

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710126990.3

[51] Int. Cl.
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月23日

[11] 公开号 CN 101108881A

[22] 申请日 2007.7.4

[21] 申请号 200710126990.3

[30] 优先权

[32] 2006.7.4 [33] EP [31] 06116550.2

[71] 申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 B·波尔曼 C·采奇

J·格拉赫-韦克 F·格吕宁格尔

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书2页 说明书36页 附图5页

[54] 发明名称

识别磷酸化多肽的抗体

[57] 摘要

本发明涉及抗体、生产该抗体的杂交瘤、包含该抗体的试剂盒以及用于诊断神经障碍的方法，其中所述抗体识别由 Ser - Ile - A1 - A2 - A3 - A4 - Ser (PO₃H₂) - Pro - Gln - Leu - Ala - Thr - Leu - Ala - A5 组成的表位，而不结合由 Ser - Ile - A1 - A2 - A3 - A4 - Ser - Pro - Gln - Leu - Ala - Thr - Leu - Ala - A5 组成的表位，其中 A1 是 Asp 或 Asn，A2 是 Met 或 Leu，A3 是 Val 或 Leu，A4 是 Asp 或 Glu，而 A5 是 Asp 或 Glu。

1. 抗体或其片段，其结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位，而不结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位，其中 A1 是 Asp 或 Asn，A2 是 Met 或 Leu，A3 是 Val 或 Leu，A4 是 Asp 或 Glu，而 A5 是 Asp 或 Glu。

2. 权利要求 1 的抗体，其中 A1 是 Asp，A2 是 Met，A3 是 Val，A4 是 Asp，而 A5 是 Asp。

3. 权利要求 1 的抗体，其中 A1 是 Asn，A2 是 Leu，A3 是 Leu，A4 是 Glu，而 A5 是 Glu。

4. 权利要求 1 或 2 的抗体，其中抗体结合含磷酸-Ser422 的 tau，而不结合含非磷酸化 Ser422 的 tau。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项的抗体，其中抗体结合含磷酸-Ser1808 的 MAP2，而不结合含非磷酸化 Ser1808 的 tau。

6. 权利要求 2 的抗体，其对由 Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp 组成的肽的 Kd 值低于 100 nM。

7. 权利要求 1-6 中任一项的抗体，其中抗体是单克隆抗体。

8. 权利要求 1-7 中任一项的抗体，其中抗体是由杂交瘤 DSM ACC2762 或 DSM ACC2763 产生的。

9. 用于诊断神经障碍的方法，该方法包括

(a) 将样品与权利要求 1-8 的抗体接触；和

(b) 检测抗体和 tau 或 MAP2 之间所形成的复合物。

10. 权利要求 9 的方法，其中神经障碍是阿尔茨海默氏病。

11. 检测含磷酸-Ser422 的 tau 的方法，该方法包括

(a) 将样品与权利要求 1-8 的抗体接触；和

(b) 检测抗体和 tau 之间所形成的复合物。

12. 检测含磷酸-Ser1808 的 MAP2 的方法，该方法包括

- (a) 将样品与权利要求 1-8 的抗体接触；和
- (b) 检测抗体和 MAP2 之间所形成的复合物。

13. 权利要求 11 或 12 的方法，其中通过 western 印迹、免疫组织化学或 ELISA 检测复合物。

14. 权利要求 1-8 中任一项的抗体在诊断神经障碍中的用途。

15. 权利要求 15 的用途，其中神经障碍是阿尔茨海默氏病。

16. 权利要求 1-8 中任一项的抗体在检测含磷酸-Ser422 的 tau 中的用途。

17. 权利要求 1-8 中任一项的抗体在检测含磷酸-Ser1808 的 MAP2 中的用途。

18. 用于诊断神经障碍的试剂盒，其包含根据权利要求 1-8 中任一项的抗体。

19. 权利要求 18 的试剂盒，其中神经障碍是阿尔茨海默氏病。

20. 用于检测含磷酸-Ser422 的 tau 的试剂盒，其包含根据权利要求 1-8 中任一项的抗体。

21. 用于检测含磷酸-Ser1808 的 MAP2 的试剂盒，其包含根据权利要求 1-8 中任一项的抗体。

22. 生产根据权利要求 1-8 中任一项的抗体的细胞。

23. 权利要求 22 的细胞，其中细胞是杂交瘤。

24. 权利要求 23 的细胞，其中杂交瘤是 DSM ACC2762 或 DSM ACC2763。

识别磷酸化多肽的抗体

发明领域

本发明涉及一种抗体，其结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位，而不结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位，其中 A1 是 Asp 或 Asn，A2 是 Met 或 Leu，A3 是 Val 或 Leu，A4 是 Asp 或 Glu，而 A5 是 Asp 或 Glu。

发明背景

阿尔茨海默氏病 (AD) 是最常见的成年发作型痴呆。当前没有可用于 AD 诊断的可靠的生物化学试验或生物标记物，仅能在死后做出确凿诊断。

死后脑的神经病理检查显示在脑特征性区域中有大量的细胞外淀粉样蛋白斑和细胞内神经纤维缠结 (NFT)。NFT 沉积较斑块累积与疾病的严重性更为相关。

NFT 包括由微管相关蛋白 tau 组成的成对螺旋丝 (PHF) (Delacourte, A, J., *Neurol. Sci.* 76 (1986) 173-180; Kosik, K., *PNAS* 83 (1986) 4044-4048; Kondo, J., *Neuron* 1 (1988) 82; Wood, J., *PNAS* 83 (1986) 4040-4043)。tau 的体内功能是在神经元的轴突区室内促进微管装配和稳定性 (Lewis, S., *Nature* 342 (1989) 498-505)。

Tau 是高度可溶性蛋白质，无论什么情况下都不倾向聚集成丝。然而，在 AD 中，tau 变得过度磷酸化 (hyperphosphorylated)。这种过度磷酸化引发聚集过程，结果形成 PHF，并最终形成 NFT。磷酸化是 tau 的正常特征，并且是调节与微管结合的控制机理的一部分 (Lovestone, S., *Biol. Psychiatry* 45(1999) 995-1003)。

Tau 分子内有大量潜在的磷酸化位点，这些位点位于其微管结合结构

域侧翼的两个区域内。这些位点上的磷酸化是良性的，并不导致 tau 聚集。在 AD 中，发现了离散的多个其他磷酸化表位（包含至少一个磷酸化氨基酸的表位），正是过度磷酸化或异常磷酸化最有可能起始纤维化过程。从而对导致 PHF-tau 形成机理的理解需要这些磷酸化位点的知识。

通过从 AD 脑中分离和表征 PHF，已经鉴定了发生在 AD 中的 tau 异常磷酸化表位(Hasegawa, M., J. Biol. Chem. 267 (1992) 17047-17054; Cripps, D., J. Biol. Chem. 281 (2006) 10825-10838)。这些磷酸化表位之一发生在接近 tau 蛋白 C 末端的 Ser422。Ser422 的磷酸化与 NFT 形成紧密联系(Jicha, G., J. Neurochem 69 (1997) 2087-2095)。该研究小组在细胞培养实验中显示 tau 在 Ser422 处的磷酸化导致 tau 溶解性降低，暗示着其在聚集过程起始步骤中的作用。Ser422 突变成丙氨酸消除了这种效应(Ferrari, A., J. Biol. Chem. 278 (2003) 40162-40168)。

tau 在 Ser422 处的磷酸化可能是 AD 的灵敏标记物，这在使用抗此磷酸化表位的多克隆抗体的早期研究中已经提出(Bussiere, T., Acta. Neuropathol. 97 (1999) 221-230)。然而，直到现在还一直没有该磷酸化表位的高亲和力、高选择性单克隆抗体。这样的抗体必须能够在非磷酸化 tau 以及在其它病原性和非病原性表位上磷酸化的 tau 的高背景中识别在 Ser422 处磷酸化的 tau。高度的选择性对于允许清楚区别 AD 中的病理性和非病理性事件是至关重要的。

许多出版物都指向单磷酸化表位即磷酸-Ser422 在 tau 病理发展中的重要性。

另外，来自 NFT 或正常脑的 tau 质谱分析显示该磷酸化表位是 PHF-tau 所独有的(Hasegawa, M., J. Biol. Chem. 267 (1992) 17047-17054, Cripps, D., J. Biol. Chem. 281 (2006) 10825-10838)。

在 PHF-tau（成对螺旋丝-tau）中有许多磷酸化表位，并且已知识别一个或多个这些磷酸化表位的几个单克隆抗体，例如，TG3 (pThr231)、PHF-1 (pSer396/pSer404)、12E8 (pS262 /pS356)、AT8 (pSer202/pT205)、AT100 (pSer212/pThr214)、AT180 (pThr231)和 AT270 (p181) (Seubert, P.,

J. Biol.Chem. 270 (1995) 18917-18922, Greenberg, S., J. Biol. Chem. 267 (1992) 564-569, Jicha, G., J.Neurochem. 69 (1997) 2087-2095, Mercken, M., Acta. Neuropathol. 84 (1992) 265-272).

这些抗体中的一些, 例如 12E8、AT180 和 AT270, 也识别健康脑的 tau, 因而不是真正的疾病状态特异性的。所有这些抗体(除了 12E8)是使用纯化的 PHF-tau 作为免疫原产生的, 因此由这些抗体所识别的抗原性表位很复杂, 包括双重/多重磷酸化, 或者构象和磷酸化表位的组合。因此这些抗体在分析单个磷酸化表位对 tau 病理发展的贡献方面作用受限。

尽管许多多克隆抗体是针对单个磷酸化表位产生的, 但是其中许多抗体显示与正常 tau 具有一定程度的交叉反应性。以前已经描述了一个单克隆抗体, AP422, 其是针对含磷酸-Ser422 的 tau 衍生磷酸肽产生的。然而, 该抗体显示与正常 tau 的弱交叉反应性(Hasegawa, M., FEBS Letters 384 (1996) 25-30)。

为了评估此磷酸化表位对 tau 病理的贡献, 以及研发用于测定来自 AD 患者脑组织中的该磷酸 tau 变体水平的免疫测定, 需要显示与正常 tau 无交叉反应性的高亲和力、高选择性的单克隆抗体。

发明内容

本发明提供一种抗体, 其结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位, 而不结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位, 其中 A1 是 Asp 或 Asn, A2 是 Met 或 Leu, A3 是 Val 或 Leu, A4 是 Asp 或 Glu, 而 A5 是 Asp 或 Glu。此外, 本发明提供一种结合含磷酸-Ser422 的 tau, 而不结合含非磷酸化 Ser422 的 tau 的抗体。此外, 本发明提供检测含磷酸-Ser422 的 tau 的方法。此外, 本发明提供该抗体在检测含磷酸-Ser422 的 tau 中的用途。此外, 本发明提供检测含磷酸-Ser422 的 tau 的试剂盒。此外, 本发明提供生产该抗体的细胞。

更具体地, 本发明提供如下(1)至(24)。

(1) 抗体或其片段，其结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位，而不结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位，其中 A1 是 Asp 或 Asn，A2 是 Met 或 Leu，A3 是 Val 或 Leu，A4 是 Asp 或 Glu，而 A5 是 Asp 或 Glu。

(2) (1) 的抗体，其中 A1 是 Asp，A2 是 Met，A3 是 Val，A4 是 Asp，而 A5 是 Asp。

(3) (1) 的抗体，其中 A1 是 Asn，A2 是 Leu，A3 是 Leu，A4 是 Glu，而 A5 是 Glu。

(4) (1) 或 (2) 的抗体，其中该抗体结合含磷酸-Ser422 的 tau 而不结合含非磷酸化 Ser422 的 tau。

(5) (1)-(4) 的抗体，其中该抗体结合含磷酸-Ser1808 的 MAP2 而不结合含非磷酸化 Ser1808 的 tau。

(6) (2) 的抗体，其中其对由 Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp 组成的肽的 Kd 值低于 100 nM。

(7) (1)-(6) 的抗体，其中该抗体是单克隆抗体。

(8) (1)-(7) 的抗体，其中该抗体是由杂交瘤 DSM ACC2762 或 DSM ACC2763 产生的。

(9) 用于诊断神经障碍的方法，该方法包括

(a) 将样品与(1)-(8)的抗体接触；和

(b) 检测抗体和 tau 或 MAP2 之间所形成的复合物。

(10) (9) 的方法，其中神经障碍是阿尔茨海默氏病。

(11) 检测含磷酸-Ser422 的 tau 的方法，该方法包括

(a) 将样品与(1)-(8)的抗体接触；和

(b) 检测抗体和 tau 之间所形成的复合物。

(12) 检测含磷酸-Ser1808 的 MAP2 的方法，该方法包括

(a) 将样品与(1)-(8)的抗体接触；和

(b) 检测抗体和 MAP2 之间所形成的复合物。

(13) (11)或(12)的方法,其中通过 western 印迹、免疫组织化学或 ELISA 检测复合物。

(14) (1)-(8)的抗体在诊断神经障碍中的用途。

(15) (14)的用途,其中神经障碍是阿尔茨海默氏病。

(16) (1)-(8)的抗体在检测含磷酸-Ser422 的 tau 中的用途。

(17) (1)-(8)的抗体在检测含磷酸-Ser1808 的 MAP2 中的用途。

(18) 用于诊断神经障碍的试剂盒,其包含(1)-(8)的抗体。

(19) (18)的试剂盒,其中神经障碍是阿尔茨海默氏病。

(20) 用于检测含磷酸-Ser422 的 tau 的试剂盒,其包含(1)-(8)的抗体。

(21) 用于检测含磷酸-Ser1808 的 MAP2 的试剂盒,其包含(1)-(8)的抗体。

(22) 生产(1)-(8)的抗体的细胞。

(23) (22)的细胞,其中该细胞是杂交瘤。

(24) (23)的细胞,其中杂交瘤是 DSM ACC2762 或 DSM ACC2763。

本发明提供一种抗体,其结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 (SEQ ID NO: 9)组成的表位,而不结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 (SEQ ID NO: 8)组成的表位,其中 A1 是 Asp 或 Asn, A2 是 Met 或 Leu, A3 是 Val 或 Leu, A4 是 Asp 或 Glu, 而 A5 是 Asp 或 Glu。在本发明中,“Ser(PO₃H₂)”是指磷酸化的丝氨酸。

在一个实施方案中,本发明的抗体结合由 Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp (SEQ ID NO: 6)组成的表位,而不结合由 Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp (SEQ ID NO: 4)组成的表位。

在优选的实施方案中,本发明提供结合含磷酸-Ser422 的磷酸化 tau 而不结合含非磷酸化 Ser422 的 tau 的抗体。

tau 有几种剪接异构体,如,胎儿-tau、Tau-A、Tau-B、Tau-C、Tau D、Tau-E、Tau-F (Swiss-Prot; 录入名: TAU_HUMAN, 初级登录号: P10636)。

在本发明中, 优选地, tau 是具有 SEQ ID NO: 1 序列的多肽。术语“tau”也包含具有 SEQ ID NO: 1 序列的多肽的剪接异构体、变体、衍生物、同源物或片段。在 tau 是具有 SEQ ID NO: 1 序列的多肽的剪接异构体、变体、衍生物、同源物或片段的情况下, 优选 tau 包含序列 Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp。

术语“磷酸化 tau”指其中至少一个氨基酸被磷酸化的 tau。

术语“磷酸-Ser422”指根据由 SEQ ID NO: 1 氨基酸序列中的位置所定义的位置 422 上的磷酸化丝氨酸。术语“磷酸-Ser422”也包含剪接异构体、衍生物、变体、同源物或片段中的磷酸化丝氨酸, 其对应于具有 SEQ ID NO: 1 序列的多肽的 422 位上的磷酸化丝氨酸。

优选本发明的抗体对含磷酸-Ser422 的 tau 具有高结合亲和力。术语“高结合亲和力”, 当在文中所使用时, 是指抗体对含磷酸-Ser422 的 tau 的解离常数 K_d 低于 100 nM。可通过本领域那些技术人员已知的方法测定抗体的 K_d 。例如, K_d 可在实施例 4 中所述的条件下使用 Biacore 表面等离子共振测定。优选使用由 Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp 组成的肽用于测定 K_d 。

在一个实施方案中, 本发明的抗体结合由 Ser-Ile-Asn-Leu-Leu-Glu-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Glu (SEQ ID NO: 7) 组成的表位, 而不结合由 Ser-Ile-Asn-Leu-Leu-Glu-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Glu (SEQ ID NO: 5) 组成的表位。

在优选的实施方案中, 本发明的抗体结合含磷酸-Ser1808 的 MAP2 (微管相关蛋白 2), 而不结合含非磷酸化 Ser1808 的 MAP2。

存在少数的 MAP2 异构体, 如异构体 1、异构体 2 或异构体 3 (Swiss-Prot; 录入名: MAP2_HUMAN, 最初登录号: P11137)。在本发明中, 优选地, MAP2 是具有 SEQ ID NO: 2 序列的多肽。术语“MAP2”也包含具有 SEQ ID NO: 2 序列的多肽的剪接异构体、变体、衍生物、同源物或片段。在 MAP2 是具有 SEQ ID NO: 2 序列的多肽的剪接异构体、变体、衍生物、同源物或片段的情况下, 优选 MAP2 具有 Ser-Ile-Asn-Leu-

Leu-Glu-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Glu 的序列。

术语“磷酸化 MAP2”指其中至少一个氨基酸被磷酸化的 MAP2。

术语“磷酸-Ser1808”指在根据由 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列中的位置所定义的位置 1808 上的磷酸化丝氨酸。术语“磷酸-Ser1808”也包含剪接异构体、衍生物、变体、同源物或片段中的磷酸化丝氨酸，其对应于具有 SEQ ID NO: 2 序列的多肽的 1808 位上的磷酸化丝氨酸。

可通过公知的方法测定抗体是否结合表位，如 western 印迹、酶免疫测定或表面等离子共振。由表位序列组成的多肽，包含表位序列的完整蛋白质或蛋白质的片段可用于测定结合。

本发明的抗体可以是多克隆或单克隆抗体。在优选的实施方案中，本发明的抗体是单克隆抗体。

术语“单克隆抗体”指从一组基本上同质的抗体中获得的抗体，即，除了小量存在的自然存在的突变体外，其中构成该组的抗体是同质的抗体组。

在优选的实施方案中，本发明的抗体是由杂交瘤 MAK<pTAU>M.2.5.2 或 MAK<pTAU>M.2.20.4 所产生的抗体。杂交瘤 MAK<pTAU>M.2.5.2 于 2006 年 3 月 15 日保藏在 DSMZ (德意志微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), 马舍尔欧德路(Mascheroderweg) 1b, D-38124 不伦瑞克(Braunschweig), 德国), 保藏号为 DSM ACC2762。杂交瘤 MAK<pTAU>M.2.20.4 于 2006 年 3 月 15 日保藏在 DSMZ (德意志微生物保藏中心, 马舍尔欧德路 1b, D-38124 不伦瑞克, 德国), 保藏号为 DSM ACC2763。

由杂交瘤 DSM ACC2762 (MAK<pTAU>M.2.5.2)或 DSM ACC2763 (MAK<pTAU>M.2.20.4)所产生的抗体对含磷酸-Ser422 的 tau 具有高亲和力和高选择性，而对含非磷酸化 Ser422 的 tau 没有交叉反应性。另外，由所述杂交瘤所产生的抗体结合含磷酸-Ser1808 的 MAP2，而不结合含非磷酸化 Ser1808 的 MAP2。这些抗体可用于检测含磷酸-Ser422 的 tau 或含磷酸-Ser1808 的 MAP2。由杂交瘤 DSM ACC2762 或 DSM ACC2763 所产生

的抗体适用于诊断神经疾病,如阿尔茨海默氏病。由杂交瘤 DSM ACC2762 或 DSM ACC2763 所产生的抗体也适用于检测含磷酸-Ser422 的 tau 或含磷酸-Ser1808 的 MAP2。

可使用已知技术,获得作为多克隆抗体或单克隆抗体的本发明抗体。例如,可通过杂交瘤方法 (Kohler G.和 Milstein C., Nature 256 (1975) 495-497)或重组方法(美国专利 No. 4,816,567)生产单克隆抗体。还可从噬菌体抗体文库中分离单克隆抗体(Clackson T., Nature 352(1991) 624-628)。

可基本上使用已知技术制备产生抗体的杂交瘤。例如,可使用下列方法:通过使用致敏抗原的常规免疫方法免疫动物以获得免疫细胞,然后通过常规细胞融合法将其与已知亲代细胞融合。通过常规筛选方法筛选融合细胞中产单克隆抗体的细胞。更具体地,可如下获得单克隆抗体。

首先,制备用作致敏抗原的具有 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 (A1 是 Asp 或 Asn, A2 是 Met 或 Leu, A3 是 Val 或 Leu, A4 是 Asp 或 Glu, 而 A5 是 Asp 或 Glu)序列的片段。该片段可通过化学合成或者通过培养含有编码该片段的基因的宿主细胞来制备。然后,将片段通过激酶进行磷酸化,例如, ERK2 激酶。包含该片段的完整蛋白质可也用作致敏抗原。在本发明中,优选的致敏抗原是 tau 的磷酸化片段,其具有序列 Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp。

对于用致敏抗原免疫的哺乳动物物种类型没有限制。不过,优选基于其与在细胞融合中欲使用的亲代细胞的相容性选择哺乳动物。一般地,可使用啮齿动物例如小鼠、大鼠、仓鼠或兔子,以及猴子。

对于用致敏抗原免疫动物,可使用已知的方法。可通过公知的方法用致敏的抗原免疫动物,如通过腹膜内或皮下将致敏抗原注射到哺乳动物内的常规方法。具体地,将致敏抗原用磷酸缓冲盐(PBS)、生理盐水等适当稀释,然后悬浮。将适当量的常规佐剂,例如,弗氏完全佐剂与悬浮液混合,如果需要的话。然后制备乳剂,用于间隔 4-21 天向哺乳动物施用几次。在免疫中可使用对致敏抗原适当的载体。

如上所述免疫哺乳动物。验证血清中靶抗体的滴度增加后，从哺乳动物中收集免疫细胞，然后进行细胞融合。脾细胞是优选的免疫细胞。

将哺乳动物骨髓瘤细胞用作与上述免疫细胞进行融合的亲代细胞。将要使用的优选的骨髓瘤细胞包括多种已知细胞系，例如，P3 (P3x63Ag8.653) (Kearney JF, 等, *J. Immunol.* 123, 1548-1550 (1979))、P3x63Ag8U.1 (Yelton DE, 等, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 81, 1-7 (1978))、NS-1 (Kohler, G和 Milstein, C. *Eur. J. Immunol.* 6, 511-519 (1976))、MPC-11 (Margulies, D. H. 等, *Cell* 8, 405-415 (1976))、SP2/0 (Shulman, M. 等, *Nature* 276, 269-270 (1978))、FO (deSt. Groth, S. F. 等, *J. Immunol. Methods* 35, 1-21 (1980))、S194 (Trowbridge, I. S., *J. Exp. Med.* 148, 313-323 (1978))及 R210 (Galfre, G. et al., *Nature* 277, 131-133 (1979))。

可基本上使用本领域技术人员已知的方法进行免疫细胞和上述骨髓瘤细胞之间的细胞融合，例如，由 Kohler 和 Milstein 所描述的方法(Kohler, G 和 Milstein, C., *Methods Enzymol.* 73: 3-46 (1981))。

例如，更具体地，可在细胞融合促进剂存在下在常规培养基中进行上述细胞融合。融合促进剂包括但不限于聚乙二醇 (PEG) 和仙台病毒 (HVJ)。如果需要的话，也可添加辅助物质如二甲基亚砜以提高融合效率。

可自行决定免疫细胞与骨髓瘤细胞的比例，优选地，每 1-10 个免疫细胞对 1 个骨髓瘤细胞。用于上述细胞融合的培养基包括，例如，适于上述骨髓瘤细胞系生长的培养基，如 RPMI 1640 培养基和 MEM 培养基，以及用于这类细胞培养的其它常规培养基。另外，也可组合使用血清补充物如胎牛血清(FCS)。

细胞融合如下进行。如上所述，将预定量的免疫细胞和骨髓瘤细胞在培养基中充分混合。一般地以 30%-60% (w/v) 的浓度向细胞悬液中添加预热至 37℃ 的 PEG 溶液 (例如，平均分子量约 1,000-6,000)，混合以产生融合细胞 (杂交瘤)。然后，相继向混合物中添加适当的培养基，将样品离心以除去上清液。该处理重复数次以除去多余的细胞融合促进剂和不利于杂交瘤生长的其它物质。

可通过将杂交瘤在常规选择性培养基中培养,进行所得杂交瘤的筛选,例如,次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶核苷(HAT)培养基。将在上述HAT培养基中的培养持续到足够长的时间(一般地,持续数天到数周)以杀死除期望杂交瘤之外的细胞(非融合细胞)。然后,通过常规的有限稀释法从杂交瘤中筛选能生产靶抗体的单个细胞克隆。

除了通过用抗原免疫非人动物制备上述杂交瘤的方法外,也可通过体外用致敏抗原使人淋巴细胞致敏、并将致敏的淋巴细胞与能永久分裂的人骨髓瘤细胞融合来获得人抗体(见,例如,日本专利申请 No. (JP-B) Hei 1-59878)。

可选地,可从产抗体的永生化细胞中获得人抗体。在该方法中,通过向包括全部人抗体基因的所有组成成分的转基因动物施用致敏抗原,制备生产抗体的细胞(见,例如 WO 94/25585、WO 93/12227、WO 92/03918 和 WO 94/02602)。

可将这样制备的生产单克隆抗体的杂交瘤在常规培养基中传代,并在液氮中长期贮藏。

例如,通过培养杂交瘤并从培养上清液中获得抗体的常规步骤,可从上述杂交瘤中制备单克隆抗体。

一旦从杂交瘤中获得单克隆抗体,也可以通过常规方法制备重组抗体。

本发明的抗体可以是标记的抗体。对于抗体的标记,可使用已知标记物如放射性物质(例如, ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 、 ^{14}C)、荧光染料(例如,荧光素、罗丹明、伞形酮)、酶(例如,荧光素酶、氧化酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖苷酶、溶菌酶、葡萄糖淀粉酶)、辅酶(例如生物素)或化学发光物质。可通过公知方法进行抗体的标记,如例如戊二醛法、马来酰亚胺法、吡啶二硫化物法或过碘酸(periodic acid)法。

本发明的抗体也可以是抗体的片段,只要该片段能结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位,而不结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位(A1 是 Asp 或 Asn, A2 是 Met 或 Leu, A3 是 Val 或

Leu, A4 是 Asp 或 Glu, 而 A5 是 Asp 或 Glu)。抗体的片段可以是, 但不限于, Fab、Fab'、Fv、F(ab')₂、scFv、sc(Fv)₂ 或双抗体。

优选地, 本发明的抗体与含有由 SEQ ID NO: 1 中的氨基酸位置所定义的 422 位磷酸化 Ser 的 tau 或其片段形成免疫复合物。更优选地, 所述 tau 或其片段从 AD 患者或患有存在 NFT 的任何其它神经障碍患者的尸检来源的脑组织中分离。优选地, 本发明的抗体与死于或者患有脑中不存在 NFT 的其它疾病的患者的尸检来源的脑材料不形成这样的免疫复合物。

本发明的抗体可通过检测磷酸化多肽而用于诊断神经障碍如阿尔茨海默氏病。本发明的抗体也可用于检测含序列 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 的磷酸化多肽, 其中 A1 是 Asp 或 Asn, A2 是 Met 或 Leu, A3 是 Val 或 Leu, A4 是 Asp 或 Glu, 而 A5 是 Asp 或 Glu, 如含磷酸-Ser422 的磷酸化 tau 或者含磷酸-Ser1808 的磷酸化 MAP2。

此外, 本发明提供生产本发明抗体的细胞。本发明的细胞可以是杂交瘤或重组细胞。

可通过上述常规方法获得生产本发明抗体的杂交瘤。在优选的实施方案中, 本发明的杂交瘤是杂交瘤 DSM ACC2762 或 DSM ACC2763。杂交瘤 DSM ACC2762 于 2006 年 3 月 15 日保藏在 DSMZ (德意志微生物保藏中心, 马舍尔欧德路 1b, D-38124 不伦瑞克, 德国), 保藏号为 DSM ACC2762。杂交瘤 DSM ACC2763 于 2006 年 3 月 15 日保藏在 DSMZ (德意志微生物保藏中心, 马舍尔欧德路 1b, D-38124 不伦瑞克, 德国), 保藏号为 DSM ACC2763。

可通过公知方法获得本发明的重组细胞。具体地, 可如下获得这样的重组细胞。

从产生抗体的杂交瘤中分离编码此抗体可变 (V) 区的 mRNA, 所述抗体结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位, 而不结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位, 其中 A1 是 Asp 或 Asn, A2 是 Met 或

Leu, A3 是 Val 或 Leu, A4 是 Asp 或 Glu, 而 A5 是 Asp 或 Glu。

对于 mRNA 分离, 首先通过常规方法制备总 RNA, 如胍超速离心法 (Chirgwin, J. M. 等, *Biochemistry* 18, 5294-5299 (1979)), 或者酸性硫氰酸胍-酚-氯仿 (AGPC) 法 (Chomczynski, P. 等, *Anal. Biochem.* 162, 156-159 (1987)), 然后使用 mRNA 纯化试剂盒 (Pharmacia) 等制备靶 mRNA。可选地, 可使用 QuickPrep mRNA 纯化试剂盒 (Pharmacia) 直接制备 mRNA。

使用反转录酶从所得到的 mRNA 中合成抗体 V 区的 cDNA。使用 AMV 反转录酶第一链 cDNA 合成试剂盒 (Seikagaku Co.) 等进行 cDNA 合成。可选地, 可通过 5'-RACE 法 (Frohman, M. A. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8998-9002 (1988); Belyavsky, A. 等, *Nucleic Acids Res.* 17, 2919-2932 (1989)), 使用 5'-Ampli FINDER RACE 试剂盒 (Clontech) 和 PCR 合成并扩增 cDNA。

从所得的 PCR 产物中纯化靶 DNA 片段, 然后与载体 DNA 相连以制备重组载体。可将该载体引入到大肠杆菌 (*E. coli*) 等菌株中, 选择用于制备目的重组载体的克隆。然后通过常规方法验证靶 DNA 核苷酸序列, 如双脱氧核苷酸链终止法。

一旦获得编码靶抗体 V 区的 DNA, 则将该 DNA 插入到含有期望抗体恒定区 (C 区) 编码 DNA 的表达载体中。

用于获得生产抗体的细胞的方法一般包括步骤: 将抗体基因插入到表达载体中, 以便基因在表达调控区如增强子和启动子的调控下表达; 并用所得的载体转化宿主细胞以表达抗体。可将编码 H 链和 L 链的多核苷酸分别插入到独立的表达载体内并共转染到宿主细胞中。可选地, 可将编码 H 链和 L 链的多核苷酸均插入到单个表达载体内并转染到宿主细胞内 (见, 例如 WO 94/11523)。宿主细胞没有限制, 只要该细胞能够生产抗体。例如, 细胞可以是 CHO、COS、NIH3T3、骨髓瘤、BHK、Hela、非洲绿猴肾细胞株系 (Vero)、两栖动物细胞、昆虫细胞、植物细胞或细菌细胞如大肠杆菌。

此外, 本发明提供诊断神经障碍的方法。诊断神经障碍的方法包括步

骤：(a) 将样品与本发明的抗体接触，和 (b) 检测抗体和 tau 或 Map2 之间所形成的复合物。

本发明进一步提供用于检测含磷酸-Ser422 的 tau 的方法。用于检测含磷酸-Ser422 的 tau 的方法包括：(a) 将样品与本发明的抗体接触；和 (b) 检测抗体和 tau 之间形成的复合物。

本发明进一步提供用于检测含磷酸-Ser1808 的 MAP2 的方法。用于检测含磷酸-Ser1808 的 MAP2 的方法包括：(a) 将样品与本发明的抗体接触；和 (b) 检测抗体和 MAP2 之间所形成的复合物。

如文中所使用的术语“神经障碍”，指与含磷酸-Ser422 的 tau 或含磷酸-Ser1808 的 MAP2 有关的疾病，如由含磷酸-Ser422 的 tau 或含磷酸-Ser1808 的 MAP2 所导致的疾病，或者在所述疾病的患者中检测到含磷酸-Ser422 的 tau 或含磷酸-Ser1808 的 MAP2。术语“神经障碍”包括但不限于：阿尔茨海默氏病、唐氏综合症(Down's Syndrome)、皮克病(Pick's Disease)、进行性核上性麻痹和皮质基底节变性。

尽管本发明方法中所使用的样品没有限制，只要有样品可能含有 tau 或 MAP2，优选从人中获得生物样品。生物样品包括但不限于：脑脊液、血清、血液、组织（例如，脑组织）和细胞（例如，脑细胞）。

可在允许在抗体和 tau 之间形成复合物或者在抗体和 MAP2 之间形成复合物的条件下，使样品与本发明的抗体接触。这样的条件为本领域技术人员公知。

可通过常规方式进行抗体和 tau 之间所形成复合物或者抗体和 MAP2 之间所形成复合物的检测，如 western 印迹、酶免疫测定如酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫测定、荧光免疫测定、发光免疫测定、免疫沉淀、免疫染色、免疫扩散和表面等离子共振生物传感器（如 BIAcore）。

本发明的方法可在体外或体内进行，不过，优选体外方法。

本发明也提供本发明抗体在诊断神经障碍如阿尔茨海默氏病中的用途。本发明也提供本发明的抗体在检测磷酸化多肽，如含磷酸-Ser422 的 tau 或含磷酸-Ser1808 的 MAP2 中的用途。

本发明的抗体可在体内或在体外使用。在优选的实施方案中，本发明的抗体在体外使用。

本发明提供包含抗体的试剂盒，所述抗体结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位，而不结合由 Ser-Ile-A1-A2-A3-A4-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-A5 组成的表位，其中 A1 是 Asp 或 Asn，A2 是 Met 或 Leu，A3 是 Val 或 Leu，A4 是 Asp 或 Glu，而 A5 是 Asp 或 Glu。该试剂盒可用于，例如，用于诊断神经障碍、检测含磷酸-Ser422 的 tau 或者检测含磷酸-Ser1808 的 MAP2。

试剂盒可包含载体，如不溶性多糖（例如，琼脂糖或纤维素）、合成树脂（例如，聚苯乙烯树脂、硅树脂、聚丙烯酰胺树脂、聚碳酸酯树脂或尼龙树脂）或者不溶性支持物（例如，玻璃）。抗体可固定到载体上。

试剂盒可包含试剂，如反应液、封闭液，或者在免疫测定中使用的其它试剂。

本发明还提供本发明抗体在制备上述试剂盒中的用途，以及本发明抗体在制备诊断或检测试剂中的用途，所述断或检测试剂可用于，例如，诊断神经障碍、检测含磷酸-Ser422 的 tau 或者检测含磷酸-Ser1808 的 MAP2。

现在已经一般性地描述了本发明，通过参考具体实施例连同下列附图将会更好地理解本发明，除非有其它说明，这里所包括的实施例仅用于说明的目的而不旨在限制。

附图说明

图 1 显示单克隆抗体的特异性。单克隆抗体的特异性通过多种 441 个氨基酸的 tau 的 western 印迹分析进行检验。A: Pan α -tau (对照)，抗体 2.5.2 和 2.20.4; B: 单克隆抗体 AP422。

- 泳道 1: 含 422 位上非磷酸化 Ser 的 tau,
- 泳道 2: 含 422 位上磷酸化 Ser 的磷酸化 tau,
- 泳道 3: 含 422 位上 Ser \rightarrow Ala 突变的 tau,
- 泳道 4: 含 422 位上 Ser \rightarrow Ala 突变的磷酸化 tau.

图 2 显示 Braak 期 AD 脑组织中可溶性和不溶性提取物的 western 印迹分析结果。由于人脑含有 tau 的多个剪接异构体的事实, 可见到数个 tau 条带。注意 Braak II 期/对照脑或可溶性的级分中都不含在 Ser422 处磷酸化的 tau。M = 含有标记蛋白 (Novex) 的泳道; I = 不溶性级分; S = 可溶性级分; II、IV、VI = 疾病严重性 (Braak 期)。

图 3 显示 AD 脑组织 (Braak VI 期) 的免疫组织化学分析结果。NFT = 神经纤维缠结; NT = 神经纤维网线 (neuropil thread); DN = 营养不良性神经炎 (环绕淀粉样蛋白斑)。使用的抗体是 2.5.2。对照脑显示不染色。

图 4 显示使用抗体 2.5.2 的冈田酸处理的 LAN-5 细胞(OA)的 western 印迹分析结果。如与载体/DMSO 提取物或者与用 pan-激酶抑制剂 K252a 处理的细胞提取物的缺乏反应性所示, 抗体与三个都是磷酸蛋白质的蛋白质反应。单个分子量与最大的蛋白质 MAP 2a/b (在 S1808 处磷酸化)、两个更小的蛋白质 tau (在 S422 处磷酸化) 的两个不同异构体一致。泳道 1 = 载体; 泳道 2 = OA, 泳道 3 = OA + K252a。

图 5 显示用于测定冈田酸处理的 LAN-5 细胞中 tau/pser422 水平的 ELISA 结果。基于 1×10^6 细胞计算 tau/pser422 的量。

实施例

下列实施例仅用于说明本发明的某些方面, 因而不应视为是限制本发明的范围。

实施例 1: 产生单克隆抗体

A. 小鼠的免疫

用包括下列氨基酸序列的磷酸肽免疫小鼠:

Cys-Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp

其对应于人 tau 最长异构体的氨基酸 415-430 (由 NeoMPS, Strasbourg 合成的肽)。用 Cys 取代天然存在的 Asp 415 以允许通过巯基与 KLH 定向

偶联。

向 10-12 周龄雌性 Balb/c (Jackson Laboratory, stock#001026) 和 NMRI 小鼠腹膜内注射溶于完全弗氏佐剂的 100 μg 磷酸肽。小鼠再接受三次腹膜内注射溶于不完全弗氏佐剂的 100 μg 肽, 每隔一个月注射一次(at monthly intervals)。在摘除脾前 3、2 和 1 天进行末次免疫, 静脉注射溶于 PBS 的 50 μg 肽。

B. 融合和克隆

根据 Galfré 和 Milstein, *Methods in Enzymology*, **73** (1981) 3-46 进行免疫小鼠的脾细胞融合。从而将每个免疫小鼠的 1×10^8 个脾细胞与 2×10^7 个骨髓瘤细胞(P3X63-Ag8-653, ATCC CRL1580)混合, 并于室温以 $300 \times g$ 离心 10 分钟。然后将细胞用 RPMI-1640 培养基(无 FCS)洗涤一次, 并在圆锥管中以 $300 \times g$ 再离心 10 分钟。通过轻拍试管使细胞松散并在预热的浴中温热到 37°C 。在 1 分钟期间, 添加 1 ml PEG (分子量 1500 的聚乙二醇, Roche Diagnostics)。接下来, 边轻轻振荡边逐滴添加 5 ml RPMI-1640 培养基(无 FCS), 最后通过添加含有 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基将终体积调整到 50 ml。然后将细胞悬液以 $300 \times g$ 离心 10 分钟。将细胞沉淀在含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基中重悬, 并种植到次黄嘌呤-重氮丝氨酸选择性培养基中(在 RPMI-1640 + 10% FCS 中含有 100 mM 次黄嘌呤[Sigma], 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 重氮丝氨酸[Sigma])。向培养基中补充 50U/ml 白介素-6 (Roche Applied Science)。

10 天后检验初级培养物的特异性抗体产量(见实施例 2)。通过在 96 孔细胞培养板中分选荧光激活的细胞, 克隆显示与磷酸肽阳性反应而不与非磷酸肽反应的初级培养物。这里使用的培养基是补充了 10% FCS 和 25 U/ml 白介素-6 的 RPMI-1640 培养基。

将以这种方式获得的杂交瘤细胞系/克隆中的两个保藏在 DSMZ (德意志微生物保藏中心, 马舍尔欧德路 1b, D-38124 不伦瑞克, 德国)。

表 1 显示了杂交瘤的细节。

表 1

克隆	以下列保藏号于 2006-03-15 保藏在 DSMZ	IgG 亚类
2.5.2	DSM ACC2762	Ig G2a; κ -轻链
2.20.4	DSM ACC2763	Ig G2a; κ -轻链

C. 从细胞培养物上清液中纯化抗体

将这样获得的杂交瘤细胞以 1×10^5 细胞/ml 的密度接种到补充了 10% FCS 和 25 U/ml 白介素-6 的 RPMI-1640 培养基中,并培养到约 3×10^5 /ml 的细胞密度。然后将细胞在 250 ml 的终体积中稀释到 1×10^6 /ml, 并允许生长到最大细胞密度。然后离心除去细胞。杂交瘤细胞培养物上清液一般含有约 40-50 μ g/ml 抗体。

每种抗体纯化如下。将无细胞的杂交瘤培养物上清液(250-300 ml)装填到用 50 mM TrisCl pH 8.0 平衡的 25 ml MEP HyperCel 柱(Pall Biosciences)上。用平衡缓冲液洗涤后,用 30 mM 柠檬酸钠/ 100 mM NaCl pH 4.1 洗脱抗体。汇集含抗体的级分,然后于 4°C 在 5 l SourceQ 缓冲液 A 中过夜透析(光谱/Por 6-8000)。将透析的 MEP 库装填到用 10 mM TrisCl pH 8.0 (缓冲液 A)平衡的 10 ml Source 15Q 柱(GE Healthcare)上。用缓冲液 A 洗涤后,将抗体用 10 个柱体积的 0-25% 缓冲液 B 进行梯度洗脱。缓冲液 B 含有 10 mM TrisCl /1 M NaCl pH 8.0。抗体在约 200 mM NaCl 洗脱。通过 SDS-PAGE 检查单个级分的纯度并汇集最纯的级分。这样纯化的抗体产量是约 10 mg/250 ml 杂交瘤培养物上清液。

实施例 2: 筛选抗 Tau/pSer422 特异性抗体

A. 测定抗体对磷酸肽(tau 416-430/pSer422)的特异性

为了测量细胞培养物上清液中抗体的特异性,将链霉抗生物素包被的微量滴定板(MicroCoat, Bernried, DE)用溶于 PBS, 0.5% Byco C (100 μ l/

孔, 室温振荡孵育 1 小时)中的 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 生物素化磷酸肽(tau 416-430/pSer422)包被。然后将平板用洗涤缓冲液(0.9% NaCl/0.05% Tween 20)洗涤 3 次。接下来, 在每个孔中添加 100 μl 含有抗体的培养物上清液, 并将平板在室温(R.T.)振荡孵育 1 小时。然后将平板用洗涤缓冲液洗涤 3 次。为了检测结合的抗体, 将 100 μl /孔抗小鼠多克隆抗体/过氧化物酶缀合物(Dianova)在室温孵育 1 小时。随后再次洗涤平板。最后, 添加 100 μl /孔 ABTS 溶液(Roche Diagnostics)并将平板在室温孵育 20 分钟。然后将平板在 X Read Plus 微板读数器(Tecan)中在 405 nm 处读数。

B. 测量抗体与非磷酸化肽(tau 416-430)的交叉反应性

使用上述同样的方法, 除了微量滴定板用非磷酸化肽(tau 416-430)包被。

C. 测量与游离磷酸肽(tau 416-430/pSer422)的结合

将 100 μl /孔每种细胞培养物上清液用移液管加到事先已用抗小鼠 Fc γ 抗体(MicroCoat, Bernried, DE)包被的微量滴定板内。然后将平板在室温振荡孵育 1 小时, 随后用洗涤缓冲液洗涤 3 次。接下来, 添加 100 μl /孔 50 nM 生物素化的磷酸肽(tau 416-430/pSer422), 并将平板在室温振荡孵育 1 小时。将平板洗涤 3 次, 然后与 100 μl /孔 50 U/ml 链霉抗生物素/过氧化物酶缀合物(Dianova)在室温孵育 1 小时。将平板再洗涤一次, 然后用 100 μl /孔 ABTS 溶液(Roche Applied Science)在室温显色 20 分钟。接着将平板在 X Read Plus 微板读数器(Tecan)中在 405 nm 读数。

D. 测量抗体与游离非磷酸化肽(tau 416-430)的结合

使用上述相同的方法, 除了将微量滴定板用非磷酸化肽(tau 416-430)包被。

使用上述方法, 保藏的两个抗体均显示与固定的和游离的磷酸肽(tau 416-430/pSer422)都能很好结合。没有观察到与非磷酸化肽(tau 416-430)的

交叉反应性。

实施例 3: 通过 western 印迹测定抗体对全长磷酸化 tau 蛋白和磷酸化突变 tau 蛋白(S422A)的特异性。

检验抗体识别四种不同 tau 蛋白中的每一种的能力, 即 tau、tauS422A (422 位上 Ser→Ala 突变)、p-tau(磷酸化 tau)和 p-tauS422A(在 422 位上含 Ser→Ala 突变的磷酸化 tau)。根据标准方法在大肠杆菌中表达并纯化 tau 和 tauS422A。然后将两个蛋白质都通过 ERK2 激酶磷酸化, 证明其在 tau 的 S422 位以及许多其它位置上引入磷酸基。将 4 种 tau 蛋白中每种 150 ng 加到 SDS-PAGE 凝胶上; 随后进行电泳, 通过标准 western 印迹方案将蛋白质转移到硝酸纤维素上。将印迹与已用 StartingBlock (Perbio)稀释两倍的单个杂交瘤细胞培养物上清液在 4℃ 过夜孵育。标准洗涤过程后, 将印迹在室温与 2 ng/ml 抗小鼠抗体/辣根过氧化物酶缀合物(Perbio)孵育 1 小时。然后洗涤印迹并用 LumiLight ECL 底物(Roche Applied Science)显色。如图 1A 所示, 抗体 2.5.2 和 2.20.4(表 1)与非磷酸化 tau 或者在非 Ser422 的 Ser(或 Thr)残基处磷酸化的 tau 没有显示交叉反应性。因此, 抗体对靶磷酸表位具有高度选择性。图 1B 显示了单克隆抗体 AP422 的特异性。单克隆抗体 AP422 从 M. Hasegawa 教授(东京大学, 日本)获得, 并用溶于 TBSt 缓冲液的 1% 牛奶 1:2000 稀释。将印迹在 4℃ 过夜孵育。第二天洗涤并与用溶于 TBSt 缓冲液的 1% 牛奶 1:2000 稀释的抗小鼠/辣根过氧化物酶(Pierce)在室温孵育 1 小时。用 Roche ECL 系统检测。抗体 AP422 与非磷酸化 tau 显示交叉反应性。

实施例 4: 测定 k_{on} 、 k_{off} 、 K_A 和 K_d

使用表面等离子共振(BIAcore 2000, 来自 BIAcore AB)测定速率常数 k_{on} 和 k_{off} 以及所得的解离常数 K_d 。

以 20 μ l/分钟的流速, 将 NHS/EDC-活化的 Sensorchips (CM5, BIAcore AB)用溶于 10 mM 乙酸钠-乙酸 pH5.0 的 15 μ g/ml 浓度的兔抗小鼠 IgG 包

被 5 分钟。将细胞培养物上清液在 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.05% 聚山梨醇酯中稀释到 50 nM 的抗体终浓度, 并以 10 μ l/分钟的流速进行为期 2 分钟的注射。然后将溶于 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.05% 聚山梨醇酯的磷酸肽或非磷酸肽 (0-1000 nM) 以 100 μ l/分钟的流速注射 2 分钟。之后, 在 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.05% 聚山梨醇酯中解离 5 分钟。

然后在使用 BIAcore 评价软件(4.1 版, BIAcore AB)进行双参照 (double referencing) 后, 从传感图(sensogram)中计算 k_{on} 和 k_{off} 。在使用 1:1 (Langmuir) 结合相互作用的数据集中对模型进行整体(gobally)拟合。从 k_{on}/k_{off} 计算缔合常数 K_a 。

所得的值总结如下。两个抗体都具有在低纳摩尔范围的 K_d 值, 因此可认为以高亲和力结合 pSer422。没有一种抗体与非磷酸化肽显示任何相互作用, 表明它们对于磷酸表位是高度选择性的, 并验证了实施例 3 中的 western 印迹结果。

表 2 显示了抗体 2.5.2 和抗体 2.20.4 的 K_{on} 、 K_{off} 、 K_a 和 K_d 。

表 2

Tau 416-430/pSer422				
克隆	k_{on}	k_{off}	K_a	K_d
	1 / Ms	1 / s	1 / M	nM
2.5.2	8×10^5	8×10^{-3}	9×10^7	11
2.20.4	7×10^5	1×10^{-2}	7×10^7	14

实施例 5: AD 脑提取物的 Western 印迹

从 Braak 期的 AD 脑和对照脑中制备超薄切片机切片。将每个脑的约 50 mg 湿重组织分配到 Eppendorf 管中。然后使用手持玻璃匀浆器将每份组织在 10 体积的冰冷 RAB-HS 缓冲液中匀浆。然后将匀浆在 4°C 以 50000 \times g 离心 40 分钟。通过均质化将所得沉淀重悬于 Tris-蔗糖-SDS, 并在室

温以 $50000 \times g$ 离心 40 分钟。保留所得上清液用于分析。将每份上清液 4.5 μl 加到 SDS-PAGE 凝胶上。如上所述进行 Western 印迹，除了将一抗 (2.5.2, 如上所述纯化) 在 StartingBlock 中稀释到 $1 \mu\text{g/ml}$ 。结果显示在图 2 中。抗体在 RAB 不溶/SDS 可溶脑提取物中特异性地检测在 Ser422 处磷酸化的 tau 异构体。这是可以预见到的，因为过度磷酸化的 tau 通常存在于提取物的这个级分中。正常 tau 存在于 RAB 可溶级分中，并且显然任何样品中的该级分都不与抗体产生交叉反应。染色强度与疾病的严重性相关，并且对照脑提取物明显不染色。

实施例 6: AD 脑切片的免疫组织化学分析

从阿尔茨海默氏病阳性诊断患者的尸检中获得人脑皮层区的未固定脑组织的低温恒冷切片，用抗 p-tauS422A 抗体通过间接免疫荧光对 Braak VI 期切片进行标记 (Wheatley S.和 Wang Y., Methods Cell Bio 57 (1998) 313-332)。使用连续的两步孵育以检测结合的抗 p-tauS422A 抗体，其通过亲和纯化的缀合于 Alexa 488 的山羊抗小鼠(GAM) IgG (H+L) (Molecular Probes)显示。进行 A β 肽的复染以显示淀粉样- β 斑。

详细地，在 -18°C 使用低温恒冷切片机 (Leica, CM 3050 S) 以 $10 \mu\text{m}$ 的正常厚度切割制备切片。在切片附着到预冷的载玻片 (Super Frost Plus, Menzel, Germany) 上后，在 PBS 中水合，并用 -20°C 预冷的 100% 丙酮处理 2 分钟。用 PBS 洗涤 2 次，2 分钟。通过在含 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 1% 卵清白蛋白 (OVA) 和 1% 正常山羊血清的 PBS 中孵育 20 分钟，进行非特异性结合位点的封闭。使用溶于含 1% BSA、1% OVA 和 1% 正常山羊血清的 PBS 中的 $10 \mu\text{g/ml}$ 浓度的抗 p-tauS422A 抗体孵育 1 小时。用 PBS 和 1% BSA 洗涤后，将载玻片用 $15 \mu\text{g/ml}$ 溶于含 1% BSA 的 PBS 中、亲和纯化的缀合于 Alexa 488 的山羊抗小鼠(GAM) IgG (H+L) (Molecular Probes) 孵育 1 小时。载玻片用 PBS 和 1% BSA 洗涤 3 次，每次 5 分钟，并用 $5 \mu\text{g/ml}$ 溶于含 1% BSA 的 PBS 中的抗 A β 小鼠单克隆抗体 (BAP-2, Dr. M. Brockhaus, F. Hoffmann La Roche, EP130424) 复染 1 小时。载玻片用

PBS 洗涤 3 次, 每次 5 分钟, 用水冲洗, 并浸入溶于 70% 含水乙醇的 0.3% 苏丹黑中 5 分钟, 以减少脂褐素的自发荧光。载玻片用 70% 乙醇冲洗一次并用水冲洗 2 次后, 用 PBS 洗涤 2 次, 每次 3 分钟, 并用荧光封固剂(S3023 Dako)包埋。对照包括无关的小鼠 IgG1 抗体(Sigma)和单独的二抗, 所有都得到阴性结果。

使用 10×/0.3 物镜用 Zeiss Axioplan2 记录图像。用 Photoshop 合并所记录的两个荧光通道的图像。

结果显示于图 3。抗体染色与阿尔茨海默氏病的病理有关的典型结构, 其中最突出的是神经纤维缠结。众多神经纤维网线也很明显, 如环绕斑块周围的营养不良性轴突(通过用淀粉样蛋白特异性抗体的复染显示)。

实施例 7: 用于检测神经母细胞瘤细胞提取物中的 tau 蛋白 pSer422 和 MAP2 的 Western 印迹

用于产生单克隆抗体的肽免疫原基于 tau 中直接环绕 S422 的氨基酸序列, 即 S416-IDMVDSPQLATLA-D430。该序列出现在接近 tau 蛋白 C 末端之处。蛋白质序列数据库的同源搜索显示高度同源的氨基酸序列 S1802-INLLESPQLATLA-E1816 出现在接近微管相关蛋白 MAP2 的 C 末端之处。用冈田酸处理并使用上述抗体通过 western 印迹分析的 LAN-5 细胞的确含有与抗体 2.5.2 和 2.20.4 交叉反应的高分子量蛋白质。该蛋白质的分子量与 MAP2 的分子量一致。

将细胞(无血清培养基中 1×10^7 /孔)在 37°C 用 DMSO 或 10 μ M K252a (Alexis)处理 1 小时; 然后培养基补充 DMSO 或 2 μ M 冈田酸, 在 37°C 再处理 1 小时。除去培养基并将细胞提取到 100 μ l Cytobuster (Novagen)内, 并用 25 μ l 进行 western 印迹分析。western 印迹根据实施例 5 中所述方法进行。结果显示在图 4 中。抗体 2.5.2 显示与磷酸化 MAP2 的交叉反应性。

实施例 8: 用于检测冈田酸处理的神经母细胞瘤细胞中 tau/pSer422 的 ELISA 试验

LAN-5 神经母细胞瘤细胞内源性表达 tau。当细胞用冈田酸处理时，内源性 tau 在 Ser422 发生磷酸化。

将 LAN-5 神经母细胞瘤细胞在 37℃ 在培养基中培养，并以 100 μ l 无血清培养基中 2.5×10^5 细胞/孔的细胞密度铺到 96 孔微量滴定板内。培养 24 小时后，接着将细胞用 2.5 μ M 冈田酸处理 2 小时。随后，添加 10 μ l 含 1 mg/ml 洋地黄皂甙、10 mM EDTA 的溶液，并将细胞在 4℃ 振荡 30 分钟。然后将该提取物直接用于下述 ELISA 试验。

按 20:1 的比例将抗体 2.5.2 用生物素-NHS 在磷酸缓冲液盐 pH7.2 中进行生物素化。根据由 BioVeris 提供的方案，以 8:1 的比例将抗体 5A6 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) 用 BV-TAG™ (BioVeris Corporation, Gaithersburg, Maryland) 标记。在典型测定中，在室温将以 1:50 稀释的 25 μ l 链霉抗生物素包被的磁珠(Dynal/Invitrogen Corporation)与 25 μ l 的 1 μ g/ml 生物素-抗体预孵育 30 分钟。然后向该混合物中添加 50 μ l 细胞提取物和 25 μ l BV 标记的抗体 2.5.2 (根据上述方法制备)。然后将混合物在 4℃ 振荡孵育 3 小时。在 96 孔微量滴定板内制备所有样品。随后，向每份样品中添加 125 μ l 缓冲液，并将平板在 BioVeris M384 分析器中测量。通过在细胞提取缓冲液中稀释 ERK2 或 P38 磷酸化的 tau，制备 Tau/pSer422 标准曲线；计算细胞中的 tau/pSer422 水平，磷酸-tau 标准表示成 1 摩尔磷酸-Ser422 磷酸盐/摩尔 tau。图 5 显示了冈田酸处理前后的标准曲线和所获得的标准值 (基于 1×10^6 细胞)。

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

<210> 2

<211> 1827

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Ala Asp Glu Arg Lys Asp Glu Gly Lys Ala Pro His Trp Thr Ser
 1 5 10 15

Ala Pro Leu Thr Glu Ala Ser Ala His Ser His Pro Pro Glu Ile Lys
 20 25 30

Asp Gln Gly Gly Ala Gly Glu Gly Leu Val Arg Ser Ala Asn Gly Phe
 35 40 45

Pro Tyr Arg Glu Asp Glu Glu Gly Ala Phe Gly Glu His Gly Ser Gln
 50 55 60

Gly Thr Tyr Ser Asn Thr Lys Glu Asn Gly Ile Asn Gly Glu Leu Thr
 65 70 75 80

Ser Ala Asp Arg Glu Thr Ala Glu Glu Val Ser Ala Arg Ile Val Gln
 85 90 95

Val Val Thr Ala Glu Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Glu Gln Glu Lys
 100 105 110

Glu Ala Gln His Lys Asp Gln Thr Ala Ala Leu Pro Leu Ala Ala Glu
 115 120 125

Glu Thr Ala Asn Leu Pro Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ala Ser Glu
 130 135 140

Gln Thr Val Thr Val Glu Glu Asp Leu Leu Thr Ala Ser Lys Met Glu
 145 150 155 160

Phe His Asp Gln Gln Glu Leu Thr Pro Ser Thr Ala Glu Pro Ser Asp
 165 170 175

Gln Lys Glu Lys Glu Ser Glu Lys Gln Ser Lys Pro Gly Glu Asp Leu
 180 185 190

Lys His Ala Ala Leu Val Ser Gln Pro Glu Thr Thr Lys Thr Tyr Pro
 195 200 205

Asp Lys Lys Asp Met Gln Gly Thr Glu Glu Glu Lys Ala Pro Leu Ala
 210 215 220

Leu Phe Gly His Thr Leu Val Ala Ser Leu Glu Asp Met Lys Gln Lys
 225 230 235 240

Thr Glu Pro Ser Leu Val Val Pro Gly Ile Asp Leu Pro Lys Glu Pro
 245 250 255

Pro Thr Pro Lys Glu Gln Lys Asp Trp Phe Ile Glu Met Pro Thr Glu
 260 265 270

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

Leu Thr Pro Met Arg Glu Lys Asp Val Phe Asp Asp Ile Pro Lys Trp
 290 295 300

Glu Gly Lys Gln Phe Asp Ser Pro Met Pro Ser Pro Phe Gln Gly Gly
 305 310 315 320

Ser Phe Thr Leu Pro Leu Asp Val Met Lys Asn Glu Ile Val Thr Glu
 325 330 335

Thr Ser Pro Phe Ala Pro Ala Phe Leu Gln Pro Asp Asp Lys Lys Ser
 340 345 350

Leu Gln Gln Thr Ser Gly Pro Ala Thr Ala Lys Asp Ser Phe Lys Ile
 355 360 365

Glu Glu Pro His Glu Ala Lys Pro Asp Lys Met Ala Glu Ala Pro Pro
 370 375 380

Ser Glu Ala Met Thr Leu Pro Lys Asp Ala His Ile Pro Val Val Glu
 385 390 395 400

Glu His Val Met Gly Lys Val Leu Glu Glu Glu Lys Glu Ala Ile Asn
 405 410 415

Gln Glu Thr Val Gln Gln Arg Asp Thr Phe Thr Pro Ser Gly Gln Glu
 420 425 430

Pro Ile Leu Thr Glu Lys Glu Thr Glu Leu Lys Leu Glu Glu Lys Thr
 435 440 445

Thr Ile Ser Asp Lys Glu Ala Val Pro Lys Glu Ser Lys Pro Pro Lys
 450 455 460

Pro Ala Asp Glu Glu Ile Gly Ile Ile Gln Thr Ser Thr Glu His Thr
 465 470 475 480

Phe Ser Glu Gln Lys Asp Gln Glu Pro Thr Thr Asp Met Leu Lys Gln
 485 490 495

Asp Ser Phe Pro Val Ser Leu Glu Gln Ala Val Thr Asp Ser Ala Met
 500 505 510

Thr Ser Lys Thr Leu Glu Lys Ala Met Thr Glu Pro Ser Ala Leu Ile
 515 520 525

Glu Lys Ser Ser Ile Gln Glu Leu Phe Glu Met Arg Val Asp Asp Lys
 530 535 540

Asp Lys Ile Glu Gly Val Gly Ala Ala Thr Ser Ala Glu Leu Asp Met
 545 550 555 560

Pro Phe Tyr Glu Asp Lys Ser Gly Met Ser Lys Tyr Phe Glu Thr Ser
 565 570 575

Ala Leu Lys Glu Glu Ala Thr Lys Ser Ile Glu Pro Gly Ser Asp Tyr
 580 585 590

Tyr Glu Leu Ser Asp Thr Arg Glu Ser Val His Glu Ser Ile Asp Thr
 595 600 605

Met Ser Pro Met His Lys Asn Gly Asp Lys Glu Phe Gln Thr Gly Lys
 610 615 620

Glu Ser Gln Pro Ser Pro Pro Ala Gln Glu Ala Gly Tyr Ser Thr Leu
 625 630 635 640

Ala Gln Ser Tyr Pro Ser Asp Leu Pro Glu Glu Pro Ser Ser Pro Gln
 645 650 655

Glu Arg Met Phe Thr Ile Asp Pro Lys Val Tyr Gly Glu Lys Arg Asp
 660 665 670

Leu His Ser Lys Asn Lys Asp Asp Leu Thr Leu Ser Arg Ser Leu Gly
 675 680 685

Leu Gly Gly Arg Ser Ala Ile Glu Gln Arg Ser Met Ser Ile Asn Leu
 690 695 700

Pro Met Ser Cys Leu Asp Ser Ile Ala Leu Gly Phe Asn Phe Gly Arg
 705 710 715 720

Ala Lys Lys Thr Glu Glu Ala Gly Asp Glu Ile Glu Thr Phe Gly Leu
980 985 990

Gly Val Thr Tyr Glu Gln Ala Leu Ala Lys Asp Leu Ser Ile Pro Thr
995 1000 1005

Asp Ala Ser Ser Glu Lys Ala Glu Lys Gly Leu Ser Ser Val Pro
1010 1015 1020

Glu Ile Ala Glu Val Glu Pro Ser Lys Lys Val Glu Gln Gly Leu
1025 1030 1035

Asp Phe Ala Val Gln Gly Gln Leu Asp Val Lys Ile Ser Asp Phe
1040 1045 1050

Gly Gln Met Ala Ser Gly Leu Asn Ile Asp Asp Arg Arg Ala Thr
1055 1060 1065

Glu Leu Lys Leu Glu Ala Thr Gln Asp Met Thr Pro Ser Ser Lys
1070 1075 1080

Ala Pro Gln Glu Ala Asp Ala Phe Met Gly Val Glu Ser Gly His
1085 1090 1095

Met Lys Glu Gly Thr Lys Val Ser Glu Thr Glu Val Lys Gln Lys
1100 1105 1110

Val Ala Lys Pro Asp Leu Val His Gln Glu Ala Val Asp Lys Glu
1115 1120 1125

Glu Ser Tyr Glu Ser Ser Gly Glu His Glu Ser Leu Thr Met Glu
1130 1135 1140

Ser Leu Lys Ala Asp Glu Gly Lys Lys Glu Thr Ser Pro Glu Ser
1145 1150 1155

Ser Leu Ile Gln Asp Glu Ile Ala Val Lys Leu Ser Val Glu Ile
1160 1165 1170

Pro Cys Pro Pro Ala Val Ser Glu Ala Asp Leu Ala Thr Asp Glu
1175 1180 1185

Arg Ala Asp Val Gln Met Glu Phe Ile Gln Gly Pro Lys Glu Glu
1190 1195 1200

Ser Lys Glu Thr Pro Asp Ile Ser Ile Thr Pro Ser Asp Val Ala
1205 1210 1215

Glu Pro Leu His Glu Thr Ile Val Ser Glu Pro Ala Glu Ile Gln
1220 1225 1230

Ser Glu Glu Glu Glu Ile Glu Ala Gln Gly Glu Tyr Asp Lys Leu
 1235 1240 1245

Leu Phe Arg Ser Asp Thr Leu Gln Ile Thr Asp Leu Gly Val Ser
 1250 1255 1260

Gly Ala Arg Glu Glu Phe Val Glu Thr Cys Pro Ser Glu His Lys
 1265 1270 1275

Gly Val Ile Glu Ser Val Val Thr Ile Glu Asp Asp Phe Ile Thr
 1280 1285 1290

Val Val Gln Thr Thr Thr Asp Glu Gly Glu Ser Gly Ser His Ser
 1295 1300 1305

Val Arg Phe Ala Ala Leu Glu Gln Pro Glu Val Glu Arg Arg Pro
 1310 1315 1320

Ser Pro His Asp Glu Glu Glu Phe Glu Val Glu Glu Ala Ala Glu
 1325 1330 1335

Ala Gln Ala Glu Pro Lys Asp Gly Ser Pro Glu Ala Pro Ala Ser
 1340 1345 1350

Pro Glu Arg Glu Glu Val Ala Leu Ser Glu Tyr Lys Thr Glu Thr
 1355 1360 1365

Tyr Asp Asp Tyr Lys Asp Glu Thr Thr Ile Asp Asp Ser Ile Met
 1370 1375 1380

Asp Ala Asp Ser Leu Trp Val Asp Thr Gln Asp Asp Asp Arg Ser
 1385 1390 1395

Ile Met Thr Glu Gln Leu Glu Thr Ile Pro Lys Glu Glu Lys Ala
 1400 1405 1410

Glu Lys Glu Ala Arg Arg Ser Ser Leu Glu Lys His Arg Lys Glu
 1415 1420 1425

Lys Pro Phe Lys Thr Gly Arg Gly Arg Ile Ser Thr Pro Glu Arg
 1430 1435 1440

Lys Val Ala Lys Lys Glu Pro Ser Thr Val Ser Arg Asp Glu Val
 1445 1450 1455

Arg Arg Lys Lys Ala Val Tyr Lys Lys Ala Glu Leu Ala Lys Lys
 1460 1465 1470

Thr Glu Val Gln Ala His Ser Pro Ser Arg Lys Phe Ile Leu Lys
 1475 1480 1485
 Pro Ala Ile Lys Tyr Thr Arg Pro Thr His Leu Ser Cys Val Lys
 1490 1495 1500
 Arg Lys Thr Thr Ala Ala Gly Gly Glu Ser Ala Leu Ala Pro Ser
 1505 1510 1515
 Val Phe Lys Gln Ala Lys Asp Lys Val Ser Asp Gly Val Thr Lys
 1520 1525 1530
 Ser Pro Glu Lys Arg Ser Ser Leu Pro Arg Pro Ser Ser Ile Leu
 1535 1540 1545
 Pro Pro Arg Arg Gly Val Ser Gly Asp Arg Asp Glu Asn Ser Phe
 1550 1555 1560
 Ser Leu Asn Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ala Arg Arg Thr Thr Arg
 1565 1570 1575
 Ser Glu Pro Ile Arg Arg Ala Gly Lys Ser Gly Thr Ser Thr Pro
 1580 1585 1590
 Thr Thr Pro Gly Ser Thr Ala Ile Thr Pro Gly Thr Pro Pro Ser
 1595 1600 1605
 Tyr Ser Ser Arg Thr Pro Gly Thr Pro Gly Thr Pro Ser Tyr Pro
 1610 1615 1620
 Arg Thr Pro His Thr Pro Gly Thr Pro Lys Ser Ala Ile Leu Val
 1625 1630 1635
 Pro Ser Glu Lys Lys Val Ala Ile Ile Arg Thr Pro Pro Lys Ser
 1640 1645 1650
 Pro Ala Thr Pro Lys Gln Leu Arg Leu Ile Asn Gln Pro Leu Pro
 1655 1660 1665
 Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Asp Asn Ile
 1670 1675 1680
 Lys Tyr Gln Pro Lys Gly Gly Gln Val Gln Ile Val Thr Lys Lys
 1685 1690 1695
 Ile Asp Leu Ser His Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Lys Asn
 1700 1705 1710
 Ile Arg His Arg Pro Gly Gly Gly Arg Val Lys Ile Glu Ser Val
 1715 1720 1725

Lys Leu Asp Phe Lys Glu Lys Val Gln Ala Lys Val Gly Ser Leu
 1730 1735 1740
 Asp Asn Ala His His Val Pro Gly Gly Gly Asn Val Lys Ile Asp
 1745 1750 1755
 Ser Gln Lys Leu Asn Phe Arg Glu His Ala Lys Ala Arg Val Asp
 1760 1765 1770
 His Gly Ala Glu Ile Ile Thr Gln Ser Pro Gly Arg Ser Ser Val
 1775 1780 1785
 Ala Ser Pro Arg Arg Leu Ser Asn Val Ser Ser Ser Gly Ser Ile
 1790 1795 1800
 Asn Leu Leu Glu Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Glu Asp Val
 1805 1810 1815
 Thr Ala Ala Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 1820 1825

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 致敏的抗原肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> 磷酸化

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

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

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

<400> 5

Ser Ile Asn Leu Leu Glu Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Glu
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 磷酸化的肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> 磷酸化

<400> 6

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

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 磷酸化的肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> 磷酸化

<400> 7

Ser Ile Asn Leu Leu Glu Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Glu
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 共有序列

<220>
 <221> 变体
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa =Asp 或 Asn

<220>
 <221> 变体
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa =Met 或 Leu

<220>
 <221> 变体
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa =Val 或 Leu

<220>
 <221> 变体
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa =Asp 或 Glu

<220>
 <221> 变体
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa =Asp 或 Glu

<400> 8

Ser Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Xaa
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 共有序列

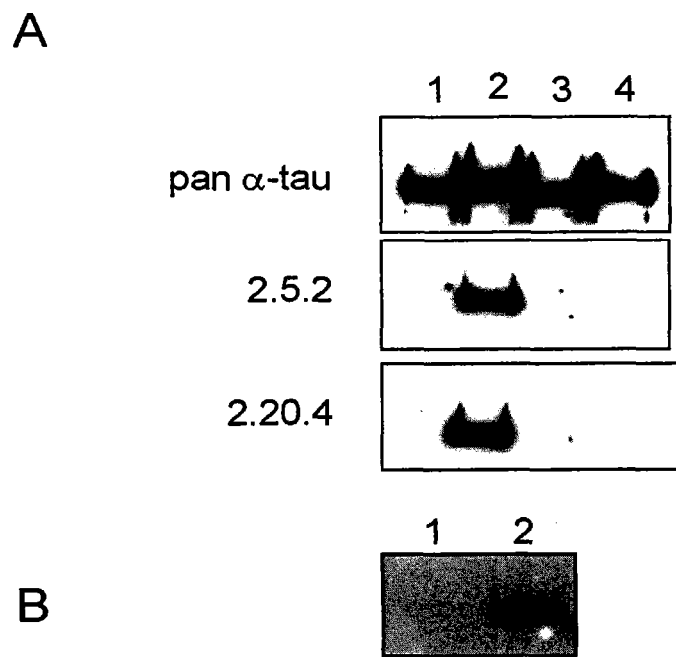


图 1

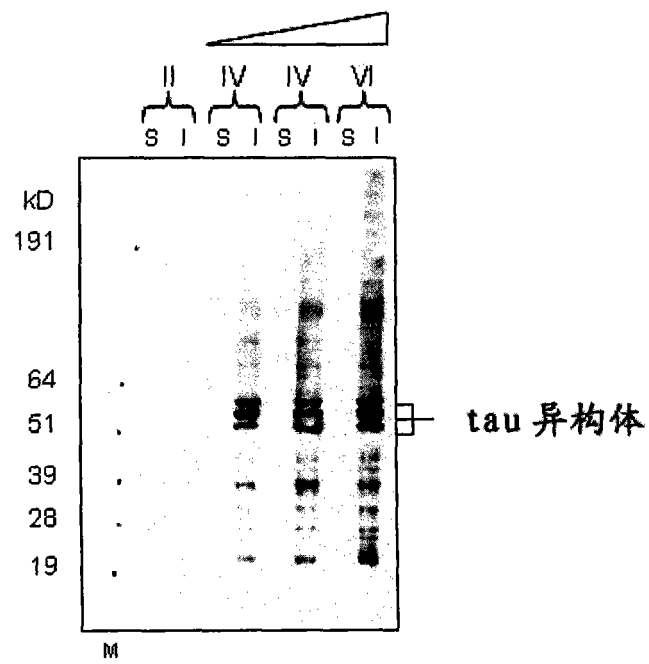


图 2

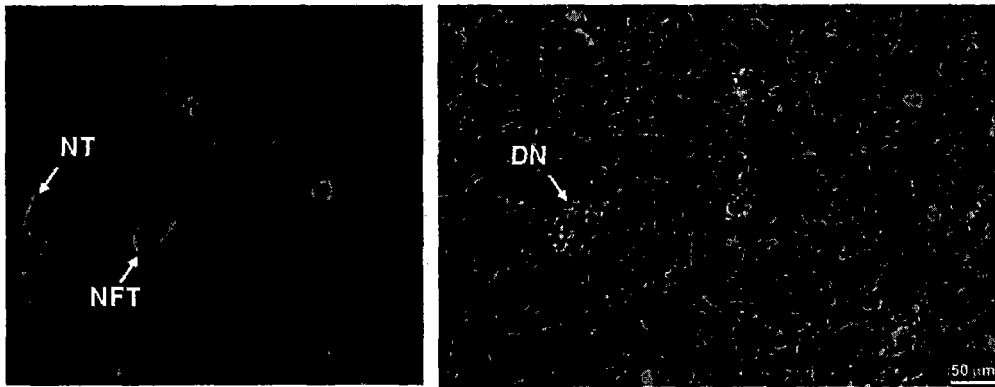


图 3

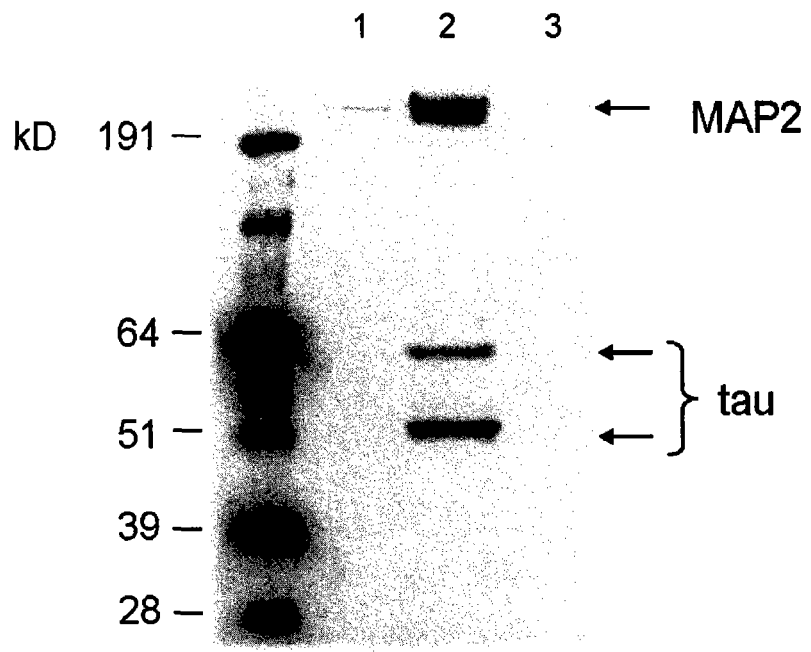
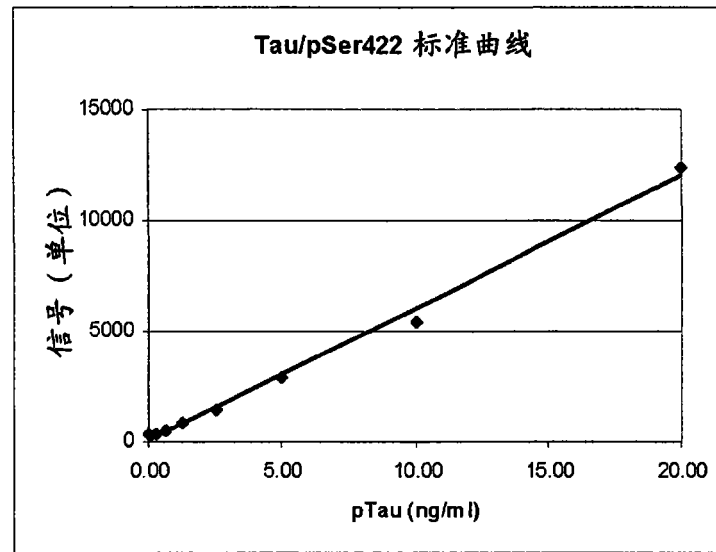


图 4



**DMSO 和冈田酸处理的 LAN-5 细胞中
Tau/pSer422 的水平**

处理	单位	[tau/pSer422] (ng 每 10 ⁶ 细胞)
DMSO	351±16	~0.5
冈田酸	5991±1266	~40±8

图 5

专利名称(译)	识别磷酸化多肽的抗体		
公开(公告)号	CN101108881A	公开(公告)日	2008-01-23
申请号	CN200710126990.3	申请日	2007-07-04
申请(专利权)人(译)	弗·哈夫曼-拉罗切有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	弗·哈夫曼-拉罗切有限公司		
[标]发明人	B波尔曼 C采奇 J格拉赫 韦克 F格吕宁格尔		
发明人	B·波尔曼 C·采奇 J·格拉赫 - 韦克 F·格吕宁格尔		
IPC分类号	C07K16/30 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/92 G01N33/6896		
优先权	2006116550 2006-07-04 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及抗体、生产该抗体的杂交瘤、包含该抗体的试剂盒以及用于诊断神经障碍的方法，其中所述抗体识别由Ser - Ile - A1 - A2 - A3 - A4 - Ser(PO₃H₂) - Pro - Gln - Leu - Ala - Thr - Leu - Ala - A5组成的表位，而不结合由Ser - Ile - A1 - A2 - A3 - A4 - Ser - Pro - Gln - Leu - Ala - Thr - Leu - Ala - A5组成的表位，其中A1是Asp或Asn，A2是Met或Leu，A3是Val或Leu，A4是Asp或Glu，而A5是Asp或Glu。

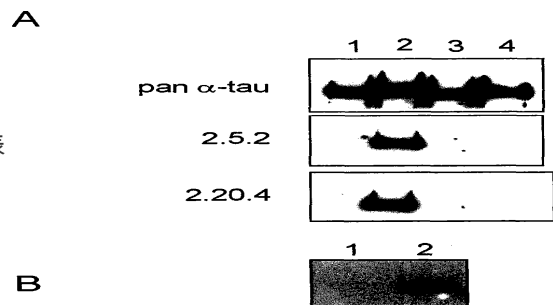


图 1