



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117098771 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 21

(21) 申请号 202180087609.5

(22) 申请日 2021.10.26

(30) 优先权数据

63/105472 2020.10.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/056539 2021.10.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/093736 EN 2022.05.05

(71) 申请人 索拉生物科学有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 菱谷彰德 圭三古屋

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 段菊兰 彭昶

(51) Int.Cl.

G07K 14/47 (2006.01)

权利要求书4页 说明书35页

序列表54页 附图8页

(54) 发明名称

用于治疗阿尔茨海默病的组合物和方法

(57) 摘要

公开了一类新型的融合蛋白,用于招募细胞的固有伴侣机制,特别是Hsp70介导的系统,以特异性减少tau介导的蛋白聚集和相关的蛋白构象病。

1. 分离的融合蛋白,其包含J蛋白的J结构域和tau结合结构域。
2. 权利要求1所述的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域是真核来源的。
3. 权利要求1-2任一项所述的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域是人源的。
4. 权利要求1-3任一项所述的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域是胞质定位的。
5. 权利要求1-4任一项所述的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域选自SEQ ID NO:1-48。
6. 权利要求1-5任一项所述的融合蛋白,其中所述J结构域包含选自SEQ ID NO:5、6、10、24和31的序列。
7. 权利要求1-6任一项所述的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO:5的序列。
8. 权利要求1-6任一项所述的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO:6的序列。
9. 权利要求1-6任一项所述的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO:10的序列。
10. 权利要求1-6任一项所述的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO:24的序列。
11. 权利要求1-6任一项所述的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO:31的序列。
12. 权利要求1-11任一项所述的融合蛋白,其中当使用ELISA测定测量时,所述tau结合结构域具有 $1\mu\text{M}$ 以下,例如300nM以下、100nM以下、30nM以下、10nM以下的对tau的 K_D 。
13. 权利要求1-12任一项所述的融合蛋白,其中所述tau结合结构域包含选自SEQ ID NO:49-54的序列。
14. 权利要求1-13任一项所述的融合蛋白,其中所述tau结合结构域包含SEQ ID NO:49的序列。
15. 权利要求1-13任一项所述的融合蛋白,其中所述tau结合结构域包含SEQ ID NO:50的序列。
16. 权利要求1-13任一项所述的融合蛋白,其中所述tau结合结构域包含SEQ ID NO:51的序列。
17. 权利要求1-16任一项所述的融合蛋白,其包含多个tau结合结构域。
18. 权利要求1-17任一项所述的融合蛋白,其由两个tau结合结构域组成。
19. 权利要求1-18任一项所述的融合蛋白,其由三个tau结合结构域组成。
20. 权利要求1-19任一项所述的融合蛋白,其包含以下构建体之一:
 - a. DNAJ-X-T,
 - b. DNAJ-X-T-X-T,
 - c. DNAJ-X-T-X-T-X-T,
 - d. T-X-DNAJ,
 - e. T-X-T-X-DNAJ,
 - f. T-X-T-X-T-X-DNAJ,
 - g. T-X-DNAJ-X-T,
 - h. T-X-DNAJ-X-T-X-T,
 - i. T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
 - j. T-X-T-X-DNAJ-X-T,
 - k. T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T,
 - l. T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,

- m. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T,
n. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T, 和
o. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
其中,

T是tau结合结构域,
DNAJ是J蛋白的J结构域,且
X是任选的接头。

21. 权利要求1-20任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域序列和SEQ ID NO:49的tau结合结构域序列。

22. 权利要求1-21任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域序列和SEQ ID NO:49的tau结合结构域序列的两个拷贝。

23. 权利要求1-22任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含选自SEQ ID NO:83-88和95-101的序列。

24. 权利要求1-23任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:83的序列。

25. 权利要求1-23任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:87的序列。

26. 权利要求1-23任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:88的序列。

27. 权利要求1-23任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:97的序列。

28. 权利要求1-37任一项所述的融合蛋白,其进一步包含靶向试剂。

29. 权利要求1-28任一项所述的融合蛋白,其进一步包含表位。

30. 权利要求29所述的融合蛋白,其中所述表位是选自SEQ ID NO:66-72的多肽。

31. 权利要求1-30任一项所述的融合蛋白,其进一步包含细胞穿透剂。

32. 权利要求31所述的融合蛋白,其中所述细胞穿透剂包含选自SEQ ID NO:73-76的肽序列。

33. 权利要求1-32任一项所述的融合蛋白,其进一步包含信号序列。

34. 权利要求33所述的融合蛋白,其中所述信号序列包含选自SEQ ID NO:77-79的肽序列。

35. 权利要求1-34任一项所述的融合蛋白,其能够减少tau蛋白在细胞中的聚集。

36. 权利要求1-35任一项所述的融合蛋白,其能够减少tau介导的细胞毒性。

37. 编码权利要求1-36任一项所述的融合蛋白的核酸序列。

38. 权利要求37所述的核酸序列,其中所述核酸是DNA。

39. 权利要求37所述的核酸序列,其中所述核酸是RNA。

40. 权利要求37-39任一项所述的核酸序列,其中所述核酸包含至少一种修饰的核酸。

41. 包含权利要求37-40任一项所述的核酸序列的载体。

42. 权利要求41所述的载体,其中所述载体选自腺相关病毒(AAV)、腺病毒、慢病毒、逆转录病毒、疱疹病毒、痘病毒(牛痘或粘液瘤)、副粘病毒(麻疹、RSV或新城疫病毒)、杆状病

毒、呼肠孤病毒、甲病毒和黄病毒。

43. 包含衣壳和权利要求41或权利要求42所述的载体的病毒颗粒。

44. 权利要求43所述的病毒颗粒,其中所述衣壳选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV rh10、AAV10、AAV11、AAV12、假型AAV、恒河猴来源的AAV、AAVrh8、AAVrh10和AAV-DJan AAV衣壳突变体、AAV杂合血清型、亲器官AAV、亲心脏AAV和亲心脏AAVM41突变体。

45. 药物组合物,其包含选自权利要求1-36任一项所述的融合蛋白、表达权利要求1-36所述的融合蛋白的细胞、权利要求37-40任一项所述的核酸、权利要求41-42任一项所述的载体、权利要求43-44任一项所述的病毒颗粒的药剂,以及药学上可接受的载体或赋形剂。

46. 减少tau蛋白在细胞中的毒性的方法,其包括使所述细胞与权利要求1-36任一项所述的融合蛋白、表达权利要求1-36所述的融合蛋白的细胞、权利要求37-40任一项所述的核酸、权利要求41-42任一项所述的载体、权利要求43-44任一项所述的病毒颗粒、和权利要求45所述的药物组合物接触。

47. 权利要求46所述的方法,其中所述细胞在受试者中。

48. 权利要求47所述的方法,其中所述受试者是人。

49. 权利要求46-48任一项所述的方法,其中所述细胞位于中枢神经系统中。

50. 权利要求46-49任一项所述的方法,其中所述受试者鉴定为患有tau疾病。

51. 权利要求50所述的方法,其中所述tau疾病选自阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、原发性年龄相关性tau蛋白病(PART)、慢性创伤性脑病(CTE)、进行性核上性麻痹(PSP)、皮质基底节变性(CBD)、与染色体17相关的额颞痴呆与帕金森综合征(FTDP-17)、Lyticobodig病、神经节神经胶质瘤和神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、脑炎后帕金森综合征、亚急性硬化性全脑炎(SSPE)、铅毒性脑病、结节性硬化症、泛酸激酶相关神经退行性变和脂褐质沉积症。

52. 权利要求50或权利要求51所述的方法,其中所述tau疾病是阿尔茨海默病。

53. 权利要求46-52任一项所述的方法,其中与对照细胞相比,所述细胞中聚集的tau蛋白的量减少。

54. 在有需要的受试者中治疗、预防tau疾病或延缓tau疾病进展的方法,所述方法包括施用有效量的一种或多种药剂,所述药剂选自权利要求1-36任一项所述的融合蛋白、表达权利要求1-36所述的融合蛋白的细胞、权利要求37-40任一项所述的核酸、权利要求41-42任一项所述的载体、权利要求43-44任一项所述的病毒颗粒、和权利要求45所述的药物组合物。

55. 权利要求54所述的方法,其中所述tau疾病选自阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、原发性年龄相关性tau蛋白病(PART)、慢性创伤性脑病(CTE)、进行性核上性麻痹(PSP)、皮质基底节变性(CBD)、与染色体17相关的额颞痴呆与帕金森综合征(FTDP-17)、Lyticobodig病、神经节神经胶质瘤和神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、脑炎后帕金森综合征、亚急性硬化性全脑炎(SSPE)、铅毒性脑病、结节性硬化症、泛酸激酶相关神经退行性变和脂褐质沉积症。

56. 权利要求55所述的方法,其中所述tau疾病是阿尔茨海默病。

57. 权利要求1-36任一项所述的融合蛋白、表达权利要求1-36任一项所述的融合蛋白

的细胞、权利要求37-40任一项所述的核酸、权利要求41-42任一项所述的载体、权利要求43-44任一项所述的病毒颗粒、和权利要求45所述的药物组合物中的一种或多种在受试者中预防tau疾病或延缓tau疾病进展的用途。

58. 权利要求1-36任一项所述的融合蛋白、表达权利要求1-36任一项所述的融合蛋白的细胞、权利要求37-40任一项所述的核酸、权利要求41-42任一项所述的载体、权利要求43-44任一项所述的病毒颗粒、和权利要求45所述的药物组合物中的一种或多种在用于在受试者中治疗或预防帕金森病的药物的制备中的用途。

用于治疗阿尔茨海默病的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请依35U.S.C. §119 (e) 要求2020年10月26日提交的美国临时专利申请63/105,472的优先权。前述申请的全部内容通过引用整体并入本文。

[0002] 发明背景

所有在细胞内表达的蛋白需要正确折叠成它们的预期结构以便正确发挥功能。越来越多的疾病和障碍显示与蛋白的不适当折叠和/或蛋白与脂蛋白以及感染性蛋白物质的不适当沉积和聚集有关。也称为构象疾病或蛋白构象病,由错误折叠引起的疾病的实例包括阿尔茨海默病(AD)、肌萎缩性侧索硬化(ALS)和额颞叶痴呆(FTLD)。突变蛋白在细胞中聚集,引起典型的细胞毒性细胞包涵体。

[0003] 多种神经退行性疾病的病理学特征在于由淀粉样原纤维构成的细胞内或细胞外蛋白聚集体的累积(Forman等人,(2004)Nat Med 10:1055-1063)。

[0004] AD是最常见的神经退行性障碍,每八位老年美国人中有一位受其影响。大约32%的超过85岁的人患有该疾病,仅在美国就有超过五百四十万患者。尽管进行了深入的研究,但AD不能治愈,并且仅有对症治疗可用。

[0005] AD的特征在于记忆缺陷和总体认知功能障碍,这是由于在包括海马体和大脑新皮层的某些脑区域中的突触损失和神经元死亡所致(Norfray&Provenzale,(2004)AJR Am JRoentgenol 182:3-13;Ittner&Gotz(2011)Nat Rev Neurosci 12:65-72)。尽管现在清楚的是神经元变性与AD记忆和认知损伤相关联,但是受影响区域中神经退行性变下面的分子机制在很大程度上仍无法解释。神经元损伤与细胞外老年斑中淀粉样蛋白 β (A β)的沉积(Selkoe,(2001)Neuron 32:177-180;Fan等人,(2007)J Neuroinflammation 4:22),以及由过度磷酸化的tau蛋白组成的神经元内神经原纤维缠结(NFT)有关。(Ittner&Gotz(2011)Nat Rev Neurosci 12:65-72;Francis等人,(1999)J Neurol Neurosurg Psychiatry 66:137-147;Craig等人,(2011)Neurosci Biobehav Rev 35:1397-1409)。但是,这些蛋白沉积物对AD病理学的贡献在很大程度上是未知的。

[0006] A β 和tau在突触中均可具有正常的作用,而这些蛋白的病理种类可导致突触变性(Spires-Jones&Hyman,(2014)Neuron 82:756-771)。

[0007] 除了组织学研究,早发性家族性AD(FAD)与几个基因座的遗传连锁的发现为鉴定有助于该疾病的发病机理的遗传因素提供了保证。早发性FAD是由三个基因(APP、PSE1和PSE2)中的遗传性基因突变和一个显著的遗传风险因子——APOE ϵ 4等位基因所引起(Spires-Jones&Hyman,(2014)Neuron 82:756-771)。在全基因组关联研究(GWAS)和大规模平行再测序(MPS)工作中已经鉴定了另外的遗传风险基因座(Van Cauwenberghe等人,(2016)Genet Med 18:421-430)。

[0008] 这些遗传研究尚未揭示tau和FAD之间的相关性,但是,连锁分析提示tau和其它神经退行性疾病之间的相关性,其中许多疾病定位于tau基因所在染色体上的区域17q21-22(Wilhelmsen等人,(1994)Am J Hum Genet 55:1159-1165;Wijker等人,(1996)Hum Mol Genet 5:151-154;Bird等人,(1997)Neurology 48:949-954;Lendon等人,(1998)Neurology

50:1546-1555)。随后,从遗传显性染色体17相关的额颞痴呆合并帕金森综合征(FTDP-17)中鉴定了tau基因中的突变(Foster等人,(1997)Ann Neurol 41:706-715;Hutton等人,(1998)Nature393:702-705;Poorkaj等人,(1998)Ann Neurol 43:815-825;Spillantini等人,(1998)Proc Natl Acad Sci U S A 95:7737-7741)。

[0009] tau是一种微管相关蛋白,其结合至微管并促进微管组装。tau与微管的结合促进了微管聚合(Cleveland等人,(1977)J Mol Biol 116:227-247;Weingarten等人,(1975)Proc Natl Acad Sci U S A 72:1858-1862)。对tau序列的分析揭示,tau具有四个微管结合基序,其位于蛋白的C端末端的4个重复区域中,具有由较不保守的13-14个氨基酸分隔的保守的18个氨基酸长的结合元件(Lee等人,(2001)Neurosci 24:1121-1159)。在成人大脑中,通过选择性剪接产生长度范围为325至441个氨基酸的六种tau同种型(Goedert等人,(1988)Proc Natl Acad Sci U S A 85:4051-4055)。

[0010] tau在中枢神经系统(CNS)中大量表达,并主要位于轴突中,而tau在外周神经系统(PNS)的轴突中以较低水平表达。在CNS星形胶质细胞和少突胶质细胞中仅观察到低水平的表达(Cleveland等人,(1977)J Mol Biol 116:227-247;Binder等人,(1985)J Cell Biol 101:1371-1378;LoPresti等人,(1995)Proc Natl Acad Sci U S A 92:10369-10373)。

[0011] tau是在正常条件下固有地无序且高度可溶的蛋白(Jeganathan等人,(2008)Biochemistry47:10526-10539),而其通过异常修饰(诸如过度磷酸化)转变为不溶(Kopeikina等人,(2012)Transl Neurosci 3:223-233)。过度磷酸化的tau蛋白可导致成对的螺旋纤丝(PHF)和直纤丝的缠结的自组装,其涉及AD、额颞痴呆(FTD)和其它tau蛋白病的发病机理。tau蛋白的成对螺旋纤丝(PHF)和过度磷酸化是AD和几种其它神经退行性tau蛋白病(包括FTDP-17和进行性核上性麻痹(PSP))中两种最公认的分子特征(Lee等人,(2001)Neurosci 24:1121-1159)。

[0012] Tau蛋白病是一组神经退行性障碍,其具有共同的病理特征——形成由纤丝状的过度磷酸化的tau蛋白构成的不溶性神经内聚集体(Lee等人,(2001)Neurosci 24:1121-1159;Delacourte,(2001)Adv Exp Med Biol 487:5-19)。

[0013] 尽管它们的临床表现不同,但这些神经退行性障碍具有共同的病理特征:形成由纤丝状的过度磷酸化的tau蛋白构成的不溶性神经内聚集体(Lee等人,(2001)Neurosci 24:1121-1159;Delacourte,(2001)Adv Exp Med Biol 487:5-19),表明tau功能障碍是这些神经退行性疾病的促成因素(Lee等人,(2001)Neurosci 24:1121-1159)。tau基因中的一些突变导致形成由过度磷酸化的tau蛋白构成的纤丝(Crowther&Goedert,(2000)J Struct Biol 130:271-279)。

[0014] 热休克70kDa蛋白(在本文中称为“Hsp70”)在多种物种的细胞中构成普遍存在的一类伴侣蛋白(Tavaria等人,(1996)Cell Stress Chaperones 1:23-28)。Hsp70需要被称为辅伴侣蛋白的辅助蛋白,诸如J结构域蛋白和核苷酸交换因子(NEF)(Hartl等人,(2009)Nat Struct Mol Biol 16:574-581)以发挥作用。在折叠蛋白的Hsp70伴侣蛋白机制的当前模型中,Hsp70在ATP-和ADP-结合状态之间循环,并且J结构域蛋白结合到需要折叠或再折叠的另一蛋白(称为“客户蛋白”)上,与Hsp70的ATP结合形式(Hsp70-ATP)相互作用(Young(2010)Biochem Cell Biol 88:291-300;Mayer,(2010)Mol Cell 39:321-331)。J结构域蛋白-客户复合物与Hsp70-ATP的结合刺激ATP水解,这导致了Hsp70蛋白的构象变化,闭合螺

旋盖,并由此稳定客户蛋白与Hsp70-ADP之间的相互作用,以及引起J结构域蛋白的释放,其随后自由结合至另一客户蛋白。

[0015] 因此,根据该模型,J结构域蛋白通过充当桥,并促进多种客户蛋白的捕获和递送至Hsp70机制中以促进正确折叠或再折叠而在Hsp70机制中起到关键作用(Kampinga&Craig (2010) Nat Rev Mol Cell Biol 11:579-592)。J结构域家族在原核生物(DnaJ蛋白)至真核生物(Hsp40蛋白家族)的物种范围中广泛保守。J结构域(大约60-80aa)由四个螺旋构成:I、II、III和IV。螺旋II和III经由含有“HPD基序”的柔性环连接,该基序在J结构域中高度保守,并被认为对活性是至关重要的,因为HPD序列内的突变消除了J结构域功能(Tsai& Douglas, (1996) J Biol Chem 271:9347-9354)。

[0016] 鉴于以上提供的关于蛋白构象病(诸如AD)的背景,似乎清楚的是,降低错误折叠的蛋白的水平可以用作治疗、预防或以其它方式改善这些破坏性障碍的症状的手段,并且招募细胞的修复蛋白错误折叠的固有能力将是合乎逻辑的选择。

[0017] 发明概述

本发明人已经开发了一类新的融合蛋白以招募细胞的固有Hsp70介导的伴侣机制,从而特异性地减少tau介导的蛋白聚集。与本发明人使用包含Hsp40蛋白(也称为J蛋白)(一种与Hsp70相互作用以增强蛋白分泌与表达的辅伴侣蛋白)片段的融合蛋白的在先研究不同,本研究使用含有J结构域的融合蛋白用于减少突变tau蛋白聚集引起的蛋白聚集和细胞毒性的目的。在这种背景下,本发明人已做出了引人注目的发现,即J结构域功能所需的元件与J结构域在增强蛋白表达和分泌中的用途完全不同,这证明了本融合蛋白的作用模式的独特机制。本文中描述的融合蛋白包含J结构域和对tau具有亲和力的结构域。融合蛋白中tau结合结构域的存在导致突变tau蛋白的聚集的特异性降低。

[0018] E1.因此,在第一方面,本文中公开了一种分离的融合蛋白,其包含J蛋白的J结构域和tau结合结构域。

[0019] E2.E1的融合蛋白,其中J蛋白的J结构域是真核来源的。

[0020] E3.E1-E2任一项的融合蛋白,其中J蛋白的J结构域是人源的。

[0021] E4.E1-E3任一项的融合蛋白,其中J蛋白的J结构域是胞质定位的。

[0022] E5.E1-E4任一项的融合蛋白,其中J蛋白的J结构域选自SEQ ID NO:1-48。

[0023] E6.E1-E5任一项的融合蛋白,其中J结构域包含选自SEQ ID NO:5、6、10、24和31的序列。

[0024] E7.E1-E6任一项的融合蛋白,其中J结构域包含SEQ ID NO:5的序列。

[0025] E8.E1-E6任一项的融合蛋白,其中J结构域包含SEQ ID NO:6的序列。

[0026] E9.E1-E6任一项的融合蛋白,其中J结构域包含SEQ ID NO:10的序列。

[0027] E10.E1-E6任一项的融合蛋白,其中J结构域包含SEQ ID NO:24的序列。

[0028] E11.E1-E6任一项的融合蛋白,其中J结构域包含SEQ ID NO:31的序列。

[0029] E12.E1-E11任一项的融合蛋白,其中当使用ELISA测定测量时,tau结合结构域具有1 μ M以下,例如300nM以下、100nM以下、30nM以下、10nM以下的对tau的K_D。

[0030] E13.E1-E12任一项的融合蛋白,其中tau结合结构域包含选自SEQ ID NO:49-54的序列。

[0031] E14.E1-E13任一项的融合蛋白,其中tau结合结构域包含SEQ ID NO:49的序列。

- [0032] E15.E1-E13任一项的融合蛋白,其中tau结合结构域包含SEQ ID NO:50的序列。
- [0033] E16.E1-E13任一项的融合蛋白,其中tau结合结构域包含SEQ ID NO:51的序列。
- [0034] E17.E1-E13任一项的融合蛋白,其中tau结合结构域包含SEQ ID NO:52的序列。
- [0035] E18.E1-E13任一项的融合蛋白,其中tau结合结构域包含SEQ ID NO:53的序列。
- [0036] E19.E1-E13任一项的融合蛋白,其中tau结合结构域包含SEQ ID NO:54的序列。
- [0037] E20.E1-E19任一项的融合蛋白,其包含多个tau结合结构域。
- [0038] E21.E1-E20任一项的融合蛋白,其由两个tau结合结构域组成。
- [0039] E22.E1-E21任一项的融合蛋白,其由三个tau结合结构域组成。
- [0040] E23.E1-E22任一项的融合蛋白,其包含以下构建体之一:
- a. DNAJ-X-T,
 - b. DNAJ-X-T-X-T,
 - c. DNAJ-X-T-X-T-X-T,
 - d. T-X-DNAJ,
 - e. T-X-T-X-DNAJ,
 - f. T-X-T-X-T-X-DNAJ,
 - g. T-X-DNAJ-X-T,
 - h. T-X-DNAJ-X-T-X-T,
 - i. T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
 - j. T-X-T-X-DNAJ-X-T,
 - k. T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T,
 - l. T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
 - m. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T,
 - n. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T,和
 - o. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
- 其中,
T是tau结合结构域,
DNAJ是J蛋白的J结构域,且
X是任选的接头。
- [0041] E24.E1-E23任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域序列和SEQ ID NO:49的tau结合结构域序列。
- [0042] E25.E1-E23任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域序列和SEQ ID NO:50的tau结合结构域序列。
- [0043] E26.E1-E23任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域序列和SEQ ID NO:51的tau结合结构域序列。
- [0044] E27.E1-E23任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域序列和SEQ ID NO:52的tau结合结构域序列。
- [0045] E28.E1-E23任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域序列和SEQ ID NO:53的tau结合结构域序列。
- [0046] E29.E1-E23任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域序列和

SEQ ID NO:54的tau结合结构域序列。

[0047] E30.E1-E29任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含选自SEQ ID NO:83-88和95-101的序列。

[0048] E31.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:83的序列。

[0049] E32.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:84的序列。

[0050] E33.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:85的序列。

[0051] E34.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:86的序列。

[0052] E35.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:87的序列。

[0053] E36.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:88的序列。

[0054] E37.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:95的序列。

[0055] E38.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:96的序列。

[0056] E39.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:97的序列。

[0057] E40.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:98的序列。

[0058] E41.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:99的序列。

[0059] E42.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:100的序列。

[0060] E43.E1-E30任一项的融合蛋白,其中融合蛋白包含SEQ ID NO:101的序列。

[0061] E44.E1-E43任一项的融合蛋白,其进一步包含靶向试剂。

[0062] E45.E1-E44任一项的融合蛋白,其进一步包含表位。

[0063] E46.E45的融合蛋白,其中表位是选自SEQ ID NO:66-72的多肽。

[0064] E47.E1-E46任一项的融合蛋白,其进一步包含细胞穿透剂。

[0065] E48.E47的融合蛋白,其中细胞穿透剂包含选自SEQ ID NO:73-76的肽序列。

[0066] E49.E1-E48任一项的融合蛋白,其进一步包含信号序列。

[0067] E50.E49的融合蛋白,其中信号序列包含选自SEQ ID NO:77-79的肽序列。

[0068] E51.E1-E50任一项的融合蛋白,其能够减少tau蛋白在细胞中的聚集。

[0069] E52.E1-E51任一项的融合蛋白,其能够减少tau介导的细胞毒性。

[0070] E53.编码E1-E52任一项的融合蛋白的核酸序列。

[0071] E54.E53的核酸序列,其中所述核酸是DNA。

[0072] E55.E54任一项的核酸序列,其中所述核酸是RNA。

[0073] E56.E53-E55任一项的核酸序列,其中所述核酸包含至少一种修饰的核酸。

[0074] E57.包含E53-E56任一项的核酸序列的载体。

[0075] E58.E57的载体,其中载体选自腺相关病毒(AAV)、腺病毒、慢病毒、逆转录病毒、疱疹病毒、痘病毒(牛痘或粘液瘤)、副粘病毒(麻疹、RSV或新城疫病毒)、杆状病毒、呼肠孤病毒、甲病毒和黄病毒。

[0076] E59.包含衣壳和E57或E58的载体的病毒颗粒。

[0077] E60.E59的病毒颗粒,其中衣壳选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV rh10、AAV11、AAV12、假型AAV、恒河猴来源的AAV、AAVrh8、AAVrh10和AAV-DJan AAV衣壳突变体、AAV杂合血清型、亲器官AAV、亲心脏AAV和亲心脏AAVM41突变体。

[0078] E61.药物组合物,其包含选自E1-E52任一项的融合蛋白、表达E1-E52的融合蛋白的细胞、E53-E56任一项的核酸、E57-E58任一项的载体、E59-E60任一项的病毒颗粒的药剂,

以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0079] E62.降低tau蛋白在细胞中的毒性的方法,其包括使所述细胞与E1-E52任一项的融合蛋白、表达E1-E52的融合蛋白的细胞、E53-E56任一项的核酸、E57-E58任一项的载体、E59-E60任一项的病毒颗粒和E61的药物组合物接触。

[0080] E63.E62的方法,其中细胞在受试者中。

[0081] E64.E62-E63任一项的方法,其中受试者是人。

[0082] E65.E62-E64任一项的方法,其中细胞是中枢神经系统的细胞。

[0083] E66.E62-E65任一项的方法,其中受试者鉴定为患有tau蛋白病。

[0084] E67.E66的方法,其中tau疾病选自阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、原发性年龄相关性tau蛋白病(PART)、慢性创伤性脑病(CTE)、进行性核上性麻痹(PSP)、皮质基底节变性(CBD)、与染色体17相关的额颞痴呆与帕金森综合征(FTDP-17)、Lytico-bodig病、神经节神经胶质瘤和神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、脑炎后帕金森综合征、亚急性硬化性全脑炎(SSPE)、铅毒性脑病、结节性硬化症、泛酸激酶相关神经退行性变和脂褐质沉积症。

[0085] E68.E66或E67的方法,其中tau蛋白病是阿尔茨海默病(AD)。

[0086] E69.E62-E68任一项的方法,其中与对照细胞相比,细胞中聚集的tau蛋白的量减少。

[0087] E70.在有需要的受试者中治疗、预防tau疾病或延缓tau疾病进展的方法,该方法包括施用有效量的一种或多种药剂,所述药剂选自E1-E52任一项的融合蛋白、表达E1-E52的融合蛋白的细胞、E53-E56任一项的核酸、E57-E58任一项的载体、E59-E60任一项的病毒颗粒和E61的药物组合物。

[0088] E71.E70的方法,其中tau疾病选自阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、原发性年龄相关性tau蛋白病(PART)、慢性创伤性脑病(CTE)、进行性核上性麻痹(PSP)、皮质基底节变性(CBD)、与染色体17相关的额颞痴呆与帕金森综合征(FTDP-17)、Lytico-bodig病、神经节神经胶质瘤和神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、脑炎后帕金森综合征、亚急性硬化性全脑炎(SSPE)、铅毒性脑病、结节性硬化症、泛酸激酶相关神经退行性变和脂褐质沉积症。

[0089] E72.E70或E71的方法,其中tau蛋白病是阿尔茨海默病(AD)。

[0090] E73.E1-E52任一项的融合蛋白、表达E1-E52的融合蛋白的细胞、E53-E56任一项的核酸、E57-E58任一项的载体、E59-E60任一项的病毒颗粒和E61的药物组合物中的一种或多种在受试者中预防tau疾病或延缓tau疾病进展的用途。

[0091] E74.E1-E52任一项的融合蛋白、表达E1-E52的融合蛋白的细胞、E53-E56任一项的核酸、E57-E58任一项的载体、E59-E60任一项的病毒颗粒和E61的药物组合物中的一种或多种在可用于在受试者中治疗、预防tau蛋白病或延缓tau蛋白病进展的药物的制备中的用途。

附图描述

[0092] 图1A显示了代表性人J结构域序列的Clustal Omega序列比对。高度保守的HPD结构域显示在突出显示的框中。

[0093] 图1B显示了代表性人J结构域序列的Clustal Omega序列比对。

[0094] 图2显示了一些说明性融合蛋白构建体,其包含J结构域和tau结合结构域。

[0095] 图3显示了细胞提取物的蛋白印迹分析,其展现了野生型tau ON4R(泳道2-6)或突

变体 (P243S) tau (泳道7-11) 的表达,其各自包含V5表位,并还共表达各种融合蛋白构建体 JB1-TBP构建体1 (泳道3和8);JB1-ScFv (tau) 构建体4 (泳道4和9);JB1-ScFv (MW7) 构建体5 (泳道5和10);和JB1-Happ1构建体6 (泳道6和11)。上图显示了用抗V5抗体探测的tau蛋白水平,而下图显示了用抗pTau (Ser396) 抗体探测的磷酸化tau水平。

[0096] 图4显示了细胞提取物的免疫印迹分析,其展现了野生型tau 0N4R (泳道2,3,7和8) 或突变体 (P243S) tau (泳道4,5,9,10) 的单独表达或共表达含有Flag表位的JB1-ScFv (tau) (泳道3,5,8和10)。上图用识别tau 2N4R中Thr231处的磷酸化tau (泳道1-5) 或Ser396处的磷酸化tau (泳道6-10) 的抗体探测。下图用抗Flag抗体探测以检测J结构域融合蛋白 (在这种情况下,JB1-ScFv (tau) 构建体,或构建体4)。

[0097] 图5显示了细胞提取物的免疫印迹分析,其展现了野生型tau 0N4R (泳道2-5) 或突变体 (P243S) tau (泳道6-9) 的单独表达 (泳道1和6) 或共表达构建体4 [JB1-ScFv (tau) (泳道4和8)], 构建体8 [与JB1-ScFv (tau) 相同的对照构建体,不同之处在于在J结构域的保守HPD基序内的P33Q突变 (泳道5和9)] 以及仅ScFv (tau) [不含J结构域的构建体4 (泳道3和7)]。

[0098] 图6显示了细胞提取物的免疫印迹,其展现了野生型 (泳道2-6) 或突变体 (P243S) tau (泳道7-11) 的单独表达 (泳道2和7)、共表达构建体6 (JB1-Happ1,泳道3和8)、构建体1 (JB1-TBP1,泳道4和9)、构建体14 (JB1-TBP2,泳道5和10) 或构建体11 (JB1-QBP1,泳道6和11)。

[0099] 图7显示了细胞提取物的免疫印迹,其展现了野生型 (泳道1-3) 或截短的Tau3R (泳道4-6) 和共表达构建体1 (JB1-TBP1,泳道2和5) 或构建体7 (在保守J结构域HPD基序内含有P33Q突变的JB1-TBP1,泳道3和6) 的野生型tau或截短的Tau3R的表达。

[0100] 图8显示了如使用LDH测定所测得的,表达构建体1 (JB1-TBP1) 对tau介导的细胞毒性的影响。

[0101] 定义

如在说明书和权利要求书中所用,单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“该/所述”包括复数指代物,除非上下文另行清楚地指明。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0102] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可互换使用,指的是任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是直链或支链的,其可包含修饰的氨基酸,并且其可以被非氨基酸中断。该术语还涵盖已经通过例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它修饰 (诸如与标记组件缀合) 来修饰的氨基酸聚合物。

[0103] 如本文中使用的术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成的氨基酸,包括但不限于D或L光学异构体,以及氨基酸类似物和肽模拟物。标准的单字母或三字母代码用于指示氨基酸。

[0104] “宿主细胞”包括可以是或已经是本发明的载体的接受者的单个细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代。由于天然、偶然或故意的突变,子代不一定与原始亲本细胞完全相同 (在形态学或总DNA互补序列 (complement) 的基因组学方面)。宿主细胞包括用本发明的载体体内转染的细胞。

[0105] “分离的”当用于描述本文中公开的各种多肽时是指已经从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收的多肽。其天然环境的污染组分是通常会干扰多肽的诊断或治疗用

途的材料,并可包括酶、激素和其它蛋白或非蛋白溶质。如对本领域技术人员显而易见的那样,非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白、抗体或其片段不需要“分离”以将其与其天然存在的对应物区分。此外,“浓缩的”、“分离的”或“稀释的”多核苷酸、肽、多肽、蛋白、抗体或其片段与其天然存在的对应物的区别在于,每体积的浓度或分子数量通常大于其天然存在的对应物。通常,通过重组手段制得并在宿主细胞中表达的多肽被认为是“分离的”。

[0106] “分离的”多核苷酸或编码多肽的核酸或编码其它多肽的核酸是经鉴定并与至少一种污染物核酸分子分离的核酸分子,所述污染物核酸分子通常在编码多肽的核酸的天然来源中与所述核酸分子相关联。分离的编码多肽的核酸分子不同于其在自然界中发现的形式或环境。因此,分离的编码多肽的核酸分子区别于存在于天然细胞中的特定的编码多肽的核酸分子。但是,分离的编码多肽的核酸分子包括通常表达该多肽的细胞中所含有的编码多肽的核酸分子,其中例如核酸分子在不同于天然细胞的染色体或染色体外位置。

[0107] 术语“多核苷酸”、“核酸”、“核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)的聚合形式,或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构,并且可以执行任何已知或未知的功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段的编码或非编码区、由连锁分析限定的基因座(loci)(基因座(locus))、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可包含修饰的核苷酸,诸如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在的话,可在聚合物组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组件中断。多核苷酸可以在聚合后进一步修饰,诸如通过与标记组件缀合。

[0108] 如本文中定义的术语“tau障碍”、“tau疾病”、“tau蛋白病”或“tau介导的疾病”是指与细胞内tau聚集体,特别是tau突变蛋白的聚集体的形成相关的障碍。tau障碍的实例包括但不限于阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、原发性年龄相关性tau蛋白病(PART)、慢性创伤性脑病(CTE)、进行性核上性麻痹(PSP)、皮质基底节变性(CBD)、与染色体17相关的额颞痴呆与帕金森综合征(FTDP-17)、Lytic-bodig病、神经节神经胶质瘤和神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、脑炎后帕金森综合征、亚急性硬化性全脑炎(SSPE)、铅毒性脑病、结节性硬化症、泛酸激酶相关神经退行性变和脂褐质沉积症。

[0109] “载体”是核酸分子,优选在合适的宿主中自我复制,其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或在宿主细胞之间转移。该术语包括主要用于将DNA或RNA插入细胞的载体、主要用于复制DNA或RNA的载体的复制物、以及用于转录和/或翻译DNA或RNA的表达载体。还包括提供超过一种上述功能的载体。“表达载体”是多核苷酸,当引入合适的宿主细胞时其可以被转录和翻译成多肽。“表达系统”通常是指包含表达载体的合适的宿主细胞,所述表达载体可用于产生所需表达产物。

[0110] 术语“可操作地连接”是指所述组分的并置,其中组分处于允许其以它们预期的方式发挥作用的关系下。“可操作地连接”至编码序列的控制序列以使得在与控制序列相容的条件下实现编码序列的表达的方式连接。“可操作地连接的”序列可包括与目标基因邻接的表达控制序列和以反式作用或在一定距离处作用以控制目标基因的表达控制序列二者。术语“表达控制序列”是指影响与其连接的编码序列的表达和加工所必需的多核苷酸序列。表达控制序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号,诸如剪

接和多聚腺苷酸化信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(诸如Kozak共有序列);增强蛋白稳定性的序列;以及当需要时增强蛋白分泌的序列。此类控制序列的性质取决于宿主生物而不同;在原核生物中,此类控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列;在真核生物中,通常,此类控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”意在包括其存在对于表达和加工必不可少的组件,并且还可包括其存在是有利的另外的组件,例如前导序列和融合配偶体序列。除非另行说明,本文中编码本发明的融合蛋白的核酸分子插入表达载体的描述或陈述是指在将含有插入的核酸分子的表达载体引入相容宿主细胞或生物体的相容细胞时,插入的核酸也已在载体内可操作地连接至表达编码的融合蛋白所需的功能性启动子和其它转录和翻译控制元件。

[0111] “重组的”当应用于多核苷酸时是指多核苷酸是体外克隆、限制和/或连接步骤和其它程序的各种组合的产物,所述组合产生可以潜在地在宿主细胞中表达的构建体。

[0112] 术语“基因”和“基因片段”在本文中可互换使用。它们是指含有至少一个开放阅读框的多核苷酸,所述开放阅读框能够在转录和翻译后编码特定的蛋白。基因或基因片段可以是基因组或cDNA,只要多核苷酸含有至少一个开放阅读框,其可以覆盖整个编码区或其区段。“融合基因”是由至少两个连接在一起的异源多核苷酸构成的基因。

[0113] 术语“疾病”和“障碍”可互换使用以指示根据本领域可接受的医学标准和实践鉴定的病理状态。

[0114] 本文中使用的术语“有效量”是指治疗的量,其足以减轻或改善疾病或其一种或多种症状的严重程度和/或持续时间;阻止有害或病理状态的发展;引起病理状态的消退;预防与病理状态相关的一种或多种症状的复发、发展、发作或进展;检测障碍;或增强或改善治疗(例如施用另一种预防或治疗剂)的预防或治疗效果。

[0115] 本文中使用的术语“J结构域”是指保留促进Hsp70及其同源物的固有ATP酶催化活性的能力的片段。已经确定了多种J蛋白的J结构域(参见例如Kampinga等人,(2010) Nat. Rev., 11:579-592;Hennessy等人,(2005) Protein Science, 14:1697-1709,其各自通过引用全文并入本文)并且其通过许多标志来表征:其特征在于四个 α -螺旋(I、II、III、IV),并且通常在螺旋II和III之间具有组氨酸、脯氨酸和天冬氨酸的高度保守的三肽序列基序(称为“HPD基序”)。通常,J蛋白的J结构域的长度为五十至七十个氨基酸,并且J结构域与Hsp70-ATP伴侣蛋白的相互作用(结合)位点据信是从螺旋II内延伸的区域,并且HPD基序对于刺激Hsp70 ATP酶活性是必需的。本文中使用的术语“J结构域”是指包括天然J结构域序列及其功能性变体,所述功能性变体保留了促进Hsp70固有ATP酶活性的能力,这可以采用本领域中公知的方法来量度(参见例如Horne等人,(2010) J. Biol. Chem., 285, 21679-21688,其通过引用全文并入本文)。在表1中提供了人J结构域的非限制性列表。

[0116] 发明详述

本发明人发现,将某些细胞与含有J蛋白的J结构域和tau结合结构域的融合蛋白构建体接触具有预料不到的减少过度磷酸化Tau蛋白的效果。过度磷酸化的tau蛋白据信引起多种毁灭性疾病,包括但不限于阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、原发性年龄相关性tau蛋白病(PART)、慢性创伤性脑病(CTE)、进行性核上性麻痹(PSP)、皮质基底节变性(CBD)、与染色体17相关的额颞痴呆与帕金森综合征(FTDP-17)、Lytic-bodig病、神经节神经胶质瘤和神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、脑炎后帕金森综合征、亚急性硬化性全脑炎

(SSPE)、铅毒性脑病、结节性硬化症、泛酸激酶相关神经退行性变和脂褐质沉积症。因此,在本文中提供了例如在有需要的受试者中治疗tau相关障碍的有用组合物和方法。

[0117] 为了克服与基于伴侣蛋白的疗法相关联的问题,我们研究了是否能设计具有高特异性的人工伴侣蛋白。我们设计了一系列融合蛋白构建体,其包含Hsp70结合/激活的效应结构域(J结构域序列)和赋予对tau蛋白的特异性的结构域。所得到的融合蛋白用于促进Hsp70及其同源物的固有ATP酶催化活性,导致增加的蛋白折叠、减少的聚集和/或促进的清除。

[0118] I. 融合蛋白构建体

a. 可用于本发明的J结构域

已经确定了多种J蛋白的J结构域。参见例如Kampinga等人,Nat.Rev.,11:579-592(2010);Hennessy等人,Protein Science,14:1697-1709(2005)。可用于制备本发明的融合蛋白的J结构域具有主要促进HSP70 ATP酶活性的J结构域的关键限定特征。因此,可用于本发明的分离的J结构域包含多肽结构域,其特征在于四个 α -螺旋(I、II、III、IV),并且通常在螺旋II和III之间具有组氨酸、脯氨酸和天冬氨酸的高度保守的三肽序列(称为“HPD基序”)。通常,J蛋白的J结构域的长度为五十至七十个氨基酸,并且J结构域与Hsp70-ATP伴侣蛋白的相互作用(结合)位点据信是从螺旋II内延伸的区域,并且HPD基序对原始活性是必不可少的。代表性的J结构域包括但不限于DnaJB1、DnaJB2、DnaJB6、DnaJC6的J结构域、SV40的大T抗原的J结构域和哺乳动物半胱氨酸链蛋白(CSP- α)的J结构域。在表1中提供了这些和可用于本发明的融合蛋白的其它J结构域的氨基酸序列。保守的HPD基序以粗体突出显示。

表1.代表性人J结构域序列

蛋白名称	SEQ ID NO:	基因 NCBI 参考	蛋白 NCBI 参考	J 结构域氨基酸序列
DNAJA1	1	NM_001539	NP_001530	TYVDVLGVKPNATQEELKKAYRKLALKY HPD KNPNEGEKFKQISQAYEVLSDAKKRELYDKGG
DNAJA2	2	NM_005880	NP_005871	KLYDILGVPPGASENELKKAYRKLAK EY HPD KNPNAGDKFKEISFAYEVLSP EKRELYDRYG
DNAJA3	3	NM_001135110	NP_001128582	DYYQILGVPRNASQKEIKKAYYQLA KKY HPD TNKDDPKAKEKFSQLAEAY EVLSDEVKRRKQYDAYG
DNAJA4	4	<u>NM_001130182</u>	NP_001123654	ETQYYDILGVKPSASPEEIKKAYRKL ALKY HPD KNPDEGEKFKLISQAYEV LSDPKKRVDYDQGGEQ
DNAJB1	5			GKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRR QALRY HPD KNKEPGAEKFKFKEIAEA YDVLSDPRKREIFDRYGEE
DNAJB2	6	<u>NM_001039550</u>	<u>NP_001034639</u>	ASYEILDVPRASADDIKKAYRRKALQW HPD KNPDNKEFAEKKFKEVAEAYEVLSDKHKREIYDRYGRE
DNAJB3	7	<u>NM_001001394</u>	<u>NP_001001394</u>	MVDYYEVLDPVPRQASSEAIKKAYRKLALKW HPD KNPENKEEAERRFKQVA EAYEVLSDAKKRDIYDRYG
DNAJB4	8	<u>NM_001317099</u>	<u>NP_001304028</u>	GKDYYCILGIEKGASDEDIKKAYRKQ ALKF HPD KNKSPQAEKFKFKEVAEAY EVLSDPKKREIYDQFGEE
DNAJB5	9	<u>NM_001135004</u>	<u>NP_001128476</u>	DYYKILGIPSGANEDEIKKAYRKMAL KY HPD KNKEPNAEEKFKFKEIAEAYDVLSDPKKRGLYDQYG
DNAJB6	10	<u>NM_005494</u>	<u>NP_005485</u>	VDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKL ALKW HPD KNPENKEEAERKFKQVA EAYEVLSDAKKRDIYDKYG
DNAJB7	11	<u>NM_145174</u>	<u>NP_660157</u>	DYYEVLGLQRYASPEDIKKAYHKVALKW HPD KNPENKEEAERKFKFKEVAEAYEVLSDNDEKRDIYDKYG
DNAJB8	12	<u>NM_153330</u>	<u>NP_699161</u>	NYEVLGVQASASPEDIKKAYRKLALRW HPD KNPDNKEEAEEKFKLVSEAYEVLSDSKRSLYDRAG
DNAJB9	13	<u>NM_012328</u>	<u>NP_036460</u>	SYDILGVPKSASERQIKKAFHKLAM KY HPD KNKSPDAEAKFREIAEAYET

				LSDANRRKEYDTLG
DNAJB11	14	<u>NM_016306</u>	<u>NP_057390</u>	DFYKILGVPRASAIKDIKKAYRKLAL QL HPDR NPDDPQAQEQFDLGAAYE VLSSEKRRKQYDTYG
DNAJB12	15	<u>NM_001002762</u>	<u>NP_001002762</u>	YEILGVSRGASDEDLKKAYRRLALKF HPD KNHAPGATEAFKAIGTAYAVLSN PEKRRKQYDQFGDD
DNAJB13	16	<u>NM_153614</u>	<u>NP_705842</u>	DYYSVLGITRNSEDAQIKQAYRRLAL KHHPLKSNPSSAEIFRQIAEAYDVL DPMKRGYDKFG
DNAJB14	17	<u>NM_001031723</u>	<u>NP_001026893</u>	NYEVLGVTKDAGDEDLKKAYRKL ALK FHPD KNHAPGATDAFKKIGNAY AVLSNPEKRRKQYDLTG
DNAJC1	18	<u>NM_022365</u>	<u>NP_071760</u>	NFYQFLGVQDASSADIRKAYRKL SL TLHPD KNKDENAETQFRQLVAIYEV LKDDERRQRYDDIL
DNAJC2	19	<u>NM_001129887</u>	<u>NP_001123359</u>	DHYAVLGLGHVRYKATQRQIKAAHK AMVLKH HPD KRKAAGEPIKEGDND YFTCITKAYEMLSDPVKRRAFNSVD
DNAJC3	20	<u>NM_006260</u>	<u>NP_006251</u>	DYYKILGVKRNAAKQEIKAAYRKLAL QW HPD NFQNEEEKKAEEKKFIDIAA AKEVLSDPKMRKKFDDGE
DNAJC4	21	<u>NM_001307980</u>	<u>NP_001294909</u>	TYEYELGVHPGASTEVEVKRAFFSKSK EL HPDR DPGNPSLHSRVELSEAYRV LSREQSRSYDDQL
DNAJC5	22	<u>NM_025219</u>	<u>NP_079495</u>	GESLYHVLGLDKNATSDDIKKSURKL ALKY HPD KNPDNPEAADKFKEINNA HAILTDATKRNIYDKYGSL
DNAJC5B	23	<u>NM_033105</u>	<u>NP_149096</u>	ALYELGLHKGASNEIKKTYRKLAL KH HPD KNPDDPAATEKFKEINNAHAI LTDISKRSIYDKYG
DNAJC6	24	<u>NM_001256864</u>	<u>NP_001243793</u>	TKWKPVGMADLVTPEQVKKVYRKA VLVV HPD KATGQPYEQYAKMIFMEL NDAWSEFENQGGKPLY
DNAJC7	25	<u>NM_001144766</u>	<u>NP_001138238</u>	DYYKILGVDKNASEDEIKKAYRKRA LMH HPDR HSGASAEVQKEEEKKFKE VGEAFTILSDPKKKTRYDSGQ
DNAJC8	26	<u>NM_014280</u>	<u>NP_055095</u>	NPFEVLQIDPEVTDEEIKRFRQLSIL V HPD KNQDDADRAQKAFAVDKAY KLLDQEQQKRALDVIQ
DNAJC9	27	<u>NM_015190</u>	<u>NP_056005</u>	DLYRVLGVRREASDGEVRRGYHKVS LQV HPDR VGEGDKEDATRRFQILGK VYSVLSDREQRAVYDEQG
DNAJC10	28	<u>NM_001271581</u>	<u>NP_001258510</u>	DFYSLGVSKTASSREIRQAFKKLAL KL HPD KNPNNPNAHGDFLKNRAYE VLKDEDLRKKYDKYG
DNAJC11	29	<u>NM_018198</u>	<u>NP_060668</u>	DYSSLNVRREASSEELKAAYRRLC MLY HPD KHRDPELKSQAERLFLNVH QAYEVLSDPQTRAIYDIYG
DNAJC12	30	<u>NM_021800</u>	<u>NP_068572</u>	DYYTLLGCDELSSVEQILAEFKVRAL EC HPD KHPENPKAVETFQKLQKAKEI LTNEESRARYDHWR
DNAJC13	31	<u>NM_015268</u>	<u>NP_056083</u>	DAYEVLNLPQGGPHDESKIRKAYFR LAQKY HPD KNPEGRDMFEKVNKAY EFLCTKSAKIVDGPDP
DNAJC14	32	<u>NM_032364</u>	<u>NP_115740</u>	NPFHVLGVEATASDVELKKAYRQLA VMV HPD KNHHPRAEEAFKVLRAAW DIVSNAEKRRKEYEMKR

DNAJC15	33	<u>NM_013238</u>	<u>NP_037370</u>	EAGLILGVSPSAGKAKIRTAHRRVMI LN HPDK GGSPYVAAKINEAKDLLET TTKH
DNAJC16	34			DPYRVLGVSRASQADIKKAYKKLA REW HPDK KNKDPGAEDKFIQISKAYEI LSNEEKRSNYDQYG
DNAJC17	35	<u>NM_018163</u>	<u>NP_060633</u>	DLYALLGIEEKAADKEVKKAYRQKA LS CHPDK KNPDNPRAAELFHQLSQAL EVLTDAAARAAYDKVR
DNAJC18	36	<u>NM_152686</u>	<u>NP_689899</u>	NYYEILGVSRDASDEELKKAYRKL LKF HPDK NCAPGATDAFKAIGNAFA VLSNPDKRLRYDEYG
DNAJC19	37	<u>NM_001190233</u>	<u>NP_001177162</u>	EAALILGVSPANKGKIRDAHRRIML LN HPDK GGSPYIAAKINEAKDLLEG QAKK
DNAJC20	38	<u>NM_172002</u>	<u>NP_741999</u>	DYFSLMDCNRSFRVDTAKLQHRYQQ LQRLV HPD FFSQRSTQTEKDFSEKHS LVNDAYKTL LAPLSRGLYLLK
DNAJC21	39	<u>NM_001012339</u>	<u>NP_001012339</u>	CHYEALGVRRDASEEELKKAYRKL LKW HPDK NLDNAAEAAEQFKLIQA AYDVLSDPQERAWYDNHR
DNAJC22	40	<u>NM_001304944</u>	<u>NP_001291873</u>	LAYQVLGLSEGATNEEIHRSYQELVK VW HPD HNLDQTEEAQRHFLEIQAA EVLSQPRKPWGSRR
DNAJC23	41	<u>NM_007214</u>	<u>NP_009145</u>	NPYEVNLNLDPGATVAEIKKQYRLLSL KY HPDK GGDEVFMFRIAKAYAALT DEESRKNWEEFG
DNAJC24	42	<u>NM_181706</u>	<u>NP_859057</u>	DWYSILGADPSANISDLKQKYQKLIL MY HPDK QSTDVPAGTVEECVQKFI DQAWKILGNEETKREYDLQR
DNAJC25	43	<u>NM_001015882</u>	<u>NP_001015882</u>	DCYEVLVSRASGAEIARAYRQLA RRY HPD RYRPQPGDEGPGRTQSAE EAFLLVATAYETLKDEETRKDYDYML
DNAJC26	44	<u>NM_001318134</u>	<u>NP_001305063</u>	SRWTPVGMADLVAPEQVKKHRYRA VLAV HPDK AAAGQPYEQHAKMIFME LNDAWSEFENQGSRPLF
DNAJC27	45			DSWDMLGVKPGASRDEVNKAYRKL AVLL HPDK CVAPGSEDAFKAVVNAR TALLKNIK
DNAJC28	46	<u>NM_001040192</u>	<u>NP_001035282</u>	EYYRLLNVEEGCSADEVRESFHKLA KQY HPD SGSNTADSATFIRIEKAYRK VLSHVIEQTNASQS
DNAJC29	47	<u>NM_014363</u>	<u>NP_055178</u>	ILKEVTSVVEQAWKLPESEKKIIRRL YLKW HPDK KNPENHDIANEVFKHLQ NEINRLEKQAFDQADRASRRTFST SASRFQSDKYS
DNAJC30	48	<u>NM_032317</u>	<u>NP_115693</u>	ALYDLLGVPSTATQAQIKAAYYRQCF LY HPD RNSGSAEAAERFTRISQAYVV LGSATLRRKYDRGL

b. Tau结合结构域

融合蛋白还包含至少一个Tau结合结构域。tau结合结构域可以是单链多肽，或与J结构域连接以形成融合蛋白的多聚体多肽。

[0120] 理想的是，tau结合结构域具有足够的亲和力以便能够在tau蛋白在细胞内以病理水平存在时结合tau蛋白。因此，在一个实施方案中，融合蛋白包含tau结合结构域，当在96孔微量滴定板上通过ELISA测试时所述tau结合结构域具有例如2 μ M以下、1 μ M以下、500nM以下、300nM以下、100nM以下、30nM以下的对tau的 K_D 。在另一实施方案中，融合蛋白包含tau结合结构域，当在96孔微量滴定板上通过ELISA测试时，所述tau结合结构域具有例如2 μ M以下、1 μ M以下、500nM以下、300nM以下、100nM以下、30nM以下的对tau的聚集形式的 K_D 。在又一

实施方案中,tau结合结构域对tau的聚集形式具有选择性;例如,当与对tau的可溶性形式的亲和力相比时,tau结合结构域具有至少两倍以上、至少3倍以上、至少4倍以上、至少5倍以上、至少10倍以上、至少30倍以上、至少100倍以上的对tau的聚集形式的亲和力。

[0121] tau结合结构域先前已被鉴定和表征(参见例如美国专利号7,605,133,WO 2019/161386,Abe等人,(2007)BMC Bioinformatics,8:451,其各自通过引用并入本文)。因此,在另一实施方案中,融合蛋白包含tau结合结构域,其选自SEQ ID NO:49-52(参见例如表2)。在一个特定实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:49的tau结合结构域。

[0122] 在另一实施方案中,融合蛋白还考虑使用与J结构域化学缀合的tau结合结构域。tau结合结构域可直接缀合到J结构域上。备选地,其可以通过接头缀合到J结构域上。例如,存在大量本领域技术人员已知并可用于将tau结合结构域交联到J结构域上,或将靶向结构域交联到包含tau结合结构域和J结构域的融合蛋白上的化学交联剂。例如,一些交联剂是异双功能交联剂,其可用于以逐步方式连接分子。异双功能交联剂提供了设计用于缀合蛋白的更特异性的偶联方法的能力,由此减少了不想要的副反应(诸如同蛋白聚合物(homoprotein polymer))的发生。多种异双功能交联剂在本领域中是已知的,包括4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS);(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸N-琥珀酰亚胺酯(SIAB)、4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸琥珀酰亚胺酯(SMPB)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC);4-琥珀酰亚胺氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫代)甲苯(SMPT)、3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、6-[3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯]己酸琥珀酰亚胺酯(LC-SPDP)。具有N-羟基琥珀酰亚胺部分的交联剂可以作为通常具有更大的水溶性的N-羟基磺基琥珀酰亚胺类似物获得。此外,可以合成在连接链中具有二硫桥的交联剂代替烷基衍生物,以减少体内接头裂解的量。除了异双功能交联剂外,还存在许多其它交联剂,包括同双功能和光反应性交联剂。辛二酸二琥珀酰亚胺基酯(DSS)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)和庚二亚氨酸二甲酯·2HCl是可用的同双功能交联剂的实例,并且双-[B-(4-叠氮水杨酰胺基)乙基]二硫化物(BASED)和6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸N-琥珀酰亚胺酯(SANPAH)是用于本公开的有用光反应性交联剂的实例。关于蛋白偶联技术的最新综述,参见Means等人,(1990)Bioconj.Chem.1:2-12,其通过引入并入本文。

[0123] 表2:tau结合结构域的实例

名称	SEQ ID NO:	长度	序列
TBP1	49	6	VQIVYK
scFv(Tau)	50	234	EVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTASGFNIKDTSMHWVRQRP EQGLEWIGRIAPANGNTKYDPKFQGKATITTTDSSNTAYLQL SSLTSEDVAVYYCSGSGNYDWGQGTTTLTVSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMNQSPSSLSASLGDITITISCHASQNINWLSWYQQ KPGNIPKLLIYEASTLYTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDI ATYYCQQGQSYPTWTFGGGKLEI
scFv(MW7)	51	243	QVKLQESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQ SPEKGLSGVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSSV YMQMNSLRAEDTGIYYCIYAGFAYWGQTTTVTVSSGGGSG GGGSGGGGSDIELTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNS NQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPDRFIGSGSG TDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYSTPWTFGGGKLEI
Happ1	52	118	MQSVLTQPPASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLP GTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRPEDE ADYYCAAWDDSLCVALVFGGGTNGGGGVDGTAG
TBP2	53	6	VQIINK
TBP3	54	13	YQQYQDATADEQG

c. 任选的接头

本文中描述的融合蛋白可任选含有一个或多个接头。接头可以是肽的或非肽的。接头的目的尤其是在蛋白内提供功能结构域之间(例如J结构域与tau结合结构域之间,tau结合结构域的串联排列之间,J结构域和tau结合结构域以及任选的靶向试剂之间,或J结构域和tau结合结构域以及任选的检测结构域或表位之间)的适当距离,以使每个结构域发挥最佳功能。显然,接头优选不干扰根据本发明的融合蛋白的J结构域、靶蛋白结合结构域的相应功能。选择接头(如果存在于本发明的融合蛋白中)以减弱靶蛋白(tau蛋白)引起的细胞毒性,并且如果直接连接实现所需效果的话,则可以省略接头。本发明的融合蛋白中存在的接头可包含一个或多个由表达载体克隆位点中或其周围的核酸区段上存在的核苷酸序列编码的氨基酸,编码本文中描述的蛋白结构域或整个融合蛋白的核酸区段框内插入到所述表达载体克隆位点中。在一个实施方案中,肽接头的长度为1个氨基酸至20个氨基酸。在另一实施方案中,肽接头的长度为2个氨基酸至15个氨基酸。在另一实施方案中,肽接头的长度为2个氨基酸至10个氨基酸。

[0124] 选择一个或多个多肽接头以产生根据本发明的融合蛋白在本领域技术人员的知识和技术范围内。参见例如Arai等人,Protein Eng.,14(8):529-532(2001);Craeto等人,Protein Eng.,13(5):309-314(2000);George等人,Protein Eng.,15(11):871-879(2003);Robinson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95:5929-5934(1998),其各自通过引用全文并入本文。可用于制备根据本发明的融合蛋白的两个或更多个氨基酸的接头的实例包括但不限于下表3中提供的那些。

[0125] 表3:接头序列

SEQ ID NO:	长度	序列
55	2	SR
56	4	GTGS
57	5	GLESR
58	4	GGSG
59	4	GGGS

60	5	DIAAA
61	9	DIAAALESR
62	15	GGGGSGGGSGGGGS
63	11	AEAAAKEAAAK
64	15	SGGGSGGGSGGGGS
65	25	DIGGGSGGGSGGGSGGGGSAAA

d. 靶向试剂

本文中公开的融合蛋白可进一步包含靶向部分。本文中使用的术语“靶向部分”和“靶向试剂”可互换使用,并且是指与融合蛋白相关的物质,其增强融合蛋白在细胞中或在受试者的身体中的结合、转运、累积、停留时间、生物利用度或改变其生物活性或治疗效果。靶向部分可以在组织、细胞和/或亚细胞水平具有功能性。靶向部分可以引导融合蛋白定位至特定细胞、组织或器官,例如,在向受试者施用融合蛋白之后。在一个实施方案中,靶向部分位于融合蛋白的N端。在另一实施方案中,靶向部分位于融合蛋白的C端。在另一实施方案中,靶向部分位于融合蛋白的N端与C端之间。在另一实施方案中,靶向部分经由化学缀合连接到融合蛋白上。

[0126] 靶向部分可以包括但不限于有机或无机分子、肽、肽模拟物、蛋白、抗体或其片段、生长因子、酶、凝集素、抗原或免疫原、病毒或其组件、病毒载体、受体、受体配体、毒素、多核苷酸、寡核苷酸或适体、核苷酸、碳水化合物、糖、脂质、糖脂、核蛋白、糖蛋白、脂蛋白、类固醇、激素、化学引诱物、细胞因子、趋化因子、药物或小分子等。

[0127] 在本发明的一个示例性实施方案中,靶向部分增强平台或其相关配体和/或活性剂在靶细胞或组织(例如CNS和/或PNS的神经元细胞)中的结合、转运、累积、停留时间、生物利用度或改变其生物活性或治疗效果。由此,靶向部分可对与CNS相关的细胞受体具有特异性,或以其它方式与增强的经由血脑屏障(BBB)向CNS的递送相关。因此,如上所述的配体可以是配体和靶向部分二者。

[0128] 在一些实施方案中,靶向部分可以是细胞穿透肽,例如如美国专利号10,111,965中所述,其通过引用全文并入本文。在另一实施方案中,靶向部分可以是抗体或其抗原结合片段或单链衍生物,例如如美国序列号16/131,591中所述,其通过引用全文并入本文。

[0129] 靶向部分可通过直接或间接结合至核心来偶联到用于靶向细胞递送的平台。例如,在其中核心包含纳米颗粒的实施方案中,靶向部分与纳米颗粒的缀合可以利用用于将PEG栓系到纳米颗粒上的类似官能团。由此,靶向部分可以通过靶向部分的官能化直接结合到纳米颗粒上。备选地,如上所述,靶向部分可以通过靶向部分与官能化PEG的缀合而间接结合到纳米颗粒上。靶向部分可以通过共价、非共价或静电相互作用的方式连接到核心上。在一个实施方案中,靶向部分是肽。在一个特定实施方案中,靶向部分是共价连接到融合蛋白的N端的肽。

e. 表位

[0130] 在某些实施方案中,本发明的融合蛋白含有任选的表位或标签,其可以赋予融合蛋白另外的性质。本文中使用的术语“表位”和“标签”可互换使用,指的是通常连接到融合蛋白的N端或C端末端的长度通常为300个氨基酸以下的氨基酸序列。在一个实施方案中,本发明的融合蛋白进一步包含用于促进纯化的表位。在下表4中提供的可用于纯化的此类表

位的实例包括人IgG1 Fc序列(SEQ ID NO:66)、FLAG表位(DYKDDDDK,SEQ ID NO:67)、His6表位(SEQ ID NO:68)、c-myc(SEQ ID NO:69)、HA(SEQ ID NO:70)、V5表位(SEQ ID NO:71)或谷胱甘肽-s-转移酶(SEQ ID NO:72)。在另一实施方案中,本发明的融合蛋白进一步包含在施用于受试者(例如人)时用于提高融合蛋白的半衰期的表位。可用于提高半衰期的此类表位的实例包括人Fc序列。因此,在一个特定实施方案中,除J结构域和tau结合结构域外,融合蛋白包含人Fc表位。表位位于融合蛋白的C端末端处。

[0131] 表4:表位的代表性实例

SEQ ID NO:	表位	长度	序列
66	人 IgG1 Fc 结构域	232	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
67	FLAG 表位	8	DYKDDDDK
68	His6	6	HHHHHH
69	c-myc	10	EQKLISEEDL
70	HA	9	YPYDVPDYA
71	V5 表位	14	GKPIPNLLGLDST
72	谷胱甘肽-S-转 移酶	220	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGD KWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKTQSMARIYIADK HNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFET LKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFML YDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLK SSKYIAWPLQGQWQATFGGGDHPPKSD

f. 细胞穿透肽

在另一些实施方案中,本文中描述的融合蛋白可进一步包含细胞穿透肽。已知细胞穿透肽携带缀合的运载物(无论是小分子、肽、蛋白还是核酸)进入细胞。本发明的融合蛋白中的细胞穿透肽的非限制性实例包括但不限于聚阳离子肽,例如HIV TAT肽49-57、聚精氨酸和穿透素(penetratin) pAntan (43-58)、两性性肽,例如pep-1、疏水肽,例如C405Y等。参见下表5。

[0132] 表5:细胞穿透肽的实例

SEQ ID NO:	序列
73	RKKRRQRRR
74	RQIKWFKQRNRMKWKK
75	KETWWETWWTEWSQPKKRKY
76	CSIPPEVKFNKPFVYLI

因此,在一个实施方案中,融合蛋白包含细胞穿透肽和融合蛋白,其中细胞穿透肽选自SEQ ID NO:73-76,并且融合蛋白选自SEQ ID NO:83-88和95-101。在另一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:73的细胞穿透肽,并且融合蛋白选自SEQ ID NO:83-88和95-101。在另一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:74的细胞穿透肽,并且融合蛋白选自SEQ ID NO:83-88和95-101。在又一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:75的细胞穿透肽,并且融合蛋白选自SEQ ID NO:83-88和95-101。在再一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:76的

细胞穿透肽,并且融合蛋白选自SEQ ID NO:83-88和95-101。表达具有细胞穿透肽的融合蛋白构建体的细胞可以施用于受试者,例如人受试者(例如患有tau障碍或处于患有tau障碍的风险的患者)。由细胞分泌融合蛋白,其有助于减少含有tau的蛋白聚集和/或相关的细胞毒性。

g. J结构域和tau结合结构域的排列

[0133] 本文中描述的融合蛋白可以以多种方式排列。在一个实施方案中,tau结合结构域连接到J结构域的C端侧。在另一实施方案中,tau结合结构域连接到J结构域的N端侧。任一构型的tau结合结构域与J结构域可任选地经由上述接头分开。

[0134] 在一些实施方案中,J结构域可以连接到多个tau结合结构域上,例如两个tau结合结构域、三个tau结合结构域、四个tau结合结构域或更多。多个tau结合结构域可以连接到J结构域的N端侧。在又一实施方案中,多个tau结合结构域可以连接在J结构域的N端侧和C端侧上。多个tau结合结构域的每一个可以是相同的tau结合结构域。在另一实施方案中,融合蛋白中的多个tau结合结构域的每一个可以是不同的tau结合结构域(即不同的序列)。

[0135] 在一些实施方案中,融合蛋白可包含选自以下的结构:

- a. DNAJ-X-T,
- b. DNAJ-X-T-X-T,
- c. DNAJ-X-T-X-T-X-T,
- d. T-X-DNAJ,
- e. T-X-T-X-DNAJ,
- f. T-X-T-X-T-X-DNAJ,
- g. T-X-DNAJ-X-T,
- h. T-X-DNAJ-X-T-X-T,
- i. T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
- j. T-X-T-X-DNAJ-X-T,
- k. T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T,
- l. T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
- m. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T,
- n. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T, 和
- o. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,

其中,

T是tau结合结构域,

DNAJ是J蛋白的J结构域,且

X是任选的接头。

[0136] 在一个实施方案中,融合蛋白包含选自SEQ ID NO:5、6、10、24和31的J结构域。在一个特定实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域。

[0137] 在另一实施方案中,tau结合结构域选自SEQ ID NO:49-54。在一个特定实施方案中,tau结合结构域是SEQ ID NO:49。

[0138] 在又一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域,和SEQ ID NO:49的tau结合结构域。在另一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域,和SEQ IDNO:49的

tau结合结构域的至少两个拷贝。在另一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域,和SEQ ID NO:50的tau结合结构域。在另一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域,和SEQ ID NO:51的tau结合结构域。在再一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域,和SEQ ID NO:52的tau结合结构域。在另一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域,和SEQ ID NO:53的tau结合结构域。在再一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:5的J结构域,和SEQ ID NO:54的tau结合结构域。

[0139] 包含J结构域和tau结合结构域的融合蛋白构建体的非限制性实例示意性描绘在图2中,并且也显示在下表6中。在另一实施方案中,特定的融合蛋白构建体选自SEQ ID NO: 83-88和95-101。

[0140] 表6:融合蛋白构建体和对照构建体

构建体编号	SEQ ID NO:	构建体名称	长度	序列
1	83	JB1-TBP1	106	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAAVQI VYK
2	84	TBP1-JB1-TBP1	147	MGKPIP NPLLGLDSTGTG SVQIVYKGGGSGGGSGG GSGGGSMGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQA LRYHPDKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREI FDYGE EGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGG AAAVQIVYK
3	85	JB1-2XTBP1	128	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAAVQI VYKGGGSGGGSGGGGSGGGSVQIVYK
4	86	JB1-scFv(Tau)	334	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAAEV QLQQSGAELVQPGASVKLSCTASGFNIKDTSMHW VRQRPEQGLEWIGRIAPANGNTKYDPKFQ GKATIT TDTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCSGSGNYDWGQ GTTLT VSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMNQSPSSLSA SLGDTITISCHASQININWLSWYQKPGNIPKLLIY EASTLYTGVPSPRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDIATY YCQQGQSYPTWTFGGG TKLEI
5	87	JB1-scFv(MW7)	343	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAAQV KLQESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFS DAWMD WVRQSPEKGLSGVAEIRSKANNHATYYAESVKGR FTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCIYAGFAY WGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSP SSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWY QQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDF T LTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPWTFGGG TKLEI
6	88	JB1-Happ1	218	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAMQ

				SVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNVYVYWY QQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSA SLAISGLRPEDEADYYCAAWDDSLCVALVFGGGT NGGGGVDGTAG
7	89	JB1(P33Q)- TBP	106	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHQ DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYG EEGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAAVQ IVYK
8	90	JB1(P33Q)- scFv(Tau)	334	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHQ DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYG EEGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAAEV QLQSGAELVQPGASVKLSCTASGFNIKDTSMHW VRQRPEQGLEWIGRIAPANGNTKYDPKFQ GKATIT TDTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCSGSGNYDWGQ GTTLTVSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMNQSPSSLSA SLGDTITISCHASQNINWLSWYQKPGNIPKLLIY EASTLYTGVP SRFSGSGTGFTLTISLQPEDIATY YCQQGQSY PWTFGGGTKLEI
9	91	JB1(P33Q)- scFv(MW7)	343	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHQ DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYG EEGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAAW VKLQESGGGLVQPGSMKLSAASGFTFSDAWM DWVRQSPEKGLSGVAEIRSKANNHATYYAESVKG RFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCIYAGFA YWGQTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQS PSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAW YQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDF TLISSVQAEDLADYFCQQHYSTPWTFGGGTKLEI
10	92	JB1(P33Q)- Happ1	218	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHQ DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYG EEGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAAW QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNVYVYW YQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSA SLAISGLRPEDEADYYCAAWDDSLCVALVFGGG TNGGGGVDGTAG
11	93	JB1-QBP1	91	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKGS GGGGSSNWKWWPGIFD
12	94	JB1(P33Q)- QBP1	91	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHQ DKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYG EEGLKGS GGGGSSNWKWWPGIFD
14	95	JB1-TBP2	106	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAAVQII NK
15	96	JB1-TBP3	113	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKGS DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAYQ QYQDATADEQG
16	97	JB1-TBP1 (无接头)	86	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKGS GGGG SVQIVYK
17	98	JB1-TBP2 (无接头)	86	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKGS GGGG SVQIINK
18	99	JB1-TBP3 (无接头)	93	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKGS GGGG SYQQYQDATADEQG

19	100	JB1-scFv(Tau) (无接头)	314	MGKDYYQTLGLLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKSGGGGSEVQLQQSGAELVQPGASVKLSCT ASGFNIKDTSMHWVRQRPEQGLEWIGRIAPANGN TKYDPKFQGKATITTTDSSNTAYLQLSSLTSED TAV YYCSGSGNYDWGQGTTLTVSGGGSGGGGSGGG GSDIQMNQSPSSLSASLGDITITISCHASQNINWLS WYQQKPGNIPKLLIYEASTLYTGVPSRFGSGSGT GFTLTISLQPEDATYYCQQQSYPTWTFGGGTKLE I
20	101	JB1-Happ1 (无接头)	198	MGKDYYQTLGLLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGE EGLKSGGGGSMQSVLTQPPASGTPGQRVTISCS GSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRPEDEADYYCAAWD DSLVALVFGGGTNGGGGVDGTAG

II. 编码融合蛋白构建体的核酸

本发明的另一方面提供了包含多核苷酸序列的分离的核酸,所述多核苷酸序列选自 (a) 编码前述实施方案任一项的融合蛋白的多核苷酸,或 (b) (a) 的多核苷酸的互补序列。本发明提供了编码包含J结构域和tau结合结构域的融合蛋白的分离的核酸,以及与编码融合蛋白的此类核酸分子互补的序列(包括其同源变体)。在另一方面,本发明包括产生编码本文中公开的融合蛋白的核酸和与编码融合蛋白的核酸分子互补的序列(包括其同源变体)的方法。根据本发明的这一方面的核酸可以是前信使RNA(前mRNA)、信使RNA(mRNA)、RNA、基因组DNA(gDNA)、PCR扩增的DNA、互补DNA(cDNA)、合成DNA或重组DNA。

[0141] 在再一方面,公开了一种生产融合蛋白的方法,其包括 (a) 合成和/或组装编码融合蛋白的核苷酸, (b) 将编码基因并入适于宿主细胞的表达载体中, (c) 用表达载体转化合适的宿主细胞,和 (d) 在引起或允许融合蛋白在转化的宿主细胞中表达的条件下培养宿主细胞,由此生产生物活性融合蛋白,其通过本领域已知的标准蛋白纯化方法作为分离的融合蛋白回收。分子生物学中的标准重组技术用于制造本发明的多核苷酸和表达载体。

[0142] 根据本发明,编码本文中公开的融合蛋白的核酸序列(或其互补序列)用于产生指导融合蛋白在合适的宿主细胞中表达的重组DNA分子。几种克隆策略适于实施本发明,其中许多用于产生包含编码本发明的融合蛋白的基因或其互补序列的构建体。在一些实施方案中,克隆策略用于产生编码本发明的融合蛋白的基因或它们的互补序列。

[0143] 在某些实施方案中,编码一种或多种融合蛋白的核酸是RNA分子,并且可以是前信使RNA(前mRNA)、信使RNA(mRNA)、RNA、基因组DNA(gDNA)、PCR扩增的DNA、互补DNA(cDNA)、合成DNA或重组DNA。

[0144] 在各种实施方案中,核酸是引入细胞以便瞬时表达所需多肽的mRNA。本文中使用的“瞬时”是指非整合转基因表达数小时、数天或数周的时间,其中表达时间小于多核苷酸在细胞中整合到基因组中或包含在稳定质粒复制子中的情况下的表达时间。

[0145] 在特定实施方案中,编码多肽的mRNA是体外转录的mRNA。本文中使用的“体外转录的RNA”是指已经在体外合成的RNA,优选mRNA。通常,体外转录的RNA由体外转录载体产生。体外转录载体包含用于产生体外转录的RNA的模板。

[0146] 在特定实施方案中,mRNA可进一步包含5'帽或修饰的5'帽和/或3'多聚(A)序列。本文中使用的5'帽(也称为RNA帽、RNA 7-甲基鸟苷帽或RNA m7G帽)是修饰的鸟嘌呤核苷酸,其在转录开始后不久被添加到真核信使RNA的“前端”或5'末端。5'帽包含连接至第一转

录核苷酸并被核糖体识别并保护免受RNA酶影响的末端基团。可以修饰加帽部分以调节mRNA的功能,诸如其稳定性或翻译效率。在一个特定实施方案中,mRNA包含大约50至大约5000个腺嘌呤的多聚(A)尾序列。在一个实施方案中,mRNA包含大约100至大约1000个碱基、大约200至大约500个碱基、或大约300至大约400个碱基的多聚(A)序列。在一个实施方案中,mRNA包含大约65个碱基、大约100个碱基、大约200个碱基、大约300个碱基、大约400个碱基、大约500个碱基、大约600个碱基、大约700个碱基、大约800个碱基、大约900个碱基、或大约1000个以上的碱基的多聚(A)序列。多聚(A)序列可以化学或酶促修饰以调节mRNA功能,诸如定位、稳定性或翻译效率。

[0147] 本文中使用的术语“多核苷酸变体”和“变体”等是指展现出与参考多核苷酸序列的实质序列相似性的多核苷酸,或在下文中定义的严格条件下与参考序列杂交的多核苷酸。这些术语包括其中与参考多核苷酸相比已经添加或缺失或用不同核苷酸置换一个或多个核苷酸的多核苷酸。在这方面,本领域中公知的是可对参考多核苷酸进行某些改变,包括突变、添加、缺失和取代,由此改变的多核苷酸保留参考多核苷酸的生物学功能或活性。

[0148] III. 包含编码融合蛋白的核酸的载体

还提供了包含根据本发明的核酸的载体。此类载体优选包含另外的核酸序列,诸如编码磷酸酶的核酸序列的转录/翻译所必需的元件(例如启动子和/或终止子序列)。所述载体还可包含编码选择标记(例如抗生素)的核酸序列,以选择或维持用所述载体转化的宿主细胞。术语“载体”在本文中用于指能够转移或转运另一核酸分子的核酸分子。转移的核酸通常连接到载体核酸分子上,例如插入到载体核酸分子中。载体可以包括引导细胞中的自主复制的序列,或可包括足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。在特定实施方案中,非病毒载体用于将一种或多种本文中设想的多核苷酸递送至受影响的细胞(例如神经元细胞)。在一个实施方案中,载体含有体外合成或合成制备的mRNA,所述mRNA编码包含J结构域和tau结合结构域的融合蛋白。非病毒载体的说明性实例包括但不限于mRNA、质粒(例如DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒和细菌人工染色体。本文中使用的术语“核酸盒”或“表达盒”是指载体内的遗传序列,其可以表达RNA,以及随后的多肽。在一个实施方案中,核酸盒含有目标基因,例如目标多核苷酸。在另一实施方案中,核酸盒含有一个或多个表达控制序列,例如启动子、增强子、多聚(A)序列和目标基因,例如目标多核苷酸。载体可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个以上的核酸盒。核酸盒在载体中在位置和顺序上取向,使得盒中的核酸可转录成RNA,并在必要时翻译成蛋白或多肽,经历转化细胞中活性所需的适当的翻译后修饰,并通过靶向适当的细胞内区室或分泌到细胞外区室中而易位到适于生物活性的区室。优选地,盒具有适合于容易地插入载体中的3'和5'末端,例如,其在每个末端具有限制性内切核酸酶位点。可以将盒取出并作为单个单元插入质粒或病毒载体。

[0149] 载体的说明性实例包括但不限于质粒、自主复制序列和可转座元件,例如piggyBac、Sleeping Beauty、Mos1、Tcl/mariner、Tol2、mini-Tol2、Tc3、MuA、Himar I、Frog Prince及其衍生物。载体的另外的说明性实例包括但不限于质粒、噬菌粒、粘粒、人工染色体诸如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生的人工染色体(PAC)、噬菌体诸如λ噬菌体或M13噬菌体、以及动物病毒。可用作载体的病毒的说明性实例包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳多空病毒(例如SV40)。表达载体的说明性实例包括但不限于用于

在哺乳动物细胞中表达的pC1neo载体 (Promega) ; 用于在哺乳动物细胞中进行慢病毒介导的基因转移和表达的pLenti4/V 5-DESTTM、pLenti6/V 5-DESTTM和pLenti6.2/V 5-GW/lacZ (Invitrogen)。在特定实施方案中, 本文中公开的多肽的编码序列可以连接到此类表达载体中以便在哺乳动物细胞中表达多肽。

[0150] 在特定实施方案中, 载体是游离型载体或保持在染色体外的载体。本文中使用的术语“游离型”是指能够复制而不整合到宿主染色体DNA中并且不从分裂的宿主细胞中逐渐丢失的载体, 也意味着所述载体在染色体外或游离地复制。

[0151] 适用于特定实施方案的示例性遍在表达控制序列包括基因启动子, 但不限于巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子、病毒猴病毒40 (SV40) 启动子 (例如早期或晚期)、莫洛尼氏鼠白血病毒 (MoMLV) LTR启动子、劳斯肉瘤病毒 (RSV) LTR、单纯疱疹病毒 (HSV) (胸苷激酶) 启动子、来自牛痘病毒的H5、P7.5和P1 1启动子、延长因子1- α (Efla) 启动子、早期生长反应因子1 (EGR1)、铁蛋白H (FerH)、铁蛋白L (FerL)、甘油醛3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、真核生物翻译起始因子4A1 (EIF4A1)、热休克70kDa蛋白5 (HSPA5)、热休克蛋白90kDa β , 成员1 (HSP90B1)、热休克蛋白70kDa (HSP70)、b-驱动蛋白 (b-KIN)、人ROSA 26基因座 (Irions等人, *Nature Biotechnology* 25, 1477-1482 (2007))、泛素C启动子 (UBC)、磷酸甘油酸激酶-1 (PGK) 启动子、巨细胞病毒增强子/鸡b-肌动蛋白 (CAG) 启动子、b-肌动蛋白启动子和骨髓增殖性肉瘤病毒增强子、负控制区域的缺失、d1587rev引物结合位点取代的 (MND) U3启动子 (Haas等人, *Journal of Virology*. 2003; 77 (17) : 9439-9450)。

[0152] 载体可包含用于多种位点特异性重组酶中任一种的一个或多个重组位点。应当理解的是, 位点特异性重组酶的靶位点是除了载体 (例如逆转录病毒载体或慢病毒载体) 整合所需的任何位点之外的位点。本文中使用的术语“重组序列”、“重组位点”或“位点特异性重组位点” (SSR) 是指重组酶识别和结合的特定核酸序列。

[0153] 例如, Cre重组酶的一个重组位点是loxP, 它是一个34个碱基对的序列, 包含在8个碱基对的核心序列侧翼的两个13个碱基对的反向重复序列 (充当重组酶结合位点) (参见 Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5: 521-527 (1994) 的图1)。适于FLP重组酶的识别位点包括但不限于: FRT (McLeod等人, 1996)、FI、F2、F3 (Schlake和Bode, 1994)、FyFs (Schlake和Bode, 1994)、FRT (LE) (Senecoff等人, 1988) 和FRT (RE) (Senecoff等人, 1988)。

[0154] 识别序列的其它实例是attB、attP、attL和attR序列, 其被重组酶I整合酶 (例如 phi-c31) 识别。pC31 SSR仅介导异型位点attB (长度为34bp) 与attP (长度为39bp) 之间的重组 (Groth等人, 2000)。attB和attP (分别对于细菌和噬菌体基因组上的噬菌体整合酶的附着位点而命名) 均含有可能被 ϕ 031同型二聚体结合的不完美反向重复序列 (Groth等人, 2000)。产物位点attL和attR对进一步的tpQA 1介导的重组为有效惰性的 (Belteki等人, 2003), 这使得反应不可逆。对于催化插入, 已经发现携带attB的DNA插入基因组attP位点比attP位点插入基因组attB位点更容易 (Thyagarajan等人, 2001; Belteki等人, 2003)。由此, 典型的策略通过同源重组将携带attP的“停泊位点”定位到确定的基因座中, 随后使其与携带attB的输入序列配对以便插入。

[0155] 本文中使用的“内部核糖体进入位点”或“IRES”是指促进内部核糖体直接进入顺反子 (蛋白编码区) 的起始密码子 (诸如ATG), 由此导致基因的非帽依赖性翻译的元件。参见例如 Jackson等人, 1990. *Trends Biochem Sci* 15 (12) : 477-83) 以及 Jackson和

Kaminski.1995.RNA 1(10):985-1000。在特定实施方案中,载体包括编码一种或多种多肽的一种或多种目标多核苷酸。在特定实施方案中,为了实现多种多肽中每一种的有效翻译,多核苷酸序列可被一个或多个IRES序列或编码自切割多肽的多核苷酸序列分隔。在一个实施方案中,本文中设想的多核苷酸中使用的IRES是EMCV IRES。

[0156] 本文中使用的术语“Kozak序列”是指极大促进mRNA与核糖体的小亚基的初始结合并提高翻译的短核苷酸序列(Kozak,1986.Cell.44(2):283-92,和Kozak,1987.Nucleic Acids Res.15(20):8125-48)。在特定实施方案中,载体包含具有共有Kozak序列并编码包含J结构域和tau结合结构域的融合蛋白的多核苷酸。引导异源核酸转录物的有效终止和多聚腺苷酸化的元件提高异源基因表达。转录终止信号通常在多聚腺苷酸化信号的下游发现。在特定实施方案中,载体包含在编码要表达的多肽的多核苷酸的3'的多聚腺苷酸化序列。

[0157] IV. 递送

在特定实施方案中,通过非病毒或病毒载体将一种或多种编码包含J结构域和tau结合结构域的融合蛋白的多核苷酸引入细胞。在特定实施方案中设想的多核苷酸的非病毒递送的说明性方法包括但不限于:电穿孔、声穿孔、脂转染、显微注射、生物弹道技术、病毒体、脂质体、免疫脂质体、纳米颗粒、聚阳离子或脂质核酸缀合物、裸DNA、人工病毒体、DEAE-葡聚糖介导的转移、基因枪和热休克。

[0158] 适用于设想的特定实施方案的多核苷酸递送系统的说明性实例包括但不限于由Amaya Biosystems、Maxcyte, Inc.、BTX Molecular Delivery Systems和Copernicus Therapeutics Inc.提供的那些。脂转染试剂是市售的(例如Transfectam™和Lipofectin™)。适于多核苷酸的有效受体识别脂转染的阳离子和中性脂质已经描述在文献中。参见例如Liu等人,(2003)Gene Therapy.10:180-187;和Balazs等人,(20W)Journal of Drug Delivery.2011:1-12。在特定实施方案中还设想了基于抗体靶向的、细菌衍生的无生命纳米细胞的递送。

[0159] 在特定实施方案中设想的包含多核苷酸的病毒载体可以通过施用于个体患者来体内递送,通常通过全身施用(例如静脉内、腹膜内、肌内、皮下或颅内输注)、通过鞘内注射、脑室内注射或局部施用,如下文所述。备选地,载体可以离体递送至细胞,诸如移植自个体患者的细胞(例如动员的外周血、淋巴细胞、骨髓穿刺液、组织活检等)或通用供体造血干细胞,随后将细胞再植入患者体内。

[0160] 在一个实施方案中,将包含编码本文中公开的融合蛋白的多核苷酸的病毒载体直接施用于生物体以便进行体内细胞转导。

[0161] 适当包装和配制的病毒载体可以经由鞘内递送递送到CNS中。例如,腺相关病毒载体可以使用美国序列号15/771,481中描述的方法递送,其通过引用全文并入本文。

[0162] 备选地,可以施用裸DNA。施用通过通常用于将分子引入与血液或组织细胞的最终接触的任何途径,包括但不限于注射、输注、局部施用和电穿孔。施用此类核酸的合适方法是本领域技术人员可获得的和公知的,并且尽管可以使用超过一种途径来施用特定组合物,但是特定途径通常可以提供比另一途径更直接和更有效的反应。

[0163] 适用于本文中设想的特定实施方案的病毒载体系统的说明性实例包括但不限于腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒和牛痘病毒载体。

[0164] 在各种实施方案中,通过用包含一种或多种多核苷酸的重组腺相关病毒(rAAV)转导细胞,将一种或多种编码包含J结构域和tau结合结构域的融合蛋白的多核苷酸引入细胞,例如神经元细胞。AAV是一种小的(~26nm)复制缺陷的、主要为游离型的无包膜病毒。AAV能感染分裂细胞和非分裂细胞二者,并可将其基因组并入到宿主细胞的基因组中。重组AAV(rAAV)通常至少由转基因及其调节序列,以及5'和3' AAV反向末端重复序列(ITR)构成。ITR序列的长度为大约145bp。在特定实施方案中,rAAV包含从AAV 1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV rh10或AAV10中分离的ITR和衣壳序列。

[0165] 在一些实施方案中,使用嵌合rAAV;ITR序列分离自一种AAV血清型,而衣壳序列分离自不同的AAV血清型。例如,具有来源于AAV2的ITR序列和来源于AAV6的衣壳序列的rAAV被称为AAV2/AAV6。在特定实施方案中,rAAV载体可包含来自AAV2的ITR,和来自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV rh10或AAV10中任一种的衣壳蛋白。在一个优选实施方案中,rAAV包含来源于AAV2的ITR序列和来源于AAV6的衣壳序列。在一个优选实施方案中,rAAV包含来源于AAV2的ITR序列和来源于AAV2的衣壳序列。

[0166] 在一些实施方案中,工程化和选择方法可应用于AAV衣壳以使它们更可能转导目标细胞。

[0167] rAAV载体的构建、其生产和纯化已公开在例如美国专利号9,169,494;9,169,492;9,012,224;8,889,641;8,809,058;和8,784,799中,其各自通过引用全文并入本文。在各种实施方案中,通过用包含一种或多种多核苷酸的逆转录病毒(例如慢病毒)转导细胞,将一种或多种编码本文中公开的融合蛋白的多核苷酸引入神经元细胞或神经元干细胞。本文中使用的术语“逆转录病毒”是指将其基因组RNA逆转录为线性双链DNA拷贝并随后将其基因组DNA共价整合到宿主基因组中的RNA病毒。适用于特定实施方案的说明性逆转录病毒包括但不限于:莫洛尼氏鼠白血病毒(M-MuLV)、莫洛尼氏鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病毒(GaLV)、猫白血病毒(FLV)、泡沫病毒、弗云德鼠白血病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)以及慢病毒。本文中使用的术语“慢病毒”是指复杂逆转录病毒的群组(或属)。说明性的慢病毒包括但不限于:HIV(人免疫缺陷病毒;包括HIV 1型和HIV 2型);维斯那-梅迪病毒(VMV);山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV);马传染性贫血病毒(EIAV);猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);和猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一个实施方案中,基于HIV的载体主链(即HIV顺式作用序列元件)是优选的。

[0168] 慢病毒载体优选含有因修饰LTR而产生的几种安全性增强。“自失活”(SIN)载体是指复制缺陷型载体,例如其中右(3')LTR增强子-启动子区(称为U3区)已被修饰(例如通过缺失或取代)以防止病毒转录超过病毒复制的第一轮。通过用异源启动子置换5'LTR的U3区以便在病毒颗粒生产期间驱动病毒基因组的转录,提供了另外的安全性增强。可以使用的异源启动子的实例包括例如病毒猴病毒40(SV40)(例如早期或晚期)、巨细胞病毒(CMV)(例如立即早期)、莫洛尼氏鼠白血病毒(MoMLV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)和单纯疱疹病毒(HSV)(胸苷激酶)启动子。在某些实施方案中,慢病毒载体根据已知方法产生。参见例如Kutner等人,BMC Biotechnol.2009;9:10.Doi:10.1186/1472-6750-9-10;Kutner等人,Nat.Protoc.2009;4(4):495-505.Doi:10.1038/nprot.2009.22。

[0169] 根据本文中设想的某些特定实施方案,大多数或所有病毒载体主链序列来源于慢

病毒,例如HIV-I。但是,要理解的是,可以使用许多不同来源的逆转录病毒和/或慢病毒序列,或组合使用,并且可以在不损害转移载体执行本文中描述的功能的能力的情况下适应某些慢病毒序列中的许多取代和改变。此外,在本领域中多种慢病毒载体是已知的,参见Naldini等人(1996a、1996b和1998);Zufferey等人,(1997);Dull等人,1998,美国专利号6,013,516和5,994,136,其中许多可以调整以适于产生本文中设想的病毒载体或转移质粒。

[0170] 在各种实施方案中,通过用包含一种或多种多核苷酸的腺病毒转导细胞,将一种或多种编码本文中公开的融合蛋白的多核苷酸引入靶细胞。基于腺病毒(Ad)的载体能够在许多细胞类型中具有非常高的转导效率,并且不需要细胞分裂。使用此类载体,已经获得了高滴度和高水平的表达。该载体可以在相对简单的系统中大量生产。大多数腺病毒载体被工程化,使得转基因置换Ad E1a、E1b和/或E3基因;随后复制缺陷型载体在以反式提供缺失基因功能的人293细胞中增殖。Ad载体可以在体内转导多种类型的组织,包括非分裂分化细胞,诸如在肝、肾和肌肉中发现的那些。常规Ad载体具有大的承载能力。

[0171] 当前腺病毒载体(其为复制缺陷型)的产生和增殖可以利用命名为293的独特辅助细胞系,其通过Ad5 DNA片段从人胚胎肾细胞转化并组成型表达E1蛋白(Graham等人,1977)。由于E3区不是腺病毒基因组所必需的(Jones&Shenk,1978),因此当前腺病毒载体在293细胞的帮助下在E1和/或D3区中携带外来DNA(Graham&Prevec,1991)。腺病毒载体已经用于真核基因表达(Levrero等人,1991;Gomez-Foix等人,1992)和疫苗开发(Grunhaus&Horwitz,1992;Graham&Prevec,1992)。将重组腺病毒施用于不同组织的研究包括气管滴注(Rosenfeld等人,1991;Rosenfeld等人,1992)、肌肉注射(Ragot等人,1993)、外周静脉内注射(Herz&Gerard,1993)和立体定向接种到大脑中(Le Gal La Salle等人,1993)。在临床试验中使用Ad载体的一个实例涉及用肌肉注射进行抗肿瘤免疫的多核苷酸疗法(Sterman等人,Hum.Gene Ther.7:1083-9(1998))。

[0172] 在各种实施方案中,通过用编码一种或多种多核苷酸的单纯疱疹病毒(例如HSV-1、HSV-2)转导细胞,将一种或多种编码本发明的融合蛋白的多核苷酸引入受试者的靶细胞。

[0173] 成熟HSV病毒体由包膜的二十面体衣壳与由152kb的线性双链DNA分子组成的病毒基因组组成。在一个实施方案中,基于HSV的病毒载体缺少一个或多个必需或非必需的HSV基因。在一个实施方案中,基于HSV的病毒载体是复制缺陷型的。大多数复制缺陷型HSV载体含有缺失以除去一个或多个立即早期、早期或晚期HSV基因以防止复制。例如,HSV载体可以缺少选自以下的立即早期基因:ICP4、ICP22、ICP27、ICP47或其组合。HSV载体的优点是其进入潜伏期的能力,这可以导致长期DNA表达,以及其可以容纳高达25kb的外源DNA插入序列的大病毒DNA基因组。基于HSV的载体描述在例如美国专利号5,837,532、5,846,782和5,804,413,以及国际专利申请WO 91/02788、WO 96/04394、WO 98/15637和WO 99/06583中,其各自通过引用全文并入本文。

[0174] V. 表达融合蛋白的细胞

在再一方面,本发明提供了表达本文中描述的融合蛋白的细胞。可以用编码如上文所述的融合蛋白的载体转染细胞。在一个实施方案中,细胞是原核细胞。在另一实施方案中,细胞是真核细胞。在又一实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一个特定实施方案中,细胞是人细胞。在另一实施方案中,细胞是来源于患有tau介导的障碍或处于患有tau介导的

障碍的风险下的患者的人细胞,所述tau介导的障碍包括但不限于ALS、FTD和阿尔茨海默病。细胞可以是神经元细胞或肌肉细胞。

[0175] 表达融合蛋白的细胞可用于生产融合蛋白。在该实施方案中,用过表达融合蛋白的载体转染细胞。融合蛋白可任选含有表位,例如如上文所述的人Fc结构域或FLAG表位,其将促进纯化(分别使用蛋白A或抗FLAG抗体柱)。表位可以经由接头或蛋白酶底物序列与融合蛋白的其余部分连接,使得在纯化期间或之后,可以从融合蛋白中除去表位。

[0176] 表达融合蛋白的细胞也可用于治疗方面。在一个实施方案中,从需要治疗的患者(例如患有tau介导的障碍或处于患有tau介导的障碍的风险下的患者)中收集细胞。在一个实施方案中,细胞是神经元细胞。随后用编码多核苷酸的载体转染收集的细胞以表达融合蛋白。随后可以处理转染的细胞以富集或选择转染的细胞。也可处理转染的细胞以分化成不同类型的细胞,例如神经元细胞。在处理后,可以将转染的细胞施用于患者。在一个实施方案中,通过鞘内注射、颅内注射或脑室内注射将细胞定向注射到CNS中来施用细胞。

[0177] 在一个备选实施方案中,可以使用表达融合蛋白的分泌形式的细胞。例如,融合蛋白构建体可以设计成在N末端具有分泌信号序列。代表性的信号序列显示在下表7中。

[0178] 表7:代表性信号序列

SEQ ID NO:	序列
77	MGVKVLFALICIAVAEA
78	MAPVQLLGLLVFLPAMRC
79	MAVLGLLFCLVTFPSCVLS

因此,在一个实施方案中,融合蛋白包含信号序列和融合蛋白,其中信号序列选自SEQ ID NO:77-79,且融合蛋白选自SEQ ID NO:83-88和95-101。在另一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:77的信号序列,和选自SEQ ID NO:83-88和95-101的融合蛋白。在另一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:78的信号序列,和选自SEQ ID NO:83-88和95-101的融合蛋白。在另一实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:79的信号序列,和选自SEQ ID NO:83-88和95-101的融合蛋白。表达具有信号序列的融合蛋白构建体的细胞可以施用于受试者,例如人受试者(例如患有tau障碍或处于患有tau障碍的风险下的患者)。融合蛋白从细胞中分泌,这有助于减少tau蛋白聚集和/或相关的细胞毒性。

[0179] 如上所述,在某些实施方案中,融合蛋白可进一步包含细胞穿透肽。表达包含信号序列和细胞穿透肽的融合蛋白的细胞将能够分泌没有信号序列的融合蛋白。还包含细胞穿透肽的分泌的融合蛋白随后将能够进入附近的细胞,并具有减少这些细胞中由tau蛋白介导的聚集和/或细胞毒性的潜力。含有信号序列和细胞穿透肽二者的融合蛋白将经由信号序列分泌并能够经由细胞穿透肽序列进入细胞。

[0180] VI. 使用方法

在另一方面,本发明提供了在tau障碍中和/或在tau障碍或由tau聚集介导的状况中实现有益效果的方法。tau障碍选自肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞痴呆(FTD)、帕金森病、亨廷顿病、阿尔茨海默病、海马硬化和路易体痴呆。

[0181] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗患有tau疾病、障碍或状况的受试者(诸如人)的方法,其包括向受试者施用治疗或预防有效量的本文中描述的融合蛋白、编码此类融合蛋白的核酸、或编码此类融合蛋白的病毒载体的步骤,其中所述施用导致与tau疾病、障

碍或状况相关的一种或多种生物化学或生理参数或临床终点的改善。

[0182] 在另一些实施方案中,本发明提供了减少tau在细胞中的聚集的方法。细胞可以是培养的细胞或分离的细胞。细胞也可以来源于受试者,例如人受试者。在一个实施方案中,细胞在人受试者的CNS中。在另一实施方案中,人受试者患有tau障碍疾病或处于患有tau障碍疾病的风险下,所述tau障碍疾病包括但不限于肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞痴呆(FTD)和阿尔茨海默病。在一个特定实施方案中,tau障碍是阿尔茨海默病。

[0183] 致病性tau蛋白可以以多种方式检测。在一个实例中,可以例如通过使用靶向磷酸化tau或构象特异性tau的抗体将过度磷酸化的tau蛋白与非致病性(即功能性)tau区分开。当与对照相比时,致病性tau蛋白的更大减少指示了更高的效力。致病性tau蛋白的减少也可以在细胞中直接检测,例如使用免疫荧光显微镜与检测tau蛋白的标记试剂(参见例如Ding等人,(2015)Oncotarget,6:24178-24191;Chou等人,(2015)Hum.Mol.Genet.24:5154-5173,和实施例1)。在某些实施方案中,当与对照物相比时,tau多肽水平的更大减少指示了更高的效力。

[0184] 因此,在一个实施方案中,该方法包括使细胞与有效量的融合蛋白或编码融合蛋白的核酸、载体或病毒颗粒接触,以使致病性tau蛋白当与未处理的细胞或对照细胞相比时减少至少10%,例如至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%。

[0185] 如下文在实施例1中显示的那样,发现包含J结构域和tau结合结构域的融合蛋白的表达降低了tau报告构建体的总体水平。因此,在另一实施方案中,该方法包括使细胞与一定量的融合蛋白、表达融合蛋白的细胞、编码融合蛋白的核酸、载体或病毒颗粒接触,当与未处理的细胞或对照细胞相比时,所述量有效地使tau蛋白水平降低至少10%,例如至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%。

[0186] VII. 药物组合物

如本文中设想的那样,本文中设想的组合物可包含一种或多种包含J结构域和tau结合结构域的融合蛋白、编码此类融合蛋白的多核苷酸、包含其的载体、遗传修饰的细胞等。组合物包括但不限于药物组合物。“药物组合物”是指在药学上可接受或生理学可接受的溶液中配制以便单独或与一种或多种其它治疗方式组合施用于细胞或受试者的组合物。还应理解的是,如果需要的话,组合物也可与其它药剂组合施用,诸如细胞因子、生长因子、激素、小分子、化疗剂、前药、药物、抗体或其它各种药理学活性剂。实际上对也可包含在组合物中的其它组分没有限制,只要另外的药剂不会不利地影响组合物递送预期治疗的能力。

[0187] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指在合理的医学判断范围内,适用于与人类和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症,与合理的效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0188] 本文中使用的“药学上可接受的载体”、“稀释剂”或“赋形剂”包括但不限于任何辅助剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂,其已被美国食品及药品管理局(United States Food and Drug Administration)批准为可用于人或家畜。示例性的药学上可接受载体包括但不限于糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,诸如玉米淀粉和马

铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄耆胶;麦芽;明胶;滑石;可可脂、蜡、动物和植物脂肪、石蜡、有机硅、膨润土、硅酸、氧化锌;油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,诸如丙二醇;多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇;酯类,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;和用于药物制剂的任何其它相容性物质。

[0189] VIII. 剂量

本文中描述的组合物(例如包括融合蛋白构建体、核酸或基因治疗病毒颗粒的组合物)的剂量可以根据许多因素而变化,诸如化合物的药效学性质;施用方式;接受者的年龄、健康和体重;症状的性质和程度;治疗的频率,以及同期联合治疗(如果有的话)的类型;和化合物在待治疗的受试者中的清除率。本文中描述的组合物初始可以以合适的剂量施用,所述剂量可以根据临床反应按需进行调整。在一些方面,组合物的剂量是预防或治疗有效量。

[0190] IX. 试剂盒

设想了试剂盒,所述试剂盒包括(a)药物组合物,其包括融合蛋白构建体、编码此类融合蛋白的核酸、或包含此类核酸的病毒颗粒,该药物组合物减少本文中描述的细胞或受试者中的tau蛋白聚集,和(b)包装插页,其具有进行本文中描述的任何方法的说明书。在一些方面,试剂盒包括(a)药物组合物,其包括本文中描述的组合物,该药物组合物减少本文中描述的细胞或受试者中的tau蛋白聚集,(b)另外的治疗剂,和(c)包装插页,其具有进行本文中描述的任何方法的说明书。

实施例

[0191] 为了测试J结构域是否可以特异性工程化以促进聚集蛋白的正确折叠,我们设计并测试了许多设计为靶向tau蛋白的融合蛋白构建体。

[0192] 实施例1:融合蛋白设计

A. 方法

通用技术和材料

除非另行指示,本发明的实践采用免疫学、生物化学、化学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、基因组学和重组DNA的常规技术,这些技术是本领域普通技术人员已知的。参见Sambrook, J.等人,“Molecular Cloning: A Laboratory Manual,”第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; “Current protocols in molecular biology”, F.M. Ausubel等人编辑, 1987; “Methods in Enzymology,”系列 Academic Press, San Diego, Calif.; “PCR 2: a practical approach”, M.J. MacPherson, B.D. Hames和 G.R. Taylor编辑, Oxford University Press, 1995; “Antibodies, a laboratory manual” Harlow, E. 和 Lane, D. 编辑, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; “Goodman & Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics,”第11版, McGraw-Hill, 2005; 和 Freshney, R.I., “Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique,”第4版, John Wiley & Sons, Somerset, N J, 2000, 其内容通过引用全文并入本文。HEK-293细胞(人胚胎肾细胞)购自 American Type Culture Collection (Manassas, VA)。抗FLAG抗体购自

Thermo Fisher Scientific。为了便于纯化、检测和/或表征,本实施例1中使用的一些融合蛋白构建体除SEQ ID NO:83-101中提供的序列外还含有在蛋白的C端或N端处的SEQ ID NO:67的FLAG表位,以及短接头序列。

[0193] HEK293细胞中蛋白的表达与检测

用Lipofectamine 3000转染试剂(Thermo Fisher Scientific)将编码各种蛋白构建体的表达载体质粒转染到HEK293细胞中。使用免疫印迹测定分析细胞裂解物的表达的蛋白。在分析前,将培养基的样品离心以除去碎片。在含有2mM PMSF和蛋白酶混合物(Complete蛋白酶抑制剂混合物;Sigma)的裂解缓冲液(10mM Tris-HCl,pH 8.0,150mM NaCl,10mM EDTA,2%SDS)中裂解细胞。在短暂超声处理后,使用免疫印迹测定来分析样品的表达的蛋白。对于免疫印迹分析,将样品在SDS样品缓冲液中煮沸,并在聚丙烯酰胺凝胶电泳上运行。随后,将分离的蛋白条带转移至PVDF膜。

[0194] 使用化学发光信号检测表达的蛋白。简而言之,将印迹与能够结合特定表位的一抗(例如抗tau抗体)一起温育。在冲洗掉未结合的一抗后,使酶连接二抗(例如HRP连接抗IgG抗体)与结合印迹的一抗分子结合。在冲洗后,加入化学发光试剂,并在X射线胶片上捕获印迹中的所得化学发光信号。使用以下抗体:

- 抗Tau抗体(MilliporeSigma,Burlington,MA),
- 抗V5抗体(Thermo Fisher Scientific),
- 抗Flag抗体(Thermo Fisher Scientific),
- 抗pTau(Ser396)抗体(BioLegend,San Diego,CA),
- 抗pTau(Thr231)(BioLegend,San Diego,CA)。

[0195] 报告构建体

我们首先研究了靶向tau的融合蛋白是否改善了tau在培养细胞中的聚集。为此,我们生成了两种表达野生型tau(0N4R),以及已知引起过度磷酸化和聚集的突变形式(含有P243S取代)(在其N端与V5表位融合)的构建体(参见下表8)。培养HEK293细胞,并用编码野生型(SEQ ID NO:80)或突变体(SEQ ID NO:81)tau的质粒转染。

[0196] 表8: Tau报告构建体

构建体名称	SEQ NO:	ID	长度	序列
V5-Tau(0N4R)	80		404	MGKPIPPELLGLDSTGTGSEFMAEPRQEFVEMEDH AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEE AGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDD KKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGQANATRIPAK TPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSR TPSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPV PMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLD LSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKV TSKCGSLGNIHHPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSK IGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDH GAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMVDSPQ LATLADEV SASLAKQGL
V5-Tau(0N4R:P 243S)	81		404	MGKPIPPELLGLDSTGTGSEFMAEPRQEFVEMEDH AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEE AGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDD KKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGQANATRIPAK TPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSR TPSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPV PMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLD LSNVQSKCGSKDNIKHVSGGGSVQIVYKPV DLSKV TSKCGSLGNIHHPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSK IGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDH GAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMVDSPQ LATLADEV SASLAKQGL
Tau3R	82		241	MIATPRGAAPPQKQGQANATRIPAKTPPAPKTPSS GEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTRE PKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNV SKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVTSKCG SLGNIHHPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLD NITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDH GAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMVD

融合蛋白构建体

设计了几种融合蛋白构建体,其包含来自人DnaJB1的J结构域(SEQ ID NO:5),如表6中所提供并概括在下表9中。这些实验中的转染构建体在其C端末端含有Flag表位融合以促进检测。这些融合蛋白构建体的对照包括含有在高度保守的HPD基序内具有P33Q突变的J结构域的构建体。此外,设计了其它对照构建体,包括仅包含人DnaJB1 J结构域(SEQ ID NO:5)而没有任何tau结合结构域的构建体(构建体13)(也具有Flag表位),含有在任一侧与多聚谷氨酰胺结合肽QBP1融合的DnaJB1 J结构域的融合蛋白构建体(构建体11),以及其在J结构域内具有P33Q突变的相应对照(构建体12)。

[0197] 表9.融合蛋白构建体和对照

构建体编号	构建体名称	SEQ ID NO:	备注
1	JB1-TBP	83	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 在其 C 端与 TBP (SEQ ID NO: 49)融合
2	TBP1-JB1-TBP1	84	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 夹在任一侧的两个 TBP (SEQ ID NO: 49)肽之间
3	JB1-2xTBP	85	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 在其 C 端与串联 TBP (SEQ ID NO: 49)肽融合
4	JB1-scFv(Tau)	86	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 在其 C 端与 scFv(Tau) (SEQ ID NO:50)融合
5	JB1-scFv(MW7)	87	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 在其 C 端与 scFv(MW7) (SEQ ID NO:51)融合
6	JB1-Happ1	88	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 在其 C 端与 Happ1 (SEQ ID NO:52)融合
7	JB1(P33Q)-TBP	89	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 含有 P33Q 突变, 在其 C 端与 TBP (SEQ ID NO: 49)融合
8	JB1(P33Q)-scFv(Tau)	90	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 含有 P33Q 突变, 在其 C 端与 scFv(Tau) (SEQ ID NO:50)融合
9	JB1(P33Q)-scFv(MW7)	91	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 含有 P33Q 突变, 在其 C 端与 scFv(MW7) (SEQ ID NO:51)融合
10	JB1(P33Q)-Happ1	92	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 含有 P33Q 突变, 在其 C 端与 Happ1 (SEQ ID NO:52)融合
11	QBP1-JB1-QBP1	93	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 在其 C 端与 QBP1 融合, QBP1 为多聚谷氨酰胺结合肽
12	QBP1-JB1(P33Q)-QBP1	94	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 含有 P33Q 突变, 在其 C 端与 QBP1 融合, QBP1 为多聚谷氨酰胺结合肽
13	仅 JB1	5	包含 JB1 而不含 Tau 结合结构域的对照构建体
14	JB1-TBP2	95	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 在其 C 端与 TBP2 (SEQ ID NO: 53)融合
15	JB1-TBP3	96	来自人 DnaJB1 的 J 结构域, 在其 C 端与 TBP3 (SEQ ID NO: 54)融合
16	JB1-TBP (无接头)	97	类似于构建体 1, 但在 DnaJB1 与 TBP 之间没有接头序列
17	JB1-TBP2 (无接头)	98	类似于构建体 14, 但在 DnaJB1 与 TBP2 之间没有接头序列
18	JB1-TBP3 (无接头)	99	类似于构建体 15, 但在 DnaJB1 与 TBP 之间没有接头序列
19	JB1-scFv(Tau) (无接头)	100	类似于构建体 4, 但在 DnaJB1 与 TBP 之间没有接头序列
20	JB1-Happ1 (无接头)	101	类似于构建体 6, 但在 DnaJB1 与 TBP 之间没有接头序列

将这些构建体中的几个与表达野生型或突变体tau的构建体一起共转染到HEK293细胞中。通过免疫印迹分析检测构建体1、构建体4、构建体5和构建体6的表达(数据未显示)。

[0198] 为了确定J结构域是否可用于减少tau聚集,通过野生型或突变体tau与融合蛋白的共表达进行了初步实验,所述融合蛋白包含来源于Hsp40 J结构域蛋白(来自人DnaJB1)的J结构域序列,其与tau结合肽TBP(构建体1)、ScFv(tau)(构建体4)、ScFv(MW7)(构建体5)和Happ1(构建体6)缀合。如图3中所示,如通过抗V5抗体所检测的那样,野生型(图3,上图,泳道2-6)或突变体(P243S)tau(泳道7-11)在HEK293细胞中的表达导致tau的出现。我们进一步测试了融合蛋白构建体中的一种的共表达是否对改变磷酸化tau的水平有影响。我们因此检查了Tau 2N4R中在Thr231或Ser396处磷酸化的tau的量,因为这些位点处的过度磷酸化与tau蛋白病相关(Bramblett等人,(1993)Neuron 10:1089-99;Alonso等人,(2004)JBiol Chem 279:34873-81;Lin等人,(2007)J Neurochem 103:802-13;Alonso等人,(2010)JBiol Chem 285:30851-30860)。当用识别在Ser396处磷酸化的tau(2N4R)的抗体探测时(图3,下图),单独的野生型或P243S tau的表达(分别为泳道2和7)检测到在大约63kDa处的pTau(Ser396)。相反,共表达构建体1、4、5和6的细胞的提取物中可检测的pTau(Ser396)水平显著降低(表达野生型Tau的细胞分别为泳道3、4和5,而表达P243S Tau的细胞分别为泳道9、10和11)。

[0199] 图4上图显示了在表达野生型(ON4R)或突变体Tau的细胞中,构建体4的共表达导致pTau(2N4R中的Thr231)和pTau(2N4R中的Ser396)的显著降低。下图显示了使用抗Flag抗体检测构建体4。

[0200] 最后,我们测试了JB1-ScFv(tau)在减少pTau(Ser396)方面的特异性。我们因此测试了几种构建体在降低可检测的pTau(Ser396)的量的能力方面的能力,如图5中所示:

- 构建体8,其与构建体4相同,除了J结构域内高度保守的HPD基序内的P33Q突变(泳道5和9);
- 仅有scFv(tau)的对照(不含J结构域序列的构建体4;泳道3和7)

如图5中所示,野生型tau(泳道2-5)或突变体(P243S)tau(泳道6-9)的表达导致可检测的tau(上图),以及pTau(Ser396)(中图)的出现。pTau(Ser396)的水平在共表达构建体4(泳道4和8)的细胞中显著降低,但在表达构建体8(泳道5和9)或仅ScFv(tau)(泳道3和7)的细胞中没有显著降低。因此,我们推断pTau(Ser396)的减少由融合蛋白(诸如构建体4)介导,其需要功能性J结构域活性。

[0201] 如图6中所示,野生型Tau(泳道2-6)或突变体(P243S)Tau(泳道7-11)的表达导致可检测的Tau(上图),以及pTau(Ser396)(下图)的出现。在共表达构建体6(泳道3和8)、构建体1(泳道4和9)和构建体14(泳道5和10)的细胞中,pTau(Ser396)的水平显著降低,表明结合序列诸如TBP2(SEQ ID NO:53)在融合构建体中是有用的。

[0202] 我们进一步测试了融合蛋白构建体中的一种的共表达是否对改变截短形式的tau(Tau3R,SEQ ID NO:80)的水平有影响。在HEK293细胞中与全长tau或截短形式的tau(Tau3R)一起表达具有tau结合肽TBP的J结构域融合蛋白(构建体1)。当用识别tau的抗体探测时,在60kDa附近检测到全长tau,而在30kDa附近检测到Tau3R(图7)。构建体1显著降低了Tau3R的蛋白水平,通过突变J结构域(构建体7)消除了该效果。

[0203] 图8显示了在U87-MG神经胶质瘤细胞中表达构建体1的效果。用慢病毒感染U87-MG神经胶质瘤细胞以表达具有或不具有构建体1或构建体7的全长tau。在第2天用新鲜培养基替换培养基。在感染后第7天从U87-MG细胞收集培养基。培养基中的乳酸脱氢酶(LDH)活性通过LDH-Cytox™测定试剂盒(BioLegend)来测量。数值代表平均值±SD。这些结果证明J结构域融合蛋白不仅能够减少蛋白错误折叠和/或聚集,还能够减少与蛋白错误折叠和/或聚集相关的细胞毒性。

[0204] 实施例2:编码融合蛋白构建体的AAV载体

示例性的基因治疗载体由携带编码表6的融合蛋白构建体的密码子优化的cDNA的AAV rh10载体构建,所述cDNA具体为在含有巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件和鸡β-肌动蛋白启动子的CAG启动子控制下的构建体1、4、5和6,以及对照构建体13(仅DnaJB1 J结构域)、GFP(阴性对照)。将编码JB1-TBP的cDNA放置在Kozak序列的下游和牛生长激素多聚腺苷酸化(BGHpA)信号的上游。整个盒的侧翼是AAV-2的两个非编码末端反向序列。

[0205] 使用类似于上述的杆状病毒表达系统(Urabe等人,2002,Unzu等人,2011(综述在Kotin,2011中))制备重组AAV载体。简而言之,使用三种重组杆状病毒感染SF9昆虫细胞,所述三种重组杆状病毒一种编码用于复制和包装的REP,一种编码用于AAV rh10衣壳的CAP-5,以及一种具有表达盒。使用AVB琼脂糖高速亲和介质(GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ)进行纯化。使用QPCR用转基因的引物-探针组合滴定载体,且滴度表示为每毫升的基因组拷贝数(GC/毫升)。载体的滴度大约为 8×10^{13} 至 2×10^{14} GC/毫升。

[0206] 实施例3:小鼠模型中的功效的测试

存在许多阿尔茨海默病的动物模型(参见例如Kitazawa等人,(2012) Curr. Pharm. Des., 18:1131-1147)。在本实施例中,使用tau蛋白病的人Tau(htau)小鼠模型(Duff等人,(2000) Neurobiol Dis. 7:87-98)。Htau小鼠表达来源于人PAC(H1单倍型)的人tau,称为8c小鼠,而鼠tau通过外显子1的靶向破坏(Duff等人,同上)而被敲除。在C57BL/6背景下饲养小鼠。

[0207] 进行预防性研究(preventive study),治疗2.5至6.5月龄的小鼠。将含有编码融合蛋白的载体的不同AAV病毒颗粒和相应的对照施用于转基因动物。在一个实施方案中,通过尾静脉注射施用病毒颗粒。在另一实施方案中,通过肌肉注射施用病毒颗粒。在又一实施方案中,通过颅内注射施用颗粒,例如如Stanek等人,(2014) Hum. Gene. Ther. 25:461-474中所述。将大约36只小鼠分成三组混合的雄性和雌性小鼠,向其施用包含编码构建体4、载体对照、在J结构域的保守HPD基序内具有P33Q突变的构建体8的cDNA的AAV rh10。

[0208] 施用后,监测疾病进展并与对照注射小鼠进行比较。研究的主要终点是与载体对照治疗小鼠相比,构建体治疗的小鼠的脑中不溶性tau聚集体的统计学显著减少。次要终点是不溶性tau聚集体的剂量依赖性减少、磷酸化tau的减少、和可溶性tau的减少。

[0209] 其它方面

本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用全文并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请具体和单独地指示通过引用全文并入本文。当发现本申请中的术语在通过引用并入本文的文献中被不同地定义时,本文提供的定义将用作该术语的定义。

[0210] 虽然已经结合本发明具体方面对本发明进行了描述,要理解的是,本发明能够进

一步修改,并且本申请意在覆盖本发明的任何变化、用途或改编,这些变化、用途或改编通常遵循本发明的原理,并且包括来自本发明所属领域内已知或常规实践的本公开的此类偏离,并且可以应用于上文所述的基本特征,并且遵循要求保护的范围。

65 70

<210> 7

<211> 69

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> Uniprot/Q8WWF6

<309> 2021-09-04

<313> (1) .. (69)

<400> 7

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

65

<210> 8

<211> 69

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_001304028

<309> 2021-07-02

<313> (2) .. (70)

<400> 8

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

65

<210> 9
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_001128476
 <309> 2021-07-11
 <313> (38) .. (102)
 <400> 9
 Asp Tyr Tyr Lys Ile Leu Gly Ile Pro Ser Gly Ala Asn Glu Asp Glu
 1 5 10 15
 Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Met Ala Leu Lys Tyr His Pro Asp Lys
 20 25 30
 Asn Lys Glu Pro Asn Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu Ala
 35 40 45
 Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Lys Lys Arg Gly Leu Tyr Asp Gln Tyr
 50 55 60
 Gly
 65
 <210> 10
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_005485
 <309> 2021-06-28
 <313> (2) .. (69)
 <400> 10
 Val Asp Tyr Tyr Glu Val Leu Gly Val Gln Arg His Ala Ser Pro Glu
 1 5 10 15
 Asp Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys Trp His Pro Asp
 20 25 30
 Lys Asn Pro Glu Asn Lys Glu Glu Ala Glu Arg Lys Phe Lys Gln Val
 35 40 45
 Ala Glu Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Ala Lys Lys Arg Asp Ile Tyr
 50 55 60
 Asp Lys Tyr Gly
 65
 <210> 11

<212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_036460
 <309> 2021-10-17
 <313> (26) .. (90)
 <400> 13
 Ser Tyr Tyr Asp Ile Leu Gly Val Pro Lys Ser Ala Ser Glu Arg Gln
 1 5 10 15
 Ile Lys Lys Ala Phe His Lys Leu Ala Met Lys Tyr His Pro Asp Lys
 20 25 30
 Asn Lys Ser Pro Asp Ala Glu Ala Lys Phe Arg Glu Ile Ala Glu Ala
 35 40 45
 Tyr Glu Thr Leu Ser Asp Ala Asn Arg Arg Lys Glu Tyr Asp Thr Leu
 50 55 60
 Gly
 65
 <210> 14
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_057390
 <309> 2021-08-09
 <313> (26) .. (91)
 <400> 14
 Asp Phe Tyr Lys Ile Leu Gly Val Pro Arg Ser Ala Ser Ile Lys Asp
 1 5 10 15
 Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Gln Leu His Pro Asp Arg
 20 25 30
 Asn Pro Asp Asp Pro Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gln Asp Leu Gly Ala
 35 40 45
 Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Ser Glu Lys Arg Lys Gln Tyr Asp Thr
 50 55 60
 Tyr Gly
 65
 <210> 15
 <211> 65
 <212> PRT

<213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_001002762
 <309> 2021-07-02
 <313> (112) .. (176)
 <400> 15
 Tyr Glu Ile Leu Gly Val Ser Arg Gly Ala Ser Asp Glu Asp Leu Lys
 1 5 10 15
 Lys Ala Tyr Arg Arg Leu Ala Leu Lys Phe His Pro Asp Lys Asn His
 20 25 30
 Ala Pro Gly Ala Thr Glu Ala Phe Lys Ala Ile Gly Thr Ala Tyr Ala
 35 40 45
 Val Leu Ser Asn Pro Glu Lys Arg Lys Gln Tyr Asp Gln Phe Gly Asp
 50 55 60
 Asp
 65
 <210> 16
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_705842
 <309> 2021-01-25
 <313> (4) .. (68)
 <400> 16
 Asp Tyr Tyr Ser Val Leu Gly Ile Thr Arg Asn Ser Glu Asp Ala Gln
 1 5 10 15
 Ile Lys Gln Ala Tyr Arg Arg Leu Ala Leu Lys His His Pro Leu Lys
 20 25 30
 Ser Asn Glu Pro Ser Ser Ala Glu Ile Phe Arg Gln Ile Ala Glu Ala
 35 40 45
 Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Met Lys Arg Gly Ile Tyr Asp Lys Phe
 50 55 60
 Gly
 65
 <210> 17
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 智人

<300>
 <308> NCBI/NP_001026893
 <309> 2021-06-26
 <313> (108) .. (172)
 <400> 17
 Asn Tyr Tyr Glu Val Leu Gly Val Thr Lys Asp Ala Gly Asp Glu Asp
 1 5 10 15
 Leu Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys Phe His Pro Asp Lys
 20 25 30
 Asn His Ala Pro Gly Ala Thr Asp Ala Phe Lys Lys Ile Gly Asn Ala
 35 40 45
 Tyr Ala Val Leu Ser Asn Pro Glu Lys Arg Lys Gln Tyr Asp Leu Thr
 50 55 60

Gly

65

<210> 18

<211> 65

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_071760

<309> 2020-11-19

<313> (65) .. (129)

<400> 18

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

Leu

65

<210> 19

<211> 74

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_001123359
 <309> 2021-02-21
 <313> (88) .. (161)
 <400> 19
 Asp His Tyr Ala Val Leu Gly Leu Gly His Val Arg Tyr Lys Ala Thr
 1 5 10 15
 Gln Arg Gln Ile Lys Ala Ala His Lys Ala Met Val Leu Lys His His
 20 25 30
 Pro Asp Lys Arg Lys Ala Ala Gly Glu Pro Ile Lys Glu Gly Asp Asn
 35 40 45
 Asp Tyr Phe Thr Cys Ile Thr Lys Ala Tyr Glu Met Leu Ser Asp Pro
 50 55 60
 Val Lys Arg Arg Ala Phe Asn Ser Val Asp
 65 70
 <210> 20
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_006251
 <309> 2021-06-26
 <313> (394) .. (462)
 <400> 20
 Asp Tyr Tyr Lys Ile Leu Gly Val Lys Arg Asn Ala Lys Lys Gln Glu
 1 5 10 15
 Ile Ile Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Gln Trp His Pro Asp Asn
 20 25 30
 Phe Gln Asn Glu Glu Glu Lys Lys Lys Ala Glu Lys Lys Phe Ile Asp
 35 40 45
 Ile Ala Ala Ala Lys Glu Val Leu Ser Asp Pro Glu Met Arg Lys Lys
 50 55 60
 Phe Asp Asp Gly Glu
 65
 <210> 21
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_001294909

<309> 2021-06-23

<313> (33) .. (98)

<400> 21

Thr Tyr Tyr Glu Leu Leu Gly Val His Pro Gly Ala Ser Thr Glu Glu
1 5 10 15

Val Lys Arg Ala Phe Phe Ser Lys Ser Lys Glu Leu His Pro Asp Arg
 20 25 30

Asp Pro Gly Asn Pro Ser Leu His Ser Arg Phe Val Glu Leu Ser Glu
 35 40 45

Ala Tyr Arg Val Leu Ser Arg Glu Gln Ser Arg Arg Ser Tyr Asp Asp
 50 55 60

Gln Leu

65

<210> 22

<211> 70

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_079495

<309> 2021-10-03

<313> (13) .. (82)

<400> 22

Gly Glu Ser Leu Tyr His Val Leu Gly Leu Asp Lys Asn Ala Thr Ser
1 5 10 15

Asp Asp Ile Lys Lys Ser Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys Tyr His Pro
 20 25 30

Asp Lys Asn Pro Asp Asn Pro Glu Ala Ala Asp Lys Phe Lys Glu Ile
 35 40 45

Asn Asn Ala His Ala Ile Leu Thr Asp Ala Thr Lys Arg Asn Ile Tyr
 50 55 60

Asp Lys Tyr Gly Ser Leu

65

70

<210> 23

<211> 66

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_149096

<309> 2021-02-17

<313> (19) .. (84)

<400> 23

Ala Leu Tyr Glu Ile Leu Gly Leu His Lys Gly Ala Ser Asn Glu Glu

1 5 10 15

Ile Lys Lys Thr Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys His His Pro Asp Lys

20 25 30

Asn Pro Asp Asp Pro Ala Ala Thr Glu Lys Phe Lys Glu Ile Asn Asn

35 40 45

Ala His Ala Ile Leu Thr Asp Ile Ser Lys Arg Ser Ile Tyr Asp Lys

50 55 60

Tyr Gly

65

<210> 24

<211> 65

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_001243793

<309> 2021-05-09

<313> (906) .. (970)

<400> 24

Thr Lys Trp Lys Pro Val Gly Met Ala Asp Leu Val Thr Pro Glu Gln

1 5 10 15

Val Lys Lys Val Tyr Arg Lys Ala Val Leu Val Val His Pro Asp Lys

20 25 30

Ala Thr Gly Gln Pro Tyr Glu Gln Tyr Ala Lys Met Ile Phe Met Glu

35 40 45

Leu Asn Asp Ala Trp Ser Glu Phe Glu Asn Gln Gly Gln Lys Pro Leu

50 55 60

Tyr

65

<210> 25

<211> 71

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_001138238

<309> 2021-02-22

<313> (325) .. (395)

<400> 25

Asp Tyr Tyr Lys Ile Leu Gly Val Asp Lys Asn Ala Ser Glu Asp Glu
1 5 10 15

Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Arg Ala Leu Met His His Pro Asp Arg
 20 25 30

His Ser Gly Ala Ser Ala Glu Val Gln Lys Glu Glu Glu Lys Lys Phe
 35 40 45

Lys Glu Val Gly Glu Ala Phe Thr Ile Leu Ser Asp Pro Lys Lys Lys
 50 55 60

Thr Arg Tyr Asp Ser Gly Gln
65 70

<210> 26

<211> 68

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_055095

<309> 2021-06-26

<313> (57) .. (124)

<400> 26

Asn Pro Phe Glu Val Leu Gln Ile Asp Pro Glu Val Thr Asp Glu Glu
1 5 10 15

Ile Lys Lys Arg Phe Arg Gln Leu Ser Ile Leu Val His Pro Asp Lys
 20 25 30

Asn Gln Asp Asp Ala Asp Arg Ala Gln Lys Ala Phe Glu Ala Val Asp
 35 40 45

Lys Ala Tyr Lys Leu Leu Leu Asp Gln Glu Gln Lys Lys Arg Ala Leu
 50 55 60

Asp Val Ile Gln
65

<210> 27

<211> 68

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_056005

<309> 2021-07-25

<313> (15) .. (82)

<400> 27

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

Asp Glu Gln Gly
 65

<210> 28

<211> 66

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_001258510

<309> 2021-08-09

<313> (35) .. (100)

<400> 28

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

Tyr Gly
 65

<210> 29

<211> 69

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_060668

<309> 2021-04-17

<313> (14) .. (82)

<400> 29

Asp Tyr Tyr Ser Leu Leu Asn Val Arg Arg Glu Ala Ser Ser Glu Glu

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

65

<210> 30

<211> 66

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_068572

<309> 2021-06-26

<313> (14) .. (79)

<400> 30

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

65

<210> 31

<211> 66

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_056083

<309> 2021-04-16

<313> (1301) .. (1366)

<400> 31

Asp Ala Tyr Glu Val Leu Asn Leu Pro Gln Gly Gln Gly Pro His Asp
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Ile Arg Lys Ala Tyr Phe Arg Leu Ala Gln Lys Tyr His
 20 25 30

Pro Asp Lys Asn Pro Glu Gly Arg Asp Met Phe Glu Lys Val Asn Lys
 35 40 45

Ala Tyr Glu Phe Leu Cys Thr Lys Ser Ala Lys Ile Val Asp Gly Pro
 50 55 60

Asp Pro
 65

<210> 32

<211> 65

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_115740

<309> 2021-07-12

<313> (443) .. (507)

<400> 32

Asn Pro Phe His Val Leu Gly Val Glu Ala Thr Ala Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15

Leu Lys Lys Ala Tyr Arg Gln Leu Ala Val Met Val His Pro Asp Lys
 20 25 30

Asn His His Pro Arg Ala Glu Glu Ala Phe Lys Val Leu Arg Ala Ala
 35 40 45

Trp Asp Ile Val Ser Asn Ala Glu Lys Arg Lys Glu Tyr Glu Met Lys
 50 55 60

Arg
 65

<210> 33

<211> 55

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_037370

<309> 2021-04-17

<313> (96) .. (150)

<400> 33

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

Ile Arg Thr Ala His Arg Arg Val Met Ile Leu Asn His Pro Asp Lys

20 25 30
 Gly Gly Ser Pro Tyr Val Ala Ala Lys Ile Asn Glu Ala Lys Asp Leu
 35 40 45
 Leu Glu Thr Thr Thr Lys His
 50 55
 <210> 34
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/EAW51732
 <309> 2015-03-23
 <313> (29) .. (93)
 <400> 34
 Asp Pro Tyr Arg Val Leu Gly Val Ser Arg Thr Ala Ser Gln Ala Asp
 1 5 10 15
 Ile Lys Lys Ala Tyr Lys Lys Leu Ala Arg Glu Trp His Pro Asp Lys
 20 25 30
 Asn Lys Asp Pro Gly Ala Glu Asp Lys Phe Ile Gln Ile Ser Lys Ala
 35 40 45
 Tyr Glu Ile Leu Ser Asn Glu Glu Lys Arg Ser Asn Tyr Asp Gln Tyr
 50 55 60
 Gly
 65
 <210> 35
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_060633
 <309> 2021-06-24
 <313> (11) .. (76)
 <400> 35
 Asp Leu Tyr Ala Leu Leu Gly Ile Glu Glu Lys Ala Ala Asp Lys Glu
 1 5 10 15
 Val Lys Lys Ala Tyr Arg Gln Lys Ala Leu Ser Cys His Pro Asp Lys
 20 25 30
 Asn Pro Asp Asn Pro Arg Ala Ala Glu Leu Phe His Gln Leu Ser Gln
 35 40 45

Ala Leu Glu Val Leu Thr Asp Ala Ala Ala Arg Ala Ala Tyr Asp Lys
 50 55 60

Val Arg

65

<210> 36

<211> 65

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_689899

<309> 2020-12-11

<313> (82) .. (146)

<400> 36

Asn Tyr Tyr Glu Ile Leu Gly Val Ser Arg Asp Ala Ser Asp Glu Glu
 1 5 10 15

Leu Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys Phe His Pro Asp Lys
 20 25 30

Asn Cys Ala Pro Gly Ala Thr Asp Ala Phe Lys Ala Ile Gly Asn Ala
 35 40 45

Phe Ala Val Leu Ser Asn Pro Asp Lys Arg Leu Arg Tyr Asp Glu Tyr
 50 55 60

Gly

65

<210> 37

<211> 55

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_001177162

<309> 2021-02-23

<313> (37) .. (91)

<400> 37

Glu Ala Ala Leu Ile Leu Gly Val Ser Pro Thr Ala Asn Lys Gly Lys
 1 5 10 15

Ile Arg Asp Ala His Arg Arg Ile Met Leu Leu Asn His Pro Asp Lys
 20 25 30

Gly Gly Ser Pro Tyr Ile Ala Ala Lys Ile Asn Glu Ala Lys Asp Leu
 35 40 45

Leu Glu Gly Gln Ala Lys Lys

50 55
 <210> 38
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_741999
 <309> 2021-09-20
 <313> (72) .. (143)
 <400> 38
 Asp Tyr Phe Ser Leu Met Asp Cys Asn Arg Ser Phe Arg Val Asp Thr
 1 5 10 15
 Ala Lys Leu Gln His Arg Tyr Gln Gln Leu Gln Arg Leu Val His Pro
 20 25 30
 Asp Phe Phe Ser Gln Arg Ser Gln Thr Glu Lys Asp Phe Ser Glu Lys
 35 40 45
 His Ser Thr Leu Val Asn Asp Ala Tyr Lys Thr Leu Leu Ala Pro Leu
 50 55 60
 Ser Arg Gly Leu Tyr Leu Leu Lys
 65 70
 <210> 39
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_001012339
 <309> 2021-06-25
 <313> (3) .. (69)
 <400> 39
 Cys His Tyr Glu Ala Leu Gly Val Arg Arg Asp Ala Ser Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Leu Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys Trp His Pro Asp Lys
 20 25 30
 Asn Leu Asp Asn Ala Ala Glu Ala Ala Glu Gln Phe Lys Leu Ile Gln
 35 40 45
 Ala Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Gln Glu Arg Ala Trp Tyr Asp
 50 55 60
 Asn His Arg
 65

<210> 40
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_001291873
 <309> 2021-02-16
 <313> (277) .. (341)
 <400> 40
 Leu Ala Tyr Gln Val Leu Gly Leu Ser Glu Gly Ala Thr Asn Glu Glu
 1 5 10 15
 Ile His Arg Ser Tyr Gln Glu Leu Val Lys Val Trp His Pro Asp His
 20 25 30
 Asn Leu Asp Gln Thr Glu Glu Ala Gln Arg His Phe Leu Glu Ile Gln
 35 40 45
 Ala Ala Tyr Glu Val Leu Ser Gln Pro Arg Lys Pro Trp Gly Ser Arg
 50 55 60
 Arg
 65
 <210> 41
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_009145
 <309> 2021-10-17
 <313> (104) .. (165)
 <400> 41
 Asn Pro Tyr Glu Val Leu Asn Leu Asp Pro Gly Ala Thr Val Ala Glu
 1 5 10 15
 Ile Lys Lys Gln Tyr Arg Leu Leu Ser Leu Lys Tyr His Pro Asp Lys
 20 25 30
 Gly Gly Asp Glu Val Met Phe Met Arg Ile Ala Lys Ala Tyr Ala Ala
 35 40 45
 Leu Thr Asp Glu Glu Ser Arg Lys Asn Trp Glu Glu Phe Gly
 50 55 60
 <210> 42
 <211> 72
 <212> PRT

<213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_859057
 <309> 2021-02-16
 <313> (11) .. (82)
 <400> 42
 Asp Trp Tyr Ser Ile Leu Gly Ala Asp Pro Ser Ala Asn Ile Ser Asp
 1 5 10 15
 Leu Lys Gln Lys Tyr Gln Lys Leu Ile Leu Met Tyr His Pro Asp Lys
 20 25 30
 Gln Ser Thr Asp Val Pro Ala Gly Thr Val Glu Glu Cys Val Gln Lys
 35 40 45
 Phe Ile Glu Ile Asp Gln Ala Trp Lys Ile Leu Gly Asn Glu Glu Thr
 50 55 60
 Lys Arg Glu Tyr Asp Leu Gln Arg
 65 70
 <210> 43
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NCBI/NP_001015882
 <309> 2020-12-12
 <313> (55) .. (130)
 <400> 43
 Asp Cys Tyr Glu Val Leu Gly Val Ser Arg Ser Ala Gly Lys Ala Glu
 1 5 10 15
 Ile Ala Arg Ala Tyr Arg Gln Leu Ala Arg Arg Tyr His Pro Asp Arg
 20 25 30
 Tyr Arg Pro Gln Pro Gly Asp Glu Gly Pro Gly Arg Thr Pro Gln Ser
 35 40 45
 Ala Glu Glu Ala Phe Leu Leu Val Ala Thr Ala Tyr Glu Thr Leu Lys
 50 55 60
 Asp Glu Glu Thr Arg Lys Asp Tyr Asp Tyr Met Leu
 65 70 75
 <210> 44
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_001305063

<309> 2021-06-29

<313> (1168)..(1232)

<400> 44

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

Phe

65

<210> 45

<211> 57

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/ 2YS8_A

<309> 2020-12-01

<313> (28)..(84)

<400> 45

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

<210> 46

<211> 65

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_001035282

<309> 2021-04-19

<313> (51) .. (115)

<400> 46

Glu Tyr Tyr Arg Leu Leu Asn Val Glu Glu Gly Cys Ser Ala Asp Glu
1 5 10 15

Val Arg Glu Ser Phe His Lys Leu Ala Lys Gln Tyr His Pro Asp Ser
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Ala Asp Ser Ala Thr Phe Ile Arg Ile Glu Lys Ala
 35 40 45

Tyr Arg Lys Val Leu Ser His Val Ile Glu Gln Thr Asn Ala Ser Gln
 50 55 60

Ser

65

<210> 47

<211> 88

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_055178

<309> 2021-07-19

<313> (4312) .. (4399)

<400> 47

Ile Leu Lys Glu Val Thr Ser Val Val Glu Gln Ala Trp Lys Leu Pro
1 5 10 15

Glu Ser Glu Arg Lys Lys Ile Ile Arg Arg Leu Tyr Leu Lys Trp His
 20 25 30

Pro Asp Lys Asn Pro Glu Asn His Asp Ile Ala Asn Glu Val Phe Lys
 35 40 45

His Leu Gln Asn Glu Ile Asn Arg Leu Glu Lys Gln Ala Phe Leu Asp
 50 55 60

Gln Asn Ala Asp Arg Ala Ser Arg Arg Thr Phe Ser Thr Ser Ala Ser
65 70 75 80

Arg Phe Gln Ser Asp Lys Tyr Ser
 85

<210> 48

<211> 66

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI/NP_115693

Tyr Cys Ile Tyr Ala Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met
 130 135 140
 Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
 145 150 155 160
 Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe
 210 215 220
 Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile
 <210> 52
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 合成tau结合结构域 Happ1
 <400> 52
 Met Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
 85 90 95
 Leu Cys Val Ala Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Asn Gly Gly Gly Gly

	100	105	110
Val Asp Gly Thr Ala Gly			
	115		
<210>	53		
<211>	6		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	合成tau结合结构域 TBP2		
<400>	53		
Val Gln Ile Ile Asn Lys			
1		5	
<210>	54		
<211>	13		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	合成tau结合结构域 TBP3		
<400>	54		
Tyr Gln Gln Tyr Gln Asp Ala Thr Ala Asp Glu Gln Gly			
1		5	10
<210>	55		
<211>	2		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	合成接头序列		
<400>	55		
Ser Arg			
1			
<210>	56		
<211>	4		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	合成接头序列		
<400>	56		
Gly Thr Gly Ser			
1			

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成接头序列
<400> 57
Gly Leu Glu Ser Arg
1 5
<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成接头序列
<400> 58
Gly Gly Ser Gly
1
<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成接头序列
<400> 59
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成接头序列
<400> 60
Asp Ile Ala Ala Ala
1 5
<210> 61
<211> 9
<212> PRT

210	215	220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
225	230	
<210> 67		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 合成FLAG表位		
<400> 67		
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys		
1	5	
<210> 68		
<211> 6		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 用于纯化的表位His6		
<400> 68		
His His His His His His		
1	5	
<210> 69		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 智人		
<300>		
<308> NCBI/AAA36340		
<309> 1993-04-27		
<313> (415) .. (424)		
<400> 69		
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu		
1	5	10
<210> 70		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人流感病毒		
<300>		
<308> Uniprot/Q03909		
<309> 2020-12-02		

- <313> (119) .. (127)
 <400> 70
 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5
 <210> 71
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 猴病毒5
 <300>
 <301> Tomas Hanke, Paul Szawlowski和Richard E. Randall
 <302> 利用标签特异性单克隆抗体和标签连接抗原构建含有猴免疫缺陷病毒p27的
 固体基质-抗体-抗原复合物
 <303> Journal of General Virology
 <304> 73
 <306> 653-660
 <307> 1992
 <400> 71
 Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 1 5 10
 <210> 72
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签克隆载体
 <220>
 <221> 合成
 <222> (1) .. (15)
 <223> 穿透肽
 <400> 72
 Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30
 Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45
 Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60
 Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn

65	70	75	80
Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu			
	85	90	95
Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser			
	100	105	110
Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu			
	115	120	125
Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn			
	130	135	140
Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp			
145	150	155	160
Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu			
	165	170	175
Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr			
	180	185	190
Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala			
	195	200	205
Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp			
	210	215	220

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<300>

<308> NCBI/AAF35362

<309> 2013-01-25

<313> (119) .. (127)

<400> 73

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成细胞穿透肽

<400> 74

Arg Gln Ile Lys Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

1	5	10	15
Met Arg Cys			
<210> 79			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> 合成信号序列			
<400> 79			
Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys			
1	5	10	15
Val Leu Ser			
<210> 80			
<211> 404			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> V5-Tau(ON4R) tau报告构建体			
<400> 80			
Met Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Gly			
1	5	10	15
Thr Gly Ser Glu Phe Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met			
	20	25	30
Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly			
	35	40	45
Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu			
	50	55	60
Lys Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu			
65	70	75	80
Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp			
	85	90	95
Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr			
	100	105	110
Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln			
	115	120	125
Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr			
	130	135	140
Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr			
145	150	155	160

Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro
 165 170 175
 Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val
 180 185 190
 Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr
 195 200 205
 Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly
 210 215 220
 Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile
 225 230 235 240
 Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser
 245 250 255
 Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val
 260 265 270
 Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 275 280 285
 Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
 290 295 300
 Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
 305 310 315 320
 Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
 325 330 335
 His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
 340 345 350
 Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro
 355 360 365
 Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp
 370 375 380
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala
 385 390 395 400
 Lys Gln Gly Leu
 <210> 81
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> V5-Tau(ON4R:P243S) Tau报告构建体
 <400> 81
 Met Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Gly

1	5	10	15
Thr Gly Ser Glu Phe Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met			
	20	25	30
Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly			
	35	40	45
Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu			
	50	55	60
Lys Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu			
65	70	75	80
Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp			
	85	90	95
Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr			
	100	105	110
Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln			
	115	120	125
Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr			
	130	135	140
Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr			
145	150	155	160
Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro			
	165	170	175
Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val			
	180	185	190
Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr			
	195	200	205
Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly			
	210	215	220
Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile			
225	230	235	240
Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser			
	245	250	255
Lys Asp Asn Ile Lys His Val Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val			
	260	265	270
Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu			
	275	280	285
Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser			
	290	295	300
Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu			
305	310	315	320

Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
 325 330 335
 His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
 340 345 350
 Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro
 355 360 365
 Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp
 370 375 380
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala
 385 390 395 400
 Lys Gln Gly Leu
 <210> 82
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> Tau3R Tau报告构建体
 <400> 82
 Met 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 Thr
 20 25 30
 Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr
 35 40 45
 Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro
 50 55 60
 Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val
 65 70 75 80
 Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr
 85 90 95
 Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly
 100 105 110
 Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile
 115 120 125
 Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser
 130 135 140
 Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys
 145 150 155 160
 Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser

	165		170		175
Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu					
	180		185		190
Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His					
	195		200		205
Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser					
	210		215		220
Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val					
225		230		235	240
Asp					
<210>	83				
<211>	106				
<212>	PRT				
<213>	人工				
<220>					
<223>	JB1-TBP1融合蛋白构建体				
<400>	83				
Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser					
1	5		10		15
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His					
	20		25		30
Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile					
	35		40		45
Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe					
	50		55		60
Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly					
65		70		75	80
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly					
	85		90		95
Ser Ala Ala Ala Val Gln Ile Val Tyr Lys					
	100		105		
<210>	84				
<211>	147				
<212>	PRT				
<213>	人工				
<220>					
<223>	TBP1-JB1-TBP1融合蛋白构建体				
<400>	84				
Met Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Gly					

1 5 10 15
 Thr Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 20 25 30
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln
 35 40 45
 Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala
 50 55 60
 Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro
 65 70 75 80
 Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu
 85 90 95
 Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly
 100 105 110
 Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Val Gln Ile
 130 135 140
 Val Tyr Lys
 145
 <210> 85
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> JB1-2XTBP1融合蛋白构建体
 <400> 85
 Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His
 20 25 30
 Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile
 35 40 45
 Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe
 50 55 60
 Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 85 90 95
 Ser Ala Ala Ala Val Gln Ile Val Tyr Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly

	100		105		110												
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys		
	115						120						125				
<210>	86																
<211>	334																
<212>	PRT																
<213>	人工																
<220>																	
<223>	JB1-scFv(Tau)融合蛋白构建体																
<400>	86																
Met	Gly	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Gln	Thr	Leu	Gly	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Ser		
1				5					10					15			
Asp	Glu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Tyr	Arg	Arg	Gln	Ala	Leu	Arg	Tyr	His		
			20						25					30			
Pro	Asp	Lys	Asn	Lys	Glu	Pro	Gly	Ala	Glu	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile		
			35					40						45			
Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Val	Leu	Ser	Asp	Pro	Arg	Lys	Arg	Glu	Ile	Phe		
			50					55						60			
Asp	Arg	Tyr	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly	Ser	Asp	Ile	Gly	Gly	Gly		
65						70					75				80		
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
						85					90				95		
Ser	Ala	Ala	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val		
				100						105					110		
Gln	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn		
				115						120					125		
Ile	Lys	Asp	Thr	Ser	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly		
						135							140				
Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Ala	Pro	Ala	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr		
145						150					155				160		
Asp	Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Ser		
						165									175		
Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala		
				180											190		
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Tyr	Asp	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
															205		
Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
															210		
															215		
															220		
Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Asn	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser		

225	230	235	240
Ala Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn			
	245	250	255
Ile Asn Val Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro			
	260	265	270
Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser			
	275	280	285
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
	290	295	300
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln			
305	310	315	320
Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
	325	330	
<210>	87		
<211>	343		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	JB1-scFv(MW7融合蛋白构建体)		
<400>	87		
Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser			
1	5	10	15
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His			
	20	25	30
Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile			
	35	40	45
Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe			
	50	55	60
Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly			
65	70	75	80
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	85	90	95
Ser Ala Ala Ala Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val			
	100	105	110
Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr			
	115	120	125
Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly			
	130	135	140
Leu Ser Gly Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr			

50	55	60																	
Asp	Arg	Tyr	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly	Ser	Asp	Ile	Gly	Gly	Gly				
65		70							75					80					
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly				
		85							90					95					
Ser	Ala	Ala	Ala	Met	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser				
		100							105					110					
Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser				
		115							120					125					
Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	Tyr	Val	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr				
130									135					140					
Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val				
145									150					155					
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala				
									165					170					
Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala				
									180					185					
Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Cys	Val	Ala	Leu	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn				
									195					200					
									205										
Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Ala	Gly										
210									215										
<210>	89																		
<211>	106																		
<212>	PRT																		
<213>	人工																		
<220>																			
<223>	JB1 (P33Q) -TBP融合蛋白构建体																		
<400>	89																		
Met	Gly	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Gln	Thr	Leu	Gly	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Ser				
1				5					10					15					
Asp	Glu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Tyr	Arg	Arg	Gln	Ala	Leu	Arg	Tyr	His				
				20					25					30					
Gln	Asp	Lys	Asn	Lys	Glu	Pro	Gly	Ala	Glu	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile				
				35					40					45					
Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Val	Leu	Ser	Asp	Pro	Arg	Lys	Arg	Glu	Ile	Phe				
				50					55					60					
Asp	Arg	Tyr	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly	Ser	Asp	Ile	Gly	Gly	Gly				
65									70					75					
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly				

	85	90	95
Ser Ala Ala Ala Val Gln Ile Val Tyr Lys			
	100	105	
<210>	90		
<211>	334		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	JB1 (P33Q) -scFv (Tau) 融合蛋白构建体		
<400>	90		
Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser			
1	5	10	15
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His			
	20	25	30
Gln Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile			
	35	40	45
Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe			
	50	55	60
Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly			
65	70	75	80
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	85	90	95
Ser Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val			
	100	105	110
Gln Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn			
	115	120	125
Ile Lys Asp Thr Ser Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly			
	130	135	140
Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Ala Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr			
145	150	155	160
Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser			
	165	170	175
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala			
	180	185	190
Val Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Asp Trp Gly Gln Gly Thr			
	195	200	205
Thr Leu Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
	210	215	220
Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser			

225	230	235	240
Ala Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn			
	245	250	255
Ile Asn Val Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro			
	260	265	270
Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Thr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser			
	275	280	285
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
	290	295	300
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln			
305	310	315	320
Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
	325	330	
<210> 91			
<211> 343			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> JB1 (P33Q) -scFv (MW7融合蛋白构建体			
<400> 91			
Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser			
1	5	10	15
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His			
	20	25	30
Gln Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile			
	35	40	45
Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe			
	50	55	60
Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly			
65	70	75	80
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	85	90	95
Ser Ala Ala Ala Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val			
	100	105	110
Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr			
	115	120	125
Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly			
	130	135	140
Leu Ser Gly Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr			

50	55	60
Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly		
65	70	75
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		80
	85	90
Ser Ala Ala Ala Met Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser		95
	100	105
Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser		110
	115	120
Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr		125
130	135	140
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val		
145	150	155
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala		
	165	170
Ile Ser Gly Leu Arg Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala		175
	180	185
Trp Asp Asp Ser Leu Cys Val Ala Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Asn		190
	195	200
		205
Gly Gly Gly Gly Val Asp Gly Thr Ala Gly		
210	215	
<210> 93		
<211> 91		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> JB1-QBP1融合蛋白构建体		
<400> 93		
Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser		
1	5	10
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His		
	20	25
Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile		30
	35	40
		45
Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe		
50	55	60
Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
65	70	75
Ser Asn Trp Lys Trp Trp Pro Gly Ile Phe Asp		80

	85	90
<210>	94	
<211>	91	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	JB1 (P33Q) -QBP1融合蛋白构建体	
<400>	94	
Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser		
1	5	10 15
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His		
	20	25 30
Gln Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile		
	35	40 45
Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe		
	50	55 60
Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
65	70	75 80
Ser Asn Trp Lys Trp Trp Pro Gly Ile Phe Asp		
	85	90

<210>	95	
<211>	106	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	JB1-TBP2融合蛋白构建体	
<400>	95	
Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser		
1	5	10 15
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His		
	20	25 30
Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile		
	35	40 45
Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe		
	50	55 60
Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly		
65	70	75 80
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	85	90 95

Ser Ala Ala Ala Val Gln Ile Ile Asn Lys
 100 105

<210> 96

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> JB1-TBP3融合蛋白构建体

<400> 96

Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His
 20 25 30
 Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile
 35 40 45
 Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe
 50 55 60
 Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 85 90 95
 Ser Ala Ala Ala Tyr Gln Gln Tyr Gln Asp Ala Thr Ala Asp Glu Gln
 100 105 110

Gly

<210> 97

<211> 86

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> JB1-TBP1 (无接头)融合蛋白构建体

<400> 97

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

65	70	75	80
Tyr Gln Gln Tyr Gln Asp Ala Thr Ala Asp Glu Gln Gly			
	85	90	
<210> 100			
<211> 314			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> JB1-scFv(Tau) (无接头)融合蛋白构建体			
<400> 100			
Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser			
1	5	10	15
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His			
	20	25	30
Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile			
	35	40	45
Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe			
	50	55	60
Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
65	70	75	80
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala			
	85	90	95
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr			
	100	105	110
Ser Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	115	120	125
Gly Arg Ile Ala Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe			
	130	135	140
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
145	150	155	160
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	165	170	175
Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val			
	180	185	190
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	195	200	205
Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
	210	215	220
Asp Thr Ile Thr Ile Ser Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp			

	165		170		175
Leu Cys Val Ala Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Asn Gly Gly Gly Gly					
	180		185		190
Val Asp Gly Thr Ala Gly					
	195				

CLUSTAL O(1.2.4) 多重序列比对

```

DNAJC20 ---DYFSLMDCNRS--FRVDTAKLQHRYQQLQRLVHPDFFSQRS-----QTEKDFSEKHST 51
DNAJC15 ---EAGLILGVS---PSAGKAKIRTAHRRVMILNHPDKGGSP-----YVAA 40
DNAJC19 ---EAALILGVS---PTANKGKIRDAHRRIMLLNHPDKGGSP-----YIAA 40
DNAJC13 ---DAYEVLNLPQGQGPHEDESKIRKAYFRLAQKYHPDKNPEGR-----DMFE 44
DNAJC2 ---DHYAVLGLGHVRYKATQRQIKAAHKAMVLKHPDKRKAAG-----EPIKEGDNDFYFT 52
DNAJC22 ---LAYQVLGLS---EGATNEEIHRSYQELVKVWHPDHNLDQT-----EEAQRHFL 45
DNAJC9 ---DLYRVLGVR---REASDGEVRRGYHKVSLQVHPDRVGEG-----DKEDATRRFQ 46
DNAJC25 ---DCYEVLGVS---RSAGKAEIARAYRQLARRYHPDRYRPPQPGDEGPGRTPQSAAEEAFL 54
DNAJC10 ---DFYSLLGVS---KTASSREIRQAFKKLALKLHPDKNPNP-----NAHGDFL 44
DNAJC1 ---NFYQFLGVQ---QDASSADIRKAYRKLSTLHPDKNKDE-----NAETQFR 43
DNAJC11 ---DYSSLNVR---REASSEELKAAAYRRLCMLYHPDKHRDPE-----LKSQAERLFN 47
DNAJC3 ---DYYKILGVK---RNAKKQEI IKAYRKLALQWHPDNFQNEE-----EKKKAEKKFI 47
DNAJC7 ---DYYKILGVD---KNASEDEIKKAYRKRALMHHPDRHSGASA-----EVQKEEKKFK 49
DNAJB13 ---DYSSVLGIT---RSEDAQIKQAYRRLALKHHPDKSNP-----SSAEIFR 43
DNAJA3 ---DYYQILGVP---RNASQKEIKKAYYQLAKKYHPDTNKDDP-----KAKEKFS 44
DNAJB11 ---DFYKILGVP---RSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDDP-----QAQEKFQ 44
DNAJC16 ---DPYRVLGVS---RTASQADIKKAYKLLAREWHPDKNKDP-----GAEDKFI 43
DNAJB9 ---SYYDILGVP---KSASERQIKKAFHKLAMKYHPDKNKSP-----DAEAKFR 43
DNAJB1 -GKDYYQTLGLA---RGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEP-----GAEKFK 45
DNAJB4 -GKDYYCILGIE---KGASDEDIKKAYRQALKFHPDKNKSP-----QAEKFK 45
DNAJB5 ---DYYKILGIP---SGANEDEIKKAYRKMALKYHPDKNKEP-----NAEEKFK 43
DNAJB2 ---ASYEILDVP---RSASADDIKKAYRRKALQWHPDKNPDNK-----EFAEKFK 46
DNAJB8 ---NYYEVLGVQ---ASASPEDIKKAYRKLALRWHPDKNPDNK-----EEAEKFK 45
DNAJB7 ---DYYEVLGLQ---RYASPEDIKKAYHKVALKWHPDKNPENK-----EEAERFK 45
DNAJB3 -MVDYYEVLDP---RQASSEAIKKAYRKLALKWHPDKNPENK-----EEAERFK 47
DNAJB6 --VDYYEVLGVQ---RHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPENK-----EEAERFK 46
DNAJC6 ---TKWKPVGMA---DLVTPQVKKVYRKAVLVVHPDKATGQP-----YEQYAKMIFM 47
DNAJC26 ---SRWTPVGMA---DLVAPEQVKKHYRRAVLAVHPDKAAGQP-----YEQHAKMIFM 47
DNAJC28 ---EYYRLLNVE---EGCSADEVRESFHKLAKQYHPDSGSNTA-----DSATFI 43
DNAJC29 ILKEVTSVVEQA---WKLPESEKKTIRRLYLKWHHPDKNPENH-----DIANEVFK 48
DNAJC24 ---DWYSILGAD---PSANISDLKQKYQKLI LMYHPDKQSTDV----PAGTVEECVQKFI 50
DNAJC12 ---DYTLLGCD---ELSSVEQILAEFKVRALECHPDKHPENP-----KAVETFQ 44
DNAJC4 ---TYYELLGVH---PGASTEDEVKRAFFSKSKEIHPDRDPGNP-----SLHSRFV 44
DNAJC8 ---NPFVQLQID---PEVTDEEIKKRFRQLSILVHPDKNQDDA-----DRAQKAFE 45
DNAJC30 ---ALYDLLGVP---STATQAQIKAAAYRQCFLYHPDRNSGSA-----EAAERFT 44
DNAJC23 ---NPYEVNLND---PGATVAEIKKQYRLLSLKYHPDKGGDEV-----MFM 40
DNAJC27 ---DSWMLGVK---PGASRDEVNKAYRKLAVLIHPDKCVAPG-----SEDAFK 43
DNAJC14 ---NPFHVLGVE---ATASDVELKKAYRQLAVMVHPDKNHHPR-----AEEAFK 43
DNAJC17 ---DLYALLGIE---EKAADKEVKKAYRQKALSCHPDKNPDNP-----RAELFH 44
DNAJC5 -GESLYHVLGLD---KNATSDDIKKSYRKLALKYHPDKNPDP-----EAADKFK 46
DNAJC5B ---ALYEILGLH---KGASNEEIKKTYRKLALKHHPDKNPDDP-----AATEKFK 44
DNAJC21 ---CHYEALGVR---RDASEEELKKAYRKLALKWHPDKNLDNA-----AEAAEQFK 45
DNAJC18 ---NYYEILGVS---RDASDEELKKAYRKLALKFHPDKNCAPG-----ATDAFK 43
DNAJB12 -----YEILGVS---RGASDEDLKKAYRRLALKFHPDKNHAPG-----ATEAFK 41
DNAJB14 ---NYYEVLGVT---KDAGDEDLKKAYRKLALKFHPDKNHAPG-----ATDAFK 43
DNAJA2 ---KLYDILGVP---PGASENELKKAYRKLAKYHPDKNPNA-----GDKFK 41
DNAJA1 ---TYDVLGVK---PNATQEELKKAYRKLALKYHPDKNPNE-----GEKFK 41
DNAJA4 -ETQYYDILGVK---PSASPEEIKKAYRKLALKYHPDKNPDE-----GEKFK 43

```

图1A

DNAJC20	LVNDAYKTL LAPL-----SRGLYLLK-----	72
DNAJC15	KINEAKDLLETT-----KH-----	55
DNAJC19	KINEAKDLLEGQA-----KK-----	55
DNAJC13	KVNKAYEFLCTKS-----AKIVDGPDP-----	66
DNAJC2	CITKAYEMLSDPV-----KRRAFNSVD-----	74
DNAJC22	EIQAAAYEVLSQPR-----KPWGSRR-----	65
DNAJC9	ILGKVYSVLSDRE-----QRAVYDEQG-----	68
DNAJC25	LVATAYETLKDEE-----TRKDYDYML-----	76
DNAJC10	KINRAYEVLKDED-----LRKKYDKYG-----	66
DNAJC1	QLVAIYEV LK DDE-----RRQRYDDIL-----	65
DNAJC11	LVHQAYEVLSDPQ-----TRAIYDIYG-----	69
DNAJC3	DIAAAKEVLS DPE-----MRKKFDDGE-----	69
DNAJC7	EVGEAFTILSDPK-----KKTRYDSGQ-----	71
DNAJB13	QIAEAYDVLS DPM-----KRGYDKFG-----	65
DNAJA3	QLAEAYEVLSD EV-----K RKQYDAYG-----	66
DNAJB11	DLGAAAYEVLSD SE-----K RKQYDTYG-----	66
DNAJC16	QISKAYEILS NEE-----KRSNYDQYG-----	65
DNAJB9	EIAEAYETLS DAN-----RRKEYDTLG-----	65
DNAJB1	EIAEAYDVLS DPR-----KREIFDRYGEE-----	69
DNAJB4	EVAEAYEVLSD PK-----KREIYDQFGEE-----	69
DNAJB5	EIAEAYDVLS DPK-----KRGLYDQYG-----	65
DNAJB2	EVAEAYEVLSD KH-----KREIYDRYGRE-----	70
DNAJB8	LVSEAYEVLSD SK-----KRSLYDRAG-----	67
DNAJB7	EVAEAYEVLSD NDE-----K RDIYDKYG-----	67
DNAJB3	QVAEAYEVLSD AK-----K RDIYDRYG-----	69
DNAJB6	QVAEAYEVLSD AK-----K RDIYDKYG-----	68
DNAJC6	ELNDAWSEFEN QG-----QKPLY-----	65
DNAJC26	ELNDAWSEFEN QG-----SRPLF-----	65
DNAJC28	RIEKAYRKVLSHV IEQTNASQS-----	65
DNAJC29	HLQNEINRLEKQAF L DQNADRASRRTFST SASRFQSDKYS	88
DNAJC24	EIDQAWKILGNEE-----TKREYDLQR-----	72
DNAJC12	KLQKAKEILTNEE-----SRARYDHWR-----	66
DNAJC4	ELSEAYRVL SREQ-----SRRSYDDQL-----	66
DNAJC8	AVDKAYKLLLDQE-----QKKRALDVIQ-----	68
DNAJC30	RISQAYVVLGSAT-----LRRKYDRGL-----	66
DNAJC23	RIAKAYAAL TDEE-----SRKNWEEFG-----	62
DNAJC27	AVVNARTALLKNI-----K-----	57
DNAJC14	VLRAAWDIVSNAE-----KRKEYEMKR-----	65
DNAJC17	QLSQALEVLT DAA-----ARAA YDKVR-----	66
DNAJC5	EINNAHAIL T DAT-----KRNIYDKYGSL-----	70
DNAJC5B	EINNAHAIL T DIS-----KRSIYDKYG-----	66
DNAJC21	LIQAAYDVLS D PQ-----ERAWYDNHR-----	67
DNAJC18	AIGNAFVLS NP D-----KRLRYDEYG-----	65
DNAJB12	AIGTAYAVLS N PE-----K RKQYDQFGDD-----	65
DNAJB14	KIGNAYAVLS N PE-----K RKQYDLTG-----	65
DNAJA2	EISFAYEVL S N PE-----KRELYDRYG-----	63
DNAJA1	QISQAYEVL S DAK-----KRELYDKGG-----	63
DNAJA4	LISQAYEVL S DPK-----KRDVYDQGG EQ-----	67

图1B


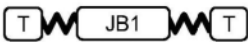





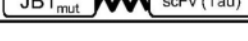
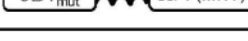
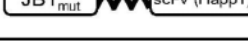
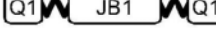
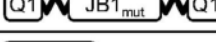



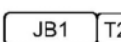
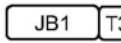
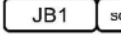


构建体编号	构建体名称	SEQ ID NO:	J结构域	Tau结合结构域	示意图
1	JB1-TBP1	83	DnaJB1	TBP1	
2	TBP1-JB1-TBP1	84	DnaJB1	TBP1	
3	JB1-2xTBP1	85	DnaJB1	TBP1	
4	JB1-scFv(Tau)	86	DnaJB1	scFv(Tau)	
5	JB1-scFv(MW7)	87	DnaJB1	scFv(MW7)	
6	JB1-Happ1	88	DnaJB1	Happ1	
7	JB1(P33Q)-TBP1	89	DnaJB1*	TBP1	
8	JB1(P33Q)-scFv(Tau)	90	DnaJB1*	scFv(Tau)	
9	JB1(P33Q)-scFv(MW7)	91	DnaJB1*	scFv(MW7)	
10	JB1(P33Q)-Happ1	92	DnaJB1*	Happ1	
11	JB1-QBP1	93	DnaJB1	QBP1+	
12	JB1(P33Q)-QBP1	94	DnaJB1*	QBP1+	
13	仅JB1	5	DnaJB1	无	
14	JB1-TBP2	95	DnaJB1	TBP2	
15	JB1-TBP3	96	DnaJB1	TBP3	
16	JB1-TBP1(无接头)	97	DnaJB1	TBP1	
17	JB1-TBP2(无接头)	98	DnaJB1	TBP2	
18	JB1-TBP3(无接头)	99	DnaJB1	TBP3	
19	JB1-scFv(Tau)(无接头)	100	DnaJB1	scFv(Tau)	
20	JB1-Happ1(无接头)	101	DnaJB1	Happ1	

图2

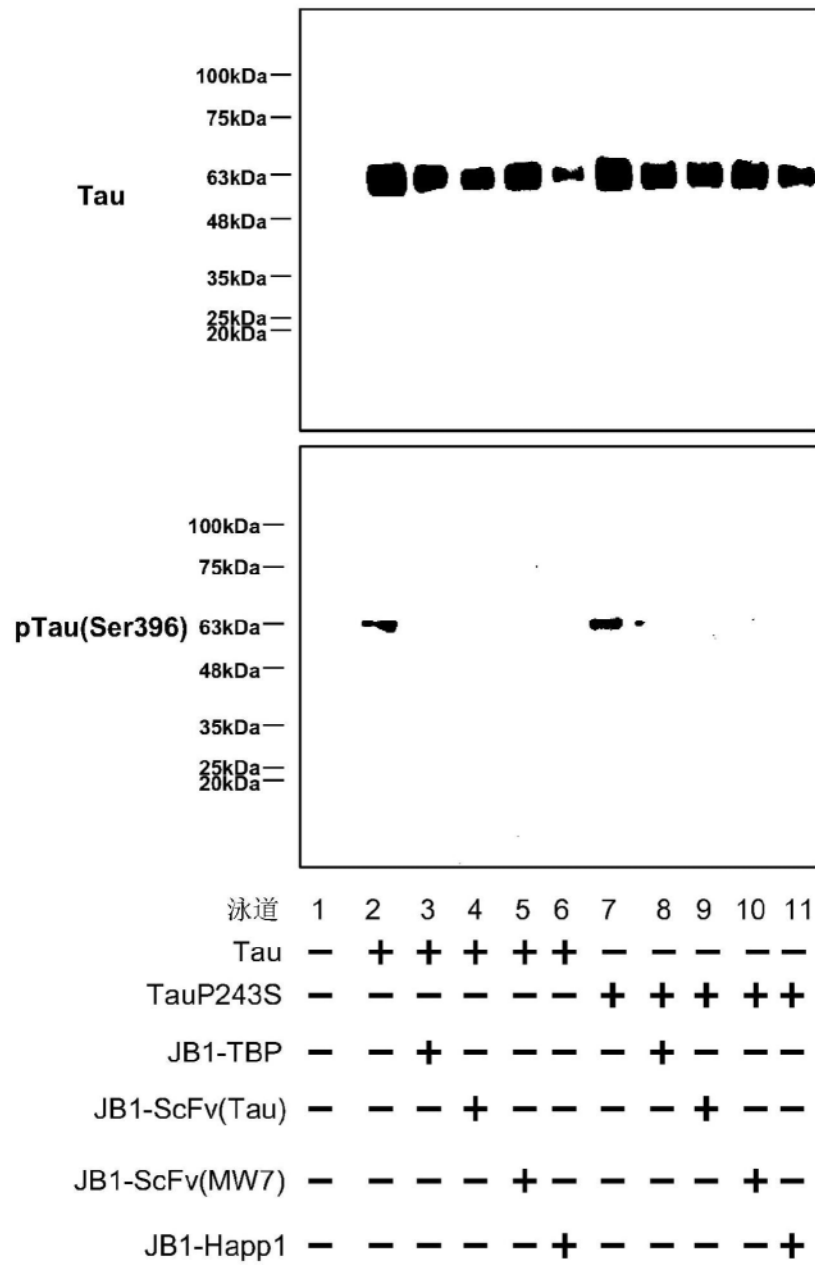


图3

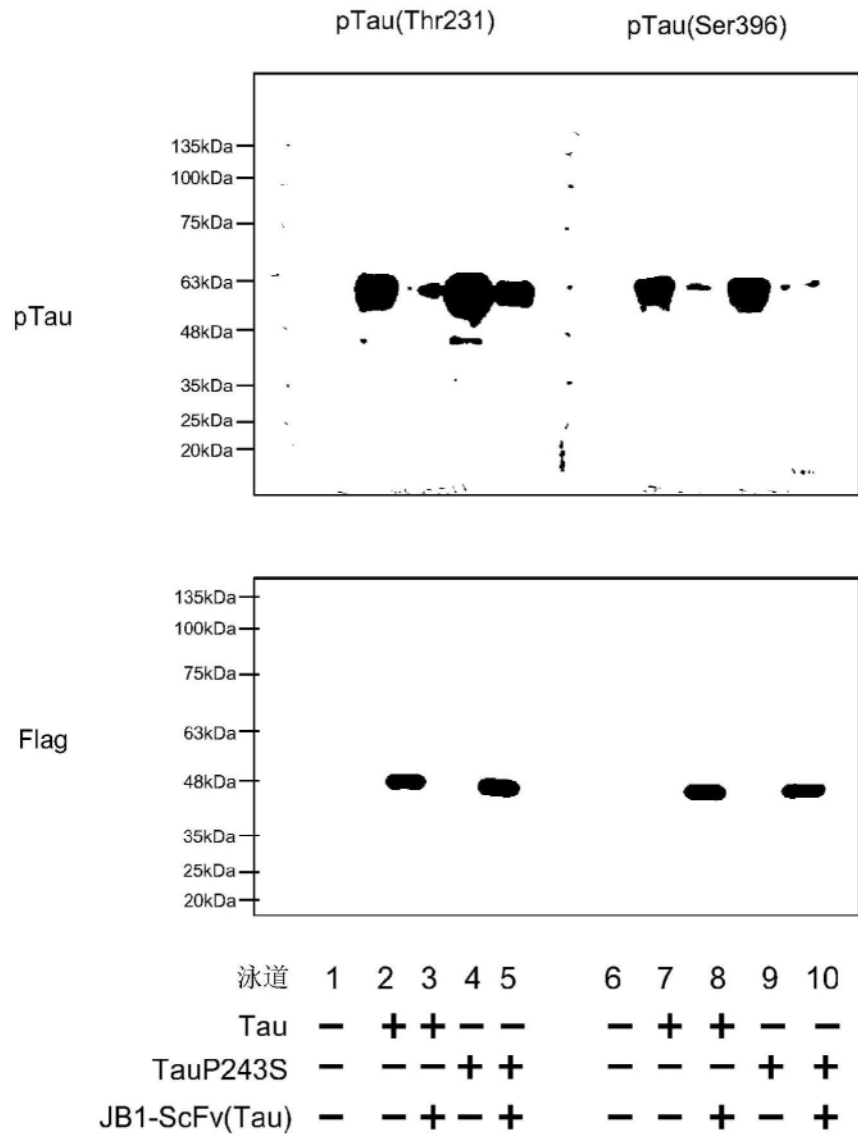


图4

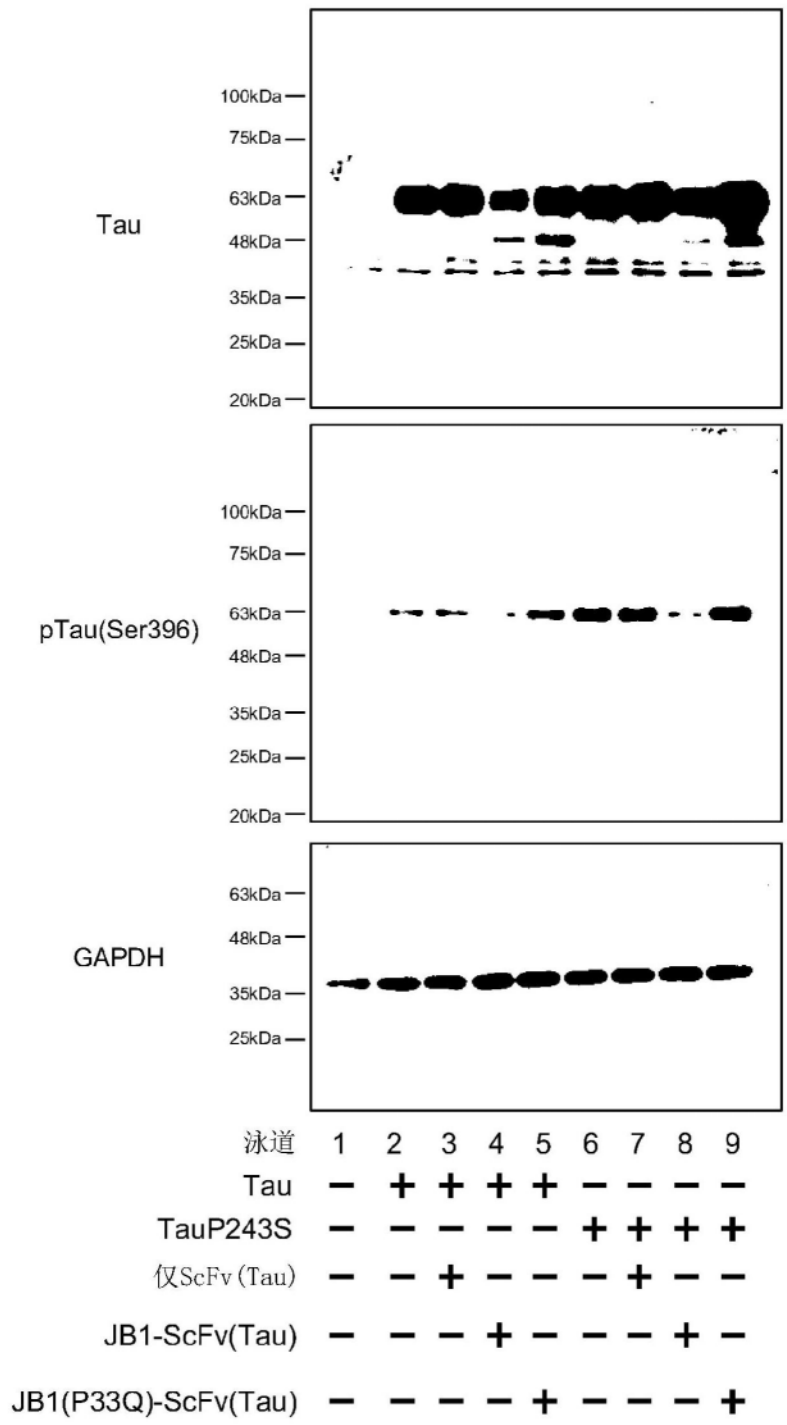


图5

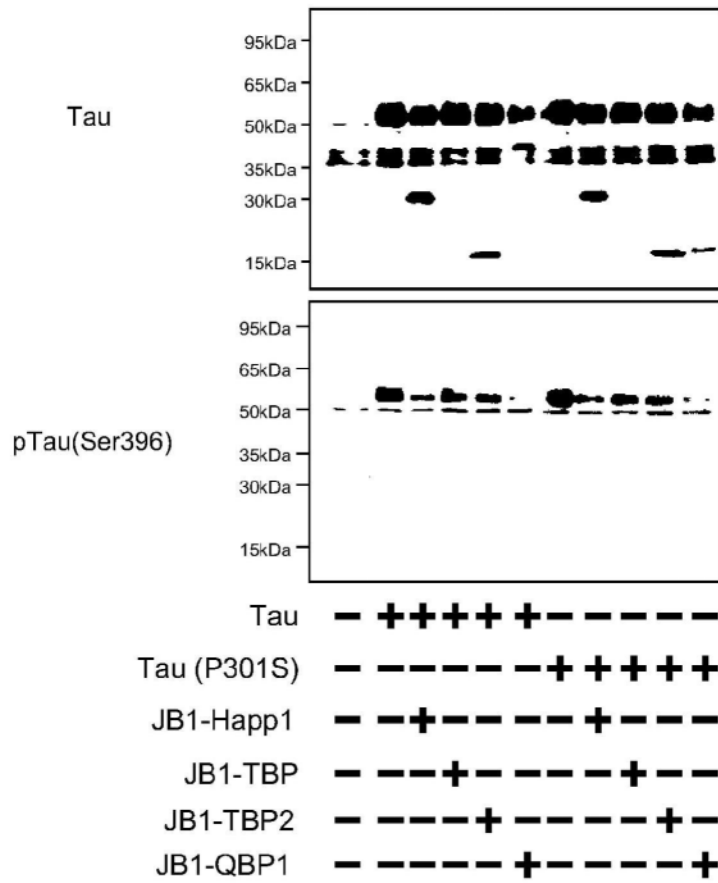


图6

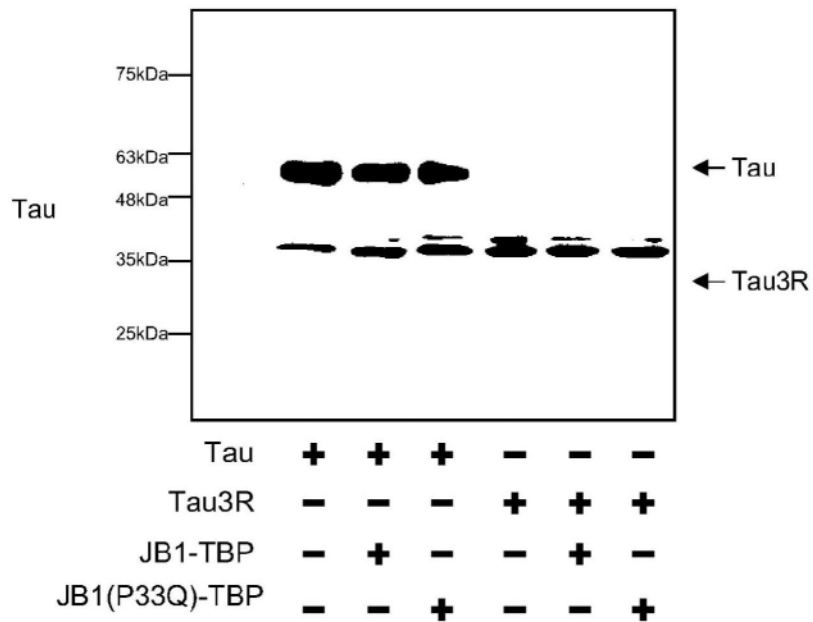


图7

细胞毒性测定 (LDH测定)

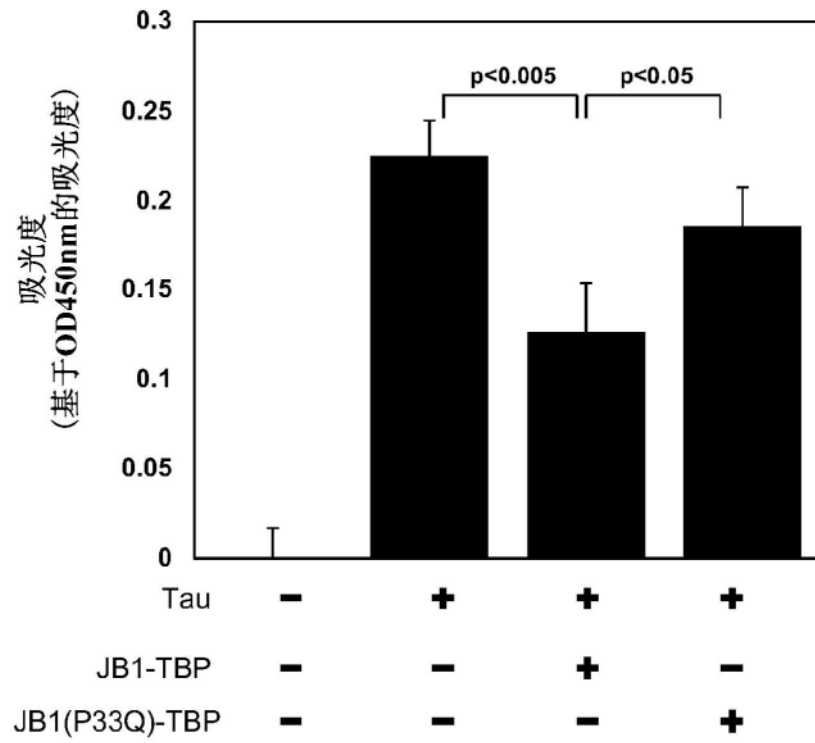


图8