觉运动作用来解释,其进一步强化了结果。

[0364] 如短期效力研究中描述地进行免疫组织化学。与注射IgG的对照比较,PHF-1染色的脑切片的定量分析揭示免疫的小鼠中梨形皮质中病理Tau减少61%。图14,小图A-C显示对照小鼠的PHF-1染色的脑切片(图14,小图A)和用抗体4E6G7免疫的hTau/PS1小鼠(图14,小图B)。图14,小图C显示了对照和免疫小鼠的脑细胞的PHF-1染色的定量分析。

[0365] 实施例9

[0366] 抗体4E6G7展示用针对Tau的^{p}Ser404表位的其他抗体没有观察到的特性

[0367] 为了进一步表明抗体4E6G7的新特征,比较其特征与同样针对Tau的^{p}Ser404表位产生的对照抗Tau抗体(抗体6B2G12;也命名为抗体6B2)的特征(Krishnaswamy, S. 等

(2014) "Antibody-Derived *in vivo* Imaging of Tau Pathology," *J.Neurosci.* 34(50) : 16835-16850) ; Congdon, E.E. 等, (2013) "Antibody Uptake Into Neurons Occurs Primarily Via Clathrin-Dependent Fcgamma Receptor Endocytosis And Is A Prerequisite For Acute Tau Protein Clearance," *J.Biol.Chem.* 288(49) :35452-35465; Gu, J. 等(2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," *J.Biol.Chem.* 288(46) :33081-33095)。抗体 4E6G7和抗体6B2G12二者都能够进入神经元并且与tau共定位(Gu, J. 等(2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," *J.Biol.Chem.* 288(46) :33081-33095)。

[0368] 在脑切片培养物中,在处理6周之后,两种抗体都减少可溶性磷酸化-Tau。然而,尽管是针对相同的表位得到的,但两种抗体展示多种不同的功能特征。但是,发现仅抗体 4E6G7而不是抗体6B2G12经细胞内机制短期降低原代神经元中的tau水平 (Congdon, E.E. 等, (2013) "Antibody Uptake Into Neurons Occurs Primarily Via Clathrin-Dependent Fcgamma Receptor Endocytosis And Is A Prerequisite For Acute Tau Protein Clearance," *J.Biol.Chem.* 288 (49) :35452-35465; Gu, J. 等(2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," *J.Biol.Chem.* 288 (46) :33081-33095)。两种抗体展示不同的结合特征,抗体4E6G7是磷酸化-选择性的,而抗体6B2G12具有受磷酸化影响的构象特性并且对于tau具有显著更高的亲和力(Gu, J. 等(2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology," *J.Biol.Chem.* 288 (46) :33081-33095)。

[0369] 抗体4E6G7而不是抗体6B2G12,短期改善hTau小鼠的认知并且减少可溶性磷酸化-Tau蛋白质。如实验错误显示的,用抗体4E6G7短期处理hTau小鼠导致认知、空间学习和记忆的显著改善,如在CFSM测试中测定的(相对于测试前,测试后的错误少 48%;13.6(平均错误) ±1.2 (SEM) 至7.1±0.9, p<0.01),而IgG对照小鼠与它们注射前表现相比未改善(图15,小图A)。这些差异不是性别相关的。抗体4E6G7处理的雄性(错误少52%;14.6±0.8至7.0±1.4, p<0.01)的表现与抗体4E6G7处理的雌性(错误少44%;12.7±2.2至7.1±1.2, p<0.05)类似。重复的测量、双因素方差分析揭示了处理作用 (p=0.0018),而不是性别作用 (p=0.5145)。相反,抗体6B2G12处理在该测试中并不导致改善(图15,小图B)。

[0370] 也鉴定了这些抗体特性另外的差异。如上所述,发现用1μg/mL或10μg/mL的 AD衍生的PHF温育在原代神经元中诱导毒性,如通过LDH测定(见例如,图1-2) 和 NeuN免疫印迹(见例如,图3-4) 测定的,并且发现抗体4E6G7预防这些作用;但是,发现抗体6B2G12不能预防这些作用。类似地,发现用抗体4E6G7 (10μg/mL或1μg/mL) 处理预防由于PHF暴露而造成的tau水平的改变(见,例如,图5-6),而发现用抗体 6B2G12处理不起作用。另外,发现抗体 4E6G7能够预防由于暴露于1μg/mL或10 μg/mL PHF造成的磷酸化的Tau的增加(见,例如,图7-8);发现抗体6B2G12不能预防这样的增加。

[0371] 抗体在恐惧条件反射测试中都未显示益处。在运动功能测试(旋转杆和开放场地测试) 中,两个处理组的小鼠的表现与IgG对照类似,表明抗体4E6G7介导的认知功能的改善

是免疫的直接结果,而不是由于运动功能改变的二级结果。

[0372] 实施例10

[0373] 抗体4E6G7主要识别溶解的PHF

[0374] 为了进一步检验抗体4E6G7和抗体6B2G12的不同特性的基础,在biacore、斑点印迹和ELISA测定中表征抗体与tau肽、溶解的PHF和其他tau组分的结合。

[0375] Biacore测定

[0376] 使用biacore测定检验抗体4E6G7和抗体6B2G12与对应tau蛋白质的396/404区域的tau肽的结合。抗体都未显示与P-Ser396的结合,这与先前公开的ELISA测定不同(Gu, J.等(2013)“Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology,”J.Biol.Chem. 288 (46) : 33081-33095)。但是,对于所有的其他表位肽,抗体6B2G12产生了比通过抗体4E6G7(10^{-7} M)观察到的 K_D 值基本上更低的 K_D 值(10^{-9} - 10^{-10} M),指示对于免疫原表位高得多的亲和力(表5)。使用ELISA,发现抗体4E6G7与包被在板上的P-Ser396肽非常差的结合,但是,抗体6B2G12未显示结合。这可能是由于与平板结合时肽中发生的构象改变,或固定抗体时发生的差异。在竞争ELISA中,我们观察到抗体4E6G7 和抗体6B2G12与溶液中的P-Ser396肽的结合的类似的缺乏,确认了biacore数据的准确性。这些发现强调了在评估抗体亲和力时,应使用各种方法。

表 5		
K_D (Biacore)	抗体 4E6G7	抗体 6B2G12
30 氨基酸肽		
Tau379-408 [P-Ser396/404]	2.71×10^{-7}	3.95×10^{-10}
Tau379-408	2.12×10^{-7}	2.51×10^{-9}
23 氨基酸肽		
Tau386-408 [P-Ser396/404]	4.69×10^{-7}	2.39×10^{-9}
Tau386-408 [P-Ser404]	2.78×10^{-7}	4.11×10^{-9}
Tau386-408 [P-Ser396]	ND	ND

[0377] [0378] 斑点印迹测定

[0379] 使用不同tau组分的斑点印迹来评估抗体4E6G7和抗体6B2G12与PHF的结合(图 1、图16,小图A)。将来自相同人AD脑的溶解的PHF组分、十二烷基肌氨酸钠可溶性组分和十二烷基肌氨酸钠不溶性组分施加至硝化纤维素膜,其然后与抗体4E6G7或抗体6B2G12一起温育(图16,小图A)。抗体4E6G7对于溶解的PHF具有更高的亲和力,但是抗体6B2G12更好地结合十二烷基肌氨酸钠不溶性组分。抗体都不与十二烷基肌氨酸钠可溶性组分很好地结合。使用斑点印迹,抗体4E6G7和抗体6B2G12二者都显示与对照样品有限的结合(图16,小图B)。在十二烷基肌氨酸钠可溶性组分中没有观察到明显的反应性,并且在其他两个组分中仅仅观察到最小的反应性。值得注意的是,对照组织具有非常有限的病理Tau(如果有的话),并且在AD组织中可成小球的(pelletable)材料少得多,并且所述可成小球的材料可能包含各种蛋白质。针对AD 和对照组织,进行相同量的蛋白质的印迹。

[0380] ELISA测定

[0381] 进行两个不同ELISA测定,以评估抗体4E6G7和抗体6B2G12与来自AD和对照脑的不

同tau组分的结合。在第一个ELISA测定中,将平板涂覆以来自十二烷基肌氨酸钠可溶性组分、溶解的PHF组分或十二烷基肌氨酸钠不溶性组分的材料(1 μ g/孔)并且添加抗体的稀释物。

[0382] 当平板被涂覆溶解的PHF时(图16,小图C),对于高达1/125k的所有稀释物,相比与对照的结合,抗体6B2G12显示与包被来自AD脑的材料的孔显著更高地结合($p < 0.0001 - 0.05$),并且,相比抗体4E6G7在1/200-1/5k与AD或对照的结合显示显著更高的结合($p < 0.0001$)。相比之下,在任何稀释度,相比与对照的结合,抗体4E6G7未显示与AD tau显著更高地结合。

[0383] 在涂覆十二烷基肌氨酸钠可溶性tau的平板中(图16,小图D),甚至在最高抗体浓度检测到了低的结合。在1/200稀释度,相比与来自对照脑的tau的结合,抗体6B2G12显示了与AD tau显著更高的结合,并且也显示比抗体4E6G7与AD或对照tau的结合更高的结合(分别为 $p < 0.01$ 、 0.05 和 0.05)。其他稀释度或条件在样品之间都未显示任何显著差异。

[0384] 最后,当平板涂覆十二烷基肌氨酸钠不溶性tau时(图16,小图E),在1/200-1/125k稀释度,相比抗体4E6G7与AD tau的结合,抗体6B2G12显示显著更高的结合($p < 0.0001 - 0.05$),并且也在相同稀释度显示与AD tau显著更高的结合($p < 0.0001 - 0.05$)。再次,抗体4E6G7与AD的结合相比与对照的结合没有显著差异。

[0385] 接着进行竞争ELISA,以确定抗体与溶液中的PHF的结合。在该测定中,如上所述,平板被涂覆溶解的PHF,但是在添加抗体之前,将小份(aliquots)与增加浓度的溶解的PHF(0.01-1 μ g/ml)一起温育1小时。在这些条件下,与溶解的PHF的结合明显抑制了抗体4E6G7与涂覆在平板上的PHF的结合,但是不影响抗体6B2G12结合。在最高PHF浓度,与孔结合的抗体4E6G7下降85%。测定IC50值为71nM(图16,小图F)。相比之下,抗体6B2G12在任何PHF浓度均未显示与孔的降低的结合。这些数据表明,两种抗体结合AD衍生的PHF材料中的不同的tau种类;抗体4E6G7结合溶解的PHF并且抗体6B2G12结合聚集的PHF。

[0386] ELISA和斑点印迹结合数据,尤其在结合来自共焦和生物化学分析的发现考虑时,表明抗体4E6G7的效力(和对于抗体6B2G12,该效力的缺乏)可通过它们各自的PHF的相互作用/中和程度来解释。斑点印迹测定和ELISA数据证明,尽管抗体4E6G7和抗体6B2G12都结合PHF,但是亲和力和优选的种类不同,其中抗体6B2G12潜在地结合更高度聚集的但是毒性较低的tau形式(图16,小图A)。

[0387] 与通过抗体6B2G12获得的结果相反,在所有测定中,抗体4E6G7显示与聚集的tau较少的结合以及与溶解的PHF的优先结合。尽管在斑点印迹中相对于对照样品与溶解的PHF组分的强的结合,但是在ELISA测定中,抗体4E6G7显示结合聚集在孔上的tau的有限的能力。共温育抗体6B2G12和PHF未观察到Ab-PHF复合物,因为后者在培养基中为其溶解形式,其不结合抗体6B2G12(图16,小图F)。(使用超离心确认实验浓度下PHF组分的溶解度)。内体/溶酶体中的pH变化可促进聚集,产生可溶性和不溶性形式PHF的混合物,因此,在这些囊泡中结合两种抗体(PHF \rightarrow Ab条件)。但是,仅仅抗体4E6G7与溶解的PHF形式的结合是有益的,而通过抗体6B2G12的结合没有作用。该详细说明对于开发tau免疫疗法和对于理解Tau疾病的发病机理具有重要启示,因为其表明治疗效力与结合可溶性(或溶解的)PHF的能力相关。

[0388] 本说明书提到的所有出版物和专利通过参考并入本文,达到如同具体和单独指出

每个单个出版物或专利申请通过参考以其整体并入的相同程度。尽管已经结合其具体实施方式描述了本发明，但是应当理解，其能够被进一步修改，并且本申请旨在覆盖大体上根据本发明原理并且包括与本公开偏离的本发明的任何变型、用途或改变，只要在本发明所属领域的已知或习惯实践内并且如可应用至本文之前所阐释的本质特征。

[0001] 序列表
[0002] <110> 纽约大学
[0003] Sigurdsson, Einar M
[0004] <120> 对Tau的{p}Ser404表位有选择性的基于抗体的分子和它们在诊断和治疗Tau疾病中的用途
[0005] <130> 1400.0009PCT
[0006] <150> US 62/204,711
[0007] <151> 2015-08-13
[0008] <160> 31
[0009] <170> PatentIn 3.5版本
[0010] <210> 1
[0011] <211> 441
[0012] <212> PRT
[0013] <213> 智人
[0014] <220>
[0015] <221> MISC_FEATURE
[0016] <222> (1) .. (441)
[0017] <223> 人Tau残基
[0018] <400> 1
[0019] Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
[0020] 1 5 10 15
[0021] Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
[0022] 20 25 30
[0023] Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
[0024] 35 40 45
[0025] Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
[0026] 50 55 60
[0027] Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
[0028] 65 70 75 80
[0029] Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
[0030] 85 90 95
[0031] Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
[0032] 100 105 110
[0033] Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
[0034] 115 120 125
[0035] Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
[0036] 130 135 140
[0037] Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro

[0038]	145	150	155	160
[0039]	Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro			
[0040]		165	170	175
[0041]	Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly			
[0042]		180	185	190
[0043]	Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser			
[0044]		195	200	205
[0045]	Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys			
[0046]		210	215	220
[0047]	Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys			
[0048]		225	230	235
[0049]	Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val			
[0050]		245	250	255
[0051]	Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly			
[0052]		260	265	270
[0053]	Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln			
[0054]		275	280	285
[0055]	Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly			
[0056]		290	295	300
[0057]	Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser			
[0058]		305	310	315
[0059]	Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gln			
[0060]		325	330	335
[0061]	Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser			
[0062]		340	345	350
[0063]	Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Asn			
[0064]		355	360	365
[0065]	Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala			
[0066]		370	375	380
[0067]	Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser			
[0068]		385	390	395
[0069]	Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser			
[0070]		405	410	415
[0071]	Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val			
[0072]		420	425	430
[0073]	Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu			
[0074]		435	440	
[0075]	<210> 2			
[0076]	<211> 15			

- [0077] <212> PRT
[0078] <213> 人工序列
[0079] <220>
[0080] <223> 包含甘氨酸的连接体
[0081] <400> 2
[0082] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
[0083] 1 5 10 15
[0084] <210> 3
[0085] <211> 18
[0086] <212> PRT
[0087] <213> 人工序列
[0088] <220>
[0089] <223> 连接体
[0090] <400> 3
[0091] Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
[0092] 1 5 10 15
[0093] Lys Gly
[0094] <210> 4
[0095] <211> 18
[0096] <212> PRT
[0097] <213> 人工序列
[0098] <220>
[0099] <223> 优选连接体
[0100] <400> 4
[0101] Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg
[0102] 1 5 10 15
[0103] Ser Ser
[0104] <210> 5
[0105] <211> 6
[0106] <212> PRT
[0107] <213> 人工序列
[0108] <220>
[0109] <223> His标签
[0110] <400> 5
[0111] His His His His His
[0112] 1 5
[0113] <210> 6
[0114] <211> 12
[0115] <212> PRT

- [0116] <213> 人工序列
- [0117] <220>
- [0118] <223> HA标签
- [0119] <400> 6
- [0120] Gly Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser
- [0121] 1 5 10
- [0122] <210> 7
- [0123] <211> 23
- [0124] <212> PRT
- [0125] <213> 人工序列
- [0126] <220>
- [0127] <223> 含有 {P} Ser404表位的免疫原
- [0128] <220>
- [0129] <221> MOD_RES
- [0130] <222> (11) .. (11)
- [0131] <223> 磷酸化 (残基是磷酸丝氨酸)
- [0132] <220>
- [0133] <221> MOD_RES
- [0134] <222> (19) .. (19)
- [0135] <223> 磷酸化 (残基是磷酸丝氨酸)
- [0136] <400> 7
- [0137] Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly
- [0138] 1 5 10 15
- [0139] Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
- [0140] 20
- [0141] <210> 8
- [0142] <211> 23
- [0143] <212> PRT
- [0144] <213> 人工序列
- [0145] <220>
- [0146] <223> 含有 {P} Ser404表位的免疫原
- [0147] <220>
- [0148] <221> MOD_RES
- [0149] <222> (11) .. (11)
- [0150] <223> 磷酸化 (残基是磷酸丝氨酸)
- [0151] <220>
- [0152] <221> MOD_RES
- [0153] <222> (19) .. (19)
- [0154] <223> 磷酸化 (残基是磷酸丝氨酸)

[0155] <400> 8

[0156] Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly

[0157] 1 5 10 15

[0158] Asp Thr Ser Pro Arg His Leu

[0159] 20

[0160] <210> 9

[0161] <211> 108

[0162] <212> PRT

[0163] <213> 小家鼠

[0164] <220>

[0165] <221> MISC_FEATURE

[0166] <222> (1) .. (108)

[0167] <223> 抗体4E6G7的轻链可变结构域

[0168] <400> 9

[0169] Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

[0170] 1 5 10 15

[0171] Asp Thr Ile Thr Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

[0172] 20 25 30

[0173] Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile

[0174] 35 40 45

[0175] Phe Glu Ala Ser Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0176] 50 55 60

[0177] Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0178] 65 70 75 80

[0179] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp

[0180] 85 90 95

[0181] Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0182] 100 105

[0183] <210> 10

[0184] <211> 11

[0185] <212> PRT

[0186] <213> 小家鼠

[0187] <220>

[0188] <221> MISC_FEATURE

[0189] <222> (1) .. (11)

[0190] <223> 抗体4E6G7的CDR1

[0191] <400> 10

[0192] His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser

[0193] 1 5 10

[0194]	<210>	11		
[0195]	<211>	7		
[0196]	<212>	PRT		
[0197]	<213>	小家鼠		
[0198]	<220>			
[0199]	<221>	MISC_FEATURE		
[0200]	<222>	(1) .. (7)		
[0201]	<223>	抗体4E6G7的轻链的CDR2		
[0202]	<400>	11		
[0203]	Glu Ala Ser Thr Leu Tyr Thr			
[0204]	1	5		
[0205]	<210>	12		
[0206]	<211>	9		
[0207]	<212>	PRT		
[0208]	<213>	小家鼠		
[0209]	<220>			
[0210]	<221>	MISC_FEATURE		
[0211]	<222>	(1) .. (9)		
[0212]	<223>	抗体4E6G7的轻链的CDR3		
[0213]	<400>	12		
[0214]	Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp Thr			
[0215]	1	5		
[0216]	<210>	13		
[0217]	<211>	112		
[0218]	<212>	PRT		
[0219]	<213>	小家鼠		
[0220]	<220>			
[0221]	<221>	MISC_FEATURE		
[0222]	<222>	(1) .. (112)		
[0223]	<223>	抗体4E6G7的重链可变结构域		
[0224]	<400>	13		
[0225]	Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser			
[0226]	1	5	10	15
[0227]	Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser			
[0228]	20	25	30	
[0229]	Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly			
[0230]	35	40	45	
[0231]	Arg Ile Ala Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln			
[0232]	50	55	60	

[0233] Gly Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu
 [0234] 65 70 75 80
 [0235] Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
 [0236] 85 90 95
 [0237] Gly Ser Gly Asn Tyr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 [0238] 100 105 110
 [0239] <210> 14
 [0240] <211> 10
 [0241] <212> PRT
 [0242] <213> 小家鼠
 [0243] <220>
 [0244] <221> MISC_FEATURE
 [0245] <222> (1) .. (10)
 [0246] <223> 抗体4E6G7的重链的CDR1
 [0247] <400> 14
 [0248] Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser Met His
 [0249] 1 5 10
 [0250] <210> 15
 [0251] <211> 17
 [0252] <212> PRT
 [0253] <213> 小家鼠
 [0254] <220>
 [0255] <221> MISC_FEATURE
 [0256] <222> (1) .. (17)
 [0257] <223> 抗体4E6G7的重链的CDR2
 [0258] <400> 15
 [0259] Arg Ile Ala Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 [0260] 1 5 10 15
 [0261] Gly
 [0262] <210> 16
 [0263] <211> 5
 [0264] <212> PRT
 [0265] <213> 小家鼠
 [0266] <220>
 [0267] <221> MISC_FEATURE
 [0268] <222> (1) .. (5)
 [0269] <223> 抗体4E6G7的重链的CDR3
 [0270] <400> 16
 [0271] Ser Gly Asn Tyr Asp

[0272] 1 5
 [0273] <210> 17
 [0274] <211> 238
 [0275] <212> PRT
 [0276] <213> 人工序列
 [0277] <220>
 [0278] <223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白
 [0279] <220>
 [0280] <221> MISC_FEATURE
 [0281] <222> (1) .. (108)
 [0282] <223> 抗体4E6G7的轻链可变结构域
 [0283] <220>
 [0284] <221> MISC_FEATURE
 [0285] <222> (109) .. (126)
 [0286] <223> 连接体
 [0287] <220>
 [0288] <221> MISC_FEATURE
 [0289] <222> (127) .. (238)
 [0290] <223> 抗体4E6G7的重链可变结构域
 [0291] <400> 17
 [0292] Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 [0293] 1 5 10 15
 [0294] Asp Thr Ile Thr Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
 [0295] 20 25 30
 [0296] Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 [0297] 35 40 45
 [0298] Phe Glu Ala Ser Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0299] 50 55 60
 [0300] Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0301] 65 70 75 80
 [0302] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp
 [0303] 85 90 95
 [0304] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Ser Gly Gly
 [0305] 100 105 110
 [0306] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Val Gln
 [0307] 115 120 125
 [0308] Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser Val Lys
 [0309] 130 135 140
 [0310] Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser Met His

[0311]	145	150	155	160
[0312]	Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile			
[0313]		165	170	175
[0314]	Ala Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys			
[0315]		180	185	190
[0316]	Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu			
[0317]		195	200	205
[0318]	Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser			
[0319]		210	215	220
[0320]	Gly Asn Tyr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser			
[0321]		225	230	235
[0322]	<210> 18			
[0323]	<211> 28			
[0324]	<212> PRT			
[0325]	<213> 人工序列			
[0326]	<220>			
[0327]	<223> N末端前导肽			
[0328]	<400> 18			
[0329]	Ile Gln Glu Glu Phe Lys Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val			
[0330]	1	5	10	15
[0331]	Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala			
[0332]		20	25	
[0333]	<210> 19			
[0334]	<211> 15			
[0335]	<212> PRT			
[0336]	<213> 人工序列			
[0337]	<220>			
[0338]	<223> C末端肽			
[0339]	<400> 19			
[0340]	Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln			
[0341]	1	5	10	15
[0342]	<210> 20			
[0343]	<211> 33			
[0344]	<212> PRT			
[0345]	<213> 人工序列			
[0346]	<220>			
[0347]	<223> C末端肽			
[0348]	<400> 20			
[0349]	Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln His			

[0350]	1	5	10	15
[0351]	His	His	His	His
			Gly	Ala
			Tyr	Pro
			Tyr	Asp
			Val	Pro
			Asp	Tyr
				Ala
[0352]		20	25	30
[0353]	Ser			
[0354]	<210>	21		
[0355]	<211>	266		
[0356]	<212>	PRT		
[0357]	<213>	人工序列		
[0358]	<220>			
[0359]	<223>	抗体4E6G7 scFv融合蛋白		
[0360]	<220>			
[0361]	<221>	MISC_FEATURE		
[0362]	<222>	(1) .. (28)		
[0363]	<223>	N末端前导肽 (SEQ ID NO:18)		
[0364]	<220>			
[0365]	<221>	MISC_FEATURE		
[0366]	<222>	(29) .. (266)		
[0367]	<223>	抗体4E6G7 scFv融合蛋白 (SEQ ID NO:17)		
[0368]	<400>	21		
[0369]	Ile	Gln	Glu	Glu
	Phe	Lys	Met	Lys
				Thr
			Ala	Ile
			Ala	Ile
			Ala	Val
[0370]	1	5	10	15
[0371]	Ala	Leu	Ala	Gly
	Phe	Ala	Thr	Val
			Ala	Gln
			Ala	Ala
			Asp	Ile
			Gln	Met
[0372]		20	25	30
[0373]	Asn	Gln	Ser	Pro
	Ser	Ser	Leu	Ser
			Ala	Ser
			Leu	Gly
			Asp	Thr
			Ile	Thr
[0374]		35	40	45
[0375]	Ile	Ser	Cys	His
	Ala	Ser	Gln	Asn
			Ile	Asn
			Val	Trp
			Leu	Ser
			Trp	Tyr
[0376]		50	55	60
[0377]	Gln	Gln	Lys	Pro
			Gly	Asn
			Ile	Pro
			Lys	Leu
			Leu	Ile
			Phe	Glu
			Ala	Ser
[0378]		65	70	75
				80
[0379]	Thr	Leu	Tyr	Thr
	Gly	Val	Pro	Ser
			Arg	Phe
			Ser	Gly
			Gly	Ser
[0380]		85	90	95
[0381]	Thr	Gly	Phe	Thr
	Leu	Thr	Ile	Ser
			Ser	Leu
			Gln	Pro
			Glu	Asp
			Ile	Ala
[0382]		100	105	110
[0383]	Thr	Tyr	Tyr	Cys
	Gln	Gln	Gly	Gln
			Ser	Tyr
			Pro	Trp
			Thr	Phe
			Gly	Gly
[0384]		115	120	125
[0385]	Gly	Thr	Lys	Leu
			Glu	Ile
			Lys	Arg
			Ser	Ser
			Gly	Gly
			Gly	Gly
[0386]		130	135	140
[0387]	Gly	Gly	Gly	Gly
	Ser	Ser	Arg	Ser
			Ser	Val
			Gln	Leu
			Gln	Gln
			Ser	
[0388]		145	150	155
				160

[0389]	Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr			
[0390]		165	170	175
[0391]	Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser Met His Trp Val Arg Gln			
[0392]		180	185	190
[0393]	Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Ala Pro Ala Asn			
[0394]		195	200	205
[0395]	Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr			
[0396]		210	215	220
[0397]	Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr			
[0398]		225	230	240
[0399]	Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Asp			
[0400]		245	250	255
[0401]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser			
[0402]		260	265	
[0403]	<210> 22			
[0404]	<211> 253			
[0405]	<212> PRT			
[0406]	<213> 人工序列			
[0407]	<220>			
[0408]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白			
[0409]	<220>			
[0410]	<221> MISC_FEATURE			
[0411]	<222> (1) .. (238)			
[0412]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白 (SEQ ID N0:17)			
[0413]	<220>			
[0414]	<221> MISC_FEATURE			
[0415]	<222> (239) .. (253)			
[0416]	<223> C末端肽 (SEQ ID N0:19)			
[0417]	<400> 22			
[0418]	Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
[0419]	1	5	10	15
[0420]	Asp Thr Ile Thr Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp			
[0421]		20	25	30
[0422]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile			
[0423]		35	40	45
[0424]	Phe Glu Ala Ser Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0425]		50	55	60
[0426]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0427]		65	70	75
				80

[0428]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp			
[0429]		85	90	95
[0430]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Ser Gly Gly			
[0431]		100	105	110
[0432]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Val Gln			
[0433]		115	120	125
[0434]	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser Val Lys			
[0435]		130	135	140
[0436]	Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser Met His			
[0437]		145	150	155
[0438]	Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile			
[0439]		165	170	175
[0440]	Ala Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys			
[0441]		180	185	190
[0442]	Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu			
[0443]		195	200	205
[0444]	Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser			
[0445]		210	215	220
[0446]	Gly Asn Tyr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala Lys			
[0447]		225	230	235
[0448]	Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln			
[0449]		245	250	
[0450]	<210> 23			
[0451]	<211> 244			
[0452]	<212> PRT			
[0453]	<213> 人工序列			
[0454]	<220>			
[0455]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白			
[0456]	<220>			
[0457]	<221> MISC_FEATURE			
[0458]	<222> (1) .. (238)			
[0459]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白 (SEQ ID N0:17)			
[0460]	<220>			
[0461]	<221> MISC_FEATURE			
[0462]	<222> (239) .. (244)			
[0463]	<223> C末端肽 (SEQ ID N0:5)			
[0464]	<400> 23			
[0465]	Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
[0466]	1	5	10	15

[0467]	Asp Thr Ile Thr Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp			
[0468]	20	25	30	
[0469]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile			
[0470]	35	40	45	
[0471]	Phe Glu Ala Ser Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0472]	50	55	60	
[0473]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0474]	65	70	75	80
[0475]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp			
[0476]	85	90	95	
[0477]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Ser Gly Gly			
[0478]	100	105	110	
[0479]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Val Gln			
[0480]	115	120	125	
[0481]	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser Val Lys			
[0482]	130	135	140	
[0483]	Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser Met His			
[0484]	145	150	155	160
[0485]	Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile			
[0486]	165	170	175	
[0487]	Ala Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys			
[0488]	180	185	190	
[0489]	Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu			
[0490]	195	200	205	
[0491]	Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser			
[0492]	210	215	220	
[0493]	Gly Asn Tyr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser His His			
[0494]	225	230	235	240
[0495]	His His His His			
[0496]	<210> 24			
[0497]	<211> 250			
[0498]	<212> PRT			
[0499]	<213> 人工序列			
[0500]	<220>			
[0501]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白			
[0502]	<220>			
[0503]	<221> MISC_FEATURE			
[0504]	<222> (1) .. (238)			
[0505]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白 (SEQ ID NO:17)			

[0506] <220>

[0507] <221> MISC_FEATURE

[0508] <222> (239) .. (250)

[0509] <223> C末端肽 (SEQ ID NO:6)

[0510] <400> 24

[0511] Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

[0512] 1 5 10 15

[0513] Asp Thr Ile Thr Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

[0514] 20 25 30

[0515] Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile

[0516] 35 40 45

[0517] Phe Glu Ala Ser Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0518] 50 55 60

[0519] Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0520] 65 70 75 80

[0521] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp

[0522] 85 90 95

[0523] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Ser Gly Gly

[0524] 100 105 110

[0525] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Val Gln

[0526] 115 120 125

[0527] Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser Val Lys

[0528] 130 135 140

[0529] Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser Met His

[0530] 145 150 155 160

[0531] Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile

[0532] 165 170 175

[0533] Ala Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys

[0534] 180 185 190

[0535] Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu

[0536] 195 200 205

[0537] Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser

[0538] 210 215 220

[0539] Gly Asn Tyr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Gly Ala

[0540] 225 230 235 240

[0541] Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser

[0542] 245 250

[0543] <210> 25

[0544] <211> 271

[0545] <212> PRT
 [0546] <213> 人工序列
 [0547] <220>
 [0548] <223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白
 [0549] <220>
 [0550] <221> MISC_FEATURE
 [0551] <222> (1) .. (238)
 [0552] <223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白 (SEQ ID NO:17)
 [0553] <220>
 [0554] <221> MISC_FEATURE
 [0555] <222> (239) .. (271)
 [0556] <223> C末端肽 (SEQ ID NO:20)
 [0557] <400> 25
 [0558] Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 [0559] 1 5 10 15
 [0560] Asp Thr Ile Thr Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
 [0561] 20 25 30
 [0562] Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 [0563] 35 40 45
 [0564] Phe Glu Ala Ser Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0565] 50 55 60
 [0566] Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0567] 65 70 75 80
 [0568] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp
 [0569] 85 90 95
 [0570] Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Ser Gly Gly
 [0571] 100 105 110
 [0572] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Val Gln
 [0573] 115 120 125
 [0574] Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser Val Lys
 [0575] 130 135 140
 [0576] Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser Met His
 [0577] 145 150 155 160
 [0578] Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile
 [0579] 165 170 175
 [0580] Ala Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys
 [0581] 180 185 190
 [0582] Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu
 [0583] 195 200 205

[0584]	Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser			
[0585]	210	215	220	
[0586]	Gly Asn Tyr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala Lys			
[0587]	225	230	235	240
[0588]	Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln His His His			
[0589]	245	250	255	
[0590]	His His His Gly Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser			
[0591]	260	265	270	
[0592]	<210> 26			
[0593]	<211> 281			
[0594]	<212> PRT			
[0595]	<213> 人工序列			
[0596]	<220>			
[0597]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白			
[0598]	<220>			
[0599]	<221> MISC_FEATURE			
[0600]	<222> (1) .. (28)			
[0601]	<223> N末端前导肽 (SEQ ID NO:18)			
[0602]	<220>			
[0603]	<221> MISC_FEATURE			
[0604]	<222> (29) .. (266)			
[0605]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白 (SEQ ID NO:17)			
[0606]	<220>			
[0607]	<221> MISC_FEATURE			
[0608]	<222> (267) .. (281)			
[0609]	<223> C末端肽 (SEQ ID NO:5)			
[0610]	<400> 26			
[0611]	Ile Gln Glu Glu Phe Lys Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val			
[0612]	1 5 10 15			
[0613]	Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Asp Ile Gln Met			
[0614]	20 25 30			
[0615]	Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr			
[0616]	35 40 45			
[0617]	Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser Trp Tyr			
[0618]	50 55 60			
[0619]	Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile Phe Glu Ala Ser			
[0620]	65 70 75 80			
[0621]	Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly			
[0622]	85 90 95			

[0623]	Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala		
[0624]	100	105	110
[0625]	Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly		
[0626]	115	120	125
[0627]	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
[0628]	130	135	140
[0629]	Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Val Gln Leu Gln Gln Ser		
[0630]	145	150	155
[0631]	Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr		
[0632]	165	170	175
[0633]	Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser Met His Trp Val Arg Gln		
[0634]	180	185	190
[0635]	Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Ala Pro Ala Asn		
[0636]	195	200	205
[0637]	Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr		
[0638]	210	215	220
[0639]	Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr		
[0640]	225	230	235
[0641]	Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Asp		
[0642]	245	250	255
[0643]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro		
[0644]	260	265	270
[0645]	Ser Val Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln		
[0646]	275	280	
[0647]	<210> 27		
[0648]	<211> 272		
[0649]	<212> PRT		
[0650]	<213> 人工序列		
[0651]	<220>		
[0652]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白		
[0653]	<220>		
[0654]	<221> MISC_FEATURE		
[0655]	<222> (1) .. (28)		
[0656]	<223> N末端前导肽 (SEQ ID N0:18)		
[0657]	<220>		
[0658]	<221> MISC_FEATURE		
[0659]	<222> (29) .. (266)		
[0660]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白 (SEQ ID N0:17)		
[0661]	<220>		

[0662] <221> MISC_FEATURE
[0663] <222> (267) .. (272)
[0664] <223> C末端肽 (SEQ_ID NO:18)
[0665] <400> 27
[0666] Ile Gln Glu Glu Phe Lys Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val
[0667] 1 5 10 15
[0668] Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Asp Ile Gln Met
[0669] 20 25 30
[0670] Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr
[0671] 35 40 45
[0672] Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser Trp Tyr
[0673] 50 55 60
[0674] Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile Phe Glu Ala Ser
[0675] 65 70 75 80
[0676] Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[0677] 85 90 95
[0678] Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala
[0679] 100 105 110
[0680] Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly
[0681] 115 120 125
[0682] Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Ser Gly Gly Ser Gly
[0683] 130 135 140
[0684] Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Val Gln Leu Gln Gln Ser
[0685] 145 150 155 160
[0686] Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr
[0687] 165 170 175
[0688] Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser Met His Trp Val Arg Gln
[0689] 180 185 190
[0690] Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Ala Pro Ala Asn
[0691] 195 200 205
[0692] Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr
[0693] 210 215 220
[0694] Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr
[0695] 225 230 235 240
[0696] Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Asp
[0697] 245 250 255
[0698] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser His His His His His His
[0699] 260 265 270
[0700] <210> 28

[0701]	<211>	278		
[0702]	<212>	PRT		
[0703]	<213>	人工序列		
[0704]	<220>			
[0705]	<223>	抗体4E6G7 scFv融合蛋白		
[0706]	<220>			
[0707]	<221>	MISC_FEATURE		
[0708]	<222>	(1) .. (28)		
[0709]	<223>	N末端前导肽 (SEQ ID NO:18)		
[0710]	<220>			
[0711]	<221>	MISC_FEATURE		
[0712]	<222>	(29) .. (266)		
[0713]	<223>	抗体4E6G7 scFv融合蛋白 (SEQ ID NO:17)		
[0714]	<220>			
[0715]	<221>	MISC_FEATURE		
[0716]	<222>	(267) .. (278)		
[0717]	<223>	C末端肽 (SEQ ID NO:6)		
[0718]	<400>	28		
[0719]	Ile Gln Glu Glu Phe Lys Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val			
[0720]	1	5	10	15
[0721]	Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Asp Ile Gln Met			
[0722]		20	25	30
[0723]	Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr			
[0724]		35	40	45
[0725]	Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser Trp Tyr			
[0726]		50	55	60
[0727]	Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile Phe Glu Ala Ser			
[0728]		65	70	75
[0729]	Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly			
[0730]		85	90	95
[0731]	Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala			
[0732]		100	105	110
[0733]	Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly			
[0734]		115	120	125
[0735]	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly			
[0736]		130	135	140
[0737]	Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Val Gln Leu Gln Gln Ser			
[0738]		145	150	155
[0739]	Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr			160

[0740]	165	170	175
[0741]	Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser Met His Trp Val Arg Gln		
[0742]	180	185	190
[0743]	Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Ala Pro Ala Asn		
[0744]	195	200	205
[0745]	Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr		
[0746]	210	215	220
[0747]	Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr		
[0748]	225	230	235
[0749]	Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Asp		
[0750]	245	250	255
[0751]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Gly Ala Tyr Pro Tyr Asp		
[0752]	260	265	270
[0753]	Val Pro Asp Tyr Ala Ser		
[0754]	275		
[0755]	<210> 29		
[0756]	<211> 299		
[0757]	<212> PRT		
[0758]	<213> 人工序列		
[0759]	<220>		
[0760]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白		
[0761]	<220>		
[0762]	<221> MISC_FEATURE		
[0763]	<222> (1) .. (28)		
[0764]	<223> N末端前导肽 (SEQ ID NO:18)		
[0765]	<220>		
[0766]	<221> MISC_FEATURE		
[0767]	<222> (29) .. (266)		
[0768]	<223> 抗体4E6G7 scFv融合蛋白 (SEQ ID NO:17)		
[0769]	<220>		
[0770]	<221> MISC_FEATURE		
[0771]	<222> (267) .. (299)		
[0772]	<223> C末端肽 (SEQ ID NO:20)		
[0773]	<400> 29		
[0774]	Ile Gln Glu Glu Phe Lys Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val		
[0775]	1 5 10 15		
[0776]	Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Asp Ile Gln Met		
[0777]	20 25 30		
[0778]	Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr		

[0779]	35	40	45
[0780]	Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser Trp Tyr		
[0781]	50	55	60
[0782]	Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile Phe Glu Ala Ser		
[0783]	65	70	75
[0784]	Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
[0785]	85	90	95
[0786]	Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala		
[0787]	100	105	110
[0788]	Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly		
[0789]	115	120	125
[0790]	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
[0791]	130	135	140
[0792]	Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Val Gln Leu Gln Gln Ser		
[0793]	145	150	155
[0794]	Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr		
[0795]	165	170	175
[0796]	Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Ser Met His Trp Val Arg Gln		
[0797]	180	185	190
[0798]	Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Ala Pro Ala Asn		
[0799]	195	200	205
[0800]	Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr		
[0801]	210	215	220
[0802]	Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr		
[0803]	225	230	235
[0804]	Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Asp		
[0805]	245	250	255
[0806]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro		
[0807]	260	265	270
[0808]	Ser Val Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln His His His His His Gly		
[0809]	275	280	285
[0810]	Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser		
[0811]	290	295	
[0812]	<210> 30		
[0813]	<211> 30		
[0814]	<212> PRT		
[0815]	<213> 人工序列		
[0816]	<220>		
[0817]	<223> Tau 379-408 ({p} Ser396/{p} Ser404)		

- [0818] <220>
- [0819] <221> MOD_RES
- [0820] <222> (18) .. (18)
- [0821] <223> 磷酸化 (残基是磷酸丝氨酸)
- [0822] <220>
- [0823] <221> MOD_RES
- [0824] <222> (26) .. (26)
- [0825] <223> 磷酸化 (残基是磷酸丝氨酸)
- [0826] <400> 30
- [0827] Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
- [0828] 1 5 10 15
- [0829] Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
- [0830] 20 25 30
- [0831] <210> 31
- [0832] <211> 30
- [0833] <212> PRT
- [0834] <213> 智人
- [0835] <220>
- [0836] <221> MISC_FEATURE
- [0837] <222> (1) .. (30)
- [0838] <223> Tau 379-408
- [0839] <400> 31
- [0840] Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
- [0841] 1 5 10 15
- [0842] Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
- [0843] 20 25 30

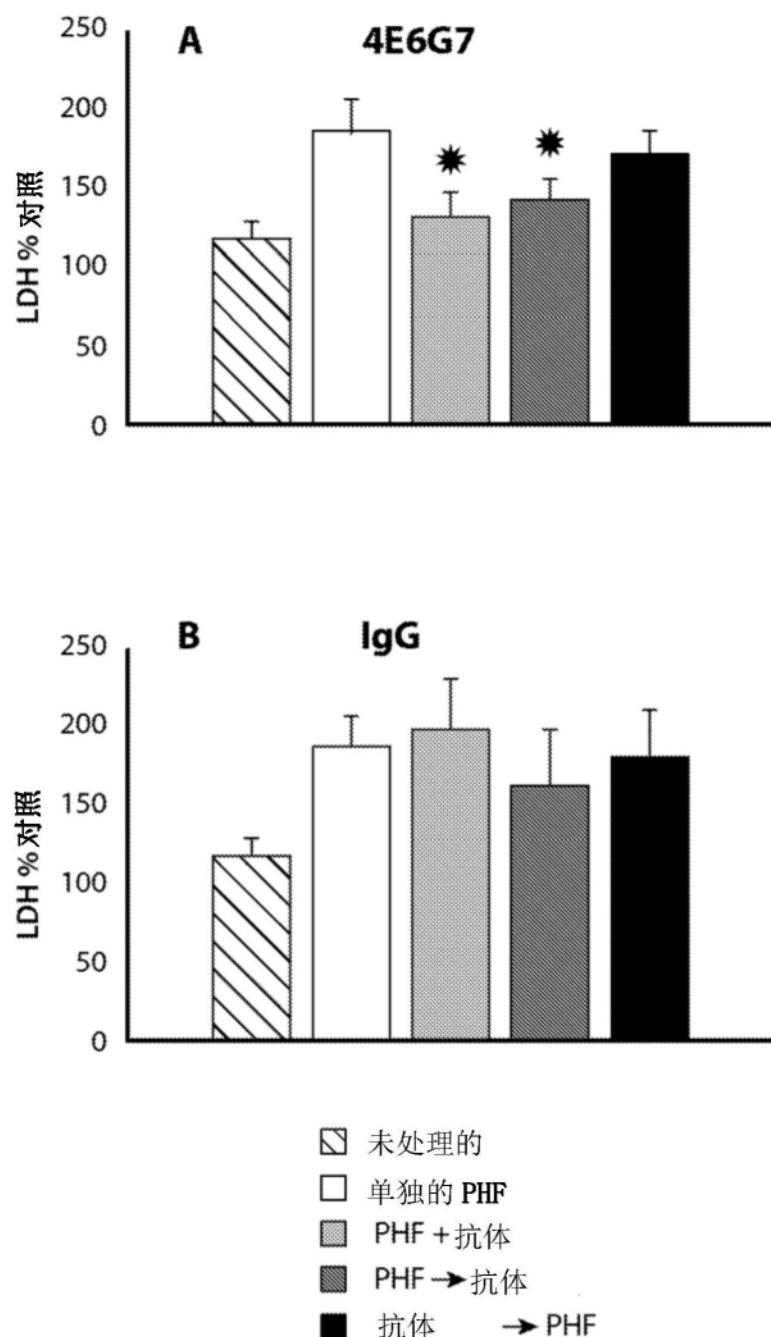


图1

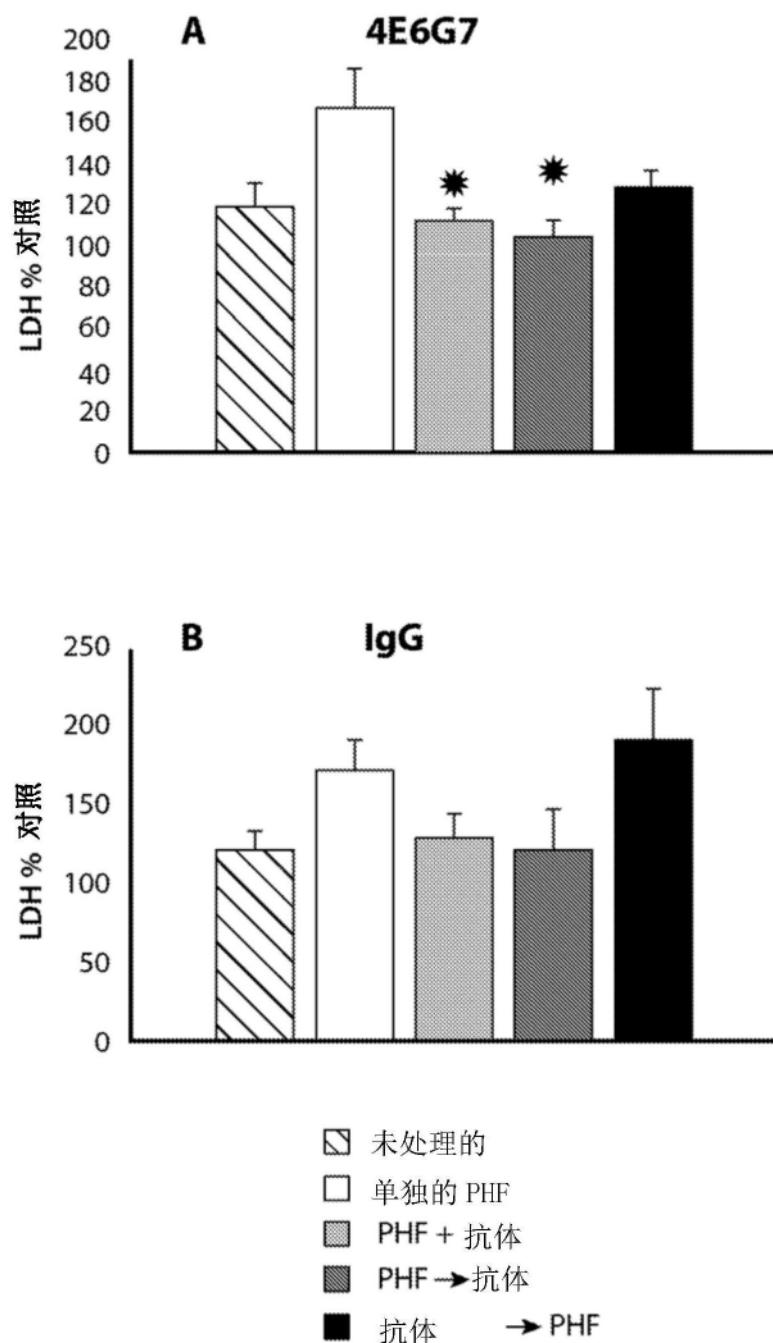


图2

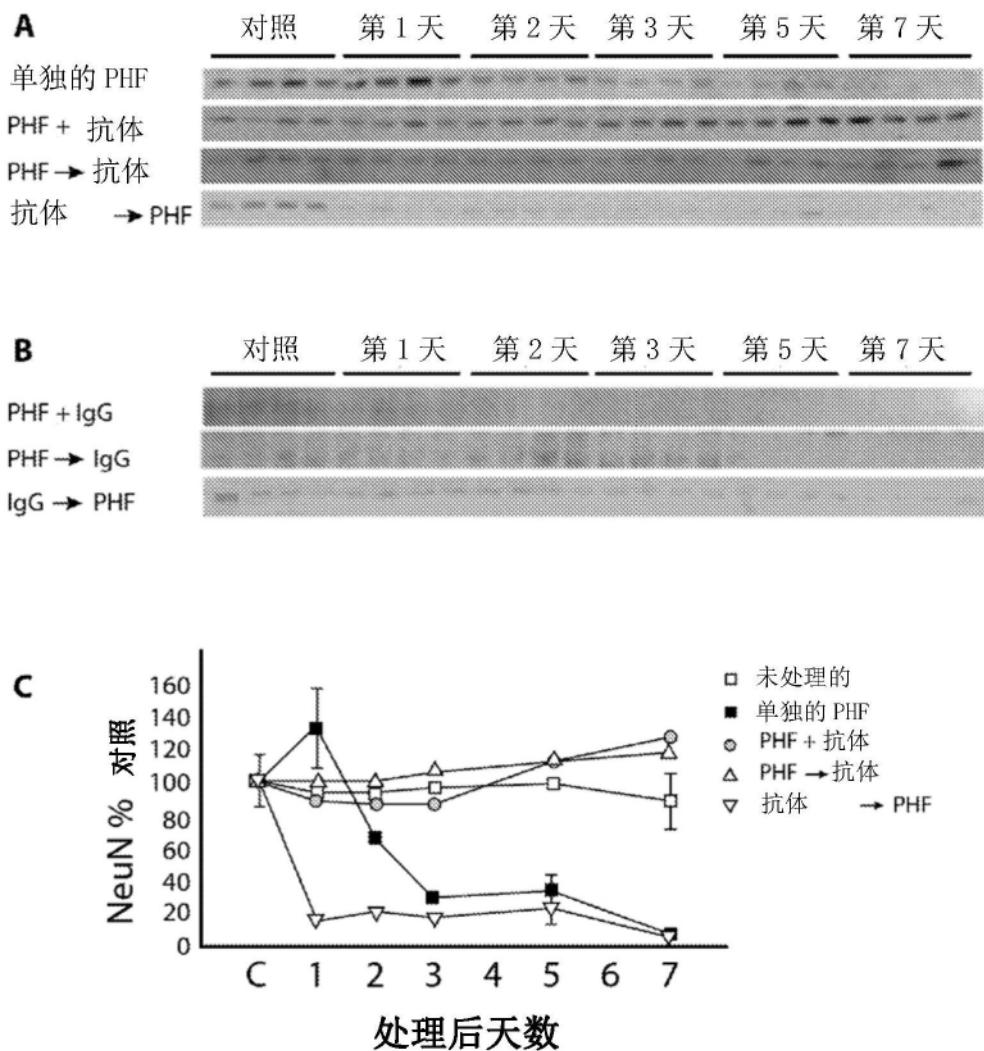


图3

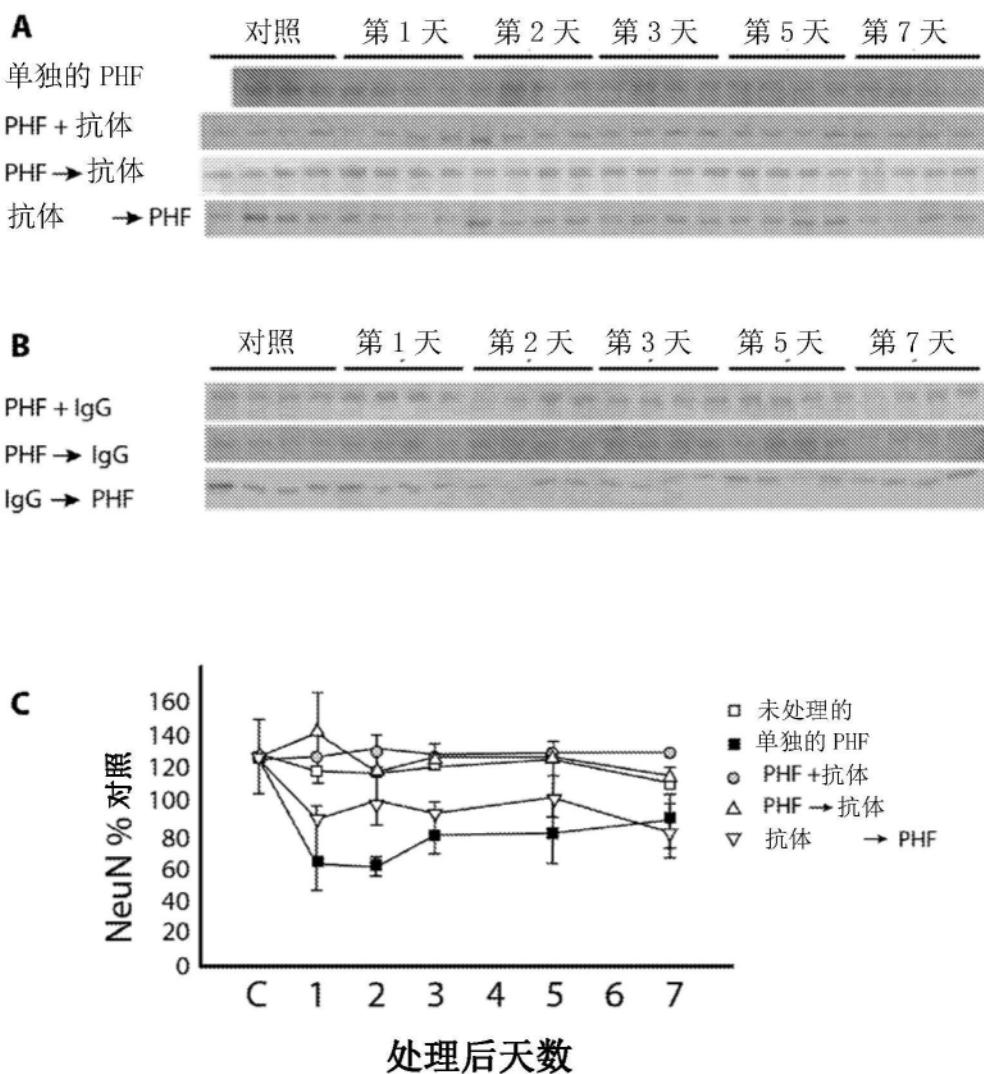


图4

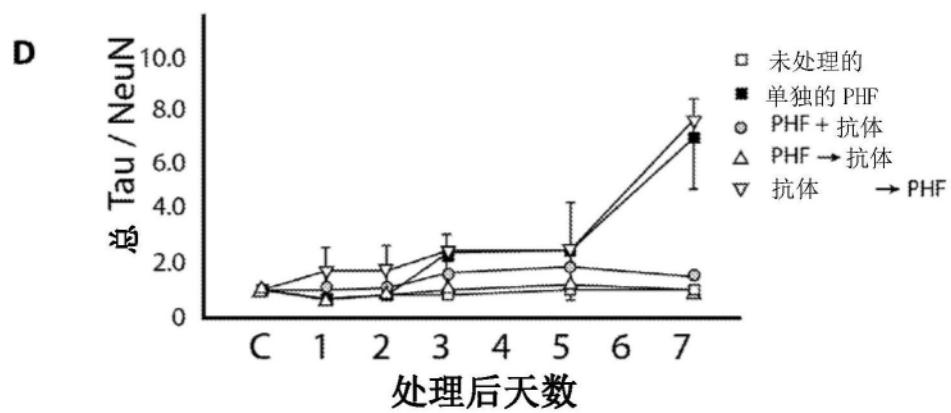
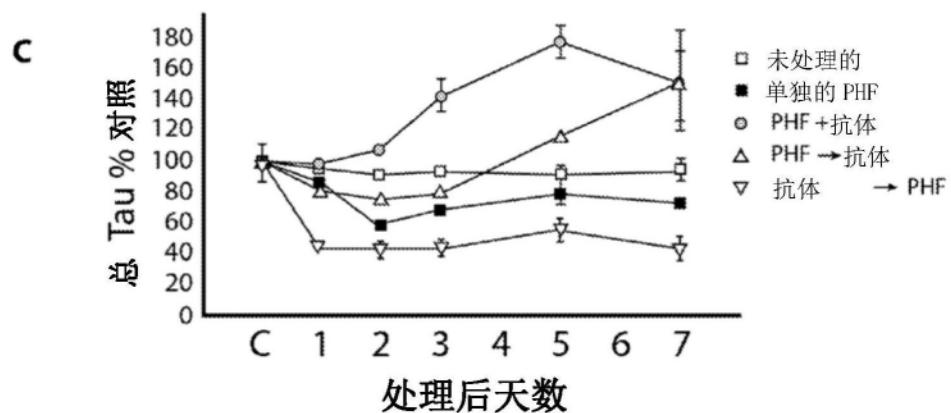
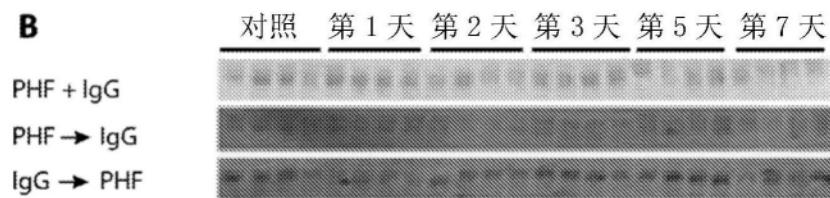
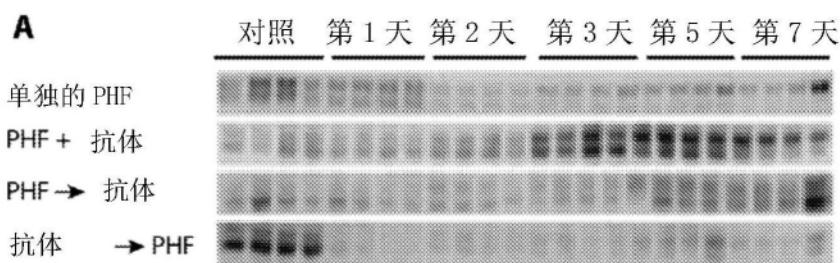


图5

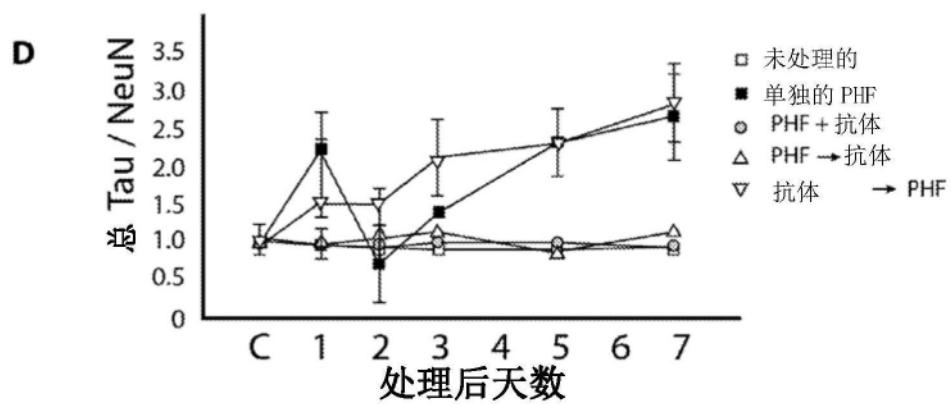
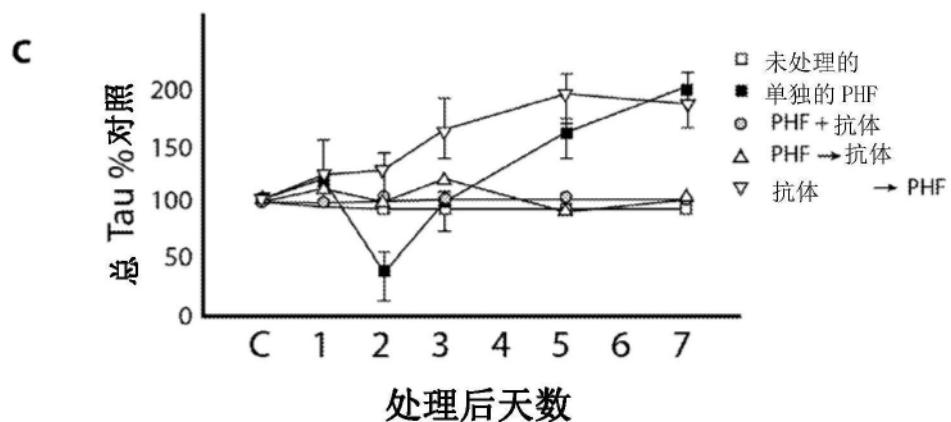
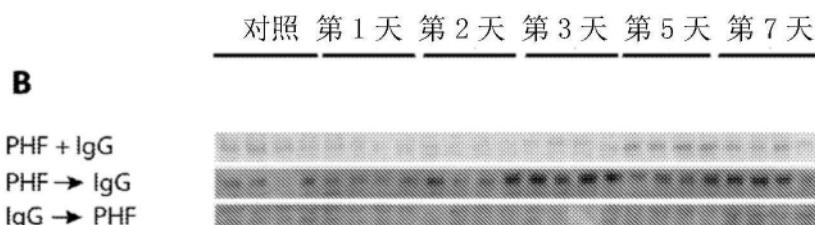
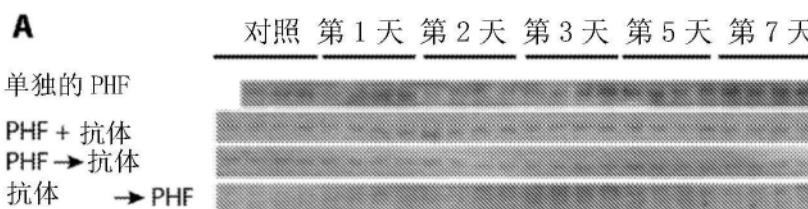


图6

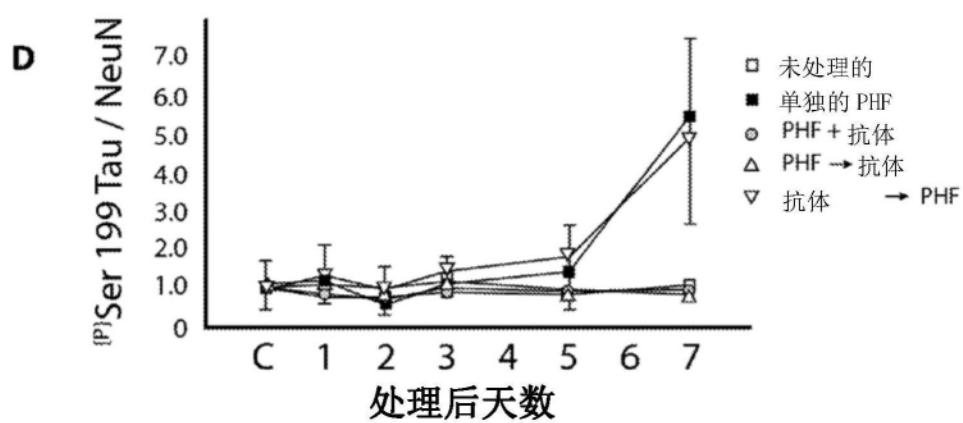
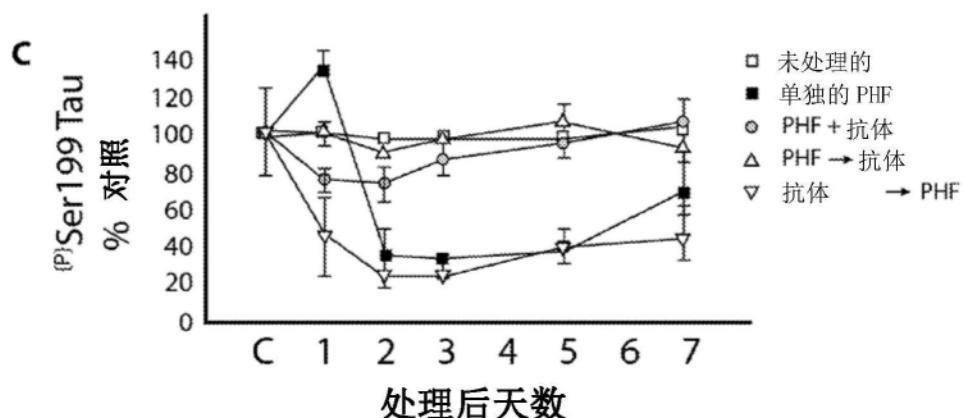
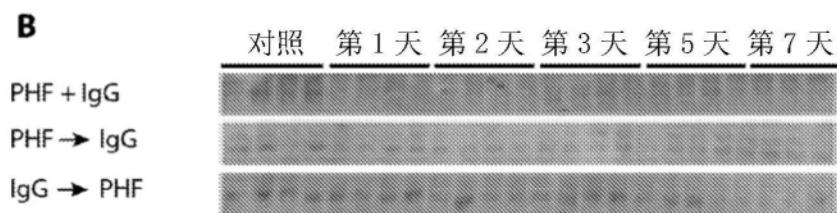
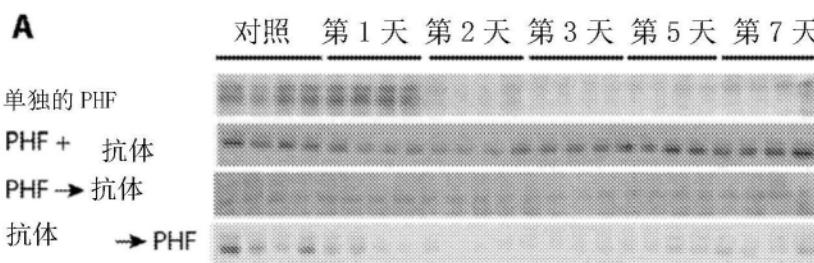


图7

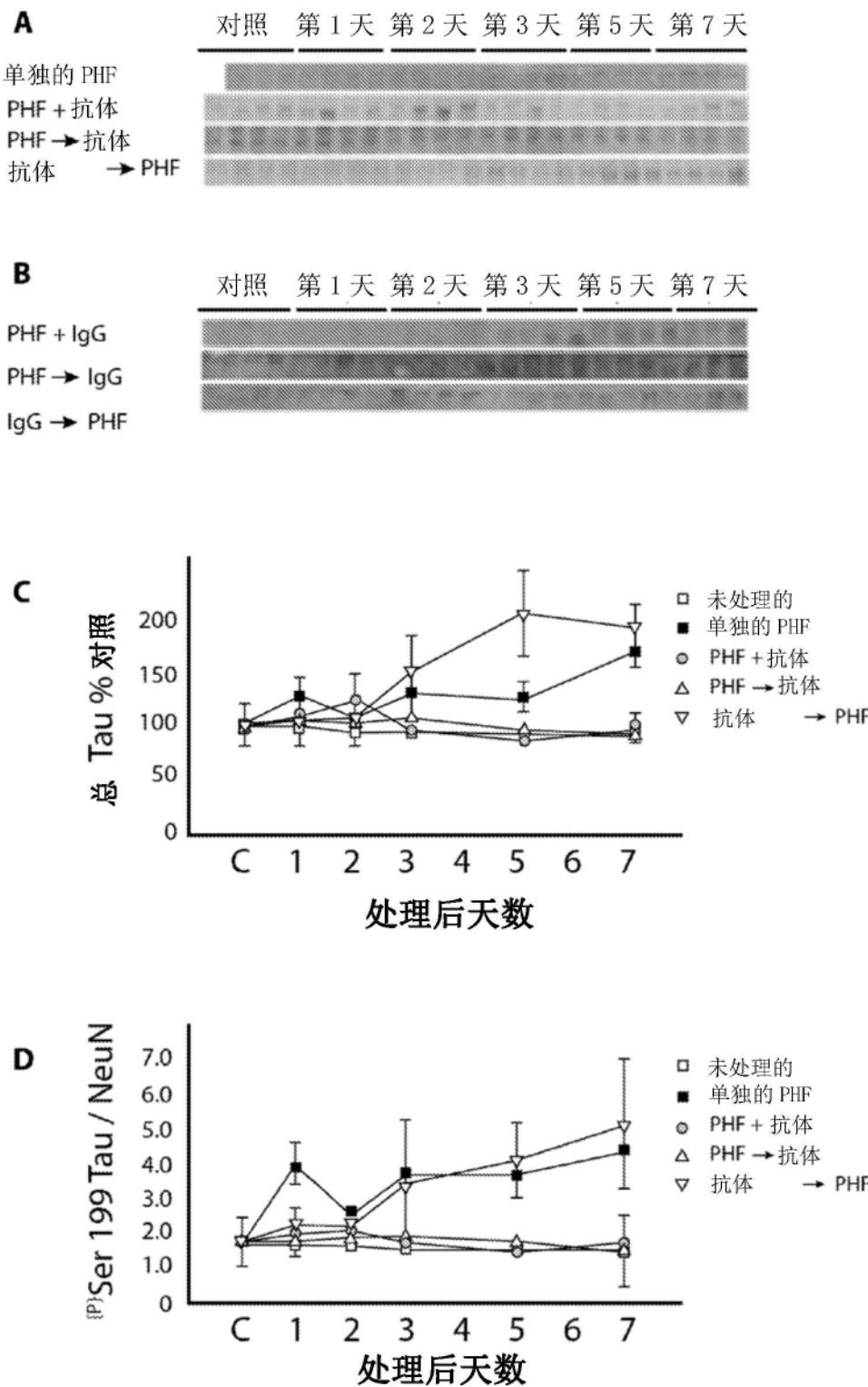


图8

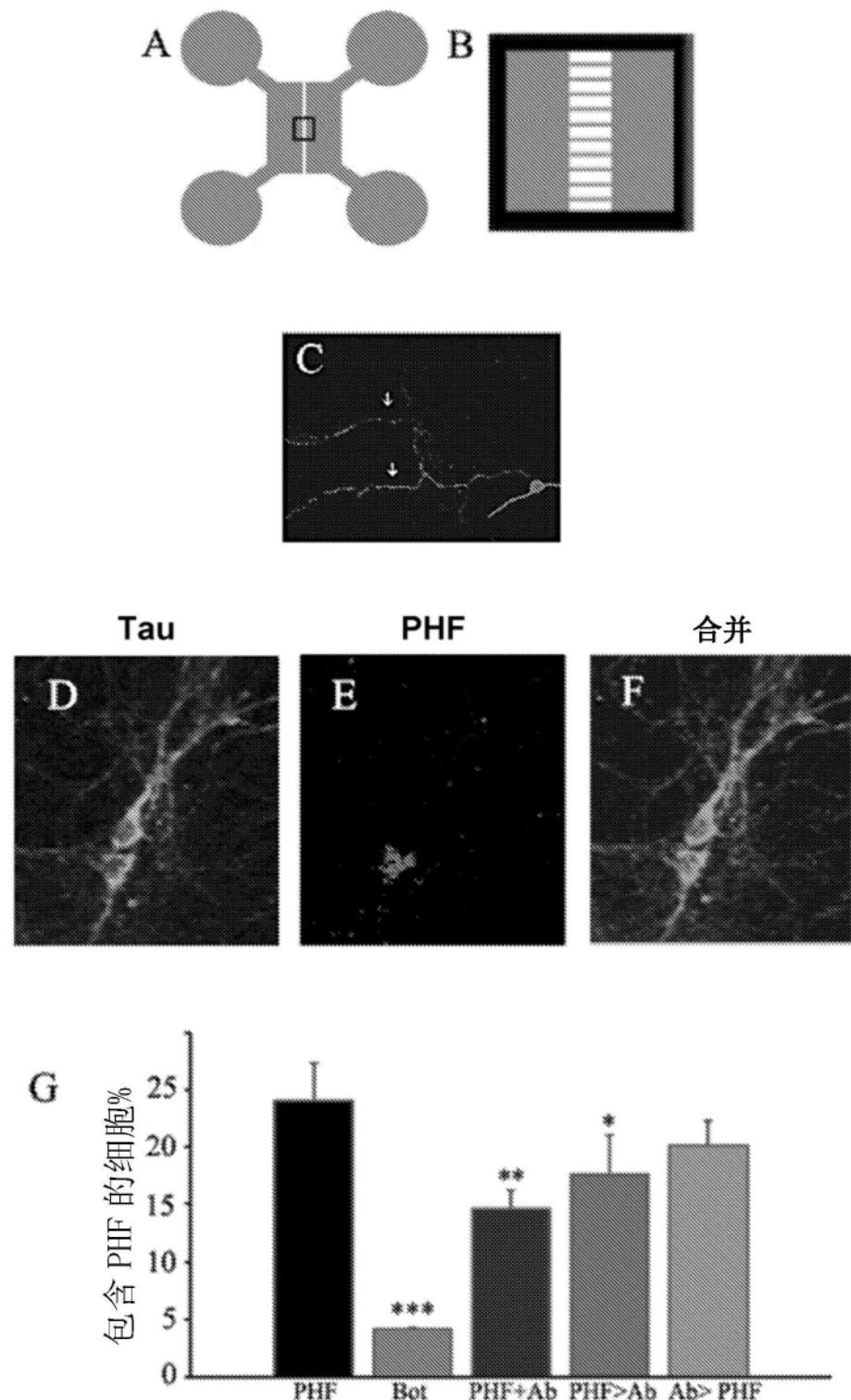


图9

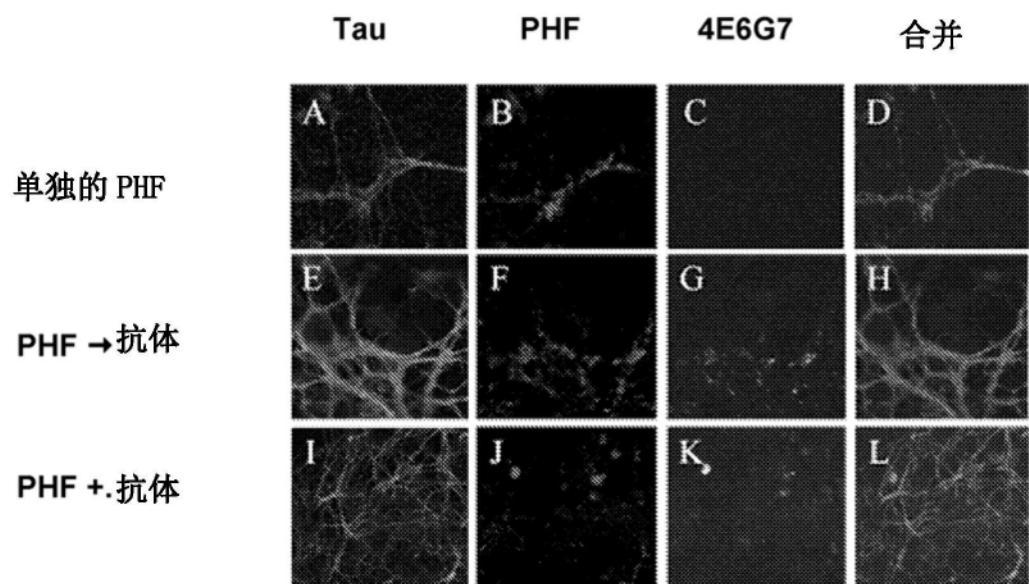


图10

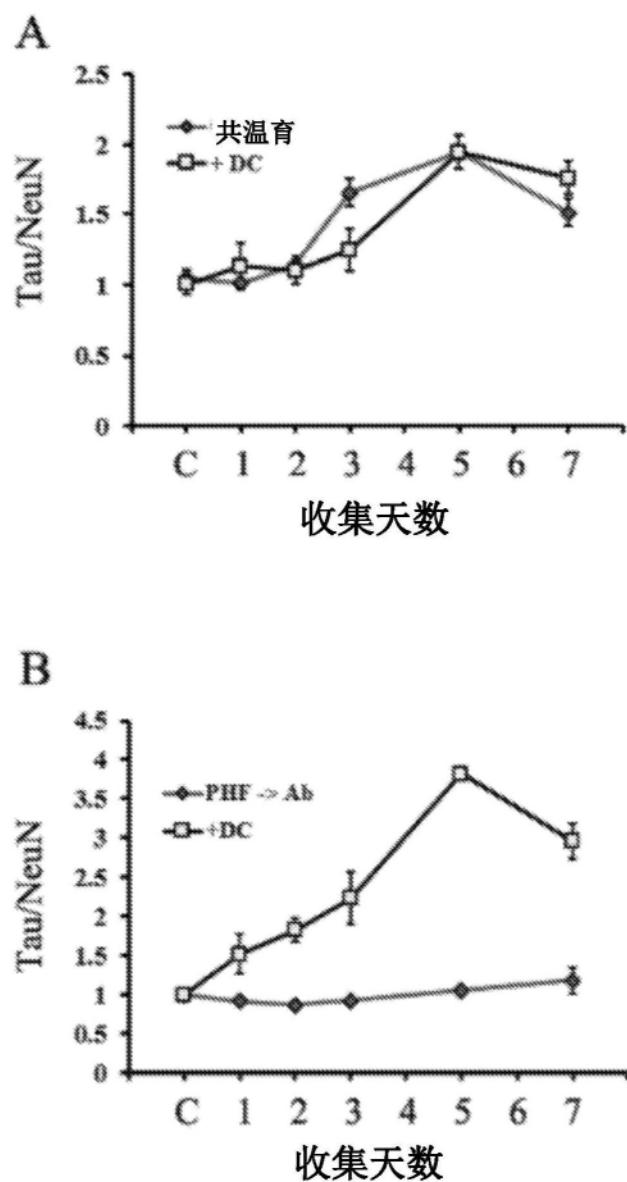


图11

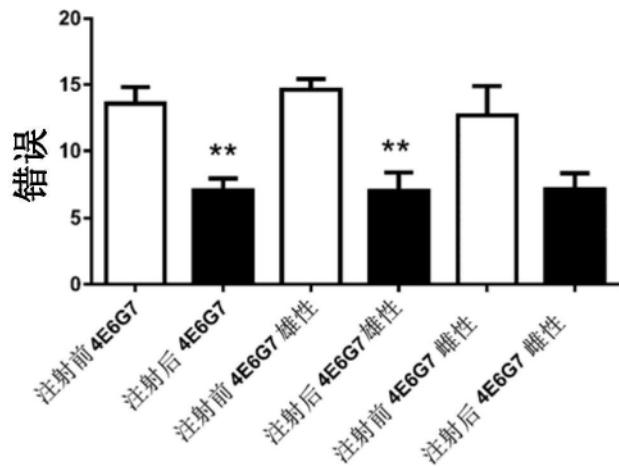
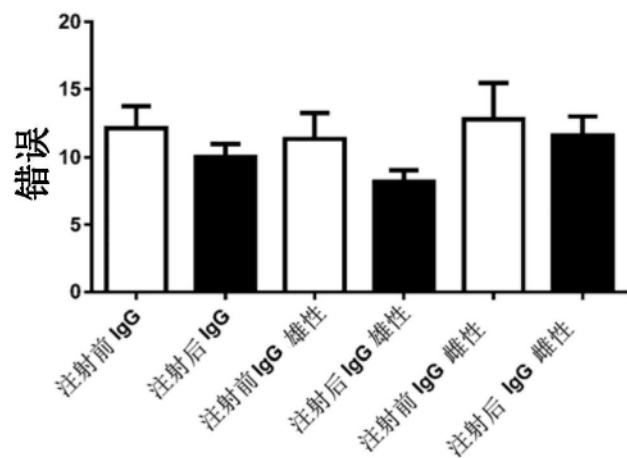
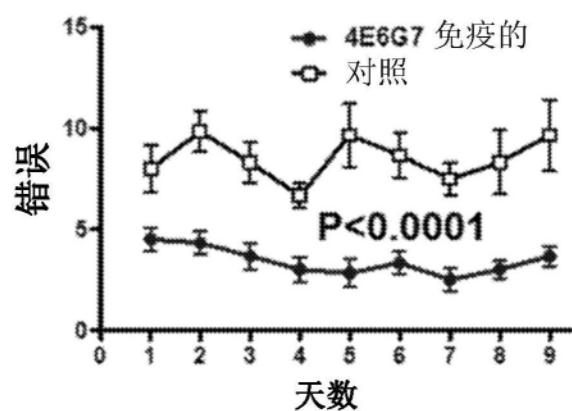
A CFSM - 4E6G7 免疫的**B CFSM - IgG 对照**

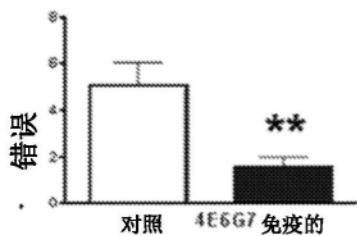
图12

A

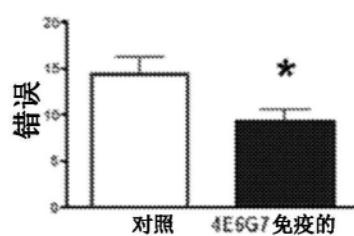
八臂迷宫



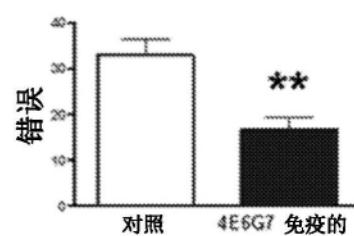
B CFSM 第 1 天



C CFSM 第 2 天



D CFSM 第 3 天



E

对象识别

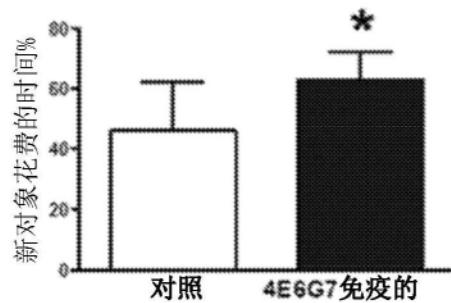


图13

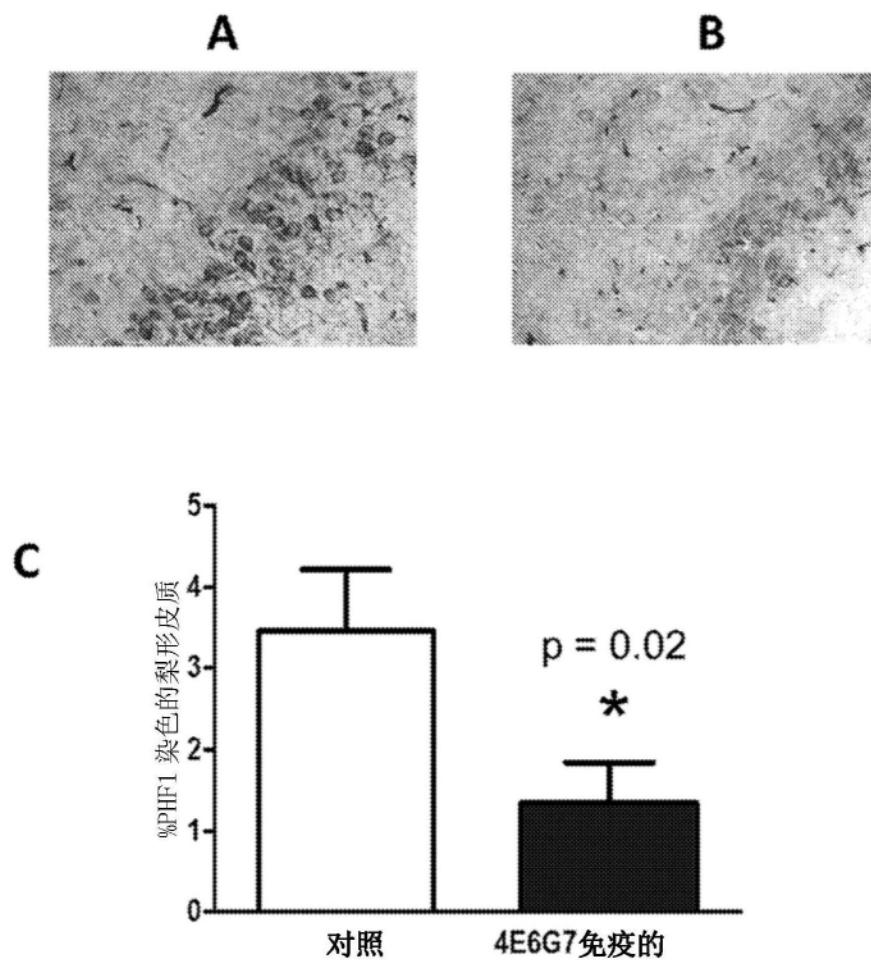
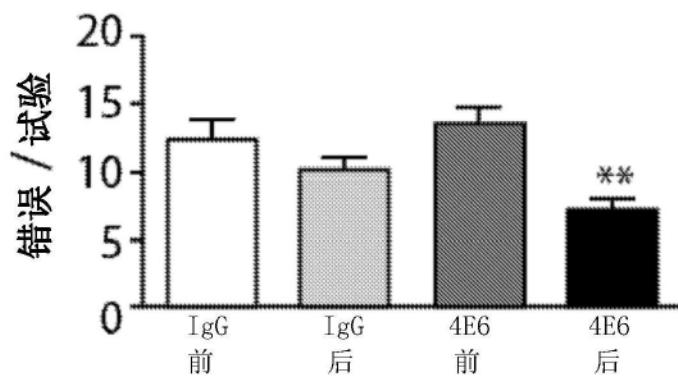


图14

小图 A: 抗体 4E6G7 CSF 迷宫, 处理前对比处理后



小图 B: 抗体 6B2G12 CSF 迷宫, 处理前对比处理后

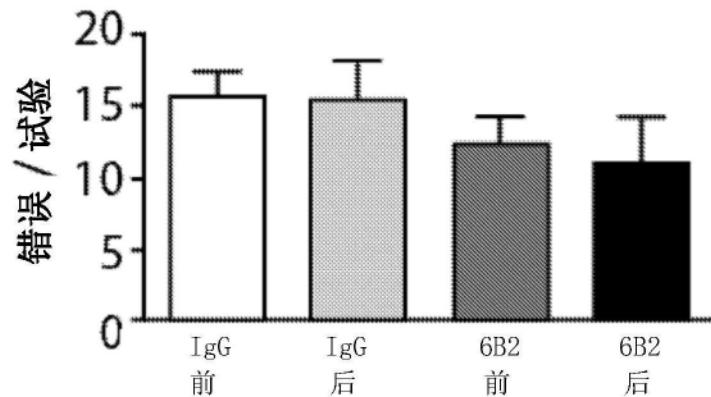


图15

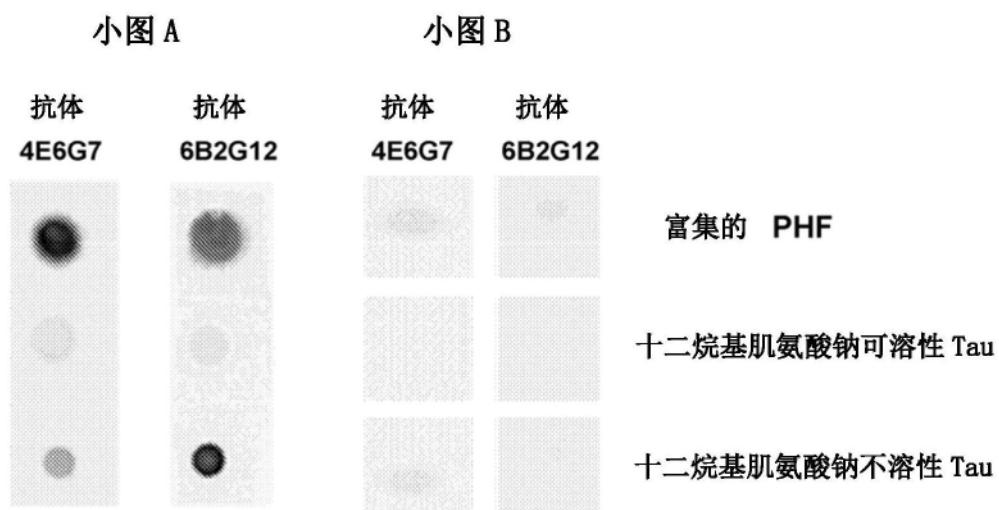
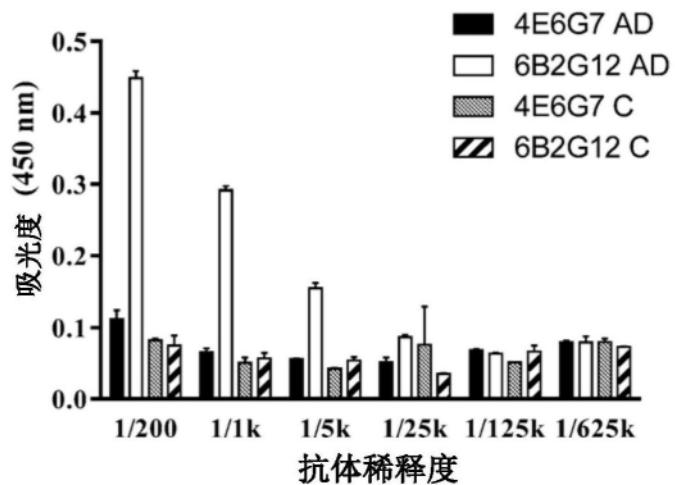


图16, 小图A和小图B

小图 C



小图 D

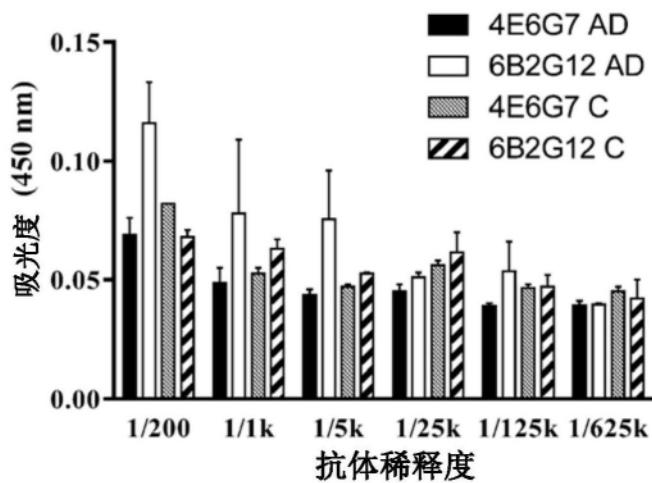
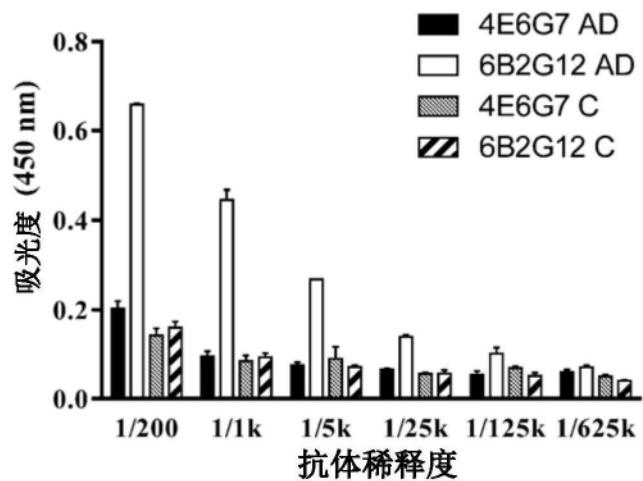


图16, 小图C和小图D

小图 E



小图 F

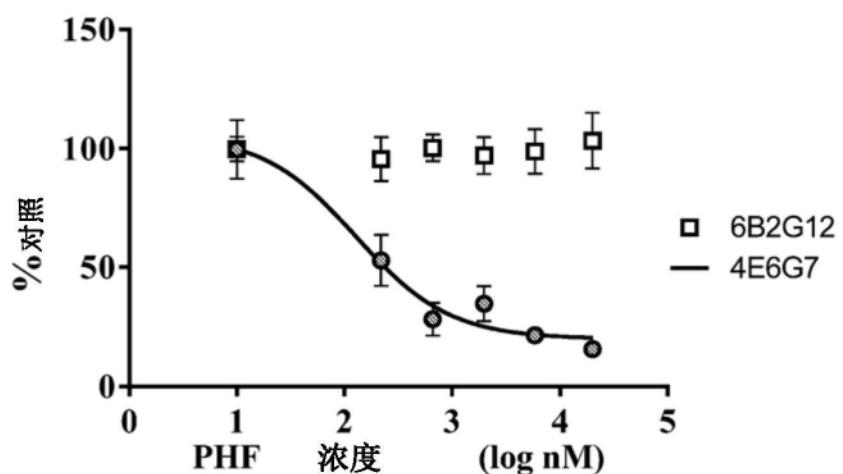


图16, 小图E和小图F