

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/85

A61P 25/28 G01N 33/68

C07K 14/47 A61K 31/54



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02806301.5

[43] 公开日 2004 年 5 月 12 日

[11] 公开号 CN 1496404A

[22] 申请日 2002.1.15 [21] 申请号 02806301.5

[30] 优先权

[32] 2001. 1. 15 [33] GB [31] 0101049.5

[86] 国际申请 PCT/GB2002/000153 2002. 1. 15

[87] 国际公布 WO02/055720 英 2002. 7. 18

[85] 进入国家阶段日期 2003. 9. 10

[71] 申请人 阿伯丁大学理事会

地址 英国苏格兰阿伯丁

[72] 发明人 克劳德·M·维希克 戴维·霍斯利

珍妮特·B·里卡德

查尔斯·R·哈林顿

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 7 页 说明书 51 页 附图 50 页

[54] 发明名称 与神经变性疾病中蛋白聚集相关的物质和方法 的材料, 药剂以及相关的用途和方法。

[57] 摘要

本发明公开了一种在稳定细胞系中前体蛋白(例如 tau)蛋白水解转化为产物片段(例如 12 kd 片段)的方法, 其中所述前体蛋白与疾病状态相关, 在该疾病状态中所述前体蛋白病理性聚集(例如 tau 相关疾病), 该方法包括提供一种用编码如下蛋白的核酸转染的稳定细胞系: (i) 前体蛋白模板片段, 以使该模板片段以对细胞无毒性的水平组成性表达于该细胞, 和(ii) 前体蛋白, 该蛋白应答于刺激物可诱导表达于该细胞; 因而所述模板片段与所述前体蛋白相互作用导致该前体蛋白构象变化, 从而导致该前体蛋白聚集以及水解为产物片段。该方法优选通过监测 1 个或多个产物条带的产生(或者对其产生的调节)用于筛选聚集过程的调节剂。另外, 本发明在试验中显示高活性的化合物例如还原的二氨基吩噻嗪的基础上, 还提供了该试验使用

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种在稳定细胞系中将前体蛋白经蛋白水解转化为产物片段的方法，
- 5 所述前体蛋白与疾病状态有关，该前体蛋白在该疾病状态中发生病理性聚集，  
该方法包括下述步骤：  
(a)提供一种用编码如下蛋白的核酸转染的稳定细胞系：(i)前体蛋白模板片段，以使该模板片段以对细胞无毒性的水平组成性表达于该细胞；和(ii)  
10 前体蛋白，该蛋白应答于刺激物可诱导表达于该细胞，  
因而所述模板片段与所述前体蛋白相互作用导致该前体蛋白构象变化，从而导致聚集以及该前体蛋白水解为产物片段。  
2. 权利要求1中的方法，其中所述的病理性聚集导致与神经变性和/或临床痴呆相关疾病状态中所述前体蛋白的蛋白水解。
- 15 3. 权利要求1或2中的方法，其中所述的疾病状态中前体蛋白的病理性聚集引发蛋白水解生成核心结构域片段和所述的模板片段，所述模板片段中至少包含所述模板蛋白的核心片段。  
4. 权利要求3中的方法，其中所述的模板片段基本上由所述核心片段组成。
- 20 5. 前述任一项权利要求中的方法，其中所述的生成于细胞中的产物片段是有毒性的。  
6. 前述任一项权利要求中的方法，其中所述的产物片段与所述模板片段相同。  
7. 权利要求1-5任一项中的方法，其中生成了众多不同的产物片段。
- 25 8. 前述任一项权利要求中的方法，该方法包括下述步骤：将细胞暴露于所述刺激物从而使所述前体蛋白诱导表达于该细胞。  
9. 前述任一项权利要求中的方法，其中至少一种产物片段的产量被监测。
- 30 10. 一种用于鉴定与疾病状态相关的前体蛋白聚集和/或蛋白水解处理的调节剂的方法，该方法包括：(a)提供一种疑似能调节聚集的试剂，(b)在该试剂存在的条件下实施权利要求9所述的方法，(c)在所监测的产物片段的产

量或所监测的每一产物片段的产量与所述试剂的调控活性间建立相关关系。

11. 权利要求 10 中的方法, 其中所述的步骤(b)通过如下操作来实施:(a) 将所述细胞培养在一个或多个培养板上, (b)用所述试剂孵育细胞足够长的一段时  
5 间, 以使该试剂进入细胞。

12. 权利要求 11 中的方法, 其中所述试剂导入细胞达到的终浓度为 1-50  $\mu\text{M}$ 。

13. 权利要求 10-12 任一项中的方法, 其中所述的众多不同产物片段的产量都被监测。

14. 权利要求 10-13 任一项中的方法, 其中将所监测的产物片段或所监测的每一产物片段的产量与标准值进行比较。

15. 权利要求 14 中的方法, 其中所述的标准值是在所述试剂不存在条件下实施该方法得到的。

16. 权利要求 10-15 任一项中的方法, 其中对所提供的试剂进行筛选以使其能穿越血-脑屏障。

17. 权利要求 10-16 任一项中的方法, 该方法包括实施下述操作对所提供试剂进行筛选的步骤: 测量所述试剂的扩散系数, 并且在扩散系数和该试剂的抑制能力间建立相关关系。

18. 权利要求 10-17 任一项中的方法, 该方法进一步还包括计算所述试剂的 B50 的步骤。

19. 权利要求 10-18 任一项中的方法, 该方法进一步包括评价所述试剂对细胞存活能力的影响。

20. 权利要求 19 中的方法, 该方法进一步包括计算所述试剂的 LD50 的步骤。

21. 权利要求 18 和 20 中的方法, 该方法进一步包括计算所述试剂的治疗指数的步骤。

22. 前述任一项权利要求中的方法, 其中所述的前体蛋白为 tau 蛋白。

23. 权利要求 22 中的方法, 其中所述的模板片段包含 tau 的核心片段。

24. 权利要求 23 中的方法, 其中所述的模板片段包含 tau 的片段, 该片段从图 7 所示全长 tau 蛋白的第 186-297 位氨基酸延伸至第 390-441 位氨基酸。

25. 权利要求 24 中的方法, 其中所述的模板片段由图 7 所示全长 tau 蛋白第 295、296 或 297 位氨基酸延伸至第 390 或 391 位氨基酸的片段组成。

26. 权利要求 22-25 任一项中所述的方法, 其中对 tau 的约 12, 14, 25, 27, 30, 32, 36, 38, 42 或 44 kDa 的产物片段的产量进行监测。

5 27. 权利要求 26 中的方法, 其中对 tau 的约 12kDa 的产物片段的产量进行监测。

28. 权利要求 22-27 中任一项所述方法, 其中在 SDS-PAGE 上对所述毒性产物片段或每一毒性产物片段的产量进行监测。

10 29. 权利要求 22-28 中任一项所述方法, 其中用免疫学的方法对所述毒性产物片段或每一毒性产物片段的产量进行监测。

30. 权利要求 29 中的方法, 其中所述监测使用的抗体选自下列单克隆抗体: (i)特异性识别位于 tau 的 Gly-16 和 Gln-26 之间区域中的人-特异性表位; (ii)特异性识别在 Glu-391 处截短的核心 tau 片段; (iii)特异性识别重复结构域中的属(generic)的 tau 表位; 或(iv)特异性识别位于 Ser-208 和 Ser-238 之间的非-种的特异性属(generic)的 tau 表位。

31. 权利要求 22-30 中任一项所述的方法, 该方法包括通过下述操作对所提供试剂进行筛选的步骤: 测定所述试剂调节对应于核心重复结构域的 tau 片段俘获可溶性全长 tau 的能力, 其中所述 tau 片段已经被吸附于固相底物上。

20 32. 权利要求 22-31 中任一项所述的方法, 其中所述试剂为吩噻嗪。

33. 权利要求 32 中的方法, 其中所述试剂为还原后的吩噻嗪。

34. 一种筛选用作治疗 tau 相关疾病的治疗剂或预防剂的药物的方法, 该方法包括:(a)实施权利要求 22-33 中任一项所述的方法(b)选择其中治疗指数大于 2 的调节剂。

25 35. 权利要求 34 中的方法, 其中所述“疾病”选自阿耳茨海默氏病, 运动神经元疾病、雷维小体病、皮克病或进行性核上麻痹。

36. 一种制备用作治疗 tau 相关疾病的治疗性调节剂或预防性调节剂的药物的方法, 该方法包括: (a)实施权利要求 34 或 35 任一项中的方法鉴定药物, (b)以分离的形式提供该药剂。

30 37. 权利要求 36 中的方法, 该方法进一步包括将该试剂配制成药物组合物用于治疗 tau 相关疾病。

38. 权利要求 37 中的方法，该方法进一步包括将所述药物组合物用于 tau 相关疾病的治疗方法中。

39. 吩噻嗪在制备用于治疗或预防 tau 相关疾病的药物组合物中的用途，其中所述制备包括预先还原吩噻嗪的步骤使其中至少有 80%，90%，95%，  
5 或 99% 的还原后的(白色-)形式。

40. 权利要求 39 中的用途，其中通过加入外源性还原剂来预先还原吩噻嗪。

41. 权利要求 40 中的用途，其中通过加入稳定剂将还原后的形式稳定在还原后的状态。

10 42. 权利要求 41 中的用途，其中用所述稳定剂将所述还原后的形式冻干。

43. 预先-还原后的吩噻嗪在制备用于治疗或预防 tau 相关疾病的药物组合物中的用途，其中所述药物包含至少 80%，90%，95%，或 99% 的还原后的(白色-)形式的吩噻嗪。

15 44. 权利要求 39-43 中任一项所述的用途，其中所述药物组合物进一步包含下列物质中的 1 种或多种：药学上可接受的赋形剂、载体或缓冲液。

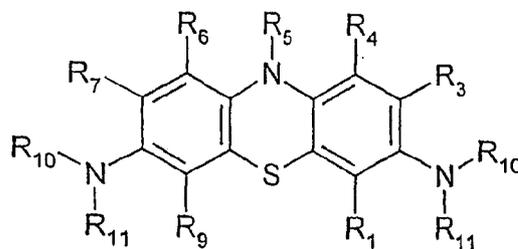
45. 权利要求 44 中的用途，其中所述的药物组合物被制备成缓释制剂。

46. 权利要求 39-45 中任一项所述的用途，其中所述的吩噻嗪为二氨基吩噻嗪。

20 47. 权利要求 39-46 中任一项所述的用途，其中所述的预先-还原后的(白色-)吩噻嗪具有下列通式：

(I)

25



30 其中 R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub> 和 R<sub>9</sub> 各自独立地选自氢、卤素、羟基、羧基、取代或未取代的烷基、卤烷基或烷氧基；R<sub>5</sub> 选自氢、羟基、羧基、取代或未取代的烷基、卤烷基或烷氧基；以及 R<sub>10</sub> 和 R<sub>11</sub> 各单独选自氢、羟基、羧基、

取代或未取代的烷基、卤烷基或烷氧基；

或者是其药物学上可接受的盐。

48. 权利要求 47 中的用途, 其中  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  和  $R_9$  独立选自氢、 $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_5$  或  $-\text{C}_3\text{H}_7$ ;  $R_{10}$  和  $R_{11}$  各单独选自氢,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_5$  或  $-\text{C}_3\text{H}_7$ ; 以及  $R_5$  为

5 氢,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_5$  或  $-\text{C}_3\text{H}_7$ 。

49. 权利要求 46-48 中任一项所述的用途, 其中吩噻嗪为二氨基吩噻嗪, 其中在二氨基吩噻嗪核的周边具有 0, 2, 3 或 4 个甲基。

50. 权利要求 46-49 中任一项所述的用途, 其中所述吩噻嗪为非对称甲基化的二氨基吩噻嗪。

10 51. 权利要求 50 中的用途, 其中所述吩噻嗪为托洛氯铵, 天青 A, 天青 B 和劳氏紫。

52. 权利要求 46-49 中任一项所述的用途, 其中所述吩噻嗪选自亚甲蓝、甲苯胺蓝 O 或 1, 9-二甲基亚甲蓝。

53. 一种药剂组合物, 其中包括权利要求 47-52 中任一项所述的预先-

15 还原后的吩噻嗪与稳定剂组合在一起, 所述的吩噻嗪至少有 80%, 90%, 95%, 或 99% 是还原后的(白色-)形式。

54. 权利要求 53 中的药物组合物, 该药物组合物用所述稳定剂冻干。

55. 权利要求 54 或权利要求 54 中的药物组合物, 其中所述稳定剂为抗坏血酸盐。

20 55. 权利要求 53-55 中任一项所述的药物组合物用于治疗或预防 tau 相关疾病。

56. 一种治疗 tau 相关疾病的方法, 包括应用权利要求 53-55 中任一项所述的药物组合物。

57. 权利要求 34-52 中任一项、权利要求 55 或权利要求 56 中的方法、

25 用途或组合物, 其中所述的治疗或预防包括向需要该药物组合物的患者施用预防有效量或治疗有效量的该药物组合物。

58. 权利要求 39-52 中任一项、权利要求 55 或权利要求 56 中的方法、

用途或组合物, 其中所述的治疗或预防包括向需要的患者给与 20 mg tds, 50 mg tds 或 100 mg tds 该药物组合物, 与  $2\times$  mg 比例的抗坏血酸联用, 从而实现

30 摄取前吩噻嗪中 90% 以上被还原。

59. 权利要求 39-52 中任一项、权利要求 55 或权利要求 56 中的方法、

用途或组合物，其中所述的治疗或预防包括给与患者吩噻嗪，该吩噻嗪为劳氏紫，且向患者给药的日剂量为 1~1000 mg，任选地分割为 1-8 个单位剂量。

5 60. 权利要求 39-52 中任一项、权利要求 55 或权利要求 56 中的方法、用途或组合物，其中所述的治疗或预防包括给与患者吩噻嗪，该吩噻嗪为亚甲蓝，且所述日剂量为约 3.2-3.5 mg/kg。

10 61. 一种制备用于权利要求 1-38 中任一项所述方法的稳定细胞的方法，该方法包括将编码如下蛋白的核酸导入细胞的步骤：(i)前体蛋白模板片段，以使该模板片段以对细胞无毒性的水平组成性表达于该细胞；和(ii)前体蛋白，以使该疾病蛋白应答于刺激物而可诱导地表达于该细胞。

62. 权利要求 61 中的方法，其中所述的编码前体蛋白的核酸可操作地连接于 lac 可诱导型启动子。

63. 权利要求 62 中的方法，其中所述的前体蛋白的表达通过加入 1-50 mM IPTG 诱导实现。

15 64. 权利要求 61-63 中任一项所述的方法，其中所述的编码模板片段的核酸可操作地连接于巨细胞病毒启动子序列。

65. 权利要求 61-64 中任一项所述的方法，其中所述的编码模板片段的核酸以模板载体导入，而所述的编码前体蛋白的核酸以单独的前体蛋白载体导入。

20 66. 权利要求 65 中的方法，其中所述的前体蛋白载体衍生自 pOPRSVICAT 载体，其中克隆入了编码前体蛋白的核酸。

67. 权利要求 65 或权利要求 66 中的方法，其中所述的模板片段载体衍生自质粒 pZeo295-391 载体，其中克隆入了编码前体蛋白的核酸。

68. 权利要求 61-67 中任一项所述的方法，其中所述前体蛋白为 tau。

25 69. 权利要求 68 中的方法，其中所述的编码模板片段的核酸编码 tau 的核心片段。

70. 权利要求 69 中的方法，其中所述的编码模板片段的核酸编码这样的 tau 片段，即该片段从全长蛋白第 186-296 位氨基酸延伸至第 390-441 位氨基酸。

30 71. 权利要求 70 中的方法，其中所述的编码模板片段的核酸编码这样的 tau 片段，即该片段从图 7 所示全长 tau 蛋白第 295、296 或 297 位氨基酸

延伸至第 390 或 391 位氨基酸残基。

72. 权利要求 71 中的方法，其中所述的编码模板片段的核酸编码图 7 所示的 295-391 位氨基酸残基的 tau 片段。

73. 一种物质的组合物，其中包括编码如下蛋白的核酸：(i)前体蛋白模板片段，以使该模板片段以对细胞无毒性的水平组成性表达于该细胞；和(ii)前体蛋白，以使该疾病蛋白应答于刺激物而可诱导地表达于该细胞，该核酸为权利要求 62-72 中任一项所述的核酸。

74. 一种被权利要求 73 所述核酸转染的哺乳动物宿主细胞，该细胞被转染后可表达：(i)前体蛋白的模板片段，该模板片段以对所述细胞无毒性的水平组成性表达；以及(ii)前体蛋白，该疾病蛋白应答于刺激物而可诱导地表达。

75. 权利要求 74 中的细胞，该细胞来自神经元细胞系或成纤维细胞系。

76. 权利要求 75 中的细胞，该细胞选自下列细胞系：3T3；NIE-115；3T6；N2A；SY5Y；COS-7。

77. 一种试剂盒，其中包括权利要求 74-76 中任一项所述的宿主细胞，外加至少 1 种其他组分，该组分选自：刺激前体蛋白生成的试剂或者检测前体蛋白与模板片段间相互作用的试剂。

78. 权利要求 77 中的试剂盒，其中所述的检测试剂为抗体。

79. 一种核酸引物，选自：

5'-3' T40-Not I

5'-gtc gac tct aga ggc ggc cgc ATG GCT GAG CCC CGG CAG GAG-3'

3'-5'T40-Not I

5'-act ctt aag ggt cgc ggc cgc TCA CAA CAA ACC CTG CTT GGC CAG-3'

295 正义引物

5'-CGG AAT TCC ACC ATG GAT AAT ATC AAA CAC GTC CCG-3'

391 反义引物

5'-C GCG GGA TCC TCA CTC CGC CCC GTG GTC TGT CTT GGC-3'.

## 与神经变性疾病中蛋白聚集相关的物质和方法

### 5 发明领域

本发明涉及用于模拟神经变性疾病(neurodegenerative disease)相关的蛋白聚集的细胞模型(cell-based models)及其他测试系统。本发明进一步还涉及能调控所述聚集的化合物。

### 10 背景技术

阿耳茨海默氏病(AD)等痴呆病症的常见特征为,患者脑内 $\beta$ -淀粉样斑等蛋白样结构的细胞内和/或细胞外沉淀物进行性积聚以及神经原纤维的缠结(neurofibrillary tangles)。上述这些损伤的出现多数与病理性神经原纤维的变性及脑萎缩相关,以及与认知损伤(cognitive impairment)相关(Mukaetova-Ladinska, E. B. et al.(2000)Am. J. Pathol. Vol. 157, No. 2, 623-636)。

神经噬斑(neuritic plaques)和神经原纤维缠结二者中都含有成对的螺旋纤丝(PHF),其中的主要成分为微管相关蛋白 tau(Wischik et al.(1988)PNAS USA 85, 4506)。噬斑中还含有源自淀粉样前体蛋白异常处理得到的细胞外的 $\beta$ -淀粉样微丝(APP; Kang et al.(1987)Nature 325, 733)。Wischik 等人的论文(“阿耳茨海默氏病的神经生物学”, 2nd Edition(2000)Eds. Dawbarn, D. and Allen, S. J., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford)详细论述了 tau 蛋白在神经变性痴呆发病机理中的推导出的作用。

阿耳茨海默氏病的研究表明:正常形式 tau 的丢失(Mukaetova-Ladinska et al.(1993)Am. J. Pathol., 143, 565; Wischik et al.(1995a)Neurobiol. Ageing, 16: 409; Lai et al.(1995b)Neurobiol. Ageing, 16: 433),病理性 PHFs 的积聚(Mukaetova-Ladinska et al.(1993), loc. cit.; Harrington et al.(1994a)Dementia, 5, 215; Harrington et al.(1994b)Am. J. Pathol., 145, 1472; Wischik et al., (1995a), loc. cit.)以及中额皮层中的突触的丢失(Terry et al.(1991)Ann. Neurol., 30, 572)都与相关的认知损伤有关。另外,突触丢失(Terry et al., loc. cit.)以及锥体细胞的丢失(Bondareff et al.(1993)Arch. Gen. Psychiatry, 50: 350)都与 tau-反应

性神经原纤维病理学的形态测定有关,与这一现象在分子水平上同时发生的是: tau 蛋白库几乎完全重新分布从可溶形式变为阿耳茨海默氏病中的多聚形式(PHF)(Mukaetova-Ladinska et al.(1993), loc. cit. ; Lai et al.(1995), loc. cit.)。

5        Tau 可以以选择性-剪接异构体形式存在,其中含有 3 至 4 个拷贝的与微管-结合结构域相当的重复序列(Goedert, M., et al.(1989)EMBO J. 8, 393-399; Goedert, M., et al.(1989)Neuron 3, 519-526)。将 PHF 形式的 Tau 蛋白酶解处理为核心结构域(Wischik, C. M., et al.(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4884-4888; Wischik et al. PNAS USA 1988, 85: 4506-4510); Novak, M., et al.(1993)EMBO J. 12, 365-370), 该结构域是由所述重复结构域的相-变版本  
10        (phase-shifted version )组成的;只有三个重复单元参与了稳定的 tau-tau 间相互作用(Jakes, R., et al.(1991)EMBO J. 10, 2725-2729)。一旦形成后, PHF-样的 tau 聚集体就作为种子继续俘获,并为全长 tau 蛋白的蛋白水解处理提供模板(Wischik et al. 1996 Proc Natl Acad Sci USA 93, 11213-11218)。

15        在其形成及积聚过程中,成对的螺旋纤丝(PHF)首先在细胞质中可能是从早期的 tau 寡聚体装配形成无定形凝聚物,所述寡聚体是在 PHF 装配之前或该过程中截短的(Mena, R., et al.(1995)Acta Neuropathol. 89, 50-56 ; Mena, R., et al.(1996)Acta Neuropathol. 91, 633-641)。然后这些纤丝进一步形成典型的胞内神经原纤维缠结。在该阶段,所述 PHF 由截短的 tau 的核和  
20        含有全长 tau 的模糊外包被层(Wischik., C. M., et al, (1996)loc. cit.)组成。该装配过程呈指数式发展,消耗细胞正常功能的 tau 库,诱导新的形成缺陷体的 tau 合成过程(Lai, R. Y. K., et al., (1995), Neurobiology of Ageing, Vol. 16, No. 3, 433-445)。最终,神经元的功能性损伤发展到细胞死亡点,留下了细胞外的缠结。细胞的死亡与胞外缠结的数量高度相关(Wischik et al. 2000, loc.  
25        cit)。当缠结被逐出到细胞外空间时,会发生神经元- PHF 的模糊外包被层的进行性损失,与之相应地是 N-末端 tau 免疫反应性的丧失,但是仍保留了 PHF 核心相关的 tau 的免疫反应性(图 1 ; 也参见 Bondareff, W. et al., (1994)J. Neuropath. Exper. Neurol., Vol. 53, No. 2, 158-164)。

      在组合入 PHF 内的 tau 的重复结构域中出现了这种相变,表明在组合  
30        入纤丝过程中该重复结构域经历了诱导性的构象变化。在阿耳茨海默氏病的发病过程中,应该正视的是这种构象变化可以因 tau 与病理性底物,如受

损的或突变后的膜蛋白的结合而引发(见图 2-也见 Wischik, C. M., et al.(1997)in"Microtubule-associated proteins : modifications in disease", eds. Avila, J., Brandt, R. and Kosik, K. S.(Harwood Academic Publishers, Amsterdam)pp. 185-241)。

- 5 在阿耳茨海默氏病的过程中, 当前的药物治疗集中在因神经变性引发的胆碱能传递损失(cholinergic transmission)的对症治疗上(Mayeux, R., et al.(1999)New Eng. J. Med. 341, 1670-1679)。但是, 尽管现有治疗可将该病的进展延缓 6-12 个月, 但是这些治疗手段无法防止这种疾病。发现能够防止导致神经变性的 tau 聚集的药物将可为预防该疾病或抑制疾病进展提供更有效的策略, 不需要对启动所述聚集的多种上游事件的即时了解(见图 3)。

#### 模型及试验

- WO 96/30766 中描述了检测 tau 聚集的体外试验, 在该试验中, 相应于核心重复结构域的 tau 片段, 被吸附到固相底物上后, 能够俘获可溶性全长 tau, 并以高亲和力与 tau 结合(见图 4)。这种结合可以为 tau 分子(在已发生聚集的 tau 分子的重复结构域上)赋予能抵抗蛋白酶消化的稳定性。这种过程是自身增殖性的, 可以被原型药物选择性地阻断((Wischik et al. 1996 Proc Natl Acad Sci USA 93, 11213-11218)。

- 尽管 WO 96/30766 中所述的体外实验能够鉴定到 tau-tau 结合的抑制剂或调节剂, 但是本发明人还认识到, 阿耳茨海默氏病-样的蛋白聚集的细胞模型也是很有用的。这些细胞模型可以用于对 tau-tau 聚集的候选调节剂的首轮筛选, 以及用于对 WO 96/30766 中体外试验已鉴定出的化合物的次轮筛选。另外, 将 tau 聚集展示在细胞中还可有助于鉴定参与病理性 tau 聚集初始阶段的正常细胞底物, 该底物自身可以作为药物干扰的靶标。

- 但是, 报道在组织培养模型中表达各种 tau 构建体的大量文献却没能解释聚集(参见, 例如, Baum, L. et al., (1995)Mol. Brain Res. 34: 117)。例如, 3T3 鼠成纤维细胞不具有 tau 蛋白, 因而提供了一种能够与内源性鼠 tau 无关的表达重组 tau 的细胞环境。此前已报道了各种细胞系的转染(Kanai et al., 1989; Goedert and Jakes, 1990; Knops et al, 1991; Lee and Rook, 1992; Gallo et al., 1992; Lo et al., 1993; Montejo de Garcini et al., 1994; Fasulo et al., 1996)。但是, 截短 tau 的稳定长期表达在该细胞系中没有取得成功。例如, 对应于 164 或 173 ~ 338 或 352 位残基的 tau 构建体没有表达出蛋白质(Lee and Rook,

1992)。

尽管 Fasulo 等(Alzheimer's Research 1996, 2, 195-200)报道了截短 tau 在 COS 细胞中的瞬间表达,但是并没有给出这种 tau 稳定长期表达的数据。这些工作人员从所述瞬间表达系统中得出结论,截短 tau 的自身表达不足以诱导适于测试药物 tau 聚集模式。

迄今为止,可溶性 tau 的体外聚集只在非-生理状况且高浓度条件下取得了成功(综述见 Wischik(2000),同上)。

WO 96/30766 中描述了两种用于在细胞环境中研究 tau 聚集的方法。在第一种方法中,全长 tau 或 tau 的片段都稳定地表达于细胞。在第二种方法中,聚集后的 tau 通过脂质转染被瞬间转染入细胞。

尽管这两种方法都可用于研究 tau-tau 聚集,但是它们还有不足之处。用脂质转染将聚集后的 tau 转染入细胞的效率变化不定,由于聚集后的 tau 自身在体外的产量就是如此。另外,所述核心 tau 片段是 tau 聚集的最有效的种子,现已发现该片段当稳定表达于细胞时是有毒性的,因而导致很低的表达水平。因此,作为 PHF 核心的截短型 tau 片段的组成性表达在真核细胞中很难实现。瞬间表达系统可以使 tau 的表达最优化,但是所述片段固有的毒性甚至使这些系统也变得不再值得信赖。较长的 tau 片段的毒性较小,但是这些片段表达于细胞时不会稳定地聚集。

因此,需要开发另外的一种模型系统,该系统可以在稳定且可控的细胞系中生理条件下对例如 tau 分子与其类似物之间的相互作用进行研究,而且该系统还可用于筛选阿耳茨海默氏病等病症的潜在的诊断、预防或治疗药物。

### 发明内容

本发明人设计了一种稳定的细胞测试系统,该系统可用于模拟蛋白的模板-驱动的蛋白水解处理,该蛋白的聚集与神经变性疾病有关。在一测试系统中,以 tau 蛋白为例,将 tau 蛋白片段的极低水平的组成型表达与全长 tau 的可诱导表达联合进行。对全长 tau 的诱导引发了其蛋白水解转化为处理后的片段,确证 tau 发生了“模板驱动的蛋白水解处理”。该系统易于通过抑制剂抑制诱导的全长 tau 产生处理的 12kD 片段来展示 tau 聚集抑制剂的作用。

尽管 12kD 片段固有的毒性令人震惊，但是这种稳定系统仍然可以实现。例如，就象下列实施例中显示的那样，如果将全长 tau 的 N-末端或 C-末端部分截短可以使细胞系中的表达保持稳定，这些较长的构建体仅表现出很弱的聚集趋势，而不会结合到微管系统。tau 片段联合的稳定表达会在细胞胞浆内产生聚集物，但是这种系统无法复制保留。以 12 kD 片段诱导表达为基础的系统产生毒性，其原因为所述片段不可预期的胞内聚集。

因此，在稳定表达的细胞系统中需要对下列两种情况进行均衡：一方面为诱导聚集及随之而生的毒性会生成变化不定或无法存活的细胞系，另一方面为维持可存活细胞系，其中 tau 具有很弱的聚集倾向。尽管如此，本发明的可诱导 tau 表达系统既是稳定的，而且还能提供受到调控的蛋白聚集用于筛选及类似试验。

此外，所述试验的用途已经提供了证据，蛋白聚集的一些抑制剂(例如，吩噻嗪)的作用机制实质上主要是空间作用，而非必要的氧化还原反应作用，这一点在现有技术基础上已经被提出了质疑。这一发现为本申请所讨论的疾病范围内的这样的化合物的选择、评估、制剂及用途提供了意想不到的提示。具体而言，其表明扩散系数的评价可以提供一种有价值的筛选试验用于鉴定推定的抑制剂，或者优化已知抑制剂的结构或状态，因为通过测定扩散系数的固定评估的参数可能与抑制剂的效力高度相关。

该试验进一步表明使用还原形式的吩噻嗪有助于增强其抑制特性。这些观察结果形成了本发明其他方面的基础。

通常，本发明提供一种在稳定细胞系中通过蛋白水解处理将前体蛋白转化为该前体蛋白产物片段的方法，该方法包括下列步骤：(a)提供一种用编码如下蛋白的核酸转染的稳定细胞系：(i)前体蛋白模板片段，以使该模板片段以对细胞无毒性的水平组成性表达于该细胞，和(ii)前体蛋白，该蛋白应答于刺激物可诱导表达于该细胞；因而所述模板片段与所述前体蛋白相互作用导致该前体蛋白构象变化，从而导致该前体蛋白聚集以及水解为产物片段。

所述方法可以包括让细胞经受刺激物的作用以使前体蛋白表达于细胞。但是在使用了可诱导启动子的实施方案中，这些启动子甚至在没有刺激物存在时也可引发低但可检测水平的表达，那么刺激物的步骤就可以省略。

通常而言，前体蛋白应该是这样的蛋白，它在体内能经历诱导的构象多聚化相互作用(以自身-增殖的方式)最终导致形成包含产物片段的，与疾病状态相关的聚集物。本发明提供的方法得到的产物片段是病理性聚集和蛋白水解过程的量度，该蛋白水解过程体内导致一种或多种毒性产物的产生和疾病状态。本方法的产物片段(或者这些片段中的一种或多种)可以是毒性的，或者可简单地用作病理聚集过程的指示剂。

以所述蛋白及相互作用为基础的方法将在下文作更详细的讨论。

本发明已经出人意料地表明可以以(第一)浓度组成性表达模板片段，所述浓度对细胞系不产生毒性，即所述细胞系可存活。而且也没有表现出例如 WO 96/30766 图 29 中所示的那种细胞异常。

然而(例如，在预定时间添加刺激物时)可以播下种子(seed)，即前体蛋白处理为产物片段(该片段可以与其相同、广义上等同于或者明显不同于模板片段)，产物片段因此可以积聚到(第二、更高)浓度，该浓度对细胞是有毒性的，并且对应于疾病状态。因而这提供了便利方法用于模拟与产物片段作用相关的疾病状态，以及用于评定调节物对产物片段生成的作用。

在各种其他分开的实施方案中，本发明提供了相应的方法，用于蛋白水解处理以及任选所述前体蛋白聚集为产物片段的启动、播种(seeding)或调控。每一情况下，所述方法都涉及监测(直接或间接)所述前体蛋白的蛋白水解处理水平。

在本发明的一个实施方案中，在一可诱导型启动子以及低组成性水平的 PHF-核心的 tau 片段(12 kD 片段)调控下，成纤维细胞(3T6)表达全长 tau("T40")。当 T40 的表达在该系统中被诱导时，其经受细胞内的聚集-依赖性截短，N-末端在第约 295 位氨基酸处，C-末端在第约 390 位氨基酸处，从而产生更高水平的 12 kD PHF-核心结构域片段。12 kD 片段的生成可被 tau-聚集抑制剂以剂量-依赖性模式阻断。实际上，化合物对细胞内蛋白水解生成 12 kD 片段的抑制活性的定量完全可以使用对体外 tau-tau 结合抑制所使用的同样的参数。也就是说，细胞内蛋白水解产生 12 kD 片段的程度完全可以由 tau-tau 通过重复结构域结合的程度来确定。细胞内相关蛋白酶的获得是没有限制的。

前体蛋白及疾病(包括 tau 相关疾病(tauopathies))

如上所述，本发明可以以与疾病相关的任一蛋白的用途为基础，该蛋

白与疾病相关,其中该蛋白经历诱导的构象多聚化相互作用,即该蛋白或其片段的构象变化引发模板结合以及自身-增殖方式的其他(前体)蛋白聚集。

成核过程一旦被启动,聚集级联反应可确保其他蛋白分子的诱导构象多聚化涉入其中,导致聚集物中毒性产物片段的形成,所述聚集物基本上能抵制进一步的蛋白水解。因此形成的蛋白聚集物被认为是神经变性、临床痴呆以及该组疾病其他病理症状的近因。

本发明的优选实施方案以 tau 蛋白为基础。本发明中使用的术语“tau 蛋白”通常指 tau 蛋白家族中的任一蛋白。Tau 蛋白的特征在于其是较大蛋白家族成员中的一种,在组装及拆卸的重复循环过程中与微管共-纯化(Shelanski et al.(1973)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70., 765-768),并被称做微管-相关蛋白(MAPs)。Tau 家族成员具有共同特征:一特征性 N-末端节段、一特征性串联重复区域和一 C-末端尾,所述 N-末端节段中插入了一段约 50 个氨基酸的序列,该序列在脑内受到发育方面的调节,所述特征性串联重复区域由 3 或 4 个 31~32 个氨基酸的串联重复单元组成。

MAP2 是在体树突状腔隙(somatodendritic compartment)中占绝对主导地位的微管相关蛋白(Matus, A., in "Microtubules" [Hyams and Lloyd, eds.] pp 155-166, John Wiley and Sons, NY)。MAP2 的同工型在串联重复区域几乎与 tau 蛋白相同,但是在 N-末端结构域的序列和延伸程度上明显不同(Kindler and Garner(1994)Mol. Brain Res. 26, 218-224)。尽管如此,串联-重复区域中的聚集并不是选择性针对 tau 重复结构域的。因此,应当理解到的是,本申请中任一涉及 tau 蛋白或 tau-tau 聚集的讨论都应该被理解为还涉及 tau-MAP2 聚集、MAP2-MAP2 聚集等。

图 5 给出的表中列出了各种疾病-相关的其他聚集蛋白,这些蛋白也可用于本发明。每一种情况下蛋白聚集和/或突变的启动在其中发挥作用的疾病也被列出。还列出了导致该疾病活性的结构域或突变,本发明使用的模板片段优选包括这种蛋白的最小部分的至少全部或部分。

从表中可以看出,特征为病理性蛋白聚集的疾病的实例包括运动神经元疾病和雷维小体病(lewy body disease)。

值得注意的是,不仅是在阿耳茨海默氏病中 tau 蛋白(及其异常功能或处理)发挥作用。神经变性病症如皮克病(Pick's disease)和进行性核上麻痹(Progressive Supranuclear Palsy)(PSP)似乎也分别与新大脑皮层中的锯齿状

脑回及星状锥体细胞中的病理性截短 tau 聚集的积聚相关。其他痴呆包括前  
颞颥痴呆 (fronto-temporal dementia)(FTD); 染色体 17 关联的帕金森病  
(FTDP-17); 脱抑制-痴呆-帕金森病-肌萎缩复合症(DDPAC); 苍白球-脑球-  
黑质变性(PPND); Guam-ALS 综合征; 苍白球-nigro-luysian 变性(PNLD); 皮  
5 质基底变性(CBD)及其他疾病(参见 Wischik et al. 2000, loc. cit, for detailed  
discussion-especially Table 5.1)。所有这些主要或部分特征在于异常 tau 聚集  
的疾病在本申请中都称为“tau 相关疾病(tauopathy)”。

因此, 应当理解到的是, 基于上述讨论, (并且除上下文另有要求外)  
适用于 tau 蛋白或 tau 样蛋白(例如, MAP2)的本发明的实施方案的描述应该  
10 同等适用于上述其他蛋白(例如,  $\beta$ -淀粉状蛋白, synuclein, 感染性蛋白质  
(prion)等), 或其他由于对聚集增殖起关键作用的结构域构象改变而启动或  
经历类似的病理聚集的蛋白质, 或赋予这种形成的聚集物以蛋白水解稳定  
性的蛋白质(article by Wischik et al.(in"Neurobiology of Alzheimer's Disease",  
2nd Edition(2000)Eds. Dawbarn, D. And Allen, S. J., The Molecular and Cellular  
15 Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford)。所有这些蛋白在本申  
请中都可称为“聚集的疾病蛋白(aggregating disease proteins)”。

类似地, 本发明中提到的“tau-tau 聚集”或类似方式, 也适用于其他“聚  
集蛋白的聚集”, 例如  $\beta$ -淀粉状蛋白的聚集、感染性蛋白的聚集及 synuclein  
的聚集等。类似地, "tau 蛋白水解性降解"等等。

## 20 模板片段

在本发明的优选实施方案中, 模板片段包括前体蛋白的“核心片段”、  
或者基本由或由前体蛋白的核心片段组成, 该术语是指所述蛋白中能够结  
合前体蛋白以启动或扩大如上所述的蛋白水解及聚集的部分。

在蛋白聚集的疾病中, 所述核心片段也可以是那些为聚集物蛋白水解  
25 稳定性作出贡献的部分。

因此, 例如, “tau 核心片段”是指其中包含了来自串联重复区域的截  
短的 tau 片段, 以及在合适条件下能够以高亲和力结合其他 tau 蛋白或 MAP2  
蛋白的串联重复区域的 tau 片段。就 tau 而言, 优选的片段的实例有, 但不  
限于, 出现于阿耳茨海默氏病脑内 PHFs(以及, 最终的神经原纤维缠结)中  
30 的 tau 片段。

因此, 优选的 tau 片段可以从约第 295-297 位延伸至约 390-391 位(参

见图 6 中的'dGAE'), 尽管所述片段的变体也可以使用。

就 APP(淀粉状蛋白的前体蛋白)而言, 例如, 包含 1-40 或 1-42 氨基酸的 A $\beta$  结构域的 APP 片段以融合蛋白形式表达可以是优选的。

5 其他核心片段可以例如图 5 中讨论的结构域为基础。模板片段可包含来自两个或多个这些蛋白的结构域(例如, 作为融合体)。

所述模板片段的总长可以为适于试验及所使用的聚集疾病蛋白核心片段的任一长度, 但是通常为大于或等于约 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 个氨基酸长度。但是在一些实施方案中, 它也可以是大于 100, 200 或甚至 500 个氨基酸, 如果需要。

## 10 衍生物

在本文所有例子中, 当讨论一种指定的蛋白(例如, 前体蛋白、模板片段或核心片段)或列举的核酸序列时, 相应标准蛋白(或核酸)的衍生物或其他变体也可适合, 只要它还保留了标准序列的适当特性。所述衍生物也可与标准序列具有序列同一性。

15 例如, 使用的蛋白可以包括一延伸了的 N-或 C-末端, 所述的延伸可以异源于该蛋白序列。同等地, 所述衍生物可以通过标准序列中氨基酸插入、缺失或添加得到的蛋白质。例如, tau 蛋白, 或 tau 核心片段、衍生物应当包括至少一部分与所述 tau 蛋白串联重复区域类似的氨基酸序列, 但是其中天然 tau 或其片段的氨基酸中的一个或多个氨基酸已经被取代或缺失,  
20 或者有其他的氨基酸插入其中。

可以通过这种变化来增强或消除结合活性(后一种情况可以用于对照试验)。对照可以包括序列或结构域的缺失来观察这些对照物对聚集的作用。

25 优选的衍生物可以是其中引入了这样突变, 该突变对应于那些已知或被怀疑为与疾病状态有关的形式。这些衍生物可以包括相应于 tau 序列内 P301S 的变化(见图 7)。其他突变包括 G272V, G389R, P301L, N279K, S305N, V337M, G272V, K280A, R406W(也可参见 Wischik et al, 2000, 同上)。

其他优选的衍生物可以包含上述核心片段中的串联重复单元或那些片段内的结合结构域。

30 还有的衍生物可以是以嵌合产物为基础的, 该嵌合产物建立在多个相关的疾病蛋白基础之上, 其中这些蛋白的序列混合或组合在一起。例如, 可以将 tau 的限制性酶切片段与 MAP2 甚至不相关基因的片段连接在一起得

到重组衍生物。另外一种用于修饰核心片段的策略按照 Ho et al., 1989, Gene 77, 51-59 中所述进行 PCR 反应或者实施 DNA 改组(Cramer et al., 1998 Nature 391)。

#### 核酸构建体的用途

5 本发明所述的或者用于本发明的核酸可以是同其天然环境分离和/或纯化来的,基本纯化或同源的形式,或者不含或基本不含其他物种来源的核酸。使用在本申请中时,"分离的"一词包括了上述所有这些情况。核酸,例如编码模板片段的核酸,可以是至少一部分是合成的,也就是说其中包含有在天然情况下不可能一块出现(非连续)的序列,但是这些序列已经被人工  
10 连接或组合在一起。

根据本发明的核酸可以是下列形式,或者源自下列形式:cDNA, RNA, 基因组 DNA 以及经修饰的核酸或核酸类似物。当 DNA 序列具体给出时,例如参照图,除非上下文另有要求外,U取代T得到的RNA等价物也应包括于其中。

15 如上所述,所述核酸可以编码与所参考序列具有同源性的衍生物或其他变体。优选地,所查询的核酸和/或氨基酸序列与变体所依据的序列之间具有约 50%、或 60%、或 70%或 80% 的序列同一性,最优选至少约 90%、95%、96%、97%、98% 或 99%的序列同一性。相似性或同源性可以通过 Altschul et al.(1990)J. Mol. Biol. 215: 403-10 中的 TBLASTN 程序来定义和测  
20 定,该程序作为标准应用于本领域,或者标准程序 BestFit 也是优选的,该程序是 Wisconsin Package, Version 8, September 1994, (Genetics Computer Group, 575 Science

Drive, Madison, Wisconsin, USA, Wisconsin 53711)的一部分,使用缺省参数。用于计算在具有特定序列同源性的核酸分子之间实现杂交所需严谨  
25 条件的通式为: $T_m = 81.5 C + 16.6 \log [Na^+] + 0.41(\% G+C) - 0.63(\% \text{甲酰胺}) - 600 / \# \text{双螺旋中的 bp 数}$ 。

编码合适蛋白或多肽的核酸序列,本领域技术人员利用本申请中包含的信息和参照序列以及本领域已知技术(例如,参见 Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor  
30 Laboratory Press, 1989, and Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1992)可以很容易地制备出来。这些技术包括(i)使用多

聚酶链反应(PCR)扩增相关核酸的样本,例如来自基因组来源的,(ii)化学合成,或(iii)制备 cDNA 序列。

5 编码例如 tau 核心片段的 DNA 可以用本领域技术人员已知的任一合适方法制备及使用,包括提取编码 DNA,鉴定出位于待表达部分两侧的合适的限制性酶切位点,从所述 DNA 切割出该部分。对蛋白(例如,tau)-编码序列的修饰可以,例如利用定点诱变来完成。

### 构建体

因此,本发明另一方面还涉及编码合适前体及模板片段蛋白的核酸分子。如下文讨论的那样,这些核酸分子可以出现在同一或不同的构建体上,10 以及在后一种情况下,还可以提供包含两种或多种类型构建体的组合物。

对于多种细菌、酵母及病毒而言,能够确保载体在所选取的一种或多种宿主细胞中复制的核酸序列为本领域熟知。例如,各种病毒来源(SV40,多瘤病毒,腺病毒,VSV 或 BPV)也可用于将载体克隆于哺乳动物细胞。含有15 本发明所述核酸的表达载体可以,例如,是下列形式:质粒、粘粒、病毒颗粒、噬菌体或可被细胞摄取并合适表达的其他任一合适载体或构建体。

表达载体包含一启动子,该启动子可操作地连接于目标蛋白编码核酸序列上,以便指导 mRNA 合成。可被多种潜能宿主细胞识别的启动子是众所周知的。“可操作地连接”是指作为同一核酸分子部分加入,且位置及方向适于该启动子所启动的转录。DNA 可操作地连接到启动子就是置于该启动子的“转录调控下”。哺乳动物宿主细胞载体的转录可以被例如下列启动子20 调控:来自病毒基因组的启动子,如来自多瘤病毒、禽痘病毒(fowlpox virus)、腺病毒(例如腺病毒 2)、牛乳头瘤状病毒、鸟肉瘤病毒、巨细胞病毒、反转录病毒、乙肝病毒和猴病毒 40(SV40),来自异源哺乳动物的启动子,如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子,以及来自热休克启动子,只要所述启动子可与所述宿主细胞系统相匹配就可以。用于真核细胞的表达载体25 (酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或者来自其他多细胞生物体的有核细胞)还可以包含终止转录及稳定该 mRNA 所需序列。

用于模板片段的启动子是“组成性的”。该启动子要足够的弱,以使细胞中表达的模板片段自身用常规方法不能(直接)检测,除非借助其对前体蛋白30 作用导致聚集及其蛋白水解处理才能(间接)检测到(即,当所述聚集被抑制时则不能有效检测)。所述启动子的选取本领域技术人员根据本发明内容

不需承担过度劳动就可实现，例如上述列出的启动子。

就前体蛋白而言，所述启动子是“可诱导的”，这就是说，而且本领域技术人员公认，对施加的刺激物响应表达被“开通”或增加。刺激物的特性随启动子变化。一些可诱导启动子在无合适刺激物存在时导致极低或不可检测水平的表达(或无表达)。其他可诱导启动子在无刺激物存在时导致可检测的组成性表达。无刺激物存在时无论表达水平如何，那么在正确刺激物存在时来自任一可诱导启动子的表达都会增加。在下述试验中，使用了 Lac 可诱导启动子。

本发明的表达载体还可包含一个或多个选择基因。常用的选择基因编码的蛋白能(a)赋予针对抗生素或其他毒素的抗性，例如，氨苄青霉素、新霉素、甲氧喋呤或四环素，(b)补充营养缺陷体的缺陷，或(c)提供复合培养基无法获得的关键养分，例如，编码杆菌的 D-丙氨酸消旋酶的基因。适于哺乳动物细胞的可选择标记物的实例为那些能够鉴定出可摄入目的蛋白编码核酸的细胞的标记物，例如 DHFR 或胸腺嘧啶激酶。当使用野生型 DHFR 时，合适的宿主细胞为 DHFR 活性缺陷的 CHO 细胞系，按照 Urlaub et al., Proc. Natl.Acad Sci USA 77: 4216(1980)所述进行制备和增殖。适于酵母使用的选择基因是存在于酵母质粒 Rp7 中的 trp1 基因[Stinchcomb et al., Nature, 282: 39(1979); Kingsman et al., Gene, 7: 141(1979); Tschemper et al., Gene, 10: 157(1980)]。所述 trp1 基因为不能生长于色氨酸的酵母突变株提供了一选择标记，例如 ATCC: No. 44076 或 PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12(1977)]。

因此，用于本发明的常见载体可以包含复制起点、可操作连接到组成性或可诱导性启动子上的一个或多个合适的蛋白序列、转录终止序列、增强元件、标记基因。包含各种不同这些成分的正确载体的构建可以利用本领域已知的标准连接技术来完成。

## 25 转化

本发明还提供了一种用于制备用于上述方法的稳定细胞的方法，该方法包括下述步骤：(a)将编码(i)模板片段的核酸导入细胞以使模板片段以对所选细胞无毒性的水平组成性地表达于该细胞；并将编码(ii)前体蛋白的核酸导入细胞以使该疾病蛋白响应刺激物以可诱导方式表达于细胞。

30 导入通常是指但不仅限于“转化”，可以使用任一合适技术。对于真核细胞而言，合适的技术包括磷酸钙转染、DEAE-Dextran, 电穿孔、脂质体介

导的转染以及使用反转录病毒和其他病毒的转导，例如痘苗病毒，或者对于昆虫细胞使用的杆状病毒。使用氯化钙的所述钙处理，如 Sambrook et al., 同上，或电穿孔通常用于原核细胞或含有坚固细胞壁屏障的其他细胞。用根瘤农杆菌转染用于某些植物细胞的转化，描述见 Shaw et al., *Gene*, 23: 5 315(1983)和 1989 年 6 月 29 日公开的 WO 89/05859。

对于没有这类细胞壁的哺乳动物细胞，可以使用 Graham 和 van der Eb, *Virology* 52: 456-457(1978)中的磷酸钙沉淀法。哺乳动物宿主系统转化方面的描述见于美国专利 4,399,216。转化入酵母通常根据 Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130: 946(1977)和 Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*, 76: 3829(1979) 10 中所述的方法来进行。但是，将 DNA 导入细胞的其他方法，例如细胞核微注射、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞的融合，或者聚阳离子，例如 polybrene、聚鸟氨酸，也可使用。转化哺乳动物的各种技术参见 Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185: 527-537(1990)and Mansour et al., *Nature* 336: 348352(1988)。

#### 15 宿主细胞

本发明使用的合适的宿主细胞可以包括细菌、真核细胞如哺乳动物细胞及酵母细胞，以及杆状病毒系统。

本领域中已有的用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括成纤维 3T6 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾细胞、COS 细胞、被 SV40 转化的猴肾 CV1 系 20 (COS-7, ATCC CRL 1651)、中华仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216(1980)); 小鼠支持细胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23 : 243-251(1980)); 人肺细胞(W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺癌细胞(MMT 060562, ATCC CCL51); 以及多种其他细胞。

25 合适的原核宿主细胞宿主包括但不限于真细菌(eubacteria)，如革兰氏阴性或阳性生物，例如，肠杆菌科，如大肠杆菌。各种不同的大肠杆菌菌株可为公众获得，例如大肠杆菌 K12 菌株 MM294(ATCC 31, 446); 大肠杆菌 X1776(ATCC 31, 537); 大肠杆菌菌株 W3110(ATCC 27, 325)以及 K5 772(ATCC 53, 635)。真核微生物如丝状真菌或酵母也是适合载体的克隆和表 30 达的宿主。酿酒酵母是一种常用的低等真核宿主微生物。合适的宿主细胞的选择被认为是在本领域技术之内。

另一方面，如上所述本发明提供了含有本发明所述异源核酸的宿主细胞。本发明所述核酸可被整合入宿主细胞的基因组(例如，染色体)。可以通过按照标准技术将促进与基因组重组的序列纳入来促进整合。替代地，所述核酸可以位于细胞内的染色体外载体上，或者是可鉴定地异源于或异于该细胞。

所述细胞可以用上述方法(核酸构建体的导入)制备或者是该细胞的先祖。另外还提供了相应的细胞系。优选的细胞系可以建立在成纤维细胞系如 3T6 基础之上。

用本发明所述的表达或克隆载体转染或转化的宿主细胞可以培养于下列目的而改良后的常规培养基中：诱导启动子、筛选转化子或者扩增编码目的序列的基因。培养条件，如培养基、温度、pH等的选择对于本领域技术人员不需承担过度劳动即可选择。通常，使细胞培养物的产率最大化的原理、方法及操作技术可参见"Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach", M. Butler, ed. JRL Press, (1991)and Sambrook et al, 同上。

样本中的基因表达可以下列技术直接确证：例如用于定量 mRNA 转录物的常规 Southern 印迹、Northern 印迹 [Thomas, Proc. Natl Acad Sci. USA, 77 : 5201-5205(1980)]、点印迹(DNA 分析)或原位杂交，这些技术使用基于聚集的疾病蛋白序列的合适标记探针。替代地，可以使用能识别特异双链体的抗体，所述双链体包括 DNA 双链体、RNA 双链体以及 DNA-RNA 杂合双链体或 DNA-蛋白双链体。

替代地，基因表达可以用免疫学方法，例如细胞或组织切片的免疫组化染色，以及细胞培养试验测量，从而对基因产物的表达直接定量。用于免疫组化染色和/或样品分析的抗体可以是单克隆或多克隆，可以用任一哺乳动物来制备。方便起见，所述抗体针对所述聚集的疾病蛋白的天然序列制备。

因此，本发明一方面保证导致或允许本发明所述核酸的表达，例如，通过将宿主细胞培养在基因能够得以表达的条件下(刺激物存在时)从而制得所述的产物片段。本发明还包括一种制备产物片段的方法，该方法包括上述的核酸的表达。

本发明另一方面提供了一种试剂盒，该试剂盒包含如本发明所述的转化后的细胞或细胞系，外加至少另一组分，例如刺激前体蛋白生成的试剂，

或者用于检测前体蛋白与模板片段相互作用的试剂，具体描述见下列章节。

#### 聚集和/或蛋白水解和/或毒性片段的检测

在各种实施方案中，蛋白水解或聚集的进程(或其调控-见下文)可通过监测下列物质中任一种或多种的浓度或水平得以直接或间接检测：前体蛋白；产物片段；处理过程中形成的任一产物片段；上述任一物质的聚集物(例如，根据沉淀系数)。

因此，以具体的 tau 蛋白和片段(以第 297-351 位片段和 T40 为基础)为例，可以根据 12kDa 处理后产物的水平的增加来检测聚集，该产物主要来自前体蛋白。

10 一些蛋白的检测方法见上述相关的基因表达部分。当本发明所述方法的实施方案中使用的是抗体或其片段时，可以用常规技术制备。多克隆抗体可以通过例如向动物注射相应的 tau 抗原来制备，优选兔子，然后用免疫亲和纯化回收抗血清，其中让所述多克隆抗体通过一结合有抗原的柱体，然后用常规方式洗脱。优选地，本发明使用对 tau 表位具有选择性的单克隆抗体，该单克隆抗体可用 Kohler 和 Milstein 方法制备。合适的 tau 表位单克隆抗体可以用已知方法修饰从而提供 Fab 片段或(Fab')<sub>2</sub> 片段、嵌合、人源化或单链抗体实施方案。

20 本发明所述抗体可以用多种方式修饰。实际上"抗体"一词应该定义为涵盖任一具有结合活性的物质，该物质带有具有期望特异性的结合结构域。因此，本发明中包含了抗体片段、衍生物、抗体的功能等价物及同系物，包括合成分子以及形状上模拟抗体从而可结合抗原或表位的分子。

一般而言，当抗体用于检测时，该抗体可携带一报道分子。替代地，结合的检测可以通过使用能与未标记的 tau-特异性的第一抗体结合的第二抗体来完成。这种情况下，所述第二抗体连接一报道分子。

25 抗体可以用于本领域已知的任一免疫测试系统，包括但不限于：放射免疫测定、“夹心”测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)；荧光免疫-测定、蛋白 A 免疫测定，等。通常，免疫印迹方法也被使用。优选地，免疫测定在固相上进行，如本领域技术人员所熟知的那样。例如，可将抗体吸附到，例如，一测试柱上，然后可在下述条件下让细胞样本洗涤通过该柱体：即  
30 该条件能确保任一目的蛋白聚集物，如 tau-tau 聚集物，能够结合到固相抗体上。洗去过量的试剂，然后用任一合适方法来检测聚集蛋白与柱体的结

合, 例如, 如上文及下文所列举的。

优选的单克隆抗体如下:

- 能够识别 tau 的 N-末端或 C-末端表位从而可以测定截短型和全长型 tau 之间结合的单克隆抗体。能够识别人-特异性表位的抗体尤其有用。一种所述单克隆抗体(命名为 27/499)可识别位于 tau 的 Gly-16 和 Gln-26 之间区域的人-特异性表位, 从而可检测全长 tau 之间的结合, 只要其是非-人源的 (Lai(1995); "The role of abnormal phosphorylation of tau protein in the development of neurofibrillary pathology in Alzheimer's Disease", PhD Thesis, University of Cambridge).
- 10 能够识别在 Glu-391 处截短的核心 tau 片段的单克隆抗体。一实例为 mAb 423(Novak et al.(1993), loc. cit.)。该抗体能够确保一终止于 Glu-391 处的截短的核心 tau 片段与一终止于 Ala-390 处的类似片段之间结合的检测, 这种结合不能被 mAb423 识别。该截短通常天然发生在阿耳茨海默氏病的 PHF 装配过程(Mena et al.(1995), (1996), loc. cit.; Novak et al.(1993), loc. cit.;
- 15 Mena et al.(1991), loc. cit.)。另外, 当 tau 通过重复结构域体外结合时, 用蛋白酶(例如链霉蛋白酶)消化产生可被 mAb423 检测的片段(参见 Wischik et al, 1996, loc cit)。在本发明的优选方面, 当其涉及 tau 蛋白时, 该抗体可用于将蛋白水解切割产物片段(Glu-391 终止)的生成与模板片段(Ala-390)组成性表达区分开来。
- 20 能够识别重复结构域中的属的(generic)的 tau 表位的单克隆抗体。一优选实施方案使用抗体(例如, MAb 7.51)。当要检测 tau-MAP2 或 MAP2-MAP2 聚集时, 可使用能检测属的 MAP2 表位的抗体。抗体 7.51 识别位于 tau 的倒数第三个重复单元中的属的 tau 表位(Novak et al.(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 5837-5841), 当 tau 以 PHF-样免疫化学构象结合时该表位被闭
- 25 合, 但是当蚁酸处理后该表位又重新暴露(Harrington et al.(1990), (1991), loc, cit.; Wischik et al.(1995a), loc. cit.)。正常可溶性 tau, 或者结合于微管的 tau, 可以用 mAb 7.51 检测, 而无需蚁酸处理(Harrington et al.(1991), loc. cit.; Wischik et al.(1995a), loc. cit.)。在 tau-tau 结合试验中, 全长 tau 的结合与 mAb 7.51 表位的部分闭合有关。
- 30 抗体 27/342 能识别位于 Ser-208 和 Ser-238 之间的非-种(non-species)的特异性属的 tau 表位, 该表位在 tau-tau 相互作用过程中被部分封闭(Lai, loc.

cit.)。)

一些单克隆抗体的结合位点显示于图 6。

### 调节剂与抑制剂的筛选

如上所述，本发明优选地涉及将本发明所提供的系统用于模拟及鉴定  
5 用于治疗本发明所述疾病的治疗试剂的方法中。

一种用于评估试剂下述能力的方法，所述能力即调节对与模板片段间  
相互作用作出应答时前体蛋白聚集和/或蛋白水解处理形成产物的能力，该  
方法包括：(a)提供一种上述的稳定细胞或细胞系，(b)让该细胞接受刺激物  
作用使前体蛋白表达于所述细胞，从而使模板片段与前体蛋白间相互作用  
10 导致该蛋白构象改变，导致聚集以及前体蛋白的蛋白水解处理为产物片段，  
(c)在试剂存在的条件下监测产物片段的产量，(d)任选地将步骤(c)中得到的  
数值与标准数值进行比较。

标准数值可以历史观察记录为基础，或者可以平行进行的对照试验为  
基础，例如，试验中的一个体(模板片段、前体蛋白、刺激物、试剂)被修饰  
15 或缺失。

上述各种方法可以进一步包括在步骤(d)结果与试剂调节活性间建立相  
关关系的步骤。

因此，一种鉴定疾病相关蛋白聚集调节剂的方法，其中所述蛋白经历  
了诱导后的构象相互作用，该方法包括在疑似能调节(例如抑制或逆转)所述  
20 聚集的一种或多种试剂存在条件下诱导所述聚集的方法。可以在该试剂存  
在或不存在的条件下观察聚集(以及任选地蛋白水解处理)的程度，相对值与  
其作为调节剂的活性相关。

例如，可将测试物质加入上述细胞系统，将细胞孵育一段时间，该时  
间足以完成结合以及对结合抑制的显示。然后检测结合后的 tau 复合物，例  
25 如，用一合适-标记的抗体如 MAb 7.51 检测全细胞提取物中的免疫印迹，或  
者任一其他检测方法。

当筛选方法用于该目的时，即用于调控/抑制化合物的检测时，可使用  
非竞争性或竞争性试验。例如，在本领域熟知类型的竞争性试验中，可将  
已知抑制剂或调节剂在其他测试物质或试剂存在或不存在条件下的作用进  
30 行比较，从而测定测试物质与已知抑制剂/调节剂之间竞争结合目的蛋白的  
能力。

本发明还提供了制备调节剂(例如,抑制剂)的方法,如上所述,但是该方法进一步还包括制备这种鉴定出的调节剂的步骤。

### 已知的特异性

根据本发明这方面的筛选方法可用于筛选显示下述特性的化合物:即  
5 对疾病-相关蛋白聚集(例如, tau-tau, tau-MAP2 或其他蛋白的结合)选择性竞争抑制,而不与前体蛋白参与的任一“正常”结合相互干扰(例如, tau 或 MAP2 结合微管蛋白,或者依此类推,其他前体蛋白与本领域技术人员迄今已知的其结合伴侣的结合)。

具体就 tau 而言,一种方法用于检测潜在抑制剂/调节剂对 tau、MAP2  
10 或其衍生物与微管蛋白间结合的任一可能干扰,该方法包括使解聚后的微管蛋白或紫杉醇稳定的微管与试剂接触,然后检测 tau-微管蛋白或 MAP2-微管蛋白间的结合。Tau-微管蛋白结合也可,例如通过正常细胞骨架分布来显示,如 WO 96/30766 中所述。用于制备可能与结合伴侣结合的微管蛋白或其片段的方法,已为本领域已知,描述见 Slobada et al.(1976, in: Cell  
15 Mobility(R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, eds.), Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp 1171-1212)。

用于其他具有“疾病”及“正常”功能的蛋白的类似方法,本领域技术人员可根据本发明公开内容得出。

### 细胞的生存能力

20 需要时,本发明的方法还可以进一步包括下述步骤:例如,通过使用乳酸脱氢酶试验试剂盒(Sigma),对表达有模板蛋白及任选表达有前体蛋白的细胞的生存能力进行测试。

在对 tau-tau、tau-MAP2 或 MAP2-MAP2 聚集进行研究时(见上文,在  
“特异性条件下”),该步骤还可为测试物质对 tau 或 MAP2 与微管蛋白结  
25 合的任一干扰提供指示,由于 tau-微管蛋白或 MAP2-微管蛋白结合的抑制或干扰一定程度上与细胞分裂能力的减弱相关,因而与细胞生存能力的减弱相关。

细胞的生存能力可用于推算该试剂的 LD50 值。

30 20. 优选的抑制剂的治疗指数(LD50/B50-见图 9 的讨论)为至少 2, 5, 10 或

### 测试试剂的选择

被测试的化合物可以是期望测试其相关活性的任一物质。

所述方法可以作为初步筛选，鉴定新抑制剂/调节剂，或者作为二次筛选进一步详细研究已知的抑制剂/调节剂。

试剂可以是天然的或是合成的化学化合物。能识别阿耳茨海默氏病-样蛋白聚集的抗体和/或能调控阿耳茨海默氏病-样蛋白聚集的抗体形成了一类潜在的针对聚集过程的抑制或调控作用的化合物。更常见的是对相对小的化合物，优选那些能够通过血脑屏障的化合物，进行测试。在与本发明的应用(刺激前，或刺激后)关联时期望的其他品质包括：对骨髓无毒性，有害的心血管活性降至最低；最小的肝及肾毒性；经口吸收好；不会代谢为无活性形式，等。如本领域技术人员所知，这些测试可以在商品化基础上通过熟知的方法对那些期望以这种方式测试的化合物进行。

对于常见的测试物质及潜在的调节剂而言，如果需要，首先应当测定溶解性，例如从 Merck 索引。当该物质在含水溶液中可溶时，可以制备浓缩的母液，例如浓度为 5-20mM 的 PBS 溶液。对于大多数化合物而言，就在使用前可用组织培养基稀释至工作浓度，例如 100 $\mu$ M，施加于细胞终浓度为 0-10 $\mu$ M。自然地，如果需要在大于 10 $\mu$ M 的浓度下测试化合物，那么可以适当提高工作浓度。

当该物质在含水溶液中不溶时，可用合适的溶剂(从 Merck 索引中确定或试验测定)制备母液，例如，用浓度为 5-29 nM 的乙醇制备。对于大多数测试化合物而言，该母液也可以在使用前用组织培养基稀释得到例如浓度为 100 $\mu$ M 的工作溶液，施加于细胞得到最浓度为例如 0-10 $\mu$ M。同上，如果需要在大于 10 $\mu$ M 的浓度下测试化合物，那么可以适当提高工作浓度。

本领域技术人员应该理解到的是，根据本发明这一方面加入到筛选试验的测试物质或化合物的量，以及实际的施加模式，如果需要，本领域技术人员通过一系列尝试都可以测定出来。当所测试的化合物与细胞系的最佳条件(例如，pH 或离子强度)冲突时，应该尝试各种条件从而发现折衷的最佳条件。初始浓度可以选择为实际上治疗范围内的水平，即对患者是非致命的(见下文的剂量说明)。根据本发明公开的内容，本领域技术人员实现这一目无需承担过度负担。

### 30 筛选吩噻嗪

本发明另一方面涉及用本发明提供的筛选方法鉴定到的化合物，以及

含有针对蛋白的诱导后的构象多聚化的抑制剂/调控剂的组合物。

如 WO 96/30766 中的描述，在所发现的能抑制 tau 等蛋白的诱导后的病理性构象多聚化的试剂中有一些二氨基吩噻嗪(diaminophenothiazines)。实例包括例如劳氏紫、亚甲蓝(MB)、托洛氯铵以及二甲基亚甲蓝(DMMB)，  
5 这些都是特别关注的用于防止阿耳茨海默氏病等疾病中 tau-tau 聚集的潜在治疗试剂。

有趣的是，如实施例更详细的描述，本发明已经使用本申请所述方法阐明：化合物如 MB 对诱导后的构象多聚化如 tau-tau 聚集的作用机制实际上主要是空间作用。另外，也已表明的是，二氨基吩噻嗪对 tau-tau 结合  
10 的强效空间抑制作用取决于该化合物的扩散系数。这些观察结果在化合物筛选及配制方面的各种提示将在下文作更为详细的讨论。

如果考虑现有技术对这类化合物用途的描述，那么这一发现则尤其出人意料。因此，例如，此前已知这类化合物可用于治疗高铁血红蛋白血症，它们的作用是通过下述作用介导的：通过从细胞内源性的还原性吡啶核苷酸  
15 转移电子将氧化后的血红蛋白催化还原(参见，例如，Hauschild, F.(1936)Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 182: 118; "Pharmacological Basis of Therapeutics", First Edition(1941), Goodman and Gilman; Hrgovic, Z.(1990)Anasth. Intensivther. Notfallmed. 25: 172; and Cudd, L. et al.(1996)Vet Human Toxicol. 38(5): 329)and in the prophylaxis of manic depressive  
20 psychosis(Narsapur, S. L.(1983)Journal of Affective Disorders 5: 155 ; Naylor, G. J.(1986)Biol. Psychiatry 21: 915)。尽管如此，MB，劳氏紫和托洛氯铵实际上本质都是弱氧化剂，在还原型吡啶核苷酸不存在时，它们氧化蛋白质如血红蛋白(Morse, E.(1988)Annals of Clin. Lab. Sci. 18(1): 13)。该毒性效应可用于  
25 于灭活病毒，因而已经开发了 MB 的治疗作用用于从血液制品中除去 HIV 和肝炎病毒的方法中(Chapman, J.(1994), Transfusion Today 20: 2; Wagner, S. J.(1995)Transfusion 35(5): 407)。这种效应的作用机制被认为涉及 MB 插入 DNA。通过光活化将化合物激发到较高的氧化还原态，当其回落至基态时，产生一单氧，氧化 DNA 并使其失活(Ben-Hur, E. et al.(1996)Transfusion  
30 Medicine Reviews, Vol. X, No. 1: 15; Margolis-Nunno, H. et al.(1994), Transfusion 34(9): 802)。光活化后的毒性效应也已被开发用于治疗癌症。在细胞内，已经被光活化为氧化形式的化合物能够破坏线粒体(Darzynkiewicz,

Z. et al.(1988), *Cancer Research* 48: 1295) 和 / 或 微管 (Stockert, J. et al.(1996)*Cancer Chemother.Pharmacol.* 39: 167)。

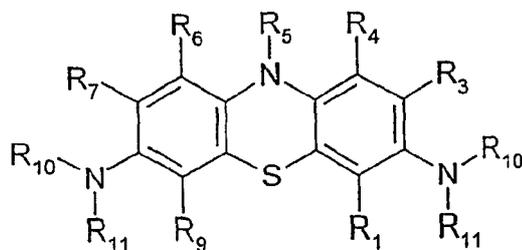
因此，纵观现有技术，显然可以提出两种可行的机制来解释化合物如 MB 和劳氏紫对 DNA 或蛋白质等实体的作用。第一种机制是通过从细胞中的还原吡啶核苷酸转移电子将氧化后的蛋白质催化还原。第二种机制是用光活化后的氧化形式的化合物氧化并最终灭活 DNA。考虑到这两种机制，因此有理由认为 MB 等化合物对 tau-tau 结合的抑制作用也可归因于氧化还原活性。即，也可以认为这类化合物作为弱氧化剂或催化性的还原剂抑制诱导后的构象多聚化如 tau-tau 结合。

由于阐明了作用机制实质上主要是空间上的，因此，本发明人的工作已经为本申请所讨论疾病范畴内的所述化合物的选择、评定、配制及用途给出了意料之外的提示。

具体而言，某些化合物已经鉴定为切实可行的治疗剂，而根据现有技术的试验结果它们都已被排除在考虑之外了。具体而言，Wischnik et al. 1996(同上述引文中)在第 1217 页报道抑制所需的 MB 浓度比临床上所能实现的浓度要高。但是，本发明的结果表明：MB 的还原改善了它的堆积能力，从而将其的抑制潜能提高到了水平，在该水平的 MB 可临床用于治疗 tau 聚集相关疾病。有关测定扩散系数(通过化合物的“堆积能力”，也可部分测定)的实施方案将在下文详细描述。

图 8 给出的只是细胞为基础的试验已测试的化合物中一些化合物的结构。图 9-16 表明特定化合物在还原形式下潜能提高，外加一些对照化合物。

因此，在本发明的一方面，本发明公开了下列通式所示还原型(“白色”(“leuco”))吩噻嗪或者其药物学上可接受的盐在治疗本发明公开的疾病中的用途：



其中 R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub> 和 R<sub>9</sub> 各自独立地选自氢、卤素、羟基、羧基、

取代或未取代的烷基、卤烷基或烷氧基; R<sub>5</sub>选自氢、羟基、羧基、取代或未取代的烷基、卤烷基或烷氧基; 以及 R<sub>10</sub>和 R<sub>11</sub>每一都单独选自氢、羟基、羧基、取代或未取代的烷基、卤烷基或烷氧基。

5 优选地, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>和 R<sub>9</sub>独立选自氢、-CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>或-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; R<sub>10</sub>和 R<sub>11</sub>每一都单独选自氢, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>或-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; 以及 R<sub>5</sub>为氢, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>或-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>。

优选地, 所述化合物为二氨基吩噻嗪, 其中在二氨基吩噻嗪核的周围具有 0, 2, 3 或 4 个甲基。优选地, 所述二氨基吩噻嗪为不对称甲基化的(例如, 托洛氯铵, 天青 A, 天青 B 和劳氏紫)。

10 优选地, 所述化合物选自亚甲蓝, 托洛氯铵, 劳氏紫, 天青 A, 天青 B 或 1,9-二甲基亚甲基蓝。

用于本发明的吩噻嗪可以用标准课本(例如, Merck Manual, Houben-Weyl, Beilstein, E. III/IV 27, 1214 ff, J. Heterocycl. Chem. 21, 613(1984))中建议的方法制备。

15 不直接施用这些化合物, 取而代之的是, 可以前体形式施用, 所述前体被待治疗细胞中生成的或者靶向待治疗细胞的具有活化活性的试剂转化为活性形式。例如, 亚甲蓝可以前体形式施用, 或者其本身作为化合物天青 A 的前体。

#### 还原形式的稳定

20 已知这些目的化合物其中一些主要是以还原形式在体内循环。例如, 就 MB 的药物动力学而言, 参见, 例如, DiSanto, A. et al.(1972)Journal Pharm. Sci. 61(7): 1086 and DiSanto, A. et al.(1972)Journal Pharm. Sci 61(7): 1090。第三, 发现只有化合物的还原形式如 MB 能穿过血-脑屏障(Chapman, D. M.(1982)Tissue and Cell 14(3): 475; Miller, T.(1992)Acta Anat. 144: 39; Muller, T.(1994)J. Anat. 184: 419; Becker, H. et al.(1952)Zeitschrift fur Naturforschung 7: 493; Muller, T.(1995)It. J. Anat. Embryo. 100(3): 179; Muller, T.(1998)Histol. Histopathol. 13: 1019)。

上述的这类文献表明, MB 等化合物的还原形式是施用给患者的切实可行的药物学上可接受的制剂。MB 此前已有口服制剂用于临床。但是, 在被临床接受之前, 需要进一步的毒性试验。MB 及相关化合物(例如, 托洛氯铵)在血液中的半衰期为约 100 分钟。显然, 这类半衰期相对较短的化合物

的缓释制剂能够显著提高化合物的利用率从而提高疗效。

图 17 表明化合物, 如本发明讨论的化合物, 在试验条件下(约 500: 1 比例过量的 DTT, 120 分钟)它们的还原程度差别很大。如该图所示, 在这些条件下劳氏紫完全被还原, 托洛氯铵以中度水平被还原, MB 和 DMMB 被还原程度则相对极小。施用 / 吸收之前, 要在 10 分钟实现 90% 氧化形式被还原, 所需常用还原剂的量是不可行的(例如, DTT 与 MB 之比为 2000: 1)。

图 18 表明, MB 在生理条件下的还原程度可以通过过夜还原然后将还原形式冻干来大大加速。在模拟胃的酸度条件下(5mM HCl), 上述冻干物 10 分钟内有 90% 被还原。对于治疗用途如果没有最佳的制剂形式, 含有经过抗坏血酸按 mg 比例 1.5-2 预先还原后的二氨基吩噻嗪的胶囊可算得上是一合适的选择。

同样的考虑也适用于其他化合物, 如劳氏紫和托洛氯铵, 它们比 MB 更易于还原, 但是其还原程度可用上述方式来加速。

因此, 本发明的吩噻嗪以优选形式提供的是预先还原后的化合物, 例如, 已冻干制剂的形式, 任选是在稳定剂存在的条件下。

用于稳定活性化合物优选形式(即该化合物的形式具有低的扩散系数, 例如该化合物的完全-还原形式)的试剂可以是还原剂或抗氧化剂。该试剂既可以将抑制性化合物的一种形式(例如, 氧化形式)转化为其优选形式(例如, 还原形式), 也可稳定该优选(例如, 还原)形式。替代地, 所述抑制性化合物可以其优选(例如, 已还原)形式加入组合物, 从而让上述试剂只发挥将所述化合物保持在该形式的作用。

特别适合用于转化和/或稳定本发明制剂中所包含的活性试剂(例如, 二氨基吩噻嗪)的还原形式的是抗氧化剂抗坏血酸盐。抗坏血酸盐此前已被用于将蛋白的氧化损伤最小化(Parkkinen J.(1996), "Thrombosis and Haemostasis"75(2): 292)。因此, 本发明提供的制剂可以方便地含有二氨基吩噻嗪, 尤其是 MB, 托洛氯铵, DMMB 或劳氏紫, 以合适的比例、浓度和剂量与抗血酸盐联用。

其他实施方案中, 还原(白色)形式可通过加入或选择合适的组分基团来优化。

因此, 本发明的进一步还包括制备用于治疗或预防上述疾病的药剂的方法, 该方法包括下述步骤: 还原所述化合物(以使其至少 50%, 60%, 70%,

优选 80%, 90%, 95%或 99%被还原), 在以合适剂量施用给需要该化合物的患者之前, 先将其以还原形式稳定在冻干组合物中。

### 治疗剂量

施用优选“预防有效量”或“治疗有效量”(尽管预防也可以被认为是治疗, 仍然可以这样表述), 该剂量足以使个体受益。准确的施用量、以及施用的速度及时程, 取决于要治疗疾病的特性和严重程度。治疗处方, 如决定剂量等, 在一般从业者及其他药剂师的职责范围内, 并且通常要考虑待治疗病症、患者个体的健康状态、给药位点、施用方法以及从业人员已知的其他因素。

10 系统施用后 MB 穿过 CNS 的描述见 Muller(1992; Acta Anat. 144: 39)。已知天青 A 和 B 为 MB 的正常代谢降解产物(Disanto and Wagner(1972a)J. Pharm. Sci. 61: 598; Disanto and Wagner(1972b)J. Pharm. Sci. 61: 1086)。托洛氯铵在绵羊中的药物动力学及毒性的讨论见 Cudd et al(1996)Vet Human Toxic 38(5)329-332。

15 就劳氏紫而言, 本发明具体以其为例, 适合的日剂量为 1~1000 mg, 优选分为 1~8 个单位剂量, 可以, 例如等量划分。但是, 应该理解的是, 上文给出的这些限制需要的话可以不予考虑, 这也适用于除劳氏紫之外本发明所述的其他具有更高或更低活性或生物利用率的化合物。

图 19 显示的是 MB 组织水平相对于 IV 剂量的曲线。

20 亚甲蓝的药物动力学已在人、狗及大鼠中作了研究, 见 DiSanto and Wagner, J Pharm Sci 1972, 61: 1086-1090 and 1972, 61: 1090-1094。人另外的尿排泄数据还可从 Moody et al., Biol Psych 1989, 26: 847-858 一文中获得。结合人的 MB 尿排泄数据, 可以设计出向 70kg 受试者施用单次 100mg 剂量后, MB 分布的整体模型, 假定为瞬间吸收(图 19B)。尿排泄占摄取剂量的  
25 54-98%。这种变化最可能是由于吸收的变化, 尽管代谢变化无法排除。从尿排泄数据中可以推算出全身清除率(whole body clearance)为 56 mg/kg/hr。因此, 如果完全吸收, 要达到 4 $\mu$ M 的有效靶组织浓度所需的剂量为 1.73 mg/kg/天(0.58 mg/kg tds)。但是, 从 Moody et al.一文可以清楚看出, 全部的尿排泄, 以及由此得到的有效生物利用率本身就是剂量的一个函数。以 1.73  
30 mg/kg/天递送所需的口服剂量为约 2 $\times$ 根据全身清除率计算出的剂量。因此, 所需的准确剂量为 3.2 mg/kg/天。这接近于临床上人用的最小的常规口

服剂量，例如在治疗慢性尿路感染时(390 mg/天)。因此，人的维持口服剂量约 225 mg/天，或 75 mg tds。约 1 小时组织水平达到峰值，组织半衰期为约 12 小时。

5 亚甲蓝的存在形式有带电荷的蓝色氧化形式和不带电荷的无色还原型的白亚甲蓝(leukomethylene blue)形式。我们细胞试验查明：对于还原后的亚甲蓝而言，阻止 50% tau 聚集(即 EC50)所需的细胞内靶组织浓度为 4  $\mu$ M，白色-形式具有优先的活性。DiSanto 和 Wagner(1972)发现：尿中回收到的亚甲蓝中约 78%以还原形式存在，静脉注射后的解剖实验中，唯一形式就是与组织结合的无色还原形式，尸体解剖后暴露于空气时该还原形式被氧化为蓝色。亚甲蓝能穿透血-脑屏障的唯一形式为还原形式(Muller, Acta  
10 Anat 1992, 144: 3944 and Becker and Quadbeck, 1952)。因此，经口吸收的亚甲蓝在体内被极快还原，并且保持该形式直至排泄，还可能经历进一步的化学修饰将其稳定为还原形式。

最大可能的是，经口吸收的变化主要取决于胃肠道中的初始还原效率。  
15 因此，实现更可靠吸收的一种方法是用抗坏血酸将亚甲蓝预先氧化。我们从体外试验发现，这种转化相当慢，以至于用 2  $\times$  mg 比例的抗坏血酸需要 3 个小时才能将水中的亚甲蓝的 90% 还原。因此，最可能确保可靠吸收的亚甲蓝的剂量为 3.5mg/kg/天的在 7 mg/kg/天抗坏血酸存在下预先还原至少 3 小时的亚甲蓝。

20 另外的可能是，低浓度的 MB 在人体内也具有活性，因此，临床可行的剂量范围为 20 mg tds, 50 mg tds or 100 mg tds, 与 2x mg 比例的抗坏血酸以这种方式联用，从而在摄取前就有 90% 以上被还原。

#### 治疗药剂的配制和使用

25 合适的化合物，如上述的制剂形式或其药物学上可接受的盐，可在进一步测试毒性后引入本发明所述组合物。所述组合物除上述成分之外可以包括药物学上可接受的赋形剂、载体、缓冲液、稳定剂或其他本领域技术人员熟知的其它物质。所述物质应该是无毒，而且不应干扰活性成分的效力。载体或其他物质的确切特性可取决于给药途径。

30 当将组合物配制为药用组合物时，其施用可通过胃肠道途径给药，如口服，以粉末、片剂、包衣片剂、糖衣丸、硬质及软质明胶胶囊、溶液、乳液或悬液，鼻腔给药(例如，以鼻腔喷雾的形式)或者直肠给药(例如，以

栓剂形式)。但是,所述施用也可通过非胃肠道途径给药,如肌肉内、静脉内、皮肤、皮下或腹膜内(例如,以注射液的形式)。

药用组合物以片剂形式时,其中可包含固相载体如明胶或佐剂。就片剂、包衣片剂、糖衣丸及硬质明胶胶囊而言,活性化合物及其药物学上可接受的酸加成盐可用药物学上惰性的有机或无机赋形剂处理。乳糖、玉米 5 (maize)、淀粉或其衍生物、滑石、硬脂酸或其盐等,可用作例如片剂、糖衣丸及硬质明胶胶囊的赋形剂。适于软质明胶胶囊的赋形剂为,例如,植物油、蜡、脂肪、半-固态及液态多羟基化合物等。

当所述组合物为液态药物制剂时,通常包含液态载体如水、石油 10 (petroleum)、动物或植物油、矿物油或合成油。生理盐溶液、葡萄糖或其他糖溶液或乙二醇如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇也可包括在内。其他适于制备溶液及糖浆剂的赋形剂为,例如水、多羟基化合物、蔗糖、转化糖、葡萄糖、trihalose 等。适于注射液的赋形剂为,例如,水、醇、多羟基化合物、甘油、植物油等。

15 适于栓剂的赋形剂为,例如,天然或硬化油、蜡、脂肪、半-液态或液态多羟基化合物,等。

另外,所述药用制剂可以包含防腐剂、增溶剂、粘性增强剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂、加色剂、加味剂、用于改变渗透压的盐类、缓冲液或包被物质。

20 就静脉、皮肤或皮下注射或者导管内灌输入脑而言,所述活性成分为非胃肠道途径-可接受的水溶液的形式,该形式不含热原并且具有合适的pH、等张性及稳定性。本领域的相关技术也能够很好地制备合适的溶液,例如用等张载体如氯化钠注射液、Ringer's 注射液、乳酸盐化的(Lactated)Ringer's 注射液。防腐剂、稳定剂、缓冲液和/或其他添加剂如果 25 需要也可包含在内。

本发明所述组合物可以单独施用,或与其他治疗方法结合,既可同时也可顺次进行,这要取决于要治疗的病症或疾病。

根据本发明,本发明提供的制剂可用于治疗或预防阿耳茨海默氏病、运动神经元疾病、雷维小体病、皮克病或进行性核上麻痹,或者涉及蛋白质诱导后的构象多聚化的其他任一疾病(见图 5)。具体而言,如下文详述, 30 所述制剂可以用于阻止、调控及抑制病理性 tau-tau 结合。

上述技术及方法的实例可参见"Remington's Pharmaceutical Sciences", 第16版, osol, A.(ed.), 1980.

另一方面, 本发明涉及前述组合物在诊断、预后或治疗涉及蛋白质诱导后的构象多聚化病症中的用途。所述病症可以为阿耳茨海默氏病等疾病, 5 或者本发明所述的其他任一病症。

#### 用扩散常数进行筛选

如上所述, 通过将化合物转化为和/或稳定在其还原形式, 可以将该化合物的抑制潜能最优化。

但是, 如下文实施例中更详细描述的那样, 令人奇怪的是, 化合物的氧化还原能力并不直接决定其在蛋白质的诱导构象多聚化方面的氧化还原能力, 因此, 氧化模型和催化还原模型都与理解化合物作为 tau-tau 聚集抑制剂 10 的活性无关。

本发明人已发现在化合物对 tau-tau 结合的抑制能力与其扩散系数的平方或三次方之间存在强反相关。

15 扩散系数可通过放电分子在阴极的堆积量来测定。试验上, 它的评估可通过测量还原电位下氧化还原电池中的电流来完成。在阴极形成的亥姆霍兹层(Helmholtz layer)中, 扩散系数与不带电(即还原)形式的聚集程度呈反相关。这些聚集是由于酚环系统  $\pi$  键堆积相互作用而形成的。

在一模型中, 扩散系数越低, 堆积趋势就越强, 而化合物抑制蛋白质的诱导后的构象多聚化如 tau-tau 结合的能力就越强, 这可通过低的  $K_i$  反应 20 出来。

当其分子为氧化形式时, 不利于二氨基吩噻嗪的堆积, 由于该形式是带电的, 所以相互间会排斥, 象分子那样。因此, 这种现象可解释为什么还原形式的二氨基吩噻嗪在抑制 tau 聚集方面具有更大的效力(见, 如图9)。

25 因此, 测定扩散系数(根据堆积能力, 而堆积能力反过来取决于形状和电荷)可作为有效调节剂开发中的一有用步骤。这样的一个空间-相关参数是扩散系数, 扩散系数可通过提供二氨基吩噻嗪的还原形式来减小。

因此, 本发明人在本申请中教导: 化合物阻断、调控或抑制蛋白质的诱导后的构象多聚化的效力(下文称作"抑制潜能")可通过包括有测量该化 30 合物扩散系数步骤的测定方法测量出来。

因此, 以其最常见的形式, 本发明提供了一种筛选可阻断、调控或抑

制蛋白的诱导后的构象多聚化的试剂的方法，该方法包括测量该试剂的扩散系数的步骤。扩散系数，具体为其扩散系数的二次或三次方用于评定吩噻嗪在治疗本发明所述疾病方面的抑制潜能形成了本发明的另一方面。

5 测量待测试剂的扩散系数的步骤可纳入到鉴定或优化推定或已知的调节剂的较大筛选程序的任一阶段。通常，所述较复杂的程序还包括本发明或现有技术(例如，WO 96/30766)中所述的测定步骤。因此，在后一种情况下例如，当要筛选可阻断、调节或抑制 tau-tau 聚集的试剂时，所述方法可包括让(a)与(b)和(c)接触的步骤：(a)含有 tau 核心片段的 tau 蛋白或其衍生物，(b)待测试其阻断、调节或抑制 tau-tau 聚集能力的物质，(c)一种标记后能结合步骤(a)中 tau 蛋白的 tau 蛋白或其标记的衍生物，或者一种不同于步骤(a)的 tau 蛋白但仍能结合步骤(a)tau 蛋白的 tau 蛋白或其衍生物。

所述扩散系数可用任一适当方法方法测量，例如根据 Murthy and Reddy(J Chem Soc., Faraday Trans J 1984, 80.2745-2750)的方法。该出版物还包括了吩噻嗪染料及其成分的一些测定的扩散系数数值，在此专门引入作为参考。

15 因此，扩散系数可在含水的酸性介质中用环伏安法(cyclic voltammetry)合适地测量出来，从而检测出该化合物在还原电位下在氧化还原电池中的电流大小。

所述方法可包括对试剂作进一步试验，例如，确定其作为具体蛋白(例如，tau)的诱导构象多聚化的抑制剂或调节剂的特异性，或者测定其作为施用给动物的试剂的药物可接受性或适宜性。

25 本发明令人惊奇地发现，试剂阻断、调控或抑制蛋白诱导后的构象多聚化的效力至少部分取决于该试剂的扩散系数，本发明提供的这一出人意料的教学可用于优化试剂的效力。本发明人已发现：试剂对于蛋白诱导后的构象多聚化的抑制潜能与其扩散系数呈反相关。换句话说，试剂的抑制潜能可通过提供扩散系数最小的形式来优化。

因此，另一方面，本发明涉及一种对试剂阻断、调控或抑制蛋白诱导后的构象多聚化的效力进行优化的方法，该方法包括将试剂的扩散系数最小化的步骤。

30 另一方面，本发明提供了一种用于预防或治疗发生了蛋白诱导后的构象多聚化病症的方法，该组合物中包含以其扩散系数最小化形式提供的化

合物，或者转化为扩散系数最小化形式的化合物。

本发明的这方面及其他方面参考下列附图及实施例提供的试验数据可得到更好的理解。

## 5 附图说明

图 1 显示的是阿耳茨海默氏病病程中的成对的螺旋纤丝的结构(上部)和神经原纤维缠结的免疫化学(下部)。

图 2 给出的是概念性的图解，其中关键的成核因子作为“种子”启动了 tau 的俘获，然后就可自身催化。

## 10 图 3 给出的是推断的阿耳茨海默氏病病理模型。

Tau 聚集是轴突运输失败及随后神经死亡之前的邻近的过程。tau 聚集级联可通过源自上游变化的形成种子/成核事件或源自 tau 基因中初始突变而激发。

## 15 图 4 显示的是如何将全长 tau 诱导转化为 12 kD 片段，只要在细胞中预先存在有 12 kD tau。

图 5 的表中列出了在蛋白聚集疾病中发挥作用的蛋白质。另外还列出了疾病本身，聚集的结构域和/或涉及的突变，以及推断的(最大)原纤维亚单元的大小。还给出了每一蛋白的 1 篇或多篇参考文献。

## 20 图 6 图示的是针对不同 N-及 C-截短形式 tau 的各种单克隆抗体的结合位点。

图 7 给出的是人 tau 蛋白同工型的核苷酸序列及推定的氨基酸序列。所述序列自 cDNA 克隆 htau40 推导而来。

图 8 显示的是劳氏紫(thionine)，托洛氯铵(tolonium chloride)，氯丙嗪及塔克林(tacrine)的结构。

## 25 图 9 给出的是二氨基吩噻嗪和结构相关的蒽醌(anthroquinone)的细胞试验相关数据，同时还给出了本发明测定的表观 KI 值。本申请的图及实施例中，已计算了另一参数，B50，用来表示与细胞试验的条件直接相关活性，因而为实现体内相应活性所需组织浓度提供了指示。B50 值是细胞试验中所用的测试化合物的浓度值，在该浓度下从全长 tau 产生的 12 kD 条带的相对 30 产量减少到了无该化合物存在时观察到的产量的 50%。在表观 KI 值及 B50 值之间存在着如下所示的简单线性关系：

细胞 B50 = 0.0217 x KI

为了比较化合物作为治疗剂的相对有效性，需要计算 LD50 值。当抑制特性近似的情况下，临床优选使用具有最高 LD50 值的化合物。可用下式来计算细胞试验中测试的每一化合物的治疗指数(RxIndx):

$$5 \quad \text{RxIndx} = \text{LD50/B50}$$

化合物的毒性可以用暴露于该化合物 24 小时后的细胞数目来测量，裂解剩余的细胞后，遵照厂商的建议使用乳酸脱氢酶试剂盒 TOX-7(Sigma Biosciences)测定。替代地，也可以使用购自 Promega UK 的试剂盒(CytoTox 96)，也按照厂商的建议进行测定。

10 图 10 显示的是在本发明中使用还原后的劳氏紫的结果，该结果依据 7 次试验的数据得出。从图中观察到，细胞制备 12kD 片段的数据与用标准函数描述的体外对 tau-tau 结合的抑制非常吻合(即，观察结果与推导结果的相关系数>0.9)。为了获得这种吻合，需要作两个与其他细胞研究及体外研究的结果一致的假设: 1)tau 的细胞内浓度为约 500 nM; 2)tau-tau 结合的亲和力为 22 nM。使用这些假设，由标准抑制模型推测的细胞活性的函数为:

$$15 \quad \text{活性} = [\text{tau}]/([\text{tau}] \text{Kd} * (1 + [\text{劳氏紫}]/\text{KI}))$$

可通过标准的数值方法(numerical method)得出表观 KI 的一个数值。如图 20 所示，还原形式的劳氏紫的数值为 100 nM，与 tau 浓度为 500 nM 的条件下 tau-tau 体外结合观察到的数值基本相等，其中 tau-tau 结合的 Kd 值已知为 22nM。因此，劳氏紫的活性，读出的结果为来自全长 tau 的 12kD 截短产物的产量，可通过细胞内重复结构域发生的 tau-tau 结合的抑制程度定量解释。这确证了 tau-tau 结合程度决定细胞内 PHF 的对蛋白水解稳定的核心 tau 单元的产量。

25 其他化合物的全部后续的细胞分析也以同样标准化的格式报告，都同样假定细胞内的 tau 浓度(500 nM)和通过重复结构域的 tau-tau 结合亲和力(22nM)。

图 11 给出的是在略去了还原试剂的条件下的结果(即，图 10 中的氧化后的劳氏紫)。

另外再通过标准抑制模型推算细胞活性:

$$30 \quad \text{活性} = [\text{tau}]/([\text{tau}] \text{Kd} * (1 + [\text{Ox. Thio.}]/\text{KI}))$$

这种情况下，劳氏紫的表观 KI 值为 1200 nM。

这确证了二氨基吩噻嗪需要是还原形式才能有活性。从体外结合数据的分析得出了类似的结论(结果未显示)。

图 12 显示通过使用还原或部分还原条件, 细胞试验中的亚甲蓝的活性比体外试验中推算的活性高得多, 体外试验中分析的时程(1-2 小时)还不足以实现还原。

再次用标准抑制模型推算细胞活性:

$$\text{活性} = [\tau] / ([\tau] K_d * (1 + [\text{MB}]/\text{KI}))$$

细胞试验中, 亚甲蓝的表现 KI 值为 123 nM, 这一数值在与劳氏紫和托洛氯铵相同的范围内。如图 9 所示, 抑制 tau 聚集所需的相应的脑组织浓度 (即 B50 值) 为 2-3  $\mu\text{M}$ 。

图 13 给出的是还原后的托洛氯铵的相应细胞为基础的活性数据, 数据表明体外试验得出的推测 KI 值可用于描述细胞中来自全长 tau 的 12 kD 片段的产量。

通过标准抑制模型推算细胞活性:

$$\text{活性} = [\tau] / ([\tau] K_d * (1 + [\text{TC}]/\text{KI}))$$

这进一步确证了使用的数学分析方法的有效性。

图 14 表明与二氨基吩噻嗪结构上相关的 DH12(葱醌)在试验条件下是没有活性的。

图 15 和 16 给出的是与图 9-14 中类似的分析, 所不同的是分别为氯丙嗪和塔克林。使用同样的假定(tau 浓度为 415 nM, 以及 tau-tau 结合的 Kd 为 22 nM), 以及用标准抑制模型推算的细胞活性:

$$\text{活性} = [\tau] / ([\tau] K_d * (1 + [\text{cpz}]/\text{KI}))$$

氯丙嗪及塔克林的表现 KI 值(分别为 2117 nM 和 802 nM)大于体外试验预期值。

图 17 给出的是各种化合物在 DTT 存在的条件下各种化合物的还原程度。

图 18 给出的是 MB 还原的百分率相对于 MB: 维生素 C 之比的曲线。

图 19(a)表明通过设定组织浓度为 4 $\mu\text{M}$ (即 1.5  $\mu\text{g/g}$ ), 可从 DiSanto 和 Wagner(1972)的数据测定出要实现这一组织浓度所需的静脉剂量为 0.11 mg/kg。

图 19(b)给出的是向 70kg 受试者施用单次 100mg 剂量后 MB 的分布模

型, 假定是立即吸收。

图 20 概括了在 3T3 和 COS-7 细胞中瞬时表达 tau 片段的结果, 以显微镜实验和生化试验为基础。

重组 tau 片段在真核细胞中的表达按下述方法进行。在 3T3 细胞和  
5 COS-7 细胞中瞬时表达的 8 个 tau 构建体, 通过免疫细胞化学和免疫印迹测定。每一细胞类型中表达的程度以两组结果为基础半定量给出: -, 无可检测的表达; ±, 极弱的免疫反应活性; + ~ +++++, 递增的阳性免疫反应活性水平。在所有情况下, 使用 mAb 7.51 与每一构建体反应得到结果。此外用一系列抗 tau 蛋白不同结构域的抗体(mAbs 499, T14, Taul, 342, 7.51, 423 和 T46)测定每一构建体的特异性。Kozak 序列在前 6 个构建体中不存在, 但是存在于  
10 cDNA 构建体 7 和 8 中。

图 21 给出的是两种细胞系的 3T6 成纤维细胞中全长 tau 的诱导表达。T40.22 显示的是未诱导状态下("U")全长 tau 的低水平背景渗漏, 以及加入 IPTG(即诱导后 "I")后的高水平表达。T40.37 给出的情况相同, 但是在未诱导时表达水平更低。  
15

图 22 给出的是三载体系统的结果。将一个可低水平组成性表达 12 kD 片段的载体导入细胞系, 该细胞系中已经实现了全长 tau 的可诱导表达(实际上就是上述图 21 中所示的细胞系 T40.22)。将低水平的 IPTG 导入以诱导全长 tau 的表达。当 IPTG 为 0 $\mu$ M 时, 12 kD 条带的表达水平很低, 并且伴有全长 tau 的低水平“背景渗漏”表达。通过导入较高水平的 IPTG, 有越  
20 来越多的全长 tau 时, 更多的全长 tau 转化为 12 kD 类型。

图 23 显示的是还原后的劳氏紫的抑制作用。在每一组泳道中, 在诱导较高水平 T40 的浓度逐渐增大的 IPTG 存在下, 都诱导产生 12 kD 条带。随着劳氏紫浓度的增大, 由 T40 生成 12 kD 条带被抑制。

图 24 定量地显示了图 23 的结果。无劳氏紫存在时, 浓度渐增的 IPTG 对 T40 的诱导导致 12 kD 片段的产量相应增加。在 2  $\mu$ M 劳氏紫存在情况下, 仍然诱导 T40, 但是其不再转化为 12 kD 片段。  
25

图 25 对比显示了各种化合物的体外 KI 值, 单位为 nM。所述 KI 值与使用的具体试验条件有关(500:1 DTT: 化合物, 120 分钟, 见图 17)。

图 26 和 27 分别显示了具有 0, 2, 3 或 0, 4, 6 个甲基的吩噻嗪对 tau-tau 结合的抑制效果。  
30

图 28 显示的是用于检测测试化合物对 tau-tau 结合抑制的两个参数的获得。STB 是相对于在无化合物时的标准化的结合, 表示为 1 和 10 $\mu$ g/ml 时观察到的平均值。如 WO 96/30766 所述, 1.0 的 STB 值代表结合等同于无化合物存在时观察到的值, 而 0.2 的 STB 值则代表所述结合减少到为测试化合物浓度为 1 和 10 $\mu$ g/ml 时观察到的平均值的 20%。LB50 为下列比值 log 10 的对数: 即化合物: 相对于无化合物时水平 50% 的 tau-tau 结合的 tau(B50)。

图 29 显示了 STB 和 LB50 两参数之间的关系。

STB 可表示为 LB50 的线性函数。

STB 为当 tau-tau 的结合减少 50% 时, 化合物与 tau 摩尔比的对数函数。

10 LB50 为当 tau-tau 结合量减少至无化合物存在时水平的 50% 时化合物与 tau 摩尔比的对数

$$LB50 = 0.05 + (2.65 \times STB)r=0.95$$

体外 B50 的测定需要对 tau-tau 结合有一定程度的抑制, 50% 值可用外推法得到。STB 的测定则无需任何外推方法。

15 图 30 显示的是 STB 和 B50 值都已测定的化合物。假定细胞中的总 tau 浓度(即实验中使用的 tau 浓度)为约 500 nM, B50 值提供了体外试验中浓度的近似值(即 [500 x B50] nM), 在该浓度下细胞系统中可表现出期望的活性。

20 图 31 显示的是二氨基吩噻嗪系列的体外 LB50 值与 log KI 值之间的形式关系(formal relationship)。

图 32 显示了二氨基吩噻嗪(NMETH)中甲基数目与氧化还原能力(E)及扩散系数(DIF)之间的关系。斜体数字给出的是排除了 MB 后的相关系数(R)和 p 值。

25 图 33 显示的是实验测定的被还原的化合物的百分比与该化合物的已知还原能力之间的关系。所述还原能力可以预期观察到的二氨基吩噻嗪还原程度。

图 34a 表明化合物的抑制能力与还原程度之间无明显关系。图 34b 表明仅凭还原能力并不能测定出抑制能力。

30 图 35 表明抑制能力可与扩散系数直接相关(扩散系数是还原形式的堆积及聚集趋势的量度)。

图 36 和 37 分别显示了估计的 LB50("ESTLB50")和 STB("ESTSTB")

分别与还原能力和扩散系数之间的预期关系，其中所述的扩散系数被赋予更大的加权。

图 38 显示了亚甲蓝的晶体结构。

5 图 39 给出的是用 WO 96/30766 中的固相试验测定时，1mM DTT 存在条件下的 tau-tau 结合。两种不同的抗体被用来检测 tau-tau 结合，名称为 mAb 342(顶部)和 499(底部)。纵轴代表 tau-tau 结合，横轴代表含水相中全长 tau 的浓度，长框中显示固相 tau 的不同浓度。可以看出，tau-tau 结合在 DTT 存在时仍然发生。

10 图 40 显示了本发明细胞系无诱导("U")及有诱导("I")时出现的各种形式的 tau 片段及双联体(doublets)。这其中包括了迁移率等于 12/14 kD, ~25/27 kD, ~30/32 kD, ~36/38 kD 和 ~42/44 kD 的种类(见实施例 3)。

图 41(a)显示了 12 kD 片段在箭头所示位置如何由全长 tau 分子经模板诱导蛋白水解处理得到的过程。

15 图 41(b)显示了 25/27kD 种类片段如何在箭头所示位置由全长 tau 分子经模板诱导蛋白水解处理得到的过程。

图 42 为图 40-41 中的各种片段的表观凝胶迁移率相对于其氨基酸残基长度的曲线图。

20 图 43 显示图 40-42 中的片段之间间隔 34 个或 17 个残基，这等于单个 tau 重复单元或其一半的长度。当在箭头所示位置发生一组单一的蛋白水解切割时，所有这些片段都可从基本的七聚体聚集物产生出来。

图 44 将这些相同片段按长度降序和按聚胶迁移率升序排列。

图 45 表明 DMMB 在细胞模型中出人意料的强效。它的抑制活性在无 IPTG 诱导时以及诱导后都可以看到(见实施例 4)。

25 图 46 显示了 DMMB 对 12/14 kD 种类的基线表达的活性，使用与图 10-16 中所使用的同样的一组设定的细胞内 tau 浓度和体外 tau-tau 结合亲和力数值。

细胞活性由标准抑制模型推算：
$$\text{活性} = [\text{tau}] / ([\text{tau}] \text{Kd} * (1 + [\text{DMMB}] / \text{Ki}))$$

DMMB 在细胞内的表观 KI 值为 4.4 nM，细胞的 B50 值 ~100 nM。

30 实施例

常规材料及方法

### 3T6H 细胞系的制备

3T6 细胞是保藏号为 ECACC No: 86120801 的小鼠 Swiss Albino 胚胎成纤维细胞。

就可诱导系统而言, 试验使用来自 Stratagene 的 Lac Switch™, 在 Lac 抑制剂的调控下, 使用 p3'SS 载体表达 Lac 抑制蛋白以及用 pOPRSVICAT 表达全长 tau。加入 IPTG 诱导表达。

首先通过电穿孔, 用 p3'SS 质粒和用潮霉素(hygromycin)抗性筛选的克隆转染 3T6 细胞。将表达不同水平 Lac 抑制蛋白的(用免疫细胞化学测定)5 个克隆挑拣出来, 另外未-克隆的细胞留作对照。

### 10 pOPRSVT40 载体的制备

用 Vent 聚合酶(NEB)通过 PCR 方法制备要克隆入 pOPRSVICAT 载体的 T40 插入片段, 其中使用的引物(下文给出)中导入了一 NotI 位点和一合适的起始或终止密码子。用 NotI 切割 PCR 产物及 pOPRSVICAT 载体, 并纯化。

15 将所述载体去磷酸化以防止重-连接, 用标准方法将插入片段连接入载体。

将得到的连接混合物转染入感受态大肠杆菌细胞, 将细胞涂布在 amp 平板上。挑出克隆并涂布于一新的 amp 平板。挑出克隆加于 Hybond-N 0.45 $\mu$ m 尼龙膜(Amersham), 用( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP 标记的 dGA(Amersham)通过克隆杂交筛选出可能阳性的克隆(使用寡聚物标记试剂盒(Pharmacia Biotech), 在 Nap-10 柱(Pharmacia Biotech)上纯化)。

20 杂交在 Church 缓冲液中 65 $^{\circ}$ C 过夜, 然后用 Church 洗液洗涤 2x20 mins。被放射活性探针标记后的阳性克隆通过将印迹在 x-ray 胶片-70 $^{\circ}$ C 下曝光过夜的方法来检测。

25 选出阳性克隆并培养, 然后通过 PCR 及限制性消化的方法核实以确证插入片段的存在。克隆载体中使用单一的限制酶切位点, T40 可以任一方向插入载体。测定插入片段的方向, 从而选择出带有其中含有正确表达方向的包含 T40 的载体的克隆。

### 所用引物

30

5'-3' T40-Not I

起始

5'-gtc gac tct aga ggc ggc cgc ATG GCT GAG CCC CGG CAG GAG-3'  
Not I

5

3'-5' T40- Not I

终止

5'-act ctt aag ggt cgc ggc cgc TCA CAA CAA ACC CTG CTT GGC CAG -3'  
Not I

10

与 T40 序列互补的序列以大写字母表示，并且标出了起始及终止密码子。下划线标出了加入的 Not I 位点。用小写字母给出的其余序列部分是 13 个碱基对的突出端，这部分可使 Not I 酶实现充分切割。这段序列与 hTau40 质粒载体中的序列互补从而保证引物可以充分结合。

#### 15 测定插入片段的方向

用限制性酶测定方向，用该酶切割插入片段一次，切割载体最多几次，该酶可为每一方向给出不同的限制性消化模式。对于 pOPRSVT40 来说 Hind III 满足这些要求。如果没有插入片段，那么就出现两个酶切条带。如果有插入片段，那么就产生 3 个条带，条带的大小取决于插入片段的方向，如下列所示。

20

正(正确的方向)向 5385 bp 1030 bp 381 bp

反向 6101 bp 381 bp 314 bp

#### 制备在可诱导型启动子调控下表达 T40 的细胞

25 制备 pOPRSVT40 质粒，通过 CsCl 梯度离心纯化。将纯化后的质粒转染(通过电穿孔)入按上述方法制备的 3T6H 细胞(表达有 Lac 抑制蛋白)。筛选对 G418(浓度为 500 $\mu$ g/ml)有抗性的阳性细胞。挑出抗性克隆并培养。使用抗-tau 抗体通过免疫细胞化学及 Western 印迹两种手段测定有和无 IPTG 加入两种情况下全长 T40 的表达水平。

#### 制备 pZeo295-391

30 设计质粒 pZeo295-391 用来表达相应于 tau 截短片段(残基 295-391; 见下文)的蛋白。使用组成性的系统(来自 InVitrogen 的 pcDNA3.1,

Netherlands)-质粒赋予对抗生素 zeocin 的抗性。用聚合酶链反应(PCR)扩增该区域的 cDNA, 使用特异性的寡聚核苷酸引物(正义和反义, 见下文)。正义引物含有一 EcoRI 位点, 而反义引物含有一 BamHI 位点。将该片段亚克隆入 pcDNA3.1(-)zeo(Invitrogen, Netherlands), 该载体已经事先用 EcoRI 和 BamHI 切割。插入的 DNA 位于巨细胞病毒启动子序列的下游和聚腺苷酸化信号的上游。所述质粒中含有对于表达抗氨基青霉素抗性和抗 zeocin 抗性的序列, 这两种抗性可分别用于细菌和真核细胞的筛选。插入的 DNA 的真实性可通过对这两种条链全长测序来证实。

截短的 tau 片段 295-391 的核苷酸及氨基酸序列

10 gataatatcaaacacgtcccgggaggcggcagtggtgcaaatagtctacaaaccagttgacctgagca  
aggtgacctccaagtggtgctcattaggcaa  
catccatcataaaccaggaggtggccaggtggaagtaaaatctgagaagcttgacttcaaggacaga  
gtccagtcgaagattgggtccctggacaatat  
caccacgtccctggcggaggaaataaaaagattgaaaccacaagctgacctccgcgagaacgcc  
15 aaagccaagacagaccacggggcggag

DNIKHVPGGGSVQIVYKPVDL SKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVK  
SEKLDFKDRVQSKIGSLDNIT  
HVPGGGNKKIETHKLTFR ENAKAKTDHGAE

20 295 正义引物

met asp<sup>295</sup>

5' - CGG AAT TCC ACC ATG GAT AAT ATC AAA CAC GTC CCG - 3'  
EcoRI

25 391 反义引物

终止 glu<sup>391</sup>

5' - C GCG GGA TCC TCA CTC CGC CCC GTG GTC TGT CTT GGC - 3'  
BamHI

30

起始和终止密码子以黑体表示, 加入的 EcoRI 和 BamHI 限制性酶切位

点用下划线标出。

#### 用于分析的细胞的组织培养物

使用的培养基为来自 Life Technologies, Scotland 的 DMEM(加有 Glutamax I, 丙酮酸盐, 4.5g/l 葡萄糖)。其中添加 10% FCS(Helena BioSciences), 50 U/ml 青霉素, 50  $\mu$ g/ml 链霉素, 其他适于相关质粒筛选及维持的抗生素。抗生素浓度为 200  $\mu$ g/ml 潮霉素(p3'SS 筛选及维持), 500 $\mu$ g/ml G418(pOPRSVT40 的筛选及维持), 400 或 200  $\mu$ g/ml zeocin(pZeo295-391 的筛选及维持)。

将细胞培养于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿环境下。将细胞维持在 10cm 的培养皿, 接近铺满时分开。除去培养基, 用 PBS 洗涤细胞, 用 1 ml 胰蛋白酶/EDTA 溶液/ 10cm 培养皿胰蛋白酶化释放细胞。将细胞按 1:10 稀释重悬于新鲜的培养基中, 或者任选地稀释范围为 1: 5 ~ 1: 20(约 5000 ~ 20000 个细胞/cm<sup>2</sup>)。

就药物的测试而言, 将细胞以初始浓度平铺于 6 孔或 24 孔平板, 该浓度可保证细胞在 24 小时内达到 50-80% 的汇合程度。将各种浓度的药物加入孔中, 加入 0-50 $\mu$ M 的 IPTG 诱导全长 tau 的表达。细胞继续培养 24 小时, 然后收集用于 SDS PAGE/Western 印迹分析。

#### 制备 tau 蛋白

制备重组 tau(克隆 htau40)以及从大鼠和人脑中提取的高氯酸可溶的 tau, 按照此前描述的方法(Goedert, M. & Jakes, R.(1990)EMBO J. 9: 4225; Goedert, M. et al(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5066)。

#### 凝胶电泳及印迹

将上述细胞用 PBS 洗涤一次, 然后用 50 $\mu$ l(24 孔板)或 100 $\mu$ l(6 孔板)laemli 缓冲液裂解细胞。将样本保存于 -20 $^{\circ}$ C, 煮沸 4 分钟后在 15% 丙烯酰胺凝胶上电泳, 使用 BioRad miniProtean III 微型凝胶系统。用 CAPs 缓冲系统通过 Western 印迹将蛋白转移至 PVDF 膜上。将该膜在封闭缓冲液中(含 5% 脱脂奶粉(Marvel), 0.1% Tween 20 的 PBS)孵育 1 小时至过夜。通过下述方法检测蛋白: 将膜用经封闭缓冲液 1: 5 稀释后的 mAb 7.51 孵育 1-3 小时或过夜, 用 PBS/0.1% Tween20 洗涤孔, 用经封闭缓冲液 1: 5000 稀释后的抗-小鼠 HRP 孵育 1 小时, 然后用 PBS/0. 1% Tween20 洗孔。在 ECL hyperfilm(Amersham)上通过 ECL 反应对结合后的抗体进行检测。

将印迹用 Hewlett Packard Scanjet 6100C flatbed 扫描仪以 600dpi 扫描入电脑, 并保存为 tiff 文件。用扫描分析程序在 Apple Power Mac G3 上对 T40 和 dGAE 条带进行密度计量学分析。

#### 药物制备

- 5 劳氏紫, 亚甲蓝, DMMB, 和托洛氯铵都用双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)配制成 1 mM 的原液。使用前用 HBSS 制备 100 $\mu$ M 的稀释液, 可直接加入细胞的培养基中。

对于氧化后的药物而言, 只需要通过用 HBSS 稀释 1mM 的原液然后过滤灭菌就可制备而成。

- 10 对于还原后的药物而言, 用抗坏血酸和 DTT 处理 1mM 得到 0.5mM 的药物, 50mM 抗坏血酸 50mM DTT, 这要求在制备稀释液之前放置 15 分钟(将蓝色变为无色)。用 HBSS 对其进行稀释得到 100  $\mu$ M 的药物, 10mM 抗坏血酸, 10 mM DTT, 然后过滤除菌。用各种浓度的药物处理细胞, 但是对于还原后的药物而言, 抗坏血酸和 DTT 浓度始终保持为 400 $\mu$ M, 这通过使用
- 15 合适量的 100 $\mu$ M 还原的原液, 100 $\mu$ M 氧化的原液以及 10 mM 抗坏血酸 /DTT 原液来实现。

#### SDS 凝胶电泳及免疫印迹

- 按照此前描述(Wischik, C. M. et al.(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4506; Novak, M., et al.(1993)EMBO J. 12: 365; Jakes, R. et al.(1991)EMBO J. 10: 2725)使用常规电泳及免疫印迹方法。免疫印迹用 ABC 试剂盒(Vector Laboratories)显色。单克隆抗体(mAbs)7.51, 21.D10, 499 和 342 使用未经稀释的杂交瘤培养物上清液。mAb AT8(Innogenetics, Belgium)使用 1/1000 的稀释液。抗-tau mAb 7. 51(该单抗识别最后一个重复单元中的表位;见 Novak, M. et al.(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5837), 423(该单抗识别在残基
- 20 Glu-391 处 C-末端截短的 tau ;见 Wischik, C. M. et al.(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4506; Novak, M. et al.(1993)EMBO J. 12: 365), 499(该单抗识别残基 Gly-14 与 Gln-26 之间的节段; 见 Wischik, C. M. et al.(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11213), 和 342(该单抗识别残基 Ser-208 与 Pro-251 之间的节段)。mAb 21.D10 是用 A68-tau 脑提取物制备的(Lee, V. M.-Y. et
- 25 al.(1991)Science 251: 675)。
- 30

#### Tau 结合试验

该试验基本上按照 Wischik, C. M., et al.(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11213 中所述的方法进行。在 50 mM 的碳酸盐缓冲液中用固相 tau 液 (0-20 $\mu$ g/ml)包被 96-孔聚(氯乙烯)微量滴定板 37 $^{\circ}$ C 1 小时。用 0.05% Tween 20 洗板两次, 然后用含 2% Marvel 的 PBST 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时。再次洗涤后, 5 用水相 tau(含 tau 0-300  $\mu$ g/ml 的 PBST, 其中还含 1%明胶)37 $^{\circ}$ C 孵育板 1 小时。本申请中, 另外再加入 1mM DTT。

洗板两次, 用经等体积含 2% Marvel 的 PBST 稀释后的 mAb 499 或 342 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗涤后, 用偶联有辣根过氧化物酶的山羊-抗-小鼠抗体 (含 1/1000 该抗体的 PBST)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板, 然后用含四甲基联苯胺和 10  $H_2O_2$  的底物溶液孵育, 用 Vmax 平板阅读仪(Molecular Diagnostics, California) 测量吸光度变化的速率, 按照此前描述的方法(Harrington, C. R. et al.(1990)J. Immunol. Meth. 134: 261)。每一试验都作平行三份, 并且设有对照, 既有固相和液相 tau 都不加入的对照, 另外还有加入二者其中之一的对照。

#### 数据分析

15 数据分析按照 Wischik et al.(同上)描述的方法进行, 根据 Langmuir 方程拟合曲线, 用 Kaleidagraph(Synergy, Philadelphia)或 Systat(SPSS Inc., Chicago) 程序使用 quasi-Newton 近似值。曲线-拟合(curve fitting)相关系数也在图中给出。

#### 实施例 1-全长、截短、及突变型 tau 的组成性表达

20 寻求真核细胞系中的 tau 表达, 以在生理条件下 tau 聚集的细胞模型, 该模型不受脂质为基础的方法限制。其涉及正常 tau 和带有病理突变的 tau 的全长 tau 及截短 tau 片段的表达。

#### 全长 tau

25 当将正常的全长 tau(T40)转染入细胞(3T3 和 NIE-115)时, 其得以表达并参与细胞中微管系统的组装。

#### 截短的 tau

30 首先, 来自 PHF 核心的截短 tau 片段(对应于片段 297-391)的 cDNA 转染入非神经元的 3T3 成纤维细胞: 之所以选择这种截短的 tau 是由于其(i) 存在于 PHF-核心; (ii)在疾病早期阶段的 AD 脑组织中检测到其沉积物;(iii) 能够支持体外的催化性俘获及 tau 俘获的增殖。然后, 进行一系列的转染, 其中在 N-或 C-末端的截短程度各不相同, 部分根据所述 tau 分子的免疫化

学特性。制备 N-末端(186-441 ; 297-441)、C-和 N-末端(186-391 ; 297-391)以及 C-末端(1-391)截短的 6 种构建体。这 6 种构建体与一组抗体表现出的免疫反应活性模式可对所有用这种方式制备的 tau 片段进行区别。

所述构建体可在真核细胞中瞬时表达(用 pSG5 作载体)和稳定表达(用 pIF2 和 pZeo 作载体)。对于 pIF2 和 pZeo 而言,可分别根据对抗生素(geneticin)遗传霉素和 zeocin 的抗性筛选稳定的转染体。用 pRK172 载体对细菌表达蛋白进行表位分析。图 20 概括了 3T3 和 COS-7 细胞中各种片段的的结果。另外的结果表明:两种形式的 tau 在同一种细胞中表达能影响免疫反应活性的模式。例如, 1-391 和 295-391 的稳定表达导致细胞中出现异常的束状物(bundles)。但是, 将所述细胞保持在稳定且可繁殖状态是很难做到的。

#### 突变的 tau

对全长 tau 进行突变来制备已知的临床用变体。将这些变体亚克隆入 pIF2 并在 3T3 和 NIE 细胞中制备用于制备大量突体的稳定转染子, 所述突变包括影响 tau 微管组装特性的突变(G272V, V337M, P301 S, R406W)和能影响 tau 基因体内选择性拼接的突变 S305N。通常, 表达带有突变的全长 tau 的细胞显示微管系统的标记(labeling)且与用野生型 tau 转染的细胞无法区分。表达某些截短的 tau 片段(包括突变体)的细胞系是不稳定的。

#### 结论

总之, 在真核细胞中组成性表达截短的 tau 被证明是难以实现的。尽管瞬间表达系统通过在 297-tau 的起始密码子周围设置 Kozak 共有序列可以优化 tau 的表达, 但是例如 297-391 的表达仍然是不多, 这显示了该片段的一些固有的毒性。稳定转染重复验证了这一结论。后一种表达系统表明 N-或 C-末端截短可使 tau 以无定形沉积物组装的趋势略强于以微管系统组装的趋势。tau 片段的组合的稳定表达也在细胞的胞浆中生成聚集物, 但是该系统不易复制。

#### 实施例 2-截短 tau 的可诱导表达

有期望创建一种稳定、可复制且无与组成性表达相关的毒性的系统时, 尝试了进行 PHF 核心-tau 片段(即 297-391-大小为 12 kD)的可诱导表达。

对可用于真核细胞蛋白表达的数种可诱导系统进行了试验, 尽管优选的系统为"lac 切换(switch)"系统。在该系统中, 两种载体引入细胞, 通常为 3T3 或 3T6 成纤维细胞, 这些细胞不表达任一内源性 tau 蛋白。第一载体

p3'SS 编码 lac I 基因的组成性表达, 基因表达子则根据潮霉素抗性来进行筛选。第二载体 OPRSVICAT 将编码 tau 蛋白片段的 DNA 置于强 RSV 启动子的调控之下, 该启动子含有来自 Lac 操纵子的操纵基因序列。引入该载体的细胞可根据新霉素抗性筛选。这两种载体都引入的细胞具有下述特性:

- 5 lac I 的组成性表达可阻止被引入到 Lac 操纵子调控下的被引入的蛋白(即 tau)的表达。加入糖 IPTG 与 lac I 竞争结合 Lac 操纵子, 从而使 tau 蛋白得到表达。

用两种细胞系实施 12 kD 片段的诱导表达。直到用 IPTG 处理 3 天后, 这些细胞系才表现出合适水平的 tau 蛋白表达, 在这一阶段高水平的 12 kD  
10 突然出现, 形成细胞内聚集物, 迅速杀死细胞。如预期的那样, 聚集过程从低水平表达到毒性聚集物的突然积聚为非-线性进程, 无明显的梯度, 这使得聚集和毒性都不可能得到控制。因此这种非-线性进程阻止了对该系统的合适调控。

#### 实施例 3-tau 在本发明所述稳定细胞系中的表达

- 15 基于上述结果, 使用另一种系统, 如下所述。

组织培养细胞系 DH 19.4.1.4 及其克隆建立在 3T6 细胞(ECACC No: 86120801 Mouse Swiss Albino 胚胎成纤维细胞)基础上, 该细胞在可诱导启动子调控下表达全长四重复单元的人 tau 以及在组成性启动子调控下表达截短的人 tau(295-391)。

- 20 在可诱导启动子调控下表达 T40 的细胞 T40.22.10 用 pZeo295-391 质粒转染(通过脂质体转染)。筛选对 400 $\mu$ g/ml zeocin 具有抗性的阳性细胞。截短的 tau 在全长 tau 可诱导表达的背景下的表达可用 Mab 7.51 通过 Western 印迹分析来证实。

图 21 表明全长人 tau 的可诱导表达仅出现在两种细胞系中的 3T6 成纤维细胞中。T40.22 在未诱导状态("U")下显示了全长 tau 的低水平背景渗漏  
25 (leakage), 加入 IPTG(即诱导, "I")后出现高水平的表达。T40.37 表现出相同, 但是在未诱导时的表达水平更低。图 22 给出的是三载体系统的结果。将能以极低水平组成性表达 12 kD 片段的细胞导入已经实现了全长 tau 可诱导表达的细胞(图 21 所示的 T40.22)。图 22 显示的是当导入低水平 IPTG 诱导全长 tau 表达时发生的情况。在 0 $\mu$ M IPTG 时, 表达极低水平的 12 kD 条带以及全长 tau 的低“背景渗漏”表达。随着导入的 IPTG 水平的升高诱导产生  
30

的全长 tau 逐渐增多, 其中越来越多的全长 tau 被转化为 12 kD 类型, 同时产生更多的较高分子量片段的中间体(更为详细的描述见图 43 和 44)。

原始的 T40-诱导细胞系(T40.22.10)中不含有用于组成性表达 12 kD 片段的载体, 对该细胞系的测试表明: 12 kD 类型不会作为全长 tau 诱导的截短副产物生成。T40 被诱导后 12 kD 条带表达量升高, 这种情况只出现于在表达前就有少量 12 kD 片段存在的细胞(DH19.4.1.4.6)。也就是说, 预先存在的 12 kD 为诱导全长 tau 后更多的 12 kD 的生成提供了模板。另外的双联体在细胞未被诱导时(例如, 在命名为 DH 19.4.1.4A. B2 的细胞系中)也可出现, 其表观凝胶迁移率为 ~25/27 kD。在用 IPTG 诱导后, 出现了另一系列双联体, 凝胶迁移率为 ~30/32 kD, ~36/38 kD 和 ~42/44 kD。

这些类型在图 40 中无诱导("U")和诱导("I")后两种情况下都显示。另外, 还给出了这些片段与 mAb 342 和 C-末端多克隆抗体 T46 的免疫反应活性模式, 该多克隆抗体识别位于残基 Ser422 和 Leu441 之间的表位。

未诱导状态时所见片段的衍生(即 12/14 kD 和 25/27 kD)可参照图 41 解释。

图 41(a)显示了 12 kD 片段如何在箭头所示位置由全长 tau 分子经模板诱导蛋白水解处理得到的过程。

就 25/27 kD 类型而言, 这些片段不代表 12/14 kD 类型的二聚体, 因为这些片段针对 T46 有免疫反应活性。因此, 全长聚集 tau 蛋白其他蛋白水解产物必须通过在图 41(b)约箭头所示的位置处切割产生。

诱导后(图 40, I), 出现了另外一系列的双联体。这些更多的片段的产生过程可参照 42-44 得到更好的理解。

图 42 为这些片段的表观凝胶迁移率相对于其氨基酸残基长度的曲线图, 该图表明: 可以根据片段的长度特征理解表观凝胶迁移率。

如图 43 所示, 所有这些片段都间隔 ~34 个残基或 ~17 个残基, 这相当于单个 tau 重复单元或其长度的一半。因此, 生成的所有片段都可理解为由图中所示基本七聚体聚集物(basic heptameric aggregate)在图 43 箭头所示位置发生一组蛋白水解切割生成的。该图中, 所述片段是由于在所述聚集物任意一端箭头所示的 3 个可能的大概位置一起全都发生切割而生成的。与同这些片段相关的 mAb 342 及 T46 之间相应的预测免疫反应模式也以制表的形式给出。

图 44 将这些相同片段按长度降序和按聚集迁移率升序排列。尽管为方便起见所述七聚体聚集物表示为完全由全长 tau 分子生成,但是应该理解到的是: 12/14 kD 片段也可插入所述聚集体,代替其中一些结合成分,这些短片段纳入所述聚集体的确切模式决定来自全套产物的哪一种确切的片段在特定情况下占主导地位。

因此,该家族蛋白水解片段的生成更应该理解为能在细胞中以各种方式例示的全部可能产物。

#### 实施例 4. 化合物对蛋白水解片段生成的抑制作用

在已经创建出一种能在其中对 12 kD 片段(及其他类型)的生成进行调控的稳定细胞系后,用该模型测试还原后的劳氏紫的抑制作用。该试验如图 23 所示。在每一组泳道中,在诱导 T40 水平升高的浓度逐渐增大的 IPTG 存在下,都诱导产生 12 kD 条带。随着劳氏紫浓度的增大,由 T40 生成 12 kD 条带过程被抑制。这种作用被定量地显示于图 24。无劳氏紫存在时,浓度渐增的 IPTG 对 T40 的诱导导致 12 kD 片段的产量相应增加。在 2 $\mu$ M 劳氏紫存在情况下,仍诱导 T40,但是不再转化为 12 kD 片段。

由于还原型劳氏紫本身有毒,所以劳氏紫水平较高时需要用相应剂量的 IPTG 诱导 T40 水平的降低。这一点可以通过测定 12 kD: T40 之比实现,这样就可以计算出全程 IPTG 水平得到数据的平均值,并显示 12 kD 的水平相对于全长 tau 呈剂量-依赖性降低。

T40/12 kD 试验中各种化合物的活性显示于图 9 ~ 16。

结果表示为在下述条件下用 IPTG(0, 10, 25, 50  $\mu$ M)处理细胞诱导全长 tau(T40)后的 12 kD: T40 之比:在有还原剂(200 RM DTT/抗坏血酸盐)存在时以所示浓度导入劳氏紫或托洛氯铵的条件下,或者在没有还原剂存在时导入氯丙嗪或塔克林的条件下。可以看出,劳氏紫和托洛氯铵产生基本相同的抑制,而氯丙嗪和塔克林在同样浓度范围内则无抑制作用。在对照试验中测试还原剂单独存在时的作用,显示在仅有还原剂存在的情况下 12 kD: T40 之比方面差异不显著。

产生较高分子量降解产物的细胞系的特性也用 MB 和 DMMB(二甲基亚甲蓝)测试了。

从图 45 可以看出,DMMB 在该细胞模型中表现出出人意料的效力。其抑制活性在无 IPTG 诱导及诱导后都可看到。用 1 $\mu$ M DMMB 处理有效地

破坏了细胞中所有的降解产物。继续用 MB 和 DMMB 处理表明 12/14 kD 类型的表观基线产量主要由聚集决定。也就是说, 295-391 片段的组成性产量本身或者低于免疫印迹的检测水平, 或者通过自发聚集被稳定化从而在细胞内达到可被免疫印迹检测的水平。替代地, 无 IPTG 诱导以及未经 tau-聚集抑制剂处理时所观察到的 12/14 kD 片段表观基线水平, 本身取决于未诱导时生成的渗漏水平的 T40 的模板依赖性聚集产量。决定基线条件下 12/14 kD 片段水平的因素无论如何组合, 都可以通过有效的聚集抑制剂如 DMMB 来基本消除该片段的表观表达, 连同较高分子量的聚集产物。这些结果进一步确证了较高分子量蛋白水解片段(即 30/32, 36/38, 42/44 kD)的生成还取决于通过重复结构域发生的必不可少的 tau-tau 结合相互作用, 如图 41, 43 和 44 所示。

图 46 显示了 DMMB 对 12/14 kD 形式基线表达的活性, 使用与图 10-16 中所使用的同样的一组设定的细胞内 tau 浓度和体外 tau-tau 结合亲和力值。这种情况下, 发现 DMMB 的细胞内表观 KI 值为 4.4 nM, 细胞 B50 值为 ~ 100 nM。这表明 DMMB 在细胞环境中是高效的。

#### 实施例 5-比较还原型化合物和氧化型化合物的抑制作用

将体外数据使用的数学模型用于分析测试物质在 T40 : 12kD 细胞试验中的效果。使用来自体外的 Kd 和 KI 的已知数值, 用所示表达解释全长 tau 的胞内浓度(见, 例如, 图 10)。

发现该浓度约 500 nM, 这一浓度在脑及细胞系统 tau 试验的预期范围内。取得了与试验数据良好的拟合, 表明对于一些化合物来说, 对细胞内截短 tau 生成的抑制可以从体外实验测定的近似 Kd 和 KI 值中推算出来。

#### 实施例 6-二氨基吩噻嗪的抑制特性的测试

在体外实验中, 鉴定到的对 tau-tau 结合活性最高的抑制剂是二氨基吩噻嗪的还原形式, 带有 0, 2 或 3 个甲基。图 25 给出了这些化合物的还原形式。相应的 tau-tau 结合曲线作为 tau 摩尔比的函数形式图示于图 26 和 27。如图示, 当化合物:tau 'AMR' 摩尔比(横轴上对数标度所示)为 3:1-4:1 时, "去甲基系列" 化合物(0, 2 或 3 个甲基)抑制大约 50%的 tau-tau 结合(纵轴所示)。对于这组化合物, 抑制 50% tau-tau 结合所需的平均摩尔比为 4:1。

具有 4 或 6 个甲基("甲基化的基团")的二氨基吩噻嗪具有双重作用, 较低浓度下增加 tau-tau 的结合, 高浓度下抑制 tau-tau 结合(图 27)。因此, 这

些化合物要实现 tau-tau 结合的 50%抑制需要高得多的摩尔比。

对二氨基吩噻嗪化合物的其他特性也进行了测试。发现将杂环氮原子或硫原子取代会严重破坏化合物的抑制效力。类似地，发现去除二氨基也会破坏抑制活性。由此明显可见，二氨基和杂环 NB 和 S-结构是所述分子具有抑制 tau-tau 结合活性的关键所在。

为了比较，将两种方法用于测定 tau-tau 试验中的抑制活性：STB 是 tau 为常规浓度 488 nM 情况下化合物浓度为 1 和 10 $\mu$ g/ml 时观察到的平均 tau-tau 结合；LB50 为 tau-tau 结合出现 50%抑制时化合物与 tau 之间摩尔比的 log<sub>10</sub> 的对数(图 28)。如图 29 所示，对于一系列化合物而言，STB 和 LB50 值之间有强的相关关系，而氯丙嗪和核黄素是两个例外(也可参见图 30 和 31)。

#### 实施例 7-抑制活性和扩散能力

图 32 显示了测试化合物中甲基数目(NMETH)与氧化还原能力(E)及扩散系数(DIF)之间的相关关系。所有比较中，都使用 Spearman 秩相关。如图 32 所示，甲基数目(NMETH)与还原能力之间的强反比关系只有在将亚甲蓝排除在外才能看出来(正常形式：包括亚甲蓝的相关值；斜体形式：排除了亚甲蓝后的相关值)。

这表明亚甲蓝具有相对于该系列中甲基数目(NMETH)不成比例的高还原能力。另外，在甲基数目与扩散系数间也存在强的正相关关系(DIF, 图 32)。

如同甲基数目与还原能力之间无可见相关(图 33)，令人奇怪的是还原能力与抑制能力之间也无可见相关(图 34b)，尽管二氨基吩噻嗪在试验条件下的还原程度与还原能力高度相关(图 33)。实际上，这些化合物的还原程度与抑制能力间不相关(图 34a)。另一方面，化合物的抑制能力与其扩散系数间呈强反相关，当给扩散系数赋予更大的加权时可以从还原系数和扩散系数的线性函数推算出近似的 LB50 和 STB 值(图 35, 36 和 37)。当 NMETH 值最大为 3 包括 3 时 LB50 和 STB 值一律都很低，但是 NMETH 值升高时(具体为亚甲蓝, NMETH=4)，表现出了与甲基数目不成比例的低抑制能力。这可能涉及甲基的对称取代，这会干扰该分子的堆积能力，如同用扩散系数计算一样。这一点可以从，例如亚甲蓝的晶体结构(见图 38)中看出来。二氨基吩噻嗪分子基本上是扁平的，形成堆积的阵列。分子中电荷的存在，如氧化后的形式中那样，会阻止所述堆积阵列的形成，正是该化合物还原后

形式形成所述堆积关系的倾向决定了该系列的抑制能力。

5 本发明人进行了这样的试验：测定水-相中全长 tau 与固相中截短的重  
复结构域片段的结合情况，详细描述见 W096/30766。上述结合用 mAb 342  
或 mAb 499 检测。如图 39 所示，在常用还原剂二硫苏糖醇极过量(DTT, 1 mM)  
情况下出现了典型的 tau 浓度-依赖性 tau-tau 结合。但是，在上述试验常规  
配置中吩噻嗪在 DTT(1 mM)存在时也表现出抑制活性(即，STB 和 LB50 的  
数据)。因此本发明人得出结论：抑制活性不能归因于 DTT 本身，而应当归  
因于由于过量 DTT 存在出现了还原后形式的吩噻嗪。

10 总之，本发明人在本申请中提供了一种有效的显著改进的系统，用于  
治疗和预防如阿耳茨海默氏病等疾病，所述疾病中蛋白经历了诱导的构象  
多聚化，例如，如同通过病理性 tau-tau 结合解释阿耳茨海默氏病那样。本  
申请的重要教导，即化合物的扩散系数在决定其对这种诱导的构象蛋白多  
聚化抑制能力上起重要作用，大大有助于增进对阿耳茨海默氏病等疾病的  
15 认识及治疗能力。最后，发现 MB 还原后的形式为优选形式，而且其浓度  
在基本上低于单纯根据体外数据推算出的浓度时在细胞试验中表现出活  
性，将上述两发现结合在一起，本发明人认为这种化合物，以及其他类似  
化合物，可以用作合适的还原性制剂，用于预防或治疗 AD 及相关病症。

#### 参考文献

20 Abrahamson, M., Jonsdottir, S., Olafsson, I. & Grubb, A.(1992)  
Hereditary cystatin C amyloid angiopathy identification of the  
disease-causing mutation and specific diagnosis by polymerase chain reaction  
based analysis. Human Genetics 89, 377-380.

25 Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinson,  
W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E.,  
Blake, C. C. F. & Pepys, M. B.(1997)Instability, unfolding and aggregation  
of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. Nature 385,  
787-793.

30 Carrell, R. W. & Gooptu, B.(1998)Conformational changes and  
disease-serpins, prions and Alzheimer's. Current Opinion in  
Structural Biology 8, 799-809.

Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M.,

- Ramponi, G. & Dobson, C.(1999)Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 96, 3590-3594.
- Czech, C., Tremp, G. & Pradier, L.(2000)Presenilins and  
5 Alzheimer's: biological functions and pathogenic mechanisms. Progress in Neurobiology 60, 363-384.
- Davis, R. L., Shrimpton, A. E., Holohan, P. D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G. H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L. M., Lacbawan, F., Krasnewich, D., Muenke, M., Lawrence, D. A., Yerby,  
10 M. S., Shaw, C.-M., Gooptu, B., Elliott, P. R., Finch, J. T., Carrell, R. W. & Lomas, D. A.(1999)Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. Nature 401, 376-379.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P. & Aronin, N.(1997)Aggregation of huntingtin in neuronal  
15 intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. Science 277, 1990-1993.
- Dische, F. E., Wernstedt, C., Westermark, G. T., Westermark, P., Pepys, M. B., Rennie, J. A., Gilbey, S. G. & Watkins, P. J.(1988) Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in  
20 a diabetic patient. Diabetologia 31, 158-161.
- Gasset, M., Bladwin, M. A., Lloyd, D. H., abriel, J.-M., Holtzman, D. M., Cohen, F. E., Fletterick, R. & Prusiner, S. B.(1992)Predicted a-helical region of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 89, 10940-10944.
- 25 Glenner, G. G. & Wong, C. W.(1984)Alzheimer's: initial report of the purification and characterisation of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochemical and Biophysical Research Communications 120, 885-890.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L.,  
30 Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak

- Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. & Hardy, J.(1991)Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's. *Nature* 349, 704-706.
- Gorevic, P. D., Casey, T. T., Stone, W. J., DiRaimondo, C. R., Prelli, F. C. & Frangione, B.(1985)b-2 Microglobulin is an amyloidogenic protein in man. *Journal of Clinical Investigation* 76, 2425-2429.
- Gustavsson, A., Engstrom, U. & Westermark, P.(1991)Normal transthyretin and synthetic transthyretin fragments form amyloidlike fibrils in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 1159-1164.
- Hutton, M., Lendon, C., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R. C., Stevens, M., de Graaf, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J. M., Nowotny, P., Che, L. K., Norton, J., Morris, J. C., Reed, L. A., Trojanowski, J. Q., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P. R., Hayward, N., Kwok, J. B. J., Schofield, P. R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B. A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. & Heutink, P.(1998)Association of missense and 5'splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.
- Johansson, B., Wernstedt, C. & Westermark, P.(1987)Atrial natriuretic peptide deposited as atrial amyloid fibrils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148, 1087-1092.
- Lomas, D. A., Evans, D. L., Finch, J. T. & Carrell, R. W.(1992)The mechanism of Z al-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 357, 605-607.
- Maury, C. P. & Baumann, M.(1990)Isolation and characterization of cardiac amyloid in familial amyloid polyneuropathy type IV(Finnish): relation of the amyloid protein to variant gelsolin.

- Biochimica et Biophysica Acta 1096, 84-86.
- Paulson, H. L.(1999)Human genetics'99 : trinucleotide repeats.  
American Journal of Human Genetics 64, 339-345.
- Pepys, M. B., Hawkins, P. N., Booth, D. R., Vigushin, D. M., Tennent,  
5 G. A., Soutar, A. K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C. C. F., Terry,  
C. J., Feest, T. G., Zalin, A. M. & Hsuan, J. J.(1993)Human lysozyme gene  
mutations cause hereditary systemic amyloidosis. Nature 362, 553-557.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia,  
A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R.,  
10 Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A.,  
Papaetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C.,  
Di Iorio, G., Golbe, L. I. & Nussbaum, R. L.(1997)Mutation in the  
a-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.  
Science 276, 2045-2047.
- 15 Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J. & Cohen, F. E.(1998)  
prion protein biology. Cell 93, 337-348.
- Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H. X.,  
Hung, W. Y., Kato, T. & Asayama, K.(1996)Intense superoxide dismutase-1  
immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic  
20 lateral sclerosis with posterior column involvement. Journal of Neuropathology  
and Experimental Neurology 55, 481-490.
- Sletten, K., Westermarck, P. & Natvig, J. B.(1976)Characterization of  
amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid.  
Journal of Experimental Medicine 143, 993-998.
- 25 Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M. &  
Goedert, M.(1998)a-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies  
from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies.  
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95, 6469-6473.
- Uemichi, T., Liuepnicks, J. j. & Benson, M. D.(1994)Hereditary renal  
30 amyloidosis with a novel variant fibrinogen. Journal of  
Clinical Investigation 93, 731-736.

- 
- Westermarck, P., Engstrom, U., Johnson, K. H., Westermarck, G. T. & Betsholtz, C.(1990)Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 87, 5036-5040.
- 5 Westermarck, P., Johnson, K. H., O'Brien, T. D. & Betsholtz, C.(1992) Islet amyloid polypeptide-a novel controversy in diabetes research. Diabetologia 35, 297-303.
- Westermarck, P., Johnson, K. H. & Pitkanen, P.(1985)Systemic amyloidosis: A review with emphasis on pathogenesis. Applied
- 10 Physiology 3, 55-68.
- Wischik, C. M., Novak, M., Thgersen, H. C., Edwards, P. C., Runswick, M. J., Jakes, R., Walker, J. E., Milstein, C., M., R. & Klug, A. (1988)Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer's. Proceedings of the
- 15 National Academy of Sciences, USA 85, 4506-4510.

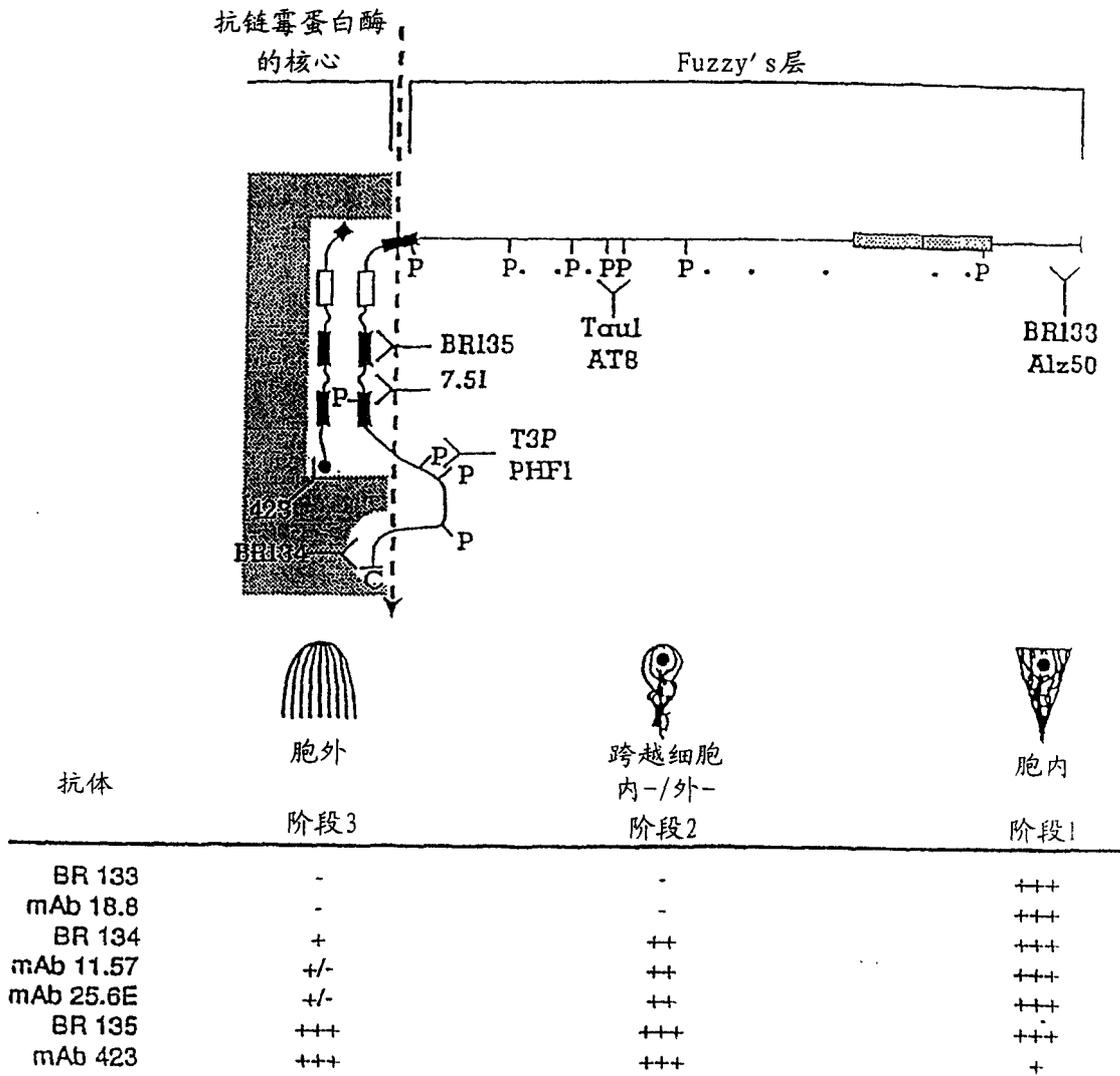


图 1

阿耳茨海默氏病中膜蛋白参与启动tau的俘获

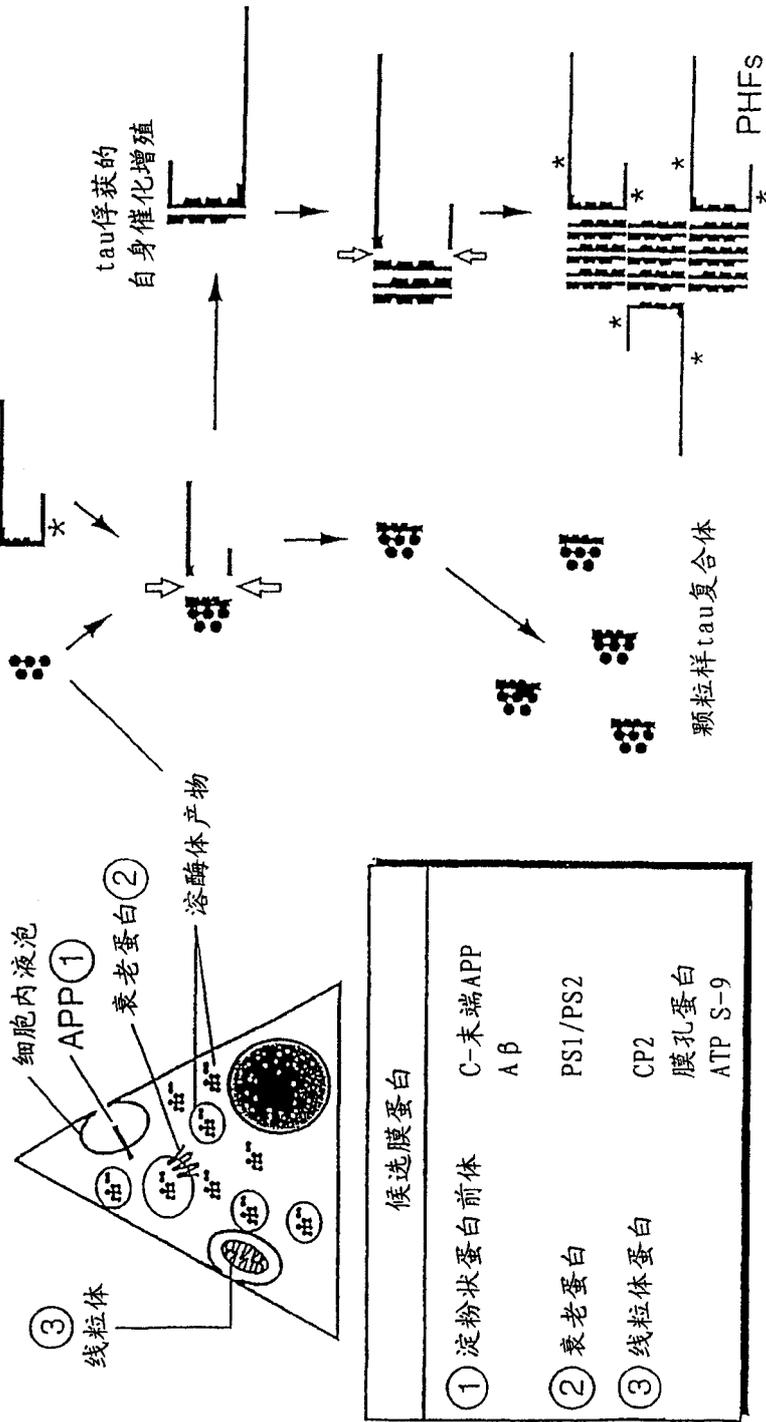


图 2

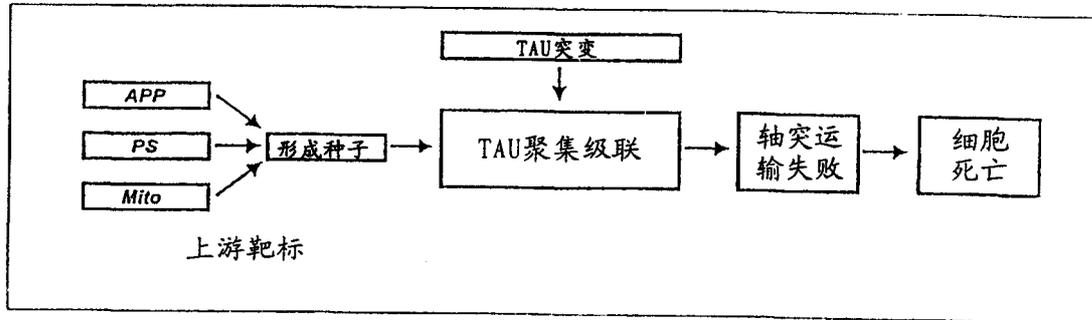


图 3

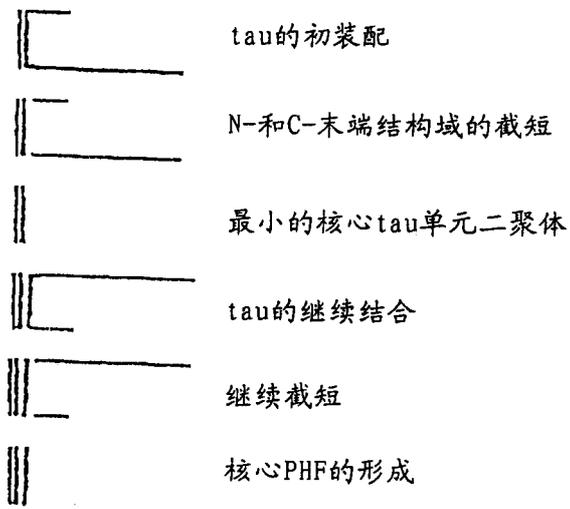


图 4

蛋白聚集疾病

蛋白质	疾病	聚集的结构域和/或突变	原纤单元的亚大 (kDa)	参考文献
神经变性疾病	神经变性疾病		27	Prusiner(1998)
感染性蛋白质	感染性蛋白质疾病 (CJD, nvCJD, 致死性家族性失眠, Gerstman-Straussier-Scheinker 综合症, Kuru)	遗传性的和散发性形式 PrP-27-30; 多突变血纤蛋白原结构域; 113-120, 178-191, 202-218		Gasset et al.(1992)
Tau 蛋白	阿耳茨海默氏病, 唐氏综合症, FTDP-17, CBD, 脑炎后帕金森神经功能障碍, 皮克病, Guam 帕金森-痴呆复症	遗传性的和散发性形式 截短的 tau (微管蛋白-结合结构域) 297-391 FTDP-17 中的 tau 突变 衰老蛋白中的多个突变	10-12	Wischik et al.(1988) Hutton et al.(1998) Czech et al.(2000)
淀粉样 β-蛋白	阿耳茨海默氏病, 唐氏综合症	遗传性的和散发性形式 淀粉样 β-蛋白; 1-42 (3); 罕见家族 APP 中的 11 处突变	4	Glenner & Wang.(1984) Goate et al.(1991)
亨廷顿蛋白 (Huntingtin)	亨廷顿舞蹈病	具有扩展的谷氨酰胺重复单元的蛋白的 N-末端	40	DiFiglia et al.(1997)
共济失调蛋白 (Ataxins)	脊髓小脑共济失调 (SCA1, 2, 3, 7)	具有扩展的谷氨酰胺重复单元的蛋白		Paulson et al.(2000)
萎缩蛋白	Dentarubropallidoluysian 萎缩 (DRPLA)	具有扩展的谷氨酰胺重复单元的蛋白		Paulson et al.(2000)
雄激素受体	脊髓和延髓性肌萎缩	具有扩展的谷氨酰胺重复单元的蛋白		Paulson et al.(2000)
神经丝氨酸蛋白酶抑制剂	具有神经包含体的家族性脑萎缩 (FENIB)	神经丝氨酸蛋白酶抑制剂; S49; S52R	57	Davis et al.(1999)
α-Synuclein	帕金森病, 带有雷维小体的痴呆, 多系统萎缩	遗传性的和散发性形式 罕见的常染色体显性 PD 家族中的 A53T, A30P	19	Spillantini et al.(1998) Polymeropoulos et al.(1997)
半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C	遗传性脑血管病	少于 10 个残基的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C; L68Q	12-13	Abrahamson et al.(1992)
过氧化物歧化酶	肌萎缩性侧索硬化	SOD1 突变		Shibata et al.(1996)

(续)

图 5a

(续)

血球蛋白	非-神经变性疾病	血球蛋白β链(S)多突变	Carrell & Gooptu(1998)
丝氨酸蛋白酶抑制剂	镰刀状细胞贫血 包含体溶血 α1-抗胰蛋白酶缺陷(肺气肿,硬化) 抗凝酶缺陷(血栓病) C1-抑制物缺陷(血管性水肿)	突变 突变 突变	Lomas et al.(1992) Carrell & Gooptu(1998) Carrell & Gooptu(1998)
免疫球蛋白轻链	浆细胞恶液质(原发性系统性AL淀粉样变性)	轻链或片段	Westermarck et al.(1985)
血清淀粉样蛋白A	反应性、继发性、系统性AA淀粉样变性 慢性炎症性疾病	SAA可变的N-末端片段	Westermarck et al.(1985)
甲状腺素运载蛋白	家族性淀粉样蛋白多神经病(系统性;FAP I)	解离成构象单体变体的四聚体多突变(一些与淀粉样蛋白无关;几种不同类型的疾病) 正常的甲状腺素运载蛋白	Gustavsson et al.(1991) Gustavsson et al.(1991)
凝溶胶蛋白	老年性心脏淀粉样变性 家族性淀粉样变性-Finnish型(系统性;FAP IV)	D187Q导致截短的173-225/243(关键残基182-192)	Maury & Baumann(1990)
β2-微球蛋白	血液透析淀粉样变性 前列腺淀粉样变性	β2-微球蛋白	Gorevic et al.(1985)
载脂蛋白A1	家族性淀粉样蛋白多神经病(系统性;FAP III)	N-末端83-93残基;G26R, W50R, L60R	Booth et al.(1995)
溶菌酶	家族性内脏淀粉样变性	溶菌酶或片段(有或无I56T, D67H)	Pepys et al.(1993)
支链淀粉(胰岛淀粉样多肽)	II形糖尿病(NIDDM)	片段(20-29的关键核心);无突变	Westermarck(1990)
血纤蛋白原α链	遗传性肾性淀粉样变性	血纤蛋白原片段	Uemichl et al.(1994)
原降钙素	甲状腺髓样癌	降钙素片段	Sletten et al.(1976)
心钠素	心脏淀粉样变性	ANF, 无变体	Johansson et al.(1987)
胰岛素	注射局部淀粉样变性	胰岛素	Dische et al.(1988)
形成淀粉状蛋白的其他蛋白	(体外)	其他蛋白	Chiti et al.(1999)

图 5b

tau的N-和C-末端截短形式

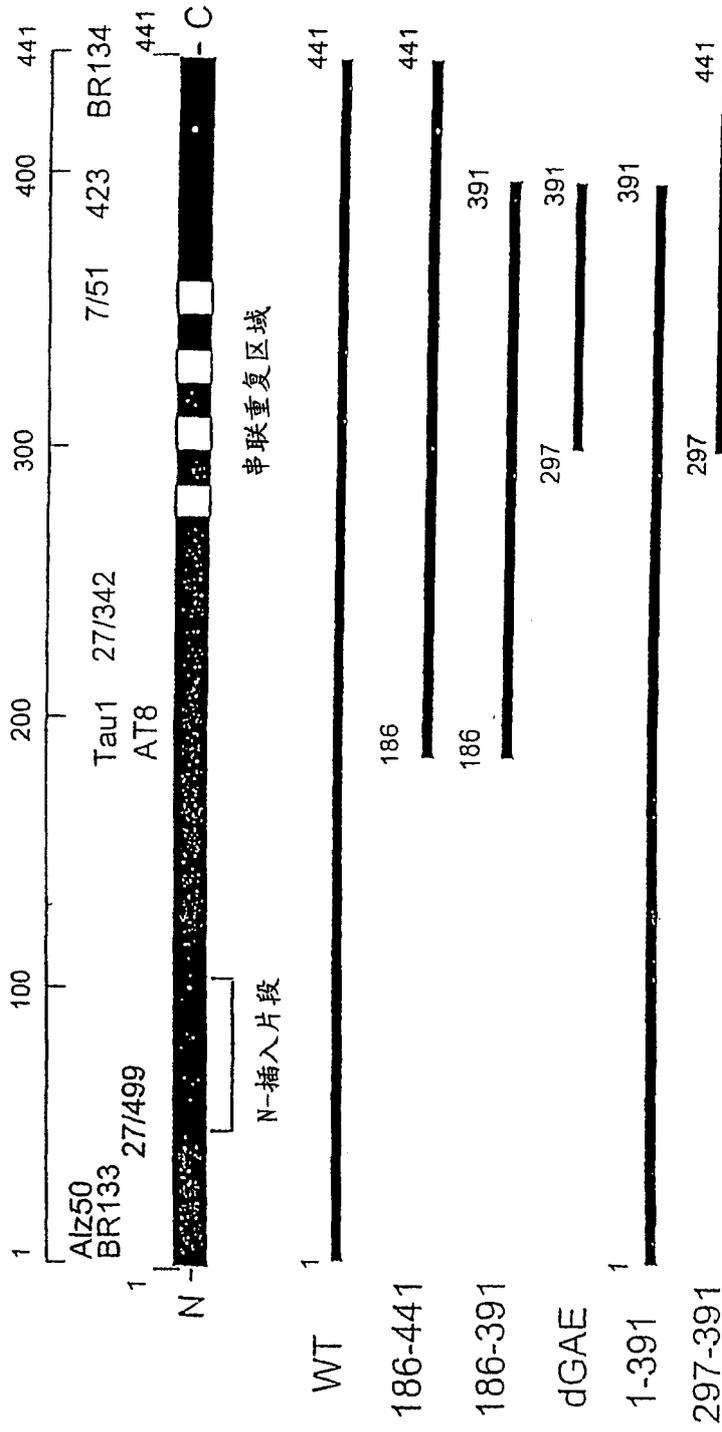


图 6

```

ATG GCT GAG CCC CGC CAG GAG TTC GAA GTG ATG GAA GAT CAC GCT GGG
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

ACG TAC GGG TTG GGG GAC AGG AAA GAT CAG GGG GGC TAC ACC ATG CAC
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

CAA GAC CAA GAG GGT GAC ACG GAC GCT GGC CTG AAA GAA TCT CCC CTG
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

CAG ACC CCC ACT GAG GAC GGA TCT GAG GAA CCG GGC TCT GAA ACC TCT
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

GAT GCT AAG AGC ACT CCA ACA GCG GAA GAT GTG ACA GCA CCC TTA GTG
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

GAT GAG GGA GCT CCC GGC AAG CAG GCT GCC GCG CAG CCC CAC ACG GAG
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

ATC CCA GAA GGA ACC ACA GCT GAA GAA GCA GGC ATT GGA GAC ACC CCC
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

AGC CTG GAA GAC GAA GCT GCT GGT CAC GTG ACC CAA GCT CGC ATG GTC
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

AGT AAA AGC AAA GAC GGG ACT GGA AGC GAT GAC AAA AAA GCC AAG GGG
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

GCT GAT GGT AAA ACG AAG ATC GCC ACA CCG CGG GGA GCA GCC CCT CCA
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

GGC CAG AAG GGC CAG GCC AAC GCC ACC AGG ATT CCA GCA AAA ACC CCG
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

CCC GCT CCA AAG ACA CCA CCC AGC TCT GGT GAA CCT CCA AAA TCA GGG
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

GAT CGC AGC GGC TAC AGC AGC CCC GGC TCC CCA GGC ACT CCC GGC AGC
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

CGC TCC CGC ACC CCG TCC CTT CCA ACC CCA CCC ACC CGG GAG CCC AAG
Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

```

图 7a

```

AAG GTG GCA GTG GTC CGT ACT CCA CCC AAG TCG CTG TCT TCC GCC AAG
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Leu Ser Ser Ala Lys
225                               230                               235                               240

AGC CGC CTG CAG ACA GCC CCC GTG CCC ATG CCA GAC CTG AAG AAT GGC
Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Gly
                               245                               250                               255

AAG TCC AAG ATC GGC TCC ACT GAG AAC CTG AAG CAC CAG CCG GGA GGC
Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
                               260                               265                               270

GGG AAG GTG CAG ATA ATT AAT AAG AAG CTG GAT CTT AGC AAC GTC CAG
Gly Pys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
                               275                               280                               285

TCC AAG TGT GGC TCA AAG GAT AAT ATC AAA CAG GTC CCG GGA GGC GGC
Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys Gln Val Pro Gly Gly Gly
290                               295                               300

AGT GTG CAA ATA GTC TAC AAA CCA GTT GAC CTG AGC AAG GTG ACC TCC
Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305                               310                               315                               320

AAG TGT GGC TCA TTA GGC AAC ATC CAT CAT AAA CCA GGA GGT GGC CAG
Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
                               325                               330                               335

GTG GAA GTA AAA TCT GAG AAG CTT GAC TTC AAG GAC AGA GTC CAG TCG
Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
                               340                               345                               350

AAG ATT GGG TCC CTG GAC AAT ATC ACC CAC GTC CCT GGC GGA GGA AAT
Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
                               355                               360                               365

AAA AAG ATT GAA ACC CAC AAG CTG ACC GTC CGC GAG AAC GCC AAA GCC
Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Val Arg Glu Asn Ala Lys Ala
                               370                               375                               380

AAG ACA GAC CAC GGG GCG GAG ATC GTG TAC AAG TCG CCA GTG GTG TCT
Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385                               390                               395                               400

GGG GAC ACG TCT CCA CGG CAT CTC AGC AAT GTC TCC TCC ACC GGC AGC
Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
                               405                               410                               415

ATT GAC ATG GTA GAC TCG CCC CAG CTC GCC ACG CTA GCT GAC GAG GGG
Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Gly
                               420                               425                               430

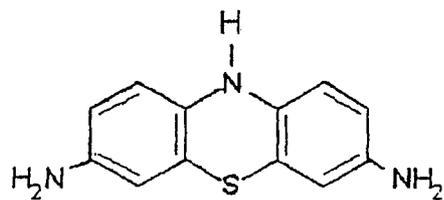
TCT GCC TCC CTG GCC AAG CAG GGT TTG TGA
Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu ***
                               435                               440

```

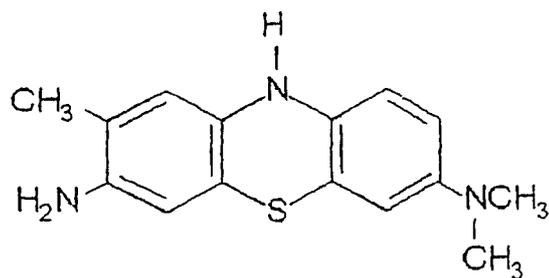
图 7b

## 细胞试验中所测试的化合物

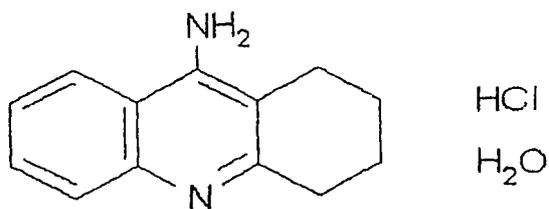
劳氏紫



托洛氟铵



塔克林



氟丙嗪

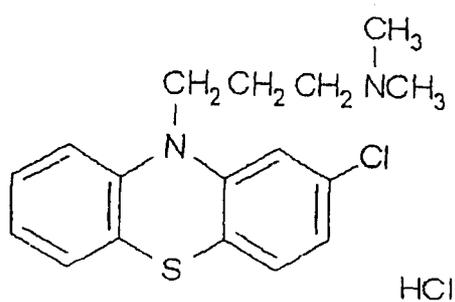


图 8

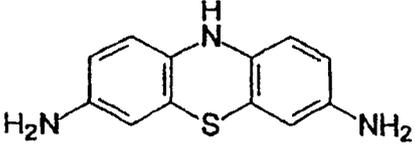
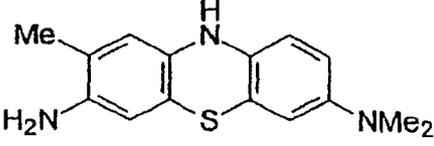
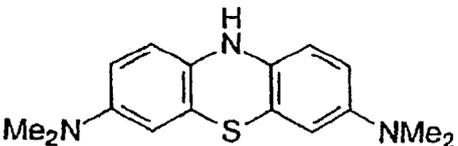
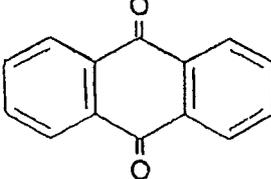
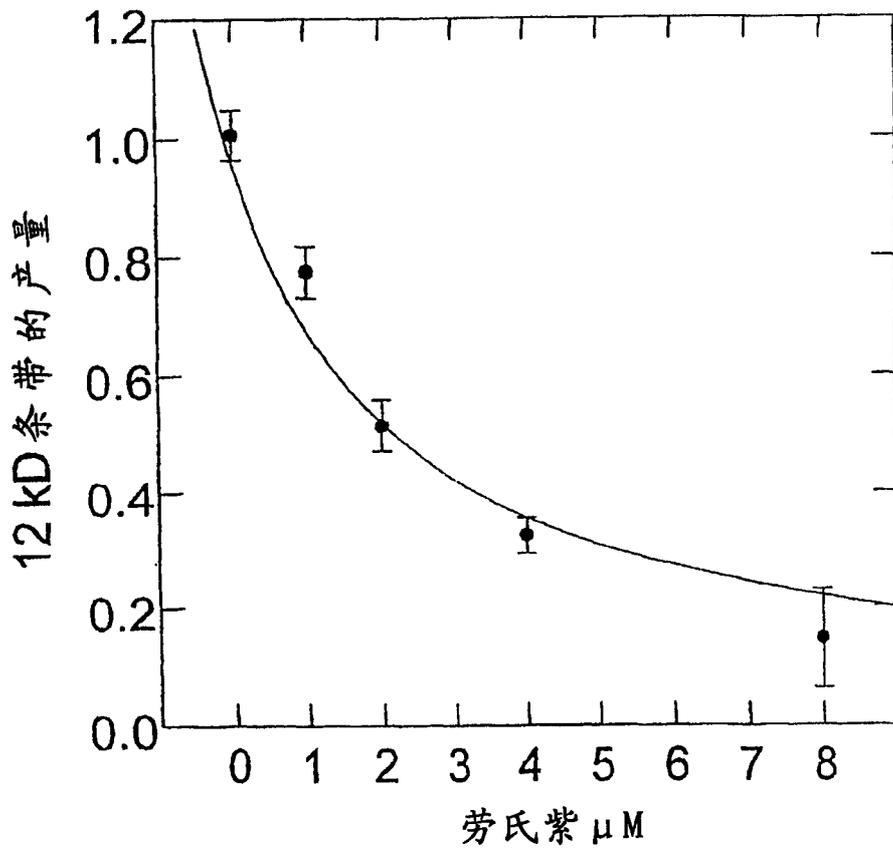
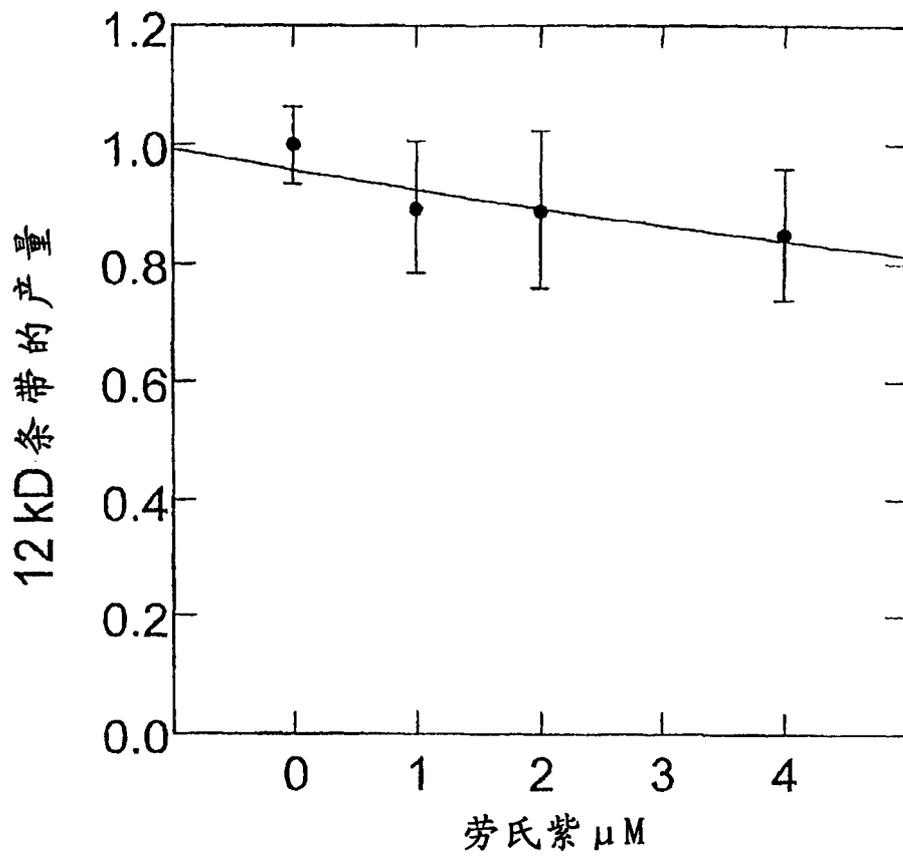
	KI (nM)	B <sub>50</sub> (μM)
<p>I</p>  <p>还原后的劳氏紫</p>	100	2.17
 <p>氧化后的劳氏紫</p>	1200	26.07
 <p>还原后的托洛氯铵</p>	105	2.28
 <p>还原后的甲蓝</p>	123	2.67
 <p>DH12</p>	—	—

图 9



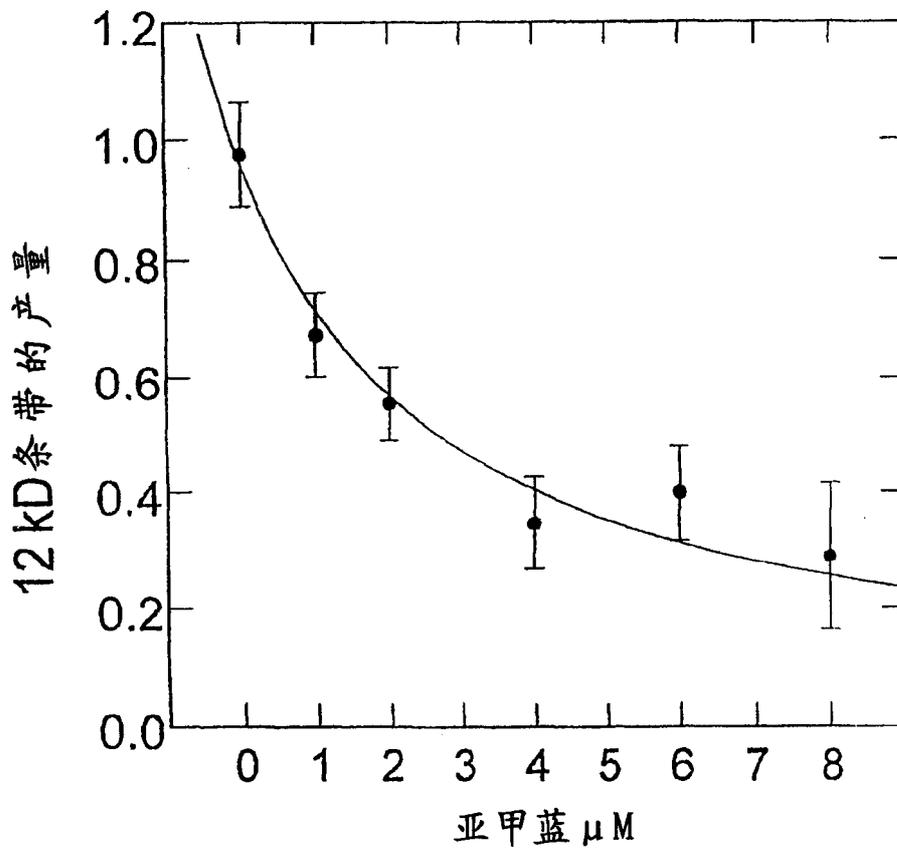
观察活性vs推算活性	$r=0.986$
胞内tau浓度	500nM
Tau-tau结合的亲和力	22nM
劳氏紫KI	100nM

图 10



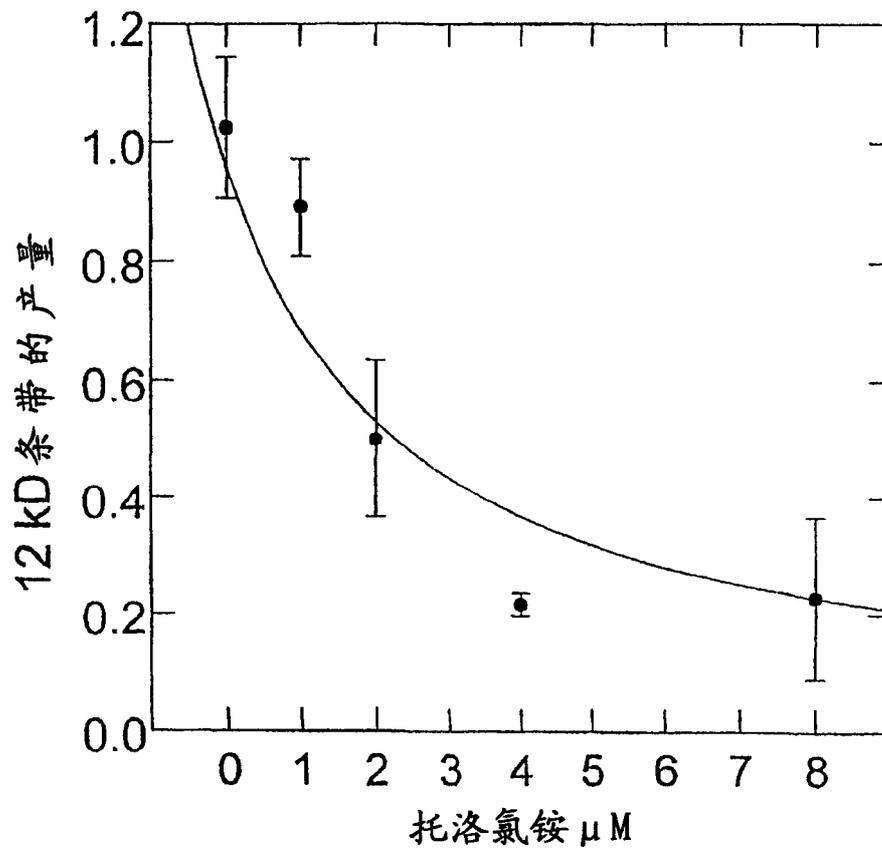
观察的活性vs推算的活性  $r=0.784$   
细胞内tau浓度 500nM  
Tau-tau结合亲和力 22nM  
氧化后的劳氏紫KI 1200nM

图 11



观察的活性vs推算的活性  $r=0.962$   
细胞内 tau 浓度 500nM  
Tau-tau 结合亲和力 22nM  
亚甲蓝 KI 123nM

图 12



观察的活性vs推算的活性	$r=0.913$
细胞内tau浓度	500nM
Tau-tau结合亲和力	22nM
托洛氯铵	105nM

图 13

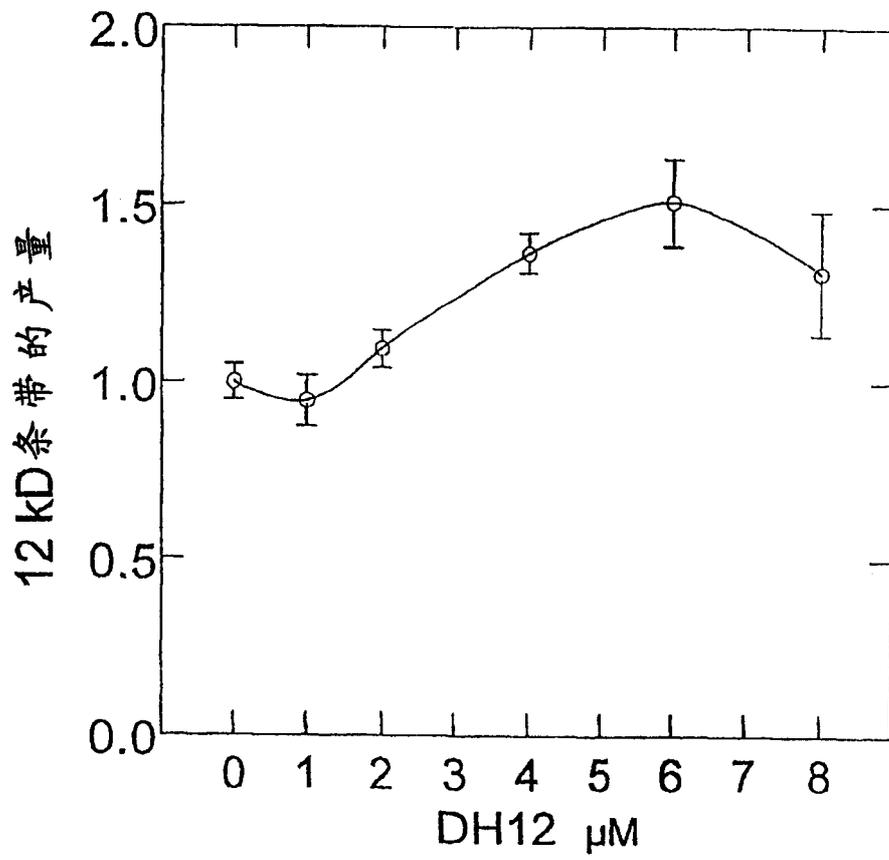
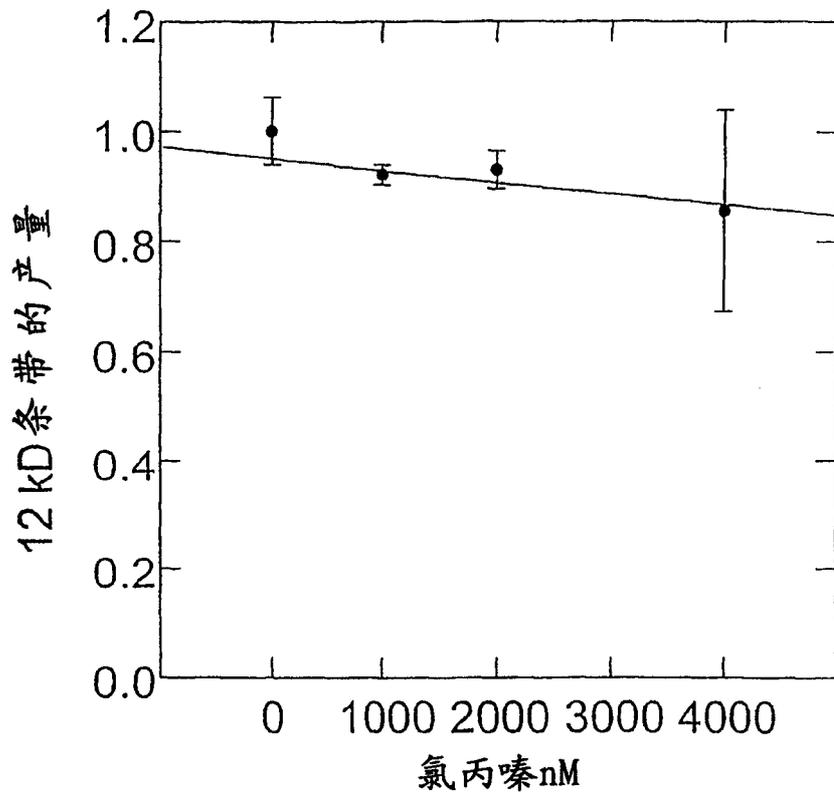
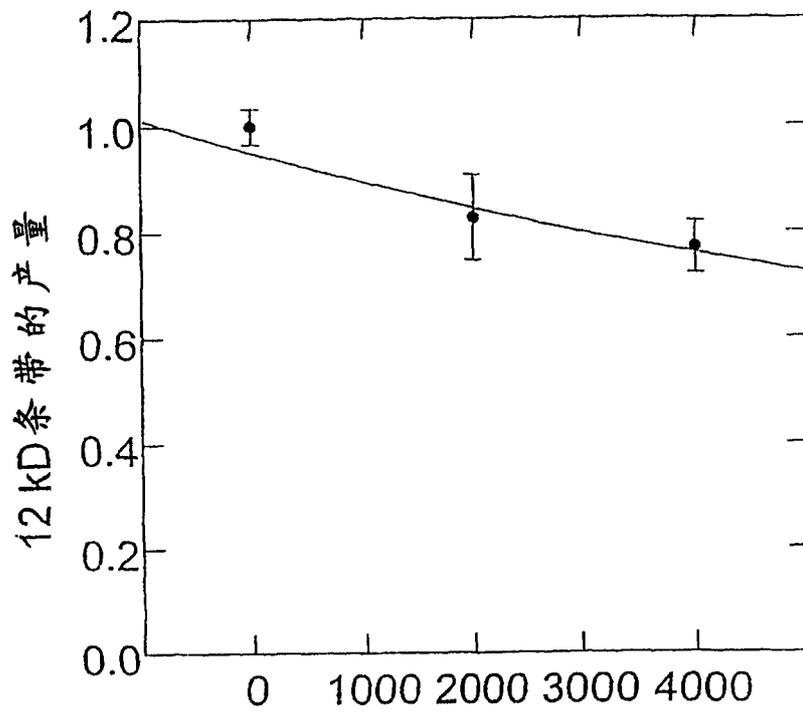


图 14



观察的活性vs推算的活性       $r=0.937$   
细胞内tau浓度                      415nM  
Tau-tau结合亲和力                  22nM  
氯丙嗪KI                                2117nM

图 15



观察的活性vs推算的活性  $r=0.976$   
细胞内 tau浓度 415nM  
Tau-tau结合亲和力 22nM  
塔克林KI 802nM

图 16

化合物在120分钟时不同的还原程度

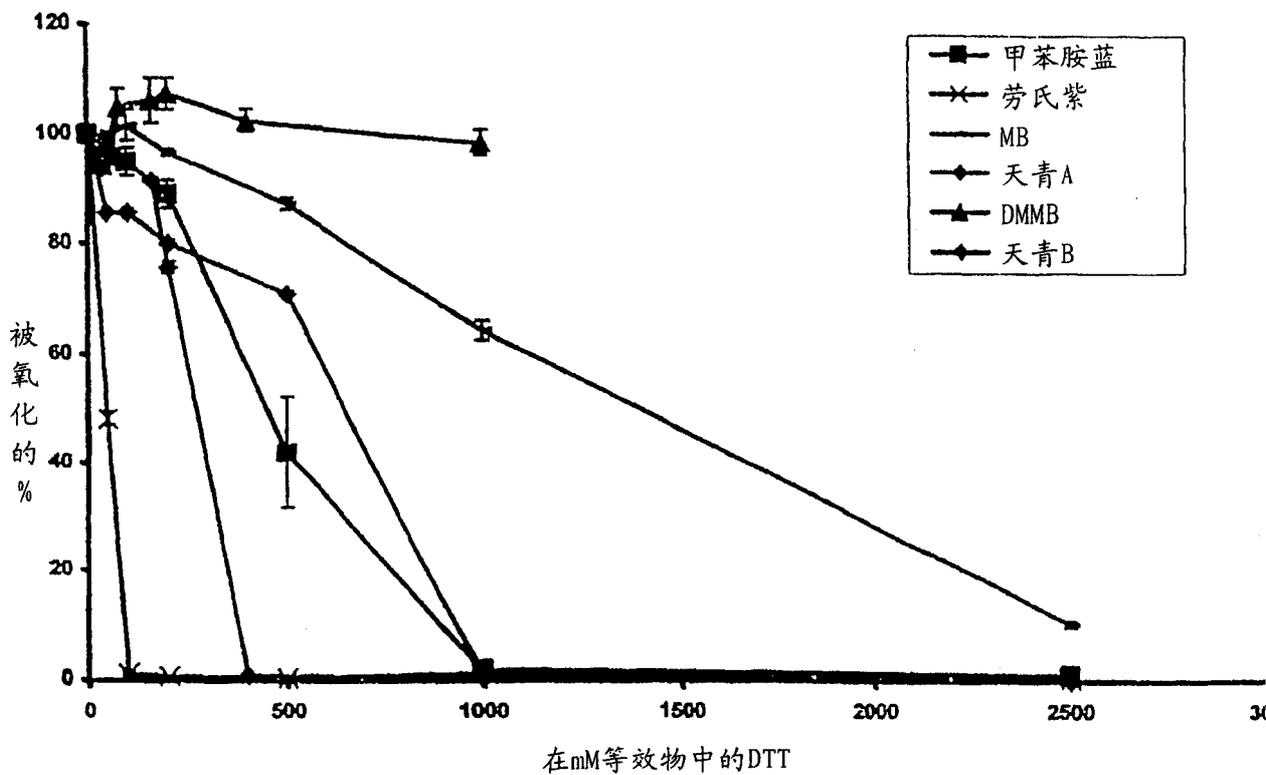


图 17

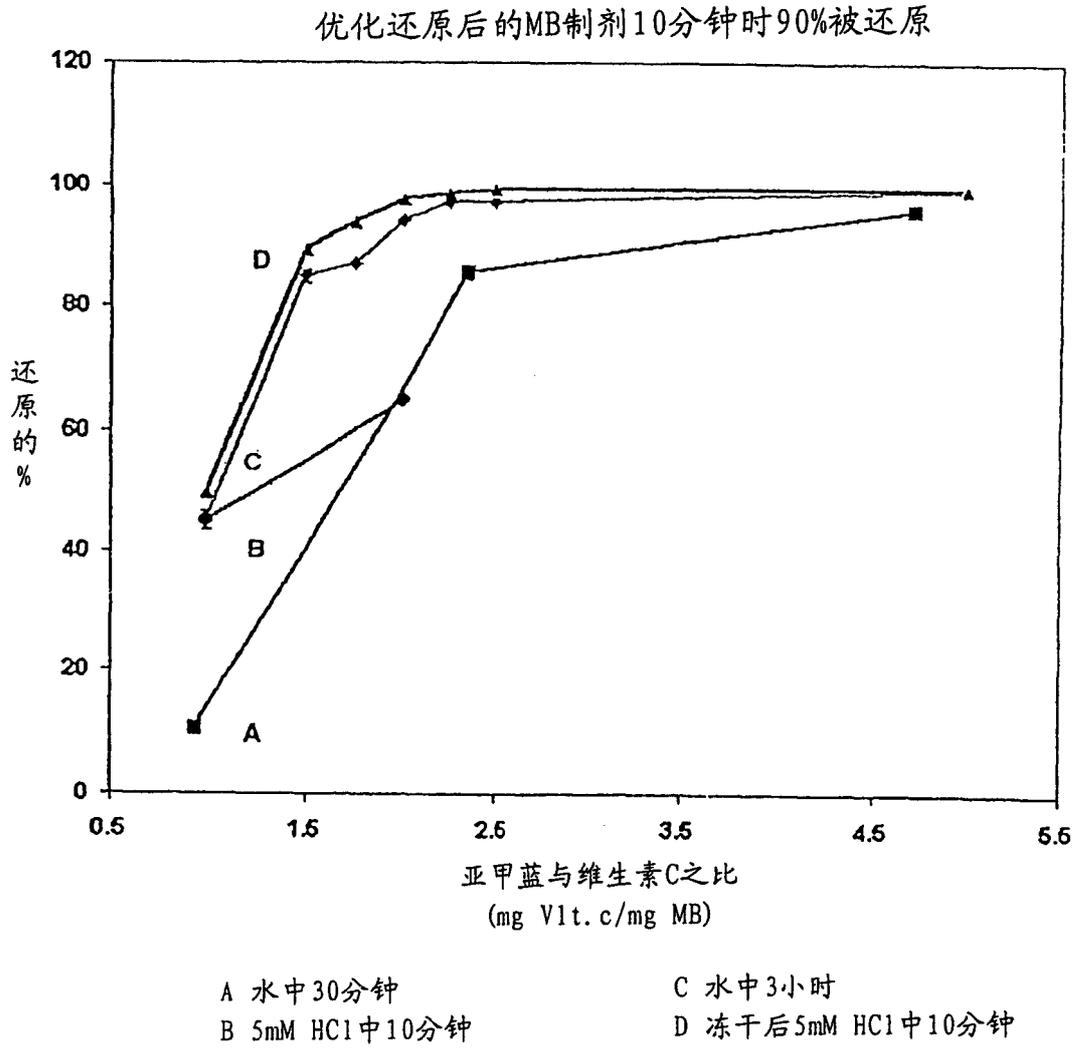


图 18

MB的组织水平与IV剂量的对照(1972)

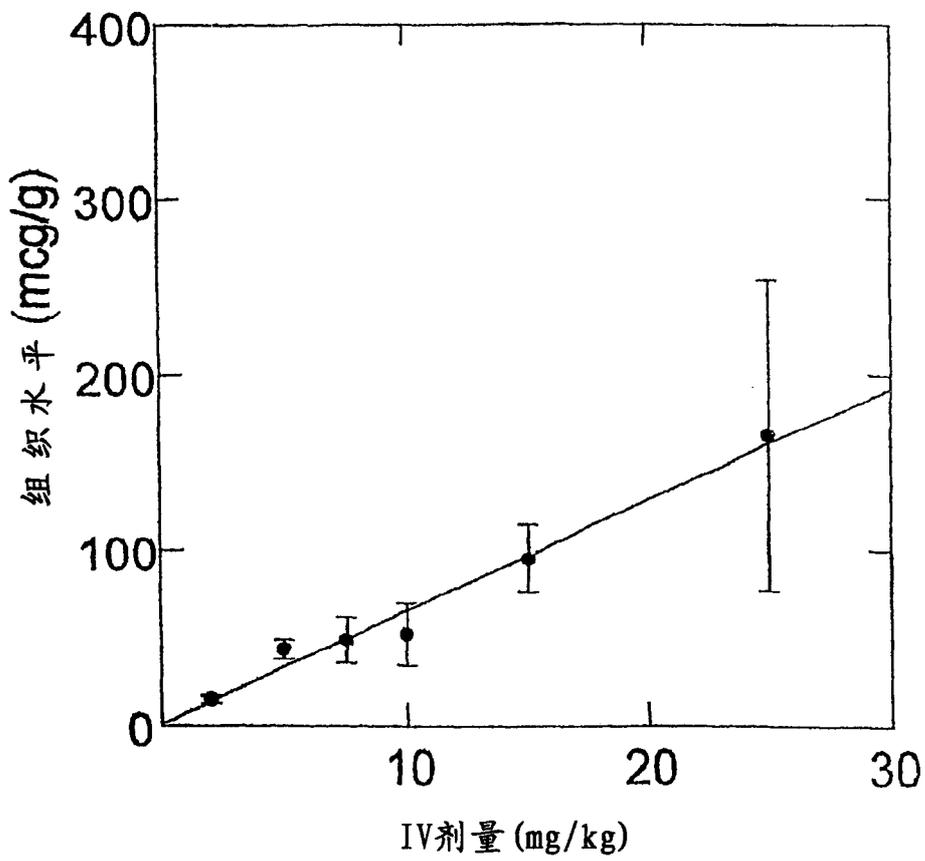


图 19a

MB的血液及组织分布 (1.43mg/kg剂量)

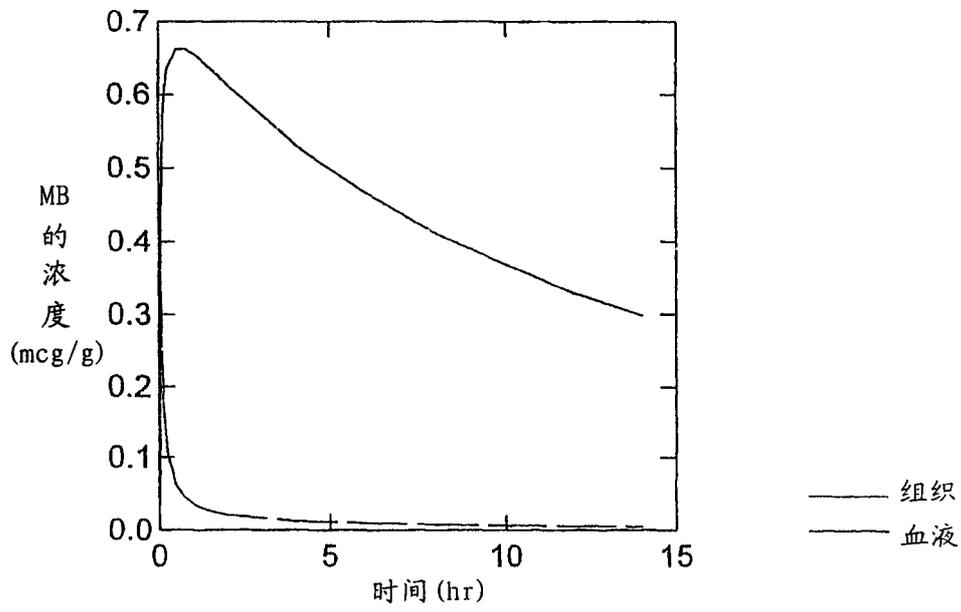


图 19b

tau的长度	表观Mr (kDa)	表达于:	
		3T3	COS-7
1) 1-391	55	++	++++
2) m186-391	26	++	++++
3) m297-391	12	+/-	+
4) m186-441	32	++	+++
5) m297-441	18	+	+
6) 1-441	67	++	++++
7) [kozak]m295-391	12	+	+++
8) [kozak]m297-391	12	+/-	++

图 20

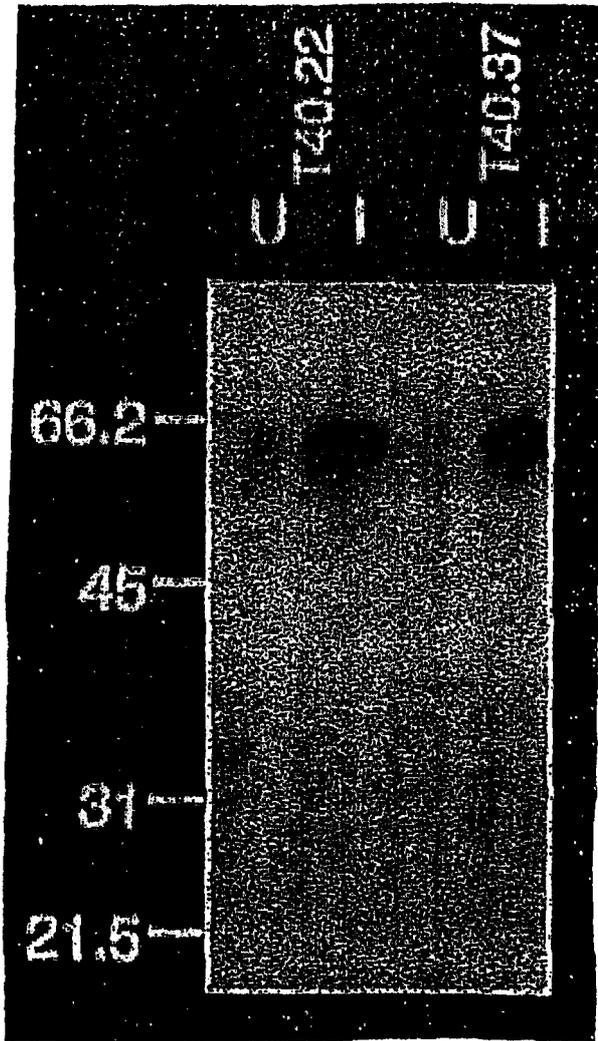


图 21

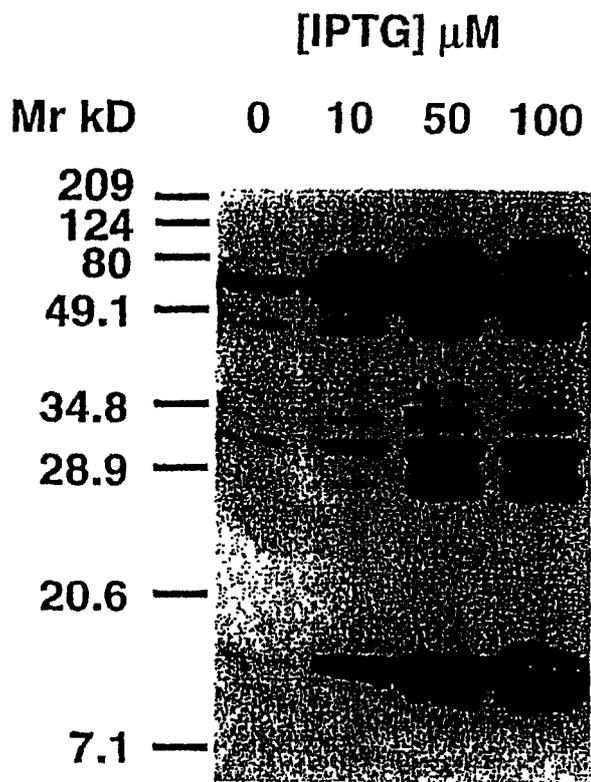


图 22

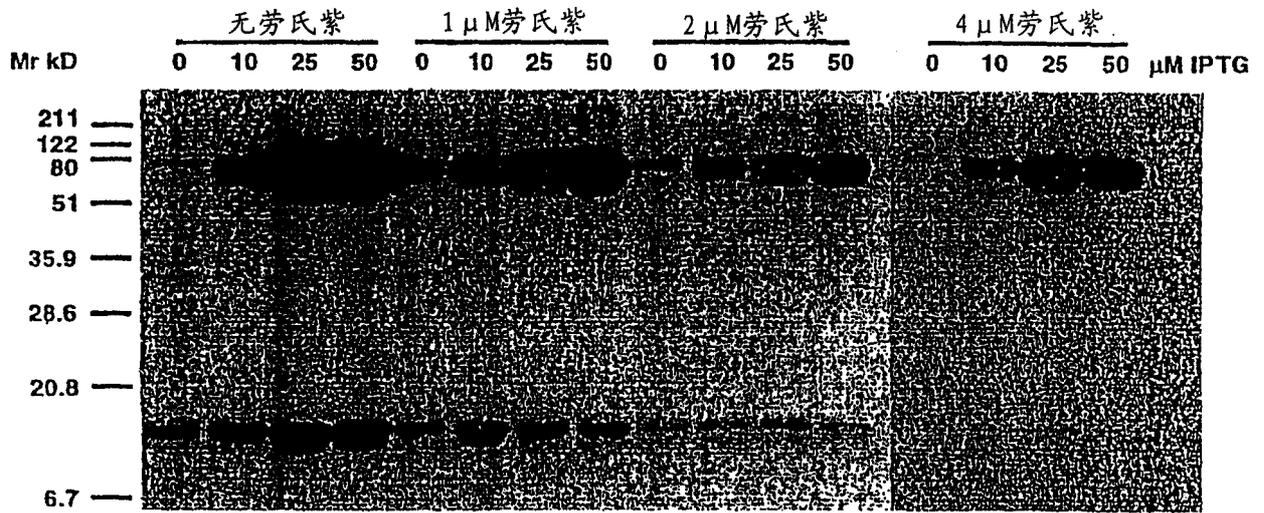


图 23

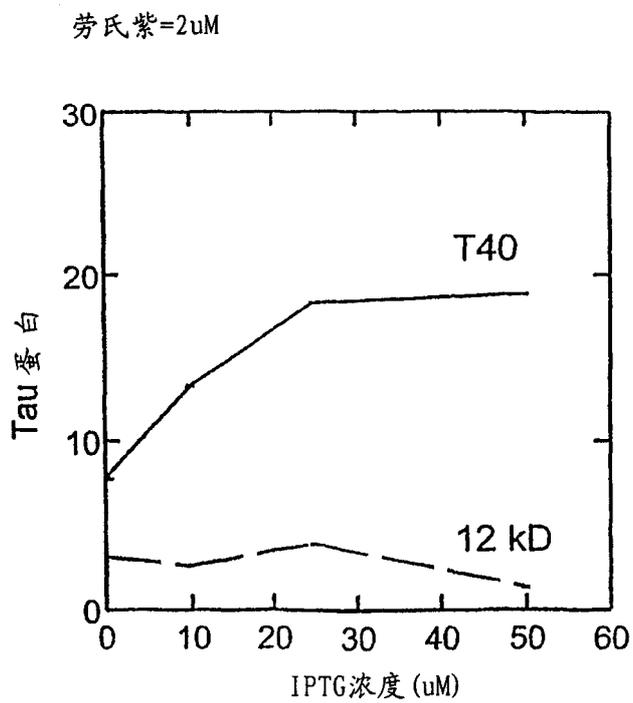
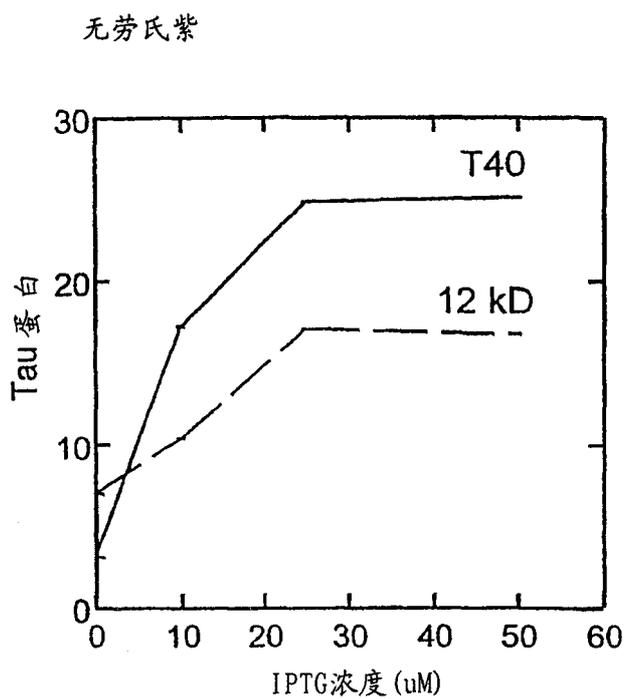


图 24

## 效力排序 (KI)

## 还原后的形式

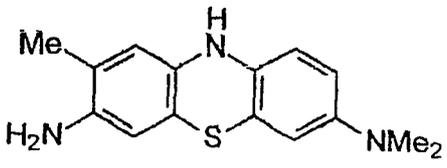
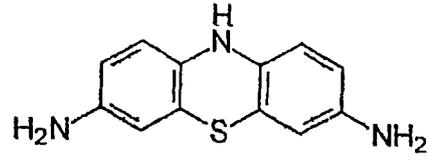
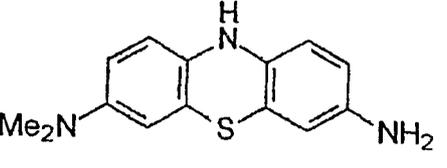
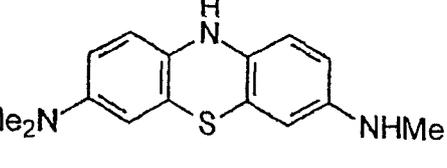
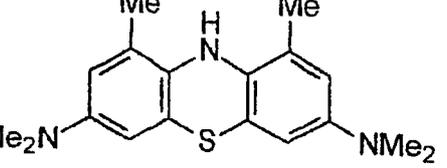
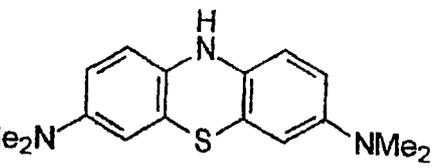
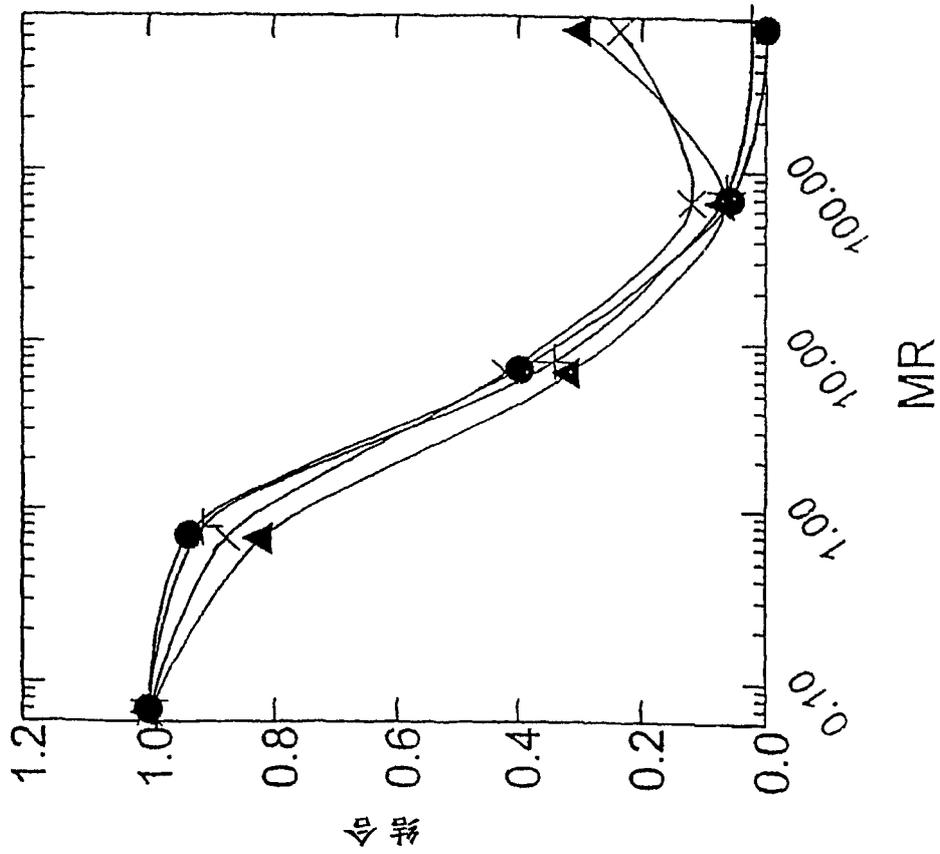
化合物	结构	KI
托洛氯铵		76.05
劳氏紫		108.34
天青A		119.01
天青B		123.91
1,9-二甲基-亚甲蓝		325.41
亚甲蓝		3731.26

图 25

Tau-tau结合与摩尔比(化合物: tau)的对照  
0, 2, 3个甲基



去甲基系列  
50%抑制的MR

- ▲ 托洛氯铵 3:1
- + 劳氏紫 4:1
- X 天青B 4:1
- 天青A 4:1

图 26

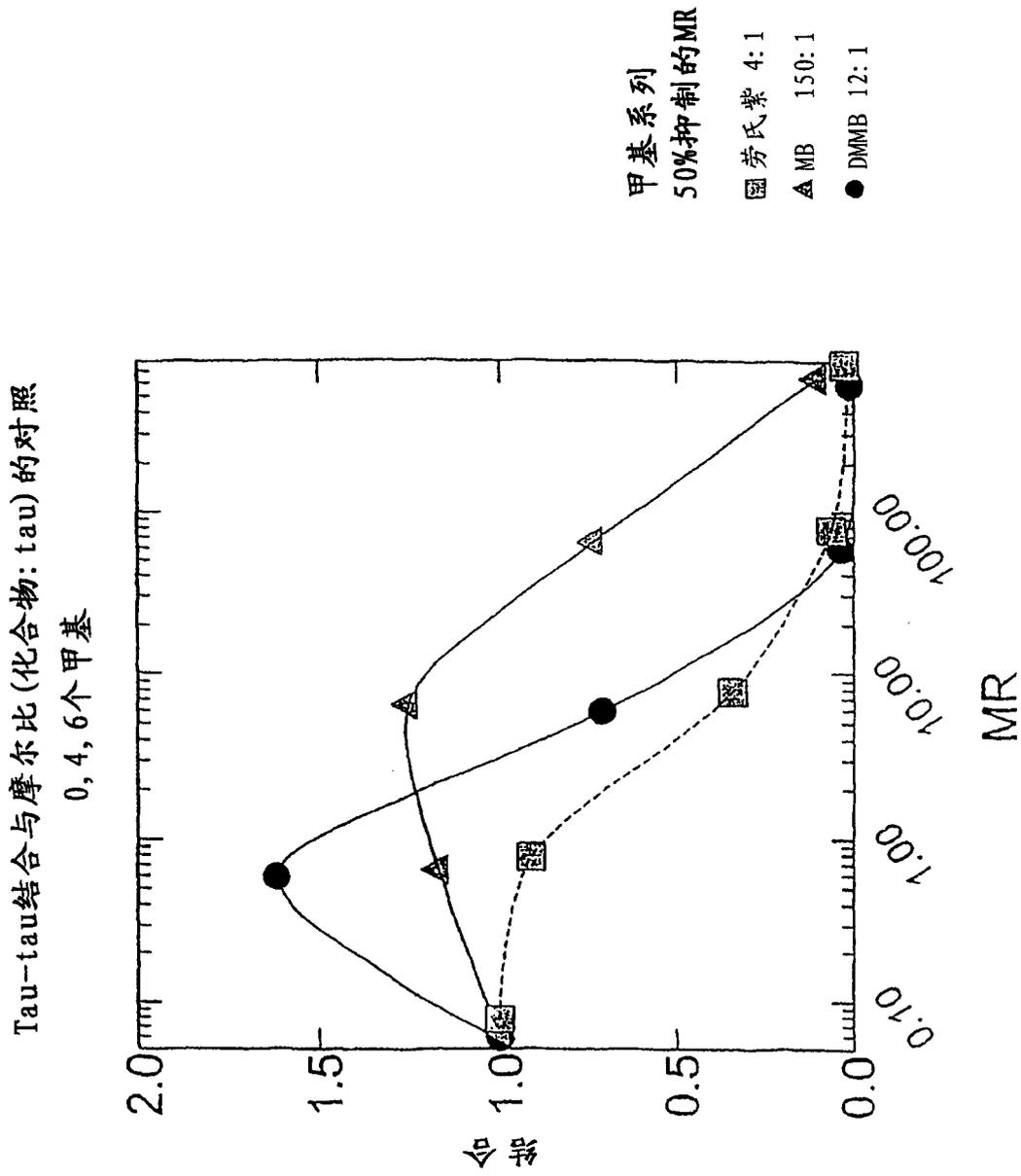


图 27

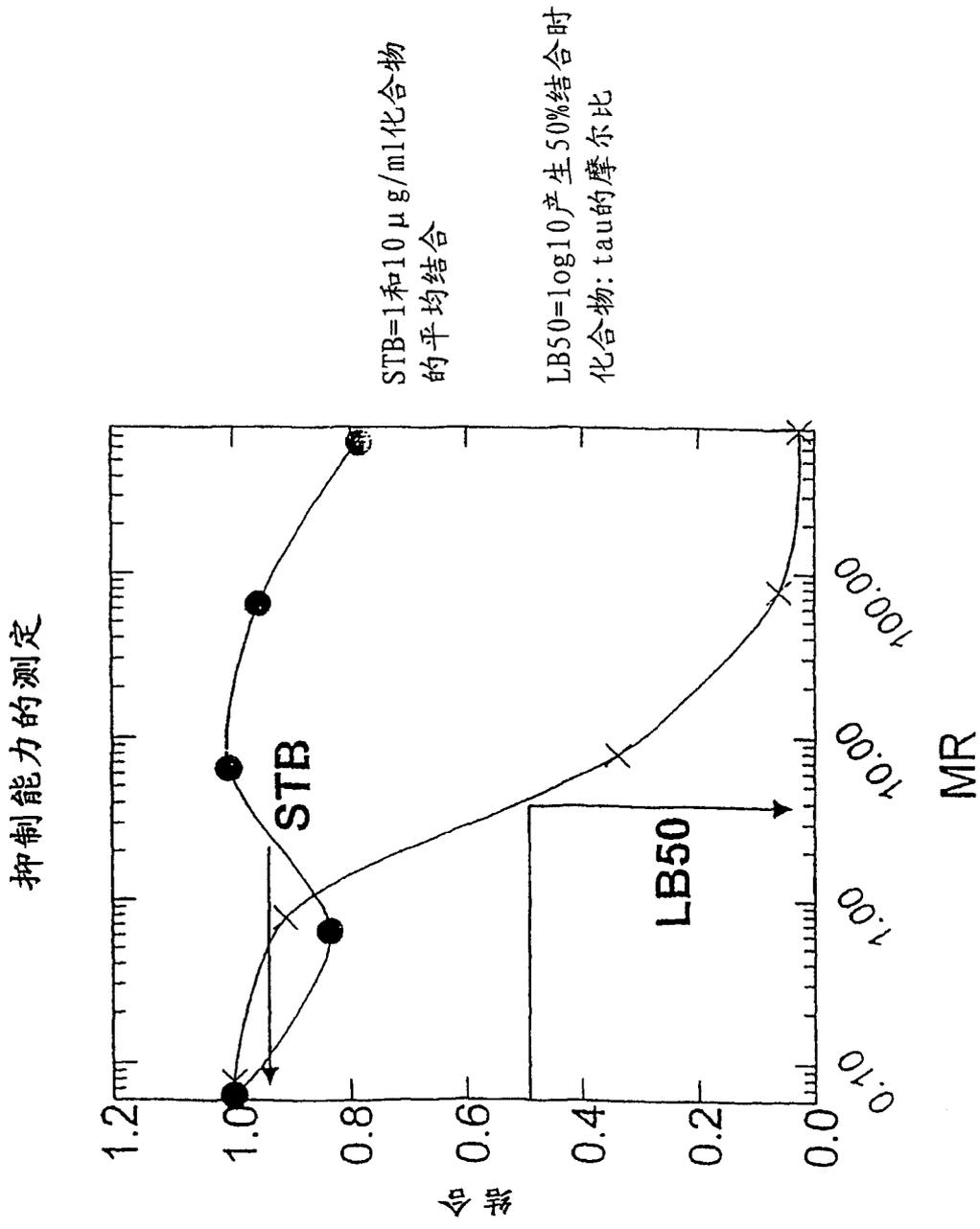


图 28

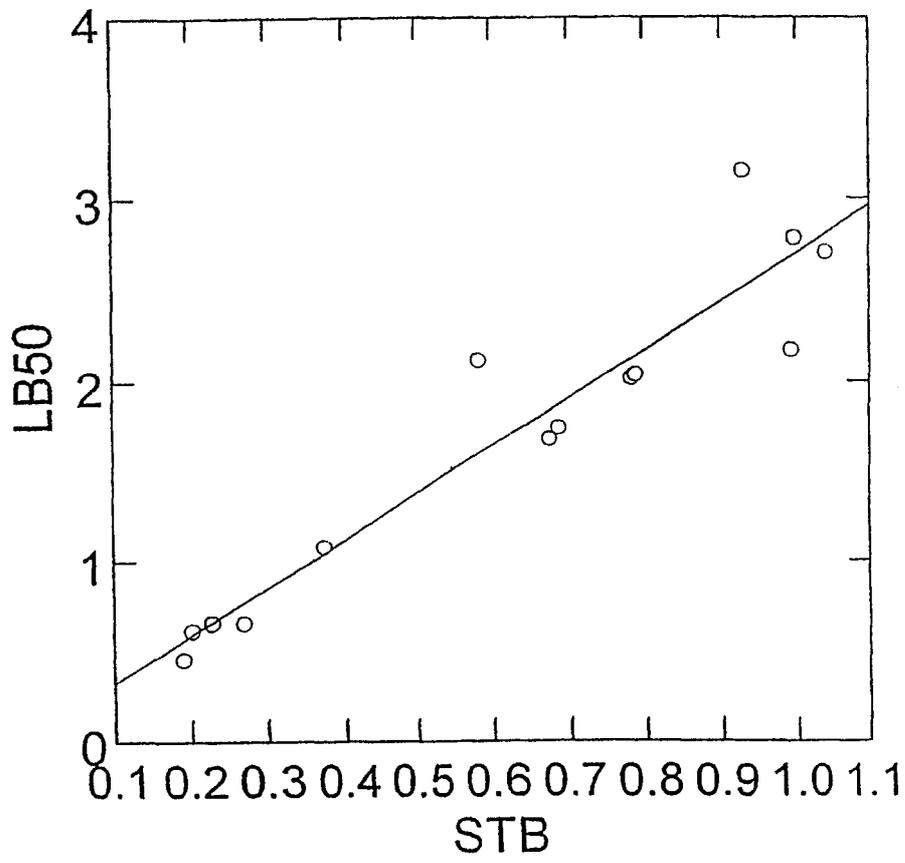


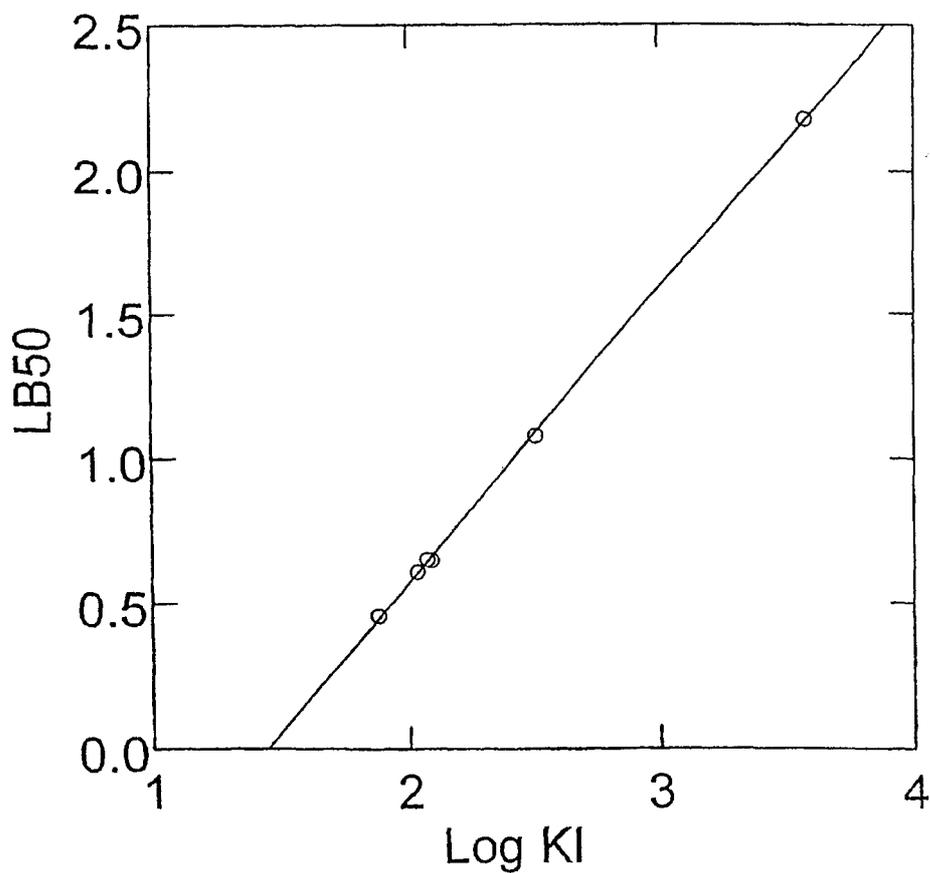
图 29

STB和B50之间的关系  
(tau-tau结合减少50%时化合物: tau的摩尔比)

化合物	STB	B50
托洛氯铵	0.190	2.86
劳氏紫	0.201	4.06
天青A	0.227	4.49
天青B	0.269	4.46
二甲基MB	0.372	12
维生素K	0.674	48
中性红	0.787	56
派洛宁Y	0.783	104
派洛宁	0.788	109
Acraflavin	0.583	132
亚甲蓝(MB)	0.992	150
吩噻嗪	1.040	508
Gallocyanin	0.997	608
Thiazin red	0.929	1419

图 30

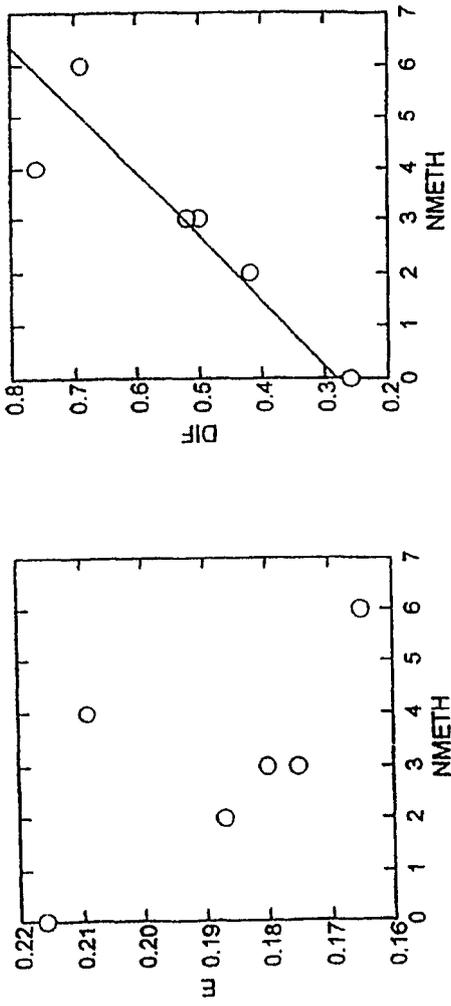
当对二氨基吩噻嗪进行测定时  
LB50值是KI值的另一种表示



$$LB50 = ( 1.019 * \text{Log}( KI ) ) - 1.471$$

图 31

甲基教目VS还原能力和扩散系数



R=0.601, NS  
R=0.975, p=0.002

R=0.928, p=0.004  
R=0.975, p=0.002

图 32

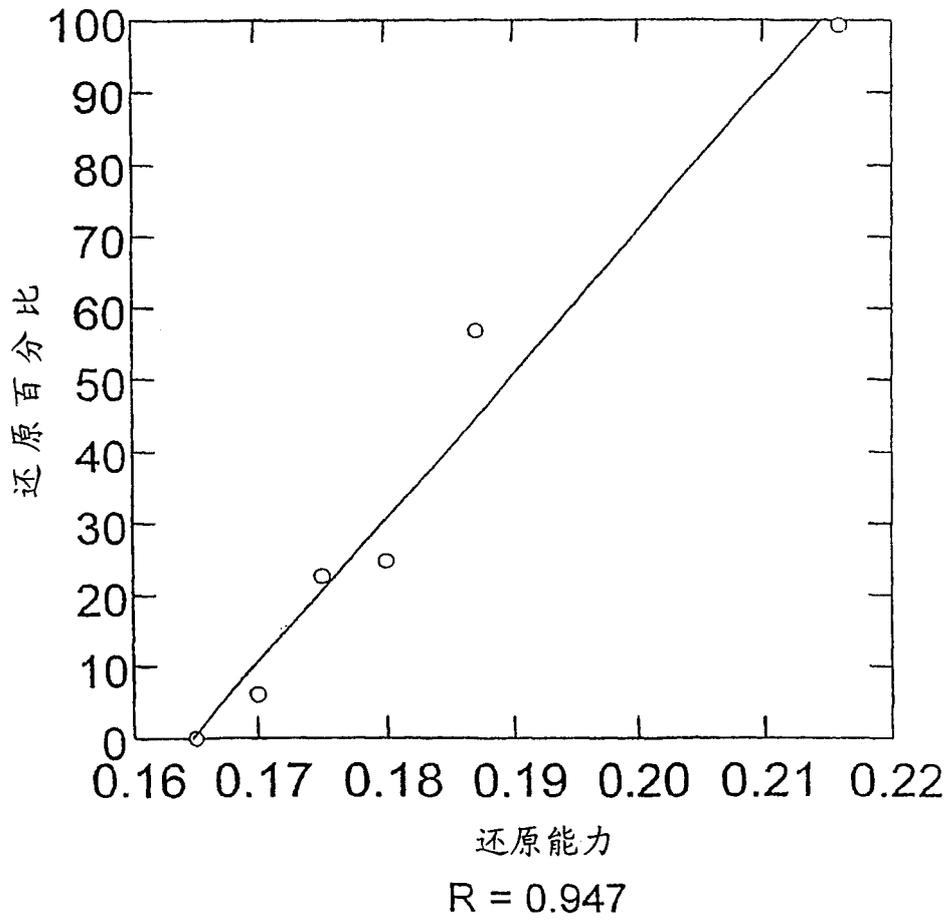


图 33

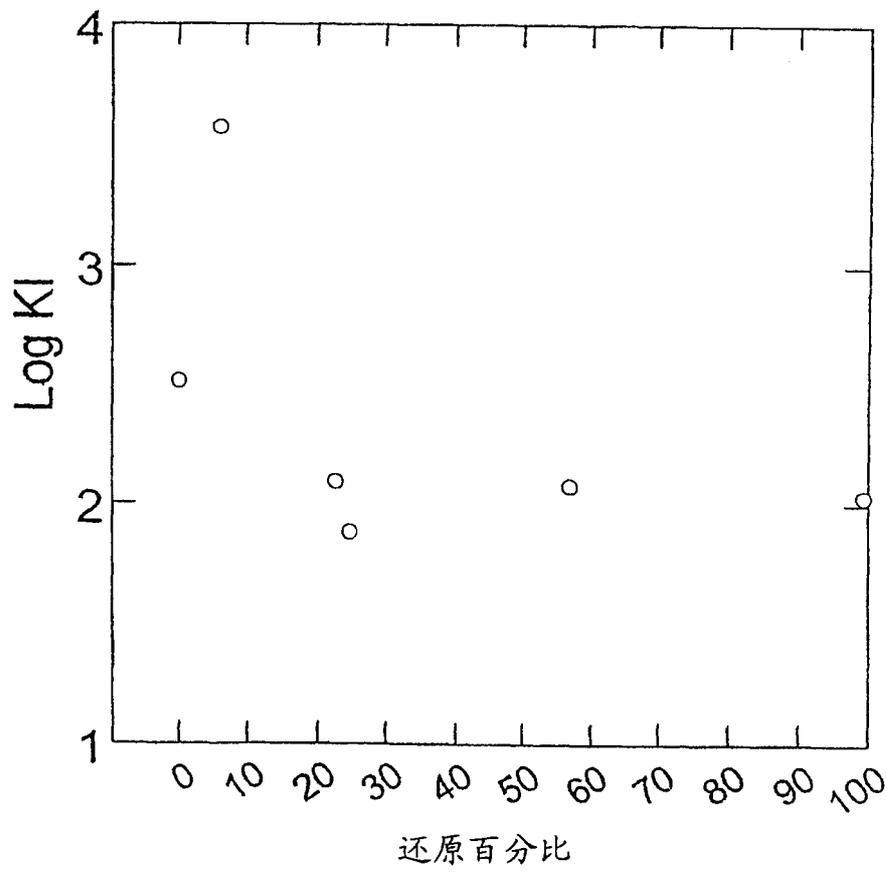
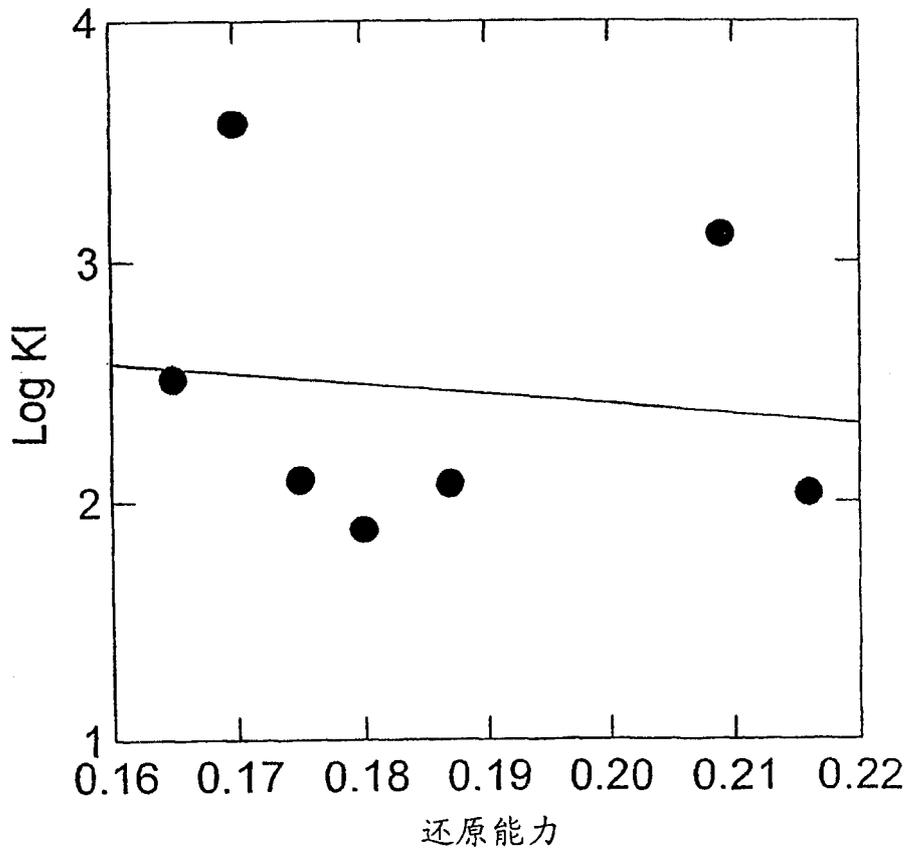
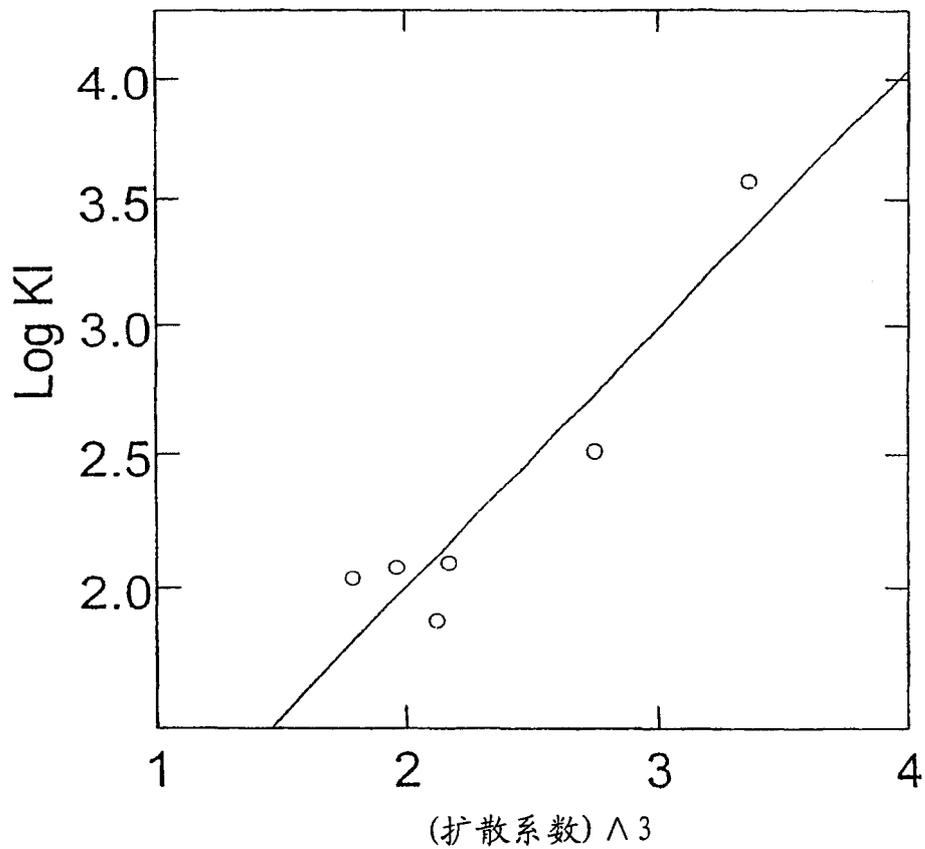


图 34a



抑制效力不能由还原能力确定

图 34b



效力与还原形式的聚集效率有关

图 35

LB50的近似值作为还原能力和扩散系数的函数

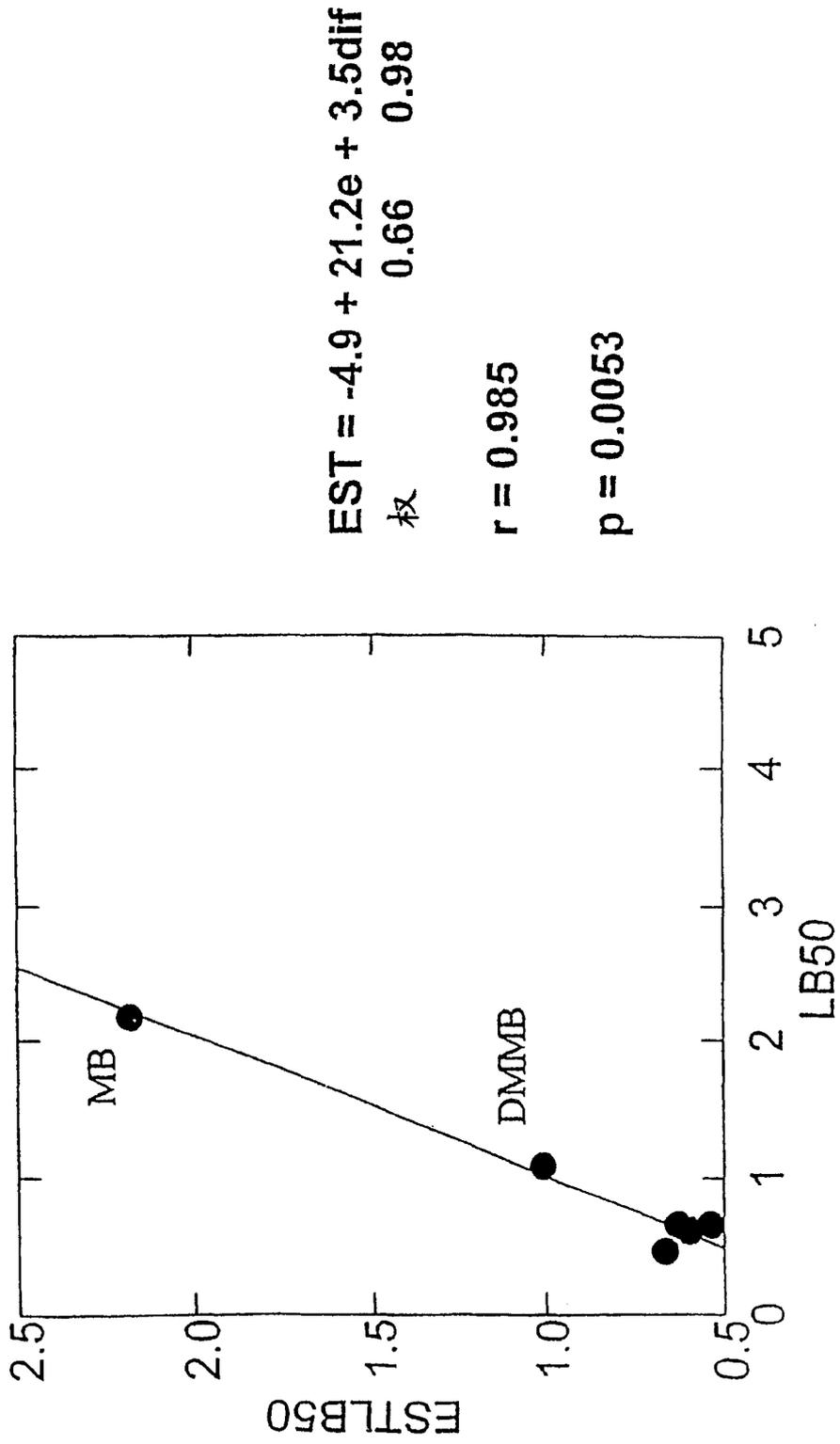


图 36

STB的近似值作为还原能力和扩散系数的函数

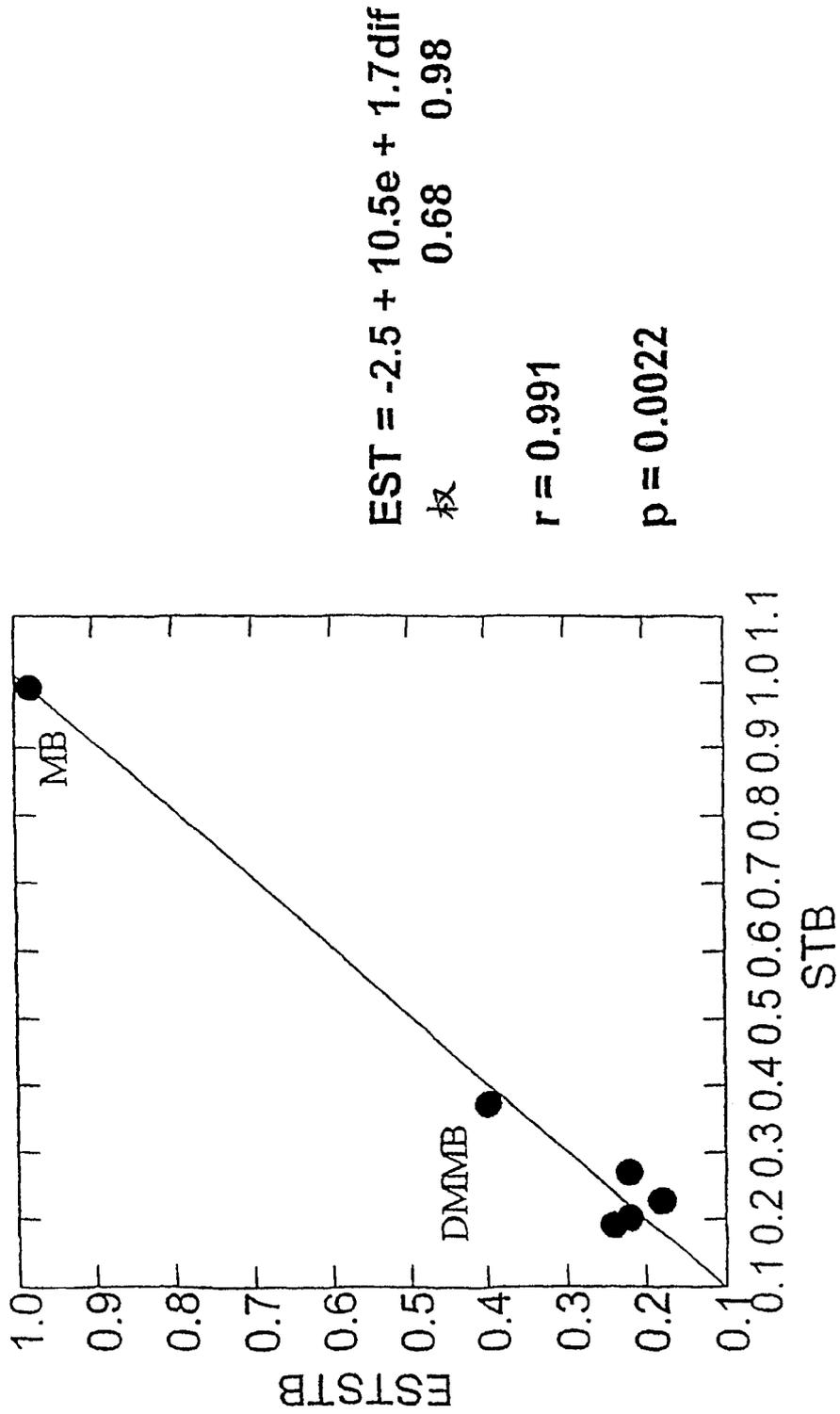


图 37

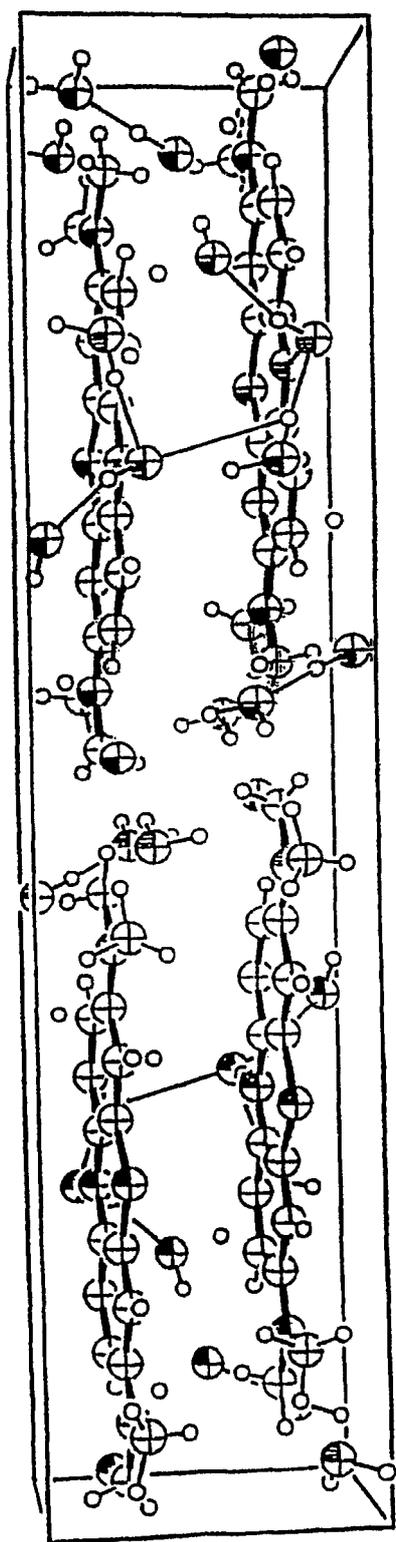


图 38

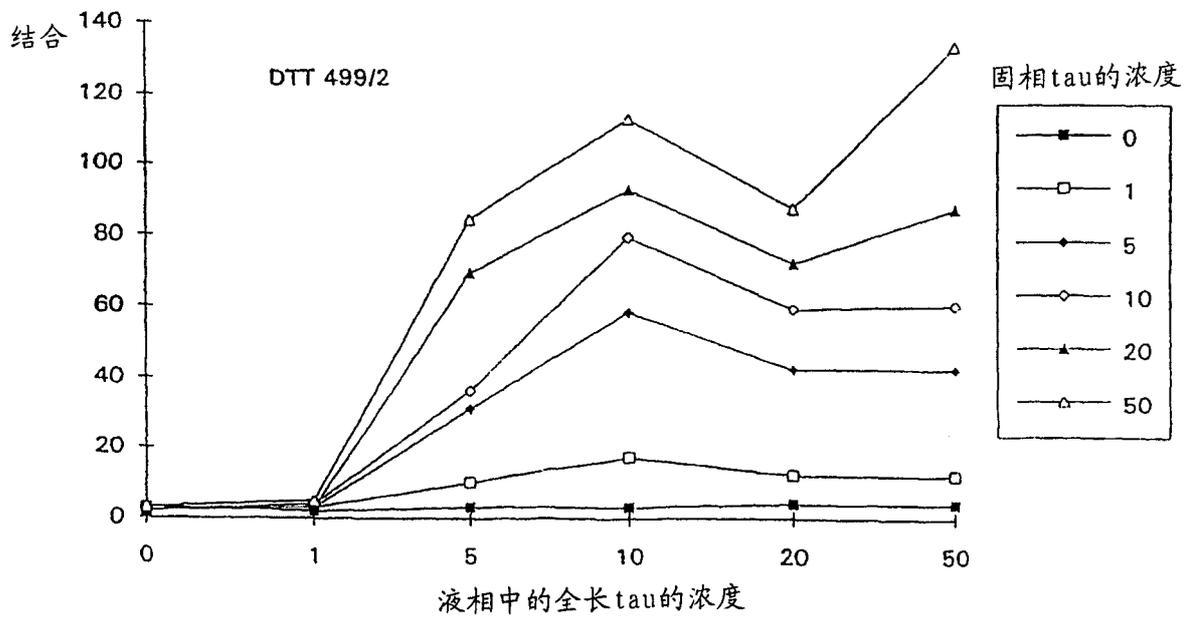
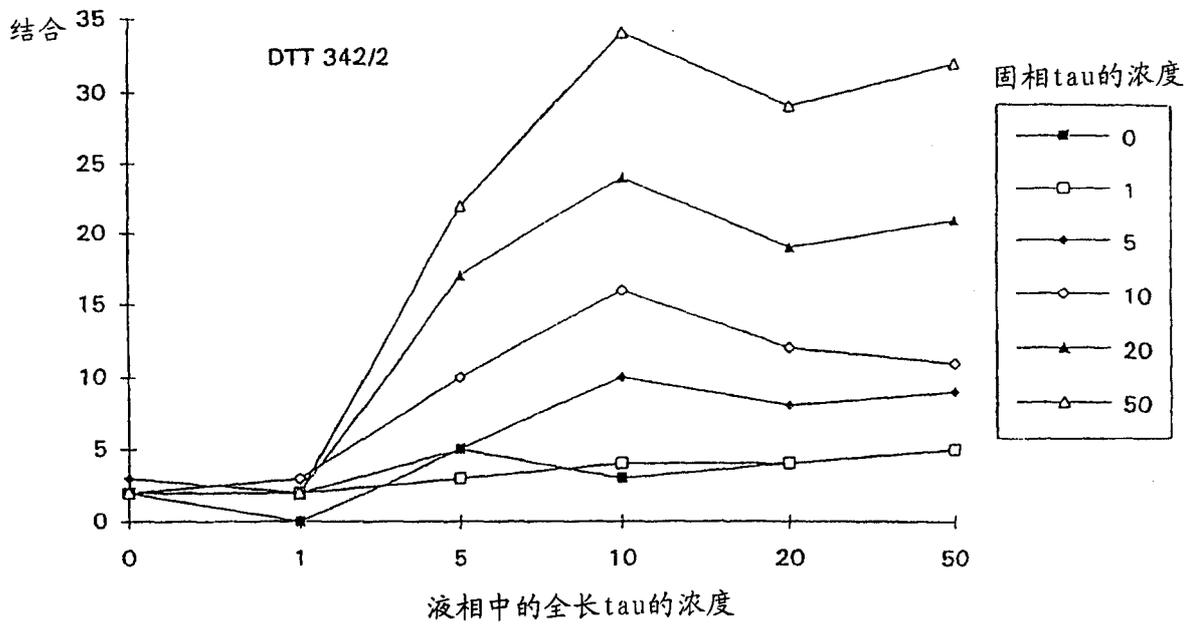


图 39

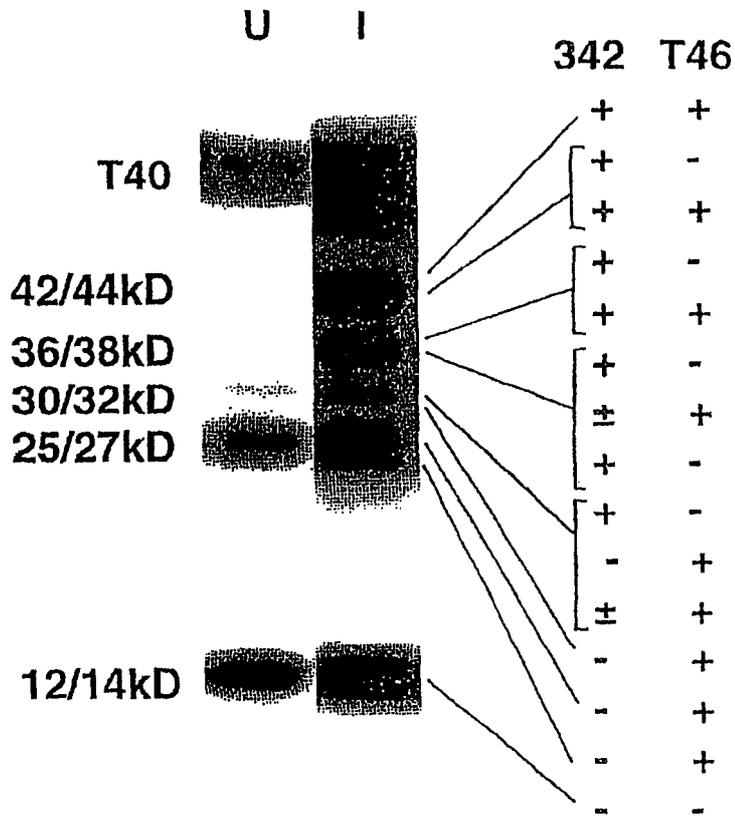


图 40

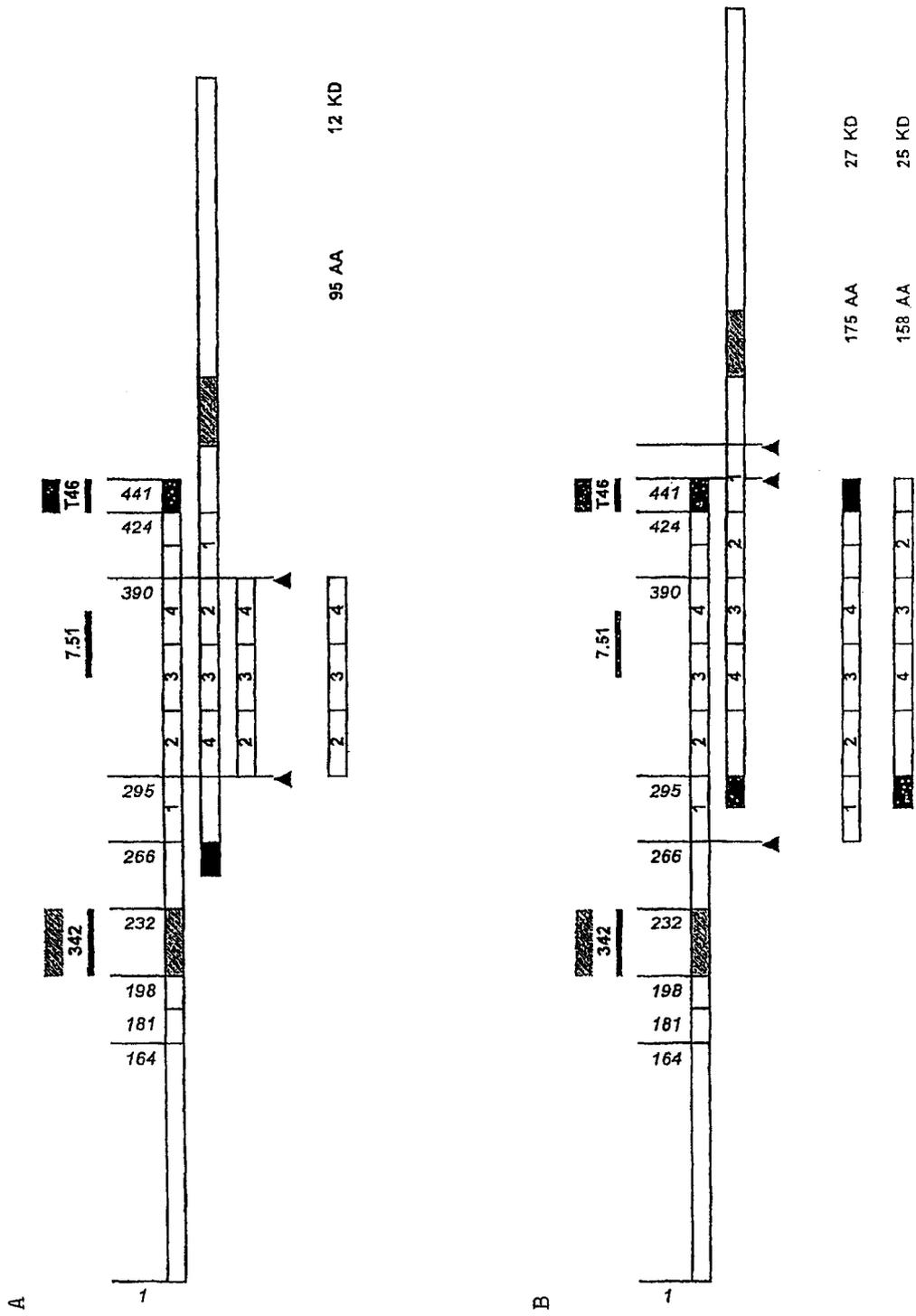


图 41

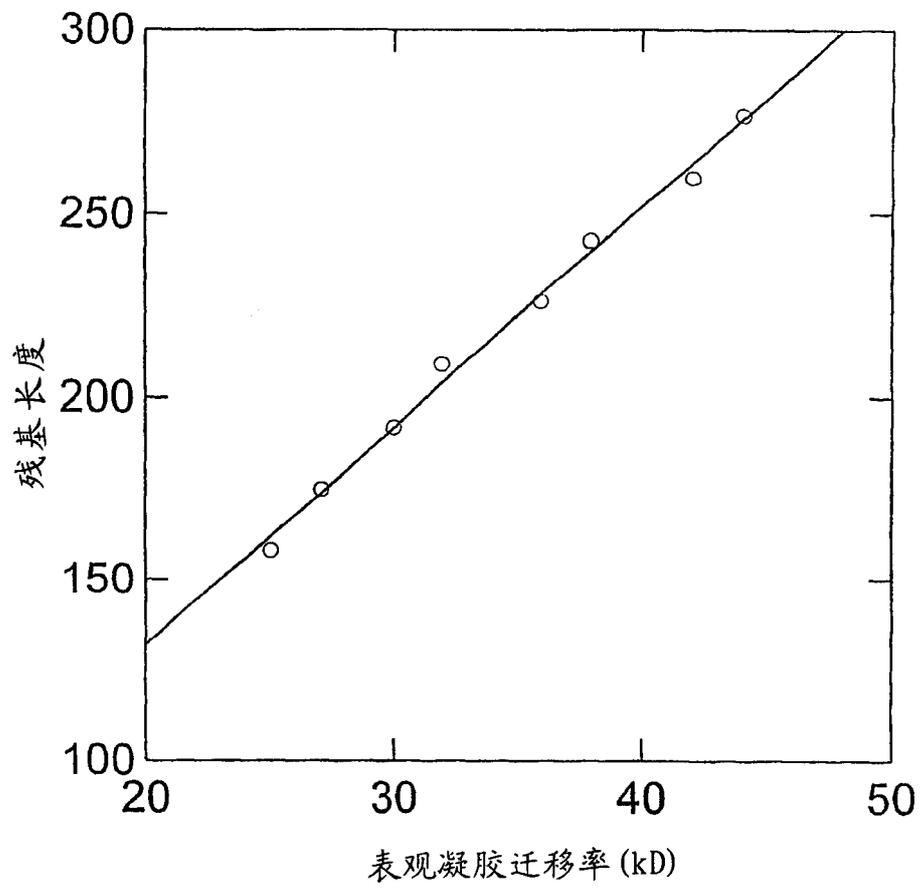


图 42

可见片段通过七聚体聚集物的蛋白水解衍生

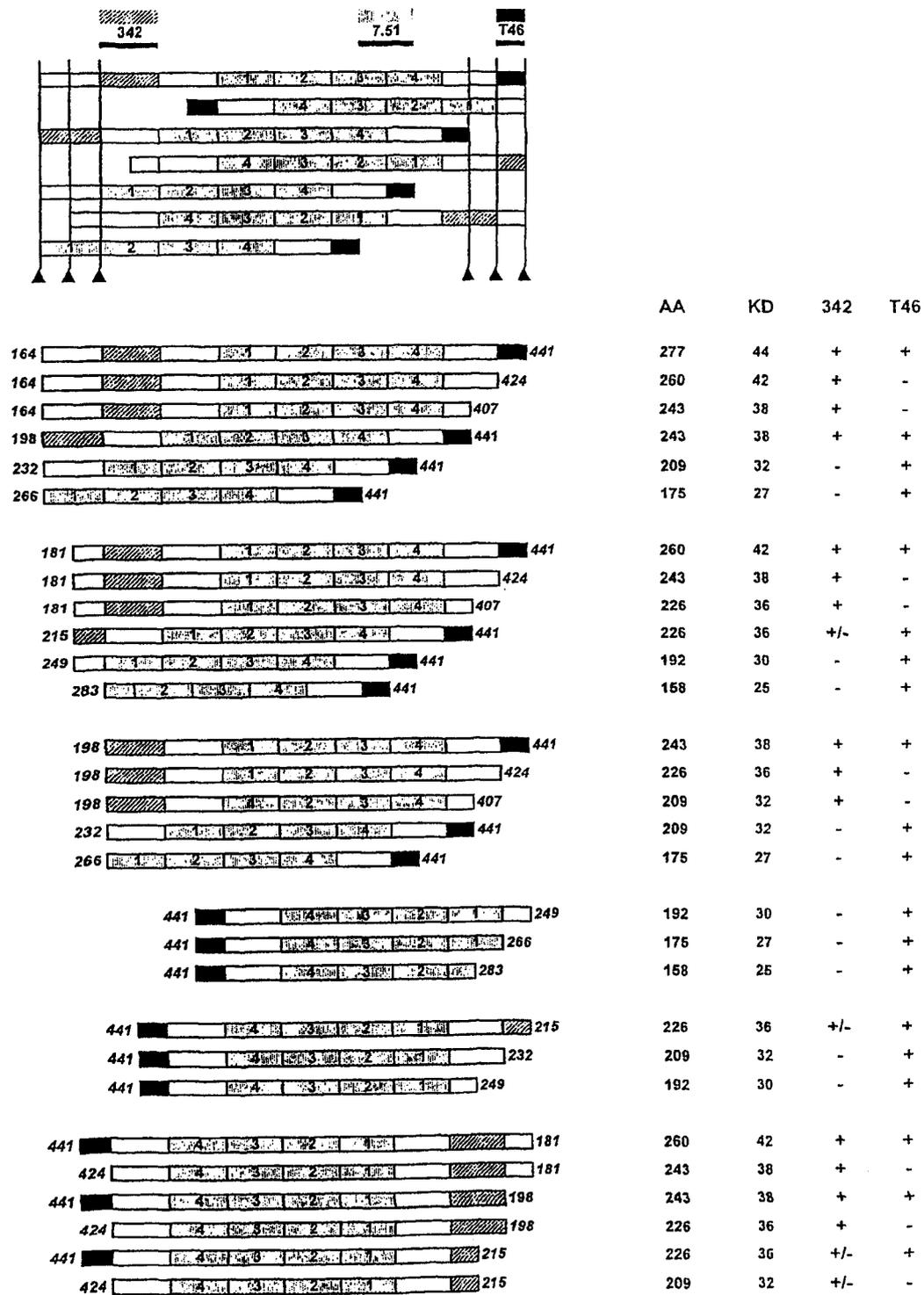


图 43

衍生自七聚体聚集物的蛋白水解处理片段

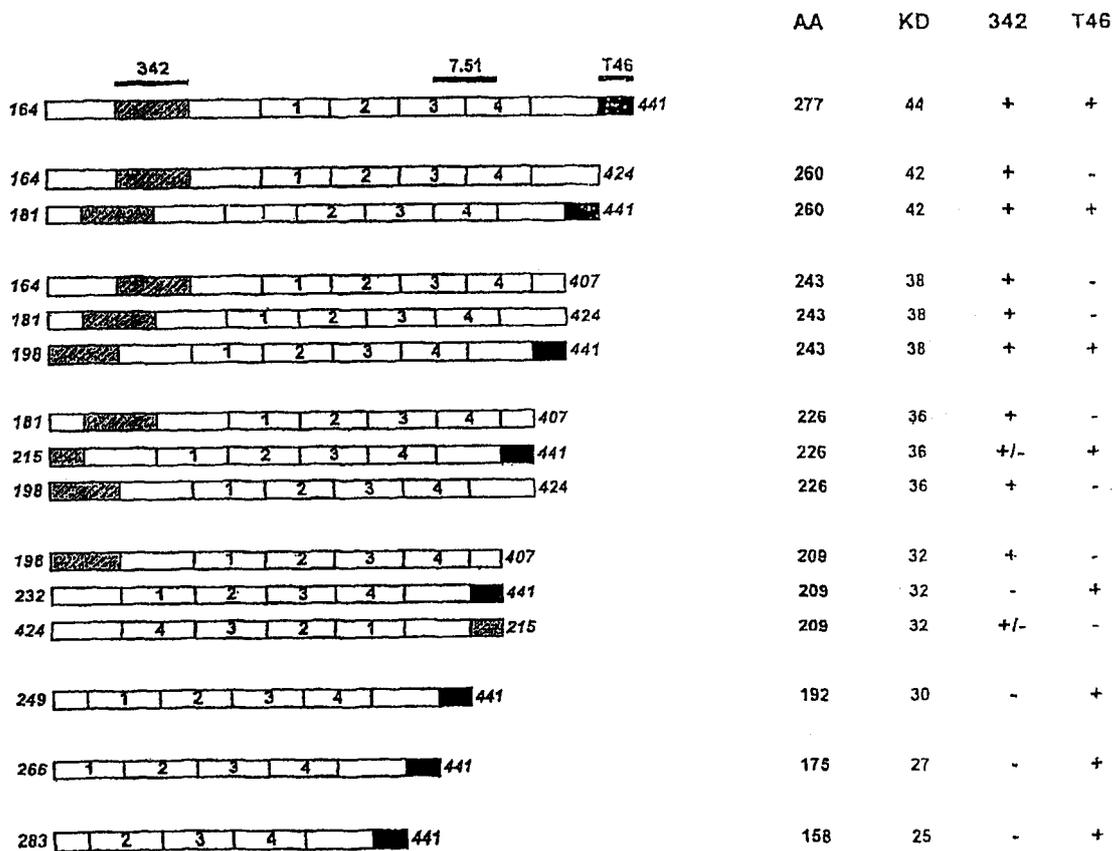


图 44

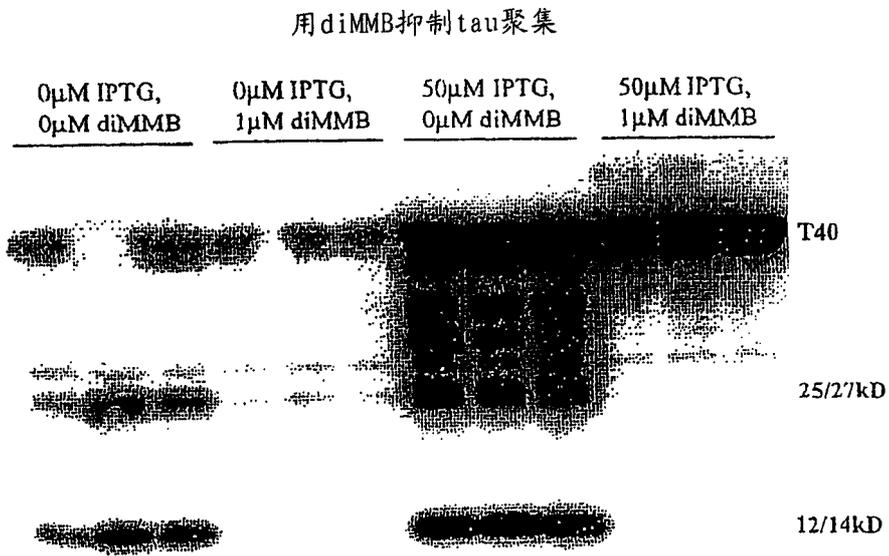
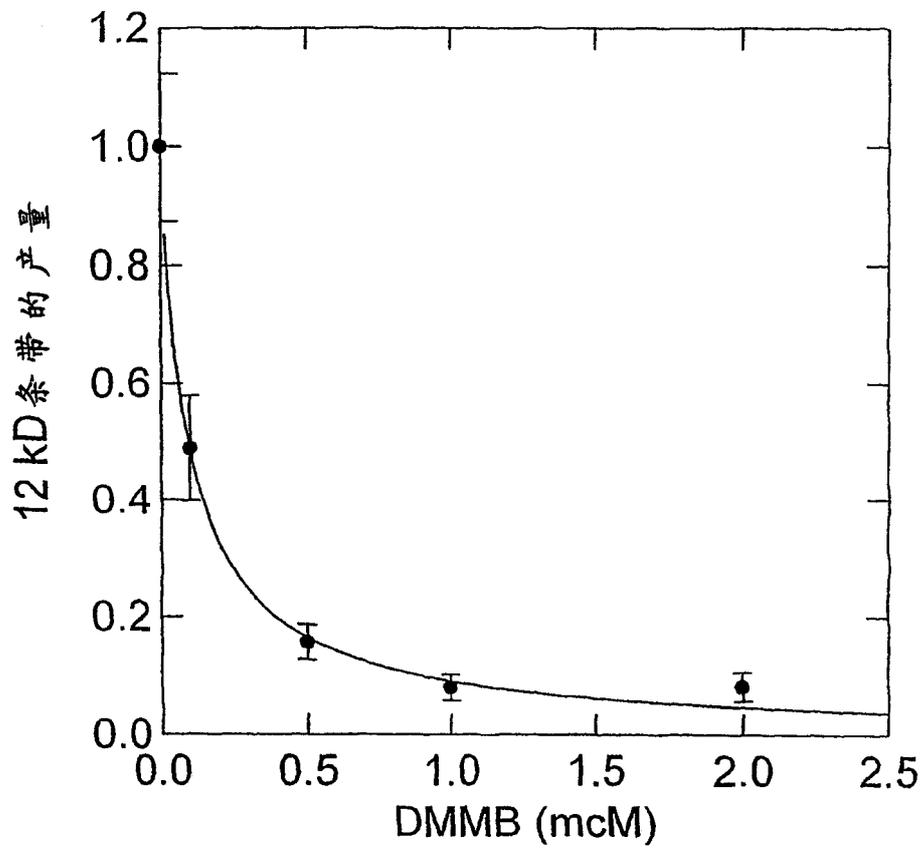


图 45



观察到的活性vs推算的活性  $r=1.00$

胞内 tau 浓度 500nM

Tau-tau 结合亲和力 22nM

DMMB KI 4.4nM

DMMB B50 100nM

图 46

专利名称(译)	与神经变性疾病中蛋白聚集相关的物质和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1496404A</a>	公开(公告)日	2004-05-12
申请号	CN02806301.5	申请日	2002-01-15
申请(专利权)人(译)	阿伯丁大学理事会		
当前申请(专利权)人(译)	阿伯丁大学理事会		
[标]发明人	克劳德M维希克 戴维霍斯利 珍妮特B里卡德 查尔斯R哈林顿		
发明人	克劳德·M·维希克 戴维·霍斯利 珍妮特·B·里卡德 查尔斯·R·哈林顿		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/00 A61K31/5415 A61K45/00 A61K47/22 A61P25/14 A61P25/28 C07K14/47 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 G01N27/447 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68 C12N15/85 A61K31/54		
CPC分类号	A61K31/00 G01N33/6896 A61K31/5415 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P43/00		
优先权	2001001049 2001-01-15 GB		
其他公开文献	CN1496404B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种在稳定细胞系中前体蛋白(例如tau)蛋白水解转化为产物片段(例如12 kd片段)的方法,其中所述前体蛋白与疾病状态相关,在该疾病状态中所述前体蛋白病理性聚集(例如tau相关疾病),该方法包括提供一种用编码如下蛋白的核酸转染的稳定细胞系:(i)前体蛋白模板片段,以使该模板片段以对细胞无毒性的水平组成性表达于该细胞,和(ii)前体蛋白,该蛋白应答于刺激物可诱导表达于该细胞;因而所述模板片段与所述前体蛋白相互作用导致该前体蛋白构象变化,从而导致该前体蛋白聚集以及水解为产物片段。该方法优选通过监测1个或多个产物条带的产生(或者对其产生的调节)用于筛选聚集过程的调节剂。另外,本发明在试验中显示高活性的化合物例如还原的二氨基吩噻嗪的基础上,还提供了该试验使用的材料,药剂以及相关的用途和方法。

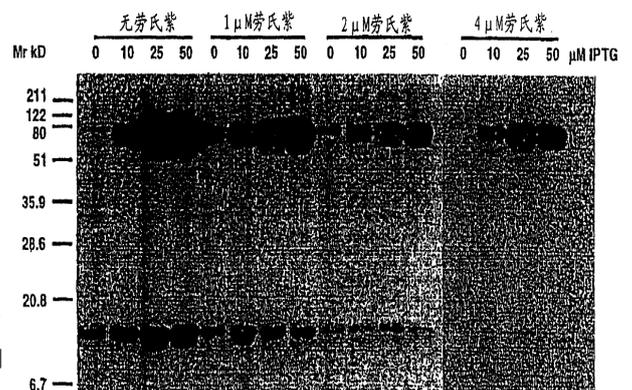


图 23