



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105121465 B

(45)授权公告日 2020.09.08

(21)申请号 201480014601.6

Y·刘 R·巴布尔

(22)申请日 2014.03.12

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

(65)同一申请的已公布的文献号

代理人 孟锐

申请公布号 CN 105121465 A

(51)Int.CI.

C07K 16/18(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

(43)申请公布日 2015.12.02

(56)对比文件

US 2012142602 A1, 2012.06.07

WO 2013007839 A1, 2013.01.17

US 2008050383 A1, 2008.02.28

(30)优先权数据

Diana L. Castillo-Carranza等.Tau

61/780,624 2013.03.13 US

61/800,382 2013.03.15 US

aggregates as immunotherapeutic targets.
《Frontiers in Bioscience》.2013, 第5卷(第1期), 第426-438页.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

审查员 马静

2015.09.11

权利要求书3页 说明书40页

(86)PCT国际申请的申请数据

序列表23页 附图4页

PCT/US2014/025044 2014.03.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/165271 EN 2014.10.09

(73)专利权人 普罗塞纳生物科技公司

地址 爱尔兰,都柏林

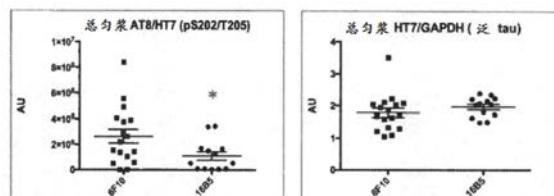
(72)发明人 P·苏波特 P·J·多兰三世

(54)发明名称

TAU免疫疗法

(57)摘要

本发明提供了tau的抗体。所述抗体抑制或延迟tau相关病状以及相关症状恶化。



1. 一种抗体, 其包含成熟的重链可变区和成熟的轻链可变区, 所述成熟的重链可变区包括SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:12的CDR-H2、SEQ ID NO:13的CDR-H3并且具有与SEQ ID NO:15至少90%相同的氨基酸序列, 且所述成熟的轻链可变区包括SEQ ID NO:17的CDR-L1、SEQ ID NO:18的CDR-L2和SEQ ID NO:19的CDR-L3并且与SEQ ID NO:22至少90%相同。

2. 根据权利要求1所述的抗体, 其条件是位置H13、H48和H91的至少一个分别由K、M和F占据, 且位置L1、L4、L36和L43的至少一个分别由N、L、F和S占据。

3. 根据权利要求2所述的抗体, 其条件是位置H13、H48和H91分别由K、M和F占据, 且位置L1、L4、L36和L43的至少两个分别由N、L、F和S占据。

4. 根据权利要求3所述的抗体, 其条件是位置H13、H48和H91分别由K、M和F占据, 且位置L1、L4、L36和L43的至少三个分别由N、L、F和S占据。

5. 根据权利要求3所述的抗体, 其条件是位置H13、H48和H91分别由K、M和F占据, 且位置L1、L4、L36和L43分别由N、L、F和S占据。

6. 根据权利要求1或2所述的抗体, 其包含成熟的重链可变区和成熟的轻链可变区, 所述成熟的重链可变区具有与SEQ ID NO:15至少95%相同的氨基酸序列, 且所述成熟的轻链可变区与SEQ ID NO:22至少95%相同。

7. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体, 其中所述成熟的重链可变区与重链恒定区融合, 且所述成熟的轻链可变区与轻链恒定区融合。

8. 根据权利要求7所述的抗体, 其中所述重链恒定区是天然人恒定区的突变形式, 其相对于所述天然人恒定区具有降低的Fc γ 受体结合。

9. 根据权利要求7所述的抗体, 其中所述重链恒定区是IgG1同种型。

10. 根据权利要求1和8中任一项所述的抗体, 其中所述成熟的重链可变区具有SEQ ID NO:25编码的氨基酸序列, 且所述成熟的轻链可变区具有指定为SEQ ID NO:21、22或23的氨基酸序列。

11. 根据权利要求10所述的抗体, 其中所述成熟的重链可变区具有SEQ ID NO:25编码的氨基酸序列, 且所述成熟的轻链可变区具有指定为SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

12. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体, 其中所述抗体与细胞毒素剂或细胞抑制剂偶联。

13. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是Fab片段。

14. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体, 其中所述抗体的重链包含具有序列SEQ ID NO:29的人IgG1恒定区, 条件是C-末端赖氨酸可被省略。

15. 根据权利要求14所述的抗体, 其中所述抗体的轻链包含具有序列SEQ ID NO:32的人 κ 恒定区。

16. 一种多核苷酸, 其包含编码如权利要求1-15中所述的抗体的重链和轻链的核酸。

17. 一种使抗体人源化的方法, 其包括:

测定小鼠抗体的重链和轻链可变区的序列;

合成编码包含所述小鼠抗体重链的CDR的人源化重链的核酸及编码包含所述小鼠抗体轻链的CDR的人源化轻链的核酸; 及

在宿主细胞中表达所述核酸以产生人源化抗体,

其中所述小鼠抗体的特征在于具有SEQ ID NO:10的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:16的序列的轻链可变区。

18. 一种产生人源化的、嵌合的或修饰的抗体的方法,其包括:

培养由编码所述抗体的重链和轻链的核酸转化的细胞,以使细胞分泌所述抗体;及
纯化来自细胞培养基的所述抗体,

其中所述抗体是特征在于具有SEQ ID NO:10的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:16的序列的轻链可变区的抗体的人源化的、嵌合的或修饰的形式。

19. 一种制备产生人源化的、嵌合的或修饰的抗体的细胞系的方法,其包括:

将编码抗体的重链和轻链的载体及选择性标志物导入细胞;

在一定条件下繁殖所述细胞以选择拷贝数增加的所述载体的细胞;

从选定细胞中分离单细胞;及

将由基于抗体产量选择的单个细胞克隆的细胞建库;其中所述抗体是特征在于具有SEQ ID NO:10的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:16的序列的轻链可变区的抗体的人源化的、嵌合的或修饰的形式。

20. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-15中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

21. 如根据权利要求1-15中任一项限定的抗体在制备用于治疗或实现预防阿尔茨海默病的药剂中的用途。

22. 根据权利要求21所述的用途,用于治疗ApoE4携带者患者中的阿尔茨海默病。

23. 如根据权利要求1-15中任一项限定的抗体在制备用于治疗或实现预防tau相关疾病的药剂中的用途。

24. 根据权利要求23所述的用途,用于治疗神经疾病。

25. 如根据权利要求1-15中任一项限定的抗体在制备用于减少tau异常传递的药剂中的用途。

26. 如根据权利要求1-15中任一项限定的抗体在制备用于通过诱导tau的吞噬作用治疗与tau的积聚相关的疾病的药剂中的用途。

27. 根据权利要求26所述的用途,用于治疗神经疾病。

28. 如根据权利要求1-15中任一项限定的抗体在制备用于治疗与tau聚集或沉积相关的疾病的药剂中的用途。

29. 根据权利要求28所述的用途,用于治疗神经疾病。

30. 如根据权利要求1-15中任一项限定的抗体在制备用于治疗患有与tau缠结形成相关的疾病或处于患有与tau缠结形成相关的疾病风险的患者的药剂中的用途。

31. 根据权利要求30所述的用途,其中所述疾病是神经疾病。

32. 一种核酸,其包含编码重链可变区的区段和编码轻链可变区的区段,所述重链可变区具有核苷酸序列SEQ ID NO:25且所述轻链可变区具有序列SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23。

33. 根据权利要求32所述的核酸,其还包含编码IgG1恒定区的区段。

34. 根据权利要求33所述的核酸,其中所述IgG1恒定区是人IgG1恒定区。

35. 根据权利要求34所述的核酸,其中所述IgG1恒定区具有序列SEQ ID NO:29,条件是

C-末端赖氨酸可被省略。

36. 根据权利要求35所述的核酸,其中编码所述IgG1恒定区的所述区段具有核苷酸序列SEQ ID NO:30。

37. 根据权利要求33-36中任一项所述的核酸,其还包含连接编码所述重链可变区和所述IgG1恒定区的所述区段的内含子。

38. 根据权利要求37所述的核酸,其中编码所述IgG1恒定区的所述区段具有核苷酸序列SEQ ID NO:31。

39. 根据权利要求32所述的核酸,其中编码所述轻链可变区的所述区段具有序列SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28。

40. 根据权利要求39所述的核酸,其还包含编码κ恒定区的区段。

41. 根据权利要求40所述的核酸,其中所述κ恒定区是人κ恒定区。

42. 根据权利要求41所述的核酸,其中所述κ恒定区具有序列SEQ ID NO:32。

43. 根据权利要求42所述的核酸,其中编码所述κ恒定区的所述核酸具有序列SEQ ID NO:33。

44. 根据权利要求40-43中任一项所述的核酸,其还包含将编码所述轻链可变区的所述区段连接至编码所述κ恒定区的所述区段的内含子。

45. 根据权利要求44所述的核酸,其中编码所述κ恒定区的所述区段具有序列SEQ ID NO:34。

46. 一种核酸,其包含编码重链可变区的区段和编码轻链可变区的区段,所述重链可变区具有序列SEQ ID NO:10且所述轻链可变区具有序列SEQ ID NO:16。

TAU免疫疗法

[0001] 相关申请案的交叉引用

[0002] 本申请是2013年3月13日提交的61/780,624和2013年3月15日提交的61/800,382的非临时申请,所述每篇申请均通过引用的方式整体并入本文用于所有目的。

[0003] 发明背景

[0004] Tau是众所周知的人蛋白质,其可以磷酸化形式存在(参见,例如,Goedert, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:4051-4055(1988);Goedert,EMBO J.8:393-399(1989);Lee,Neuron 2:1615-1624(1989);Goedert,Neuron 3:519-526(1989);Andreadis,Biochemistry 31:10626-10633(1992)。已报道Tau具有稳定微管的作用,尤其是在中枢神经系统中。通过大脑响应神经损伤和神经退行性变释放总tau(t-tau,即磷酸化和未磷酸化形式)和磷酸化-tau(p-tau,即磷酸化tau),且已报道相对于普通人群其在阿尔茨海默病(Alzheimer)患者的CSF中其发生的水平增加(Jack等,Lancet Neurol 9:119-28(2010))。

[0005] Tau是神经原纤维缠结的主要组分,其与斑块一起作为阿尔茨海默病的标志特征。所述缠结构成直径10nm的异常纤维,所述异常纤维成对出现并以80nm的规则周期性按螺旋方式缠绕。神经原纤维缠结中的tau被连接在分子特定位点的磷酸基团异常磷酸化(过度磷酸化)。在阿尔茨海默病内嗅皮质的层II神经元、CA1和海马的钩回下区、杏仁核及新皮层的更深层(层III、层V和浅层VI)可看到神经元纤维缠结的严重受累。也已报道过度磷酸化的tau干扰微管组装,其可能加速神经元网络的破坏。

[0006] Tau内含物是几种神经退行性疾病的确定性神经病理学的一部分,所述神经退行性疾病包括阿尔茨海默病、额颞叶变性、进行性核上性麻痹和皮克氏病(Pick's disease)。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了与单克隆抗体16B5竞争结合tau的单克隆抗体。一些抗体是人源化的、嵌合的、修饰的或人抗体。一些抗体是人IgG同种型(例如,IgG1、IgG2或IgG4)。一些此类抗体具有包含序列SEQ ID NO:29的人IgG1恒定区。一些抗体具有包含序列SEQ ID NO:32的人κ恒定区。一些抗体具有在恒定区的至少一个突变。

[0009] 一些抗体是人源化的、嵌合的或修饰形式的单克隆抗体16B5。一些抗体具有单克隆抗体16B5的如Kabat定义的三个轻链CDR和如Kabat定义的三个重链CDR。一些抗体与磷酸化和未磷酸化形式的tau结合。

[0010] 本发明还提供了与SEQ ID NO:1(Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46中的表位特异性结合的单克隆抗体。一些此类抗体是人的、人源化的、嵌合的或修饰的抗体。一些抗体与SEQ ID NO:1的残基25-44中的表位特异性结合。一些抗体与SEQ ID NO:1的残基30-39中的表位特异性结合。一些抗体与磷酸化和未磷酸化形式的tau结合。

[0011] 本发明还提供了包含成熟的重链可变区和成熟的轻链可变区的单克隆抗体,所述成熟的重链可变区具有与SEQ ID NO:15至少90%(例如,至少95%、至少98%、至少99%)相同的氨基酸序列,所述成熟的轻链可变区与SEQ ID NO:22至少90%(例如,至少95%、至少98%、至少99%)相同。在某些实施方案中,所述单克隆抗体包含具有SEQ ID NO:15的三个Kabat CDR和具有SEQ ID NO:22的三个Kabat CDR。在一些抗体中,所述成熟的重链可变区

具有指定为SEQ ID NO:15的氨基酸序列,且所述成熟的轻链可变区具有指定为SEQ ID NO:21、22或23的氨基酸序列。

[0012] 在一些抗体中,位置H13、H48和H91的至少一个分别由K、M和F占据,且位置L1、L4、L36和L43的至少一个分别由N、L、F和S占据。在一些抗体中,位置H13、H48和H91分别由K、M和F占据,位置L1、L4、L36和L43的至少两个分别由N、L、F和S占据。在一些抗体中,位置H13、H48和H91分别由K、M和F占据,且位置L1、L4、L36和L43的至少三个分别由N、L、F和S占据。在一些抗体中,位置H13、H48和H91分别由K、M和F占据,且位置L1、L4、L36和L43分别由N、L、F和S占据。

[0013] 在一些抗体中,所述成熟的重链可变区与重链恒定区融合,且所述成熟的轻链可变区与轻链恒定区融合。在一些抗体中,所述重链恒定区是天然人恒定区的突变形式,其相对于天然人恒定区具有降低的Fc γ 受体结合。在一些抗体中,所述重链恒定区是IgG1同种型。

[0014] 在一些抗体中,分别来自SEQ ID NOS:15和22的成熟的重链可变区和成熟的轻链可变区的CDRs的差异存在于位置H60-H65中。

[0015] 所述抗体可以是完整的抗体或片段,如Fab片段。

[0016] 任意单克隆抗体或片段可以与细胞毒性或细胞生长抑制剂结合。

[0017] 本发明还提供了使抗体人源化的方法。一些方法包括测定小鼠抗体的重链和轻链可变区的序列;合成编码包含小鼠抗体重链的CDR的人源化重链的核酸和包含小鼠抗体轻链的CDR的人源化轻链的核酸;并在宿主细胞中表达所述核酸以产生人源化抗体,其中所述小鼠抗体是16B5。

[0018] 本发明还提供了生产人源化的、嵌合的或修饰的抗体的方法。一些方法包括培养由编码抗体的重链和轻链的核酸转化的细胞,以使细胞分泌抗体;并纯化来自细胞培养基的抗体,其中所述抗体是16B5的人源化的、嵌合的或修饰的形式。

[0019] 本发明还提供了制备产生人源化的、嵌合的或修饰的抗体的细胞系方法。一些方法包含将编码抗体的重链和轻链的载体及选择性标志物导入细胞;在一定条件下繁殖细胞以选择拷贝数增加的载体的细胞;从选定细胞中分离单个细胞;并将由基于抗体产量选择的单个细胞克隆的细胞建库;其中所述抗体是16B5的人源化的、嵌合的或修饰的形式。

[0020] 本发明还提供了包含本文所公开的任意抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0021] 本发明还提供了包含编码重链可变区的区段的核酸,所述重链可变区具有序列SEQ ID NO:10。

[0022] 本发明还提供了包含编码重链可变区的区段的核酸,所述重链可变区具有序列SEQ ID NO:15。在一些核酸中,所述区段具有核苷酸序列SEQ ID NO:25。一些核酸还包含编码IgG1恒定区的区段,任选地人IgG1恒定区,例如,具有序列SEQ ID NO:29,条件是C-末端赖氨酸可被省略。在一些核酸中,编码IgG1恒定区的区段具有核苷酸序列SEQ ID NO:30。一些此类核酸还包含连接编码重链可变区和IgG1恒定区的区段的内含子。例如,所述内含子可具有SEQ ID NO:31中发现的内含子的序列。因此,所述内含子和编码IgG1恒定区的区段可具有核苷酸序列SEQ ID NO:31。

[0023] 本发明还提供了包含编码轻链可变区的区段的核酸,所述轻链可变区具有序列

SEQ ID NO:16。

[0024] 本发明还提供了包含编码轻链可变区的区段的核酸,所述轻链可变区具有序列SEQ ID NO:21、22或23。在一些核酸中,所述编码轻链可变区的区段具有序列SEQ ID NO:26、27或28。一些此类核酸还包含编码κ恒定区的区段。所述κ恒定区可以是人κ恒定区且具有序列SEQ ID NO:32。任选地,编码κ恒定区的核酸具有序列SEQ ID NO:33。一些此类核酸还包含连接编码轻链可变区的区段和编码κ恒定区的区段的内含子。例如,所述内含子可具有SEQ ID NO:34中发现的内含子的序列。因此,所述内含子和编码κ恒定区的区段可具有核苷酸序列SEQ ID NO:34。

[0025] 任意上述抗体可包含重链和/或轻链,所述重链包含具有序列SEQ ID NO:29的人IgG1恒定区,所述轻链包含具有序列SEQ ID NO:32的人κ恒定区。

[0026] 本发明还提供了tau的分离片段,其包括SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46内的tau的3-10个连续残基。一些片段包括SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基30-39内的tau的3-10个连续残基。一些片段包括SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基33-37。一些片段任选地通过间隔基与载体分子连接,所述间隔基有助于引发对抗所述片段的抗体。一些片段是药物组合物的一部分,所述组合物包括可接受施用于人的佐剂。

[0027] 本发明还提供了治疗或实现预防阿尔茨海默病的方法。一些方法包括向患有阿尔茨海默病或处于患有阿尔茨海默病风险的患者施用有效方案的抗体或诱导所述抗体的试剂,所述抗体与SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46内的表位特异性结合,从而治疗或实现预防所述疾病。优选地,所述抗体是本文所述的抗体。在一些方法中,所述诱导所述抗体的试剂是tau的片段,其包括SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46内的tau的3-10个连续残基。在一些方法中,所述患者是ApoE4携带者。

[0028] 本发明还提供了治疗或实现预防tau相关疾病的方法。一些方法包括向患有疾病或处于患有该病风险的患者施用有效方案的抗体或诱导所述抗体的试剂,所述抗体与SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46内的表位特异性结合,从而治疗或实现预防所述疾病。优选地,所述抗体是本文中所述的抗体(例如,人源化的16B5抗体)。在一些方法中,所述诱导所述抗体的试剂是tau的片段,其包括SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46中tau的3-10个连续残基。在一些方法中,所述疾病是神经疾病。

[0029] 本发明还提供了减少tau异常传送的方法。一些方法包括向患有与tau异常传送相关的疾病或处于患有与tau异常传送相关的疾病风险的患者施用有效方案的抗体或诱导所述抗体的试剂,所述抗体与SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46内的表位特异性结合,从而治疗或实现预防所述疾病。优选地,所述抗体是本文中所述的抗体(例如,人源化的16B5抗体)。在一些方法中,所述诱导所述抗体的试剂是tau的片段,其包含SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46中tau的3-10个连续残基。

[0030] 本发明还提供了诱导tau的吞噬作用的方法。一些方法包括向患有与tau的积聚相关的疾病或处于患有与tau的积聚相关的疾病风险的患者施用有效方案的抗体或诱导所述抗体的试剂,所述抗体与SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46内的表位特异性结合。优选地,所述抗体是本文所述的抗体(例如,人源化的16B5抗体)。在一些方法中,所述诱导所述抗体的试剂是tau的片段,其包括SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的

残基24-46中tau的3-10个连续残基。在一些方法中,所述疾病是神经疾病。

[0031] 本发明还提供抑制tau聚集或沉积的方法。在某些实施方案中,所述方法包括向患有与tau聚集或沉积相关的疾病或处于患有与tau聚集或沉积相关的疾病风险的患者施用有效方案的抗体或诱导所述抗体的试剂,所述抗体与SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46内的表位特异性结合。优选地,所述抗体是本文所述的抗体(例如,a人源化的16B5抗体)。在一些方法中,所述诱导所述抗体的试剂是tau的片段,其包括SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46中tau的3-10个连续残基。在一些方法中,所述疾病是神经疾病。

[0032] 本发明还提供了抑制tau缠结形成的方法。一些方法包括向患有与tau缠结形成相关的疾病或处于患有与tau缠结形成相关的疾病风险的患者施用有效方案的抗体或诱导所述抗体的试剂,所述抗体与SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46内的表位特异性结合。优选地,所述抗体是本文所述的抗体(例如,a人源化的16B5抗体)。在一些方法中,所述诱导所述抗体的试剂是tau的片段,其包括SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46中tau的3-10个连续残基。在一些方法中,所述疾病是神经疾病。

[0033] 本发明还提供筛选抗阿尔茨海默病活性剂的方法。一些方法包括将所述试剂施用于表达tau转基因的转基因动物,并测定所述试剂是否抑制或延迟阿尔茨海默病的至少一个体征或症状,其中所述试剂是与SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot编号P10636-8)的残基24-46内的表位特异性结合的抗体,或诱导所述抗体的试剂。

[0034] 附图简述

[0035] 图1描述了设计用于对16B5单克隆抗体结合的表位作图的实验结果。含有全长Tau或Tau缺失突变体(Δ 5-24或 Δ 25-44)的Western印迹用16B5抗体(左图)或Tau46抗体(右图)染色。Tau46抗体与Tau的C-末端表位结合。

[0036] 图2描述了设计用于对16B5单克隆抗体结合的表位作图的实验结果。含有全长Tau或Tau缺失突变体的Western印迹用16B5抗体(左上图)或Tau46抗体(右图)染色。左下图示出了用16B5抗体染色的印迹曝光更长。该实验中分析的Tau缺失突变体包括 Δ 25-44、 Δ 5-24、 Δ 23-32、 Δ 30-39和 Δ 37-46。

[0037] 图3描述了设计用于对16B5单克隆抗体结合的表位作图的丙氨酸扫描实验结果。含有野生型Tau (WT) 或Tau的丙氨酸点突变体的Western印迹用16B5抗体(左图)或Tau46抗体(右图)染色。该实验中分析的Tau的丙氨酸突变体包括T30A、M31A、H32A、Q33A、D34A、Q35A、E36A、G37A、D38A、T39A、D40A、A41L和G42A。

[0038] 图4示出了在表达人tau.P301L蛋白的转基因小鼠脑干的肌氨酰不溶物中检测的tau蛋白相对量。所述小鼠用16B5抗体或6F10抗体被动免疫,非免疫IgG1同种型对照。通过Western印迹、抗体染色及所获信号的定量分析样品。用于检测tau的抗体包括抗磷酸化-tau特异性抗体(AT8,左上图;AT100,左下图;或1F5,右上图)和泛tau抗体(HT7,右下图)。

[0039] 图5示出了磷酸化-tau和总tau蛋白的比例(左图)及在表达人tau.P301L蛋白的转基因小鼠总脑干匀浆中检测的标准化的总tau量(右图)。所述小鼠用16B5抗体或6F10抗体被动免疫,非免疫IgG1同种型对照。通过Western印迹、抗体染色及所获信号的定量分析样品。使用AT8抗体检测磷酸化-tau且用HT7抗体检测总tau。使用抗GAPDH抗体来标准化在用16B5抗体和对照6F10抗体治疗的小鼠中检测到的tau量。

[0040] 图6描述了表达人tau.P301L蛋白的转基因小鼠小脑核的切片,使用AT8抗-磷酸化-tau抗体免疫组织化学染色。所述小鼠用16B5抗体(左上图)或6F10抗体(左下图)被动免疫,非免疫IgG1同种型对照。上面的条形图示出了16B5或6F10抗体被动免疫的小鼠的小脑间位核、小脑前部和后部、附带小脑外侧核(IntA/P/LAT)及丘脑底核附带未定带区(STH/ZI)内用AT8抗体检测的tau染色数量的定量分析。下面的条形图示出了使用AT100抗-磷酸化-tau抗体对16B5或6F10抗体被动免疫的小鼠的IntA/P/LAT和STH/ZI部分检测的磷酸化-tau染色数量的定量分析。使用Student's t测试评估统计学显著性,p<0.05。

[0041] 图7描述了用嵌合的16B5抗体和人源化的16B5抗体(H1L2和H1L3版)获得的tau免疫沉淀结果。Tau由阿尔茨海默病患者的额叶皮层样本的可溶性和不溶性部分免疫沉淀。使用多克隆抗-tau抗体(tau pAb)检测印迹的免疫沉淀物中存在的tau。

[0042] 定义

[0043] 通常以分离的形式提供单克隆抗体和其它治疗剂。这意味着所述药剂通常至少50% w/w纯度的由其生产或纯化过程产生的干扰蛋白及其它污染物,但不排除所述药剂与过量的药学上可接受的载体或旨在促进其应用的其它载体结合的可能性。有时单克隆抗体(或其它治疗剂)是至少60%、70%、80%、90%、95%或99% w/w纯度的由其生产或纯化过程产生的干扰蛋白及其它污染物。

[0044] 本发明的抗体通常以至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 $10^{10} M^{-1}$ 的结合常数与其指定的靶标结合。此类结合是特异性结合,其数量级可检测地更高,且明显区别于与至少一个不相关靶标的非特异性结合。特异性结合可以是特定功能性基团或特定空间适配(例如,锁匙型)之间的键形成结果,然而非特异性结合通常是范德华力(van der Waals force)的结果。然而特异性结合并不一定意味着一个单克隆抗体只结合一个且仅一个靶标。

[0045] 基本的抗体结构单元是亚基的四聚体。每个四聚体包括两对相同的多肽链,每对具有一条“轻”链(大约25kDa)和一条“重”链(大约50-70kDa)。每条链的氨基端部分包括大约100至110个或更多氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。该可变区最初表达连接到可裂解信号肽。无信号肽的可变区有时是指成熟的可变区。因此,例如,轻链成熟的可变区是指无轻链信号肽的轻链可变区。每条链的羧基端部分界定了恒定区,其主要负责效应功能。恒定区可包括CH1区、铰链区、CH2区和CH3区中的任一个或全部。

[0046] 轻链分为κ或λ。重链分为γ,μ,α,δ或ε,且分别定义抗体同种型为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在轻链和重链中,可变区与恒定区通过大约12个或更多个氨基酸的“J”区相连接,重链还包括大约10个或更多个氨基酸的“D”区(一般参见,Fundamental Immunology(Paul, W., 编,第二版,Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7) (通过引用的方式整体并入本文用于所有目的)。

[0047] 各轻链/重链对的成熟的可变区形成抗体结合位点。因此,完整的抗体具有两个结合位点。除了在双功能或双特异性抗体中,两个结合位点是相同的。所有链都示出了相同的相对保守框架区(FR)的一般结构,其被三个高变区连接,也称为互补决定区或CDR。每对双链的CDR通过框架区对齐,使其与特异性表位结合。从N-末端到C-末端,轻链和重链都包括FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。各个域的氨基酸排列根据Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991)或Chothia&Lesk, J.Mol.Biol.196:901-917(1987); Chothia等,Nature 342:

878-883 (1989) 定义。Kabat还提供了广泛使用的编号惯例 (Kabat编号) , 其中不同重链之间或不同轻链之间的相应残基被指定相同编号。

[0048] 术语“抗体”包括完整的抗体及其结合片段。通常, 片段与其来源的完整的抗体竞争以特异性结合靶标。片段包括独立的重链、轻链Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)c、Fv和单域抗体。单(可变)域抗体包括在常规抗体中由其VL配偶体分离的VH区(或反之亦然) (Ward等, 1989, *Nature* 341:544-546) 及来自如骆驼科 (Camelidae) 或软骨鱼类(例如, 护士鲨) 物种的VH区(有时称作VHH) , 其中VH区与VL区不相关(参见, 例如, WO9404678)。其中一条链是由其天然配偶体分离的单域抗体有时被称为Dabs且来自骆驼科或软骨鱼类的单域抗体有时被称为纳米体。在单域抗体中可能存在或不存在恒定区或恒定区的部分。例如, 来自骆驼科的天然单可变区抗体包括VHH可变区, 及CH2和CH3恒定区。单域抗体可以是通过与常规抗体类似的方法进行人源化的对象。Dab型抗体通常由人源抗体获得。纳米体型抗体来源于骆驼科或鲨鱼, 且可作为人源化对象。可通过重组DNA技术或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学分离产生片段。术语“抗体”还包括双特异性抗体。双特异性或双功能性抗体是具有两个不同重链/轻链对和两个不同结合位点的人工杂交抗体(参见, 例如, Songsivilai和Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny等, *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992))。

[0049] 术语“表位”是指抗原上与抗体结合的位点。表位可由连续的氨基酸或通过一种或多种蛋白三级折叠并列的非连续氨基酸形成。连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时被保留, 而通过三级折叠形成的表位通常在变性溶剂处理时丢失。表位在独特空间构象中通常包括至少3个, 更常见至少5个或8-10个氨基酸。当认为表位在蛋白质的氨基酸残基的范围内(例如, 在tau的残基25至44内)时, 所述范围包括界定其边界的残基。在范围内的某些残基有助于表位, 而其它的则没有作用。形成表位的残基可以是相互连续或可以不是连续的。相似地, 当抗体与氨基酸的特定范围内发现的表位结合时, 所述抗体不需要与范围内的全部氨基酸残基接触, 且由抗体接触的表位的残基可以是相互连续或可以是不连续的。确定表位空间构象的方法包括, 例如, x-射线晶体法和2维核磁共振。参见, 例如, *Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology*, 第66卷, Glenn E. Morris, 编 (1996)。

[0050] 识别相同或重叠表位的抗体可在简单的免疫测定中确定, 其示出了一种抗体与另一种抗体竞争结合靶抗原的能力。抗体的表位还可通过与抗原结合的抗体的X-射线晶体法限定以确定接触残基。或者, 如果降低或消除与一种抗体结合的抗原中的所有氨基酸突变降低或消除与另一种抗体的结合, 则两个抗体具有相同表位。如果降低或消除与一种抗体结合的一些氨基酸突变降低或消除与另一种抗体的结合, 则两个抗体具有重叠表位。本发明包括与16B5竞争和/或与16B5在tau的相同表位结合的抗体。

[0051] 通过检验测定抗体之间的竞争, 其中试验抗体抑制参照抗体(例如16B5)与共同抗原的特异性结合(参见, 例如, Junghans等, *Cancer Res.* 50:1495, 1990)。如果试验抗体过量(例如, 至少2x、5x、10x、20x或100x)抑制参照抗体结合至少50%但优选地75%、90%或99%, 如竞争结合检验中测得的, 则试验抗体与参照抗体竞争。通过竞争分析(竞争抗体)测定的抗体包括与参照抗体结合相同表位的抗体, 及与参照抗体结合的表位足够近的相邻表位结合用于空间位阻发生的抗体。

- [0052] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性处理的人或其它哺乳动物受试者。
- [0053] 为了将氨基酸取代分为保守的或非保守的,氨基酸分组如下:第I组(疏水性侧链):甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸;第II组(中性亲水侧链):半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸;第III组(酸性侧链):天冬氨酸、谷氨酸;第IV组(碱性侧链):天冬氨酰、谷氨酰、组氨酸、赖氨酸、精氨酸;第V组(残基影响链方向):甘氨酸、脯氨酸;及第VI组(芳香族侧链):色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。保守的取代包括同类别的氨基酸之间的取代。非保守的取代构成这些类别中的一个氨基酸向另一氨基酸的转换。
- [0054] 通过Kabat编号惯例最大限度地对齐抗体序列来确定百分比序列同源性。对齐之后,如果将受试者抗体区域(例如,轻链或重链的整个成熟的可变区)与参照抗体的相同区域比较,受试者抗体与参照抗体区域之间的百分比序列同源性是在受试者抗体和参照抗体区域由相同氨基酸占据的位置数除以两个区域对齐位置的总数(缺口不计算在内),乘以100换算成百分比。
- [0055] 术语“佐剂”是指与抗原一起施用时增强和/或改变抗原的免疫响应,但单独施用时不产生对抗原的免疫响应的化合物。佐剂可以通过几种机制增强免疫响应,所述机制包括淋巴细胞募集、B和/或T细胞的刺激以及巨噬细胞刺激。
- [0056] 如果一群疾病的患者的脑中tau水平增加,或tau沉积或包裹体增加,或脑中存在tau缠结,或脑中tau磷酸化增加(每分子tau磷酸基团的平均数),或与不知道患神经疾病的患者群相比tau的异常细胞间或细胞内传送,则该疾病与tau相关。如果与带有野生型(最常发生在人类群体的变异)tau基因的患者相比,带有变异型tau基因的患者患病风险增加,则该病也与tau有关。
- [0057] 如果受试者具有至少一个已知风险因素(例如,遗传学、生物化学、家族史、病情暴露),该风险因素使具有该风险因素的个体比不具有风险因素的个体处于统计学上显著的更大患病风险,则个体患病风险增加。
- [0058] 术语“症状”是指疾病的主观证据,如患者感觉到的变化的步态。“体征”是指医师观察到的疾病的客观证据。
- [0059] 统计学显著性意为 $p \leq 0.05$ 。

具体实施方式

- [0060] I. 概要
- [0061] 本发明提供了与tau结合的抗体。一些抗体与SEQ ID NO.1的残基23-46内的表位特异性结合。一些抗体与tau结合,与其磷酸化状态无关。本发明的一些抗体用于抑制或延迟tau-相关病状及其相关症状恶化。尽管本发明的实践不需要机制的理解,但通过稳定无毒构象或通过抑制tau致病形式的细胞间或细胞内传送以及其它机制,毒性降低是由诱导tau的吞噬作用,在分子间或分子内的聚集、或结合于其它分子时抑制tau的抗体导致的。本发明的抗体或诱导所述抗体的试剂可用于治疗或实现预防阿尔茨海默病及其它与tau相关的疾病的方法中。
- [0062] II. Tau
- [0063] 除非上下文中另有明显说明,tau的引用是指天然人源化形式tau,包括所有同种型,与是否存在翻译后修饰(例如,磷酸化、糖基化或乙酰化)无关。人脑中主要存在六个tau

同种型(剪接变异数)。这些变体中最长的具有441个氨基酸,其中初始甲硫氨酸残基被裂解。根据441同种型编号残基。因此,例如,引用在位置404的磷酸化意为441同种型的位置404,或任何其它同种型与441同种型最大限度对齐时的相应位置。同种型的氨基酸序列及Swiss-Prot编号如下所示。

[0064] P10636-8 (SEQ ID NO:1)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG	TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG
130	140	150	160	170	180
HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK
190	200	210	220	230	240

[0065]

TPPSSGEPPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSRS	RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
250	260	270	280	290	300
SRLQTAPVPM	PDLKNVKSK	GSTENLKHQP	GGGKVQIINK	KLDLSNVQSK	CGSKDNIKHV
310	320	330	340	350	360
PGGGSVQIVY	KPVDSLKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDKFDRV	QSKIGSLDNI
370	380	390	400	410	420
THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHL	VSSTGSIDMV
430	440				
DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L			

[0066] P10636-7 (SEQ ID NO:2)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAAEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMV	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT
130	140	150	160	170	180
KIATPRGAAP	PGQKGQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEPP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
190	200	210	220	230	240
SRTPSLPTPP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVKSK	IGSTENLKHQ
250	260	270	280	290	300
PGGGKVQIIN	KKLDLSNVQS	KCGSKDNIKH	VPGGGSVQIV	YKPVDLSKV	SKCGSLGNIH
310	320	330	340	350	360
HKPGGGQVEV	KSEKLDKFDR	VQSKIGSLDN	IETHVPGGGN	KIETHKLTFR	ENAKAKTDHG
370	380	390	400	410	
AEIVYKSPVV	SGDTSPRHL	NVSSTGSIDM	VDSPQLATL	DEVSASLAKQ	GL

[0068] P10636-6 (SEQ ID NO:3)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEAEAGI	GDTPSLEDEA
70	80	90	100	110	120
AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKGQANA	TRIPAKTPPA
130	140	150	160	170	180
PKTPPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV	VRTPPKSPSS
190	200	210	220	230	240
AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQII	NKKLDLSNVQ	SKCGSKDNIK
250	260	270	280	290	300
HVPGGGSVQI	VYKPVDLSKV	TSKCGSLGNI	HHKPGGGQVE	VKSEKLDKF	RVQSKIGSLD
310	320	330	340	350	360
NITHVPGGGN	KKIETHKLTF	RENAKAKTDH	GAEIVYKSPV	VSGDTSPRHL	SNVSSTGSID
370	380				
MVDSPQLATL	ADEVSASLAK	QGL			

[0070] P10636-5 (SEQ ID NO:4)

	10	20	30	40	50	60
	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
	70	80	90	100	110	120
	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG	TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG
	130	140	150	160	170	180
[0071]	HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK
	190	200	210	220	230	240
	TPPSSGEPPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSRS	RTPSLPTPPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
	250	260	270	280	290	300
	SRLQTAPVPM	PDLKNVKSK	GSTENLKHQP	GGGKVQIVYK	PVDLSKVTSK	CGSLGNIHHK
	310	320	330	340	350	360
	PGGGQVEVKS	EKLDFKDRVQ	SKIGSLDNIT	HVPGGGNKKI	ETHKLTFREN	AKAKTDHGAE
[0072]	370	380	390	400	410	
	IVYKSPVVSG	DTSPRHLNSV	SSTGSIDMVD	SPQLATLAD	VSASLAKQGL	
[0073]	P10636-4 (SEQ ID NO:5)					
	10	20	30	40	50	60
	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
	70	80	90	100	110	120
	SETSDAKSTP	TAEEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMV	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT
	130	140	150	160	170	180
	KIATPRGAAP	PGQKGQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEPP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
	190	200	210	220	230	240
[0074]	SRTPSLPTPP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVKSK	IGSTENLKHQ
	250	260	270	280	290	300
	PGGGKVQIVY	KPVDSLKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDKFDRV	QSKIGSLDNI
	310	320	330	340	350	360
	THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLN	VSSTGSIDMV
	370	380				
	DSPQLATLAD	EVASLAKQGL	L			
[0075]	P10636-2 (SEQ ID NO:6)					
	10	20	30	40	50	60
	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEAEAGI	GDTPSLEDEA
	70	80	90	100	110	120
	AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKGQANA	TRIPAKTPPA
	130	140	150	160	170	180
	PKTPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV	VRTPPKSPSS
	190	200	210	220	230	240
[0076]	AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQIV	YKPVDSLKV	SKCGSLGNIH
	250	260	270	280	290	300
	HKPGCCQVEV	KSEKLDKFDR	VQSKIGSLDN	I	THVPGGGNK	KIETHKLTFR
	310	320	330	340	350	
	AEIVYKSPVV	SGDTSPRHL	NVSSTGSIDM	VDSPQLATLA	DEVSASLAKQ	GL

[0077] tau的引用包括已知的大约30个Swiss-Pro数据库中列举的天然变异体及其排列,以及与tau病理学相关的突变,如痴呆、皮克氏病、核上性麻痹等(参见,例如,Swiss-Pro database和Poorkaj,等,Ann Neurol.43:815-825(1998))。由441同种型编号的tau突变体的一些实例是赖氨酸在氨基酸残基257(K257T)突变为苏氨酸;异亮氨酸在氨基酸位置260(I260V)突变为缬氨酸;甘氨酸在氨基酸位置272(G272V)突变为缬氨酸;天冬酰胺在氨基酸位置279(N279K)突变为赖氨酸;天冬酰胺在氨基酸位置296(N296H)突变为组氨酸;脯氨酸在氨基酸位置301(P301S)突变为丝氨酸;甘氨酸在氨基酸位置303(G303V)突变为缬氨酸;丝氨酸在位置305(S305N)突变为天冬氨酸;甘氨酸在氨基酸位置335(G335S)突变为丝氨酸;缬氨酸在位置337(V337M)突变为甲硫氨酸;谷氨酸在位置342(E342V)突变为缬氨酸;赖

氨酸在氨基酸位置369 (K369I) 突变为异亮氨酸；甘氨酸在氨基酸位置389 (G389R) 突变为精氨酸；及精氨酸在氨基酸位置406 (R406W) 突变为色氨酸。

[0078] Tau可在一个或多个氨基酸残基处被磷酸化，其包括酪氨酸在氨基酸位置18、29、97、310和394，丝氨酸在氨基酸位置184、185、198、199、202、208、214、235、237、238、262、293、324、356、396、400、404、409、412、413和422；及苏氨酸在氨基酸位置175、181、205、212、217、231和403。

[0079] III. 抗体

[0080] A. 结合特异性和功能特性

[0081] 本发明提供了与tau结合的抗体。一些抗体与SEQ ID NO.1的残基23-46内的表位特异性结合。一些抗体与SEQ ID NO.1的残基25-44内的表位特异性结合。一些抗体与SEQ ID NO.1的残基28-41内的表位特异性结合。一些抗体与SEQ ID NO.1的残基30-39内的表位特异性结合。一些抗体与SEQ ID NO.1的残基30-36内的表位特异性结合。一些抗体与SEQ ID NO.1的残基33-39内的表位特异性结合。一些抗体与SEQ ID NO.1的残基28-30、28-31、28-32、28-33、28-34、28-35、28-36、28-37、28-38、28-39、28-40、28-41、29-31、29-32、29-33、29-34、29-35、29-36、29-37、29-38、29-39、29-40、29-41、30-32、30-33、30-34、30-35、30-36、30-37、30-38、30-39、30-40、30-41、31-33、31-34、31-35、31-36、31-37、31-38、31-39、31-40、31-41、32-34、32-35、32-36、32-37、32-38、32-39、32-40、32-41、33-35、33-36、33-37、33-38、33-39、33-40、33-41、34-36、34-37、34-38、34-39、34-40、34-41、35-37、35-38、35-39、35-40、35-41、36-38、36-39、36-40、36-41的表位特异性结合。一些抗体与tau结合，与其磷酸化状态无关。一些抗体与不包含磷酸化残基的表位结合。可通过纯化自天然来源或重组表达的tau多肽进行免疫来获得这些抗体。可筛选抗体用于结合未磷酸化形式的tau及其中易受磷酸化作用的一个或几个残基已磷酸化的tau。此类抗体优选地以不可辨别的亲和力或至少与非磷酸化tau (即，“pan特异性”) 相比具有1.5、2或3倍的系数来结合磷酸化tau。16B5是pan特异性单克隆抗体的实例。本发明还提供了与任何上述抗体相同表位 (如，16B5的表位) 结合的抗体。还包括与任何上述抗体竞争结合tau的抗体，例如，与16B5竞争。

[0082] 可通过用包含SEQ ID NO:1的残基23-46、25-44、28-30、28-31、28-32、28-33、28-34、28-35、28-36、28-37、28-38、28-39、28-40、28-41、29-31、29-32、29-33、29-34、29-35、29-36、29-37、29-38、29-39、29-40、29-41、30-32、30-33、30-34、30-35、30-36、30-37、30-38、30-39、30-40、30-41、31-33、31-34、31-35、31-36、31-37、31-38、31-39、31-40、31-41、32-34、32-35、32-36、32-37、32-38、32-39、32-40、32-41、33-35、33-36、33-37、33-38、33-39、33-40、33-41、34-36、34-37、34-38、34-39、34-40、34-41、35-37、35-38、35-39、35-40、35-41、36-38、36-39、36-40、36-41的肽，或用全长tau多肽及其包括此类残基的片段进行免疫，并筛选用于特异性结合包括此类残基的肽重新产生上述抗体。此类肽优选地连接于帮助引发抗体对肽的响应的异源缀合物分子。可直接地或通过间隔肽或氨基酸连接。半胱氨酸用作间隔氨基酸，因为其游离SH基团有利于连接载体分子。还可使用在甘氨酸和肽之间含有或不含有半胱氨酸残基的聚甘氨酸连接子 (例如，2-6个甘氨酸)。载体分子用于有助于引发抗体对肽的响应的T-细胞表位。常用的几种载体具体为匙孔血蓝蛋白 (KLH)、卵清蛋白和牛血清蛋白 (BSA)。肽间隔基可被添加到肽免疫原作为固相肽合成的一部分。载体通常通

过化学交联加入。可以使用的化学交联剂的一些实例包括交叉-N-马来酰亚胺基-6-氨基乙酰基酯或间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS) (参见,例如,Harlow,E.等, *Antibodies:A Laboratory Manual*,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.1988;Sinigaglia等, *Nature*,336:778-780(1988);Chicz等, *J.Exp.*编,178:27-47(1993);Hammer等, *Cell* 74:197-203(1993);Falk K.等, *Immunogenetics*,39:230-242(1994);W0 98/23635;以及Southwood等, *J.Immunology*,160:3363-3373(1998))。如果存在载体和间隔基,其可被连接到免疫原的任一端。

[0083] 具有任选的间隔基和载体的肽可用于免疫如下更详细描述的实验室动物或B细胞。杂交瘤上清液可用于测试与包括SEQ ID N0:1的残基24-46、25-44、28-30、28-31、28-32、28-33、28-34、28-35、28-36、28-37、28-38、28-39、28-40、28-41、29-31、29-32、29-33、29-34、29-35、29-36、29-37、29-38、29-39、29-40、29-41、30-32、30-33、30-34、30-35、30-36、30-37、30-38、30-39、30-40、30-41、31-33、31-34、31-35、31-36、31-37、31-38、31-39、31-40、31-41、32-34、32-35、32-36、32-37、32-38、32-39、32-40、32-41、33-35、33-36、33-37、33-38、33-39、33-40、33-41、34-36、34-37、34-38、34-39、34-40、34-41、35-37、35-38、35-39、35-40、35-41、36-38、36-39、36-40、36-41的一个或多个肽,和/或tau的磷酸化和未磷酸化的形式进行结合的能力,如,位置404磷酸化的tau全长同种型。所述肽可以连接到载体或其它标签以促进筛选检验。在这种情况下,载体或标签优选地不同于用于免疫的间隔基和载体分子的组合以清除特异于间隔基或载体而不是tau肽的抗体。可使用任何tau同种型。

[0084] 对于选定小鼠抗体(例如,16B5)具有结合特异性的抗体还可使用噬菌体变体显示方法产生。参见Winter, WO 92/20791。这种方法特别适合产生人抗体。在这种方法中,选定小鼠抗体的重链或轻链可变区可用作起始材料。如果,例如,选择轻链可变区为起始材料,则构建噬菌体库,其中成员显示相同的轻链可变区(即,小鼠起始材料)和不同的重链可变区。例如,重链可变区可由重排的人重链可变区库获得。选择显示所需靶标(例如,tau肽)强特异性结合(例如,至少 10^8 且优选地至少 $10^9 M^{-1}$)的噬菌体。然后,所述噬菌体的重链可变区用作起始材料构建进一步的噬菌体库。在这个库中,每个噬菌体显示相同的重链可变区(即,第一个显示库确定的所述区)和不同的轻链可变区。例如,轻链可变区可由重排的人轻链可变区库获得。再次选择显示所需靶标强特异性结合的噬菌体。所获得抗体通常与小鼠起始材料具有相同或相似的表位特异性。

[0085] 可通过诱变编码示例性抗体(如16B5)的重链和轻链的cDNA获得其它抗体。本发明中还包括与16B5成熟的重链和/或轻链可变区的氨基酸序列至少90%、95%或99%相同并保持其功能特性的单克隆抗体,和/或通过少量功能上不重要的氨基酸取代(例如,保守取代)、缺失或插入其与相应抗体不同。本发明还包括具有至少一个且优选地全部六个如Kabat所定义的CDR的单克隆抗体,所述CDR与16B5的相应CDR的90%、95%、99%或100%相同。

[0086] B. 非人抗体

[0087] 其它针对免疫原的非人单克隆抗体的产生,例如,小鼠、豚鼠、灵长类动物、兔或大鼠,可通过,例如,用上述免疫原免疫动物进行。参见Harlow&Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY,1988) (通过引用的方式并入本文)。这种免疫原可以通过肽

合成或重组表达由天然来源获得。

[0088] 可选地,免疫原可与佐剂一起施用。可使用如下所述的几种类型的佐剂。优选的用于免疫实验室动物的是完全弗氏佐剂(Complete Freund's adjuvant)后伴随不完全佐剂。兔或豚鼠通常用于制备单克隆抗体。小鼠通常用于制备单克隆抗体。筛选特异性结合的抗体,任选地,进一步筛选与tau的特定区结合的抗体。可通过测定抗体与tau的缺失突变体集合的结合并确定哪个缺失突变体结合所述抗体完成此类筛选。例如,可通过Western印迹、FACSTM或ELISA评价结合。

[0089] C.人源化抗体

[0090] 人源化抗体是基因工程抗体,其中将非人“供体”抗体(例如,16B5)的CDR移植到人“受体”抗体序列(参见,例如,Queen,US5,530,101和5,585,089;Winter,US 5,225,539,Carter,US 6,407,213,Adair,US 5,859,2056,881,557,Foote,US 6,881,557)。受体抗体序列可以是,例如,成熟的人抗体序列、此类序列的组合、人抗体序列的共同序列或胚系区序列。因此,人源化抗体是一种抗体,其具有一些或全部完全地或基本上来自供体抗体的CDR以及(如果存在)完全地或基本上来自人抗体序列的可变区框架序列和恒定区。相似地人源化的重链具有至少一个、两个及通常所有三个完全地或基本上来自供体抗体重链的CDR,以及(如果存在)基本上来自人重链可变区框架和恒定区序列的重链可变区框架序列和重链恒定区。相似地人源化的轻链具有至少一个、两个及通常所有三个完全地或基本上来自供体抗体轻链的CDR,以及(如果存在)基本上来自人轻链可变区框架和恒定区序列的轻链可变区框架序列和轻链恒定区。除了纳米体和dAbs,人源化抗体包括人源化的重链和人源化的轻链。人源化抗体中的CDR基本上来自非人抗体中相应的CDR,其中各自的CDR之间至少85%、90%、95%或100%相应的残基(如Kabat所定义的)是相同的。抗体链的可变区框架序列及抗体链的恒定区基本上分别来自人可变区框架序列或人恒定区,其中至少85%、90%、95%或100%如Kabat所定义的相应残基是相同的。

[0091] 尽管人源化抗体通常合并了来自小鼠抗体的所有六个CDR(优选地如Kabat所定义的),但是它们也可由少于所有来自小鼠抗体的CDR(例如,至少3、4或5个)制备(例如,Pascalis等,J.Immunol.169:3076,2002;Vajdos等,Journal of Molecular Biology,320:415-428,2002;Iwahashi等,Mol.Immunol.36:1079-1091,1999;Tamura等,Journal of Immunology,164:1432-1441,2000)。

[0092] 在一些抗体中,只需要CDR的一部分保持人源化抗体中的结合,所述CDR的一部分,即结合所必需的CDR残基亚类,称为SDR。不接触抗原且不在SDR中的CDR残基可基于以前的研究(例如,CDR H2中的残基H60-H65通常不需要),从乔西亚高变区环(Chothia hypervariable loop)外的Kabat CDR区(Chothia,J.Mol.Biol.196:901,1987),通过分子建模和/或经验地,或如Gonzales等,Mol.Immunol.41:863,2004中所描述而确定。在位于一个或多个供体CDR残基缺失或整个供体CR被省略的位置的此类人源化抗体中,占据所述位置的氨基酸可以是占据受体抗体序列中相应位置(通过Kabat编号)的氨基酸。CDR中包括的供体氨基酸的受体的此类取代数目反应了竞争考虑的平衡。此类取代对减少人源化抗体中小鼠氨基酸数量具有潜在优势,且因此降低潜在免疫原性。然而,取代还可能导致亲和性的变化,且优选地避免亲和性的显著降低。还可经验地选择CDR内的取代的位置及待取代的氨基酸。

[0093] 任选地人受体抗体序列可选自许多已知的人抗体序列以在人受体序列可变区框架和相应的供体抗体链的可变区框架之间提供高度的序列同源性(例如,65-85%的同源性)。

[0094] 某些人可变区框架残基的氨基酸可基于其对CDR构象和/或结合抗原的影响被选择用于取代。通过建模、检测特定位置的氨基酸特征或对特定氨基酸的取代或突变效应的经验观察,来研究此类可能的影响。

[0095] 例如,当小鼠可变区框架残基与选定的人可变区框架残基之间的氨基酸不同时,可合理地预期所述氨基酸时人框架氨基酸可被来自小鼠抗体的等效的框架氨基酸等效的来自小鼠抗体的框架氨基酸取代:

[0096] (1) 非共价地直接结合抗原;

[0097] (2) 与CDR区相邻;

[0098] (3) 另外与CDR区(例如,在CDR区约6Å内)相互作用(例如,通过在同源的已知免疫球蛋白链的已解析结构上对轻链或重链建模来确定);以及

[0099] (4) 参与VL-VH界面的残基。

[0100] Queen, US 5,530,101定义的类别(1)-(3)的框架残基有时交替地称为典型残基和游标残基。对确定CDR环构象的供体CDR环的典型类别进行界定的框架残基有时称为典型残基(Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987), Thornton&Martin J. Mol. Biol., 263, 800-815, 1996)。支持抗原结合环构象在抗体对抗原的适配其起微调作用的一层框架残基有时称为游标残基(Foote&Winter, 1992, J Mol Bio. 224, 487-499)。其它取代的候选是创建潜在糖基化位点的残基。其它取代的候选是受体人框架氨基酸,其对于那个位置上的人免疫球蛋白是不常见的。这些氨基酸可由来自小鼠供体抗体等效位置或更典型的人免疫球蛋白的等效位置的氨基酸取代。其它取代的候选是受体人框架氨基酸,其对于那个位置上的人免疫球蛋白是不常见的。

[0101] 本发明提供了小鼠16B5抗体的人源化形式。所述小鼠抗体包含成熟的重链和轻链可变区,其分别具有包括SEQ ID NOS.10和16的氨基酸序列。本发明提供了一个示例性的人源化成熟的重链可变区(H1)和三个示例性的人源化成熟的轻链可变区(L1、L2和L3)。H1L2变体具有与嵌合的16B5相同或更好的亲和性及七个回复突变。H1L1和H1L3具有与嵌合的16B5相似的亲和性及六个回复突变。

[0102] 本发明提供了H1L2人源化的16B5抗体变体,其中人源化成熟的重链可变区示出了与SEQ ID N0:15至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,人源化成熟的轻链可变区示出了与SEQ ID N0:22至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,在此类抗体中保留了H1L2中的一些或所有回复突变。换言之,至少1、2或3个位置的位置H13被K占据,位置H48被M占据且位置H91被F占据。优选地,至少1、2、3或全部4个位置的位置L1被N占据,位置L4被L占据,位置L36被F占据且位置L43被S占据。此类人源化抗体的CDR区优选地与H1L2的CDR区相同或基本相同,H1L2的CDR区与小鼠供体抗体相同。所述CDR区可通过任何常规定义(例如,Chothia)来定义但优选地如Kabat所定义的。

[0103] 16B5变体中其它变异的一种可能性是在可变区框架中的额外的回复突变。许多不与人源化的mAb中的CDR接触的框架残基可以适应来自供体小鼠mAb或其它小鼠或人抗体相应位置的氨基酸取代,且甚至许多潜在的CDR-接触残基也可以取代或甚至CDR内的氨基

酸可被残基改变,例如,用于提供可变区框架的人受体序列的相应位置发现的残基。此外,改变的人受体序列可用于,例如,重链和/或轻链。如果使用不同的受体序列,以上推荐的一个或多个回复突变可能不发生,因为相应的供体和受体残基已经是相同的,而没有回复突变。例如,当使用其中位置H13已经被K占据的重链受体序列时,回复突变是非必要的。

[0104] 本发明还包括人源化抗体,其中成熟的轻链和重链可变区示出了与人源化的16B5 H1L1抗体的成熟的轻链和重链可变区(分别为SEQ ID N0s:21和15)或人源化的16B5 H1L3抗体的成熟的轻链和重链可变区(分别为SEQ ID N0s:23和15)至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0105] D. 嵌合的及修饰的抗体

[0106] 本发明还提供嵌合的及修饰的形式的非人抗体,特别是16B5抗体。

[0107] 嵌合的抗体是其中非人抗体(例如,小鼠)的成熟的轻链和重链可变区与人轻链和重链恒定区结合的抗体。此类抗体基本上或完全地保留了小鼠抗体的结合特异性,且为约三分之二的人序列。

[0108] 修饰的抗体是一种类型的人源化抗体,其保留一些和通常是全部的CDR以及一些非人抗体的非人可变区框架残基,但用来自人抗体序列的对应位置的残基取代其它可能有助于B细胞或T细胞表位的可变区框架残基,例如暴露的残基(Padlan, Mol. Immunol. 28: 489, 1991)。结果是产生其中CDR全部或基本上来自非人抗体的抗体,并且通过取代使得非人抗体的可变区框架更人类化。本发明中包括任何修饰形式的16B5抗体。

[0109] E. 人抗体

[0110] 通过下述各种技术提供了对tau的人抗体。产生人抗体的方法包括三源杂交瘤方法(Oestberg等,Hybridoma 2:361-367 (1983);Oestberg,U.S.Patent No.4,634,664;和Engleman等,US Patent 4,634,666),使用包含人免疫球蛋白基因的转基因小鼠(参见,例如,Lonberg等,W093/12227 (1993);US 5,877,397,US 5,874,299,US 5,814,318,US 5,789,650,US 5,770,429,US 5,661,016,US 5,633,425,US 5,625,126,US 5,569,825,US 5,545,806,Nature 148,1547-1553 (1994)、Nature Biotechnology 14,826 (1996)、Kucherlapati,W0 91/10741 (1991))及噬菌体显示方法(参见,例如,Dower等,W0 91/17271和McCafferty等,W0 92/01047,US 5,877,218,US 5,871,907,US 5,858,657,US 5,837,242,US 5,733,743和US 5,565,332)。

[0111] F. 恒定区的选择

[0112] 嵌合的、人源化的(包括修饰的)或人抗体的重链和轻链可变区可连接于至少一部分的人恒定区。恒定区的选择部分取决于,是否需要抗体-依赖性补体和/或细胞介导的细胞毒性。例如,人同种型IgG1和IgG3具有补体介导的细胞毒性,然而人同种型IgG2和IgG4具有较弱的或无补体介导的细胞毒性。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 。抗体可表达为含有两个轻链和两个重链的四聚体,单独的重链、轻链,Fab、Fab'、F(ab')2和Fv,或其中重链和轻链可变区通过间隔基连接的单链抗体。

[0113] 人恒定区在不同个体中示出了同种异型变异和同族同种异型变异,即所述恒定区在不同个体中的一个或多个多肽性位置不同。同族同种异型与同种异型的差异在于血清识别与一个或多个其它同种型的非多态性区结合的同族同种异型。人恒定区的引用包括具有任何天然同种异型或任何占据天然同种异型中多态性位置的残基的取代或减弱或增强下

述效应功能的达3、5或10个取代的恒定区。

[0114] 轻链和/或重链的氨基或羧基末端的一个或几个氨基酸,如重链的C-末端赖氨酸,可以一定比例或全部的分子缺失或衍生。可在恒定区中发生取代以减弱或增强效应功能,如补体介导的细胞毒性或ADCC(参见,例如,Winter等,US Patent No.5,624,821;Tso等,US Patent No.5,834,597;和Lazar等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:4005,2006),或延长在人体中的半衰期(参见,例如,Hinton等,J.Biol.Chem.279:6213,2004)。示例性取代包括位置250的谷氨酰胺和/或位置428的亮氨酸(在本段恒定区中使用的EU编号),用于增加抗体的半衰期。在位置234、235、236和/或237中的任一个或全部的取代降低对Fc γ 受体的亲和性,特别是Fc γ RI受体(参见,例如,US 6,624,821)。人IgG1位置234、235和237的丙氨酸取代优选地用来减弱效应物功能。可选地,人IgG2的位置234、236和/或237被丙氨酸取代且位置235被谷氨酰胺取代。(参见,例如,US 5,624,821.)

[0115] G. 重组抗体的表达

[0116] 嵌合的、人源化的(包括修饰的)和人抗体通常通过重组表达产生。编码所述抗体的核酸可进行密码子优化以在所需细胞型(例如,CHO或Sp2/0)中表达。本文所公开的编码人源化的16B5重链和轻链可变区的核酸具有包含,例如SEQ ID NO:25(编码Hu16B5 H1)、SEQ ID NO:26(编码Hu16B5 L1)、SEQ ID NO:27(编码Hu16B5 L2)或SEQ ID NO:28(编码Hu16B5 L3)的序列。对于包含信号肽如SEQ ID NOS.10和16的可变区,所述核酸可以编码具有或不具有信号肽的可变区。编码重链和轻链的核酸区段可存在于相同的连续的核酸分子或分开的分子上。重链和轻链可由相同载体或不同载体表达。通常以分离形式提供核酸。

[0117] 编码人源化的16B5重链可变区的核酸可连接于编码人IgG1恒定区的核酸区段,例如,具有序列SEQ ID NO:30。此类核酸还可包含位于编码重链可变区和IgG1恒定区的区段之间的内含子,即5'端至编码恒定区的区段。SEQ ID NO:31中示出了编码人IgG1恒定区并在其5'端具有小鼠内含子的示例性核酸序列。

[0118] 编码人源化的16B5轻链可变区的核酸可接于编码人 κ 恒定区的核酸区段,例如,具有序列SEQ ID NO:33。此类核酸还可包含位于编码轻链可变区和人 κ 恒定区的区段之间的内含子,即5'端至 κ 恒定区。SEQ ID NO:34中示出了编码人 κ 恒定区并在其5'端具有人内含子的示例性核酸序列。

[0119] 重组多核苷酸构建体通常包括与抗体链的编码序列可操作地连接的表达调控序列,其包括天然相关的或异源的启动子区。优选地,所述表达调控序列是载体中能够转化或转染真核宿主细胞的真核启动子系统。一旦所述载体并入合适的宿主中,宿主维持在一定条件下以在适于核苷酸序列的高水平表达、以及交叉反应抗体的收集和纯化。编码抗体链的载体还可以包含可选基因,如二氢叶酸还原酶或谷氨酰胺合成酶,使编码抗体链的核酸拷贝数扩增。

[0120] 大肠杆菌(E.coli)是特别用于表达抗体的原核宿主,所述抗体特别是抗体片段。微生物,如酵母也可用于表达。酵母菌是优选的酵母宿主,带有合适的载体,所述载体具有所需的表达调控序列、复制起点、终止序列等。典型的启动子包含3-磷酸甘油酸激酶和其它糖醇解酶。诱导型酵母启动子包括,来自醇脱氢酶、异细胞色素C及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0121] 哺乳动物细胞是用于表达编码免疫球蛋白或其片段的核苷酸区段的优选宿主。参

见 Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987)。本领域中已研发许多合适的能够分泌完整异源蛋白质的宿主细胞系,其包括CHO细胞系、各种COS细胞系、HeLa细胞、HEK293细胞、L细胞,非抗体产生的包含Sp2/0和NS0的骨髓瘤。优选地,所述细胞是非人的。这些细胞的表达载体可以包含表达调控序列,如复制起点、启动子、增强子(Queen等, Immunol. Rev. 89:49 (1986)),及必需的加工信息位点,如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。优选的表达调控序列是源自内源基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒等的启动子。参见Co等, J. Immunol. 148:1149 (1992)。

[0122] 将编码抗体重链和轻链的载体导入细胞培养物中,可在无血清培养基中筛选出用于生长生产率和产物质量的细胞群。然后将以上产生的细胞群经基于FACS的单个细胞克隆以产生单克隆系。优选地,具体生长率超过每天每细胞50pg或100pg,其对应的产物效价大于7.5g/L培养基。由单个细胞克隆产生的抗体还可检测浊度、过滤性能、PAGE、IEF、UV扫描、HP-SEC、糖类-低聚糖作图、质谱及结合测定,如ELISA或Biacore。然后将选定的克隆子在多个小瓶中建库并冻存以备后续使用。

[0123] 抗体一旦表达,可根据本领域的标准流程纯化,所述流程包括蛋白质A捕获、柱色谱法(例如,疏水作用或离子交换)、用于病毒失活的低pH等(一般参见,Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982))。

[0124] 可以采用商业生产抗体的方法,包括密码子优化、启动子选择、转录元件和终止子、无血清的单个细胞克隆、细胞建库、使用扩增拷贝数选择性标志物、CHO终止子、无血清的单个细胞克隆、蛋白质效价的提高(参见,例如,US 5,786,464、US 6,114,148、US 6,063,598、US 7,569,339、W02004/050884、W02008/012142、W02008/012142、W02005/019442、W02008/107388和W02009/027471,及US 5,888,809)。

[0125] IV. 活性免疫原

[0126] 用于主动免疫的试剂用作在患者中诱导联系上述被动免疫所述的相同类型的抗体。用于主动免疫的试剂可以是用于在实验室动物中产生单克隆抗体的相同类型的免疫原,例如,3-15或3-12或5-12或5-8个连续氨基酸的肽,所述氨基酸来自对应于SEQ ID NO.1的残基23-46、25-44、28-41或30-39的tau区,如,包括SEQ ID NO:1的残基28-30、28-31、28-32、28-33、28-34、28-35、28-36、28-37、28-38、28-39、28-40、28-41、29-31、29-32、29-33、29-34、29-35、29-36、29-37、29-38、29-39、29-40、29-41、30-32、30-33、30-34、30-35、30-36、30-37、30-38、30-39、30-40、30-41、31-33、31-34、31-35、31-36、31-37、31-38、31-39、31-40、31-41、32-34、32-35、32-36、32-37、32-38、32-39、32-40、32-41、33-35、33-36、33-37、33-38、33-39、33-40、33-41、34-36、34-37、34-38、34-39、34-40、34-41、35-37、35-38、35-39、35-40、35-41、36-38、36-39、36-40、36-41的肽。为了诱导与16B5的相同或重叠表位结合的抗体,这些抗体的特异性表位可被作图(例如,通过检测与一系列重叠肽扫描tau的结合)。然后包含或重叠表位的tau的片段可以用作免疫原。此类片段通常以未磷酸化的形式而使用。

[0127] 如果使用异源载体和佐剂,其可以与产生单克隆抗体的载体和佐剂相同,但其还可被选择以得到更好的药物适用性用于人。合适的载体包括血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵清蛋白、破伤风类毒素,或来自其它病原性细菌的类毒素,如白喉(例如,CRM 197)、大肠杆菌、霍乱、或幽门螺杆菌(*H. pylori*),或减毒的毒素衍生物。

T cell表位也是合适的载体分子。一些缀合物可通过连接本发明的试剂形成免疫刺激聚合物分子(例如,三棕榈-S-甘油半胱氨酸(Pam₃Cys)、甘露聚糖(甘露糖聚合物)或葡聚糖(α β1→2聚合物))、细胞因子(例如,IL-1、IL-1 α 和β肽、IL-2、 γ -INF、IL-10、GM-CSF)和趋化因子(例如,MIP1- α 和β及RANTES)。免疫原可连接到具有或不具有间隔氨基酸的载体(例如,gly-gly)。其它载体包括病毒样颗粒。病毒样颗粒(VLPs)还称为假病毒或病毒衍生的颗粒,表示有多个拷贝的病毒衣壳和/或包膜蛋白的亚基结构,其能够在体内自组装成定义的球形对称VLP(Powilleit,等,(2007) PLoS ONE 2 (5) :e415)。可选地,肽免疫原可以连接于至少一个能够结合大部分MHC Class II分子的人工T细胞表位,如pan DR表位("PADRE")。PADRE如US 5,736,142、WO 95/07707,和Alexander J等,Immunity,1:751-761(1994)中所述。活性免疫原可以多体形式存在,其中免疫原的多个拷贝和/或其载体作为单独的共价分子存在。

[0128] 片段经常与药学上可接受佐剂一起施用。相对于单独使用肽时,所述佐剂增加了诱导的抗体的效价和/或诱导的抗体的结合亲和性。可使用多种佐剂与tau的免疫原片段结合以引发免疫响应。优选的佐剂增强了对免疫原的固有响应而不引起影响响应定性形式的免疫原的构象变化。优选的佐剂包含铝盐,如氢氧化铝和磷酸铝,3脱氧酰化单磷酸脂质A(MPLTM) (参见GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, now part of Corixa)。StimulonTM QS-21是由南美洲发现的皂皮树(Quillaja Saponaria Molina tree)的树皮中分离的三萜皂苷或皂苷(参见Kensil等,in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell&Newman编,Plenum Press, NY, 1995); US 5,057,540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; now Antigenics, Inc., New York, NY)。其它佐剂是水包油乳剂(如角鲨烯或花生油),任选地与免疫刺激剂结合,如单磷酸脂质A(参见Stoute等,N. Engl. J. Med. 336, 86-91(1997))、复合聚合物及灭活的分枝杆菌。Ribi佐剂是水包油乳剂。Ribi含有可代谢的油(角鲨烯),其由含有吐温80的生理盐水乳化。Ribi还含有精练的分枝杆菌产物,其用作免疫刺激剂和细菌单磷酸脂质A。另一种佐剂是CpG (WO 98/40100)。佐剂可作为与活性剂的药物组合物的组分施用或单独施用,可在药剂之前、同时或之后施用。

[0129] 还可使用tau天然片段的类似物诱导抗体对抗tau。例如,在这种肽中一个或多个L氨基酸可由D氨基酸取代。而且氨基酸的顺序逆转(反转肽)。任选地肽包含所有逆序的D氨基酸(反转-变型肽)。肽和其它化合物不必具有与tau肽的显著的氨基酸序列相似性,但其仍可作为tau肽的模拟物并诱导相似的免疫响应。还可使用如上所述的抗tau单克隆抗体的抗独特型抗体。此类抗独特型抗体可模拟抗原并产生免疫响应(参见Essential Immunology, Roit编, Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., p.181)。

[0130] 肽(和任选地融合到肽的载体)还可以编码肽的核酸形式施用并在患者中原位表达。编码免疫原的核酸区段通常与调控元件连接,如允许在患者的预期靶细胞中表达DNA区段的启动子和增强子。对于在血细胞中表达,如诱导免疫反应所需的,来自轻链或重链免疫球蛋白基因的启动子和增强子元件或CMV主要中间体早期启动子和增强子适合直接表达。连接的调控元件和编码序列通常克隆到载体。抗体还可以编码抗体重链和/或轻链的核酸形式施用。如果重链和轻链都存在,所述链优选地连接为单链抗体。被动施用的抗体也可以被制备,例如,通过肽免疫原治疗的患者血清的亲和层析。

[0131] DNA可以裸形递送(即,无胶体或封装材料)。可选地可使用大量病毒载体系统,包括逆转录病毒系统(参见,例如,Lawrie和Tumin,Cur.Opin.Genet.Develop.3,102-109(1993));腺病毒载体adenoviral vectors{参见,例如,Bett等,J.Viro1.67,5911(1993)};腺相关病毒载体{参见,例如,Zhou等,J.Exp.编,179,1867(1994)},来自包含牛痘病毒和禽痘病毒的痘病家族的病毒载体,来自甲病毒属的病毒载体,如源自辛德毕斯森林脑炎病毒的那些病毒Sindbis和Semliki Forest Viruses(参见,例如,Dubensky等,J.Viro1.70,508-519(1996)),委内瑞拉马脑炎病毒(参见US 5,643,576)和弹状病毒,如水泡性口炎病毒(参见WO 96/34625)和乳头状瘤病毒(Ohe等,Human Gene Therapy 6,325-333(1995);Woo等,WO 94/12629和Xiao&Brandsma,Nucleic Acids.Res.24,2630-2622(1996))。

[0132] 编码免疫原的DNA,或含有所述DNA的载体,可包装到脂质体中。US 5,208,036、US 5,264,618、US 5,279,833和US 5,283,185描述了合适的脂质体和相关类似物。载体和编码免疫原的DNA还可吸附到和连接到颗粒载体,其实例包含聚甲基丙烯酸甲酯聚合物和聚(乳酸-共-乙醇酸)(参见例如,McGee等,J.Micro Encap.1996)。

[0133] V.筛选方法

[0134] 如上所述根据预期结合特异性初步筛选抗体。同样可根据诱导具有此类结合特异性的抗体的能力筛选出活性免疫原。在这种情况下,活性免疫原用于免疫实验室动物,且获得的血清用于测试合适的结合特异性。

[0135] 然后将具有所需结合特异性的抗体在细胞和动物模型中进行测试。用于这种筛选的细胞优选为神经元细胞。已报道tau病理的细胞模型,其中用tau的四重结构域,任选地tau病理相关的突变体转染神经母细胞瘤细胞(例如,δK280,参见Khlistunova,Current Alzheimer Research 4,544-546(2007))。在另一模型中,在神经母细胞瘤N2a细胞系中通过添加多西环素诱导tau。细胞模型能够使人研究出tau对水溶性或聚合状态细胞的毒性、tau基因表达转换后tau聚集的产生、基因表达转换为关闭后tau聚集的消失以及抗体抑制tau聚集形成或使其分解的效率。

[0136] 还可在tau相关疾病的转基因动物模型中筛选抗体或活性免疫原。此类转基因动物可以包含tau转基因(例如,任何人同种型)和任选地人APP转基因,如磷酸化tau的激酶、ApoE、早老素或α突触核蛋白。这种转基因动物用于研发tau相关疾病的至少一个体征或症状。

[0137] 示例性转基因动物是K3系小鼠(Itner等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105(41):15997-6002(2008))。这些小鼠具有K 369I突变的人tau转基因(所述突变与皮克氏病有关)和Thy 1.2启动子。所述模型示出了快速的神经退行性过程、运动障碍及传入纤维和小脑颗粒细胞变性。另一个示例性动物是pR5系小鼠。这些小鼠具有P301L突变的人tau转基因(所述突变与额颞叶痴呆有关)和Thy 1.2启动子(Taconic,Germantown,N.Y.,Lewis,等,Nat Genet.25:402-405(2000))。这些小鼠具有更渐进的神经性退行过程。所述小鼠在几个脑区域和脊髓形成神经原纤维缠结,其通过引用的方式整体并入本文。这是一个可研究缠结产生的原因及筛选抑制聚集体产生的治疗的优良模型。这些动物的另一个优势是相对较早的病理的发作。在纯合系中,与tau病理相关的行为异常可至少早在3个月时观察到,但动物至少直到8个月还保持相对健康。换言之,在8个月时,动物行走、喂养自己、并能足够好地执行行为任务,以监测治疗效果。用AI wI KLH-PHF-1主动免疫这些6-13个月龄的小鼠产生大约

1000的效价并示出了相对于未治疗对照组小鼠更少的神经原纤维缠结,更少的pSer422及减弱的体重下降。

[0138] 可通过各种指标评价抗体或活性剂的活性,所述指标包括总tau或磷酸化tau数量的减少,其它病理学特征的减少,如A_β淀粉样蛋白沉积及抑制或延迟行为缺陷。活性免疫原还可用于检测诱导血清中的抗体。被动免疫和主动免疫均可检测抗体跨过血脑屏障进入转基因动物的大脑。诱导抗体的抗体或片段还可在非人灵长类动物中检测天然地或通过诱导产生的tau特征的疾病症状。对抗体或活性剂的检测通常与对照组一起进行,在对照组中不存在抗体或活性剂(例如,载体取代)时进行平行实验。然后可对比对照组来评估试验下归因于抗体或活性剂的疾病体征或症状的减少、延迟或抑制。

[0139] VI. 接受治疗的患者

[0140] 在几种疾病中发现了神经原纤维缠结,所述疾病包括阿尔茨海默病、唐氏综合征(Down's syndrome)、轻度认知损伤、脑炎后帕金森综合征、创伤后痴呆或痴呆、C型尼曼-皮克病(type C Niemann-Pick disease)、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、肌萎缩性侧索硬化症/帕金森痴呆,和PSP进行性核上性麻痹。本方案也可以用于治疗或预防任何的上述这些疾病。由于神经疾病和病症与tau之间的普遍关联,本方案可以用于治疗或预防与无神经疾病的个体平均值相比,任何示出了升高水平的tau或磷酸化tau(例如,在CSF)的受试者。本方案也可以用于治疗或预防具有与神经疾病有关的tau突变的个体的神经疾病。本方法特别适合于治疗或预防(特别是患者的)阿尔茨海默病。

[0141] 接受治疗的患者包括处于疾病风险但未表现出症状的个体,以及目前显示症状的患者。处于疾病风险的患者包括那些已知具有疾病遗传风险的患者。此类个体包括那些亲人患有这种病的个体,以及那些由遗传分析和生化标志物分析所确定存在风险的个体。风险的遗传标志物包括tau中的突变,如以上所讨论的那些,以及与神经疾病相关的其它基因的突变。例如,在杂合子以及甚至是在纯合子形式中与阿尔茨海默病的风险关联的ApoE4等位基因。阿尔茨海默病风险的其它标志物包括APP基因内的突变,尤其在位置717和位置670和671的分别称为哈迪(Hardy)和瑞典(Swedish)的突变,在早老素基因内的突变、PS1和PS2、AD的家族病史、高胆固醇血症或动脉粥样硬化。目前患阿尔茨海默病的个体可以由特征化的痴呆,以及上述存在的危险因素通过PET成像识别。另外,一些诊断试验可用于识别患有AD的个体。这些试验包括脑CSF tau和磷酸化tau和A_β42水平的测量。升高的tau或磷酸化tau和降低的A_β42水平表明存在AD。一些突变与帕金森症相关。Ala30Pro或Ala53,或与帕金森病相关的其它基因内的突变如富含亮氨酸重复激酶、PARK8。个体也可被诊断出患有上述任何由DSM IV TR的标准中提到的神经疾病。

[0142] 在无症状的患者中,治疗可开始于任何年龄(例如,10岁、20岁、30)。然而,直到患者满40岁、50岁、60岁或70岁之前通常是没有必要开始治疗的。通常需要在一段时间内进行多剂量的治疗。治疗可以通过在一段时间内分析抗体水平来监测。如果响应下降,表明需要加强剂量。在潜在的唐氏综合征的病人的情况下,可以通过出生前向母体施用治疗剂或出生后不久使用治疗剂来开始治疗。

[0143] VII. 药物组合物和治疗方法。

[0144] 在预防性应用中,在所述方案(施用的剂量、频率和施用途径)中,施用于易患病患者,或其它具有的疾病(例如,阿尔茨海默病)风险的患者的抗体或诱导抗体的药剂或相同

的药物组合物,有效降低所述疾病的风险、减轻所述疾病的严重程度、或延迟所述疾病的至少一种迹象或症状的发生。具体地,方案优选有效地抑制或延迟脑中tau或磷酸化tau以及由其形成的成对的丝,和/或抑制或延缓其毒性作用和/或抑制/或延缓行为缺陷的发展。在治疗应用中,在所述方案(施用的剂量、频率和施用途径)中,施用于疑似或已经患有疾病(例如,阿尔茨海默病)的患者中的抗体或诱导抗体的药剂有效地改善或至少抑制至少一种疾病的体征或症状的进一步恶化。特别地,所述方案优选有效地减少或至少抑制tau、磷酸化tau,或由它形成的成对的丝的水平、有关的毒性和/或行为缺陷。

[0145] 在控制的临床实验中(例如,II期,II/III期或III期试验),如果个体治疗患者相比于未用本发明的方法治疗的可比较患者的对照群体内的平均结果,以p<0.05或0.01或甚至0.001水平获得了更好的结果,或者如果在治疗的患者与对照患者的比较中证明了其具有更好的结果,则认为是治疗或预防有效的。

[0146] 有效剂量取决于许多不同的因素,如施用方式、目标位点、患者的生理状态、患者是否为ApoE携带者、患者人还是动物、所施用的其它药物,以及治疗是预防性的或是治疗性的。

[0147] 抗体的示例性剂量范围约为患者体重的0.01mg/kg至5mg/kg,且更通常为0.1mg/kg至3mg/kg或0.15mg/kg至2mg/kg或0.15mg/kg至1.5mg/kg。可以此类剂量每天、隔天、每周、每两周、每月、每季度或根据经验分析确定的任何其它方案施用抗体。示例性的治疗方案需要一段延长的时间(例如,至少为六个月)多次施用。另外的示例性的治疗方案需要每两个星期一次或每月一次或每3至6个月一次施用。

[0148] 主动施用的药剂的量从每名患者0.1-500 μ g变化,且更通常为从每次注射1-100 μ g或1-10 μ g变化以用于人的施用。注射的时间可从每天一次到一年一次、到十年一次显著地变化。典型的方案包括免疫后以一定时间间隔加强注射,如6周的间隔或两个月的间隔。另一种方案包括免疫后在1、2和12个月后加强注射。另一种方案需要终生每两个月注射。任选地,加强注射可以根据监控免疫反应而不规律地进行。

[0149] 抗体或诱导抗体的药剂优选通过外周途径施用(即,在其中施用或诱导的抗体穿过血脑屏障以到达大脑中的预期位置。施用途径包括局部、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、鼻内或肌肉内。施用抗体的优选途径是静脉内施用和皮下施用。对于主动免疫优选的途径是皮下施用和肌内施用。最典型地是在手臂或腿部肌肉进行这种类型的注射。在一些方法中,直接将药剂注入到聚集有沉积物的特定的组织,例如颅内注射。

[0150] 用于肠胃外施用的药物组合物优选是无菌且基本上等渗的并在GMP条件下生产的。药物组合物可以单位剂量(即,单次施用的剂量)的形式提供。药物组合物可以使用一种或多种生理学上可接受载体、稀释剂、赋形剂或助剂来配制。制剂取决于所选择的施用途径。对于注射来说,抗体可配制在水溶液中,优选在生理相容的缓冲液(如Hank氏溶液、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理盐水或乙酸盐缓冲液(以减少注射位置的不适)中。所述溶液可以包含制剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,抗体可以是在使用前用合适的溶媒如无菌无热原的水构成的冻干形式。

[0151] 本方案可以与另一种有效治疗或预防待治疗的疾病的药物组合施用。例如,在阿尔茨海默病的情况下,本方案可与抗A β 的免疫疗法(WO/2000/072880)、胆碱酯酶抑制剂或美金刚组合,或在帕金森氏病的情况下,与抗 α -突触核蛋白的免疫疗法(WO/2008/103472)、

左旋多巴、多巴胺激动剂、COMT抑制剂、MAO-B抑制剂、金刚烷胺或抗胆碱能药组合施用。

[0152] VIII. 体内成像、诊断方法以及优化免疫疗法

[0153] 本发明提供了一种在患者tau蛋白沉积体内成像(如,神经原纤维缠结和tau包含物)的方法。所述方法通过向患者施用试剂,如结合tau的抗体(例如,小鼠、人源化的、嵌合的或修饰的16B5抗体),然后在其结合后再检测试剂而进行。抗体结合的tau的表位的优选在氨基酸24至46内。在一些方法中,抗体结合的表位在氨基酸25至44内,或在氨基酸30至39内。使用缺少全长恒定区如Fab的抗体片段可避免或降低对施用的抗体的清除响应。在一些方法中,相同的抗体可同时作为治疗试剂和诊断试剂。

[0154] 诊断试剂可以通过静脉注射施用到患者的身体,或通过颅内注射或通过在颅骨上钻一个洞直接注入脑中。试剂的剂量应该与治疗方法内的剂量范围相同。通常,所述试剂被标记,尽管在一些方法中,对于tau具有亲和力的第一试剂是未标记的,并使用了第二标记试剂以结合第一试剂。标记的选择取决于检测手段。例如,荧光标记适用于光学检测。顺磁标记的使用适用于无外科手术干的预断层探测。还可以使用PET或SPECT检测放射性标记。

[0155] tau蛋白沉积体内成像的方法可用于诊断或确认tau相关疾病,如阿尔茨海默病、额颞叶变性、进行性核上性麻痹和皮克病,或诊断对于这种疾病的易感性。例如,所述方法可以用于呈现痴呆症状的患者。如果患者具有异常神经原纤维缠结,则患者很有可能患有阿尔茨海默病。或者,如果患者具有异常tau内含物,则根据不同的内含物的位置,患者可能患有额颞叶变性。所述方法还可以用于无症状患者。异常的tau蛋白沉积的存在表明对于未来症状疾病的易感性。所述方法也可用于监测患者体内的疾病进展和/或对治疗的响应,所述患者之前已经被诊断为患有tau相关的疾病。

[0156] 诊断可以通过参照相应的基线值,比较标记位点的数目、大小、和/或强度来进行。基线值可以代表非疾病个体的群体中平均水平。基线值也可以代表在同一患者体内以前测定的水平。例如,基线值可以在开始tau免疫疗法前在患者体内测定,并且将之后的测量值与基线值进行比较。相对于基线值的下降标志着对治疗的积极响应。

[0157] 在一些患者中,可以通过进行PET扫描来辅助诊断tau相关疾病。PET扫描可以用例如常规的PET成像和辅助设备进行。扫描一般包括大脑中已知的通常与tau蛋白沉积相关的一个或多个区域以及其中几乎没有沉积的通常存在作为对照的一个或多个区域。

[0158] 在PET扫描检测到的信号可以多维图像表示。多维图像可以是表示通过大脑横截面的二维图像、表示三维脑的三维图像或表示随时间的变化的脑的三维图像的四维图像。可以使用具有不同颜色的彩色刻度指示不同量的标志物,并推断检测的tau蛋白沉积。扫描的结果也可以用数字呈现,数字与检测的标记的量以及由此的tau蛋白沉积量有关。将已知的与特定的tau相关疾病(如阿尔茨海默病)的沉积相关的大脑区域存在的标记,与已知的与沉积无关的区域中存在的标记进行比较,以提供比例来表示在前者区域内的沉积程度。对于相同的放射标的配体,此类比例提供了tau蛋白沉积的可比较的测量及其在不同患者之间的变化。

[0159] 在一些方法中,PET扫描进行的同时或在患者的同一次就诊中进行MRI或CAT扫描。MRI或CAT扫描比PET扫描提供更多大脑的解剖细节。然而,从PET扫描的图像可以叠加在MRI或CAT扫描图像上更精确地表明相对于脑解剖结构的PET配体和推断的tau沉积物的位置。一些机器可以同时执行PET扫描和MRI或CAT扫描而不需要患者在扫描期间变换位置,从而

有助于图像的叠加。

[0160] 合适的PET配体包含本发明的放射性标记的抗体(例如,小鼠、人源化、嵌合或修饰的16B5抗体)。所用的放射性同位素可以是,例如,C¹¹、N¹³、O¹⁵、F¹⁸或I¹²³。在施用PET配体和执行扫描之间的间隔可以取决于PET配体,特别是其在脑中的摄取和清除速率以及其放射性标记的半衰期。

[0161] PET扫描也可以在无症状患者或在具有轻度认知障碍症状的患者体内作为预防措施进行,所述具有轻度认知障碍症状的患者还未被诊断为患有tau相关疾病,但是这些患者存在患有tau相关疾病的增高风险。对于无症状的患者,扫描对于因为家族史、遗传或生化危险因素而考虑具有tau相关疾病的增高风险的个体或成人是特别有用的。可在例如45至75岁之间的患者中进行预防性扫描。在一些患者中,在50岁进行第一次扫描。

[0162] 预防性扫描可以间隔进行,例如,6个月至10年之间,优选1-5年之间。在一些患者中,每年进行一次预防性扫描。如果作为预防措施进行的PET扫描指示异常高的tau蛋白沉积水平,就可以开始免疫疗法,随后在诊断为患有tau相关疾病的患者中进行PET扫描。如果作为预防措施进行的PET扫描指示tau蛋白沉积水平在正常水平内,则还像以前那样以间隔进行,例如,6个月至10年之间,优选1-5年之间进行PET扫描,或者对tau相关疾病或轻度认知障碍的信号和症状的表现作出响应。通过联合使用预防性扫描和施用tau定向免疫疗法,当检测到tau蛋白沉积高于正常水平时,能够使tau蛋白沉积的水平可以降低到或接近正常水平,或者至少抑制其进一步升高,且与未接受预防性扫描和tau定向免疫疗法的患者相比,患者能够保持一段较长时间的不具有tau相关疾病(例如,至少5年、10年、15年或20年,或患者的余生)。

[0163] tau蛋白沉积的正常水平可以通过脑的代表性样品中的神经原纤维缠结或tau内含物的量来确定,所述脑来自未被诊断患有特定tau相关疾病(如阿尔茨海默病)并且被认为不具有患有这种疾病的增高风险的普通人群中的个体,所述样品例如为50岁以下无病个体的代表性的样品。或者,如果根据本发明的方法的PET信号在已知形成tau蛋白沉淀的脑区域与来自通常在不形成这中沉淀的脑区域中的信号没有不同(测量的精度范围内),则能够在个体患者中识别正常的水平。通过与正常的水平(例如,超出了平均值和标准偏差的方差)比较可以识别个体患者体内的升高水平,或者可以简单地从超过与沉积无关的大脑区域进行比较时,与tau蛋白沉积相关的大脑区域的超过实验误差的升高的信号识别出个体患者体内的升高水平。为了比较在个体和群体中的tau蛋白沉积的水平,所述tau蛋白沉积应优选在脑的(多个)同一区域确定,这些区域至少包括一个其中已知形成tau蛋白沉积的tau相关疾病(如阿尔茨海默病)相关联的区域。具有增高水平的tau蛋白沉积的患者是开始免疫疗法的候选者。

[0164] 开始免疫疗法后,tau蛋白沉积水平的降低可以先看作是所述治疗具有期望效果的一个指示。所观察到的降低可以是,例如,在基线值的1-100%、1-50%或1-25%的范围内。此类效果可以在脑的一个或多个已知形成沉积的区域进行测量或者测量来自所述区域的平均值。总的治疗效果可以通过将相对于基线的降低百分比加入到未治疗患者平均值中出现的tau蛋白沉积的增量而近似获得。

[0165] 将tau蛋白沉积维持在近似恒定水平或者甚至是少量增加tau蛋白沉积,也可以是对治疗的响应的指示,虽然只是次优响应。此类响应可以与具有特定tau相关疾病如阿尔茨

海默病而未接受治疗的患者体内的一段时间的tau蛋白沉积水平进行比较,以确定免疫疗法是否具有抑制tau蛋白沉积进一步增加的效果。

[0166] tau蛋白沉积变化的监测允许对免疫疗法或其它对治疗响应的治疗方案的调整。PET监测提供对治疗的响应的性质和程度的指示。然后可以确定是否需要调整治疗,如果需要,可以调整治疗以响应PET监测。PET监测在其它生物标志物、MRI或认知评量被可检测地响应之前,可使得tau定向免疫疗法或其它治疗方案能够有所调整。显著变化意味着,相对于基线治疗后参数的值的比较,提供一些证据表明治疗是否导致有益的效果。在一些情况下,患者中参数值的变化本身提供的证据表明治疗是否导致有益的效果。在其它情况下,将患者中值的变化(如果有)与未经过免疫疗法的代表性对照群体患者中的值的变化(如果有)进行比较。特定患者的响应与对照患者的正常响应的差异(例如,平均值加上标准差的方差)也提供了证据,表明免疫疗法方案是否能在患者体内达到有益效果。

[0167] 在一些患者中,监测表明tau蛋白沉积的可检测的下降,但所述tau蛋白沉积的水平仍高于正常水平。在此类患者中,如果没有不可接受的副作用,则所述治疗方案可以继续按原样进行,或者是如果尚未以最大推荐剂量使用时,甚至可以增加施用频率和/或剂量。

[0168] 如果监测表明患者体内的tau蛋白沉积的水平已降至正常或接近正常水平的tau蛋白沉积水平,则免疫疗法方案可以从诱导方案之一(即,降低tau蛋白沉积水平)调整到维持方案之一(即,保持tau蛋白沉积在近似恒定的水平)。减少施用免疫疗法的剂量和/或频率可以影响此类治疗方案。

[0169] 在其它患者中,监测可表明免疫疗法具有一些有益的效果,但是是次优效果。最佳效果可以被定义为,在tau蛋白沉积变化中的最多的二分之一或四分之一内的tau蛋白沉积水平降低的百分比(在整个脑或代表区域测量或计算,其中已知形成tau蛋白沉积),所述变化是在在开始治疗后在给定时间点经免疫疗法的tau相关疾病的患者的代表性试样所经历的变化。患者经历了较小的下降或患者体内的tau蛋白沉积保持不变或甚至增加,但相比于不存在免疫疗法的预期情况(例如,从未施用免疫疗法的患者对照组中推导出)而言其增加程度较轻,可以归类为经历了积极的、但次优的响应。对此类患者任选地调整其中药物的施用剂量或频率有所增加的方案。

[0170] 在一些患者中,tau蛋白沉积物可以相对未接受免疫疗法的患者体内tau蛋白沉积物,以类似或较强的方式增加。如果此类增加持续一段时间,例如18个月或2年,甚至是在药物的频率或剂量增加之后,如果需要,也可以中断免疫疗法,以利于其它治疗。

[0171] 前面对诊断、监测和调整治疗tau相关疾病的描述,大部分集中在使用PET扫描上。然而,用于可视化和/或测量的tau蛋白沉积物的适于使用本发明的tau抗体(例如,小鼠、人源化的、嵌合的或修饰的16B5抗体)的任何其它技术,也可以用于代替PET扫描来执行此类方法。

[0172] 实施例

[0173] 实施例1.抗体16B5的产生

[0174] 可识别tau是否被磷酸化的pan抗体16B5,用于纯化tau,且基于其在ELISA检验中的高亲和捕获能力而被选择。

[0175] 实施例2.抗体16B5的克隆和测序

[0176] 使用Trizol LS (Invitrogen) 从表达16B5抗体的微球细胞中提取RNA。使用Quant-

IT试剂盒(Invitrogen)测定RNA浓度。

[0177] 使用Smart RACE试剂盒(Clontech)用5'-RACE扩增IgG mRNA的5'端。大约1 μ g RNA用于RT反应,并且使用Smart RACE试剂盒提供的通用引物以及在ExonBI0中设计的基因特异性引物(GSP)进一步扩增cDNA池。

[0178] 引物序列:

[0179] 通用引物:CTAATACGACTCACTATAGGGC (SEQ ID NO:7)

[0180] GSP:

[0181] IgG1和IgG2a:CTC AAT TTT CTT GTC CAC CTT GGT GC (SEQ ID NO:8)

[0182] IgG2b:CTC AAG TTT TTT GTC CAC CGT GGT GC (SEQ ID NO:9)

[0183] 将PCR产物通过凝胶纯化并克隆到p SUPER-blunt载体(Adexon, www.adexonbiotech.com)中。对于重链,小规模制备(mini-prepare)15个克隆并测序。对于轻链,进行菌落PCR以区分内源性变体轻链,并仅对那些没有从菌落PCR中扩增的克隆进行测序。在NTI载体上分析测序结果。在图谱上标记接头和GSP引物序列。接头和GSP序列之间的区域是IgG重链序列,其包括前导区、信号肽和V区,以及部分恒定区。在图谱上标记ORF。

[0184] 实施例3.抗体16B5的表位作图

[0185] 通过肽片段分析鉴定表位。在大肠杆菌中表达具有4个微管结合重复并没有N端插入、且包含P301L突变(rTau)的人tau序列,并进行纯化。这种形式Tau具有序列SEQ ID NO:3,并在第243位由亮氨酸取代脯氨酸(使用基于最长同种型tau的编号惯例时其对应于P301L)。对200 μ g的tau的酶消化是用四种不同的蛋白酶之一进行的:胰蛋白酶(其在精氨酸和赖氨酸的羧基末端裂解)、胰凝乳蛋白酶(其主要在酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸的羧基末端裂解)、LysC(其在赖氨酸的羧基末端裂解),或GluC(其在谷氨酸残基以及很少地在天冬氨酸残基后裂解)。所有的蛋白酶都是从Thermo Scientific获得的,并在37°C下消化16小时。将所得肽片段与10 μ g的16B5一起孵育,并利用蛋白G磁珠(NEB)沉淀。沉淀物在含有300mM NaCl和0.5%NP-40的PBS中充分洗涤,然后用1M NaCl的100mM甘氨酸溶液(pH值2.8)洗脱。洗脱液在真空下干燥并重悬于0.1%三氟乙酸(TFA)中。重悬洗脱液加载到4.6 \times 50mm C18柱上,然后用HPLC(Agilent 1260 Infinity系统)分馏,所述HPLC使用具有0.075%TFA的线性梯度的乙腈。收集峰馏分、干燥并重悬于蒸馏水中。通过MALDI-TOF/TOF确定肽质量和身份。在LysC的MS谱中确定对应于SEQ ID NO:1的残基25-44的峰。在胰蛋白酶MS谱中,确定对应于SEQ ID NO:1的残基25-44和24-44的峰。用糜蛋白酶和GluC消化的过程中没有获得信号,这表明一些表位可能包含SEQ ID NO:1的残基29和/或SEQ ID NO:1的残基37。

[0186] 通过突变分析鉴定表位。使用由肽片段分析中确定的结果(如上所述),通过使用标准分子生物学方法扩增整个质粒进行rTau的缺失诱变。在小体积的细菌培养物中表达蛋白,将等体积的澄清的细菌裂解液进行电泳、印迹,并用抗体16B5染色。为了控制样品加载量,将对于tau(C末端表位)的C末端区域具有特异性的抗体Tau46用于染色双重印迹。以0.2 μ g/mL的浓度使用两种抗体。使用Licor Odyssey荧光扫描仪捕获图像。以如下方式制作并分析tau的缺失突变体: Δ 5-24、 Δ 23-32、 Δ 25-44、 Δ 30-39和 Δ 37-46。如图1和2所示,tau的 Δ 25-44和 Δ 30-39的缺失突变体未被16B5抗体检测到,提供证据表明,由16B5识别的表位位于那些残基内。tau的 Δ 37-46缺失突变体是用16B5仅能稍微可检测到,提供证据表明,37-46范围内的一些残基(如,残基37)可能在16B5与tau结合中起作用。16B5抗体染色的tau

的 Δ 23-32缺失突变体的程度低于 Δ 5-24并高于 Δ 25-44和 Δ 30-39缺失突变体,提供证据表明,16B5也可能与包含残基33-36、30-36、33-37、30-37或33-39的肽结合。作为一个整体,从tau蛋白缺失突变体中获得的数据表明,由16B5识别的表位可以包含一些或所有SEQ ID N0:1的残基23-32以及一些或所有SEQ ID N0:1的残基37-46。例如,16B5可识别在SEQ ID N0:1的残基32-38或28-41中的表位。

[0187] 通过丙氨酸扫描鉴定表位。接着,用PCR诱变将tau的跨越残基30-42区域内的单一残基突变成丙氨酸。表达突变的蛋白,如上所述,裂解物通过电泳进行分离并用16B5抗体或Tau46抗体进行印迹。该分析的结果在图3中示出。上面的印迹列出了经分析的特定点突变体,包括T30A、M31A、H32A、Q33A、D34A、Q35A、E36A、G37A、D38A、T39A、D40A、A41L和G42A。在每个印迹上,特别关注的残基含在各店的框内。可检测的16B5的结合被Q33A tau突变体完全清除,被G37A tau突变体大幅降低,提供证据表明残基33,且到较小程度上残基37,可能是由16B5识别的表位的重要成分。在Biacore分析中,其它残基可能是由16B5识别的表位的重要成分。

[0188] 实施例4.在tau相关疾病的hTau.P301L转基因小鼠模型内的被动免疫

[0189] 免疫。将FVB/N遗传背景下的3个月大的hTau.P301L-Tg的雌性小鼠用于这项研究。腹腔内施用10mg/kg的测试抗体和对照抗体,每周一次。治疗持续时间大约为5个月。注射23次之后,该研究以小鼠的处死而结束。表1描述了在该研究中施用的试验抗体和对照抗体。

[0190] 表1

[0191] 给药方案

	组K	组M
抗体	16B5	6F10
结合特异性	在23-46之内 (参见实施例3)	非免疫IgG1同种型对照
N	22	22
处理	N2	N3
剂量	每周10mg/kg	每周10mg/kg
剂量体积	1.724ml/kg	2.381ml/kg

[0193] 过早死亡是在转基因小鼠tau相关疾病模型中观察到的一种表型。在这项研究中所使用的特定模型的小鼠在6月龄出现超磷酸化的Tau,尽管其发作是高变性的。小鼠也患有运动缺陷如后肢夹紧和一般的活动性降低,并在8-11月龄过早死亡(reMYND未出版资料, Terwel等人,2005)。处死出现末期疾病症状的小鼠,所述症状特征在于,存在夹紧表型和体重减轻。超乎预期大量的小鼠过早死亡而并不存在这些症状。在此类情况下,死亡的原因被认为是与后期tau相关疾病或测试抗体无关,且相反地被认为是与近交系FVB/N的背景有关。

[0194] 表2示出了在研究过程中所有小鼠的总体存活情况的概要。

[0195] 表2

[0196] 治疗过程中的存活率(死亡的所有原因)

		在研究开始时的N	在处死时存活的N	存活%
组K	N2	22 (23)*	11	50 (47)
组M	N3	22	13	59

[0198] *在组K中,一只小鼠在研究开始时被替换。可以用也可以不用这只替换小鼠来进行数据分析。

[0199] 处死之后,将小鼠解剖,使用potter型机械均化器(VOS 14S40,速率750rpm;VWR)将脑干和中脑在10倍体积的冰冷的Tris-蛋白酶-磷酸酶-抑制剂缓冲液(TPPI-buffer)中匀浆,所述缓冲液包含:20mM的Tris-HCl (pH值8.1);150mM的NaCl;1mM的乙二胺四乙酸(EDTA,Merck);1mM的乙二醇四乙酸(EGTA,Sigma-Aldrich);5mM的焦磷酸钠(Sigma);30mM的氟化钠(Sigma-Aldrich);1mM PMSF(Sigma);2mM的钒酸钠(Sigma);10mM的1,10-邻菲罗啉(Sigma-Aldrich);5 μ g/ml大豆胰蛋白酶抑制剂;5 μ g/ml胃酶抑素;和蛋白酶抑制剂混合物((CPI,Roche Diagnostics GmbH,Germany)。分别为140 μ l和100 μ l体积的脑干和中脑匀浆的固体体积(TotH) (大约一半的总体积),在4°C下,以136000 \times g离心60分钟(TLA-55转子,OptimaTMTLX超速离心机,Beckman Coulter),以产生Tris-可溶组分(SF),总匀浆的剩余部分储存在-80°C下。由于离心支架的数量有限(N=12),将样品随机化以使离心机平衡并划分不同的治疗组经历不同的离心分离过程。

[0200] 从球团(P1)分离上清液(S1,也称为“可溶性组分”或“SF”),等分并储存在-80°C下。P1球团溶解在10倍体积的高盐溶液(含TPPI-缓冲液的0.85M氯化钠)中,并在4°C下以20000 \times g离心30分钟。所得高盐球团(P2)储存在-80°C下。在顶置式(top-over-top)旋转滚筒内,上清液(S2)与1%的肌氨酰以及十分之一的10%肌氨酰接触,并且在室温下孵育60分钟,然后在4°C下,以136000 \times g离心60分钟。可溶于肌氨酰的上清液(S3)储存在-80°C下,并且不溶于肌氨酰的球团(P3,也被称为“不溶性组分”或“IF”)重悬于30 μ l的TPPI缓冲液中并等分。通过上述的分馏方案产生的总匀浆(TotH)、Tris-可溶(SF)和不溶于肌氨酰(IF)脑干组分用于随后的聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western印迹分析。

[0201] 聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western印迹。为了应用于常规SDS-PAGE和Western印迹,样品通过在95°C下孵育10分钟变性并缩小,然后在7.5%的Tris-HCl凝胶(标准XT预制凝胶,26孔梳,15 μ l,1.0mm;Biorad公司)上分离。干电转移(iBlotTM Invitrogen)到PVDF-膜(iBlotTM Gel Transfer Stacks,PVDF,Regular,Invitrogen)后中,将膜在0.4%PFA中洗涤30分钟,然后在Tris-缓冲盐溶液中洗涤。下一步将膜在含有5% (重量/体积)脱脂奶粉和0.1% (体积/体积) Tween-20的Tris缓冲盐溶液(TBS,pH7.6)孵育1小时。以表3中所示的工作浓度用各种抗tau蛋白第一抗体孵育印迹过夜。用抗小鼠或抗兔HRP偶联的第二抗体(山羊抗小鼠或山羊抗兔IgG,DAKO)洗涤并孵化后,用ECL检测系统(SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate,产品34096,Thermo Scientific)观察(develop)印迹。用不同的曝光时间数字化地记录图像(VisionWorks Acquisition,UVP),并用专用软件(VisionWorks Analysis,UVP)分析印迹。为了作比较,将跨凝胶参照凝胶与待比较的将在每个凝胶上电泳的等份的四个馏分一起电泳。用于检测的抗tau第一单克隆抗体包括AT100(磷酸化-Tau,Thermo Scientific;稀释比1:250),AT8(磷酸化-Tau,Thermo Scientific;稀释比1:500),HT7(泛tau,Pierce;稀释比1:1000),和1F5(对于测试设备来说,表位未知,Neotope,稀释比3:500)。用抗GAPDH(Abcam 9485;稀释比1:2500)探针标记的印迹作为上样对照。泛tau抗体对于磷酸化-Tau没有特异性。

[0202] 表3

[0203] 用于生化分析的抗体的总结

mAb	供应商	特异性 (人)	储液浓度	工作浓度
[0204]	AT100	Thermo Scientific 磷酸化 -PHF-tau pSer212/Thr2 14	200 μ g/ml	0.8 μ g/ml
	AT 8	Thermo Scientific 磷酸化 -PHF-tau pSer202/Thr2 05	200 μ g/ml	0.4 μ g/ml
	HT7	Pierce 在残基159和 残基163之间	200 μ g/ml	0.2 μ g/ml
	1F5*	Neotope pS ⁴⁰⁴	1 mg/ml	6 μ g/ml
	GAPDH	Abcam 人	1mg/ml	0.4 μ g/ml

[0205] *IgG2b同种型, JH131-1F5.4.1杂交瘤, lot#NB-0081

[0206] 如图4所示,与用6F10对照抗体处理的动物相比,用16B5抗体处理的动物中观察到在不溶于肌氨酰的脑干组分中tau蛋白的量统计学上显著地降低。使用斯氏t检验评估统计学显著性, $p < 0.05$ 。磷酸化-tau特异性抗体(AT8, 左上图; AT100, 左下图; 1F5, 右上图)的泛tau抗体(HT7, 右下图)观察这种降低。当用磷酸化特异性抗体检测时,相对于6F10抗体处理的对照动物,在用16B5处理的动物中,总匀浆的蛋白质印迹也显示磷酸化-tau/总tau的比例显著降低。参见图5, 左图(示出了用AT8抗磷酸化tau抗体检测的信号通过HT7泛tau抗体检测的信号分开)。与此相反,相对于6F10抗体处理的对照动物,在用16B5处理的动物中,总tau与总匀浆中的GAPDH水平的比例没有显著变化。参见图5, 右图(示出了用HT7泛tau抗体检测的信号通过GAPDH抗体检测的信号分开)。这些数据提供证据表明在匀浆中磷酸化-Tau而不是总tau的水平发生降低。

[0207] 组织学分析。在底丘脑核附件未定带(STH/ZI)和小脑的中间核、前部和后部、附件侧小脑核(IntA/P/LAT)中进行使用抗磷酸化tau抗体的免疫组化分析。将弧形振动切片机切片(40 μ m)存放于4°C的具有0.1%叠氮化钠的PBS中,直至使用。每只小鼠前囟门处表示的八个切片用mAb AT8、AT100或1F5自由浮动地染色。在下表4中列出了用于使用示出的抗体染色所选的切片。对所选的用于特定染色的所有动物的切片进行随机染色和盲定量(blinded quantification)。

[0208] 在NetwellsTM中孵育自由浮动切片。然后在PBS中将切片洗涤两次,并在PBS和甲醇(1:1)的1.5%过氧化氢中孵育20分钟以除去内源性过氧化物酶的活性。用含有0.1%的Triton X100(PBST)的PBS中洗涤切片三次后,在PBST的10%胎牛血清(FCS)中将切片封闭30分钟,接着在具有10%FCS的PBST中,与第一抗体AT8、AT100(Thermo Scientific)一起孵育过夜,抗体的使用浓度分别为0.4 μ g/ml和0.05 μ g/ml。漂洗后,将切片与山羊抗小鼠过氧化物酶标记的(GAMPO)第二抗体(DAKO, PBST中的1/500, 10%FCS)一起孵育,且信号用3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB, 每10ml Tris-盐酸1片与每10ml的3 μ l H₂O₂)显影。将切片用

Mayer氏苏木素共染色,在在五个梯度的乙醇(50、70、95和2×100%)和二甲苯(Merck Eurolab)中脱水,并固定在Depex(Depex固定介质,BDH实验室)。

[0209] 表4

[0210] 用于免疫组织化学分析的抗体的总结

	mAb	供应商	特异性	宿主	储液浓度	工作浓度
[0211]	AT8	Thermo Scientific	人	小鼠	200 µg/ml	0.4 µg/ml
	AT100	Thermo Scientific	人	小鼠	200 µg/ml	0.05

[0212] 由配备有Color view II Olympus相机的Olympus BX41显微镜获取图像,并用计算机使用AnalySIS Five-Cell[^]D软件进行分析。在整个图像获取过程中,显微镜的光强度和聚光器的设置保持恒定。所有获取的图像进行相同的计算机子程序,以使研究者偏差最小化。在整个分析中统一使用密度切片阈值。

[0213] 选择如下所定义目的的区域用于(多个)染色信号的自动定量。底丘脑核和未定带分别由大脑脚腹侧和白质背侧,并基于细胞密度的差异描绘出轮廓(弓形小脑切片前囟1,32-1,92)。小脑的中间核,前部和后部,侧面小脑核由白质和细胞密度的变化以及第三脑室描绘出轮廓(弓形小脑部分,前囟门用于LAT的1,92-2,64和用于IntA/P的0,84-1.8)。对于每个染色而言,在分析中每个小鼠有6个含有STH/ZI的脑切片和16个含有IntA/P/LAT的切片。

[0214] 如图6所示,相比于用6F10抗体处理的对照动物的相同结构中检测的磷酸化-tau的量,用16B5抗体处理的动物在小脑核及底丘脑区域中检测到磷酸化-tau的量显著降低。使用斯氏t检验评估统计显著性,p<0.05。

[0215] 实施例5.16B5的人源化

[0216] 序列分析表明,16B5抗体具有可变的k(Vk)域,其具有序列SEQ ID NO:16,其属于鼠Kabat的亚组1,并对应于人的Kabat亚组4。Kabat CDR用下划线标出。16B5抗体的重链可变区(Vh)具有序列SEQ ID NO:10,其属于小鼠的Kabat亚组2b,并对应于人的Kabat亚组1(Kabat等人(1991),Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版;NIH出版号91-3242)。Kabat CDR用下划线标出。

[0217] The 16B5 Vk域包含17个残基CDR-L1序列(KSSQSLLNSRTRKNYLA,SEQ ID NO:17),7个残基CDR-L2序列(WASTRES,SEQ ID NO:18)以及8个残基CDR-L3(KQSYTLRT,SEQ ID NO:19)。CDR-L1序列属于典型类别3,且CDR-L2和CDR-L3序列属于类别1(Martin&Thornton(1996),J.Mol.Biol.263:800-15)。

[0218] 16B5Vh域包含基于Kabat编号的5残基的CDR-H1序列(YHGMD,SEQ ID NO:11)或基于组合的Kabat和Chothia编号的10个残基的CDR-H1序列(GYPFTYHGMD,SEQ ID NO:24),17个残基的CDR-H2序列(WINTYSGVPTYADDFKG,SEQ ID NO:12),和8个残基的CDR-H3序列(RRDFTMDF,SEQ ID NO:13)。CDR-H1序列属于典型类别1,并且CDR-H2序列属于类别2(Martin&Thornton(1996),J.Mol.Biol.263:800-15)。CDR-H3序列没有典型类别,但根据

Shirai等(1999), FEBS Lett. 455:188-97的规则可能具有扭结的碱基。

[0219] 在V_k和V_h域之间的界面的残基是通常在小鼠这些位置的残基。

[0220] PDB数据库的蛋白质序列中进行检索 (Deshpande等, (2011), J. Virol. 85:1820-33) 以找到能够提供16B5抗体的粗略结构模型的结构。抗霍乱毒素抗体Fab片段Te33 (pdb代码1ZEA_H) 的结构用作具有1.78A的分辨率的VL。它保留了与16B5相同的标准环结构。在Dsbb-Fab复合物 (pdb代码2ZUQ_B) 中Fab的晶体结构用作16B5的VH域的模型。它解决了3.3A的分辨率并含有与CDR-H1和CDR-H2相同的典型结构, 及相同长度的带有扭结的CDR-H3。所述BioLuminate程序用来模拟16B5Fv的粗略结构。

[0221] 具有CDR“X”的16B5Fv序列的来自NCBI的非冗余蛋白质序列数据库的一个检索允许选择合适的人类框架, 其中移植了鼠科CDR。对于V_k, 选择具有NCBI登录码ACJ71718.pro的人κ轻链 (SEQ ID NO:20)。所述人κ轻链序列具有相同的典型类别的CDR-L2和L3。对于V_h, 选择人Ig重链BAC02002.1 (SEQ ID NO:14)。它具备16B5CDR-H1和H2的典型形式, 并且H3的长度为具有预计扭结碱基的8个残基。

[0222] 分别在表5和表6中示出了基于这些人框架中的人源化的重链和轻链设计以及回复突变。

[0223] 设计具有序列SEQ ID NO:15的人源化16B5可变重链 (H1)。所述设计包括三个回复突变: R13K、V48M和Y98F。选择位置13的K, 因为它比人类中的R更加频繁。选择在位置48上的M, 因为它比人类中的V更加频繁。选择在位置98的F, 因为它位于接口处, 使得它被期望保留小鼠残基。

[0224] 设计3个人源化16B5可变轻链序列:

[0225] 版本1 (L1) 具有序列SEQ ID NO:21并包括三个回复突变: D1N、M4L和Y36F。选择在位置1的N, 因为它与在HCDR2的N61形成潜在氢键。选择在位置4的L, 因为它接触LCDR3中的K96、Q97和S98; 它还接触接口残基F104。选择位置36的F, 因为Y能够与HCDR3中的D106形成氢键, 而F不能。氢键将构成可能影响HCDR3功能的额外的相互作用, 且因此最好避免。

[0226] 版本2 (L2) 具有序列SEQ ID NO:22并包括四个回复突变: D1N、M4L、Y36F和P43S。对于D1N、M4L和Y36F选择的基本原理与版本1相同。选择在位置43的S, 因为S与VH中的Q110形成氢键, 其接近HCDR3。

[0227] 版本3 (L3) 具有序列SEQ ID NO:23并包括三个回复突变: M4L、Y36F和P43S。这些突变的每个的选择原理与版本1和2相同。

[0228] 表5

[0229] 用于人源化16B5重链的序列

[0230]

Kabat 残基 #	线性 残基 #	FR ₃ CDR	亲本 小鼠 mAb SEQ ID NO:10	Hu VH 受体 FR B2 SEQ ID NO:14	FR ₃ CDR (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO:15
1	1	Fr1	Q	Q	Q
2	2	Fr1	I	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L
5	5	Fr1	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G
9	9	Fr1	P	S	S
10	10	Fr1	E	E	E
11	11	Fr1	L	L	L
12	12	Fr1	K	K	K
13	13	Fr1	K	R	K
14	14	Fr1	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G
16	16	Fr1	E	A	A
17	17	Fr1	T	S	S
18	18	Fr1	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K
20	20	Fr1	I	V	V
21	21	Fr1	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S
26	26	Fr1	G	G	G
27	27	Fr1	Y	Y	Y
28	28	Fr1	P	S	T
29	29	Fr1	F	F	F

[0231] 表5

[0232] 用于人源化16B5重链的序列

Kabat 残基 #	线性 残基 #	FR 或 CDR	亲本 小鼠 mAb SEQ ID NO:10	Hu VH 受体 FR B2 SEQ ID NO:14	总计 VI (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO:15
30	30	Fr1	T	T	T
31	31	CDR-H1	Y	S	Y
32	32	CDR-H1	H	Y	H
33	33	CDR-H1	G	A	G
34	34	CDR-H1	M	V	M
35	35	CDR-H1	D	N	D
35A		CDR-H1			
35B		CDR-H1			
36	36	Fr2	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q
40	40	Fr2	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P
42	42	Fr2	W	G	G
43	43	Fr2	G	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W
48	48	Fr2	M	V	M
49	49	Fr2	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	I	I
52	52	CDR-H2	N	N	N
52A	53	CDR-H2	T	T	T
52B	54	CDR-H2	Y	N	Y
52C	55	CDR-H2	S	T	S
52D	56	CDR-H2	G	G	G
52E	57	CDR-H2	V	N	V
52F	58	CDR-H2	P	P	P
53	59	CDR-H2	T	T	T
54	60	CDR-H2	Y	Y	Y
55	61	CDR-H2	A	A	A

[0233]

表5

[0234] 用于人源化16B5重链的序列

Kabat 残基 #	线性 残基 #	FR 或 CDR	亲本 小鼠 mAb SEQ ID NO:10	Hu VH 受体 FR B2 SEQ ID NO:14	设计 V1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO:15
56	62	CDR-H2	D	Q	D
57	63	CDR-H2	D	G	D
58	64	CDR-H2	F	F	F
59	65	CDR-H2	K	T	K
60	66	CDR-H2	G	G	G
66	67	Fr3	R	R	R
67	68	Fr3	F	F	F
68	69	Fr3	A	V	V
69	70	Fr3	F	F	F
70	71	Fr3	S	S	S
71	72	Fr3	L	L	L
72	73	Fr3	E	D	D
73	74	Fr3	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S
75	76	Fr3	V	V	V
76	77	Fr3	G	S	S
77	78	Fr3	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A
79	83	Fr3	Y	Y	Y
80	84	Fr3	L	L	L
81	85	Fr3	Q	Q	Q
82	86	Fr3	I	I	I
82A	87	Fr3	N	S	S
82B	88	Fr3	N	S	S
82C	89	Fr3	L	L	L
83	90	Fr3	K	K	K
84	91	Fr3	N	A	A
85	92	Fr3	E	A	E
86	93	Fr3	D	D	D
87	94	Fr3	T	T	T
88	95	Fr3	A	A	A
89	96	Fr3	T	V	V
90	97	Fr3	Y	Y	Y
91	98	Fr3	F	Y	F

[0236]

表5

[0237] 用于人源化16B5重链的序列

Kabat 残基 #	线性 残基 #	FR 或 CDR	亲本 小鼠 mAb SEQ ID NO:10	Hu VH 变体 FR B2 SEQ ID NO:14	设计 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO:15
92	99	Fr3	C	C	C
93	100	Fr3	A	A	A
94	101	Fr3	R	R	R
95	102	CDR-H3	R	A	R
96	103	CDR-H3	R	R	R
97	104	CDR-H3	D	G	D
98	105	CDR-H3	F	Q	F
99	106	CDR-H3	T	N	T
100	107	CDR-H3	M	G	M
100A		CDR-H3		M	
100B					
100C					
100D					
100E					
100F					
100G					
100H					
100I					
100J					
100K					
101	108	CDR-H3	D	D	D
102	109	CDR-H3	F	V	F
103	110	Fr4	W	W	W
104	111	Fr4	G	G	G
105	112	Fr4	Q	Q	Q
106	113	Fr4	G	G	G
107	114	Fr4	T	T	T
108	115	Fr4	S	T	T
109	116	Fr4	V	V	V
110	117	Fr4	T	T	T
111	118	Fr4	V	V	V
112	119	Fr4	S	S	S
113	120	Fr4	S	S	S

[0240] 表6

[0241] 人源化的16B5轻链可变区的序列

[0242]

Kabat 残基 #	线性 残基 #	FR 或 CDR	亲本 小鼠 mAb SEQ ID NO:16	Hu VL 受体 Fr SEQ ID NO:20	人源化的设计 v1 (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO:21	人源化的设计 v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	人源化的设计 v3 (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
1	1	Fr1	N	D	N	N	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	L	M	L	L	L
5	5	Fr1	S	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	S	D	D	D	D
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	A	A	A	A	A
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	S	S	S	S
15	15	Fr1	P	L	L	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	E	E	E	E	E
18	18	Fr1	K	R	R	R	R
19	19	Fr1	V	A	A	A	A
20	20	Fr1	T	T	T	T	T
21	21	Fr1	M	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	N	N	N	N
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	V	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L
27D	31	CDR-L1	N	Y	N	N	N
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S

[0243] 表6

[0244] 人源化的16B5轻链可变区的序列

[0245]

Kabat 残基 #	线性 残基 #	FR 或 CDR	亲本 小鼠 mAb SEQ ID NO:16	Hu VL 受体 Fr SEQ ID NO:20	人源化的设计 v1 (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO:21	人源化的设计 v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	人源化的设计 v3 (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
27F	33	CDR-L1	R	S	R	R	R
28	34	CDR-L1	T	N	T	T	T
29	35	CDR-L1	R	N	R	R	R
30	36	CDR-L1	K	K	K	K	K
31	37	CDR-L1	N	N	N	N	N
32	38	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
33	39	CDR-L1	L	L	L	L	L
34	40	CDR-L1	A	A	A	A	A
35	41	Fr2	W	W	W	W	W
36	42	Fr2	F	Y	F	F	F
37	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
38	44	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	45	Fr2	K	K	K	K	K
40	46	Fr2	P	P	P	P	P
41	47	Fr2	G	G	G	G	G
42	48	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	49	Fr2	S	P	P	S	S
44	50	Fr2	P	P	P	P	P
45	51	Fr2	K	K	K	K	K
46	52	Fr2	L	L	L	L	L
47	53	Fr2	L	L	L	L	L
48	54	Fr2	I	I	I	I	I
49	55	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	56	CDR-L2	W	W	W	W	W
51	57	CDR-L2	A	A	A	A	A
52	58	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	59	CDR-L2	T	T	T	T	T
54	60	CDR-L2	R	R	R	R	R
55	61	CDR-L2	E	E	E	E	E
56	62	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	63	Fr3	G	G	G	G	G
58	64	Fr3	V	V	V	V	V

[0246] 表6

[0247] 人源化的16B5轻链可变区的序列

[0248]

Kabat 残基 #	线性 残基 #	FR 或 CDR	亲本 小鼠 mAb SEQ ID NO:16	Hu VL 受体 Fr SEQ ID NO:20	人源化的设计 v1 (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO:21	人源化的设计 v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	人源化的设计 v3 (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
59	65	Fr3	P	P	P	P	P
60	66	Fr3	D	.. D	D	D	D
61	67	Fr3	R	R	R	R	R
62	68	Fr3	F	F	F	F	F
63	69	Fr3	T	S	S	S	S
64	70	Fr3	G	G	G	G	G
65	71	Fr3	S	S	S	S	S
66	72	Fr3	G	G	G	G	G
67	73	Fr3	S	S	S	S	S
68	74	Fr3	G	G	G	G	G
69	75	Fr3	T	T	T	T	T
70	76	Fr3	D	D	D	D	D
71	77	Fr3	F	F	F	F	F
72	78	Fr3	T	T	T	T	T
73	79	Fr3	L	L	L	L	L
74	80	Fr3	T	T	T	T	T
75	81	Fr3	I	I	I	I	I
76	82	Fr3	S	S	S	S	S
77	83	Fr3	S	S	S	S	S
78	84	Fr3	V	L	L	L	L
79	85	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q
80	86	Fr3	A	A	A	A	A
81	87	Fr3	E	E	E	E	E
82	88	Fr3	D	D	D	D	D
83	89	Fr3	L	V	V	V	V
84	90	Fr3	A	A	A	A	A
85	91	Fr3	V	V	V	V	V
86	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	93	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	94	Fr3	C	C	C	C	C
89	95	CDR-L3	K	Q	K	K	K
90	96	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q

[0249] 表6

[0250] 人源化的16B5轻链可变区的序列

[0251]

Kabat 残基 #	线性 残基 #	FR 或 CDR	亲本 小鼠 mAb SEQ ID NO:16	Hu VL 受体 Fr SEQ ID NO:20	人源化的设计 v1 (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO:21	人源化的设计 v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	人源化的设计 v3 (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
91	97	CDR-L3	S	Y	S	S	S
92	98	CDR-L3	Y	Y	Y	Y	Y
93	99	CDR-L3	T	S	T	T	T
94	100	CDR-L3	L	T	L	L	L
95		CDR-L3		P			
95A		CDR-L3					
95B		CDR-L3					
95C		CDR-L3					
95D		CDR-L3					
95E		CDR-L3					
95F		CDR-L3					
96	101	CDR-L3	R	Q	R	R	R
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	G	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	N	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	V	V	V	V
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	I	I	I	I
106A	112	Fr4	K	K	K	K	K
107	113	Fr4	R	R	R	R	R

[0252] 实施例6. 人源化的16B5抗体的Tau亲和性

[0253] 下表7中示出了具有H1L1或H1L2设计的人源化16B5抗体的结合数据示。为了比较, 还示出了嵌合的16B5的结合数据。使用Biacore仪器产生数据。得出的结论是版本H1L2具有最强的亲和力, 基本上与嵌合的16B5相同。人源化的16B5版本H1L1和H1L3也具有足够的亲和力。

[0254] 使用Biacore T200 (GE Lifesciences) 进行表面等离子共振测定。所有实验使用10mM的流动相以30 μ l/min的速率流过由胺偶联抗小鼠或抗人捕获抗体制备的CM5传感器芯片, 所述流动相为HEPES (pH7.4)、150mM氯化钠和的0.05%吐温20。16B5 (嵌合或人源化的形式) 结合到固定的捕获抗体, 并且不同浓度的重组纯化hTau-P301L连续重复地施加到抗体复合物上。高盐或低pH再生步骤分离重复。用不同制剂的抗体和抗原重复实验。用机载的Biacore软件进行分析。

[0255] 表7

[0256] Biacore数据

[0257]

	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	K _{on} 误差	K _{off} (1/s)	K _{off} 误差
Chi16B5	232pM	1.43x 10 ⁷	1.5x 10 ⁵	3.33x 10 ⁻³	3.5x 10 ⁻⁵
Hu16B5H1L1	617pM	3.5x 10 ⁶	1.5x 10 ⁴	2.15x 10 ⁻³	8.2x 10 ⁻⁶
Hu16B5H1L2	286pM	1.2x 10 ⁷	4.6x 10 ⁴	3.42x 10 ⁻³	1.1x 10 ⁻⁵
Hu16B5H1L3	320pM	1.25x 10 ⁷	6.2x 10 ⁴	3.98x 10 ⁻³	1.8x 10 ⁻⁵

[0258] 实施例7. 用人源化的16B5抗体对Tau进行免疫沉淀检测

[0259] 来自阿尔茨海默病患者的额叶皮层具有Braak分为6分的尸检样品依次在溶解度增高的缓冲液中提取,缓冲液按照以下顺序: (i) 高盐缓冲液 (20mM的Tris、5mM的EDTA、1mM的DTT、10%蔗糖、7500mM的NaCl, pH7.4), (ii) Triton缓冲液 (20mM的Tris、5mM的EDTA、1mM的DTT、10%蔗糖、1%的Triton X100、500mM的NaCl, pH7.4), 和 (iii) 十二烷基肌氨酸钠缓冲液 (10mM的Tris、5mM的EDTA、1mM的DTT、10%蔗糖、500mM氯化钠、1%十二烷基肌氨酸钠, pH 7.4)。

[0260] 对于每个样品,200微克的高盐可溶组分或20微克的十二烷基肌氨酸钠不溶组分,在400微升的免疫沉淀缓冲液 (10mM的Tris、150mM的氯化钠、0.5%的Triton X100、1mM的EGTA、1mM EDTA中, pH 7.4) 中稀释。将样品用G蛋白磁珠 (New England Biolabs) 预清除,并向每个管中加入5微克的抗体。所用的抗体包括:1) 作为对照的小鼠非免疫IgG抗体 (mIgG); 2) 作为对照的人非免疫IgG抗体 (hIgG); 3) 嵌合的抗体16B5 (Chi16B5); 4) 人源化的16B5, 版本H1L2 (h16B6-H1L2); 和人源化的16B5, 版本H1L3 (h16B6-H1L3)。预清除裂解物并使抗体在4°C孵育2小时。通过使用G蛋白磁珠使抗体/抗原复合物沉淀, 将沉淀物用PBS/350mM氯化钠充分洗涤。使用Laemmli缓冲液洗脱后, 洗脱液通过SDS-PAGE分离并使用多克隆tau抗体 (DAKO) 印迹。

[0261] 如图7所示, 嵌合的16B5和人源化的16B5 H1L2和H1L3在阿尔茨海默病脑中可溶和不溶组分中均识别出tau。

[0262] 实施例8. 鼠的和人源化的16B5tau抗体在阿尔茨海默病脑上的免疫组织化学表征

[0263] 鼠单克隆抗tau抗体16B5和它的两个人源化变异体 (h16B5-H1L2和h16B5-N1D) 还在来自阿尔茨海默病供体和非患病老年对照的人脑新鲜的冷冻切片上进行了免疫组织化学试验。

[0264] 方法:

[0265] 人脑组织

[0266] 额叶皮质获自Sun健康研究所。案例包括确诊为阿尔茨海默氏症且尸检得到神经病理学评估证实的六名患者 (平均年龄86.8±0.40SEM), 和三个非患病老年对照 (平均年龄77±9.7SEM)。病例的人口统计学特征列于下表8中。在少量丙酮固定的10um载玻片上的冰冻切片进行免疫组织化学分析。

[0267] 表8

[0268] 用于免疫组织化学检测的案例的人口统计学特征

病例	诊断	死亡年龄 (年龄)	性别	尸检间隔 (h)
11-21	AD	88	F	2.28
03-34	AD	88	F	3.3
08-06	AD	86	M	2.66

[0269]	03-52	AD	86	M	2.2
	01-16	AD	87	M	3
	01-18	AD	86	M	3
	10-63	对照	79	M	3
	10-39	对照	93	M	3
	10-22	对照	59	F	3.2

[0270] 免疫组织化学

[0271] 免疫过氧化物酶法是主要的检测体系,其由标记有过氧化物酶标记的、与山羊抗小鼠免疫球蛋白缀合的聚合物(EnVision+系统HRP标记的聚合物;Dako K4001)或直接生物素化人源化抗体的Vector ABC扩增系统(ABC Elite Standard;PK-6100;载体实验室)组成。用DAB色原体(液体DAB+基底色原体系统;Dako K3468)使染色可视化,其产生了棕色沉淀物。

[0272] 用IgG同种型对照抗体或省略一次抗体在邻近的切片上执行整个免疫组织化学过程的阴性对照。

[0273] 免疫荧光标记

[0274] 进行双重免疫荧光染色以确定鼠科抗体和人源化抗体变异数,其它识别各种磷酸化表位的tau抗体以及淀粉状蛋白 β 之间的关系。用抗体混合物平行地进行组织切片染色,所述混合物包含生物素化的或FITC标记的人源化16B5的变异数(1 μ g/mL)以及鼠科抗体(单克隆16B5(1 μ g/mL)、AT8(1:1000)、AT100(1:1000)或3D6(1 μ g/mL))。用缀合至488或635的荧光团(Invitrogen)的山羊抗小鼠二级抗体检测鼠科抗体。用链霉抗生素蛋白635检测生物素化的人源化抗体。

[0275] 预吸附

[0276] 为了评估抗体与其靶抗原的特异性,在4°C下,用50 μ g/mL的纯化的人P301L tau蛋白或野生型核蛋白(一种不相关蛋白)预吸附1 μ g/mL 16B5抗体过夜。所述抗体然后施加于组织并如上所概述进行免疫组织化学过程。

[0277] 图像分析

[0278] 用奥林巴斯BX61显微镜(Olympus BX61 microscope)、奥林巴斯Nanoozoomer 2.0HT

(Olympus Nanozoomer 2.0HT), 或Leica SPE光谱共聚焦系统中的任一个使载玻片成像。图像整理为TIFF文件。

[0279] 结果

[0280] 如下表9所示,小鼠单克隆抗体16B5和人源化变异数都显示出对于阿尔茨海默病组织的反应性,染色主要在神经纤维网线、一些神经元纤维缠结(主要是球状的)和一些tau阳性神经炎斑。大多数16B5AD-纤维状病理仅限于灰质,但在白质中也检测到了一些反应性。与此相反,非患病对照组织呈弥漫背景反应性,但是对在AD组织中发现的任何病理为阴性。

[0281] 用16B5的鼠单克隆版本和与(1)两个人源化变异数, (2)在各种不同磷酸化的表位识别tau的抗体,和(3)β淀粉样蛋白进行双标记实验以进一步表征由所述抗体变异数识别的病理。

[0282] h16B5-H1L2和h16B5-N1D都用与AD-纤维状病理结构具有高度一致性的单克隆16B5抗体共定位。H16B5-H1L2还检测到示出与各种磷酸化tau表位具有免疫反应性的病理,包括丝氨酸202和苏氨酸205(AT8),丝氨酸212和苏氨酸214(AT100),和丝氨酸396(内部专有抗体,20H1)。最后,用淀粉样蛋白β双表示的抗体识别N末端氨基酸序列(3D6;氨基酸1-5),并且16B5几乎未显示出在淀粉样蛋白斑上AB和16B5免疫反应结构之间的共定位。

[0283] 当16B5免疫反应性与充分表征的市售单克隆抗tau蛋白抗体(Dako)相比时,两者都使纤维状AD病理染色,其包括tau蛋白阳性神经斑块、神经网线和神经原纤维缠结。

[0284] 通过用纯化的重组P301L tau蛋白预吸附来评估抗体的特异性。当用P301L tau蛋白预吸附16B5时,观察到染色衰减,但是当用不相关的蛋白(野生型核蛋白)以相同摩尔浓度预吸附抗体时,染色没有受到影响。

[0285] 所有测试的组织染色中,IgG-同种型对照抗体和第一抗体省略切片都是阴性的。

[0286] 表9

[0287] 免疫组织化学表征的16B5抗体

[0288]

抗体	Lot#	染色AD组织	浓度
Murine 16B5	NB-0174A	是	1ug/mL
嵌合的16B5	061512	是	1ug/mL
h16B5-H1L2	NB-0248	是	1ug/mL
H16B5-NID	011113	是	1ug/mL

[0289] 所有引用的出版物(包括GenBank登记号、UniProtKB/Swiss-Prot登录号等)、专利和专利申请都出于所有目的、以相同的程度通过引用的方式整体并入本文,如同每个单独的出版物、专利和专利申请被明确地和各自地指出出于所有目的通过引用的方式整体并入本文。如果与Genbank和UniProtKB/Swiss-Prot登录号等相关的序列存在任何变化,截止本申请的有效申请日之前本申请涉及引用登录号相关的序列,所述有效申请日是指公开相关登录号的优选权申请的实际申请日或更早的日期。除非另有特别注明,本发明的任何特征、步骤、要素、实施方案或方面可与任何其它的组合使用。尽管为了清楚和理解,已经通过例证和实例对本发明进行了详细的描述,然而,显然可以在所附权利要求的范围内进行某些改变和修改。

序列表

<110> Seubert, Peter
Dolan, Philip James III
Liu, Yue
Barbour, Robin

<120> TAU 免疫疗法

<130> 057450/442367

<140> PCT/US2014/025044
<141> 2014-03-12

<150> US 61/780,624
<151> 2013-03-13

<150> US 61/800,382
<151> 2013-03-15

[0001] <160> 34

<170> 用于 Windows 版本 4.0 的 FastSEQ

<210> 1
<211> 434
<212> PRT
<213> 智人

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

Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Pro Ser Leu
 100 105 110
 Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys
 115 120 125
 Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp
 130 135 140
 Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln
 145 150 155 160
 Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro
 165 170 175
 Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser
 180 185 190
 Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
 195 200 205
 Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala
 210 215 220
 Val Val Arg Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln
 225 230 235 240
 Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile
 245 250 255
 Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Lys Val Gln
 [0002] 260 265 270
 Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Gly Ser
 275 280 285
 Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Ser Val Gln Ile Val
 290 295 300
 Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 305 310 315 320
 Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
 325 330 335
 Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp
 340 345 350
 Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His
 355 360 365
 Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Thr Asp His Gly Ala
 370 375 380
 Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg
 385 390 395 400
 His Leu Ser Asn Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro
 405 410 415
 Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln
 420 425 430
 Gly Leu

<210> 2
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser Asp
 50 55 60
 Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Ala Gly Ile Gly Asp
 65 70 75 80
 Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg
 85 90 95
 Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Ala Lys
 100 105 110
 Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro
 [0003] 115 120 125
 Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr
 130 135 140
 Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser
 145 150 155 160
 Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 165 170 175
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 180 185 190
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 195 200 205
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 210 215 220
 Lys Ser Lys Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 225 230 235 240
 Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
 245 250 255
 Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Ser
 260 265 270
 Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Lys Cys
 275 280 285

Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu
 290 295 300
 Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile
 305 310 315 320
 Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Asn Lys Lys
 325 330 335
 Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp
 340 345 350
 His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr
 355 360 365
 Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met
 370 375 380
 Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser
 385 390 395 400
 Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 405

[0004] <210> 3
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 3
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
 35 40 45
 Gly Ile Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr
 50 55 60
 Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp
 65 70 75 80
 Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg
 85 90 95
 Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Arg Ile Pro
 100 105 110
 Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro
 115 120 125
 Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly
 130 135 140
 Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr
 145 150 155 160

Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
 165 170 175
 Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
 180 185 190
 Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
 195 200 205
 Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 210 215 220
 Asn Val Gln Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val
 245 250 255
 Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Val Gln
 275 280 285
 Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
 290 295 300
 Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
 305 310 315 320
 Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
 325 330 335
 [0005] Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 340 345 350
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 355 360 365
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375

<210> 4

<211> 404

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

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

Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val Asp
 65 70 75 80
 Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu Ile
 85 90 95
 Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Pro Ser Leu
 100 105 110
 Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys
 115 120 125
 Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp
 130 135 140
 Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln
 145 150 155 160
 Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro
 165 170 175
 Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser
 180 185 190
 Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
 195 200 205
 Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala
 210 215 220
 Val Val Arg Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln
 [0006] 225 230 235 240
 Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile
 245 250 255
 Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Lys Val Gln
 260 265 270
 Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Gly Ser
 275 280 285
 Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gln Val Glu Val Lys
 290 295 300
 Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser
 305 310 315 320
 Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu
 325 330 335
 Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
 340 345 350
 Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro
 355 360 365
 Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp
 370 375 380
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala
 385 390 395 400
 Lys Gln Gly Leu

<210> 5
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser Asp
 50 55 60
 Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Ala Gly Ile Gly Asp
 65 70 75 80
 Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg
 85 90 95
 Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Ala Lys
 100 105 110
 Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro
 [0007] 115 120 125
 Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr
 130 135 140
 Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser
 145 150 155 160
 Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 165 170 175
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 180 185 190
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 195 200 205
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 210 215 220
 Lys Ser Lys Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 225 230 235 240
 Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 245 250 255
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gln
 260 265 270
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Ser Lys
 275 280 285

Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys
 290 295 300
 Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly
 325 330 335
 Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp
 340 345 350
 Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala
 355 360 365
 Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375

<210> 6

<211> 352

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 [0008] 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
 35 40 45
 Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
 50 55 60
 Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
 65 70 75 80
 Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
 85 90 95
 Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
 100 105 110
 Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
 115 120 125
 Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
 130 135 140
 Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
 145 150 155 160
 Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
 165 170 175
 Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
 180 185 190

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

[0009]

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 7
 ctaatacgac tcactatagg gc 22
 <210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 8
 ctcaatttgc ttgtccacct tggtgc 26

<210> 9		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 9		
ctcaagttt ttgtccaccc tggtgc		26
<210> 10		
<211> 225		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 10		
Met Asp Trp Val Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser		
1 5 10 15		
Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys		
20 25 30		
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe		
35 40 45		
Thr Tyr His Gly Met Asp Trp Val Lys Gln Ala Pro Trp Gly Gly Leu		
50 55 60		
Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala		
65 70 75 80		
Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Val Gly		
85 90 95		
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr		
100 105 110		
Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Phe Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln		
115 120 125		
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val		
130 135 140		
Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr		
145 150 155 160		
Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr		
165 170 175		
Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
180 185 190		

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 210 215 220
 Ser
 225

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 11
 Tyr His Gly Met Asp
 1 5

[0011] <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 12
 Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 13

Arg Arg Asp Phe Thr Met Asp Phe
1 5

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ala Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

[0012] Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Arg Gly Gln Asn Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 15

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr His

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

<210> 16
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0013] <220>
 <223> 合成的
 <400> 16
 Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Gly Asn Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp
 165 170 175
 Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys
 195 200 205
 Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys
 210 215 220
 Thr Ser Thr Ser Pro Ile
 225 230

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

<220>
 <223> 合成的

<400> 17
 [0014] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 18
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 19

Lys Gln Ser Tyr Thr Leu Arg Thr

1 5

<210> 20

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 20

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

[0015] Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg

<210> 21

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 21

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

[0016] <210> 22
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 22

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 23

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 23

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Ser Tyr Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 24

Gly Tyr Pro Phe Thr Tyr His Gly Met Asp

1 5 10

<210> 25

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

caggtccagt tgggcgcagtc tggatctgag ctgaagaagc ctggagccctc cgtcaagggt 60
 tcctgcaagg cttctgggta tcccttcaca taccatggaa tggactgggt gcgtcaggct 120
 cctggtcagg gtttagatgt gatgggctgg ataaacacct actctggagt gccaacatat 180
 gctgatgact tcaagggacg atttgtgttc tcttggaca cctctgtctc tactgcctat 240
 ttgcagatct cttctctcaa agccgaggac acggccgtgt attttgc aagacggcgt 300
 gattttacaa tggacttctg gggtaagga accaccgtga ccgtctccctc a 351

<210> 26

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0018]

<400> 26

aacatcggtgc tgacccagag ccccgatagc ctggccgtga gcctggcgaa gagagccacc 60
 atcaactgca agagcagccca gagcctgctg aacagcagga ccaggaagaa ctacctggcc 120
 tggttccagc agaagcccg ccagcccccc aagctgctga tctactggc cagcaccagg 180
 gagagcggcg tgcccgatag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgattt caccctgacc 240
 atcagcagcc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcaagcagag ctacaccctg 300
 agaaccttcg gcggcggcac caaggtggaa attaaacgt 339

<210> 27

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 27

aacatcggtgc tgacccagag ccccgatagc ctggccgtga gcctggcgaa gagagccacc 60
 atcaactgca agagcagccca gagcctgctg aacagcagga ccaggaagaa ctacctggcc 120
 tggttccagc agaagcccg ccagagcccc aagctgctga tctactggc cagcaccagg 180
 gagagcggcg tgcccgatag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgattt caccctgacc 240
 atcagcagcc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcaagcagag ctacaccctg 300

agaacacctcg	gccccatggcac	caaggtggaa	attaaacgt	339		
<210>	28					
<211>	339					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	合成的					
<400>	28					
gacatcggtgc	tgacccagag	ccccatggcac	ctggccgtga	gcctggcgaa	gagagccacc	60
atcaactgca	agaggcggca	gagcctgctg	aacagcagga	ccaggaagaa	ctacctggcc	120
tgttccagc	agaagcccg	ccagagcccc	aagctgctga	tctactggc	cagcaccagg	180
gagagccg	tgcccgatag	gttcagcggc	acggcagcgc	gcaccgattt	caccctgacc	240
atcagcagcc	tgcaggccg	ggatgtggcc	gtgtactact	gcaagcagag	ctacaccctg	300
agaacacctcg	gccccatggcac	caaggtggaa	attaaacgt	339		
<210>	29					
<211>	330					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					
[0019]						
<220>						
<223>	合成的					
<400>	29					
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys						
1	5	10	15			
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr						
20	25	30				
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser						
35	40	45				
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser						
50	55	60				
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr						
65	70	75	80			
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys						
85	90	95				
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys						
100	105	110				
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro						
115	120	125				
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys						

130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Val Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

[0020]

<210> 30
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 30
 gcttagcacca agggcccatc ggtctccccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
 tggaaactcag ggcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccttcca gcagcttggg cacccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtc acaaactca cacatcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctccccagccc ccatecgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc cggggaggag 720
 atgaccaaga accaggtcag cctgacactgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt ctccctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccggtaaa 990

<210> 31

<211> 1343

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 31

ggtgagtgga tccgcggccg ctaaactctg agggggtcgg atgacgtggc cattcttgc 60
 ctaaagcatt gagttactg caaggtcaga aaagcatgca aagccctcag aatggctgca 120
 aagagctcca acaaaaacaat ttagaacttt attaaggaaat agggggaaagc taggaagaaa 180
 ctcaaaacat caagattta aatacgcttc ttggctctt tgctataatt atctggata 240
 agcatgtgt tttctgtctg tccctaacat gccctgtat tatccgaaaa caacacaccc 300
 aagggcagaa ctttggtaact taaacaccat cctgtttgct tcttcctca gcctccacca 360
 agggcccttc ggtttccccc ctggcaccct cctccaagag cacctctgg ggcacagcgg 420
 ccctgggctg cctggtaag gactactcc cgaaccggg gacgggtgtc tggaactctag 480
 ggcgcctgac cagcggcgtg cacacccctt ccgtgtctt acagtcctca ggactctact 540
 ccctcagcag cgtggtaacc gtgccttcca gcagcttggg cacccagacc tacatctgca 600
 acgtgaatca caagccccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc aaatcttgc 660
 acaaaaactca cacatgccca ccgtccccag cacctgaact cctgggggaa ccgtcagtct 720
 tccttttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat 780
 gctgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaacttgg tacgtggacg 840
 gctgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcggggagga gcagtacaac agcacttgc 900
 gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt 960
 gcaaggcttc caacaaagcc ctccccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag 1020
 ggcagccccg agaaccacag gtgtacacgc tgccccatc ccggggaggag atgaccaaga 1080
 accaggtcag cctgacactgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt 1140
 gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg ctggactccg 1200
 acggctcctt ctccctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga 1260
 acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc 1320
 tctccctgtc cccggtaaa tga 1343

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 32

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

[0022]

<210> 33

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 33

acgggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgcctatctg atgagcaggaa gaaatctggaa 60

actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120

aagggtggata acgccttcca atcggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180

aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaaggcaga ctacgagaaa 240

cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgccgt cacaaagagc 300

ttaaacaggg gagagtgt 318

<210> 34

<211> 671

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 34

cgtgagtgga tccgcggccg ctaaactctg agggggtcgg atgacgtggc cattcttgc 60
ctaaaggcatt gagtttactg caaggtcaga aaagcatgca aagccctcag aatggctgca 120
aagagctcca acaaaaacaat ttagaacttt attaaggaat aggggaaagc taggaagaaa 180
ctcaaaaacat caagatttta aatacgcttc ttggtctcct tgctataatt atctggata 240
agcatgctgt tttctgtctg tccctaacat gccctgtgat tatccgcaaa caacacacccc 300
aagggcagaa ctttgttact taaacaccat cctgtttgct tcttcctca ggaactgtgg 360
ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct 420
ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg 480
ataaacgcctt ccaatcggtt aactcccgagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca 540
gcacacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaaag 600
tctacgcctg cgaagtcaacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag agcttcaaca 660
ggggagagtg t 671

[0023]

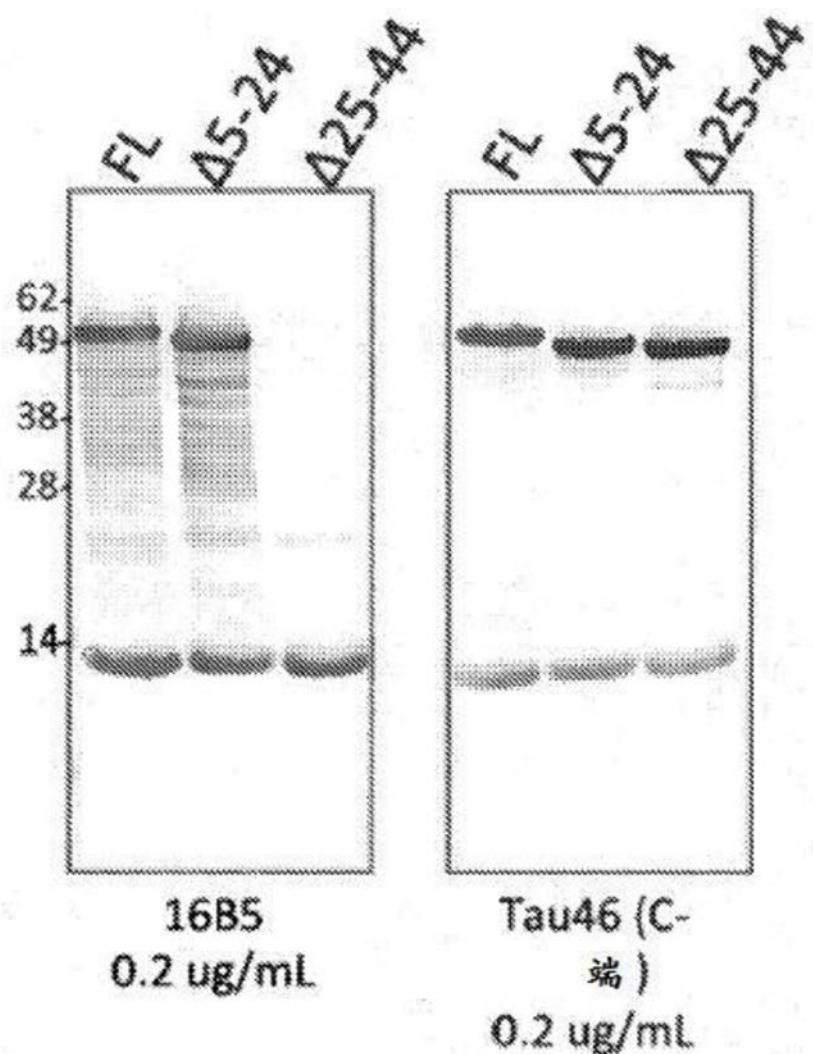


图1

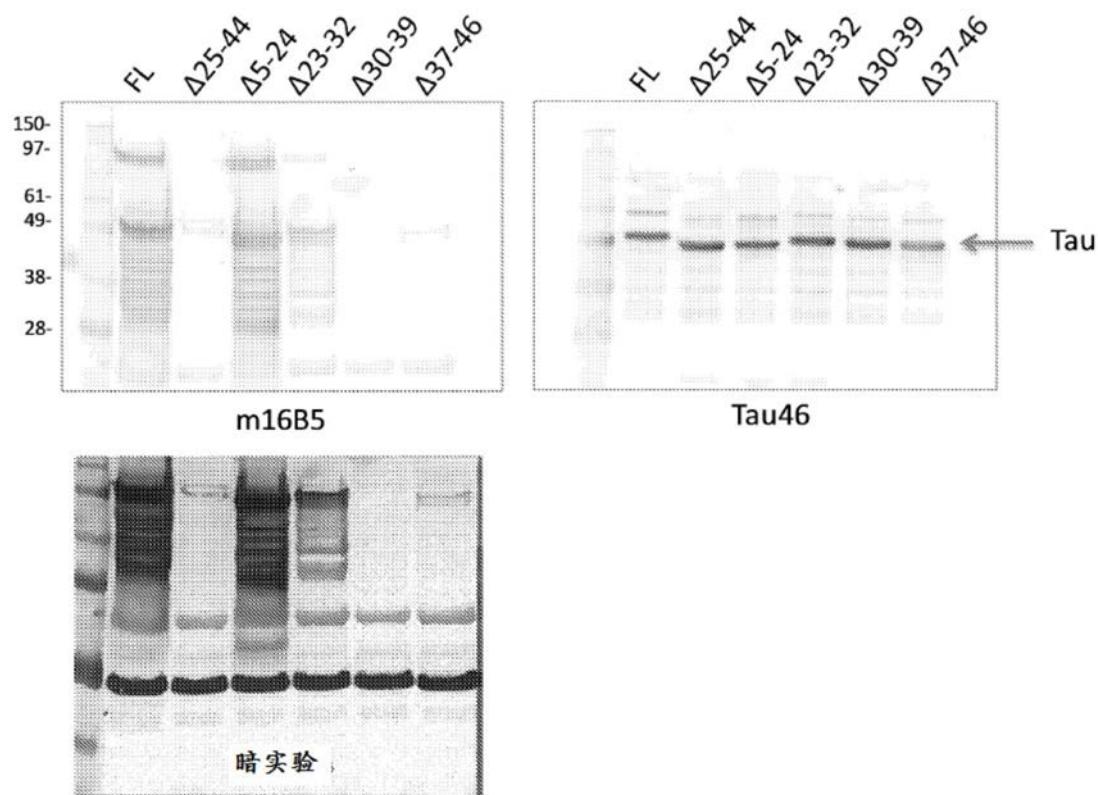


图2

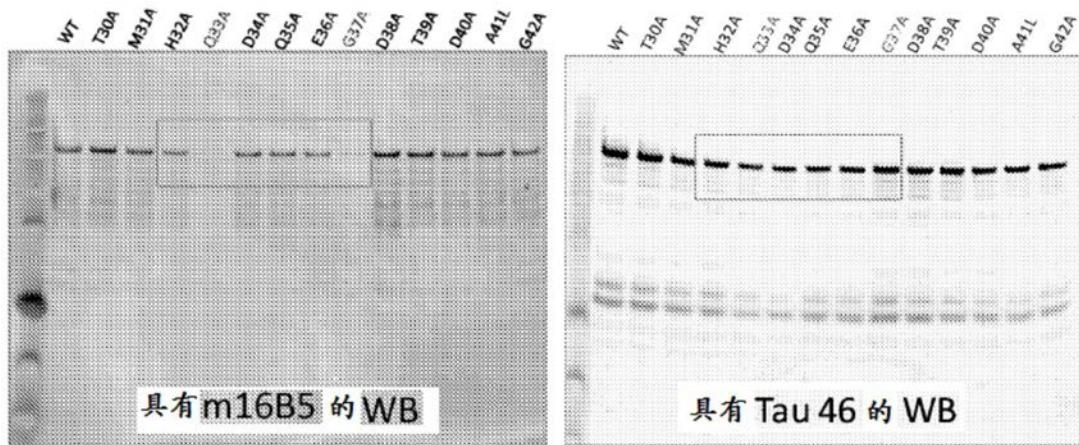


图3

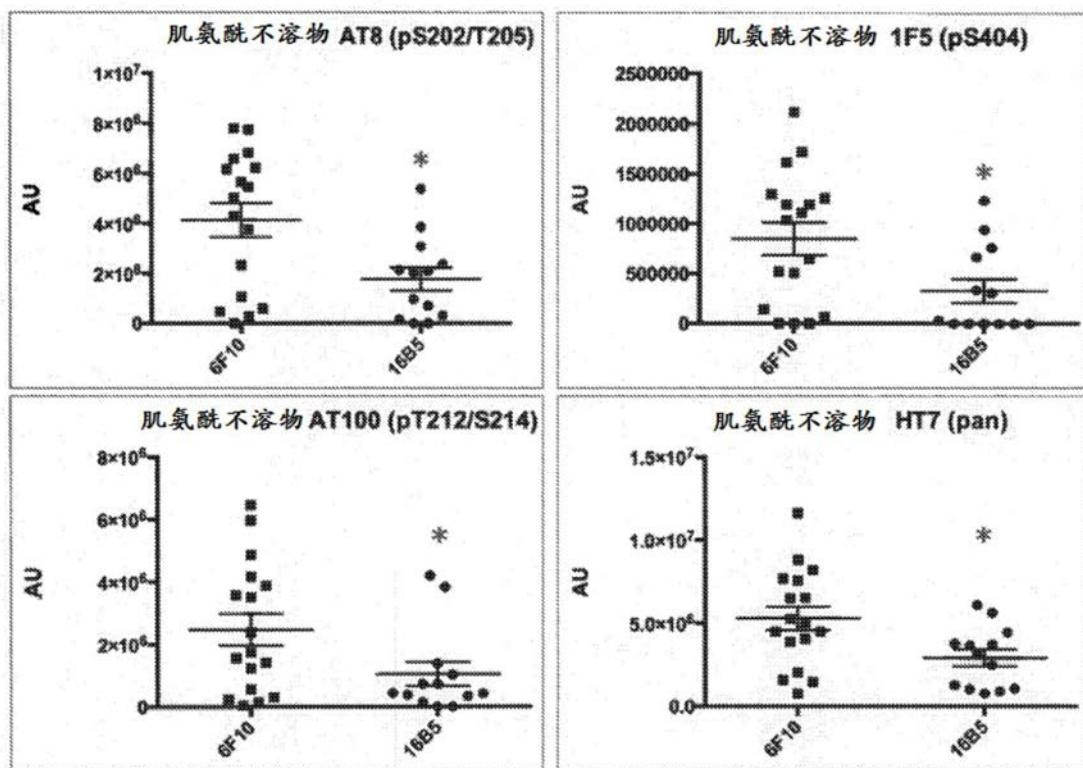


图4

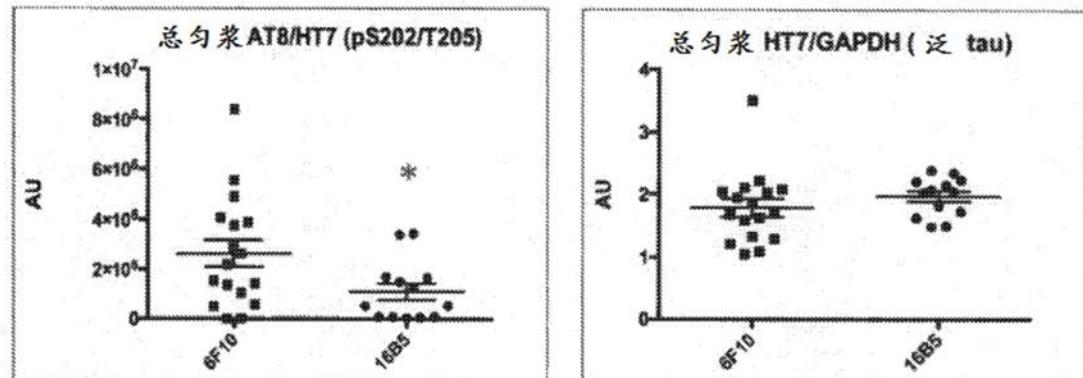


图5

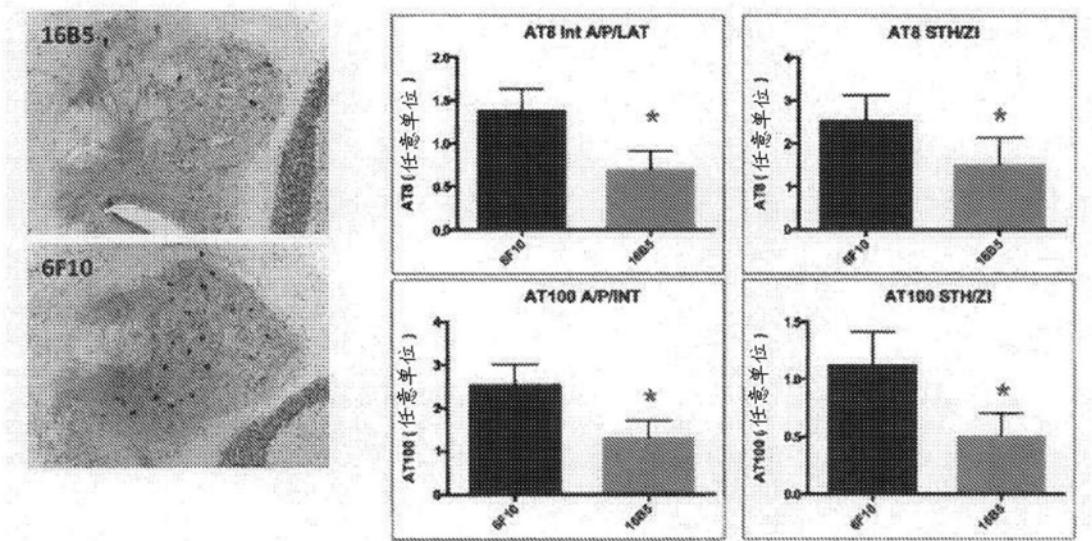


图6

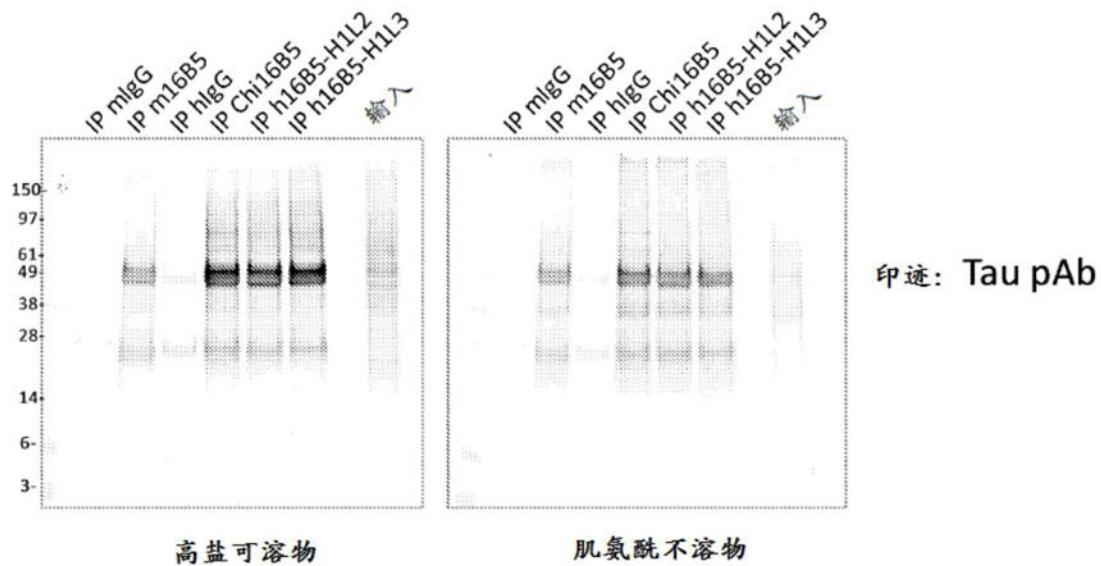


图7