



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202208403 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：110125335

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 07 月 09 日

(51)Int. Cl. : C07K14/435 (2006.01)

C07K16/44 (2006.01)

(30)優先權：2020/07/10 英國

GB2010620.9

(71)申請人：新加坡商威斯塔實驗室公司 (新加坡) WISTA LABORATORIES LTD. (SG)
新加坡

(72)發明人：波拉克 薩斯奇雅 茱莉 POLLACK, SASKIA JULIE (FR)；馬紹爾 凱倫 伊莉莎白 MARSHALL, KAREN ELIZABETH (GB)；瑟佩爾 路易斯 夏洛特 SERPELL, LOUISE CHARLOTTE (GB)；威斯奇克 克勞蒂 米歇爾 WISCHIK, CLAUDE MICHEL (GB)；哈靈頓 查理斯 羅伯特 HARRINGTON, CHARLES ROBERT (GB)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：10 共 84 頁

(54)名稱

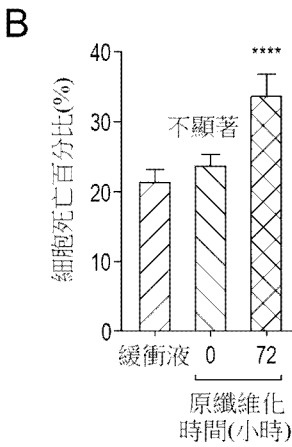
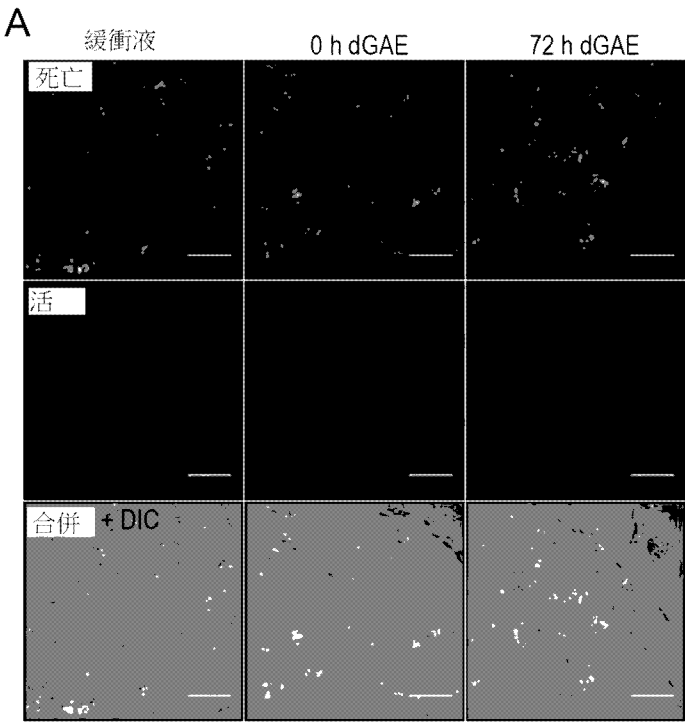
系統

(57)摘要

本發明提供用於活體外研究神經元細胞內 Tau 蛋白質聚集之系統，該系統可用於篩選對 Tau 蛋白質或其片段之聚集物具有療效之藥劑。

The present invention provides a system for the study of tau protein aggregation in neuronal cells in vitro which can be used to screen agents for therapeutic effectiveness against aggregates of tau protein or fragments thereof.

指定代表圖：



【圖 2】



【發明摘要】

【中文發明名稱】 系統

【英文發明名稱】 SYSTEM

【中文】

本發明提供用於活體外研究神經元細胞內Tau蛋白質聚集之系統，該系統可用於篩選對Tau蛋白質或其片段之聚集物具有療效之藥劑。

【英文】

The present invention provides a system for the study of tau protein aggregation in neuronal cells *in vitro* which can be used to screen agents for therapeutic effectiveness against aggregates of tau protein or fragments thereof.

【指定代表圖】 圖2B

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 系統
【英文發明名稱】 SYSTEM

【技術領域】

【0001】 本發明提供用於活體外研究神經元細胞內Tau蛋白質聚集之系統，該系統可用於篩選對Tau蛋白質或其片段之聚集物具有療效之藥劑。

【先前技術】

【0002】 將Tau蛋白質組裝成成對螺旋絲(PHF)及直絲作為聚集物係阿茲海默症(Alzheimer’s disease，AD)之關鍵特點。Tau之聚集與神經退化、細胞毒性及伴隨疾病進展之傳播有關。Tau蛋白質在纏結內錯誤摺疊、自組裝及積聚為Tau蛋白病(Tauopathy)共有之主要病理特點，其中最常見的係阿茲海默症(AD)。在病理條件下，Tau蛋白質異常聚集成成對螺旋絲(PHF)成為神經原纖維纏結(NFT)，並伴隨著Tau蛋白質功能喪失及神經元功能障礙。

【0003】 已顯示Tau展現出類普里昂蛋白質(prion)之行為，該行為包括細胞攝取及模板化接種。活體外研究顯示，胞外Tau聚集物可藉由神經元內化以誘導胞內內源性Tau之自組裝，隨後可釋放胞內內源性Tau且將其轉移至鄰近或突觸連接的神經元。在經培養之細胞株中，可在胞內體隔室中觀測到使用肝素或AD腦衍生之Tau聚集物誘導之重組Tau的經內化聚集物，且該等經內化聚集物能夠募集內源性及易聚集之Tau進行聚集。此等研究中一致發現Tau與胞內體及溶酶體之共定位。

【0004】 雖然強烈支援Tau聚集物在神經元及/或神經膠細胞之間傳輸，但負責此舉之物質一直存在爭議。研究表明，Tau之接種能力視Tau聚集物之尺寸

及構形而定，且Tau寡聚物而非自rTg4510小鼠純化之單體或更長原纖維充當用於誘導繁衍之關鍵物質。一項研究中報導，大Tau聚集物(> 10聚體)為P301S Tau基因轉殖小鼠中具有接種能力之物質，而在另一項研究中，發現Tau三聚體為人類表現Tau之HEK-293細胞中之構形模板接種及胞內Tau聚集所需的最小單元。

【0005】 許多研究已使用其中人類及/或突變Tau已經過度表現之動物或細胞模型。活體外研究已利用需要肝素誘導之原纖維化(fibrillisation)的全長或截短Tau蛋白質。兩種方法均旨在克服全長Tau之低聚集傾向及細胞毒性缺乏。然而，對肝素誘導之Tau絲之生理相關性愈來愈懷疑，此乃因其不能自組裝且亦不能再現AD絲之關鍵結構特點。跨越殘基297-391之Tau之截短重複域片段(稱為dGAE (參閱Despres等人*ACS Chem.Biol.*, 第14卷, 第6期, 第1363–1379頁, (2019年); Zhang等人*Elife*, 第8卷, 第e43584頁, (2019年); Wischik等人*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 第85卷, 第12期, 第4506–4510頁, (1988))為在來自AD腦組織之蛋白質水解穩定的PHF核心製劑中首次進行生化識別的，其與核心序列(306-378)重疊，該核心序列藉由低溫電子顯微術定性為形成C形亞單元，該等C形亞單元經組裝以形成組合交叉 β/β -螺旋結構。尚不理解何物起始AD中之Tau聚集過程，但截短dGAE在無細胞模型及細胞模型中(Harrington等人*J. Biol. Chem.*, 第290卷, 第17期, 第10862–10875頁, (2015年)，Wischik等人*Proc Natl Acad Sci USA*, 第93卷, 第20期, 第11213-11218頁(1996年))及在基因轉殖小鼠中(Melis等人*Cell. Mol. Life Sci.*, 第72卷, 第11期, 第2199–2222頁, (2015年))用於模板導向之Tau聚集。Tau (297-391)之dGAE區在生理條件下自發組裝以在諸如肝素之添加劑不存在之情況下活體外形成PHF樣絲。

【0006】 研究組織培養物細胞模型中外源性施用之Tau之特性之先前研究受到非神經元或神經元活體外模型之使用的阻礙，該等模型過度表現人類野生型或突變Tau，常常使用Tau之非生理片段或製劑以起始聚集(Falcon等人, J.

Biol.Chem., 第290卷, 第2期, 第1049–1065頁, (2015年); J. L. Guo及V. M. Y. Lee, J. Biol.Chem., 第286卷, 第17期, 第15317-15331頁(2011年); 及Kfoury等 人, J. Biol.Chem., 第287卷, 第23期, 第19440–19451頁, (2012年))。

【0007】 亦已報導，具有不同磷酸化狀態之全長Tau、經突變Tau及Tau聚集物對細胞活力具有極小效應(Kumar等人, *J. Biol.Chem.*, 第289卷, 第29期, 第20318–20332頁, (2014年); Tepper等人, *J. Biol.Chem.*, 第289卷, 第49期, 第34389–34407頁, (2014年)及Kaniyappan等人, *Alzheimer's Dement.*, 第13卷, 第11期, 第1270–1291頁, (2017年))。舉例而言，觀測到，由變異重複Tau片段(對應於具有Lys-280缺失之Tau244-372; Tau^{RDΔK})形成之寡聚物對樹突狀棘具有選擇性毒性而不影響細胞活力(Kaniyappan等人, *Alzheimer's Dement.*, 第13卷, 第11期, 第1270–1291頁, (2017))。

【0008】 其他研究亦顯示，毒性視所使用之Tau之精確片段而定(Flach等人, *J. Biol.Chem.*, 第287卷, 第52期, 第43223–43233頁, (2012年); Lasagna-Reeves等人, *Biochemistry*, 第49卷, 第47期, 第10039–10041頁, (2010年); 及Lasagna-Reeves等人, *Mol. Neurodegener.*, 第6卷, 第1期, 第39頁, (2011年))。Tau毒性分析之變化性可能部分地與所使用之Tau片段及其製備方法之差異有關。

【0009】 Tau聚集抑制劑之識別描述於WO 1996/030766及WO 2002/055720中。對Tau成對螺旋絲抑制劑之篩選描述於WO 2001/018546中。用於識別Tau聚集抑制劑之高通量篩選已綜述於Bulic等人(*J. Med. Chem.* 第56卷, 第4135-4155頁(2013年))中。Liu等人(*Pharm. Pat. Anal.* 第3卷第429-447頁(2014年))亦報導使用與Tau聚集抑制劑相異之幾種不同機制的各種Tau靶向方法。所識別之化合物之臨床研發論述於Panza等人(*BioMed Research Int.*, 第216卷, 文章ID 3245935, (2016年))中。儘管有此等報導，但除了亞甲藍(MB)或LMT ((隱色甲硫鎘雙氫甲磺酸鹽，LMTM; 亦稱為LMT-X或TRx0237)以外之所描述抑制劑中無

一者進展至完整III期臨床試驗(Panza等人(*BioMed Research Int.*, 第216卷, 文章ID 3245935, (2016年))。

【發明內容】

【0010】 本文所描述之新穎系統准許以更貼近生理之方式活體外研究Tau聚集病理之傳播之分子機制以便研發新穎治療方法。本文所描述之新型模型系統准許研究在突變Tau過度表現或外源性接種因子不存在之情況下人類神經元細胞中Tau之PHF形成區的內化、細胞毒性及對內源性Tau之效應。

【圖式簡單說明】

【0011】

[圖1]顯示dGAE及dGAE-488自組裝以形成結構上類似之原纖維。dGAE及dGAE-488係以100 μ M經培育72小時。在原纖維化之前(0小時)及之後(72小時)採集組裝混合物之等分試樣以用於負染色TEM、SDS-PAGE凝膠電泳及CD光譜法。(A) dGAE物質在0小時及72小時攪動下之電子顯微圖。比例尺：500 nm。中間圖為左圖中之白色框之較高放大率(比例尺：200 nm)。(B)顯示為考馬斯染色(Coomassie stain) (左圖)及螢光(右圖)之dGAE及dGAE-488之非還原性SDS-PAGE凝膠。黑色箭頭指向孔中之單體及二聚體、四聚體以及不溶性原纖維。(C) dGAE及dGAE-488之整個組裝混合物在0小時及72小時攪動下之CD光譜。

[圖2]顯示暴露於經聚集之dGAE而非可溶性(單體/二聚體) dGAE導致細胞死亡增加。100 μ M dGAE經攪動72小時以產生原纖維。將可溶性(0小時)或經聚集(72小時)物質(1 μ M)添加至細胞中，且將其培育24小時。(A)利用ReadyProbes[®]試劑之暴露於緩衝液或dGAE之後的代表性寬場影像，藍色顯示總細胞核且綠色顯示死細胞核。比例尺：100 μ m。(B)定量所有條件之細胞死亡百分比。所顯示

之數據為4-6項獨立實驗之六個視野之平均值 $\pm$ SEM。單因素方差分析(one-way ANOVA)顯示各組之間的顯著差異($F = 11.26$, $R^2 = 0.12$, $p < 0.0001$)。Dunnett之多重比較顯示僅經緩衝液處理之細胞($21.6 \pm 1.6\%$)與經dGAE原纖維處理之細胞(72 h dGAE) ($34.0 \pm 2.9\%$)之間的顯著差異($p < 0.0001$)，但未顯示經緩衝液處理之細胞與經可溶性dGAE處理之細胞($24.1 \pm 1.2\%$)之間的顯著差異。

[圖3]顯示可溶性dGAE-488容易內化至dSH-SY5Y細胞中。(A)將1 μ M可溶性dGAE-488 (未經攪動)或經72小時攪動(聚集)之dGAE添加至dSH-SY5Y細胞之培養基中，且隨後進行固定且在暴露24小時之後藉由共聚焦顯微術可視化。所有比例尺：20 μ m。(B)自來自6項獨立實驗之 $N = 273$ 個細胞(0小時)及來自3項獨立實驗之 $N = 120$ 個細胞(72小時)的z堆疊中間定量細胞體中之488螢光強度。伴隨Welch氏校正之未經配對t檢定顯示0小時(1114 ± 66.75 AU)與72小時(474.1 ± 95.97 AU)之間的488螢光強度之顯著差異($t = 5.475$, $df = 237.7$, $R^2 = 0.112$, $p < 0.0001$)。數據顯示為平均值 $\pm$ SEM。(C)自 $t = 0$ 小時至 $t = 14$ 小時使用共聚焦顯微術實時監測5 μ M可溶性dGAE-488 (未經攪動)之內化。距最初添加dGAE-488之後2小時，可見到內化至細胞體及神經元突中之488陽性斑點(白色箭頭)。比例尺：50 μ m。(D)24小時暴露之後的經內化可溶性dGAE-488之較高放大率影像顯示細胞體中之斑點圖案(白色箭頭)及較大核周積聚(紅色箭頭)。比例尺：15 μ m。所有圖之細胞體中間顯示一個z切片。

[圖4]顯示暴露於dGAE-488引起dSH-SY5Y細胞中之內源性磷酸化Tau積聚。將1 μ M可溶性dGAE-488 (未經攪動)添加至dSH-SY5Y細胞之培養基中並保持24小時。使用p-Tau抗體(Ai)AT180、(Bi)AT8及(Ci)去磷酸化Tau-1對細胞之內源性Tau進行免疫標記。細胞體之中間顯示一個z切片。正交視圖示於Ai及Bi中以顯示dGAE-488與內源性Tau之潛在共定位。比例尺：20 μ m。各圖以經緩衝液處理細胞之百分比顯示螢光強度之定量。(Aii)AT180螢光之定量($N = 69$ 個細胞(緩

衝液)，76個細胞(dGAE)，來自4項獨立實驗)。伴隨Welch氏校正之未經配對t檢定顯示經dGAE處理之細胞($143.5 \pm 7.8\%$)與經緩衝液處理之細胞($100 \pm 5.2\%$)之間的AT180螢光強度之顯著差異($t = 4.702$ ， $df = 128.2$ ， $R^2 = 0.1471$ ， $p < 0.0001$)。

(Bii)AT8螢光之定量。N = 348個細胞(緩衝液)，N = 338個細胞(dGAE)，來自3項獨立實驗。伴隨Welch氏校正之未經配對t檢定顯示經dGAE處理之細胞($270.7 \pm 22.5\%$)與經緩衝液處理之細胞($100 \pm 3.51\%$)之間的AT8螢光強度之顯著差異($t = 7.103$ ， $df = 353.4$ ， $R^2 = 0.1249$ ， $p < 0.0001$)。

(Cii)Tau1螢光之定量。N = 68個細胞(緩衝液)，96個細胞(dGAE)，來自3項獨立實驗。伴隨Welch氏校正之未經配對t檢定顯示經dGAE處理之細胞($59.17 \pm 3.6\%$)與經緩衝液處理之細胞($100 \pm 7.3\%$)之間的Tau-1螢光強度之顯著差異($t = 5.011$ ， $df = 99.84$ ， $R^2 = 0.201$ ， $p < 0.0001$)。

[圖5]顯示暴露於dGAE 24 小時引起內源性磷酸化Tau在dSH-SY5Y細胞之Triton不溶性部分中積聚。(Ai)SH-SY5Y細胞溶胞產物之代表性西方墨點法。將1 μ M可溶性dGAE (未經攪動)添加至dSH-SY5Y細胞之培養基中。24小時後，將細胞在RIPA緩衝液中裂解且在SDS-PAGE上運行。對總Tau、AT180及AT8進行墨點探測。GAPDH用作負載對照。(Aii)定量各抗體之50-70 kDa條帶強度，且對GAPDH進行標準化。AT180及AT8之標準化值表示為總Tau比例(緩衝液百分比)。數據顯示為來自3項獨立實驗之平均值 $\pm$ SEM。未經配對t檢定顯示經緩衝液處理之對照與經dGAE處理之細胞之間的總Tau ($p = 0.3101$)、AT180 ($p = 0.4662$)或AT8 ($p = 0.2119$)免疫反應性無顯著差異。(Bi)亦將細胞在Triton-X 100裂解緩衝液中依序裂解且在SDS-PAGE上運行。S = Triton-X 100可溶性溶胞產物；I = Triton-X 100不溶性溶胞產物。AT180-抗體係用於偵測內源性磷酸化Tau，且GAPDH用作負載對照。B)不溶性部分及可溶性部分中之Tau比例係藉由密度測定法來定量且表示為經緩衝液處理之對照百分比。數據顯示為來自4項獨立實驗之平均值 $\pm$ SEM (每個實驗1個生物重複品)。未經配對t檢定顯示經緩衝液處理之

細胞(100 ± 0)與經dGAE處理之細胞(139.4 ± 14.54)之間的不溶性Tau之顯著差異($t = 2.709$, $df = 6$, $R^2 = 0.5501$, $p = 0.0352$)及經緩衝液處理之細胞(100 ± 0)與經dGAE處理之細胞(82.98 ± 5.48)之間的可溶性Tau之顯著差異($t = 3.106$, $df = 6$, $R^2 = 0.6165$, $p = 0.0201$)。

[圖6]顯示經內化之可溶性dGAE-488經定位至dSH-SY5Y細胞中之酸性囊泡。Ai)暴露於1 μ M可溶性dGAE-488 (未經攪動) 24小時之細胞之代表性免疫螢光影像。細胞經LysoTracker[®]標記以染色包括溶酶體及胞內體之酸性囊泡且進行實時成像。dGAE-488及LysoTracker[®]標記主要位於細胞體中(白色箭頭)。細胞體之中間顯示一個z切片。比例尺：50 μ m。(Aii)以經緩衝液處理之細胞百分比定量LysoTracker[®]螢光強度之。數據顯示自3項獨立實驗匯集之平均值 $\pm$ SEM。N = 170個細胞(緩衝液)，N = 146個細胞(dGAE)。伴隨Welch氏校正之未經配對t檢定顯示經dGAE處理之細胞($211.9 \pm 9.89\%$)與經緩衝液處理之細胞($100 \pm 5.23\%$)之間的LysoTracker[®]螢光強度之顯著差異($t = 10$, $df = 222.6$, $R^2 = 0.3101$, $p < 0.0001$)。Bi)含有經內化之dGAE-488之經LysoTracker[®]標記之單個細胞的較高放大率。最後一個圖展示顯示dGAE-488與LysoTracker[®]之共定位的正交視圖。細胞體之中間顯示一個z切片。比例尺：10 μ m。(Bii)488 (綠色)及LysoTracker(紅色)沿(Bi)中之最後一個圖中之白線所指示之區域(20 μ m)的螢光強度的標準化值。dGAE-488與LysoTracker[®]之共定位係由綠色通道與紅色通道之間的皮爾遜相關係數(Pearson's correlation coefficient)確認。平均皮爾遜R值為 0.8382 ± 0.036 (對於各細胞， $p < 0.0001$) (N = 7個細胞)。

[圖7]顯示經內化之可溶性dGAE-488經定位至dSH-SY5Y細胞中之囊泡結構。使dSH-SY5Y細胞暴露於1 μ M可溶性dGAE-488 (未經攪動) 24小時，且對其進行處理以用於免疫金電子顯微術。使用抗488抗體來標記dGAE，藉由10-nm金顆粒來偵測。A)顯示細胞之保留超微結構之電子顯微圖，其中主要細胞隔室標

記如下：n，細胞核；nu，核仁；m，粒線體；v，囊泡結構。黑色箭頭指向囊泡結構。黑色輪廓影像表示白框中之區域之放大影像。左比例尺：5 μm 。右比例尺：1 μm 。B)囊泡直徑之定量。數據顯示為自2項獨立實驗匯集之平均值 $\pm$ SEM。N = 34個囊泡(緩衝液)，N = 45個囊泡(dGAE-488)。未經配對t檢定顯示經緩衝液處理之細胞(303.7 ± 20.03)與經dGAE處理之細胞(478.4 ± 22.48)之間的囊泡直徑之顯著差異($t = 5.601$ ， $df = 77$ ， $p < 0.0001$ ， $R^2 = 0.2895$)。C)經緩衝液處理之細胞及經dGAE-488處理之細胞的囊泡結構之較高放大率電子顯微圖。黑色箭頭指向金顆粒之一些實例。比例尺：200 nm。

[圖8]顯示在抗體存在及不存在之情況下組裝之dGAE之穿透式電子顯微影像。(A)dGAE (100 μM)；(B)dGAE (25 μM)；(C)dGAE (10 μM)；(D)dGAE (100 μM) + s1D12 (25 μM ；4:1)；(E)dGAE (25 μM) + s1D12 (25 μM ；1:1)；(F)dGAE (10 μM) + s1D12 (2.5 μM ；4:1)；(G)dGAE (10 μM) + 抗卵白蛋白(2.5 μM ；4:1)；(H)s1D12 (25 μM)；(I)抗卵白蛋白(2.5 μM)。原纖維僅在s1D12 (A-C)不存在之情況下之製劑中或在非Tau IgG抗體、抗卵白蛋白(G)存在之情況下製備之dGAE對照中觀測到。當將s1D12以1:1或4:1之dGAE蛋白質:抗體比添加至組裝混合物(D、E及F)中時，未觀測到原纖維形成。在dGAE不存在之情況下抗體對照中亦不存在原纖維(H及I)。比例尺(對於所有圖，在I上)：200 nm。

[圖9]顯示(A)100 μM dGAE伴有(虛線)及不伴有(實線) 25 μM s1D12 (4:1比)及單獨抗體(點線)之以毫度(mdeg)為單位之CD光譜以及(B)經減去之抗體光譜。dGAE (實線)展示 β 摺疊構形(正約200 nm，負約220 nm)，但顯示無規捲曲(正約200 nm，負約220 nm)，此時s1D12光譜已減去(B；虛線及點線)，指示dGAE尚未組裝至原纖維中。

[圖10]顯示與ThS一起培育之樣本之螢光。在25 (A，1:1)及100 μM (B，4:1) dGAE (實線)之情況下清楚地觀測到在483 nm處之發射峰，當s1D12包括在組裝

混合物(虛線)中時，該發射峰經消除，此顯示僅不包括s1D12之樣本含有自組裝之澱粉樣原纖維。點線顯示單獨s1D12對螢光無貢獻。

【實施方式】

【0012】 根據本發明之第一態樣，提供篩選有效抑制Tau蛋白質片段對神經元細胞之細胞毒性之藥劑的方法，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該方法包含以下步驟：

- (a) 在藥劑存在之情況下培養神經元細胞，且隨後在肝素不存在之情況下與Tau蛋白質片段一起培養神經元細胞；或
- (b) 在肝素不存在之情況下與Tau蛋白質片段一起培養神經元細胞，且隨後在藥劑存在之情況下培養神經元細胞；及
- (c) 在執行步驟(a)或步驟(b)之後測定Tau蛋白質片段對神經元細胞之細胞毒性。

【0013】 本發明之方法適當地在神經元細胞群體上活體外進行。因此，本發明之方法為用於篩選具有對抗Tau蛋白質或其片段之聚集物之所需活性之藥劑的離體方法。

【0014】 可在藥劑存在之情況下培養神經元細胞，且隨後在Tau蛋白質片段存在之情況下進一步培養神經元細胞。可替代地，可在Tau蛋白質片段存在之情況下培養神經元細胞，且隨後在藥劑存在之情況下進一步培養神經元細胞。

【0015】 如上文所定義之Tau蛋白質片段適當地聚集以形成包括寡聚物及/或絲之自組裝結構。Tau蛋白質片段可呈主要無規之捲曲構形及/或由可溶性單體及二聚體形式組成。如本文所描述之Tau蛋白質或其片段之聚集物可為任何合適形式之Tau蛋白質。適當地，Tau蛋白質為重組形式之Tau蛋白質。該等Tau蛋白質片段亦可稱為Tau聚集物。Tau蛋白質片段可存在於自製劑移除了污染物(較

短肽片段)之經純化製劑中。

【0016】 如本文所描述之Tau蛋白質片段能夠自聚集而無需磷酸化。本文所描述之Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質共聚集。在共聚集之後，本文所描述之Tau蛋白質片段及內源性Tau蛋白質一起積聚在神經元細胞內之胞內體及/或溶酶體隔室內。

【0017】 包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸之Tau蛋白質片段適當地包含具有來自SEQ ID NO: 4之胺基酸之至少70個胺基酸的連續序列。

【0018】 根據本發明使用之如上文所定義之Tau蛋白質片段的長度可為70至97個胺基酸，視情況長度可為71至97個胺基酸。如上文所定義之Tau蛋白質片段可適當地選自以下者之群：長度為71、73、94、95、97個胺基酸之片段。

【0019】 因此，包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸之Tau蛋白質片段可選自由以下者組成之群：具有如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 7中所描述之胺基酸序列或與其具有至少85%一致性之序列的Tau蛋白質片段。

【0020】 dGAE95係指Tau (2N4R)之95個殘基片段，其中N端處於殘基Ile-297處且C端處於殘基Glu-391處，如SEQ ID NO: 4中所描述，或處於其他物種之同源位置處(所提及之殘基係指人類或小鼠Tau序列，在此區中該等殘基係相同的)。

【0021】 因此，根據本發明使用之Tau蛋白質片段亦包括片段dGAE97(dGAE97係指Tau (2N4R)之97個殘基片段，其中N端處於殘基Asp-295處且C端處於殘基Glu-391處，如SEQ ID NO: 3中所描述，或處於其他物種之同源位置處)、dGA(「dGA」係指Tau (2N4R)之94個殘基片段，其中N端處於殘基Ile-297處且C

端處於殘基Ala-390處，如SEQ ID NO: 5中所描述，或處於其他物種之同源位置處)、dGAE73 (dGAE73係指Tau (2N4R)之片段，其中N端處於殘基Val-306處且C端處於殘基Phe-378處，如SEQ ID NO: 6中所描述，或處於其他物種之同源位置處)及Tau (2N4R)之殘基308至378之胺基酸序列(其中N端處於殘基Ile-308處且C端處於殘基Phe-378處，如SEQ ID NO: 7中所描述，或處於其他物種之同源位置處)。

【0022】 本發明中之Tau蛋白質序列及結構之所有殘基編號均指人類Tau蛋白質(Uniprot ID P10636-8)之四重複同功型2N4R之序列之SEQ ID NO:1的殘基、或其他物種或其變異體中之同源位置。人類Tau同功型2N4R (Uniprot ID P10636-8)對應於全長Tau (Uniprot ID P10636或P10636-1，以SEQ ID NO:2形式提供)之胺基酸1-124、376-394及461-758。SEQ ID NO: 2係關於在周邊神經系統(PNS)而非中樞神經系統(CNS)中發現之更長形式之Tau。如本文所使用，對「全長」Tau之提及係指SEQ ID NO: 1 (CNS之相關序列)而非SEQ ID NO: 2 (與CNS無關)。

SEQ ID NO: 1 (同功型Tau-F，亦稱為Tau-4、2N4R，441個胺基酸)：
>sp|P10636-8|微管相關蛋白質Tau之TAU_人類同功型Tau-F OS=智人OX=9606
GN=MAPT
MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQT
PTEDGSEEPG
SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSL
EDEAAG
HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRI
PAKTPPAPK
TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKS

PSSAK
SRLQTAPVPMPLKKNVKSIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCG
SKDNIKHV
PGGGSVQIVYKPVDLSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQS
KIGSLDNI
THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL SNVS
STGSIDMV
DSPQLATLADEV SASLAKQGL
SEQ ID NO: 2 (全長人類Tau，同功型PNS-Tau，758個胺基酸)；
>sp|P10636-1|TAU_人類微管相關蛋白質Tau OS=智人OX=9606 GN=MAPT PE=1
SV=5
MAEPRQEFV MEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQT
PTEDGSEEPG
SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSL
EDEAAG
HVTQEPESGKVVQEGFLREPGPPGLSHQLMSGMPGAPLLPEGPREATRQPSG
TGPEDTEG
GRHAPELLKHQLLGDLHQEGPPLKGAGGKERPGSKEEVDEDRDVDESSPQD
SPPSKASPA
QDGRPPQTAAREATSIPGFPAEGAIPLPVDFLSKVSTEIPASEPDGPSVGRAKGQ
DAPLE
FTFHVEITPNVQKEQAHSEEHLGRAAFPGAPGEGPEARGPSLGEDTKEADLPE
PSEKQPA
AAPRGKPVSRVPQLKARMVSKSKDGTGSDDKKAKTSTRSSAKTLKNRPCLSP

KHPTPGSS
DPLIQPSSPAVCPEPPSSPKYVSSVTSRTGSSGAKEMKLKGADGKTKIATPRGA
APPGQK
GQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTP
PTREP
KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLDKNVSKIGSTENLKHQPGGGKV
QIINKKLD
LSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVLDLSKVTSCGSLGNIHHKPGGG
QVEVKSEK
LDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKS
PVVSGDT
SPRHLSNVSSSTGSIDMVDPQLATLADEVSAKQGL

【0023】 dGAE97係指Tau (2N4R)之97個殘基片段，其中N端處於殘基 Asp-295處且C端處於殘基Glu-391處，如SEQ ID NO: 3中所描述，或處於其他物種之同源位置處(所提及之殘基係指人類或小鼠Tau序列，在此區中該等殘基係相同的)。熟習此項技術者將顯而易見，dGAE97亦對應於同功型PNS-Tau (P10636-1)之片段，其中N端處於Asp-612處且C端處於Glu-708處。

SEQ ID NO: 3 (dGAE97，人類/小鼠，97個胺基酸)：

DNIKHVPGGGSVQIVYKPVLDLSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDF
KDRVQSKIGSLDNITHVPGGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAE

【0024】 dGAE95係指Tau (2N4R)之95個殘基片段，其中N端處於殘基 Ile-297處且C端處於殘基Glu-391處，如SEQ ID NO: 4中所描述，或處於其他物種之同源位置處(所提及之殘基係指人類或小鼠Tau序列，在此區中該等殘基係相同的)。熟習此項技術者將顯而易見，dGAE95亦對應於同功型PNS-Tau (P10636-1)

之片段，其中N端處於Ile-614處且C端處於Glu-708處。此序列有時可簡稱為「dGAE」。Tau (2N4R)之殘基297至391亦以自成對螺旋絲(PHF)之蛋白質水解穩定核心分離之主要片段為人所知。

SEQ ID NO: 4 (dGAE95或「dGAE」，人類/小鼠，95個胺基酸)：

IKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKD
RVQSKIGSLDNITHVPGGGGNKKIETHKLTFR ENAKAKTDHGAE

【0025】 Tau (297-391)之dGAE區在生理條件下自發組裝以在諸如肝素之添加劑不存在之情況下活體外形成PHF樣絲。

【0026】 「dGA」係指Tau (2N4R)之94個殘基片段，其中N端處於殘基Ile-297處且C端處於殘基Ala-390處，如SEQ ID NO: 5中所描述，或處於其他物種之同源位置處(所提及之殘基係指人類或小鼠Tau序列，在此區中該等殘基係相同的)。

SEQ ID NO: 5 (dGA，人類/小鼠，94個胺基酸)：

IKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKD
RVQSKIGSLDNITHVPGGGGNKKIETHKLTFR ENAKAKTDHGA

【0027】 dGAE73係指Tau (2N4R)之片段，其中N端處於殘基Val-306處且C端處於殘基Phe-378處，如SEQ ID NO: 6中所描述，或處於其他物種之同源位置處(所提及之殘基係指人類或小鼠Tau序列，在此區中該等殘基係相同的)。此片段對應於由低溫-EM識別為自AD腦組織分離之PHF核心之序列的殘基306-378 (Fitzpatrick等人, 2017; Nature)。核心可延伸至此等殘基之外，但受到低溫-EM之解析度限制。熟習此項技術者將顯而易見，dGAE73亦對應於同功型PNS-Tau (P10636-1)之片段，其中N端處於Val-623處且C端處於Phe-695處。

SEQ ID NO: 6 (dGAE73，人類/小鼠，73個胺基酸)：

VQIVYKPVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSL

DNITHVPGGGNKKIETHKLTF

【0028】 PHF核心之另一片段為Tau (2N4R)之殘基308至378，其中N端處於殘基Ile-308處且C端處於殘基Phe-378處，如SEQ ID NO: 7中所描述，或處於其他物種之同源位置處(所提及之殘基係指人類或小鼠Tau序列，在此區中該等殘基係相同的)。

SEQ ID NO: 7 (2N4R之殘基308至378，人類/小鼠，71個胺基酸)：

IVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNI
THVPGGGNKKIETHKLTF

【0029】 Tau蛋白質之一種較佳形式為對應於胺基酸殘基297-391 (使用2N4R Tau之編號)之Tau蛋白質之dGAE片段，適當而言其重組形式，此係根據SEQ ID NO: 4。在純化之後，dGAE以主要無規之捲曲構形存在，且主要由dGAE之可溶性單體及二聚體形式組成。

【0030】 可根據本發明之方法使用之Tau片段為包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸之片段。視情況，該序列可與SEQ ID NO:4之胺基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。

【0031】 因此，該等序列定義為與如本文所描述之一或多個序列(參考SEQ ID NO)具有某一百分比之序列一致性。序列一致性可藉由任何適宜方法來評估。然而，為了測定序列之間的序列一致性程度，對序列進行配對或多重比對之電腦程式係有用的，例如EMBOSS Needle或EMBOSS stretcher (兩者均為Rice, P.等人, Trends Genet., 16, (6) 第276-277頁, 2000年)可用於成對序列比對，而Clustal Omega (Sievers F等人, Mol. Syst. Biol. 7:539, 2011年)或MUSCLE (Edgar, R.C., Nucleic Acids Res. 32(5):1792-1797, 2004年)可用於多重序列比對，但可使用任何其他適當的程式。無論比對係成對的抑或多重的，其必須全局(亦即在整個

參考序列中)而非局部執行。

【0032】 序列比對及一致性百分比(%)計算可使用例如標準Clustal Omega參數來測定：矩陣Gonnet、空位開放罰分6、空位延伸罰分1。可替代地，可使用標準EMBOSS Needle參數：矩陣BLOSUM62，空位開放罰分10，空位延伸罰分0.5。可替代地使用任何其他合適的參數。

【0033】 出於本申請案之目的，在藉由不同方法獲得之序列一致性值之間存在爭議之情況下，藉由使用具有預設參數之EMBOSS Needle進行全局成對比對獲得之值應視為有效的。

【0034】 為了在本發明之方法中使用，Tau蛋白質或Tau蛋白質片段之聚集物(Tau蛋白質之聚集物)可在例如磷酸鹽緩衝液(生理pH，適當地pH 7.4，例如磷酸鹽緩衝溶液)之生理緩衝溶液中適當地稀釋，且在生理溫度下(適當地在37°C下)培育，適當地伴隨攪動，之後投予至神經元細胞。磷酸鹽緩衝溶液之合適形式可包含磷酸氫二鈉及氯化鈉之水溶液或氯化鉀及磷酸二氫鉀之水溶液。攪動可為500 rpm至1000 rpm，例如700 rpm。攪動可持續24小時至96小時，例如24小時、36小時、48小時、60小時、72小時或96小時。

【0035】 因此，在一個實例中，用於本發明之方法中之Tau蛋白質或其片段之聚集物之合適製劑可藉由以下來製備：在10 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中稀釋100 μ M蛋白質且在37°C下培育，適當地伴隨攪動，例如以700 rpm之速度攪動長達72小時，之後投予至神經元細胞。

【0036】 神經元細胞可適當地表現Tau蛋白質之內源性形式。舉例而言，細胞株SH-SY5Y表現內源性人類Tau蛋白質。因此，神經元細胞未經轉染以表現Tau蛋白質。

【0037】 神經元細胞可來自神經元細胞株，例如神經母細胞瘤細胞株，例如細胞株SH-SY5Y。細胞可未經分化且隨後在例如視黃酸之適當生長因子存在

之情況下在培養物中經分化。因此，本發明之方法可使用例如未經分化SH-SY5Y之未經分化神經元細胞。適當地，神經元細胞為例如經分化SH-SY5Y (dSH-SY5Y)之經分化神經元細胞。在細胞為未經分化細胞類型之情況下，本發明之方法可因此包括初始預先步驟，其中未經分化細胞在生長因子存在之情況下在培養物中經分化。生長因子可為視黃酸。

【0038】 適當地，神經元細胞株之細胞可在視情況補充有分化因子及/或生長因子之例如低血清或無血清培養基(例如DMEM生長培養基)之培養基或磷酸鹽緩衝鹽水溶液中提供。神經元細胞可根據本發明在該培養基中培養。

【0039】 未經分化SH-SY5Y人類神經母細胞瘤細胞可在任何一般合適的生長培養基，例如補充有10%胎牛血清(FCS)、1%青黴素/鏈黴素(Penicillin/Streptomycin, P/S)及1% L-麩醯胺酸之達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)/營養混合物F-12 (DMEM/F-12)中培養。為了分化，SH-SY5Y細胞可以例如25,000至30,000 cm^2 之密度，視情況在24孔盤中每孔50,000個細胞或在6孔盤中每孔300,000個細胞塗鋪。在分化第一天，培養基可適當地經含有10 μM 全反式視黃酸(RA) (Sigma-Aldrich)之低血清培養基(含有1%胎牛血清(FCS)、1%青黴素/鏈黴素(P/S)及1% L-麩醯胺酸之DMEM/F-12)置換，且細胞可經培育48小時。在第3天，可將此過程用新鮮RA重複且將細胞再培育48小時。在第5天，可將細胞在無血清培養基中洗滌一次以移除痕量血清。可將含有50 ng/ml腦衍生神經營養因子(STEMCELL Technologies)之無血清培養基(含有1% P/S及1% L-麩醯胺酸之DMEM/F-12)添加至細胞中且培育48小時。適當地預備經分化細胞(dSH-SY5Y)以在第7天用於實驗。

【0040】 神經元細胞與藥劑之培育可長達12小時至72小時，例如12小時、16小時、20小時、24小時、36小時、48小時、60小時或72小時。

【0041】 Tau蛋白質或其片段之聚集物可投予至細胞(以各別地在24孔盤

或6孔盤中每孔50,000-300,000個之密度塗鋪)或以0.01 μM 至100 μM ，例如1 μM 、5 μM 或10 μM 之濃度投予25,000-30,000/cm²。

【0042】 適當地，神經元細胞與藥劑之培養進行足夠時間以便允許神經元細胞內化藥劑達例如1-24小時、1至36小時或1至48小時。

【0043】 向神經元投予Tau蛋白質或其片段之聚集物之步驟係在允許神經元細胞內化Tau蛋白質或其片段之聚集物達例如24至48小時之條件下進行。

【0044】 就根據本發明使用之神經元細胞而言之細胞毒性可定義為培養物中之細胞存活百分比，包括相對氧化應力之量測、Tau之內源性募集、神經元細胞中之溶酶體/粒線體損壞等。

【0045】 毒性降低可藉由細胞活力、細胞形態或神經元細胞內Tau蛋白質之細胞骨架分佈來確定。

【0046】 如本文所描述，所篩選之藥劑可在相對於向神經元細胞投予Tau蛋白質片段而言不同之時間點添加至神經元細胞中，即在投予Tau蛋白質片段之前或在投予Tau蛋白質片段之後。

【0047】 因此，本發明之方法可用於評估所測試之藥劑是否能夠防止或降低如上文所定義之Tau蛋白質片段之細胞毒性。Tau蛋白質片段之細胞毒性降低可顯示為在藥劑存在之情況下與如上文所定義之Tau蛋白質片段一起培養之神經元細胞培養物中之細胞死亡百分比與在藥劑不存在之情況下與如上文所定義之Tau蛋白質片段一起培養之神經元細胞培養物中之細胞死亡百分比相比降低。

【0048】 適當地，步驟(c)中之細胞毒性抑制測定可包括與在所測試之藥劑不存在之情況下神經元細胞與Tau蛋白質或其片段之聚集物一起培育時的神經元細胞之對照值進行比較。細胞毒性之測定可表示為經對照處理之細胞(在藥劑不存在之情況下與如上文所定義之Tau蛋白質片段一起培育之神經元細胞)的百分比。亦可參考經緩衝液處理之細胞建立如上文所定義之Tau蛋白質片段之毒

性參考水平，該等經緩衝液處理之細胞將提供在任何給定分析中所使用之該濃度之如上文所定義之Tau蛋白質片段的絕對毒性水平。

【0049】 用於確立分析結果是否顯示藥劑能夠防止或降低細胞毒性之合適方法將藉助於統計檢定，亦即用於檢驗差異顯著性之統計檢定(例如未配對T檢定)。因此，降低可為統計學上顯著之細胞毒性降低。舉例而言，與例如低血清或無血清培養基(例如DMEM生長培養基)之對照培養基或磷酸鹽緩衝鹽水溶液中之神經元細胞培養物之20%細胞死亡之對照值相比，Tau蛋白質之細胞毒性片段可導致神經元細胞培養物中之40%-60%細胞死亡。

【0050】 根據本發明之方法之細胞毒性分析可適當地對不經藥劑處理或經處理媒劑處理之細胞所獲得之結果進行標準化。與在約2 μ M或更低之合適濃度下之藥劑展現出50%抑制之化合物可視為細胞毒性之活性抑制劑。因此，亦可亦根據如本文所描述之本發明方法比較不同藥劑之相對活性。

【0051】 任何物質之細胞毒性均可藉助於細胞活力分析來分析。可使用任何一般合適的方法進行細胞活力分析，例如(i)螢光分析；(ii)比色分析；(iii)發光分析；或(iv)染料排斥分析。

【0052】 對細胞毒性之螢光分析包括：ReadyProbes®細胞活力成像套組(Life Technologies)、刃天青、阿爾瑪藍(alamarBlue)分析或CFDA-AM分析。對細胞毒性之比色分析包括：MTT分析、MTS分析、XTT分析、WST-1分析、WST-8分析、LDH分析、SRB分析、NRU分析或結晶紫分析。對細胞毒性之發光分析包括：ATP分析或即時活力分析。對細胞毒性之染料排斥分析包括：TUNEL、凋亡蛋白酶-3、台盼藍(Trypan blue)、伊紅、剛果紅、紅螢素B分析。

【0053】 細胞活力及細胞毒性之發光分析易於使用螢光顯微鏡、螢光計、螢光微定量盤式讀取器或流式細胞儀來執行，且其提供許多優於傳統的染料排斥分析及比色分析之優勢。發光分析亦適用於黏著或懸浮細胞株且易於使用。

因此，在根據本發明之方法評估所關注之藥劑對Tau蛋白質或其片段之聚集物對神經元細胞之細胞毒性的效應中，發光分析可為較佳的。

【0054】 一種使用發光途徑之該方法可適當地使用差異螢光方法。在將Tau蛋白質或其片段之聚集物添加至例如dGAE之神經元細胞群體中之後，可使用ReadyProbes®細胞活力成像套組(Life Technologies)量測細胞活力。套組含有可用於標記所有細胞(藍色)之NucBlue®試劑及僅用於標記死細胞(綠色)之NucGreen®試劑。對於例如dGAE之Tau蛋白質或其片段之加標籤聚集物，NucRed®試劑可用於標記死細胞(紅色)。

【0055】 可適當地將神經元細胞與試劑一起在37°C下培育15分鐘。DAPI螢光可使用G 365激發濾光片及LP 420發射濾光片以及FT 395分色鏡來捕獲。綠色螢光可使用FITC濾光片組(BP 450-490激發濾光片、BP 515-565發射濾光片及FT 510分色鏡)來捕獲。

【0056】 經緩衝液處理之細胞死亡之比例可藉由將影像轉換為灰度，接著手動調整臨限值且將其轉換為二元影像以突出顯示活DAPI染色細胞來定量。可自動計數細胞數目。死細胞可以相同方式來計數，且細胞死亡可表示為經緩衝液處理之細胞百分比。

【0057】 螢光活化細胞分選(FACS)亦可用於螢光強度之大量量測。經內化之未標記Tau蛋白質片段之定量可使用免疫螢光來確定。可替代地，未標記Tau蛋白質片段可使用硫代黃素S (ThS)染色或類似方法來量測。

【0058】 比色分析量測生化標記以評估細胞之代謝活性。比色分析中所使用之試劑對於細胞活力作出反應而顯現顏色，從而允許經由分光光度計對細胞活力進行比色量測。比色分析適用於黏著或懸浮細胞株。

【0059】 發光分析提供快速且簡單的哺乳動物細胞中之細胞增殖及細胞毒性測定。此等分析可在適宜的96孔及384孔微量滴定盤格式中執行，且藉由發

光微定量盤式讀取器進行偵測。

【0060】 用於評估細胞毒性之最簡單且廣泛之方法為染料排斥法。在染料排斥法中，活細胞排斥染料，但死細胞不排斥染料。可使用包括伊紅、剛果紅、紅螢素B及台盼藍之多種該等染料。

【0061】 本發明之系統可用於評估所關注之藥劑在改變Tau蛋白質或其片段之聚集物對神經元細胞之作用方面的有效性。藥劑可為任何醫藥活性分子或物質，包括化合物或生物分子，適當地為特異性結合分子，諸如抗體(例如包括雙特異性抗體在內之多株抗體或單株抗體或例如Fab、F(ab')₂、Fc、Fd、Fv、dAb、scFv、CDR片段之抗體片段、雙體抗體(diabody)或其變異體或衍生物)。藥劑可直接投予或在合適的佐劑、稀釋劑或溶液(例如合適的生理緩衝溶液，諸如磷酸鹽緩衝鹽水)中調配，或使用此項技術中已知之標準技術調配為醫藥調配物。

【0062】 本發明之方法可包含建立作為具有已知活性之陽性對照之藥劑之活性的步驟。對Tau蛋白質片段具有已建立之抑制活性的用作陽性對照之已知測試化合物之實例可包括但不限於亞甲藍(MB；亦稱為氯化甲硫鎢)或LMT (隱色甲硫鎢雙氫甲磺酸鹽，LMTM；亦稱為LMT-X或TRx0237)。可將根據本發明之方法分析之藥劑之活性與陽性對照進行比較。

【0063】 本發明之方法可包含使用陰性對照(不具有已知活性)建立藥劑之無活性基線的步驟。合適的陰性對照之實例可包括用於神經元細胞之培養基、磷酸鹽緩衝鹽水溶液或類似物。可將根據本發明之方法分析之藥劑之活性與陰性對照進行比較。

【0064】 視情況，本發明之方法可另外包含用該藥劑治療患有Tau蛋白病之受試者之步驟，進一步視情況包括適用於治療Tau蛋白病之另一治療活性物質。

【0065】 因此，本發明提供用於研究藥劑對Tau蛋白質或其片段之聚集物

表現之作用的系統，該系統可用於評估藥劑在治療受試者之Tau蛋白病或以Tau蛋白質在神經元細胞中異常積聚為特徵之疾病方面的有效性。

【0066】 Tau蛋白質之聚集為稱為「Tau蛋白病」之疾病標誌。已辨認到之各種Tau蛋白病以神經元及/或神經膠質中之主要Tau病理為特點，且該術語已在此項技術中使用數年。此等病理包涵體與諸如AD之疾病中之特徵性Tau包涵體之間的類似性指示結構特點係共有的，且病理之局部解剖分佈係導致所觀測到之不同臨床表型的原因。確切而言，先前已獲得AD、匹克症(Pick's disease) (額顳葉型失智症之亞型)、慢性創傷性腦病(CTE)及皮質基底退化症(CBD)中之聚集Tau之低溫電子顯微鏡結構，且全部顯示共同的構形特點，指示具有調節在例如PHF中(如在AD中所觀測)之Tau聚集之能力的化合物亦可調節其他Tau蛋白病中之Tau聚集。除了下文所論述之特定疾病之外，熟習此項技術者可藉由認知或行為症狀之組合加上另外經由使用如以PET或MRI所觀察到之聚集Tau之合適配位體(諸如WO 02/075318中所描述者)來識別Tau蛋白病。

【0067】 除阿茲海默症(AD)之外，諸如匹克症(Pick's disease)及進行性核上神經麻痺症(PSP)之神經退行性病之發病機制似乎各別地與新皮質之齒狀回及星狀錐體細胞內病理性截短Tau聚集物的積聚相關。相關Tau蛋白病(或Tau相關失智)包括額顳葉型失智症(FTD)；與染色體17相關之巴金森氏症(parkinsonism linked to chromosome 17, FTDP-17)；去抑制-失智-巴金森氏症-肌萎縮複徵症候群(DDPAC)；蒼白球腦橋黑質變性(PPND)；關島型ALS症候群；蒼白球-黑質-盧易體變性(PNLD)；皮質基底退化症(CBD)；嗜銀顆粒性失智症(AgD)；拳擊手型失智症(DP)，其中儘管局部解剖學不同，但NFT與AD中所觀測到之NFT類似(Bouras等人, 1992年)；慢性創傷性腦病(CTE)，亦即Tau蛋白病，包括DP以及重複性及運動相關之震盪(McKee等人, 2009年)。其他疾病論述於Wischik等人2000年中，對於詳細論述-尤其見表5.1)。

【0068】 NFT中之異常Tau亦在唐氏症候群(DS) (Flament等人, 1990年)及路易氏體失智症(DLB) (Harrington等人, 1994年)中可見。Tau陽性NFT亦在腦炎後巴金森氏症(PEP) (Charpiot等人, 1992年)中可見。神經膠質Tau纏結係在亞急性硬化性全腦炎(SSPE) (Ikeda等人, 1995年)中觀測到。其他Tau蛋白病包括C型尼曼匹克症(Niemann-Pick disease type C, NPC) (Love等人, 1995年)；B型聖菲利柏氏症候群(Sanfilippo syndrome type B) (或黏多糖病III B, MPS III B) (Ohmi等人, 2009年)；強直性營養不良(DM)、DM1 (Sergeant等人, 2001年及其中所引用之參考文獻)以及DM2 (Maurage等人, 2005年)。另外，文獻中愈來愈多之共識認為，Tau病理亦可能更一般地造成認知缺陷及下降，包括輕度認知障礙(MCI) (參閱例如Braak等人, 2003年；Wischnik等人, 2018年)。

【0069】 主要或部分以異常Tau聚集為特徵之所有此等疾病在本文中稱為「Tau蛋白病」或「Tau蛋白質聚集疾病」。在關於Tau蛋白病之本發明態樣中，Tau蛋白病可選自本文所定義之任何Tau蛋白病。

【0070】 Tau蛋白病可選自由以下者組成之群：阿茲海默症、原發性年齡相關Tau蛋白病(PART)、神經原纖維纏結為主型老年失智症、慢性創傷性腦病(CTE)、進行性核上神經麻痺症(PSP)、皮質基底退化症(CBD)、額顳葉型失智症(FTD)、額顳葉型失智症及與染色體17相關之巴金森氏症(FTDP-17)、匹克病、去抑制-失智-巴金森氏症-肌萎縮複徵症候群(DDPAC)、蒼白球腦橋黑質變性(PPND)、關島型ALS症候群、蒼白球-黑質-盧易體變性(PNLD)、嗜銀顆粒性失智症(AgD)、唐氏症候群(DS)、路易氏體失智症(DLB)、腦炎後巴金森氏症(PEP)、拳擊手型失智症(DP)、創傷性腦損傷(TBI)、中風、缺血、利替可-波帝格病(Lytico-bodig disease) (關島型巴金森氏症-失智症複徵症候群)、神經節膠質細胞瘤、神經節細胞瘤、腦膜血管瘤病、腦炎後巴金森氏症、亞急性硬化性全腦炎(SSPE)、鉛毒腦病、結節性硬化症、泛酸激酶相關性神經系統退化症、脂褐質

症及輕度認知障礙(MCI)。

【0071】 Tau蛋白病可為阿茲海默症。

【0072】 本發明亦涵蓋作為預防性措施之治療。治療可為預防性治療。治療可利用主動免疫或被動免疫。

【0073】 已顯示主動Tau免疫可藉由靶向單個或多個磷酸化抗原決定基、胺基末端、全長正常及突變Tau或聚集Tau來減少Tau病理。達成病理性Tau之減少且報導了極少副作用，且持久免疫反應使主動免疫成為有前景的選擇。然而，針對天然蛋白質之抗體之起始總攜帶著不良免疫反應及對正常蛋白質之有害靶向的風險。

【0074】 被動免疫為主動策略造成之安全問題提供有潛質的解決方案。患者自身不會產生抗體，且免疫作用可能為短暫的，此降低免疫副作用風險。被動免疫亦提供更大的對所靶向之抗原決定基之特異性。抗體亦可藉由阻止Tau病理之擴散來改變疾病進展。

【0075】 藉由本發明之方法識別之對受試者之Tau蛋白病或以Tau蛋白質在神經元細胞中異常積聚為特徵之疾病具有療效的藥劑可因此用於治療早期Tau蛋白病及/或以輕度症狀為特徵之Tau蛋白病。該藥劑可用於治療輕度認知障礙(MCI)。

【0076】 該藥劑可用於治療處於罹患Tau蛋白病之風險下之受試者的Tau蛋白病。處於罹患Tau蛋白病之風險下之受試者可藉由任何合適的手段來識別，該等手段諸如為以下者中之一或多者：病史、體格檢查、神經系統檢查、腦成像、精神狀態測試(諸如簡短智能測驗(MMSE)及簡易認知功能測試(Mini-Cog test))、計算機化認知測試(諸如Cantab Mobile、Cognigram、Cognivue、認知及自動神經心理評估度量(ANAM)裝置)、情緒評估及基因測試。

【0077】 熟習此項技術者意識到，Tau蛋白病診斷可能並非總是在死去之

前即為確定的。因此，該藥劑可用於治療處於罹患Tau蛋白病之風險下之受試者的Tau蛋白病。受試者可能疑似患有Tau蛋白病。受試者可能患有Tau蛋白病之一或多種症狀。該藥劑可用於減緩Tau蛋白病或疑似Tau蛋白病之進展。

【0078】 術語「治療有效量」在用於本文中之情況下係指用於實踐本發明之組合方法之藥劑的量，該量在根據所需治療方案投予時有效產生一些與合理的效益/風險比相稱之所需治療效果。

【0079】 如上文所闡述，本發明亦涵蓋作為預防性措施之治療。舉例而言，本發明提供預防性治療受試者之Tau蛋白病之方法，該方法包含向該受試者投予藉由本發明之方法識別之藥劑。

【0080】 術語「預防有效量」在用於本文中之情況下係關於藉由本發明之方法識別之藥劑的量，該量在根據所需治療方案投予時有效產生一些與合理的效益/風險比相稱之所需預防效果。在本說明書之上下文中之「預防」不應理解為限制在完全成效，亦即完全保護或完全預防。更確切而言，在本發明之上下文中之預防係指在偵測到有症狀之病況之前以藉由幫助延遲、減輕或避免特定病況來保持健康之目的投予的措施。

【0081】 本發明之第二態樣及後續態樣之較佳特點係相對於第一態樣而言在細節上做必要的變更。

【0082】 根據本發明之第二態樣，提供篩選有效抑制Tau蛋白質片段之內化之藥劑的方法，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該方法包含以下步驟：

- (a)在該藥劑存在之情況下培養神經元細胞，且隨後在肝素不存在之情況下與Tau蛋白質片段一起培養神經元細胞；或
- (b)在肝素不存在之情況下與Tau蛋白質片段一起培養神經元細胞，且隨後在該藥劑存在之情況下培養神經元細胞；及

(c) 在執行步驟(a)或步驟(b)之後測定神經元細胞內Tau蛋白質片段之內化。

【0083】 如本文所描述，如上文所定義之Tau蛋白質片段之內化引起不溶性Tau物質(亦即聚集物)之產生、內源性全長Tau蛋白質之異常磷酸化及截短。

【0084】 對如本文所描述之Tau蛋白質片段之內化之抑制可使用免疫螢光及/或穿透式電子顯微術(TEM)來分析。該等技術可顯示在活性劑存在之情況下經神經元細胞內化之Tau蛋白質片段之相對量。亦可如本文所描述來製備合適的陽性及陰性對照以便分別地為具有已知抑制活性之藥劑建立已知水平之活性及在藥劑不存在之情況下建立基線活性。

【0085】 在使用免疫螢光之方法中，如本文所描述之Tau蛋白質片段可經可偵測螢光標記加以標記。該方法可使用與合適的螢光團連接之單一(一級)抗體，其中該抗體特異性辨識且結合至如本文所描述之Tau蛋白質片段。可替代地，該方法可使用兩種抗體，其中未經標記之第一(一級)抗體特異性辨識且結合至如本文所描述之Tau蛋白質片段，而經螢光團標記之二級抗體辨識且結合一級抗體。

【0086】 免疫金穿透式電子顯微術(TEM)使用膠體金顆粒，該等顆粒可附著至特異性辨識且結合如本文所定義之Tau蛋白質片段的抗體。膠體金顆粒可附著至特異性辨識且結合至如本文所定義之Tau蛋白質片段的一級抗體，或膠體金顆粒可附著至特異性辨識且結合至一級抗體之二級抗體，該一級抗體特異性辨識且結合至如本文所描述之Tau蛋白質片段。

【0087】 如本文所描述之Tau蛋白質片段之內化亦可使用例如經螢光地標記之Tau蛋白質片段之經可偵測地標記之Tau蛋白質片段來分析。

【0088】 因此，測定對神經元細胞內Tau蛋白質片段之內化之抑制的步驟可使用攝影術或TEM以可視化在神經元細胞中內化之Tau蛋白質片段的相對量。

【0089】 如本文所描述之經處理細胞之免疫螢光及免疫金穿透式電子顯

微術(TEM)顯露，例如dGAE之如上文所定義之Tau蛋白質片段在細胞之胞內體/溶酶體隔室內積聚。

【0090】 培育後，可對神經元細胞進行成像且使用諸如「ImageJ」之合適的分析程式執行分析，以定量細胞體內之螢光強度以提供內化讀數，且進行統計分析以比較陽性及陰性對照與經藥劑處理之樣本的螢光強度。可對細胞數目進行計數以將內化水平表示為平均螢光強度/細胞以將視野中不同的細胞數目考慮進去。

【0091】 用於確定分析結果是否顯示藥劑能夠抑制Tau蛋白質片段之內化之合適方法可藉助於統計檢定，亦即用於檢驗差異顯著性之統計檢定(例如未配對T檢定)來進行。因此，減少可能為統計學上顯著之內化減少。舉例而言，與例如DMEM生長培養基之對照培養基中之神經元細胞培養物之20%抑制的對照值相比，能夠充當內化抑制劑之Tau蛋白質片段可引起神經元細胞培養物中之Tau蛋白質片段之40%-60%內化抑制。

【0092】 根據本發明之方法抑制Tau蛋白質片段之內化之分析可適當地對不經藥劑處理或經處理媒劑處理之細胞所獲得之結果進行標準化。與在約2 μ M或更低之合適濃度下之藥劑展現出50%抑制之化合物可視為內化之活性抑制劑。因此，亦可亦根據如本文所描述之本發明方法比較不同藥劑之相對活性。

【0093】 本發明之方法可包含建立作為具有已知活性之陽性對照之藥劑之活性的步驟。對Tau蛋白質片段具有已建立之抑制活性的用作陽性對照之已知測試化合物之實例可包括但不限於亞甲藍(MB，亦稱為氯化甲硫鎢)或LMT (隱色甲硫鎢雙氫甲磺酸鹽，LMTM；亦稱為LMT-X或TRx0237)。可將根據本發明之方法分析之藥劑之活性與陽性對照進行比較。

【0094】 本發明之方法可包含使用陰性對照(不具有已知活性)建立藥劑之無活性基線的步驟。合適的陰性對照之實例可包括用於神經元細胞之培養

基、磷酸鹽緩衝鹽水溶液或類似物。可將根據本發明之方法分析之藥劑之活性與陰性對照進行比較。

【0095】 視情況，本發明之方法可另外包含用藥劑治療患有Tau蛋白病之受試者之步驟，進一步視情況包括適用於治療Tau蛋白病之另一治療活性物質。

【0096】 根據本發明之第三態樣，提供篩選有效擾亂Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之交互作用之藥劑的方法，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該方法包含以下步驟：

- (a) 在該藥劑存在之情況下培養神經元細胞，且隨後在肝素不存在之情況下與Tau蛋白質片段一起培養神經元細胞；或
- (b) 在肝素不存在之情況下與Tau蛋白質片段一起培養神經元細胞，且隨後在該藥劑存在之情況下培養神經元細胞；及
- (c) 在執行步驟(a)或步驟(b)之後測定神經元細胞中Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之交互作用程度。

【0097】 對Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之間的交互作用之擾亂可適當地使用如本文所描述之免疫螢光及/或免疫金穿透式電子顯微術(TEM)來分析。

【0098】 如本文所描述，如上文所定義之Tau蛋白質片段之內化引起不溶性Tau物質之產生、內源性全長Tau蛋白質之異常磷酸化及截短。

【0099】 經處理之細胞之免疫螢光及免疫金TEM顯露，例如dGAE之Tau蛋白質或其片段之聚集物在細胞之胞內體/溶酶體隔室內積聚。對Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之交互作用之擾亂可描述為對Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之間的交互作用之抑制。

【0100】 測定對神經元細胞內Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之間的

交互作用之擾亂的步驟可因此使用攝影術或TEM以可視化神經元細胞內Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之相對交互作用。

【0101】 如本文所描述，免疫螢光及/或免疫金TEM可用於顯示對在活性劑存在之情況下經神經元細胞內化之Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之間的交互作用之相對擾亂。亦可如本文所描述來製備合適的陽性及陰性對照以便分別地為具有已知抑制活性之藥劑建立已知水平之活性及在藥劑不存在之情況下建立基線活性。

【0102】 用於確立分析結果是否顯示藥劑能夠擾亂Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之交互作用的合適方法可藉助於統計檢定，亦即用於檢驗差異顯著性之統計檢定(例如未配對T檢定)來進行。因此，減少可為統計學上顯著之對Tau片段與內源性Tau蛋白質之交互作用之擾亂減少。舉例而言，與例如DMEM生長培養基之對照培養基中之神經元細胞培養物之20%抑制的對照值相比，能夠用於擾亂交互作用之Tau蛋白質片段可引起對神經元細胞培養物中之Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之交互作用的40%-60%擾亂。

【0103】 對根據本發明之方法進行之對Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之交互作用之擾亂的分析可適當地對不經藥劑處理或經處理媒劑處理之細胞所獲得之結果進行標準化。與在約2 μ M或更低之合適濃度下之藥劑展現出50%活性之化合物可視為交互作用之活性抑制劑。因此，亦可亦根據如本文所描述之本發明方法比較不同藥劑之相對活性。

【0104】 本發明之方法可包含建立作為具有已知活性之陽性對照之藥劑之活性的步驟。對Tau蛋白質片段具有已建立之抑制活性的用作陽性對照之已知測試化合物之實例可包括但不限於亞甲藍(MB，亦稱為氯化甲硫鎗)或LMT (隱色甲硫鎗雙氫甲磺酸鹽，LMTM；亦稱為LMT-X或TRx0237)。可將根據本發明之方法分析之藥劑之活性與陽性對照進行比較。

【0105】 本發明之方法可包含使用陰性對照(不具有已知活性)建立藥劑之無活性基線的步驟。合適的陰性對照之實例可包括用於神經元細胞之培養基、磷酸鹽緩衝鹽水溶液或類似物。可將根據本發明之方法分析之藥劑之活性與陰性對照進行比較。

【0106】 視情況，本發明之方法可另外包含用該藥劑治療患有Tau蛋白病之受試者之步驟，進一步視情況包括適用於治療Tau蛋白病之另一治療活性物質。

【0107】 根據本發明之第四態樣，提供用於篩選有效抑制Tau蛋白質片段之細胞毒性之藥劑的系統，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該系統包含(i)神經元細胞株；(ii)Tau蛋白質片段，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸；及(iii)藥劑庫；其中該神經元細胞株不含肝素。

【0108】 藥劑庫(library)可包含如本文所描述之任何所關注之藥劑，該藥劑可改變如本文所描述之Tau蛋白質或其片段之聚集物對神經元細胞之作用。藥劑可為任何醫藥活性分子或物質，包括化合物或生物分子，適當地為特異性結合分子，諸如抗體。庫可為化合物庫或特異性結合分子庫。

【0109】 此類本發明之系統可以部件套組形式提供，該部件套組包含神經元細胞株之細胞群體；包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸之Tau蛋白質片段；及藥劑庫；其中神經元細胞株不含肝素。此類本發明之系統或部件套組亦可具備使用說明書。細胞可在如本文所描述之合適生長培養基或培養基中提供。細胞亦可在合適的容器中提供。

【0110】 關於本發明之系統之本發明之第四態樣及後續態樣之其他較佳

特點係如上文所描述。

【0111】 根據本發明之第五態樣，提供用於篩選有效抑制Tau蛋白質片段之內化之藥劑的系統，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該系統包含(i)神經元細胞株；(ii)Tau蛋白質片段，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸；及(iii)藥劑庫；其中該神經元細胞株不含肝素。

【0112】 藥劑庫可包含如本文所描述之任何所關注之藥劑，該藥劑可改變如本文所描述之Tau蛋白質或其片段之聚集物對神經元細胞之作用。藥劑可為任何醫藥活性分子或物質，包括化合物或生物分子，適當地為特異性結合分子，諸如抗體。庫可為化合物庫或特異性結合分子庫。

【0113】 此類本發明之系統可以部件套組形式提供，該部件套組包含神經元細胞株；包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸之Tau蛋白質片段；及藥劑庫；其中神經元細胞株不含肝素。

【0114】 根據本發明之第六態樣，提供用於篩選有效擾亂Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之交互作用之藥劑的系統，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該系統包含(i)神經元細胞株；(ii)Tau蛋白質片段，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸；及(iii)藥劑庫；其中該神經元細胞株不含肝素。

【0115】 藥劑庫可包含如本文所描述之任何所關注之藥劑，該藥劑可改變如本文所描述之Tau蛋白質或其片段之聚集物對神經元細胞之作用。藥劑可為任何醫藥活性分子或物質，包括化合物或生物分子，適當地為特異性結合分子，

諸如抗體。庫可為化合物庫或特異性結合分子庫。

【0116】 此類本發明之系統可以部件套組形式提供，該部件套組包含神經元細胞株；包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸之Tau蛋白質片段；及藥劑庫；其中神經元細胞株不含肝素。

【0117】 本發明描述可如何探索如本文所定義之可溶物及Tau蛋白質片段，亦即Tau蛋白質之聚集形式，例如Tau蛋白質片段dGAE的細胞攝取。Tau內化至經分化之SH-SY5Y神經母細胞瘤細胞中之下游結果可使用螢光及電子顯微術以及結構性分析及生化分析來檢驗。

【0118】 在本發明之任何態樣之方法或系統之一個實施例中，未經分化之神經元細胞可以合適的濃度(例如30,000個細胞/孔)塗鋪在多孔盤中，且如先前所描述，在經耗盡之血清培養基中使用視黃酸進行分化，或保持不分化。隨後，可以以下方式中之一種處理細胞：

(1)在添加如本文所定義之Tau蛋白質片段(該等片段亦可稱為Tau聚集物)之前，在所關注之藥劑存在之情況下對細胞進行預培育；或(2)將細胞與同時投予之所關注之藥劑及Tau聚集物共同培育。

【0119】 細胞可在各階段經培育12、24或48小時。舉例而言，細胞可經培育24小時，此意味著(1)之總時間為48小時且(2)之總時間為24小時。舉例而言，如本文所描述，可將Tau蛋白質片段dGAE-488 (例如以1 μ M之濃度使用)與細胞一起培育24小時，該時長足以使經內化之Tau蛋白質可見。

【0120】 培育後，可對細胞進行拍攝且使用合適的分析軟體程式(例如ImageJ)執行影像分析以定量細胞體內之螢光強度。螢光強度之定量可提供Tau蛋白質內化之量度。

【0121】 可對細胞數目進行計數以將內化水平表示為平均螢光強度/細胞

以將視野中不同細胞數目考慮進去。

【0122】 在一個實施例中，例如dGAE-488之Tau蛋白質片段可以例如約1 μM 之合適的濃度添加。用於篩選之藥劑可最初以例如10 μM 之單一濃度進行測試；隨後，可測試在一定濃度範圍內，例如約2 μM 下至約20 nM之彼等顯示抑制活性之藥劑，且化合物活性經報告為例如觀測到50%活性抑制時之濃度。

【0123】 如本文所描述，根據本發明之方法或系統量測之活性可包括：
(i)Tau之內化(例如如藉由如本文所描述之Tau蛋白質之經可偵測地標記之片段的胞內螢光所量測)；(ii)如本文所描述之Tau蛋白質之經可偵測地標記之片段的胞內積聚(例如如藉由收穫細胞、將其裂解且藉由超速離心來分離Tau蛋白質之聚集標記片段且量測聚集Tau (例如藉由用抗Tau抗體進行之免疫墨點法)來量測)；及
(iii)如本文所描述之Tau蛋白質片段之細胞毒性(例如如使用合適的細胞毒性分析(例如ReadyProbes[®]分析)以量測細胞死亡來量測)(參閱例如圖2A)。

【0124】 活性可對不經藥劑處理或經處理媒劑處理之細胞所獲得之結果進行標準化。適當地，與2 μM 或更低之所測試藥劑展現出50%抑制之化合物視為有活性的。本文所描述之方法及系統亦准許比較不同藥劑之相對活性。

【0125】 本文所描述之研究結果顯示，所組裝之dGAE比可溶性非聚集形式展現出更急劇的細胞毒性。相反地，可溶性形式更容易經內化且一旦進入細胞內，則能夠與內源性Tau締合，從而引起內源性Tau之磷酸化及聚集增加，該內源性Tau在細胞之溶酶體/胞內體隔室中積聚。似乎可溶性寡聚形式能夠傳播Tau病理而無急劇毒性。因此，本文所描述之研究提供用於測定藥劑抑制Tau蛋白質片段之活性的活性的方法及系統，此係如藉由如本文所描述之Tau蛋白質片段之細胞毒性、如本文所描述之Tau蛋白質片段之內化及/或內源性Tau蛋白質與如本文所描述之Tau蛋白質片段之交互作用來量測。

【0126】 本文所呈現之結果顯示，聚集dGAE具有細胞毒性，而可溶性非

纖維狀dGAE不具有急劇毒性且可被神經元樣細胞攝取。內化引起不溶性Tau物質之產生、內源性全長Tau之異常磷酸化及截短。經處理之細胞之免疫螢光及免疫金TEM顯露，dGAE在細胞之胞內體/溶酶體隔室內積聚。因此，Tau片段之內化之下游結果為細胞毒性、聚集成不溶性Tau物質中及Tau截短/磷酸化。

【0127】 在本文所描述之實驗之24小時時間範圍內，在經分化之神經母細胞瘤細胞暴露於聚集dGAE之後觀測到細胞死亡增加，但經可溶性dGAE處理之細胞之活力差異很小。

【0128】 在此處所使用之條件下，在24小時培育期之後，聚集dGAE似乎對經分化之神經母細胞瘤細胞更具急劇毒性。儘管即使在較高濃度下毒性亦很小，但呈可溶性形式之dGAE在2小時暴露內經內化至經分化之神經母細胞瘤細胞中。攪動後，dGAE-488之內化效率要低得多。在本發明之研究中，觀測到使用聚集製劑之一些內化，但這些聚集製劑可能為在絲製備期間保留呈溶液態之可溶性或部分可溶性物質。經攪動之dGAE-488有可能含有各尺寸之Tau組裝之混合物，其中一些是經內化的，而一些不是經內化的。雖然經內化之確切物質仍有待解答，但可溶性dGAE製劑由直徑範圍為10-80 nm之聚集物組成，此意味著多種寡聚形式(圖1A)。

【0129】 此外，0小時dGAE變得具有毒性所花費之時間可能比此等實驗之時間範圍更長。本文所描述之內化不需要用於聚集或細胞攝取之外源性因素。

【0130】 本發明之研究已研究了內源性Tau是否可在可溶性dGAE經攝取至細胞質中之後經募集且轉化成不溶性形式。經內吞之Tau與細胞質Tau之間的交互作用先前已在需要過表現人類Tau之各種細胞模型中或藉由在蛋白質遞送試劑之幫助下引入外源性Tau加以研究。

【0131】 本文所呈現之資料顯示，與可溶性形式之dGAE一起培育引起具有正常含量之內源性Tau之細胞中的內源性磷酸化Tau局部增加，此與AD中之Tau

病理一致。使用dGAE-488以及辨識重複域外部之抗原決定基之抗體探測內源性Tau蛋白質之磷酸化狀態，本文已顯示，在T231及S202-T205處之內源性Tau之磷酸化增加。此等變化伴隨依序萃取之後不溶性磷酸化Tau蛋白質而非整個溶胞產物之含量增加。使用AT80或AT180對整個溶胞產物進行之西方墨點法不顯露磷酸化Tau含量之任何明顯差異，此可能表明總含量保持恆定，但不溶性/聚集Tau區域內之局部磷酸化Tau含量增加，如藉由免疫螢光及在依序萃取之後所顯示。在此階段尚不清楚在攝取可溶性形式之dGAE之後誘導聚集或經增加之磷酸化的機制。此經截短之Tau物質能夠自發地自聚集而無需任何磷酸化。吾等在此處表明，dGAE與內源性Tau共同聚集，且此等物質在胞內體/溶酶體隔室內積聚在一起。

【0132】 本發明顯示，經細胞內化之大部分dGAE經定位至溶酶體隔室。使用免疫金TEM，dGAE-488向囊泡結構之定位已經證明暗示性的溶酶體隔室之尺寸範圍。

【0133】 免疫螢光及TEM發現共同表明dGAE及內源性Tau在胞內溶酶體隔室內之積聚。此等發現為Tau病理形式內化之後的細胞超微結構提供新的視角，且表明自噬途徑可能與其降解相關。

【0134】 Tau之生理及病理形式經蛋白酶體及自噬降解系統清除，且已表明，病理性Tau優先經自噬-溶酶體系統降解。病理性Tau之積聚有可能會擾亂此等降解過程之正常功能。在AD中，溶酶體對自噬泡降解受損之支援表明病理性Tau之不完全清除可能導致神經元功能障礙。除了Tau聚集抑制之外，理解可如何自細胞中清除經積聚之Tau物質可允許發展相配的治療方法。

【0135】 可溶性dGAE自組裝且內化至神經元細胞中之容易性使得研究其自組裝在細胞環境中之作用(詳言之在超微結構水平下其對急劇毒性之作用及其對內源性Tau之磷酸化狀態及不溶性之效應)成為可能。此途徑將提供適用於促進

在蛋白質之任何過表現、轉譯後修飾或組裝誘導劑不存在之情況下研究Tau聚集、且最終研究靶向AD及相關Tau蛋白病中之Tau接種及神經元傳遞之Tau聚集抑制劑之作用機制的工具。

【0136】 如上文所陳述，本發明之第二態樣及後續態樣之較佳特點係相對於第一態樣而言在細節上做必要的變更。

【0137】 現將參考以下實例進一步描述本發明，該等實例僅出於參考目的而包括在內且不應解釋為對本發明之限制，亦參考多個圖式。

材料及方法

重組dGAE之製備

【0138】 在整個研究中使用經純化之重組截短Tau (dGAE，對應於胺基酸殘基297 – 391，使用2N4R Tau之編號)。重組Tau蛋白質297-391係如先前在Al-Hilaly等人(*J. Mol.Biol.*, 第429卷, 第23期, 第3650-3665頁(2017年))中所描述經純化。純化後，dGAE以主要無規捲曲構形存在且主要由可溶性單體及二聚體組成，如先前在Al-Hilaly等人(*J. Mol.Biol.*, 第429卷, 第23期, 第3650-3665頁(2017年))中所表徵及描述。

Tau蛋白質之Alexa Fluor® 488標記

【0139】 為了生成加螢光標籤之Tau蛋白質(dGAE-488)，藉由使200 µl蛋白質(425.2 µM)與10 µl 113 nM Alexa Fluor® TFP酯及20 µl 1 M碳酸氫鈉(pH 8.3)混合來用Alexa Fluor 488® (Life Technologies)共價標記dGAE。將混合物在室溫下在黑暗中培育15分鐘。藉由添加1 ml 10 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)且在4°C下以1,000 × g離心2分鐘來平衡Zeba 7K MWCO管柱(Thermo Scientific)。丟棄溶離液且重複該過程三次。將蛋白質/染料混合物逐滴添加至管柱頂部上，接著立即添加40 µl磷酸鹽緩衝液，且在4°C下以1,000 × g離心2分鐘。將蛋白質溶液保持在冰上，且使用NanoDrop分光光度計量測在280 nm處之吸光度(A₂₈₀)。使用A₂₈₀及

dGAE之莫耳消光係數($1,400\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$)計算蛋白質濃度，此考慮到染料在 A_{494} 下之吸收。dGAE具有14個離胺酸殘基，該等殘基全部為488染料可結合之潛在位點。藉由 A_{494} 及染料之莫耳消光係數($71,000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$)測定標記程度。蛋白質(dGAE-488)立即用於後續實驗或經歷活體外攪動。

dGAE及dGAE-488之活體外組裝

【0140】 dGAE及dGAE-488之活體外組裝係如先前在Al-Hilaly等人(*J. Mol. Biol.*, 第429卷, 第23期, 第3650-3665頁(2017年))中所描述在無還原劑之情況下執行。簡言之，將 $100\text{ }\mu\text{M}$ 蛋白質在 10 mM 磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中稀釋且在 37°C 下培育，同時在Eppendorf ThermoMixer®上以 700 rpm 速度攪動72小時。使用負染色穿透式電子顯微術(TEM)觀察樣本。所有實驗均使用於磷酸鹽緩衝液中之 $100\text{ }\mu\text{M}$ dGAE儲備液進行。

負染色TEM

【0141】 將dGAE總成混合物($100\text{ }\mu\text{M}$ 於磷酸鹽緩衝液中，pH 7.4)之等分試樣($4\text{ }\mu\text{l}$)置放於400目碳塗布網格上且培育1分鐘。在用濾紙移除過量溶液之後，將網格用 $4\text{ }\mu\text{l}$ 經過濾之Milli-Q水洗滌1分鐘且吸乾。將網格用 $4\text{ }\mu\text{l}$ 經過濾之2% (w/v)乙酸氧鈾負染色1分鐘，吸乾且將其空氣乾燥至少五分鐘。在JEOL JEM1400增強型穿透式電子顯微鏡上在 100 kV 下檢查網格，且使用 $4\text{k} \times 4\text{k}$ One View (Gatan)攝影機收集電子顯微影像。

圓偏光二色性光譜法

【0142】 使用Jasco光譜儀J715執行圓偏光二色性光譜法(CD)，且在 21°C 維持溫度下收集光譜三次。將蛋白質樣本置放至 0.02 mm 路徑長度之石英比色管(Hellma)中且自 180 nm 至 320 nm 進行掃描。CD數據經轉換為莫耳橢圓率($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$)。

細胞培養及dGAE處理

【0143】 在補充有10%胎牛血清(FCS)、1%青黴素/鏈黴素(P/S)及1% L-麩醯胺酸之達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基/營養混合物F-12 (DMEM/F-12)中使未經分化之SH-SY5Y人類神經母細胞瘤細胞生長。為了分化，將SH-SY5Y細胞以50,000個細胞/孔之密度塗鋪在24孔盤中或以300,000個細胞/孔之密度塗鋪在6孔盤中。對於免疫螢光，將細胞塗鋪至Menzel-Gläser蓋玻片(Thermo Scientific)上。對於活細胞成像，將細胞塗鋪在1.5-mm蓋玻片(Mattek)上之35-mm盤上。在分化第一天，使培養基經含有10 μ M全反式視黃酸(RA) (Sigma-Aldrich)之低血清培養基(含有1% FCS、1% P/S及1% L-麩醯胺酸之DMEM/F-12)置換，且將細胞培育48小時。在第3天，用新鮮RA重複此過程，且將細胞再培育48小時。在第5天，將細胞在無血清培養基中洗滌一次以移除痕量血清。將含有50 ng/ml腦衍生神經營養因子(STEMCELL Technologies)之無血清培養基(含有1% P/S及1% L-麩醯胺酸之DMEM/F-12)添加至細胞中且培育48小時。經分化之細胞(dSH-SY5Y)預備在第7天用於實驗。對於dGAE處理，使細胞暴露於1 μ M dGAE (在無攪動之情況下或在攪動之後可溶)且培育24小時。所有實驗均使用dSH-SY5Y細胞進行。

細胞活力分析

【0144】 添加dGAE之後，使用ReadyProbes[®]細胞活力成像套組(Life Technologies)量測細胞活力。該套組含有用於標記所有細胞之NucBlue[®]試劑(藍色)及僅用於標記死細胞之NucGreen[®]試劑(綠色)。對於加標籤之dGAE，使用NucRed[®]試劑標記死細胞(紅色)。如製造商方案(Life Technologies)中所描述，將一滴各試劑添加至500 μ l培養基中之細胞中。將細胞與試劑一起在37°C下培育15分鐘，且使培養基經活細胞成像溶液(Invitrogen[™], Thermo Scientific)置換。使用Zeiss Cell Observer Axiovert 200M顯微鏡對細胞進行成像。使用G 365激發濾光片及LP 420發射濾光片以及FT 395分色鏡捕獲DAPI螢光。使用FITC濾光片組(BP 450-490激發濾光片、BP 515-565發射濾光片及FT 510分色鏡)捕獲綠色螢光。所

有重複使用相同的採集裝置，且使用FIJI分析影像。每個樣本取六個視野，且每個條件分析平均4500個細胞。藉由將影像轉換為灰度，接著手動調整臨限值且將其轉換為二元影像以突出顯示活DAPI染色細胞來定量經緩衝液處理之細胞死亡比例。對細胞數目進行自動計數。以相同方式對死細胞進行計數，且細胞死亡表示為經緩衝液處理之細胞百分比。

細胞裂解及分級(fractionation)

【0145】 藉由在0.25%胰蛋白酶-EDTA (Gibco™)中培育以使細胞自蓋玻片脫離，且隨後將其與5 ml培養基混合。藉由以500 × g離心5分鐘收取細胞且丟棄上清液。將細胞沈澱再懸浮於冰冷PBS中，且在4°C下以500 × g離心。在冰上在含有Halt™蛋白酶抑制劑(Thermo Scientific)及磷酸酶抑制劑(Thermo Scientific)之1% Triton裂解緩衝液(1% Triton X-100 (v/v)、150 mM NaCl及50 mM Tris-HCl，pH 7.6)中裂解細胞15分鐘。將樣本在4°C下以16,000 × g離心30分鐘，且收集上清液(Triton可溶性級分)。將沈澱再懸浮於含有蛋白酶抑制劑及磷酸酶抑制劑之SDS裂解緩衝液(1% SDS (w/v)、150 mM NaCl及50 mM Tris-HCl，pH 7.6)中。將樣本在室溫下以16,000 × g離心30分鐘，且收集上清液(Triton不溶性級分)。根據製造商說明書，使用Pierce™ BCA蛋白質分析套組(Thermo Scientific)測定Triton可溶性級分中之蛋白質濃度。

SDS-PAGE及西方印漬

【0146】 對於細胞溶胞產物，將Triton可溶性蛋白質(20 µg)及等體積之Triton不溶性蛋白質各自與含有5% (v/v) β-巯基乙醇之Lämmli樣本緩衝液(4 ×) (Bio-Rad Laboratories)混合且在95°C下加熱5分鐘。對於重組蛋白質，在無還原劑或煮沸之情況下將3 µg與樣本緩衝液混合。將所有樣本以1000 × g離心五分鐘，且將樣本裝載至4-20% Mini-PROTEAN®預製凝膠(Bio-Rad Laboratories)中且在Tris-甘胺酸泳動緩衝液(25 mM Tris，192 mM甘胺酸，pH 8.3)中在120 V下泳動1

小時，或直至樣本緩衝液到達凝膠末端為止。對於考馬斯染色，將凝膠在雙蒸餾水中洗滌三次達5分鐘，且用Imperial™蛋白質染料(Thermo Scientific)染色1小時，且隨後在雙蒸餾水中去染色隔夜。使用HP Photosmart C5280掃描儀掃描經染色之凝膠。對於西方印漬，將凝膠上之經分離蛋白質在200 mA下轉移至硝化纖維素膜(0.45 μm) 90分鐘。在室溫下在於含有0.1% (v/v) Tween-20之Tris緩衝鹽水(50 mM Tris-HCl, pH7.4、150 mM NaCl) (TBS-T)中之5% (w/v)牛血清白蛋白(BSA)中封阻膜，搖晃1小時。將膜與在含5% BSA之TBS-T中稀釋之一級抗體一起在4°C下培育隔夜。使用以下一級抗體及稀釋液：抗Tau (多株，總Tau) (Thermo Scientific) (1:2500)、AT180 (抗pT231) (Thermo Scientific) (1:1000)、AT8 (抗pS202-T205) (1:1000) (Thermo Scientific)、抗GAPDH (1:5000) (Abcam)。第二天，在室溫下在於含5% BSA之TBS-T中之山葵過氧化酶(HRP)-抗小鼠抗體(1:5000) (Sigma-Aldrich)或HRP-抗兔抗體(1:5000) (Abcam)中培育膜1小時。在抗體培育之間，將膜在TBS-T中洗滌3×10分鐘。使用ECL受質(Clarify™, Bio-Rad)偵測免疫反應性蛋白質條帶，且使用HP Photosmart C5280掃描儀掃描X射線膠片。FIJI係用於定量任意密度單位中之條帶。測定對應於全長Tau (50-70 kDa)之條帶密度且針對GAPDH之量將其標準化。此等值係用於計算總磷酸化Tau之比例，該等比例表示為經緩衝液處理之對照組百分比。對於Triton不溶性及可溶性蛋白質之定量，分別地使用不溶性/(可溶性+不溶性)或可溶性/(可溶性+不溶性)等式計算不溶性及可溶性級分中之Tau比例，且該比例表示為各別的可溶性或不溶性對照值百分比。

免疫螢光

【0147】 自dSH-SY5Y細胞中抽吸細胞培養基且用PBS將其洗滌一次。將細胞在含4% (w/v)多聚甲醛(PFA)之PBS中固定15分鐘，接著在PBS中洗滌三次。對於透化，將細胞在含0.25% (v/v) Triton X-100之PBS中培育10分鐘。將細胞在

含2% (w/v) BSA之PBS中封阻1小時，接著在PBS中洗滌三次。將一級抗體在含2% (w/v) BSA之PBS中稀釋，且與細胞一起培育1小時。使用以下一級抗體及稀釋液：AT180 (抗pT231) (1:250) (Thermo Scientific)、AT8 (抗pS202-T205) (1:500) (Thermo Scientific)及Tau1 (S195、S198、S199及S202處之去磷酸化Tau) (Merck Millipore)。將在含2% (w/v) BSA之PBS中稀釋之細胞與山羊抗小鼠Alexa Fluor[®] 594 (1:1000) (Invitrogen™, Thermo Scientific)一起在黑暗中培育1小時。在抗體培育之間將細胞在PBS中洗滌3次。使用含有4,6-二甲脒基-2-苯基吡啶(DAPI)之Prolong Gold封固劑將細胞固定至載玻片上。將經固定之載玻片在成像前在室溫下在黑暗中儲存24-48小時，且在4°C下長期儲存。使用Leica SP8共聚焦顯微鏡對細胞進行成像。

酸性胞器之標記

【0148】 將細胞塗鋪於1.5-mm蓋玻片(Mattek)上之35-mm盤上。分化後，將dGAE-488 (5 μ M)添加至細胞中24小時。為了標記溶酶體及胞內體，將LysoTracker[®] red (Life Technologies)在培養基中以50 nM最終濃度稀釋，且在使用Leica SP8共聚焦顯微鏡成像前培育90分鐘。

共聚焦顯微術

【0149】 所有共聚焦顯微術成像均使用Leica SP8共聚焦顯微鏡進行。儀器裝置使用PMT 3及PMT Trans通道/雷射，且用HC PLAPoCs2 63 x/1.40油浸物鏡採集影像。依序掃描樣本以防止光譜滲漏。使用0.5 μ m步長收集所有影像作為所有通道之Z堆疊。各樣本取五到十個Z堆疊，且各實驗重複三次或更多次。為了監測dGAE-488之實時攝取，將環境維持在37°C及加濕CO₂下，且在整個實驗過程中使用適應性聚焦控制特點來維持恆定焦平面。

處理用於TEM的細胞

【0150】 用含有Alexa Fluor[®] 488之緩衝液或10 μ M新鮮製備之dGAE-488

處理DSH-SY5Y細胞24小時。將細胞在PBS中洗滌一次，刮入管中且以 $500 \times g$ 離心5分鐘。移除培養基，且將細胞在預熱培養基: 4% (v/v) PFA之1:1混合物中在 37°C 下懸浮15分鐘。將細胞以 $500 \times g$ 離心5分鐘，且將細胞在新鮮的含4% (v/v) PFA及0.1% (v/v) 戊二醛(GA)之0.1 M磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中在室溫下再懸浮3小時。將經固定之細胞以 $1,000 \times g$ 離心5分鐘。丟棄上清液，且將沈澱在含有50 mM 甘胺酸之PBS中在室溫下懸浮10分鐘。將細胞以 $1,000 \times g$ 離心5分鐘，且用0.1 M 二甲砷酸鹽緩衝液(pH 7.4)洗滌沈澱三次。將約200 μl 4% (w/v)低熔點瓊脂糖添加至細胞中，且立即在 30°C 下以 $1,000 \times g$ 離心10分鐘。立即將管轉移至 4°C 或在冰上20分鐘以固化瓊脂糖。將包埋瓊脂糖之細胞沈澱轉移至新管中，且用0.1 M 二甲砷酸鹽緩衝液(pH 7.4)洗滌2-3次。將沈澱在還原鐵溶液(1% (v/v)四氧化鐵、1.5% (w/v)亞鐵氰化鉀於0.1 M二甲砷酸鹽緩衝液中，pH 7.4)中在 4°C 下後固定1小時，接著在0.1 M二甲砷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中洗滌三次且在雙蒸餾 H_2O 中洗滌三次，各5分鐘。將沈澱在由30%、50%、75%、90%及95%乙醇組成之乙醇系列中在 4°C 下脫水，各15分鐘，接著在100%乙醇中在 4°C 下培育三次，各20分鐘。隨後，將樣本浸入100%乙醇:Unicryl™ 樹脂之2:1混合物中30分鐘，接著浸入100%乙醇:Unicryl™樹脂之1:2混合物(BBI Solutions)中30分鐘。最後，將沈澱轉移至BEEM囊(Agar Scientific)中，且在 4°C 下浸入完全Unicryl™樹脂中隔夜。藉由自BEEM囊下部自12 V、100 W型6834 Philips投影燈以35 cm距離照明，使用光聚合將樹脂固化48小時。在裝有Leica M80顯微鏡(Leica Microsystems)之Leica EM UC7超薄切片機上使用金剛石刀獲取超薄切片(70 nm)，且將其置放於300目Hexagon Nickel 3.05 mm網格(Agar Scientific Ltd)上，之後進行免疫金標記。

免疫金標記TEM

【0151】 在整個用於所有抗體稀釋及金探針之後續程序中使用含有1% BSA、500 $\mu\text{l/L}$ Tween-20、10 mM Na-EDTA及0.2 g/L NaN_3 之改良PBS (pH 8.2)(稱

為PBS+)。在室溫下最初使用正常山羊血清(在PBS+中稀釋1:10稀釋液；Sigma-Aldrich)封阻超薄切片30分鐘，且隨後將其與抗Alexa Fluor® 488一級抗體(1:50) (Thermo Scientific)一起培育。將切片在PBS+中洗滌三次，各2分鐘，接著將其與10 nm接合金顆粒之山羊抗兔IgG二級探針一起以1:10稀釋度在PBS+中在室溫下培育1小時。將切片在PBS+中洗滌三次，各10分鐘，且在蒸餾水中洗滌四次，各5分鐘。隨後，在TEM上成像之前，將經免疫金標記之薄片在2% (w/v)乙酸氧鉍中後染色1小時。

影像分析

【0152】 FIJI (<https://fiji.sc>)成像處理套裝(J. Schindelin等人, *Nat. Methods*, 第9卷, 第7期, 第 676–682頁, (2012年))係用於所有影像分析。為了定量螢光強度，使影像Z投影至最大強度。各條件取五至十個視野，且每個條件平均50個細胞經受分析。首先，在個別細胞周圍繪製所關注之區域(細胞體)，該個別細胞不包括具有融合細胞核之細胞。量測面積積分強度及平均灰度值以及自無螢光之細胞(背景)周圍進行之三個選擇。隨後，使用以下等式計算經校正之總細胞螢光(CTCF)：

$$CTCF = \text{積分密度} - (\text{所選細胞之面積} \times \text{背景讀數之平均螢光})$$

【0153】 為了定量經內化之dGAE-488，選擇含有最大DAPI螢光之細胞中間之焦平面且其經受分析。

數據分析

【0154】 使用Microsoft Excel及GraphPad Prism 7執行數據及統計分析。所有數據均表示為平均值±平均值之標準差(SEM)。當比較兩組時，使用伴隨Welch氏校正之司徒頓未經配對t檢定(Student's unpaired t-test)來測定統計顯著性。當比較超過兩個組時，使用伴隨鄧奈特事後檢定(Dunnet's post-hoc test)之單因素方差分析(ANOVA)來測定實驗組與對照組之間的差異。若 $p < 0.05$ ，則差異視為統計

學上顯著的。

實例1：檢驗藉由dGAE及dGAE-488進行之原纖維形成

【0155】 使用Alexa-fluor 488標籤(dGAE-488)對可溶性dGAE進行螢光標記以使得能夠監測dGAE組裝之內化且區分外源性dGAE與內源性表現之Tau。平均而言，在每次標記反應之後，每莫耳蛋白質有0.1莫耳488染料。Alexafluor標籤標記在N末端處及在離胺酸殘基上之胺基，且因此吾等使用TEM、SDS-PAGE及CD光譜法檢驗加標籤及未加標籤之dGAE以判定標記是否影響聚集及/或絲形成。使用先前建立之用於聚集之非還原條件(Al-Hilaly等人, *J. Mol. Biol.*, 第429卷, 第23期, 第3650-3665頁(2017年))，dGAE及dGAE-488產生形態上類似之短扭曲原纖維(圖1A)。dGAE及dGAE-488之SDS-PAGE顯示10/20-kDa及12/24-kDa形式(單體/二聚體)之存在，其中後者在0小時在未經攪動之dGAE製劑中佔主導。吾等先前已表明，dGAE在0小時為無規捲曲且主要由SDS可溶性單體及二聚體組成，但溶液可能含有低分子量物質之混合物。隨著時間推移，dGAE自組裝以形成富含 β 摺疊之絲(Al-Hilaly等人, *J. Mol. Biol.*, 第429卷, 第23期, 第3650-3665頁(2017年))。dGAE-488製劑顯示在0小時二聚體條帶之略微地增加之強度。在0小時及72小時蛋白質之電子顯微圖顯示dGAE及dGAE-488製劑中尺寸類似之物質(圖S1)，其中在0小時圓形物質之直徑範圍為10-80 nm (圖S1Aii)且在72小時原纖維之長度範圍為20-350 nm (圖S1Bii)。藉由攪動誘導原纖維化72小時之後，與dGAE-488相比，dGAE之12-kDa單體形式較少，且兩種製劑中之更多者保留在凝膠孔中(Al-Hilaly等人, *J. Mol. Biol.*, 第429卷, 第23期, 第3650-3665頁(2017年))。兩種製劑之CD光譜類似，其中在0小時198 nm處之最小強度(主要為無規捲曲構形)類似，且無規捲曲信號預期最遲在72小時之前減少，此伴隨著不溶性 β 摺疊結構增加，其中最小值係在218 nm周圍。吾等先前已表明，離心之後，沈澱中之218 nm處之 β 摺疊信號將其與上清液分離(Al-Hilaly等人, *J. Mol. Biol.*, 第

429卷, 第23期, 第3650-3665頁(2017年))。所呈現之結果顯示, dGAE及dGAE-488形成結構及形態上類似之原纖維。

實例2：研究dGAE對細胞死亡之誘發

【0156】 將經聚集之dGAE (100 μ M, 攪動72小時)及可溶性dGAE (100 μ M 0小時, 無攪動)以1 μ M濃度直接施用至dSH-SY5Y細胞且培育24小時。24小時後使用ReadyProbes[®]分析量測細胞活力, 從而量測細胞死亡(圖2A)。儘管與緩衝液處理相比, 歸因於可溶性dGAE之死細胞百分比在某種程度上增加, 但此並未達到統計顯著性(圖2B)。與僅緩衝液對照($21.6 \pm 1.6\%$)相比, 與經聚集之dGAE一起培育後細胞死亡顯著地增加($34 \pm 2.9\%$, $p < 0.0001$)。培育24小時後, 將可溶性dGAE之濃度增加至20 μ M不產生細胞死亡之進一步增加(圖S2)。在將細胞與1 μ M可溶性或經聚集蛋白質一起培育之後, dGAE及dGAE-488對細胞死亡顯示相當效應, 但dGAE-488之可溶性形式略更具毒性, 但在72小時原纖維化之後不具有差異。結果顯示, 胞外施用之經聚集之dGAE而非可溶性dGAE誘發急性細胞死亡。

實例3：dGAE-488內化

【0157】 研究dSH-SY5Y細胞對可溶性及經聚集dGAE之攝取以檢驗聚集狀態是否影響內化效率。經標記之dGAE-488形式係用於准許觀察及量測攝取, 校正總細胞螢光。將可溶性或經聚集(72小時) dGAE-488與dSH-SY5Y細胞一起以1 μ M培育24小時。共聚焦顯微鏡分析顯示, 在暴露於可溶性dGAE-488之後, 在細胞內觀測到呈點狀染色形式之螢光(圖3A)。經聚集之dGAE-488之內化效率顯著地低於可溶性形式(474 ± 96 相對於 $1,114 \pm 67$ AU/個細胞, $p < 0.0001$; 圖3B), 且可在細胞外部觀測到更大之dGAE-488螢光積聚。活細胞成像係用於監測可溶性dGAE-488之內化。一些dGAE-488保留在細胞外部且隨著時間推移增加亮度及尺寸, 此與培養基中之一些持續組裝一致。培育2小時之後, 可在神經元內偵測

到經內化之dGAE-488，且發現攝取隨時間推移而增加(圖3C)。最遲在24小時之前，觀測到明顯的點狀染色模式以及更大的核周積聚(圖3C及圖3D)。儘管活細胞成像之時間間隔不允許對胞內輸送進行詳細檢驗，但觀測到經內化之dGAE-488正在沿過程運輸。結果顯示，經標記之dGAE-488經dSH-SY5Y細胞內化。

實例4：dGAE內化後之磷酸化變化

【0158】 本文所呈現之結果表明，與經聚集之dGAE一起培育在僅培育24小時之後會導致大量細胞死亡，而可溶性dGAE經內化，但在培育24小時之後似乎不具有顯著毒性。因此，進一步研究經內化之可溶性dGAE-488是否能夠改變內源性Tau之聚集或磷酸化狀態。暴露於可溶性1 μ M dGAE-488之後，使用辨識dGAE序列外部之Tau抗原決定基之抗體固定細胞且進行免疫標記，從而允許僅特異性偵測內源性Tau (圖4A-C)。檢驗細胞之經內化之dGAE-488及內源性Tau之共定位，且對各抗體定量個別細胞內細胞體中之經標記Tau的螢光強度。用AT180 (Tau在T231處磷酸化；pT231)及AT8 (Tau在202-205處磷酸化；pS202-pT205)進行之標記在經緩衝液處理之細胞中很大程度上不存在，但在與可溶性dGAE-488一起培育之後顯著地增加，其中一些細胞顯示dGAE-488與磷酸化內源性Tau之共定位(圖4A、圖4B)。吾等先前已表明，在dSH-SY5Y細胞之細胞核中發現使用Tau-1抗體偵測到之胺基酸192-204之間的去磷酸化Tau (Maina等人, Acta Neuropath.Comm, 第6卷第70期, 第1-13頁(2018年))。在此處，吾等識別出如所預期之細胞核中之Tau-1標記，但發現與dGAE-488不存在共定位。Tau-1螢光之定量顯示，經dGAE-488處理之細胞中之螢光強度顯著地降低(圖4C)，此可能指示Tau經磷酸化。結果顯示，經內化之dGAE-488引起內源性Tau之磷酸化增加。

實例5：細胞暴露於可溶性dGAE-488之效應

【0159】 執行全細胞溶胞產物之西方墨點法以檢驗經外源性施用之dGAE

對內源性Tau磷酸化抗原決定基的效應。與可溶性dGAE一起培育之細胞與經緩衝液處理之對照細胞的比較顯露，總Tau含量無變化，且AT8或AT180免疫反應性之邊緣增加未達到統計顯著性。儘管西方墨點法量測細胞內磷酸化Tau之總含量，但免疫螢光成像能夠突出顯示亞細胞定位之任何增加。為了測定經內化之可溶性dGAE-488對神經元中之內源性Tau溶解度的效應，吾等在用1% Triton X-100溶解且離心(16,000 g達30分鐘)之後自細胞溶胞產物中依序萃取Tau蛋白質。與可溶性dGAE一起培育24小時之後，與經緩衝液處理之對照相比，在與可溶性dGAE一起培育之後經來自Triton-X 100可溶性級分至Triton-X 100不溶性級分之AT180免疫標記的Tau蛋白質存在明顯的重新分佈。dGAE培育引起對AT180具有免疫反應性之可溶性Tau減少($83.0 \pm 5.5\%$, $p = 0.0201$)及不溶性形式增加($139.4 \pm 14.5\%$, $p = 0.0352$) (圖5A、圖5B)。出乎意料地，在經緩衝液處理之對照之不溶性級分中觀測到少量Tau，但對照細胞與經處理細胞之間的差異係顯著的。此外，在不溶性級分中出現了新的經截短Tau物質，該物質之凝膠遷移率為20-25-kDa，其抗原決定基位於Tau分子之N端那一半中。此在與dGAE一起培育之細胞中比單獨緩衝液情況下更強烈。結果顯示，細胞暴露於可溶性dGAE-488會引起triton不溶性內源性Tau增加。

實例6：經內化之dGAE-488之定位

【0160】 在神經元暴露於可溶性dGAE-488達24小時之後，在靠近細胞核之細胞質內觀測到胞內螢光點狀顆粒。此染色模式與其在細胞質囊泡中之定位一致。因此，吾等檢驗了經內化之dGAE-488是否定位至胞內體/溶酶體隔室。將可溶性dGAE-488與細胞一起培育24小時，且用LysoTracker[®] (標記酸性胞器(溶酶體及晚期胞內體)之染料)染色30分鐘，且隨後固定且藉由共聚焦顯微鏡加以觀察。與經緩衝液處理之對照細胞相比，暴露於可溶性dGAE-488之細胞中之LysoTracker[®]螢光強度顯著地增加($211.9 \pm 9.9\%$, $p < 0.0001$ ；圖6Ai、圖6Aii)。

在使用皮爾遜相關係數在Z堆疊中進行定量之後，經內化之dGAE-488顯示與LysoTracker[®]之強烈共定位(0.8382 ± 0.036 ， $p < 0.0001$ ；圖6Bi、圖6Bii)。結果顯示，經內化之dGAE-488定位至核周酸性囊泡。

實例7：細胞內經積聚Tau及dGAE-488之超微結構

【0161】 使用TEM來檢驗細胞內經積聚Tau及dGAE-488之超微結構。dSH-SY5Y暴露於10 μ M可溶性dGAE-488達24小時，且使用針對Alexa Fluor[®] 488之抗體進行處理以用於免疫金TEM，從而特異性標記dGAE-488。在切片細胞內觀測到囊泡結構及粒線體，從而確認TEM方案保留細胞結構(圖7A)。儘管在細胞質中不存在明顯的經抗488標記之原纖維狀結構，但在較高放大率下之檢驗顯露，在膜結合囊泡結構內存在經抗488密集標記之顆粒，從而表明此等胞器中存在488標記蛋白質之積聚(圖7C)。類似囊泡結構亦存在於經媒劑處理之細胞中，但缺乏金標記。用於比較膜結合隔室之直徑之分析顯示，經dGAE-488處理之神經元細胞含有直徑大於經緩衝液處理之對照細胞的囊泡(448.4 ± 22.5 nm相對於 303.7 ± 20.0 nm， $p < 0.0001$)，其中最大囊泡為700-800 nm且最小囊泡為200-300 nm (圖7B)。結果顯示，經內化之dGAE-488經封裝在囊泡隔室中。

實例8：測試藥劑對神經元細胞內Tau蛋白質聚集物之作用的效應

【0162】 將SHSY5Y細胞塗鋪於24孔盤中(30,000個細胞/孔)，且如先前所描述在耗盡血清培養基中使用視黃酸進行分化，或保持未經分化。以下列方式中之一種處理細胞：(1)在添加Tau聚集物之前，在所關注之藥劑存在之情況下進行預培育，或(2)與同時投予之所關注之藥劑及Tau聚集物一起共培育。各階段之培育時間為24小時，此意味著(1)之總時間為48小時且(2)之總時間為24小時。將dGAE-488 (1 μ M)與細胞一起培育24小時足以見到經內化之蛋白質。培育後，對細胞進行攝影且使用ImageJ執行影像分析以定量細胞體內之螢光強度，從而提供dGAE-488內化之量度。對細胞數目進行計數以將內化水平表示為平均螢光強度/

細胞，以將視野中之不同細胞數目考慮進去。以1 μ M添加dGAE-488片段。可最初以10 μ M之單一濃度測試用於篩選之藥劑；隨後，以2 μ M下至20 nM之濃度範圍測試顯示抑制活性之藥劑，且化合物之活性經報告為觀測到50%活性抑制時之濃度。待量測之活性包括：(i)藉由胞內螢光量測之Tau內化；(ii)藉由收取細胞、將其裂解且藉由超速離心分離經聚集之Tau以及藉由用抗Tau抗體進行免疫墨點法量測經聚集之Tau來測量之Tau胞內聚集；及(iii)使用用於量測細胞死亡之ReadyProbes[®]分析量測之細胞毒性(圖2A)。將活性全部對不經藥劑處理或經處理媒劑處理之細胞所獲得之結果進行標準化。與不同藥劑相比，與2 μ M或更低之藥劑展現出50%抑制之化合物視為具有活性及相對活性。

實例9：活體外Tau聚集抑制分析

【0163】 將dGAE蛋白質與單株抗體s1D12一起以4:1蛋白質:Ab比(100 μ M dGAE + 25 μ M s1D12及10 μ M dGAE + 2.5 μ M s1D12)或1:1蛋白質:Ab比(25 μ M dGAE + 25 μ M s1D12)稀釋至10 mM磷酸鹽緩衝液pH 7.4 (PB)中。

【0164】 「s1D12」係指2020年7月10日提出申請之英國申請案第GB2010652.2號及2021年7月9日以WisTa Laboratories Ltd名義提出申請之國際(PCT)申請案中所揭示之單株抗體，該等案兩者均特此以全文引用之方式併入。在本文中稱為「S1D12」之特異性結合分子之CDR所結合之抗原決定基可處於包含SEQ ID NO: 1之殘基337至349之胺基酸序列內或較佳地處於包含SEQ ID NO: 1之殘基341至353之胺基酸序列內。抗原決定基可包含SEQ ID NO: 8 (VEVKSEKLDFKDR)之胺基酸序列。S1D12包含CDR VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2及VLCDR3，其中該等CDR中之各者包含如下胺基酸序列：

VHCDR1包含SEQ ID NO: 9 (NNAVG)中所闡述之序列；

VHCDR2包含SEQ ID NO: 10 (GCSSDGTCYYNSALKS)中所闡述之序列；

VHCDR3包含SEQ ID NO: 11 (GHYSIYGYDYLGTIDY)中所闡述之序列；
VLCDR1包含SEQ ID NO: 12 (SGSSSNVGGGNSVG)中所闡述之序列；
VLCDR2包含SEQ ID NO: 13 (DTNSRPS)中所闡述之序列；且
VLCDR3包含SEQ ID NO: 14 (VTGDSTTHDDL)中所闡述之序列。

【0165】 s1D12可包含：

- (a) 包含SEQ ID NO: 15 (QVQLQESGPSLVKPSQTLSTCTVSGFSLNNNAVGWV
RQAPGKVPESLVGCSSDGTCYYNSALKSRLDITRDTSKNQISLSLSSVTDDA
AVYYCTRGHYSIYGYDYLGTIDYWGPGLLVTVSS)中所闡述之序列之VH域；
及/或
- (b) 包含SEQ ID NO: 16 (QAVLTQPSSVSGSLGQRV SITCSGSSSNVGGGNSVGW
YQHLPGSGLKTHIYDTNSRPSGVPDRFSGSRSGNTATLTINSLQAEDEGDYYCV
TGDSTTHDDLVGSGTRLTVLG)中所闡述之序列之VL域；
或其任一者之人類化變異體。

【0166】 s1D12可包含：

- (a) 包含SEQ ID NO: 17 (QVQLQESGPSLVKPSQTLSTCTVSGFSLNNNAVGWV
RQAPGKVPESLVGCSSDGTCYYNSALKSRLDITRDTSKNQISLSLSSVTDDA
AVYYCTRGHYSIYGYDYLGTIDYWGPGLLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDT
TGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTS
STWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPP
KIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYN
STLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVY
VLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS
DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK)中 所
闡述之序列之重鏈；及/或

(b) 包含SEQ ID NO: 18 (QAVLTQPSSVSGSLGQRV SITCSGSSSNVGGGNSVGW
YQHLPGLKTHIYDTNSRPSGVPDRFSGSRSGNTATLTINSLQAEDEGDYYCV
TGDSTTHDDLVGSGTRLTVLGGQPKSSPSVTLFPPSSEELETNKATLVCTITDF
YPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNNKYM ASSYLTLTARAWERHS
SYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS)中所闡述之序列之輕鏈；
或其任一者之人類化變異體。

【0167】 以10、25或100 μM 於10 mM PB中之最終濃度製備dGAE作為陽性對照。陰性對照由呈4:1比率之dGAE及非Tau IgG抗體(10 μM dGAE + 2.5 μM 抗卵白蛋白)或單獨抗體(25或2.5 μM s1D12及2.5 μM 抗卵白蛋白)組成。將樣本在37°C下以700 rpm攪動3天。

【0168】 穿透式電子顯微術(TEM)、圓偏光二色性(CD)及硫代黃素S (ThS)分析係如Al-Hilaly等人 (2018) J. Mol. Biol.430, 4119-4131中所描述來執行。簡言之，藉由將4 μL 樣本添加至碳塗布網格中，接著用milli-Q過濾水洗滌，隨後用2%乙酸氧鈾染色兩次來製備TEM網格。對網格進行空氣乾燥且隨後使用在80 kV下操作之JEOL電子顯微鏡使其成像。

【0169】 對於CD，將60 μL 樣本置放於0.1 mm石英比色管中且置放至JASCO分光偏振計中。將含100 μL ThS之20 mM MOPS緩衝液添加至50 μL 各樣本中以達到20 μM 最終濃度，充分混合，在室溫下培育10分鐘，隨後在Cary Eclipse分光光度計中使用440 nm激發波長量測螢光強度。自CD及ThS量測結果減去10 mM PB之基線讀數。

【0170】 此三項實驗之發現指示，s1D12活體外抑制dGAE組裝至原纖維中。

【0171】 首先，在使用低至10 μM 濃度之樣本中藉由TEM容易地觀測到dGAE原纖維；在s1D12存在之情況下在相同濃度下，不存在原纖維，此表明對

組裝之抑制。當使用相同莫耳比之dGAE:Ab及非Tau抗體時存在原纖維，此表明抑制作用係特異性的。

【0172】 圓偏光二色性報告於溶液中之蛋白質之二級結構特徵。儘管10及25 μM dGAE之濃度過低而無法使用CD觀測到，且信號以來自抗體結構之預期特徵 β 摺疊信號為主。在100 μM dGAE時，當自dGAE信號減去抗體CD信號時，會顯露無規捲曲確認。此進一步指示，對於呈4:1比率之s1D12:dGAE，dGAE無法組裝至富含 β 摺疊之原纖維中。

【0173】 最後，硫代黃素S係用於報導原纖維之存在。ThS為結合至類澱粉蛋白(亦即dGAE原纖維中之基礎結構)的染料，且當以440 nm波長之光激發時發出約483 nm特徵波長之螢光。對於25及100 μM dGAE原纖維，可清楚地觀測到陽性信號。然而，當與s1D12一起以4:1或1:1之比例培育時，此信號經消除，此支援先前觀測結果，亦即當dGAE與s1D12一起培育時不存在原纖維。

【0174】 總而言之，此等結果提供以下證明：(i) s1D12特異性抑制dGAE組裝至原纖維中及(ii)此等分析可用於測定其他抗體在擾亂原纖維形成方面之抑制活性，該等原纖維強烈地類似於存在於阿茲海默症之Tau病理特徵中之經配對螺旋絲。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 新加坡商威斯塔實驗室公司

<120> 用於研究Tau聚集的系統

<130> P136457WO

<140> 110125335

<141> 2021-07-09

<150> GB2010620.9

<151> 2020-07-10

<160> 18

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1

<211> 441

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

<210> 2
<211> 758
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His

202530

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
354045

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
505560

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65707580

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
859095

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100105110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Glu Pro Glu Ser
115120125

Gly Lys Val Val Gln Glu Gly Phe Leu Arg Glu Pro Gly Pro Pro Gly
130135140

Leu Ser His Gln Leu Met Ser Gly Met Pro Gly Ala Pro Leu Leu Pro
145150155160

Glu Gly Pro Arg Glu Ala Thr Arg Gln Pro Ser Gly Thr Gly Pro Glu
165170175

Asp Thr Glu Gly Gly Arg His Ala Pro Glu Leu Leu Lys His Gln Leu
180185190

Leu Gly Asp Leu His Gln Glu Gly Pro Pro Leu Lys Gly Ala Gly Gly
195200205

Lys Glu Arg Pro Gly Ser Lys Glu Glu Val Asp Glu Asp Arg Asp Val
210215220

Asp	Glu	Ser	Ser	Pro	Gln	Asp	Ser	Pro	Pro	Ser	Lys	Ala	Ser	Pro	Ala
225					230					235					240
Gln	Asp	Gly	Arg	Pro	Pro	Gln	Thr	Ala	Ala	Arg	Glu	Ala	Thr	Ser	Ile
				245					250					255	
Pro	Gly	Phe	Pro	Ala	Glu	Gly	Ala	Ile	Pro	Leu	Pro	Val	Asp	Phe	Leu
			260					265					270		
Ser	Lys	Val	Ser	Thr	Glu	Ile	Pro	Ala	Ser	Glu	Pro	Asp	Gly	Pro	Ser
	275						280					285			
Val	Gly	Arg	Ala	Lys	Gly	Gln	Asp	Ala	Pro	Leu	Glu	Phe	Thr	Phe	His
	290					295					300				
Val	Glu	Ile	Thr	Pro	Asn	Val	Gln	Lys	Glu	Gln	Ala	His	Ser	Glu	Glu
305					310					315					320
His	Leu	Gly	Arg	Ala	Ala	Phe	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Pro	Glu
				325					330					335	
Ala	Arg	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Glu	Asp	Thr	Lys	Glu	Ala	Asp	Leu	Pro
			340					345					350		
Glu	Pro	Ser	Glu	Lys	Gln	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Arg	Gly	Lys	Pro	Val
	355						360					365			
Ser	Arg	Val	Pro	Gln	Leu	Lys	Ala	Arg	Met	Val	Ser	Lys	Ser	Lys	Asp
	370					375					380				
Gly	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Thr	Ser	Thr	Arg	Ser	Ser
385					390					395					400
Ala	Lys	Thr	Leu	Lys	Asn	Arg	Pro	Cys	Leu	Ser	Pro	Lys	His	Pro	Thr
				405					410					415	
Pro	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ile	Gln	Pro	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Cys

420 425 430

Pro Glu Pro Pro Ser Ser Pro Lys Tyr Val Ser Ser Val Thr Ser Arg
435 440 445

Thr Gly Ser Ser Gly Ala Lys Glu Met Lys Leu Lys Gly Ala Asp Gly
450 455 460

Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys
465 470 475 480

Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro
485 490 495

Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser
500 505 510

Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
515 520 525

Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala
530 535 540

Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu
545 550 555 560

Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys
565 570 575

Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val
580 585 590

Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys
595 600 605

Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
610 615 620

Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly
625 630 635 640

Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val
645 650 655

Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly
660 665 670

Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile
675 680 685

Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp
690 695 700

His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr
705 710 715 720

Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met
725 730 735

Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser
740 745 750

Leu Ala Lys Gln Gly Leu
755

<210> 3
<211> 97
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

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

Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly
20 25 30

Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu
35 40 45

Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp
50 55 60

Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His
65 70 75 80

Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala
85 90 95

Glu

<210> 4
<211> 95
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

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

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

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
35 40 45

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
50 55 60

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu
65 70 75 80

Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu

859095

<210> 5
<211> 94
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
151015

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
202530

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
354045

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
505560

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu
65707580

Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala
8590

<210> 6
<211> 73
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys
151015

Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val
202530

Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys

35 40 45

Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys
50 55 60

Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
65 70

<210> 7
<211> 71
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

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

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

Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly
35 40 45

Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile
50 55 60

Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
65 70

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> S1D12抗原決定基

<400> 8

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
1 5 10

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VHCDR1 S1D12

<400> 9

Asn Asn Ala Val Gly
1 5

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VHCDR2 S1D12

<400> 10

Gly Cys Ser Ser Asp Gly Thr Cys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VHCDR3 S1D12

<400> 11

Gly His Tyr Ser Ile Tyr Gly Tyr Asp Tyr Leu Gly Thr Ile Asp Tyr
1 5 10 15

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

<220>

<223> VLCDR1 S1D12

<400> 12

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Val Gly Gly Gly Asn Ser Val Gly
1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VLCDR2 S1D12

<400> 13

Asp Thr Asn Ser Arg Pro Ser
1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VLCDR3 S1D12

<400> 14

Val Thr Gly Asp Ser Thr Thr His Asp Asp Leu
1 5 10

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH域S1D12

<400> 15

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Asn
20 25 30

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

Val Gly Cys Ser Ser Asp Gly Thr Cys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Asp Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Ile Ser Leu
65 70 75 80

Ser Leu Ser Ser Val Thr Thr Asp Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Gly His Tyr Ser Ile Tyr Gly Tyr Asp Tyr Leu Gly Thr Ile Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Pro Gly Leu Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL域S1D12

<400> 16

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

Arg Val Ser Ile Thr Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Val Gly Gly Gly
20 25 30

Asn Ser Val Gly Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Ser Gly Leu Lys Thr
35 40 45

Ile Ile Tyr Asp Thr Asn Ser Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Arg Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Val Thr Gly Asp Ser Thr
85 90 95

Thr His Asp Asp Leu Val Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 17
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> S1D12重鏈

<400> 17

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Asn
20 25 30

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

Val Gly Cys Ser Ser Asp Gly Thr Cys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Asp Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Ile Ser Leu
65 70 75 80

Ser Leu Ser Ser Val Thr Thr Asp Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Gly His Tyr Ser Ile Tyr Gly Tyr Asp Tyr Leu Gly Thr Ile Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Pro Gly Leu Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
115 120 125

Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly
130 135 140

Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val
180 185 190

Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val
195 200 205

Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg
210 215 220

Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
245 250 255

Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
275 280 285

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
355 360 365

Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
370 375 380

Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
385 390 395 400

Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
420 425 430

Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
435 440 445

Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450

<210> 18
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> S1D12輕鏈

<400> 18

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

Arg Val Ser Ile Thr Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Val Gly Gly Gly
20 25 30

Asn Ser Val Gly Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Ser Gly Leu Lys Thr
35 40 45

Ile Ile Tyr Asp Thr Asn Ser Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Arg Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Val Thr Gly Asp Ser Thr
85 90 95

Thr His Asp Asp Leu Val Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
115 120 125

Glu Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp
130 135 140

Phe Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro
145 150 155 160

Val Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
165 170 175

Lys Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu
180 185 190

Arg His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val
195 200 205

Glu Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
210 215

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種篩選有效抑制Tau蛋白質片段對神經元細胞之細胞毒性之藥劑的方法，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該方法包含以下步驟：

- (a) 在該藥劑存在之情況下培養該神經元細胞，且隨後在肝素不存在之情況下與該Tau蛋白質片段一起培養該神經元細胞；或
- (b) 在肝素不存在之情況下與該Tau蛋白質片段一起培養該神經元細胞，且隨後在該藥劑存在之情況下培養該神經元細胞；及
- (c) 在執行步驟(a)或步驟(b)之後測定該Tau蛋白質片段對該神經元細胞之細胞毒性。

【請求項2】一種篩選有效抑制Tau蛋白質片段之內化之藥劑的方法，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該方法包含以下步驟：

- (a) 在該藥劑存在之情況下培養神經元細胞，且隨後在肝素不存在之情況下與該Tau蛋白質片段一起培養該神經元細胞；或
- (b) 在肝素不存在之情況下與該Tau蛋白質片段一起培養神經元細胞，且隨後在該藥劑存在之情況下培養該神經元細胞；及
- (c) 在執行步驟(a)或步驟(b)之後測定該神經元細胞內該Tau蛋白質片段之內化。

【請求項3】一種篩選有效擾亂Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之交互作用之藥劑的方法，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該方法包含以下步驟：

- (a) 在該藥劑存在之情況下培養神經元細胞，且隨後在肝素不存在之情況下與該Tau蛋白質片段一起培養該神經元細胞；或
- (b) 在肝素不存在之情況下與該Tau蛋白質片段一起培養神經元細胞，且隨後在該

藥劑存在之情況下培養該神經元細胞；及

(c) 在執行步驟(a)或步驟(b)之後測定該神經元細胞中該Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之交互作用程度。

【請求項4】如請求項1至3中任一項之方法，其中根據本發明使用之如上文所定義之該Tau蛋白質片段的長度可為70至97個胺基酸，視情況長度可為71至97個胺基酸。

【請求項5】如請求項4之方法，其中該Tau蛋白質片段係選自以下者之群：長度為71、73、94、95、97個胺基酸的片段。

【請求項6】如請求項1至3中任一項之方法，其中包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸之該Tau蛋白質片段係選自由以下者組成之群：具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 7中所描述之胺基酸序列或與其具有至少85%一致性之序列的Tau蛋白質片段。

【請求項7】一種用於篩選有效抑制Tau蛋白質片段之細胞毒性之藥劑的系統，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該系統包含(i)神經元細胞株；(ii)Tau蛋白質片段，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸；及(iii)藥劑庫(library)；其中該神經元細胞株不含肝素。

【請求項8】一種用於篩選有效抑制Tau蛋白質片段之內化之藥劑的系統，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該系統包含(i)神經元細胞株；(ii) Tau蛋白質片段，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸；及(iii)藥劑庫；其中該神經元細胞株

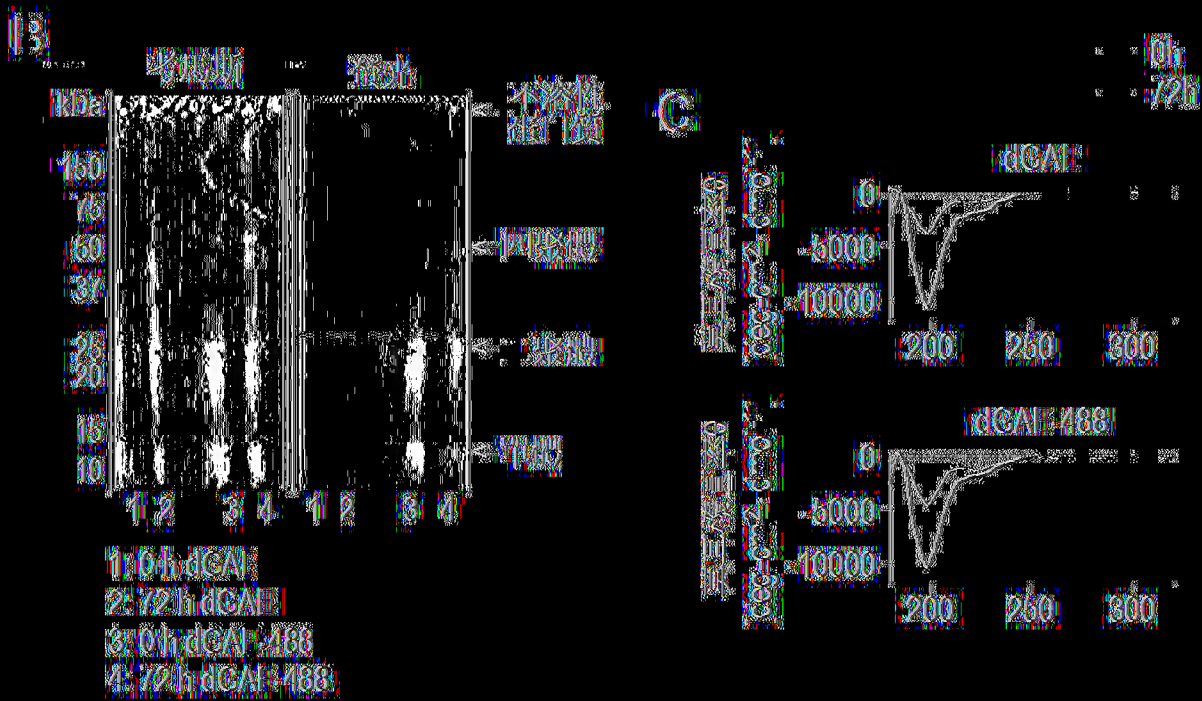
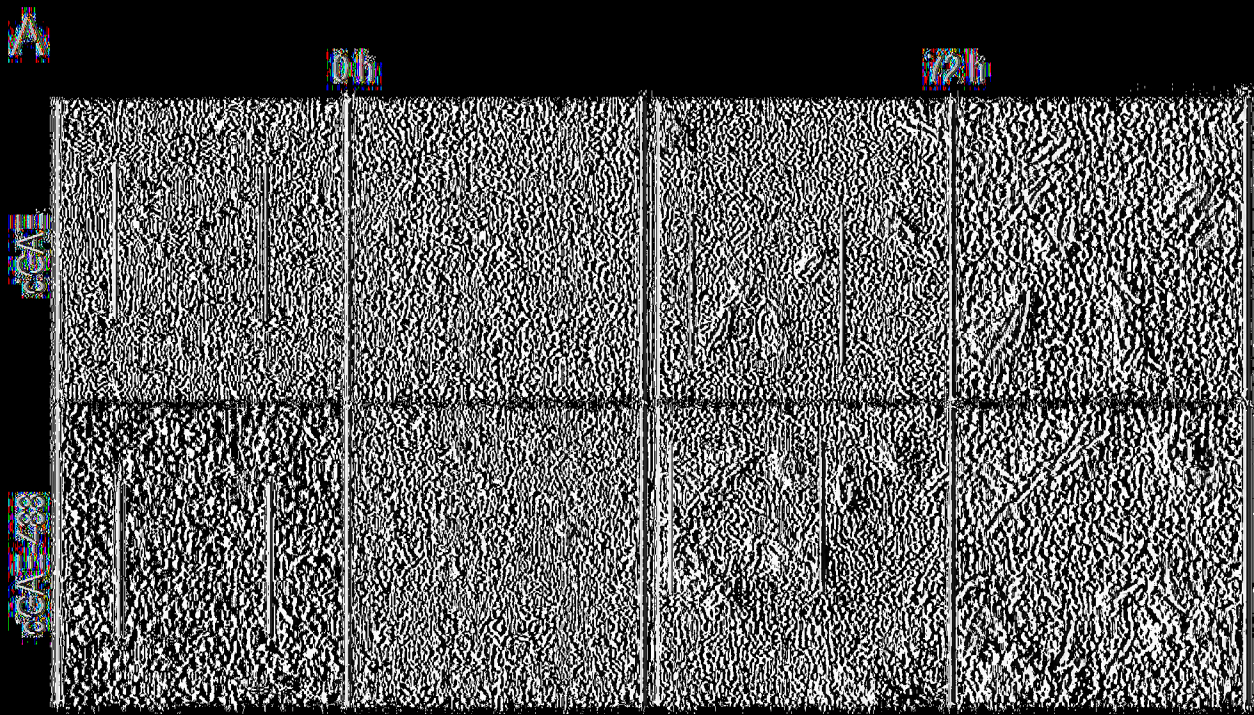
不含肝素。

【請求項9】一種用於篩選有效擾亂Tau蛋白質片段與內源性Tau蛋白質之交互作用之藥劑的系統，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸，該系統包含(i)神經元細胞株；(ii)Tau蛋白質片段，該Tau蛋白質片段包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸；及(iii)藥劑庫；其中該神經元細胞株不含肝素。

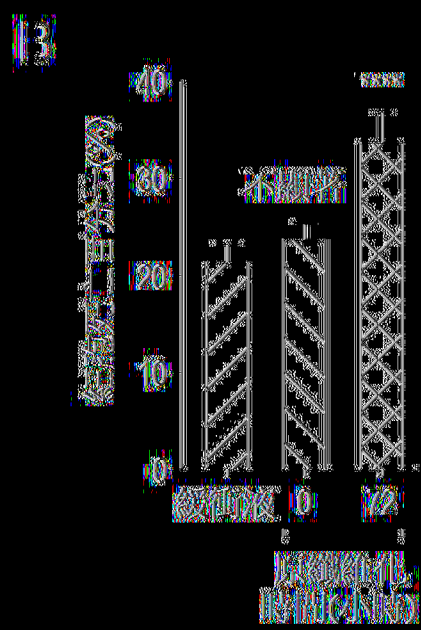
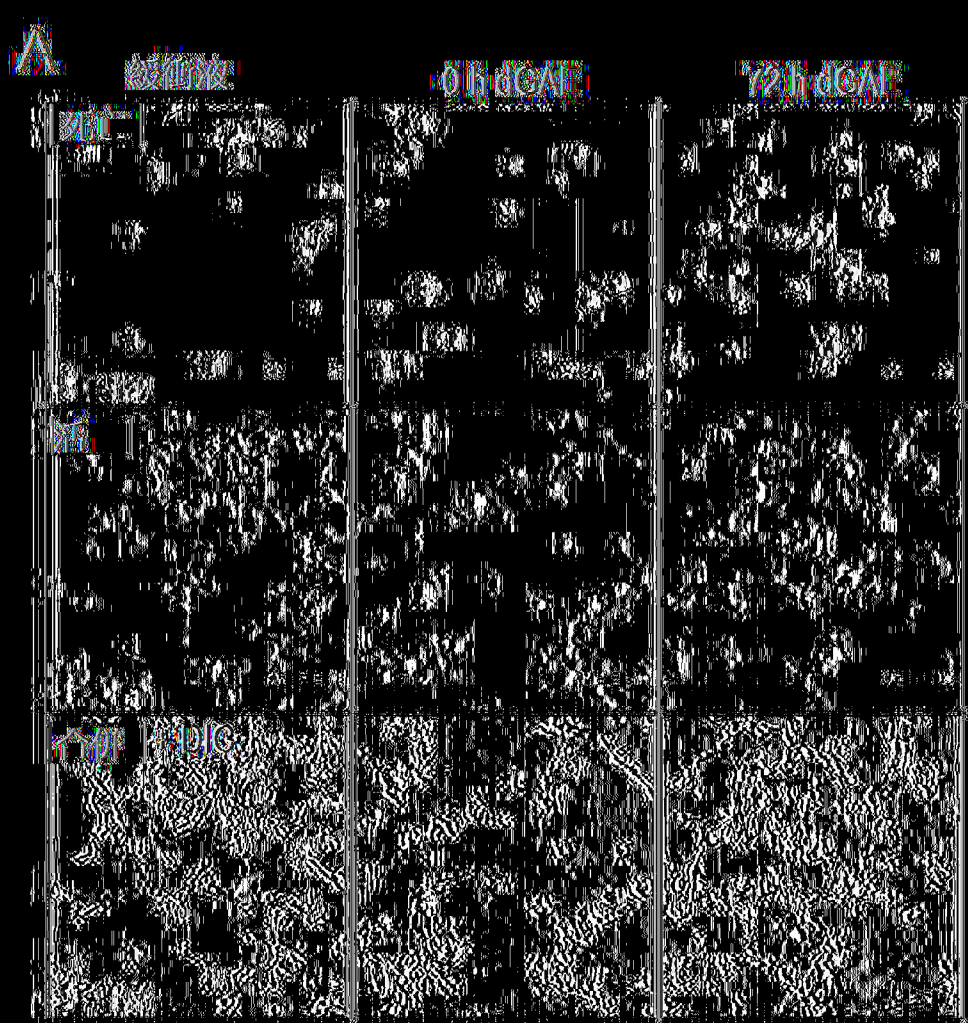
【請求項10】如請求項7至9中任一項之系統，其中根據本發明使用之如上文所定義之該Tau蛋白質片段的長度可為70至97個胺基酸，視情況長度可為71至97個胺基酸。

【請求項11】如請求項10之系統，其中該Tau蛋白質片段係選自以下者之群：長度為71、73、94、95、97個胺基酸的片段。

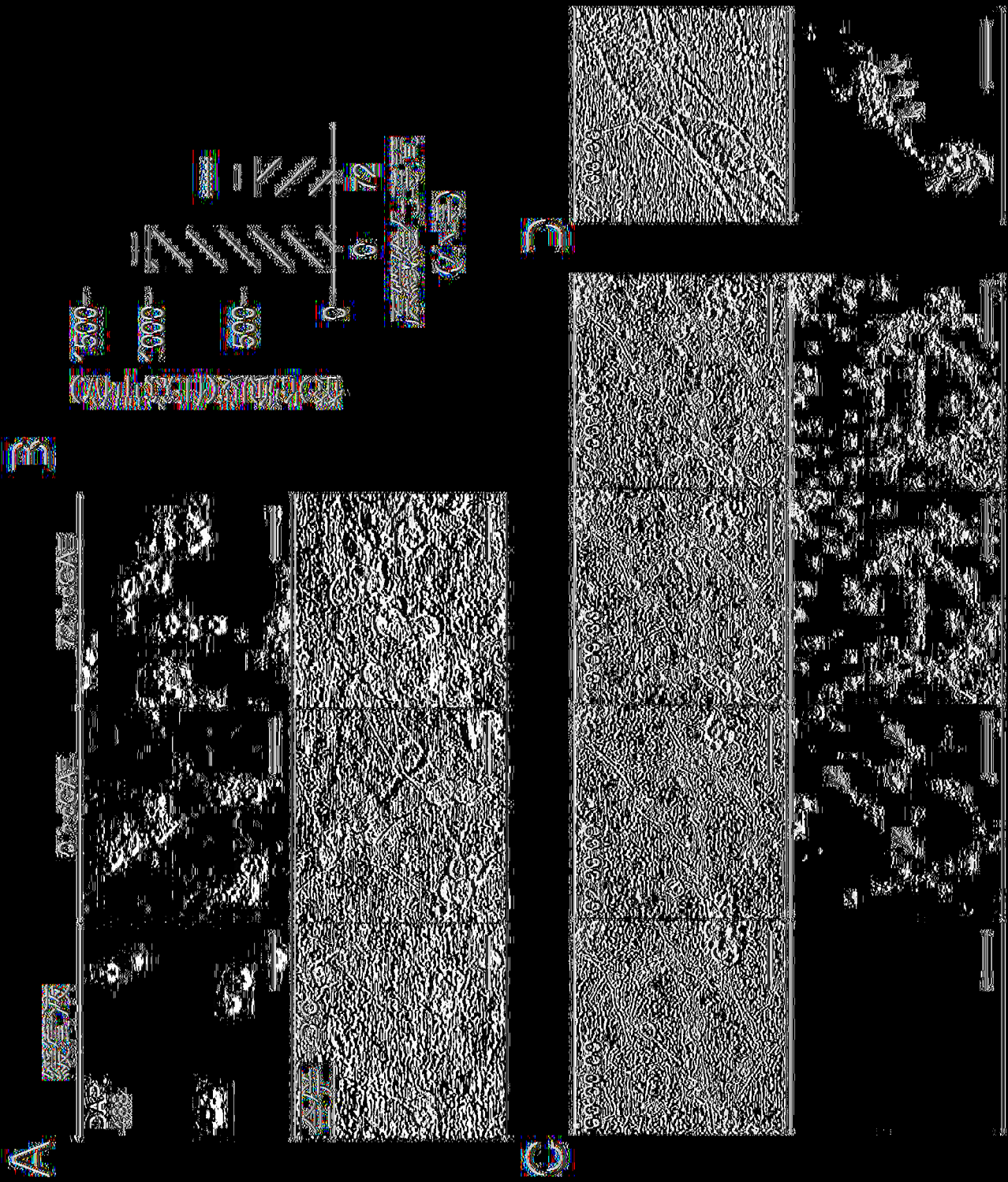
【請求項12】如請求項7至9中任一項之系統，其中包含dGAE95之胺基酸序列(SEQ ID NO:4)或與其具有至少85%一致性之序列中的至少70個胺基酸之該Tau蛋白質片段係選自由以下者組成之群：具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 7中所描述之胺基酸序列或與其具有至少85%一致性之序列的Tau蛋白質片段。



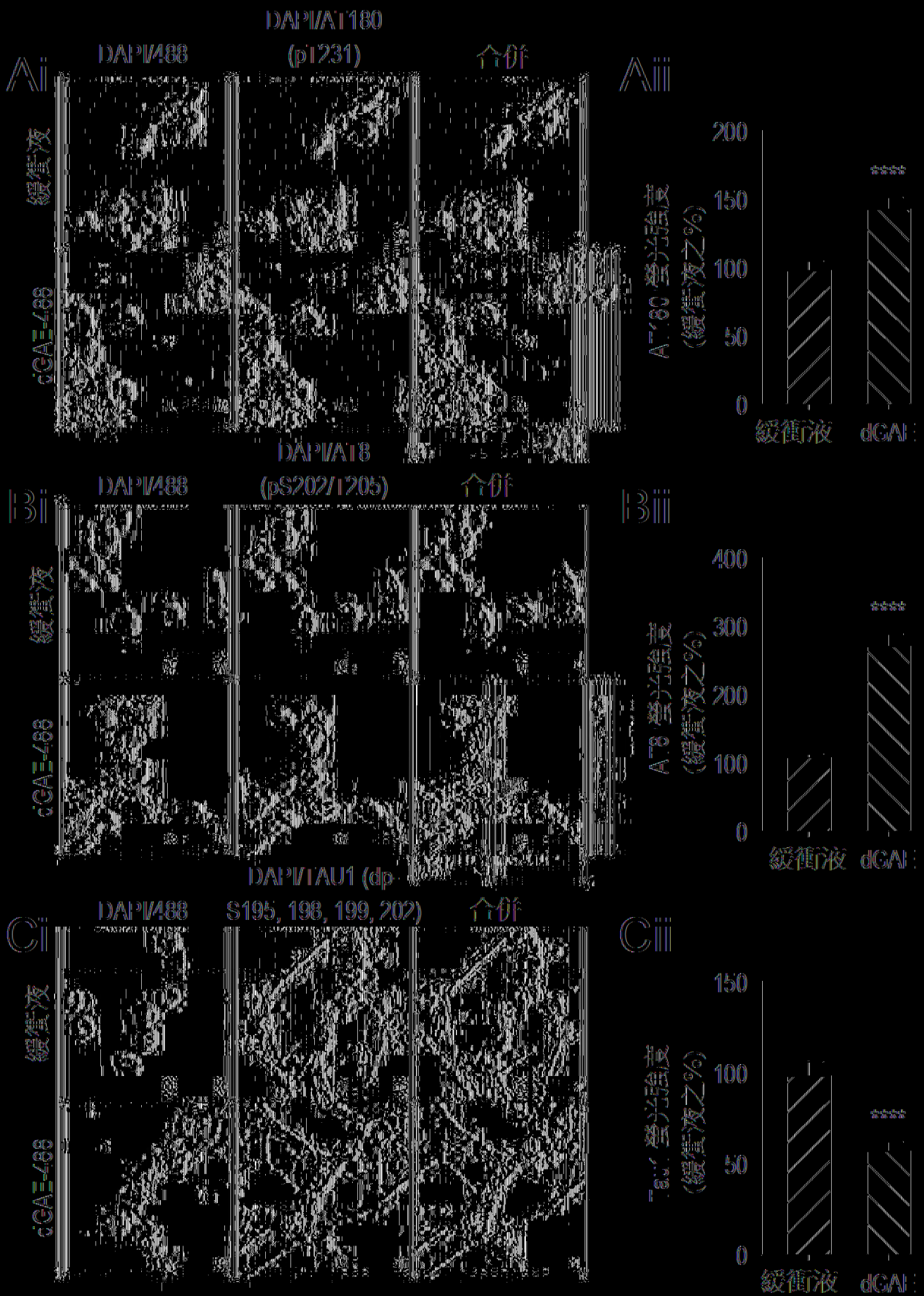
|(圖 1)|



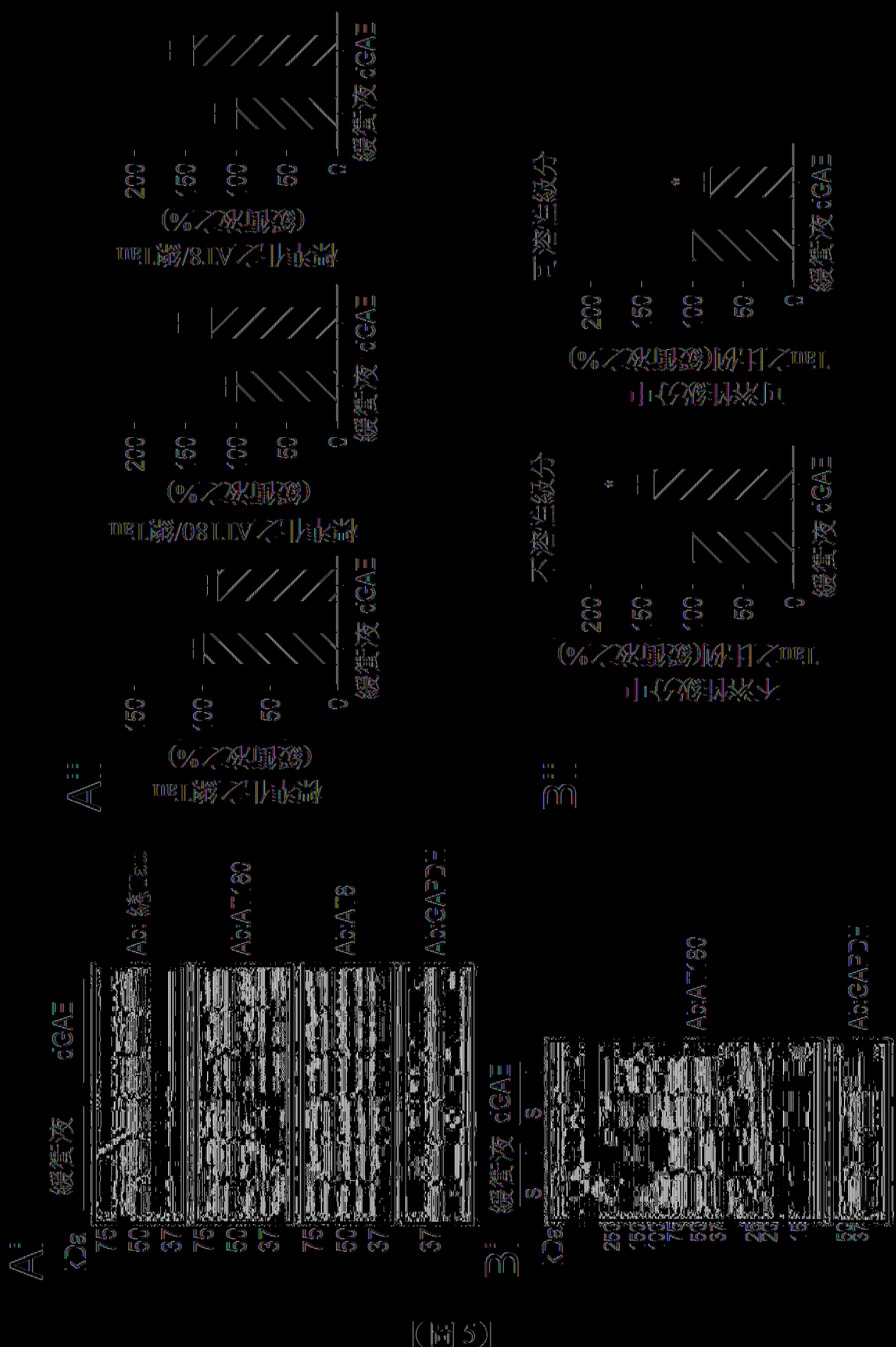
[(圖] 2)]

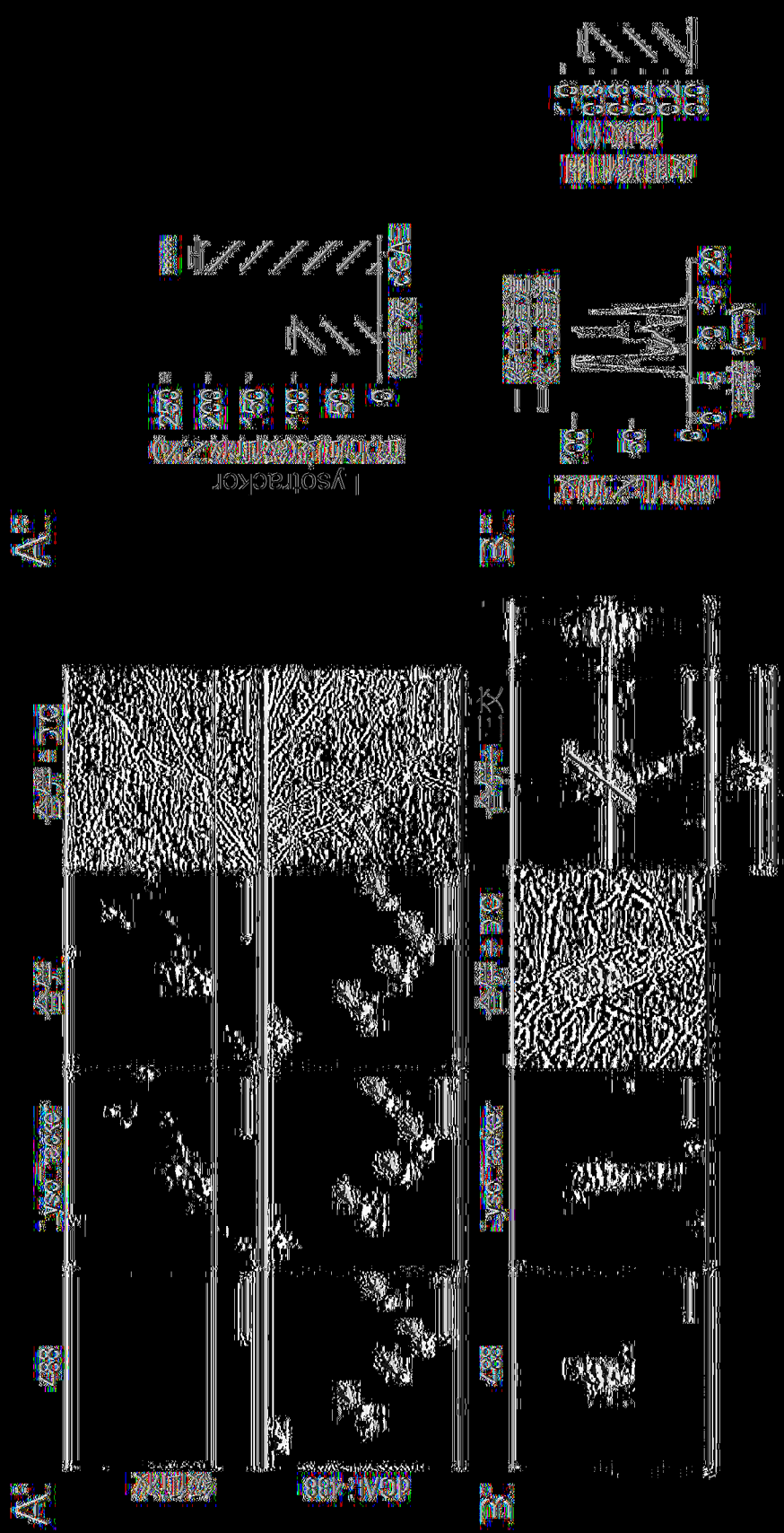


[(圖 3)]

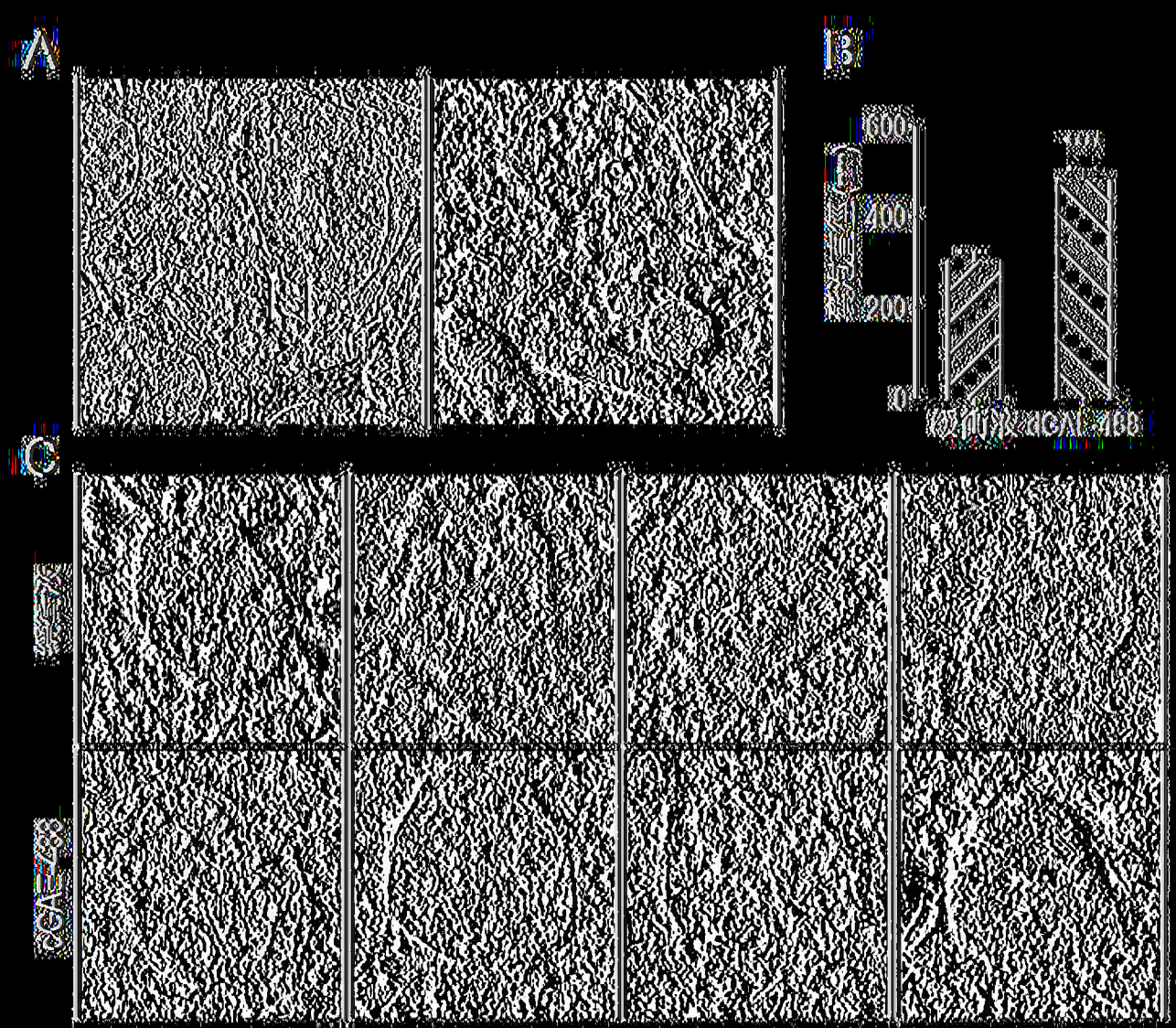


[(圖 4)]

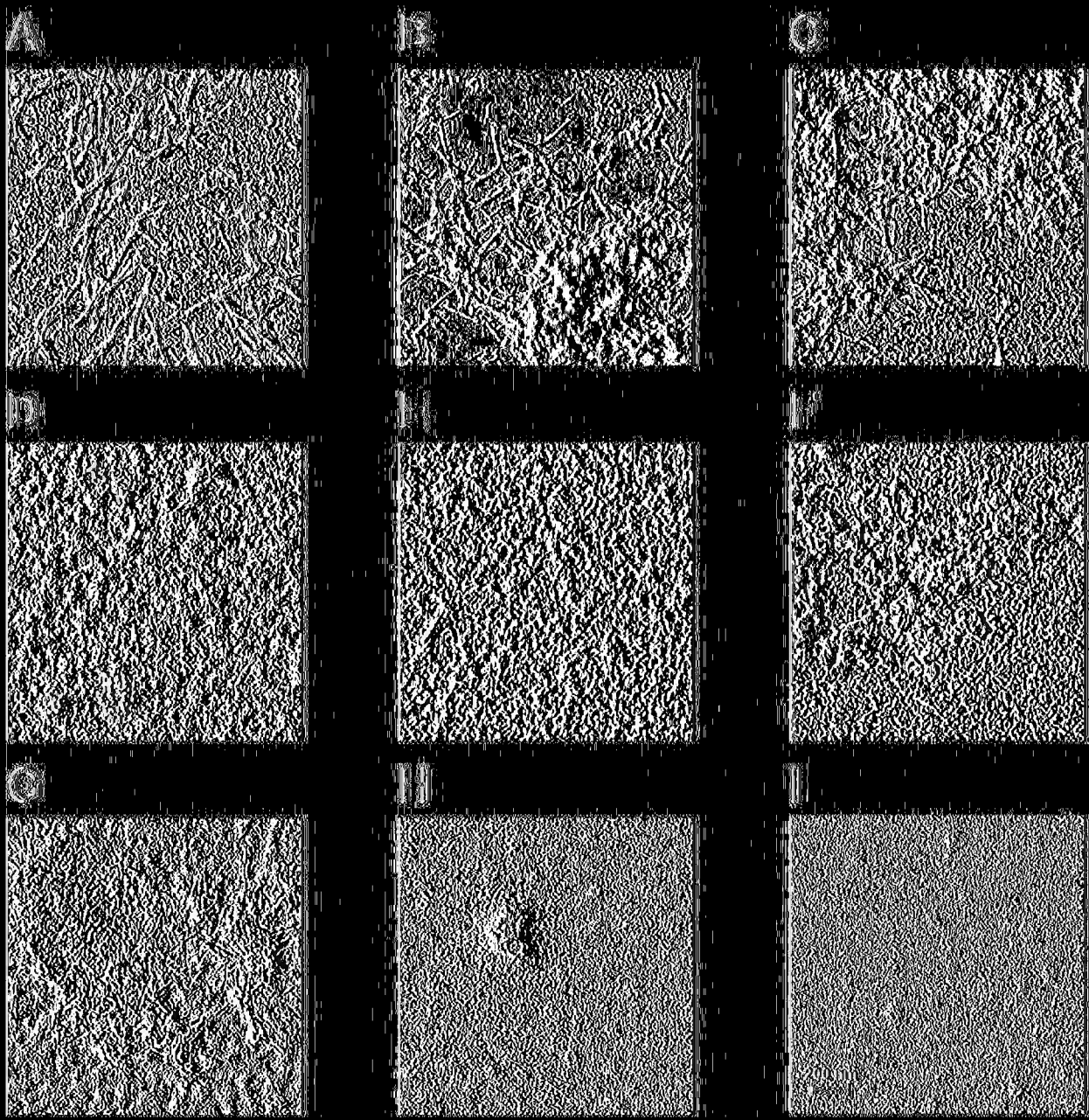




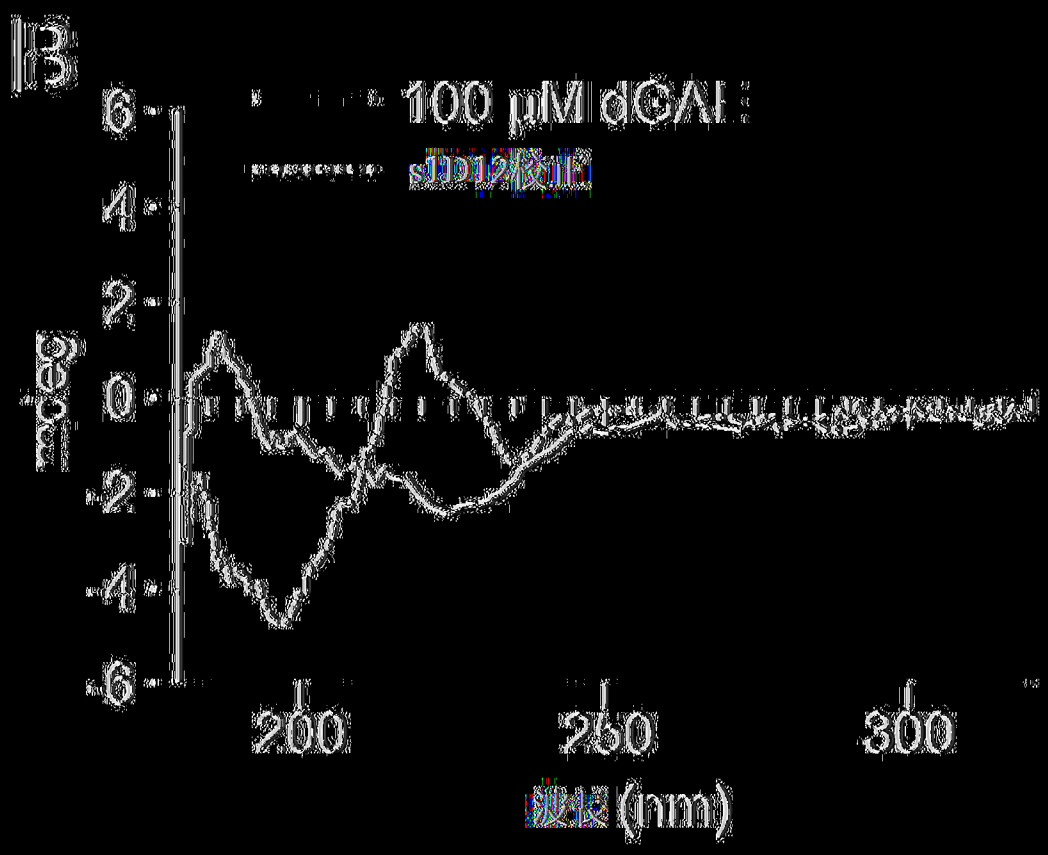
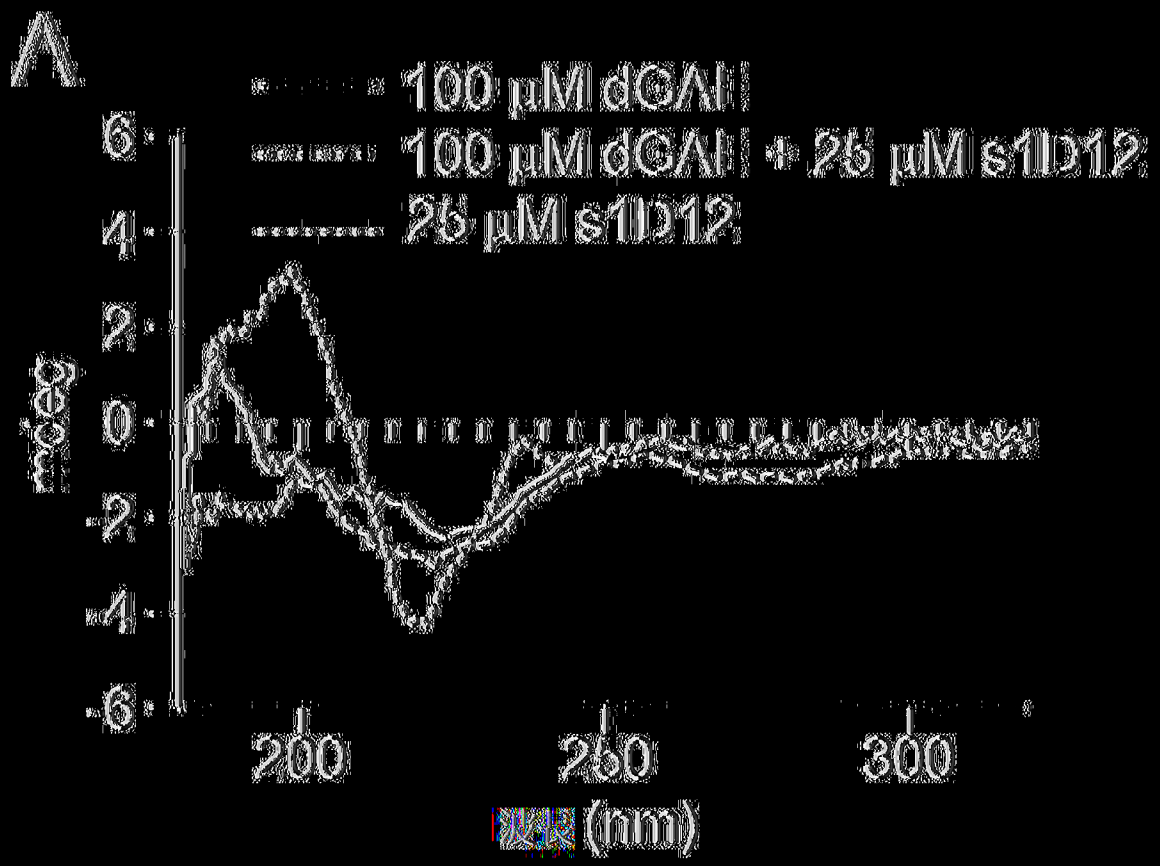
[(圖) 6]



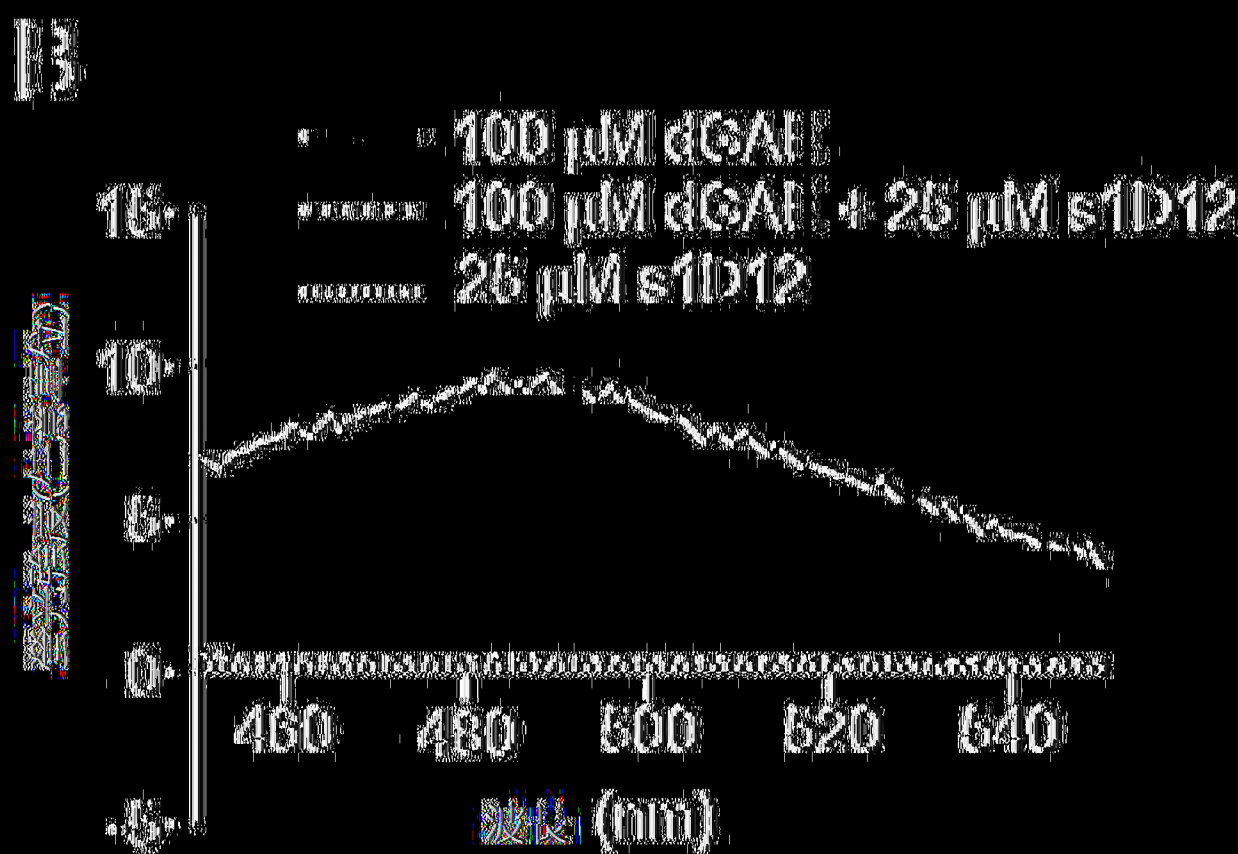
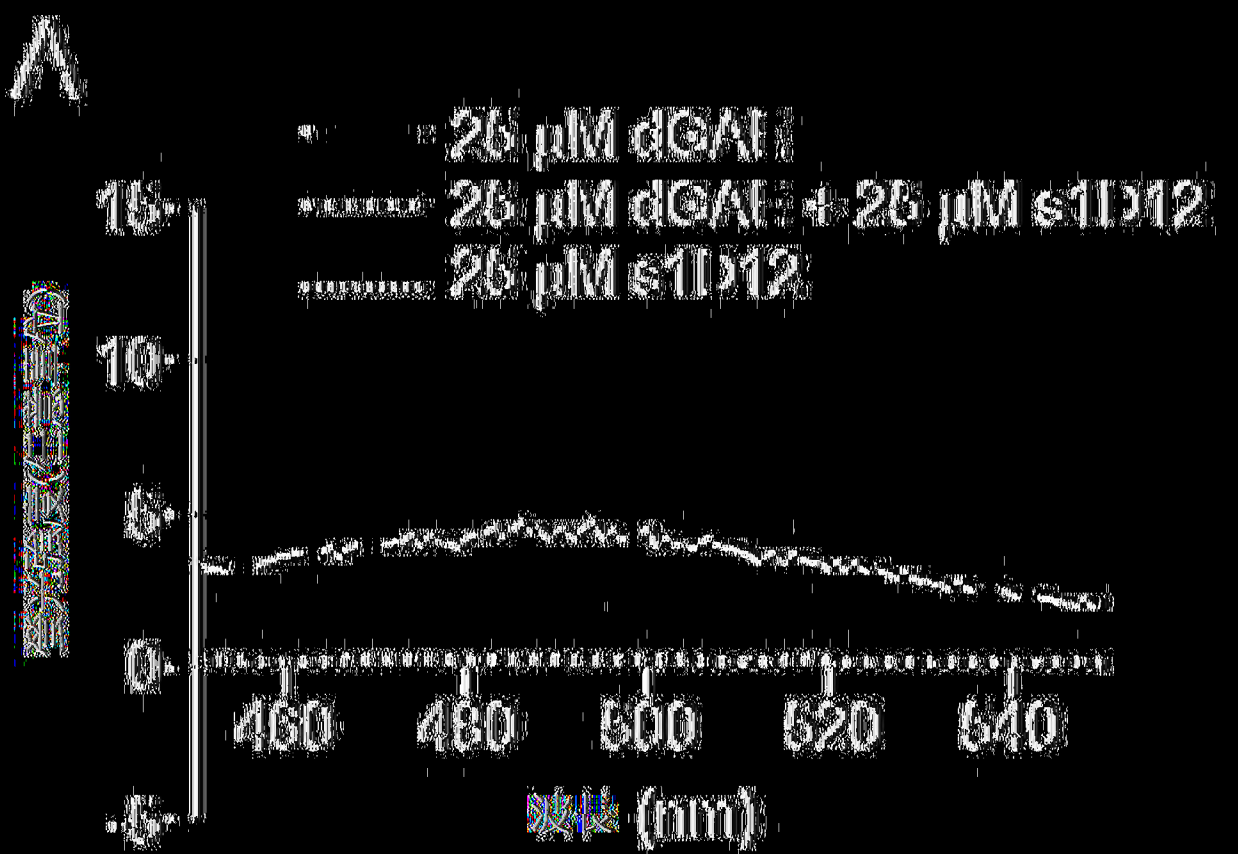
[(圖) 7]



[(圖 8)]



[(图 9)]



[同 10]