



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102596221 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201080036213. X

*A61K 39/395* (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 06. 10

*A61P 25/28* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*G01N 33/53* (2006. 01)

61/185, 895 2009. 06. 10 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 02. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/038184 2010. 06. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02010/144711 EN 2010. 12. 16

(71) 申请人 纽约大学

地址 美国纽约州

(72) 发明人 E·M·西瓜德森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 李进 刘健

(51) Int. Cl.

*A61K 38/17* (2006. 01)

*C07K 14/47* (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 36 页

序列表 78 页 附图 10 页

(54) 发明名称

病理 TAU 蛋白的免疫靶向

(57) 摘要

本发明涉及在有效地治疗、预防或诊断阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的条件下通过施用识别免疫原性 tau 表位的免疫原性 tau 肽或抗体, 来在受试者中治疗、预防和诊断阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的方法和组合物。本发明还公开促进从受试者脑清除聚集体和在受试者中减缓 tau 病理相关的行为表型进展的方法。

1. 一种在受试者中治疗或预防阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的方法,所述方法包括:

在有效地治疗或预防所述受试者的阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的条件下,向所述受试者施用:一种或多种免疫原性 tau 肽,其含有选自由 SEQ ID NO:2-75 组成的组的氨基酸序列;或一种或多种抗体,所述抗体识别免疫原性 tau 表位,所述免疫原性 tau 表位包含选自由 SEQ ID NO:2-75 和 101-103 组成的组的氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括:

选择患有阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病或者处于患有阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的风险中的受试者,其中向所述选择的受试者施用所述一种或多种免疫原性 tau 肽或识别免疫原性 tau 表位的一种或多种抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述一种或多种免疫原性 tau 肽在一个或多个氨基酸残基处磷酸化,并且所述一种或多种抗体识别磷酸化的免疫原性 tau 肽。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中免疫原性载体连接所述免疫原性 tau 肽。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在所述施用一种或多种免疫原性 tau 肽或抗体之前、之后或同时施用佐剂。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在所述施用一种或多种免疫原性 tau 肽之前、之后或同时施用一种或多种其他的免疫原性 tau 肽。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述一种或多种其他的免疫原性 tau 肽包含选自由 SEQ ID NO:81-100 组成的组的氨基酸序列。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中 tau 蛋白病得以治疗或预防,所述 tau 蛋白病选自:连锁于 17 号染色体的伴帕金森病的额颞叶痴呆 (FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克病、进行性皮质下胶质增生、仅痴呆缠结、伴发钙化的弥漫性神经原纤维缠结、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩性侧索硬化帕金森-痴呆复征、拳击员痴呆、唐氏综合征、Gerstmann-Straussler-Scheinker 病、Hallerworden-Spatz 病、包涵体肌炎、Creutzfeld-Jakob 病、多系统萎缩、C 型 Niemann-Pick 病、朊病毒蛋白大脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、非-guanamian 伴发神经原纤维缠结的运动神经元病、慢性创伤脑病和脑炎后帕金森综合征。

9. 一种促进从受试者脑中清除 tau 聚集体的方法,所述方法包括:

在有效地促进从所述受试者脑中清除 tau 聚集体的条件下,向所述受试者施用:一种或多种免疫原性 tau 肽,其含有选自由 SEQ ID NO:2-75 组成的组的氨基酸序列;或一种或多种抗体,所述抗体识别免疫原性 tau 表位,所述免疫原性 tau 表位包含选自由 SEQ ID NO:2-75 和 101-103 组成的组的氨基酸序列。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,进一步包括:

选择脑中具有 tau 聚集体的受试者,其中向所述选择的受试者施用所述一种或多种免疫原性 tau 肽或识别免疫原性 tau 表位的一种或多种抗体。

11. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述一种或多种免疫原性 tau 肽在一个或多个氨基酸残基处磷酸化,并且所述一种或多种抗体识别磷酸化的免疫原性 tau 肽。

12. 根据权利要求 9 所述的方法,其中免疫原性载体连接所述免疫原性 tau 肽。

13. 根据权利要求 9 所述的方法,其中在所述施用一种或多种免疫原性 tau 肽或抗体之

前、之后或同时施用佐剂。

14. 根据权利要求 9 所述的方法,其中在所述施用一种或多种免疫原性 tau 肽之前、之后或同时施用一种或多种其他的免疫原性 tau 肽。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述一种或多种其他的免疫原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO :81-100 组成的组的氨基酸序列。

16. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述聚集体是神经原纤维缠结或它们的病理 tau 前体。

17. 一种在受试者中减缓 tau 病理相关的行为表型进展的方法,所述方法包括:

在有效地减缓所述受试者的所述 tau 病理相关的行为表型进展的条件下,向所述受试者施用:一种或多种免疫原性 tau 肽,其含有选自 SEQ ID NO :2-75 组成的组的氨基酸序列;或一种或多种抗体,所述抗体识别免疫原性 tau 表位,所述免疫原性 tau 表位包含选自 SEQ ID NO :2-75 和 101-103 组成的组的氨基酸序列。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,所述方法进一步包括:

选择患有 tau 病理相关的行为表型的受试者,其中向所述选择的受试者施用所述一种或多种免疫原性 tau 肽或识别免疫原性 tau 表位的一种或多种抗体。

19. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述一种或多种免疫原性 tau 肽在一个或多个氨基酸残基处磷酸化,并且所述一种或多种抗体识别磷酸化的免疫原性 tau 肽。

20. 根据权利要求 17 所述的方法,其中免疫原性载体连接免疫原性 tau 肽。

21. 根据权利要求 17 所述的方法,其中在所述施用一种或多种免疫原性 tau 肽或抗体之前、之后或同时施用佐剂。

22. 根据权利要求 17 所述的方法,其中在所述施用一种或多种免疫原性 tau 肽之前、之后或同时施用一种或多种其他的免疫原性 tau 肽。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述一种或多种其他的免疫原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO :81-100 组成的组的氨基酸序列。

24. 一种分离的 tau 肽,包含选自 SEQ ID NO :2-75 和 101-103 组成的组的氨基酸序列。

25. 根据权利要求 24 所述的分离的 tau 肽,其中所述肽在一个或多个氨基酸残基处磷酸化。

26. 根据权利要求 24 所述的分离的 tau 肽,进一步包含:

连接所述分离的肽的免疫原性载体。

27. 一种药物组合物,包含:

根据权利要求 24 所述的一种或多种分离的肽;和  
药物载体。

28. 权利要求 27 所述的药物组合物,进一步包含:

药学上可接受的佐剂。

29. 权利要求 27 所述的药物组合物,进一步包含:

一种或多种其他的免疫原性 tau 肽,其具有选自 SEQ ID NO :81-100 组成的组的氨基酸序列。

30. 一种抗体或其结合部分,其对根据权利要求 24 所述的分离的 tau 肽具有抗原特异

性。

31. 根据权利要求 30 所述的抗体或其结合部分,其中所述分离的肽是磷酸化的。

32. 根据权利要求 30 所述的抗体或其结合部分,其中所述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体,或其活性结合部分。

33. 一种联合免疫治疗剂,包含:

根据权利要求 30 所述的抗体;和

识别一种或多种不同促淀粉样变蛋白或肽的一种或多种抗体或其结合部分。

34. 根据权利要求 33 所述的联合免疫治疗剂,其中所述一种或多种促淀粉样变蛋白或肽选自: $\beta$  蛋白前体、朊病毒和朊病毒蛋白、 $\alpha$ -突触核蛋白、淀粉样蛋白- $\beta$ 、胰岛淀粉样多肽、载脂蛋白 AI、载脂蛋白 AII、溶菌酶、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C、凝溶胶蛋白、心钠素、降钙素、角膜上皮素、乳铁蛋白、免疫球蛋白轻链、运甲状腺素蛋白、A 淀粉样变性、 $\beta$  2-微球蛋白、免疫球蛋白重链、纤维蛋白原  $\alpha$  链、催乳素、角蛋白和 Medin。

35. 一种在受试者中诊断阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的方法,所述方法包括:

在所述受试者中使用诊断试剂检测病理 tau 蛋白构象异构体的存在情况,其中所述诊断试剂包含权利要求 30 所述的抗体或其活性结合片段;和

根据所述检测在所述受试者中诊断阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病。

36. 根据权利要求 35 所述的方法,其中所述检测包括:

从所述受试者获得生物样品;

在有效地使所述诊断试剂结合所述样品中的病理 tau 蛋白构象异构体的条件下,使来自所述受试者的所述生物样品接触所述诊断试剂;和

在所述样品中检测所述诊断试剂与所述病理 tau 蛋白构象异构体的结合。

37. 根据权利要求 35 所述的方法,其中所述检测包括:

向所述受试者施用所述诊断试剂,其中所述诊断试剂包含可检测的标记,以及使用体内成像设备检测在所述受试者中的标记诊断试剂。

38. 一种诊断试剂盒,包含:

权利要求 30 所述的分离的抗体;和

可检测的标记。

## 病理 TAU 蛋白的免疫靶向

[0001] 本申请要求 2009 年 6 月 10 日提交的美国临时专利申请序列 No61/185,895 的权益,其由此以引用的方式全部并入本文。

[0002] 本发明的主题在来自美国政府的支持在国家卫生研究院下进行,授权 No. AG032611。美国政府享有某些权利。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于在受试者中预防、治疗和诊断阿尔茨海默病和相关的 tau 蛋白病 (taupathy)、以及抑制神经原纤维缠结和 / 或它们的病理 tau 前体积聚的免疫学方法和组合物。

### 背景技术

[0004] 新兴的阿尔茨海默病 (AD) 治疗方法是清除  $\beta$ -淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) 的免疫治疗。在 AD 和额颞叶失智症中,另一个重要标志是神经原纤维缠结和 / 或它们的病理 tau 蛋白构象异构体,它们的存在于痴呆程度非常有关系 (Terry R., " Neuropathological Changes in Alzheimer Disease, " Prog Brain Res. 101:383-390(1994);Goedert M., " Tau Protein and Neurodegeneration, " Semin Cell Dev Biol. 15:45-49(2004))。tau 病理免疫治疗的目的是,抗-tau 抗体能清除可影响神经元活性的 tau 蛋白聚集。其他免疫系统的成分可在所述清除过程中发挥作用。tau 是可溶性蛋白,其可以促进微管蛋白组装、微管稳定性和细胞骨架完整性。虽然根据唐氏综合征研究,tau 病理有可能是在 A $\beta$  聚集之后发生,但对 AD 脑和小鼠模型的分析表明这些病状是具有协同性的 (Sigurdsson et al., " Local and Distant Histopathological Effects of Unilateral Amyloid-beta 25-35 Injections into the Amygdala of Young F344 Rats, " Neurobiol Aging 17:893-901(1996);Sigurdsson et al., " Bilateral Injections of Amyloid- $\beta$  25-35 into the Amygdala of Young Fischer Rats:Behavioral, Neurochemical, and Time Dependent Histopathological Effects, " Neurobiol Aging 18:591-608(1997); Lewis et al., " Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP, " Science 293(5534):1487-91(2001);Gotz et al., " Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by A-beta 42 Fibrils, " Science 293:1491-1495(2001);Delacourte et al., " Nonoverlapping but Synergetic Tau and APP Pathologies in Sporadic Alzheimer ' s Disease, " Neurology. 59:398-407(2002);Oddo et al., " Abeta Immunotherapy Leads to Clearance of Early, But Not Late, Hyperphosphorylated Tau Aggregates via the Proteasome, " Neuron 43:321-332(2004);Ribe et al., " Accelerated Amyloid Deposition, Neurofibrillary Degeneration and Neuronal Loss in Double Mutant APP/Tau Transgenic Mice, " Neurobiol Dis. (2005))。因此,以两种病理为目标可显著提升治疗效果。迄今,没有在 AD 中观察到 tau 突变,然而在中额

颞叶失智症中,在染色体 17(FTDP-17) 上的突变是该疾病的诱发因素,其进一步支持基于 tau 蛋白的治疗方案 (Poorkaj et al., " Tau is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia, " Ann Neurol.43 :815-825(1998);Spillantini et al., " Frontotemporal Dementia and Parkinsonism Linked to Chromosome 17:A New Group of Tauopathies, " Brain Pathol.8 :387-402(1998))。表达突变的转基因小鼠已经发展出很多该疾病的方面,并且该小鼠对于研究 tau 病理相关的神经变性的发病机理和评估潜在的疗法来说,是有价值的工具。这些模型中的一种,P301L 小鼠模型 (Lewis et al., " Neurofibrillary Tangles,Amyotrophy and Progressive Motor Disturbance in Mice Expressing Mutant(P301L)Tau Protein, " Nat Genet.25 :402-405(2000)),概括了很多额颞叶失智症的特征,虽然 tau 蛋白聚集的 CNS 分布主要地导致了感觉运动异常,其使认知评价复杂化。纯合系小鼠模型具有中枢神经病和有关的功能损伤的及早发作,这种特点使它们理想地用于最初评估免疫治疗、病理 tau 构象异构体靶向的可行性。

[0005] 其他 tau- 相关的治疗方案包括:(1) 抑制激酶或激活磷酸酶(影响 tau 磷酸化的状态)的药物 (Iqbal et al., " Inhibition of Neurofibrillary Degeneration: A Promising Approach to Alzheimer' s Disease and Other Tauopathies, " Curr Drug Targets5 :495-502(2004);Noble et al., Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 by Lithium Correlates with Reduced Tauopathy and Degeneration In Vivo, " Proc Natl Acad Sci U S A 102 :6990-6995(2005));(2) 微管稳定药物 (Michaelis et al., {beta}-Amyloid-Induced Neurodegeneration and Protection by Structurally Diverse Microtubule-Stabilizing Agents, " J Pharmacol Exp Ther.312 :659-668(2005);Zhang et al., " Microtubule-Binding Drugs Offset Tau Sequestration by Stabilizing Microtubules and Reversing Fast Axonal Transport Deficits in a Tauopathy Model, " Proc Natl Acad Sci U S A 102 :227-231(2005));(3) 干扰 tau 蛋白聚集体的化合物 (Pickhardt et al., " Anthraquinones Inhibit Tau Aggregation and Dissolve Alzheimer' s Paired Helical Filaments In Vitro and in Cells, " J Biol Chem.280 :3628-3635(2005));和(4) 促进热休克蛋白调节 tau 蛋白清除的药物 (Dickey et al., " Development of a High Throughput Drug Screening Assay for the Detection of Changes in Tau Levels--Proof of Concept with HSP90 Inhibitors, " Curr Alzheimer Res.2 :231-238(2005))。虽然全部这些方案肯定值得继续做,但靶向特异性和毒性是一个关注事项,其强调了同时研发其他 tau- 靶向治疗的重要性,例如免疫治疗。

[0006] 本发明涉及克服在本领域这些的和其他的缺点。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明的第一个方面涉及在受试者中预防或治疗阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的方法。该方法包括有效治疗或预防受试者的阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的条件下,向受试者施用任一种或多种免疫原性 tau 肽,其含有选自由 SEQ ID NO :2-75 组成的组的氨基酸序列,或一种或多种抗体,其识别免疫原性 tau 表位(包含选自由 SEQ ID NO :2-75 和 101-103 组成的组的氨基酸序列)。

[0009] 另外一个本发明的方面涉及促进从受试者脑中清除 tau 蛋白聚集的方法。该方法

包括在有效于促进从受试者脑中清除 tau 蛋白聚集的条件下,向受试者施用任一种或多种免疫原性 tau 肽,其含有选自 SEQ ID NO :2-75 组成的组的氨基酸序列,或一种或多种抗体,其识别免疫原性 tau 表位(包含选自 SEQ ID NO :2-75 和 101-103 组成的组的氨基酸序列)。

[0010] 本发明的第 3 个方面涉及减缓 tau 病理相关的行为表型进展的方法。该方法包括在有效减缓受试者的 tau 病理相关的行为表型的条件下,向受试者施用任一种或多种免疫原性 tau 肽,其含有选自 SEQ ID NO :2-75 组成的组的氨基酸序列,或一种或多种抗体,其识别免疫原性 tau 表位(包含选自 SEQ ID NO :2-75 和 101-103 组成的组的氨基酸序列)。

[0011] 本发明的第 4 个方面涉及分离的 tau 肽,其包含选自 SEQ ID NO :2-75 和 101-103 组成的组的氨基酸序列。免疫原性 tau 肽在受试者中,是有效预防和治疗阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病,促进从受试者脑中清除聚集,并且在受试者中减缓 tau 病理相关的行为表型的进展。

[0012] 对于预防和治疗阿尔茨海默病和其他 tau- 相关的神经变性病,神经原纤维缠结和它们的病理 TAU 蛋白构象异构体是非常重要的目标。然而,对于靶向和清除神经原纤维缠结和 / 或病理 tau 构象异构体,缺乏一种高靶向特异性和少到没有的毒性的策略。如本文所述,设计免疫原性 tau 肽和抗体以克服这些缺点。因为本发明的免疫原性 tau 肽,模拟病理 tau 的狭义磷酸基 - 表位,和识别这些相同的狭义磷酸基 - 表位的抗体,以获得提高的专一性和安全性。本方案也应用于针对游离的病理 tau 片段的 N- 或 C- 末端产生的如本文所述的抗体。相应地,使用如本文所述的免疫治疗,能对病理 TAU 蛋白产生强烈免疫应答,同时对正常 tau 蛋白产生不利免疫应答的风险极小。

[0013] 附图简述

[0014] 图 1A-1B 描述在 JNPL3 P301L 缠结小鼠模型中,对本发明的免疫原性 tau 肽的免疫应答。2-3 个月龄的小鼠以 2 周为间隔接受最初 2 次免疫,其后每月接受一次。为评估抗体应答,在首次免疫之前给小鼠抽血,其后定期地在疫苗施用后 1 周给小鼠抽血,并且在 8-9 个月龄时处死小鼠以获得组织。如在图 1A 和 1B 中所示,在第 6 次免疫 (T3) 1 周后,以及在被处死的 8-9 个月龄时 (Tf = T 最终),测定 IgG 和 IgM。图 1A 显示:用通过 GPSL 接头连接于破伤风毒素 T 辅助细胞表位 (TT947-967) 的 Tau210-216 [P-Thr<sub>212</sub>-Ser<sub>214</sub>] (SEQ ID NO :2) 免疫 JNPL3 P301L 小鼠,在该小鼠中产生强烈 IgG 和 IgM 免疫应答。图 1B 显示:针对破伤风毒素表位产生了强烈的抗体应答,这由以下测试所示,IgG 和 IgM 结合于通过 GPSL 连接于 TT947-967 的无关的 tau 蛋白表位 Tau260-264 [P-Ser<sub>262</sub>]。ELISA 板涂有 0.5 μg 每孔的肽和稀释至 1 : 200 的血浆。

[0015] 图 2A-2C 显示:用通过 GPSL 接头连接于破伤风毒素 T 辅助细胞表位 (TT947-967) 的 Tau260-264 [P-Ser<sub>262</sub>] (SEQ ID NO :3) (也是指 T299 肽) 免疫 JNPL3 P301L 缠结小鼠,该小鼠对免疫原产生了强烈 IgG 应答。图 2A 显示:用 Tau260-264 [P-Ser<sub>262</sub>] 肽免疫之后,小鼠中的 IgG 抗体应答。如上所述,小鼠以 2 周间隔接受最初的两次免疫,其后从 2-3 月龄至 8-9 月龄每月接受免疫。图 2B 显示:对破伤风毒素表位产生了大量抗体应答,这由以下测试所示,IgG 结合于不相关的通过 GPSL 连接于 TT947-967 的 tau 蛋白表位 Tau210-216 [P-Thr<sub>212</sub>-Ser<sub>214</sub>]。图 2c 显示:对 tau 蛋白表位产生了大量抗体应答,

这由以下测试所示, IgG 结合于更大的含有 Tau260-264[P-Ser<sub>262</sub>] 区域的 tau 蛋白表位 Tau240-270[P-Ser<sub>262</sub>]。ELISA 板涂有 0.5 μg 每孔的肽和稀释至 1 : 200 的血浆。T0-T 最终, 分别在接种疫苗之前 (T0), 第三次 (T1)、第六次 (T2)、第七次 (T3) 免疫后一周, 和在获取组织 (Tf) 时, 对小鼠抽血。

[0016] 图 3 显示: 在用连接于破伤风毒素 T 辅助细胞表位 (TT947-967) 的 Tau229-237[P-Thr<sub>231</sub>-Ser<sub>235</sub>] (SEQ ID NO :4) 免疫的 JNPL3 P301L 缠结模型小鼠中, 产生了强烈抗体 (IgG) 应答。从 2-3 月龄开始免疫小鼠, 2 周间隔, 其后每月免疫, 并且在第三次免疫后一周 (T1) 抽血。ELISA 板涂有 0.5 μg 每孔的肽和稀释至 1 : 200 的血浆。

[0017] 图 4 显示: 在用明矾佐剂中的磷酸化的免疫原 Tau379-408[Asp<sub>396,404</sub>] (SEQ ID NO : 57) 免疫的 JNPL3 P301L 缠结模型小鼠中, 产生了强烈抗体 (IgG) 应答。重要地, 这些抗体识别磷酸基 - 表位 Tau379-408[P-Ser<sub>396,404</sub>], 并达到相似的程度。从 2-3 月龄开始对小鼠免疫, 最初两次以 2 周为间隔, 其后每月免疫。在获取 8-9 月龄小鼠的组织时, 对小鼠抽血 (Tf)。ELISA 板涂有 0.5 μg 每孔的肽和稀释至 1 : 200 的血浆

[0018] 图 5A-5B 显示: 在 Tau 免疫治疗之后, 在缠结小鼠模型的脑干 (图 5) 和齿状回 (图 5B) 中观察到病理 tau 减少。用 T299 (Tau260-264[P-Ser<sub>262</sub>] (SEQ ID NO :3)) 免疫纯合 JNPL3 tau P301L 小鼠, 该 T299 通过 GPSL 接头序列连接于破伤风毒素 T 辅助细胞表位。通过 PHF1 抗体免疫染色来评估在脑干和齿状回中的病理 tau。PHF1 是识别 tau 的单克隆抗体, 该 tau 在 C-末端的丝氨酸氨基酸 404 和 396 上是磷酸化的 (Greenberg et al., "Hydrofluoric Acid-Treated Tau PHF Proteins Display the Same Biochemical Properties as Normal Tau," J Biol Chem 267 :564-569 (1992), 其由此以引用的方式全部并入本文)。相比只施用佐剂的对照, 在用 T299 肽积极免疫动物的脑干和齿状回中, 观察到病理 tau 染色蛋白的显著减少。

[0019] 图 6 显示: 用磷酸化 Tau379-408[P-Ser<sub>396,404</sub>] (SEQ ID NO :82) 免疫原性肽免疫对 htau/PS1 进行免疫, 使在梨状皮质中的 tau 蛋白聚集数量减少 56%。在免疫组和对照组之间观察到显著的差异 (单因素 ANOVA,  $p < 0.01$ )。析因分析也显示免疫的 htau/PS1 小鼠区别于它们的 htau/PS1 对照 ( $p < 0.01$ )。\* $p < 0.01$ 。

[0020] 图 7A-7B 显示: Tau 免疫治疗在缠结小鼠模型中预防功能损伤。使用通过 GPSL 接头序列连接于破伤风毒素辅助 T 细胞表位 (TT947-967) 的磷酸化免疫原性 Tau 299 肽 (Tau260-264[P-Ser<sub>262</sub>] (SEQ ID NO :3)), 免疫纯合 JNPL3 P301L 小鼠。对照动物只施用佐剂。利用在 8 月龄时的横梁测试评估预防功能损伤的 Tau260-264[P-Ser<sub>262</sub>] 肽疫苗施用效果, 结果显示相对于对照动物, 免疫的动物录得更少量的失足 (图 7A)。另外, 通过在 5-6 月龄和在 8-9 月龄时的转杆测试, 评估预防功能损伤的 Tau260-264[P-Ser<sub>262</sub>] 肽疫苗施用效果 (图 7B)。

[0021] 图 8A-8B 显示: 用磷酸化 Tau379-408[P-Ser<sub>396,404</sub>] (SEQ ID NO :82) 对 htau/PS1 小鼠的免疫提高在八臂迷宫 (图 8A) 和目标识别测试中的表现 (图 8B)。如图 8A 所示, 在八臂迷宫测试中, 在免疫组合对照组之间观察到显著差异 (两因素 ANOVA 重复测量,  $p < 0.0001$ )。Neuman-Keuls 析因检验显示: 在所有天内, 免疫的 htau/PS1 小鼠比对照 htau/PS1 小鼠表现更好 (即, 更少犯错) ( $p < 0.01-0.001$ )。在目标识别测试中, 在各组之间观察到显著差异 (单因素 ANOVA,  $p = 0.005$ ) (图 8B)。Neuman-Keuls 析因检验显示: 免疫的

htau/PS1 小鼠比相同的对照小鼠具有更好的短期记忆 ( $p < 0.01$ )。这充分确定相对于旧的目标,认知正常的小鼠用大约它们的 70% 时间在新目标上。 $**p < 0.01$ 。

[0022] 图 9A-9C 显示:用磷酸化 Tau379-408 [P-Ser<sub>396,404</sub>] (SEQ ID NO:82) 对 htau/PS1 小鼠的免疫提高在封闭域对称迷宫测试中的表现。在每个迷宫测试中,在免疫组合对照组之间观察到关于犯错次数的显著差异 9A-9C (单因素 ANOVA, 迷宫 A :  $p < 0.001$ , 迷宫 B :  $p < 0.0001$ , 迷宫 C :  $p < 0.01$ )。析因分析显示:处理过的 htau/PS1 组比它们相同的对照小鼠表现更好 (htau/PS1 对照) (迷宫 A :  $p < 0.01$ , 迷宫 B, C :  $p < 0.001$ )。析因分析也发现在一些其他组之间的随迷宫而定的显著差异,但这些差异缺乏关联性,因而不在这里详述。错误次数显示,这三个迷宫的复杂性依次上升 (注意 Y 轴刻度不同)。 $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ 。

[0023] 图 10A-10F 中图表描述:在用磷酸化 Tau379-408 [P-Ser<sub>396,404</sub>] (SEQ ID NO:82) 免疫的 htau/PS1 小鼠和相应的对照中,通过 western 印迹分析检测到的可溶性和不溶性 tau (总 tau 和病理 Tau) 的水平。相对于总 tau, Tau 免疫治疗使病理 Tau 降低 35-43% (图 10C 和 10D)。如用 B19 抗体测试所示,免疫治疗不影响总 tau 水平,这对本方法安全性重要 (图 10A 和 10B)。相对于 htau/PS1 对照,PHF1 可溶性 tau 显著降低 ( $p < 0.001$ ) 而且可溶性 tau 比例 (PHF1/总 tau) 降低 35% ( $p < 0.05$ ) (图 10E)。在 PHF1 不溶性 tau 中也观察到强烈的下降趋势 ( $p = 0.06$ ), 并且不溶性 tau 比例 (PHF1/总 tau) 降低 43% ( $p = 0.08$ ) (图 10F)。 $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$

[0024] 图 11A-11C 显示:靶向磷酸化 tau 396 和 404 表位的被动免疫治疗预防功能衰退,以及在 P301L 缠结小鼠中降低蛋白病。图 11A 的图表显示:由 IgG 注射的对照和 PHF1 免疫的 P301L 小鼠在横梁测试中发生的失足次数的显著差异,当穿越横梁时对照动物具有更多失足 (联合试验,  $p = 0.03$ )。图 11B 的图表显示:在免疫的和对照 P301L 小鼠的齿状回中的 tau 免疫染色的比例。相比对照,PHF1 免疫的 P301L 小鼠在齿状回中 PHF1 染色的 tau 病理少 58% ( $p = 0.02$ )。如图 11C 所示,在血浆中的 PHF-1 抗体 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 数量在 2 周之内下降 4 倍。在对照中没有观察到可检测的抗体,而免疫的动物中的该水平随时间推移而下降。这里有免疫的小鼠的平均值。T0:首次免疫之前、T1:第 12 次注射后 24h、T2:第 13 次和最后一次注射后 7 天、T3:最后注射后 14 天。ELISA 板涂有 Tau379-408 [P-Ser<sub>396,404</sub>]。

[0025] 图 12A-12B 的图表显示:PHF1 抗体和 tau 病理的血浆水平的逆相关。在脑中观察到显著相关 (图 12A ;  $p < 0.01$ ), 以及在皮层运动区中观察到相关性的强烈趋势 (图 12B ;  $p = 0.06$ )。

[0026] 图 13A-13B 的图表描述:针对免疫原性 tau 肽产生单克隆抗体,该免疫原性 tau 肽包含氨基酸 386-408 (SEQ ID NO:13), 并含有在第 396 和 404 的氨基酸上磷酸化的丝氨酸的表位。如图 13A 所示,针对免疫原 Tau-386-408 [P-Ser<sub>396,404</sub>] tau 位点 (红), 产生非常强的效价,这由血浆系列稀释检测而知。血浆抗体优选地识别磷酸基 -Ser404 表位 (蓝) 和非 -磷酸基表位 (白)。磷酸基 -Ser396 表位 (绿) 被识别的程度较低。检测到大量强阳性克隆 ( $> 50$ )。其中,选择 8 个磷酸基 - 特异性克隆用于第一次亚克隆 (图 13B)。所有都显示出稳定,并且选择其中 3 个用于第二次亚克隆 (全部 IgG1)。从不特异性识别磷酸化 - 表位的克隆中,选择 6 个用于初次亚克隆。所有都显示出稳定,并且选择其中 3 个用于第二次亚克隆亚克隆 (IgG1、IgG2a 和 IgM)。

[0027] 图 14A-14B 的图表显示:第三次亚克隆后,通过 ELISA,测定表位结合于稳定的磷酸基-特异性(图 14A)和非-磷酸基-特异性(图 14B) Tau-386-408 [P-Ser<sub>396,404</sub>] 抗体克隆。从中选择磷酸基-特异性单克隆抗体用于进一步亚克隆,6 个中的 4 个维持它们对磷酸基-Ser<sub>404</sub> 表位的特异性(参见图 14A 中的克隆 1F12C2、1F12G6、4E6E3,和 4E6G7)。另外 2 个克隆具有较差的磷酸基-特异性(8B2D1)或非-特异性(8B2D4)(图 14A)。在进一步亚克隆后,非-磷酸基-特异性单克隆抗体中的 6B2E9 和 6B2G12 尤其地维持它们的非-特异性(图 14B)。在培养上清液的 1:810 稀释液中获得所示数据。

[0028] 图 15A-15B 中的 western 印迹显示:4 个 Tau-386-408 [P-Ser<sub>396,404</sub>] 磷酸基-特异性(图 15A)和非-磷酸基-特异性(图 15B)单克隆抗体克隆与来自 JNPL3 P301L 小鼠和野生型(Wt)小鼠的脑匀浆的反应。4 个磷酸基-特异性克隆中的 4E6G7 显示最强的反应,这与图 14A 的 ELISA 结果一致。与也识别 tau P-Ser<sub>396,404</sub> 表位的 PHF-1 抗体不同,相比 Wt 匀浆,所有克隆更好地与 JNPL3 P301L 脑匀浆反应。如预料的一样,非-磷酸基-特异性克隆反应更快,正如多数 tau 是非-磷酸化的。

[0029] 图 16A-16B 显示:针对包含氨基酸 260-271(SEQ ID NO:12)并含有磷酸化丝氨酸 262 表位的免疫原性 tau 肽,产生单克隆抗体。如图 16A 所示,针对免疫原 Tau260-271 [P-Ser<sub>262</sub>](紫)产生强的效价,但血浆抗体也识别非-磷酸基肽 Tau260-271 (No-P;白)。选择 8 个稳定的磷酸基-特异性克隆用于进一步分析(图 16B)。

[0030] 图 17 中的 western 印迹显示:3 个磷酸基-特异性 Tau260-271 [P-Ser<sub>262</sub>] 单克隆抗体克隆的反应性。相比其他磷酸基-特异性克隆,2C11 抗体克隆识别更高分子量带,而且它不区分野生型和 P301L 组织。5F7D10 和 5F7E9 是其他克隆的代表。Tau-5 识别总 tau 并别结合于在 tau 氨基酸 216-227 附近的表位。CP27 识别人类 tau 而不是鼠 tau。

[0031] 图 18A-18E 的免疫组织化学显微照片显示:在 P301L 缠结小鼠脑切片中,利用 5F7D10 抗体克隆检测 tau 病理。在 P301L 脑切片中,相对于野生型(图 18B),5F7D10 单克隆抗体显示强组织染色(图 18A)。在同样的缠结小鼠中,PHF1 抗体筛选 tau 病理(图 18C),虽然它的图案与 5F7D10 抗体的图案是不一样的,但这也不奇怪,因为他们识别不同的 tau 表位。图 18D 是图 18A 方框区域的放大图,其描述了带有聚集的 tau 的神经元。图 18E 是利用 5F7D10 检测的缠结-样病状(在不同 JNPL3 P301L 小鼠中)的更高的放大图。

[0032] 发明详述

[0033] 本发明的第一个方面涉及在受试者中预防或治疗阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的方法。该方法包括在有效治疗或预防受试者的阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的条件下,向受试者施用任一种或多种免疫原性 tau 肽,其具有选自 SEQ ID NO:2-75 组成的组的氨基酸序列,或一种或多种抗体,其识别免疫原性 tau 表位(包含选自 SEQ ID NO:2-75 和 101-103 组成的组的氨基酸序列)。

[0034] 如本文所用 tau 蛋白病包含任一神经变性病,其包含在脑中微管 TAU 蛋白的病态聚集。相应地,除了家族性遗传性和偶发性阿尔茨海默病,能够用本发明方法治疗的其他 tau 蛋白病,包括但不限于,连锁于 17 号染色体的伴帕金森病的额颞叶痴呆(frontotemporal dementia, parkinsonism linked to chromosome 17, FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性(corticobasal degeneration)、皮克病、进行性皮质下胶质增生、仅痴呆缠结(tangle only dementia)、伴发钙化的弥漫性神经原纤维缠结、嗜银颗粒

性痴呆 (argyrophilic grain dementia)、肌萎缩性侧索硬化帕金森 - 痴呆复征、拳击员痴呆、唐氏综合征、Gerstmann-Straussler-Scheinker 病、Hallerworden-Spatz 病、包涵体肌炎、Creutzfeld-Jakob 病、多系统萎缩、C 型 Niemann-Pick 病、朊病毒蛋白大脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、非-guanamian 伴发神经原纤维缠结的运动神经元病 (non-guanamian motor neuron disease with neurofibrillary tangles)、慢性外伤脑病, 和脑炎后帕金森综合征。

[0035] 另外一个本发明的方面涉及促进从受试者脑中清除 tau 蛋白聚集的方法。该方法包括, 在有效于促进从受试者脑中清除 tau 蛋白聚集的条件下, 向受试者施用任一种或多种免疫原性 tau 肽, 其含有选自由 SEQ ID NO :2-75 组成的组的氨基酸序列, 或一种或多种抗体, 其识别免疫原性 tau 表位 (包含选自由 SEQ ID NO :2-75 和 101-103 组成的组的氨基酸序列)。

[0036] 清除 tau 蛋白聚集包括清除神经原纤维缠结和 / 或神经原纤维缠结的病态 tau 蛋白前体。神经原纤维缠结经常与神经变性病有关, 该神经变性病包含例如, 偶发性和家族性阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化、嗜银颗粒性痴呆、拳击员痴呆、慢性外伤脑病、伴发钙化的弥漫性神经原纤维缠结、唐氏综合征、Gerstmann-Straussler-Scheinker 病、Hallerworden-Spatz 病、遗传性额颞叶失智症、染色体 17 (FTDP-17) 相关的帕金森病、包涵体肌炎、Creutzfeld-Jakob 病、多系统萎缩、C 型 Niemann-Pick 病、皮克病、朊病毒蛋白大脑淀粉样血管病、偶发性皮质基底节变性、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、有神经原纤维缠结的运动神经元疾病、仅痴呆缠结, 和进行性皮质下胶质增生。

[0037] 另外一个本发明的方面涉及减缓 tau 病理相关的行为表型进展的方法。该方法包括, 在有效减缓受试者的 tau 病理相关的行为表型的条件下, 向受试者施用任一种或多种免疫原性 tau 肽, 其含有选自由 SEQ ID NO :2-75 组成的组的氨基酸序列, 或一种或多种抗体, 其识别免疫原性 tau 表位 (包含选自由 SEQ ID NO :2-75 和 101-103 组成的组的氨基酸序列)。

[0038] 如本文所用, tau 病理相关的行为表型包括但不限于, 认知损伤、早期的人格改变和失控、冷漠、意志力丧失、缄默症、失用、持续言语、刻板的动作 / 行为、多言、混乱、无法计划或组织顺序的任务、自私 / 无情、反社会的特征、缺乏换位思考、停止、相对保存完好的理解的频繁错语和无语法的讲话、受损的理解和选词障碍、缓慢渐进的步态不稳、后退、不动、经常跌倒、非左旋多巴响应的轴向刚性、核上凝视麻痹、方波抽搐、缓慢垂直扫视、假性球麻痹、肢体失用、肌张力障碍、皮质感觉丧失和震颤。

[0039] 根据本发明的方法, 在一个实施方案中, 向有需要的受试者施用免疫原性 tau 肽或免疫原性 tau 肽的联合剂。合适的 tau 蛋白的免疫原性 tau 肽包含一种或多种抗原性表位, 其模拟 tau 蛋白的病理型。示例性的免疫原性 tau 蛋白表位在一种或多种氨基酸上是磷酸化的, 其是在 tau 蛋白的病理型中被磷酸化, 而不是在正常的或非病理型 tau 蛋白中磷酸化。

[0040] 在一个本发明优选的实施方案中, 施用免疫原性 tau 肽, 以诱导出针对免疫原性 tau 肽和 tau 病理型的主动免疫应答, 从而促进和 tau 蛋白聚集体相关的清除、减缓 tau 病理相关的行为进展以及治疗潜在的 tau 蛋白病。根据本发明的这个方面, 免疫应答包含



[0071]	Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
[0072]	225 230 235 240
[0073]	Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
[0074]	245 250 255
[0075]	Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
[0076]	260 265 270
[0077]	Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
[0078]	275 280 285
[0079]	Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
[0080]	290 295 300
[0081]	Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
[0082]	305 310 315 320
[0083]	Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
[0084]	325 330 335
[0085]	Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
[0086]	340 345 350
[0087]	Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
[0088]	355 360 365
[0089]	Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
[0090]	370 375 380
[0091]	Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
[0092]	385 390 395 400
[0093]	Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
[0094]	405 410 415
[0095]	Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
[0096]	420 425 430
[0097]	Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
[0098]	435 440
[0099]	表 1 :免疫原性 tau 肽
[0100]	

SEQ ID NO:	名称	序列
SEQ ID NO: 2	Tau210-216 [P-Thr <sub>212</sub> - Ser <sub>214</sub> ]	SRT*PS*LP
SEQ ID NO: 3	Tau260-264 [P-Ser <sub>262</sub> ]	IGS*TE
SEQ ID NO: 4	Tau229-237 [P-Thr <sub>231</sub> -Ser <sub>235</sub> ]	VRT*PPKS*PS
SEQ ID NO: 5	Tau394-406 [P-Ser <sub>396,404</sub> ]	YKS*PVVSGDTS*PR
SEQ ID NO: 6	Tau192-221 [P-Thr <sub>212</sub> Ser <sub>214</sub> ]	GDRSGYSSPGSPGTPGSRRT*PS*LPTPPT
SEQ ID NO: 7	Tau192-221 [P-Ser <sub>199, 202, 214, Thr<sub>205, 212</sub></sub> ]	GDRSGYSS*PGS*PGT*PGSRRT*PS*LPTPPT
SEQ ID NO: 8	Tau192-221 [P-Ser <sub>199,214</sub> Thr <sub>212, 217</sub> ]	GDRSGYSS*PGSPGTPGSRRT*PS*LPT*PPT
SEQ ID NO: 9	Tau192-221 [P-Ser <sub>202</sub> Thr <sub>205</sub> ]	GDRSGYSSPGS*PGT*PGSRRTPSLPTPPT
SEQ ID NO: 10	Tau200-229 [P-Thr <sub>212</sub> - Ser <sub>214</sub> ]	PGSPGTPGSRRT*PS*LPTPPTREPCKVAVV
SEQ ID NO: 11	Tau322-358[P-Ser <sub>324,356</sub> ]	CGS*LGNHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGS*LD
SEQ ID NO: 12	Tau260-271 [P-Ser <sub>262</sub> ]	IGS*TENLKHQPG
SEQ ID NO: 13	Tau386-408 [P-Ser <sub>396, Ser<sub>404</sub></sub> ]	TDHGAEIVYKS*PVVSGDTS*PRHL
SEQ ID NO: 14	Tau48-71 [P-Thr <sub>50,69</sub> ]	LQT*PTEDGSEEPGSETSDAKST*PT
SEQ ID NO: 15	Tau111-115 [P-Ser <sub>113</sub> ]	TPS*LE
SEQ ID NO: 16	Tau151-155[P-Thr <sub>153</sub> ]	IAT*PR
SEQ ID NO: 17	Tau173-177[P-Thr <sub>175</sub> ]	AKT*PP
SEQ ID NO: 18	Tau203-219[P-Thr <sub>205,212,217</sub> - Ser <sub>208,210,214</sub> ]	PGT*PGS*RS*RT*PS*LPT*PP
SEQ ID NO: 19	Tau233-237[P-Thr <sub>235</sub> ]	PKS*PS
SEQ ID NO: 20	Tau256-264[P-Ser <sub>258,262</sub> ]	VKS*KIGS*TE
SEQ ID NO: 21	Tau287-291[P-Ser <sub>289</sub> ]	VQS*KC

[0101]

SEQ ID NO:	名称	序列
SEQ ID NO: 22	Tau354-358[P-Ser <sub>356</sub> ]	IGS*LD
SEQ ID NO: 23	Tau398-416[P-S <sub>400,409,412,413</sub> - Thr <sub>403,414</sub> ]	VVS*GDT*SPRHLS*NVS*S*T*GS
SEQ ID NO: 24	Tau420-437[P-Ser <sub>422,433,435</sub> - Thr <sub>427</sub> ]	VDS*PQLAT*LADEVS*AS*LA
SEQ ID NO: 25	Tau200-204[P-Ser <sub>202</sub> ]	PGS*P
SEQ ID NO: 26	Tau203-207[P-Thr <sub>205</sub> ]	PGT*PG
SEQ ID NO: 27	Tau197-207[P-Ser <sub>199,202</sub> -- Thr <sub>205</sub> ]	YSS*PGS*PGT*PG
SEQ ID NO:28	Tau206-216 [P-Thr <sub>212</sub> -Ser <sub>214</sub> ]	PGRSRT*PS*LP
SEQ ID NO:29	Tau229-239 [P-Thr <sub>231</sub> - Ser <sub>235</sub> ]	VRT*PPKS*PSSA
SEQ ID NO:30	Tau179-188 [P-Thr <sub>181</sub> -Ser <sub>184,185</sub> ]	PKT*PPS*S*GEP

[0102] 上述免疫原性肽的变体和类似物,其针对能够使用的优选的 tau 蛋白表位,诱导抗体和/或与抗体交叉反应。包含等位基因的类型、种、诱导的变体的类似物,通常在1个、2个或多个位置,而经常借助连续取代,区别于自然产生的肽。通常类似物至少具有与天然肽80或90%的序列一致性。一些类似物包含非天然氨基酸,或者在1个、2个或多个位置的N-或C-末端的氨基酸的修饰结构。

[0103] 在本发明的一个实施方案中,变异的免疫原性 tau 肽是伪-磷酸化肽。通过用酸性氨基酸,例如谷氨酸和天冬氨酸,取代一种或多种 tau 肽的磷酸化丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基,制备伪-磷酸化肽丝氨酸 (Huang et al., "Constitutive Activation of Mek1 by Mutation of Serine Phosphorylation Sites," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(19): 8960-3(1994), 其由此以引用的方式全部并入本文)。示例性的本发明的分离的免疫原性伪-磷酸化 tau 肽如下表2所示。在每个表2的序列中,以X说明氨基酸残基取代的位置,其中x是谷氨酸或天冬氨酸残基取代

[0104] 表2:免疫原性伪-磷酸化 Tau 肽

[0105]

[0106]

SEQ ID NO:	名称	序列
SEQ ID NO: 31	Tau210-216 [T212X, S214X]	SRXPXLP
SEQ ID NO: 32	Tau260-264 [S262X]	IGXTE
SEQ ID NO: 33	Tau229-237 [T231X, S235X]	VRXPPKXPS
SEQ ID NO: 34	Tau394-406 [S396X, S202X]	YKXPVVSGDTXPR
SEQ ID NO: 35	Tau192-221 [T212X, S214X]	GDRSGYSSPGSPGTPGSRSRXPXLTPPTR
SEQ ID NO: 36	Tau192-221 [S199X, S202X, S214X, T205X, T212X]	GDRSGYSXPGXPGXPGSRSRXPXLTPPTR
SEQ ID NO: 37	Tau192-221 [S199X, S214X, T212X, T217X]	GDRSGYSXPGSPGTPGSRSRXPXLXPTR
SEQ ID NO: 38	Tau192-221 [S202X, T205X]	GDRSGYSSPGXPGXPGSRSRTPSLTPPTR
SEQ ID NO: 39	Tau200-229 [T212X, S214X]	PGSPGTPGSRSRXPXLTPPTREPKKVAVV
SEQ ID NO: 40	Tau322-358 [S324X, S356X]	CGXLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGXLD
SEQ ID NO: 41	Tau260-271 [S262X]	IGXTENLKHQPG
SEQ ID NO: 42	Tau386-408 [S396X, S404X]	TDHGAEIVYKXPVVSGDTXPRHL
SEQ ID NO: 43	Tau48-71 [T50X, T69X]	LQXPTEDGSEEPGSETSDAKSXPT
SEQ ID NO: 44	Tau111-115 [S113X]	TPXLE
SEQ ID NO: 45	Tau151-155 [T153X]	IAXPR
SEQ ID NO: 46	Tau173-177 [T175X]	AKXPP
SEQ ID NO: 47	Tau203-219 [T205X, T212X, T217X, S208X, S210X, S214X]	PGXPGXRXPXLXPP
SEQ ID NO: 48	Tau233-237 [T235X]	PKXPS
SEQ ID NO: 49	Tau256-264 [S258X, S262X]	VKXKIGXTE
SEQ ID NO: 50	Tau287-291 [S289X]	VQXKC

[0107]

SEQ ID NO:	名称	序列
SEQ ID NO: 51	Tau354-358[S356X]	IGXLD
SEQ ID NO: 52	Tau398-416[S400X, S409X, S412X, S413X, T403X, S414X]	VVXGDXXSPRHLXNVXXXGS
SEQ ID NO: 53	Tau420-437[S422X, S433X, S435X, T427X]	VDXPQLAXLADEVXAXLA
SEQ ID NO: 54	Tau200-204[S202X]	PGXP
SEQ ID NO: 55	Tau203-207[T205X]	PGXPG
SEQ ID NO: 56	Tau 133-162 [T149X, T153X]	DGTGSDDKKAKGADGKXKIAXTPRGAAPPGQ
SEQ ID NO: 57	Tau 379-408 [S396X, S404X]	RENAKAKTDHGAEIVYKXPVVSVDGTXPRHL
SEQ ID NO: 58	Tau 192-221 [S199X, S202X, S214X, T205X, T212X]	GDRSGYSXPGXPGXPGSRSRXPXLTPPTR
SEQ ID NO: 59	Tau221-250 [T231X, S235X]	REPKKVAVVRXPPKXPSSAKSRLQTAPVPM
SEQ ID NO: 60	Tau184-213[S184X, S191X, Y197X, S198X, S199X, S202X, T205X, S208X, S210X, T212X]	XSGEPPKXGDRSQXXXPGXPGXPGXRRX
SEQ ID NO: 61	Tau1-30 [Y18X, Y29X]	MAEPRQEFVMEHDHAGTXGLGDRKDQGGXT
SEQ ID NO: 62	Tau30-60 [T39X, S46X, T50X, T52X, S56X]	TMHQDQEGDXDAGLKEXPLQXPXEDGXEEP
SEQ ID NO: 63	Tau60-90 [S68X, T69X, T71X]	GSETSDAKXXPAEDVTAPLVDEGAPGKQAA
SEQ ID NO: 64	Tau90-120 [T95X, T101X, T102X, T113X]	AAQPHXEIPEGXXAEEAGIGDTPXLEDEAAG
SEQ ID NO: 65	Tau120-150 [T123X, S131X, T149X]	GHVXQARMVSKXKDGTSDDKKAKGADGKXK
SEQ ID NO: 66	Tau150-180 [T175X]	KIATPRGAAPPGQKQANATRIPAKXPPAPK
SEQ ID NO: 67	Tau180-210 [T181X, S184X, S185X, Y197X, S198X, S199X, S202X, T205X, S208X]	KXPPXXGEPKSGDRSGXXXPGXPGXPGXRS
SEQ ID NO: 68	Tau210-240 [T212X, S214X, T217X, T231X, S235X, S237X, S238X]	SRXPXLPXPPTREPCKVAVVRXPPKXPXXAK
SEQ ID NO: 69	Tau240-270 [S262X]	KSRLQTAPVPMPLKXNVKSKIGXTENLKHQP

[0108]

SEQ ID NO:	名称	序列
SEQ ID NO: 70	Tau270-300 [S293]	PGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGXKDNKIHV
SEQ ID NO: 71	Tau300-330 [Y310, S324X]	VPGGGSVQIVXKPVDLSKVTSKCGXLGNIHH
SEQ ID NO: 72	Tau330-360 [S356X]	HKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGXLDNI
SEQ ID NO: 73	Tau360-390 [T361X, T373X, T386X]	IXHVPGGGNKKIEXHKLTFRENAKAKXDHGA
SEQ ID NO: 74	Tau390-420 [Y394X, S396X, S400X, T403X, T404X, S409X, S412X, S413X]	AEIVXKXPVVXGDXXPRHLXNVXXTGSIDMV
SEQ ID NO: 75	Tau411-441 [S412X, S413X, S422X]	VXXTGSIDMVDXPQLATLADEVASLAKQGL

[0109] 每个本发明的 tau 蛋白,即 SEQ ID NO :2-75 和 87-88(下文表 3) 优选地在 N- 末端被乙酰化和在 C- 末端被酰胺化,从而更紧密地组装相同的完整长度 tau 蛋白的内部氨基酸。本发明的 tau 肽也能够包含一种或多种 D- 氨基酸残基以提高肽的稳定性。这些 D- 氨基酸能以相同的顺序以 L- 型肽型式存在,或以相反于 L- 型序列的顺序组装,从而维持总体上的天然序列拓扑结构 (Ben-Yedidia et al., "A Retro-Inverso Peptide Analogue of Influenza Virus Hemagglutinin B-cell Epitope 91-108 Induces a Strong Mucosal and Systemic Immune Response and Confers Protection in Mice after Intranasal Immunization," Mol Immunol. 39 :323(2002) ;Guichard, et al., "Antigenic Mimicry of Natural L-peptides with Retro-Inverso-Peptidomimetics," PNAS 91 : 9765-9769(1994) ;Benkirane, et al., "Antigenicity and Immunogenicity of Modified Synthetic Peptides Containing D-Amino Acid Residues," J. Bio. Chem. 268(35) : 26279-26285(1993), 其全部通过引用的方式被并入本文)。

[0110] 每个上面的肽序列可连接于免疫原性载体分子以提高免疫原性。合适的免疫原性载体分子,包括但不限于 T 辅助细胞表位,例如破伤风类毒素(例如 P2 和 P30 表位), 肝炎 B 表面抗原,霍乱毒素 B、类毒素、白喉类毒素、麻疹病毒 F 蛋白、沙眼衣原体主要外部膜蛋白、恶性疟原虫环孢子蛋白 T, P. 恶性疟原虫 CS 抗原、磷酸异构酶、百日咳博德特氏菌、破伤风杆菌、Pertusaria trachythallina、大肠杆菌 TraT、和流行性感病毒红血球凝集素 (HA) (参见授予 Wang 的美国专利 No. 6, 906, 169 ;授予 Wang 的美国专利申请公开 No. 20030068325 和授予 Wang 的 WO/2002/096350, 其全部通过引用的方式被并入本文)。在本发明优选的实施方案中, T 辅助细胞表位是破伤风毒素 947-967 (P30) 表位, 其具有氨基酸序列 FNNFTVSFWRVLPKVSASHLE (SEQ ID NO :76)。在另一个实施方案中, T 辅助细胞表位是破伤风毒素 830-843 (P2) 表位, 其具有氨基酸序列 QYIKANSKFIGIT (SEQ ID NO :77)。

[0111] 利用短氨基酸接头序列, 将本发明的免疫原性 tau 肽连接于免疫原性载体分子。在一个本发明优选的实施方案中, GPSL (SEQ ID NO :78) 接头序列用于将免疫原性 tau 肽连接到免疫原性载体分子。其他合适的接头序列包含甘氨酸-富集的(例如 G3-5) 或丝氨酸-富集的(例如 GSG, GSGS (SEQ ID NO :79)、GSGSG (SEQ ID NO :80), GSNG) 接头序列, 或单性免疫球蛋白接头, 其公布于授予 Huang et al 的美国专利 No. 5, 516, 637), 并由此以引

用的方式全部并入本文。

[0112] 可选地,利用化学交联,将本发明的免疫原性 tau 肽连接于免疫原性载体分子。将免疫原连接到免疫原性载体分子的技术,包括构造二硫键,利用 N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基-硫代)丙酸盐 (SPDP) 和琥珀酰亚胺 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯 (SMCC) (如果肽缺乏硫基,可以通过添加半胱氨酸残基的方式提供硫基)。这些药剂在它们自己和一个蛋白上的肽半胱氨酸残基之间构建二硫键,以及通过在赖氨酸上的  $\epsilon$  氨基,或在其他氨基酸上的其他游离氨基的酰胺键。多种这样的二硫键 / 氨酰键形成剂描述于 Jansen et al., “Immunotoxins: Hybrid Molecules Combining High Specificity and Potent Cytotoxicity” Immun Rev 62:185-216(1982), 其以引用的方式全部并入本文。其他的双官能团偶联剂形成硫醚而不是二硫键。很多这些硫醚形成剂是可从商业途径获得的,并且包含 6-马来酰亚胺己酸、2-溴乙酸、2-碘苯甲酸、4-N-马来酰亚胺-甲基)环己烷-1-羧酸。通过将羰基与琥珀酰亚胺或 1-羟基-2-硝基-4-磺酸结合、钠盐能激活羰基基团。

[0113] 通过固相肽合成或重组表达系统,能合成本发明的免疫原性 tau 肽。可以从很多供应商以商业方式获得自动肽合成器,例如 Applied Biosystems (Foster City, Ca.)。重组表达系统可包含细菌,例如 E. coli、酵母,昆虫细胞,或哺乳动物细胞。重组表达的方法描述于 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C. S. H. P. Press, NY 2d ed., 1989), 其由此以引用的方式全部并入本文。

[0114] 能够将本发明的免疫原性 tau 肽单独或联合其他本发明的免疫原性 tau 肽施用于有需要的受试者。在一个实施方案中,本发明的免疫原性 tau 肽联合一种或多种如表 3 所示的免疫原性 tau 肽的施用,描述于授予 igurdsson 的美国专利申请公开 No. 20080050383, 其由此以引用的方式全部并入本文。表 3 中肽的名字和这些肽的氨基酸位置相对应,其中最长的 tau 蛋白同种型具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1。每个序列的被磷酸化的氨基酸残基以粗体显示并用星号标记。

[0115] 表 3:用于联合施用的免疫原性 tau 肽序列

[0116]

SEQ ID NO:	名称	序列
SEQ ID NO:81	Tau 133-162	DGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQ
SEQ ID NO:82	Tau 379-408 [P-Ser <sub>396,404</sub> ]	RENAKAKTDHGAEIVYKS*PVVSGDTS*PRHL
SEQ ID NO:83	Tau 192-221 [P-Ser <sub>199,202,214</sub> , -Thr <sub>205,212</sub> ]	GDRSGYSS*PGS*PGT*PGSRRT*PS*LPTPTR
SEQ ID NO:84	Tau221-250 [P-Thr <sub>231</sub> , -Ser <sub>235</sub> ]	REPKKVAVVRT*PPKS*PSSAKSRLQTAPVPM
SEQ ID NO:85	Tau184-213	SSGEPKSGDRSQYSSPGSPGTPGSRRT
SEQ ID NO:86	Tau1-30 [P-Tyr <sub>18,29</sub> ]	MAEPRQEFVEMEDHAGTY*GLGDRKDQGGY*T
SEQ ID NO:87	Tau30-60	TMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDEGSEEPG
SEQ ID NO:88	Tau60-90	GSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAA
SEQ ID NO:89	Tau90-120	AAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG
SEQ ID NO:90	Tau120-150	GHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTK
SEQ ID NO:91	Tau150-180 [P-Thr <sub>175</sub> ]	KIATPRGAAPPQKQGANATRIPAKT*PPAPK
SEQ ID NO:92	Tau180-210 [P-Thr <sub>181,205</sub> , -Ser <sub>184,185,198,199,202,208</sub> , -Tyr <sub>197</sub> ]	KT*PPS*S*GEPPKSGDRSGY*S*S*PGS*PGT*PGS*RS
SEQ ID NO:93	Tau210-240 [P-Thr <sub>212,217,231</sub> , -Ser <sub>214,235,237,238</sub> ]	SRT*PS*LPT*PPTREPKKVAVVRT*PPKS*PS*S*AK
SEQ ID NO:94	Tau240-270 [P-Ser <sub>262</sub> ]	KSRLQTAPVPMPLKKNVSKIGS*TENLKHQP
SEQ ID NO:95	Tau270-300 [P-Ser <sub>293</sub> ]	PGGGKVQIINKLDSLNVQSKCGS*KDNIKHV
SEQ ID NO:96	Tau300-330 [P-Tyr <sub>310</sub> , Ser <sub>324</sub> ]	VPGGGSVQIVY*KPVDLSKVTSKCGS*LGNIHH
SEQ ID NO:97	Tau330-360 [P-Ser <sub>356</sub> ]	HKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGS*LDNI
SEQ ID NO:98	Tau360-390	ITHVPGGGNKKIETHKLTFRNAKAKTDHGA
SEQ ID NO:99	Tau390-420 [P-Tyr <sub>394</sub> , Ser <sub>396,400,404,409,412,413</sub> , Thr <sub>403</sub> ]	AEIVY*KS*PVVS*GDT*S*PRHLS*NVS*S*TGSIDMV
SEQ ID NO:100	Tau411-441 [P-Ser <sub>412,413,422</sub> ]	VS*S*TGSIDMVDS*PQLATLADEVSAASLAKQGL

[0117]

[0118] 能够将本发明的免疫原性 tau 肽联合合适的佐剂联合施用，以在受试者中获得所需要的免疫应答。能够在本发明的免疫原性 tau 肽施用之前、之后或同时施用合适的佐剂。优选的佐剂提高针对免疫原的内在应答，而不在免疫原中引起构象改变，其影响应答定性的形成。

[0119] 优选的的佐剂类别是铝盐（明矾），例如氢氧化铝、磷酸铝和硫酸铝。这样的佐剂可和 / 不和其他特异性免疫刺激性药剂一起使用，例如 3 脱 -O- 酰化单磷酰基脂质 A (MPL) 或 3-DMP、聚合或单体氨基酸，例如聚谷氨酸或聚赖氨酸。这样的佐剂可和 / 不和其他特异性免疫刺激性药剂一起使用，例如胞壁酰基肽（例如，N- 乙酰基胞壁酰基 -L- 苏氨酸 -D- 异谷氨酸酰胺 (thr-MDP)、N- 乙酰基 - 非胞壁酰基 -L- 丙氨酸 -D- 异谷氨酸酰胺（非 -MDP）、N- 乙

酰基胞壁酰基-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺-L-丙氨酸-2-(1'-2' 二棕榈酰基-sn-丙三氧基-3-羟基磷酸基氧基)-胺 (MTP-PE)、N-乙酰基葡萄糖胺基-N-乙酰基胞壁酰基-L-Ala-D-异谷氨酸-L-Ala-二棕榈酰氧基丙基酰胺 (DTP-DPP) theramide™, 或其他细菌的细胞壁组分。水包油乳液包含 MF59 (参见授予 Van Nest et al. 的 W090/14837, 其由此以引用的方式全部并入本文), 其包含, 通过微射流被制备进入亚微微粒的 5% 鲨烯、0.5% Tween 80, 和 0.5% Span 85 (可选地包含各种量的 MTP-PE); SAF, 包含 10% 鲨烯、0.4% Tween80、5% 聚醚-嵌段聚合物 L121, 和 thr-MDP, 其中任一被微射流入亚微乳液或被涡旋以产生更大微粒乳液; 和 Ribi™ 佐剂系统 (RAS) (Ribi ImmunoChem, Hamilton, Mont.), 包含 2% 鲨烯、0.2% Tween 80, 和一种或多种细菌的细胞壁组分, 该组分选自下列的组: 单磷酸脂质 A (MPL)、海藻糖二霉菌酸酯 (TDM), 和细胞壁骨架 (CWS)、优选地 MPL+CWS (Detox™)。其他佐剂包含 Complete Freund's 佐剂 (CFA)、Incomplete Freund's 佐剂 (IFA), 和细胞因子, 例如白介素 (IL-1、IL-2, 和 IL-12)、巨噬细胞克隆刺激因子 (M-CSF), 和肿瘤坏死因子 (TNF)。

[0120] 佐剂的选择取决于含有佐剂的免疫原性制剂的稳定性、施用途径、剂量安排、对已接种疫苗的种的佐剂效果, 以及在人类中, 药学上可接受的佐剂是一种已经被相关监管机构证明或是可被证明的用于人类施用的佐剂。例如明矾、MPL 或 Incomplete Freund's 佐剂 (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:173-186 (1998), 其由此以引用的方式全部并入本文) 单独地或可选地其所有联合物是适合于人类施用。

[0121] 本发明的另一个方面涉及含有一种或多种上文所述的免疫原性 tau 肽的药物组合物, 和药物载体 (如下文所述)。药物组合物可含有相同免疫原性 tau 肽的混合物。可选地, 药物组合物含有一种或多种不同的本发明的免疫原性 tau 肽的混合物。在一个优选的实施方案中, 如上文所述, 本发明的药物组合物包含一种或多种合适的佐剂。

[0122] 在另一个本发明的实施方案中, 对有需要的受试者施用抗体, 该抗体识别一种或多种本发明的免疫原性 tau 表位。本发明合适的抗体包含任一特异地结合于免疫原性 tau 表位的免疫球蛋白分子, 该表位包含任一 SEQ ID NO:2-75 和 101-103 的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中, 本发明的抗体, 特异地针对病理型 tau 蛋白, 识别且结合于表位, 而且与正常 tau 蛋白或非 tau 蛋白几乎没有交叉反应。

[0123] 如本文所述, 产生单克隆抗体, 其识别包含 SEQ ID NO:13 (Tau 386-408 [P-Ser396, 404]) 和 SEQ ID NO:12 (Tau 260-271 [P-Ser262]) 的免疫原性 tau 表位。这些抗体是磷酸基特异性的且, 因此对病理 tau 蛋白型具有特异性, 而与正常 tau 蛋白几乎没有交叉反应。

[0124] 除了识别磷酸化病理 tau 蛋白表位的抗体, 本发明还涉及抗体, 其优选地识别涉及促进神经元毒素和 / 或强化 tau 蛋白聚集的病理 tau 片段。例如, 胱天冬酶裂解 tau 蛋白, 优选地在 tau 蛋白天冬氨酸残基 421 (D421), 产生截断的分子, 其与缠结共存并与在阿尔茨海默病中和 tau 蛋白病动物模型中的进展有关系 (参见 Calignon et al., "Caspase Activation Precedes and Leads to Tangles," *Nature* 464:1201-1205 (2010), 其由此以引用的方式全部并入本文)。针对裂解的 tau 蛋白游离 D421 末端的抗体将是特异于病理 tau, 且促进病理 tau 而非正常 tau 的移除。相应地, 本发明涉及抗体, 优选地是单克隆抗体, 其针对在裂解的病理 TAU 蛋白游离 C-末端的 D421, 该 D421 不存在于正常的 tau 蛋白中。在本

发明的一个实施方案中,用本文所述的方法,以包含氨基酸序列 HLSNVSSTGSIDMVD(SEQ ID NO:101) 的免疫原性 tau 肽,产生抗体。

[0125] 谷氨酸残基 391(E391) 的截断,是与在阿尔茨海默病患者脑中的神经原纤维缠结形成有关。(Basurto-Islas et al.,“Accumulation of Aspartic Acid421-and Glutamic Acid391-Cleaved Tau in Neurofibrillary Tangles Correlates with Progression in Alzheimer Disease,”J Neuropathol Exp Neurol67:470-483(2008),其由此以引用的方式全部并入本文)。相应地,本发明也涉及抗体,优选地是单克隆抗体,其针对在裂解的病理 TAU 蛋白游离 C-末端的 E391,该 E391 不存在于正常的 tau 蛋白中。在本发明的一个实施方案中,用本文所述的方法,以包含氨基酸序列 RENAKAKTDHGAE(SEQ ID NO:102) 的免疫原性 tau 肽,产生抗体。

[0126] 钙蛋白酶也调节 tau 蛋白裂解,产生毒性 17kDa tau 片段,其提高 A $\beta$ -诱导的神经毒性(Park et al.,“The Generation of a 17kDa Neurotoxic Fragment:An Alternative Mechanism by which Tau Mediates  $\beta$ -Amyloid-Induced Neurodegeneration,”J Neurosci 25(22):5365-75(2005),其由此以引用的方式全部并入本文)。相应地,本发明的实施方案也涉及抗体,优选地是单克隆抗体,特异性地识别毒性 tau 片段的游离的 N-和/或游离的 C-末端,而不识别正常 tau 蛋白,如下文 SEQ ID NO:103 所示,该抗体包含 tau(SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基 45-230。

[0127] Glu Ser Pro Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly

[0128] 1 5 10 15

[0129] Ser Glu Thr Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr

[0130] 20 25 30

[0131] Ala Pro Leu Val Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln

[0132] 35 40 45

[0133] Pro His Thr Glu Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile

[0134] 50 55 60

[0135] Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln

[0136] 65 70 75 80

[0137] Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys

[0138] 85 90 95

[0139] Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly

[0140] 100 105 110

[0141] Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro

[0142] 115 120 125

[0143] Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro

[0144] 130 135 140

[0145] Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly

[0146] 145 150 155 160

[0147] Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr

[0148] 165 170 175

[0149] Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg

[0150] 180 185

[0151] 如本文所用,术语“抗体”包含完整免疫球蛋白,其源自自然来源或重组来源,以及完整免疫球蛋白的免疫反应性位点(即抗原结合位点)。本发明的抗体可以多种形式出现,包含,例如多克隆抗体、单克隆抗体、细胞内抗体(内抗体),抗体片段(例如,Fv、Fab 和 F(ab)<sub>2</sub>),以及单链抗体(scFv)、嵌合抗体和人源化抗体。(Ed Harlow and David Lane,Using Antibodies :A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999);Houston et al.,“Protein Engineering of Antibody Binding Sites:Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in Escherichia coli,”Proc Natl Acad Sci USA 85 :5879-5883(1988);Bird et al,“Single-Chain Antigen-Binding Proteins,”Science 242 :423-426(1988))。

[0152] 利用本文所述的或其他在本领域熟知的技术,完成单克隆抗体的制备方法(Monoclonal Antibodies-Production, Engineering and Clinical Applications(Mary A. Ritter and Heather M. Ladyman eds., 1995),其由此以引用的方式全部并入本文)。通常,该过程包括从哺乳动物的脾获得免疫细胞(淋巴细胞),以有用抗原(即免疫原性 tau 肽)在体内或体外事先免疫该脾。示例性 tau 肽如上文所述。为了用 SEQ ID NO :2-75 的 tau 肽或 SEQ ID NO :101-103 的 tau 肽产生多克隆抗体,可将半胱氨酸残基添加到每个序列的 N- 或 C- 末端,以促进载体蛋白的连接,该载体蛋白可以在免疫过程中抗体产出。合适的载体蛋白包括但不限于钥孔戚血蓝素、蓝载体免疫原性蛋白(源自 Concholepas concholepas)、牛血清清蛋白(BSA)、卵白蛋白、阳离子 BSA。

[0153] 抗体分泌淋巴细胞与能在细胞培养物中无限复制的骨髓瘤细胞或转化细胞融合,从而产生永生化的、免疫球蛋白分泌的细胞系。通过标准的熟知的技术,可以完成与能在细胞培养物中无限复制的骨髓瘤细胞或其他融合伴侣的融合,例如利用聚乙二醇(PEG)或其他融合药剂(Milstein and Kohler,“Derivation of Specific Antibody-Producing Tissue Culture and Tumor Lines by Cell Fusion,”Eur J Immunol 6 :511(1976),其由此以引用的方式全部并入本文)。选择优选地是鼠科动物,但也可以源自其他哺乳动物种的细胞的永生化的细胞系,该细胞系应该缺乏利用某种营养所必须的酶,应该可以迅速生长,并具有良好的融合能力。筛选所得到的融合细胞,或培养的杂交瘤以及所得到的集落,以产生所需要的单克隆抗体。克隆产生这样抗体的集落,在体内或体外培养以产生大量的抗体。

[0154] 可选地,利用如授予 Cabilly 等人的美国专利 4, 816, 567 所述的重组 DNA 方法,制备单克隆抗体,该专利以引用的方式全部并入本文。例如,通过 RT-PCR 使用寡核糖核酸引物(其特异性地扩增编码抗体的重和轻链的基因),从成熟的 B 细胞核杂交瘤细胞分离编码单克隆抗体的聚核苷酸。然后,将分离得到的编码重和轻链的聚核苷酸克隆进入合适的表达载体,其立刻被转染进入宿主细胞例如 E. coli 细胞、类人猿 COS 细胞、中国地鼠卵巢(CHO)细胞,或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞、宿主细胞产生的单克隆抗体。并且,从噬菌体展示文库能分离得到所需种类的重组单克隆抗体或其片段(McCafferty et al.,“Phage antibody :Filamentous Phage Displaying antibody Variable Domains,”Nature 348 :552-554(1990);Clackson et al.,“Making antibody Fragments using Phage Display Libraries,”Nature 352 :624-628(1991); 和 Marks et al.,“By-Passing

Immunization. Human antibody from V-Gene Libraries Displayed on Phage,” J. Mol. Biol. 222 :581-597(1991),其全部通过引用的方式被并入本文。

[0155] 利用 DNA 技术能进一步修饰编码单克隆抗体的聚核苷酸,以产生可选的抗体。例如,能用小鼠单克隆抗体轻链和重链的恒定区取代人源抗体的那些区域,以产生嵌合抗体。可选地,能用小鼠单克隆抗体轻链和重链的恒定区取代非免疫球蛋白多肽,以产生嵌合抗体。在其他的实施方案中,截断或去除恒定区以产生所需的单克隆抗体的抗体片段。此外,可变区的定向位点或高密度诱变可以用于优化单克隆抗体的特异性和亲和力。

[0156] 本发明的单克隆抗体可以是人源化抗体。人源化抗体是含有来自非人源(例如鼠科动物)抗体可变区内的最小序列的抗体。当这样的抗体被施用于人类受试者时,这样的抗体在治疗上用于降低抗原性和人源抗-小鼠抗体应答。

[0157] 通过用具有所需特异性、亲和力和能力的非人源抗体(例如,小鼠、大鼠、兔、仓鼠等)的体互补决定区(CDR)取代人源抗体(CDR),能够人源化抗体(Jones et al., “Replacing the Complementarity-Determining Regions in a Human antibody With Those From a Mouse,” Nature 321 :522-525(1986); Riechmann et al., “Reshaping Human antibody for Therapy,” Nature 332 :323-327(1988); Verhoeyen et al., “Reshaping Human antibody: Grafting an Antilysozyme Activity,” Science 239 :1534-1536(1988),其全部通过引用的方式被并入本文)。通过在Fv 构架区中和/或在被代替的非人源残基中用其他残基取代,能够进一步修饰人源化抗体,以提高和优化抗体特异性、亲和力和/或能力。

[0158] 在本领域内,能够使用多种技术制备人源抗体。能够制备在体外被免疫的或从被免疫个体分离的永生化人源B淋巴细胞,其可以产生直接对抗靶向抗原的抗体(参见例如 Reisfeld et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77(Alan R. Liss ed., 1985) 和美国专利 No. 5, 750, 373(Garrard),其全部通过引用的方式被并入本文)。可选地,人源抗体能选自噬菌体文库,其中噬菌体文库表达人源抗体(Vaughan et al., “Human antibody with Sub-Nanomolar Affinities Isolated from a Large Non-immunized Phage Display Library,” Nature Biotechnology, 14 :309-314(1996); Sheets et al., “Efficient Construction of a Large Nonimmune Phage antibody Library: The Production of High-Affinity Human Single-Chain antibody to Protein Antigens,” Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 :6157-6162(1998); Hoogenboom et al., “By-passing Immunization. Human antibody From Synthetic Repertoires of Germline VH Gene Segments Rearranged In Vitro,” J. Mol Biol 227 :381-8(1992); Marks et al., “By-passing Immunization. Human antibody from V-gene Libraries Displayed on Phage,” J Mol Biol 222 :581-97(1991),其全部通过引用的方式被并入本文)。也能够含有含人源免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制备人源抗体,该转基因小鼠可以进行产生全部人源抗体的免疫作用,而不产生内源性免疫球蛋白。这种方法描述于授予 Surani et al. 的美国专利 No. 5, 545, 807; 授予 Lonberg et al. 的 5, 545, 806; 授予 Lonberg et al. 的 5, 569, 825; 授予 Lonberg et al. 的 5, 625, 126; 授予 Lonberg et al. 的 5, 633, 425 和授予 Lonberg et al. 的 5, 661, 016,其全部通过引用的方式被并入本文。

[0159] 制备单克隆抗体的方法是在本领域熟知的。通常,通过向新西兰白兔皮下施用含

有所需表位的肽（即任一选自自由 SEQ ID NO :2-75 或 SEQ ID NO :101-103 组成的组的 tau 肽），可以制备这样的抗体，该白兔已经被抽血以获得免疫前血清。可以联合佐剂注射该抗原。在初次注射后大约每两周对兔抽血，并定期地用相同的抗原每 6 周执行 3 次。通过亲和色谱法，利用相应的抗原以获取抗体，从血清中回收单克隆抗体。这种以及其他制备单克隆抗体的方法描述于 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies :A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988), 其由此以引用的方式全部并入本文。

[0160] 除了完整抗体，本方面包括这样的抗体的结合位点。这样的结合位点包含单价的 Fab 片段、Fv 片段（例如单 - 链抗体 scFv），和但可变  $V_H$  和  $V_L$  区域，和双价  $F(ab')_2$  片段、双特异抗体、三链抗体、微抗体。能够通过常规方法制备这些抗体片段，例如蛋白水解片段方法，描述于 James Goding, *Monoclonal Antibodies :Principles and Practice* 98-118 (Academic Press, 1983) and Ed Harlow and David Lane, *Antibodies :A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), 其全部通过引用的方式被并入本文，或其他本领域已知的方法。

[0161] 结合于细胞内蛋白（即胞内抗体）的工程化抗体片段也是适合用于本发明。针对免疫原性 tau 表位（包含任一 SEQ ID NO :2-75 或 SEQ ID NO :101-103）的胞内抗体，能预防病态 tau 在神经元或胶质细胞内聚集和积聚，和 / 或促进聚集清除。胞内抗体技术应用于治疗神经疾患，包含 tau 蛋白病，综述于 Miller et al., “Intrabody Applications in Neurological Disorders :Progress and Future Prospects,” *Mol Therapy* 12 : 394-401 (2005), 其由此以引用的方式全部并入本文。

[0162] 通常，通过从具有 2 个可变域（即，重链可变域和轻链可变域的异二聚体）的抗体的可变区选择单可变域，获得胞内抗体。对于胞内抗体发展，单链 Fv 片段、Fab 片段、ScFv-Ck 融合蛋白、单链双特异抗体、 $V_H$ - $C_H1$  片段，和甚至完整 IgG 分子式适合是合适的形式 (Kontermann R. E., “Intrabodies as Therapeutic Agents,” *Methods* 34 :163-70 (2004), 其由此以引用的方式全部并入本文)。

[0163] 能够从噬菌体展示、酵母表面展示或核糖体表明展示，获得对病理 TAU 蛋白表位具有抗原特异性的胞内抗体。制备胞内抗体文库或分离所需胞内抗体的方法进一步描述于授予 Zauderer 的美国已公布专利申请 No. 20030104402 和授予 Rabbitts 的美国已公布专利申请 No. 20050276800, 其由此以引用的方式全部并入本文。提高胞内抗体稳定性和结合特性亲和力的方法描述于 W02008070363 (Zhenping and Contreras-Martinez et al.,) “Intracellular Ribosome Display via SecM Translation Arrest as a Selection for antibody with Enhanced Cytosolic Stability,” *J Mol Biol* 372(2) : 513-24 (2007), 其由此以引用的方式全部并入本文。

[0164] 尤其就抗体片段而言，需要进一步修饰抗体，以提高血清半衰期。这个目的可以通过以下方法达成，例如，通过将结合表位的挽救受体掺入抗体片段、通过在抗体片段中的合适区域的突变，或通过将表位掺入肽标签，该标签随后融合于抗体片段的两端或中间（例如通过 DNA 或肽合成）。

[0165] 根据本发明，抗体模拟物适合使用。在本领域已知的大量抗体模拟物包括但不限于，那些称为单体，其源自第 10 人类 III 型纤连蛋白域 (10Fn3) (Koide et al., “The

fibronectin Type III Domain as a Scaffold for Novel Binding Proteins,” J Mol Biol 284 :1141-1151(1998) ;Koide et al.,” Probing Protein Conformational Changes in Living Cells by Using Designer Binding Proteins :Application to the Estrogen Receptor,” Proc Natl Acad Sci USA99 :1253-1258(2002), 其由此以引用的方式全部并入本文), 和那些称为亲和体, 其源自葡萄球菌蛋白A的稳定的  $\alpha$ -螺旋细菌受体域Z(Nord et al.,” Binding Proteins Selected from Combinatorial Libraries of an alpha-helical Bacterial receptor Domain,” Nature Biotechnol 15(8) :772-777(1997), 其由此以引用的方式全部并入本文)。

[0166] 本发明进一步涉及药物组合物, 该药物组合物包含一种或多种识别如上文所述的本发明的免疫原性 tau 肽的抗体。这种药物组合物可含有识别相同 tau 表位的相同抗体的混合物。可选地, 该药物组合物可含有识别一种或多种不同 tau 表位的一种或多种抗体。

[0167] 本发明的药物组合物进一步含有, 如下文所述的药学上可接受的载体或其他药学上可接受的组分。其含有免疫原性 tau 肽或识别免疫原性 tau 肽的抗体的本发明的药物组合物, 除有效治疗药剂意外, 还包含多种其他药学上可接受的组分 (参见 Remington' s Pharmaceutical Science(15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980), 其由此以引用的方式全部并入本文)。优选的药物组合物制剂取决于所需要的施用模式和治疗应用。该组合物能够包含药学上可接受的非毒性载体或稀释剂, 其被定义为媒介物, 通常用于制备药物组合物 (施用于动物或人类)。选择稀释剂以便不影响联合物的生物学活性。稀释剂的示例是蒸馏水、生理磷酸盐缓冲盐水、Ringer' s 溶液、右旋糖溶液, 和 Hank' s 溶液。此外, 药物组合物或制剂也可包含其他载体、佐剂、或非毒性、非治疗性、非-免疫原性稳定剂等。

[0168] 药物组合物可包含大的、缓慢代谢的高分子, 例如蛋白、多糖例如壳聚糖、聚氨基酸、聚氨基酸和共聚物 (例如, 乳胶官能琼脂糖凝胶、琼脂糖、纤维素等等)、聚合的氨基酸、氨基酸共聚物和脂质聚集和脂质聚集 (例如, 油滴或脂质体)。另外, 这些载体能够发挥免疫刺激性药剂的功能 (即, 佐剂)。

[0169] 本发明的药物组合物可能进一步包含合适的递送媒介物。合适的递送媒介物包括但不限于病毒、细菌、生物可降解的微球体、微粒, 纳米粒子、脂质体、胶原质微球和螺旋状。

[0170] 在本发明的一个实施方案中, 递送媒介物是病毒或细菌, 而且免疫原性 tau 肽表现为病毒或细菌作为免疫原性组合物的一部分。根据本发明的这个实施方案, 将编码免疫原性肽的核酸分子掺入病毒或细菌的基因组或游离基因。可选地, 用这样的方法将核酸分子掺入, 在该方法中, 以分泌蛋白, 或与病毒外表面蛋白或细菌跨膜蛋白的融合蛋白的形式, 表达免疫原性肽, 从而显示肽。在这样的方法中使用的病毒或细菌是非病理的或是毒性减弱的。合适的病毒包含, 腺病毒、单纯疱疹病毒、委内瑞拉马脑炎病毒和其他  $\alpha$  病毒、水疱性口炎病毒、和其他 rhabdo 病毒, 牛痘和禽痘。腺病毒, 单纯疱疹病毒, 委内瑞拉马脑炎病毒和其他  $\alpha$  病毒, 水疱性口炎病毒, 和其他 rhabdo 病毒, 牛痘和禽痘。合适的细菌包含沙门氏菌和 Shigella。将免疫原性肽与 HBV 的 HbsAg 融合是非常合适的。

[0171] 在另一个本发明的实施方案中, 药物组合物包含脂质体递送媒介物。脂质体包含一种或多种特定顺序的脂质脂质双分子层, 其封装水相。本发明的免疫原性 tau 肽或

针对免疫原性 tau 肽制备的抗体,可以使用脂质体媒介物膜进行表面包裹、封装,或与这种膜结合。多种适合于 tau 肽疫苗递送的脂质体在本领域是已知的(参见例如 Hayashi et al.,“A Novel Vaccine Delivery System Using Immunopotentiating Fusogenic Liposomes,”*Biochem Biophys Res Commun* 261(3):824-28(1999) 和美国专利公开 No. 20070082043(Michaeli et al.),其全部通过引用的方式被并入本文)。其他制备用于本发明的脂质体的方法描述于 Bangham et al.,“Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids,”*J. Mol. Biol.* 13:238-52(1965);授予 Hsu 的美国专利 No. 5,653,996;授予 Lee et al. 的美国专利 No. 5,643,599;授予 Holland et al. 的美国专利 No. 5,885,613;授予 Dzau & Kaneda 的美国专利 No. 5,631,237;和授予 Loughrey et al. 的美国专利 No. 5,059,421,其由此以引用的方式全部并入本文。

[0172] 在另一个本发明的实施方案中,利用基因疗法递送系统,施用编码本发明的免疫原性 tau 肽或 tau 抗体的核酸分子。合适的基因疗法载体包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、并疱疹病毒载体。

[0173] 能够迅速制备和应用腺病毒载体递送媒介物,描述于 Berkner,“Development of Adenovirus Vectors for the Expression of Heterologous Genes,”*Biotechniques* 6:616-627(1988) 和 Rosenfeld et al.,“Adenovirus-Mediated Transfer of a Recombinant Alpha 1-Antitrypsin Gene to the Lung Epithelium In Vivo,”*Science* 252:431-434(1991), WO 93/07283(Curiel et al.), WO 93/06223(Perricaudet et al.) 和 WO 93/07282(Curiel et al.),其由此以引用的方式全部并入本文。腺伴随病毒递送媒介物能被构建并用于递送编码本发明 tau 抗体的核酸进入细胞,描述于 Shi et al.,“Therapeutic Expression of an Anti-Death Receptor-5 Single-Chain Fixed Variable Region Prevents Tumor Growth in Mice,”*Cancer Res.* 66:11946-53(2006); Fukuchi et al.,“Anti-A $\beta$  Single-Chain Antibody Delivery via Adeno-Associated Virus for Treatment of Alzheimer's Disease,”*Neurobiol. Dis.* 23:502-511(2006); Chatterjee et al.,“Dual-Target Inhibition of HIV-1 In Vitro by Means of an Adeno-Associated Virus Antisense Vector,”*Science* 258:1485-1488(1992); Ponnazhagan et al.,“Suppression of Human Alpha-Globin Gene Expression Mediated by the Recombinant Adeno-Associated Virus 2-Based Antisense Vectors,”*J. Exp. Med.* 179:733-738(1994); 以及 Zhou et al.,“Adeno-associated Virus 2-Mediated Transduction and Erythroid Cell-Specific Expression of a Human Beta-Globin Gene,”*Gene Ther.* 3:223-229(1996),其由此以引用的方式全部并入本文。这些媒介物体内用途描述于 Flotte et al.,“Stable in Vivo Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator With an Adeno-Associated Virus Vector,”*Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:10613-10617(1993) 和 Kaplitt et al.,“Long-Term Gene Expression and Phenotypic Correction Using Adeno-Associated Virus Vectors in the Mammalian Brain,”*Nature Genet.* 8:148-153(1994),其由此以引用的方式全部并入本文。其他类型的腺病毒载体描述于授予 Wickham et al. 的美国专利 No. 6,057,155;授予 Bout et al. 的美国专利 No. 6,033,908;授予 Wilson et al. 的美国专利 No. 6,001,557;授予 Chamberlain et al. 的美国专利 No. 5,994,132;授予 Kochanek et al. 的美国专利

No. 5, 981, 225 ;授予 Spooner et al. 的美国专利 No. 5, 885, 808 ;和授予 Curiel 的美国专利 No. 5, 871, 727, 其由此以引用的方式全部并入本文。

[0174] 已修饰的逆转录病毒载体形成的传染转化系统, 该系统也可用于递送编码针对靶向细胞的所需肽或抗体核酸分子。一种这样类型的逆转录病毒载体公开于授予 Kriegler et al. 的美国专利 No. 5, 849, 586, 其由此通过引用的方式并入本文。

[0175] 例如通过下列方式将承载编码免疫原性 tau 肽或 tau 抗体的核酸分子的基因疗法载体施用于受试者 : 静脉注射局部施用 ( 授予 Nabel et al. 的美国专利 No. 5, 328, 470, 其由此以引用的方式全部并入本文 ) ; 或立体定向注射 ( 参见例如 Chen et al., “Gene Therapy for Brain Tumors : Regression of Experimental Gliomas by Adenovirus Mediated Gene Transfer In Vivo,” Proc. Nat’l. Acad. Sci. USA 91 : 3054-3057 (1994), 其由此以引用的方式全部并入本文 ) 。基因疗法载体的药物制剂可包括在可接受的稀释剂中的基因疗法载体, 或可包含其中嵌入基因递送媒介物的缓释基质。

[0176] 在本发明方法的实施中, 在施用本发明的免疫原性肽或抗体之前, 优选选择 : 患有阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病或处于患有阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的风险中的受试者 ; 脑中具有 tau 聚集体的受试者 ; 或展现出混乱相关的行为表型的受试者。易于治疗的受试者包括处于疾病风险但还没有表现出症状的个体、以及目前表现出症状的患者。就阿尔茨海默病而言, 事实上任何人都处于遭受阿尔茨海默病的风险之中。因此, 本方法可以预防性应用于普通人群, 而不需要评估受试患者的风险。本方法尤其适用于这样的个体, 该个体确定具有已知的阿尔茨海默病的遗传风险。这样的个体包括亲属经历该疾病的那些、以及通过遗传或生物化学标志物分析测定的那些。针对阿尔茨海默病的风险的遗传标志物包括 APP 基因中的突变, 尤其是 717 位的突变、以及 670 和 671 位的突变, 分别称为 Hardy 和 Swedish 突变。风险的其他标志物包括早老素基因、PS1 和 PS2、以及 ApoE4 基因中的突变、AD 和高胆固醇血症或动脉硬化症的家族史。目前遭受阿尔茨海默病的个体可以通过存在上述风险因子从特征性痴呆来识别。另外, 可得多种诊断测试用于鉴定具有 AD 的个体。这些包括测量 CSFtau 和 A $\beta$  42 水平。增加的 tau 和降低的 A $\beta$  42 水平表示存在 AD。遭受阿尔茨海默病的个体还可以通过阿尔茨海默病和相关病患联合会标准来诊断。

[0177] 在无症状患者中, 可以在任何年龄 ( 例如 10, 20, 30 岁的年龄 ) 开始治疗。然而, 通常不必在患者达到 40, 50, 60 或 70 岁的年龄才开始治疗。治疗典型地在一定时间期限内需要多种剂量。治疗可以通过下列方式来监控 : 随着时间的消逝, 测定针对治疗剂的抗体或激活的 T- 细胞或 B- 细胞应答。如果应答下降, 表示加强剂量。在潜在唐氏综合征的患者们的情况下, 可以通过向母体出生前或出生后立即施用治疗剂来开始治疗。

[0178] 在预防应用中, 以这样的量将含有免疫原性 tau 肽的药物组合物施用至易患阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病或者处于患有阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的风险中的患者, 该量足以消除或降低风险、降低严重性、或延迟疾病的发作 ( 包括疾病的生物化学、组织学和 / 或行为症状 ) 、在疾病发展过程中展现的其并发症和中间病理表型。在治疗应用中, 以这样的量将含有 tau 抗体的组合物施用至患有或已经遭受这些疾病的患者, 该量足以治愈或至少部分阻止疾病症状 ( 生物化学、组织学和 / 或行为症状 ) , 包括在疾病发展过程中展现的其并发症和中间病理表型。在一些方法中, 施用药剂会在仍未发展为特征性阿尔茨海默病理的患者中降低或消除温和和认知损伤。足以实现预防或治疗疗法的量定义为预

防或治疗性有效剂量。在预防和治疗方案中,药剂通常以数种剂量来施用,直到已经实现足够的免疫应答。典型地,免疫应答被监控,并且如果免疫应答开始衰弱则给予重复剂量。

[0179] 为了治疗上述病症,本发明组合物的有效剂量取决于多种不同因素而改变,包括施用方式、靶点、患者的生理状态、施用的其他药物、以及治疗是预防性还是治疗性的。治疗剂量需要改变以优化安全性和效果。免疫原的量取决于是否还施用佐剂,在不存在佐剂的情况下需要更高剂量。对于人的施用,免疫原的施用量有时从 1 至 500  $\mu\text{g}$ /患者变化,更通常从 5 至 500  $\mu\text{g}$ /注射变化。偶尔,使用 1-2mg/注射的更高剂量。典型地约 10, 20, 50 或 100  $\mu\text{g}$  用于每次人注射。免疫原的质量还取决于免疫原内免疫原性表位的质量和免疫原整体的质量的比。典型地,每微克的免疫原使用  $10^{-3}$  至  $10^{-5}$  微摩尔的免疫原性表位。注射时间可以从一天一次、一年一次至十年一次显著地变化。在给予免疫原剂量的任何给定天,如果还施用佐剂,剂量大于 1  $\mu\text{g}$ /患者,并且通常大于 10  $\mu\text{g}$ /患者,如果不存在佐剂,剂量大于 10  $\mu\text{g}$ /患者,并且通常大于 100  $\mu\text{g}$ /患者。典型方案包括先进行免疫,然后在时间间隔(例如 6 周间隔)进行加强注射。另外方案包括先进行免疫,然后 1, 2 和 12 月后进行加强注射。另外方案需要每两个月进行注射以生存。或者,加强注射可以定期进行,这由免疫应答的监控而指示。

[0180] 对于使用抗体进行被动免疫,剂量为约 0.0001 至 100mg/kg,更通常为 0.01 至 5mg/kg 的宿主体重。例如剂量可以为 1mg/kg 体重或 10mg/kg 体重或在 1-10mg/kg 的范围内。示例性治疗方案需要每两周施用一次或者每月施用一次或者每 3 至 6 个月施用一次。在一些方法中,同时施用具有不同结合特异性的两种或多种单克隆抗体,在这种情况下施用的各抗体的剂量落入指示的范围内。抗体通常在多个间隔内施用。单词给药之间的间隔可以为每周、每月或每年。在一些方法中,调节剂量以实现血浆抗体浓度为 1-1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,并且在一些方法中为 25-300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。或者,抗体可以作为缓释制剂来施用,在这种情况下需要施用的频率更少。剂量和频率取决于抗体在患者中的半衰期而改变。通常,人抗体显示最初半衰期,其次是人源化抗体、嵌合抗体和非人抗体。施用的剂量和频率可以取决于治疗是预防性还是治疗性的而改变。在预防应用中,在较长时间期限内以相对不频繁的间隔来施用相对较低剂量。一些患者持续接受治疗以度过余生。在治疗应用中,有时需要以相对较短间隔的相对较高剂量,直到降低或终止疾病进展,优选直到患者显示部分或完全改善疾病的症状。此后,患者可以按照预防性方案来施用。

[0181] 编码免疫原的核酸的剂量为每个患者约 10ng 至约 1g、约 100ng 至约 100mg、约 1  $\mu\text{g}$  至约 10mg 或约 30 至约 300  $\mu\text{g}$  的 DNA。传染病毒载体的剂量为每剂 10-100 或更多个病毒粒子。

[0182] 用于诱导免疫应答的药剂可以通过胃肠外、局部、静脉、口服、皮下、动脉、颅内、腹腔内、鼻内或肌内方式来施用以用于预防和/或治疗疗法。免疫原性药剂的最典型的施用途径是皮下,尽管其他途径可以是相等效果的。然后最通常的途径是肌内注射。这种注射途径最典型地在手或腿肌肉中进行。在一些情况下,可以期望将本发明的治疗剂直接注射到其中积聚沉积物的特定组织中,例如颅内注射。肌内注射或静脉输注优选用于施用抗体。在一些方法中,特定治疗抗体直接注射到颅骨中。在一些方法中,抗体作为缓释组合物或装置施用,例如 Medipad™ 装置 (Elan Pharm. Technologies, Dublin, Ireland)。

[0183] 本发明的另一个方面涉及联合疗法,其中识别本发明的免疫原性 tau 表位的免

疫原性 tau 肽或抗体联合这样的药剂来施用,该药剂有效地预防或治疗和促淀粉样变蛋白 (amyloidogenic protein) 或肽的沉积相关或者源自其的其他病症或疾病。经历沉积的促淀粉样变蛋白 / 肽包括但不限于  $\beta$  蛋白前体,朊病毒和朊病毒蛋白,  $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein), tau, ABri 前体蛋白, ADan 前体蛋白,胰岛淀粉样多肽,载脂蛋白 AI,载脂蛋白 AII,溶菌酶,半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C,凝溶胶蛋白,心钠素,降钙素,角膜上皮素,乳铁蛋白,免疫球蛋白轻链,运甲状腺素蛋白, A 淀粉样变性 (A amyloidosis),  $\beta$ 2-微球蛋白,免疫球蛋白重链,纤维蛋白原  $\alpha$  链,催乳素,角蛋白和 medin。因此,本发明的联合治疗将包括识别免疫原性 tau 表位的免疫原性 tau 肽或抗体、和靶向上述促淀粉样变蛋白或肽中的一种或多种的一种或多种药剂。

[0184] 在遗传性淀粉样病 (例如阿尔茨海默病和唐氏综合征) 的情况下,免疫调节以清除淀粉样- $\beta$  ( $A\beta$ ) 沉积物是脱颖而出的疗法。靶向  $A\beta$  的免疫疗法恒定地导致认知改善。可能的是,tau 和  $A\beta$  病理学是协同的。因此,同时靶向清除 tau 和  $A\beta$  以及  $A\beta$ -相关病理学的联合疗法可比单独靶向各种的方法更加有效。

[0185] 在帕金森氏症和相关神经变性病的情况下,清除  $\alpha$ -突触核蛋白的聚集形式的免疫调节也是脱颖而出的疗法。同时靶向 tau 和  $\alpha$ -突触核蛋白的清除的联合疗法可比单独靶向各种蛋白的方法更加有效。

[0186] 在朊病毒病和相关神经变性病的情况下,清除朊病毒蛋白 PrP<sup>Sc</sup> 的疾病相关形式的免疫调节是脱颖而出的疗法。因此,同时靶向 tau 和病理 PrP<sup>Sc</sup> 蛋白的清除的联合疗法可比单独靶向各种蛋白的方法更加有效。

[0187] 患有 II 型糖尿病的个体可更易于发展阿尔茨海默病。因此,联合疗法包括靶向胰岛淀粉样多肽的清除的药剂和预防阿尔茨海默病的发展或进展 (即预防 tau 沉积) 的药剂,这将对个体具有增强的治疗益处。

[0188] 本发明的另一个方面涉及在受试者中诊断阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的方法。该方法包括在受试者中使用诊断试剂来检测病理 Tau 构象异构体的存在情况,其中诊断试剂是本发明的抗体或其活性结合片段。如上所述,抗体对于具有选自 SEQ ID No :2-75 或 SEQ ID No :101-103 的氨基酸序列的分离的 tau 肽具有抗原性特异性。阿尔茨海默病或其他 tau 蛋白病的诊断基于受试者中病理 tau 构象异构体的检测。

[0189] 使用本发明的诊断抗体药剂在受试者中诊断病理 Tau 构象异构体的存在情况可以通过下列方式来实现:从受试者中获得生物样品 (例如血液、尿液、脑脊液),使生物样品接触诊断抗体药剂,以及在来自受试者的样品中检测诊断抗体药剂和病理 Tau 蛋白构象异构体的结合。使用本发明的诊断抗体在生物样品中实施病理 Tau 蛋白的检测的测定法是本领域熟知的,并且包括但不限于 ELISA、免疫组织化学、western 印迹。

[0190] 或者,使用本发明的诊断抗体药剂在受试者检测病理 Tau 蛋白构象异构体的存在情况可以使用体内成像技术来实现。体内成像包括:向受试者施用对于病理 Tau 肽或表位 (即 SEQ ID No :2-75 和 101-103) 具有抗原性特异性的诊断抗体,并且体内检测诊断抗体药剂和病理 Tau 蛋白构象异构体的结合。如上所述,优选抗体结合病理 Tau 蛋白而不结合非-tau 蛋白并不结合 tau 的非-病理形式。

[0191] 诊断抗体或类似药剂可以通过静脉注射施用到患者体内,或通过颅内注射直接施加到脑内。抗体剂量应该在治疗方法的相同范围内。典型地,抗体被标记,尽管在一些方法

中,对于病理 Tau 蛋白具有亲和性的第一抗体未被标记,并且第二标记药剂用于结合第一抗体。标记的选择取决于检测方式。例如荧光标记适于光学检测。顺磁性标记的使用适于在没有手术干预的条件下的 X 线断层摄影术检测。放射活性标记也可以使用 PET 或 SPECT 来检测。

[0192] 通过下列方式来进行诊断:使在来自受试者的样品中或在受试者中的标记的病理 Tau 构象异构体、tau 聚集体和 / 或神经原纤维缠结的数量、尺寸和 / 或强度比较于对应的基线数值。基线数值可以表示未生病个体的群体的平均水平。基线数值还可以表示在相同受试者中测定的之前水平。

[0193] 上述诊断方法还可以用于监控受试者对于疗法的应答。在该实施方案中,在受试者中检测病理 tau 的存在情况在开始治疗之前进行确定。在该时间点受试者中病理 tau 的水平用作基线数值。在治疗过程中的多个时间处重复病理 Tau 蛋白构象异构体、tau 聚集体和 / 或神经原纤维缠结的检测,并且此后将测量的数值和基线数值比较。数值相对于基线下降是针对治疗的阳性应答的信号。数值还可以在生物流体中暂时增加,因为病理 tau 从脑中清除。

[0194] 本发明还涉及用于进行上述诊断和监控方法的试剂盒。典型地,这些试剂盒包括诊断试剂,优选对于病理 tau 肽(即 SEQ ID No :2-75 和 101-103)具有抗原性特异性的本发明的抗体。试剂盒还可以包括可检测的标记。诊断抗体本身可以含有可检测的标记(例如荧光分子,生物素等),其可直接检测或通过第二反应(例如和链酶亲和素反应)检测。或者,可以使用含有可检测的标记的第二药剂,其中第二药剂具有针对第一抗体的结合特异性。在适于测量生物样品中的病理 tau 蛋白的诊断试剂盒中,试剂盒的抗体可以预结合固相(例如微量滴定盘的孔)来供应。

[0195] 本发明的诊断试剂盒还包括这样的试剂盒,其用于在施用本发明的免疫原性 tau 肽后在受试者中检测抗体的产生。典型地,这种试剂盒包括含有由受试者产生的抗体的抗原性表位的药剂。试剂盒还包括可检测的标记。在优选的实施方案中,标记通常为标记的抗-个体基因型抗体的形式。试剂盒的药剂可以预结合固相(例如微量滴定盘的孔)来供应。

[0196] 下列实施例示出在本发明的治疗方法中用于组合物的多种方法。实施例旨在描述而不以任何方式限制本发明的范围。

## 实施例

[0197] 实施例 1- 肽

[0198] 在 Keck 设施 (Yale University) 里,利用 Biosearch SAM 2 合成仪 (Biosearch, Inc., San Rafael, Ca.), 通过固相技术在 p- 甲基 - 二苯胺树脂上合成肽免疫原。用 HF 从树脂切割肽,并且在冻干之前用乙醚和醋酸提取。随后,通过使用反相支持媒介物 (Delta-Bondapak) 的 HPLC, 在 0.78x30cm 柱用上,以在 0.1% TFA 中的 0-66% 线性梯度乙腈提纯肽。

[0199] 实施例 2 用于研究的动物

[0200] 在转基因 (Tg) JNPL3 P301L 小鼠模型中进行研究,该小鼠模型在多个脑区域和脊髓中发展神经原纤维缠结 (Taconic, Germantown, NY) (Lewis et al., " Neurofibrillary

Tangles, Amyotrophy and Progressive Motor Disturbance in Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein, " Nat Genet 25 :402-405 (2000), 其由此以引用的方式全部并入本文)。虽然这个模型对 AD 研究来说并不理想,但对缠结发展后果研究,以及筛选可预防这些聚集产生的疗法来说,它是很好的模型。这些动物其他的优点是相当早的病状发作。在纯合系中,在至少最早 3 个月龄时,能够观察到和 tau 病理有关的行为异常,而且这些动物在 8 月龄之前维持相当的健康。换句话说,在 8 月龄时,该动物可以自主行动和进食,而且能够有效地完成行为任务,这使得治疗效果可以得到监视。

[0201] 除了 JNPL3 P301L 模型,也可以利用 htau/PS1 (M146L) 小鼠模型进行研究 (Boutajangout et al., "Presenilin 1 Mutation Promotes Tau Phosphorylation and Aggregation in a Novel Alzheimer's Disease Mouse Model," Alzheimer's and Dementia 4 :T185 (2008), 其由此以引用的方式全部并入本文)。htau 小鼠在没有鼠 tau 的背景下,表达未突变的人源 tau 蛋白,而且在发作年龄和脑分布方面,更类似于阿尔茨海默 tau 病理 (Andorfer et al., "Hyperphosphorylation and Aggregation of Tau in Mice Expressing Normal Human Tau Isoforms," J Neurochem 86 :582-90 (2003), 其由此以引用的方式全部并入本文)。在 Presenilin 1 蛋白中带有突变 (M146L) 的 PS1 模型,当与 Tg2576 小鼠杂交时,显示出升高的 A $\beta$  水平和促进 A $\beta$  沉积 (Duff et al., "Increased Amyloid-beta 42(43) in Brains of Mice Expressing Mutant Presenilin 1," Nature 383 :710-713 (1996) and Holcomb et al., "Accelerated Alzheimer-Type Phenotype in Transgenic Mice Carrying Both Mutant Amyloid Precursor Protein and Presenilin 1 Transgenes," Nature Med 4 :97-100 (1998), 其全部通过引用的方式被并入本文)。

[0202] 使表达 6 种人源 tau 同种型的 htau 小鼠与 PS1 (M146L) 小鼠杂交,并维持小鼠 tau 基因敲除背景 (htau/PS1/mtau $^{-/-}$ )。PS1 突变促进在这种模型中 tau 高度磷酸化,这导致比 htau 模型中更具有攻击性的更早发作的 tau 病理 (Boutajangout et al., "Presenilin 1 Mutation Promotes Tau Phosphorylation and Aggregation in a Novel Alzheimer's Disease Mouse Model," Alzheimer's and Dementia 4 :T185 (2008), 其由此以引用的方式全部并入本文)。

[0203] 实施例 3- 疫苗施用

[0204] 以 1mg/ml 浓度将 Phos-tau 肽与 Adju-Phos 佐剂 (Brenntag Biosector, Denmark) 混合,并在施用之前将溶液在 4 $^{\circ}$ C 转动过夜,以使得肽吸附于磷酸铝微粒。

[0205] 对 JNPL3 P301L 小鼠皮下注射 100  $\mu$  l,接着 2 周之后注射第二次,并且其后每月注射 (除非有其他说明)。在 2-3 月龄时接种疫苗而且继续接种至 8-9 个月,此时灌注动物并获取器官用于分析。在处死之前,在 5-6 月龄以及 8-9 月龄时,对小鼠进行感觉运动测试笼饲。对照小鼠只施用佐剂。

[0206] 以磷酸化 tau 免疫原 Tau379-408 [P-Ser<sub>396,404</sub>] 免疫 htau/PS1/mtau $^{-/-}$  小鼠 (n = 12)。3 个未免疫对照组属于只施用佐剂的组。主对照组包含一样的未免疫的小鼠 (htau/PS1 对照 ;n = 16)。其他对照组是表达小鼠 tau (htau/PS1/mtau ;n = 8) 的 htau/PS1 小鼠,以及有小鼠 tau 基因敲除背景的 htau 同窝出生仔畜 (htau 对照 ;n = 10)。

[0207] htau/PS1/mtau $^{-/-}$  小鼠 (3-4 月龄),每隔 2 周,接受 3 次在明矾主机中的 100  $\mu$  g 磷酸化 tau 衍生物腹膜内 (i. p.) 注射。其后隔月施用。对照组只施用佐剂。在 7-8 月

龄时,小鼠接受更多的行为测试,以测定治疗效果,然后在 8-9 月龄时处死小鼠用于分析。进行活动能力、横梁,和转杆测试,以确定在学习和记忆任务中测量得到的认知障碍是否归因于感觉运动异常。利用八臂迷宫、封闭域对称迷宫,和目标识别测试进行认知测试 (Sigurdsson et al., "An Attenuated Immune Response is Sufficient to Enhance Cognition in an Alzheimer's Disease Mouse Model Immunized with Amyloid-beta Derivatives," J Neurosci 24 :6277-6282(2004), Asuni et al., "Vaccination of Alzheimer's Model Mice with Abeta Derivative in Alum Adjuvant Reduces Abeta Burden Without Microhemorrhages." Eur J Neurosci. 24 :2530-42(2006), and Asuni et al., "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements," J Neurosci 27 :9115-9129(2007),其全部通过引用的方式被并入本文)。

[0208] 实施例 4tau 免疫治疗产生强烈抗体应答

[0209] 在研究开始之前 (T0)、第三次注射一周之后、其后定期地,和在处死时 (Tf),对小鼠抽血。通过利用 ELISA 测验血浆稀释液 (1 : 200 除非有其他说明),以确定针对疫苗的抗体应答,近期描述于 (Sigurdsson et al., " Immunization with a Non-Toxic/ Non-Fibrillar Amyloid- $\beta$  Homologous Peptide Reduces Alzheimer's Disease Associated Pathology in Transgenic Mice, " Am J Pathol. 159 :439-447(2001) and Sigurdsson et al., " An Attenuated Immune Response is Sufficient to Enhance Cognition in an Alzheimer's Disease Mouse Model Immunized with Amyloid-beta Derivatives, " J Neurosci. 24 :6277-6282(2004),其全部通过引用的方式被并入本文),其中将免疫原覆盖于 Immulon™ 微孔 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA,)。为了检测,连接于辣根过氧化物酶的山羊抗-鼠 IgG (Pierce, Rockford, IL) 或抗-鼠 IgM (Sigma, St. Louis, MO) 以 1 : 3000 稀释使用。四甲联苯胺 (Pierce) 是基质。

[0210] 图 1A 显示 :用通过 GPSL 接头连接于破伤风毒素 T 辅助细胞表位 (TT947-967) 的 Tau210-216 [P-Thr<sub>212</sub>-Ser<sub>214</sub>] (SEQ ID NO :2) 免疫 JNPL3P301L 小鼠,在该小鼠中强烈 IgG 和 IgM 免疫应答。2-3 个月龄的小鼠以 2 周为间隔接受最初 2 次免疫,其后每月接受一次。为评估抗体应答,在首次免疫之前给小鼠抽血,其后定期地在疫苗施用后 1 周给小鼠抽血,并且在 8-9 个月龄时处死小鼠以获得组织。图 1A 显示 :在第 6 次免疫 (T3) 1 周后,以及在处死的 8-9 个月龄时 (Tf = T 最终),测定的 IgG 和 IgM 抗体应答。图 1B 显示 :针对破伤风毒素表位本身产生了强烈的抗体应答,这由以下测试所示,IgG 和 IgM 结合于通过 GPSL 结合于 TT947-967 的无关的 tau 蛋白表位 Tau260-264 [P-Ser<sub>262</sub>]。

[0211] 图 2A 显示 :用通过 GPSL 接头连接于破伤风毒素 T 辅助细胞表位 (TT947-967) 的 Tau260-264 [P-Ser<sub>262</sub>] (SEQ ID NO :3) 免疫的 JNPL3 P301L 缠结小鼠,针对免疫原产生了强烈 IgG 应答。如上所述,小鼠以 2 周间隔接受最初的两次免疫,其后从 2-3 月龄至 8-9 月龄每月接受免疫。对破伤风毒素表位产生了大量抗体应答,这由以下测试所示,IgG 结合于不相关的通过 GPSL 连接于 TT947-967 的 tau 蛋白表位 Tau210-216 [P-Thr<sub>212</sub>-Ser<sub>214</sub>] (图 2B)。然而,如图 2c 所示,对 tau 蛋白表位也产生了大量抗体应答,因为测试发现 IgG 结合于更大的含有 Tau260-264 [P-Ser<sub>262</sub>] 区域的 tau 蛋白表位 Tau240-270 [P-Ser<sub>262</sub>]。T0-T 最终,分别在接种疫苗之前 (T0),第三次 (T1)、第六次 (T2)、第七次 (T3) 免疫后一周,和在获取组织

(Tf) 时,对小鼠抽血。

[0212] 在用连接于破伤风毒素 T 辅助细胞表位 (TT947-967] 的 Tau229-237 [P-Thr<sub>231</sub>-Ser<sub>235</sub>] (SEQ ID NO :4) 免疫的 JNPL3 P301L 缠结模型小鼠中,产生了强烈抗体 (IgG) 应答 (图 3)。从 2-3 月龄开始免疫小鼠,2 周间隔,其后每月免疫,并且在第三次免疫后一周 (T1) 抽血。

[0213] 在用明矾佐剂中的磷酸化的免疫原 Tau379-408 [Asp<sub>396,404</sub>] (SEQ ID NO :57) 免疫的 JNPL3 P301L 缠结模型小鼠中,也产生了强烈抗体 (IgG) 应答。重要地,这些抗体识别磷酸基 - 表位 Tau379-408 [P-Ser<sub>396,404</sub>], 并达到相似的程度。从 2-3 月龄开始对小鼠免疫,最初两次以 2 周为间隔,其后每月免疫。在获取 7-8 月龄小鼠的组织时,对小鼠抽血 (Tf)。

[0214] 实施例 5 Tau 免疫治疗降低在脑中的 tau 蛋白聚集

[0215] 为了 tau 病理组织学分析,用戊巴比妥钠 (120mg/kg, i. p.) 麻醉并用 PBS 经皮层灌输小鼠,以及如前所述地处理脑 (Sigurdsson et al., " Immunization with a Non-Toxic/Non-Fibrillar Amyloid- $\beta$  Homologous Peptide Reduces Alzheimer ' s Disease Associated Pathology in Transgenic Mice, " Am J Pathol 159 : 439-447 (2001) ; Sigurdsson et al., " An Attenuated Immune Response is Sufficient to Enhance Cognition in an Alzheimer ' s Disease Mouse Model Immunized with Amyloid-beta Derivatives, " J Neurosci 24 :6277-6282 (2004) ; and Sigurdsson E., " Histological Staining of Amyloid-beta in Mouse Brains, " Methods Mol Biol 299 :299-308 (2005), 其全部通过引用的方式被并入本文)。简要地说,在高碘酸盐 - 赖氨酸 - 多聚甲醛 (PLP) 中固定浸泡右半脑过夜,而速冻左半脑用于 tau 蛋白分析。固定之后,将脑移至含有 20% 甘油和 2% 二甲亚砜 (DMSO) 的磷酸盐缓冲溶液,并保存于 4°C 直至切片之前。制备一系列冠脑切片 (40  $\mu$  m), 并且用 PHF1 单克隆抗体对每十分之一切片染色, PHF1 识别位于在 PHFtau 蛋白 C- 末端上的微管结合重复序列之内的磷酸化丝氨酸 396 和 404 (Otvos et al., " Monoclonal Antibody PHF-1 Recognizes Tau Protein Phosphorylated at Serine Residues 396 and 404, " J Neurosci Res 39 : 669-673 (1994), 其由此以引用的方式全部并入本文)。

[0216] 完成 Tau 抗体染色的方法描述于 Sigurdsson et al., " Immunization with a Non-Toxic/Non-Fibrillar Amyloid- $\beta$  Homologous Peptide Reduces Alzheimer ' s Disease Associated Pathology in Transgenic Mice, " Am J Pathol 159 :439-447 (2001) and Sigurdsson et al., " An Attenuated Immune Response is Sufficient to Enhance Cognition in an Alzheimer ' s Disease Mouse Model Immunized with Amyloid-beta Derivatives, " J Neurosci 24 :6277-6282 (2004), 其由此以引用的方式全部并入本文。简要地说,在主 PHF1 抗体 1 : 100 到 1 : 1000 稀释液中孵育切片。使用鼠 - 鼠免疫检测试剂盒 (Vector Laboratories, Burlingame, CA), 其中以 1 : 2000 稀释,使用抗 - 鼠 IgG 第二抗体。

[0217] 用 Bioquant 影像分析系统量化组织切片分析。软件利用色调、饱和度和强度分割影像区域中的目标。用在标准的系列幻灯片上精确鉴定的目标建立阈值,而且这些分割阈值在整个分析过程中保持恒定。建立这些阈值后,用抓帧器数字化影像区域。Bioquant 在背景照明 (空白去校正) 中校正异质性,并且为整个区域计算参数。为了免疫组化

学量化影像分析,最初选择齿状回粒层,其一贯含有神经元内 tau 蛋白聚集(前缠结和缠结)。观察结果符合这种模型的最初特点(Lewis et al., " Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy and Progressive Motor Disturbance in Mice Expressing Mutant(P301L) Tau Protein," Nat Genet 25 :402-405(2000),其由此以引用的方式全部并入本文)。不考虑研究的实验条件,所有过程都由个体完成。在组织处理之前,随机化样品号码,并且仅在分析完成之后破坏标号。对来自小鼠脑部的第 10 个切片取样,测量值是以 X200 放大倍数的测量视野中的面积百分率,其由在视野的左侧处齿状回的顶端的反应产物占据。对每个动物的 4 到 5 个切片进行分析。

[0218] 相对于只施用佐剂的对照小鼠,用连接于 TT947-967(T299)的 Tau260-264[P-Ser<sub>262</sub>] (SEQ ID NO :3) 对纯合系 JNPL3 tau P301L 小鼠进行免疫,该免疫降低在脑干(图 5A)和齿状回(图 5B)中的病理 tau。相似地,用磷酸化 Tau379-408[P-Ser<sub>396</sub>, 404] 免疫原性肽免疫对 htau/PS1 进行的免疫,使在梨状皮质中的 tau 蛋白聚集数量减少 56%。(图 6,免疫的 htau/PS1 和 htau/PS1 对照的对比)。在免疫组和对照组之间观察到显著的差异(单因素 ANOVA,  $p < 0.01$ )。后 hoc 分析也显示免疫的 htau/PS1 小鼠区别于它们的 htau/PS1 对照 ( $p < 0.01$ )。\* $p < 0.01$ 。

[0219] 实施例 6-Tau 免疫治疗预防认知衰退

[0220] 为测定是否 Tau 免疫治疗预防或逆转在 P301L 中观察到的年龄相关的感觉运动异常或是否它在 htau/PS1 小鼠中引起任一运动损伤,用多种如下文所述的感觉运动和认知测试,评估被施用免疫原性 Tau260-264[P-Ser<sub>262</sub>] (SEQ ID NO :3) 或 Tau 379-408[P-Ser<sub>396</sub>, 404] (SEQ ID NO :82) 的动物。

[0221] 转杆测试:将动物放置在杆(直径 3.6cm)装置上,以通过测量上肢和下肢运动协调和平衡来评价运动协调和平衡中的区别(Rotarod 7650 加速模型;Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Varese, Italy)。该方法设计以评价运动行为而没有混淆的实施。通过接受两种试验的训练阶段而使动物习惯于装置,这足以实现实施的基线水平。然后,使小鼠另外测试三次,其中速度增加。在习惯过程中,转杆设定为 1.0rpm,其每 30sec 逐渐增加,并且在各阶段后也使用 30%乙醇溶液清洗干净。在该装置下面放置软泡沫垫以防止可能的摔伤。各动物对于三个阶段都测试(整合数据用于接下来的分析),其中各个阶段间隔 15min,并且进行测量从旋转筒的顶部潜在落入或反转(通过粘紧)。

[0222] 横梁:该任务测试平衡和普通运动协调和功能整合。通过下列方式来评价小鼠:测量它们穿过分级的狭窄木梁以达到目标箱的能力(Torres et al., " Behavioural, Histochemical and Biochemical Consequence of Selective Immunolesions in Discrete Regions of the Basal Forebrain Cholinergic System," Neuroscience 63 :95-122(1994),其由此以引用的方式全部并入本文)。将小鼠放置在 1.1cm 宽的梁上,该梁为 50.8cm 长,并且通过两个相同的柱而悬挂在成垫表面上 30cm。在梁的各个末端处附接遮蔽的目标箱。使小鼠以垂直取向放置在梁上以习惯,然后监控最多 60sec。在落入或达到目标箱之前,记录各小鼠的失足数量用于四个连续试验中的每个。误差定义为失足并且数字地记录。

[0223] 八臂迷宫:该迷宫装置是由胶质玻璃构建的 8-臂举起的放射迷宫。每个臂是 35cm 长和 7cm 宽,且在每个臂的末端放置一个直径 1cm 的水杯。15cm 高的侧壁延伸进入每个臂

12cm,以防止动物在各个臂之间跨越。中央区域是八边形的直径 14cm 的中心。通过滑轮系统控制各臂的入口,遥控透明的胶质玻璃闸门。将迷宫升至高于地面 75cm 并安置在一个房间内,在该房间中一些在固定位置的明显目标起外部暗示的作用。在测试之前,让小鼠适应 5 天。在这段时间内,该小鼠每天接受 0.1%糖水 1 小时,适应 16 小时后让它可以接近放置于每个臂末端的水杯中的糖溶液。起初 2 天的适应在 Y- 迷宫中进行,在该迷宫中小鼠可以自由地探索。其后 3 天的适应在八臂迷宫中进行,在迷宫中定期地升起和放下闸门,以使动物适应于它们选择有关的声音。在 9 天测试期间,维持同样的缺水安排。在这段时间内该小鼠保持良好的健康。每次测试开始,都将小鼠置于中央区域,并升起所有的闸门。当小鼠进入一个臂时,所有闸门落下。小鼠吃完糖水后,升起小鼠所在臂的门,让小鼠回到中央区域。5 秒间隔后,同时开启所有的门,以启动下一个试验。这个过程一直持续到该动物进入所有的 8 个臂,或者直到用完 10 分钟。每日的获取阶段持续 9 天。记录错误次数(进入刚去过的臂)和完成每个阶段的时间。

[0224] 目标识别:该自发的目标识别测试应用于测量短期记忆缺陷,并且该测试在正方形开放域盒子中进行(48cm 正方形,带有由黑色胶质玻璃制作的 18cm 高围墙),将盒子升高至里地面 50cm。将光强设置为 30lx。测试前一天,使小鼠经历独自习惯阶段,在该阶段小鼠可以探索空盒子 15 分钟。在训练阶段,将 2 个新目标放置于开放域的两个成对角的角,并且让动物探索 15 分钟。对于特定的试验,成对的目标是 10cm 高,且由相同的材质构成,由此它们不能容易地通过嗅觉暗示区别。通过跟踪系统(San Diego Instruments, San Diego, CA)记录探索每个目标所用的时间,并且在该训练阶段结束时,将小鼠从盒子移走,维持一段记忆力延迟(RD = 3h)。延迟以后,正常小鼠在 1 小时之内记住特定目标,而且在记忆力试验期间,用它们的主要时间探寻新目标。在记忆力测试期间,将动物放回同样的盒子,在该盒子中放置一个前面训练期间使用过的相似目标和第二个新目标,并且让小鼠自由探索 6 分钟。不同目标对用于给定动物的各试验,并且暴露于目标对的顺序以及各对的标识样品和新目标在组内和组间平衡。开发新的和熟悉目标所花费的时间记录为 6 分钟。

[0225] 封闭域对称迷宫:该装置为矩形视场 30cm 正方形,9cm 高的壁,分为 36 个 9.5cm 正方形,并被透明胶质玻璃盖覆盖。将均为 11x16x9cm 的纸盒(Endboxes)安置在视场的对角线拐角。对称迷宫是上面讨论的 Hebb-Williams 和 Rabinovitch-Rosvold 型测试的改进(Asuni et al., "Vaccination of Alzheimer's Model Mice with Abeta Derivative in Alum Adjuvant Reduces Abeta Burden without Microhemorrhages," *Eur J Neurosci* 24 :2530-2542 (2006), 其由此以引用的方式全部并入本文)。简言之,主要差别是各个末端隔室是开始箱和目标箱的功能,并且小鼠在交替轨道上沿相反方向跑动,从而消除种族间的处理。将屏障以对称图案放置在视场中,使得小鼠面向相同转变方向,从而在给定问题内沿任一方向进行。在测试前,小鼠适应于限制饮水方案(每天 2h 接近水)。小鼠分为两个适应阶段,之后开始测试。在第一阶段,所有动物在目标箱中被给予糖精味的水 10 分钟。在第二阶段中,它们放置于开始室中,并允许开发视场和进入目标箱,其中给予水(0.05mL)。当小鼠可靠地从开始室跑向目标箱时,它们在简单问题上被分为三个实施阶段,其中一个或两个屏障放置在视场的不同位置处,以阻止直接到达目标箱。正式测试包括基于之前的数据展示难以分级的三个问题(Asuni et al., "Vaccination of Alzheimer's Model Mice with Abeta Derivative in Alum Adjuvant Reduces Abeta Burden without

Microhemorrhages,” *Eur J Neurosci* 24:2530-2542(2006), 其由此以引用的方式全部并入本文) 和用于小鼠的公开的基准。一个问题是每天展示, 并且在各问题上小鼠被给予五个试验, 其中种族间间隔为 2 分钟。通过相同观察者就误差而言手动记录性能 (即进入和再进入标识的误差区段) 和时间以完成各个试验。

[0226] 这些实验地目的是评价疫苗接种对于感觉运动 (即, 横梁和转杆) 和认知行为 (即, 八臂迷宫、目标识别测试, 和封闭域对称迷宫测试) 的作用。纯合 P301L 小鼠早在 3 月龄时就患有缠结病状, 在 5 和 8 月龄时测试这些小鼠。在 7-8 月龄时测试 htau/PS1 动物。

[0227] 用连接于破伤风毒素辅助 T 细胞表位 (TT947-967) 的磷酸化免疫原性 tau 肽 Tau260-264 [P-Ser<sub>262</sub>], 免疫纯合 JNPL3 tau P301L 小鼠, 预防与神经原纤维缠结发展有关的功能损伤, 这由使用 8 月龄时的横梁测试 (图 7A) 以及 5-6 月龄和 8-9 月龄时的转杆测试 (图 7B) 评估。对照 JNPL3 tau P301L 小鼠只施用佐剂。

[0228] 用磷酸化 Tau379-408 [P-Ser396, 404] 免疫 htau/PS1 小鼠, 预防在全部 3 个所用测试中的认知衰退: 1) 八臂迷宫 (RAM; 两因素 ANOVA 重复测量,  $p < 0.0001$ , 图 8A), 2) 目标识别测试 (ORT; 单因素 ANOVA,  $p = 0.005$ , 图 8B), 和 3) 封闭域对称迷宫 (CFSM; 单因素 ANOVA, 迷宫 A:  $p < 0.001$ , 迷宫 B:  $p < 0.0001$ , 迷宫 C:  $p < 0.01$ , 图 9A-9C)。在 RAM 和 CFSM 中, 所有天内 (RAM:  $p < 0.01-0.001$ ) 和在所有复杂程度不断提高的迷宫中, 免疫的 htau/PS1 小鼠比对照 htau/PS1 小鼠表现好, 这由错误次数 (注意 Y 轴刻度不同; CFSM 迷宫 A:  $p < 0.01$ , 迷宫 B、C:  $p < 0.001$ ) 显示。在 ORT 中, 析因分析发现免疫的 htau/PS1 小鼠比相同的对照小鼠, 具有更好地短期记忆 ( $p < 0.01$ )。这充分确定相对于旧的目标, 认知正常的小鼠用大约它们的 70% 时间在新目标上 (Asuni et al., “Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements,” *J Neurosci* 27:9115-9129(2007), 其由此以引用的方式全部并入本文)。在任一感觉运动任务 (转杆、横梁、活动能力) 中, 免疫的 htau/PS1 小鼠与它们的未免疫的相同对照小鼠没有显著区别。这些发现说明免疫后观察到的认知提高, 不能由感觉运动效果解释, 这进一步强化了结果。

[0229] 实施例 7-Tau 免疫治疗降低病理 Tau 水平

[0230] 在含有 0.1mM 2-(N-吗啉代) 乙磺酸、0.5mM MgSO<sub>4</sub>、1mM EGTA、2mM 二硫苏糖醇、pH 6.8、0.75mM NaCl、2mM 苄基磺酰氯化物、Complete mini 蛋白酶抑制剂混合物 (1 片 10ml 水; Roche) 和磷酸酶抑制剂 (20mM NaF 和 0.5mM 原钒酸钠) 的缓冲液中, 使脑组织均质。然后以 (20,000xg) 在 4°C 离心 30 分钟, 以分离可溶性细胞部分 (上清液 1) 和不溶性部分 (细胞沉淀 1)。用相同体积的缓冲液重悬细胞沉淀, 该缓冲液没有蛋白酶和磷酸酶抑制剂但含有 % (v/v) Triton X-100 和 0.25% (w/v) 脱氧胆酸钠, 并且以 50,000 高速离心 30 分钟, 以获得清洁剂-提取的作为不溶性部分分离得到的上清液 2。上清液 1 和 2 于 100°C 加热 5 分钟, 并且使相同量的蛋白在 12% (w/v) 聚丙烯酰胺胶上经电泳。在含有 0.1% Tween-20 的 TBS 的 5% 脱脂奶中, 阻止印迹, 并且与不同的抗体孵育过夜, 然后洗涤并与共轭过氧化物酶、抗-鼠或抗-兔 IgG 在室温孵育 1 小时。随后, 用 ECL (Pierce) 检测结合抗体。通过 NIH Image J 程序完成免疫印迹密度分析, 并且相对于总 tau 蛋白量而不是肌动蛋白水平, 将病理 Tau 水平正常化。一些研究报告病理生理学情况的改变和于胞内基质的交互作用能够改变肌动蛋白合成, 使激动蛋白对内部标准来说成为不合适的。

[0231] 对于 Western 印迹分析,用单克隆 B19 抗体测量总,而用单克隆 PHF1 抗体检测病理 Tau(图 10A-10F)。总可溶性和不溶性 tau 的水平在各组之间没有显著差异(图 10A-10B),然而相对于他们一样的对照,在免疫的小鼠中可溶性 PHF1 染色的 tau 水平显著降低(41%,  $p < 0.001$ )(图 10C)。观察到的趋势是不溶性 PHF1 活性 tau 降低了(22%)(图 10D)。进一步的分析显示了非常强的趋势:免疫治疗在可溶性和不溶性部分中的 PHF1/B19 比例分别降低 35%和 43%(图 10E 和 10F)。这些发现说明优选地将病理 Tau 清除。

[0232] 重要的是,观察到的在接受免疫治疗的 htau/PS1 小鼠中的认知改善和染色的 tau 聚集的减少(由免疫组织化学测试而知)是相符的。在全部 3 个记忆测试中,都观察到显著的关联性(RAM(分析测试的最后一天): $r = 0.36, p = 0.01$ ;CFSM:迷宫 A, $r = 0.33, p = 0.02$ ;迷宫 C, $r = 0.40, p = 0.01$ ;ORT: $r = -0.31, p = 0.03$ )。关于 western 印迹片段,在八臂迷宫模型中,观察到在可溶性和不溶性部分以及它们相对于总 tau 的比例之间有显著的相关性(可溶性 PHF1: $r = 0.41, p < 0.01$ ;可溶性 PHF1/总可溶性 tau: $r = 0.34, p < 0.05$ ;不溶性 PHF1: $r = 0.52, p < 0.001$ ;不溶性 PHF1/总不溶性 tau: $r = 0.33, p < 0.05$ ),但在其他 2 个认知测试没有观察到。

[0233] 实施例 8 靶向 P-396,404 表位的被动免疫治疗预防功能衰退和在脑中减少 Tau 聚集

[0234] 为测定被动免疫治疗的可行性,对纯合 P301L 小鼠腹膜内(i. p.)注射施用 PHF1,该 PHF1 是一种单克隆 tau 抗体(由 Dr. Peter Davies 提供),其在 P301L(JNPL3)小鼠模型和在 AD 中识别 NFT 和前缠结(Lewis et al,“Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy and Progressive Motor Disturbance in Mice Expressing Mutant(P301L)Tau Protein,”*Nat Genet* 25:402-405(2000),其由此以引用的方式全部并入本文)。这种单克隆抗体识别 tau,该 tau 在 C-末端的丝氨酸氨基酸 404 和 396 上是磷酸化的(Greenberg et al.,“Hydrofluoric Acid-Treated Tau PHF Proteins Display the Same Biochemical Properties as Normal Tau,”*J Biol Chem* 267:564-569(1992),其由此以引用的方式全部并入本文)。因而,它是一种主动免疫方法原型的单克隆类似物(Asuni et al.,“Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements,”*J Neurosci* 27:9115-9129(2007),其由此以引用的方式全部并入本文),Tau379-408[P-Ser396,404]含有 PHF1 抗体表位。

[0235] PHF1 的剂量是溶解于 PBS 的  $250 \mu\text{g}/125 \mu\text{L}$ 。向对照注射相同剂量的在 PBS 中的小鼠 IgG。在 9 到 12 周龄之间施用首次注射。接着动物每周接受注射,总共接受 13 次注射,然后在 5-6 月龄时接受行为测试,其后在 6-7 月时对其进行组织分析。

[0236] 在 P301L 小鼠模型中,用 PHF1 抗体进行的被动免疫预防 tau 病理相关的运动能力衰退。如图 11A 所示,在横梁测试中,在 IgG 注射的对照和 PHF1 免疫的动物之间存在显著差异,当穿越横梁时,对照动物比免疫的动物具有更多的失足(试验合并, $p = 0.03$ )。另外,PHF1 免疫的 P301L 小鼠在齿状回中 PHF1 染色的 tau 病理少 58%( $p = 0.02$ )(图 11B)。在脑中观察到在血浆 PHF1 抗体水平和 tau 病理之间的逆相关(图 12A; $p < 0.01$ ),以及在皮层运动区中观察到相关性的强烈趋势(图 12B; $p = 0.06$ )。

[0237] 在血浆中的 PHF-1 抗体( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )数量在 2 周之内下降 4 倍(图 11C)。在对照中

没有观察到可检测的抗体。这里有免疫的小鼠的平均值。

[0238] 实施例 9- 制备单克隆 Tau 抗体

[0239] 用通过添加到 N- 末端的半胱氨酸残基连接于 KLH 的 Tau386-408 [P-Ser<sub>396,404</sub>] (SEQ ID NO:13), 免疫 10 只 balb/c 小鼠。针对免疫原的 tau 位点, 产生了强抗体效价, 这由血浆系列稀释检测而知 (图 13A)。两只小鼠被选择用于细胞融合, 并且初始筛选使用不具有 KLH 的免疫原肽来进行。第二筛选使用相同肽以及 Tau386-408 [P-Ser<sub>396</sub>]、Tau386-408 [P-Ser<sub>404</sub>] 和非 - 磷酸基肽 Tau386-408 来进行 (图 13B)。基于该筛选, 克隆被选择用于第一和第二亚克隆。重要地, 鉴定多种强阳性克隆 (> 50), 并且已经鉴别稳定克隆, 该克隆特异性识别该区域内的磷酸基 - 表位或结合该区域内的非 - 磷酸化位点, 从而允许在分子的不同区域内结合磷酸基 - 或非 - 磷酸基 tau 表位的抗体的效果和安全性性能的比较。

[0240] 从中选择磷酸基 - 特异性单克隆抗体用于进一步亚克隆, 6 个中的 4 个维持它们对磷酸基 - Ser404 表位的特异性 (参见图 14A 中的克隆 1F12C2、1F12G6、4E6E3, 和 4E6G7)。另外 2 个克隆具有较差的磷酸基 - 特异性 (8B2D1) 或非 - 特异性 (8B2D4) (图 14A)。在进一步亚克隆后, 非 - 磷酸基 - 特异性单克隆抗体中的 6B2E9 和 6B2G12 尤其地维持它们的非 - 特异性 (图 14B)。

[0241] 针对来自 JNPL3 P301L 小鼠和野生型 (Wt) 小鼠的脑匀浆, 测试 4 个 P-Ser<sub>396,404</sub>tau 磷酸基 - 特异性 (图 15A) 和非 - 磷酸基 - 特异性 (图 15B) 单克隆抗体克隆的反应。4 个磷酸基 - 特异性克隆中的 4E6G7 显示最强的反应 (图 15), 这与图 14A 的 ELISA 结果一致。与也识别 tau P-Ser<sub>396,404</sub> 表位的 PHF-1 抗体不同, 相比 Wt 匀浆, 所有克隆更好地与 JNPL3 P301L 脑匀浆反应。如预料的一样, 非 - 磷酸基 - 特异性克隆反应更快, 正如多数 tau 是非 - 磷酸化的。

[0242] 用通过在 C- 末端上的半胱氨酸残基连接于 KLH 的 Tau260-271 [P-Ser<sub>262</sub>] (SEQ ID NO:12), 免疫其他一组 10 只 balb/c 小鼠。虽然针对免疫原 Tau260-271 [P-Ser<sub>262</sub>] 免疫原产生强的效价, 但血浆抗体也识别非 - 磷酸基肽 Tau260-271 (图 16A)。从第二次亚克隆, 选择 8 个稳定的磷酸基 - 特异性克隆用于进一步分析 (图 16B), 并且选择 2C11 克隆用于抗体产生, 因为它是 IgG2a 的同种型。IgG3 具有较短的半衰期, 因而对被动免疫研究来说是不理想的。

[0243] 测试 3 个磷酸基 - 特异性 P-Ser<sub>262</sub> tau 单克隆抗体克隆针对来自 JNPL3P301L 和野生型 (Wt) 小鼠脑匀浆的反应 (图 17)。相比其他磷酸基 - 特异性克隆, 2C11 抗体克隆识别更高分子量带, 而且它不区分野生型和 P301L 组织。5F7D10 和 5F7E9 是其他克隆的代表。Tau-5 识别总 tau 并别结合于在 tau 氨基酸 216-227 附近的表位。CP27 识别人类 tau 而不是鼠 tau。

[0244] 如图 18A-18E 所示, 在 P301L 缠结小鼠脑切片中, 5F7D10 抗体克隆易于检测 tau 病理。在 P301L 脑切片中, 相对于野生型 (图 18B), 5F7D10 单克隆抗体显示强组织染色 (图 18A)。在同样的缠结小鼠中, PHF1 抗体筛选 tau 病理 (图 18C), 虽然它的图案与 5F7D10 抗体的图案是不一样的, 但这也不奇怪, 因为他们识别不同的 tau 表位。图 18D 是图 18A 方框区域的放大图, 其描述了带有聚集的 tau 的神经元。图 18E 是利用 5F7D10 检测的缠结 - 样病状 (在不同 JNPL3 P301L 小鼠中) 的更高的放大图。

[0245] 虽然本文详细地描写和叙述了优选的实施方案,但对相关领域熟练的技术人员来说,非常明白的是在不脱离本发明精神的条件下可以做很多修饰、添加、替换等等,而且如在权利要求所定义,这些都被认为是在本发明的范围之内。











<221> MOD\_RES  
 <222> (7).. (7)  
 <223> 磷酸化

<400> 4

Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser  
 1 . . . . . 5

<210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> tau肽

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3).. (3)  
 <223> 磷酸化

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11).. (11)  
 <223> 磷酸化

<400> 5

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

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工

[0007]

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)..(21)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)..(23)

<223> 磷酸化

<400> 6

Gly	Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly
1				5					10						15

Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg
								25					30

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> 磷酸化

[0008]

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11)..(11)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)..(14)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)..(21)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)..(23)

<223> 磷酸化

<400> 7

Gly	Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly
1				5					10						15

Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg
			20					25					30

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

[0009]

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8).. (8)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21).. (21)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23).. (23)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (26).. (26)

<223> 磷酸化

<400> 8

Gly	Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	

Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg
			20				25						30

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

[0010]

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11)..(11)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)..(14)

<223> 磷酸化

<400> 9

Gly	Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly
1			5					10						15	

Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg
			20				25						30

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)..(13)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15)..(15)

<223> 磷酸化

[0011]

<400> 10

Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu  
 1                    5                    10                    15

Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val  
                   20                    25                    30

<210> 11

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (35)..(35)

<223> 磷酸化

<400> 11

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

Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys  
                   20                    25                    30

[0012]



<221> MOD\_RES  
 <222> (19).. (19)  
 <223> 磷酸化

<400> 13

Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly  
 1                    5                    10                    15

Asp Thr Ser Pro Arg His Leu  
 20

<210> 14  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> tau肽

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3).. (3)  
 <223> 磷酸化

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (22).. (22)  
 <223> 磷酸化

<400> 14

Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr  
 1                    5                    10                    15

[0014]

Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr  
20

<210> 15  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> tau肽

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> 磷酸化

<400> 15

Thr Pro Ser Leu Glu  
1 5

<210> 16  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> tau肽

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> 磷酸化

<400> 16

[0015]

Ile Ala Thr Pro Arg

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 磷酸化

<400> 17

Ala Lys Thr Pro Pro

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 磷酸化

[0016]

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6).. (6)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8).. (8)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (10).. (10)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12).. (12)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15).. (15)

<223> 磷酸化

<400> 18

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro  
1                    5                                    10                                    15

Pro

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

[0017]

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 磷酸化

<400> 19

Pro Lys Ser Pro Ser

1                      5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> 磷酸化

<400> 20

Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu

1                      5

[0018]



1 5

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15)..(17)

<223> 磷酸化

<400> 23

Val	Val	Ser	Gly	Asp	Thr	Ser	Pro	Arg	His	Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Ser
1				5					10				15		

Thr Gly Ser

[0020]

<210> 24  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> tau肽

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3).. (3)  
 <223> 磷酸化

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8).. (8)  
 <223> 磷酸化

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14).. (14)  
 <223> 磷酸化

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16).. (16)  
 <223> 磷酸化

<400> 24

Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser  
 1                    5                    10                    15

Leu Ala

[0021]

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 磷酸化

<400> 25

Pro Gly Ser Pro  
1

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 磷酸化

<400> 26

[0022]

Pro Gly Thr Pro Gly  
1 5

<210> 27  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> tau肽

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> 磷酸化

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> 磷酸化

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9)..(9)  
<223> 磷酸化

<400> 27

Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly  
1 5 10

<210> 28  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工

[0023]

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (9)..(9)

<223> 磷酸化

<400> 28

Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro
1				5					10	

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> 磷酸化

[0024]

<400> 29

Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala  
1                    5                    10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3).. (3)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6).. (6)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7).. (7)

<223> 磷酸化

<400> 30

Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro  
1                    5                    10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

[0025]

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 31

Ser Arg Xaa Pro Xaa Leu Pro

1

5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 32

Ile Gly Xaa Thr Glu

[0026]





Ser Arg Ser Arg Xaa Pro Xaa Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg  
 20 25 30

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 36

[0029]





<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (13).. (13)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (15).. (15)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 39

Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Xaa Pro Xaa Leu  
1                    5                    10                    15

Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val  
                  20                    25                    30

<210> 40

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

[0032]







1

5

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 伪磷酸化的tau肽

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (3).. (3)

&lt;223&gt; Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

&lt;400&gt; 45

Ile Ala Xaa Pro Arg

1

5

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 伪磷酸化的tau肽

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (3).. (3)

&lt;223&gt; Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

&lt;400&gt; 46

[0036]

Ala Lys Xaa Pro Pro  
1 5

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

[0037]

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15).. (15)  
 <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 47

Pro Gly Xaa Pro Gly Xaa Arg Xaa Arg Xaa Pro Xaa Leu Pro Xaa Pro  
 1                    5                    10                    15

Pro

<210> 48  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 伪磷酸化的tau肽

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3).. (3)  
 <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 48

Pro Lys Xaa Pro Ser  
 1                    5

<210> 49  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工

[0038]



<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 51

Ile Gly Xaa Leu Asp

1 5

<210> 52

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

[0040]





<210> 55  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 55

Pro Gly Xaa Pro Gly  
1                      5

<210> 56  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (17)..(17)  
<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (21)..(21)

[0043]

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 56

Asp	Gly	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly	Ala	Asp	Gly	Lys
1				5					10					15	

Xaa	Lys	Ile	Ala	Xaa	Thr	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	Gly	Gln
			20					25					30	

<210> 57

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 57

Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Ala	Lys	Thr	Asp	His	Gly	Ala	Glu	Ile	Val	Tyr
1				5					10					15	

Lys	Xaa	Pro	Val	Val	Ser	Gly	Asp	Thr	Xaa	Pro	Arg	His	Leu
			20					25				30	

[0044]

- <210> 58  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> 人工
- <220>  
<223> 伪磷酸化的tau肽
- <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8).. (8)  
<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基
- <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (11).. (11)  
<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基
- <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (14).. (14)  
<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基
- <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (21).. (21)  
<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基
- <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (23).. (23)  
<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基
- <400> 58

Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Xaa Pro Gly Xaa Pro Gly Xaa Pro Gly

[0045]

1	5	10	15
Ser Arg Ser Arg Xaa Pro Xaa Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg			
	20	25	30

<210> 59

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 59

Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Xaa Pro Pro Lys Xaa Pro			
1	5	10	15

Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met		
	20	30

<210> 60

<211> 29

<212> PRT

[0046]

- <213> 人工
- <220>
- <223> 伪磷酸化的tau肽
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1).. (1)
- <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (8).. (8)
- <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (14).. (16)
- <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (19).. (19)
- <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (22).. (22)
- <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (25).. (25)
- <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (27).. (27)

[0047]

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (29).. (29)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 60

Xaa	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Xaa	Gly	Asp	Arg	Ser	Gln	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10					15	

Pro	Gly	Xaa	Pro	Gly	Xaa	Pro	Gly	Xaa	Arg	Xaa	Arg	Xaa
			20					25				

<210> 61

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (18).. (18)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (29).. (29)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 61

Met	Ala	Glu	Pro	Arg	Gln	Glu	Phe	Glu	Val	Met	Glu	Asp	His	Ala	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0048]



<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 62

Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Xaa Asp Ala Gly Leu Lys Glu  
1                    5                    10                    15

Xaa Pro Leu Gln Xaa Pro Xaa Glu Asp Gly Xaa Glu Glu Pro Gly  
                  20                    25                    30

<210> 63

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(10)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 63

Gly Ser Glu Thr Ser Asp Ala Lys Xaa Xaa Pro Xaa Ala Glu Asp Val  
1                    5                    10                    15

Thr Ala Pro Leu Val Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala  
                  20                    25                    30

[0050]



<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 65

Gly	His	Val	Xaa	Gln	Ala	Arg	Met	Val	Ser	Lys	Xaa	Lys	Asp	Gly	Thr
1			5					10					15		

Gly	Ser	Asp	Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly	Ala	Asp	Gly	Lys	Xaa	Lys
			20					25					30	

<210> 66

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

[0052]



<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 67

Lys	Xaa	Pro	Pro	Xaa	Xaa	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Arg	Ser
1				5				10							15

Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Gly	Xaa	Pro	Gly	Xaa	Pro	Gly	Xaa	Arg	Ser
				20				25					30	

<210> 68

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

[0054]



<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 69

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

Val	Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	Xaa	Thr	Glu	Asn	Leu	Lys	His	Gln	Pro
			20					25					30	

<210> 70

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 70

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

[0056]

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

<210> 71  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 伪磷酸化的tau肽

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (25)..(25)  
 <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 71

Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Xaa Lys Pro Val Asp Leu  
 1 5 10 15

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

<210> 72  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人工

[0057]



<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 73

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

Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Xaa Asp His Gly Ala  
                  20                    25                    30

<210> 74

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 伪磷酸化的tau肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

[0059]

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(15)  
 <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (23)..(24)  
 <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 74

Ala	Glu	Ile	Val	Xaa	Lys	Xaa	Pro	Val	Val	Xaa	Gly	Asp	Xaa	Xaa	Pro
1				5					10					15	

Arg	His	Leu	Xaa	Asn	Val	Xaa	Xaa	Thr	Gly	Ser	Ile	Asp	Met	Val
			20					25					30	

<210> 75  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 伪磷酸化的tau肽

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(3)  
 <223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

[0060]

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa是谷氨酸或天冬氨酸残基

<400> 75

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

Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
                  20                   25                   30

<210> 76

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> T辅助细胞表位

<400> 76

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser  
1                   5                   10                   15

Ala Ser His Leu Glu  
                  20

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工

<220>

[0061]

<223> T辅助细胞表位

<400> 77

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr  
1                    5                    10

<210> 78

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 接头

<400> 78

Gly Pro Ser Leu

1

<210> 79

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 接头

<400> 79

Gly Ser Gly Ser

1

<210> 80

<211> 5

<212> PRT

[0062]

<213> 人工

<220>

<223> 接头

<400> 80

Gly Ser Gly Ser Gly

1 . 5

<210> 81

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<400> 81

Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 82

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

[0063]

<221> MOD\_RES

<222> (18).. (18)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (26).. (26)

<223> 磷酸化

<400> 82

Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Ala	Lys	Thr	Asp	His	Gly	Ala	Glu	Ile	Val	Tyr
1				5						10					15

Lys	Ser	Pro	Val	Val	Ser	Gly	Asp	Thr	Scr	Pro	Arg	His	Leu
			20					25					30

<210> 83

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8).. (8)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11).. (11)

<223> 磷酸化

<220>

[0064]

<221> MOD\_RES  
 <222> (14).. (14)  
 <223> 磷酸化

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21).. (21)  
 <223> 磷酸化

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (23).. (23)  
 <223> 磷酸化

<400> 83

Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly  
 1                    5                    10                    15

Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg  
                   20                    25                    30

<210> 84  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> tau肽

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11).. (11)  
 <223> 磷酸化

<220>

[0065]

<221> MOD\_RES

<222> (15)..(15)

<223> 磷酸化

<400> 84

Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro  
1                   5                   10                   15

Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met  
                  20                   25                   30

<210> 85

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<400> 85

Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gln Tyr Ser Ser  
1                   5                   10                   15

Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr  
                  20                   25

<210> 86

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

[0066]

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (18)..(18)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> 磷酸化

<400> 86

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  
                  20                    25                    30

<210> 87

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<400> 87

Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu  
1                    5                    10                    15

Ser Pro Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly  
                  20                    25                    30

[0067]



<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<400> 90

Gly	His	Val	Thr	Gln	Ala	Arg	Met	Val	Ser	Lys	Ser	Lys	Asp	Gly	Thr
1				5					10					15	

Gly	Ser	Asp	Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Lys
			20					25					30	

<210> 91

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (26)..(26)

<223> 磷酸化

<400> 91

Lys	Ile	Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	Gly	Gln	Lys	Gly	Gln
1				5					10					15	

Ala	Asn	Ala	Thr	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Lys
			20					25					30	

[0069]

- <210> 92
- <211> 31
- <212> PRT
- <213> 人工
  
- <220>
- <223> tau肽
  
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (2).. (2)
- <223> 磷酸化
  
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (5).. (6)
- <223> 磷酸化
  
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (18).. (20)
- <223> 磷酸化
  
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (23).. (23)
- <223> 磷酸化
  
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (26).. (26)
- <223> 磷酸化
  
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (29).. (29)
- <223> 磷酸化

[0070]



<220>

<221> MOD\_RES

<222> (26)..(26)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (28)..(29)

<223> 磷酸化

<400> 93

Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys
1				5					10					15	

Val	Ala	Val	Val	Arg	Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys
			20					25					30	

<210> 94

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)..(23)

<223> 磷酸化

<400> 94

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

[0072]

Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro  
 20 25 30

<210> 95  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> tau肽

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (24)..(24)  
 <223> 磷酸化

<400> 95

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

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

<210> 96  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> tau肽

[0073]



Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile  
 20 25 30

<210> 98

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<400> 98

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

Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala  
 20 25 30

<210> 99

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

[0075]

<222> (7).. (7)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11).. (11)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14).. (15)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20).. (20)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23).. (24)

<223> 磷酸化

<400> 99

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

Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val  
                  20                    25                    30

<210> 100

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工

<220>

[0076]

<223> tau肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(3)

<223> 磷酸化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223> 磷酸化

<400> 100

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

Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
                  20                    25                    30

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<400> 101

His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp  
1                    5                    10                    15

<210> 102

<211> 13

[0077]

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<400> 102

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

<210> 103

<211> 186

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> tau肽

<400> 103

Glu Ser Pro Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly  
1                    5                    10                    15

Ser Glu Thr Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr  
                  20                    25                    30

Ala Pro Leu Val Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln  
                  35                    40                    45

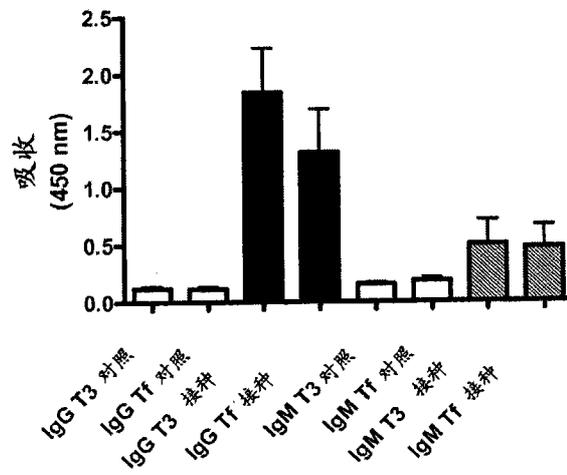
Pro His Thr Glu Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile  
50                    55                    60

Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln

[0078]

65	70	75	80
Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys	85	90	95
Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly	100	105	110
Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro	115	120	125
Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro	130	135	140
Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly	145	150	155
Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr	165	170	175
Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg	180	185	

**A** 对 Tau210-216[P-Thr212-Ser214] - TT947-967 的免疫应答



**B** 对 TT947-967的免疫应答

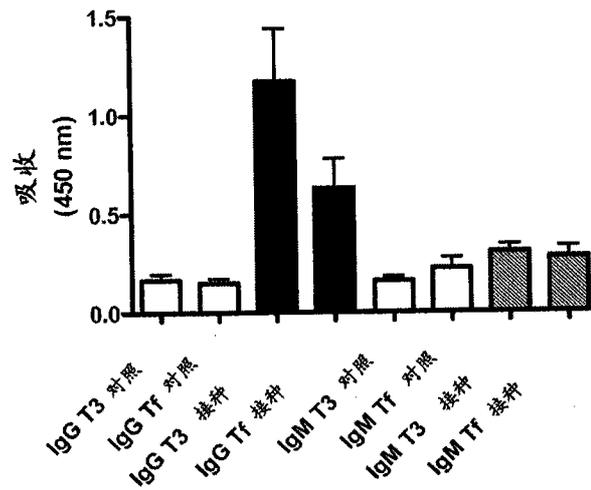
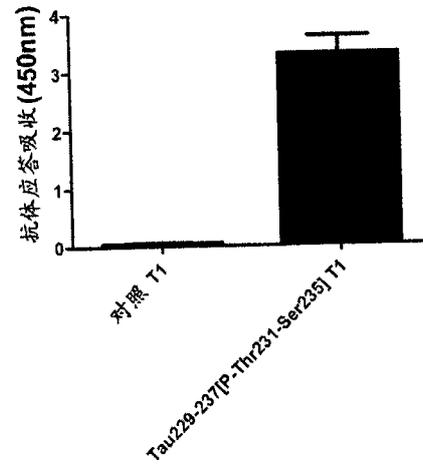
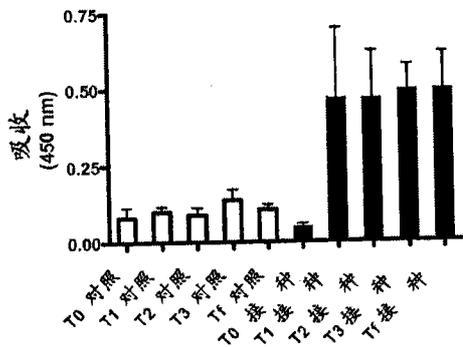


图 1A-1B

使用 Tau229-237[P-Thr231-Ser235]-GPSL-TT947-967 免疫的小鼠抗体应答

A 对Tau260-264[P-Ser262] - TT947-967 的IgG 免疫应答



B 对TT947-967的IgG 免疫应答

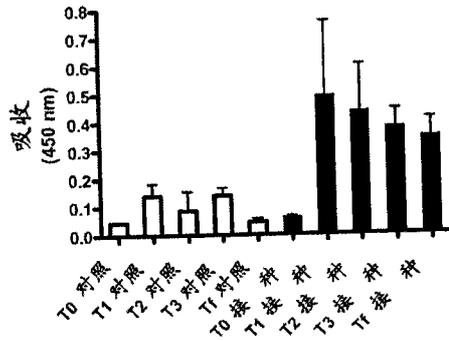


图 3

C 对Tau260-264[P-Ser262]的IgG 免疫应答

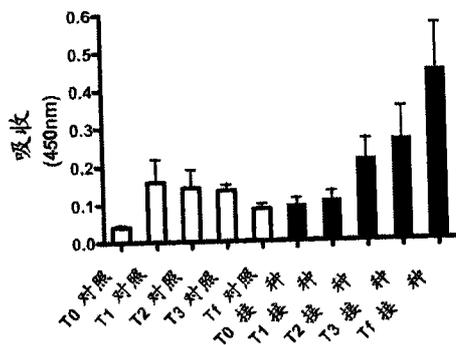


图 2A-2C

使用Tau379-408[Asp396, 404]  
免疫的小鼠抗体应答

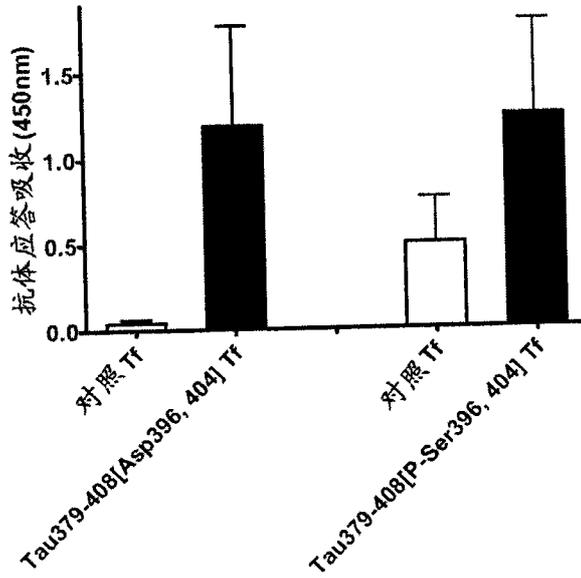


图 4

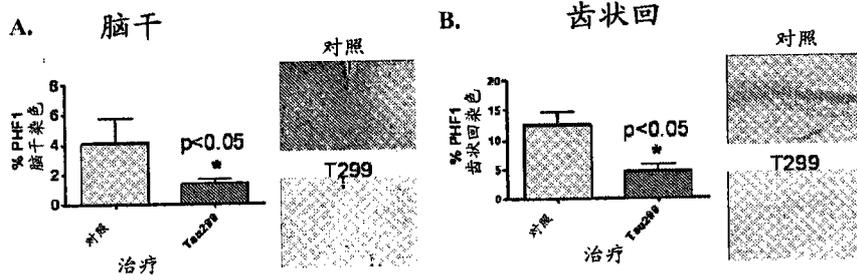


图 5A-5B

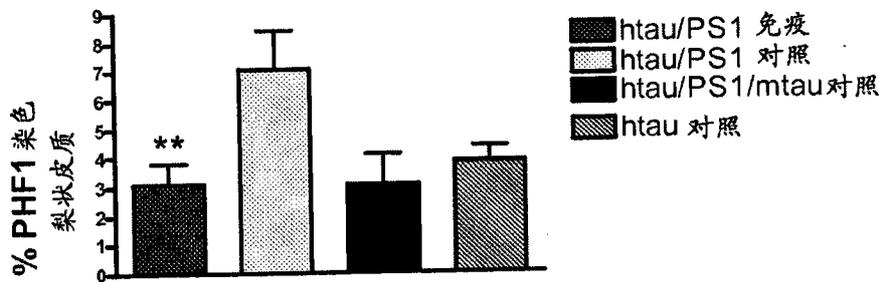


图 6

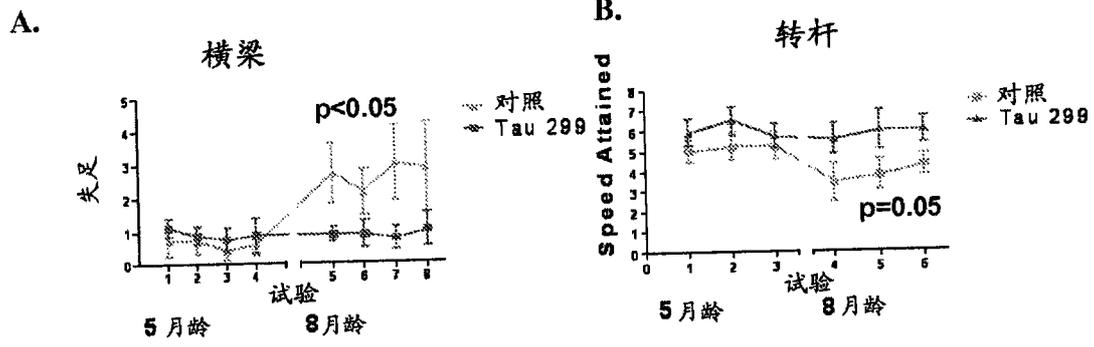


图 7A-7B

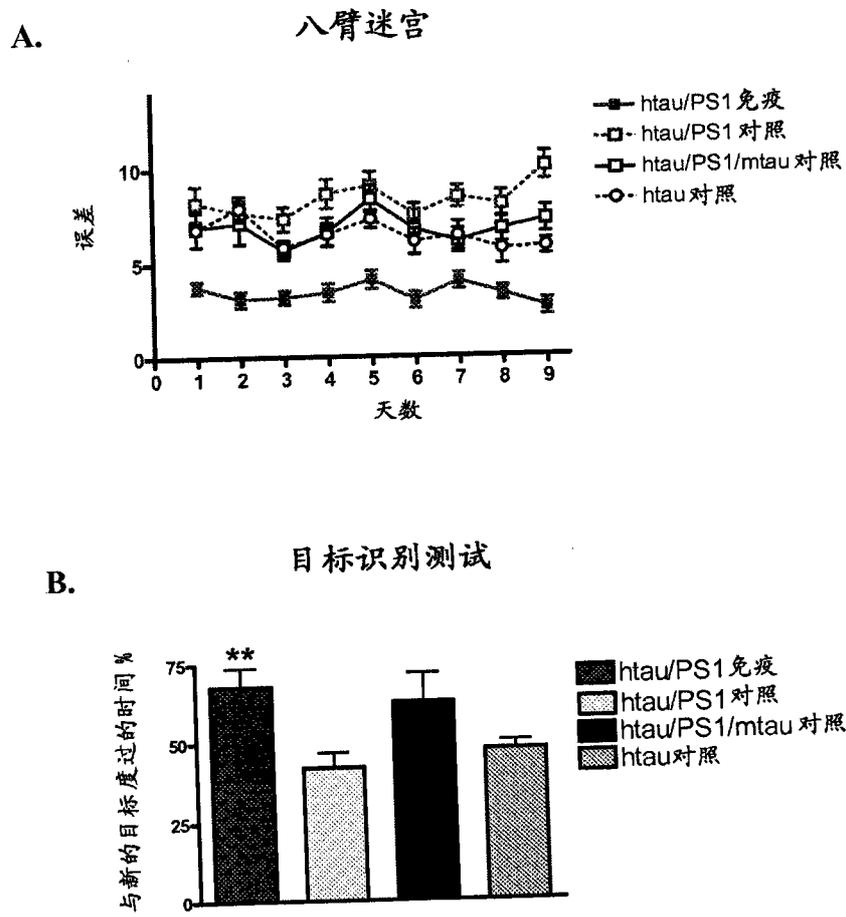


图 8A-8B

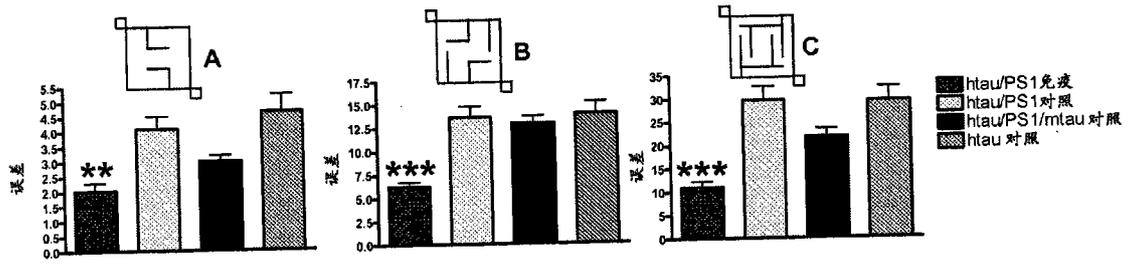


图 9A-9C

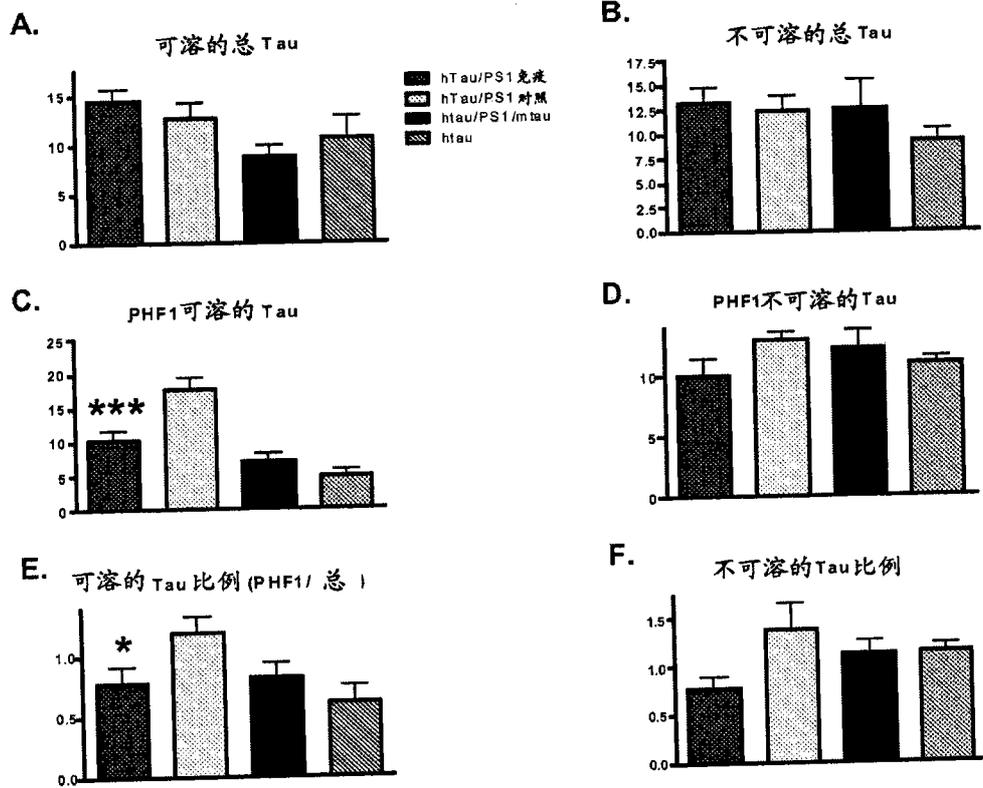


图 10A-10F

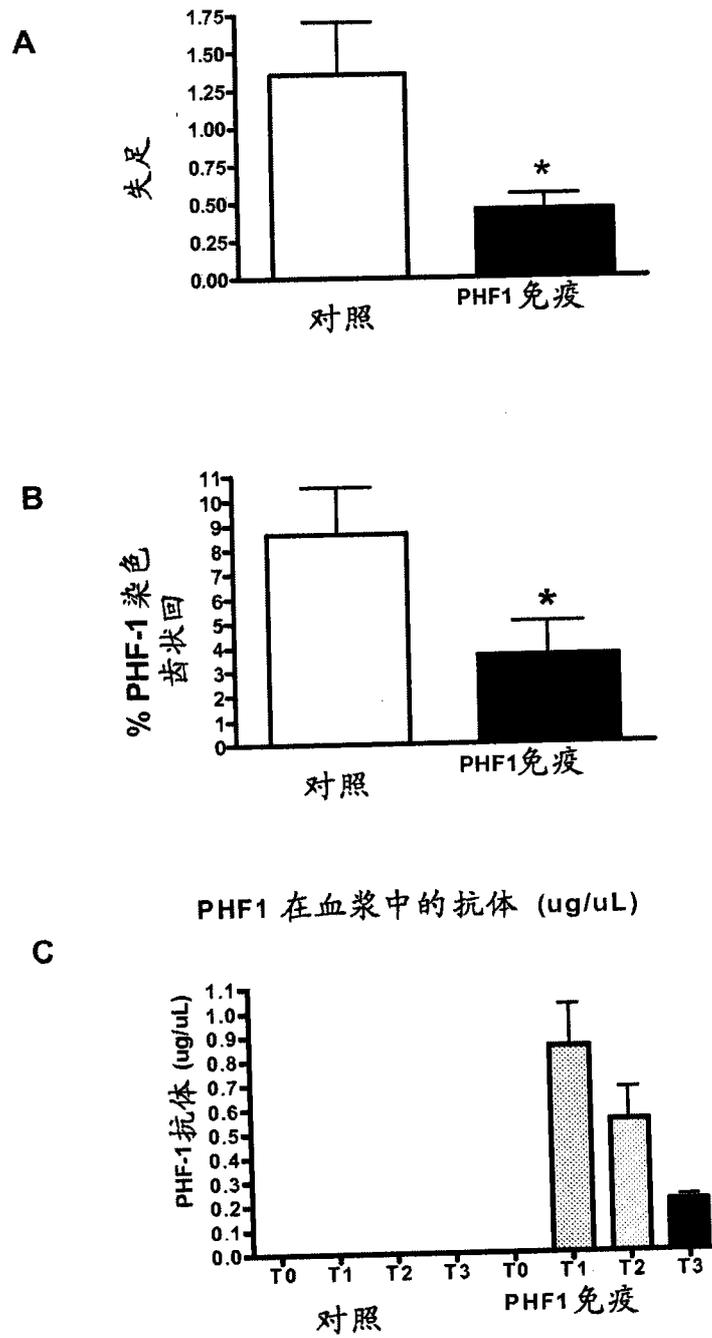


图 11A-11C

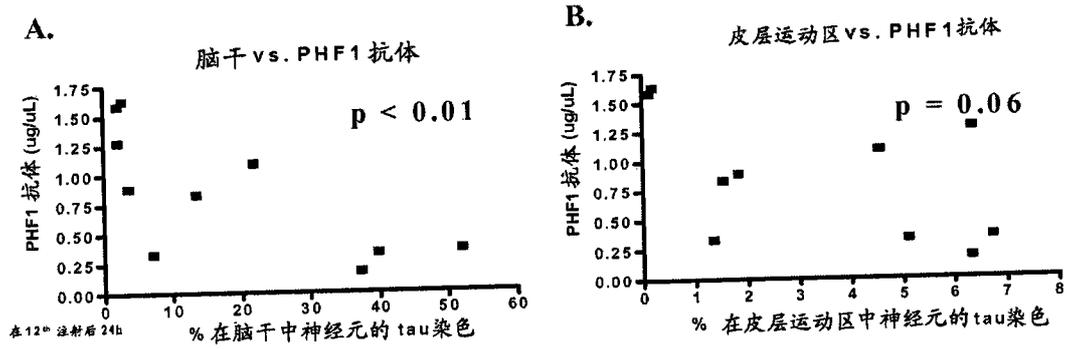


图 12A-12B

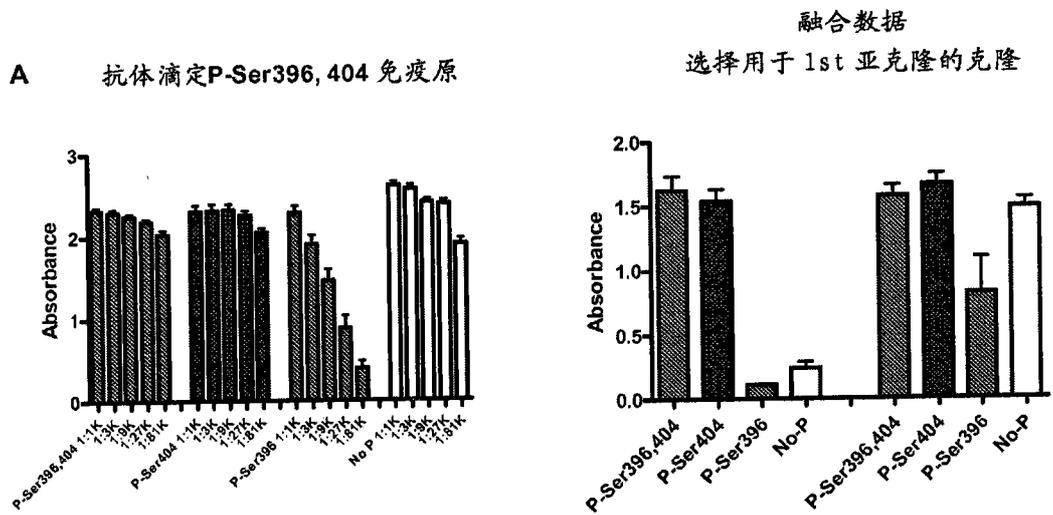


图 13A-13B

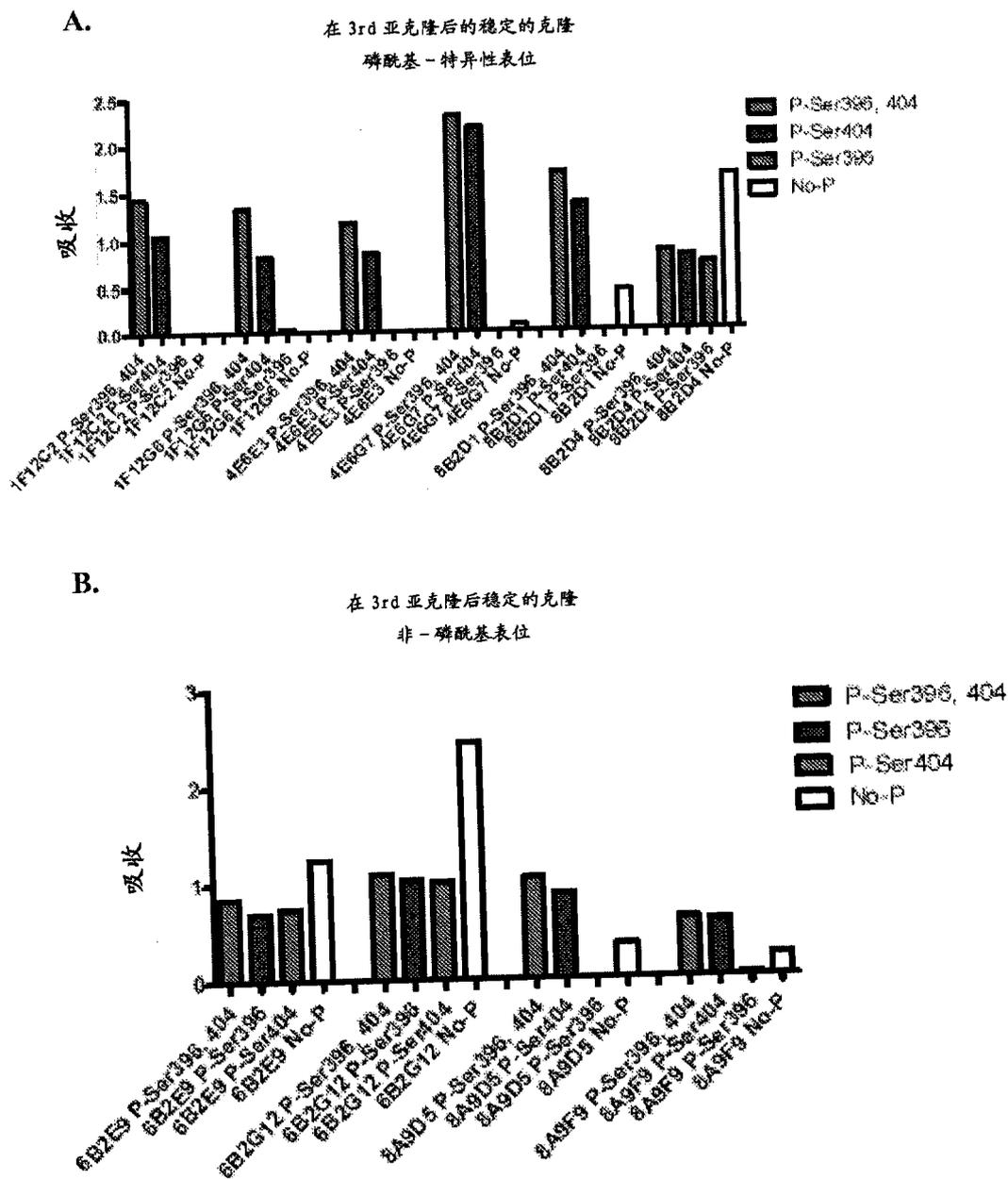


图 14A-14B

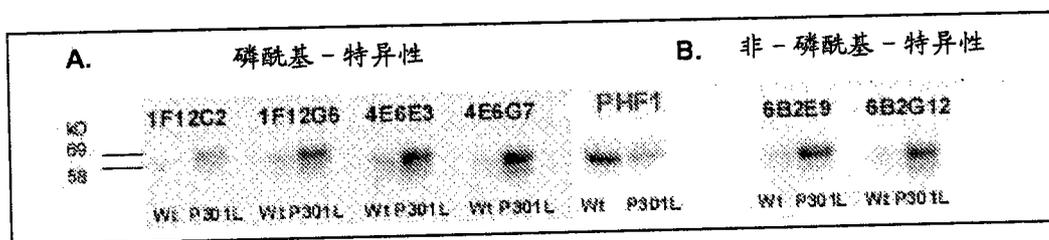


图 15A-15B

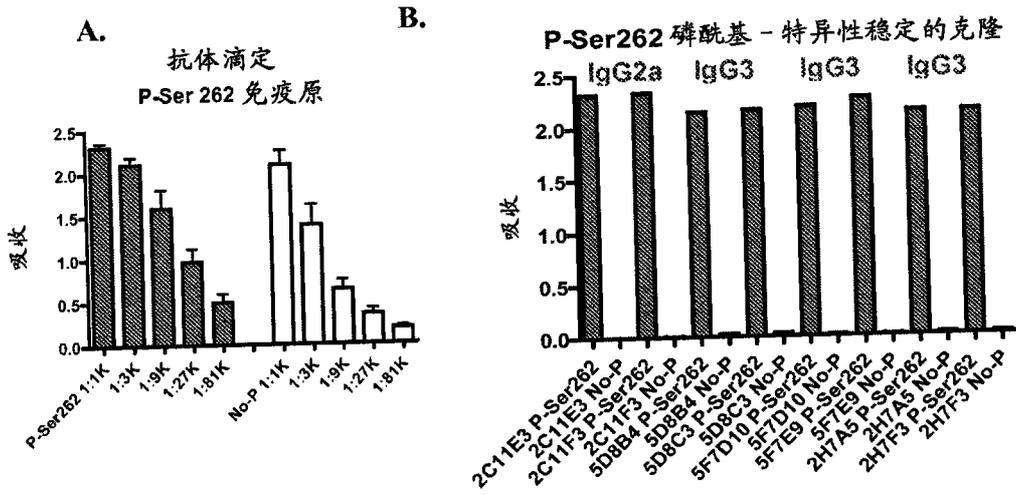


图 16A-16B

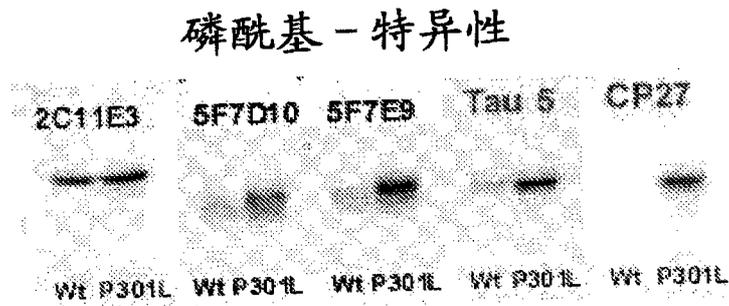


图 17

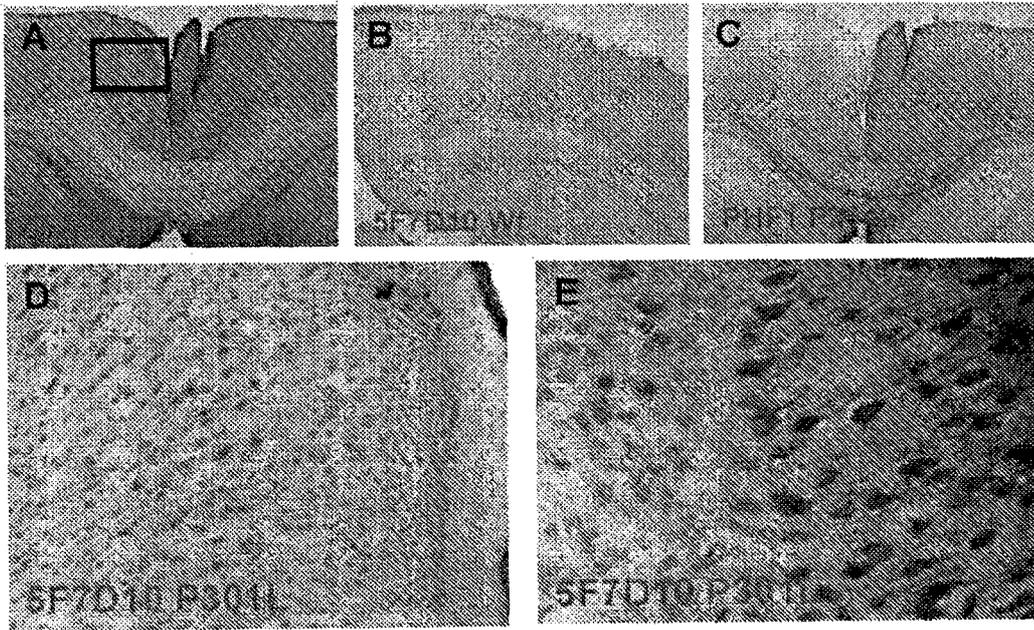


图 18A-18E

专利名称(译)	病理TAU蛋白的免疫靶向		
公开(公告)号	<a href="#">CN102596221A</a>	公开(公告)日	2012-07-18
申请号	CN201080036213.X	申请日	2010-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	纽约大学		
申请(专利权)人(译)	纽约大学		
当前申请(专利权)人(译)	纽约大学		
发明人	E·M·西瓜德森		
IPC分类号	A61K38/17 C07K14/47 A61K39/395 A61P25/28 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2821 A61K2039/507 A61K39/3955 A61K2039/505 A61K39/0005 C07K16/18 A61K39/0007 A61K39/39 A61K39/395 C07K14/4711 C07K2317/20 C07K2317/76 A61P21/00 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28		
代理人(译)	李进 刘健		
优先权	61/185895 2009-06-10 US		
其他公开文献	CN102596221B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及在有效地治疗、预防或诊断阿尔茨海默病或其他tau蛋白病的条件下通过施用识别免疫原性tau表位的免疫原性tau肽或抗体，来在受试者中治疗、预防和诊断阿尔茨海默病或其他tau蛋白病的方法和组合物。本发明还公开促进从受试者脑清除聚集体和在受试者中减缓tau病理相关的行为表型进展的方法。

SEQ ID NO:	名称	序列
SEQ ID NO: 2	Tau210-216 [P-Thr212 - Ser214]	SRT*PS*LP
SEQ ID NO: 3	Tau260-264 [P-Ser260]	IGS*TE
SEQ ID NO: 4	Tau229-237 [P-Thr231 - Ser235]	VRT*PPKS*PS
SEQ ID NO: 5	Tau394-406 [P-Ser396,404]	YKS*PVVSGDTS*PR
SEQ ID NO: 6	Tau192-221 [P-Thr212 - Ser214]	GDRSGYSSPGSPGTPGSRRT*PS*LPTPPTR
SEQ ID NO: 7	Tau192-221 [P-Ser199, 202, 214, Thr205,212]	GDRSGYSS*PGS*PGT*PGRSRT*PS*LPTPPTR
SEQ ID NO: 8	Tau192-221 [P-Ser199,214 Thr212,217]	GDRSGYSS*PGSPGTPGSRRT*PS*LPT*PPTR
SEQ ID NO: 9	Tau192-221 [P-Ser202, Thr205]	GDRSGYSSPGS*PGT*PGRSRT*PS*LPTPPTR
SEQ ID NO: 10	Tau200-229 [P-Thr212 - Ser214]	PGSPGTPGSRRT*PS*LPTPPTR*PKK*VAVV
SEQ ID NO: 11	Tau322-358 [P-Ser324,356]	CGS*LGNIHHKPGGGQVEVSEKLDKDRVQSKIGS*LD
SEQ ID NO: 12	Tau260-271 [P-Ser262]	IGS*TENLKHQPG
SEQ ID NO: 13	Tau386-408 [P-Ser396, Ser404]	TDHGAEIVYKS*PVVSGDTS*PRHL
SEQ ID NO: 14	Tau48-71 [P-Thr50,69]	LQT*PTEDGSEEPGSETDAKST*PT
SEQ ID NO: 15	Tau111-115 [P-Ser113]	TPS*LE
SEQ ID NO: 16	Tau151-155 [P-Thr153]	IAI*PR
SEQ ID NO: 17	Tau173-177 [P-Thr175]	AKT*PP
SEQ ID NO: 18	Tau203-219 [P-Thr205,212,217 - Ser208,210,214]	PGT*PGS*RS*RT*PS*LPT*PP
SEQ ID NO: 19	Tau233-237 [P-Thr235]	PKS*PS
SEQ ID NO: 20	Tau256-264 [P-Ser258,262]	VKS*KIGS*TE
SEQ ID NO: 21	Tau287-291 [P-Ser289]	VQS*KC