(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113490505 A
(43)申请公布日 2021.10.08

(21)申请号 201980089304.0

(22)申请日 2019.11.18

(30)优先权数据
62/769,281 2018.11.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.07.16

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/061928 2019.11.18

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/106598 EN 2020.05.28

(71)申请人 德克萨斯大学系统董事会
地址 美国得克萨斯州

(72)发明人 马克·I·戴蒙德
肯尼斯·德罗姆博斯基 陈代璐
维克托·马农 刘晓华
哈米德·米尔扎耶
海梅·瓦凯-阿利恰
希尔达·米尔巴哈
卢卡什·约阿希米亚克

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 张福誉 韩晓帆

(51)Int.Cl.
*A61K 39/00*(2006.01)
*C07K 16/18*(2006.01)

权利要求书3页 说明书63页
序列表37页 附图2页

(54)发明名称

# 用于治疗tau蛋白病的tau肽抗原及与其结合的抗体

(57)摘要

本公开内容提供用于治疗和诊断tau蛋白病的方法和组合物。更具体地,本公开内容涉及tau上表位的鉴定及其作为疫苗或作为试剂来产生可用于tau相关疾病的诊断和治疗二者的单克隆抗体的用途。

CN 113490505 A

1.治疗患有tau蛋白病或处于发生tau蛋白病风险之中的对象的方法,其包括向所述对象施用来自表B或表C的一种或更多种肽。

2.权利要求1所述的方法,其还包括在第二时间点施用来自表B或表C的相同或不同的肽。

3.权利要求1至2所述的方法,其中所述对象患有阿尔茨海默病、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、额颞痴呆、多发性硬化、嗜银颗粒病、慢性创伤性脑病或原发性年龄相关性Tau蛋白病。

4.权利要求1至3所述的方法,其还包括向所述对象施用佐剂和/或生物响应调节剂。

5.权利要求1至4所述的方法,其中所述对象已被诊断出患有tau蛋白病。

6.权利要求1至5所述的方法,其中所述对象是人对象。

7.权利要求1至5所述的方法,其中所述对象是非人哺乳动物对象。

8.权利要求1至7所述的方法,其中施用包括肌内注射、经口递送、皮下注射、透皮递送、吸入、静脉内注射、鞘内或室内注射。

9.权利要求1至8所述的方法,其中所述肽的长度不超过约100个残基、长度不超过约50个残基或长度不超过约38个残基。

10.权利要求1至8所述的方法,其中所述肽的长度为至少5个残基、长度为至少6个残基或长度为至少10个残基。

11.治疗患有tau蛋白病或处于发生tau蛋白病风险之中的对象的方法,其包括向所述对象施用与由来自表B或表C的一种或更多种肽定义的tau表位结合的一种或更多种抗体或抗体片段。

12.权利要求11所述的方法,其还包括施用与由来自表B或表C的一种或更多种肽定义的tau表位结合的相同或不同抗体。

13.权利要求11至12所述的方法,其中所述对象患有阿尔茨海默病、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、额颞痴呆、多发性硬化、嗜银颗粒病、慢性创伤性脑病或原发性年龄相关性Tau蛋白病。

14.权利要求11至13所述的方法,其还包括向所述对象施用佐剂和/或生物响应调节剂。

15.权利要求11至14所述的方法,其中所述对象已被诊断出患有tau蛋白病。

16.权利要求11至15所述的方法,其中所述对象是人对象。

17.权利要求11至15所述的方法,其中所述对象是非人哺乳动物对象。

18.权利要求11至17所述的方法,其中施用包括肌内注射、经口递送、皮下注射、透皮递送、吸入、静脉内注射、鞘内或室内注射。

19.权利要求11至18所述的方法,其中所述抗体片段是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段,或者所述抗体是嵌合抗体或双特异性抗体。

20.权利要求11至18所述的方法,其中所述抗体是IgG或重组IgG抗体或抗体片段,其包含突变成改变(消除或增强)FcR相互作用、提高半衰期和/或提高治疗效力的Fc部分,例如LALA、N297、GASD/ALIE、YTE或LS突变;或者修饰成改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖,例如酶促或化学添加或去除聚糖或者在用限定的糖基化模式改造的细胞系中表达。

21.肽疫苗,其包含在可药用稀释剂、缓冲剂或赋形剂中的来自表B或表C的一种或更多

种肽。

22.权利要求21所述的疫苗，其还包含佐剂和/或生物响应调节剂。

23.权利要求21至22所述的疫苗，其中所述疫苗配制成用于肌内注射、经口递送、皮下注射、透皮递送、吸入、静脉内注射、鞘内或室内注射。

24.权利要求21至23所述的疫苗，其中所述肽的长度不超过约100个残基、长度不超过约50个残基或长度不超过约37个残基。

25.权利要求21至24所述的疫苗，其中所述肽的长度为至少5个残基、长度为至少10个残基或长度为至少16个残基。

26.疫苗，其包含与由来自表B或表C的一种或更多种肽定义的tau表位结合的一种或更多种抗体或抗体片段。

27.权利要求26所述的疫苗，其还包含佐剂和/或生物响应调节剂。

28.权利要求26至27所述的疫苗，其中所述疫苗配制成用于肌内注射、经口递送、皮下注射、透皮递送、吸入、静脉内注射、肌内注射、鞘内或室内注射。

29.权利要求26至28所述的疫苗，其中所述抗体片段是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')$_2$片段或Fv片段，或者所述抗体是嵌合抗体或双特异性抗体。

30.权利要求26至29所述的疫苗，其中所述抗体是IgG或重组IgG抗体或抗体片段，其包含突变成改变(消除或增强)FcR相互作用、提高半衰期和/或提高治疗效力的Fc部分，例如LALA、N297、GASD/ALIE、YTE或LS突变；或者修饰成改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖，例如酶促或化学添加或去除聚糖或者在用限定的糖基化模式改造的细胞系中表达。

31.在对象中检测tau蛋白或结构相关抗原的方法，其包括：

(a)使来自所述对象的样品与一种或更多种抗体或抗体片段接触，所述一种或更多种抗体或抗体片段与由来自表B或表C的一种或更多种肽定义的tau表位结合；以及

(b)通过所述一种或更多种抗体或抗体片段与所述样品中的所述tau蛋白或结构相关抗原的结合来检测所述样品中的所述tau蛋白或结构相关抗原。

32.权利要求31所述的方法，其中所述样品是体液或组织。

33.权利要求31至32所述的方法，其中所述样品是血液、痰、脑脊液、泪、唾液、黏液、血清、精液、宫颈或阴道分泌物、羊水、胎盘组织、尿、渗出物、渗出液、组织刮屑或粪便，或脑组织。

34.权利要求31至33所述的方法，其中检测包括ELISA、RIA、侧流测定、Western印迹或免疫组织化学。

35.权利要求31至34所述的方法，其还包括第二次进行步骤(a)和(b)以及确定与第一次测定相比tau或结构相关抗原水平的变化。

36.权利要求31至35所述的方法，其中所述抗体片段是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')$_2$片段或Fv片段。

37.权利要求31至36所述的方法，其中所述对象被怀疑患有tau蛋白病。

38.权利要求31至36所述的方法，其中所述对象先前已被诊断出患有tau蛋白病。

39.权利要求31至38所述的方法，其中所述对象是人或非人哺乳动物。

40.权利要求31至39所述的方法，其中所述tau蛋白病是阿尔茨海默病、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、额颞痴呆、多发性硬化、嗜银颗粒病、慢性创伤性脑病或原发性年龄

相关性Tau蛋白病。

# 用于治疗tau蛋白病的tau肽抗原及与其结合的抗体

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求于2018年11月19日提交的美国临时申请序列号62/769,281的优先权权益,其全部内容在此通过引用并入。

[0003] 背景

## 1.技术领域

[0004] 本公开内容涉及医学和细胞生物学领域。更具体地,本公开内容涉及用于治疗和诊断tau蛋白病(tauopathy)例如阿尔茨海默病的肽抗原及其抗体。

## 2.背景技术

[0005] 广泛多种的神经退行性疾病涉及不溶性tau蛋白的积聚。由于tau缠结的存在,这些病症统称为tau蛋白病,但其临床表现差异很大。一种公知的tau蛋白病,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)在神经病理学上被定义为β-淀粉样斑块(beta-amyloid plaque)和包含tau蛋白的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle,NFT)的积聚。已发现AD中的NFT由tau蛋白的过度磷酸化形式组成。过度磷酸化的tau表现出降低的结合并稳定微管的能力,并且可自聚集以形成包含NFT的不溶性配对螺旋丝(paired helical filament,PHF)(Gustke et al.,1992;Bramblett et al.,1993;Alonso et al.,1996)。NFT的发生率与AD中的认知缺陷和神经元丢失呈正相关(Arriagada et al.,1992;Gomez-Isla et al.,1997),并且tau基因的突变构成额颞痴呆常染色体显性形式的基础这一发现表明tau的病理变化可作为神经变性和认知损伤的主要原因(Hutton et al.,1998;Poorkaj et al.,1998;Spillantini et al.,1998)。鉴于此,已将tau磷酸化作为tau蛋白病的可能介质进行研究。然而,新的证据表明,单独的磷酸化不足以驱动tau蛋白病,并且必须考虑不同的病理构象。特别是,tau显示出从局部结构更塌陷的惰性状态转变到暴露新表位的更延展的形式(Mirbaha et al.,2018;Chen et al.,2019)。

## 发明内容

[0006] 因此,根据本公开内容,提供了治疗患有tau蛋白病或处于发生tau蛋白病风险之中的对象的方法,其包括向所述对象施用来自表B或表C的一种或更多种肽。该方法还可包括在第二时间点施用来自表B或表C的相同或不同的肽。对象可能患有阿尔茨海默病、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、额颞痴呆、多发性硬化、嗜银颗粒病、慢性创伤性脑病、亚急性硬化性全脑炎或原发性年龄相关性Tau蛋白病。该方法还可包括向所述对象施用佐剂和/或生物响应调节剂。

[0007] 对象可已被诊断出患有tau蛋白病。对象可以是人对象或非人哺乳动物对象。施用可包括肌内注射、经口递送、皮下注射、透皮递送、吸入、静脉内注射、鞘内或室内注射。肽可以长度不超过约100个残基、长度不超过约50个残基或长度不超过约38个残基。肽的长度可以是至少5个残基、长度可以是至少6个残基或长度可以是至少10个残基。

[0008] 在另一个实施方案中，提供了治疗患有tau蛋白病或处于发生tau蛋白病风险之中的对象的方法，其包括向所述对象施用与由来自表B或表C的一种或更多种肽定义的tau表位结合的一种或更多种抗体。该方法还可包括施用与由来自表B或表C的一种或更多种肽定义的tau表位结合的相同或不同抗体。对象可患有阿尔茨海默病、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、额颞痴呆、多发性硬化、嗜银颗粒病、慢性创伤性脑病或原发性年龄相关性Tau蛋白病。该方法还可包括向所述对象施用佐剂和/或生物响应调节剂。

[0009] 对象可已被诊断出患有tau蛋白病。对象可以是人对象或非人哺乳动物对象。施用可包括肌内注射、经口递送、皮下注射、透皮递送、吸入、静脉内注射、鞘内或室内注射。抗体片段可以是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')2片段或Fv片段，或者所述抗体是嵌合抗体或双特异性抗体。抗体可以是IgG或重组IgG抗体或抗体片段，其包含突变成改变(消除或增强)FcR相互作用、提高半衰期和/或提高治疗效力的Fc部分，例如LALA、N297、GASD/ALIE、YTE或LS突变；或者修饰成改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖，例如酶促或化学添加或去除聚糖或者在用限定的糖基化模式改造的细胞系中表达。

[0010] 还提供了肽疫苗，其包含可药用稀释剂、缓冲剂或赋形剂中的来自表B或表C的一种或更多种肽。疫苗还可包含佐剂和/或生物响应调节剂。疫苗可配制成用于肌内注射、经口递送、皮下注射、透皮递送、吸入、静脉内注射、鞘内或室内注射。肽可以长度不超过约100个残基、长度不超过约50个残基或长度不超过约37个残基。肽的长度可以是至少5个残基、长度可以是至少10个残基或长度可以是至少16个残基。

[0011] 在另一个实施方案中，提供了疫苗，其包含与由来自表B或表C的一种或更多种肽定义的tau表位结合的一种或更多种抗体。疫苗还可包含佐剂和/或生物响应调节剂。疫苗可配制成用于肌内注射、经口递送、皮下注射、透皮递送、吸入、静脉内注射、肌内注射、鞘内或室内注射。抗体片段可以是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')2片段或Fv片段，或者所述抗体是嵌合抗体或双特异性抗体。该抗体可以是IgG或重组IgG抗体或抗体片段，其包含突变成改变(消除或增强)FcR相互作用、提高半衰期和/或提高治疗效力的Fc部分，例如LALA、N297、GASD/ALIE、YTE或LS突变；或者修饰成改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖，例如酶促或化学添加或去除聚糖或者在用限定的糖基化模式改造的细胞系中表达。

[0012] 在又一个实施方案中，提供了在对象中检测tau蛋白或结构相关抗原的方法，其包括(a)使来自所述对象的样品与一种或更多种抗体或抗体片段接触，所述抗体或抗体片段与由来自表B或表C的一种或更多种肽定义的tau表位结合；以及(b)通过所述一种或更多种抗体或抗体片段与所述样品中的所述tau蛋白或结构相关抗原的结合来检测所述样品中的所述tau蛋白或结构相关抗原。样品可以是体液，例如血液、脑脊液、痰、泪、唾液、黏液、血清、精液、宫颈或阴道分泌物、羊水、胎盘组织、尿、渗出物(exudate)、渗出液(transudate)、组织刮屑或粪便，或者可以是组织，例如脑组织。

[0013] 检测可包括ELISA、RIA、侧流测定(lateral flow assay)、Western印迹或免疫组织化学。该方法还可包括第二次进行步骤(a)和(b)以及确定与第一次测定相比tau或结构相关抗原水平的变化。抗体片段可以是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')2片段或Fv片段。对象可被怀疑患有tau蛋白病或者可先前已被诊断出患有tau蛋白病。对象可以是人或非人哺乳动物。tau蛋白病可以是阿尔茨海默病、进行性核上性麻痹、皮质基底节

变性、额颞痴呆、多发性硬化、嗜银颗粒病、慢性创伤性脑病或原发性年龄相关性Tau蛋白病。

[0014] 考虑了本文中所述的任何方法或组合物可相对于本文中所述的任何其他方法或组合物来实施。

[0015] 当在权利要求书和/或说明书中与术语“包含/包括”结合使用时，没有数量词修饰的名词的使用可意指“一个/种”，但是其也符合“一个/种或更多个/种”、“至少一个/种”和“一个/种或多于一个/种”的含义。词语“约”意指加上或减去指定数字的5％

[0016] 根据以下详细描述，本公开内容的其他目的、特征和优点将变得明显。然而，应理解，详细描述和具体实例尽管指出了本公开内容的一些具体实施方案，但仅通过举例说明的方式给出，因为根据该详细描述，在本公开内容的精神和范围内的多种改变和修改对于本领域技术人员而言将变得明显。

## 附图说明

[0017] 以下附图构成本说明书的一部分，并且被包括在内以进一步说明本公开内容的某些方面。通过参照这些附图中的一个或更多个结合详细描述，可更好地理解本公开内容。

[0018] 图1A至1D。Tau蛋白病突变驱动聚集倾向。(图1A)tau-RD和代表$^{306}$VQIVYK$^{311}$(SEQ ID NO:1)周围最小结构元件的衍生肽的示意图。(图1B)VQIVYK(SEQ ID NO:1)和DNIKHV(SEQ ID NO:2)六肽的ThT聚集曲线。(图1C)映射到$^{306}$VQIVYK$^{311}$(SEQ ID NO:1)附近的预测最小R2R3结构元件的卡通上的一级氨基酸序列。突变显示为球体。(图1D)R2R3野生型和突变体肽的ThT聚集曲线。

[0019] 图2A至2B。增强β-发夹结构挽救了自发聚集表型。(图2A)用于在肽模型中在与P301(红球)相对应的位置产生顺式和反式脯氨酸构象异构体的脯氨酸和氟化脯氨酸类似物的示意图。(图2B)被替换到R2R3肽(200μM)中的顺式、反式和中性(Ea)脯氨酸类似物的ThT聚集反应。ThT信号是至少6个独立实验的平均值。

[0020] 图3A至3B。适合于新的治疗剂和诊断剂靶向的tau-RD中的区域。(图3A)tau-RD和代表跨越所有内部重复区(包括R1R2、R3R4、R4R’和剪接变体R1R3)的最小结构元件的衍生肽的示意图。(图3B)P301R2R3等同脯氨酸在每个内部重复元件中的位置。预测这些元件的反式脯氨酸构型以代表强大的治疗和诊断元件。(SEQ ID NO:146、147、148、149和121;从上到下)。

[0021] 图4.来自用IP和上清液进行的接种测定的样品数据。比较IP和上清液部分的接种活性的图，所述IP和上清液部分由用来自抗R1R2transP270杂交瘤的100μl条件培养基的抗体对来自4种不同tau蛋白病的脑匀浆的15μg总蛋白进行免疫沉淀产生。所有结果均相对于来自指定脑匀浆的15μg蛋白质的IP前接种活性归一化。

## 具体实施方式

[0022] tau蛋白(或τ蛋白，以具有该名称的希腊字母命名)是稳定微管的蛋白质。它们富含于中枢神经系统的神经元中，并且在其他地方不太常见，但是也在CNS星形胶质细胞和少突胶质细胞中以非常低的水平表达。神经系统的病理和痴呆例如阿尔茨海默病和帕金森病(Parkinson’s disease)与已变得有缺陷并且不再正确稳定微管的tau蛋白相关。

[0023] tau蛋白是来自单基因的选择性剪接的产物,该基因在人中被命名为MAPT(微管相关蛋白tau(microtubule-associated protein tau))并位于17号染色体上。tau蛋白于1975年被鉴定为微管组装所必需的热稳定蛋白并且从那时起,它们被表征为固有无序蛋白(intrinsically disordered protein)。

[0024] tau蛋白是高度可溶性微管相关蛋白(microtubule-associated protein,MAP)。在人中,与非神经元细胞相比,这些蛋白质主要存在于神经元中。tau的主要功能之一是调节轴突微管的稳定性。其他神经系统MAP可执行类似的功能,如通过tau敲除小鼠未表现出脑发育异常所表明的-可能是因为其他MAP对tau缺乏的补偿。tau不存在于树突中,并且主要在轴突的远端部分活跃,在那里它提供微管稳定,但也根据需要提供灵活性。这与轴突近端部分的MAP6(STOP)蛋白相反,后者在本质上锁定微管和在树突中稳定微管的MAP2。

[0025] tau蛋白与微管蛋白相互作用以稳定微管并促进微管蛋白组装成微管。tau具有两种控制微管稳定性的方式:同种型和磷酸化。

[0026] 人脑组织中存在六种tau同种型,并且它们的区别在于其结合结构域的数目。三种同种型具有三个结合结构域并且其他三种具有四个结合结构域。结合结构域位于蛋白质的羧基端并带正电荷(使得它与带负电荷的微管结合)。具有四个结合结构域的同种型比具有三个结合结构域的那些在稳定微管方面更好。同种型是tau基因外显子2、3和10中选择性剪接的结果。

[0027] tau是在最长的tau同种型上具有79个潜在的丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)磷酸化位点的磷蛋白质。在正常tau蛋白中,已在这些位点中的约30个上报道了磷酸化。tau的磷酸化由许多激酶(包括PKN,其是丝氨酸/苏氨酸激酶)调节。当PKN被活化时,它使tau磷酸化,导致微管组织的破坏。

[0028] tau的磷酸化也是发育调节的。例如,胎儿tau在胚胎CNS中比成人tau更高度地磷酸化。由于磷酸酶的活化,所有六种同种型中磷酸化程度均随年龄而降低。与激酶一样,磷酸酶也在调节tau的磷酸化中发挥作用。例如,PP2A和PP2B均存在于人脑组织中,并且具有使Ser396去磷酸化的能力。这些磷酸酶与tau的结合影响tau与MT的缔和。tau蛋白(tau内含物,pTau)的过度磷酸化可导致配对螺旋丝和直丝的缠结的自组装,这与阿尔茨海默病、额颞痴呆和另一些tau蛋白病的发病机制有关。

[0029] 所有六种tau同种型均以通常高度磷酸化的状态存在于来自阿尔茨海默病脑的配对螺旋丝中。在另一些神经退行性疾病(包括阿尔茨海默病)中,已报道了富含某些tau同种型的聚集体的沉积,这将它们统称为“tau蛋白病”。当错误折叠时,这种原本非常易溶的蛋白质可形成极难溶的聚集体,从而导致许多神经退行性疾病。tau蛋白对由形成和阻断神经突触的缠结引起的活细胞的分解具有直接作用。缠结是tau蛋白团块(clump),它们黏在一起并阻断需要分配给脑中的细胞的必需营养物,从而导致细胞死亡。该疾病如何发挥功能的一些方面也表明它与朊病毒蛋白具有一些类似之处,因为tau蛋白的致病形式可通过充当构象模板,以进行性方式离开细胞并在脑细胞之间传播病理。

[0030] 本发明人开发了基于将免疫沉淀与报道了tau“朊病毒”存在的基于细胞的生物传感器测定组合来鉴定tau蛋白上的表位的方法,所述tau“朊病毒”是脑组织中存在的致病性种子。使用该方法,他们确定了tau上的表位,所述表位在被合适的抗体靶向时将相对于“天然”(即非致病性)tau优先免疫沉淀致病性tau朊病毒。这些表位可用作活性疫苗(包含一个

或更多个表位)以在患者中产生靶向tau的免疫应答,或者在患有由tau积聚引起的神经退行性疾病的患者中产生用作被动疫苗的单克隆抗体。

[0031] 本公开内容的该方面和其他方面在下面详细阐述。

[0032] I.Tau蛋白病和Tau蛋白

[0033] Tau蛋白病是一类与人脑中神经原纤维或胶质原纤维缠结中tau蛋白的病理性聚集相关的神经退行性疾病。缠结由称为tau的微管相关蛋白的过度磷酸化形成,导致该蛋白从微管分离并形成不溶性形式的聚集体。(这些过度磷酸化的tau蛋白的聚集也称为配对螺旋丝)。缠结形成的确切机制尚未完全了解,并且对于缠结是疾病的主要致病因素还是发挥更次要的作用仍有争议。

[0034] A.阿尔茨海默病

[0035] AD是一种进行性神经退行性疾病,其特征在于记忆丧失、语言退化、视觉空间技能受损、判断力差、态度冷漠,但保留运动功能。AD通常在65岁之后开始,然而,它的发作可能早在40岁发生,首先表现为记忆衰退并在数年内破坏认知、人格和发挥功能的能力。也可能出现混乱和不安。精神变化的类型、严重程度、顺序和进展差异很大。AD的早期症状包括健忘和集中力丧失可容易地被忽视,因为它们类似于自然的衰老迹象。类似的症状也可由以下引起:疲劳、悲伤、抑郁、疾病、视力或听力丧失、酒精或某些药物的使用,或者仅仅是细节太多而无法一次记住的负担。

[0036] AD无法治愈并且没有减缓该疾病进展的方法。对于处于疾病早期或中期的一些人来说,药物例如他克林(tacrine)可缓解一些认知症状。安理申(Aricept)(多奈哌齐)、Razadyne(加兰他敏)和Exelon(利斯的明)是指定用于治疗轻度至中度阿尔茨海默型痴呆的可逆的乙酰胆碱酯酶抑制剂。此外,一些药物可有助于控制行为症状,例如失眠、激越、徘徊、焦虑和抑郁。这些治疗旨在使患者更舒适。

[0037] AD是一种进行性疾病。疾病的进程因人而异。一些人只在生命的最后5年患有该疾病,而另一些可能患有该疾病多达20年。AD患者中最常见的死亡原因是感染。

[0038] AD的分子方面复杂并且尚未完全确定。如上所述,AD的特征在于脑中,特别是在作为记忆处理中心的海马中淀粉样斑块和神经原纤维缠结的形成。数个分子有助于这些结构:淀粉样β蛋白(Aβ)、早老蛋白(presenilin,PS)、胆固醇、载脂蛋白E(apolipoprotein E,ApoE)和Tau蛋白。其中,Aβ显示出发挥核心作用。

[0039] Aβ包含约40个氨基酸残基。42和43个残基形式比40个残基形式的毒性大得多。Aβ是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein,APP)通过连续蛋白酶解产生的。其中一种酶缺乏序列特异性并且因此可产生不同(39至43)长度的Aβ。Aβ的毒性形式导致异常事件,例如细胞凋亡、自由基形成、聚集和炎症。早老蛋白编码负责将APP切割成Aβ的两种蛋白酶之一。有两种形式-PS1和PS2。导致产生$A\beta_{42}$的PS1突变是早发性AD的典型原因。

[0040] 尽管没有明确的证据将胆固醇升高与AD风险提高相关联,但胆固醇降低剂被认为具有AD预防性能力。然而,Aβ包含鞘脂结合结构域这一发现为该理论提供了进一步的可信性。类似地,参与胆固醇再分配的ApoE现在被认为有助于AD发生。如上所讨论的,具有ApoE4等位基因的个体,表现出最低程度的胆固醇从神经元流出,更可能发生AD。

[0041] 与正常脑中的微管相关的tau蛋白在受AD影响的脑中形成配对螺旋丝(PHF),其是神经原纤维缠结的主要组分。最近的证据表明,Aβ蛋白可引起Tau蛋白的过度磷酸化,导致

与微管分离并聚集成PHF。

[0042] 公知的是AD的神经变性涉及神经元线粒体的功能障碍(Carvalho et al.,2015);因此,用$A_3$AR激动剂治疗来改善该功能障碍将是AD的潜在治疗方法。

[0043] B.多发性硬化

[0044] 多发性硬化(multiple sclerosis,MS)是其中脑和脊髓中神经细胞的绝缘覆盖物受损的脱髓鞘病。该损伤破坏了部分神经系统交流的能力,导致了一系列体征和症状,包括身体的、心理的并且有时是精神的问题。具体症状可包括视歧(double vision)、单眼失明、肌无力、感觉问题或协调问题。MS具有数种形式,其中新症状出现在单独的发作(attack)中(复发形式)或随时间积累(进行性形式)。在发作之间,症状可完全消失;然而,通常保留永久性的神经问题,特别是随着疾病的进展。

[0045] 虽然不清楚原因,但潜在的机制被认为是免疫系统的破坏或髓磷脂产生细胞的衰竭。针对此提出的原因包括遗传和环境因素,例如由病毒性感染诱发的。MS通常是基于出现的体征和症状以及支持医学检查的结果诊断的。

[0046] 没有针对多发性硬化的已知治愈。治疗试图在发作之后改善功能并防止新的发作。用于治疗MS的药物虽然适度有效,但可具有副作用并且耐受性差。物理治疗可有助于人发挥功能的能力。尽管缺乏益处的证据,但许多人寻求替代治疗。长期结局很难预测,其中良好的结局更常见于女性、在生命早期发生该疾病的那些人、具有复发进程的那些人以及最初经历很少发作的那些人。预期寿命比未受影响的群体低平均5至10岁。

[0047] 多发性硬化是影响中枢神经系统的最常见的免疫介导病症。在2015年,全球约230万人受到影响,其中在不同区域和在不同群体之间的比率差异很大。那一年约18,900人死于MS,高于1990年的12,000。该疾病通常在20至50岁之间开始,并且在女性中的普遍是在男性中的两倍。MS于1868年由Jean-Martin Charcot首次描述。名称多发性硬化是指在脑和脊髓的白质上发展的大量瘢痕(巩膜-更广为人知的是斑块或病变)。许多新的治疗和诊断方法正在开发中。

[0048] 患有MS的人几乎可具有任何神经症状或体征,其中自主神经、视觉、运动和感觉问题是最常见的。具体症状由神经系统内病变的位置决定,并且可包括敏感性丧失或感觉变化例如刺痛、针刺感(pins and needles)或麻木、肌无力、视力模糊、非常明显的反射、肌痉挛或移动困难;协调和平衡困难(共济失调);言语或吞咽问题、视觉问题(眼球震颤、视神经炎或视歧)、感觉疲劳、急性或慢性疼痛以及膀胱和肠困难等。思维困难和情绪问题例如抑郁或情绪不稳定也是常见的。Uhthoff现象(由于暴露于高于平常温度而导致症状恶化)和Lhermitte体征(当弯曲颈时沿背部向下运行的电感觉)是MS的特别特征。失能和严重程度的主要测量是扩展失能状态量表(expanded disability status scale,EDSS)以及其他测量,例如正在越来越多地用于研究中的多发性硬化功能复合物。

[0049] 在85%的病例中该病症以临床孤立综合征(clinically isolated syndrome,CIS)开始,持续数天,其中45%具有运动或感觉问题,20%具有视神经炎,并且10%具有与脑干功能障碍相关的症状,而其余25%具有多于一种的之前的困难。症状的进程最初以两种主要模式出现:作为持续数天至数月的突然恶化的发作(称为复发、恶化、阵发(bout)、发作或突然复发)随后是改善(85%的病例)或者作为随时间的逐渐恶化,没有恢复期(10%至15%的病例)。也可发生这两种模式的组合,或者人们可以以复发和缓解过程开始,其随后

后续变成进行性的。复发通常是不可预测的，在没有预兆的情况下发生。恶化发生的频繁很少多于每年两次。然而，一些复发之前是常见的诱因，并且它们在春季和夏季期间更频繁地发生。类似地，病毒性感染例如普通感冒、流感或肠胃炎提高了其风险。应激也可触发发作。妊娠的患有MS的女性经历较少的复发；然而，在分娩之后的前数个月期间，风险提高。总体而言，妊娠似乎不影响长期失能。已发现许多事件不影响复发率，包括疫苗接种、母乳喂养、物理创伤和Uhthoff现象。

[0050] MS的病因未知；然而，认为其由于遗传和环境因素(例如感染原)的一些组合而发生。理论试图将数据组合成可能的解释，但没有一个被证明是确定的。虽然存在许多环境风险因素，并且虽然一些可部分改变，但需要进一步研究以确定消除这些因素是否可预防MS。

[0051] MS的三个主要特征是中枢神经系统中病变(也称为斑块)的形成、炎症和神经元髓鞘的破坏。这些特征以复杂且尚未完全了解的方式相互作用，引起神经组织的破裂，并且进而引起该疾病的体征和症状。认为胆固醇晶体既损伤髓磷脂修复又加重炎症。另外，认为MS是由个体的遗传学与尚未确定的环境原因的相互作用发展而来的免疫介导的病症。认为损伤至少部分地是由人的自身免疫系统对神经系统的攻击造成的。

[0052] 多发性硬化通常是基于出现的体征和症状，组合支持的医学成像和实验室测试来诊断的。其可能难以确认，特别是在早期，因为体征和症状可能与其他医疗问题的体征和症状类似。集中于不同时间处和不同区域中的病变的临床、实验室和放射学证据的McDonald标准是最常用的诊断方法，其中Schumacher和Poser标准是最具历史意义的。

[0053] 如果个体曾患有该疾病特有的神经症状的单独发作，则单独的临床数据可足以诊断MS。在仅在一次发作之后就寻求医疗关注的那些人中，需要进行其他测试以用于诊断。最常使用的诊断工具是神经成像、脑脊液分析和诱发电位。脑和脊柱的磁共振成像可显示脱髓鞘(病变或斑块)区域。钆(Gadolinium)可作为对比剂静脉内施用以突出活动斑块，并通过消除证明存在与评价时的症状无关的历史病变。对从腰椎穿刺获得的脑脊液进行测试可提供中枢神经系统中慢性炎症的证据。在电泳上测试脑脊液的IgG寡克隆带，其是在75％至85％的患有MS的人中发现的炎症标志物。由于这样的途径引起的脱髓鞘，MS中的神经系统可对视神经和感觉神经的刺激响应较不活跃。可使用视觉和感官诱发电位检查这些脑响应。

[0054] 虽然以上标准允许用于非侵入性诊断，并且即使一些声明唯一明确的证据是其中检测到MS的典型病变的尸检或活检，但是目前，截至2017年，没有单一测试(包括活检)可提供对该疾病的明确诊断。多份新报道描述了MS患者脑中tau病理学的积聚，表明该病症可能是tau蛋白病，并且tau病理学的进行性积聚可能是该疾病不间断进展的基础。

[0055] 已描述了数种表型(通常称为类型)或进展模式。表型使用疾病的过去进程试图预测未来的进程。它们不仅对预后是重要的，而且对治疗决策也是重要的。目前，美国国家多发性硬化协会(United States National Multiple Sclerosis Society)和多发性硬化国际联合会(Multiple Sclerosis International Federation)描述了四种类型的MS(2013年修订)：

[0056] 临床孤立综合征(CIS)

[0057] 复发-缓解型MS(Relapsing-remitting MS,RRMS)

[0058] 原发进展型MS(Primary progressive MS,PPMS)

[0059] 继发进展型MS(Secondary progressive MS,SPMS)

[0060] 复发-缓解型MS的特征在于不可预测的复发,随后是数月至数年的相对平静(缓解)期,没有疾病活动的新迹象。在发作期间出现的缺陷可解决或留下问题,后者占发作的约40%,并且人患该疾病越久越常见。这描述了80%的患有MS个体的初始进程。当缺陷总是在发作之间解决时,这有时被称为良性MS,但从长远看人们将仍积累一定程度的失能。在另一方面,术语恶性多发性硬化用于描述在短期内达到显著失能水平的患有MS的患者。复发-缓解型亚型通常以临床孤立综合征(CIS)开始。在CIS中,人具有暗示脱髓鞘的发作,但不符合多发性硬化的标准。30%至70%的正在经历CIS的人后来发生MS。

[0061] 原发进展型MS在约10%至20%的个体中发生,在初始症状之后没有缓解。它的特征在于从发作就有失能进展,没有或只有偶尔和轻微的缓解和改善。原发进展型亚型的通常发作年龄晚于复发-缓解型亚型。这与通常以复发-缓解型MS开始的继发进展型的年龄类似,约40岁。

[0062] 继发进展型MS在约65%的具有初始复发-缓解型MS的那些中发生,他们最终在急性发作之间具有进行性神经系统衰退,没有任何明确的缓解期。可出现偶尔的复发和轻微的缓解。疾病发作与从复发-缓解型MS到继发进展型MS的转变之间最常见的时间长度是19年。

[0063] 已描述了其他不寻常的MS类型;这些包括德维克病(Devic's disease)或视神经脊髓炎(Neuromyelitis Optica,NMO)、巴洛同心圆性硬化(Balo concentric sclerosis)、希尔德弥漫性硬化(Schilder's diffuse sclerosis)和马尔堡多发性硬化(Marburg multiple sclerosis)。关于它们是MS变体还是不同疾病存在争论。多发性硬化在儿童中的表现不同,花费更多时间来达到进展型状态。尽管如此,他们仍以比成人通常更低的平均年龄达到进展型状态。

[0064] 尽管没有已知对于多发性硬化的治愈,但已证明数种治疗是有帮助的。治疗的主要目的是在发作之后恢复功能、预防新的发作和预防失能。当在MRI上看到多于两个病变时,通常建议人们在第一次发作之后开始用药。

[0065] 与任何医学治疗一样,用于管理MS的药物具有数种不良作用。尽管缺乏支持证据,但一些人仍在寻求替代治疗。

[0066] 在症状性发作期间,施用高剂量的静脉内皮质类固醇(例如甲基泼尼松龙)是常用的治疗,其中经口皮质类固醇显示出具有类似的效力和安全特性。尽管一般来说,皮质类固醇治疗在短期内对缓解症状有效,但其未显示出对长期恢复具有显著影响。对皮质类固醇无响应的严重发作的结果可通过血浆置换治疗。

[0067] 截至2017年,监管机构批准了十种疾病缓解(disease-modifying)药物用于复发-缓解型多发性硬化(RRMS)。它们是干扰素β-1a、干扰素β-1b、醋酸格拉替雷(glatiramer acetate)、米托蒽醌(mitoxantrone)、那他珠单抗(natalizumab)、芬戈莫德(fingolimod)、特立氟胺(teriflunomide)、富马酸二甲酯、阿仑单抗(alemtuzumab)和奥美珠单抗(ocrelizumab)。截至2012年,它们的成本效益尚不清楚。在2017年3月,FDA批准奥美珠单抗(人源化抗CD20单克隆抗体)作为用于RRMS的治疗,并且需要数项IV期临床试验。

[0068] 在RRMS中,它们在降低发作次数方面适度有效。干扰素和醋酸格拉替雷是一线治疗并且大致等同,降低约30%的复发。早期开始的长期治疗是安全的并改善结局。那他珠单

抗比一线药剂降低更多的复发率;然而,由于不良作用的问题,二线药剂保留给对其他治疗没有响应或患有严重疾病的那些人。使用受到严重不良作用限制的米托蒽醌是对其他药物没有响应的那些人的三线选择。用干扰素治疗临床孤立综合征(CIS)降低了进展为临床MS的机会。已估计干扰素和醋酸格拉替雷在儿童中的效力与在成人中的大致等同。截至2011年,一些较新的药剂例如芬戈莫德、特立氟胺和富马酸二甲酯的作用尚不完全清楚。

[0069] 截至2017年,利妥昔单抗被广泛用于标签外治疗RRMS以及进展原发型MS(progressive primary MS)。在2017年3月,FDA批准奥美珠单抗作为用于原发进展型MS的治疗,其是获得该批准的第一种药物,并且需要数项IV期临床试验。

[0070] 截至2011年,仅一种药物米托蒽醌已被批准用于继发进展型MS。在该群体中,初步证据支持米托蒽醌在两年内适度减缓疾病进展并降低复发率。

[0071] 疾病缓解治疗具有数种不良作用。最常见的一种是在醋酸格拉替雷和干扰素的注射部位处的刺激(皮下注射多至90%并且肌内注射多至33%)。随着时间的推移,由于脂肪组织的局部破坏(称为脂肪萎缩),可在注射部位处发生可见凹痕。干扰素可产生流感样症状;服用格拉替雷(glatiramer)的一些人经历了具有脸红、胸部紧迫感、心悸和焦虑的注射后反应,其通常持续少于30分钟。更危险但不太常见的是来自干扰素的肝损伤、收缩功能障碍(12%)、不孕和来自米托蒽醌的急性髓性白血病(0.8%),以及在那他珠单抗的情况下发生的进行性多灶性白质脑病(progressive multifocal leukoencephalopathy)(每600名接受治疗的人中有1人发生)。

[0072] 芬戈莫德可导致高血压和心率减慢、黄斑水肿、肝酶升高或淋巴细胞水平降低。初步证据支持特立氟胺的短期安全性,其常见副作用包括:头痛、疲劳、恶心、毛发脱落和肢体疼痛。也有在使用其的情况下的肝衰竭和PML的报道,并且它对胎儿发育是危险的。富马酸二甲酯最常见的副作用是脸红和胃肠问题。虽然富马酸二甲酯可导致白细胞计数降低,但在试验期间没有报道机会性感染病例。

[0073] 已显示药物和神经康复二者改善了一些症状,但二者均没有改变疾病的进程。一些症状例如膀胱不稳定和痉挛对药物具有良好的响应,而其他症状几乎没有变化。对于神经系统问题,多学科方法对于改善生活质量是重要的;然而,难以指定“核心团队”,因为在不同的时间点可能需要许多健康服务。多学科康复项目提高了患有MS的人的活动和参与,但不影响损伤水平。尽管有特定方法例如锻炼和心理治疗有效的良好证据,但对于单个治疗学科的整体效力的证据有限。认知行为治疗已被证明对降低MS疲劳是中适度有效的。

[0074] 超过50%的患有MS的人可使用补充和替代药物,但百分比因如何限定替代药物而异。在大多数情况下,这样的治疗的有效性的证据是弱的或不存在的。患有MS的人所使用的未经证实益处的治疗包括膳食补充和方案、维生素D、放松技术例如瑜伽、草本药物(包括医用大麻)、高压氧治疗、[钩虫自我感染、反射学、针灸和正念。关于使用者的特征,她们更频繁地是女性,已患有MS持续较长时间、往往更失能并且在具有传统医疗保健的情况下具有较低的满意水平。

[0075] 预期的疾病的未来进程取决于疾病的亚型;个体的性别、年龄和初始症状;以及人失能的程度。女性性别、复发-缓解型亚型、发作时的视神经炎或感觉症状、在最初数年中的并且特别是在发作早期的较少发作与更好的进程相关。

[0076] 从疾病开始起,平均预期寿命为30年,这比未受影响的人少5至10年。几乎40%的

患有MS的人达到了生命的第七个十年。尽管如此，三分之二的死亡与疾病的结果直接相关。自杀更为常见，而感染和其他并发症对更失能的特别危险。尽管大多数人在死之前丧失了行走能力，但90％在自发作起10年能够独立行走，并且75％在自发作起15年能够独立行走。

[0077] C.额颞痴呆

[0078] 额颞痴呆(frontotemporal dementia，FTD)，之前称为脱抑制-痴呆-帕金森综合征-肌萎缩复合征(disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex，DDPAC)，是特征为严重的额颞叶变性的神经退行性疾病。该病症于1994年由Kirk Wilhelmsen及同事首次确定，他们基于该病症未表现出淀粉样斑块、神经原纤维缠结或路易体的事实将其与阿尔茨海默病和路易体痴呆区分开来。在患病率方面仅次于阿尔茨海默病(AD)的FTD占早老性痴呆病例的20％。无论性别如何，症状可在平均约45至65岁开始出现。最常见的症状包括社交和个人行为的显著变化，以及普遍的情绪迟钝。症状以快速、稳定的速度进展。患有该疾病的患者可存活2至10年。最终，患者将需要24小时护理用于日常功能。因为FTD经常发生在较年轻人(即在其40多岁或50多岁)中，它会严重影响家庭。患者通常还有儿童住在家里。在经济上，它可能是毁灭性的，因为该疾病在通常是赚取工资最高的年份的生命时期发作。目前，FTD无法治愈。可获得治疗来管理行为症状。脱抑制和强迫行为可通过选择性血清素再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor，SSRI)来控制。尽管阿尔茨海默症和FTD共有某些症状，但它们不能用相同的药理学药剂来治疗，因为胆碱能系统在FTD中不受影响。

[0079] 由于相关症状的异质性，FTD传统上难以诊断。基于额叶和颞叶的功能将症状分为三组。行为变异型FTD(behavioral variant FTD，bvFTD)在一方面表现出嗜睡和自发性的症状，并且在另一方面表现出脱抑制。冷漠的患者可能变得社交退缩并且整天呆在床上或不再照顾他们自己。脱抑制患者可做出不恰当的(有时是性的)评论或进行不恰当的行为。患有FTD的患者有时会由于不恰当的行为例如偷窃或超速而触犯法律。最近的发现显示，在FTD中精神病性症状是罕见的，可能是由于颞边缘受累有限。在FTD患者中，约2％具有妄想，有时具有偏执的想法。幻觉是罕见的。这些精神病性症状明显不如AD患者中所见的那些普遍，在AD患者中约20％具有妄想和偏执。进行性非流利性失语(progressive nonfluent aphasia，PNFA)表现为由于发音困难、音系和/或句法错误而引起言语流利性下降，但保留了单词理解力。在一些患者中可发现语义痴呆(semantic dementia，SD)，其在正常音系和句法方面保持流利，但在命名和单词理解方面提高了难度。已研究，一些人可能甚至经历了抑郁并丧失其抑制并表现出反社会行为。

[0080] FTD患者倾向于与暴食和强迫行为作斗争。这些暴食习惯通常与包括以下的异常饮食行为相关：暴饮暴食(overeating)、用食物塞满自己、食物偏好改变(对更多甜食、碳水化合物的渴望)、吃不可食用的物品和抢夺他人的食物。最近的结果已表明，负责FTD中饮食变化的神经结构包括右腹侧脑岛、纹状体和眶额皮质在基于结构MRI体素的形态测量(右半球)中的萎缩。

[0081] 执行功能是计划和组织的认知技能。大多数FTD患者变得不能执行需要复杂计划或排序的技能。除特征性认知功能障碍之外，通常还能够引发被称为额释放体征的许多原始反射。通常来说，这些额释放体征中首先出现的是在疾病进程中相对较早出现的掌颏反射(palmomental reflex)，而手掌抓握反射(palmar grasp reflex)和觅食反射(rooting

reflex)则在疾病进程后期出现。FTD患者的以下能力被保留:感知、空间技能、记忆、实践,FTD患者的以下能力受到影响:社交行为/表现、情绪调节、集中能力、利用行为(其中患者抓起视野中的物体并在错误时间开始进行正确行为的神经行为障碍),以及不恰当的言语/动作。

[0082] 在罕见的情况下,FTD可能发生在患有运动神经元疾病(motor neuron disease,MND)(通常是肌萎缩侧索硬化)的患者中。当与FTD组合时,患有MND的人的预后更差,生存期缩短约一年。现在已发表了关于额颞痴呆病理学基础的许多病例系列。与其他与额颞叶变性(frontotemporal lobar degeneration,FTLD)相关的综合征一样,许多不同的病理状况与FTD相关:

[0083] Tau病理学:在健康个体中,tau蛋白稳定微管,微管是细胞骨架的主要组分。实例包括皮克病(Pick's disease),现在也称为FTLD-tau,以及其他tau阳性病理状况,包括FTDP-17、皮质基底节变性和进行性核上性麻痹。约50%的FTD病例将在死后出现tau病理学。

[0084] TDP-43病理学:该疾病形式先前被描述为具有泛素阳性、tau和α-突触核蛋白阴性内含物的痴呆,具有或不具有运动神经元变性。FTLD-TDP43约占FTD的40%(±MND)。

[0085] FUS病理学:具有潜在FUS病理学的病例倾向于表现为行为变异型FTD(bvFTD),但该相关性的可靠性并不足以预测死后病理学。FTLD-FUS仅代表临床诊断FTD的5%至10%。

[0086] 缺乏独特组织学的痴呆(dementia lacking distinctive histology,DLDH)是罕见的实体并且代表了在死后不能被确诊为上述任一种的FTD的剩余一小部分。

[0087] 在罕见的情况下,患有临床FTD的患者在尸检时被发现具有与阿尔茨海默病一致的变化。证据表明FTD选择性地损伤纺锤体神经元,其是仅在人、类人猿和鲸鱼的脑中发现的神经元类型。微量营养素叶酸和B12的缺乏与患有FTD的个体的认知受损相关。慢性叶酸缺乏也与脑萎缩有关,导致神经功能受损。

[0088] 结构性MRI扫描通常显示额叶和/或前颞叶萎缩,但在早期病例中,该扫描可能显示出正常。萎缩可以是双侧的或不对称的。在不同时间点(例如,相隔一年)的图像配准可显示萎缩的证据,否则(在单独的时间点)可被报道为正常。许多研究组已开始使用技术,例如磁共振波谱、功能成像和皮质厚度测量试图为FTD患者提供早期诊断。氟-18-氟脱氧葡萄糖正电子发射断层扫描(FDG-PET)扫描经典地显示额和/或前颞代谢减退,这有助于区分该疾病和阿尔茨海默病。阿尔茨海默病的PET扫描经典地显示了双顶代谢减退。基于成像方法的元分析(meta-analyse)表明,额颞痴呆主要影响在社交认知或"心理理论"的情况下讨论的额内侧(frontomedial)网络。这完全符合以下观点:即基于认知神经心理学证据,腹内侧前额皮质是额颞变性行为变异过程中早期功能障碍的主要部位。额颞叶变性(语义性痴呆和进行性非流利性失语)的语言亚型可通过体内成像方法进行区域性分离。

[0089] 由于阿尔茨海默症和FTD的初始症状之间的类似性,它们之间的混淆是有道理的。患者在运动和其他运动任务方面没有困难。随着FTD症状的出现,难以区分阿尔茨海默病和FTD的诊断。在两种痴呆的行为和情绪症状方面存在明显差异,特别是在FTD患者中看到的情绪迟钝。在FTD的早期阶段,焦虑和抑郁是常见的,这可导致诊断不明确。然而,随着时间的推移,随着这种痴呆进展和定义冷漠(FTD特有)的症状开始出现,这些不明确逐渐消失。

[0090] 使用[$^{18}$F]FDDNP正电子发射断层扫描对额颞痴呆中tau聚集进行的体内脑成像更

直观并增强了对额颞痴呆有更深入了解的能力。先前对阿尔茨海默病(AD)脑标本的荧光显微术研究表明,[18F]FDDNP显示出神经元间神经原纤维缠结(NFT)的优异显现。与AD中突出的颞信号相比,[18F]FDDNP-PET图像的视觉图像强调了FTD中的额信号。[18F]FDDNP-PET使得能够增强患者中tau蛋白病的显现。这有助于区分FTD与AD中的顶骨信号和颞信号。此外,[18F]FDDNP在体内赋予tau蛋白病的能力提供了用于监测治疗作用以消除NFT积聚的工具。数年来的最新研究已开发了用于诊断行为变异型额颞痴呆(bvFTD)的新标准。六种不同的临床特征已被确定为bvFTD的症状:

[0091] 脱抑制

[0092] 冷漠/惰性

[0093] 失去同情心/同理心

[0094] 持续言语行为/强迫行为

[0095] 把任何看得到的东西塞进嘴里(Hyperorality)

[0096] 执行不良神经心理学特征

[0097] 在六个特征中,患者中必须存在三种才能诊断出可能患有bvFTD的患者。与标准FTD类似,主要诊断源于鉴定相关症状的临床试验,而不是影像学研究。以上标准用于区分bvFTD与病症例如阿尔茨海默症和其他原因的痴呆。另外,新标准允许基于出现的症状数目区分可能的、很可能的和确定的bvFTD的诊断层级。

[0098] 与更常见的神经退行性疾病(如阿尔茨海默病)相比,更高比例的FTD病例显示出具有家族性组分。越来越多的突变和遗传变体一直被鉴定,因此遗传影响列表需要一致地更新。tau阳性额颞痴呆伴帕金森综合征(FTDP-17)是由17号染色体上编码Tau蛋白的MAPT基因的突变引起的。已确定tau突变的类型与基因突变的神经病理学之间存在直接关系。tau外显子10剪接点处的突变导致神经元和胶质中重复性tau的选择性沉积。与tau中其他地方的突变相关的病理表型难以预测,并且典型的神经原纤维缠结(由3个重复和4个重复tau二者组成)和Pick小体(仅由3个重复tau组成)二者均已被描述。在外显子10以外突变的家族中,胶质内tau沉积物的存在也是可变的。该疾病现在非正式地命名为FTDP-17T。FTD显示出与17号染色体上tau基因座区域的连锁,但认为在17号染色体上有两个基因座在彼此的数兆碱基内导致FTD。由FTLD-TDP43引起的FTD有许多遗传原因。一些病例是由同样位于17号染色体上的GRN基因突变引起的。另一些是由VCP突变引起的,但是这些患者表现为包涵体肌病、佩吉特骨病和FTD的复杂混合物。最近添加至列表的是C9ORF72启动子区域中的六核苷酸重复扩增。仅报道了一个或两个描述临床纯FTD(没有MND的FTD)中的TARDBP(TDP-43基因)突变的病例。

[0099] D.进行性核上性麻痹

[0100] 进行性核上性麻痹(progressive supranuclear palsy,PSP;或斯蒂尔-理查森-奥尔谢夫斯基综合征(Steele-Richardson-Olszewski syndrome),以在1963年描述它的医生命名)是涉及特定脑体积的逐渐恶化和死亡的退行性疾病。男性和女性受到的影响大致相同并且没有种族、地域或职业偏好。每100,000群体约有6人患有PSP。它被描述为tau蛋白病。虽然一些症状可对非特异性测量做出响应,但目前无法有效治疗或治愈PSP。症状发作的平均年龄为63岁,并且从发作起的存活平均为7年,具有广泛的差异。肺炎是常见的死亡原因。

[0101] 三分之二病例的初始症状是失去平衡、活动时向前扑、快速行走、撞到物体或人以及跌倒。其他常见的早期症状是性格改变、移动普遍减慢和视觉症状。后来的症状和体征是痴呆(通常包括丧失抑制和组织信息的能力)、言语不利、吞咽困难和眼睛移动困难,特别是在垂直方向上。后者解释了这些患者由于其不能够向上或向下看而经历的一些跌倒。其他一些迹象是睑功能差、面部肌挛缩、头向后倾斜和颈部肌肉僵硬、睡眠中断、尿失禁和便秘。

[0102] 视觉症状在该病症的诊断中特别重要。患者通常抱怨由于不能良好地向下看而引起的阅读困难。值得注意的是,这些患者所经历的眼肌瘫痪主要涉及自主眼运动(eye movement)和不能进行垂直扫视,向下扫视通常更糟。患者往往难以向下看(下视性麻痹),随后是加上上视性麻痹。作为头眼反射测试的一部分,当检查者被动地上下转动患者的头时,该垂直凝视瘫痪将得到纠正。例如,由贝尔现象(Bell's phenomenon)引发的不自主眼运动可能更接近正常。在仔细检查时,当患者在远处凝视时,可看到被称为"方波跳动(square-wave jerks)"的眼运动。这些是可被误认为是眼球震颤的精细运动,但它们本质上是跳视的且没有平滑的相位。尽管健康个体也进行方波跳动运动,但PSP患者的方波跳动运动较慢,具有较小的垂直分量。评估这些方波跳动和垂直扫视减少对于诊断进行性核上性麻痹特别有用,因为这些运动使PSP患者与其他帕金森病患者区分开来。典型的是会聚困难(会聚不足),其中在将眼集中在附近的事物(如书本的页面)时眼睛更近地聚在一起。由于眼睛在近距离聚焦时有困难,患者在阅读时可能抱怨复视(diplopia)(视歧)。

[0103] 主要表现包括核上性眼肌瘫痪、颈肌张力障碍、帕金森综合征、假性延髓麻痹(Pseudobulbar palsy)、行为和认知损害、失衡和行走困难以及频繁跌倒。

[0104] PSP的原因是未知的。少于1%的患有PSP的那些的家庭成员患有相同疾病。位于17号染色体上的称为H1单倍型的tau蛋白基因的变体与PSP相关。几乎所有患有PSP的人都从每个父母接受到了该变体的拷贝,但这对于约三分之二的普通群体也是如此。因此,H1单倍型显示是必要的,但不足以引起PSP。正在调查其他基因以及环境毒素作为PSP原因的可能因素。

[0105] 受影响的脑细胞是神经元和胶质细胞二者。神经元显示出神经原纤维缠结,这是tau蛋白的团块,是脑细胞内部结构骨架的正常部分。这些缠结通常与在阿尔茨海默病中所见到的那些不同,但当它们出现在大脑皮质中时,可能在结构上类似。然而,它们的化学组成通常不同,并且类似于皮质基底节变性中所见到的缠结。星形胶质细胞或簇状星形胶质细胞中的tau蛋白簇也被认为是诊断性的。与球形NFT不同,它们可能在皮质中更广泛分布。路易小体见于一些病例中,但尚不清楚这是变异还是独立的共存过程,并且在一些病例中,PSP可与皮质基底节变性、帕金森病和/或阿尔茨海默病共存,特别是在较年长患者中。

[0106] 受影响的脑的主要区域是:

[0107] 基底神经节,特别是底丘脑核、黑质和苍白球;

[0108] 脑干,特别是"核上"眼运动所在的中脑部分;

[0109] 大脑皮质,特别是额叶大脑皮质;

[0110] 小脑齿状核;

[0111] 脊髓,特别是其中一些控制膀胱和肠道所在的区域

[0112] 一些人认为PSP、皮质基底节变性和额颞痴呆是同一疾病的变化形式。另一些人认为它们是独立的疾病。PSP偶尔显示出与皮克病共存。

[0113] 通常进行MRI来诊断PSP。MRI可能显示中脑萎缩、脑桥保留、呈现“蜂鸟”征外观和米老鼠征(Mickey Mouse sign)。PSP由于运动缓慢和步履艰难而经常被误诊为帕金森病，或由于行为改变而经常被误诊为阿尔茨海默病。它是统称为帕金森加综合征的许多疾病之一。对左旋多巴的响应差以及对称性发作可有助于区分该疾病与PD。此外，与其他帕金森病症的向前驼背姿势(stooped-forward posture)相反，具有理查森变体的患者倾向于具有直立或弓背姿势(arched-back posture)，但是PSP-帕金森综合征(参见下文)可能表现出驼背姿势。早期跌倒是特征性的，特别是在理查森综合征(Richardson-syndrome)的情况下。

[0114] 对于PSP没有已知的治愈并且管理主要是支持性的。PSP病例通常分为两个亚组，PSP-理查森(经典型)和PSP-帕金森综合征，可获得对左旋多巴的短期响应。运动障碍是偶然但罕见的治疗并发症。金刚烷胺有时也有帮助。数年之后，帕金森综合征变体倾向于呈现理查森特征。已描述了其他变体。肉毒杆菌素可用于治疗颈肌张力障碍和眼睑痉挛，但这会加重吞咽困难。

[0115] 研究表明利斯的明可有助于认知方面，但两项研究的作者均建议使用更大的采样。存在催眠的唑吡坦可改善运动功能和眼运动的一些证据，但仅来自小规模研究。

[0116] 患有PSP的患者通常寻求或被转至职业治疗、针对运动言语改变的言语-语言病理学(通常为痉挛性-共济失调性构音障碍)以及针对报道频繁跌倒的平衡和步态问题的物理治疗。PSP中缺乏基于证据的康复方法，并且目前关于该主题的大多数研究由涉及仅少数患者的病例报道组成。

[0117] 患有PSP的患者的康复方案的病例报道通常包括肢体协调活动、倾斜板平衡、步态训练、具有进行性抗阻训练和等速训练的力量训练以及颈部肌肉的拉伸。虽然一些病例报道表明物理治疗可在患有PSP的患者的平衡和步态方面提供改善，但结果不能推广至患有PSP的所有患者，因为每个病例报道仅追踪一名或两名患者。然而，从这些病例研究中得出的观察结果可能可用于帮助指导未来的关于平衡和步态训练计划在PSP管理中的有效性的研究。

[0118] 患有PSP的个体通常会被转至职业治疗师，以帮助管理他们的病情并帮助提高他们的独立性。这可包括进行教导以使用助行器。由于他们倾向于向后跌倒，建议使用步行器(walker)，特别是可在前面加重的助行器，而不是手杖(cane)。使用适当的助行器将有助于降低个体跌倒的风险，并使他们在社区中独立行走更安全。由于他们的平衡问题和不规则运动，个体需要花费时间学习如何在他们的家中以及社区中安全地转移。这可包括安全地从椅子上起身和坐在椅子上。

[0119] 由于该疾病的进行性性质，所有个体最终均丧失其行走能力并且将需要发展至使用轮椅。严重的吞咽困难经常随之而来，并且此时死亡通常是数月的事情。

[0120] E.皮质基底节变性

[0121] 皮质基底节变性(corticobasal ganglionic degeneration,CBgD)或皮质基底节变性(CBgD)是累及大脑皮质和基底神经节的罕见的进行性神经退行性疾病。CBgD症状通常开始于50至70岁的人，并且平均的疾病持续时间为6年。其特征在于明显的运动障碍和认知功能障碍，并且被归类为帕金森加综合征之一。临床诊断困难，因为CBgD的症状通常与其他病症，例如帕金森病(PD)、进行性核上性麻痹(PSP)和路易体痴呆(DLB)的症状类似。由于与

CBgD相关的多种临床表现,最终诊断只能在神经病理学检查之后做出。

[0122] 由于CBgD是进行性的,因此可使用一套标准的诊断标准,它以疾病的演变为中心。在这些基本特征中包括皮质处理问题、基底神经节的功能障碍以及突然和有害发作。精神和认知功能障碍虽然存在于CBgD中,但要不普遍地多,并且缺乏作为该疾病存在的常见指标的确立。

[0123] 表现出CBgD的人中一些最普遍的症状类型与可鉴定的运动障碍和皮质处理问题有关。这些症状是疾病存在的初始指标。每个相关的运动并发症通常不对称地出现,并且在整个身体中未观察到症状一致。例如,在一只手中表现出异手综合症(alien hand syndrome)(稍后解释)的人不会相应地在对侧肢体中表现出相同的症状。与CBgD相关的主要运动障碍和皮质功能障碍包括帕金森综合征、异手综合征、失用症(观念运动性失用症和肢体运动性失用症)和失语。

[0124] 作为CBgD临床症状的帕金森综合征的存在在很大程度上是开发针对该疾病的独特诊断标准的并发症的原因。其中帕金森综合征形成整体诊断特征的其他这样的疾病是PD和PSP。CBgD中的帕金森综合征主要存在于肢例如臂,并且总是不对称的。已表明更经常地涉及非优势臂。包含帕金森综合征的常见的相关运动功能障碍是强直、运动迟缓和步态障碍,其中肢体强直形成CBgD中帕金森综合征最典型的表现。尽管相对模糊,但这种强直可导致步态和相关运动障碍。当肢体的某些运动完成明显减慢时发生CBgD的运动迟缓。在相关研究中,确定在首次诊断之后三年,71%的患有CBgD的人表现出存在运动迟缓。

[0125] 异手综合征已被证明在约60%的诊断为CBgD的那些人中是普遍的。该病症涉及个体无法控制他或她的手的运动,这是由于肢体是“外来”的感觉造成的。异肢体(alien limb)的运动是对外部刺激的反应,并且不偶尔发生或在没有刺激的情况下发生。异肢体的存在在CBgD中具有明显的外观,其中被诊断出的个体可能具有“触觉附和(tactile mitgehen)”。该附和(德语,意为“跟去”)是对CBgD相对特定的,并且涉及当双手直接接触时,对象的手主动跟随实验者的手的。在CBgD中已注意到异手综合症的另一种更罕见形式,其中个体的手对外部刺激表现出回避响应。另外,通过肢体麻木或刺痛感表现出的感觉障碍也可与异手综合征同时出现,因为两种症状均表明皮质功能障碍。与大多数运动障碍一样,异手综合征在诊断为CBgD的患者中也出现不对称。

[0126] 观念运动性失用症(ideomotor apraxia,IMA)虽然明显存在于CBgD中,但是由于在表现出该病症的那些个体中另外存在运动迟缓和强直,通常表现不典型。CBgD中的IMA症状的特征在于在有或没有物体的实施两种情况下,不能重复或模仿特定的运动(无论是显著的还是随机的)。这种形式的IMA存在于手和臂中,而下肢中的IMA可导致行走问题。表现出IMA的患有CBgD的那些可显示出开始行走有困难,因为脚可能似乎固定在地板上。这可导致绊倒和难以维持平衡。IMA与前运动皮质、顶叶联合区、连接白质束、丘脑和基底神经节的退化相关。患有CBgD的一些个体表现出肢体运动性失用症,这涉及通常由手和手指执行的更精细的运动移动的功能障碍。

[0127] CBgD中的失语是通过不能说话或难以开始口语对话来揭示的,并且属于该病症的非流利(与流利或流畅相反)亚型。这可能与言语障碍例如构音障碍有关,并且因此不是真正的失语,因为失语与语言功能的变化有关,例如难以检索单词或将单词放在一起以形成有意义的句子。CBgD中的言语和/或语言障碍导致不连贯的言语模式和单词的遗漏。随着疾

病的进展，具有该CBgD症状的个体通常丧失说话的能力。

[0128] 与CBgD相关的精神问题通常是由于该疾病的虚弱症状而出现。患有CBgD的个体中列举的主要精神和认知状况包括痴呆、抑郁和易激惹，其中痴呆形成关键的特征，其有时会导致将CBgD误诊为另一种认知障碍，例如阿尔茨海默病(AD)。额颞痴呆可能是早期特征。

[0129] 与CBgD相关的神经病理学发现包括脑内存在星形胶质细胞异常和蛋白tau的不当积聚(称为tau蛋白病)。对诊断为CBgD的个体的脑进行的死后组织学检查揭示了涉及局部区域中的星形胶质细胞的独特特征。用于鉴定这些星形胶质细胞内含物的典型程序是Gallyas-Braak染色方法。该过程涉及将组织样品暴露于银染材料，该银染材料标记tau蛋白和星形胶质细胞内含物的异常。CBgD中的星形胶质细胞内含物被确定为星形胶质细胞斑块，其表现为星形胶质细胞模糊生长的环状显示。最近的研究表明，CBgD在额叶前部分和大脑皮质的运动前区中产生高密度的星形胶质细胞斑块。

[0130] 蛋白tau是重要的微管相关蛋白(MAP)，并且通常存在于神经元轴突中。然而，蛋白质发育的功能失常可导致星形胶质细胞和胶质细胞的不自然的高水平表达。因此，这通常是在组织学CBgD检查中突出指出星形胶质细胞斑块的原因。尽管它们被认为在神经退行性疾病例如CBgD中发挥显著的作用，但是它们的确切作用仍然是个谜。

[0131] 与CBgD相关的最显著的问题之一是无法在表现出与CBgD相关症状的个体仍然活着时进行明确的诊断。CBgD的临床诊断是基于指定的诊断标准进行的，该诊断标准主要集中于与该疾病相关的症状。然而，这通常导致并发症，因为这些症状通常与许多其他神经退行性疾病重叠。通常对CBgD进行鉴别诊断，其中基于不重叠的特定症状排除其他疾病。然而，在该过程中使用的CBgD的一些症状对于该疾病是罕见的，并且因此不能总是使用鉴别诊断。

[0132] 死后诊断提供了CBgD存在的唯一真实指示。这些诊断中的大多数利用Gallyas-Braak染色方法，该方法在确定星形胶质细胞内含物和巧合tau蛋白病的存在方面是有效的。

[0133] 进行性核上性麻痹(PSP)通常是最常与CBgD混淆的疾病。PSP和CBgD二者均导致类似的症状，并且二者均在组织学检查后显示tau蛋白病。然而，已注意到PSP中的tau蛋白病导致簇状星形胶质细胞，与作为CBgD的结果发现的环形星形胶质细胞斑块形成对比。

[0134] 诊断为PD的个体通常表现出与诊断为CBgD的那些类似的运动功能障碍，这提高了对其进行诊断的复杂性。一些其他的神经退行性疾病，包括阿尔茨海默病(AD)、路易体痴呆(DLB)和额颞痴呆(FTD)也显示出与CBgD的共性。

[0135] F.慢性创伤性脑病

[0136] 慢性创伤性脑病(chronic traumatic encephalopathy,CTE)，以前称为拳击性痴呆，是在具有多处头部损伤的人中发现的神经退行性疾病。症状可包括行为问题、情绪问题和思维问题。这通常在受伤之后数年才开始。它通常随着时间变得更糟并且可导致痴呆。尚不清楚自杀风险是否改变。

[0137] 大多数记录的病例发生在参与接触性运动例如拳击、美式足球、摔跤、冰球、橄榄球和足球的运动员上。其他风险因素包括在军队中、之前的家庭暴力和反复敲击头部。发生该病症所需的确切创伤量是未知的。明确的诊断只能在尸检时发生。它是tau蛋白病的一种形式。

[0138] 截至2018年,没有特定的治疗。已发现,在具有多处头部损伤史的那些中该疾病的比率为约30%。然而,人口比率尚不清楚。对反复头部损伤导致的脑损伤的研究始于1920年代,当时该病症被称为拳击性痴呆或“拳击手脑病综合征(punch-drunk syndrome)”。改变一些运动中的规则已被讨论作为预防的手段。

[0139] CTE的症状以四个阶段出现,通常在运动员经历重复性轻度创伤性脑损伤之后8至10年出现。

[0140] 第一阶段症状包括注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder)以及意识错乱、定向障碍、头晕和头痛。第二阶段症状包括记忆丧失、社交不稳定、冲动行为和判断力差。第三和第四阶段包括进行性痴呆、运动障碍、表情缺乏、言语障碍、感觉处理障碍、震颤、眩晕、耳聋、抑郁和自杀。

[0141] 另外的症状包括构音障碍、吞咽困难、认知障碍(例如遗忘)和眼部异常(例如上睑下垂)。

[0142] 该病症表现为痴呆或心智能力下降、记忆问题、头晕或缺乏平衡至以下点:短时间内不能够依靠自己的力量行走和/或帕金森综合征,或者震颤和缺乏协调。它还可能导致言语问题和步态不稳。患有CTE的患者可倾向于不恰当或爆炸性的行为,并且可表现出病态嫉妒或偏执。

[0143] CTE的神经病理学表现不同于其他tau蛋白病,例如阿尔茨海默病。已将可观察到的CTE失能的四个临床阶段与脑组织中的tau病理学相关联,严重程度从额新皮质中神经原纤维缠结的局灶性血管周围震中到影响广泛脑区域的严重tau蛋白病。

[0144] CTE的主要物理表现包括脑重量降低,其与额皮质和颞皮质以及内侧颞叶的萎缩相关。侧脑室和第三脑室经常扩大,具有第四脑室扩张的罕见病例。CTE的其他物理表现包括前透明隔腔和后开窗、黑质和蓝斑的苍白,以及嗅球、丘脑、乳头体、脑干和小脑的萎缩。随着CTE进展,可存在海马、内嗅皮质和杏仁核的明显萎缩。

[0145] 在微观尺度上,病理学包括神经元丢失、tau沉积、TAR DNA结合蛋白43(TDP 43)沉积、白质变化和其他异常。tau沉积作为致密的神经原纤维缠结(NFT)、神经突和胶质缠结出现,它们由星形胶质细胞和其他胶质细胞组成。β-淀粉样沉积是CTE相对不常见的特征。

[0146] 一小组患有CTE的个体患有慢性创伤性脑肌病(chronic traumatic encephalomyopathy,CTEM),其特征在于运动神经元疾病的症状并且其模仿肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis,ALS)。进行性肌无力以及平衡和步态问题(行走问题)似乎是CTEM的早期体征。

[0147] 由脑产生的外排体囊泡是TBI的潜在生物标志物,包括CTE。CTE的亚型是拳击性痴呆或拳击手痴呆(来自拉丁文pugilator-boxer),因为它最初是在具有拳击史的那些中发现的,也称为“拳击手脑病综合征”。

[0148] 神经元丢失、脑组织的瘢痕化、蛋白质聚集、老年斑、脑积水、胼胝体的衰减、弥漫性轴突损伤、神经原纤维缠结和小脑损伤均与该综合征有关。该病症在病因学上可能与阿尔茨海默病相关。在拳击性痴呆患者的脑中发现了神经原纤维缠结,但其分布不同于通常在患有阿尔茨海默症的人中发现的分布。一个组检查了来自具有多处轻度创伤性脑损伤的患者的脑切片,并且发现了细胞骨架的变化,他们提出这可能是由于脑血管受损引起的。

[0149] 暴露于脑震荡和亚脑震荡打击的提高被认为是最重要的风险因素,这可取决于战

斗总数、淘汰赛负场数的数目、职业生涯的持续时间、战斗频率、退休年龄和拳击风格。

[0150] 目前,CTE只能通过死后直接组织检查,包括全面和免疫组织化学脑分析来明确诊断。

[0151] 缺乏显示CTE独特生物标志物的体内技术是目前无法在人活着时诊断CTE的原因。针对CTE的唯一已知诊断是通过研究死后的脑组织来进行的。脑震荡是非结构性的损伤,并且不导致脑出血,这就是为什么在常规神经影像学测试例如CT或MRI中无法看到大多数脑震荡的原因。急性脑震荡症状(在受伤之后不久出现的那些)不应与CTE混淆。区分持续很久的脑震荡后综合征(post-concussion syndrome,PCS,其中症状在脑震荡后不久开始并持续数周、数月,并且有时甚至数年)和CTE症状可能是困难的。调研研究目前正在检查神经影像学是否可检测到CTE中可能发生的轴突完整性和结构性病变的细微变化。最近,使用DTI、fMRI、MRI和MRS成像已在CTE的体内诊断技术方面取得了更多进展;然而,在可验证任何这样的技术之前,还需要进行更多的研究。

[0152] 期望与tau蛋白特异性结合的PET示踪剂来帮助诊断活体个体的CTE。一种候选物是示踪剂[$^{18}$F]FDDNP,其保留在患有多种痴呆病症例如阿尔茨海默病、唐氏综合征(Down syndrome)、进行性核上性麻痹、家族性额颞痴呆和克罗伊茨费尔特-雅各布病病(Creutzfeldt-Jakob disease)的个体的脑中。在对5名具有认知和情绪症状的退役NFL运动员进行的一项小研究中,PET扫描揭示了示踪剂在他们的脑中的积聚。然而,[$^{18}$F]FDDNP也与β-淀粉样蛋白和其他蛋白质结合。此外,脑中保留示踪剂的部位与已知的CTE的神经病理学不一致。更有前景的候选物是示踪剂[$^{18}$F]-T807,其仅与tau结合。它正在数项临床试验中进行测试。

[0153] CTE的假定生物标志物是血清中针对脑的自身抗体的存在。在经历了大量头部撞击但没有脑震荡的足球运动员中检测到该自身抗体,这表明即使是亚脑震荡发作也可对脑造成损伤。自身抗体可通过被破坏的血-脑屏障进入脑,并攻击通常受到免疫突击保护的神经元细胞。鉴于脑中存在大量神经元(860亿),并考虑到抗体穿过正常血-脑屏障的渗透性差,在初始事件(头部撞击)和任何体征或症状的发展之间存在较长时间。尽管如此,运动员血液中自身免疫变化可包含最早可测量的预测CTE的事件。

[0154] II.单克隆抗体及其生产

[0155] “分离的抗体”是已从其天然环境的组分中分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染物组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,并且可包括酶、激素和其他蛋白质性或非蛋白质性溶质。在一些具体实施方案中,抗体被纯化至:(1)通过劳里法(Lowry method)确定的抗体的按重量计大于95%,并且最特别地按重量计大于99%;(2)通过使用旋转杯序列分析仪(spinning cup sequenator)足以获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或者(3)使用考马斯蓝或银染色剂在还原或非还原条件下通过SDS-PAGE的均质。由于抗体天然环境的至少一种组分将不存在,分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,通常来说,分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0156] 基础4链抗体单元是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成的异四聚体糖蛋白。IgM抗体由5个基础异四聚体单元以及被称为J链的另外的多肽组成,并且因此包含10个抗原结合位点,而分泌的IgA抗体可聚合以形成包含2至5个基础4链单元以及J链的多价聚集体。在IgG的情况下,4链单元通常为约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键

与H链连接，而两条H链根据H链同种型通过一个或更多个二硫键彼此连接。每条H和L链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条H链在N端具有可变区($V_H$)，随后是对于每个α和γ链的三个恒定结构域($C_H$)，以及对于μ和同种型是四个$C_H$结构域。每条L链在N端具有可变区($V_L$)，随后是在其另一端的恒定结构域($C_L$)。$V_L$与$V_H$对齐，并且$C_L$与重链的第一恒定结构域($C_{H1}$)对齐。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。$V_H$和$V_L$的配对一起形成单个抗原结合位点。对于不同类别抗体的结构和特性，参见例如Basic and Clinical Immunology，第8版，Daniel P.Stites，Abba I.Terr and Tristram G.Parslow(编辑)，Appleton&Lange，Norwalk，Conn.，1994，第71页和第6章。

[0157] 来自任何脊椎动物物种的L链可基于其恒定结构域($C_L$)的氨基酸序列分配为两种明显不同的类型(称为κ和λ)之一。根据其重链的恒定结构域($C_H$)的氨基酸序列，免疫球蛋白可分为不同类别或同种型。存在5种类别的免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，其具有分别定名为α、δ、ε、γ和μ的重链。基于$C_H$序列和功能的相对较小差异，其γ和α类别进一步分为亚类，人表达以下亚类：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0158] 术语“可变”是指V结构域的某些区段在抗体之间序列差异很大的事实。V结构域介导抗原结合并且限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而，可变性不是均匀地分布于可变区的110个氨基酸跨度中。相反，V区由15至30个氨基酸的称为框架区(framework region，FR)的相对不变的段(stretch)组成，所述相对不变的段被每个9至12个氨基酸长的称为“高变区”的极度可变的较短区域分隔。天然重链和轻链的可变区各自包含通过被形成环连接的三个高变区连接的四个FR，所述四个FR主要采用β-片层构型，并且在一些情况下形成β-片层结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧密地保持在一起，并且与来自其他链的高变区一起有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat et al.，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版.Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，Md.(1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但表现出多种效应物功能，例如使抗体参与抗体依赖性细胞毒性(antibody dependent cellular cytotoxicity，ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(antibody-dependent cellular phagocytosis，ADCP)、抗体依赖性嗜中性粒细胞吞噬作用(ntibody-dependent neutrophil phagocytosis，ADNP)和抗体依赖性补体沉积(antibody-dependent complement deposition，ADCD)。

[0159] 当在本文中使用时，术语“高变区”是指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如，$V_L$中的约第24至34位(L1)、第50至56位(L2)和第89至97位(L3)残基附近，以及$V_H$中的约第31至35位(H1)、第50至65位(H2)和第95至102位(H3)残基附近，当根据Kabat编号系统编号时；Kabat et al.，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版.Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，Md.(1991))；和/或来自“高变环”的那些残基(例如，$V_L$中的第24至34位(L1)、第50至56位(L2)和第89至97位(L3)残基，以及$V_H$中的第26至32位(H1)、第52至56位(H2)和第95至101位(H3)残基，当根据Chothia编号系统编号时；Chothia and Lesk，J.Mol.Biol.196:901-917(1987))；和/或来自“高变环”/CDR的那些残基(例如，$V_L$中的第27至38位(L1)、第56至65位(L2)和第105至120位(L3)残基，以及$V_H$中的第27至38位(H1)、第56至65位(H2)和第105至120位(H3)残基，当根据IMGT编号系统编号时；

Lefranc,M.P.等Nucl.Acids Res.27:209-212(1999),Ruiz,M.等Nucl.Acids Res.28:219-221(2000))。任选地,抗体在以下点中的一个或更多个处具有对称插入:$V_L$中的28、36(L1)、63、74至75(L2)和123(L3),以及$V_{sub}$H中的28、36(H1)、63、74至75(H2)和123(H3),当根据AHo编号时;Honneger,A.and Plunkthun,A.J.Mol.Biol.309:657-670(2001))。

[0160] “种系核酸残基”意指天然存在于编码恒定区或可变区的种系基因中的核酸残基。“种系基因”是在生殖细胞(即注定要变成卵子或精子的细胞)中发现的DNA。“种系突变”是指在单细胞阶段在生殖细胞或受精卵中发生的特定DNA的可遗传变化,并且当传递给后代时,这样的突变被并入身体的每个细胞中。种系突变与在单个体细胞中获得的体细胞突变形成对比。在一些情况下,编码可变区的种系DNA序列中的核苷酸突变(即体细胞突变)并被不同的核苷酸替换。

[0161] 本文中使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上均质的抗体的群体获得的抗体,即除可能少量存在的可能天然存在突变之外,构成该群体的各抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原位点。此外,与包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除它们的特异性之外,单克隆抗体的优点还在于其可被合成而不受其他抗体的污染。修饰语“单克隆”不应被解释为要求通过任何特定方法产生抗体。例如,本公开内容中可用的单克隆抗体可通过最初由Kohler et al.,Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法来制备,或者可在对抗原特异性B细胞、响应于感染或免疫接种的抗原特异性浆母细胞进行单细胞分选,或大量经分选抗原特异性集合中从单个细胞中捕获连接的重链和轻链之后使用重组DNA方法在细菌、真核动物或植物细胞中制备(参见,例如美国专利No.4,816,567)。“单克隆抗体”还可例如使用Clackson et al.,Nature,352:624-628(1991)和Marks et al.,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库分离。

[0162] A.一般方法

[0163] 应理解,与tau结合的单克隆抗体将具有多种应用。这些包括产生用于检测和诊断tau蛋白病以及用于治疗其的诊断试剂盒。在这些情况下,可将这样的抗体与诊断或治疗剂连接,将其在竞争性测定中用作捕获剂或竞争剂,或者单独使用它们而没有与其连接的另外的试剂。如下文进一步讨论的,抗体可突变或被修饰。用于制备和表征抗体的方法是本领域中公知的。

[0164] 用于产生单克隆抗体(monoclonal antibody,MAb)的方法通常沿着与用于制备多克隆抗体的方法相同的路线开始。这两种方法的第一步均是对合适的宿主进行免疫接种或鉴定由于之前的自然感染或用许可的或实验疫苗进行疫苗接种而免疫接种的对象。如本领域中公知的,用于免疫接种的给定组合物的免疫原性可不同。因此,通常有必要加强宿主的免疫系统,如可通过将肽或多肽免疫原与载体偶联来实现。一些示例性且优选的载体是钥孔戚血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin,KLH)和牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)。其他白蛋白例如卵白蛋白、小鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白也可用作载体。用于使多肽与载体蛋白缀合的方式是本领域中公知的,并且包括戊二醛、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(m-maleimidobencoyl-N-hydroxysuccinimide ester)、碳二亚胺(carbodiimyde)和双-重氮联苯胺(bis-biazotized benzidine)。同样如本领域中公知的,特定免疫原组合物的免疫原性可通过使用免疫应答的非特异性刺激物(称为佐剂)

来增强。动物中的示例性且优选的佐剂包括完全弗氏佐剂(包含经杀伤结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)的免疫应答的非特异性刺激物)、不完全弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂,并且在人中,包括明矾、CpG、MFP59以及免疫刺激分子的组合(“佐剂系统”,例如AS01或AS03)。可有另外实验接种形式来诱导tau特异性B细胞,包括纳米粒疫苗,或在物理递送系统(例如脂质纳米粒或在金生物弹道珠上)中作为DNA或RNA基因递送以及利用针、基因枪、经皮电穿孔装置递送的基因编码抗原。抗原基因也可由有复制能力或复制缺陷型病毒载体例如腺病毒、腺相关病毒、痘病毒、疱疹病毒或甲病毒复制子或替代地病毒样颗粒编码来携带。

[0165] 在针对天然病原体的人抗体的情况下,合适的方法是识别已暴露于病原体的对象,例如已被诊断为已感染该疾病的那些或已接种疫苗以产生针对该病原体的保护性免疫的那些,或者测试实验疫苗的安全性或有效性。可检测循环的抗病原体抗体,并随后可从抗体阳性对象获得编码或产生B细胞的抗体。

[0166] 用于产生多克隆抗体的免疫原组合物的量根据免疫原的性质以及用于免疫接种的动物而不同。可使用多种途径来施用免疫原(皮下、肌内、皮内、静脉内和腹膜内)。可通过在免疫接种之后的不同时间点对经免疫接种的动物采血来监测多克隆抗体的产生。还可给予第二、加强注射。重复加强免疫和滴定过程直至获得合适的效价。当获得期望的免疫原性水平时,可对经免疫接种的动物采血并分离和储存血清,和/或可将动物用于产生MAb。

[0167] 在免疫接种之后,选择具有产生抗体的潜力的体细胞(特别是B淋巴细胞(B细胞))用于MAb产生方案。这些细胞可从活检的脾、淋巴结、扁桃体或腺样体、骨髓抽吸物或活检物、来自黏膜器官例如肺或GI道的组织活检物或者从循环血液获得。然后将来自经免疫接种的动物或免疫人的抗体产生B淋巴细胞与永生化骨髓瘤细胞的细胞融合,其通常是与经免疫接种的动物为同一物种的永生化骨髓瘤细胞或者是人或人/小鼠嵌合细胞。适用于产生杂交瘤的融合程序的骨髓瘤细胞系优选地不产生抗体、具有高融合效率和酶缺陷,这然后使得其不能在仅支持期望的融合细胞(杂交瘤)生长的某些选择培养基中生长。如本领域技术人员已知的,可使用多种骨髓瘤细胞中的任一种。HMMA2.5细胞或MFP-2细胞是这样的细胞的特别有用的实例。

[0168] 用于产生抗体产生脾细胞或抗体产生淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂交体的方法通常包括:在存在促进细胞膜融合的一种或更多种试剂(化学的或电学的)的情况下使体细胞与骨髓瘤细胞以2:1的比例混合,但是该比例可分别为约20:1至约1:1而不等。在一些情况下,用EB病毒(Epstein Barr virus,EBV)转化人B细胞作为初始步骤提高了B细胞的尺寸,从而增强与相对较大尺寸的骨髓瘤细胞的融合。通过在转化培养基中使用CpG和Chk2抑制剂药物增强了EBV的转化效率。或者,可通过在含另外的可溶性因子例如IL-21和人B细胞活化因子(BAFF)(TNF超家族的II型成员)的培养基中与表达CD40配体(CD 154)的转染细胞系共培养来活化人B细胞。Kohler和Milstein(1975;1976)已描述了使用仙台病毒(Sendai virus)的融合方法,并且Gefter et al.,(1977)已描述了使用聚乙二醇(PEG)例如37%(v/v)PEG的融合方法。使用电诱导融合方法也是合适的(Goding,第71至74页,1986),并且一些方法具有更好的效率(Yu et al.,2008)。融合程序通常以较低频率(约$1\times10^{-6}$至$1\times10^{-8}$)产生活杂交体,但是利用优化程序可实现接近1/200的融合效率(Yu et al.,2008)。然而,相对低的融合效率并不造成问题,因为通过在选择培养基中培养,活的融合杂合体与亲本

未融合细胞(特别是在正常情况下将持续无限分裂的未融合骨髓瘤细胞)区分开来。选择培养基通常是在组织培养基中包含阻断核苷酸从头合成的试剂的培养基。示例性且优选的试剂为氨基蝶呤、甲氨蝶呤和重氮丝氨酸。氨基蝶呤和甲氨蝶呤阻断嘌呤和嘧啶二者的从头合成,而重氮丝氨酸仅阻断嘌呤合成。当使用氨基蝶呤或甲氨蝶呤时,向培养基补充次黄嘌呤和胸苷作为核苷酸的来源(HAT培养基)。当使用重氮丝氨酸时,向培养基补充次黄嘌呤。如果B细胞来源是EBV转化的人B细胞系,则添加哇巴因(ouabain)以清除未与骨髓瘤融合的EBV转化系。

[0169] 优选的选择培养基是HAT或具有哇巴因的HAT。只有能够进行核苷酸补救途径的细胞才能在HAT培养基中存活。骨髓瘤细胞在补救途径的关键酶(例如,次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(hypoxanthine phosphoribosyl transferase,HPRT))中有缺陷,因此其不能存活。B细胞可进行该途径,但是其在培养中具有有限的寿命并且通常在约2周内死亡。因此,只有可在选择培养基中存活的细胞才是由骨髓瘤和B细胞形成的那些杂合体。当用于融合的B细胞的来源是EBV转化B细胞系时,此时还可将哇巴因用于杂合体的药物选择,因为EBV转化B细胞对药物杀伤易感,而选择所使用的骨髓瘤配偶体对哇巴因具有抗性。

[0170] 培养提供了从中选择特定杂交瘤的杂交瘤群体。通常来说,杂交瘤的选择如下进行:通过在微量滴定板中进行单克隆稀释来培养细胞,随后测试单独的克隆上清液(在约2至3周之后)的期望反应性。测定应灵敏、简单并且迅速,例如放射免疫测定、酶免疫测定、细胞毒性测定、噬菌斑测定、斑点免疫结合测定等。然后将选择的杂交瘤连续稀释或通过流式细胞术分选进行单细胞分选,并克隆到单独抗体产生细胞系中,所述克隆然后可无限增殖以提供mAb。细胞系可以以两种基本方式用于MAb产生。可将杂交瘤样品注射(通常注射到腹膜腔中)到动物(例如,小鼠)中。任选地,在注射之前将动物用烃,特别是油(例如姥鲛烷(四甲基十五烷))致敏(prime)。当以这种方式使用人杂交瘤时,注射免疫缺损的小鼠(例如SCID小鼠)是最佳的,以防止肿瘤排斥。经注射动物产生分泌由融合细胞杂合体产生的特异性单克隆抗体的肿瘤。然后,可取出动物的体液(例如血清或腹水)以提供高浓度的MAb。也可在体外培养单个细胞系,其中MAb自然地分泌到培养基中,从中可容易地获得高浓度的mAb。或者,可在体外使用人杂交瘤细胞系以在细胞上清液中产生免疫球蛋白。可将细胞系调整为在不含血清的培养基中生长,以优化回收高纯度的人单克隆免疫球蛋白的能力。

[0171] 如果期望的话,可使用过滤、离心和多种色谱方法(例如FPLC或亲和色谱)对通过任一种方式产生的mAb进行进一步纯化。本公开内容的单克隆抗体的片段可通过以下方法由经纯化的单克隆抗体获得:其包括用酶(例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)消化,和/或通过经化学还原切割二硫键。或者,本公开内容所涵盖的单克隆抗体片段可使用自动化肽合成仪合成。

[0172] 还考虑了可使用分子克隆方法来产生单克隆抗体。可使用顺磁珠选择或流式细胞术分选来物理地分选用目的抗原标记的单B细胞,然后可从单细胞中分离RNA,并通过RT-PCR扩增抗体基因。或者,可将抗原特异性的大量分选的细胞群隔离在微泡中,并使用重链和轻链扩增子的物理连接或对来自囊泡的重链和轻链基因进行共同条码化来从单细胞中回收匹配的重链和轻链可变基因。来自单细胞的匹配的重链和轻链基因也可通过用携带RT-PCR引物和用于以每个细胞一种条码来标记转录物的条码的细胞穿透纳米粒处理细胞来从抗原特异性B细胞群获得。也可通过杂交瘤系的RNA提取分离抗体可变基因,并通过RT-

PCR获得抗体基因并克隆到免疫球蛋白表达载体中。或者，由从细胞系分离的RNA制备组合的免疫球蛋白噬菌粒文库，并使用tau抗原通过淘选选择表达合适抗体的噬菌粒。该方法相对于常规杂交瘤技术的优点是可在单轮中产生并筛选约$10^4$倍多的抗体，并且通过H链和L链组合产生新特异性，其进一步提高了发现合适抗体的机会。

[0173] 教导产生可用于本公开内容的抗体的其他美国专利(其各自通过引用并入本文)包括美国专利5,565,332，其描述了使用组合方法产生嵌合抗体；美国专利4,816,567，其描述了重组免疫球蛋白制备；和美国专利4,867,973，其描述了抗体-治疗剂缀合物。

[0174] B.本公开内容的抗体

[0175] 根据本公开内容的抗体可在第一种情况下通过其结合特异性来定义。通过使用本领域技术人员公知的技术评估给定抗体的结合特异性/亲和力，本领域技术人员可确定这样的抗体是否落入本发明权利要求书的范围内。例如，给定抗体与之结合的表位可由位于抗原分子内的4个或更多个(例如，4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个)氨基酸的单个连续序列组成(例如，结构域中的线性表位)。或者，表位可由位于抗原分子内的多个不连续的氨基酸(或氨基酸序列)组成(例如，构象表位)。

[0176] 本领域普通技术人员已知的多种技术可用于确定抗体是否与多肽或蛋白质内的“一个或更多个氨基酸相互作用”。示例性技术包括例如常规的交叉阻断测定，例如在Antibodies，Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Press，Cold Spring Harbor，N.Y.)中描述的。交叉阻断可在多种结合测定(例如ELISA、生物层干涉术或表面等离子共振)中测量。其他方法包括丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke(2004)Methods Mol.Biol.248:443-63)、肽切割分析、使用单粒子重建的高分辨率电子显微术技术、cryoEM、或断层摄影术(tomography)、晶体学研究和NMR分析。另外，可使用例如表位切除、表位提取和抗原的化学修饰的方法(Tomer(2000)Prot.Sci.9:487-496)。可用于鉴定抗体与之相互作用的多肽内氨基酸的另一种方法是通过质谱检测的氢/氘交换。一般而言，氢/氘交换方法涉及氘标记目的蛋白，随后使抗体与氘标记的蛋白质结合。接下来，将蛋白质/抗体复合物转移到水中，并且受抗体复合物保护的氨基酸内的可交换质子以比不是界面一部分的氨基酸内的可交换质子更慢的速率进行氘对氢的反向交换。作为结果，与不包含在界面中的氨基酸相比，形成蛋白质/抗体界面的一部分的氨基酸可保留氘，并且因此表现出相对更高的质量。在抗体解离之后，对靶蛋白进行蛋白酶切割和质谱分析，从而揭示氘标记的残基，其对应于抗体与之相互作用的特定氨基酸。参见，例如Ehring(1999)Analytical Biochemistry 267:252-259;Engen and Smith(2001)Anal.Chem.73:256A-265A。

[0177] 术语“表位”是指抗原上B和/或T细胞对其做出响应的位点。B细胞表位可由连续氨基酸或通过蛋白质的三级折叠而并列的非连续氨基酸二者形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留，而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包含具有独特的空间构象的至少3个，并且更通常地至少5或8至10个氨基酸。

[0178] 修饰辅助谱分析(Modification-Assisted Profiling，MAP)，也称为基于抗原结构的抗体谱分析(Antigen Structure-based Antibody Profiling，ASAP)，是根据每种抗体与化学或酶促修饰的抗原表面的结合特性的类似性对大量针对相同抗原的单克隆抗体(mAb)进行分类的方法(参见US 2004/0101920，特别地其通过引用整体并入本文)。每个类别可反映与通过另一类别所代表的表位明显不同或部分重叠的独特表位。该技术使得能够

快速过滤遗传上相同的抗体，从而使表征可集中在遗传上独特的抗体上。当应用于杂交瘤筛选时，MAP可有助于鉴定产生具有期望特征的mAb的罕见杂交瘤克隆。MAP可用于将本公开内容的抗体分类为结合不同表位的抗体组。

[0179] 本公开内容包括可与相同表位或表位的一部分结合的抗体。同样，本公开内容还包括与本文中所述的任何具体示例性抗体竞争与靶标或其片段结合的抗体。通过使用本领域中已知的常规方法，可容易地确定抗体是否与参考抗体结合相同的表位，或与其竞争结合。例如，为了确定受试抗体是否与参考结合相同表位，允许参考抗体在饱和条件下与靶标结合。接下来，评估受试抗体与靶分子结合的能力。如果受试抗体能够与与参考抗体饱和结合之后的靶分子结合，则可得出结论，受试抗体与参考抗体结合不同的表位。在另一方面，如果受试抗体不能与与参考抗体饱和结合之后的靶分子结合，则受试抗体可与与由参考抗体结合的表位相同的表位结合。

[0180] 为了确定抗体是否与参考抗tau抗体竞争结合，在两个方向上进行上述结合方法：在第一个方向上，使参考抗体与tau抗原在饱和条件下结合，随后评估受试抗体与tau抗原的结合。在第二个方向上，使受试抗体与tau抗原在饱和条件下结合，随后评估参考抗体与tau抗原的结合。如果在两个方向上，仅第一(饱和)抗体能够与tau结合，则可得出结论，受试抗体和参考抗体竞争与tau的结合。如本领域普通技术人员将理解的，与参考抗体竞争结合的抗体可能不一定与参考抗体结合相同的表位，但可通过结合重叠或相邻表位而在空间上阻断参考抗体的结合。

[0181] 如果两种抗体中的一种竞争性地抑制(阻断)另一种与抗原的结合，则两种抗体与相同或重叠的表位结合。即，一种抗体过量1-、5-、10-、20-或100倍会抑制另一种抗体的结合至少50％，但优选75％、90％或甚至99％，如在竞争性结合测定中测量的(参见，例如，Junghans et al.,Cancer Res.1990 50:1495-1502)。或者，如果抗原中降低或消除一种抗体结合的基本上所有氨基酸突变降低或消除另一种抗体的结合，则两种抗体具有相同表位。如果降低或消除一种抗体结合的一些氨基酸突变降低或消除另一种抗体的结合，则两种抗体具有重叠表位。

[0182] 然后可进行另外的常规实验(例如，肽突变和结合分析)以确认观察到的受试抗体的结合缺乏是否实际上是由于与参考抗体结合相同的表位，或者空间阻断(或其他现象)是否是缺乏观察到的结合的原因。可使用ELISA、RIA、表面等离子体共振、流式细胞术或本领域可用的任何其他定量或定性抗体结合测定来进行这类实验。使用EM或晶体学的结构研究也可证明两种竞争结合的抗体是否识别相同的表位。

[0183] C.抗体序列的改造

[0184] 在多个实施方案中，可出于多种原因，例如改善表达、改善交叉反应性或降低脱靶结合而选择对所鉴定抗体的序列进行改造。可通过本领域技术人员已知的任何技术来制备经修饰抗体，所述技术包括通过标准分子生物技术进行表达或化学合成多肽。用于重组表达的方法在本文件的其他地方提出。以下是用于抗体改造的相关目标技术的一般讨论。

[0185] 可培养杂交瘤，然后裂解细胞，并提取总RNA。可使用随机六聚体和RT一起来产生RNA的cDNA拷贝，并随后使用预期扩增所有人可变基因序列的PCR引物的多重混合物进行PCR。可将PCR产物克隆到pGEM-T Easy载体中，然后使用标准载体引物通过自动化DNA测序进行测序。可使用从杂交瘤上清液收集并使用G蛋白柱通过FPLC纯化的抗体进行结合和中

和的测定。

[0186] 可通过以下产生重组全长IgG抗体:将来自克隆载体的重链和轻链Fv DNA亚克隆到IgG质粒载体中,将其转染到293(例如Freestyle)细胞或CHO细胞中,并可从293或CHO细胞上清液中收集和纯化抗体。另一些合适的宿主细胞系统包括细菌(例如大肠杆菌(E.coli))、昆虫细胞(S2、Sf9、Sf29、High Five)、植物细胞(例如具有或不具有针对类人聚糖进行改造的烟草)、藻类或多种非人转基因环境,例如小鼠、大鼠、山羊或牛。

[0187] 还考虑了出于随后抗体纯化和出于对宿主进行免疫接种二者目的的编码抗体的核酸的表达。抗体编码序列可以是RNA,例如天然RNA或经修饰RNA。经修饰RNA考虑了赋予mRNA以提高的稳定性和低免疫原性,从而促进治疗上重要的蛋白质的表达的某些化学修饰。例如,就翻译能力而言,N1-甲基-假尿苷(N1mΨ)优于数种其他核苷修饰及其组合。除关闭免疫/eIF2α磷酸化依赖性翻译抑制之外,并入的N1mΨ核苷酸还通过提高mRNA上核糖体停顿和密度来显著改变翻译过程的动态。经修饰mRNA的核糖体载量提高通过促进同一mRNA上的核糖体再循环或从头重新核糖体募集而使它们更易于起始。这样的修饰可用于在接种RNA之后增强体内抗体表达。RNA,无论是天然的还是经修饰的,均可作为裸RNA或在递送载剂(例如脂质纳米粒)中递送。

[0188] 或者,可将编码抗体的DNA用于相同目的。将DNA包含在含有在为其设计的宿主细胞中具有活性的启动子的表达盒中。表达盒有利地包含在可复制载体,例如常规质粒或微载体中。载体包括病毒载体,例如考虑了痘病毒、腺病毒、疱疹病毒、腺相关病毒和慢病毒。还考虑了编码抗体基因的复制子,例如基于VEE病毒或辛德毕斯病毒(Sindbis virus)的甲病毒复制子。这样的载体的递送在期望体内表达时可通过针通过肌内、皮下或皮内途径,或者通过经皮电穿孔来进行。

[0189] 与最终cGMP制造过程在相同宿主细胞和细胞培养过程中产生的抗体的迅速可用性具有降低过程开发计划的持续时间的潜力。Lonza已经开发了使用在CDACF培养基中培养的合并转染子用于在CHO细胞中迅速产生少量(多至50g)抗体的一般方法。尽管比真正的瞬时系统稍慢,但是其优点包括更高的产物浓度和与生产细胞系使用相同的宿主和过程。在一次性生物反应器中表达模型抗体之GS-CHO库的生长和生产力的实例为:在以补料分批模式进行的一次性袋状生物反应器培养(5L工作体积)中,在转染后9周内达到了2g/L的收获抗体浓度。

[0190] 抗体分子将包含例如通过mAb的蛋白水解切割产生的片段(例如F(ab')、$F(ab')_2$)或者例如可通过重组方式产生的单链免疫球蛋白。F(ab')抗体衍生物是单价的,而$F(ab')_2$抗体衍生物是二价的。在一个实施方案中,这样的片段可彼此组合,或者与其他抗体片段或受体配体组合以形成“嵌合”结合分子。明显地,这样的嵌合分子可包含能够与同一分子的不同表位结合的取代基。

[0191] 在一些相关实施方案中,抗体是所公开抗体的衍生物,例如,包含与所公开抗体中CDR序列相同的CDR序列的抗体(例如,嵌合抗体或CDR接枝抗体)。或者,可希望进行修饰,例如向抗体分子中引入保守变化。在进行这种变化时,可考虑氨基酸的亲水指数(hydropathic index)。氨基酸亲水指数在赋予蛋白质以相互作用生物学功能中的重要性是本领域中通常了解的(Kyte and Doolittle,1982)。已接受的是,氨基酸的相对亲水特性有助于所得蛋白质的二级结构,其转而限定了蛋白质与另一些分子(例如酶、底物、受体、

DNA、抗体、抗原等)的相互作用。

[0192] 本领域中还应理解的是,可基于亲水性有效地进行类似氨基酸的替换。美国专利4,554,101(通过引用并入本文)声称:蛋白质的最大局部平均亲水性(如受其邻近氨基酸的亲水性支配)与蛋白质的生物学特性相关。如美国专利4,554,101中所详述的,已向氨基酸残基分配了以下亲水性值:碱性氨基酸:精氨酸(+3.0)、赖氨酸(+3.0)和组氨酸(-0.5);酸性氨基酸:天冬氨酸(+3.0±1)、谷氨酸(+3.0±1)、天冬酰胺(+0.2)和谷氨酰胺(+0.2);亲水性非离子氨基酸:丝氨酸(+0.3)、天冬酰胺(+0.2)、谷氨酰胺(+0.2)和苏氨酸(-0.4);含硫氨基酸:半胱氨酸(-1.0)和甲硫氨酸(-1.3);疏水性非芳族氨基酸:缬氨酸(-1.5)、亮氨酸(-1.8)、异亮氨酸(-1.8)、脯氨酸(-0.5±1)、丙氨酸(-0.5)和甘氨酸(0);疏水性芳族氨基酸:色氨酸(-3.4)、苯丙氨酸(-2.5)和酪氨酸(-2.3)。

[0193] 应理解的是,氨基酸可被替换为具有类似亲水性的另一氨基酸,并且产生在生物学或免疫学上修饰的蛋白质。在这样的变化中,优选亲水性值在±2内的氨基酸的替换,特别优选在±1内的那些,并且甚至更特别优选在±0.5内的那些。

[0194] 如上文概括的,氨基酸替换通常基于氨基酸侧链取代基的相对类似性,例如,其疏水性、亲水性、电荷、大小等。预期多个前述特征的示例性替换是本领域技术人员公知的,并且包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0195] 本公开内容还考虑了同种型修饰。通过修饰Fc区域以具有不同同种型,可实现不同功能。例如,改变为$IgG_1$可提高抗体依赖性细胞细胞毒性,转换为A类可改善组织分布,以及转换为M类可改善价位。

[0196] 作为替代或补充,将氨基酸修饰与改变IL-23p19结合分子的Fc区的C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)功能的一种或更多种另外的氨基酸修饰组合在一起可以是有用的。特别令人感兴趣的结合多肽可以是与C1q结合并显示出补体依赖性细胞毒性的结合多肽。可修饰具有预先存在的C1q结合活性,任选地还具有介导CDC能力的多肽以使得这些活性中的一种或两种得到增强。改变C1q和/或修饰其补体依赖性细胞毒性功能的氨基酸修饰描述于例如WO/0042072中,其在此通过引用并入。

[0197] 可例如通过修饰C1q结合和/或FcγR结合并由此改变CDC活性和/或ADCC活性来设计具有改变的效应物功能的抗体的Fc区。“效应物功能”负责激活或减弱生物活性(例如,在对象中)。效应物功能的一些实例包括但不限于:C1q结合;补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;下调细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)等。这样的效应物功能可需要待与结合结构域(例如抗体可变结构域)组合的Fc区,并可使用多种测定(例如Fc结合测定、ADCC测定、CDC测定等)进行评估。

[0198] 例如,可产生抗体的具有改善的C1q结合和改善的FcγRIII结合(例如,具有改善的ADCC活性和改善的CDC活性二者)的变体Fc区。或者,如果期望降低或消除效应物功能,则可将变体Fc区改造为具有降低的CDC活性和/或降低的ADCC活性。在另一些实施方案中,可提高这些活性中的仅一种,并且任选地,另一种活性也降低(例如,产生具有改善的ADCC活性但是降低的CDC活性的Fc区变体,反之亦然)。

[0199] FcRn结合。还可引入Fc突变并将其改造成改变其与新生Fc受体(FcRn)的相互作用并改善其药动学特性。已经描述了具有与FcRn的结合改善的人Fc变体的集合(Shields et

al.,(2001).High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fcγ RI,FcγRII,FcγRIII,and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR,(J.Biol.Chem.276:6591-6604)。已知可导致半衰期提高的许多方法(Kuo and Aveson,2011),包括可通过包括以下的技术产生氨基酸修饰:丙氨酸扫描诱变、随机诱变以及筛选,以评估与新生Fc受体(FcRn)结合和/或体内行为。诱变之后的计算策略也可用于选择氨基酸突变中之一以进行突变。

[0200] 因此,本公开内容提供了具有与FcRn的最佳结合的抗原结合蛋白的变体。在一个具体实施方案中,抗原结合蛋白的所述变体在所述抗原结合蛋白的Fc区中包含至少一个氨基酸修饰,其中与所述亲本多肽相比,所述修饰选自Fc区的第226位、第227位、第228位、第230位、第231位、第233位、第234位、第239位、第241位、第243位、第246位、第250位、第252位、第256位、第259位、第264位、第265位、第267位、第269位、第270位、第276位、第284位、第285位、第288位、第289位、第290位、第291位、第292位、第294位、第297位、第298位、第299位、第301位、第302位、第303位、第305位、第307位、第308位、第309位、第311位、第315位、第317位、第320位、第322位、第325位、第327位、第330位、第332位、第334位、第335位、第338位、第340位、第342位、第343位、第345位、第347位、第350位、第352位、第354位、第355位、第356位、第359位、第360位、第361位、第362位、第369位、第370位、第371位、第375位、第378位、第380位、第382位、第384位、第385位、第386位、第387位、第389位、第390位、第392位、第393位、第394位、第395位、第396位、第397位、第398位、第399位、第400位、第401403位、第404位、第408位、第411位、第412位、第414位、第415位、第416位、第418位、第419位、第420位、第421位、第422位、第424位、第426位、第428位、第433位、第434位、第438位、第439位、第440位、第443位、第444位、第445位、第446位和第447位,其中Fc区中氨基酸的编号是Kabat中EU索引的编号。在本公开内容的另一方面中,修饰是M252Y/S254T/T256E。

[0201] 另外,多个出版物描述了用于获得半衰期被修饰的生理活性分子的方法,参见例如Kontermann(2009),通过将FcRn结合多肽引入到分子中,或者通过将分子与保留了FcRn结合亲和力但针对其他Fc受体的亲和力已大大降低的抗体融合或与抗体的FcRn结合结构域融合。

[0202] 衍生抗体可用于改变亲本抗体在哺乳动物,特别是人中的半衰期(例如血清半衰期)。这样的改变可导致半衰期大于15天,优选大于20天、大于25天、大于30天、大于35天、大于40天、大于45天、大于2个月、大于3个月、大于4个月或大于5个月。本公开内容的抗体或其片段在哺乳动物,优选人中的半衰期提高使得所述抗体或抗体片段在哺乳动物中的血清效价更高,并因此降低了所述抗体或抗体片段的施用频率和/或降低了待施用的所述抗体或抗体片段的浓度。具有提高的体内半衰期的抗体或其片段可通过本领域技术人员已知的技术来产生。例如,具有提高的体内半衰期的抗体或其片段可通过对被鉴定为参与Fc结构域与FcRn受体之间的相互作用的氨基酸残基进行修饰(例如,替换、缺失或添加)来产生。

[0203] Beltramello et al.(2010)先前报道了通过产生其中$CH_2$结构域的1.3和1.2位的亮氨酸残基(根据C结构域的IMGT独特编号)被丙氨酸残基替换来使mAb(由于其倾向于增强登革病毒(dengue virus)感染)中和的修饰。该修饰(也称为"LALA"突变)消除了与FcγRI、FcγRII和FcγRIIIa结合的抗体,如Hessell et al.(2007)所述。比较变体和未经修饰的重组mAb的中和和增强四种登革病毒血清型的感染的能力。LALA变体保留了与未经修饰mAb

相同的中和活性,但完全没有增强活性。因此,在当前公开的抗体的情况下预期了这种性质的LALA突变。

[0204] 糖基化改变。本公开内容的一个具体实施方案是包含无唾液酸、半乳糖或岩藻糖的基本上均质的聚糖的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段。单克隆抗体包含重链可变区和轻链可变区,其二者可分别与重链或轻链恒定区连接。前述基本上均质的聚糖可与重链恒定区共价连接。

[0205] 本公开内容的另一个实施方案包含具有新Fc糖基化模式的mAb。分离的单克隆抗体或其抗原结合片段存在于由GNGN或G1/G2糖型表示的基本上均质的组合物中。Fc糖基化在治疗性mAb的特性中发挥重要作用。具有缺乏核芯岩藻糖的均质聚糖的本公开内容的该实施方案显示出针对特定病毒的保护提高了两倍以上。消除核芯岩藻糖显著改善了自然杀伤(NK)细胞介导的mAb的ADCC活性,但显示对多形核细胞(polymorphonuclear cell,PMN)的ADCC活性具有相反的作用。

[0206] 与不具有基本上均质的GNGN糖型和具有含G0、G1F、G2F、GNF、GNGNF或GNGNFX糖型的相同抗体相比,包含由GNGN或G1/G2糖型表示的基本上均质的组合物的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段表现出对Fcγ RI和Fcγ RIII的结合亲和力提高。在本公开内容的一个实施方案中,所述抗体以$1\times10^{-8}$M或更小的Kd从Fcγ RI解离并且以$1\times10^{-7}$M或更小的Kd从Fcγ RIII解离。

[0207] Fc区的糖基化通常是N-连接或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链的连接。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种与羟基氨基酸(最通常为丝氨酸或苏氨酸)的连接,尽管也可使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。用于将碳水化合物部分与天冬酰胺侧链肽序列酶促连接的识别序列是天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,其中X是除脯氨酸之外的任何氨基酸。因此,多肽中这些肽序列中任一个的存在均会产生潜在的糖基化位点。

[0208] 糖基化模式可例如通过缺失一个或更多个存在于多肽中的糖基化位点和/或添加一个或更多个不存在于多肽中的糖基化位点来改变。通过改变氨基酸序列以使其包含一个或更多个上述三肽序列,方便地实现了将糖基化位点添加至抗体的Fc区(对于N-连接的糖基化位点)。示例性的糖基化变体具有重链的残基Asn 297的氨基酸替换。该改变也可通过向原始多肽的序列添加一个或更多个丝氨酸或苏氨酸残基或者用一个或更多个丝氨酸或苏氨酸残基替换原始多肽的序列来进行(对于O-连接的糖基化位点)。另外,将Asn 297改变为Ala可去除糖基化位点之一。

[0209] 在某些实施方案中,抗体在表达β(1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III(GnT III)的细胞中表达,使得GnT III将GlcNAc添加至IL-23p19抗体。用于以这样的方式产生抗体的方法提供于WO/9954342、WO/03011878、美国专利公开2003/0003097A1和Umana et al.,Nature Biotechnology,17:176-180,February 1999中。可使用基因组编辑技术例如成簇规律间隔短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat,CRISPR)将细胞系改变以增强或降低或消除某些翻译后修饰,例如糖基化。例如,CRISPR技术可用于在用于表达重组单克隆抗体的293或CHO细胞中消除编码糖基化酶的基因。

[0210] 单克隆抗体蛋白质序列缺陷(liability)的消除。可改造从人B细胞获得的抗体可

变基因序列,以增强其可制造性和安全性。潜在的蛋白质序列缺陷可通过检索与包含以下的位点相关的序列基序来鉴定:

[0211] 1)未配对的Cys残基,

[0212] 2)N-连接的糖基化,

[0213] 3)Asn脱酰胺,

[0214] 4)Asp异构化,

[0215] 5)SYE截短,

[0216] 6)Met氧化,

[0217] 7)Trp氧化,

[0218] 8)N端谷氨酸,

[0219] 9)整合素结合,

[0220] 10)CD11c/CD18结合,或

[0221] 11)片段化。

[0222] 这样的基序可通过改变编码重组抗体的cDNA的合成基因来消除。

[0223] 在开发治疗性抗体领域中的蛋白质改造工作清楚地揭示了某些序列或残基与溶解度差异相关(Fernandez-Escamilla et al.,Nature Biotech.,22(10),1302-1306,2004;Chennamsetty et al.,PNAS,106(29),11937-11942,2009;Voynov et al.,Biocon.Chem.,21(2),385-392,2010)。文献中来自溶解度改变突变的证据表明与另一些亲水性残基,例如天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、赖氨酸和精氨酸相比,一些亲水性残基例如天冬氨酸、谷氨酸和丝氨酸明显更有利地有助于蛋白质溶解度。

[0224] 稳定性。可对抗体进行改造以增强生物物理特性。可使用平均表观解链温度(average apparent melting temperature),使用升高的温度来使抗体解折叠(unfold)以确定相对稳定性。差示扫描量热术(Differential Scanning Calorimetry,DSC)测量作为温度函数的分子的热容$C_p$(使该分子升温每度所需的热)。可使用DSC研究抗体的热稳定性。mAb的DSC数据是特别令人感兴趣的,因为其有时解析了mAb结构内单独结构域的解折叠,从而在热谱图中产生多至三个峰(来自Fab、$C_H2$和$C_H3$结构域的解折叠)。通常来说,Fab结构域的解折叠产生最强峰。Fc部分的DSC谱和相对稳定性显示了人$IgG_1$、$IgG_2$、$IgG_3$和$IgG_4$亚类的特征差异(Garber and Demarest,Biochem.Biophys.Res.Commun.355,751-757,2007)。还可使用圆二色性(circular dichroism,CD)(用CD分光计进行)来确定平均表观解链温度。将以0.5nm的增量在200至260nm范围内测量抗体的远紫外CD谱。最终谱可确定为20次累积的平均值。可在背景减除之后计算残基椭圆率值。抗体(0.1mg/mL)的热解折叠可在235nm处在25至95℃下以及以1℃/分钟的加热速率进行监测。可使用动态光散射(dynamic light scattering,DLS)来评估聚集的倾向性。DLS用于表征多种颗粒包括蛋白质的尺寸。如果体系在尺寸上不分散,则可确定颗粒的平均有效直径。这种测量取决于颗粒核芯的尺寸、表面结构的尺寸和颗粒浓度。由于DLS基本上测量了由颗粒引起的散射光强度的波动,因此可确定颗粒的扩散系数。商业DLA仪器中的DLS软件显示不同直径的颗粒群。可使用DLS方便地进行稳定性研究。样品的DLS测量可通过确定颗粒的流体动力学半径是否提高来显示颗粒是否随时间或随温度变化而聚集。如果颗粒聚集,则可看到半径更大的更大颗粒群。取决于温度的稳定性可通过控制原位温度来分析。毛细管电泳(capillary electrophoresis,CE)技

术包括经过验证的用于确定抗体稳定性特征的方法。可使用iCE方法解析由于脱酰胺、C端赖氨酸、唾液酸化、氧化、糖基化以及可导致蛋白质pI变化的任何其他蛋白质变化而引起的抗体蛋白质电荷变体。可使用Protein Simple Maurice仪器在毛细管柱(cIEF)中通过高通量、自由溶液等电聚焦(isoelectric focusing,IEF)来评价每种表达的抗体蛋白质。可每30秒进行全柱UV吸收检测,以实时监测聚焦在等电点(pI)的分子。这种方法将传统凝胶IEF的高分辨率与基于柱的分离中存在的定量和自动化的优点相组合,同时消除了对转移步骤的需要。该技术对表达的抗体的身份、纯度和异质性谱进行可重现、定量分析。结果确定了抗体上的电荷异质性和分子尺寸,在吸光度和天然荧光检测模式二者下并且检测灵敏度低至0.7μg/mL。

[0225] 溶解度。可确定抗体序列的固有溶解度评分。固有溶解度评分可使用CamSol Intrinsic(Sormanni et al.,J Mol Biol 427,478-490,2015)进行计算。可通过在线程序评价每个抗体片段例如scFv的HCDR3中第95至102位残基(Kabat编号)的氨基酸序列,以计算溶解度评分。也可使用实验室技术确定溶解度。存在多种技术,包括将冻干的蛋白质添加至溶液直至溶液变得饱和并达到溶解度极限,或者通过在具有合适的分子量截止值的微浓缩器中超滤进行浓缩。最直接的方法是诱导无定形沉淀,其使用涉及使用硫酸铵进行蛋白质沉淀的方法来测量蛋白质溶解度(Trevino et al.,J Mol Biol,366:449-460,2007)。硫酸铵沉淀提供有关相对溶解度值的快速且准确的信息。硫酸铵沉淀产生具有明确水相和固相的沉淀的溶液,并且需要相对少量的蛋白质。使用通过硫酸铵诱导无定形沉淀进行的溶解度测量也可在不同的pH值下容易地进行。蛋白质溶解度是高度pH依赖性的,并且pH被认为是影响溶解度的最重要的外在因素。

[0226] 自身反应性。通常认为,应在个体发生期间通过负选择消除自身反应性克隆;然而,已经清楚的是,具有自身反应性特性的许多人天然存在抗体在成体成熟库中仍然存在,并且自身反应性可增强许多抗体的功能。已经注意到,在早期B细胞发育期间抗体中的HCDR3环通常富含正电荷并且表现出自身反应性模式(Wardemann et al.,Science 301,1374-1377,2003)。可通过在显微镜(使用黏附的HeLa或HEp-2上皮细胞)和流式细胞术细胞表面染色(使用悬浮的Jurkat T细胞和293S人胚肾细胞)中评估与人来源细胞结合的水平来测试给定抗体的自身反应性。也可使用对与组织阵列中组织的结合的评估来考察自身反应性。

[0227] 优选残基(“人相似性”)。在最近的许多研究中,正在大规模地对来自血液供体的人B细胞进行B细胞库深度测序。关于人抗体库重要部分的序列信息有助于对健康人中常见的抗体序列特征进行统计学评估。利用人重组抗体可变基因参考数据库中有关抗体序列特征的知识,可估计抗体序列的“人相似性”(Human Likeness,HL)的位置特异性程度。已表明HL可用于开发临床使用的抗体,如治疗性抗体或作为疫苗的抗体。目的是提高抗体的人相似性,以降低将导致抗体药物的效力显著下降或可诱导严重的健康影响的潜在不良作用和抗抗体免疫应答。可评估总共约4亿个序列的三名健康人血液供体的组合抗体库的抗体特征,并创建了聚焦于抗体的高变区的新“相对人相似性”(rHL)评分。rHL评分使人们容易地区分人序列(正评分)与非人序列(负评分)。可对抗体进行改造,以消除人库中不常见的残基。

[0228] D.单链抗体

[0229] 单链可变片段(scFv)是用短(通常丝氨酸、甘氨酸)接头连接在一起的免疫球蛋白重链和轻链可变区的融合物。这种嵌合分子虽然去除了恒定区并且引入了接头肽但是保留了原始免疫球蛋白的特异性。这种修饰通常不改变特异性。历史上产生这些分子是为了有利于噬菌体展示,其中将抗原结合结构域表达为单个肽非常方便。或者,可由来源于杂交瘤或B细胞的亚克隆重链和轻链直接产生scFv。单链可变片段缺少存在于完全抗体分子中的恒定Fc区,并且因此缺少用于纯化抗体的常见结合位点(例如,蛋白A/G)。这些片段通常可使用蛋白L纯化/固定,因为蛋白L与κ轻链的可变区相互作用。

[0230] 柔性接头通常由促进螺旋和转角的氨基酸残基(例如丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸)构成。然而,其他残基也可很好地作用。Tang et al.(1996)使用噬菌体展示作为从蛋白质接头文库中快速选择用于单链抗体(scFv)的专用接头的方式。构建随机接头文库,其中用于重链和轻链可变结构域的基因通过编码具有可变组成的18-氨基酸多肽的区段连接。在丝状噬菌体上展示scFv库(约$5\times10^6$个不同成员)并且用半抗原进行亲和选择。所选择变体的群体表现出结合活性显著提高,但是保留了相当大的序列多样性。随后筛选1054个单独变体产生了以可溶性形式有效产生的催化活性scFv。序列分析揭示,所选择栓链(tether)的仅有的共同特征是:$V_H$C末端之后的2个残基是接头中的保守脯氨酸以及在其他位置处有大量的精氨酸和脯氨酸。

[0231] 本公开内容的重组抗体还可涉及允许受体二聚化或多聚化的序列或部分。这样的序列包括来源于IgA的那些,其允许与J链联合形成多聚体。另一个多聚化结构域是Gal4二聚化结构域。在另一些实施方案中,可用允许两个抗体组合的试剂(例如生物素/抗生物素蛋白)对链进行修饰。

[0232] 在一个独立的实施方案中,可通过使用非肽接头或化学单元连接受体轻链和重链来产生单链抗体。通常来说,使轻链和重链在不同细胞中产生,纯化,并且随后以合适的方式连接在一起(即,通过合适的化学桥将重链的N端与轻链的C端连接)。

[0233] 使用交联试剂形成将两个不同分子的官能团系住的分子桥,例如,稳定和凝结剂。然而,考虑可产生相同类似物的二聚体或多聚体或者包含不同类似物的异聚复合体。为了以逐步方式连接两个不同化合物,可使用异-双官能交联剂,其消除了不想要的均聚物形成。

[0234] 一种示例性的异-双官能交联剂包含两个反应性基团:一个与伯胺基(例如,N-羟基琥珀酰亚胺)反应并且另一个与硫醇基团(例如,吡啶基二硫化物、马来酰亚胺、卤素等)反应。通过伯胺反应基,交联剂可与一个蛋白质(例如,所选择的抗体或片段)的赖氨酸残基反应,并且通过硫醇反应基,已经系在第一蛋白质上的交联剂与另一蛋白质(例如,选择剂)的半胱氨酸残基(游离巯基)反应。

[0235] 优选地,使用在血液中具有合理稳定性的交联剂。已知多种类型含二硫键的接头可成功用于使靶向剂和治疗剂/预防剂缀合。包含在空间上受阻之二硫键的接头可证明在体内提供更高稳定性,从而防止靶向肽在到达作用位点之前释放。因此,这些接头是一组连接剂。

[0236] 另一种交联试剂是SMPT,这是一种包含二硫键的双官能交联剂,该二硫键由于邻近的苯环和甲基而在“空间上受阻”。认为二硫键的空间位阻发挥了保护键不被可存在于组织和血液中的硫醇盐阴离子(例如谷胱甘肽)攻击的功能,并且从而有助于防止缀合物在连

接的药剂递送到靶部位之前解偶联。

[0237] 与许多其他已知的交联试剂一样,SMPT交联试剂也能够使官能团例如半胱氨酸的SH或伯胺(例如,赖氨酸的ε氨基)交联。另一种可能的交联剂类型包括含有可切割二硫键的异-双官能光反应性叠氮基苯,例如磺基琥珀酰亚胺基-2-(对叠氮基水杨酰氨基)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯。N-羟基-琥珀酰亚胺基与伯氨基反应,并且叠氮基苯(光分解之后)非选择性地与任何氨基酸残基反应。

[0238] 除了受阻交联剂,非受阻交联剂也可据此使用。不考虑包含或产生被保护的二硫化物的话,其他有用的交联剂包括SATA、SPDP和2-亚氨基硫烷(Wawrzynczak&Thorpe,1987)。这样的交联剂的使用是本领域中非常了解的。另一个实施方案涉及使用柔性接头。

[0239] 美国专利4,680,338描述了可用于产生配体与含胺聚合物和/或蛋白质的缀合物,特别是用于与螯合剂、药物、酶、可检测标记等形成抗体缀合物的双官能接头。美国专利5,141,648和5,563,250公开了包含在多种温和条件下可切割之不稳定键的可切割缀合物。这种接头特别可用,因为目的药剂可直接与接头键合,并且其切割导致活性剂的释放。特别的用途包括向蛋白质例如抗体或药物添加游离氨基或游离巯基。

[0240] 美国专利5,856,456提供了用于连接多肽成分以制备融合蛋白(例如,单链抗体)的肽接头。接头的长度为多至约50个氨基酸;包含带电氨基酸(优选精氨酸或赖氨酸)接着是脯氨酸,出现至少一次;并且以更高的稳定性和聚集降低为特征。美国专利5,880,270公开了可用于多种免疫诊断和分离技术的含氨基氧基接头。

[0241] E.多特异性抗体

[0242] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体是双特异性或多特异性的。双特异性抗体是对至少两个不同表位具有结合特异性的抗体。示例性的双特异性抗体可与单一抗原的两个不同表位结合。其他这样的抗体可将第一抗原结合位点与第二抗原的结合位点组合。或者,可将抗病原体臂与和白细胞上的触发分子例如T细胞受体分子(例如CD3)或IgG的Fc受体(FcγR),例如FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)和FcγRIII(CD16)结合的臂组合,以便将细胞防御机制集中和定位至受感染细胞。双特异性抗体也可用于将细胞毒性剂定位于受感染细胞。这些抗体具有病原体结合臂和与细胞毒性剂(例如,皂草毒蛋白(saporin)、抗干扰素-α、长春花生物碱、蓖麻毒蛋白A链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)结合的臂。可将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段(例如F(ab')2双特异性抗体)。WO 96/16673描述了双特异性抗ErbB2/抗FcγRIII抗体,并且美国专利No.5,837,234公开了双特异性抗ErbB2/抗FcγRI抗体。WO98/02463中示出了双特异性抗ErbB2/Fcα抗体。美国专利No.5,821,337教导了双特异性抗ErbB2/抗CD3抗体。

[0243] 用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统产生基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条链具有不同的特异性(Millstein et al.,Nature,305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分类,因此这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))产生了十种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和色谱步骤而完成的正确分子的纯化相当繁琐,并且产物产率低。在WO 93/08829和Traunecker et al.,EMBO J.,10:3655-3659(1991)中公开了类似的操作。

[0244] 根据不同的方法,将具有期望结合特异性(抗体-抗原组合位点)的抗体可变区与

免疫球蛋白恒定结构域序列融合。优选地，融合是与Ig重链恒定结构域(包含铰链区、$C_{H2}$区和$C_{H3}$区的至少一部分)进行的。优选使得包含轻链键合所必需位点的第一重链恒定区($C_{H1}$)存在于至少一个融合物中。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如果期望的话)免疫球蛋白轻链的DNA插入到分开的表达载体中，并共转染到合适的宿主细胞中。在当构建中使用的不等比率的三条多肽链提供了期望双特异性抗体的最佳产率时的一些实施方案中，这为调节三个多肽片段的相互比例提供了更大的灵活性。然而，当至少两条多肽链以相等比率的表达导致高产率时，或者当比率对所期望链组合的产率没有显著影响时，可将两条或全部三条多肽链的编码序列插入到单个表达载体中。

[0245] 在该方法的一个具体实施方案中，双特异性抗体由一个臂中的具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一个臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。已发现，这种不对称结构有助于从不期望的免疫球蛋白链组合中分离期望的双特异性化合物，因为仅在双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链提供了简易的分离方式。该方法在WO 94/04690中公开。对于产生双特异性抗体的另外的详细信息，参见例如Suresh et al.,Methods Enzymol.,121:210(1986)。

[0246] 根据美国专利No.5,731,168中描述的另一种方法，可对一对抗体分子之间的界面进行改造，以使从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包括$C_{H3}$结构域的至少一部分。在该方法中，将来自第一抗体分子的界面的一个或更多个小氨基酸侧链替换为较大的侧链(例如，酪氨酸或色氨酸)。通过将大的氨基酸侧链替换为较小的侧链(例如，丙氨酸或苏氨酸)，在第二抗体分子的界面上产生了与一种或更多种大的侧链相同或类似尺寸的补偿“腔”。这提供了提高异二聚体的产率而不是其他不期望的最终产物(例如同二聚体)的产率的机制。

[0247] 双特异性抗体包括交联或“异缀合”抗体。例如，异缀合物中的一种抗体可与抗生物素蛋白偶联，另一种与生物素偶联。例如，已提出这样的抗体以将免疫系统细胞靶向不期望的细胞(美国专利No.4,676,980)，以及用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373和EP 03089)。杂缀合物抗体可使用任何方便的交联方法来制成。合适的交联剂是本领域公知的，并连同许多交联技术一起在美国专利No.4,676,980中公开。

[0248] 关于从抗体片段产生双特异性抗体的技术也已在文献中描述。例如，可使用化学键联来制备双特异性抗体。Brennan et al.,Science,229:81(1985)描述了这样的操作，其中完整的抗体被蛋白水解切割以产生$F(ab')_2$片段。这些片段在二硫醇络合剂亚砷酸钠的存在下被还原，以稳定邻位二硫醇并阻止分子间二硫化物形成。然后将产生的Fab’片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原将一种Fab’-TNB衍生物重新转化为Fab’-硫醇，并与等摩尔量的另一种Fab’-TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作用于选择性固定酶的试剂。

[0249] 存在促进从大肠杆菌直接回收Fab’-SH片段的技术，该片段可进行化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby et al.,J.Exp.Med.,175:217-225(1992)描述了人源化双特异性抗体$F(ab')_2$分子的产生。每个Fab’片段单独从大肠杆菌中分泌出，并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够与过表达ErbB2受体的细胞和正常人T细胞结合，以及触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳腺肿瘤靶标的裂解活性。

[0250] 还已描述了用于直接从重组细胞培养物制备并分离双特异性抗体片段的多种技

术(Merchant et al.,Nat.Biotechnol.16,677-681(1998).doi:10.1038/nbt0798-677pmid:9661204)。例如,已使用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体(Kostelny et al.,J.Immunol.,148(5):1547-1553,1992)。通过基因融合,将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的Fab'部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原以形成单体,然后再氧化以形成抗体异二聚体。该方法也可用于产生抗体同二聚体。Hollinger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)描述的"双抗体"技术为制备双特异性抗体片段提供了替代机制。片段包含通过接头与$V_L$连接的$V_H$,该接头太短而无法允许在同一链上的两个结构域之间的配对。因此,一个片段的$V_H$和$V_L$结构域被迫与另一片段的互补的$V_L$和$V_H$结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。还已报道了通过使用单链Fv(sFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber et al.,J.Immunol.,152:5368(1994)。

[0251] 在一个具体实施方案中,双特异性或多特异性抗体可形成为DOCK-AND-LOCK™(DNL™)复合物(参见,例如,美国专利7,521,056;7,527,787;7,534,866;7,550,143和7,666,400,其各自的实施例部分通过引用并入本文)。通常来说,该技术利用了在cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)的调节(R)亚基的二聚化及对接结构域(dimerization and docking domain,DDD)序列与来源于多种AKAP蛋白中任何一种的锚定结构域(anchor domain,AD)序列之间发生的特异性和高亲和力结合相互作用(Baillie et al.,FEBS Letters.2005;579:3264;Wong and Scott,Nat.Rev.Mol.Cell Biol.2004;5:959)。DDD和AD肽可与任何蛋白质、肽或其他分子连接。由于DDD序列自发地二聚化并与AD序列结合,因此该技术允许在可与DDD或AD序列连接的任何选择的分子之间形成复合物。

[0252] 考虑了具有多于二价的抗体。例如,可制备三特异性抗体(Tutt et al.,J.Immunol.147:60,1991;Xu et al.,Science,358(6359):85-90,2017)。多价抗体可比二价抗体更快速地被表达抗体与其结合的抗原的细胞内化(和/或分解代谢)。本公开内容的抗体可以是具有三个或更多个抗原结合位点的多价抗体(例如四价抗体),其可通过重组表达编码抗体多肽链的核酸来容易地产生。多价抗体可包含二聚化结构域以及三个或更多个抗原结合位点。优选的二聚化结构域包含Fc区或铰链区(或由其组成)。在这种情况下,抗体将包含Fc区和Fc区氨基末端的三个或更多个抗原结合位点。本文中优选的多价抗体包含3个至约8个,但优选4个抗原结合位点(或由其组成)。多价抗体包含至少一条多肽链(并且优选两条多肽链),其中该一条或更多条多肽链包含两个或更多个可变区。例如,一条或更多条多肽链可包含VD1-$(X1)_n$-VD2-$(X2)_n$-Fc,其中VD1是第一可变区,VD2是第二可变区,Fc是Fc区的一条多肽链,X1和X2代表氨基酸或多肽,并且n为0或1。例如,一条或更多条多肽链可包含VH-CH1-柔性接头-VH-CH1-Fc区链;或VH-CH1-VH-CH1-Fc区链。本文中的多价抗体优选地还包含至少2个(并且优选4个)轻链可变区多肽。本文中的多价抗体可例如包含约2至约8个轻链可变区多肽。在此考虑的轻链可变区多肽包含轻链可变区,并且任选地还包含$C_L$结构域。

[0253] 电荷修饰特别可用于多特异性抗体的情况,其中Fab分子中的氨基酸替换导致轻链与不匹配重链的错配(本-周型(Bence-Jones-type)副产物)降低,这可在基于Fab的双/多特异性抗原结合分子的产生中发生,所述分子的结合臂中的一个(或更多个,在分子包含多于两个抗原结合Fab分子的情况下)具有VH/VL交换(另见PCT公开no.WO 2015/150447,特别是其中的实施例,通过引用整体并入本文)。

[0254] 因此,在一些具体实施方案中,治疗剂中所包含的抗体包含

[0255] (a)与第一抗原特异性结合的第一Fab分子

[0256] (b)与第二抗原特异性结合的第二Fab分子,并且其中Fab轻链和Fab重链的可变结构域VL和VH彼此替换,

[0257] 其中所述第一抗原是活化T细胞抗原且所述第二抗原是靶细胞抗原,或者所述第一抗原是靶细胞抗原且所述第二抗原是活化T细胞抗原;并且

[0258] 其中

[0259] i)在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CL中,第124位氨基酸被带正电荷的氨基酸替换(根据Kabat编号),并且其中在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CH1中,第147位氨基酸或第213位氨基酸被带负电荷的氨基酸替换(根据Kabat EU索引编号);或者

[0260] ii)在b)中的所述第二Fab分子的恒定结构域CL中,第124位氨基酸被带正电荷的氨基酸替换(根据Kabat编号),并且其中在b)中的所述第二Fab分子的恒定结构域CH1中,第147位氨基酸或第213位氨基酸被带负电荷的氨基酸替换(根据Kabat EU索引编号)。

[0261] 抗体可不包含i)和ii)中提到的两种修饰。所述第二Fab分子的恒定结构域CL和CH1不彼此替换(即保持未交换)。

[0262] 在抗体的另一个实施方案中,在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CL中,第124位氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)替换(根据Kabat编号)(在一个优选实施方案中独立地被赖氨酸(K)或精氨酸(R)替换),并且在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CH1中,第147位氨基酸或第213位氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)替换(根据Kabat EU索引编号)。

[0263] 在另一个实施方案中,在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CL中,第124位氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)替换(根据Kabat编号),并且在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CH1中,第147位氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)替换(根据Kabat EU索引编号)。

[0264] 在一个具体实施方案中,在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CL中,第124位氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)替换(根据Kabat编号)(在一个优选实施方案中独立地被赖氨酸(K)或精氨酸(R)替换)并且第123位氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)替换(根据Kabat编号)(在一个优选实施方案中独立地被赖氨酸(K)或精氨酸(R)替换),并且在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CH1中,第147位氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)替换(根据Kabat EU索引编号)并且第213位氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)替换(根据Kabat EU索引编号)。

[0265] 在一个更具体的实施方案中,在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CL中,第124位氨基酸被赖氨酸(K)替换(根据Kabat编号)并且第123位氨基酸被赖氨酸(K)或精氨酸(R)替换(根据Kabat编号),并且在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CH1中,第147位氨基酸被谷氨酸(E)替换(根据Kabat EU索引编号)并且第213位氨基酸被谷氨酸(E)替换(根据Kabat EU索引编号)。

[0266] 在一个甚至更具体的实施方案中,在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CL中,第124位氨基酸被赖氨酸(K)替换(根据Kabat编号)并且第123位氨基酸被精氨酸(R)替换(根据Kabat编号),并且在a)中的所述第一Fab分子的恒定结构域CH1中,第147位氨基酸被

谷氨酸(E)替换(根据Kabat EU索引编号)并且第213位氨基酸被谷氨酸(E)替换(根据Kabat EU索引编号)。

[0267] F.纯化

[0268] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以是经纯化的。如本文中使用的术语“纯化的”意在指可与其他组分分离的组合物,其中蛋白质被纯化至相对于其可天然获得状态的任何程度。因此,经纯化的蛋白质也指这样的蛋白质,其脱离了其可天然存在的环境。当使用术语“基本上纯化的”时,该指定是指这样的组合物,其中蛋白质或肽形成该组合物的主要组分,例如构成组合物中蛋白质的约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多。

[0269] 蛋白质纯化技术是本领域技术人员公知的。这些技术在一个水平上涉及将细胞环境粗分级至多肽级分和非多肽级分。在使多肽与其他蛋白质分离之后,可使用色谱和电泳技术进一步纯化目的多肽以实现部分纯化或完全纯化(或纯化至均质)。特备适合制备纯肽的分析方法是离子交换色谱、排阻色谱;聚丙烯酰胺凝胶电泳;等电聚集。其他用于蛋白质纯化的方法包括用硫酸铵、PEG、抗体等或通过热变性进行沉淀,然后进行离心;凝胶过滤、反相、羟基磷灰石和亲和色谱;以及这些技术与其他技术的组合。

[0270] 在纯化本公开内容的抗体中,可需要在原核或真核表达系统中表达多肽并使用变性条件提取蛋白质。可使用与多肽的标记部分结合的亲和柱从其他细胞组分纯化多肽。如本领域中通常已知的,认为进行各纯化步骤的顺序可改变,或者可省略某些步骤,并且仍然获得适合制备基本上纯化的蛋白质或肽的方法。

[0271] 通常,使用与抗体的Fc部分结合的试剂(即,蛋白A)对完全抗体进行分级。或者,可使用抗原以同时纯化和选择合适的抗体。这样的方法通常使用结合在支持物(例如柱、过滤器或珠)上的选择剂。使抗体与支持物结合,除去(例如,冲洗掉)污染物,并通过施加条件(盐、热等)释放抗体。

[0272] 根据本公开内容,本领域技术人员将知道多种用于对蛋白质或肽之纯化程度进行定量的方法。这些包括例如确定活性级分的比活性,或者通过SDS/PAGE分析来评估级分中多肽的量。另一种用于评估级分纯度的方法是计算级分的比活性,将其与初始提取物的比活性比较,并且因此计算纯度。当然,用于表示活性量的实际单位将取决于根据纯化而选择的特定测定技术,以及所表达蛋白质或肽是否表现出可检测活性。

[0273] 已知多肽的迁移可随着不同的SDS/PAGE条件而改变,有时候显著地改变(Capaldi et al.,1977)。因此,应理解的是,在不同的电泳条件下,纯化的或部分纯化的表达产物的表观分子量可改变。

[0274] III.Tau肽表位

[0275] 本发明人已经鉴定了许多tau片段,他们认为这些tau片段将证明可用于产生用于诊断和被动免疫接种的抗体以及用于在对象中产生治疗性和/或保护性免疫应答的活性疫苗。这两种方法都在本文件的其他地方公开,并且那些公开内容在此并入。

[0276] 本文中描述的肽代表在tau的致病形式的设置中预测具有独特暴露或结构的序列,并因此将代表将促进有效疫苗的产生和诊断免疫测定的重要表位。在肽表位列表下方是说明本发明人如何使用关于tau结构和构象的新兴信息来挑选肽序列和所述序列的非天然修饰来设计用于治疗和诊断二者的有效抗原的详细原理。公开的表位设计的总结如下:

[0277] R1/R3发夹

[0278] R1/R3发夹的N端部分

[0279] R1/R3发夹的C端部分

[0280] R2/R3发夹

[0281] R2/R3发夹的N端部分

[0282] R2/R3发夹的C端部分

[0283] R1/R2发夹

[0284] R1/R2发夹的N端部分

[0285] R1/R2发夹的C端部分

[0286] R3/R4发夹

[0287] R3/R4发夹的N端部分

[0288] R3/R4发夹的C端部分

[0289] R4发夹

[0290] R4发夹的N端部分

[0291] R4发夹的C端部分

[0292] 上面列出的发夹之间的间插片段

[0293] Tau274至311：

[0294] Tau274至311抗原内的片段

[0295] 从N端和C端二者截短的Tau274至311

[0296] Tau274至311抗原的构象突变体

[0297] 肽通常限定为不超过约100个残基的氨基酸聚合物。该最大长度当然可以更小，例如75个或更少的残基、50个或更少的残基、或37个残基。根据本公开的肽的最小长度为约5个残基，但可以是长度为至少6个残基、至少7个残基、至少10个残基或至少20个残基。最小和最大长度的范围可通过组合以上任何两个最小和最大尺寸来产生，例如但不限于6至38个残基、6至100个残基、6至50个残基、6至25个残基、10至30个残基等。肽也可包含全部L氨基酸、全部D氨基酸或L氨基酸和D氨基酸的混合。肽还可在指定或未指定位置包含氨基酸类似物，或在未指定位置包含非天然氨基酸。此外，考虑在特定位置处的保守替换。

[0298] 尽管大多数疫苗是基于目的蛋白的肽序列的概念(如下限定)开发的，但本发明人在此使用tau蛋白结构的新兴知识来鉴定捕获局部二级以及甚至三级结构的短氨基序列。这在某些实例(详述如下，参见反式脯氨酸肽)中可涉及非天然多肽序列的产生。捕获特定构象状态下的抗原产生针对tau蛋白致病性构象的特异性。因此，除纯氨基酸序列之外，本文中肽的定义还捕获结构信息。

[0299] 肽可通过使用DNA构建体的表达来产生，如全长蛋白质一样。然而，由于其长度较短，可采用化学合成。在有机化学中，肽合成是肽的产生，所述肽即其中多个氨基酸通过酰胺键(也称为肽键)连接的化合物。肽通过一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基的缩合反应化学合成。保护基团策略通常是必要的，以防止与多种氨基酸侧链发生不期望的副反应。化学肽合成最常从肽的羧基端(C端)开始，并向氨基端(N端)进行。活的生物体中的蛋白质生物合成(长肽)以相反的方向发生。

[0300] 肽的化学合成可使用经典的溶液相技术进行，但是这些在大多数研究和开发环境

中已被固相方法(见下文)取代。然而,溶液相合成在大规模产生用于工业目的的肽中保留其可用性。

[0301] 化学合成促进了难以在细菌中表达的肽的产生、非天然氨基酸的并入、肽/蛋白质骨架修饰以及由D-氨基酸组成的D-蛋白质的合成。

[0302] 用于在实验室中产生合成肽的既定方法称为固相肽合成(solid-phase peptide synthesis,SPPS)。由Robert Bruce Merrifield首创的SPPS允许通过氨基酸衍生物在不溶性多孔支持物上的连续反应来迅速组装肽链。

[0303] 固体支持物由与新生肽链连接的反应基团(例如胺基或羟基)官能化的小聚合树脂珠组成。由于肽在整个合成期间保持与支持物共价连接,因此可通过洗涤和过滤去除多余的试剂和副产物。该方法避免了在每个反应步骤之后相对耗时地从溶液中分离产物肽,而这在使用常规溶液相合成时将是必需的。

[0304] 与肽链N端偶联的每个氨基酸必须使用适当的保护基(例如使用Boc(酸不稳定)或Fmoc(碱不稳定),取决于侧链和使用的保护策略)在其N端和侧链上进行保护。

[0305] 一般的SPPS程序是交替的N端去保护和偶联反应的重复循环之一。可在每个步骤之间洗涤树脂。首先将氨基酸偶联至树脂。随后,将胺去保护,并然后与第二个氨基酸的游离酸偶联。重复该循环,直到已经合成了期望的序列。SPPS循环还可包括封端步骤,其阻止未反应的氨基酸末端发生反应。在合成结束时,粗肽从固体支持物上切割,而同时使用强酸(如三氟乙酸或亲核试剂)去除所有保护基。粗肽可从非极性溶剂(如乙醚)中沉淀出来,以去除有机可溶性副产物。可使用反相HPLC纯化粗肽。纯化过程,尤其是较长肽的纯化过程可具有挑战性,因为必须去除少量与产物非常类似的数种副产物。出于这个原因,所谓的连续色谱(例如MCSGP)越来越多地被用于商业环境,以在不牺牲纯度水平的情况下使产率最大化。

[0306] SPPS受到反应产率的限制,并且通常70个氨基酸范围内的肽和蛋白质挺近了合成可及性的极限。合成难度也是序列依赖性的;通常,易于聚集的序列(例如淀粉样蛋白)难以制备。更长的长度可通过使用连接方法获得,例如天然化学连接,其中两个较短的完全去保护的合成肽可在溶液中连接在一起。

[0307] 使SPPS能够广泛应用的一个重要特征是在偶联步骤中产生极高的产率。需要高效的酰胺键形成条件,并且应添加过量的每种氨基酸(2至10倍)。偶联期间氨基酸外消旋化的最小化对于避免最终肽产物中的差向异构化也至关重要。

[0308] 胺和羧酸之间的酰胺键形成是缓慢的,并因此通常需要“偶联剂”或“活化剂”。羧基的活化通常涉及原位形成“活性酯”。

[0309] 碳二亚胺,例如二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide,DCC)和二异丙基碳二亚胺(diisopropylcarbodiimide,DIC)经常用于酰胺键形成。该反应通过形成高反应性的O-酰基异脲进行。该反应性中间体受到肽N端胺的攻击,形成肽键。O-酰基异脲的形成在非极性溶剂例如二氯甲烷中进行得最快。

[0310] DIC特别可用于SPPS,因为它作为液体很容易分配,并且尿素副产物(N,N’-二异丙基碳二亚胺容易被洗掉。相反,相关的碳二亚胺1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)通常用于溶液相肽偶联,因为其尿素副产物可通过在水处理期间洗涤来去除。

[0311] 碳二亚胺活化开启了对于活化氨基酸的外消旋化的可能性。外消旋化可用“外消

旋化抑制”添加剂，例如三唑1-羟基-苯并三唑(HOBt)和1-羟基-7-氮杂-苯并三唑(HOAt)来避免。这些试剂攻击O-酰基异脲中间体以形成活性酯，其随后与肽反应形成期望的肽键。氰基羟基亚氨基乙酸乙酯(Oxyma)是一种用于碳二亚胺偶联的添加剂，充当HOAt的替代物。

[0312] 一些偶联剂完全省去了碳二亚胺，并且并入了HOAt/HOBt部分作为非亲核阴离子(四氟硼酸盐或六氟磷酸盐)的铵盐/脲盐或鏻盐。胺/脲试剂的一些实例包括HATU(HOAt)、HBTU/TBTU(HOBt)和HCTU(6-ClHOBt)。HBTU和TBTU的区别仅在于阴离子的选择。鏻试剂包括PyBOP(HOBt)和PyAOP(HOAt)。

[0313] 这些试剂形成与碳二亚胺活化条件相同的活性酯物质，但初始活化步骤的速率不同，这由偶联剂的碳骨架的性质决定。此外，胺/脲试剂能够与肽N端反应形成无活性的胍基副产物，而鏻试剂则不能。

[0314] 针对物理稳定性选择用于肽合成的固体支持物，以允许迅速过滤液体。合适的支持物对SPPS期间使用的试剂和溶剂是惰性的，但是其必须在所使用的溶剂中溶胀以允许试剂渗透并允许连接第一个氨基酸。

[0315] 三种主要类型的固体支持物是:凝胶型支持物、表面型支持物和复合物。用于肽合成的固体支持物的改善增强了其在SPPS的去保护步骤期间承受重复使用TFA的能力。根据是否期望C端羧酸或酰胺来使用两种主要树脂。截至1996年，Wang树脂是用于具有C端羧酸的肽最常用的树脂。

[0316] Tau蛋白聚集是阿尔茨海默病和相关tau蛋白病中神经变性的基础。Tau有6种同种型，所有这些同种型都可在病理性组装或聚集中找到。根据剪接，这些包括0、1或2个N端结构域，以及3或4个重复结构域序列(表A)。

[0317] 表A-基于包含/排除N和R结构域的6种tau同种型的命名

[0318]

| 0,1,2 N | 3,4 R | Tau命名 |
|---|---|---|
| 0 | 3 | 0N3R |
| 1 | 3 | 1N3R |
| 2 | 3 | 2N3R |
| 0 | 4 | 0N4R |
| 1 | 4 | 1N4R |
| 2 | 4 | 2N4R |

[0319] 来自阿尔茨海默病和神经退行性疾病中心(Center for Alzheimer’s and Neurodegenerative Diseases)的最近工作表明，tau蛋白，而不是天然非结构化的，实际上占据了不同的构象集合。一类结构在健康对照中发现，并且在蛋白质聚集的生化测定中是相对惰性的(本文中称为$M_i$)。第二类是在tau病理学的情况下发现的，并且代表“具有接种能力(seed-competent)”、能够自组装并充当构象模板将惰性tau单体转变为聚集状态的结构(本文中称为$M_s$)。在Mirbaha et al.(2018)中，发明人使用交联质谱(cross-linking with mass spectrometry,XL-MS)来确定特定的分子内接触区分$M_i$和$M_s$。这与暴露两个淀粉样蛋白形成序列VQIINK(SEQ ID NO:3)和VQIVYK(SEQ ID NO:1)的tau重复结构域(RD，由3或4个R序列组成)内的构象变化相关。这些序列存在于在4R tau的R2/R3和R3/R4连接处存在的预测发夹结构内。另外的预测发夹存在于R1/R2、R4/R’(紧接在C端至第四个重复序列

的序列)和缺少R2区域的3R tau环境中的R1/R3的连接处之间。最近的工作表明,这些发夹结构在$M_s$的环境中不稳定。这预测在这些结构之内和周围的序列将代表重要的治疗和诊断靶标。

[0320] 肽的具体类别如下所示:

[0321] 1.在P301处包含非天然氨基酸(特别是反式脯氨酸)的表位将产生针对检测和治疗病理构象的tau的特异性。已发表(Mirbaha et al.,2018)和未发表(Drombosky,Biorxiv 2018)的结构生物学研究表明,病理构型的tau将与反式构型的P301一起存在。这预示着特异性地包含这种结构的表位将成为用于免疫治疗(被动和主动疫苗)以及用于脊髓液或血液的诊断测试的优异的靶标。为了包含足够的蛋白质部分,本发明人预测第294至311位aa将是最有效的。

[0322] 2.包含整个tau蛋白的发夹结构的表位将是重要的待靶向残基。本发明人关于tau中发夹结构的工作表明,存在掩蔽蛋白质中易于聚集的序列的“看门人(gatekeeper)”序列。他们预测,在疾病状态下,看门人序列将揭开易于聚集的序列。这将允许在看门人序列和易于聚集的序列二者上的表位暴露,这将成为用于诊断和治疗的强大靶标。在这些位点利用反式脯氨酸残基的非天然表位将代表重要的治疗途径。

[0323] 3.包含第130至160位aa的表位将代表与病理形式的tau反应的重要靶标。在Mirbaha et al.(2018)中阐明的XL-MS研究表明,当tau从惰性形式(Mi)转变为具有接种能力的形式(Ms)时,tau的一个区域经历显著的构象变化。这涉及重复结构域内第140至150位aa之间的接触。这表明肽中显著的构象变换。本发明人预测这将揭示与治疗性或诊断性抗体进行相互作用的新氨基酸。包含侧翼肽使潜在的肽靶标范围达到130至160。

[0324] 4.特异性pSer262与病理形式的tau单体独特相关。本发明人预测,在治疗和诊断应用中,包含这种磷酸残基的表位将在区分病理性tau与正常形式中起预测作用。这是基于对来自小鼠和人脑样品的病理性与正常tau单体的质谱分析。

[0325] 下表提供了根据本公开内容的示例性tau肽序列:

[0326] 表B-TAU肽

**1) R2/R3 发夹(295-311):**

**295-311**
**DNIKHVPGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 4)**

**295-311 P301L**
**DNIKHVLGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 5)**

**295-311 P301S**
**DNIKHVSGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 6)**

**295-311 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)**
**DNIKHV[4S-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 7)**

**295-311 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)**
**DNIKHV[4R-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 8)**

[0327] **2) R2/R3 发夹的N端片段 (295-305):**

**295-305**
**DNIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 9)**

**295-305 (P301L)**
**DNIKHVLGGGS (SEQ ID NO: 10)**

**295-305 (P301S)**
**DNIKHVSGGGS (SEQ ID NO: 11)**

**295-305 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)**
**DNIKHV[4S-FPro] GGGS (SEQ ID NO: 12)**

**295-305 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)**
**DNIKHV[4R-FPro] GGGS (SEQ ID NO: 13)**

**3) R2/R3 发夹的C端片段(300-311):**

300-311
VPGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 14)

300-311 P301L
VLGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 15)

300-311 P301S
VSGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 16)

300-311 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
V[4S-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 17)

300-311 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)
V[4R-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 18)

4) R1/R2发夹(258- 或 263-281):

263-281
TENLKHQPGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 19)

263-281 (P270L)
TENLKHQLGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 20)

263-281 (P270S)
[0328] TENLKHQSGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 21)

263-281 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
TENLKHQ[4S-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 22)

263-281 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)
TENLKHQ[4R-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 23)

258-281 (pS262)
SKIGpSTENLKHQPGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 24)

258-281 (P270L)
SKIGpSTENLKHQLGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 25)

258-281 (P270S)
SKIGpSTENLKHQSGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 26)

258-281 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
SKIGpSTENLKHQ[4S-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 27)

258-281 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)
SKIGpSTENLKHQ[4R-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 28)

5) R1/R2发夹的N端片段 (258- 或 263-274):

263-274
TENLKHQPGGGK (SEQ ID NO: 29)

263-274 (P270L)
TENLKHQLGGGK (SEQ ID NO: 30)

263-274 (P270S)
TENLKHQSGGGK (SEQ ID NO: 31)

263-274 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
TENLKHQ[4S-FPro]GGGK (SEQ ID NO: 32)

263-274 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)
TENLKHQ[4R-FPro]GGGK (SEQ ID NO: 33)

258-274 (pS262)
SKIGpSTENLKHQPGGGK (SEQ ID NO: 34)

258-274 (P270L)
SKIGpSTENLKHQLGGGK (SEQ ID NO: 35)

258-274 (P270S)
SKIGpSTENLKHQSGGGK (SEQ ID NO: 36)

[0329] 258-274 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
SKIGpSTENLKHQ[4S-FPro]GGGK (SEQ ID NO: 37)

258-274 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)
SKIGpSTENLKHQ[4R-FPro]GGGK (SEQ ID NO: 38)

6) R1/R2发夹的C端片段(269-281):

269-281
QPGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 39)

269-281 (P270L)
QLGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 40)

269-281 (P270S)
QSGGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 41)

269-281 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
Q[4S-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 42)

269-281 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)
Q[4R-FPro]GGGKVQIINKK (SEQ ID NO: 43)

7) R3/R4发夹(326-343):

326-343

GNIHHKPGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 44)

326-343 (P332L)
GNIHHKLGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 45)

326-343 (P332S)
GNIHHKSGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 46)

326-343 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
GNIHHK[4S-FPro]GGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 47)

326-343 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)
GNIHHK[4R-FPro]GGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 48)

8) R3/R4发夹的N端片段(326-336):

326-336
GNIHHKPGGGQ (SEQ ID NO: 49)

326-336(P332L)
GNIHHKLGGGQ (SEQ ID NO: 50)

326-336(P332S)
GNIHHKSGGGQ (SEQ ID NO: 51)

[0330]

326-336 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
GNIHHK[4S-FPro]GGGQ (SEQ ID NO: 52)

326-336(氟化4R-F-脯氨酸;反式)
GNIHHK[4R-FPro]GGGQ (SEQ ID NO: 53)

9) R3/R4发夹的C端片段(331-343):

331-343
KPGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 54)

331-343 (P332L)
KLGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 55)

331-343 (P332S)
KSGGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 56)

331-343 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
K[4S-FPro]GGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 57)

331-343 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)
K[4R-FPro]GGGQVEVKSEK (SEQ ID NO: 58)

10) R4发夹358-375:

358-375
DNITHVPGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 59)

358-375 (P364L)
DNITHVLGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 60)

358-375 (P364S)
DNITHVSGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 61)

358-375 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
DNITHV[4S-FPro]GGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 62)

358-375 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)
DNITHV[4R-FPro]GGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 63)

11) R4发夹的N端片段(358-368):

358-368
DNITHVPGGGN (SEQ ID NO: 64)

358-368 (P364L)
DNITHVLGGGN (SEQ ID NO: 65)

358-368 (P364S)
DNITHVSGGGN (SEQ ID NO: 66)

[0331]

358-368 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
DNITHV[4S-FPro]GGGN (SEQ ID NO: 67)

358-368 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)
DNITHV[4R-FPro]GGGN (SEQ ID NO: 68)

12) R4发夹的C端片段(363-375):

363-375
VPGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 69)

363-375 (P364L)
VLGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 70)

363-375 (P364S)
VSGGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 71)

363-375 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
V[4S-FPro]GGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 72)

363-375 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)
V[4R-FPro]GGGNKKIETHK (SEQ ID NO: 73)

13) 发夹之间的中间体片段

**231-242 TPPKSPSSAKSR (SEQ ID NO: 150)**

**237-255 SSAKSRLQTAPVPMPDLKN (SEQ ID NO: 151)**

**243-262 LQTAPVPMPDLKNVKSKIGS (SEQ ID NO: 74)**

**253-262 LKNVKSKIGS (SEQ ID NO: 75)**

**243-252 LQTAPVPMPD (SEQ ID NO: 76)**

**281-294 KLDLSNVQSKCGSK (SEQ ID NO: 77)**

**288-294 QSKCGSK (SEQ ID NO: 78)**

**281-287 KLDLSNV (SEQ ID NO: 79)**

**312-325 PVDLSKVTSKCGSL (SEQ ID NO: 80)**

**319-325 TSKCGSL (SEQ ID NO: 81)**

**312-318 PVDLSKV (SEQ ID NO: 82)**

**344-357 LDFKDRVQSKIGSL (SEQ ID NO: 83)**

[0332] **351-357 QSKIGSL (SEQ ID NO: 84)**

**344-350 LDFKDRV (SEQ ID NO: 85)**

**376-395 LTFRENAKAKTDHGAEIVYK (SEQ ID NO: 86)**

**385-395 KTDHGAEIVYK (SEQ ID NO: 87)**

**376-384 LTFRENAKA (SEQ ID NO: 88)**

**14) Tau274-311抗原内的片段:**

**274-288**
**KVQIINKKLDLSNVQ (SEQ ID NO: 89)**

**289-300**
**SKCGSKDNIKHV (SEQ ID NO: 90)**

**305-320**
**SVQIVYKPVDLSKVTS (SEQ ID NO: 91) (延伸超过原始抗原但保持VQIVYK后序列对称)**

**15) 从N端和C端两端截短Tau274-311:**

**C端截短**

KVQIINK (SEQ ID NO: 92)
KVQIINKKLDLSNVQSKC (SEQ ID NO: 93)
KVQIINKKLDLSNVQSKCGSK (SEQ ID NO: 94)
KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV (SEQ ID NO: 95)
KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 96)

N端截短

KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 97)
CGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 98)
PGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 99)

N端截短的构象变体

P301L
KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVLGGGSVQIVY (SEQ ID NO: 100)

P301L
CGSKDNIKHVLGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 101)

[0333]

P301S
KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVSGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 102)

P301S
CGSKDNIKHVSGGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 103)

(氟化4S-F-脯氨酸;顺式)
KLDLSNVQSKCGSKDNIKHV [4S-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 104)

(氟化4R-F-脯氨酸;反式)
KLDLSNVQSKCGSKDNIKHV [4R-FPro] GGGSVQIVYK (SEQ ID NO: 105)

16) Tau274-311抗原的构象突变体

274-311 (P301L)
KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV LGGGSVQIVY K (SEQ ID NO: 106)

274-311 (P301S)
KVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV SGGGSVQIVY K (SEQ ID NO: 107)

**274-311 (氟化4S-F-脯氨酸;顺式)**
**KVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV [4S-FPro] GGGSVQIVY K (SEQ ID NO: 108)**

**274-311 (氟化4R-F-脯氨酸;反式)**
**KVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV [4R-FPro] GGGSVQIVY K (SEQ ID NO: 109)**

**17) 3R**

**aa263-311: TENLKHQP GGGKVQIVY K (SEQ ID NO: 110)**

**18) 4R**

**aa18-34: YGL GDRKDQGGYT MHQD (SEQ ID NO: 111)**
**aa22-34: DRKDQGGYT MHQD (SEQ ID NO: 112)**
**aa22-38: RKDQGGYT MHQDQEGD (SEQ ID NO: 113)**
**aa131-141: SKDGTGSDDK K (SEQ ID NO: 114)**
**aa130-160: KSKDGTGSDDKKAKGADGKTK IATPRGAAPP (SEQ ID NO: 115)**
**aa263-281: TENLKHQP GGGKVQIINK K (SEQ ID NO: 116)**
**aa275-293: VQIINK KLDLSNVQSK CGS (SEQ ID NO: 117)**
**aa294-311: KDNIKHV PGGGSVQIVY K (SEQ ID NO: 118)**
[0334] **aa326-343: GNIHH KPGGGQVEVK SEK (SEQ ID NO: 119)**
**aa358-375: DNI THVPGGGNKK IETHK (SEQ ID NO: 120)**

**19) R1/R3 发夹(263-280)**

**263-281**
**TENLKHQPGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 121)**

**P270L 263-280**
**TENLKHQLGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 122)**

**P270S 263-2810**
**TENLKHQSGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 123)**

**263-280 (氟化4S-F-脯氨酸顺式)**
**TENLKHQ[4S-F-Pro cis]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 124)**

**263-280 (氟化4R-F-脯氨酸反式)**
**TENLKHQ[4R-F-Pro trans]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 125)**

**258-280**
**SKIGpSTENLKHQPGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 126)**

**P270L 258-280**
**SKIGpSTENLKHQLGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 127)**

**P270S 258-280**
**SKIGpSTENLKHQSGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 128)**

**258-280 (氟化4S-F-脯氨酸顺式)**
**SKIGpSTENLKHQ[4S-F-Pro cis]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 129)**

**258-280 (氟化4R-F-脯氨酸反式)**
**SKIGpSTENLKHQ[4R-F-Pro trans]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 130)**

**20) R1/R3 发夹的N端片段 (263-274)**

**263-274**
**TENLKHQPGGGK (SEQ ID NO: 131)**

**P270L 263-274**
**TENLKHQLGGGK (SEQ ID NO: 132)**

**P270S 263-274**
**TENLKHQSGGGK (SEQ ID NO: 133)**

**263-274 (氟化4S-F-脯氨酸顺式)**
**TENLKHQ[4S-F-Pro cis]GGGK (SEQ ID NO: 134)**

**263-274 (氟化4R-F-脯氨酸反式)**
**TENLKHQ[4R-F-Pro trans]GGGK (SEQ ID NO: 135)**

**258-274**
**SKIGpSTENLKHQPGGGK (SEQ ID NO: 136)**

[0335] **P270L 258-274**
**SKIGpSTENLKHQLGGGK (SEQ ID NO: 137)**

**P270S 258-274**
**SKIGpSTENLKHQSGGGK (SEQ ID NO: 138)**

**258-274 (氟化4S-F-脯氨酸顺式)**
**SKIGpSTENLKHQ[4S-F-Pro cis]GGGK (SEQ ID NO: 139)**

**258-274 (氟化4R-F-脯氨酸反式)**
**SKIGpSTENLKHQ[4R-F-Pro trans]GGGK (SEQ ID NO: 140)**

**21) R1/R3 发夹的C端片段 (269-280)**

**269-280**
**QPGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 141)**

**P270L 269-280**
**QLGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 142)**

**P270S 269-280**

**QSGGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 143)**

**269-280 (氟化4S-F-脯氨酸顺式)**
**Q[4S-F-Pro cis]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 144)**

**269-280 (氟化4R-F-脯氨酸反式)**
**Q[4R-F-Pro trans]GGGKVQIVYK (SEQ ID NO: 145)**

[0336] IV.主动/被动免疫接种和Tau蛋白病的治疗/预防

[0337] A.制剂和施用

[0338] 本公开提供了包含抗tau抗体和用于产生该抗体的抗原的药物组合物。这样的组合物包含预防或治疗有效量的抗体或其片段或者肽免疫原以及可药用载体。在一个具体实施方案中,术语“可药用的”意指由联邦或州政府的监管机构批准或者在美国药典或其他公认的药典中列出用于动物并且更特别地用于人。术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、赋形剂或载剂。这样的药用载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物是静脉内施用时,水是特定的载体。盐水溶液和右旋糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于可注射溶液。另一些合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0339] 如果需要的话,组合物还可包含少量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可采取溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、散剂、缓释制剂等形式。经口制剂可包含标准载体,例如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药用剂的一些实例在“Remington's Pharmaceutical Sciences”中描述。这样的组合物将包含预防或治疗有效量的抗体或其片段(优选以纯化的形式)以及合适量的载体,以便向患者提供用于适当施用的形式。制剂应适合于施用方式,其可以是经口、静脉内、动脉内、颊内、鼻内、雾化、支气管吸入、直肠内、经阴道、表面或通过机械通气递送。

[0340] 还设想了主动疫苗,其中抗体像所公开的那些抗体一样是在处于发生tau蛋白病风险之中的对象中体内产生的。这样的疫苗可配制成用于肠胃外施用,例如配制成用于通过皮内、静脉内、肌内、皮下或甚至腹膜内途径注射。考虑通过皮内和肌内途径施用。或者,疫苗可通过表面途径直接施用至粘膜,例如通过滴鼻剂、吸入、通过雾化器、或通过直肠内或阴道递送。可药用盐包括酸盐以及与以下形成的盐:无机酸,例如如盐酸或磷酸,或有机酸,例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等。与游离羧基形成的盐也可来源于无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或铁氢氧化物,以及有机碱,例如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。

[0341] 抗体的被动转移,称为人工获得的被动免疫,通常将涉及静脉内或肌内注射的使用。抗体的形式可以是人或动物血液血浆或血清,作为用于静脉内使用的合并人免疫球蛋白(IVIG)或肌内使用的合并人免疫球蛋白(IG),作为来自经免疫接种或来自从疾病中恢复的供体的高效价人IVIG或IG,以及作为单克隆抗体(MAb)。这样的免疫通常仅持续短的时间段,并且还存在对于超敏反应和血清病,尤其是来自于非人来源的γ-球蛋白的超敏反应和血清病的潜在风险。然而,被动免疫提供即时保护。抗体将被配制在适合于注射(即无菌且可注射)的载体中。

[0342] 通常来说,本公开内容的组合物的成分以单位剂型分开提供或混合在一起提供,例如作为在指示活性剂的量的密封容器(例如安瓿或药袋(sachette))中的干燥的冻干粉末或无水浓缩物提供。当组合物通过输注施用时,其可用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶进行分配。当组合物通过注射施用时,可提供一安瓿的无菌注射用水或盐水以便可在施用之前将成分混合。

[0343] 本公开内容的组合物可被配制为中性或盐形式。可药用盐包括与阴离子形成的那些,所述阴离子例如来源于盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些;以及与阳离子形成的

那些,所述阳离子例如来源于钠、钾、铵、钙、铁氢氧化物、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些。

[0344] 2.ADCC

[0345] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)是导致免疫效应细胞裂解抗体包被的靶细胞的一种免疫机制。靶细胞是抗体或其包含Fc区的片段通常通过该Fc区N端的蛋白质部分与之特异性结合的细胞。“具有提高/降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的抗体”意指如通过本领域普通技术人员已知的任何合适方法所确定的具有提高/降低的ADCC的抗体。

[0346] 本文中使用的术语“提高/降低的ADCC”定义为:在靶细胞周围的介质中的抗体的给定浓度下,通过如上定义的ADCC的机制,在给定时间内裂解的靶细胞数量的提高/降低;和/或在靶细胞周围的介质中,通过ADCC机制,在给定时间内实现给定数量的靶细胞裂解所需的抗体浓度的降低/提高。ADCC的提高/降低是相对于使用相同标准的产生、纯化、配制和储存方法(其是本领域技术人员已知的)由同一类型的宿主细胞(但其是未经改造的)产生的相同抗体介导的ADCC。例如,由通过本文中所述方法改造为具有改变的糖基化模式(例如,表达糖基转移酶GnTIII或其他糖基转移酶)的宿主细胞产生的抗体所介导的ADCC的提高是相对于由通过同一类型的未经改造宿主细胞产生的相同抗体介导的ADCC。

[0347] 3.CDC

[0348] 补体依赖性细胞毒性(CDC)是补体系统的功能。其是免疫系统中的过程,通过破坏病原体的膜来杀伤病原体而无需免疫系统的抗体或细胞的参与。存在三种主要过程。所有这三种过程都将一种或更多种攻膜复合物(membrane attack complex,MAC)插入病原体中,这引起致死的胶体-渗透肿胀,即CDC。

[0349] V.抗体缀合物

[0350] 本公开内容的抗体可与至少一种试剂连接以形成抗体缀合物。为了提高抗体分子作为诊断剂或治疗剂的效力,常规地与至少一种期望的分子或部分连接或共价结合或复合。这样的分子或部分可以是但不限于至少一种效应分子或报道分子。效应分子包括具有期望活性,例如细胞毒活性的分子。相比之下,报道分子被定义为可使用测定检测的任何部分。已经与抗体缀合的报道分子的一些非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、光亲和分子、着色颗粒或配体,例如生物素。

[0351] 通常优选使用抗体缀合物作为诊断剂。抗体诊断剂通常属于两类:用于体外诊断例如用于多种免疫测定的那些,以及用于通常称为“抗体指导的成像”的体内诊断方案的那些。许多合适的显像剂是本领域中已知的,其与抗体连接的方法也如此(参见,例如,美国专利5,021,236、4,938,948和4,472,509)。所使用的成像部分可以是顺磁性离子、放射性同位素、荧光染料、可NMR检测物质和X-射线显像剂。

[0352] 在顺磁性离子的情况下,可通过以下示例性离子来提及:例如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钕(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、锶(III)、镝(III)、钬(III)和/或铒(III),其中特别优选钆。在另一些情况(例如X-射线成像)下可用的离子包括但不限于镧(III)、金(III)、铅(II)和特别是铋(III)。

[0353] 在用于治疗和/或诊断应用的放射性同位素的情况下,可提及砹$^{211}$、$^{14}$碳、$^{51}$铬、$^{36}$氯、$^{57}$钴、$^{58}$钴、铜$^{67}$、$^{152}$Eu、镓$^{67}$、$^{3}$氢、碘$^{123}$、碘$^{125}$、碘$^{131}$、铟$^{111}$、$^{59}$铁、$^{32}$磷、铼$^{186}$、铼$^{188}$、$^{75}$硒、$^{35}$硫、

锝$^{99m}$和/或钇$^{90}$。在某些实施方案中通常优选使用$^{125}$I,并且也通常优选锝$^{99m}$和/或铟$^{111}$,因为其能量低和适用于长距离检测。本公开内容的放射性标记的单克隆抗体可根据本领域公知的方法产生。例如,可通过与碘化钠和/或碘化钾和化学氧化剂(例如次氯酸钠)或酶促氧化剂(例如乳过氧化物酶)接触来使单克隆抗体碘化。根据本公开内容的单克隆抗体可通过配体交换过程用锝$^{99m}$标记,例如,通过用亚锡溶液还原高锝酸盐,将还原的锝螯合到Sephadex柱上,并将抗体施加于该柱。或者,可使用直接标记技术,例如通过孵育高锝酸盐、还原剂(例如$SNCl_2$)、缓冲溶液(例如邻苯二甲酸钠钾溶液)和抗体进行。通常用于使作为金属离子存在的放射性同位素与抗体结合的中间官能团是二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0354] 在考虑作为缀合物使用的荧光标记之中包括Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、异硫氰酸荧光素、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、罗丹明绿、罗丹明红、肾造影剂(Renographin)、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明和/或德克萨斯红(Texas Red)。

[0355] 在本公开内容中考虑的另外类型的抗体是主要意图体外使用的那些,其中抗体与第二结合配体和/或在与显色底物接触之后产生着色产物的酶(酶标签)连接。合适的酶的一些实例包括脲酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶或葡萄糖氧化酶。优选的第二结合配体是生物素以及抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白化合物。这样的标记的使用对于本领域技术人员是公知的,并且在例如美国专利3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241中描述。

[0356] 分子与抗体的位点特异性连接的另一种已知方法包括使抗体与基于半抗原的亲和标记反应。实质上,基于半抗原的亲和标记与抗原结合位点中的氨基酸反应,从而破坏该位点并阻断特异性抗原反应。然而,这可能是不利的,因为其导致通过抗体缀合物的抗原结合丧失。

[0357] 包含叠氮基的分子也可用于经由通过低强度紫外光产生的反应性氮宾中间体来与蛋白质形成共价键(Potter and Haley,1983)。特别地,已经使用嘌呤核苷酸的2-叠氮类似物和8-叠氮类似物作为定点光探针以鉴定粗制细胞提取物中的核苷酸结合蛋白(Owens& Haley,1987;Atherton et al.,1985)。2-叠氮核苷酸和8-叠氮核苷酸还已被用于对经纯化蛋白质的核苷酸结合结构域进行图谱绘制(Khatoon et al.,1989;King et al.,1989;Dholakia et al.,1989)并且可用作抗体结合剂。

[0358] 用于使抗体与其缀合部分连接或缀合的数种方法是本领域中已知的。一些连接方法涉及使用金属螯合物复合物,其使用例如与抗体连接的有机螯合剂,例如二乙烯三胺五乙酸酐(DTPA);亚乙基三胺四乙酸;N-氯-对-甲苯磺酰胺;和/或四氯-3α-6α-二苯基甘脲-3(tetrachloro-3α-6α-diphenylglycouril-3)(美国专利4,472,509和4,938,948)。单克隆抗体还可在存在偶联剂例如戊二醛或高碘酸盐的情况下与酶反应。与荧光素标记的缀合物在存在这些偶联剂的情况下或通过与异硫氰酸酯反应来制备。在美国专利4,938,948中,使用单克隆抗体实现了乳腺肿瘤的成像并且使用接头例如甲基-对羟基苯甲亚氨酸酯或N-琥珀酰亚胺基-3-(4-羟基苯基)丙酸酯使可检测成像部分与抗体结合。

[0359] 在另一些实施方案中,考虑通过使用不改变抗体结合位点的反应条件选择性地将

巯基引入免疫球蛋白的Fc区中来使免疫球蛋白衍生化。据公开，根据这种方法产生的抗体缀合物表现出改善的寿命、特异性和灵敏度(美国专利5,196,066，其通过引用并入本文)。在文献中也已经公开了效应分子或报道分子的位点特异性连接，其中报道分子或效应分子与Fc区中的糖残基缀合(O'Shannessy et al.,1987)。已经报道该方法产生目前处于临床评价之中的在诊断和治疗方面有希望的抗体。

[0360] VI.免疫检测/诊断方法

[0361] 在另一些实施方案中，本公开内容涉及用于结合、纯化、去除、定量和以其他方式一般地检测tau蛋白及其相关抗原的免疫检测方法。虽然这样的方法可以在传统意义上应用，但另一种用途将是用于疫苗和其他病毒储液的质量控制和监测，其中根据本公开内容的抗体可用于评估病毒中抗原的量或完整性(即长期稳定性)。或者，该方法可用于筛选多种抗体的适当/期望反应性谱。

[0362] 其他免疫检测方法包括用于在对象中确定tau蛋白存在的特异性测定，例如用于诊断或区分tau蛋白病的目的。考虑了广泛多种测定形式，但具体地是将用于在从对象获得的流体(例如唾液、血液、血浆、痰、精液或尿)中检测tau蛋白的那些。可有利地对测定进行格式化以用于非健康护理(家庭)使用，包括类似于家庭妊娠测试的侧流测定(见下文)。这些测定可以以带有适当试剂的试剂盒的形式和说明书一起包装以允许家庭成员的对象使用。

[0363] 一些免疫检测方法包括酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)、放射免疫测定(radioimmunoassay,RIA)、免疫放射测定、荧光免疫测定、化学发光测定、生物发光测定和Western印迹等。特别地，还提供了用于检测和定量针对样品中特定寄生虫表位的tau抗体的竞争性测定。在科学文献例如Doolittle and Ben-Zeev(1999)、Gulbis and Galand(1993)、De Jager et al.(1993)和Nakamura et al.(1987)中已描述了多种可用免疫检测方法的步骤。通常来说，免疫结合方法包括获得怀疑含有tau蛋白的样品并根据本公开内容使样品与第一抗体接触，视情况而定，这在有效允许免疫复合物形成的条件下进行。

[0364] 这些方法包括用于从样品中纯化tau蛋白或相关抗原的方法。抗体将优选地连接至固体支持物，例如柱基质形式的固体支持物，并且将怀疑含有tau蛋白或抗原成分的样品应用于固定化抗体。不需要的成分将从柱上洗掉，使tau抗原免疫复合至固定化抗体，其然后通过从柱上去除生物体或抗原来收集。

[0365] 免疫结合方法还包括用于在样品中检测和定量tau蛋白或相关组分的量以及检测和定量在结合过程期间形成的任何免疫复合物的方法。在此，将获得怀疑含有tau蛋白或其相关抗原的样品，并使该样品与结合tau蛋白或其组分的抗体接触，随后检测并定量在特定条件下形成的免疫复合物的量。就抗原检测而言，所分析的生物样品可以是任何怀疑含有tau蛋白或相关抗原的样品，例如组织切片或试样，均质化组织提取物，生物流体包括血液和血清，或者分泌物例如粪便或尿。

[0366] 使所选生物样品与抗体在有效条件下接触并持续足以允许形成免疫复合物(初级免疫复合物)的时间通常是简单地将抗体组合物添加至样品并将混合物孵育足够长的时间以使抗体与存在的tau蛋白或相关抗原形成免疫复合物(即与之结合)的问题。在该时间之后，通常对样品-抗体组合物，例如组织切片、ELISA板、斑点印迹或Western印迹进行洗涤以

去除任何非特异性结合的抗体种类，从而允许只有特异性结合在初级免疫复合物中的那些抗体被检测到。

[0367] 通常来说，免疫复合物形成的检测是本领域中公知的，并且可通过应用多种方法来实现。这些方法通常基于标记或标志物(例如那些放射性标签、荧光标签、生物标签和酶标签中的任一种)的检测。有关使用这样的标记的专利包括美国专利3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241。当然，如本领域中已知的，通过使用第二结合配体例如第二抗体和/或生物素/抗生物素蛋白配体结合布置，可发现另外的优点。

[0368] 用于检测的抗体可本身与可检测标记连接，其中然后将简单地检测该标记，从而允许确定组合物中初级免疫复合物的量。或者，可通过对第一抗体具有结合亲和力的第二结合配体来检测结合在初级免疫复合物中的该抗体。在这些情况下，第二结合配体可与可检测标记连接。第二结合配体本身通常是抗体，其因此可称为“第二”抗体。使初级免疫复合物与经标记的第二结合配体或抗体在有效条件下接触并持续足以允许形成次级免疫复合物的时间。然后，通常洗涤次级免疫复合物以去除任何非特异性结合的经标记的第二抗体或配体，并且随后检测次级免疫复合物中的剩余标记。

[0369] 另一些方法包括通过两步法检测初级免疫复合物。如上所述，将对抗体具有结合亲和力的第二结合配体(例如抗体)用于形成次级免疫复合物。在洗涤之后，再次使次级免疫复合物与对第二抗体具有结合亲和力的第三结合配体或抗体在有效条件下接触并持续足以允许形成免疫复合物(三级免疫复合物)的时间。第三配体或抗体与可检测标记连接，从而允许检测由此形成的三级免疫复合物。如果期望的话，该系统可提供信号放大。

[0370] 一种免疫检测方法使用两种不同的抗体。将第一生物素化抗体用于检测靶抗原，并且然后将第二抗体用于检测与复合生物素连接的生物素。在该方法中，首先将待测试样品在包含第一步抗体的溶液中孵育。如果存在靶抗原，则一些抗体与抗原结合形成生物素化抗体/抗原复合物。然后通过在链霉抗生物素蛋白(或抗生物素蛋白)、生物素化DNA和/或互补生物素化DNA的连续溶液中孵育来扩大抗体/抗原复合物，其中每个步骤向抗体/抗原复合物添加另外的生物素位点。重复扩大步骤直至达到合适的扩大水平，此时将样品在包含针对生物素的第二步抗体的溶液中孵育。该第二步抗体是经标记的，如例如经酶标记的，所述酶可用于使用色原底物通过组织酶学来检测抗体/抗原复合物的存在。经过适当扩大，可产生宏观可见的缀合物。

[0371] 另一种已知的免疫检测方法利用免疫PCR(聚合酶链反应)方法。在与生物素化DNA一起孵育之前，PCR方法类似于Cantor方法，然而，作为使用多轮链霉抗生物素蛋白和生物素化DNA孵育的替代，将DNA/生物素/链霉抗生物素蛋白/抗体复合物用低pH或高盐缓冲液洗掉，这释放抗体。然后将所得洗涤溶液用于用合适的引物与合适的对照进行PCR反应。至少在理论上，PCR的巨大扩增能力和特异性可用于检测单抗原分子。

[0372] A.ELISA

[0373] 免疫测定在其最简单和直接的意义上是结合测定。某些优选的免疫测定是本领域中已知的多种类型的酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)。使用组织切片的免疫组织化学检测也特别有用。然而，将容易理解的是，检测不限于此类技术，并且也可使用western印迹、斑点印迹、FACS分析等。

[0374] 在一种示例性ELISA中，将本公开内容的抗体固定在表现出蛋白质亲和力的所选表面上，例如聚苯乙烯微量滴定板中的孔上。然后，向孔添加怀疑包含tau蛋白或相关抗原的受试组合物。在结合并洗涤以去除非特异性结合的免疫复合物之后，可检测结合的抗原。检测可通过添加与可检测标记连接的另外的抗tau抗体来实现。这种类型的ELISA是简单的“夹心ELISA”。检测也可通过添加第二抗tau抗体，随后添加对该第二抗体具有结合亲和力的第三抗体来实现，其中该第三抗体与可检测标记连接。

[0375] 在另一种示例性ELISA中，将怀疑包含tau抗原的样品固定在孔表面上，并随后与本公开内容的抗tau抗体接触。在结合并洗涤以去除非特异性结合的免疫复合物之后，检测结合的抗tau抗体。当初始抗tau抗体与可检测标记连接时，可直接检测免疫复合物。同样，可使用对第一抗tau抗体具有结合亲和力的第二抗体来检测免疫复合物，其中第二抗体与可检测标记连接。

[0376] 不论使用何种形式，ELISA都具有某些共同特征，例如包被、孵育和结合、洗涤以去除非特异性结合的物质以及检测结合的免疫复合物。以下对这些进行描述。

[0377] 在用抗原或抗体包被板中，通常用抗原或抗体的溶液孵育板的孔过夜或持续指定的一段时间。然后对板的孔进行洗涤以去除不完全吸附的物质。然后，将孔的任何剩余可用表面用相对于受试抗血清为抗原中性的非特异性蛋白质“包被”。这些包括牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或乳粉溶液。包被允许封闭固定表面上的非特异性吸附位点，并且因此降低由抗血清在表面上的非特异性结合引起的背景。

[0378] 在ELISA中，可能更习惯于使用二级或三级检测方法而不是直接操作。因此，在蛋白质或抗体与孔结合，用非反应性物质包被以降低背景，并洗涤以去除未结合的物质之后，使固定表面与待测试的生物样品在有效允许免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下接触。然后，免疫复合物的检测需要经标记的第二结合配体或抗体，以及与经标记的第三抗体或第三结合配体联合的第二结合配体或抗体。

[0379] “在有效允许免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下”意指该条件优选包括用溶液(例如BSA、牛丙种球蛋白(bovine gamma globulin，BGG)或磷酸缓冲盐水(phosphate buffered saline，PBS)/吐温)来稀释抗原和/或抗体。这些添加的试剂还倾向于有助于降低非特异性背景。

[0380] “合适的”条件还意指孵育在足以允许有效结合的温度或时间下进行。孵育步骤通常在优选为约25℃至27℃的温度下进行约1至2至4小时左右，或者可在约4℃左右下过夜进行。

[0381] 在ELISA中所有孵育步骤之后，洗涤接触的表面以去除未复合的物质。一个优选的洗涤过程包括用溶液例如PBS/吐温或硼酸盐缓冲液洗涤。在受试样品与最初结合物质之间形成特异性免疫复合物并随后进行洗涤之后，可确定甚至是微量的免疫复合物的出现。

[0382] 为了提供检测手段，第二或第三抗体具有缔合的标记以允许检测。优选地，这是在与合适的显色底物孵育之后产生显色的酶。因此，例如，期望在有利于发生进一步的免疫复合物形成的时间和条件下使初级和次级免疫复合物与脲酶、葡萄糖氧化酶、碱性磷酸酶或过氧化氢酶缀合的抗体接触或孵育(例如，在室温下在含有PBS的溶液(例如PBS-吐温)中孵育2小时)。

[0383] 在与经标记的抗体孵育并随后进行洗涤以去除未结合的物质之后，对标记的量进

行定量，例如通过与显色底物(例如尿素或溴甲酚紫或2,2'-联氮基-二-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)或$H_2O_2$(在过氧化物酶作为酶标记的情况下))一起孵育进行。然后通过测量产生的颜色的程度，例如使用可见光谱分光光度计实现定量。

[0384] 在另一个实施方案中，本公开内容考虑使用竞争形式。这特别可用于在样品中检测tau抗体。在基于竞争的测定中，未知量的分析物或抗体通过其置换已知量的经标记抗体或分析物的能力来确定。因此，信号的可量化损失指示样品中未知抗体或分析物的量。

[0385] B.Western印迹

[0386] Western印迹(或者，蛋白质免疫印迹)是用于在给定的组织匀浆或提取物样品中检测特定蛋白质的分析技术。其使用凝胶电泳通过多肽的长度(变性条件)或通过蛋白质的3-D结构(天然/非变性条件)来分离天然或变性的蛋白质。然后将蛋白质转移到膜(通常是硝酸纤维素或PVDF)上，在膜上使用对靶蛋白具有特异性的抗体对其进行探测(检测)。

[0387] 样品可取自整个组织或来自细胞培养物。在大多数情况下，首先使用搅拌器(用于较大的样品体积)、使用均化器(较小的体积)或通过声处理将实体组织机械破碎。细胞也可通过上述机械方法之一破裂。然而，应注意的是，细菌、病毒或环境样品可以是蛋白质的来源，并且因此Western印迹不仅限于细胞研究。可使用多种洗涤剂、盐和缓冲液来促进细胞裂解和使蛋白质溶解。通常添加蛋白酶和磷酸酶抑制剂以防止样品被其自身的酶消化。组织制备通常在低温下进行以避免蛋白质变性。

[0388] 使用凝胶电泳分离样品的蛋白质。蛋白质的分离可通过等电点(pI)、分子量、电荷或这些因素的组合来进行。分离的本质取决于样品的处理和凝胶的性质。这是确定蛋白质的非常有用的方法。也可使用二维(two-dimensional,2-D)凝胶，其将来自单个样品的蛋白质以两个维度散布。在第一维度中根据等电点(蛋白质具有中性净电荷时的pH)分离蛋白质，而在第二维度中根据其分子量分离蛋白质。

[0389] 为了使蛋白质易于进行抗体检测，将其从凝胶中移动到由硝酸纤维素或聚偏二氟乙烯(PVDF)制成的膜上。将膜放置在凝胶的顶部，并在其顶部放置一叠滤纸。将整叠放置在缓冲溶液中，该缓冲溶液通过毛细作用移动至纸上，从而使蛋白质随之移动。用于转移蛋白质的另一种方法称为电印迹，并且使用电流将蛋白质从凝胶拉到PVDF或硝酸纤维素膜中。蛋白质在维持其在凝胶中具有的组织的同时从凝胶中移动到膜上。作为该印迹过程的结果，蛋白质被暴露在薄的表面层上用于检测(参见下文)。选择这两种膜是因为其非特异性的蛋白质结合特性(即，同等良好地结合所有蛋白质)。蛋白质结合基于疏水性相互作用以及膜与蛋白质之间的带电相互作用。硝酸纤维素膜比PVDF便宜，但更加易脆而不能良好地经受反复探测。蛋白质从凝胶转移到膜上的均匀性和整体有效性可通过用考马斯亮蓝或丽春红S(Ponceau S)染料对膜进行染色来检查。一旦转移，就使用经标记的初级抗体或未经标记的初级抗体并随后使用经标记蛋白A或与初级抗体的Fc区结合的第二经标记抗体进行间接检测来检测蛋白质。

[0390] C.侧流测定

[0391] 侧流测定，也称为侧流免疫色谱测定，是旨在检测样品(基质)中目标分析物的存在(或不存在)而无需专用且昂贵的设备的简单装置，尽管存在许多由阅读设备支持的基于实验室的应用。通常来说，这些测试用作低资源医学诊断，用于家庭测试，即时检测(point of care testing)或实验室使用。广泛传播且公知的应用是家庭妊娠测试。

[0392] 该技术基于一系列毛细管床，例如多孔纸片或烧结聚合物。这些元件中的每一个都具有自发运输流体(例如尿)的能力。第一元件(样品垫)充当海绵并容纳过量的样品流体。一旦浸泡，流体就迁移至制造商已在其中储存所谓缀合物的第二元件(缀合垫)，所述缀合物是在盐-糖基质中干燥形式的生物活性颗粒(见下文)，该基质包含确保靶分子(例如抗原)与其已固定在颗粒表面上的化学配偶体(例如抗体)之间的优化化学反应的所有物质。在样品流体溶解盐-糖基质的同时，它还溶解颗粒，并且在一种组合的运输作用下，样品和缀合物在流过多孔结构的同时混合。以这种方式，分析物在进一步迁移通过第三毛细管床的同时与颗粒结合。该材料具有一个或更多个区域(通常称为条带(stripe))，制造商已将第三分子固定在该区域上。当样品-缀合物混合物到达这些条带时，分析物已结合在颗粒上，并且第三“捕获”分子结合复合物。一段时间之后，当越来越多的流体已通过条带时，颗粒积聚并且条带区域变色。通常来说，至少有两个条带：一个(对照)捕获任何颗粒，并从而表明反应条件和技术运行良好，第二个包含特定的捕获分子并且仅捕获已将分析物分子固定在其上的那些颗粒。在通过这些反应区之后，流体进入最终的多孔材料，芯(wick)，其仅充当废物容器。侧流测试可作为竞争性测定或夹心测定进行操作。侧流测定在美国专利6,485,982中公开。

[0393] D.免疫组织化学

[0394] 本公开内容的抗体还可与新鲜冷冻和/或福尔马林固定石蜡包埋的组织块二者联合使用，所述组织块为了通过免疫组织化学(immunohistochemistry，IHC)进行研究而制备。由这些颗粒状样本制备组织块的方法已成功用于多种预后因子的先前IHC研究中，并且是本领域技术人员公知的(Brown et al.，1990；Abbondanzo et al.，1990；Allred et al.，1990)。

[0395] 简言之，冷冻切片可通过以下来制备：在室温下在小塑料囊中的磷酸缓冲盐水(PBS)中将50ng冷冻的“粉碎”组织再水合；通过离心使颗粒沉淀；将其重悬在黏性包埋介质(OCT)中；将囊倒置和/或通过离心再次沉淀；在-70℃异戊烷中速冻；切割塑料囊和/或取出冷冻的组织圆柱状物；将组织圆柱状物固定在低温恒温切片机卡盘上；和/或从囊上切下25至50个连续切片。或者，可将整个冷冻的组织样品用于连续切片切割。

[0396] 可通过类似的方法制备永久切片，其包括在塑料微量离心管中将50mg样品再水合；沉淀；重悬于10％福尔马林中固定4小时；洗涤/沉淀；重悬于温热的2.5％琼脂中；沉淀；在冰水中冷却以使琼脂硬化；从管中取出组织/琼脂块；将块浸入和/或包埋在石蜡中；和/或切割多至50个连续的永久切片。同样，整个组织样品可替换。

[0397] E.免疫检测试剂盒

[0398] 在另一些实施方案中，本公开内容涉及与上述免疫检测方法一起使用的免疫检测试剂盒。由于抗体可用于检测tau抗原，因此试剂盒中可包含抗体。免疫检测试剂盒因此在合适的容器装置中包含结合tau抗原的第一抗体和任选地免疫检测试剂。

[0399] 在某些实施方案中，抗tau抗体可与固体支持物，例如柱基质和/或微量滴定板的孔预先结合。试剂盒的免疫检测试剂可采取多种形式中的任一种，包括与给定抗体缔合或连接的那些可检测标记。与第二结合配体缔合或连接的可检测标记也在考虑之中。示例性的第二配体是对第一抗体具有结合亲和力的那些第二抗体。

[0400] 用于本发明试剂盒的其他合适的免疫检测试剂包括双组分试剂，其包含对第一抗

体具有结合亲和力的第二抗体，以及对第二抗体具有结合亲和力的第三抗体，所述第三抗体与可检测标记连接。如上所述，许多示例性的标记在本领域中是已知的，并且所有这样的标记均可结合本公开内容使用。

[0401] 试剂盒还可包含适当等分的tau或相关抗原的组合物，例如包含本文中所述表位的肽，无论是标记的还是未标记的，如可用于制备用于检测测定的标准曲线那样。试剂盒可包含以完全缀合形式、以中间体形式或作为将由试剂盒使用者进行缀合的独立部分的抗体-标记缀合物。试剂盒的组分可包装在水性介质中或以冻干形式包装。

[0402] 试剂盒的容器装置通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其他容器装置，其中可放置抗体，或者优选将抗体适当地等分。本公开内容的试剂盒通常还包括用于封闭限制式容纳抗体、抗原和任何其他试剂容器以用于商业销售的装置。这样的容器可包括其中保持期望小瓶的注塑或吹塑的塑料容器。

[0403] VII.实施例

[0404] 包括以下实施例以表明本公开内容的一些具体实施方案。本领域技术人员应理解，以下实施例中公开的技术代表了本发明人发现在本公开内容的实施中良好发挥作用的技术，并且因此可被认为构成了用于其实践的具体模式。然而，本领域技术人员应理解，根据本公开内容，可对公开的具体实施方案进行许多改变并且仍然获得相同或类似的结果，而不脱离本公开内容的精神和范围。

[0405] 实施例1-材料和方法

[0406] 肽是根据本发明人关于在以PGGG基序为中心的R1/R2、R2/R3、R3/R4和R4末端的界面处形成抑制性发夹的知识设计的。设计策略的中心思想是发夹构象在重复结构域内观察到的可溶性和具有接种能力的构象之间发生变化。最初的策略在WT环境和突变体环境二者中捕获发夹周围的表位，但也并入促进顺式与反式构象之间转变的脯氨酸类似物([4S-FPro]和[4R-FPro])；顺式保护其免于聚集而反式是促聚集。除了探测完整的发夹之外，本发明人还改造了包含发夹左侧和右侧的表位-也许在这些情况下将不需要控制构象。某些抗原(14至16)包括275至311表位的简单扰动。

[0407] 实施例2-结果和讨论

[0408] Tau淀粉样蛋白形成受侧翼残基的控制。在tau蛋白中，$^{306}$VQIVYK$^{311}$(SEQ ID NO:1)序列是驱动淀粉样蛋白形成的关键基序。它在R3开头的tau重复结构域内编码(图1A)。在溶液中，如通过硫磺素T(Thioflavin T,ThT)荧光强度所测量的，$^{306}$VQIVYK$^{311}$(SEQ ID NO:1)六肽自发且迅速地聚集，而N端序列$^{295}$DNIKHV$^{300}$(SEQ ID NO:2)不聚集(图1B)。组合这些序列产生了从R2跨越至R3中的最小结构元件($^{295}$DNIKHVPGGGSVQIVYK$^{311}$(SEQ ID NO:4)，R2R3)，其通过计算机建模预测(图1A至C)。该序列也是许多疾病相关突变聚集的地方。实际上，代表该基序的WT肽片段不容易聚集，直至96小时都未检测到ThT(图1D)。相比之下，替换到R2R3肽片段中的疾病相关突变(图1D)足以产生自发的淀粉样蛋白形成：R2R3-P301S、R2R3-P301L、R2R3-N296Δ、R2R3-G303V、R2R3-S305N和R2R3-V300I。除了在其中未发现大结构的野生型R2R3肽之外，这些肽中的每一种都通过透射电子显微镜确认形成淀粉样原纤维形态。

[0409] 脯氨酸301顺反异构化调节聚集。已经提出tau中的脯氨酸异构化事件在聚集和疾病中发挥作用，但P301异构化尚未与tau聚集和病理学联系起来。$^{306}$VQIVYK$^{311}$(SEQ ID No:

1)附近的P301处的丝氨酸或亮氨酸替换显著改变聚集倾向。发明人假设P301在诱导P-G-G-G基序中的β-转角中发挥至关重要的作用,其介导折叠结构。他们测试了P301的异构化是否会影响自发性淀粉样蛋白形成。他们构建了一系列具有脯氨酸类似物的R2R3肽,这些肽优先填充:1)顺式旋转异构体(2S,4S)-氟脯氨酸;(2)反式旋转异构体(2S,4R)-氟脯氨酸;或(3)易于在顺式与反式(4,4)-二氟脯氨酸之间相互转换的脯氨酸类似物(图2A)。只有R2R3-反式自发聚集(图2B),表明tau发病机制中脯氨酸异构化事件的潜力。另外,本发明人预期了tau重复结构域内其他区(包括R1R2、R3R4、R4R'片段)的构象变化,并且剪接变体R1R3可提供合适的位点来靶向tau发病机制或检测病理形式(图3A至B)。

[0410] 重要发夹区的总结。先前的工作表明R2R3结构域包含关键的发夹(在图1A至2B中详述)。基于同源性和预测的结构,本发明人预期其他连接结构域也将体现发夹结构,其将在不同的tau蛋白病中经历构象变化。因此,关于R2R3的工作有助于了解tau的整个RD区。

[0411] 实施例3-材料和方法

[0412] 抗体。线性肽抗原由合同研究组织(Genscript,Piscataway,NJ)合成,并通过添加的N端半胱氨酸残基与KLH缀合。对于合成的反式脯氨酸残基,使用Fmoc-反式-4-氟-L-脯氨酸,而对于合成的顺式脯氨酸残基,使用Fmoc-顺式-4-氟-L-脯氨酸。线性肽表位如下:

[0413] a.a.22-34-DRKDQGGYTMHQD

[0414] a.a.145-160-ADGKTKIATPRGAAPP

[0415] a.a.244-266-QTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENL

[0416] a.a.259-266-KIGSTENL

[0417] a.a.263-281(R1R2)反式-P270-TENLKHQ[反式-P]GGGKVQIINKK

[0418] a.a.263-311Δ275-305(R1R3)反式-P270-TENLKHQ[反式-P]GGGKVQIVYK

[0419] a.a.294-311(R2R3)反式-P301-KDNIKHV[反式-P]GGGSVQIVYK

[0420] a.a.294-311(R2R3)顺式-P301-KDNIKHV[顺式-P]GGGSVQIVYK

[0421] a.a.326-343(R3R4)反式-P332-GNIHHK[反式-P]GGGQVEVKSEK

[0422] a.a.358-375(R4R')反式-P364-DNITHV[反式-P]GGGNKKIETHK

[0423] 用KLH偶联肽抗原对小鼠或兔进行接种,以分别用于产生单克隆或多克隆抗体。对于小鼠单克隆抗体,通过使用来自杂交瘤的条件培养基进行免疫沉淀(immunoprecipitation,IP)来筛选多个杂交瘤。在用于IP之前将兔多克隆抗体进行亲和纯化。

[0424] 免疫沉淀。将50微升Dynabeads蛋白-A(Thermo Fisher,Waltham,MA)与100ul杂交瘤条件培养基或10ug经亲和纯化的兔多克隆抗体一起孵育1小时,用PBS-T(含0.02%Tween-20的1xPBS)洗涤两次并与15ug总脑匀浆在4℃下一起孵育过夜。收集上清液并使用低pH洗脱缓冲液(Thermo Fisher,Waltham,MA)洗脱免疫沉淀物。

[0425] 接种测定。对于每个IP,使用表达tauRD-CFP和tau-RD-YFP的HEK293 FRET生物传感器细胞在洗脱液和上清液中测量接种活性,如前所述(Holmes et al.,2014)。每个IP或上清液样品用于处理96孔板的3个孔。对于每个一式三份,将4.5μl的Lipofectamine 2000(Thermo Fisher,Waltham,MA)悬浮于25.5μl的OptiMEM,并在室温下孵育5分钟。然后将Lipofectamine混合物添加至每个样品,并将混合物在室温下孵育30分钟,然后添加至96孔板中的3个生物传感器细胞孔。48小时之后,将细胞在2%PFA中固定,并使用流式细胞术测

量FRET信号以确定FRET阳性百分比。对于每个IP或上清液样品，将结果相对于15μl脑匀浆参考样品中的接种活性(匀浆的IP前量)归一化。使用归一化的IP相对于上清液部分的接种活性来确定每个抗体-脑对的IP效率。

[0426] 实施例4-结果

[0427] 使用不同抗体的免疫沉淀的IP和上清液部分中的接种活性的比较显示出多种IP效率模式。使用来自组织病理学诊断为阿尔茨海默病(AD)、嗜银颗粒病(Argyrophilic Grain Disease，AGD)、进行性核上性麻痹(PSP)和皮质基底节变性(Corticobasal Degeneration，CBD)的四个人脑的组织的匀浆来筛选抗体。图4示出了用于确定这些抗体中的一种，R1R2杂交瘤1的IP效率的接种活性数据的实例。该抗体以高效率免疫沉淀了来自AD和AGD脑匀浆的病理性tau种子，如通过IP部分中高水平的接种活性和保留在上清液中相对较低水平的接种活性所证明的，但该抗体对来自PSP和CBD脑的tau种子具有低的IP效率。表C总结了针对13种不同线性肽tau表位产生的抗体的相对IP效率。以绿色突出显示的抗体是经亲和纯化的兔多克隆抗体，而以红色突出显示的那些是未经纯化的小鼠单克隆抗体。数种抗体表现出疾病依赖性IP效率，以黄色突出显示。靶向不同表位的抗体的疾病区分特性反映了限定不同tau蛋白病的病理性tau物质之间的结构差异。这样的抗体是有价值的基础科学研究工具，并具有潜在的诊断效用。此外，其说明了表位选择在针对tau蛋白病的免疫治疗中的重要性。

[0428] 表C-针对特定tau线性肽表位的抗体在来自人tau蛋白病脑匀浆的tau种子的免疫沉淀中的性能。

[0429]

| 抗体 | 序列 | AD | AGD | PSP | CBD |
|---|---|---|---|---|---|
| aa 22-34 | DRKDQGGYTMHQD | ++ | ++ | ++ | ++ |
| aa 145-160 | ADGKTKIATPRGAAPP | + | + | + | + |
| TauA | QTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENL | +++ | +++ | +++ | +++ |
| TauB | KIGSTENL | +++ | +++ | +++ | +++ |
| R1R2 杂交瘤 1 | TENLKHQ[反式-P]GGGKVQIINKK | +++ | +++ | + | + |
| R1R2 杂交瘤 2 | TENLKHQ[反式-P]GGGKVQIINKK | +++ | +++ | ++ | + |
| R1R3 杂交瘤 1 | TENLKHQ[反式-P]GGGKVQIVYK | +++ | +++ | - | - |
| R1R3 杂交瘤 2 | TENLKHQ[反式-P]GGGKVQIVYK | ++ | + | - | - |
| R2R3tP | KDNIKHV[反式-P]GGGSVQIVYK | ++ | ++ | ++ | ++ |
| R2R3cP | KDNIKHV[顺式-P]GGGSVQIVYK | ++ | ++ | ++ | ++ |
| R3R4 | GNIHHK[反式-P]GGGQVEVKSEK | ++ | n/a | + | + |
| R4R' 杂交瘤 1 | DNITHV[反式-P]GGGNKKIETHK | ++ | n/a | + | ++ |
| R4R' 杂交瘤 2 | DNITHV[反式-P]GGGNKKIETHK | + | n/a | - | + |

关键

定制小鼠 mAb

兔 pAb

疾病区分

[0430] * * *

[0431] 根据本公开内容，不需要过度实验就可进行和实施本文中公开和要求保护的所有组合物和/或方法。尽管已经按照一些优选实施方案描述了本公开内容的组合物和方法，然而对于本领域技术人员显而易见的是，可对本文中所述组合物和/或方法以及方法的步骤

或步骤的顺序进行改变，而不脱离本公开内容的概念、精神和范围。更具体地，显而易见的是，可用某些在化学和生理学两个方面均相关的试剂替代本文中所述的试剂，同时实现相同或类似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有这些类似替代和修改被认为在由所附权利要求书限定的本公开内容的精神、范围和概念内。

[0432] VIII.参考文献

[0433] 以下参考文献就其提供补充本文中所阐述的那些操作或细节的示例性操作或其他细节而言特别地通过引用并入本文。

[0434] Remington's Pharmaceutical Sciences,15th Edition.

[0435] 美国专利3,817,837

[0436] 美国专利3,850,752

[0437] 美国专利3,939,350

[0438] 美国专利3,996,345

[0439] 美国专利4,196,265

[0440] 美国专利4,275,149

[0441] 美国专利4,277,437

[0442] 美国专利4,366,241

[0443] 美国专利4,472,509

[0444] 美国专利4,554,101

[0445] 美国专利4,680,338

[0446] 美国专利4,816,567

[0447] 美国专利4,867,973

[0448] 美国专利4,938,948

[0449] 美国专利5,021,236

[0450] 美国专利5,141,648

[0451] 美国专利5,196,066

[0452] 美国专利5,563,250

[0453] 美国专利5,565,332

[0454] 美国专利5,856,456

[0455] 美国专利5,880,270

[0456] 美国专利6,485,982

[0457] "Antibodies:A Laboratory Manual,"Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY,1988.

[0458] Abbondanzo et al.,Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol.,12(4),480-489,1990.

[0459] Alonso et al.,Nat.Med.,2:783-787,1996.

[0460] Allred et al.,Arch.Surg.,125(1),107-113,1990.

[0461] Arriagada et al.,Neurology,42:631-639,1992.

[0462] Atherton et al.,Biol.of Reproduction,32,155-171,1985.

[0463] Barzon et al.,Euro Surveill.2016 Aug 11;21(32).

[0464] Beltramello et al.,Cell Host Microbe 8,271-283,2010.

[0465] Bramblett et al.,Neuron.,10:1089-1099,1993.

[0466] Brown et al.,J.Immunol.Meth.,12;130(1),:111-121,1990.

[0467] Campbell,In:Monoclonal Antibody Technology,Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,Vol.13,Burden and Von Knippenberg, Eds.pp.75-83,Amsterdam,Elsevier,1984.

[0468] Capaldi et al.,Biochem.Biophys.Res.Comm.,74(2):425-433,1977.

[0469] Chen et al.,Nat Commun.10(1):2493.doi:10.1038/s41467-019-10355-1, 2019.

[0470] De Jager et al.,Semin.Nucl.Med.23(2),165-179,1993.

[0471] Dholakia et al.,J.Biol.Chem.,264,20638-20642,1989.

[0472] Diamond et al.,J Virol 77,2578-2586,2003.

[0473] Doolittle and Ben-Zeev,Methods Mol.Biol.,109,:215-237,1999.

[0474] Duffy et al.,N.Engl.J.Med.360,2536-2543,2009.

[0475] Elder et al.Infections,infertility and assisted reproduction.Part II: Infections in reproductive medicine&Part III:Infections and the assisted reproductive laboratory.Cambridge UK:Cambridge University Press;2005.

[0476] Gefter et al.,Somatic Cell Genet.,3:231-236,1977.

[0477] Gornet et al.,Semin Reprod Med.2016 Sep;34(5):285-292.Epub 2016 Sep 14.

[0478] Gulbis and Galand,Hum.Pathol.24(12),1271-1285,1993.

[0479] Gustke et al.,FEBS Lett.,307:199-205,1992.

[0480] Halfon et al.,PLoS ONE 2010;5(5)e10569.

[0481] Hartig et al.,Eur.J.Neurosci.,25:69-80,2007.

[0482] Hessell et al.,Nature 449,101-4,2007.

[0483] Hutton et al.,Nature,393:702-705,1998.

[0484] Khatoon et al.,Ann.of Neurology,26,210-219,1989.

[0485] King et al.,J.Biol.Chem.,269,10210-10218,1989.

[0486] Kohler and Milstein,Eur.J.Immunol.,6,511-519,1976.

[0487] Kohler and Milstein,Nature,256,495-497,1975.

[0488] Kyte and Doolittle,J.Mol.Biol.,157(1):105-132,1982.

[0489] Mansuy et al.,Lancet Infect Dis.2016 Oct;16(10):1106-7.

[0490] Mirbaha et al.,Elife,pii:e36584.doi:10.7554/eLife.36584,2018.

[0491] Nakamura et al.,In:Enzyme Immunoassays:Heterogeneous and Homogeneous Systems,Chapter 27,1987.

[0492] O'Shannessy et al.,J.Immun.Meth.,99,153-161,1987.

[0493] Persic et al.,Gene 187:1,1997

[0494] Poorkaj et al.,Ann.Neurol.,43:815-825,1998.

[0495] Potter and Haley,Meth.Enzymol.,91,613-633,1983.

[0496] Purpura et al.,Lancet Infect Dis.2016 Oct;16(10):1107-8.Epub 2016 Sep

19.

[0497] Remington's Pharmaceutical Sciences,15th Ed.,3:624-652,1990.

[0498] Spillantini et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95:7737-7741,1998.

[0499] Tang et al.,J.Biol.Chem.,271:28324-28330,1996.

[0500] Wawrzynczak&Thorpe,In:Immunoconjugates,Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer,Vogel(Ed.),NY,Oxford University Press,28,1987.

[0501] Yu et al.,J Immunol Methods 336,142-151,doi:10.1016/j.jim.2008.04.008,2008.

<110> 德克萨斯大学系统董事会

<120> 用于治疗tau蛋白病的tau肽抗原及与其结合的抗体

<130> UTFD.P3548WO

<140> 尚未分配
<141> 2019-11-18

<150> 62/769,281
<151> 2018-11-19

<160> 151

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 1

Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0001] <223> 合成肽

<400> 2

Asp Asn Ile Lys His Val
1 5

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 3

Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 4

Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
1 5 10 15

Lys

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 5

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

Lys

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 6

Asp Asn Ile Lys His Val Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
1 5 10 15

Lys

[0002]

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (7)..(7)

<400> 7

Asp Asn Ile Lys His Val Xaa Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
1 5 10 15

Lys

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (7)..(7)

<400> 8

Asp Asn Ile Lys His Val Xaa Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
1 5 10 15

Lys

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 9

Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 10

Asp Asn Ile Lys His Val Leu Gly Gly Gly Ser
1 5 10

[0003]

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

<220>
<223> 合成肽

<400> 11

Asp Asn Ile Lys His Val Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (7)..(7)

<400> 12

Asp Asn Ile Lys His Val Xaa Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (7)..(7)

<400> 13

Asp Asn Ile Lys His Val Xaa Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 14

Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 15

Val Leu Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10

[0004]

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 16

Val Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (2)..(2)

<400> 17

Val Xaa Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 18
<211> 12
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (2)..(2)

<400> 18

Val Xaa Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10

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

<220>
<223> 合成肽

<400> 19

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

Asn Lys Lys

[0005]

<210> 20
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 20

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

Asn Lys Lys

<210> 21
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 21

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

Asn Lys Lys

<210> 22
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (8)..(8)

<400> 22

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

Asn Lys Lys

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (8)..(8)

<400> 23

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

Asn Lys Lys

[0006]

<210> 24
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 24

Ser Lys Ile Gly Xaa Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
1 5 10 15

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
20

<210> 25
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 25

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

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
20

<210> 26
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 26

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

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
20

<210> 27
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

[0007]

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸 顺式
<222> (13)..(13)

<400> 27

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

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
20

<210> 28
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸 反式
<222> (13)..(13)

<400> 28

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

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
20

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 29

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
1 5 10

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 30

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Leu Gly Gly Gly Lys
1 5 10

[0008]

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 31

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Ser Gly Gly Gly Lys
1 5 10

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (8)..(8)

<400> 32

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Xaa Gly Gly Gly Lys
1 5 10

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (8)..(8)

<400> 33

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Xaa Gly Gly Gly Lys
1 5 10

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 34

Ser Lys Ile Gly Xaa Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
1 5 10 15

Lys

[0009]

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 35

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

Lys

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 36

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

Lys

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸 顺式
<222> (13)..(13)

<400> 37

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

Lys

[0010]

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸 反式
<222> (13)..(13)

<400> 38

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

Lys

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 39

Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
1 5 10

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 40

Gln Leu Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
1 5 10

<210> 41
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 41

Gln Ser Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
1 5 10

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0011]

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (2)..(2)

<400> 42

Gln Xaa Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
1 5 10

<210> 43
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (2)..(2)

<400> 43

Gln Xaa Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
1 5 10

<210> 44
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 44

Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
1 5 10 15

Glu Lys

<210> 45
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 45

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

Glu Lys

<210> 46
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 46

[0012] Gly Asn Ile His His Lys Ser Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
1 5 10 15

Glu Lys

<210> 47
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (7)..(7)

<400> 47

Gly Asn Ile His His Lys Xaa Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
1 5 10 15

Glu Lys

<210> 48
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (7)..(7)

<400> 48

Gly Asn Ile His His Lys Xaa Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
1 5 10 15

Glu Lys

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 49

Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
1 5 10

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 50

[0013]

Gly Asn Ile His His Lys Leu Gly Gly Gly Gln
1 5 10

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 51

Gly Asn Ile His His Lys Ser Gly Gly Gly Gln
1 5 10

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (7)..(7)

<400> 52

Gly Asn Ile His His Lys Xaa Gly Gly Gly Gln
1 5 10

<210> 53

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (7)..(7)

<400> 53

Gly Asn Ile His His Lys Xaa Gly Gly Gly Gln
1 5 10

<210> 54
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 54

Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
1 5 10

<210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

[0014] <220>
<223> 合成肽

<400> 55

Lys Leu Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
1 5 10

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 56

Lys Ser Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
1 5 10

<210> 57
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (2)..(2)

<400> 57

Lys Xaa Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys

1 5 10

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (2)..(2)

<400> 58

Lys Xaa Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
1 5 10

<210> 59
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 59

Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

[0015] His Lys

<210> 60
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 60

Asp Asn Ile Thr His Val Leu Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

His Lys

<210> 61
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 61

Asp Asn Ile Thr His Val Ser Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

His Lys

<210> 62
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (7)..(7)

<400> 62

Asp Asn Ile Thr His Val Xaa Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

His Lys

<210> 63
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (7)..(7)

<400> 63

[0016]

Asp Asn Ile Thr His Val Xaa Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

His Lys

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 64

Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
1 5 10

<210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 65

Asp Asn Ile Thr His Val Leu Gly Gly Gly Asn
1 5 10

<210> 66
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 66

Asp Asn Ile Thr His Val Ser Gly Gly Gly Asn
1 5 10

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (7)..(7)

<400> 67

Asp Asn Ile Thr His Val Xaa Gly Gly Gly Asn
1 5 10

<210> 68
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0017]

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (7)..(7)

<400> 68

Asp Asn Ile Thr His Val Xaa Gly Gly Gly Asn
1 5 10

<210> 69
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 69

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
1 5 10

<210> 70
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 70

Val Leu Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
1 5 10

<210> 71
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 71

Val Ser Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
1 5 10

<210> 72
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (2)..(2)

<400> 72

Val Xaa Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
1 5 10

<210> 73
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

[0018]

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (2)..(2)

<400> 73

Val Xaa Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
1 5 10

<210> 74
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 74

Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser
1 5 10 15

Lys Ile Gly Ser
20

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 75

Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser
1 5 10

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 76

Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp
1 5 10

<210> 77
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 77

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys
1 5 10

[0019]

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 78

Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys
1 5

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 79

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val
1 5

<210> 80
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 80

Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
1 5 10

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 81

Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
1 5

<210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 82

Pro Val Asp Leu Ser Lys Val
1 5

<210> 83
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

[0020] <220>
<223> 合成肽

<400> 83

Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
1 5 10

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 84

Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
1 5

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 85

Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val
1 5

<210> 86
<211> 20

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 86

Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu
1 5 10 15

Ile Val Tyr Lys
20

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 87

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0021]

<400> 88

Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
1 5

<210> 89
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 89

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
1 5 10 15

<210> 90
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 90

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val
1 5 10

<210> 91
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 91

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
1 5 10 15

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 92

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5

<210> 93
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 93

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
1 5 10 15

[0022] Lys Cys

<210> 94
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 94

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
1 5 10 15

Lys Cys Gly Ser Lys
20

<210> 95
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 95

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
1 5 10 15

Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val
20 25

<210> 96
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 96

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
1 5 10 15

Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 97
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 97

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
1 5 10 15

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
20 25 30

[0023]

<210> 98
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 98

Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val
1 5 10 15

Gln Ile Val Tyr Lys
20

<210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 99

Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 100
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 100

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
1 5 10 15

Ile Lys His Val Leu Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
20 25 30

<210> 101
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 101

Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Leu Gly Gly Gly Ser Val
1 5 10 15

Gln Ile Val Tyr Lys
20

<210> 102
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0024]

<400> 102

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
1 5 10 15

Ile Lys His Val Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
20 25 30

<210> 103
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 103

Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Ser Gly Gly Gly Ser Val
1 5 10 15

Gln Ile Val Tyr Lys
20

<210> 104
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>

<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (21)..(21)

<400> 104

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
1 5 10 15

Ile Lys His Val Xaa Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
20 25 30

<210> 105
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (21)..(21)

<400> 105

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
1 5 10 15

Ile Lys His Val Xaa Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
20 25 30

[0025]

<210> 106
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 106

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
1 5 10 15

Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Leu Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Val Gln Ile Val Tyr Lys
35

<210> 107
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 107

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
1 5 10 15

Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Ser Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Val Gln Ile Val Tyr Lys
35

<210> 108
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸; 顺式
<222> (28)..(28)

<400> 108

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
1 5 10 15

Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Xaa Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Val Gln Ile Val Tyr Lys
35

<210> 109
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

[0026] <220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸; 反式
<222> (28)..(28)

<400> 109

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
1 5 10 15

Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Xaa Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Val Gln Ile Val Tyr Lys
35

<210> 110
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 110

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

Tyr Lys

<210> 111
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 111

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

Asp

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

<220>
<223> 合成肽

<400> 112

Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp
1 5 10

<210> 113
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

[0027] <220>
<223> 合成肽

<400> 113

Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp
1 5 10 15

<210> 114
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 114

Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
1 5 10

<210> 115
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 115

Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala
1 5 10 15

Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
20 25 30

<210> 116
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 116

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

Asn Lys Lys

<210> 117
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 117

Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys
1 5 10 15

Cys Gly Ser

[0028]

<210> 118
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 118

Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val
1 5 10 15

Tyr Lys

<210> 119
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 119

Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
1 5 10 15

Glu Lys

<210> 120
<211> 18

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 120

Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

His Lys

<210> 121
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 121

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

Tyr Lys

<210> 122
<211> 18
<212> PRT
[0029] <213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 122

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

Tyr Lys

<210> 123
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 123

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

Tyr Lys

<210> 124
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸 顺式
<222> (8)..(8)

<400> 124

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

Tyr Lys

<210> 125
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸 反式
<222> (8)..(8)

<400> 125

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

Tyr Lys

[0030]

<210> 126
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 126

Ser Lys Ile Gly Xaa Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
1 5 10 15

Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys
20

<210> 127
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 127

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

Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys
20

<210> 128
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 128

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

Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys
20

<210> 129
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

[0031]

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸 顺式
<222> (13)..(13)

<400> 129

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

Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys
20

<210> 130
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸 反式
<222> (13)..(13)

<400> 130

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

Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys
20

<210> 131
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 131

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
1 5 10

<210> 132
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 132

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Leu Gly Gly Gly Lys
1 5 10

[0032]

<210> 133
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 133

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Ser Gly Gly Gly Lys
1 5 10

<210> 134
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸 顺式
<222> (8)..(8)

<400> 134

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Xaa Gly Gly Gly Lys
1 5 10

<210> 135
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸 反式
<222> (8)..(8)

<400> 135

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Xaa Gly Gly Gly Lys
1 5 10

<210> 136
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 136

Ser Lys Ile Gly Xaa Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
1 5 10 15

Lys

[0033]

<210> 137
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 137

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

Lys

<210> 138
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<400> 138

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

Lys

<210> 139
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸 顺式
<222> (13)..(13)

<400> 139

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

Lys

[0034]

<210> 140
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 磷酸丝氨酸
<222> (5)..(5)

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸 反式
<222> (13)..(13)

<400> 140

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

Lys

<210> 141
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 141

Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 142
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 142

Gln Leu Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 143
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 143

Gln Ser Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 144
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0035] <220>
<221> 氟化的4S-F-脯氨酸 顺式
<222> (2)..(2)

<400> 144

Gln Xaa Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 145
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 氟化的4R-F-脯氨酸 反式
<222> (2)..(2)

<400> 145

Gln Xaa Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 146
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 146

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

Asn Lys

<210> 147
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 147

Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val
1 5 10 15

Tyr Lys

<210> 148
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 148

[0036] Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys
1 5 10 15

Ser Glu Lys

<210> 149
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 149

Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu
1 5 10 15

Thr His

<210> 150
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 150

Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg
1 5 10

<210> 151
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0037]

<400> 151

Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp
1 5 10 15

Leu Lys Asn

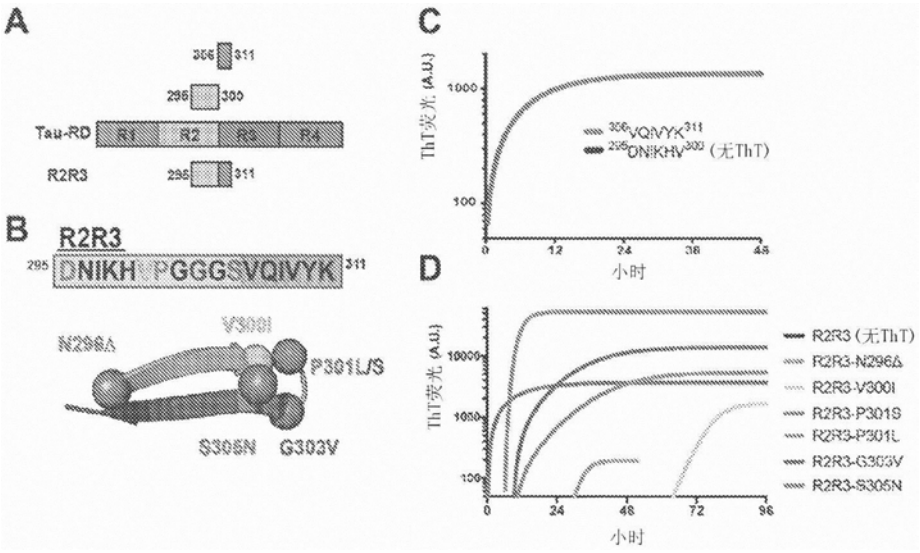
A
356 311
295 300
Tau-RD R1 R2 R3 R4
R2R3 295 311
B
R2R3
295 DNIKHVPGGGSVQIVYK 311
V300I
N296A
P301L/S
S305N G303V
C
ThT荧光 (A.U.)
1000
100
0 12 24 36 48
小时
306VQIVYK311
295DNIKHV300 (无ThT)
D
ThT荧光 (A.U.)
10000
1000
100
0 24 48 72 96
小时
R2R3 (无ThT)
R2R3-N296Δ
R2R3-V300I
R2R3-P301S
R2R3-P301L
R2R3-G303V
R2R3-S305N

图1A至D

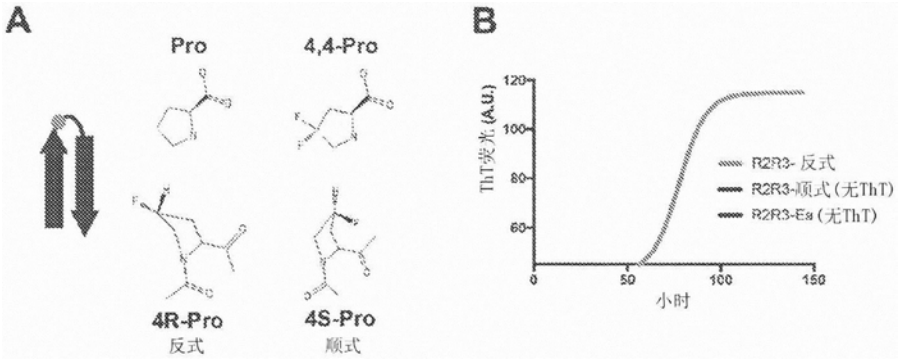
A
Pro
4,4-Pro
4R-Pro
反式
4S-Pro
顺式
B
ThT荧光 (A.U.)
120
100
80
60
0 50 100 150
小时
R2R3- 反式
R2R3-顺式 (无ThT)
R2R3-Es (无ThT)

图2A至B

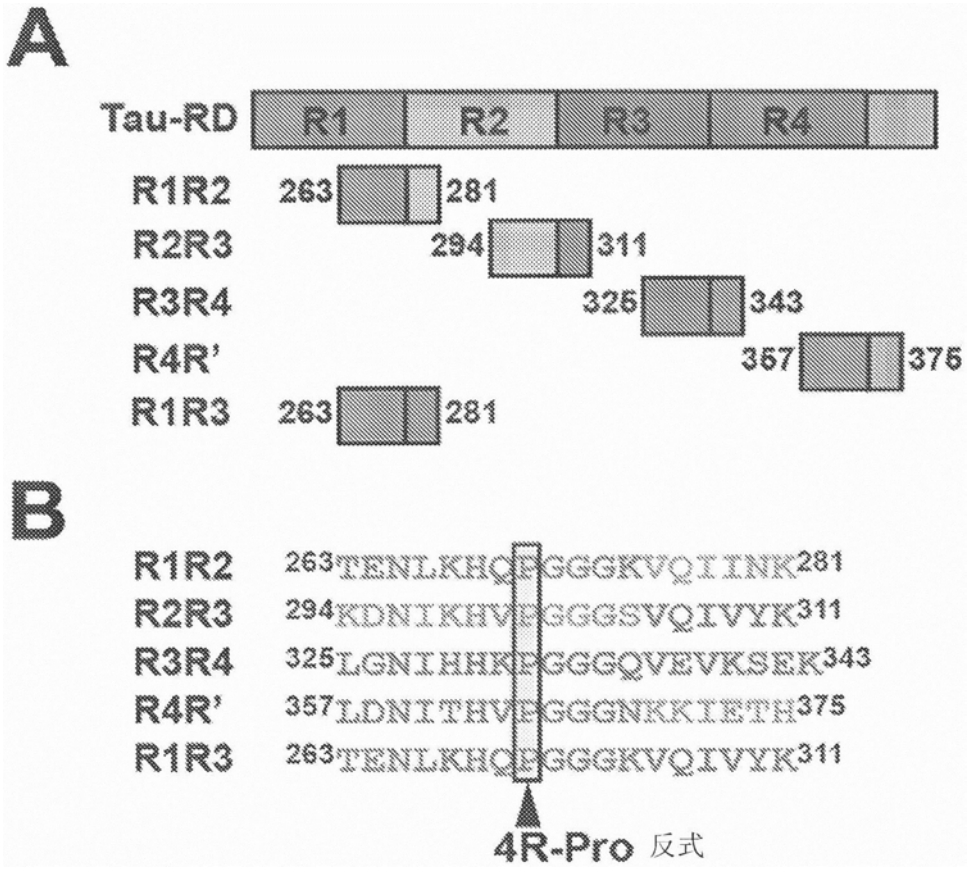
A
Tau-RD
R1
R2
R3
R4
R1R2
263
281
R2R3
294
311
R3R4
325
343
R4R'
357
375
R1R3
263
281
B
R1R2
263TENLKHQPGGGKVQIINK281
R2R3
294KDNIKHVPGGGSVQIVYK311
R3R4
325LGNIHHKPGGGQVEVKSEK343
R4R'
357LDNITHVPGGGNKKIETH375
R1R3
263TENLKHQPGGGKVQIVYK311
4R-Pro 反式

图3A至B

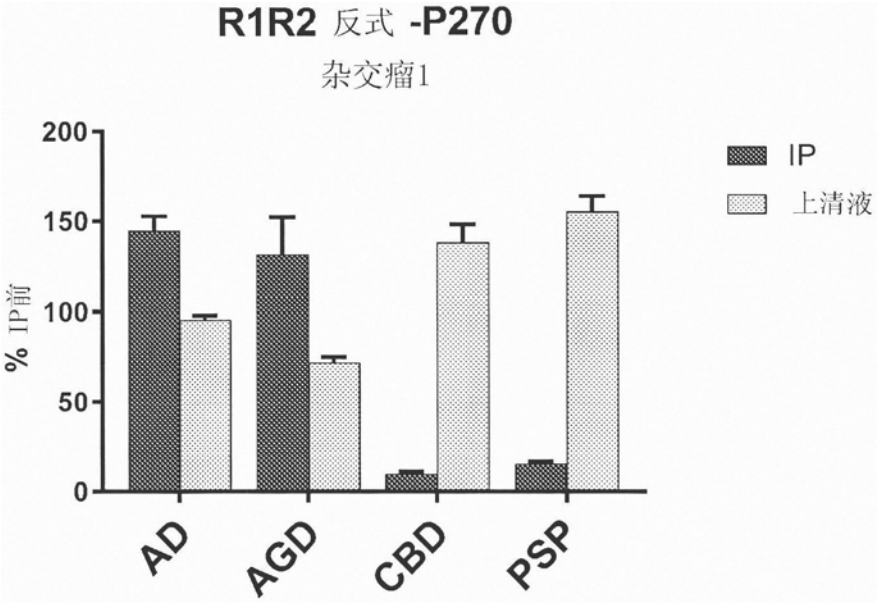
R1R2 反式 -P270
杂交瘤1
% IP前
200
150
100
50
0
IP
上清液
AD
AGD
CBD
PSP

图4