

發明專利說明書

【發明名稱】(中文/英文)

折疊錯誤之 TAU 蛋白的檢測及檢測折疊錯誤之 TAU 蛋白的套組

DETECTION OF MISFOLDED TAU PROTEIN AND KIT FOR DETERMINING MISFOLDED TAU PROTEIN

【技術領域】

相關申請案之交互參照

【0001】本申請案主張 2017 年 5 月 16 日申請的美國臨時專利申請案第 62/507,166 號之優先權，其全部內容係以引用方式併入本文中。

【先前技術】

【0002】Tau 蛋白病 (tauopathy) 可包括例如阿茲海默症 (Alzheimer' s disease ; AD)、帕金森氏症 (Parkinson' s Disease ; PD)、進行性上眼神經核麻痺症 (Progressive Supranuclear Palsy ; PSP)、額顳葉失智症 (FrontoTemporal Dementia ; FTD)、皮質基底核退化症 (Corticobasal degeneration ; CBD)、輕度認知障礙 (Mild cognitive impairment ; MCI)、嗜銀顆粒病 (Argyrophilic grain disease ; AgD)、創傷性腦損傷 (Traumatic Brain Injury ; TBI)、慢性創傷性腦病變 (Chronic Traumatic Encephalopathy ; CTE)、及拳擊員癡呆 (Dementia Pugilistica ; DP)、及類似疾病。折疊錯誤之 tau 聚集體及小纖維 (fibrils) 可經由成核及生長來形成並累積。折疊錯誤之 tau 聚集體可誘導細胞官能不良及組織損傷以及其他效應。

【0003】已證實即時震動誘導轉換 (real time

quaking-induced conversion ; RT-Quic)引起來自從匹克症(Pick's disease)受試者抽取的腦均質物及腦脊髓液樣本之 3-重複序列(3R) tau 同功型(isoform)之複製，從而允許對此種罕有疾病之靈敏檢測及與其他 Tau 蛋白病之區別。然而，令人驚訝的，對於包括 4R tau 之折疊錯誤的具有臨床重要性之更普通 Tau 蛋白病而言，RT-Quic 之功效減少 3 至 5 個數量級，從而使得其對臨床及實驗室用途而言是無效及不切實際的。此等不利的結果係藉由用含有來自 CBD、AgD、及 FTDP-17、及 PSP、以及 AD (4R+3R Tau 蛋白病)之病例的主導 4-重複序列(4R) tau 聚集體的腦樣本接種來獲得。一些 AD 及 PSP 樣本得到高於檢測極限之訊號，但該等訊號相較於匹克症腦樣本而言係離群值且為弱得多的。另外，並未針對污染來分析產生弱反應的 AD 及 PSP 樣本。4R 或 4R + 3R Tau 蛋白病之 RT-Quic 分析一般而言並不呈現為與使用不患有免疫組織學檢測到的 tau 病理學之患病受試者的對照顯著不同。此等對照包括對以下各項之診斷：衰老 (senile change ; SC)、腦血管疾病(cerebrovascular disease ; CVD)、瀰漫性路易氏體病(diffuse Lewy body disease ; DLBD)、具有 TDP-43 之額顳葉失智症(frontotemporal dementia with TDP-43 ; FTD-TDP)、及肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis ; ALS)。總之，已證實 RT-Quic 分析對於包括 4R 主導及 4R + 3R 混合 Tau 蛋白病之 4R Tau 蛋白病而言通常為無效及不切實際的。

【0004】 本申請案理解到：例如用於相關疾病之診斷的折疊錯誤之tau蛋白的檢測可為有挑戰性之事業。

【發明內容】

【0005】 在一個實施例中，提供一種用於測定樣本中存在或

不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的方法。該方法可包括執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增 (protein misfolding cyclic amplification; PMCA) 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第一部分與第一受質蛋白 (substrate protein) 接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 4R tau 蛋白。該第一 PMCA 程序可包括在有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞第一培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由分析第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。

【0006】 在另一實施例中，提供一種用於測定受試者中存在或不存在相應於第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的 Tau 蛋白病的方法。該方法可包括提供來自受試者之樣本。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第一部分與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 tau 同功型。該第一受質蛋白可經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括在有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養

循環可包括破壞第一培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由分析第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在該 Tau 蛋白病。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。該方法可提供：當第一受質蛋白由單體 3R tau 組成時，Tau 蛋白病排除匹克症。

【0007】 在一個實施例中，提供一種使用捕獲以用於測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的方法。該方法可包括自該樣本捕獲該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體以形成經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體與莫耳過量之第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該莫耳過量可大於經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中包括的蛋白質單體之量。該方法可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞第一培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定該樣本中存在或不存

在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。

【0008】 在另一實施例中，提供一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病之方法，該 Tau 蛋白病包括阿茲海默症 (AD)。該方法可包括提供該受試者。該方法可包括獲得來自受試者之樣本。該樣本可包括以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 4R tau。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測在第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在 AD。

【0009】 在一個實施例中，提供一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病之方法，該 Tau 蛋白病包括帕金森氏症 (PD)。該方法可包括提供該受試者。該方法可包括獲得來自受試者之樣本。該樣本可包括以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本與第一受

質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 4R tau。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測在第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在 PD。

【0010】 在另一實施例中，提供一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病之方法，該 Tau 蛋白病包括進行性上眼神經核麻痺症(PSP)。該方法可包括提供該受試者。該方法可包括獲得來自受試者之樣本。該樣本可包括以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 4R tau。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測在第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚

集體。該方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在 PSP。

【0011】在一個實施例中，提供一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病之方法，該 Tau 蛋白病包括額顳葉失智症 (FTD)。該方法可包括提供該受試者。該方法可包括獲得來自受試者之樣本。該樣本可包括以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 4R tau。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測在第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在 FTD。

【0012】在另一實施例中，提供一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病之方法，該 Tau 蛋白病包括皮質基底核退化症 (CBD)。該方法可包括提供該受試者。該方法可包括獲得來自受試者之樣本。該樣本可包括以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包

括 4R tau。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測在第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在 CBD。

【0013】 在一個實施例中，提供一種用於測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的套組。該套組可包括第一受質蛋白，該第一受質蛋白可包括 4R tau。該套組可包括第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的指示劑。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可相應於 Tau 蛋白病。該套組可包括緩衝液。該套組可包括肝素。該套組可包括鹽。該套組可包括說明書。該說明書可指導使用者獲得樣本。該說明書可指導使用者至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第一部分與第一受質蛋白、該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之該指示劑、該緩衝液、該肝素、及該鹽接觸來形成第一培養混合物。該第一培養混合物可由一定濃度之以下一或多者來形成：小於約 20 μM 之該第一受質蛋白；小於約 75 μM 之該肝素；小於約 190 mM 之為 NaCl 的鹽；及小於約 9.5 μM 之為硫代黃素 T(Thioflavin T)的該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之該指示劑。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有

效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該說明書可指導使用者藉由根據該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之該指示劑分析第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定該樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。

【圖式簡單說明】

【0014】併入本說明書並構成本說明書之一部分的隨附圖式說明示例性方法及結果，且僅僅用於說明示例性實施例。

【0015】圖 1A 顯示在培養之 0h、5h、10h、及 24h 時獲取的電子顯微照片。

【0016】圖 1B 為可溶性寡聚 A β 蛋白質聚集體之西方墨點。

【0017】圖 2A 為顯示在藉由實例 1 的各種濃度之合成可溶性寡聚 A β 蛋白質接種的情況下，藉由 ThT 螢光隨時間變化量測的未擴增類澱粉形成之圖表。

【0018】圖 2B 為顯示在藉由實例 1 的各種濃度之合成可溶性寡聚 A β 蛋白質接種的情況下，藉由 ThT 螢光隨時間變化量測的擴增循環加速的類澱粉形成之圖表。

【0019】圖 3A 為隨 ThT 螢光標記變化量測的類澱粉形成相對時間之圖表，其顯示藉由來自 AD、NND、及 NAND 群組的 5 個代表性樣本之 CSF 接種的 A β 聚集之平均動力學。

【0020】圖 3B 為在來自 AD、NND、及 NAND 群組之樣本存在下 A β 聚集的以 h 計之停滯期時間的圖表。

【0021】圖 3C 為顯示在來自 AD、NND 及 NAND 患者之

CSF 樣本存在下，在 180 次 $A\beta$ -PMCA 循環之後，亦即，在 90 h 之培養(P90)之後獲得的類澱粉形成之程度的圖表。

【0022】圖 4A-D 為針對 AD 相對 NAND (圖 4A)、AD 相對 NND (圖 4B)及 AD 相對所有對照樣本(圖 4C)的使用圖 3B 中顯示的停滯期值對不同截止點而言真陽性率(靈敏度)隨假陽性率(特異性)變化的圖表。圖 4D 估算對不同組之群組比較而言的最可靠截止點。

【0023】圖 5 的表 1 顯示使用停滯期數計算的對 $A\beta$ -PMCA 測試之靈敏度、特異性及預測值的估算。

【0024】圖 6 為在來自 AD 及對照患者之 CSF 樣本存在下，針對在 300 次 $A\beta$ -PMCA 循環之後，亦即，在 150 h 之培養(P150)之後獲得的樣本的以 h 計之停滯期時間的圖表。

【0025】圖 7A 為顯示使用摻入人類 CSF 中的合成製備之 $A\beta$ 寡聚物進行的免疫耗盡之結果的西方墨點。

【0026】圖 7B 為顯示藉由對照及免疫耗盡 CSF 樣本接種的 $A\beta$ 聚集之動力學的圖表。

【0027】圖 7C 為顯示藉由對照及免疫耗盡 CSF 樣本接種的 $A\beta$ 聚集之動力學的圖表，該免疫耗盡 CSF 樣本係僅用 A11 構形抗體耗盡。

【0028】圖 8A 為用於自複合生物樣本捕獲 $A\beta$ 寡聚物的 ELISA 固相方法之示意表示。

【0029】圖 8B 為用於自複合生物樣本捕獲 $A\beta$ 寡聚物的磁珠固相方法之示意表示。

【0030】圖 9 的表 2 顯示特異性抗體捕獲 $A\beta$ 寡聚物之能力。

【0031】圖 10 為類澱粉形成相對時間之圖表，其顯示因存在摻入人類血漿中之不同數量之合成寡聚物而加速 $A\beta$ 聚集。

【0032】圖 11 為顯示在來自 AD 患者及對照者之血漿樣本存在下，在 A β -PMCA 檢定中達到 50%聚集之時間的圖表。

【0033】圖 12 為西方墨點，其顯示在蛋白酶消化之後在藉由西方墨點監視的相異數量之合成 A β 寡聚物的存在下，藉由培養/音波振動處理之循環進行 A β 聚集之擴增的結果。

【0034】圖 13A 為硫代黃素 T 螢光相對時間之圖表，其顯示藉由 PD-PMCA 進行的對 α S 種子之檢測。

【0035】圖 13B 為將達到 50%聚集之時間隨指示量之 α S 種子變化來作圖的圖表。

【0036】圖 14 顯示相對患有阿茲海默症(AD)或非神經退化性疾病(NND)之對照者，在來自人類 PD 患者之 CSF 樣本中藉由 PD-PMCA 檢測 α S 種子。

【0037】圖 15 的表 3 證明不同序列或構形抗體捕獲 α S 寡聚物之能力。

【0038】圖 16A 為用於捕獲 α S 寡聚物之 ELISA 固相方法之示意表示。

【0039】圖 16B 為用於捕獲 α S 寡聚物之磁珠固相方法之示意表示。

【0040】圖 17A、17B、及 17C 為一系列圖表，其顯示使用三種不同的 α 突觸核蛋白(synuclein)抗體進行的來自人類血漿之 α 突觸核蛋白寡聚物之免測沉澱/抗體之結果。圖 17A 顯示用抗體 N-19 之結果。圖 17B 顯示用抗體 211 之結果。圖 17C 顯示用抗體 C-20 之結果。

【0041】圖 18A、18B、及 18C 為一系列圖表，其顯示檢測 CSF 樣本中之 α S 種子之結果。圖 18A 對照樣本中之結果。圖 18B 顯示 PD 患者中之結果。圖 18C 顯示患有多系統萎縮症

(Multiple System Atrophy ; MSA)之患者的結果。

【0042】圖 19 為顯示重組全長 4R TAU 蛋白之製備及純化的流程圖。

【0043】圖 20A 為根據針對各種初始量之 tau 種子及對照物的 ThT 螢光的以%計的聚集之圖表。圖 20A 中之值為兩次重複測試之平均值，其中誤差槓指示標準偏差。

【0044】圖 20B 為相對以 fmol 計的寡聚 tau 種子之量之對數，如藉由 ThT 螢光量測的 T_{50} 即達到 50%聚集之時間之圖表。

【0045】圖 20C 為藉由 ThT 螢光隨時間推移跟蹤的聚集之圖表。

【0046】圖 20D 為 tau 寡聚物之數量與 Tau-PMCA 訊號(達到 50%聚集之時間)之間的關係的圖表。

【0047】圖 20E-20L 為一系列圖表，其顯示基於所測試的條件中的 8 個之 ThT 螢光的聚集結果，包括 4 個不同的時間點(第 0 天、第 7 天、第 14 天及第 30 天)，其中樣本經受或不經受冷凍及融化且在緩衝液或 CSF 存在下進行。

【0048】圖 20E 為在第 0 天基於第一種子製備之 ThT 螢光的聚集之圖表。

【0049】圖 20F 為在第 7 天基於第一種子製備之 ThT 螢光的聚集之圖表。

【0050】圖 20G 為在第 14 天基於第一種子製備之 ThT 螢光的聚集之圖表。

【0051】圖 20H 為在第 30 天基於第一種子製備之 ThT 螢光的聚集之圖表。

【0052】圖 20I 為在第 0 天基於第二種子製備之 ThT 螢光的聚集之圖表。

【0053】圖 20J 為在第 7 天基於第二種子製備之 ThT 螢光的聚集之圖表。

【0054】圖 20K 為在第 14 天基於第二種子製備之 ThT 螢光的聚集之圖表。

【0055】圖 20L 為在第 30 天基於第二種子製備之 ThT 螢光的聚集之圖表。

【0056】圖 20M 為顯示跨於 16 種不同條件的再現性的 T_{50} 值之表。

【0057】圖 20N 為針對用 1 pm 之 tau、A β 40、AB42、His α Syn、Hua α Syn 接種及不具有種子之對照進行的 tau 檢定的 ThT 螢光相對時間之圖表。

【0058】圖 21A 為顯示針對以下各項的在 447h 之培養時之 ThT 螢光的圖表：患有 AD 之患者、患有 MCI 之患者、患有其他 Tau 蛋白病之患者、使用摻有合成 Tau 寡聚物(12.5 fmol)之健康 CSF 之樣本的陽性對照、不具有 Tau 種子之健康 CSF 之樣本的陰性對照；及患有其他神經病學疾病之對照患者。

【0059】圖 21B 顯示來自患有 AD 或其他 Tau 蛋白病之患者的樣本的 tau-PMCA 之螢光訊號，其相當於在含有重組 tau 寡聚物之樣本中觀察到的螢光訊號。

【0060】圖 22 為顯示針對受 AD、FTD (額顳葉失智症)、CBD (皮質基底核退化症)、及 PSP (進行性上眼神經核麻痺症) 影響的患者相對來自對照之代表性 CSF 樣本的基於 ThT 之聚集 %相對時間之圖表。

【實施方式】

【0061】提供用於檢測或表徵樣本中之折疊錯誤之 tau 蛋白的方法及套組，包括測定或診斷自其獲取樣本的受試者中之 Tau

蛋白病。可形成並累積 tau 蛋白之折疊錯誤聚集體。折疊錯誤聚集體可誘導細胞官能不良及組織損傷以及其他效應。例如，Tau 蛋白病可包括主要考慮 4R 之折疊錯誤或 4R 及 3R 之混合物之折疊錯誤的彼等者：阿茲海默症(AD)、帕金森氏症(PD)、進行性上眼神經核麻痺症(PSP)、額顳葉失智症(FTD)、皮質基底核退化症(CBD)、輕度認知障礙(MCI)、嗜銀顆粒病(AgD)、創傷性腦損傷(TBI)、慢性創傷性腦病變(CTE)、及拳擊員癡呆(DP)、及類似疾病。

【0062】 在一些實施例中，本文的 Tau 蛋白病可排除匹克症。在一些實施例中，本文描述的 Tau 蛋白病可排除主要考慮 3R tau 折疊錯誤之彼等者，例如，匹克症。

【0063】 該方法可包括蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)，其可提供經由活體外折疊錯誤及聚集過程之人工加速及擴增對諸如 tau 之折疊錯誤之蛋白質聚集體的超靈敏檢測。PMCA 之基本概念已在先前在實驗上針對傳染性蛋白顆粒(Soto 等人, WO 2002/04954； Estrada 等人,美國專利申請公開案第 20080118938 號，其每一者係全部以引用方式併入本文中)及針對其他蛋白質折疊錯誤，諸如阿茲海默症中「A β 」或「 β 類澱粉」及帕金森氏症中之 α 突觸核蛋白(Soto 等人, WO 2016/040907，其係全部以引用方式併入本文中)之蛋白質折疊錯誤得以證明。然而，在本文件之申請日之前，沒有參考文獻描述 PCMA 用於擴增及檢測相應於任何 Tau 蛋白病的折疊錯誤之 tau 蛋白，該 Tau 蛋白病主要考慮 4R 之折疊錯誤，或考慮在 4R tau 存在下的 3R tau 之折疊錯誤，或除匹克症之外的任何 Tau 蛋白病。本文件揭示特定的實例及細節，從而賦能 PMCA 技術用於檢測折疊錯誤之 tau 聚集體的存在或不存在，且在各種實施例中，賦能一或多種另

外 PMCA 程序用於檢測其他折疊錯誤之蛋白質，諸如阿茲海默症中的折疊錯誤之 A β 及帕金森氏症中的 α 突觸核蛋白。此一或多種另外的 PMCA 程序可提供在各種 Tau 蛋白病間的區別，例如以便將 AD 及 PD 彼此區別且與 PSP、FTD、CBD、MCI、AgD、TBI、CTE、DP、及類似疾病相區別。

【0064】如本文所使用，「A β 」或「 β 類澱粉」係指經由類澱粉前驅物蛋白質(amyloid precursor protein；APP)之連續分裂形成的肽。各種 A β 同功型可包括 38-43 個胺基酸殘基。當 APP 藉由 β 及/或 γ 分泌酶以任何組合方式進行加工時，可形成 A β 蛋白質。A β 可為罹患或疑似患有 AD 的個體之腦中的類澱粉斑塊之成分。各種 A β 同功型可包括且不限於 A β 40 及 A β 42。各種 A β 肽可與神經元破壞相關聯，該神經元破壞與 AD 相關聯。

【0065】如本文所使用，「 α S」或「 α 突觸核蛋白」係指全長、140 胺基酸 α 突觸核蛋白蛋白質，例如，「 α S-140」。其他同功型或片段可包括「 α S-126」， α 突觸核蛋白-126，其例如歸因於失去外顯子而缺乏殘基 41-54；及「 α S-112」， α 突觸核蛋白-112，其例如歸因於失去外顯子 5 而缺乏殘基 103-130。 α S 可存在於罹患 PD 或疑似患有 PD 之個體之腦中。各種 α S 同功型可包括且不限於 α S-140、 α S-126、及 α S-112。各種 α S 肽可與神經元破壞相關聯，該神經元破壞與 AD 相關聯。

【0066】如本文所使用，「tau」係指蛋白質，其為自單一基因，例如，人類之 MAPT (微管相關聯蛋白質 tau)進行替代剪接之產物。tau 蛋白包括多達全長形式及截斷形式之任何 tau 同功型。各種同功型包括但不限於已知存在於人類腦組織中之六個 tau 同功型，其相應於在 tau 基因之外顯子 2、3、及 10 中的替代剪接。三個同功型具有三個結合結構域而其他三個具有四個

結合結構域。折疊錯誤之 tau 可存在於罹患 AD 或疑似患有 AD 或其他 Tau 蛋白病之個體的腦中，該等其他 Tau 蛋白病如同 AD 考慮為在 4R 及 3R tau 同功型兩者存在下的折疊錯誤。折疊錯誤之 tau 亦可存在於考慮為主要 4R tau 同功型之折疊錯誤的疾病中，諸如進行性上眼神經核麻痺症(PSP)、tau 依賴性額顳葉失智症(FTD)、皮質基底核退化症(CBD)、輕度認知障礙(MCI)、嗜銀顆粒病(AgD)、及類似疾病。

【0067】 如本文所使用，「折疊錯誤之蛋白質聚集體」為部分地或完整地含有蛋白質之結構構形的蛋白質，該結構構形不同於當涉及其在生物系統中內的典型、非病原性正常功能時存在的結構構形。折疊錯誤之蛋白質可聚集。折疊錯誤之蛋白質可定位在蛋白質聚集體中。折疊錯誤之蛋白質可為無功能蛋白質。折疊錯誤之蛋白質可為蛋白質之病原性構形異構物。單體蛋白質組合物可以不具有用於與種子相關聯的折疊錯誤、寡聚、及聚集的催化活性(折疊錯誤之蛋白質寡聚物能夠在 PMCA 條件下催化折疊錯誤)之原生(native)、非病原性構形來提供。單體蛋白質組合物可以無種子形式提供。

【0068】 如本文所使用，「單體蛋白質」係指單一蛋白質分子。「可溶性經聚集折疊錯誤之蛋白質」係指保留在溶液中的單體蛋白質之寡聚物或聚集物。可溶性折疊錯誤之蛋白質之實例可包括任何數量之蛋白質單體，只要折疊錯誤之蛋白質保持可溶即可。例如，可溶性折疊錯誤之蛋白質可包括在 2 個單位與約 50 個單位之間的單體蛋白質之單體或聚集體。

【0069】 單體及/或可溶性折疊錯誤之蛋白質可聚集以形成不可溶聚集體、高階寡聚物及/或 tau 小纖維。例如，A β 或 tau 蛋白之聚集可導致在 AD 或 Tau 蛋白病受試者中可觀察到的原

纖維、小纖維、及最終折疊錯誤之斑塊或纏結。「種子」或「核」係指折疊錯誤之蛋白質或短的分段小纖維，尤其是具有用於進一步折疊錯誤、寡聚、及聚集之催化活性的可溶性折疊錯誤之蛋白質。此種成核依賴性聚集可藉由緩慢的停滯期表徵，在該緩慢停滯期中可形成聚集體核，該聚集體核可隨後催化其他聚集體及較大寡聚物及聚合物之迅速形成。停滯期可藉由添加預形成的核或種子來最小化或移除。可提供單體蛋白質組合物，其不具有用於與折疊錯誤之種子相關聯的折疊錯誤及聚集之催化活性。單體蛋白質組合物可以無種子形式提供。

【0070】 如本文所使用，「可溶性」物質可在生理條件下於生物學流體中形成溶液，而「不可溶」物質可在生理條件在此等生物學流體中作為沉澱物、小纖維、沉積物、纏結、或其他非溶解形式存在。此等生物學流體可包括例如流體，或自以下一或多者壓出的流體：羊水；膽汁；血液；腦脊髓液；耳聾 (cerumen)；皮膚；滲出物；糞便；胃液；淋巴；乳汁；黏液，例如鼻分泌物；黏膜，例如，鼻黏膜；腹膜液；血漿；胸膜液；膿液；唾液；皮脂；精液；汗液；滑液；淚液；尿；及類似物。不可溶物質可包括例如 $A\beta$ 、 αS 、 $4R\ tau$ 、 $3R\ tau$ 、其諸如 $3R\ tau + 4R\ tau$ 之組合及類似物的小纖維。在生理條件下溶於非生物流體中而不是上述生物流體之一者中的物質可視為不可溶的。例如， $A\beta$ 、 αS 、 $4R\ tau$ 、 $3R\ tau$ 、其諸如 $3R\ tau + 4R\ tau$ 之組合及類似物的小纖維可溶於例如諸如十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate；SDS) 之表面活性劑於水中之溶液中，但仍可在生理條件下於所提及生物流體之一或多者中為不可溶的。

【0071】 在一些實施例中，樣本可排除作為沉澱物、小纖維、沉積物、纏結、斑塊、或可在生理條件下不可溶於所描述

生物流體中之一或多者中的其他形式的諸如 $A\beta$ 、 αS 、4R tau、3R tau、其諸如 3R tau + 4R tau 之組合及類似物的折疊錯誤之蛋白質之不可溶物質。

【0072】 例如，在一些實施例中，樣本可排除呈小纖維形式之 tau。樣本可排除呈不可溶形式的折疊錯誤之 tau 蛋白，例如，樣本可排除作為沉澱物、小纖維、沉積物、纏結、斑塊、或其他不可溶形式例如呈小纖維形式的折疊錯誤之 tau 蛋白。本文描述的方法可包括藉由排除呈不可溶形式的折疊錯誤之 tau 蛋白，例如，藉由自樣本排除作為沉澱物、小纖維、沉積物、纏結、斑塊、或其他不可溶形式例如呈小纖維形式的折疊錯誤之 tau 蛋白來製備樣本。本文描述的套組可包括說明書，其指導使用者藉由自樣本排除作為沉澱物、小纖維、沉積物、纏結、斑塊、或其他不可溶形式例如呈小纖維形式的折疊錯誤之 tau 蛋白來製備樣本。此種不可溶形式之所描述折疊錯誤之蛋白質自樣本的排除可為實質或完全的。

【0073】 如本文所使用，折疊錯誤之蛋白質的聚集體係指包括可溶性折疊錯誤之蛋白質的蛋白質之非共價締合物。折疊錯誤之蛋白質的聚集體可「解聚集」，或破壞以破碎或釋放可溶性折疊錯誤之蛋白質。可溶性折疊錯誤之蛋白質種子的集合之催化活性可至少部分地隨混合物中此種種子之數量來縮放。因此，破壞混合物中折疊錯誤之蛋白質的聚集體以釋放折疊錯誤之蛋白質種子可導致用於單體蛋白質之寡聚或聚集的催化活性之增加。

【0074】 在各種實施例中，提供一種用於測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的方法。該方法可包括執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序。該第一 PMCA 程

序可包括藉由使樣本之第一部分與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 4R tau 蛋白。該第一 PMCA 程序可包括在有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞第一培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由分析第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。

【0075】 在各種實施例中，提供一種用於測定受試者中存在或不存在相應於第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的 Tau 蛋白病的方法。該方法可包括提供來自受試者之樣本。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第一部分與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 tau 同功型。該第一受質蛋白可經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括在有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞第一培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由分析第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在

來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在該 Tau 蛋白病。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。該方法可提供：當第一受質蛋白由單體 3R tau 組成時，Tau 蛋白病排除匹克症。

【0076】 在各種實施例中，提供一種使用捕獲以用於測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的方法。該方法可包括自該樣本捕獲該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體以形成經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體與莫耳過量之第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該莫耳過量可大於經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中包括的蛋白質單體之量。該方法可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞第一培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定該樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第一受質蛋白。

【0077】 在各種實施例中，提供一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病之方法，該 Tau 蛋白病包括阿茲海默症 (AD)。該方法可包括提供該受試者。該方法可包括獲得來自受試者之樣本。該樣本可包括以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 4R tau。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測在第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在 AD。

【0078】 在一些實施例中，測定受試者中存在或不存在 AD 可包括藉由測定 AD tau 蛋白聚集體之特性(signature)來將 AD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別。AD tau 蛋白聚集體之特性可包括以下一或多者：以下一或多個 AD-特異性相應 PMCA 動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 AD tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 AD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 AD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

【0079】 在各種實施例中，提供一種用於測定受試者中存在

或不存在 Tau 蛋白病之方法，該 Tau 蛋白病包括帕金森氏症 (PD)。該方法可包括提供該受試者。該方法可包括獲得來自受試者之樣本。該樣本可包括以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 4R tau。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測在第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在 PD。

【0080】 在一些實施例中，測定受試者中存在或不存在 PD 可包括藉由測定 PD tau 蛋白聚集體之特性來將 PD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別。PD tau 蛋白聚集體之特性可包括以下一或多者：以下一或多個 PD-特異性相應 PMCA 動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 PD tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 PD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 PD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

【0081】 在各種實施例中，提供用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病之方法，該 Tau 蛋白病包括進行性上眼神經核麻痺症 (PSP)。該方法可包括提供該受試者。該方法可包括獲得

來自受試者之樣本。該樣本可包括以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 4R tau。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測在第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在 PSP。

【0082】 在一些實施例中，測定受試者中存在或不存在 PSP 可包括藉由測定 PSP tau 蛋白聚集體之特性來將 PSP 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別。PSP tau 蛋白聚集體之特性可包括以下一或多者：以下一或多個 PSP-特異性相應 PMCA 動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 PSP tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 PSP tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 PSP tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

【0083】 在各種實施例中，提供一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病之方法，該 Tau 蛋白病包括額顳葉失智症 (FTD)。該方法可包括提供該受試者。該方法可包括獲得來自受試者之樣本。該樣本可包括以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該方法可包括至少執行第

一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 4R tau。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測在第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在 FTD。

【0084】 在一些實施例中，測定受試者中存在或不存在 FTD 可包括藉由測定 FTD tau 蛋白聚集體之特性來將 FTD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別。FTD tau 蛋白聚集體之特性可包括以下一或多者：以下一或多個 FTD-特異性相應 PMCA 動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 FTD tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 FTD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 FTD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

【0085】 在各種實施例中，提供一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病之方法，該 Tau 蛋白病包括皮質基底核退化症(CBD)。該方法可包括提供該受試者。該方法可包括獲得來自受試者之樣本。該樣本可包括以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該方法可包括至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本與第

一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物。該第一受質蛋白可包括 4R tau。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一 PMCA 程序可包括藉由檢測在第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。該方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定受試者中存在或不存在 CBD。

【0086】 在一些實施例中，測定受試者中存在或不存在 CBD 可包括藉由測定 CBD tau 蛋白聚集體之特性來將 CBD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別。CBD tau 蛋白聚集體之特性可包括以下一或多者：以下一或多個 CBD-特異性相應 PMCA 動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 CBD tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 CBD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 CBD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

【0087】 在其他實施例中，上文描述的方法中之每一者可併入以下特徵之一或多者。詳言之，參考任何蛋白質受質、折疊錯誤之蛋白質聚集體、擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體、培養混合物、PMCA 程序、樣本之部分、及類似物描述的每一特徵應理解為在各種其他實施例中獨立選擇的情況下描述任何其他蛋白質受質、折疊錯誤之蛋白質聚集體、擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體、培養混合物、PMCA 程序、樣本之部分、及類似物。

例如，對「第一」蛋白質受質描述的特徵可在一些實施例中亦獨立地選擇來描述「第二」蛋白質受質；對「第一」折疊錯誤之蛋白質聚集體描述的特徵亦可獨立地選擇來描述「第二」折疊錯誤之蛋白質聚集體；對「第一」培養混合物描述之特徵亦可獨立地選擇來描述「第二」培養混合物；對「第一」PMCA程序描述之特徵亦可獨立地選擇來描述「第二」PMCA程序；及類似情況。另外，例如，參考「每一」蛋白質受質、折疊錯誤之蛋白質聚集體、擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體、培養混合物、PMCA程序、樣本之部分、及類似物描述的特徵應理解為在各種其他實施例中獨立選擇的情況下描述任何其他枚舉的要素，例如，如應用於蛋白質受質、折疊錯誤之蛋白質聚集體、擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體、培養混合物、PMCA程序、樣本之部分、及類似物的「第一」、「第二」、「第三」、及類似物。例如，參考「每一受質蛋白」之描述可獨立地選擇來描述並支援對「第一受質蛋白」、「第二受質蛋白」、「第三受質蛋白」及類似物之敘述。

【0088】 在若干實施例中，一般對所枚舉或指定要素例如「第一」、「第二」、「每一」、及類似物描述的特徵可獨立地選擇為相同或相異的。例如，在一些實施例中，第一受質蛋白可包括 4R tau 且第二受質蛋白可包括 A β ；諸如溫度之條件可獨立地選擇用於第一及第二 PMCA 程序，及類似程序。在若干實施例中，一般對此等第一及第二要素描述的一些特徵可選擇為相同，或重疊，而一般對此等第一及第二要素描述的其他特徵可獨立地選擇為相異。例如，在一些實施例中，樣本之第一及第二部分可為相同的或加以組合，且第一及第二培養混合物可為相同的或加以組合，而相應第一及第二 PMCA 程序可在使用例

如 4R tau 及 A β 的不同第一及第二受質蛋白之組合培養混合物中並行地或連續地進行。

【0089】 在若干實施例中，可針對每一蛋白質受質、折疊錯誤之蛋白質聚集體、擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體、培養混合物、PMCA 程序、樣本之部分、及類似物獨立地選擇一個、兩個、或更多個實例。例如，各種方法實施例可包括使用 4R tau 作為第一受質蛋白之第一 PMCA 程序、使用 A β 作為第二受質蛋白之第二 PMCA 程序、使用 α 突觸核蛋白作為第三受質蛋白之第三 PMCA 程序、使用 3R tau 作為第四受質蛋白之第四 PMCA 程序、及類似程序。可對樣本，例如，實驗室樣本，或自諸如患有 Tau 蛋白病之受試者的受試者抽取的樣本執行此等多個 PMCA 程序。可例如如下對每一蛋白質受質、折疊錯誤之蛋白質聚集體、擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體、培養混合物、PMCA 程序、樣本之部分、及類似物並行地執行此等多個 PMCA 程序。

【0090】 在各種實施例中，該方法可包括測定樣本中第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之存在。該方法可包括至少執行第二 PMCA 程序以測定樣本中存在或不存在至少第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物。該第二受質蛋白可經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括在有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次。每一培養循環可包括在第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第二培養混合物以有效引起第二受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞第二培養混合物以有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括

藉由分析第二培養混合物中該第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第二受質蛋白。該第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第二受質蛋白。

【0091】 在一些實施例中，該方法可包括測定樣本中第一折疊錯誤之蛋白質聚集體及第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之存在。該方法可包括至少執行第三 PMCA 程序以測定樣本中存在或不存在至少第三折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第三 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第三部分與第三受質蛋白接觸來形成第三培養混合物。該第三受質蛋白可經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成第三折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第三 PMCA 程序可包括在有效形成第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次。每一培養循環可包括在第三折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第三培養混合物以有效引起第三受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞第三培養混合物以有效形成第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第三 PMCA 程序可包括藉由分析第三培養混合物中該第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第三折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第三折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第三受質蛋白。該第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第三受質蛋白。

【0092】 在若干實施例中，該方法可包括測定樣本中第一折疊錯誤之蛋白質聚集體、第二折疊錯誤之蛋白質聚集體、及第四折疊錯誤之蛋白質聚集體之存在。該方法可包括至少執行第四 PMCA 程序以測定樣本中存在或不存在第四折疊錯誤之蛋白

質聚集體。該第四 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第四部分與第四受質蛋白接觸來形成第四培養混合物。該第四受質蛋白可經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成第四折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第四 PMCA 程序可包括在有效形成第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次。每一培養循環可包括在第四折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第四培養混合物以有效引起第四受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞第四培養混合物以有效形成第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第四 PMCA 程序可包括藉由分析第四培養混合物中該第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第四折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第四折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第四受質蛋白。該第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第四受質蛋白。

【0093】 在各種實施例中，第一受質蛋白可獨立地包括 tau 同功型，例如，3R tau、4R tau、及類似物。在若干實施例中，該第一受質蛋白可包括 4R tau。該第一受質蛋白可包括 3R tau。例如，當樣本相應於匹克症或自患有匹克症之受試者抽取時，該第一受質蛋白可排除 3R tau。該第一受質蛋白可為可溶的。該第一受質蛋白可為單體的。該第一受質蛋白可呈原生活體內構形，例如，折疊的。該第一受質蛋白可與每一其他受質蛋白相異。

【0094】 在各種實施例中，該第二受質蛋白可獨立地包括以下一者：tau 同功型，例如，3R tau、4R tau、及類似物；A β 、 α 突觸核蛋白、及類似物。該第二受質蛋白可包括以下一者：3R tau、A β 、 α 突觸核蛋白、及類似物。該第二受質蛋白可包括 3R

tau。該第二受質蛋白可包括 A β 。該第二受質蛋白可包括 α 突觸核蛋白。該第二受質蛋白可主要由以下一者組成，或由以下一者組成：3R tau、4R tau、A β 、或 α 突觸核蛋白。該第二受質蛋白可為可溶的。該第二受質蛋白可為單體的。該第二受質蛋白可呈原生活體內構形，例如，折疊的。該第二受質蛋白可與每一其他受質蛋白相異。

【0095】 在各種實施例中，該第三受質蛋白可獨立地包括以下一者：tau 同功型，例如，3R tau、4R tau、及類似物；A β 、 α 突觸核蛋白、及類似物。該第三受質蛋白可包括以下一者：3R tau、A β 、 α 突觸核蛋白、及類似物。該第三受質蛋白可包括 3R tau。該第三受質蛋白可包括 A β 。該第三受質蛋白可包括 α 突觸核蛋白。該第三受質蛋白可主要由以下一者組成，或由以下一者組成：3R tau、4R tau、A β 、或 α 突觸核蛋白。該第三受質蛋白可為可溶的。該第三受質蛋白可為單體的。該第三受質蛋白可呈原生活體內構形，例如，折疊的。該第三受質蛋白可與每一其他受質蛋白相異。

【0096】 在各種實施例中，該第四受質蛋白可獨立地包括以下一者：tau 同功型，例如，3R tau、4R tau、及類似物；A β 、 α 突觸核蛋白、及類似物。該第四受質蛋白可包括以下一者：3R tau、A β 、 α 突觸核蛋白、及類似物。該第四受質蛋白可包括 3R tau。該第四受質蛋白可包括 A β 。該第四受質蛋白可包括 α 突觸核蛋白。該第四受質蛋白可主要由以下一者組成，或由以下一者組成：3R tau、4R tau、A β 、或 α 突觸核蛋白。該第四受質蛋白可為可溶的。該第四受質蛋白可為單體的。該第四受質蛋白可呈原生活體內構形，例如，折疊的。該第四受質蛋白可與每一其他受質蛋白相異。

【0097】 在一些實施例中，該樣本可取自受試者。該方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定或診斷受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。

【0098】 在若干實施例中，該方法可包括至少執行第二 PMCA 程序以測定樣本中存在或不存在第二折疊錯誤之蛋白質聚集體，例如，包括第二受質蛋白的折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物。該第二受質蛋白可經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該等方法可包括藉由分析第二培養混合物中該第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第二受質蛋白。該第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第二受質蛋白。該第二受質蛋白可包括以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、及 3R tau。

【0099】 在一些實施例中，該樣本可取自受試者。該等方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定或診斷受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。該等方法可包括至少執行第二 PMCA 程序以測定樣本中存在或不存在第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物。該第二受質蛋白可經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括在有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次。每一培養循環可包括在第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第二培養混合物以有效引起第二受質蛋白

之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞第二培養混合物以有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括藉由分析第二培養混合物中該第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第二受質蛋白。該第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第二受質蛋白。

【0100】 在各種實施例中，該受試者可患有 Tau 蛋白病。該等方法可包括根據：樣本中第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之存在；及樣本中第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之存在或不存在來表徵受試者中的 Tau 蛋白病之身份(identity)。該第二受質蛋白可包括以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、及 3R tau。例如，折疊錯誤之 4R tau 聚集體作為第一折疊錯誤之蛋白質聚集體及 A β 作為第二折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在可指示受試者中之 Tau 蛋白病為 AD；折疊錯誤之 4R tau 聚集體作為第一折疊錯誤之蛋白質聚集體及 α 突觸核蛋白作為第二折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在可指示受試者中之 Tau 蛋白病為 PD；折疊錯誤之 4R tau 聚集體作為第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在及包括 A β 、 α 突觸核蛋白、或 3R 的第二折疊錯誤之蛋白質聚集體的不存在可指示 4R Tau 蛋白病，諸如 PSP、CBD、AGD、及類似物。

【0101】 在各種實施例中，該 Tau 蛋白病可包括原發性 Tau 蛋白病或繼發性 Tau 蛋白病。該 Tau 蛋白病可至少部分地藉由 4R tau 蛋白之折疊錯誤及/或聚集來表徵。該 Tau 蛋白病可至少部分地藉由 4R tau 蛋白及 3R tau 蛋白之折疊錯誤及/或聚集來表徵。該 Tau 蛋白病可至少部分地藉由約以下之一的折疊錯誤及/

或聚集之 4R tau 蛋白與折疊錯誤及/或聚集的 3R tau 蛋白之比率來表徵：1:99、5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5、及 99:1，或前述比率之任何兩者之間的範圍，例如，1:99 與 99:1 之間。

【0102】 在若干實施例中，該等方法可包括藉由針對以下至少一者之特性來分析第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體或其一或多個相應 PMCA 動力學參數來表徵 Tau 蛋白病之身份：阿茲海默症(AD)、帕金森氏症(PD)、進行性上眼神經核麻痺症(PSP)、額顳葉失智症(FTD)、皮質基底核退化症(CBD)、輕度認知障礙(MCI)、嗜銀顆粒病(AgD)、創傷性腦損傷(TBI)、慢性創傷性腦病變(CTE)、及拳擊員癡呆(DP)。例如，表徵 Tau 蛋白病之身份可包括測定一或多個相應 PMCA 動力學參數，包括以下一或多者：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度。表徵 Tau 蛋白病之身份可包括將一或多個相應 PMCA 動力學參數與為 Tau 蛋白病之身份之特性的一或多個相應預定相應 PMCA 動力學參數比較來判定相似性或差異以有效表徵 Tau 蛋白病之身份。

【0103】 在一些實施例中，該等方法可包括使用對 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體表徵 Tau 蛋白病之身份。該等方法可包括使用對 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑表徵 Tau 蛋白病之身份。對每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑可包括小分子、肽、或 DNA 或 RNA 適配體；及類似物。該等方法可包括使用每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體的頻譜特性表徵 Tau 蛋白病之身份。

【0104】 在一些實施例中，該等方法可包括例如藉由分析每

一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之蛋白水解抵抗力表徵 Tau 蛋白病之身份。例如，每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體可與例如蛋白酶 K、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、及類似物的蛋白酶以 0.1 至 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之蛋白酶濃度在自 20°C 至 120°C 之各種溫度下接觸並歷時例如自 1 min 至 4 h 之各種時間。每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之蛋白水解抵抗力可經表徵且用於區別各種 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體。

【0105】在若干實施例中，該等方法可包括藉由分析每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體對變性的穩定性來表徵 Tau 蛋白病之身份。例如，每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體可用胍鹽或尿素在誘導每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之蛋白質變性的足夠高溫下處理。胍鹽或尿素之濃度可在 0.1 M 至 8 M 之範圍。該溫度可在 20°C 至 120°C 之間的範圍。每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之穩定性可經表徵並用於區別各種 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體。

【0106】該等方法可包括每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之沉澱。該等方法可包括凝膠層析以表徵每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之大小。該等方法可包括每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之圓偏光二色性光譜學(circular dichroism spectroscopy)。該等方法可包括傅立葉轉換紅外光譜學以分析每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之二級結構。該等方法可包括核磁共振光譜學以分析每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之結構。該等方法可包括質譜法，例如，破碎及碰撞誘導之解離

以分析每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之二級及三級結構。該等方法可包括顯微術，例如，原子力顯微術、低溫電子顯微術、及類似物以分析每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之形態學。該些方法中之每一者可與使用具有不同質量、磁性性質、及/或同位素穩定性之原子同位素進行的置換聯用以對該等方法進行補充；例如，核磁共振光譜學可與每一 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體中之氘交換聯用以獲得結構資訊。

【0107】 在各種實施例中，該等方法經提供以使得 Tau 蛋白病特定地排除匹克症。在各種實施例中，匹克症之排除不涵蓋匹克複合疾病之剩餘者。

【0108】 在若干實施例中，該等方法可包括測定或診斷受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病，包括將樣本中第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在與取自對照受試者之對照樣本比較。該檢測可包括檢測樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量。該樣本可取自受試者。該等方法可包括藉由將樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量與預定閾值量比較來測定或診斷受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。該樣本可取自根據認知測試不呈現失智症之臨床徵象的受試者。該等方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定或診斷受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。該樣本可取自根據對比度成像不呈現皮層斑塊或纏結之受試者。該等方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定或診斷受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。該樣本可取自根據認知測試呈現失智症之臨床徵象的受試者。該等方法可包括根據樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定

或診斷受試者中存在或不存在作為失智症之臨床徵象的促成因子之 Tau 蛋白病。該樣本可取自根據認知測試不呈現失智症之臨床徵象的受試者。該受試者可根據遺傳測試呈現對失智症之傾向。遺傳測試可例如根據 ApoE4 對偶基因、腦源性神經滋養因數 (brain derived neurotrophic factor; BDNF) 基因諸如 val66met 對偶基因(其中 AA 位置 66 處之纈胺酸由甲硫胺酸替代)之變異體、及類似物之一或兩個複本來指示增加的 Tau 蛋白病風險。該等方法可包括根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定或診斷受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。

【0109】 在一些實施例中，該等方法可包括製備第一培養混合物，該第一培養混合物藉由以下至少一個濃度表徵：小於約 20 μM 之第一受質蛋白；小於約 75 μM 之肝素；小於約 190 mM 之 NaCl；及小於約 9.5 μM 之硫代黃素 T。

【0110】 在各種實施例中，該等方法可包括製備第一培養混合物，其包括在約以下一或多者之以 μM 計的濃度下的第一受質蛋白：0.001、0.01、0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、25、50、70、100、150、200、250、500、750、1000、1500、或 2000，或前述值之任何兩者之間的範圍，例如，約 0.001 μM 與約 2000 μM 之間。該等方法可包括製備第一培養混合物，其藉由在約以下一或多者之以 μM 計的濃度下的肝素表徵：0.001、0.01、0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、11、12、12.5、15、17.5、20、25、30、35、

40、45、50、55、60、65、70、及 75，或前述值之任何兩者之間的範圍，例如，約 0.001 μM 與約 75 μM 之間。該等方法可包括製備第一培養混合物，該第一培養混合物包括以下一或多者之緩衝液組合物：Tris-HCL、PBS、MES、PIPES、MOPS、BES、TES、及 HEPES。該等方法可包括製備第一培養混合物，該第一培養混合物包括在約以下一或多者之總濃度下的緩衝液組合物：1 μM 、10 μM 、100 μM 、250 μM 、500 μM 、750 μM 、1 mM、10 mM、100 mM、250 mM、500 mM、750 mM、及 1M，或前述值之任何兩者之間的範圍，例如，約 1 μM 與約 1 M 之間。該等方法可包括製備第一培養混合物，該第一培養混合物包括在約以下一或多者之總濃度下的鹽組合物：1 μM 、10 μM 、100 μM 、250 μM 、500 μM 、750 μM 、1 mM、10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、110 mM、120 mM、130 mM、140 mM、150 mM、160 mM、170 mM、180 mM、190 mM、200 mM、250 mM、500 mM、750 mM、及 1M，或前述值之任何兩者之間的範圍，例如，約 1 μM 與約 1 M 之間。該鹽組合物可包括以下一或多者：NaCl 及 KCl。

【0111】 在各種實施例中，該等方法可包括在約以下一或多者之 pH 下製備或維持第一培養混合物：5、5.5、6、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、或 9，或前述值之任何兩者之間的範圍，例如，約 pH 5 至約 pH 9 之間。

【0112】 在一些實施例中，該等方法可包括製備第一培養混合物，該第一培養混合物包括在以下一或多者之總濃度下的指示劑：1 nM、10 nM、100 nM、250 nM、500 nM、750 nM、1 μM 、2 μM 、3 μM 、4 μM 、5 μM 、6 μM 、7 μM 、8 μM 、9 μM 、9.5 μM 、

10 μM 、25 μM 、50 μM 、100 μM 、250 μM 、500 μM 、750 μM 、1 mM，或前述值之任何兩者之間的範圍，例如，約 1 nM 與約 1 mM 之間。

【0113】在該等方法之一些實施例中，該培養可包括在以下一者的以 $^{\circ}\text{C}$ 計的溫度下加熱或維持第一培養混合物：5、10、15、20、22.5、25、27.5、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、50、55、60，或前述值之任何兩者之間的範圍，例如，約 5°C 與約 60°C 之間。

【0114】在若干實施例中，該等方法可包括使第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑與第一培養混合物接觸。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑可藉由在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下的指示狀態及在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體不存在時的非指示狀態來表徵。測定樣本中第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在可包括檢測第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑的指示狀態。指示劑之指示狀態及指示劑之非指示狀態可藉由螢光之差異來表徵。測定樣本中第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在可包括檢測螢光之差異。該等方法可包括使莫耳過量的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑與第一培養混合物接觸。該莫耳過量可大於包括在第一受質蛋白中之蛋白質單體及第一培養混合物中之第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的總莫耳量。第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑可包括以下一或多者：硫代黃素，例如，硫代黃素 T 或硫代黃素 S；剛果紅、m-I-二苯乙烯、金黃胺 G、PIB、BF-227、X-34、TZDM、FDDNP、MeO-XO4、IMPY、NIAD-4、發光共軛聚噻吩、具有諸如綠色螢光蛋白及黃色螢光蛋白之螢光蛋白的融合物、其衍生物、及類似物。

【0115】 在各種實施例中，該方法可包括測定樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量。例如，可將已知量的活體外合成的折疊錯誤之蛋白質聚集體添加至健康患者之生物流體之各種部分，例如，CSF。隨後，可對各種部分執行 PMCA。在各種部分之每一者中，可添加折疊錯誤之蛋白質聚集體之螢光指示劑，且可隨例如 PMCA 循環之數量的變化來量測螢光以測定各種 PMCA 動力學參數，例如，達到最大螢光訊號之 PMCA 循環數量、達到最大螢光訊號之 50% 的 PMCA 循環數量、螢光訊號增加之停滯期、螢光訊號相對 PMCA 循環之增加速率、及類似物。校準曲線顯示所添加的合成種子之濃度與 PMCA 動力學參數之間的關係。可對未知樣本量測該等動力學參數且與校準曲線比較以測定存在於特定樣本中預期量之種子。替代地，樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量可藉由樣本之一系列已知稀釋液及每一連續稀釋之 PMCA 來測定，以測定第一折疊錯誤之蛋白質聚集體是否可在特定稀釋液中得以檢測。未稀釋樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量可基於已知稀釋液來估算，該已知稀釋液使得藉由 PMCA 未檢測到第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。在另一實例中，樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量可藉由樣本之一系列已知稀釋液及 PMCA 來測定，以測定每一連續稀釋液中的檢測訊號。連續稀釋液中所收集的檢測訊號可例如經由最小二乘方分析擬合來測定第一折疊錯誤之蛋白質聚集體是否可在特定稀釋液中得以檢測。在另一實例中，樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量可藉由已知量的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的抗體來測定

【0116】 在一些實施例中，該等方法可包括在至少約以下一或多者之靈敏度下檢測樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體

之量：70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、及 100%，例如，至少約 70%。該等方法可包括在小於約以下一或多者下檢測樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量：625、62.5、6.25、630 μg 、63 μg 、6.3 μg 、630 ng 、63 ng 、6.3 ng 、630 pg 、200 pg 、63 pg 、6.3 pg 、630 fg 、300 fg 、200 fg 、125 fg 、63 fg 、50 fg 、30 fg 、15 fg 、12.5 fg 、10 fg 、5 fg 、或 2.5 fg 。該等方法可包括在小於約以下一或多者下檢測樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量：100 nmol 、10 nmol 、1 nmol 、100 pmol 、10 pmol 、1 pmol 、100 fmol 、10 fmol 、3 fmol 、1 fmol 、100 attomol 、10 attomol 、5 attomol 、2 attomol 、1 attomol 、0.75 attomol 、0.5 attomol 、0.25 attomol 、0.2 attomol 、0.15 attomol 、0.1 attomol 、及 0.05 attomol ，例如，小於約 100 nmol 。該等方法可包括以與藉由樣本包括的第一受質蛋白之莫耳比率檢測樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量。該莫耳比率可小於約以下一或多者：1: 100、1: 10,000、1: 100,000、及 1: 1,000,000，例如，小於約 1:100。該等方法可包括與對照樣本比較來測定樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量。

【0117】 在若干實施例中，該等方法可包括以至少約以下一或多者之特異性來檢測樣本中的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體：70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、及 100%，例如，至少約 70%。該等方法可包括檢測第一折疊錯誤之蛋白質聚集體，包括以下一或多者：西方墨點檢定、

點跡墨點檢定、酶聯免疫吸附檢定 (enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)、螢光蛋白/肽結合檢定、硫代黃素結合檢定、剛果紅結合檢定、沉澱檢定、電子顯微術、原子力顯微術、表面電漿子共振、及光譜學。ELISA 可包括雙側夾心 ELISA。該光譜學可包括以下一或多者：準光散射光譜學、多光譜紫外光譜學、共焦雙色螢光關聯光譜學、傅立葉轉換紅外光譜學、利用分光鏡檢測之毛細管電泳、電子自旋共振光譜學、核磁共振光譜學、及螢光共振能量轉移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer ; FRET)光譜學。檢測第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括使第一培養混合物與蛋白酶接觸；及在以下一或多者中使用抗折疊錯誤之蛋白質抗體或對折疊錯誤之 tau 聚集體為特異性的抗體檢測第一折疊錯誤之蛋白質聚集體：西方墨點檢定、點跡墨點檢定、及 ELISA。

【0118】 在各種實施例中，該等方法可包括提供呈標記形式之第一受質蛋白。呈標記形式之第一受質蛋白可包括以下一或多者：共價併入之放射性胺基酸、共價併入、經同位素標記之胺基酸、及共價併入之螢光團。該等方法可包括檢測併入第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體中的呈標記形式之第一受質蛋白。

【0119】 在一些實施例中，該樣本可包括以下一或多者：例如血液之生物流體、例如叮嚀之生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該樣本可包括以下一或多者：羊水；膽汁；血液；腦脊髓液；叮嚀；皮膚；滲出物；糞便；胃液；淋巴；乳汁；黏液；黏膜；腹膜液；血漿；胸膜液；膿液；唾液；皮脂；精液；汗液；滑液；淚液；及尿。該樣本可來源於以下一或多者之細胞或組織：皮膚、腦、心臟、肝、胰臟、肺、腎、胃腸、

神經、黏膜、血液細胞、腺、及肌肉。該等方法可包括諸如藉由抽取生物流體或生物材料，執行組織生檢、及類似方式自受試者獲得樣本。例如以流體或均質化形式添加至特定 PMCA 反應的樣本之每一部分之體積可為約以下一者的以 μL 計之體積：5,000、4,000、3,000、2,000、1000、900、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300、250、200、150、125、100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、15、10、5、或 1，或前述值之任何兩者之間的範圍，例如，約 1 μL 至約 1000 μL 之間。在一些實施例中，當樣本為 CSF 時，添加至特定 PMCA 反應之每一部分之量可為例如約以下之前述一者的任何體積的以 μL 計之體積：80、70、60、50、40、30、25、20、15、或 10，或前述值之任何兩者之間的範圍，例如，約 10 μL 至約 80 μL ，例如，約 40 μL 。在一些實施例中，當樣本為血漿時，添加至特定 PMCA 反應之每一部分之量可為例如約以下之前述一者的任何體積的以 μL 計之體積：750、700、650、600、550、500、450、400、350、300、250，或前述值之任何兩者之間的範圍，例如，約 250 μL 至約 750 μL ，例如，約 500 μL 。在一些實施例中，當樣本為血漿時，添加至特定 PMCA 反應之每一部分之量可為例如約以下之前述一者的任何體積的以 μL 計之體積：5,000、4,000、3,000、2,000、1000、900、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300、250、或 200，或前述值之任何兩者之間的範圍，例如，約 200 μL 至約 1000 μL 之間。

【0120】 在若干實施例中，該受試者可為以下一者：人類、小鼠、大鼠、犬、貓、牛、馬、鹿、麋鹿、綿羊、山羊、豬、及非人類靈長類動物。該受試者可為以下一或多者：患有 Tau 蛋白病之風險、患有 Tau 蛋白病、及處於針對 Tau 蛋白病之治

療之下。該等方法可包括藉由將樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量與比較樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量比較來測定受試者中 Tau 蛋白病之進程或體內環境恆定，該比較樣本係相較於樣本在不同時間取自受試者。該受試者可用 Tau 蛋白病調節療法來治療。該等方法可包括將樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量與比較樣本中該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量比較。該樣本及該比較樣本可在 Tau 蛋白病調節療法下的時間段內於不同時間取自受試者。該等方法可包括測定為以下一者的受試者：根據在該時間段內該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之改變而對 Tau 蛋白病調節療法有反應，或根據在該時間段內該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之體內環境恆定而對 Tau 蛋白病調節療法無反應。該等方法可包括用 Tau 蛋白病調節療法治療測定為對 Tau 蛋白病調節療法有反應的受試者。該等方法可包括用 Tau 蛋白病調節療法治療受試者以抑制第一受質蛋白之產生或抑制第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之聚集。

【0121】 在一些實施例中，該受試者可用蛋白質折疊錯誤病症(protein misfolding disorder；PMD)調節療法來治療。該方法可包括將樣本中每一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量與比較樣本中每一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量比較。該樣本及該比較樣本可在每一折疊錯誤之蛋白質聚集體調節療法下的時間段內於不同時間取自受試者。該等方法可包括測定或診斷為以下一者的受試者：根據在該時間段內每一折疊錯誤之蛋白質聚集體之改變而對每一折疊錯誤之蛋白質聚集體調節療法有反應，或根據在該時間段內每一折疊錯誤之蛋白質聚集體之體內環境恆定而對每一折疊錯誤之蛋白質聚集體調節療法無反應。該方法可

包括用每一折疊錯誤之蛋白質聚集體調節療法治療測定為對每一折疊錯誤之蛋白質聚集體調節療法有反應之受試者。對於 AD，例如，PMD 調節療法可包括投與以下一或多者：BACE1 (β 分泌酶 1) 之抑制劑； γ -分泌酶之抑制劑；及 $A\beta$ 體內環境恆定之調節劑，例如， $A\beta$ 體內環境恆定之免疫治療調節劑。該 $A\beta$ 調節療法可包括投與以下一或多者：E2609；MK-8931；LY2886721；AZD3293；semagacestat (LY-450139)；avagacestat (BMS-708163)；索拉珠單抗；克雷內治單抗(crenezumab)；巴匹珠單抗(bapineuzumab)；BIIB037；CAD106；8F5 或 5598 或針對 $A\beta$ globulomer 產生的其他抗體，例如，如藉由 Barghorn 等人「Globular amyloid β -peptide₁₋₄₂ oligomer--a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease」*J. Neurochem.*, **2005**, *95*, 834-847 所述，其全部教示內容係以引用方式併入本文中；ACC-001；V950；Affitrope AD02；及類似物。

【0122】對於 PD，例如，PMD 調節療法可包括主動免疫接種，諸如 PD01A+或 PD03A+；被動免疫接種，諸如 PRX002、及類似物。PMD 調節療法亦可包括用以下各項治療：GDNF (源於神經膠細胞系之神經滋養因數)、肉苜、鈣通道阻斷劑、特定而言 Cav1.3 通道阻斷劑諸如伊拉地平、菸鹼及菸鹼受體促效劑、GM-CSF、麩胱甘肽、PPAR- γ 促效劑諸如吡格列酮、及多巴胺受體促效劑，包括 D2/D3 多巴胺受體促效劑及 LRRK2 (白胺酸富集的重複片段激酶 2) 抑制劑。

【0123】在若干實施例中，可使用 PMCA 在來自患者之樣本中量測折疊錯誤之蛋白質之量。具有升高的折疊錯誤之蛋白質量測值的患者可用針對 PMD 之疾病改質療法來治療。可不治療具有正常折疊錯誤之蛋白質量測值的患者。可跟蹤患者對疾

病改質療法之反應。例如，可在治療介入開始時，可在患者樣本中量測折疊錯誤之蛋白質位準。在治療患者達臨床有意義之時間段之後，可獲得另一患者樣本且可量測折疊錯誤之蛋白質位準。在治療介入之後顯示折疊錯誤之蛋白質位準之改變的患者可視為對治療有反應。顯示未改變的折疊錯誤之蛋白質位準的患者可視為無反應的。該等方法可包括在含有可干擾 PMCA 反應之患者樣本中檢測折疊錯誤之蛋白質聚集體。

【0124】 在各種實施例中，該等方法可包括選擇性地濃縮樣本及第一培養混合物之一或多者中的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。選擇性地濃縮第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括在形成第一培養混合物之前預處理樣本。選擇性地濃縮第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括在培養第一培養混合物之前預處理第一培養混合物。選擇性地濃縮第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括接觸能夠結合第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的一或多種抗體以形成經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。能夠結合第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的一或多種抗體可包括以下一或多者：對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的胺基酸表位序列為特異性的抗體、及對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的構形為特異性的抗體。對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的構形為特異性的抗體可對 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 聚集體之構形表位有選擇性。能夠結合第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的一或多種抗體可偶合至固相。固相可包括磁珠及多孔板之一或多者。

【0125】 例如，ELISA 板可用用於來自患者樣本之經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的抗體塗覆。抗體塗覆的 ELISA 板可用患者樣本培養，未結合材料可予以洗除，且可執行 PMCA 反應。抗體亦可偶合至珠粒。珠粒可用患者樣本培養且用於將

第一折疊錯誤之蛋白質聚集體-抗體複合物與患者樣本之剩餘部分分離。

【0126】 在一些實施例中，使樣本與第一受質蛋白接觸以形成第一培養混合物可包括使莫耳過量之第一受質蛋白與包括經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的樣本接觸。莫耳過量之第一受質蛋白可大於包括在經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中的蛋白質單體之總莫耳量。培養第一培養混合物可在經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集以形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。

【0127】 在若干實施例中，破壞第一培養混合物可包括物理上破壞及/或以熱方式破壞。例如，破壞可包括以下一或多者：音波振動處理、攪拌、搖動、冷凍/融化、雷射照射、高壓釜培養、高壓、及均質化。破壞第一培養混合物可包括循環攪動。循環攪動可進行達以下一或多者：約 50 轉每分鐘(rotations per minute；RPM)與 10,000 RPM 之間，約 200 RPM 與約 2000 RPM 之間，及約 500 RPM。破壞第一培養混合物可在每一培養循環進行達以下一或多者：約 5 秒與約 10 分鐘之間、約 30 秒與約 1 分鐘之間、約 45 秒與約 1 分鐘之間、及約 1 分鐘。培養第一培養混合物可在每一培養循環中獨立地進行達以下一或多者：約 1 分鐘與約 5 小時之間、約 5 分鐘與約 5 小時之間、約 10 分鐘與約 2 小時之間、約 15 分鐘與約 1 小時之間、及約 25 分鐘與約 45 分鐘。每一培養循環可包括獨立地培養及破壞第一培養混合物達以下一或多者：培養約 1 分鐘與約 5 小時之間且破壞約 5 秒與約 10 分鐘之間；培養約 5 分鐘與約 5 小時之間且破壞約 5 秒與約 10 分鐘之間；培養約 10 分鐘與約 2 小時之間且破壞約

30 秒與約 1 分鐘之間；培養約 15 分鐘與約 1 小時之間且破壞約 45 秒與約 1 分鐘之間；培養約 25 分鐘與約 45 分鐘之間且破壞約 45 秒與約 90 秒之間；培養約 29 分鐘且破壞約 1 分鐘；及培養約 1 分鐘且破壞約 1 分鐘。進行培養循環可重複達以下一或多者：約 2 次與約 1000 次之間、約 5 次與約 500 次之間、約 50 次與約 500 次之間、及約 150 次與約 250 次之間。

【0128】 在各種實施例中，使樣本與第一受質蛋白接觸以形成第一培養混合物可在生理條件下進行。該等方法可包括使樣本與莫耳過量之第一受質蛋白接觸以形成第一培養混合物。該莫耳過量可大於包括在樣本中的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中的蛋白質單體之總莫耳量。

【0129】 在一些實施例中，該等方法可包括使樣本與例如硫代黃素 T 或硫代黃素 S 之硫代黃素及莫耳過量之第一受質蛋白接觸以形成第一培養混合物。該莫耳過量可大於包括在樣本中的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中的第一受質蛋白之量。該方法可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之至少部分的折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括搖動第一培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該等方法可包括藉由檢測相應於第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的硫代黃素之螢光來測定樣本中第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在。

【0130】 在若干實施例中，第一受質蛋白可藉由以下一者產生：化學合成、重組產生、及自非重組生物樣本提取。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括可溶性第一折疊錯誤之蛋白質

聚集體及不可溶第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之一或多者。該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括以下一或多者：可溶性部分及不可溶部分。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可實質上為可溶性第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。在一些實施例中，該等方法可提供：樣本排除 tau 小纖維。例如，該樣本可經過濾或離心以移除 tau 小纖維。

【0131】 在各種實施例中，該第二受質蛋白可與第一受質蛋白相異。該第二受質蛋白可包括以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、3R tau、及 4R tau。該第一受質蛋白可包括 4R tau。

【0132】 在一些實施例中，該等方法可包括至少執行第二 PMCA 程序以測定樣本中存在或不存在第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物。該第二受質蛋白可經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括在有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次。每一培養循環可包括在第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第二培養混合物以有效引起第二受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞第二培養混合物以有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括藉由分析第二培養混合物中該第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第二受質蛋白。該第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第二受質蛋白。

【0133】 在若干實施例中，Tau 蛋白病可存在於受試者中。

該等方法可包括根據樣本中存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來表徵受試者中 Tau 蛋白病之身份。該等方法可包括根據樣本中存在或不存在該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體來表徵受試者中 Tau 蛋白病之身份。

【0134】 在一些實施例中，該等方法可提供：Tau 蛋白病不是主要藉由 3R tau 蛋白之折疊錯誤及/或聚集來表徵。例如，該 Tau 蛋白病可至少部分地藉由約以下之一的折疊錯誤及/或聚集之 4R tau 蛋白與折疊錯誤及/或聚集的 3R tau 蛋白之比率來表徵：1:99、5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5、及 99:1，或前述比率之任何兩者之間的範圍，例如，1:99 與 99:1 之間。

【0135】 在各種實施例中，該等方法可包括使樣本與例如硫代黃素 S 或硫代黃素 T 之硫代黃素及莫耳過量之第一受質蛋白接觸以形成第一培養混合物。該莫耳過量可大於包括在樣本中的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中的蛋白質單體之量。該等方法可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之至少部分的折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括搖動第一培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該等方法可包括藉由檢測相應於第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的硫代黃素之螢光來測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。

【0136】 在該等方法之一些實施例中，自樣本捕獲第一折疊錯誤之蛋白質聚集體以形成經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚

集體可使用對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體為特異性的一或多種抗體來進行。對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體為特異性的一或多種抗體可包括以下一或多者：對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的胺基酸表位序列為特異性的抗體、及對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的構形為特異性的抗體。對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的構形為特異性的抗體可對 Tau 蛋白病特異性第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之構形表位有選擇性。對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之構形為特異性的抗體可相應於以下一者：阿茲海默症(AD)、帕金森氏症(PD)、進行性上眼神經核麻痺症(PSP)、額顳葉失智症(FTD)、皮質基底核退化症(CBD)、輕度認知障礙(MCI)、嗜銀顆粒病(AgD)、創傷性腦損傷(TBI)、慢性創傷性腦病變(CTE)、及拳擊員癡呆(DP)。對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體為特異性的一或多種抗體可偶合至固相。固相可包括磁珠及多孔板之一或多者。使樣本與第一受質蛋白接觸以形成第一培養混合物可包括使莫耳過量之第一受質蛋白與樣本接觸。莫耳過量之第一受質蛋白可大於包括在經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中的蛋白質單體之總莫耳量。培養第一培養混合物可在經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集以形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第一受質蛋白可包括 4R tau 蛋白。

【0137】 在各種實施例中，該等方法可包括至少執行第二 PMCA 程序以測定樣本中存在或不存在第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物，該第二受質蛋白可經受病理學折疊錯誤及/或聚集。該第二 PMCA 程序可包括在有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環

兩次或更多次。每一培養循環可包括在第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第二培養混合物以有效引起第二受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞第二培養混合物以有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括藉由分析第二培養混合物中該第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。Tau 蛋白病可存在於受試者中。該等方法可包括根據：樣本中第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之存在；及樣本中第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之存在或不存在來表徵受試者中的 Tau 蛋白病之身份。該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第二受質蛋白。該第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第二受質蛋白。該第二受質蛋白可與第一受質蛋白相異。該第二受質蛋白可包括以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、及 3R tau。

【0138】 在一些實施例中，該等方法可包括藉由分析一或多種折疊錯誤之聚集體之至少一個特性來將每一 Tau 蛋白病與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，該等折疊錯誤之聚集體各自相應於 A β 、 α 突觸核蛋白、及 3R tau 之一者。每一特性可相應於以下一或多者：使用對一或多種折疊錯誤之聚集體中任何者之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；一或多種折疊錯誤之聚集體之一或多個 PMCA 動力學參數包括以下一或多者：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；對一或多種折疊錯誤之聚集體中任何者有選擇性的指示劑；及一或多種折疊錯誤之聚集體中任何者的頻譜特性。

【0139】 另外，例如，特異性抗體可用於第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。例如，對於 AD，類澱粉抗體可包括以下一或多者：

6E10、4G8、82E1、A11、X-40/42、16ADV；及類似物。此等抗體可如下獲得：6E10及G8 (Covance, Princeton, NJ)；82E1 (IBL America, Minneapolis, MN)；A11 (Invitrogen, Carlsbad, CA)；X-40/42 (MyBioSource, Inc., San Diego, CA)；及16ADV (Acumen Pharmaceuticals, Livermore, CA)。

【0140】另外，對於PD，例如，一或多種突觸核蛋白特異性抗體可包括PD特異性抗體，其包括以下一或多者： α/β 突觸核蛋白N-19； α 突觸核蛋白C-20-R； α 突觸核蛋白211； α 突觸核蛋白Syn 204； α 突觸核蛋白2B2D1； α 突觸核蛋白LB 509； α 突觸核蛋白SPM451； α 突觸核蛋白3G282； α 突觸核蛋白3H2897； α/β 突觸核蛋白Syn 202； α/β 突觸核蛋白3B6； $\alpha/\beta/\gamma$ -突觸核蛋白FL-140；及類似物。在一些實例中，一或多種特異性抗體可包括以下一或多者： α/β 突觸核蛋白N-19； α 突觸核蛋白C-20-R； α 突觸核蛋白211； α 突觸核蛋白Syn 204；及類似物。此等抗體可如下獲得： α/β 突觸核蛋白N-19 (目錄號SC-7012, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX)； α 突觸核蛋白C-20-R (SC-7011-R)； α 突觸核蛋白211 (SC-12767)； α 突觸核蛋白Syn 204 (SC-32280)； α 突觸核蛋白2B2D1 (SC-53955)； α 突觸核蛋白LB 509 (SC-58480)； α 突觸核蛋白SPM451 (SC-52979)； α 突觸核蛋白3G282 (SC-69978)； α 突觸核蛋白3H2897 (SC-69977)； α/β 突觸核蛋白Syn 202 (SC-32281)； α/β 突觸核蛋白3B6 (SC-69699)；或 $\alpha/\beta/\gamma$ 突觸核蛋白FL-140 (SC-10717)。

【0141】在各種實施例中，提供一種用於測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的套組。該套組可包括第一受質蛋白，該第一受質蛋白可包括4R tau。該套組可包括第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的指示劑。該第一折疊錯誤之蛋白

質聚集體可包括第一受質蛋白。該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體可相應於 Tau 蛋白病。該套組可包括緩衝液。該套組可包括肝素。該套組可包括鹽。該套組可包括說明書。該說明書可指導使用者獲得樣本。該說明書可指導使用者至少執行第一 PMCA 程序。該第一 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第一部分與第一受質蛋白、該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之該指示劑、該緩衝液、該肝素、及該鹽接觸來形成第一培養混合物。該第一培養混合物可由一定濃度之以下一或多者來形成：小於約 20 μM 之該第一受質蛋白；小於約 75 μM 之該肝素；小於約 190 mM 之為 NaCl 的鹽；及小於約 9.5 μM 之為硫代黃素 T 的該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之該指示劑。該第一 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第一培養混合物以有效引起第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該說明書可指導使用者藉由根據該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之該指示劑分析第一培養混合物中該第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定該樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。

【0142】 在若干實施例中，該套組可包括本文描述的方法之任何要素。此外，該套組可包括說明書，其指導使用者進行本文描述的方法之任何步驟。

【0143】 在一些實施例中，例如，該說明書可包括指導使用者以獲得來自受試者之樣本。該樣本可包括以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物。該說明書

指導使用者根據樣本中存在或不存在該第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定或診斷受試者中的 Tau 蛋白病。

【0144】在各種實施例中，該套組可包括第二受質蛋白及第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑。該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體可包括第二受質蛋白。該第二受質蛋白可與第一受質蛋白相異。該第二受質蛋白可包括以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、3R tau、及 4R tau。該說明書可指導使用者至少執行第二 PMCA 程序。該第二 PMCA 程序可包括藉由使樣本之第二部分與第二受質蛋白及第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑接觸來形成第二培養混合物。該第二 PMCA 程序可包括進行培養循環兩次或更多次以有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。每一培養循環可包括在第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養第二培養混合物以有效引起第二受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集。每一培養循環可包括破壞培養混合物以有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。該第二 PMCA 程序可包括藉由分析第二培養混合物中該第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在該第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。該說明書亦可指導使用者根據：樣本中第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之存在；及樣本中第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之存在或不存在來針對 Tau 蛋白病之身份表徵樣本。

【0145】在一些實施例中，該套組可包括 PMCA 設備。該 PMCA 設備可包括以下一或多者：多壁微滴定板；微射流板；搖動設備；分光計；及培養器。該設備可作為個別板或設備之一或多者、作為組合裝置、及類似物來包括。例如，搖動微板閱讀器可用以執行培養及搖動之循環且在實驗(例如，FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH Inc., Cary, NC)之過程中自動地量測

ThT 螢光發射。

【0146】對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之構形為特異性的抗體可相應於以下一者：阿茲海默症(AD)、帕金森氏症(PD)、進行性上眼神經核麻痺症(PSP)、額顳葉失智症(FTD)、皮質基底核退化症(CBD)、輕度認知障礙(MCI)、嗜銀顆粒病(AgD)、創傷性腦損傷(TBI)、慢性創傷性腦病變(CTE)、及拳擊員癡呆(DP)。該說明書可包括根據使用對第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之構形為特異性的抗體進行的結合檢定測定受試者中存在或不存在以下一者：AD、PD、PSP、FTD、CBD、MCI、AgD、TBI、CTE、及 DP。

實例

實例 1：合成 A β 寡聚物之製備

【0147】A β 1-42 係使用固相 N-第三丁氧基羰基化學作用在耶魯大學的 W. Keck 設施處合成且藉由逆相 HPLC 純化。將最終產物冷凍乾燥且藉由胺基酸分析及質譜法來表徵。為製備不含聚集折疊錯誤之 A β 蛋白質的儲備溶液，將聚集體高 pH 溶解且經由 30 kDa 截止過濾器過濾以移除剩餘的聚集體。為製備不同類型之聚集體，將無種子的 A β 1-42 之溶液(10 μ M)在 pH 7.4 的 0.1 M Tris-HCl 中在 25 $^{\circ}$ C 下在攪動下培養不同時間。此製備物取決於培養時間含有呈相異比例的 A β 單體以及小纖維、原纖維及可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質之混合物。聚集度係藉由 ThT 螢光發射、陰性染色之後的電子顯微術、利用 A11 構形抗體之點跡墨點研究及在凝膠電泳之後使用 4G8 抗 A β 抗體的西方墨點來表徵。

【0148】具有不同大小的 A β 寡聚物之混合物係在小纖維形成的過程期間產生。特定而言，可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質係

藉由在 25°C 下在攪拌下培養單體合成的 A β 1-42 (10 μ M)來製備。在 5 h 之培養之後，在陰性染色之後藉由電子顯微術觀察到豐富的可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質，其外觀上呈小球狀，其中僅觀察到少量原纖維及小纖維。在 10 h，主要存在原纖維，且在 24 h，觀察到大量長的小纖維。圖 1A 顯示在培養之 0h、5h、10h、及 24h 時獲取的電子顯微照片。

【0149】根據 Kaye 等人「Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis」, *Science* 2003, 300, 486-489 之方法，使用 A11 抗寡聚物特異性抗體測試可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質聚集體為陽性。在進一步培養之後，在 10 h 及 24 h，觀察到原纖維及小纖維結構。聚集體之大小係藉由經由具有有限定孔隙大小之過濾器過濾及在 SDS-PAGE 分離之後的西方墨點來測定。藉由培養 5 h 形成的可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質係保持在具有 30 kDa 截止值的過濾器且通過 1000 kDa 截止過濾器。圖 1B 為可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質聚集體之西方墨點。此可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質之電泳分離顯示：大多數材料作為約 170 kDa SDS 耐性聚集體遷移，在 17 kDa 處存在微小帶。

實例 2：A β -PMCA 檢測合成的 A β 寡聚物

【0150】實例 2A. A β 聚集之接種係藉由在硫代黃素 T 存在下，利用或不利用不同數量之合成可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質(對照(無 A β 寡聚物)；或於合成可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質中 3、80、300、及 8400 毫微微莫耳)培養無種子 A β 1-42 來研究。A β -PMCA 一般程序：將 2 μ M 無聚集體 A β 1-42 於 pH 7.4 的 0.1 M Tris-HCl 中之溶液(200 μ L 總體積)放置於不透明 96 孔板中且單獨或在合成 A β 聚集體(如實例 1 所述藉由培養 5h 來製備)或

40 μL 之 CSF 等分試樣存在下培養。將樣本在 5 μM 硫代黃素 T (ThT)存在下培養且使用 Eppendorf 熱混合器在 22 $^{\circ}\text{C}$ 之恆定溫度下經受循環攪動(在 500 rpm 下 1 min，繼之以無搖動 29 min)。在各種時間點處，使用板式分光螢光計在 435 nm 激發之後在 485 nm 處於板中量測 ThT 螢光。圖 2A 為使用所指示毫微微莫耳濃度之合成可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質種子，藉由硫代黃素 T 螢光量測的類澱粉形成(無循環擴增)相對時間之圖表。監視緩衝液之肽濃度、溫度及 pH 以控制停滯期之程度及實驗間的再現性。在該些條件下，在其中執行實驗之時間(125 h)期間未檢測出自發 A β 聚集。在 0.3 至 8.4 fmol 之實例 1 的合成可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質存在下觀察到單體 A β 1-42 蛋白質之聚集。

【0151】實例 2B：使用擴增循環即培養及物理破壞之組合階段。將與圖 2A 相同的樣本在循環攪動(在 500 rpm 下攪拌 1 min，繼之以無搖動 29 min)下培養。使用板式分光螢光計(激發：435 nm；發射：485 nm)，藉由結合至類澱粉小纖維之硫代黃素 T (ThT)量測隨時間推移的聚集。圖表顯示 3 次重複測試之平均值加標準誤差。A β 寡聚物之濃度係假定 170 kDa 之平均分子量來估算。圖 2B 為顯示針對實例 1 的各種濃度之合成可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質，藉由 ThT 螢光隨時間變化量測的擴增循環加速的類澱粉形成之圖表。在該些條件下，藉由 8400、300、80 及 3 fmol 之合成可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質誘導的單體 A β 1-42 蛋白質之聚集明顯更快，且更易於與在不存在合成可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質情況下觀察到的區別。此結果指示：在該些條件下，給定樣本中的檢測極限為 3 fmol 之可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質或更小。

實例 3：A β -PMCA 檢測 AD 患者之腦脊髓液中的折疊錯誤

之 A β

【0152】CSF 之等分試樣係自 50 位 AD 患者、39 位受非退化性神經病學疾病(non-degenerative neurological disease ; NND) 影響的認知正常個體、及 37 位受包括其他形式之失智症的非 AD 神經退化性疾病(non-AD neurodegenerative disease ; NAND) 影響的患者獲得。測試 CSF 樣本係自 50 位診斷為具有可能的 AD 之患者獲得，該可能的 AD 係如 DSM-IV 及 NINCDS-ADRA 準則(McKhann 等人，1984)定義且使用各種測試來測定，該等測試包括常規醫學檢查、神經病學評估、神經心理學評定、磁共振成像及對 A β 1-42、總 Tau 及磷酸 Tau 之 CSF 位準的量測。AD 患者在樣本收集之時間時的平均年齡為 71.0 \pm 8.1 歲(範圍 49-84)。對照 CSF 樣本係自 39 位受非退化性神經病學疾病(NND) 影響的患者獲得，包括正常壓力水腦之 12 個病例、7 位患有周邊神經病變之患者、7 位患有多樣形式之腦腫瘤者、2 位患有 ICTUS 者、1 位患有嚴重頭痛者、3 位患有腦炎者、1 位患有高血壓者及 6 位不明者診斷者。自此組樣本獲取 CSF 樣本的平均年齡為 64.6 \pm 14.7 歲(範圍 31-83)。對照 CSF 樣本亦取自 37 個受非 AD 神經退化性疾病(NAND)影響的個體，包括 10 個額顳葉失智症之病例(5 行為變異體及 5 個語言變異體)、6 位患有帕金森氏症之患者(包括 4 位與失智症相關聯者及 1 位患有運動神經元病者)、6 位患有進行性上眼神經核麻痺症者、6 位患有脊髓小腦性失調症者(1 位與失智症相關聯)、4 位患有肌肉萎縮性脊髓側索硬化症者、2 位患有亨汀頓氏舞蹈症者、1 位患有 MELAS 者、1 位患有路易氏體失智症者、及 1 位患有血管性失智症者。對此群組而言，在樣本收集時的平均年齡為 63.8 \pm 11.1 歲(範圍 41-80)。在一夜禁食之後，用防止損傷的針在 L4/L5 或 L3/L4

間隙處的腰椎穿刺之後，將 CSF 樣本收集在聚丙烯管中。在 3,000 g 下將樣本在 4°C 下離心 3 min，取等分試樣且在 -80°C 下儲存直至分析。測定 CSF 細胞計數、葡萄糖及蛋白質濃度。藉由速率濁度測定法量測白蛋白。為評估血腦阻障之完整性及鞘內 IgG 產生，計算白蛋白商(CSF 白蛋白/血清白蛋白) $\times 10^3$ 及 IgG 指數(CSF 白蛋白/血清白蛋白)/(CSF IgG/血清 IgG)。該研究係根據赫爾辛基宣言之規定來進行且獲倫理委員會批准。

【0153】分析之實驗以及原生部分係盲式進行。圖 3A 為隨 ThT 螢光標記變化量測的類澱粉形成相對時間之圖表，其顯示來自 AD、NND、及 NAND 群組的 5 個代表性樣本的 A β 聚集之平均動力學。

【0154】結果指示：來自 AD 患者之 CSF 相較於對照 CSF 顯著地加速 A β 聚集($P < 0.001$)。藉由單向 ANOVA、繼之以測試後塔基多重比較(Tukey's multiple comparison)來分析在人類 CSF 樣本存在下的 A β 聚集動力學之差異顯著性。顯著水準係設定在 $P < 0.05$ 。在 AD 與來自其他兩個群組之樣本之間的差異為高度顯著的，其中 $P < 0.001$ (***)。

【0155】圖 3B 為對來自 AD、NND、及 NAND 群組之樣本而言的以 h 計之停滯期時間的圖表。為測定個別樣本對 A β 聚集之效應，估算停滯期，其係定義為在對照緩衝樣本的去離之後達到大於 40 個任意單位的 ThT 螢光之時間。選擇此值係考慮到其相應於對照緩衝樣本之讀數的約 5 倍。

【0156】圖 3C 為顯示在 180 次 A β -PMCA 循環，亦即，90 h 之培養(P90)之後獲得的類澱粉形成之程度的圖表。在實驗群組間的停滯期及 P90 之比較揭露來自 AD 與來自患有非退化性神經病學疾病或患有非 AD 神經退化性疾病的個體的對照樣本之

間的顯著差異。另外，在 AD 患者之聚集參數與年齡之間未檢測到相關性，從而指示標誌物之位準相應於患者 CSF 中之聚集 A β 蛋白質而非患者年齡。

【0157】圖 5 的表 1 顯示使用停滯期數計算的對 A β -PMCA 測試之靈敏度、特異性及預測值的估算。

【0158】為研究再現性，利用不同的樣本、試劑及新一批的作為 A β -PMCA 之受質的 A β 肽來獨立地進行類似於圖 3A-C 中所示一者的實驗。在每一患者中量測在 300 次 A β -PMCA 循環，亦即，150 h 之培養(P150)之後獲得的類澱粉形成之程度。對照組包括受其他神經退化性疾病影響的人及非神經性病之患者。每一樣本之資料表示重複測試管之平均值。藉由學生 t 檢驗分析統計學差異。圖 6 為在 300 次 A β -PMCA 循環之後，亦即，在 150 h 之培養(P150)之後獲得的樣本的以 h 計之停滯期時間的圖表。

【0159】在研究過程中，甚至在用大濃度之合成寡聚物摻入之後，來自第四位置的一整組 CSF 樣本根本不聚集。預期在樣本收集期間的試劑污染干擾了檢定。

【0160】藉由判斷包括停滯期、A50、及 P90 的不同動力學參數評估不同樣本之間的聚集動力學之差異。停滯期係定義為達到高於單獨緩衝液之背景值的 5 倍的 ThT 螢光所需要的時間。A50 相應於達到最大聚集之 50% 的時間。P90 相應於在 90 h 時的聚集程度(量測為 ThT 螢光)。使用此資料，利用藉由接收器操作特性(Receiver Operating Characteristics ; ROC)曲線分析，使用 MedCalc 軟體(MedCalc Software, Ostend, Belgium)測定的截止點閾值來測定靈敏度、特異性及預測值。

實例 4: 針對 CSF 中 AD 之 A β -PMCA 檢測的折疊錯誤之 A β

的閾值測定

【0161】為支援圖 5 的表 1，使用停滯期資料，利用藉由接收器操作特性(ROC)曲線分析，使用 MedCalc 軟體(12.2.1.0 版，MedCalc, Belgium)測定的截止點閾值來測定靈敏度、特異性及預測值。如圖 5 的表 1 所示，針對由患有非退化性神經病學疾病之年齡匹配個體組成的對照組估算出 90.0%靈敏度及 84.2%特異性。對比而言，對 AD 與包括其他形式之失智症的其他神經退化性疾病的臨床更相關差異而言，估算出 100%靈敏度及 94.6%特異性。A β -PMCA 將 AD 與其他形式之神經退化性疾病區別的此能力係臨床顯著的。考慮所有對照個體的總體靈敏度及特異性分別為 90%及 92%。

【0162】為評估 A β -PMCA 測試將 AD 患者與對照區別的效能，針對不同截止點將真陽性率(靈敏度)隨假陽性率(特異性)的變化作圖。對此分析，使用針對 AD 相對 NAND (圖 4A)、AD 相對 NND (圖 4B)及 AD 相對所有對照樣本(圖 4C)的停滯期值。作為曲線下方面積來估算的測試效能對 AD 與 NAND、NND 及所有對照之比較而言分別為 0.996 ± 0.0033 、 0.95 ± 0.020 及 0.97 ± 0.011 。使用 MedCalc ROC 曲線分析軟體(12.2.1.0 版)進行統計分析且結果指示：測試可將 AD 與對照區別，其中 $P<0.0001$ 。為估算針對不同組之群組比較的最可靠截止點，對每一截止值將靈敏度(藍線)及特異性(紅線)作圖(圖 4D)。圖表顯示針對 AD 相對所有對照樣本(包括 NAND 及 NND 群組)的曲線及 95%信賴區間。該些截止值係用於估計圖 5 的表 1 中之靈敏度、特異性及預測值。

實例 5: A β -寡聚物免疫耗盡移除人類腦脊髓液中之 A β 種子且證實 A β -PMCA 在 AD CSF 中檢測到可溶性折疊錯誤之 A β

蛋白質

【0163】執行免疫耗盡實驗以確認 A β -PMCA 檢測到與存在於 CSF 中的可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質相關聯的接種活性。用於可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質之有效免疫耗盡的方法首先藉由使用合成製備的可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質來最佳化。藉由用與特定而言識別 A β (4G8)及構形(A11)抗體之序列的抗體之混合物共軛的岱拿珠(dynabead)進行培養來執行免疫耗盡。圖 7A 為顯示使用摻入人類 CSF 中的合成製備之 A β 寡聚物進行的免疫耗盡之結果的西方墨點。藉由此免疫耗盡有效地移除可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質。

【0164】圖 7A 及圖 7B 為如藉由硫代黃素 T 螢光量測的類澱粉形成相對時間之圖表，從而證明藉由可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質免疫耗盡來移除 AD CSF 中之接種活性。用 4G8 及 A11 抗體進行免疫耗盡之前或之後的 AD CSF 之樣本係用於在 A β -PMCA 檢定中接種 A β 聚集。免疫耗盡係應用於 3 AD CSF。圖 7B 為顯示對照及免疫耗盡 CSF 樣本之動力學的圖表。圖 7B 顯示：對於免疫耗盡的 AD CSF，A β -PMCA 反應中之 A β 聚集之動力學與在對照 CSF 樣本中觀察到的相當，且兩者皆顯著地不同於在免疫耗盡之前利用 AD CSF 觀察到的聚集。圖 7C 為顯示對照及免疫耗盡 CSF 樣本之動力學的圖表，該免疫耗盡 CSF 樣本係僅用 A11 構形抗體耗盡且藉由 A β -PMCA 檢定來監視聚集。圖 7C 顯示類似結果，其係使用 AD CSF 獲得，該 AD CSF 係使用特定而言識別折疊錯誤之 A β 的 A11 構形抗體免疫耗盡。該些結果確認：A β -PMCA 在 AD CSF 中檢測到可溶性折疊錯誤之 β 蛋白質。

實例 6：固相免疫捕獲

【0165】圖 8A 及圖 8B 為用於自諸如血漿之複合樣本捕獲可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質的兩個固相方法之示意表示。策略 1 使用由結合至 ELISA 板上之固相的特異性抗體預塗覆的 ELISA 板。在洗滌板之後，A β -PMCA 反應在相同板中進行。策略 2 使用由特異性抗體塗覆的磁珠作為固相。此方法提供對樣本之濃縮。

實例 7：免疫捕獲之特異性

【0166】圖 9 顯示表 2，其證明特異性抗體捕獲 A β 寡聚物之能力。頂部圖顯示用於此研究的多樣序列抗體之 A β 蛋白質上的表位識別位點之示意表示。圖 9 中之表 2 證明不同的序列或構形抗體捕獲 A β 寡聚物之效率。藉由將合成 A β 寡聚物摻入健康人類血漿中且藉由 A β -PMCA 檢測來量測捕獲寡聚物之能力。符號指示使用不同抗體的檢測極限為：<12 fmol (+++); 在 10-100 fmol 之間(++); >1pmol (+)且不顯著地高於無捕獲試劑(-)的情況。

實例 8：摻入人類血漿中的 A β 寡聚物之檢測

【0167】圖 10 為如藉由硫代黃素 T 螢光量測的類澱粉形成相對時間之圖表，其顯示檢測到摻入人類血漿中的可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質。用蛋白質 G 預塗覆的 ELISA 板係用抗構形抗體(來自 Acumen 之 16ADV)塗覆。之後，將板用人類血漿(100 μ l)原樣(對照)或在用不同濃度之合成可溶性折疊錯誤之 A β 蛋白質摻入的情況下培養。在培養之後，使板在 A β 40 單體(2 μ M)及 ThT (5 μ M)存在下經受 A β -PMCA (29 min 培養及 30 s 搖動)。藉由硫代黃素螢光量測類澱粉形成。圖 10 為用 3 種類似作用的不同抗體進行的若干實驗。

實例 9：相對於對照自 AD 患者樣本捕獲可溶性折疊錯誤之

A β

【0168】圖 11 為顯示在來自 AD 患者及對照者之血漿樣本中，在 A β -PMCA 檢定中達到 50%聚集之時間的圖表。用抗 A β 抗體(82E1)塗覆的珠粒培養來自受 AD、非 AD 神經退化性疾病 (NAD)影響的患者、及健康對照者的血漿樣本。如實例 2 所述進行 A β -PMCA。在每一群組之個別患者中記錄達到 50%聚集所需的時間。藉由單向 ANOVA 繼之以塔基 hoc 後測試分析差異。此資料之 ROC 分析顯示對用於正確地自對照者鑑別 AD 患者而言 82%的靈敏度及 100%的特異性。

實例 10：利用各種檢測方法時音波振動處理及搖動皆為有效的

【0169】圖 12 為西方墨點，其顯示藉由使用音波振動處理替代搖動作為用於破碎聚集體之手段的 A β 聚集擴增之結果。在相異數量之合成 A β 寡聚物存在下進行實驗。單獨(泳道 1)或用 300 (泳道 2)、30 (泳道 3)及 3 (泳道 4) fmol 之折疊錯誤之 A β 來培養 10 μ g/ml 的無種子單體 A β 1-42 之樣本。將樣本無擴增冷凍(未擴增)或經受 96 次 PMCA 循環(擴增)，每一循環包括 30 min 培養繼之以 20 sec 音波振動處理。聚集之 A β 係藉由使用抗 A β 抗體之西方墨點在用蛋白酶(PK)處理樣本之後檢測到。在吾等實驗中，觀察到，使用硫代黃素 T 螢光之檢測不與音波振動處理相容，但在搖動作為物理破壞方法的情況下與搖動一起工作極好。圖 12 顯示對 A β 聚集體使用不同的檢測方法，在此情況下為西方墨點，音波振動處理亦與搖動工作良好。

實例 11：產生單體 A β 作為 PMCA 受質

【0170】無種子單體 A β 係藉由粒徑排阻層析法獲得。簡言之，將在二甲亞砷中製備的 1 mg/mL 肽溶液的等分試樣使用以

0.5 mL/min 用 pH 7.5 的 10 mM 磷酸鈉溶析的 Superdex 75 管柱分餾。藉由在 220 nm 處的 UV 吸光度檢測峰。收集相應於含有 A β 之單體/二聚體的 4-10 kDa 分子量之峰且藉由胺基酸分析測定濃度。在 -80°C 下冷凍乾燥地儲存樣本。

實例 12：A β 之產生及純化

【0171】在 37°C 下，在 Luria 培養液(LB)中生長藏有 pET28 GroES-Ub-A β 42 質體之大腸桿菌細胞，且用 0.4 mM IPTG 誘導表現。在 4 h 之後，收穫細胞且在溶解緩衝液(pH 8.0 的 20 mM Tris-Cl、10 mM NaCl、0.1 mM PMSF、0.1 mM EDTA 及 1 mM β -巰基乙醇)中溶解並在 18,000 rpm 下離心 30 min。將包涵體再懸浮於含有 6 M 尿素之再懸浮緩衝液(pH 8.0 的 50 mM Tris-Cl、150 mM NaCl、及 1 mM DTT)中。藉由在 18,000 rpm 下離心 30 min 來移除不可溶蛋白質。收集含有 GroES-Ub-A β 42 融合蛋白質之上清液。為自融合蛋白質分裂 A β 42，用再懸浮緩衝液稀釋融合蛋白質 2 倍且在 37°C 下用 1:100 酶比受質莫耳比率的重組去泛素化酶(Usp2cc)處理 2 h。之後，將樣本裝載於 C18 管柱上(25 mm x 250 mm, Grace Vydac, USA)。用溶劑系統緩衝液 1 (pH 10 的 30 mM 乙酸銨、2%乙腈)及緩衝液 2 (70%乙腈)以流動速率 10 ml/min 使用緩衝液 2 之 20-40%線性梯度歷經 35 min 來純化 A β 42。將純化的 A β 42 在 -80°C 下冷凍乾燥及儲存直至使用。

實例 13：藉由 PD-PMCA 檢測 α S 種子

【0172】實例 13A：藉由在硫代黃素 T 存在下，利用或不利用不同數量之合成可溶性寡聚 α S 蛋白質培養無種子 α S 之溶液來研究 α S 聚集之接種：對照(無 α S 寡聚物)；或 1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、及 1 μ g/mL 之合成可溶性寡聚 α S 蛋白質種子。 α S-PMCA 一般程序：將 100 μ g/mL 無 α S 種子之 α S 於 pH 7.4

的 PBS(200 μ L 總體積)之溶液放置在不透明 96 孔板中且單獨或在所指示濃度之合成 α S 聚集體或 40 μ L 之 CSF 等分試樣存在下培養。將樣本在 5 μ M 硫代黃素 T(ThT)存在下培養且使用 Eppendorf 熱混合器在 22 $^{\circ}$ C 之恆定溫度下經受循環攪動(在 500 rpm 下 1 min, 繼之以無搖動 29 min)。在各種時間點處, 使用板式分光螢光計在 435 nm 激發之後在 485 nm 處於板中量測 ThT 螢光。圖 13A 為硫代黃素 T 螢光隨時間變化的圖表, 其顯示藉由 PD-PMCA, 使用所指示濃度之合成可溶性寡聚 AS 蛋白質種子檢測 AS 種子。監視緩衝液之肽濃度、溫度及 pH 以控制停滯期之範圍及實驗間的再現性。在合成可溶性寡聚 α S 蛋白質種子之 1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、及 1 μ g/mL α S 存在下觀察到單體 α S 蛋白質之聚集。

【0173】 實例 13B: 使用實例 1A 中之樣本測定隨所添加 α S 種子之量變化的達到 50% 聚集之時間。圖 13B 為顯示將達到 50% 聚集之時間隨所添加的 α S 種子之量變化來作圖的圖表。

實例 14: α S-PMCA 檢測 PD 患者之腦脊髓液中之寡聚 α S

【0174】 藉由 PD-PMCA 執行在來自對照者及 PD 患者的人類 CSF 樣本中接種活性之檢測。使 pH 7.4 的 PBS 中之純化無種子 α 突觸核蛋白(100 μ g/mL)在 37 $^{\circ}$ C 下, 在 500 rpm 之搖動下, 在來自患有確認 PD、AD 或非神經退化性神經病學疾病(NND)之人類患者的 CSF 存在下聚集。使用板式分光螢光計, 藉由在 435 nm 激發之後在 485 nm 處的硫代黃素螢光監視聚集之範圍。

【0175】 自 PD 患者、受非退化性神經病學疾病(NND)影響的認知正常個體、及受阿茲海默症(AD)影響的患者獲得 CSF 之等分試樣。測試 CSF 樣本係自診斷為具有可能的 AD 之患者獲得, 該可能的 AD 係如 DSM-IV 定義且使用各種測試來測定,

該等測試包括常規醫學檢查、神經病學評估、神經心理學評定、及磁共振成像。在一夜禁食之後，用防止損傷的針在 L4/L5 或 L3/L4 間隙處的腰椎穿刺之後，將 CSF 樣本收集在聚丙烯管中。在 3,000 g 下將樣本在 4°C 下離心 3 min，取等分試樣且在 -80°C 下儲存直至分析。測定 CSF 細胞計數、葡萄糖及蛋白質濃度。藉由速率濁度測定法量測白蛋白。為評估血腦阻障之完整性及鞘內 IgG 產生，計算白蛋白商(CSF 白蛋白/血清白蛋白) $\times 10^3$ 及 IgG 指數(CSF 白蛋白/血清白蛋白)/(CSF IgG/血清 IgG)。該研究係根據赫爾辛基宣言之規定來進行且獲倫理委員會批准。

【0176】分析之實驗以及原生部分係盲式進行。圖 14 為隨 ThT 螢光標記變化量測的 α S 寡聚相對時間之圖表，其顯示來自 PD、AD、及 NND 群組的代表性樣本的 α S 聚集之平均動力學。

【0177】結果指示：來自 PD 患者之 CSF 相較於對照 CSF 顯著地加速 α S 聚集($P < 0.001$)。藉由單向 ANOVA、繼之以測試後塔基多重比較來分析在人類 CSF 樣本存在下的 α S 聚集動力學之差異顯著性。顯著水準係設定在 $P < 0.05$ 。在 PD 與來自其他兩個群組之樣本之間的差異為高度顯著的，其中 $P < 0.001$ (***)。

實例 15：免疫捕獲之特異性

【0178】圖 15 的表 3 證明不同序列或構形抗體捕獲 α S 寡聚物之能力。藉由將合成 α S 寡聚物摻入健康人類血漿中且藉由 α S-PMCA 檢測來量測捕獲寡聚物之能力。第一行顯示所測試的各種抗體及相應商業來源。第二行列出用於此研究的多樣序列抗體之 α S 蛋白質上的表位識別位點。第三行指示觀察到的特異性抗體捕獲 α S 寡聚物之能力。符號指示使用不同抗體的檢測極限為： < 12 fmol (+++)； $10-100$ fmol (++)之間； > 1 pmol (+)且不顯著地高於無捕獲試劑(-)的情況。 α/β 突觸核蛋白抗體 N-19 (N

末端表位)及 α 突觸核蛋白抗體 C-20-R(C 末端表位)顯示最好的結果；且 α 突觸核蛋白抗體 211(表位：胺基酸 121-125)顯示極好的結果； α 突觸核蛋白抗體 204(表位：片段 1-130)顯示良好結果；而 16ADV 小鼠 IgG1(構形表位)未顯示結果。

實例 16：固相免疫捕獲

【0179】圖 16A 及圖 16B 為用於自諸如血漿之複合樣本捕獲可溶性折疊錯誤之 α S 蛋白質的兩個固相方法之示意表示。策略 1 使用由結合至 ELISA 板上之固相的特異性抗體預塗覆的 ELISA 板。在洗滌板之後， α S-PMCA 反應在相同板中進行。策略 2 使用由特異性抗體塗覆的磁珠作為固相。此方法提供對樣本之濃縮。

實例 17：用於檢測摻入人類血漿中的 α 突觸核蛋白寡聚物之 α S-PMCA

【0180】藉由抗 α 突觸核蛋白抗體塗覆的珠粒(Dynabead)執行來自人類血漿的 α 突觸核蛋白寡聚物之免測沉澱法，且使用 α 突觸核蛋白單體作為接種受質連同用於檢測之硫代黃素 T 進行接種聚集檢定。在利用 α 突觸核蛋白種子(+ 0.2 μ g 種子)及不利用 α 突觸核蛋白種子(-種子)的情況下，用人類血漿(500 μ L)培養抗 α 突觸核蛋白塗覆的珠粒(1×10^7 個珠粒)。在免測沉澱法之後，將珠粒再懸浮於 20 μ L 之反應緩衝液(1X PBS)中，且將 10 μ L 之珠粒添加至 96 孔板之每一孔中。藉由添加 α 突觸核蛋白單體(200 μ g/mL)及硫代黃素 T (5 μ M)執行聚集檢定。藉由使用 435 nm 之激發及 485 nm 之發射的螢光計監視螢光之增加。圖 17A 說明在利用及不利用種子的情況下在血漿中使用 N-19 抗體之免測沉澱法/聚集結果。圖 17B 說明在利用及不利用種子的情況下在血漿中使用 211 抗體之免測沉澱法/聚集結果。圖

17C 說明在利用及不利用種子的情況下在血漿中使用 C-20 抗體之免測沉澱法/聚集結果。

實例 18： α S-PMCA 以高靈敏度及特異性檢測受 PD 及多系統萎縮症影響的患者之腦脊髓液中的寡聚 α S。

【0181】 為研究 α S-PMCA 對 PD 及相關 α 突觸核蛋白病諸如多系統萎縮症(MSA)之生物化學診斷之效率，對來自受該些疾病影響的許多患者以及受其他疾病影響的對照者的 CSF 執行測試。圖 18A、圖 18B、及圖 18C 顯示使用 α S-PMCA 分別在來自對照者及受 PD 及 MSA 影響的患者之人類 CSF 樣本中檢測到接種活性。使 pH 6.0 的 PBS 中之純化無種子 α 突觸核蛋白(100 μ g/mL)在 37°C 下，在 500 rpm 之搖動下，在來自人類患者及對照者的 CSF 存在下聚集。使用板式分光螢光計，藉由在 435 nm 激發之後在 485 nm 處的硫代黃素 T 螢光監視聚集之程度。

【0182】 測試 CSF 樣本係自診斷為具有可能的 PD 及 MSA 之患者獲得，該可能的 PD 及 MSA 係如 DSM-IV 定義且使用各種測試來測定，該等測試包括常規醫學檢查、神經病學評估、神經心理學評定、及磁共振成像。在一夜禁食之後，用防止損傷的針在 L4/L5 或 L3/L4 間隙處的腰椎穿刺之後，將 CSF 樣本收集在聚丙烯管中。在 3,000 g 下將樣本在 4°C 下離心 3 min，取等分試樣且在 -80°C 下儲存直至分析。測定 CSF 細胞計數、葡萄糖及蛋白質濃度。藉由速率濁度測定法量測白蛋白。該研究係根據赫爾辛基宣言之規定來進行且獲倫理委員會批准。

【0183】 分析之實驗以及原生部分係盲式進行。圖 18A、圖 18B、及圖 18C 為隨 ThT 螢光標記變化量測的 α S 聚集相對時間之圖表，其顯示分別對對照者及來自 PD 及 MSA 群組之兩個代表性樣本的 α S 聚集之平均動力學。

【0184】結果指示：來自 PD 患者之 CSF 相較於對照 CSF 顯著地加速 α S 聚集($P<0.001$)。藉由單向 ANOVA、繼之以測試後塔基多重比較來分析在人類 CSF 樣本存在下的 α S 聚集動力學之差異顯著性。顯著水準係設定在 $P<0.05$ 。在 PD 與來自其他兩個群組之樣本之間的差異為高度顯著的，其中 $P<0.001$ (***)。

【0185】29 個 PD 或 MSA 樣本及 41 個對照的整租之結果為 29 個 PD 或 MSA 中之 26 個為陽性，而 41 個對照樣本中之 3 個為陽性，其相應於 90%靈敏度及 93%特異性。

實例 19：全長 4R tau 蛋白及種子之合成

【0186】圖 19 為顯示重組全長 4R tau 蛋白之製備及純化的流程圖。將 hTau40 之基因轉染至大腸桿菌中且在標準條件下培養以表現 hTau40。在生長期之後，將大腸桿菌細胞剝落、溶解、熱處理、且用硫酸銨沉澱來產生粗產物。使粗產物經受陽離子交換層析法、透析、隨後濃縮及緩衝液交換。使用在 100 kDa 之質量下的截止過濾以進一步純化 hTau40。純化 hTau 40 之產率為 20 mg/L 之細菌培養物。隨後藉由在 37°C 下，使用循環攪動(在 500 rpm 下 1 min 搖動繼之以無搖動 29 min)用 pH 7.4 的 10 mM HEPES、100 mM NaCl 中之 12.5 μ M 肝素培養 hTau 40 單體 3 天來製備全長 4R Tau 種子。

實例 20A：TAU PMCA

【0187】在 96 孔板上使用 12.5 μ M Tau 單體、1.25 μ M 肝素、5 μ M 硫代黃素 T，使用循環攪動(在 500 rpm 下 1 min 搖動繼之以無搖動 29 min)執行 Tau-PMCA 檢定。以 12.5 pmol、1.25 pmol、125 fmol、12.5 fmol、及 1.25 fmol 之量將種子添加至孔。執行無種子之對照。使用板式分光螢光計(激發：435 nm；發射：485 nm)，藉由 ThT 螢光隨時間推移跟蹤聚集。圖 20A 為針對各

種初始量之種子及對照物的以%計的聚集之圖表。圖 20A 中之值為兩次重複測試之平均值，其中誤差槓指示標準偏差。圖 20B 為相對以 fmol 計的寡聚 tau 種子之量之對數，如藉由 ThT 螢光量測的 T_{50} 即達到 50% 聚集之時間之圖表。

實例 20B：TAU PMCA

【0188】為最佳化 tau-PMCA 檢定，全長人類 Tau40 包括四個不完整的串聯微管結合重複序列(4R)。藉由在 37°C 下在肝素 (12.5 μ M) 存在下培養全長 Tau (50 μ M) 3 天來產生 Tau 寡聚物。種子係藉由接種 tau 聚集之能力、結合至硫代黃素 T、西方墨點及電子顯微術來表徵。預形成的聚集體係用於成核且誘導 Tau 之聚集。對於檢定，使在含有 3 μ M 之肝素的 pH 7.4 的 10 mM HEPES、100 mM NaCl 中之無種子單體 tau (15 μ M) 在不存在或存在不同數量之合成種子的情況下藉由在 20°C 下培養 29.5 min 繼之以在 500 rpm 下搖動 30 sec 經受 tau-PMCA 之循環。在該些條件下，僅觀察到 Tau 在預形成種子的存在下聚集且聚集之動力學取決於所添加的種子之量。重要地，觀察到 PMCA 訊號與添加至反應的種子之量成正比。此檢定相應於 0.125 pg 之寡聚 tau 的檢測閾值。此檢測閾值基於 tau 單體之分子量相應於 -2 阿莫耳(atto-mol)，基於作為針對平均寡聚物大小的代理物的 12 mer 寡聚物之分子量相應於 0.15 阿莫耳。

實例 20C：TAU PMCA

【0189】使用全長 Tau 種子執行另一 Tau-PMCA 檢定，該等種子藉由在 37°C 下，在搖動下用 pH 7.4 的 10 mM HEPES、100 mM NaCl 中之 12.5 μ M 肝素培養 Tau 單體來製備。在 96 孔板上使用 12.5 μ M Tau 單體、1.25 μ M 肝素、及 5 μ M 硫代黃素 T，使用循環攪動(在 500 rpm 下 1 min 搖動繼之以無搖動 29 min)

執行檢定。圖 20C 為使用板式分光螢光計(激發：435 nm；發射：485 nm)，藉由 ThT 螢光隨時間推移跟蹤的聚集之圖表。圖 20C 顯示兩次重複測試之平均值及 SD。圖 20D 為 tau 寡聚物之數量與 Tau-PMCA 訊號(達到 50%聚集之時間)之間的關係的圖表。

【0190】 實例 20D：TAU PMCA 為可再現的

【0191】 進行大規模實驗以評估 tau-PMCA 檢定之穩固性及再現性以分析在有或無冷凍/融化的情況下在四個不同時間(0、14、28 及 30 天)的效能。使用兩組不同的合成種子及五個不同濃度之合成種子(1250、125、12.5、1.25 及 0.125 pg 之種子)，摻入緩衝液或對照 CSF 中。每一樣本重複運作三次。實驗涵蓋若干步驟，包括以執行所有實驗所需的數量大規模表現及純化 tau、對所產生的材料之品質控制、合成 tau 寡聚種子之產生及表徵及調查在緩衝液及在生物學基質(CSF)中之檢定精確度及再現性的 tau-PMCA 實驗。總計而言，實驗使用 32 個不同條件(2 個不同種子 x 4 個時間點 x 2 種稀釋方式(冷凍或不冷凍) x 2 個不同基質(緩衝液或 CSF))。因為用五個不同濃度之寡聚種子測試所有條件且每一者重複進行三次，整個實驗涉及 480 個孔。蛋白質濃度、緩衝液及 PMCA 條件與實例 20B 相同。自 32 個所測試的條件，僅一個得到稍微顯著地不同於其他者的結果，從而指示高精度度及再現性。圖 20E-20L 係液一系列圖表，其顯示基於所測試的條件中的 8 個的 ThT 螢光之聚集結果，該等條件包括 4 個不同時間點(0、7、14 及 30 天)，其中樣本經受或不經受冷凍及融化且在緩衝或 CSF 存在下進行，及兩個不同的種子製備物(圖 20E-20H 及圖 20I-20L)。圖 20E-20L 證明：所獲得的結果在三次重複測試、不同時間點、及相異種子之間為極類似的。資料相應於三次重複測試樣本之平均值±標準誤差。不

存在種子時的 tau 受質在任何條件下在進行實驗的時間內未觀察到聚集。

【0192】為分析檢定之再現性，在 1250 pg 之 Tau 種子存在下，測量實驗之 T_{50} 值(達到 50%聚集之時間)。在不同天進行的實驗之 T_{50} 值不顯示任何統計學顯著差異且獲得 71.5 ± 1.8 h 之平均 T_{50} ，該等實驗利用兩個種子製備物 A 或 B 之一及使用新鮮或冷凍的種子。對在所有其他種子濃度存在下進行的研究或對在緩衝液中進行的實驗觀察到類似的非顯著差異。圖 20M 為顯示跨於 16 種不同條件的再現性的 T_{50} 值之表。所有值係藉由單向 ANOVA、繼之以塔基多重比較測試來分析。

【0193】實例 20E：TAU PMCA 為特異性的

【0194】調查 tau PMCA 分析的特異性，尤其調查檢測由其他類澱粉源性蛋白質構成的聚集體之能力。製備 $A\beta$ 及 α Syn 寡聚物質且用於交叉接種單體 tau。圖 20N 為針對用 1 pm 之 tau、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、His α Syn、Hu α Syn 接種及不用種子接種的 tau 檢定的 ThT 螢光相對時間之圖表。圖 20N 顯示：在 $A\beta\alpha$ Syn 種子存在下不可檢測到顯著訊號，且在約 100 h 之前，甚至當該些粒子之濃度相對高時(等效於 2 ng 之 tau 種子)未檢測到訊號。該些 $A\beta$ 為 α Syn 種子且在前述實例中描述的各別 $A\beta$ -PMCA 或 α Syn-PMCA 檢定中極有效地誘導聚集。該些結果指示：在所使用的條件及濃度下，在其他蛋白質聚集體之間不存在交叉接種，且 tau-PMCA 對檢測 tau 寡聚物為特異性的。

實例 21A：TAU PMCA 檢測人類 CSF 中之 TAU

【0195】藉由 Tau-PMCA 分析來自 AD 患者(7 個病例)、5 個其他 Tau 蛋白病(1FTD、2PSP、2CBD)、受輕度認知障礙(MCI)影響的人及受其他神經病學疾病影響的對照者(7 樣本)的人類

CSF 樣本。圖 21A 為顯示在培養之 447 h 時的 ThT 螢光，其中大多數樣本已達到最大螢光。陽性對照使用由合成 Tau 寡聚物 (12.5 fmol) 摻入的健康 CSF 之樣本。陰性對照相應於不具有 Tau 種子的健康 CSF 之樣本。圖 21A 顯示：患有 AD、其他 Tau 蛋白病、及 MCI 之患者顯示顯著高於陰性對照並與陽性對照一致的 Tau 聚集。7 位患有其他神經病學疾病之對照患者中的 6 位與陰性對照一致。在其他神經病學疾病群組中的一位對照患者顯示與 Tau 蛋白病一致的最大螢光。此可指示彼患者中未經診斷的 Tau 蛋白病，或替代地，指示無意的污染。

實例 21B：TAU PMCA 檢測人類 CSF 中之 TAU

【0196】調查來自 11 位受 AD 影響的患者、11 位來自其他 Tau 蛋白病(4 位 PSP、1 位 FTD、5 位 CBD 及 1 位 CTE)及 7 位受無關神經錯亂影響的對照者之人類 CSF 樣本。陽性對照係藉由將 CSF 摻入 20 ng 之重組 tau 寡聚物來製備。陰性對照為不具有 tau 種子之健康 CSF。圖 21B 為來自患有 AD 或其他 Tau 蛋白病之患者的樣本的 tau-PMCA 之螢光訊號的圖表，其相當於在含有重組 tau 寡聚物之樣本中觀察到的螢光訊號。因此，來自患有 AD 或其他 Tau 蛋白病之患者的樣本能夠加速 tau 聚集。相反地，7 位對照者中之 6 位在 tau-PMCA 中產生低訊號，其中值係等效於在沒有種子之 CSF 中觀察到的彼等值。不管小的樣本大小，對照者與患者之間的差異係統計學顯著的。該些陽性結果指示 tau-PMCA 能夠在患者之 CSF 中檢測到 tau 聚集體。圖 21B 顯示以任意單位表達的最大 ThT 螢光。藉由單向 ANOVA 繼之以測試後塔基多重比較來分析差異。 ** P<0.01。

實例 22：TAU PMCA 檢測人類 CSF 中之 TAU

【0197】Tau-PMCA 檢定之效能係在來自對照者及受 AD、

FTD (額顳葉失智症)、CBD (皮質基底核退化症)、及 PSP (進行性上眼神經核麻痺症)影響的患者之代表性 CSF 樣本存在下調查。在 96 孔板上使用 12.5 μ M Tau 單體、1.25 μ M 肝素、5 μ M 硫代黃素 T，使用循環攪動(在 500 rpm 下 1 min 搖動繼之以無搖動 29 min)執行 Tau-PMCA 檢定。使用板式分光螢光計(激發：435 nm；發射：485 nm)，藉由 ThT 螢光隨時間推移跟蹤聚集。圖 22 為顯示基於 ThT 相對時間的聚集%之圖表。各種 Tau 蛋白病在 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度方面有所不同。例如，PSP 及 AD 樣本之 T_{50} 在 150 h 約為相同的，而 PSP 樣本相較於 AD 似乎具有較短停滯期、較低擴增速率、及較低擴增程度。CBD 似乎具有約 175 h 之 T_{50} ，與相較於 AD 及 PSP 兩者的較低擴增速率、及較低擴增程度。FTD 似乎具有約 210 h 之 T_{50} ，與相較於 AD、PSP、及 CBD 中之每一者的較高擴增速率、及較低擴增程度。對照 CSF 樣本具有相較於 FTD 的類似 T_{50} 及擴增速率，與進一步較低的擴增程度。對照 CSF 樣本中之擴增可歸因於自發(無種子)擴增、意外污染、或具有稍微與 FTD 類似的動力學的未診斷 Tau 蛋白病。

論述

【0198】本發明 tau-PMCA 可提供超過其他方法之各種優點。例如，本發明之實施例能夠直接檢測關鍵的 tau 折疊錯誤之分子病原性事件，此與已知間接措施對比，諸如非病原性生物標誌物，tau 之總池之量測，其中僅小部分形成突觸毒性寡聚聚集體，或 tau 之各種磷酸化物質的量測。本發明之實施例特定而言檢測折疊錯誤之 tau 寡聚物，其呈現疾病、接種 tau 折疊錯誤及因此在疾病期間在腦中傳播破壞的關鍵病理學特徵。另外，所有其他方法檢測樣本中存在的材料，PMCA 遵循在患病腦中

發生的相同原理檢測藉由樣本中的寡聚種子之分鐘量達成的吾等添加至所接種反應的蛋白質之轉化。

【0199】 在術語「包括(include)」或「包括(including)」用於說明書或申請專利範圍中的程度上，其意欲以與術語「包含」類似的方式為包括性的，如彼術語在用作申請專利範圍中之過渡用詞時所解釋的。此外，在使用術語「或」(例如，A 或 B)的程度上，其意欲指「A 或 B 或兩者」。當申請人意欲指示「僅 A 或 B 而不是兩者」時，則使用術語「僅 A 或 B 而不是兩者」。因此，術語「或」在本文之使用為包括性的，而非排他使用。參見 Bryan A. Garner, *A Dictionary of Modern Legal Usage* 624 (第 2 版, 1995)。此外，在術語「...中」或「至...中」用於說明書或申請專利範圍的程度上，其意欲另外指「...上」或「至...上」。在術語「選擇性地」用於說明書或申請專利範圍的程度上，其意欲指組件之條件，其中設備之使用者可按需要或在使用設備所需時啟用或停用該組件之特徵或功能。在術語「可操作地連接」用於說明書或申請專利範圍的程度上，其意欲指所識別組件係以執行指定功能之方式來連接。在術語「實質上」用於說明書或申請專利範圍的程度上，其意欲指所識別組件具有以如將在受試者行業中可接受的誤差程度所指示的關係或品質。

【0200】 如本說明書及申請專利範圍中所使用，除非明確地指定單數，否則單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數。例如，提及「一化合物」可包括兩種或兩種以上化合物之混合物，以及單一化合物。

【0201】 如本文所使用，術語「約」連同數量意欲包括±該數量之 10%。換言之，「約 10」可意指 9 至 11。

【0202】 如本文所使用，術語「可選」及「視情況」意指隨

後描述的情形可發生或可不發生，以便描述包括其中該情形發生之實例及其中其不發生之實例。

【0203】 另外，在本揭示內容之特徵或態樣就馬庫西群組來描述的情況下，熟習此項技術者將認識到，本揭示內容亦據此就馬庫西群組之任何個別構件或構件之子群組來描述。如熟習此項技術者所理解的，對於任何及所有目的，諸如就提供書面描述而言，本文揭示的所有範圍亦涵蓋任何及所有可能的子範圍及其子範圍之組合。任何所列範圍可易於視為充分地描述及賦能相同範圍，該等範圍可分解為至少相同的半部、三部分、四部分、五部分、十部分、及類似物。作為非限制性實例，本文論述的每一範圍可容易分解為下三分之一、中間三分之一及上三分之一，及類似物。如熟習此項技術者亦將理解的，諸如「多至」、「至少」、「大於」、「小於」之所有語言包括所敘述的數量且係指可隨後分解為如上文論述的子範圍的額範圍。最終，如熟習此項技術者所理解的，範圍包括每一個別構件。例如，具有 1-3 個細胞之群組係指具有 1、2、或 3 個細胞之群組。類似地，具有 1-5 個細胞之群組係指具有 1、2、3、4、或 5 個細胞等等之群組。雖然各種態樣及實施例已在本文揭示，但其他態樣及實施例將對熟習此項技術者為明顯的。

【0204】 如上所述，雖然本申請案已藉由其實施例之描述來說明，且雖然已相當詳細地描述實施例，但申請人並不意欲約束或以任何方式限制隨附申請專利範圍之範疇於此等細節。另外的優點及修改將對獲益於本申請案之熟習此項技術者顯而易見。因此，本申請案在其較寬態樣方面不限於所顯示的特定細節、說明性實例，或其涉及的任何設備。在不脫離一般發明概念之精神或範疇的情況下，可自此等細節、實例、及設備做出

偏離。

【0205】 本文揭示的各種態樣及實施例係出於說明目的且不意欲為限制性的，其中真實的範疇及精神係藉由隨附申請專利範圍來指示。

【符號說明】

無。

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

折疊錯誤之 TAU 蛋白的檢測及檢測折疊錯誤之 TAU 蛋白的套組

DETECTION OF MISFOLDED TAU PROTEIN AND KIT FOR DETERMINING MISFOLDED TAU PROTEIN

【中文】

提供用於自樣本，例如，自具有 Tau 蛋白病之患者擴增及檢測折疊錯誤之 tau 蛋白的方法及套組，前述 Tau 蛋白病諸如阿茲海默症、進行性上眼神經核麻痺症等。

【英文】

Methods and kits are provided for amplifying and detecting misfolded tau protein from samples, for example, from patients having tauopathies such as Alzheimer's Disease, Progressive Supranuclear Palsy, and the like.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖19。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

申請專利範圍

1. 一種用於測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的方法，前述方法包含：

執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，前述第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序包含：

藉由使前述樣本之第一部分與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；

在有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白且前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白。

2. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在，前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體為折疊錯誤之 4R tau 聚集體。
3. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中存在或不存在至少第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。
4. 如請求項 3 所記載之方法，其進一步包含至少執行第二蛋

白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序以測定前述樣本中存在或不存在至少前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物，前述第二受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第二培養混合物以有效引起前述第二受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第二培養混合物以有效形成前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第二培養混合物中前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白且前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白。

5. 如請求項 4 所記載之方法，其中前述第二受質蛋白包含以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、及 3R tau。
6. 如請求項 4 所記載之方法，其中前述第二受質蛋白包含 3R tau，前述方法進一步包含測定前述樣本中前述 4R tau 與前述 3R tau 之比率為約 1:99 與約 99:1 之間。
7. 如請求項 3 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體及前述第二折疊錯誤之

蛋白質聚集體的前述存在。

8. 如請求項 3 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中存在或不存在至少第三折疊錯誤之蛋白質聚集體。

9. 如請求項 8 所記載之方法，其進一步包含至少執行第三蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序以測定前述樣本中存在或不存在至少前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第三部分與第三受質蛋白接觸來形成第三培養混合物，前述第三受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第三培養混合物以有效引起前述第三受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第三培養混合物以有效形成前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第三培養混合物中前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白且前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白。

10. 如請求項 9 所記載之方法，其中前述第一受質蛋白包含 4R tau，前述第二受質蛋白包含類澱粉- β (A β)，且前述第三受質蛋白包含 α 突觸核蛋白。

11. 如請求項 8 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體、前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體、及前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在。
12. 如請求項 8 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中存在或不存在至少第三折疊錯誤之蛋白質聚集體。
13. 如請求項 12 所記載之方法，其進一步包含至少執行第四蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 程序以測定前述樣本中存在或不存在至少前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：
 - 藉由使前述樣本之第四部分與第四受質蛋白接觸來形成第四培養混合物，前述第四受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體；
 - 在有效形成第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：
 - 在前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第四培養混合物以有效引起前述第四受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；
 - 破壞前述第四培養混合物以有效形成前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及
 - 藉由分析前述第四培養混合物中前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體；
 - 前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第四受質蛋白且前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第四受質蛋白。

14. 如請求項 13 所記載之方法，其中前述第一受質蛋白包含 4R tau，前述第二受質蛋白包含類澱粉- β (A β)，前述第三受質蛋白包含 α 突觸核蛋白，且前述第四受質蛋白包含 3R tau。
15. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自受試者，其進一步包含根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。
16. 如請求項 15 所記載之方法，前述方法進一步包含：

至少執行第二蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序以測定前述樣本中存在或不存在包含第二受質蛋白的折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物，前述第二受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第二培養混合物以有效引起前述第二受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第二培養混合物以有效形成前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第二培養混合物中前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質

蛋白且前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白。

17. 如請求項 16 所記載之方法，其中前述受試者包含前述 Tau 蛋白病，前述方法進一步包含根據：前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在；及前述樣本中前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在或不存在來表徵前述受試者中的 Tau 蛋白病之身份。
18. 如請求項 16 所記載之方法，其中前述第二受質蛋白包含以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、及 3R tau。
19. 如請求項 16 所記載之方法，前述方法進一步包含：

至少執行第三蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 程序以測定前述樣本中存在或不存在包含第三受質蛋白的折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第三部分與第三受質蛋白接觸來形成第三培養混合物，前述第三受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第三培養混合物以有效引起前述第三受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第三培養混合物以有效形成前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第三培養混合物中前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在或不存在來測定前述樣本中

存在或不存在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白且前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白。

20. 如請求項 19 所記載之方法，前述方法進一步包含：

至少執行第四蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序以測定前述樣本中存在或不存在包含第四受質蛋白的折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第四部分與第四受質蛋白接觸來形成第四培養混合物，前述第四受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第四培養混合物以有效引起前述第四受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第四培養混合物以有效形成前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第四培養混合物中前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第四受質蛋白且前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第四受質蛋白。

21. 如請求項 15 所記載之方法，其中前述 Tau 蛋白病包含原發

性 Tau 蛋白病或繼發性 Tau 蛋白病。

22. 如請求項 15 所記載之方法，其中前述 Tau 蛋白病至少部分地藉由 4R tau 蛋白之折疊錯誤及/或聚集來表徵。
23. 如請求項 15 所記載之方法，其中前述第二受質蛋白包含 3R tau，前述方法進一步包含藉由前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體與前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之間的比率表徵前述 Tau 蛋白病，及根據為已知 Tau 蛋白病之特性的 4R tau 蛋白之折疊錯誤及/或聚集與 3R tau 蛋白之折疊錯誤及/或聚集的已知比率來測定相應於前述已知 Tau 蛋白病之前述 Tau 蛋白病。
24. 如請求項 15 所記載之方法，其進一步包含藉由針對以下至少一者之特性來分析前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體或其一或多個相應蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 動力學參數來表徵前述 Tau 蛋白病之身份：阿茲海默症 (AD)、帕金森氏症 (PD)、進行性上眼神經核麻痺症 (PSP)、額顳葉失智症 (FTD)、皮質基底核退化症 (CBD)、輕度認知障礙 (MCI)、嗜銀顆粒病 (AgD)、創傷性腦損傷 (TBI)、慢性創傷性腦病變 (CTE)、及拳擊員癡呆 (DP)。
25. 如請求項 24 所記載之方法，其中表徵前述 Tau 蛋白病之前述身份包含：

測定前述一或多個相應蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 動力學參數，包含以下一或多者：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；

將前述一或多個相應蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 動力學參數與為前述 Tau 蛋白病之前述身份之特性的一或多個相應預定相應蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 動力

學參數比較來判定相似性或差異以有效表徵前述 Tau 蛋白病之前述身份。

26. 如請求項 24 所記載之方法，其中表徵前述 Tau 蛋白病之前述身份包含使用以下一或多者：對 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體；對前述 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；前述 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之頻譜特性；前述 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之蛋白水解抵抗力；及前述 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之變性穩定性。
27. 如請求項 15 所記載之方法，其中其前提為前述 Tau 蛋白病排除匹克症。
28. 如請求項 15 所記載之方法，其中測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病包含將前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在與取自對照受試者之對照樣本比較。
29. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述檢測包含檢測前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量，前述樣本係取自受試者，前述方法進一步包含藉由將前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量與預定閾值量比較來測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。
30. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自根據認知測試不呈現失智症之臨床徵象的受試者，前述方法進一步包含根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。

31. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自根據對比度成像不呈現皮層斑塊或纏結的受試者，前述方法進一步包含根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。
32. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自根據認知測試不呈現失智症之臨床徵象的受試者，前述方法進一步包含根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在測定或診斷前述受試者中存在或不存在作為失智症之前述臨床徵象的促成因子的 Tau 蛋白病。
33. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自根據認知測試不呈現失智症之臨床徵象的受試者及根據遺傳測試呈現失智症傾向的受試者，前述方法進一步包含根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。
34. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培養混合物，前述第一培養混合物係藉由以下至少一個濃度表徵：
 - 小於約 20 μM 之前述第一受質蛋白；
 - 小於約 75 μM 之肝素；
 - 小於約 190 mM 之 NaCl；及
 - 小於約 9.5 μM 之硫代黃素 T。
35. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備包含在約 0.001 μM 與約 2000 μM 之間的濃度下的前述第一受質蛋白之前述第一培養混合物。
36. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培

養混合物，其藉由在約 0.001 μM 與約 75 μM 之間的濃度下的肝素表徵。

37. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培養混合物，其包含以下一或多者之緩衝液組合物：
Tris-HCL、PBS、MES、PIPES、MOPS、BES、TES、及 HEPES。
38. 如請求項 31 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培養混合物，其包含在約 1 μM 與約 1 M 之間的總濃度下的前述緩衝液組合物。
39. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培養混合物，其包含在約 1 μM 與約 1 M 之間的總濃度下的鹽組合物。
40. 如請求項 39 所記載之方法，其中前述鹽組合物包含以下一或多者：NaCl 及 KCl。
41. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含在約 5 與約 9 之間的 pH 下製備或維持前述第一培養混合物。
42. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培養混合物，其包含在約 1 nM 與約 1 mM 之間的總濃度下的指示劑。
43. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述培養包含在約 5 $^{\circ}\text{C}$ 與約 60 $^{\circ}\text{C}$ 之間的溫度下加熱或維持前述第一培養混合物。
44. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含：

使前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑與前述第一培養混合物接觸，前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑係藉由在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下的指示狀態及在不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的非指示狀態來表徵；及

- 其中前述測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在包含檢測前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑的前述指示狀態。
45. 如請求項 44 所記載之方法，其中前述指示劑的前述指示狀態及前述指示劑的前述非指示狀態係藉由螢光之差異表徵，前述測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在包含檢測螢光之前述差異。
 46. 如請求項 44 所記載之方法，其進一步包含使莫耳過量的前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑與前述第一培養混合物接觸，前述莫耳過量大於包括在前述第一受質蛋白中的蛋白質單體及前述第一培養混合物中的前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之總莫耳量。
 47. 如請求項 44 所記載之方法，其中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑包含以下一或多者：硫代黃素、剛果紅、m-I-二苯乙烯、金黃胺 G、PIB、BF-227、X-34、TZDM、FDDNP、MeO-XO4、IMPY、NIAD-4、發光共軛聚噻吩、螢光蛋白、及其衍生物。
 48. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在包含測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量。
 49. 如請求項 47 所記載之方法，其進一步包含以至少約 70%之靈敏度檢測前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量。
 50. 如請求項 47 所記載之方法，其進一步包含檢測在小於約 100 nmol 下的前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量。

51. 如請求項 47 所記載之方法，其進一步包含以與藉由前述樣本包含的前述第一受質蛋白之莫耳比率檢測前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量，前述莫耳比率小於約 1:100。
52. 如請求項 47 所記載之方法，其進一步包含與對照樣本比較來測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量。
53. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含以至少約 70% 之特異性檢測前述樣本中之前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。
54. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述檢測前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含以下一或多者：西方墨點分析、點跡墨點分析、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、螢光蛋白/肽結合分析、硫代黃素結合分析、剛果紅結合分析、沉澱分析、電子顯微術、原子力顯微術、表面電漿子共振、及光譜學。
55. 如請求項 54 所記載之方法，其中前述酶聯免疫吸附分析(ELISA)包含雙側夾心酶聯免疫吸附分析(ELISA)。
56. 如請求項 54 所記載之方法，其中前述光譜學包含以下一或多者：準光散射光譜學、多光譜紫外光譜學、共焦雙色螢光關聯光譜學、傅立葉轉換紅外光譜學、利用分光鏡檢測之毛細管電泳、電子自旋共振光譜學、核磁共振光譜學、及螢光共振能量轉移(FRET)光譜學。
57. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述檢測前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含：
使前述第一培養混合物與蛋白酶接觸；及
在以下一或多者中使用抗折疊錯誤之蛋白質抗體或對

折疊錯誤之 tau 聚集體為特異性的抗體檢測前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體：西方墨點檢定、點跡墨點檢定、及酶聯免疫吸附分析(ELISA)。

58. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含提供呈標記形式之前述第一受質蛋白。
59. 如請求項 58 所記載之方法，其中呈標記形式之前述第一受質蛋白包含以下一或多者：共價併入之放射性胺基酸、共價併入、經同位素標記之胺基酸、及共價併入之螢光團。
60. 如請求項 59 所記載之方法，其中前述檢測前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含檢測併入前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體中的呈標記形式之前述第一受質蛋白。
61. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本包含以下一或多者：羊水；膽汁；血液；腦脊髓液；叮嚀；皮膚；滲出物；糞便；胃液；淋巴；乳汁；黏液；黏膜；腹膜液；血漿；胸膜液；膿液；唾液；皮脂；精液；汗液；滑液；淚液；及尿。
62. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係來源於以下一或多者之細胞或組織：皮膚、腦、心臟、肝、胰臟、肺、腎、胃腸、神經、黏膜、血液細胞、腺、及肌肉。
63. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本之每一部分係藉由約 1 μL 至約 1000 μL 之體積表徵。
64. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本之每一部分包含 CSF，其係藉由約 10 μL 至約 80 μL 之體積表徵。
65. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本之每一部分包含以下一者：
血漿，其藉由約 250 μL 至約 750 μL 之體積表徵；及

血液，其藉由約 200 μL 至約 1000 μL 之體積表徵。

66. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含自受試者獲得前述樣本。
67. 如請求項 66 所記載之方法，其中前述受試者為以下一者：人類、小鼠、大鼠、犬、貓、牛、馬、鹿、麋鹿、綿羊、山羊、豬、及非人類靈長類動物。
68. 如請求項 66 所記載之方法，其中前述受試者為以下一或多者：患有 Tau 蛋白病之風險、患有前述 Tau 蛋白病、及處於針對前述 Tau 蛋白病之治療下。
69. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自受試者，前述方法進一步包含藉由將前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量與比較樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量比較來測定前述受試者中 Tau 蛋白病之進程或體內環境恆定，前述比較樣本係相較於前述樣本在不同時間取自前述受試者。
70. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述受試者係用 Tau 蛋白病調節療法治療，前述方法進一步包含：

將前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量與比較樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量比較，前述樣本及前述比較樣本係在前述 Tau 蛋白病調節療法下的一時間段內的不同時間取自前述受試者；及

測定為以下一者的前述受試者：根據在前述時間段內前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之改變而對前述 Tau 蛋白病調節療法有反應，或根據在前述時間段內前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之體內環境恆定而對前述 Tau 蛋白病調節療法無反應。

71. 如請求項 70 所記載之方法，其進一步包含用前述 Tau 蛋白病調節療法治療測定為對前述 Tau 蛋白病調節療法有反應的前述受試者。
72. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自受試者，前述受試者係用 Tau 蛋白病調節療法治療受試者以抑制前述第一受質蛋白之產生或抑制前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之聚集。
73. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含選擇性地濃縮前述樣本及前述第一培養混合物之一或多者中的前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。
74. 如請求項 73 所記載之方法，其中前述選擇性地濃縮前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含在形成前述第一培養混合物之前預處理前述樣本。
75. 如請求項 70 所記載之方法，其中前述選擇性地濃縮前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含在培養前述第一培養混合物之前預處理前述第一培養混合物。
76. 如請求項 73 所記載之方法，其中前述選擇性地濃縮前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含接觸能夠結合前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的一或多種抗體以形成經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。
77. 如請求項 76 所記載之方法，其中能夠結合前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述一或多種抗體包含以下一或多者：對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的胺基酸表位序列為特異性的抗體，及對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的構形為特異性的抗體。
78. 如請求項 77 所記載之方法，其中對前述第一折疊錯誤之蛋

白質聚集體的構形為特異性的前述抗體對 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 聚集體之構形表位有選擇性。

79. 如請求項 77 所記載之方法，其中能夠結合前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述一或多種抗體係偶合至固相。
80. 如請求項 79 所記載之方法，其中前述固相包含磁珠及多孔板之一或多者。
81. 如請求項 76 所記載之方法，其中前述使前述樣本與前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物包含使莫耳過量之前述第一受質蛋白與包含前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述樣本接觸，前述第一受質蛋白之前述莫耳過量大於包括在前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的蛋白質單體之總莫耳量中。
82. 如請求項 81 所記載之方法，其中前述培養前述第一培養混合物係在前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集以形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。
83. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述破壞前述第一培養混合物包含以下一或多者：音波振動處理、攪拌、搖動、冷凍/融化、雷射照射、高壓釜培養、高壓、及均質化。
84. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述破壞前述第一培養混合物包含循環攪動。
85. 如請求項 84 所記載之方法，其中前述循環攪動係進行達以下一或多者：約 50 轉每分鐘(RPM)與 10,000 RPM 之間，約 200 RPM 與約 2000 RPM 之間、及約 500 RPM。
86. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述破壞前述第一培養混合物係在每一培養循環進行達以下一或多者：約 5 秒與約

- 10 分鐘之間、約 30 秒與約 1 分鐘之間、約 45 秒與約 1 分鐘之間、及約 1 分鐘。
87. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述培養前述第一培養混合物係在每一培養循環中獨立地進行達以下一或多者：約 1 分鐘與約 5 小時之間、約 5 分鐘與約 5 小時之間、約 10 分鐘與約 2 小時之間、約 15 分鐘與約 1 小時之間、及約 25 分鐘與約 45 分鐘。
88. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述每一培養循環包含獨立地培養及破壞前述第一培養混合物達以下一或多者：培養約 1 分鐘與約 5 小時之間且破壞約 5 秒與約 10 分鐘之間；培養約 5 分鐘與約 5 小時之間且破壞約 5 秒與約 10 分鐘之間；培養約 10 分鐘與約 2 小時之間且破壞約 30 秒與約 1 分鐘之間；培養約 15 分鐘與約 1 小時之間且破壞約 45 秒與約 1 分鐘之間；培養約 25 分鐘與約 45 分鐘之間且破壞約 45 秒與約 90 秒之間；培養約 29 分鐘且破壞約 1 分鐘；及培養約 1 分鐘且破壞約 1 分鐘。
89. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述進行前述培養循環係重複達以下一或多者：約 2 次與約 1000 次之間、約 5 次與約 500 次之間、約 50 次與約 500 次之間、及約 150 次與約 250 次之間。
90. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述使前述樣本與前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物在生理條件下進行。
91. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含使前述樣本與莫耳過量之前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物，前述莫耳過量大於包括在前述樣本中的前述第一折疊

錯誤之蛋白質聚集體中的蛋白質單體之總莫耳量。

92. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含：

使前述樣本與硫代黃素及莫耳過量之前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物，前述莫耳過量大於包括在前述樣本中的前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中的第一受質蛋白之量；

進行前述培養循環兩次或更多次以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集；

搖動前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測相應於前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述硫代黃素之螢光來測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在。

93. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述第一受質蛋白係藉由以下一者產生：化學合成、重組產生、及自非重組生物樣本提取。

94. 如請求項 1 所記載之方法，其中：

前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含可溶性第一折疊錯誤之蛋白質聚集體及不可溶第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的一或多者；及

前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含以下一或多者：可溶性部分及不可溶部分。

95. 如請求項 94 所記載之方法，其中前述第一折疊錯誤之蛋白

質聚集體為前述可溶性第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。

96. 如請求項 1 所記載之方法，其中其前提為前述樣本排除 tau 小纖維。

97. 一種用於測定受試者中存在或不存在相應於第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的 Tau 蛋白病的方法，其包含：

提供來自前述受試者之樣本；

至少執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 程序，前述第一蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 程序包含：

藉由使前述樣本之第一部分與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 tau 同功型，前述第一受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在前述 Tau 蛋白病；

前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受

質蛋白且前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白；且

其前提為當前述第一受質蛋白由單體 3R tau 組成時，前述 Tau 蛋白病排除匹克症。

98. 如請求項 97 所記載之方法，前述方法進一步包含：

至少執行第二蛋白質折疊錯誤循環擴增程序以測定前述樣本中存在或不存在至少第二折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物，前述第二受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第二培養混合物以有效引起前述第二受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第二培養混合物以有效形成前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第二培養混合物中前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白且前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白。

99. 如請求項 98 所記載之方法，其中前述第二受質蛋白與前述

第一受質蛋白相異，且前述第二受質蛋白包含以下一者：
類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、3R tau、及 4R tau。

100.如請求項 98 所記載之方法，其中前述第一受質蛋白包含 4R tau。

101.如請求項 98 所記載之方法，前述方法進一步包含：

至少執行第三蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序以測定前述樣本中存在或不存在至少第三折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第三部分與第三受質蛋白接觸來形成第三培養混合物，前述第三受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第三培養混合物以有效引起前述第三受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第三培養混合物以有效形成前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第三培養混合物中前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白且前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白。

102.如請求項 101 所記載之方法，其中前述 Tau 蛋白病存在於前

述受試者中，前述方法進一步包含根據：前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在；及前述樣本中前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來表徵前述受試者中的前述 Tau 蛋白病之身份。

103.如請求項 97 所記載之方法，其中其前提為前述 Tau 蛋白病不主要地藉由 3R tau 蛋白之折疊錯誤及/或聚集表徵。

104.如請求項 97 所記載之方法，其進一步包含：

使前述樣本與硫代黃素及莫耳過量之前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物，前述莫耳過量大於包括在前述樣本中的前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中的蛋白質單體之量；

進行前述培養循環兩次或更多次以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少前述部分的折疊錯誤及/或聚集；

搖動前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測相應於前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述硫代黃素之螢光來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。

105.一種用於使用捕獲來測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的方法，其包含：

自前述樣本捕獲前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體以形成經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；

至少執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 程

序，前述第一蛋白質折疊錯誤循環擴增程序包含：

藉由使前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體與莫耳過量之第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述莫耳過量大於前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中包括的蛋白質單體之量；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體之至少一部分來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白且前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白。

106.如請求項 105 所記載之方法，其中前述自前述樣本捕獲前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體以形成經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體係使用對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體為特異性的一或多種抗體來進行，前述抗體包含以下一或多者：對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的胺基酸表位序列為特異性的抗體及對前述第一折疊錯誤之蛋白質

聚集體的構形為特異性的抗體。

- 107.如請求項 106 所記載之方法，其中對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的構形為特異性的前述抗體對 Tau 蛋白病特異性第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之構形表位有選擇性。
- 108.如請求項 106 所記載之方法，其中對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述構形為特異性的前述抗體相應於以下一者：阿茲海默症(AD)、帕金森氏症(PD)、進行性上眼神經核麻痺症(PSP)、額顳葉失智症(FTD)、皮質基底核退化症(CBD)、輕度認知障礙(MCI)、嗜銀顆粒病(AgD)、創傷性腦損傷(TBI)、慢性創傷性腦病變(CTE)、及拳擊員癡呆(DP)。
- 109.如請求項 105 所記載之方法，其中對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體為特異性的前述一或多種抗體係偶合至固相。
- 110.如請求項 109 所記載之方法，其中前述固相包含磁珠及多孔板之一或多者。
- 111.如請求項 109 所記載之方法，其中前述使前述樣本與前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物包含使莫耳過量之前述第一受質蛋白與前述樣本接觸，前述第一受質蛋白之前述莫耳過量大於包括在前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的蛋白質單體之總莫耳量中。
- 112.如請求項 109 所記載之方法，其中前述培養前述第一培養混合物係在前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集以形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。
- 113.如請求項 105 所記載之方法，其中前述第一受質蛋白包含 4R tau 蛋白。
- 114.一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病的方法，前

述 Tau 蛋白病包含阿茲海默症(AD)，前述方法包含：

提供前述受試者；

自前述受試者獲得樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物；

至少執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，前述第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序包含：

藉由使前述樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在 AD。

- 115.如請求項 114 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在 AD 進一步包含藉由測定 AD tau 蛋白聚集體之特性來將 AD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述特性包含以下一或多者：以下一或多個 AD-特異性相應蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 AD tau 蛋白聚集體之構形表位有

選擇性的抗體進行的檢定；對 AD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 AD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

116. 一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病的方法，前述 Tau 蛋白病包含帕金森氏症(PD)，前述方法包含：

提供前述受試者；

自前述受試者獲得樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物；

執行至少第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，包含：

藉由使前述樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在 PD。

117. 如請求項 116 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在 PD 進一步包含藉由測定 PD tau 蛋白聚集體之特性來將 PD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述特性包含

以下一或多者：以下一或多個 PD-特異性相應蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 PD tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 PD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 PD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

118.一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病的方法，前述 Tau 蛋白病包含進行性上眼神經核麻痺症(PSP)，前述方法包含：

提供前述受試者；

自前述受試者獲得樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物；

執行至少第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，包含：

藉由使前述樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋

白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在 PSP。

119.如請求項 118 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在 PSP 進一步包含藉由測定 PSP tau 蛋白聚集體之特性來將 PSP 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述特性包含以下一或多者：以下一或多個 PSP-特異性相應蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 PSP tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 PSP tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 PSP tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

120.一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病的方法，前述 Tau 蛋白病包含額顳葉失智症(FTD)，前述方法包含：

提供前述受試者；

自前述受試者獲得樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物；

執行至少第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，包含：

藉由使前述樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊

錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在 FTD。

121.如請求項 120 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在 FTD 進一步包含藉由測定 FTD tau 蛋白聚集體之特性來將 FTD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述特性包含以下一或多者：以下一或多個 FTD-特異性相應蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 FTD tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 FTD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 FTD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

122.一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病的方法，前述 Tau 蛋白病包含皮質基底核退化症(CBD)，前述方法包含：

提供前述受試者；

自前述受試者獲得樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物；

至少執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，前述第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序包含：

藉由使前述樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至

少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在 CBD。

123.如請求項 122 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在 CBD 進一步包含藉由測定 CBD tau 蛋白聚集體之特性來將 CBD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述特性包含以下一或多者：以下一或多個 CBD-特異性相應蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 CBD tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 CBD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 CBD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

124.如請求項 114、116、118、120、及 120 中任一項所記載之方法，其進一步包含：

至少執行第二蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序以測定前述樣本中存在或不存在至少第二折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物，前述第二受質蛋白經受病理學折疊錯誤及/或聚集；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第二培養混合物以有效引起前述第二受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第二培養混合物以有效形成前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第二培養混合物中前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

前述 Tau 蛋白病存在於前述受試者中，前述方法進一步包含根據：前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在；及前述樣本中前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來表徵前述受試者中的前述 Tau 蛋白病之身份；

前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白；

前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白；且

前述第二受質蛋白與前述第一受質蛋白相異，且前述第二受質蛋白包含以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、及 3R tau。

125. 如請求項 124 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在每一 Tau 蛋白病進一步包含藉由分析一或多種折疊錯誤之聚集體之至少一個特性來將每一 Tau 蛋白病與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述折疊錯誤之聚集體各自相應於類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、及 3R tau 之一者，每一特性相應於以下一或多者：使用對一或多種折疊錯誤之

聚集體中任何者之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；使用對一或多種折疊錯誤之聚集體中任何者之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；前述一或多種折疊錯誤之聚集體之一或多個蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數，其包含以下一或多者：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；對前述一或多種折疊錯誤之聚集體中任何者有選擇性的指示劑；及前述一或多種折疊錯誤之聚集體中任何者的頻譜特性。

126. 一種用於測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的套組，其包含：

第一受質蛋白，其包含 4R tau；

第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑，前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白且前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體相應於 Tau 蛋白病；

緩衝液；

肝素；及

鹽；

說明書，前述說明書指導使用者：

獲得樣本；

執行至少第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，包含：

藉由使前述樣本之第一部分與前述第一受質蛋白、前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑、前述緩衝液、前述肝素、及前述鹽接觸來形成第一培養混合物，前述第一培養混合物係用一定濃度之以下一或多者形成：小於約 $20 \mu\text{M}$ 之前述第一受質蛋白；小於約 $75 \mu\text{M}$ 之

前述肝素；小於約 190 mM 之作為 NaCl 的前述鹽；及小於約 9.5 μ M 之作為硫代黃素 T 的前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由根據前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑分析第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。

127.如請求項 126 所記載之套組，其中前述說明書指導前述使用者自受試者獲得前述樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物，且前述說明書指導前述使用者根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定或診斷前述受試者中之 Tau 蛋白病。

128.如請求項 126 所記載之套組其進一步包含：

第二受質蛋白及第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑，前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白，前述第二受質蛋白與前述第一受質蛋白相異且前述第二受質蛋白包含以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、3R tau、及 4R tau；

前述說明書進一步指導前述使用者：

執行至少第二蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，包含：

藉由使前述樣本之第二部分與前述第二受質蛋白及前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑接觸來形成第二培養混合物；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第二培養混合物以有效引起前述第二受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第二培養混合物以有效形成前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；

藉由分析前述第二培養混合物中前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

根據：前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在；及前述樣本中前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來針對 Tau 蛋白病之身份表徵前述樣本。

129.如請求項 126 所記載之套組，其進一步包含蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)設備，前述蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)設備包含以下一或多者：多壁微滴定板；微射流板；搖動設備；分光計；及培養器。

130.如請求項 126 所記載之套組，其中對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述構形為特異性的前述抗體相應於以下一

者：阿茲海默症(AD)、帕金森氏症(PD)、進行性上眼神經核麻痺症(PSP)、額顳葉失智症(FTD)、皮質基底核退化症(CBD)、輕度認知障礙(MCI)、嗜銀顆粒病(AgD)、創傷性腦損傷(TBI)、慢性創傷性腦病變(CTE)、及拳擊員癡呆(DP)，前述說明書包含根據使用對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述構形為特異性的前述抗體進行的結合檢定測定前述受試者中存在或不存在以下一者：AD、PD、PSP、FTD、CBD、MCI、AgD、TBI、CTE、及DP。

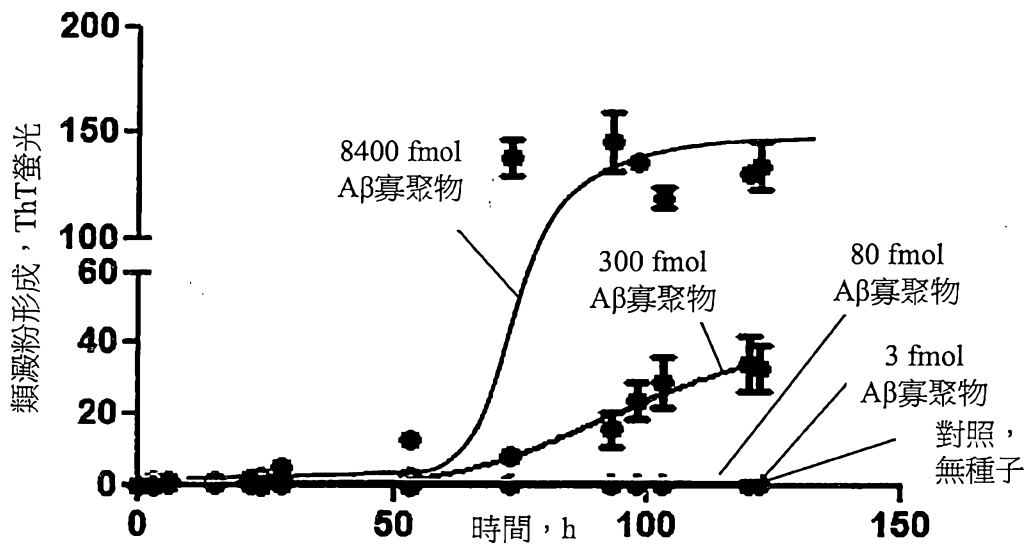


圖2A

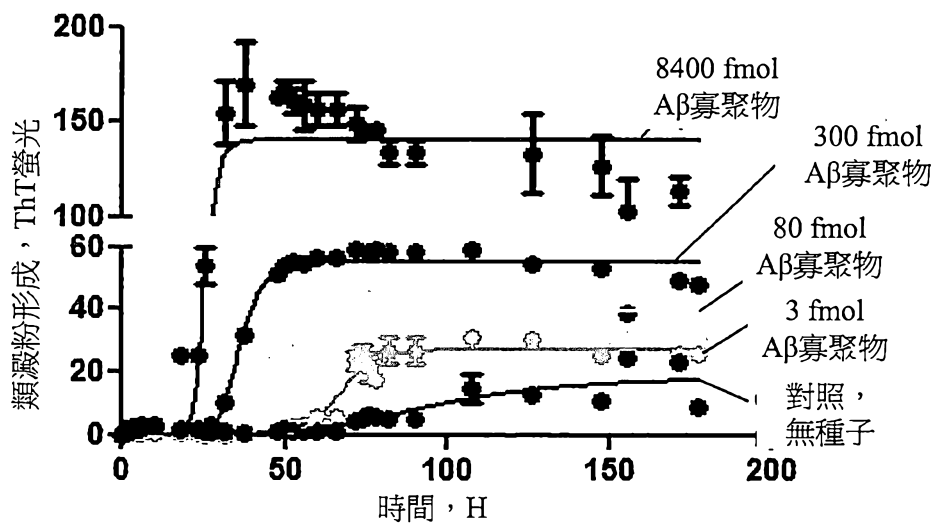


圖2B

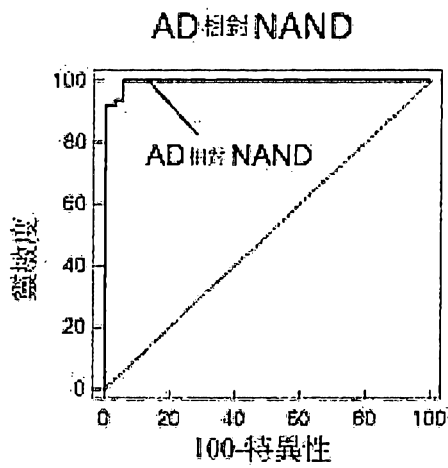


圖4A

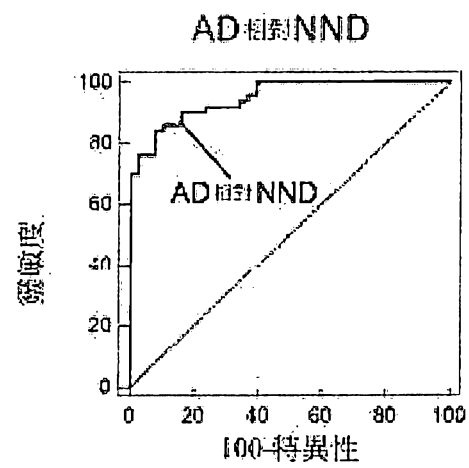


圖4B

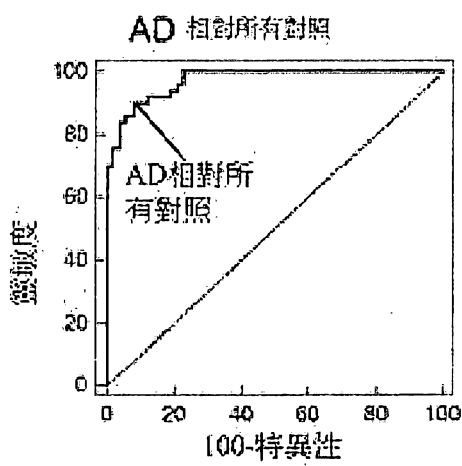


圖4C

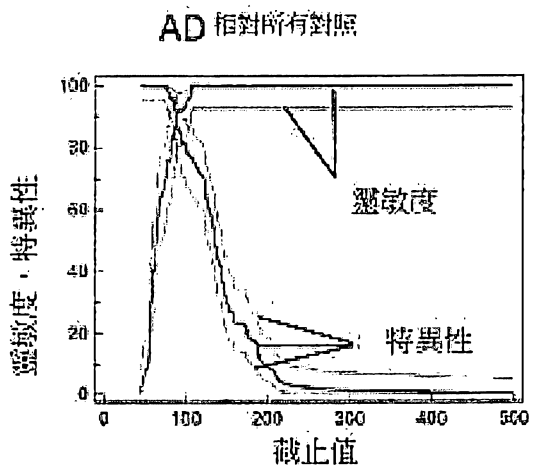


圖4D

表1：針對CSF¹中的Aβ-PCMA的靈敏度、特異性、及預測值之估算

群組	靈敏度 ²	特異性 ²	陽性預測值 ²	陰性預測值 ²
AD相對NAND	100.0%	94.6%	96.2%	100.0%
AD相對NND	90.0%	84.2%	88.2%	86.5%
AD相對對照	90.0%	92.0%	88.2%	93.2%

- 對於靈敏度、特異性及預測值之估算，使用如圖9B所示的停滯期之結果。
藉由接收器操作特性(ROC)曲線分析，使用MedCalc軟體估算的截止點。
- 藉由式： $[\text{真陽性}/(\text{真陽性} + \text{假陰性})] \times 100$ 估算靈敏度；
藉由式： $[\text{真陰性}/(\text{真陰性} + \text{真陽性})] \times 100$ 估算特異性；
藉由式： $[\text{真陽性}/(\text{真陽性} + \text{假陽性})] \times 100$ 估算正預測值；
藉由式： $[\text{真陰性}/(\text{真陰性} + \text{假陰性})] \times 100$ 估算負預測值；
- 對照係指來自NND加NAND之樣本。

圖5

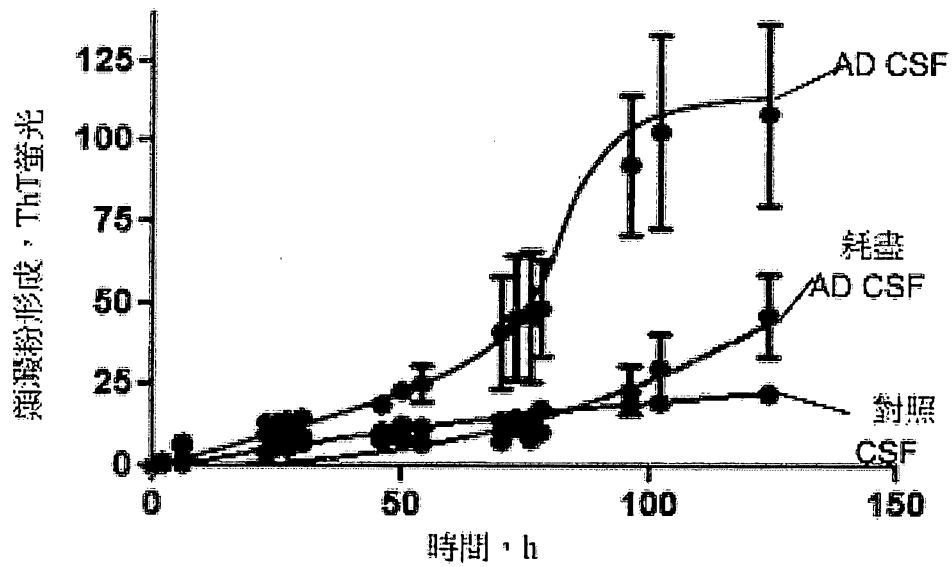


圖 7B

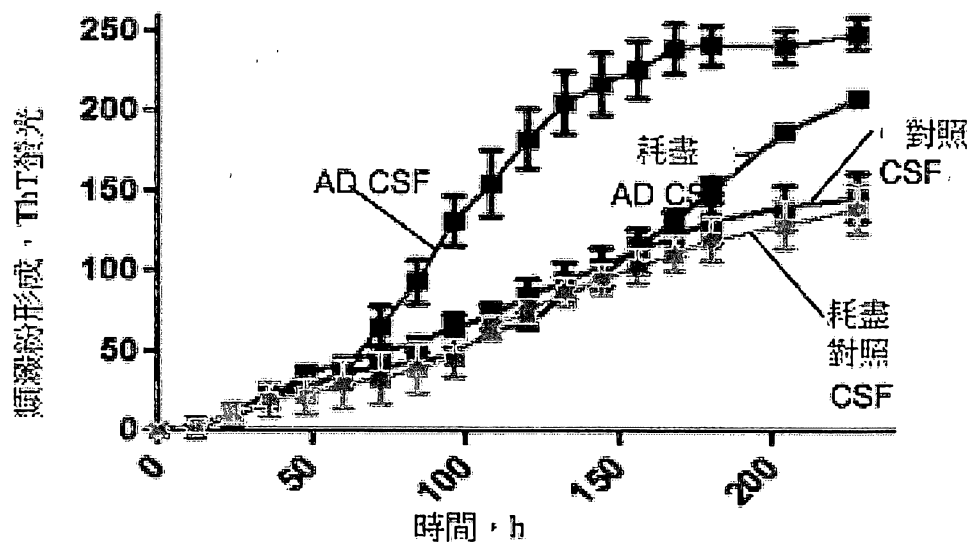


圖 7C

表2



抗體	表位	商業來源	Aβ寡聚物 俘獲能力
82E1	1-5	IBL America	+++
4G8	18-22	Covance	+
6E10	3-8	Covance	++
X-40/42	C末端	Mybiosource	-
16-ADY 小鼠 IgG1	構形	Acumien	++
A11	構形	Invitrogen	-

+++ 最好
 ++ 極好
 + 良好
 - 無結果

圖9

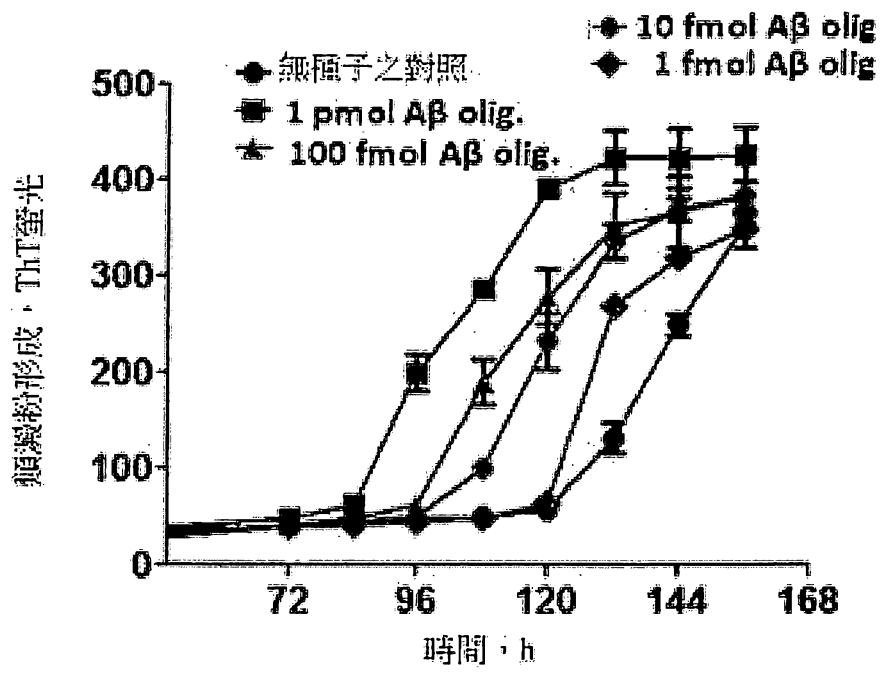


圖 10

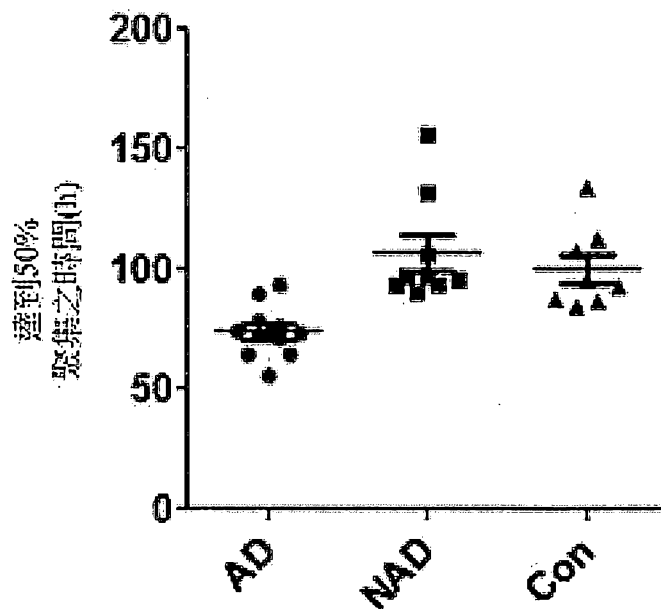


圖 11

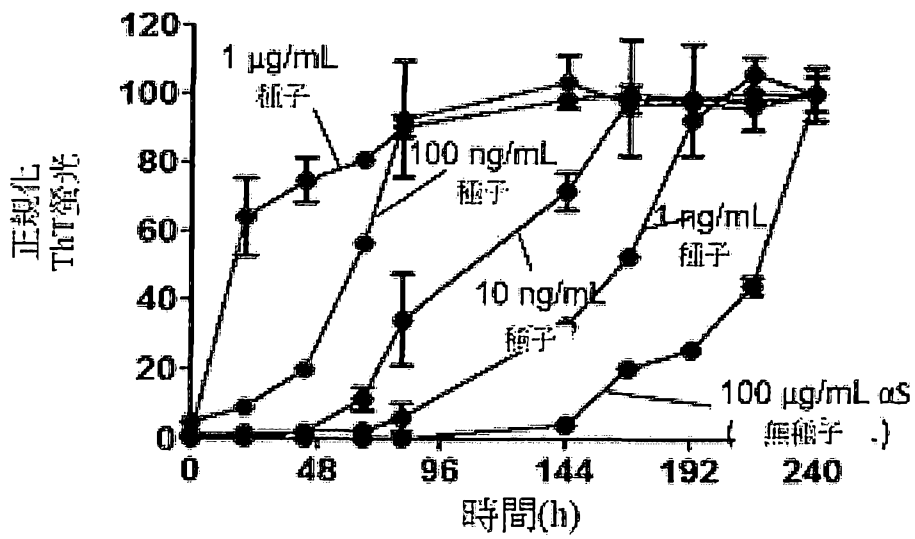


圖 13A

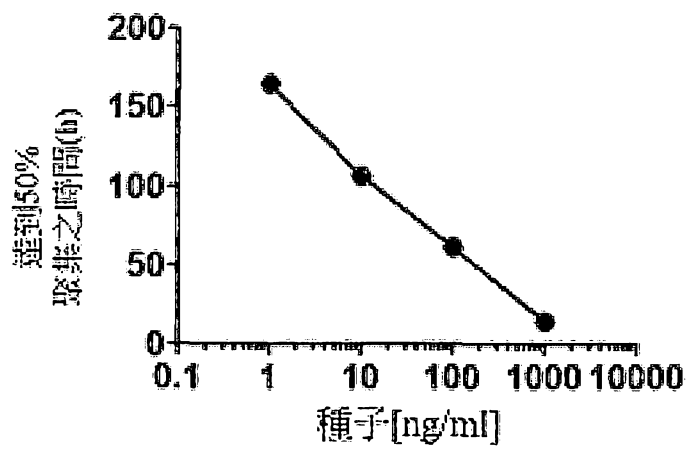


圖 13B

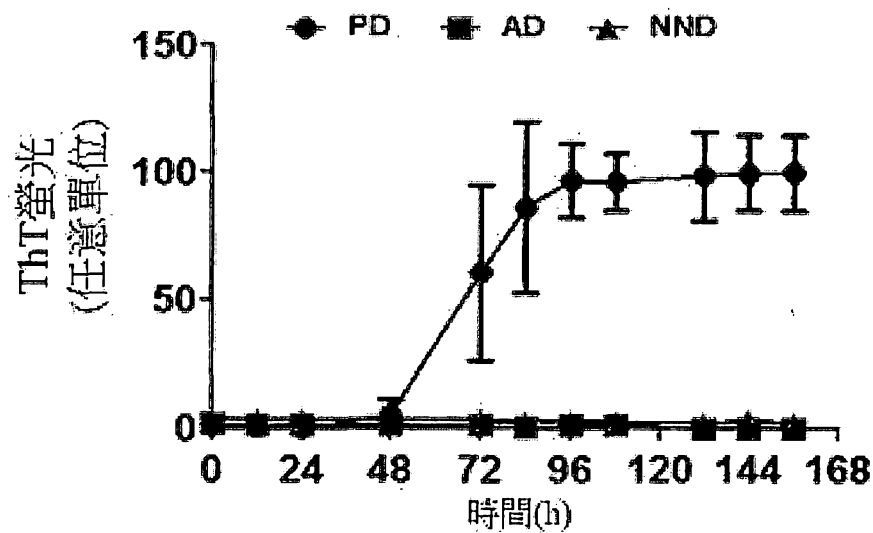


圖 14

表 3

抗體 (公司)	表位	α 突觸核蛋白寡聚 物俘獲能力
α/β 突觸核蛋白抗 體N-19 (Santa Cruz Biotechnology)	N末端	+++
α 突觸核蛋白抗體C- 20-R (Santa Cruz Biotechnology)	C末端	+++
α 突觸核蛋白抗體211 (Santa Cruz Biotechnology)	胺基酸121 - 125	++
α 突觸核蛋白抗體Syn- 204 (Santa Cruz Biotechnology)	片段1 - 130	+
I6ADV小鼠IgG1 (Acumen)	構形	-

+++ 最好
 ++ 極好
 + 良好
 - 無結果

圖 15

用N-19抗體進行免測沉澱法

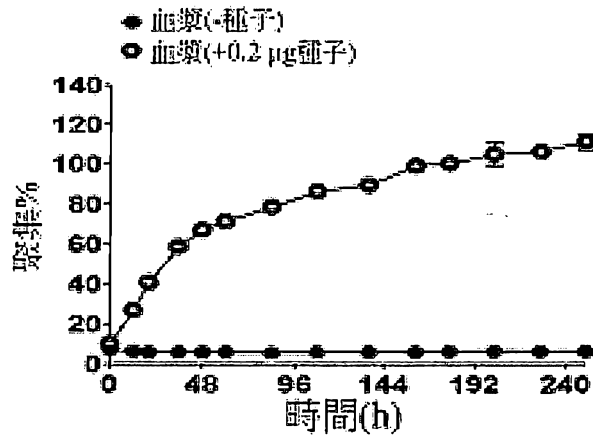


圖17A

用211抗體進行免測沉澱法

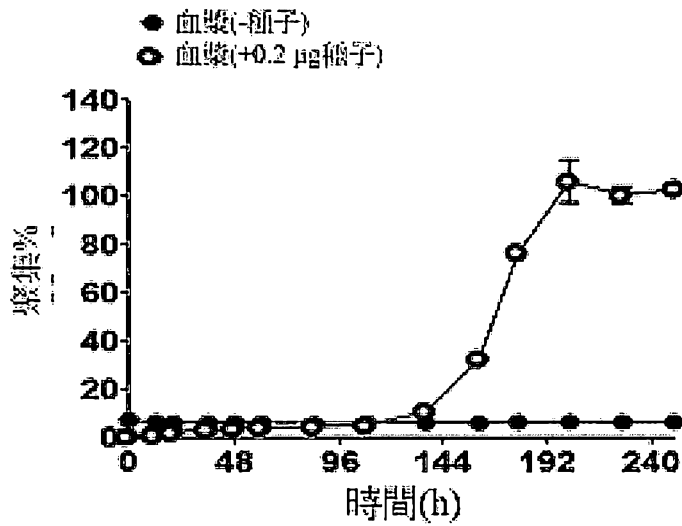


圖17B

用C-20抗體進行免測沉澱法

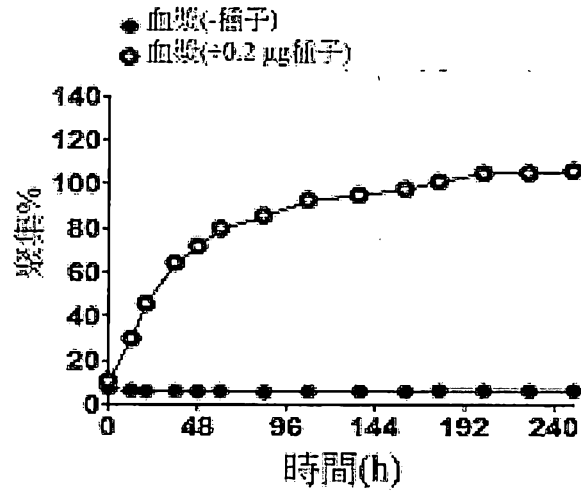


圖 17C

健康對照

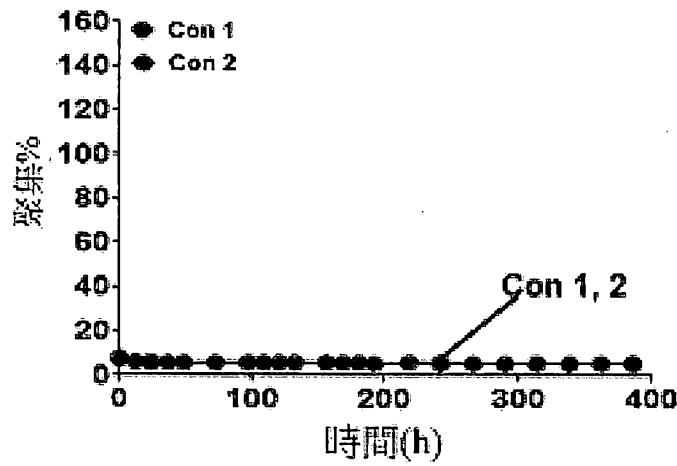


圖 18A

帕金森氏症

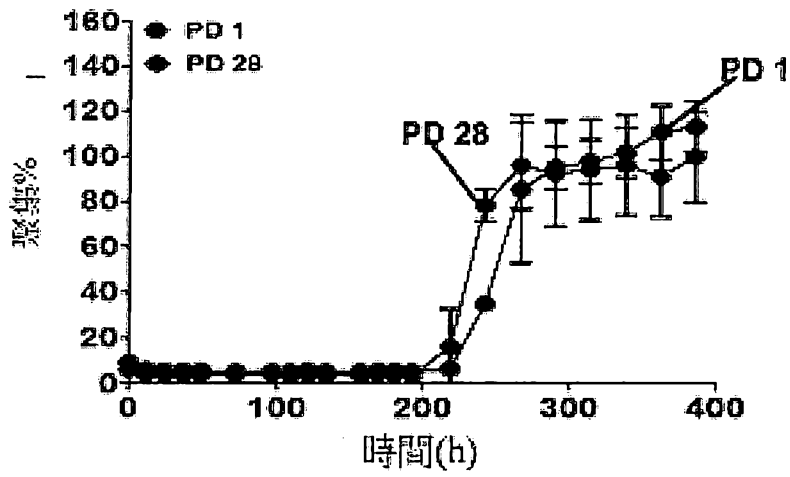


圖 18B

多系統萎縮症

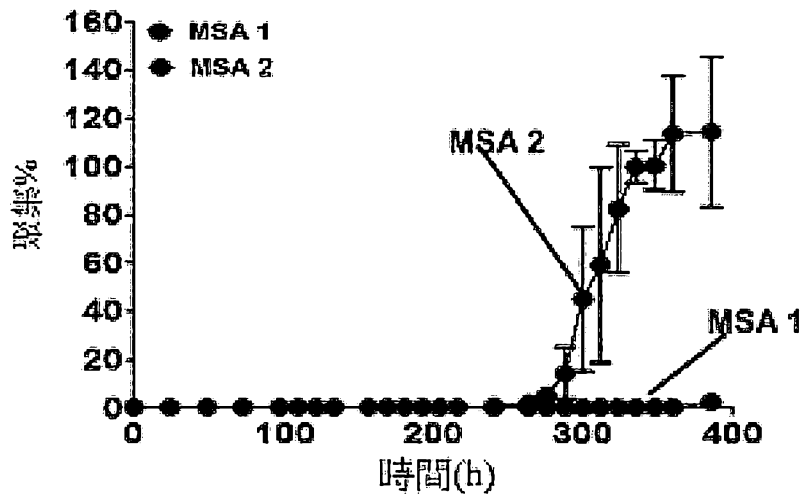


圖 18C

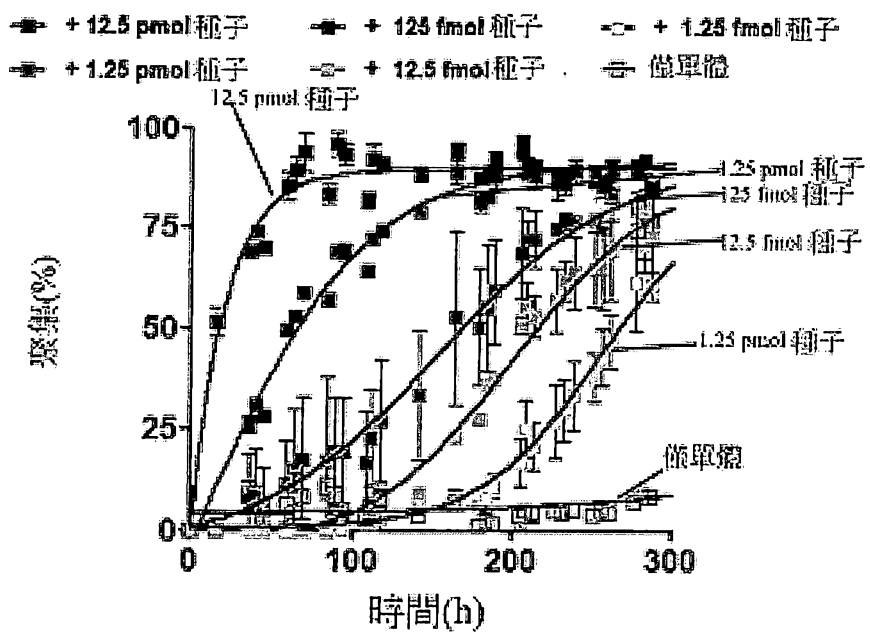


圖20A

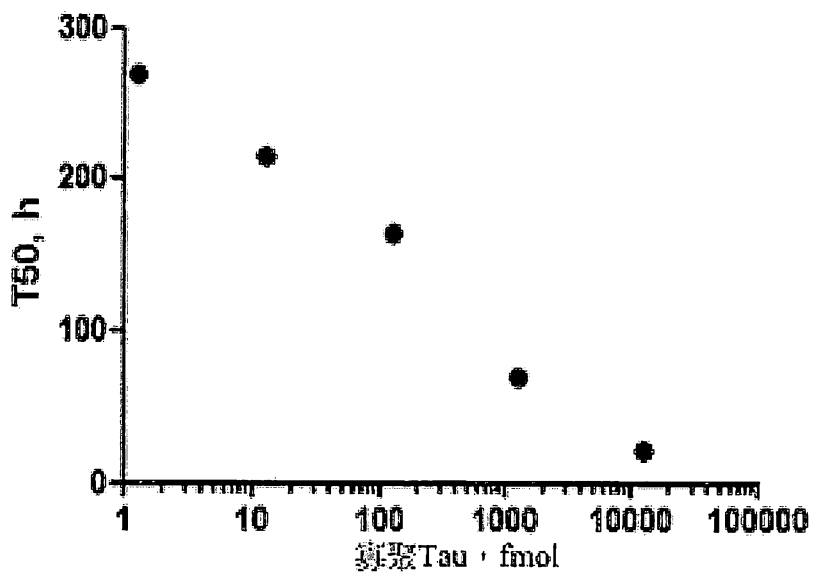
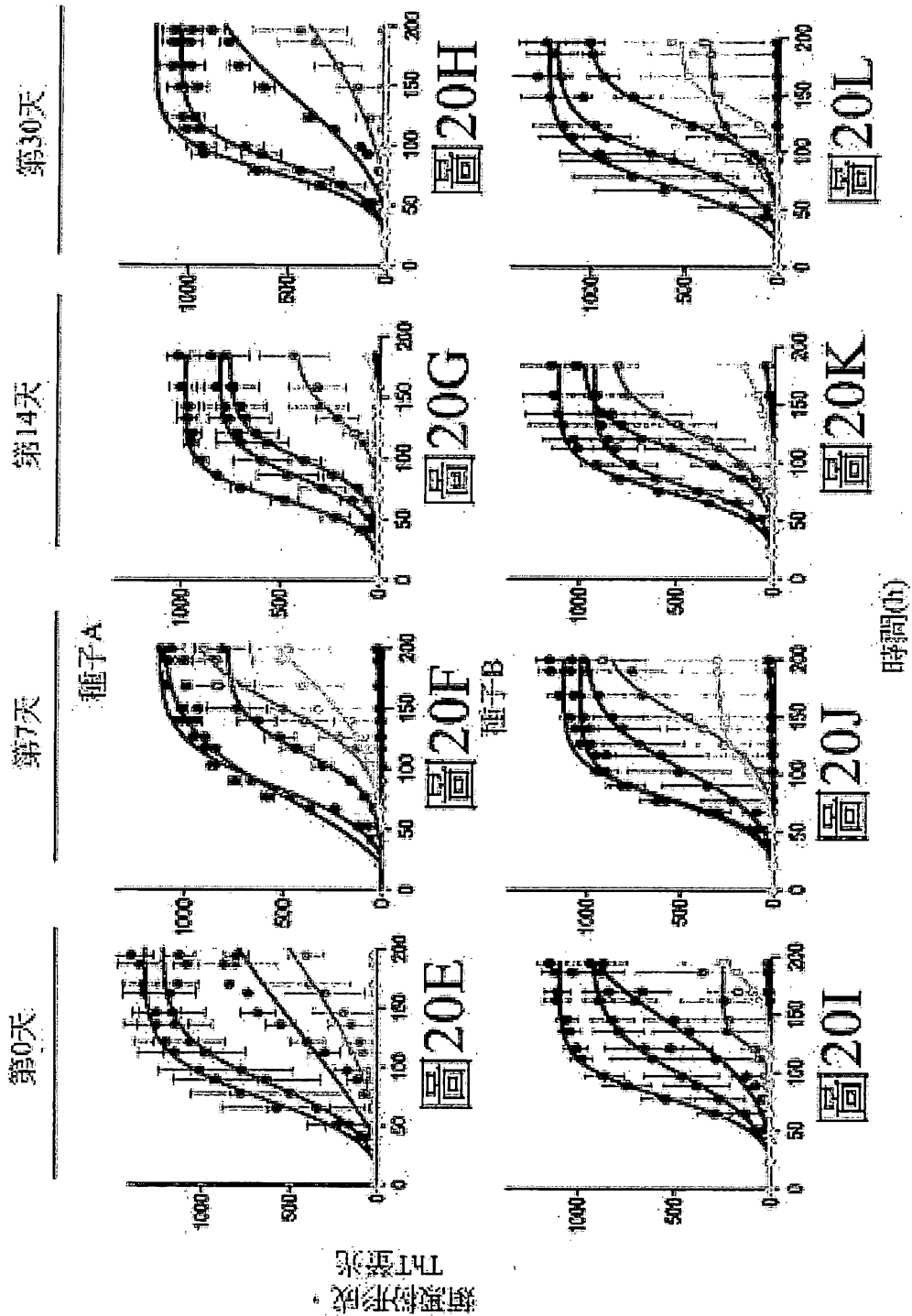


圖20B



T ₅₀ ± s.e.m. (h)						
天	種子A		種子B		平均值	P值(ns)
	未稀釋標準	稀釋標準	未稀釋標準	稀釋標準		
第0天	65 ± 5	78 ± 3	72 ± 6	65 ± 3	70 ± 3.1	0.19
第7天	69 ± 3	74 ± 2	74 ± 4	74 ± 8	72 ± 1.2	0.84
第14天	63 ± 4	75 ± 3	69 ± 3	63 ± 1	68 ± 2.9	0.06
第30天	74 ± 2	70 ± 7	88 ± 4	77 ± 3	77 ± 3.9	0.09
平均值:	67 ± 2.6	74 ± 1.6	75 ± 4.2	70 ± 3.4	71.5 ± 1.8	
P值(ns)	0.14	0.62	0.08	0.16		0.26

圖20M

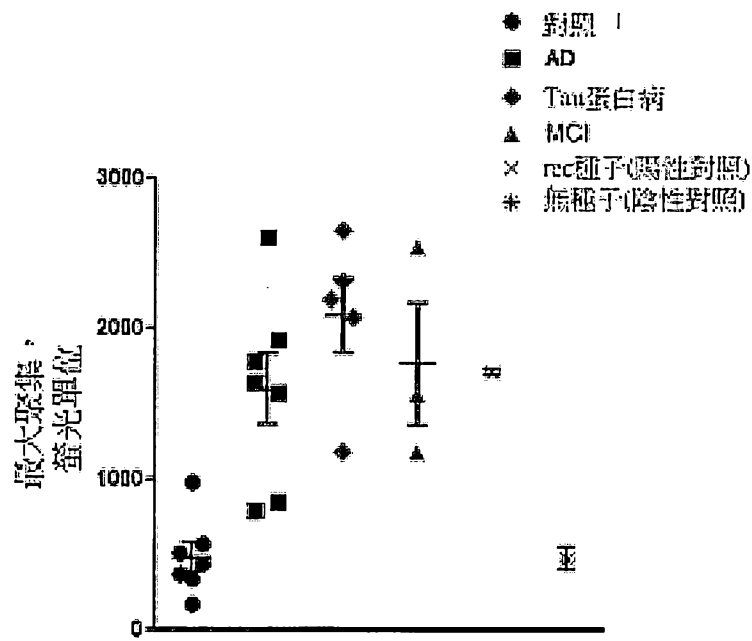


圖21A

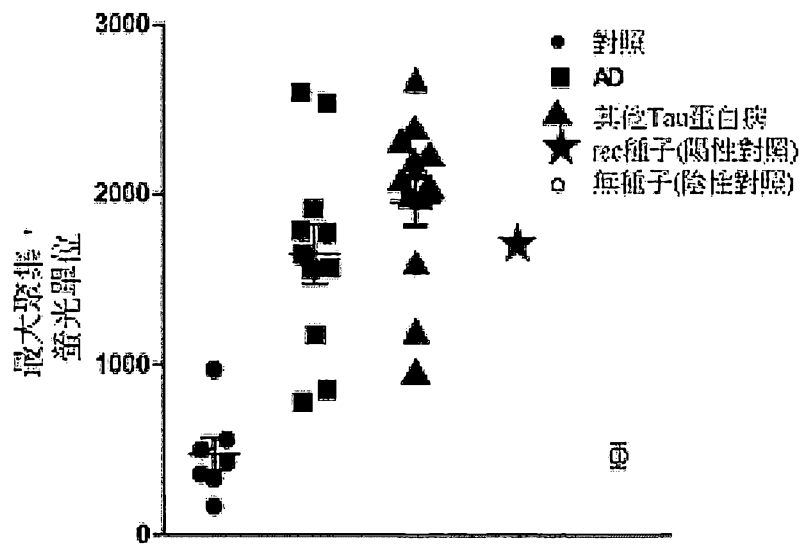


圖21B

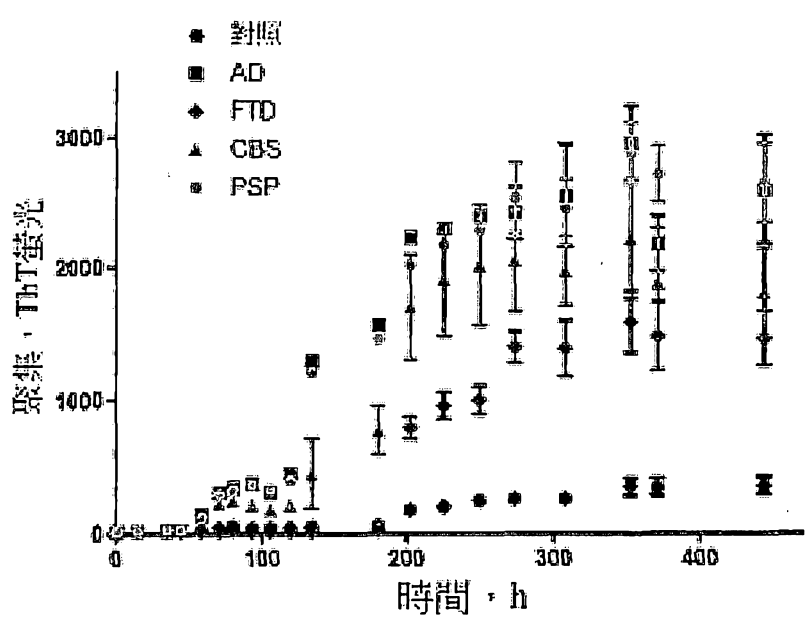


圖 22

申請專利範圍

1. 一種用於測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的方法，前述方法包含：
 - 執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，前述第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序包含：
 - 藉由使前述樣本之第一部分與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；
 - 在有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：
 - 在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；
 - 破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及
 - 藉由分析前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；
 - 前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白且前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白。
2. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在，前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體為折疊錯誤之 4R tau 聚集體。
3. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中存在或不存在至少第二折疊錯誤之蛋白質聚集體。
4. 如請求項 3 所記載之方法，其進一步包含至少執行第二蛋

白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 程序以測定前述樣本中存在或不存在至少前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物，前述第二受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第二培養混合物以有效引起前述第二受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第二培養混合物以有效形成前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第二培養混合物中前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白且前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白。

5. 如請求項 4 所記載之方法，其中前述第二受質蛋白包含以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、及 3R tau。
6. 如請求項 4 所記載之方法，其中前述第二受質蛋白包含 3R tau，前述方法進一步包含測定前述樣本中前述 4R tau 與前述 3R tau 之比率為約 1:99 與約 99:1 之間。
7. 如請求項 4 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體及前述第二折疊錯誤之

蛋白質聚集體的前述存在。

8. 如請求項 4 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中存在或不存在至少第三折疊錯誤之蛋白質聚集體。

9. 如請求項 8 所記載之方法，其進一步包含至少執行第三蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序以測定前述樣本中存在或不存在至少前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第三部分與第三受質蛋白接觸來形成第三培養混合物，前述第三受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第三培養混合物以有效引起前述第三受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第三培養混合物以有效形成前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第三培養混合物中前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白且前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白。

10. 如請求項 9 所記載之方法，其中前述第一受質蛋白包含 4R tau，前述第二受質蛋白包含類澱粉- β (A β)，且前述第三受質蛋白包含 α 突觸核蛋白。

11. 如請求項 8 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體、前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體、及前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在。
12. 如請求項 8 所記載之方法，其進一步包含測定前述樣本中存在或不存在至少第四折疊錯誤之蛋白質聚集體。
13. 如請求項 12 所記載之方法，其進一步包含至少執行第四蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 程序以測定前述樣本中存在或不存在至少前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：
 - 藉由使前述樣本之第四部分與第四受質蛋白接觸來形成第四培養混合物，前述第四受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體；
 - 在有效形成第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：
 - 在前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第四培養混合物以有效引起前述第四受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；
 - 破壞前述第四培養混合物以有效形成前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及
 - 藉由分析前述第四培養混合物中前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體；
 - 前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第四受質蛋白且前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第四受質蛋白。

14. 如請求項 13 所記載之方法，其中前述第一受質蛋白包含 4R tau，前述第二受質蛋白包含類澱粉- β (A β)，前述第三受質蛋白包含 α 突觸核蛋白，且前述第四受質蛋白包含 3R tau。
15. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自受試者，其進一步包含根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。
16. 如請求項 15 所記載之方法，前述方法進一步包含：

至少執行第二蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序以測定前述樣本中存在或不存在包含第二受質蛋白的折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物，前述第二受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第二培養混合物以有效引起前述第二受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第二培養混合物以有效形成前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第二培養混合物中前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質

蛋白且前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白。

17. 如請求項 16 所記載之方法，其中前述受試者包含前述 Tau 蛋白病，前述方法進一步包含根據：前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在；及前述樣本中前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在或不存在來表徵前述受試者中的 Tau 蛋白病之身份。
18. 如請求項 16 所記載之方法，其中前述第二受質蛋白包含以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、及 3R tau。
19. 如請求項 16 所記載之方法，前述方法進一步包含：

至少執行第三蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 程序以測定前述樣本中存在或不存在包含第三受質蛋白的折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第三部分與第三受質蛋白接觸來形成第三培養混合物，前述第三受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第三培養混合物以有效引起前述第三受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第三培養混合物以有效形成前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第三培養混合物中前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在或不存在來測定前述樣本中

存在或不存在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白且前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白。

20. 如請求項 19 所記載之方法，前述方法進一步包含：

至少執行第四蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序以測定前述樣本中存在或不存在包含第四受質蛋白的折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第四部分與第四受質蛋白接觸來形成第四培養混合物，前述第四受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第四培養混合物以有效引起前述第四受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第四培養混合物以有效形成前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第四培養混合物中前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第四折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第四受質蛋白且前述第四擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第四受質蛋白。

21. 如請求項 15 所記載之方法，其中前述 Tau 蛋白病包含原發

- 性 Tau 蛋白病或繼發性 Tau 蛋白病。
22. 如請求項 15 所記載之方法，其中前述 Tau 蛋白病至少部分地藉由 4R tau 蛋白之折疊錯誤及/或聚集來表徵。
 23. 如請求項 15 所記載之方法，其中前述第二受質蛋白包含 3R tau，前述方法進一步包含藉由前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體與前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之間的比率表徵前述 Tau 蛋白病，及根據為已知 Tau 蛋白病之特性的 4R tau 蛋白之折疊錯誤及/或聚集與 3R tau 蛋白之折疊錯誤及/或聚集的已知比率來測定相應於前述已知 Tau 蛋白病之前述 Tau 蛋白病。
 24. 如請求項 15 所記載之方法，其進一步包含藉由針對以下至少一者之特性來分析前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體或其一或多個相應蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 動力學參數來表徵前述 Tau 蛋白病之身份：阿茲海默症 (AD)、帕金森氏症 (PD)、進行性上眼神經核麻痺症 (PSP)、額顳葉失智症 (FTD)、皮質基底核退化症 (CBD)、輕度認知障礙 (MCI)、嗜銀顆粒病 (AgD)、創傷性腦損傷 (TBI)、慢性創傷性腦病變 (CTE)、及拳擊員癡呆 (DP)。
 25. 如請求項 24 所記載之方法，其中表徵前述 Tau 蛋白病之前述身份包含：

測定前述一或多個相應蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 動力學參數，包含以下一或多者：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；

將前述一或多個相應蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 動力學參數與為前述 Tau 蛋白病之前述身份之特性的一或多個相應預定相應蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 動力

學參數比較來判定相似性或差異以有效表徵前述 Tau 蛋白病之前述身份。

26. 如請求項 24 所記載之方法，其中表徵前述 Tau 蛋白病之前述身份包含使用以下一或多者：對 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體；對前述 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；前述 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之頻譜特性；前述 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之蛋白水解抵抗力；及前述 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 蛋白聚集體之變性穩定性。
27. 如請求項 15 所記載之方法，其中其前提為前述 Tau 蛋白病排除匹克症。
28. 如請求項 15 所記載之方法，其中測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病包含將前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在或不存在與取自對照受試者之對照樣本比較。
29. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述檢測包含檢測前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量，前述樣本係取自受試者，前述方法進一步包含藉由將前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量與預定閾值量比較來測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。
30. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自根據認知測試不呈現失智症之臨床徵象的受試者，前述方法進一步包含根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在或不存在測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。

31. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自根據對比度成像不呈現皮層斑塊或纏結的受試者，前述方法進一步包含根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。
32. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自根據認知測試不呈現失智症之臨床徵象的受試者，前述方法進一步包含根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在測定或診斷前述受試者中存在或不存在作為失智症之前述臨床徵象的促成因子的 Tau 蛋白病。
33. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自根據認知測試不呈現失智症之臨床徵象的受試者及根據遺傳測試呈現失智症傾向的受試者，前述方法進一步包含根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在測定或診斷前述受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病。
34. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培養混合物，前述第一培養混合物係藉由以下至少一個濃度表徵：
 - 小於約 20 μM 之前述第一受質蛋白；
 - 小於約 75 μM 之肝素；
 - 小於約 190 mM 之 NaCl；及
 - 小於約 9.5 μM 之硫代黃素 T。
35. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備包含在約 0.001 μM 與約 2000 μM 之間的濃度下的前述第一受質蛋白之前述第一培養混合物。
36. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培

養混合物，其藉由在約 0.001 μM 與約 75 μM 之間的濃度下的肝素表徵。

37. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培養混合物，其包含以下一或多者之緩衝液組合物：
Tris-HCL、PBS、MES、PIPES、MOPS、BES、TES、及 HEPES。
38. 如請求項 37 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培養混合物，其包含在約 1 μM 與約 1 M 之間的總濃度下的前述緩衝液組合物。
39. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培養混合物，其包含在約 1 μM 與約 1 M 之間的總濃度下的鹽組合物。
40. 如請求項 39 所記載之方法，其中前述鹽組合物包含以下一或多者：NaCl 及 KCl。
41. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含在約 5 與約 9 之間的 pH 下製備或維持前述第一培養混合物。
42. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含製備前述第一培養混合物，其包含在約 1 nM 與約 1 mM 之間的總濃度下的指示劑。
43. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述培養包含在約 5 $^{\circ}\text{C}$ 與約 60 $^{\circ}\text{C}$ 之間的溫度下加熱或維持前述第一培養混合物。
44. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含：

使前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑與前述第一培養混合物接觸，前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑係藉由在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下的指示狀態及在不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的非指示狀態來表徵；及

其中前述測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在包含檢測前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑之前述指示狀態。

45. 如請求項 44 所記載之方法，其中前述指示劑之前述指示狀態及前述指示劑之前述非指示狀態係藉由螢光之差異表徵，前述測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在包含檢測螢光之前述差異。
46. 如請求項 44 所記載之方法，其進一步包含使莫耳過量之前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑與前述第一培養混合物接觸，前述莫耳過量大於包括在前述第一受質蛋白中的蛋白質單體及前述第一培養混合物中的前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之總莫耳量。
47. 如請求項 44 所記載之方法，其中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑包含以下一或多者：硫代黃素、剛果紅、m-I-二苯乙烯、金黃胺 G、PIB、BF-227、X-34、TZDM、FDDNP、MeO-XO4、IMPY、NIAD-4、發光共軛聚噻吩、螢光蛋白、及其衍生物。
48. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述存在包含測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量。
49. 如請求項 48 所記載之方法，其進一步包含以至少約 70%之靈敏度檢測前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量。
50. 如請求項 48 所記載之方法，其進一步包含檢測在小於約 100 nmol 下的前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量。

51. 如請求項 48 所記載之方法，其進一步包含以與藉由前述樣本包含的前述第一受質蛋白之莫耳比率檢測前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量，前述莫耳比率小於約 1:100。
52. 如請求項 48 所記載之方法，其進一步包含與對照樣本比較來測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量。
53. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含以至少約 70% 之特異性檢測前述樣本中之前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。
54. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述檢測前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含以下一或多者：西方墨點分析、點跡墨點分析、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、螢光蛋白/肽結合分析、硫代黃素結合分析、剛果紅結合分析、沉澱分析、電子顯微術、原子力顯微術、表面電漿子共振、及光譜學。
55. 如請求項 54 所記載之方法，其中前述酶聯免疫吸附分析(ELISA)包含雙側夾心酶聯免疫吸附分析(ELISA)。
56. 如請求項 54 所記載之方法，其中前述光譜學包含以下一或多者：準光散射光譜學、多光譜紫外光譜學、共焦雙色螢光關聯光譜學、傅立葉轉換紅外光譜學、利用分光鏡檢測之毛細管電泳、電子自旋共振光譜學、核磁共振光譜學、及螢光共振能量轉移(FRET)光譜學。
57. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述檢測前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含：
使前述第一培養混合物與蛋白酶接觸；及
在以下一或多者中使用抗折疊錯誤之蛋白質抗體或對

折疊錯誤之 tau 聚集體為特異性的抗體檢測前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體：西方墨點檢定、點跡墨點檢定、及酶聯免疫吸附分析(ELISA)。

58. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含提供呈標記形式之前述第一受質蛋白。
59. 如請求項 58 所記載之方法，其中呈標記形式之前述第一受質蛋白包含以下一或多者：共價併入之放射性胺基酸、共價併入、經同位素標記之胺基酸、及共價併入之螢光團。
60. 如請求項 59 所記載之方法，其中前述檢測前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含檢測併入前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體中的呈標記形式之前述第一受質蛋白。
61. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本包含以下一或多者：羊水；膽汁；血液；腦脊髓液；叮嚀；皮膚；滲出物；糞便；胃液；淋巴；乳汁；黏液；黏膜；腹膜液；血漿；胸膜液；膿液；唾液；皮脂；精液；汗液；滑液；淚液；及尿。
62. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係來源於以下一或多者之細胞或組織：皮膚、腦、心臟、肝、胰臟、肺、腎、胃腸、神經、黏膜、血液細胞、腺、及肌肉。
63. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本之每一部分係藉由約 1 μ L 至約 1000 μ L 之體積表徵。
64. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本之每一部分包含 CSF，其係藉由約 10 μ L 至約 80 μ L 之體積表徵。
65. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本之每一部分包含以下一者：
血漿，其藉由約 250 μ L 至約 750 μ L 之體積表徵；及

血液，其藉由約 200 μ L 至約 1000 μ L 之體積表徵。

66. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含自受試者獲得前述樣本。
67. 如請求項 66 所記載之方法，其中前述受試者為以下一者：人類、小鼠、大鼠、犬、貓、牛、馬、鹿、麋鹿、綿羊、山羊、豬、及非人類靈長類動物。
68. 如請求項 66 所記載之方法，其中前述受試者為以下一或多者：患有 Tau 蛋白病之風險、患有前述 Tau 蛋白病、及處於針對前述 Tau 蛋白病之治療下。
69. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自受試者，前述方法進一步包含藉由將前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量與比較樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量比較來測定前述受試者中 Tau 蛋白病之進程或體內環境恆定，前述比較樣本係相較於前述樣本在不同時間取自前述受試者。
70. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述受試者係用 Tau 蛋白病調節療法治療，前述方法進一步包含：

將前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述量與比較樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之量比較，前述樣本及前述比較樣本係在前述 Tau 蛋白病調節療法下的一時間段內的不同時間取自前述受試者；及

測定為以下一者的前述受試者：根據在前述時間段內前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之改變而對前述 Tau 蛋白病調節療法有反應，或根據在前述時間段內前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之體內環境恆定而對前述 Tau 蛋白病調節療法無反應。

71. 如請求項 70 所記載之方法，其進一步包含用前述 Tau 蛋白病調節療法治療測定為對前述 Tau 蛋白病調節療法有反應的前述受試者。
72. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述樣本係取自受試者，前述受試者係用 Tau 蛋白病調節療法治療受試者以抑制前述第一受質蛋白之產生或抑制前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之聚集。
73. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含選擇性地濃縮前述樣本及前述第一培養混合物之一或多者中的前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。
74. 如請求項 73 所記載之方法，其中前述選擇性地濃縮前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含在形成前述第一培養混合物之前預處理前述樣本。
75. 如請求項 73 所記載之方法，其中前述選擇性地濃縮前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含在培養前述第一培養混合物之前預處理前述第一培養混合物。
76. 如請求項 73 所記載之方法，其中前述選擇性地濃縮前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含接觸能夠結合前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的一或多種抗體以形成經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。
77. 如請求項 76 所記載之方法，其中能夠結合前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述一或多種抗體包含以下一或多者：對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的胺基酸表位序列為特異性的抗體，及對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的構形為特異性的抗體。
78. 如請求項 77 所記載之方法，其中對前述第一折疊錯誤之蛋

白質聚集體的構形為特異性的前述抗體對 Tau 蛋白病特異性折疊錯誤之 tau 聚集體之構形表位有選擇性。

79. 如請求項 77 所記載之方法，其中能夠結合前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述一或多種抗體係偶合至固相。
80. 如請求項 79 所記載之方法，其中前述固相包含磁珠及多孔板之一或多者。
81. 如請求項 76 所記載之方法，其中前述使前述樣本與前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物包含使莫耳過量之前述第一受質蛋白與包含前述經捕獲 的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述樣本接觸，前述第一受質蛋白之前述莫耳過量大於包括在前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的蛋白質單體之總莫耳量中。
82. 如請求項 81 所記載之方法，其中前述培養前述第一培養混合物係在前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集以形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。
83. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述破壞前述第一培養混合物包含以下一或多者：音波振動處理、攪拌、搖動、冷凍/融化、雷射照射、高壓釜培養、高壓、及均質化。
84. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述破壞前述第一培養混合物包含循環攪動。
85. 如請求項 84 所記載之方法，其中前述循環攪動係進行達以下一或多者：約 50 轉每分鐘(RPM)與 10,000 RPM 之間，約 200 RPM 與約 2000 RPM 之間、及約 500 RPM。
86. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述破壞前述第一培養混合物係在每一培養循環進行達以下一或多者：約 5 秒與約

- 10 分鐘之間、約 30 秒與約 1 分鐘之間、約 45 秒與約 1 分鐘之間、及約 1 分鐘。
87. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述培養前述第一培養混合物係在每一培養循環中獨立地進行達以下一或多者：約 1 分鐘與約 5 小時之間、約 5 分鐘與約 5 小時之間、約 10 分鐘與約 2 小時之間、約 15 分鐘與約 1 小時之間、及約 25 分鐘與約 45 分鐘。
88. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述每一培養循環包含獨立地培養及破壞前述第一培養混合物達以下一或多者：培養約 1 分鐘與約 5 小時之間且破壞約 5 秒與約 10 分鐘之間；培養約 5 分鐘與約 5 小時之間且破壞約 5 秒與約 10 分鐘之間；培養約 10 分鐘與約 2 小時之間且破壞約 30 秒與約 1 分鐘之間；培養約 15 分鐘與約 1 小時之間且破壞約 45 秒與約 1 分鐘之間；培養約 25 分鐘與約 45 分鐘之間且破壞約 45 秒與約 90 秒之間；培養約 29 分鐘且破壞約 1 分鐘；及培養約 1 分鐘且破壞約 1 分鐘。
89. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述進行前述培養循環係重複達以下一或多者：約 2 次與約 1000 次之間、約 5 次與約 500 次之間、約 50 次與約 500 次之間、及約 150 次與約 250 次之間。
90. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述使前述樣本與前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物在生理條件下進行。
91. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含使前述樣本與莫耳過量之前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物，前述莫耳過量大於包括在前述樣本中的前述第一折疊

錯誤之蛋白質聚集體中的蛋白質單體之總莫耳量。

92. 如請求項 1 所記載之方法，其進一步包含：

使前述樣本與硫代黃素及莫耳過量之前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物，前述莫耳過量大於包括在前述樣本中的前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中的第一受質蛋白之量；

進行前述培養循環兩次或更多次以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集；

搖動前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測相應於前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述硫代黃素之螢光來測定前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在。

93. 如請求項 1 所記載之方法，其中前述第一受質蛋白係藉由以下一者產生：化學合成、重組產生、及自非重組生物樣本提取。

94. 如請求項 1 所記載之方法，其中：

前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含可溶性第一折疊錯誤之蛋白質聚集體及不可溶第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的一或多者；及

前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含以下一或多者：可溶性部分及不可溶部分。

95. 如請求項 94 所記載之方法，其中前述第一折疊錯誤之蛋白

質聚集體為前述可溶性第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。

96. 如請求項 1 所記載之方法，其中其前提為前述樣本排除 tau 小纖維。

97. 一種用於測定受試者中存在或不存在相應於第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的 Tau 蛋白病的方法，其包含：

提供來自前述受試者之樣本；

至少執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 程序，前述第一蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 程序包含：

藉由使前述樣本之第一部分與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 tau 同功型，前述第一受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在前述 Tau 蛋白病；

前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受

質蛋白且前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白；且

其前提為當前述第一受質蛋白由單體 3R tau 組成時，前述 Tau 蛋白病排除匹克症。

98. 如請求項 97 所記載之方法，前述方法進一步包含：

至少執行第二蛋白質折疊錯誤循環擴增程序以測定前述樣本中存在或不存在的至少第二折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物，前述第二受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第二培養混合物以有效引起前述第二受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第二培養混合物以有效形成前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第二培養混合物中前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在的來測定前述樣本中存在或不存在的第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白且前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白。

99. 如請求項 98 所記載之方法，其中前述第二受質蛋白與前述

第一受質蛋白相異，且前述第二受質蛋白包含以下一者：
類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、3R tau、及 4R tau。

100.如請求項 98 所記載之方法，其中前述第一受質蛋白包含 4R tau。

101.如請求項 98 所記載之方法，前述方法進一步包含：

至少執行第三蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序以測定前述樣本中存在或不存在至少第三折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第三部分與第三受質蛋白接觸來形成第三培養混合物，前述第三受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

在有效形成第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的條件下進行培養循環兩次或更多次，每一培養循環包含：

在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第三培養混合物以有效引起前述第三受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第三培養混合物以有效形成前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第三培養混合物中前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第三折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白且前述第三擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第三受質蛋白。

102.如請求項 101 所記載之方法，其中前述 Tau 蛋白病存在於前

述受試者中，前述方法進一步包含根據：前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在；及前述樣本中前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來表徵前述受試者中的前述 Tau 蛋白病之身份。

103.如請求項 97 所記載之方法，其中其前提為前述 Tau 蛋白病不主要地藉由 3R tau 蛋白之折疊錯誤及/或聚集表徵。

104.如請求項 97 所記載之方法，其進一步包含：

使前述樣本與硫代黃素及莫耳過量之前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物，前述莫耳過量大於包括在前述樣本中的前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中的蛋白質單體之量；

進行前述培養循環兩次或更多次以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少前述部分的折疊錯誤及/或聚集；

搖動前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測相應於前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述硫代黃素之螢光來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。

105.一種用於使用捕獲來測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的方法，其包含：

自前述樣本捕獲前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體以形成經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；

至少執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 程

序，前述第一蛋白質折疊錯誤循環擴增程序包含：

藉由使前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體與莫耳過量之第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白經受活體內病理學折疊錯誤及/或聚集以形成前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述莫耳過量大於前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體中包括的蛋白質單體之量；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體之至少一部分來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；

前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白且前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白。

- 106.如請求項 105 所記載之方法，其中前述自前述樣本捕獲前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體以形成經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體係使用對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體為特異性的一或多種抗體來進行，前述抗體包含以下一或多者：對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的胺基酸表位序列為特異性的抗體及對前述第一折疊錯誤之蛋白質

聚集體的構形為特異性的抗體。

- 107.如請求項 106 所記載之方法，其中對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的構形為特異性的前述抗體對 Tau 蛋白病特異性第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之構形表位有選擇性。
- 108.如請求項 106 所記載之方法，其中對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述構形為特異性的前述抗體相應於以下一者：阿茲海默症(AD)、帕金森氏症(PD)、進行性上眼神經核麻痺症(PSP)、額顳葉失智症(FTD)、皮質基底核退化症(CBD)、輕度認知障礙(MCI)、嗜銀顆粒病(AgD)、創傷性腦損傷(TBI)、慢性創傷性腦病變(CTE)、及拳擊員癡呆(DP)。
- 109.如請求項 105 所記載之方法，其中對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體為特異性的前述一或多種抗體係偶合至固相。
- 110.如請求項 109 所記載之方法，其中前述固相包含磁珠及多孔板之一或多者。
- 111.如請求項 109 所記載之方法，其中前述使前述樣本與前述第一受質蛋白接觸以形成前述第一培養混合物包含使莫耳過量之前述第一受質蛋白與前述樣本接觸，前述第一受質蛋白之前述莫耳過量大於包括在前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的蛋白質單體之總莫耳量中。
- 112.如請求項 109 所記載之方法，其中前述培養前述第一培養混合物係在前述經捕獲的第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集以形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體。
- 113.如請求項 105 所記載之方法，其中前述第一受質蛋白包含 4R tau 蛋白。
- 114.一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病的方法，前

述 Tau 蛋白病包含阿茲海默症(AD)，前述方法包含：

提供前述受試者；

自前述受試者獲得樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物；

至少執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，前述第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序包含：

藉由使前述樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在 AD。

- 115.如請求項 114 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在 AD 進一步包含藉由測定 AD tau 蛋白聚集體之特性來將 AD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述特性包含以下一或多者：以下一或多個 AD-特異性相應蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 AD tau 蛋白聚集體之構形表位有

選擇性的抗體進行的檢定；對 AD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 AD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

116. 一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病的方法，前述 Tau 蛋白病包含帕金森氏症(PD)，前述方法包含：

提供前述受試者；

自前述受試者獲得樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物；

執行至少第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，包含：

藉由使前述樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在 PD。

117. 如請求項 116 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在 PD 進一步包含藉由測定 PD tau 蛋白聚集體之特性來將 PD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述特性包含

以下一或多者：以下一或多個 PD-特異性相應蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 PD tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 PD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 PD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

118.一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病的方法，前述 Tau 蛋白病包含進行性上眼神經核麻痺症(PSP)，前述方法包含：

提供前述受試者；

自前述受試者獲得樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物；

執行至少第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，包含：

藉由使前述樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋

白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在 PSP。

119.如請求項 118 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在 PSP 進一步包含藉由測定 PSP tau 蛋白聚集體之特性來將 PSP 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述特性包含以下一或多者：以下一或多個 PSP-特異性相應蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 PSP tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 PSP tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 PSP tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

120.一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病的方法，前述 Tau 蛋白病包含額顳葉失智症(FTD)，前述方法包含：

提供前述受試者；

自前述受試者獲得樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物；

執行至少第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，包含：

藉由使前述樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊

錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在 FTD。

121. 如請求項 120 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在 FTD 進一步包含藉由測定 FTD tau 蛋白聚集體之特性來將 FTD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述特性包含以下一或多者：以下一或多個 FTD-特異性相應蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 FTD tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 FTD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 FTD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

122. 一種用於測定受試者中存在或不存在 Tau 蛋白病的方法，前述 Tau 蛋白病包含皮質基底核退化症(CBD)，前述方法包含：

提供前述受試者；

自前述受試者獲得樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物；

至少執行第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，前述第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序包含：

藉由使前述樣本與第一受質蛋白接觸來形成第一培養混合物，前述第一受質蛋白包含 4R tau；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之至

少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由檢測前述第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

根據前述樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體來測定前述受試者中存在或不存在 CBD。

123.如請求項 122 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在 CBD 進一步包含藉由測定 CBD tau 蛋白聚集體之特性來將 CBD 與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述特性包含以下一或多者：以下一或多個 CBD-特異性相應蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；使用對 CBD tau 蛋白聚集體之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；對 CBD tau 蛋白聚集體有選擇性的指示劑；及 CBD tau 蛋白聚集體之頻譜特性。

124.如請求項 114、116、118、120、及 120 中任一項所記載之方法，其進一步包含：

至少執行第二蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序以測定前述樣本中存在或不存在至少第二折疊錯誤之蛋白質聚集體，包含：

藉由使前述樣本之第二部分與第二受質蛋白接觸來形成第二培養混合物，前述第二受質蛋白經受病理學折疊錯誤及/或聚集；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第二培養混合物以有效引起前述第二受質蛋白之至少一部分的折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第二培養混合物以有效形成前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由分析前述第二培養混合物中前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

前述 Tau 蛋白病存在於前述受試者中，前述方法進一步包含根據：前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在；及前述樣本中前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來表徵前述受試者中的前述 Tau 蛋白病之身份；

前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白；

前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白；且

前述第二受質蛋白與前述第一受質蛋白相異，且前述第二受質蛋白包含以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、及 3R tau。

- 125.如請求項 124 所記載之方法，其中測定前述受試者中存在或不存在每一 Tau 蛋白病進一步包含藉由分析一或多種折疊錯誤之聚集體之至少一個特性來將每一 Tau 蛋白病與一或多種另外的 Tau 蛋白病區別，前述折疊錯誤之聚集體各自相應於類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、及 3R tau 之一者，每一特性相應於以下一或多者：使用對一或多種折疊錯誤之

聚集體中任何者之構形表位有選擇性的抗體進行的檢定；前述一或多種折疊錯誤之聚集體之一或多個蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)動力學參數，其包含以下一或多者：停滯期、 T_{50} 、擴增速率、及擴增程度；對前述一或多種折疊錯誤之聚集體中任何者有選擇性的指示劑；及前述一或多種折疊錯誤之聚集體中任何者的頻譜特性。

126. 一種用於測定樣本中存在或不存在第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的套組，其包含：

第一受質蛋白，其包含 4R tau；

第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑，前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第一受質蛋白且前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體相應於 Tau 蛋白病；

緩衝液；

肝素；及

鹽；

說明書，前述說明書指導使用者：

獲得樣本；

執行至少第一蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程序，包含：

藉由使前述樣本之第一部分與前述第一受質蛋白、前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑、前述緩衝液、前述肝素、及前述鹽接觸來形成第一培養混合物，前述第一培養混合物係用一定濃度之以下一或多者形成：小於約 20 μM 之前述第一受質蛋白；小於約 75 μM 之前述肝素；小於約 190 mM 之作為 NaCl 之前述鹽；及小於約 9.5 μM 之作為硫代黃素 T 之前述第一折疊錯誤之蛋白質

聚集體之前述指示劑；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第一培養混合物以有效引起前述第一受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第一培養混合物以有效形成前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；及

藉由根據前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑分析第一培養混合物中前述第一擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的存在或不存在來測定樣本中存在或不存在前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體。

127.如請求項 126 所記載之套組，其中前述說明書指導前述使用者自受試者獲得前述樣本，前述樣本包含以下一或多者：生物流體、生物材料、均質化組織、及細胞溶解產物，且前述說明書指導前述使用者根據前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定或診斷前述受試者中之 Tau 蛋白病。

128.如請求項 126 所記載之套組其進一步包含：

第二受質蛋白及第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之指示劑，前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體包含前述第二受質蛋白，前述第二受質蛋白與前述第一受質蛋白相異且前述第二受質蛋白包含以下一者：類澱粉- β (A β)、 α 突觸核蛋白、3R tau、及 4R tau；

前述說明書進一步指導前述使用者：

執行至少第二蛋白質折疊錯誤循環擴增(PMCA)程

序，包含：

藉由使前述樣本之第二部分與前述第二受質蛋白及前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述指示劑接觸來形成第二培養混合物；

進行培養循環兩次或更多次以有效形成第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體，每一培養循環包含：

在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體存在下培養前述第二培養混合物以有效引起前述第二受質蛋白之折疊錯誤及/或聚集；

破壞前述第二培養混合物以有效形成前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體；

藉由分析前述第二培養混合物中前述第二擴增折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來測定前述樣本中存在或不存在前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體；

根據：前述樣本中前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在；及前述樣本中前述第二折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述存在或不存在來針對 Tau 蛋白病之身份表徵前述樣本。

129.如請求項 126 所記載之套組，其進一步包含蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 設備，前述蛋白質折疊錯誤循環擴增 (PMCA) 設備包含以下一或多者：多壁微滴定板；微射流板；搖動設備；分光計；及培養器。

130.如請求項 126 所記載之套組，其中對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體的前述構形為特異性的前述抗體相應於以下一者：阿茲海默症 (AD)、帕金森氏症 (PD)、進行性上眼神經核麻痺症 (PSP)、額顳葉失智症 (FTD)、皮質基底核退化症

(CBD)、輕度認知障礙(MCI)、嗜銀顆粒病(AgD)、創傷性腦損傷(TBI)、慢性創傷性腦病變(CTE)、及拳擊員癡呆(DP)，前述說明書包含根據使用對前述第一折疊錯誤之蛋白質聚集體之前述構形為特異性的前述抗體進行的結合檢定測定前述受試者中存在或不存在以下一者：AD、PD、PSP、FTD、CBD、MCI、AgD、TBI、CTE、及DP。